

2010년 2월  
박사학위논문

대장암에서 CDK8 및  
 $\beta$ -catenin의 역할

조선대학교 대학원

의학과

서 중 옥

# 대장암에서 CDK8 및 $\beta$ -catenin의 역할

Role of CDK8 and  $\beta$ -catenin in colorectal  
adenocarcinoma

2010년 2월 25일

조선대학교 대학원  
의학과  
서 종 옥

# 대장암에서 CDK8 및 $\beta$ -catenin의 역할

지도교수 임 성 철

이 논문을 의학박사학위신청 논문으로 제출함.

2009년 10월 일

조선대학교 대학원

의학과

서 중 옥

# 서 종 옥의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 서 재 홍 인

위 원 조선대학교 교수 기 근 홍 인

위 원 조선대학교 교수 이 미 자 인

위 원 조선대학교 교수 홍 란 인

위 원 조선대학교 교수 임 성 철 인

2009년 12월 17일

조선대학교 대학원

# 목 차

표목차.....	i
도목차.....	ii
Abstract.....	1
서론.....	3
재료 및 방법.....	5
결과.....	11
고찰.....	17
결론.....	21
참고문헌.....	22

## 표목차

Table 1. Frequency of CDK8 expression in colorectal adenocarcinoma according to clinical and pathologic features.....	26
---	----

## 도목차

Figure 1. Immunohistochemical staining of colonic adenocarcinoma for CDK8.....	29
Figure 2. Immunohistochemical staining of colonic adenocarcinoma for $\beta$ -catenin.....	29
Figure 3. Immunohistochemical staining of colonic adenocarcinoma for $\beta$ -catenin.....	30
Figure 4. Western blot analysis of colon cancer cell lines for CDK8 and $\beta$ -catenin.....	30
Figure 5. Effect of CDK8 interference on $\beta$ -catenin expression in colon cancer cell lines.....	31
Figure 6. Cumulative survival curves of colon cancer patients by CDK8 expression.....	31

ABSTRACT

## **Role of CDK8 and $\beta$ -catenin in colorectal adenocarcinoma**

Seo, Jong Og

Advisor: Prof. Lim, Sung-Chul, Ph.D.  
Department of Medicine,  
Graduate School of Chosun University

Colorectal adenocarcinoma is a major cause of morbidity and mortality in Korea. The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway plays an important role in colon cancers. However, relatively little is known about the regulatory mechanism of  $\beta$ -catenin in colon cancers.

CDK8 is a cyclin-dependent kinase (CDK) member of the mediator complex that couples transcriptional regulators to the basal transcriptional machinery, and is implicated in the transcriptional regulation of key pathways involved in colon cancers.

To determine the relationship between CDK8 and  $\beta$ -catenin expressions, the author have conducted a population-based study for immunohistochemical staining analysis of tumor tissues, and Western blot analysis and CDK8 interference studies of colon cancer cell lines.

Here, the author tested the hypothesis that colorectal cancers with CDK8 expression have distinct clinical, prognostic and molecular attributes. Among 127 colorectal cancers, CDK8 expression was detected in 96 (76%) tumors by immunohistochemistry. CDK8 and  $\beta$ -catenin expression had significant positive correlation with carcinogenesis, tumor



progression and patients' survival. Immunohistochemically, CDK8 expression in colorectal cancer was independently associated with  $\beta$ -catenin activation ( $p=0.0002$ ). However,  $\beta$ -catenin expression was not completely suppressed by CDK8 interference in colon cancer cell lines, HCT-116, HT-29 and SNU-C5.

These data support a potential link between CDK8 and  $\beta$ -catenin, and suggest that CDK8 may identify a subset of colon cancer patients with a poor prognosis. However, control of CDK8 is not an effective therapeutic strategy through  $\beta$ -catenin regulation of general colon cancer.

-----

**Key Words:** Colorectum, Adenocarcinoma, CDK8,  $\beta$ -catenin, Immunohistochemistry, Western blot analysis, CDK8 interference

# 서론

여러 종류의 암 발생 초기 과정에 관여한 Wnt/ $\beta$ -catenin 경로가 대부분의 대장암의 발생에도 관여한다 (Walther et al., 2009; Powell et al., 1992).  $\beta$ -catenin은 Wnt 신호전달계의 중추적인 핵 효과기(nuclear effector) 인데 생리적 상황에서 Wnt는  $\beta$ -catenin의 안정화에 기여하며 일단 안정화되면  $\beta$ -catenin이 축적되고 핵으로 이동한다. Wnt/ $\beta$ -catenin 경로의 조절장애는 대장암(특히 APC 돌연변이가 있는 경우)의 시작에 중요한 역할을 담당한다 (Firestein & Hahn, 2009). 세포질내  $\beta$ -catenin이 안정화되고 핵내로 전위(translocation) 되는 기전에 관한 연구가 진행되고 있지만 핵내에서 비인산화된(nonphosphorylated)  $\beta$ -catenin이 축적되어 *cyclin D1*, *c-myc*, *c-jun* 등과 같은 표적 유전자 전사(transcription)를 활성화시키는 기전(Oving & Clevers, 2002)에 관한 이해는 아직 부족한 실정이다.

CDK8은 염색체 13번에 위치하며 전사조절자(transcriptional regulators)와 짝을 이루어 대장암 형성과정에 관여하는 핵심적인 경로의 전사조절에 관여한다 (Kim et al., 2006). 또한  $\beta$ -catenin 의존성 전사 및 종양형성(oncogenesis)은 CDK8의 kinase 활성이 필수적이다 (Firestein et al., 2008; Morris et al., 2008).

따라서, 인체 대장암 조직을 이용한 CDK8과  $\beta$ -catenin에 대한 연구는 향후  $\beta$ -catenin 조절자를 이용한 항암치료에 중요한 방향을 제시할 것으로 판단된다.

이에 저자는 대장암 조직을 이용하여 여러 가지 임상병리학적 요소에 따른 CDK8과  $\beta$ -catenin의 면역조직화학적 발현정도나 양상을 평가하

고 CDK8과  $\beta$ -catenin 상호간의 관련성을 분석하였다. 그리고 대장암 조직을 이용한 면역조직화학적 연구결과의 타당성을 확인하기 위하여 대장암 세포주를 이용한 분자병리학적 연구를 추가하였다.

# 재료 및 방법

## 1. 증례 선정 및 조직채취

면역조직화학적 염색을 통한 분석을 위해 증례는 1992년 1월부터 2004년 12월까지 13년 동안 조선대학교 병원에서 대장 샘암종 치료를 위하여 외과적 적출술을 시행한 환자 중에서 생존여부 및 사망일을 확인 할 수 있고, 조직의 보관상태 및 의무기록이 양호한 환자 127 명을 연속적으로 선택하였다. 그리고 비교분석을 위하여 2005 년도에 내시경적 절제술이 시행된 10 예의 대장 샘종과 특별한 이상소견이 발견되지 않는 내시경적으로 생검된 정상점막 10 예를 대상으로 정하였다.

단, 증례 선정에서 수술전에 항암제나 방사선 치료가 시행되었거나, 응급수술이 시행되었거나, 유전성 비용종성 대장암(hereditary non-polyposis colon cancer, HNPCC)이나 가족성 샘종성 용종증(familial adenomatous polyposis)의 증거가 있는 경우는 제외하였다.

## 2. 조직병리학적 분석

### 가. 광학현미경적 검사

환자의 임상기록과 병리과 조직 슬라이드 화일을 후향적으로 분석하여 각 종양을 재검토하고 나이, 성별, 종양의 크기, 종양의 조직학적 형태 및 분화도, 종양 침습 깊이, 혈관침습여부, 림프절 또는 원격 전이 유무 등을 확인하였다. American Joint Committee on Cancer의 TNM staging system에 따라 병기를 정하였다 (Greene et al. 2002).

관찰 대상이 된 조직들은 10% 중성 포르말린에 고정 후 제작한 파라핀 포매 조직을 4-5 $\mu$ m 두께로 박절하여 H&E 염색을 실시하여 광학현미경으로 검경하여 연구목적에 부합되는 대표적인 부위를 선택하여 면역조직화학적 검사를 위한 슬라이드를 제작하였다.

## 나. 면역조직화학적 검사

파라핀 포매 조직을 4 $\mu$ m 두께로 박절하여 X-tra<sup>TM</sup>슬라이드(Surgipath, Richmond, USA)에 부착하여 xylene에 탈 파라핀한 뒤 무수 알코올, 90%, 75% 및 50% 에탄올에 각각 2분씩 처리하여 함수시킨 후 항원성 회복을 위하여 citrate 완충액 (10mM, pH 6.0)에 슬라이드를 담가 압력밥솥(pressure cooker)에 15분간 끓인 후 실온에 방치시켜 20분간 식힌 후 50mM Tris 완충용액(TBS, pH 7.5)으로 수8<sup>TM</sup>슬라이드조직절편 내의 내인성 과산화효소의 활여 억제에 탈 0.3% hydrogen peroxide-methanol에 10분간 처리 후 증류수로 세척하고 차단항체를 실온에서 10분간 반응시킨 뒤 1차 항체인 mouse monoclonal  $\beta$ -catenin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)과 rabbit polyclonal CDK8 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)을 1:200으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다.

Tris 완충액으로 세척하고  $\beta$ -catenin은 Polink-2 HRP plus mouse DAB detection system (Golden Bridge International, Inc., WA, USA)을, CDK8은 Polink-2 HRP plus rabbit DAB detection system (Golden Bridge International, Inc., WA, USA)을 이용하여 술식에 따라 염색을 시행하였다. Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 시행하고, Clearmount<sup>TM</sup> Mounting Solution (Zymed Laboratories, South

San Francisco, CA, USA)으로 봉입하였다.

양성 대조군으로 CDK8의 경우는 다른 연구에서 CDK8 발현이 확인된 유방의 침윤성 관암종을 이용하였고,  $\beta$ -catenin의 경우는 종양주변의 정상대장 점막의 발현을 기준하였다. 그리고 음성 대조군으로는 1차 항체 대신 tris 완충액을 사용하였다.

#### 다. 면역조직화학적 염색의 판정

염색의 결과 판정은 주관성을 배제하기 위하여 환자의 임상경과나 관련 검사결과를 알지 못하는 상태에서 시행되었다.

$\beta$ -catenin에 대한 염색은 핵, 세포질 및 세포막 염색을 각각 평가하였으며 음성(no expression), 약한 발현(weak expression), 중등도/강한 발현(moderate/strong expression)으로 구분하였다. 염색 정도는 핵, 세포질 및 세포막 염색 정도 평가점수의 합으로 정하였는데 이들 각각의 점수는 다음과 같다. 핵 염색점수(2+, positive expression; 1+, weak expression; 0, no expression), 세포질 염색점수(2+, positive expression; 1+, weak expression; 0, no expression), 세포막 염색점수(0, positive membrane expression; 1+, negative membrane expression).  $\beta$ -catenin 염색 결과의 해석은 최종 평가점수의 합이 3-5에 해당되면  $\beta$ -catenin이 활성화(active) 된 것으로 정하였다 (Jass et al., 1999).

CDK8에 대한 염색은 종양세포의 핵염색을 대상으로 평가하였는데 핵 염색이 없는 경우 음성으로 판정하고, 핵염색이 관찰되는 경우 염색강도를 기준으로 약한(weak) 염색, 중등도(moderate) 염색, 강한(strong) 염색으로 구분하였다 (Firestein et al., 2009).

### 3. CDK8과 $\beta$ -catenin의 Western blot analysis

#### 가. 세포배양

인체유래 대장암세포주 HCT116 (Brattain et al., 1981), HT29 (Fogh, 1975)와 SNU-C5(Park et al., 1987)를 10% fetal bovine serum (GIBCO BRL)과 1X antibiotic-antimycotic (GIBCO BRL)이 포함된 RPMI 1640에 배양하였다. 이들 세포주는 항암치료나 방사선 치료를 받은 적이 없는 대장의 샘암종에서 수립되었다.

세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 10 cm petri dish에 1.5 x 10<sup>6</sup> 개의 세포 밀도가 유지되게 분주한 후 하룻밤 배양을 하여 약물처리를 하였다.

#### 나. 시약

polyclonal rabbit anti-human CDK8 (H-139)와 monoclonal anti- $\beta$ -catenin (E-5)은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서, monoclonal mouse anti-actin은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서, ECL system은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구매하였다. 그리고 기타 세포배양에 필요한 시약은 GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구매하였다.

#### 다. 단백질 분리정제

5 x 10<sup>5</sup> 개 정도의 세포를 100 $\emptyset$  T/C dish에 분주하고, 37°C, 5%

CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양하였다. trypsin/EDTA로 처리하여 세포를 수확하여 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 세척한 후 1X CHAPS 용해완충액(10 mM Tris HCl, pH 7.5, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA, 0.1 nM Benaxmidine, 5 mM β-mercaptoethanol, 0.5% CHAPS, 10% Glycerol) 200 μl로 처리하고 얼음위에서 30분간 방치한 후 12,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리하여 상층액을 얻었다.

#### 라. Western blot 분석

배양된 세포를 PBS로 씻고, 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM EGTA, 50 mM glycerophosphate, 20 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM PMSF, 10 μg/ml leupeptin 및 10 μg/ml aprotinin으로 용해시켜 원심분리한 후 단백질 양을 정량하였다. 동량의 단백질을 SDS-PAGE (15%)를 통하여 분리한 후 nitrocellulose 막에 옮겨 해당 항체를 이용하여 immunoblot을 시행하였다. 반응신호는 ECL system을 이용하여 측정하였다.

#### 4. RNA interferences

CDK8 siRNA 5'-GUU UUU GCC GGU UGU CAA A(dTdT)-3' (S) 5'-UUU GAC AAC CGG CAA AAA C(dTdT)-5' (AS) 와 scrambled RNA (Ctrl RNAi) sequence 5'-CCU ACG CCA CCA AUU UCG U(dTdT)-3' (S) 5'-ACG AAA UUG GUG GCG UAG G(dTdT)-3' (AS)를 BIONEER (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 디자인하고 합성하였다. 대장암세포주 HCT116, HT29 와 SNU-C5를 10<sup>6</sup> 개씩 JET-PEI



reagent (Polyplus-Transfection, France)를 이용하여 생산자가 지시하는 술식에 따라 5 µg siRNA를 transfect 시켰다. transfect 된 세포들은 48 시간 배양하여 total protein extracts를 얻어 Western blot 으로 분석하였다.

## 5. 통계학적 분석

대장암에서 CDK8 및  $\beta$ -catenin 발현과 여러 임상병리학적 요소들에 관한 통계학적 분석은  $\chi^2$  test, Fisher's exact test, ANOVA, logistic regression analysis를 이용하였으며, 통계학적 유의 수준은  $p < 0.05$ 로 하였다. 생존분석은 Kaplan-Meier 방법으로 하였고 log-rank test를 시행하였다. 분석에 사용된 프로그램은 Stat View software package (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA)이다.

# 결 과

## 1. 임상 및 조직학적 소견

본 연구에서 면역조직화학적 분석에 사용된 127 예의 경우 2004 년 12월 31일까지의 생존여부를 전화 및 우편으로 확인하였다. 그 결과 최장 156 개월의 생존 기록(평균 추적기간:  $58.8 \pm 32.7$  개월)을 확인할 수 있었다. 127 증례는 Table 1과 같은 T 병기, 국소 림프절 전이 유무, 원격전이 유무 및 임상병기를 나타냈다.

## 2. CDK8 면역반응에 따른 임상병리학적 의의

### 1) CDK8의 면역조직화학적 발현

임상병기 I-IV 대장암 127 예를 대상으로 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 이중 96(76%) 예에서 CDK8의 핵내 양성발현을 보였다 (Fig. 1). 검사가 시행된 증례에서 남녀 성에 따른 CDK8의 양성 발현율을 비교해보면 여성 61 예중 50예(82%), 남성 66 예 중 46 예(70%)에서 양성을 보여 여성에서 더 높은 양성율을 보였으며 이는 통계학적으로 유의하였다( $P < 0.005$ ).

비교관찰을 위하여 병행된 정상대장 점막의 경우 1 예(10%)에서 양성 반응을 보였는데 이는 약한(weak) 양성이었다. 또한 관샘종(tubular adenoma)의 경우 6 예(60%)에서 양성을 보였는데 1 예는 약하게, 4 예는 중등도, 1 예는 강하게 양성반응을 보였다 (Table 1).

이와 같은 소견은 CDK8 이 대장암 형성과정의 초기에 관여하고 있음을 시사한다고 여겨진다.

## 2) CDK8 발현과 T 병기와의 관계

T 병기에 따른 CDK8의 변화를 분석하였다. T 병기 4에 해당되는 증례가 분석대상에 포함되어 있지 않아 의미를 해석하는데 제한적이지만 T 병기가 높아질수록 CDK8 발현이 증가되었으며, T 병기 3은 1에 비하여 통계적으로 유의하게 CDK8 발현이 증가하였다( $P < 0.005$ ).

## 3) CDK8 발현과 림프절 전이 관계

림프절 전이가 있는 41 예중 38 예(93%)는 CDK8을 발현하였으나 림프절 전이가 없는 86 예는 58 예(67%)에서 CDK8을 발현하여 CDK8 발현과 림프절 전이는 상관관계가 있으며 이는 통계학적으로 유의하였다( $P < 0.005$ ).

## 4) CDK8 발현과 원격전이 관계

분석대상중에 원격전이가 초래된 증례가 단 4건 포함되어 있어 통계학적 유의성을 평가하는 데는 매우 제한적이지만 원격전이가 없는 123 예중 92 예(75%)는 CDK8 양성을 보였고 원격전이가 초래된 4 예는 CDK8 양성을 보여 CDK8의 발현과 원격전이는 매우 유의한 상관성이 있었다.

## 5) CDK8 발현과 임상병기 관계

임상병기 IV에 해당되는 증례가 4예로 적어 통계학적 분석이 제한적

이었다. CDK8 발현율은 임상병기가 증가할수록 같이 증가하는 경향을 보여 CDK8 이 대장암의 진행에 관여됨을 추정할 수 있다. CDK8 양성 발현율은 병기 I에 비하여 III, IV에서 각각 통계학적으로 유의하게 증가하였다(각각  $P < 0.01$ ,  $P < 0.0005$ ).

### 3. $\beta$ -catenin과 CDK8 면역반응 관계

#### 1) $\beta$ -catenin의 핵 염색에 따른 분석

대장암 74 예(58%)에서 핵염색이 관찰되었는데 40 예(31%)는 약한 발현을 보였고, 34 예(27%)는 중등도/강한 발현을 보였다 (Fig. 2).  $\beta$ -catenin의 핵발현이 없는 53 예(42%)중 33 예(62%)가 CDK8 양성 발현을 보였는데  $\beta$ -catenin의 핵내 양성발현이 관찰된 경우는 78-79%에서 CDK8 양성발현을 보여  $\beta$ -catenin의 핵내 양성발현과 CDK8의 양성발현간 상관관계가 있으며 이는 통계학적으로 유의하였다( $P < 0.05$ ).

#### 2) $\beta$ -catenin의 세포질내 염색에 따른 분석

대장암 54 예(43%)에서 세포질내 염색이 관찰되었는데 44 예(35%)는 약한 발현을 보였고, 10 예(8%)는 중등도/강한 발현을 보였다 (Fig. 2).  $\beta$ -catenin의 세포질내 발현이 없는 73 예(57%)중 46 예(63%)가 CDK8 양성발현을 보였는데  $\beta$ -catenin의 세포질내 양성발현이 관찰된 경우는 염색 강도에 따라 약한 염색의 경우는 75%에서 CDK8 양성 발현을 보이고, 중등도/강한 발현을 보이는 경우는 80%에서 CDK8 양성 발현을 보여  $\beta$ -catenin의 세포질내 양성발현과 CDK8의 양성발현간 상관관계가 있으며 이는 통계학적으로 유의하였다(각각  $P < 0.01$ ,  $P < 0.005$ ).

### 3) $\beta$ -catenin의 세포막 염색에 따른 분석

대장암 76 예(60%)에서  $\beta$ -catenin의 세포막 염색이 소실되었고 (Fig. 3), 51 예(40%)는 세포막 염색이 유지되었다. 세포막 염색이 소실된 증례중 60 예(79%)에서 CDK8의 발현이 관찰되었으나 세포막 염색이 유지된 경우는 32 예(63%)에서만 CDK8이 관찰되었다. 따라서 CDK8 발현과  $\beta$ -catenin의 세포막 염색 소실은 상관관계가 있으며 이는 통계적으로 유의하였다( $P < 0.05$ ).

### 4) $\beta$ -catenin 염색 종합점수에 따른 분석

이상에서 언급된  $\beta$ -catenin 염색, 즉 핵, 세포질, 세포막 염색을 종합하여 평가한 점수가 0-2 점에 해당하는  $\beta$ -catenin 불활성의 경우는 전체 대장암 증례중 72 예(57%), 3-5 점에 해당하는  $\beta$ -catenin 활성의 경우는 전체 대장암 증례중 55 예(43%)에 해당하였다.  $\beta$ -catenin 활성의 경우 CDK8 발현율은 82%인 반면  $\beta$ -catenin 불활성의 경우 CDK8 발현율은 60%로서 CDK8 발현과  $\beta$ -catenin 활성은 상관관계가 있으며 이는 통계학적으로 유의하였다( $P < 0.0005$ ).

## 4. 대장암 세포주 연구

### 1) Western blot 분석

#### (1) CDK8의 발현 양상

대장암 세포주를 배양하여 CDK8을 측정된 결과 HCT-116, HT-29 및 SNU-C5 세포주 모두에서 강하게 발현되었다 (Fig. 4). 이는 면역조직화학적 염색의 결과에서 나타났듯이 대장암에 CDK8 이 관여하고 있음을 시사한다.

#### (2) $\beta$ -catenin 발현양상

대장암 세포주를 배양하여  $\beta$ -catenin 을 측정된 결과 HCT-116, HT-29 및 SNU-C5 세포주 모두에서 강하게 발현되었다. 그러나 HT-29의 경우는  $\beta$ -catenin 의 발현이 HCT-116 및 SNU-C5에 비하여 다소 약하게 발현되었다 (Fig. 4). 이는 면역조직화학적 염색의 결과에서 보인 바와 같이 대장암에 CDK8 과 관계하여  $\beta$ -catenin 이 발현될 수 있음을 시사한다고 볼 수 있다.

#### (3) 혈청인자 배제 실험

CDK8과  $\beta$ -catenin 의 관계를 명확하게 하기 위하여 대장암 세포주 배양액에서 10% FBS 를 제외하고 24 시간 동안 배양하였다. HCT-116, HT-29 및 SNU-C5 세포주 모두에서 CDK8은 혈청인자가 배제된 상황에서 약간 감소하였다. 그러나  $\beta$ -catenin 은 혈청인자가

배제된 경우 약간 더 강하게 발현되는 경향을 보였다 (Fig. 4). 즉, 혈청인자가 배제되어 CDK8이 감소하는 상황에서  $\beta$ -catenin 은 오히려 상승하는 경향을 보였다.

## 2) CDK8siRNA처리에 따른 $\beta$ -catenin 변화

CDK8 간섭(interference)를 일으켜 대장암 세포주 HCT-116, HT-29 와 SNU-C5의  $\beta$ -catenin 발현을 측정 한 결과 HCT-116과 SNU-C5의 경우  $\beta$ -catenin 발현이 현저히 감소하였으나 완전하게 억제하지는 못하였다. 또한 HT-29의 경우는  $\beta$ -catenin 발현의 감소가 현저하게 관찰되지는 않았다 (Fig. 5).

## 5. CDK8 발현유무에 따른 생존율 분석

CDK8 발현에 따른 환자의 결과를 분석하기 위하여 CDK8 이 대장암 환자의 생존에 미치는 영향을 분석하였다. 환자의 전반적인 5년 생존율은 73.3% 이었다. 조사시점에 127 명의 환자(평균 추적기간: 4.9 년) 중 75 명이 생존하여 59.1%의 생존율을 보였는데 CDK8 음성군(31명)은 22 명(71%)이 생존하였으나 CDK8 양성군(96 명)은 53 명(55%) 이 생존하였다(log-rank  $p=0.028$ ) (Fig. 6). 이로써 CDK8 발현이 대장암 환자의 높은 사망률과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다.

## 고찰

WNT 유전자 및 이의 산물은 WNT 신호경로를 구성하는 데 이 신호 경로에서 중추적 역할을 담당하는 것이  $\beta$ -catenin 이며 이의 안정성 (stability)은 APC complex 에 의해 조절된다. WNT 수용체가 불활성화 되면  $\beta$ -catenin 은 막단백 E-cadherin (*CDH1*) 에 국지화되고 APC complex 에 있는 kinase 들이 세포질내  $\beta$ -catenin 을 인산화시켜 빠른 퇴화(degradation)를 일으킨다. 반면, WNT 수용체가 활성화되면 APC complex 에 있는 kinase 들이 억제되어 세포질내  $\beta$ -catenin 의 축적이 초래되고 이를 핵으로 이동시켜 다양한 표적 유전자들의 전사를 촉진시킨다 (Clevers, 2004). 이외에도 WNT 경로에 TGF- $\beta$  경로 (Attisano and Labbe, 2004), COX-2/prostaglandin 경로가 cross-talks 에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Buchanan and DuBois, 2006; Castellone et al., 2005; Araki et al., 2003).

WNT/ $\beta$ -catenin 신호의 활성이 대장암을 포함한 각종 인체 암의 발생에 관여한다고 알려져 있는데 대장암에서 CDK8과  $\beta$ -catenin의 관계에 대한 연구는 미미한 실정이다 (Samowitz et al., 2007; Zeng et al., 2006; Thorstensen et al., 2005).

Firestein 등(2008)은  $\beta$ -catenin 의 translation 후 수정자 (post-translational modifier) 역할을 무엇이 담당하는가를 알아내기 위하여 high-throughput screening 연구를 시행하여 CDK8 만이 유일하게 대장암 환자의 반수 이상에서 copy number 획득이 발생하는 것과 관련된 것을 찾아냈다. 이들은 또한 murine cell 배양실험을 통하여 CDK8 이 발현되는 경우 불멸화 세포로 형질전환을 시키나, CDK8 이 불활성화된 경우는 그렇지 못함을 확인하였다. 결국 이런 배경을 토대로 CDK8은 대장암에서 증폭되는 대장암 종양유전자(oncogene) 임을 밝혔다. 대부분의 CDK는 세포주기조절에 중요한 역할을 담당하는데



CDK 7, CDK8 과 CDK9 는 전사기구(transcriptional machinery)와 직접 작용하여 유전자 발현을 조절한다. 특히 CDK8 은 이의 파트너 Cyclin C, MED12 및 MED13 과 함께 전사조절에 중추적인 역할을 담당하는 커다란 단백질 복합체인 mediator complex 'CDK8 module' 을 형성한다. 그리고 CDK8 module 구성요소인 MED12, MED13 이  $\beta$ -catenin 활성의 조절자로서 작용을 한다고 밝혀졌다 (Firestein and Hahn, 2009, Casamassimi and Napoli, 2007; Gold and Rice, 1998). 또한 CDK8 은 간접적인 방법으로  $\beta$ -catenin 을 증가시킬 수 있는데  $\beta$ -catenin 을 억제하는 E2F1 을 통한 방법이다. 즉, CDK8 이 E2F1 을 억제하는데 결국 E2F1의  $\beta$ -catenin 억제력이 감소하여 결과적으로  $\beta$ -catenin 이 증가하게 된다 (Morris et al., 2008). 이외에도 CDK8은 기저 전사기구(basal transcriptional machinery)가 Notch (Fryer et al., 2004) 나 p53 (Donner et al., 2007) 과 같은 전사인자와 결합하여 정상세포의 세포주기조절에 관여한다.

이와 같은 CDK8 과  $\beta$ -catenin 관계를 대장암 환자의 조직을 토대로 확인하고자 우선 면역조직화학적 연구를 시행하였다. 정상 대장점막, 관샘종을 대상으로 실시한 CDK8 염색과 대장 샘암종을 대상으로 실시한 CDK8 염색을 토대로 CDK8 이 대장암 형성의 초기단계는 물론 샘암종의 진행 및 전이에도 관여하는 것으로 추정된다. 또한 CDK8 이  $\beta$ -catenin 발현양상과 유의한 관계가 있었는데  $\beta$ -catenin 의 핵 또는 세포질 발현과는 양의 상관관계가 존재하고  $\beta$ -catenin 의 세포막 염색과는 음의 상관관계가 존재하여 CDK8 을 통한 WNT/ $\beta$ -catenin 신호경로 조절이 가능한지가 관심으로 부각되었다.

즉, CDK8 조절을 통한  $\beta$ -catenin 활성의 조절은 대장암의 발생에 대한 이해는 물론 대장암의 진행에 대한 이해의 폭을 넓힐 것으로 판단되

며 대장암의 정확한 진단은 물론 CDK8 불활성화 유도를 통한 대장암의 새로운 치료방법 접근에도 큰 도움이 될 것으로 판단된다.

CDK8 과  $\beta$ -catenin 의 관계를 구체적으로 확인하기 위하여 실시한 대장암 세포주를 이용한 실험은 기대에 약간 못 미치는 결과를 보여 면역조직화학적 염색을 통하여 확인된 CDK8에 의한  $\beta$ -catenin 조절관계를 약간 달리 해석하여야 할 것으로 여겨진다. 즉,  $\beta$ -catenin을 강하게 발현하던 대장암세포주에 siRNA를 이용하여 CDK8 간섭을 초래한 후  $\beta$ -catenin 발현변화를 분석한 결과 일부에서는 현저한 감소를 보였으나 완전 억제를 보이지 않았고 일부는  $\beta$ -catenin 발현이 약간만 감소하여  $\beta$ -catenin 발현에 CDK8 이외의 인자도 깊이 관여함을 의미한다고 사료된다. 또한 혈청인자 배제실험후 시행된 Western blot 분석 결과에서도 혈청인자 배제시 CDK8이 감소하게 되지만  $\beta$ -catenin 발현은 오히려 상승하는 현상은 CDK8에 의하여  $\beta$ -catenin 발현이 주도적으로 영향을 받는다는 가정을 의심케 한다. 이런 결과는 Firestein 등(2008)이  $\beta$ -catenin 의 translation 후 수정자 역할을 CDK8 만이 유일하게 담당할 것이라는 주장과는 상반된 결과라고 생각된다.

Firestein 등(2008)은 APC deletion 이 있고,  $\beta$ -catenin 의존성 증식을 하는 대장암세포주 DLD1을 제작하고,  $\beta$ -catenin 의존성 증식을 하는 대장암세포주 HCT-116을 이용한 보강실험을 통하여 연구결과를 발표하였으나 본 연구의 경우 사용된 대장암 세포주는 HCT-116, HT-29 와 SNU-C5로서 DLD1과는 다른 특성을 갖는 세포로 여겨진다. 따라서 Firestein 등(2008)이 자신의 연구결과를 토대로  $\beta$ -catenin 발현에 CDK8 이 중요한 역할을 담당하고 있으며 이를 근거로 CDK8 조절을 통한 대장암치료 가능성을 강력히 제시한 것은 특정의 대장암에 국한된 이론임을 밝히는 것으로 수정되어야 타당할 것으로 판단된다.

또한 *in vitro* 실험의 결과를 일반적인 종양발생 및 진행의 이론으로 추가적인 확인과정 없이 바로 받아들이는 것은 매우 제한적이라 생각된다. 하지만 종양조직을 토대로 시행된 본 연구 내용을 통하여 대장암의 발생, 진행 및 전이과정에 CDK8과  $\beta$ -catenin은 매우 중요한 역할을 담당하고 있으며 이들 상호간은 밀접한 관련이 있는 것으로 확인되었다. 그리고 CDK8을 통한 효과적인  $\beta$ -catenin 발현의 조절은 일부 제한된 대장암의 경우에 해당되는 사항이나 전반적인 대장암에는 적용되지 않는 사항임을 확인할 수 있었다. 따라서 CDK8 조절을 통한 대장암 치료법 개발 등에 관한 이론 역시 일부 제한된 대장암에만 국한됨을 알 수 있었다.

## 결 론

대장암은 한국에서 식생활습관의 변화 등에 힘입어 해마다 발생률이 증가하고 있으며 항암치료 내성 발생 등으로 대장암으로 인한 사망률 또한 증가하고 있다. 최근 CDK8과  $\beta$ -catenin 간의 관계규명을 통한 연구를 토대로 CDK8 조절을 통한 대장암의 효과적인 새로운 치료법의 가능성을 제시하기에 이르렀다.

저자는 면역조직화학적으로 대장암 조직을 이용하여 CDK8과  $\beta$ -catenin의 발현이 종양형성, 진행 및 전이는 물론 환자의 생존에도 유의한 관련성이 있으며 CDK8과  $\beta$ -catenin의 면역조직화학적 발현간 밀접한 상호관련성이 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 최근 제시된 것과는 달리 대장암 세포주 HCT-116, HT-29 및 SNU-C5를 이용한 CDK8 간섭실험에서 CDK8 억제를 통한 효과적인  $\beta$ -catenin 차단은 일반적인 대장암에는 적용하기 힘든 이론임을 확인하였다.

이상의 결과를 종합하면 CDK8 및  $\beta$ -catenin 발현은 대장암의 발생 및 진행은 물론 환자생존에 중요한 역할을 담당하고 있으며 이들 상호간 밀접한 연관이 있음을 알 수 있었다. 그러나  $\beta$ -catenin을 효과적으로 차단하여 대장암을 치료하는 방법으로 CDK8을 억제하는 것은 일부 국한된 대장암에만 적용 가능한 이론으로 확인되어  $\beta$ -catenin을 효과적으로 차단하기 위한 새로운 연구가 뒤따라야 될 것으로 추정된다.

## 참고문헌

Araki Y, Okamura S, Hussain SP, Nagashima M, He P, Shiseki M, Miura K, Harris CC. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and ras pathways. *Cancer Res* 63: 728-34, 2003

Attisano L, Labbe E. TGFbeta and Wnt pathway cross-talk. *Cancer Metastasis Rev* 23: 53-61, 2004

Brattain MG, Fine WD, Khaled FM, Thompson J, Brattain DE. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res* 41:1751-6, 1981

Buchanan FG, DuBois RN. Connecting COX-2 and Wnt in cancer. *Cancer Cell* 9: 6-8, 2006

Casamassimi A, Napoli C. Mediator complexes and eukaryotic transcription regulation: an overview. *Biochimie* 89: 1439-46, 2007

Castellone MD, Teramoto H, Williams BO, Druey KM, Gutkind JS. Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science* 310: 1504-10, 2005

Clevers H. Wnt breakers in colon cancer. *Cancer Cell* 5: 5-6, 2004

Donner AJ, Szostek S, Hoover JM, Espinosa JM. CDK8 is a stimulus-specific positive coregulator of p53 target genes. *Mol Cell* 27: 121-33, 2007

Firestein R, Bass AJ, Kim SY, Dunn IF, Silver SJ, Guney I, Freed

E, Ligon AH, Vena N, Ogino S, Chheda MG, Tamayo P, et al. CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates beta-catenin activity. *Nature* 455: 547–51, 2008

Fryer CJ, White JB, Jones KA. Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. *Mol Cell* 16: 509–20, 2004

Firestein R, Hahn WC. Revving the Throttle on an oncogene: CDK8 takes the driver seat. *Cancer Res* 15:69: 7899–901, 2009

Firestein R, Shima K, Nosho K, Irahara N, Baba Y, Bojarski E, Giovannucci EL, Fuchs CS, Ogino S. CDK8 expression in 470 colorectal cancers in relation to beta-catenin activation, other molecular alterations and patient survival. *Int J Cancer* 2009 Sep 29. [Epub ahead of print]

Fogh J. ed. *Human tumor cells in vitro*. New York: Plenum Press: 1975: pp.115–159

Gold MO, Rice AP. Targeting of CDK8 to a promoterproximal RNA element demonstrates catalysis dependent activation of gene expression. *Nucleic Acids Res* 26: 3784–8, 1998

Greene FL, Page DL, Fleming ID. *AJCC cancer staging manual*, 6th ed. New York: Springer-Verlag, 2002

Jass JR, Biden KG, Cummings MC, Simms LA, Walsh M, Schoch E, Meltzer SJ, Wright C, Searle J, Young J, et al. Characterisation of a subtype of colorectal cancer combining features of the suppressor and mild mutator pathways. *J Clin Pathol* 52: 455–60, 1999

Kim S, Xu X, Hecht A, Boyer TG. Mediator is a transducer of

Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 281: 14066–75, 2006

Morris EJ, Ji JY, Yang F, Di Stefano L, Herr A, Moon NS, Kwon EJ, Haigis KM, Naar AM, Dyson NJ. E2F1 represses beta-catenin transcription and is antagonized by both pRB and CDK8. *Nature* 455: 552–6, 2008

Oving IM, Clevers HC. Molecular causes of colon cancer. *Eur J Clin Invest* 32: 448–57, 2002

Park JG, Oie HK, Sugarbaker PH, Henslee JG, Chen TR, Johnson BE, Gazdar A. Characteristics of cell lines established from human colorectal carcinoma. *Cancer Res* 15: 6710–8, 1987

Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359: 235–7, 1992

Samowitz WS, Slattery ML, Sweeney C, Herrick J, Wolff RK, Albertsen H. APC mutations and other genetic and epigenetic changes in colon cancer. *Mol Cancer Res* 5: 165–70, 2007

Thorstensen L, Lind GE, Lovig T, Diep CB, Meling GI, Rognum TO, Lothe RA. Genetic and epigenetic changes of components affecting the WNT pathway in colorectal carcinomas stratified by microsatellite instability. *Neoplasia* 7: 99–108, 2005

Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 9: 489–99, 2009

Zeng G, Germinaro M, Micsenyi A, Monga NK, Bell A, Sood A, Malhotra V, Sood N, Midda V, Monga DK. Aberrant Wnt/beta-catenin signaling in pancreatic adenocarcinoma. *Neoplasia* 8: 279–89, 2006



Table 1. Frequency of CDK8 expression in colorectal adenocarcinoma according to clinical and pathologic feature (%)

Clinical and pathologic feature	Total No	CDK8 +	P value
All cases	127	96(76)	
Gender			<0.005
Male	66	46(70)	
Female	61	50(82)	
T stage			
1	5	3(60)	Referent
2	24	16(67)	
3	98	77(79)	<0.005
4	0	0	
Lymph node			<0.0005
-	86	58(67)	
+	41	38(93)	
Distant metastasis			<0.0005
-	123	92(75)	
+	4	4(100)	
Clinical stage			
I	27	19(70)	Referent
II	58	43(74)	
III	38	33(87)	<0.01
IV	4	4(100)	<0.0005
$\beta$ -catenin, nuclear			
-	53	33(62)	Referent
1+	40	31(78)	<0.05
2+	34	27(79)	<0.05
$\beta$ -catenin, cytoplasmic			
-	73	46(63)	Referent
1+	44	33(75)	<0.01
2+	10	8(80)	<0.005
$\beta$ -catenin, membrane			<0.05
Expressed	51	32(63)	
Lost (1+)	76	60(79)	

(Continued to the next page)

---

$\beta$ -catenin, overall score *			<0.0005
0-2 (inactive)	72	43(60)	
3-5 (active)	55	45(82)	
Normal colon mucosa	10	1(10) <sup>†</sup>	
Tubular adenoma	10	6(60) <sup>‡</sup>	

---

Only significant p values are described.

\*  $\beta$ -catenin score was calculated as the sum of nuclear (0-2), cytoplasmic (0-2) and membrane (0-1) scores as described in the materials and methods.

<sup>†</sup> CDK8 staining was detected as weak (+) positive.

<sup>‡</sup> Tubular adenomas showed 1 weak (+), 4 moderate (+) and 1 strong (+) CDK8 staining.

## 그림설명

Figure 1. Immunohistochemical staining of colonic adenocarcinoma for CDK8. Tumor cells showed diffuse strong positive nuclear staining. Polink-2 HRP plus rabbit DAB detection system, counterstained by hematoxylin.

Figure 2. Immunohistochemical staining of colonic adenocarcinoma for  $\beta$ -catenin. a: Tumor cells showed diffuse positive nuclear staining and some membranous staining. b: Tumor cells showed diffuse positive cytoplasmic staining. Polink-2 HRP plus mouse DAB detection system, counterstained by hematoxylin.

Figure 3. Immunohistochemical staining of colonic adenocarcinoma for  $\beta$ -catenin. a: Tumor cells showed diffuse positive membranous staining. b: Tumor cells showed negative membranous staining. Polink-2 HRP plus mouse DAB detection system, counterstained by hematoxylin.

Figure 4. Western blot analysis of colon cancer cell lines for CDK8 and  $\beta$ -catenin. Each cell line expressed CDK8 and  $\beta$ -catenin intensely. After serum starvation for 24 h, CDK8 level was decreased in each cell lines nevertheless,  $\beta$ -catenin level was increased in each cell lines.

Figure 5. Effect of CDK8 interference on  $\beta$ -catenin expression in colon cancer cell lines. Significant suppression of  $\beta$ -catenin was identified in HCT-116 and SNU-C5, but not significant in HT-29.

Figure 6. Cumulative survival curves of colon cancer patients by CDK8 expression. CDK8 expression group showed significant low survival compared to CDK8 negative group.

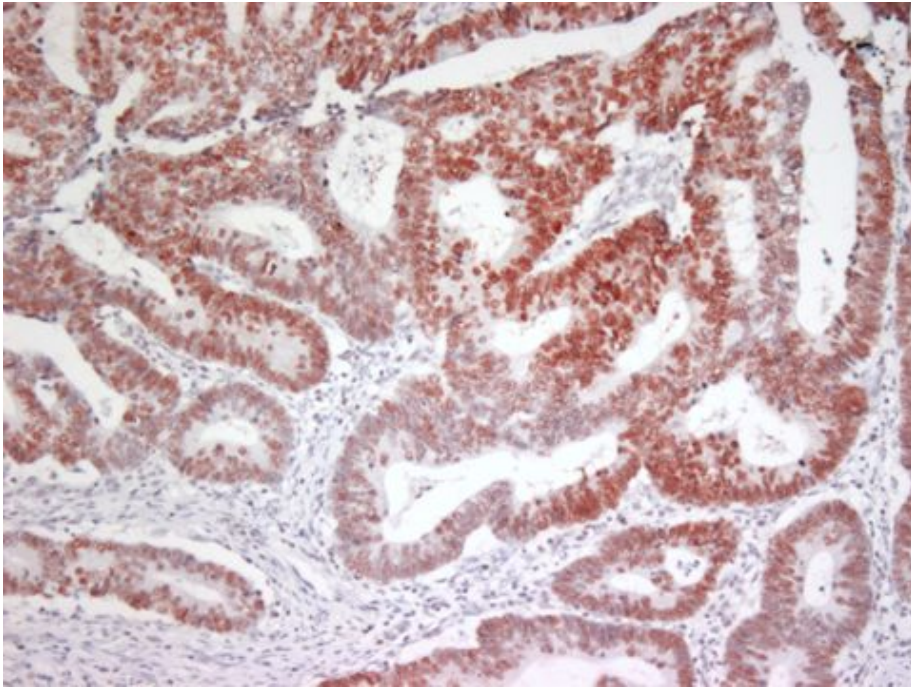


Figure 1

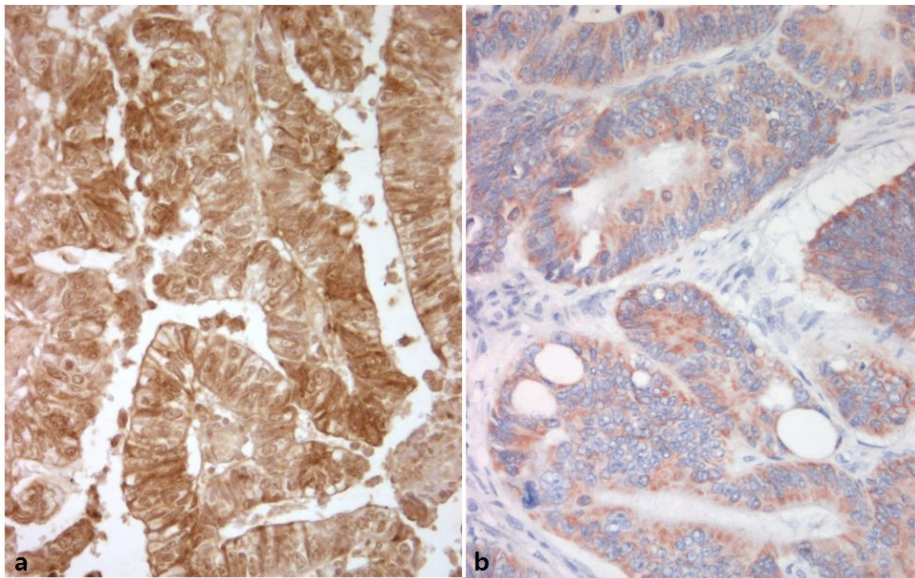


Figure 2

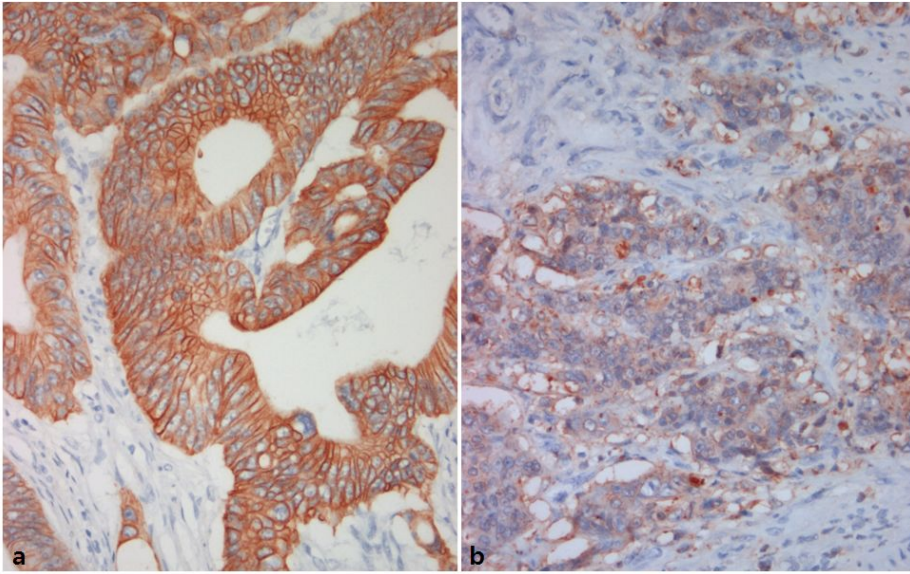


Figure 3

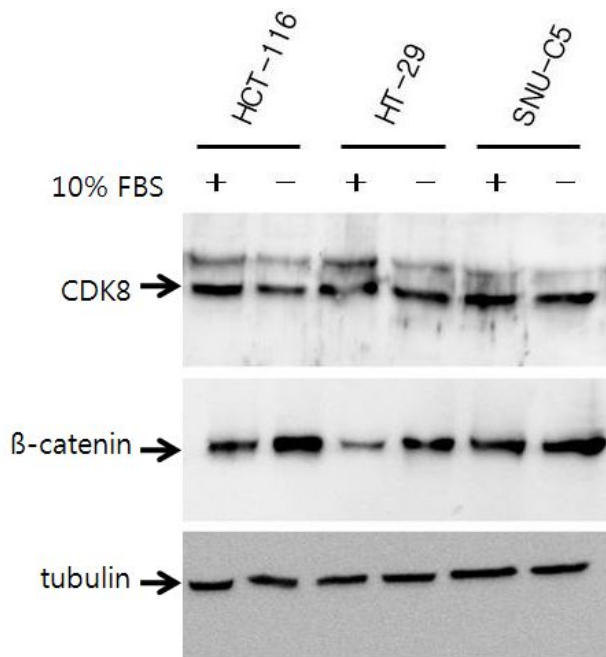


Figure 4

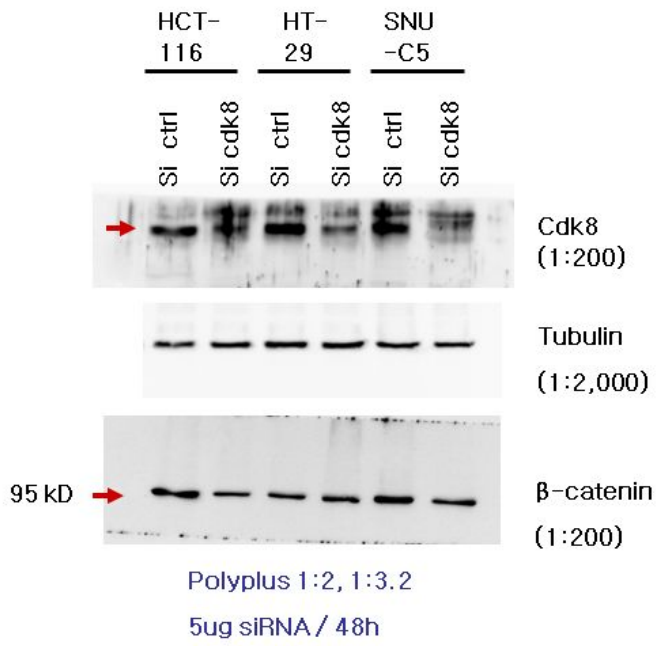


Figure 5

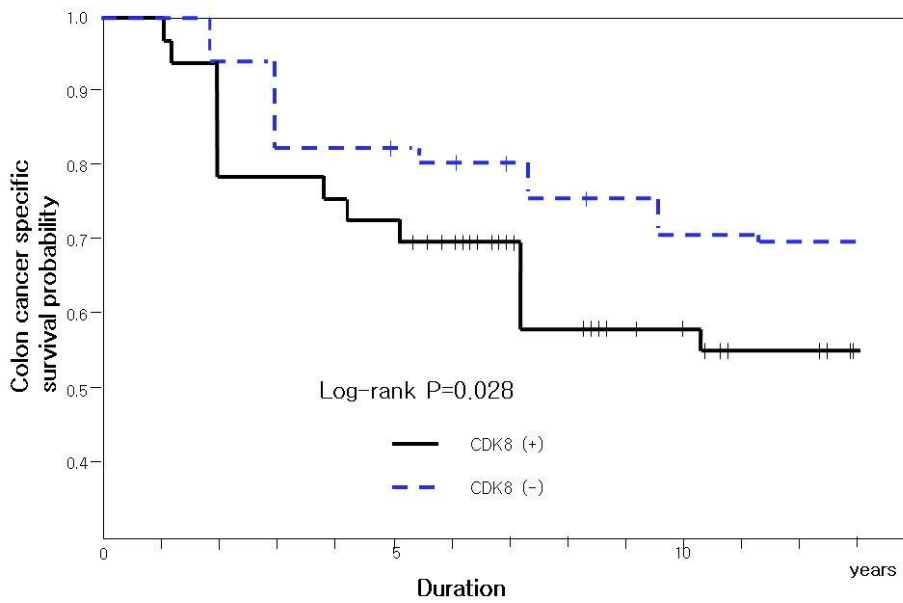


Figure 6

## 저작물 이용 허락서

학 과	의학과	학 번	20087407	과 정	박사학위과정
성 명	한글: 서 종 옥    한문: 徐 鐘 玉    영문: Seo, Jong Og				
주 소	전남 순천시 연향동 1478-1 서종옥내과				
연락처	017-661-5815				
논문제목	한글 : 대장암에서 CDK8 및 $\beta$ -catenin의 역할 영문 : Role of CDK8 and $\beta$ -catenin in colorectal adenocarcinoma				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

2009년 12월 일

저작자: 서 종 옥 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하