

원발성 소세포폐암에서 Microsatellite 분석을 이용한 Microsatellite 불안정화에 대한 연구

연세대학교 의과대학 내과학교실¹, 분자외과², 병리학교실³, 흉부외과학교실⁴, 폐질환연구소⁵,
BK21 의학사업단⁶, 인하대학교 의과대학 내과학교실⁷

조은송^{2,6}, 장 준^{1,5,6}, 박재민¹, 신동환^{3,5}, 김세훈³, 김영삼¹, 장윤수¹,
조철호⁷, 박승민⁷, 이준구¹, 정경영^{4,5}, 김성규^{1,5}, 이원영^{1,5}, 김세규^{1,5,6}

= Abstract =

A Study of Microsatellite Instability in Primary Small Cell Lung Cancers by Microsatellite Analysis

Eun Song Cho^{2,6}, Joon Chang, M.D.^{1,5,6}, Jae Min Park, M.D.¹, Dong Hwan Shin, M.D.^{3,5},
Se Hoon Kim, M.D.³, Young Sam Kim, M.D.¹, Yoon Soo Chang, M.D.¹,
Chul Ho Cho, M.D.⁷, Seung Min Kwak, M.D.⁷, Jun Gu Lee, M.D.¹,
Kyung Young Chung, M.D.^{4,5}, Sung Kyu Kim, M.D.^{1,5},
Won Young Lee, M.D.^{1,5}, Se Kyu Kim, M.D.^{1,5,6}

Department of Internal Medicine¹, Molecular Medicine², Pathology³, Cardiovascular and Thoracic Surgery⁴,

The Institute of Chest Diseases⁵, Brain Korea 21 Project for Medical Sciences⁶,

Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Inha University, Sungnam, Korea⁷

Background : Genomic instability, which is manifested by the replication error (RER) phenotype, has been proposed for the promotion of genetic alterations necessary for carcinogenesis. Merlo et al. reported frequent microsatellite instability in primary small cell lung cancers. However, Kim et al. found that instability occurred in only 1% of the loci tested and did not resemble the replication error-positive phenotype. The significance of

[†]본 연구는 1997학년도 연세대학교 의과대학 일반교수연구비 지원에 의해 이루어졌음.

Address for correspondence :

Se Kyu Kim, M.D.

Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine

CPO BOX 8044, Seoul, Korea.

Phone : 82-2-361-5429 Fax : 82-2-312-0963 E-mail : sekyukim@yumc.yonsei.ac.kr

microsatellite instability in the tumorigenesis of small cell lung cancer as well as the relationship between microsatellite instability and its clinical prognosis was investigated in our study.

Methods : Fifteen primary small cell lung cancers were chosen for this study. The DNAs extracted from paraffin-embedded tissue blocks with primary tumor and corresponding control tissue were investigated. Forty microsatellite markers on chromosome 1p, 2p, 3p, 5q, 6p, 6q, 9p, 9q, 13q, and 17p were used in the microsatellite analysis.

Results : Thirteen (86.7%) of 15 tumors exhibited LOH in at least one of the tested microsatellite markers. Three of 13 tumors exhibiting LOH lost a larger area in chromosome 9p. LOH was shown in 72.7% on chromosome 2p, 40% on 3p, 50% on 5q, 46.7% on 9p, 69.2% on 13q, and 66.7% on 17p (Table 1). Nine (60%) of 15 tumors exhibited shifted bands in at least one of the tested microsatellite markers. Nine cases exhibiting shifted bands showed altered loci ranging 2.5~52.5% (mean 9.4% \pm 16.19) (Table 2). Shifted bands occurred in 5.7% (34 of 600) of the loci tested (Table 2). Nine cases with shifted bands exhibited LOH ranging between 0~83.3%, and the median survival duration of those cases was 35 weeks. Six cases without shifted bands exhibited LOH ranging between 0~83.3%, and the median survival duration of those cases was 73 weeks. There was no significant difference between median survival durations of the two groups ($p=0.4712$).

Conclusion : Microsatellite instability as well as the inactivation of several tumor suppressor genes may play important roles in the development and progression process of tumors. However, the relationship between microsatellite instability and its clinical prognosis in primary small cell lung cancer could not be established. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2000, 48 : 180-190)

Key words : Small cell lung cancer, Microsatellite instability, Loss of heterozygosity.

서 론

사람에서 생기는 암은 조직병리학적 진행 과정동안에 나타나는 다양한 신체의 유전적 변화들의 축적에 의한 다단계 과정에 의해 발생한다고 생각된다. 이러한 암 발생 과정에서 암유전자의 활성화와 종양억제유전자의 불활성화가 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{1,2}.

그런데 일부 결장직장암에서는 microsatellite라고 하는 단순 반복 염기 서열에 매우 많은 신체의 돌연변이가 발견되며, 이를 microsatellite 돌연변이유발유전자 표현형(mutator phenotype)이라고 한다³. 이러한 것은 특히 선천성 비용종성 대장암(hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome; HNPCC)에서 관찰되며⁴, 유전자 불안정화(genomic

instability)를 가리키는 지표로 빈번하게 이용된다.

Microsatellite 불안정화는 염색체 2번의 단완(2p)에 있는 *hMSH2*^{5,6}와 염색체 3번의 단완(3p)에 있는 *hMLH1*^{7,8} 등의 DNA 복제오류교정유전자(mismatch repair gene)의 이상에 의한 DNA 복제 오류(DNA replication error; RER)에 의해 발생한다.

DNA 복제 과정 중 혹은 과정 후 나타날 수 있는 돌연변이를 방지하는 기전의 장애가 발생하면 이러한 세포들은 추가로 돌연변이 유발을 잘 일으키는 경향이 있어서 내인성의 유전자 불안정화의 원인이 되는 돌연변이 표현형은 암 발생의 초기 단계에서 강력한 충동적 역할을 한다고 한다^{9,10}.

폐암은 서구에서 뿐만 아니라 우리나라에서도 암 사망 원인의 중요한 부분을 차지하고 있다. 폐암은 조직

학적으로 비소세포폐암과 소세포폐암으로 구분하는데 비소세포폐암은 선천성 비용종성 대장암 관련 종양들에서 발견되는 유전자 불안정화가 드물다¹¹. 그러나 소세포폐암에서는 1994년 Merlo 등의 보고에 의하면 (CA)n dinucleotide 반복의 결손 혹은 확대에 의한 microsatellite 불안정화의 빈도가 45%로 매우 높게 관찰되며, 이를 보이는 경우 대립형질 결손이 광범위하게 있으면서 예후가 좋지 않다고 하였다¹².

이와는 달리 Kim 등의 최근 보고에 의하면 46예의 소세포폐암을 대상으로 14개의 microsatellite markers를 이용한 염색체 9번의 단완(9p)에 대한 microsatellite 분석 결과 불안정화는 644개의 loci 중 오직 1%인 7개에서만 발견되어 Merlo 등과는 매우 상반된 결과를 보였다¹³.

따라서 저자들은 종양 발생에 관여하는 원인을 찾는 노력의 일환으로 유전자 불안정화가 원발성 소세포폐암의 발생과 진행에 어떠한 병인적 중요성을 갖는지 확인하고, 외국의 결과와 비교하여 우리나라 환자들에서 유전적 변이의 차이점을 관찰하고자 하였으며, microsatellite 불안정화가 빈번히 관찰된다면 이를 우리나라 소세포폐암 환자들의 분자생물학적 조기 진단 및 환자의 예후 판정에도 활용할 수 있는지 알아보 고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

연세대학교 의과대학 세브란스병원에서 원발성 소세포폐암으로 진단된 15예를 대상으로 하였다. 대상 환자는 모두 남자이었으며, 평균 연령은 56.1세 (30~74세) 이었고, 흡연자는 12명, 흡연력은 평균 21.4 갑년이었다. 대상 환자들의 중앙 생존 기간은 40.5주 (22~285주) 이었다. 환자의 병기는 extensive stage 1예를 제외하고, 나머지 모두 limited stage이었다.

DNA 추출을 위해 소세포폐암 조직과 이에 대응하

는 동일한 환자에서의 정상 조직 파라핀 포매 블록들을 이용하였다. 암 조직 블록은 microtome을 이용하여 4- μ m로 절편한 후 hematoxylin과 eosin 염색을 하여 병리의사에 의해 소세포폐암임을 재차 확인하고, 종양 부위를 확인하였다. 이후 4-5개의 10- μ m 추가 절편을 만든 다음 저배율 현미경하에서 scalpel을 이용하여 정상 세포의 오염이 30% 이하로 가능한 적도록 주의하면서 종양 조직을 박리하였다. 정상 조직도 동일한 방법으로 준비하였다.

2. 방 법

박리한 조직은 1% SDS-proteinase K를 포함하는 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 200 μ l 에 넣어 42°C에서 12~24시간 incubation 하여 용해시켰다. 용해시킨 검체는 phenol chloroform으로 정제하고, ethanol precipitation 방법을 이용하여 DNA를 추출하였다¹⁴.

Microsatellite 분석을 위하여 이용한 40개의 polymorphic microsatellite markers는 Research Genetics (Huntsville, AL, USA)로 부터 구입하였으며, 종류는 다음과 같다.

1p(D1S252) ; 2p(D2S162 and D2S136) ; 3p(D3S1284, and THRB) ; 5q(D5S421) ; 6p(D6S105 and D6S265) ; 6q(D6S255 and D6S264) ; 9p(D9S144, D9S156, D9S162, INF- α , D9S171, D9S126, D9S161, D9S166, D9S200, D9S269, D9S274, RPS6, D9S157, D9S169, D9S104, and D9S1853) ; 9q(D9S146, D9S153, D9S152, D9S15, D9S12/2.1, D9S119, D9S176, D9S53, D9S105, and GSN) ; 13q(D13S133 and D13S170) ; and 17p(D17S786 and CHRNB).

각각의 primer들 중 하나는 [γ -³²P]ATP (3000 Ci/mmol ; Amersham Life Science, Buckinghamshire, England)와 T₄ DNA polynucleotide kinase (New England Biolabs, Beverly, MA)를 이용하여 end-labeling 하였고, 중합효소연쇄반응은 다음을

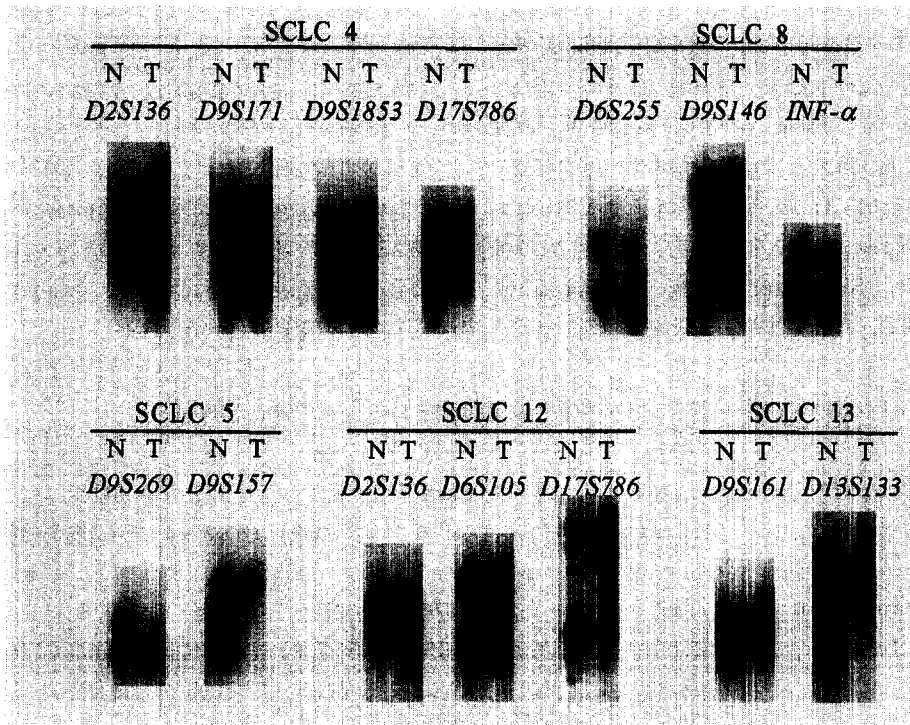


Fig. 1. Microsatellite instability in normal (N) and tumor (T) tissue from five representative small cell lung cancer (SCLC) patients. The markers *D2S136* (SCLC 4 and SCLC 12), *D9S171* and *D9S1853* (SCLC 4), and *D9S161* (SCLC 13) revealed novel bands, representing altered (deleted or expanded) alleles. LOH was found for the markers *D17S786* (SCLC 4 and SCLC 12), *D6S255*, *D9S146* and *INF-α* (SCLC 8), *D9S269* and *D9S157* (SCLC 5), *D6S105* (SCLC 12), and *D13S133* (SCLC 13).

이용하여 12.5 μ l volume으로 시행하였다. ; 20 ng genomic DNA, 1% dimethylsulfoxide, 200 mM dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.4 mM PCR primers including 0.1 mM [γ - ^{32}P] labeled primer, and 0.5 units of Taq DNA polymerase (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD).

DNA는 temperature cycler(Hyaid ; Omnigene, Woodbridge, NJ)를 이용하여 500- μ l plastic tubes에서 95 $^{\circ}C$ 30초, 52-60 $^{\circ}C$ 60초, 그리고 70 $^{\circ}C$ 60초 동안 35 cycles를 증폭한 다음 70 $^{\circ}C$ 에서 5분 동안 extension시켰다. 중합효소연쇄반응 산물은 6% polyacrylamide-urea-formamide gel에서 전기영동으로 분리시키고, autoradiography를 시행하

였다. 실험 결과는 소세포폐암에서 대립형질 2개중 1개의 신호 강도가 정상 대조군과 비교하여 50% 이상 감소하면 LOH (loss of heterozygosity)로 정의하였다. 또한 정상 대조군에서 관찰되지 않는 새로운 대립형질이 관찰되는 경우 shifted bands로 정의하였다 (Fig. 1).

자료의 통계분석은 SAS 통계 패키지를 이용하였으며, 대상 환자의 생존기간은 Kaplan-Meier 방식으로 계산하였고, Wilcoxon test로 유의성을 비교하였다.

결 과

1) 대상 환자 15예중에서 LOH가 1개라도 관찰된

경우는 13예(86.7%)이었다. 2) LOH가 관찰된 13예중 3예에서는 염색체 9p의 광범위한 지역에서 결손이 관찰되었다. 3) LOH는 염색체 2p에서 72.7%, 염색체 3p 40%, 염색체 5q 50%, 염색체 9p 46.7%, 염색체 13q 69.2%, 그리고 염색체 17p에서 66.7%가 관찰되었다(Table 1). 4) 대상 환자 15예중에서 shifted bands가 1개라도 관찰된 경우는 9예(60%)이었다. 5) Shifted bands, 즉 microsatellite 불안정화를 보이는 9예중 altered loci는 2.5~

52.5% (평균 $9.4\% \pm 16.19$)에서 관찰되었다(Table 2). 6) 검사한 총 600개 loci 중에서 shifted bands가 있는 경우는 34 loci로 5.7%이었다(Table 2). 7) Shifted bands를 보이는 9예에서 LOH는 0~83.3%까지 관찰되었으며, 중앙생존기간은 35주이었다. Shifted bands를 보이지 않는 6예에서 LOH는 0~83.3%까지 관찰되었으며, 중앙생존기간은 73주이었다(Table 1). 그러나 양군간의 중앙생존기간은 유의한 차이가 없었다($p=0.4712$).

Table 1. Frequency of allelic loss (LOH) in primary small cell lung cancer

	2p	3p	5q	9p	9q	13q	17p
9 SCLCs with shifted bands	5/6 (83.3%)	1/4 (25%)	3/6 (50%)	3/9 (33.3%)	3/9 (33.3%)	4/7 (57.1%)	4/6 (66.7%)
6 SCLCs without shifted bands	3/6 (50%)	3/6 (50%)	3/6 (50%)	4/6 (66.7%)	5/6 (83.3%)	5/6 (83.3%)	4/6 (66.7%)
Total	8/11 (72.7%)	4/10 (40%)	6/12 (50%)	7/15 (46.7%)	8/15 (53.3%)	9/13 (69.2%)	8/12 (66.7%)

Table 2. Primary small cell lung cancer with microsatellite instability

Patients	Altered loci/ tested loci(%)	Altered loci
SCLC4	21/40(52.5%)	<i>D2S136, D3S1284, D6S105, D6S265, D9S133, D9S146, D9S153, D9S12, D9S176, D9S53, D9S105, GSN, D13S170, D9S274, D9S156, D9S157, D9S162, RPS6, D9S171, D9S104, D9S1853</i>
SCLC2	2/40(5%)	<i>D3S1284, CHRNBI</i>
SCLC8	2/40(5%)	<i>D9S166, D9S12</i>
SCLC11	2/40(5%)	<i>D1S252, D9S153</i>
SCLC12	2/40(5%)	<i>D1S252, D2S136</i>
SCLC14	2/40(5%)	<i>D2S136, D9S104</i>
SCLC5	1/40(2.5%)	<i>D1S252</i>
SCLC10	1/40(2.5%)	<i>D3S1284</i>
SCLC13	1/40(2.5%)	<i>D9S161</i>

고 찰

결장직장암에서 단순 반복 염기 서열의 복제오류가 진정한 돌연변이유발유전자 표현형을 만든다는 것이 알려져 있으며^{3,15-17}, 이러한 변화를 보이는 복제오류 양성 결장직장암은 음성인 경우와 비교하여 환자의 생존율을 증가시키는 것과 중요한 연관 관계가 있으면서 염색체 5q, 17p, 18q에 발생하는 LOH와는 역상관 관계가 있다고 한다¹⁶.

그러나 예후와의 연관성에 대한 보고들은 다양하여 microsatellite 불안정화 양성 종양의 예후가 음성인 종양 보다 훨씬 좋다는 연구 보고들이 있는 반면^{18,19} 유방암 및 폐암에서는 불안정화 양성인 종양의 예후가 불량하다는 보고도 있다^{20,21}.

이러한 (CA)n 혹은 다른 단순 반복 염기 서열의 변화들을 보이는 선천성 비용종성 대장암(hereditary nonpolyposis colorectal cancer ; HNPCC) 환자에서는 암이 잘 발생하는 경향이 있으며²², DNA의 연관 분석 결과 염색체 2p와 3p에 있는 polymorphic markers와 연관이 있다는 것이 확인되었다¹⁷. 염색체 2p에서는 bacterial *mutS*, yeast *MSH2*와 상동성을 갖는 *hMSH2* (human *mutS* homologue 2), 염색체 3p에서는 bacterial *mutL*, yeast *yMLH1*과 상동성을 갖는 *hMLH1* 등의 DNA 복제 오류 (DNA replication error ; RER)를 인식하여 교정하는데 중요한 역할을 하는 유전자들이 발견되었다^{5,6}.

이러한 발견이후 최근까지 박테리아의 DNA 복제 오류 교정유전자와 상동성을 갖는 여러 유전자들이 사람에서 추가로 발견되었다^{23,24}. 이 중에서 GTBP/*hMSH6* 및 hDUG1/*hMSH3*는 *hMSH2*와 결합하여 DNA 복제 오류가 일어난 부위를 인식하고, 이후 hPMS2 및 hMLH1의 이형결합체와 결합함으로써 오류를 교정한다^{5,25}.

Microsatellite 불안정화는 선천성 비용종성 대장암에서 가장 흔히 동반되는 것으로 알려져 있으나 비용종성 대장암 환자에서 자주 발생하는 종양은 아니지만 microsatellite 불안정화 양성은 자궁내막암²⁶, 난소

암²⁷, 췌장암²⁸, 위암^{28,29} 등에서도 발견된다. 그 외에도 microsatellite sequences의 복제 오류는 두경부암, 방광암, 폐암 등에서도 보고된다³⁰.

폐암은 서구에서 뿐만 아니라 우리나라에서도 암 사망 원인의 중요한 부분을 차지하고 있다. 원발성 폐암의 조직학적 분류 중 소세포폐암은 약 20% 정도를 차지하며, 비소세포폐암과는 달리 진단 초기에 이미 원격 전이가 발생하였거나 치료 경과 중 높은 재발률 때문에 예후가 매우 불량하다³¹.

최근 사람에서 생기는 암에 대한 분자유전학적 지식의 발전과 함께 폐암 발생에도 많은 종양억제유전자의 불활성화가 관여하고 있다는 사실이 확인되었다^{32,33}. 종양억제유전자는 한 개의 대립형질에 돌연변이가 발생하고, 다른 또 하나의 대립형질에 결손이 발생하면서 불활성화되는 특성을 갖기 때문에 LOH는 종양억제유전자가 존재할 가능성이 있는 염색체 부위를 가리키는 지표가 된다.

최근의 세포유전학적 연구에 따르면 소세포폐암에서는 염색체 3p, 4q, 5q, 10q, 13q와 17p에서 LOH가 빈번하게 발생하는 것이 관찰되며³⁴⁻³⁶, 이중 염색체 10q는 소세포폐암의 94%에서, 그리고 4q, 5q, 13q, 17p에서는 86%에서 대립형질의 결손이 관찰된다³⁹. 이러한 결과들은 여러 부위의 염색체 부위에 존재하는 다양한 종양억제유전자들의 불활성화가 소세포폐암의 발생과 진행에 중요한 역할을 하는 것을 가리킨다.

이렇게 다양한 유전자 변이와 함께 microsatellite 돌연변이유발유전자 표현형을 나타내는 유전자 불안정화가 소세포폐암의 종양발생에 필요한 유전자 변이의 발생을 촉진시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 추정된다.

비소세포폐암에서는 선천성 비용종성 대장암 관련 종양에서 발견되는 유전자 불안정화가 적은 반면¹¹ Merlo 등의 보고¹²에 의하면 소세포폐암은 비소세포폐암과는 달리 (CA)n dinucleotide repeats의 결손 혹은 확대 등으로 구성된 microsatellite loci의 변화가 45% 정도로 microsatellite 불안정화가 매우 빈

변함을 보고하면서 microsatellite 불안정화를 보이는 소세포폐암은 대립형질 결손이 광범위하게 있으면서 예후가 좋지 않다고 하였다.

그러나 이와는 달리 Kim 등의 최근 연구 결과¹³에 따르면 46예의 소세포폐암을 대상으로 염색체 9p에 위치한 14개의 microsatellite markers를 이용한 microsatellite 분석 결과 644개의 loci 중 불안정화는 오직 1%인 7개의 loci에서만 발견되어 Merlo 등의 연구와는 매우 상반된 결과를 보였다.

따라서 예후가 매우 불량한 원발성 소세포폐암에서 유전자 불안정화의 병인적 중요성에 대한 조명이 필요하지만 우리나라 환자를 대상으로 한 이에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 우리나라 뿐 아니라 전세계적으로도 원발성 소세포폐암에 대한 분자생물학적 연구가 미흡한 것은 우선적으로 연구를 위한 소세포폐암 조직을 얻기가 쉽지 않다는 점에서 기인한다. 그 이유는 비소세포폐암과는 달리 소세포폐암은 진단 당시 초기에 원격 전이를 잘 일으키며, 항암화학요법에 비교적 잘 반응을 하는 특성 때문에 소세포폐암 환자에서는 굴곡성 기관지 내시경 혹은 세침흡인 폐생검 등의 검사 방법을 이용하여 진단이 된 이후에는 수술적 치료를 원칙적으로 시행하지 않기 때문이다.

본 연구 결과 LOH가 1개라도 관찰된 경우는 총 대상 15예중에서 86.7%인 13예이었으며, 염색체 2p, 3p, 5q, 9p, 13q, 17p 등에서 40~72.7%의 LOH가 관찰되어 여러 염색체 부위에 존재하는 다양한 종양억제유전자가 소세포폐암의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다(Table 1). 특히 3예에서는 염색체 9p의 광범위한 지역에서 결손이 관찰되었는데 최근 Kim 등¹³도 염색체 9p부위에서 최소 3개 이상의 새로운 종양억제유전자좌의 존재 가능성을 보고한바 있어서 이 부위에는 소세포폐암의 발생 및 진행에 관여하는 종양억제유전자들이 존재할 가능성이 매우 높을 것으로 생각된다.

또한 shifted bands, 즉 microsatellite 불안정화 소견이 1개라도 관찰되는 경우는 대상 환자 15예중 60%인 9예에서 관찰되어 Merlo 등¹²의 보고처럼 소

세포폐암에서 microsatellite 불안정화가 매우 빈번하게 관찰되었다. 그러나 이러한 돌연변이유발유전자표현형은 검사를 시행한 모든 대립형질의 2.5~52.5%에서 관찰되었지만 여러 loci에서 관찰된 경우는 52.5%의 빈도를 보인 1예에 불과하였으며, 나머지는 모두 5%이하의 매우 낮은 빈도로 관찰되었다(Table 2). 또한 검사를 시행한 총 600개 loci 중에서 shifted bands가 있는 경우는 34 loci로 5.7%에 불과하여 선천성 비용종성 대장암에서 모든 dinucleotide 대립형질의 약 70%에서 관찰되는 것보다 훨씬 적은 표현형 변화를 보였다. 이러한 결과는 대상 예들이 대부분 limited stage로 진행되기 이전 단계이므로 돌연변이유발유전자표현형이 소세포폐암의 진행에 주된 역할을 하기보다는 일부에서 암 발생의 초기 단계에서 충동적 역할을 하는 것으로 생각된다.

한편 shifted bands를 보이는 9예의 중앙생존기간은 35주로 shifted bands를 보이지 않는 경우의 73주보다 짧았으나 양군간에 유의한 차이는 없었다($p=0.4712$). microsatellite 불안정화와 환자의 임상적 예후와의 연관성에 대해서는 더 많은 예를 대상으로 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구 결과가 다른 연구와 차이가 있을 수 있는 요인들은 1) 신선한 조직을 사용하는 것과 파라인 포매 조직의 차이점이 있을 수 있으며, 2) 연구에 참여한 환자의 진행 정도, 즉 병기의 차이가 있을 수 있어서 앞으로도 이에 대한 보다 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

결론적으로 원발성 소세포폐암 일부에서 여러 종양억제유전자들의 불활성화뿐 아니라 microsatellite 불안정화도 암 발생에 관여하는 것으로 생각된다. 그러나 microsatellite 불안정화와 소세포폐암의 임상적 예후와의 연관성은 관찰할 수 없었다.

요 약

연구배경 :

Microsatellite 돌연변이 유발유전자 표현형으로 나타

나는 유전자 불안정화는 암 발생에 필요한 유전자 변이의 출현을 조장하는 것으로 알려져 있다. Merlo 등은 원발성 소세포폐암에서 빈번한 microsatellite 불안정화가 관찰됨을 보고하였으나 최근 Kim 등의 또 다른 보고에서는 검사를 시행한 loci 중 오직 1%에서만 microsatellite instability가 관찰되어 상반된 결과를 보였다. 따라서 저자들은 종양 발생에 관여하는 원인을 찾는 노력의 일환으로 유전자 불안정화가 원발성 소세포폐암의 발생과 진행에 어떠한 병인적 중요성을 갖는지 확인하고, 외국의 결과와 비교하여 우리나라 환자들에서 유전적 변이의 차이점을 관찰하고자 하였으며, microsatellite 불안정화가 빈번히 관찰된다면 이를 우리나라 소세포폐암 환자들의 분자생물학적 조기 진단 및 환자의 예후 판정에도 활용할 수 있는지 알아보고자 하였다.

대상 및 방법 :

연세대학교 의과대학 세브란스병원에서 원발성 소세포폐암으로 진단된 15명의 남자 환자를 대상으로 하였다. 암조직과 이에 대응하는 정상 조직의 파라핀 포매 블록으로부터 DNA를 추출하였으며, 염색체 1p, 2p, 3p, 5q, 6p, 6q, 9p, 9q, 13q, 17p에 위치한 총 40개의 microsatellite markers를 이용하여 microsatellite 분석을 실시하였다.

결 과 :

- 1) 대상 환자 15예중에서 LOH가 1개라도 관찰된 경우는 13예(86.7%)이었다.
- 2) LOH가 관찰된 13예중 3예에서는 염색체 9p의 광범위한 지역에서 결손이 관찰되었다.
- 3) LOH는 염색체 2p에서 72.7%, 염색체 3p 40%, 염색체 5q 50%, 염색체 9p 46.7%, 염색체 13q 69.2%, 그리고 염색체 17p에서 66.7%가 관찰되었다(Table 1).
- 4) 대상 환자 15예중에서 shifted bands가 1개라도 관찰된 경우는 9예(60%)이었다.
- 5) Shifted bands, 즉 microsatellite 불안정화를 보이는 9예중 altered loci는 2.5~52.5% (평균 9.4% \pm 16.19)에서 관찰되었다(Table 2).

6) 검사한 총 600개 loci 중에서 shifted bands가 있는 경우는 34 loci로 5.7%이었다(Table 2).

7) Shifted bands를 보이는 9예에서 LOH는 0~83.3%까지 관찰되었으며, 중앙생존기간은 35주이었다. Shifted bands를 보이지 않는 6예에서 LOH는 0~83.3%까지 관찰되었으며, 중앙생존기간은 73주이었다(Table 1). 그러나 양군간의 중앙생존기간은 유의한 차이가 없었다($p=0.4712$).

결 론 :

원발성 소세포폐암 일부에서 여러 종양억제유전자들의 불활성화뿐 아니라 microsatellite 불안정화도 암 발생에 관여하는 것으로 생각된다.

그러나 microsatellite 불안정화와 소세포폐암의 임상적 예후와의 연관성은 관찰할 수 없었다.

참 고 문 헌

1. Knudson, A.G. Hereditary cancer, oncogenes, and anti-oncogenes. *Cancer Res.* 1985;45:1437-43.
2. Vogelstein, B., & Kinzler, K.W. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 1993;9:138-14.
3. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature (Lond.)*, 1993; 363:558-61.
4. Vasen HFA, Mecklin JP, Kahn PM, Lynch HT. Hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Lancet* 1991;328:877.
5. Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;75:1027-38.
6. Leach, F.S., Nicolaides, N.C., Papadopoulos, N., et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary

- nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993;75:1215-35.
7. Papadopoulos N, Nicolaides N, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, et al. Mutation of a MutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994;263:1625-9.
 8. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, et al. Mutation of the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994;368:258-61.
 9. Harwood, J., Tachibana, A., and Meuth, M. Multiple dispersed spontaneous mutations: a novel pathway of mutagenesis in a malignant human cell line. *Mol Cell Biol* 1991;11:3163-70.
 10. Loeb, L.A. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 1991;51:3075-9.
 11. Peltomäki, P., Lothe, R.A., Aaltonen, L.A., Pylkkänen, L., Nyström-Lathi, M., Seruca, R., David, L., Holm, R., Ryberg, D., Haugen, A., Brogger, A., Borresen, A-L., de la Chapelle, A. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 1993;53:5853-5.
 12. Merlo, A., Mabry, M., Gabrielson, E., Vollmer, R., Baylin, S.B., Sidransky, D. Frequent microsatellite instability in primary small cell lung cancer. *Cancer Res* 1994;54:2098-101.
 13. Kim SK, Ro JY, Kemp BL, Lee JS, Kwon TJ, Fong KM, Sekido Y, Minna JD, Hong WK, Mao L. Identification of three distinct tumor suppressor loci on the short arm of chromosome 9 in small cell lung cancer. *Cancer Res* 1997;57:400-3.
 14. Mao, L., Lee, J.S., Fan, Y.H., Ro, J.Y., Batsakis, J.G., Lippman, S., Hittelman, W., and Hong, W. K. Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. *Nature Med* 1996;2:682-5.
 15. Aaltonen, L.A., Peltomäki, P., Leach, F.S., Sistonen, P., Pylkkänen, L., Mecklin, J-P., Järvinen, H., Powell, S.M., Jen, J., Hamilton, S.R., Petersen, G.M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., de la Chapelle, A. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science (Washington DC)* 1993;260:812-6.
 16. Thibodeau, S.N., Bren, G., Schaid, D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-9.
 17. Peltomäki, P., Aaltonen, L.A., Sistonen, P., Pylkkänen, L., Mecklin, J-P, Järvinen, H., Green, J.S., Jass, J.R., Weber, J.L., Leach, F.S., Petersen, G. M., Hamilton, S.R., de la Chapelle, A., Vogelstein, B. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science (Washington DC)* 1993;260:810-2.
 18. Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu JF, Levitt RC, Sistonen P, Kinzler KW, Vogelstein B, Hamilton SR. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *New Engl J Med* 1994;331:213-21.
 19. Seruca R, Santos NR, David L, Constanica M, Barroca H, Carneiro F, et al. Sporadic gastric carcinomas with microsatellite instability display a particular clinicopathologic profile. *Int J Cancer* 1995;64:32-6.
 20. Paulson TG, Wright FA, Parker BA, Russack V, Wahl GM. Microsatellite instability correlates with reduced survival and poor disease prognosis in breast cancer. *Cancer Res* 1996;56:4021-4026.
 21. Pifarre A, Rosell R, Monzo M, de Anta JM,

- Moreno I, Sanchez JJ, Ariza A, Mate JL, Martinez E, Sanchez M. Prognostic value of replication errors on chromosomes 2p and 3p in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1997;75:184-9.
22. Lynch, H.T., Smyrk, T.C., Watson, P., Lanspa, S. J., Lynch, J.F., Lynch, P.M., Cavalieri, R.J., Boland, C.R. Genetics, natural history, tumor spectrum and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 1993;104:1535-49.
23. Palombo F, Gallinari P, Iaccarino I, Lettieri T, Hughes M, D'Arrigo A, et al. GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. *Science* 1995;268:1912-4.
24. Malkhosyan S, Rampino N, Yamamoto H, Perucho M. Frameshift mutator mutations. *Nature* 1996;382:499-500.
25. Acharya S, Wilson T, Gradia S, Kane MF, Marsischky GT, Kolodner R, Fishel R. hMSH2 forms specific mismatch-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93:13629-34.
26. Kobayashi K, Sagae S, Kudo R, Saito H, Koi S, Nakamura Y. Microsatellite instability in endometrial carcinomas: frequent replication errors in tumors of early onset and/or of poorly differentiated type. *Genes Chrom Cancer* 1995;14: 128-32.
27. Fujita M, Enomoto T, Yoshino K, Nomura T, Buzard GS, Inoue M, Okudaira Y. Microsatellite instability and alterations in the hMSH2 gene in human ovarian cancer. *Int J Cancer* 1995;64: 361-6.
28. Han HJ, Yanagisawa A, Kato Y, Park JG, Nakamura Y. Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. *Cancer Res* 1993;53:5087-9.
29. Chong JM, Fukayama M, Hayashi Y, Takizawa T, Koike M, Konishi M, et al. Microsatellite instability in the progression of gastric carcinoma. *Cancer Res* 1994;54:4595-7.
30. Mao L, Lee DJ, Tockman MS, Erozan YS, Askin F, Sidransky D. Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9871-5.
31. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1997. *CA Cancer J Clin* 1997;47:5-27.
32. Yokota J, Siimura T. Multiple steps in carcinogenesis involving alterations of multiple tumor suppressor genes. *FASEB J* 1993;7:920-5.
33. Rodriguez E, Sreekantaiah C, Chaganti RSK. Genetic changes in epithelial solid neoplasia. *Cancer Res* 1994;54:3398-406.
34. Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, Baffa R, Cotticelli MG, Inoue H, Tornelli S, Pilotti S, De Gregorio L, Pastorino U, Pierotti MA, Ohta M, Huebner K, Croce CM. The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell* 1996;85:17-26.
35. Hosoe S, Ueno K, Shigedo Y, Tachibana I, Osaki T, Kumagai T, Tanio Y, Kawase I, Nakamura Y, and Kishimoto T. A frequent deletion of chromosome 5q21 in advanced small cell and non-small cell carcinoma of the lung. *Cancer Res* 1994;54: 1787-90.
36. Merlo A, Gabrielson E, Mabry M, Vollmer R, Baylin SB, Sidransky D. Homozygous deletion on chromosome 9p and loss of heterozygosity on 9q, 6p, and 6q in primary human small cell lung cancer. *Cancer Res* 1994;54:2322-6.
37. Mori N, Yokota J, Akiyama T, Sameshima Y, Okamoto A, Mizoguchi H, Youshima K, Sugimura T, Terada M. Variable mutations of

- the RB in small-cell lung carcinoma. *Oncogene* 1990;5:1713-7.
38. Miller CW, Simon K, Aslo A, Kok K, Yokota J, Buys CH, Terada M, Koeffler HP. p53 mutations in human lung tumors. *Cancer Res* 1992;52:1695-8.
39. Petersen I, Langreck H, Wolf G, Schwendel A, Psille R, Vogt P, Reichel MB, Ried T, Dietel M. Small-cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3p, 4q, 5q, 10q, 13q and 17p. *Br J Cancer* 1997;75(1):79-86.
-