

□ 원 저 □

비소세포폐암에서 종양억제유전자와 극소위성 변이에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 내과학교실¹, 생화학교실², 의학연구소³,
성균관대학교 의과대학 흉부외과학교실⁴

신태립¹, 홍영숙^{1,3}, 김진국⁴, 장중현^{1,3}

= Abstract =

Genetic Alteration of Tumor Suppressor Gene and Microsatellite in Nonsmall Cell Lung Cancer

Tae Rim Shin, M.D.¹, Young-Sook Hong, PhD.^{2,3}, Jhngook Kim, M.D.⁴,
Jung Hyun Chang^{1,3}, M.D.

Department of Internal Medicine¹, Biochemistry², and Medical Research Center³,

College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, Korea

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery⁴,

College of Medicine, Sungkyunkwan University, Seoul, Korea

Background : Lung carcinogenesis is a multistage process involving alterations in multiple genes and diverse pathway. Mutational activation of oncogenes and inactivation of tumor suppressor genes, and subsequent increased genetic instability are the major genetic events. The p53 gene and FHIT gene as tumor suppressor genes contribute to the pathogenesis of lung cancer, evidenced by mutation, microsatellite instability(MI) and loss of heterozygosity(LOH).

Methods : We analysed genetic mutations of p53 and FHIT gene in 29 surgical specimens of nonsmall cell lung cancer using PCR-single strand conformation polymorphism, DNA sequencing and RT-PCR. MI and LOH were analyzed in loci of D3S1285, D9S171, and TP53.

Results : In 2 cases, point mutation of p53 gene was observed on exon 5. MI of 3 times and LOH of 14 times

Address for correspondence :

Jung Hyun Chang, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, Korea

911-1 Mok-Dong, Yangcheon-Ku, Seoul, 158-710, Korea

Phone : 02-650-5086 Fax : 02-655-2076 E-mail : hs1017@mm.ewha.ac.kr

were observed in at least one locus. In terms of the location of microsatellite, D3S1285 as a marker of FHIT was observed in 5 cases out of 26 specimens; D9S171 as a marker of p16 in 5 out of 17; and TP53 as a marker of p53 in 7 out of 27. In view of histologic type, squamous cell carcinoma presented higher frequency of microsatellite alteration, compared to others. Mutation of FHIT gene was observed in 11 cases and 6 cases of those were point mutation as a silent substitution on exon 8. FHIT mRNA expression exhibited deletion on exon 6 to 9 in 4 cases among 15 specimens, presenting beta-actin normally.

Conclusion : Our results show comparable frequency of genetic alteration in nonsmall cell lung cancer to previous studies of Western countries. Microsatellite analysis might have a role as a tumor marker especially in squamous cell carcinoma. Understanding molecular abnormalities involved in the pathogenesis could potentially lead to prevention, earlier diagnosis and the development of novel investigational approaches to the treatment of lung cancer. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2000, 49 : 453-465)

Key words : P53, FHIT, Nonsmall cell lung cancer, Microsatellite instability, Loss of heterozygosity.

서 론

폐암은 세계적인 종양 사망의 주요 원인으로 해마다 환자수는 증가 추세이나 생존율에 있어서는 진전을 보이지 않고 있으며 최근의 생존 자료에 의하면 비소세포암 환자의 10%에서만 장기 생존이 보고되고 있다¹. 따라서 지난 10여 년간 폐암의 생물학적 이해를 돕고자 분자 병인론에 대한 다양한 연구들이 이루어져 왔고 이들은 폐암의 예방 및 진단, 새로운 치료적 접근을 발전시키는데 도움을 줄 것으로 기대되었다.

대표적 종양억제유전자인 p53은 DNA 손상에 대한 반응으로 세포주기와 세포고사를 조절하는 전사인자로 작용하는데 결실, 점돌연변이, 과발현과 같은 돌연변이의 발생이 발암 과정에 관여하며 비소세포암의 약 50%에서 보고되고 있다^{2,4}. 한편 지놈내 분포하는 짧은 반복 염기 배열의 변이를 나타내는 극소위성 불안정성이나 특정 부위의 유전자 결손으로 발생되는 이형접합성 상실도 폐암의 병인론에 관여하는 것으로 알려져 있고 비소세포암에서 다양한 빈도를 보이고 있다⁵⁻⁶. 비교적 최근에 확인된 종양억제유전자인 FHIT은 인간 지놈의 가장 취약부위인 FRA3B를 포함하며 이로부터 생성되는 비정상 전사체가 발암과정에 관여한다는 보고들이 있다⁷⁻⁹.

본 연구에서 저자들은 비소세포암의 분자유전학

적 특징을 알아보기 위하여 종양억제유전자인 p53과 FHIT의 돌연변이 여부를 확인하고 종양억제유전자 부근에 위치하는 극소위성의 유전적 변화를 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

비소세포암으로 진단된 후 외과적 적출술을 시행받은 환자 29명의 생검조직과 그에 대응하는 동일인의 정상조직을 대상으로 하였다. 조직학적 분류는 WHO 분류체계¹⁰에, 병기는 TNM 분류체계¹¹에 준하였다. 모든 조직은 생검후 즉시 -70℃에 보관하였다.

2. 방 법

1) DNA 분리

정상조직과 종양조직을 각 시험관에 담고, 완충용액 (50mM Tris, pH 8.5, 1mM EDTA, 0.5% Tween 20, 200µg/ml proteinase K)을 50-100µl 넣어서 55℃에서 밤새동안 반응시킨 다음, 100℃에서 15분 동안 가열하여 불활성화시켰다. 그 후 원심분리하여 상층액 5µl를 PCR(polymerized chain reaction) 반응에 사용하였다.

Table 1. Primer sequences of p53 gene exon

Exon	Primer sequence (5'→3')	PCR product size
5	S CTCTTCCCTACAGTACTCCCCTGC	211bp
	AS GCCCCAGCTGCTCACCATCGCTA	
6	S GATTGCTCTTAGGTCTGGCCCCTC	185bp
	AS GGCCACTGACAACCACCCTTAACC	
7	S GTGTTGTCTCCTAGGTTGGCTCTG	139bp
	AS CAAGTGGCTCCTGACCTGGAGTC	
8	S ACCTGATTTCTTACTGCCTCTTGC	200bp
	AS GTCCTGCTTGCTTACCTCGCTTAGT	

S ; sense, AS ; antisense

2) p53 PCR-SSCP와 염기서열 결정

PCR primer는 Clontech(Palo Alto, California, U.S.A.)에서 제시한 염기서열을 인용하여 합성하였다 (Table 1). PCR은 template DNA 100ng, 1X PCR 완충액(10 mM Tris-HCl pH 8.3 at 25℃ ; 50 mM KCl ; 1.5 mM MgCl₂), 0.5 unit Taq polymerase^R (Takara Shuzo Corp., Shiga, Japan), 2.5 μM[α-³²P] dCTP, 0.2 μM의 각 exon별 upstream 및 downstream primer를 최종 반응 부피 25 μl 가 되게 혼합한 후 GeneAmp PCR System 9600(Perkin Elmer Corp., Norwalk, U.S.A.)을 사용하여 반응시켰다. 반응조건은 94℃에서 5분 동안 변성시키고 94℃에서 1분간 denaturation 단계, 65℃에서 1분간 annealing 단계, 72℃에서 1분간 extension 단계를 주기로 하여 35번 반복시행 시킨 후, 추가로 72℃에서 7분 동안 extension 반응을 하였다. PCR 산물 2 μl 에 loading dye (95% formamide, 20mM EDTA, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol) 2 μl 를 첨가하여 100℃에서 5분간 변성시킨 후 재빨리 얼음에 넣어 반응산물을 처리하였다. 다섯 배의 TBE(44.5 mM Tris-borate ; 44.5 mM boric acid ; 1 mM EDTA)을 10% acrylamide 용액을 섞은 후 0.45 μm filter를 사용하여 여과한 다음 10% ammonium persulfate 400 μl 와 TEMED 40 μl 을 넣어 gel을 만든 후, 처리한 산

물을 1 μl 씩 점적하여 4℃에서 30W로 3~4시간 동안 전기영동하고, 80℃에서 40분 동안 3M filter paper상에서 gel을 말렸다. 그 다음 X-ray film (Fuji Photo Film Co. Ltd, Tokyo, Japan)에 8시간 동안 노출시킨 후 현상하였다. SSCP상에서 변이가 일어난 band 부위의 gel을 잘라내어 20 μl 멸균된 증류수를 넣고 80℃에서 15분 동안 반응시킨 다음 원심분리하여 상층액 중 10 μl 를 취하여 위와 같은 방법으로 동위원소를 넣지 않고 PCR을 시행하여 PCR 산물을 Jetsorb gel extraction kit 시약 (GENOMED GmbH, Oeynhausen, Germany)으로 정제하여 염기서열 반응을 시켰다.

염기서열 결정은 Sanger등의 방법¹²으로 PCR에서와 동일한 primer를 사용하여 Sequenase PCR product sequencing kit(Amersham Life Science, Cleveland, U.S.A.)를 이용하여 정제한 증폭산물의 염기서열을 결정하였다.

3) 이형접합성상실(loss of heterozygosity : LOH)과 극소위성 불안정성(microsatellite instability : MI) 분석

① 극소위성 primer

LOH를 분석하기 위한 표지자(marker)로 FHIT 유전자 부근(3p14)에 있는 D3S1285를, CDKN2 유

Table 2. Primer sequences of FHIT gene exon

Exon	Primer sequence (5'→3')		product size
5	S	ATGGCATCCTCTCTGCAA	302bp
	AS	TTCATTTGGCTGGTTAGG	
6	S	GGTCCGAGAGGATTC AAT	313bp
	AS	TATCAGGAGGAGCAAGCC	
7	S	TGGTCCCCATGAGAATACTA	304bp
	AS	TTACGGCTCTAACACTGAGG	
8	S	GGAGTAATTGGGCTTCAT	226bp
	AS	AGGTTGATGTCATCCAC	
9	S	TTC AAGGAGATCCCAAGG	238bp
	AS	TGTGCATCCCCATTCTGA	

S ; sense, AS ; antisense

전자 부근(9p21)에 있는 D9S171를, p53 유전자 부근(17p13)의 TP53을 선택하여 사용하였다. Primer는 Bioneer(Bioneer Corp. Chung Won Gun, Korea)에서 합성하였다.

② 극소위성 분석

PCR은 template DNA, 1X PCR 완충액(10 mM Tris-HCl pH 8.3 at 25℃ ; 50 mM KCl ; 1.5 mM MgCl₂), 1 unit Taq polymerase^R (Takara Shuzo Corp., Shiga, Japan), 20 mM 각 dNTP, 각 해당하는 10 pmol의 sense 및 antisense primer를 최종 반응 부피 50μl 가 되게 혼합한 후 GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer Corp., Norwalk, U. S.A.)을 사용하여 반응시켰다. 반응조건은 94℃에서 3분 동안 변성시키고 94℃에서 1분간 denaturation 단계, 각 알맞은 온도에서 1분간 annealing 단계, 72℃에서 1분간 extension 단계를 주기로 하여 35 번 반복시행 시킨 후 72℃에서 7분동안 extension 반응을 추가로 시켰다. 8% non-denaturing acrylamide gel에 PCR 산물 10μl 를 점적하여 250V로 15시간 동안 전기영동한 후, 은염색으로 발색하여 band를 분석하였다.

4) FHIT exon-특이적 PCR 반응에 의한 결실 및 변

이 분석

FHIT 유전자의 exon 5-9에 대해 Druck 등의 방법¹³으로 primer을 이용하여(Table 2) PCR을 시행하고 PCR 산물을 4℃ 30W로 3-4시간동안 전기영동한 후, 은염색으로 발색시켜 band를 관찰하였다. PCR-SSCP에서 band를 감지할 수 없을 때는 ERCC I 유전자의 exon 4(5'-CAGAGGGGCAATCCCGT-ACT-3'와 5'-GCAGAGCTCATGAG-GAAC-3'; 118 bp) primer와 함께 PCR을 다시 시행하였다. Exon 9인 경우는 β-globin(5'-CAACTTCAGTTCACC-3'와 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3')을 사용하여 PCR을 하였다. PCR 은 94℃에서 30초, 57℃에서 30초, 72℃에서 1분을 주기로 30번 시행하였다. SSCP상 정상조직에서 보이는 band와 다른 band는 잘라내어 Sequenase PCR product sequencing kit(Amer-sham Life Science, Cleveland, U.S.A.)을 사용하여 염기서열 반응을 시행하여 변화 여부를 확인하였다.

5) RT-PCR에 의한 전사체 변화 분석

Gilliland 등의 방법¹⁴을 응용하여 reverse transcription system (PromegaTM, Madison Corp., U.S.A.)을 사용하여 RT-PCR을 시행하였다. 10mM Tris-

HCl(pH 8.8), 50mM KCl, 0.1% Triton X-100, 5mM MgCl₂, 각 1mM dNTP, 20units RNase inhibitor, 15units AMV 역전사 효소, 0.5 μ g oligo(dT)₁₈, 1 μ g total RNA가 포함된 20 μ l 용액을 30분 동안 42 $^{\circ}$ C에서 반응시켜 보체 DNA(cDNA)를 합성하고, 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하여 역전사 효소를 비활성시킨 뒤, 이 cDNA 표본 2 μ l 을 최종 부피가 30 μ l 가 되도록 PCR master mix를 첨가하였다. FHIT 유전자의 exon 5~6를 걸쳐 있는 primer로 P1f/1r (sense : 5' - GAGAAAGAAGGTATCCTAGG - 3' ; antisense : 5' - TGAGAGAGGTCCCATGAA - 3')을, exon 6~9에 걸쳐 있는 primer로 P2f/2r (sense: 5' - ATGGGACCTCTCTCACCTTT - 3' ; antisense : 5' - GCGGTCCTTCAAAGTGGTTGG - 3')을 사용하였다. PCR은 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 50 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 2분의 주기로 33회 반복 시행하고 72 $^{\circ}$ C에서 7분동안 연장시켰다. RNA에 대한 내부 대조군 인자로 β -actin을 사용하였으며, PCR 반응 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동하여 ethidium bromide로 염색후 UV하에서 관찰하였다.

각 증폭된 DNA 산물은 P1f/1r과 P2f/2r 내부에 있는 primer (S1, 5'-GA GGACTCCGAAGAGGTAGC-3'과 S2r, 5'-GCAATAGCTCTTTTGTG-TG-3')를 가지고 Sequenase PCR product sequencing kit (Amersham Life Science, Cleveland, U.S.A.)를 사용하여 양쪽 가닥의 염기서열을 분석하였다.

결 과

1. 대상 환자의 특성

환자의 성별 분포는 남자 26명, 여자 3명이었고, 평균 연령은 61.7 \pm 9.0세(34-80세)이었다. 조직학적 분류에 따라서는 편평세포암이 16예, 선암이 11예, 대세포암이 2예였고 종양의 병기에 따라서는 1기가 12예, 2기가 6예, 3기가 10예, 4기가 1예였다 (Table 3).

Table 3. Clinical characteristics

	number (%)
Gender	
Male	26 (89.7)
Female	3 (7.3)
Mean age \pm SD	61.7 \pm 9.0
Tumor histology	
Squamous cell carcinoma	16 (55.2)
Adenocarcinoma	11 (37.9)
Large cell carcinoma	2 (6.9)
Tumor stage	
I	12 (41.4)
II	6 (20.7)
III	10 (34.5)
IV	1 (3.4)

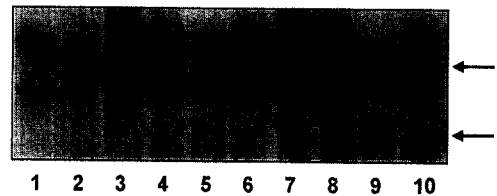


Fig. 1. SSCP by exon-specific genomic PCR of the p53 gene.

Lane 1 ; H460 cell was identified as p53 wild type and lane 2 ; H520 cell was identified as p53 exon 5 mutant type. Lane 3 and 9 show shifted band.

2. p53 유전자 변이

p53 유전자의 변이를 확인하기 위해 exon 5, 6, 7, 8을 PCR-SSCP을 시행한 결과 29예중 2예에서 변이가 관찰되었다. 변이는 exon 5에서 나타났으며 모두 1개의 염기가 치환되는 점돌연변이였다. 1예는 13203번째 염기서열이 G가 A로 바뀌는 transition 이었고 1예는 13131번째 염기서열이 G가 T로 바뀌는 transversion 이었다(Fig. 1, 2, 3).

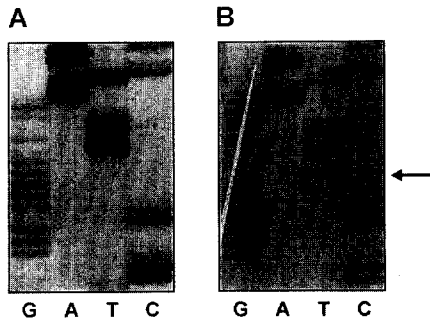


Fig. 2. DNA sequencing of p53 exon 5
A demonstrates the known wild type sequence. B shows G to T transversion at nucleotide 13131.

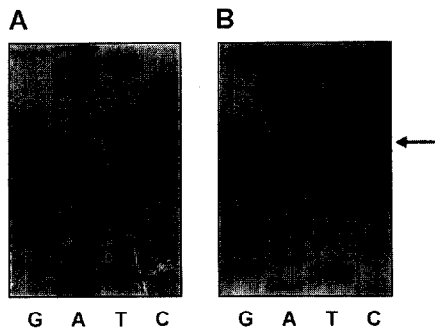


Fig. 3. DNA sequencing of p53 exon 5
A demonstrates the known wild type sequence. B shows G to A transition at nucleotide 13203.

3. 극소위성 불안정성과 이형접합성 상실

극소위성 표지자인 D3S1285, D9S171, TP53에 대한 분석은 각각 26예, 17예, 27예에서 가능하였다. D3S1285와 D9S171에서 극소위성 불안정성은 각각 2예, 1예에서 관찰되었고 이형접합성 상실은 D3S1285, D9S171, TP53에서 각각 3예, 4예, 7예 관찰되었다. 극소위성 변이는 종양의 조직형에 따라서

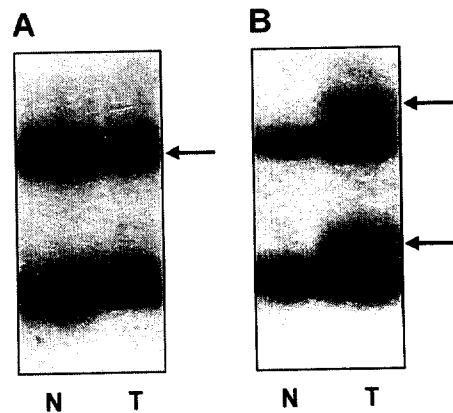


Fig. 4. Representative examples of LOH(A) and MI(B) at D3S1285
A : N lane demonstrates two alleles of equal intensity, whereas T lane shows a shift in intensity to one dominant allele.
B : T lane shows a generation of a novel allele.(N ; normal tissue DNA, T ; tumor tissue DNA)

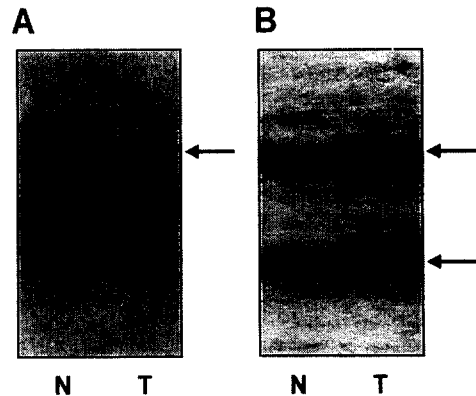


Fig. 5. Representative examples of LOH(A) and MI(B) at D9S171
A : N lane demonstrates two alleles of equal intensity, whereas T lane shows a shift in intensity to one dominant allele.
B : T lane shows a generation of a novel allele.(N ; normal tissue DNA, T ; tumor tissue DNA)

Table 4. Frequency of microsatellite alteration according to histology and stage

	Microsatellite marker					
	D3S1285		D9S171		TP53	
	MI	LOH	MI	LOH	MI	LOH
Tumor histology						
Squamous cell carcinoma	2	3	1	3	0	6
Adenocarcinoma	0	0	0	0	0	0
Large cell carcinoma	0	0	0	1	0	1
Tumor stage						
I	2	0	1	1	0	3
II	0	1	0	0	0	2
III	0	2	0	2	0	2
IV	0	0	0	1	0	0

MI ; microsatellite instability, LOH ; loss of heterozygosity.



N T

Fig. 6. Representative example of LOH at TP53
N lane demonstrates two alleles of equal intensity, whereas T lane shows a shift in intensity to one dominant allele. (N; normal tissue DNA, T ; tumor tissue DNA)

는 대세포암과 편평세포암에서 빈도가 높았으며 병기에 따른 빈도의 차이는 없었다(Table 4, Fig. 4, 5, 6).

4. FHIT 유전자 변이

FHIT 유전자의 변이를 확인하기 위해 exon 5, 6, 7, 8, 9을 PCR-SSCP을 시행한 결과 11예에서 변이가 관찰되었다. 변이가 있는 띠를 염기서열 분석한 결과 변이는 6예에서 동일하게 exon 8의 nucleotide 565, codon 98에서 염기서열이 CAT가 CAC로 바

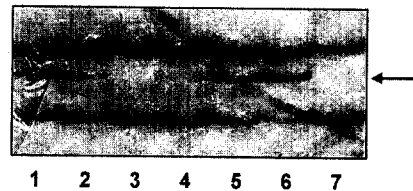


Fig. 7. SSCP by exon-specific genomic PCR of the FHIT gene. The abnormal band (arrow) indicates the presence of mutation.

고 찰

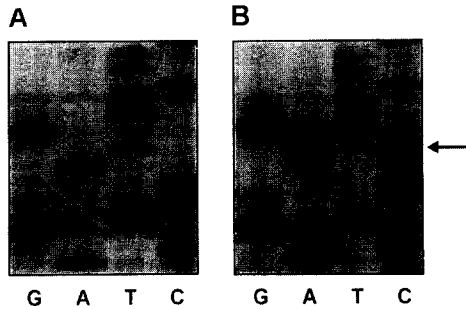


Fig. 8. DNA sequencing of FHIT gene at exon 8
A demonstrates the known wild type sequence, whereas B shows T to C transition at nucleotide 565 (codon 98), representing point mutation.

뛰었으나 아미노산 복제(histidine)에는 영향을 미치지 않는 잠재적 치환이었다(Fig. 7, 8).

5. 전사수준에서의 FHIT 유전자발현

FHIT 유전자에 이상이 있거나 결실이 있는 전사체를 보고자 RT-PCR을 시행한 결과 내부 대조군 인자인 β -actin이 제대로 발현되는 15예중 4예에서 exon 6-9의 해당부위에 결실이 관찰되었다(Fig. 9).



Fig. 9. RT-PCR of FHIT and β -actin

Primers P1f and P1r were used to amplify exon 5-6 and primers P2f and P2r were used to amplify exon 6-9.

폐암의 발생과정은 다른 암의 발생과 마찬가지로 다양한 유전자 이상과 여러 가지 경로 이상을 포함한 다단계 과정이다¹⁵. 잘 알려진 발암물질대사유전자와 같은 다양한 유전자의 유전적 다형성은 개인이 환경적 요인에 노출되었을 때 폐암 발생의 감수성에 영향을 미치고^{16,17} DNA 복구, 세포 성장, 신호 전달 및 세포 주기 조절에 관여하는 유전자들은 폐암으로의 발전 과정 중의 각기 다른 단계에서 손상을 받는다. 암유전자의 활성화나 종양억제유전자의 불활성화, 그리고 결과적인 유전적인 불안정성의 증가는 폐암의 발암과정에서 일어나는 중요 사건으로 작용하며 임상적으로 폐암이 진단되기까지는 약 10내지 20여 가지의 유전적 변화가 축적되는 것으로 알려져 있다¹⁵. 본 연구에서 저자들은 비소세포폐암에서 종양억제유전자인 p53과 FHIT의 돌연변이, FHIT 유전자의 전사체 이상 여부를 확인하고 종양억제유전자부근에 위치하는 극소위성의 유전적 변화를 관찰하였다.

p53 유전자는 염색체의 17p13.1에 위치하고 11개의 exon으로 구성되어 있으며 전사인자로 작용하여 DNA 손상이나 종양유전자의 활성화, 바이러스 감염, 저산소증이나 산화 스트레스시에 세포가 G0/G1기에

머물게 하여 DNA 복구 과정에 직접 관여하며 세포 고사를 조절한다^{3, 18}. 결실, 점돌연변이, 과발현을 포함하는 p53 유전자 변이는 인체 종양에서 흔히 발견되는 이상이며 이러한 변이의 대부분은 exon 5-8에서 발생하는 것으로 알려져 있다^{19, 20}. 비소세포폐암의 경우 p53 유전자 변이는 약 50%에서 보고되고 있고² 세포형에 따라서는 편평세포암에서 높은 빈도를 보인다²¹. 변이는 주로 codon 157, 248, 273에서 일어나고 흡연과 관련된 것으로 알려져 있으며^{3, 22, 23} 특히 가장 흔히 일어나는 GC의 TA로의 transversion은 비흡연자와 비교시 흡연자에서 높은 빈도로 나타나 담배 연기 속의 benzopyrene adduct에 의한 것으로 보고되었다^{21, 23}. 반면에 흡연력이 없는 비소세포폐암을 대상으로 한 연구에서 p53 유전자 변이는 26%의 빈도를 보였다²⁴. 본 연구에서 p53 유전자 변이는 29예 중 단지 2예에서만 관찰되어서 이전의 보고들^{3, 19, 21}과 차이를 보였으며 연구의 대상수가 작으므로 결론을 내리기는 어렵다. SSCP에서 음성을 보인 예에 대해서는 무작위로 exon의 배열을 확인하였으므로 실험상의 문제는 배제할 수 있을 것을 생각된다.

극소위성은 인간 지놈내에 흩어져 분포하는 DNA의 짧은 반복적인 배열로 안정적으로 유전되고 낮은 돌연변이율을 가진다^{25, 26}. 종양 DNA를 이에 상응하는 정상 DNA와 비교하였을 때 한쪽 또는 양쪽 대립 유전자의 확장이나 수축으로 나타나는 극소위성의 불안정성은 mismatch repair gene의 이상으로 생기는 다양한 복제 이상을 반영하는 것으로 알려져 있으며²⁷⁻²⁹, 처음 비유전성 대장암, 직장암과 선천성 비용종성 대장암 연구에서 확인되었고^{30, 31} 이후 다른 종양에서도 기술되었다³²⁻³⁴. 소세포폐암의 경우 dinucleotide 반복의 결실이나 확장 형태의 극소위성 불안정성이 45%에서 보고된 반면³⁵, 비소세포폐암의 경우 극소위성 불안정성의 빈도나 양상에 대해 일치된 결과를 보이지 못하고 있다. 한 보고에 의하면 단일 dinucleotide 표지자에서 7%의 불안정성을 보고하였고⁵ 이와 달리 34%에서 몇 개의 극소위성 표지자가 동시에 불안정성을 나타낸다는 보고도 있다³⁵. 극소위성 불안정

성의 빈도에 대한 상이 차이는 각 연구에 사용된 극소위성 표지자의 다양성^{6, 36, 37}, 각 연구의 대상이 되었던 종양의 병기가 동일하지 않은 이유, 혹은 지리적 또는 인종적 차이로 생겼을 가능성³⁸ 등을 고려해 볼 수 있다. 본 연구에서는 각각 3p, 9p, 17p에 위치하는 3개의 극소위성 표지자에 대한 불안정성이 8%의 빈도로 관찰되었으며 전자와 마찬가지로 단지 하나의 좌위에 국한되어 있었다. 이러한 결과는 폐암과 같이 외부적 노출과 관련된 종양에서 DNA mismatch 경로와 관계되는 유전적 변이는 발암과정에 있어 단지 작은 역할을 함을 제시하는 것으로 생각해 볼 수 있다³⁹.

다양한 염색체 좌위에서 유전물질의 손실은 결과적으로 이형접합성 상실을 유발하며 이는 다양한 인체 종양에서 발견되고 폐암을 포함한 많은 종양의 염색체 3p, 9p, 17p에서 흔히 발견된다⁶. 본 연구에서 염색체 3p, 9p, 17p에서 62%의 이형접합성 상실을 보였으며 좌위별로는 각각 12%, 24%, 26%로 관찰되어 극소위성 불안정성보다는 높은 빈도를 보였다. 이를 세포형에 따라 나누었을 때 선암에 비해 대세포암과 편평세포암에서의 빈도가 높았으며 이는 이전의 보고⁶에서와 일치된 결과였다. 폐암에서 가장 흔히 보이는 유전적 변화의 하나인 3p에서의 이형접합성 상실은 12%로 다른 보고들과 비교시^{6, 40, 41} 낮은 빈도를 보였지만 편평세포암에서 가장 높은 빈도를 보인 것은 일치하였다. 이렇게 낮은 빈도를 보이는 것은 방법론적 차이에 기인한 것일 수 있으며 종양 조직이 정상 조직에 오염된 경우 이형접합성 상실의 빈도가 과소평가될 수도 있다. G1/S에서 세포주기 조절에 관여하는 CDK4 억제자를 포함한 잠정적인 종양억제유전자인 p16 및 p15가 위치하는 9p21에서의 이형접합성 상실은 비소세포폐암을 대상으로 한 연구에서 0-83%로 다양하게 보고되고 있으며^{8, 42, 43} 본 연구에서는 24%로 관찰되었다.

FHIT 유전자는 종양억제유전자로서 염색체 3p14.2에 위치하며 인간 지놈의 가장 취약부위인 FRA3B을 포함하고 있다^{13, 44}. 10개의 exon으로 구성되어 있으며 이중 exon 5-9은 16.8kDa의 단백질을 암호화

하는 open reading frame을 이룬다. FHIT 유전자의 이상은 발암과정에서 일어나는 가장 빈번한 유전적 변화중의 하나이며 폐암 세포주를 대상으로 시행한 유전자의 배열 분석에서 codon 249의 CAT가 CAC로의 잠재치환이 보고되었고⁵ 본 연구에서도 codon 98에서의 동일한 잠재치환이 6예에서 확인되었다. 원발성 폐암에서 FHIT 전사체의 이상은 1996년 처음으로 보고되었으며⁷ 염기배열 분석을 통해 첫 부호결정 exon인 exon 5와 HIT(histidine triad) 영역을 포함하는 exon 8의 손실이 있음을 확인하였다. 폐암 세포주를 대상으로 시행한 연구에서도 시작 methionine codon의 결손을 보이는 비정상 전사체가 관찰되었으며⁸ 비소세포폐암에서 FHIT 전사체 이상의 빈도는 29-40%로 다양하게 보고되었다^{7-9, 45}. 본 연구에서 전사체 이상의 빈도는 27%였고 모두 exon 8의 손실을 포함하고 있어 다른 연구 결과와 유사하였다.

이상으로 비소세포폐암 발생에 p53, FHIT 유전자의 변이, 극소위성 불안정성 및 이형접합성 상실 등 다양한 분자유전학적 기전이 복합적으로 작용할 것으로 생각되며 이러한 발암과정에 대한 이해는 예방, 진단 및 치료적 접근을 발전시키는데 도움을 줄 수 있을 것이고 향후 이들에 관한 기능적 연구들이 수행되어야 하겠다.

요 약

연구배경 :

폐암의 발생과정은 다양한 유전자 이상과 여러 가지 경로 이상을 포함한 다단계 과정이다. 암유전자의 활성화나 종양억제유전자의 불활성화, 그리고 결과적인 유전적 불안정성의 증가는 폐암의 발암과정에서 일어나는 주요한 사건이며 임상적으로 폐암이 진단되기까지 10내지 20여 가지의 유전적 변화가 축적되는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 저자들은 비소세포폐암에서 종양억제유전자인 p53과 FHIT의 돌연변이, FHIT 유전자의 전사체 이상 여부를 확인하고 종양억제유전자부근에 위치하는 극소위성의 유전적 변화를 관찰하였다.

대상 및 방법 :

비소세포폐암으로 진단된 후 외과적 적출술을 시행한 환자 29명의 생검조직과 그에 대응하는 동일인의 정상조직을 대상으로 하였다. p53과 FHIT의 돌연변이 여부는 PCR-SSCP, DNA 염기분석으로 확인하였고 D3S1285, D9S171, TP53에서 극소위성 불안정성과 이형접합성 상실은 PCR로 확인하였다. FHIT 유전자의 전사체 이상 여부 확인을 위해서는 RT-PCR을 사용하였다.

결 과 :

1) p53 유전자의 변이는 2예에서 관찰되었고 모두 exon 5에서 1개의 염기가 치환되는 점돌연변이였다.

2) 극소위성 불안정성은 D3S1285와 D9S171에서 각각 2예, 1예, 이형접합성 상실은 D3S1285, D9S171, TP53에서 각각 3예, 4예, 7예가 관찰되었다.

3) FHIT 유전자의 변이는 11예에서 관찰되었으며 이중 6예는 exon 8의 codon 98에서 염기서열이 CAT가 CAC로 바뀌는 잠재적 치환이였다.

4) FHIT 유전자의 전사체 이상은 β -actin이 제대로 발현되는 15예중 4예에서 관찰되었으며 exon 6-9의 결실로 확인되었다.

결 론 :

이상으로 비소세포폐암 발생에 p53, FHIT 유전자의 변이, 극소위성 불안정성과 이형접합성 상실 등 다양한 분자유전학적 기전이 복합적으로 작용할 것으로 생각되며 이번 연구에서 조사된 유전적 이상의 빈도는 앞서 발표된 서양의 연구결과와 대체적으로 일치한다. 특히 극소위성의 분석은 편평세포암에서 종양표지자로서의 역할이 기대된다. 이런 발암과정에 대한 이해는 예방, 진단 및 치료적 접근을 발전시키는데 도움을 줄 수 있을 것이고 향후 이들에 관한 기능적 연구들이 수행되어야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. Skarin A. A analysis of long term survivors with small-cell lung cancer. Chest 1993;103:440S-4S.

2. Sidransky D, Hollstein M. Clinical implication of the p53 gene. *Annu Rev Med* 1996;47:285-301.
3. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994;54:4855-78.
4. Takahashi T, Nau MM, Chiba I, Birrer MJ, Rosenberg RK, Vinocour M, et al. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 1989;246:491-4.
5. Fong KM, Zimmerman PV, Smith PJ. Microsatellite instability and other molecular abnormalities in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1995;55:28-30.
6. Pylkkanen L, Karjalainen A, Anttila S, Vainio H, Husgafvel-Pursiainen K. No evidence of microsatellite instability but frequent loss of heterozygosity in primary resected lung cancer. *Environ Mol Mutagen* 1997;30:217-23.
7. Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, Baffa R, Coticelli MG, Inoue H, et al. The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell* 1996;85:17-26.
8. Yanagisawa K, Kondo M, Osada H, Uchida K, Takagi K, Masuda A, et al. Molecular analysis of the FHIT gene at 3p14.2 in lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1996;56:5579-82.
9. Fong KM, Biesterveld EJ, Virmani A, Wistuba I, Sekido Y, Bader SA, et al. FHIT and FRA3B 3p14.2 allele loss are common in lung cancer and preneoplastic bronchial lesions and are associated with cancer-related FHIT cDNA splicing aberrations. *Cancer Res* 1997;57:2256-67.
10. Kreyberg L. Histological typing of lung tumors. Geneva: WHO; 1981. p.1-36.
11. Mountain CF. Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest* 1997;111:1711-17.
12. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-67.
13. Druck T, Hadaczek P, Fu TB, Ohta M, Siprashuli E, Baffa R, et al. Structure and expression of human FHIT gene in normal and tumor cells. *Cancer Res* 1997;57:504-12.
14. Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2725-9.
15. Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH, Turrissi AT. Lung cancer: principles and practice. 1st ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p.143-8.
16. Caporaso N, Landi MT, Vineis P. Relevance of metabolic polymorphisms to human carcinogenesis: evaluation of epidemiologic evidence. *pharmacogenetics* 1991;1:4-19.
17. Nakachi K, Imai K, Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose. *Cancer Res* 1991;51:5177-80.
18. Harris CC. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinician abridged historical perspective. *Carcinogenesis* 1996;17:1187-98.
19. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49-53.
20. Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell* 1992;70:523-6.
21. Chiba I, Takahashi T, Nau M, D'Amico D, Curiel D, Mitsudomi T, et al. Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1990;5:1603-10.

22. Kishimoto Y, Murakami Y, Shiraishi M, Hayashi K, Sekiya T. Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res* 1992;52:4799-804.
23. Miller CW, Simon K, Aslo A, Kok K, Yokota J, Buys CHCM, et al. p53 mutations in human lung tumors. *Cancer Res* 1992;52:1695-8.
24. Takagi Y, Osada H, Kuroishi T, Mitsudomi T, Kondo M, Niimi T, et al. p53 mutations in non-small cell lung cancer occurring in individuals without a past history of active smoking. *Br J Cancer* 1998;77:1568-72.
25. Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989;44:388-96.
26. Hearne CM, Gnosh S, Todd JA. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genet* 1992;8:288-94.
27. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;75:1027-38.
28. Fishel R, Kolodner R, Liskay M. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994;368:258-61.
29. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1994;77:167.
30. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkanen L, Mecklin JP, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993;260:812-6.
31. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-9.
32. Wooster R, Cleton-Jansen AM, Collins N, Mangion J, Cornrlis RS, Cooper CS, et al. Instability of short tandem repeats(microsatellites) in human cancers. *Nature Genet* 1994;6:152-6.
33. Rhyu MG, Park WS, Melzer SJ. Microsatellite instability occurs frequently in human gastric carcinoma. *Oncogene* 1994;9:29-32.
34. Yee CJ, Rodi N, Verrier CS, Parl FF. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer. *Cancer Res* 1994;54:1641-4.
35. Merlo A, Mabry M, Gabrielson E, Vollmer R, Baylin SB, Sidransky D. Frequent microsatellite instability in primary small cell lung cancer. *Cancer Res* 1994;54:2098-101.
36. Shridhar V, Siegfried J, Hunt J, del Mar Alonso M, Smith DI. Genetic instability of microsatellite sequences in many non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 1994;54:2084-7.
37. Peltomaki P, Lothe RA, Aaltonen LA, Pylkanen L, Nystrom-Lahti M, Seruca R, et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 1993;53:5853-5.
38. Johansson B, Mertens F, Mitelman F. Geographic heterogeneity of neoplasia-associated chromosome aberrations. *Genes Chromosomes Cancer* 1991;3:1-7.
39. Speicher MR. Microsatellite instability in human cancer. *Oncology Res* 1995;7:267-75.
40. Tsuchiya E, Nakamura Y, Weng SY, Nakagawa K, Tsuchiya S, Sugano H, et al. Allelotype of non-small cell lung carcinoma : comparison between

- loss of heterozygosity in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *Cancer Res* 1992;52:2478-81.
41. Sato S, Nakamura Y, Tsuchiya E. Difference in allelotype between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Cancer Res* 1994; 54:5652-5.
42. Merlo A, Gabrielson E, Askin F, Sidransky D. Frequent loss of chromosome 9 in human primary non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1994;54:640-2.
43. Spanakis NE, Gorgoulis V, Mariatos G, Zacharatos P, Kotsinas A, Garinis G, et al. Aberrant p16 expression in correlated with hemizygous deletions at the 9p21-22 chromosome region in non-small cell lung carcinomas. *Anticancer Research* 1999;19:1893-900.
44. Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, et al. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 1996; 84:587-97.
45. Tokuchi Y, Kobayashi Y, Hayashi S, Hayashi M, Tauimoto K, Hashimoto T, et al. Abnormal FHIT transcripts found in both lung cancer and normal lung tissue. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 24:105-11.
-