

Microarray comparative genomic hybridization을 이용한 진행된 장액성 난소암의 염색체 변화 분석

연세대학교 의과대학 산부인과학교실, 부인암전문클리닉
김상운 · 김재욱 · 김영태 · 김재훈 · 김성훈 · 윤보성 · 남은지

목적 : 진행된 장액성 난소암에서 특징적인 염색체의 변화를 microarray comparative genomic hybridization (mCGH)을 이용하여 알아보고 항암제 저항성 난소암에서 특징적인 염색체 변화가 무엇인지 알아보고자 하였다.

연구 방법 : 성공적인 일차 종양감축술(optimal cytoreductive surgery) 후 platinum을 기초로 한 복합항암화학요법을 시행 받은 장액성 난소암 병기 IIIc인 환자를 대상으로 하였다. 총 17명의 난소암 환자의 암 조직에서 DNA를 추출하여 MACArray™- Karyo 4 K BAC-chip을 이용하여 염색체의 변화를 분석하였다. 항암제 투여 시작 후 36개월 이상 재발하지 않은 7명의 환자를 항암제 감수성 난소암(대조군)으로 분류하였고 항암제 투여 시작 후 12개월 이내에 병이 진행된 10명의 환자를 항암제 저항성 난소암(시험군)으로 분류하였다.

결과 : 4,000개의 BAC clone 중 대조군에서 증가를 보인 clone의 수는 평균 288개(7.2%)이었고 감소를 보인 clone의 수는 평균 508개(12.7%)이었다. 시험군에서는 증가를 보인 clone의 수는 평균 450개(11.3%)이었고 감소를 보인 clone의 수는 평균 860개(21.5%)이었다($p=0.007$). 대조군과 시험군에 공통적으로 증가되어 있는 염색체는 1p36.33, 3q26.2, 8q24.3, 10q26.3, 12p11.21, 20q13.33, 21q22.3이었고 감소되어 있는 염색체는 4p12, 5q13.2, 7q11.21, 8p23.1, 14q32.33, Xq13.3-Xq21.1, Xq21.31이었다. 시험군에서만 통계적으로 유의하게 증가되어 있는 염색체는 5p15.33와 14q11.2이었고 감소되어 있는 염색체는 4q34.2, 4q35.2, 5q15, 8p21.1, 8p21.2, 11p15.5, 13q14.13, 13q14.2, 13q32.1, 13q34, 16q22.2, 17p11.2, 17p12, 22q12.3이었다.

결론 : 항암제 저항성 난소암의 mCGH 분석 결과 염색체 소실이 증가보다 더 많았고 그 중에 염색체 13q32.1과 8p21.1의 소실이 항암제 감수성 난소암보다 가장 유의하게 차이가 있는 것으로 나타났다. 난소암에서 염색체의 소실이 많을수록 항암제 저항성을 보일 가능성이 높을 것으로 판단된다. 그러나 이런 결과를 확인하기 위해서는 향후 추가적인 연구가 더 필요하다고 생각된다.

중심단어 : 난소암, 항암제 저항성, 염색체 변이

서론

난소암은 부인암의 약 1/4을 차지하고 있으나 사망률은 가장 높은 암이다. 난소암은 조기발견이 어려워 대부분의 환자가 많이 진행된 상태에서 발견되고 예후가 나빠지며 평균 5년 생존율은 35%이고 stage IIIc 환자는 27%

로 매우 낮은 5년 생존율을 보이고 있다. 난소암의 치료는 일차적으로 종양감축술(optimal debulking operation)을 시행 후 cisplatin (or carboplatin)과 paclitaxel 병행요법(platinum-based combination chemotherapy)을 시행한다. 그러나 일부 환자에서는 항암요법시행 후에도 병이 계속 잔존하거나 시행 도중에 병이 진행되기도 한다. 이러한 경우를 항암제 저항성 암(chemoresistant disease)이라고 하는데 이런 환자의 예후는 항암제 감수성 암(chemo-sensitive disease) 환자보다 더욱 예후가 나빠다. 지금까지 난소암 환자의 암조직의 염색체 이상을 발견하기 위한 여러 연구들이 많이 있었으며¹⁻⁴ 일부 cisplatin-resistant cancer에 대한 염색체 이상을 발견하기 위한 연구도

논문접수일 : 2006년 8월 26일 채택일 : 2006년 9월 22일
교신저자 : 김영태, 120-752 서울시 서대문구 신촌동 134번지
연세대학교 의과대학 산부인과학교실
전화 : 02) 2228-2230 · 전송 : 02) 313-8357
E-mail : ytkchoi@yumc.yonsei.ac.kr
제20차 대한부인종양-골프스코피학회 학술대회에서 구연 발표하였으며 우수논문상(구연)을 수상하였음.

일부 있었다.⁵⁻⁷

지금까지 암 조직에 대한 염색체 이상을 알아보기 위한 방법으로는 염색체분석(karyotyping), Fluorescence in Situ Hybridization (FISH), metaphase comparative genomic hybridization 등이 있었다. 그러나 염색체분석(karyotyping)과 FISH는 방법이 어렵고 시간도 많이 걸리는 단점이 있으며 상세한 염색체의 구조변화를 알기도 어렵다. 또한 metaphase CGH는 염색체분석(karyotyping)이나 FISH 보다는 쉽고 빨리 결과를 알 수 있으나 resolution이 5-10Mbp 정도로 낮아서 어떤 유전자가 증폭(chromosomal gain) 또는 소실(loss)되었는지는 정확히 알 수 없고 microdeletion이나 microduplication은 확인할 수 없는 단점이 있다. 이런 단점을 어느 정도 보완해 줄 수 있는 방법으로 bacterial artificial chromosome (BAC)을 이용하여 최대 100Kbp 정도의 resolution을 가지고 있는 microarray comparative genomic hybridization (mCGH)가 개발되었다. 현재까지 난소암 환자의 암 조직에서 mCGH를 이용한 연구는 많지 않으며 특히 암 조직의 항암제 감수성(chemosensitivity)과 관련된 연구는 Bernardini 등의 연구 이외에는 드물다.⁵ 따라서 본 연구에서는 mCGH를 이용하여 진행된 장액성 난소암에서 공통적으로 관찰되는 염색체 변화를 알아보고, 항암제 감수성 암환자와 항암제 저항성 암환자의 암 조직에서 염색체 변화의 차이를 분석하여 난소암 환자들의 항암제 감수성 여부를 염색체의 변화 분석을 통해서 예측할 수 있는지를 알아보고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구대상

난소암의 병기와 잔류종양의 크기에 따라 환자의 예후가 다르기 때문에 성공적으로 일차 종양감축술이 가능했던 장액성 난소암(serous ovarian cancer) 병기 IIIC 환자 17명을 대상으로 하였다. 모든 환자는 수술 후 platinum을 기초로 한 6회의 보조항암화학요법을 시행하였다. 항암제 감수성을 보인 환자(chemosensitive disease)가 7명(대조군)이었고 항암제 저항성을 보인 환자(chemoresistant disease)가 10명(시험군)이었다. 항암제 저항성 암(chemoresistant disease)의 정의는 보조항암화학요법 시작 후 12개월 이내에 병이 진행되는 것으로 하

였고 항암제 감수성 암(chemosensitive disease)은 보조항암화학요법 시작 후 36개월 이상 재발 징후가 없는 경우로 정의하였다. 병의 진행은 병의 치료 시작 시점에는 없던 새로운 병변이 발생하거나 CA-125가 이전 검사 결과에 비해 25% 이상 증가하는 경우로 정의하였다. 항암제 투여는 3주 간격으로 투여하였으며 매회마다 항암제 투여 전에 CA-125를 측정하였으며 CA-125가 증가하는 경우에는 자기공명영상이나 컴퓨터단층촬영술을 시행하여 병의 진행이나 재발여부를 판단하였다. 치료 후 추적 관찰은 보조항암화학요법 종료 1개월 후에는 CA-125와 컴퓨터단층촬영술을 시행하였고 1년 동안은 2개월 간격으로 CA-125를 측정하였고 6개월 간격으로 컴퓨터단층촬영술을 시행하였다. 2년째에는 3개월 간격으로 CA-125를 측정하였고 6개월 간격으로 컴퓨터단층촬영술을 시행하였으며, 3년째에는 4개월마다 CA-125를 측정하였고 6개월 간격으로 컴퓨터단층촬영술을 시행하였으며 그 이후로는 6개월마다 CA-125를 측정하였고 1년마다 컴퓨터단층촬영술을 시행하였다.

2. Genomic DNA preparation and microarray CGH

11개의 snap-frozen ovarian cancer tissue와 6개의 paraffin archived tumor tissues에서 Gentra Puregene DNA isolation kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA)을 이용하여 Isola 등이 기술한 바와 같이 genomic DNA를 추출하였다.⁸ 1% agarose gel을 이용하여 genomic DNA의 quality를 확인하고 흡광도계(spectrophotometer)를 이용하여 genomic DNA의 농도를 측정하였다. Microarray-CGH에 사용한 chip은 MACArray™-Karyo 4 K BAC-chip (Macrogen, Seoul, Korea, www.macrogen.co.kr)으로서 약 1 Mb interval을 보이는 4,000개의 BAC clones가 2중으로 놓여져 있다. Pinkel 등이 기술한 labeling and hybridization protocols을 약간 변형하여 실험하였다.⁹ 우선 2µg of tumor DNA (test DNA)와 normal DNA (reference DNA)를 Dpn II (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)를 이용하여 하룻밤 동안 절단하고 purification한 후 digested test 또는 reference DNA 500ng (21µl solution)과 20 µl의 BioPrime® DNA Labeling System random primers solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 증류수를 95°C에서 5분간 방치한 후 얼음에 식혔다. 10x dNTPs labeling mix (1 mM dCTP, 2 mM dATP, 2 mM dGTP, 2 mM dTTP)

5 μ l, 1 mM Cy-3 dCTP (for test DNA) or Cy-5 dCTP (for reference DNA)(GeneChem, Montreal, Canada) 3 μ l, BioPrime[®] DNA Labeling System Klenow fragment (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 40 U을 혼합하고 부드럽게 섞은 후에 37°C에서 하룻밤 동안 방치하였다. BioPrime[®] DNA Labeling System Stop Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 5 μ l를 첨가하여 반응을 종료시킨 후 QIA-quick Spin columns (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)을 이용하여 unincorporated fluorescent nucleotides를 제거하였다. Cy3-labeled test DNA and Cy5-labeled reference DNA를 100 μ g human Cot I DNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 혼합하고 20 μ l 3M sodium acetate와 600 μ l cold 100% ethanol을 이용하여 침전시킨 후 침전물을 40 μ l hybridization solution (50% formamide, 10% dextran sulfate, 2x SSC, 4% SDS, 200 ug yeast tRNA)에 녹였다. Hybridization solution을 72°C에서 10분간 denaturation시킨 후 37°C에서 1시간 동안 방치한 후 37°C slide chambers 에서 48시간 동안 hybridization시켰다. Post-hybrid-

ization washes와 dry 후에 GenePix4200A two-color fluorescent scanner (Axon Instruments, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 영상을 얻은 후에 GenePix software (Axon Instruments, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 각 BAC clone의 log₂ transformed fluorescent ratios를 계산하여 0.25보다 크면 염색체 증가(chromosomal gain), -0.25보다 작으면 염색체 소실(chromosomal loss)로 판단하였다. 통계적 처리는 SPSS 12.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하였으며, 두 군의 환자 중 70% 이상에서 공통적으로 증가되어있거나 소실되어있는 BAC clones을 선택하였다. 두 군 간에 DNA copy 수의 변화에 차이가 있는지를 알아보기 위하여 Mann-Whitney U test를 이용하였다. 두 군 간에 유의한 차이를 보이는 BAC clone을 선택하기 위하여 Fisher's exact test를 시행하였다.

결 과

항암제 감수성 난소암 환자 7명과 항암제 저항성 난소

Table 1. Clinico-pathologic characteristics and number of BAC clones with DNA copy number aberrations of the 17 optimally debulked stage IIIc serous ovarian carcinoma cases

Case no.	Age (years)	Histologic grade	CA125 (U/ul)	Initial chemotherapy	PFS (months)	Follow-up (months)	Gain (%)	Loss (%)	Total (%)
Chemosensitive diseases									
S1	44	1	142	TP	33	ANEC 33	341 (9)	871 (22)	1,212 (30)
S2	55	3	564	TP	40	ANEC 40	315 (8)	552 (14)	867 (22)
S3	44	2	488	TP	45	ANEC 45	526 (13)	830 (21)	1,356 (34)
S4	53	3	805	TP	46	ANEC 47	8 (0.2)	61 (2)	69 (2)
S5	44	2	298	TP	46	ANEC 47	144 (4)	91 (2)	235 (6)
S6	63	3	29	TP	46	ANEC 47	115 (3)	164 (4)	279 (7)
S7	51	3	953	TP	55	ANEC 55	566 (14)	987 (25)	1,553 (39)
Chemoresistant diseases									
R1	40	3	2,402	TP	6	DOC 16	265 (7)	389 (10)	654 (16)
R2	55	3	3,065	TP	3	DOC 11	573 (14)	1,087 (27)	1,660 (42)
R3	45	3	69	TP	5	AWC 35	594 (15)	935 (23)	1,529 (38)
R4	50	2	310	TP	7	DOC 16	321 (8)	603 (15)	924 (23)
R5	66	3	1,371	PAC	6	DOC 10	547 (14)	1,081 (27)	1,628 (41)
R6	37	3	2,351	TP	8	AWC 24	425 (11)	879 (22)	1,304 (33)
R7	23	1	166	PC	10	DOC 27	343 (9)	248 (6)	591 (15)
R8	50	3	560	TP	12	DOC 25	409 (10)	1,363 (34)	1,772 (44)
R9	65	3	2,451	TP	12	DOC 19	454 (11)	967 (24)	1,421 (36)

TP; paclitaxel/carboplatin, PAC; carboplatin/cyclophosphamide/doxorubicin, PC; carboplatin/cyclophosphamide, ANEC; alive with no evidence of cancer, DOC; died of cancer, AWC; alive with cancer

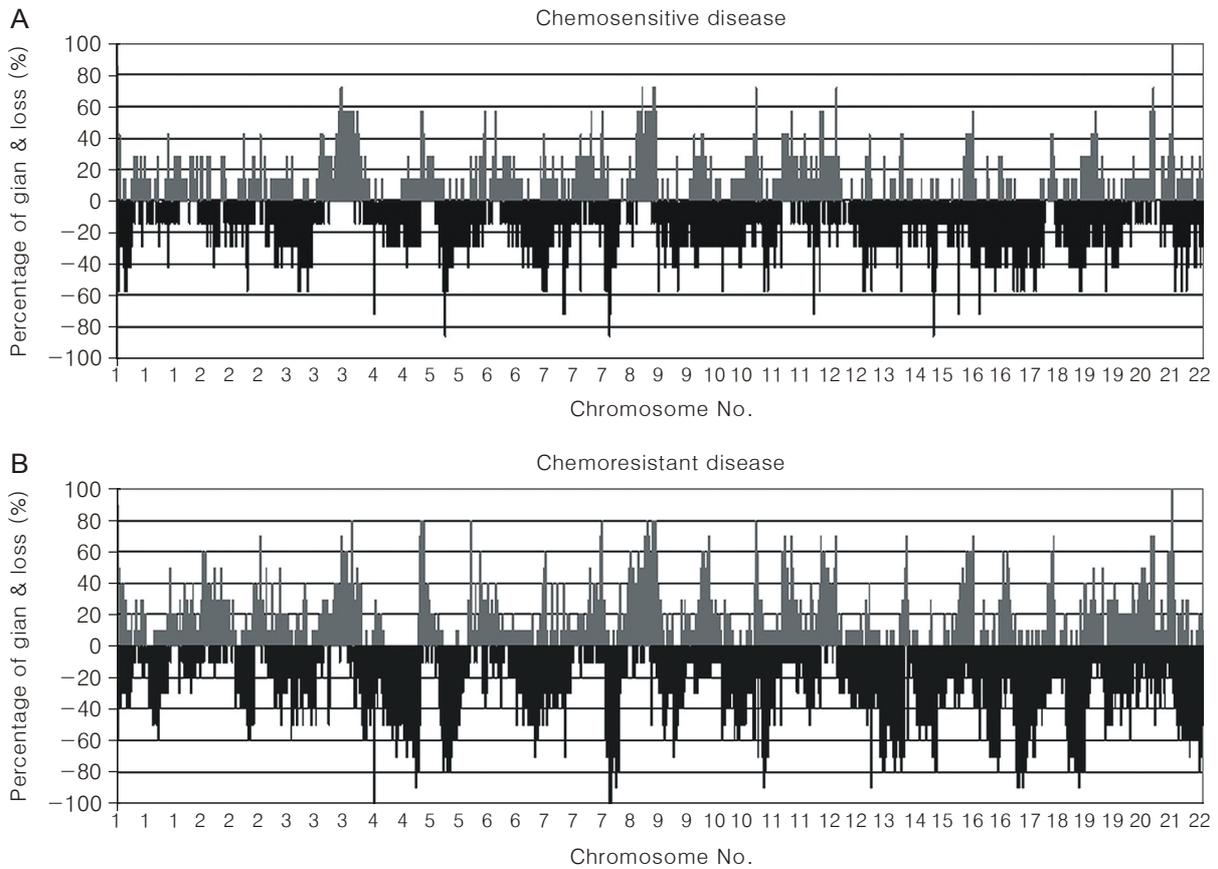


Fig. 1. The frequency plot of DNA copy number changes at chromosome 1-22 is shown for 7 chemosensitive diseases (A) and 10 chemoresistant diseases (B). Cumulative results per chromosomal region for each tumor group are presented. Gain and loss is indicated in gray and black, respectively.

암 환자 10명을 대상으로 하였으며 중앙 추적 기간 (median follow-up period)은 27개월(범위: 10-55개월)이었다(Table 1). 각각의 중앙에서의 Microarray CGH 검사 결과는 Fig. 1과 Table 1에 나타내었다. 항암제 감수성 난소암 환자(chemosensitive diseases)에서 4,000개의 BAC clones 중 염색체 증가(chromosomal gain) 또는 염색체 소실(chromosomal loss)을 보인 clones은 평균 288개(7.2%)와 508개(12.7%)이었으며 염색체 소실이 더 많은 양상을 보였다($p=0.051$)(Table 2). 항암제 저항성 난소암 환자(chemoresistant diseases)에서는 염색체 증가 또는 소실을 보인 clones은 각각 평균 450개(11.3%)와 860개(21.5%)이었으며 염색체 소실이 유의하게 많았다($p=0.007$). 항암제 저항성 난소암 환자와 항암제 감수성 난소암 환자에서 염색체 증가나 감소를 보인 clones의 총 수는 중앙값이 각각 1,475 (interquartile range; 857-1636)와 867 (interquartile range; 235-1356)로 항암제 저항성 난소암

Table 2. Number of BAC clones with DNA copy number aberrations in the chemosensitive and chemoresistant diseases

	Mean±SD		p
	Gain	Loss	
Chemosensitive diseases	288±210	508±399	0.051
Chemoresistant diseases	450±118	860±360	0.007
p	0.07	0.043	

환자에서 염색체 이상을 보인 clones이 더 많은 경향을 보였다($p=0.055$). 염색체 소실을 보인 clones은 항암제 감수성 난소암 환자보다 항암제 저항성 난소암 환자에서 유의하게 많았으며($p=0.043$) gain도 항암제 저항성 난소암 환자에서 더 많은 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다($p=0.07$). 항암제 감수성 난소암 환자와 항

Table 3. Chromosomal aberrations more frequently identified in chemoresistant diseases

Aberrations	BAC_START	Frequency (%)		p	Genes
		Control group	Study group		
-4q34.2	177,022,812	14 (1/7)	70 (7/10)	0.036	<i>GPM6A</i>
-4q35.2	187,969,726	29 (2/7)	90 (9/10)	0.018	<i>FAT</i>
+5p15.33	203,816	14 (1/7)	70 (7/10)	0.036	<i>SDHA</i>
-5q15	94,577,749	14 (1/7)	70 (7/10)	0.036	None
-8p21.1	28,537,260	0 (0/7)	70 (7/10)	0.006	<i>DOCK5, GNRH1, KCTD9, CDCA2</i>
-8p21.1A	28,628,117	14 (1/7)	70 (7/10)	0.036	<i>DPYSL2</i>
-8p21.2	25,280,064	14 (1/7)	80 (8/10)	0.013	<i>EXTL3</i>
-8p21.2A	26,505,249	29 (2/7)	90 (9/10)	0.018	<i>EXTL3, RC74</i>
-11p15.5	202,626	14 (1/7)	70 (7/10)	0.036	<i>RIC8, SIRT3, PSM13, COX8B, NALP6, FLJ22635, MRPS24P1, IFITM2</i>
-13q14.13	45,575,222	14 (1/7)	70 (7/10)	0.036	<i>CPB2, LCP1</i>
-13q14.2	49,413,927	14 (1/7)	70 (7/10)	0.036	<i>RFP2, KCNRG</i>
-13q14.2A	49,506,422	14 (1/7)	70 (7/10)	0.036	<i>DLEU2, DLEU1, FLJ31945</i>
-13q32.1	96,900,316	0 (0/7)	80 (8/10)	0.002	<i>RAP2A</i>
-13q34	114,027,501	14 (1/7)	70 (7/10)	0.036	<i>CDC16, UPF3A, C13orf8</i>
+14q11.2	23,562,393	14 (1/7)	70 (7/10)	0.036	<i>C14orf121, CPNE6, NRL, PCK2</i>
-16q22.2	70,065,754	14 (1/7)	70 (7/10)	0.036	<i>ZNF19, CHST4</i>
-17p11.2	18,551,708	29 (2/7)	90 (9/10)	0.018	<i>HS3ST3B1</i>
-17p12	14,132,966	14 (1/7)	80 (8/10)	0.013	<i>PMP22</i>
-17p12A	15,031,462	29 (2/7)	90 (9/10)	0.018	<i>FBXW10, FAM18B</i>
-22q12.3	31,510,139	14 (1/7)	70 (7/10)	0.036	<i>SYN3, TIMP3</i>

-; loss, +; gain

암제 저항성 난소암 환자의 70% 이상에서 공통적으로 증가되어있는 염색체는 1p36.33, 3q26.2, 8q24.3, 10q26.3, 12p11.21, 20q13.33, 21q22.3이었고 공통적으로 소실되어 있는 염색체는 4p12, 5q13.2, 7q11.21, 8p23.1, 14q 32.33, Xq13.3, and Xq21.31이었다.

항암제 저항성 난소암 환자에서만 유의하게 많은 것으로 나타난 염색체 증가 부위는 5p15.33와 14q11.2이었고 염색체 소실 부위는 4q34.2, 4q35.2, 5q15, 8p21.1, 8p21.2, 11p15.5, 13q14.13, 13q14.2, 13q32.1, 13q34, 16q 22.2, 17p11.2, 17p12, 22q12.3이었다(Table 3). 각각의 해당 염색체 부분에 존재하는 모든 유전자를 Table 3에 표시하였다. 항암제 저항성 난소암 환자를 가장 잘 예측할 수 있는 염색체 변화를 알아보기 위하여 ROC curve 분

석을 시행한 결과 AUC가 가장 큰 것은 염색체 13q32.1의 소실이었고(AUC=0.900) 그 다음은 8p21.1의 소실이 있었다(AUC=0.850)(Table 4).

고 찰

여러 가지 원인으로 인해 진행된 상피성 난소암은 낮은 생존율을 보이는데 그 다양한 원인 중에 하나는 일부 난소암세포가 항암제에 저항성을 보이기 때문이다. 이런 항암제에 저항성을 나타내는 난소암에서의 특징적인 염색체변화를 알아보기 위한 연구가 그 동안 진행이 되어왔는데 그 중에서 Bernardini 등이 발표한 연구에 의하면 염색체 1p36, 1q42-44, 6p22.1-p21.2, 7q32.1-q34,

Table 4. ROC curve analysis of each chromosomal aberration

Aberrations	AUC	p	95% confidence interval		Sensitivity (%)	Specificity (%)
			Lower bound	Upper bound		
-4q34.2	0.779	0.057	0.545	1.012	70	86
-4q35.2	0.807	0.036	0.574	1.04	90	71
+5p15.33	0.779	0.057	0.545	1.012	70	86
-5q15	0.779	0.057	0.545	1.012	70	86
-8p21.1	0.85	0.017	0.66	1.04	70	100
-8p21.1A	0.779	0.057	0.545	1.012	70	86
-8p21.2	0.829	0.025	0.615	1.042	80	86
-8p21.2A	0.807	0.036	0.574	1.04	90	71
-11p15.5	0.779	0.057	0.545	1.012	70	86
-13q14.13	0.779	0.057	0.545	1.012	70	86
-13q14.2	0.779	0.057	0.545	1.012	70	86
-13q14.2A	0.779	0.057	0.545	1.012	70	86
-13q32.1	0.9	0.006	0.741	1.059	80	100
-13q34	0.779	0.057	0.545	1.012	70	86
+14q11.2	0.779	0.057	0.545	1.012	70	86
-16q22.2	0.779	0.057	0.545	1.012	70	86
-17p11.2	0.829	0.025	0.615	1.042	80	86
-17p12	0.807	0.036	0.574	1.04	90	71
-17p12A	0.807	0.036	0.574	1.04	90	71
-22q12.3	0.779	0.057	0.545	1.012	70	86

ROC: receiver operating characteristics; AUC: area under the ROC curve

9q33.3-q34.3, 11p15.2, 13q12.2-q13.1, 13q21.31, 17q11.2, 17q24.2-q25.3, 18q12.2, 21q21.2-q21.3 등의 변이가 항암제 감수성 여부와 연관이 있다고 하였으며 그 중에서 염색체 1p36, 18q12.2, 21q21.2-q21.3의 소실과 염색체 1q42-44의 증가가 10개의 항암제 저항성 난소암 조직에서 유의하게 많았다고 보고하였다.⁵ 이번 연구에서는 염색체 5p15.33과 14q11.2의 증가와 염색체 4q34.2, 4q35.2, 5q15, 8p21.1, 8p21.2, 11p15.5, 13q14.13, 13q14.2, 13q32.1, 13q34, 16q22.2, 17p11.2, 17p12, 22q12.3의 소실이 항암제 저항성 난소암에서 유의하게 증가되어 있었으며 Bernardini 등의 연구 결과와⁵ 일치하는 염색체의 변화는 없었다. 이번 연구가 Bernardini 등의 연구와⁵ 차이를 보이는 원인으로는 두 연구 모두 대상 환자가 많지 않아서 발생하였을 가능성이 있고 또한 Bernardini 등의 연구에서는 일부 환자에서 병기와 일차 종양감축술의 성공 여부가 다르기 때문에 이런 임상적 예후인자의 영향으로 인하여 차이가 있을 가능성도 있다고 판단된다.⁵ 한편 Hu 등은 2p22p25, 19p12q13.1, 20q12q13의 증가와 5q14q22

의 소실이 항암제 저항성과 연관이 있을 것이라고 보고 하였는데 5q14q22의 소실만이 이번 연구에서 보인 5q15의 소실과 일치하였다.¹

ROC curve 분석 결과 염색체 13q32.1 (chr13: 96,900,316-97,000,000)과 8p21.1 (chr8: 28,537,260-28,628,117)의 소실이 가장 유의하게 차이가 있는 것으로 나타났다. 염색체 13q32.1에는 *Rap2A* 유전자가 존재하고 염색체 8p21.1에는 *EXTL3* (EXT-like gene 3)과 *RC74* 유전자가 존재한다. Rap는 Ras-dependent signaling을 억제하는 anti-mitogenic protein이며 Rap2A는 Rap2의 subfamily인 것으로 알려져 있다.¹⁰ *EXTL3* 유전자는 *EXT-EXTL* gene family의 구성원이고 *EXT1*과 *EXT2* 유전자는 종양억제 유전자(tumor suppressor gene)로 알려져 있다. *EXTL* 유전자는 종양억제 유전자인 *EXT* 유전자와 유사한 염색체 서열을 가지고 있어서 *EXTL* 유전자도 종양억제 기능을 할 것으로 제시되었다.¹¹ 이런 종양억제 유전자의 소실이 난소암의 항암제 저항성을 증가시키는 한가지 원인으로 작용할 가능성은 있으나 아직까지 정확히 밝혀진 바가

없으므로 추가적인 연구를 통하여 항암제 저항성과의 관계가 명확히 규명되어야 할 것으로 판단된다.

Bernardini 등은 항암제 감수성 난소암에 비하여 항암제 저항성 난소암에서 약 두 배 정도 더 많은 염색체 변이(chromosomal imbalance)가 발견되었다고 보고하였는데⁵ 본 연구에서도 항암제 저항성 난소암에서 더 많은 염색체의 증가나 소실을 보였으며 그 중 염색체 소실(chromosomal loss)은 통계적으로 유의하게 더 많았다. 항암제 감수성 난소암과 항암제 저항성 난소암 조직에서 염색체 변이의 공통적인 특징으로는 염색체 소실이 염색체 증가보다 더 많았다는 것이다. 이 결과는 난소암에서는 염색체의 증가보다는 염색체의 소실이 더 많은 것을 보여주고 또한 염색체의 변이가 많을수록 난소암의 발생이 증가하고 항암제에 더욱 저항성을 나타내게 될 수 있다는 것을 보여준다. 특히 염색체의 소실이 많을수록 상피성 난소암이 항암제에 더 저항성을 보이게 되는 것으로 판단된다.

이번 연구에 사용된 MACArray™-Karyo 4 K BAC-chip에는 4,000개의 BAC clone이 각각 두 개씩 배치되어 있어서 실험상의 오류를 최대한 줄여 줄 수 있도록 하였지만 그럼에도 불구하고 mCGH 검사 자체의 오류 가능성이 있을 수 있기 때문에 mCGH 검사만으로는 해당 염색체 부위가 증가 또는 소실되었다고 단정할 수는 없으며 FISH나 real-time PCR을 통한 추가적인 검증이 필요할 것이다. 그러나 전체적인 염색체의 증가나 감소 양상을 파악하고 변화가 있는 염색체 부위를 검색하기에는 mCGH가 가장 유용한 방법이라고 판단된다.

결론적으로 항암제 저항성 상피성 난소암에서 관찰된 염색체 변화의 특징으로는 염색체 소실이 증가보다 더 많았고 그 중에 염색체 13q32.1과 8p21.1의 소실이 가장 유의하게 항암제 감수성 난소암과 차이가 있는 것으로 나타났다. 따라서 난소암에서 염색체의 소실이 많을수록 항암제 저항성을 보일 가능성이 높다고 할 수 있으며 특히 염색체 13q32.1과 8p21.1의 소실이 있는 환자일수록 그 가능성은 더 클 것으로 예상된다. 그러나 이런 결과를 확인하기 위해서는 향후 추가적인 연구가 더 필요하다고 생각된다.

참고문헌

1. Hu J, Khanna V, Jones MW, Surti U. Comparative study of primary and recurrent ovarian serous carcinomas: Comparative genomic hybridization analysis with a potential application for prognosis. *Gynecol Oncol* 2003; 89: 369-75.
2. Kudoh K, Takano M, Koshikawa T, Hirai M, Yoshida S, Mano Y, et al. Gains of 1q21-q22 and 13q12-q14 are potential indicators for resistance to cisplatin-based chemotherapy in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2526-31.
3. Wasenius VM, Jekunen A, Monni O, Joensuu H, Aebi S, Howell SB, et al. Comparative genomic hybridization analysis of chromosomal changes occurring during development of acquired resistance to cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 18: 286-91.
4. Bernardini M, Weberpals J, Squire JA. The use of cytogenetics in understanding ovarian cancer. *Biomed Pharmacother* 2004; 58: 17-23.
5. Bernardini M, Lee CH, Beheshti B, Prasad M, Albert M, Marano P, et al. High-resolution mapping of genomic imbalance and identification of gene expression profiles associated with differential chemotherapy response in serous epithelial ovarian cancer. *Neoplasia* 2005; 7: 603-13.
6. Makhija S, Sit A, Edwards R, Aufman K, Weiss H, Kanbour-Shakir A, et al. Identification of genetic alterations related to chemoresistance in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2003; 90: 3-9.
7. Kudoh K, Takano M, Koshikawa T, Yoshida S, Hirai M, Kikuchi Y, et al. Comparative genomic hybridization for analysis of chromosomal changes in cisplatin-resistant ovarian cancer. *Hum Cell* 2000; 13: 109-16.
8. Isola J, DeVries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol* 1994; 145: 1301-8.
9. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998; 20: 207-11.
10. Cook SJ, Rubinfeld B, Albert I, McCormick F. RapV12 antagonizes Ras-dependent activation of ERK1 and ERK2 by LPA and EGF in Rat-1 fibroblasts. *Embo J* 1993; 12: 3475-85.
11. Stickens D, Clines G, Burbee D, Ramos P, Thomas S, Hogue D, et al. The EXT2 multiple exostoses gene defines a family of putative tumour suppressor genes. *Nat Genet* 1996; 14: 25-32.

Microarray comparative genomic hybridization analysis of chromosomal changes in advanced serous ovarian carcinoma

Sang Wun Kim, Jae Wook Kim, Young Tae Kim, Jae Hoon Kim,
Sunghoon Kim, Bo Sung Yoon, Eun Ji Nam

Department of Obstetrics and Gynecology, Women's Cancer Clinic, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Objective : Ovarian cancer is the leading cause of death in women with gynecological malignancies. The purpose of this study was to search characteristic genetic changes in advanced serous ovarian carcinomas using microarray comparative genomic hybridization (mCGH) and to identify genomic alterations specific to chemoresistant disease.

Methods : Genetic changes of 17 primary ovarian tumors were analyzed by MACArray™-Karyo 4 K BAC-chip. All the patients had stage IIIc serous ovarian cancer optimally debulked and were initially treated with 6 cycles of platinum-based combination chemotherapy. Ten patients who progressed within 12 months from initial chemotherapy were defined as chemoresistant disease (control group), whereas 7 patients who did not recur for more than 36 months were defined as chemosensitive disease (study group).

Results : In control group, the mean number of clones with gain and loss was 288 (7.2%) and 508 (12.7%), respectively. In study group, the mean number of clones with gain and loss was 450 (11.3%) and 860 (21.5%), respectively. In study group, loss of DNA copy number was more frequent than gain ($p=0.007$). The chromosomal regions with gain of DNA copy numbers in more than 70% of each group were 1p36.33, 3q26.2, 8q24.3, 10q26.3, 12p11.21, 20q13.33, and 21q22.3, while the regions with loss of DNA copy number were 4p12, 5q13.2, 7q11.21, 8p23.1, 14q32.33, Xq13.3-Xq21.1, and Xq21.31. The more frequent chromosomal gains in study group were on 5p15.33 and 14q11.2, while the loss were on 4q34.2, 4q35.2, 5q15, 8p21.1, 8p21.2, 11p15.5, 13q14.13, 13q14.2, 13q32.1, 13q34, 16q22.2, 17p11.2, 17p12, and 22q12.3.

Conclusion : In this mCGH analysis, common chromosomal abnormalities specific to serous ovarian carcinoma were identified. This study suggests that several genomic aberrations might be related to chemoresistant phenotype in patients with advanced serous ovarian cancer.

Key Words : Ovarian cancer, Resistance, Antineoplastic agent, Chromosomal aberrations
