Journal of Breast Cancer

ISSN 1738-6756 J Breast Cancer 2007; March 10 (1): 59-67

ORIGINAL ARTICLE

유방암에서 $p16^{INK4a}$과 *hTERT* 유전자의 프로모터 과메틸화와 단백 발현과의 연관성

이수민 · 임현우 · 이아원[1] · 박우찬 · 이제승[2] · 이원철

가톨릭대학교 의과대학 예방의학교실, [1]임상병리학교실, [2]외과학교실

Association between Promoter Hypermethylation of the $p16^{INK4a}$ and *hTERT* Genes and Their Protein Expressions in Human Breast Cancer

Su Min Lee, Hyeon Woo Yim, Ahwon Lee[1], Woo Chan Park, Je Seung Lee[2], Won Chul Lee

Departments of Preventive Medicine, [1]Clinical Pathology and [2]Surgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Purpose: This study was undertaken to observe the pattern of methylation of the $p16^{INK4a}$ and human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*) genes and the p16 and hTERT protein expressions in invasive ductal carcinoma of the breast. In addition, we evaluated the relationship between the methylation status of the two genes and their protein expressions.
Methods: We performed methylation-specific PCR (MSP) and immunohistochemical staining in 63 breast cancer specimens.
Results: There was no statistical association between $p16^{INK4a}$ gene methylation and the histological grade (tumor grade, tumor size and lymph node status). Methylation of the *hTERT* promoter did show significant differences according to the histological tumor grade and tumor size, but there was no clinical significance. Methylation of the $p16^{INK4a}$ and *hTERT* genes was found in 22.2% and 31.8% of the specimens, respectively. A negative p16 protein expression (0-10% expression rate) was observed in 38.1% of the specimens (24 of 63). A positive hTERT expression (more than a 25% expression rate) was observed in 73.0% of the specimens (46 of 63). There was no statistical significance in the relationship between the methylation status and the protein expression.
Conclusion: Our data suggest that methylation of the *p16* and *hTERT* genes is not associated with their protein expressions according to Immunohistochemisty. There seemed to be another complicated mechanism for p16 inactivation and hTERT activation in breast cancer. *(J Breast Cancer 2007; 10:59-67)*

Key Words : *Breast cancer, Methylation, p16, hTERT*

중심단어 : 유방암, 메틸화, *p16*, *hTERT*

서 론

유전자 서열에 영향을 주지 않으면서 유전자의 발현을 억제하는 유전자 변조기전인 DNA 메틸화가 최근 발암의 중요한 기전으로 부각되고 있다. 사람의 DNA에서 CpG가 많이 분포되어 있는 부분을 CpG island라고 하며 이러한 CpG island는 유전자의 프로모터 부위에 주로 위치한다. 일반적으로 CpG island 내에 위치한 사이토신은 메틸화가 되어 있지 않으며 전사조절인자의 도움으로 특정 유전자의 전사가 시작되게 된다. 그러나 CpG island 내에 위치한 사이토신이 메틸화되면, 메틸화된 사이토신 결합 단백질이 DNA에 결합하여 DNA가 전사인자에 노출되지 못하도록 막아 전사는 일어나지 않게 된다. 따라서 메틸화는 유전자 서열의 변화 없이 유전자 발현을 억제시키는 기전으로 제안되었으며, 특히 종양억제유전자의 발현억제기전으로 주목 받고 있다.*(1)*

책임저자 : 임현우
137-701 서울시 서초구 반포동 505, 가톨릭대학교 의과대학 예방의학교실
Tel: 02-590-2511, Fax: 02-532-3820
E-mail : y1693@catholic.ac.kr
접수일 : 2007년 1월 12일 **게재승인일 :** 2007년 3월 5일
*본 논문은 2005년 가톨릭중앙의료원 성의장학 학술연구비원과제 연구비에 의하여 이루어졌음.

메틸화 기전은 발암 단계 중 조기에 발생되는 기전으로 알려져 있으며 병리학적으로 전암 병변인 이형성단계 혹은 현미경상 정상 세포로 보이는 세포에서도 메틸화가 보고되고 있어 하나의 조기 검진 표지자로서 제안되고 있다.(2)

p16 유전자는 사이클린 의존성 키나아제 억제제로서 비활성화되면 세포주기조절 Cyclin D-CDK 4,6-pRB pathway가 활성화되며, 발암 과정 초기단계에 중요한 역할을 함이 여러 종양에서 밝혀졌다.(3) INK4a/ARF locus (9p21)는 다른 엑손에 존재하는 서로 다른 프로모터의 전사를 통하여 p16INK4a 단백질을 만든다. 유방암에서는 *p16*가 메틸화되면 예후가 나쁜 것으로 보고되었다.(4)

정상세포는 정상적인 복제과정이 수행될 때마다 종말체(telomere)가 짧아지기 때문에 한정된 생명력을 가진다. 암세포가 발생되는데 있어서 가장 중요한 과정이 무한정한 복제능력을 가지는 것이다. 이러한 불멸화(immortalization)를 위해 요구되는 조건은 각각의 조직마다 다른 것으로 알려져 있으며, 특히 텔로메라아제의 활성화가 무한적인 복제능력을 제공하는 중요한 기전으로 보고되었으며(5, 6) 상피세포의 경우에는 *p16*의 비활성화와 텔로메라아제의 활성화가 동시에 이루어져야 효과적으로 죽지 않는 세포로 만든다는 보고도 있다.(7)

유방암에서는 *APC*, *p16*, *E-cadherin*, *BRCA1* 등의 종양억제유전자는 유전적 돌연변이가 없거나 소수에서만 보고 되어 이들 유전자의 비활성화 기전을 설명하지 못하고 있었으나, 최근 유전자의 메틸화 상태를 볼 수 있는 여러 실험방법이 알려지면서, 이들 유전자의 비활성화에 메틸화가 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다.(8, 9) *p16* 유전자의 메틸화 정도는 8-48%까지 매우 다양하게 보고되고 있고,(10, 11) 국내 연구로는 위암, 대장암, 림프종, 수막종에서의 *p16* 메틸화에 의한 비활성화가 중요 암화 기전으로 보고되었으며,(12, 13) 유방암의 경우에는 면역조직화학염색을 통한 p16 단백의 발현감소가 보고되었다.(14, 15) 그러나 단백 발현 손실이 유전자 프로모터 메틸화와 연관이 없으며, 프로모터 부위의 메틸화뿐 만 아니라 특이적 매카니즘이 존재할 것이라고 보고와 최근 들어 메틸화가 유전자 비활성과 관계 없다는 연구들이 보고되고 있다.(16, 17) 이처럼 많은 연구들에 있어 프로모터 메틸화의 기능에 대한 논란이 있어왔다. 따라서, 저자들은 유방암에서 *p16* 및 *hTERT* 유전자의 메틸화와 이들 유전자 발현의 연관성을 알아보고자 본 연구를 진행하였다.

방 법

1. 연구대상 및 임상병리자료 조사

2002년 5월부터 2004년 12월까지 가톨릭대 성모병원에서 유방암 적출술을 시행 받은 환자 중 파라핀 블록 조직 및 신선 동결조직을 얻을 수 있었던 환자 83명 중 침윤성 관암종으로 진단된 63명을 연구대상으로 하였다. 임상, 병리자료 조사를 통하여 연령, 종괴의 크기, 변형된 Scarff-Bloom-Richardson grading system에 의한 조직학적 분화도, 림프절 전이를 확인하였다. 본 연구에 대한 연구계획서는 성모병원의 기관생명윤리위원회의 검토 및 승인을 받았으며, 연구대상자 또는 가족의 동의를 받은 후 유방암 신선동결조직과 파라핀 블록을 확보하였다.

2. DNA 추출 bisulfite를 이용한 DNA 변형

조직의 변성을 최소화하기 위하여 RNAlator (Ambion, Austin, USA)에 넣은 후 -70℃에 냉동보관 된 유방암 조직을 대상으로 DNeasy Tissue Kits (Qiagen Inc, Avenue Stanford, Valencia, USA)를 사용하여 DNA 분리하였다. 이렇게 추출한 DNA는 1% agarose gel에 전기 영동하여 dsDNA를 확인하였다. 이러한 DNA에 bisulfite를 처리하여 modification시키면 DNA nucleotide 중 cytosine이 uracil로 전환되는데 이때 methylated cytosine은 uracil로 전환되지 않고 그대로 cytosine으로 남아 있게 되어 unmethylated cytosine과 methylated cytosine을 구별할 수 있게 된다. 60 μL의 DNA에 3M NaOH (Applied Biosystems, Foster City, USA) 용액 6 μL 첨가하여 75℃에서 10분간 반응시켜 DNA를 변성시켰다. 그 후 sodium bisulfite로 DNA를 변환시키기 위해 4.8M sodium bisulfite (Sigma, Missouri, USA) 750 μL와 10 mM hydroquinone 42 μL를 첨가한 후 wax (Roche, Mannheim, Germany)를 넣고 55℃, 5시간 동안 반응시켰다. 정제 과정으로 Centricone 3D column (Millipore, billerica, USA)을 이용하여 원심 분리하였다. 3M NaOH 10 μL 첨가하여 37℃, 15분 동안 반응 후 DNA 침전을 위해 3M sodium acetate 30 μL와 ethanol (100%) 400 μL를 첨가하여 -70℃에서 1시간 반응시킨 다음 15분간 원심분리 하였다. 마지막으로 세척을 위해 70% ethanol 첨가 후 원심분리하여 실온에 건조 후 TE 100 μL로 용해시켰다.

3. Methylation specific PCR (MSP)

유전자의 메틸화 상태를 검사하는 방법 중 methylation-specific PCR (MSP)가 보편적으로 사용되는데 그 원리는 bisulfite 처리로, 메틸화된 cytosine은 보존되나 메틸화되지 않은 cytosine은 uracil로 뉴클레오티드를 변화시키기 때문에, 메틸화 여부를 구분할 수 있다. *p16*, *hTERT* 유전자의 프로모터 부위의 사이토신에 메틸화가 되었는지 여부를 확인하기 위해 메틸화 특이 중합효소연쇄반응(MSP)을 시행하였다.

DNA를 bisulfite 처리한 후 메틸화된 DNA와 비메틸화 DNA

를 구별할 수 있는 각각의 시발체(primer)를 이용하였다.*(18, 19)* PCR (Bio-rad, Hrercules, USA) 조건은 95℃에서 30초, 각각의 붙임온도(annealing temperature)는 *p16* 62.5℃ (U), 63.7℃ (M); *hTERT* 58℃ (U), 58.5℃ (M); 30초, 72℃ 30초 반응시켰고 40회 반복하였다. 그 후 72℃ 5분 연장한 후 반응을 종결하였으며, 3회 반복 실험하였다. 음성대조로 DNA 대신 증류수를 넣었고, 양성대조로 CpGenome methylated DNA (Chemicon international inc, Boronia Victoria, Australia)를 사용하였다. 증폭 된 PCR 산출물을 2% agarose gel에서 전기영동(Mupid, Tokyo, Japan)하여 각각의 메틸화 상태를 관찰하였다.*(18, 19)* 메틸화에 대한 조사는 3회 반복하여 실험하였다.

4. Tissue array block 제작

대상 증례의 H&E 염색표본 재검색을 통하여 각각의 조직학적 소견을 대변할 수 있는 부위를 표시하고, 각각의 파라핀 포매 조직에서 그에 해당하는 부위를 조직 채취 기구를 이용하여 파냈다. 조직 배열블록 제작을 위해서 조직이 없는 파라핀 블록에 지름 3 mm의 구멍을 뚫어 각각의 파라핀 포매 조직에서 채취한 조직 조각을 심었다. 가장자리의 구멍들은 대조군 블록에서 채취한 조직을 삽입하고 가운데 부분은 실험군 조직 조각을 삽입하여 조직블록을 제작하였다.

5. 면역조직화학염색

Tissue array block을 4 μm 두께로 박절하여 통상의 탈파라핀화 및 함수과정을 진행하였다. 항원의 활성 회복을 돕기 위하여 pH 6.0 citrate 완충액을 이용해 microwave oven에 15분간 전처리하였다. 조직 내 과산화효소의 작용을 억제하기 위하여 3% 과산화수소수에 10분간 처리 후 TBS 완충액으로 수세하였다. 일차항체는 단 클론 항체인 p16 (1:200 dilution, DACO, Kent, Denmark), hTERT (1:200 dilution, 44F12, Newcastle upon Tyne, UK)를 사용하였다. 각 일차 항체는 45℃에서 60분간 반응시켰다. 이차항제(biotinylated anti-mouse immunoglobulin antibody, Dako. Colorado, USA)를 상온에서 20분간 작용시켜 biotin-avidin 특이결합을 유도한 후, DAB, 3′-diaminobenzidine tetrahydrochloride solution (Research Genetics, California, USA)를 가하여 발색시킨 후 hematoxyln으로 대조 염색하였다. 광학 현미경으로 관찰하여 세포핵에 적갈색으로 염색된 종양세포의 수를 세어 백분율을 구하였다.

Table 1. Clinicopathological characteristics of breast cancer (n=63) used in this study

Clinical parameter	No (%)
Age	
<50	35 (55.6)
≥50	28 (44.4)
Mean age (range, yr)	51.6 (34-85)
Tumor grade (histological)*	
I	14 (22.2)
II	34 (54.0)
III	15 (23.8)
Tumor size	
≤2 cm	26 (41.3)
2 cm, ≤5 cm	34 (53.9)
> 5 cm	3 (4.8)
Lymph node status	
Negative	35 (55.6)
Positive	28 (44.4)

*: Modified Scarff-Bloom-Richardson grading system.

6. 결과 판정 및 통계 분석

DNA를 분리할 때 암세포만을 micordissection하지 않았기 때문에 정상세포가 검체에 포함될 가능성이 있다. 따라서 메틸화에 대한 MSP 결과가 methylation PCR에서만 양성이 나온 경우와 unmetylation PCR과 methylation PCR에서 동시에 양성으로 나온 경우 MSP 양성으로 정의하였고, unmethylation PCR에서만 양성이 나온 경우에는 MSP 음성으로 정의하였다. 본 연구에서는 메틸화와 면역염색과의 관련성을 보고자 하였기 때문에 부분 메틸화 혹은 deletion의 가능성이 있는 두 PCR에서 모두 음성인 경우에는 통계분석에서 제외하였다. p16은 모두 종양세포의 10% 이하에서 염색 반응을 보일 때 음성으로 hTERT는 25% 이하에서 염색 반응을 보일 때 음성으로 판정하였다. 각각의 유전자에 대한 메틸화 발현 유무와 단백발현 양상은 모수검정법인 Chi-squared test와 비모수 검정법인 Fisher's exact test를 조건에 따라 시행하였다. 통계분석은 SAS Software Release 8.01 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA)을 사용하여 수행하였다. p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

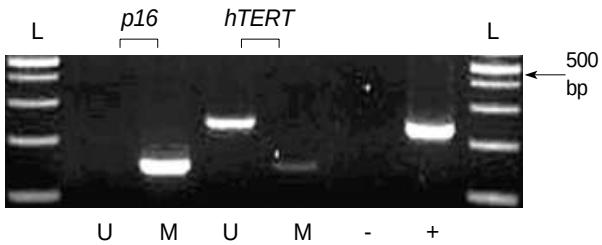

Fig. 1. Representative Methylation-specific PCR (MSP) results are shown for four genes (*p16* and *hTERT*) in breast cancer sample. MSP was performed on bisulfite-treated DNA form breast cancer. MSP products were run on a 2% agarose gel. unmethylated DNA <U>, methylated DNA <M>, negative control (DW) <->, positive control <+>, 100 bp DNA ladder <L>.

결 과

1. 연구대상자의 임상 및 병리학적 소견

연구대상자의 연령은 50세 미만이 35명(55.6%)이었고, 50세 이상이 28명(44.4%)이었다. 변형된 Scarff-Bloom-Richardson grading system에 따른 조직학적 분화도는 고분화군 15명(23.8%), 중등도 분화군 34명(54.0%), 저분화군 14명(22.2%)이었다. 종괴의 크기는 2 cm 이하인 경우가 26명(41.2%), 2 cm보다 크고 5 cm 이하인 경우가 34명(54.0%), 5 cm보다 큰 경우가 3명(4.8%)이었으며, 액와 림프절 전이 양성은 28명(44.4%), 음성은 35명(55.6%)이었다(Table 1).

2. 유방암 조직에서 *p16*과 *hTERT* 유전자 과메틸화 빈도

유방암 DNA 63개 중 *p16*의 프로모터 부위의 유전자에 대한 MSP 양성 빈도는 14예(22.2%), MSP 음성은 39예(61.9%)이었고, metylation PCR과 unmetylation PCR 둘 다 음성인 경우는 10명(15.9%)이었다. *hTERT*의 프로모터 부위의 유전자에 대한 MSP 양성은 20예(31.8%), MSP 음성은 32예(50.8%)이었고,

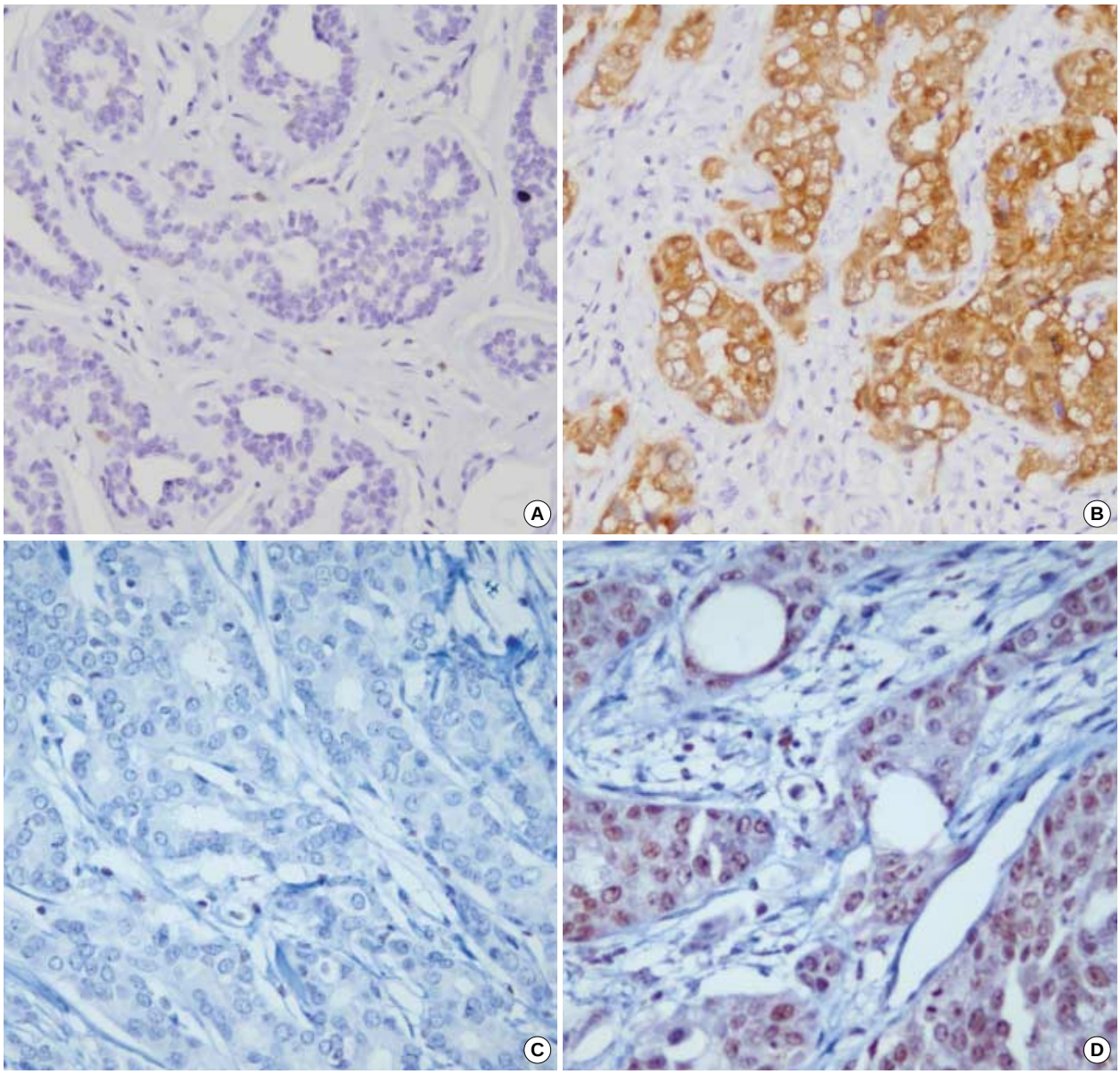

Fig 2. Examples of immunohistochemical staining: (A) p16 staining of normal breast. (B) p16 positive in breast cancer. (C) hTERT staining of normal breast. (D) hTERT positive in breast cancer. All sections is ×400.

metylation PCR과 unmetylation PCR 둘 다 음성인 경우는 11명(17.4%)이었다(Table 2, Fig 1).

Table 2. Methylation of *p16* and *hTERT* from representative Methylation-specific PCR (MSP) assay

Locus	MSP (+)	MSP (-)	NA	Total (%)
p16	14 (22.2)	39 (61.9)	10 (15.9)	63 (100)
hTERT	20 (31.8)	32 (50.8)	11 (17.4)	63 (100)

MSP (+)=only methylation PCR (+) or metylation PCR (+) and unmethylation PCR(+); MSP (-)=only unmethylation PCR (-); NA=metylation PCR (-) and unmethylation PCR (-).

Table 3. Relationship between clinicopathological finding and methylation

Clinicopathological parameter	Methylation			
	p16 (%)		*hTERT* (%)	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Tumor grade				
I	4 (33.3)	8 (66.7)	6 (50.0)	6 (50.0)
II	7 (25.9)	20 (74.1)	13 (46.4)	15 (53.6)
III	3 (21.4)	11 (78.6)	1 (8.3)	11 (91.7)
p-value	0.833		0.041	
Tumor size				
≤2 cm	4 (18.2)	18 (81.8)	13 (54.2)	11 (45.8)
>2 cm, ≤5 cm	10 (35.7)	18 (64.3)	6 (23.1)	20 (76.9)
>5 cm	0 (0)	3 (100)	1 (50.0)	1 (50.0)
p-value	0.549		0.033	
Lymph node status				
Netative	6 (20.7)	23 (79.3)	9 (32.1)	19 (67.9)
Positive	8 (33.3)	16 (66.7)	11 (45.8)	13 (54.2)
p-value	0.645		0.618	

Table 4. Cell counting of p16 and hTERT from immunohistochemistry are shown (%)

Protein	IHC (-)	IHC (+)	Total (%)
p16	24 (38.1)	39 (61.9)	63 (100)
hTERT	17 (27.0)	46 (73.0)	63 (100)

IHC (-)=p16 ≤10% & hTERT ≤25%; IHC (+)=p16>10% & hTERT >25%.

Table 5. Relationship between immunohistochemistry and methylation status (p16 and hTERT)

IHC/MSP	MSP positive	MSP negative	*p*-value
p16/*p16*			
Negative	5 (23.8)	16 (76.2)	0.727
Positive	9 (28.1)	23 (71.9)	
hTERT/*hTERT*			
Negative	5 (41.7)	7 (58.3)	0.795
Positive	15 (37.5)	25 (62.5)	

3. 임상 병리 소견과 메틸화 상관관계

조직학적 분화도에 따라서 *p16* 유전자 프로모터 부위의 메틸화 분포는 차이가 없었고, 조직학적 분화도에 따라서 *hTERT* 유전자 프로모터 부위의 메틸화 분포는 유의한 차이가 있었으나(p=0.041), 오히려 고분화군에서 MSP 음성이 11예(91.7%)였다. 암의 종괴 크기에 따른 *p16* 유전자 프로모터 부위의 메틸화 분포는 차이가 없었고, 암의 종괴 크기에 따른 *hTERT* 유전자 프로모터 부위의 메틸화 분포는 유의한 차이가 있었으나(p=0.033), 오히려 중분화군에서 MSP 음성이 20예(76.9%)이었다. 림프절 전이 유무에 따른 *p16*, *hTERT* 유전자 프로모터 부위의 메틸화 분포는 차이가 없었다(Table 3).

4. 면역조직화학염색법을 이용한 단백질의 발현 양상

침윤성 관암종에서 p16과 hTERT 단백에 대한 면역조직화학염색을 시행한 후 광학현미경을 이용하여 관찰하였다. 단백이 발현된 경우 적갈색으로 염색되었다(Fig 2). p16의 경우 종양세포의 10% 이하에서, 음성으로 hTERT는 25% 이하에서 염색 반응을 보일 때 음성으로 판정하였는데 면역조직화학염색상 p16은 24예(38.1%)에서 음성으로 관찰되었고, hTERT는 46예(73.0%)에서 양성으로 관찰되었다(Table 4).

5. 유전자 메틸화와 단백질 발현의 상관관계

침윤성 관암종 63명을 대상으로 면역조직화학염색을 이용하여 측정한 p16과 hTERT 단백의 양성률의 분포는 Fig 3과 같았다. MSP에서 *p16* 유전자의 메틸화 여부에 대한 결과를 얻을 수 있었

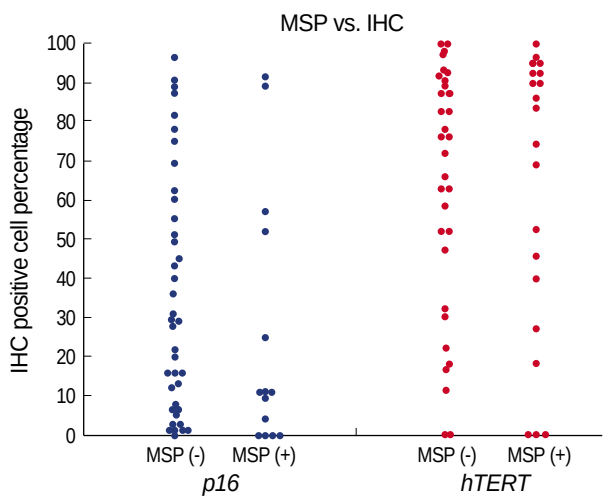

Fig 3. Relationship between the methylation status in promoter lesion for *p16*, *hTERT* gene and immunohistochemistry positive cell percentage for p16, hTERT protein. Notes: MSP (+)=only methylation PCR (+) or metylation PCR (+) and unmethylation PCR (+); MSP (-)=only unmethylation PCR (-).

던 53예에 대하여 *p16* 유전자 프로모터부위 메틸화여부에 따른 면역조직화학염색법에 의한 p16 단백의 발현여부에는 차이가 없었다(p>0.05, Table 5). MSP에서 *hTERT* 유전자의 메틸화 여부에 대한 결과를 얻을 수 있었던 52건에 대하여 *hTERT* 유전자 프로모터부위 메틸화에 따른 면역조직화학염색법에 의한 hTERT 단백의 발현여부에는 차이가 없었다(p>0.05, Table 5).

고 찰

DNA 메틸화는 유일하게 알려진 자연적인 DNA의 modification이며 유전자 활성을 억제하는 강력한 기전으로 알려져 왔다. 암 억제 유전자의 비활성화는 돌연변이에 의해서 일어나는 것이 일반적이나 최근 다양한 연구에서 메틸화가 많은 암 억제 유전자의 비활성화와 연관되어 있다는 보고가 있었다.*(20)* 유전자의 메틸화 양상을 연구하는 방법에는 Southern blot analysis, restriction enzyme-PCR, bisulfite genomic DNA sequencing, MSP, COBRA assay 그리고 methylation-sensitive nucleotide primer extension (MS-SNuPE) 등이 알려져 있다. 그 중 MSP는 시발체 제작이 까다로운 점이 있지만, bisulfite를 처리함으로써 메틸화의 유무에 따른 차이를 알 수 있으며 정성적이고 신속한 장점이 있다고 알려져 있다.*(21)*

세포주기 진행은 촉진인자인 활성화된 사이클린 및 사이클린 의존성 키나아제(CDK)4/6 그리고 억제인자인 CDKIs에 의해 조절되며, CDK 억제제로 작용하는 단백질에는 p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c, p19INK4d, p21CIP1, p27KIP1, p57KIP2 등이 알려져 있다. 이 중 *p16* 종양억제유전자(INK4A, CDKN2A, MTS1, CDK4I)의 메틸화에 의한 비활성화가 가장 널리 알려진 후성적(epigenetic) 기전 중 하나로 식도암, 대장 및 직장암, 간암, 유방암, 방광암, 췌장암, 폐암, 난소암 등 여러 종류의 종양 발생에서 관련이 있는 것으로 알려져 있다.*(22)* *p16* 유전자가 유방암을 포함한 다수의 원발암이나 암세포주에서 결실이나 점 돌연변이 등의 형태로 기능을 상실하여 p16 단백 발현이 억제되어 암 발생에 관여한다고 보고되었으며, 유방암(60%), 흑색종(57-61%), 신경교종(17-97%), 백혈병(25-60%), 췌장암(70%)의 여러 종양에서 유래된 세포주에서 비활성화가 보고되고 있다.*(23)* *p16* 유전자가 불활성되는 대부분은 동형접합 결실(homozygous deletion) 때문이나 최근 DNA 과메틸화에 의한 비활성화가 보고되고 있으며 이로 인한 비활성화 결과는 *p16* 유전자의 산물인 p16 단백이 핵 내에 없는 것으로 나타난다.*(24)* 세포주에서는 높은 빈도의 동형접합 결실이 관찰되나, 원발성암에서는 서로 역관계의 결과가 보고되고 있으며, 점 돌연변이의 결과는 유방암에서 미미하다고 보고되어,*(23)* *p16*의 비활성화 기전으로 메틸화가 주목을 받아 왔다.*(2)*

텔로메라아제는 RNA dependent DNA polymerase의 기능을 가진 리보핵산단백으로서, 이 효소의 활성도가 대부분의 종양조직에서 증폭되어 나타나는 것이 알려지며, 악성종양으로 진행되거나 유지에 중요한 역할을 하고 있다.

정상체세포에서는 텔로메라아제가 비활성화되어 검출되지 않으나, 세포 분열이 지속적으로 일어나는 배아세포, 불멸화 세포 그리고 대부분의 악성세포에서 텔로메라아제의 활성이 매우 높게 발현된다. 인간의 텔로메라아제는 세가지 중요한 요소인 human telomerase RNA (hTR), telomerase-associated protein I (TPI), 그리고 human telomerase reverse transcriptase (hTERT)로 구성되고, 이중 hTERT는 텔로메라아제 양성 종양에서 발현되는 것으로 알려져 있다.*(25)* 불멸화을 위해 요구되는 조건은 각각의 조직마다 다르며, 텔로메라아제의 활성화가 무한적인 복제능력을 제공하는 중요한 기전으로 보고되었다.*(5, 6)*

이번 연구 결과, 유방암 DNA 63개의 유전자 메틸화 빈도는 *p16*이 22.2%, *hTERT*가 31.8%로 나타났다(Table 2). 유방암의 경우 *p16* 유전자의 메틸화는 8-48%까지 다양하게 보고되고 있다.*(10, 11, 8)* 원발성 침윤성 유방암 193명을 대상으로 MSP를 시행한 Li 등*(26)*의 연구에서 *p16* 유전자의 메틸화 빈도는 14% (27/193)였으며, 산발성 일차 침윤성 유방암 45건으로 *p16* 이외 9개 유전자의 MSP를 시행한 Parrella 등*(27)*은 18%로 낮은 메틸화 빈도를 보고하였다. Domingueza 등*(28)*의 연구에 따르면 100명의 유방암 검체를 대상으로 MSP를 시행한 결과, *p16*은 19%로 우리의 연구 결과인 p16 (22.2%)와 유사한 메틸화 빈도가 보였다.

또한 124개의 난소암과 65개의 자궁암 검체를 대상으로 Real-time PCR를 통해 메틸화한 *hTERT* 메틸화 빈도는 29.8% (37/124, 난소암), 58.5% (38/65, 자궁암)로 보고되었으며,*(29)* 제자리부합법(in situ hybridization)을 통해 일차 비소세포성 폐암 94명을 대상으로 연구한 Lu 등은 34.0%의 *hTERT* 발현을 보였다.*(30)* Clement 등*(31)*의 연구에서는 27개의 바렛 식도 선암종의 methylation-sensitive dot-blot assay (MS-DBA) 결과, *hTERT* 프로모터의 메틸화 빈도가 64%이었다. 이와 같이 유전자에 메틸화 비율이 연구마다 다른 이유는 연구대상자의 차이, 분석기법의 차이(민감도 또는 microdissection 유무 등)도 한 원인이 되었을 것으로 사료된다. 조직학적 소견에 따른 p16 유전자의 메틸화 상태는 차이가 없었다. *hTERT*는 암분화도와 암의 크기에 따라 유전자의 메틸화 상태에 차이가 있었으나, 오히려 더 심한 고분화군과 암의 크기가 2 cm보다 크고 5 cm 이하인 경우에서 메틸화가 안된 비율이 더 높았다. 메틸화에 대한 검사는 처음 유전자 분리부터 3회 반복하여 측정하였기 때문에 정밀도에는 문제가 없었을 것으로 사료된다.

유방암에서 면역조직화학염색을 통한 p16 단백의 발현이 감소된다는 보고*(14, 15)*와 같이 본 연구에서도 면역염색에 의한 p16 단백 발현 음성(단백발현율이 10% 이하 범위)은 24예(38.1%), 양성(단백발현율이 11% 이상인 경우)은 39예(61.9%)의 발현 빈도로 관찰되었다.

Geradts 등*(32)*은 104개의 유방암 조직(관암 63예, 소엽암 33예, 혼합암종 8예)으로 면역조직화학염색을 시행한 결과, 49% (51예)의 p16 단백발현 음성률이었고, 295개 침윤성 유방암(관암 164예, 비관암 65예)을 대상으로 면역조직화학염색을 시행하여 전체종양세포수의 5% 이상일 시 양성으로 판정한 결과, 70.5% (208예)의 p16 단백발현 양성률이 관찰되었다.*(33)* 면역염색의 판독 기준을 완전 음성(5% 미만), 부분 음성(5–10%), 양성(10% 이상)으로 나눈 31예의 유방암 조직을 대상으로 한 Song 등*(23)*의 연구에서는 p16 단백 염색(31예)은 음성 7예(22.6%), 부분음성 2예(6.5%)로 이러한 빈도 차이는 처리과정에서 p16 단백이 파괴되기 쉽고, 연구자마다 판독이 다르기 때문이라고 보고하였다.

hTERT 단백 발현 음성(단백발현율이 25% 미만인 경우)은 17예(27.0%), 양성(단백발현율이 25% 이상인 경우)은 46예(73.0%)로 관찰되었다. 64예의 유방암과 엽상종양을 포함한 인접 정상조직 2예의 면역조직화학염색에서 81% (52예)의 hTERT 양성률이 관찰되었으며,*(34)* 53예의 유방암과 31예의 유방 양성종양을 대상으로 면역염색을 시행한 Yano 등*(35)*은 30/53 (57%), 11/31 (35%)의 hTERT 단백발현 양성률을 보였다. Yan 등*(36)*의 연구에서는 34예의 직장암을 대상으로 hTERT 단백발현 50% 이상일 때 양성으로 판정한 결과 27/34 (79.4%)로 우리의 결과와 유사한 발현 빈도를 보였다.

우리의 연구에서 MSP로 측정한 *p16* 유전자 메틸화와 면역화학염색으로 측정한 p16 단백질 발현, *hTERT* 유전자 메틸화와 hTERT 단백질 발현간에는 유의한 연관성이 없었다. Vinci 등*(37)*은 유방 섬유선종(fibroadenoma)과 암종에서 메틸화와 면역염색의 비교연구에서 p16 면역염색의 높은 이질성 때문에 조직기원과 관계없이 음성과 양성 부위가 공존하여 결론적으로 프로모터 과메틸화와 *p16* 유전자 silencing 사이의 명백한 관계는 기대할 수 없다는 결과를 보고한 바 있다. 또한 골육종을 대상으로 한 CDKN2A 유전자 메틸화 연구에서 p16에 대한 면역조직화학염색에서의 미발현이 메틸화와 연관이 없었으며,*(38)* 구강 편평세포암종을 대상으로 연구한 *p16* 유전자의 메틸화 연구에서는 p16 단백 발현 감소를 확인하였으나, *p16* 프로모터 부위의 메틸화가 관찰되지 않아 메틸화 이외에 다른 유전적 변화가 있을 것이라고 결론 내렸다.*(39)* 침윤성 자궁내막암을 대상으로 p16 단백 발현 손실이 프로모터 메틸화와 연관이 없으며, 프로모터 부위의 메틸화는 자궁내막암에서 *p16* 불활성의 특이적 매카니즘이 존재할 것이라고 보고하였다.*(40)*

직장선종과 암종 패널에서 *hTR*과 *hTERT* 발현 조사와 *hTR* 프로모터의 메틸화가 전사조절과 관계 있는지를 결정하기 위한 Atsuo 등*(16)* 연구에서는 *hTR* 발현이 선종에서 암종으로 변화 단계에서 상승하나, *hTERT* 발현과 항상 연관되지 않으며, *hTR* promoter 부위의 저메틸화가 *hTR* 발현 조절의 주 매카니즘의 가능성이 부족하다고 제안하였다.

유전자의 비활성화에 메틸화가 중요한 역할을 함으로써 유방암을 비롯한 다양한 암의 예후, 진단, 치료에 유용한 매카니즘을 제공할 것이라는 연구 결과들이 있으나,*(8, 9)* 최근에 들어 메틸화가 유전자 비활성과 관계 없다는 연구들이 있다. 본 연구 결과 역시 메틸화가 중요 암화 기전으로 보고되는 유전자 비활성과 관계가 없었고, 단백 발현 손실이 유전자 프로모터 메틸화와 연관성을 보이지 않았다.

결 론

침습성 유방암으로 진단된 유방암 검체 63개를 대상으로 *p16*, *hTERT* 유전자의 프로모터 부위에 메틸화 상태가 면역조직화학염색에서 p16, hTERT 단백 발현과의 연관성을 알아보고자 하였으며, 메틸화 상태는 메틸화 특이 PCR (MSP)로 측정하였다.

MSP 양성 빈도는 *p16*의 경우 14예(22.2%), *hTERT*의 경우 20예(31.8%)였다. 임상, 병리 소견에 따른 *p16*, 유전자의 프로모터 부위에 메틸화 상태에 차이는 없었으며, 조직학적 분화도와 종양크기에 따라 *hTERT* 유전자 프로모터 부위의 메틸화 분포는 유의한 차이가 있었으나, 다른 임상적 의의는 없었다. 면역조직화학염색에서 p16 단백 발현 음성 범위(≤10%)는 24예(38.1%)이었고, hTERT 단백 발현 양성(>25%)은 46예(73.0%)이었으나 *p16* 유전자의 메틸화 상태와 p16 단백 발현 분포(p>0.05)뿐만 아니라, *hTERT* 유전자의 메틸화 상태와 hTERT 단백 발현 분포에도 차이가 없었다(p>0.05).

유방암에서 메틸화가 중요 암화 기전으로 보고되는 유전자 비활성와 직접적 연관 관계가 없었으므로 *p16* 유전자의 비활성화와 *hTERT* 유전자의 활성화를 일으키는데 promoter 부위의 메틸화 이외에 다른 복잡한 유전적 매카니즘이 있을 것으로 사료되었다.

참고문헌

1. Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. J Pathol 2002; 196:1-7.
2. Hibi K, Koike M, Nakayama H, Fujitake S, Kasai Y, Ito K, et al. A

cancer-prone case with a background of methylation of p16 tumor suppressor gene. Clin Cancer Res 2003;9:1053-6.

3. Clurman BE, Groudine M. The CDKN2A tumor suppressor locus-a tale of two proteins. N Engl J Med 1998;338:910-2.
4. Dominguez G, Silva J, Garcia JM, Silva JM, Rodriguez R, Munoz C, et al. Prevalence of aberrant methylation of p14ARF over p16INK4a in some human primary tumors. Mutat Res 2003;530:9-17.
5. Harada H, Nakagawa H, Oyama K, Takaoka M, Andl CD, Jacobmeier B, et al. Telomerase induces immortalization of human esophageal keratinocytes without p16INK4a inactivation. Mol Cancer Res 2003; 1:729-38.
6. Dickson MA, Hahn WC, Ino Y, Ronfard V, Wu JY, Weinberg RA, et al. Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16 (INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. Mol Cell Biol 2000;20:1436-47.
7. Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelhutz AJ. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. Nature 1998;396: 84-8.
8. Nielsen NH, Roos G, Emdin SO, Landberg G. Methylation of the p16 umor suppressor gene 5' -CpG island in breast cancer. Cancer Lett 2001;163:59-69.
9. Jin Z, Tamura G, Tsuchiya T, Sakata K, Kashiwaba M, Osakabe M, et al. Adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter hypermethylation in primary breast cancer. Br J Cancer 2001;85:69-73.
10. Herman JG, Merlo A, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. Caner Res 1995;55:4525-30.
11. Brenner AJ, Pladugu A, Wang H, Olopade OI, Dreyling MH, Aldaz CM. Preferential loss of expression of p16ink4a rather than p16ARF in breast cancer. Clin Cancer Res 1996;2:1993-8.
12. Kim DH, Cho M, Joo KR, Park NH, Yang US. Methylation of the p16 tumor suppressor gene in Korean patients with colon cancer and adenoma. Korean J Med 2003;64:396-404.
13. Park CW, Lee DH, Kim JY, Seo SB, Ju HJ, Kim GH, et al. Relationship between methylation status of p16 tumor suppressor gene and clinicopathologic behavior of stomach cancer. Korean J Gastroenterol 2002;39:402-8.
14. Lee MJ, Jeon HJ, Kim KC. Significance of expression of p16, cyclin D1, Rb, and p53 protein and correlation with clinicopathologic prognostic factor in invasive ductal carcinoma of breast. Korean J Pathol 2000;34:288-99.
15. Shin MJ, Lee SJ, Suh BY, Kwun KB, Kim DS. Clinical significance of Cyclin D1 and p16 protein expression in primary breast carcinoma. J Korean Surg Soc 1999;57:324-36.
16. Atsuo N, Takeshi S, Terasu H, Toru T, Masato I, Nobuo W, et al. Increased *hTR* expression during transition from adenoma to carcinoma is not associated with promoter methylation. Digest Dis Sci 2004;49: 1504-12.
17. Chang HG, Kim SJ, Chung KW, Noh DY, Kwon YM, Lee ES, et al. Tamoxifen-resistant breast cancers show less frequent methylation of the estrogen receptor β but not the estrogen receptor α gene. J Mol Med 2005;83:132-9.
18. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci 1996;93:9821-6.
19. Dessain SK, Yu H, Reddel RR, Beijersbergen RL, Weinberg RA. Methylation of the human telomerase gene CpG island. Cancer Res 2000;60:537-41.
20. Antequera F, Boyes J, Bird A. High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. Cell 1990; 62:503-14.
21. Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour supressor locus 3p21.3. Nat Genet 2000;25:315-9.
22. Park CW, Lee DH, Kim JY, Seo SB, Ju HJ, Kim GH, et al. Relationship between methylation status of p16 tumor suppressor gene and clinicopathologic behavior of stomach cancer. Korean J Gastroenterol 2002;39:402-8.
23. Song TJ, Lee ES, Kwon JA, Kim CS, Bae JW, Koo BH. The study of CDKN2/p16INK4A mutation in human breast cancer. J Korean Surg Soc 1998;55:167-75.
24. Song TJ, Moon JS, Lee S, Lee JB, Choi WJ, Chae GB, et al. Immunohistochemical analysis of abnormal p16INK4A protein expression in human breast cancer. J Korean Surg Soc 1999;56:326-33.
25. Hong JW, Lee SK, Ban TH, Ji SG. Correlation of telomerase activity, hTERT mRNA expression and HPV E6 detection in cervical cancer tissue. Korean J Obstet Gynecol 2002;45:378-85.
26. Li SY, Rong M, Iacopetta B. DNA hypermethylation in breast cancer and its association with clinicopathological features. Cancer Lett 2006; 237:272-80.
27. Parrella P, Poeta ML, Gallo AP, Prencipe M, Scintu M, Apicella A,

et al. Nonrandom distribution of aberrant promoter methylation of cancer-related genes in sporadic breast tumors. Clin Cancer Res 2004; 10:5349-54.

28. Dominguez G, Silva J, Garcia JM, Silva JM, Rodriguez R, Munoz C, et al. Prevalence of aberrant methylation of *p14ARF* over *p16INK4a* in some human primary tumors. Mutat Res 2003;530:9-17.
29. Widschwendter A, Müller HM, Hubalek MM, Wiedemair A, Fiegl H, Goebel G. Methylation status and expression of human telomerase reverse transcriptase in ovarian and cervical cancer. Gynecol Oncol 2004;93:407-16.
30. Lu C, Soria JC, Tang X, Xu XC, Wang L, Mao L, et al. Prognostic factors in resected stage I non-small-cell lung cancer: a multivariate analysis of six molecular markers. J Clin Oncol 2004;22: 4575-83.
31. Genevieve C, Richard B, Nathalie P, Fred TB, Jean B. Methylation of APC, TIMP3, and TERT: a new predictive marker to distinguish Barrett's oesophagus patients at risk for malignant transformation. J Pathol 2006;208:100-7.
32. Geradts J, Wilson PA. High frequency of aberrant p16 (INK4A) expression in human breast cancer. Am J Pathol 1996;149:15-20.
33. Shin MJ, Lee SJ, Suh BY, Kwun KB, Kim DS. Clinical significance of Cyclin D1 and p16 protein expression in primary breast carcinoma. J Korean Surg Soc 1999;57:324-36.
34. Kammori M, Izumiyama N, Hashimoto M, Nakamura K, Okano T, Kurabayashi R. Expression of human telomerase reverse transcriptase gene and protein, and of estrogen and progesterone receptors, in breast tumors: preliminary data from neo-adjuvant chemotherapy. Int J Oncol 2005;27:1257-63.
35. Yano Y, Yoshida K, Osaki A, Toge T, Tahara H, Ide T. Expression and distribution of human telomerase catalytic component, hTERT, in human breast tissues. Anticancer Res 2002;22:4101-7.
36. Yan P, Benhattar J, Seelentag W, Stehle JC, Bosman FT. Immunohistochemical localization of hTERT protein in human tissues. Histochem Cell Biol 2004;121:391-7.
37. Vinci AD, Perdelli L, Banelli B, Salvi S, Casciano I, Gelvi I, et al. *p16INK4a* promoter methylation and protein expression in breast fibroadenoma and carcinoma. Int J Cancer 2005;114:414-21.
38. Oh JH, Lee SH, Suh SW, Cho HS, Kim JH, Kim JE, et al. Significance of the methylation of cyclin-dependent kinase inhibitor 2A gene in the prognosis of osteosarcoma. J Korean Orthop Assoc 2003; 38:631-40.
39. Kang GW, Kim KW, Lyu JW, Kim CJ. P16ink4 methylation in squamous cell carcinoma of the oral cavity. J Korean Assoc Maxillifac Plast Reconstr Surg 2000;22:164-73.
40. Salvesen HB, Das S, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression is not associated with promoter methylation but defines a subgroup of aggressive endometrial carcinomas with poor prognosis. Clin Cancer Res 2000;6:153-9.