

# 골육종의 분자생물학과 Biological Markers

## Osteosarcoma: Biologic Markers in Its Treatment

김 한 수

서울의대 정형외과

Han-Soo Kim, MD

Department of Orthopaedic Surgery, Seoul National University College of Medicine

E-mail : hankim@snu.ac.kr

J Korean Med Assoc 2006; 49(12): 1082 - 1087

### Abstract

Osteosarcoma is a primary malignant bone tumor that accounts for 5% of childhood cancers. Despite the use of chemotherapy, long-term survival has reached a plateau, and this figure has not changed for almost 20 years. Therefore, there is a need for understanding of the basic biology and pathogenesis of osteosarcoma in order to develop more therapeutic strategies and ultimately improve survival. This article reviews current state of knowledge about several aspects of osteosarcoma biology with regard to host genetic predispositions, cytogenetics and molecular markers. Genetic conditions with a predisposition to osteosarcoma include hereditary retinoblastoma, Li-Fraumeni syndrome, Rothmund-Thomson syndrome and Werner syndrome. Although most of osteosarcomas are sporadic, these syndromes may provide important clues to the pathogenesis of sporadic osteosarcomas. A multitude of cytogenetic abnormalities have been detected, but no specific abnormalities that can serve as markers of osteosarcoma have been found. Areas of molecular aberrations include tumor suppressor pathway (RB and p53), oncogenes (Her-2), telomere maintenance, angiogenesis (VEGF), chemokines (CXCR4), cytoskeletons (Ezrin), matrix metalloproteinases and adhesion molecules (CD44). Understanding the contributions of the different cytogenetic and molecular aberrations will aid in discovering predictors of outcome and in devising therapies for osteosarcoma.

**Keywords : Osteosarcoma; Biology; Molecular marker; Outcome**

**핵심용어 : 골육종; 분자생물학적 표지자**

골육종은 뼈에서 발생하는 가장 흔한 원발성 악성 종양으로 소아에서 발생하는 암의 약 5%를 차지한다. 최근 30년 동안 항암화학요법의 발달에 따라 골육종 환자의 생존율이 크게 향상되었지만 초진시 원격전이가 있는 경우나 종양이 재발된 경우 20%에도 못 미치는 장기 생존율을 보이고 있다. 새로운 항암제의 개발과 다양한 종류의 항암제 투여 술식의 시도에도 불구하고 생존율의 눈에 띄는 향상은 이루어지지 못한 실정이다(1, 2). 이는 골육종 환자의 15%가 진단 당시 이미 폐나 뼈같은 다른 장기로의 육안적 전이(gross metastasis) 혹은 미세 전이(micro-metastasis)를 가지고 있고 현재까지 사용되고 있는 항암제에 대한 저항성(drug resistance)이 원인이라고 생각된다. 골육종 환자의 생존율을 향상시키기 위하여 기존 항암제의 한계를 극복하고 보다 효과적인 전신적인 종양의 억제력을 얻기 위한 치료법의 개발이 필요하다. 이를 위해 골육종의 발병 과정에 대한 분자생물학적인 이해와 이 과정에 특이하게

관련이 있는 생물학적 표지자(biologic marker)를 찾아내는 일이 중요한 것으로 생각된다.

이 글에서는 현재까지 알려진 골육종의 생물학적인 정보들을 유전적 소인, 세포유전학적 이상 그리고 분자생물학적으로 중요한 물질의 관점에서 검토해 보고자 한다.

### 골육종의 유전적 소인 (Genetic Predisposition)

대부분의 골육종은 산발적으로(sporadic) 발생하나 일부에선 유전적 소인을 갖는다. 골육종이 호발하는 유전적 소인을 갖는 질환으로 유전 망막모세포종(hereditary retinoblastoma), Li-Fraumeni 증후군, Rothmund-Thomson 증후군과 Werner 증후군이 있다(2). 이 질환들은 세포주기의 조절(cell cycle control)이나 DNA의 대사와 관련된 유전자의 돌연변이(mutation)를 보이는데 이러한 현상은 산발적으로 발생한 골육종의 이해에 있어서도 많은 도움을 준다.

### 골육종의 세포유전학적 이상

활막육종, 횡문근육종, 또는 유잉육종 등에서 특징적인 염색체의 이상이 발견되는 것과는 달리 골육종에서는 종양에 특이적인 염색체의 이상이 발견되지 않는다(3). 골육종의 약 70%에서 세포유전학적인 이상이 발견되고 복잡하고 다양한 양상으로 나타난다.

염색체의 증폭은 6p12-p21, 17p.11.2와 12q13-q14에서 가장 흔하게 관찰되며 염색체의 소실(2p, 3p, 9, 10p 등)과 염색체의 획득(Xp, Xq, 5q, 6p 등)이 나타났다(4).

## 골육종의 분자생물학적 이상

### 1. 종양억제 유전자(Tumor Suppressor Gene) 관련

#### (1) RB 경로(Pathway)

RB 단백질은 세포주기의 G1기에서 S기로의 진행을 조절하는 물질로 종양의 성장을 억제하는 기능을 한다. RB경로의 조절에 관여하는 물질로 사이클린-의존 키나아제 4/6(cyclin-dependent kinase-4/6, CDK 4/6), 사이클린 D1(cyclin D1)과 p16<sup>INK4a</sup> 등이 있는데 RB 유전자나 조절에 관여하는 물질들의 유전자 이상은 종양의 발병에 영향을 줄 수 있다.

#### 1) RB

골육종에서 가장 흔히 발견되는 세포주기 조절의 이상과 관련된 종양억제 유전자이다. 망막모세포종의 약 40%를 차지하는 유전성 망막모세포종에서 RB 유전자의 내립 물려받기(germline) 돌연변이가 발견된다. 유전 망막모세포종 환자들에서 또 다른 암이 발생할 확률이 높는데, 특히 골육종의 발생이 일반인의 약 1,000배에 이르는 것으로 알려져 있다(5). 산발적으로 발생하는 골육종에서도 약 70%에서 RB 유전자가 위치하고 있는 13q14 염색체의 이상이 발견된다(6).

#### 2) p16<sup>INK4a</sup>

p16<sup>INK4a</sup>는 사이클린-의존 키나아제 4/6의 억제물질로 RB의 인산화를 막아 세포주기의 G1기에서 S기로의 진행을 억제하여 종양 세포의 증식을 억제한다(7). 골육종 환자의 약 10%에서 p16<sup>INK4a</sup>이 불활성화된 것이 관찰된다(8).

#### 3) 사이클린-의존 키나아제 4/6와 사이클린 D1

사이클린-의존 키나아제 4/6(cyclin-dependent kinase-4/6, CDK 4/6)는 사이클린 D1과 같이 작용하여 RB의 인산화를 일으킨다. 인산화된 RB는 세포주기의 G1

기에서 S기로의 진행을 억제하지 못해 종양 세포의 증식이 일어나게 된다. CDK4 유전자와 사이클린 D1 유전자의 이상은 골육종 환자에서 각각 약 10%와 4%에서 발견이 된다.

## (2) p53 경로

p53은 인간에게서 발생하는 암에서 가장 흔히 발견되는 돌연변이된 유전자로 염색체 17p13에 위치한다. p53은 세포의 DNA가 손상되었을 때 세포주기의 조절과 세포자멸사(apoptosis)에 관여하여 종양의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있다(9). p53경로의 조절에 관여하는 물질로 murine double minute 2(MDM2)와 p14<sup>ARF</sup> 등이 있는데 p53 유전자나 조절에 관여하는 물질들의 유전자 이상은 종양의 발병에 영향을 줄 수 있다.

### 1) p53

골육종의 약 15~30%에서 p53유전자의 돌연변이가 발견이 된다(10). Li-Fraumeni 증후군은 가족의 구성원이 유방암, 백혈병이나 골육종 등의 다양한 종류의 암에 이환되는 가족성 암 증후군으로 p53 유전자의 내림 물려받기 돌연변이가 원인이다(11). p53은 p21을 활성화하는데 활성화된 p21은 사이클린 D와 사이클린-의존 키나아제 4/6 또는 사이클린 E와 사이클린-의존 키나아제 2를 억제하여 RB의 인산화를 감소시켜 세포주기의 진행을 억제한다. p53 유전자의 이상과 골육종의 전이와의 연관성에 대한 연구에서는 전이가 이루어지기 전과 후의 p53 유전자 상태의 차이가 없어 p53 유전자의 이상은 골육종의 초기 발병과 연관이 있을 것으로 생각되고 있다(12). 한편 최근에 발표된 전향적 연구에 의하면, p53의 돌연변이는 골육종 환자에서 전이의 발생이나 치료 결과에 의미있는 영향을 주지 못한다는 보고도 있다(13).

### 2) MDM2

MDM2는 염색체 12q13에 위치하여 p53과 결합하여 불활성화시킨다. MDM2의 과발현은 p53을 억제하여 종

양의 성장에 기여하게 되는데 골육종의 약 10~20%에서 나타난다. MDM2의 발현은 골육종의 진행과 관련이 있는 것으로 알려져 있다(14).

### 3) p14<sup>ARF</sup>

p14<sup>ARF</sup>는 MDM2와 결합하여 p53을 불활성화시키는 것을 막는다. 염색체 9p21에 위치하며 골육종의 약 10%에서 p14<sup>ARF</sup>의 homozygous deletion이 관찰된다(15). 또한 p14<sup>ARF</sup> 촉진염기 서열(promoter region) 부위의 메틸화는 골육종의 40% 이상에서 관찰되는데, 이들 환자에서는 매우 불량한 예후를 보인다(16).

## 2. 인간 표피 성장 인자 수용체 2

### (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)

HER-2라고 알려진 인간 표피 성장 인자 수용체 2는 막횡단 타이로신 카이네이즈(receptor tyrosine kinase)로 유방암의 전이와의 연관성이 밝혀져 있으며 이에 대한 항체(trastuzumab)가 이미 유방암의 치료에 사용되고 있다. 골육종에서도 발현 정도와 치료결과의 연관성이 있다고 보고된 후 재발성 골육종에 대하여 임상시험이 시행되었으나, 별다른 생존율 향상을 보이지 않았는데, 아마도 trastuzumab과 IGF-1R(insulin-like growth factor-1 receptor)의 상호작용이 암세포가 저항성을 가지게 되는 중요한 요인일 것으로 생각된다. IGF-1R이 골육종에서 악성도에 기여한다고 알려져 있으므로 이 둘을 동시에 타겟으로 하는 치료가 유리할 것으로 보인다(17~19).

## 3. 혈관내피성장인자

### (Vascular Endothelial Growth Factor)

악성 종양의 성장과 전이가 이루어지기 위해서 꼭 필요한 혈관 생성(angiogenesis)에 가장 중요한 인자인

VEGF는 혈관내피세포의 분열촉진물질(mitogen)로 혈관 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 다른 많은 종류의 암과 마찬가지로 골육종에서도 VEGF의 높은 발현은 불량한 예후를 초래하며 골육종에서도 혈관내피성장인자에 대한 연구는 매우 많이 진행되어 왔고 siRNA를 이용하여 VEGF를 타겟으로 하는 세포 수준의 연구는 되고 있으나 임상 연구를 할 단계까지는 오지 않았다(20~22).

#### 4. 케모카인 수용체 4(CXCR-4)

많은 종류의 케모카인과 그 수용체들이 암의 진행에 연관이 있는 것으로 알려져 있는데, 골육종에서는 특히 CXC receptor 4(CXCR-4)가 높게 (63%) 발현된다. 또한 이런 환자에서 무병 생존율이 매우 낮은 것으로 밝혀져 있으며, 전이의 발생률도 매우 높은 것으로 보고되고 있다(23, 24).

#### 5. 에즈린(Ezrin)

에즈린은 세포막과 세포골격(cytoskeleton)을 연결시키는 물질로 신호 전달 체계에 관여하여 종양 세포의 이동과 전이 작용을 일으키는 것으로 알려져 있다. 최근 다양한 종류의 암에서 에즈린의 발현과 환자 예후와의 연관성이 밝혀지고 있다. 마우스를 이용한 실험에서 골육종의 전이가 일어나기 위해서는 에즈린이 필요함이 밝혀졌고 이는 MAPK 활성화에 의존한다. 소아 골육종 환자의 92%에서 에즈린의 발현되며, 고발현 환자의 경우 높은 경우 무병생존기간(disease free interval)이 짧으며( $p=0.01$ ) 종양이 전이될 확률이 더 높은 것으로 알려져 있다(25).

#### 6. 매트릭스 메탈로프로테아제

##### (Matrix Metalloproteinase)

종양이 성장하고 전이되기 위해서 세포외 간질 조직을

분해하는 것이 필요하다. 매트릭스 메탈로프로테아제에는 아교질분해효소(collagenase), 젤라틴분해효소(gelatinase)와 스트로멜리신(stromelysin) 등의 다양한 효소들이 포함되며 이 효소들은 다양한 세포외 간질 조직을 분해시킬 수 있다. 매트릭스 메탈로프로테아제에는 다양한 종류의 암에서 그 발현이 증가되어 있는 것으로 알려져 있다. 골육종에서도 매트릭스 메탈로프로테아제-2와 매트릭스 메탈로프로테아제-9의 발현이 증가되고 종양의 침습능과 연관성이 있는 것으로 알려져 있다(26).

#### 7. CD44

세포막에 존재하는 당단백 물질로 세포간 또는 세포-간질의 상호 작용에 관여하여 종양의 성장과 전이에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 다양한 종류의 암에서 예후와의 관련성이 알려져 있으며 골육종에서도 CD44의 아형인 CD44v5가 불량한 예후와 관련이 있는 것으로 보고된 바 있다(27).

이상으로 골육종의 진행과 치료결과에 영향을 주는 몇 가지 대표적인 인자를 소개하였다. 이 외에도 TGF- $\beta$ 3(28)와 MET(HGF receptor)같은 성장인자 또는 그 수용체(29), bcl-2, survivin 등과 같은 세포자멸사 관련 인자들(30), 인테그린(31) 등 골육종의 성장과 전이에 영향을 주는 많은 물질들이 있으나, 이들을 이용한 targeted therapy를 실제로 적용하기까지는 아직 더 많은 연구가 필요할 것으로 보인다.

## 참 고 문 헌

1. Marina N, Gebhardt M, Teot L, Gorlick R. Biology and therapeutic advances in pediatric osteosarcoma. *Oncologist* 2004; 9: 422 - 41

2. Wang L. Biology of osteogenic sarcoma. *Cancer J* 2005; 11: 294 - 305
3. Sandberg A, Bridge J. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 145: 1 - 30
4. Ozaki T, Schaefer K, Wai D, Buerger H, Flege S, Lindner N, et al. Genetic imbalances revealed by comparative genomic hybridization in osteosarcomas. *Int J Cancer* 2002; 102: 355 - 65
5. Wong F, Boice J, Abramson D. Cancer incidence retinoblastoma: radiation dose and sarcoma risk. *JAMA* 1997; 278: 1262 - 7
6. Wadayama B, Toguchida J, Shimizu T, Ishizaki K, Sasaki M, Kotoura Y, et al. Mutation spectrum of the retinoblastoma gene in osteosarcomas. *Cancer Res* 1994; 54: 3042 - 48
7. Maelandsmo G, Berner J, Florens V. Homozygous deletion frequency and expression levels of the CDKN2 gene in human sarcomas: relationship to amplification and mRNA levels of CDK4 and CCND1. *Br J Cancer* 1995; 72: 393 - 8
8. Wei G, Lonardo F, Ueda T, Kim T, Huvo A, Healey J, et al. CDK4 gene amplification in osteosarcoma: reciprocal relationship with INK4A gene alterations and mapping of 12q13 amplifications. *Int J Cancer* 1999; 80: 199 - 204
9. Hollenstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris C. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49 - 53
10. Scholz R, Kabisch H, Weber B, Roser K, Delling G, Winkler K. Studies of the RB1 gene and the p53 gene in human osteosarcomas. *Pediatr Hematol Oncol* 1992; 9: 125 - 37
11. Li F, Fraumeni J, Mulvihill J. A cancer family syndrome in twenty - four kindreds. *Cancer Res* 1988; 48: 5358 - 62
12. Gokgoz N, Wunder J, Mousses S, Eskandarian S, RS RB, Andrulis I. Comparison of p53 mutations in patients with localized osteosarcoma and metastatic osteosarcoma. *Cancer* 2001; 92: 2181 - 9
13. Wunder JS, Gokgoz N, Parkes R, Bull SB, Eskandarian S, Davis AM, Beauchamp CP, et al. TP53 mutations and outcome in osteosarcoma: a prospective, multicenter study. *J Clin Oncol* 2005 Mar 1; 23: 1483 - 90
14. Lonardo F, Ueda T, Huvo A. p53 and MDM2 alterations in osteosarcomas: correlation with clinicopathologic features and proliferative rate. *Cancer* 1997; 79: 1541 - 7
15. Lopez - Guerrero J, Lopez - Gines C, Pellin A. Deregulation of the G1 to S - phase cell cycle checkpoint is involved in the pathogenesis of human osteosarcoma. *Diag Mol Pathol* 2004; 13: 81 - 91
16. Oh JH, Kim HS, Kim HH, Kim WH, Lee SH. Aberrant methylation of p14ARF gene correlates with poor survival in osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res* 2006 Jan; 442: 216 - 22
17. Fellenberg J, Krauthoff A, Pollandt K. Evaluation of the predictive value of Her - 2/neu gene expression on osteosarcoma therapy in laser - microdissected paraffin - embedded tissue. *Lab Invest* 2004; 84: 113 - 21
18. Scotlandi K, Manara MC, Hattinger CM, Benini S, Perdicchi S, Serra M, et al. Eur J Cancer. 2005 Jun; 41: 1349 - 61 Prognostic and therapeutic relevance of HER2 expression in osteosarcoma and Ewing's sarcoma.
19. Gorlick R, Huvo AG, Heller G, Aledo A, Beardsley GP, Meyers PA, et al. Expression of HER2/erbB - 2 correlates with survival in osteosarcoma. *J Clin Oncol* 1999 Sep; 17: 2781 - 8
20. Kaya M, Wada T, Akatsuka T, Kawaguchi S, Nagoya S, Shindoh M, et al. Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 572 - 7
21. Charity R, Foukas A, Deshmukh N, Grimer R. Vascular endo-

- thelial growth factor expression in osteosarcoma. Clin Orthop 2006; 448: 193 - 8
22. Guan H, Zhou Z, Wang H, Jia SF, Liu W, Kleinerman ES. Clin Cancer Res. A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor inhibits Ewing's sarcoma growth in a xenograft mouse model. 2005 Apr 1; 11: 2662 - 9
  23. Perissinotto E, Cavalloni G, Leone F, Fonsato V, Mitola S, Grignani G, et al. Involvement of chemokine receptor 4/stromal cell - derived factor 1 system during osteosarcoma tumor progression. Clin Cancer Res 2005; 11: 490 - 7
  24. Laverdiere C, Hoang BH, Yang R, Sowers R, Qin J, Gorlick R, et al. Messenger RNA expression levels of CXCR4 correlate with metastatic behavior and outcome in patients with osteosarcoma. Clin Cancer Res 2005 Apr 1; 11: 2561 - 7
  25. Khanna C, Wan X, Bose S, Cassaday R, Olomu O, Mendoza A, et al. The membrane - cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. Nat Med 2004; 10: 182 - 6
  26. Bjorland K, Flatmark K, Pettersen S, Aasen A, Fodstad O, Malandsmo G. Matrix metalloproteinases participate in osteosarcoma invasion. J Surg Res 2005; 127: 151 - 6
  27. Kim H, Park Y, Oh J, Jeong J, Kim C. Expression of CD44 isoforms correlates with the metastatic potential of osteosarcoma. Clin Orthop 2002; 396: 184 - 90
  28. Kloen P, Gebhardt MC, Perez - Atayde A, Rosenberg AE, Springfield DS, Mankin HJ, et al. Cancer. 1997 Dec 15; 80: 2230 - 9 Expression of transforming growth factor - beta (TGF - beta) isoforms in osteosarcomas: TGF - beta3 is related to disease progression
  29. Coltella N, Manara MC, Cerisano V, Trusolino L, Di Renzo MF, Ferracini R, et al. Role of the MET/HGF receptor in proliferation and invasive behavior of osteosarcoma. FASEB J. 2003 Jun; 17: 1162 - 4 Epub 2003 Apr 22
  30. Trieb K, Lehner R, Stulnig T, Sulzbacher I, Shroyer KR. Survivin expression in human osteosarcoma is a marker for survival. Eur J Surg Oncol 2003 May; 29: 379 - 82
  31. Duan X, Jia SF, Zhou Z, Langley RR, Bolontrade MF, Kleinerman ES. Association of alphavbeta3 integrin expression with the metastatic potential and migratory and chemotactic ability of human osteosarcoma cells. Clin Exp Metastasis 2004; 21: 747 - 53



## Peer Reviewer Commentary

### 정 성택 (전남의대 정형외과)

본 논문은 골 육종 발병과정에 대한 분자생물학적 이해와 관련된 생물학적 표지자에 대해 기술하고 있다. 최근 항암요법과 수술요법의 발달에도 불구하고 골 육종은 아직까지 60~70% 정도의 장기 생존율을 보이며, 특히 전이나 재발된 경우 장기 생존율은 급격하게 감소된다. 이러한 현실에서 골 육종의 발생과정에 대한 기초 연구를 검토해 보고 이를 응용한 새로운 치료방법의 개발이 절실히 요구된다.

필자는 골 육종과 관련된 세포유전학적 이상, 분자생물학적 이상 인자를 상세히 소개하였고, 각각의 의의와 한계에 대해서도 명확하게 규정하였다. 이러한 보고는 향후 골 육종의 발생과정을 이해하는 기초자료가 되며, 나아가 이를 기초로 새로운 치료방법의 개발을 제시하였다는 점에서 학술적 가치가 있다고 사료된다.