

산발성 부갑상선 종양에서 *MEN1* 유전자의 체성 돌연변이 유형과 표현형에 대한 연구

단국대학교 의과대학 외과학교실, ¹내과학교실, ²성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 내분비대사내과학교실

채영수 · 김희진¹ · 김선욱² · 장명철

Somatic Mutational Analysis of *MEN1* and Phenotypic Correlation in Sporadic Parathyroid Tumors

Young Su Chae, M.D., Hee Jin Kim, M.D.¹, Sun Wook Kim, M.D.², Myung-Chul Chang, M.D.

Departments of Surgery and ¹Internal Medicine, Dankook University College of Medicine, Cheonan, ²Division of Endocrinology and Metabolism,
Department of Medicine, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: *MEN1* gene mutation causes multiple endocrine neoplasia type 1. It also suggests that somatic *MEN1* gene mutation plays a role in sporadic endocrine tumor. In this study, we examined whether somatic mutations of *MEN1* gene are responsible for sporadic parathyroid tumors and correlate with clinical manifestations of parathyroid tumors.

Methods: Somatic mutation of *MEN1* gene in the formalin-fixed, paraffin-embedded parathyroid tumor tissue from 8 adenomas, 2 carcinomas and 1 hyperplasia were analyzed by direct sequencing. Clinicopathological parameters were reviewed from medical records and compared with the mutational data.

Results: Eight of eleven (73%) sporadic parathyroid tumors had somatic *MEN1* mutations of 14 different types. In the 14 types, 13 were a point mutation which is composed of 8 missense mutations, 2 nonsense mutations and 3 silent mutations. One of 14 types is a frameshift deletion of 27 base pairs in exon 2. Somatic mutation was frequent in the exon 2 and exon 10. Four types of polymorphism were found. There was no correlation between the presence of mutations and clinicopathological phenotype of parathyroid tumors.

Conclusion: This result suggests that somatic mutation of *MEN1* gene plays a definite role in sporadic parathyroid tumor formation. (J Korean Surg Soc 2009;76:15-22)

Key Words: Parathyroid, *MEN1*, Sporadic, Somatic mutation

중심 단어: 부갑상선, *MEN1*, 산발성, 체성 돌연변이

서 론

MEN1 유전자는 제1형 다발성 내분비 선종증(multiple en-

docrine neoplasia type 1, *MEN1*)의 원인 유전자로 10개의 엑손(exon)으로 구성되어 있고, 610개의 아미노산으로 이루어진 *menin* 단백질을 생성한다.(1) *MEN1* 유전자의 배선 돌연변이(germline mutation)는 상염색체 우성으로 유전되며, 이러한 돌연변이가 있는 경우 부갑상선 종양, 췌십이지장 내분비 종양, 뇌하수체 종양이 가계 구성원에 발생하는 *MEN1*을 유발한다. *MEN1* 유전자의 배선 돌연변이는 엑손 2번에서 10번에 걸쳐 전반적으로 다양하게 나타나는 것으로 보고되고 있으며,(2) 돌연변이의 형태도 여러 가지로 나타나지만 대부분 *menin* 단백질의 절단을 유발하여 단백질의 기

책임저자: 장명철, 충남 천안시 안서동 산16-5
☎ 330-714, 단국대학교병원 외과
Tel: 041-550-3930, Fax: 041-556-3878
E-mail: changmc@dankook.ac.kr

접수일 : 2008년 6월 16일, 게재승인일 : 2008년 8월 7일
이 연구는 2006학년도 단국대학교의료원 의학연구소 연구비 지원으로 연구되었음.

능 소실을 초래한다.(3) *MEN1* 유전자는 종양억제유전자로 Knudson의 이타가설(two-hit hypothesis)을 따르게 되므로 종양의 발생을 위하여 *MEN1* 유전자의 돌연변이와 함께 반대편 대립유전자의 이형접합소실(loss of heterozygosity, LOH)이 필요하다.

부갑상선 종양은 *MEN1*의 가장 흔한 표현형으로 대부분 가족력 없이 산발적으로 발생한다. 외국의 보고에 의하면 산발성 부갑상선 종양의 약 30%에서 *MEN1* 유전자의 이형접합소실이 관찰되며(4) 약 20%에서 *MEN1* 유전자의 체성 돌연변이(somatic mutation)가 보고된다.(5) 이는 산발성 부갑상선 종양의 발생에도 *MEN1* 유전자가 일부 관여함을 나타낸다. 하지만 국내에서는 *MEN1* 유전자의 배선 돌연변이에 대한 일부 보고(6-11)만 있으며 체성 돌연변이에 대한 연구는 없다. 따라서 본 연구에서는 산발성 부갑상선 종양에서 *MEN1* 유전자의 체성 돌연변이를 조사하여 산발성 부갑상선 종양에서 *MEN1* 유전자의 변이 유형과 임상적 표현형과의 관계에 대하여 알아보고자 하였다.

방 법

1) 대상 표본

단국대병원에서 산발성 부갑상선 종양으로 수술을 시행한 11예를 대상으로 하였다. 산발성 부갑상선 종양은 부갑상선, 뇌하수체, 췌장 내분비 종양의 가족력이 없으면서, 부갑상선 이외 다른 내분비 종양이 없는 예로 정의하였다. 의무기록을 통하여 성별, 연령, 부갑상선 호르몬, 칼슘, 알칼

라인 포스파타제(alkaline phosphatase), 골밀도검사 등 임상적 인자와 병리 조직학적 인자를 조사하였다.

2) 종양 조직에서 DNA 추출

파라핀 포매 부갑상선 종양 조직에서 10 μ m 두께로 2개의 절편을 만들어 TaKaRa DEXPAT kit (TaKaRa Biomedicals, Shiga, Japan)를 이용하여 DNA를 추출하였다.

3) 중합효소연쇄반응(PCR)

10개의 엑손 중 전사되는 엑손 2에서 엑손 10까지의 9개 엑손에 대하여 PCR을 시행하였다. 엑손 2와 엑손 10은 두 부분으로 나누어 PCR을 시행하였고, 엑손 5와 엑손 6은 하나의 primer를 이용하였다. Non-nested 및 nested PCR을 시행하였으며 사용된 primer는 Table 1과 같았다. PCR 반응액은 5X Green GoTaq buffer 10 μ l, dNTP 혼합용액(dATP, dGTP, dCTP, dTTP 각 0.2 mM), 각각의 primer 5 pmol, Taq-polymerase (Promega, WI, USA) 1 unit과 추출한 DNA 5 μ l를 혼합하여 최종 반응액이 50 μ l가 되도록 하였다. PCR 반응은 94°C에서 5분간 변성시키고, 94°C에서 1분, 각 반응의 불임온도(56~65°C)에서 1분, 72°C에서 1분으로 하여 45회 시행한 후 마지막으로 72°C에서 10분간 연장하여 반응시켰다. Nested PCR을 실시한 경우는 두 번째 PCR 반응 시 첫 번째 PCR 산물 0.5 μ l를 template으로 사용하고 각각의 2차 PCR primer를 이용하여 94°C에서 5분간 변성시키고, 94°C에서 1분, 각 반응의 불임온도(56~65°C)에서 1분, 72°C에서 1분으로 하여 20~40회 시행한 후 마지막으로

Table 1. PCR primers used for *MEN1* somatic mutation analysis

Exon	Sense primer (5'→3')	Antisense Primer (5'→3')
2 1 st PCR	TGGAACCTTAGCGGACCCT	GCTTCAGTTTCCCAACTGCA
2A 2 nd PCR	GGGCGGGTGGAACCTTAG	GCTGGGCTGGAAGGTGAG
2B 2 nd PCR	GTCATCCCTACCAACGTTCC	CCATGGAGGGTTTTGAAGAA
3	AGTGTGGCCCATCACTACCT	AAGGGGCTCTTCTGTCTTCC
4	CAGCCTTGTCCTTCATAC	CCAGCCCTTTAATGGAGTCA
5+6	CCTCCTGGAAAAATGGGTTA	CCCCAACACACAAAGTTCT
7 1 st PCR	AGAAAGAGAAGGGCCCTGAG	GGTCCCTACCTCTGGGTAA
7 2 nd PCR	ACTCCCTGGGATCTTCCTGT	GCCTAGGGACTGGATGGAA
8 1 st PCR	TTAACCACCATCATCCAGCA	TACCTTCAGTCCCGTCCAAC
8 2 nd PCR	GCATCATTTTGCAGTGAGGA	CCCTAATCCCGTACATGCAG
9 1 st PCR	ATGGTACGTCCTGGCTATGG	AGAGCAAGGTGAGAGCAAGG
9 2 nd PCR	AGGGGTCTTTGCCTAGGTG	ACCCAGGGGGTCTCAGTC
10 1 st PCR	CATCTGCCCATCCCCTTG	GCAGAACATGGGCTCAGAGT
10A 2 nd PCR	AACCTTGCTCTCACCTTGCT	CAGCGACAGTCCCAGGAG
10B 2 nd PCR	AGCCTCCTGGGACTGTCTG	AGTAGTTCAGAGGCCTTTGC

72°C에서 10분간 연장하여 반응시켰다. PCR 반응산물은 1.5% 아가로스 겔(agarose gel)에서 전기 영동하여 DNA 밴드를 확인한 후 AccuPrep® PCR Purification Kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 정제하였다.

4) 직접 DNA 염기서열분석

염기서열 분석은 ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems, CA, USA) 자동서열분석기를 이용하여 직접 염기서열분석(direct sequencing)을 시행하였다. 직접 염기서열분석은 5' 및 3' primer 각각에 대하여 앞방향(forward) 및 뒷방향(reverse) 서열분석을 시행하여 분석오류를 줄이고자 하였다.

염기서열분석결과를 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>), Universal Mutation Database (<http://www.umd.be/>), GeneCards (<http://www.genecards.org/>), dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) 자료와 비교하여 돌연변이 및 다형성(polymorphism) 여부를 확인하였고, 각각의 임상병리 자료와의 상관관계에 대하여 조사하였다. 돌연변이는 *MEN1* cDNA reference sequence (GenBank accession number NM_130799.1)의 염기서열을 기준으로 하였다.(12)

5) 통계적 분석

돌연변이 여부와 임상병리학적 표현형과의 상관관계를 알아보기 위하여 연속 변수의 경우 Mann-Whitney U test를, 비연속 변수의 경우는 Fisher exact test를 시행하였다. 통계적 분석은 SPSS for windows ver. 12.0을 이용하였다.

결 과

1) 임상병리학적 특성

11예 중에서 남성이 4예였고 평균연령은 54±17세였다. 단일 종양은 10예, 다발성 종양은 1예였다. 단일 종양 10예 중 8예가 부갑상선 선종이었고, 2예가 부갑상선 암이었다. 다발성 종양 1예는 만성신부전과 동반한 부갑상선 과증식이었다. 종양의 크기는 평균 2.9±1.3 cm였다. 수술 전 PTH는 평균 713.2±592.3 pg/ml (정상 10~67 pg/ml)로, 선종의 수술 전 PTH는 평균 624.4±415.0 pg/ml였다. 혈중 칼슘은 평균 12.3±1.7 mg/dl (정상 8.4~10.4 mg/dl)로, 선종의 혈중 칼슘은 평균 12.8±1.8 mg/dl였다. 알칼라인 포스파타제는 평균 309.2±272.4 IU/L (정상 35~104 IU/L), 골밀도검사 T-score (L-spine)는 평균 -2.88±0.96였다.

수술 전 무증상으로 우연히 발견된 경우는 6예였다. 3예에서는 신장 및 요로 결석으로 검사 중에 발견되었고, 1예에서는 소화성 궤양의 치료 중에 발견되었다. 나머지 1예는 만성신부전으로 치료 중 발견된 부갑상선 과증식이었다. 11예의 임상병리학적 특성을 Table 2에 정리하였다.

2) MEN1 유전자의 체성 돌연변이

11개 표본 중 8개에서 14종류의 체성 돌연변이가 관찰되었다. 이들은 모두 이전에 보고되지 않은 새로운 형태의 돌연변이였다. 14종류의 돌연변이는 엑손 2에서 4종류, 엑손 9에서 1종류, 엑손 10에서 9종류가 관찰되었다. 14종류 중

Table 2. Clinicopathological characteristics in sporadic parathyroid tumors

Case No.	Sex	Age	Type	Histology	Size (cm)	PTH [†] (pg/ml)	Calcium (mg/dl)	ALP [§] (IU/L)	Sx	BMD [¶] T-score
1	F	37	U*	Adenoma	2.0	782	12.4	341	Yes	Na**
2	M	39	U	Adenoma	5.0	1,151	14.9	275	Yes	-2.27
3	F	52	U	Adenoma	3.0	153	10.6	72	Yes	Na
4	M	43	U	Adenoma	2.5	333.2	15.1	247	No	-2.35
5	F	72	U	Adenoma	3.0	470.5	10.9	83	No	Na
6	M	70	U	Adenoma	2.5	1,248.6	11.1	336	No	-3.83
7	F	64	U	Adenoma	3.0	658.4	13.5	176	No	-3.29
8	F	20	U	Adenoma	2.0	198.1	13.6	205	No	-1.60
9	M	77	U	Carcinoma	1.3	164.1	10.9	37	Yes	-2.50
10	F	47	U	Carcinoma	5.5	Na	11.7	627	No	Na
11	F	43	M [†]	Hyperplasia	2.3	1,973.2	10.4	972	Yes	-4.30

*U = Uniglandular; [†]M = Multiglandular; [†]PTH = parathyroid hormone; [§]ALP = alkaline phosphatase; ^{||}Sx = symptom; [¶]BMD = bone mineral density; **Na = not available.

에서 13종류는 point mutation이었다.

한 종류는 엑손 2의 2B primer로 PCR 시행 후 전기영동 결과 두 개의 band로 나타났다(Fig. 1). 아래 band를 정제 후 염기서열 분석을 시행하여 정상적인 348bp의 PCR 산물에서 27bp가 결손되었음을 확인하였다(Fig. 2). 이는 frameshift mutation (c.340_366del27AGCCGTGAGCTGGTGAAGAAG-GTCTCC)으로 그 결과 9개의 아미노산(SerArgGluLeuVal-LysLysValSer)이 결손되었다.

14종류의 돌연변이 대부분은 이형접합체(heterozygote)였으나 c.24G>A 및 c.107T>C 2종류는 동형접합체(homozygote) 형태로 나타났다.

돌연변이 결과로 인하여 c.24G>A, c.1212C>T, c.1509C>T는 아미노산의 변화가 없는 silent mutation이었다. c.19C>T 및 c.1768C>T는 종결 코돈(stop codon)을 형성하

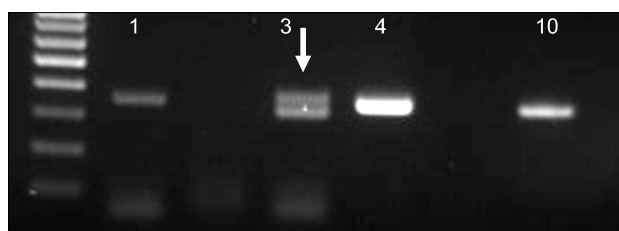


Fig. 1. The agarose gel electrophoresis of exon 2B of *MEN1* in case 1, 3, 4, 10 parathyroid tissue. The band of case 3 (arrow) was double.

는 nonsense mutation이었으며, 나머지 8 종류는 새로운 아미노산을 생성하는 missense mutation이었다.

한 종류의 돌연변이가 여러 표본에서 나타났는데, c.107T>C는 2개의 표본(표본 5, 10)에서 관찰되었고, c.1366C>T는 4개의 표본(표본 2, 3, 5, 8)에서 관찰되었다.

또한 하나의 표본에서도 여러 종류의 돌연변이가 나타났는데, 표본 2에서 4종류, 표본 3에서 2종류, 표본 4에서 2종류, 표본 5에서 2종류, 표본 6에서 6종류의 돌연변이가 관찰되었다. 이상의 돌연변이를 Table 3과 Fig. 3에 정리하였다.

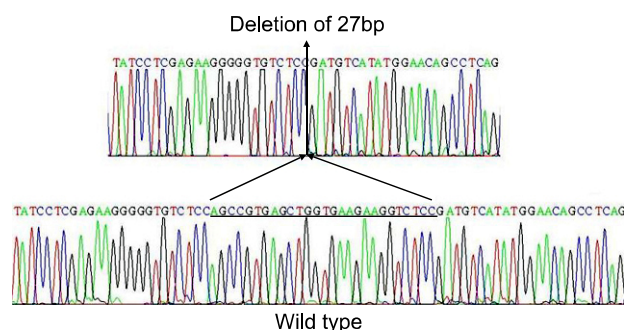


Fig. 2. The direct sequencing result of lower part band of exon 2B of *MEN1* in case 3 parathyroid tissue. The lower graph was normal wild type and the upper graph was mutated result. The underlined 27bp sequences of normal wild type were deleted.

Table 3. *MEN1* gene somatic mutation in sporadic parathyroid tumors

Mutation	Exon	Codon	Effect	Type	Case No.
c.19C>T	2	7	Nonsense (Gln [†] >Stop)	Hetero [†]	6
c.24G>A	2	8	Silent (Lys [§] >Lys)	Homo*	2
				Hetero	6
c.107T>C	2	36	Missense (Leu >Pro [¶])	Homo	5, 10
c.340_366del27AGCCGTGAGCTG-GTGAAGAAGGTCTCC	2	114	Frameshift deletion	Hetero	3
c.1212C>T	9	404	Silent (Leu>Leu)	Hetero	11
c.1355G>A	10	452	Missense (Arg ^{**} >Gln)	Hetero	2
c.1366C>T	10	456	Missense (Arg>Cys ^{††})	Hetero	2, 3, 5, 8
c.1409C>T	10	470	Missense (Pro>Leu)	Hetero	4
c.1436G>A	10	479	Missense (Arg>Gln)	Hetero	4
c.1509C>T	10	503	Silent (Gly ^{††} >Gly)	Hetero	2
c.1684A>G	10	562	Missense (Lys>Glu ^{§§})	Hetero	6
c.1768C>T	10	590	Nonsense (Gln>Stop)	Hetero	6
c.1792T>C	10	598	Missense (Tyr >His ^{¶¶})	Hetero	6
c.1799T>C	10	600	Missense (Leu>Pro)	Hetero	6

*Homo = homozygote; [†]Hetero = heterozygote; [†]Gln = Glutamine; [§]Lys = Lysine; ^{||}Leu = Leucine; [¶]Pro = Proline; ^{**}Arg = Arginine; ^{††}Cys = Cysteine; ^{††}Gly = Glycine; ^{§§}Glu = Glutamic acid; ^{|||}Tyr = Tyrosine; ^{¶¶}His = Histidine.

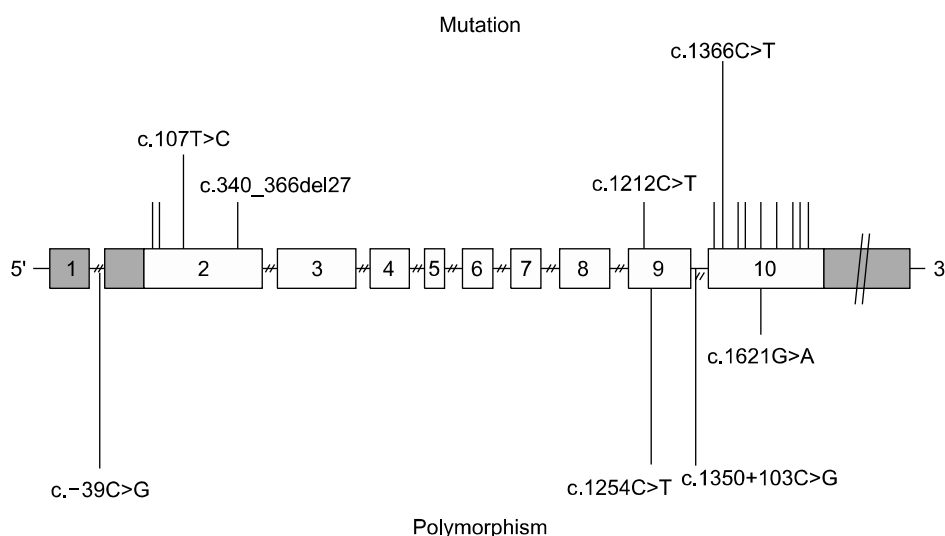


Fig. 3. Schematic representation of genomic structure and position of mutations and polymorphisms in the *MEN1* gene. The upper part was the mutation and the lower part was the polymorphism. The length of the vertical line indicates the frequency of mutations. The shaded areas of exon 1 and part of exon 2 and 10 are non-translated code.

Table 4. Clinicopathological parameters of *MEN1* mutation-positive and negative parathyroid tumors

Parameters	Mutation positive (%)	Mutation negative (%)	P
No. of patients	8 (72.7)	3 (27.3)	
Sex			1
Male	3 (37.5)	1 (33.3)	
Female	5 (62.5)	2 (66.7)	
Age (years)	48±17	69±7	0.10
Disease			1
Uniglandular	7 (87.5)	3 (100)	
Multiglandular	1 (12.5)	0	
Histology			0.63
Adenoma	6 (75.0)	2 (66.7)	
Carcinoma	1 (12.5)	1 (33.3)	
Hyperplasia	1 (12.5)	0	
Symptom			0.55
Yes	3 (37.5)	2 (66.7)	
No	5 (62.5)	1 (33.3)	
Size (cm)	3.2±1.3	2.1±0.9	0.18
PTH (pg/ml)	789.7±684.0	534.8±327.0	0.73
Calcium (mg/dl)	12.3±1.9	12.3±1.3	0.92
ALP* (IU/L)	352.1±304.6	194.7±138.0	0.41
BMD T-score	-2.87±0.51	-2.90±0.56	0.70

*ALP = alkaline phosphatase.

3) 돌연변이 유형과 임상병리학적 표현형과의 상관관계

*MEN1*의 체성 돌연변이가 발견된 8예와 발견되지 않은 3예 사이에서 임상병리학적 인자인 성별, 연령, 다발성, 병리학적 진단, 증상유무, 부갑상선 크기, 부갑상선 호르몬, 혈중 칼슘, 알칼라인 포스파타제, 골밀도검사에서의 차이가

있는지 조사하였다(Table 4). 돌연변이가 있는 경우에 나이가 젊고, 다발성이 많으며, 증상이 없고, 크기가 크며, 부갑상선 호르몬 수치 및 알칼리 포스파타제 수치가 높았으나 통계적인 유의성은 없었다.

고 찰

부갑상선 종양은 제1형 및 제2형 다발성 내분비 선종증이나 부갑상선 기능항진증-턱종양 증후군(hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome, HPT-JT)과 같이 *MEN1*, *RET*, *HRPT2* 유전자의 배선 돌연변이로 인하여 유전성으로 발생할 수 있다. 반면 대부분을 차지하는 산발성 부갑상선 종양의 발생기전은 세포주기를 조절하는 cyclin D1을 생성하는 *PRAD1* (parathyroid adenoma 1) 유전자 과발현(13)이나 종양 억제 유전자인 *RBI* (Retinoblastoma 1) 유전자 결손(14) 및 *HPT-JT* 유전자 돌연변이 등이 제시되고 있으나 유전성 종양에 비하여 확실하지 않다.

산발성 종양에서 유전성 종양 유전자의 체성 돌연변이 검사는 산발성 종양의 발생 기전에 대한 이해를 높일 수 있으며, 산발성 종양의 예후와 관련이 있는 경우 치료 방법에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어 *MEN2B*에서 관찰되는 엑손 16번 코돈 918의 돌연변이가 산발성 갑상선 수질암의 40%에서 체성 돌연변이 형태로 관찰되며,(15) 이 경우 나쁜 예후를 나타낸다.(16) 본 연구에서는 제1형 다발성 내분비 선종증의 가장 흔한 표현형인 부갑상선 종양에 대하여 *MEN1* 유전자의 체성 돌연변이를 조사함으로써 산발성 부갑상선 종양에서 *MEN1* 유전자의 역할에 대하여 알아보고

자 하였다.

현재까지 전세계적으로 *MEN1* 유전자의 돌연변이는 1,133개의 배선 돌연변이와 203개의 체성 돌연변이가 보고되었다.(12) 동일한 돌연변이를 제외하면 서로 다른 459개의 배선 돌연변이와 167개의 체성 돌연변이가 있으며 이 중 61개는 배선 돌연변이와 체성 돌연변이에서 함께 보고되어 총 565개의 서로 다른 *MEN1* 유전자 돌연변이가 보고되었다.

배선 돌연변이는 1,830bp의 코딩 부위에 고르게 분포하고 있으며, 41%는 frameshift mutation, 23%는 nonsense mutation, 20%는 missense mutation, 9%는 splice site mutation, 6%는 in-frame deletion or insertion, 1%는 whole or partial gene deletion으로 보고되고 있다.(12) 호발 부위(hot spot)는 없으나 엑손 2 코돈 83-84의 c.249_252delGTCT가 4.5%, 엑손 3 코돈 210-211의 c.628_631delACAG가 2.5%, 엑손 10 코돈 460의 c.1378C>T가 2.6%, 엑손 10 코돈 516의 c.1546delC 및 c.1546_1547insC가 각각 1.8%, 2.7%를 차지하여 전체 돌연변이의 14.1%를 차지한다.(12) 전체 돌연변이의 약 75%는 menin 단백질의 조기 전사 종결로 인하여 C 말단 부위가 결손된 단백질이 생성되는데 이는 *MEN1* 유전자가 종양억제 유전자라는 사실과 일치한다.(3)

현재까지 국내에서 보고된 *MEN1* 유전자 돌연변이는 배선 돌연변이에 국한되어 6개 논문에서 9예이다. 이 중 c.196>200dupAGCCC는 3개의 논문(6-8)에서 보고되었다. 이는 우리나라 *MEN1* 돌연변이 호발 부위의 가능성이 있으나, 세 증례가 서로 친척이었을 가능성이 높다. 보고된 7종류의 돌연변이는 엑손 2의 c.196>200dupAGCCC, 엑손 7의 c.969C>A (Y323X), 엑손 7의 c.973G>C (A325P), 엑손 9의 c.1213C>T (Q405X),(6) 엑손 7 splice site의 c.913-2A>G,(9) 엑손 9의 c.1252G>C (D418H),(10) 엑손 3의 628_631delACAG(11)이다. 이중 c.973G>C (A325P), c.913-2A>G는 외국에서도 보고된 예가 없었다. 엑손 7에서 3예가 발견되었고, frameshift mutation 2예, missense mutation 2예, nonsense mutation 2예, splice site mutation 1예였다.

MEN1 유전자의 체성 돌연변이는 부갑상선 종양의 약 20%, 가스트린종의 약 40%, 인슐린종의 약 15%, VIP종의 약 60%, 비기능성 췌장 내분비 종양의 약 15%, 글루카곤종의 약 60%, 기관지 유선암의 약 35%에서 관찰되는 반면 산발성으로 발생하는 뇌하수체 종양, 부신피질 종양에서는 *MEN1* 유전자 돌연변이가 5% 이내로 관찰된다.(12) 배선 돌연변이와 마찬가지로 코딩 부위 전반에 걸쳐 돌연변이가

관찰되고 40%는 frameshift mutation, 18%는 nonsense mutation, 29%는 missense mutation, 7%는 splice site mutation, 6%는 in-frame deletion or insertion이다.(12) 본 연구에서는 11개의 표본 중 8개에서 돌연변이가 발견되어 73%의 높은 돌연변이율을 나타내었다. 이는 20% 정도의 외국 보고(12)와는 큰 차이가 있었다. 이는 검사방법에 있어 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)나 SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) 등을 선별검사로 이용하지 않고 모든 예에서 정확도가 높은 직접염기서열 분석을 이용하였으며, 보고되지 않은 한국인의 다형성이 포함되었기 때문일 가능성을 배제하지 못하였다.

14종류의 돌연변이가 나타났는데 이는 모두 이전에는 보고되지 않은 새로운 돌연변이였다. 1종류의 frameshift mutation, 2종류의 nonsense mutation, 8종류의 missense mutation, 3종류의 silent mutation이 나타나서 missense mutation의 빈도가 높았다. 체성 돌연변이는 배선 돌연변이에 비하여 엑손 2에 많다고 보고되었는데,(12) 본 연구에서도 엑손 2에서 4종류, 엑손 10에서 9종류가 관찰되어 대부분 엑손 2와 10에서 체성 돌연변이가 관찰되었다. 이는 전체 14종류의 93%로 엑손 2와 10의 크기가 전체 엑손 크기의 50% 정도를 차지하는 점을 감안하여도 높은 수치였다. 이는 본 연구의 특징적인 내용으로 한국인의 특징적인 호발 부위일 가능성을 배제하지 못하였다.

대부분 하나의 표본에서 1종류의 돌연변이가 관찰되는데 반하여, 본 연구에서는 특징적으로 5개의 표본에서 2종류 이상의 돌연변이가 나타났다. 73%의 높은 체성 돌연변이율을 나타낸 이유 중의 하나이며, 따라서 돌연변이가 발견된 경우에도 추가적인 돌연변이가 있을 수 있기 때문에 검사를 소홀히 해서는 안 될 것으로 생각하였다.

두 종류의 돌연변이(c.107T>C, c.1366C>T)는 여러 표본에서 나타나서 다형성의 가능성이 있으나 현재까지 알려진 다형성에 속하지는 않았다. 하지만 한국인에 국한된 보고되지 않은 다형성일 가능성을 완전히 배제하지는 못하였다.

전세계적으로 *MEN1* 유전자의 다형성은 24종류가 보고되었다.(12) Correa 등(17)에 따르면 일반인에 비하여 원발성 부갑상선 기능항진증에서 c.1254C>T (D418D) 다형성의 빈도가 높다고 보고하였다. 본 연구에서도 인트론 (intron) 1, 엑손 9, 인트론 9, 엑손 10에서 4종류의 다형성이 관찰되었다(Table 5, Fig. 3). 인트론 1에서 발견된 c.-39C>G는 10예(91%)에서 동형접합체로 발견되어, Lemos와 Thakker

Table 5. *MEN1* gene somatic polymorphism in sporadic parathyroid tumors

Polymorphism	Position	Codon change	Type	Case No.
c.-39C>G	Intron 1	—	Homo*	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11
c.-1254C>T	Exon 9	Asp [†] 418Asp	Hetero [†]	3, 4, 8, 9, 10, 11
			Homo	2, 5
c.-1350+103C>G	Intron 9	—	Homo	1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11
c.-162G>A	Exon 10	Ala [§] 542Thr	Homo	5, 7

*Homo = homozygote; [†]Hetero = heterozygote; [†]Asp = Aspartic acid; [§]Ala = Alanine; ^{||}Thr = Threonine.

(12)가 보고한 20%와 비교하면 상당히 높은 빈도였다. 엑손 9의 c.1254C>T는 6예에서 이형접합체로, 2예에서 동형접합체로 발견되어 총 8예(73%) 발견되어, 42%의 다형성 빈도(12)와 비교하면 높았다. 인트론 9에서 발견된 c.1350+103C>G는 9예(82%)에서 동형접합체로 발견되어, 42%의 다형성 빈도(12)와 비교하여 높았다. 엑손 10에서 발견된 c.1621G>A는 2예(18%)에서 동형접합체로 발견되어 4%의 다형성 빈도(12)와 비교하여 높았다.

최근 *MEN1* 유전자의 돌연변이에 대한 표기법은 인간게놈변이협회(Human Genome Variation Society)의 돌연변이 명명법 개정에 따라 변경되었다.(18) 이전에는 1번 염기서열이 엑손 2부터 시작하였으나 최근에는 엑손 2 앞부분의 번역되지 않는 110개의 핵산을 제외하여 이전과 비교하여 염기서열 번호가 110 감소하였다. 또한 Lemos와 Thakker (12)의 보고에서와 같이 염기서열 번호가 잘못 기술된 경우도 있기 때문에 주의가 필요하다. 국내의 논문 중에서도 일부 오류가 관찰되었는데, Lee 등(9)이 보고한 핵산 1023번은 엑손 7의 splice site에 위치한 1021번이었고, 따라서 c.913-2A>G로 표기하여야 한다고 생각한다. 코돈 383(10)은 코돈 418을 잘못 표기하였으며 GAC>CAT 중 C>T는 다형성인 c.1254C>T이기 때문에 c.1252G>C로 표기하여야 한다고 생각한다.

MEN1 유전자는 유전성 및 산발성 종양에서 모두 유전형과 표현형 사이에 상관 관계가 없다고 알려져 있다. Uchino 등(19)은 *MEN1* 유전자 돌연변이와 부갑상선 종양의 연령, 성별, 다발성, 종양의 무게, 병리적 진단 사이에 상관 관계가 없다고 하였다. Scarpelli 등(20)도 혈중 칼슘 농도 및 부갑상선 호르몬 수치 등 임상적 인자와의 연관성은 없다고 하였다. 본 연구에서도 *MEN1* 유전자의 돌연변이가 있는 경우 나이가 젊고, 다발성이 많으며, 무증상이 많고, 크기가 크며, 부갑상선 호르몬 수치 및 알칼라인 포스파타제의 수치가 높았으나 통계적인 유의성은 없었다. 하지만 가스트

린종에 있었서는 유전형과 표현형 사이 상관관계가 보고되고 있는데 Goebel 등(21)은 엑손 2의 체성 돌연변이가 있는 가스트린종의 경우 십이지장 이외에 위치하고 크기가 크다고 하였다.

산발성 부갑상선 종양의 30%에서 *MEN1* 유전자 부위의 이형접합소실이 보고되지만, 본 연구에서는 *MEN1* 유전자 부위의 이형접합소실에 대하여는 조사하지 않았다. 따라서 대규모의 유전자 결손이나 삽입이 존재할 가능성을 배제할 수 없다. 특히 Table 3에서와 같이 일부 돌연변이는 동형접합체 형태로 나타나서 이 부분의 대립유전자가 결손되었을 가능성이 높았다.

본 연구에서는 이전 보고와 비교하여 높은 빈도의 *MEN1* 유전자의 체성 돌연변이가 보고되었지만 산발성 종양의 일부에서만 *MEN1*의 돌연변이가 관찰되었다. 이는 *MEN1* 유전자 외에 다른 유전자 돌연변이가 이들 종양의 발생에 관여함을 시사한다. 본 연구에서는 1예의 부갑상선 과증식과 2예의 부갑상선 암을 포함하였다. 부갑상선 과증식에서는 silent mutation이 관찰되었고, 부갑상선 암에서는 1예에서만 missense mutation이 관찰되었다. 따라서 부갑상선 과증식 및 부갑상선 암과 부갑상선 선종과의 차이점을 알아보기 위해서는 좀 더 많은 증례에 대한 체성 돌연변이 검사가 필요하리라 생각한다.

결론

11예의 산발성 부갑상선 종양에 대한 *MEN1* 유전자의 체성 돌연변이 검사 결과, 14종류의 돌연변이와 4종류의 다형성이 관찰되어 외국의 보고보다 높은 빈도를 나타내었다. 이는 산발성 부갑상선 종양의 발생기전에서 *MEN1* 유전자의 체성 돌연변이가 관여함을 강하게 나타내었다. 하지만 돌연변이 유무와 임상적 표현형 사이에는 유의한 관계를 찾을 수 없었다.

REFERENCES

- 1) Chandrasekharappa SC, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Collins FS, Emmert-Buck MR, et al. Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1. *Science* 1997; 276:404-7.
- 2) Thakker RV. Molecular genetics and patient management of multiple endocrine neoplasia type 1. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2001;15:189-212.
- 3) Pannett AA, Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia type 1. *Endocr Relat Cancer* 1999;6:449-73.
- 4) Farnedo F, Teh BT, Kytola S, Svensson A, Phelan C, Sandelin K, et al. Alterations of the MEN1 gene in sporadic parathyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2627-30.
- 5) Heppner C, Kester MB, Agarwal SK, Debelenko LV, Emmert-Buck MR, Guru SC, et al. Somatic mutation of the MEN1 gene in parathyroid tumours. *Nat Genet* 1997;16:375-8.
- 6) Park JH, Kim IJ, Kang HC, Lee SH, Shin Y, Kim KH, et al. Germline mutations of the MEN1 gene in Korean families with multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) or MEN1-related disorders. *Clin Genet* 2003;64:48-53.
- 7) Park SE, Kang ES, Lee HJ, Kim SH, Do MY, Kang SA, et al. A case of multiple endocrine neoplasia type 1 with mutation in MENIN gene. *J Korean Soc Endocrinol* 2005;20:71-7.
- 8) Sung HY, Chun YJ, Lee H, Kwon BJ, Park KW, Lee JM, et al. A case of familial multiple endocrine neoplasia with MEN1 gene mutation. *J Korean Soc Endocrinol* 2006;21:560-6.
- 9) Lee KD, Kim JY, Mun HS, Choi SH, Lee HH, Choi YS, et al. Menin mutational analysis in a MEN I family. *Korean J Otolaryngol - Head Neck Surg* 2005;48:347-51.
- 10) Lee SW, Choi YS, Park YH, Oh KS, Shin JW, Kim IJ, et al. A case of multiple endocrine neoplasia associated with VIPoma. *J Korean Soc Endocrinol* 2005;20:64-70.
- 11) Jo YE, Choi YJ, Kim YK, Ahn SM, Jung SH, Kim HJ, et al. A case of familial multiple endocrine neoplasia type 1 with MEN1 gene mutation. *J Korean Soc Endocrinol* 2007;22:68-73.
- 12) Lemos MC, Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): analysis of 1,336 mutations reported in the first decade following identification of the gene. *Hum Mutat* 2008; 29:22-32.
- 13) Hsi ED, Zukerberg LR, Yang WI, Arnold A. Cyclin D1/PRAD1 expression in parathyroid adenomas: an immunohistochemical study. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1736-9.
- 14) Cryns VL, Thor A, Xu HJ, Hu SX, Wierman ME, Vickery AL Jr, et al. Loss of the retinoblastoma tumor-suppressor gene in parathyroid carcinoma. *N Engl J Med* 1994;330:757-61.
- 15) Eng C, Mulligan LM. Mutations of the RET proto-oncogene in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes, related sporadic tumours and hirschsprung disease. *Hum Mutat* 1997; 9:97-109.
- 16) Elisei R, Cosci B, Romei C, Bottici V, Renzini G, Molinaro E, et al. Prognostic significance of somatic RET oncogene mutations in sporadic medullary thyroid cancer: a 10-year follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:682-7.
- 17) Correa P, Lundgren E, Rastad J, Akerstrom G, Westin G, Carling T. Multiple endocrine neoplasia type 1 polymorphism D418D is associated with sporadic primary hyperparathyroidism. *Surgery* 2002;132:450-5.
- 18) Recommendations including Nomenclature Guidelines. Human Genome Variation Society. <http://www.hgvs.org/>.
- 19) Uchino S, Noguchi S, Sato M, Yamashita H, Yamashita H, Watanabe S, et al. Screening of the Men1 gene and discovery of germ-line and somatic mutations in apparently sporadic parathyroid tumors. *Cancer Res* 2000;60:5553-7.
- 20) Scarpelli D, D'Aloiso L, Arturi F, Scillitani A, Presta I, Bisceglia M, et al. Novel somatic MEN1 gene alterations in sporadic primary hyperparathyroidism and correlation with clinical characteristics. *J Endocrinol Invest* 2004;27:1015-21.
- 21) Goebel SU, Heppner C, Burns AL, Marx SJ, Spiegel AM, Zhuang Z, et al. Genotype/phenotype correlation of multiple endocrine neoplasia type 1 gene mutations in sporadic gastrinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:116-23.