

한국인의 폐암에서 TP53 유전자 변이 분석

Analysis of TP53 Gene Mutations in the Korean Patients with Lung Cancer

정상봉¹ · 장희경¹ · 최석철² · 신경철³ · 이관호³ · 전창호⁴

Sang Bong Jung, MS¹, Hee Kyung Chang, M.D.¹, Seok Cheol Choi, Ph.D.², Kyeong-Cheol Shin, M.D.³, Kwan-Ho Lee, M.D.³, Chang Ho Jeon, M.D.⁴

고신대학교 의과대학 병리학교실¹, 부산가톨릭대학교 임상병리학과², 영남대학교 의과대학 내과학교실³, 대구가톨릭대학교 의과대학 진단검사의학교실⁴

Department of Pathology¹, Kosin University College of Medicine, Busan; Department of Clinical Laboratory Science², Catholic University, Busan; Department of Internal Medicine³, College of Medicine, Yeungnam University, Daegu; Department of Laboratory Medicine⁴, Daegu Catholic Medical Center, Daegu, Korea

Background: Lung cancer is one of the leading causes of cancer-related deaths throughout the world. The gene *tumor protein 53 (TP53)* is frequently mutated in cases of lung cancer. This study was performed to investigate the frequencies and types of mutations in the *TP53* gene in Korean patients with lung cancer.

Methods: We obtained tissue samples from 80 lung cancer patients and synthesized *TP53* cDNA by using RNA isolated from these tissues by performing reverse transcriptase polymerase chain reaction. Hybridization and denaturing high-performance liquid chromatography were performed to identify the *TP53* gene mutations, and then, the mutations were validated by direct sequencing.

Results: Forty mutations out of the 80 patients (50.0%) were noted in the *TP53* gene. The frequencies of *TP53* gene mutation for different cancer types, namely, squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and small cell carcinoma were 61.1%, 27.3%, and 26.7%, respectively. The mutation frequencies in the different regions of the gene were 10.0% for exon 4, 35.0% for exon 5, 12.5% for exon 6, 22.5% for exon 7, 17.5% for exon 8, and 2.5% for exon 9. The frequently mutated positions were codon 179 in exon 5, codons 202 and 220 in exon 6, and codons 266 and 273 in exon 8.

Conclusions: Exon 5 was the most frequently mutated region in the *TP53* gene. Compared to the patients with the other types of cancers, patients with squamous cell carcinoma showed a higher frequency of *TP53* mutation. Codon 179 was the most frequently mutated codon in the *TP53* gene.

Key Words: *TP53* gene mutation; denaturing high performance liquid chromatography; exon; codon

서론

종양의 발생은 세포증식의 조절에 영향을 주는 여러가지 유전자들의 변화에 의한 것이라는 견해가 일반적이다.

폐암의 발생과정은 다양한 유전자 이상을 포함하는 다단계 과

정으로 암유전자의 활성화와 종양억제유전자의 불활성화, 그리고 유전적 불안정성의 증가 등이 관련된다 알려져 있다[1]. 폐암발생과 관련성이 높은 것으로 알려져 있는 유전자로는 *TP53*, vascular endothelial growth factor (*VEGF*) epidermal growth factor receptor (*EGFR*) fragile histidine triad (*FHIT*) 등이 있으며[2-4], 세포의 성장, 분화와 생존 등에 관여한다. 그 중 특히 변이의 빈도가 높으면서 크게 주목을 받고 있는 유전자가 *TP53* 유전자이다.

TP53 유전자는 폐암뿐 아니라, 유방암, 대장암 등을 포함한 많은 종류의 암에서 50-60% 정도로 높은 빈도의 변이를 보이는데[5, 6], 이는 인체 종양에서 발견되는 발암 또는 종양억제유전자들의 돌연변이 빈도 중에서 가장 높다. 정상적인 *TP53* 유전자는 세포주기의 조절에 관여하여 손상된 DNA를 가진 세포의 증식을 막거나, 복구할 수 없는 손상을 가진 세포의 세포자멸사(apoptosis)를 유도하여 종양을 억제한다[7]. 만약 종양 바이러스를 포함하는 여러 가지 외부 또는 내부의 요인에 의해 *TP53* 유전자가 그 기능을 제대로 발휘하지 못하게 될 경우, 종양의 발생 가능성이 크게 증가하

Corresponding author: Chang Ho Jeon, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Daegu Catholic Medical Center, 3056-6 Daemyung 4-dong, Nam-gu, Daegu 705-718, Korea
Tel: +82-53-650-4144, Fax: +82-53-653-8672, E-mail: chjeon@cu.ac.kr

Received: March 5, 2011

Revision received: April 21, 2011

Accepted: May 30, 2011

This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2011, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

는 것으로 알려져 있다. TP53 유전자에 생기는 돌연변이 중 대부분이 일부 염기가 다른 염기로 치환되어 TP53 유전자의 일부 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되는 과오돌연변이이다[8]. TP53 유전자는 구조적으로 11개의 exon 들로 이루어지는데 이 중 exon 4-9는 생성되는 단백질의 입체적 구조에 유연성을 부가하는 중심 부분을 암호화하고 있다. 따라서 exon 4-9에 일어나는 변이로 인해 생성되는 단백질의 경우 구조적 변화가 발생하게 된다[9]. 이 중 폐암에서 돌연변이를 가장 많이 보이는 부위는 exon 7의 codon 248과 exon 8의 codon 273 인 것으로 알려져 있으나[9, 10], 일부에서는 codon 157, 158, 248, 273이 폐암에서 가장 많은 TP53 유전자 돌연변이를 보이는 부위라는 보고도 있다[11, 12]. 그러나 이들 자료는 대부분 외국의 연구결과에 근거한 것이다. 따라서 본 연구에서는 한국인의 폐암을 대상으로 TP53 유전자의 모든 exon에서의 돌연변이의 빈도에 대해 최초로 연구한 Lee 등[13]의 연구결과와 비교하고 한국인의 폐암의 조직학적 분류에 따른 TP53 유전자 돌연변이의 형태와 빈도를 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 연구 재료

본 연구의 재료는 2004년에서 2007년까지 영남대학병원 호흡기 내과를 방문하여 폐암으로 확진된 80명으로부터 기관지 내시경을 시행하여 얻은 생검조직을 대상으로 하였다. WHO 분류에 따른 폐암종 80예의 조직학적 유형은 편평세포암종(squamous cell carcinoma)이 54예(67.5%), 소세포암(small cell carcinoma)이 15예(18.8%), 샘암종(adenocarcinoma)이 11예(13.7%)로 분류되었다. 채취한 생검조직은 중앙조직이 채취되었음을 육안으로만 확인하고 바로 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 1 mL이 담겨 있는 냉동보관용 시험관에 주입되었다. 남자가 67명(83.7%)이었으며 나이는 70.83 ± 7.68 세였으며 여자가 13명(16.3%)이었으며 평균나이는

71.17 ± 11.56 세였다(Table 1). 대조검체는 건강검진을 목적으로 채혈된 건강인의 혈액을 대상으로 검진검사 후 남은 잔여혈액을 사용하였다. 본 연구는 잔여혈액을 사용한 환자를 제외한 모든 환자에서 동의서를 취득하였고, 영남대학교 병원 연구윤리위원회의 승인을 얻었다.

2. 연구 방법

1) RNA 분리

기관지 내시경을 통해 얻은 생검 조직은 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 1 mL이 담겨 있는 냉동보관용 시험관에 담아 -20°C 의 이동용 상자를 이용하여 실험실로 운반하였으며, 실험실에서 RNA를 추출할 때까지 -70°C 의 냉동고에 보관하였다. Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 담긴 생검조직을 조직 분쇄기를 이용하여 암조직을 분쇄한 후에 Invitrogen사에서 제공한 방법으로 RNA를 추출하였다. diethyl pyrocarbonate-distilled water (DEPC-DW)에 녹인 후 분광광도기로 RNA 농도와 순도를 측정하였다. 연구자들은 TP53 유전자의 돌연변이와 함께 다른 유전자의 발현 정도를 함께 관찰하고자 하였다. 하지만 한 환자에서 많은 양의 시료를 채취하기 어려워 DNA대신 RNA를 대상으로 하였다.

대조검체인 건강인의 혈액 200 μL 는 QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hamburg, Germany)를 사용하여 RNA를 추출하였다.

2) 역전사에 의한 cDNA의 합성

추출된 RNA 용액을 70°C 수조에 10분간 두어 RNA를 변성시킨 뒤 얼음에 보관하였다. 먼저 ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA)으로 Promega사에서 제공한 방법으로 역전사 혼합액을 만들었다. 역전사 혼합액에 얼음에 보관했던 추출된 RNA 용액 1 μg 을 넣어 혼합하고 실온에서 10분간 두었다. 10분 후 중합효소연쇄반응 시험관을 42°C 에서 60분간 열처리하여 cDNA를 합성하였으며 이 역전사 반응물을 증류수로 1:1 희석한 뒤 중합효소연쇄반응에 이용하였다.

3) 중합효소연쇄반응

본 연구에서는 11개의 exon을 모두 대상으로 하지 않고, DNA binding domain 위치로 TP53 유전자의 전사촉진 활성과 관련된 부위이며 돌연변이 빈도가 높다고 알려진 부위를 대상으로 하였다. 이에 exon 4-5, exon 6-9 까지를 포함하는 시발체의 염기서열을 Table 2와 같이 고안하였다. 역전사에 의해 합성된 cDNA를 주형 DNA로 하여 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 중합효소연쇄반응은 GoTaq Master Mixes (Promega, Madison, WI, USA)로 Promega사에서 제공한 방법으로 중합효소연쇄반응 혼합액을 만들었다. 이 혼합액에 역전사 반응물을 4 μL 넣어 혼합하여 94°C 에서 10분,

Table 1. Characteristics of the lung cancer patients

Variables	Sqcc	Smcc	Adeno	Total
Sample size (%)	54 (67.5)	15 (18.8)	11 (13.7)	80
Age (mean \pm SD years)	71.86 \pm 7.41	68.83 \pm 10.86	69.20 \pm 9.50	70.88 \pm 8.48
Sex (%)				
Male	50 (92.6)	11 (73.3)	6 (54.5)	67 (83.7)
Female	4 (7.4)	4 (26.7)	5 (45.5)	13 (16.3)
Pathologic stage				
Stage I	5	Limited 4	1	-
Stage II	3	-	-	-
Stage III	27	Extensive 11	-	-
Stage IV	19	-	10	-

Abbreviations: Sqcc, squamous cell carcinoma; Smcc, small cell carcinoma; Adeno, adenocarcinoma.

Table 2. Primer sequences used for detecting mutations in exons 4 to 9 of the *TP53* gene

Primers	Sequence of primer	Size of PCR products
Exon 4-5 Forward	tgccgtccaagcaatggatgatt	477 bp
Exon 4-5 Reverse	gatgctgaggaggggcagaccat	
Exon 6-9 Forward	tagcgatggtctgcccctctca	490 bp
Exon 6-9 Reverse	ggcctcattcagctctcggaacat	

Abbreviation: bp, base pairs.

94℃에서 30초, 63℃에서 30초, 72℃에서 1분의 조건으로 35주기 반응시켜 exon 4-5 DNA를 증폭시켰으며, 최종적으로 72℃에서 5분간 처리하여 중합효소 연쇄반응을 완료하였다. Exon 6-9는 시발체의 결합온도를 60℃에서 실시하였다. 중합효소연쇄반응의 증폭산물의 일부를 취하여 ethidium bromide가 섞인 1.5% 한천겔에서 전기영동을 한 후 UV transilluminator로 증폭된 DNA 크기를 확인하였다.

4) 교잡형성반응

중합효소연쇄반응의 증폭산물을 전기영동을 통해 단일한 크기의 증폭 산물을 확인한 후 교잡형성을 실시하였다. 첫 번째 시험관에는 환자검체 증폭산물 7 µL에 대조검체 증폭산물 7 µL를 주입하였고, 두 번째 시험관에는 대조 검체 증폭산물 7 µL만 넣었다. 조작은 무균실험대 안에서 실시하였으며, 각 시발체당 대조검체를 준비하였다. 준비한 검체를 중합효소연쇄반응 반응기에 주입하여 95℃ 4분 방치 후, 95℃에서 한 주기에 1.6℃씩 내려가며 1분 반응 후 42주기를 실시하여 교잡형성 반응을 완료하였다.

5) *TP53* 유전자의 돌연변이 분석

TP53 유전자의 돌연변이 검색은 denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC)의 원리를 이용한 WAVE DNA Fragment Analysis system (Transgenomic Inc, Omaha, NA, USA)으로 실시하였다. Transgenomics사에서 제공하는 변이양성 대조물질을 주입하여 DHPLC 장비의 분리곡선을 확인한 다음, 상기 교잡반응에서 형성된 heteroduplex와 homoduplex를 0.9 mL/min로 0.5 µL 주입하여 돌연변이를 검출하였다. 돌연변이가 관찰된 검체는 Solvents사(Solgent, 대전, 한국)에 의뢰하여 ABI prism DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster, USA)를 이용한 양방향 직접 염기서열 분석을 통하여 염기서열의 변화를 확인하였다.

6) 자료분석

돌연변이 발생 빈도에 대한 자료의 유의성 검정을 위해 SPSS ver. 12.0 for Windows (IBM, Somers, NY, USA) 소프트웨어를 이용하였고, 검정에 이용된 통계분석방법은 교차분석을 이용하여 카이

제곱값에 대한 유의성으로서 $P < 0.05$ 일 경우에 유의성을 나타내는 것으로 하였다.

결 과

1. 중합효소연쇄반응에 의한 증폭산물 확인

Exon 4-5, exon 6-9를 각각의 시발체로 증폭시켜 각각 477, 490 base pair의 증폭산물을 얻었다. 중합효소연쇄반응 산물을 ethidium-bromide가 함유된 1.5% 한천겔에 size marker와 함께 전기영동을 하여 exon 4-5, exon 6-9 모두 증폭된 생성물이 예상된 위치에서 형성된 것을 관찰하였다.

2. DHPLC법에 의한 돌연변이 분석

DHPLC법에 의해 분석한 결과 exon 4-5는 야생형과 돌연변이형 모두 3분대에서 peak가 나오는 결과를 얻었고, exon 6-9는 야생형과 돌연변이형 모두 4분대에서 peak가 나오는 결과를 얻었다. 또한 야생형과 돌연변이형의 peak의 모습이 서로 다른 것을 확인하였다(Fig. 1).

총 80예의 폐암조직 중 40예(50.0%)의 *TP53* 유전자 돌연변이를 보였으며, 이 중 exon 4-5와 exon 6-9에서 돌연변이를 보인 경우는 각각 18예(45.0%)와 22예(55.0%)이었다.

3. 염기서열 분석을 통한 염기서열 변화 관찰

DHPLC 분석에서 돌연변이를 보인 검체는 모두 염기서열 분석에서 염기서열의 변화를 보였다. 단 2예에서는 DHPLC 분석에서는 양성이었지만 아미노산에 변화가 없는 침묵돌연변이가 관찰되어 최종 결과분석에는 제외하였다.

Exon에 의한 돌연변이 빈도는 exon 4에서 4예(10.0%), exon 5에서 14예(35.0%), exon 6에서 5예(12.5%), exon 7에서 9예(22.5%), exon 8에서 7예(17.5%), exon 9에서 1예(2.5%)의 돌연변이를 보였으며, 1예에서 exon 6과 8에서 복합 돌연변이를 보였다(Table 3).

조직학적으로 분류하면 편평세포암종 54예 중 33예(61.1%)에서 돌연변이를 보였으며, 소세포암종 15예 중 4예(26.7%)에서 돌연변이를 보였으며, 샘암종 11예 중 3예(27.3%)에서 돌연변이를 보여 편평세포암종에서 소세포암종 및 샘암종에 비해 유의하게 높은 돌연변이 빈도를 보였다. 편평세포암종 1예에서는 두 곳의 exon에서 복합 돌연변이를 보였다.

상대적으로 높은 변이빈도를 보인 부위는 exon 5 (codon 179)에서 4예, exon 6 (codon 202, 220)과 exon 8 (codon 266, 273)에서 각각 2예씩의 돌연변이가 관찰되었다. 돌연변이를 보인 40예 중 32예(80.0%)에서 과오 돌연변이를 보였으며 정지 돌연변이가 3예(7.5%)에서 관찰되었다. 또한 4예(10.0%)에서 염기의 결손이 관찰되었으

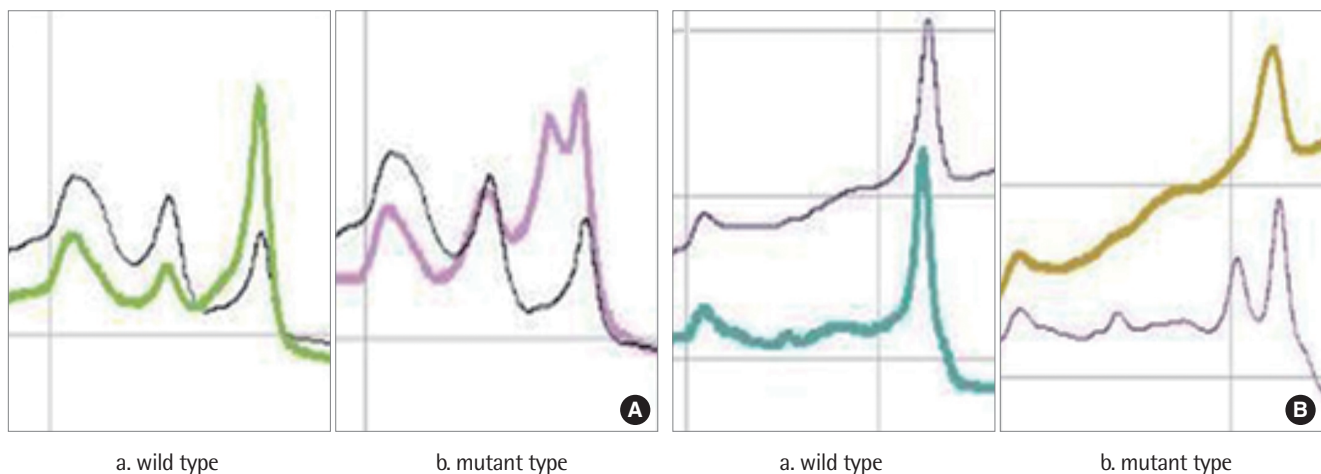


Fig. 1. Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) analysis of exons 4-5 and 6-9.

Chromatograms obtained by performing DHPLC for exons 4-5 (A) and 6-9 (B) of wild type (a) and mutated (b) *TP53* gene. The chromatograms for both the regions of the wild type gene were similar to those for the corresponding regions of the controls, while those for both the regions of the mutant genes were different from those for the corresponding regions of the controls.

Table 3. *TP53* mutation frequencies for the different types of lung carcinomas

Cancer types	Total	Mutation number (%)	Number of mutations (%)					
			Exon 4	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8	Exon 9
Squamous cell carcinoma	54	33* (61.1)	-	11 (33.3)	5 (15.2)	9 (27.3)	7 (21.2)	1 (3.0)
Small cell carcinoma	15	4 (26.7)	2 (50.0)	2 (50.0)	-	-	-	-
Adenocarcinoma	11	3 (27.3)	2 (66.7)	1 (33.3)	-	-	-	-
P value		0.025	-	-	-	-	-	-
Total	80	40 (50.0)	4 (10.0)	14 (35.0)	5 (12.5)	9 (22.5)	7 (17.5)	1 (2.5)

*One patient had a compound mutation at exon 6 and 8.

며, 1예(2.5%)에서 염기의 삽입이 관찰되었다(Table 4).

고찰

암의 발생에 대한 분자유전학적 연구기법이 도입된 이래 *TP53* 유전자에 대한 많은 연구가 진행되었다. *TP53* 유전자는 사람에서 발생하는 암에서 가장 많은 변이를 일으키고 이러한 변이는 암의 원인과 분자생물학적인 병리과정을 알려주고 있어 암 연구 분야에 선구적인 역할을 하고 있을 뿐만 아니라 임상에서는 암의 진단, 예후 및 치료에 도움을 주고 있다[5, 6]. *TP53* 유전자는 17번 염색체 단완(17p13)에 위치하고 있으며, 약11개의 exon과 10개의 intron으로 구성되어 있다. 11개의 exon 중 hot-spot 부위라고 부르는 5, 6, 7, 8에서 암세포의 돌연변이가 호발한다. Hot-spot 부위에서 상대적으로 높은 변이를 보이는 것은 이 부분이 *TP53* 유전자 구조상 DNA binding domain 위치로 *TP53* 유전자가 종양억제자로 기능을 수행하는데 중요한 전사촉진 활성과 관련된 부위이기 때문이다[14, 15]. *TP53* 유전자의 돌연변이는 대부분 일부 염기가 다른 염기로 치환되어 *TP53* 유전자의 일부 아미노산이 다른 아미

노산으로 치환되는 과오 돌연변이이다[8].

폐암에서 *TP53* 유전자 변이는 1989년 처음으로 보고되었으며 [16]비소세포 폐암의 경우 약 50%에서 보고되고 있으며 그 중 편평세포암종에서 가장 높은 빈도를 보인다고 보고되었다[11, 13, 17]. 본 연구에서는 한국인의 폐암 조직 총 80예 중 40예(50.0%)의 *TP53* 유전자 돌연변이를 확인하였다. 이 같은 결과는 이전의 연구 결과[13, 20]에 비해 상대적으로 높은 돌연변이 빈도이다. 본 연구에서 돌연변이 분석을 DHPLC의 원리를 이용한 WAVE DNA Fragment Analysis system (Transgenomic Inc, Omaha, NA, USA)으로 실시하였고, 이전의 연구에서는 중합효소연쇄반응 법과 Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP)법으로 분석하였다. 돌연변이 분석방법에 따라 돌연변이의 빈도에 다소의 차이가 있을 것으로 사료된다. 병리조직학적 분류로는 편평세포암종 54예 중 33예(61.1%)에서 돌연변이를 보여 15예 중4예(26.7%)에서 돌연변이를 보인 소세포암종나 11예 중 3예(27.3%)에서 돌연변이를 보인 샘암종에 비해 유의하게 높은 빈도를 나타내었다. 이런 빈도는 기존의 연구[13, 18-20]와 거의 일치한다.

본 연구에서는 편평세포암종에서 모든 exon에 걸쳐 돌연변이를

Table 4. Types of *TP53* mutations in Korean patients with lung cancer

Case No.	Sex	Age	Cancer stage	Exon	Type of mutation	Change in protein	Effect	Type of cancer
1	M	69	IV	4	c.169G>C	p.D57H*	Missense	Adeno
2	M	59	extensive	4	c.208G>C	p.A70P*	Missense	Smcc
3	M	72	IV	4	c.222_225del4	unknown	FS	Adeno
4	F	69	limited	4	c.338T>G	p.F113C	Missense	Smcc
5	M	66	IV	5	c.404G>A	p.C135Y	Missense	Sqcc
6	M	63	IIIA	5	c.406C>T	p.Q136X	Nonsense	Sqcc
7	M	79	IV	5	c.413C>T	p.A138V	Missense	Sqcc
8	M	79	I	5	c.434T>C	p.L145P*	Missense	Sqcc
9	F	54	IV	5	c.446C>T	p.S149F*	Missense	Adeno
10	M	72	I	5	c.463A>C	p.T155P	Missense	Sqcc
11	M	70	IV	5	c.475G>C	p.A159P	Missense	Sqcc
12	F	74	IIIB	5	c.482C>G	p.A161G*	Missense	Sqcc
13	M	67	IV	5	c.493C>T	p.Q165X	Nonsense	Sqcc
14	M	59	extensive	5	c.532_533ins1	unknown	FS	Smcc
15	M	65	IIIA	5	c.536A>G	p.H179R	Missense	Sqcc
16	M	65	IIIA	5	c.536A>G	p.H179R	Missense	Sqcc
17	M	69	IV	5	c.536A>G	p.H179R	Missense	Sqcc
18	M	67	limited	5	c.536A>G	p.H179R	Missense	Smcc
19	M	65	IIIB	6	c.596G>C	p.G199A*	Missense	Sqcc
20	M	83	IIIB	6	c.605G>A	p.R202H*	Missense	Sqcc
21	M	78	IIIB	6	c.658T>C	p.Y220H	Missense	Sqcc
22	M	80	IIIB	6	c.658T>C	p.Y220H	Missense	Sqcc
23	M	70	IV	7	c.707A>G	p.Y236C	Missense	Sqcc
24	M	72	IV	7	c.708_709del2	unknown	FS	Sqcc
25	M	76	IIIB	7	c.713G>C	p.C238S	Missense	Sqcc
26	M	75	IIIB	7	c.722C>T	p.S241F	Missense	Sqcc
27	M	62	I	7	c.729_742del14	unknown	FS	Sqcc
28	M	79	IIIA	7	c.734G>T	p.G245V	Missense	Sqcc
29	M	74	IIIB	7	c.743G>A	p.R248Q	Missense	Sqcc
30	M	78	IV	7	c.755T>C	p.L252P	Missense	Sqcc
31	M	70	IIIB	7	c.780_803del24	unknown	FS	Sqcc
32	M	79	IIIA	8	c.797G>A	p.G266E	Missense	Sqcc
33	M	60	IIIB	8	c.817_818CG>TC	p.R273S	Missense	Sqcc
34	M	81	IV	8	c.817_818CG>TC	p.R273S	Missense	Sqcc
35	M	76	IIIA	8	c.824G>A	p.C275Y	Missense	Sqcc
36	M	79	IV	8	c.839G>C	p.R280T	Missense	Sqcc
37	M	72	IIA	8	c.841G>A	p.D281N	Missense	Sqcc
38	M	59	IIIA	9	c.958A>T	p.K320X	Nonsense	Sqcc
39	F	83	IIIB	6	c.605G>A	p.R202H	Missense	Sqcc
				8	c.797G>A	p.G266E	Missense	

*Novel mutation.

Abbreviations: Adeno, adenocarcinoma; Smcc, small cell carcinoma; Sqcc, squamous cell carcinoma; FS, frameshift; M, male; F, female; c, codon; p, protein.

보였으나 이에 반해 소세포암종과 샘암종에서는 exon 4와 exon 5에서만 돌연변이를 보였다. 한국인을 대상으로 한 이전의 연구에서는 선암종에서 exon 5에서 돌연변이 빈도가 상대적으로 높았으며, codon 334, 342, 349에서의 돌연변이는 선암종에서만 관찰되었다는 보고가 있었다[13]. 본 연구에서는 exon 10에 대한 연구는 이루어지지 않아 codon 334, 342, 349에서의 돌연변이는 관찰되지 않았지만 암종의 조직학적 분류에 따라 돌연변이의 부위가 다를

것으로 사료된다. *TP53* 유전자 돌연변이를 보인 exon 중 exon 4에서 4예(10.0%), exon 5에서 14예(35.0%), exon 6에서 5예(12.5%), exon 7에서 9예(22.5%), exon 8에서 7예(17.5%), exon 9에서 1예(2.5%)의 돌연변이를 나타냈으며 1예에서 exon 6과 exon 8 두 곳에서 복합 돌연변이를 보여 exon 5에서 상대적으로 높은 빈도의 돌연변이를 보였다. 이러한 결과는 Takehisa H 등의 일본인을 대상으로 한 연구결과와 일치한다[20]. 또한 본 연구에서는 exon 5의 co-

Table 5. Comparison of our results with those of previous studies on lung cancer

	Our study (%)	Lee's study (%) [17]	Data from Japan (%) [20]	Data from IARC (%) [21]
Sample size (no.)	80	176	151	1,931
Cancer type (no.)				
Squamous cell carcinoma	54	59	38	-
Small cell carcinoma	15	0	0	-
Adenocarcinoma	11	117	113	-
Mutation Frequency (no.)	50.0	36.9	45.0	37.4
Exon3	NT	1.6	NT	0.1
Exon4	10.0	9.7	6.1	2.6
Exon5	35.0	21.0	26.2	34.3
Exon6	12.5	21.0	13.9	12.3
Exon7	22.5	6.5	23.1	26.0
Exon8	17.5	22.5	24.6	23.1
Exon9	2.5	3.2	NT	0.8
Exon10	NT	14.5	6.1	0.8
Hot spot codons (%)	179 (10.0)	193 (4.3)	273 (10.7)	273 (5.7)
	202 (5.0)	285 (4.3)	245 (9.2)	248 (5.5)
	220 (5.0)	334 (4.3)	158 (6.1)	249 (5.0)
	266 (5.0)	154 (2.9)	138 (3.1)	158 (3.5)
	273 (5.0)	214 (2.9)	248 (3.1)	157 (3.3)
		273 (2.9)	274 (3.1)	
		320 (2.9)	282 (3.1)	

Abbreviation: NT, not tested.

don 179에서 4예로 가장 높은 빈도의 돌연변이가 관찰되었으며 codon 202, 220, 266, 273 에서 각각 2예에서 돌연변이를 보였으며, codon 57, 70, 145, 149, 161, 199, 202에서의 돌연변이는 International Agency For Research On Cancer (IARC) *TP53* Mutation Database [21]에서 지금까지 보고되지 않은 돌연변이 codon이다. 또한 한국인을 대상으로 한 이전의 연구에서[13] 처음 보고한 codon 320에서의 돌연변이는 본 연구에서도 관찰되었다(Table 5).

폐암에서 가장 많은 *TP53* 유전자 돌연변이를 보이는 부위가 exon 7의 codon 248과 exon 8의 codon 273이라는 이전의 연구 결과[9, 10] 및 IARC의 자료와는 상당한 차이를 보였다. 이러한 차이는 이전의 연구가 주로 서양인들을 대상으로 이루어진 점을 고려해 보았을 때 *TP53* 유전자 돌연변이가 인종 간, 민족 간의 환경적 차이에 따라 변화의 차이가 있을 것으로 추측해 볼 수 있으나, 보다 많은 증례를 포함한 비교연구가 필요할 것으로 생각된다.

흡연과 관련된 폐암에서 높은 빈도로 돌연변이가 일어난다고 보고된 codon 157에서의 돌연변이[22-24]는 본 연구에서는 관찰되지 않았다. 이는 본 연구의 대상 80예 중 흡연과의 연관성이 상대적으로 높은 것으로 알려져 있는 편평세포암종이 54예(67.5%)로 가장 높은 빈도를 차지한 것과는 일치되지 않는 소견이다. 그러나 본 연구의 대상이었던 80예의 폐암환자에 대한 흡연여부에 대한 조사가 이루어지지 않았다. 흡연유무에 따른 폐암 간의 *TP53* 유전

자 돌연변이의 차이 유무와 인종 간의 차이 유무에 대한 연구가 계속 이루어져야 할 것으로 생각된다. 또한 소세포암종과 샘암종에서는 exon 4와 5에서만 돌연변이가 관찰된 것에 대한 연구도 계속 이루어져야 할 것으로 생각된다.

요 약

배경: 폐암은 전세계적으로 사망률 1위의 암이다. *TP53* 유전자의 돌연변이는 폐암에서 빈번하게 일어난다. 본 연구에는 한국인의 폐암에서 *TP53* 유전자의 돌연변이 빈도와 형태에 대해 알아보고자 한다.

방법: 80명의 폐암환자의 조직으로부터 RNA를 분리하여 RT-PCR을 통해 cDNA를 합성하였으며 DHPLC를 통하여 돌연변이를 분석하였으며, 염기서열 분석을 통하여 염기서열의 변화를 확인하였다.

결과: 80예 중 40예(50.0%)에서 *TP53* 유전자돌연변이가 관찰되었으며 병리학적으로 편평세포암종 61.1%, 샘암종 27.3%, 소세포암종 26.7%에서 *TP53* 유전자의 돌연변이를 보였다. Exon별로는 exon 4에서 10.0%, exon 5에서 35.0%, exon 6에서 12.5%, exon 7에서 22.5%, exon 8에서 17.5%, exon 9에서 2.5%가 관찰되었다. 돌연변이가 빈번하게 관찰된 부위는exon 5 (codon 179), exon 6 (codon 202, 220)과 exon 8 (codon 266, 273)이었다.

결론: Exon 5가 *TP53* 유전자돌연변이의 hot-spot 부위였다. 편평세포암종에서 다른 암종에 비해 높은 빈도의 돌연변이를 보였다. 한국인 폐암에서 *TP53* 유전자돌연변이는 codon 179에서의 변화가 가장 빈번하였다.

참고문헌

- Minna JD. Molecular biology overview. In: Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH, Turrisi AT. eds. Lung cancer: principles and practice. 1st ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996;143-8.
- Mendelsohn J. Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. J Clin Oncol 2002;20(S18): S1-13.
- Sozzi G, Pastorino U, Moiraghi L, Tagliabue E, Pezzella F, Ghirelli C, et al. Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions. Cancer Res 1998;58:5032-7.
- Mao L. Recent advances in the molecular diagnosis of lung cancer. Oncogene 2002;21:6960-9.
- Oliver M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010;2:a001008.
- Hainaut P and Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thou-

- sand mutations. *Adv Cancer Res* 2000;77:81-137.
7. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408:307-10.
 8. Pfeifer GP and Besaratinia A. Mutational spectra of human cancer. *Hum Genet* 2009;125:493-506.
 9. Jassem E, Nikliński J, Rosell R, Niklińska W, Jakóbkiewicz J, Monzo M, et al. Types and localisation of p53 gene mutations: a report on 332 non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 2001;34(S2):S47-51.
 10. Feng Z, Hu W, Rom WN, Costa M, Tang MS. Chromium(VI) exposure enhances polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA binding at the p53 gene in human lung cells. *Carcinogenesis* 2003;24:771-8.
 11. Pfeifer GP, Denissenko MF, Oliver M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* 2002;21:7435-51.
 12. Hussain SP, Amstad P, Raja K, Sawyer M, Hofseth L, Shields PG, et al. Mutability of p53 hotspot codons to benzo(a)pyrene diol epoxide (BPDE) and the frequency of p53 mutations in nontumorous human lung. *Cancer Res* 2001;61:6350-5.
 13. Lee EB, Jin G, Lee SY, Park JY, Kim MJ, Choi JE, et al. TP53 mutations in Korean patients with non-small cell lung cancer. *J Korean Med Sci* 2010;25:698-705.
 14. Walker DR, Bond JP, Tarone RE, Harris CC, Makalowski W, Boguski MS, et al. Evolutionary conservation and somatic mutation hotspot maps of p53: correlation with p53 protein structural and functional features. *Oncogene* 1999;18:211-8.
 15. Kato S, Han SY, Liu W, Otsuka K, Shibata H, Kanamaru R, et al. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8424-9.
 16. 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.
 17. Hu Y, McDermott MP, Ahrendt SA. The p53 codon 72 proline allele is associated with p53 gene mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:2502-9.
 18. Sidransky D and Hollstein M. Clinical implications of the p53 gene. *Annu Rev Med* 1996;47:285-301.
 19. Horio Y, Takahashi T, Kuroshi T, Hibi K, Suyama M, Niimi T, et al. Prognostic significance of p53 mutations and 3p deletions in primary resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1993;53:1-4.
 20. Hashimoto T, Tokuchi Y, Hayashi M, Kobayashi Y, Nishida K, Hayashi S, et al. Different subtypes of human lung adenocarcinoma caused by different etiological factors. Evidence from p53 mutational spectra. *Am J Pathol* 2000;157:2133-41.
 21. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. IARC tp53 database, R15. <http://www-p53.iarc.fr/index.html> (Updated on Nov 2010).
 22. Hernandez-Boussard TM and Hainaut P. A specific spectrum of p53 mutations in lung cancer from smokers: review of mutations compiled in the IARC p53 database. *Environ Health Perspect* 1998;106:385-91.
 23. Bennett WP, Hussain SP, Vahakangas KH, Khan MA, Shields PG, Harris CC. Molecular epidemiology of human cancer risk: gene-environment interactions and p53 mutation spectrum in human lung cancer. *J Pathol* 1999;187:8-18.
 24. Pfeifer GP, Denissenko MF, Tang M. p53 mutations, benzo[a]pyrene and lung cancer: a reply. *Mutagenesis* 1998;13:537-8.