

□ 원 저 □

비소세포폐암 조직에서 p16 종양억제유전자와 Death-Associated Protein Kinase의 Aberrant Methylation의 양상

부산대학교 의과대학 내과학교실, 흉부외과학교실¹, 병리학교실², 핵의학과학교실³,
의학연구소⁴, 동아대학교 의과대학 병리학교실⁵

김윤성, 이민기, 정경식, 김기욱, 김영대¹, 이형렬¹, 이창훈²,
석주원³, 김용기³, 전은숙⁴, 최영민⁴, 나서희⁵, 박순규

= Abstract =

Aberrant Methylation of p16 Tumor Suppressor Gene and Death-Associated Protein Kinase in Non-Small Cell Lung Carcinoma

Yun Seong Kim, M.D., Min Ki Lee, M.D., Kyung Sik Jung, M.D., Ki Uk Kim, M.D.,
Young Dae Kim, M.D.¹, Hyung Ryul Lee, M.D.¹, Chang Hoon Lee, M.D.²,
Ju Won Seok, M.D.³, Yong Ki Kim, M.D.³,
Eun Sook Jun⁴, Young Min Choi⁴, Seo Hee Rha, M.D.⁵, And Soon Kew Park

*Department of Internal Medicine, thoracic surgery¹, Pathology²,
and Nuclear medicine³, Pusan National University College of Medicine,
Medical Research Institute of Pusan National University Hospital⁴, Department of Pathology⁵,
Dong-A University College of Medicine, Pusan, Korea*

Background : The p16^{INK4a} (p16) tumor suppressor gene is frequently inactivated in human non-small cell lung cancers (NSCLCs), predominantly through homozygous deletion or in association with aberrant promotor hypermethylation. Death-associated protein kinase (DAPK) gene influences interferon γ -induced apoptotic cell death and has important role in metastasis of lung cancer in animal model. Hypermethylation of promoter region of DAP kinase gene may suppress the expression of this gene.

Methods : This study was performed to investigate the aberrant methylation of p16 or DAP kinase in 35

Address for correspondence :

Min Ki Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, Pusan National University College of medicine

1-10, Ami-Dong, Suh-Gu, Pusan 602-739, Korea

Phone : 051-240-7211 Fax : 051-254-3127 E-mail : leemk98@dreamwiz.com

resected primary NSCLCs by methylation-specific PCR (MSP), and demonstrated frequency, diagnostic value and clinical implication of aberrant methylation of two genes.

Results : Thirty-two cases were male patients, and 3 cases were female patients with an average age was 57.8 ± 10.5 years. The histologic types of lung cancer were 22 of squamous cell carcinoma, 12 of adenocarcinoma, 1 of large cell carcinoma. Pathologic stages were 11 cases of stage I (1 I A, 10 I B), 13 cases of stage II (1 IIA, 12 IIB), and 11 cases of stage III (9 IIIA, 2 IIIB). Regarding for the cancer tissue, p16 aberrant methylation was noted in 13 case of 33 cases (39.4%), DAP kinase in 21 cases of 35 cases (60%). Age over 55 year was associated with p16 aberrant methylation significantly ($p < 0.05$). Methylation status of two genes was not different by smoking history, histologic type, size of tumor, lymph node metastasis and disease progression of lung cancer. There was no correlation between p16 and DAP kinase hypermethylation.

Conclusion : This investigation demonstrates that aberrant methylation of p16 tumor suppressor gene or DAP kinase showed relatively high frequency (74.3%) in NSCLCs, and that these genes could be a biologic marker for early detection of lung cancer. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2001, 51 : 108-121)

Key words : DNA methylation, p16, DAPK, Non-small cell lung carcinoma, Methylation-specific PCR.

서 론

폐암은 조기 발견이 어렵고 완치율이 매우 낮은 암으로 지난 20여년간 의학의 눈부신 발전에도 불구하고 사망률은 줄어들지 않고 있다. 미국과 유럽 등의 선진국에서는 흡연 인구의 감소로 발생률이 감소하고 있으나 우리 나라에서는 흡연 인구가 증가함에 따라 폐암 환자의 비율이 급증하고 있으며, 전국 실태 조사에서도 흡연과의 연관성이 높다고 알려진 편평 상피암이 가장 많은 것으로 보고되고 있다¹.

폐암은 가장 좋은 치료법을 적용하여도 진단 후 5년 생존율이 10-15%에 불과하므로 조기 발견, 치료 및 예방에 새로운 방법이 필요하다². 다른 암종과 마찬가지로 폐암도 유전자 이상과 연관된 질병으로 종양 유전자 또는 종양 억제 유전자들이 발암과 진행과정에 관여하는 것으로 알려져 있다. 그 중에서도 종양 억제 유전자의 불활성화는 폐 종양의 발생에 중요하다고 알려져 있으며, 폐암의 비정상적인 증식, 변형(transformation), 침습, 전이에 영향을 미친다고 한다^{3,5}.

종양 억제 유전자가 불활성화 되는 기전으로 유전자의 돌연변이, 이형 접합체 소실(loss of heterozy-

gosity, LOH)이나 동형 접합체 결손의 유전자 소실 등이 원인으로 잘 알려져 있으나, 최근 promoter의 비정상적인 메틸화에 의한 전사 억제가 유전자의 발현을 억제하는 또 다른 기전으로 보고되고 있다⁶.

진핵 세포(eukaryote)에서 DNA 메틸화는 cytosine 고리의 탄소 5번 위치에 메틸기가 붙는 경우를 말하는데 이는 DNA methyltransferase(MTase)에 의해 촉매되며, 이러한 DNA 메틸화는 자연적으로 일어나는 DNA 변형의 유일한 형태로 CpG 부위에서만 일어난다. 유전체에서 CpG dinucleotide의 빈도는 CG 억제(suppression)로 불리는 현상으로 인해 매우 낮으나, 일부분에서는 CpG 빈도가 기대치보다 높은, 300~3000 bp 길이의 작은 부위가 존재하는데 이를 CpG island라고 하며, 단백질 coding 부위의 5' 부위에 존재한다. CpG island를 가진 promoter가 메틸화되면 유전자의 전사가 억제됨으로 유전자는 발현되지 않으며, 유사분열을 통해 자손 세포에 전달된다. 따라서 DNA 염기서열의 변화가 없이 유전자 발현의 변화가 세포 분열을 통해서 유전되는 epigenetic inheritance를 보인다.

이에 근거하여 본 연구에서는 여러 종양 억제 유전

자 중 비소세포 폐암이 발병하는 초기 단계에 영향을 미치는 것으로 추측되는 p16 종양 억제 유전자와 폐암의 전이에 중요한 역할을 한다고 알려진 death associated protein(DAP) kinase 유전자에서의 메틸화 양상을 알아 보았다.

메틸화 변화가 있는 유전자를 찾기 위한 방법에는 여러 가지⁷⁻¹¹가 있으나 과정이 복잡하고, 많은 제약이 있다고 알려져 있다. 이에 저자는 비교적 최근에 고안되어, 전통적인 Southern hybridization보다 여러 가지 이점이 있다고 알려진 methylation specific PCR (MSP)¹²을 이용하여 폐암에서 두 유전자의 메틸화 빈도, 임상적, 병리학적 특성에 따른 메틸화의 차이와 진단적 이용 가능성을 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 실험재료 및 기구

본 연구에 사용된 검체는 1999년 1월부터 2000년 3월까지 부산대학교 병원에서 비소세포 폐암으로 근치적 절제술을 받은 환자 중 총 35예로부터 얻어진 파라핀 포매 조직이었다.

본 연구에 사용된 시약은 다음과 같다. InstageneTM DNA 정제 kit는 미국 BioRad사의 것을, primer는 (주)제노텍의 oligonucleotide를, Taq polymerase는 미국 GiBcoBRL사의 것을, SssI methyltransferase는 미국 New England Biolabs사의 것을, PCR 반응 혼합액은 미국 Promega사의 것을, proteinase K, hydroquinone, sodium bisulfate 및 mineral oil은 미국 Sigma사의 것을, 7% polyacrylamide gel은 미국 BioRad사의 것을 사용하였다. 또한 원심분리기는 미국 Eppendorf사의 Centrifuge 5415C를, thermal cycler는 미국 MJ Research사의 PTC-100TM을, Wizard[®] DNA cleanup system과 Vac-Man[®] laboratory vacuum Manifold는 미국 Promega사의 것을 사용하였다.

2. 방 법

1) DNA 추출

파라핀 포매 조직을 10 μ m 두께로 잘라서 hematoxylin & eosin 염색을 시행하여 암 조직을 확인한 후 DNA를 추출하였다¹³. 파라핀 포매 조직 절편을 xylene 1ml를 첨가하여 실온에 10분간 방치 후, 원심분리기에서 12,000 rpm으로 5분간 원심분리 하여 상층을 제거하였다. Pellet에 100% alcohol 1ml를 첨가하여, vortex 하여 10초간 섞은 후 12,000 rpm에서 4분간 원심분리하여 상층을 제거하는 과정을 90% alcohol, 70% alcohol 순서로 반복한 후 pellet을 건조하였다. TEN buffer 300 μ l, 10% SDS 25 μ l, proteinase K (10mg/ml) 20 μ l를 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에 하룻밤 동안 반응하였으며, spin down후 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) 400 μ l 첨가하여 30초간 vortex 후 12,000 rpm에서 5분간 원심분리를 하였다. 상층액을 취하여 chloroform/isoamylalcohol 400 μ l를 첨가하여 원심분리하여 상층을 100% cold ethanol 900 μ l와 5M NaCl 10 μ l를 첨가하여 -70 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 방치하였다. 70% ethanol로 세척하여 건조 시킨 후 spectrophotometer로 DNA 농도를 측정하였다.

2) Sodium bisulfite 처리 및 DNA 정제

DNA 1 μ g을 증류수 30 μ l로 희석하여 2M NaOH 5.5 μ l를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응 후 10mM hydroquinone 30 μ l를 첨가한 후, 3M sodium bisulfate 520 μ l를 가하여 DNA와 잘 혼합한 뒤 mineral oil 50 μ l를 중층시켜 50 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 처리하였다. Mineral oil 제거 후 DNA Wizard cleanup system의 resin 1ml를 가하여 Wizard minicolumn에 첨가한 후 Vac-Man laboratory vacuum 장치를 연결하고 진공펌프로 약한 음압을 가하여 용액을 배출시켰다. 80%의 isopropanol 2ml를 가한 후 진공으로 음압을 가하여 세척하고 30초간 건조시킨 다음 minicolumn을 1.5ml 원심관에 옮겨서 12,000

Table 1. Primers used in MSP

Primer	Product Size	Annealing temperature	Sequence
p16			
Unmethylated			
sense	151 bp	60°C	5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3'
antisense			5'-CAACCCCAAACCACAACCATAA-3'
Methylated			
sense	150 bp	65°C	5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3'
antisense			5'-GACCCCGAACCGCGACCGTAA-3'
DAP kinase			
Unmethylated			
sense	106 bp	60°C	5'-GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT-3'
antisense			5'-CAAATCCCTCCCAAACACCAA-3'
Methylated			
sense	98 bp	60°C	5'-GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC-3'
antisense			5'-CCCTCCCAAACGCCGA-3'

rpm으로 1분간 원침한 후 60°C~70°C로 가열된 증류수 50 μ l를 가하여 정제된 DNA를 회수하였다. 3M NaOH 5.5 μ l를 첨가하고 실온에서 5분간 반응한 후, glycogen (10mg/ml) 1 μ l를 가하고, 10M ammonium acetate 1 μ l와 3 vol ice-cold 100% ethanol을 가하여 -20°C에서 하룻밤 동안 침전시켰다. 25분간 원심분리후 상층액을 버리고 4°C의 70% ethanol로 세척후 고압 멸균 처리된 증류수 20~30 μ l에 resuspend 후 PCR에 사용하였으며, 나머지는 -70°C에 보관하였다.

3) Methylation specific PCR(MSP)

p16 유전자와 DAP kinase의 methylation 양상은 MSP 방법을 이용하였다¹². Primer는 보고된 염기서열¹⁴을 참고하여 결정된 oligonucleotide를 사용하였다(Table 1). PCR 반응의 조성은 10 \times buffer (670 mM Tris-HCl, pH 8.8, 166 mM (NH₄)₂, 67 mM MgCl₂, 100 mM β -mercaptoethanol), 2mM dNTP 2.5 μ l, 300ng/ μ l sense primer 1 μ l, anti-

sense primer 1 μ l, bisulfite treated DNA 2 μ l, Platinum[®]Taq polymerase 1.25 unit, 증류수 28.5 μ l으로 총 40 μ l가 되게 하였다. p16 MSP는 95°C에서 5분간 가열후, 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초간씩 35주기를 반복하고 마지막에 72°C에서 4분간 더 반응시켰다. DAP kinase는 통상의 PCR에서 증폭이 약하여 stepdown PCR을 시행하였는데, 95°C에서 5분간 변성후 70°C에서 58°C까지 2°C 하강하면서 각각의 온도에서 2 cycle의 PCR을 하고 56°C에서 30 cycle을 한 후 72°C에서 5분 연장 반응을 하였다. 이때 denaturing, annealing, extension 시간은 위의 p16 MSP와 동일하게 시행하였다. 건강 성인의 말초 혈액 임파구에서 추출된 DNA를 음성 대조로 하였으며, 말초 혈액 임파구에서 추출된 DNA를 SssI methyltransferase로 처리한 것을 양성 대조로 하였다. 모든 MSP 반응은 여기서 얻어진 PCR 산물 10 μ l를 nondenaturing 7% polyacrylamide gel에 80 volt에서 1시간 30분 동안 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여

Table 2. Clinicopathologic characteristics of NSCLC patients

Characteristics	Histologic type			Total (No.)
	SCC	Adenocarcinoma	LCC	
Patients, No.(%)	22 (62.9)	12 (34.3)	1 (2.9)	35 (100)
Sex, No.(%)				
Male	21 (95.5)	10 (83.3)	1 (100)	32 (91.4)
Female	1 (4.5)	2 (16.7)		3 (8.6)
Age, yr. (mean±SD)	59.3±9.7	55.9±11.7	73	57.8±10.5
Smoking status, No.(%)				
Smoker	20 (90.9)	7 (58.3)	1 (100)	28 (80)
Nonsmoker	2 (9.1)	5 (41.7)		7 (20)
Tumor, No.(%)				
T1			1 (100)	1 (2.9)
T2	18 (81.8)	6 (50)		24 (68.6)
T3	4 (18.2)	4 (33.3)		8 (22.9)
T4		2 (16.7)		2 (5.7)
Node, No.(%)				
N0	12 (54.6)	6 (50)	1 (100)	19 (54.3)
N1	5 (22.7)	2 (16.7)		7 (20)
N2	5 (22.7)	4 (33.3)		9 (25.7)
N3				
Stage, No.(%)				
I				11 (31.4)
IA			1 (100)	1 (2.9)
IB	9 (40.9)	1 (8.3)		10 (28.6)
II				13 (37.1)
IIA		1 (8.3)		1 (2.9)
IIB	8 (36.4)	4 (33.3)		12 (34.3)
III				11 (31.4)
IIIA	5 (22.7)	4 (33.3)		9 (25.7)
IIIB		2 (16.7)		2 (5.7)

NSCLC : Non-small cell lung carcinoma,

SCC : Squamous cell carcinoma, LCC : Large cell carcinoma

자외선 투시하에서 띠(band)를 관찰하였다.

3. 통계학적 처리

통계 처리는 SPSS version 10.0 프로그램을 이용하

여, 단변수 분석에는 chi-square test를, 다변수 분석에는 logistic regression analysis를 시행하였고, p16과 DAP kinase 메틸화의 연관성은 Pearson 상관계수를 이용하였다. p값이 0.05 미만인 경우 유의한 것으로 정의 하였다.

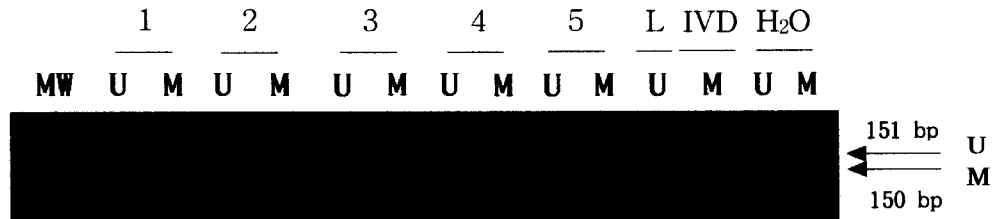


Fig. 1. MSP of p16 in primary non-small cell lung carcinoma. Both the unmethylated (U) and methylated (M) PCR products are shown for each sample. Lane MW, molecular weight marker ; Lane L, Peripheral blood lymphocyte as a negative control for methylation; Lane IVD, in vitro methylated DNA as a positive control for methylation ; Lane H₂O, water blanks. Methylated alleles were observed in DNA from cases 2, 3 and 5. Unmethylated alleles were shown in all lesions due to contaminating normal tissue.

결 과

1. 대상 환자들의 임상적, 병리학적 특징

대상 환자는 남자 32예, 여자 3예이었으며, 평균 연령은 57.8 ± 10.5 세이었다. 전 35예중 흡연자는 28예, 비흡연자는 7예이었고, 흡연자의 평균 흡연력은 41.4 ± 18.6 갑년이었다. 폐 절제술로 얻은 비소세포 폐암의 조직학적 진단은 WHO 기준¹⁵에 의하였고, 이에 따른 폐암의 조직형은 편평 상피암 22예, 선암 12예, 대세포암 1예이었다. 술후 병리학적 병기¹⁶는 1기 11예(IA:1예, IB:10예), 2기 13예(IIA:1예, IIB:12예), 3기 11예(IIIA:9예, IIIB:2예)이었다(Table 2).

2. p16 메틸화 빈도

전체 대상 35예중 33예에서 p16 MSP를 시행하였으며, 그중 13예(39.4%)에서 p16 유전자의 메틸화를 확인할 수 있었다(Fig. 1). 메틸화 빈도는 남녀의 차이가 없었으며, 흡연 유무나 흡연량에 따른 차이도 없었다($p > 0.05$). 나이를 기준으로 55세 미만에서는 비정상적인 메틸화가 14명중 2명(14.3%)이었으나, 55세 이상에서는 19명중 11명(57.9%)으로 유의하게 빈도가 증가하였다($p = 0.011$). 그러나, 종양의 조

직형에 따른 메틸화 빈도의 차이는 없었고, 종양의 크기 및 임파선 전이 및 병기의 진행도에 따른 메틸화 양상의 차이도 없었다(Table 3).

3. DAP kinase 유전자의 메틸화 빈도

전 35예를 대상으로 DAP kinase MSP를 시행하였는데, 35예중 21예(60%)에서 DAP kinase의 메틸화를 확인할 수 있었다(Fig. 2). 여자 3명은 모두 DAP kinase의 비정상적인 메틸화를 보였다. 흡연자군보다 비흡연자군에서 메틸화 빈도가 높게 나타났으나, 통계학적 유의성은 없었으며($p > 0.05$), 흡연량에 따른 차이도 없었다. p16과는 달리 나이에 따른 차이도 관찰할 수 없었다. 종양의 조직형에 따른 메틸화 빈도의 차이는 없었으며, 종양의 크기, 임파선 전이에 따른 메틸화 양상의 차이는 없었다. 병기가 높을수록 hypermethylation의 빈도는 증가하였으나 통계적으로 유의하지 않았다($p > 0.05$)(Table 4).

4. p16 및 DAP kinase 유전자의 메틸화 양상에 따른 원격 전이의 빈도

술후 6개월간의 추적 관찰에서 전체 대상 35예 중 12예(34.3%)에서 원격 전이가 관찰되었는데, p16의 비정상적인 메틸화가 확인된 환자에서는 13명중 3

Table 3. Relationship between clinicopathologic characteristics and p16 hypermethylation in NSCLC patients

Characteristics	p16 hypermethylation, No. (%)		Total, No.	p value
	Positive	Negative		
Patients	13(39.4)	20(60.6)	33	NS
Sex				
Male	12(40)	18(60)	30	NS
Female	1(33.3)	2(66.6)	3	
Age, yr*				
<55	2(14.3)	12(85.7)	14	p=0.011
≥55	11(57.9)	8(42.1)	19	
Histology				NS
SCC	10(50)	10(50)	20	
Adenocarcinoma	3(25)	9(75)	12	
LCC		1(100)	1	
Tumor				NS
T1		1(100)	1	
T2	7(31.8)	15(68.2)	22	
T3	6(75)	2(25)	8	
T4		2(100)	2	
Node				NS
N0	8(47.1)	9(52.9)	17	
N1	3(42.9)	4(57.1)	7	
N2	2(22.2)	7(77.8)	9	
N3				
Stage				NS
I	4(44.4)	5(55.6)	9	
II	6(46.2)	7(53.8)	13	
III	3(27.3)	8(72.7)	11	

NS : not significant, * : statistically significant, NSCLC : Non-small cell lung carcinoma, SCC : Squamous cell carcinoma, LCC : Large cell carcinoma

명(23.1%)인 반면, DAP kinase의 비정상적인 메틸화가 확인된 환자에서는 21명중 8명(38.1%)으로, p16 메틸화 환자에 비해 높은 경향을 보였으나 통계적인 차이는 없었다($p>0.05$).

5. 폐암에서 p16과 DAP kinase 유전자의 메틸화 양상의 연관성 및 두 유전자의 비정상적인 메틸화 빈도

전 35예중 MSP 후 p16에 대하여 메틸화 되거나 또는

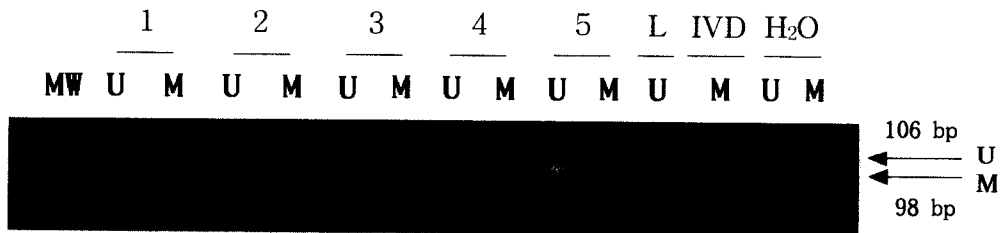


Fig. 2. MSP of DAP kinase gene in primary non-small cell lung carcinoma. Both the unmethylated (U) and methylated (M) PCR products are shown for each sample. Lane MW, molecular weight marker ; Lane L, Peripheral blood lymphocyte as a negative control for methylation ; Lane IVD, in vitro methylated DNA as a positive control for methylation ; Lane H₂O, water blanks. Methylated alleles were observed in DNA from cases 1-5. Unmethylated alleles were in all lesions except case 2 due to contaminating normal tissue.

메틸화 되지 않은 band가 하나도 관찰되지 않았던 2예를 제외한 33예에서 p16과 DAP kinase 유전자가 비정상적으로 메틸화 되거나 또는 메틸화 되지 않은 band를 관찰할 수 있었는데, p16에서만 메틸화가 관찰된 경우는 5예(15.4%), DAP kinase에서만 메틸화가 관찰된 경우는 12예(36.4%) 이었다. 두 유전자 모두에서 비정상적인 메틸화가 있었던 경우와 메틸화가 없었던 경우는 각각 8예(24.2%)이었으나, 두 유전자 사이의 메틸화 양상에서 연관성은 없었다($r=0.015$, $p>0.05$). 전체 대상 환자에서 두 유전자중 하나라도 메틸화가 발견된 경우는 26예(74.3%) 이었다.

고 찰

폐암의 발생은 유전적 변화(genetic alteration)가 축적되는 다단계 과정을 거치며¹⁷, 그 중 종양 유전자의 발현과 종양 억제 유전자의 불활성화가 중요하다고 알려져 있다.

종양 억제 유전자가 불활성화되는 기전의 한가지로 종양 억제 유전자 promoter의 비정상적 메틸화에 의한 전사 억제가 최근 보고되었다.

DNA 메틸화는 포유 동물 유전자의 promoter 부위에서 DNA MTase에 의해서 cytosine 고리에 메

틸기가 붙는 경우를 말하며, 이러한 DNA 메틸화는 DNA major groove에 돌출된 메틸기를 형성하므로 종양 억제 유전자의 전사 시작을 방해함으로 전사를 억제한다고 추측된다. 그 기전으로는 DNA 메틸화가 시퀀스-특이적 전사 인자의 결합력을 감소시키며, 메틸화 의존성 DNA-결합 단백질(methylation dependent binding protein, MDBP)이 전사 억제 인자로 작용하거나, 염색질 구조의 변화를 일으켜 전사 억제를 유발한다고 한다. 또한, DNA 메틸화에 의해 생성된 5-methylcytosine(5-mC)이 탈아미노화되어 thymidine으로 바뀌면 guanine과 잘못된 쌍을 이루게 되는데, thymidine은 DNA에서 발견되는 정상적인 염기이므로 DNA glycosylase에 의한 복구 과정은 효과적이지 못하게 된다¹⁸.

이러한 비정상적 메틸화와 관련된 원인적 요소로는 국소적인 DNA 구조의 변화, nickel 또는 platinum 등의 발암 물질 노출, DNA MTase 활성도 증가, microsatellite instability(MSI) 등이 고려되는데, 한가지가 주된 요소라기보다는 여러 요소가 연관되는 것으로 추측된다¹⁹.

암 발생에서 새로운 메틸화가 원인인지 아니면 부수적인 역할을 하는지의 여부와 종양 억제 유전자의 불활성화에 직접 관여하는지 또는 다른 기전에 의한 불활성화를 단지 강화시켜 주는지에 대해 논란의 여지가

Table 4. Relationship between clinicopathologic characteristics and DAP kinase hypermethylation in NSCLC patients

Characteristics	DAP kinase hypermethylation, No. (%)		Total, No.	p value
	Positive	Negative		
Patients	21(60)	14(40)	35	NS
Sex				
Male	18(56.2)	14(43.8)	32	NS
Female	3(100)		3	
Age, yr				
<55	9(60)	6(40)	15	NS
≥55	12(60)	8(40)	20	
Histology				NS
SCC	13(59.1)	9(40.9)	22	
Adenocarcinoma	8(66.7)	4(33.3)	12	
LCC		1(100)	1	
Tumor				NS
T1		1(100)	1	
T2	13(54.2)	11(45.8)	24	
T3	6(75)	2(25)	8	
T4	2(100)		2	
Node				NS
N0	12(63.2)	7(36.8)	19	
N1	3(42.9)	4(57.1)	7	
N2	6(66.7)	3(33.3)	9	
N3				
Stage				NS
I	5(45.5)	6(54.5)	11	
II	8(61.5)	5(38.5)	13	
III	8(72.7)	3(27.3)	11	

NS : not significant, NSCLC : Non-small cell lung carcinoma, SCC : Squamous cell carcinoma, LCC : Large cell carcinoma

있으나, DNA 메틸화가 암 발생에 원인적 역할을 한다는 증거들이 최근 제시되고 있다.

Laird 등²⁰에 의하면 ApcMin에 의해 유발된 장 용종 mice에서 메틸화의 환원은 용종의 생성을 억제시켰다고 하며, 다른 연구에서는 MSI를 가진 대부분

의 대장암에서 mismatch repair gene인 MLH1 promoter의 비정상적인 메틸화를 보이며²¹, 이런 종양을 DNA MTase 억제제인 5-aza-2'-deoxycytidine(5-azad-c)으로 처리하면 MLH1 promoter를 탈메틸화시켜 MLH1 단백질의 재축적을 유도하

고, mismatch-repair activity의 회복이 유발됨으로 CpG island의 비정상적인 메틸화가 MLH1 불활성화의 일차적인 요소라고 생각하였다²².

염색체 9p21 부위에 위치하는 p16 종양 억제 유전자는 CDK4와 결합하여 Rb의 phosphorylation을 방해하므로 p16 기능의 소실은 Rb의 불활성화를 야기한다. p16 유전자는 비소세포 폐암의 모든 조직형으로부터 얻어진 세포주의 70% 이상에서 불활성화되는데²³, 동형 접합체 결손(homozygous deletion) 또는 반수 접합체 결손(hemizygous deletion)에 의하거나²⁴, 점 돌연변이에 의한 p16 allele 불활성화²⁵, 또는 p16 첫 번째 exon에 존재하는 CpG island methylation에 의한 유전자 silencing으로 야기되며²⁶, 이중 DNA 메틸화에 의한 p16 silencing은 비소세포 폐암의 초기 단계에 작용하고 동형 접합체 결손이나 돌연변이는 흔히 비소세포 폐암 발생의 후기에 작용한다고 알려져 있다²⁶.

본 연구에서는 p16 MSP를 시행한 33예중 13예(39.4%)에서 비정상적인 메틸화를 확인할 수 있었는데, 41%로 보고한 다른 연구⁶에서의 결과와 비슷한 빈도를 보였다. 55세를 기준으로 한 나이가 p16 메틸화의 발현과 연관성이 있었는데, 외국의 연구 결과¹⁹에서는 60세 이상의 나이가 암 발생의 중요한 독립 변수임을 고려할 때 p16 메틸화가 암 뿐만 아니라 암이 없음에도 불구하고 연령 증가에 따라 높은 빈도를 보일 수 있으므로 추후 연구가 더 필요하리라 생각된다. Geradts 등²⁷은 최근 103예의 비소세포 폐암 절제 조직에서 p16의 조직 화학적 발현 정도는 병기 및 생존율과 연관성이 없었다고 보고하였는데, 본 연구는 전체 대상수가 적고, MSP를 통한 첫 번째 exon 부위의 비정상적인 메틸화 유무를 확인한 검사로서 차이가 있지만, 두 유전자와 임파선 전이 및 병기는 연관성이 없었으므로, 비슷한 결과를 확인할 수 있었다.

그러나 같은 DNA 검체를 사용하여 여러 조건에서 실험하였음에도 불구하고 전체 대상중 2예에서 PCR 후 p16 메틸화의 띠를 관찰할 수 없었는데, 이는 메틸화 세포가 10⁵중 1개만 있어도 검출할 수 있다는

이론적 근거²⁸에도 불구하고, 종양 DNA의 양이 부족하였거나, 또는 불량한 DNA template가 원인으로 생각된다. Merlo 등²⁹에 의하면 정상 기관지 상피 세포와 말초 혈액 백혈구에서 p16 메틸화는 관찰할 수 없었다하며 본 연구에서도 기관지 확장증으로 수술 받은 환자의 조직에서 p16 메틸화는 보이지 않았다.

DAP kinase로 불리는 DAP-2는 serine/threonine kinase로 Ca²⁺/Calmodulin 의존성이며, 염색체 9q34.1 부위에 위치한다. DAP kinase는 세포골격(cytoskeleton)과 연관된 protein kinase(160kDa)로 interferon γ -induced apoptotic cell death에 영향을 미쳐 폐암의 전이에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, promoter의 비정상적인 메틸화는 유전자의 발현을 억제한다고 한다³⁰.

Tang 등³¹의 연구에 의하면 DAP kinase promoter의 비정상적인 메틸화를 폐암 조직의 44%에서 발견할 수 있었고, DAP kinase가 비소세포 폐암의 초기에 생물학적 침습성 결정에 중요한 역할을 한다고 하였는데, 본 연구에서는 전체 대상중 60%에서 비정상적인 메틸화가 관찰되어 이전 결과보다 약간 높은 빈도를 보였다. 이러한 차이는 stage I을 대상으로 한 이전 연구보다 본 연구에 참여한 환자의 병기가 높은 것이 원인으로 추측되나 각 병기에 포함된 환자수가 적으므로 좀더 연구가 필요하리라 생각된다.

DAP kinase MSP후 비정상적인 메틸화 band만 관찰되고, 메틸화 되지 않은 band가 관찰되지 않았던 1예는 파라핀 포매 조직 절제시나 DNA 추출 과정에서 기저막이나 정상 조직이 하나도 포함되지 않은 순수 암종일 가능성이 있으나, 불량한 DNA template의 가능성도 고려해 볼 수 있다.

본 연구에서는 평균 6개월간의 추적 관찰에서 12예에서 타장기로의 전이가 확인되었는데, DAP kinase 메틸화는 원격 전이가 없었던 환자의 28.6%에 비해 원격 전이가 있었던 환자에서는 38.1%로 빈도가 높았으나 통계적 유의성은 없었는데, 전체 검체수가 적고, 추적 관찰한 기간이 불과 6개월에서 1년으로 짧은 것이 제한점으로 작용하였다고 추측되며, 계

속적인 추적 관찰이 필요하리라 생각된다. 또한, 종양의 크기, 임파선 전이나 병기에 따라 DAP kinase의 메틸화가 증가되는 경향을 보였으나 유의한 상관성은 없었다.

p16 유전자와 DAP kinase의 메틸화 양상이 동일한 경우는 16예이었으나, 상이한 경우도 17예이었으므로 서로 연관성은 관찰할 수 없었는데, 다양한 원인이 메틸화에 영향을 미치기 때문으로 생각된다. p16이나 DAP kinase중 하나라도 비정상적인 메틸화를 보인 경우는 전체 대상중 74.3%에서 발견되어, 비교적 높은 빈도를 보여주었다. 이와 같은 결과는 메틸화가 비소세포폐암에서 종양 억제 유전자의 불활성화와 관련된 기전의 하나임을 보여주며, 여러 가지 다른 종양 억제 유전자들과 병행하여 검사시 비정상적인 메틸화의 빈도는 더욱 높아져 폐암 조기진단의 표지자로 사용 가능성을 보여준다³².

CpG island promoter 부위에서 메틸화 변화가 있는 유전자의 확인을 위한 고전적인 방법에는 restriction landmark genome scanning(RLGS)⁷, representational difference analysis(RDA)⁸, methylation-sensitive arbitrarily primed PCR(AP-PCR)⁹,¹⁰, methylated CpG island amplification(MCA)¹¹ 등이 있는데, 이러한 방법들은 매우 복잡하거나, 파라핀 포매 블록을 이용할 수 없거나, 대조군을 필요로 하는 등의 제한점이 있는 반면 MSP법은 아래와 같은 여러 가지 이점이 있는 것으로 보고되어 본 연구에 이용하였다. 첫째, 200ng 이하의 적은 양의 DNA template만으로도 검사가 가능하여 파라핀 포매 조직으로부터 얻은 DNA를 사용할 수 있으며, 둘째, DNA를 sodium bisulfite로 처리하여 탈아미노화를 시키면, 메틸화 되지 않은 cytosine은 uracil로 바뀌어, PCR 후 thymidine으로 변화되지만, 비정상적으로 메틸화된 cytosine은 PCR후에도 변화가 없으므로 메틸화된 DNA와 메틸화 되지 않은 DNA 사이에는 시퀀스의 차이가 나타나서 PCR후 차이를 확인할 수 있으며, 또한 primers는 메틸화 된 또는 메틸화 되지 않은 alleles을 양쪽 모두를 확인 하므로 정상 조직이 포

함되어 있어도 메틸화를 확인하는데 방해가 되지 않으며, 셋째, 이 방법의 민감도는 메틸화 세포가 십만개 중 한개만 있어도 확인할 수 있을 정도이므로²⁸, 객담과 같이 이질적인 세포군에서 메틸화 alleles을 포함하는 세포를 확인할 수 있는 유용한 방법이 될 수 있다. 그러나, MSP법은 특별한 유전자에 대한 메틸화의 양적인 정보를 제공하지 못하는 단점도 있다²⁵.

DNA 메틸화는 종양으로부터 얻어진 genomic DNA에서 유일하게 보존된 epigenetic marker로서 유전자의 발현정도를 반영하므로, 파라핀 포매 종양 조직에서 분리가 어려운 RNA 또는 단백질에 근거한 expression analysis의 대용으로 사용될 수 있으며, 임상적인 관점에서도 DNA MTase 억제제인 5-aza-2'-deoxycytidine으로 처리시 promoter의 탈메틸화를 야기시켜 epigenetic change를 반전시키면 세포의 기능을 회복시켜 종양의 치료에도 도움을 줄 수도 있으므로 종양 억제 유전자의 epigenetic silencing에 대한 연구는 중요한 의미가 있다. 본 연구는 폐암 절제술 후의 암 조직을 대상으로 시행하였으나, 향후 기관지 내시경 생검 조직, 환자의 혈장이나 혈청 그리고 흉수와 같은 체액에서 분리된 DNA를 이용하여 메틸화 양상의 연구시, 폐암의 조기진단 뿐 아니라, 분자 병기 결정, 재발의 발견 및 치료 효과 판정 등에 유용한 분자 생물학적 검사의 개발도 가능한 것으로 생각된다.

요 약

배 경 :

p16 종양 억제 유전자 promoter의 aberrant methylation에 의한 불활성화가 비소세포 폐암이 발병하는 초기단계에 영향을 미치는 것으로 추측되며, DAP kinase 유전자 promoter의 hypermethylation은 유전자의 발현을 억제하여 폐암의 전이에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.

방 법 :

본 연구는 비소세포 폐암으로 근치적 절제술을 받은

환자 중에서 총 35예를 대상으로 MSP를 이용하여 p16 유전자와 DAP kinase의 비정상적인 methylation의 양상을 조사하여, 폐암에서 두 유전자의 메틸화 빈도, 진단적 응용의 가능성 및 임상적 유용성을 알고자 하였다.

결 과 :

전체 대상 35예중 p16 유전자의 aberrant methylation은 33예중 13예(39.4%)에서, DAP kinase 유전자 hypermethylation은 35예중 21예(60%)에서 확인할 수 있었다. 55세 이상에서 p16의 aberrant methylation은 유의하게 증가되어 있었으며, DAP kinase는 병기의 진행도에 따라 발현 빈도가 증가하였으나, 통계학적 의미는 없었다. 또한 p16 유전자와 DAP kinase 유전자간의 메틸화 양상에서도 연관성은 관찰할 수 없었다.

결 론 :

p16과 DAP kinase 유전자중 하나라도 비정상적인 메틸화가 발견된 경우는 전체 대상의 74.3%로 비교적 높은 빈도로 관찰되어 폐암의 조기 진단을 위한 분자 생물학적 방법으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 대한 결핵 및 호흡기학회 학술위원회. 폐암의 전국 실태조사. 결핵 및 호흡기질환 1999;46:455-65
- Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. Biochim Biophys Acta 1998;1378:21-59
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Methylation in the p53 tumor suppressor gene; clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Res 1994;54:4855-78
- Reissmann PT, Koga H, Takahashi R, Figlin RA, Holmes C, Piantadosi S, et al. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in non-small-cell lung cancer. The Lung Cancer Study Group. Oncogene 1993;8:1913-19
- Kelley MJ, Nakagawa K, Steinberg SM, Mulshine JL, Kamb A, Johnson BE. Differentiated inactivation of CDKN2 and RB protein in non-small-cell and small-cell lung cancer cell lines. J Natl Cancer Inst 1995;87:756-61
- Fong KM, Sekido Y, Minna JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. J Thorac Cardiovas Surg 1999;118:1136-52
- Hatada I, Sugama T, Mukai T. A new imprinted gene cloned by a methylation-sensitive genome scanning method. Nucleic Acids Res 1993;21:5577-82
- Ushijima T, Morimura K, Hosoya Y, Okonogi H, Tatematsu M, Sugimura T, et al. Establishment of methylation-sensitive representational difference analysis and isolation of hypo- and hypermethylated genomic fragments in mouse liver tumors. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:2284-9
- Gonzalzo ML, Liang G, Spruck CH III, Zingg JM, Rideout WM III, Jones PA. Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR. Cancer Res 1997;57:594-9
- Huang TH, Laux DE, Hamlin BC, Tran P, Tran H, Lubahn DB. Identification of DNA methylation markers for human breast carcinomas using the methylation-sensitive restriction fingerprinting technique. Cancer Res 1997;57:1030-4
- Toyota M, Ho C, Ahuja N, Jair KW, Li Q, Ohe-Toyota M, et al. Identification of differentially methylated sequences in colorectal carcinoma by methylated CpG island amplification. Cancer Res 1999;59:2307-12

12. Herman JG, Gaff JR, Myohannan S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR; a novel PCR assay for methylation status of CpG island. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9821-6
13. Levi S, Urgano-Ispizua A, Gill R, Thomas DM, Gilberton TJ, Foster C, et al. Multiple K-ras codon 12 mutations in cholangiocarcinomas demonstrated with a sensitive polymerase chain reaction technique. *Cancer Res* 1991;51:3497-502
14. Esteller M, Sanchez-Céspedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 1999;59:67-70
15. Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y, Brambilla E, and Collaborators from 14 Countries. World Health Organization Pathology Panel; World Health Organization. Histological typing of lung and pleural tumors. International histological classification of tumors. 3rd ed. Berlin: Springer Verlag; 1999
16. Mountain CF. Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest* 1997;111: 1710-7
17. Thiberville L, Payne P, Vielkins J, LeRiche J, Horsman D, Nouvet G, et al. Evidence of cumulative gene losses with progression of premalignant epithelial lesions to carcinoma of the bronchus. *Cancer Res* 1995;55:5133-9
18. Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood* 1999;93:4059-70
19. Issa JP. Aging, DNA methylation and cancer. *Clin Reviews in Oncol/Hematol* 1999;32:31-43
20. Laird PE, Jackson-Grusby L, Frazeli A, Dickison SL, Jung WE, Li E, et al. Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell* 1995;81:197-205
21. Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, Kim CY, Roche PC, Burgart LJ, et al. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1998; 58:3455-60
22. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;95:6870-5
23. Otterson GA, Kratz RA, Coxon A, Kim YW, Kaye FJ. Absence of p16 INK4 protein is restricted to the subset of lung cancer cell lines that retains wild type RB. *Oncogene* 1994;9: 3375-8
24. Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, Yokino K, Califano J, Merlo A, et al. Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumors. *Nat Genet* 1995;11:210-2
25. Rusin MR, Okamoto A, Chorazy M, Czyzewski K, Harasim J, Spillare EA, et al. Intragenic mutations of the p16^{INK4A}, p15^{INK4B} and p18 genes in primary non-small cell lung cancers. *Int J Cancer* 1996;65:734-9
26. Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, et al. Aberrant methylation of p16^{INK4A} is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:11891-6
27. Geradts J, Fong KM, Zimmerman PV, Maynard R, Minna JD. Correlation of abnormal RB, p16ink4a, and p53 expression with 3p loss of heterozygosity, other genetic abnormalities, and clinical features in 103 primary non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 1999;5:791-800

28. Belinsky SA, Foley JF, White CM, Anderson MW, Maronport RR. Dose-response relationship between O6-methylguanine formation in clara cells and induction of pulmonary neoplasia in the rat by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res* 1990;50:3772-80
 29. Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, et al. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1995;1:686-92
 30. Cohen O, Feinstein E, Kimchi A. DAP-kinase is a Ca^{2+} /calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. *EMBO J* 1997;16:998-1008
 31. Tang X, Khuri FR, Lee JJ, Kemp BL, Liu D, Hong WK, Mao L. Hypermethylation of the death-associated protein(DAP) kinase promoter and aggressiveness in stage I non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1511-6
 32. Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 2001;61:249-55
-