

폐암환자의 유도 객담에서 MAGE의 발현

고신대학교 의과대학 내과학교실, 계명대학교 의과대학 의과학연구소*,
대구 효성가톨릭대학교 의과대학 임상병리과교실**

육동승, 신호식, 최바울, 김지혜, 신성훈, 옥철호,
조현명, 장태원, 정만홍, 박종욱, 전창호**

=Abstract=

Expression of MAGE in the Induced Sputum of Lung Cancer Patients

Dong-Seung Yook, M.D., Ho-Sik Shin, M.D., Paul Choi, M.D.,
Ji-Hae Kim, M.D. Seong-Hoon Shin, M.D. Chul-Ho Ok, M.D.,
Hyun-Myung Cho, M.D., Tae-Won Jang, M.D., Maan-Hong Jung, M.D.,
Jong-Wook Park, M.D., Chang-Ho Jeon M.D.**

*Department of Internal Medicine, College of Medicine, Kosin University, Busan, Korea,
The Institute of Medical Science, College of Medicine, Keimyung University, Taegu, Korea*,
Department of Clinical Pathology, School of Medicine, Catholic University of Taegu, Taegu, Korea***

Background : Tumor associated antigens, which are produced specifically by tumor cells, are promising targets for the early diagnosis and immunotherapy. Among the tumor associated antigens, MAGE (a melanoma antigen), BAGE, GAGE, PRAME and NY-ESO were named as cancer/testis specific antigens since they are detected exclusively in the testis or cancer cells. If MAGE is easily detectable in the sputum, it would become a convenient method for diagnosing lung cancer. This study was undertaken to investigate MAGE expression in the induced sputum obtained from lung cancer patients.

Method : In 14 control patients and 30 lung cancer patients, the induced sputum was collected after inhaling 3% saline(5 cc) delivered by nebulizer for approximately 5 minutes after a mouth rinse and bronchodilator inhalation. The induced sputum was placed in a conservative-mixed solution (guanidinium isothiocyanate, Triton X-100). The total cellular mRNA was extracted from the cells and RT PCR and nested PCR were run in 30 and 35 cycles respectively, with two different types of primers specially designed to detect six subtypes of MAGE DNA simultaneously.

Address for correspondence :

Maan-Hong Jung M.D.

Department of Internal Medicine, Kosin Medical College

34 Amnam-dong, Suh-gu, Busan, 602-702

Phone : 051-990-6210 Fax 051-48-5686 Email: jungmh@ns.kosinmed.or.kr

Results : MAGE expression was not detected in the 14 controls, but in the 30 cancer patients, MAGE was found in 24 patients (80%, $p=0.001$). In the cancer patients, there were no differences in the expression level according to the tissue types (squamous cell cancer 13/17, adenocarcinoma 7/9, and small cell cancer 4/4, $p=0.56$). Among the 24 MAGE-positive patients, the tumor was not visible on a bronchoscopy in 11 patients (45.8%).

Conclusion : A study of MAGE in induced sputum appears to be a useful and complementary method in the diagnosis of lung cancer. A further prospective study with more patients is recommended. (*Tuberculosis and Respiratory Diseases* 2002, 53:265-274)

Key word : MAGE, Induced sputum, Lung cancer, RT PCR.

서 론

폐암은 여러 치료에도 불구하고 전체적인 5년 생존율이 14% 정도에 불과할 정도로 예후가 좋지 않다.¹ 따라서 폐암의 생존율을 높이기 위해서는 철저한 금연교육을 통한 예방과 병을 초기에 진단하려는 노력이 무엇보다 필요하다.

폐암의 조기진단을 위한 방법으로 low dose spiral CT,¹⁻⁴ autofluorescent bronchoscopy,⁵⁻⁷ 객담, 기관지폐포세척액, 기관지 생검 조직 등에서 종양유전자나 종양억제유전자, telomerase, micro-satellite instability, DNA의 메틸화, 핵의 riboprotein의 과발현 등을 조사하는 연구가 많이 시도되고 있지만⁸⁻¹⁵ 종양특이항원을 이용한 연구는 드물었다. 분자 생물학적인 방법으로 암을 진단하는데 있어서 가장 중요한 점은 검출할 목적유전자(target gene)가 암에서만 특이적으로 발현되면서 그 발현 빈도도 높아야 하는데 이런 관점에서 볼 때 고환의 생식세포를 제외한 정상세포에서는 비활성화된 DNA 상태로만 존재하지만 악성흑색종, 유암, 두경부암, 폐암, 육종, 방광암, 간암 등 여러 종양세포에서는 promotor 부위가 활성화되면서 발현되는 MAGE 유전자는 이상적인 종양표식자로서의 요건을 갖추고 있다고 생각된다.¹⁶

본 연구에서는 환자에서 쉽게 채취할 수 있는 유

도객담으로 기관지 상피세포에서의 MAGE의 발현율을 이 등¹⁷이 고안한 MAGE common primer를 이용한 nested RT-PCR로 조사하여 이 검사가 폐암의 진단이나 향후 치료 계획을 세우는데 도움이 될 수 있는지를 알아보았다.

대상 및 방법

1. 대상 환자

조직학적으로 폐암으로 진단 환자 30명, 대조군은 다른 호흡기 질환으로 입원한 환자들 중 FEV₁/FVC가 75% 미만(중양값 56%, 30-75%)이었던 14명을 대상으로 하였다.

폐암 환자들의 평균 연령은 61.3세(43-78세)였으며 남자가 20명, 여자가 10명이었다. 대조군은 COPD 11명, 천식 1명, 기관지 확장증 1명 및 결핵 환자가 1명이었고 평균연령은 60.7세(47-72세)였으며 남자가 11명, 여자가 3명이었다. 폐암 환자들은 입원 기간 동안에 기관지 내시경검사와 3회 이상의 객담세포진 검사를 실시하였다. 기관지 내시경 검사상 육안적으로 종양병변이 발견되는 경우는 17예(우하엽 5예, 좌측 주기관지 4예, 우 상엽 3예, 좌상엽 및 하엽 각각 2예, 우측 주관지 및 기관지 각각 1예)였으며 병변이 발견되지 않는 경우가 13

Table 1. Characteristics of the lung cancer patients

Characteristics	No.
Age (range)	61.3 (43 - 78)
Sex (M/F)	20/10
Smoker/Nonsmoker	26/4
NSCLC	26(87)
Squamous cell carcinoma	17(57)
Adenocarcinoma	9(30)
Stage < IIIb	4(13)
≥ IIIb	22(73)
Small Cell Lung Carcinoma	4(13)
LD	2(7)
ED	2(7)

NSCLC : Nonsmall cell lung cancer.

The number in the parentheses is percent.

Table 2. Characteristics of the control group

Characteristics	No.
Age (range)	60.7 (42-72)
Sex (M/F)	11/3
Smoker/Nonsmoker	11/3
Diagnosis	
COPD	11(78%)
Bronchiectasis	2(14%)
Pulmonary Tbc	1(7%)
FEV ₁ /FVC (range)	56%(30-75)
Bronchoscopy	N-S

예였다. 병변이 발견되지 않은 경우 경기관지 폐생검이나 경피적 폐세침흡입검사로 병리학적 진단을 하였다. 병리진단은 편평상피암이 17명으로 가장 많았으며 선암이 9명, 소세포폐암이 4명이었다 (표 1, 2).

2. 유도 객담의 채취

유도 객담은 아침 식후 1시간 정도가 경과한 후 생리식염수로 목안을 행구어 낸 후 salbutamol 흡입제를 2회 흡입시킨 다음 10분 후에 ultrasonic nebulizer를 이용하여 3% saline 5cc를 흡입시키면서 의료진의 감독 하에 기침을 유도하여 객담을 채취하였다.

3. 가검물에서 RNA의 분리 및 cDNA 합성

1) mRNA 분리

50 ml conical tube에 환자 객담을 받은 후 즉시 3-5 cc 정도의 보존제(guanidium isothiocyanate, Triton X-100)를 넣고 강하게 혼합하여 완전히 액화시켰다. Magnetic bead(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 150 μ l(7.5mg)를 액화된 객담에 주입하고 부드럽게 혼합한다. 30분간 실온에 혼합하면서 방치한 다음 1,100g에서 2분간 원심분리하여 상층액은 버리고 세척액으로 magnetic bead를 부유시켜서 1.5ml E-tube로 옮겼다. 4회 세척한 다음 세척액을 모두 제거하고, bead에 결합된 핵산은 용출액으로 부유시킨 다음, 이를 70℃, 1400 rpm으로 10분간 혼합한다. 부유된 용출액은 새 시험관에 옮긴 다음, biotin이 결합된 oligo(dT)₂₀ (10 pmol/ μ l) 3 μ l를 혼합한 핵산결합 시약 150 μ l를 상기 시험관에 주입하였다. SMP(Streptavidin Magnetic Particles, 10 mg/ml, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 완전히 부유시키고, 보존용액을 제거한 다음, 혼합된 핵산-용출액을 주입한 다음 37℃에서 10 분간 반응시킨다. SMP 세척액을 주입하여 3회 세척하고, 자석으로 SMP를 붙인 다음, 상층액을

Table 3. Common primer sequences for the detection of MAGE 1-6 genes

Primer	Type	use	Sequence	size (bp)
C1	S*	RT-PCR	CTGAAGGAGAAGATCTGCC	828-852
C2	AS**	RT-PCR	CTCCAGGTAGTTTTCTGCAC	
C3	S	nested PCR	CTGAAGGAGAAGATCTGCCW ⁺ GTG	466-490
C4	AS	nested PCR	CCAGCATTTCTGCCTTTGTGA	

S*, sense primer; AS**, antisense primer

W⁺, A or T

제거하였다. 핵산분해효소가 함유되지 않은 3차 증류수를 20 μ l 가하여 SMP를 부유시킨 다음 70 $^{\circ}$ C, 2분간 반응시켜 mRNA를 용출하였다.

2) cDNA의 합성

cDNA의 합성을 위한 조성은 mRNA 2 μ l에 대하여 5 \times MMLV RT buffer 6 μ l, oligo(dT) (100 pmole/ μ l) 1 μ l, 10mM dNTP 4 μ l, RNasin (40unit/ μ l) 0.2 μ l, MMLV RTase (200unit/ μ l) 0.5 μ l를 혼합하고 반응액의 전체부피가 30 μ l 되게 DEPC 처리한 멸균수를 첨가한 다음 반응액의 증발을 방지하기 위해 mineral oil로 표면을 덮었다. Reverse transcription은 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 실시하였고, reverse transcriptase의 활성을 제거하기 위해 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 처리하였다.

4. Polymerase Chain Reaction(PCR)

MAGE A-1, -2, -3, -4, -4a, -4b -5a, -5b, -6의 sequences 중에서 공통으로 존재하는 두 종류의 염기서열을 찾아 각각 다른 primer로 Perkin Elmer 2400(U.S.A.)을 사용하여 증폭하였다. 먼저 828-852 bp의 nucleotides를 발견할 수 있는 primer를 이용하여 PCR로 증폭시켜 발현율을 조사하였는데 이것을 임의로 C1/C2로 명명하였다. 이후 다시 nested PCR로 466-490 bp의 nucleotides를 발견할 수 있는 다른 primer를 이용하여 증폭시켜 발현율을 조사하였으며 이것은 임의로

C3/C4로 명명하였다. 이때 사용한 sense 및 antisense primer는 표 3과 같다.

1) PCR 반응조건

PCR 반응은 RT product 1 μ l를 기준으로 10 pmole sense primer와 antisense primer를 각각 1 μ l, 10mM dNTP 1 μ l, 10 \times buffer 2.5 μ l, Taq DNA polymerase (5unit/ μ l) 0.2 μ l를 섞고 반응액의 전체 부피가 25 μ l 되도록 멸균수를 첨가한 다음 반응액의 증발을 방지하기 위해 mineral oil로 표면을 덮었다. 반응조건은 denaturation을 94 $^{\circ}$ C에서 30초, annealing을 60 $^{\circ}$ C에서 30초, extension을 72 $^{\circ}$ C에서 30초로 모두 30회 반복 수행하였고, 반응 전후로 각각 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 pre-denaturation과 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 post-extension을 실시하였다. 반응 후의 product를 template로 사용하여 같은 조건하에서 nested PCR을 35회 수행하였다.

2) PCR product의 확인

PCR product는 10 μ l씩 1.5% agarose gel에서 전기영동하고 0.5mg/ml EtBr 용액에 20분간 침지시킨 다음 UV transilluminator 위에서 원하는 크기의 band의 증폭 여부를 확인하였다. 전기영동 결과는 사진을 촬영하여 보관하였다(그림 1).

폐암군과 대조군, 그리고 폐암환자에서 세포형태 및 기관지 내시경검사상 병변이 발견되는 유무 및 세포진 검사에 따른 MAGE 발현율의 차이를 χ^2 test로 비교 검증하였다. p<0.05인 경우 통계적으

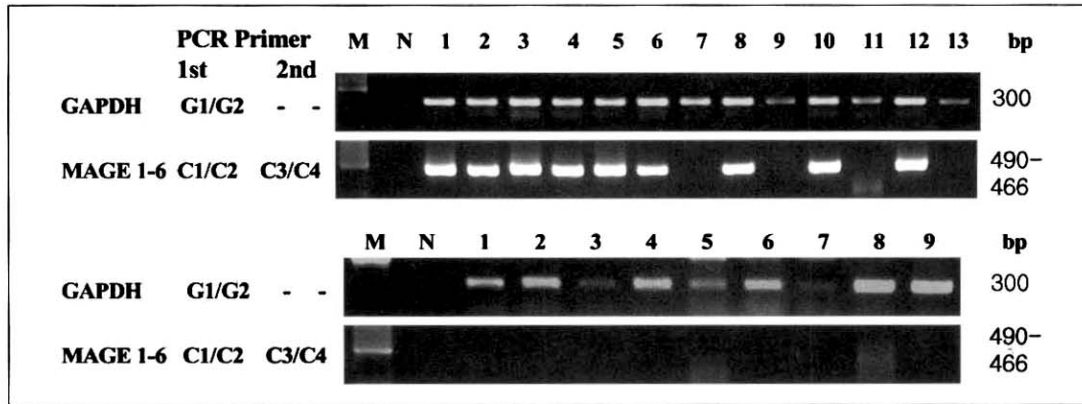


Fig. 1. Amplification of MAGE 1-6 by nested RT-PCR using multiple MAGEs recognizing primers(C1/C2 and C3/C4) in the induced sputum from the lung cancer patients (upper panel) and the control group (lower panel). G1/G2:sense/antisense primer for GAPDH, Fig. 1. Amplification of MAGE 1 - 6 by nested RT-PCR using multiple MAGEs recognizing primers(C1/C2 and C3/C4) in the induced sputum from the lung cancer patients (upper panel) and the control group (lower panel). G1/G2: sense/antisense primer for GAPDH, M: size marker, N: negative control.M: size marker, N: negative control.

Table 4. Mage expression in the induced sputum from lung cancer patients and the control group

	MAGE (+)	MAGE (-)
Cancer patients	24(80%)	6(20%)
Control group	0	14(100%)
Total	24	20

p=0.0001

로 유의한 것으로 하였다.

결 과

대조군 14명의 유도객담에서는 MAGE 발현된 경우는 한 명도 없었으나, 폐암환자 30명중에서 24명에서 발현되어 양성율은 80%로 유의한 차이가 있었다(p=0.0001, 표 4).

폐암의 조직학적 차이에 따른 발현율은 편평상피암 17예 중 13예(76.5%), 선암 9예 중 7예(77.8%), 소세포암 4예는 전예(100%)에서 발현되었

으나 조직형태별 차이는 없었다(p=0.56, 표 5).

기관지내시경 검사상 육안적으로 병변이 발견된 17명중에서 13명(76.52%), 발견되지 않는 경우 13명 중 11명(84.6%)에서 유도객담에서 MAGE가 발현되었으며 두 군간의 차이는 없었다(p=0.927). MAGE가 발현된 24명 중 11명은 기관지내시경 검사 상 육안적으로 종양이 발견되지 않는 경우였다. 전체 폐암환자 30명중 11명(36.7%)에서 객담세포진 검사에서 양성이었다 이들에서는 모두 MAGE가 발현되었다. 객담세포진 검사에서 음성되었던 19명중 13명(68.4%)에서 MAGE가 발현되었으며 6명에서

Table 5. MAGE expression in the induced sputum according to the tissue types of lung cancer

Tissue type	MAGE (+)	MAGE (-)	Total
Squamous cell	13(76.5%)	4	17
Adenocarcinoma	7(77.8%)	2	9
Small cell	4(100%)	0	4
Total	24(80.0%)	6	30

p=0.56

Table 6. Mage expression in the induced sputum according to the visibility of the tumor on bronchoscopy and its relationship with the sputum cytology

Endobronchial lesion	MAGE (+)	MAGE(-)	Total
Found*	13(72.2%)	4(23.5%)	17
Cytology (+)**	8	0	8
Cytology (-)	5	4	9
Not found	11(84.6%)	2(15.4%)	13
Cytology (+)	3	0	3
Cytology (-)	8	2	10
Total	24	6	30

*p value of MAGE expression by the bronchoscopic findings; 0.927

**p value of MAGE expression by the result of sputum cytology; 0.107

는 발현되지 않았다(p=0.107). 기관지 내시경검사 상 병변이 발견된 17명중 8명(47.1%)에서 세포진 검사상 양성이었다고, 발견되지 않았던 13명중에서는 3명(23.1%)에서만 양성이었다(표 6).

고 찰

우리 나라에서 폐암으로 인한 사망률은 2000년 조사에서 인구 10만명당 24.4명으로 암으로 인한 사망원인 중 수위를 차지하였으며, 1990년에 비해 69.4%나 증가하였다.¹⁸ 새로운 진단 및 치료법의 개발에도 불구하고 상당수의 환자들은 병이 이미 진행된 상태에서 진단되기 때문에 생존율을 높이기 위해서는 폐암의 병소가 작고 수술로 제거가 가능한 초기에 진단하는 것이 가장 중요하다. 그러나 미국에서 1970년대에 약 3만 8천명의 남자 흡연자를 대상으로 흉부 X-선 사진과 객담 세포진 검사를 정기적으로 검진한 대규모의 전향적인 역학조

사에서 stage I의 폐암 발견율, 수술로 병소를 제거한 빈도 및 생존율 등은 검진군에서 더 높았으나 폐암으로 인한 사망률은 대조군과 차이가 없었기 때문에 이들의 정기적인 검사가 큰 도움이 되지 않는다고 보고하였다.¹⁹⁻²¹ 그러나 이후 이들 조사에서는 남자만을 대상으로 하였고, 폐암의 고위험군으로 인정되는 기도폐쇄(FEV₁/FVC; 70% 미만)가 있거나 40 갑년 정도의 흡연력이 있는 사람을 대상으로 한 것이 아니었다는 점, 조기발견기간 편견(lead time bias), 질병기간 편견(length time bias) 및 과진단 편견(overdiagnosis bias) 등으로 생존율이 상대적으로 높게 나타날 수 있었다는 점, 그리고 객담 세포진 검사에서 진단율이 상대적으로 낮은 선암에 대한 고려가 없었다는 문제점들이 지적되었다.^{13,22,23} 최근에 spiral CT, autofluorescent bronchoscopy, 그리고 폐, 기관지 세포단위에서의 다양한 유전자의 변화를 발견할 수 있는 분자생물학적인 진단방법들이 개발되면서 폐암의 조기진단을

위한 연구는 새로운 전기를 맞고 있다.

객담검사는 폐암으로 진행된 경우나 전암단계에서 진단할 수 있는 유일한 비침습적인 방법으로 기존의 세포진 검사 외에 컴퓨터분석으로 정상 기관지세포들의 이차적인 형태학적인 변화를 관찰하거나 분자생물학적인 방법을 적용하여 폐암으로 진행되기 전 단계에 일어나고 있는 변화를 발견할 수도 있다.^{15,24,25} 그러나 환자의 협조로 적절한 객담을 먼저 채취해야하며 병변의 위치나 종양의 크기에 따라서 진단율이 달라진다는 점을 고려해야 한다.^{26,27} 통상적으로 객담은 아침에 일어나서 처음 뱉는 것을 사용하지만 보다 많은 기관지세포를 얻기 위해서는 본 연구에서와 같이 고농도의 식염수를 흡입하고 난 후에 얻는 유도객담법을 많이 이용한다. 유도객담법을 사용하더라도 흡연자와 금연자의 각각 19.6%, 28.9%에서는 면역염색법(immunostaining)을 적용할 만큼의 충분한 객담을 얻지 못한다는 보고도 있다.²⁸ 그러나 PCR 검사법은 10,000개의 정상세포 속에 포함된 하나의 돌연변이 세포를 찾아낼 수 있는 정도로 감수성이 높은 검사로 알려져 있기 때문에^{29,30} 다른 가검물에 비해서 상대적으로 세포수가 적은 객담을 이용한 검사에서 더 유용할 것으로 생각된다.

종양세포에서만 특이적으로 발현하는 것으로 알려진 종양특이항원(tumor specific antigen)을 객담에서 발견하는 것이 폐암의 진단에 많은 도움이 될 것이라고 추정되지만 이러한 연구는 아주 드물다. MAGE는 여러 군의 MAGE 유전자들이 활성화되면서 만들어지는데 유전자의 위치에 따라서 MAGE A, B, C, D 등으로 나눈다.¹⁶ 이들 중 MAGE A gene은 X 염색체의 장완(Xq28)에 있으며 종양세포에서 주로 발견되는 subtypes는 MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A11, -A12가 알려져 있으나 그 역할은 아직까지도 확실히 밝혀져 있지 않다.³¹ MAGE 단백질 중의 일부가 종양세포의 class I 조직항원(HLA)위에 epitope로 발현되면 이것을 인식

한 특이적인 세포독성 T 림파구(cytotoxic T lymphocyte)가 종양세포를 이물질로 인식해 처리하기 때문에 악성흑색종에서는 면역치료제로 많이 연구하고 있다. 그러나 이들 MAGE의 종양별 발현율에 대한 조사는 있지만 진단에 사용한 보고는 드물다. 본 연구에서는 MAGE A 1-6의 유전자에 공통으로 존재하는 염기서열을 찾아낼 수 있도록 이등¹⁷이 고안한 각각 828-852 bp와 466-490 bp 크기의 common primers를 사용하여 nested RT-PCR법으로 폐암 및 대조군의 유도객담에서 MAGE의 발현율을 조사하였다. 그 결과 폐암 환자 30명 중 24명(80%)에서 MAGE가 발견되었으나 대조군 14명에서는 한 예에서도 발견되지 않았다. 이것은 Weynant 등³²이 폐암세포에서 MAGE A3만을 조사하여 발현율이 약 30% 정도라는 보고보다 훨씬 높은 것으로 각각의 subtypes를 조사하는 것보다 common primer를 이용하는 것이 훨씬 진단율이 높다는 것을 나타낸다. 또한 편평상피암과 증식기관지에 병이 있을 경우에 발견율이 더 높은 것으로 알려진 세포진 검사와는 달리^{26,27} 선암과 기관지 내시경검사상 병변이 발견되지 않는 경우에서도 각각 77.8% 및 84.6%의 높은 양성율을 나타내어 향후 폐암의 진단의 새로운 방법으로 많은 도움이 될 것으로 추정된다. 그러나 임상적으로 이러한 검사가 보편적으로 사용되기 위해서는 더 많은 환자 및 대조군을 대상으로 한 비교 연구가 필요할 것이다. 또한 폐암의 고위험군에서의 조기진단이나 폐암치료후의 경과관찰을 위한 검사로서의 가치에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다.

요 약

배 경 :

종양 특이 항원인 MAGE 유전자는 여러 종류의 암조직에서 발현되지만 정상조직에서는 고환의 생식 세포를 제외하고는 발현이 없다. 본 연구에서는

MAGE 유전자의 암 특이적 발현을 폐암의 진단에 활용할 수 있는지를 유도객담을 이용하여 알아보 고자 하였다.

방 법 :

조직학적으로 폐암으로 진단된 환자 30명, 대조군 으로 기타 폐질환 환자 14명에서 얻은 유도객담을 3cc의 보존제(guanidinium isothiocyanate, Triton X-100)와 잘 섞어 냉장보관 후 당일 MAGE A 1 -6를 동시에 발견할 수 있도록 고안된 2종류의 primer(MAGE common primer C1/C2, C3/C4)를 이용하여 nested PT PCR를 실시하여 MAGE 유전 자의 발현 유무를 조사하였다.

결 과 :

MAGE common primer를 이용한 nested RT-PCR 에서 폐암환자 30 명 중 24명(80%)에서 MAGE가 양성으로 발현되었고 대조군에서는 전례에서 발견 되지 않았다($p=0.001$). 편평세포암 17례 중 13례 (76.5%), 선암 9례 중 7례(77.8%)에서 소세포암은 4례에서 모두 MAGE 양성이었으며 각 군간에 발 현율의 차이는 없었다($p=0.56$). MAGE양성인 환자 24명 중 약 반수인 11명에서는 기관지 내시경검사 에서 육안적으로 종양 병변이 발견되지 않는 경우 였다.

결 론 :

유도객담에서 MAGE 유전자는 암 환자에서 선택 적으로 높은 빈도의 발현을 보이는 것을 확인하였 다. 이러한 결과로 객담을 이용한 MAGE 검사법이 폐암의 검색, 조기진단 그리고 치료 후 경과 관찰 에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA: Cancer statistics, 1998 CA Cancer J Clin 1998;48:6-29.
2. Kaneko M, Eguchi K, Ohmatsu H, Kakinuma R, Naruke T, Suemasu K, Moriyama N: Peripheral lung cancer: screening and detection with low-dose spiral CT versus radiography. Radiology 1996;201:798-802.
3. Sone S, Takashima S, Li F, Yang Z, Honda T, Maruyama Y, Hasegawa M, Yamanda T, Kubo K, Hanamura K, Asakura K: Mass screening for lung cancer with mobile spiral computed tomography scanner. Lancet 31998;51:1242-5.
4. Henschke CI, McCauley DI, Yankelevitz DF, Naidich DP, McGuinness G, Miettinen OS, Libby DM, Pasmantier MW, Koizumi J, Altorki NK, Smith JP: Early Lung Cancer Action Project: overall design and findings from baseline screening. Lancet 1999;354: 99-105.
5. Lam S, MacAulay C, Hung J, LeRiche J, Profio AE, Palcic B. Detection of dysplasia and carcinoma in situ with a lung imaging fluorescence endoscope device. J Thorac Cardiovasc Surg 1993;105:1035-40.
6. Lam S, Shibuya H. Early diagnosis of lung cancer. Clin Chest Med 1999;20:53-61
7. Lam S, MacAulay C, leRiche JC, Palcic B. Detection and localization of early lung cancer by fluorescence bronchoscopy. Cancer 2000;89(11 Suppl):2468-73.
8. Szabo E, Birrer MJ, Mulshine JL. Early detection of lung cancer. Semin Oncol 1993; 20:374-82.
9. Tockman MS, Mulshine JL, Piantadosi S, Erozan YS, Gupta PK, Ruckdeschel JC, Taylor PR, Zhukov T, Zhou WH, Qiao YL, Yao SX: Prospective detection of preclinical lung cancer: results from two studies of

- heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 overexpression. *Clin Cancer Research* 1997;3:2237-46.
10. Fong KM, Sekido Y, Minna JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;118:1136-52.
11. Mulshine JL, Zhou J, Treston AM, Szabo E, Tockman MS, Cuttitta F. New approaches to the integrated management of early lung cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 1997; 11:235-52.
12. Jacobson DR, Fishman CL, Mills NE. Molecular genetic tumor markers in the early diagnosis and screening of non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 1995;6: Suppl 3:S3-S8.
13. Tockman MS, Gupta PK, Myers JD, Frost JK, Baylin SB, Gold EB, Chase AM, Wilkinson PH, Mulshine JL: Sensitive and specific monoclonal antibody recognition of human lung cancer antigen on preserved sputum cells: a new approach to early lung cancer detection. *J Clin Oncol*. 1988;6:1685-93.
14. Crowell RE, Gilliland FD, Temes RT, Harms HJ, Neft RE, Heaphy E, Auckley DH, Crooks LA, Jordan SW, Samet JM, Lechner JF, Belinsky SA: Detection of trisomy 7 in nonmalignant bronchial epithelium from lung cancer patients and individuals at risk for lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996;5:631-7.
15. Ikeda N, MacAulay C, Lam S, LeRiche J, Payne P, Garner D, Konaka C, Kato H, Palcic B: Malignancy associated changes in bronchial epithelial cells and clinical application as a biomarker. *Lung Cancer*. 1998;19: 161-6.
16. Chomez P, De Backer O, Bertrand M, De Plaen E, Boon T, Lucas S: An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res* 2001;61:5544-51.
17. 이강대, 이정삼, 이환호, 이영선, 장희경, 전창호, 박종욱: 두경부 암에서 MAGE 1-6 mRNA를 검출하는 새로운 MAGE Common Primer의 의의. *Korean J Otolaryngol* 2001;44:736-43.
18. 통계청: 2000년 사망원인 통계결과. <http://www.nso.go.kr/report/data>.
19. Frost JK, Ball WC, Levin ML, Tockman MS, Baker RR, Carter D, Eggleston JC, Erozan YS, Gupta PK, Khouri NF: Early lung cancer detection: results of the initial (prevalence) radiologic and cytologic screening in the Johns Hopkins study. *Am Rev Respir Dis* 1984;130:549-54.
20. Flehinger BJ, Melamed MR, Zaman MB, Heelan RT, Perchick WB, Martini N. Early lung cancer detection: results of the initial (prevalence) radiologic and cytologic screening in Memorial Sloan-Kettering study. *Am Rev Respir Dis* 1984;130:555-60.
21. Fontana RS, Sanderson DR, Taylor WF, Woolner LB, Miller WE, Muhm JR, Uhlenhopp MA: Early lung cancer detection: results of the initial (prevalence) radiologic and cytologic screening in the Mayo Clinic study. *Am Rev Respir Dis* 1984;130:561-5.
22. Kennedy TC, Proudfoot SP, Franklin WA, Merrick TA, Saccomanno G, Corkill ME, Mumma DL, Sirgi KE, Miller YE, Archer PG, Prochazka A: Cytopathological analysis of sputum in patients with airflow obstruction

- and significant smoking histories. *Cancer Res* 1996;56:4673-8.
23. Patz EF, Goodman PC, Bepler G: Screening for lung cancer. *N Engl J Med* 2000;343: 1627-33.
 24. MacAulay C, Lam S, Payne PW, LeRiche JC, Palcic B: Malignancy-associated changes in bronchial epithelial cells in biopsy specimens. *Anal Quant Cyto Histol* 1995;17(1):55-61.
 25. Payne PW, Sebo TJ, Doudkine A, Garner D, MacAulay C, Lam S, LeRichie JC, Palcic B: Sputum screening by quantitative microscopy: a reexamination of a portion of the National Cancer Institute Cooperative Early Lung Cancer Study. *Mayo Clin Proc* 1997; 72:697-704.
 26. Ng AB, Horak GC: Factors significant in the diagnostic accuracy of lung cytology in bronchial washing and sputum samples. II. Sputum samples. *Acta Cyto* 1983;27:397-402.
 27. Risse EK, van't Hof MA, Laurini RN, Vooijs PG: Sputum cytology by the Saccomanno method in diagnosing lung malignancy. *Diagn Cytopathol* 1985;1:286-91.
 28. Tockman MS, Erozan YS, Gupta P, Piantadosi S, Mulshine JL, Ruckdeschel JC: The early detection of second primary lung cancers by sputum immunostaining. LCEWDG Investigators. Lung Cancer Early Detection Group. *Chest*. 1994;106(Suppl 6):385S-90S.
 29. Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Tockman M, Sidransky D: Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res* 1994;54:1634-7.
 30. Sidransky D, Von Eschenbach A, Tsai YC, Jones P, Summerhayes I, Marshall F, Paul M, Green P, Hamilton SR, Frost P: Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 1991;252: 706-9.
 31. De Plaen E, Arden K, Travesari C, Gaforio JJ, Szikora JP, De Smet C, Brasseur F, Van der Bruggen P, Lethe B, Lurquin C, Brasseur R, Chomez P, De Backer O, Cavenee W, Boon T: Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 1994;40:360-9.
 32. Weynants P, Lethe B, Brasseur F, Marchand M, Boon T: Expression of MAGE genes by non-small cell carcinoma. *Int J Cancer* 1994; 56:826-9.