

골육종에서 RUNX3 CpG Island의 비정상적 과도 메틸화

오주한 · 한일규 · 김준혁 · 강경훈* · 조환성[†] · 강승철 · 이미라 · 김한수

서울대학교 의과대학 정형외과학교실, 병리학교실*, 경북대학교 의과대학 정형외과학교실[†]

Aberrant CpG Island Hypermethylation of the RUNX3 Gene in Osteosarcoma

Joo Han Oh, M.D., Ilkyu Han, M.D., June Hyuk Kim, M.D., Gyeong Hoon Kang, M.D.*, Hwan Seong Cho, M.D.[†], Seung Cheol Kang, M.D., Mi-Ra Lee, M.D., and Han-Soo Kim, M.D.

Departments of Orthopaedic Surgery and Pathology*, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Department of Orthopedic Surgery, Kyungpook National University School of Medicine[†], Daegu, Korea

Purpose: Transcriptional silencing of tumor suppressor genes by aberrant methylation of CpG islands plays a crucial role in the development of human cancers. We comprehensively examined the methylation status of several tumor suppressor genes in osteosarcoma with a special focus on the RUNX3 gene.

Materials and Methods: Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) was performed for osteosarcoma tissues and their cell lines. MSP and RT-PCR for the RUNX3 gene were performed in the tumor-derived cell lines and the immortalized cell lines. The demethylating agent 5-aza-2' deoxycytidine was used in the SaOS-2 cell line to reverse the methylation status.

Results: Hypermethylation of the RUNX3 gene was observed in 60% (24 of 40) of the osteosarcoma tissues, whereas other tumor suppressor genes showed very low methylation. Thirteen of 30 (43%) tumor-derived cell lines, and U-2OS and SaOS-2 showed hypermethylation of the RUNX3 gene on MSPCR. However, RUNX3 was expressed in the SaOS-2 cell line, as determined by RT-PCR, and the expression was augmented by treatment with 5-aza-2' deoxycytidine.

Conclusion: Our study suggests that aberrant methylation is an important mechanism of RUNX3 down-regulation in osteosarcoma. This data may have potential significance in developing a potential therapeutic target for osteosarcoma.

Key Words: RUNX3, Osteosarcoma, Methylation, CpG island

서 론

골육종은 원발성 악성 골종양 중 가장 흔히 발생하는 종양으로서, 소아와 청년기에 호발하는 특징을 가진다. 골육종의 생존율은 항암약물요법의 도입과 수술적 치료의 발달로 인해 증가되었고 종양의 국소적 재발(local recurrence)은 많이 감소되었다¹⁾. 기존 항암제의 치료 효과의 한계로 더 이상의 생존율의 향상은 이루어지지 못하고 있는 실정이며 특히, 전이가 발생한 환자에서의 5년

생존율은 20-30%에 머물고 있는 실정이다¹⁷⁾. 골육종의 진행이나 전이와 관련이 있는 발병기전을 밝히고, 이를 조절할 수 있는 물질을 개발하여 생존율의 향상을 도모하려는 연구가 많이 시도되고 있다⁵⁾.

포유류 세포의 유전자 발현 억제는 유전자의 결손(deletion)이나 전이(mutation) 외에도 촉진염기서열부위(promoter region)의 메틸화에 의해서도 이루어진다고 알려져 있다²²⁾. 유전자의 5' 말단에 위치한 촉진염기

통신저자 : 김 한 수
서울시 종로구 대학로 101
서울대학교병원 정형외과
TEL: 02-2072-2362 • FAX: 02-764-2718
E-mail: hankim@snu.ac.kr

Address reprint requests to
Han-Soo Kim, M.D.
Department of Orthopaedic Surgery, Seoul National University College of Medicine, 101 Daehangno, Jongno-gu, Seoul 110-744, Korea
Tel: +82-2-2072-2362, Fax: +82-2-764-2718
E-mail: hankim@snu.ac.kr

*본 논문은 한국학술진흥재단 연구비(과제번호:E00163)의 지원에 의해 이루어졌음.

서열부위에 메틸화되지 않은 cytosine과 guanine으로 이루어진 CpG dinucleotide가 집중되어 있는데 이를 CpG island라고 하며²²⁾, CpG island의 비정상적인 메틸화는 유전자 발현 조절에 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 최근, 암의 발병 과정에서 유전자의 결손, 변이 등과 함께 종양억제유전자(tumor suppressor gene)의 발현을 억제하는 중요한 기전으로 CpG island의 비정상적인 메틸화가 주목 받고 있다. 다양한 종류의 암의 발병에 관련되는 P16¹⁹⁾, hMLH1¹²⁾, RASSF1A³⁾, E-cadherin²⁹⁾ 등의 여러 유전자의 발현 억제가 CpG island의 메틸화와 관련이 있는 것으로 알려졌다.

이러한 CpG island의 메틸화와 연관되어서 histone acetylation이 유전자의 전사(transcription) 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다. Histone acetylation과 염색체의 구조 사이에는 깊은 연관이 있으며, 유전자의 발현을 조절하여 세포 성장 억제, apoptosis 유발 및 세포 분화를 유발한다고 보고되고 있다^{23,26)}. 인체의 여러 가지 종양 세포에서 p53 단백질을 포함하는 종양 억제 유전자와 세포 주기 관련 유전자의 발현이 억제되어 있고, 이러한 유전자 발현의 억제 기전에 DNA demethylation과 함께 histone acetylation이 중요한 역할을 한다는 연구가 근래에 들어 보고 되고 있다^{6,15)}. 또한 histone deacetylase inhibitor를 처리한 종양 세포에서 apoptosis유발이 관찰되어, 이러한 약제를 새로운 암 치료법으로 이용하려는 시도가 있다^{23,28)}.

골육종에서 각종 유전자들의 methylation 연구는 매우 중요한 의미를 가진다고 할 수 있다. 현재까지 골육종에서 많은 분자생물학적 연구가 수행되었으나, 종양발생과 관계 있는 각종 유전자들의 결손이나 변이가 명확히 밝혀진 것이 없는 실정이다. 또한, 골육종에서는 종양 억제 유전자 및 세포 주기 관련 유전자가 메틸화에 의해 억제되어 있다는 연구 보고들이 최근 들어 발표되고 있으나⁹⁾, 유전자의 메틸화와 histone deacetylation이 동시에 유전자에 어떤 영향을 미치는 지에 대한 연구는 드물다²⁵⁾. 골육종에서 종양의 증식이나 전이를 조절하는 새로운 기전에 대한 이러한 연구는, 골육종의 발생 과정을 이해하는 동시에, 화학요법에 한계가 있는 현실에 새로운 치료법을 찾을 수 있는 계기가 될 수 있다.

RUNX (runt-domain related) 전사 인자는 초파리 유전자(runt 및 lozenge)에 해당되는 포유류 유전자로,

고도로 보호된 DNA 결합 아단위(subunit)인 알파와 베타 2개로 구성된 이종이합(heterodimeric) 단백질이다¹⁰⁾. RUNX 전사 인자는 TGF-beta super family signaling의 중요 목표물 가운데 하나로, 포유류의 발달에 있어서 핵심적인 기능을 수행한다. RUNX 단백질은 TGF-beta의 성장 억제 효과를 중재하는데 있어서 다운스트림 SMAD 단백질과 상호작용하며, 정상 발달(normal development)과 종양 형성(tumorigenesis)에서 중요한 역할을 하는 것으로 보인다¹⁰⁾. 지금까지 3종류의 포유류 RUNX 유전자(RUNX1, RUNX2, RUNX3)가 발견되었는데 그 중 RUNX3는 대장암, 위암, 유방암, 난소암에서 LOH (loss of heterozygosity)가 빈번하게 나타나는 지역인 염색체 1p36에 국소 편재된 종양 억제 유전자로 추정된다^{3,12,19,22)}.

본 연구에서는 여러 암에서 메틸화가 알려진 종양 형성과 관련된 다수 유전자의 메틸화 상태를 포괄적으로 골육종 조직에서 조사하였고, 다른 유전자보다 메틸화가 상당히 높은 수준에 있는 RUNX3의 골육종 조직에서 배양, 분리한 세포주에서 CpG island 메틸화에 의한 RUNX3 발현 억제 상태와 이에 대한 유전자 demethylation와 함께 histone acetylation의 영향을 분석하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 골육종 조직과 세포주

1995년부터 2000년 사이에 본원에 입원하여 치료받은 골육종 환자 중, 절개 생검으로 항암약물 치료 이전 단계의 조직이 확보 가능한 40명의 조직을 재료로 하였다. 불멸화된 골육종 세포주로는 HOS, U-20S, MG-63, SaOS-2 세포주를 표준 세포주로 이용하였다(American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA).

2. 골육종 DNA의 분리

100 mm 배양접시에 2×10^6 개의 골육종 세포를 넣어 배양하고 24시간 뒤에 PBS로 세척했다. 표준적인 방법인 proteinase K 처리와 페놀-클로로포름/이소아밀알코올 추출로 genomic DNA를 분리했다(QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN Inc, Valencia, CA, USA).

3. 메틸화-특이적 중합효소연쇄반응(Methylation-specific polymerase chain reaction)

먼저, 골육종 DNA를 sodium bisulfite을 처리하여 변

형시켰다. 200 ng/ μ l의 DNA 10 μ l (2 μ g)와 pH 5.0으로 조절한 550 μ l의 modification agent (1 mM hydroquinone/3.5 M sodium bisulfite)를 55°C에서 16 시간 동안 배양하였다. DNA의 정제는 JETSORB gel 추출 키트(Genomed, Oeynhausen, Germany)를 사용하였다. 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 위한 각 molecule에 대한 정제된 상류 시발체와 하류 시발체(sense/antisense primer)와 결합(annealing) 온도는 Table 1과 같다. PCR 시험관에 정제된 DNA 1 μ l, 증류수 2 μ l, 각각의 시발체(primer) 1 μ l씩을 넣었다. PCR은 Perkin Elmer 480을 사용하여 진행하였다. 초기 DNA 열 변성(denaturation)은 97°C에서 5분간 반응을 실시한 후 95°C에서 40초간의 열 변성, 각 물질마다 Table 1의 온도에서 50초간 결합(annealing)을 실시한 다음에 72°C에서 50초간 신장(extension)을 35 cycle을 시행했다. 최종 신장으로 72°C에서 10분간 반응시켜 각 PCR을 완료했다. 초기 열 변성 동안, 각 시험관 마다 증류수 3.1 μ l, 10X buffer 1 μ l, 내옥시뉴클레오타이드(dNTP) 0.8 μ l, Taq DNA 폴리머라제(Taq DNA polymerase, Takara Shuzo Co., Kyoto, Japan) 0.75 unit이 되도록 마스터 혼합물을 만들고, 초기 열 변성 후 온도가 80°C로 30초 정도 지나면 PCR을 잠시 정지시킨 후 이 혼합물을 5 μ l씩 시험관에 넣고

PCR을 재개하였다. PCR이 끝난 후 PCR 산물에 전기영동 염색액(loading buffer) 2 μ l을 섞고 원침하고, size marker와 PCR 산물을 8 μ l씩 loading한 후 100 V에서 아가로스 젤(agarose gel)에서 전기영동(electrophoresis)하였다. Ethidium bromide로 염색을 하고 자외선 투영기(UV transilluminator)와 카메라로 촬영하여 이동 정도를 확인했다. 결과가 불확실한 경우 검출의 민감도를 높이기 위해, 필요한 경우에는 polyacrylamide gel (PAGE) 전기 영동을 추가로 시행하였다. Size marker의 것과 대략 상응하는 시그널을 보인 것을 메틸화된 것으로 평가했으며, 희미한 양성 시그널을 보인 경우에는 3회 반복하고, 일관된 양성 시그널을 보인 것만 메틸화된 것으로 평가했다.

4. 약물 처리와 역전사 중합효소연쇄반응(Reverse-transcriptase polymerase chain reaction)

메틸화를 가장 많이 보인 RUNX3에 대하여 RUNX3 mRNA 발현 상실과 연관성이 있는지 알아보기 위하여, RUNX3 메틸화가 가장 잘 나타난 골육종 세포주인 SaOS-2를 이용하여 약물 처리 시험을 시행하였다. 100 mm 배양접시 당 1×10^6 세포의 농도로 배양하고, 24시간 뒤에 DNA demethylating agent인 5-aza-2' deoxycytidine (5-aza-dc) 또는 histone deacetylase inhi-

Table 1. Primer Sequences and PCR Conditions of Tumor Suppressor Genes for Methylation-specific PCR

Name		Forward	Reverse	Size (bp)	Temp.*
APC	[†] M	TATTGCGGAGTGCGGGTC	TCGACGAACTCCCGACGA	98	55
	[†] U	GTGTTTTATTGTGGAGTGTGGGTT	CCAATCAACAACTCCCAACAA	108	60
COX2	M	TTAGATACGGCGGCGCGGC	TCITTTACCGAACGCTTCGG	161	61
	U	ATAGATTAGATATGGTGGTGG TGGT	CACAATCTTTACCCAAACACTTCCA	171	61
DAP-K	M	GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC	CCCTCCCAACGCGCGA	98	60
	U	GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT	CAAATCCCTCCCAACACCAA	98	60
E-cadherin	M	TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT	TAACTAAAAATTCACCTACCGAC	115	57
	U	TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT	CACAACCAATCAACAACACA	97	53
GSTP1	M	TTCGGGGTGTAGCGGTCGTC	GCCCCAATACTAAATCAGGACG	91	59
	U	GATGTTTGGGGTGTAGTGGTTGTT	CCACCCCAATACTAAATCACAACA	97	59
MGMT	M	TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTCGC	GCACTCTTCCGAAACGAAACG	81	65
	U	TTTGTGTTTGTATGTTTGTAGGTTTTTGT	AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA	93	59
RASSF1A	M	GTGTTAACGCGTTGCGTATC	AACCCGCGAACTAAAAACGA	93	60
	U	TTTGGTTGGAGTGTGTTAATGTG	CAAACCCACAACTAAAAACAA	105	60
RUNX3	M	TATTCGTTAGGGTTCGTTCTGT	AAACAACCACGAAAAACGAC	121	60
	U	AAGTGGGAAAGTAGAAGTGGTG	CCAAACAACTACAAACAACCA	126	60
THBS1	M	TGCGAGCGTTTTTTTAAATGC	TAAACTCGCAACCAACTCG	74	62
	U	GTTTGGTTGTGTTTATTGGTTG	CCTAAACTCACAAACCAACTCA	115	62

*annealing temperature, [†]M, methylated; [†]U, unmethylated.

bitor인 trichostatin A (TSA)로 처리하였다. 대조군, 5-aza-dc 처리군, TSA 처리군과 5-aza-dc+TSA 처리군으로 나누어 실험을 수행하였다. 5-aza-dc는 5 μ M로 3일간 처리하고 TSA는 600 nM로 1일간 처리했다.

약물 처리 후 유전자 발현의 변화를 관찰하기 위해 mRNA 발현 분석을 위한 역전사 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 약물 처리가 끝난 후 RNA를 분리했다. 추출된 RNA 1 μ g으로부터 42°C에서 random hexamer와 reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 제작하고 이 cDNA를 이용하여 PCR 반응을 일으켰다. PCR 반응은 95°C에서 5분 간 초기 열 변성 후 35 cycle로 95°C에서 30초간, 55°C에서 30초간, 72°C에서 30초간, 그리고 72°C에서 10분간 배양하는 방식으로 실시했다. GAPDH를 증폭하여 앞서 설명한 cDNA 합성의 효율성을 추정했다. 이 반응액을 1% 아가로스 젤에서 전기 영동하고, ethidium bromide로 염색하여 결과를 확인했다. 이 결과의 신빙성을 높이기 위하여 동일한 시료에 대해 2회의 서로 다른 실험을 하여 같은 결과가 나오는지 확인했다.

5. Bisulfite 유전자 서열 분석(Bisulfite genomic sequencing)

메틸화-특이적 중합효소연쇄반응으로 메틸화를 검사한 데이터를 확인하고 CpG 아일랜드의 메틸화 수준을 조사하기 위하여, 4개의 불멸화된 골육종 세포주의 DNA를 대상으로 Bisulfite 유전자 서열 분석을 실시했다. 두 부분을 선택하여 첫 번째 시발체 5'-ATT TTG GAG GAT TTG TTT TGG G-3' (sense) 및 5'-CAA CCT ACC CRA CTA ATC CC-3' (antisense)와 두 번째 시발체 5'-CRG GGT TGT TTC RTT TTA TTT G-3' (sense) 및 5'-CCC TTT CAC CRT TCR CAC CCC-3' (antisense)를 사용하여 sodium bisulfite를 처리한 genomic DNA를 증폭했다. 증폭은 95°C에서 12분 초기 열 변성 후, 35 cycle로 95°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 30초, 그리고 72°C에서 10분간 마지막 합성을 진행하는 방식으로 진행했다. PCR 반응 산물은 젤을 사용해 정제하고 pCR2.1-TOPO 벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 클로닝했다. 클론 각각의 삽입 PCR 절편은 분석 키트를 사용하여 서열을 파악했다[ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Kits (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA)과 ABI Prism 377 DNA Se-

quencer (Perkin-Elmer)].

결 과

1. 골육종 조직에서의 각종 암 관련 유전자의 메틸화

골육종 조직의 genomic DNA를 이용하여 메틸화-특이적 중합효소연쇄반응으로 메틸화를 검사한 유전자로는, 다른 암에서 메틸화가 많이 관찰된다고 보고된 암 발생 관련 유전자들로, 세포 주기 조절에 관련되는 유전자(COX-2), 세포 신호 전달 관련 유전자(APC, RASSF-1A), DNA의 복구 및 보호에 관련된 유전자(MGMT, GSTP1), 세포자기괴사(apoptosis)에 연관된 유전자(DAP-kinase, RUNX3), neoangiogenesis와 관련된 유전자(THBS1), 그리고 전이(metastasis)에 관련된 유전자(E-cadherin) 등이었다. 검사 결과 RUNX3 유전자에서 가장 많은 예(60%)의 메틸화가 관찰되었다(Fig. 1).

2. 골육종 조직에서 분리된 골육종 세포에서 RUNX3 유전자의 메틸화

환자의 골육종 조직에서 분리 배양된 골육종 세포주들의 DNA는 골육종 조직에서 직접 얻어진 DNA와는 달리 다른 세포가 섞이지 않은 비교적 순수하게 골육종 세포만의 DNA로 생각된다. 조직으로부터 직접 얻어진 DNA를 이용한 실험에서 가장 높은 수준의 메틸화를 보인 RUNX3 유전자의 결과를 확인하기 위해 골육종 환자의 조직에서 배양한 세포주를 이용하여 메틸화-특이적 중합효소연쇄반응을 실험하였다. 30예 중에서 13예(43%)에서 RUNX3

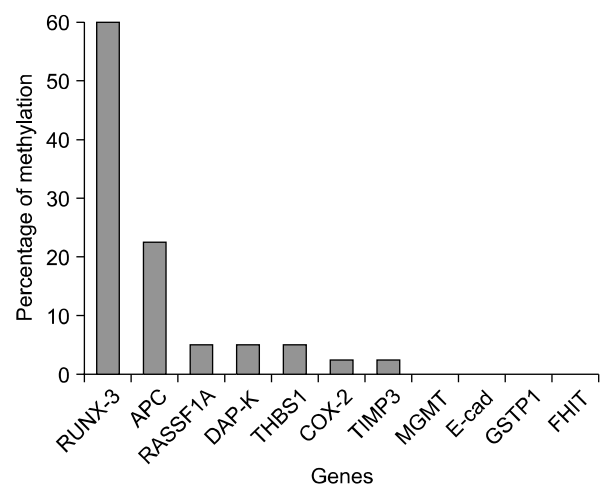


Fig. 1. Methylation status of various tumor suppressor genes in osteosarcoma (n=40).

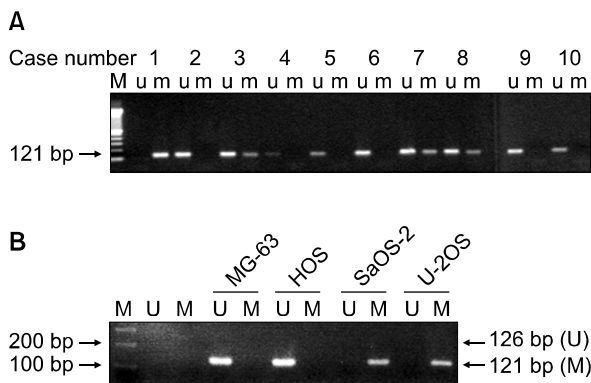


Fig. 2. Methylation of RUNX3 gene using methylation-specific PCR in osteosarcoma cell lines. (A) The results of 10 representative cell lines cultured from osteosarcoma tissues are shown. Numbers 2, 3, 7, 8 show methylated bands. (B) The results of 4 immortalized cell lines are shown. SaOS-2 and U-2OS showed methylation of RUNX3.

유전자의 메틸화가 관찰되었다(Fig. 2A).

3. 불멸화된 골육종 세포주에서 RUNX3 유전자의 메틸화

불멸화된 골육종 세포주(MG-63, HOS, U-2OS, SaOS-2)에서 RUNX3의 메틸화 상태를 분석하기 위해 메틸화-특이적 중합효소연쇄반응을 실행하였다. MG-63 및 HOS 세포는 RUNX3 메틸화를 보이지 않았으나, U-2OS와 SaOS-2는 메틸화를 나타냈다(Fig. 2B).

4. 역전사 PCR (RT-PCR)에서 RUNX3의 발현

DNA 메틸화가 RUNX3 mRNA 발현 상실과 연관성이 있는지 알아보기 위하여, 선행 실험에서 RUNX3 메틸화가 잘 나타난 SaOS-2 세포에서의 RUNX3 발현 상태를 역전사 중합효소연쇄반응 방법으로 조사했다. 예상과는 달리 RUNX3 발현이 비정상적으로 검출되었다. SaOS-2를 DNA demethylating agent인 5-aza-dC로 처리하자 RUNX3 발현이 증가했고 histone deacetylase inhibitor인 TSA를 처리하자 RUNX3 발현이 감소했다. 5-aza-dC와 TSA를 동시에 처리하였을 때 RUNX3 발현이 증가했다(Fig. 3).

5. Bisulfite 유전자 서열 분석

메틸화-특이적 중합효소연쇄반응으로 메틸화를 검사한 데이터를 확인하고 CpG 아일랜드의 메틸화 수준을 조사하기 위하여, 모든 불멸화된 골육종 세포주의 DNA

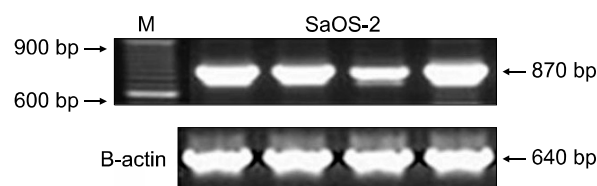


Fig. 3. Expression of RUNX3 in SaOS-2 cell line by RT-PCR. RUNX3 was expressed in SaOS-2 cell line. Treatment with Trichostatin A (TSA) down-regulated RUNX3 expression, which was reversed by co-treatment with 5-aza-2' deoxycytidine (5-aza-dC). Lane 1: control, lane 2: 5-aza-dC, lane 3: TSA, lane 4: 5-aza-dC + TSA.

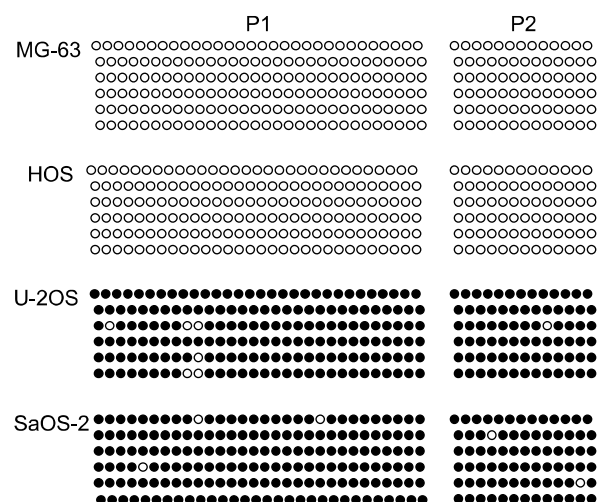


Fig. 4. Bisulfite genomic sequencing of 4 immortalized osteosarcoma cell lines. Most of the CpG islands were methylated in SaOS-2 and U-2OS cell lines. However, some unmethylated CpG sites were also observed.

를 대상으로 중아황산염 유전자 서열 분석을 실시했다. 특히 SaOS-2에서 RT-PCR의 결과 예상과 달리 메틸화된 RUNX3가 발현된 점을 설명하고자 하였다. RUNX3 유전자는 P1 (distal) 및 P2 (proximal) 프로모터에서 전사될 수 있으며 P2 프로모터가 메틸화되어 있더라도 RUNX3 P1 프로모터를 통해 발현될 수 있는데 메틸화-특이적 중합효소연쇄반응에서 양성 SaOS-2는 P1 (distal) 및 P2 (proximal) 프로모터의 대부분이 메틸화되어 있었으나 일부가 비메틸화를 보였다(Fig. 4).

고 찰

암의 발생을 억제하는 종양억제유전자(tumor suppressor gene)의 발현 억제는 유전자 자체의 이상인 유전자의 결손이나 돌연변이 외에도 CpG island의 비정상

적 메틸화와 같은 epigenetic mechanism에 의해서도 이루어지는 것으로 알려져 있다²²⁾. CpG island의 비정상적 메틸화에 의한 종양 억제 유전자의 발현 억제는 각종 암의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다. 암의 발생 과정 중 세포 주기(cell cycle), 조직 침투(invasion), DNA repair 및 apoptosis 등과 관련된 많은 유전자가 이러한 CpG island의 비정상적 메틸화에 의해 불활성화 되는 것으로 보인다. 메틸화 과정이 특히 관심을 끈 이유는 이 과정이 약물에 의해서 환원이 가능한 가역적인 반응이라는 것이다²¹⁾. 본 연구에서는 여러 암에서 CpG island의 비정상적인 메틸화가 관찰된 여러 가지 유전자에 대하여 골육종에서의 메틸화 상태를 분석하였다. 여러 유전자 중 RUNX3의 메틸화가 가장 많이 관찰되었고 이러한 RUNX3의 메틸화는 골육종 조직뿐만 아니라 조직으로 분리 배양한 세포주에서도 높은 비율로 확인되었다. 메틸화를 환원시키는 DNA demethylating agent로 처리하였을 때 RUNX3의 발현이 복원되었다.

Esteller 등⁴⁾은 위암, 대장암, 폐암을 포함하여 15개 주요 종양 유형을 대표하는 600개 이상의 원발 종양 조직에서 12개 유전자의 프로모터 과도 메틸화(hypermethylation)를 분석했다. 조사 대상 유전자는 종양 억제, 세포 주기 조절, 세포사, DNA 수리, 전이성을 포괄하는 여러 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다.

이러한 CpG island의 메틸화를 측정하는 방법으로는, 메틸화 부위에만 작용하는 제한효소(restriction enzyme)를 사용하는 실험 방법인 Southern blot hybridization이나 중합효소연쇄반응을 이용한 방법이 주로 쓰여져 왔지만, 많은 양의 DNA가 필요하고, 제한효소가 인지하는 부위만을 검출할 수 있으며, 불완전하게 절제된 부분이 위양성(false positive)을 일으킬 수 있고, 적은 부위의 메틸화는 검출할 수 없는 단점 등이 있었다. 하지만, 최근에 사용되기 시작한 메틸화 특이적 중합효소연쇄반응법은 제한 효소를 사용하지 않고, 대신 DNA를 bisulfite로 처리하여 메틸화되지 않은 모든 cytosine기를 uracil기로 치환되고, 메틸화된 cytosine기는 그대로 cytosine으로 남아있는 점을 이용하여 메틸화를 확인하는 방법이다³⁾. 이것은 CpG island의 메틸화를 측정하는 예민하고 특이적인 방법으로서 종양억제유전자의 비활성화 기전의 하나를 밝히는 유용한 수단이 될 수 있다.

김 등¹⁴⁾은 위암, 간세포암, 후두암, 폐암, 유방암, 전립

선암, 자궁내막암, 대장암, 자궁경부암 등 여러 유형의 암에서 RUNX3 메틸화를 조사했는데 전장(foregut) 부분, 즉 위, 간, 후두, 폐 조직의 암에서 RUNX3 메틸화가 특히 빈번하다는 것을 관찰했다. 본 연구에서는 121 bp 크기의 PCR 산물을 생산하는 메틸화 시발체를 설계하고 이들 시발체를 활용한 반응이 골육종에서 RUNX3 RNA의 전사 상실과 밀접한 관계에 있음을 증명했다. RUNX3 메틸화는 사람 골육종 조직 샘플 60%에서 관찰되었다. 반면 동일 골육종 조직에서 다른 종양 관련 유전자의 메틸화 수준은 매우 낮았다. 그러므로 높은 수준의 RUNX3 메틸화가 골육종 발생에 상대적으로 중요한 역할을 한다는 의미로 볼 수 있다.

골육종에서 RUNX3 메틸화 상태를 더욱 확인하기 위하여, 골육종 조직에서 직접 추출한 DNA가 아닌 골육종 조직으로부터 배양한 골육종 세포주를 이용하여 검사하였다. 골육종 조직은 종양의 heterogeneity 때문에 골육종 조직 외에도 다른 세포 성분이 포함 될 수 있는 반면 배양한 골육종 세포주는 비교적 순수하게 골육종세포만으로 구성되어 있어 골육종 세포의 특성을 잘 반영할 것으로 판단된다. 골육종 세포주에서 RUNX3 메틸화 비율이 골육종 조직에 비해 감소했는데, 이러한 차이 역시 배양 세포주의 특성 때문으로 생각된다.

메틸화 특이적 중합효소연쇄반응에서 메틸화를 보인 SaOS-2에서 RT-PCR의 결과로 RUNX3가 예상과 달리 발현되는 것을 관찰하였다. Bisulfite 유전자 서열 분석 결과에 따르면 SaOS-2는 소수의 반메틸화(hemi-methylated) 상태였으며, 이는 SaOS-2는 대부분이 메틸화되고 일부가 비메틸화 상태임을 의미한다. 이러한 SaOS-2의 반메틸화는 RUNX3 유전자에 두 개의 촉진염기서열(promoter)이 존재하는 것으로 설명할 수 있다. 즉, RUNX3 유전자는 P1 및 P2 촉진염기서열에서 전사될 수 있으며, 그러므로 P2 촉진염기서열이 메틸화되어 있더라도 P1 촉진염기서열을 통해 발현될 수 있다^{2,24)}. 보편적으로 존재하고 활성 상태인 P2 촉진염기서열과는 달리, P1 촉진염기서열의 활성은 흥선과 난소같은 일부 조직에만 제한되며, 각종 조직에서 P1 프로모터의 활성에 관한 데이터는 없는 상태이다²⁴⁾. 과도 메틸화 상태의 신생아 유래 고환 난황낭 종양에서 RUNX3 유전자가 위치한 1p36.1에서의 LOH (loss of heterozygosity)가 확인되었다는 점은 중요한 의미를 갖는다¹³⁾. 간염의 경우

에 종양성 조직의 메틸화 수준이 매우 높았지만, 만성 B형 간염, 전립선 및 결장 점막 등 다른 비종양성 조직에서는 RUNX3 메틸화가 발견되지 않았다.

암 발생과 관련된 다수의 종양억제유전자가 비정상적 DNA 메틸화에 의해 억제된다는 것은, 이 과정을 환원시킬 수 있는 저해제가 암 치료에 활용될 수 있는 가능성을 시사한다. 촉진염기서열 메틸화는 5-azacytidine 또는 5-aza-2' deoxycytidine에 의해 역전될 수 있으므로, 이러한 메틸화 관련 메커니즘에 초점을 둔 새로운 치료 방식을 개발할 수 있다. DNA에 5-aza-2' deoxycytidine를 첨가하면 DNA methyltransferase와 유사체 사이의 비가역적 공유결합 형성으로 인해, DNA methyltransferase의 불활성화를 유발할 수 있다는 보고가 있다^{11,27)}. 본 연구에서도 5-aza-2' deoxycytidine을 처리하였을 때 골육종 세포에서 RUNX3의 발현이 복원되었다. DNA methyltransferase에 대한 antisense도 in vitro 실험에서 종양 억제능을 보이는 것으로 알려졌다¹⁶⁾. 5-aza-2' deoxycytidine를 대상으로 한 첫 임상 시험을 통해 재발 상태의 급성 백혈병 환자에서 회복을 유도할 수 있음이 밝혀졌다²¹⁾.

Histone acetylation은 유전자의 발현 조절에 관여하여, 세포 성장 억제, apoptosis 유발 및 세포 분화를 유발한다고 보고되고 있다^{23,26)}. 골육종에서 p53 단백질을 포함하는 종양 억제 유전자와 세포 주기 관련 유전자의 발현이 억제되어 있는 것이 보고되어 있고^{7,20)}, 이러한 유전자 발현의 억제 기전에 DNA demethylation과 함께 histone acetylation이 중요한 역할을 할 가능성이 있다. 또한 histone deacetylase inhibitor를 처리한 골육종 세포에서 apoptosis 유발된다는 보고가 있다^{18,25)}. 본 연구에서는 골육종에서 유전자의 메틸화와 histone deacetylation이 동시에 RUNX3 발현에 영향을 주는 것을 확인하였다.

결론

여러 암에서 메틸화가 많이 관찰된다고 보고된 암 발생 관련 유전자들 중 골육종 조직에서 RUNX3의 메틸화가 가장 높은 수준으로 관찰되었고 RUNX3의 메틸화는 골육종 조직뿐만 아니라 골육종 조직으로부터 배양한 세포 주 모두에서 높은 수준으로 관찰되었다. Demethylating agent인 5-aza-2' deoxycytidine를 처리함으로써 RUNX3

유전자 발현을 촉진할 수 있었다. 골육종에서 RUNX3 유전자의 메틸화에 대한 연구는 골육종의 발암기전을 밝히고 새로운 치료제 개발에 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Bacci G, Picci P, Ferrari S, et al: Primary chemotherapy and delayed surgery for nonmetastatic osteosarcoma of the extremities. Results in 164 patients preoperatively treated with high doses of methotrexate followed by cisplatin and doxorubicin. *Cancer*, 72: 3227-3238, 1993.
2. Bangsow C, Rubins N, Glusman G, et al: The RUNX3 gene—sequence, structure and regulated expression. *Gene*, 279: 221-232, 2001.
3. Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP: Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet*, 25: 315-319, 2000.
4. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG: A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*, 61: 3225-3229, 2001.
5. Gorlick R, Anderson P, Andrulis I, et al: Biology of childhood osteogenic sarcoma and potential targets for therapeutic development: meeting summary. *Clin Cancer Res*, 9: 5442-5453, 2003.
6. Grunstein M: Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 389: 349-352, 1997.
7. Guo W, Wang X, Feng C: P53 gene abnormalities in osteosarcoma. *Chin Med J (Engl)*, 109: 752-755, 1996.
8. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 9821-9826, 1996.
9. Hou P, Ji M, Yang B, et al: Quantitative analysis of promoter hypermethylation in multiple genes in osteosarcoma. *Cancer*, 106: 1602-1609, 2006.
10. Ito Y: Molecular basis of tissue-specific gene expression mediated by the runt domain transcription factor PEBP2/CBF. *Genes Cells*, 4: 685-696, 1999.
11. Juttermann R, Li E, Jaenisch R: Toxicity of 5-aza-2'-

- deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 11797-11801, 1994.
12. **Kane MF, Loda M, Gaida GM, et al:** Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res*, 57: 808-811, 1997.
 13. **Kato N, Tamura G, Fukase M, Shibuya H, Motoyama T:** Hypermethylation of the RUNX3 gene promoter in testicular yolk sac tumor of infants. *Am J Pathol*, 163: 387-391, 2003.
 14. **Kim TY, Lee HJ, Hwang KS, et al:** Methylation of RUNX3 in various types of human cancers and premalignant stages of gastric carcinoma. *Lab Invest*, 84: 479-484, 2004.
 15. **Lewis IJ, Nooij MA, Whelan J, et al:** Improvement in histologic response but not survival in osteosarcoma patients treated with intensified chemotherapy: a randomized phase III trial of the European Osteosarcoma Intergroup. *J Natl Cancer Inst*, 99: 112-128, 2007.
 16. **MacLeod AR, Szyf M:** Expression of antisense to DNA methyltransferase mRNA induces DNA demethylation and inhibits tumorigenesis. *J Biol Chem*, 270: 8037-8043, 1995.
 17. **Marina N, Gebhardt M, Teot L, Gorlick R:** Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. *Oncologist*, 9: 422-441, 2004.
 18. **Matsubara H, Watanabe M, Imai T, et al:** Involvement of extracellular signal-regulated kinase activation in human osteosarcoma cell resistance to the histone deacetylase inhibitor FK228 [(1S,4S,7Z,10S,16E,21R)-7-ethylidene-4,21-bis (propan-2-yl)-2-oxa-12,13-dithia-5,8,20,23-tetraazabicyclo [8.7.6] tricos-16-ene-3,6,9,19,22-pentone]. *J Pharmacol Exp Ther*, 328: 839-848, 2009.
 19. **Merlo A, Herman JG, Mao L, et al:** 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med*, 1: 686-692, 1995.
 20. **Miller CW, Aslo A, Won A, Tan M, Lampkin B, Koeffler HP:** Alterations of the p53, Rb and MDM2 genes in osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 122: 559-565, 1996.
 21. **Momparler RL:** Molecular, cellular and animal pharmacology of 5-aza-2'-deoxycytidine. *Pharmacol Ther*, 30: 287-299, 1985.
 22. **Momparler RL, Bovenzi V:** DNA methylation and cancer. *J Cell Physiol*, 183: 145-154, 2000.
 23. **Peltonen K, Kiviharju TM, Järvinen PM, Ra R, Laiho M:** Melanoma cell lines are susceptible to histone deacetylase inhibitor TSA provoked cell cycle arrest and apoptosis. *Pigment Cell Res*, 18: 196-202, 2005.
 24. **Rini D, Calabi F:** Identification and comparative analysis of a second runx3 promoter. *Gene*, 273: 13-22, 2001.
 25. **Roh MS, Kim CW, Park BS, et al:** Mechanism of histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induced apoptosis in human osteosarcoma cells. *Apoptosis*, 9: 583-589, 2004.
 26. **Romanski A, Bacic B, Bug G, et al:** Use of a novel histone deacetylase inhibitor to induce apoptosis in cell lines of acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 89: 419-426, 2004.
 27. **Santi DV, Norment A, Garrett CE:** Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81: 6993-6997, 1984.
 28. **Wu ZQ, Zhang R, Chao C, Zhang JF, Zhang YQ:** Histone deacetylase inhibitor trichostatin A induced caspase-independent apoptosis in human gastric cancer cell. *Chin Med J (Engl)*, 120: 2112-2118, 2007.
 29. **Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A, Shimoyama Y, Sugimura T, Hirohashi S:** Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 7416-7419, 1995.

= 국문초록 =

목 적: CpG island의 비정상적 메틸화에 의한 종양억제유전자의 발현억제는 여러 암 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 골육종에서 여러 종양억제유전자들의 메틸화 상태를 조사하고, 특히, RUNX3 유전자에 대한 demethylation의 효과를 분석하였다.

대상 및 방법: 골육종 조직에서 여러 종양억제유전자에 대해 메틸화-특이적 중합효소연쇄반응(Methylation-specific PCR, MSP)을 시행하였고, 골육종 세포주로 RUNX3에 대한 MSP과 RT-PCR을 시행하였다. 메틸화 상태의 환원을 확인하기 위해 SaOS-2세포에 demethylating agent인 5-aza-2'deoxyctidine를 처리하였다.

결 과: 40예의 골육종 조직에서 여러 종양억제유전자 중 RUNX3의 메틸화가 가장 높은 수준으로 관찰되었다 (60%). 배양한 세포주 13예(43%)와, 불멸화 세포주 중 U-2OS와 SaOS-2에서 RUNX3의 메틸화를 나타냈다. SaOS-2에서 demethylating agent인 5-aza-2' deoxyctidine에 의해 RUNX3의 발현이 증가되었다.

결 론: 골육종에서 RUNX3 유전자의 메틸화에 대한 연구는 골육종의 발암기전을 밝히고 새로운 치료제 개발에 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

색인 단어: RUNX3, 골육종, 메틸화, CpG island