

ORIGINAL ARTICLE

유방암에서 암 관련 유전자의 메틸화 양상

지성배 · 박우찬 · 김기환 · 김지일 · 안창혁 · 임근우 · 오세정 · 송병주 · 정상설 · 김정수

가톨릭대학교 의과대학 외과학교실

Methylation Patterns of Cancer-Associated Genes in Breast Cancer

Sung-Bae Jee, Woo-Chan Park, Kee-Whan Kim, Ji-Il Kim, Chang-Hyeok Ahn, Keun-Woo Lim, Se-Jung Oh, Byung-Joo Song, Sang-Seol Jung, Jeong-Soo Kim

Department of Surgery, The Catholic University of Korea, College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: To investigate the methylation status of cancer-associated genes in breast cancer to assess its use in the diagnosis of breast cancer and the relationship with distinctive clinical and pathological features.

Methods: A total of 29 benign tumors and their adjacent normal tissues as well as 67 malignant tumors and adjacent normal samples, from women undergoing surgery for primary invasive breast carcinoma at Uijongbu St. Mary's Hospital, between March 2003 and March 2005, were used. Eleven candidate genes were chosen; *P14*, *P16*, *DAPK*, *MGMT*, *h-MLH*, *E-cadherin*, *RASSF1a*, *Twist*, *RARβ*, *HIN-1*, and *Cyclin D*. DNA was extracted from fresh tissues, and methylation specific PCR performed.

Results: The number of methylated genes was increased in the malignant tissues compared to the benign tumors and adjacent normal tissues. 7 genes; *P14*, *P16*, *MGMT*, *RASSF1a*, *Twist*, *RARβ*, and *Cyclin D*, were more frequently methylated in malignant than benign tumors, with the differences in the *p14*, *p16*, and *RARβ*, genes were statistically significant ($p < 0.05$). In benign tumors, the *p16* and *HIN-1* genes were the most infrequently (6.9%) and frequently methylated (82.8

%), respectively. In malignant tumors, the *h-MLH* and *RASSF1a* genes were most infrequently and frequently methylated genes, respectively. The subgroup showing methylation of the *DAPK* gene had a higher nuclear grade and greater progesterone receptor negativity. The group in which the *RASSF1a* gene was methylated, had greater estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR) positivities. The *Twist* gene was frequently methylated in the subgroup showing higher nuclear and histologic grades. The group with *HIN-1* and *cyclin D* methylation had a tendency to show greater ER positivity.

Conclusion: The subgroups showing methylated *DAPK* and *Twist* should be more intensely treated and followed up more carefully than those with *RASSF1a*, *HIN-1* and *Cyclin D* methylation. Gene methylation may be linked to various pathological features of breast cancer; however, this will require confirmation from larger studies. (*J Breast Cancer* 2007;10:51-8)

Key Words : Breast cancer, Tumor suppressor gene, Methylation

중심단어 : 유방암, 암억제유전자, 메틸화

서 론

다른 악성종양과 마찬가지로 유방암도 종양형성유전자의 활성화 및 암억제유전자의 불활성화에 의해 유발되는 것으로 생각되

고 있으며, 이에 관련하여 기존의 genetics에 대별하는 개념으로서 epigenetics의 기전들이 암발생과 관련하여 최근 제시되고 있다.(1) 그 중 메틸화에 의해 암억제유전자의 전사가 정지되는 현상은 유전자가 불활성화되는 epigenetics의 기전 가운데 매우 중요한 것으로, 유전자 프로모터(promoter)의 CpG 염기반복구역이 메틸화됨으로 인해 성장을 조절하는 유전자들의 발현이 저해되는 현상이 나타나게 된다.(2)

유방암에서 과메틸화가 일어나는 것으로 알려진 유전자들에는 세포주기조절에 관여하는 *p14*, *p16*, *Cyclin D*, 세포부착에 관여

책임저자 : 김정수

480-130 경기도 의정부시 금오동 65-1, 가톨릭대학교 의과대학
의정부성모병원 외과

Tel: 031-820-3048, Fax: 031-847-2717

E-mail : drbreast@catholic.ac.kr

접수일 : 2006년 12월 11일 게재승인일 : 2007년 2월 23일

하는 *Twist*, *E-cadherin*, DNA를 복구하는 *MGMT*, *h-MLH*, 그리고 세포신호전달과정에 참여하는 *RASSF1a*, *DAPK*, *HIN-1*, *RARβ* 등이 있다.(3, 4) 이렇게 메틸화되는 유전자가 무엇인지 밝혀짐에 따라 세포의 성장조절단계에서 어떤 과정이 영향을 받아 유방암이 발생하는지 파악할 수 있으며,(5) 또한 종양 특이적으로 DNA의 과메틸화에 대해 연구함으로써 유관 세척액을 이용한 유방암의 조기진단과 같은 분야에도 활용할 수 있다.

이미 알려진 종양관련 유전자에 대한 메틸화의 특징을 각 종양별로 연구함으로써, 조기 진단 및 예후, 치료에 대한 반응평가 등에 활용할 수 있다. 이미 대장암에서 *p16*, *MLH1*, *MDR1* 유전자 프로모터의 메틸화는 임상, 병리적 특징들과 밀접하게 관련되어 있는 것으로 알려져 있다.(6)

유방암에서 유전자 메틸화가 조직특성과 임상적 특징을 결정한다는 증거들이 밝혀지고 있는데, 최근 microarray를 이용한 연구에서 미분화된 종양이 분화도가 좋은 종양에 비하여 CpG 염기반복구역이 더 메틸화된 것으로 나타난 것이 한 가지 예이다.(7) *Twist*의 메틸화는 소엽상피암보다 유관상피암에서 더 흔한 것으로 나타나는 반면,(8) *CCND2*의 메틸화는 종양의 진행정도에 따라 다양한 메틸화상태를 보였다.(9) *PTEN*의 메틸화는 *ErbB2*의 과발현, 종양의 크기, 핵등급과 연관되어 있는 것으로 알려져 있다.(10) 그러나 유방암에서 특정한 메틸화의 표현형이라는 것이 존재한다고 말하기 어렵다고 결론내린 연구도 발표된 바 있다.(11)

본 연구의 목적은 정상조직, 양성종양조직과 유방암조직에서 암관련유전자의 메틸화의 정도의 차이를 알아보고, 유전자의 메틸화와 유방암의 주요 임상, 병리적 특징들 사이에 어떠한 연관관계가 있는지 밝혀내는 것이다. *p14*, *p16*, *RARβ*, *MGMT*, *RAS-SF1a*, *Cyclin D*, *Twist*, *DAPK*, *HIN-1*, *h-MLH*, *E-cadherin* 유전자의 메틸화상태를 관찰하였으며, 이 유전자들은 유방암 발생기전에서 중요한 기능을 할 것으로 추정되며 기존의 다른 연구에서 흔히 메틸화되어 발현이 저하되는 것으로 알려져 있다(Table

1). 메틸화 특이적 중합효소연쇄반응(methylation-specific polymerase chain reaction, MSP) 기법을 사용하여 상기 유전자들에 대하여 메틸화 여부를 조사하였다.

방 법

1. 대상

2003년 3월부터 2005년 3월까지 시행된 수술을 통해 모두 96(양성 29, 악성 67)예의 환자에서 유방조직을 얻었으며, 신선조직으로부터 페놀-클로로포름 추출기법(phenol-chloroform extraction procedure)으로 genomic DNA를 추출하였다. 악성 증례에서 연령은 35세에서 89세(평균연령 51.4세)까지였으며 추적관찰은 13개월에서 38개월(평균 27.9개월)까지 이루어졌다. 각 종양의 크기와 병기 및 액와림파절 전이 여부, 조직학적 등급, 핵등급, 에스트로젠 수용체(Estrogen Receptor, ER), 프로세스테론 수용체(Progesterone receptor, PgR), *p53*, *ErbB2* 등을 조사하였다. 유방암의 병기구분에는 2002년도판 American Joint Committee on Cancer Staging System for Breast cancer가 사용되었다. 연구종료시점에서 총 5명(7.5%)의 환자에서 유방암의 재발이 일어났고, 그 중 3명(4.5%)이 사망하였으며, 종양의 평균 크기는 2.65 cm이었다(Table 2).

2. 방법

DNA의 sodium bisulfite modification 및 MSP를 이용하여 유전자의 메틸화 상태를 조사하였다. 총 부피 15 μ L에 1-2 μ g의 genomic DNA를 1.7 μ L의 2 M NaOH를 첨가하여 37°C에서 15분간 배양하여 변성(denature)시키고, 이어서 9 μ g의 hydro-quinone (1 mg/mL)과 156 μ L의 sodium bisulfite solution (380 mg/mL)을 섞었다. DNA에 50 μ L의 mineral oil을 첨가하고 16시간 동안 55°C에 배양하였다. Bisulfite-modified DNA

Table 1. Genes investigated in this study

Gene Abb.	Gene	Function
<i>p14</i>	<i>p-14</i> alternative reading frame	<i>MDM2</i> inhibitor
<i>p16</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 4a	Cyclin-dependent kinase inhibitor
<i>Cyclin D</i>	D-type cyclin	Regulation of transition from G ₁ to S
<i>Twist</i>	Basic Helix-loop-helix transcription factor	Epithelial-mesenchyme transition during metastasis
<i>E-cadherin</i>	Epithelial cadherin	Epithelial intercellular adhesion
<i>MGMT</i>	O-6-methylguanine-DNA Methyltransferase	DNA repair of O6-alkyl-guanine
<i>h-MLH</i>	Human mutL-homologue	DNA mismatch repair
<i>RASSF1a</i>	Ras-associated domain family 1 α	<i>Ras</i> effector homologue
<i>DAPK</i>	Death-associated protein kinase 1	Interferon-induced apoptotic kinase, pro-apoptotic
<i>HIN-1</i>	High-in-normal 1	Putative cytokine with growth-inhibitory activities
<i>RAR β</i>	Retinoic acid receptor β	Nuclear retinoic acid receptor

Abb.=abbreviation.

Table 2. Characteristics of breast cancer patients

Clinicopathological factors (N=67)	n (%)
Operation	
BCS	24 (35.8)
MRM	42 (62.7)
Stage	
I	15 (22.4)
IIA	24 (35.8)
IIB	12 (17.9)
IIIA	7 (10.4)
IIIB	1 (1.5)
IIIC	6 (9.0)
IV	2 (3.0)
Size of tumor (cm)	
0-1	6 (9.0)
1.1-2.0	19 (28.4)
2.1-3.0	28 (41.8)
3.1-4.0	6 (9.0)
4.1-5.0	6 (9.0)
5.1-	2 (3.0)
Histologic grade	
G1	7 (10.8)
G2	33 (50.8)
G3	25 (38.4)
Nuclear grade	
G1	8 (14.2)
G2	31 (55.4)
G3	17 (30.4)
Histologic type	
Invasive ductal cancer	60 (93.8)
Invasive lobular cancer	3 (4.7)

BCS=breast conserving surgery; MRM=modified radical mastectomy.

는 QIA quick PCR Purification Kit (Qiagen, Melbourne, Australia)을 이용하여 정제하였다. DNA는 50 μ L의 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)을 이용하여 용출하고 5.5 μ L의 3 M NaOH를 이용하여 desulphonation 시킨 뒤 37°C에서 15분 동안 배양하였다. 6 μ L의 3 M sodium acetate (pH 5.2), 1 μ L의 당원 (glycogen, 20 mg/mL), 180 μ L의 ice-cold absolute ethanol을 이용하여 DNA를 침전시킨 뒤 시료를 -80°C에서 30분 동안 보관하고 30분 동안 원심분리하였다. 상청액을 따라내고 결정(pellet)을 건조시킨 뒤 20 μ L의 Milli-Q water에 재부유화(resuspension)시켰다. 이러한 방법으로 마련된 bisulfite modified DNA는 바로 PCR에 사용되었다.

MSP의 프라이머 서열(primer sequence)과 결합 온도(annealing temperature, T_m), PCR product의 크기를 Table 3에 정리하였다. 2 μ L의 sodium bisulfite-converted DNA를 총 부피 18 μ L의 PCR 혼합용액(1회의 중합효소반응 완충액, 1회의 Q-용액, 프라이머에 적절한 Mg^{2+} 농도, 0.4 μ M의 각 프라이머, 그리고 0.1 μ L의 Taq 중합효소)에 첨가하였다. PCR 반응은 94°C에서 5분간 “hot-start” 한 뒤 94°C에서 30-45초간 35-40

cycle을 반복하고 적절한 결합 온도에서 30-60초간 둔 다음 72°C에서 30-45초를 두고 7분간 72°C에서 마지막 연장 반응이 이루어지도록 하였다. PCR product는 2-2.5%의 아가로스 젤라틴 (agarose gel)에서 전기영동(electrophoresis)하여 분석하였다. 메틸화되지 않은 RAR β 의 프라이머는 bisulfite modification 후 DNA가 존재한다는 것을 증명하기 위해 사용되었다. 11개의 유전자마다 MSP가 시행될 때 이 대조군 실험은 항상 시행되었다. DNA 과메틸화를 나타내는 것으로 알려진 대장 및 유방암 시료가 양성대조군으로 사용되었으며, 혈액 DNA가 음성 대조군으로 사용되었고 DNA가 들어있지 않은 시료가 blank로 사용되었다. *p14*, *p16*, *RAR β* , *MGMT*, *RASSF1a*, *Cyclin D*, *Twist*, *DAPK*, *HIN-1*, *h-MLH*, *E-cadherin*의 메틸화결과를 96예의 자료들로부터 얻었다.

3. 통계분석

대응표본 및 독립 T 검정(paired, independent T test)를 사용하여 정상, 양성, 악성 조직간에 총 메틸화된 유전자의 개수의 평균에 차이가 있는지 조사하였다. 카이제곱검정(Chi-square test) 및 피셔 직접확률계산법(Fisher's exact test)를 사용하여 정상, 양성, 악성 조직간에 유전자별로 메틸화 정도에 차이가 있는지 조사하였다. 피어슨의 적률상관(Pearson's correlation)을 사용하여 정상과 양성, 정상과 악성조직간에 메틸화 개수의 상관관계가 있는지 조사하였다. T 검정 및 카이제곱검정, 선형 대 선형 결합법(linear by linear test), 피셔 직접확률계산법을 사용하여 11개의 유전자 별로 악성 종양에서 각 유전자들의 메틸화 여부에 따른 임상병리적 특징들의 유의성을 조사하였다. 로지스틱 회귀분석을 사용하여 각 유전자별로 정상, 양성조직보다 악성종양일 가능성이 얼마나 되는지 비교하였다. 모든 *p* 값은 양측검정(two-tailed statistical test)으로부터 얻어졌으며 <0.01에서 유의하다고 판단하였다. 통계처리는 SPSS 12.0 패키지를 사용하였다.

결 과

29개 양성종양의 종양조직에서 11개의 유전자가 메틸화되는 개수는 평균 4.79 ± 1.544 개(최소 1개에서 최대 8개)였으며 주변의 정상조직에서 11개의 유전자가 메틸화되는 개수는 평균 4.21 ± 2.042 개(최소 1개에서 최대 9개)로 유의한 차이는 없었다(Fig 1).

67개 악성종양의 종양조직에서 11개의 유전자가 메틸화되는 개수는 평균 5.94 ± 2.335 개(최소 1개에서 최대 11개)였으며 주변의 정상조직에서 11개의 유전자가 메틸화되는 개수는 평균 2.94 ± 1.740 개(최소 0개에서 최대 7개)로 유의한 차이가 있었다(Fig 2).

Table 3. MS-PCR primers of specific genes analyzed in this study

Gene	Methylation	Forward primer	Reverse primer	Annealing temperature (°C)	Product size (base pair)
<i>MGMT</i>	Unmethylated	5'-GTAGTTGTTTGTATGTTTGT-3'	5'-AACCAATACAAACCAACA-3'	59	121
	Methylated	5'-GGTCGTTTGTACGTCGC-3'	5'-GACCGATACAAACCGAACG-3'	59	118
<i>p16</i>	Unmethylated	5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3'	5'-CAACCCCAAAACCACAACCATAA-3'	63	151
	Methylated	5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3'	5'-GACCCCGAACC GCGACCGTAA-3'	63	150
<i>p14</i>	Unmethylated	5'-TTTTTGGTGTTAAAGGGTGGTGTAGT-3'	5'-CACAAAAACCCCTCACTCACAAACA-3'	62	132
	Methylated	5'-GTGTTAAAGGGCGGCGTAGC-3'	5'-AAAACCCCTCACTCGCGACGA-3'	62	122
<i>E-cadherin</i>	Methylated	5'-TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT-3'	5'-CACAAACCAATCAACAACACA-3'	55	97
	Methylated	5'-TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT-3'	5'-TAACTAAAAATTCACCTACCGAC-3'	57	116
<i>DAPK</i>	Unmethylated	5'-GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT-3'	5'-CAAATCCCTCCCAACACCAA-3'	63	106
	Methylated	5'-GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC-3'	5'-CCCTCCCAACGCGCA-3'	63	98
<i>h-MLH</i>	Unmethylated	5'-AGAGTGGATAGTGATTTTAAATGT-3'	5'-ACTCTATAAATTAATAATCTCTTCA-3'	491	00
	Methylated	5'-GATAGCGATTTTAAACGC-3'	5'-TCTATAAATTAATAATCTCTTCG-3'	51	92
<i>Twist</i>	Unmethylated	5'-GGTTTGGGGGTGTTGTTTGTATG-3'	5'-CCCACCTCCTAACCAACCTCC-3'	60.5	105
	Methylated	5'-GTTAGGGTTCGGGGCGTGTGTT-3'	5'-CCGTCGCCTTCTCCGACGAA-3'	60.5	77
<i>RARβ</i>	Unmethylated	5'-GGATTGGGATGTTGAGAATGT-3'	5'-CAACCAATCCAACCAAAACAA-3'	61	163
	Methylated	5'-GAACGCGAGCGATTCGAGT-3'	5'-GACCAATCCAACCGAAACG-3'	61	142
<i>HIN-1</i>	Unmethylated	5'-GGTATGGGTTTTTATGGTTTGTT-3'	5'-CAAAACTTCTTATACCAATCCTCA-3'	55	136
	Methylated	5'-GGTACGGGTTTTTACGGTTCGTC-3'	5'-AATTCTTATACCCGATCCTCG-3'	59	136
<i>Cyclin D</i>	Unmethylated	5'-AGAGTATGTGTTAGGGTTGATT-3'	5'-ACATCCTCACCAACCCTCCA-3'	61	106
	Methylated	5'-GGCGGATTTATCGTAGTCG-3'	5'-CTCCACGCTCGATCCTTCG-3'	59	101
<i>RASSF1α</i>	Unmethylated	5'-GGTGTGAAGTTGGGGTTTG-3'	5'-CCCATACTTCACTAACTTTAAAC-3'	61	76
	Methylated	5'-GCGTTGAAGTCGGGGTTC-3'	5'-CCCGTACTTCGCTAACTTTAAACG-3'	59	75

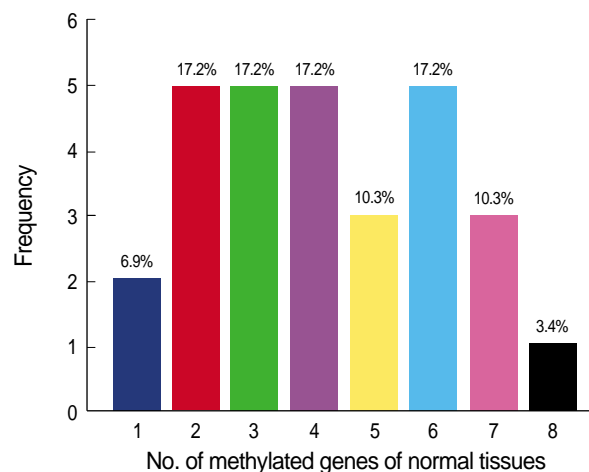
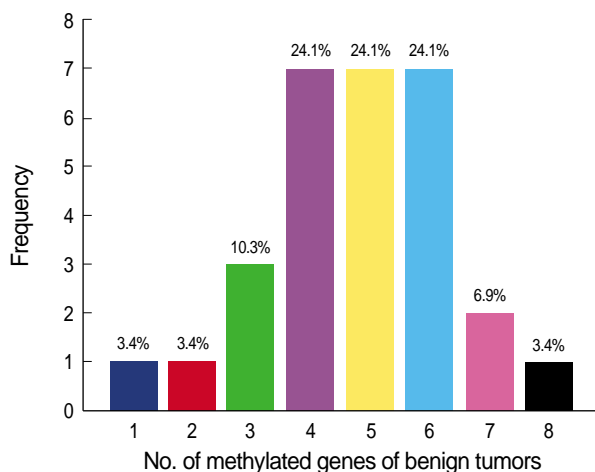


Fig 1. Number of methylated genes, benign tumor vs. normal tissue.

양성종양의 종양조직과 악성종양의 종양조직 사이에 11개 유전자가 메틸화되는 개수는 각각 4.79 ± 1.544 개, 5.94 ± 2.335 개로 유의한 차이가 있었다(Table 4).

악성종양의 경우, 악성 종양 조직과 주변 정상조직에서 11개의 유전자가 메틸화되는 개수간의 상관성(correlation)을 보면 상관계수 0.454 정도의 상관성이 있었다($p=0.000$, Fig 3). 양성종양의 경우, 양성종양조직과 주변 정상종양 조직에서 11개의 유전자가 메틸화되는 개수간의 상관성을 보면 상관계수 0.297 정도의

상관성이 낮고 통계적으로도 의미가 없었다($p=0.117$, Fig 4).

각 유전자 별로 양성종양 조직과 악성 종양조직에서 메틸화되는 빈도를 비교해 보면 7개의 유전자(*p14*, *p16*, *MGMT*, *RASSF1 α* , *Twist*, *RAR β* , *Cyclin D*)는 악성종양조직에서 메틸화가 많이 되는 것을 관찰할 수 있었으며, 이중 3개의 유전자(*p14*, *p16*, *RAR β*)는 통계적으로 유의하였다. 하지만 4개의 유전자(*DAPK*, *h-MLH*, *E-cadherin*, *HIN-1*)에선 양성 종양 조직에서 메틸화가 많이 되지 않았지만 통계적으로 유의하진 않았다. 양성 종양 조직에선 *p16*이

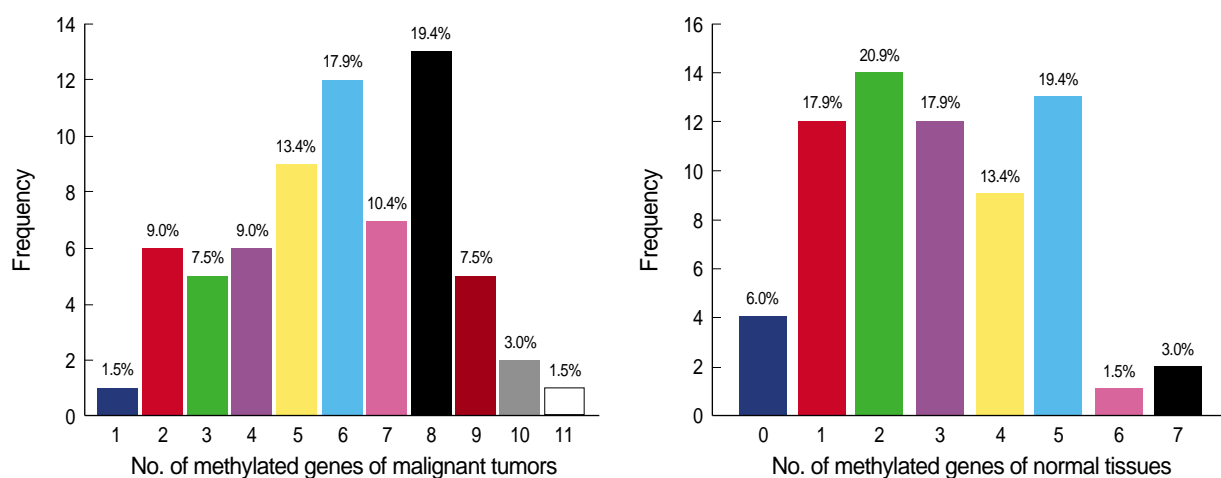


Fig 2. Number of methylated genes, malignant tumor vs. normal tissue.

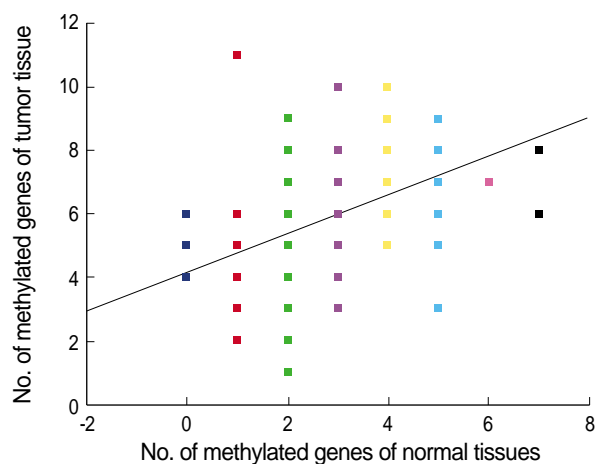


Fig 3. The correlation of numbers of methylated genes between normal tissue vs. malignant tumor.

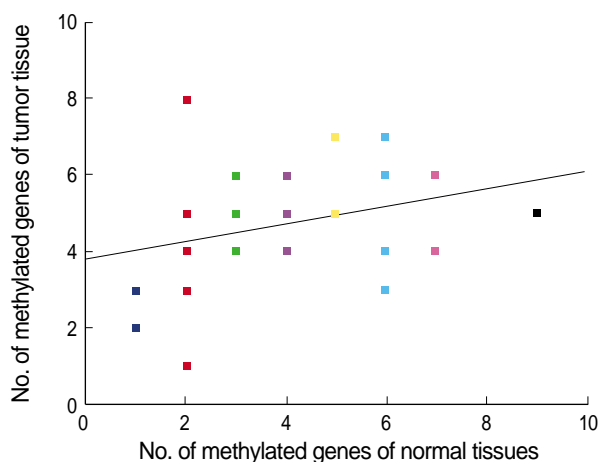


Fig 4. The correlation of numbers of methylated genes between normal tissue vs. benign tumor.

Table 4. Comparison of numbers of hypermethylation in 11 genes

	<i>p</i>
Benign tumors (N=29)	
Normal tissue vs. Tumor tissue	
4.21 ± 2.042 vs. 4.79 ± 1.544	0.156*
Malignant tumors (N=67)	
Normal tissue vs. Tumor tissue	
2.94 ± 1.740 vs. 5.94 ± 2.335	0.000*
Benign (N=29) and malignant (N=67) tumors	
Benign tumor tissue vs. Malignant tumor tissue	
4.79 ± 1.544 vs. 5.94 ± 2.335	0.006 [†]

*: Paired T-test; [†]: Independent T-test.

6.9%로 메틸화 빈도가 가장 낮았고, *HIN-1*이 82.8%로 가장 높았다. 악성 종양 조직에선 *h-MLH*가 14.9%로 메틸화 빈도가 가장 낮았고, *RASSF1a*가 83.6%로 가장 높았다(Table 5).

Table 5. The comparison of methylation status of each gene, benign tumor vs. malignant tumor

Gene	Benign tumor tissue (%)	Malignant tumor tissue (%)	<i>p</i>
<i>p14</i>	37.9	68.7	0.005*
<i>p16</i>	6.9	38.8	0.002*
<i>DAPK</i>	55.2	53.7	0.896*
<i>MGMT</i>	20.7	38.8	0.084*
<i>h-MLH</i>	17.2	14.9	0.767 [†]
<i>E-cadherin</i>	51.7	46.3	0.623*
<i>RASSF1 α</i>	75.9	83.6	0.374*
<i>Twist</i>	48.3	68.7	0.058*
<i>RARβ</i>	37.9	59.7	0.050*
<i>HIN-1</i>	82.8	73.1	0.310*
<i>Cyclin D</i>	44.8	49.3	0.690*

*: Chi-square Test; [†]: Fischer exact Test.

Table 6. The comparison of methylation status of each gene, normal tissue vs. malignant tumor

Gene	Normal tissue (%)	Malignant tumor tissue (%)	p^*
<i>p14</i>	46.3	68.7	0.009
<i>p16</i>	22.4	38.8	0.039
<i>DAPK</i>	20.9	53.7	0.000
<i>MGMT</i>	13.4	38.8	0.001
<i>h-MLH</i>	10.4	14.9	0.436
<i>E-cadherin</i>	35.8	46.3	0.219
<i>RASSF1α</i>	46.3	83.6	0.000
<i>Twist</i>	13.4	68.7	0.000
<i>RARβ</i>	20.9	59.7	0.002
<i>HIN-1</i>	46.3	73.1	0.000
<i>Cyclin D</i>	17.9	49.3	0.000

*: Chi-square Test.

Table 8. Logistic regression of hypermethylation status, normal tissue vs. malignant tumor

	p	Exp(B)	95.0% C.I. for EXP(B)	
			Lower	Upper
<i>p14</i>	.011	4.069	1.376	12.033
<i>DAPK</i>	.046	3.215	1.020	10.133
<i>RASSF1α</i>	.020	4.785	1.285	17.819
<i>Twist</i>	.000	13.696	4.025	46.603

Exp(B)=odds ratio.

각 유전자 별로 양성 종양 조직과 주위 정상 조직에서 메틸화되는 양상을 보면, 전반적으로 양성 종양 조직에서 메틸화가 많이 되었으며 통계적으로 의미있게 양성 종양에서 메틸화가 많이 되는 유전자는 *p14*, *p16*, *DAPK*, *MGMT*, *RASSF1 α* , *Twist*, *RAR β* , *HIN-1*, *Cyclin D*였다 (Table 6).

양성조직과 양성조직간에 Logistic 회귀분석으로 비교한 결과 *p14*가 메틸화된 종양인 경우 종양조직이 양성보다 악성일 가능성이 3.508배 높았고($p=0.037$), *p16*이 메틸화된 종양인 경우 종양조직이 양성보다 악성일 가능성이 9.253배 높았으며($p=0.009$), *HIN-1*이 메틸화된 종양인 경우 종양조직이 양성보다 악성일 가능성이 0.173배 높았다($p=0.025$). 다시 말하면 *HIN-1*이 메틸화된 종양인 경우 종양조직이 양성보다 양성일 가능성이 5.780배 높았다($p=0.025$, Table 7).

정상조직과 양성조직간에 Logistic 회귀분석으로 비교한 결과 *p14*가 메틸화를 보이는 조직이 정상조직보다 양성종양 조직일 가능성이 4.069배 높았으며($p=0.011$), *DAPK*의 경우 3.215배 높았다($p=0.046$). *RASSF1 α* 는 4.785배 높았으며($p=0.020$), *Twist*는 13.696배 높은 것으로 나타났다($p=0.000$, Table 8).

11개의 유전자 별로 양성 종양에서 각 유전자들의 메틸화 여부에 따른 특징(나이, 종양의 크기, 병기, 액와임파절 전이 여부, 조

Table 7. Logistic regression of hypermethylation status, benign tumor vs. malignant tumor

	p	Exp(B)	95.0% C.I. for EXP(B)	
			Lower	Upper
<i>p14</i>	.037	3.508	1.076	11.439
<i>p16</i>	.009	9.253	1.756	48.764
<i>HIN-1</i>	.025	.173	.038	.801

Exp(B)=odds ratio.

Table 9. Association between gene promoter methylation and clinicopathological features

	Gene	p
Nuclear grade (N=56)	<i>DAPK</i>	0.039 [†]
	<i>Twist</i>	0.032 [*]
ER (N=66)	<i>RASSF1α</i>	0.001 [‡]
	<i>HIN-1</i>	0.031 [*]
	<i>Cyclin D</i>	0.020 [*]
	<i>RASSF1α</i>	0.001 [‡]
PgR (N=66)	<i>Twist</i>	0.022 [†]
Histologic grade (N=65)	<i>DAPK</i>	0.000 [*]
	<i>RARβ</i>	0.004 [*]
	<i>RASSF1α</i>	0.001 [*]
	<i>p14</i>	0.050 [*]
	<i>MGMT</i>	0.002 [‡]
	<i>E-cadherin</i>	0.000 [*]

*: Chi-square test; [†]: Linear by linear test; [‡]: Fischer exact test.

직학적 등급, 핵등급, ER, PgR, *p53*, *ErbB2*, 주위 정상조직에서 메틸화 유무)을 비교하였다. *DAPK* 유전자가 메틸화되는 그룹에서 *DAPK* 유전자가 메틸화되지 않는 그룹에 비해 핵 등급(nuclear grade)이 전반적으로 높았고, PgR이 음성이 되는 빈도가 높았다. *RASSF1 α* 유전자가 메틸화되는 그룹에서 *RASSF1 α* 유전자가 메틸화되지 않는 그룹에 비해 ER과 PgR이 양성으로 나타나는 빈도가 높았다. *Twist* 유전자가 메틸화되는 그룹에서 *Twist* 유전자가 메틸화되지 않는 그룹에 비해 조직학적 등급(histologic grade)과 핵 등급이 전반적으로 높았다. *HIN-1*, *Cyclin D* 유전자 각각이 메틸화되는 그룹에서 *HIN-1*, *Cyclin D* 유전자 각각이 메틸화되지 않는 그룹에 비해 ER의 양성 빈도가 높았다. *p14*, *DAPK*, *MGMT*, *h-MLH*, *E-cadherin*, *RASSF1 α* , *RAR β* 유전자는 주변 정상 조직에서 메틸화된 경우 양성 종양조직에서도 메틸화될 가능성이 높았다(Table 9).

고 찰

본 연구의 목적은 유방암 발생과정에서 기능하는 것으로 추정되는 암 관련 유전자의 메틸화 상태의 특징 및 임상, 병리적인 요소들과의 연관관계를 살펴보는 것이다. DNA 메틸화와 함께 중

양의 크기, 림프절 전이여부, 병기, 조직학적 등급, 핵 등급, ER, PgR, *p53*, *ErbB2* 등을 조사하였으며, MS-PCR 반응을 시행하여 결과를 얻었다.

주변정상조직에서 암관련유전자의 메틸화 개수가 많을수록 양성종양조직에서도 메틸화 개수가 유의하게 많은 것으로 나타난 반면 양성종양조직과 주변정상조직간에는 그러한 상관관계가 없는 것으로 나타났다. 즉, 악성종양환자의 정상유방조직에는 전반적인 과메틸화가 이미 발생한 상태로서, 그러한 환경이 악성화에 필요한 것이 아닐까 추측해볼 수 있다. 한편, Logistic 회귀분석에서는 *p14*, *p16*, *Twist* 등이 메틸화된 경우 그 조직은 양성종양보다 악성종양일 확률이 높은 것으로 나타났으며, *p14*, *DAPK*, *RASSF1a*, *Twist* 등이 메틸화된 경우 그 조직은 정상조직보다 악성종양일 확률이 높은 것으로 나타났다.

p14, *p16*, *RARβ*는 정상조직-악성종양 및 양성종양-악성종양 비교에서 모두 악성종양에 유의하게 메틸화가 많이 된 것을 확인할 수 있었다. *p14*, *p16*은 종양억제유전자로 알려진 cyclin-dependent kinase inhibitor로 9p21에 위치하며 *INK4a-ARF*의 선택적 스플라이싱(splicing)에 의해 *p16*과 *p14*로 발현되게 된다. *p14*는 *p53*을 안정화시킴으로써 *p53* 경로를 특이적으로 활성화시켜 세포주기정지나 세포자연사멸을 유도하며, (12) *p16*은 CDK4와 작용하여 G1 시기로의 진행을 억제시키는 효과를 가지고 있다. (13) *RARβ* 역시 종양억제기능을 하는 세포핵내 retinoic acid 수용체로, retinoic acid와 결합하여 세포성장억제 및 세포자연사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다. (14) 한편 *MGMT*, *RASSF1a*, *Cyclin D*, *Twist*는 양성종양보다 악성종양에서 더 많은 메틸화를 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 하지만 정상조직과 비교하였을때는 통계적으로 유의하게 악성종양에서 메틸화가 많이 되어있었다. *MGMT*는 guanine의 O-6 위치에서 메틸, 알킬기를 제거함으로써 DNA 손상을 복구하는 기능을 가진 암 억제유전자이며, (15) *RASSF1a*는 3p21.3에 위치하는 세포 신호전달체계 중간물질로서 암 억제기능을 가진 것으로 추측되고 있다. (16) *Cyclin D*는 cyclin-dependent kinase와 결합하여 cell cycle에 관여하며 유방암에서 일반적으로 발현이 저하되어 있는 것으로 알려져 있다. (17) 이 세 유전자와 달리 *Twist*는 *E-cadherin*을 발현저해하여 암의 전이와 일부 관련이 있는 것으로 알려져 있다. (18) *DAPK*, *HIN-1*은 정상조직보다 악성종양조직에서 메틸화가 증가되어 있으며 통계적으로 유의하나, 악성종양조직과 비교하여 양성종양조직에서 오히려 메틸화가 증가되어 있으나 통계적 유의성은 없는 것으로 나타났다. *DAPK*는 160 kD의 calmodulin-dependent serine/threonine kinase로, 세포자연사멸을 유도하는 조절인자로서 암의 전이성에 대한 저해작용을 하는 것으로 알려져 있으며, (19) *HIN-1*은 세포성장 저해작용을

가진 것으로 추정되는 사이토카인이다. (20) *h-MLH*, *E-cadherin*은 정상조직보다 양성종양조직에서 메틸화가 증가되어 있으나 악성조직보다 양성종양조직에서 메틸화가 증가되어 있는 것으로 나타났으며, 두가지 비교 모두에서 통계적 유의성이 없는 것으로 나타났다. *h-MLH*는 잘 알려진 mismatch repair gene (21)이며 *E-cadherin*은 상피에서 세포간 결합에 관여하며 발현이 감소할 때 암의 전이 및 침윤을 일으키는 것으로 알려져 있다. (22)

*DAPK*가 메틸화된 군에서는 높은 핵등급 및 PgR(-)를 나타냈으며 *Twist*가 메틸화된 군에서는 높은 핵등급과 조직학적 등급을 보인 반면, *RASSF1a*, *HIN-1*, *Cyclin D* 등은 ER(+), PgR(+)가 더 높게 나타났다. 그러므로 *DAPK*, *Twist* 등이 메틸화된 것으로 나타난 군에서는 *RASSF1a*, *HIN-1*, *Cyclin D*가 메틸화된 것으로 나타난 군보다 적극적인 치료와 세심한 추적관찰이 필요할 것으로 생각된다.

조직학적 분화도는 *Twist*에서 통계적 유의성을 보였다. 이러한 발견은 DNA 메틸화와 조직학적 특징의 상관관계로서 의미를 갖는다. 대장암에서 CpG 염기반복구역의 메틸화 표현형과 조직학적으로 낮은 분화도 사이에 상관관계가 있다는 사실 역시 보고된 바 있다. (23)

다른 여러 유전자들과 병리적(ER, PgR, 핵등급 등) 특징들 사이의 상관관계 또한 관찰되었으나 생물학적으로 설명하기 어려운 내용인 것들이었다. 지금까지 언급된 상관관계들은 더 큰 규모의 연구를 통해 검증되어야 한다. 또한, 메틸화가 종양의 표현형에 영향을 주는 기전이 유전자의 발현 저해에 의한 현상인지 아니면 다른 어떤 기전이 존재하는지도 장차 밝혀져야 할 일이다.

결론

대장암에서 기존의 연구결과에 따르면 빈발하는 메틸화는 나쁜 예후와 연관된 것으로 나타났다. (24) 유방암에서 이루어진 본 연구에서는 재발 및 사망의 개체수가 적은 관계로 생존과 관련하여 유의한 결과를 얻지는 못하였다. 하지만 메틸화는 생존율과 연관되어 있을 것으로 추정되며, 이는 epigenetics에 의해 서로 다른 유전자들의 발현이 저해됨에 따라 각각 예후에 다른 영향을 끼치기 때문일 것으로 생각된다. 암관련유전자들의 메틸화 여부를 가지고 예측 가능한 것으로 지금까지 보고된 것은 호르몬치료와 항암화학치료에 대한 반응이다. (25)

*DAPK*와 *Twist*가 메틸화된 군은 *RASSF1a*, *HIN-1*과 *Cyclin D*가 메틸화된 군보다 세심한 추적관찰이 필요하다고 생각된다. 또한 유전자의 메틸화는 여러 임상병리적 특징들과 연관되어 있을 것으로 추정되고 유방암의 조기발견에 기여할 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구의 결과는 지금까지 보고된 유방암에서의 유전자 메

틸화와 높은 조직학적 분화도사이의 연관관계와 일치하며, 본 연구의 결과를 가지고 명확하게 유방암의 CpG 염기반복구역의 메틸화 표현형이라는 것이 존재한다고 말하기는 어려우나 앞으로 보다 큰 규모의 후속연구를 통해 밝혀야 할 것으로 생각되는 바이다.

참고문헌

1. El-Osta A. The rise and fall of genomic methylation in cancer. *Leukemia* 2004;18:233-7.
2. Garinis GA, Patrinos GP, Spanakis NE, Menounos PG. DNA hypermethylation: when tumour suppressor genes go silent. *Hum Genet* 2002;111:115-27.
3. Szyf M, Pakneshan P, Rabbani SA. DNA methylation and breast cancer. *Biochem Pharmacol* 2004;68:1187-97.
4. Widschwendter M, Jones PA. DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene* 2002;21:5462-82.
5. Esteller M. Dormant hypermethylated tumour suppressor genes: questions and answers. *J Pathol* 2005;205:172-80.
6. van Rijnsoever M, Grieu F, Elsaleh H, Joseph D, Iacopetta B. Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands. *Gut* 2002;51:797-802.
7. Yan PS, Perry MR, Laux DE, Asare AL, Caldwell CW, Huang TH. CpG island arrays: an application toward deciphering epigenetic signatures of breast cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:1432-8.
8. Fackler MJ, McVeigh M, Evron E, Garrett E, Mehrotra J, Polyak K, et al. DNA methylation of RASSF1 α , HIN-1, RAR-beta, Cyclin D2 and Twist in situ and invasive lobular breast carcinoma. *Int J Cancer* 2003;107:970-5.
9. Lehmann U, Langer F, Feist H, Glockner S, Hasemeier B, Kreipe H. Quantitative assessment of promoter hypermethylation during breast cancer development. *Am J Pathol* 2002;160:605-12.
10. Garcia JM, Silva J, Pena C, Garcia V, Rodriguez R, Cruz MA, et al. Promoter methylation of the PTEN gene is a common molecular change in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;41:117-24.
11. Bae YK, Brown A, Garrett E, Bormann D, Fackler MJ, Sukumar S, et al. Hypermethylation in histologically distinct classes of breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:5998-6005.
12. Mason SL, Loughran O, La Thangue NB. P14(ARF) regulates E2F activity. *Oncogene* 2002;21:4220-30.
13. Enders GH, Koh J, Missero C, Rustgi AK, Harlow E. P16 inhibition of transformed and primary squamous epithelial cells. *Oncogene* 1996;12:1239-45.
14. Liu Y, Lee MO, Wang HG, Li Y, Hashimoto Y, Klaus M, et al. Retinoic acid receptor beta mediates the growth-inhibitory effect of retinoic acid by promoting apoptosis in human breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 1996;16:1138-49.
15. Sabharwal A, Middleton MR. Exploiting the role of O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) in cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 2006;6:355-63.
16. Burbee DG, Forgacs E, Zochbauer-Muller S, Shivakumar L, Fong K, Gao B, et al. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:691-9.
17. Shapiro GI. Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J Clin Oncol* 2006;24:1770-83.
18. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004;117:927-39.
19. Cohen O, Feinstein E, Kimchi A. DAP-kinase is a Ca²⁺/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. *EMBO J* 1997;16:998-1008.
20. Shigematsu H, Suzuki M, Takahashi T, Miyajima K, Toyooka S, Shivapurkar N, et al. Aberrant methylation of HIN-1 (high in normal-1) is a frequent event in many human malignancies. *Int J Cancer* 2005;113:600-4.
21. Soreide K, Janssen EA, Soiland H, Korner H, Baak JP. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg* 2006;93:395-406.
22. Asgeirsson KS, J inverted question markonasson JG, Tryggvad inverted question markottir L, Olafsd inverted question markottir K, Sigurgeirsd inverted question markottir JR, Ingvarsson S, et al. Altered expression of E-cadherin in breast cancer. Patterns, mechanisms and clinical significance. *Eur J Cancer* 2000;36:1098-106.
23. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8681-6.
24. Ward RL, Cheong K, Ku SL, Meagher A, O'Connor T, Hawkins NJ. Adverse prognostic effect of methylation in colorectal cancer is reversed by microsatellite instability. *J Clin Oncol* 2003;21:3729-36.
25. Widschwendter M, Siegmund KD, Muller HM, Fiegl H, Marth C, Muller-Holzner E, et al. Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen. *Cancer Res* 2004;64:3807-13.