

cDNA Microarray를 이용한 유방암 조직에서의 유전자 발현 분석

경북대학교 의과대학 외과학교실, ¹면역학교실

김희석 · 정진향 · 박호용 · 이영하 · 정은정¹ · 김문규¹ · 김정철¹

Gene Expression Profile Analysis of Human Breast Cancer Using cDNA Microarrays

Hee Seok Kim, M.D., Jin Hyang Jung, M.D., Ho Yong Park, M.D., Young Ha Lee, M.D., Eun Jung Chung, Ph.D.,
Moon Kyu Kim, M.D.¹ and Jung Chul Kim, M.D.¹

Departments of Surgery and ¹Immunology, Kyungpook National University College of Medicine, Daegu, Korea

Purpose: The aim of this study was to classify breast carcinomas based on variations in gene expression patterns derived from cDNA microarrays and to correlate tumor characteristics to clinical outcome.

Methods: A total of 7 pairs of breast tumors and control tissues were taken at the time of primary surgery for array analysis. Then, performed microarray experiments in breast cancer tissues with the cDNA microarray spotted 3,063 clones of genes, were analyzed by hierarchical clustering.

Results: Thirteen genes were over expressed in tumor samples regardless of their histopathological features and ER status, those were including, vitamin A responsive gene, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), and signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1). Twenty-four genes were down-regulated in tumor sites, those were including, discoidin domain receptor family member 2, crystallin alpha B, and myosin light polypeptide kinase. We also identified the differentially expressed genes between ER positive and negative tumors. PCNA, FLJ20500, STAT1, signal recognition particle 9 kD, and proteasome activator subunit 2 were more predominantly expressed in ER negatives. Serine protease 23, vitamin responsive gene, fibronectin 1, and SERPINA1 genes were more highly expressed in ER positive tumors. We further classified the patients according to their gene expression patterns with Cluster program. Clustering results divided patients into two distinct groups,

the first group consists of only estrogen receptor (ER) negative tumors and they showed more higher gene expression levels of cell replication and cycle, invasion and metastasis, those considered poor prognosis signature. The other group mostly consists of ER positive tumors.

Conclusion: These results support the feasibility and usefulness of this systematic approach to studying variation in gene expression patterns in human cancers as a means to dissect and classify solid tumors. We believe, this gene expression profile will outperform all currently available clinical parameters in predicting disease outcome. (*Journal of Korean Breast Cancer Society* 2003;6:58-67)

Key Words: Breast cancer, cDNA microarray, cDNA chip
중심 단어: 유방암, 유전자칩

서론

많은 연구에도 불구하고 유방암의 생물학적 특성은 대부분 밝혀지지 않고 있다. 림프절의 전이, 조직학적 특성, 에스트로젠 수용체(ER)나 growth factor 수용체의 존재 여부, cathepsin D와 같은 에스트로젠 유도 유전자, c-erbB2와 같은 종양유전자의 발현, p53 유전자의 돌연변이 등이 모두 예후와 관련이 있지만 이러한 개별적인 예후 인자들에 관한 지식은 유방암의 생물학적 특성을 이해하는 데 한정된 정보만을 제공한다. 또한 이들 인자들이 특정 경로에 국한되어 있을 경우, 예후 측정에 있어서의 효용성이 낮다.(1,2)

유방암은 조직학적 소견과 분자생물학적 특성이 매우 다양하다. 그리고 대부분의 악성종양이 그렇듯이 세포의 성장과 사멸, 그리고 분화를 조절하는 데 많은 유전자들이 관여하는 것을 생각할 때, 유전적 변이를 나타내는 모든 유전자를 동시에 연구하는 것은 중요하다. 최근에 유전자 칩(DNA microarray)을 이용하여 암 조직에서 수천 종의 유전자를 동시에 검사할 수 있게 되었다.(3,4) 각종 종양 조직에서 유전자 칩을 이용한 유전자 발현 검사로 얻어진 정보로 지금까지 전통적인 조직학적 방법으로는 힘들었던 종양의 여러 아형으로의 분류가 가능해졌다.(3,5)

책임저자 : 박호용, 대구시 중구 삼덕동 2가 50번지

☎ 700-721, 경북대학교병원 외과

Tel: 053-420-5605, Fax: 053-421-0510

E-mail: phy123@chollian.net, hoyong-park@hanmail.net

접수일 : 2003년 3월 5일, 게재승인일 : 2003년 5월 15일

본 논문은 제 54차 대한외과학회 추계통합학술대회에서 구연되었음.

그러한 정보는 암 환자의 치료 방법의 결정이나 예후 판정에 매우 유용하게 이용될 것이다.

현재까지는 수술 후 유방암 환자에서 보조 항암 치료와 호르몬 치료는 림프절 전이 유무와 종양의 크기를 기준으로 일반적인 과정을 거쳐서 환자에게 치료하기 때문에 환자 개개인의 종양의 특성에 대한 반응여부를 조사할 수는 없었다. 유방암의 치료에서 예후를 반영하는 인자로서 액와 림프절 전이가 중요하지만 최근에는 림프절 음성인 환자에서도 항암치료를 확대하여 시행하고 있다. 이러한 림프절 음성에서 전이와 재발을 예측할 수 있는 지표를 개발하려는 노력이 진행 중이다.(6) 또한 병기가 같은 유방암 환자라도 치료에 반응하는 것은 서로 다르고 예후 또한 다른데, 이러한 종양의 특성은 유전자 발현 정도를 알아봄으로써 치료의 결과를 미리 예측할 수 있을 것이다. 따라서 유방암 환자에 있어서 유전자 칩을 이용한 유전자 발현 검사는 각각의 종양에 대한 '분자수준의 설계도'를 그리는 것을 가능하게 하고 그 결과보다 체계적이고 세밀한 분류가 가능할 것이다.(7) 또한 유방암 환자 개개인의 종양 특성에 가장 적절한 항암치료와 호르몬 치료를 선택할 수 있을 것이다.(8,9)

본 연구는 유방암 환자의 암조직과 정상 조직에서 각각 특이적으로 나타나는 유전자 변화를 경북의대 기질세포 유전자은행에서 개발한 3,063종의 유전자가 찍혀있는 KNU3.1K 유전자 칩을 이용하여 수천 종의 유전자를 동시에 분석함으로써 기존의 예후인자와 비교하고 새로운 진단이나 치료 및 예후인자를 밝혀낼 목적으로 시행하였다.

방법

1) 유전자 칩 제작

본 실험에서는 경북대학교 기질세포 유전자은행에서 제작한 human 3K cDNA microarray를 사용하였다. 제작과정을 간략히 설명하면, 기질세포 유전자은행이 보유한 3,063종

의 cDNA 클론을 C6 amine modified T3 (5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3') primer와 C6 amine modified T7 (5'-GTAATACGACTTC ACTATAGGGC-3') primer를 이용하여 PCR한 후 sodium acetate와 ethanol을 첨가하여 PCR 산물을 침전, 건조시키고 일정량의 3×SSC에 녹였다. 이들을 Cartesian사의 PixSYS 5500 arrayer를 이용하여 amino-silane으로 코팅된 슬라이드 글래스(CMT-GAPSTM coated slides; Corning Inc.)에 print하고 succinic anhydride를 이용한 후처리 과정을 거쳐 제작하였다.

2) 유방암 조직 채취

경북대학교병원 일반외과에서 수술한 유방암 환자의 암 부위 중에서 고형화된 부위를 1~2 mm 두께로 직경 1 cm 가량 절제하여 채취하고 정상조직에서도 비슷한 양의 조직을 채취하였다. 모두 7쌍의 환자의 조직을 유전자 칩 실험에 이용하였으며 각 환자의 조직학적 특성과 에스트로겐 수용체 및 프로게스테론 수용체 발현 여부, p53, c-erbB2 단백질 발현을 Table 1에 나타내었다. 환자의 수술 후 즉시 채취한 조직은 바로 실험에 이용하거나 혹은 RNA 보관 용액(RNA laterTM, Ambion)에 저장하였다가 실험에 사용하였다.

3) RNA 추출 및 소량의 mRNA의 선형 증폭(linear amplification)

RNA의 분리는 액체질소를 이용하여 조직을 분쇄하고 TRI reagent (Sigma) 용액에 녹인 다음, chloroform을 가하여 진탕한 후 4°C에서 13,000 rpm으로 원심분리시키고 상층액을 새로운 시험관에 옮겼다. 여기에 동량의 isopropanol을 넣어 -20°C에서 RNA를 침전시켰다. 이들을 4°C에서 13,000 rpm으로 원심분리하고 pellet을 75% ethanol로 씻고 공기 중에서 건조시켜 diethylpyrocarbonate (DEPC)로 처리한 증류수에 녹였다. 분리한 RNA는 10% formamide agarose 겔에서 전기영동하여 18S와 28S ribosomal RNA

Table 1. Estrogen receptor status, histological types, tumor size and other clinical characteristics of the breast cancer cases

Sample No.	Age	Stage	ER*	PR [†]	p53	c-erbB-2	Tumor size (cm)	Lymph node	Histological type
1	57	IIB	-	+	+	++	4.5	+	IDC [‡]
2	57	IIIA	-	-	++++	+++	6	+	IDC
3	45	IIIA	-	+++	+	+++	6.5	+	IDC
4	44	IIIA	++++	+++	+++	++++	5.5	+	IDC
5	28	IIA	+	-	+++	++	4	-	IDC
6	28	IIA	+++	++	++	++	2.2	-	Mucinous carcinoma
7	47	IIIA	++	++	+++	++++	5.5	+	IDC

*ER = estrogen receptor; [†] PR = progesteron receptor; [‡] IDC = invasive ductal carcinoma.

band를 확인하였다. 분리한 total RNA로부터 oligotex mRNA midi kit (Qiagen)를 이용하여 mRNA를 분리하고 UV spectrophotometer (DU530, Beckman)로 정량하였다.

유전자 칩 실험에 필요한 만큼의 충분한 양의 mRNA를 얻기 위해 Ampliscribe T7 Transcription Kit (Epicentre)를 사용하여 in vitro transcription을 통한 RNA 선형증폭 하였다. mRNA로부터 이중가닥 cDNA를 합성하기 위해, mRNA에 T7-Oligo (dT) primer를 섞고 70°C에서 10분 동안 가열한 후, first strand buffer, DTT, dNTP, Superscript II reverse transcriptase를 첨가하여 42°C에서 1시간 동안 반응하였다. 이 반응액에 second strand buffer, dNTP, E. coli DNA ligase, E. coli DNA polymerase, E. coli RNase H 등을 섞고 16°C에서 2시간 동안 반응한 후, T4 DNA polymerase를 넣고 16°C에서 5분 더 반응시켜 이중가닥 cDNA를 합성하였다. Phenol 추출법으로 단백질을 제거하고 ammonium acetate와 100% ethanol을 첨가하여 -20°C에서 이중가닥 cDNA를 침전시키고, 침전된 pellet을 75% ethanol로 씻고 말린 후, DEPC 처리된 증류수에 녹였다. cDNA에 T7 specific promoter, T7 reaction buffer, ATP, CTP, GTP, UTP, DTT와 T7 RNA polymerase를 섞고 37°C에서 2시간 30분 동안 반응하였다. TRI reagent (Sigma)를 이용해 위 반응액으로부터 RNA를 분리하여 증폭된 aRNA를 획득하였다.

4) 형광 cDNA probe 제작

cDNA probe는 DeRisi 등(5)이 기술한 방법을 토대로 제작하였다. aRNA 4μg에 oligo-dT, Superscript II reverse transcriptase, fluorescent nucleotides (Cy5-dUTP : 암조직 mRNA, Cy3-dUTP : 정상 조직 mRNA) 등을 가하여 역전사시킨 후 1.5 M sodium hydroxide 1μl와 30 mM EDTA 1μl를 넣어 65°C에서 10분간 처리하여 반응을 중지시켰다. Cy3-, Cy5-probe 각각을 Microcon 30 (Millipore)을 사용해 농축시킨 후, 두 가지 probe를 함께 섞고, 3×SSC, 0.1% SDS, 0.5 mg/ml yeast tRNA, 0.5 mg/ml poly A blocker를 첨가하였다.

5) Microarray hybridization

Human 3.1K chip slide를 10 mg/ml BSA, 3.5×SSC, 0.1% SDS 용액에 넣어 50°C에서 20분간 pre-hybridization한 후 증류수, isopropanol의 순서로 행구고 500 rpm에서 5분간 원심 분리하여 slide를 건조시켰다.

준비된 probe를 99°C에서 2분간 끓이고 잠시 원심 분리하여 human 3.1K chip slide에 점적하고, cover glass를 덮어 hybridization cassette (Corning Inc.)에 넣어 50°C에서 16~20시간 hybridization하였다. Hybridization 후 slide를 상온에서 0.1×SSC/0.1% SDS에 한 번, 0.1×SSC에 두 번 수세하고 역시 500 rpm에서 5분간 원심 분리하여 slide를 건조시켰다.

6) Scanning과 분석

Laser confocal scanner (Scanarray 4,000, GSI Lumonics)를 사용하여 각 유전자 spot으로부터 발현되는, Cy3의 녹색 형광과 Cy5의 적색 형광을 각각 scanning하고 이로부터 얻어진 영상을 Quantarray software (GSI lumonics)를 이용하여 두 이미지를 합성하고 분석하여 각 유전자마다 절대적 발현 정도와 유방암 조직과 정상 조직에서의 상대적 발현비율(Cy5/Cy3 비, red와 green의 intensity비)을 측정하였다.

7) Clustering과 분석

유전자 칩에서 얻어진 결과를 이용하여 유전자 발현의 유사성에 따라 비슷한 유전자 발현 양상을 보이는 환자군끼리 묶어서 각 그룹간의 특성을 알아보기 위하여 Cluster와 Tree View programs을 사용하였다.(10) 본 실험에서는 주로 여러 가지 알고리즘 중에서 hierarchical clustering 방법을 average-linkage method를 사용하여 clustering하였다.

결 과

유방암 조직에서 특이적으로 발현되는 유전자를 발굴하기 위한 목적으로, 경북대학교병원 일반외과에서 유방암 수술 시에 얻어진 조직을 이용하여 KNU human 3.1K 유전자 칩으로 암조직과 정상조직 간에 발현되는 유전자를 비교하였다. 본 실험에 이용한 7명의 유방암 조직에서 면역조직화학적 염색방법으로 에스트로겐 호르몬 수용체, 프로게스테론 호르몬 수용체, p53, c-erbB2 단백질을 발현을 검사하였고 발현정도에 따라 음성(-)에서 양성(1+~4+)으로 분류하였다. 에스트로겐 호르몬 수용체 중에서 3명은 ER 음성이었고, 4명은 ER 양성이었다(Table 1).

실험에 이용한 정상 혹은 암조직의 양은 약 0.1~0.5 g 정도였으며 얻어진 total RNA의 양은 3~20μg이었다. total RNA는 반드시 formamide 겔에서 전기영동하여 28S와 18S ribosomal RNA가 파괴되지 않았는지를 확인한 후에 실험에 이용하였다. 조직에서 얻어진 total RNA의 양이 유전자 칩 실험에 바로 이용하기에 충분하지 않아 T7 RNA polymerase를 이용하는 선형 RNA 증폭법으로 일 회 증폭하여 실험에 이용하였다. RNA 증폭에는 가능하면 5μg 이상의 total RNA를 이용하였으며 일 회 증폭으로 100배 정도의 RNA를 증폭할 수 있었다. 유전자 칩 hybridization을 위한 cDNA probe 제작 시에 정상 조직에서 분리된 RNA에는 Cy3-dUTP (녹색형광)를 그리고 암조직에서 분리된 RNA에는 Cy5-dUTP (적색형광)로 표식자를 결합시켰다.

유전자 칩 hybridization 후 Scanarray 4,000 스캐너로 각 유전자 spot에서 발현되는 Cy3와 Cy5 형광의 양을 읽어

들인 후 Quantarray software로 영상을 분석하여 3,063 유전자 중에서 암조직이나 정상조직에서 서로 특이적 발현된 유전자를 분석하였다. 암조직과 정상조직의 형광의 발현 정도가 2배 이상(Cy5/Cy3 혹은 Cy3/Cy5의 비) 차이나는 유전자를 유의하게 증가하거나 감소한 것으로 판정하였다. Fig. 1에서는 환자 1에서 얻어진 영상자료를 나타내었다. 전체 3,063 유전자 spots은 16개의 구역으로 나뉘어 있고 각 구역은 다시 가로 세로 각 14개씩의 유전자로 구성되어 있음을 알 수 있다(Fig. 1A). 각 유전자 spot은 조직에서 발현되는 정도에 따라 더 진하거나 흐린 점으로 표시된다. 암조직보다 정상조직에서 더 많이 발현되는 유전자는 녹색으로 반대로 암조직에서 더 많이 발현되는 유전자는 적색으로 표시되었다(Fig. 1B). Scatter plot 그래프에서는 전체 유전자를 가로축은 Cy3의 발현강도와 세로축은 Cy5의 발현강도에 따라 각각을 하나의 점으로 표시한 것으로 Cy5/Cy3 비가 2배 이상 차이나는 것은 적색점으로

표시되었다(Fig. 1C).

전체 7명의 환자의 유전자 칩 실험결과를 Cluter와 Tree-View 프로그램을 이용하여 유전자 발현 패턴에 따라 분류하여 보았다(Fig. 2). 전체 3,063 유전자 중에서 발현의 강도가 미약한 유전자를 제외한 2,119 유전자 spots을 각각 Cy5/Cy3 비에 따라 그 비가 1 이상(암조직에서 더 많이 발현된 유전자)인 유전자는 적색으로 그 비가 1 이하(암조직에서 발현이 감소된 유전자)인 유전자는 녹색으로 하여 7명의 환자에서 얻어진 결과를 하나의 그림에 표시하였다(Fig. 2). 유전자 발현 패턴에 따른 clustering 결과 1과 2 환자군과 3~7 환자군으로 크게 두 개의 그룹으로 구분할 수 있었는데, 1~3번 환자는 ER 음성이고 4~7 환자는 ER 양성인 것과 비교하면 3번 환자를 제외하면 크게 ER 양성군과 음성군으로 구분되었다.

정상조직에 비하여 암조직에서 7예 중 최소 3예에서 2배 이상 증가한 유전자는 Vitamin A responsive gene, pro-

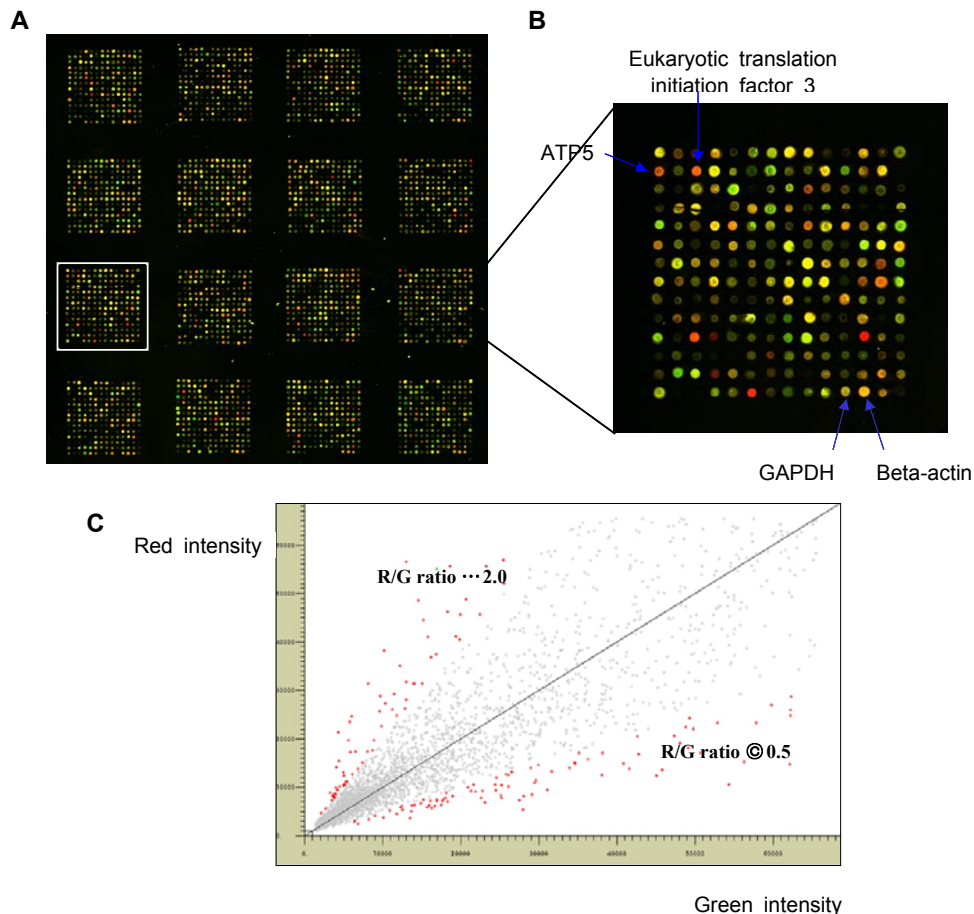


Fig. 1. (A) Differential gene expression screened with the use of cDNA microarrays. KNU human 3.1K cDNA chips were hybridized with cDNA probes those were isolated from corresponding normal and cancer tissues. (B) Insets are magnified view of part of the array image. Some genes (green and red spots) are differentially expressed in normal and cancer tissues, respectively. (C) Scatter plots of cDNA microarray result.

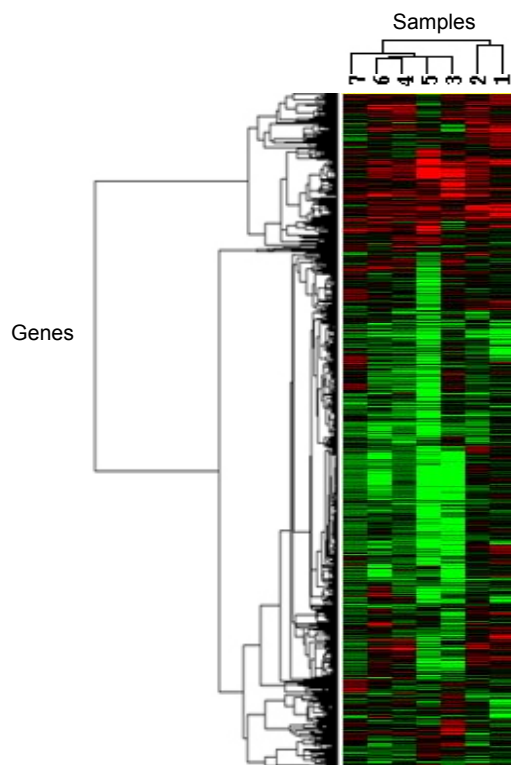


Fig. 2. Gene expression patterns of 7 patients with breast cancer analyzed by hierarchical clustering. There were 2,119 genes those were consistently expressed in 80% of samples. Each column represents tumors and each row a single gene. The red block indicates up regulation, green down regulation, black no change, and grey no data available. The tumor specimens were divided into two (three) subtypes based on similarities and differences in their gene expression.

liferating cell nuclear antigen (PCNA), signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) 등을 포함하는 13종이었다(Cy5/Cy3 비의 평균이 2 이상인 것) (Table 2). 암조직에서 감소한 유전자는 discoidin domain receptor family member 2, crystallin alpha B, myosin light polypeptide kinase 등을 포함하는 24종이었다(Cy5/Cy3 비의 평균이 최소 3에서 0.5 이하인 것) (Table 3). 또한 암조직 내의 ER 발현 여부에 따라 서로 다른 발현 양상을 보이는 유전자를 구분할 수 있었다. Lactate dehydrogenase B, PCNA, FLJ20500, STAT1, signal recognition particle 9 kD, proteasome activator subunit 2 등은 ER 음성인 종양에서 그리고 serine protease 23, vitamin responsive gene, fibronectin 1, SERPINA 1, angiotensin receptor 1 등은 ER 양성인 종양에서 각각 더 많이 발현되었다(Table 4).

고 찰

유전자 칩을 이용한 유전자 발현 패턴 분석 실험 결과로 백혈병이나 임파종양에서 지금까지 가능하지 않았던 분자 수준에서의 분류가 가능해졌다.(3) 유방암 연구에서도 최근에 유전자 칩을 이용하여 조직학적 혹은 ER 발현 여부에 따른 유전자 발현 변화를 분석한 많은 결과들이 발표되고 있다.(11) 유방암의 병리조직학적 차이에 따른 유전자 칩을 이용한 유전자 발현의 차이에 대한 연구를 Li 등(12)이 발표하였는데, 침윤성 유방암(invasive ductal carcinoma)에 비하여 114개의 서로 다른 유전자가 관내 유두암(DCIS)에서 발현되었는데 주로 wnt-signaling, extra-cellular matrix, stromal protease, adhesion-related genes 등으로 관내 유두암에서 침윤성 유방암으로의 진행과 관련이 있다고 하여 'invasion-related genes'이라고 발표하였다. 이렇게 다른 차이를 보인 유전자를 대상으로 하여 RT-PCR을 이용한 정량분석, 면역조직학적 방법, tissue arrays 등으로 분석하는 연구가 진행 중이다. Van't Veer 등(13)은 유방암 수술 후 5년 이내에 재발한 유방암 환자와 재발이 없는 환자들을 대상으로 하여 cDNA microarray를 통한 유전자 발현 연구에서 cell cycle, mitosis, invasion, angiogenesis, signaling 등에 관여하는 유전자들이 재발된 예에서 유의하게 차이가 있어 이들을 prognosis reporter genes이라고 명하였다. 기존의 예후인자들이 odd ratio가 2~6배 정도 예측한다면 이 유전자의 발현 정도는 94%의 민감도를 보이며 15배 정도의 odd ratio를 보여 주었다. 51세 이하, 림프절 음성인 유방암 환자의 5년 내 재발 정도를 기존의 자료로는 20% 정도에서 예측할 수 있지만 이 유전자들 중 poor prognosis profile을 보인 경우는 60~70%, good prognosis profile을 보인 경우는 8~10%가 5년 내 재발한다고 하여 상당히 정확하게 재발을 예측할 수 있었다고 보고하였다.

본 연구에서는 7명의 유방암 환자의 조직에서 3,063 종의 유전자를 대상으로 특이발현 유전자를 검색하였다. 본 실험에서 ER 발현 여부에 관계없이 정상조직에 비해 암조직에서 발현이 2배 이상 증가한 유전자는 13종이었다. 그중 proliferating cell nuclear antigen (PCNA), high-mobility group protein 2 (HMG2), 14-3-3 zeta, signal recognition particle 9 kD, eukaryotic translation initiation factor 3 등은 세포 분열이나 DNA 복제 그리고 단백질 생성에 직접적으로 관여하는 유전자들로 이미 유방암 조직뿐 아니라 다른 암종에서도 증가됨이 보고된 바 있다. 세포의 구조나 세포의 기질 유전자 중에서 암조직에서 증가된 것은 vitamin A responsive cytoskeleton related (JWA), fibronectin 1, beta actin, cytoskeletal tropomyosin 등이다.

Vitamin A responsive cytoskeleton related gene은 최근에

Table 2. Over expressed genes in breast cancer tissue compared to control

GeneBank ID.	Identification	No of breast tissue (R/G ratio ≥ 2)	Mean
NM_006407	Vitamin A responsive; cytoskeleton related (JWA)	5	3.7
NM_002592	Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	3	2.7
NM_007315	Signal transducer and activator of transcription 1	4	2.5
NM_002026	Fibronectin 1 transcript variant 1	3	2.5
NM_002129	High-mobility group protein 2	4	2.4
NM_003133	Signal recognition particle 9 kD	3	2.3
NM_003406	14-3-3, zeta	3	2.2
NM_001101	Actin, beta	3	2.1
NM_000291	Phosphoglycerate kinase 1	3	2.1
NM_005252	FOS	5	2.0
NM_006475	Osteoblast specific factor 2	4	2.0
NM_003752	Eukaryotic translation initiation factor 3	4	2.0
NM_004494	Hepatoma-derived growth factor	3	1.9
X04588	Cytoskeletal tropomyosin TM30 (nm)	3	1.9
NM_003564	Transgelin 2 (TAGLN2)	3	1.8
NM_021130	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	3	1.8
NM_002856	PRR2 (polio virus receptor protein)	3	1.8
	K1818-5	4	3.8
	B0039-5	3	2.8
	Tramnsmembrane trafficking protein (TMP21)	3	2.0

클로닝된 유전자로 아직 그 기능이 잘 알려져 있지 않고 쥐에서 세포의 분화를 조절한다고 알려진 정도인데, 많은 비타민 A 유도체가 유방암 세포의 증식을 조절할 수 있는 점을 생각할 때 이 유전자가 유방암 세포의 증식과 분화에 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다.(14)

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)은 조직 내 세포 분열의 정도를 잘 반영하는 유전자인데, 유방암에서 중요한 예후인자의 하나로서 암조직에서 PCNA 발현이 높고 ER 음성일수록 예후가 나쁜 것으로 알려져 있다.(15) 본 연구에서도 PCNA 발현이 특히 많이 증가한 군과 그렇지 않은 군을 구분하여 예후를 비교하여 볼 필요가 있을 것이다.

유방암에서 STAT family 단백질의 역할은 매우 복잡한데 여러 종류의 STAT 단백질이 관여하고 있다. Watson과 Miller 등(16)은 유방암 세포의 핵 추출물에서 높게 발현되고 있음을 보고하였고, 본 연구에서도 STAT1이 유방암 조직에서 공통적으로 높게 발현됨을 알 수 있었다.

암세포나 주변의 기질세포에서 발현되는 fibronectin은 암세포의 전이과정에 중요한 역할을 하는데 기질내 fibronectin의 발현이 많은 암조직에서 암세포의 전이가 비교적 낮은 반면 fibronectin의 양이 적은 조직에서는 전이가 더

잘 일어난다고 한다.(17) 본 연구에서 fibronectin 발현이 비교적 낮은 암조직은 세포분열 척도인 PCNA가 오히려 높고 ER 음성인 것으로 보아 이들 암세포는 세포분열도 빠르고 전이도 잘 일어나며 호르몬 억제제에도 잘 반응하지 않을 것으로 생각된다.

Signal recognition particle (SRP)와 eukaryotic translation initiation factor 3는 단백질 합성에 관여하는 것들로 암세포에서 빠른 세포분열과 대사과정에 많은 새로운 단백질의 합성이 요구되어 증가한 것으로 생각된다.(18)

14-3-3은 단백질의 인산화 과정을 도와주는 역할을 함으로 여러 종류의 대사작용이나 신호전달에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 유방암 조직에서는 14-3-3 sigma가 감소되어 있다고 보고되어 있는데,(19) 본 연구에서 14-3-3 zeta는 오히려 암조직에서 발현이 증가되어 있음을 알 수 있었다.

Osteoblast specific factor 2 (OSF-2, periostin)은 곤충에서 알려진 adhesion molecule인 fasciclin I과 유사한 단백질로 non small cell 폐암 등에서 발현이 증가하며,(20) 혈중 OSF-2의 농도가 높을수록 예후가 나쁜 것으로 알려졌다. 유방암에서의 발현 여부는 아직 알려져 있지 않은데 본 실험에서는 ER 음성 암조직에서 ER 양성보다 더 높은 발현

Table 3. Down regulated genes in breast cancer tissue compared to control

GenBank ID.	Identification	No of breast tissue (R/G ratio ≤ 0.5)	Mean
NM_006182	Discoidin domain receptor family, member 2	4	0.4
NM_001885	Crystallin, alpha B	5	0.4
NM_005965	Myosin, light polypeptide kinase (MYLK)	6	0.4
NM_000552	Von Willebrand factor (VWF)	5	0.5
NM_002135	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	4	0.5
NM_006472	Upregulated by 1,25-dihydroxyvitamin D-3 (VDUP1)	4	0.5
NM_053032	Myosin, light polypeptide kinase (MYLK)	3	0.5
NM_002015	Forkhead box O1A (rhabdomyosarcoma)	4	0.5
NM_005655	TGFB inducible early growth response (TIEG)	4	0.5
NM_016441	Cysteine-rich motor neuron 1	4	0.5
NM_004657	Serum deprivation response	3	0.5
NM_030808	LIS1-interacting protein NUDEL	4	0.5
NM_002023	Fibromodulin (FMOD)	4	0.5
NM_001753	Caveolin 1, caveolae protein, 22kD (CAV1)	4	0.5
NM_002293	Laminin, gamma 1 (formerly LAMB2) (LAMC1)	3	0.5
	M3534-5	5	0.4
	B0384-5	6	0.4
	P1881-5	5	0.4
	P0670-5	5	0.5
	M2007-5	5	0.5
	M1184-5	3	0.5
	B0814-5	5	0.5
	B0013-5	5	0.5
	P2484-5	3	0.5

Table 4. Differentially expressed genes between ER(-) and ER(+) breast cancers

GenBank ID.	Identification	Patients No. and ER status								Mean ratio	
		1(-)	2(-)	3(-)	4(+)	5(+)	6(+)	7(+)	ER(-)	ER(+)	
Predominantly expressed genes in ER(-) tumors											
NM_002592	Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	6.0	5.1	1.5	1.6	2.2	1.8	1.0	4.2	1.7	
NM_019058	Hypothetical protein FLJ20500	3.7	3.1	1.0	0.3	1.5	0.7	0.6	2.6	0.8	
NM_007315	Signal transducer and activator of transcription 1	5.2	4.3	1.0	2.0	1.7	2.6	1.0	3.5	1.8	
NM_003133	Signal recognition particle 9 kD	5.1	2.2	1.8	2.5	1.2	1.8	1.4	3.0	1.7	
NM_002818	Proteasome activator subunit 2	1.8	2.0	2.9	1.2	1.1	1.1	1.2	2.2	1.2	
Predominantly expressed genes in ER (+) tumors											
NM_007173	Protease, serine, 23 (SPUVE)	0.9	1.0	0.7	4.7	1.0	6.7	1.2	0.9	3.4	
NM_006407	Vitamin A responsive; cytoskeleton related (JWA)	1.2	3.4	3.2	3.5	2.2	11.2	1.5	2.6	4.6	
NM_002026	Fibronectin 1	0.9	1.5	1.0	2.8	1.8	6.8	1.0	1.1	3.1	
NM_000295	Alpha-1-antichymotrypsin precursor (SERPINA1)	0.9	0.8	1.1	1.1	1.0	3.8	3.2	0.9	2.3	

경향을 보였다.

세포의 신호전달계에서 immediate early gene에 해당하는 activating protein-1 (AP-1) 복합체를 형성하는 c-jun과 c-fos 단백질은 유방암 조직에서 증가되어 있으며 이들이 높게 발현되는 암은 전이도 빠르고 예후가 나쁜 것으로 알려졌다.(21) c-fos는 ETS-domain family 전사인자인 Elk-1에 의해 활성이 조절되며 Elk-1은 BRCA-1과 직접적으로 결합하여 활성이 조절 받는다.(22) 따라서 c-fos의 증가는 간접적으로 BRCA-1 자체의 이상이나 다른 원인으로 그 하부 과정의 조절이 제대로 일어나지 않고 있음을 알 수 있다.

유방암조직에서 발현이 감소한 유전자는 discoidin domain receptor family member 2, crystallin alpha B, myosin light polypeptide kinase 등을 포함하는 24종이었다(Table 3).

Crystallin alpha B는 안구 내 렌즈 단백질의 주성분 중 하나이고 small heat shock proteins과 유사하다. Crystallin alpha B는 glucocorticoid 호르몬에 의해 활성화되는데 비슷한 구조인 small heat shock protein Hsp27이 유방암에서 증가된 반면 crystallin alpha B는 오히려 발현이 되지 않는다고 한다.(23) 이러한 결과는 본 실험에서도 유사하게 암조직에서 발현이 감소되어 있었다.

von Willebrand factor (vWF)는 혈소판이 지혈과정에 혈관내피세포에 부착되는 데 관여하는 단백질로 유방암 환자의 혈중 농도는 암의 진행에 따라 증가되어 있으나 조직 내에서는 오히려 거의 발현되지 않는다고 한다.(24) 본 실험에서도 vWF는 암조직에서 감소하였다.

TGF-beta inducible early growth response gene (TIEG)은 정상 유방 상피세포에서는 강하게 발현되지만 침윤성 암에서는 거의 10분의 1 이하로 발현이 급격히 감소한다고 보고되었다.(25) TIEG는 암억제 유전자의 하나로, apoptosis나 cell cycle 조절 등의 기능을 가질 것으로 추측하고 있다. 본 실험에서도 ER 발현 여부와 상관없이 암조직에서 발현이 매우 감소하였다.

유전자 칩 실험결과를 유전자 발현 패턴에 따라 clustering하여 환자를 소그룹으로 분류해 보았다(Fig. 2). 그 결과 1과 2 환자군과 3~7 환자군으로 크게 두 개의 그룹으로 구분할 수 있었는데, 1~3번 환자는 ER 음성이고 4~7 환자는 ER 양성인 것과 비교하면 3번 환자를 제외하면 크게 ER 양성군과 음성군으로 구분할 수 있었던 것 같다. Clustering 결과 그림에서 암조직에서 과발현되거나 감소한 유전자군은 뚜렷하게 구분할 수 있었으나, ER 양성군과 음성군에 따른 발현 차이에 의한 유전자군은 뚜렷하게 구분되지 않았다. 이는 ER 발현 정도에 따른 변화하는 유전자의 수가 그렇게 많지 않았기 때문인 것으로 생각된다.

유방암 조직에서 ER 발현 양상은 중요한 예후 추정뿐만 아니라 tamoxifen과 같은 항에스트로젠 치료에 반응여부를 결정하는 중요한 인자이다.(26) 최근 유전자 칩을 이용

한 유방암 연구에서도 ER 발현 양상에 따른 유전자 발현 연구가 매우 활발하게 진행되고 있는데,(2) 이들 연구 결과에서 estrogen receptor 1, trefoil factor 3, GATA-binding protein 3, S100 calcium-binding protein A8, insulin-like growth factor binding protein 2, cyclin D1, lactate dehydrogenase B, cytochrome P450 subfamily IIB, insulin-like growth factor, stanniocalcin 2 등(2)이 ER 발현 여부를 결정할 수 있는 유전자로 보고하고 있다. 본 실험에 이용한 유전자 칩에서는 estrogen receptor 1, trefoil factor 3, GATA-binding protein 3 등 ER 발현 여부를 가장 잘 구분할 수 있는 유전자가 포함되지 않아서 그들 결과와 일치하는지 알아보지 못한 것이 본 연구에서 부족한 점이였다. 또한 lactate dehydrogenase B는 본 실험결과와 일치하였지만, IGFBP-2 (ER-/ER+=1/0.87), cyclin D1 (ER-/ER+=0.9/1.4), stanniocalcin (ER-/ER+=1/1.6) 등도 본 연구에서는 ER 발현 양상에 따라 아주 뚜렷한 차이를 보이지는 못했다. 본 연구에서 ER 발현 양상에 따라 뚜렷하게 서로 다른 발현 양상을 보이는 유전자는 PCNA, FLJ20500, STAT1, signal recognition particle 9 kD, proteasome activator subunit 2 등은 ER 음성인 종양에서 그리고 serine protease 23, vitamin A responsive gene, fibronectin 1, SERPINA1 등은 ER 양성인 종양에서 각각 더 많이 발현되었다(Table 4). ER 음성 암조직에서 더 많이 발현된 유전자인 PCNA와 STAT1 등은 세포 분열과 신호전달에 주로 작용하는 것으로 상대적으로 더 빠른 세포 분열과 전이에 관여할 것으로 생각됨으로 ER 음성인 유방암이 ER 양성보다 예후가 나쁜 것을 설명할 수 있는 증거가 될 수 있을 것이다. ER 양성에서 더 많이 발현된 유전자들의 역할은 좀 더 연구해 보아야 할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 유방암 조직에서 특이적으로 발현되는 유전자를 유전자 칩을 이용하여 발굴하여 이들 유전자가 진단이나 예후인자 또는 치료제의 개발에 이용될 수 있을지를 알아보았다. 본 실험에 포함된 환자의 수가 비교적 적고 estrogen receptor나 BRCA1, BRCA2, Her2/Neu 등의 기존 알려진 유방암 예후인자가 포함되지 않은 점이 부족하였으며, 본 연구결과 발견된 유방암조직에서 특이발현된 유전자들이 암발생 과정이나 진단 혹은 예후 판정에의 이용성에 관한 기능연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

결론

유전자 칩(DNA microarray)을 이용하여 수천 종의 유전자를 동시에 검사할 수 있게 되었으며 이를 이용하여 각종 종양 조직에서 지금까지 전통적인 조직학적 방법으로는 힘들었던 종양을 그 유전자 발현 패턴에 따라 여러 아형으로 분류가 가능해졌다. 본 연구는 유방암 환자의 암조직과 정상 조직에서 각각 특이적으로 나타나는 유전자

변화를 3,063종의 유전자가 찍혀있는 유전자 칩을 이용하여 분석함으로써 기존의 예후인자와 비교하고 새로운 진단이나 치료 및 예후인자를 밝혀낼 목적으로 시행하였다.

7명의 유방암 조직과 정상조직에서 RNA를 분리하여 일회 증폭한 다음 각각 다른 형광표식자를 결합시켰다. 유전자 칩 hybridization 후 confocal laser scanner로 형광의 양을 읽어 들인 후 영상분석 프로그램으로 분석하였다.

전체 7명의 환자의 유전자 칩 실험결과를 clustering한 결과 유전자 발현 패턴에 따라 두 개의 그룹으로 구분할 수 있었으며 이들은 대부분 에스트로젠 수용체(ER) 발현 여부에 따라 구분될 수 있었다. 암조직에서 발현이 증가된 유전자는 vitamin A responsive gene, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) 등을 포함하는 13종이었고, 암조직에서 발현이 감소한 유전자는 discoidin domain receptor family member 2, crystallin alpha B, myosin light polypeptide kinase 등을 포함하는 24종이었다. 암조직 내의 ER 발현 여부에 따라 서로 다른 발현 양상을 보이는 유전자는, PCNA, FLJ20500, STAT1, signal recognition particle 9 kD, proteasome activator subunit 2 등이 ER 음성인 종양에서, 그리고 serine protease 23, vitamin responsive gene, fibronectin 1, SERPINA1, angiotensin receptor 1 등은 ER 양성인 종양에서 각각 더 많이 발현되었다.

본 연구에 포함된 환자의 수가 비교적 적어 유의한 차이를 발견하는 데 어려운 점이 있었으나 본 연구결과로 유방암 환자의 진단이나 예후 판정 인자로 이용될 수 있는 충분한 결과를 확보할 수 있었다고 생각된다.

REFERENCES

- 1) Torregrosa D, Bolufer P, Lluch A, Lopez JA, Barragan E, Ruiz A, et al. Prognostic significance of c-erbB-2/neu amplification and epidermal growth factor receptor (EGFR) in primary breast cancer and their relation to estradiol receptor (ER) status. *Clin Chim Acta* 1997;262:99-119.
- 2) Vollenweider-Zerargui L, Barrelet L, Wong Y, Lemarchand-Beraud T, Gomez F. The predictive value of estrogen and progesterone receptors' concentrations on the clinical behavior of breast cancer in women. Clinical correlation on 547 patients. *Cancer* 1986;57:1171-80.
- 3) Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503-11.
- 4) Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R, et al. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* 2001;344:539-48.
- 5) DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 1996;14:457-60.
- 6) Immaneni A, Tsimeizon A, Hilsenbeck SG, et al. Genetic profiles of risk of recurrence in node-negative breast cancers. 24th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, 564 Scientific Poster Presentations, December, 2001
- 7) Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747-52.
- 8) Sotiriou C, Neo SY, Mcshane L, et al. cDNA microarray gene expression profiles as a potential prognostic and predictive tool for an improved management of breast cancer, 3rd European Breast Cancer Conference, 460 Proffered paper presentation, March 23, 2002.
- 9) Van De Velde CJH, Van De Hage JA, et al. Pre-versus post-operative systemic treatment in operable disease, 3rd European Breast Cancer Conference, Primary systemic therapy symposium, March 22, 2002.
- 10) Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14863-68.
- 11) Gruvberger S, Ringner M, Chen Y, Panavally S, Saal LH, Borg A, et al. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer Res* 2001;61:5979-84.
- 12) Li Z, Tsimelzon A, Immaneni A, et al. DCIS versus IBC: A cDNA microarray study, 3rd European Breast Cancer Conference, 294 Proffered paper presentation, March 21, 2002.
- 13) Van't Veer LJ, Dai H, Van De Vijver MJ, et al. Microarray expression profiling in breast cancer tailors optimal treatment, 3rd European Breast Cancer Conference, molecular biology symposium, March 22, 2002.
- 14) Okamoto K, Andreola F, Chiantore MV, Dedrick RL, De Luca LM. Differences in uptake and metabolism of retinoic acid between estrogen receptor-positive and -negative human breast cancer cells. *Cancer Chemother* 2000;46:128-34.
- 15) Takashima T, Onoda N, Ishikawa T, Ogawa Y, Kato Y, Fujimoto Y, et al. Prognostic value of combined analysis of estrogen receptor status and cellular proliferative activity in breast cancer patients with extensive lymph node metastases. *Oncol Rep* 2002;9:589-94
- 16) Watson CJ, Miller WR. Elevated levels of members of the STAT family of transcription factors in breast carcinoma nuclear extracts. *Br J Cancer* 1995;71:840-4.
- 17) Werbajh SE, Urtreger AJ, Puricelli Li, de Lustig ES, Bal de Kier, Joffe E, et al. Downregulation of fibronectin transcription in highly metastatic adenocarcinoma cells. *FEBS Lett* 1988; 440:277-81.
- 18) Gorodkin J, Knudsen B, Zwieb C, Samuelsson T. SRPDB (Signal Recognition Particle Database). *Nucleic Acids Res* 2001;29:169-70.
- 19) Vercoutter-Edouart AS, Lemoine J, Le Bourhis X, Louis H, Boily B, Nurcombe V, et al. Proteomic Analysis reveals that 14-3-3 sigma is down-regulated in human breast cancer cells.

- Cancer Res 2001;61:76-80.
- 20) Sasaki H, Auclair D, Fukai I, Kiriya Y, Fujii Y, Chen LB. Serum level of the periostin, a homologue of an insect cell adhesion molecule, as a prognostic marker in nonsmall cell lung carcinoma. Cancer 2001;92:843-8.
- 21) Gee JM, Barroso AF, Ellis IO, Robertson JF, Nicholson RI. Biological and clinical association of c-jun activation in human breast cancer. Int J Cancer 2000;89:177-86.
- 22) Chai Y, Chiptsyna G, Cui J, Liao B, Liu S, Aysola K, et al. c-Fos oncogene regulator ELK-1 interacts with BRCA1 splice variants BRCA1a/1b and enhances BRCA1a/1b-mediated growth suppression in breast cancer cells. Oncogene 2001;20:1357-67.
- 23) Klemenz R, Scheier B, Muller A, Steiger R, Aoyama A. Alpha B crystallin expression in response to hormone, oncogenes and stress. Verh Dtsch Ges Pathol 1994;78:34-5.
- 24) Teo NB, Shoker BS, Jarvis C, Martin L, Sloane JP, Holcombe C. Vascular density and phenotype around ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast. Br J Cancer 2002;86:905-11.
- 25) Subramaniam M, Hefferan TE, Tau K, Peus D, Pittelkow M, Jalal S, et al. Tissue, cell type, and breast cancer stage-specific expression of a TGF-beta inducible early transcription factor gene. J Cell Biochem 1998;68:226-36.
- 26) Osborne CK. Steroid hormone receptors in breast cancer management. Breast Cancer Res Treat 1998;51:227-38.