

난소암에서 종양억제유전자들의 Multiple Methylator Phenotypes

계명대학교 의과대학 산부인과학교실

류효충 · 조치흠 · 권상훈 · 박준철 · 서민애 · 정선옥 · 이정호 · 김종인 · 윤성도 · 차순도

Multiple Methylator Phenotypes Involving Tumor Suppressor Genes in Ovarian Cancers

Hyo Chung Ryu, M.D., Chi Heum Cho, M.D., Sang Hoon Kwon, M.D.,
Joon Cheol Park, M.D., Min Ae Seo, M.D., Sun Wok Chung, M.D., Jeong Ho Rhee, M.D.,
Jong In Kim, M.D., Sung Do Yoon, M.D., Soon Do Cha, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology School of Medicine, Keimyung University, Daegu, Korea

Objective : Recent evidence suggests that aberrant methylation of CpG islands is a major pathway leading to the inactivation of tumor suppressor genes and development of cancer. The purpose of this study was to detect the methylation in ovarian cancer.

Methods : Recent studies on colorectal and breast cancer have defined a CpG island methylator phenotype, which involves the targeting of multiple genes by promotor hypermethylation. Little is currently known about the role of methylation in ovarian cancer. To detect the methylation in ovarian cancer, we have investigated the methylation status of 13 primary ovarian cancers at six genes using methylation specific polymerase chain reaction compared with 7 normal ovaries.

Results : Six of tumor suppressor genes (*p15*, *p16*, *p21*, *p73*, *BRCA1*, and *hMLH1*) were evaluated to see the methylation status. Methylation of *p15*, *p21*, *p73*, and *hMLH1* did not detect in ovarian cancers compared with normal ovaries. Ten of 13 ovarian cancers showed methylation of *p16* gene and all normal ovaries showed hypermethylation. The *BRCA1* gene was methylated in 11 (85%) of 13 ovarian cancers, 4 (57%) of 7 normal ovaries.

Conclusion : Methylation of the *BRCA1* gene is common alteration in ovarian cancers, and may play a part of role in pathogenesis of ovarian cancer.

Key Words : Ovarian cancer, Multiple methylator phenotype

서 론

난소암은 “Silent killer”라고 불리울 만큼 조기진단이 어렵고 또한 사망률이 높은 여성 생식기 암중의 하나이다. 우리나라에서는 여성 생식기 암중에서 자궁경부암 다음으로 많은 빈도를 차지하며 서서히 증가 추세에 있다.¹ 미국의 통계를 보면 난소암은 1996년에 26,000명의 새로운 환자가 발생했으며 이 암으로 인해 15,000명의 환자가 사망했다고 보고하고 있다.² 이처럼 난소암이 사망률이 높은 이유는 다른 암과는 달리

조기발견이 어렵고 또한 적절한 조기 진단 방법이 개발되지 않았기 때문이다. 대부분 환자들이 난소암에 대한 증상을 호소하여 병원에 내원할 때는 약 70%에서 진행된 3기 내지 4기의 상태로 진단된다.³ 난소암을 조기 진단하게 되면 5년 생존율이 약 95% 정도에 이르게 되나 진행된 3기, 4기에는 30% 이하로 떨어지게 된다.⁴ 난소암에 대한 수술 및 항암 요법의 개발로 인해 생존율의 증가가 보고되어 있지만 전체적으로는 큰 변화가 없는 실정이다.⁵ 따라서 난소암의 발생원인을 밝히고 조기진단을 할 수 있다면 사망율을 낮출 것

이다.

인간유전체 DNA에서 CpG dinucleotides는 cytosine의 5'position에 methylation이 되어있어 대부분 발현이 되지 않는다.⁶ 이에 반해 인간 유전자의 promotor에 위치한 CpG islands는 정상적으로 methylation 되지 않도록 보호를 받는다. 그러나 암에서는 DNA의 methylation이 흔히 종양억제유전자와 관련해서 CpG islands에서 나타나고, genome wide hypermethylation이나 hypomethylation이 동반된다.⁷ 최근에 methylation의 역할의 중요성이 대두되고, 특히 종양억제유전자인 *p16*,⁸ *Rb*,⁹ *BRCA1*¹⁰ 등은 promotor hypermethylation에 의해 불활성화 된다고 보고되고 있다. 실제로 mismatch repair 유전자인 *hMLH1*은 promotor hypermethylation에 의해 암에서의 발현이 감소된다.¹¹ 근래에 DNA methylation 진단 기술의 발달로 암에서 methylation의 역할을 쉽게 분석할 수 있게 되었다. 이외에 여러 개 유전자들의 동시 methylation이 급성골수 백혈병에서도 보고되었다.¹² 그러나 난소암에서는 methylation의 역할이 많이 알려져 있지 않으며, 대부분의 연구가 *p16*에 초점이 맞추어져 있다. 즉 *p16*의 발현 감소가 나타나고, 또한 *BRCA1*의 methylation을 보고하고 있다.¹³ 상기문헌의 지견을 바탕으로 본 연구자는 난소암에서 종양억제유전자인 *BRCA1*, *p15*, *p16*, *p21*, *p73*, *hMLH1*의 methylation 이상을 알아보고자 연구를 계획하였다.

연구 대상 및 방법

계명대학교 동산의료원 산부인과에서 난소암으로 수술하는 환자의 난소암 조직 13예와 양성 종양으로 수술시 절제된 정상 난소 7예를 환자의 동의와 윤리위원회를 거쳐 채취하고, 실험시까지 78℃ 냉동 보관하였다. 난소암의 조직학적 분류는 상피성 난소암이 10예, 생식세포암이 1예, 간질 종양이 2예 이었다. 난소암 조직과 정상 난소 조직에서 genomic DNA kit (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega, USA)을 사용하여 DNA를 분리하고 정확히 3 µg으로 정량하였다. 이 DNA를 bisulfate modification 하는데, 먼저 3 µg의 DNA를 증류수로 40 µL가 되게 만들고 1 mol/L NaOH를 최종 농도가 0.2 mol/L 되게 넣어서 37℃에서 30분간 배양하였다. 배양이 끝나면 30 µL의 10 mmol/L hydroquinone (Sigma, H9003, USA)과 520 µL의 3

mol/L sodium bisulfate (pH 5.0, Sigma S9000, USA)을 넣고 50℃에서 16-24시간 배양하였다. 배양이 끝나면 Wizard DNA clean up system (Promega, USA)을 사용하여 DNA를 정제하고 증류수 혹은 TE 완충액 50 µL를 넣어 녹였다. 여기에 1 mol/L NaOH를 최종 농도가 0.3 mol/L 되게 넣고 37℃에서 15분간 녹인다. 그 뒤 1/10 용량의 3 mol/L sodium acetate와 2배 용량의 에탄올을 넣어 에탄올 침전을 한 뒤 DNA pellet을 증류수 혹은 TE 완충액 20 µL에 녹여 -20℃에 보관하며 PCR에 사용하였다. Methylation specific polymerase chain reaction (MSPCR)의 경우 비특이적 밴드가 보이기도 하고 크기가 작아 primer dimer와 겹쳐 보일 수 있기 때문에 3% Seaplage (Cambrex Bio Science, Rockland)에서 PCR 결과를 확인하였다. PCR을 위해 사용된 각 유전자의 primer들의 염기 서열은 Table 1과 같고, PCR에 방법은 *p15*는 94℃ 10분/94℃ 1분, 64℃ 1분, 72℃ 1분/72℃ 10분; 35 cycle을 시행하였고, *p16*은 94℃ 10분/94℃ 1분, 64℃ 1분, 72℃ 1분/72℃ 10분; 45 cycle 시행하였으며, *p73*은 95℃ 5분/95℃ 1분, 55℃ 1분, 72℃ 1분/72℃ 5분; 35 cycle, *BRCA1*은 95℃ 5분/95℃ 1분, 55℃ 1분, 72℃ 1분/72℃ 5분; 35 cycle, *hMLH1*은 95℃ 5분/94℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 30초/72℃ 7분; 33 cycle, *p21*은 94℃ 10분/98℃ 1분, 68℃ 1분, 74℃ 1분/72℃ 10분; 35 cycle을 시행하였다.

결 과

난소암 13예와 정상 난소 조직 7예를 이용하여 *p15*, *p16*, *p21*, *p73*, *BRCA1*, *hMLH1* 유전자들에 대한 MSPCR을 시행하였다. *p15* 유전자는 난소암과 정상 난소에서 모두가 methylation을 보이지 않았고, *hMLH1*에서는 모두에서 같은 methylation이 보여 의의가 없었다(Fig. 1). *p21* 유전자는 양군 모두에서 같은 정도의 methylation을 보였고, *p73* 유전자는 난소암 13예 중에서 11예에서 methylation을 보였고, 정상 난소에서는 모두에서 methylation이 있었으나, 난소암에서 보다는 methylation이 적었다(Fig. 2). *p16* 유전자는 난소암에서 13예 중 10예에서 methylation을 보였으나 정상에서도 methylation이 모두 관찰되었다. *BRCA1* 유전자는 난소암의 85% (11/13)에서 methylation이 있었고, 정상에서는 57% (4/7)에서 methylation이 나타나 그 차이를 확인하였다(Fig. 3).

Table 1. Primer Sequences Used for Methylation -specific PCR Analysis

Primer set		Sequence
<i>p15</i>	sense	GCG TTC GTA TTT TGC GGT T
	antisense	CGT ACA ATA ACC GAA CGA CCG A
<i>p16</i> (MM)	sense	TTA TTA GAG GGT GGG GCG GAT CGC
	antisense	GAC CCC GAA CCG CGA CCG TAA
<i>p16</i> (UM)	sense	TTA TTA GAG GGT GGG GTG GAG GAT TGT
	antisense	CAA CCC CAA ACC ACA ACC ATA A
<i>p73</i>	sense	GTT CGC GTT GTT TTT TCG CG
	antisense	AAT ACC TAC CCA ACG CAT CG
<i>p21</i>	sense	GCC TGC TGG AAC TCG GCC AGG CTC AGC CTG C
	antisense	GAG GCG ACC CGC GCT CGG CCC AGC GCG CCG
<i>BRCA1</i>	sense	GAG TTT CGA GAG ACG TTT GG
	antisense	AAT CTC AAC GAA CTC ACG CC
<i>hMLH1</i>	sense	CGC TCG TAG TAT TCG TGC
	antisense	TCA GTG CCT CGT GCT CAC

MM; methylated, UM; unmethylated.

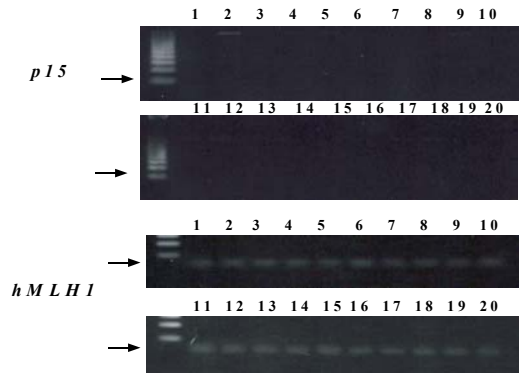


Fig. 1. Methylation of the p15 and hMLH1 genes analyzed by methylation-specific PCR. Lane 1-7 are normal ovaries and lane 8-20 are ovarian cancers.

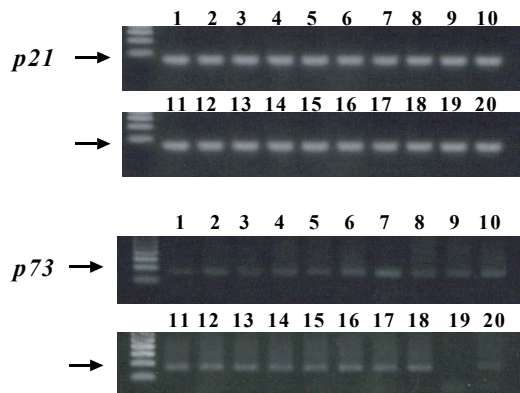


Fig. 2. Methylation of the p21 and p73 genes analyzed by methylation-specific PCR. Lane 1-7 are normal ovaries and lane 8-20 are ovarian cancers.

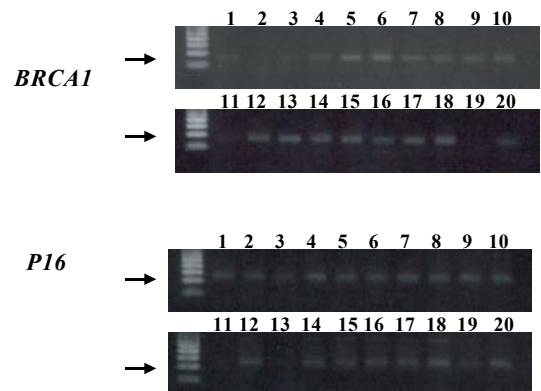


Fig. 3. Methylation of the p16 and BRCA1 genes analyzed by methylation-specific PCR. Lane 1-7 are normal ovaries and lane 8-20 are ovarian cancers.

고 찰

난소암에서 methylation에 관한 연구는 많이 행해져 있지 않다. 지금까지 알려진 바로는 methylation의 이상으로 종양억제유전자의 기능의 불활성화가 생겨 암 발생이 초래된다고 한다. 따라서 난소암 환자에서 종양억제유전자들의 CpG islands의 methylation의 유무를 알아보고자 하는 연구가 진행되고 있다.¹⁴ 또한 대장암이나 위암에서 이러한 hypermethylation이 진단적 지표자로서의 사용가능성이 제시되고 있다.^{15,16} 나아가 최근에는 폐암과 간암 환자의 혈청에서 암세포의 DNA methylation을 증명하였다.^{17,18} 또한 다른 연구에서는 DNA의 hypermethylation이 in vitro와 in vivo에서

유전자 전사의 소실과의 연관성을 보고하고 있다.⁷

본 연구자는 이러한 종양억제유전자의 methylation 이상을 한국인 난소암에서 알아보려고 MSPCR을 실시한 결과 *p15* 유전자에 대한 methylation변화는 정상이나 난소암에서의 차이를 보이지 않았다. *hMLH1* 유전자의 methylation의 변화는 정상이나 난소암에서 모두가 차이가 없었으며, 이러한 결과는 다른 보고에서도 난소암에서의 변화는 의미가 없는 것으로 해석하고 있다.¹⁴ 그러나 위암에서는 *hMLH1*의 hypermethylation과 microsatellite instability와의 연관성을 보고하고 있다.¹⁹ *p21* 유전자에서도 암과 정상과의 연관 관계는 없었으나, *p73* 유전자는 난소암에서의 methylation이 높은 것으로 나타났다. 그러나 이러한 것이 정상과의 차이를 구별할 수 있는 뚜렷한 변화를 본 연구에서는 보이지 않았다. *p16*은 INK 단백질의 일종으로 CDK4와 CDK6와 결합하여 CDK4-6/cyclin D 결합체의 kinase 활성을 저해한다.²⁰ 그러므로 *p16*과 CDK4, CDK6와의 결합은 cyclin D와의 반응을 억제하고, Rb 단백질의 CDK 매개 인산화 과정을 방해한다. Rb 단백질의 인산화는 G1에서 S주기로의 세포 주기회로의 진행에 관여한다.²¹ 그러므로 *p16* 단백질의 결손은 Rb 단백질을 과인산화를 초래하여 세포 성장을 계속 자극하고, 마침내 암으로 발전된다. 이러한 *p16* 유전자의 결손이나 변이는 일차성 종양에는 드물게 일어나며, hypermethylation에 의한 *p16* 유전자의 불활성화에 대해 보고되어 있다.²² 이러한 *p16* 유전자의 hypermethylation과 관계해서 난소암을 포함한 많은 종양에서의 연구가 있었다.²³ 본 연구에서는 정상에서 모두에서 methylation이 있었고, 난소암에서 13예 중 10예에서 methylation을 보여 난소암에서의 *p16* 유전자의 hypermethylation과의 연관성을 찾을 수 없었다. *BRCA1* 유전자는 난소암에서 85% (11/13)의 methylation을 보였고, 정상에서는 57% (4/7)에서 methylation을 보여 난소암에서의 증가를 확인하였으나, 표본수의 한계로 인해 이것의 유의성을 판단할 수는 없으나 전체적인 hypermethylation의 증가를 확인하였다. *BRCA1* 유전자의 발현과 methylation의 상관관계는 유방암에서 methylation에 의해서 발현이 감소되는 것이 보고되어 있다.²⁴ 그러나 다른 보고에 의하면 *BRCA1* methylation이 *BRCA1* 유전자 발현에 관계없는 것으로 보고하고 있어,¹⁴ 아직까지 서로의 상관관계를 규명하려면 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 CpG islands의 methylation에 관계하는 위치가 수

천개 이상으로 많아 하나의 종양발생에 관계하는 것이 어떤 CpG islands의 이상인지 정확히 파악하기 어렵다.

이상의 결과로 보아 본 연구자가 시행한 난소암과 정상 난소에서의 종양억제유전자들의 CpG islands의 hypermethylation 차이를 증명하려고 했으나, 저자가 시행한 종양억제유전자들에서의 methylation 차이의 유의성을 찾을 수 없었으며, 향후 좀더 많은 난소암과 대조군을 가지고 이러한 MSPCR 방법을 이용해 종양억제유전자의 변이나 발현 감소를 적절한 표적 CpG islands를 찾아 시행하면 좋은 결과를 보게 되리라 생각된다.

참고문헌

1. 조치흠, 차순도, 이태성, 서영욱: 최근 20년간 여성 생식기 암 발생 양상의 변화. 대한산부회지 1998; 41: 2113-8.
2. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA: Cancer statistics, 1996. CA Cancer J Clin 1996; 46: 5-27.
3. International Federation of Gynecology and Obstetrics Cancer Committee. Staging announcement. Gynecol Oncol 1994; 25: 383.
4. Averette HE, Janicek MF, Menck HR: The national cancer data base report on ovarian cancer. Cancer 1996; 76: 1096-103.
5. McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, et al. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. N Engl J Med 1996; 334: 1-6.
6. Bird A: The relationship of DNA methylation to cancer. Cancer Surv 1996; 28: 87-101.
7. Jones PA, Laird PW: Cancer epigenetics comes of age. Nat Genet 1999; 21: 163-7.
8. Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JJ, Davidson NE, et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. Cancer Res 1995; 55: 4525-30.
9. Sakai T, Toguchid J, Ohtani N, Yandell DW, Rapaport JM, Dryja TP: Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. Am J Hum Genet 1991; 48: 880-8.
10. Dobrovic A, Simpfendorfer D: Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. Cancer Res 1997; 57: 3347-50.
11. Simpkins SB, Bocker T, Swisher EM, Mutch DG, Gersell

- DJ, Kovatich AJ, et al. MLH1 promoter methylation and gene silencing is the primary cause of microsatellite instability in sporadic endometrial cancers. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 661-6.
12. Melki JR, Vincent PC, Clark SJ: Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 1999; 59: 3730-40.
13. Milde-Langosch K, Okon E, Becker G, Loning T: p16/MTS1 inactivation in ovarian carcinomas: high frequency of reduced protein expression associated with hypermethylation or mutation in endometrioid and mucinous tumors. *Int J Cancer* 1998; 79: 61-5.
14. Strathdee G, Appleton K, Millan DW, Sargent J, Paul J, Brown R: Primary ovarian carcinomas display multiple methylator phenotypes involving known tumor suppressor genes. *Am J Pathol* 2001; 158: 1121-7.
15. 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.
16. Toyota M, Ahuja N, Suzuki H, Itoh F, Ohe-Toyota M, Imai K, et al. Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Res* 1999; 59: 5438-42.
17. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG: Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 1999; 59: 67-70.
18. Wong IHN, Lo YMD, Zhang J, Liew CT, Ng MHL, Wong N, et al. Detection of aberrant methylation in plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res* 1999; 59: 71-3.
19. Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Chan ASY, Ho JCI: hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res* 1999; 59: 159-64.
20. Sherr CJ: Mammalian G1 cyclins. *Cell* 1993; 73: 1059-65.
21. Cobrinik D, Dowdy SF, Hinds PW, Mittnacht S, Weinberg RA: The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling. *Trends Biochem Sci* 1992; 17: 312-5.
22. Okajima E, Fukuda T, Okita S, Gombart AF, Cho SK, Koeffler HP: Infrequent somatic alteration of p16/MTS1 in human primary superficial bladder cancers. *Cancer Lett* 1996; 103: 227-31.
23. McCluskey LL, Chen C, Delgadillo E, Felix JC, Muderspach LI, Dubeau L: Differences in p16 gene methylation and expression in benign and malignant ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 1999; 72: 87-92.
24. Niwa Y, Oyama T, Nakajima T: BRCA1 expression status in relation to DNA methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic cancers. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91: 519-26.

국문초록

지금까지 알려진 바로는 종양억제유전자와 관련해서 CpG island의 methylation 이상으로 종양억제유전자의 기능 변화가 암 형성에 관여한다고 알려져 있다. 최근의 연구 결과 대장암이나 유방암에서 이러한 hypermethylation이 진단적 지표자로서의 사용가능성을 제시하였다. 따라서 난소암 환자에서 이러한 있는 종양억제유전자들의 CpG islands의 methylation의 변화를 알아보고자 하는 연구가 시도되고 있다. 지금까지 난소암에서 methylation에 관한 연구는 많이 행해져 있지 않아 본 연구자는 난소암에서 종양억제 유전자인 *BRCA1*, *p15*, *p16*, *p21*, *p73*, *hMLH1*의 methylation유무를 알아보고자 연구를 계획하였다.

난소암 13예와 정상 난소 조직 7예를 이용하여 *p15*, *p16*, *p21*, *p73*, *BRCA1*, *hMLH1* 유전자들에 대한 MSPCR을 시행하였다. *p15* 유전자는 난소암과 정상 난소에서 모두가 methylation을 보이지 않았고, *hMLH1*에서는 모두에서 같은 methylation을 보여 의의가 없었다. *p21* 유전자는 양군 모두에서 같은 정도의 methylation을 보였고, *p73* 유전자는 난소암 13예 중에서 11예에서 methylation이 관찰되었으며, 정상 난소에서는 모두에서 methylation이 있었으나, 난소암에서 보다는 methylation이 적었다. *p16* 유전자는 난소암에서 13예 중 10예에서 methylation이 보였으나 정상에서도 methylation이 모두 관찰되었다. *BRCA1* 유전자는 난소암에서 11/13 (85%)에서 methylation이 있었고, 정상에서는 4/7 (57%)에서 methylation이 나타나 차이를 확인하였다.

이상의 결과로 저자가 확인한 난소암에서의 methylation 이상은 *BRCA1* 유전자에서 정상과 비교하여 차이를 확인하였으며, *BRCA1* 유전자의 methylation 변화가 난소암의 암화 과정에 관계한다는 것을 유추할 수 있겠다. 그러나 표본 수가 적은 관계로 향후 좀더 많은 난소암과 대조군을 가지고 이러한 MSPCR 방법을 이용해 종양억제유전자의 변이나 발현 감소를 적절한 표적 CpG islands를 찾아 시행하면 좋은 결과를 보게 되리라 생각된다.

중심단어 : 난소암, Multiple methylator phenotype