

## 원발성 자궁경부암의 유전적 불안정성 분석

서울대학교 의과대학 산부인과학교실<sup>1</sup>, 한국생명공학연구원 유전체연구센터<sup>2</sup>

서상수<sup>1</sup> · 박노현<sup>1</sup> · 노주원<sup>1</sup> · 김재원<sup>1</sup> · 박화용<sup>2</sup>

송용상<sup>1</sup> · 김용성<sup>2</sup> · 강순범<sup>1</sup> · 이효표<sup>1</sup>

### - Abstract -

### Analysis of Genetic Instability in Primary Cervical Carcinoma

Sang Soo Seo<sup>1</sup> · Noh Hyun Park<sup>1</sup> · Ju Won Roh<sup>1</sup> · Jae Weon Kim<sup>1</sup>

Hwayong Park<sup>2</sup> · Yong Sang Song<sup>1</sup> · Yong Sung Kim<sup>2</sup>

Soon Beom Kang<sup>1</sup> · Hyo Pyo Lee<sup>1</sup>

*Department of Obstetrics and Gynecology, Cancer Research Institute, College of Medicine,  
Seoul National University, Seoul, Korea <sup>1</sup>*

*Genome Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon, Korea <sup>2</sup>*

**Objective:** The aim of this study is to investigate the incidence of genetic instability, defined as microsatellite instability (MI) or loss of heterozygosity (LOH) in cervical carcinoma and its relationship with clinical characteristics.

**Materials and Methods:** Twenty-four patients with cervical carcinoma were studied. Genomic DNA was extracted from tumor tissues collected from consenting patients undergoing surgery. MI and LOH were analyzed with five microsatellite regions on chromosome 2, 3 and 6 (D2S123; 2p16-2p16 & 2p21-2p16, D3S1619; 3p24.2-3p22, D6S291; 6p21.3-6p21.2, D6S308; 6q16.3-6q27, D6S270; 6q22.3-6q23.2) by polymerase chain reaction (PCR) and automatic laser fluorescent DNA sequencer. MI was defined as tumor-associated alteration in at least of one of five dinucleotide microsatellite markers examined. The relationship between genetic instability and clinical profile was analyzed. The significance of BAT-26 sequence size as a marker of replication error (RER) phenotype was assessed.

**Results:** Total genetic instability was detected in 79%(19/24) of cervical carcinoma. MI was detected in 50% of the cervical carcinomas and LOH in 45.8%. BAT-26 size variation was observed only in one case. There was no statistically significant difference between the groups of positive and negative genetic instability in human papillomavirus (HPV) 16 or 18 positive rate, stage, 2 year-survival rate.

**Conclusion:** This results suggest that MI and LOH are present in a subset of cervical carcinoma and may have a role for carcinogenesis as co-factors. BAT-26 has no value as a marker of RER in cervical cancer.

**Key words:** Cervical carcinoma, Microsatellite instability; Loss of heterozygosity

## I. 서 론

자궁경부암은 전세계적으로는 여성에서 발생하는 암중 유방암과 결장직장암에 이어 세 번째로 높은 빈도를 보이고 있으며, 개발도상국 여성에서는 가장 흔한 암이다. 한국에서는 여성에서 발생하는 암중 세 번째로 높은 빈도를 나타내는데 연간 4,200여명의 침윤성 자궁경부암 신환이 발생한다.<sup>1</sup>

자궁경부암의 발생 원인에 대해서는 여러 역학적·실험적 연구 결과 인유두종바이러스(human papillomavirus, HPV)가 중심적인 역할을 하는 것으로 보고되고 있으며, 특정 고위험군의 HPV 감염시에 자궁경부의 전암성 병변은 물론 침윤암의 발생 위험성이 증가하는 것으로 알려져 있다. 반면에 단순히 HPV 감염만으로는 악성 종양으로 진행하지 않는다는 실험적 증거도 있다.<sup>2,3</sup> 자궁경부의 전암성 병변은 내부 요인 또는 외부 변이원 등 보조인자의 보조적인 역할에 따라 침윤암으로의 발암과정이 진행되는 것으로 생각된다. 그러한 보조인자를 규명하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.

미세위성(microsatellite) DNA는 1-6개의 염기 단위로 구성되는 정상적으로는 안정적인 반복 염기서열로 유전체내에 비단백 부호로서 광범위하게 존재하는 구조이다.<sup>4,5</sup> 미세위성 불안정성(microsatellite instability; MI)은 이러한 단순 반복 염기서열인 미세위성의 크기에 변화를 보인다는 의미로, 단순 반복 서열에서는 구조상 복제 과정 중에 미끄럼 현상(strand slippage)이 일어나기 쉽고 따라서 복제 오류가 나타날 가능성이 높아 반복 횟수가 달라지는 변이가 빈번하게 일어난다. 통상 이러한 미끄럼 현상이 일어나는 경우에는 부정합 사슬(mismatch strand)이 생겨나 부정합 교정 체계(mismatch repair system, MMR system)에 의해서 교정이 되지만, 유전자 보수 기능이 저하된 경우에는 미끄러진 염기 쌍의 사슬이 그대로 복제되어 처음과는 다른 짧아지거나 길어진 새로운 핵산 절편이 만들어진다. 따라서 MI는 암세포가 부정합 보수 기능을 상실함으로써 나타나는 변이 표현형이라고 할 수 있고, MMR 유전자의 불활성화에 의한 DNA 복제 오류 현상을 나타내는 지표로 사용되고 있다.<sup>6,9</sup> 이러한 현상은 유전성 비용

종증 결장직장암(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)에서 가장 먼저 보고되었으며, hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 등과 같은 MMR 유전자의 변이와 연관성이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>10</sup> 이후 위암, 유방암, 자궁체부암 등 다양한 암종에서도 동일한 현상이 나타난다는 연구 결과가 속속 보고되고 있다.<sup>4,7, 9-14</sup> 이러한 유전자들은 전형적인 종양유전자, 혹은 종양억제유전자가 아니며, 이형접합 상실(loss of heterozygosity, LOH)과정을 거치는 기전과는 무관하다고 하였다. 물론 암세포에서 발견되는 단순·반복 염기서열의 변화가 곧바로 암 발생에 중요한 역할을 하는 특정 단백질의 비활성화로 이어지는 것은 아니나, 암세포의 유전체에 변이가 자주 일어나는 유전적으로 불안정한 상태라는 것을 의미한다고 생각되며, 이처럼 유전적 불안정성은 유전체가 종양 억제 유전자의 변이, 결손, 발현의 증감과 같은 다양한 변화에 취약하다는 반증으로 다단계 발암과정의 추진력이 된다고 보고 있다. 또한 RER 표현형을 보이는 종양과 그렇지 않은 종양간에 종양 형성과정에 차이가 있으며, RER 표현형을 보이는 종양은 그렇지 않은 종양에 비하여 양호한 예후를 보인다고 하여 예후 인자로의 가능성도 제시되고 있다.

BAT-26은 단일 deoxyadenosine이 26개 연속되는 구조로 hMSH2의 전유전자 허서열(intron)에 위치하는데, BAT-26은 양 대립유전자간에 크기 차이가 없고 정상인의 조직 또는 RER 표현형을 보이지 않는 종양에서도 크기 차이를 보이지 않는다고 한다.<sup>15</sup> 반면에 RER 표현형을 보이는 종양에서는 대립유전자의 길이가 감소하여 정상 조직과 비교할 필요 없이 종양 조직의 RER 상태를 판정할 수 있다고 하였다.<sup>15</sup>

자궁경부암에서 유전적 불안정성에 대한 연구는 드물어서 아직은 어떤 결론을 내릴 수 없고 기초적인 자료가 보고되는 단계이다. 이에 따라 본 연구에서는 자궁경부암에서 유전적 불안정성의 빈도를 살펴보고, BAT-26의 분석이 자궁경부암에서도 유전적 불안정성 판정에서의 유용한지, 이러한 유전적 불안정성과 HPV 감염, 병기, 생존 등의 임상양상과의 관계를 분석하고자 하였다.

## II. 연구대상 및 방법

### 1. 연구대상 검체

서울대학교병원에서 수술을 시행한 침윤성 자궁경부암 환자 24명의 암조직 및 해당 환자의 인접 정상조직을 대상으로 액체질소탱크에 냉동 보관된 수술 전 혹은 수술 중에 얻은 자궁경부 조직을 각각 0.5×0.5 cm 정도의 크기로 자른 후 실험에 이용하였다. 이 조직들은 환자 동의하에 얻어졌으며, 21례는 편평상피암(squamous cell carcinoma)이었고, 2례는 선암(adenocarcinoma)이었으며 1례는 선편평암(adenosquamous cell carcinoma)이었다. 각 환자에서 병기, 생존, 조직형 등의 임상 양상은 의무기록의 후향적 검토를 통하여 파악하였다.

### 2. DNA 추출 및 인유두종바이러스 감염상태의 확인

검체에서 DNA를 추출하기 전에 자궁경부암 조직의 일부를 동결절편법으로 절제하여 조직병리학

적으로 자궁경부암임을 재확인한 뒤, 파라핀 포매 조직에서는 병리소견상 암조직이 가장 많이 발견된 파라핀 포매괴(paraffin block)를 선택, 20  $\mu$ m 두께의 절편으로 잘라 1.5 ml eppendorf tube에 넣어 DNA를 추출하였다. 또한 채취된 검체의 바로 옆 조직을 얻어 hematoxylin-eosin 염색을 통하여 병리조직 소견을 확인하였다. 이후 통상적인 proteinase K, phenol-chloroform 추출방법으로 시료에서 DNA를 준비하였다. 인유두종바이러스의 감염여부와 유전형의 분석은 수술 전 얻어진 cytobrush를 이용하여 얻어진 자궁경부세포를 이용하여 E6, E7에 기초한 중합효소 연쇄반응을 시행하였다.<sup>16</sup>

### 3. MI 및 이형접합상실(loss of heterozygosity, LOH)의 평가

2, 3 및 6번 염색체에서 다섯 개의 유전자좌(loci)를 선택하여 분석하였다(Table. 1). 모두 dinucleotides인 이 유전자좌의 증폭을 위하여 Genome Database web site (www.gdb.org) 자료에 근거하여 얻어진 시발체 서열(primer sequence)을 이용, 각각의 전

Table 1. Microsatellite markers and primers used for detection of MI in cervical cancer

Chromosome	Locus	Primers*
2	D2S123: (CA)n repeats 2p16-2p16, 2p21-2p16 Amplimer GDB:187953	5'-6-FAM-AAACAGGATGCCTGCCTTTA-3' 5'-GGACTTTCACCTATGGGAC-3'
3	D3S1619: (CA)n repeats 3p24.2-3p22 Amplimer GDB:200078	5'-6-FAM-GTCCTGCAAGACTCATTG-3' 5'-TTGCTAGGATGGTTGTTTTC-3'
6	D6S291 6p21.3-6p21.2 Amplimer GDB:574098	5'-6-FAM-GGGGATGACGAATTATTCATAACT-3' 5'-GGCATTGAGGCATGCCTGGC-3'
	D6S308 6q16.3-6q27 Amplimer GDB:188594	5'-6-FAM-GAGAGAATTCACGTACATAAACACA-3' 5'-GTCTAATCACTGCCCCAAAG-3'
	D6S270 6q22.3-6q23.2 Amplimer GDB:188039	5'-6-FAM-GTGTAAGTCTGAATGGTTC-3' 5'-GTAGTGAAGCCTGGATGTGG-3'

Note, \*Six-FAM was labelled only on 5' end of forward primer.

방시발체(forward primer)의 5' end 에 6-FAM (6-carboxyfluorescein)으로 표지하도록 제작을 의뢰하여(PE Biosystems, Foster city, CA, USA) 사용하였다(Table. 1). D2S123 유전자좌의 경우, 10 $\mu$ l 용액에 10 ng gDNA, 0.25 unit of Taq polymerase (Takara Shuzo, Otsu Shiga, Japan), 2 $\mu$ l of 5M Betaine, 100 pM of each primer, 10 mM dNTPs, 10x buffer (Takara Shuzo, Otsu Shiga, Japan)의 PCR 조건하에 반응을 수행하였다. 다른 유전자좌에 대하여서는, PCR 조건은 시발체와 완충액 농도에서 서로 약간의 차이가 있었다. 최초 변성단계는 94 $^{\circ}$ C에서 3 분이었고, 사용된 시발체에 따라 28-30 PCR cycles을 94 $^{\circ}$ C에서 20 초, 56 $^{\circ}$ C에서 20 초, 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 30 초간 시행하였다. 최후 extension 은 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 시행하였다. PCR 산물은 표준 6% polyacrylamide gels denaturing sequencing gel (formamide 4.0 $\mu$ l, size standard 0.4 $\mu$ l, loading buffer 0.6 $\mu$ l, PCR products 1.0 $\mu$ l)에 적재하였다. ROX 표지된 21 single-stranded DNA 절편을 표준 크기로 이용하여 GeneScan 400HD<sup>®</sup>(ABI- Perkin-Elmer, Foster city, CA, USA)를 통하여 분석하였다. 이 gels 은 2 시간 동안 일정 전력(200 W)하에 자동 레이저 형광 DNA 서열분석기(ABI Prism 377<sup>®</sup>: ABI-Perkin-Elmer, Foster city, CA, USA)에서 전기영동하였다. 전기영동 후 자료는 ABI 377 GeneScan<sup>®</sup> software을 이용하여 분석하였다.

#### 4. BAT-26을 이용한 RER status의 평가

BAT-26은 MSH2 유전자의 허서열-5에 위치하는 것으로 알려진 염기서열에 근거를 두고 만들어 졌다(Table. 2)<sup>17</sup>. 5'-TGACTACTTTTGACTTCAGCC-3', 5'-AACCATTCAACATTTT- AACCC-3'의 시발체를 사용하여 다음과 같은 조건하에 PCR을 시행하였다. 시발체는 각각 300 nM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, dNTP 100  $\mu$ M, Taq polymerase 0.25 U, genomic DNA 50 ng 을 섞어 총 용량이 20  $\mu$ l가 되도록 하였다. PCR의 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 예열 후 35 cycles(95 $^{\circ}$ C, 30 초간, 45 $^{\circ}$ C, 1분간, 70 $^{\circ}$ C, 1분간)을 거쳐 마지막으로 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰다.

BAT-26으로 증폭된 산물을 nondenaturing 12% polyacrylamide gel에서 전기영동하고 etidium bromide로 염색한 뒤 자외선하에서 관찰 및 촬영,

판독하였다.

#### 5. 통계 처리

통계 처리 프로그램인 SPSS(release 9.0.1 for Windows)를 이용하였다. 자궁경부암의 병기 등 임상 자료와 유전체 불안정성 정도간의 상관 관계는 chi-squared test를, 각 군에서 유전체 불안정성 지수의 평균값의 차이를 비교하는데는 Student's t test를 적용하였으며, p 값은 양측검정으로 0.05 미만을 의미있는 수치로 해석하였다. 생존분석은 Kaplan-Meyer method를 이용 log rank test를 통하여 분석하였다.

### III. 결 과

#### 1. 유전적 불안정성의 분석

유전적 불안정성을 적어도 한 곳 이상의 유전자좌에서 MI나 LOH를 보인 경우로 정의하였을 때, 총 24개의 암 조직 검체 중 19례에서(79%) 적어도 한 곳 이상의 유전자좌에서 유전적 불안정성을 보

였다(Table. 2,3)(Fig.1). 19례 중 11례에서는 적어도 2 곳 이상에서 유전적 불안정성을 보였으며(11/24, 46%), 1례에서는 3곳에서 유전적 불안정성을 보였다. 12례(50%)에서는 적어도 한 곳 이상에서 MI를 보였으며, 11례(45.8%)에서는 적어도 한 곳 이상에서 LOH를 보였다. 또한 2곳 이상의 MI를 보인 곳은 3례였다(12.5%).

D2S123의 경우 MI나 LOH를 전혀 관찰할 수 없었다. 3번 증례에서 암 조직 검체의 경우 정상 조직에서는 볼 수 없었던 225.63bp의 band를 보여 MI인 것으로 생각되었으나 data peak를 재검토한 결과 정상 조직에서도 역시 작지만 그 band가 존재하는 것으로 보아 정상 조직과 암 조직에 전혀 차이가 없음을 알 수 있었다. D3S1619의 경우 모두 24개의 암 조직 검체 중 LOH는 7례에서, MI는 2례에서 관찰되어 37.5%에서 유전적 불안정성을 나타내었다. D6S270의 경우 LOH는 2개의 암 조직에서, MI는 5개의 암 조직에서 관찰되어 29.2%에서 유전적 불안정성을 보였고, 특히 21번 증례와 24번 증례의 검체의 경우 band shift의 폭이 매우 큰 것을 볼 수 있었

Table 2. Genetic instability of MI and LOH in 24 cases of cervical carcinoma.

Case	Histology	HPV16	HPV18	D2S123*	D3S1619	D6S270	D6S291	D6S308	BAT-26	Total
1	SCCA	+	-	-	-	-	MI	-	-	
2	SCCA	+	-	-	LOH	-	LOH	-	-	
3	SCCA	-	-	-	MI	-	-	MI	-	
4	SCCA	-	+	-	-	-	-	-	-	
5	SCCA	+	+	-	LOH	LOH	-	-	-	
6	SCCA	+	-	-	LOH	-	MI	LOH	-	
7	SCCA	+	-	-	-	-	-	-	-	
8	SCCA	+	+	-	LOH	-	-	LOH	-	
9	SCCA	+	+	-	-	-	-	-	-	
10	SCCA	+	+	-	-	-	MI	-	-	
11	SCCA	+	-	-	LOH	-	-	MI	-	
12	Adenosq	-	+	-	LOH	-	-	-	-	
13	SCCA	+	+	-	-	-	-	-	-	
14	SCCA	+	-	-	-	MI	-	MI	-	
15	Adeno	+	-	-	-	MI	-	-	+	
16	SCCA	-	-	-	MI	MI	-	-	-	
17	SCCA	-	-	-	-	LOH	-	LOH	-	
18	Adeno	-	-	-	-	-	-	-	-	
19	SCCA	-	-	-	-	-	LOH	-	-	
20	SCCA	-	-	-	-	-	-	MI	-	
21	SCCA	+	-	-	-	MI	LOH	-	-	
22	SCCA	+	-	-	-	-	-	MI	-	
23	SCCA	+	-	-	LOH	-	-	-	-	
24	SCCA	-	-	-	-	MI	LOH	-	-	
Genetic instability: MI				0/24	2/24	5/24	3/24	5/24		12/24
LOH				0/24	7/24	2/24	4/24	3/24		11/24
Total				0/24	9/24	7/24	7/24	8/24		19/24

Note. HPV, human papillomavirus; MI, microsatellite instability; LOH, loss of heterozygosity; SCCA, squamous cell carcinoma; Adenosq, adenosquamous cell carcinoma; Adeno, adenocarcinoma

Table 3. The frequencies of Genetic instability of MI and LOH in each markers.

Chromosome	Map position	Marker	LOH (%)	MI (%)	Total genetic instability
2p	2p21-2p16	D2S123	0(0%)	0(0%)	0(%)
3p	3p24.2-3p22	D3S1619	7(29.2%)	2(8.3%)	37.5%
6p	6p21.3-6p21.2	D6S291	3(12.5%)	3(12.5%)	25.0%
6q	6q16.3-6q27	D6S308	2(8.3%)	6(25.0%)	33.3%
6q	6q22.3-6q23.2	D6S270	2(8.3%)	5(20.1%)	29.2%

다. D6S291의 경우는 LOH는 3개의 암 조직에서, MI는 3개의 암 조직에서 관찰되어 25%, D6S308의 경우 LOH는 2개의 암 조직에서 MI는 6개의 암 조직에서 관찰되어 33.3%에서 유전적 불안정성을 나타내었다.

BAT 26의 경우 1례의 검체에서 양성을 나타내었다.

## 2. 임상양상과의 연관성 분석

적어도 1곳 이상의 MI를 보인 증례와 MI를 보이지 않은 증례간의 HPV 양성율, 병기, 2년 생존율의 차이는 유의하지 않았으며, LOH 양성 증례와 음성 증례간에는 HPV 양성율, 병기의 차이는 없었으나, 2년 생존율은 90%와 33%로 양성을 보인 증례에서 더욱 낮았지만 추적 기간이 짧아 통계적으로 유의

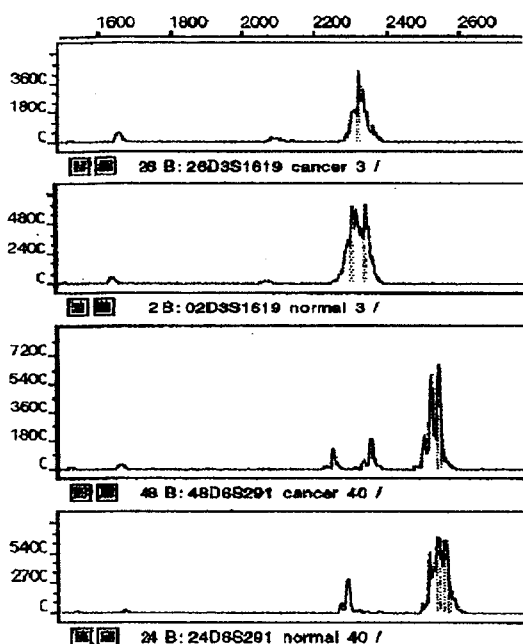


Fig. 1. Examples of LOH (cancer 3) and MI (cancer 40) analyzed by automatic laser fluorescent DNA sequencer in cervical carcinoma and normal adjacent tissue.

하지는 않았다.

#### IV. 고 찰

최근 유전성 결장직장암에서의 연구결과를 시초로 하여 자궁체부, 위, 소장, 신장, 요관, 난소 등에서 발생하는 각종 암에서 DNA 복구 경로에서의 장애가 발암과정에 관여한다는 증거가 MI 분석을 통하여 점차 밝혀지고 있다<sup>9-14,17,18</sup>. MI를 초래하는 기전이 아직 완전히 밝혀진 것은 아니지만, 이는 DNA의 보수, 합성 단계에서의 오류와 관계되는 것으로 생각되며 따라서 이러한 MI는 복제 오류 표현형(replication error phenotype)으로 간주되고 있으며, DNA 부정합 보수 단백질을 코딩하는 4곳의 유전자 중의 일부가 돌연변이가 일어나 유전되는 것이 그 기전으로 생각되고 있다.<sup>19</sup>

본 연구에서의 24 증례에서는 12례에서 5곳의 미세위성 표지자(marker) 중 적어도 한 곳에서 MI를

보여 50%의 양성율을 보였는데 이는 과거 보고된 것보다는 높은 양성율을 보인 것이다. 1993년 Han 등은 2, 3, 17번 염색체에서 4개의 미세위성 표지자를 이용하여 실험한 결과 15%의 자궁경부암에서 적어도 1개 이상의 MI를 보였다고 보고하였고, 1996년 Larson 등은 염색체 3p, 4, 11q에서 총 30개의 미세위성 표지자를 이용, 6%에서 적어도 2개 이상의 MI를 보였다고 보고하였다<sup>20,21</sup>. 또한 Chung 등은 2001년 25%의 자궁경부암에서 염색체 3p, 4q, 11q에서 5개의 표지자 중 적어도 1개에서 MI를 보였다고 하였다<sup>22</sup>. 이와 같이 다양한 범위의 양성율을 보이는 것은 각기 다른 염색체에서 다양한 표지자를 이용한 실험을 하였고, 또한 MI의 양성, 즉 복제 오류 표현형을 정의함에 있어서 서로 다른 정의를 이용하였기 때문이다. 2곳 이상의 표지자에서 양성일 때를 MI 양성이라고 정의한다면 이번 실험에서도 12.5%의 양성율을 보여 그간 보고되었던 바와 큰 차이가 없었다. 그러나 아직은 어떤 위치에서 몇 개의 유전좌좌를 이용하여 실험하고 몇 곳 이상에서 양성인 나와야 MI로 정의 될 수 있는지는 명확한 결론은 나지 않은 상태이며, 따라서 결장직장암에서도 보고자마다 55-91%까지의 다양한 MI의 빈도를 보이고 있는 형편이다. 또한 자궁경부암의 발암 과정에 있어서 민족간의 차이가 있어서 다양한 결과를 보였을 가능성도 배제할 수는 없다. 이를 뒷받침하는 연구로서 1999년 Krul 등은 네덜란드와 수리남 증례의 비교연구로부터 6p25.1-24.3위치에서 각각 33%와 71%의 LOH 양성율을 보였다고 보고하여 발암과정에서 민족적 차이가 있을 것임을 시사하였다.<sup>23</sup>

6번 염색체에서 3곳의 표지자를 이용한 실험에서는 24례 중 12례(50%)에서 적어도 하나 이상의 미세위성 표지자에서 양성을 보였고 8례에서(33.3%) LOH를 보였다. 3번 염색체의 미세위성 표지자인 D3S1619에서는 7례(29.2%)의 LOH를 보여 단일 표지자로서는 본 실험에서 가장 높은 양성율을 보였다. 이러한 MI 소견이 결장직장암에서와 마찬가지로 RER 표현형을 반영하는지에 대해서는 향후 MSH2의 분석 등을 통하여 규명되어야 하리라 사료된다. 특히 Nishimura 등은 2000년 미세침윤암과 침윤암에서의 MI 분석을 통하여 자궁경부암에서는 MI가 암화과정에 있어서 후기단계에 일어난다고

주장하였다<sup>24</sup>. 이는 RER 양성인 개체에서 MMR 유전자의 기능이상이 선행하고 그 이유로 암화과정이 진행된다고 생각되는 HNPCC 등의 종양과는 달리 이미 암화과정이 진행되고난 후에 유전적 불안정성이 일어난다고 생각될 수도 있는 보고이며, 이 역시 자궁경부암에서의 MI는 HNPCC 등의 종양에서 보이는 것과는 다른 과정에 의한 것일 수 있다는 가정을 뒷받침한다. 과거 3번 및 6번 염색체의 단완에서의 LOH가 자궁경부암과 관련되어 있다는 보고가 있었으며<sup>25,26</sup> 본 실험에서 역시 과거 보고와 크게 다르지 않은 양성율을 나타내었다.

BAT-26은 MSH2의 5번째 엑손에 존재하는 poly(A) tract으로 정상인의 DNA와 RER 표현형을 보이는 대장암 환자의 정상 대장 조직, RER 표현형을 보이지 않는 대장 조직에서는 BAT-26이 준(準)단일형(quasi-monomorphic)이지만 특발성 원발성 대장암과 세포주에서는 160bp 중 159bp에서 BAT-26의 크기의 축소, 즉 미세한 크기 변화만을 보이는 단일 띠(band)를 확인하는 것만으로도 RER 상태를 확인할 수 있었다고 하여 99.4%의 효율을 가진다고 보고되었다<sup>15</sup>. BAT-26을 다양한 장기에서 기인한 542개 종양 조직에 적용한 Zhou 등의 연구에서는 99.5%의 효율을 보고한 바 있다<sup>16</sup>. 그러나 본 실험에서 BAT 26은 MI가 나타난 검체에서 대부분 음성을 보여 상이한 결과를 보였는데, 이는 자궁경부암에서는 MI가 결장직장암에서와 같이 MSH2 등의 유전자가 관여하는 부정합사슬 복구 기능과는 다른 기전을 통하여 나타났을 가능성도 배제할 수 없을 것이다. 또한 이번 실험의 경우 BAT 26이 양성으로 나온 경우는 MI가 5곳의 유전자좌 중 1곳에서만 보인 경우여서 더욱 자궁경부암에서 MI가 나타나는 기전이 결장직장암에서와 다를 가능성이 있음을 시사하며, 이 부분에서는 추후 재검토가 필요할 것으로 보인다.

#### - 참고문헌 -

1. 보건복지부. 한국인 암등록 조사자료 분석보고(1998. 1.1-1998.12.31). 대한민국 보건복지부. 2000.
2. Howley PM. Role of human papillomavirus in human cancers. *Cancer Res* 1991;51(Suppl.):5019s-22s.

3. zur Hausen H. Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of virus in human cancers. *Cancer Res* 1989;49:4677-81.
4. Litt M, Luty JA. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 1989;44:397-401
5. Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989;44:388-96
6. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993;260:812-6
7. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-9.
8. Jiricny J. Mismatch repair and cancer. *Cancer Surv* 1996;28:47-68.
9. Karran P. Microsatellite instability and DNA mismatch repair in human cancer. *Semin Cancer Biol* 1996;7:15-24.
10. Acharya S, Wilson T, Gradia S et al. hMSH2 forms specific mismatch-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:13629-34.
11. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558-61.
12. Akiyama Y, Nakasaki H, Nihei Z et al. Frequent microsatellite instabilities and analyses of the related genes in familial gastric cancers. *Jpn J Cancer Res* 1996;87:595-601.
13. Contegiacomo A, Palmirotta R, De Marchis L et al. Microsatellite instability and pathological aspects of breast cancer. *Int J Cancer* 1995;64:264-8.
14. Burks RT, Kessis TD, Cho KR et al. Microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Oncogene* 1994;9:1163-6.
15. Hoang JM, Cottu PH, Thuille B et al. BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res* 1997;57:300-3.
16. Song YS, Kee SH, Kim JW et al. Major sequence variants in E7 gene of human papillomavirus type 16 from cervical cancerous and noncancerous lesions of Korean women. *Gynecol Oncol* 1997;66:275-81.
17. Liu B, Parsons RE, Hamilton SR et al. hMSH2 mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds. *Cancer Res* 1994;54:4590-4.
18. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P et al. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary

- nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 1993;104:1535-49.
19. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994;368:258-61.
  20. Han HJ, Yanagisawa A, Kato Y et al. Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. *Cancer Res* 1993;53:5087-9.
  21. Larson AA, Kern S, Sommers RL, Yokota J et al. Analysis of replication error (RER+) phenotypes in cervical carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:1426-31.
  22. Chung TK, Ip TY, Hampton GM et al. Microsatellite instability in cervical carcinoma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;94:121-4.
  23. Krul EJ, Kersemaekers AM, Zomerdijs-Nooyen YA et al. Different profiles of allelic losses in cervical carcinoma cases in Surinam and The Netherlands. *Cancer* 1999;86:997-1004.
  24. Nishimura M, Furumoto H, Kato T et al. Microsatellite instability is a late event in the carcinogenesis of uterine cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2000;79:201-6.
  25. Kesseljov F, Semionova L, Samoylova E et al. Instability of chromosome 6 microsatellite repeats in human cervical tumors carrying papillomavirus sequences. *Int J Cancer* 1996;69:484-7.
  26. Mullokandov MR, Kholodilov NG, Atkin NB et al. Genomic alterations in cervical carcinoma: losses of chromosome heterozygosity and human papilloma virus tumor status. *Cancer Res* 1996;56:197-205.

#### = 국문초록 =

**배 경:** 미세위성 DNA 불안정성(microsatellite instability, MI)은 부정합교정체계 유전자의 불활성화에 의한 DNA 복제 오류 현상을 나타내는 지표로 사용되고 있으며, 유전성 결장-직장암에서 암화과정에서의 관련성을 시초로 위암, 자궁내막암 등 각종 암에서 관련된다는 보고가 있다. 또한 종양억제유전자의 불활성화가 암화과정에 기여한다고 생각되는데 그 불활성화되는 유전자는 이형접합 상실(loss of heterozygosity, LOH)의 분석을 통하여 위치 및 기능을 유추할 수 있다. 본 연구는 자궁경부암에서 MI 및 LOH의 빈도를 알아보고 자궁경부암의 암화과정과의 관련성을 규명하고자 하였고, 결장-직장암 등에서와 같이 BAT-26의 분석이 DNA 복제 오류의 표현형으로서 유용한지 검증하기 위하여 시행되었다.

**방 법:** 24례의 자궁경부암 증례를 대상으로 수술 전 얻어진 조직을 이용하여 연구하였다. 2, 3, 6번 염색체에 분포하는 5 곳의 미세위성 표지자(D2S123; 2p16-2p16 & 2p21-2p16, D3S1619; 3p24.2-3p22, D6S291; 6p21.3-6p21.2, D6S308; 6q16.3-6q27, D6S270; 6q22.3-6q23.2)를 이용하여 MI 및 LOH의 빈도를 중합효소연쇄반응과 자동 레이저 형광 DNA 염기서열분석기를 이용하여 분석하였다. 모든 검체를 대상으로 BAT-26도 함께 분석하였다.

**결 과:** 24개의 암 조직 검체 중 19례에서(79%) 적어도 한 곳 이상의 표지자에서 MI 나 LOH의 유전적 불안정성을 보였다. 19례 중 11례에서는 적어도 2 곳 이상에서 유전적 불안정성을 보였으며(11/24, 46%), 1례에서는 3곳에서 유전적 불안정성을 보였다. 12례(50%)에서는 적어도 한 곳 이상의 MI를 보였으며, 11례(45.8%)에서는 적어도 한 곳 이상의 LOH를 보였다. 또한 2곳 이상의 MI를 보인 곳은 3례였다(12.5%). 그러나 BAT-26은 단지 1례에서만 양성소견을 나타내었다. 적어도 1곳 이상의 MI를 보인 증례와 MI를 보이지 않은 증례간의 HPV 양성율, 병기, 2년 생존율의 차이는 유의하지 않았으며, LOH 양성율 보인 증례간에는 HPV 양성율, 병기의 차이는 없었으나, 2년 생존율은 90%와 33%로 양성율 보인 증례에서 더욱 낮았지만 통계적으로 유의하지는 않았다.

**결 론:** 위의 결과를 볼 때 일부의 자궁경부암에서는 MI 나 LOH 같은 유전적 불안정성이 암화과정에서 공인자로서의 역할을 할 가능성이 있으나, BAT-26의 소견을 고려할 때, 적어도 MSH2에 관련되지 않은 다른 기전이 작용할 가능성이 있을 것이다.

**중심 단어:** 자궁경부암, 유전적 불안정성, 미세위성 DNA 불안정성, 이형접합 상실