

□ 원 저 □

비소세포폐암에서의 망막모세포종유전자의 소실

원자력병원 내과, 흉부외과*

이춘택 · 김창민 · 조재일* · 심영목*
홍원선 · 이진오 · 강태웅

= Abstract =

Loss of the Retinoblastoma Gene in Non-Small Cell Lung Cancer

Choon-Taek Lee, Chang-Min Kim, Jae-Il Zo*, Young-Mog Shim*
Weon-Seon Hong, Jhin-Oh Lee and Tae-Woong Kang

Department of Internal Medicine and Thoracic Surgery*, Korea Cancer Center Hospital, Seoul, Korea

Background: Inactivation of retinoblastoma gene (*Rb*) has been observed in a variety of human cancers. Loss of heterozygosity (LOH) of *Rb* which is a common mode of allelic inactivation of *Rb*, has been known as a frequent genetic event in small cell lung cancer but it has been detected less frequently in non-small cell lung cancer. To define the role of *Rb* deletion in lung cancer, we investigated the genomic DNAs of 43 non-small cell lung cancers and 1 small cell lung cancer paired with normal lung tissues obtained by thoracotomy.

Methods: The genomic DNAs were obtained by the digestion with proteinase K followed by phenol-chloroform extraction method. The genomic DNAs were digested by restriction endonuclease (EcoRI), separated by agarose gel electrophoresis, transferred to nylon membrane by Southern blot transfer and then hybridized with labelled *Rb* 1 probe which contains 1.4 kb sized DNA sequence containing N-terminal portion of *Rb*.

Results: In 26 squamous cell lung cancers, 16 cases were informative after EcoRI digestion and LOH of *Rb* was found in 10 cases (62.5%). In 17 adenocarcinomas of lung, 11 cases were informative and LOH of *Rb* was found in five cases (45.4%). The analysis of clinical parameters revealed no significant differences between the two groups with or without LOH of *Rb* in the aspects of age, sex, degree of differentiation, stage and smoking amount.

Conclusions: These results suggest that *Rb* inactivation is also significantly involved in the molecular pathogenesis of non-small cell lung cancer.

Key Words: *Rb*, Non-small cell lung cancer, LOH, Southern blot

서 론

분자생물학의 발전에 따라 종양유전자(oncogene)의 활성화 및 종양억제유전자(tumor suppressor gene)의

비활성화가 암의 발생에 중요한 역할을 한다는 사실이 알려지면서 많은 종류의 종양유전자와 종양억제유전자가 발견되었다. 한 종류의 암의 발생에 여러 종류의 종양유전자 및 종양억제유전자가 관여하고 반대로 한 종류의 종양유전자나 종양억제유전자는 여러 종류의 암의 발생에 기여하는 것이 알려졌다¹⁾. 폐암에도 여러 종류의 종양유전자의 활성화 및 종양억제유전자의 비활성화가

*본 연구는 1992년도 과학기술처 연구비로 이루어 졌음

알려져 있다^{2,3)}.

종양억제유전자중 망막모세포종유전자(retinoblastoma gene: 이하 *Rb*로 약함)와 *p* 53이 대표적이다. 1971년 Knudson⁴⁾이 망막모세포종 발생의 통계학적 분석을 이용하여 *Rb*의 두 대립유전자가 모두 돌연변이를 일으켜 비활성화 되어야 망막모세포종이 발생한다는 two-hit 가설을 제창하면서 종양억제유전자로서의 *Rb*의 존재가능성을 제시하였다. *Rb*는 Friend⁵⁾에 의해 처음 분리되었고 Lee⁶⁾에 의해 DNA 염기 서열이 밝혀졌다.

*Rb*의 소실은 망막모세포종 이외에 육종 특히 골육종⁵⁾, 전립선암, 유방암등에서 발견되며 특히 폐암중 소세포폐암에서는 거의 100%에서 발견되고 있다^{7,8)}. 그러나 비소세포폐암에서의 *Rb*의 소실은 소세포암과는 달리 30~40% 정도로 낮게 보고되고 있다^{7,9)}.

현재 국내에서는 폐암조직에서의 *Rb*의 변화에 대한 연구가 거의 없어 저자들은 폐암수술시 얻은 폐의 정상조직 및 암조직에서 DNA를 추출하여 *Rb*의 변화를 restriction fragment length polymorphism (RFLP)을 이용한 Southern blot 방법에 의해 관찰하고 임상적 특성과의 연관성을 연구하였다.

연구재료 및 방법

1. 연구 재료

폐암조직은 1990년 1월부터 1992년 2월까지 원자력병원에 입원하여 폐암수술을 받은 환자의 절제된 폐조직에서 정상폐조직과 함께 분리되어 실험시까지 -70°C 냉장고에 보관하였다. 이중 편평상피세포암이 26예, 선암이 17예이며 소세포암이 1예였다.

2. 연구 방법

genomic DNA는 폐암조직 및 정상폐조직을 액체질소로 동결시킨 후 분쇄하여 proteinase K로 소화시킨후 phenol-chloroform 추출방법을 이용하여 추출하였

다¹⁰⁾. 추출된 DNA는 분광광도계를 이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 측정하였고 260 nm 및 280 nm에서의 흡광도의 비(A260/A280)가 1.8 이상임을 확인하여 DNA의 순도를 점검하였다.

15 ug의 DNA를 제한효소 EcoRI으로 12시간이상 소화시킨후 minigel로 완전소화를 확인한 후 0.8% agarose gel에서 30 volt의 전압하에 12시간이상 전기영동으로 분리시켰다. agarose gel을 2차례씩 denaturation 및 neutralization 용액에 담가 변성 및 중화시킨 후 Southern blot 방법을 이용하여 nylon 막에 이동, 흡착시켰다¹¹⁾.

본 실험에는 DNA 탐식자(probe)는 *Rb* 1 탐식자를 사용하였다. 이 탐식자는 *Rb* 1의 N-terminal의 1.4 kb 크기의 DNA로 random primer labelling 방법으로 ³²P-dCTP를 부착하여 0.5×10⁸cpm/ug DNA 이상의 것을 사용하였다¹²⁾.

이 탐식자를 상기 nylon 막에 hybridization 시킨 후 stringent condition (0.1×SSC, 0.1% SDS, 55°C)에서 세척한 후 X-ray 필름에 적당기간 노출시켜 현상하였다¹³⁾.

연구 결과

1. *Rb*의 소실[Loss of Heterozygosity (LOH) of *Rb*]

26예의 편평상피세포암중 EcoRI효소로 소화후 16예의 정상폐 DNA에서 RFLP에 의한 이형성이 관찰되었으며 (informative) 이중 10예 (62.5%)에서 폐암 DNA에서 이형성이 소실되었다(Fig. 1).

17예의 선암중 EcoRI으로 소화후 11예의 정상폐 DNA에서 이형성이 관찰되었으며 이중 5예 (45.5%)에서 폐암 DNA에서 이형성이 소실되었다(Fig. 2).

1예의 소세포암에서도 폐암 DNA에서 이형성의 소실이 관찰되었다(Fig. 3) (Table 1).



Fig. 1. LOH of *Rb* in squamous cell carcinoma of lung. (N: Normal, T: Tumor)



Fig. 2. LOH of *Rb* in adenocarcinoma of lung.

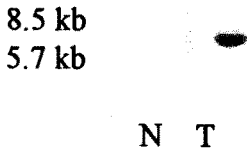


Fig. 3. LOH of *Rb* in small cell carcinoma of lung.

Table 1. Incidence of LOH of *Rb*

	Total	Informa- tive	LOH
Squamous cell ca.	26	16	10 (62.5%)
Adenocarcinoma	17	11	5 (45.4%)
Small cell ca.	1	1	1 (100%)

2. 비세포암 환자의 임상적 특성과 *Rb* 소실과의 연관성

비세포암 환자중 27예에서 정상폐조직의 DNA에서 *EcoRI*로 소화시 RFLP에 의한 이형성이 관찰되었으며 이중 15예(55.5%)에서 폐암조직의 DNA에서 이형성의 소실이 관찰되었다. *Rb* 소실의 유무에 따른 두군간의 임상적 특성을 비교시 환자의 성, 연령, 병기(tumor and node stage), 암의 분화도 및 흡연력에서 유의한 차이가 없었으며 예후는 대상환자가 적고 추적기간이 불충분하여 판정할 수 없었다(Table 2).

고 찰

1969년 Harris등¹³⁾은 정상세포와 암세포를 결합시켜 형성된 hybrid 세포가 암세포의 특성을 잃어버리는 현상을 발견하였다. 이 현상은 정상세포내에 암세포의 표현을 억제하는 하나 이상의 유전자가 있음을 의미하여 이런 유전자를 종양억제유전자라 하였다. 그러나 종양억제유전자에 의한 종양형성의 억제는 완전한 것이 아닌

Table 2. Characteristics of NSCLC Patients According to the Presence of LOH of *Rb*

	Negative LOH	Positive LOH	
Number	12	15 (55.5%)	
Age	63 (50-72)	58 (33-70)	NS*
Sex (M : F)	8 : 4	13 : 2	NS
Disease Stage			
Stage I	4	1	
Stage II	2	6	
Stage IIIa	6	8	NS
Tumor differentiation			
W/D	0	1	
M/D	7	12	
P/D	5	2	NS
Smoking			
Smoker	9	13	
Pack-year	30 (0-40)	35 (0-90)	NS

* NS : not significant by t-test.

부분적인 것이며 종양형성에는 종양유전자의 활성화이라는 다른 요인이 있다. 즉 종양유전자의 활성화 및 종양억제유전자의 비활성화는 서로 독립적인 과정으로 생각되며 모두 종양의 형성에 기여한다¹⁴⁾.

종양억제유전자가 암발생에 기여한다는 첫번째 증거는 망막모세포종의 발생모델에서 알수 있었다. 망막모세포종은 2가지 형태로 구분되는 데 유전적인 발생과 산발적인 발생으로 구분된다. 유전적인 망막모세포종은 2개의 *Rb* 대립유전자중 1개의 유전자가 부모로부터 돌연변이가 일어나 비활성화된 상태로 출생하여 출생후 남은 1개의 *Rb*에 돌연변이가 일어나 암이 발생되며 산발적인 망막모세포종은 2개의 *Rb*에 모두 후천적인 돌연변이가 일어나 암이 발생된다¹⁾. 이 현상에서 *Rb*의 활성화가 아닌 소실에 의해 암이 발생한다는 사실이 밝혀져 *Rb*가 종양억제유전자임을 알수 있었다.

*Rb*는 염색체 13q14에 위치하며¹⁵⁾ 200 kb 크기의

DNA로 27개의 exon을 갖고 있으며 4.7 kb의 mRNA를 전사하고 110 kd의 단백질을 생산한다^{6,16}. *Rb*가 어떻게 종양의 발생을 억제하는가는 *Rb*에서 형성되는 단백질 (pRB)의 기능에 관한 연구로 밝혀졌다. 정상 pRB는 인산화된 pRB (phosphorylated pRB)와 비인산화된 pRB (unphosphorylated pRB)의 두 가지 형태가 있으며 비인산화된 pRB는 G1 stage의 비증식세포에서 발견되며 핵속에 결합되어 있어 세포의 증식을 억제하나(nuclear anchor) pRB가 인산화가 되면 핵속에서 세포질내로 이동하여 세포의 증식억제가 풀려 세포는 S stage로 이동하여 증식하게 된다(G1/S phosphorylation). 그러나 변이된 *Rb*에서 형성된 pRB (mutant pRB)는 비인산화된 상태에서 핵내에 결합하는 nuclear anchor의 능력이 없는 것이 밝혀졌다^{17,18}. 즉 변이성 pRB는 정상적으로 세포의 증식을 억제하는 능력이 소실되어 세포의 무절제한 증식이 일어나 암형성이 일어나게 된다¹⁹. *Rb*가 비활성화되는 기전은 수백 kb 크기의 큰 DNA가 소실되어 염색체감사에서 13q14 띠가 없어지는 경우도 있으나 그 보다 작은 DNA가 소실되거나 점돌연변이(point mutation)에 의해 비활성화되기도 한다²⁰. 이 경우에는 *Rb*와 긴밀히 연관된 DNA의 locus에 RFLP가 있는 경우(즉 이형성이 있는 경우) 제한효소로 DNA를 분해시킨후 Southern blot 분석을 통해 이형성이 없어지면 *Rb*의 변이가 일어났음을 알 수 있다^{7,8,11,14}. 그러나 점돌연변이만 있는 경우는 Southern blot 분석으로는 발견할 수 없고 polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) 등의 방법을 통해 발견할 수 있다²¹.

폐암에서는 *ras* 등의 종양유전자 및 *Rb*, *p 53* 등의 종양억제유전자에 대한 연구가 많이 되어 있다. 폐암중 소세포암과 비소세포암은 서로 다른 특징적인 유전자 변화를 가지고 있다. 소세포암에서는 거의 모든 예에서 *Rb*의 소실 및 3p 유전자의 소실(deletion of 3p)이 발견된다^{7,8,22}. 그러나 비소세포암에서는 소세포암에서는 발견되지 않는 *ras*의 활성화가 발견되며^{23,24} *Rb*의 비활성화는 소세포암보다 낮은 30~40%에서 발견된다^{7,9}. *p 53*의 변이는 비소세포암 및 소세포암 모두에서 흔하게 발견되며 특히 임상적 특성 및 예후와의 연관성에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다²⁵⁻²⁸.

본 연구에서는 편평상피세포암에서는 62.5%, 선암에서는 45.4%의 비교적 높은 빈도로 *Rb*의 소실이 발견되

었다. 이는 한국인의 폐암이라는 인종적인 차이와 지금까지의 연구에서는⁷⁻⁹ 염색체 13q14의 한 loci를 대표하는 탐식자를 사용하였던 데 비해 본 실험에서는 실제 *Rb*의 sequence를 사용한 것에 기인하리라 생각된다. 그러나 본 연구에서는 발견할수 없는 점돌연변이에 의한 *Rb*의 비활성화의 가능성을 고려하면 이보다 더 높은 빈도로 *Rb*의 비활성화가 있으리라 생각되어 *Rb*의 비활성화는 소세포암 뿐 아니라 비소세포암의 발생에도 큰 역할을 하리라 생각된다.

또한 종양억제유전자의 비활성화나 종양유전자의 활성화의 유무와 임상적 특성과의 연관성을 찾아보려는 연구가 많이 있어왔다. Rodenhuis등²³은 선암에서 *K-ras*와 흡연과의 연관성을 발견하였고 Mitsudomi²⁴, Sugio등²⁹은 비소세포암에서 *K-ras*의 활성화가 있는 경우 예후가 나쁨을 밝혔다. 또한 *p 53*의 비활성화 및 3p의 소실이 있는 폐암환자도 예후가 나쁘다는 보고도 있다³⁰.

본 연구에서는 *Rb* 소실의 유무에 따른 두군간의 임상적 특성을 비교하였으나 성별, 연령, 흡연력, 암의 분화도 및 병기에서 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 예후는 추적기간이 짧고 예가 적어 통계적 검증을 할 수 없었다.

저자들은 더 많은 증례의 폐암조직을 대상으로 한 실험 및 이들 환자에 대한 장기간의 추적을 계속하고 있으며 *K-ras*, *p 53* 등의 변화와의 연관성에 관한 연구도 진행하고 있다. 이와 같은 폐암의 분자적 병인론에 대한 업적이 축적되면 현재 일부의 폐암을 대상으로 시도되고 있는 유전자 치료³¹를 위한 필수불가결한 초석이 되리라 생각된다.

요 약

연구배경 : Retinoblastoma 유전자(*Rb*)의 비활성화는 여러 종류의 암에서 관찰되어 왔다. *Rb*의 이형성의 소실(loss of heterozygosity)은 *Rb*의 비활성화의 가장 흔한 기전으로 소세포폐암에서는 거의 모든 예에서 관찰되나 비소세포폐암에서는 훨씬 낮은 빈도로 관찰된다고 알려져 있다. 이에 저자들은 개흉수술시 얻은 한국인의 비소세포폐암 및 정상폐조직의 DNA에서 *Rb*의 변화를 관찰하였다.

방법 : 폐암조직 및 정상폐조직에서 proteinase K에 의한 소화 및 phenol-chloroform 추출 방법으로 geno-

mic DNA를 추출한 후 제한효소인 EcoRI로 소화시키고 agarose gel에서 전기영동분리시켰다. Southern blot 방법으로 DNA를 nylon 막에 흡착시킨 후 Rb 1 탐식자로 hybridization시켜 stringent condition에서 세척하여 X-ray 필름에 적당기간 노출시켜 현상하였다.

결과 : 26예의 편평상피세포암중 16예에서 정상폐 DNA에서 RFLP에 의한 Rb의 이형성이 관찰되었으며 이중 10예(62.5%)의 폐암조직 DNA에서 이형성의 소실이 관찰되었다. 17예의 폐선암중 11예의 정상폐 DNA에서 RFLP에 의한 Rb의 이형성이 관찰되었으며 이중 5예(45.4%)의 폐암 DNA에서 이형성의 소실이 관찰되었다. Rb의 비활성화 유무에 따른 두 군 사이에 연령, 성별, 암의 병기, 암의 분화도 및 흡연력의 차이가 없었다.

결론 : 이상의 결과로 Rb의 비활성화는 비소세포폐암의 발생기전에 중요한 역할을 하리라 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Bishop JM: The molecular genetics of cancer. Science 235:305, 1986
- 2) Birrer MJ, Minna JD: Molecular genetics of lung cancer. Sem Oncol 15:226, 1988
- 3) Carbone DP, Minna JD: Chapter 14, Molecular biology of lung cancer, Broder S (ed), Molecular foundations in oncology, 1st Ed, 339, Baltimore, Williams and Wilkins, 1991
- 4) Knudson AGJr: Mutation and cancer. Proc Natl Acad Sci USA 68:820, 1971
- 5) Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rappaport JM, Albert DM, Dryja TP: A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. Nature 323:643, 1986
- 6) Lee WH, Bookstein R, Hong F, Young LJ, Shew JY, Lee HP: Human retinoblastoma susceptibility gene: Cloning, identification, and sequencing. Science 235: 1394, 1987
- 7) Yokoda J, Wada M, Shimosato Y, Terada M, Sugimura T: Loss of heterozygosity on chromosome 3, 13, and 17 in small cell carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. Proc Natl Acad Sci USA 84:9252, 1987
- 8) Mori N, Yokota J, Oshimura M, Cavenee WK, Mizoguchi H, Noguchi M, Shimosato Y, Sugimura T, Terada M: Concordant deletions of chromosome 3p and loss of heterozygosity for chromosome 13 and 17 in small cell lung carcinoma. Cancer Res 49: 5130, 1989
- 9) Westin A, Willey JC, Modali R, Sugimura, McDowell EM, Resau J, Light B, Haugen A, Mann DL, Trump BF, Harris CC: Differential DNA sequence deletions from chromosomes 3, 11, 13, and 17 in squamous-cell carcinoma, large-cell carcinoma, and adenocarcinoma of the human lung. Proc Natl Acad Sci USA 86:5099, 1989
- 10) Preparation of genomic DNA from mammalian tissue. Current protocols in molecular biology, 2.2, Wiley, 1987
- 11) Analysis of genomic DNA by Southern hybridization. In Sambrook, Fritsch, Maniatis (Ed), Molecular cloning, 2nd Ed, 9.31, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 12) Synthesis of uniformly labelled double-stranded DNA probe. In Sambrook, Fritsch, Maniatis (Ed), Molecular cloning, 2nd Ed, 10.6, Cold Spring Harbor Press, 1989
- 13) Harris H, Miller OJ, Klein G, Worst P, Tachinaba T: Suppression of malignancy by cell fusion. Nature 260:17, 1969
- 14) Cooper JM: Chapter 9, Tumor suppressor genes, Oncogene, 1st Ed, 121, Jones and Barlett, 1990
- 15) Dryja TP, Rapaport JM, Joyce JM, Peterson RA: Molecular detection of deletions involving band q 14 of chromosome 13 in retinoblastomas. Proc Natl Acad Sci USA 83:7391, 1986
- 16) Hong FD, Huang HJS, To H, Young LJS, Oro A, Bookstein R, Lee EYH, Lee WH: Structure of the human retinoblastoma gene. Proc Natl Acad Sci USA 86:5502, 1989
- 17) Mitnacht S, Weinberg RA: G1/S phosphorylation of retinoblastoma protein is associated with an altered affinity for the nuclear compartment. Cell 65:381, 1991
- 18) Templeton DJ, Park H-S, Lanier L, Weinberg RA: Nonfunctional mutants of the retinoblastoma protein are characterized by defects in phosphorylation, viral oncoprotein association, and nuclear tethering. Proc Natl Acad Sci USA 88:3033, 1991
- 19) Weinberg RA: The retinoblastoma gene and gene product. Tumor suppressor genes, the cell cycle and cancer. Cancer Surveys 12:43, 1992
- 20) Horowitz JM, Yandell DW, Park SH, Canning S,

- Whyte P, Buchkovich KJ, Harlow E, Weinberg RA, Dryja TP: Point mutational inactivation of the retinoblastoma antioncogene. *Science* **243**:937, 1989
- 21) Murakami Y, Katahira M, Makino R, Hayashi K, Hirohashi S, Sekiya T: Inactivation of the retinoblastoma gene in a human lung carcinoma cell line detected by single-strand conformation polymorphism analysis of the polymerase chain reaction product of cDNA. *Oncogene* **6**:37, 1991
 - 22) Mori N, Yokota J, Akiyama T, Sameshima Y, Okamoto A, Mizoguchi H, Toyoshima K, Sugimura T, Terada M. Variable mutations of the *Rb* gene in small-cell lung carcinoma. *Oncogene* **5**:1713, 1990
 - 23) Rodenhuis S, Slebos R, Boot A, Evers SG, Mooi WJ, Wagenaar SS, van Bodegom PC, Bos JL: Incidence and possible clinical significance of K-*ras* oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res* **48**:5738, 1988
 - 24) Mitsudomi T, Steinberg SM, Oie HK, Mulshine JL, Phelps R, Vialett J, Pass H, Minna JD, Gazdar AF: *ras* gene mutations in non-small cell lung cancers are associated with shortened survival irrespective of treatment intent. *Cancer Res* **51**:4999, 1991
 - 25) Takahashi T, Nau M, Chiba I, Birrer M, Rosenberg R, Vinocour M, Levitt M, Pass H, Gazdar A, Minna JD: *p 53*: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* **246**:491, 1989
 - 26) Chiba I, Takahashi T, Nau M, D'Amico D, Curiel D, Mitsudomi T, Buchhagen T, Carbone D, Piantadosi S, Koga H, Reissmann P, Slamon D, Holmes E, Minna J: Mutations in the *p 53* gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. *Oncogene* **5**:1603, 1990
 - 27) Takahashi T, Takahashi T, Suzuki H, Hida T, Sekido Y, Ariyoshi Y, Ueda R: The *p 53* gene is very frequently mutated in small-cell lung cancer with distinct nucleotide substitution pattern. *Oncogene* **6**:1775, 1991
 - 28) Mitsudomi T, Steinberg SM, Nau MM, Carbone D, D'Amico D, Bodner S, Oie HK, Linnoila RI, Mulshine JL, Minna JD, Gazdar AF: *p 53* gene mutations in non-small cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of *ras* mutations and clinical features. *Oncogene* **7**:171, 1992
 - 29) Sugio K, Ishida T, Yokoyama H, Inoue T, Sugimachi K, Sasazuki T: *ras* gene mutations as a prognostic marker in adenocarcinoma of the human lung without lymph node metastasis. *Cancer Res* **52**:2903, 1992
 - 30) Horio Y, Takahashi T, Kuroishi T, Hibi K, Suyama M, Niimi T, Shimokata K, Yamakawa K, Nakamura Y, Ueda R, Takahashi T: Prognostic significance of *p 53* mutations and 3p deletions in primary resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res* **53**:1, 1993
 - 31) Huang HJ, Yee JK, Shew JY, Chen PL, Bookstein R, Friedmann T, Lee EY, Lee WH: Suppression of neoplastic phenotype by replacement of the *Rb* gene in human cancer cells. *Science* **242**:1563, 1988