

Cyclin D1의 발현이 비소세포폐암의 예후에 미치는 영향

한양대학교 의과대학 내과학교실¹, 병리학교실², 성균관대학교 의과대학 병리학교실³

양석철¹, 신동호¹, 박성수¹, 이정희¹, 금주섭³, 공 구², 이중달²

= Abstract =

Prognostic Significance of Cyclin D1 Overexpression in Non-Small Cell Lung Cancer

Seok Chul Yang, M.D.,¹ Dong Ho Shin, M.D.,¹ Sung Soo Park, M.D.,¹ Jung Hee Lee, M.D.,¹
Joo Seob Keum, M.D.,³ Gu Kong, M.D.,² Jung Dal Lee, M.D.,²

*Department of Internal Medicine¹, Pathology², College of Medicine, Hanyang University,
Department of Pathology³, SungKyunKwan University³, Seoul, Korea*

Background : The cyclin D1 gene is one of the most frequently amplified chromosomal regions(11q13) in human carcinomas. In laryngeal and head and neck carcinomas, its overexpression has been shown to be associated with advanced local invasion and presence of lymph node metastases. Cyclin D1 may therefore play a key role in cell growth regulation and tumorigenesis. Lung cancer is a worldwide problem and in many countries it is the most lethal malignancy. As relapse is frequent after resection of early stage non-small cell lung cancer, there is an urgent need to define prognostic factors.

Purpose : This study was undertaken to evaluate the prognostic value of the cyclin D1, that is one the G1 cyclins which control cell cycle progression by allowing G1 to S phase transition, on the patients in radically resected non-small cell lung cancer.

Method : Total 81 cases of formalin-fixed paraffin-embedded blocks from resected primary non-small cell lung cancer from January 1, 1983 to July 31, 1995 at Hanyang University Hospital were available for both clinical follow-up and immunohistochemical staining using monoclonal antibodies for cyclin D1.

Results : The histologic classification of the tumor was based on WHO criteria, and the specimens included 45 squamous cell carcinomas, 25 adenocarcinomas and 11 large cell carcinomas. Cyclin D1 overexpression was noted in 26 cases of 81 cases tested (30.9%). Cyclin D1 expression was not significantly associated with cell types of the tumor, pathological staging and the size of the tumor. But cyclin D1 overexpression was significantly correlated with positive lymph node metastasis(p=0.035). The mean survival duration was 22.76±3.50 months in cyclin D1 positive group and 45.38±5.64 months in cyclin D1 negative group. There was a nearly

significant difference in overall survival between cyclin D1 positive and negative groups($p=0.0515$) in radically resected non-small cell lung cancer.

Conclusion : Based on this study, cyclin D1 overexpression appears an important poor prognostic indicator in non-small cell lung cancer and may have diagnostic and prognostic importance in the treatment of resectable non-small cell lung cancer. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1998, 45 : 776-784)

Key words : Non-small cell lung cancer, Prognostic indicator, Cyclin D1, Cell cycle regulator

서 론

지난 30여 년간의 암치료와 원인에 관한 많은 연구에도 불구하고 폐암, 특히 비소세포폐암 환자의 예후는 별다른 진전이 없었다. 비소세포폐암은 외과적 절제술만이 완치를 기대할 수 있는 가장 효과적인 치료법이지만 이러한 수술적 치료가 적용되는 경우는 전체 환자의 30%도 되지 못하고 아울러 조기에 발견하여 광범위한 외과적 절제술로 치료된 경우에도 환자의 약 50% 정도만이 5년간 생존할 수 있다. 이러한 상황에서 보다 환자의 치료와 예후에 정확한 지표를 제공할 수 있는 새로운 예후적 인자를 알아내는 필요성이 제기되었다.

발암 현상과 세포 주기를 조절하는 구성 요소들과의 사이에 수많은 관계들이 증대되고 있는데 여러 검사점(checkpoint)들은 각각의 세포 주기 상태의 이행 과정들을 조절하며¹⁾ cyclin-dependent kinase(cdk)들과 이와 짝짓는 cyclin들은 여러 검사점을 조절하게 된다. 이중 세포 주기의 중요한 요소인 cyclin D 계 중 하나인 cyclin D1은 염색체 11q13에 존재하는 암유전자²⁾로 세포 주기에서 G1기에서 S기로의 전환을 유도하므로써 세포 주기를 진행시키는데 여러 연구에서 알려진 바와 같이 여러 암종(식도암, 유방암, 방광암, 간암 등)에서 이의 과발현이 암발생에 중요한 요인이 될 수 있다는 보고³⁻⁵⁾가 있으며 cyclin D1의 과발현은 G1/S기로의 진행을 짧게 하여 세포의 증식과 분화를 촉진한다고 알려져 있다⁶⁾.

본 연구에서는 여러 가지 세포 주기에 직, 간접으로 조절하는 요소 중 cyclin D1이 비소세포폐암의 예후

에 미치는 영향을 알아보고 더 나아가 이러한 결론을 통해 보다 환자에 대한 정확한 치료와 예후를 알 수 있는 인자로서의 cyclin D1의 역할을 알고자 이 연구를 시행하였다.

대상과 방법

1. 연구 대상

1983년 1월부터 1995년 7월까지 한양대학교 부속병원에 입원하여 단순 객담 세포진검사, 기관지 내시경 및 폐생검 등으로 진단된 비소세포폐암 환자 중 치료 목적으로 수술적 처치를 받은 총 81명의 환자를 대상으로 하였고 이환자의 대부분은 술전 병기가 IIIa 이하였다. 또한 수술 후 환자의 예후에 영향을 미칠수 있는 인자를 최소한으로 줄이기 위해 술전에 방사선 치료나 항암제 치료를 받은 환자는 제외하였고 혼합형의 조직학적 진단이 이루어진 경우와 수술 1달 이내에 사망한 경우는 본 연구의 대상에서 제외하였다. 이러한 방법으로 얻어진 암종 조직을 이용하여 cyclin D1의 단클론성 항체를 사용하여 면역조직화학적 염색을 시행하였다.

2. 방 법

ABC 방법(avidin-biotinyl peroxidase complex method)을 이용하여 수술적 절제로 얻어진 폐암 조직에서의 cyclin D1의 발현 양상을 알아보았는데 파라핀 포매 조직에서 hematoxyline-eosin(H-E) 염

색으로 조직내 종양의 유무를 재검색한 후 종양의 존재가 확인된 절편을 대상으로 cyclin D1에 대한 일차항체(Novocastra, Newcastle, UK)를 이용하여 면역조직화학적 염색을 시행하였고 음성대조군으로는 주변의 정상 폐조직을 이용하였다.

염색 방법을 요약하면 우선 포르말린에 고정되어 파라핀에 보관된 조직을 4 μm의 두께로 절단한 후 슬라이드에 붙이고 이후 histoclear 용액을 이용하여 파라핀을 제거한 다음 ethanol에 연속적으로 10분씩 처리한 후 재함수시켰다. 이후 약 30분 간 0.3% H₂O₂와 함께 처리하여 내재된 비특이적 peroxidase 작용을 억제하였고 슬라이드는 microwave에서 pH 6.0인 10-mmol/L citrate buffer 용액과 함께 가열한 뒤 적어도 실온에서 20분간 식힌 뒤 1 : 100으로 희석된 0.05M Tris buffered saline(TBS) 용액에서 10분씩 3번 세척하였다. 슬라이드는 non-immune rabbit serum(5%, pH 7.6)과 함께 1 : 50 희석하여 10분간 반응시켜 cyclin D1에 대한 비특이적인 염색을 방지하였고 그런 다음에 완충액으로 희석한 일차항체와 함께 조직절편이 있는 슬라이드를 2시간 동안 37°C humidified chamber에서 배양하였으며 이후 TBS에 세척한 다음 anti-mouse IgG(Dako, Carpenteria, CA)에 30분간 반응시키고 이어 peroxidase-antiperoxidase conjugate(Dako, Carpenteria, CA)를 도포하였다. 이후 Diaminobenzidine tetrachloride(Dako, Carpenteria, CA)로 발색시킨 후 crystal mount로 봉입하여 검경하였다. 음성 대조군에서는 일차항체 대신에 phosphate-buffered saline(PBS)를 사용하였다.

면역조직화학적 염색의 양성 반응은 폐암세포의 핵에서 전체 종양 세포중 발현되는 세포의 비율이 전체 종양세포의 5% 이상 나타나면 양성으로 정의하였다.

3. 통계학적 분석

본 연구에서의 자료는 SPSS 통계프로그램을 이용하여 분석하였고 생존분석은 Kaplan Meier 방법을 이

용하고 생존 curve의 분석은 log rank test로, 생존분석은 Cox's proportional hazards를 사용하였다. 통계적 유의성은 p값이 0.05미만인 경우로 정하였다.

결 과

1. 임상적 특징(Table 1)

총 81명의 환자의 평균 연령은 55.4세였고 남자가 67명 여자가 14명이었다. 환자에서 폐암의 위험 직업 인자는 발견할 수 없었고 흡연력은 평균 27.22 ± 22.34

Table 1. Clinical characteristics

	No(%)
Total number of patients	81
Mean age(years)	55.4
Sex	
Male	67(82.7)
Female	14(17.3)
Histologic type	
Squamous cell carcinoma	45(55.6)
Adenocarcinoma	25(30.9)
Large cell carcinoma	11(13.5)

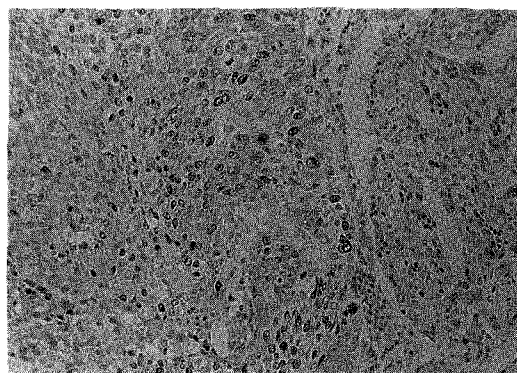


Fig. 1. Cyclin D1 expression by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer tissue. Cancer cells with nuclear staining are conspicuous.

Table 2. Cyclin D1 expression and tumor stage

Tumor stage	Cyclin D1(-)	Cyclin D1(+)	(+)%
I (n=20)	18	2	10
II (n=13)	6	7	53.8
IIIa (n=30)	20	10	33.3
IIIb (n=10)	8	2	20
IV (n=3)	3	0	0

(p=0.559)

Table 3. Cyclin D1 expression and nodal status

Nodal status	Cyclin D1(-)	Cyclin D1(+)	(+)%
N0	25	4	13.8
N1	14	10	41.7
N2	15	12	44.4
N3	1	0	0

(N0 versus N1-3 : p=0.035)

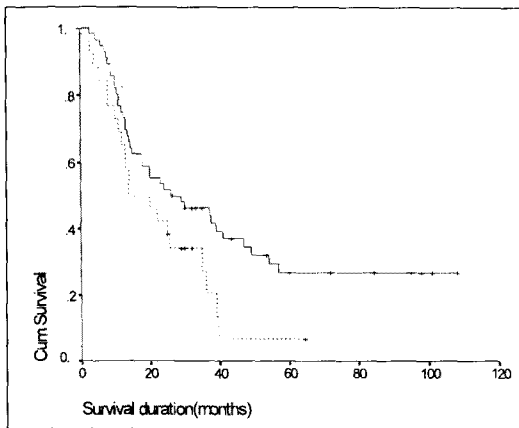


Fig. 2. Survival of patients with cyclin D1(+) versus cyclin D1(-) groups. (The mean survival duration was 22.76 ± 3.50 months in cyclin D1 positive group and 45.38 ± 5.64 months in negative group : p=0.0515). (solid line : cyclin D1 negative, dot line : cyclin D1 positive)

pack-years이었다. 비소세포폐암의 조직형은 편평세포암종 45예, 선암종 25예, 대세포암종 11예였다.

2. 실험 결과

Cyclin D1의 발현은 총 81예중 26예에서 관찰되어 30.9%의 발현율을 보였고 이때 종양세포의 핵에 진하게(주위의 침범한 림프구와 같은 정도의 강도) 염색된 경우에 한하여 양성 반응으로 간주하였고 이러한 종양세포가 5% 이상인 경우를 양성으로 판정하였다(Fig. 1). Cyclin D1의 발현은 각각의 조직형이나 병기, 암의 크기와의 상관관계에서 통계학적인 유의한 차이를 보이지 않았으나(Table 2) TNM 병기 판정에 따라 N0와 나머지 N1-3의 두군으로 나누어 비교할 때 cyclin D1 과발현에 따른 뚜렷한 의의를 보였다(Table 3)(p=0.035).

3. 생존 분석

환자의 추적 관찰기간은 최소 1.5개월부터 최장 108개월이었고 Cyclin D1 양성 발현군의 평균생존기간이 22.76 ± 3.50 개월, 음성 발현군의 평균생존기간이 45.38 ± 5.64 개월로 생존율과의 상당한 통계학적 연관

성의 가능성을 나타내었다($p=0.0515$)(Fig. 2).

고 찰

모든 세포는 스스로 생존하기 위해서 자기와 동일한 세포를 세포 분열이라는 방법을 통해 이의 목적을 이루고 있는데 세포 주기의 여러 복잡한 과정의 균형이 깨져 유전자적 불안정성을 보일 때 악성 세포의 발생이 시작될 수 있다. 따라서 암의 발생은 이러한 세포 성장과 재생의 이상 조절의 특징을 보인다고 말할 수 있다. 세포가 생존하고 성장하기 위해서는 계속적인 세포분열을 통해 자세포를 생성하여야 하는데 이러한 과정은 세포주기에 맞추어 이루어지게 된다.

세포주기는 크게 두 개의 기능적 기간(S기, M기)과 두 개의 준비 기간(G1기, G2기)로 구성되어 있는데 어떤 과정으로 세포주기가 조절되는 지는 정확하게는 알 수 없고 세포내 조절 기전과 세포외의 여러 요소들, 즉 growth factor, mitogen, antimitogen, differentiation factor, cell-cell contact or anchorage factor, nutrients 등에 의해 영향을 받게 된다고 여겨지고 있다.

체내에서 세포 분열 활동을 하지 않는 세포들은 종말분화된 세포이거나 세포 주기에 재진입하지 못하여 G0기에서 일시적으로 정지되어 있는 상태, 또는 G1/S기 혹은 G2/M기의 검사점에 걸려 정지되어 있는 상태이다. 이러한 세포 주기를 조절하는 정확한 기전은 밝혀져 있지 않지만 세포내적, 세포외적 많은 요소에 의해 좌우되리라 여겨지고 있다⁶⁻¹¹⁾. 그중 세포 주기의 분자적 조절 장치의 중심이 되는 것이 cyclin-dependent kinase(cdk)라는 효소군으로 여러 cyclin과 결합하여 복합체를 형성함으로써 활성화되어 표적 분자들을 인산화시킴으로써 세포 주기를 진행시킨다. 그런데 이러한 세포 주기의 활성화, 특히 그중에서도 G1기에서 S기로의 이행에 관여하는 세포 주기 관련 단백질들은 암발생에 있어서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 포유동물 세포에서 G1로의 진행에 주 조절인자는 3개 D-type cyclin

(D1, D2, D3)과 이들을 인산화하여 활성화시키는 cdk4 또는 cdk6 및 G1기 말기에 cdk2와 반응하는 cyclin E가 있다. 세포 주기의 G1기에서 일어나는 분자학적 과정에서 restriction point(R)은 세포 주기 진행의 첫 조절점이 되는데 이 지점을 넘어서면 외부에서 mitogenic growth factor가 없어도 DNA 합성을 완수할 수 있게 된다.

발암 현상과 세포 주기를 조절하는 구성 요소들과의 사이에 수많은 관계들이 증대되고 있는데 여러 검사점들은 각각의 세포 주기 상태의 이행과정들을 조절하며¹²⁾ cdk들과 이와 짝짓는 cyclin들은 여러 검사점을 조절하게 된다. 검사점들 중 가장 중요한 것은 포유동물 세포들에서 restriction point로 알려진 G1기 후기의 START이며 양성 및 음성 신호들이 여기에서 통합되어진다. 많은 검사점들은 cyclin과 cdk 복합체의 변화들로 인해 발암 현상에서 조절 실조가 일어나고 또한 START의 조절 실조현상이 정상 신호 전달체계에 반응치 않아서 세포성장과 분열의 결과를 초래하게 된다. 실제 종양 세포에 있어서 cyclin과 같은 양성 조절자들의 이상 발현 및 cdk inhibitor들 같은 음성 조절자들의 손실이 증명되었다¹³⁾. 포유동물 세포들에 있어서 START를 조절하는 cyclin과 cdk 복합체는 cyclin D와 여기에 상응하는 cdk들중 특히 cdk4이다. cyclin D들은 30분내의 짧은 반감기를 갖고, 성장인자의 탐색자들로 작용하며¹⁴⁾ START를 통하여 세포를 조정하기 위하여 cdk4 또는 cdk6를 활성화시킨다^{15,16)}. Cyclin D 합성의 탈조절 현상은 성장 인자들에 의존치 않는 세포 주기 진행의 결과를 가져와 발암 현상을 유발시킨다. 또한 cyclin D들은 또 다른 암억제 유전자인 Rb에 의한 세포 주기 조절에 필수적이다.

분자생물학의 발전으로 세포 증식을 조절하는 여러 단백질을 알게 되었는데 G1 cyclin인 cyclin D1은 세포주기 제한점(restriction point) 이전의 세포 주기의 초기에 발현되어 세포가 G1기에서 S기로의 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌으며 결국 세포주기의 시발점으로서의 역할을 알게 되었으며 또한

세포 성장의 감지자(sensor)로서의 역할을 가늠할 수 있었다. Cyclin D1은 처음에 추정적인 전암유발 유전자, BCL1/PRAD1으로 확인되었으며 염색체 11q13에 위치하는데 인체 암종에서 가장 흔하게 증폭되는 염색체 부분의 하나로 알려지고 있으며 실제 cyclin D1의 과발현이 식도암, 유방암 및 간암 등에서 발견되기도 하였는데³⁻⁵⁾ cyclin D1의 과발현은 G1/S기로의 진행을 짧게하여 세포의 증식과 분화를 촉진한다고 알려지고 있다⁶⁾. Cyclin D1이 발암과정에 연관되어 있을 가능성을 보인 것은 첫째, 부갑상선 종에서 발현에 포함된 것뿐만 아니라 BCL1 breakpoint에서 염색체 역전좌, t(11;14)(q13;q32)의 결과로 인해 면역글로블린 heavy chain 유전자의 영향하에 cyclin D1의 발현이 상향 조절되다는 보고이다^{17,18)}. 두 번째로 cyclin D1이 활성화된 myc 및 ras 종양 유전자에 의해 유도된다는 것이고^{19,20)} 최근 연구 결과에 의하면 cyclin D1이 apoptotic neuronal cell death의 매개체가 된다는 보고도 있다²¹⁾. 이처럼 cyclin D1은 세포 주기의 비조절화를 통해 폐암²²⁻²⁵⁾ 뿐만 아니라 여러 다른 종류의 암종의 발암과정에서 중요한 작용을 하리라고 여겨지고 있다^{26,27)}.

발암과정에서의 cyclin D1의 역할은 발암유전자의 가능성을 보여준 in vitro 연구에 의해 잘 알려졌는데 설치류 세포에서 구성 과발현이 G1기를 짧게 할 수 있고²⁸⁾ 비슷하게 G1기에 정지되어 있는 유방암 세포에서 cyclin D1 유도로 세포주기를 완성할 수 있고 G1/S기를 짧게 한다는 보고도 있다²⁹⁾. Cyclin D1의 역할에 대한 정확한 기전은 완전히 밝혀지지 않은 상태로 지속적인 연구가 진행중이다. 그럼에도 불구하고 그기능에 대한 일부 연구³⁰⁾에서 pRb 유전자 단백질이 G1기 말기에 하향 조절되고 threonine과 serine residue의 인산화로 pRb 유전자의 비활성화가 일어난다는 것을 밝혔다. Cyclin D1과 cyclin-dependent kinases(CDK4, CDK6)와 같은 다른 세포주기 조절인자 사이의 상호 작용과 cyclin D1/CDK4, p16(CDK6)의 복합체의 상호 작용에서 최근 폐암의 발

암 과정에서 상당히 중요한 작용을 할 수 있다는 연구 결과³¹⁾가 대두되었고 식도암³²⁾에서 cyclin D1의 돌연변이 빈도는 21-50%, 두경부암³³⁾에서는 10%, 비소세포폐암^{34,35)}에서는 10-30%를 보이거나 본 연구에서는 81명의 비소세포 폐암 환자의 절제된 조직 절편에서 30.9%의 cyclin D1의 과발현을 보여 다소 높은 결과를 보였다.

Cyclin D1 단클론성 항체를 이용한 면역조직화학적 방법으로 cyclin D1의 존재를 알 수 있는데 Gillet 등³⁶⁾은 이러한 항체를 이용하여 CCND1 유전자의 증폭과 cyclin D1의 과발현 사이에 상당한 연관성이 있다는 것을 알아냈는데 본 연구에서도 이와 같이 단클론성 항체를 이용하여 cyclin D1의 과발현을 알아 보았다. 본 연구에서 cyclin D1의 과발현이 각각의 조직형, 병기 및 암의 크기에 따른 변화는 통계학적 차이를 보이지 않았으나 TNM 병기 판정에 따라 N0와 나머지 N1-3의 두군으로 나누어 비교할 때 cyclin D1에 따른 통계적 의의를 보였고($p=0.035$) Cyclin D1 양성 발현군의 생존 기간이 22.76 ± 3.50 개월, 음성군의 생존기간이 45.38 ± 5.64 개월로 비소세포폐암에서 환자의 생존율과 상당한 통계적인 연관성의 가능성을 나타내었다($p=0.0515$).

결론적으로 본 연구에서는 cyclin D1의 과발현은 비소세포폐암에서 상당히 불량한 예후 인자로 작용할 가능성을 보였고 앞으로 보다 광범위한 연구가 진행되어 비소세포폐암에서 예후적 인자로서의 중요성을 찾는 연구가 필요하다고 생각된다.

요 약

연구목적 :

폐암은 생물학적 및 병리화학적 특성에 따라 비소세포 폐암과 소세포폐암으로 구분되는데 전체폐암의 약 80%가 비소세포폐암으로 국소적인 폐암인 경우 수술적 치료가 절대적 완치 방법인데 조기에 발견하여 광범위한 절제로 치료된 경우에도 환자의 약 50% 정도만이 5년간 생존한다. 확실히 비소세포폐암에서 비슷한 병

기의 환자들도 생존 가망성은 상당한 차이를 보인다. 이러한 상황이 보다 정확히 생존 가망성을 예측하고 각각의 환자에게 보다 효율적인 치료를 제공할 수 있게 도울 수 있는 새로운 예측 인자를 밝혀야 하는 필요성이 제기되었다. 정상적인 세포주기 뿐만 아니라 암종의 세포주기에 중요한 역할을 하는 cyclin D계중 하나인 cyclin D1이 세포주기에서 G1기에서 S기로의 전환을 유도하므로써 세포주기를 진행시키는데 유방암, 식도암 및 방광암에서 이의 과발현이 암발생에 중요한 요인이 된다는 보고가 있다. 이에 본 연구에서는 광범위 절제된 비소세포폐암에서 cyclin D1의 과발현이 예후에 미치는 영향을 알아보기 위해 연구를 시행하였다.

방 법 :

1983년 1월부터 1995년 7월까지 한양대학교 부속병원에서 비소세포폐암으로 진단된 술전 병기 IIIa이하인 환자 총 81예를 대상으로 치료적 목적으로 광범위 폐절제술을 통해 얻어진 술후 조직에서 cyclin D1에 대한 단클론성 항체를 사용하여 면역조직화학적 염색을 시행하고 더불어 병리조직학적 특징과 임상적 특징, 특히 생존률과의 연관성을 알아보았다. 또한 술후 환자의 예후적 인자를 최소한으로 줄이기 위해 술전에 방사선 치료나 항암제 치료를 받은 환자는 제외하였고 혼합형의 조직학적 진단이 이루어진 경우와 술후 1달 이내에 사망한 경우는 본 연구의 대상에서 제외하였다. 조직병리학적 병기 판정은 TNM 병기 판정 기준에 맞추었고 조직학적 특징은 WHO 표준 기준에 맞추었다.

결 과 :

Cyclin D1의 발현은 총 81예에서 시행하여 26예에서 발현되어 30.9%의 발현율을 보였고 각각의 조직형이나 병기, 암의 크기에는 통계적 차이를 보이지 않았으나 TNM 병기 판정에 따라 N0와 나머지 N1-3의 두군으로 나누어 비교할 때 cyclin D1에 따른 통계적 의의를 보였고($p=0.035$) cyclin D1 양성 발현군의 평균생존기간은 22.76 ± 3.50 개월, 음성 발현군의 평균생존기간이 45.38 ± 5.64 개월($p=0.0515$)로

생존율과의 상당한 통계적인 연관성의 가능성을 나타내었다.

결 론 :

본 연구에서는 여러 가지 세포주기를 직, 간접으로 조절하는 인자중 cyclin D1의 과발현은 비소세포폐암에서 상당히 불량한 예후 인자로 작용할 수 있다고 생각되며 앞으로 보다 초기와 진행된 병기에 따른 cyclin D1의 발현이 예후에 미치는 영향 등 보다 세밀하고 대단위적인 연구가 진행되어 비소세포폐암에서 보다 정확한 치료와 예후를 예측할 수 있는 인자로서의 역할을 밝혀야 한다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Nurse P : Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 79 : 547, 1994
2. Matshushime H, Roussel MF, Ashmun RA, Sherr CJ : Colony stimulating factor I regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 65 : 701-713, 1991
3. Jiang W, Kahn SM, Tmita N, Zhang YJ, Lu SH, Weinstein IB : Amplification and expression of the human cyclin D gene in esophageal cancer. *Cancer Res* 52 : 2980-2983, 1992
4. Gillett C, Fantl V, Smith R, Fisher C, Bartek J, Dickson C, Barnes D, Peter G : Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res* 54 : 1812-1817, 1994
5. Zhang YJ, Jiang W, Chen CJ, Lee CS, Kahn SM, Santella RM, Weinstein IB : Amplification and overexpression of cyclin D1 in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 196 : 1010-1016, 1993
6. Sherr CJ : G1 phase progression : cycling on cue. *Cell* 79:551-555, 1994
7. Sherr CJ, Roberts JM : Inhibitors of mammalian

- G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9 : 1149, 1995
8. Pines J : Cyclins, CDKs and cancer : *Semin Cancer Biol* 6 : 63, 1995
 9. Grana X, Reddy EP ; Cell cycle control in mammalian cells : role of cyclins, cyclin dependent kinases(CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors(CDKIs). *Oncogene* 11 : 211, 1995
 10. Hartwell LH, Kastan MB: Cell cycle control and cancer. *Science* 266 : 1821, 1994
 11. Sherr CJ, Kato J, Quelle DE, Mastuoka M, Roussel MF : D-type cyclins and their cyclin-dependent kinase : G1 phase integrators of the mitogenic response. In : *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 59 : 1994
 12. Nurse P : Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 79 : 547, 1994
 13. Hunter T, Pines J : Cyclins and cancer II : Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79 : 573, 1994
 14. Sherr CJ : Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73 : 1059, 1993
 15. Meyerson M, Harlow E : Identification of G1 Kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol* 14 : 2077, 1994
 16. Bates S, Bonetta L, MacAlain D, Parry d, Holder A, Dickson C, Peters G : CDK6 (PLS-TIRE) and CDK4(PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin-dependent kinases that associate with cyclin D1. *Oncogene* 9 : 71, 1994
 17. Seto M, Yamamoto K, Iida S, Akao Y, Utsumi KR et al : Gene rearrangement and overexpression of PRAD1 in lymphoid malignancy with t(11 ; 14)(q13 ; q32) translocation. *Oncogene* 7 : 1401-1406, 1992
 18. de Boer CJ, Van Krieken JHJM, Kluin-Neleman HC et al : Cyclin D1 messenger RNA overexpression as a marker for mantle cell lymphoma. *Oncogene* 10 : 1833-1840, 1995
 19. Filmus J, Robles AI, Shi W, Wong MJ, Colombo LL, Conti CJ : Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras. *Oncogene* 9 : 3627-3633, 1994
 20. Daksis JI, Lu RY, Facchini LM, Marhin WW, Penn LJZ : Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo protein synthesis and links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle. *Oncogene* 9 : 3635-3645, 1994
 21. Kranenburg O, Van der Eb AJ, Zanema A : Cyclin D1 is an essential mediator of apoptotic neuronal cell death. *EMBO J* 15 : 46-54, 1996
 22. Betticher DC, Heighway J, Hasleton PS, Altermatt HJ, Ryder WD, Cerny T, Thatcher N : Prognostic significance of CCND1 overexpression in primary resected non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 73 : 294-300, 1996
 23. Kwa HB, Michalides RJ, Dijkman JH, Mooi WJ : The prognostic value of NCAM, p53 and cyclin D1 in resected non-small cell lung cancer. *Lung cancer* 14 : 207-217, 1996
 24. Betticher DC, Heighway J, Thatcher N, Hasleton PS : Abnormal expression of CCND1 and Rb1 in resection margin epithelia of lung cancer patients. *Br J Cancer* 75 : 1761-1768, 1997
 25. Caputi M, De Luca L, Papaccio G, D'Aponte A, Cavallotti I, Scala P et al : Prognostic role of cyclin D1 in non-small cell lung cancer ; an immunohistochemical analysis. *Eur J Histochem* 41 : 133-138, 1997
 26. Monden N, Nishizaki K, Fukushima K, Masuda Y, Tsukuda K, Shimizu K : Quantitative analysis of cyclin D1 messenger RNA expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Jpn J Can-*

- cer 88 : 660-668, 1997
27. Gansauge S, Gansauge F, Ramadani M, Stobbe H, Rau B, Harada N, Begler HG : Overexpression of cyclin D1 in human pancreatic carcinoma is associated with poor prognosis. *Cancer Res* 57 : 1634-1637, 1997
 28. Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato JY, Bar-Sagi D, Roussel MF, Sherr CJ : Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev* 7 : 1559-1571, 1993
 29. Musgrove EA, Lee CSL, Buckley MF, Sutherland RL : Cyclin D1 induction in breast cancer cells shorten G1 and is sufficient for cells arrested in G1 to complete the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci* 91 : 8022-8026, 1994
 30. Wiman KG : The retinoblastoma gene: role in cell cycle control and cell differentiation. *FASEB J* 7 : 841-845, 1993
 31. Shapiro GI, Edwards CD, Kobzik L, Godleski J, Richards W, Sugarbaker DJ, Rollins BJ : Reciprocal Rb inactivation and p16INK4 expression in primary lung cancers and cell lines. *Cancer Res* 55 : 505-509, 1995
 32. Zhou X, Tarmin L, Yin J, Jiang HY, Suzuki H, Rhyu MG, Abraham JM, Meltzer SJ : The MTS1 gene is frequently mutated in primary human esophageal tumors. *Oncogene* 9 : 3737-3741, 1994
 33. Zhang SY, Klein-Szanto AJP, Sauter ER et al : Higher frequency of alterations in the p16/CDK N2 gene in squamous cell carcinoma cell lines than in primary tumors of the head and neck. *Cancer Res* 54 : 5050-5053, 1994
 34. Hayashi N, Sugimoto Y, Tsuchiya E, Ogawa M, Nakamura Y : Somatic mutations of the MTS1/CDK4I gene in human primary non-small cell lung carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 202 : 1426-1430, 1994
 35. Woo-Ick Yang, Kyung-Young Chung, Kong-Hwan Shin, Yung-Bae Kim : Cyclin D1 protein expression in lung cancer. *Yonsei Medical Journal* 37 : 142-150, 1996
 36. Gillett C, Fantl V, Smith R, Fisher C, Bartek J, Dickson C, Barnes D, Peters G : Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res* 54 : 1812-1817, 1994