

## Comparative genomic hybridization 기법을 이용한 인체 구강암의 유전자 변화에 대한 연구

이명렬 · 심광섭 · 이영수 · 우순섭 · 공 구\*

한양대학교 의과대학 치과학교실, 병리학교실\*

### Abstract

### GENETIC ALTERATIONS OF HUMAN ORAL CANCERS USING COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION

Myeong-Reoyl Lee, Kwang-Sup Shim,

Young-Soo Lee, Soon-Seop Woo, Gu Kong\*

*Dept. of Dentistry and Dept of Pathology\*, College of Medicine, Hanyang University*

The development and progression of oral cancer is associated with an accumulation of multiple genetic alterations through the multi-step processes. Comparative genomic hybridization(CGH), newly developed cytogenetic and molecular biologic technique, has been widely accepted as a useful method to allow the detection of genetic imbalance in solid tumors and the screening for chromosome sites frequently affected by gains or losses in DNA copy number.

The authors examined 19 primary oral squamous cell carcinomas using CGH to identify altered chromosome regions that might contain novel oncogenes and tumor suppressor genes. Interrelationship between these genetic aberrations detected and major oncogenes and tumor suppressor genes previously recognized in carcinogenesis of oral cancers was studied.

1. Changes in DNA copy number were detected in 14 of 19 oral cancers (78.9%, mean: 5.58, range: 3~13). High level amplification was present in 4 cases at 9p23, 12p21.1~q13.1, 3q and 8q24~24.3. Fourteen cases(78.9%, mean: 3.00, range: 1~8) showed gains of DNA copy number and 12 cases(70.5%, mean: 2.58, range: 1~9) revealed losses of DNA copy number.
2. The most common gains were detected on 3q(52.6%), 5p(21.0%), 8q(21.0%), 9p(21.0%), and 11q(21.0%). The losses of DNA copy number were frequently occurred at 9p(36.8%), 17q(36.8%), 13q(26.3%), 4p(21.0%) and 9p(21.0%).
3. The minimal common regions of gains were repeatedly observed at 3q24~26.7, 3q27~29, 1q22~31, 5p12~13.3, 8q23~24, and 11q13.1-13.3. The minimal common regions of losses were detected at 9q11~21.3, 17p31, 13q22~34, and 14p16.
4. In comparison of CGH results with tumor stages, the lower stage group showed more frequent gain at 3q, 5q, 9p, and 14q, whereas gains at 1q(1q22~31) and 11q(11q13.1~13.3) were mainly detected in higher stage group. The loss at 13q22~34 was exclusively detected in higher stage.

The results indicate that the most frequent genetic alterations in the development of oral cancers were gains at 3q24~26.3, 1q22~31, and 5p12~13.3 and losses at 9q11~21.3, 17p31, and 13q. It is suggested that genetic alterations manifested as gains at 3q24~26.3, 3q27~29, 5p12~13.3 and 5p are associated with the early progression of oral cancer. Gains at 1q22~31 and 11q13.1~13.3 and loss at 13q22~34 could be involved in the late progression of oral cancers.

### I. 서 론

암의 발생은 일반적으로 많은 성장 인자, 종양 유전자 및 종양 억제 유전자의 매우 다양한 변이가 여러 단계의 발생 과정에서 축적된 결과로 생각한다. 구강 암종의 발암 과정에서도 여러 단계에 걸쳐 많은 유전자의 변이가 축적되는 것으로 알고 있다(Fearon and Volgestein, 1990; Renan et al., 1993; Partridge et al., 1998). 이러한 연구의 대부분은 고전적인 세포 유전학적 연구인 염색체 핵형 분석과 polymerase chain reaction(PCR) 기법 및

#### 심 광 섭

133-792, 서울시 성동구 행당동 17

한양대학교 의과대학 치과학교실

Kwang-Sup Shim

Dept. of Dentistry, Hanyang University Hospital

17, Haengdang-Dong, Sengdong-Ku, Seoul, 133-792, Korea

Tel. 82-2-2290-8671,2 Fax. 82-2-2290-8678

microsatellite marker를 이용한 loss of heterozygote(LOH) 기법과 Southern blotting에 의해 이루어졌다(Scully, 1992). 염색체 핵형 분석은 인체 종양에서 염색체의 수적 및 구조적 이상을 검색할 수 있으나, 종양 세포를 배양하기 매우 힘들고, 많은 경비와 노동을 필요로 하며, 종양 세포의 유전자 변이를 찾는 것이 쉽지 않다. 분자 생물학적 기법인 LOH와 Southern blotting은 각각 종양 유전

자와 종양 억제 유전자를 검색할 수 있는 매우 유용한 방법으로 종양의 유전자 변이에 대한 연구가 진행되고 있으나, 염색체의 국소적 부위만이 검색의 대상이 되므로 제한된 정보만을 얻을 수 밖에 없다(Jin et al., 1993; Rao et al., 1994; Nawroz et al., 1994; E1-Naggar et al., 1995; Jones et al., 1997).

이전의 많은 세포 유전학적 연구 및 분자 생물학적 연구로 인

**Table 1.** Clinical Data and DNA Copy Number Changes in Oral Cancers from 19 Patients

Case	Sex/age (years)	Stage	Site	Differentiation	Amplification	Gain	Loss
1	M/64	I	Tongue	Well	9q23	9p13-pter	9q13-q21.3, 11p15.1-p15.5
2	M/64	IV	Oropharynx	Moderate	12p12.1-q13.1	3q24-qter, 6p12-21.1, 7q21.1-31.1, 8q23-24.3, 12p12.1-q13.1, Xp11.4-q25	3p22-pter, 4q33-35, 8p21.1-23.3, 10p13-15, 13
3	M/51	IV	Tonsil	Well	3q	1q-23-32.1, 3q, 11q13.1-13.5, Xp11.4-X21.3	2q31-qter, 3p14.1-pter, 10p12.1-pter, 11p12-pter, 17p
4	F/56	II	Tongue	Moderate	-	-	-
5	M/63	III	Tonsil	Well	8q24.1-24.3	2q14.2-21.3, 3q, 5p, 7q21.2-22, 8q, 11q13.1-13.5, 14q22-23, 18p11.2,	4p15.1-pter, 7q34-qter, 17p13, 20p12-13
6	M/58	IV	Tonsil	Well	-	1q42.1-44, 3q24-qter, 7q21.1-22, 11p12-q13.5	4p13-pter, 5p14-pter, 9p23-24, 9q, 19p, 20p12-13
7	F/70	I	Tongue	Moderate	-	3q24-qter, 5p12-15.2, 6p21.2-q21.3, 12p12.1-p12, 12q21.1-21.3, 13q21.1-32	9pter-q21.3, 17q, 19q13.2-qter, 20q13.2-qter
8	F/60	II	FOM	Well	-	7p12-qter, 12q22-24.1	17p13
9	M/54	II	Tongue	Moderate	-	8q12-24.2, 9p23-24, 9q31-qter, 18p11.2-q11.2, Xq13-23	12p12.1-pter, 13q, 17p13
10	M/60	IV	Tongue	Well			
11	F/55	II	Buccal	Moderate			
12	M/57	III	FOM	Well			
13	M/76	III	Tongue	Well	-	1q12-41, 3q	2q24.1-qter, 9p, 9q12-q22.3, 10p13-14, 10q11.2-q21.3, 13q, 17q, 18p13, 18q
14	F/65	IV	Tonsil	Moderate	-	1q12.1-31, 3q23-qter, 11q13.1-13.5	9q13-21.3, 17q
15	M/42	I	Tongue	Moderate	-	2q32.1-34, 3p13-q13.1, 3q22-26.3, 9p21-pter, 9q32-qter, 13q22-32, 14q 3q23-qter, 5p12-13.3, 12p	4p, 4q, 9q13-21.3, 16p, 19p
16	F/77	I	Tongue	Well	-		
17	F/62	II	Tongue	Well			
18	F/53	II	Tongue	Moderate	-	2q23-q32.3, 3q25.1-qter, 5p, Xq	4p31.1-pter, 5q21-qter, 9pter-q21.3
19	M/50	III	Buccal	Moderate	-	8p21.3-8qter, 9p, 9q22.1-qter	-

FOM: floor of mouth

체 구강암의 발암과정에 여러 종양 유전자의 증폭, 즉 cyclin D, epidermal growth factor receptor(EGFR), c-erb B-2, int-2, c-myc 등이 관여하고 있음을 보고하고 있다(Somers et al., 1990; Hou et al., 1992; Scully, 1992; William et al., 1993). 종양 억제 유전자로는 p53 유전자가 약 30-40%에서 결손 및 변이로 나타난다(Koh et al., 1998). LOH 기법과 고전적 염색체 핵형 분석에 의하면 염색체 3p, 5q, 7q, 8p, 9p, 11q, 13q, 17p 및 18q 유전자의 결손이 자주 관찰된다. 그러나 이러한 연구들은 인체 구강암의 발암 과정에 특정 유전자의 변이에 대한 연구이므로, 매우 제한적이고, 국소적인 정보만을 제공하였다(Largey et al., 1994; El-Naggar et al., 1995; Califano et al., 1996; Emilion et al., 1996; Roz et al., 1996; Pershouse et al., 1997).

Comparative genomic hybridization(CGH)는 새롭게 개발된 분자 생물학적 및 세포 유전학적 기법으로서, 전체 염색체의 각 국소 부위에서 DNA의 복제수(DNA copy number)의 증가와 감소를 분석할 수 있는 방법으로 최근 그 정교함과 정확성을 인정받아 이 기법을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다(Speicher et al., 1994; Levin et al., 1995; Speicher et al., 1995; Tarkkanen et al., 1995; Levin et al., 1995). CGH 기법은 기본적으로 서로 다른 두 개의 형광물질로 표식된 종양 DNA와 정상 DNA를 정상 염색체 metaphase spread 슬라이드 위에서 hybridization 시킨다. 이리하여 정상 DNA에 대한 종양 DNA의 상대적인 형광의 강도를 측정하고 각 염색체 특정 부위에서 DNA 복제수의 증가와 감소를 객관적으로 측정하는 방법이다. CGH 기법의 유용성으로는 모든 염색체의 국소 부위에 나타나는 유전자의 변이를 검출하여 새로운 종양 유전자나 종양 억제 유전자의 위치를 제시할 수 있는 것이며, 또한 기존에 밝혀진 유전자의 변이에 따른 역할 및 상호 관계를 쉽게 알 수 있다는 점이다(Kollioniemi et al., 1992; 1994a, b).

지금까지 CGH 기법에 의해 구강암에 대한 유전자 변이의 분석은 Komiyama(1997) 등의 연구가 유일한 것인데, 이 연구에서는 단지 4례의 인체 원발성 구강암을 대상으로 하고 매우 제한적인 정보를 제시하고 있다.

본 연구의 목적은 CGH 기법을 이용하여 인체 구강암에서 전체 염색체의 국소 부위에 나타나는 유전자 변이를 검색하고, DNA의 복제수의 변이가 빈번한 염색체 부위를 제시하는데 있다. 나아가서 국소 부위의 변이가 기존의 종양 유전자와 종양 억제 유전자와의 연관성을 밝히고, 구강암의 발암과정에 관여하는 새로운 유전자의 위치를 제시하고자 이 연구를 실시하였다.

## II. 연구대상 및 방법

### 1. 연구대상

한양대학교 병원에서 구강에 발생한 편평 세포 암종으로 진단을 받고 절제된 19례를 실험 대상으로 하였다. 각 예의 종양 부위에서 절취한 조직을 -70°C에서 냉동 보관하였다. 환자의 임상 정보와 임상 병기는 병력지를 검토하여 결정하였고, 조직학적 분화도는 조직 표본을 다시 검경하여 결정하였다. 암의 임상 병기

는 TMN 분류법을 이용하였고, 암 조직의 분화도는 WHO 분류에 의해, 고분화, 중등도 분화 및 저분화로 나누었다. 환자의 성별은 여자가 8례, 남자가 11례였다. 발생 부위로는 10례가 혀, 4례가 편도, 2례가 구강 기저부, 2례가 구강 협부, 1례가 구강인두부에 발생하였다. 임상 병기별로는 제 I기가 4례, II기가 6례, III기가 4례 그리고 제 IV기가 5례였다. 종양 조직의 분화도는 10례가 고분화도, 9례가 중등도 분화도에 속하였다(Table 1).

### 2. 연구방법

#### 1) DNA 추출 및 추출된 DNA의 농도 측정

DNA의 추출은 Sepa gene kit (Sanko Junyaka, Tokyo, Japan)을 이용하여 제조 회사의 지시에 따라 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 1:50으로 희석하여 UV spectrophometer로 파장 260nm와 290nm에서 흡광도를 측정하여 DNA 농도와 A260/A280의 비를 측정하였다. A260/A280 비가 1.7이상인 경우를 실험에 적정한 비율로 하였다. DNA 농도를 0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l 가 되도록 희석 또는 농축하여 표본의 DNA 농도를 일정하게 맞추었다.

7.5 $\mu$ l	nuclease free water
10.0 $\mu$ l	extracted DNA(0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l)
2.5 $\mu$ l	0.2mM spectrum green(tumor)
	0.2mM spectrum red (reference)
5.0 $\mu$ l	0.1mM dTTP
10.0 $\mu$ l	dNTP mix
5.0 $\mu$ l	10x nick translation buffer
10.0 $\mu$ l	Nick translation enzyme
50.0 $\mu$ l	Total volume

#### 2) Comparative genomic hybridization:

##### (1) DNA에 형광물질의 표식

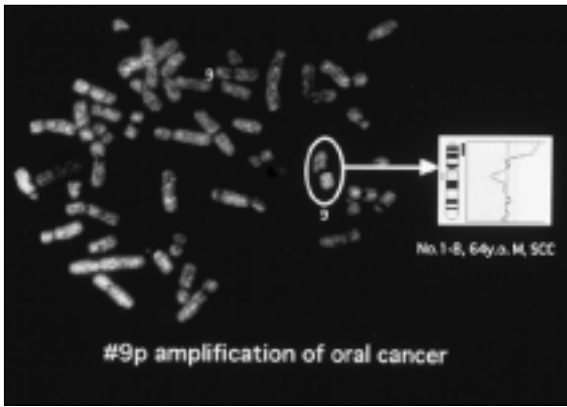
Nick translation kit(Vyxis, IL, U.S.A.)를 이용하여 1.5ml microcentrifuge tube에 다음과 같은 물질들을 잘 혼합하였다. 종양 DNA와 정상 DNA를 각각 spectrum green과 spectrum red 형광물질로 표식하였다.

1.5ml microcentrifuge tube에 잘 혼합된 위의 혼합물을 2시간 30분간 15°C에 incubation 시킨 후 70°C로 가열하여 효소의 활성도를 증가시켰다.

##### (2) Metaphase spread slide에 hybridization

###### ① 종양 DNA 및 정상 DNA의 denaturation

Human COT-1 DNA 10 $\mu$ g, spectrum red(적색)로 표식된 reference DNA 20 $\mu$ l 및 spectrum green(녹색)으로 표식된 종양 DNA 10 $\mu$ l 을 3.0 M sodium acetate와 100% ethanol 90 $\mu$ l 에 잘 혼합하여 -70°C에서 20분간 방치한 후 원심분리하여 DNA를 침전시킨다. 상온에서 잘 건조한 DNA를 10 $\mu$ l 의 master mix (50% formamide, 2XSSC, 10% dextran sulfate, pH=7.0)에 잘 혼합하여 metaphase spread slide에 도포하고 74°C로 5분간 가열한다.



**Fig. 1.** An example of comparative genomic hybridization(CGH) analysis of oral cancer with 9p amplification. Fluorescence ratio image of a CGH with tumor DNA(spectrum green) and reference DNA(spectrum red) is shown on metaphase spread slide of lymphocyte from normal mole (46 x Y).

② metaphase spread slide의 denaturation

Metaphase spread slide를 denaturing solution (70% formamide, 2XSSC, pH=7.0)으로 72°C에서 2분간 처리한다. 처리 후 70%, 80%, 100% cold ethanol로 각각 2분간 처리한 후 공기 중에서 건조한다.

③ Hybridization

①과 ②의 과정으로 denaturation된 종양 및 정상 DNA를 metaphase spread slide에 도포하여 37°C에서 2~3일간 hybridization 시킨다.

(3) 슬라이드 세척

2~3일간 hybridization된 slide를 hybridization wash buffer I(50% formamide, 2XSSC, pH=7.0)와 hybridization wash buffer II(2XSSC)로 45°C에서 각각 5분간 처리한 후 상온에서 PN buffer(0.1M Na2HPO4/NaH2PO4)에 5분간 처리한다. 처리 후에 10µl DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylindole) II (Vyxis, IL, U.S.A.)로 염색한다.

(4) Digital 영상 분석

각각의 metaphase spread slide를 형광 현미경으로 관찰하여 CGH 분석기(Vyxis, IL, U.S.A.)를 이용하여 검색한다. 감소(loss)는 녹색과 적색의 비가 0.85보다 낮은 경우이고 증가(gain)는 1.15보다 높은 경우로 정하고 1.4보다 높은 경우를 증폭(amplification)으로 판정하였다(Fig. 1).

III. 결 과

1. CGH 기법에 의한 DNA 복제수의 변화

전체 19례의 구강암 중 14례(78.9%)가 DNA 복제수의 변화를 한 개 이상의 염색체 부위(평균 : 5.58, 범위: 3-13)에서 보였다. 증폭은 4례에서 관찰되었고 9p23, 12p21.1~q13.1, 3q 그리고 8q24.1~24.3이었다. 증가는 14례(78.9%)에서 나타났으며 변화를

**Table 2.** Summary of Chromosome Regions with Changes in DNA Copy Number

Chromosomes (minimal common regions)	Frequency(%)
<b>Gain</b>	
3q (3q24-26.3, 3q27-29)	10/19 (52.6)
1q (1q22-31)	4/19 (21.0)
5p (5p12-13.3)	4/19 (21.0)
8q (8q23-24)	4/19 (21.0)
9p (9p)	4/19 (21.0)
11q (11q13.1-13.3)	4/19 (21.0)
14q (14q32)	4/19 (21.0)
Xq (Xq12-21.3)	4/19 (21.0)
7q (7q21.2-22)	3/19 (15.7)
12p (12p11.1-12.1)	3/19 (15.7)
<b>Loss</b>	
9q (9q11-21.3)	7/19 (36.8)
17p (17p31)	7/19 (36.8)
13q (13q22-34, 13q)	5/19 (26.3)
4p (4p16)	4/19 (21.0)
9p (9p, 9p23-24)	4/19 (21.0)
10p (10p13-15)	3/19 (15.7)
11p (11p11.1-11.5)	3/19 (15.7)
19p (19p)	3/19 (15.7)
20p (20p)	3/19 (15.7)

보인 염색체 부위의 수는 평균적으로 3.00(범위:1~8)이었다. 감소는 12례(70.5%)에서 관찰하였고, 변화를 보인 염색체 부위의 수는 평균적으로 2.58(범위: 1~9)이었다. 임상적 및 병리학적 변화와 DNA 복제수의 증폭, 증가 및 감소를 Table 1에 요약하였다.

2. 염색체 부위에 따른 DNA 복제수 변화의 빈도

DNA 복제수의 증폭, 증가, 감소를 염색체 부위에 따른 빈도와 함께 Fig. 2와 Table 1에 요약하였다. 증가로 나타나는 염색체 부위는 3q에서 10례(52.6%)였고 5p, 8q, 9p, 11q, 14q, Xq에서 각각 4례(21.0%)였으며, 7q, 9q에서 각각 3례(15.7%)였다. 감소는 9q와 17p에 각각 7례(36.8%), 13q에서 5례(26.3%), 4p와 9p에서 각각 4례(21.0%) 그리고 10p, 11p, 19p, 20p에서 각각 3례(15.7%)가 보였다(Fig. 2). DNA 복제수의 변화가 중복되는 최소 공통 부위(minimal common region)로서 증가 부위는 3q24~26.3, 3q27~29, 1q22~31, 5p12~13.3, 8q23~24, 9q 그리고 11q13.1~13.3이었고 감소 부위는 9q11~21.3, 17p31, 13q22~34, 13q, 4p16, 9p였다(Table 2).

3. 병기에 따른 DNA 복제수의 변화

제 I 및 II 병기를 저등급 병기군으로 하고 제 III 및 IV 병기를 고등급 병기군으로 다시 나누었다. 각 병기군에 따라 DNA 복제수의 증폭, 증가, 감소를 분석한 결과를 Fig. 3과 Table 3에 제시하

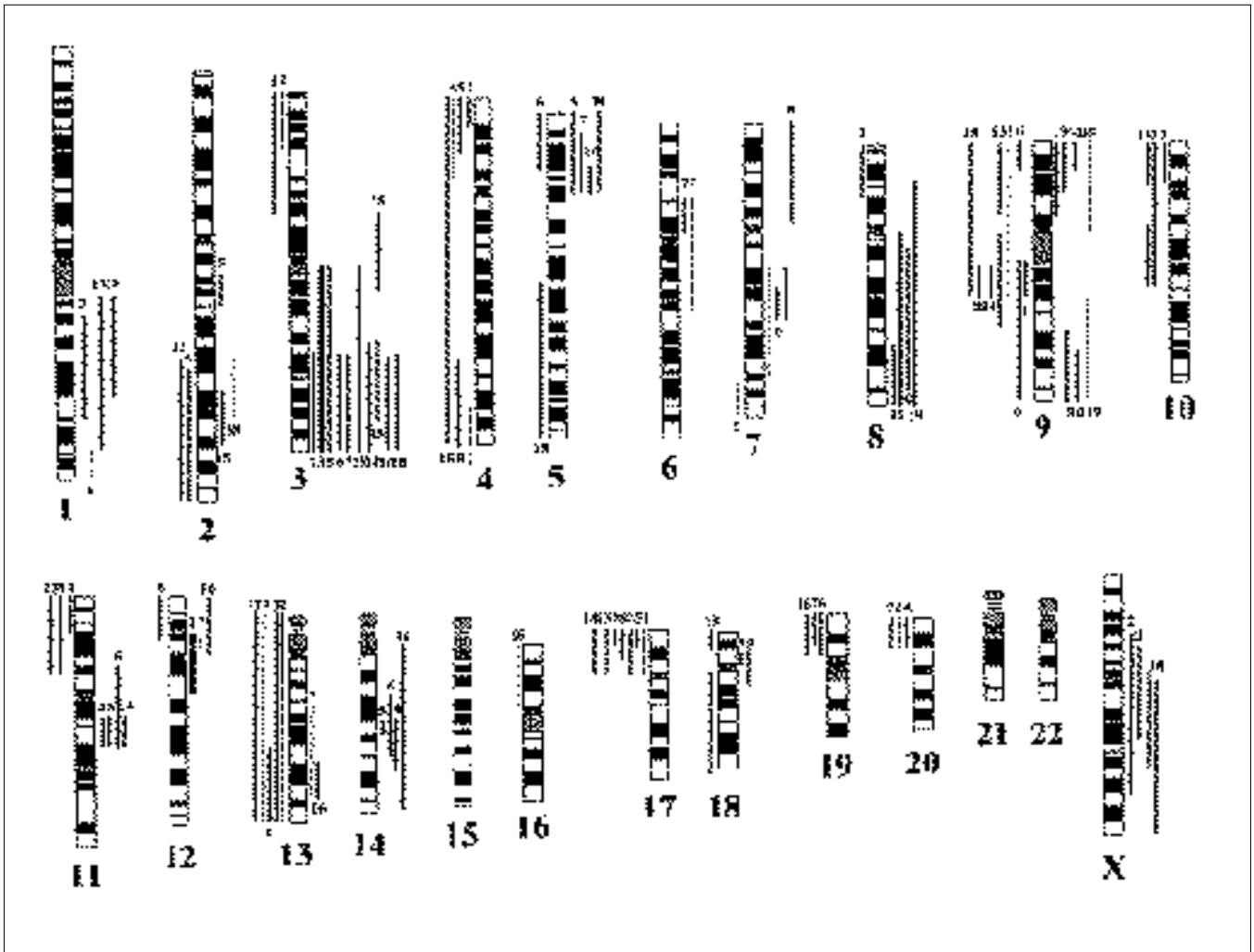


Fig. 2. Summary of DNA copy number gains(right) and losses(left) in the 19 oral cancers. Highly amplified regions are shown with thick solid lines.

Table 3. Summary of Frequent Regions with Changes in DNA Copy Number by Stages

Chromosomes (minimal common regions)	Frequency (%)	Stage I, II (%)	Stage III, IV (%)
Gain			
3q (3q24-26.3, 3q27-29)	10/19 (52.6)	4/10(40)	6/9(66)
1q (1q22-31)	4/19 (21.0)	0/10(0)	4/9(44)
5p (5p12-13.3)	4/19 (21.0)	3/10(30)	1/9(11)
8q (8q23-24)	4/19 (21.0)	1/10(10)	3/9(33)
9p (9p)	4/19 (21.0)	3/10(30)	1/9(11)
11q (11q13.1-13.3)	4/19 (21.0)	0/0(0)	4/9(44)
14q (14q32)	4/19 (21.0)	2/10(20)	2/9(22)
Loss			
9q (9q11-21.3)	7/19 (36.8)	4/10(40)	3/9(33)
17p (17p31)	7/19 (36.8)	3/10(30)	4/9(44)
13q (13q22-34, 13q)	5/19 (26.3)	1/10(10)	4/9(44)
4p (4p16)	4/19 (21.0)	3/10(30)	1/9(11)
9p (9p, 9p23-24)	4/19 (21.0)	2/10(20)	2/9(22)

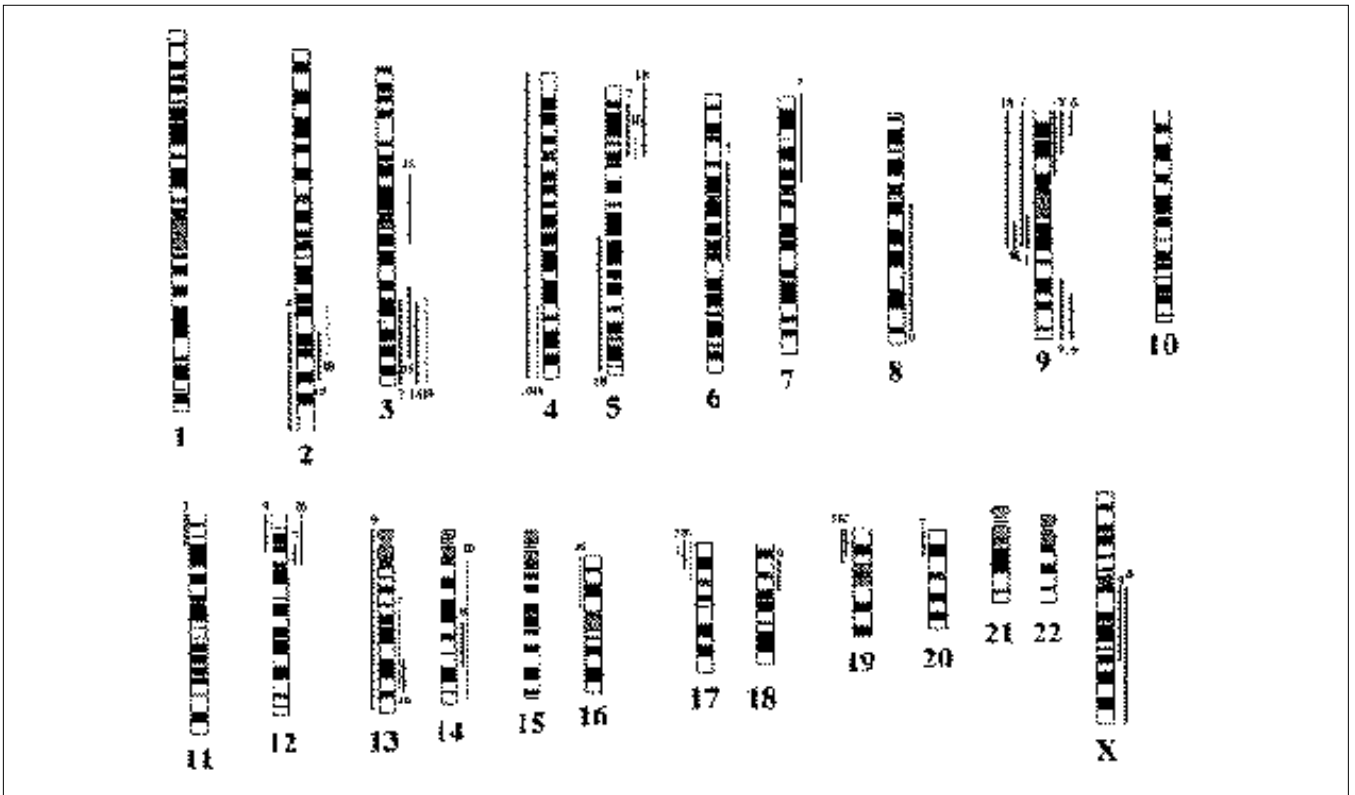


Fig. 3a. Summary of DNA copy number gains and losses in lower clinical stage of oral cancers.

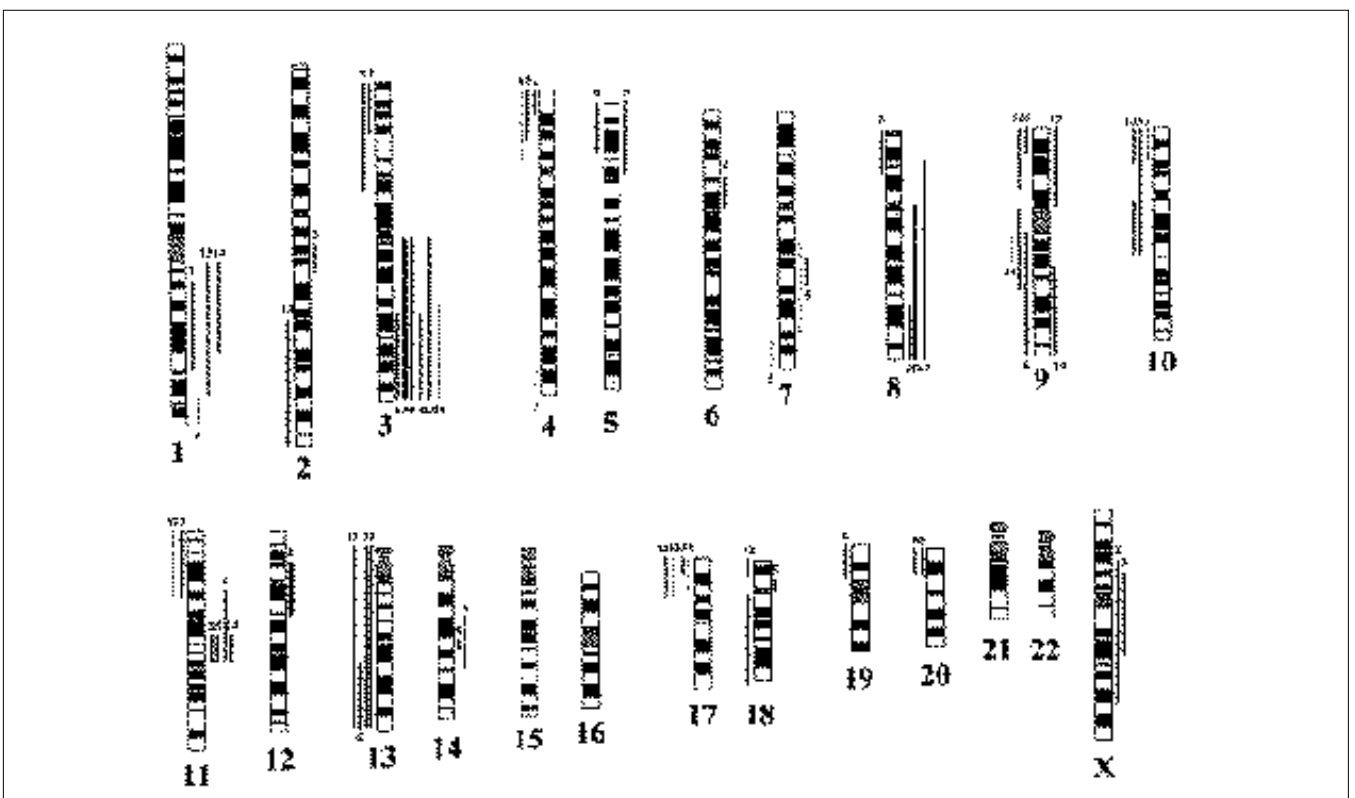


Fig. 3b. Summary of DNA copy number gains and losses in higher clinical stage of oral cancers.

였다. 저등급 병기에서는 증가가 3q(3q24-26.3, 3q27-29)에서 10례 중 4례(40%)가 나타났으며, 5p(5p12-13.3)와 9p는 각각 3례(30%), 14q(14q32)는 2례(20%) 그리고 8q(8q23-24)에서 단지 1례만이 관찰되었다. 1q(1q22-31)와 11q(11q13.1-13.3)에서는 전혀 증가를 보이지 않았다. 반면, 고등급 병기군에서는 1q와 11q에서 9례 중 4례(44%)가 관찰되었고, 8q에서는 3례(33%)가 나타났다. 감소는 7q(9q11-21.3), 17p(17q31), 4p(4p16), 및 9p(9p, 9p23-24)에서 고등급군이나 저등급군 모두 전체와 비슷한 빈도를 보인 반면, 13q(13q22-34, 13q)는 저등급 병기군에서 1례(10%)만이 나타났고 고등급 병기군에서는 9례 중 4례(44%)가 관찰되었다 (Fig. 3, Table 3).

#### IV. 고 찰

구강암은 지역적으로 빈도의 차이는 있지만 전 세계적으로 흔히 발생하는 암종으로 매년 400,000명의 새로운 구강암 환자가 발생하는 것으로 보고되고 있다(Pisani et al., 1993). 술, 담배, 구강 위생 등의 여러 환경적 요인과 종양 유전자 및 종양 억제 유전자의 변이 등의 유전 인자들이 협동적으로 작용하여 구강암이 발생하는 것으로 생각하고 있다. 구강암의 발생은 여러 단계에 걸쳐 많은 유전자들의 변이가 축적하는 과정으로 생각한다. 지난 20년간 세포 유전학적 기법이나 분자 생물학 기법으로 암의 발생에 관여하는 70여종의 종양 유전자와 10여개의 종양 억제 유전자가 발견되었다. 그러나, 이러한 기법들은 유전자의 국소적인 변이를 찾는 데는 유용하나 모든 염색체에서 유전자의 변이를 검색하는데는 많은 시간과 비용이 소요되므로 실제로 실험에 이용하기에는 매우 제한적이라고 할 수 있다. Kallioniemi(1992) 등은 종양 및 정상 DNA에 각각 다른 형광 물질의 표식자로 표식하여 정상 중기 확산 슬라이드(metaphase spread slide)에 교잡(hybridization)시켜 모든 염색체에서 종양 DNA의 국소적 변화를 관찰하고 이 새로운 방법을 comparative genomic hybridization (CGH) 이라고 불렀다. 이 방법은 새로운 종양 유전자 및 종양 억제 유전자의 위치를 확인할 수 있는 방법으로 최근 여러 유전자의 변이소 연구에 이용하고 있다(Kallioniemi et al., 1994a, b; Speicher et al., 1994; Levin et al., 1995; Speicher et al., 1995; Tarkkanen et al., 1995; Levin et al., 1995).

본 연구에서는 구강에 발생한 편평 세포 암종을 재료로 CGH 기법을 이용하여 DNA 복제수의 변이를 찾아 보았던 결과 19례 중 14례(78%)가 하나 이상의 염색체 부위에 DNA 복제수의 변이가 관찰되었다. 이러한 변이는 다른 장기에 발생한 종양의 유전자 변이율(70-90%)과 비슷한 결과를 보였다. 또한, 평균 변이수는 5.58로서 이는 Renan (1993)이 암종을 유발하는데 6 내지 12개의 유전자 변이가 필요하다는 가설을 지지해 주는 소견으로 생각한다.

본 연구의 결과에 의하면 구강암에서 가장 흔히 관찰되는 DNA의 변이수가 증가하는 염색체 부위는 1q, 3q, 5p, 8q, 9p, 및 11q 였으며, 중복되는 공통 부위는 3q24-26.3, 3q27-29, 1q22-23, 5p12-13.3, 8q23-24, 및 11q13.1-13.3으로 나타났다. 지금까지 연구

된 보고에 의하면 원발성 구강암이나 배양한 암세포주에서 가장 연관성이 있는 종양 유전자로 c-myc, cyclin D1, Int-2, ERBB-2 등을 지목하고 있는 이유는 이들의 과발현이나 증폭이 자주 관찰되기 때문이다(Somers et al., 1990; Hou et al., 1992; Scully, 1992; William et al., 1993; Xu et al., 1998). Cyclin D1과 Int-2는 염색체 11q13에 위치한다. Int-2 유전자는 원발성 구강암 조직이나 림프절에 전이한 암병소에서 드물게 증폭되거나 cyclin D1 유전자는 원발성 구강암을 포함한 두경부 암종에서 30-50% 정도 증폭되거나 과발현된다(William et al., 1993; Lese et al., 1995; Xu et al., 1998). 본 연구에서 11q13 부위의 DNA 복제수가 약 20%로 증가하는 것은 cyclin D1 유전자의 변이를 반영하는 것으로 생각하며 이는 cyclin D1의 과발현이나 증폭에 대한 결과와 일치하는 것으로 생각한다. C-myc 유전자는 염색체 8q23-24에 위치하며 원발성 구강암의 약 30%에서 과발현되는 것으로 보고되고 있다. 또한 C-myc 유전자의 과발현은 전이와 나쁜 예후를 암시하는 인자로 알려져 있다(Neel et al., 1982; Saranath et al., 1989; Leonard et al., 1991). 본 연구에서는 염색체 8q23-24에 약 20%의 DNA 복제수의 증가를 보였다. 본 연구에서 가장 흔한 DNA 복제수의 증가 부위는 염색체 3q 부위였는데 (중복 최소공통부위로 3q24-26.3와 3q27-28) 약 52.6%의 빈도로 관찰되었다. 3q27-28 부위는 Bcl-6 유전자가 소재하는 부위이며, Bcl-6 유전자의 과발현과 구강암의 예후와의 연관성에 대한 보고는 아직 없다(Vitolo et al., 1998). 또 다른 3q의 중복 최소 공통 부위인 3q24-26.3이나 1q22-31, 5p12-13.3의 증감과 구강암의 예후와의 연관성에 대한 연구는 없는 실정이다. 이런 부위에는 아직 찾지 못한 새로운 유전자가 존재할 가능성이 있고 또한 기존 유전자중 구강암의 발암과정에 관여하지 않는 유전자가 있을 가능한 부위로 생각된다.

최근 LOH 기법과 PCR 기법을 이용한 cloning 기법의 개발로 10여개의 새로운 종양 억제 유전자가 발견되었고 염색체의 여러 부위에 결손을 보고하고 있다. 구강암에서 보고되고 있는 LOH 염색체 부위로는 3p, 3q, 7q, 8p, 9p, 11q, 13q, 17q, 및 18q가 있다(Jin et al., 1993; Rao et al., 1994; Nawroz et al., 1994; El-Naggar et al., 1995; Jones et al., 1997). 본 연구의 결과에 의하면 9q (중복 최소 공통 부위: 9q11-21.3)과 17q(중복 최소 공통 부위: 17q13) 염색체 부위에서 DNA 복제수의 감소가 가장 높은 빈도(36.8%)를 보였다. 이 부위는 각각 GAS 1, CKS 2 유전자와 p53 종양 억제 유전자가 위치하는 부위이다. p53 종양 억제 유전자는 구강암을 포함하여 여러 암종의 발암 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 종양 억제 유전자이다. p53은 구강암에서 돌연 변이 또는 LOH가 30-40%의 빈도로 관찰된다는 결과와 본 연구 결과는 대체로 일치하는 것으로 생각된다(Chiba et al., 1996; Mao et al., 1996; Koh et al., 1998). 9p21-22 부위는 최근에 cloning된 GAS 1과 CKS 2가 위치하는 부위이다(Demetrick et al., 1996; Evdokiou and Cowled, 1998). GAS 1 유전자는 p53으로 유발된 apoptosis로 배양 암세포의 성장을 억제하는 역할을 담당하는 종양 억제 유전자이다. 원발성 암종에서 GAS 1 유전자에 대한 연구는 없는 상태이다(Evdokiou and Cowled, 1998). 또한, 최근에 알려진 p16/p15 종양 억제 유전자는 9p21 부위에 위치하며 세포 주기중 제 1 휴지기에서 합성기

(G1→S)를 조절하는 인자중의 하나로, 구강암 뿐만 아니라 대부분의 암종의 발암 과정에 변이 또는 LOH가 나타나는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 약 20%의 구강암이 DNA 복제수의 감소를 보였다. 구강암에서 p16의 변이는 약 10%에서 나타나고 9p21의 LOH는 약 20%에서 보고되고 있다(Sakata et al., 1995; Mao et al., 1996; Matouda et al., 1996; Papadimitrakopoulou et al., 1997). 본 연구에서는 13q(13q22-34)와 4p(4p16) 염색체 부위에서 DNA 복제수가 감소하였는데, 이 부위는 지금까지 구강암을 비롯하여 다른 암종에서 LOH 또는 종양 억제 유전자가 발견되지 않는 부위로서 새로운 종양 억제 유전자가 있을 가능성이 있다고 생각한다.

구강암의 발생은 field carcinogenesis와 multistep carcinogenesis의 두 가설로 설명하고 있는데, 이러한 가설에 의하면 담배, 알코올, human papillomavirus(HPV) 등의 여러 인자가 구강 점막의 넓은 부위에 협동적으로 동시에 작용하여 다발적으로 암전구 병변을 유발하며, 이러한 전암성 병변들은 여러 단계를 거치는 사이에 최소 5~6개의 유전자 변이를 일으켜서 암종이 발생하는 것으로 설명하고 있다(Slaughter et al., 1953; Fearon and Vogelstein, 1990; Renan, 1993; Partridge et al., 1998). 이러한 가설은 구강암을 포함한 두경부암의 발암 모델인 van der Reit(1994)의 모델로 잘 알려지고 있다. 이 모델에 의하면 초기 발암 과정인 세포 증식 과정에서는 9p의 결손이 있고 악성 형질전환 과정(transformation)에서는 integrin과 collagenase의 발현이 관찰되며 p53 유전자가 초기 발암 과정에 관여할 것으로 믿고 있다.

병기에 따라 DNA 복제수의 변이 빈도는 본 연구의 결과에 의하면, 3q, 5p, 및 9p 부위의 증가와 17p, 9q, 4p 및 9p의 감소가 병기에 관계없이 비슷한 빈도로 관찰되었는데, van der Reit 모델에서 관찰한 p53(17p31)과 9p의 결손이 초기 발암 과정에 관여할 것이라는 주장과 일치하는 것으로 생각된다. 또한 1q(1q22-31), 8q(8q23-24), 및 11q(11q13.1-13.3)의 증가 및 13q의 감소의 빈도는 고등급 병기군에서 저등급 병기군에 비하여 의의있게 높았다. 이러한 결과는 cyclin D1(11q13.1-13.3)과 c-myc(8q23-24)의 과발현 및 Rb(13q)의 비활성화(결손 또는 변이)가 구강암의 불량한 예후와 전이를 지적하는 소견으로 생각하며, 1q에는 새로운 암 유전자가 존재할 것으로 추측하는데 이 유전자는 구강암의 악성도와 관계가 있을 것으로 생각한다.

이상의 연구 결과를 종합해 보면 최근에 개발된 CGH 기법을 이용한 구강의 편평 암종 세포의 발암 과정에서 관찰되는 염색체의 가장 빈번한 유전자 변이 부위는 3q24-26.3, 1q22-31 및 5p12-13.3의 증가와 9p11-21.3, 17q31 및 13q 부위의 감소로 나타났다. 구강암의 진행 초기에 관여하는 염색체 변이 부위는 3q24-26.3, 3q27-29, 5p12-13 및 9p의 증가로 생각하고, 진행 말기에 관여하는 염색체의 변이 부위는 1q22-31와 11q13.1-13.3 부위의 증가와 13q22-34 부위의 감소로 생각한다.

## V. 결 론

인체의 구강에서 발생한 편평 세포 암종 19예를 재료로 com-

parative genomic hybridization 기법을 이용하여 암세포의 염색체를 구성하는 DNA의 복제수에 변이가 빈번한 부위를 찾아서 기존의 종양 유전자와 종양 억제 유전자와의 연관성을 밝히고자 이 연구를 실시하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. DNA 복제수의 변화는 전체 19례의 구강암 중 14례(78.9%)에서 한 개 이상의 염색체 부위(평균:5.58, 범위:3~13)에 나타났다. 증폭은 4례에서 관찰하였으며 9p23, 12p21.1~q13.1, 3q 그리고 8q24.1~24.3이었다. 증가는 14례(78.9%, 평균:3.00, 범위:1~8)에서 나타났으며 감소는 12례(70.5%, 평균:2.58, 범위:1~9)에서 보였다.
2. 염색체 부위에 따른 DNA 복제수의 변화는 증가를 나타내는 염색체 부위는 3q가 10례(52.6%)에서 나타났고, 5p, 8q, 9p, 11q, 14q, 및 Xq가 각각 4례(21.0%)에서 관찰되었으며 7q와 9q에서 각각 3례(15.7%)을 보였다. 감소를 나타내는 염색체 부위는 9q와 17p에 각각 7례(36.8%), 13q에 5례(26.3%), 4p와 9p에 4례(21.0%), 그리고 10p, 11p, 19p, 20p에 각각 3례(15.7%)였다.
3. DNA 복제수의 변화가 중복되는 최소 공통 부위(minimal common region)는 증가 부위로 3q24~26.3, 3q27~29, 1q22~31, 5p12~13.3, 8q23~24, 9q와 11q13.1~13.3이었다. 감소 부위는 9q11~21.3, 17p31, 13q22~34, 13q, 4p16, 및 9p이었다.
4. 병기에 따른 DNA 복제수의 변화는 저등급 병기군에서 증가가 3q(3q24~26.3, 3q27~29) 부위에서 10례중 4례(40%)가 나타났으며, 5p(5p12~13.3)와 9p는 각 3례(30%), 14q(14q32)는 2례(20%), 그리고 8q(8q23~24)에서는 한 예만이 관찰되었다. 고등급 병기군에서는 1q와 11q에 9례중 4례(44%) 그리고 8q에 3례(33%)가 관찰되었다. 13q22~34 부위의 감소는 저등급 병기군에서 1례(10%)를 보인 반면 고등급 병기군에서는 9례중 4례(44%)의 빈도로 나타났다.

이상의 결과를 종합해 보면 구강의 편평세포암종의 암세포에서 관찰되는 염색체의 가장 빈번한 변이는 3q24~26.3, 1q22~31, 5p12-13.3 부위의 증가와 9q11~21.3, 17p31, 13q 부위의 감소로 나타났다. 구강암의 진행 초기에 관여하는 염색체의 변이는 3q24~26.3, 3q27~29, 5p12~13.3과 9p의 증가로 생각되고 진행 말기에 관여하는 염색체의 변이는 1q22~31, 11q13.1~13.3 부위의 증가와 13q22~34 부위의 감소로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Califano J, van der Riet P, Westra W, et al.: Genetic progression model for head and neck cancer: Implications for field cancerization. *Cancer Res* 56: 2488-2492, 1996.
2. Chiba I, Shindoh M, Yasuda M, et al.: Mutations in the p53 gene and human papillomavirus infection as significant prognostic factors in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Oncogene* 12: 1663-1668, 1996.
3. Demetrick DJ, Zhang H, Beach DH: Chromosomal mapping of the human genes CKS1 to 8q21 and CKS2 to 9q22. *Cytogenet Cell Genet* 73: 250-254, 1996.
4. El-Naggar AD, Hurr K, Batsakis JG, Luna MA, Goepfert H, Huff V: Sequential loss of heterozygosity at microsatellite motifs in preinvasive and invasive head and neck squamous carcinoma. *Cancer Res*



- 55: 2656-2659, 1995.
5. Emilion G, Langdon JD, Speight P, Partridge M: Frequent gene deletions in potentially malignant oral lesions. *Br J Cancer* 73: 809-813, 1996.
  6. Evdokiou A, Cowled PA: Tumor-suppressive activity of the growth arrest-specific gene GAS1 in human tumor cell lines. *Int J Cancer* 75: 568-577, 1998.
  7. Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767, 1990.
  8. Hou L, Shi D, Tu SM, et al: Oral cancer progression and c-erbB-2/neu proto-oncogene expression. *Cancer Lett* 65: 215-220, 1992.
  9. Jin Y, Martens F, Mandahl N, et al: Chromosome abnormalities in eighty-three head and neck squamous cell carcinomas: Influence of culture conditions on karyotypic pattern. *Cancer Res* 53: 2140-2146, 1993.
  10. Jones JW, Raval JR, Beals TF, et al: Frequent loss of heterozygosity on chromosome arm 18q in squamous cell carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 123: 610-614, 1997.
  11. Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Sudar D, et al: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258: 818-821, 1992.
  12. Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Piper J, et al: Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2156-2160, 1994(a).
  13. Kallioniemi O-P, Kallioniemi A, Piper J, et al: Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 10: 231-243, 1994(b).
  14. Koh JY, Cho NP, Kong G, Lee JD, Yoon K: p53 mutations and human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinoma: correlation with apoptosis. *Brit J Cancer* 78: 354-359, 1998.
  15. Komiya T, Matsumura K, Tsuchida N: Comparison of DNA copy numbers in original oral squamous cell carcinomas and corresponding cell lines by comparative genomic hybridization. *Jpn J Cancer Res* 88: 476-483, 1997.
  16. Largey JS, Meltzer SJ, Sauk JJ, Hebert CA, Archibald DW: Loss of heterozygosity involving the APC gene in oral squamous cell carcinomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 77: 260-263, 1994.
  17. Leonard JH, Kearsley JH, Chenevix-Trench G, Hayward NK: Analysis of gene amplification in head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* 48: 511-515, 1991.
  18. Lese CM, Rossie KM, Appel BN, Reddy JK, Johnson JT, Myers EN, Gollin SM: Visualization of INT2 and HST1 amplification in oral squamous cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 12: 288-295, 1995.
  19. Levin NA, Brzoska PM, Warnock ML, Gray JW, Christman MF: Identification of novel regions of altered DNA copy number in small cell lung tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 13: 175-185, 1995.
  20. Mao EJ, Schwartz SM, Daling JR, Oda D, Tickman L, Beckmann AM: Human papilloma viruses and p53 mutations in normal pre-malignant and malignant oral epithelia. *Int J Cancer* 69: 152-158, 1996.
  21. Mao L, Lee J, Fan YH, et al: Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. *Nat Med* 2: 682-685, 1996.
  22. Matsuda H, Konishi N, Hiasa Y, et al: Alterations of p16/CDKN2, p53 and ras genes in oral squamous cell carcinomas and premalignant lesions. *J Oral Pathol Med* 25: 232-238, 1996.
  23. Nawroz H, van der Riet P, Hruban RH, Koch W, Ruppert JM, Sidransky D: Allelotype of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 54: 1152-1155, 1994.
  24. Neel BG, Jhanwar SC, Chaganti RSK, Hayward WS: Two human c-onc genes are located on the long arm of chromosome 8. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 79: 7842-7846, 1982.
  25. Papadimitrakopoulou V, Izzo J, Lippman SM, et al: Frequent inactivation of p16INK4a in oral premalignant lesions. *Oncogene* 14: 1799-1803, 1997.
  26. Partridge M, Emilion G, Pateromichelakis S, A' Hern R, Phillips E, Langdon J: Allelic imbalance at chromosomal loci implicated in the pathogenesis of oral precancer, cumulative loss and its relationship with progression to cancer. *Oral Oncol* 34: 77-83, 1998.
  27. Pershouse MA, El-Naggar AK, Hurr K, Lin H, Yung WK, Steck PA: Deletion mapping of chromosome 4 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 14: 369-373, 1997.
  28. Pisani P, Parkin DM, Ferlay J: Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985: implications for prevention and projections of future burden. *Int J Cancer* 55: 891-903, 1993.
  29. Rao PH, Sreekantaiah C, Schantz SP, Chaganti RSK: Cytogenetic analysis of 11 squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Genet Cytogenet* 77: 60-64, 1994.
  30. Renan MJ: How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog* 7: 139-146, 1993.
  31. Roz L, Wu CL, Porter S, et al: Allelic imbalances on chromosome 3p in oral dysplastic lesions: an early event in oral carcinogenesis. *Cancer Res* 56: 1228-1231, 1996.
  32. Sakata K, Tamura G, Maesawa C, et al: Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 9 without p16 gene mutation in gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 86: 333-335, 1995.
  33. Saranath D, Panchal RG, Nair R, Metha AR, Des MG: Oncogene amplification in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Jpn J Cancer Res* 80: 430-437, 1989.
  34. Scully C: Oncogenes, onco-suppressors, carcinogenesis and oral cancer. *Br Dent J* 173: 53-59, 1992.
  35. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W: "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium: Clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 6: 963-968, 1953.
  36. Somers KD, Cartwright SL, Schechter GL: Amplification of the int-2 gene in human head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 5: 915-920, 1990.
  37. Speicher MR, Howe C, Crotty P, Manoir SD, Costa J, Ward DC: Comparative genomic hybridization detects novel deletions and amplifications in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 55: 1010-1013, 1995.
  38. Speicher MR, Prescher G, Manoir SD, et al: Chromosomal gains and losses in uveal melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 54: 3817-3823, 1994.
  39. Tarkkanen M, Karhu R, Kallioniemi A, et al: Gains and losses of DNA sequences in osteosarcomas by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 55: 1334-1338, 1995.
  40. van der Reit P, Nawroz H, Hruban RH, et al: Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer Res* 54: 1156-1158, 1994.
  41. Visakorpi T, Kallioniemi AH, Syvanen AC, et al: Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 55: 342-347, 1995.
  42. Vitolo U, Gaidano G, Botto B, et al: Rearrangements of bcl-6, bcl-2, c-myc and 6q deletion in B-diffuse large-cell lymphoma: Clinical relevance in 71 patients. *Ann Oncol* 9: 55-61, 1998.
  43. William ME, Gaffey MJ, Weiss LM, et al: Chromosomal 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 119: 1238-1241, 1993.
  44. Xu J, Gimenez-Conti IB, Cunningham JE, et al: Alterations of p53, cyclin D1, Rb, and H-ras in human oral carcinomas related to tobacco use. *Cancer* 83: 204-212, 1998.