

구강 편평세포암종에서 P16^{ink4} 유전자의 Methylation에 대한 연구

강진원 · 김경욱 · 류진우* · 김창진**

단국대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, 단국대학교 의과대학 일반외과학교실*

순천향대학교 의과대학 병리학교실**

Abstract

P16^{ink4} Methylation in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity.

Gin-Won Kang, Kyung-Wook Kim, Jin-Woo Lyu*, Chang-Jin Kim**

Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Dankook University

*Dept. of General Surgery, College of Medicine, Dankook University**

*Dept. of Pathology College of Medicine, Soon Chun Hyang University***

The p16 protein is a cyclin dependent kinase inhibitor that inhibits cell cycle progression from G₁ phase to S phase in cell cycle. Many p16 gene mutations have been noted in many cancer-cell lines and in some primary cancers, and alterations of p16 gene function by DNA methylation have been noticed in various kinds of cancer tissues and cell-lines. There have been a large body of literature has accumulated indicating that abnormal patterns of DNA methylation (both hypomethylation and hypermethylation) occur in a wide variety of human neoplasia and that these aberrations of DNA methylation may play an important epigenetic role in the development and progression of neoplasia. DNA methylation is a part of the inheritable epigenetic system that influences expression or silencing of genes necessary for normal differentiation and proliferation. Gene activity may be silenced by methylation of upstream regulatory regions. Reactivation is associated with demethylation.

Although evidence of a high incidence of p16 alterations in a variety of cell lines and primary tumors has been reported, that has been contested by other investigators. The precise mechanisms by which abnormal methylation might contribute to carcinogenesis are still not fully elucidated, but conceivably could involve the modulation of oncogene and other important regulatory gene expression, in addition to creating areas of genetic instability, thus predisposing to mutational events causing neoplasia. There have been many variable results of studies of head and neck squamous cell carcinoma(HNSCC). This investigation was studied on 13 primary HNSCC for p16 gene status by protein expression in immunohistochemistry, and DNA genetic/epigenetic analyzed to determine the incidence, the mechanisms, and the potential biological significance of its inactivation.

As methylation detection method of p16 gene, the methylation specific PCR(MSP) is sensitive and specific for methylation of any block of CpG sites in a CpG islands using bisulfite-modified DNA. The genomic DNA is modified by treatment with sodium bisulfite, which converts all unmethylated cytosines to uracil(thymidine). The primers designed for MSP were chosen for regions containing frequent cytosines (to distinguish unmodified from modified DNA), and CpG pairs near the 5' end of the primers (to provide maximal discrimination in the PCR between methylated and unmethylated DNA). The two strands of DNA are no longer complementary after bisulfite treatment, primers can be designed for either modified strand. In this study, 13 paraffin embedded block tissues were used, so the fragment of DNA to be amplified was intentionally small, to allow the assessment of methyla-

tion pattern in a limited region and to facilitate the application of this technique to samples. In this 13 primary HNSCC tissues, there was no methylation of p16 promoter gene (detected by MSP and automatic sequencing). The p16 protein-specific immunohistochemical staining was performed on 13 paraffin embedded primary HNSCC tissue samples. Twelve cases among the 13 showed altered expression of p16 proteins (negative expression).

In this study, The author suggested that low expression of p16 protein may play an important role in human HNSCC, and this study suggested that many kinds of genetic mechanisms including DNA methylation may play the role in carcinogenesis.

I. 서 론

종양은 종양을 유발시키려는 유전자(암 유발 유전자 : oncogene)와 이러한 종양을 억제시키고자 하는 유전자(암 억제 유전자 : tumor suppressor gene)간의 변화가 계속 됨으로서 발생하게 된다^{1,2)}.

여러 가지 세포집단 중에서 한 세포집단이 빠르게 성장하여 종양을 유발시키게되는데 어느 세포집단에서 유전자 변이를 일으키는지를 초기에 發見해 내고자 하는 시도가 분자생물학적 암 연구의 주된 목표이다³⁻⁹⁾.

1929년 Boveri가 암은 유전자적 요소에서의 변화에 의해 발생된다고 최초로 기술된 이후 1960년에 Nowell과 Hunger Ford가 만성 골수성 백혈병(chronic myelogenous leukemia : CML)환자에게서 염색체 이상(異狀)을 발견하여 Philadelphia 염색체(ph¹)라 명명하고 22번 염색체와 9번 염색체가 상호 전좌(reciprocal translocation)되어 있음을 처음으로 입증하였다^{10,11)}.

정상세포가 암세포로 변화되어 증식되기 위하여는 다양한 유전자 변이가 동반되어야 하는데 유전자 변이가 일어나면 세포주기(Cell Cycle)의 조절능력이 떨어져 세포증식이 촉진되어 종양이 유발된다¹²⁻¹⁴⁾.

인간에서 발생하는 암종에서 암억제 유전자로 알려진 p53 유전자는 약 43%에서 염색체의 변이나 결핍이 관찰되며 p53의 과발현은 약 20~84%에서 관찰되고 망막모세포종(retinoblastoma : Rb)의 Rb 암 억제유전인자는 13q14에 위치하며 두경부 암종에서 13q의 loss of heterozygosity (LOH)가 약 52%에서 관찰되나 Rb단백질의 과발현은 19%에 불과해 구강암에서 Rb 유전자의 역할은 낮은 것으로 알려져 있다¹⁵⁾.

구강암을 포함한 두경부 암종에서 유전자의 변이를 살펴보면 9p, 3p, 11q, 13q 그리고 17p 등에서 염색체의 결손 및 LOH가 발견되기 때문에 Rb, p53 이외도 여러 암 억제 유전인자가 관여하고 특히 9p의 LOH가 약 72%에서 관찰되어 p16 gene이 위치하는 9p21에 관심이 모아지고 있다^{16,17)}.

Multiple tumor suppressor 1(MTS 1)으로도 불리는 CDK N2/P16ink4 유전자는 염색체 9p21에 위치하고 있으며 16KD(kilodalton)의 핵단백질을 생성하고 이 핵단백질은 156개의 아미노산 배열과 4개의 ankyrin motif를 갖고 있다. 이 단백질을 전사하는 p16 유전자는 세포주기에 관여하여 다수의 원발암에서 암 발생에 관여한다고 알려져 있다¹⁸⁻²⁰⁾.

세포주기는 여러 가지 cyclin dependent kinase(CDK)에 의해 촉진되는데 CDK 4는 cyclin D1과 결합하여 G1 세포주기로의 진입을 촉진시키는데 암 억제 유전인자 p16ink4는 CDK inhibitors군에 속하는 단백질로 CDK4와 결합하여 cyclin D1이 CDK4와 결합하는 것을 방해하여 G1 세포주기 진입을 억제하여 암 억제 역할을 나타내게 된다¹²⁻¹⁴⁾.

이와같이 p16은 암세포의 증식을 억제하는 역할이 있으나 p16의 결핍이나 변이가 일어나면 세포주기 이상을 초래하여 종양을 유발시키게 된다.

p16의 기능손실을 가져오는 유전자의 변화로는 점변이(point mutation), homozygous deletion이 알려져 왔으나²¹⁻²⁵⁾ 최근에는 p16 유전자의 5' CpG 부위에 methylation이 일어나 전사가 방해되어 p16의 생성이 억제되고 이러한 기전에 의하여 세포주기 조절에 이상이 생겨 암이 형성된다고 보고되고 있다²⁶⁻²⁸⁾.

이에 본 연구는 13례의 구강 편평세포암종을 대상으로 암 조직과 정상조직에서 p16 유전자의 5' CpG island의 methylation 상태를 관찰하여 구강암 발생기전을 규명하고 이를 임상에 응용함을 목적으로 하여 본 연구를 시행하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

구강내 병변 중 조직검사로 편평세포암종으로 진단된 13례를 대상으로하였다. 생검 및 수술로 적출한 조직을 10% neutral buffered formalin으로 24시간 고정 후 통상적인

방법으로 파라핀 포매조직을 만들고 6 μ m 절편을 제작하여 hematoxylin-eosin 염색을 시행한 후 편평세포암종의 조직학적 유형을 판독하였다. 13례의 편평세포암종 중 12례가 침윤성 증등도 분화 편평세포암종 이었고 1례는 미분화 암이었다.

Microdissection에 의한 정상조직을 대조군으로 하였다.

2. 연구방법

1) DNA추출

암세포와 정상세포에서 각각 DNA를 추출하기 위하여 microdissection 방법으로 암 조직과 정상조직을 채취하였다(Fig. 1, 2, 3 & 4). 이를 위하여 파라핀 포매조직에서 5

개의 7 μ m 절편을 만들어 통상적인 방법으로 탈파라핀하고 degraded alcohol로 흡수시킨 후 조직을 건조시켰다. 건조된 조직을 10X 현미경하에 28 gauze 바늘로 암조직과 정상조직을 끊어 300 μ l의 digestion buffer (50mM Tris HCl, pH 8.5, 1mM EDTA, 0.5% Tween 20, 400 μ g proteinase K)가 들은 1.5ml Eppendorf tube에 넣어 55 $^{\circ}$ C에서 24시간 부란하였다. 부란 후 proteinase K의 활성을 억제하기 위하여 97 $^{\circ}$ C에서 5분간 처리하였고 그 후 phenol/chloroform으로 DNA를 추출하였다. 추출과정은 65 $^{\circ}$ C의 0.5% sodium sarcosine의 buffer-saturated phenol을 300 μ l씩 시료에 넣어 vortex시켜 homogenous emulsion을 만든 후 3500g로 원심분리 하였다. 그 후 상층액을 깨끗한 Eppendorf tube에 옮긴 후 이에 300 μ l의



Fig. 1. Nest of tumor cells infiltrated deep in the stroma(H-E, $\times 100$). Arrow indicates boundary of the nest of tumor cells.

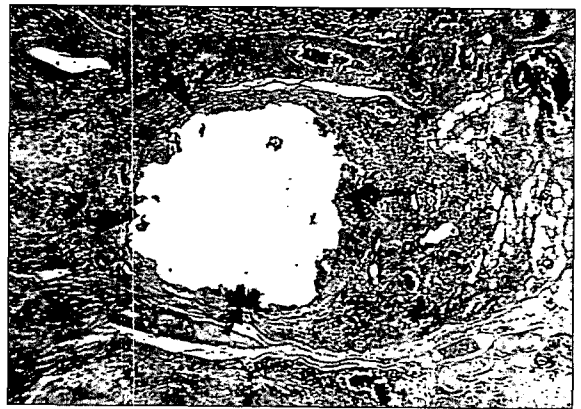


Fig. 2. The nest of tumor cells is completely dissected by microdissection(H-E, $\times 100$). Arrow indicates boundary of dissected the nest of tumor cells.

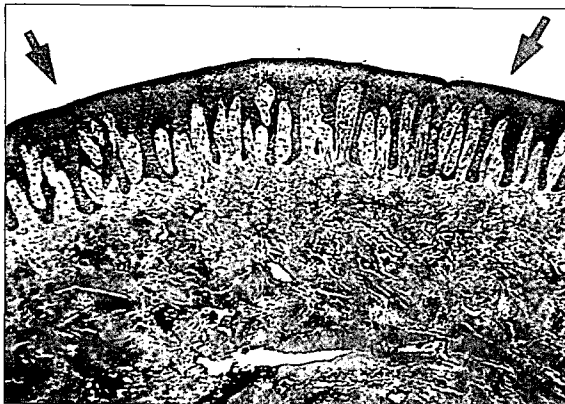


Fig. 3. Normal stratified squamous epithelium apart from the tumor is noted (H-E, $\times 100$). Arrow indicates normal epithelium.



Fig. 4. Normal epithelium is completely dissected by microdissection (H-E, $\times 100$). Arrow indicates dissected normal epithelium.

chloroform isoamylalcohol을 첨가하여 vortex로 잘 섞은 후 역시 3500g로 원심분리 하였고, 이 과정을 3회 반복하였다. 그 후 상층액을 새 tube에 옮긴 후 1/10 volume의 3M sodium acetate와 2X volume의 100% ethanol을 첨가하여 조심스럽게 섞은 후 -70℃에 1시간 방치하여 DNA를 침전 시켰다. 그 후 3500g로 5분간 원심분리 한 후 상층액을 버리고 침전물을 70% cold ethanol로 수세 후 재 원심분리하여 DNA를 침전시키고 DNA pellet을 공기 중에 건조시킨 후 멸균 증류수로 용해시켰다.

추출한 DNA의 순도는 photometer로 260nm와 280nm의 파장에서 수치를 읽어 이 수치의 비 260/280가 1.8 이상인 DNA를 시료로 사용하였고 순도가 이 수치 이하인 경우에는 phenol/chloroform추출을 다시 하였다.

이렇게 추출한 DNA는 1% agarose gel에 전기영동하여 DNA를 확인하였다.

2) DNA modification

50 μ l 용액 중 1 μ g의 DNA를 최종농도 0.2M의 NaOH 용액으로 37℃에서 10분간 처리하여 DNA를 변성시켰다. 그 후 urea/sodium bisulfite로 DNA를 변환시키기 위하여 50ml의 Falcon tube에 7.5g의 urea(analytical grade, BDH)를 넣고 여기에 10ml의 증류수를 첨가하여 vortex하면서 녹였다. 여기에 실온에서 7.6g의 sodium metabisulfite(Sigma)를 넣고 증류수를 20ml까지 증가시키면서 vortex하여 녹이면서 용액의 pH를 10M NaOH로 5.0으로 조절하였다. 이렇게 만든 urea/sodium bisulfite 용액과 hydroquinone을 변성시킨 DNA에 최종농도가 각각 5.36M, 3.44M 및 0.5mM 되도록 DNA 용액 22.2 μ l, urea/sodium bisulfite 208 μ l 및 10mM의 신선한 hydroquinone 용액 12 μ l씩 혼합하였다. 그 후 혼합 용액을 0.5ml의 Polymerase Chain Reaction(PCR) tube에 넣고 위에 100 μ l의 mineral oil을 첨가 후 55℃에서 15분, 이어서 95℃에서 30초 부란하였고 이 과정을 20회 반복하였다. 이러한 과정이 끝난 modified DNA는 Wizard DNA purification resin(Promega)으로 정제 후 다시 NaOH(final concentration 0.3M)로 실온에서 5분간 처리 후 ethanol로 침전시켜 멸균 증류수로 녹였다.

3) Polymerase Chain Reaction(PCR) Amplification

PCR 반응을 위한 primer는 사람의 p16 유전자의 promoter/exon 1 부위중 일부를 증폭하도록 설계한 것을 사용하였다⁵³⁾.

Cytosine을 치환시키지 않은 정상 p16 promoter 부위의 증폭은 p16-W primer set(sense: 5'→3' TCACCA-GAGGG TGGGGCGGACCGC

antisense: 5'→3' CGACCCGGGCCCGCGCCGTGG)

를 사용하였고, methylated cytosine을 구별하기 위한 primer set는 p16-M(sense: 5'→3' TTATTA-GAGGGTGGGGCGGATCGC antisense: 5'→3' GACCC CGAACCGCGACCGTAA)를, unmethylated cytosine을 구별하기 위한 primer set는 p16-U(sense: 5'→3' TTATTAGACGGGTGGGGTGA TTGT antisense: 5'→3' CAACCCAAACCACAACCATAA)를 사용하였다. 반응은 20 μ l의 반응으로 1x PCR buffer에 dNTP 각각 250mM, 각각의 primer 10pM, DNA/modified DNA 50ng, 1.25mM MgCl₂, Taq polymerase 0.5 U들을 넣어 반응 시켰고 반응조건은 95℃에서 5분 반응 후 95℃에서 30초, 65℃에서 30초, 72℃에서 30초 반응시키고 이 과정을 36회 반복하였다. 그 후 72℃에서 5분 연장한 후 반응을 종결하였다. 이렇게 반응시켜 얻은 PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동하여 각각의 bp(150-151)를 확인 하였다.

(Abbreviation : T : Thymidine, A : Adenine, C : Cytosine, G : Guanine)

4) DNA Autosequencing

PCR 증폭산물의 염기서열 분석은 ABI 310 autosequencer(Perkin Elmer, U.S.A.)를 이용하였다. 방법은 Bigdye terminator 기법으로 제조회사의 instruction에 의하여 진행하였다. 즉 순수 정제된 PCR 산물을 20-30ng/ μ l, primer 1 pmol/ μ l로 농도를 조정 후 20 μ l의 PCR 반응을 시행하였다. 반응 조건은 DDW 6.8 μ l, reaction mixture 8 μ l, PCR 산물 2 μ l (30ng/ μ l), primer 3.2 μ l를 각각 혼합하여 96℃에서 15초 반응 후 96℃에서 10초, 50℃에서 5초, 60℃에서 4분씩의 반응을 25회 반복 후 반응을 마쳤다. 이 PCR 산물을 다시 깨끗한 Eppendorf tube에 DNA 20 μ l와 멸균증류수 80 μ l을 넣은 후 이에 다시 3M의 sodium acetate 10 μ l와 250 μ l의 100% ethanol과 잘 섞어 실온에서 5분간 방치한 후 다시 실온에서 3500g로 10분간 원심분리하여 상층액을 버리고 침전 DNA를 말렸다. 그 후 template suppression reagent 25 μ l를 섞어 3분간 vortex한 후 96℃에서 3분간 처리하였고 그 후 바로 얼음에 3분간 넣었다. 이렇게 처리한 시료를 autosequencer의 setup tube에 넣어 기계 조작을 하였다.

5) p16의 면역 조직화학적 염색

조직세포에서의 p16표출을 검색하기 위하여 p16항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 시행하기 위하여 파라핀 포매조직에서 6 μ m의 절편을 만들어 탈파라핀한 후 degraded alcohol로 함수시킨 후 내인성 peroxidase를 차단하기 위하여 3% 과산화 수소용액을 methanol에 섞어 실온에서 30분 부란하였다. 그 후 phosphate buffered

saline(PBS, pH 7.4)로 수세하고, 다시 비 특이성 결합을 방지하기 위하여 정상 goat serum에 조직을 실온에서 30분간 부란하였다. 다시 PBS로 3분간 3회 수세 후 항원을 노출시키기 위하여 10mM의 citrate buffer에 조직을 넣고 microwave oven에서 15분간 끓인 후 실온에서 서서히 식힌 후 PBS로 3회 수세하였고, p16에 대한 단일클론항체(Santacruz, U.S.A.)를 1 : 100으로 희석하여 실온에서 2시간 부란하였다. 다시 PBS로 3회 수세하였고, biotin-labeled antimouse immune goat serum과 실온에서 30분 부란하였고 이를 다시 3회 PBS로 수세한 후 peroxidase labeled streptavidin과 실온에서 30분 반응시킨 후 PBS로 수세하였고, diaminobenzidine으로 발색하였다. 물로 수세 후 hematoxylin-eosin으로 대조염색을 시행하고 광학현미경으로 관찰하였다. p16에 양성반응세포는 세포질이나 핵에 갈색의 염색상을 보인 것으로 하였다.

III. 연구결과

1. Microdissection에 의한 DNA 추출

현미경 하에 종양조직과 정상조직을 구분하여 microdissection으로 얻은 파라핀 포매조직에서 추출한 DNA는 1%



Fig. 5. The DNA extracted from paraffin blocks show smear pattern (ethidium bromide).

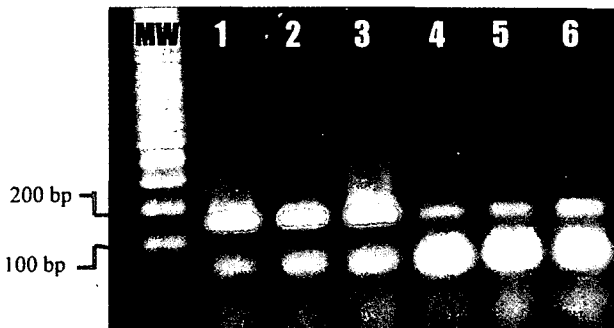


Fig. 6. Unmodified DNA was amplified by p15-w primer pairs (ethidium bromide). MW:100 bp marker

agarose gel 전기영동상에 smear pattern을 보였는데 이는 조직이 formalin에 고정된 것이고 또한 파라핀 포매조직 제작시 여러단계의 유기용제에 조직이 접촉되었기 때문에 DNA가 분절(fragmentation)된 결과인 것이었다(Fig. 5). 그러나 이러한 분절된 DNA들도 300bp이하의 DNA를 PCR로 증폭하는 데는 어려움이 없었다.

2. urea/sodium bisulfite처리된 DNA의 증폭

DNA의 nucleotide중 methylation된 cytosine을 관찰하기 위하여 DNA를 urea/sodium bisulfite로 화학반응시켜 methylation된 cytosine과 methylation되지 않은 cytosine이 uracil로 변환되는 것으로 methylation의 여부를 알 수 있으며 이렇게 처리된 DNA를 PCR로 증폭함으로써 uracil로 변환된 cytosine은 PCR산물에서 thymidine으로 치환된 것을 알 수 있다. PCR증폭에 쓰이는 primer set는 unmodified DNA를 증폭하는 p16-W, CpG island의 cytosine에 methylation된 DNA를 특이적으로 증폭할 수 있도록 제작된 primer p16-M, CpG island에 methylation이 안된 DNA를 증폭할 수 있도록 제작된 p16-U primer등 세 종류를 각각 사용하였다. urea/sodium bisulfite으로 처리하지 않은 DNA의 PCR을 위한 p16-W primer로는 bp가 150의 증폭산물이 확인되었으나 p16-M과 p16-U에 의한 PCR은 증폭산물이 확인되지 않아 p16-M과 p16-U primer들이 urea/sodium bisulfite 처리된 DNA를 특이하게 증폭함을 확인하였다. 한편 urea/sodium bisulfite으로 처리시킨 DNA는 p16-W primer로는 증폭산물이 확인되지 않았고 정상조직이나 종양조직의 DNA 모두 p16-M로는 증폭되지 않은 반면 p16-U primer로는 151 bp의 증폭산물이 확인되었다(Fig. 6, 7). 이러한 결과는 구강내의 편평세포암종의 발생과 p16 유전자의 promoter부위의 methylation에 의한 p16 생성저하와 연관성이 없음을 시사해 주는 것이다.

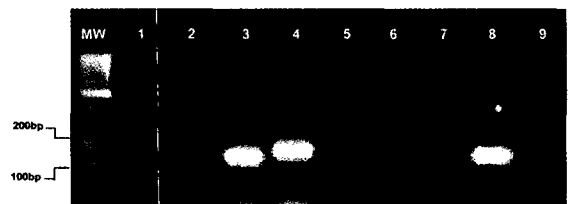


Fig. 7. DNA amplified by p16-U, p16-M, and p16-W. 1,2,3:unmodified DNA, 4,5,6:normal DNA, unmethylated, 7,8,9:tumor DNA, methylated. 1,4,7:p16-U 2,5,8:p16-M 3,6,9:p16-W MW:100/25bp marker:ethidium bromide.



Fig. 8. Normal stratified epithelium(H-E, ×100).

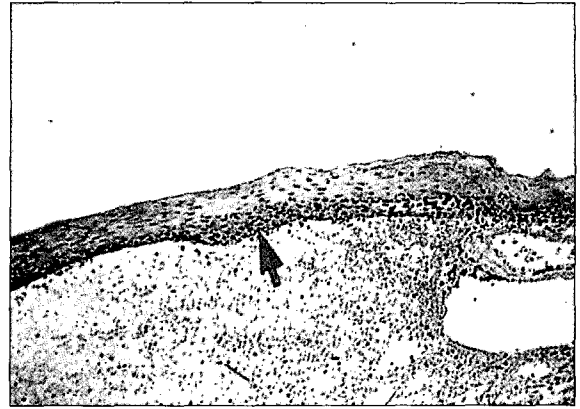


Fig. 9. p16 was expressed mainly in the cells of basal layer (ABC, ×200). Arrow indicates p16 positive basal cells.



Fig. 10. Invasive squamous cell carcinoma(H-E, ×200).

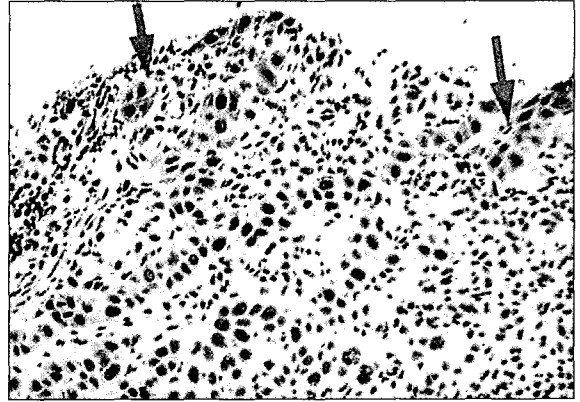


Fig. 11. p16 was expressed in both nuclei and cytoplasm of the invasive squamous cell carcinoma(ABC, × 200). Arrow indicates p16 positive cells.

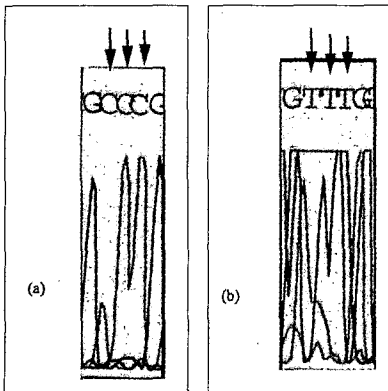


Fig. 12. Electropherogram of unmodified (a) and modified (b) DNA by bisulfite. The GCCCC has been changed into GTTTG by the conversion of unmethylated C to T.

Abbreviation :

H-E : Hematoxylin-Eosin

ABC : Avidin-Biotin Peroxidase Complex

3. DNA Sequencing에 의한 methylation확인

Electropherogram상 정상조직과 종양조직 모두에서 cytosine(C)이 thymidine(T)으로 변환된 것이 관찰되었다. 이러한 변화는 CpG island의 C뿐 아니라 CpG island 이외의 C도 모두 변화하여 cytosine이 methylation되지 않음을 확인 하였다(Fig. 12).

4. p16의 면역 조직화학적 염색

정상 증층 편평상피세포에서의 p16 표출은 주로 기저층의 세포분열이 왕성한 세포에서 표출되었고, 정상의 혈관내피세포나 섬유모세포에서도 표출되었다. 표출양상은 핵내와 세포질 내에서 모두 표출되었다(Fig. 8, 9).

13례의 구강내 편평상피암중 1례에서만 경도의 표출을 보였고 (Fig. 10, 11) 그 외의 12례에서 모두 음성반응을 보여 p16의 표출저하와 편평상피암중 발생과 관련있는 것으로 나타났다.

IV. 총괄 및 고찰

인체에서 종양발생에 대한 이해로서 세포의 증식과 소멸에 대한 기전은 복잡한 여러 유전자와의 연결된 역할에 의해 이루어진다. 많은 유전자들이 연구되었지만 가장 많은 종류의 장기와 암에서 관찰되는 p53 종양억제 유전자는 암 발생의 유전자 역할에 대한 좋은 예라고 할 수 있다^{29,31}. 이러한 종양억제 유전자의 역할에 대한 연구로 adenomatous polyposis coli(APC), Wilm's tumor(WT1) 혹은 neurofibromatosis type1(NF1) 유전자 등과 같은 종양 억제 유전자가 인체 암 발생에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으나 조직의 특성에 따라 선택적인 성격을 보이는 것으로 보고되고 있다²⁹. p53, Rb(retinoblastoma), p16^{ink4}, APC 등 종양 억제 유전자들의 배선 변이(germline mutation)는 유전적 암을 발생하는 희귀한 유전적 가족병 가계에서 관찰되나 보편적인 산발적 암종 (sporadic cancer)에 있어서는 종양억제 유전자들의 체성변이(somatic mutation)가 자주 관찰되는 현상이다. 이러한 암 유발 유전자들은 유전자 전사, 세포주기조절, DNA의 손상 복구, 세포 자가 소멸 기전(apoptosis) 등 다양한 역할을 하는 단백질들을 유전자 암호 정보로 갖고 있게된다. 암 발생 과정에 있어 유전자 상호간의 역할에 의한 연구로 실제적인 세포의 증식과 유전적 정보의 유지를 조절하는 기전으로 Kinzler 등과 Vogelstein 등에 의하여 주장되는 gatekeeper 유전자와 caretaker 유전자의 상호작용에 대한 개념이 최근에 소개되고 있다^{32,33}. Gatekeeper 유전자로는 대표적으로 대장암에서 APC 유전자의 역할에 대한 연구가 이루어지고 있으며

APC 유전자의 변화가 세포증식 과정의 이상을 초래하고 이런 현상이 계속적으로 유지되면서 종양 생성의 초기 단계로 진행되고 종양 발생기전이 지속됨을 보여준다³⁴⁻³⁶. 이와는 차이가 있으나 caretaker 유전자는 종양 발생에 직접적으로 관여하여 암을 유발하기 보다는 간접적으로 caretaker 유전자에 변이가 다른 유전자 특히 gatekeeper 유전자의 기능과 경로를 갖는 유전자에 변이를 초래할 위험도를 높여 종양 발생과정을 일으킬 수 있는 기전을 제시하여 주는 것으로 알려져 있으며, 이런 논리적 배경으로 인체에서 대장암 발생의 단계적 유전자 변이가 잘 설명되어지고 있다^{34,36}. 이러한 암 발생과정의 단계적 발달에 대한 이해는 분자 생물학의 역학적 연구 방법으로서 적은 비용의 연구로 암 발생과정의 단계를 규명하며, 특히 초기의 암 발생과정의 병리 생물학적 성격을 정확히 규명하고자 하는 목적으로, 암 발생의 위험군을 선별하며 초기의 과정에서 암 발생 위험군에 대한 치료 방침을 결정하고자 함이다.

최근에 연구되는 유전자로 p16^{ink4} 종양억제 유전자는 암 발생에 관여하는 기전으로 Rb 종양억제 유전자와 연관되어 세포주기의 G1기에 작용하여 손상세포의 복구 및 소멸에 관여함으로써 암 발생에 관여한다고 한다³⁷. p16^{ink4} 종양억제 유전자는 염색체 9p21에 위치하며 16kd (kilodalton)의 분자량을 갖는 cyclin kinase inhibitor로 CDK4(cyclin dependent kinase⁴²)와 CDK6에 결합하며^{12,38} 이런 작용은 세포주기의 G1에서 S기로의 이행과정에 관여하여 위에서 설명한 Rb 종양억제 유전자 단백질의 cyclin-D-dependent phosphorylation을 억제함으로써 세포주기의 이행을 억제하는 역할을 한다¹³. 이러한 종양억제 유전자인 p16^{ink4}은 DNA의 메틸화(methylation)에 의해 유전자의 비 활성화가 되어 종양발생과정이 형성된다고 보고되고 있으며^{26,39}, 유전자 촉진자(promoter) 부분의 CpG 위치에서 일어나는 과메틸화(hypermethylation)가 p16^{ink4} 유전자의 기능을 억제하여 종양이 발생한다고 한다. DNA 메틸화와 유전자 변이 위치와의 연구로서 p53 종양억제 유전자에서의 연구를 보면, p53 유전자의 메틸화된 CpG 위치가 인체 암에서 변이의 주 발생부분(mutational hot spots)을 대단히 높게 포함하고 있다⁴⁰. 이런 5'-methylcytosine에서 탈 아미노화(deamination)가 일어나게 되면 유전자 변이의 중요 내부적 기전으로 작용하며, 유전자 변이가 복구되지 않으면 cytosine이 thymidine으로 변화하게 된다(C to T transition).

이것은 cytosine에 탈 아미노화가 이루어지면서 cytosine이 thymidine으로 변하는 것으로⁴¹ 메틸화된 CpG 위치가 유전자 점 변이의 주 발생부분임을 보여주는 기전으로 인체 암에서 p53 종양 억제 유전자의 점 변이현상 (point mutation)으로 cytosine이 thymidine으로 치환되는 변이가 가장 빈번히 일어나는 기전에 대한 설명이 된다. Myöh

änen 등⁴²⁾은 대장암 세포주 HCT116을 대상으로 한 실험에서 p16^{ink4} 유전자의 메틸화가 종양발생의 원인이라는 직접적 증거를 제시하였으며 대립 유전자쌍에서 한쪽에 틀이동변이(frameshift mutation)가 있을 때 다른 쪽에 메틸화만 있어도 암 발생이 표현된다고 보고하였다⁴²⁾. Myöhänen 등에 의하면 HCT116 세포주는 대장암 세포주가 공통적으로 대부분 과메틸화된 p16^{ink4} 대립 유전자를 갖고 있다는 Herman 등의 보고와는²⁶⁾ 상이하게 유전자 촉진자 CpG 위치에 50%만이 메틸화 되어 있음을 밝히면서 탈메틸화(demethylation)하는 방법을 이용하여 p16^{ink4} 유전자의 CpG 위치의 메틸화가 유전자 기능 억제의 초기단계임을 증명하였다.

일반적으로 DNA에서 염기의 특정 부위가 메틸화된(methylated) 것을 흔히 볼 수 있는데, DNA분자에서 이와 같이 변형된 또는 이례적인 염기는 유전정보의 발현을 조절한다든지 혹은 유전정보를 여러 가지 파괴요인으로부터 방어하기 위한 특이한 신호로 이해되고 있다.

p16^{ink4}종양억제 유전자의 변이에 대한 연구로 Hussain과 Harris⁴³⁾는 암의 분자생물학적 역학조사 연구에서 배선 변이와 체성변이 간에 변이 형태의 차이가 있음을 보고하였으며, 체성변이의 33%가 유전자소실 혹은 유전자첨가(deletion or insertion) 형태임에 비해 배선변이는 5%만이 소실 혹은 첨가의 형태이고 나머지 95%가 점 변이(point mutation) 형태라 보고하였고, 이들 암의 분자 생물학적 역학조사 결과는 p16^{ink4} 유전자의 이상에 의한 발암과정이 배선변이의 영향보다는 유전자에 대한 다른 형태의 변화에 영향을 많이 받는다는 것을 시사한다.

p16^{ink4}종양 억제 유전자에 대한 연구로 유전자 기능의 비활성화를 초래하는 기전으로 유전자의 변이된 전사(alternative transcript)¹⁴⁾나 혹은 CpG 위치의 메틸화가 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, El-Naggar 등⁴⁴⁾은 두경부 편평세포암종에 대한 연구로 11례의 세포주와 46명의 원발성 암 환자에서 다음과 같은 결론을 추론하였다. 첫째, p16 유전자의 배선 변이는 암 발생에 주로 관여하는 기전이 아니다. 둘째, p16 유전자 exon 1의 메틸화가 p16 유전자 비 기능화(silencing)의 공통된 기전이다. 셋째, p16 유전자의 비 활성화가 두경부 편평세포암종의 초기 발달과 암 유지의 중요 역할이다. 넷째, p16유전자의 변화와 임상적, 병리학적 예후인자 등과는 관계가 없다. 또한 El-Naggar 등⁴⁴⁾은 여러 보고서에서, p16 유전자의 변화에 의한 종양의 생물학적 변화 특성이 암종의 종류에 따라 다르고 두경부 편평세포암종에서 최근까지도 성격의 규명이 불확실하였던 것⁴⁵⁻⁴⁷⁾은 연구자에 따라 연구방법의 차이 등의 변수가 많아 다양한 결과를 보여준 것이라 설명하였다. 이들의 연구에서 보면 DNA변이나 p16 유전자의 일부소실은 세포주 11례 중 2례, 두경부 암 환자 46례 중 9례로 전

체 대상 예의 일부임을 보고하였고 메틸화 변화가 전체 43%에서 보이며 p16 유전자의 전사(transcription)가 없었던 종양 34례 중 exon 1 메틸화가 54%에서 관찰되며 이와는 상이하게 exon 2에서는 메틸화 7례의 종양 중 4례에서 p16 단백질이 검출되어 기능적 역할을 수행함을 관찰하여 exon 2 메틸화는 부가적 변화임을 보고하였다. 인체에서 타 장기의 발암과정으로 CpG 위치의 메틸화로 인한 유전자의 비활성화에 대한 연구로 최근 들어 폐암 및 신경모세포종에 대한 연구^{48,49)}가 보고되었으며, Huschtscha 등⁵⁰⁾은 유방암에서 p16^{ink4} 유전자의 메틸화로 인한 유전자 기능의 억제로 유방상피 세포 증식을 보고하였고, Kashiwabara 등⁵¹⁾은 폐의 비소세포암 환자의 파라핀 포매조직을 이용한 p16/CDKN2 유전자의 메틸화 상태와 p16과 Rb 유전자의 단백질 표현과의 상관관계에 대한 연구에서 p16/CDKN2 유전자의 메틸화는 메틸화 특이 중합효소연쇄반응(MS-PCR ; methylation specific polymerase chain reaction)을 이용하여 29명의 원발성 비소세포암 환자의 신선조직에서 34%에서 p16 유전자의 메틸화를 보고하였으며, p16과 Rb 유전자 단백질 표현은 면역조직 화학 염색법을 이용하여 82명의 원발성 비소세포암 환자의 파라핀포매조직에서 66% 환자에서 p16 단백질 이상 발현을 관찰하였고, 또한 p16 유전자의 메틸화와 임상적, 병리적 예후인자 등과는 관계가 없음을 보고하였다.

본 연구는 p16^{ink4} 종양억제 유전자의 메틸화 위치를 찾는 방법으로 CpG 위치의 메틸 cytosine 을 측정하였으며 Clark 등⁵²⁾과 Herman 등⁵³⁾이 발표한 메틸화 특이 중합효소연쇄반응(MS-PCR)을 이용하였으며 PCR반응을 위한 primer는 사람의 p16 유전자의 exon 1 부위를 증폭하도록 하여 메틸화된 cytosine과 DNA의 약품처리에 의한 영향을 받는 메틸화되지 않은 cytosine을 증폭하였다. 또한 본 연구에서는 urea/sodium bisulfite로 처리하지 않은 DNA의 PCR반응에서는 p16유전자의 정상 primer인 p16-W로 증폭한 결과 150bp의 증폭산물을 확인할 수 있었다(13례 전례).

Urea/sodium bisulfite로 처리된 DNA에서 p16-W primer에 의한 증폭에는 없었으며 exon 1의 메틸화를 찾기 위한 p16-M primer에서도 증폭에는 없었다. p16-U primer에 의한 증폭은 13례 전례에서 151bp의 증폭산물이 있었다. 유전자 염기 서열 분석에 의한 확인에서 13례 전례에서 cytosine이 urea/sodium bisulfite에 의하여 thymidine으로 치환되었음을 확인하여 p16유전자 촉진부위의 메틸화를 발견할 수 없어 El-Naggar 등⁴⁴⁾이 보고한 두경부 암 환자 및 세포주에서의 메틸화 43%의 보고와는 차이가 있었다. 실험의 재료로 본 연구에서는 파라핀 포매조직을 이용하였고 El-Naggar 등은 신선조직 및 세포주를 이용한 차이가 있다. 기타 타 장기의 연구에서도 Kashiwabara 등

⁵¹⁾의 보고서에서 신선 폐암 조직에서 34%의 메틸화를 보고하였고, 파라핀 포매조직을 이용한 면역조직화학염색법에서 66%의 환자에서 p16 단백질 표출저하(low expression)를 관찰 보고하였다. 본 연구에서 p16 면역조직화학염색 결과는 13례중 12례에서 (92%)음성반응을 보여 p16 단백질 기능이상이 발견되었다.

p16의 생성저하는 암발생과 밀접한 관련이 있으며 이러한 생성저하 기저는 p16 promoter부위의 methylation 이외에 다른 유전적 변화에 의한 것으로 생각되며 이에 대해서도 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

V. 결 론

p16은 cyclin dependent kinase를 억제함으로 세포주기를 제어해 주는 작용을 한다. p16의 표출이 감소되면 세포주기가 제어되지 않아 세포증식이 증가되어 악성종양으로 발전될 수 있다. p16의 표출감소와 암 발생과의 관계는 주로 이 유전자의 exon부위의 변이에 관한 연구이며 promoter부위의 methylation에 대한 연구는 드문 실정이다. 유전자의 promoter부위의 methylation은 transcription factor의 기능을 저하시키기 때문에 유전자산물 형성이 억제된다.

따라서 본 연구에서는 13례의 구강내 편평세포암종을 대상으로 파라핀 포매조직에서 microdissection기법으로 DNA를 추출하고 p16 promoter부위의 methylation 상태를 urea/sodium bisulfite로 처리하고 methylation-specific PCR기법으로 관찰하였으며, PCR산물은 DNA autosequencer로 염기서열을 분석하여 methylation 여부를 확인하였다. 또한 종양과 정상 세포에서 p16의 표출여부를 면역조직화학적염색으로 관찰하여 promoter부위의 methylation여부와 p16표출과의 관계를 연구하여 다음의 결과를 얻었다.

1. Urea/sodium bisulfite로 처리된 정상과 종양조직의 DNA는 p16-U primer로 증폭되었으나 p16-M나 p16-W primer로는 증폭되지 않았다.
2. 구강 편평세포암종 13례 전부는 p16-M으로는 증폭되지 않았고 p16-U로만 증폭되어 promoter부위의 CpG island에 methylation이 되지 않음을 알 수 있었다.
3. PCR 산물의 DNA 염기서열을 autosequencer로 확인한 바 DNA 염기의 모든 cytosine이 thymidine으로 치환되어 methylation을 전에서 발견할 수 없었다.
4. p16의 면역조직화학적 염색에서 1례를 제외한 12례에서 모두 음성 반응을 보여 p16 표출 저하와 구강내 편평 세포암종 발생과 밀접한 관련이 있는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하면, 구강내 편평세포암종에서 p16 promoter의 methylation은 관찰되지 않았으나, p16의 면역조직화학적 염색으로 종양세포에서 p16의 표출감소를 확인하였다. 이러한 결과는 p16의 생성저하는 암 발생과 밀접한 관련이 있으며 이러한 생성저하 기저는 p16 promoter부위의 methylation 이외에 다른 유전적 변화에 의한 것으로 생각되며 이에 대해서도 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Fearon ER, Vogelstein B : A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61 :759, 1990.
2. Weinberg RA : Tumor suppressor genes. *Science* 254 : 1138, 1991.
3. Nowell PC : Clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194 : 23, 1976.
4. Sidransky D, Frost P, Von Eschenbach A, et al. : Clonal origin of bladder cancer. *New Engl. J. Med.* 326 : 737, 1992.
5. Sidransky D, Mikkelsen T, Schwachheimer K, et al. : Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumour progression. *Nature* 355 : 846, 1992.
6. Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, et al. : Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 256 : 102, 1992.
7. Sidransky D, Von Eschenbach A, Tsai YC, et al. : Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 252 : 706, 1991.
8. Mao L, Hruban RH, Bpyle JO, et al. : Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res* 54 : 1634, 1994
9. Mao L, Lee DJ, Tockman MS, et al. : Microsatellite alterations as clonal markers in the detection of human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 9871, 1994.
10. Nowell PC, Hungerford DA : A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132 : 1497, 1960.
11. Rowley GD : A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature* 243 : 290, 1973.
12. Serrano M, Hannon GJ, Beach D : A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/cdk4. *Nature* 366 : 704, 1993.
13. Serrano M, Gomez-Lahoz E, Depinho RA, et al. : Inhibition of Ras-induced proliferation and cellular transformation by p16 INK4. *Science* 267 : 249, 1995.
14. Liggett WH, Sewell Da, Rocco J, et al. : p16 and p16 β are potent growth suppressors of head and neck squamous carcinoma cell in vitro. *Cancer Res* 56 : 4119, 1996.
15. J. Kim : Molecular biological mechanism of oral cancer. *Oncology of oral cancer : KAOMS p6*, 1997.
16. Nobori, T, Miura K, Wu DJ, et al. : Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene multiple human cancers. *Nature* 368 : 753, 1994.
17. Van der Riet P, Nawroz H, Hruban RH, et al. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer Res* 54 : 1156, 1994
18. Xu L, Sgri D, Sterner CJ, et al. : Mutational analysis of

- CDKN2(MTS1/P16ink4) in breast carcinomas. *Cancer Res* 54 : 5262, 1994.
19. Raymond A, Breut R : p16 proteins from melanoma-prone families deficient in binding to CDK4. *Oncogene* 11 : 1173, 1995.
 20. Kay PH, Jacobsen PF, Taylor J, et al. : The significance of DNA methylation in cancer. *Advances in Anatomic Pathology* 2 : 353, 1995.
 21. Caldas C, Hahn SA, Da costa IT, et al. : Frequent somatic mutations and homozygous deletion of the p16(MST1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 8 : 27, 1994.
 22. Mori T, Miura K, Aoki T, et al. : Frequent somatic mutations of the MST1/CDK4(multiple tumour suppressor/cyclin dependent kinase 4 inhibitor)gene in esophageal cell carcinoma. *Cancer Res* 54 : 3396, 1994.
 23. Okamoto A, Demetrick DJ, Spillare EA, et al. : Mutations and altered expression of p16INK4 in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 11045, 1994.
 24. Cairns P, Mao L, Merlo A, et al. : Rates of p16(MTS1) mutations in primary tumour with 9p loss. *Science* 265 : 415, 1994.
 25. Jen J, Harper JW, Bigner SH, et al. : Deletion of p16 and p15 genes in brain tumours. *Cancer Res* 54 : 6353, 1994.
 26. Herman JG, Merlo A, Mao L, et al. : Inactivation of the CDK2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 55 : 4525, 1995.
 27. Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, et al. : Methylation of the 5'-CpG island of the p16/CDK2 tumour suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res* 55 : 4531, 1995.
 28. Merlo A, Herman JG, Mao L, et al. : 5'-island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDK2/MTS1 in human cancer. *Nat Med* 1 : 686, 1995.
 29. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. : p53 mutations in human cancer. *Science* 253 : 49, 1991.
 30. Levine AJ, Momand J, Finlay CA : The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 351 : 453, 1991.
 31. Ponder B : Cancer. Gene losses in human tumours. *Nature* 335 : 400, 1988.
 32. Kinzler KW, Vogelstein B : Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386 : 761, 1997.
 33. Kinzler KW, Vogelstein B : Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87 : 159, 1996.
 34. Levy DB, Smith KJ, Beazer-Barclay Y, et al. : Inactivation of both APC alleles in human and mouse tumors. *Cancer Res* 54 : 5933, 1994.
 35. Jen J, Powell SM, Papadopoulos N, et al. : Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res* 54 : 5523, 1994.
 36. Luongo C, Moser AR, Gledhill, et al. : Loss of APC in intestinal adenoma from Min mice. *Cancer Res* 54 : 5947, 1994.
 37. Sharr CJ : Cancer cell cycles. *Science* 274 : 1672, 1996.
 38. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, et al. : A cell cycle regulator potentially involved in genesis of tumor types. *Science* 264 : 436, 1994.
 39. Issa JPJ, Baylin SB : Epigenetics and human disease. *Nat Med* 2 : 281, 1996.
 40. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, et al. : Mutations in the p53 tumor suppressor gene : Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54 : 4855, 1994.
 41. Ehrlich M, Zhang XY, Inamdar NM : Spontaneous deamination of cytosine and 5-methylcytosine residues with cytosine residues. *Mutat Res* 238 : 277, 1990.
 42. Myöhänen SK, Baylin SB, Herman JG : Hypermethylation can selectively silence individual p16/ink4A alleles in neoplasia. *Cancer Res* 58 : 591, 1998.
 43. Hussain SP, Harris CC : Molecular epidemiology of human cancer : Contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res* 58 : 4023, 1998.
 44. El-Naggar AK, Clayman G, Lee JJ, et al. : Methylation, a major mechanism of p16/CDKN2 gene inactivation in head and neck squamous carcinoma. *Amer J Pathol* 151 : 1767, 1997.
 45. Larsen GJ : p16/INK4A : A gene with a dual capacity to encode unrelated proteins that inhibit cell cycle progression. *Oncogene* 12 : 2041, 1996.
 46. Campbell IG, Beynon G, Davis M, et al. : LOH and mutation analysis of CDKN2 in human ovarian cancers. *Int J Cancer* 63 : 22, 1995.
 47. Koniya A, Suzuki H, Aida S, et al. : Mutational analysis of CDKN2(CDK4/MTS1) gene in tissue and cell lines of human prostate cancer. *Jpn J Cancer Res* 86 : 622, 1995.
 48. Nagatake M, Osada H, Kondo M, et al. : Aberrant hypermethylation at the bcl-2 locus at 18q21 in human lung cancers. *Cancer Res* 56 : 1886, 1996.
 49. Thoraval D, Asakawa J-1, Wimmer K, et al. : Demethylation of repetitive DNA sequences in neuroblastoma. *Genes chromosomes cancer* 17 : 234, 1996.
 50. Huschtscha LI, Noble JR, Neumann AA, et al. : Loss of p16/INK4 expression by methylation is associated with life span extension of human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 58 : 3508, 1998.
 51. Kashiwabara K, Oyama T, Sano T, et al. : Correlation between methylation status of the p16/CDKN2 gene and the expression of p16 and Rb proteins in primary non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 79 : 215, 1998.
 52. Clark SJ, Harrison J, Paul CL, et al. : High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acid Research* 22 : 2990, 1994.
 53. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, et al. : Methylation-specific PCR : A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 9821, 1996.

저자연락처

우편번호 330-716
 충남 천안시 신부동 산 7-1
 단국대학교 치과대학 구강악안면외과학교실
 강진원

원고 접수일 2000년 01월 19일
 게재 확정일 2000년 02월 28일

Reprint requests

Gin-Won Kang
 Dept. of OMFS, College of Dentistry, Dankook Univ.
 7-1, Shinbu-Dong, Chonan, Chungnam, 330-716, Korea
 Tel. 82-417-550-1991 Fax. 82-417-551-8988

Paper received 19 January 2000
 Paper accepted 28 February 2000