

위장관 간질성 종양의 *Epidermal Growth Factor Receptor* 유전자 돌연변이 연구

가톨릭대학교 의과대학 ¹병리학교실, ²외과학교실

유남진¹ · 이종우¹ · 송영화¹ · 전해명² · 남석우¹ · 김수영¹ · 박원상¹ · 이정용¹ · 이석형¹

목적: 대부분의 위장관 간질성 종양에서는 KIT 혹은 *platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA)* 유전자의 돌연변이를 가지고 있지만, 약 10% 정도에서는 두 가지 유전자의 돌연변이가 발견되지 않는다. 본 연구의 목적은 *epidermal growth factor receptor (EGFR)* 유전자의 돌연변이가 위장관 간질성 종양의 발병기전과 연관이 있는지를 밝히는 것이었다.

대상 및 방법: Polymerase chain reaction (PCR), the single strand conformation polymorphism (SSCP) 및 DNA sequencing을 이용하여 *EGFR* 유전자 exon 18, 19, 21의 돌연변이를 60예의 위장관 간질성 종양에서 조사하였다.

결과: 조사결과 60예의 위장관 간질성 종양에서 *EGFR* 유전자 exon 18, 19, 21의 돌연변이를 발견하지 못하였다.

결론: 본 연구의 결과는 위장관 간질성 종양에서 *EGFR* 유전자가 돌연변이 되지 않음을 나타냈고, 돌연변이 *EGFR*을 대상으로 시행하는 치료가 위장관 간질성 종양에서는 유용하지 않을 가능성이 높다는 것을 제시하였다.

중심 단어: EGFR 유전자, 위장관간질성종양, 돌연변이

서 론

위장관 간질성 종양(gastrointestinal stromal tumor; GIST)은 위장관에서 발생하는 비상피성 종양의 약 80% 정도를 구성하며 Cajal 세포에서 기원한다.(1,2) 위장관 간질성 종양은 다른 위장관 비상피성 종양과는 달리 c-kit receptor tyrosine kinase (KIT)를 발현한다.(1,2) KIT은 제3형의 receptor tyrosine kinase로 extracellular domain, transmembrane domain, juxtamembrane domain, tyrosine kinase domain으로 구성된다.(3) 80% 이상의 위장관 간질성 종양이 *KIT* 유전자의 돌연변이를 그리고 5~10%의 위장관 간질성 종양이 *platelet-*

derived growth factor receptor alpha (PDGFRA) 유전자의 돌연변이를 나타내는 것이 보고되었다.(4-7) 이들 유전자의 돌연변이는 위장관 간질성 종양의 발생에 결정적인 역할을 한다고 알려져 있다. 하지만 여전히 위장관 간질성 종양의 10% 정도는 이 두 유전자의 돌연변이가 없으므로, KIT 및 PDGFRA 이외의 돌연변이를 발견하는 것이 위장관 간질성 종양의 발병기전을 밝히는 과제 중의 하나이다.(6,7)

Tyrosine kinase inhibitor인 imatinib (Gleevec)은 만성골수성 백혈병의 치료에 효과를 나타내는데, 만성골수성 백혈병 세포의 BCR-ABL fusion gene의 활성화된 ABL kinase의 활성을 억제한다.(8) Imatinib의 tyrosine kinase 억제 효과는 ABL에만 특이적이지 않고 KIT 등에도 작용하므로 위장관 간질성 종양의 치료에 사용되는데,(9) 항암효과는 하지만 KIT의 돌연변이를 가지고 있는 종양환자의 대부분에서 나타난다.

Epidermal growth factor receptor (EGFR)는 receptor tyrosine kinase로 ligand인 epidermal growth factor와의 결합에 의해서 활성화된다.(10) EGFR의 활성화는 세포의 증식에 중요한 역할을 하며, 많은 종양에서 활성화가 보고되었다.(10) Gefitinib (Iressa)는 EGFR에 대한 kinase inhibitor로 비소세포성 폐암, 특히 adenocarcinoma와 bronchioloalveolar carcinoma subtype에 임상적 약효가 있다.(11) 초기의 연구는 EGFR의 과발현이 gefitinib의 감수성을 결정하는 인자로 생각되었으나, 최근 연구로 EGFR의 kinase domain의 돌연변이가 gefitinib의 감수성을 결정하는 인자임이 알려졌다.(12,13) EGFR이 세포의 증식에 중요한 역할을 담당하는 단백질이므로, 본 연구는 위장관 간질성 종양에서 연구 보고가 없었던 *EGFR* 유전자의 돌연변이에 대하여 연구하고자 한다.

방 법

1) 연구 대상

1989년 2001년까지 가톨릭대학교 의과대학병원에서 수술로 절제술을 받은 60명의 위장관 간질성 종양(위에서 40예, 소장에서 15예, 대장에서 5예) 환자를 대상으로 하였다. 위장관 간질성 종양 의 파라핀 포매 조직을 5 μ m 두께로 박절하여 hematoxylin & eosin 염색을 실시한 후 2명의 진단 병리 의사가 독립적으로 병리진단하였다. 병리조직에 대한

책임저자 : 이석형, 서울시 서초구 반포동 505번지
가톨릭대학교 의과대학 병리학교실, 137-701
Tel: 02-590-1188, Fax: 02-537-6586
E-mail: suhulee@catholic.ac.kr

접수일 : 2004년 10월 21일, 게재승인일 : 2004년 10월 28일
본 연구는 2004년도 과학재단 특장기초 연구지원으로 이루어진 것임(No. R01-2004-000-10463-0).

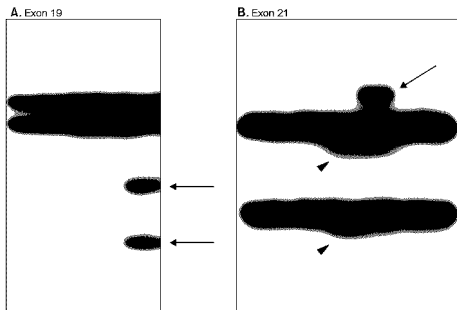


Fig. 1. Absence of somatic mutation of *EGFR* within the kinase domain in GISTs. (A) The PCR products of the exon 19 from the representative 4 cases of GISTs and a known positive control mutation (2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC, arrows) were visualized on SSCP. (B) The PCR products of the exon 21 from the representative 6 cases of GISTs and two known positive control mutation (2573T>G (arrow) and 2543C>T (arrow head)) were visualized on SSCP. The DNAs from the GISTs show wild-type bands without any additional aberrant bands.

크기(장경), 50 high power field에서의 세포분열 수를 기준으로 aggressive behavior에 대한 risk를 등급화하였다.(2) 또한, 모든 종양은 c-kit, CD34, smooth muscle antigen, desmin, S-100에 대한 면역조직염색을 시행 후 위장관 간질성 종양을 판정하였다.

2) 돌연변이 조사

Hematoxylin & eosin 염색된 조직에서 미세절제술(microdissection)을 이용하여 암세포 및 정상세포를 각각 분리 수집한 후, proteinase K를 처리하여 DNA를 얻었다.(14) 비소세포 폐암세포의 *EGFR* 유전자의 돌연변이는 kinase domain을 coding하는 exon 18, 19, 21에서만 발견되므로,(12,13) 이 부위를 증폭할 수 있는 시발제(primer)를 제작하였다. 방사성 동위원소인 (³²P)dCTP)를 중합효소연쇄반응에 포함시켜서 자기방사법 (autoradiogram)으로 중합효소연쇄반응 산물을 분석할 수 있게 하였다. 중합효소연쇄반응은 혼합액을 94°C에서 10분간 변성시킨 후 94°C에서 30초, 53~62°C에서 40초와 72°C에서 40초씩 각각 35회 반복하였으며 72°C에서 5분간 연장반응을 실시하였다. 중합효소연쇄반응 및 single strand conformation polymorphism (SSCP), DNA 염기서열분석에 관한 내용은 이전의 논문에서 자세히 기술되어 있다.(14) PCR-SSCP에 의한 *EGFR*의 돌연변이에 대한 양성대조군으로 폐암에서 발견된 돌연변이들 동시에 분석하였다.

결 과

미세절제물 통해서 암 및 정상세포를 조사한 60예의 위

장관 간질성 종양조직에서 선택적으로 분리할 수 있었고, 추출된 DNA를 이용하여 kinase domain을 포함하는 exon 18, exon 19, exon 21의 돌연변이들 중합효소연쇄반응 및 SSCP로 분석하였다. 모든 중합효소연쇄반응 산물은 SSCP에서 관찰되었는데, 모두 새로운 band의 출현 없이 wild-type의 band로 나타났으며, 이들은 염기서열 분석 결과 돌연변이가 없는 정상 염기서열을 가지고 있었다(Fig. 1). 각각의 정상 세포를 SSCP로 분석한 결과도 종양과 동일하게 돌연변이를 관찰할 수 없었다. 반면에 폐암에서 발견된 양성대조군은 SSCP에서 aberrant band를 나타냈고(Fig. 1), sequencing에서도 염기서열의 변화를 확인하였다. 이 실험은 미세절제, 중합효소연쇄반응, SSCP 및 염기서열분석을 2회 반복하였으며, 결과는 2회 모두 일치하였다.

고 찰

본 연구의 목적은 암세포 증식에 중요한 역할을 하는 *EGFR*의 kinase domain이 위장관 간질성 종양에서 돌연변이를 가지고 있는지, 또 돌연변이가 있다면 그것이 기존에 폐암에서 알려진 활성화성 돌연변이인지로 알아보고자 한 것이었다. 저자 등은 이 유전자 등의 kinase domain이 60예의 위장관 간질성 종양조직에서 돌연변이가 되지 않았다는 것을 확인하였고, 이를 통해서 위장관 간질성 종양의 발생 이전에 이 부위의 돌연변이가 작용하지 않으리라는 것을 예측할 수 있었다.

이제까지 밝혀진 바에 의하면, 종양의 발생은 중요한 생물학적 기능을 갖는 유전자의 돌연변이가 연속적으로 누적되어서 이루어지는 것으로 알려져 있다.(15) *KIT* 유전자의

germline mutation을 가진 환자는 Cajal cell의 증식에 의한 다발성 결절을 위장관에 가지고 있지만, 성인이 되어야 비로소 이 결절이 위장관 간질성 종양으로 진행하고 임상적인 문제를 야기한다.(16,17) 이는 Cajal cell의 초기 증식에 *KIT* 혹은 *PDGFRA*의 돌연변이가 작용하고, 이외의 다른 유전자의 돌연변이가 위장관 간질성 종양의 발생 및 진행에 관계할 것이라는 것을 제시한다. 유전학적 조사에 의하면 위장관 간질성 종양은 염색체 14q11.1-q12, 14q22-24 및 22q의 소실을 가지고 있으며, 이는 이 부위의 종양억제 유전자의 존재 가능성과 이 유전자의 불활성화가 위장관 간질성 종양의 발병에 일종의 역할을 하는 것을 제시한다.(18) Fukasawa 등은 22q12.1-2에 존재하는 *neurofibromatosis 2 (NF2)* 유전자의 돌연변이 2예를 22q의 소실이 있는 위장관 간질성 종양에서 발견하여 22q의 소실에 관계하는 종양억제 유전자가 *NF2*일 것이라는 가설을 제시하였다.(19) 이외에도 염색체 1p, 9p 및 11p의 소실도 위장관 간질성 종양에서 관찰된다.(18) 또한, 염색체 8q 및 17q의 증폭도 발견된다. 하지만, 이런 연구가 결정적인 위장관 간질성 종양의 진행에 관한 결정적 단서를 제공하기에는 미흡하므로, 본 연구자는 *EGFR*의 유전자 돌연변이를 조사하였지만 위장관 간질성 종양의 진행에 *EGFR*의 돌연변이가 연관이 없다는 것을 밝혔으며, 이 기전을 밝히기 위해 추가적인 연구가 필요하다고 생각한다.

현재 위장관 간질성 종양의 발병기전의 연구에서 규명하지 못한 다른 하나는 *KIT* 혹은 *PDGFRA*의 돌연변이가 없는 10%의 종양에 대한 초기 위장관 간질성 종양의 발병기전을 규명하는 것이다. *KIT* 및 *PDGFRA* 유전자 모두 tyrosine kinase를 코딩하는 유전자이므로 *EGFR* 이외의 다른 tyrosine kinase 유전자가 관련되어 있을 가능성은 여전히 높다고 생각된다. 최근, Bardelli 등은 138개의 kinase 유전자의 유전자 이상을 147예의 대장암에서 조사하여 14개의 유전자에서 돌연변이를 발견하였다.(20) 아직까지 발견되지 않거나 여기에 포함되지 않았던 kinase 유전자를 고려한다면 더 많은 kinase 유전자의 돌연변이가 발견될 것으로 기대한다. 이들 kinase를 조사한다면 위장관 간질성 종양의 발생기전에 간여하는 *KIT* 혹은 *PDGFRA*의 돌연변이 이외의 돌연변이를 발견할 것이다.

위장관 간질성 종양에 대한 유전자 분석을 통하여 *KIT*와 *PDGFRA* 유전자의 이상이 이 종양을 유발하는 것을 알게 되었고, 이에 대한 inhibitor인 Gleevec을 이용하여 위장관 간질성 종양을 치료하고 있는 사실은 유전자의 이상에 대한 연구가 임상에 직접 적용될 수 있음을 보여주는 것이다. 이런 관점에서 본 연구는 비록 *EGFR*의 돌연변이를 찾지 못하였지만, 향후의 위장관 간질성 종양의 발병기전의 규명과 이를 이용한 새로운 치료제의 개발에 대한 연구에 중요한 정보를 제공하리라고 생각한다.

결 론

암세포의 증식에 중요한 역할을 하며 항암치료제인 gefitinib의 therapy target인 *EGFR* 유전자의 kinase domain의 돌연변이를 위장관 간질성 종양 60예를 대상으로 중합효소 연쇄반응 및 SSCP로 분석하였다. 위장관 간질성 종양조직에서 선택적으로 분리된 종양세포 및 정상세포 모두 *EGFR* 유전자의 kinase domain에서 돌연변이의 증거를 관찰할 수 없었다. 이 결과를 통하여 저자들은 위장관 간질성 종양의 *EGFR*의 kinase domain 돌연변이는 없거나 있다 하여도 발생빈도가 극히 낮을 것이라는 것을 알 수 있었고, 또한 위장관 간질성 종양이 gefitinib 등의 *EGFR* kinase inhibitor의 임상적용 대상이 아닌 것을 확인하였다.

REFERENCES

1. Kindblom LG, Remotti HE, Aldenborg F, Meis-Kindblom JM. Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* 1998;152:1259-1269.
2. Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, et al. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol* 2002;33:459-465.
3. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 1987;6:3341-3351.
4. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998;279:577-580.
5. Lux ML, Rubin BP, Biase TL, et al. *KIT* extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 2000;156:791-795.
6. Hirota S, Ohashi A, Nishida T, et al. Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* 2003;125:660-667.
7. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, et al. *PDGFRA* activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003;299:708-710.
8. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 2001;344:1038-1042.
9. Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2003;21:4342-4329.
10. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms

- of activation and signalling. *Exp Cell Res* 2003;284:31-53.
11. Wakeling AE, Guy SP, Woodburn JR, et al. ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy. *Cancer Res* 2002;62:5749-5754.
 12. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129-2139.
 13. Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497-1500.
 14. Lee JY, Dong SM, Kim SY, Yoo NJ, Lee SH, Park WS. A simple, precise and economical microdissection technique for analysis of genomic DNA from archival tissue sections. *Virchows Arch* 1998;433:305-309.
 15. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87:159-170.
 16. Nishida T, Hirota S, Taniguchi M, et al. Familial gastrointestinal stromal tumours with germline mutation of the KIT gene. *Nat Genet* 1998;19:323-324.
 17. Beghini A, Tibiletti MG, Roversi G, et al. Germline mutation in the juxtamembrane domain of the kit gene in a family with gastrointestinal stromal tumors and urticaria pigmentosa. *Cancer* 2001;92:657-662.
 18. Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC. Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2004;22:3813-3825.
 19. Fukasawa T, Chong JM, Sakurai S, et al. Allelic loss of 14q and 22q, NF2 mutation, and genetic instability occur independently of c-kit mutation in gastrointestinal stromal tumor. *Jpn J Cancer Res* 2000;91:1241-1249.
 20. Bardelli A, Parsons DW, Silliman N, et al. Mutational analysis of the tyrosine kinase in colorectal cancers. *Science* 2003;300:949.

= Abstract =

Mutational Analysis of the *Epidermal Growth Factor Receptor* Gene in Gastrointestinal Stromal Tumors

Nam Jin Yoo, M.D.¹, Jong Woo Lee¹, Young Hwa Soung¹, Hae Myung Jeon, M.D.², Suk Woo Nam, Ph.D.¹, Su Young Kim, M.D.¹, Won Sang Park, M.D.¹, Jung Young Lee, M.D.¹ and Sug Hyung Lee, M.D.¹

Departments of ¹Pathology and ²General Surgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Purpose: Most gastrointestinal stromal tumors (GISTs) have gain-of-function mutations of the *KIT* or the *platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA)* genes, but approximately 10% of the GISTs are wild types for both the *KIT* and the *PDGFRA* genes. The purpose of this study was to investigate the possibility that *epidermal growth factor receptor (EGFR)* gene mutation might be responsible for the pathogenesis of GIST.

Materials and Methods: We analyzed the *EGFR* gene in 60 GISTs for the detection of somatic mutations by using the polymerase chain reaction (PCR), the single strand conformation polymorphism (SSCP), and DNA sequencing in exon 18, 19, and 21 encoding the kinase domain.

Results: The SSCP analysis revealed no evidence of *EGFR* mutations in exon 18, 19, and 21 in GISTs.

Conclusion: The data indicate that the *EGFR* gene may not be mutated in human GIST and suggest that therapies targeting the mutated *EGFR* gene products might not be useful in the treatment of GISTs. (*J Korean Gastric Cancer Assoc* 2004;4:268-271)

Key Words: Epidermal growth factor receptor gene, Gastrointestinal stromal tumor, Mutation