

두경부 편평상피세포암에서 종양억제유전자들의 변이*

영남대학교 의과대학 이비인후과학교실
송시연 · 박강식 · 배창훈

= Abstract =

Alteration of Multiple Tumor Suppressor Genes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Si Youn Song, M.D., Kang Shik Park, M.D., Chang Hoon Bai, M.D.

Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, College of Medicine Yeungnam University, Daegu, Korea

Objectives : Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the most common head and neck malignant tumor. The molecular genetic changes involving both oncogenes and tumor suppressor genes are known to be involved in head and neck squamous cell carcinogenesis, but the roles of the known tumor suppressor genes in carcinogenesis are not fully elucidated. The objectives of this study are to demonstrate the genetic alterations including the loss of heterozygosity (LOH), amplification, and microsatellite instability of known tumor suppressor genes in HNSCC and to evaluate the relationship between genetic alterations of tumor suppressor genes and clinicopathologic features.

Materials and Methods : Genetic alterations of 10 microsatellite markers of the 6 known tumor suppressor genes (APC, EXT1, DPC4, p16, FHIT, and PTEN) were analysed by DNA-PCR in paraffin-embedded histologically confirmed HNSCC specimens.

Results : The genetic alterations of tumor suppressor genes were found frequently. Among the genetic alterations, LOH was most frequently found one. LOH was found frequently in APC (45.4%), EXT1 (36.4%), DPC4 (54.5%), and p16 (50%), but not found in FHIT. Also, the author found that abnormalities of APC gene was related to cervical lymph node metastasis and recurrence and that abnormalities of EXT1 gene were coexisted with those of APC gene or DPC4 gene. But these coexistences had no correlation with clinical features.

Conclusion : These results suggested that APC, EXT1, p16, and DPC4 genes might play important roles and multiple tumor suppressor genes may participate dependently or independently in the carcinogenesis of HNSCC. These results also suggested that APC gene might relate to prognosis.

KEY WORDS : Head and neck neoplasm · Squamous cell carcinoma · Tumor suppressor gene.

서 론

편평상피세포암은 두경부의 악성 종양 중 가장 흔하며 세계

*본 논문은 2001년 영남대학교 심임교원정착 연구비의 지원으로 연구 되었음.

교신저자 : 송시연, 705-717 대구광역시 남구 대명동 317-1

영남대학교 의과대학 이비인후과학교실

전화 : (053) 620-3782 · 전송 : (053) 628-7884

E-mail : ssyskhs@med.yu.ac.kr

적으로는 여섯 번째로 흔한 고형암이다. 인도나 서남아시아에서는 매우 높은 빈도를 보이며 서구에서는 모든 암의 2%정도를 차지한다¹⁾. 두경부 편평상피세포암은 발생하는 각 부위에 따라 임상 양상이 매우 다양하여 임상적인 진행은 각 환자의 종양의 위치나 병리학적인 진단에 따라 결정된다. 발생의 가장 중요한 원인인자로는 흡연을 들 수 있는데 환자의 90% 이상이 흡연의 경력이 있는 것으로 보고된다. 음주도 중요한 원인인자의 하나이며 흡연과 동반될 경우 구강암, 인두암 또

는 성문상암에서는 서로 상승작용을 나타낸다²⁾. 두경부암 발암의 분자생물학적인 기전은 지난 10여년간 연구되어 왔으며 이러한 정보들은 악성화를 일으키거나 암으로의 발전을 야기하는 유전자를 목표로 하는 치료의 근간을 제시할 수 있게 하였다. 그럼에도 불구하고 아직까지 많은 부분이 밝혀지지 않고 있다. 두경부암의 치료는 원발부위의 병기에 따라 다르지만 그 치료의 결과로 인해 일반적으로는 기능적으로 매우 심한 장애를 초래하고 또 외모적으로도 손상을 남기며 그럼에도 불구하고 예후도 좋지 못하다¹⁾.

암의 발생은 다단계(multi-step) 과정이며, 이는 어떤 세포에서 발암물질에 의해 유도된 유전자 손상으로 시작되며 만약 이것이 세포의 DNA 복구 기전에 의해 인식되어지지 않는다면 선택적인 성장을 하여 종양이 된다. 따라서 특정 염색체 부위의 유전학적 변화는 독립적으로 나타날 수도 있지만 다단계 과정의 일부분일 수도 있다. 두경부암 발생을 일으키는 표적 유전자에 대한 연구는 처음에는 세포유전학적인 기법으로 염색체의 이상을 주로 발견하였으나, 최근에는 microsatellite marker를 이용하면서 특정 염색체의 아주 미세한 부위의 이상까지 알 수 있게 되었다. 이러한 염색체의 이상에는 염색체의 소실이나 확대, 역전이나 이동과 같은 염색체 재배열, 유전자의 소실 그리고 증폭 등이 포함된다¹⁾. 종양억제유전자 중 변이가 가장 빈번하게 관찰되며 또한 현재까지 가장 널리 연구되어진 것이 p53이다. 종양억제유전자의 가장 큰 특징은 이형접합성 상실(loss of heterozygosity, 이하 LOH로 약함)로서 한 대립유전자(allele)가 결손되어 있거나 결손은 되지 않았어도 변이가 일어나 있다는 것이다. 현재까지 이러한 종양억제유전자에 대한 연구는 국내외를 막론하고 다양한 암종에 대해 연구가 진행되어오고 있다³⁾.

종양억제유전자에 대한 연구들은 대부분 외국에서 이루어진 것들이며 또한 이비인후과 영역에서 비교적 흔하게 발견되는 두경부 편평상피세포암을 대상으로 다양한 종양억제유전자의 이상에 관한 보고는 흔치 않은 실정이다.

저자들은 두경부 편평상피세포암 조직을 대상으로 이미 알려진 종양억제유전자인 APC(adenomatous polyposis coli), EXT1, p16, PTEN, DPC4(deleted in pancreatic carcinoma-4) 및 FHIT(fragile histidine triad gene)에서 이형접합성의 상실, 증폭 및 불안정을 포함하는 유전자의 변이를 알아보고 이들 유전자의 변이와 임상양상의 연관성을 확인함으로써 두경부 편평상피세포암의 발암기전에 있어 중요한 종양억제유전자를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

영남대학교 의과대학 이비인후과학교실에서 조직검사 상

편평상피세포암으로 진단된 파라핀에 포매된 두경부 편평상피세포암 조직 11예와 동일 환자의 혈액에서 채취한 말초혈액 림프구 11예를 대상으로 하였다. 유전자의 변이를 조사하기 위한 종양억제유전자로는 APC, EXT1, p16, PTEN, DPC4, 및 FHIT 유전자 등을 이용하였으며, 이들 중 APC(D5S299, D5S82), EXT1(D8S200, D8S85), PTEN(AFMa086Wg9, WI10275), 및 DPC4 유전자(D18S363, D18S46) 등에서는 두 가지의 microsatellite marker를 이용하였으며 p16(D9SIFNA)과 FHIT 유전자(D3S1312)에서는 한 가지의 microsatellite marker를 이용하였다.

2. 방 법

Xylene을 이용하여 파라핀에 포매된 두경부 편평상피세포암 조직으로부터 탈파라핀화 후 proteinase K 방법으로 DNA를 추출하였다. 말초혈액 림프구에서는 bead-beating 방법을 이용하여 DNA를 추출하였다. 두가지의 DNA는 모두 분광측광법을 이용하여 농도를 보정하였다. Microsatellite marker들은 γ -³²P로 표식을 하였으며 이를 polyacrylamide gel에 전기영동을 하여 확인하였다. 두경부 편평상피세포암 조직에서 추출한 DNA를 종양측으로 말초혈액림프구에서 추출한 DNA를 정상대조군으로, 그리고 microsatellite marker들을 primer로 하여 DNA-PCR을 시행하였다.

PCR을 위한 반응혼합액은 표식된 microsatellite marker 1 μ l(순방향 및 역방향 배열), 표식되지 않은 microsatellite marker 1 μ l(순방향 및 역방향 배열), 10 \times Taq DNA 증합효소 완충액 5 μ l, Taq DNA 증합효소 1 unit(0.5 μ l), 각 100 μ M의 2'-deoxyguanosine-5'-triphosphate(dGTP), 2'-deoxyadenosine-5'-triphosphate(dATP), 2'-deoxythymidine-5'-triphosphate(dTTP) 및 2'-deoxycytosine-5'-triphosphate(dCTP)(이하 dNTPs로 약함) 및 증류수 25.5 μ l로 구성되었으며 여기에 각 조직 혹은 백혈구로부터 분리된 DNA 용액 5 μ l를 각각 가하여 최종 용적이 50 μ l가 되도록 하였다. PCR 반응은 변성(denaturation), 결합(annealing) 및 증합(polymerization)의 3 단계로 구성되어 30주기를 반복하였는데 변성반응은 95 $^{\circ}$ C에서 1분, 결합반응은 60 $^{\circ}$ C에서 1분, 그리고 증합반응은 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 반응시켰다. PCR 산물을 요소를 포함하는 6% sequencing gel에 각 6 μ l씩 부하하여 1시간 동안 전기영동한 후 X-ray film에 약 3일간 노출시켰다. PCR에 이용된 각 종양억제유전자들의 microsatellite marker의 염기배열은 다음과 같다(Table 1).

Film을 현상한 후 림프구에서 추출한 DNA의 띠(band)를 기준으로 이에 비해 종양측에서 하나 이상의 대립인자의 신호가 50% 이하로 의미있게 감소한 경우를 LOH로 판단하였으며, 림프구측에 비해 차이는 있으나 신호의 차이가 크

Table 1. Microsatellite markers

Gene (locus)	Markers	Product size (bp)	Sequence (5' to 3')
FHIT (3p14.2)	D3S1312	215-225	F : TGGGTCTGCCTCCAA R : GGCTCCCCAGGGTAAG
p16 (9p21)	D9S1FNA	138-159	F : TGC GCGTTAAGTTAATTGGTT R : GTAAGGTGGAACCCCACT
APC (5q21)	D5S299	156-182	F : GCTATTCTCTCAGGATCTTG R : GTAAGCCAGGGACAAGATGATGACAG
APC (5q21)	D5S299	156-182	F : GCTATTCTCTCAGGATCTTG R : GTAAGCCAGGGACAAGATGATGACAG
	D5S82	169-179	F : ATCAGAGTATCAGAATTCT R : CCAATTGTATAGATTAGAAGTC
EXT1 (8q24.1)	D8S200	184-196	F : TGCAATTAACCTCTAGTGC R : GATCTTCGTCTCTTCAAGT
	D8S85	73-83	F : AGCTATCATCACCCATAAAAT R : AGTTAACCATGTCTCTCCCG
pTEN (10q23)	AFMa08-6Wg9	154	F : AAATGTACGGTTCATTGACTT R : GACTGACTACAAATGGGCA
	W110275	276	F : TTGCAGCACAAATTATTATCTGG R : TGTGGGATCTGAGGTATG
DPC4 (18q12.1)	D18S363	177-247	F : TTGGAACTGCTCTACACATTC R : GCTTCATTCTCCACTGGAT
	D18S46	129-153	F : GAATAGCAGGACCTATCAAAGAGC R : CAGATTAAGTGAAAACAGCATATGTG

지 않은 경우 또는 차이가 없는 경우를 저류(retention)으로 판단하였다. 또한 림프구측에 비해 신호가 증가한 경우를 증폭(amplification)으로 판단하였으며, 림프구측에 존재하지 않는 띠가 나타나는 경우를 microsatellite instability로 판단하였다. 한편 림프구측에서 띠가 나타나지 않는 경우에는 심험상의 오류로 판단(not informative)하여 결과판정에서 제외하였다(Fig. 1).

결 과

환자의 평균연령은 59.2세였고, 11예 모두 남자였다. 원발병소는 7예가 후두였고, 2예는 하인두였으며 구강과 구인두가 각 1예였다. 하인두암 2예는 모두 이상와암이었으며, 구강암은 가동설에 국한된 암이었고, 구인두암은 구인두 후벽에 발생한 예였다.

임상병기는 1기가 1예, 2기와 3기가 각각 3예, 그리고 4기가 4예였다. 원발병소의 병기는 1기가 2예, 2기가 7예, 3기가 1예, 그리고 4기가 1예였다. 경부 림프절로의 전이가 있었던 경우가 5예였고, 이 중 2예는 일측에서 한 개만이 축지되었고, 3예는 원발 병소와 동측에서 여러 개가 축지되었다.

병리학적으로는 전례에서 편평상피세포암이었고, 분화정도는 6예에서 분화가 잘되어 있었고, 4예에서 중등도로 분화가 되어 있었으며 1예는 분화가 불량하였다.

전례에서 흡연의 과거력이 있었으며, 평균 흡연량은 39.1

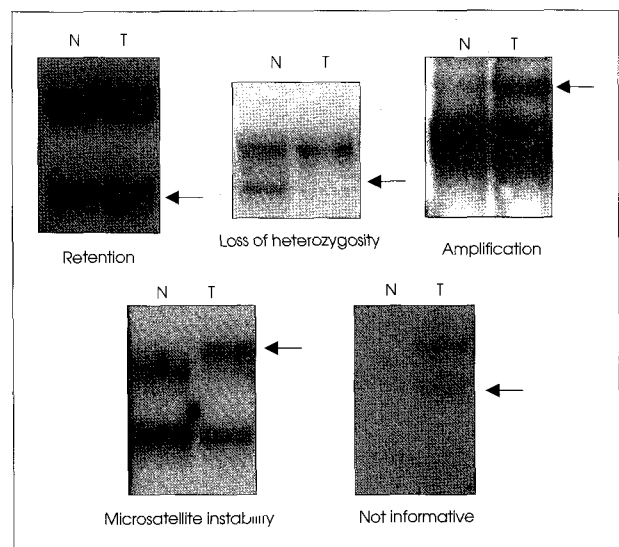


Fig. 1. Retention, loss of heterozygosity, amplification, microsatellite instability and not informative case by PCR (N : normal, T : tumor).

갑/일·년이였다. 음주 역시 1예를 제외한 10예가 음주자였다.

초치료로서 수술만 시행한 경우가 1예였으며, 유도항암화학요법 후 방사선치료를 시행한 경우가 2예, 유도항암화학요법을 시행하지 않고 방사선치료만 시행한 경우가 1예, 그리고 수술 후 방사선치료를 시행한 경우가 7예였다. 치료 채취 이전에 항암화학요법이나 방사선치료를 받은 예는 없었다. 추적관찰은 최단 24개월에서 최장 96개월까지 시행되었으

Table 2. Case review of head and neck squamous cell carcinoma patients

Case	Age	Sex	Site	Stage	TNM	Diff.	Treatment modality	F/U(Month)	Result	Failure site
ENT 1	55	M	Lx	II	T ₂ N ₀ M ₀	WD	OP	36	NED	None
ENT 2	66	M	Lx	III	T ₃ N ₀ M ₀	WD	OP+RT	32	DOD	Local
ENT 3	58	M	Lx	II	T ₂ N ₀ M ₀	MD	OP+RT	42	NED	None
ENT 4	47	M	HP	IV	T ₂ N _{2b} M ₀	PD	CT+RT	60	NED	None
ENT 5	58	M	OC	I	T ₁ N ₀ M ₀	WD	OP+RT	30	DOD	Local
ENT 6	56	M	OP	III	T ₂ N ₁ M ₀	WD	OP+RT	24	DOD	Lung
ENT 7	57	M	HP	IV	T ₁ N _{2b} M ₀	WD	CT+RT	24	DOD	Neck
ENT 8	61	M	Lx	IV	T ₄ N ₀ M ₀	MD	OP+RT	40	AWD	Lung
ENT 9	59	M	Lx	II	T ₂ N ₀ M ₀	WD	RT	36	NED	None
ENT 10	68	M	Lx	IV	T ₂ N _{2a} M ₀	MD	OP+RT	96	NED	None
ENT 11	66	M	Lx	III	T ₂ N _{2b} M ₀	MD	OP+RT	42	NED	None

M : male, Lx : larynx, HPx : hypopharynx, OC : oral cavity, OPx : oropharynx, T : tumor stage, N : nodal stage, M : distant metastasis, Diff. : differentiation, WD : well differentiated, MD : moderately differentiated, PD : poorly differentiated, OP : operation, RT : radiotherapy, CT : chemotherapy, F/U : follow up, NED : no evidence of disease, DOD : died of disease, AWD : alive with disease

며 평균 추적관찰기간은 42개월이었다. 치료시행 후 3년의 시점에서 6예가 무병생존해 있었으며, 1예는 생존해 있으나 폐전이 있는 상태였고, 나머지 4예는 병의 재발로 인해 사망하였다. 재발의 부위는 원발병소가 2예, 경부 림프절이 1예, 그리고 원격전이가 2예였다(Table 2). 원격전이는 2예 모두 폐로의 전이였다. 11예의 두경부 편평상피세포암 조직에서 여섯 가지의 중앙억제유전자들의 microsatellite marker에 대한 LOH가 발견되는지를 DNA-PCR로 관찰하였다. 본 연구의 결과를 각 유전자별과 원발부위별로 나누면 다음과 같았다.

1. 유전자별 결과

1) APC gene

D5S299에서는 informative case 11예 중 4예(36.4%)에서 LOH가 발견되었으며, 나머지 7예는 retention으로 판명되었다. D5S82에서는 informative case 11예 중 2예(18.2%)에서만 LOH가 발견되었으며, 나머지 9예는 retention으로 판명되었다(Fig. 2). 이 중 하인두암 환자인 ENT 7에서는 두 개의 microsatellite marker 모두에서 LOH가 발견되었다. 두 가지의 microsatellite marker를 모두 고려하면 11예 중 5예(45.5%)에서 최소한 하나의 APC gene의 microsatellite marker에서 LOH가 발견되었다. APC 유전자의 이상과 임상병기와의 상관관계를 보면 3기가 2예, 4기가 3예로 이상이 나타난 5예 모두가 진행된 병기였고 이러한 진행된 병기는 원발부위와의 연관성보다는 경부전이와 연관성이 있어 5예 중 4예(80.0%)에서 경부림프절 전이가 있었다. 세포의 분화도와와의 연관성은 알 수가 없었으며 5예 중 3예(60.0%)에서 재발이 있었다.

2) EXT1 gene

D8S200에서는 informative case 8예 중 1예(12.5%)에

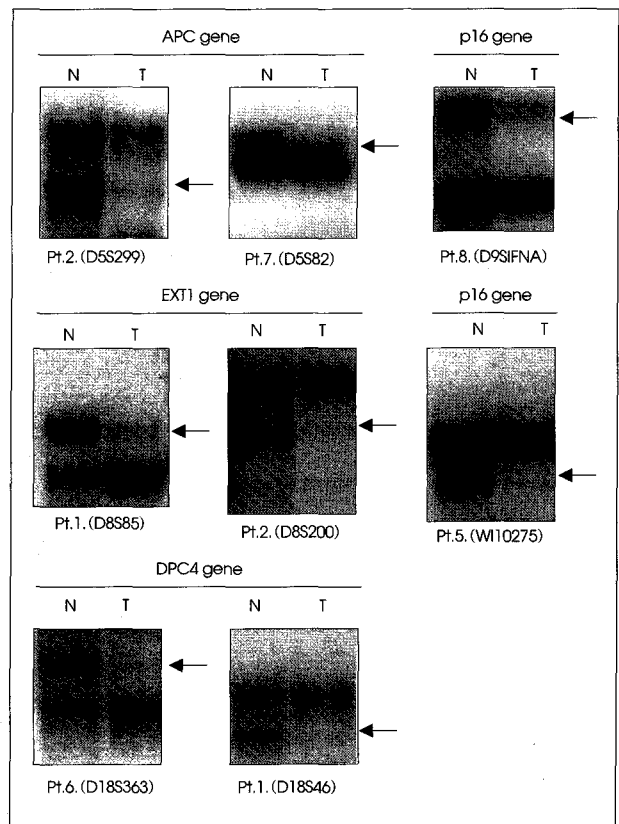


Fig. 2. Expression of APC, p16, EXT1, pTEN and DPC4 gene from peripheral blood lymphocyte(N) and tumor tissue from head and neck squamous cell carcinoma(T) by PCR. Arrows mean the loss of heterozygosity.

서만 LOH가 발견되었으며, 나머지 7예는 retention으로 판명되었다. D8S85에서는 informative case 11예 중 3예(27.3%)에서 LOH가 발견되었으며, 1예에서 증폭이 있었고, 나머지 7예는 retention으로 판명되었다(Fig. 2). 이 중 후두암 환자인 ENT 2에서는 두 개의 microsatellite marker 모두에서 LOH가 발견되었다. 두 가지의 microsatellite mar-

ker를 모두 고려하면 11예 중 4예(36.4%)에서 최소한 하나의 EXT1 gene의 microsatellite marker에서 유전자의 이상이 발견되었다. EXT1 유전자의 이상과 임상양상과의 연관성을 찾기는 어려웠으나 4예 중 2예(50.0%)에서 재발이 있었다.

3) p16 gene

D9SIFNA에서는 informative case 8예 중 3예(37.5%)에서 LOH가 발견되었으며, 1예(12.5%)에서 microsatellite instability가 있었으며 나머지 4예는 retention으로 판명되었다. 즉 informative case 8예 중 4예(50.0%)에서 최소한 한 가지의 p16 gene의 microsatellite marker의 이상이 발견되었다(Fig. 2). p16 유전자의 이상과 임상양상과의 연관성을 찾기는 어려웠으나 4예 중 2예(50.0%)에서 재발이 있었다.

4) pTEN gene

WI10275에서는 informative case 9예 중 2예(22.2%)에서만 LOH가 발견되었으며, 나머지 7예는 retention으로 판명되었다(Fig. 2). AFMa086wg9에서는 informative case 8예 전례에서 retention으로 판명되었다. pTEN 유전자의 이상과 임상양상과의 연관성은 찾을 수 없었다.

5) DPC4 gene

D18S363에서는 informative case 10예 중 2예(20.0%)에서 LOH가 발견되었으며, 1예(10%)에서 중복이 나타났고, 나머지 7예는 retention으로 판명되었다(Fig. 2). D18S46에서는 11예 모두 informative case였고 이 중 3예(27.3%)에서 LOH가 발견되었으며, 나머지 8예는 retention으로 판명되었다(Fig. 2). DPC4 gene의 경우 중복되어 microsatellite marker의 이상이 나타난 경우는 없었다. 따라서 두 가지의 microsatellite marker를 모두 고려하면 11예 중 6예(54.5%)에서 최소한 하나의 microsatellite marker에서 유전자의 이상이 발견되었다. DPC4 유전자와 임상양상과는 어떤 연관성을 찾기는 어려웠으나 6예 중 3예(50.0%)에서 재발이 있었다.

6) FHIT gene

D3S1312의 실험에서는 informative case 10예 모두 retention으로 판명되어 전례에서 이상소견을 발견할 수 없었다. 이상의 결과를 도식화하여 나타내었다(Table 3, Fig. 3).

7) 유전자별 상호연관성

중양억제유전자들 사이의 연관성을 보면 APC 유전자의 이상이 있는 5예 중 3예에서 EXT1 유전자의 이상이 발견되었으며, DPC4 유전자도 5예 중 2예에서 이상을 나타내었는데 2예 모두 EXT1 유전자에도 이상이 있는 경우였다. DPC4 유전자의 이상이 있는 경우에는 p16과도 2예에서 같이 발견되었으며 APC와는 무관하게 EXT1과 같이 나타난 경우도 1예가 있었다. 총11예 중 7예에서 두가지 이상의 유전자에 대해 동시에 이상을 나타내었다. 그렇지만 유전자의 중복이상과 임상양상과의 연관성은 찾을 수 없었다.

2. 해부학적 부위별 결과

1) 후두암(laryngeal cancer)

11예 중 후두암이 7예였으며, 전례에서 하나 이상의 유전

	FHIT		APC		EXT1		p16		PTEN		DPC4	
	D3S1312	D5S299	D5S82	D8S200	D8S85	D9SIFNA	AFMa086Wg9	WI10275	D18S363	D18S46		
ENT 1	R	R	R	R	L	R	R	R	R	R	R	L
ENT 2	R	L	R	L	L	R	R	R	R	R	R	L
ENT 3	R	R	R	R	R	L	R	R	R	R	R	R
ENT 4	N	L	R	N	A	N	N	N	N	N	N	L
ENT 5	R	R	R	R	R	R	R	R	L	R	R	R
ENT 6	R	R	L	R	R	M	R	R	R	L	R	R
ENT 7	R	L	L	N	L	N	N	R	R	R	R	R
ENT 8	R	R	R	R	R	L	R	R	R	R	R	R
ENT 9	R	R	R	N	R	N	N	N	N	L	R	R
ENT10	R	L	R	R	R	R	R	L	R	R	R	R
ENT11	R	R	R	R	R	L	R	R	A	R	R	R

Fig. 3. Summary of genetic alteration of six tumor suppressor genes in tissues from head and neck squamous cell carcinoma. L : loss of heterozygosity, R : retention, A : amplification, M : microsatellite instability, N : not informative.

Table 3. Frequency of allelic abnormalities of tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma

Gene	Markers	LOH/IC (%)	AM/IC (%)	MI/IC (%)	TA/IC (%)
FHIT	D3S1312	0/10 (0.0)	0/10 (0.0)	0/10 (0.0)	0/10 (0.0)
p16	D9SIFNA	3/8 (37.5)	0/8 (0.0)	1/8 (12.5)	4/8 (50.0)
APC	D5S299	4/11 (36.3)	0/11 (0.0)	0/11 (0.0)	4/11 (36.3)
	D5S82	2/11 (18.1)	0/11 (0.0)	0/11 (0.0)	2/11 (18.1)
EXT1	D8S200	1/8 (12.5)	0/8 (0.0)	0/8 (0.0)	1/8 (12.5)
	D8S85	3/11 (27.2)	1/11 (9.0)	0/11 (0.0)	4/11 (36.3)
pTEN	AFMa086Wg9	0/8 (0.0)	0/8 (0.0)	0/8 (0.0)	0/8 (0.0)
	WI10275	2/9 (22.2)	0/9 (0.0)	0/9 (0.0)	2/9 (22.2)
DPC4	D18S363	2/10 (20.0)	1/10 (10.0)	0/10 (0.0)	3/10 (30.0)
	D18S46	3/11 (27.2)	0/11 (0.0)	0/11 (0.0)	3/11 (27.2)

LOH : loss of heterozygosity, IC : informative case, AM : amplification, MI : microsatellite instability, TA : total abnormality cases

Table 4. Frequency of allelic abnormalities in head and neck squamous cell carcinoma grouped to anatomical site

Site	Case	LOH/IC (%)	AM/IC (%)	MI/IC (%)	TA/IC (%)
Larynx	7	12/66(18.1)	1/66(1.5)	0/66(0.0)	13/66(19.6)
Hypopharynx	2	5/11(45.4)	1/11(9.0)	0/11(0.0)	6/11(54.5)
Oropharynx	1	2/10(20.0)	0/10(0.0)	1/10(10.0)	3/10(30.0)
Oral cavity	1	1/10(10.0)	0/10(0.0)	0/10(0.0)	1/10(10.0)

LOH : loss of heterozygosity, IC : informative case, AM : amplification, MI : microsatellite instability, TA : total abnormality cases

자의 microsatellite marker에 대한 LOH를 가지고 있는 것으로 판명되었다. 이 중 4예에서는 한 가지 유전자의 microsatellite marker에 대해서만 LOH를 가지고 있었으며, 2예는 2가지, 그리고 ENT 2에서는 APC(D5S299), EXT1(D8S200, D8S85), 그리고 DPC4(D18S46) 등 3가지 중앙역제유전자의 4종류의 microsatellite marker의 LOH를 보였다. 중앙역제유전자 중에서는 DPC4가 7예 중 4예(57.1%)에서 이상이 나타나 가장 높은 빈도를 보였으며 그 외에 p16도 6예 중 3예(50.0%)에서 이상이 있었으며 APC는 7예 중 2예(28.6%)에서 이상이 나타났다.

2) 하인두암(Hypopharyngeal cancer)

11예 중 하인두암은 2예였으며 2예 모두에서 둘 이상의 microsatellite marker에 대한 유전자적 이상을 가지고 있는 것으로 판명되었다. ENT 4에서는 informative한 4종류의 microsatellite marker 중 2종류에서 LOH를 나타내었고, 한 종류에서는 증폭을 나타내어 총 3종류의 microsatellite marker에서 이상을 보였다. ENT 7에서는 informative한 7종류의 microsatellite marker 중 3종류의 microsatellite marker에서 LOH를 보였다. 유전자별로는 APC와 EXT1이 2예 모두에서 그리고 DPC4가 1예에서 이상을 나타내었다.

3) 구인두암(Oropharyngeal cancer)

11예 중 구인두암은 1예(Pt. 10)였으며 3종류의 gene의 3종류의 microsatellite marker에서 이상을 보였다(LOH 2, microsatellite instability 1). 유전자별로는 APC와 p16 그리고 DPC4에서 이상소견을 나타내었다.

4) 구강암(Oral cavity cancer)

11예 중 구강암은 1예(Pt. 5)였다. 모든 microsatellite marker에서 informative하게 나타났으며 이중 pTEN gene의 microsatellite marker인 AFMa086wg9 한가지에서만 LOH를 보였다.

이상의 결과를 하나의 표로 정리하였다(Table 4).

고 찰

암세포는 정상세포와 여러 가지 점에서 차이를 보이는데 잘 분화되지 않는 성질, 주변조직을 침범하는 침습성 등의

특징을 가진다. 이러한 암세포의 특징은 암세포가 단지 세포 증식이 통제되지 않는 성장을 하기 때문이라기보다는 세포진화의 한 과정으로 이해해야 할 것이다. 노령의 인구가 증가하면서 노인층에서 암의 발생률이 높은 것은 복합적이면서 다양한 유전적 변화로 인하여 암이 발생할 가능성이 있음을 시사해준다⁴⁾.

Nowell⁵⁾이 대부분의 종양은 단일세포 기원이며 암세포가 변이를 거쳐 유전적으로 불안정하게 되고 세포진화가 촉진된다고 주장한 이래 암발생의 유전적 요인이 많이 연구되어 왔으나 대부분 염색체 수준에서의 이상을 규명하는데 그쳤고 구체적으로 어떤 유전자의 변이가 암의 발생을 유도하는지를 밝히지 못하였다. 이 후 변이가 일어날 경우 암의 발생이 증가하는 유전자들이 발견되었고 또한 과발현이 되는 경우 암의 발생이 증가하는 유전자들이 발견되면서 전자를 중앙역제유전자, 후자를 중앙유전자라고 부르게 되었다.

대장 선종성 용종증(APC) 유전자는 5번 염색체의 장완의 5q21에 존재하는 중앙역제유전자이다. Bodmer 등³⁾에 의해 대장암의 발생에 APC 유전자의 이상이 관련된다는 것이 증명된 이래로 신체의 다른 여러 부위의 암에서 LOH나 다른 유전적 변이가 관찰되었다⁶⁾. 한편, 위의 전암병변 중 심한 이형성증에서는 APC 유전자가 단지 25.9%에서만 정상적으로 발현되어 위암 발생의 초기에 APC 유전자가 관련될 것이라는 보고도 있다⁷⁾. APC 유전자의 두경부 영역의 암종에 대한 연구는 구강 편평상피세포암 중 72%에서 APC 유전자의 LOH가 발견됨이 보고된 이래로 주로 구강암에 국한되어 있었다⁸⁾. 우리와 같은 동양인인 대만인의 구강 편평상피세포암에서는 53.8%에서 APC 유전자의 LOH가 있음이 보고되었다⁹⁾. 본 연구에서는 11예 중 5예(45.4%)에서 최소한 한가지 이상의 microsatellite marker에 LOH가 나타났으며 후두암이 2예, 하인두암이 2예, 그리고 구인두암이 1예였다. 이상의 결과로 다양한 부위의 두경부암에서 APC 유전자의 이상이 있음을 알 수 있었다. 임상양상과의 상관관계에서는 원발병소의 병기와는 연관성이 없으나 5예 중 4예(80.0%)에서 경부 림프절 전이가 있는 것을 볼 때 APC 유전자의 이상과 경부 림프절 전이가 연관성이 있는 것으로 사료된다. 또한 일반적으로 림프절 전이가 있는 경우 예후가 불량한 것과 마찬가지로 5예 중 3예에서 재발이 있어 APC 유전자의 이상이 불량한 예후와도 연관성이 있을 것으로 판단된다.

유전성 다발성 외골종(hereditary multiple exostosis, EXT)은 상염색체 우성으로 유전되며 장골의 말단이 비정상적으로 과다성장하는 특징을 가진다. 이 질환을 가진 환자에서는 연골육종이 가장 흔히 생기는 악성 종양으로 알려져 있으며 때로는 골육종이 생기기도 한다¹⁰⁾. EXT gene family는 8q24.1(EXT 1), 11p13(EXT 2), 그리고 19q(EXT 3) 등 세 개의 유전자위(gene locus)를 가지고 있다¹¹⁾. 다른 종류의 종양에 대한 결과를 보면 대장 및 직장암 등¹²⁾에 관한 연구가 보고된 바 있다. 본 연구에서는 11예 중 3예(27.3%)에서 최소한 한 가지 이상의 microsatellite marker에 LOH를 나타내었고 유전자의 이상을 모두 고려하면 11예 중 4예(36.4%)에서 유전자의 이상 소견을 나타내었으며 이들은 후두암과 하인두암이 각 2예씩이었다.

염색체 9번 단완의 9p21에 위치하는 p16은 세포주기의 조절단백의 하나인 CDKN2를 만드는 유전자로서 CDK4와 cyclin D의 결합을 방해함으로써 세포주기의 정지를 유도하는 역할을 한다. 신체 다른 부위의 악성 종양과 p16의 연관성에 관한 연구는 국내외적으로 다양하게 이루어지고 있으며 두경부 편평상피세포암에 대한 연구도 다양하게 보고되고 있으며 국내에서는 Kim 등¹³⁾의 보고 이래 몇몇 보고가 있다. Kim 등¹³⁾은 p16의 결손과 cyclin D1의 과발현이 G1 phase의 이상을 초래하여 두경부암이 발생에 중요한 역할을 할 것이라 하였다. Do 등¹⁴⁾은 p16과 진행된 암의 병기와 연관성이 있으며 후두암에서는 예후와 연관성이 있을 것이라 보고 하였다. 본 연구에서는 8예 중 3예(37.5%)에서 LOH를 발견할 수 있었으며 1예(12.5%)에서 microsatellite instability가 발견되어 총 4예(50.0%)에서 이상을 발견할 수 있었으며 부위별로는 후두암이 3예 구인두암이 1예였다.

염색체 10번 장완의 10q23에 존재하는 PTEN 유전자는 MMAC1이라고 불리며 세포뼈대를 형성하는 tensin과 auxilin과 상동성을 나타내는 dual-specific phosphatase를 만드는 유전자이며 다양한 종류의 암종에서 결손이나 변이 등의 이상이 알려지면서 종양억제유전자로 인정되기 시작했다¹⁵⁾. 두경부 편평상피세포암에 있어 PTEN에 대한 연구도 많이 보고 되고 있다. Henderson 등¹⁶⁾은 두경부 편평상피세포암 세포주를 대상으로 시행한 연구에서 p53의 이상은 발견할 수 있었으나 PTEN 유전자의 이상은 발견할 수 없었다고 보고하면서 그렇지만 PCR을 기초로한 접근에서는 전체 유전자의 이상이나 촉진제 영역의 이상을 발견할 수 없지만 대신에 PTEN 유전자의 촉진제 영역의 메틸화가 결손되어 있음을 발견하여 이것이 암억제유전자의 불활화의 중요한 기전일 것이라는 제안을 하였다. Poetsch 등¹⁷⁾도 PCR과 direct sequencing analysis로는 전체 유전자나 엑손의 결손을 발견할 수 없었다고 보고하여 Henderson 등¹⁶⁾의 보고를 뒷받침하였다. 그러나 10q 부위의 LOH가 병의 진

행 및 불량한 예후와 연관성이 있음이 보고된 경우도 있으나¹⁹⁾ 국내에서는 아직 보고된 바가 없다. 본 연구에서도 두 가지의 microsatellite marker 중 WI10275에서는 informative case 9예 중 구강암과 후두암 각 1예씩 모두 2예(22.2%)에서 LOH가 발견되었으나, AFMa086wg9에서는 informative case 8예 중 유전적 이상이 없어 Henderson 등¹⁶⁾이나 Poetsch 등¹⁷⁾의 결과와 유사하였다.

Smad4라고도 불리는 DPC4 유전자는 18번 염색체의 장완 18q21에 존재하며 인체의 발달과 종양억제의 기능을 한다. DPC4는 1996년 췌장암의 3분의 1에서 결손되어 있다고 해서 그 이름을 얻게 되었으며, 유전자에 대한 연구결과 tumor growth factor(TGF)- β 의 signalling homologue인 *Drosophila melanogaster*의 mothers against dpp(MAD) 단백질 및 *Caenorhabditis elegans* MAD homologue인 sma-2, sma-3, sma-4와 동일한 염기서열을 가지고 있음이 밝혀졌다¹⁸⁾. 이러한 결과로 DPC4가 종양억제유전자의 역할을 하면서 TGF- β signalling과 포유류의 성장에 중요한 역할을 할 것이라는 것이 밝혀졌다. 즉 DPC4 단백질은 DNA의 특정 염기서열부위에 부착하여 TGF- β 의 자극에 의한 유전자의 전사를 매개하는 역할을 하는 것이다. 지금까지 밝혀진 DPC4의 변종들은 모두 이러한 유전자 전사조절의 기능이 결여되어 있다. 이러한 변종들은 DNA 결합이 결손된 것, 전사 활성 영역에 영향을 미치는 것, 그리고 핵전위의 결손을 일으키는 것들로 대별된다. 국외적으로 두경부 편평상피세포암에 대한 연구가 어느 정도는 이루어져 있는 상태이지만¹⁹⁾ 국내에서는 보고된 바가 없다. 본 실험에서는 11예 중 6예(54.5%)에서 최소한 하나의 microsatellite marker에서 유전자의 이상이 발견되었는데 이중 후두암이 4예로 가장 많았으며 하인두암과 구인두암이 각 1예씩이었다.

EXT1 유전자, p16 유전자, PTEN 유전자, 그리고 DPC4 유전자의 이상과 임상양상과의 연관성은 찾을 수 없었으나 대상 환자의 수가 너무 작으므로 대상을 늘린 후 추가적인 분석이 필요할 것으로 사료된다.

FHIT 유전자는 3번 염색체의 단완 3p14.2에 존재하는 종양억제유전자로서 hereditary renal cell carcinoma t(3;8) translocation breakpoint와 aphidicolin-inducible FRA3B fragile site를 포함하며 또한 diadenosine triphosphate hydrolase와 같은 작용을 하는 단백질 생산의 암호를 발생시키며 다양한 암에서 그 이상이 발견되고 있지만 아직 그 기전은 명확히 밝혀져 있지 않다²⁰⁾. FHIT 유전자는 두경부 영역에서도 비교적 많이 연구가 되어지고 있는 종양억제유전자이지만 주로 구강암에 대한 연구로 국한되어 있다. FHIT의 이상이 구강암 조직의 50% 이상에서 나타나므로 FHIT의 이상이 구강상피의 발암과정에 개입되어 있는 것은 분명하지만 기능이나 종양억제유전자로서 구강암의 발암단계 중

어는 부분에 작용하는지는 아직 알려져 있지 않다²⁰⁾. 본 실험에서는 FHIT 유전자의 이상을 발견할 수 없었다. 그렇지만 하나의 microsatellite marker에 대한 연구이므로 다른 microsatellite marker들을 더 많이 이용하여 실험을 진행한 후 결론을 내려야만 할 것으로 사료된다.

다른 종양억제유전자와의 연관성에 대한 결과를 보았을 때 APC 유전자와 EXT1 유전자의 이상이 3예에서 동시에 나타나(Fig. 2). 서로 상관관계가 있을 확률이 높으며 EXT1 유전자와 DPC4 유전자도 이상이 3예에서 동시에 나타나므로 서로 상관관계가 있을 확률이 높다. 또한 DPC4와 p16도 서로 상관관계가 있을 수 있을 것으로 예상된다. 후두암 1예와 하인두암 1예 등 모두 2예에서는 APC 유전자와 EXT1 유전자 그리고 DPC4 유전자가 모두 이상이 있는 경우였다. 따라서 APC 유전자와 EXT1 유전자 그리고 DPC4 유전자가 상호 관련성을 가질 수 있을 것으로 사료된다. 그 외에 구인두암 1예에서는 APC 유전자와 p16 유전자 그리고 DPC4 유전자가 동시에 이상이 있는 경우였다. 또한 FHIT를 제외한 5가지의 종양억제유전자 중 한 유전자의 이상이 있을 경우 많은 예에서 다른 유전자의 이상을 동반하는 것으로 보아 두경부 편평상피세포암의 발생에는 하나의 유전자만이 관련이 되는 것이 아니라 여러 가지의 유전자가 동시에 변이를 일으켜 암이 발생하는 것으로 생각된다. 또한 유전자의 중복이상과 임상양상과의 연관성은 찾을 수 없었지만 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

저자들이 분석한 6가지의 종양억제유전자 중 APC 유전자, p16 유전자 그리고 DPC4 유전자 등의 이상이 두경부 편평상피세포암에서 높은 빈도로 관찰되었다. 아울러 APC 유전자와 EXT1 유전자의 이상은 전이 및 재발과 연관이 있는 것으로 나타났고 또한 서로 동반되어 나타나 이들 종양억제유전자의 이상 분석은 두경부 편평상피세포암의 발암기전 연구뿐만 아니라 예후추정에도 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

두경부 편평상피세포암은 두경부암 중 가장 흔한 것으로 그 발암과정에 종양유전자나 종양억제유전자의 유전적 이상이 관여한다고 알려져 있으나 그 역할이나 기전이 명확하지는 않다. 본 연구에서는 이미 알려진 종양억제유전자들을 대상으로 두경부 편평상피세포암에서 이형접합성 상실(LOH), 중복, 및 microsatellite instability를 포함하는 유전자의 이상을 분석하여 종양억제유전자의 이상과 임상양상과의 연관성을 규명하고자 하였다.

종양억제유전자들 중 APC 유전자(45.4%), EXT1 유전자(36.4%), DPC4 유전자(54.5%) 및 p16 유전자(50.0%)에서는 이형접합성의 상실을 포함하는 유전자 이상이 비교적 높

은 빈도로 관찰되었으나 PTEN 유전자는 낮은 빈도(22.2%)로 관찰되었고 FHIT 유전자에서는 이상을 발견할 수 없었다. 이 중 APC 유전자의 이상은 임상양상 중 경부림프절 전이 및 재발과 연관성이 높아 예후와 관련이 있는 것으로 나타났다. 그러나, 다른 유전자의 이상과 임상양상과의 연관성은 찾을 수 없었다.

또한 다른 종양억제유전자와의 연관성에 대한 결과를 보았을 때 APC 유전자와 EXT1 유전자 그리고 EXT1 유전자와 DPC4 유전자가 서로 상관관계가 있을 확률이 높다. 또한 FHIT와 PTEN을 제외한 4가지의 종양억제유전자 중 한 유전자의 이상이 있을 경우 많은 경우에서 다른 유전자의 이상을 동반하였지만 이러한 유전자의 중복이상과 임상양상과의 연관성은 찾을 수 없었다.

이상의 결과로 볼 때 APC, EXT1, p16, 및 DPC4 유전자는 두경부 편평상피세포암의 발생에 종양억제유전자로서의 역할을 할 것으로 사료되며, 특히 APC 유전자는 경부 림프절 전이 및 예후와 연관성이 높을 것으로 사료된다. 또한 두경부 편평상피세포암의 발생에는 하나의 유전자만이 관련이 되는 것이 아니라 여러 가지의 유전자가 동시에 변이를 일으켜 암이 발생하는 것으로 생각된다.

중심 단어 : 두경부 종양 · 편평상피세포암 · 종양억제유전자.

References

- 1) Field JK: *The role of oncogenes and tumour-suppressor genes in the aetiology of oral, head and neck squamous cell carcinoma.* *J R Soc Med.* 1995;88:35-39
- 2) Jones AS: *Tumour suppressor genes and head and neck cancer.* *Adv Otorhinolaryngol.* 2000;56:249-260
- 3) Bodmer WF, Cottrell S, Frischanf AM et al: *Genetic analysis of colorectal cancer: Princess Takamatsu Symp.* 1989;20:49-59
- 4) Klein G, Klein E: *Evolution of tumours and the impact of molecular oncology.* *Nature.* 1985;315:190-195
- 5) Nowell PC: *The clonal evolution of tumor cell populations.* *Science.* 1976;194:23-28
- 6) Dong SM, Kim HS, Rha SH, Sidransky D: *Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix.* *Clin Cancer Res.* 2001;7:1982-1986
- 7) Wu H, Wang G, Dong Y: *APC gene expression in precancerous lesions of stomach examined by light and electron microscopic in situ hybridization.* *Zhonghua Zhong Lin Za Zhi.* 2000;22:308-310
- 8) Uzawa K, Yoshida H, Suzuki H et al: *Abnormalities of the adenomatous polyposis coli genes in human oral squamous cell carcinoma.* *Int J Cancer.* 1994;58:814-817
- 9) Huang JS, Chiang CP, Kok SH, Kuo YS, Kuo MY: *Loss of heterozygosity of APC and MCC genes in oral squamous cell carcinomas in Taiwan.* *J Oral Pathol Med.* 1997;26:322-326

- 10) Hecht JT, Hogue D, Strong LC, Hansen MF, Blanton SH, Wagner M: *Hereditary multiple exostosis and chondrosarcoma: linkage to chromosome 11 and loss of heterozygosity for EXT-linked markers on chromosomes 11 and 8. Am J Hum Genet.* 1995;56:1125-1131
- 11) Piao Z, Kim H, Jeon BK, Lee WJ, Park C: *Relationship between loss of heterozygosity of tumor suppressor genes and histologic differentiation in hepatocellular carcinoma. Cancer.* 1997;80:865-872
- 12) Arai T, Akiyama Y, Nagasaki H et al: *EXTL3/EXTR1 alterations in colorectal cancer cell lines. Int J Oncol.* 1999;15:915-919
- 13) Kim SH, Park SA, Oh YS: *Expression of p16 protein and cyclin D1 protein in head and neck squamous cell carcinomas. Korean J Otolaryngol.* 1998;41:901-905
- 14) Do NY, Park SY, Yun HS, et al: *Immunohistochemical expression of p16 and p21 proteins in laryngeal squamous cell carcinoma. Korean J Otolaryngol.* 2004;47:56-62
- 15) Li J, Yen C, Liaw D et al: *PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. Science.* 1997;275:1943-1947
- 16) Henderson YC, Wang E, Clayman GL: *Genotypic analysis of tumor suppressor genes PTEN/MMAC1 and p53 in head and neck squamous cell carcinomas. Laryngoscope.* 1998;108:1553-1556
- 17) Poetsch M, Lorenz G, Kleist B: *Detection of new PTEN/MMAC1 mutations in head and neck squamous cell carcinoma with loss of chromosome 10. Cancer Genet Cytogenet.* 2002;132:20-34
- 18) Gasparotto D, Vukosavljevic T, Piccinin S et al: *Loss of heterozygosity at 10q in tumors of the upper respiratory tract is associated with poor prognosis. Int J Cancer (Pred. Oncol.).* 1999;84:432-436
- 19) Schutte M: *DPC4/SMA4 gene alterations in human cancer, and their functional implications. Ann Oncol 10 Suppl 4:1999:S56-S59*
- 20) Pateromichelakis S, Lee G, Langdon JD, Partridge M: *The FHIT gene in oral squamous cell carcinoma: allelic imbalance is frequent but cDNA aberrations are uncommon. Oral Oncol.* 2000;36:180-188