

한국인 폐암 환자에서 RRM1 유전자 Promoter의 다형성

전남대학교 의과대학 내과학교실, HLee Moffitt Cancer Center, USA

고경행, 김은정, 오인재, 김수옥, 손준광, 정종필, 조계중, 주진영, 김규식, 김유일, 임성철, 김영철, Gerold Bepler

Promoter Polymorphism of RRM1 Gene in Korean Lung Cancer Population

Kyung Haeng Ko, M.D., Eun Jung Kim, B.A., In Jae Oh, M.D. Soo Ock Kim, M.D., Jun Gwang Son, M.D., Jong Pil Jung, M.D., Gye Jung Cho, M.D., Jin Young Ju, M.D., Kyu Sik Kim, M.D., Yu Il Kim, M.D., Sung Chul Lim, M.D., Young Chul Kim, M.D., Gerold Bepler, M.D.

Department of Internal Medicine, Chonnam National University Medical School, Gwangju, South Korea, HLee Moffitt Cancer Center, USA

Background: LOH11A is a region with frequent allele loss (>75%) in lung cancer that is located on the centromeric part of chromosome 11p15.5. Clinical and cell biological studies suggest that this region contains a gene associated with metastatic tumor spread. RRM1 encoding the M1 subunit of ribonucleotide reductase, which is an enzyme that catalyses the rate-limiting step in deoxyribonucleotide synthesis, is located in the LOH11A region.

Methods: Polymorphisms were found at nucleotide position (-)37 (C/A) and (-)524 (C/T) from the beginning of exon 1 of the RRM1 gene that might regulate the expression of RRM1. We studied the polymorphisms in 127 Korean individuals (66 lung cancer and 61 normal controls) and compared with those of 140 American patients with lung cancer.

Results: CC, AC and AA were found at the (-)37 position in 64(50.4%), 55(43.3%), and 8(6.3%) out of 127 Korean individuals (66 cancer, 61 non-cancer patients), respectively. There was a similar frequency of allele A at (-)37 in the American(27.9%) and Korean population(28.0%). CC, CT and TT was found at the (-)524 position in 24(18.9%), 44(34.6%), and 59(46.5%) out of the 127 Korean individuals, respectively. There was a similar frequency of allele C at (-)524 in the American(34.6%) and Korean population(36.2%).

There was no difference in the frequency of the (-)37 and (-)524 genotypes between the cancer and non-cancer group. However there was a significant correlation of the genotypes between (-)37 and (-)524 ($p < 0.001$), which suggests the possible coordination of these polymorphisms in the regulation of the promoter activity of the RRM1 gene.

Conclusion: RRM1 promoter polymorphisms were not found to be significant risk factors for lung cancer. However, a further study of the promoter activity and expression of the RRM1 gene according to the pattern of the polymorphism will be needed. (*Tuberc Respir Dis* 2006; 61: 248-255)

Keywords: RRM1 gene, Promoter polymorphism, Lung cancer, Korean

서 론

염색체 11p15.5에 위치한 LOH11A 부위는 75%의 폐암에서 loss of heterozygosity (LOH)를 보이므로 Bepler 등은 중첩된 650 kb 크기의 P1/PAC/BAC clone들을 이용하여 LOH11A 부위에 있는 몇 개의 유

전자들을 찾아내었고 그 중에 하나가 ribonucleotide reductase M1 subunit (RRM1) 유전자이다. 이 ribonucleotide reductase는 M1과 M2 subunit가 heterodimer를 이루어 핵산 합성에 필수적인 deoxy-ribonucleotide 합성을 수행한다². 또한 ras transformed fibroblast를 이용한 실험에서 RRM1 유전자를 발현시킨 암세포는 전이 능력이 감소되는 것으로 보고되어 있어서 암억제 유전자로서의 가능성이 높다^{3,4}.

Pitterle 등⁵은 폐암 조직에서 RRM1 유전자에 돌연변이가 발견되는지를 알아보기 위해 12쌍의 암/정상 조직 DNA 쌍을 이용하여 RRM1 유전자의 19개 exon들에 대하여 SSCP 분석을 시행한 결과 exon들에 돌연변이는 발견되지 않았다. 그러나 RRM1의 promoter 부위인 첫 번째 exon 시작에서 (-)37과 (-)524

이 연구는 전남대학교 병원 임상연구소 학술연구비 (CUHRI-U-200209)에 의하여 이루어 졌음.

Address for correspondence: **Young-Chul Kim, M.D.**
Lung and Esophageal Cancer Clinic, Chonnam National University Medical School and Hwasun Hospital, 160 Ilim-ri, Hwasungun, Jeonnam, South Korea. 519-809
Phone: 061-379-7614, (FAX) 061-379-7628

E-mail: kyc0923@jnu.ac.kr

Received : Jul. 24. 2006

Accepted : Aug. 31. 2006

번째 염기에 A 또는 C 그리고 T 또는 C 유전자 다형성이 발견되었다⁶. 이 다형성은 RRM1 유전자의 promoter에 위치해 있기 때문에 이 유전자의 발현 정도를 조절할 수 있다.

RRM1이 암억제 유전자로 추정되는 위 증거들을 함께 고려할 때에 암억제 유전자의 발현을 조절할 수 있는 promoter의 다형성 양상에 따라 폐암의 위험도가 다를 수 있을 것이며 인종에 따른 차이와 동양인에서의 분포 및 임상적 의의는 아직 밝혀져야 할 부분이다.

따라서 본 연구에서 저자들은 전남 대학교 병원에 내원한 폐암 환자들과 비폐암 대조군 환자들로부터 얻어진 말초 혈액 백혈구의 DNA를 이용하여 유전자 다형성 분석을 통하여 광주, 전남 지역 한국인에서의 RRM1 유전자의 promoter 다형성의 양상 및 질환별 분포를 관찰하고 이를 미국인에서의 성적과 비교하고자 하였다.

연구 대상 및 방법

연구 대상: 전남 대학교 병원에서 진료 받은 환자들로부터 추출된 127예 중 폐암군은 66예, 비폐암 대조군은 61예로 폐암군의 연령은 62.2±7.8세, 비폐암군 56.2±8.8세로 폐암군이 비폐암군에 비하여 유의한 차이로 연령이 높았다. 또한 성별 분포에 있어서도 폐암군 남/여 : 55/11에 비하여 비폐암군 남/여 : 36/25로

폐암군에서 남성의 비율이 유의하게 높았으며($X^2=9.2, p<0.01$), 편평상피세포암이 37예, 선암 9예, 조직형이 결정되지 않았던 비소세포암 10예 그리고 소세포암 10예이었다. 또한 Dr. Bepler의 연구소 (Duke 대학, North Carolina)에 소장된 폐암 환자 자료 중 140예의 DNA를 함께 비교하였다. 이들은 남/여 : 94/46예, 연령은 62.0±10.7세이었고, 선암이 61예, 편평상피세포암이 45예, 소세포암이 15예, 기타 다른 장기의 종양 19예 이었다 (Table 1).

DNA 추출: 말초 혈액 4 cc를 7.5% EDTA가 포함된 vacutainer(Becton Dickinson, Plymouth, UK)에 채취하여 15 mL Falcon tube에 옮겨 담고 RBC lysis buffer를 넣고 37°C 수조에서 20-25분간 흔들어 주었다. 이후 상온, 1,500 rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 버린 다음 RBC lysis buffer를 적당히 넣고 흔들어 다시 37°C 수조에서 20-25분간 흔들어 주었다. 이후에는 1,500 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 TEN buffer 1 mL를 가하여 잘 섞은 후 1,500 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 다시 버리고 TEN buffer 375 µL + 10% SDS 25µL + pro-K 10mg/mL 10 µL를 넣고 37°C 수조에 넣어 12시간 이상 보관시켰다.

검체를 꺼내어 5 분간 1,500 rpm에서 원심분리 시킨 후 Eppendorf tube에 반응물을 옮기고 5 M NaCl 160 µL를 가하여 1 mL tip으로 잘 섞고 13,000 rpm으로 15분간 원심분리 시켰다. 다음으로 상층액 만들 취

Table 1. Characteristics of study subjects

	Korean (N=127)		American (N=140)
	Cancer (N=66)	Non-Cancer (N=61)	Cancer (N=140)
Age	62.2 ± 7.8	56.2 ± 8.8 ***	62.0 ± 10.7
Sex (Male/Female)	55/11	36/25 **	84/46
Diseases\$	SQC : 37	Tuberculosis : 57	SQC : 45
	ADC : 9	Normal : 4	ADC : 61
	NSCLC : 10		SCLC : 15
	SCLC : 10		Others : 19

Between cancer and control groups : ** : p < 0.01, *** : p < 0.01

\$ SQC : squamous cell carcinoma, ADC : adenocarcinoma,

NSCLC : non-small cell lung carcinoma,

SCLC : small cell lung carcinoma

Others : breast, colon, uterine cervix, chondrosarcoma, etc.

하여 다른 Eppendorf tube에 옮기고 2배 부피의 100% alcohol 880 μ L를 넣고 잘 흔들어 DNA 침전물을 눈으로 확인하면서 1 mL tip으로 DNA 침전물을 얻었다. 얻어진 침전물을 다른 Eppendorf tube에 넣고 70% ethanol 400 μ L를 가한 후 잘 섞고 5분간 13,000 rpm에서 원심분리 시켰다. 상층액을 버리고 물기를 털어 낸 다음 37°C 에서 5분간 건조시킨 후 TE buffer 300 μ L를 첨가하여 37°C에서 5~10시간 용해시킨 후에 spectrophotometer로 DNA 농도를 측정하고 PCR 용으로 5 μ g/mL 농도를 만들어 두었다가 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 시행하였다.

Allelotyping: Genebank accession number AF107045의 1038 위치가 RRM1 (-)37 다형성(C 또는 A)을 보이는 위치이다. 이 유전자 다형성은 제한 효소 BbsI으로 구분될 수 있는데, 이 효소는 GAAGACNN(NNNN) 염기 배열을 읽어서 절단한다. PCR을 위한 primer는 KRRMIP-F (GGTCT TGCCC AGACT CAACA) 와 KRRMIPB-R (CTGCT CAGGG GAAAG AACTG) 를 이용하여 217 bp (AF107045의 985-1201) 크기의 종산물을 얻었다.

적절 횟수의 PCR 증폭(94°C-30초, 64~55°C touch-down -30초, 72°C-60초) 후에 10 단위의 BbsI을 15 μ L의 PCR 종산물에 추가하여 37°C에 2시간 이상 방치하였다. (-)37 위치에 C를 가지고 있는 검체는 217 bp가 절단되지 않고 그대로 남게 되고, A를 가지고

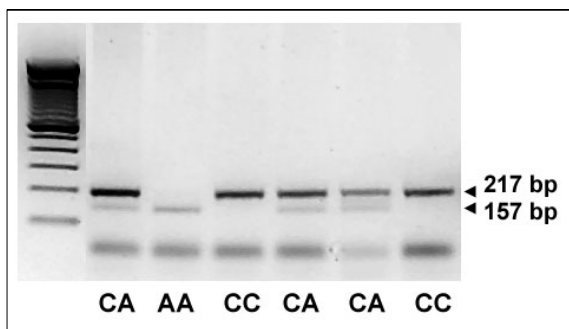


Figure 1. Allelotyping of RRM1 (-)37 C/A polymorphism. Restriction enzyme BbsI cuts when (-)37 base is A. Homozygous A allelotype (lane 3 from left) shows complete digestion into 157 bp bands. Homozygous C allelotype (lane 4 and 7) have original 217 bp bands only without digestion.

있다면 156 + 61 bp의 절단된 종산물이 보임을 2% agarose gel에 전기 영동하여 확인하였다(Figure 1).

Genebank accession number AF107045의 551 위치가 RRM1 (-)524 다형성 (T 또는 C)을 보이는 위치이다. 이 유전자 다형성은 제한 효소 ApoI으로 구분될 수 있는데, 이 효소는 (A or G) + AATTY + (C or T) 염기 배열을 읽어서 절단한다. 중합 효소 연쇄 반응을 위한 primer는 KRRMID-F (ATACC CTGTC TCTGC CACCA)와 KRRMIPB-R (CTTTT AGATC GGCCA GAGGA) 를 이용하여 176 bp (AF107045의 478-653) 크기의 종산물을 얻었다.

적절한 횟수의 PCR cycling (94°C-30초, 57°C-30초, 72°C-60초) 후에 10 단위의 ApoI 을 15 μ L 의 PCR 종산물에 추가하여 37°C에 2시간 이상 방치하였다. (-)524 위치에 T 를 가지고 있는 검체는 176 bp 가 74(70) bp + 106(102) bp 로 절단되고 C 를 가지고 있다면 절단되지 않음을 2% agarose gel에 전기 영동하여 확인하였다(Figure 2).

Sequencing: Agarose gel에서 제한 효소 절단 양상을 관찰하는 것만으로 allelotype을 신뢰할 수 없는 경우들에 대하여는 염기 서열 분석을 더불어 시행하였다. 또한 40 주기 증폭시킨 PCR 종산물을 2% agarose gel에 전기 영동시킨 후 정확한 크기의 band를 포함하는 gel부분을 예리한 칼로 절단하여 Agarose Power kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 DNA를 다시 추출 정제하였다. 정제된 PCR 종산물 2-4 mL에

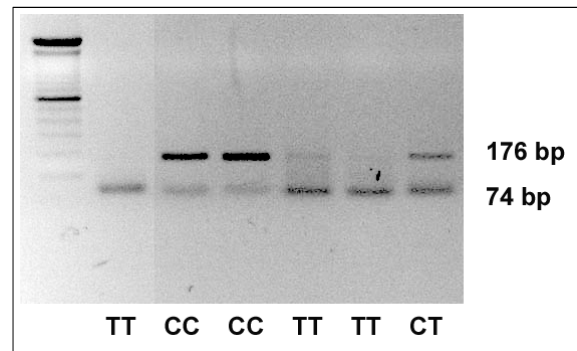


Figure 2. Allelotyping of RRM1 (-)524 C/A polymorphism. Restriction enzyme ApoI cuts when (-)524 base is T. Homozygous T allelotype (lane 2, 5 and 6 from left) shows complete digestion into 74 bp bands. Homozygous C allelotype (lane 3 and 4) have original 176 bp bands only without digestion.

Table 2. Allele Frequency of RRM1 Gene (-)37 Polymorphism in Korean and American Population ($\chi^2 = 1.21$, $p = 0.55$)

	Korean (n=127)		American (n=138)	
	Observed	Expected	Observed	Expected
CC	64 (50.4%)	65.9	74 (53.6%)	71.7
AC	55 (43.3%)	51.2	51 (37.0%)	55.5
AA	8 (6.3%)	9.9	13 (9.4%)	10.7
Allele frequency for A	71 (28.0%)		77 (27.9%)	
Hardy-Weinberg Equilibrium	$\chi^2 = 0.37$, $p = 0.83$		$\chi^2 = 0.45$, $p = 0.8$	

* Haplotype distribution between Korean and American population

Table 3. Allele Frequency of RRM1 Gene (-)524 Polymorphism in Korean and American Population ($\chi^2 = 2.26$, $p = 0.32$)*

	Korean (n=127)		American (n=140)	
	Observed	Expected	Observed	Expected
CC	24 (18.9%)	16.7	18 (12.9%)	16.8
CT	44 (34.6%)	58.7	61 (43.6%)	63.4
TT	59 (46.5%)	51.7	61 (43.6%)	59.8
Allele frequency for C	92 (36.2%)		97 (34.6%)	
Hardy-Weinberg Equilibrium	$\chi^2 = 3.9$, $p = 0.14$		$\chi^2 = 0.1$, $p = 0.95$	

* Haplotype distribution between Korean and American population

forward primer를 1.6 pM 첨가하고 여기에 BigDye terminator를 8 mL 첨가하여 (95°C 10 sec, 50°C 5 sec, 60°C 4 min)으로 25 주기 증폭하여 ethanol 침전 후 ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems, CA)를 이용하여 자동화된 염기 서열 분석을 시행하였다.

통계적 분석: 본원에서 검사한 127명의 자료와 미국인에서 얻은 140명의 자료와 비교하였고 T 검정과 chi square 검정을 이용하여 통계적 의의를 검토하였고 두 가지 유전자 다형성의 상관관계는 chi square와 Pearson의 상관계수로써 표현하였다. 유전자의 다형성은 각각의 위치에서 allele들의 빈도가 Hardy-Weinberg equilibrium⁷을 따르는지 chi square 검증을 하였다.

결 과

RRM1 유전자의 Exon 1 으로부터 (-)37 번째 염기에서 A 또는 C를 보이는 유전자 다형성을 조사한 결과 127예 중 CC 가 64예(50.4%)에서 발견되었고, AC

는 55예(43.3%), 그리고 AA는 8예(6.3%)에서 발견되었다. 각 염기의 빈도에 따라 추정된 haplotype의 예측 빈도와 관찰 빈도는 Hardy-Weinberg equilibrium을 따르고 있어서 신뢰할 수 있는 성적으로 사료되었다(Table 2).

Allele A의 빈도는 미국인들의 27.9%에 비하여 한국인에서 28.0%로 두 집단 간에 차이는 없었다(Table 2). 폐암군과 비폐암군 간에 allele의 빈도를 비교하였는데 Table 4 에서와 같이 양 군간에 유의한 차이는 관찰되지 않았다 ($\chi^2 = 2.34$, $p = 0.31$).

RRM1 유전자의 (-)524 번째 염기에서 C 또는 T 유전자 다형성의 양상은 CC 가 24 (18.9%), CT 는 44 (34.6%), 그리고 TT는 59 (46.5%)에서 발견되었다. 각 염기의 빈도에 따라 추정된 haplotype의 예측 빈도와 관찰 빈도는 Hardy-Weinberg equilibrium을 따르고 있어서 신뢰할 수 있는 성적으로 사료되었다(Table 3).

Allele C의 빈도 역시 36.2%로써 미국인의 34.6%와 차이가 없었으며 (Table 3), 폐암군과 비폐암군 간에 allele 의 분포도 서로 차이를 보이지 않았다($\chi^2 =$

Table 4. Allele frequency of RRM1 gene Polymorphisms among Korean lung cancer and non-cancer population

(-)37	Cancer (n=66)	Non-Cancer (n=61)	
CC	29	35	$\chi^2 = 2.34, p = 0.31$
AC	32	23	
AA	5	3	
(-)524			
CC	13	11	$\chi^2 = 0.94, p = 0.62$
CT	25	19	
TT	28	31	

Table 5. Distribution of RRM1 (-)37 and (-)524 genotype in Korean and American Population

(-)524 (-)37	CC	TC	TT	
Korean				
CC	3	8	53	$\chi^2 = 88.4, \text{ Pearson's } R = -0.71, p < 0.001$
AC	14	35	6	
AA	7	1		
American				
CC	1	14	59	$\chi^2 = 129.6, \text{ Pearson's } R = -0.80, p < 0.001$
AC	8	44		
AA	9	2		

0.94, p = 0.62, Table 4).

RRM1 유전자의 Exon 1으로부터 (-)37번째 염기는 인종에 관계없이 70% 이상에서 C 이었고, (-)524 염기는 역시 65% 정도에서 T를 보이고 있었다. 한편 (-)37과 (-)524 염기는 서로 밀접한 상관관계를 보이고 있었다. 즉 (-)37염기가 모두 C 인 경우 (-)524 염기도 모두 T인 빈도가 높았고, (-)37 염기가 한 개라도 A를 가지고 있는 경우 (-)524도 C를 가지고 있는 빈도가 높았다 (Table 5, p<0.001).

그러나 (-)37과 (-)524 다형성의 조합 양상을 Table 6과 같이 4 군으로 나누어서 각 군에서의 폐암 환자의 빈도를 비교하였을 때 각 군에서 빈도는 유의한 차이를 보이지 않았다($\chi^2 = 2.46, p > 0.05$, Table 6).

Table 6. Proportion of cancer according to combinations of genotypes in Korean Population

(-)37 \ (-)524	CC or TC Cancer / Total	TT Cancer / Total
CC	5 / 11 (45.5%)	24 / 53 (45.3%)
AC AA	33 / 57 (57.9%)	4 / 6 (66.7%)
	$\chi^2 = 2.46$	$p > 0.05$

고 안

RRM1 유전자는 deoxyribonucleotide(dNTP) 형성 과정에 rate limiting step을 촉매하는 효소인 Ribonucleotide Reductase의 M1 subunit를 coding하는 유전자로써 인체에서 유전자 합성 과정에서 필수적인 house keeping gene이다. 이 효소의 활성 형은 두 개의 작은 부분 효소와 또 다른 두 개의 큰 부분 효소가 heterodimer를 이루어 하나의 효소를 형성한다^{8,9}.

이 큰 부분 효소를 전사하는 유전자(RRM1)는 11번 염색체의 단완 15.5 (11p15.5)에 위치해 있는데⁵ 이 부분은 폐암에서 loss of heterozygosity (LOH) 가 높은 빈도로 발견되는 부위이다¹⁰. 이 부위를 LOH11A라고 부르며 SSA/Ro52 유전자와 polymorphic marker D11S860 사이에 위치한다^{1,11}.

RRM1 유전자가 포함된 LOH11A 부위를 암세포에 넣어주었을 때(genetic complementation) 종양 형성 능력이 감소됨이 증명되었고³, 또한 ras-transformed fibroblast에 RRM1을 발현시켰을 때에도 종양 형성 능력 뿐만 아니라 전이 형성 능력도 감소됨이 보고되었다⁴.

임상적 근거로는 RRM1에 아주 가까운 위치(50 kb centromeric)에 있는 polymorphic marker인 D11S12의 LOH가 제 4 병기의 폐암 환자들에서 더 높은 빈도로 발견되었다¹². 그러나 D11S12에 LOH가 있거나 없었던 12쌍의 폐암/정상 조직 쌍을 이용하여 19개의 RRM1 유전자에 대한 돌연변이를 검색 결과 어떠한 돌연변이도 발견되지 않았고⁵ D11S12의 homozygous deletion 또한 폐암 세포주들에서 발견되지 않았다¹³. 따라서 RRM1 유전자는 위의 증거들으로써 암억제 유

전자로 생각되지만 일반적인 다른 암억제 유전자와 같은 기전으로 발암 과정에 관여하지는 않는 것으로 생각된다.

연구자들은 LOH 또는 allele loss가 흔히 발견되는 유전자 부위에서 보통 암억제 유전자를 찾는다. 그 이유는 암억제 효과를 잃어서 암의 발생에 관여되기 위해서는 최소한 한 쪽 염색체의 암억제 유전자는 결손되어 있을 가능성이 높기 때문이다. 이렇게 한 쪽 유전자를 염색체 결손(LOH)으로 소실한 상태에서 나머지 다른 한 쪽 유전자에 돌연변이가 발생되면 두 개의 유전자를 모두 소실하게 되므로 암억제 효과를 잃게 되는 것이다. 이렇게 두 개의 유전자들이 모두 손상을 받아서 암억제 유전자의 기능을 소실하게 된다는 의미에서 Knudson의 two-hit 가설¹⁴이 널리 인정 받고 있다.

본 연구의 대상인 RRM1 유전자는 주변에서 LOH가 흔히 발견되었지만 나머지 유전자의 돌연변이나 DNA methylation은 발견되지 않아서 전형적인 two-hit 가설을 따르는 암억제 유전자는 아님을 알 수 있었다. 그러나 RRM1 유전자는 세포에 필수적인 기능을 갖는 house-keeping gene이므로 두 개의 유전자를 모두 소실하고서는 세포가 사멸하게 될 것이기 때문에, two-hit 가설을 따르리라고는 기대되지 않는다. 그렇다면 어떻게 RRM1 유전자의 LOH가 암의 발생에 관여될 수 있는 것일까? P53 암억제 유전자의 경우에는 종양세포에서 전형적인 two-hit 가설을 따라서 LOH와 나머지 유전자의 돌연변이를 보이는 경우가 많다.

그러나 Venkatachalam 등¹⁵은 P53 유전자를 두 개 모두 잃지 않고서도 즉 한 쪽의 유전자만 소실한 상태에서도 암의 발생에 관여함을 실험적으로 증명하였다. 그들은 두 쌍의 염색체에 존재하는 P53 중에 한 개만 knock out 시킨 쥐들에서도 정상적인 두 쌍의 P53 유전자를 가지고 있는 쥐들에 비하여 더 빠른 속도로 암이 발생하는 것을 발견하였다. 즉 암억제 유전자가 발암 과정에 관여되기 위하여 반드시 두 개가 모두 소실될 필요는 없다는 점이다. 두 개의 유전자 중에서 한 개만 소실되어도 암 억제 효과가 불충분할 수 있으므로 암이 더 쉽게 발생할 수 있는 것이다.

따라서 11p15.5에서 빈발하는 LOH로 인하여 RRM1의 유전자의 양이 감소됨으로써 발암 과정에 관여될 수 있다는 가설이 가능하다. 또 다른 방법으로는 RRM1의 promoter에 다형성이 있어서 특정 위치의 염기나 염기들의 조합 양상에 따라 promoter의 활성도가 달라지고 그로 인해 RRM1 유전자의 발현이 감소되면서 발암 과정에 관여될 수도 있다. 이러한 가능성을 확인하고자 본 연구에서는 RRM1 promoter 부위의 2개의 유전자 다형성 양상의 빈도와 분포를 관찰하고 폐암 발생의 위험 인자로서의 의의를 검토하였다.

본 연구의 결과 두 위치의 유전자 다형성의 빈도는 미국인들과 비교하여 차이가 없어서 인종간에 차이는 없었고 특정 염기들의 조합 양상도 비슷한 성적을 보였다. 또한 두 위치의 유전자 다형성의 양상은 폐암군과 대조군 간에 서로 차이가 발견되지 않아서 다형성 양상에 따른 폐암 발생의 위험도의 차이는 관찰되지 않았다. 단지 폐암군과 대조군의 연령과 성비가 달랐기 때문에 대조군의 연령이 폐암 군과 같이 높은 집단으로 또는 남성만을 비교하였다면 통계적인 차이를 보였을 가능성도 배제할 수는 없다. 따라서 연령이나 특성들이 서로 같은 대조군을 선택한 후에 각각의 유전자 다형성 여부에 따른 폐암 발생 위험도의 차이를 증명할 수 있는 집단의 크기를 미리 계산하여 연구를 계획하였다면 좀더 신뢰할 수 있는 자료를 제시할 수 있었을 것이다.

또한 본 연구에서는 RRM1 유전자의 발현을 조절하는 promoter 부위의 (-37A/C와 (-524C/T) 두 개의 유전자 다형성이 서로 특정 조합을 보임을 발견하였다. 그러나 (-37과 (-524) 다형성의 조합 양상에 따른 폐암 환자의 빈도가 서로 차이를 보이지 않아서 다형성의 조합 양상이 폐암의 위험 인자일 가능성은 높지 않다. 그러나 이러한 조합들이 암억제 유전자의 발현을 조절하는 인자로서 작용할 가능성은 고려할 수 있다.

결론적으로 두 위치의 유전자 다형성은 폐암의 발생의 위험인자는 아니었으나, 향후 특정 조합의 다형성에 따라서 promoter 활성이 달라지는지를 그리고 RRM1 발현의 차이가 있는지를 추구하고야 할 것이다.

요 약

연구배경: 약 75%의 비소세포 폐암에서 loss of heterozygosity (LOH)를 보이는 11p15.5에 위치한 ribonucleotide reductase M1 subunit gene(RRM1) 유전자는 ras transformed fibroblast를 이용한 실험에서 암세포의 전이능력을 감소시키는 것으로 보고되어 있어서 암억제 유전자로서의 가능성이 높다. RRM1의 promoter 부위인 exon 1 시작에서 (-)37과 (-)524번째 염기에 A/C 그리고 C/T 다형성이 발견되었는데 이 다형성의 양상에 따라 RRM1 유전자의 발현 정도가 조절될 수 있어서 폐암 발생의 위험도가 다를 수 있다.

대상 및 방법: 전남대학교 병원에 내원한 폐암환자들과 비폐암 대조군 환자 127명과 미국인 폐암 환자 140명의 말초혈액 백혈구로부터 얻은 DNA를 이용하여 미국인과 한국인에서의 유전자 다형성의 분포 및 임상적 의의를 조사하였다.

결 과: RRM1 유전자의 Exon 1 으로부터 (-)37 염기에서 A/C 유전자 다형성은 127명 중 CC가 64명(50.4%), AC는 55명(43.3%), 그리고 AA는 8명(6.3%)에서 발견되었다. Allele A의 빈도는 미국인들의 27.9%에 비하여 한국인에서 28.0%로 차이가 없었고, 폐암군과 비폐암군 간에도 유의한 차이는 관찰되지 않았다. RRM1 유전자의 (-)524 염기에서 C 또는 T 유전자 다형성의 양상은 CC가 24명(18.9%), CT는 44명(34.6%), 그리고 TT는 59명(46.5%)에서 발견되었다. Allele C의 빈도는 36.2%로써 미국인의 34.6%와 차이가 없었고, 폐암군과 비폐암군 간에도 차이는 관찰되지 않았다. RRM1 유전자의 (-)37 염기는 인종에 관계없이 70% 이상에서 C 이었고, (-)524 염기는 65% 정도에서 T를 보이고 있었다. 또한 (-)37과 (-)524 염기는 서로 밀접한 상관관계를 보이고 있었다. 즉 (-)37염기가 모두 C 인 경우 (-)524 염기도 모두 T인 빈도가 높았고, (-)37 염기가 한 개라도 A를 가지고 있는 경우 (-)524 염기도 C를 가지고 있는 빈도가 높았다 ($p < 0.001$).

결 론: RRM1 유전자의 발현을 조절하는 promoter 부위의 두 개의 유전자 다형성의 빈도는 인종 간에 그

리고 폐암군과 비폐암군 간에 차이가 없어서 폐암 발생의 위험인자는 아니었다. 그러나 두 유전자 다형성이 서로 특정 조합을 보임으로 그 조합 양상에 따른 promoter 활성도에 대한 연구가 뒤따라야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. Bepler G, O'Briant KC, Kim YC, Schreiber G, Pitterle DM. A 1.4-Mb high-resolution physical map and contig of chromosome segment 11p15.5 and genes in the LOH11A metastasis suppressor region. *Genomics* 1999;55:164-75.
2. Schreiber G, Pitterle D, Kim YC, Bepler G. Molecular genetic analysis of primary lung cancer and cancer metastatic to the lung. *Anticancer Res* 1999;19:1109-15.
3. O'Briant K, Jolicoeur E, Garst J, Campa M, Schreiber G, Bepler G. Growth inhibition of a human lung adenocarcinoma cell line by genetic complementation with chromosome 11. *Anticancer Res* 1997;17:3243-51.
4. Fan H, Huang A, Villegas C, Wright JA. The R1 component of mammalian ribonucleotide reductase has malignancy-suppressing activity as demonstrated by gene transfer experiments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:13181-6.
5. Pitterle DM, Kim YC, Jolicoeur EM, Cao Y, O'Briant KC, Bepler G. Lung cancer and the human gene for ribonucleotide reductase subunit M1 (RRM1). *Mamm Genome* 1999;10:916-22.
6. Bepler G, Gautam A, McIntyre LM, Beck AF, Chervinsky DS, Kim YC, et al. Prognostic significance of molecular genetic aberrations on chromosome segment 11p15.5 in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:1353-60.
7. Ueda T, Ugawa S, Ishida Y, Shibata Y, Murakami S, Shimada S. Identification of coding single-nucleotide polymorphisms in human taste receptor genes involving bitter tasting. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285:147-51.
8. Filatov D, Ingemarson R, Johansson E, Rova U, Thelander L. Mouse ribonucleotide reductase: from genes to proteins. *Biochem Soc Trans* 1995;23:903-5.
9. Stubbe J. Ribonucleotide reductases in the twenty-first century. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:2723-4.
10. Bepler G, Garcia-Blanco MA. Three tumor-suppressor regions on chromosome 11p identified by high-resolution deletion mapping in human non-small-cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:5513-7.

11. Kim YC, Cao Y, Pitterle DM, O'Briant KC, Bepler G. SSA/RO52gene and expressed sequence tags in an 85 kb region of chromosome segment 11p15.5. *Int J Cancer* 2000;87:61-7.
 12. Bepler G, Fong KM, Johnson BE, O'Briant KC, Daly LA, Zimmerman PV, et al. Association of chromosome 11 locus D11S12 with histology, stage, and metastases in lung cancer. *Cancer Detect Prev* 1998;22:14-9.
 13. Bepler G, Koehler A. Multiple chromosomal aberrations and 11p allelotyping in lung cancer cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 1995;84:39-45.
 14. Knudson AG. Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996;122:135-40.
 15. Venkatachalam S, Shi YP, Jones SN, Vogel H, Bradley A, Pinkel D, et al. Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation. *EMBO J* 1998;17:4657-67.
-