

두경부 편평상피세포암 세포주의 염색체 이상 분석 : 비교유전체보합법과 Array 비교유전체보합법

이화여자대학교 의과대학 이비인후과학교실,¹⁾ 해부학교실,²⁾
충북대학교 의과대학 이비인후과학교실,³⁾ 서울위생병원 이비인후과⁴⁾
신유리¹⁾ · 박수연²⁾ · 이동욱³⁾ · 김한수¹⁾ · 고영민⁴⁾ · 박현주¹⁾ · 정성민¹⁾

= Abstract =

Cytogenetic Analysis in Korean Head and Neck Cancer Cell Lines : Comparative Genomic Hybridization(CGH) and Array-CGH

You Ree Shin, M.D.,¹⁾ Soo-Yeun Park, M.D.,²⁾ Dong Wook Lee, M.D.,³⁾ Han Su Kim, M.D.,¹⁾
Young Min Go, M.D.,⁴⁾ Hyun Joo Park, M.D.,¹⁾ Sung Min Choung, M.D.¹⁾

*Department of Otolaryngology,¹⁾ Anatomy,²⁾ School of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, Korea
Department of Otolaryngology,³⁾ College of Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Korea
Department of Otolaryngology,⁴⁾ Seoul Adventist Hospital, Seoul, Korea*

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is notorious for its poor outcome and increasing incidence. But, the studies of cytogenetic analysis in HNSCC are relatively rare, because of difficulties in culturing solid tumor cells and complexity in chromosomal DNA aberrations associated with the lesions.

The purpose of this study is to evaluate the location of chromosomal aberrations in Korean HNSCC cell lines (SNU-1041, 1066, and 1076) with comparative genomic hybridization (CGH) and array based CGH (array-CGH).

Chromosomal gains of 3q23-q27, 5p13-p15.3, 7p21-pter, 8q11.2-q12, 8q21.1-qter, 9q22-q34, 16q22-q24, and 20q11.2-qter, as well as chromosomal losses on 3p10-p14 were found in all 3 SNU cell lines. Losses on 3p15-p23, 4q22-q27, 4q31.3-qter, 6q14-q15, 7q31-q34, 8p12-pter, 18q21-q23, and 21q11.2-q12 were observed in 2 of 3 cell lines.

In array-CGH, many genes were altered including gains of *PIK3CA*, *MYC*, *EVII*, *MAD1L1* genes and losses of *SERPIN* genes. These aberrations of gene and chromosome coincide with other results of study, generally.

These data about the patterns of chromosomal aberrations could be a basic step for understanding more detailed genetic events in the carcinogenesis and also provide information for diagnosis and treatment in HNSCC.

KEY WORDS : Genomic hybridization · Head and neck cancer · Squamous cell carcinoma · Cytogenetic analysis.

서 론

백혈병과 같은 혈액암과는 달리 고형암에서의 세포유전학

적 기법에는 몇 가지 제한점이 있다. 즉, 종양 세포를 배양하기 어렵고 낮은 분열지수 때문에 중기세포를 얻기 어려우며 많은 염색체이상을 동반하고 있고 생체 내에서와는 달리 주세포클론이 배양되는 게 아니라 부세포 클론만이 배양되는 경우도 있다.

비교유전체 보합법(comparative genomic hybridization, CGH)은 고형암에서의 다양한 염색체 이상을 발견하고자 하는 종양세포유전학적 방법 중 매우 민감도가 높은 방법

교신저자 : 정성민, 157-710 서울 양천구 목동 911-1
이화여자대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (02) 2650-6163 · 전송 : (02) 2653-5135
E-mail : sungmin@ewha.ac.kr

이다. 기존의 세포유전학적 방법과는 달리 암세포를 배양하지 않아, 세포배양에 따른 클론의 진행과 같은 문제를 해결할 수 있으며, FISH처럼 어떤 특정한 염색체 부위에 대한 검색이 아닌 모든 유전체 상에서의 검색이 가능한 방법이다. 그러나, CGH는 전체 암 조직의 평균적인 염색체 증가와 감소만을 나타내기 때문에 자리옮김이나 역위 등의 균형적 재배열은 분석할 수 없으며, 비교적 해상력이 낮다는 단점이 있다. 이러한 한계에도 불구하고 CGH는 상대적으로 짧은 시간에 DNA만을 이용하여 염색체 수적 이상을 쉽게 밝힐 수 있어, 세포배양이 어려운 고형암에서 매우 유용하다.

Array 기반 비교 유전체보합법(array based comparative genomic hybridization, Array-CGH)은 CGH를 좀 더 발전시킨 방법으로, CGH가 증기 염색체를 이용하는 것과 달리, 이미 위치가 밝혀진 유전자 또는 염기서열을 배열한 슬라이드를 이용함으로써, 염색체 이상의 위치를 좀 더 정확히 알 수 있으며, 이와 관련된 유전자를 밝힐 수 있는 새로운 방법이다. 그러므로, 암 연구에서의 array-CGH는 암의 발생 및 진행과 관련된 유전자를 규명하는데 이용될 수 있다.

비록 세포주가 원발성 암을 완전히 대표할 수는 없다는 제한에도 불구하고 세포주에 대한 염색체 이상 분석은 고형암의 발생 과정 및 진행에 대한 연구에 많이 이용되고 있다. 최근, 우리나라 두경부 편평상피세포암 환자로부터 수립된 세포주들이 확립되어 있으나, 아직 그들에 대한 염색체 이상은 보고된 바 없다. 한국인 두경부 편평상피세포암 세포주 SNU-1041, SNU-1066, SNU-1076 등은 여러 분야에서 널리 연구되고 있는¹⁾ 유용한 세포주이면서도 그 세포유전학적 분석은 전무한 실정이다. 이에 본 연구에서는 통상적인 CGH와 array-CGH를 병행함으로써 두경부 편평상피세포암의 발생 및 진행과 관련된 염색체 및 유전자의 이상을 밝히고자 하였다.

연구재료 및 방법

1. 두경부 편평상피세포암 세포주의 배양 및 유전체 DNA 추출

두경부 편평상피세포암 세포주 SNU-1041, SNU-1066, SNU-1076은 한국 세포주은행에서 구입하여 사용하였다. SNU-1041 세포주는 중등도의 분화도를 가진 하인두(hypopharynx)의 편평상피세포암에서 유래된 세포주이며, SNU-1066, SNU-1076 두 세포주는 높은 분화도를 가진 후두(larynx)의 편평상피세포암으로부터 유래된 세포주이다. 이들 세 개의 세포주는 RPMI 1640 배지에 10% FBS 을 넣어 5% CO₂ 하에 37°C에서 배양하였다. 배양액은 2~3일에 한번씩 갈아주었으며, 세포가 플라스크에 90% 이상 부

착되어 자랐을 때 4개의 플라스크에 나누어 계대배양하였다. 세포주 SNU-1041은 34주기(passage 34), SNU-1066은 41주기(passage 41), SNU-1076은 31주기(passage 31) 시기에 유전체 DNA를 추출하였다.

세포주의 유전체 DNA는 Wizard genomic DNA purification kit(Promega, Madison, WI, U.S.A)를 이용하여 추출하였다. 세포가 플라스크에 꽉 찼을 때 0.25% trypsin-EDTA(Gibco/BRL, Rockville, MD, U.S.A)로 세포를 분리시키고, PBS(phosphate buffered saline, Gibco/BRL, Rockville, MD, U.S.A)로 trypsin의 작용을 멈추게 한 후 실온에서 1000rpm, 5분간 원심분리하여 세포를 수확하였다. PBS 1ml을 첨가하여 실온에서 8,000rpm, 20초간 원심분리하고 침전을 보존하였다. 여기에 핵 분해 용액 600 μl을 첨가하여 잘 혼합하고 RNase 3 μl를 첨가한 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 실온으로 식힌 후, 단백질을 침전 용액 300 μl 첨가하여 잘 혼합하여 실온에서 14,000rpm, 4~8분간 원심분리 후 상층액을 새 튜브로 옮겼다. 이 용액에 100% 에탄올 600 μl를 첨가하여 잘 섞고 -70°C에서 30분간 둔 후 4°C에서 15,000rpm으로 2분간 원심분리하였다. DNA 침전이 보이면 상층액을 버리고 70% 에탄올을 1ml 넣고 실온에서 2,000rpm, 2분간 원심분리하고 상층액을 버린 후 실온에서 15분간 잘 건조하였다. DNA 재용해 용액을 DNA 양과 비교하여 첨가하고 녹인 후, DNA의 농도와 순도를 측정하였다.

2. 정상 대조군의 유전체 DNA 추출

Giemsa banding으로 정상 남자 핵형(46, XY)을 가진 것으로 판명된 건강한 정상 성인 남자의 혈액으로부터 동의하에 정상 DNA를 추출하였으며, Wizard genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI, U.S.A)를 이용하였다.

3. CGH

1) Nick translation에 의한 DNA 표지

Nick translation kit(Roche, Basel, Switzerland)를 이용하여 시행하였으며, 세포주 DNA에 대하여는 biotin-16-dUTP로, 정상 DNA에 대하여는 digoxigenin-11-dUTP로 표지하였다. 20 μl의 nick translation 혼합물(1 μl DNA, 4 μl biotin (or dig)-dUTP, 1 μl DNA polymerase I, ddH₂O)을 15°C에서 90분 간 반응시키고 68°C에서 15분간 두어 반응을 정지시킨 후, 1% agarose gel에서 전기영동하여 DNA 크기를 확인하였다.

두경부 편평상피세포암 세포주 SNU-1041, SNU-1066, SNU-1076으로부터 추출한 DNA를 nick translation으로 표지한 후, 나타난 DNA의 크기는 500~3,000bp의 크기

었다. 정상 유전체 DNA를 nick translation으로 표지한 후 전기영동하여 확인한 DNA의 크기는 500~3,000bp임을 확인하였다.

2) 정상 증기 염색체 표본 작성

정상 성인 말초 혈액을 15% FBS와 PHA를 첨가한 RPMI-1640 배지에서 5% CO₂ 하에 37°C에서 3일간 배양한 후 정상 증기 세포를 수확하였다. 증기 세포를 colcemid 0.1 µg/ml로 30분간 처리하고, 튜브에 옮겨 실온에서 1,000 rpm, 5분간 원심분리하고 부유물을 버린 후 저장액(0.075 M KCl)을 넣어 37°C에 20분간 둔 후, 고정액(methanol : acetic acid=3 : 1)으로 세 번 처리하여, 정상 증기 염색체 슬라이드를 제작하였다. CGH를 위한 슬라이드로는 세포질이 없고 염색체가 구부러지거나 겹치지 않으며 잘 퍼진 것을 골라 70%, 85%, 100% 에탄올에 차례로 탈수한 후 사용할 때까지 -20°C에 보관하였다.

3) Hybridization 및 결과 분석

탐침자 혼합물(1 µg labeled control DNA, 1 µg labeled tumor DNA, 40 µg human cot-1 DNA)에 0.1배의 3M sodium acetate와 2배의 100% 에탄올을 첨가하여 에탄올 침전시켰다. 이 용액을 10 µg의 master hybridization solution(50% formamide, 10% dextran sulfate, 2×SSC, pH 7.0)에 재용해하여, 75°C에서 5분간 변성시킨 후, 37°C에서 30분간 미리결합(preannealing)시켰다. 정상 증기 염색체 슬라이드는 65°C에서 1분 동안 변성시킨 후 70%, 85%, 100% 에탄올에서 각각 2분간 차례로 탈수하였다. 슬라이드에 변성시킨 탐침자를 얹고 가장자리를 봉하여 37°C에서 2~3일간 마르지 않도록 주의하며 hybridization 하였다. 수세용액(50% formamide, 2×SSC, pH 7.0)으로 45°C에서 10분간 3회, 2×SSC 용액으로 45°C에서 3회, 실온에서 1회 수세하고, 1% BSA(bovine serum albumin), 4×SSC를 얹어 37°C에서 5~20분간 두었다. 이것을 FITC (fluorescein isothiocyanate, Oncor, Gaithersburg, MD, U.S.A)로 37°C에서 70분간 반응시킨 후 4×SSC로 45°C에서 2분간 3회 수세하였다. 다시 1% BSA, 4×SSC를 얹어 37°C에서 5~20분간 두고, biotinylated antiavidin과 anti-digoxigenin-rhodamin으로 37°C에서 90분간 반응시킨 후 4×SSC로 45°C에서 2분간 3회 수세하였다. 다시 FITC로 37°C에서 60분간 반응시킨 후 4×SSC로 45°C에서 2분간 3회 수세하고 공기 건조하였다. 그리고, 공기 건조한 슬라이드에 DAPI(4'-6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Vysis, Downers Grove, IL, U.S.A)로 대조염색하고 CGH CytoVision system(Applied Imaging, San Jose, CA, U.S.A)을 이용하여 관찰하였다.

DAPI 염색에 기초하여 겹치지 않고 잘 퍼진 10~15개 정

도의 증기세포 염색체를 분석하여 적색(정상 DNA)에 대한 녹색(중양 DNA)의 비율을 평균하여 구하였다. 적색에 대한 녹색의 비율이 1일 때를 기준으로 하여 적색에 대한 녹색의 비율이 1.25 이상을 염색체 증가(gain)로, 0.75 이하를 염색체 감소(loss)로 분석하였다. 특히, 그 비율이 1.50 이상인 경우는 염색체 증폭(amplification)으로 정의하였다.

4) Array-CGH

두경부 편평상피세포암 세포주에서 추출한 DNA는 Cy3로 표지하고, 정상세포에서 추출한 DNA는 Cy5로 표지한 후 cot-1 DNA를 포함한 부합완충액(hybridization buffer)에 탐침자를 혼합하여 70°C에서 15분간 변성시킨 후 37°C에서 60분간 미리결합시켰다. GenomArray™(MacroGen, Seoul, Korea)는 4,030개의 BAC(bacterial artificial chromosome) 클론으로 이루어진 것으로 FISH를 통해 그 위치가 확인된 microarray template이다. MacArray™karyo 4000(MacroGen, Seoul, Korea)를 70°C에서 15분간 변성시킨 다음, 혼합된 탐침자와 microarray template을 37°C에서 48~72시간 동안 결합시켰다. 수세용액(50% formamide, 2×SSC)으로 46°C에서 15분간 수세하였고, 2×SSC, 0.1% SDS로 46°C에서 30분간 둔 후, PN buffer로 실온에서 15분간 둔 후, 2×SSC로 실온에서 5분간 수세하였다. 실온에서 1분간 차례로 70%, 85%, 100% 알코올에 담귀 탈수한 후 공기건조하였다.

Image capture와 분석은 ArrayScanner™(MacroGen, Seoul, Korea)와 ArrayAnalysis™(MacroGen, Seoul, Korea)를 이용하였다. Array CGH의 결과는 Cy3/Cy5 fluorescence ratio의 log값을 구해 0.30이상인 경우를 염색체 증가로 하였으며, -0.30 이하인 경우를 염색체 감소로 분석하였다.

결 과

1. CGH 결과

세 개의 세포주에서 다양한 염색체 변화가 관찰되었으며, 21~30개 염색체부위에서의 변화를 관찰할 수 있었다(Table 1).

1) SNU-1041의 CGH 결과

CGH를 시행하여 탐침자의 형광 image를 얻었고, 컴퓨터 분석을 통해 profile을 얻었다(Fig. 1). 염색체 2p22, 2p25, 3q21-qter, 5p10-p15.3, 7p21-pter, 8p22-pter, 8q11.2-q12, 8q21.1-qter, 9q21-q34, 11q12-q13, 11q14-q21, 13q21, 14q24-q32, 15q22-qter, 16q22-q24, 17q24-q25, 19p13.1-pter, 19q13.2-q13.3, 20 등이었으며, 이 중 3q22-qter, 7p22, 8q23,

8q24.1, 19p13.3, 20q11.2-q13.1에서는 염색체의 증폭 (amplification)이 관찰되었다. 염색체 감소로 나타난 부위는 3p10-p14, 4p15.2, 4q22-qter, 5q12-q23, 6q14-q21, 7q31-q34, 9p23, 11q23-q25, 18q21-q23, 21, 22q11.2의 11개 부위였다(Table 1).

2) SNU-1066의 CGH 결과

CGH를 시행하여 탐침자의 형광 image를 얻었고, 컴퓨터

분석을 통해 profile을 얻었다(Fig. 2). 염색체 증가로 나타난 부위는 1p36.1-p36.2, 2q36-qter, 3q23-qter, 5p, 6p21.1-pter, 7pter-q21, 8q, 9q13-qter, 12p12-pter, 13q12-qter, 14q32-qter, 16p13.2-qter, 17p12-pter, 17q11.2-qter, 20q11.2-qter 등이었으며, 이 중 2q37-qter, 3q27, 5p, 7p21, 7q11.2-q21, 8q23-qter, 9q32-qter, 12p13-pter, 16q12.2-q23, 17q24-q25, 20q13.1-q13.3 등 11개 부위에서는 염색체 증폭을 관찰할 수 있었

Table 1. Chromosome gains and losses in 3 head and neck squamous cell carcinoma cell lines observed by CGH

	SNU-1041	SNU-1066	SNU-1076
Gains	2p22, 2p25, 3q21-qter, 5p10-p15.3, 7p21-pter, 8p22-pter, 8q11.2-q12, 8q21.1-qter, 9q21-q34, 11q12-q13, 11q14-q21, 13q21, 14q24-q32, 15q22-qter, 16q22-q24, 17q24-q25, 19p13.1-pter, 19q13.2-q13.3, 20	1p36.1-p36.2, 2q36-qter, 3q23-qter, 5p, 6p21.1-pter, 7pter-q21, 8q, 9q13-qter, 12p12-pter, 13q12-qter, 14q32-qter, 16p13.2-qter, 17p12-pter, 17q11.2-qter, 20q11.2-qter	2p13, 2p22-pter, 2q11.2-q21, 3q11.2-q27, 5p13-pter, 6p22-pter, 7p12-pter, 8q, 9q22-q34, 10q25, 12p11.2-pter, 16q11.2-qter, 20
Losses	3p10-p14, 4p15.2, 4q22-qter, 5q12-q23, 6q14-q21, 7q31-q34, 9p23, 11q23-q25, 18q21-q23, 21, 22q11.2	3p10-p23, 8p12-pter, 18q, 19p12-p13.1, 20p12, 21q11.2-q12	3p, 4p12, 4q13-q27, 4q31.3-qter, 6q12-q15, 6q22-q23, 7q31-q35, 8p

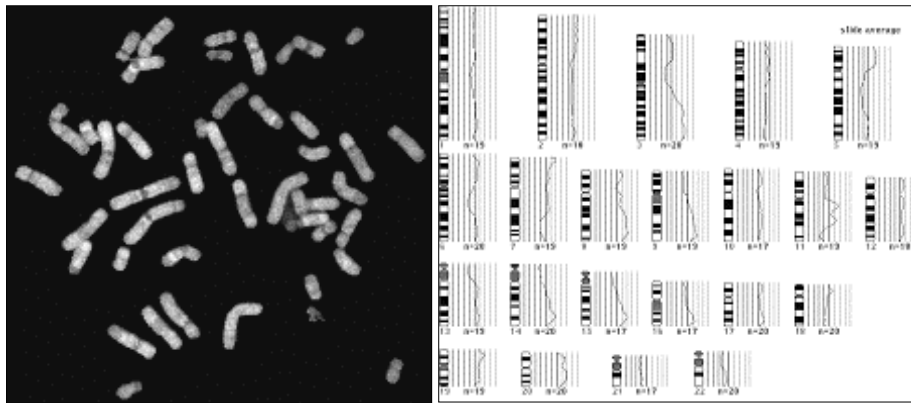


Fig. 1. Representative digital probe image and CGH profile in SNU-1041. Gains of 2p22, 2p25, 3q21-qter, 5p10-p15.3, 7p21-pter, 8p22-pter, 8q11.2-q12, 8q21.1-qter, 9q21-q34, 11q12-q13, 11q14-q21, 13q21, 14q24-q32, 15q22-qter, 16q22-q24, 17q24-q25, 19p13.1-pter, 19q13.2-q13.3, and 20 were observed as well as losses of 3p10-p14, 4p15.2, 4q22-qter, 5q12-q23, 6q14-q21, 7q31-q34, 9p23, 11q23-q25, 18q21-q23, 21, and 22q11.2 were found. The high amplification of 3q22-qter, 7p22, 8q23, 8q24.1, 19p13.3, and 20q11.2-q13.1 were observed especially. n : number of cells which were observed.

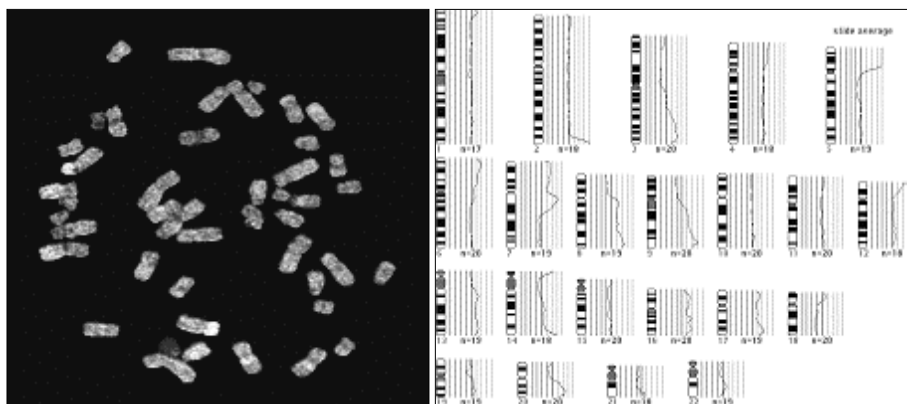


Fig. 2. Representative digital probe image and CGH profile in SNU-1066. Gains of 1p36.1-p36.2, 2q36-qter, 3q23-qter, 5p, 6p21.1-pter, 7pter-q21, 8q, 9q13-qter, 12p12-pter, 13q12-qter, 14q32-qter, 16p13.2-qter, 17p12-pter, 17q11.2-qter, and 20q11.2-qter were observed as well as losses of 3p10-p23, 8p12-pter, 18q, 19p12-p13.1, 20p12, and 21q11.2-q12 were found. The high amplification of 2q37-qter, 3q27, 5p, 7p21, 7q11.2-q21, 8q23-qter, 9q32-qter, 12p13-pter, 16q12.2-q23, 17q24-q25, and 20q13.1-q13.3 were observed especially. n : number of cells which were observed.

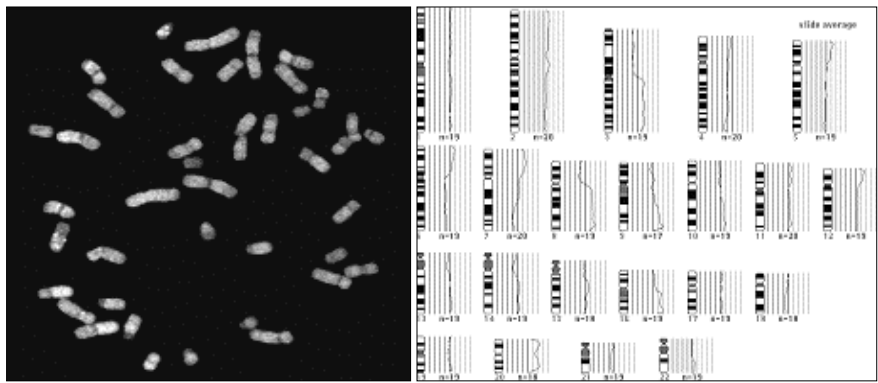


Fig. 3. Representative digital probe image and CGH profile in SNU-1076. Gains of 2p13, 2p22-pter, 2q11.2-q21, 3q11.2-q27, 5p13-pter, 6p22-pter, 7p12-pter, 8q, 9q22-q34, 10q25, 12p11.2-pter, 16q11.2-qter, and 20 were observed as well as losses of 3p, 4p12, 4q13-q27, 4q31.3-qter, 6q12-q15, 6q22-q23, 7q31-q35, and 8p were found. The high amplification of 8q24, 9q34, 16q24, 20p12-p13, and 20q11.2-q13.2 were observed especially. n : number of cells which were observed.

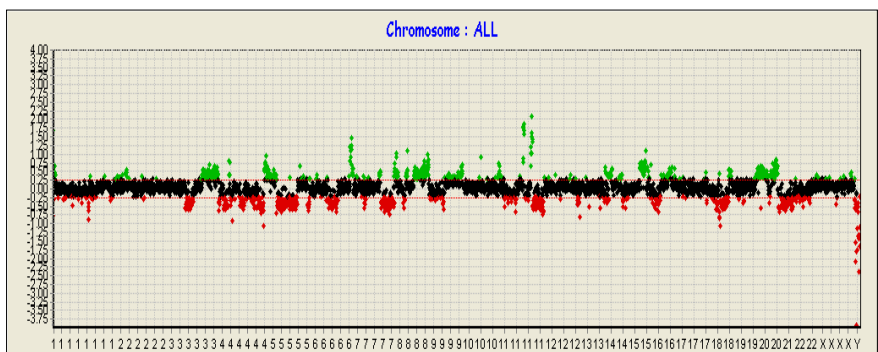


Fig. 4. Array-CGH results of SNU-1041. Green color represents the gained regions in chromosomes, and red color represents the lost regions.

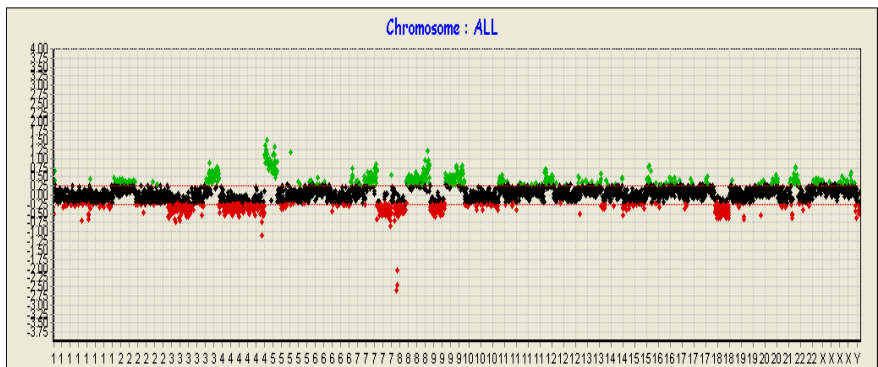


Fig. 5. Array-CGH results of SNU-1066. Green color represents the gained regions in chromosomes, and red color represents the lost regions.

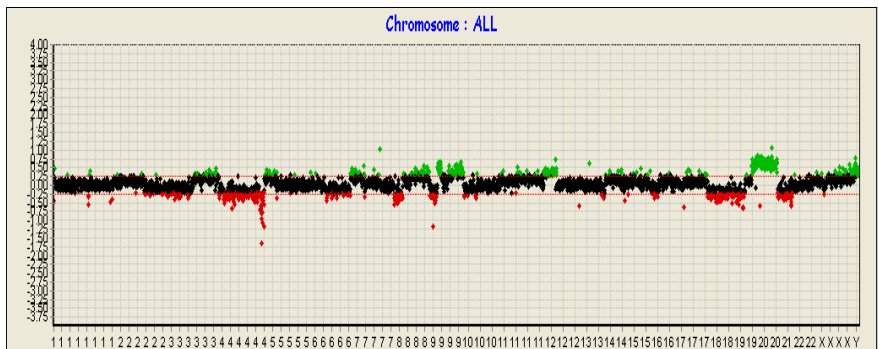


Fig. 6. Array-CGH results of SNU-1076. Green color represents the gained regions in chromosomes, and red color represents the lost regions.

다. 한편, 염색체 감소로 나타난 부위는 3p10-p23, 8p12-pter, 18q, 19p12-p13.1, 20p12, 21q11.2-q12 등임을 확인하였다(Table 1).

3) SNU-1076의 CGH 결과

CGH를 시행하여 탐침자의 형광 image를 얻었고, 컴퓨터 분석을 통해 profile을 얻었다(Fig. 3). 염색체 2p13, 2p22-pter, 2q11.2-q21, 3q11.2-q27, 5p13-pter, 6p22-pter, 7p12-pter, 8q, 9q22-q34, 10q25, 12p

11.2-pter, 16q11.2-qter, 20 등에서 증가가 관찰되었다. 특히, 염색체 8q24, 9q34, 16q24, 20p12-p13, 20q11.2-q13.2 등 다섯 부위에서는 염색체의 증폭을 관찰할 수 있었다. 염색체 감소가 나타난 부위는 3p, 4p 12, 4q13-q27, 4q31.3-qter, 6q12-q15, 6q22-q23, 7q31-q35, 8p 등이었다(Table 1).

2. Array-CGH 분석(Fig. 4-6)

세 개의 세포주 모두에서 다양한 염색체 및 유전자의 변

Table 2. Gained clones in 3 head and neck squamous cell carcinoma cell lines observed by array-CGH

Chromosome	Gene
1p36.33	LOC440551, LOC440552
1p36.33-1p36.32	SKI, FLJ13941
1q22	CLK2
3q25.1	MED12L, TM4SF4, WWTR1
3q26.2	EVI1
3q26.31	NAALADL2
3q26.32	PIK3CA, KCNMB3
3q29	OPA1
5p12	FGF10
5p15.31	LOC285692
5p15.33	ZDHHC11, BRD9, TRIP13, CRR9, LOC401169, SLC6A3
7p11.2	CALM1P2
7p22.3	MAD1L1, MGC11257, LOC393076, GPR146, GPR30, LOC402518
8q21.3	NBN, DECR1
8q22.1	RAD54B, FSBP, DKFZP434I116
8q22.2	KCNS2, STK3
8q22.3	ODF1
8q24.21	DDEF1, MYC, PVT1, SRRM1L
8q24.22	NDRG1, LOC392271, TG
8q24.3	BOP1, HSF1, DGAT1, SCRT1, LOC340393, FBXL6, GPR172A, ADCK5, CYHR1, KIFC2, FOXH1, PPP1R16A, GPT, LOC113655, RECQL4, LRRC14, LRRC24, MGC70857, KIAA1688, HSF1, DGAT1, DKFZp547F072, SCRT1, LOC340393, FBXL6, GPR172A, ADCK5, LOC442403, EXOSC4, GPAA1, CYC1, Sharpin, MAF1, KIAA1875, LOC51236, LOC402353
9q22.32	C9orf3, FANCC
9q31.2	FCMD, TAL2
9q33.2	GSN, LOC441465, STOM
9q34.11	SPTAN1, WDR34, SET
9q34.12	ABL1, P518, FIBCD1
9q34.3	LCN12, LOC203235, PTGDS, FLJ45224, LOC286257, CLIC3, ABCA2, FLJ36268, FUT7, LOC389814, NPDC1, ENTPD2, C9orf140, UAP1L1, MAN1B1, UAP1L1, MAN1B1, DPP7, LOC389815, GRIN1, LOC389816, ANAPC2, SSNA1, C9orf75, MGC14327, KIAA0310, FLJ36779, NOTCH1
9q34.3	C9orf75, MGC14327, NDOR1, LOC389822, DKFZP761H1710, SLC34A3, TUBB2, LOC401565, LOC441476, COBRA1, FLJ20245, LOC441477, MGC61598, FLJ20433, NELF, C9orf111, KIAA0310, FLJ36779, NOTCH1, KIAA0649, C9orf116, MRPS2, LCN1, OBP2A, PAEP, TRAF2, FBXW5, C8G, LCN12, LOC203235
12p13.33	LOC440123, SLC6A12, SLC6A13
14q32.33	CDCA4, GPR132, ZFYVE21, PPP1R13B
16p13.3	ZNF434, ZNF174, ZNF597, FLJ14154, LOC390671, CLUAP1
20q11.21	HM13, SNTA1
20q13.2	BCAS1
20q13.33	KCNQ2, EEF1A2, C20orf149, PTK6, ARFGAP1, KIAA1510, CHRNA4, KCNQ2, MYT1, C20orf36, SRMS, MGC5356, PRIC285, GMEB2, TPD52L2, DNAJC5, UCKL1, GM632, C20orf14, LOC284739, SOX18, TCEA2, RGS19, OPRL1, C20orf135, TPD52L2, DNAJC5

Table 3. Lost clones in 3 head and neck squamous cell carcinoma cell lines observed by array-CGH

Chromosome	Gene
1p36.33	LOC388578, FLJ40008, FLJ22639, LOC284591, FAM41C, LOC388579
1q21.1	LOC388687, LOC440682, LOC440683, LOC400781, MGC8902, LOC388686
1q44	FLJ10157
3p14.1	PSMC1P, FAM19A4
4p12	LOC401131
4p13	LOC389207
4p15.32	PROM1, FLJ90013, MED28, KIAA1276
4p15.33	BAPX1, LOC285548, FAM44A
4p16.1	WFS1, PPP2R2C, SORCS2, SLC2A9
4p16.2	STK32B
4p16.3	FLJ90036, LOC441002, LOC401112
4p16.3-4p16.2	D4S234E, STX18
4q21.22	MASA, LOC441027
4q22.1	TIGD2, IBSP, MEPE, HSPCP1
4q22.3	LOC441031, GRID2, BMPR1B, UNC5C
4q25	LOC132707, LOC442115,
4q31.23	ARHGAP10, NR3C2, LOC285423
4q31.3	LOC391705, PET112L
4q32.2	DKFZP434L1717, FLJ11184, MARCH1
4q32.3	KIAA0992
4q34.2	GPM6A
4q35.1	ACSL1, LOC442122, TLR3, STOX2, DCTD
4q35.2	FAT, HSPCAL2, LOC285442, LOC442124, LOC441055
6q15	ANKRD6
6q21	WISP3
8p23.3	LOC442376
9p22.2	SH3GL2
9p24.2	FLJ35024, VLDLR
9p24.3	DOCK8
13q12.11	LOC440124, LOC400094
14q11.2	PSMB5, FLJ16369, CDH24, ACIN1, C14orf119, CEBPE, SLC7A8, SLC7A7, MRPL52, MMP14, LRP10, FLJ38964
15q11.2	LOC388078, LOC388079, LOC441709
16p11.2	LOC441762, LOC441763
18q12.1	NOL4
18q12.2	BRUNOL4, LOC441820, FHOD3, C18orf10
18q12.3	SETBP1, RIT2
18q21.1	MAPK4, MYO5B, CCDC11, MBD1, CXXC1
18q21.2	TCF4
18q21.2-18q21.31	TXNL1, WDR7
18q21.31	ALPK2
18q21.32	ZNF532, LOC390858, CCBE1, GRP
18q21.33	BCL2, KIAA1468
18q21.33-18q22.1	SERPIN2, SERPINB10, LOC284293, SERPINB8
18q22.1	LOC441822
18q23	LOC400662, TXNL4A, C18orf22, LOC441834, KIAA0863, PARD6G, CTDP1, LOC441833
19q12	LOC440521

Table 3. Continued

Chromosome	Gene
19q13.2	PSG3, PSG8, FLJ30307
19q13.2-19q13.31	FLJ30307, LOC440534, PSG10, PSG1, PSG6
19q13.31	PSG6, PSG7, LOC441853, PSG11
21q22.11	C21orf63
21q22.3	BACE2, PLAC4
22q11.1	LOC391284

화가 관찰되었으며, 다수의 유전자의 증가나 감소가 있음을 확인하였다. 세 개의 세포주 모두에서 증가하거나 감소한 유전자를 정리한 결과는 Table 2와 Table 3에서 보는 바와 같다.

Array-CGH 결과 세 개의 세포주 모두에서 증가한 유전자는 3q25.1-q29 부위에 위치하는 *MED12L*, *TM4SF4*, *WWTRI*, *EVII*, *NAALADL2*, *PIK3CA*, *KCNMB3*, *OPA1*, 5p12의 *FGF10*, 5p15.33의 *ZDHC11*, *BRD9*, *TRIP13*, *CRR9*, *SLC6A3*, 7p22.3 위치의 *MAD1L1*, 8q21.3-24.3에 위치하는 *NBN*, *DECRI*, *RAD54B*, *FSBP*, *KCNS2*, *STK3*, *ODF1*, *DD-EIF1*, *MYC*, *PVT1*, *SRRM1L*, *NDRG1*, *TG*, *BOPI*, *HSF1*, *DG-ATI*, *SCRT1*, *Sharpin* 등의 유전자, 20q13,2의 *BCAS1*, 20q13.33의 *SNTA1* 등을 비롯한 다수의 유전자로 확인되었다.

Array-CGH 결과 세 개의 세포주 모두에서 감소한 유전자는 3p14.1에 위치하는 *PSMC1P*, *FAM19A4*, 4q22.1의 *IBST*, *MEPE*, *HSPCP1*, *TIGD2*, 4q22.3 위치의 *GRID2*, *BMPR1B*, *UNC5C*, 4q31.23의 *ARHGAP10*, *NR3C2*, 4q31.3의 *PET112L*, 4q32.2의 *MARCH1*, 4q32.3의 *KIAA0992*, 4q34.2의 *GPM6A*, 4q35.1의 *DCTD*, *STOX2*, *ACSL1*, *TLR3*, 4q35.2의 *FAT*, *HSP-CAL2*, 18q12.1-q23에 위치하는 *NOL4*, *BRUNOL4*, *FHOD3*, *SETBP1*, *RIT2*, *MAPK4*, *MBD1*, *TCF4*, *TXNL1*, *ALPK2*, *ZNF532*, *BCL2*, *KIAA1468*, *SERPIN2B*, *SERPIN8B*, *SERPIN10B* 등의 유전자를 비롯한 다수의 유전자로 확인되었다.

고 찰

본 연구의 CGH 결과에서, 세 개의 세포주 모두에서 증가한 염색체 부위는 3q23-q27, 5p13-p15.3, 7p21-pter, 8q11.2-q12, 8q21.1-qter, 9q22-q34, 16q22-q24, 20q11.2-qter 등의 여덟 부위였다. 세포주 3개 모두에서 감소한 염색체 부위는 3p10-p14의 한 부위였으나, 염색체 3p15-p23, 4q22-q27, 4q31.3-qter, 6q14-q15, 7q31-q34, 8p12-pter, 18q21-q23, 21q11.2-q12의 감소가 두 개의 세포주에서 관찰되었으며, 이러한 결과는 이전의 다른 연구자들이 보고한 내용과 비교적 잘 일치하고 있다²⁾.

본 연구에서 사용된 세포주 중 SNU-1041은 중등도의 분화도를, SNU-1066과 SNU-1076은 높은 분화도를 가진 암에서 유래된 세포주이나 본 연구 결과 나타난 염색체 변화는 혼재되어 있어, 기존의 보고와는 달리 분화도와는 연관되지 않았음을 확인하였다. 그러나, 본 연구에서 사용한 세포주의 수가 적고, 각각 하인두(SNU-1041)와 후두(SNU-1066, SNU-1076)의 암에서 기원한 세포주로서 그 기원이 조금 다르므로, 향후 다수의 한국인 두경부 편평상피세포암 세포주를 확보하여 연구한다면, 분화도와의 상관성도 밝힐 수 있을 것으로 생각된다.

두경부 편평상피세포암에서 가장 흔한 것으로 보고된 염색체 이상은 3q의 증가 및 3p의 감소이다³⁾. 본 연구에서는 세 개의 세포주 모두에서 3q의 증가와 3p의 감소를 확인할 수 있었다. 또한 array-CGH 결과에서 3q25.1-q29 부위에 위치하는 *MED12L*, *TM4SF4*, *WWTR1*, *EVII*, *NAALADL2*, *PIK3CA*, *KCNMB3*, *OPA1* 등의 유전자가 증가하였고, 3p14.1에 위치하는 *PSMC1P*, *FAM19A4* 등의 유전자가 감소하였음을 확인할 수 있었다.

염색체 5p의 증가도 세 개의 세포주 모두에서 관찰되었다. 본 연구의 array-CGH 결과에서는 5p12, 5p15.33 등의 부위가 세 개의 세포주에서 공통적으로 증가한 것으로 나타났으며, 이부위에서 증가한 것으로 확인된 유전자는 *ZDHC11*, *BRD9*, *TRIP13*, *CRR9*, *FGF10* 등의 유전자였으며, 두경부편평상피세포암에서 증가한 것을 본 연구에서 처음으로 확인하였다.

본 연구에서 규명된 8q의 증가는 *MYC* 유전자의 증폭과 관련이 있다는 점이 Yin 등⁴⁾의 정량 dot blot 분석에서 규명된 바 있다. 정상세포군과 비교하여 34례의 두경부 편평상피세포암 세포주를 분석하여 *MYC* 유전자의 증폭과 통계적으로 반비례 관계를 보인다고 기술하였다. Agochiya 등⁵⁾은 FISH 기법을 이용하여 *MYC*과 *PTK2*의 증가가 두경부 편평상피세포암을 포함하여 폐암, 대장암, 그리고 유방암 세포주에서 발견된다고 보고하였다. 본 연구의 array-CGH 결과에서는 세 개의 세포주 모두에서 *MYC* 유전자의 증가를 확인하였다.

염색체 7p의 증가도 두경부 편평상피세포암에서 흔히 발견되는 염색체 이상으로 알려져 있으며⁶⁾, 특히 후두에서 발생하는 편평상피세포암에서 흔히 발견할 수 있는 염색체 이상으로 보고되어 있다⁷⁾. 본 연구에 사용된 세포주 SNU-1066과 SNU-1076은 각각 7pter-q21, 7p12-pter의 증가가 관찰되었으며, 특히 SNU-1066 세포주에서는 7p21의 고도증폭이 관찰되었다. Array-CGH 결과 7p22.3 위치의 *MADILI* 유전자가 세 개의 세포주에서 공통적으로 증가되었음을 관찰할 수 있었는데, 이는 소세포성 폐암 세포주에서 증가하는 유전자로서 보고된 유전자로서⁸⁾, 본 연

구의 결과로 볼 때 두경부 편평상피세포암의 발생과 관련된 유전자로 생각할 수 있다.

염색체 16q의 증가는 Schlade-Bartusiak 등⁹⁾이 두경부 편평상피세포암에서 처음으로 증가함을 확인하였고, 20q의 증가는 이미 Bockmühl 등²⁾에 의해 두경부 편평상피세포암에서 흔히 발생하는 염색체 이상임이 보고되었으며, 그 외에도 유방암에서 종양의 미분화 정도, 홀배수성(aneuploidy), high S-phase fraction 등과 관련된다고 보고되었다¹⁰⁾. 유방암을 대상으로 한 연구결과에서는 20q의 증가가 동반된 경우, 무병 생존율이 낮아진다는 결과가 보고되고 있다. 이 부위는 유방암에서 주로 발현하는 BCAS1, ZNF217 등과 관계있다. 본 연구에 사용된 세 개의 세포주에서 모두 20q의 증가와 BCAS1, SNTA1 유전자의 증가가 관찰되었다. SNTA1 유전자는 염색체 20q11.21-q11.22에 위치하는 유전자로서 구강 편평상피세포암에서 전이와 관련되는 유전자로 보고된 유전자이다¹¹⁾. 그러므로, BCAS1, SNTA1 유전자는 두경부 편평상피세포암의 예후 및 전이와 관련된 유전자로 생각할 수 있다.

염색체 3p의 감소는 두경부 편평상피세포암 뿐 아니라 다양한 암에서 이미 보고되었다¹²⁾. 이 부위는 두경부 편평상피세포암에서 가장 흔한 염색체 감소 부위로 알려져 있다. 이는 구강암의 전암성 세포변성단계에서도 발견되어 두경부 편평상피세포암의 초기변화에서 동반된다고 보고되었다¹³⁾. 이 위치와 *FHIT* 유전자와의 관계가 여러 연구에서 조사된 바 있으며, 이는 *FHIT* 유전자의 기능저하가 두경부 편평상피세포암의 진행에 중요한 역할을 함을 시사한다¹⁴⁾. 본 연구에서는 SNU-1041, SNU-1066 두 개의 세포주에서 3p의 감소와 *FHIT* 유전자의 감소가 확인되었다. 또한 array-CGH 결과 세 개의 세포주 모두에서 3p14.1의 *PSMC1P* 유전자가 감소함을 확인할 수 있었으며, 두경부편평상피세포암에서 감소한 것을 본 연구에서 처음으로 확인하였다.

염색체 4q의 감소는 두경부 편평상피세포암에 대한 여러 기존 연구에서 밝혀진 바 있다. 이는 발암억제기전에 영향을 주어 암을 발생시키는 것으로 생각된다고 하였다¹⁵⁾. 본 연구의 CGH 결과에서는 4q22-q27, 4q31.3-qter의 감소가 SNU-1041, SNU-1076 등 두 개의 세포주에서 공통적으로 확인되었으며, array-CGH 결과에서 감소된 다수의 유전자 중 *GRID2*, *UNC5C* 유전자는 암억제 유전자의 기능을 하는 것으로 알려져 있는 유전자임이 보고되어 있다¹⁶⁾.

염색체 18q의 감소도 두경부 편평세포암에 대한 기존 연구에서 이미 보고된 바 있다¹⁷⁾. 본 연구에서는 두 개의 세포주에서 18q21-q23의 감소가 관찰되었다. 여기에 여러 종양억제 유전자가 위치한다고 알려져 있는데, *DCC*, *DPC4*, *MADR2*, *serpin*, *maspin(PII5)*, *SCCA1*, *SCCA2*, *PAI2*, *head-*

pin (PII3) 등이 그것이다. 본 연구의 array-CGH 결과에서는 *SERPINB2*, *SERPINB8*, *SERPINB10* 등의 유전자 3개 개의 세포주에서 모두 감소함을 확인할 수 있었는데, 이러한 결과는 array-CGH의 해상력이 CGH보다 우수함을 나타내는 것으로 생각할 수 있다. 현재까지는 18q의 감소를 초래하는 자세한 기전은 밝혀져 있지 않으나, 18q 감소는 두경부 편평상피세포암의 예후를 불량하게 하는 것과 관련이 있는 중요한 현상으로 알려져 있다¹⁸⁾.

염색체 8p의 감소는 두경부 편평상피세포암을 비롯한 다수의 암에서 감소하고 있는 부위이다¹⁹⁾. 본 연구의 CGH 결과에서는 SNU-1066과 SNU-1076 두 세포주에서 8p의 감소가 나타났다. 두경부 편평상피세포암의 40~50%에서 8p23의 동형접합소실(homozygous deletion)이 나타나고 있어, 이 부분에 암억제유전자를 포함하고 있을 것이라고 알려져 있으며¹⁹⁾, Toomes 등²⁰⁾은 *CSMD1* 유전자가 두경부 편평상피세포암과 관련된 암억제 유전자로서 가능성이 있다고 보고하였다.

본 연구에서는 두경부 편평상피세포암 세포주 SNU-1041, SNU1066, SNU-1076의 염색체 이상을 CGH를 이용하여 분석하였고, 또한 관련된 유전자를 규명하고자 array-CGH를 시행하였다. CGH와 array-CGH는 두경부 편평상피세포암의 유전적 변화를 규명하는데 있어 유용한 선별검사 방법으로서 의의가 있다.

본 연구에서 확인된 3q, 5p, 8q, 7p, 16q, 20q의 증가와 3p, 4q, 7q, 18q, 8p의 감소는 두경부 편평상피세포암에 대한 기존의 보고와 일치하며 이 부위는 폐암을 비롯한 다수의 암에서 이상이 있는 부위로 이미 보고되어 있다. 이러한 이상 염색체 부위는 두경부 편평상피세포암 발생 및 진행과 관련된 유전자를 포함하고 있는 부위이므로, 향후 암의 진단과 치료의 목표가 되는 유전자에 대한 정보를 제공할 수 있을 것이다.

또한 본 연구의 array-CGH 결과에서 증가한 *PIK3CA*, *MYC* 등 두 개의 유전자는 두경부 편평상피세포암의 발생 및 발달에 관련된 유전자임이 이미 보고되어 있는 유전자이다. *EVII* 유전자는 두경부 편평상피세포암에서는 밝혀진 바 없으나 식도암에서의 증가가 보고되어 있는 유전자이며, *MAD1L1* 유전자는 소세포성 폐암 세포주에서 증가하는 것으로 보고된 유전자로서, 본 연구에서는 두경부 편평상피세포암에서도 위의 두 유전자가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 그 외의 다수의 유전자들은 아직까지는 암과의 관계가 보고된 것이 없다. 그러므로, 본 연구를 통하여 증가하거나 감소하는 것으로 확인된 유전자들에 대한 후속 연구를 통해 좀 더 정확한 발현 양상을 규명해야 할 것으로 생각한다. 즉, 연구의 결과에서 보고된 유전자를 탐침자로 하여 두경부 편평상피세포암 조직에 대한 FISH를 시행하여 발

현 양상을 확인하거나, LOH 등을 시행하여 유전자의 기능 상실에 대한 연구를 시행하는 것이 필요하다고 생각한다.

결 론

이 연구에서는 두경부 편평상피세포암 세포주를 대상으로 CGH와 array-CGH를 시행하여 두경부 편평상피세포암의 병인에 관련된 염색체 이상과 유전자 변화를 밝히고자 하였다.

CGH 결과, 세 개의 세포주 모두에서 증가한 염색체 부위는 3q23-q27, 5p13-p15.3, 7p21-pter, 8q11.2-q12, 8q21.1-qter, 9q22-q34, 16q22-q24, 20q11.2-qter 등의 여덟 부위였다. 세포주 3개 모두에서 감소한 염색체 부위는 3p10-p14의 한 부위였으나, 염색체 3p15-p23, 4q22-q27, 4q31.3-qter, 6q14-q15, 7q31-q34, 8p12-pter, 18q21-q23, 21q11.2-q12의 감소가 두 개의 세포주에서 관찰되었다.

Array-CGH 결과, 세 개의 세포주 모두에서 *PIK3CA*, *MYC*, *EVII*, *MAD1L1* 유전자의 증가와 *SERPIN* 유전자의 감소를 비롯한 다수의 유전자 이상이 확인되었다.

본 연구에서 규명된 이상 염색체 부위는 두경부 편평상피세포암의 발생 및 진행과 관련된 유전자를 포함하고 있는 부위이며, 본 연구의 array-CGH 결과에서 증가하거나 감소한 유전자는 두경부 편평상피세포암의 발생 및 발달에 관련된 유전자이다. 그러므로, 향후 두경부 편평상피세포암 조직에서 위의 유전자의 발현에 대한 연구를 지속한다면, 두경부 편평상피세포암 발생, 전이 등의 중앙학적 특성에 관련된 확실한 유전자를 규명할 수 있을 것으로 생각된다.

중심 단어 : 비교 유전체 보합법 · array 기반 비교 유전체 보합법 · 두경부 편평상피세포암 · 염색체 분석.

References

- 1) Koh Ty, Park KH, Lee SG, et al: *Inhibitory effect of p27KIP1 gene transfer on head and neck squamous cell carcinoma cell lines. Head Neck. 2003;25:44-49*
- 2) Bockmühl U, Wolf G, Schmidt S, et al: *Genomic alterations associated with malignancy in head and neck cancer. Head Neck. 1998;20:145-151*
- 3) Van Dyke DL, Worsham MJ, Genninger MS, et al: *Recurrent cytogenetic abnormalities in squamous cell carcinoma of the head and neck region, Genes Chromosome Cancer. 1994;3:192-206*
- 4) Yin XY, Donovan-Peluso M, Whiteside TL, et al: *Gene amplification and gene dosage in cell lines derived from squamous cell carcinoma of the head and neck. Genes Chromosome Cancer. 1991;3:443-454*
- 5) Agochiya M, Brunton VG, Owens DW, et al: *Increased dosage*

- and amplification of the focal adhesion kinase gene in human cancer cells. *Oncogene*. 1999;18:5646-5653
- 6) Bergamo NA, Rogatto SR, Poli-Frederico RC, et al: *Comparative genomic hybridization analysis detects frequent over-representation of DNA sequences at 3q, 7p, and 8q in head and neck carcinomas*. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000;119:48-55
 - 7) Huang Q, Yu GP, McCormick SA, et al: *Genetic differences detected by comparative genomic hybridization in head and neck squamous cell carcinomas from different tumor sites: Construction of oncogenetic trees for tumor progression*. *Genes Chromosome Cancer*. 2002;34:224-233
 - 8) Coe BP, Lee EH, Chi B, et al: *Gain of a region on 7p22.3, containing MAD1L1, is the most frequent event in small-cell lung cancer cell lines*. *Genes Chromosome Cancer*. 2005;45:11-19
 - 9) Schlade-Bartusiak K, Stembalska A, Ramsey D: *Significant involvement of chromosome 13q deletions in progression of larynx cancer, detected by comparative genomic hybridization*. *J Appl Genet*. 2005;35:407-413
 - 10) Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, holli K, Collins C, Kowbel D, Gray JW, Kallioniemi OP, Isola J: *Amplification of chromosomal region 20q13 in invasive breast cancer: prognostic implications*. *Clin Cancer Res*. 1995;1:1456-1461
 - 11) Carinci F, Lo Muzio L, Piattelli A, et al: *Potential markers of tongue tumor progression selected by cDNA microarray*. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2005;18:513-524
 - 12) Maestro R, Gasparotto D, Vukosavljevic T, Barzan L, Sulfaro S, Boiocchi M: *Three discrete regions of deletion at 3p in head and neck cancers*. *Cancer Res*. 1993;53:5775-5779
 - 13) Roz L, Wu CL, Porter S, et al: *Allelic imbalance on chromosome 3p in oral dysplastic lesions: an early event in oral carcinogenesis*. *Cancer Res*. 1996;56:1228-1231
 - 14) Gotte K, Hadaczek P, Coy JF, et al: *Fhit expression is absent or reduced in a subset of primary head and neck cancer*. *Anticancer Res*. 2000;20:1057-1060
 - 15) Lin SC, Chang MF, Chung MY, et al: *Frequent microsatellite alterations of chromosome locus 4q13.1 in oral squamous cell carcinomas*. *J Oral Pathol Med*. 2005;34:209-213
 - 16) Smith D, Zhu Y, McAvoy S, Kuhn R: *Common fragile sites, extremely large genes, neural development and cancer*. *Cancer Lett*. 2006;28:232 (1):48-57
 - 17) Takebayashi S, Ogawa T, Jung KY, et al: *Identification of new minimally lost regions on 18q in head and neck squamous cell carcinoma*. *Cancer Res*. 2000;60:3397-3403
 - 18) Pearlstein RP, Benninger MS, Carey TE, et al: *Loss of 18q predicts poor survival of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Genes Chromosome Cancer*. 1998;21:333-339
 - 19) Gollin SM: *Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck: Window to the biology of disease*. *Head Neck*. 2001;23:238-253
 - 20) Toomes C, Jackson A, Maguire K, et al: *The presence of multiple regions of homozygous deletion at the CSMD1 locus in oral squamous cell carcinoma question the role of CSMD1 in head and neck carcinogenesis*. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003;37:132-140