

한국인의 비소세포폐암종에서 O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)의 발현도 분석

이경은¹ · 홍영습^{1,2} · 최필조³ · 노미숙^{1,4*}

동아대학교 ¹암분자치료연구센터, 동아대학교 의과대학 ²예방의학교실, ³흉부외과학교실, ⁴병리학교실

Received March 17, 2008 / Accepted April 1, 2008

Immunohistochemical Expression of O⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) in Korean Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. Kyung Eun Lee¹, Young Seoub Hong^{1,2}, Phil Jo Choi³ and Mee Sook Roh^{1,4*}. ¹Medical Research Center for Cancer Molecular Therapy, Dong-A University, Busan 602-714, Korea, Departments of ²Preventive Medicine, ³Thoracic and Cardiovascular Surgery, and ⁴Pathology, Dong-A University College of Medicine, Busan 602-714, Korea - O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) is a DNA repair protein that protects cells against the carcinogenic effects of alkylating agents. The loss of MGMT expression was commonly known due to hypermethylation of CpG islands in its promoter region. We evaluated the expression of MGMT by immunohistochemistry in order to examine the relationship between loss of MGMT expression and clinicopathological characteristics in 74 Korean patients with non-small cell lung cancers. Loss of MGMT was detected in 25 (33.8%) of 74 cases. The loss of MGMT expression was frequently seen in the adenocarcinoma than in the squamous cell carcinoma (p=0.021). However, there was no significant differences between loss of MGMT expression and other clinicopathological characteristics, including age, gender, smoking status, tumor size, tumor T stage, and lymph node metastasis (p>0.05). In conclusion, loss of MGMT expression was related with the histologic type of lung cancer. Further methylation study of MGMT promoter is needed to evaluate the relationships with immunohistochemical expression of MGMT and to clarify the role of MGMT in lung cancer.

Key words : O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase, non-small cell lung cancer, immunohistochemistry

서 론

O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)는 알킬화제의 발암 및 세포독성 효과로부터 DNA를 방어하여 손상된 DNA를 수복하는 중요한 효소 역할을 하는 것으로 알려져 있다[4,15]. O⁶-methylguanine은 DNA 염기 중 구아닌의 위치가 메틸화제와 반응하여 생기는 생성물로서 세포가 죽거나 돌연변이를 일으키는 원인으로 밝혀져 있다. O⁶-methylguanine의 수복은 MGMT에 의해서 이루어지며, MGMT는 O⁶-methylguanine이 가지는 DNA 기질로부터 메틸기를 효소 자신의 시스테인으로 옮겨오는 반응을 촉매한다[4]. 메틸화된 MGMT의 시스테인 수용기는 재활성화 되지 않고 1회 반응에 의하여 불활성화 되는 자살반응을 하는 것으로 알려져 있으나[15], MGMT의 발현 조절 기전은 아직 정확히 밝혀지지 않았다.

MGMT 활성은 인체의 모든 조직에서 나타나지만 그 활성 정도는 조직의 종류에 따라 다르다고 알려져 있고[5], 중앙세포의 경우 종양의 종류 및 조직의 유형에 따라 다른 것으로 알려져 있다[2]. 또한 MGMT 활성은 대장암에서 가장 높게 나타나며 뇌세포에서 가장 낮게 나타나고[16], 비소세포폐암

종에 비해 소세포폐암종이 더 낮게 나타난다고 보고되었다[14]. 한편 MGMT는 폐암의 약 12% 정도에서 활성이 나타나지 않는 것으로 보고되었으며[2], 이러한 MGMT 발현 소실은 유전자의 결손이나 변이, 재배열 등에 의한 것이 아니라 MGMT 유전자에서 불연속적으로 존재하는 CpG islands의 메틸화와 연관된다고 알려져 있다[6,8]. MGMT 유전자 promoter CpG islands 과메틸화로 인해 불활성화되면 이 단백질이 수행하는 고유한 기능인 구아닌의 O⁶ 위치의 메틸기를 제거하는 기능이 상실되고 종양 억제 유전자나 암유전자의 변이가 촉진되기 때문이다[4,15].

하지만 국내에서는 promoter 메틸화에 의한 MGMT의 활성 정도를 관찰한 연구에 비해[11,17,20] 면역조직화학 염색법을 이용하여 폐암의 MGMT 단백질 발현 및 소실을 관찰한 논문은 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 비소세포폐암종 중 편평세포암종과 샘암종을 대상으로 MGMT 단백질 발현을 면역조직화학 염색법으로 관찰하고 임상병리학적 변수들 간의 상관관계를 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

연구 재료

동아대학교 의료원에서 2001년부터 2004년까지 외과적으

*Corresponding author

Tel : +82-51-240-2833, Fax : +82-51-243-7396

E-mail : msroh@dau.ac.kr

로 적출한 폐암종 조직 중 병리과에서 비소세포암종으로 진단된 74예를 연구대상으로 하였으며, 생명윤리심의회의 허가를 얻은 후 본 연구를 수행하였다. 수술 전에 방사선 요법이나 화학요법을 받은 예는 연구대상에서 제외하였으며, 연구대상의 병리진단 보고서를 참고하고 보관된 조직 슬라이드를 재검토하였다. WHO 분류 방법에 의해 조직학적 유형을 분류하였고[19], 대상 환자의 의무기록 추적조사를 통해 나이, 성별, 흡연력, 종양의 크기, 종양의 T병기, 림프절 전이 유무 등 임상 병리적 양상을 조사하였다.

연구 방법

면역조직화학 염색

4 μm 두께로 절편된 조직을 100% xylene에서 탈파라핀하고 100%, 95%, 70% 알코올에서 차례대로 흡수 과정을 거친 후 흐르는 물에서 10분간 씻어냈다. 항원성 회복을 위하여 pH 9.0 Tris-EDTA 용액으로 전자레인지에서 10분간 끓이는 전처리를 하였다. 조직 내의 내인성 과산화효소를 비활성화 시키기 위하여 실온에서 3% H₂O₂에서 10분간 반응시킨 후 Tris buffered saline (pH 7.4)로 세척하였다. 비특이적인 반응을 줄이기 위하여 Cap-Plus™ Blocking solution (Zymed, California, USA)에서 10분간 더 반응시켰다. 수세 과정 없이 마우스 단클론성 일차항체 O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT, Lab Vision, Fremont CA, USA)를 1:100 희석하여 실온에서 한 시간 동안 반응 시킨 후, Cap-Plus™ Biotinylated secondary antibody (Zymed, California, USA)에서 30분간, Cap-Plus™ Streptavidine-HRP (Zymed, California, USA)에서 30분간 반응시켰다. 면역 염색 후 DAB (3,3'-Diaminobenzidine)로 발색시킨 후 Gill's hematoxylin으로 대조염색 하였다.

면역조직화학 염색 판독

면역조직화학 염색 결과, MGMT가 종양세포의 핵 또는 핵과 세포질에 동시에 갈색 과립상으로 염색될 때를 양성으로 판정하였다. MGMT 발현 유무는 반정량적 분석을 시행하여, 100배 시야에서 염색되지 되지 않은 경우 즉, 0%를 0점, 25% 미만의 종양세포가 염색되는 경우 1점, 26-50% 2점, 50% 이상을 3점으로 하였다. 그리고 염색 강도에 따라 음성은 0점, 약양성인 경우를 1점, 중등도 양성인 경우를 2점, 강양성을 3점으로 분류하였다. 염색 강도에 따른 점수와 분포 점수를 합하여 0-2점이면 MGMT 발현 소실, 3점 이상이면 MGMT 발현 양성으로 판정하였다.

통계학적 분석

통계 처리는 SPSS (Version 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 임상병리학적 변수에 따른 MGMT 단백질 발현의 차이를 평가하기 위해서는 χ^2 검정방법을 사용하여 분석하였고 p<0.05 일 때 통계적 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

임상병리학적 소견

총 74예의 연령은 30세에서 74세(평균 연령은 59.6세)까지 분포하였고, 이 중 남성은 60명(81.1%), 여성은 14명(18.9%)이었으며, 흡연자가 56명(75.7%), 비흡연자가 18명 (24.3%)이었다. WHO 분류에 근거하여 조직학적 유형에 따라 나누면 편평세포암종이 39예(52.7%), 샘암종이 35예(47.3%)였다. 종양 크기에 따라서 3cm 이하인 경우가 31예(41.9%), 3cm 초과인 경우가 43예(58.1%)이었다. T병기별로 나누면 T1 16예(21.6%), T2 43예(58.1%), T3 11예(14.9%), T4 4예(5.4%)이었으며, 림프절 전이가 있는 경우가 35예(47.3%), 림프절 전이가 없는 경우가 39예(52.7%)이었다.

MGMT 단백질 발현과 임상병리학적 인자의 상관관계

종양 주위 정상 폐조직에서 MGMT 단백질은 기관지 상피세포와 간질의 림프구에서 균일하게 양성으로 발현되었다. 한편 종양 조직에서 MGMT 단백질 발현은 74예 중 49예(66.2%), 단백질 소실은 25예(33.8%)에서 관찰되었다. MGMT 단백질 발현은 나이, 성별, 흡연 유무에 따른 유의한 차이는 관찰되지 않았다(p>0.05). 조직학적 유형에 따라 살펴보면 총 39예의 편평세포암종 중 31예(79.5%)에서 발현 양성이고, 8예(20.5%)에서 단백질 소실이 관찰되었으며, 샘암종 35예 중 18예(51.4%)에서 발현 양성이고, 17예(48.6%)에서 단백질 소실이 관찰되어 통계적으로 유의한 차이를 보였다(p=0.021)(Fig. 1). 반면 종양의

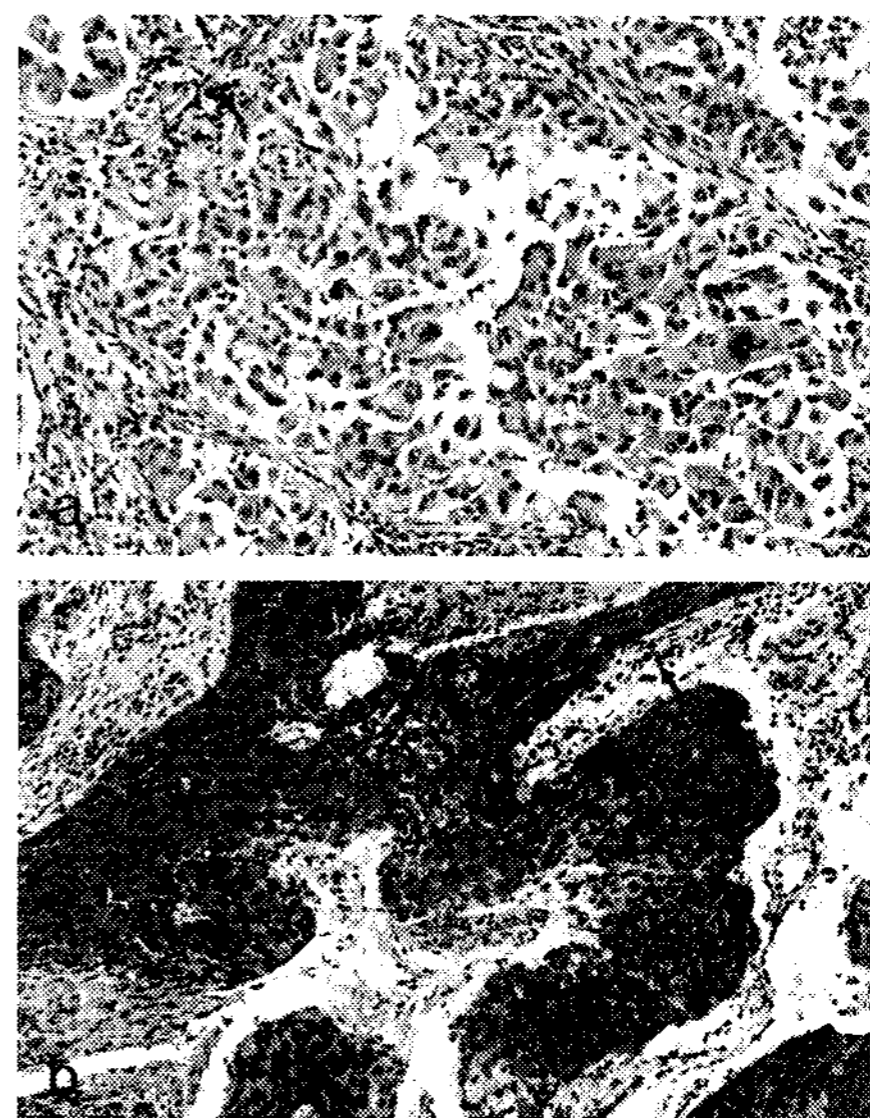


Fig. 1. Immunohistochemical studies for O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) show a loss of MGMT protein in the adenocarcinoma (a), but a positive reaction in the squamous cell carcinoma (b) (arrow: interstitial lymphocytes showing positive expression for MGMT as internal positive control).

Table 1. Relationship between O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) expression and clinicopathological characteristics in 74 non-small cell lung cancers

Characteristics	No. of cases	MGMT expression		p value
		Positive (%) n=49	Loss (%) n=25	
Age				0.862
≤60 yr	33	21(63.6)	12(36.4)	
>60 yr	41	28(68.3)	13(31.7)	
Gender				0.885
Male	60	40(66.7)	20(33.3)	
Female	14	9(64.3)	5(35.7)	
Smoking				0.165
Smoker	56	40(71.4)	16(28.6)	
Non-smoker	18	9(50.0)	9(50.0)	
Histology				0.021
Squamous cell carcinoma	39	31(79.5)	8(20.5)	
Adenocarcinoma	35	18(51.4)	17(48.6)	
Tumor size				0.989
≤3 cm	31	20(64.5)	11(35.5)	
>3 cm	43	29(67.4)	14(32.6)	
T stage				0.925
1	16	10(62.5)	6(37.5)	
2	43	28(65.1)	15(34.9)	
3	11	8(72.7)	3(27.3)	
4	4	3(75.0)	1(25.0)	
Lymph node metastasis				0.514
Negative	35	25(71.4)	10(28.6)	
Positive	39	24(61.5)	15(38.5)	

크기 및 T병기, 림프절 전이 유무에 따른 MGMT 단백질 발현 사이에는 유의한 차이가 관찰되지 않았다 (p>0.05)(Table 1).

고찰

MGMT는 알킬화에 의한 발암원과 알킬화항암제에 의한 DNA 손상을 수복하는 중요한 효소로 알려져 있다[4,15]. MGMT의 활성정도는 조직의 유형에 따라 차이가 나고 MGMT 단백질 소실은 종양 발생과 관련이 있다고 보고되었다 [6,18]. MGMT 단백질 소실은 promoter 메틸화에 의한 종양억제유전자의 불활성화와 연관되어 교종[18], 비소세포폐암종 [13], 대장암[6]등에서 관련성이 보고된 바 있다. 폐암의 경우 비소세포암종에서 25% 정도의 MGMT 단백질 소실이 관찰되었고 특히 샘암종에서는 37% 정도의 높은 단백질 소실이 보고되었다[13]. 본 연구에서는 전체 74예의 비소세포폐암종 중 25예(33.8%)에서 MGMT 단백질 소실이 관찰되었으며, 특히 샘암종에서는 35예 중 17예(48.6%)에서 단백질 소실이 관찰되어 편평세포암종 8/39예(20.5%)에 비해 단백질 소실이 높게 나타

나 Mattern 등[13]의 연구와 일치하는 소견이 관찰되었다. 이러한 연구 결과는 폐암, 대장암, 두경부암 등에서 promoter에 과메틸화가 발생하면 MGMT 유전자가 불활성화되면서 샘암종의 발생과 밀접한 연관이 있는 K-ras 암 유전자의 변이가 증가된다는 보고로 그 이유를 설명할 수 있을 것이다 [1]. 또한 폐암에서 MGMT 메틸화와 p53 암 억제유전자 변이 증가의 관련성이 보고되고 있으므로[20], 향후 여러 가지 유전자 수준 변화들의 상호작용 효과를 관찰한다면 MGMT와 폐암 발생과의 연관성 특히 조직 유형에 따른 차이를 밝힐 수 있을 것이다.

한편 MGMT의 발현 유무는 종양에서 독립적인 예후 인자로 작용할 가능성에 대해 제시되고 있는데, 간암, 위암, 유방암 등에서 MGMT 발현은 좋은 예후라고 하였으며[3,12], 마찬가지로 폐암의 샘암종에서도 MGMT 발현 음성인 경우가 MGMT 발현 양성인 경우 보다 예후가 더 나쁘다고 보고하였다[10]. 하지만 본 연구에서는 MGMT 발현과 나이, 성별, 종양크기, 병기, 림프절 전이 유무 등 임상병리학적 특징에 따른 의미 있는 상관관계를 관찰하지 못했다. 또한 Furonaka 등[9]은 폐암의 편평세포암종과 샘암종에서 MGMT 단백질 소실이 유전자의 메틸화와 유의한 상관관계가 있다고 보고하면서, 샘암종에서는 종양크기 및 병기에서도 유의한 차이가 관찰된다고 보고하였다. 따라서 본 연구 결과와 임상병리학적 인자들과의 상관관계를 좀 더 뒷받침하기 위해서는 메틸화 실험을 통한 분석이 따라야 될 것으로 생각된다.

흡연은 폐암의 주요한 원인 중 하나이다. Mattern 등[13]은 MGMT 단백질 소실이 비흡연자에게서 더 높게 나타나며 흡연력에 따라 유의한 차이가 관찰된다고 하였다. 다른 메틸화 연구에서는 흡연력에 따른 MGMT의 발현이 일치된 결과를 보이지 않고 있는데, Pulling 등[17]은 비흡연자에게서 발생한 샘암종에서 메틸화가 높게 관찰되었고, Liu 등[11]은 비흡연자보다 흡연자에게서 메틸화가 더 높게 관찰되었다. 본 연구에서는 연구 대상의 예가 적은 이유로 흡연력에 따른 유의한 차이를 찾지는 못했으나, 비흡연자가 흡연자보다 단백질 소실이 높게 나타나는 양상을 보였다. MGMT 발현과 흡연력의 상관관계를 정확히 규명하기 위해서는 좀 더 많은 연구 대상의 확보와 정확한 흡연량의 조사 등 추가적인 연구가 이루어져야 될 것으로 생각된다.

본 연구는 면역조직화학 염색을 이용하여 비소세포폐암종의 MGMT 단백질 발현의 의미를 찾고자 시행하였다. 연구 결과, 조직 유형에 따른 유의한 차이를 얻을 수 있었고, 특히 샘암종에서의 단백질 소실이 편평세포암종에 비해 높게 나타나는 것을 관찰하여 MGMT의 발현 유무가 폐 샘암종 발생과 연관이 있을 것으로 추정되었다. 하지만 그 외 임상병리학적 인자들과의 상관관계를 찾을 수는 없었다. 따라서 이번 결과만으로 MGMT의 임상적 의의를 단언하기 어려우므로 향후 병기에 따른 연구 대상의 예가 고른 비율을 나타내고 장기간

예후 추적 관찰이 가능한 좀 더 많은 예를 연구 대상으로 삼을 필요가 있다고 생각된다. 또한 미만성 대세포 림프종[7] 및 대장암, 뇌종양[6] 등에서는 면역조직화학 염색법에 의한 MGMT 단백 소실 비율이 메틸화 특이성 중합효소 연쇄반응법을 이용한 promoter 메틸화 결과와 83%정도 일치된다고 하였으므로[17], 비소세포폐암종에서의 MGMT 단백 소실의 임상적 의의를 밝히기 위해서는 promoter 메틸화에 대한 연구가 추가적으로 수행되어야 될 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 손상된 DNA를 수복하는 중요한 효소로 알려진 O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) 발현의 의미를 비소세포폐암종에서 면역조직화학 염색법으로 알아보려고 하였다. 동아대학교 의료원에서 2001년부터 2004년까지 외과적으로 적출한 폐암종 조직 중 비소세포암종으로 진단된 74예를 연구대상으로 하였다. 면역염색 결과, MGMT 발현은 총 74예 중 49예(66.2%)에서 양성을 보였으며, 25예(33.8%)에서 단백 소실을 보였다. 조직학적 유형에 따른 결과를 살펴보면, 편평세포암종은 8/39예(20.5%)에서 단백 소실이 보였고, 샘암종은 17/35예(48.6%)에서 단백 소실이 관찰되어 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었다(p=0.021). 하지만 나이, 성별, 흡연유무, 종양 크기, T 병기 및 림프절 전이에 따른 유의한 차이는 관찰되지 않았다(p>0.05). MGMT 단백 발현 소실은 특히 promoter 메틸화와 연관되어 종양에서 관찰된다고 알려져 있으므로, 향후 연구에서는 비소세포폐암종의 MGMT 단백 소실에 대한 임상적 의의를 밝히기 위하여 promoter 메틸화 연구가 추가적으로 수행되어야 될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 암분자치료연구센터의 지원으로 수행되었음.

References

1. Barbacid, M. 1987. Ras genes. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 779-827.
2. Citron, M., R. Decker, S. Chen, S. Schneider, M. Graver, L. Kleynerman, L. B. Kahn, A. White, M. Schoenhaus and D. Yarosh. 1991. O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in human normal and tumour tissue from brain, lung, and ovary. *Cancer Res.* **51**, 4131-4134.
3. Cayre, A., F. Penault-Llorca, M. De Latour, C. Rolhion, V. Feillel, J. P. Ferrière, F. Kwiatkowski, F. Finat-Duclos and P. Verrelle. 2002. O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression and prognosis in breast carcinoma. *Int. J. Oncol.* **21**, 1125-1131.
4. Coulondre, C and J. H. Miller. 1977. Genetic studies of the lac repressor IV. Mutagenic specificity in the lacI gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **117**, 577-606.
5. D'Incalci, M., L. Citti, P. Taverna and C. V. Catapano. 1988. Importance of the DNA repair enzyme O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase (AT) in cancer chemotherapy. *Cancer Treat. Rev.* **15**, 279-292.
6. Esteller, M., S. R. Hamilton, P. C. Burger, S. B. Baylin and J. G. Herman. 1999. Inactivation of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res.* **59**, 793-797.
7. Esteller, M and J. G. Herman. 2002. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J. Pathol.* **196**, 1-7.
8. Fornace, A. J., M. A. Papathanasiou, M. C. Hollander and D. B. Yarosh. 1990. Expression of the O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene MGMT in MER⁺ and MER⁻ human tumor cells. *Cancer Res.* **50**, 7908-7911.
9. Furonaka, O., Y. Takeshima, H. Awaya, K. Kushitani, N. Kohno and K. Inai. 2005. Aberrant methylation and loss of expression of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in pulmonary squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *Pathol. Int.* **55**, 303-309.
10. Hayashi, H., T. Yazawa, K. Okudela, J. I. Nagai, T. Ito, M. Kanisawa and H. Kitamura. 2002. Inactivation of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in human lung adenocarcinoma relates to high grade histology and worse prognosis among smokers. *Jpn. J. Cancer Res.* **93**, 184-189.
11. Liu, Y., Q. Lan, J. M. Siegfried, J. D. Luketich and P. Keohavong. 2006. Aberrant promoter methylation of p16 and MGMT gene in lung tumors from smoking and never-smoking lung cancer patients. *Neoplasia* **8**, 46-51.
12. Matsukura, S., K. Miyazaki, H. Yakushiji, A. Ogawa, K. Harimaya, Y. Nakabeppu and M. Sekiguchi. 2001. Expression and prognostic significance of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in hepatocellular, gastric, and breast cancers. *Ann. Surg. Oncol.* **8**, 807-816.
13. Mattern, J., R. Koomagi and M. Volm. 1998. Smoking related increase of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase expression in human lung carcinomas. *Carcinogenesis* **19**, 1247-1250.
14. Oberli-Schrammli, A. E., F. Joncourt, M. Stadler, H. J. Altermatt, K. Buser, H. B. Ris, U. Schmid and T. Cerny. 1994. Parallel assessment of glutathione-based detoxifying enzymes, O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase and P-glycoprotein as indicators of drug resistance in tumor and normal lung of patients with lung cancer. *Int. J. Cancer* **59**, 629-636.
15. Pegg, A. E. 1990. Mammalian O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Res.* **50**, 6119-6129.
16. Preuss, I., S. Haas, U. Eichhorn, I. Eberhagen, M. Kaufmann, T. Beck, R. H. Eibl, P. Dall, T. Bauknecht, J.

- Hengstler, B. M. Wittig, W. Dippold and B. Kaina. 1996. Activity of the DNA repair protein O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in human tumour and corresponding normal tissue. *Cancer Detect. Prev.* **20**, 130-136.
17. Pulling, L. C., K. K. Divine, D. M. Klinge, F. D. Gilliland, T. Kang, A. G. Schwartz, T. J. Bocklage and S. A. Belinsky. 2003. Promoter hypermethylation of the O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene: more common in lung adenocarcinomas from never-smokers than smokers and associated with tumor progression. *Cancer Res.* **63**, 4842-4848.
18. Rolhion, C., F. Penault-Llorca, J. L. Kemeny, F. Kwiatkowski, J. J. Lemaire, P. Chollet, F. Finat-Duclos and P. Verrelle. 1999. O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) expression in human glioblastomas in relation to patient characteristics and p53 accumulation. *Int. J. Cancer* **416**, 416-420.
19. Travis, W. D., E. Brambilla, H. K. Muller-Hermelink and C. C. Harris. 2004. World health organization international histological classification of tumours. Pathology and genetics of tumors of the lung, pleura, thymus and heart. In: Colby TV, Noguchi M, eds. *Adenocarcinoma*. pp. 35-44, 4th eds., Lyon: IARC Press.
20. Wolf, P., Y. C. Hu, K. Doffek, D. Sidransky and S. A. Ahrendt. 2001. O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase promoter hypermethylation shifts the p53 mutational spectrum in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **61**, 8113-8117.