



ORIGINAL ARTICLE

Lung Adenocarcinoma Mutation Hotspot in Koreans: Oncogenic Mutation Potential of the *TP53* P72R Single Nucleotide Polymorphism

Jae Ha BAEK, Kyu Bong CHO

Department of Biomedical Laboratory Science, Shinhan University, Uijeongbu, Korea

한국인의 폐선암 돌연변이 핫스팟: *TP53* P72R Single Nucleotide Polymorphism의 발암성 돌연변이 가능성

백재하, 조규봉

신한대학교 임상병리학과

ARTICLE INFO

Received May 24, 2023
Revised June 11, 2023
Accepted June 15, 2023

Key words

Lung cancer
Mutation hotspot
TP53 P72R Single nucleotide polymorphism

ABSTRACT

This study aimed to identify new markers that cause lung adenocarcinoma by analyzing mutation hotspots for the top five genes with high mutation frequency in lung adenocarcinoma in Koreans by next generation sequencing (NGS) analysis. The association between *TP53* mutation types and patterns with smoking, a major cause of lung cancer, was examined. The clinicopathological characteristics of lung adenocarcinoma patients with *TP53* P72R SNPs were analyzed. In Korean lung adenocarcinoma cases, regardless of the smoking status, the *TP53* P72R SNP was the most frequently occurring mutational hotspot, in which the nucleotide base was transversed from C to G, and the amino acid was substituted from proline to arginine at codon 72 of *TP53*. An analysis of the clinicopathological characteristics of lung adenocarcinoma cases with *TP53* P72R SNP revealed no significant correlation with the patient's age, gender, smoking status, and tumor differentiation, but a significant correlation with low stage (P -value = 0.026). This study confirmed an increase in *TP53* rather than *EGFR*, which was reported as the most frequent mutations in lung adenocarcinoma in Koreans through NGS. Among them, *TP53* P72R SNP is the most frequent regardless of smoking status.

Copyright © 2023 The Korean Society for Clinical Laboratory Science.

서론

비소세포성 폐암(non-small cell lung cancer)은 전체 폐암 중 80%~85%를 차지하며 폐선암과 폐편평상피암 그리고 대세포암으로 구분된다[1]. 2022년에 발표된 중앙암등록본부 자료에 의하면 2020년 우리나라에서 발생한 전체 폐암 중 폐선암

이 50.6%로 가장 많이 발생했다[2].

흡연은 폐암의 주요 원인으로 흡연자는 비흡연자에 비해 폐암에 걸릴 위험이 11배 증가하는 것으로 알려져 있으며 흡연하는 담배 수와 흡연 기간, 흡연 시작 연령과 비례하여 폐암에 걸릴 위험이 증가한다고 보고되었다[1-4]. 종양 억제 유전자인 *TP53*은 P53 단백질을 생산하여 손상된 DNA의 복구, 세포주기 정지, 세포자멸사, 자가포식을 포함하여 많은 생물학적 과정을 통해 유전자를 보호하는 역할을 한다. 하지만 돌연변이를 일으킨 *TP53*은 P53 기능의 비활성화와 P53 기능에 수반되는 경로의 비활성화로 악성 종양으로의 발달과 성장을 유도한다

Corresponding author: Kyu Bong CHO

Department of Biomedical Laboratory Science, Shinhan University, 95 Hoam-ro, Uijeongbu 11644, Korea

E-mail: kbcho@shinhan.ac.kr

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2457-7811>

[5-7]. 흡연에 의해 유발되는 대표적 종양인 폐암에서 *TP53* 유전자 돌연변이는 비소세포성 폐암의 약 50%에서 나타나며 비흡연 환자(8%~47%)보다 흡연 환자(26%~71%)에게서 더욱 빈번하게 발생한다고 보고되었다[5-8]. 특히 *TP53* 유전자 돌연변이는 폐선암 보다 폐편평세포암의 종양 형성에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[7-9]. 지금까지 다양한 연구를 통해 흡연과 관련된 *TP53* 유전자 돌연변이 핫스팟이 발견되었으며 코돈 157, 158, 245, 248, 273 변이와 함께 뉴클레오타이드 염기 G에서 T로의 전환이 특징적인 소견으로 확인되었다[10-12]. 하지만 최근 우리나라의 젊은 여성과 비흡연자에게서 폐선암의 발생은 증가하고 있는 추세이며, 특히 우리나라 여성에서의 폐선암 발생은 흡연과 상관없이 발생하고 있다[1]. 따라서 이러한 추세에 따른 각 환자의 유전자 돌연변이 패턴을 분석하여 표적 치료에 적용하는 환자의 생존율에 도움을 주는 유전자 검사가 반드시 필요하다.

최근 비소세포성 폐암의 발생과 진행에 영향을 미치는 원인에 대한 다양한 분자생물학적 기전의 발견과 유전자 프로파일링 기술이 발전하면서 종양 억제 유전자 또는 종양 유전자의 돌연변이에 대한 연구가 활발하게 진행됨에 따라 폐암을 유발하는 특정 유전자들이 발견되었으며 이를 바탕으로 표적 치료제들이 개발되면서 비소세포성 폐선암 환자의 생존율에 큰 영향을 미치게 되었다[13, 14]. 특히 차세대 염기서열 분석법(next generation sequencing, NGS)은 포르말린 고정 파라핀 포매 조직(formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE)을 이용하여 한 번의 검사로 단일염기변이(single nucleotide variant) 및 복제수변이(copy number variant)등을 동시에 식별하는 것이 가능하며 전체 게놈(whole genome), 전체 엑솜(whole exome) 그리고 표적 디옥시리보핵산(deoxyribonucleic acid, DNA)의 돌연변이 위치와 뉴클레오타이드 염기의 변화와 그에 따른 아미노산의 변화를 확인할 수 있다[13-15].

우리는 선행 연구에서 NGS를 통해 83명의 한국인 폐선암 환자의 최근 유전자 돌연변이를 분석했으며 폐선암을 유발할 수 있는 돌연변이 유전자를 확인했다[16]. 본 연구는 이전 연구 결과를 토대로 폐선암에서 상위 5개 돌연변이 유전자 *TP53*, *EGFR*, *KRAS*, *PIK3CA*, *CDKN2A*의 돌연변이에 대한 핫스팟을 분석하여 폐선암을 유발하는 새로운 표지자를 확인하고자 했으며 가장 많은 돌연변이가 발생한 *TP53* 유전자의 돌연변이 유형과 패턴을 폐암의 주요 원인인 흡연과의 연관성을 분석하여 환자에게 미치는 임상병리학적 특성을 분석하고자 했다.

재료 및 방법

1. 임상검체 및 데이터 수집

2018~2020년 한양대학교병원 내원 환자 중 폐선암으로 진단을 받은 환자 83명을 대상으로 절제 또는 생검 조직을 이용하여 제작된 병리과의 FFPE를 이용했다. 모든 환자는 사전에 진단을 위한 다양한 검사와 유전자 검사를 위해 검사 동의서에서 명한 환자를 대상으로 진료에 사용된 기록을 이용하여 데이터를 수집했으며, 환자의 흡연에 대한 기준은 1년 이상 흡연경험이 있거나 현재까지 흡연하고 있는 사람을 대상으로 분석했다. 모든 환자의 개인정보는 인식할 수 없도록 암호화하여 한양대학교 병원에서 연구윤리 심의위원회의 생명윤리에 대한 승인을 받았다(IRB Approval No. HYUH 2022-03-030-001).

2. 검체의 전처리

FFPE를 10 µm로 자른 염색 안 된 슬라이드와 4 µm로 잘라 hematoxylin and eosin (H&E) 염색 슬라이드를 준비했다. 염색되지 않은 슬라이드는 xylene에서 5분간 방치하여 파라핀을 제거한 후 100% 에틸알코올로 5분간 3회 처리하여 xylene을 제거했다. 이후 공기 중 15분 이상 건조하여 완전히 100% 에틸알코올을 제거하여 검체를 전처리했다. 이후 H&E 슬라이드 상에서 종양 부위를 전처리한 슬라이드와 맞춰 다이아몬드 펜으로 표기했다.

3. DNA 추출

DNA 추출에는 RecoverAll MultiSample RNA/DNA Kit (Thermo Fisher Scientific)를 사용했다. 먼저 digestion buffer 25 µL을 nuclease Free Water 75 µL로 희석하여 각 검체당 100 µL의 digestion buffer를 1.5 mL tube에 준비했다. 4 µL의 digestion buffer를 전처리된 슬라이드 조직에 올려 칼로 굽어 튜브에 넣은 후 protease 4 µL를 넣고 55°C의 Heating block (Thermo Fisher Scientific)에서 1시간 배양하며 15분마다 tapping했다. 이후 다시 Heating block에 90°C에서 15분 간격으로 tapping 하면서 1시간 동안 인큐베이션 한 후에 Isolation Additive를 120 µL 넣어 검체를 준비했다. 준비된 검체를 PureLink column (Thermo Fisher Scientific)으로 옮기고, 10,000 ×g에서 1분간 원심분리했다. column을 새 collection tube에 옮기고 wash buffer 1을 600 µL넣은 후 10,000 ×g에서 1분간 원심분리한 뒤 하층액은 버리고 튜브는 다시 사용했다. 다음으로 Wash buffer 2/3을 500 µL 넣고 10,000 ×g에서 1분간 원심분리한 뒤 하층액은 버리고 튜브는 재사용했으며 다시 14,000 rpm에서 3분간 원심분리한 뒤

column을 새 튜브로 옮겨주었다. 그 후 heating block에서 95°C로 가열된 low TE buffer를 50 µL를 넣고 실온에 3분간 방치한 후 14,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 DNA를 추출했다. 추출한 DNA의 농도 측정은 Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific)로 측정했으며 DNA의 농도가 3.33 ng/µL 이상을 정량이라고 판단했다.

4. RNA 추출

리보핵산(ribonucleic acid, RNA) 추출에는 Recover All Multi Sample RNA/DNA Kit (Thermo Fisher Scientific)를 사용했다. 먼저 digestion buffer 25 µL를 nuclease Free Water 75 µL로 희석하여 각 검체 당 100 µL의 digestion buffer를 1.5 mL tube에 준비했다. 4 µL의 digestion buffer를 전처리된 슬라이드 조직에 올려 칼로 긁어 튜브에 넣고 protease 4 µL를 넣고 55°C의 heating block (Thermo Fisher Scientific)에서 1시간 배양하며 15분마다 tapping했다. 이후 다시 heating block에 90°C에서 15분 간격으로 tapping하면서 1시간 동안 배양한 후 isolation additive를 120 µL 넣어 검체를 준비했다. 준비된 검체를 PureLink column (Thermo Fisher Scientific)으로 옮기고, 10,000 ×g에서 1분간 원심분리(Thermo Fisher Scientific)했다. 걸러진 하층액에 100% 에틸알코올 275 µL를 넣은 후 새로운 PureLink column으로 500 µL를 옮겨 주었다. 그 후 10,000 ×g에서 1분간 원심분리한 후 하층액을 버리고 튜브는 다시 사용했다. 다음으로 wash buffer 1을 600 µL 넣고 10,000 ×g에서 1분간 원심분리한 후 하층액은 버리고 튜브는 다시 사용했다. 다시 12,000 rpm에서 1분간 원심분리한 후 하층액은 버린 뒤 DNase 4 µL에 10X DNase buffer 6 µL와 Nuclease free water 50 µL로 희석된 DNase 60 µL를 넣고 실온에서 30분 방치했다. 그 후 wash buffer 1을 600 µL를 넣고 1분간 방치한 후 10,000 ×g에서 1분간 원심분리한 뒤 하층액은 버리고 튜브는 다시 사용했다. 다음으로 Wash buffer 2/3을 500 µL를 넣고 10,000 ×g에서 1분간 원심분리한 뒤 하층액은 버리고 튜브는 재사용하는 과정을 2회 반복했다. 14,000 rpm에서 3분간 원심분리한 뒤 column을 새 튜브로 옮겨준 후 heating block에서 95°C로 가열된 low Tris-EDTA buffer를 50 µL를 넣고 실온에 3분간 방치한 후 14,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 RNA를 추출했다. 추출된 RNA 농도측정은 Qubit RNA HS assay kit (Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific)로 측정했으며 1.4 ng/µL 이상을 정량이라고 판단했다.

5. cDNA 합성과 cDNA 및 DNA 정량

RNA는 중합효소연쇄반응(polymerase chainreaction, PCR) 방법으로 SuperScript IV VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 상보적 DNA (complementary DNA, cDNA)을 합성했다. 10 ng/µL로 준비된 RNA 검체 4 µL를 증류수(distilled water) 4 µL에 희석한 뒤 SuperScript IV VILO Master Mix를 2 µL 넣어 준비했다. 이후 PCR (Thermo Fisher Scientific) 장비를 이용하여 25°C에서 10분간 프라이머를 결합했다. 이후 50°C에서 10분간 역전사효소를 이용하여 cDNA를 합성한 후 85°C에서 5분간 효소 불활성화 과정을 수행하여 cDNA를 합성했다. 합성한 cDNA는 TaqMan Faster Reagent Starter Kit (Thermo Fisher Scientific)을 사용했으며, 추출한 DNA는 TaqMan RNase P Detection Kit (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 cDNA와 DNA를 실시간 PCR (real-time PCR) 방법으로 50°C에서 2분간 인큐베이션 한 뒤 95°C에서 10분간 효소 활성화 과정을 진행했다. 이후 95°C에서 15초간 변성 과정을 수행한 후 60°C에서 60초간 프라이머를 결합시키는 과정을 거친 뒤 60°C에서 20초간 연장 과정을 수행했다. 이후 변성과 프라이머 결합 그리고 연장 과정을 총 40회 진행하여 cDNA와 DNA를 정량했다. cDNA는 0.1 ng/µL에서 0.01 ng/µL 사이 값을 정량이라 했으며 DNA는 5 ng/µL에서 0.5 ng/µL 사이 값을 정량이라 했다.

6. 차세대 염기서열 분석법(next generation sequencing)

NGS는 Ion S5 XL (Thermo Fisher Scientific) 장비로 sequencing을 수행했다. 그 후 데이터 분석은 Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific)에서 제공하는 torrent mapping alignment program과 torrent variant calling 알고리즘을 이용하여 생물정보학적 분석을 시행했다. 결과 해석에 포함되는 variant calling의 판정 기준은 Table 1과 같으며 탐지할 수

Table 1. Next generation sequencing variant call criteria

Nucleotide variation	Variant call criteria
SNV/INDEL	VAF: ≥5% in SNV 5% in INDEL
CNV	Amplification: avg. CNV ≥4 (gain), <1 (loss)
Translocation (fusion gene)	Read counts: ≥20 Total valid mapped reads: ≥50,000

Variant detection/Interpretation: Ion Reporter V5.6, OncoPrint Reporter. Abbreviations: SNV/INDEL, single nucleotide variation/small insertions, deletion; VAF, variation allele frequency; CNV, copy number variation.

있는 대상 유전자 범위는 Table 2와 같다. 본 연구의 유전자 돌연변이 평가는 세계에서 가장 널리 사용되는 4등급 평가 시스템 (tier system)을 기반으로 했으며, 그중에서도 강력한 임상적 중요성(Tier I)이 있거나 잠재적인 임상적 중요성(Tier II)이 있는 유전자 변이만을 선택하여 적용했다.

7. 통계학적 분석

본 연구에서 통계 분석을 위해 IBM SPSS software version 25.0 (IBM Co.)를 이용했다. 흡연과 *TP53* 돌연변이 패턴의 연관성 확인을 위해 교차분석(Fisher's exact test)을 시행했으며 폐암 환자의 임상병리학적 특징과 *TP53* P72R 단일염기다형성 (single nucleotide polymorphism, SNP)과 연관성을 확인하기 위해 교차분석(Pearson's chi-square or Fisher's exact test)을 시행했다. 유의확률(*P*-value)이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 간주했다.

결 과

1. 폐선암에서 NGS 분석 결과 돌연변이 빈도가 높은 상위 5개 유전자의 돌연변이 핫스팟 분석

이전 연구에서 83명의 한국인 폐선암 환자의 NGS 분석 결과 돌연변이 빈도가 높은 상위 5개 유전자 *TP53* (60%), *EGFR* (48%), *KRAS*(14%), *PIK3CA* (8%), *CDKN2A* (6%)를 확인했다. 돌연변이가 발생한 5개 유전자의 돌연변이 핫스팟을 분석하여 한국인의 폐선암을 유발하는 주요 유전자의 돌연변이 패턴과 새로운 표지자를 확인하고자 했다.

1) 폐선암의 *TP53* 돌연변이 핫스팟

대표적인 종양 억제 유전자인 *TP53*의 경우 폐선암에서 돌연변이 핫스팟은 P53 DNA 결합 도메인(DNA-binding domain, DBD), 잔기(residues) 102-292에 집중되어 나타났으며 과오 돌연변이(missense mutation)가 76%로 가장 많이 발생하는 돌연변이 유형이었다. 하지만 exon 4의 코돈 72 뉴클레오타이드 염기 C가 G로 전환되는 점돌연변이(point mutation)가 발

Table 2. Target gene lists

	Target genes
Hotspot genes	<i>AKT1, AKT2, AKT3, ALK, AR, ARAF, ARID1A, ATM, ATR, ATRX, AXL, BAP1, BRAF, BRCA1, BRCA2, BTK, CBL, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CDK12, CDK2, CDK4, CDK6, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, CHEK1, CHEK2, CREBBP, CSF1R, CTNNA1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERCC2, ESR1, EZH2, FANCA, FANCD2, FANCI, FBXW7, FGF19, FGF3, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT3, FOXL2, GATA2, GNA11, GNAQ, GNAS, H3F3A, HIST1H3B, HNF1A, HRAS, IDH1, IDH2, IGF1R, JAK1, JAK2, JAK3, KDR, KIT, KNSTRN, KRAS, MAGOH, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K4, MAPK1, MAX, MDM2, MDM4, MED12, MET, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MTOR, MYC, MYCL, MYCN, MYD88, NBN, NF1, NF2, NFE2L2, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NRAS, NTRK1, NTRK2, NTRK3, PALB2, PDGFRA, PDGFRB, PIK3CA, PIK3CB, PIK3R1, PMS2, POLE, PPARG, PPP2R1A, PTCH1, PTEN, PTPN11, RAC1, RAD50, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAF1, RB1, RET, RHEB, RHOA, RICTOR, RNF43, ROS1, SETD2, SF3B1, SLX4, SMAD4, SMARCA4, SMARCB1, SMO, SPOP, SRC, STAT3, STK11, TERT, TOP1, TP53, TSC1, TSC2, UAF1, XPO1</i>
Full-length genes (tumor suppressor gene)	<i>ATM, BAP1, BRCA1, BRCA2, CDKN2A, FBXW7, MSH2, NF1, NF2, NOTCH1, PIK3R1, PTCH1, PTEN, RB1, SMARCB1, STK11, TP53, TSC1, TSC2, ARID1A, ATR, ATRX, CDK12, CDKN1B, CDKN2B, CHEK1, CREBBP, FANCA, FANCD2, FANCI, MLH1, MRE11A, MSH6, NBN, NOTCH2, NOTCH3, PALB2, PMS2, POLE, RAD50, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RNF43, SETD2, SLX4, SMARCA4</i>
Copy number genes	<i>ALK, AXL, BRAF, EGFR, ERBB2, ERG, ETV1, ETV4, ETV5, FGFR1, FGFR2, FGFR3, NTRK1, NTRK3, PDGFRA, PPARG, RAF1, R ET, ROS1, AKT2, AR, BRCA1, BRCA2, CDKN2A, ERBB4, ESR1, FGR, FLT3, JAK2, KRAS, MDM4, MET, MYB, MYBL1, NF1, NOTCH1, NOTCH4, NRG1, NTRK2, NUTM1, PDGFRB, PIK3CA, PRKACA, PRKACB, PTEN, RAD51B, RB1, RELA, RSPO2, RSPO3, TERT</i>
Fusion driver genes	<i>ALK, AXL, BRAF, EGFR, ERBB2, ERG, ETV1, ETV4, ETV5, FGFR1, FGFR2, FGFR3, NTRK1, NTRK3, PDGFRA, PPARG, RAF1, R ET, ROS1, AKT2, AR, BRCA1, BRCA2, CDKN2A, ERBB4, ESR1, FGR, FLT3, JAK2, KRAS, MDM4, MET, MYB, MYBL1, NF1, NOTCH1, NOTCH4, NRG1, NTRK2, NUTM1, PDGFRB, PIK3CA, PRKACA, PRKACB, PTEN, RAD51B, RB1, RELA, RSPO2, RSPO3, TERT</i>

Target gene sequencing: ion torrent S5 (540 chip kit). Variant detection, interpretation: ion reporter V5.6, oncomine reporter; Reference sequence: GRCh37/hg19.

생하여 아미노산이 proline에서 arginine으로 치환되는 P72R SNP의 발생 빈도가 가장 높았다(56%). 그 뒤를 이어 코돈 273 (10%)과 코돈 282 (6%) 순으로 발생 빈도가 높았다(Figure 1).

2) 폐선암의 EGFR 돌연변이 핫스팟

EGFR 돌연변이 핫스팟은 tyrosine kinase 영역에서 집중되어 발생했다. 그 중 EGFR exon 21에서 뉴클레오타이드 염기 T에서 G로 전환되는 점돌연변이가 발생하여 아미노산 leucine이 arginine으로 치환되는 L858R 과오돌연변이(37%)가 가장

많았으며 exon 19에서 코돈 746 glutamic acid에서 750 alanine까지 결손이 발생하는 E746_A750del (30%)이 두 번째로 많이 나타났다. 또한 exon 20, 코돈 790에서 Threonine이 methionine으로 치환되는 T790M EGFR 돌연변이가 확인되었다(Figure 2).

3) 폐선암의 KRAS 돌연변이 핫스팟

한국인의 KRAS 돌연변이는 폐선암에서 코돈 12에 집중되어 나타났으며 코돈 13, 61에서도 확인되었다. 그 중 코돈 12

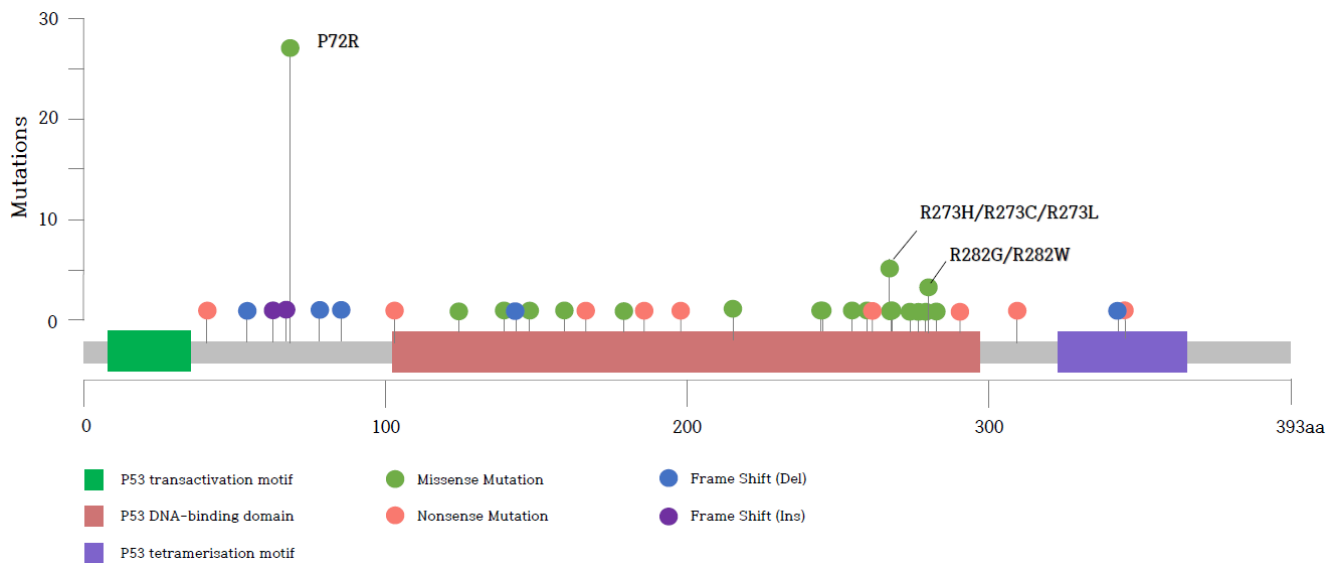


Figure 1. TP53 mutation hotspots in lung adenocarcinoma. side bar shows the number of mutations. the lower bar shows residues of TP53. Abbreviations: P72R, codon 72 proline→arginine; R273H, codon 273 arginine→histidine; R273C, codon 273 arginine→cysteine; R273L, codon 273 arginine→leucine; R282G, codon 282 arginine→glycine; R282W, codon 282 arginine→tryptophan.

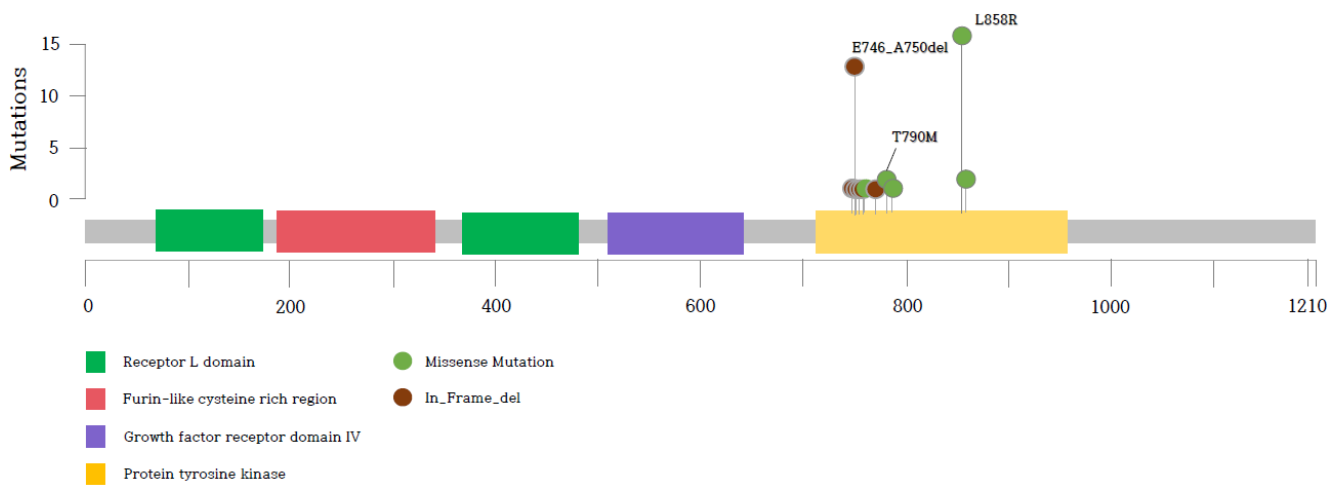


Figure 2. EGFR mutation hotspots in lung adenocarcinoma. side bar shows the number of mutations. the lower bar shows residues of EGFR. Abbreviations: L858R, codon 858 leucine→arginine; E746_A750del, deletion from codons 746 glutamic acid to 750 alanine in exon 19; T790M, codon 790 threonine→methionine.

glycine이 cysteine으로 치환되는 G12C 과오돌연변이(58.3%)가 가장 빈번하게 나타난 것을 확인했다(Figure 3).

4) 폐선암의 *PIK3CA* 돌연변이 핫스팟

한국인의 폐선암에서 *PIK3CA* 유전자 돌연변이는 N345L, E418K, E542K, E545K, E546K, H1047R가 발생했으며 엑손9 (Helical domain)에서 발생하는 과오돌연변이 빈도가 가장 빈번했다. 그중에서도 코돈 545에서 glutamic acid가

lysine으로 치환되는 E545K (28.5%)의 빈도가 가장 높은 것으로 확인되었다(Figure 4).

5) *CDKN2A* 돌연변이 핫스팟

폐선암에서 *CDKN2A* 돌연변이 핫스팟은 P48fs, R58Ter, L63P, H66R, L78fs로 각 1건씩 발생했으며 exon 2 (4건, 80%)에 집중되어 발생했다(Figure 5).

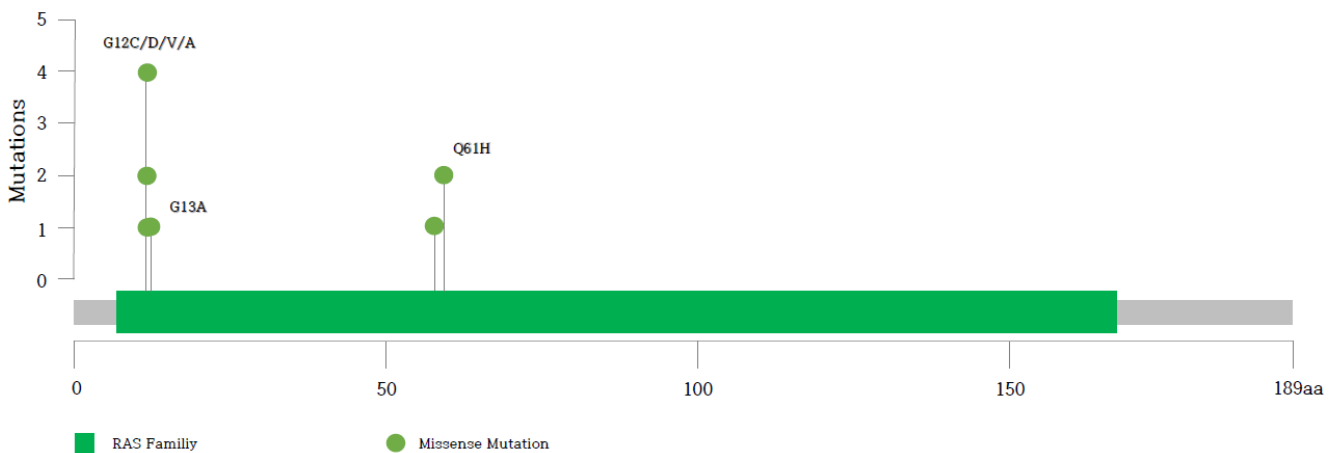


Figure 3. *KRAS* mutation hotspots in lung adenocarcinoma. side bar shows the number of mutations. The lower bar shows residues of *KRAS*. Abbreviations: G12C, codon 12 glycine→cysteine; G12D, codon 12 glycine→aspartic acid; G12V, codon 12 glycine→valine; Q61H, codon 61 glutamine→histidine; G13A, codon 13 glycine→alanine.

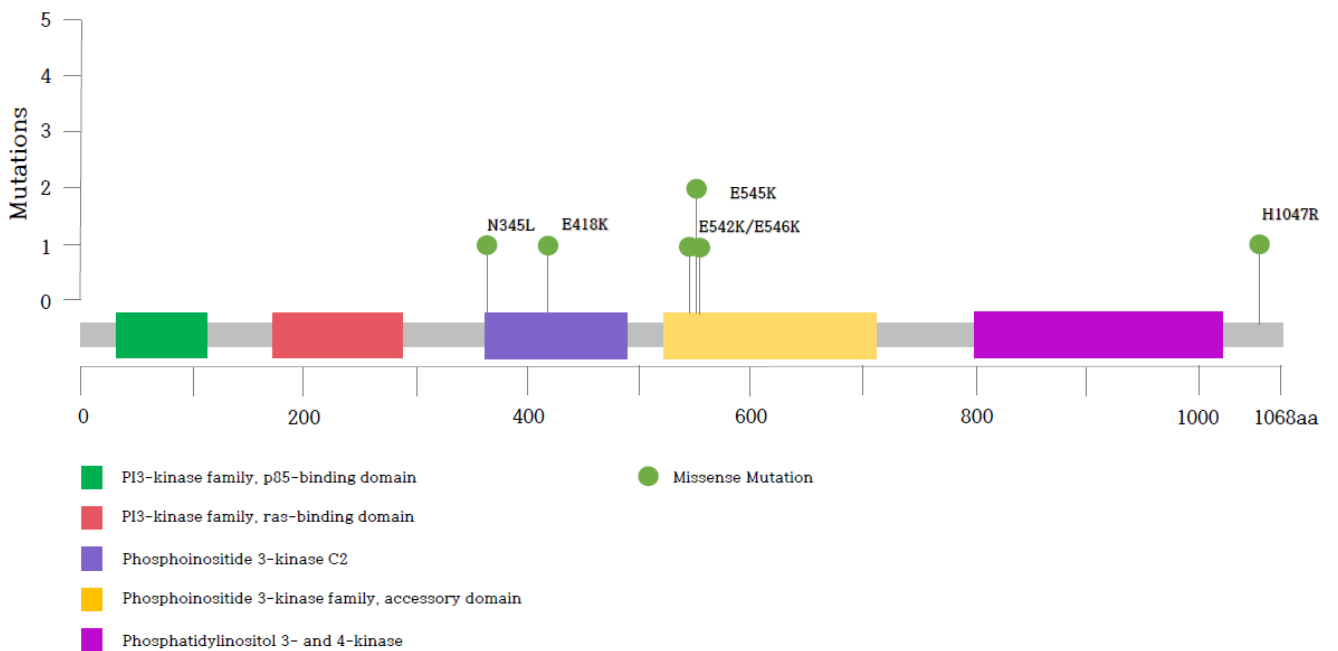


Figure 4. *PIK3CA* mutation hotspots in lung adenocarcinoma. side bar shows the number of mutations. The lower bar shows residues of *PIK3CA*. Abbreviations: E545K, codon 545 glutamic acid→lysine; E542K, codon 542 glutamic acid→lysine; E546K, codon 546 glutamic acid→lysine; N345L, codon 345 asparagine→leucine; E418K, codon 418 glutamic acid→lysine; H1047R, codon 1047 histidine→arginine.

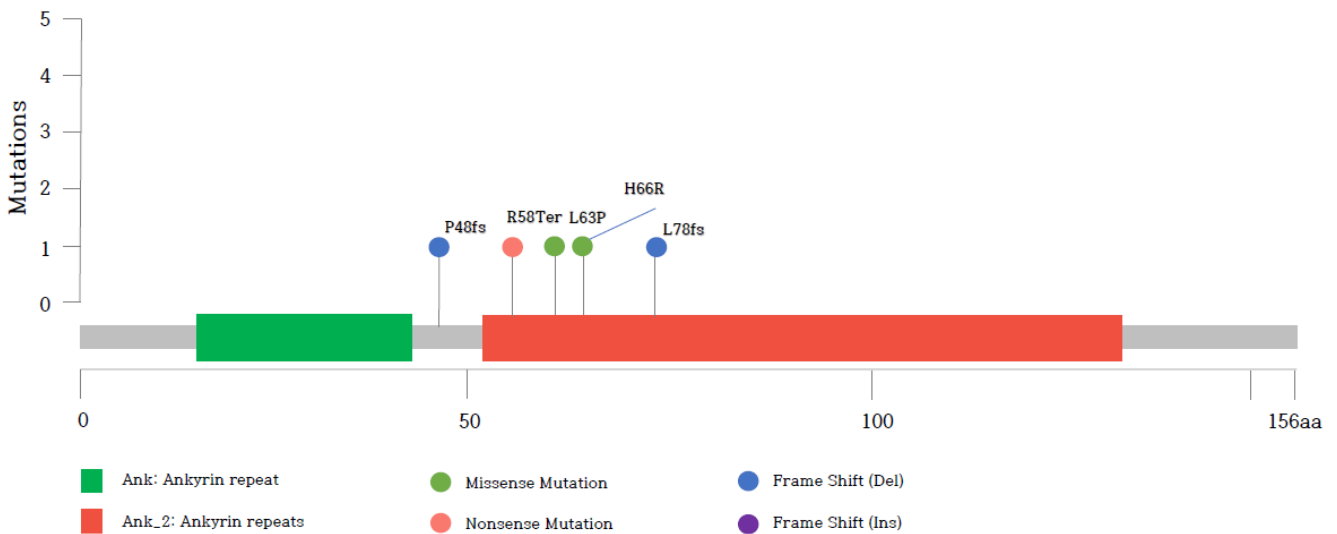


Figure 5. *CDKN2A* mutation hotspots in lung adenocarcinoma. side bar shows the number of mutations. The lower bar shows residues of *CDKN2A*. Abbreviations: P48fs, frame shift due to deletion at codon 48 proline; L78fs, Frame shift due to deletion at codon 78 leucine; R58Ter, termination at codon 58 arginine; L63P, codon 63 leucine→proline; H66R, codon 66 histidine→arginine.

Table 3. Baseline characteristics of lung adenocarcinoma patients with TP53 amino acid nucleotide changes

Characteristics	Analytic patient (N=50)
Age (yr)	66.7 (40~89)
Sex	
Male	20 (40.0)
Female	30 (60.0)
Smoking	
Male	
Former and current	19 (95.0)
Never	1 (5.0)
Female	
Former and current	1 (3.3)
Never	29 (96.7)

Median (range) or N (%).

2. TP53 돌연변이가 발생한 폐선암 환자의 임상특성

폐선암에서 가장 많은 돌연변이와 폐암 발생의 주요 원인인 흡연과 연관성이 높은 것으로 알려진 TP53 돌연변이가 발생한 폐선암 환자의 임상특성을 분석했다. 폐선암 환자 50명이 포함되었으며 그중 남성이 20명(40%)이었으며 흡연자는 19명(95.0%), 비흡연자는 1명(5.0%)으로 확인되었다. 여성은 모두 30명(60.0%)이었으며 그중 흡연자 1명(3.3%), 비흡연자는 29명(96.7%)으로 확인되었다. 폐선암에서의 TP53 돌연변이는 흡연자(40.0%)보다 비흡연자(60.0%)에서 많이 발생했다 (Table 3).

Table 4. TP53 mutation types in TP53 mutant lung adenocarcinoma

Types of mutation	TP53 mutation	
	Smoker (N=19*)	Never smoker (N=30)
Transversions	12 (63.2)	16 (53.3)
Deletions	1 (5.3)	3 (10.0)
Transitions	3 (15.8)	5 (16.7)
Transversions + deletions	2 (10.5)	1 (3.3)
Deletions + transitions	0 (0.0)	1 (3.3)
Transversions + transitions	0 (0.0)	4 (13.3)
Transversions + deletions + transitions	1 (5.3)	0 (0.0)

N (%).

*Missed case.

3. 폐선암에서 흡연에 따른 TP53 유전자의 점돌연변이 유형 분석

TP53 돌연변이를 보이는 폐선암 증례에서 흡연에 따른 점돌연변이의 종류를 확인했다. 흡연자에서 전환(transversion, 63.2%)의 비율이 가장 높았으며 그 뒤를 이어 전이(transition, 15.8%), 전환과 결실(transversion + deletion, 10.5%)이 동시에 발생한 경우와 결실(deletion, 5.3%)순으로 발생했다. 비흡연자도 전환(53.3%)이 가장 발생 비율이 높았으며 그 뒤를 이어 전이(16.7%), 전환과 전이의 동시 발생(13.3%), 결실(10.0%) 순으로 발생했다. 한국인의 폐선암에서 전환 혹은 결실이 전이보다 더 흔하게 나타났다(Table 4). 흡연과 TP53의 돌연변이 유형과의 상관관계를 확인하기 위해 데이터 분석결과 전환 또는 결실이 전이보다 발생 빈도는 높았으나 통계적으로 유의하지 않

Table 5. Association between smoking and TP53 mutation types in TP53 mutant lung adenocarcinoma

Variable	TP53 mutation		P-value
	Transversions or deletions / transversion + deletions	Transitions	
Smoking	15 (83.3)	3 (16.7)	>0.999*
Non-smoking	20 (80.0)	5 (20.0)	

N (%).
*Fisher's exact test.

Table 6. Patterns of TP53 base transversion in TP53 mutant lung adenocarcinoma

Patterns of transversions	TP53 mutation	
	Smoker (N=15)	Never smoker (N=21)
G>T	2 (13.3)	1 (4.8)
T>G	0 (0.0)	0 (0.0)
G>C	0 (0.0)	0 (0.0)
C>G	10 (66.7)	18 (85.7)
A>C	1 (6.7)	0 (0.0)
C>A	0 (0.0)	0 (0.0)
A>T	0 (0.0)	0(0.0)
G>T + C>G	1 (6.7)	1 (4.8)
G>T + C>A	1 (6.7)	0 (0.0)
G>C + C>G	0 (0.0)	1 (4.8)

N (%).
Abbreviations: G, Guanine; T, Thymine; C, Cytosine; A, Adenine.

았다($P>0.999$) (Table 5).

폐선암 증례에서 가장 많은 점돌연변이 유형인 전환의 염기 서열 변화를 분석했으며 흡연의 여부와 관계없이 코돈 72번 C에서 G로의 염기 전환이 가장 흔하게 발생했다(Table 6).

4. TP53 P72R SNP가 발생하는 환자의 임상병리학적 특성

본연구에서 TP53 돌연변이 빈도가 가장 높은 TP53 P72R SNP가 나타나는 환자의 임상병리학적 특성을 분석했다. 폐선암에서 TP53 P72R SNP가 확인된 환자는 전체 83명 중 27명이었으며 발생하지 않은 환자는 56명이었다.

TP53 P72R SNP의 발생은 낮은 병기의 폐선암 환자에서 더 자주 확인되었지만($P=0.026$) 환자의 연령, 성별, 흡연의 유무 그리고 종양의 분화도와 유의한 상관관계를 보이지 않았다 (Table 7).

Table 7. Clinicopathological characteristics of patients with TP53 P72R SNP in lung adenocarcinoma

Variables	P72R (c.215C>G)		P-value
	Not identified (N=56)	Present (N=27)	
Age (yr)			0.108*
<60	15 (55.6)	12 (44.4)	
≥60	41 (73.2)	15 (26.8)	
Sex			0.657*
Female	36 (69.2)	16 (30.8)	
Male	20 (64.5)	11 (35.5)	
Smoking			0.976*
Never	35 (67.3)	17 (32.7)	
Former and current	21 (67.7)	10 (32.3)	
Differentiation [†]			0.405*
Well	3 (50.0)	3 (50.0)	
Moderately or poorly	33 (67.3)	16 (32.7)	
Stage [‡]			0.026*
I, II	26 (56.5)	20 (43.5)	
III, IV	28 (80.8)	7 (20.0)	

N (%).
Abbreviations: P72R, codon 72 amino acid proline to arginine substitution; SNP, single nucleotide polymorphism.
*Fisher's exact test. [†]Differentiation, 28 cases missed. [‡]Stage, 2 cases missed.

고 찰

NGS 분석을 통해 폐선암에서 돌연변이 유전자를 탐지하는 것은 돌연변이 유전자에 대한 표적치료를 가능하게 한다[13, 14]. 또한, 폐선암과 관련된 아직 알려지지 않은 새로운 타겟 유전자를 탐지하고 분석한다면 새로운 표적 치료제의 개발과 폐선암 환자의 생존율 증가로 이어질 수 있다.

본연구는 NGS 분석을 이용하여 최근 한국인의 폐선암에서 돌연변이 발생 빈도가 높은 상위 5개 유전자에 대한 돌연변이 핫스팟을 분석하여 폐암을 유발하는 가장 대표적인 원인인 흡연과 돌연변이 유전자와의 연관성 및 돌연변이 패턴을 확인하고 아직 발견되지 않은 한국인의 폐선암과 관련된 새로운 표지자를 확인하고자 했다.

선행 연구에서 NGS 분석을 통해 한국인의 폐선암에서의 돌연변이 빈도가 높은 상위 5개 유전자 TP53 (60%), EGFR (48%), KRAS(14%), PIK3CA(8%), CDKN2A(6%)를 확인했으며 이들을 대상으로 돌연변이 핫스팟을 분석했다[16]. 한국인의 폐선암을 유발하는 상위 5개 유전자 돌연변이의 핫스팟을 분석한 결과 EGFR, KRAS, PIK3CA, CDKN2A의 돌연변이 핫스팟은 이전에 보고된 결과와 일치하는 것으로 확인되었지만 TP53의 경우 약간의 다른 결과를 나타냈다[17-27].

*TP53*은 대표적인 종양 억제 유전자로 손상된 DNA의 수선과 세포사멸 및 세포주기 정지에 관여한다. *TP53* 돌연변이의 약 95%가 DBD에서 발생하며, DBD의 돌연변이는 단백질이 타겟 DNA 염기서열에 결합하는 능력을 억제하고, 이 유전자들의 전사 활성화를 막아 P53의 기능이 억제된다. 이러한 결과는 세포의 증식을 효과적으로 조절할 수 없으며, 세포 안에 DNA 손상이 축적되어 결국 종양을 성장하게 한다[28]. 따라서 본 연구의 *TP53* 돌연변이의 증가는 한국인 폐선암의 원인이 될 수 있으며 특히 *TP53* 핫스팟 분석결과 코돈 72에서의 가장 많은 돌연변이 발생 빈도는 한국인 폐선암에서 새로운 바이오마커로서 가능성이 있다고 사료된다.

흡연과 관련된 폐암 환자는 비흡연 환자보다 *TP53* 돌연변이의 빈도가 더 높은 것으로 보고되고 있다[9, 12, 28]. 본 연구의 NGS 결과는 폐선암에서 *TP53* 돌연변이가 가장 많이 발생했으며 한국인의 폐선암 증례에서 흡연과 *TP53* 돌연변이와의 연관성을 확인하기 위해 *TP53* 돌연변이가 발생한 폐선암 환자의 임상특성을 분석한 결과 남성보다 여성에게 많이 발생했으며 흡연자보다 비흡연자에게 많이 발생하여 기존 연구와 다른 결과를 나타냈다. 폐선암이 있는 비흡연 여성의 *TP53* 돌연변이는 주로 전이(83%)로 나타나는 반면 흡연자의 *TP53* 돌연변이는 주로 전환(60%)과 결실(20%)이었으며 전환과 결실의 발생 비율이 전이보다 높다고 보고되었다[7]. 본 연구의 폐선암 증례에서 흡연에 따른 점돌연변이 유형을 분석한 결과 비흡연자의 경우도 전환의 발생률이 가장 높아 이전 연구의 결과와 다르다는 것을 확인했으며 통계학적 분석의 결과 *TP53* 돌연변이 유형과 흡연의 유의미한 상관관계를 나타내지 않았다(P -value > 0.999). 하지만 표본에 대한 변수가 적어 정확한 결과를 얻기가 어려웠을 것이라 사료된다.

또한, 흡연과 관련 있는 *TP53* 돌연변이 핫스팟은 코돈 157, 158, 245, 248, 273으로 알려져있다. 게다가 *TP53* 유전자에서 흡연과 관련된 유전자 핫스팟을 발견했으며 뉴클레오타이드 염기 G:C에서 T:A 전환(G→T transversion)이 가장 특징적인 소견이었다[29, 30]. 반면에 비흡연자의 폐암 조직에서 *TP53* 유전자의 G→T 전환 발생은 흡연자의 폐암 조직보다 현저하게 낮게 나타난다고 보고되었다[31-33]. 하지만 한국인의 폐선암 증례에서 흡연 여부와 상관없이 *TP53* 코돈 72 뉴클레오타이드 염기가 C에서 G로 전환되어 아미노산이 proline에서 arginine으로 치환되는 *TP53* P72R SNP 발생 비율이 가장 높게 나타나 기존 보고와 다른 결과를 나타냈다. 이러한 결과는 한국인의 폐선암에서 *TP53* P72R SNP가 흡연이 아닌 다른 원인에 의해서 발생한다는 것이라고 사료된다.

유전자의 염기서열에 영향을 미치는 다형성은 단백질의 기능을 변경할 수 있는 암 유전자로서 관련이 있다고 알려져 있으며 *TP53*의 SNP는 폐암을 포함하여 다양한 유형의 암 위험의 증가와 관련이 있다고 보고되었으며 특히 돌연변이 *TP53* 유전자에 의해 발현된 돌연변이 단백질인 P53이 세포 내에서 높은 농도로 존재하면서 혈관 생성, 이동, 침윤 전이, 세포사멸에 대한 저항성, 세포주기에 관여하여 암을 발생시키는데 기여하는 것으로 확인되는 돌연변이 P53 단백질의 기능획득(gain-of-function)을 보고했다[34-37]. 2011년 한국인을 대상으로 진행된 연구에 의하면 *TP53* 코돈 72 SNP가 연령, 성별, 흡연, 유전자형과 관계없이 폐암의 발생을 증가시키며 특히 남성의 소세포성폐암과, 폐편평상피암의 발생 위험을 증가시키는데 관련이 있다고 보고했다[38]. 하지만 본 연구에서는 폐선암에서 *TP53* 돌연변이가 가장 많이 발생했으며 특히 *TP53* P72R SNP가 가장 높은 비율로 나타났다. 지금까지 연구된 한국인의 폐선암의 주요 돌연변이는 *EGFR*가 가장 많은 것으로 알려졌으나 본 연구의 이러한 결과는 한국인 폐선암의 발생 원인이 *EGFR*에서 *TP53*으로 이동하고 있을 가능성이 있으며 그중에서도 *TP53* P72R SNP가 중요한 원인이라고 사료된다.

다른 한편으로 *TP53* 핫스팟 돌연변이의 발암 효과가 P72 SNP에 의해 억제된다는 연구 결과를 보고했다. 특히 3개의 핫스팟 과돌연변이인 R248W, R248Q, R273H를 폐암 세포주인 H1299에 형질 도입하여 P72 또는 R72 SNP가 암세포에 미치는 영향을 평가했으며, P72 SNP를 갖는 핫스팟 돌연변이가 암세포의 성장을 억제한다는 결과를 얻었다. 반면에 R72 SNP를 갖는 동일한 돌연변이체는 종양을 촉진하는 역할을 제한했다[39]. 따라서 본 연구의 *TP53* P72R SNP가 발생한 증례들의 임상병리학적 특성을 분석한 결과 폐선암에서 *TP53* P72R SNP의 발생이 환자의 연령, 성별, 흡연 유무 그리고 종양의 분화도와 유의한 상관관계를 보이지 않았지만 낮은 병기와 유의한 상관관계를 나타냈다(P -value=0.026). 이러한 결과는 *TP53* P72R SNP가 환자의 연령이나 성별, 흡연 여부와 상관없이 발생할 가능성이 있으며 또한, 비소세포성 폐암을 유발하는 주요한 원인이지만 폐선암에서 종양의 성장을 억제하여 종양의 이동과 전이의 속도를 더디게 하는데 연관이 있다고 사료된다.

최근 연구된 결과에 의하면 암조직뿐만 아니라 정상조직에서의 유전자 돌연변이는 노화에 따라 증가한다고 보고되고 있다. 특히 NGS의 발전을 토대로 암이 없는 개인의 정상조직에서 노화와 함께 체세포 돌연변이가 축적되며, 염증이나 전암병변성 조직에서 증가된다는 것이 점점 더 분명해지고 있다[40]. 이러한 보고는 노화에 따른 유전자 돌연변이의 축적이 폐암 발달의

가능성을 증가시킨다. 하지만 본 연구에서 *TP53* 돌연변이가 발생한 폐선암 증례의 임상병리학적 특성을 분석한 결과 연령과 유의한 상관관계를 나타내지 않았다(P -value=0.108).

다양한 위험 환경에 노출과 노화로 인한 *TP53* 돌연변이의 발생 원인과 그중에서도 *TP53* P72R SNP가 한국인의 폐선암에서 종양 형성에 기여 여부는 아직 알 수 없다. 따라서 폐선암의 종양 형성 여부와 치료와 예후를 결정하는데 있어 *TP53* P72R SNP는 활용할 만한 가치가 있으며 심도 있는 연구가 지속적으로 필요하다.

하지만 본 연구에서는 폐선암에서 *TP53* P72R SNP가 발생한 비흡연 환자의 간접흡연에 대한 영향을 충분히 반영하지 못했다. 따라서 *TP53* P72R SNP가 발생한 한국인 폐선암에서 간접흡연이 미치는 영향에 대한 분석을 추가로 수행하여 *TP53* P72R SNP가 종양 형성에 대한 기여 여부를 확인해야 할 것이라고 사료된다.

결론적으로 NGS를 이용한 폐선암 환자의 돌연변이 유전자 분석은 점돌연변이나, 염기의 삽입, 결실, 융합, 전위, 복제수변이 등 돌연변이 유형뿐만 아니라 돌연변이 핫스팟을 동시에 분석하는 것이 가능하다. 또한, 흡연 여부와 상관없이 NGS 검사를 시행하여 동반진단을 통한 폐선암 환자의 표적 치료를 가능하게 하여 생존율을 높일 수 있다. 게다가 NGS를 통해 한국인의 폐선암에서 돌연변이 발생 빈도가 가장 많이 보고되었던 *EGFR*이 아닌 *TP53*의 증가를 확인했고 그중에서도 *TP53* P72R SNP의 발생 빈도가 가장 높음을 보고하는 바이다. 이처럼 NGS는 아직 알려지지 않은 새로운 표지자를 확인하는데 매우 유용할 것으로 사료된다. 하지만 *TP53* 돌연변이를 유발하는 다양한 원인과 *TP53* P72R SNP이 종양 형성에 기여 및 비소세포성 폐암에서의 역할에 대한 더 많은 증례를 포함한 비교 연구가 필요하다.

요약

이전 연구에서 83명의 한국인 폐선암 환자의 차세대 염기서열 분석법(next generation sequencing, NGS) 분석 결과 돌연변이 빈도가 높은 상위 5개 유전자 *TP53*(60%), *EGFR*(48%), *KRAS*(14%), *PIK3CA*(8%), *CDKN2A*(6%)를 확인했다. 본 연구는 NGS 분석을 이용하여 최근 한국인의 폐선암에서 돌연변이 발생 빈도가 높은 상위 5개 유전자에 대한 돌연변이 핫스팟을 분석하여 폐선암을 유발하는 새로운 표지자를 확인하고자 했으며 가장 많은 돌연변이가 발생한 *TP53* 유전자의 돌연변이 유형과 패턴을 폐암의 주요 원인인 흡연과의 연관성을 분석했으며 *TP53* P72R SNP가 발생한 폐선암 환자의 임상병리학적 특성을 분석하고자 했다.

TP53, *EGFR*, *KRAS*, *PIK3CA*, *CDKN2A*의 돌연변이 핫스

팟을 분석한 결과 이전에 보고된 결과와 일치했으나 *TP53*의 경우 약간의 차이를 나타냈다. *TP53* 돌연변이 핫스팟은 DBD에 집중하여 발생하는 점은 기존 연구 결과와 같았으나 코돈 72에서 발생하는 높은 돌연변이 빈도는 이전에 보고된 연구 결과와 다르게 나타났다. *TP53* 돌연변이가 발생한 폐선암 환자의 임상 특성을 분석한 결과 남성보다 여성, 흡연자보다 비흡연자에게 더 많이 발생했다. 또한, *TP53* 돌연변이 유형은 흡연 여부와 상관없이 전환의 비율이 가장 높았으며 전환 또는 결실 그리고 전환과 결실이 동시에 발생하는 비율이 전이의 발생 비율보다 높게 나타났다. 한국인의 폐선암 증례에서 흡연 여부와 상관없이 가장 발생 빈도가 높은 돌연변이 핫스팟은 *TP53* 코돈 72 뉴클레오타이드 염기가 C에서 G로의 전환되어 아미노산이 proline에서 arginine으로 치환되는 *TP53* P72R SNP 발생 비율이 가장 높게 나타났다. *TP53* P72R SNP가 발생한 폐선암 증례들의 임상병리학적 특성을 분석한 결과 환자의 연령, 성별, 흡연 유무 그리고 종양의 분화도와 유의한 상관관계를 보이지 않았지만 낮은 병기와 유의한 상관관계를 나타냈다(P -value=0.026).

본 연구는 NGS를 통해 한국인의 폐선암에서 돌연변이 발생 빈도가 가장 많이 보고되었던 *EGFR*이 아닌 *TP53*의 증가를 확인했고 그중에서도 흡연 여부와 관계없이 *TP53* P72R SNP의 발생 빈도가 가장 높음을 보고하는 바이다.

Funding: None

Acknowledgements: This article is a condensed form of the first author's doctoral thesis.

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Baek JH, Graduate student; Jo KB, Professor.

Author Contributions

- Conceptualization: Baek JH, Cho KB.
- Data curation: Baek JH.
- Formal analysis: Baek JH.
- Methodology: Baek JH, Cho KB.
- Validation: Baek JH, Cho KB.
- Investigation: Baek JH.
- Writing - original draft: Baek JH, Cho KB.
- Writing - review & editing: Baek JH, Cho KB.

Ethics approval

All procedures were performed in accordance with protocols approved by Hanyang University Hospital Institutional Review Board (HYUH 2022-03-030-001).

REFERENCES

- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71:209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- National Cancer Center. Annual report of cancer statistics in Korea, 2019 [Internet]. Goyang: National Cancer Center; [cited 2023 May 22]. Available from: <https://www.ncc.re.kr/cancerStatsView.ncc?bbsnum=598&searchKey=total&searchValue=&pageNum=1>
- Union for International Cancer Control (UICC). Global cancer data: GLOBOCAN 2018 [Internet]. Geneva: UICC; [cited 2023 May 22]. Available from: <https://www.uicc.org/news/global-cancer-data-globocan-2018>
- International Agency for Research on Cancer (IARC). Lung Cancer Awareness Month 2022 [Internet]. Lyon: IARC; [cited 2023 May 22]. Available from: <https://www.iarc.who.int/news-events/lung-cancer-awareness-month-2022/>
- Toufekchian E, Toledo F. The guardian of the genome revisited: p53 downregulates genes required for telomere maintenance, DNA repair, and centromere structure. *Cancers (Basel).* 2018;10:135. <https://doi.org/10.3390/cancers10050135>
- Sabapathy K, Lane DP. Therapeutic targeting of p53: all mutants are equal, but some mutants are more equal than others. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15:13-30. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.151>
- Mogi A, Kuwano H. TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:583929. <https://doi.org/10.1155/2011/583929>
- Hecht SS. Progress and challenges in selected areas of tobacco carcinogenesis. *Chem Res Toxicol.* 2008;21:160-171. <https://doi.org/10.1021/tx7002068>
- Bennett WP, Alavanja MC, Blomeke B, Vähäkangas KH, Castrén K, Welsh JA, et al. Environmental tobacco smoke, genetic susceptibility, and risk of lung cancer in never-smoking women. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91:2009-2014. <https://doi.org/10.1093/jnci/91.23.2009>
- Hainaut P, Pfeifer GP. Patterns of p53 G→T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke. *Carcinogenesis.* 2001;22:367-374. <https://doi.org/10.1093/carcin/22.3.367>
- Baugh EH, Ke H, Levine AJ, Bonneau RA, Chan CS. Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers? *Cell Death Differ.* 2018;25:154-160. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.180>
- Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene.* 2002;21:7435-7451. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205803>
- Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran WJ Jr, Wu YL, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet.* 2017;389:299-311. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30958-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30958-8)
- Chan BA, Hughes BG. Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future. *Transl Lung Cancer Res.* 2015;4:36-54. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2014.05.01>
- Al-Ahmedi A, Ardeshir-Larijani F, Fu P, Cao S, Lipka MB, Dowlati A, et al. Next generation sequencing of advanced non-small cell lung cancer: utilization based on race and impact on survival. *Clin Lung Cancer.* 2021;22:16-22.e1. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2020.08.004>
- Baek JH, Cho KB. Lung adenocarcinoma gene mutation in Koreans: detection using next generation sequence analysis technique and analysis of concordance with existing genetic test methods. *Korean J Clin Lab Sci.* 2023;55:16-28. <https://doi.org/10.15324/kjcls.2023.55.1.16>
- Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature.* 2014;511:543-550. <https://doi.org/10.1038/nature13385> Erratum in: *Nature.* 2014;514:262. Erratum in: *Nature.* 2018;559:E12.
- Jiang R, Zhang B, Teng X, Hu P, Xu S, Zheng Z. Validating a targeted next-generation sequencing assay and profiling somatic variants in Chinese non-small cell lung cancer patients. *Sci Rep.* 2020;10:2070. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58819-5>
- Kosaka T, Yatabe Y, Onozato R, Kuwano H, Mitsudomi T. Prognostic implication of EGFR, KRAS, and TP53 gene mutations in a large cohort of Japanese patients with surgically treated lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2009;4:22-29. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181914111>
- Kenmotsu H, Koh Y, Serizawa M, Isaka M, Maniwa T, Murakami H, et al. Abstract 1537: prospective mutational characterization of Japanese patients with non-small cell lung cancer by next-generation sequencing. *Cancer Res.* 2014;74(Suppl 19):1537. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2014-1537>
- Chun YJ, Choi JW, Hong MH, Jung D, Son H, Cho EK, et al. Molecular characterization of lung adenocarcinoma from Korean patients using next generation sequencing. *PLoS One.* 2019;14:e0224379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224379>
- Shi Y, Au JS, Thongprasert S, Srinivasan S, Tsai CM, Khoa MT, et al. A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER). *J Thorac Oncol.* 2014;9:154-162. <https://doi.org/10.1097/JTO.000000000000033>
- Suda K, Onozato R, Yatabe Y, Mitsudomi T. EGFR T790M mutation: a double role in lung cancer cell survival? *J Thorac Oncol.* 2009;4:1-4. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181913c9f>
- Riely GJ, Marks J, Pao W. KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Proc Am Thorac Soc.* 2009;6:201-205. <https://doi.org/10.1513/pats.200809-107LC>
- Samuels Y, Velculescu VE. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle.* 2004;3:1221-1224. <https://doi.org/10.4161/cc.3.10.1164>
- Kang S, Bader AG, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:802-807. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408864102>
- Tam KW, Zhang W, Soh J, Stastny V, Chen M, Sun H, et al. CDKN2A/p16 inactivation mechanisms and their relationship to smoke exposure and molecular features in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2013;8:1378-1388. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3182a46c0c>
- Larsen S, Yokochi T, Isogai E, Nakamura Y, Ozaki T, Nakagawara A. LMO3 interacts with p53 and inhibits its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;392:252-257. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.010>

29. Levine AJ, Ting DT, Greenbaum BD. P53 and the defenses against genome instability caused by transposons and repetitive elements. *Bioessays*. 2016;38:508-513. <https://doi.org/10.1002/bies.201600031>
30. Wylie A, Jones AE, D'Brot A, Lu WJ, Kurtz P, Moran JV, et al. p53 genes function to restrain mobile elements. *Genes Dev*. 2016;30:64-77. <https://doi.org/10.1101/gad.266098.115>
31. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*. 1991;51(23 Pt 1):6304-6311.
32. Kasthuber ER, Lowe SW. Putting p53 in context. *Cell*. 2017;170:1062-1078. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028>
33. Nikulenkov F, Spinnler C, Li H, Tonelli C, Shi Y, Turunen M, et al. Insights into p53 transcriptional function via genome-wide chromatin occupancy and gene expression analysis. *Cell Death Differ*. 2012;19:1992-2002. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.89>
34. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol*. 1999;19:1092-1100. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.2.1092>
35. Boltze C, Roessner A, Landt O, Szibor R, Peters B, Schneider-Stock R. Homozygous proline at codon 72 of p53 as a potential risk factor favoring the development of undifferentiated thyroid carcinoma. *Int J Oncol*. 2002;21:1151-1154. <https://doi.org/10.3892/ijo.21.5.1151>
36. Zhang C, Liu J, Xu D, Zhang T, Hu W, Feng Z. Gain-of-function mutant p53 in cancer progression and therapy. *J Mol Cell Biol*. 2020;12:674-687. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjaa040>
37. Alvarado-Ortiz E, de la Cruz-López KG, Becerril-Rico J, Sarabia-Sánchez MA, Ortiz-Sánchez E, García-Carrancá A. Mutant p53 gain-of-function: role in cancer development, progression, and therapeutic approaches. *Front Cell Dev Biol*. 2021;8:607670. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.607670>
38. Piao JM, Kim HN, Song HR, Kweon SS, Choi JS, Yun WJ, et al. p53 codon 72 polymorphism and the risk of lung cancer in a Korean population. *Lung Cancer*. 2011;73:264-267. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2010.12.017>
39. De Souza C, Madden J, Koestler DC, Minn D, Montoya DJ, Minn K, et al. Effect of the p53 P72R polymorphism on mutant TP53 allele selection in human cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2021;113:1246-1257. <https://doi.org/10.1093/jnci/djab019>
40. Risques RA, Kennedy SR. Aging and the rise of somatic cancer-associated mutations in normal tissues. *PLoS Genet*. 2018;14:e1007108. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007108>