

PanIN 병변의 유전자 발현 프로파일에서 나타난 Hedgehog 신호전달의 췌관상피세포에 대한 영향

(Gene Expression Profiles in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia Reflect the Effects of Hedgehog Signaling on Pancreatic Ductal Epithelial Cells. Cancer Res 2005;65:1619-1626)

요약: 췌장암은 분자생물학적인 이해와 치료법의 발달에도 불구하고 5년 생존율이 4%에 미치지 못하는 극히 불량한 예후를 보이는 암 중 하나이다. 병리조직학 및 분자생물학 연구를 통하여 췌장암은 pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN)이라는 비침윤 병변을 거쳐 침윤 암으로 진행된다는 증거가 많이 축적되어 있다. 초기에 해당하는 PanIN-1A와 1B 병변은 세포와 구조의 비정형은 미미하지만 이는 K-ras 종양유전자의 활성화 변이,¹ telomere의 단축²과 p21^{WAF1/CIP1}의 과발현³ 동반한다. PanIN-2 병변은 중등도의 세포와 구조의 비정형을 보이며 p16^{INK4A} 발현의 소실과 cyclin D1의 과발현을 흔히 동반한다.^{3,4} PanIN-3 병변에서는 세포와 구조의 심한 비정형과 함께 p53 유전자변이와 DPC4 발현의 소실이 나타난다.^{5,6}

이러한 분자 수준에서의 변이는 암화과정에서 중요한 역할을 하며 PanIN 병변의 진행에 따라서 변이 빈도 역시 증가한다. 최근에는 Notch, Hedgehog 등 전장(foregut)의 발생을 조절하는 유전자의 재활성화가 PanIN 병변의 발생과 연관되어 있다는 증거가 제시되고 있다.^{7,8}

이 연구에서는 췌장암으로 절제된 조직에서 발견된 PanIN 초기 병변과 상응하는 정상 췌관부위에서 조직을 채집한 후 cDNA microarray를 시행하여 발현하는 유전자를 비교하였다. 냉동 보관된 조직으로부터 현미경하 미소절제술을 통하여 500-1,000개의 세포를 채집하였고 tRNA를 추출한 뒤 T7 RNA 중합효소를 이용한 두 차례의 증폭과정을 거쳐 합성된 cDNA를 검체로 이용하였다. 15,000 transcripts를 포함하는 DNA 칩을 이용하여 PanIN 병변에서 발현이 3배 이상 증가된 32개의 유전자와 3배 이상 감소된 17개의 유전자를 찾아냈다. 발현이 증가된 유전자에는 pepsinogen C, MUC6, Kruppel-like factor 4 (KLF4), trefoil factor 1 (TFF1)과 rhomboid-like 등이 포함되었고 감소된 유전자에는 retinol-binding protein 1 (CRABP1)이 포함되었다. 발현이 증가된 유전자는 81예의 췌장암 절제조직에서 발견된 150예의 PanIN 병변으로부터 real-time PCR, in situ hybridization, 면역조직화학염색을 시행하여 재검증하였다.

저자 등은 전장에서 발현되는 유전자의 과발현에 착안하

여 발생 시 전장에서 발현되는 유전자들의 발현 정도를 RT-PCR로 PanIN 병변과 정상췌관에서 비교하였는데, gastrin, GATA4, GATA5, GATA6, villin 1, villin 2, Sox2, HoxA5와 Forkhead6 (Fkh 6)의 발현이 증가되어 있음을 확인하였다. 반면에 중장(midgut)과 후장(hindgut)에서 발현되는 CDX1과 CDX2는 PanIN 병변에서 발현되지 않았다.

나아가서 인체에서 유래한 불멸화 췌관상피세포(HPDE cells)에서 Gli1 유전자가 과발현되도록 형질전환한 뒤 전장 상피세포 표지자들의 발현 변화를 분석하였는데, 예측한대로 전장 유전자인 GATA6, GATA5, GATA4와 FKH6 등의 발현이 5배 이상 증가하였다. 이러한 변화는 PanIN 병변에서 과발현한 유전자군과 매우 유사한 양상을 보였다.

결론으로, 초기 PanIN 병변은 전장 유전자들의 과발현을 동반하며 이는 Hedgehog 신호전달경로에 의하여 매개되는 위상피세포 발생 프로그램을 따른다고 저자 등은 주장하였다.

해설: 비록 모든 췌장암이 PanIN 병변을 거쳐 발생하는지는 분명하지 않으나 PanIN 병변이 여러 단계를 거쳐 새로운 유전자변이를 획득함으로써 췌장선세포암으로 진행된다는 주장은 이미 정설로 받아들여지고 있다. 이 연구는 정상 췌관상피세포에서 PanIN 병변을 거쳐 췌장선세포암으로 진행되는 과정에서 나타나는 유전자발현양상의 변화를 microarray를 이용하여 개괄적으로 분석함으로써, PanIN 병변은 발생 단계에서 위상피세포에서 나타나는 유전자발현양상을 재현한다는 점을 밝힌 데 의의가 있다.

암화과정에서 상피세포의 정체성이 변화하여 타 장기의 발생 프로그램을 답습하는 특성은 식도, 위, 자궁 경부 등 몇 가지 암에서도 밝혀진 바 있다.⁹⁻¹¹ 가령 위암의 전구병변으로 알려진 장형화생에서는 위형 점액으로 알려진 MUC5A (foveolar형)와 MUC6 (유문형)에서 장형 점액인 MUC2로 발현되는 점액의 성분이 전환되며 위상피세포 특이적인 Sox2의 발현은 감소하지만 장점막상피세포의 분화에 필수인 CDX1과 CDX2의 발현은 증가된다.^{10,12} 이러한 소견은 암 발생과정에서 장기에 특이적으로 역분화(dedifferentiation)와

전환분화(transdifferentiation)가 발생함을 시사한다.

PanIN 병변에서 발견되는 위형 분화 프로그램의 활성화는 PanIN과 이와 유사한 병리소견을 보이는 췌관 내 점액성 유두상종양(intraductal papillary mucinous neoplasm, IPMN)의 상이한 발생기전을 설명하는 좋은 예가 된다. IPMN은 병리 소견에 따라 장형분화, 췌담관형분화 또는 gastric foveolar 분화로 세분된다.^{13,14} 가장 많은 유형인 장형분화를 보이는 IPMN은 다량의 점액을 분비하는 유두상 종양으로 MUC2, MUC5A와 CDX2에는 양성이나 MUC1 음성인데,¹⁵⁻¹⁷ 암으로 진행되는 경우에는 침윤성 콜로이드 선암이 발생하며 췌장 선암보다는 양호한 예후를 가진다.¹⁸ 췌담관형은 분화가 미숙한 형태에 해당하는데 복잡하게 분지하는 유두상 병리 소견을 보이고, MUC1과 MUC5A에는 양성이나 MUC2와 CDX2는 음성이다.^{17,19} 췌담관형은 암으로 진행하면 전형적인 췌장선암이 되어 매우 불량한 예후를 보인다.¹⁷ Gastric foveolar 분화형은 MUC5A에 양성이나 MUC1과 MUC2에는 음성 소견을 보이는데 분지췌관형의 IPMN에서 주로 나타나는 유형이다.²⁰ 췌담관형의 IPMN과 PanIN이 병리 소견과 면역조직화학 소견에서 매우 유사하나 큰 차이는 IPMN은 주 췌관이나 직경이 큰 분지췌관에서 발생하는 반면에 PanIN은 직경이 작은 췌관에서 발생한다는 점이다.²¹

특기할 점은 이 연구에서 저자 등이 주장하는 전장 유전자의 활성화는 PanIN-1A나 B의 초기 병변에 두드러지고 병변이 진행됨에 따라 발현이 감소한다는 점이다. 가령 PanIN-1 병변에서 전장 유전자의 발현은 KLF4 11예 중 5예(45%), TFF1 29예 중 24예(83%), MUC6 29예 중 26예(90%)이나, PanIN-2 병변에서는 TFF1 17%, MUC6 67%이고 PanIN-3 병변에서는 TFF1 0%, MUC6 33%였다. 즉, 발암 개시 단계와 진행 단계에서 발현되는 유전자군 차이는 암으로 진행되는 각각의 단계에서 활성화되는 유전 프로그램의 차이를 시사하며, 이는 전암세포가 새로이 획득하는 암유전자 또는 소실한 종양억제유전자와 관련이 있어 보인다. 흥미로운 점은 장형 또는 췌담관형 IPMN의 변연에 gastric foveolar형의 병변이 종종 발견된다는 점인데, 이는 IPMN 역시 발생의 매우 초기 단계에서는 많은 예에서 위형 분화 프로그램을 따르다가 병변이 진행하면서 장형 또는 췌담관형의 프로그램이 활성화될 수 있음을 의미한다.

상기한 전장 유전자의 활성화는 췌장의 암화과정 초기에 나타나는 현상으로서 이는 tumor initiation과 밀접한 관련을 가짐을 시사한다. 췌장암 발생과정에서 초기에 흔히 발견되는 변이로는 K-ras 종양유전자의 활성화가 잘 알려져 있으나, 최근에는 Hedgehog 신호전달의 활성화가 PanIN 병변을 포함한 초기 병변에 흔히 동반됨이 보고되었다.⁸ Hedgehog 신호는 정상적인 발생과정에서 전장 형성에 중대한 역할을 하여 위장관의 발생과 분화는 촉진하는 반면 췌장의 발생은

억제하는데, Hedgehog 신호의 활성화는 위암, 췌장암 및 기저세포암 등의 종양 발생을 매개함이 이미 알려져 있다.²²⁻²⁴ 대표적인 예로는 Pdx1-Shh 형질전환 마우스에서 PanIN과 유사한 병변이 생후 3주 만에 췌장에 발생한 보고가 있다.⁸ 저자 등의 연구에서 췌관상피세포주를 Hedgehog 신호의 매개자인 Gli1 유전자로 형질전환한 뒤 시행한 RT-PCR에서 다양한 전장 유전자가 활성화됨을 보여주었는데 이는 PanIN에서 Hedgehog 신호의 활성화를 매개로 하여 전장 유전자의 발현이 증가할 수 있다는 매우 개연성이 큰 실험 결과다. 이 개념을 IPMN에 적용하여 gastric foveolar형에서 Hedgehog 신호의 활성화를 분석한다면 췌장 발암과정에서 Hedgehog를 매개로 하는 전장 유전자의 활성화가 PanIN 특이적인 현상이 아닌 보다 일반적인 현상인지를 알려주는 흥미로운 연구가 될 것으로 보인다. 하지만 Hedgehog 신호의 활성화는 췌장암 초기 병변뿐 아니라 침윤 암에서도 흔히 나타나는 소견으로 보아, 진행된 PanIN 병변에서 전장 유전자 발현의 감소는 다소 해석하기 어려운 점이다. 가능한 해석은, 진행된 PanIN 병변에서 세포가 점차 분화능력을 상실해감에 따라, 활성화된 Hedgehog 신호에 대한 세포의 반응능력도 감소함으로써 전장 유전자의 발현이 감소한다는 설명이다.

췌장암은 과거 수십 년간의 의학 발전에도 불구하고 아직까지 생존의 향상을 가져오지 못한 파멸의 암이다. 특히 발견 당시 85% 이상이 이미 절제가 불가능한 췌장암에서는 뚜렷한 항암효과를 보이는 약물도 없어 고식 요법 외에는 치료가 궁핍하다. 췌장암을 극복하고자 노력하는 많은 연구자들은 암 조직은 물론 암 전구병변을 시료로 하여 분자 수준에서의 변화를 규명함으로써 유전자 수준에서 지식을 꾸준히 축적하고 암화과정에 대한 이해를 심화하고 있다. 저자가 분석한 논문과 같이 전구병변을 시료로 한 연구는 조기진단법의 개발에 이용할 수 있는 표적분자의 발견은 물론, 고위험군에서 특정 유전자를 표적으로 하는 약물예방법의 개발에도 커다란 도움을 줄 것이다.

(정리: 연세대학교 의과대학 내과학교실 박승우)

참고문헌

1. Moskaluk CA, Hruban RH, Kern SE. p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1997;57:2140-2143.
2. van Heek NT, Meeker AK, Kern SE, et al. Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol* 2002;161:1541-1547.
3. Biankin AV, Kench JG, Morey AL, et al. Overexpression of p21WAF1/CIP1 is an early event in the development of pan-

- creatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res* 2001;61:8830-8837.
4. Wilentz RE, Geradts J, Maynard R, et al. Inactivation of the p16 INK4A tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression. *Cancer Res* 1998;58:4740-4744.
 5. Digiuseppe JA, Hruban RH, Goodman SN, et al. Overexpression of p53 protein in adenocarcinoma of the pancreas. *Am J Clin Pathol* 1994;101:684-688.
 6. Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, et al. Loss of expression of Dpc4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res* 2000;60:2002-2026.
 7. Miyamoto Y, Maitra A, Ghosh B, et al. Notch mediates TGF α -induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell* 2003;3:565-576.
 8. Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 2003;425:851-856.
 9. Jankowski JA, Harrison RF, Perry I, et al. Barrett's metaplasia. *Lancet* 2000;356:2079-2085.
 10. Yuasa Y. Control of gut differentiation and intestinal-type gastric carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2003;3:592-600.
 11. Holowaty P, Miller AB, Rohan T, et al. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:252-258.
 12. Tsukamoto T, Inada K, Tanaka H, et al. Down-regulation of a gastric transcription factor, Sox2, and ectopic expression intestinal homeobox genes, Cdx1 and Cdx2: inverse correlation during progression from gastric/intestinal-mixed to complete intestinal metaplasia. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;130:135-145.
 13. D'Angelica M, Brennan MF, Suriawinata AA, et al. Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: an analysis of clinicopathologic features and outcome. *Ann Surg* 2004;239:400-408.
 14. Adsay NV, Merati K, Andea A, et al. The dichotomy in the preinvasive neoplasia to invasive carcinoma sequence in the pancreas: differential expression of MUC1 and MUC2 supports the existence of two separate pathways of carcinogenesis. *Mol Pathol* 2002;15:1087-1095.
 15. Lüttges J, Zamboni G, Longnecker D, Kloppel G. The immunohistochemical mucin expression pattern distinguishes different types of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas and determines their relationship to mucinous non-cystic carcinoma and ductal adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2001; 25:942-948.
 16. Nakamura A, Horinouchi M, Goto M, et al. New classification of pancreatic intraductal papillary-mucinous tumour by mucin expression: its relationship with potential for malignancy. *J Pathol* 2002;197:201-210.
 17. Adsay NV, Merati K, Basturk O, et al. Pathologically and biologically distinct types of epithelium in intraductal papillary mucinous neoplasms: delineation of an "intestinal" pathway of carcinogenesis in the pancreas. *Am J Surg Pathol* 2004;28:839-848.
 18. Adsay NV, Pierson C, Sarkar F, et al. Colloid (mucinous non-cystic) carcinoma of the pancreas. *Am J Surg Pathol* 2001; 25:26-42.
 19. Yonezawa S, Taira M, Osako M, et al. MUC-1 mucin expression in invasive area of intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas. *Pathol Int* 1998;48:319-322.
 20. Maitra A, Fukushima N, Takaori K, Hruban RH. Precursors to invasive pancreatic cancer. *Adv Anat Pathol* 2005;12:81-91.
 21. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN): a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 2001;25:579-586.
 22. Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling pathway and gastric cancer. *Cancer Biol Ther* 2005;4:1050-1054.
 23. Pasca di Magliano M, Hebrok M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer* 2003;3:903-911.
 24. Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, et al. Widespread requirement for hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* 2003;425:846-851.