

구강 편평 세포 암종에서
TGF- β 수용체의 발현

연세대학교 대학원

치 의 학 과

이 근 형

구강 편평 세포 암종에서
TGF- β 수용체의 발현

지도 육 종 인 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함.

2004년 6월 일

연세대학교 대학원
치 의 학 과
이 근 형

이근형의 박사학위 논문을 인준함.

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2004년 6월 일

감사의 글

미약한 능력으로 조그마한 결과물을 얻어 크나큰 영광으로 생각합니다. 이 영광을 항상 저와 늘 함께 하시는 절대자에게 드립니다.

누군가 저에게 모든 것이 끝났다고 말하지만, 저는 벅차오르는 가슴으로 새로운 시작의 선상에 서있다고 생각합니다. 지금 이러한 영광과 흥분을 있게 해주신 김진 교수님의 큰 관심과 가르침을 잊을 수 없고 감사를 드립니다. 바쁘신 중에도 논문에 깊은 관심과 조언을 아끼지 않으신 관동대학교 윤도준 교수님께 감사를 드립니다. 논문의 세세한 부분까지 질책과 교정에 힘써주신 김형준 교수님과 이은주 교수님께 감사의 말씀을 올립니다. 아울러, 지도교수 육종인 교수님께 무어라 감사의 말씀을 드릴지 모르겠습니다.

그 동안 이번 실험에 손, 발이 되어준 최정희 선생님께 감사의 마음을 전합니다. 또한, 실험에 많은 도움을 주신 구강 병리학교실 모든 선생님께 감사의 뜻을 전하고 싶습니다. 자신의 일을 묵묵히 해준 병원 식구들께도 감사드립니다.

돌아가신 아버님께 이 논문을 올립니다. 아직도 항상 자식걱정을 하시고 아낌 없는 사랑을 주시는 어머님, 항상 사위를 배려하시고 격려하시는 장인, 장모님께 감사를 드립니다. 언제나 변함없이 사랑으로 후원하는 아내 혜진에게 고마운 마음을 전하며 기쁨을 함께 하고 싶습니다. 삶의 의미와 기쁨을 주는 두 딸, 경연과 경원에게 사랑을 전합니다.

2004년 6월

이근형 올림

목 차

감사의 글	i
Tables & Figures	iii
국문요약	iv
I. 서론	1
II. 연구 재료 및 방법	5
가. 연구 재료	5
나. 연구 방법	6
(1) Growth inhibition assay	6
(2) TGF- β 1 수용체 mRNA 추출과 RT-PCR	6
(3) TGF- β 1 수용체 Northern blotting	7
(4) TGF- β 1 수용체 Western blotting	7
(5) Cell cycle regulatory protein Western blotting	8
III. 연구 결과	9
(1) TGF- β 1에 의한 세포 성장 억제 효과	9
(2) TGF- β 1 type II 수용체의 mRNA 발현	10
(3) TGF- β 1 type II 수용체 단백질 발현	11
(4) Cell cycle regulatory protein 발현	13
IV. 총괄 및 고찰	14
V. 결론	19
참고문헌	21
영문요약	28

Tables and Figures

Table 1. Pathologic characteristics of oral squamous carcinoma cell lines	5
Table 2. Sequences of primers for PCR of TGF- β 1 type II receptor	7
Figure 1. The effects of TGF- β 1 on oral squamous carcinoma cell growth	9
Figure 2. mRNA expression analysis by RT-PCR of TGF- β 1 type II receptor genes in oral squamous carcinoma cell lines	10
Figure 3. The expression of TGF- β 1 type I and type II receptor by western blotting	11
Figure 4. The expression of TGF- β 1 type II receptor by lactacystein	12
Figure 5. The expression of cell cycle regulatory protein(p21) on TGF- β 1 in YD-8 and YD-9 cell line	13

국문요약

구강 편평 세포 암종에서 TGF- β 수용체의 발현

상피세포는 상피성장인자와 억제인자의 균형에 의해 항상성이 유지된다. 따라서 두경부 및 구강 점막에서 발생하는 상피 암종의 발생기전은 성장인자와 억제인자의 불균형으로 설명될 수 있다. 발암과정에서 상피 성장인자로 알려진 epidermal growth factor(EGF)와 그 수용체의 역할에 대해서는 이미 잘 알려져 있다. 최근에는 암종이 발생하는 과정에 있어 transforming growth factor- β (TGF- β)에 의한 상피 세포 성장 억제 효과의 소실도 중요한 역할을 한다고 한다. TGF- β 의 type I, type II 수용체의 돌연변이가 TGF- β 에 의한 상피 세포 성장 억제 기전의 하나로 생각되고 있지만, 두경부를 비롯한 암종에서 수용체 돌연변이 빈도가 높지 않고, 그 돌연변이와 TGF- β 에 의한 in vitro 성장 억제 효과가 일치 하지 않아 TGF- β 에 의한 성장 억제 효과 소실에 다른 기전이 있을 것으로 생각된다. 특히 세포의 증식과 apoptosis에 관련된 단백질의 proteasomal degradation에 의한 반감기 조절이 종양 형성 과정과 밀접한 연관이 있다고 알려져 있으나, TGF- β 수용체에 있어 그 역할은 잘 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 두경부 점막에서 발생하는 다단계 암종 발생과정 중 TGF- β 에 의한 세포 성장 억제 소실 기전을 파악하기 위하여 8예의 구강 편평 세포 암종 세포주를 대상으로 TGF- β 에 의한 성장 억제 효과, 세포 주기 단백질 p21^{CIP1} 발현을 검색하였고, 나아가 type I & II TGF- β 수용체의 전사 조절과 전사 후 조절을 검색함으로써 TGF- β 수용체의 발현 조절 과정을 규명하고자 하였고, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. YD-8을 제외한 다른 구강 암종 세포주에서 TGF- β 에 의한 세포 성장 억제 효과를 보이지 않았다.
2. TGF- β 에 의한 성장 억제 효과를 보였던 YD-8에서는 TGF- β 투여후 p21^{CIP1}의 발현 증가를 관찰할 수 있었고, TGF- β 에 의한 성장 억제 효과가 없었던 YD-9에서는 p21^{CIP1}의 발현이 관찰되지 않았다.
3. Western blotting에서 TGF- β type I 수용체는 모든 세포주에서 발현되었으나 type II 수용체는 모두 발현되지 않았다.
4. RT-PCR과 Northern blotting에서 대부분의 세포주에서 Type II TGF- β receptor mRNA 발현이 관찰되었고, YD-8과 YD-17M 세포주에서 가장 많이 발현되었다.
5. Proteasomal degradation inhibitor인 MG132를 처리했을 때 Western blotting 상에서 시간에 의존적인 형태로 TGF- β type II 수용체의 발현이 증가하였고, 이들은 분자량이 점차 증가하였다.

이상의 결과로 대부분의 구강 암종 세포주는 TGF- β 에 의한 세포 성장 억제 효과를 상실하는 것으로 판단되며, 세포 성장 억제 효과를 보였던 세포주에서는 p21^{CIP1}을 경유하는 세포 증식 주기 조절을 통하여 세포 성장 억제 효과를 보일 것으로 판단되었다. 또한 TGF- β type II 수용체에 있어서 비교적 많은 mRNA 발현에도 불구하고 Western blotting상에서 단백질이 발현하지 않은 것은 proteasomal degradation에 의해 반감기가 매우 짧기 때문인 것으로 판단된다. 따라서 향후 종양 발생 과정에 있어 TGF- β 에 의한 성장 억제 효과의 소실이 수용체의 돌연 변이 뿐만 아니라 proteasomal degradation 의한 반감기 조절도 기인할 것으로 생각되며, 종양 발생 과정에 있어 TGF- β 수용체의 proteasomal

degradation에 의한 TGF- β 에 의한 성장 억제 효과 소실 과정을 규명하는게 필요하리라 생각하였다.

핵심되는 말: 구강 편평세포 암종, TGF- β 수용체 발현, p21^{CIP1}, proteasomal degradation

구강 편평 세포 암종에서 TGF- β 수용체의 발현

연세대학교 대학원 치의학과

(지도 육 종 인 교수)

이 근 형

I. 서 론

구강 및 두경부 암은 전체 암종의 3~5% 정도로 이중 구강 점막에서 발생하는 종양을 포함하여 두경부에 발생하는 악성 종양의 대부분은 편평세포암종이다 (Paterson 등, 2001). 편평세포암종은 6대 암종에 속하고 전 세계적으로 매년 약 40만 명이 발병하고 있다(Parkin 등, 1980). 두경부 암에 있어 지금까지 임상 및 병리학적 진단 요소가 중요하였지만, 최근의 분자 생물학 및 암 유전자 연구 발달은 암 발생 및 전이 기전을 이해하는데 있어 많은 도움을 주고 있다. 하지만 다단계 발암과정을 특징으로 하는 두경부 및 구강 점막에서 발생하는 편평세포암종에 대한 분자 생물학적 연구는 많지 않다(Slaughter 등, 1953, Farber, 1984).

구강 점막의 편평세포암종의 발생은 특징적인 전암병소가 관찰되며, 이는 field cancerization과 다단계 발암과정으로 설명된다(Slaughter 등, 1953). 즉, 발암요인에 의한 유전적 손상이 불멸화(immortalization)를 동반하는 암세포로의 전환을 유도하고, 정상 상피의 이형성과 상피 내암(carcinoma in situ)단계를 거쳐 침윤성 암종으로 발전하게 된다. 구강점막을 구성하는 중층편평상피는 외부 자극으로 탈락되며 기저세포층에서 지속적인 세포분열을 하여 각화세포로의 분화를 반복하는 조직으로서, 세포의 성장과 분화를 조절하는 인자들, 즉 상피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF)와 그 수용체, 억제인자(transforming growth factor, TGF- β)와 그 수용체등에 의해 항상성이 유지된다. 따라서 이들 상피세포 성장인자와 억제인자간의 불균형과 조절 이상은 구강 점막의 다단계 발암과정을 이해하는 중요한 요소라 할 수 있다(Sporn & Roberts, 1985, Shirasuna 등, 1991).

상피 성장 인자(epidermal growth factor, EGF)는 상피세포의 강력한 세포 성장 인자이다. 이의 세포 수용체인 상피성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor, EGFR)는 대부분의 상피성 종양에서 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다. 구강을 포함하는 두경부에 발생하는 편평세포암종의 발생 과정에서도 전암 병소 단계를 거쳐 침윤성 암종으로 진행되는 과정에서 EGFR 발현이 점진적으로 증가하는 것이 알려져 있으며, 특히 암종 주위의 정상 조직에서도 높은 빈도로 과발현되어 두경부 점막의 발암과정에 중요한 역할을 하는 것으로 이해되고 있다(Sporn & Roberts, 1985, 김태연 등, 1997). 한편 상피 세포의 성장을 억제하는 것으로 알려진 transforming growth factor- β (TGF- β)는 EGFR와 함께 상피 조직의 항상성을 유지하는 것으로 생각되고 있다. 실제로 전암 병소 단계에서 EGFR의 증가와 함께 기저세포층의 TGF- β type II 수용체의 발현이 감소함이 보고 되어 있고 이러한 결과는 EGFR와 TGF- β 수용체간의 불균형이 전암 병소 및 암발생 기전에 관여하리라는 점을 암시한다(김태연 등, 1997).

TGF- β 신호전달 체계는 다양한 세포 현상, 즉 증식, 분화, 인지, apoptosis를 조절한다. TGF- β 는 상피세포에서 cyclin-cdk 복합체의 활성을 억제하여 세포 주기를 정지시킴으로서 세포 성장을 억제한다(Geng & Weinberg, 1993). 그러나 TGF- β 는 간엽 조직에서는 증식을 촉진하는 이중적 성질을 가지고, 섬유세포의 교원질 합성을 조절하고, 발생기 때는 척추, 팔, 다리, 치아, 안면골, 심장 판막 등의 개조에 관여하며, 단백질 용해 효소의 기능을 억제함으로써 새로운 육아조직 형성을 촉진하여 상처치유를 돕는다(Sporn & Roberts, 1989). 이들 TGF- β 가 조절하는 과정들이 비정상적으로 활성화되거나 억제되면 종양 발생에 관련 있을 것으로 생각되며(Wieser 등, 1993), 최근에는 TGF- β 가 암억제 유전자로서의 기능을 갖는다고 한다(Sporn & Roberts, 1985, Brattain 등, 1996).

TGF- β ligand는 세포 표면에 존재하는 type I, type II 수용체에 결합하고 이들의 serine/threonine kinases 활성을 유도한다(Wrana 등, 1992, Massague, 1992, Alexandrow & Mases, 1995, Rich 등, 2001, Wrana 등, 1998, Hu 등, 1998, Wakefield & Roberts, 2002). 이들 수용체 단말기의 인산화는 Smad 단백질의 연속적인 인산화 과정에 의해 세포내 신호가 핵으로 전달된다. 지금까지 8개의 Smad 단백질이 알려져 있고 이들은 receptor-regulated Smad(R-Smad), co-mediator Smad(Co-Smad), inhibitory Smad (I-Smad)등으로 분류된다. 이 중 R-Smad (Smad 1, 2, 3, 5, and 8)는 type I 수용체 kinase에 의해 직접 인산화 됨으로써 활성화되고, 이들은 homotrimerization을 형성하여 Co-Smad, Smad4와 heteromeric 복합체를 형성한다(Attisano & Wrana, 1998, Souchelytskyi 등, 1997, Abdollah 등, 1997). 이들 복합체는 핵 내부로 이동하여 다른 핵 전사 보조 인자와 함께 target 유전자의 전사를 조절하게 된다. I-Smad로 알려진 Smad-6와 Smad7은 R-Smad와 경쟁하여 수용체의 활성을 저지하거나, Co-Smad와 결합하여 수용체의 proteasomal degradation을 촉진함으로써 TGF- β 의 활성을 억제한다(Fink 등, 2001, Joan 등, 2000, Fan & Marikki, 2003, Hong-Jian 등, 2001).

TGF- β 신호 전달체계는 전술한 바와 같이 상피세포의 성장을 억제하므로, 이 신호 전달체계의 이상이 종양 형성과정과 밀접한 연관이 있을 것으로 생각되고 있다. TGF- β 유전자군 이나 Smad 단백질 유전자의 돌연변이가 다양한 암종에서 이미 보고 되어 있다(Garrigue-Antar 등, 1995, Wang 등, 2000, Munoz-Antonia 등, 1996). 특히 TGF- β type II 수용체의 돌연변이에 의한 이상은 대부분의 소화기 종양에서 microsatellite instability와 함께 관찰되며(Nakashima 등, 1995, Myeroff 등, 1995, Parsons 등, 1995), 췌장암종에서는 Smad4의 돌연변이가 잘 알려져 있다. 뿐만 아니라, 많은 유전성 질환에서 TGF- β 신호 전달 체계의 중요성이 보고 되어 있다. 최근에는 이들 돌연 변이가 신호 전달과 관련된 단백질 구조의 다양한 변화를 초래하는 것으로 보고 되어 돌연변이가 악성 종양과 같은 다양한 질환의 원인 인자임이 규명되고 있다(Geng & Weinberg, 1993, Liahoo 등, 1990). 그러나 TGF- β 유전자의 돌연 변이나 Smad를 통한 신호 전달 과정과는 달리 TGF- β 수용체 단백질의 발현 조절에 대해서는 많이 알려져 있지 않다(Peter 등, 2000).

EGFR에서 알려진 바와 같이 다단계 발암과정에서 수용체의 발현을 세포의 성장과 분화를 조절하는 중요 요소이다. 하지만 세포 내에서 TGF- β 수용체의 발현 조절 과정은 지금까지 거의 알려져 있지 않아 이의 중요성과 역할을 규명하는 것은 발암과정을 이해하는데 있어 많은 도움을 줄 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 우리나라 사람에서 확립된 구강 편평 세포 암종 세포주에서 TGF- β 수용체의 전사 조절에 의한 mRNA 발현과 이의 translational control, 나아가 단백질의 반감기 조절에 따른 발현 조절 가능성을 알아봄으로써 구강 암종 및 전암 병소 발생과정에서 TGF- β 수용체의 발현 조절이 갖는 역할을 규명하고자 하였다.

II. 연구 재료 및 방법

가. 연구 재료

이 연구는 연세대학교 치과대학 구강병리학 교실에서 구강 편평세포암종 환자로부터 확립한 8 예의 암종세포주를 대상으로 하였으며, 확립된 암세포주들의 병리학적 특징은 Table 1에 정리하였다(전용찬 등, 2002). 구강 편평세포암종 세포주는 5% CO₂가 일정하게 유지되는 37°C 배양기에서 10% fetal bovine serum(FBS)를 포함한 DMEM/Ham's의 F-12 배지(3:1)를 사용하여 배양하였다.

Table 1. Pathologic characteristics of oral squamous carcinoma cell lines

Cell line	Age/ Sex	Primary Site	Pathological Diagnosis	p53 mutation codon (exon)
YD-8	46/F	Tongue	SCC, MD	CGT→CAT Arg→His
YD-9	56/M	Buccal Cheek	SCC, MD	No
YD-10B	67/M	Tongue	SCC, MD	TAC→TAA Tyr→Stop
YD-15	39/M	Tongue	MEC, HG	GAA→GCA Glu→Ala
YD-15M		Lymph Node	Metastatic	GAA→GCA Glu→Ala
YD-17	66/M	Mandible	SCC, PD	No
YD-17M		Lymph Node	Metastatic	No
YD-38	67/F	Mandible	SCC, MD	No

SCC: squamous cell carcinoma

PD: poorly differentiated

HG: high grade

MD: moderately differentiated

MEC: mucoepithermoid carcinoma

나. 연구 방법

(1) Growth inhibition assay

8 예의 구강 편평세포암종 세포주의 TGF- β 1에 의한 세포성장 억제효과를 관찰하기 위해 각각의 구강 편평세포암종 세포를 96well plate에 200 μ l당 3 X 10³개의 세포를 뿌리고 24시간동안 배양한 후, TGF- β 1 단백질(R&D system)을 5ng/ml의 농도로 처리하여 37 $^{\circ}$ C에서 48시간동안 반응 시킨 후 세포성장 억제효과를 N-methyl-thiotetrazole(MTT, Sigma, USA) 검사로 측정하였다. MTT 검사는 각 세포주에 MTT 용액을 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 처리한 후, 배양액을 버리고 DMSO(Dimethyl sulfoxide)로 녹여내어 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) TGF- β 1 수용체 mRNA 추출과 RT-PCR

구강 편평세포암종 세포주로부터 RNeasyTM kit(QIAGEN, Germany)를 이용하여, total RNA를 추출한 후, 자외선 분광기(UV spectrophotometer)를 이용하여 260nm에서 흡광도를 측정하였다. cDNA 합성을 위하여 1 μ g 의 RNA를 reverse transcriptase(Boehringer Mannheim, Germany)와 oligod(T) primer를 이용하여 42 $^{\circ}$ C에서 1시간, 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시키고 4 $^{\circ}$ C에서 반응을 중지시켰다. 합성된 cDNA를 대상으로 β -actin과 TGF- β type II 수용체를 PCR하였다. PCR 반응은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 둔 후, 변성반응을 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 결합반응을 58 $^{\circ}$ C에서 1분, 중합 반응은 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 35주기를 반복하고, 마지막 중합반응은 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 연장하여 반응시켰다. RT-PCR 반응 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동 하였다.

Table 2. Sequences of primers for PCR of TGF- β 1 type II receptor

Primer Name	Sequence (5' → 3')	PCR product (bp)
T β R- II sense	TTTCCTTTGGGCTGCACATG	242
T β R- II anti-sense	CCTAAGAGGCAACTTGGTTGAATC	
β -actin sense	GGCGGACTATGACTTAGTTG	238
β -actin anti-sense	AAACAACAATGTGCAATCAA	

(3) TGF- β 1 수용체 Northern blotting

구강편평세포암종으로부터 total RNA를 분리한 후, 1.5 % agarose gel에서 전기영동한 후, membrane으로 total RNA를 capillary transfer 방법을 이용하여 옮긴 후, 32 P isotope으로 label된 TGF- β type II receptor probe를 사용하여 Northern blotting을 시행하였다.

(4) TGF- β 1 수용체 Western blotting

구강편평세포암종 세포주는 RIPA buffer [150mM NaCl, 0.5% Triton-X 100, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 20 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄, protease inhibitor cocktail tablet(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)] 를 이용하여 용해시킨 후, 1,500 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 회수하였고, BSA(Bovine serum albumin) 로 단백질을 정량분석 하였다. 각각의 암종세포주에서 모은 단백질 10 μ g을 5 \times SDS

sample buffer(60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 25% glycerol, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% Bromophenol blue)에 넣고 5분간 100°C에서 denaturation 시킨 후 10% SDS-polyacrylamide gel에서 120V로 2시간동안 전기영동한 후, nitrocellulose membrane에 옮겼다. Membrane은 5% skim milk-PBST buffer(PBS, 0.2% Tween-20)에서 2시간동안 blocking하고, 1× PBST buffer로 3번씩 5분간 세척하였다. TGF-β type I, II receptor mouse 항체(sc-398, c-16, Santa cruz)를 사용하여 2시간 동안 흔들고, 다시 5분 간격으로 1× PBST 용액에서 3회 세척하였다. Membrane은 anti-mouse rabbit TGF-β receptor I, II 항체가 포함된 용액에서 1시간동안 반응시킨 후, ECL(Enhanced chemiluminescence) detection kit를 사용하여 X-ray 필름에 감광하여 현상하여 관찰하였다.

TGF-β type II 수용체의 proteasomal degradation 가능성을 파악하기 위하여 proteasome inhibitor인 lactacystein(MG 132, CALBIOCHEM)을 시간별로 처리하여 TβR-II의 발현을 Western blotting으로 관찰하였다.

(5) Cell cycle regulatory protein Western blotting

TGF-β1 에 대해 세포성장억제효과를 보인 YD-8 구강편평암종 세포주와 그렇지 않은 YD-9 세포주를 대상으로 세포성장 조절 단백질의 발현을 조사하기 위해 6 well plate에 5×10^4 개의 세포를 뿌려 배양한 후, TGF-β1을 5 ng/ml의 농도로 각 시간별로 0, 24, 48 시간동안 처리하여 단백질을 분리한 후, 20 ug의 단백질을 전기영동하여 세포성장조절단백질인 p16과 p21(Santa cruz) 항체를 사용하여 위와 동일한 방법으로 Western blotting하였다.

III. 연구 결과

(1) TGF- β 1에 의한 세포성장 억제 효과

구강 편평세포암종 세포주의 TGF- β 1에 의한 세포성장 억제효과를 관찰하기 위해, 8 예의 구강 편평세포암종 세포주를 대상으로 MTT assay를 시행하였다. TGF- β 1 단백질을 5 ng/ml 농도로 구강 편평세포암종 세포주에 대해 투여하여 MTT 검사를 시행한 결과, YD-8 세포주에서는 세포성장 억제를 관찰할 수 있었으나, 다른 구강편평세포암종 세포주에서는 세포성장 억제정도의 차이를 볼 수 없었다(Fig 1).

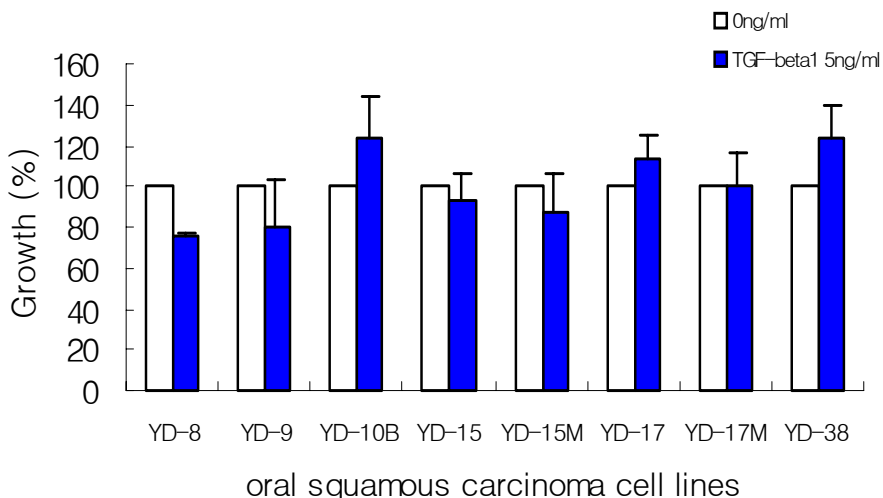


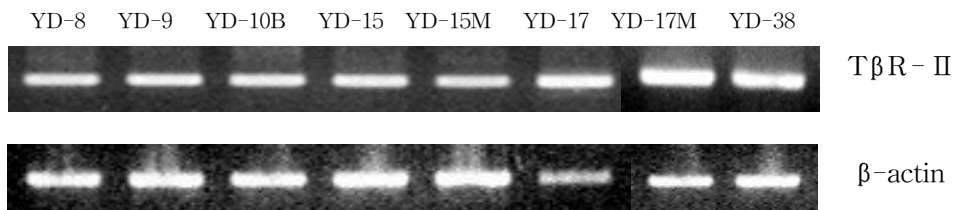
Fig 1. The effects of TGF- β 1 on oral squamous carcinoma cell growth.

Oral squamous carcinoma cell lines(OSCCs) were incubated without or with 5ng/ml TGF- β 1 for 48hrs and then analyzed by MTT assay. All OSCCs were resistant to TGF- β 1 except YD-8.

(2) TGF- β 1 type II 수용체의 mRNA 발현

구강 편평세포암종 세포주에서 TGF- β 1 type II 수용체의 mRNA의 발현을 알아보기 위해, 대조군으로 β -actin과 TGF- β 1 type II 발현정도를 RT-PCR과 Northern blotting으로 관찰한 결과, 모든 세포주에서 mRNA 발현을 관찰할 수 있었다(Fig 2).

(A) RT-PCR



(B) Northern blotting

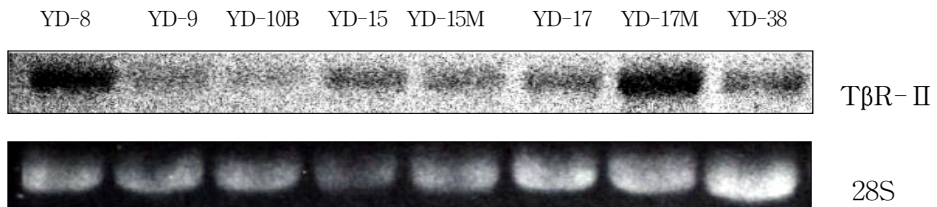


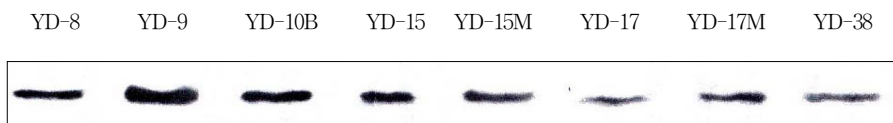
Fig 2. mRNA expression analysis by RT-PCR of TGF- β 1 type II receptor(T β R- II) genes in OSCCs.

Constitutively expressing β -actin gene used as an internal control for each reaction. The expression of T β R- II was detectable in all OSCCs by RT-PCR(A). Northern blot analysis of expression of TGF- β 1 type II receptor in OSCCs(B).

(3) TGF- β 1 type II 수용체 단백질 발현

구강 편평세포암종 세포주에서 TGF- β 1 type II 수용체의 단백질 발현을 알아보기 위해, TGF- β 1 type I, II 수용체 단백질의 항체를 이용하여 그 발현을 조사한 결과, 8 예의 구강 편평세포암종 세포주 모두에서 발현되지 않는 것을 관찰하였다(Fig 3). 이는 세포내에의 proteosome에 의해 degradation되는 것으로 생각되어 proteosome inhibitor인 lactacystein(MG132)를 각각의 구강편평세포암종 세포주에 시간별로 처리하여 TGF- β 1 type II 수용체의 단백질의 발현을 관찰하였다. 그 결과, YD-17 세포주의 경우 lactacystein을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 볼 때, lactacystein을 처리한지 30분 만에 TGF- β 1 type II 수용체의 발현되는 관찰할 수 있었다(Fig 4).

(A) TGF- β type I receptor



(B) TGF- β type II receptor

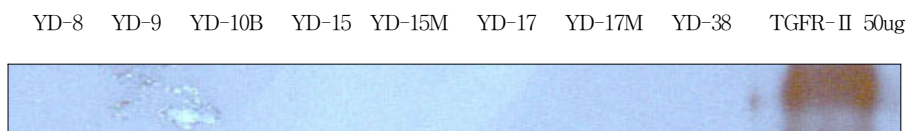


Fig 3. The expression of TGF- β 1 type I and II receptor by western blotting.

Total proteins of OSCCs were extracted and aliquots(20ug) were analyzed by western blot analyses using antibodies specific for TGF- β 1 type I and II receptor. The expression of TGF- β 1 type II receptor protein was not detectable all cell lines, but all of cell lines were expressed TGF- β 1 type I receptor.

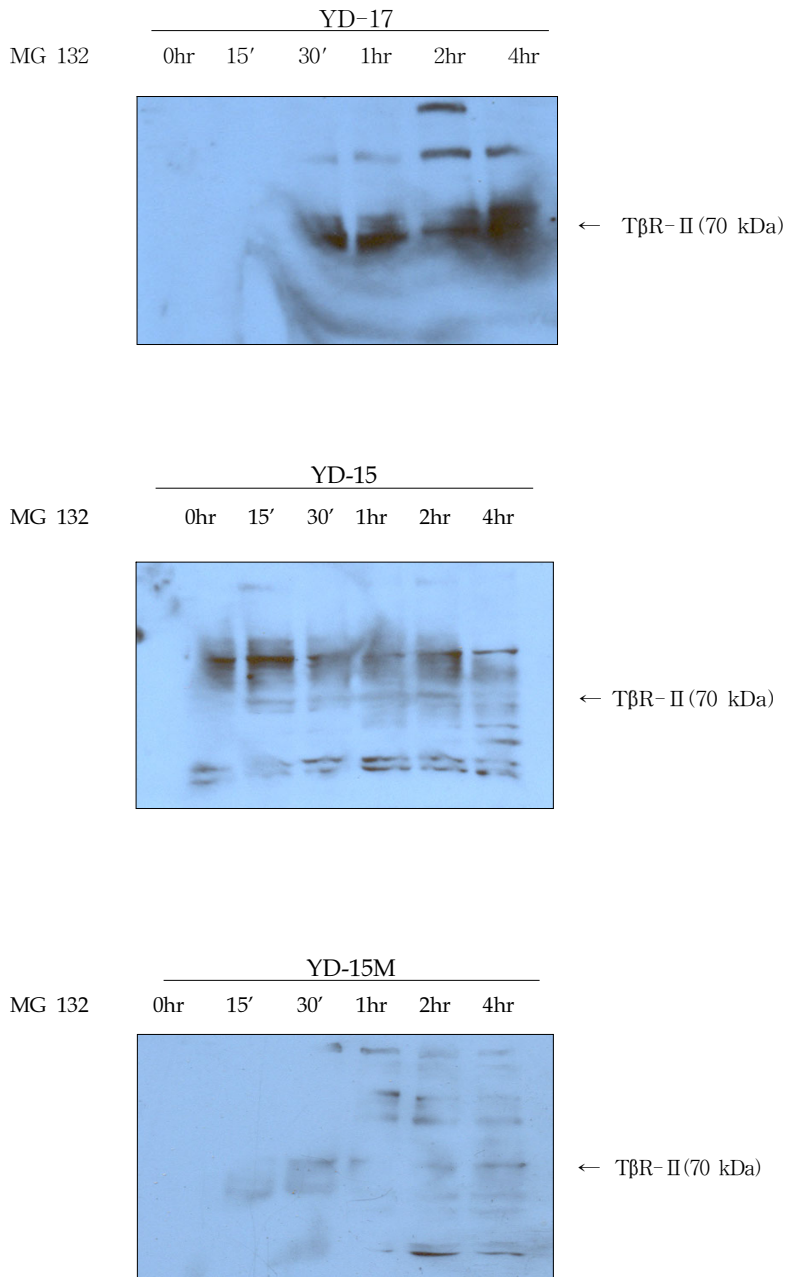


Fig 4. The expression of TGF- β 1 type II receptor(T β R-II) by lactacystein

(4) cell cycle regulatory protein 발현

TGF- β 1에 의한 세포성장 억제 효과를 보인 YD-8 세포주와 세포성장 억제 효과를 보이지 않은 YD-9 세포주를 대상으로 TGF- β 1을 5 ng/ml을 처리한 후 세포주기 조절 단백질인 p16 단백질과 p21 단백질을 발현을 조사한 결과, p16 단백질의 발현은 관찰되지 않았으나(data not shown), p21 단백질의 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig 5).

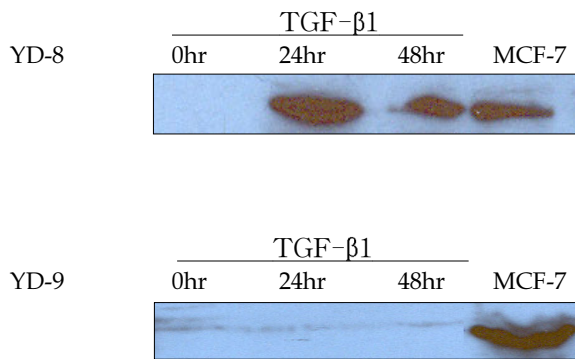


Fig 5. The expression of cell cycle regulatory protein(p21) on TGF- β 1 in YD-8 and YD-9 cell line.

YD-8 and YD-9 cell lines were treated for 0, 24, 48hr with 5 ng/ml TGF- β 1. Cell lysates were prepared and p16 and p21 expression was measured by western blotting. MCF-7 cell lines used as positive control.

IV. 총괄 및 고찰

TGF- β 는 발생, 창상 치유, 발암과정에서 다양한 기능을 수행하며, 상피세포, 혈관 내피세포의 증식을 억제하고 간엽기원의 세포 증식과 세포외 기질(extracellular matrix)의 합성을 자극한다. 상피세포에 있어 TGF- β 는 세포 성장 감소, apoptosis, cellular senescence, genomic stability의 증가를 유도한다(Sporn & Roberts, 1989, Ignatz & Massague, 1986). 이러한 효과는 암 발생 기전과 밀접한 연관이 있을 것으로 생각되기 때문에 종양 발생과 TGF- β signaling은 관심의 대상이 되어 왔다(Rich 등, 2001).

실제로 정상 상피세포, 선 세포(dental epithelium)등에 TGF- β 수용체가 발현되고, 특히 MCF-7과 같은 유방암 세포에서 TGF- β 에 의한 성장 억제 효과 특징적이나 세포주마다 다양한 반응성을 보인다. 본 연구에서는 한국인의 구강 점막에서 발생한 암종 세포주를 대상으로 TGF- β 에 의한 성장 억제 효과를 관찰하였다. 그 결과 YD-8 세포주에서는 대조군에 비해 약 30%의 세포 증식 억제 효과를 보였으며, 그 외의 세포주에서는 효과가 없거나 오히려 증식을 유도하였다. YD-8에서 관찰된 증식 억제 효과는 다른 화학 약제를 사용 하였을 때 나타나는 효과에 비해 다소 적었으나 이는 TGF- β 는 생체 내에 존재하는 성장인자라는 관점에서 볼 때 분명히 성장 억제 효과가 있으리라 생각하였다. 아울러 TGF- β 에 의한 암종 세포주의 성장 억제 효과가 수일내의 apoptosis 유도에 의한 것 이라기보다는 세포 증식 주기를 조절함으로써 성장 정지(growth arrest)에 의한 것으로 알려져 있고(Yigong & Joan, 2003), 본 연구에서도 강력한 세포 증식 주기 정지 단백질인 p21^{CIP1}의 발현이 TGF- β 에 의해 강력히 유도됨을 보여주어 이러한 설명을 뒷받침 하고 있다. 따라서 mitochondrial metabolism를 이용하는 MTT 방법보다는 DNA 합성 매개물질을 이용한 방법을 사용한다면 증식 억제 효과가 더욱 효과적이었을 것으로 생각되었다. 아울러 향후 구강 암종 세포주에서 TGF- β 의 역할은 apoptosis 유도가 아닌 세포 증식 주기 조절에 의한 성

장 정지(growth arrest)에 초점을 맞추어야 할 것으로 사료되었다(Yigong & Joan, 2003).

TGF- β 에 의한 세포 증식 억제와 성장 정지(growth arrest)는 상피 세포뿐만 아니라 혈관 내피 세포, 혈액 세포(hematopoietic), 신경 세포와 일부의 간엽기원 세포에서 관찰된다. TGF- β 에 의한 성장 억제 효과는 크게 두가지 요인에 의해 유도되는데, 첫째, c-myc의 발현 감소에 의한 증식 관련 유전자의 전사 억제가 유도되며(Laiho 등, 1990), 둘째, 세포 증식 주기의 조절에 의한 성장 정지(growth arrest)이다(Yigong & Joan, 2003). 외인성 TGF- β 처리는 세포 증식 주기의 대부분 단계에 영향을 미치지만, G1 주기에서의 정지가 가장 특징적인 것으로 알려져 있다. TGF- β 처리는 Rb(retinoblastoma protein)가 과인산화 되는 것을 방지하고, 또한 cyclin E의 발현을 억제함으로써 G1 phase arrest를 유도한다(Geng & Weinberg, 1993). Cyclin E가 발현된 경우에도 활성화된 cyclin-cdk 복합체의 형성을 방해하여, Rb의 과인산화를 억제함으로써 G1 phase에서 S phase로의 진행을 막아서 세포성장 억제효과를 나타내게 된다(Koff 등, 1993). 상피기원의 세포에서는 TGF- β 처리가 p21^{CIP1}의 발현을 유도하며, 이는 cyclin D-cdk4-p27과 cyclin E-cdk2를 강력한 억제함으로써 상피 세포의 성장 정지를 유도한다. 본 연구에서 TGF- β 에 의해 세포 증식 억제 효과를 보였던 YD-8 세포주에서는 p21^{CIP1}의 발현이 강력하게 유도되었으나 TGF- β 의 효과를 관찰할 수 없었던 YD-9 세포주에서는 p21^{CIP1}의 발현이 유도되지 않았다. 이는 구강암종 세포주에서 TGF- β 에 의한 성장 억제 효과가 p21^{CIP1}을 경유하는 세포 증식 주기 조절 과정과 밀접한 관련이 있음을 시사하는 것이다. 따라서 구강 암종에서 TGF- β 의 역할을 규명하기 위해서는 p21^{CIP1}에 의해 조절되는 cdk4와 cdk2에 초점을 맞춘 연구가 필요할 것으로 생각된다.

TGF- β 은 세포막에 존재하는 I 형 수용체 (type I receptor)와 II 형 수용체 (type II receptor)를 통해 핵으로 신호를 전달한다. TGF- β 1의 세포성장 억제효과에 대한 저항력이 인체 암 발생의 원인으로 알려져 있으며, 이러한 저항력

을 얻게 되는 기전의 하나로 TGF- β 1 type II 수용체 유전자의 돌연변이가 다양한 암종 세포주에서 알려져 있다(Wrana 등, 1992, Munoz-Antoniz 등, 1996, Maestro 등, 1993, Markowitz 등, 1995, Grady 등, 1999, Wang 등, 1995, Ionov 등, 1993, Thiboeau 등, 1993, Furuta 등, 1993). 식도암, 위암, 췌장암에서 TGF- β 1 type II 수용체 유전자의 돌연변이와 같은 유전적 이상이 보고되어 수용체 이상이 상피 세포기원의 발암과정에서 중요한 기전으로 작용할 것으로 제시한 바 있다(Park 등, 1994). 위장관계의 암종과는 달리 두경부 암종에서는 TGF- β 1 type II 수용체 유전자 변이는 연구가 많지 않아 결론적이지는 못하지만 그 빈도는 25% 내외로 알려져 있으며, 이들 돌연 변이에 의한 TGF- β signaling의 이상은 두가지 기전으로 설명된다. 첫째, 암종 세포주의 돌연변이가 serine/threonine kinase domain에 집중되어 있어 돌연 변이가 Smad 유전자 군의 인산화 과정을 방해함으로써 암 발생 과정에 기여하리라고 추측되고(Wang 등, 1997), 둘째, TGF- β 1 type II 수용체 유전자의 missense 변이가 아미노산의 극성변화를 유발하여 단백질의 구조적인 folding이 영향을 주거나 catalytic 활성이 변함으로써 TGF- β 1 type I 수용체를 인지하는 능력에 장애가 생겨서 세포내 신호전달체계에 이상이 생겼을 것으로 추정하였다(Garrigueu-Antar 등, 1995). 하지만 이들 수용체의 돌연 변이 빈도가 높지 않고, 돌연 변이와 TGF- β 에 의한 성장 억제 효과가 일치하지 않아(Paterson 등, 2001), 유전적 돌연 변이 이외의 기전이 있을 것으로 추측된다.

정상 상피 세포가 암종 세포로 전환되는 과정에서 TGF- β 1의 세포성장 억제효과가 소실되는 다른 기전으로 type I 수용체와 type II 수용체의 다양한 빈도의 발현 감소가 알려져 있다. 실제로 많은 빈도의 위암 세포주에서 TGF- β 1 type I 수용체의 감소가 보고되어 있고(Ito 등, 1992), 만성 골수성 백혈병에서는 TGF- β 1 type II 수용체의 발현 감소를 알려져 있다(Rooke 등, 1999). 나아가 대장암 세포주에서 세포성장 억제효과가 소실된 원인으로 TGF- β 1 수용체의 발현 감소가 이미 지적된 바 있다(MacKay 등, 1995). 그러나 일부 학자들의 보고에 의하면 두경부 편평세포암종에서 85%의 세포주에서 TGF- β 1 type I 수

용체의 발현을 관찰할 수 없었고, 92%의 세포주에서는 TGF- β 1 type II 수용체의 발현을 관찰할 수 없다고 하였다. 최근 두정부 및 식도 암종에서 type II 수용체의 발현 감소가 보고 되어 있고(Eisma 등, 1996, Muro-Cacho 등, 1999, Garrigue-Antar 등, 1996), 본 연구에서 사용한 구강 암종 세포주에서는 모두 type I 수용체의 발현이 관찰되었으나, type II 수용체의 발현은 전혀 관찰되지 않았다. 본 연구에서 사용한 암종 세포주는 모두 상피 세포 분화를 보여 이들의 TGF- β 반응성 감소가 type II 수용체의 발현 감소와 관련이 있을 것으로 생각되었다.

세포에 의한 단백질의 발현은 전사 조절(transcriptional control)과 전사후 조절(postranscriptional control)에 의존한다. 본 연구에서 관찰한 type II 수용체의 발현 감소 원인을 파악하기 위해 mRNA에 대한 RT-PCR과 Northern blotting을 수행하였다. 흥미롭게도 RT-PCR에서 세포내의 TGF- β type II 수용체 mRNA 발현이 관찰되었다. 특히 Northern blotting을 이용하여 정량적인 분석을 하였을 때 TGF- β 에 의한 세포 성장 억제 효과가 뚜렷하였던 YD-8에서 가장 뚜렷한 발현을 관찰하였다. 또한 일차 편평 세포 암종에서 기원한 YD-17과 임과절에 전이된 YD-17M은 두 세포주 간의 유사한 형태학적, 생물학적 특징에도 불구하고 type II 수용체의 발현에 차이가 있어 TGF- β 신호 전달 체계와 임상적인 전이간에 연관성을 암시하고 있어 이에 대한 관심이 필요하리라 생각되었다. 하지만 type II 수용체의 mRNA 발현에도 불구하고 전술한 바와 같이 Western blotting에서 단백질의 발현이 관찰 되지 않은 점은 TGF- β 의 성장 억제 효과 소실과 관련하여 매우 흥미로운 점이다.

DNA 전사에 의한 mRNA의 발현에도 불구하고 세포막 단백질 발현이 감소한 점은 두가지 가능성에 기인한다. 첫째, small double-stranded RNA에 의한 RNA interference 과정에 의한 TGF- β type II 수용체 mRNA의 degradation이다. 이는 최근 세포내부의 유전자 발현을 조절하는 중요한 post-transcriptional regulation 과정으로 받아들여지고 있다. 둘째, proteasomal degradation에

의한 단백질의 반감기(half-life) 조절과정이다(Cecile, 2001). 이 과정은 단백질에 존재하는 ubiquitination signal을 E3 ligase에 의해 인지하고, 이 부위의 ubiquitin lysine residue와 ubiquitin의 C-terminal이 isopeptide bond에 의해 결합함으로써 촉발된다(Peter 등, 2000, Cecile, 2001). Ubiquitin chain의 결합과 고분자 단백질은 26S proteasome으로 이동되어 아미노산 수준으로 분해됨으로써 단백질 발현을 조절한다. 이러한 ubiquitination-proteasome 경로는 수많은 단백질의 발현을 조절하고, 손상된 단백질을 처리하는 기전으로 받아들여지고 있다. 특히 proteasomal degradation은 TGF- β 신호 전달 체계에서도 수용체를 통한 신호 전달 체계를 조절하는 기전으로 제시된바 있다(Fan & Marikki, 2003, Peter 등, 2000). TGF- β 수용체는 Smuf2 E3 ligase에 의해 ubiquitination 됨으로써 발현 감소가 유도된다. 특히 TGF- β signaling의 inhibitor로 알려진 Smad7이 Smuf2에 의한 proteasomal degradation과정 중에 adaptor molecule로 작용한다고 알려져 있어 이들이 TGF- β 에 의한 성장 억제 효과를 조절할 것으로 추측되고 있다(Peter 등, 2000, Yigong & Joan, 2003). 본 연구에서 사용한 YD-17을 비롯한 대부분의 구강 암종 세포주에서 proteasomal inhibitor인 MG132를 처리했을 때 시간에 의존적인 형태로 type II 수용체 발현이 증가되었다. 이러한 발현 증가는 ubiquitination에 의한 분자량 증가를 동반하였고 2시간 이후에는 매우 큰 분자량의 oligomer를 관찰 할 수 있어 구강 암종 세포주에서 TGF- β type II 수용체가 proteasomal degradation에 의한 반감기(half-life)가 조절됨을 보여주었다. 이러한 결과는 구강 암종 세포주의 TGF- β type II 수용체는 proteasomal degradation에 의해 조절됨으로써 매우 짧은 반감기를 가지고 있으리라는 점을 암시하며, 이는 mRNA 발현에도 불구하고 Western blotting에서 단백질 발현을 관찰 할 수 없었던 이유를 설명해준다. 그러나 이러한 발현 감소가 TGF- β 에 의한 성장 억제 효과 소실과의 직접적인 연관성을 파악하기 위해서는 proteasomal degradation에 대한 보다 많은 연구가 필요할 것으로 생각한다.

V. 결 론

본 연구에서는 두경부 점막에서 발생하는 다단계 암종 발생과정 중 TGF- β 에 의한 세포 성장 억제 소실 기전을 파악하기 위하여 8예의 구강 편평 세포 암종 세포주를 대상으로 TGF- β 에 의한 성장 억제 효과, 세포 주기 단백질 p21^{CIP1} 발현을 검색하였고, 나아가 type I & II TGF- β 수용체의 전사 조절과 전사 후 조절을 검색함으로써 TGF- β 수용체의 발현 조절 과정을 규명하고자 하였고, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. YD-8을 제외한 다른 구강 암종 세포주에서 TGF- β 에 의한 세포 성장 억제 효과를 보이지 않았다.
2. TGF- β 에 의한 성장 억제 효과를 보였던 YD-8에서는 TGF- β 투여후 p21^{CIP1}의 발현 증가를 관찰할 수 있었고, TGF- β 에 의한 성장 억제 효과가 없었던 YD-9에서는 p21^{CIP1}의 발현이 관찰되지 않았다.
3. Western blotting에서 TGF- β type I 수용체는 모든 세포주에서 발현되었으나 type II 수용체는 모두 발현되지 않았다.
4. RT-PCR과 Northern blotting에서 대부분의 세포주에서 Type II TGF- β receptor mRNA 발현이 관찰되었고, YD-8과 YD-17M 세포주에서 가장 많이 발현되었다.
5. Proteasomal degradation inhibitor인 MG132를 처리했을 때 Western blotting 상에서 시간에 의존적인 형태로 TGF- β type II 수용체의 발현이 증가하였고, 이들은 분자량이 점차 증가하였다.

이상의 결과로 대부분의 구강 암종 세포주는 TGF- β 에 의한 세포 성장 억제 효과를 상실하는 것으로 판단되며, 세포 성장 억제 효과를 보였던 세포주에서는 p21^{CIP1}을 경유하는 세포 증식 주기 조절을 통하여 세포 성장 억제 효과를 보일 것으로 판단되었다. 또한, TGF- β type II 수용체에 있어서 비교적 많은 mRNA 발현에도 불구하고 Western blotting상에서 단백질이 발현하지 않은 것은 proteasomal degradation에 의해 반감기가 매우 짧기 때문인 것으로 판단된다. 따라서 향후 종양 발생 과정에 있어 TGF- β 에 의한 성장 억제 효과의 소실이 수용체의 돌연 변이 뿐만 아니라 proteasomal degradation 의한 반감기 조절도 기인할 것으로 생각되며, 종양 발생 과정에 있어 TGF- β 수용체의 proteasomal degradation에 의한 TGF- β 에 의한 성장 억제 효과 소실 과정을 규명하는게 필요하리라 생각하였다.

참 고 문 헌

- 김태연, 육종인, 김진: 구강점막의 백반증과 편평상피세포암종에서 Epidermal Growth Factor Receptor 및 Transforming Growth Factor- β 1 수용체의 발현. 대한 구강병리학회지, 31: 1247-1255, 1997.
- 전용찬, 이승애, 김영삼, 윤정훈, 육종인, 김진: 구강암종세포주의 확립과 생물학적 특징, 대한구강악안면병리학회지, 26(1) : 1-19, 2002
- Abdollah S, Macias-Silva M, Tsukazaki T, Hayashi H, Attisano L and Wrana JL: T β RI Phosphorylation of Smad2 on Ser⁴⁶⁵ and Ser⁴⁶⁷ Is Required for Smad2-Smad4 Complex Formation and Signaling. J Biol Chem, 272: 27678-27685, 1997.
- Alexandrow MG and Mases HL: Transforming Growth Factor β and Cell Cycle Regulation. Cancer Res: 1452-1457, 1995.
- Attisano L and Wrana JL: Mads and Smads in TGF β signaling. Cur Opin Biol, 10: 188-194, 1998.
- Brattain MG, Markowitz SD, Willson JKV: The type II transforming growth factor- β receptor as a tumor-suppressor gene. Cur Opin Oncol, 8: 49-53, 1996.
- Cecile M. Pickart: Mechanisms underlying ubiquitination. Ann Rev Biochem, 70: 503-533, 2001.
- Eisma RJ, Spiro JD, Biberstein SE, Lindquist R, Kreutzer DL: Decreased Expression of Transforming Growth Factor Beta Receptors on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. Am J Surg, 101: 641-645, 1996.
- Fan Zhang and Marikki Laiho. On and off: proteasome and TGF- β

- signaling. *Exp Cell Res*, 291: 275-281, 2003.
- Farber E: The Multistep Nature of Cancer Development. *Cancer Res*, 44: 4217-4223, 1984.
- Fink SP, Swinler SE, Lutterbaugh JD, Massague J, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B, Willson JKV and Markowitz S: Transforming Growth factor- β -included Growth Inhibition in a Smad4 mutant Colon Adenoma Cell Line. *Cancer Res*, 61: 256-260, 2001.
- Furuta K, Misao S, Takahashi K, Tagaya T, Fukuzawa Y, Ishikawa T, Yoshioka K and Kakumu S: Gene Mutation of transforming growth factor β 1 type II receptor in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 81: 851-853, 1993
- Garrigue-Antar L, Malabika D, Vellucci VF, et al.: The role of transforming growth factor- β receptors in cancer of the upper aero-digestive tract. In *Head and Neck Cancer-Advances in Basic Research*, Werner JA, Lippert BM, Rudent HH(eds). Elsevier Science: Amsterdam: 235-252, 1996.
- Garrigue-Antar L, Munoz-Antonia T, Antonia SJ, Gesmonde J, Vellucci VF and Reiss M: Missense Mutations of the Transforming Growth factor β Type II Receptor in Human Head and Neck Squamous Carcinoma Cells. *Cancer Res*, 55: 3982-3987, 1995.
- Garrigue-Antar L, Souza RF, Vellucci VF, Meltzer SJ, Reiss M: Loss of Transforming Growth Factor- β Type II Receptor Gene Expression in Primary Human Esophageal Cancer. *Lab Invest*, 75: 263-272, 1996.
- Geng Y and Weinberg RA: Transforming Growth Factor β effects on expression of G1 Cyclins and cyclin-dependent protein kinases. *Proc Natl Acad Sci*, 90: 10315-10319, 1993.
- Grady WM, Myeroff LL, Swinler SE, Rajput A, Thiagalingam S,

- Lutterbaugh JD, Neumann A, Brattain MG, Chang J, Kim SJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Willson JKV and Markowitz S: Mutational Inactivation of Transforming Growth Factor β Receptor Type II in Microsatellite Stable Colon Cancers. *Cancer Res*, 59: 320-324, 1999.
- Hong-Jian Zhu and antony W. Burgess: Regulation of transforming growth factor- β signaling. *Mol Cell Biol Res Comm*, 4: 321-330, 2001.
- Hu PP, Datto MB and Wang X: Molecular Mechanisms of Transforming Growth factor- β Signaling. *Endocrine Rev*, 19(3): 349-363, 1998
- Ignotz RA and Massague J: Transforming Growth Factor- β Stimulates the Expression of Fibronectin and Collagen and Their Incorporation into the Extracellular Matrix. *J Biol Chem*, 261: 4377-4345, 1986.
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D & Perucho M: Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*, 363: 558-561, 1993.
- Ito M, Yasui W, Nakayama H, Yokozaki H, Ito H and Tahara E: Reduced Levels of Transforming Growth Factor-beta Type I Receptor in Human Gastric Carcinoma. *Jpn J Cancer Res*, 83: 86-92, 1992.
- Joan Massague, Stacy W. Blain, and Roger S.: TGF- β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*, 103: 295-309, 2000.
- John R. Benson: Role of transforming growth factor β in breast carcinogenesis. *Lancet Oncol*, 5: 229-239, 2004.
- Koff A, Ohtsuki M, Polyak K, Roberts JM, Massague J: Negative Regulation of G1 in Mammalian Cells: Inhibition of Cyclin E-Dependent Kinase by TGF- β . *Science*, 260: 536-539, 1993.

- Laiho M, DeCaprio JA, Ludlow JW, Livingston DM and Massague J: Growth Inhibition by TGF- β Linked to Suppression of Rstinoblastoma Protein Phosporylation. *Cell*, 62: 175-185, 1990.
- MacKay SLD, Yaswen LR, Tarnuzzer RW, Modawer LL, Bland KI, Copeland III EM and Schultz GS: Colon Cancer Cells That Are Not Growth Inhibited by TGF- β Lack Functional Type I and II TGF- β Receptors. *Ann Surg*, 221: 767-777, 1995.
- Maestro R, Gasparotto D, Vukosavljevic T, Barzan L, Sulfaro S and Boiocchi M: Three Discrete Regions of Deletion at 3p in Head and Neck Cancers. *Cancer Res*, 53: 5775-5779, 1993.
- Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, Brattain M, Willson JKV: Inactivation of the Type II TGF- β Receptor in Colon Cancer Cells with Microsatellite Instability. *Science*, 268: 1336-1338, 1995.
- Massague J: Receptors for the TGF- β Family. *Cell*, 69: 1067-1070, 1992.
- Munoz-Antonia T, Li X, Reiss M, Jackson R and Antonia S: A Mutation in the Transforming Growth Factor Type II Receptor Gene Promoter Associated with Loss of Gene Expression. *Cancer Res*, 56: 4831-4835, 1996.
- Muro-Cacho CA, Anderson M, Cordero J and Munoz-Antonia T: Expression of Transforming Growth Factor β Type II Receptors In Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*, 5: 1243-1248, 1999.
- Myeroff LL, Parsons R, Kim SJ, Hedrick L, Cho KR, Kim Orth, Mathis M, Kinzler KW, Lutterbaugh J, Park K, Bang YJ, Lee HY, Park JG,

- Lynch HT, Roberts AB, Vogelstein B and Markowitz SD: A Transforming Growth Factor β Type II Receptor Gene Mutation Common in Colon and Gastric but Rare in Endometrial Cancers with Microsatellite Instability. *Cancer Res*, 55: 5545-5547, 1995.
- Nakashima H, Mori M, Mimori K, Inoue H, Shibuta K, Bada K, Mafune K and Akiyoshi T: Microsatellite Instability In Japanese Esophageal Carcinoma. *Int J Cancer*, 64: 286-289, 1995.
- Park K, Kim SJ, Bang YJ, Park JG, Kim NK, Roberts AB and Sporn MB: Genetic changes in the transforming growth factor β (TGF- β) type II receptor gene in human gastric cancer cells: Correlation with sensitivity to growth inhibition by TGF- β . *Proc Natl Acad Sci*, 91: 8772-8776, 1994.
- Parkin DM, Laara E, Muir CS, Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancer in 1980, 41: 184-97
- Parsons R, Myeroff LL, Liu B, Willson JKV, Markowitz SD, Kinzler KW and Vogelstein B: Microsatellite Instability and Mutations of the Transforming Growth Factor β Type II Receptor Gene in Colorectal Cancer. *Cancer Res*, 55: 5548-5550, 1995.
- Paterson IC, Matthews JB, Huntly S, Robinson CM, Fahey M, Parkinson EK and Prime SS: Decreased expression of TGF- β cell surface receptors during progression of human oral squamous cell carcinoma. *J Pathol*, 193: 458-467, 2001.
- Peter Kavsak, et al.: Smad7 binds to smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF β receptor for degradation. *Mol Cell*, 6: 1365-1375, 2000.
- Rich JN, Borto AJ, Wang X: Transforming Growth factor- β Signaling in Cancer. *Mic Res and Tech*, 52: 363-373, 2001.

- Rooke HM, Vitas MR, Crosier PS and Crosier KE: The TGF- β type II receptor in chronic myeloid leukemia: analysis of microsatellite regions and gene expression. *Leukemia*, 13: 535-541, 1999.
- Shirasuna K, Hayashido Y, Sugiyama M, Yoshioka H, and Matsuya T: Immunohistochemical localization of epidermal growth factor(EGF) and EGF receptor in human oral mucosa and its malignancy. *Virch Arch Path Anat*, 418: 349-353, 1991.
- Slaughter DP, Southwick HW, and Smejkal W: "field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. *Cancer*: 963-968, 1953.
- Souchelytskyi S, Tamaki K, Engstrom U, Wernstedt C, Dijke P and Heldin C: Phosphorylation of Ser⁴⁶⁵ and Ser⁴⁶⁷ in the C Terminus of Smad2 Mediates Interaction with Smad4 and Is Required for Transforming Growth factor- β Signaling. *J Biol Chem*, 272: 28107-28115, 1997.
- Sporn MB & Roberts AB: Autocrine growth factors and cancer. *Nature*, 313, 28: 745-747, 1985
- Sporn MB, Roberts AB: Transforming Growth Factor- β , Multiple Actions and Potential Clinical Applications. *J Am Med Assoc*, 262: 938-941, 1989.
- Thiboeau SN, Bren G, Schaid D: Microsatellite Instability in Cancer of the Proximal Colon. *Science*, 260: 816-819, 1993.
- Wakefield LM and Roberts AB: TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin & Dev*, 12: 22-29, 2002.
- Wang D, Kanuma T, Mizunuma H, Takama F, Ibuki Y, Wake N, Mogi A, Shitara Y and Takenoshita SE: Analysis of specific gene mutations in the Transforming Growth factor- β signal transduction pathway in human ovarian cancer. *Cancer Res*, 60: 4507-4512, 2000.

- Wang D, Song H, Evans JA, Lang JC, Schuller DE and Weghorst CM: Mutation and downregulation of the transforming growth factor β type II receptor gene in primary squamous cell carcinomas of the head and neck. *Carcinogenesis*, 18: 2285-2290, 1997.
- Wang J, Sun L, Myeroff L, Wang X, Gentry LE, Yang J, Liang J, Zborowska E, Markowitz S, Willson JKV and Brattain MG: Demonstration That Mutation of the Type II Transforming Growth Factor β Receptor Inactivates Its Tumor Suppressor Activity in Replication Error-positive Colon Carcinoma Cells. *J Biol Chem*, 270: 22044-22049, 1995.
- Wieser R, Attisano L, Wrana JL and Massague J: Signaling Activity of Transforming Growth factor β Type II Receptors Lacking Specific Domains in the Cytoplasmic Region. *Mol Cell Biol*, 13: 7239-7247, 1993.
- Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang X and Massague J: TGF β Signals through a Heteromeric Protein Kinase Receptor Complex. *Cell*, 71: 1003-1014, 1992.
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F & Massague J: Mechanism of activation of TGF- β receptor. *Nature*, 370: 341-347, 1998.
- Yigong Shi and Joan Massague: Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113: 685-700, 2003.

ABSTRACT

Expression of TGF- β receptor in oral squamous cell carcinoma

Geun Hyung Lee

*Department of Oral Pathology,
The Graduate School, Yonsei University
(Directed by Prof. Jong In Yook D.D.S., Ph. D.)*

Epithelium maintains homeostasis by the signaling balance of growth stimulation and inhibition. Therefore, the developmental mechanism of carcinoma is explained as a imbalance of epithelial growth and inhibitory factors. It is well-known that the roles of epidermal growth factor(EGF) and its receptor during the development of cancer. Recently, loss of growth inhibitory effects of transforming growth factor- β (TGF- β) on epithelial cells is regarded as a possible mechanism of cancer. Although the genomic mutation in type I and type II receptors of TGF- β is considered one of important mechanism of these inactivation, there might be another inactivation mechanism because the mutation rate is relatively low and inhibitory effect is not associated with the mutation. Especially, half-life controlled by proteasomal degradation is known to relate the proliferation and apoptosis of epithelial calls, its roles on TGF- β receptor are now well-known. In these background, the purpose of this study is evaluating controlling mechanism type I and type II receptor of TGF- β by detecting effects of TGF- β on growth inhibition and on expression of

cell cycle regulatory protein p21^{CIP1}. Eight cancer cell lines derived from oral squamous cell carcinoma were used for this study. The results were as follows;

1. There was no growth inhibition effects by TGF- β except YD-8 cells.
2. YD-8 cells which showed growth inhibition expresses p21^{CIP1} by TGF- β whether refractory cell lines, YD-9, did not.
3. All of the tumor cells express type I receptor of TGF- β on western blot analysis whereas there was no detectable expression of type II receptor.
4. All of the tumor cells express mRNA of type II receptor by RT-PCR and northern blot analysis, especially on YD-8 and YD-17M.
5. The expression level of type II receptor of TGF- β was gradually increased in time-dependent manner by the treatment of MG132, a specific proteasomal degradation inhibitor.

From these results, most of oral cancer cell lines might lose the growth inhibitory effects by TGF- β , and the growth inhibition on YD-8 cells was mediated by expression of p21^{CIP1}. The reasons of non-detectable level of protein expression of type II receptor in spite of there was an expression of mRNA suggest the possibility of shortened half-life of the protein by proteasomal degradation, Further research on the roles of proteasomal degradation of TGF- β may delight the mechanism of loss of inhibitory effect by TGF- β .

Key Words: oral squamous cell carcinoma, expression of receptor of TGF- β , p21^{CIP1}, proteasomal degradation