신경내분비성 대세포폐암에서 염색체 5번의 장완에 위치한 종양억제 유전자좌의 확인

연세대학교 대학원

의 학 과

강 신 명

신경내분비성 대세포폐암에서 염색체 5번의 장완에 위치한 종양억제 유전자좌의 확인

지도교수 김 성 규

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2004년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

강 신 명

강신명의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2004년 12월 일

감사의 글

한 걸음 떼기도 힘겨워할 때 방향을 제시해 주시고 격려와 조언을 아끼지 않으신 김성규 교수님과 김세규 교수님, 윤채옥 교수님께 먼저 감사의 인사를 드립니다. 또한 항상 관심을 가지고 지도해 주시는 장 준 교수님, 김영삼 교수님께 감사 드립니다. 초보 연구자에게 시간을 할애해 주고 노고를 아끼지 않은 임상의학연구센터 신주혜 선생께 고마운 마음을 전합니다. 아들을 믿고 묵묵히 바라보고 계시는 아버지, 언제라도 달려가고픈 안식처인 가족 - 아내와 첫째 준원, 둘째 호승 - 은 저에게 누구 보다도 큰 힘이 되었습니다.

이 논문으로 The American College of Chest Physicians의 CHEST 2004에서 Young Investigator Award를 받은 것을 주위의 많은 분들의 노력으로 엮어낸 결과로 생각하며, 여러분들께 영광을 돌립니다. 또한 하늘나라에서 흐뭇하게 저를 바라보고 계실 어머니께 논문과 상을 바칩니다.

저 자 씀

차 례

국문요약 ····· 1

I. 서론 ····· 2

II. 연구방법 ····· 4

1. 연구 대상 ····· 4

2. 연구 방법 ····· 5

가. 파라핀 포매 블록 ····· 5

나. DNA 추출 ····· 5

다. PCR－LOH 분석 ····· 5

III. 결과 ····· 8

IV. 고찰 ····· 12

V. 결론 ····· 15

참고문헌 ····· 16

영문요약 ····· 20

List of Tables

Table 1. Characteristics of thirteen patients with LCNEC ····· 4

Table 2. Microsatellite markers used in analyzing 5q of LCNEC ····· 6

Table 3. Frequencies of LOH in 5q of LCNEC ····· 9

List of Figures

Figure 1. Schematic representation of the deletion map of chromosome 5q in large cell neuroendocrine carcinoma ····· 10

Figure 2. Examples of deletions observed in LCNEC ····· 11

국문요약

신경내분비성 대세포폐암에서 염색체 5번의 장완에 위치한 종양억제 유전자좌의 확인

최근 폐암에 관한 대립인자 연구를 통해 염색체 5번의 장완에 이형접합소실이 빈번히 관찰된다고 알려져 있고, 이는 이 부위에 종양억제 유전자가 존재할 가능성을 시사한다. 그러나 신경내분비성 대세포폐암에서 이러한 유전적 변화가 알려진 바는 극히 적다. 향후 신경내분비성 대세포폐암의 발생 및 진행에 중요한 역할을 하는 특이 종양억제 유전자를 찾기 위한 노력의 일환으로 염색체 5번의 장완에서 현미부수체 표지자를 이용한 PCR-이형접합소실 분석으로 공동결손 구역 결정을 위한 연구를 시행하였다. 신경내분비성 대세포폐암으로 진단된 13명의 암 조직과 이에 대응하는 정상 조직의 파라핀 포매 블록으로부터 DNA를 추출하였으며, 염색체 5번의 장완에 위치하는 총 19개의 현미부수체 표지자를 이용하여 PCR-이형접합소실 분석을 실시하였다. 연구 결과 50% 이상의 이형접합소실을 보인 영역을 네 군데에서 확인할 수 있었다. 5q14.3에 위치하는 *D5S107*과 5q21.1에 위치하는 *D5S409* 사이인 19.1 cM 영역에서 91.7%, 5q22.2에 위치하는 *D5S421*과 5q23.1에 위치하는 *D5S404* 사이인 4.0 cM 영역에서 53.8%, 5q23.3에 위치하는 *IRF-1*과 5q33.2에 위치하는 *D5S209* 사이인 20.7 cM 영역에서 100%, 그리고 5q35.1에 위치하는 *D5S400*과 5q35.2에 위치하는 *D5S498* 사이의 5.4 cM 영역에서 84.6%의 빈도로 이형접합소실을 관찰하였다. Shifted band는 224 loci 중 6 loci(2.7%)에서 관찰되었다. 이상의 결과는 염색체 5번의 장완에 신경내분비성 대세포폐암의 발생 및 진행에 관여하는 최소 4개의 종양억제 유전자좌가 존재할 가능성을 시사하며, 향후 특이 유전자를 찾기 위한 추가적인 노력이 있어야 할 것으로 생각된다.

핵심되는 말: 신경내분비성 대세포폐암, 종양억제 유전자좌, 염색체 5번 장완, 이형접합소실

신경내분비성 대세포폐암에서 염색체 5번의 위치한 장완에 종양억제 유전자좌의 확인

<지도교수 김 성 규>

연세대학교 대학원 의학과

강 신 명

Ⅰ. 서 론

폐암은 전 세계적으로 주된 암 사망의 원인이며, 우리나라에서 위암에 이어 두 번째로 흔히 발생하는 암이다[1]. 폐암 발생에는 다단계의 형태학적 변화가 관찰되며 이는 암유전자(oncogene)의 활성화나 종양억제유전자(tumor suppressor gene)의 불활성화를 나타내는 유전적 또는 부유전적(epigenetic) 변화의 축적을 통해 진행하는 것으로 생각되고 있다[2].

현미부수체(microsatellite)란 보통 한 개에서 다섯 개의 뉴클레오티드로 이루어진 짧은 motif의 반복배열을 보이는 DNA의 줄기(stretches)를 말하며, 1981년 Miesfeld 등이 발견한 이래 많은 반복 구조가 보고되어 있다[3]. 사람에서는 cytosine과 adenine으로 이루어진 디뉴클레오티드(dinucleotide)의 반복배열이 가장 흔하다. 이 중 몇 가지 반복배열은 동일 종 내에 반복 수에 변이(variation)가 있는 것이 알려져 있다. 현미부수체 다형성(polymorphism)의 장점은 게놈 DNA 상에 많이 존재하여 상세한 연쇄분석이 가능하고, 반복 수의 변이가 많아 대립 유전자 수가 많아 동형접합이 될 확률이 낮고, 유전적 정보량이 많아지며, PCR 이용이 가능하고 소량의 게놈 DNA를 이용하여 신속하게 대량의 시료를 분석할 수 있다는 것이다.

종양억제 유전자의 불활성화는 하나의 대립형질에서 작은 돌연변이가 발생하고, 다른 대립형질에서 보다 큰 영역의 결손을 동반하는 것이 가장 흔한 기전으로 생각되고 있다[4]. 따라서 많은 연구자들은 종양억제 유전자 불활성화의 특징인 이형접합소실(loss of heterozygosity, LOH)의 분석을 통해 종양억제 유전자를

찾는 다양한 연구를 시행하여 오고 있다.

신경내분비성 대세포폐암(large cell neuroendocrine carcinoma, LCNEC)은 대세포암(large cell carcinoma)의 한 아형으로, 소세포암과 함께 높은 악성도의 신경내분비암에 속하며, 예후도 매우 불량한 것으로 알려져 있다[5]. 최근 박 등도 국내 37예의 신경내분비성 대세포폐암 환자를 분석하여 5년 생존율 27%, 중앙생존기간 24개월을 보고하였다[6]. 따라서 분자생물학적 병인의 규명은 신경내분비성 대세포폐암의 임상적, 생물학적 특성을 이해하는데 기여하여 진단 및 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

폐암에 대한 연구 결과 1p, 3p, 4q, 5q, 8p, 9p, 9q, 10q, 13q, 17p, 18q, Xp, Xq 등 여러 염색체에서 LOH가 발견됨으로써 폐암 발생에 중요한 역할을 할 것으로 추정되는 종양억제 유전자좌에 대한 단서가 제공되었다[7-9].

염색체 5번 장완의 종양억제 유전자로는 가족성선종성폴립증(familial adenomatous polyposis)의 발생과 관련이 있는 APC(adenomatous polyposis coli) 유전자가 널리 알려져 있다[10]. APC/MCC 유전자 이외에 5q11-q13 영역[11], 5q15 영역[12], 5q33-35 영역[13] 등이 폐암에서 LOH가 관찰되는 영역으로 종양억제 유전자가 존재할 가능성을 시사하고 있다. 그러나 신경내분비성 대세포폐암에 대한 연구는 다른 세포형(cell type)에 비해 상당히 부족한 실정이다. 최근 Ullmann[14], Onuki[15], Hiroshima[16] 등이 염색체 5번 장완에서 LOH를 보고하였으나, 소수의 현미부수체 표지자 만을 검토한 결과이었다.

따라서 본 연구자는 신경내분비성 대세포폐암의 발생과 진행에 병인적 중요성을 갖는 종양억제 유전자를 찾기 위한 노력의 일환으로 염색체 5번의 장완에 위치한 19개의 현미부수체 표지자를 이용하여 PCR-LOH 분석을 시행하였다.

Ⅱ. 대상 및 방법

1. 연구 대상

연세대학교 의과대학 세브란스병원에서 신경내분비성 대세포폐암으로 진단되어 수술적 절제를 받은 13명의 조직을 대상으로 하였다(Table 1).

Table 1. Characteristics of thirteen patients with LCNEC

Patient	Sex	Age	Smoking*	TNM classification			Stage	Overall survival†
				T	N	M		
L1	M	72	46	1	0	0	IA	>27
L2	M	56	60	2	0	0	IB	>98
L3	M	63	70	3	1	0	IIIA	36
L4	M	54	13	2	2	0	IIIA	>101
L5	M	65	48	1	0	0	IA	13
L6	M	67	60	2	0	0	IB	>98§
L7	M	73	55	2	1	0	IIB	1
L8	M	63	106	1	0	0	IA	>52
L9	M	62	40	3	2	0	IIIA	6
L10	M	66	30	2	0	0	IB	110
L11	M	72	20	1	2	0	IIIA	>38
L12	M	59	30	2	2	0	IIIA	>66
L13	M	59	50	3	1	0	IIIA	20

*pack years
†months
§loss to follow up after 98 months

2. 연구 방법

가. 파라핀 포매 블록

DNA 추출을 위해 신경내분비성 대세포폐암 조직과 이에 대응하는 동일한 환자에서의 정상 조직 파라핀 포매 블록을 이용하였다. 암 조직 블록은 microtome을 이용하여 4 μm로 절편 한 후, hematoxylin과 eosin 염색을 하여 병리의사에 의해 신경내분비성 대세포폐암을 재차 확인하였고, 종양 부위를 확인하였다. 이후 4~5개의 10 μm 추가 절편을 만든 다음 저배율 현미경 하에서 scalpel을 이용하여 정상 세포의 오염이 30% 이하로 가능한 적도록 주의하면서 종양 조직을 박리하였다. 정상 조직도 동일한 방법으로 준비하였다.

나. DNA 추출

박리한 조직은 1% SDS-proteinase K를 포함한 TE9 buffer (1M Tris-HCl (pH8.9), 0.5M EDTA, 4M NaCl) 200 μl에 넣어 42℃에서 12~24시간동안 배양하여 용해시켰다. 용해시킨 조직은 phenol, chloroform을 동량 첨가하여 14,000 rpm에서 2분간 원심 분리한 후 상층액만을 새 튜브에 옮겨 담았다. 이러한 과정을 2번 반복한 후 Master mix (10M NH_3AC, 100% Ethanol)와 소량의 glycogen을 넣고, 14,000 rpm에서 20분간 원심분리를 하였다. Pellet을 확인하고, 70% ethanol로 세척한 뒤 실온에서 건조시켰다. 이 후 멸균된 3차 증류수를 적당량 넣어 DNA를 녹였다. 분광 광도계를 이용하여 260 nm 파장에서 DNA 농도를 측정하였고, 실험 전까지 4℃에 보관하였다.

다. PCR-LOH 분석

표지자를 사용한 PCR-LOH 분석을 위하여 염색체 5번의 장완에 위치하는 19개의 현미부수체 표지자 (Research Genetics, Huntsville, AL, USA)를 선택하여 구입하였다 (Table 2).

각각의 primer들 중 하나는 [γ-^{32}P]ATP (3,000Ci/mmol; Buckinghamshire, England)와 T4 DNA polynucleotide kinase (New England Biolabs, Beverly, MA)를 이용하여 end-labeling하였다. 중합효소연쇄반응은 총 12.5 μl가 되도록 20 ng genomic DNA, 1% dimethylsulfoxide, 200 mM dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.1 mM [γ-^{32}P]ATP를 포함한 0.4 mM PCR primers, 0.5 units Taq DNA polymerase (GIBCO-BRL, Gaithersburg,

MD, USA)을 첨가하였다. 이를 temperature cycler (Hybaid; Omnigene, Woodbridge, NJ, USA)를 이용하여 95℃에서 30초간 변성, 52~60℃에서 60초동안 재결합, 그리고 70℃에서 60초동안 신장하는 과정을 35회 증폭한 다음 70℃에서 5분 동안 신장시켰다. 중합효소연쇄반응 산물은 2X stop buffer (95% formamide, 20 mM EDTA, 0.1% bromophenol blue, 0.1% Xylene cyanol FF)를 동량 섞어 95℃에서 3분간 가열한 다음 즉시 얼음에 넣고, 그 중 4 μl를 6% polyacrylamide-urea-formamide (PAGE) gel에 loading하여 70 W로 약 4시간 전기영동을 시켰다. 전기영동이 끝난 gel은 gel dryer에서 1시간 정도 말린 후 Kodak XAR-5 film (Kodak, Rochester, NY, USA)에 노출시켜 합성물을 판독하였다.

Table 2. Microsatellite markers used in analyzing 5q of LCNEC

Marker	Location	Repeat	Size
D5S118	5q12.1	DI	78-92
D5S107	5q14.3	DI	133-155
D5S644	5q15	DI	81-101
D5S409	5q21.1	DI	138-154
D5S346	5q22.2	DI	96-122
D5S421	5q22.2	DI	152-170
D5S404	5q23.1	DI	180-198
FBN 2	5q23.2	DI	110-155
IRF-1	5q23.3	DI	174-184
IL 9	5q31.1	DI	98-120
D5S414	5q31.2	DI	186-206
D5S178	5q31.3	DI	98-120
D5S210	5q32	DI	212-232
D5S209	5q33.2	DI	196-214
D5S820	5q33.3	TETRA	190-218
D5S400	5q35.1	DI	218-236
D5S625	5q35.1	DI	224-238
D5S429	5q35.1	DI	160-186
D5S498	5q35.2	DI	171-189

DI:dinucleotides repeat

TETRA:tetranucleotides repeat

실험 결과는 신경내분비성 대세포폐암에서 대립형질 2개중 1개의 신호 강도가 정상 대조군과 비교하여 50% 이상 감소하면 LOH로 정의하였고, 또한 정상 대조군에서 관찰되지 않는 새로운 대립형질이 관찰되는 경우 shifted band로 정의하였다.

Ⅲ. 결 과

13예의 모든 대상자 조직 (100%)에서 19개의 현미부수체 표지자 중 적어도 3개 이상의 LOH를 관찰할 수 있었다. 50% 이상의 LOH를 보인 영역을 네 군데에서 확인 할 수 있었는데, 5q14.3에 위치하는 *D5S107*과 5q21.1에 위치하는 *D5S409* 사이인 19.1 cM 영역에서 91.7%, 5q22.2에 위치하는 *D5S421*과 5q23.1에 위치하는 *D5S404* 사이인 4.0 cM 영역에서 53.8%, 5q23.3에 위치하는 *IRF-1*과 5q33.2에 위치하는 *D5S209* 사이인 20.7 cM 영역에서 100%, 그리고 5q35.1에 위치하는 *D5S400*과 5q35.2에 위치하는 *D5S498* 사이의 5.4 cM 영역에서 84.6%의 빈도로 LOH를 관찰하였다 (Table 3, Figure 1, Figure 2). Shifted band는 13예 중 3예 (23.1%), 총 224 loci 중 6 loci (2.7%)에서 관찰되었다 (Figure 1).

Table 3. Frequencies of LOH in 5q of LCNEC

Marker	Location	Repeat	No. of informative	% informative	No. of LOH	% LOH
D5S118	5q12.1	DI	13	100	3	23.1
D5S107	5q14.3	DI	12	92.3	10	83.3
D5S644	5q15	DI	12	92.3	6	50
D5S409	5q21.1	DI	10	76.9	8	80
D5S346	5q22.2	DI	12	92.3	2	16.7
D5S421	5q22.2	DI	13	100	5	38.5
D5S404	5q23.1	DI	12	92.3	5	41.7
FBN 2	5q23.2	DI	12	92.3	4	33.3
IRF-1	5q23.3	DI	11	84.6	5	45.5
IL 9	5q31.1	DI	13	100	7	53.9
D5S414	5q31.2	DI	8	61.5	7	87.5
D5S178	5q31.3	DI	9	69.2	5	55.6
D5S210	5q32	DI	12	92.3	8	66.7
D5S209	5q33.2	DI	13	100	8	61.5
D5S820	5q33.3	TETRA	13	100	5	38.5
D5S400	5q35.1	DI	7	53.9	5	71.4
D5S625	5q35.1	DI	13	100	7	53.9
D5S429	5q35.1	DI	12	92.3	8	66.7
D5S498	5q35.2	DI	11	84.6	5	45.5

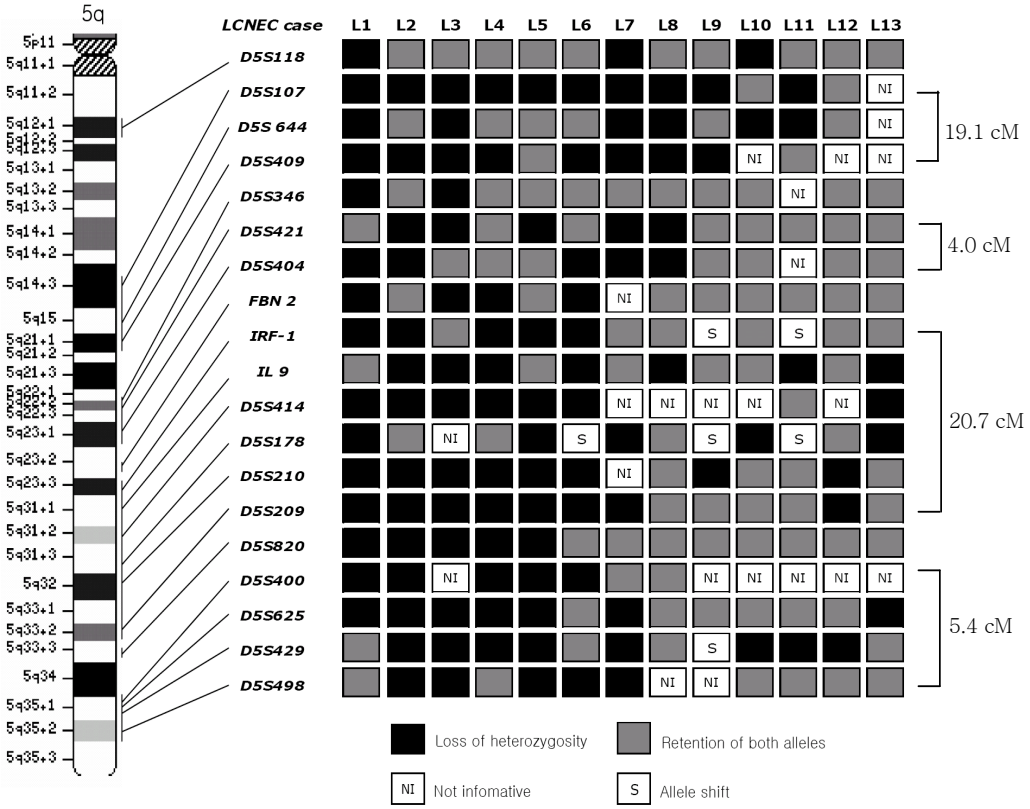

Figure 1. Schematic representation of the deletion map of chromosome 5q in large cell neuroendocrine carcinoma. The common deleted regions are indicated on the right side of the figure.

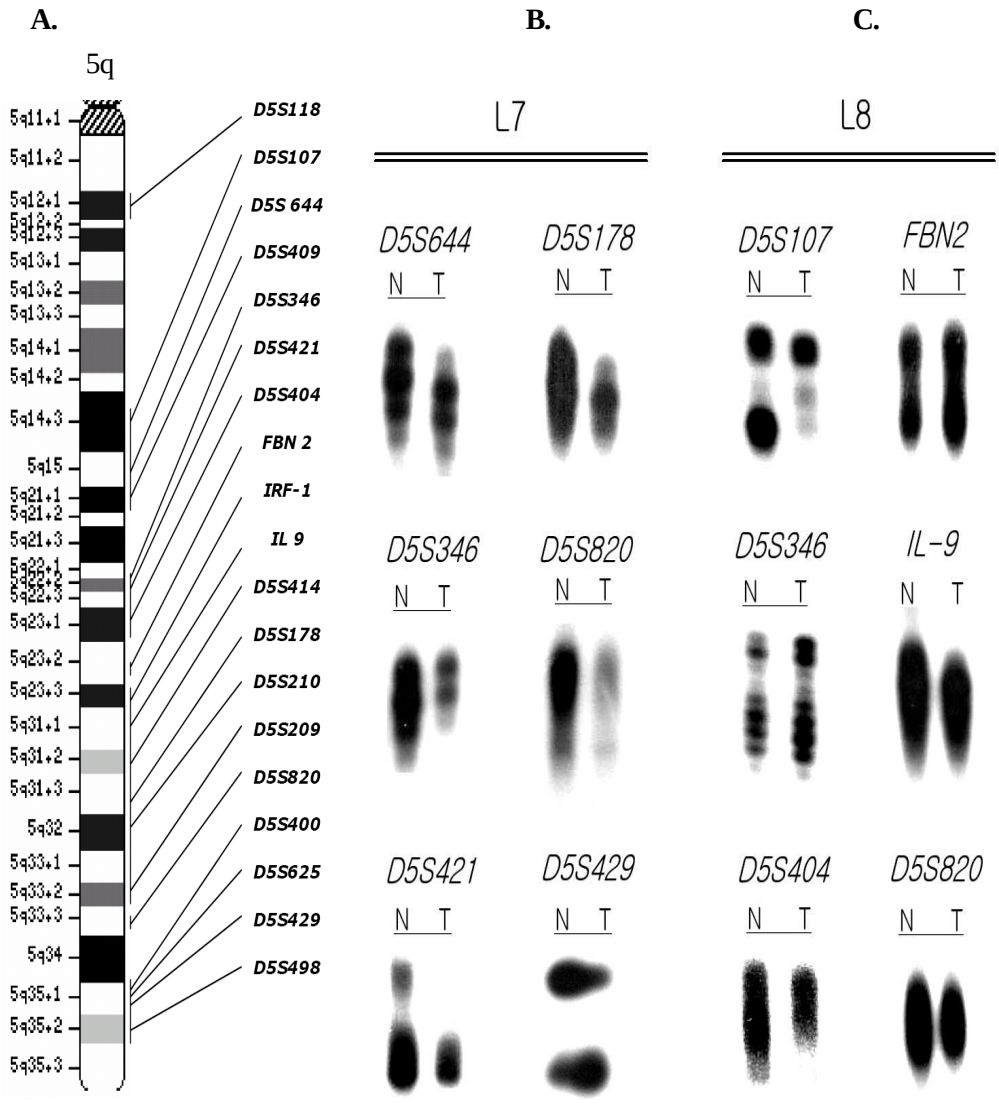

Figure 2. Examples of deletions observed in LCNEC. A. Order of microsatellite markers used in this study. B. LOH at markers *D5S644, D5S421, D5S178, D5S429,* while retention at markers *D5S346, D5S820* in tumor LCNEC7. C. LOH at markers *D5S107, D5S404, IL-9,* while retention at markers *D5S346, FBN2, D5S820* in tumor LCNEC. N indicates normal tissues and T indicates tumor tissues.

Ⅳ. 고 찰

염색체 5번은 난소암, 위암, 식도암, 급성 골수성 백혈병, 골수이형성 증후군, 폐암과 같은 몇몇 악성 질환에서 유전자 변화의 표적이 되고 있다[17-19]. APC/MCC 유전자는 염색체 5번 장완에서 확인된 종양억제 유전자이고, 폐암에서도 흔히 LOH가 관찰되는 유전자 영역이다[13,20-22]. 그 외에 mismatch repair gene 인 hMSH3을 포함하는 5q11-q13 영역[11], 5q15 영역[12], 5q33-35 영역[13] 등이 폐암에서 LOH가 관찰되는 영역으로, 이 영역에서 종양억제 유전자가 존재할 가능성을 시사하고 있다.

신경내분비성 대세포폐암에 대한 연구는 다른 폐암 세포형에 비해 상당히 적은 편 이지만 최근의 몇몇 연구에서 염색체 5번 장완의 LOH가 보고되었다. Ullmann 등은 13예의 신경내분비성 대세포폐암의 염색체를 분석한 결과 5q가 3p, 13q, 19q와 더불어 가장 흔한 염색체 소실을 보인다고 보고하였다[14]. Onuki 등은 신경내분비 폐암종 범주의 종양 중 5q21 위치 (APC 유전자와 MCC 유전자 사이 영역)에서 비정형유암종 (atypical carcinoid)은 25%, 신경내분비성 대세포폐암은 46%, 소세포폐암은 86%의 빈도로 LOH가 관찰됨을 보고하였다. 또한 신경내분비성 대세포폐암과 유암종 그룹의 생존율 비교에서 5q21 위치의 이형접합소실이 불량한 생존율을 나타내는 유의한 인자라고 보고하였다[15]. Hiroshima 등은 1기 신경내분비성 대세포폐암을 조사하여 5q11의 75%, 5q31.3의 71.4%, 5q33의 30%의 빈도로 LOH가 관찰됨을 보고하였다[16]. 그러나 이러한 신경내분비성 대세포폐암 연구에서 사용한 현미부수체는 소세포폐암 등 다른 세포형에서 빈번히 LOH를 보인 소수의 표지자로 한정되어 있었다[7,14-16]. 따라서 본 연구자는 신경내분비성 대세포폐암에서 많은 현미부수체 표지자를 이용하여 염색체 5번 장완에서 LOH를 선별 (screen)하여 가능성 있는 종양억제유전자좌를 찾기 위한 연구를 행하였다. 13예의 신경내분비성 대세포폐암을 대상으로 시행한 본 연구 결과 염색체 5번의 장완에서 LOH 빈도가 높은 4군데의 영역이 확인되었다. 첫째는 5q14.3에 위치하는 *D5S107*과 5q21.1에 위치하는 *D5S409* 사이 영역, 둘째는 5q22.2에 위치하는 *D5S421*과 5q23.1에 위치하는 *D5S404* 사이 영역, 셋째는 5q23.3에 위치하는 *IRF-1*과 5q33.2에 위치하는 *D5S209* 사이 영역, 넷째는 5q35.1에 위치하는 *D5S400*과 5q35.2에 위치하는 *D5S498* 사이 영역이 확인되었다. 이는 염색체 5번의 장완에 신경내분비성 대세포폐암의 발생과 진행에 중요한 역할을 하는 종양억제 유전자좌가 최소 4개 이상 존재할 가능성을 시사하는 것이다.

5q14.3-q21.1 영역, 특히 5q14 영역은 ACC/MCC 종양억제 유전자와 더불어 5번 염색체 장완에서 LOH가 흔히 관찰되는 주목되는 부위이다[17,23-25]. 이 영역에서는 비소세포폐암 뿐만 아니라[12,26] 난소암[17], 위암[18,24], 고환배세포종 (testicular germ cell tumor)에서도[25] 흔히 LOH가 관찰된다. 현재까지 이 영역에서 확인된 종양과 연관된 유전자는 5q14.3에 RASA1 유전자가 있고 종양억제 유전자는 확인되지 않았으나 본 연구 결과 신경내분비성 대세포폐암에서도 91.7%의 높은 빈도로 LOH를 관찰할 수 있었으므로 다른 여러 종양에서의 결과를 함께 고려하면 이 영역은 신경내분비성 대세포폐암의 종양억제 유전자가 존재할 아주 좋은 후보영역이 될 것으로 판단되며, 향후 지속적인 연구 노력이 필요할 것으로 생각된다.

APC/MCC 유전자는 염색체 5번에서 가장 많이 알려진 종양억제 유전자로, APC 유전자는 가족성 선종성폴립증 발생과 관련이 있고[10], APC 유전자의 돌연변이는 빈번한 LOH와 함께 결장암[27], 췌장암[28], 위암[29], 구강암[30] 식도암[31] 등에서 발견된다. Ashton-Rickardt 등과 D'Amico 등은 폐암에서도 APC/MCC 영역에서 흔히 LOH가 관찰된다고 처음으로 보고하였고[20,21], 그 이후 여러 보고가 뒤따랐다[13,22,32]. 본 연구 결과 5q22.2-q23.1 영역에서 53.8%의 빈도로 LOH가 관찰되었다. 사용한 표지자가 APC 유전자와는 약 0.7 cM, MCC 유전자와 약 0.3 cM 거리를 두고 원위부에 위치하여 APC/MCC 유전자의 연관성을 생각할 수 있겠으나, APC 유전자와 약 0.03 cM 거리에 위치한 *D5S346*에서 LOH가 16.7%로 낮게 관찰되어 APC/MCC 유전자 외의 다른 종양억제 유전자가 존재할 가능성이 있어 추가적인 검증이 필요하리라 생각된다.

5q23.3-q33.2 영역에는 IRF1 (interferon regulatory factor 1), SMAD5, CDC23 등의 유전자가 존재한다. 그 중 IRF1 유전자는 종양억제 유전자처럼 기능하고, 골수이형성 증후군, 위암에서 기능적으로 불활성화 되어있는 것으로 알려져 있다[33,34]. 폐암에서는 LOH가 보고된 예는 극히 적었으나[12,16,35], 본 연구 결과는 100%의 빈도로 LOH를 보여 신경내분비성 대세포폐암의 병인에 관련된 종양억제유전자가 존재할 가능성이 매우 높을 것으로 생각된다. 특히, 높은 LOH 빈도와 IRF1 유전자의 기능을 고려할 때 IRF1 유전자가 종양억제 유전자로서 중요한 표적이 될 수 있을 것으로 생각된다.

5q35.1-q35.2 영역은 Girard, Mendes-da-Silva P 등이 각각 소세포폐암과 비소세포폐암에서 흔히 LOH를 보이는 영역으로 보고한 바 있다[7,12]. 5q35.1에 NPM1 유전자와 DUSP1 유전자가 이 영역에서 종양과 관련된 유전자이고, DUSP1 유전자는 비소세포폐암에서 mitogen-activated protein kinase phosphatase-1을 과발현 시킨다

는 보고가[36] 있으나, 아직까지 종양억제 유전자가 확인되지는 않았다. 본 연구에서도 이 영역에서 84.6%의 높은 LOH를 보여 종양억제 유전자의 존재 가능성을 나타내고 있고, 특히 *D5S625*와 *D5S498*에서는 LOH가 없고 그 사이에 있는 *D5S429*에서 LOH를 보인 L10, L11, L12의 예는 신경내분비성 대세포폐암의 종양억제 유전자를 찾는데 좋은 단서를 제공하고 있다고 생각된다.

이상의 결과를 소세포폐암 5q에서 본 연구와 동일한 현미부수체를 이용하여 연구를 시행한 조 등의 결과와 비교할 때[35] 5q21.1-q23, 5q33.2, 5q35.1-q35.2 영역에서는 유사한 결과를 보였으나, 다른 영역에서는 상이한 결과를 보여 소세포폐암과는 다른 종양억제 유전자가 존재할 가능성이 있다고 생각된다.

이형접합소실 유무나 이형접합소실 갯수와 환자 생존율과는 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 이는 환자의 수가 적었고 수술이 가능했던 환자로 장기 생존한 환자가 많았다는 점이 작용했을 것으로 생각된다.

본 연구 결과를 종합하여 보면, 5q23.3-q33.2 영역은 이전의 신경내분비성 대세포폐암에서 관찰된 연구와 유사한 결과를 보였다. 반면에 5q14.3-q21.1 영역과 5q35.1-q35.2 영역은 이전의 연구에서 볼 수 없었던 결과로 신경내분비성 대세포폐암에서 종양억제 유전자가 존재할 영역을 확장시켰다는데 의의가 있으며, 염색체 5번 장완에는 최소 4개의 종양억제유전자좌가 존재할 것으로 추정된다. 또한 현미부수체 불안정화는 224 loci 중 2.7 %인 6 loci에서만 관찰되어 폐절제가 가능했던 국소성 진행성 폐암 환자가 대상인 본 연구를 고려할 때 신경내분비성 대세포폐암의 진행에 주된 역할을 하기 보다는 암 발생 초기 단계에서 충동적 역할을 하는 것으로 생각된다.

Ⅴ. 결 론

신경내분비성 대세포폐암 13예에 대한 염색체 5번의 장완에 존재하는 종양억제 유전자좌를 찾고자 총 19개의 현미부수체 표지자들을 이용하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 13예의 모든 대상자 조직(100%)에서 19개의 현미부수체 표지자 중 적어도 3개 이상의 LOH를 관찰하였다.

2) 50% 이상의 LOH를 보인 영역을 네 군데에서 확인 할 수 있었다. 즉 5q14.3에 위치하는 *D5S107*과 5q21.1에 위치하는 *D5S409* 사이인 19.1 cM 영역에서 91.7%, 5q22.2에 위치하는 *D5S421*과 5q23.1에 위치하는 *D5S404* 사이인 4.0 cM 영역에서 53.8%, 5q23.3에 위치하는 *IRF-1*과 5q33.2에 위치하는 *D5S209* 사이인 20.7 cM 영역에서 100%, 그리고 5q35.1에 위치하는 *D5S400*과 5q35.2에 위치하는 *D5S498* 사이의 5.4 cM 영역에서 84.6%의 빈도로 LOH를 관찰하였다.

3) Shifted band는 13예 중 3예(23.1%), 총 224 loci 중 6 loci(2.7%)에서 관찰하였다.

이상의 결과는 염색체 5번의 장완에 신경내분비성 대세포폐암의 발생 및 진행에 관여하는 최소 4개의 종양억제 유전자좌가 존재할 가능성을 시사하며, 향후 특이 유전자를 찾기 위한 추가적인 노력이 있어야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. 보건복지부. 2002년 한국중앙암등록 사업 결과. 2003.
2. Osada H, Takahashi T. Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. Oncogene 2002; 21:7421-7434.
3. Miesfeld R, Krystal M, Arnheim N. A member of a new repeated sequence family which is conserved throughout eukaryotic evolution is found between the human delta and beta globin genes. Nucleic Acids Res 1981;9:5931-5947.
4. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci USA 1971;68:820-823.
5. Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y, Brambilla E, and Collaborators from 14 countries. Histological typing of lung and pleural tumors, 3rd ed. Berlin: Spring-Verlag, 1999:7-12.
6. Park MS, Kim KD, Shin DH, Chung KY, Kim YS, Kim SK, Ahn CM, Kim SK, Chang J, et al. Clinical features of pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma. Cancer Res Treat 2003;35:245-253.
7. Girard L, Zochbauer-Muller S, Virmani AK, Gazdar AF, Minna JD. Genome-wide allelotyping of lung cancer identifies new regions of allelic loss, differences between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer, and loci clustering. Cancer Res 2000;60:4894-4906.
8. Fong KM, Sekido Y, Minna JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. J Thorac Cardiovasc Surg 1999;118:1136-1152.
9. Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. Biochim Biophys Acta 1998;1378:F21-59.
10. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. Science 1991;253: 661-665.
11. Benachenhou N, Guiral S, Gorska-Flipot I, Labuda D, Sinnett D. High resolution deletion mapping reveals frequent allelic losses at the DNA mismatch repair loci hMLH1 and hMSH3 in non-small-cell lung cancer. Int J Cancer 1998;77: 173-180.

12. Mendes-da-Silva P, Moreira A, Duro-da-Costa J, Matias D, Monteiro C. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 5 in non-small cell lung carcinoma. Mol Pathol 2000;53:184-187.
13. Hosoe S, Ueno K, Shigedo Y, Tachibana I, Osaki T, Kumagai T, Tanio Y, Kawase I, Nakamura Y, Kishimoto T. A frequent deletion of chromosome5q21 in advanced small cell and non-small cell carcinoma of the lung. Cancer Res 1994;54:1787-1790.
14. Ullmann R, Petzmann S, Sharma A, Cagle PT, Popper HH. Chromosomal aberrations in a series of large-cell neuroendocrine carcinomas: unexpected divergence from small-cell carcinoma of the lung. Hum Pathol 2001;32:1059-1063.
15. Onuki N, Wistuba II, Travis WD, Virmani AK, Yashima K, Brambilla E, Hasleton P, Gazdar AF. Genetic changes in the spectrum of neuroendocrine lung tumors. Cancer 1999;85:600-607.
16. Hiroshima K, Iyoda A, Shibuya K, Haga Y, Toyozaki T, Iizasa T, Nakayama T, Fujisawa T, Ohwada H. Genetic alterations in early-stage pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma. Cancer 2004;100;1190-1198.
17. Tavassoli M, Steingrimsdottir H, Pierce E, Jiang X, Alagoz M, Farzaneh F, Campbell IG. Loss of heterozygosity on chromosome 5q in ovarian cancer is frequently accompanied by TP53 mutation and identifies a tumour suppressor gene locus at 5q13.121. Br J Cancer 1996;74:115-119.
18. Tamura G, Ogasawara S, Nishizuka S, Sakata K, Maesawa C, Suzuki Y, Terashima M, Saito K, Satodate R. Two distinct regions of deletion on the long arm of chromosome 5 in differentiated adenocarcinomas of the stomach. Cancer Res 1996;56:612-615.
19. Ogasawara S, Tamura G, Maesawa C, Suzuki Y, Ishida K, Satoh N, Uesugi N, Saito K, Satodate R. Common deleted region on the long arm of chromosome 5 in esophageal carcinoma. Gastroenterology 1996;110:52-57.
20. D'Amico D, Carbone DP, Johnson BE, Meltzer SJ, Minna JD. Polymorphic sites within the MCC and APC loci reveal very frequent loss of heterozygosity in human small cell lung cancer. Cancer Res 1992;52:1996-1999.
21. Ashton-Rickardt PG, Wyllie AH, Bird CC, Dunlop MG, Steel CM, Morris RG, Piris J, Romanowski P, Wood R, White R, et al. MCC, a candidate familial

polyposis gene in 5q.21, shows frequent allele loss in colorectal and lung cancer. Oncogene 1991;6:1881-1886.

22. Fong KM, Zimmerman PV, Smith PJ. Microsatellite instability and other molecular abnormalities in non-small cell lung cancer. Cancer Res 1995;55:28-30.
23. Stackhouse MA, Ortiz JB, Sato K, Chen DJ. Functional complementation of the radiation-sensitive mutant M10 cell line by human chromosome 5. Mutat Res 1994;323:47-52.
24. Achille A, Baron A, Zamboni G, Di Pace C, Orlandini S, Scarpa A. Chromosome 5 allelic losses are early events in tumours of the papilla of Vater and occur at sites similar to those of gastric cancer. Br J Cancer 1998;78:1653-1660.
25. Peng HQ, Liu L, Goss PE, Bailey D, Hogg D. Chromosomal deletions occur in restricted regions of 5q in testicular germ cell cancer. Oncogene 1999;18:3277-3283.
26. Gorgoulis VG, Mariatos1 G, Manolis EN, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Vogiatzi T, et al. Allelic imbalance at the 5q14 locus is associated with decreased apoptotic rate in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs). Possible synergistic effect with p53 gene alterations on apoptosis. Lung Cancer 2000;28:211-224.
27. Cottrell S, Bicknell D, Kaklamanis L, Bodmer WF. Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. Lancet 1992;340:626-630.
28. Horii A, Nakatsuru S, Miyoshi Y, Ichii S, Nagase H, Ando H, Yanagisawa A, Tsuchiya E, Kato Y, Nakamura Y. Frequent somatic mutations of the APC gene in human pancreatic cancer. Cancer Res 1992;52:6696-6698.
29. Horii A, Nakatsuru S, Miyoshi Y, Ichii S, Nagase H, Kato Y, Yanagisawa A, Nakamura Y. The APC gene, responsible for familial adenomatous polyposis, is mutated in human gastric cancer. Cancer Res 1992;52:3231-3233.
30. Uzawa K, Yoshida H, Suzuki H, Tanzawa H, Shimazaki J, Seino S, Sato K. Abnormalities of the adenomatous polyposis coli gene in human oral squamous-cell carcinoma. Int J Cancer 1994;58:814-817.
31. Boynton RF, Blount PL, Yin J, Brown VL, Huang Y, Tong Y, McDaniel T, Newkirk C, Resau JH, Raskind WH, et al. Loss of heterozygosity involving the APC and MCC genetic loci occurs in the majority of human esophageal cancers. Proc Natl Acad Sci U.S.A 1992;89:3385-3388.

32. Wieland I, Bohm M, Arden KC, Ammermuller T, Bogatz S, Viars CS, Rajewsky MF. Allelic deletion mapping on chromosome 5 in human carcinomas. Oncogene 1996;12:97-102.
33. Harada H, Willison K, Sakakibara J, Miyamoto M, Fujita T, Taniguchi T. Absence of the type I IFN system in EC cells: transcriptional activator (IRF-1) and repressor (IRF-2) genes are developmentally regulated. Cell 1990;63:303-312.
34. Nozawa H, Oda E, Ueda S, Tamura G, Maesawa C, Muto T, Taniguchi T, Tanaka N. Functionally inactivating point mutation in the tumor-suppressor IRF-1 gene identified in human gastric cancer. Int J Cancer 1998;77:522-527.
35. Cho ES , Kim H, Cho CH, Chang J, Chung KY, Kim YS, Park JM, Kim SK, Kim SK. Identification of Tumor Suppressor Loci on the Long Arm of Chromosome 5 in Primary Small Cell Lung Cancers. Tuberc Respir Dis 2000;49:49-59.
36. Vicent S, Garayoa M, Lopez-Picazo JM, Lozano MD, Toledo G, Thunnissen FB, Manzano RG, Montuenga LM. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and is an independent predictor of outcome in patients. Clin Cancer Res 2004;10:3639-3649.

Abstract

Identification of tumor suppressor loci on the long arm of chromosome 5 in pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma

Shin Myung Kang

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor **Sung Kyu Kim**)

Background: A number of allelotyping studies of lung carcinoma indicate frequent loss of heterozygosity (LOH) at chromosome 5q, suggesting the presence of a tumor suppressor gene in its place. But the data on genetic change of pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC) are so limited. To map the precise tumor-suppressor loci on the chromosome 5q for further positional cloning efforts, 13 surgically resected pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma specimen were investigated.

Materials and methods: The DNAs extracted from paraffin-embedded tissue blocks with primary tumor and corresponding normal tissue were investigated. Nineteen polymorphic microsatellite markersbv located in the long arm of chromosome 5 were used for analysis. Polymerase chain reactions were performed and LOH was evaluated by the gel electrophoresis.

Results: All of 13 LCNEC specimen exhibited LOH in at least three of the tested microsatellite markers. LOH was observed in four common deleted regions in 5q, which were 5q14.3-q21.1, 5q22.2-q23.1, 5q23.3-q33.2, q35.1-q35.2. Shifted band occurred in 2.7% (6 of 224) of the loci tested.

Conclusion: The data of this research suggest the presence of at least four tumor suppressor loci in the long arm of chromosome 5 and that they may play in important role in pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma tumorigenesis.

Key Words: pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma, tumor suppressor loci, chromosome 5q, LOH