

대장암에서 프로모터 메틸화에 의
해 불활성화되는 *SPARC* 유전자
동정과 발현 억제의 임상적 의의

연세대학교 대학원
의 과학과
양은기

대장암에서 프로모터 메틸화에 의
해 불활성화되는 *SPARC* 유전자
동정과 발현 억제의 임상적 의의

지도교수 김 호 근

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2005년 12월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

양 은 기

양은기의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2005년 12월 일

감사의 글

2년이라는 시간이 어느새 지나가 버리고 한편의 논문으로써 결실을 맺었습니다. 비록 많이 미흡하지만 여러 번의 실패와 되풀이되는 실험을 통하여 완성하였기에 너무나 뿌듯하고 기쁩니다.

저에게 많은 힘이 되어주시고 조언과 격려를 해주신 분들께 깊은 감사드립니다.

먼저 부족한 저에게 많은 배움의 기회를 주시고 올바른 길로 인도해 주신 김호은 교수님께 감사드립니다. 저의 논문을 세심하게 심사해주신 박전환 교수님, 용태순 교수님께도 감사드립니다. 그리고 실험 분석에 도움과 조언을 해주셨던 이환석 선생님께도 감사드립니다.

이 논문을 완성하는 동안 정말 많은 것을 배우고 얻었습니다. 그 중 정말 큰 선물은 2년 동안 매일 함께 생활하였던 실험실 선생님들인 것 같습니다. 지금은 미국에 가서서 안계시지만 처음 저에게 실험을 가르쳐주신 이용산 선생님, 수많은 질문에 전혀 싫은 내색 없이 토의하여 주신 강현주 선생님, 항상 차분하게 가르쳐주시던 고귀혜 선생님, 대학원 입학 동기이지만 선배로써 많은 조언해주신 유원태 선생님께 정말 깊은 감사드립니다. 시간이 지나고 어디를 가더라도 정말 잊지 못하고 그리울 것 같습니다.

언제나 바쁘척하고 소홀히 대해도 격려와 응원을 아끼지 않았던 많은 친구들과 선배들에게도 지면에 이름을 모두 올리지는 못하지만 고마움을 전하고 싶습니다.

가까운 곳에서 힘들 때 위로해주던 친구 같은 동생 은수에게도 고맙다고 말하고 싶고 마지막으로 항상 저를 믿음과 사랑으로 지켜봐 주시고 저의 편에 서서 든든한 울타리가 되어 용기를 주신 존경하는 부모님께 감사의 뜻을 전하며 이 논문을 바치고 싶습니다.

이것이 끝이 아닌 시작으로 생각하고 겸손함과 당당함을 지닌 과학자가 되기 위해 끊임없이 노력하겠습니다.

저자 씀

<차례>

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 연구재료	7
가. 세포주	7
나. 대장암 조직	7
2. 연구방법	8
가. 5-aza-2'-deoxycytidine의 처리	8
나. Oligonucleotide microarray를 이용한 전사체 발현 분석	8
다. SPARC 유전자에 대한 역전사 증합 효소 연쇄반응	10
라. DNA 추출	10
마. 증합효소 연쇄반응-이형접합성 소실 검사 (PCR-LOH)	11
바. Sodium bisulfite modification 및 염기서열 분석	12
사. Methylation specific polymerase chain reaction (MSP)	13
아. 면역조직화학 염색	13
III. 결과	15

1. 대장암 세포주에서 메틸화 가능성 있는 유전자 선별-----	15
2. 대장암 세포주에서의 <i>SPARC</i> 발현 분석-----	21
3. 5-aza-2'-deoxycytidine 처리에 의한 <i>SPARC</i> mRNA 발현의 복원-----	24
4. <i>SPARC</i> 프로모터 CpG의 과메틸화 정도 확인-----	26
5. MSP를 이용한 <i>SPARC</i> 프로모터의 메틸화 분석-----	28
6. 사람 대장암 조직에서 <i>SPARC</i> 프로모터의 메틸화 분석---	29
7. <i>SPARC</i> 발현도에 따른 임상적 특징-----	31
 IV. 고찰-----	 34
 V. 결론-----	 38
 참고문헌-----	 46
 영문요약-----	 55

<그림 차례>

Figure 1. Clustering analysis of 7 colorectal cancer cell lines-----16

Figure 2. Diagram for selecting candidate genes, which are methylated in colorectal cancer-----18

Figure 3. RT-PCR analysis of *SPARC* gene in colorectal cell lines-----21

Figure 4. Genomic PCR and PCR-LOH analysis of *SPARC*---23

Figure 5. RT-PCR analysis *SPARC* gene in colorectal cancer cell lines after treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine-----25

Figure 6. DNA sequencing analysis of CpG islands present in *SPARC* gene after bisulfite modification of genomic DNA extracted from colorectal cancer cell lines-----27

Figure 7. MSP analysis of the *SPARC* gene in colorectal cancer cell lines-----28

Figure 8. MSP analyses of the *SPARC* genes in 20 primary human colorectal carcinomas (CRC) and their corresponding 20 normal colonic mucosae samples (NL)-----30

Figure 9. Immunohistochemical analysis of SPARC expression in colorectal carcinomas-----32

Figure 10. The Kaplan-Meier survival curve of 292 cases colorectal cancer patients according to SPARC expression-----33

〈표 차례〉

Table 1. List of methylated genes in colorectal cancer-----6

Table 2. List of novel target genes methylated in colorectal cancer-----19

Table 3. Expression level (log ratio) of *SPARC* with or without 5-aza-2'-deoxycytidine treated in colorectal cancer cell lines-----20

Supplementary Table 1. List of 226 genes overexpressed (>2-fold) in at least one of the seven colorectal cell lines after 5-aza-2'-deoxycytidine treatment-----40

국문요약

대장암에서 프로모터 메틸화에 의해 불활성화되는 *SPARC* 유전자 동정과 발현 억제의 임상적 의의

CpG island 메틸화는 유전자 프로모터 부위의 CpG islands에 메틸기가 결합하여 mRNA 전사가 방해를 받아 유전자 발현이 억제되는 현상으로 종양억제유전자의 발현을 억제시킴으로써 암 발생에 큰 영향을 미친다.

본 연구에서는 oligonucleotide microarray 기술을 이용하여 유전자의 발현 패턴을 분석함으로써 대장암에서 CpG island 메틸화에 의해 발현 감소되는 유전자를 발굴하고자 하였다. 이를 위해 대장암 세포주에 메틸화 억제제인 5-aza-2'-deoxycytidine을 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹, 정상 대장 점막 조직 그룹, 이렇게 세 그룹을 oligonucleotide microarray 실험을 시행하여 유전자 발현 패턴을 비교, 분석하였다. 그리하여 5-aza-2'-deoxycytidine에 의해 재발현되고, 정상 대장조직에서 유의하게 발현 증가하는 유전자 226개를 발굴하였다. 이 중 기존에 대장암에서 메틸화되어있다고 알려진 유전자, CpG island가 존재하지 않는 유전자, 기능이 알려지지 않은 유전자를 제외시키고 암과 관련이 있는 기능을 가진 유전자 70개를 선별하였다. 이들 유전자 중 *SPARC* (secreted protein acidic rich in cysteine)는 실험에 사용한 7개의 모든 세포주에서 정상 대장조직에 비하여 발현 감소되었고, 5-aza-2'-deoxycytidine 처리 전, 후 세포주의 *SPARC* 발현 양상을 비교해 보았을 때 7개 세포주 중 4개 세포주가 발현 증가하는 양상을 보였다. 또한 *SPARC* 유전자는 기존의 연구

자료에서 조직의 분화나 종양의 발생에 다양하게 관여하는 것으로 있기 때문에 대장암과 *SPARC* 유전자 프로모터 메틸화의 상호관계를 구체적으로 조사하였다. 대장암 세포주에서 *RT-PCR*로 *SPARC* mRNA가 발현되지 않음을 확인하였고, 이것이 유전자 소실에 기인하는 것이 아님을 *PCR-LOH*로 확인하였다. 대장암 세포주에서 메틸화 억제제에 의한 *SPARC*의 재발현이 7개 세포주 중 5개의 세포주에서 확인되었고, methylation specific *PCR* (*MSP*)로 프로모터 메틸화를 분석한 결과, 7개 세포주에서 6개 세포주가 메틸화되어있음을 확인하였다. 인체 대장 조직에서 *SPARC* 프로모터의 메틸화는 20예의 대장암 조직에서 20예 모두가 메틸화되어있는 반면, 이에 상응하는 20예의 정상 대장 조직에서는 3예가 메틸화되어있음을 *MSP*로 확인하였다. 또한 대장암에서 *SPARC*의 발현 감소가 임상적으로 어떤 의의가 있는가를 알아보기 위해 292예의 대장암 조직이 포함된 조직 array를 사용하여 *SPARC* 표현 여부와 예후와의 관계를 분석한 결과 *SPARC*를 발현하지 않는 예들은 *SPARC*를 발현하는 집단에 비해 불량한 예후를 보임을 알 수 있었다 ($P=0.0001$).

따라서 대장암에서 *SPARC* 유전자는 프로모터 과메틸화로 인한 유전자의 불활성을 보이며, 이러한 *SPARC* 유전자의 발현 억제는 대장암 발생에 관여할 것으로 추정된다.

핵심되는 말: CpG island, 메틸화, oligonucleotide microarray, *SPARC*,
대장암

대장암에서 프로모터 메틸화에 의해 불활성화되는 *SPARC*
유전자 동정과 발현 억제의 임상적 의의

<지도교수 김호근>

연세대학교 대학원 의과학과

양 은 기

1. 서론

유전학적으로 염기서열이 변하지 않은 상태에서 특별한 기전에 의해 유전자의 발현 양상이 변하고, 이러한 유전자 발현의 변화가 자손세포에 전달되는 현상을 epigenetics라고 한다¹. 암은 종양형성유전자나 종양억제유전자의 돌연변이가 축적되어 그 기능이 증폭, 소실됨으로써 발생하는 것인데, epigenetics는 돌연변이 없이 유전자의 발현 양상만을 조절하여 종양형성유전자의 과다 발현이나, 종양억제유전자의 발현 억제를 통해 암 발생에 큰 영향을 미치게 된다. Epigenetics의 주요 기전 중 하나인 CpG island 메틸화는 유전자 프로모터 부위의 CpG islands에 메틸기가 결합하여 mRNA 전사가 방해를 받아 유전자 발현이 억제 되는 것으로, CpG island 과메틸화는 종양억제유전자가 그 기능을 잃어버리는 여러 가지 기전 중 하나이다².

RB 프로모터의 과메틸화가 보고되면서부터 DNA 과메틸화에 의해 종양억제유전자의 발현이 억제될 수 있다는 것이 밝혀지게 되었고³, 그 후 종양억제유전자 *VHL*⁴과 *p16*^{*INK4A*} 등의 프로모터에 과메틸화가

보고되었다⁵. DNA 과메틸화가 소화기암에서 본격적으로 연구되기 시작한 것은 *hMLH1* 프로모터의 메틸화가 보고되면서 부터이다⁶. Epigenetics 개념이 도입되기 전 대장암의 발생기전은 크게 염색체 불안정형 (chromosomal instability, *CIN*)과 현미부수체 불안정형 (high microsatellite instability, *MSI-H*)으로 설명되어졌다.

CIN 종양은 종양억제유전자인 *APC* (adenomatous polyposis coli) 유전자의 불활성화로부터 암발생이 시작하여 수많은 종양형성유전자의 활성화와 종양억제유전자의 불활성화가 축적되어 암의 발생 및 진행이 이루어지는 유형이다. 특히 *ras*와 같은 종양형성유전자의 돌연변이와 *APC*, *p53*, *smad2* (mothers against decapentaplegic homolog), *smad4*와 같은 암억제유전자의 결손 혹은 기능 소실 돌연변이가 빈번하게 관찰된다^{7,8}. 대부분의 대장암은 *CIN* 유형을 따르며, 이들은 병변이 진행될수록 유전적 변화가 축적되어 나타난다는 것이 보고되었다⁹.

MSI-H 종양은 현미부수체의 길이 변화가 빈번함을 그 특징으로 하여 DNA를 수선하는데 관여하는 유전자들이 하나 또는 여러 개가 불활성화되어 DNA 보수 (DNA mismatch repair, *MMR*)가 제대로 이루어지지 않아 수많은 돌연변이가 생겨 암이 발생하는 유형이다¹⁰. 현미부수체란 유전체 전체에 퍼져서 존재하는 1개에서 4개 혹은 6개 단위의 염기서열이 반복적으로 존재하는 염기서열을 의미하는데, DNA 복제과정 중 작은 부정합 고리 형성으로 인하여 염기의 삽입과 결손이 일어나는 미끄럼 현상에 의해 상대적으로 불안정한 특성을 가지고 있다¹¹. 그러나 정상 세포에서는 복제오류 교정 유전자들에 의해 교정되기 때문에 현미부수체가 안정적으로 유지된다. 선천성 비용종성 대장암 (*HNPCC*)의 약 86%가 *MSI-H*를 보이는데 비하여, 산발적으로 발생하는 대장암은 단지 16% 정도만 *MSI-H*를 보이는 것으로 확인되

었다¹⁰.

그러나 모든 대장암의 발생이 이 두 가지 기전으로만 설명되는 것은 아니다. 실제로 38%의 대장암에서 *CIN* 경로의 특징인 LOH나 *MSI-H* 경로의 특징인 단순 반복 염기서열의 frameshift 돌연변이를 보이지 않는다¹². 이들의 상당부분, 그리고 *CIN* 및 *MSI-H*와 겹치는 상당부분이 epigenetics 기전인 CpG island methylator phenotype (*CIMP*)에 해당하는 것으로 알려지게 되었다. 현재까지 알려진 것 중 대장암의 *CIMP*경로에서 중요한 것은 hMLH1⁶과 p16⁵의 프로모터 메틸화가 있다. *CIN*과 *MSI-H* 경로에 의해 손상되는 유전자 군들이 겹치는 경우가 별로 없다는 사실과 대조적으로 *CIMP* 경로에 관련된 유전자들은 *CIN*과 *MSI-H* 경로를 넘나들며 영향을 미친다¹³⁻¹⁶. 예를 들어 *MSI-H*를 보이는 산발성 대장암의 90%에서 hMLH1의 epigenetics silencing이 관찰되었으며, 이외에도 수많은 종양억제유전자의 메틸화가 현재까지 밝혀지고 있다 (Table 1).

Table 1. List of methylated genes in colorectal cancer

Gene	Map	Methylation in colon cancer (%)
COX2 ¹⁷	1p25.2-3	10-20
CSPG2 ¹⁸	5q12-14	70
ER-alpha ¹⁹	6q25.1	>90
HPP1 ²⁰ /TPEF ²¹	2q33	60-80
IGF2 (P2-4) ²²	11p15.5	70
MINT1 ²³	9q13-q21.1	20
N33 ²⁴	8p22	80
PAX6 ²⁵	11p13	70
RAR β 2 ²⁶	3p24	10-30
RASSF1A ²³	3p21.3	50
CDH13 ²³	16q24.2-q24.3	66
hMLH1 ⁶	3p21.3	10-20
P14/ARF ²⁷	9p21	10-20
APC ²⁸	5q21	10-20
CACNA1G ²⁹	17q22	10-20
CALCA ²⁴	11p15	50
HIC1 ³⁰	17p13.3	50
WT1 ²³	11p13	58
MDR1 ³¹	7q21.1	20-30
O6-MGMT ³²	10q26	30
P16(CDKN2A) ³³	9p21	20-30
CDX1 ²⁴	5q31-q33	100
THBS1 ³⁴	15q15	10-20
MYOD1 ²³	11p15.4	69

따라서 본 연구에서는 oligonucleotide microarray 기술을 이용하여 대장암에서 메틸화에 의해 불활성화되는 유전자 군에 메틸화 억제제 투여 전, 후 유전자 발현 양상을 비교, 분석 후 유의미한 유전자를 동정하여 이들이 대장암의 발생과 진행에 어떤 관계가 있는가를 밝히고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구재료

가. 세포주

사람 대장암 세포주 DLD-1, HCT8, HCT116, LOVO, RKO, HT29, WiDr과 사람 대장 섬유아세포주인 CCD-18Co는 ATCC (American Type Culture Collection; <http://www.atcc.org>)와 한국세포주은행 (KCLB, Korean Cell Line Bank; <http://cellbank.snu.ac.kr>)에서 분양 받아 사용하였다. 세포주들은 10% 우태아혈청 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)과 100 U/mL의 penicillin, 100 µg/mL의 streptomycin이 첨가된 EMEM, MEM 또는 RPMI 1640 (Life Technologies) 배지에서 5% CO₂를 포함하는 37°C 배양기에서 배양하였다.

나. 대장암 조직

대장암 조직은 1996년 12월부터 1999년 11월까지 연세대학교 의과대학 부속 세브란스병원에서 수집된 대장암 조직 중 20예와 각 증례의 정상 대장은 장점막 조직을 채취하였으며, 사용 전까지 -70°C에서 보관하였다. 대장암 조직은 조직을 채취할 때 준비한 동일 부위 암조직의 hematoxylin-eosin 염색 슬라이드를 통하여 암세포의 함유량을 확인하고, cryostat fractionation 방법을 통하여 선택적으로 암세포를 분리하였다^{35,36}.

2. 연구방법

가. 5-aza-2'-deoxycytidine의 처리

7개의 대장암 세포주 (DLD-1, HCT8, HCT116, LOVO, RKO, HT29, WiDr)에 메틸화 억제제인 5-aza-2'-deoxycytidine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 5 μ M 농도로 처리하였다. 48 시간 간격으로 배지 교환과 함께 5-aza-2'-deoxycytidine을 재처리 하였으며, 6일간 배양 후 세포주를 모아 실험에 사용하였다.

나. Oligonucleotide microarray를 이용한 전사체 발현 분석

대장암 세포주와 정상 대장 점막조직으로부터 Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, Auckland, New Zealand)를 사용하여 총 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하고, 흡광도를 측정하여 RNA의 질을 확인하였다.

분리된 20 μ g의 총 RNA를 4 μ g Oligo-dT (Invitrogen, Carlsbed, CA, USA)와 섞은 후 65°C에서 10분간 배양한 후 얼음에 식히고, superScript II enzyme (Invitrogen), Cy-3 dUTP (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden), RNaseOUT (Invitrogen), 그리고 dNTP (Promega, Madison, WI, USA)와 섞은 후 42°C에서 60분간 반응시켜 Cy-3로 표지된 cDNA를 합성하였다. 기준 RNA는 개개인간의 편차를 극복하고 새로운 실험군 간에도 데이터를 비교, 공유할 수 있도록 상품화된 Universal Human Reference RNA (Stratagene, La Jolla, CA, USA)를 사용하였다. 각 실험마다 20 μ g의 기준 RNA를 조

적의 cDNA 합성과 동일한 방법으로 단, Cy-3 dUTP 대신 Cy-5 dUTP를 사용하여 Cy-5로 표지된 cDNA를 합성하였다. 합성된 각각의 cDNA는 Microcon-YM30 (Millipore, Billerica, MA, USA)를 사용하여 900 μ l TE buffer로 세척한 후, Cy-3로 표지된 시료의 cDNA와 Cy-5로 표지된 기준 RNA의 cDNA를 40 μ g의 herring sperm DNA (Invitrogen)와 20 μ l의 DIG Easy Hyb 용액 (Roche, Penzberg, Germany)과 섞은 후 Compugen에서 디자인하고 Sigma-Aldrich에서 합성한 60 mer 길이의 oligonucleotide (OligolibraryTM)를 이용하여 제작된 microarray에 적용하였다. 사용한 OligolibraryTM는 18,664개의 유전자/EST와 대조 유전자인 197개의 glyceraldehyde-3-phosphate, 총 18,861개의 oligonucleotide로 구성되어 있다. 시료 cDNA 및 기준 cDNA를 microarray에 적용한 후 Hybrislip (Sigma Chemical Co.)으로 덮고 슬라이드를 Array chamber (Genomictree, Seoul, Korea)에 넣고 42°C에서 16시간 동안 hybridization을 시켰다. Hybridization이 끝난 슬라이드는 2X SSC, 1X SSC, 0.5X SSC, 0.05X SSC 용액에 순차적으로 세척한 후 100 g에서 4분간 원심분리하여 건조시켰다. 건조가 끝난 슬라이드는 GenePix 4000B scanner (Axon Instruments, Union, CA, USA)를 이용하여 결과를 얻었다. 얻어진 microarray 결과는 GenePix pro 5.0 (Axon Instruments) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 이렇게 얻어진 유전체 발현 데이터를 Cluster version 3.0 (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>) 및 Treeview version 1.60 (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>) 등의 분석, 통계프로그램을 이용하여 유전자들의 발현 패턴에 따라 분류하였다.

다. *SPARC* 유전자에 대한 역전사 중합효소 연쇄반응

Oligonucleotide microarray 분석을 통하여 이상 발현이 확인된 *SPARC* 유전자를 역전사 중합효소 연쇄반응 (reverse transcriptase polymerase chain reaction; *RT-PCR*)을 통해서 그 결과를 다시 한번 검증하였다. 먼저 1 µg의 *RNA*에 1 µl의 20 pM random hexamer (Qiagene, Valencia, CA, USA), 1 µl의 10 mM dNTP를 첨가 후 65°C에서 5분 간 가열한 후 얼음에 냉각 처리하였다. 이후 4 µl의 5X first strand buffer와 2 µl의 0.1 M DTT, 1 µl의 M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) 200 U를 첨가한 다음, 37°C에서 50분, 75°C에서 15분 동안 반응시켰다. 최종 cDNA 용액의 양을 50 µl가 되게 한 다음, 2 µl의 cDNA 용액을 주형으로 하여 총 20 µl가 되도록 1.5 mM MgCl₂와 20 pM의 각각의 primer [*SPARC*: 5'-TGATGAGACA GAGGTGGTGG-3' (sense), 5'-AAGTGGCAGGAAGAGTCTGAAG-3' (antisense)]와 10 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP, 1X *PCR* buffer 와 1 U Taq polymerase (Life Technologies)를 첨가하여 94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 30초 동안 증폭시켰다. 반응이 끝난 *PCR* 산물은 ethidium bromide가 첨가된 1.5%-2% agarose gel에서 전기영동을 하여 *PCR* 산물의 양을 확인한 뒤 β-actin의 *PCR* 산물의 양과 비교하여 유전자의 발현정도를 평가하였다.

라. DNA 추출

세포주와 조직에 500 µl lysis buffer (100 mM Tris buffer, pH 7.5-8.0, 50 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5% SDS, 200 µg/ml

proteinase K)를 첨가하여 50°C에서 조직이 완전히 녹을 때까지 12-24시간 이상 반응시켰다. 그 후 phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1)을 동량 첨가하여 잘 섞은 뒤, 15,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 상층액만을 조심스럽게 새 tube에 취하였다. 같은 양의 isopropanol과 0.2배 양의 NH₄OAc를 첨가하여 실온에서 5분간 방치하였다. 이 후에 DNA를 육안으로 확인하였으며, 이를 tip으로 조심스럽게 취하여 70% ethanol에 세척한 뒤 실온에서 말렸다. 이 후 DNA는 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)에 완전히 녹인 다음 분광 광도계를 이용하여 260 nm 파장에서 농도를 측정하였고, 실험 전까지 -20°C에 보관하였다.

마. 중합효소 연쇄반응-이형접합소실 검사 (PCR-LOH)

중합효소 연쇄반응은 25 ng genomic DNA에 1.5 mM MgCl₂, 20 pM primer, 0.2 mM dATP, dGTP, dTTP, 5 μM dCTP, 1μ Ci [α -³²P] dCTP (3,000 Ci/mmol; NEN DuPont, Boston, MA, USA), 1X PCR buffer와 1.25 U Taq polymerase (Invitrogen)를 총 20 μl가 되도록 첨가하여 수행하였다. DNA 변성을 위하여 95°C에서 5분간 가열하였고, 이 후 95°C에서 30초간 변성 과정 (denaturation), 55°C에서 30초간의 재결합 과정 (annealing), 그리고 72°C에서 15초간의 신장 과정 (extension)을 30회 반복 시행하였고, 72°C에서 5분간 진행하였다. 이상과 같이 합성된 PCR 산물을 같은 부피의 loading buffer (95°C formamide, 20 mM EDTA, 0.05% xylene cyanol FF, 0.05% bromophenol blue)에 섞어 95°C에서 3분간 가열한 다음 즉시 얼음에 넣고, 그 중 5 μl만을 7.5 M의 urea를 포함하는 6% 변성 PAGE 젤에

적용하여 60 W로 1시간 30분에서 2시간 동안 전기영동시켰다. 전기영동이 끝난 젤을 젤 건조기에서 1시간 동안 말린 후 Kodak XAR-5 film (Kodak, Rochester, NY, USA)에 현상하여 합성물을 판독하였다.

바. Sodium bisulfite modification 및 염기서열 분석

Sodium bisulfite modification을 위해 DNA 1 μg 을 취하여 총 부피가 50 μl 가 되도록 증류수로 채우고, 5.6 μl 의 5 N NaOH를 첨가한 후, 37°C에서 15분간 방치하였다. 각 tube에 30 μl 의 10 mM hydroquinone, 520 μl 의 4 M sodium bisulfite, pH 5.0 을 첨가하여 부드럽게 섞어주었다. 이후 mineral oil을 용액이 덮일 만큼 떨어뜨리고, 55°C에서 16-20시간 동안 반응시켰다. Sodium bisulfite로 처리한 DNA는 Wizard DNA purification resin (Promega)을 이용하여 정제하였다. 최종적으로 50 μl 의 증류수로 정제된 DNA를 추출한 후, 5.6 μl 의 5 N NaOH 용액을 첨가하여 37°C에서 15 분간 반응시켰다. 반응이 끝나면, 5.5 μl 의 10 M ammonium acetate와 125 μl 의 ethanol을 첨가하여 -20°C에서 30분 이상 방치하여 DNA를 침전시켰다. 이 후 4°C에서 14,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 상등액을 제거하고 DNA 침전물을 실온에서 완전히 말렸다. 마지막으로 증류수 20 μl 를 넣고 혼합한 후, 즉시 -20°C에 보관하였다.

Modified된 DNA를 이용하여 각 유전자의 프로모터 부위에 대한 PCR을 시행한 뒤, PCR 산물의 DNA 염기서열을 분석하였다.

사. Methylation specific polymerase chain reaction (MSP)

*RT-PCR*을 통하여 이상 발현이 확인된 *SPARC* 유전자에 대하여 메틸화 또는 비메틸화를 관별할 수 있는 각각의 표지자를 이용하여 *PCR*을 수행함으로써 메틸화를 관찰하였다³⁷.

*SPARC*의 primer 염기서열은 비메틸화 반응의 경우 5'-TTTTTTTA GATTGTTTGGAGAGTG-3' (sense), 5'-AACTAACCAACATAAAC AAAAATATC-3' (antisense)이고 메틸화 반응의 경우 5'-GAGAGC GCGTTTTGTTTGTC-3' (sense), 5'-AACGACGTAAACGAAAAT ATCG-3' (antisense) 이다. *PCR*은 최종 부피가 20 μ l가 되도록 2 μ l의 bisulfite modified DNA template에 1.5 mM $MgCl_2$, 20 pM의 sense, antisense primer, 10 mM dATP, dGTP, dTTP, 1X *PCR* buffer와 1 U Taq polymerase (Life Technologies)를 첨가하여 혼합하였다. 95°C 20초, 62°C 20초, 72°C 20초 동안 40 cycle *PCR* 반응을 실시하였다. 반응이 끝난 *PCR* 산물은 ethidium bromide가 첨가된 1.5-2% agarose gel에서 전기영동을 하여 메틸화 양상을 확인하였다.

아. 면역조직화학 염색

대장암 파라핀 포매 조직 329예로 조직 array를 제작하여 면역조직화학 염색을 시행하였다. 먼저 조직 array 블록을 6 μ m 절편으로 만들어 xylene과 alcohol을 이용, 탈파라핀 과정과 재수화 과정을 거친 후, 3% hydrogen peroxide에 10분간 처리하였다. 일차항체로는 *SPARC* 항체 (Haematologic Technologies, Essex Junction, VT, USA)를 1:2000 으로 사용하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 발색제인

diaminobenzidine을 이용, avidin-biotin complex 방법³⁸을 사용하여 면역조직화학 염색을 수행하였다. 최종적으로 Mayer hematoxylin을 이용 대조염색을 하였다.

III. 결과

1. 대장암 세포주에서 메틸화 가능성 있는 유전자 선별

본 연구에서는 유전자의 발현 패턴을 분석하여 대장암에서 CpG island 메틸화에 의해 발현 감소되는 유전자를 발굴하기 위해 대장암 세포주 (DLD-1, HCT8, HCT116, LOVO, RKO, HT29, WiDr)에 메틸화 억제제인 5-aza-2'-deoxycytidine를 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹, 정상 대장 조직 그룹, 이렇게 세 그룹에서 cDNA를 합성하여 18,664 유전자가 집적된 oligonucleotide microarray에 반응시켜 유전자 발현 패턴을 비교, 분석 하였다. 유전자 발현도의 standard deviation (SD) 값이 0.3 이상인 6,490개의 유전자를 선별하여 unsupervised hierarchical clustering 분석을 수행한 결과, 각 세포주가 5-aza-2'-deoxycytidine을 처리한 세포주와 cluster를 이루는 경향을 보였다. 이것은 첫째, 각 세포주에 따른 유전자 표현의 차이가 너무 상이하기 때문이거나 둘째, 메틸화로 변화하는 유전자 군들의 수가 매우 적어 발현 이상에 따른 cluster가 크게 변하지 않는다는 것을 유추할 수 있었다 (Figure 1).

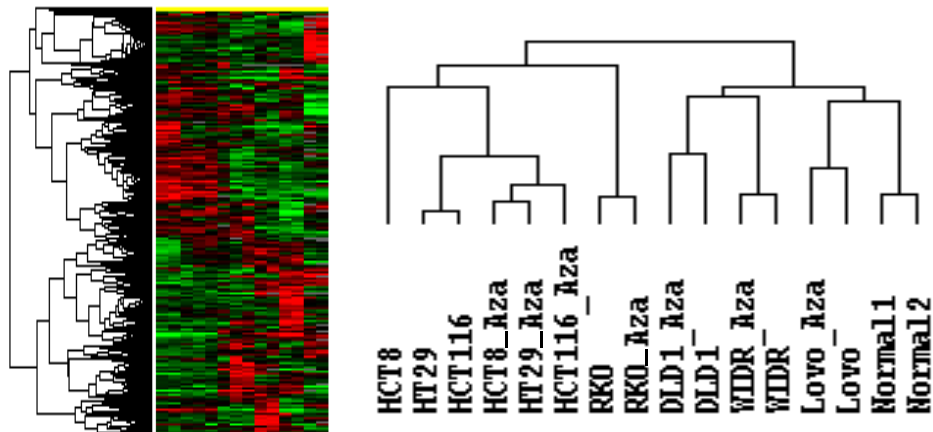


Figure 1. Clustering analysis of 7 colorectal cancer cell lines. Unsupervised hierarchical clustering analysis of 7 colorectal cancer cell lines treated with or without 5-aza-2'-deoxycytidine and 2 normal colonic mucosae was done according to gene expression profile. Genes that passed the filtering criteria were used (gene expression values present in more than 60% in all array were taken, and genes having standard deviation of less than 0.3 were discarded). Overall 6,490 genes were selected and applied to complete linkage hierarchical clustering analysis using the uncentered correlation similarity metric method. Red and green indicate transcript level above and below the median sample/Universal Human Reference RNA expression ratio for each gene across all samples, respectively.

그러나 이러한 결과에서 세포주의 다양성을 고려하여, 각 세포주 별로 5-aza-2'-deoxycytidine을 처리하지 않은 세포주에서 5-aza-2'-deoxycytidine을 처리한 세포주보다 2배 이상 감소하였고, 정상 대장 조직과 비교하였을 때도 2배 이상 감소하는 유전자를 선별하였다. DLD-1에서 83개, HCT116에서 99개, HCT8에서 57개, HT29에서 30개, LOVO에서 62개, RKO에서 17개, WiDr에서 35개의 유전자가 위의 조건에 준하였다. 이 유전자들 중 1종 이상의 세포주에서 위의 조건을 만족하는 유전자 총 개수는 226개였다 (Supplementary Table 1). 이 중 기능이 밝혀지지 않은 유전자 26개를 제외하고, 암과 관련있는 기능을 가진 유전자 92개 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 중 CpG island가 없는 유전자 16개 (<http://cpgislands.usc.edu/>)와 이미 대장암에서 메틸화에 의해 silencing 되어있다고 밝혀진 유전자 6개를 제외한 70개의 유전자를 선별해낼 수 있었다 (Figure 2, Table 2).

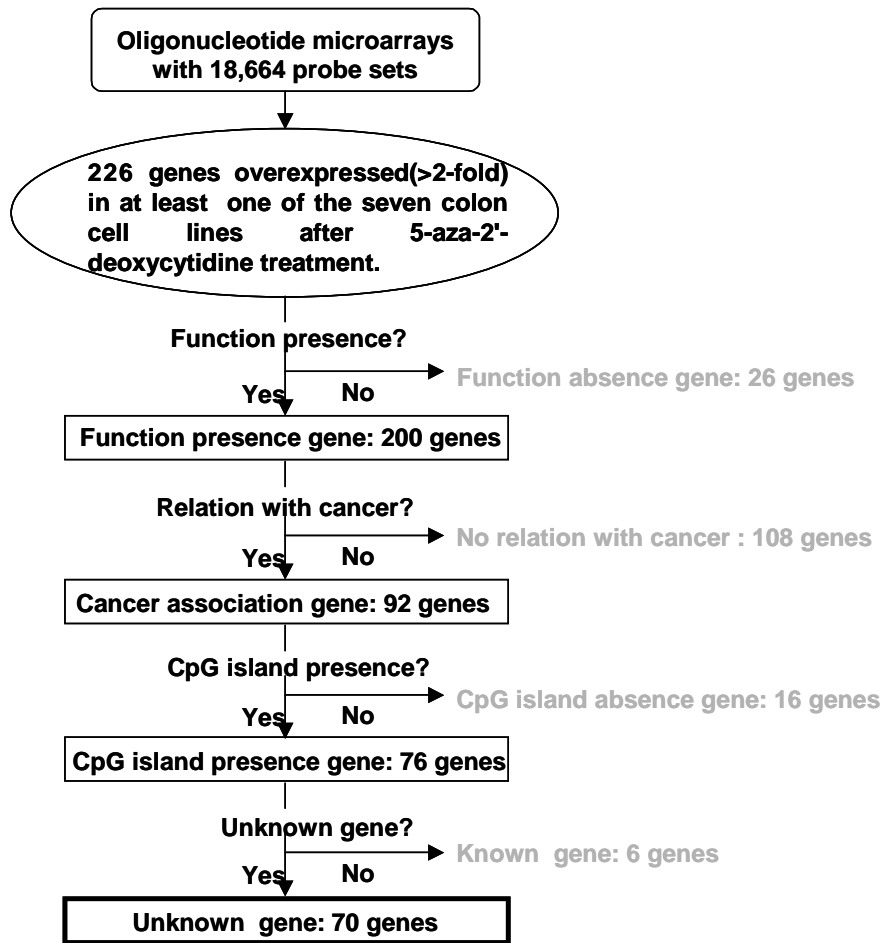


Figure 2. Diagram for selecting candidate genes, which are methylated in colorectal cancer.

Table 2. List of novel target genes methylated in colorectal cancer

Symbol	Chromosomal location	function
SPARC	5q31.3-q32	cell adhesion,growth
FSTL1	3q13.33	function as a negative regulator of cell growth
CCL20	2q33-q37	chemotaxis
TFF3	21q22.3	digestion
MAFK	7p22	transcription factor
ALB	4q11-q13	transport
CKB	14q32	amino acid and derivative metabolism
HMGB1	13q12	bind DNA with low specificity
IGFBP4	17q12-q21.1	signal transduction
ACTN4	19q13	invasive growth
IGSF4	11q23.2	virulence
GAGE1	Xp11.4-p11.2	cellular defense response
LGALS1	22q13.1	apoptosis
HOXA10	7p15-p14	transcription regulation
SGK	6q23	protein phosphorylation
CEACAM1	19q13.2	immune response
DUSP1	5q34	cell cycle
DEFB1	8p23.2-p23.1	nitrogen metabolism
ID1	20q11	transcription regulation from Pol II promoter
APP	21q21.3	cell adhesion
MUC1	1q21	cholesterol catabolism
MGST2	4q28.3	leukotriene metabolism
MSN	Xq11.2-q12	cell motility
APOH	17q23-qter	complement activation, classical pathway
EMP1	12p12.3	ionic insulation of neurons by glial cells
SPRY2	13q22.1	histogenesis and organogenesis
DUSP1	5q34	cell cycle
TGFBI	5q31	cell proliferation
MXI1	10q24-q25	transcription regulation
ELF3	1q32.2	transcription from Pol II promoter
SPOCK	5q31	cell adhesion
BTG1	12q22	negative control of cell proliferation
MUT	6p21	transport
GMNN	6p22.1	cell cycle arrest
CDC45L	22q11.21	DNA replication initiation
CRIP1	7q11.23	zinc binding
ATF3	1q32.3	transcription regulation
TYR	11q14-q21	melanin biosynthesis from tyrosine
IFI30	19p13.1	immune response
ICB-1	1p35.2	cell adhesion
MLPH	2q37.3	transport
ST5	11p15	RNA dependent DNA replication
NCF1	7q11.23	superoxide metabolism
BTC	4q13-q21	cell cycle
RAC3	17q25.3	cell growth and/or maintenance
OLFM1	9q34.3	signal transduction
GPR30	7p22	chemotaxis
PMP22	17p12-p11.2	ionic insulation of neurons by glial cells
ABCB10	1q42	transport
EPLIN	12q13	transcription regulation from Pol II promoter
LGALS4	19q13.13	cell adhesion
INSIG1	7q36	metabolism; cell proliferation;
MX1	21q22.3	signal transduction
GPC3	Xq26.1	cell growth and/or maintenance
EGR1	5q31.1	transcription regulation
LEF1	4q23-q25	transcription regulation
SIAT1	3q27-q28	humoral immune response; protein modification
HCLS1	3q13	protein modification
MDK	11p11.2	cell cycle control
PTP4A1	6q12	DNA replication
FGFR3	4p16.3	ATP binding
MCAM	11q23.3	cell adhesion
KLF3	4p14	repression of transcription from Pol II promoter
CDKN1A	6p21.2	cell cycle
JUNB	19p13.2	transcription regulation
APBB1	11p15	signal transduction
CCND3	6p21	cell cycle control
WFD32	20q12-q13.2	signal transduction
DNER	2q37.1	cell adhesion
APOB	2p24-p23	signal transduction

이상의 유전자들 중 *SPARC*는 실험에 사용한 7개의 대장암 세포주 모두에서 정상 대장 조직보다 최소 10.3배에서 최대 30.8배 감소하였고, 5-aza-2'-deoxycytidine를 처리한 후 7개의 대장암 세포주들 중 DLD-1, HCT8, HCT116 및 HT29의 세포주에서 최소 3.1배 최대 8.7배 발현 증가하는 결과를 얻었다 (Table 3). 따라서 정상 대장 조직에서와 달리 대장암 세포주에서 발현 감소하고, 5-aza-2'-deoxycytidine를 처리한 대장암 세포주에서 발현 증가하는 *SPARC* 유전자가 대장암과 어떠한 상호관계를 갖고 있는지 구체적으로 알아보는 실험을 진행하였다.

Table 3. Expression level (log ratio) of *SPARC* with or without 5-aza-2'-deoxycytidine treated in colorectal cancer cell lines.

	Log ratio value		Fold change (Cell line+5-aza :Cell line)	Log ratio value Normal tissue	Fold change (Normal tissue :Cell line)
	Cell line	Cell line+ 5-aza			
DLD-1	-4.65	-1.53	8.7	-1.10	11.7
HCT8	-3.69	-2.05	3.1	-1.10	12.9
HCT116	-4.94	-2.87	4.2	-1.10	30.8
LOVO	-4.03	-4.12	1.0	-1.10	16.3
RKO	-3.37	-3.55	0.9	-1.10	10.3
HT29	-4.15	-1.97	4.5	-1.10	17.8
WiDr	-4.59	-4.31	1.2	-1.10	24

2. 대장암 세포주에서의 *SPARC* 발현 분석

인체 대장암에서 *SPARC* mRNA 발현 양상을 파악하기 위해 7종의 대장암 세포주 (DLD-1, HCT8, HCT116, LOVO, RKO, HT29, WiDr) 와 1종의 대장 섬유아세포주 (CCD-18Co)를 대상으로 RT-PCR을 하였다. RT-PCR 결과, 5종의 세포주 (DLD-1, HCT116, LOVO, RKO, WiDr)에서 mRNA 발현이 전혀 검출 되지 않았고, CCD-18Co와 HCT8, HT29에서는 발현됨을 확인할 수 있었다. (Figure 3).

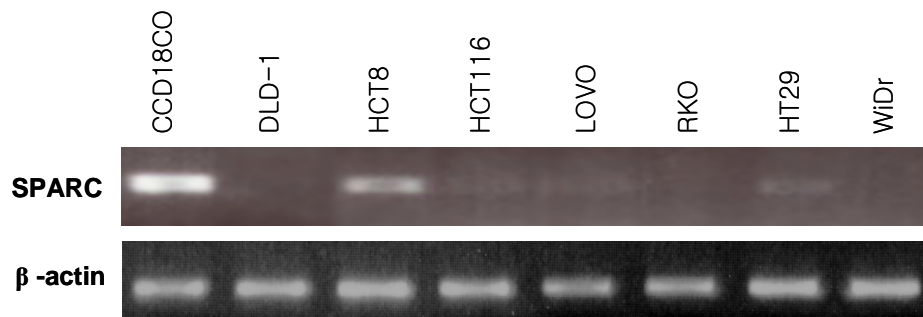


Figure 3. RT-PCR analysis of *SPARC* gene in colorectal cell lines. RT-PCR analysis of *SPARC* mRNA expression in 7 colorectal cancer cell lines (DLD-1, HCT8, HCT116, LOVO, RKO, HT29, WiDr) and normal fibroblast (CCD-18Co). *SPARC* mRNA expression was reduced in 5 colorectal cancer cell lines (DLD-1, HCT116, LOVO, RKO, WiDr). β -actin was amplified as an internal control.

SPARC 유전자의 발현감소가 유전자의 소실 (deletion)에 기인하는 것인지를 파악하기 위하여 동일한 세포주들로부터 추출된 genomic DNA를 이용하여 *SPARC* 유전자에 대한 DNA-PCR을 시행한 결과, 모든 세포주에서 정상 세포주와 같은 수준으로 유전자가 존재함을 확인하였다. 또한 다형성 빈도가 80%이상으로 알려진 유전자 표지자인 *SPARC*를 (forward primer: 5'-tatgttcacaagagggtgtc-3', reverse primer: 5'-atctcgccactgtactctac-3') 이용하여 PCR-LOH를 수행한 결과 10예의 대장암 조직 중 1예 (case 2)에서만 이형접합 소실이 있음을 확인하였다 (Figure 4).

이러한 결과는 인체 대장암의 발생 또는 악성화 과정에서 *SPARC* 유전자의 발현이 특이적으로 감소하며, 이러한 *SPARC* 유전자의 발현 감소는 *SPARC* 유전자 자체의 소실에 기인하기 보다는 유전자 전사 (transcription)의 이상에 의해 야기되는 현상임을 시사한다.

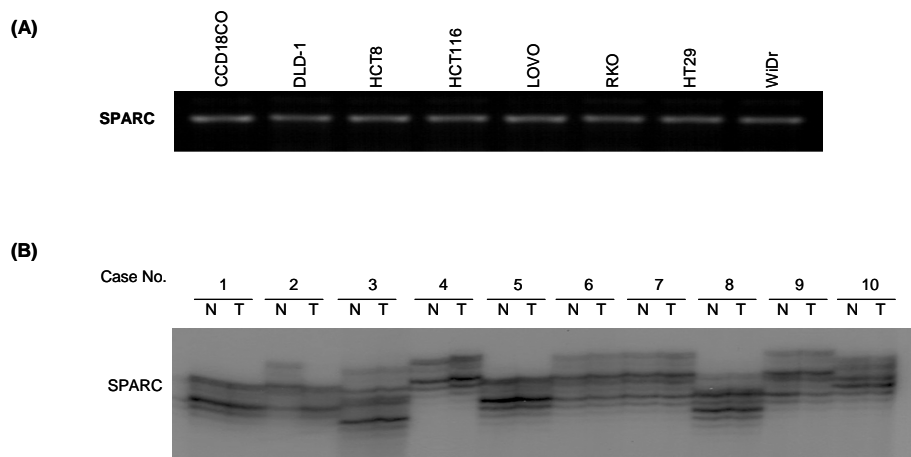


Figure 4. Genomic PCR and PCR–LOH analysis of *SPARC*. **(A)** Genomic PCR analysis of *SPARC* in colorectal cancer cell lines. **(B)** PCR–LOH analysis at the *SPARC* (5q31,3–q32) gene locus in 10 colorectal carcinoma samples. Only one case (case 2) shows allelic loss in the *SPARC*.

3. 5-aza-2'-deoxycytidine 처리에 의한 *SPARC* mRNA 발현의 복원

대장암 세포주에서 관찰되는 *SPARC* mRNA 발현 감소가 *SPARC* 유전자 소실과 관련 없다는 결과는 *SPARC* 발현이상이 유전자 자체의 구조적 결함에 의해 야기되기보다는 프로모터 즉, 유전자 전사조절 부위의 과메틸화에 의한 전사작용 중단 (transcriptional silencing) 가능성이 있음을 시사한다. 따라서 과메틸화가 *SPARC* 발현을 감소시키는 주요한 원인으로 작용하고 있는지를 파악하기 위해, *SPARC*가 발현되지 않았던 세포주에 과메틸화를 억제하는 것으로 알려진 5-aza-2'-deoxycytidine을 처리한 후 *SPARC* mRNA 발현이 복원되는가를 분석하였다. 낮은 수준의 *SPARC* mRNA 발현을 보이는 HCT8, HT29의 대장암 세포주와 전혀 발현을 보이지 않았던 DLD-1, HCT116, LOVO, RKO, WiDr 세포주에 5 uM 5-aza-2'-deoxycytidine을 6일간 처리한 후 RT-PCR을 이용하여 mRNA 발현 정도를 분석한 결과, 5종의 세포주에서 *SPARC* mRNA 발현의 현저한 증가가 관찰되었다 (Figure 5). 따라서 이러한 결과는 대장암 세포주에서 관찰되는 *SPARC* 발현 감소가 *SPARC* 유전자의 프로모터 과메틸화에 의한 전사기능의 중단에 기인함을 의미한다.

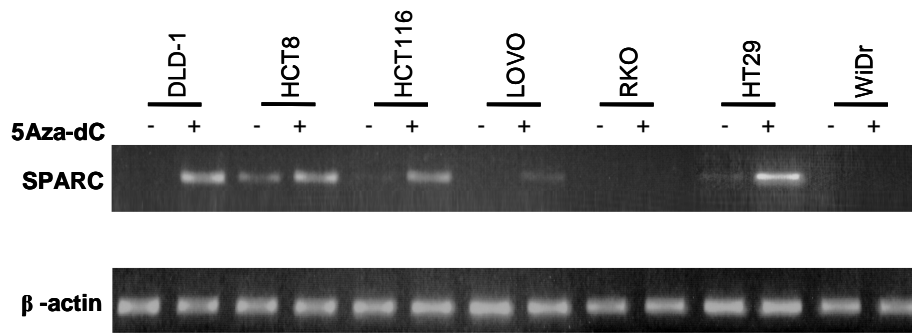


Figure 5. RT-PCR analysis of *SPARC* gene in colorectal cancer cell lines after treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine. *SPARC* gene expression was reactivated in 5 colorectal cancer cell lines (DLD-1, HCT8, HCT116, LOVO, HT29). β -actin was amplified as in internal control. - and + denote with and without 5-aza-2'-deoxycytidine treatment, respectively.

4. *SPARC* 프로모터 CpG의 과메틸화 정도 확인

대장암세포에서 *SPARC* mRNA의 발현감소를 야기한 원인이 *SPARC* 프로모터의 비정상적 과메틸화 때문인지를 보다 구체적으로 검증하기 위하여 *SPARC* 프로모터 부위에 존재하는 16개의 CpG 부위에 대한 메틸화 여부를 bisulfite DNA 염기서열 분석을 통해 분석하였다 (Figure 6).

낮은 수준의 *SPARC* mRNA 발현을 보이는 2종의 세포주(HCT8, HT29)를 먼저 살펴보면, HCT8의 경우 1-6번, 9-16번 CpG 부위는 완전 메틸화, 7, 8번 CpG 부위는 부분적 메틸화가 관찰되었고, HT29의 경우 1-6번, 8-16번 CpG 부위는 완전 메틸화, 7번 CpG 부위는 비메틸화가 관찰되었다. 전혀 *SPARC* 발현을 보이지 않던 5종의 세포주 (DLD-1, HCT116, LOVO, RKO, WiDr)를 보면, DLD-1과 LOVO의 경우 1-16번 CpG 부위는 완전 메틸화, 17번 CpG 부위는 부분적 메틸화가 관찰되었고, HCT116, RKO, WiDr의 경우 모든 CpG 부위에서 완전 메틸화되어 있었다. 따라서 프로모터 CpG 부위의 메틸화 정도는 *SPARC* mRNA의 발현 수준과 밀접하게 연관되어 있음을 확인할 수 있었다.

이러한 관찰은 이들 CpG 부위의 과메틸화가 대장암세포에서 발견되는 *SPARC* 유전자의 전사 중단에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다.

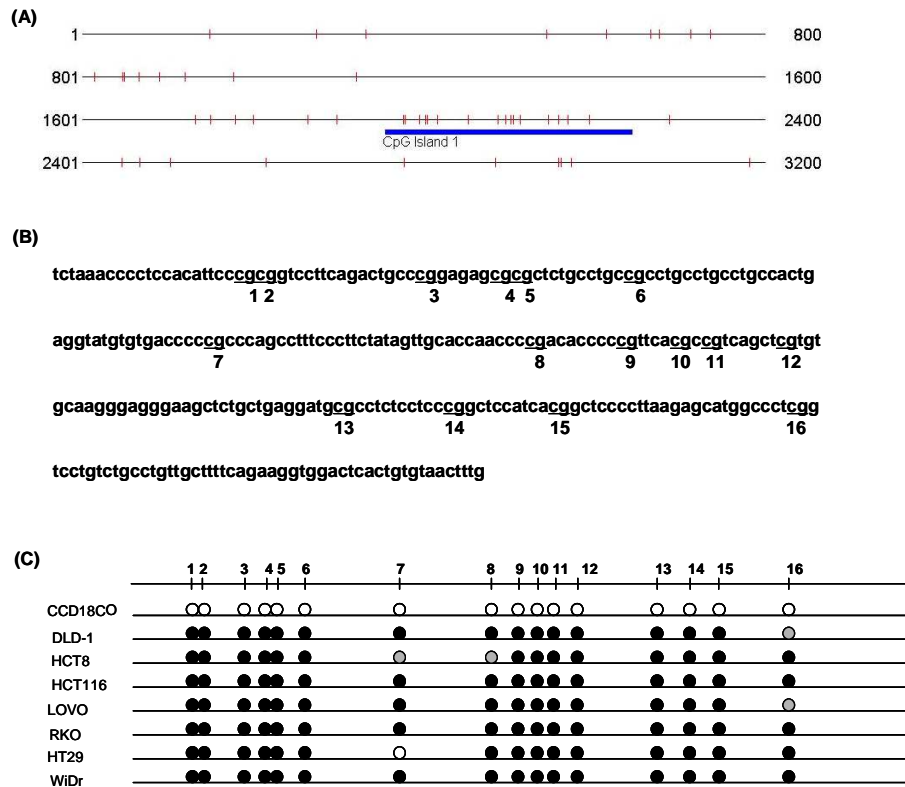


Figure 6. DNA sequencing analysis of CpG islands present in *SPARC* gene after bisulfite modification of genomic DNA isolated from colorectal cancer cell lines. **(A)** Distribution of CpG dinucleotides (vertical lines) in the 5' region of the *SPARC* gene showing a CpG-rich sequence (CpG island) spanning from exon 1 to intron 1. CpG island start=1955, end=2245, %GC=61.9. ObsCpG/ExpCpG=0.602, length=291. **(B)** Promoter sequence of human *SPARC*. The 16 CpG sites were underlined. **(C)** The methylation status of 16 CpG sites was examined in several cell lines. ○, unmethylated site; ◐, partially methylated site; ●, methylated site.

5. MSP를 이용한 *SPARC* 프로모터의 메틸화 분석

DNA를 sodium bisulfite로 처리한 후 염기 서열 분석을 통하여 확인된 결과를 바탕으로 *SPARC* 유전자의 메틸화를 살펴보기 위해 MSP를 시행하였다.

대장 섬유아세포주인 CCD18-Co 세포주는 메틸화가 없고, 대장암세포주인 DLD-1, HCT116, LOVO, RKO, HT29는 메틸화되어있으며 HCT8 세포주는 부분 메틸화가 존재하였다 (Figure 7).

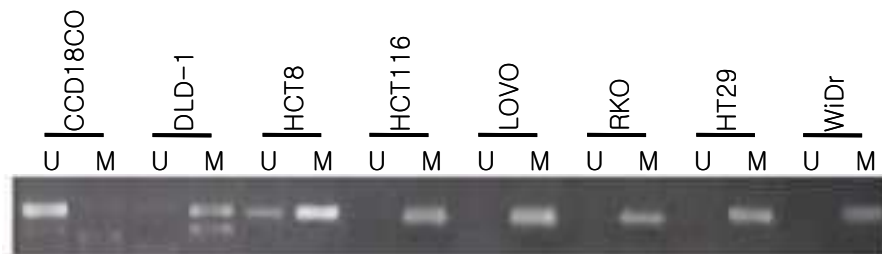


Figure 7. MSP analysis of the *SPARC* gene in colorectal cancer cell lines. The promoter region of the *SPARC* gene was methylated in 7 cell lines (DLD-1, HCT8, HCT116, LOVO, RKO, HT29, WiDr). Lanes labeled M and U denote products amplified by primers recognizing methylated and unmethylated sequence respectively.

6. 사람 대장암 조직에서 *SPARC* 프로모터의 메틸화 분석

대장암 세포주에서 관찰되는 *SPARC* 프로모터의 메틸화가 실제 대장암 조직에서도 발견되는 현상인지를 파악하기 위하여 사람 대장암 조직 20예와 각 예에 해당하는 정상 대장 조직 20예를 대상으로 MSP를 시행하였다. 대장암 조직 20예 모두에서 부분메틸화 (partially methylated)가 존재하는 반면, 정상 대장 조직에서는 20예 중 3예에서 부분메틸화가 존재하였고 17예는 비메틸화 (unmethylated) 되어있었다 (Figure 8).

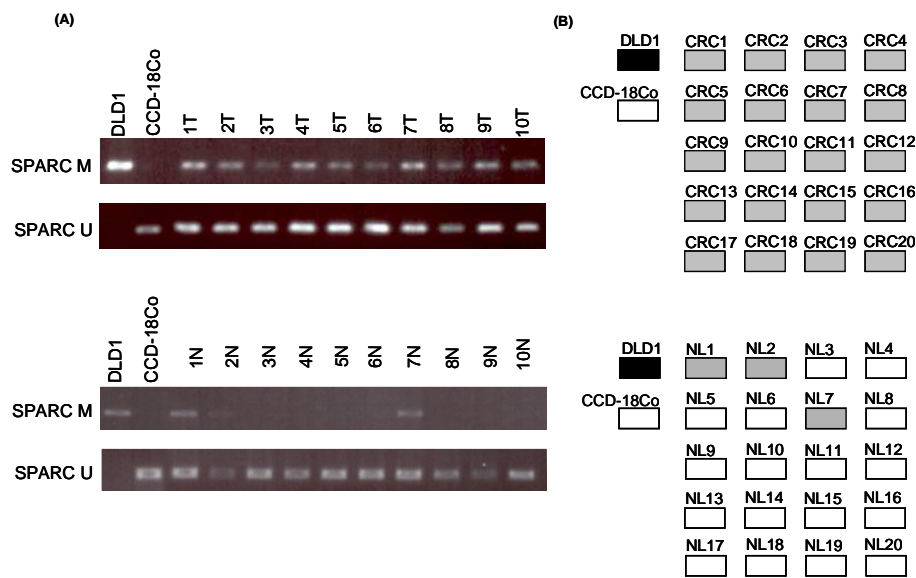


Figure 8. MSP analyses of the *SPARC* genes in 20 primary human colorectal carcinomas samples (CRC) and their corresponding 20 normal colonic mucosae samples (NL). **(A)** Representative examples of MSP assay in primary tumours and their adjacent normal colonic mucosae. M=methylated; U=unmethylated; T=colorectal carcinoma samples; N=normal colonic mucosa samples; DLD-1=positive control; CCD-18Co=negative control. **(B)** Open boxes, gray boxes and black boxes indicate unmethylation, partial methylation and homozygous methylation, respectively.

7. SPARC 발현도에 따른 임상적 특징

SPARC의 발현도와 예후와의 관련성을 조사하기 위해 292예의 대장암 파라핀 포매 조직으로 이루어진 조직 array를 이용하여 면역조직 화학 염색을 수행하였다. 실험에 사용한 대장암 292예의 병기는 32예가 1기, 117예는 2기, 103예는 3기, 40예는 4기였다. 면역조직 화학 염색 결과, 정상 대장 점막의 세포질에 SPARC의 발현이 전 예에서 관찰되었으나, 대장암에서는 다양한 발현 양상을 보였다. 대장암에서 전혀 발현이 안 되는 경우 음성, 정상 점막보다 약하게 발현되는 경우를 약 양성, 정상 점막에서 발현하는 정도 이상으로 발현하는 경우를 양성으로 판정하였다 (Figure 9).

SPARC의 발현 빈도는 27.7% (81/292)에서는 전혀 발현하지 않았고, 56.5% (165/292)는 약하게 발현, 15.8% (46/292)는 강하게 발현하였다. SPSS 프로그램을 이용하여 발현 여부에 따른 생존율의 차이를 분석한 결과 SPARC 발현도에 따라 예후의 차이를 보였다. SPARC가 많이 발현될수록 예후가 좋았고, SPARC가 발현되지 않는 군은 예후가 불량함을 알 수 있었다 (Figure 10).

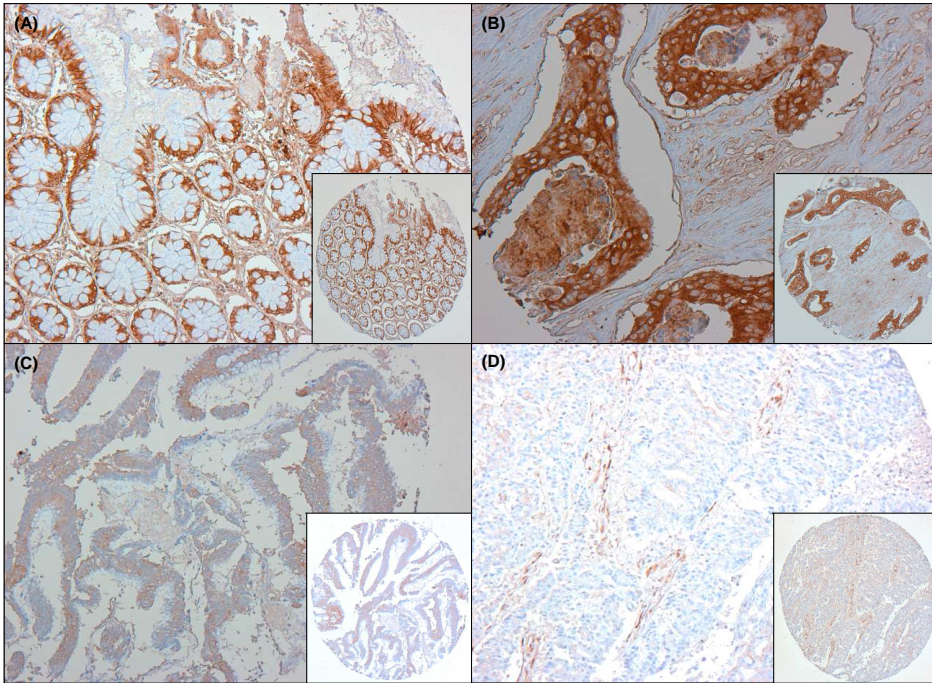
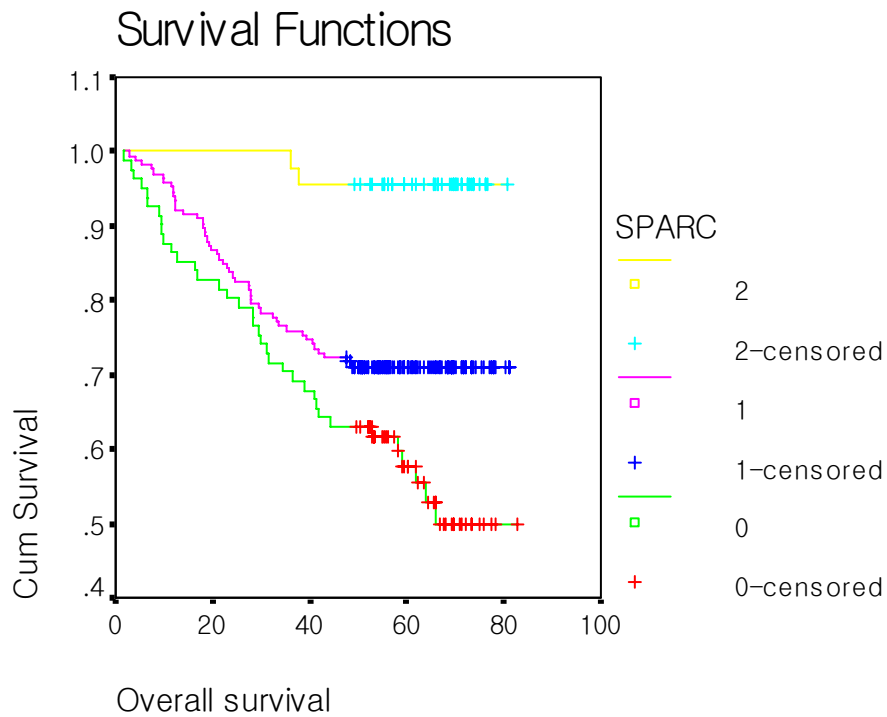


Figure 9. Immunohistochemical analysis of SPARC expression in colorectal carcinomas. **(A)** Strong expression of SPARC is noted in the cytoplasm of normal colonic epithelial cells. **(B)** Strong expression of SPARC in carcinomas cells. **(C)** Reduced expression of SPARC in carcinoma cells. **(D)** No SPARC expression in carcinoma cells.



P value=0.0001

Figure 10. The Kaplan–Meier survival curve of 292 cases colorectal cancer patients according to SPARC expression. The survival curve shows that cases lacking SPARC expression were correlated with poor prognosis of colorectal carcinomas. Five years survival rate of colorectal carcinoma group with weak (1) or strong (2), no (0) SPARC expression was 56.5% or 15.8%, 27.7% respectively.

IV. 고찰

암 발생은 세포성장과 사멸에 관여하는 유전자들의 변이에 의한 것으로 종양형성유전자와 종양억제유전자가 복합적으로 작용하여 일어난다. 이러한 유전적 변이는 유전자 자체의 유전학적 변이와 후생 유전학적 변이 (epigenetics)로 야기된다. 이상의 기전 중, epigenetics는 돌연변이 없이 유전자의 발현 양상만을 조절하지만, 종양형성유전자의 과다발현과 종양억제유전자의 억제 즉, 종양관련유전자의 기능을 변화시켜 암 진행에 큰 영향을 미친다. 최근 epigenetics 연구는 암 치료 측면에서 큰 기대를 불러일으키며 활발한 연구가 진행되고 있다. 특히 DNA microarray를 이용하여 유전자의 발현 정도를 비교하여 메틸화에 의해 억제된 유전자를 발굴해내는 연구들이 많이 이루어지고 있으나, 실험 방법과 비교 그룹에 따라 다양한 결과를 볼 수 있었다. 본 연구에서는 epigenetics의 주요 기전 중 하나인 CpG island 메틸화에 의해 기능을 잃어버린 유전자를 발굴해 내기 위해 대장암 세포주에 메틸화 억제제인 5-aza-2'-deoxycytidine을 처리한 그룹과 처리하지 않은 세포주 그룹, 정상 대장 조직 그룹, 이렇게 세 그룹을 oligonucleotide microarray로 유전자 발현 패턴을 비교, 분석하였다. 그 결과, 대부분의 각 세포주가 5-aza-2'- deoxycytidine을 처리한 세포주와 cluster를 이루는 경향을 보였다. 그것은 첫째, 세포주에 따른 유전자 발현의 차이가 너무 상이하기 때문이거나 둘째, 메틸화로 변화하는 유전자 군들의 수가 매우 적어 발현 이상에 따른 cluster가 크게 변하지 않는다는 것을 유추 할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 세포주의 다양성을 고려하여, 각 세포주 별로 5-aza-2'-deoxycytidine를 처리한 세포주에서 2배 이상 발현 증가하는 유전자

를 찾아내고자 하였다. 실험 후 최소 1개 이상의 세포주에서 조건을 만족하는 유전자를 선별해내고 중복되는 유전자를 제외하여 226개의 유전자를 발굴해 내었다. 이들 유전자 중 CpG island 유무, 유전자 기능의 유무, 암과 관련 정도 등의 조건을 세워, 기준에 준하는 70개의 후보 유전자를 선별해내었다. 이상의 유전자들 중 *SPARC*는 7개 중 5개의 대장암 세포주에서 4배 이상 발현 차이가 났으며 최근 다양한 종류의 암에서 종양발생과 더불어 다양한 생물학적 기능이 밝혀지고 있다^{39,40}.

*SPARC*는 골 (bone)에서 가장 흔한 비교원성 단백질이며 칼슘결합 당단백질로써 분자량이 35 kDa 이다. 주로 발육중인 골의 무기성분에 존재하고 교원세섬유와 칼슘에 부착한다고 보고가 있으나, 조직에서 *SPARC*의 기능은 명확하게 밝혀져 있지 않다⁴¹⁻⁴³. 정상 조직과 세포에서는 *SPARC* 발현이 연골세포, 용모막세포, 평활근세포, 혈관내피세포에 국한되어있지만, 최근에는 골조직에서 발생하는 종양, 즉 골육종, 골아세포종 등의 종양세포에서도 발현되는 것으로 알려져 있다⁴⁴. *SPARC*는 발견 초기에는 석회화 기질의 형성에 관여하는 당단백으로 알려졌으나, 최근의 연구 결과, 세포의 기질과의 상호작용, 상피와 결합조직 상호 작용에 관여함으로써 조직의 발생과 분화뿐만 아니라 종양의 발생이나 종양 세포의 석회화 물질 형성에 관여한다고 알려져 있다⁴⁵. 또한 *SPARC*는 조직의 개조 (tissue remodeling), 창상 치유 (wound repair), 세포 분화 (cellular differentiation), 증식 (cell proliferation), 이동 (cell migration), 혈관형성 (angiogenesis) 등 다양한 생물학적 기능이 알려져 있다⁴⁰. 그러나 이러한 연구들은 대부분 골 형성 조직이나 골종양, 유방암 등에서 이루어졌으나⁴⁶, 그 밖의 종양에서 연구된 바가 비교적 드문 편이다. 최근 *SPARC*가 폐암, 췌장

암 등에서 메틸화에 의해 발현 억제된다는 연구결과가 보고 되었다. 췌장암세포를 이용한 결과 *SPARC* mRNA가 DNA 메틸화에 의해 발현 저하됨이 밝혀졌고⁴⁰, 면역조직화학염색을 하여 *SPARC* 단백질이 종양 상피조직 (neoplastic epithelium)과 근접한 기질 섬유아세포 (stromal fibroblast)에서 과발현됨을 밝혔다. 그리하여 *SPARC*의 tumor-stromal interaction이 암의 진행을 촉진시킬 것이라 하였다. 또한 폐암 조직의 69%가 *SPARC* 프로모터 메틸화되어있다고 보고되었으며⁴¹, 면역조직화학염색 결과, bronchial epithelium (weak intensity)과 juxtatumoral stromal tissue (strong intensity)에서 *SPARC* 단백질이 발현되었으나, alveolar cell과 tumor cell에서는 발현되지 않았다고 보고되었다.

이렇듯 종양의 종류에 따라 종양 형성 과정에서 *SPARC*의 역할은 매우 복잡하며 다양하다. 본 실험에서는 oligonucleotide microarray 실험을 통해 대장암 세포주에서 *SPARC* 발현 감소가 메틸화와 관련이 있음을 몇 가지 실험을 통하여 검증하였다. PCR-LOH를 통하여 대장암 세포주에서 *SPARC* mRNA의 발현 감소가 유전자 소실에 기인하는 것이 아님을 확인하였고, 세포주에 5-aza-2'-deoxycytidine 처리 후 *SPARC* mRNA가 재발현됨을 RT-PCR로 확인함으로써 *SPARC*의 발현 감소가 유전자 소실에 기인하는 것이 아니라 *SPARC* 유전자 프로모터의 과메틸화에 의한 것임을 증명하였다. MSP와 sodium bisulfite DNA 염기 분석을 통하여 위의 결과를 다시 한번 구체적으로 증명하였다. 또한 이러한 결과가 사람 대장암 조직에서는 어떻게 반영이 되는지를 알아보기 위해 대장암 조직과 정상 대장 조직 각각 20 예에서 MSP를 시행한 결과, 대장암 조직 20예 (100%)에서 모두 메틸화 (partially methylated)가 존재하는 반면, 정

상 대장 조직에서는 3예 (15%)에서만 메틸화가 존재하였다. 따라서 대장암의 발생과 진행에 *SPARC*의 발현 감소가 관계있음을 확인할 수 있었다. 대장암 세포주에서 프로모터 메틸화로 전혀 발현이 되지 않던 *SPARC*가 사람 대장 조직에서 완전 메틸화가 아닌 모든 예에서 부분 메틸화로 나타나는 것은 몇 가지 이유를 예상할 수 있다. 먼저 대장암 조직에 정상 대장 조직 오염의 가능성이 있고, 또한 *SPARC*가 흥미롭게도 종양세포에서는 발현되지 않고 종양 상피조직 (neoplastic epithelium)과 근접한 기질 섬유아세포 (stromal fibroblast)에서 발현된다고 보고되어져 있어 대장암 조직에서 정상 대장 조직보다는 적은 양이지만 *SPARC*가 발현할 가능성이 있어 이러한 결과가 나왔음을 예상할 수 있다. *MSP*는 증폭 산물이 원래의 주형량을 반드시 반영하는 것이 아니므로 적은 양의 unmethylated allele이나 methylated allele이 존재하여도 증폭되어, 정량을 하는 것에는 한계점이 있다. 그러나 immunohistochemistry를 이용하여 대장암 조직과 대장 조직에서의 *SPARC*의 발현 양과 발현 위치를 확인한 결과, 많은 수의 대장암에서 *SPARC*가 전혀 발현되지 않는 것을 확인하였기 때문에 상당수의 대장암은 *SPARC* 프로모터의 메틸화로 발현이 억제됨을 알 수 있었다. 본 연구에서 관찰한 대장암에서 *SPARC*의 발현 감소가 임상적으로 어떤 의미가 있는가를 알기 위해 대장암 292 예로 구성된 조직 array를 이용, *SPARC*에 대하여 면역조직화학 염색을 수행하여 이들을 발현 정도에 따라 예후와 비교하였다. *SPARC*를 발현하지 않는 예들은 *SPARC*를 발현하는 집단에 비해 불량한 예후를 보임을 알 수 있었다 ($P=0.0001$). 이러한 사실은 대장암에서의 *SPARC*의 발현 저하는 암의 진행을 촉진하여 불량한 예후를 보이는 것과 관계가 있는 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서 발굴한 *SPARC* 유전자는 대장암의 진단 및 예 후 판정에 있어 중요한 발전을 가져올 것으로 기대되며, 대장암에서 특이적으로 발현 감소하여 메틸화 가능성이 있을 것으로 예상되는 70 개의 유전자들에 대하여 이 후 지속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

V. 결론

본 연구에서는 oligonucleotide microarray 기술을 이용하여 유전자의 발현 패턴을 분석함으로써 대장암에서 CpG island 메틸화에 의해 발현 감소되는 유전자를 발굴하였다. 이를 위해 대장암 세포주에 메틸화 억제제인 5-aza-2'-deoxycytidine을 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹, 정상 대장 점막 조직 그룹, 이렇게 세 그룹을 oligonucleotide microarray 실험을 시행하여 유전자 발현 패턴을 비교, 분석하였다. 이로써, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Oligonucleotide microarray를 이용하여 전사체 발현 분석 결과 대장암 특이적으로 메틸화되어있을 가능성이 있는 유전자 70개를 발굴하였다.
2. 이들 유전자 중 대장암과 *SPARC* 유전자 프로모터 메틸화의 상호관계를 다양한 실험으로 검증하였다.
 - i) *RT-PCR*을 통하여 대장암 세포주에서 *SPARC* mRNA가 발현되지 않음을 확인.
 - ii) *PCR-LOH*로 *SPARC* mRNA 발현 감소가 유전자의 소실이 아님을 확인.
 - iii) 대장암 세포주에 5-aza-2'-deoxycytidine 처리 후 *SPARC* mRNA가 재발현됨을 확인.
 - iv) Sodium bisulfite modification 염기서열 분석 및 *MSP*를 통하여 대장암 세포주의 *SPARC* 프로모터에 메틸화 되어있음을 확인.
 - v) 사람 대장 조직에서 *SPARC* 프로모터의 메틸화는 20예 대장암

조직에서 20예 모두가 메틸화 되어있는 반면 이에 상응하는 정상 대장 조직에서는 3예가 메틸화되어있음을 MSP로 확인.

vi) 대장암에서 *SPARC*의 발현 감소가 임상적으로 어떤 의의가있는가를 알기 위해 조직 array를 한 결과 *SPARC*를 발현하지 않는 예들은 *SPARC*를 발현하는 집단에 비해 불량한 예후를 보임 ($P=0.0001$).

이상의 결과를 바탕으로 사람 대장암의 상당수에서 *SPARC* 유전자는 프로모터 과메틸화로 인하여 유전자가 불활성화 되어 있으며 이러한 *SPARC* 유전자의 발현 억제는 대장암 발생에 관여하는 것으로 판단된다. 따라서 대장암의 진단 및 예후 판정에 있어 중요한 발전을 가져올 것으로 기대된다.

Supplementary Table 1. List of 226 genes overexpressed (>2-fold) in at least one of the seven colorectal cell lines after 5-aza-2'-deoxycytidine treatment.

Gene Name
Hs.111779 Homo sapiens secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin) (SPARC), mRNA.
Hs.137476 Homo sapiens MEF3L1 mRNA for MEF3 like 1, complete cds.
Hs.82568 Homo sapiens, cytochrome P450, subfamily XXVIIA (steroid 27-hydroxylase, cerebrotendinous xanthomatosis), polypeptide 1, clone IMAGE:3887033, mRNA.
Hs.433622 Homo sapiens cDNA: FLJ22207 fis, clone HRC01454.
Hs.7644 Homo sapiens H1 histone family, member 2 (H1F2), mRNA.
Hs.75498 Homo sapiens small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 20 (SCYA20), mRNA.
Hs.82961 Homo sapiens trefoil factor 3 (intestinal) (TFF3), mRNA.
Hs.131953 Homo sapiens v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog K (avian) (MAFK), mRNA.
Hs.184411 Homo sapiens clone FLB9714 PRO2619 mRNA, complete cds.
Hs.173724 Homo sapiens creatine kinase, brain (CKB), mRNA.
Hs.101302 Homo sapiens mRNA: cDNA DKFZp586K2324 (from clone DKFZp586K2324).
Hs.283108 Homo sapiens hemoglobin, gamma A (HBG1), mRNA.
Hs.6727 Homo sapiens mRNA: cDNA DKFZp566M063 (from clone DKFZp566M063).
Hs.81256 Homo sapiens S100 calcium binding protein A4 (calcium protein, calvasculin, metastasin, murine placental homolog) (S100A4), transcript variant 1, mRNA.
Hs.1516 Human insulin-like growth factor binding protein 4 (IGFBP4) mRNA, complete cds.
Hs.325474 Homo sapiens caldesmon 1 (CALD1), transcript variant 3, mRNA.
Hs.247817 Homo sapiens mRNA for for histone H2B, clone pjG4-5-14.
Hs.95594 Homo sapiens vitellogenic carboxypeptidase-like protein (HVLP) mRNA, complete cds.
Hs.182485 Homo sapiens actinin, alpha 4 (ACTN4), mRNA.
Hs.75619 Homo sapiens hyaluronoglucosaminidase 1 (HYAL1), transcript variant 1, mRNA.
Hs.75653 Homo sapiens fumarate hydratase (FH), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
Hs.274453 Homo sapiens likely ortholog of mouse embryonic epithelial gene 1 (EEG1), mRNA.
Hs.184167 Homo sapiens splicing factor, arginine/serine-rich 7, 35kDa (SFRS7), mRNA.
Hs.182771 Homo sapiens vitelliform macular dystrophy (Best disease, bestrophin) (VMD2), mRNA.

Hs.285050 Homo sapiens full length insert cDNA clone ZE05A03.
Hs.795 Homo sapiens H2A histone family, member O (H2AFO), mRNA.
Hs.2621 Homo sapiens cystatin A (stefin A) (CSTA), mRNA.
Hs.295944 Homo sapiens tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI2), mRNA.
Hs.7381 Homo sapiens voltage-dependent anion channel 3 (VDAC3), mRNA.
Hs.9914 Homo sapiens follistatin (FST), transcript variant FST317, mRNA.
Hs.70337 Homo sapiens immunoglobulin superfamily, member 4 (IGSF4), mRNA.
Hs.74120 Homo sapiens adipose specific 2 (APM2), mRNA.
Hs.176660 Homo sapiens G antigen 1 (GAGE1), mRNA.
Hs.117992 Homo sapiens sialic acid binding Ig-like lectin 6 (SIGLEC6), mRNA.
Hs.297681 Human alpha-1-antitrypsin (alpha-1-AT) mRNA, 3' end.
Hs.301350 Homo sapiens FXD domain containing ion transport regulator 3 (FXD3), transcript variant 1, mRNA.
Hs.382367 Homo sapiens lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1) (LGALS1), mRNA.
Hs.153261 Homo sapiens rheumatoid factor RF-ET13 mRNA, partial cds.
Hs.88778 Homo sapiens carbonyl reductase 1 (CBR1), mRNA.
Hs.110309 Homo sapiens major histocompatibility complex, class I, F (HLA-F), mRNA.
Hs.386655 Homo sapiens hemoglobin, gamma G (HBG2), mRNA.
Hs.110637 Homo sapiens homeo box A10 (HOXA10), mRNA.
Hs.296323 Homo sapiens serum/glucocorticoid regulated kinase (SGK), mRNA.
Hs.42346 Homo sapiens mRNA: cDNA DKFZp586G1023 (from clone DKFZp586G1023).
Hs.75285 Homo sapiens inter-alpha (globulin) inhibitor, H2 polypeptide (ITI2), mRNA.
Hs.50964 Homo sapiens carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein) (CEACAM1), mRNA.
Hs.171695 Homo sapiens partial mRNA: ID YG39-3, YG81-1A, ED166-8C.
Hs.85119 Homo sapiens SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 (yeast) (SMT3H1), mRNA.
Hs.32949 Homo sapiens defensin, beta 1 (DEFB1), mRNA.
Hs.38972 Homo sapiens tetraspan 1 (TSPAN-1), mRNA.
Hs.75424 Homo sapiens inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein (ID1), mRNA.
Hs.177486 Human amyloid beta precursor protein (ABPP) mRNA, 5' end.
Hs.89603 Homo sapiens mucin 1, transmembrane (MUC1), mRNA.
Hs.178470 Homo sapiens cDNA: FLJ22662 fis, clone HSI08080.

Hs.81874 Homo sapiens microsomal glutathione S-transferase 2 (MGST2), mRNA.
Hs.284205 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564A132 (from clone DKFZp564A132).
Hs.386655 Human gamma-globin mRNA, 3' end.
Hs.170328 Homo sapiens moesin (MSN), mRNA.
Hs.47913 Homo sapiens coagulation factor X (F10), mRNA.
Hs.375679 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp547E193 (from clone DKFZp547E193).
Hs.1252 Homo sapiens apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I) (APOH), mRNA.
Hs.79368 Homo sapiens epithelial membrane protein 1 (EMP1), mRNA.
Hs.17110 Homo sapiens cDNA FLJ14288 fis, clone PLACE1006382.
Hs.18676 Homo sapiens sprouty homolog 2 (Drosophila) (SPRY2), mRNA.
Hs.12246 Homo sapiens reelin (RELN), mRNA.
Hs.5940 Homo sapiens transmembrane mucin MUC13 (MUC13) mRNA, complete cds.
Hs.397649 Homo sapiens skin-specific protein (xp32) mRNA, partial cds.
Hs.1872 Homo sapiens phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble) (PCK1), mRNA.
Hs.171695 Homo sapiens dual specificity phosphatase 1 (DUSP1), mRNA.
Hs.118787 Homo sapiens transforming growth factor, beta-induced, 68kDa (TGFB1), mRNA.
Hs.19221 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp566G1424 (from clone DKFZp566G1424).
Hs.72924 Homo sapiens cytidine deaminase (CDA) mRNA, complete cds.
Hs.118630 Homo sapiens MAX interacting protein 1 (MXI1), transcript variant 1, mRNA.
Hs.158258 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434B1272 (from clone DKFZp434B1272); partial cds.
Hs.204354 Human HepG2 3' region cDNA, clone hmd1f06.
Hs.58414 Homo sapiens filamin C, gamma (actin binding protein 280) (FLNC), mRNA.
Hs.82502 Human mRNA for KIAA0039 gene, partial cds.
Hs.75452 Human heat shock protein mRNA, complete cds.
Hs.41270 Homo sapiens procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase (lysine hydroxylase) 2 (PLOD2),
Hs.112341 Homo sapiens protease inhibitor 3, skin-derived (SKALP) (PI3), mRNA.
Hs.166096 Homo sapiens E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific) (ELF3), mRNA.
Hs.380450 Homo sapiens RNA binding motif protein, Y chromosome, family 1, member A1 (RBM1A1), mRNA.
Hs.93029 Homo sapiens sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) (SPOCK), mRNA.
Hs.82359 Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6 (TNFRSF6), transcript variant 1,

mRNA.
Hs.250175 Homo sapiens PRO0530 mRNA, complete cds.
Hs.271473 Homo sapiens epithelial protein up-regulated in carcinoma, membrane associated protein 17 (DD96), mRNA.
Hs.77054 Homo sapiens B-cell translocation gene 1, anti-proliferative (BTG1), mRNA.
Hs.182140 Homo sapiens H2B histone family, member K (H2BFK), mRNA.
Hs.155212 601764784F1 NIH_MGC_53 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3996740 5', mRNA sequence.
Hs.234896 Homo sapiens geminin, DNA replication inhibitor (GMNN), mRNA.
Hs.155538 Homo sapiens G protein-coupled receptor 92 (GPR92), mRNA.
Hs.5753 Homo sapiens inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2 (IMPA2), mRNA.
Hs.192927 Homo sapiens protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14D (PPP1R14D), mRNA.
Hs.70266 Homo sapiens yeast Sec31p homolog (KIAA0905), mRNA.
Hs.80962 Homo sapiens neurotensin (NTS), mRNA.
Hs.324746 Homo sapiens alpha-2-HS-glycoprotein (AHSG), mRNA.
Hs.22404 Homo sapiens protease, serine, 12 (neurotrypsin, motopsin) (PRSS12), mRNA.
Hs.188361 Homo sapiens cDNA FLJ12807 fis, clone NT2RP2002316.
Hs.381398 Human HL14 gene encoding beta-galactoside-binding lectin, 3' end, clone 2.
Hs.283802 Homo sapiens PCDH-psi3 pseudogene, mRNA sequence.
Hs.79356 Homo sapiens Lysosomal-associated multispinning membrane protein-5 (LAPTM5), mRNA.
Hs.114311 Homo sapiens CDC45 cell division cycle 45-like (S. cerevisiae) (CDC45L), mRNA.
Hs.109051 Homo sapiens P1725 mRNA, complete cds.
Hs.384944 Human HepG2 3' region Mbol cDNA, clone hmd2a08m3.
Hs.1211 Homo sapiens acid phosphatase 5, tartrate resistant (ACP5), mRNA.
Hs.15277 Homo sapiens cDNA: FLJ22940 fis, clone KAT08051.
Hs.104925 Homo sapiens ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain) (ENC1), mRNA.
Hs.433877 Homo sapiens DKFZP564B147 protein (DKFZP564B147), mRNA.
Hs.187958 Homo sapiens solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8 (SLC6A8), mRNA.
Hs.20252 Homo sapiens cDNA FLJ10616 fis, clone NT2RP2005453.
Hs.111632 Homo sapiens Lsm3 protein (LSM3), mRNA.
Hs.423190 Homo sapiens cysteine-rich protein 1 (intestinal) (CRIP1), mRNA.
Hs.460 Homo sapiens activating transcription factor 3 (ATF3), mRNA.

Hs.2053 Homo sapiens tyrosinase (oculocutaneous albinism IA) (TYR), mRNA.
Hs.347315 Homo sapiens cDNA: FLJ22545 fis, clone HSI00239.
Hs.14623 Homo sapiens interferon, gamma-inducible protein 30 (IFI30), mRNA.
Hs.10649 Homo sapiens basement membrane-induced gene (ICB-1), mRNA.
Hs.77399 Homo sapiens caudal type homeo box transcription factor 2 (CDX2), mRNA.
Hs.297405 Homo sapiens cDNA FLJ12145 fis, clone MAMMA1000395.
Hs.469 Homo sapiens succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp) (SDHA), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
Hs.79265 Homo sapiens suppression of tumorigenicity 5 (ST5), transcript variant 1, mRNA.
Hs.1583 Homo sapiens neutrophil cytosolic factor 1 (47kDa, chronic granulomatous disease, autosomal 1) (NCF1), mRNA.
Hs.73105 Homo sapiens betacellulin (BTC), mRNA.
Hs.274401 Homo sapiens mRNA: cDNA DKFZp434P086 (from clone DKFZp434P086); partial cds.
Hs.118893 Homo sapiens melanoma-associated antigen MG50 mRNA, partial cds.
Hs.308134 Homo sapiens (clone DR3) mRNA fragment.
Hs.45002 Homo sapiens ras-related C3 botulinum toxin substrate 3 (rho family, small GTP binding protein Rac3) (RAC3), mRNA.
Hs.74376 Human neuronal olfactomedin-related ER localized protein mRNA, partial cds.
Hs.401703 Homo sapiens cDNA FLJ20541 fis, clone KAT11364.
Hs.75975 Homo sapiens signal recognition particle 9kDa (SRP9), mRNA.
Hs.750 Homo sapiens fibrillin 1 (Marfan syndrome) (FBN1), mRNA.
Hs.8526 Homo sapiens UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 6 (B3GNT6), mRNA.
Hs.113207 Homo sapiens G protein-coupled receptor 30 (GPR30), mRNA.
Hs.103724 Homo sapiens peripheral myelin protein 22 (PMP22), mRNA.
Hs.198273 Homo sapiens NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 8, 19kDa (NDUFB8), mRNA.
Hs.1710 Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 10 (ABCB10), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
Hs.10706 Homo sapiens epithelial protein lost in neoplasm beta (EPLIN), mRNA.
Hs.27595 Homo sapiens hypothetical protein FLJ10997 (FLJ10997), mRNA.
Hs.112405 Homo sapiens S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B) (S100A9), mRNA.
Hs.5302 Homo sapiens lectin, galactoside-binding, soluble, 4 (galectin 4) (LGALS4), mRNA.
Hs.79516 Homo sapiens brain abundant, membrane attached signal protein 1 (BASP1), mRNA.
Hs.1545 Homo sapiens caudal type homeo box transcription factor 1 (CDX1), mRNA.
Hs.17109 Homo sapiens integral membrane protein 2A (ITM2A), mRNA.

Hs.272003 Homo sapiens hemoglobin, zeta (HBZ), mRNA.
Hs.30332 Homo sapiens glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2 (GFPT2), mRNA.
Hs.264981 Homo sapiens 2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa (OAS2), transcript variant 2, mRNA.
Hs.95972 Homo sapiens silver homolog (mouse) (SILV), mRNA.
Hs.56205 Homo sapiens insulin induced gene 1 (INSIG1), mRNA.
Hs.5320 Homo sapiens esophageal cancer associated protein (MGC16824), mRNA.
Hs.362729 Homo sapiens cDNA: FLJ22859 fis, clone KAT01752.
Hs.76391 Homo sapiens myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse) (MX1), mRNA.
Hs.83656 Human GDP-dissociation inhibitor protein (Ly-GDI) mRNA, complete cds.
Hs.119651 Homo sapiens glypican 3 (GPC3), mRNA.
Hs.381361 Homo sapiens mRNA for keratin 19, partial cds, isolate:K19-141.
Hs.315 Homo sapiens mucin 2, intestinal/tracheal (MUC2), mRNA.
Hs.134742 Homo sapiens mRNA: cDNA DKFZp547D065 (from clone DKFZp547D065).
Hs.108623 Homo sapiens thrombospondin 2 (THBS2), mRNA.
Hs.112242 Homo sapiens cDNA: FLJ22645 fis, clone HSI07093.
Hs.239069 Homo sapiens four and a half LIM domains 1 (FHL1), mRNA.
Hs.326035 Homo sapiens early growth response 1 (EGR1), mRNA.
Hs.94672 Homo sapiens GCN5 general control of amino-acid synthesis 5-like 1 (yeast) (GCN5L1), mRNA.
Hs.44865 Homo sapiens lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF1), mRNA.
Hs.1355 Homo sapiens cathepsin E (CTSE), transcript variant 1, mRNA.
Hs.278957 Homo sapiens retina and anterior neural fold homeobox (RAX), mRNA.
Hs.48876 Homo sapiens farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1 (FDFT1), mRNA.
Hs.417504 Homo sapiens mRNA: cDNA DKFZp434G0719 (from clone DKFZp434G0719); partial cds.
Hs.2554 Homo sapiens sialyltransferase 1 (beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase) (SIAT1), mRNA.
Hs.263395 Homo sapiens semaphorin SEMA6A1 mRNA, complete cds.
Hs.14601 Homo sapiens hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1 (HCLS1), mRNA.
Hs.4158 Homo sapiens, regenerating islet-derived 1 beta (pancreatic stone protein, pancreatic thread protein), clone MGC:34236 IMAGE:5227370, mRNA, complete cds.
Hs.367740 Homo sapiens HSPC022 protein (HSPC022), mRNA.
Hs.24763 Homo sapiens RAN binding protein 1 (RANBP1), mRNA.
Hs.169388 Homo sapiens cDNA FLJ14216 fis, clone NT2RP3003672, weakly similar to T-CELL SURFACE

GLYCOPROTEIN E2 PRECURSOR.
Hs.240443 Human MEN1 region clone epsilon/beta mRNA, 3' fragment.
Hs.574 Homo sapiens fructose-1,6-bisphosphatase 1 (FBP1), mRNA.
Hs.385099 H.sapiens (JER58) MUC5AC mRNA for mucin (partial).
Hs.158351 Homo sapiens galanin receptor 2 (GALR2), mRNA.
Hs.75268 Homo sapiens sialyltransferase 4C (beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase) (SIAT4C), mRNA.
Hs.25318 Homo sapiens clone 25194 mRNA sequence.
Hs.82045 Homo sapiens midkine (neurite growth-promoting factor 2) (MDK), mRNA.
Hs.154365 Human cis-acting sequence.
Hs.7917 Homo sapiens likely ortholog of mouse hypoxia induced gene 1 (HIG1), mRNA.
Hs.22972 Homo sapiens cDNA FLJ13352 fis, clone OVARC1002165, weakly similar to 3-OXO-5-ALPHA-STEROID 4-DEHYDROGENASE 2 (EC 1.3.99.5).
Hs.82396 Homo sapiens 2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa (OAS1), transcript variant E18, mRNA.
Hs.190722 Homo sapiens HSPC142 protein (HSPC142), mRNA.
Hs.406455 Human HepG2 partial cDNA, clone hmd3c07m5.
Hs.71465 Homo sapiens squalene epoxidase (SQLE), mRNA.
Hs.334347 Homo sapiens creatine kinase, muscle (CKM), mRNA.
Hs.227777 Homo sapiens protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1 (PTP4A1), mRNA.
Hs.1420 Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 3 (achondroplasia, thanatophoric dwarfism) (FGFR3), transcript variant 1, mRNA.
Hs.78765 Human zinc finger protein mRNA, complete cds.
Hs.381105 Homo sapiens cDNA: FLJ23366 fis, clone HEP15665.
Hs.2399 Homo sapiens matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted) (MMP14), mRNA.
Hs.211579 Homo sapiens melanoma adhesion molecule (MCAM), mRNA.
Hs.119640 Homo sapiens Kruppel-like factor 3 (basic) (KLF3), mRNA.
Hs.75140 Homo sapiens low density lipoprotein-related protein-associated protein 1 (alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein 1) (LRPAP1), mRNA.
Hs.11638 Homo sapiens fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 5 (FACL5), mRNA.
Hs.24332 Homo sapiens CGI-26 protein (LOC51071), mRNA.
Hs.255416 Homo sapiens cDNA: FLJ21986 fis, clone HEP06248.
Hs.35086 Homo sapiens ubiquitin specific protease 1 (USP1), mRNA.
Hs.171558 Homo sapiens sex comb on midleg-like 2 (Drosophila) (SCML2), mRNA.
Hs.9235 Homo sapiens non-metastatic cells 4, protein expressed in (NME4), mRNA.

Hs.22975 Homo sapiens mRNA for KIAA1576 protein, partial cds.
Hs.135281 Homo sapiens alpha-actinin-2-associated LIM protein (ALP), mRNA.
Hs.59506 Homo sapiens DMRT2 and terra-like protein (DMRT2) bicistronic mRNA, complete cds, alternatively spliced.
Hs.166975 Homo sapiens splicing factor, arginine/serine-rich 5 (SFRS5), mRNA.
Hs.179665 Human wild-type p53 activated fragment-1 (WAF1) mRNA, complete cds.
Hs.400124 Homo sapiens jun B proto-oncogene (JUNB), mRNA.
Hs.27836 Homo sapiens cDNA: FLJ22362 fis, clone HRC06544.
Hs.247813 Homo sapiens H3 histone family, member H (H3FH), mRNA.
Hs.18069 Homo sapiens legumain (LGMN), mRNA.
Hs.268552 Homo sapiens interleukin-1 receptor-associated kinase 3 (IRAK3), mRNA.
Hs.3763 Homo sapiens amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1 (Fe65) (APBB1), transcript variant 1, mRNA.
Hs.83173 Homo sapiens cyclin D3 (CCND3), mRNA.
Hs.182138 Homo sapiens H2B histone family, member H (H2BFH), mRNA.
Hs.16361 Homo sapiens hypothetical protein H17 (H17), mRNA.
Hs.233955 Homo sapiens hypothetical protein FLJ20401 (FLJ20401), mRNA.
Hs.155410 Homo sapiens isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) beta (IDH3B), mRNA.
Hs.426228 Homo sapiens cDNA FLJ13485 fis, clone PLACE1003892.
Hs.2719 Homo sapiens WAP four-disulfide core domain 2 (WFDC2), transcript variant 1, mRNA.
Hs.75360 Homo sapiens carboxypeptidase E (CPE), mRNA.
Hs.234074 Homo sapiens mRNA: cDNA DKFZp761G02121 (from clone DKFZp761G02121); partial cds.
Hs.585 Homo sapiens apolipoprotein B (including Ag(x) antigen) (APOB), mRNA.
Hs.302043 Homo sapiens chemokine (C-C motif) receptor-like 2 (CCRL2), mRNA.
Hs.74111 Homo sapiens RNA binding protein (autoantigenic, hnRNP-associated with lethal yellow) (RALY), transcript variant 1, mRNA.
Hs.15299 Homo sapiens HMBA-inducible (HIS1), mRNA.

참고문헌

1. Issa JP, Baylin SB. Epigenetics and human disease. *Nat Med* 1996;2:281-282.
2. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003;349:2042-2054.
3. Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E, Horsthemke B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet* 1989; 83:155-158.
4. Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9700-9704.
5. Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, et al. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1995;1:686-692.
6. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 1997;57: 808-811.
7. Heldin CH, Miyazono K, Ten Dijke P. TGF β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD protein. *Nature* 1997;390: 465-471.

8. White *RL*. Tumor suppressing pathways. *Cell* 1998;92:591-592.
9. Vogelstein *B*, Fearon *ER*, Hamilton *SR*, Kern *SE*, Preisinger *AC*, Leppert *M*, et al. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525-532.
10. Thibodeau *SN*, Bren *G*, Schaid *D*. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-819.
11. Li *YC*, Korol *AB*, Fahima *T*, Nevo *E*. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Mol Biol Evol* 2004;21:991-1007.
12. Goel *A*, Arnold *CN*, Niedzwiecki *D*, Chang *DK*, Ricciardiello *L*, Carethers *JM*, et al. Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res* 2003;63:1608-1614.
13. Boland *CR*, Sato *J*, Saito *K*, Carethers *JM*, Marra *G*, Laghi *L*, et al. Genetic instability and chromosomal aberrations in colorectal cancer: a review of the current models. *Cancer Detect Prev* 1998;22:377-382.
14. Toyota *M*, Itoh *F*, Imai *K*. DNA methylation and gastrointestinal malignancies: functional consequences and clinical implications. *J Gastroenterol* 2000;35:727-734.
15. Toyota *M*, Issa *JP*. The role of DNA hypermethylation in human neoplasia. *Electrophoresis* 2000;21:329-333.
16. Kondo *Y*, Issa *JP*. Epigenetic changes in colorectal cancer.

Cancer Met Rev 2004;23:29-39.

17. Toyota M, Shen L, Ohe-Toyota M, Hamilton SR, Sinicrope FA, Issa JP. Aberrant methylation of the cyclooxygenase 2 CpG island in colorectal tumors. *Cancer Res* 2000;60:4044-4048.

18. Issa JP, Ahuja N, Toyota M, Bronner MP, Brentnall TA. Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Res* 2001;61:3573-3577.

19. Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links aging and neoplasia in human colon. *Nat Genet* 1994;7:536-540.

20. Young J, Biden KG, Simms LA, Huggard P, Karamatic R, Eyre HJ, et al. HPP1: A transmembrane protein-encoding gene commonly methylated in colorectal polyps and cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:265-270.

21. Liang G, Robertson KD, Talmadge C, Sumegi J, Jones PA. The gene for a novel transmembrane protein containing epidermal growth factor and follistatin domains is frequently hypermethylated in human tumor cells. *Cancer Res* 2000;60:4907-4912.

22. Issa JPJ, Vertino PM, Boehm CD, Newsham IF, Baylin SB. Switch from mono-allelic to bi-allelic human IGF2 promoter methylation during aging and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:11757-11762.

23. Xu XL, Yu J, Zhang HY, Sun MH, Gu J, Du X, et al. Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis *World J Gastroenterol*

2004;10:3441-3454.

24. Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, Issa JPJ. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res* 1998;58:5489-5494.

25. Toyota M, Ho C, Ahuja N, Jair KW, Li Q, Ohe-Toyota M, et al. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res* 1999;59:2307-2312.

26. Youssef EM, Estecio MR, Issa JP. Methylation and regulation of expression of different retinoic acid receptor beta isoforms in human colon cancer. *Cancer Biol Ther* 2004;3:82-86.

27. Robertson KD, Jones PA. The human *ARF* cell cycle regulatory gene promoter is a CpG island which can be silenced by DNA methylation and down-regulated by wildtype p53. *Mol Cell Biol* 1998;18:6457-6473.

28. Esteller M, Sparks A, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, et al. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* 2000;60:4366-4371.

29. Toyota M, Ho C, Ohe-Toyota M, Baylin SB, Issa JP. Inactivation of *CACNA1G*, a T-type calcium channel gene, by aberrant methylation of its 5' CpG island in human tumors. *Cancer Res* 1999;59:4535-4541.

30. Wales MM, Biel MA, el Deiry W, Nelkin BD, Issa JP, Cavenee

WK, et al. p53 activates expression of *HIC-1*, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat Med* 1995;1:570-577.

31. El-Osta A, Kantharidis P, Zalcborg JR, Wolffe AP. Precipitous release of methyl-CpG binding protein 2 and histone deacetylase 1 from the methylated human multidrug resistance gene (*MDR1*) on activation. *Mol Cell Biol* 2002;22:1844-1857.

32. Costello JF, Futscher BW, Tano K, Graunke DM, Pieper RO. Graded methylation in the promoter and body of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (*MGMT*) gene correlates with *MGMT* expression in human glioma cells. *J Biol Chem* 1994; 269:17228-17237.

33. Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, et al. Inactivation of the *CDKN2/p16/MTS1* gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995;55:4525-4530.

34. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JPJ. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8681-8686.

35. Kim NG, Choi YR, Baek MJ, Kang H, Kim NK, Kim H. Frameshift mutations at coding mononucleotide repeats of the *hRAD50* gene in gastrointestinal carcinomas with microsatellite instability. *Cancer Res* 2001;61:36-38

36. Kim NG, Rhee H, Li LS, Kim H, Lee JS, Kim JH, et al. Identification of *MARCKS*, *FLJ11383* and *TAF1B* as putative novel target genes in colorectal carcinomas with microsatellite instability.

Oncogene 2002;21:5081-5087.

37. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific *PCR*: a novel *PCR* assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9821-9826.

38. Kim H, Nam SW, Rhee H, Li LS, Kang HJ, Koh KH, et al. Different gene expression profiles between microsatellite instability-high and microsatellite stable colorectal carcinomas. *Oncogene* 2004;23:6218-6225.

39. Sato N, Fukushima N, Maehara N, Matsubayashi H, Koopmann J, Su GH, et al. *SPARC*/osteonectin is a frequent target for aberrant methylation in pancreatic adenocarcinoma and a mediator of tumor-stromal interactions. *Oncogene* 2003;22:5021-5230.

40. Suzuki M, Hao C, Takahashi T, Shigematsu H, Shivapurkar N, Sathyanarayana UG, et al. Aberrant methylation of *SPARC* in human lung cancers. *Br J Cancer* 2005;92:942-948.

41. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 1981;26:99-105.

42. Romsberg RW, Riggs BL. Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium binding proteins. *Biochemistry* 1986;25:1176-1180.

43. Pacific M, Oshima, Fisher LW, Young MF, Shapiro LM, Leboy PS. Changes in osteonectin distribution and levels are associated with mineralization of the chicken tibial growth cartilage. *Calcif*

Tissue Int 1990;47:51-61.

44. Serra M, Morini MC, Scotalandi K, Fisher LW, Zini N, Colombo MP, et al. Evaluation of osteonectin as a diagnostic marker of osteogenic bone tumors. *Human Pathol* 1992;23:1326-1331.

45. Porte H, Chastre E, Prevot S, Nordlinger B, Empereur S, Basset P, et al. Neoplastic progression of human colorectal cancer is associated with overexpression of the stromal lysin-3 and BM-40/SPARC gene. *Int J Cancer* 1995;20:70-75.

46. Bellahcene A, Cstronovo V. Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix protein in human breast cancer. *Am J Pathol* 1995;146:95-100.

Abstract

**Identification and clinical signification of *SPARC* inactivation
through Promoter Hypermethylation in Human Colorectal
Cancers**

Eungi Yang

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by *Professor Hoguen Kim*)

Epigenetic alteration is an important mechanism in the development of human cancer. *In* particular, inactivation of tumor suppressor genes through the hypermethylation of CpG islands located in their promoter regions is firmly established as an important mechanism for gene inactivation in cancer.

In this study, we intended to discover the gene showing CpG island hypermethylation in human colorectal cancer. We analyzed the altered expression pattern before and after 5-aza-2'-deoxycytidine treatment by using oligonucleotide microarray technology.

We found that the *RNA* expression of 226 out of 18,664 genes were induced after 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. Among these 226 genes we selected 70 novel genes that were not previously

reported to be hypermethylated in colorectal cancer.

Among these genes, *SPARC* (secreted protein acidic rich in cysteine) was markedly reduced in comparison to normal colonic mucosae in all seven cell lines, and is known to be involved in carcinogenesis to various extents.

In colorectal cancer cell lines, we confirmed that *SPARC* mRNA was not detected by *RT-PCR*, and *PCR-LOH* analysis showed that this was not due to gene destruction. *MSP* demonstrated hypermethylation of six out of the seven cell lines. Also, re-expression of *SPARC* was demonstrated in five out of the seven cell lines after treatment of the cell lines with the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. In human tissues, the methylation of *SPARC* promoter was found in all twenty human colorectal carcinomas but only three among the corresponding twenty normal colonic musosae were methylated.

An immunohistochemical and survival analysis of 292 colorectal carcinoma cases demonstrated a poorer prognosis in the group without *SPARC* expression than the group with normal *SPARC* expression ($P=0.0001$).

In conclusion, epigenetic gene silencing of *SPARC* is frequent in colon cancers, and the inactivation of *SPARC* may be involved in colonic tumorigenesis.

Key Words : CpG island, methylation, oligonucleotide microarray, *SPARC*, colorectal cancer

