

전이 전립선암 환자의 말초혈액내
순환상피세포에서 Enhancer of
Zeste Homolog 2의 발현 검색

연세대학교 대학원
의 학 과
조 강 수

전이 전립선암 환자의 말초혈액내
순환상피세포에서 Enhancer of
Zeste Homolog 2의 발현 검색

지도 홍 성 준 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2006년 12월

연세대학교 대학원

의 학 과

조 강 수

조강수의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 홍 성 준 인

심사위원 최 영 득 인

심사위원 임 중 백 인

연세대학교 대학원

2006년 12월 일

감사의 글

지난 석사과정 동안 부족한 저를 아낌없는 지도와 격려로 이끌어 주신 홍성준 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 연구과정에서 많은 조언을 주셨던 최영득 교수님, 임종백 교수님께 감사드립니다. 실험실에서 많은 도움을 주었던 오혜영 선생님, 이은진 선생님 그리고 진단검사의학과 김창기 선생님께도 감사의 뜻을 전합니다.

항상 믿어주시고 지원해주신 양가 부모님께도 진심으로 고마운 마음을 전하고 싶습니다. 무엇보다도 사랑하는 아내 그리고 아들 은규와 함께 이 기쁨을 나누고 싶습니다.

저자 씀

차례

그림 차례	ii
국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	5
1. 전립선암 세포와 조직에서 EZH2 발현 확인	5
2. 순환상피세포의 EZH2 발현 분석법 확립	6
3. 환자 말초혈액을 이용한 대조 실험	7
III. 결과	9
1. 전립선암 세포와 조직에서 EZH2 발현 확인	9
2. 순환상피세포의 EZH2 발현 분석법 확립	9
3. 환자 말초혈액을 이용한 대조 실험	10
IV. 고찰	12
V. 결론	16
참고문헌	17
영문요약	22

그림 차례

그림 1. 전이 전립선암 세포주 및 전이 전립선암 환자의 조직에서 EZH2 단백질 발현의 확인	9
그림 2. PC3 세포주의 EZH2 mRNA 발현 검색을 위한 RT-PCR의 민감도	10
그림 3. 정상 대조군, 국소 전립선암 및 전이 전립선암 환자의 말초혈액내 순환상피세포에서 EZH2 mRNA의 발현 검색 ...	11
그림 4. 정상 대조군, 국소 전립선암 및 전이 전립선암 환자군의 말초혈액내 EZH2 mRNA의 발현 강도	11
그림 5. Ber-EP4 immunomagnetic beads와 순환상피세포 및 단핵세포의 결합	14

국문요약

전이 전립선암 환자의 말초혈액내 순환상피세포에서 Enhancer of Zeste Homolog 2의 발현 검색

전립선암 환자에서 말초혈액내 순환암세포의 검색은 질병의 진행 및 생존에 의미있는 생체표지자로 연구되어 왔다. 한편 최근에 전사 억제자의 일종인 enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)가 전이 전립선암에서 과발현되는 것으로 보고된 바 있다. 이에 본 연구에서는 전이 전립선암 환자의 말초혈액내 순환상피세포에서 EZH2 mRNA의 발현을 검색하고, 생체표지자로서의 가능성을 알아보고자 하였다.

말초혈액에서 순환상피를 분리하기 위해 Ber-EP4 coated immunomagnetic beads를, 순환상피세포에서 mRNA를 얻기 위해 oligo dT conjugated immunomagnetic beads를 사용하였다. EZH2 mRNA에 대하여 reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 시행하고, 발현 강도를 측정하였다. EZH2 mRNA의 발현 검색을 위한 본 연구 기법의 민감도 검사를 위해 인간 전립선암 세포주 (PC-3)를 사용하였다. 또한, 정상 대조군, 국소 전립선암 환자군 및 전이 전립선암 환자군에서 각각 10명씩 혈액을 채취하여, 순환상피세포에서 EZH2 mRNA 발현을 조사하였다.

전립선암 세포주를 이용한 민감도 검사에서 10개의 종양세포를 검색할 수 있을 정도로 매우 민감한 검사임을 알 수 있었다. 혈액 검체를 이용한 검사에서는 전이 전립선암 환자군에서 EZH2 mRNA의 평균 발현 강도가 정상 대조군 및 국소 전립선암 환자군에서 보다 통계학적으로 높은 것을 알 수 있었다 ($p < 0.05$, by Mann-Whitney U test).

결론적으로 전이 전립선암 환자에서 분리된 순환상피세포에서 EZH2 mRNA의 과발현을 확인할 수 있었다. 따라서 순환상피세포에서의 EZH2 mRNA 발현은 전립선암 환자에서 조기 전이를 예측할 수 있는 유용한 생체표지자가 될 것으로 기대된다. 그러나 말초혈액에서

단핵세포의 오염 없이 순환상피세포를 분리할 수 있는 보다 특이적인 검사법이 필요할 것이다.

핵심되는 말 : 전립선암, 전이, 순환상피세포, enhancer of zeste homolog

2

전이 전립선암 환자의 말초혈액내 순환상피세포에서
Enhancer of Zeste Homolog 2의 발현 검색

<지도교수 홍 성 준>

연세대학교 대학원 의학과

조 강 수

I. 서론

전립선암은 전 세계에서 세 번째로 흔한 남성암이며,¹ 미국의 경우 발생률이 가장 높은 남성암으로 폐암에 이어 두 번째로 높은 암 특이 사망률을 보인다.² 우리나라의 경우 전립선암은 인구 고령화와 식생활 서구화의 영향으로 남성암 중에서 가장 빠른 증가율을 보이고 있다.

혈청 전립선특이항원 (Prostate-specific antigen: PSA), 경직장초음파 및 전산화단층촬영 등이 국소진행성 또는 전이성 전립선암 환자 여부를 판단하기 위한 병기 결정 수단으로 이용되고 있다.³ 전립선암 환자의 50%만이 진단 당시 임상적으로 전립선에 국한된 질병으로 알려져 있으며, 임상적으로 전립선에 국한된 전립선암 환자에서도 3분의 1은 근치적 전립선적출술 후 평가한 병리학적 병기에서 국소진행성 전립선암으로 판정된다.⁴ 또한 이들 중 30-50%의 환자는 근치적 치료 이후에도 10년 이내에 생화학적 재발을 경험하게 되며, 이러한 재발의 원인은 현재 사용되는 임상적 검사법으로는 알아낼 수 없는 암세포의 미세전이나 전립선 주위로의 국소침윤 등에 의한 것으로 생각되고 있다.⁵⁻⁸

혈청 PSA 및 전립선생검조직의 Gleason 점수가 병리학적 병기를 예측하는데 도움이 되며 술 후 병리학적 병기상승을 감소시켰지만, 여전히 술 전 병기 결정의 정확성은 만족스럽지 못한 상태이다.⁹ 계

다가 치료 성적을 살펴보면 조기 전립선암에서 대기요법에 비해 근치적 전립선적출술이 우수한지에 대해서도 의문이 제기되고 있는 상태이다.¹⁰ 이에 전이 잠재력을 가지고 있는, 공격적 성향의 조기 전립선암을 판별할 수 있는 새로운 검사법에 대한 필요성이 제기되었다.

1980년대 후반부터 혈액종양 환자를 대상으로 reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR)이 잔존암 유무를 평가하기 위한 방법으로 사용되기 시작하였다.⁷ 1992년에 Moreno 등¹¹은 전이성 전립선암 환자의 말초혈액에서 PSA mRNA의 발현을 확인하기 위해 RT-PCR을 처음으로 적용하였다. 그 이후로 말초혈액, 림프절 및 골수 등에서 RT-PCR을 이용하여 잠재적인 암세포를 검색하려는 많은 연구들이 진행되었다. PSA 또는 prostate-specific membrane antigen (PSMA) mRNA를 이용하여 말초혈액내 순환암세포를 검출한 결과를 살펴보면, 임상적으로 장기내 국한된 전립선암 환자의 경우 0-72%, 전이 전립선암 환자에서는 25-100%로 다양하게 보고되고 있다.¹²⁻²⁰

Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)는 polycomb group (PcG) 단백질의 일종으로 전사억제자이며, 일부 trithorax group (trxG) 단백질의 특성을 가지는 것으로 알려져 있다.²¹ Varambally 등²²은 cDNA microarray를 이용하여 EZH2 mRNA 발현을 분석한 결과 전립선 비대증, 국소 전립선암 및 전이 전립선암의 순으로 발현이 증가함을 보고한 바 있다. 또한 면역조직화학염색과 western blot에서도 같은 결과를 확인하였다. 한편 근치적 전립선적출술을 받은 환자의 조직에서 EZH2의 발현이 절제변연상태, 종양용적, Gleason 점수, 술 전 혈청 PSA 수치 보다 더 유용한 예후예측인자라고 보고하였다. 이러한 결과로 EZH2 mRNA 및 단백질 발현이 암 전이의 예측인자로 활용될 수 있다는 가능성을 제시하였다.

본 연구에서는 앞서 기술한 이론적 근간을 바탕으로 전이 전립선암 환자들의 말초혈액내에 순환상피세포에서 EZH2 mRNA의 발현을 RT-PCR로 측정 비교함으로써 새로운 전이표지자 또는 전이예측인자로서의 임상적 활용 가능성을 알아보고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 전립선암 세포와 조직에서 EZH2 발현 확인

가. 세포 배양

PC3와 LNCaP 세포주를 이용하여 전이성 전립선암 세포에서 EZH2 단백질의 발현을 확인하고, PC3세포주를 이용하여 immunomagnetic beads를 이용한 세포분리와 RT-PCR의 민감도를 평가하였다. PC3 및 LNCaP 세포주는 10% 우태아 혈청과 antibiotic-antimycotic (Invitrogen Co., Gibco™, NY, USA)이 포함된 RPMI 1640 medium에 37°C, 95% air, 5% carbon dioxide 조건에서 배양하였다.

나. Western blotting

동일 수의 PC3와 LNCaP 세포를 RIPA lysis buffer; 50mM HEPES (USB, Ohio, USA) [pH7.6], 150mM NaCl (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA), 1% NP-40 (Amresco, Ohio, USA), 10 μ l/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (Amresco), 10 μ l/ml aprotinin (Sigma-Aldrich®)에 넣어 균질화시켰다. 영하 20°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 3초씩 3번 초음파 처리하였다. 이를 원심 분리한 후, 상층액의 단백질량은 BCA protein assay kit (Bio Rad, California, USA)로 측정하였다. 단백질 40 μ g을 5% SDS-PAGE gel에서 전기영동하여 분리하였으며, Hybond™ ECL™ nitrocellulose membranes (Amesharm Biosciences, UK)로 이동시켰다. Membrane은 anti-EZH2 rabbit IgG (Upstate, NY, USA)와 4°C에서 24시간 동안 반응 시킨 후, goat anti-rabbit HRP conjugated IgG (Upstate)와 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 단백질 발현은 ECL Western blotting detection reagent (Amesharm Biosciences)를 이용하여 chemiluminescence assay로 측정하였다.

다. 면역조직화학염색

면역조직화학염색은 immunohistochemistry detection kit (Innogenex™, California, USA)를 사용하였다. 재수화된 조직 슬라이드는 37°C에서 5분 동안 펩신과 반응시킨 후, 실온에서 5분 동안 3% 과산화수소로 처리하였다. 실온에서 5분 동안 카제인으로 블로킹한 후, 1:200으로 희석된 anti-EZH2 IgG (Upstate)와 4°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 조

직은 biotinylated goat anti-rabbit antibody와 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate로 37°C에서 5분씩 차례대로 반응시킨 후, 15분 동안 AEC substrate 용액으로 처리하였다.

2. 순환상피세포의 EZH2 발현 분석법 확립

가. RT-PCR assay의 민감도

PC3 세포를 hematocytometer를 이용하여 각각 1, 10, 100, 1,000 및 10,000개의 세포를 세어 동일한 부피의 세포액을 만들었다. PC3 세포가 담긴 세포액에 PBS 5ml을 혼합한 후, 말초혈액내 순환상피세포의 EZH2 mRNA의 발현을 측정하는 아래 방법과 동일하게 시행하였다.

나. 말초혈액에서 단핵세포 분리

혈액 (5ml)은 EDTA 튜브에 담아 4°C에서 보관하고, 채혈 후 1시간 이내에 실험실로 운반하였다. 혈액은 PBS (pH 7.4)로 희석한 후 (혈액:PBS=1:2), Accuspin™ System-Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich®) 튜브에 옮겨 담았다. 이를 상온에서 1000 x g의 조건으로 10분 동안 원심 분리하여 단핵세포를 얻었다. 침전된 단핵세포는 PBS 10ml를 첨가하여 부유화시킨 후 다시 250 x g의 조건에서 10분간 원심분리를 시행하였다. 침전된 단핵세포는 1% FCS (fetal calf serum, Invitrogen Corporation, Gibco™)와 0.6% sodium citrate가 포함된 PBS로 부유시켰다.

다. Immunomagnetic beads를 이용한 혈액내의 상피세포 분리

생쥐 IgG1 단일클론항체 (mAb Ber-EP4, DYNAL Biotech®, Oslo, Norway)가 공유 결합된 immunomagnetic beads를 세척한 후, 25µl를 (1×10^7 beads) 분리한 단핵세포에 첨가하였다. Ber-EP4는 대부분의 정상 상피 조직과 종양 상피조직에서 발현되는 두 종류 (34, 39 kDa)의 glycopolypeptides membrane 항원에 특이적으로 반응하는 항체이다.²³ 세포는 4°C에서 2시간 동안 배양하였으며, 자기장치 (DYNAL magnetic particle concentrator, DYNAL Biotech®)를 이용하여 상피세포와 결합된 구슬을 수집하였고 수집된 구슬은 PBS로 5번 세척하고, 세척된 구슬을 잠시 동안 0°C에서 보관하였다.

라. RT-PCR 증폭을 위한 mRNA 분리

구슬에 결합된 상피세포는 Lysis/Binding Buffer를 첨가하여 용해한 후 자기장치에서 mAb Ber-EP4 구슬을 제거하였다. 소량의 상피세포에서 mRNA를 분리하기 위해서 Dynabeads mRNA Direct™ Micro kit (DynaL Biotech®)를 이용하였다. 미리 씻어둔 Dynabeads Oligo (dT)₂₅ 20 μ l와 세포액을 혼합하여 실온에서 5분간 반응시킨다. 자기장치에서 Dynabeads Oligo (dT)₂₅ 구슬을 수집하고, washing buffer로 3번 세척하였다. 세척된 Dynabeads Oligo (dT)₂₅ 구슬은 차가운 10mM Tris-HCl로 부유시킨 후, 0°C에서 잠시 보관하였다.

마. cDNA 합성과 RT-PCR

cDNA합성은 reverse transcription system (Promega Co., WI, USA)을 사용하여 제조사에서 제시한 방법에 따라 수행하였다. 최종 반응량은 20.25 μ l이며, 분리된 10 μ l mRNA를 모두 합성에 이용하였다. PCR은 Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 총 반응량이 50 μ l가 되도록 하였다. EZH2 primer는 Varambally 등²²의 연구에서와 동일한 염기서열이며, 반응 조건은 94°C 1분, 60°C 45초, 72°C 2분 (35 cycles)으로 하였다.

3. 환자 말초혈액을 이용한 대조 실험

가. 대상 환자군

연구 대상은 정상 대조군, 국소 및 전이 전립선암 환자군으로 분류하였으며, 각각의 대상을 10명으로 하여 총 30명을 대상으로 하였다. 정상 대조군은 비뇨기계 질환 등의 다른 질병이 없는 건강한 성인을 대상으로 하였으며, 국소 전립선암 환자군은 임상적으로 전이가 없는 환자로 근치적 전립선적출술 시행 예정인 환자를 대상으로 하였다. 전이 전립선암 환자는 본 검사 당시에 전이가 확인되었던 환자를 대상으로 하였다.

나. 환자를 대상으로 말초 혈액 내의 EZH2 발현 검사

환자군 및 대조군의 혈액 (5ml)은 EDTA 튜브에 담아 4°C에서 보관하였으며, 채혈 후 1시간 이내에 실험실로 옮긴 후 확립된 검사 방법에 의해 말초혈액내 EZH2 mRNA의 발현을 평가하였다. 연구 대상의 말초혈액내 순환상피세포에 존재하는 EZH2 mRNA의 발현 강도는

Quantity One[®] program으로 측정하였다.

다. 통계적 분석

Quantity One[®] program으로 측정한 연구 대상의 EZH2 mRNA의 발현 강도는 Mann-Whitney U test로 비교하였으며, p값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 간주하였다.

III. 결과

1. 전립선암 세포와 조직에서 EZH2 발현 확인

대표적인 인체 전립선암 세포주인 PC3와 LNCaP 세포의 EZH2 발현을 western blotting으로 관찰한 결과, 두 세포 모두에서 강한 EZH2 단백질 발현이 보였다 (그림 1A). 경요도적 전립선 절제술로 얻어진 전이 전립선암 환자의 전립선 조직에서도 면역조직화학염색을 이용한 조직학적 관찰 결과, 세포 핵 내에 붉은색으로 염색된 EZH2가 확인되었다 (그림 1B).

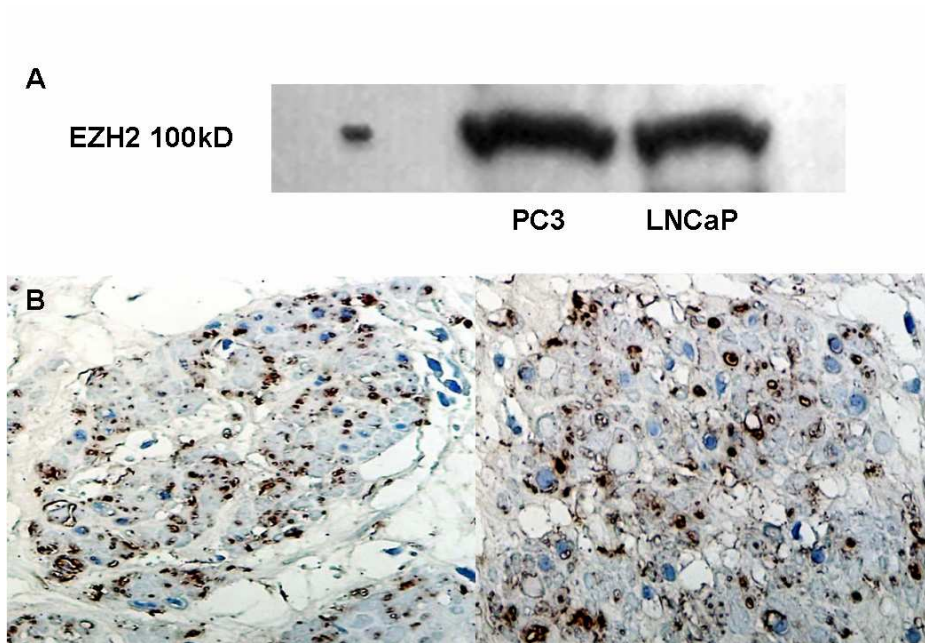


그림 1. 전이 전립선암 세포주 및 전이 전립선암 환자의 조직에서 EZH2 단백질 발현의 확인. (A) Western blotting, (B) 면역조직화학염색

2. 순환상피세포의 EZH2 발현 분석법 확립

EZH2 양성 발현을 보이는 PC3 세포 0, 1, 10, 100, 1000, 10000개를 RT-PCR 한 결과, 대조군과 1개의 세포에서는 EZH2 발현을 확인할 수 없었으나 세포수 10개부터 세포수가 증가함에 따라 EZH2 발현

강도가 비례적으로 증가하였다 (그림 2).

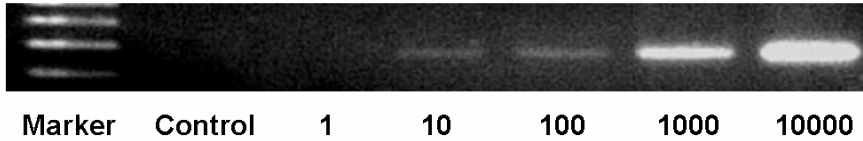


그림 2. PC3 세포주의 EZH2 mRNA 발현 검색을 위한 RT-PCR의 민감도. 아라비아 숫자는 PC3 세포의 개수를 의미함.

3. 환자 말초혈액을 이용한 대조 실험

전이 전립선암 환자와 정상인의 말초혈액내 순환상피세포의 EZH2 발현을 RT-PCR을 이용하여 측정한 결과, 전이 전립선암 환자군에서 강한 발현이 관찰되었다 (그림 3). EZH2 발현 강도를 Quantity One[®] program을 이용하여 수치화 한 결과, 정상 대조군, 국소 전립선암 환자군 및 전이 전립선암 환자군의 평균 발현 강도는 각각 345.7 ± 131.8 , 349.4 ± 156.7 및 2040.5 ± 1881.3 으로 나타났다. 이를 Mann-Whitney U test를 이용하여 비교하였을 때, 전이 전립선암 환자군의 발현 강도가 정상 대조군 및 국소 전립선암 환자군에서 보다 의미있게 높은 것을 확인하였다 (그림 4) ($p < 0.05$).

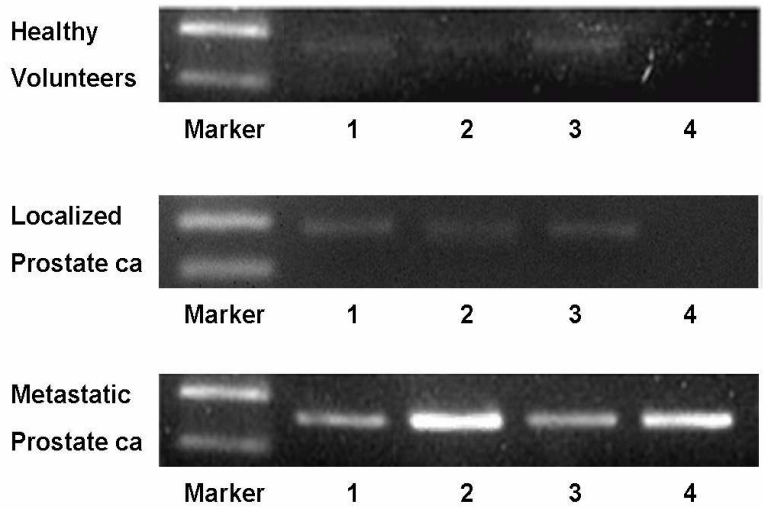


그림 3. 정상 대조군, 국소 전립선암 및 전이 전립선암 환자의 말초 혈액내 순환상피세포에서 EZH2 mRNA의 발현 검색

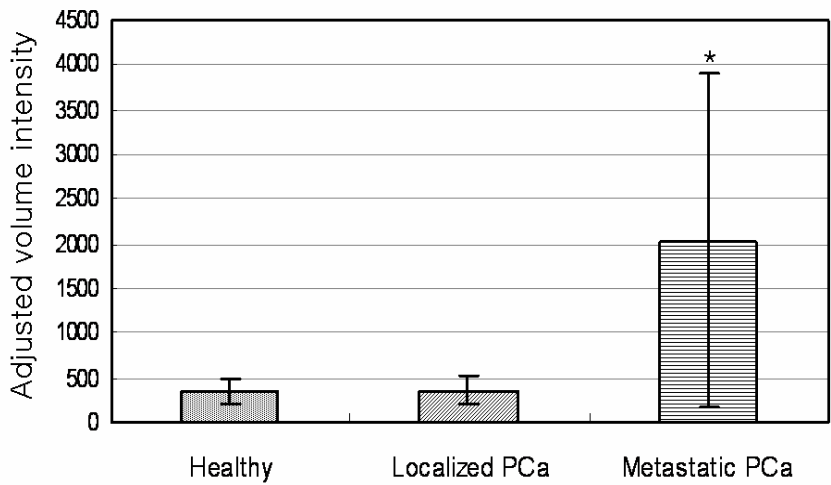


그림 4. 정상 대조군, 국소 전립선암 및 전이 전립선암 환자군의 말초 혈액내 EZH2 mRNA의 발현 강도.

*: 정상 대조군 및 국소 전립선암 환자군과 비교하였을 때, $p < 0.05$

IV. 고찰

전립선암 환자에서 혈청 PSA 및 전립선생검조직의 Gleason 점수가 병리학적 병기를 예측하는데 도움이 되며 술 후 병리학적 병기상승을 감소시켰지만, 여전히 술 전 병기 결정의 정확성은 만족스럽지 못한 상태이다.⁹ 이러한 관점에서 말초혈액내 순환암세포 및 미세전이의 검출은 중요한 치료적 또는 예후적 의의를 가질 것으로 기대가 된다.

말초혈액내 순환암세포의 검색은 암특이 DNA 또는 mRNA 이상을 polymerase chain reaction (PCR) 증폭을 통해 확인할 수 있다. PCR을 이용한 순환암세포 또는 미세전이의 확인은 매우 민감한 방법으로 10^6 - 10^7 개의 정상세포 중 1개의 암세포까지도 검색할 수 있는 것으로 보고된 바 있다.²⁴ 1992년에 Moreno 등¹¹은 전이성 전립선암 환자의 말초혈액에서 PSA mRNA의 발현을 확인하기 위해 RT-PCR을 처음으로 적용하였다. 그 이후로 말초혈액, 림프절 및 골수 등에서 RT-PCR을 이용하여 잠재적인 암세포를 검색하려는 많은 연구들이 진행되었다. PSA 또는 prostate-specific membrane antigen (PSMA) mRNA를 이용하여 말초혈액내 순환암세포를 검출한 결과를 살펴보면, 임상적으로 장기내 국한된 전립선암 환자의 경우 0-72%, 전이 전립선암 환자에서는 25-100%로 다양하게 보고되고 있다.¹²⁻²⁰ 그러나 PSA mRNA는 전립선암 세포에 국한되지 않고 정상 전립선 상피 세포뿐만 아니라 다른 조직에서 분리된 세포에서도 양성 발현한다는 등의 한계점이 있다.²⁵

또한 Ellis 등²⁶은 국소적 전립선암에서 말초혈액내 순환암세포의 존재는 초기 현상일 뿐, 그 자체로 전이를 일으키는 데 충분하지 않다고 하였다. 이에 전립선암 환자에서 말초혈액내 순환암세포의 검색이 가지는 임상적 중요성에 대한 의문이 제기되었다. 이러한 한계를 보완하기 위한 방법으로 순환암세포의 정량화를 위한 시도들이 이루어지고 있다.^{27,28} 다른 한편으로 Her-2/neu 과다발현이 전립선암의 진행과 관련이 있다는 사실에 착안하여, Ady 등²⁹은 순환암세포에서 Her-2/neu mRNA의 발현을 확인하고자 하였다. 그러나 아직까지 그 유용성에 대해서는 결론을 내리기 어려운 단계이다. 본 연구에서는 EZH2

mRNA 및 단백질 발현이 전립선암 전이의 예측인자로서의 가능성을 제시한 Varambally 등²²의 연구를 근간으로 전이 전립선암 환자들의 말초혈액내에 순환상피세포에서 EZH2 mRNA의 발현을 RT-PCR로 측정 비교함으로써 새로운 전이표지자 또는 전이예측인자로서의 임상적 활용 가능성을 알아보고자 하였다.

EZH2는 PcG 단백질의 일종으로 전사억제자이며, 일부 trxG 단백질의 특성을 가지는 것으로 알려져 있다.²¹ 유전자 발현의 항상성을 유지하는 기전으로 PcG 단백질과 trxG 단백질이 작용한다는 사실이 알려져 있는데,^{21,30} PcG 단백질은 복합체를 형성하여 유전자 발현을 억제하는 전사억제자로 작용하며, trxG 단백질은 PcG 단백질의 작용을 길항하여 반대로 유전자 발현을 촉진한다.^{30,31} 전립선암 세포에서 EZH2 유전자가 활성화되면 일부 다른 유전자들의 기능이 억제되는데, 이들 유전자에는 여러 종양 억제 유전자들도 포함되어 이것들이 억제될 경우 종양의 전이가 일어나게 된다. 그러나, EZH2에 의해 억제되는 모든 유전자가 종양의 진행을 억제하는 기능을 가진 것은 아니다. EZH2는 Znf1a1 같은 전사인자나 세포 신호 체계를 비활성화시키는 Rho GTPase-activating protein 같은 종양 억제 인자를 억제하지만, 반면에 종양이 진행하면서 상향 조절되는 여러 유전자도 동시에 억제하기도 한다. 예를 들면, 종양 주변조직으로의 침윤에 관여하는 MMP-7이나 세포 증식능을 높여주는 erb-b2/HER2 등을 동시에 억제한다. 따라서 EZH2처럼 전이를 촉진하기도 하고 억제하기도 하는 양면성을 가진 인자가 어느 한쪽 방향으로 더 기울어짐에 따라 종양의 진행 속도가 결정되는 것으로 추정된다.³²

본 연구에서는 말초혈액에서 Ber-EP4 coated immunomagnetic beads를 이용하여 순환상피세포를 분리하고, 순환상피세포의 EZH2 mRNA의 발현 여부를 확인하였는데, 이러한 시도는 아직까지 문헌에 보고된 바가 없었다. 그 결과 전이 전립선암 환자군의 발현 강도가 정상 대조군 및 국소 전립선암 환자군에서 보다 의미있게 높은 것을 확인하였다 (그림 4). 본 검사법에서 무엇보다 중요한 것은 검사의 민감도이다. 본 연구의 RT-PCR 민감도 분석 결과, 1개의 PC3 세포에서는 EZH2 mRNA가 검출되지 않았으나, 10개 이상부터 세포 수의 증가에

따라 비례적인 발현 상승을 확인할 수 있었다 (그림 2). 약 5cc의 말초혈액내 존재하는 순환상피세포는 매우 소량이므로, 단 1개의 순환상피세포라도 검출 가능하도록 기술적인 보완이 필요할 것으로 생각한다. 또 다른 문제점은 정상 대조군에서도 비록 발현강도가 약하지만 EZH2 발현이 되었다는 것이다. 이는 정상 순환상피세포 또는 단핵세포가 Ber-EP4 coated immunomagnetic beads가 비특이적인 결합으로 인하여 야기된 것으로 생각된다. Ber-EP4는 혈구세포에서 발현이 되지 않으므로 Ber-EP4 coated immunomagnetic beads를 이용한 순환상피세포 분리법은 신뢰할 만한 방법으로 알려져 있으나,³³ 저자가 Wright-Giemsa 염색을 통해 확인한 바에 의하면 단핵세포의 일부가 Ber-EP4 coated immunomagnetic beads와 결합하고 있는 것을 확인할 수 있었다 (그림 5). 또한 단핵세포에서 정상적으로 EZH2 mRNA가 발현하기 때문에 이러한 결과를 초래한 것으로 생각된다. 따라서 순환상피세포에서 EZH2의 발현을 정확히 평가하기 위해서는 단핵세포의 오염없이 순환상피세포를 보다 특이적으로 분리해 낼 수 있는 방법의 개발이 필요하다고 하겠다.

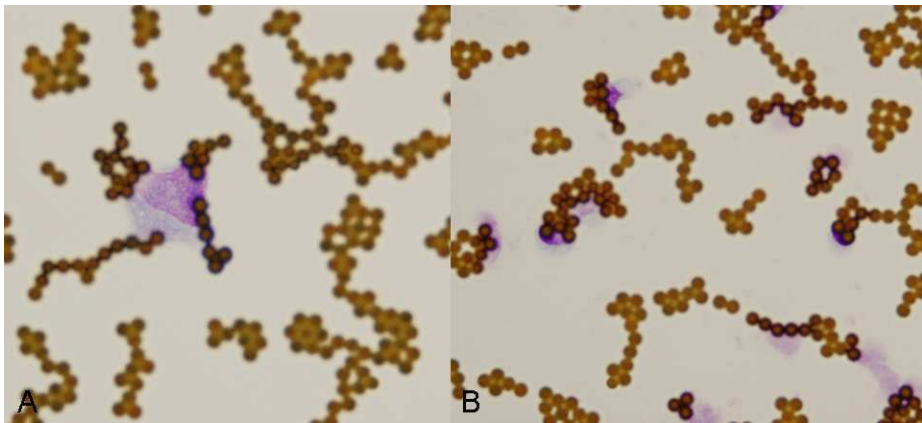


그림 5. Ber-EP4 immunomagnetic beads와 순환상피세포 (A) 및 단핵세포 (B)의 결합. Wright-Giemsa 염색

본 연구는 단순한 순환암세포의 검출법과는 달리 전이 전립선암의 표지자인 EZH2가 발현된 순환암세포의 검출을 목표로 한다. 따라서 기존의 방법에 비하여 전이 현상과 보다 직접적인 연관성이 있다는 장점을 가지고 있다. 본 연구에서는 연구대상 수가 적고, 대상을 단순히 정상 대조군, 국소 및 전이 전립선암 환자군으로만 분류하였기 때문에, 순환암세포에서의 EZH2 발현의 의미를 정확히 파악하기에는 부족한 상태이다. 따라서 앞서 기술한 방법적 보완과 함께 다양한 병기 및 질병 상태에 따른 EZH2의 발현 차이를 비교 연구하는 것이 필요할 것이다. 예를 들어 근치적 수술 전후, 호르몬 치료 전후, 생화학적 재발 전후 그리고 호르몬 민감성암 및 호르몬 불응성암 등에 따른 차이를 확인하는 것이 도움이 되리라 생각한다. 또한 보다 많은 환자를 대상으로 하는 장기 추적 연구를 통해 순환암세포에서의 EZH2 발현이 내포하는 임상적 의의에 대한 충분한 이해가 이루어진다면, 유용한 생체표지자로서 임상적 활용이 가능할 것으로 기대가 된다.

V. 결론

말초혈액내 순환상피세포에서 EZH2 mRNA 발현 검색을 위한 본 연구 기법은 민감도가 높은 검사임을 알 수 있었다. 전이 전립선암 환자에서 분리된 순환상피세포에서 EZH2 mRNA가 과발현되며, 전이 전립선암 환자군의 평균 발현 강도가 정상 대조군 및 국소 전립선암 환자군에서 보다 의미있게 높은 것을 확인하였다. 따라서 순환상피세포에서의 EZH2 mRNA 발현은 전립선암 환자에서 조기 전이를 예측할 수 있는 유용한 생체표지자가 될 것으로 기대된다. 그러나 말초혈액에서 단핵세포의 오염 없이 순환상피세포를 분리할 수 있는 보다 특이적인 검사법이 필요할 것이다.

참고 문헌

1. Gronberg H: Prostate cancer epidemiology. *Lancet*. 361: 859-64, 2003.
2. Greenlee RT, Murray T, Bolden S and Wingo PA: Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin*. 50: 7-33, 2000.
3. Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, deKernion JB, Ratliff TL, Kavoussi LR, Dalkin BL *et al.*: Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J Urol*. 151: 1283-90, 1994.
4. Scardino PT, Weaver R and Hudson MA: Early detection of prostate cancer. *Hum Pathol*. 23: 211-22, 1992.
5. Han M, Partin AW, Pound CR, Epstein JI and Walsh PC: Long-term biochemical disease-free and cancer-specific survival following anatomic radical retropubic prostatectomy. The 15-year Johns Hopkins experience. *Urol Clin North Am*. 28: 555-65, 2001.
6. Moul JW, Kane CJ and Malkowicz SB: The role of imaging studies and molecular markers for selecting candidates for radical prostatectomy. *Urol Clin North Am*. 28: 459-72, 2001.
7. Olsson CA, de Vries GM, Buttyan R and Katz AE: Reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays for prostate cancer. *Urol Clin North Am*. 24: 367-78, 1997.
8. Rees MA, Resnick MI and Oesterling JE: Use of prostate-specific antigen, Gleason score, and digital rectal examination in staging

patients with newly diagnosed prostate cancer. *Urol Clin North Am.* 24: 379-88, 1997.

9. Wieder JA and Soloway MS: Incidence, etiology, location, prevention and treatment of positive surgical margins after radical prostatectomy for prostate cancer. *J Urol.* 160: 299-315, 1998.
10. Holmberg L, Bill-Axelson A, Helgesen F, Salo JO, Folmerz P, Haggman M, Andersson SO, Spangberg A, Busch C, Nordling S *et al.*: A randomized trial comparing radical prostatectomy with watchful waiting in early prostate cancer. *N Engl J Med.* 347: 781-9, 2002.
11. Moreno JG, Croce CM, Fischer R, Monne M, Vihko P, Mulholland SG and Gomella LG: Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. *Cancer Res.* 52: 6110-2, 1992.
12. Corey E, Arfman EW, Oswin MM, Melchior SW, Tindall DJ, Young CY, Ellis WJ and Vessella RL: Detection of circulating prostate cells by reverse transcriptase-polymerase chain reaction of human glandular kallikrein (hK2) and prostate-specific antigen (PSA) messages. *Urology.* 50: 184-8, 1997.
13. Ghossein RA, Scher HI, Gerald WL, Kelly WK, Curley T, Amsterdam A, Zhang ZF and Rosai J: Detection of circulating tumor cells in patients with localized and metastatic prostatic carcinoma: clinical implications. *J Clin Oncol.* 13: 1195-200, 1995.
14. Hara N, Kasahara T, Kawasaki T, Bilim V, Obara K, Takahashi K and Tomita Y: Reverse transcription-polymerase chain reaction detection of prostate-specific antigen, prostate-specific membrane antigen, and prostate stem cell antigen in one milliliter of peripheral blood: value

for the staging of prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 8: 1794-9, 2002.

15. Israeli RS, Miller WH, Jr., Su SL, Powell CT, Fair WR, Samadi DS, Huryk RF, DeBlasio A, Edwards ET, Wise GJ *et al.*: Sensitive nested reverse transcription polymerase chain reaction detection of circulating prostatic tumor cells: comparison of prostate-specific membrane antigen and prostate-specific antigen-based assays. *Cancer Res.* 54: 6306-10, 1994.
16. Katz AE, Olsson CA, Raffo AJ, Cama C, Perlman H, Seaman E, O'Toole KM, McMahon D, Benson MC and Buttyan R: Molecular staging of prostate cancer with the use of an enhanced reverse transcriptase-PCR assay. *Urology.* 43: 765-75, 1994.
17. Mejean A, Vona G, Nalpas B, Damotte D, Brousse N, Chretien Y, Dufour B, Lacour B, Brechot C and Paterlini-Brechot P: Detection of circulating prostate derived cells in patients with prostate adenocarcinoma is an independent risk factor for tumor recurrence. *J Urol.* 163: 2022-9, 2000.
18. Seiden MV, Kantoff PW, Krithivas K, Propert K, Bryant M, Haltom E, Gaynes L, Kaplan I, Bublely G, DeWolf W *et al.*: Detection of circulating tumor cells in men with localized prostate cancer. *J Clin Oncol.* 12: 2634-9, 1994.
19. Sokoloff MH, Tso CL, Kaboo R, Nelson S, Ko J, Dorey F, Figlin RA, Pang S, deKernion J and Belldegrun A: Quantitative polymerase chain reaction does not improve preoperative prostate cancer staging: a clinicopathological molecular analysis of 121 patients. *J Urol.* 156: 1560-6, 1996.

20. Wood DP, Jr. and Banerjee M: Presence of circulating prostate cells in the bone marrow of patients undergoing radical prostatectomy is predictive of disease-free survival. *J Clin Oncol.* 15: 3451-7, 1997.
21. LaJeunesse D and Shearn A: E(z): a polycomb group gene or a trithorax group gene? *Development.* 122: 2189-97, 1996.
22. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP *et al.*: The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature.* 419: 624-9, 2002.
23. Latza U, Niedobitek G, Schwarting R, Nekarda H and Stein H: Ber-EP4: new monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelial. *J Clin Pathol.* 43: 213-9, 1990.
24. Ghossein RA and Rosai J: Polymerase chain reaction in the detection of micrometastases and circulating tumor cells. *Cancer.* 78: 10-6, 1996.
25. Schamhart DH, Maiazza R and Kurth KH: Identification of circulating prostate cancer cells: a challenge to the clinical implementation of molecular biology (review). *Int J Oncol.* 26: 565-77, 2005.
26. Ellis WJ, Pfitzenmaier J, Colli J, Arfman E, Lange PH and Vessella RL: Detection and isolation of prostate cancer cells from peripheral blood and bone marrow. *Urology.* 61: 277-81, 2003.
27. Chen BT, Loberg RD, Neeley CK, O'Hara SM, Gross S, Doyle G, Dunn RL, Kalikin LM and Pienta KJ: Preliminary study of immunomagnetic quantification of circulating tumor cells in patients with advanced disease. *Urology.* 65: 616-21, 2005.

28. Moreno JG, O'Hara SM, Gross S, Doyle G, Fritsche H, Gomella LG and Terstappen LW: Changes in circulating carcinoma cells in patients with metastatic prostate cancer correlate with disease status. *Urology*. 58: 386-92, 2001.
29. Ady N, Morat L, Fizazi K, Soria JC, Mathieu MC, Prapotnich D, Sabatier L and Chauveinc L: Detection of HER-2/neu-positive circulating epithelial cells in prostate cancer patients. *Br J Cancer*. 90: 443-8, 2004.
30. Mahmoudi T and Verrijzer CP: Chromatin silencing and activation by Polycomb and trithorax group proteins. *Oncogene*. 20: 3055-66, 2001.
31. Francis NJ and Kingston RE: Mechanisms of transcriptional memory. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2: 409-21, 2001.
32. Zetter BR and Banyard J: Cancer. The silence of the genes. *Nature*. 419: 572-3, 2002.
33. Hardingham JE, Kotasek D, Farmer B, Butler RN, Mi JX, Sage RE and Dobrovic A: Immunobead-PCR: a technique for the detection of circulating tumor cells using immunomagnetic beads and the polymerase chain reaction. *Cancer Res*. 53: 3455-8, 1993.

Abstract

Identification of enhancer of zeste homolog 2 expression in peripheral circulating epithelial cells in metastatic prostate cancer patients

Kang Su Cho

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Sung Joon Hong)

Circulating tumor cells (CTC) have been investigated as a significant marker for clinical progression and survival in men with prostate cancer (PCa). Recently, enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), a kind of transcriptional repressor, was reported to be over-expressed in metastatic PCa. In this study, we analyzed EZH2 mRNA of circulating epithelial cells in peripheral blood as a biomarker in patients with metastatic PCa.

Ber-EP4-coated immunomagnetic beads were used to harvest CTCs and mRNA was isolated by oligo dT conjugated immunomagnetic beads. The reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for EZH2 mRNA was performed using EZH2 specific primers and the expression density was measured. The sensitivity of this test for detection of EZH2 mRNA was determined by serial dilutions of human prostate cancer cell line (PC-3). Blood samples were collected from 20 patients with metastatic or localized PCa and 10 healthy volunteers, and EZH2 mRNA expression in CTCs was evaluated.

This test was highly sensitive as it could detect 10 tumor cells. EZH2 mRNA expression was obtained from peripheral blood samples of healthy volunteers, patients with localized prostate cancer and metastatic prostate cancer. EZH2 mRNA was strongly expressed in patients with metastatic PCa and the mean value of mRNA image density was significantly higher compared to those of

control and localized prostate cancer group ($p < 0.05$, by Mann-Whitney U test).

In conclusion, EZH2 mRNA in circulating tumor cells was over-expressed in patients with metastatic PCa. Thus, it would be a promising marker in detecting early metastasis in PCa. However, more specific technique for detection of circulating tumor cells is needed to avoid mononuclear cell contamination.

Key Words : prostate cancer, metastasis, circulating epithelial cell, enhancer of zeste homolog 2