

간암의 단계적 발생에서 암 억제
유전자의 전사 조절 부위 메틸화

연 세 대 학 교 대 학 원
의 과 학 과
엄 태 희

간암의 단계적 발생에서 암 억제 유전자의 전사 조절 부위 메틸화

지도교수 박 영 년

이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

2008년 12월

연 세 대 학 교 대 학 원

의 과 학 과

엄 태 희

엄태희의 석사 학위 논문을
인준함

심사위원: _____인

_____인

_____인

연세대학교 대학원

2008년 12월

감사의 글

결실을 맺는 오늘이 있기까지 많은 관심과 격려로 이끌어주신 많은 분들께 감사의 말씀을 전합니다.

우선 연구를 할 수 있도록 이끌어 주시고 지도 편 달 해 주신 박영년 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 부족한 점을 짚어주시며 과학도로서의 자세와 마음 가짐을 알려주신 오봉경 교수님, 본 논문을 위해 충고와 조언을 주신 김경식 교수님께 마음을 담아 감사 드립니다. 그리고 오늘을 있도록 인도해주신 김호근 선생님께 고개 숙여 감사 드립니다.

또한 실험을 위해 도움 주신 병리학 교실 선생님들, 실험실 생활을 시작하면서 관심과 조언으로 도움 주시고 함께 동고동락 한 유정은 선생님, 윤소미 선생님과 실험에 아낌 없는 조언을 주신 이재은 선생님, 강호진 선생님께 감사 드립니다.

힘들어 할 때 어깨를 다독여주고 좋은 일을 함께 기뻐하며 힘이 되어 준 하나, 선, 수영, 은지, 보라, 그리고 희수 오빠에게 감사와 사랑을 전합니다. 무엇보다 부족한 딸을 믿고 사랑하며 늘 함께 해 주신 어머니께 이 논문을 드립니다.

저자 씀.

차 례

국 문 요 약	1
I. 서 론.....	4
II. 실험 재료 및 방법	8
1. Tissues	8
2. genomic DNA 추출	8
3. genomic DNA modification	9
4. 프라이머와 탐침자의 설계	10
5. Real-time PCR	16
6. 결과 분석	16
III. 결 과.....	19
1. 암 억제 유전자의 과메틸화와 간암의 단계적 발생의 상 관관계	19
2. 간암의 진행 단계별 암 억제 유전자 전사 조절 부위의	

과메틸화 변화.....	22
IV. 고찰.....	27
V. 결론.....	30
VI. 참고 문헌.....	31
Abstract.....	35

그림 차례

Figure 1. Location of primer and probe in APC, p16, RASSF1A, SOCS1, and COX2.....	14
Figure 2. Real-time PCR analysis of p16 and ACTB in HCCs, normal liver tissues, and dysplastic nodules.....	17
Figure 3. Distribution of percent of methylation ratio (PMR) at each of 5 tumor suppressor genes.....	20
Figure 4. Summary of MethyLight results of APC, p16, RASSF1A, SOCS1, COX2 in 136 liver samples from 46 hepatectomy patients	25

표 차례

Table 1. Primer and probe sequences for MethyLight	13
--	----

국 문 요 약

간암의 단계적 발생에서 암 억제 유전자의 전사 조절 부위 메틸화

간암은 전 세계적으로 흔히 발생하는 암 중 하나이며, HBV 또는 HCV 감염이 가장 큰 요인으로 알려져 있다. 간암의 발생은 다단계로 일어나며 전암 병변인 형성이상 결절이 있는 경우 간암의 발생률이 높다. 형성이상 결절은 조직의 특성에 따라 저등도(low-grade)와 고등도(high-grade)로 분류되며, 고등도 형성이상 결절은 간암의 발생과 유의한 연관이 있다.

암에서 DNA의 메틸화는 암 억제 유전자의 전사 조절 부위에 있는 CpG 섬(CpG island)에서 이루어져 유전자 침묵(gene silencing)을 유도한다. 간암에서는 암 억제 유전자의 전사 조절 부위에 과메틸화가 일어나 있으며 형성이상 결절에서도 간 경변 조직보다 암 억제 유전자의 과메틸화가 증가해 있다. 그러나 저등도 형성이상 결절과 고등도 형성이상 결절의 임상적

차이가 있음에도 불구하고, 형성이상 결절의 단계적 구분에 따른 분자생물학적 연구가 부족한 실정이다.

본 연구에서는 전암 병변인 형성이상 결절의 저등도와 고등도를 구분하여 세포 주기를 조절하는 암 억제 유전자인 APC, p16, RASSF1A, SOCS1, COX2, DCC, SPRY2, GNMT의 전사 조절 부위에 대한 과메틸화가 간암의 단계적 발생에서 어떻게 변하는 지 32개 간암, 15개 조기 간암, 14개 고등도 형성이상 결절, 29개 저등도 형성이상 결절, 53개 암 주변 조직과 15개의 HBV 감염이 없는 간 조직에서 확인하였다. 그 결과 저등도 형성이상 결절에서부터 APC, RASSF1A, SOCS1의 과메틸화가 이루어지고 있으며, 특히 매 단계에서 APC와 COX2의 과메틸화가 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이 연구에서는 형성이상 결절의 각 단계에서부터 암 억제 유전자의 전사 조절 부위 과메틸화에 대한 변화를 보여줌으로써 저등도 형성이상 결절과 고등도 형성이상 결절, 간암의 후생적 차이에 대한 정보를 제공하여 형성이상 결절의 치료에 대한 정보를 제공할 것으로 기대된다.

Keywords : hepatocellular carcinoma, multi-step
hepatocarcinogenesis, dysplastic nodule, tumor suppressor
gene, DNA hypermethylation,

간암의 단계적 발생에서 암 억제 유전자의

전사 조절 부위 메틸화

< 지도교수 박 영 년 >

연세대학교 대학원 의과학과

엄 태 희

I. 서론

간암은 전 세계적으로 5번째로 흔한 암으로서 매년 50만명의 환자가 발생하며, 그 중 80%가 아시아와 아프리카 지역에서 나타나고 있다¹. 간암의 원인은 HBV 또는 HCV 감염이 가장 큰 요인으로 알려져 있으며 남성이 여성보다 발병률이 높은 경향을 보인다^{2,3}. 간암은 단계적 발생을 하며, 전암 병변인 형성이상 결절(dysplastic

nodule, DN)을 거쳐 소 간세포 암종(small HCC)으로 진행되는 것으로 여겨지고 있다⁴⁻⁶. 형성이상 결절은 구성하는 간세포가 세포 및 구조 형성 이상을 보이지만 암은 아닌 병변이며, 앞으로 간세포 암종이 발생할 가능성이 높은 전암 병변으로 정의되어 있다. 형성이상 결절의 진단은 증가하고 있는 추세이며 형성이상 결절을 가지고 있는 경우 간암의 발생률이 높다고 알려져 있다⁶⁻⁸. 조직의 특성을 관찰하여 그 정도에 따라 저등도 형성이상 결절(low-grade DN, LGDN)과 고등도 형성이상 결절(high-grade DN, HGDN)으로 분류되며 간혹 소 간세포 암종(early HCC, eHCC)을 포함하고 있는 경우도 있다⁹⁻¹¹. 저등도 형성이상 결절은 세포의 밀도가 증가해 있으나 결절을 구성하는 간세포의 세포 및 구조 이형성이 적다. 고등도 형성이상 결절은 저등도 형성이상 결절과 비슷하지만 세포의 구조 이형성이 중증도 이상으로 관찰된다⁹. 형성이상 결절 중 고등도는 치료가 필요한 전암 병변이며, 저등도는 암종으로의 진행 위험도가 높지 않으므로 추적 관찰 해야 한다는 보고가 있다^{7,12}.

DNA 메틸화는 유전자의 후생적 조절에 영향을 미친다¹³. 암에서 DNA 반복 서열은 탈 메틸화 되어 염색체 불안정성이 증가하고, 억제 되어 있던 유전자가 발현되게 한다. 반대로 암 억제 유전자의 전사 조절 부위에 있는 CpG 섬(CpG island)이 과메틸화 되어 유전자

침묵(gene silencing)을 유도한다¹³⁻¹⁷. 암 억제 유전자는 주로 세포 주기, DNA 수리, 발암물질 대사, 세포간 결합, 세포 자멸사, 신생혈관 유도의 조절에 연관된 유전자들로, 암에서는 이 유전자들이 발현되지 않거나 단백질이 변형되어 제 기능을 수행하지 못하는 것으로 보고되어 있다^{15, 17}.

간암의 단계적 발생에서, 암 억제 유전자의 전사 조절 부위 과메틸화는 암 주변 조직과 형성이상 결절에 비해 암에서 더 많이 관찰되었다¹⁸⁻²¹. 특히 암 억제 유전자인 APC, SOCS1, p16의 전사 조절 부위 메틸화가 간 경변 조직보다 간암에서 증가해 있으며²¹, 형성이상 결절과 간 경변 조직을 비교하였을 때 일부 암 억제 유전자에서 전사 조절 부위 메틸화의 유의한 차이를 보였다²⁰. 현재까지 암 억제 유전자의 전사 조절 부위 메틸화가 전암 병변과 간암에서 정상 조직보다 증가되어 있다는 보고가 있으나, 전암 병변인 형성이상 결절의 저등도와 고등도의 차이를 확인한 보고는 없었다. 그러나 저등도 형성이상 결절과 고등도 형성이상 결절에서 임상적 차이가 보고된 바 있어, 저등도 형성이상 결절과 고등도 형성이상 결절 사이의 분자생물학적 연구가 필요한 실정이다. 이와 관련하여 본 연구에서는 세포 주기의 조절과 연관되어 있는 유전자인 APC, p16, RASSF1A, SOCS1, COX2, SPRY2, DCC, ERK, GNMT의 전사 조절 부위에서

MethyLight를 수행하여 간암의 발생 단계에 따른 과메틸화의 양상을 관찰하고, 간암의 발달 단계별로 비교하여 간암 발달 과정에서 세포 주기를 조절하는 암 억제 유전자의 메틸화의 영향을 확인하고자 한다.

II. 실험 재료 및 방법

1. Tissues

세브란스 병원에서 간 절제 수술을 한 B 형 간염 (hepatitis B virus, HBV) 감염 환자 46 명으로부터 32 개의 간암 조직, 46 개의 암 주변 조직, 7개의 LRN, 29 개의 low grade DN, 14 개의 high grade DN, 15 개의 early HCC를 채취하였다. 환자의 나이는 32세부터 69세까지 분포하였고, 평균 나이는 52 세였다. 전체 46 명의 환자 중 11 명이 여성이고, 35 명이 남성이었다. 대조군으로 HBV 감염이 없는 15 명의 환자로부터 15 개의 정상 간 조직을 채취하였다. 15개 정상 간 조직은 각각 간문부 담관암 (klatskin tumor) 1 명, 전이성 위암 (metastatic stomach cancer) 2 명, 전이성 대장암 (metastatic colon cancer) 5 명, 전이성 난소암 (metastatic ovarian cancer) 2 명, 전이성 직장암 (metastatic rectal cancer) 3 명, 외상성 간 열상 (traumatic laceration) 1명, 건강 간 공여자 (health living donor) 1명 으로부터 채취하였다. 모든 조직은 채취 직후 액체 질소에서 냉동되었고, -80°C 초저온 냉동고에 보관되었다.

2. Genomic DNA 추출

냉동 보관 되어 있던 간 조직에서 DNA를 추출한다. 간 조직 20~40 mg을 액체 질소를 이용해 얼린 상태에서 막자와 막자 사발을 이용해 가루로 만들고, 20 µg/mL LaboPass protease K (Cosmo Genetech, Seoul, Korea)과 20 mM Tris·HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA (pH 8.0), 400 mM NaCl, 1% SDS가 함유된 700 µL의 용해 완충액 (lysis buffer)을 넣어 42°C의 항온 수조에서 하룻밤 동안 진탕 배양한다. 동일한 양의 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) 을 넣고 10분간 진탕해준 후 15분간 13000 rpm으로 원심 분리하여 상층 액을 취한다. 동일한 작업을 3회 수행하고 같은 부피의 isopropanol을 넣어 -20°C에서 한 시간 배양하였다. 이후 4°C에서 25분간 13000 rpm으로 원심분리 하고, 상층 액을 분리하여 침전물만 남긴다. 침전물에 70% 에탄올 1mL을 넣고 5분간 13000 rpm으로 원심분리 한 후 에탄올을 제거한다. DNA 침전물은 물 300µL에 용해되어 NanoDrop ND-100 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)으로 정량 되었다.

3. Genomic DNA modification

추출한 DNA는 1 µg을 취하여 EZ DNA modification kit (ZymoResearch, Orange, CA, USA)로 sodium-bisulfite 처리를 하였

다. 실험 지침서에 따라 DNA 1 μL 에 M-dilution buffer 5 μL 를 넣고 물로 50 μL 를 맞춘 후 15 분간 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양되었다. 배양된 샘플은 210 μL 의 M-dilution buffer와 750 μL 의 물에 녹인 CT conversion reagent 100 μL 을 넣고 50 $^{\circ}\text{C}$ 진탕 배양기에서 15 시간 배양되었다. 이후 샘플을 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10 분간 보관하고, 400 μL 의 M-binding buffer를 넣어 Zymo-Spin IC Column으로 옮겼다. 컬럼에 옮긴 샘플을 30초간 13000 rpm 으로 원심분리 하고, 하층액을 제거하였다. DNA의 정제를 위해 컬럼에 200 μL 의 M-wash buffer를 넣어 30초간 13000 rpm으로 원심분리 하여 컬럼을 세척하였다. M-wash buffer는 처음 사용 전 96 mL 의 99% 에탄올을 넣어 사용하였다. 이후 200 μL 의 M-desulphonation buffer를 넣어 15분간 실온에서 배양하고 샘플을 30초간 13000 rpm으로 원심 분리하였다. 세척을 위해 하층액을 버리고 200 μL 의 M-wash buffer를 넣어 30초간 13000 rpm 으로 원심분리 하는 작업을 2회 수행하였다. 이후 칼럼을 1.5 mL tube로 옮겨, 30 μL 의 물에 DNA를 용출시켰다. 용출된 DNA는 곧장 real-time PCR에 사용되거나 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에 냉동 보관 되었다.

4. 프라이머와 탐침자의 설계

간암의 다단계 발생이 세포 분열을 억제하는 암 억제 유전자

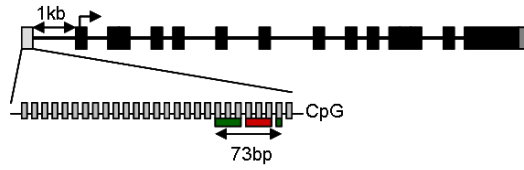
의 과메틸화와 관련되어 있음을 확인하기 위해 세포 분열을 억제하는 것으로 알려진 암 억제 유전자 8 개와 Ras 신호 전달계에서 중요한 ERK/MAPK를 선택하였다. 정량화를 위한 참조 유전자로 β -actin(ACTB)의 전사 조절 부위에서 CpG 서열이 포함되지 않는 프라이머와 탐침자를 사용하였다. 선택한 암 억제 유전자와 ERK에 대하여 MethyLight를 위해 제작된 프라이머와 탐침자를 PubMed에서 검색하였다. 논문을 통해 보고된 프라이머와 탐침자 서열은 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 데이터 베이스에서 검색한 유전자의 염기 서열을 Bisulfite Conversion Reaction (<http://bioneer.kaist.ac.kr/~yhahn/util/bisulfite-web/index.html>)을 통해 CpG 서열이 아닌 사이토신이 티민으로 전환된 염기 서열로 바꾼 후 유전자 내에서의 위치를 확인하였다. MethyLight가 수행된 보고가 없는 GNMT와 ERK는 NCBI와 Human Genome Browser Gateway (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) 데이터 베이스에서 유전자 염기 서열을 검색하여 MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>) 에서 MSP를 위한 프라이머 다섯 쌍을 선택하였다. 선택된 프라이머 서열에 대하여 유전자 염기 서열 내에서의 위치와 시작 코돈에서의 거리를 확인하고, 시작 코돈 서열로부터 1kb 내에 있는 프라이머 중 가장 가까이에 있는 프라이

머를 선택하였다. 선택된 프라이머 쌍에 의해 증폭되는 서열을 가지고 GenScript (<http://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>)를 통해 탐침자를 디자인 하였다. 사용한 프라이머와 탐침자는 Table 1 에 나타내었다. APC, p16, RASSF1A, SOCS1, COX2 에 대한 프라이머와 탐침자의 유전자 내에서의 위치는 Figure 1에 나타내었다.

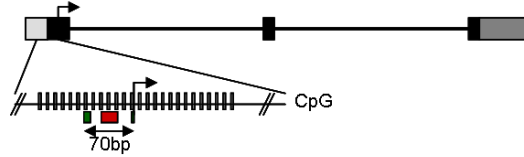
Table 1. Primer and probe sequences for MethyLight

Gene	GeneBank Accession Number	Amplicon Location	sequence		Reference
			Forward Primer	Reverse Primer	
APC	U02509	759-832	GAACCAAAA CG CTCCCCAT	TTATATGTCGGTTACGT GCG TTTATAT	22
			6FAM-CCCGTCGAAAACCC GCC GATTA-BHQ-1		
p16	NM_000077	66-133	TGGAGTTTT CG GTTGATTGGT	AACAAC GCCC GCACCTCCT	22
			6FAM-ACCCGACCCCGAAC CCG -BHQ1		
RASSF1A	AC002481	18107-18171	ATTGAGTT GCG GGAGTTGGT	ACAC GCT CCAACCGAATACG	22
			6FAM-CCCTTCCCAAC GCG CCCA-BHQ-1		
SOCS1	AC009121	108805-108888	GCGT CGAGTT CG TGGGTATT T	CCGAAACCATCTTCAC GCT A A	22
			6FAM-ACAATTCC GCT AACGACTAT CGCG CA-BHQ1		
COX2	AF044206	6779-6924	CGGAAG CGTT CG GGTAAAG	AATTCCACCG CCCAAAC	23
			6FAM-TTTCC GCC AAATATCTTTTCTTCTT CG CA-BHQ-1		
SPRY2	NM_005842	450-625	GGG CGG TAGAT CG GTTTGGG ACG	CAATAAATAACGTCATATAAAATCCG	24
			6FAM-CCGATCCCAACTCATTA ACTCCG -BHQ1		
PTEN	AF143312	1060-1147	GTTTT CGCG TGTTGTAAAAGT CG	CAATATAACTACCTAAA ACTTACT CGAACC	22
			6FAM-TTCCAAC CCG CAACCTACA ACTTACT TA-BHQ-1		
GNMT	AF101475	696-827	GTTTT CG TTTTTTTTGATTTTTTTC	CTAAATCCTTTTAACCAACCTACGA	
			6FAM-CCAACCTCTATA CAATCC CACGACG-BHQ-1		
ERK	NM_002745.4	349-466	GAACCAAAA CG CTCCCCAT	TTATATGTCGGTTACGT GCG TTTATAT	
			6FAM-CCCGTCGAAAACCC GCC GATTA-BHQ-1		
ACTB	Y00474	390-552	TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT	AACCAATAAA ACTTACT CCTCCCTTAA	25
			6FAM-ACCACC CCCAAC ACACAATAACAAACACA-BHQ-1		

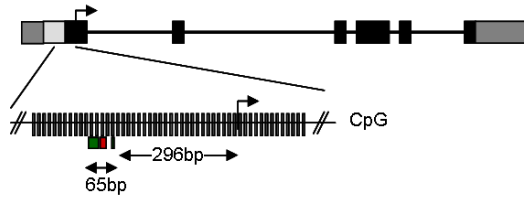
APC



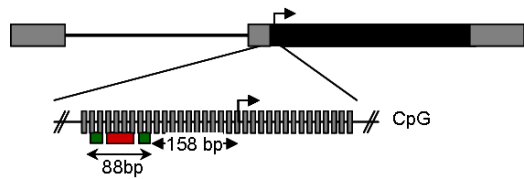
p16



RassF1A



SOCS1



COX2

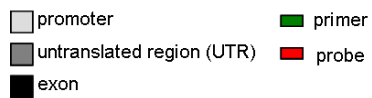
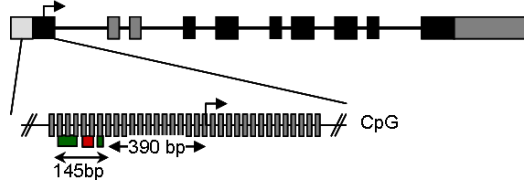


Figure 1. Location of primer and probe in APC, p16, RASSF1A, SOCS1, and COX2. Light gray box indicates promoter region, dark gray box indicates untranslated region (UTR), and black box indicates exon region. Green boxes under CpGs indicate MethyLight primers, and red box indicates probe. The size of PCR product is shown under primers and probe. The distance from PCR product to start codon (ATG) is shown next to 3' primer.

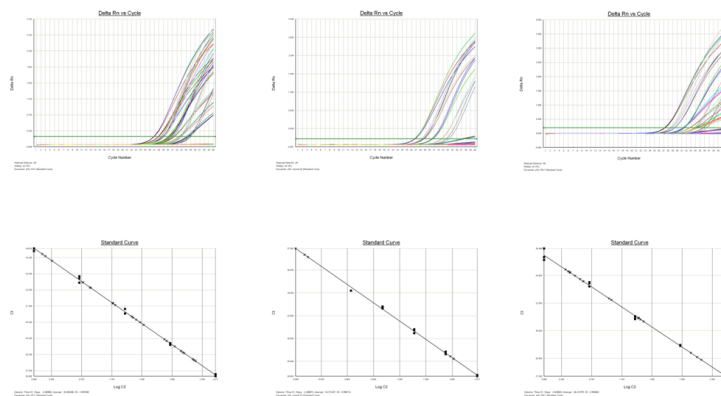
5. Real-time PCR

Sodium-bisulfite 처리를 하여 사이토신을 티민으로 전환시킨 DNA 1 μL 를 주형으로 하여 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 전사 프라이머 3 μL (0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) , 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 역전사 프라이머 3 μL (0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 탐침자 3 μL (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 2x TaqMan PCR Master Mix (ABI 4324018, Foster City, CA, USA)를 넣고 물로 총 부피 30 μL 를 맞추었다. 96-well plate에 샘플을 넣고 ABI 7300 real time PCR 기계를 이용해 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10 분간 전 변성(pre-denature)후, 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15초 변성, 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1분 어닐링(annealing) 하여 45회 증폭을 수행하였다. 양성 대조군으로 sodium-bisulfite 처리를 수행한 CpGenome Universal Methylated DNA(chemicon S7821, Billerica, MA, USA)를 사용하였으며, 동일한 DNA를 가지고 1/4, 1/16, 1/64, 1/256으로 희석하여 표준 곡선을 그렸다. β -actin(ACTB)은 모든 유전자에 대하여 참조 유전자로 사용되었다. p16과 ACTB에 대한 standard curve와 real-time 증폭 곡선과 표준 곡선을 그림 2에서 확인할 수 있다.

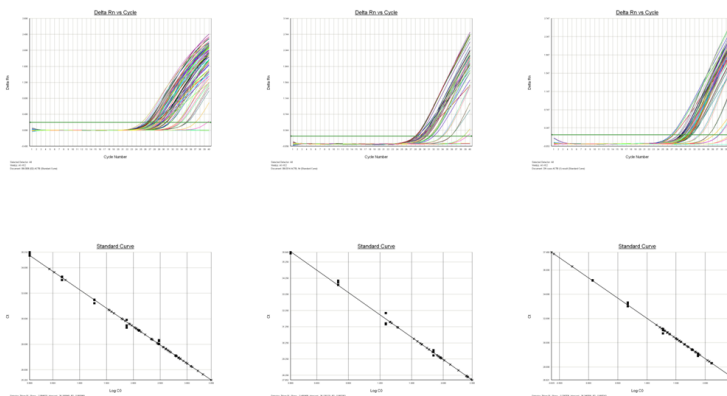
6. 결과 분석

각 샘플에 대하여 real-time PCR을 수행한 유전자의 평균량을 ACTB의 평균량으로 나눠주었다. 이 수치를 다시 양성 대조군에

p16



ACTB



HCC

Normal

Dysplastic
Nodules

Figure 2. Real-time PCR analysis of p16 and ACTB in HCCs, normal liver tissues, and dysplastic nodules. PCR amplification of p16 is shown in HCCs and dysplastic nodules, not in normal liver tissues. Amplification of ACTB is shown in all samples.

대한 계산 값으로 나누어 PMR(Percent of methylation ratio)을 구하였다. PMR은 사용된 샘플의 DNA 양을 보정하기 위해 참조 유전자인 ACTB의 정량값으로 유전자의 정량값을 나눠주었고, 이 결과를 다시 양성 대조군을 가지고 계산한 수치로 나눠주었다. 퍼센트로 나타내기 위해 얻은 수치에 100을 곱하였다. PMR을 구하는 공식을 정리하면 다음과 같다.

$$PMR = \frac{(\text{gene})_{\text{sample}} / (\text{ACTB})_{\text{sample}}}{(\text{gene})_{\text{control}} / (\text{ACTB})_{\text{control}}} * 100$$

간암 발달 단계에서 메틸화의 변화를 비교하기 위하여 PMR 을 가지고 student's t-test를 수행하였다.

Ⅲ. 결과

1. 암 억제 유전자의 과메틸화와 간암의 단계적 발생의 상관관계

총 46명의 환자 중 17명이 형성이상 결절을 가지고 있었고, 이 중 3명은 간암과 형성이상 결절을 동시에 가지고 있었다. 46명 중 29명은 암 주변 조직과 간암 조직만 가지고 있었고, 이 중 15명은 grade 2, 14명이 grade 3로 진단되었다.

간암의 단계적 발생 과정 중 암 억제 유전자의 전사 조절부위 과메틸화는 각 유전자 별로 다른 양상을 보였다. 선택한 9개의 유전자 중 APC, p16, RASSF1A, SOCS1, COX2는 정상 간에서 간암으로 발달하는 동안 전사 조절 부위의 과메틸화가 증가하는 경향을 보였다 (Figure 3). 그러나 ERK와 DCC에서는 정상 간부터 간암까지 모든 단계에서 PCR에 의한 증폭이 확인되지 않았다. PTEN과 GNMT에서는 PCR에 의한 증폭이 나타났으나, PMR이 모두 5% 미만으로 확인되었다.

APC의 PMR 평균은 정상 간 조직에서 9%, 암 주변 조직에서는 8%, 저등도 형성이상 결절에서 30%, 고등도 형성이상 결절에서 51%, 초기 간암에서 46%, 간암에서 44%로 나타났다. p16의 PMR 평균은 정상 간 조직, 암 주변 조직, 저등도 형성이상 결절, 고등도

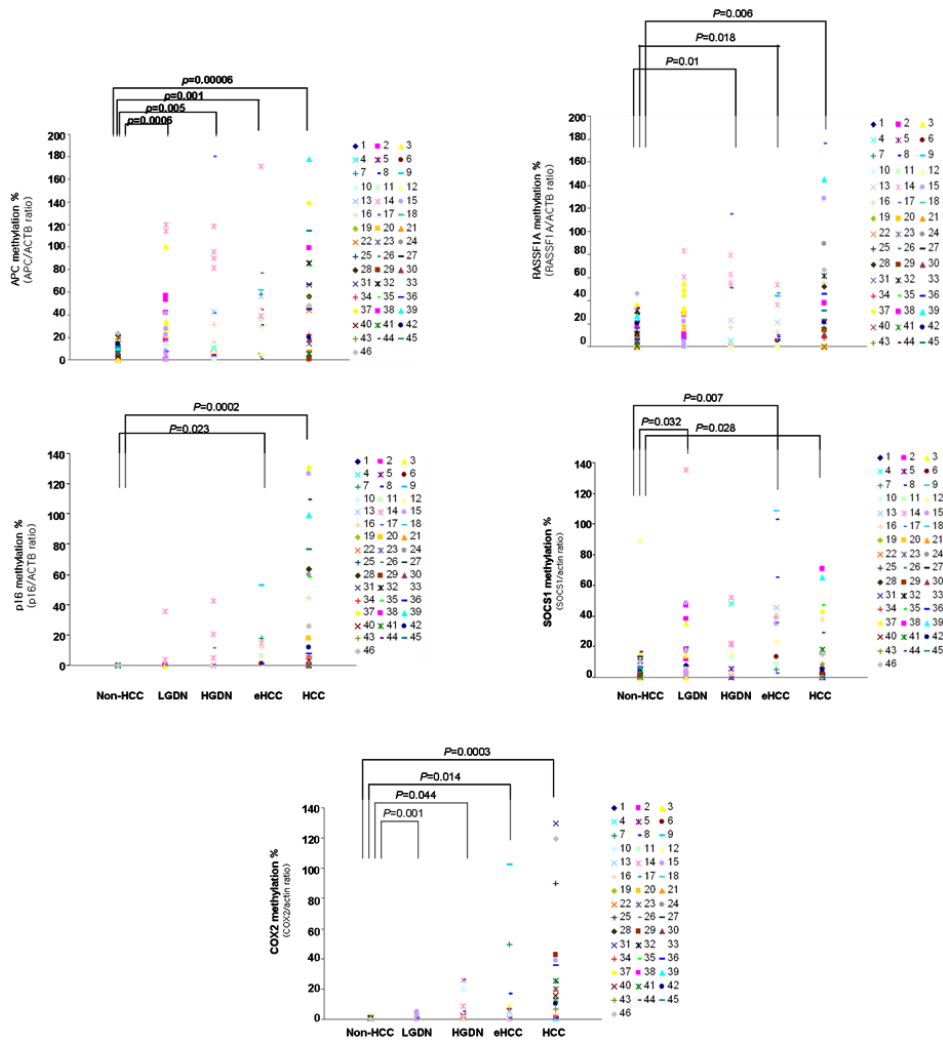


Figure 3. Distribution of percent of methylation ratio (PMR) at each of 5 tumor suppressor genes. The overall distribution of PMR was observed in normal liver, non-HCC, low-grade dysplastic nodules, high-grade dysplastic nodules, early HCCs, and HCCs.

형성이상 결절, 초기 간암, 간암에서 각각 0.003%, 1%, 6%, 7%, 28%로 나타났다. RASSF1A는 정상 간 조직에서 11%, 암 주변 조직에서 10%, 저등도 형성이상 결절에서 21%, 고등도 형성이상 결절에서 36%, 초기 간암에서 20%, 간암에서 32%의 PMR을 보였다. SOCS1의 PMR은 정상 간에서 6%, 암 주변 조직에서 5%, 저등도 형성이상 결절에서 16%, 고등도 형성이상 결절에서 14%, 초기 간암에서 57%, 간암에서 14%로 나타났고, COX2에서 PMR은 정상 간 0.4%, 암 주변 조직 0.3%, 저등도 형성이상 결절에서 1%, 고등도 형성이상 결절에서 7%, 초기 간암 13%, 간암에서 20%로 나타났다.

간암의 진행 단계에서 암 억제 유전자의 과메틸화가 증가한다는 가설을 확인하기 위해 각 단계에서 암 억제 유전자의 PMR을 t-test로 비교하였다. 다섯 개의 암 억제 유전자에서 정상 간 조직, 과암 주변 조직 사이에서 암 억제 유전자의 과메틸화는 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다. 그러나 정상 간 조직이나 암 주변 조직과 간암의 과메틸화 정도를 비교하였을 때, 모든 유전자에서 과메틸화 정도의 증가가 통계적으로 유의한 차이를 보였다. APC는 정상 간 조직과 암 주변 조직간의 과메틸화 정도의 차이가 없었으나, 정상 또는 암 주변 조직보다 저등도 형성이상 결절, 고등도 형성이상 결절, 초기 간암, 간암에서 과메틸화가 증가하였다. 형성이상 결절과 간암

조직 사이에서 APC 의 과메틸화는 유의한 차이가 나타나지 않았다. p16은 정상 간 조직, 암 주변 조직과 조기 간암, 간암에서 과메틸화가 통계적으로 유의하게 증가해 있음이 확인되었다. 또한 저등도 형성이상 결절, 고등도 형성이상 결절, 조기 간암에 비해 간암에서 과메틸화가 증가해있었다. 그러나 형성이상 결절과 조기간암 사이에서는 유의한 차이가 나타나 지 않았다. RASSF1A는 정상 간 조직과 저등도 형성이상 결절, 고등도 형성이상 결절을 비교하였을 때 형성이상 결절에서 더 과메틸화 되어있음을 확인하였으나 조기 간암과는 차이가 없었다. 그러나 간암에서는 과메틸화 되어 있었다. 암 주변 조직에서도 같은 결과를 확인할 수 있었다. SOCS1의 경우 정상 간 조직, 암 주변 조직보다 저등도 형성이상 결절, 조기 간암, 간암에서 과메틸화 되어 있었으나, 고등도 형성이상 결절과는 차이가 나타나지 않았다. COX2에서는 정상 간 조직, 암 주변 조직과 형성이상 결절, 간암의 모든 단계에서 과메틸화가 증가하였다. 또한 저등도 형성이상 결절과 고등도 형성이상 결절 사이에서도 과메틸화의 유의한 증가를 확인할 수 있었다 (Figure 3).

2. 간암의 진행 단계별 암 억제 유전자 전사 조절 부위의 과메틸화 변화

PMR은 %에 따라 5% 미만, 10% 미만, 15% 미만, 20% 미만, 20% 이상으로 구분되었고, 10% 이상인 경우를 과메틸화 되어 있다고 정의하였다 . 형성이상 결절을 가지고 있는 17 case에서, APC와 RASSF1A, SOCS1은 암 주변 조직에서부터 과메틸화 된 경우가 관찰되었고, p16과 COX2는 고등도 형성이상 결절에서부터 과메틸화 된 경우가 확인되었다. 각 단계에 따른 유전자의 과메틸화 경향을 확인한 결과, APC는 과메틸화 된 경우가 암 주변 조직에서 53개 중 10개, 저등도 형성이상 결절에서 29개 중 23개, 고등도 형성이상 결절에서 14개 중 9개, 조기 간암에서 15개 중 12개, 간암에서 32개 중 24개 관찰되었다 (19%, 79%, 64%, 80%, 75%). p16은 암 주변 조직과 저등도 형성이상 결절에서 과메틸화 된 경우가 관찰되지 않았고, 고등도 형성이상 결절에서 14개 중 3개, 조기 간암에서 15개 중 5개, 간암에서 32개 중 12개가 과메틸화 되어 있었다 (0%, 0%, 21%, 33%, 38%). RASSF1A는 암 주변 조직 53개 중 11개, 저등도 형성이상 결절 29개 중 17개, 고등도 형성이상 결절 14개 중 8개, 조기 간암 15개 중 8개, 간암 32개 중 16개에서 과메틸화가 관찰되었다 (21%, 59%, 57%, 53%, 50%). SOCS1은 암 주변 조직에서 4개, 저등도 형성이상 결절에서 11개, 고등도 형성이상 결절에서 6개, 조기간암에서 12개, 간암에서 10개가 과메틸화 되어 있었다 (8%, 38%, 43%, 80%,

67%, 31%). COX2도 암 주변 조직과 저등도 형성이상 결절에서는 과메틸화가 관찰되지 않았고, 고등도 형성이상 결절에서 4개, 조기 간암에서 4개, 간암에서 15개가 과메틸화 되어 있었다 (0%, 0%, 29%, 27%, 47%). 정상 간 조직에서도 APC, RASSF1A, SOCS1의 과메틸화된 경우가 각각 6개, 7개, 2개 관찰되었다 (40%, 47%, 13%). 이 결과는 Figure 4에 정리하여 나타내었다.

	No*	APC	p16	RASSF1A	SDCS1	COS2	No†
Normal liver							0
							3
							0
							1
							0
							3
							1
							2
							1
							3
							3
							2
							1
							0
							0
Non-HCC	1						1
	2						0
	3						3
	4						1
	5						3
	6						2
	7						1
	8						2
	9						1
	10						0
	11						0
	12						2
	13						1
	14						0
	15						2
	16						1
	17						1
	18						0
	19						0
	20						0
	21						0
	22						0
	23						0
	24						0
	25						1
	26						1
	27						2
	28						2
	29						2
	30						3
	31						3
	32						3
	33						0
	34						0
	35						0
	36						1
	37						1
	38						2
	39						3
	40						0
	41						1
	42						2
	43						2
	44						3
	45						3
	46						3
LRN	1						3
	1						2
	2						2
	3						3
	3						3
	15						3
15						2	
LGDN	1						3
	2						3
	2						2
	2						3
	2						3
	2						2
	2						2
	3						3
	3						3
	3						2
	3						2
	3						2
	3						2
	3						2
	3						2
	10						1
	11						3
13						1	
14						4	
14						3	
14						2	
15						1	
15						2	
15						2	
15						2	
15						0	
15						2	
17						3	

No*	APC	p16	RASSF1A	SOCS1	COX2	No†
4						3
5						2
5						0
10						2
12						2
13						2
14						4
14						3
14						5
14						4
16						1
16						2
17						2
17						6
6						2
7						6
8						3
8						4
9						4
9						5
11						3
12						3
13						4
14						3
14						4
16						4
16						5
17						2
17						1
15						6
16						4
17						2
18						0
19						1
20						2
21						2
22						2
23						2
24						2
25						2
26						2
27						2
28						2
29						2
30						2
31						2
32						2
33						3
34						3
35						3
36						3
37						3
38						3
39						3
40						4
41						4
42						4
43						4
44						4
45						4
46						5

Figure 4. Summary of MethyLight results of APC, p16, RASSF1A, SOCS1, COX2 in 136 liver samples from 46 hepatectomy patients. No*, case number ; No†, number of genes methylated ; 7 cases of LRN are not presented.

IV. 고찰

간암은 다단계 발생을 하는 암으로서 전암 병변인 형성 이상 결절을 거쳐 암이 발생하며, 고등도 형성이상 결절이 있는 간에서 암의 발생률이 높다는 보고가 있다^{7, 11, 12}.

본 연구에서는 메틸화에 의해 전사가 조절되는 암 억제 유전자 중 세포 주기를 조절하는 유전자들이 간암의 각 발생 단계별로 전사 조절 부위의 메틸화가 어떻게 변하는지를 확인하였다.

세포 주기를 조절하는 암 억제 유전자의 전사 조절 부위 메틸화는 저등도 형성이상 결절에서부터 증가하는 경향을 보였다 (Fig 3). APC, RASSF1A, SOCS1은 정상 또는 암 주변 조직에서도 과메틸화되어 있는 경우가 있었지만, p16과 COX2는 과메틸화 된 경우가 나타나지 않았다. 저등도 형성이상 결절에서 APC, RASSF1A, SOCS1, COX2의 전사 조절 부위 메틸화가 증가하였으나, p16에서는 변화가 없었다. APC, RASSF1A, COX2는 고등도 형성이상 결절에서 정상 또는 암 주변 조직보다 메틸화가 증가해 있었다. APC, p16, SOCS1, COX2는 조기 간암에서 정상 또는 암 주변 조직보다 메틸화가 증가되어 있었으며, 모든 유전자의 메틸화는 암 주변 조직에 비해 암에서 증가되어 있었다. 전암 단계와 정상 간 조직, 암 주변 조직에서 암 억

제 유전자의 전사 조절 부위 메틸화 정도를 비교해 보았을 때 APC와 COX2는 간암이 발달하는 때 단계가 정상 또는 암 주변 조직에 비해 전사 조절 부위의 메틸화가 증가해 있었다. p16은 암 주변 조직과 저등도 형성이상 결절, 고등도 형성이상 결절 사이의 차이는 없었으나 조기 간암에서 암 주변 조직이나 형성이상 결절에 비해 메틸화가 증가해 있음을 확인하였다. RASSF1A 는 저등도 형성이상 결절과 고등도 형성이상 결절에서 정상 또는 암 주변 조직보다 과메틸화 되어 있었다. SOCS1은 저등도 형성이상 결절과 조기 간암에서 메틸화가 증가해있었다. 흥미롭게도 형성이상 결절에서의 과메틸화 양상은 한 환자로부터 얻은 여러 개의 조직에서 비슷한 패턴을 보였다. 또한 저등도 형성이상 결절에서 과메틸화가 증가한 유전자는 같은 환자의 고등도 형성이상 결절이나 조기 간암에서도 과메틸화 되어 있는 경우가 관찰되었다. 이 결과는 각 병변이 유전자 침묵의 변이가 생긴 하나의 세포로부터 출발하여 생긴 단일 클론이라는 사실을 뒷받침한다 (Figure 4).

각 전암 단계에서 세포 주기를 조절하는 유전자의 전사 조절 부위에 과메틸화가 증가함으로써 전암 병변에서의 세포 주기가 활발하게 돌아가 형성이상 결절을 만드는 것으로 보인다. APC는 Wnt/ β -catenin 신호 전달 경로에서 전사 조절 인자인 β -catenin의 활성을

억제하는 인자이며^{26, 27} RASSF1A는 Ras 신호 전달 경로와 연관되어 세포 주기를 조절하고 세포 자살을 유도하며, 미소관 형성을 조절하는 인자이다^{28, 29}. SOCS1 또한 JAK/STAT 신호 전달 경로에서 전사 인자를 억제하는 것으로 알려진 인자이고, Ras 신호 전달계와 관련하여 AKT 경로를 억제하기도 한다³⁰⁻³². 기존의 연구에서 간암의 발생이 Wnt 신호 전달계와 Ras 신호 전달계에 의한 세포 분열의 촉진 및 종양 유전자의 발현과 연관이 있음이 밝혀진 바 있다^{6, 18}. 이와 관련하여 APC, RASSF1A, SOCS1은 전암 병변이 형성되는 초기 단계에서부터 메틸화가 되는 것으로 나타났다 (Figure 3). 또한 이 유전자들의 메틸화는 저등도 형성이상 결절이 고등도 형성이상 결절이나 조기 간암, 또는 간암으로 진행되는 동안 유지되거나 증가하게 된다. 이는 전암 병변이 발달하는 초기에서부터 Wnt 신호 전달계나 Ras 신호 전달계를 조절하는 암 억제 유전자의 유전자 침묵이 메틸화에 의해 일어난다는 것을 시사한다. 또한 형성이상 결절이 고등도로 발달하면서 p16과 COX2의 과메틸화가 증가함으로써, 전암 병변이 암으로 진행될 가능성이 높아지는 것으로 보인다.

V. 결론

간암의 다단계 발생 과정에서 세포 주기 조절과 연관된 암 억제 유전자의 전사 조절 부위 과메틸화는 저등도 형성이상 결절에서부터 증가해 있음을 확인하였다. 특히 Wnt/ β -catenin 신호 전달계와 Ras 신호 전달계에 연관된 암 억제 유전자의 전사 조절 부위가 저등도 형성이상 결절에서부터 과메틸화 되어 있었고, 고등도 형성이상 결절과 조기 간암으로 갈수록 메틸화가 더 많이 이루어지는 것을 관찰할 수 있었다. 이 연구에서는 형성이상 결절의 각 단계에서 암 억제 유전자의 전사 조절 부위 과메틸화에 대한 변화를 보여주고, 저등도 형성이상 결절과 고등도 형성이상 결절의 차이를 보여줌으로써 저등도 형성이상 결절과 고등도 형성이상 결절의 구분 및 전암 병변의 치료에의 중요한 정보를 제공해줄 수 있다.

VI. 참고 문헌

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001;94:153-6.
2. Anzola M. Hepatocellular carcinoma: role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis. *J Viral Hepat* 2004;11:383-93.
3. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007;132:2557-76.
4. Hytioglou P, Park YN, Krinsky G, Theise ND. Hepatic precancerous lesions and small hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 2007;36:867-87, vii.
5. Takayama T, Makuuchi M, Kojiro M, Lauwers GY, Adams RB, Wilson SR, et al. Early hepatocellular carcinoma: pathology, imaging, and therapy. *Ann Surg Oncol* 2008;15:972-8.
6. Wong CM, Ng IO. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2008;28:160-74.
7. Borzio M, Fargion S, Borzio F, Fracanzani AL, Croce AM, Stroffolini T, et al. Impact of large regenerative, low grade and high grade dysplastic nodules in hepatocellular carcinoma development. *J Hepatol* 2003;39:208-14.
8. Seki S, Sakaguchi H, Kitada T, Tamori A, Takeda T, Kawada N, et al. Outcomes of dysplastic nodules in human cirrhotic liver: a clinicopathological study. *Clin Cancer Res* 2000;6:3469-73.
9. Kojiro M. Histopathology of liver cancers. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005;19:39-62.
10. Park YN. [Pathology of hepatocellular carcinoma: recent update]. *Korean J Gastroenterol* 2005;45:227-33.
11. Theise ND, Park YN, Kojiro M. Dysplastic nodules and hepatocarcinogenesis. *Clin Liver Dis* 2002;6:497-512.
12. Terasaki S, Kaneko S, Kobayashi K, Nonomura A, Nakanuma Y. Histological features predicting malignant transformation of nonmalignant hepatocellular nodules: a prospective study. *Gastroenterology* 1998;115:1216-22.
13. Miranda TB, Jones PA. DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol* 2007;213:384-90.

14. Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* 2000;1:11-9.
15. Ushijima T. Epigenetic field for cancerization. *J Biochem Mol Biol* 2007;40:142-50.
16. Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet* 2007;16 Spec No 1:R50-9.
17. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008;358:1148-59.
18. Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Lee JS, Conner EA, et al. Mechanistic and prognostic significance of aberrant methylation in the molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* 2007;117:2713-22.
19. Gao W, Kondo Y, Shen L, Shimizu Y, Sano T, Yamao K, et al. Variable DNA methylation patterns associated with progression of disease in hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis* 2008;29:1901-10.
20. Lee S, Lee HJ, Kim JH, Lee HS, Jang JJ, Kang GH. Aberrant CpG island hypermethylation along multistep hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol* 2003;163:1371-8.
21. Yang B, Guo M, Herman JG, Clark DP. Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 2003;163:1101-7.
22. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006;38:787-93.
23. Fiegl H, Gatringer C, Widschwendter A, Schneitter A, Ramoni A, Sarlay D, et al. Methylated DNA collected by tampons--a new tool to detect endometrial cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:882-8.
24. McKie AB, Douglas DA, Olijslagers S, Graham J, Omar MM, Heer R, et al. Epigenetic inactivation of the human sprouty2 (hSPRY2) homologue in prostate cancer. *Oncogene* 2005;24:2166-74.
25. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000;28:E32.
26. Akiyama T. Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11:273-82.
27. Csepregi A, Rocken C, Hoffmann J, Gu P, Saliger S, Muller O, et al. APC promoter methylation and protein expression in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008;134:579-

- 89.
28. Peters I, Rehmet K, Wilke N, Kuczyk MA, Hennenlotter J, Eilers T, et al. RASSF1A promoter methylation and expression analysis in normal and neoplastic kidney indicates a role in early tumorigenesis. *Mol Cancer* 2007;6:49.
 29. Vos MD, Martinez A, Elam C, Dallol A, Taylor BJ, Latif F, et al. A role for the RASSF1A tumor suppressor in the regulation of tubulin polymerization and genomic stability. *Cancer Res* 2004;64:4244-50.
 30. Chan MW, Chu ES, To KF, Leung WK. Quantitative detection of methylated SOCS-1 , a tumor suppressor gene, by a modified protocol of quantitative real time methylation-specific PCR using SYBR green and its use in early gastric cancer detection. *Biotechnol Lett* 2004;26:1289-93.
 31. Elliott J, Johnston JA. SOCS: role in inflammation, allergy and homeostasis. *Trends Immunol* 2004;25:434-40.
 32. Niwa Y, Kanda H, Shikauchi Y, Saiura A, Matsubara K, Kitagawa T, et al. Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2005;24:6406-17.

Abstract

Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes during multi-step hepatocarcinogenesis

Um, Tae-hee

Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Young Nyun Park)

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common cancers worldwide and its risk factors are well established including hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV). Hepatocarcinogenesis is a multistep process evolving from pre-cancerous lesions known as dysplastic nodules (DNs). DNs are divided into low-grade and high-grade, and high-grade DNs are significantly associated with HCC formation.

In cancer, DNA methylation induces dysfunction of tumor suppressor genes by CpG island hypermethylation on promoter region.

Promoter hypermethylation of tumor suppressor gene is increased in HCCs and DN than cirrhotic liver. However, the molecular difference between low-grade and high-grade DN are poorly understood.

In this study, promoter hypermethylation was investigated during multistep hepatocarcinogenesis using 32 HCC, 15 early HCC, 14 high-grade DN, 29 low-grade DN, 53 corresponding non-cancerous liver and 15 normal liver samples, in cell cycle related 8 tumor suppressor gene APC, p16, RASSF1A, SOCS1, COX2, DCC, SPRY2, GNMT and 1 Ras signal related gene ERK. Promoter hypermethylation of APC, RASSF1A, SOCS1 was increased from low-grade DN, and hypermethylation ratio of APC and COX2 was significantly increased in every step. These data provide evidence for epigenetic difference during multi-step hepatocarcinogenesis and give information to clinical treatment.