

원발성 소세포폐암에서 염색체
5번의 장완에 위치한
종양억제유전자좌의 확인

연세대학교 대학원

의과학 사업단

조 은 송

원발성 소세포폐암에서 염색체
5번의 장완에 위치한
종양억제유전자좌의 확인

지도 김 세 규 부교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2000년 6월 일

연세대학교 대학원

의과학 사업단

조 은 송

조은송의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 김민기 인

심사위원 김기호 인

심사위원 조찬호 인

연세대학교 대학원

2000년 6월 일

감사의 글

길 것만 같았던 2년이라는 시간이 벌써 흘러 아직도 미숙한 제가 졸업을 하게 되었습니다. 지금의 제가 있기까지 참으로 많은 분들이 도와주셨음을 새삼 깨닫게 되었습니다. 부족한 저를 여기까지 이끌어 주시고 따뜻한 배려로 지켜주신 김세규 선생님, 격려와 용기를 주시던 조철호 선생님과 김호근 선생님께 감사의 말씀을 올립니다. 제가 이 길을 택할 수 있도록 학부때부터 이끌어 주시고 조언을 해주시던 학부때 지도 교수님이셨던 선상수 선생님께도 감사의 뜻을 전합니다. 가족과 떨어져 지낸 저에게 물질적·정신적으로 힘이 되어주신 둘째 작은어머니와 작은아버지, 항상 따뜻하게 맞이해 주시는 외삼촌네와 막내 작은어머니에게도 이 작은 글귀로 감사하다는 말씀을 전하고 싶습니다. 또한 같은 집에 살면서도 고맙다는 말 한마디 건네지 못한 현식오빠, 병숙언니, 영갑이, 정숙이. 그리고 항상 옆에서 힘이 되어준 은숙언니, 지금은 이곳을 떠났지만 오랜 시간을 같이 했던 보배언니, 정진언니, 영미언니, 양미언니, 원영언니 그리고 황수연 선생님. 웃음과 도움을 많이 주었던 명진언니, 윤희언니, 그리고 지은언니. 같이 고민해주고 도와주던 편안한 친구들 주원이, 지은이, 율이에게도 고맙다고 전하고 싶습니다. 밤늦게 불쑥 찾아가도 따뜻한 미소로 맞이해 주시는 주원이네 가족들과 알게 모르게 제 주위에서 절 도와준 많은 사람들에게 감사드립니다. 마음만 급해 시간을 내지 못해도 넓은 아량으로 이해해주고 안부를 챙겨주던 친구들과 선배들에게 미안하고 고맙다는 말밖에 할말이 없습니다. 저의 생활에 지쳐 있을 때 하느님의 사랑을 잊지 않도록 도와 주던 성당 사람들에게도 감사하다고 전하고 싶습니다. 하지만 그 누구보다도 절 사랑해주시는 저의 가족들에게 감사의 말을 전하고 싶습니다. 제가 하는 일에 언제나 묵묵히 지켜봐 주시고 용기를 주시던 저의 아빠와 엄마. 바라는 것 없이 베풀어 주기만 하는 부모같고 친구같은 언니, 그런 언니의 뜻을 이해해 주시는 우리집 큰아들 같으신 형부, 그리고 새로 태어난 사랑스런 조카 아영이. 가족들과 떨어져 있는 제게 함께 살고 있는 유일한 가족이며 자신만 챙기는 동생에게 불평 한마디 없이 지켜봐 준 고마운 오빠. 이 부족한 언니를 자랑스럽게 여긴다면서 격려를 해주는 동생 은하에게 고3이라는 이 한해를 잘 보내라고 전하고 싶고 가족들에게 은송이가 사랑한다고 전하고 싶습니다.

그리고 제게 이런 고마운 많은 사람들은 만날 수 있게 해주신 하느님께 감사드립니다.

저 자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 연구대상	6
2. 연구방법	6
가. 파라핀 포매 블록	6
나. DNA 추출	7
다. PCR-LOH 분석	7
III. 결과	10
IV. 고찰	14
V. 결론	19
참고문헌	20
영문요약	27

그림 차례

그림 1. 염색체 5번 장완의 markers를 이용한 소세포폐암 15예의 PCR-LOH 분석 결과	12
그림 2. 원발성 소세포폐암의 PCR-LOH 결과로 밝힌 결손 부위	13

표 차례

표 1. 염색체 5번 장완에서 선택한 현미부수체 표지자	9
표 2. 원발성 소세포폐암 15예에서 발생한 염색체 5번 장완의 LOH 빈도	11

원발성 소세포폐암에서 염색체 5번의 장완에 위치한 종양억제유전자좌의 확인

최근 세포유전학적 연구 결과 소세포폐암에서는 염색체 5번 장완의 빈번한 결손이 관찰되며, 이러한 결과는 이 부위에 종양억제유전자의 존재 가능성을 시사한다. 향후 소세포폐암 발생 및 진행에 중요한 역할을 하는 특이 종양억제유전자를 찾기 위한 노력의 일환으로 본 연구에서는 15예의 소세포폐암 조직을 대상으로 현미부수체 표지자를 이용한 PCR-LOH 분석 기법으로 염색체 5번의 장완에 대한 연구를 시행하였다. 연구는 연세대학교 의과대학 세브란스병원에서 원발성 소세포폐암으로 진단된 15명의 남자 환자를 대상으로 하였다. 암 조직과 이에 대응하는 정상 조직의 파라핀 포매 블록으로부터 DNA를 추출하였으며, 염색체 5번의 장완에 위치하는 총 19개의 현미부수체 표지자들을 이용하여 PCR-LOH를 실시하였다. 연구 결과 15예 중에서 LOH가 1개라도 있는 경우는 10예로 66.7%이었다. LOH가 있는 10예 중 검사를 시행한 모든 marker들의 결손이 있는 경우는 2예 (SCLC1, SCLC3)로써 13%이었다. 19개의 marker중 5개에서 50%이상의 LOH 빈도를 확인할 수 있었는데, 5q14-15에 위치하는 *D5S409*와 5q23-31에 위치하는 *D5S404* 사이인 18.3cM 간격에서 57.1%, 5q31.1에 위치한 *IRF-1*에서 63.6%, 5q31.3-33.3에 위치하는 *D5S209*에서 54.5%, 5q34-35에 위치하는 *D5S400*에서 54.5%, 그리고 5q34-qter에 위치하는 *D5S429*와 5q35.2-35.3에 위치하는

D5S498사이인 5.5cM 간격에서 75%의 빈도로 관찰되었다. Shifted bands는 15예 중 3예에서 관찰되었는데 SCLC8에서 26.3%, SCLC6에서 5.3%, SCLC14에서 5.3% 의 altered loci가 관찰되었다. Shifted bands는 검사한 총 285 loci 중 2.5%인 7 loci에서 관찰되었다. 결론적으로 염색체 5번의 장완에 원발성 소세포폐암 일부에서 종양의 발생 및 진행에 관여하는 최소 5개의 종양억제유전자좌가 존재할 것으로 생각되며, 향후 특이 유전자를 찾기 위한 추가적인 노력이 있어야 할 것으로 생각된다.

핵심 되는 말 : 소세포폐암, LOH, microsatellite marker

원발성 소세포폐암에서 염색체 5번의 장완에 위치한

종양억제유전자좌의 확인

< 지도 김 세 규 부교수 >

연세대학교 대학원 의과학사업단

조 은 송

I. 서 론

사람에서의 암은 체내 유전적 변화의 축적을 통해 발생하고 진행되는 것으로 생각된다. 암 발생의 초기 단계에서는 후천적인 유전자 불안정화나 돌연변이 유발 유전자 표현형(mutator phenotype)이 관여하는 것으로 알려져 있으며,^{1,3} 암 발생 및 진행 과정 중 암유전자의 활성화, 종양억제유전자의 불활성화 등이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있지만^{4,6} 아직도 분자생물학적 병인에 대해서는 잘 밝혀져 있지 않은 부분이 많다.

종양억제유전자가 불활성화 되는 기전은 많은 경우에서 하나의 대립형질 돌연변이와 다른 대립형질의 결손에 의해 생긴다고 한다.⁷ 따라서 연구자들은 암 발생 및 진행에 관여하는 특이 종양억제유전자를

찾기 위한 노력의 일환으로 종양억제유전자 불활성화의 특성인 loss of heterozygosity (LOH)를 분석하는 다양한 연구를 시행하여 왔다.^{8,9}

폐암은 전세계적인 주된 암 사망 원인으로 선암, 편평상피세포암, 대세포암등의 비소세포폐암과 소세포폐암으로 구분하는데 이중 소세포폐암이 18~29%를 차지한다. 소세포폐암은 진단 초기에 이미 원격 전이를 한 경우가 많고, 치료 중 재발을 잘하기 때문에 예후가 매우 불량하다.¹⁰ 따라서 분자생물학적 병인의 규명은 소세포폐암의 임상적, 생물학적 특성을 이해하는데 기여하여 진단 및 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

소세포폐암에 대한 연구 결과 염색체 3p, 4q, 5q, 8p, 9p, 10q, 11p, 13q, 17p, 18q, 22q 등에서 관찰되는 빈번한 결손은 이들 부위에 소세포폐암 관련 종양억제유전자가 존재함을 시사한다.¹¹⁻¹³ 최근 Kim 등은 소세포폐암을 대상으로 염색체 9번의 단완에 3개, 염색체 10번의 장완에 2개의 종양억제유전자좌의 존재 가능성을 제시한 바 있다.^{14,15}

염색체 5번 장완의 5q21에서 확인된 APC (adenomatous polyposis coli) 유전자는 가족성선종성폴립증(familial adenomatous polyposis) 발생과 관련이 있으며,¹⁶ APC 유전자의 돌연변이는 결장직장암,¹⁷ 췌장암,¹⁸ 구강암,¹⁹ 위암²⁰ 등에서 발견된다. 또한 APC 좌에서의 빈번한 LOH가 결장직장암, 위암, 구강암, 식도암, 간암 뿐 아니라 폐암^{21,22}에서도 관찰된다. 그러나 폐암에서는 염색체 5q에 APC 좌 이외의 영역에서 또 다른 결손이 관찰되는데 Hosoe 등²³은 빈번한 결손 영역이 5q21과 5q33-35에 위치한다고 보고하였으며, Wieland 등²⁴은 새로운 종양억제유전자가

5q13-14와 가깝게 연관되어 있다고 하였다.

이와 같은 많은 연구에도 불구하고 소세포폐암과 관련된 특이 유전자가 아직까지 확인되지 않았기 때문에 연구자들은 원발성 소세포폐암의 발생과 진행에 병인적 중요성을 갖는 종양억제유전자를 찾기 위한 노력의 일환으로 염색체 5번의 장완에 위치한 19개의 **microsatellite marker**들을 이용하여 PCR-LOH 분석으로 공동소실구역 결정을 위한 연구를 시행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구대상

연세대학교 의과대학 세브란스 병원에서 원발성 소세포폐암으로 진단된 15예를 대상으로 하였다. 대상 환자는 모두 남자이었으며, 평균 연령은 56.1세 (30~74세)이었고, 흡연자는 12명, 흡연력은 평균 21.4 갑/년이었다. 대상 환자들의 중앙 생존 기간은 40.5주(22~285주)이었다. 환자의 병기는 extensive stage 1 예를 제외하고, 나머지 모두 limited stage이었다.

2. 연구방법

가. 파라핀 포매 블록

DNA 추출을 위해 원발성 소세포폐암 조직과 이에 대응하는 동일한 환자에서의 정상 조직 파라핀 포매 블록들을 이용하였다. 암 조직 블록은 microtome을 이용하여 4 μ m로 절편 한 후, hematoxylin과 eosin 염색을 하여 병리의사에 의해 소세포폐암임을 재차 확인하고, 중앙 부위를 확인하였다. 이후 4~5개의 10 μ m 추가 절편을 만든 다음 저배율 현미경 하에서 scalpel을 이용하여 정상 세포의 오염이 30% 이하로 가능한 적도록

주의하면서 종양 조직을 박리하였다. 정상 조직도 동일한 방법으로 준비하였다.

나. DNA 추출

박리한 조직은 1% SDS-proteinase K를 포함한 TE9 buffer (1M Tris-HCl (pH8.9), 0.5M EDTA, 4M NaCl) 200 μ l에 넣어 42 $^{\circ}$ C에서 12~24시간 동안 배양하여 용해시켰다. 용해시킨 검체는 phenol, chloroform을 동량 첨가하여 14,000 rpm에서 2분간 원심 분리한 후 상층액만을 새 튜브에 옮겨 담았다. 이러한 과정을 2번 반복한 후 Master mix (10M NH₃AC, 100% Ethanol)와 소량의 glycogen을 넣고, 14,000 rpm에서 20분간 원심분리를 하였다. Pellet을 확인하고, 70% ethanol로 세척한 뒤 실온에서 말렸다. 이후 멸균된 3차 증류수를 적당량 넣어 DNA를 녹였다. 분광 광도계를 이용하여 260nm 파장에서 DNA 농도를 측정하였고, 실험 전까지 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다.²⁵

다. PCR-LOH분석

표지자를 사용한 PCR-LOH 분석을 위하여 염색체 5번의 장완에 위치하는 19개의 microsatellite markers (Research Genetics, Huntsville, AL, USA)를 선택하여 구입하였다. (표 1)

각각의 primer들 중 하나는 [γ -³²P]ATP (3,000Ci/mmol; Buckinghamshire, England)와 T4 DNA polynucleotide kinase (New England Biolabs, Beverly,

MA)를 이용하여 end-labeling하였다. 중합효소연쇄반응은 총 12.5 μ l가 되도록 20ng genomic DNA, 1% dimethylsulfoxide, 200mM dNTP, 1.5mM MgCl₂, 0.1mM [γ -³²P]ATP를 포함한 0.4mM PCR primers, 0.5 units Taq DNA polymerase (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 첨가하였다. 이를 temperature cycler (Hybaid; Omnigene, Woodbridge, NJ, USA)를 이용하여 95 $^{\circ}$ C에서 30초간 변성, 52~60 $^{\circ}$ C에서 60초 동안 재결합, 그리고 70 $^{\circ}$ C에서 60초 동안 신장하는 과정을 35회 증폭한 다음 70 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 신장시켰다. 중합효소연쇄반응 산물은 2X stop buffer (95% formamide, 20mM EDTA, 0.1% bromophenol blue, 0.1% Xylene cyanol FF)를 동량 섞어 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 가열한 다음 즉시 얼음에 넣고, 그 중 4 μ l를 6% polyacrylamide-urea-formamide(PAGE) gel에 loading하여 70W로 약 4시간 전기영동을 시켰다. 전기영동이 끝난 gel은 gel dryer에서 1시간 정도 말린 후 Kodak XAR-5 film (Kodak, Rochester, NY, USA)에 노출시킨 후 합성물을 판독하였다.

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

표 1. 염색체 5번 장완에서 선택한 microsatellite markers

Marker	Hetero	Repeat	Size	LOH/ Informative(%)
<i>D5S118</i>	0.49	DI	78-92	3/9(33.3)
<i>D5S107</i>	0.82	DI	133-155	5/10(50)
<i>D5S644</i>	0.85	DI	81-101	3/11(27)
<i>D5S409</i>	0.69	DI	138-154	5/10(50)
<i>D5S346</i>	0.83	DI	96-122	5/10(50)
<i>D5S421</i>	0.83	DI	152-170	6/12(50)
<i>D5S404</i>	0.73	DI	180-198	2/3(66.7)
<i>IL9</i>	0.80	DI	98-120	4/10(40)
<i>IRF-1</i>	0.74	DI	174-184	7/11(63.6)
<i>D5S414</i>	0.83	DI	186-206	3/10(30)
<i>D5S210</i>	0.78	DI	212-232	5/11(45.5)
<i>FBN2</i>	0.87	DI	110-155	2/7(28.6)
<i>D5S178</i>	0.93	DI	98-120	3/11(27.3)
<i>D5S209</i>	0.71	DI	196-214	6/11(54.5)
<i>D5S820</i>	0.73	TETRA	190-218	3/12(25)
<i>D5S400</i>	0.83	DI	218-236	6/11(54.5)
<i>D5S625</i>	0.74	DI	224-238	1/4(25)
<i>D5S429</i>	0.82	DI	160-186	6/9(66.7)
<i>D5S498</i>	0.78	DI	171-189	6/8(75)

III. 결 과

연구 결과 15예 중에서 LOH가 1개라도 있는 경우는 10예로 66.7%이었다. LOH가 있는 10예 중 검사를 시행한 모든 marker 들의 결손이 있는 경우는 2예(SCLC1, SCLC3)로써 13%이었다. 검사를 시행한 19개의 marker중 5개에서 50%이상의 LOH 빈도를 확인할 수 있었는데 5q14-15에 위치하는 *D5S409*와 5q23-31에 위치하는 *D5S404* 사이인 18.3cM 간격에서 57.1%, 5q31.1에 위치한 *IRF-1*에서 63.6%, 5q31.3-33.3에 위치하는 *D5S209*에서 54.5%, 5q34-35에 위치하는 *D5S400*에서 54.5%, 그리고 5q34-qter에 위치하는 *D5S429*와 5q35.2-35.3에 위치하는 *D5S498*사이인 5.5cM 간격에서 75%의 빈도로 관찰되었다(표 2, 그림 1, 그림 2). Shifted bands는 15예 중 3예에서 관찰되었는데 SCLC8에서 26.3%, SCLC6에서 5.3%, SCLC14에서 5.3% 의 altered loci가 관찰되었다. Shifted bands는 검사한 총 285 loci 중 2.5%인 7 loci에서 관찰되었다(그림 1).

표 2. 원발성 소세포폐암 15예에서 발생한 염색체 5번 장완의 LOH 빈도

Primer	Location	No. of amplified	% amplified	No. of Informative	% Informative	No. of LOH	% LOH
<i>D5S118</i>	5cen-q11.2	14	93	9	64	3	33.3
<i>D5S107</i>	5q11.2-13.3	14	93	10	79	5	50
<i>D5S644</i>	5pter-qter	15	100	11	73	3	27
<i>D5S409</i>	5q14-15	14	93	10	71	5	50
<i>D5S346</i>	5q21-22	15	100	10	67	5	50
<i>D5S421</i>	5q22-23	14	93	12	86	6	50
<i>D5S404</i>	5q23-31	14	93	3	36	2	66.7
<i>IL9</i>	5q22.3-32	14	93	10	71	4	40
<i>IRF-1</i>	5q31.1	14	93	11	79	7	63.6
<i>D5S414</i>	5pter-qter	14	93	10	71	3	30
<i>D5S210</i>	5q31.3-33.3	14	93	11	79	5	45.5
<i>FBN2</i>	5q23-31	15	100	7	47	2	28.6
<i>D5S178</i>	5q31	15	100	11	73	3	27.3
<i>D5S209</i>	5q31.1-33.3	14	93	11	79	6	54.5
<i>D5S820</i>	5pter-qter	15	100	12	80	3	25
<i>D5S400</i>	5q34-35	13	87	11	85	6	54.5
<i>D5S625</i>	5pter-qter	13	87	4	46	1	25
<i>D5S429</i>	5q34-qter	14	93	9	71	6	66.7
<i>D5S498</i>	5q35.2-35.3	13	87	8	62	6	75

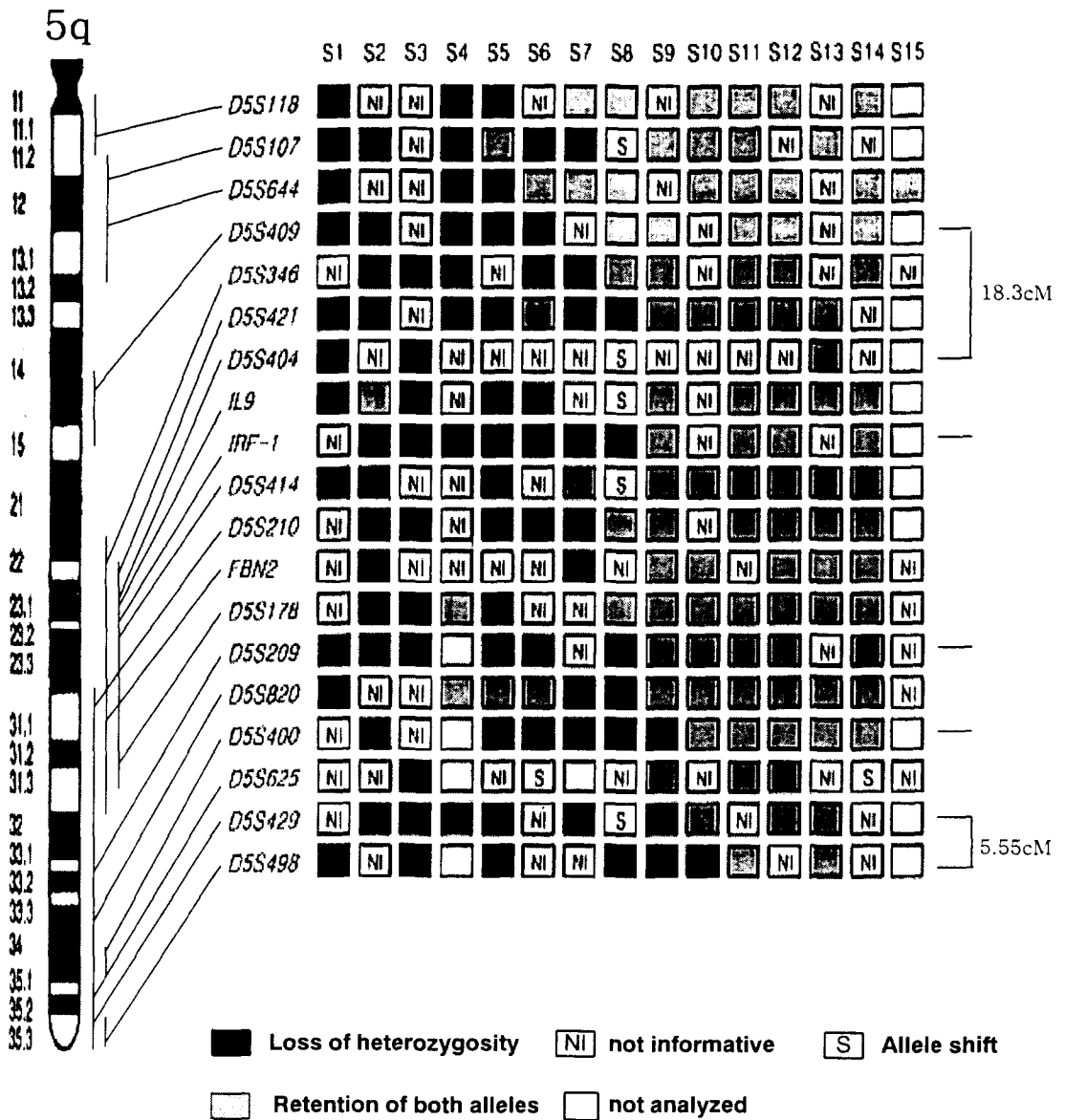


그림 1. 염색체 5번 장완의 markers를 이용한 소세포폐양 15예의 PCR-LOH 분석 결과. 오른쪽에 위치한 선은 결손 빈도가 높은 부위를 나타낸다. 위치는 5q14-15, 5q21-22, 5q31.1-33.3, 그리고 5q34-35이다.

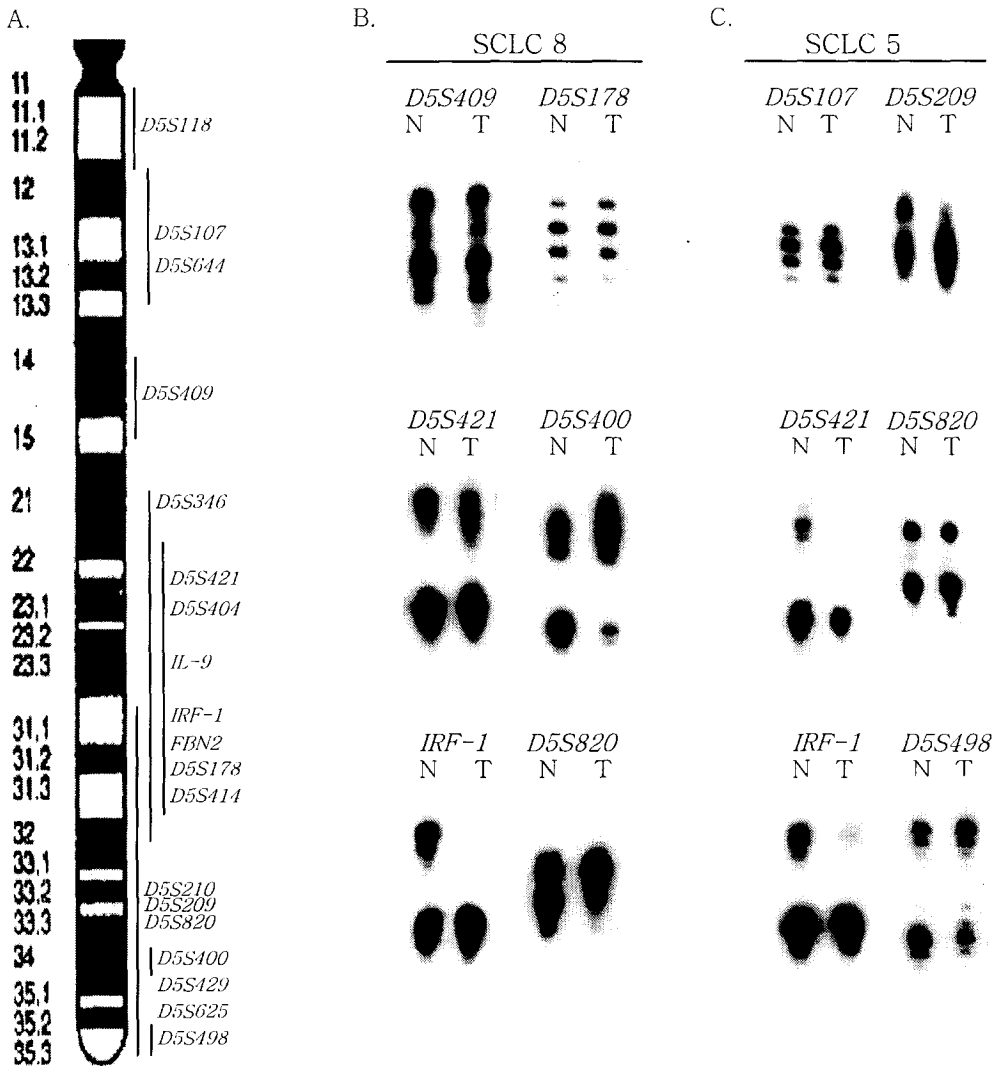


그림2. 원발성 소세포폐암의 PCR-LOH 결과로 밝힌 결론. A, 선택되어진 marker들의 염색체 5번 장완에서의 위치. B, SCLC8에서 관찰된 LOH(*D5S421*, *IRF-1*, *D5S400*, *D5S820*)와 retention (*D5S409*, *D5S178*). C, SCLC5에서 관찰되는 LOH(*D5S421*, *IRF-1*, *D5S209*, *D5S498*)와 retention(*D5S107*, *D5S820*)

V. 고찰

소세포폐암에서 유전학적 변화의 기전은 매우 복잡하다. 세포유전학적 연구에 의하면 폐암에서는 염색체 13번의 장완에 위치하는 *Rb* 유전자와 염색체 17번의 단완에 위치하는 *p53* 유전자의 불활성화가 빈번하게 나타날 뿐 아니라^{26,27} 소세포폐암에서는 3p, 4q, 5q, 8p, 9p, 10q, 11p, 13q, 17p, 18q, 22q 등 여러 염색체상에서 대립형질의 결손이 빈번하게 관찰된다.¹¹⁻¹³

Petersen 등¹³의 CGH (comparative genomic hybridization) 방법을 이용한 연구 결과 염색체 10q에서 94%, 그리고 4q, 5q, 13q, 17p에서 86%의 결손이 관찰되었는데 이와 같이 높은 빈도로 관찰되는 염색체 결손은 소세포폐암의 공격적인 표현형이 다양한 성장 억제 경로를 통해 나타난다는 것을 의미한다. 높은 빈도의 결손을 보이는 염색체 10번의 장완에서 소세포폐암의 발생 및 진행에 중요한 역할을 하는 종양억제유전자의 존재를 확인하기 위한 Kim 등¹⁵의 연구결과 원발성 소세포폐암에서 종양억제유전자좌 2개의 존재 가능성을 보고한 바 있다. 이와 같은 노력의 일환으로 연구자들은 우리나라 사람에서 발생한 원발성 소세포폐암을 대상으로 염색체 5번의 장완에 위치하는 암 관련 특이 종양억제유전자좌를 찾고자 하였다.

15예의 원발성 소세포폐암을 대상으로 한 본 연구 결과 염색체 5번의 장완에서 LOH 빈도가 높은 5군데의 영역이 확인되었다. 첫째는 5q14-15에 위치한 *D5S409* 와 5q23-31에 위치하는 *D5S404* 사이, 둘째는 5q31.1에

위치한 *IRF-1*, 셋째는 5q31.3-33.3에 위치하는 *D5S209*, 넷째는 5q34-35에 위치하는 *D5S400*, 다섯째는 5q34-qter에 위치하는 *D5S429*와 5q35.2-35.3에 위치하는 *D5S498*사이이다. (그림 2, 표 2) 이러한 결과는 염색체 5번의 장완에 소세포폐암의 발생과 진행에 중요한 역할을 하는 종양억제유전자좌가 최소 5개 이상 존재할 가능성을 시사하는 것이다.

염색체 5번에서 대립형질의 결손은 여러 종류의 종양에서 관찰된다. 이중 5q21에 위치하는 종양억제유전자인 *APC*와 *MCC*가 결장직장암에서 빈번하게 결손되거나 돌연변이를 일으킨다. 특히 *APC* 유전자는 가족성선종성폴립증 발생과 관련이 있으며,¹⁶ *APC* 유전자의 돌연변이는 결장직장암,¹⁷ 췌장암,¹⁸ 구강암,¹⁹ 위암²⁰ 등에서 발견된다. 또한 5q21에서의 빈번한 LOH가 결장직장암, 위암, 구강암, 식도암, 간암 뿐 아니라 폐암^{21,22}에서도 관찰된다.

폐암에서 결손의 빈도는 세포형에 따라 차이가 있다. D'Amico 등²⁸의 보고에 의하면 5q21 부위의 대립형질 결손이 비소세포폐암에서는 40%에 불과하지만 소세포폐암에서는 80%이상에서 관찰되는데 이러한 결과는 임상적으로 더욱 진행된 병기를 가진 환자의 부검 예를 대상으로 하였기 때문에 염색체 5q의 결손은 소세포폐암 진행 과정 중 후기에 일어나는 변화로 추정된다고 하였다. 그러나 본 연구 결과에서는 extensive stage가 1예 (SCLC12)뿐이었지만 검사를 시행한 19개 marker들 모두에서 LOH가 하나도 발견되지 않았으므로 D'Amico 등의 보고와는 상반된 결과를 보여서 이에 대한 추가적인 검증이 필요하리라 생각된다.

폐암에서는 *APC* 유전자가 위치하는 부위와 분명하게 다른 영역인

5q13-14 부위의 centromeric region²⁶과 5q33-35 부위의 telomeric region²³ 에서도 또 다른 결손이 관찰되므로 이 부위에 폐암 발생과 관련된 종양억제 유전자들이 존재할 것으로 생각된다.

5q13-14 영역에서의 대립형질 결손은 분화도가 좋은 위선암(well differentiated adenocarcinoma) 에서 빈번하게 관찰된다²⁹. 한편 5q13.3에서의 염색체 변이는 모발상세포(hairy cell) 백혈병³⁰에서 가장 빈번하게 관찰되며, 불응성 빈혈,³¹ 급성 골수성 백혈병과 척수이형성증후군(myelodysplastic syndrome),^{32,33} 난소암,³⁴ 그리고 폐암²⁶에서도 보고되는데 특히 난소암에서는 병기 I의 초기 단계에서 변화를 일으키는 것으로 추정된다. 이러한 결과는 5q13부위에 악성 질환과 관련된 한 개 이상의 중요한 유전자좌가 있을 것으로 추정하지만 아직까지 특이 종양억제유전자는 확인되지 않았다.

5q35-qter에서의 LOH는 간경변이 없는 간암,³⁵ 남성 배세포종³⁶ 등에서 관찰된다. 결손의 범위에 약간의 차이가 있지만 Murty 등³⁷에 의하면 고환 배세포종에서 5q34-35의 결손이 관찰되며, Peng 등³⁸은 약 20 cM 길이의 5q34-qter에서도 흔한 결손이 관찰됨을 보고하였다.

이러한 보고들은 본 연구 결과 확인된 5q14-15에 위치하는 *D5S409*와 5q23-31에 위치한 *D5S404* 사이, 그리고 5q34-35에 위치하는 *D5S400*에서의 빈번한 LOH와 일치한다(그림 1, 표 2). *D5S409*와 *D5S404*사이에는 *APC* 유전자가 위치하므로 소세포폐암에서도 *APC* 유전자가 중요한 역할을 하는 것으로 추정할 수 있으나 *SCLC1*과 *SCLC3*에서는 19개 marker들 모두에서 LOH가 관찰되어 *APC* 유전자좌의 결손이 염색체 5q에서 생기는 완전한 결손의 한 부분적인 소견일 가능성도 배제할 수 없다.

고환배세포종(testicular germ cell tumor)에서는 5q34-35뿐 아니라 5q11에서도 결손이 관찰되며, 1cM이내인 5q14에서도 흔한 결손 영역이 관찰된다.^{37,38} 본 연구 결과 5q14-15에 위치하는 *D5S409*에서의 빈번한 결손은 Peng 등의 보고와 일치하지만 아직 특이 종양억제유전자는 발견되지 않았으며, 대상 예 일부에서 5q11에서의 결손을 관찰할 수 있었지만 그 빈도가 낮으면서 대부분 넓은 부위의 5q 결손과 동반되어 있기 때문에 그 역할의 중요성을 확인하기 어려울 것으로 생각된다. 식도암에서는 5q11-12에 위치하는 *MSH3* 복제오류교정유전자의 위치에서 LOH가 빈번하게 관찰되어 식도암 발생의 표적으로 추정된다.³⁹

또한 식도암에서는 염색체 5q에서 결손이 빈번하게 발견되는데도 불구하고 *APC* 유전자의 돌연변이가 매우 드물기 때문에^{40,41} *APC* 유전자 이외에 5q에 위치하는 다른 종양억제유전자가 더 큰 영향을 미치는 것으로 추정할 수 있다. 5q31.1에 위치하는 *IRF-1* (interferon regulatory factor-1) 유전자와 그 외 다른 cytokine 유전자들인 *IL-3*, *IL-4*, *IL-5*, *GM-CSF*, 그리고 유사분열의 유도인자인 *CDC25C* 유전자 등⁴²이 가능성이 있지만 그 중에서 항암성질과 증식 억제 활성화도 때문에 *IRF-1* 유전자가 중요한 표적으로 생각된다.⁴³ 이러한 가능성은 Harada 등에 의해서도 제시되었다.⁴⁴ 즉, *IRF-1* 유전자는 종양억제 활성화도를 보이는 전사 활성 인자인 야생형 *IRF-1*의 과발현은 세포주기를 정지시키지만 돌연변이형은 전사 활성화도가 상당히 감소한다.⁴⁵ *IRF-1*은 식도암뿐 아니라 위선암(stomach adenocarcinoma)에서도 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.⁴⁶ 본 연구에서도 대상 예의 63.6%에서 *IRF-1*에 LOH가 확인되어 소세포폐암에서 중요한 역할을 할 것으로 추정

된다.

최근 5q31에서 확인된 *TTID* 유전자는 갑상선, 골수, 다양한 근조직에서 표현되지만 불활성화를 일으키는 돌연변이가 발견되지 않아 악성 골수성 질환에서 종양억제 유전자의 가능성이 없는 것으로 추정된다.⁴⁷

본 연구 결과를 종합하여 보면 현재까지의 보고들과 유사한 결과를 보임을 알 수 있어서 염색체 5번의 장완에는 최소 5개의 원발성 소세포폐암 관련 종양억제유전자좌가 존재할 것으로 추정된다. 그러나 *microsatellite* 분석 결과 불안정화는 285개의 *loci* 중 오직 2.5%인 7개에서만 발견되어 이러한 결과는 대상 예들이 대부분 *limited stage*로 진행되기 이전 단계이므로 돌연변이 유발유전자 표현형이 소세포폐암의 진행에 주된 역할을 하기 보다는 일부에서 암 발생의 초기 단계에서 총동적 역할을 하는 것으로 생각된다.

V. 결론

소세포암 15예에 대한 염색체 5번의 장완에 존재하는 종양억제유전자를 찾고자 총 19개의 *microsatellite markers*를 이용하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 15예중에서 LOH가 하나라도 있는 경우는 10예로 66.7%이었다.
2. LOH가 10예 중 검사를 시행한 모든 *marker*들의 손실이 있는 경우는 2예 (*SCLC1*, *SCLC3*)로써 13%이었다.
3. 19개의 *marker*중 5개에서 50%이상의 LOH 빈도를 확인할 수 있었는데 5q14-15에 위치하는 *D5S409*와 5q23-31에 위치하는 *D5S404* 사이인 18.3cM 간격에서 57.1%, 5q31.1에 위치한 *IRF-1*에서 63.6%, 5q31.3-33.3에 위치하는 *D5S209*에서 54.5%, 5q34-35에 위치하는 *D5S400*에서 54.5%, 그리고 5q34-qter에 위치하는 *D5S429*와 5q35.2-35.3에 위치하는 *D5S498*사이인 5.5cM 간격에서 75%의 빈도로 관찰되었다.
4. Shifted bands는 15예 중 3예에서 관찰되었는데 *SCLC8*에서 26.3%, *SCLC6*에서 5.3%, *SCLC14*에서 5.3% 의 altered loci가 관찰되었다.
5. Shifted bands는 검사한 총 285 loci 중 2.5%인 7 loci에서 관찰되었다.

이상의 결과는 염색체 5번의 장완에 원발성 소세포암 일부에서 종양의 발생 및 진행에 관여하는 최소 5개의 종양억제유전자좌가 존재할

것으로 생각되며, 향후 특이 유전자를 찾기 위한 추가적인 노력이 있어야 할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Harwood J, Tachibana A, Meuth M. Multiple dispersed spontaneous mutations: a novel pathway of mutation in a malignant human cell line. *Mol Cell Biol* 1991;11:3163-70.
2. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature (Lond)* 1993;363:558-61.
3. Merlo A, Mabry M, Gabrielson E, Vollmer R, Baylin SB, Sidransky D. Frequent microsatellite instability in primary small cell lung cancer. *Cancer Res* 1994;54:2098-101.
4. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61 :759-67.
5. Knudson AG. Hereditary cancer, oncogenes, and anti-oncogenes. *Cancer Res* 1985;45:1437-43.
6. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993;9:138-41.
7. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971;68:820-3.

8. Ittman MM, Wiczorek R. Alterations in the Rb gene in clinically localized, stage B prostate adenocarcinomas. *Hum Pathol* 1996;27:28-34.
9. Shimizu T, Sekiya T. Loss of heterozygosity at 9p21 loci and mutations of the MTS1/p16 and MTS2 genes in human lung cancers. *Int J Cancer* 1996;63:515-20.
10. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1997. *CA Cancer J Clin* 1997;47:5-27.
11. Kawanishi M, Kohno T, Otsuka T, Adachi J, Sone S, Noguchi M, et al. Allelotype and replication error phenotype of small cell lung carcinoma. *Carcinogen* 1997;18:2057-62.
12. Minna JD, Sekido Y, Fong KM, Gazdar AF. *Cancer Principles & Practice of Oncology*, 5th ed. Vol. 1. In : Devita Jr VT, Hallman S, Rosenberg SA, editors. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p. 849-57.
13. Petersen I, Langreck H, Wolf G, Schwendel A, Psille R, Vogt P, et al. Small-cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3p, 4q, 5q, 10q, 13q and 17p. *Br J Cancer* 1997;75:79-86.
14. Kim SK, Ro JY, Kemp BL, Lee JS, Kwon TJ, Fong KM, et al. Identification of three distinct tumor suppressor loci on the short arm of chromosome 9 in small cell lung cancer. *Cancer Res* 1997;57:400-3.
15. Kim SK, Ro JY, Kemp BL, Lee JS, Kwon TJ, Hong WK, et al. Identification of two distinct tumor-suppressor loci on the long arm of chromosome 10 in small cell lung cancer. *Oncogene* 1998;17:1749-53.

16. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991;253:661-5.
17. Cottrell S, Bicknell D, Kaklamanis L, Bodmer WF. Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *Lancet* 1992;340:626-30.
18. Horii A, Nakatsuru S, Miyoshi Y, Ichii S, Nagase H, Ando H, et al. Frequent somatic mutations of the *APC* gene in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 1992;52:6696-8.
19. Uzawa K, Yoshida H, Suzuki H, Tanzawa H, Shimazaki J, Seino S, et al. Abnormalities of the adenomatous polyposis coli gene in human oral squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* 1994;58:814-7.
20. Horii A, Nakatsuru S, Miyoshi Y, Ichii S, Nagase H, Kato Y, et al. The *APC* gene, responsible for familial adenomatous polyposis, is mutated in human gastric cancer. *Cancer Res* 1992;52:3231-3.
21. Boynton RF, Blount PL, Yin J, Brown VL, Huang Y, Tong Y, et al. Loss of heterozygosity involving the *APC* and *MCC* genetic loci occurs in the majority of human esophageal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3385-8.
22. Huang Y, Boynton RF, Blount PL, Silvestein RJ, Yin J, Tong Y, et al. Loss of heterozygosity involves multiple tumor suppressor genes in human esophageal cancers. *Cancer Res* 1992;52:6525-30.
23. Hosoe S, Ueno K, Shigedo Y, Tachibana I, Osaki T, Kumagai T, et al. A frequent deletion of chromosome 5q21 in advanced small cell and non-small

- cell carcinoma of the lung. *Cancer Res* 1994;54:1787-90.
24. Wieland I, Bohm M. Frequent allelic deletion at a novel locus on chromosome 5 in human lung cancer. *Cancer Res* 1994;54:1772-4.
 25. Mao L, Lee JS, Fan YH, Ro JY, Batsakis JG, Lippman S, et al. Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. *Nature Med* 1996;2:682-5.
 26. Harbour JW, Sali S-L, Whang-Peng J, Gazdar AF, Minna JD, Kaye FJ. Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science (Washington DC)* 1988;241:353-7.
 27. Takahashi T, Nau M, Chiba I, Birrer M, Rosenberg R, Vinocour M, et al. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science (Washington DC)* 1989;246:491-4.
 28. D'Amico D, Carbone DP, Johnson BE, Meltzer SJ, Minna JD. Polymorphic sites within the MCC and APC loci reveal very frequent loss of heterozygosity in human small cell lung cancer. *Cancer Res* 1992;52:1996-9.
 29. Tamura G, Ogasawara S, Nishizuka S, Sakata K, Maesawa C, Suzuki Y, et al. Two distinct regions of deletion on the long arm of chromosome 5 in differentiated adenocarcinomas of the stomach. *Cancer Res* 1996;56:612-5.
 30. Wu X, Ivanova G, Merup M, Jansson M, Stellan B, Grander D, et al. Molecular analysis of the human chromosome 5q13.3 region on patients with hairy cell leukemia and identification of tumor suppressor gene candidates. *Genomics* 1999;60:161-71.

31. Van den Berghe H, Vermaelen K, Mecucci C, Barbieri D, Tricot G. The 5q-anomaly. *Cancer Genet Cytogenet* 1985;17:189-255.
32. Castro PD, Fairman J, Nagarajan L. The unexplored 5q13 locus: A role in hematopoietic malignancies. *Leuk Lymphoma* 1998;30:443-8.
33. Fairman J, Wang RY, Liang H, Zhao L, Saltman D, Liang JC, et al. Translocations and deletions of 5q31.1 in myelodysplasia and acute myelogenous leukemia: Evidence for a novel critical locus. *Blood* 1996;88:2259-66.
34. Tavassoli M, Steingrimsdottir H, Pierce E, Jiang X, Alagoz M, Farzaneh F, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 5q in ovarian cancer is frequently accompanied by TP53 mutation and identifies a tumour suppressor gene locus at 5q13.1-21. *Br J Cancer* 1996;74:115-9.
35. Ding SF, Habib NA, Dooley J, Wood C, Bowles L, Delhanty JD. Loss of constitutional heterozygosity on chromosome 5q in hepatocellular carcinoma without cirrhosis. *Br J Cancer* 1991;64:1083-7.
36. Al-Jehani RMA, Povey S, Delhanty JDA, Parrington JM. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;13:249-56.
37. Murty VV, Reuter VE, Bosl GJ, Chaganti RS. Deletion mapping identifies loss of heterozygosity at 5p15.1-15.2, 5q11 and 5q34-35 in human male germ cell tumors. *Oncogene* 1996;12:2719-23.
38. Peng HQ, Liu L, Goss PE, Bailey D, Hogg D. Chromosomal deletions occur in restricted regions of 5q in testicular germ cell cancer. *Oncogene*

- 1999;18:3277-83.
39. Dolan K, Garde J, Gosney J, Sissons M, Wright T, Kingsnorth AN, et al. Allelotype analysis of oesophageal adenocarcinoma: loss of heterozygosity occurs at multiple sites. *Br J Cancer* 1998;78:950-7.
 40. Ogasawara S, Maesawa C, Tamura G, Satodate R. Lack of mutations of the adenomatous polyposis coli gene in oesophageal and gastric carcinomas. *Virchows Arch* 1994;424:607-11.
 41. Powell SM, Papadopoulos N, Kinzler KW, Smolinski KN, Meltzer SJ. *APC* gene mutations in the mutation cluster region are rare in esophageal cancers. *Gastroenterology* 1994;107:1759-63.
 42. Willman CL, Sever CE, Pallavicini MG, Harada H, Tanaka N, Slovak ML, et al. Deletion of *IRF-1*, mapping to chromosome 5q31.1 in human leukemia and preleukemic myelodysplasia. *Science (Washington DC)* 1993;259:968-71.
 43. Ogasawara S, Tamura G, Maesawa C, Suzuki Y, Ishida K, Satoh N, et al. Common deleted region on the long arm of chromosome 5 in esophageal carcinoma. *Gastroenterology* 1996;110:52-7.
 44. Harada H, Kitagawa M, Tanaka N, Yamamoto H, Harada K, Ishihara M, et al. Anti-oncogenic and oncogenic potentials of interferon regulatory factors-1 and -2. *Science* 1993;259:971-4.
 45. Peralta RC, Casson AG, Wang RN, Keshavjee S, Redston M, Bapat D. Distinct regions of frequent loss of heterozygosity of chromosome 5p and 5q in human esophageal cancer. *Int J Cancer* 1998;78:600-5.

46. Nozawa H, Oda E, Ueda S, Tamura G, Maesawa C, Muto T, et al. Functionally inactivating point mutation in the tumor-suppressor IRF-1 gene identified in human gastric cancer. *Int J Cancer* 1998;77:522-7.
47. Godley LA, Lai F, Liu J, Zhao N, Le Beau MM. *TTID*: a novel gene at 5q31 encoding a protein with titin-like features. *Genomics* 1999;60:226-33.

Abstract

Identification of tumor suppressor loci on the long arm of chromosome 5 in primary small cell lung cancers

Eun Song Cho

Division of Medical Sciences

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Associate Professor Se Kyu Kim)

Recent cytogenetic studies indicated that loss of the long arm of chromosome 5 is a frequent event in small cell lung cancer (SCLC), which suggests the presence of a tumor suppressor gene there. To map precise tumor-suppressor loci on the chromosome arm for further positional cloning efforts, we tested 15 primary SCLCs using microsatellite analysis.

By analyzing 19 polymorphic microsatellite markers located in the long arm of chromosome 5, we found that ten (66.7%) of 15 tumors exhibited LOH in at least one of tested microsatellite markers. Two (13%) of 10 tumors exhibiting LOH lost a larger area in chromosome 5q. LOH was observed in five common deleted regions at 5q. Among

those areas, LOH between 5q34-qter and 5q35.2-35.3 was most frequent (75%). LOH was also observed in more than 50% of the tumors at four other regions, between 5q14-15 and 5q23-31, 5q31.1, 5q31.3-33.3, and 5q34-35. Three of 15 tumors exhibited shifted bands in at least one of the tested microsatellite markers. Shifted bands occurred in 2.5% (7 of 285) of the loci tested.

Our data demonstrated that at least five tumor-suppressor loci exist in the long arm of chromosome 5 and that they may play an important role in small cell lung cancer tumorigenesis.

Key Words: small cell lung cancer, LOH, microsatellite marker