

구강 편평세포암종에서 TGF- β 1
type II 수용체의 돌연변이

연세대학교 대학원

치 의 학 과

배 경 진

구강 편평세포암종에서 TGF- β 1
type II 수용체의 돌연변이

지도 김 진 교수

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

배 경 진

배경진의 치의학박사 학위논문을 인준함

심사위원	_____	인
심사위원	_____	인
심사위원	_____	인
심사위원	_____	인
심사위원	_____	인

연세대학교 대학원

2002년 6월 일

감사의 글

저의 삶을 인도하시고 어려울 때 위로해 주시며, 늘 함께 하시는 하나님께 감사를 드립니다. 박사 과정 3년 동안 부족한 저를 지도해 주시고 본 논문의 시작부터 마지막까지 많은 가르침과 질책으로 이끌어 주신 김 진 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 바쁘신 중에도 논문에 깊은 관심과 조언을 아끼지 않으신 이의웅 교수님과 박광균 교수님, 서울대학교 임창운 교수님께 감사를 드립니다. 아울러, 본 논문에 관심을 가지고 논문의 세세한 부분까지 교정해주신 조선대학교 윤정훈 교수님께도 감사의 말씀을 올립니다.

지난 1년 반 동안 이번 실험의 손, 발이 되주신 김은정 선생님, 자신의 논문을 쓰듯 걱정하며 실험과 원고교정에 최선을 다해주신 최정희 선생님께 감사의 마음을 전합니다. 또한, 실험에 많은 도움을 주신 구강 병리학교실 모든 선생님들께 감사의 뜻을 전하고 싶습니다. 논문기간 동안 병원에서 저를 걱정해 주시고 진료를 도와주신 황문종 선생님과 지난 5년간의 대학원 생활동안 환자관리에 남다른 노력을 아끼지 않은 김미영 실장님 그리고 홍영민 실장님, 이혜림, 표진영, 이미정 간호사께도 감사를 드립니다.

지금까지 저를 키워 주시고 공부에 전념할 수 있도록 후원해 주신 부모님의 은혜에 감사드리며, 병상에 계신 아버님께 이 논문을 올립니다. 항상 힘이 되어 준 사랑하는 아내 부영과 두 딸 윤비, 규리에게 고마움을 전합니다. 끝으로 부족한 저를 이끌어주신 하나님의 은혜에 감사드립니다.

2002년 6월 배경진 올림

목 차

감사의 글	
Tables & Figures	
국문요약	
I. 서론	1
II. 연구 재료 및 방법	4
가. 연구 재료	4
나. 연구 방법	5
(1) DNA 추출	5
(2) TGF- β 1 type II 수용체 중합효소 연쇄반응	5
(3) 클로닝 및 염기서열 분석	7
(4) mRNA 추출 및 역전사-중합효소 연쇄반응	7
(5) 면역조직화학 염색 및 관찰	8
(6) MTT assay	8
III. 연구 결과	9
(1) TGF- β 1 type II 수용체 유전자의 돌연변이 분석	9
(2) TGF- β 1 type II 수용체의 mRNA 발현	13
(3) 면역조직화학 염색 소견	14
(4) TGF- β 1에 의한 세포성장 억제효과	15
IV. 총괄 및 고찰	16
V. 결론	21
참고문헌	23
영문요약	29

Tables and Figures

Table 1. Pathologic characteristics of oral squamous carcinoma cell lines	4
Table 2. Sequences of primers for PCR of TGF- β 1 type II receptor	6
Table 3. Mutational analysis of TGF- β 1 type II receptor	12
Figure 1 : Structure of TGF- β 1 type II receptor gene	6
Figure 2 : Sequence analysis of TGF- β 1 type II receptor gene in oral squamous cell carcinoma	10
Figure 3 : RT-PCR products of TGF- β 1 type II receptor	13
Figure 4 : Immunohistochemical findings of TGF- β 1 type II receptor in oral squamous cell carcinoma	14
Figure 5 : Growth inhibition effect of TGF- β 1 in oral squamous cell carcinoma	15

국문 요약

구강 편평세포암종에서 TGF- β 1 type II 수용체의 돌연변이

상피세포는 상피성장인자와 억제인자의 균형에 의해 항상성이 유지되며, 따라서 인체에 발생하는 상피 암종의 발생기전은 상피세포 성장인자와 억제인자의 불균형에 따른 결과로 설명되고 있다. TGF- β 1은 상피세포의 성장을 억제하는 인자로서 여러 암종에서 TGF- β 1 수용체의 발현감소 및 TGF- β 1 type II 수용체 유전자의 돌연변이가 알려져 있다. 그러나, 암종 발생부위와 유형에 따라 유전자 돌연변이와 발현정도는 매우 다양하다. 이에 저자는 구강 편평세포암종에서 TGF- β 1 수용체의 발현 및 TGF- β 1 type II 수용체 유전자의 돌연변이 여부를 알아보려고 하였다. 연구 재료로는 연세대학교 치과대학 구강병리학교실에서 확립한 6 예의 구강 편평세포암종 세포주를 이용하였다. 연구 방법으로는 돌연변이를 관찰하기 위하여 phenol-chloroform 방법에 의해 DNA를 추출하여 수용체 유전자의 exon 3, 4, 5, 6에 대해 중합효소 연쇄반응을 시행하였고, 반응산물을 클로닝 벡터(pGEM-T easy vector)에 삽입하여 자동화된 DNA 염기서열 분석기로 분석하였다. TGF- β 1 type II 수용체의 mRNA 발현을 알아보려고 역전사-중합효소 연쇄반응을 시행하였으며, TGF- β 1 type II 수용체의 단백질 발현을 알아보기 위하여 면역조직화학 검사를 시행하였다. 또한, MTT 검사로 구강 편평세포암종 세포주에서 TGF- β 1의 세포성장 억제효과를 조사하였다.

이 연구의 결과는 다음과 같다.

1. YD-8 세포주에서 TGF- β 1 type II 수용체 유전자의 세포외 영역 (extracellular domain)의 exon 3, codon 125 부위에서 한 개의 adenine이

탈락한 frameshift를 관찰하였다.

2. YD-17 세포주에서 type II 수용체 유전자의 세포내 영역(intracellular domain)의 exon 4, codon 238 부위에서 아미노산 asparagine이 aspartic acid(A:T→G:C)로 바뀐 missense 변이를 관찰하였다.
3. YD-10B 세포주의 exon 4의 codon 168, 206 및 YD-17M 세포주의 exon 6, codon 475 부위에서 silent 변이를 관찰하였다.
4. 모든 세포주의 exon 5, codon 439 부위에서 아미노산 변화(Ala→Val)를 관찰하였다.
5. 역전사-중합효소연쇄반응 결과 모든 세포주에서 TGF-β1 type II 수용체의 mRNA가 다소 감소되는 발현상을 보였다.
6. 번역조직화학 염색에서 TGF-β1 type II 수용체 단백질이 모든 세포주의 생검조직 표본에서 발현되었다.
7. MTT 검사 결과 YD-8과 YD-17M 세포주를 제외한 4 예의 세포주에서 TGF-β1의 세포증식 억제효과의 감소상을 관찰하였다.

이상의 연구 결과 6 예의 구강 편평세포암종 세포주에서 2 예의 돌연변이가 관찰되었고, mRNA 발현이 감소하였다. 따라서 TGF-β1 type II 수용체의 변화를 구강 편평세포암종 발생과정에서 확인하였지만, TGF-β1 type II 수용체의 유전자 돌연변이의 역할 규명이 필요할 것으로 생각한다.

핵심되는 말: 구강 편평세포암종, TGF- β 1 type II 수용체의 발현, TGF- β 1
type II 수용체 유전자의 돌연변이

구강 편평세포암종에서 TGF- β 1 type II 수용체의 돌연변이

연세대학교 대학원 치의학과

(지도 김 진 교수)

배 경 진

I. 서론

구강암은 전체 암종의 3~5% 정도로, 이중 편평세포암종이 약 90%를 차지하고 전세계적으로 매년 40만명이 발병하고 있다(1). 구강점막의 편평세포암종 발생은 발암물질에 노출된 부위에 유전적인 손상이 지속적으로 축적되어 암세포로의 전환이 일어나며, 정상조직으로부터 세포의 증식을 거쳐 이형성이 진행되면서 상피내암을 거쳐 침윤성 성장에 이르는 다단계 과정을 거치게 된다(2,3).

구강점막을 구성하는 중층편평상피는 외부 자극으로 탈락되며 기저층에서 지속적인 세포분열을 하여 각화세포로의 분화를 반복하는 조직으로서, 세포의 성장과 분화를 조절하는 인자들, 즉 상피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF)와 그 수용체, 억제인자(transforming growth factor, TGF- β)와 그 수용체 등에 의해 항상성이 유지된다. 따라서 상피세포 성장인자와 억제인자간의 불균형은 편평세포암종을 일으키는데 관여할 것으로 생각한다(4,5).

상피세포의 성장을 억제하는 인자인 TGF- β 는 112개의 아미노산으로 구성된 2개의 동일한 사슬로 이루어져 있고, 사람의 혈소판과 태반, 소의 신장에서 처음

추출되었다(6). TGF- β 는 β 1부터 β 5까지 알려져 있으며, TGF- β 1이 가장 먼저 분리되었고, 포유류에서는 TGF- β 1, β 2, β 3의 세가지 유형이 존재한다(7-10). TGF- β 는 상피세포에서는 성장을 억제하는 효과를 보이며, 결합조직에서는 증식을 촉진하는 이중적 성질을 가진다. 또한, TGF- β 는 교원질 합성을 조절하고, 발생기 때는 척추, 팔, 다리, 치아, 안면골, 심장판막 등의 개조에 관여하며, 단백질 용해 효소의 기능을 억제함으로써 새로운 육아조직 형성을 촉진하여 상처치유를 돕는다(6,11). 이들 TGF- β 가 조절하는 과정들이 비정상적으로 활성화되거나 억제되면 암을 포함한 여러 질환들이 유발될 수 있다(4,12).

TGF- β 의 수용체에는 type I, type II, type III(betaglycan), type IV, type V 등이 있다(7,13). Type I, type II, type III, type V 수용체는 대부분의 세포에서 동시에 발현되며, type IV는 단지 뇌하수체 세포에서만 보인다(14). TGF- β 1 type II 수용체(ligand binding receptor)는 serine/threonine kinase를 갖는 75-85kDa의 막단백질로서 TGF- β 와 직접 결합하며, 신호서열(signal sequence), 9개의 cysteine이 존재하는 136개의 아미노산으로 이루어진 세포외 영역, 단일막 영역, 376개의 아미노산으로 이루어진 kinase 활성을 갖는 길다란 세포내 영역 등 총 365개의 아미노산으로 이루어지며, 스스로 인산화된다(13). 세포내 영역은 주로 kinase 영역으로 이루어지며, 2개의 짧은 insert를 가진다. Insert 1은 codon 366에서 374부위로서 kinase의 catalytic center에 근접해 있으며, 별다른 역할을 하지 않는 것으로 밝혀졌고, insert 2 부위는 codon 490에서 508에 위치하며, kinase 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 즉, 인산화가 일어나는 부위로서 type I 수용체와의 신호전달 기능을 담당하는 것으로 알려져 있다(15,16).

TGF- β 1 type I 수용체(signaling receptor)는 50-60kDa으로 501개의 아미노산으로 구성되며, TGF- β 1 type II 수용체와는 다르게 리간드와 직접 결합하지 못한다. Type I 수용체는 TGF- β 가 TGF- β 1 type II 수용체에 결합된 후 이것들과 복합체를 형성하여 인산화되고 세포안으로 신호를 전달하게 된다(7,9,13,17-19). 활성화된 TGF- β 1 type I 수용체의 kinase 영역은 Smad라고 부

르는 세포내 신호전달 매개물질을 인산화시키는데, 먼저 Smad2와 Smad3가 인산화되고 Smad4가 함께 결합되서 Smad 복합체를 형성하고 핵으로 이동한다 (20-22). 핵안에서 Smad 복합체는 DNA에 결합하여 특정 유전자의 전사를 돕는다 (23).

구강을 포함하는 두경부에 발생하는 편평세포암종의 발생 과정은 정상 조직에서 전암 병소 단계를 거쳐 침윤성 암종으로 진행되는 과정에서 상피세포 성장수용체(epidermal growth factor receptor, EGFR)의 발현이 점진적으로 증가하는 것이 알려져 있으며, 특히 암 발생의 위험이 없는 조직과는 달리 암종 주위의 정상 조직에서도 높은 빈도로 과발현되어 발암과정에 중요한 역할을 하는 것으로 이해되고 있다(4,14). 그러나, 구강 편평세포암종의 경우에는 TGF- β 1 수용체의 발현 및 TGF- β 1 type II 수용체 유전자의 돌연변이에 관한 연구가 거의 없는 실정이다. 또한, 한국인의 구강 편평세포암종의 발생과정은 지역 및 인종 차이로 서구인과 다르다. 이에 저자는 한국인의 구강 편평세포암종에서 TGF- β 1 수용체의 발현 및 TGF- β 1 type II 수용체 유전자의 돌연변이를 규명하고자 구강 편평세포암종 세포주를 대상으로 TGF- β 1 type II 수용체의 유전자 돌연변이와 mRNA 발현상을 관찰하였으며, 암세포주의 TGF- β 1에 의한 세포성장 억제효과를 조사하였다.

II. 연구 재료 및 방법

가. 연구 재료

이 연구는 연세대학교 치과대학 구강병리학교실에서 구강 편평세포암종 환자로 부터 확립한 6 예의 구강 암종 세포주를 대상으로 하였다. 확립된 구강 암종 세포주의 병리학적 특징은 Table 1에 정리하였다.

Table 1. Pathologic characteristics of oral squamous carcinoma cell lines

Cell line	Age/ Sex	Primary Site	Histologic finding			p53 mutation codon (exon)
			Differentiation/	Inflammation/	Desmoplasia	
YD-8	46/F	Tongue	Moderately	Yes	Yes	273 (exon8) Arg→His
YD-9	56/M	Buccal Cheek	Moderately	Yes	No	No
YD-10B	67/M	Tongue	Moderately	Yes	Yes	236 (exon7) Tyr→Stop
YD-17	66/M	Mandible	Poorly	Focal	Yes	No
YD-17M		Lymph Node	Poorly	No	No	No
YD-38	67/F	Mandible	Moderately	Focal	Yes	No

나. 연구 방법

(1) DNA 추출

확립된 구강 암종 세포주로부터 phenol-chloroform 방법으로 DNA를 추출하였다. 이를 요약하면 다음과 같다. 약 1×10^6 의 세포를 trypsin으로 처리한 후 원심분리하여 미세 원심관에 모은 후 $400\mu\text{l}$ 의 효소완충용액(100mM Tris-HCl, pH 8.3, 5mM EDTA, 1% SDS, $100\mu\text{l}/\text{ml}$ proteinase K)을 첨가하고 37°C 에서 흔들면서 24시간 동안 그대로 두었다. DNA의 추출을 위해 $200\mu\text{l}$ 의 phenol:chloroform: isoamylalcohol(25:24:1)을 첨가하여 흔든 후 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 취하는 과정을 2회 반복하였다. 용액 안에 남아있는 phenol을 제거하기 위해 $400\mu\text{l}$ 의 chloroform-isoamylalcohol(24:1)을 넣고 흔든 후 5분간 13,000 rpm에서 회전시켜 상층액을 취하고 $40\mu\text{l}$ 3M sodium acetate와 1ml의 차가운 100% 에틸알콜을 첨가하여 70% 에틸알콜로 2회 세척한 후 건조하여 $50\sim 100\mu\text{l}$ 의 효소완충용액에 녹인 후, 4°C 에서 보관하고 자외선 흡광 분석기로 DNA양을 측정하였다.

(2) TGF- β 1 type II 수용체 중합효소 연쇄반응

구강 암종 세포주로부터 분리한 DNA를 주형으로 하여 TGF- β 1 type II 수용체 유전자의 poly-adenine 부위와 serine/threonine kinase의 영역(exon 3-6)을 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 시행하였다 (Fig 1). 암세포주 각각의 DNA 절편 50ng을 사용하여 PCR mixture(Bioneer, Korea)로 반응시켰다. Exon 3-6 중합효소 연쇄반응은 94°C 에서 5분간 둔 후, 변성반응을 94°C 에서 1분, 결합반응은 각각 50°C , 58°C , 55°C , 58°C 에서 중합반응은 72°C 에서 1분간 40주기를 반복하고, 마지막 중합반응은 10분간 연장하여 반응시키고 4°C 에서 반응을 중지시켰다. 사용한 primer는 Table 2와 같다(24). 중합효소 연쇄반응의 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하고, ethidium bromide로 염색하고 자외선을 조사하여 확인하였다.

Fig. 1 Structure of TGF- β 1 type II receptor gene

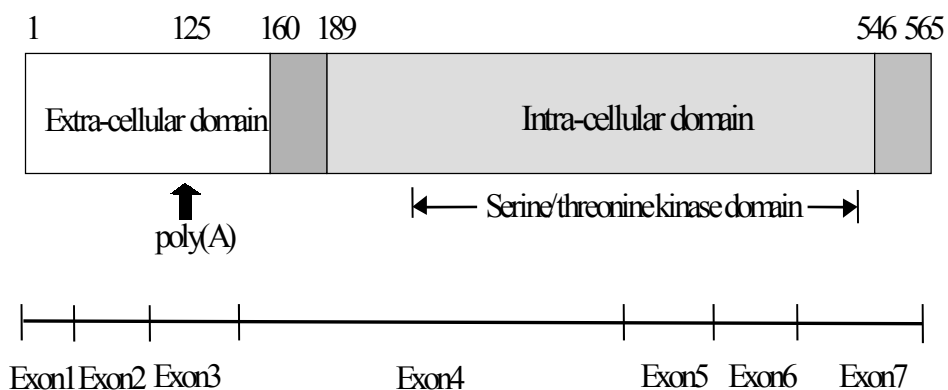


Table 2. Sequences of primers for PCR of TGF- β 1 type II receptor

Primer Name	Sequence (5'→ 3')	PCR product (bp)
Exon 3-1	TCCAATGAATCTCTTCACTC	241
Exon 3-2	CCCACACCCCTTAAGAGAAGA	
Exon 4-1	CCAACTCCTTCTCTCCTTGTTTTG	445
Exon 4-2	TCCAAGAGGCATACTCCTCATAGG	
Exon 5-1	GGCAGCTGGAATTAAATGATGGGC	261
Exon 5-2	TGCTCGAAGCAACACATG	
Exon 6-1	TTTCCTTTGGGCTGCACATG	242
Exon 6-2	CCTAAGAGGCAACTTGGTTGAATC	

(3) 클로닝 및 염기서열 분석

TGF- β 1 type II 수용체의 serine/threonine kinase 영역을 포함한 exon 3-6의 중합효소 연쇄반응 산물은 1% agarose gel에서 전기영동 하였고, 확인된 DNA는 gel extraction kit(Promega, USA)를 이용하여 정제하여, pGEM-T easy vector system(Promega, USA)을 사용하여 모두 클로닝 하였다. 정제된 중합효소 연쇄반응 산물은 pGEM T easy vector에 ligation 시킨 뒤, ligation mixture는 competent DH5 *a E. Coli* strain에 transformation 시키고, 50 μ g/ml ampicillin과 X-gal/IPTG를 포함한 배지에서 하루동안 배양한 후, 균집을 골라내 plasmid DNA를 QIAGEN plasmid mini prep kit(QIAGEN, Germany)를 사용하여 분리하고, 흡광도를 측정하여 농도를 결정하였다. pGEM T easy 벡터에 클로닝된 TGF- β 1 type II 수용체의 serine/threonine kinase 영역을 포함한 exon 3-6의 DNA는 pGEM T easy vector의 T7, Sp6 primer를 사용하여 자동화된 염기서열 분석기(API PRISM[®] 3700 DNA Analyzer, Applied Bio systems, USA)로 분석하였다.

(4) mRNA 추출과 역전사-중합효소 연쇄반응(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)

구강 암종 세포주로부터 RNeasyTM kit(QIAGEN, Germany)를 이용하여, 총 RNA를 추출한 후, 자외선 분광기(UV spectrophotometer)를 이용하여 260nm에서 흡광도를 측정하였다. cDNA 합성을 위하여 0.5 μ g 의 RNA를 reverse transcriptase(Boehringer Mannheim, Germany)와 oligod(T) primer를 이용하여 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시키고 4 $^{\circ}$ C에서 반응을 중지시켰다. 합성된 cDNA를 대상으로 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)와 TGF- β type II 수용체 exon 6 primer로 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 중합효소 연쇄반응은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 둔 후, 변성반응을 94. C에서 1분, 결합반응을 58 $^{\circ}$ C에서 1분 중합 반응은 72. C에서 1분간 35주기를 반복하고 마지막 중합반응은 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 연장하여 반응시켰다. 역전사-중합효소 연쇄반응 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하였다. 전기영동한 gel은 영상 분석기(Densitometer,

TINA 2.0)를 이용하여 정량하였고, 각 유전자의 발현은 GAPDH 유전자의 발현을 기준으로 계산하였다.

(5) 면역조직화학 염색 및 관찰

구강 암종 세포주를 확립하였던 환자의 생검 조직으로부터 박절 표본을 xylen 용액에서 30분간 파라핀을 제거하고 95%, 90%, 70% 에틸알콜과 증류수에 순차적으로 함수하였다. 3% H₂O₂로 20분간 endogenous peroxidase를 제거한 후, 0.1% trypsin으로 효소 처리하여 항원 부위를 노출시키고, goat serum에 30분간 반응시켰다. 일차 항체로는 토끼의 혈청에서 추출한 복합 클론 항체인 T β R-II antibody(clone C-16, Santa Cruz Co, USA)를 avidin-biotin 방법으로 면역조직화학 염색을 하였다. 각 단계마다 phosphate buffered saline(PBS)으로 씻어냈고, DAB(3, 3'-diaminobenzidine)로 발색한 다음 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하고 광학 현미경으로 관찰하였다. 음성 대조군으로는 일차 항체 대신 PBS를 반응시켰으며, 6 예의 정상 구강점막 상피를 함께 염색하여 비교 관찰하였다.

(6) MTT assay

6 예의 구강 암종 세포주의 TGF- β 1에 의한 세포성장 억제효과를 관찰하기 위해 각각의 구강 암종 세포를 96well plate에 200 μ l당 3 X 10³의 세포를 뿌리고 24시간동안 배양한 후, TGF- β 1 단백질(R&D system)을 0, 0.5, 1, 5, 10ng/ml의 다양한 농도로 처리하여 37 $^{\circ}$ C에서 24시간동안 반응시킨 후 PBS로 잘 씻어주고 다시 48시간동안 배양하여 세포성장 억제효과를 N-methylthiotetrazole (MTT, Sigma, USA) 검사로 측정하였다. MTT 검사는 각 세포주에 MTT 용액을 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 처리한 후, 배양액을 버리고 DMSO(Dimethyl sulfoxide)로 녹여내어 580nm에서 흡광도를 측정하였다. 정상 구강점막 상피도 같은 조건으로 배양한 후 MTT 검사를 시행하였다.

Ⅲ. 연구 결과

(1) TGF-β1 type II 수용체 유전자의 돌연변이 분석

YD-8 세포주에서는 세포의 영역에 해당하는 exon 3의 codon 125(subdomain V, codon 103-126)에서 한 개의 adenine이 탈락되는 frameshift를 관찰하였다.

YD-17 세포주에서는 exon 4의 codon 238(subdomain VI)에서 아미노산 asparagine이 aspartic acid(A:T→G:C)로 바뀌는 missense 변이를 관찰하였다.

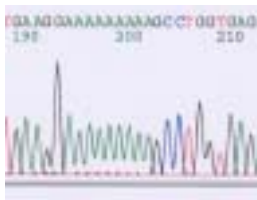
YD-10B 세포주에서는 exon 4의 codon 168(subdomain VI)에서 아미노산 threonine에는 변화가 없이 base(T:A→G:C)가 바뀌는 transversion silent 변이를 관찰하였다. 또한, YD-10B 세포주 exon 4의 codon 206(subdomain VI)에서도 아미노산 threonine에 변화가 없이 base(G:C→A:T)가 바뀌는 silent 변이를 관찰하였다. YD-17M 세포주에서도 exon 6의 codon 475(subdomain X, codon 450-500)에서 아미노산 glycine에 변화가 없이 base(T:A→C:G)가 바뀌는 silent 변이를 관찰하였다(Fig. 2, Table 2).

모든 세포주(YD-8, YD-9, YD-10B, YD-17, YD-17M, YD-38)에서 TGF-β1 type II 수용체 exon 5의 codon 439(subdomain IX, codon 425-450) 부위에서 아미노산 alanine이 valine(C:G→T:A)으로 바뀌는 변화를 관찰하였다.

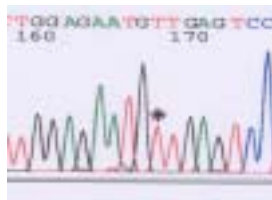
Fig 2. Sequence analysis of TGF- β 1 type II receptor gene in oral squamous cell carcinoma

YD-8

A10 \rightarrow A9 (exon 3)

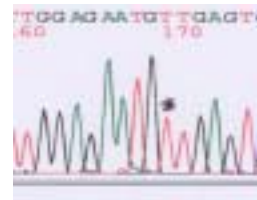


GCT \rightarrow GTT (exon 5)



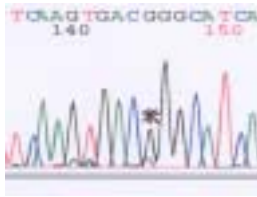
YD-9

GCT \rightarrow GTT (exon 5)

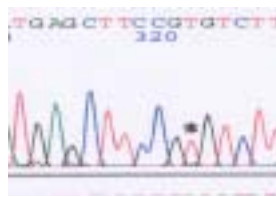


YD-10B

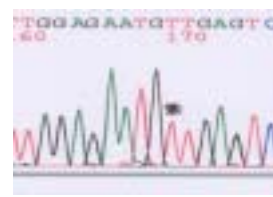
ACT \rightarrow ACG (exon 4)



ACG \rightarrow ACA (exon 4)

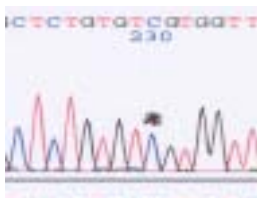


GCT \rightarrow GTT (exon5)

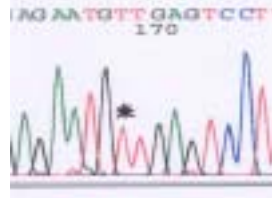


YD-17

AAC \rightarrow GAC (exon 4)

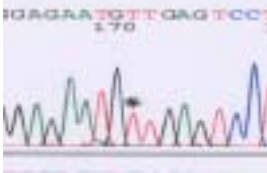


GCT \rightarrow GTT(exon 5)

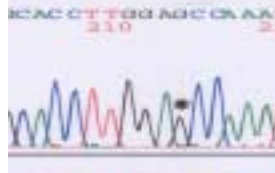


YD-17M

GCT → GTT (exon 5)



GGT → GGC (exon 6)



YD-38

GCT → GTT (exon 5)

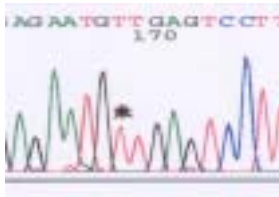


Table 3. Mutational analysis of TGF- β 1 type II receptor

Cell line	Exons	codon	Base change or Deletion	Amino acid change
YD-8	3	125	"GAA \rightarrow G-A	
	5	439	§G <u>C</u> T \rightarrow GTT	Ala \rightarrow Val
YD-9	5	439	§GCT \rightarrow GTT	Ala \rightarrow Val
YD-10B	4	168	#ACT \rightarrow ACG	Thr \rightarrow Thr
	4	206	#ACG \rightarrow ACA	Thr \rightarrow Thr
	5	439	§GCT \rightarrow GTT	Ala \rightarrow Val
YD-17	4	238	*AAC \rightarrow GAC	Asn \rightarrow Asp
	5	439	§GCT \rightarrow GTT	Ala \rightarrow Val
YD-17M	5	439	§GCT \rightarrow GTT	Ala \rightarrow Val
	6	475	#GGT \rightarrow GGC	Gly \rightarrow Gly
YD-38	5	439	§GCT \rightarrow GTT	Ala \rightarrow Val

" : frameshift mutation

* : missense mutation

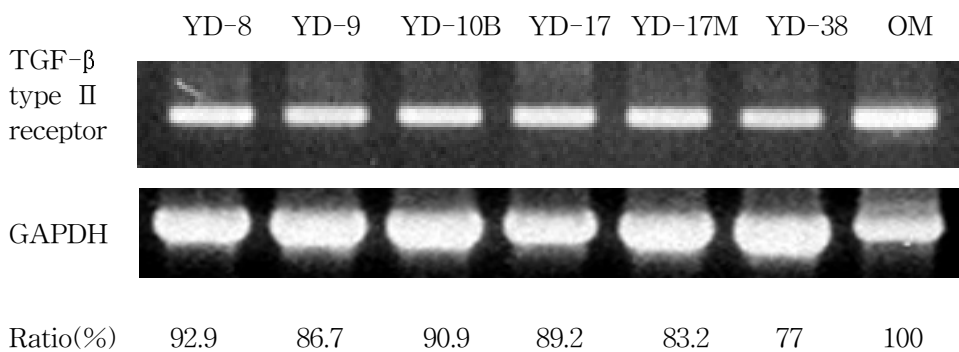
: silent mutation

§ : polymorphism

(2) TGF- β 1 type II 수용체의 mRNA 발현

구강 암종 세포주에서 TGF- β 1 type II 수용체의 mRNA의 발현을 알아보기 위해, 대조 유전자로 GAPDH와 TGF- β 1 type II 수용체의 exon 6 primer를 이용하여 그 발현정도를 관찰한 결과, 모든 세포주에서 mRNA 발현을 관찰할 수 있었다. 그러나, 정상 구강점막 세포와 비교할 때, TGF- β type II 수용체 mRNA의 발현이 다소 감소된 경향을 보였으며, 특히 YD-38 세포주에서는 그 발현이 77%로 뚜렷이 감소된 것을 확인할 수 있었다(Fig 3).

Fig 3. RT-PCR products of TGF- β 1 type II receptor



(3) 면역조직화학 염색 소견

구강 암종 세포주에서 TGF- β 1 type II 수용체의 단백질 발현을 알아보기 위해, 구강 암종 세포주 고유의 생검조직에서 면역조직화학염색을 시행하였다. 그 결과, 6 예의 구강 편평세포암종 세포 모두에서 세포질에 발현되는 것을 관찰하였다. 정상 구강상피에도 전층에서 TGF- β 1 type II 수용체가 발현되었으며, 정상 구강점막 조직과 비교하여 발현의 차이를 볼 수 없었다(Fig 4).

Fig 4. Immunohistochemical findings of TGF- β 1 type II receptor in oral squamous cell carcinoma

Normal oral mucosa

negative control

T β R- II



YD-10B

negative control

T β R- II



YD-17

negative control

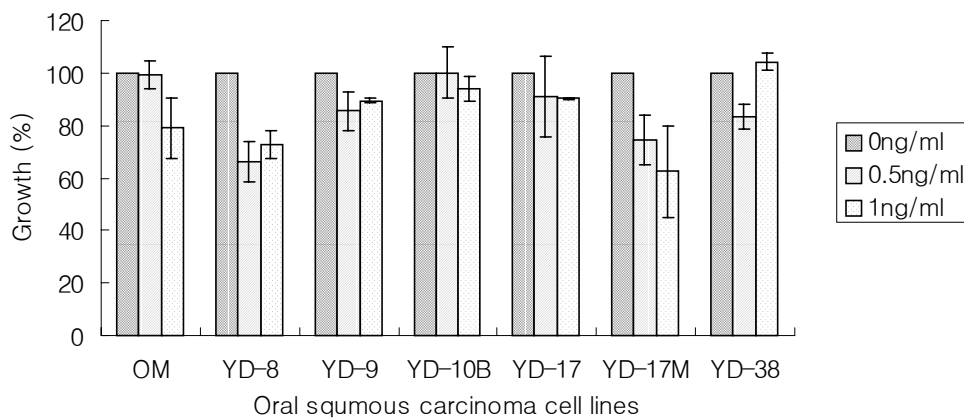
T β R- II



(4) TGF-β1에 의한 세포성장 억제효과

구강 암종 세포주의 TGF-β1에 의한 세포성장 억제효과를 관찰하기 위해, 정상 구강점막 상피세포와 6 예의 구강 암종 세포주를 대상으로 MTT assay를 시행하였다. TGF-β1 단백질을 0, 0.5, 1, 5, 10 ng/ml의 다양한 농도로 구강 암종 세포주에 대해 투여하여 MTT 검사를 시행한 결과, TGF-β1 1 ng/ml 이상의 농도에서는 세포성장 억제정도의 차이를 볼 수 없었다. 따라서, TGF-β1 0, 0.5, 1 ng/ml을 대상으로 정상 구강점막 상피와 구강 암종 세포주에서 MTT 검사를 3회 시행하였다(Fig. 5). 그 결과, 정상 구강점막 상피세포에서는 TGF-β1 1 ng/ml에서 22%의 성장억제 효과를 보인 반면, 4 예(YD-9, YD-10B, YD-17, YD-38)의 구강 암종 세포주에서는 TGF-β1의 세포성장 억제효과가 1 ng/ml을 처리하였을 때 각각 11%, 6%, 10%, 0% 감소율을 보였으며, 2 예(YD-8, YD-17M)의 구강 암종 세포주에서는 정상 구강점막 상피세포와 유사하게 각각 28%와 38%의 세포성장 억제효과를 나타내었다.

Fig. 5 Growth inhibition effect of TGF-β1 in oral squamous cell carcinoma



IV. 총괄 및 고찰

TGF- β 는 세포주기 중 G1 phase에서 Rb(retinoblastoma protein)가 과인산화되는 것을 방지하여 세포성장 억제효과를 나타낸다. 즉, G1 phase에서 TGF- β 는 c-myc 발현을 억제하거나(25), cyclin E의 발현을 억제하게 된다(8). Cyclin E가 발현된 경우에도 활성화된 cyclin-cdk 복합체의 형성을 방해하여, Rb의 과인산화를 억제함으로써 G1 phase에서 S phase로의 진행을 막아서 세포성장 억제효과를 나타내게 된다(26).

TGF- β 1의 세포성장 억제효과에 대한 저항력이 인체 암 발생의 원인으로 알려져 있으며, 이러한 저항력을 얻게 되는 기전의 하나로 TGF- β 1 type II 수용체 유전자의 돌연변이가 다양한 암종 세포주에서 알려져 있다(7,27-34). Nakashima 등은 식도암(6/32)에서 이 유전자의 돌연변이를 보고하였고(35), Park 등은 위암세포주의 50%(4/8)에서 TGF- β 1 type II 수용체 유전자의 탈락과 증폭을 보고하여, 발암과정에서 중요한 기전으로 작용할 것으로 제시한 바 있다(36). 또한, Myeroff 등도 위암 세포주의 21%(6/29)에서, Parsons 등은 대장암 세포주의 90%(100/111)에서 TGF- β 1 type II 수용체의 poly adenine tract의 돌연변이를 관찰하였다(37, 38). 위장관계의 암종과는 달리 두경부 암종에서는 TGF- β 1 type II 수용체 유전자 변이는 연구가 미미하여 결론적이지는 못하지만 그 발현율이 낮다. Wang 등은 두경부 편평세포암종의 22%(6/28)에서 TGF- β 1 type II 수용체의 유전자변이가 있음을 확인하고, 돌연변이는 모두 serine/threonine kinase domain에 있었다고 하였다(39). Garrigue-Antar 등은 두경부 편평세포암종 세포주의 25%(2/8)에서 TGF- β 1 type II 수용체 유전자의 missense 변이를 관찰하였으며, 유전자 돌연변이에 의한 아미노산 변화로 아미노산의 극성변화가 유발되어 단백질의 folding이 영향을 받아서 catalytic 활성이 변함으로써 TGF- β 1 type I 수용체를 인지하는 능력에 장애가 생겨서 세포내 신호전달체계에 이상이 생겼을 것으로 추정하였다(15).

이와 같이 TGF- β 1 type II 수용체 유전자의 돌연변이에 관해 여러 암종을 대상으로 활발한 연구가 진행 중에 있으나, 구강 편평세포암종에서 TGF- β 1 type II 수용체 유전자의 돌연변이에 관한 연구는 미약한 실정이다.

Paterson등은 2001년에 구강 편평세포암종 세포주 14 예를 대상으로 한 연구에서 1 예의 세포주에서 1개의 adenine base가 poly A tract(bases 709-718, codons 125-128)에 삽입되는 frameshift 변이를 관찰하고, 돌연변이로 인해서 TGF- β 1 type II 수용체가 잘려짐으로써 serine/threonine kinase domain(codon 246에서 544)을 갖지 못했을 것으로 추정하였다(1). 이 연구에서도 YD-8 세포주에서 exon 3의 세포외 영역에 해당하는 codon 125(subdomain V, codon 103-126)에서 한 개의 adenine이 탈락되는 frameshift 변이를 관찰할 수 있었다. 그러나, 이 연구에서는 YD-38 세포주에도 TGF- β 1 type II 수용체의 mRNA 및 단백질이 발현된 점으로 볼 때, frameshift 변이로 인해 TGF- β 1 type II 수용체가 잘려진 것으로 추정하는 데에는 어려움이 있을 것으로 생각한다.

Garrigue-Antar등은 두경부 편평세포암종에서 25%(2/8)의 missense 변이 발생을 보고하였으며(15), Wang등도 두경부 편평세포암종에서 18%(5/28)의 missense 변이 발생을 보고하였다(39). 이 연구에서 나타난 missense 돌연변이는 1 예에서 나타났으며, 17%(1/6)의 발생빈도를 보였다. YD-17 세포주에서는 exon 4의 codon 238(subdomain VI)에서 아미노산 asparagine이 aspartic acid(A:T→G:C)로 바뀌는 missense 변이를 관찰하였다. 이 위치는 serine/threonine kinase domain의 전방 부위이며, 아미노산 asparagine은 pH 6~7 사이에서 물에 잘 녹지 않는 비극성 아미노산이고, aspartic acid는 음전하를 띠는 산성 아미노산이다. 따라서, 관찰된 missense 변이는 비극성에서 극성으로의 아미노산 변화를 유발하여 단백질 구조에 변화를 가져온 것으로 생각한다(15).

이 연구에서는 missense 변이 이외에 silent 돌연변이가 3 예 있었다. 즉, YD-10B 세포주에서 exon 4의 codon 168(subdomain VI)에서 아미노산

(threonine)에는 변화없이 base(T:A→G:C)만 바뀌는 transversion에 의한 silent 변이를 관찰하였다. Transversion에 의한 base 변화는 담배가 원인이 된 구인두암에서 흔히 나타나는 것으로 알려져 있다(15). 또한, YD-10B 세포주 exon 4의 codon 206 및 YD-17M 세포주 exon 6의 codon 475에서도 silent 돌연변이를 관찰하였다.

TGF-β1 type II 수용체 exon 5의 codon 439(subdomain IX, codon 425-450)에서 alanine이 valine(C:G→T:A)으로 바뀌는 변화는 정상 구강점막 상피세포에서도 관찰되는 다형성(polymorphism)으로 암 발생과는 연관이 없는 것으로 밝혀졌으며(1,40), 본 연구에서도 모든 세포주에서 exon 5의 codon 439 부위의 변화를 관찰할 수 있었다.

TGF-β1의 세포성장 억제효과가 소실되는 다른 기전으로 TGF-β1 type I 수용체와 type II 수용체의 발현감소가 알려져 있다. Ito등은 17예 위암 세포주의 82%에서 TGF-β1 type I 수용체의 감소를 확인하였다(41). Rooke등은 만성 골수구성 백혈병에서 TGF-β1 type II 수용체의 발현감소를 관찰하였다(42). Mackay등은 대장암 세포주에서 세포성장 억제효과가 감소된 원인으로 TGF-β1 수용체의 발현부족을 지적하였다(43). Eisma등은 두경부 편평세포암종에서 85%(40/47)의 세포주에서는 TGF-β1 type I 수용체의 발현을 관찰할 수 없었으며, 92%(43/47)의 세포주에서는 TGF-β1 type II 수용체의 발현을 관찰할 수 없어, 두경부 편평세포암종의 발암과정에 TGF-β1 수용체의 발현감소가 영향을 주었을 것으로 추측하였다(44). Muro-Cacho등도 두경부 편평세포암종에서 암종이 진행되면서 TGF-β1 type II 수용체의 발현감소를(45), Garrigue-Antar등도 식도암 세포주의 29%(6/21)에서 TGF-β1 type II 수용체의 발현감소를 관찰하였다(46).

이 연구에서는 TGF-β1 type II 수용체의 mRNA 발현을 알아보기 위하여 역전사-중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 그 결과 모든 구강 편평세포암종 세포주에

서 TGF- β 1 type II 수용체의 발현을 관찰할 수 있었으나, GAPDH 유전자의 발현을 기준으로 보았을 때 다소 감소된 경향을 보였으며, 특히 YD-38 세포주에서는 mRNA 발현이 77%로 감소된 경향을 보였다. 그러나, 면역조직화학 염색으로 TGF- β 1 type II 수용체의 단백질 발현을 검사한 결과 모든 세포주에서 단백질 발현을 관찰할 수 있었다. 따라서, TGF- β 1 type II 수용체의 발현과 구강 편평 세포암종의 발생과정의 연관성을 알아보기 위하여는 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

TGF- β 1에 의한 세포성장 억제효과를 알아보기 위하여 TGF- β 1 단백질을 0, 0.5, 1 ng/ml로 투여한 후 정상 구강점막 상피세포와 구강 암종 세포주를 대상으로 MTT 검사를 시행하였다. 그 결과 정상 구강점막 상피세포에서는 1 ng/ml 농도에서 22 %의 세포성장이 억제되었으며, 4 예(YD-9, YD-10B, YD-17, YD-38)의 구강 암종 세포주는 TGF- β 1의 세포성장 억제효과가 감소되었다. 그러나, 2 예(YD-8, YD-17M)의 구강 암종 세포 주에서는 정상 구강점막 상피세포와 유사한 세포성장 억제효과를 볼 수 있었다. TGF- β 1 처리후 나타난 세포성장 억제효과의 차이는 세포주의 조직학적 분화정도나 염증유무, *p53* 변이와 연관성을 보이지 않았다. 또한, 원발부위에서 확립한 YD-17 세포주와 전이된 부위에서 확립한 YD-17M 세포주의 돌연변이와 성장억제 효과가 다르게 나타난 것은 원발부위로 부터의 전이가 초기단계에 일어남으로서 독립적으로 돌연변이가 진행되었을 것으로 추측할 수 있다.

이 연구에서는 나타난 TGF- β 1 type II 수용체 돌연변이와 성장억제 효과의 결과는 연관성을 찾을 수 없었다. TGF- β 1이 세포주기의 G1 phase 후기에 작용하는 점을 볼 때(26), 이러한 결과는 세포 대부분의 분획(fraction)이 G1 phase를 넘어 선 단계에 있다는 점을 시사한다고 생각된다. Geng등의 연구에 의하면 TGF- β 1이 G1 phase의 후기, 적어도 S phase가 시작되기 3시간 이전에는 투여하여야 세포성장 억제효과가 확인된다고 하였다(8). 또한, Paterson 등의 연구에 의하면 TGF- β 1에 의한 세포성장 억제 효과는 TGF- β 1 수용체의 돌연변이에

의존하기보다는 TGF- β 1의 type I 과 type II 수용체의 발현정도에 따른 상호작용과 밀접한 연관이 있다고 하였다(1). 따라서 이 연구에서 관찰한 TGF- β 1 type II 수용체의 돌연 변이 및 mRNA 발현이 암 발생과정에 미치는 영향을 분석하기 위해서는 세포주기에 대한 검토와 TGF- β 에 의한 신호전달과정의 Smads 돌연변이 및 type I,II 수용체 발현에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각한다.

V. 결 론

이 연구는 6 예의 구강 편평세포암종 세포주를 대상으로 TGF- β 1 type II 수용체의 유전자변이를 알아보기 위해 DNA 염기서열 분석을 하였다. TGF- β 1 type II 수용체의 mRNA 발현을 알아보고자 역전사-중합효소 연쇄반응을 시행하였으며, TGF- β 1 type II 수용체의 단백질 발현을 알아보기 위하여 면역조직화학 염색을 시행하였다. 또한, MTT 검사로 구강 편평세포암종 세포주에서 TGF- β 1의 세포성장 억제효과를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. YD-8 세포주에서 TGF- β 1 type II 수용체 유전자의 extracellular domain의 exon 3, codon 125 부위에서 한 개의 adenine이 탈락한 frameshift를 관찰하였다.
2. YD-17 세포주에서 type II 수용체 유전자의 세포내 영역의 exon 4, codon 238 부위에서 아미노산 asparagine이 aspartic acid(A:T→G:C)로 바뀌는 missense 변이를 관찰하였다.
3. YD-10B 세포주의 exon 4의 codon 168, 206 및 YD-17M 세포주의 exon 6, codon 475 부위에서 silent 변이를 관찰하였다.
4. 모든 세포주의 exon 5, codon 439 부위에서 아미노산 변화(Ala→Val)를 관찰하였다.
5. 역전사-중합효소 연쇄반응 결과 모든 세포주에서 TGF- β 1 type II 수용체의 mRNA가 다소 감소된 발현상을 보였다.
6. 면역조직화학 염색에서 TGF- β 1 type II 수용체 단백질이 모든 세포주의 생

검조직 표본에서 발현되었다.

7. MTT 검사 결과 YD-8과 YD-17M 세포주를 제외한 4 예의 세포주에서 TGF- β 1의 세포증식 억제효과의 감소상을 관찰하였다.

이상의 연구 결과 6 예의 구강 편평세포암종 세포주에서 2 예의 돌연변이가 관찰되었고, mRNA 발현이 감소하였다. 따라서 TGF- β 1 type II 수용체의 변화를 구강 편평세포암종 발생과정에서 확인하였지만, TGF- β 1 type II 수용체의 유전자 돌연변이의 역할 규명이 필요할 것으로 생각한다.

참고 문헌

1. Paterson IC, Matthews JB, Huntley S, Robinson CM, Fahey M, Parkinson EK and Prime SS: Decreased expression of TGF- β cell surface receptors during progression of human oral squamous cell carcinoma. *J Pathol*, 193: 458-467, 2001.
2. Slaughter DP, Southwick HW, and Smejkal W: "field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. *Cancer*, 963-968, 1953.
3. Farber E: The Multistep Nature of Cancer Development. *Cancer Res*, 44: 4217-4223, 1984.
4. Sporn MB & Roberts AB: Autocrine growth factors and cancer. *Nature*, 313, 28: 745-747, 1985
5. Shirasuna K, Hayashido Y, Sugiyama M, Yoshioka H, and Matsuya T: Immunohistochemical localization of epidermal growth factor(EGF) and EGF receptor in human oral mucosa and its malignancy. *Virch Arch Path Anat*, 418: 349-353, 1991.
6. Sporn MB, Roberts AB: Transforming Growth Factor- β , Multiple Actions and Potential Clinical Applications. *J Am Med Assoc*, 262: 938-941, 1989.
7. Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang X and Massague J: TGF β Signals through a Heteromeric Protein Kinase Receptor Complex. *Cell*, 71: 1003-1014, 1992.
8. Geng Y and Weinberg RA: Transforming growth factor β effects on expression of G₁ cyclins and cyclin-dependent protein kinases. *Proc Natl Acad Sci*, 90: 10315-10319, 1993.
9. Massague J: Receptors for the TGF- β Family. *Cell*, 69: 1067-1070, 1992.

10. Alexandrow MG and Moses HL: Transforming Growth Factor β and Cell Cycle Regulation. *Cancer Res*, 1452-1457, 1995.
11. Ignatz RA and Massague J: Transforming Growth Factor- β Stimulates the Expression of Fibronectin and Collagen and Their Incorporation into the Extracellular Matirx. *J Biol Chem*, 261: 4377-4345, 1986.
12. Brattain MG, Markowitz SD, Willson JKV: The type II transforming growth factor- β receptor as a tumor-suppressor gene. *Cur Opin Oncol*, 8: 49-53, 1996.
13. Rich JN, Borton AJ, Wang X: Transforming Growth Factor- β Signaling in Cancer. *Mic Res and Tech*, 52: 363-373, 2001.
14. 김태연, 육종인, 김진: 구강점막의 백반증과 편평상피세포암종에서 Epidermal Growth Factor Receptor 및 Transforming Growth Factor- β 1 수용체의 발현. *대한 구강병리학회지*, 31: 1247-1255, 1997.
15. Garrigue-Antar L, Munoz-Antonia T, Antonia SJ, Gesmonde J, Vellucci VF and Reiss M: Missense Mutations of the Transforming Growth Factor β Type II Receptor in Human Head and Neck Squamous Carcinoma Cells. *Cancer Res*, 55: 3982-3987, 1995.
16. Wieser R, Attisano L, Wrana JL and Massague J: Signaling Activity of Transforming Growth Factor β Type II Receptors Lacking Specific Domains in the Cytoplasmic Region. *Mol Cell Biol*, 13: 7239-7247, 1993.
17. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F & Massague J: Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature*, 370: 341-347, 1994.
18. Hu PP, Datto MB and Wang X: Molecular Mechanisms of Transforming Growth Factor- β Signaling. *Endocrine Rev*, 19(3): 349-363, 1998.
19. Wakefield LM and Roberts AB: TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Gen & Dev*, 12: 22-29, 2002.
20. Attisano L and Wrana JL: Mads and Smads in TGF β

- signalling. *Cur Opin Cell Biol*, 10: 188-194, 1998.
21. Souchelnytskyi S, Tamaki K, Engatrom U, Wernstedt C, Dijke P and Heldin C: Phosphorylation of Ser⁴⁶⁵ and Ser⁴⁶⁷ in the C Terminus of Smad2 Mediates Interaction with Smad4 and Is Required for Transforming Growth Factor- β Signaling. *J Biol Chem*, 272: 28107-28115, 1997.
 22. Abdollah S, Macias-Silva M, Tsukazaki T, Hayashi H, Attiano L and Wrana JL: T β R I Phosphorylation of Smad2 on Ser⁴⁶⁵ and Ser⁴⁶⁷ Is Required for Smad2-Smad4 Complex Formation and Signaling. *J Biol Chem*, 272: 27678-27685, 1997.
 23. Fink SP, Swinler SE, Lutterbaugh JD, Massague J, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B, Willson JKV and Markowitz S: Transforming Growth Factor- β -induced Growth Inhibition in a Smad4 Mutant Colon Adenoma Cell Line. *Cancer Res*, 61: 256-260, 2001.
 24. Wang D, Kanuma T, Mizunuma H, Takama F, Ibuki Y, Wake N, Mogi A, Shitara Y and Takenoshita SE: Analysis of specific gene mutations in the Transforming Growth factor- β signal transduction pathway in human ovarian cancer. *Cancer Res*, 60: 4507-4512, 2000.
 25. Laiho M, DeCaprio JA, Ludlow JW, Livingston DM and Massague J: Growth inhibition by TGF- β Linked to Suppression of Rstinoblastoma Protein Phosporylation. *Cell*, 62: 175-185, 1990.
 26. Koff A, Ohtsuki M, Polyak K, Roberts JM, Massague J: Negative Regulation of G1 in Mammalian Cells: Inhibition of Cyclin E-Dependent Kinase by TGF- β . *Science*, 260: 536-539, 1993.
 27. Munoz-Antonia T, Li X, Reiss M, Jackson R and Antonia S: A Mutation in the Transforming Growth Factor Type II Receptor Gene Promoter Associated with Loss of Gene Expression, *Cancer Res*, 56: 4831-4835, 1996.
 28. Maestro R, Gasparotto D, Vukosavljevic T, Barzan L, Sulfaro S and Boiocchi M: Three Discrete Regions of Deletion at 3p in Head and Neck

- Cancers. *Cancer Res*, 53: 5775-5779, 1993.
29. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, Brattain M, Willson JKV Inactivation of the Type II TGF- β Receptor in Colon Cancer Cells with Microsatellite Instability. *Science* 268: 1336-1338, 1995.
 30. Grady WM, Myeroff LL, Swinler SE, Rajput A, Thiagalingam S, Lutterbaugh JD, Neumann A, Brattain MG, Chang J, Kim SJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Willson JKV and Markowitz S: Mutational Inactivation of Transforming Growth Factor β Receptor Type II in Microsatellite Stable Colon Cancers. *Cancer Res*, 59: 320-324, 1999.
 31. Wang J, Sun L, Myeroff L, Wang X, Gentry LE, Yang J, Liang J, Zborowska E, Markowitz S, Willson JKV and Brattain MG: Demonstration That Mutation of the Type II Transforming Growth Factor β Receptor Inactivates Its Tumor Suppressor Activity in Replication Error-positive Colon Carcinoma Cells. *J Biol Chem*, 270: 22044-22049, 1995.
 32. 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*, 363: 558-561, 1993.
 33. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D: Microsatellite Instability in Cancer of the Proximal Colon. *Science*, 260: 816-819, 1993.
 34. Furuta K, Misao S, Takahashi K, Tagaya T, Fukuzawa Y, Ishikawa T, Yoshioka K and Kakumu S: Gene Mutation of transforming growth factor β 1 type II receptor in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 81: 851-853, 1993.
 35. Nakashima H, Mori M, Mimori K, Inoue H, Shibuta K, Baba K, Mafune K and Akiyoshi T: Microsatellite Instability In Japanese Esophageal Carcinoma, *Int J Cancer*, 64: 286-289, 1995.
 36. Park K, Kim SJ, Bang YJ, Park JG, Kim NK, Roberts AB and Sporn MB:

- Genetic changes in the transforming growth factor β (TGF- β) type II receptor gene in human gastric cancer cells: Correlation with sensitivity to growth inhibition by TGF- β . *Proc Natl Acad Sci*, 91: 8772-8776, 1994.
37. Myeroff LL, Parsons R, Kim SJ, Hedrick L, Cho KR, Kim Orth, Mathis M, Kinzler KW, Lutterbaugh J, Park K, Bang YJ, Lee HY, Park JG, Lynch HT, Roberts AB, Vogelstein B and Markowitz SD: A Transforming Growth Factor β Type II Receptor Gene Mutation Common in Colon and Gastric but Rare in Endometrial Cancers with Microsatellite Instability. *Cancer Res*, 55: 5545-5547, 1995.
 38. Parsons R, Myeroff LL, Liu B, Willson JKV, Markowitz SD, Kinzler KW and Vogelstein B: Microsatellite Instability and Mutations of the Transforming Growth Factor β Type II Receptor Gene in Colorectal Cancer. *Cancer Res*, 55: 5548-5550, 1995.
 39. Wang D, Song H, Evans JA, Lang JC, Schuller DE and Weghorst CM: Mutation and downregulation of the transforming growth factor β type II receptor gene in primary squamous cell carcinomas of the head and neck. *Carcinogenesis*, 18: 2285-2290, 1997.
 40. Garrigue-Antar L, Malabika D, Vellucci VF, et al.: The role of transforming growth factor- β receptors in cancer of the upper aero-digestive tract. In *Head and Neck Cancer-Advances in Basic Research*, Werner JA, Lippert BM, Rudent HH(eds). Elsevier Science: Amsterdam: 235-252, 1996.
 41. Ito M, Yasui W, Nakayama H, Yokozaki H, Ito H and Tahara E: Reduced Levels of Transforming Growth Factor-beta Type I Receptor in Human Gastric Carcinomas. *Jpn J Cancer Res*, 83: 86-92, 1992.
 42. Rooke HM, Vitas MR, Crosier PS and Crosier KE: The TGF- β type II receptor in chronic myeloid leukemia: analysis of microsatellite regions and gene expression. *Leukemia*, 13: 535-541, 1999.

43. MacKay SLD, Yaswen LR, Tarnuzzer RW, Modawer LL, Bland KI, Copeland III EM and Schultz GS: Colon Cancer Cells That Are Not Growth inhibited by TGF- β Lack Functional Type I and II TGF- β Receptors. *Ann Surg*, 221: 767-777, 1995.
44. Eisma RJ, Spiro JD, Biberstein SE, Lindquist R, Kreutzer DL Decreased Expression of Transforming Growth Factor Beta Receptors on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Tumor Cells. *Am J Surg*, 101: 641-645, 1996.
45. Muro-Cacho CA, Anderson M, Cordero J and Munoz-Antonia T: Expression of Transforming Growth Factor β Type II Receptors In Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*, 5: 1243-1248, 1999.
46. Garrigue-Antar L, Souza RF, Vellucci VF, Meltzer SJ, Reiss M: Loss of Transforming Growth Factor- β Type II Receptor Gene Expression in Primary Human Esophageal Cancer. *Lab Invest*, 75: 263-272, 1996.

ABSTRACT

Mutation of the TGF- β 1 type II receptor in oral squamous cell carcinoma

KYUNG JIN BAE

Department of Dental Science, Graduate school, Yonsei university

(Directed by Prof. Jin Kim D.D.S., Ph. D.)

It is well known that the imbalance between epithelial cell growth and inhibitory factors may cause human epithelial cancer. The dysregulation of growth inhibitory effect of TGF- β 1 has been recognized in a variety of carcinomas. This study aimed to investigate the role of TGF- β 1 in the carcinogenesis of oral squamous cell carcinoma(OSCC). 6 cell lines established from OSCC in the department of Oral Pathology, Yonsei University College of Dentistry were used. DNA was extracted from harvested cells by phenol-chloroform method. Polymerase chain reaction (PCR) was done with each primer of exon 3, 4, 5, 6 of T β R-II (TGF- β 1 type II receptor) gene. PCR products were inserted to cloning vector (pGEM-T easy vector) and then analyzed to automatic DNA sequencing analyzer. Reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) was performed to confirm the mRNA expression of T β R-II gene. Immunohistochemical staining was performed to detect the expression of the T

β R-II protein. MTT assay was performed to examine the growth inhibitory effect of TGF- β 1 in OSCC cell lines.

The results were as follows :

1. A frameshift within a polyadenine region of exon 3 was found in YD-8 cell line.
2. In YD-17 cell line, a missense mutation at codon 238 of exon 4 was found, suggesting the alteration of amino acid from asparagine to aspartic acid.
3. YD-10B showed the silent mutation of codon 168 and 206 of exon 4. YD-17M also showed a silent mutation at codon 475 of exon 6.
4. All 6 cell lines showed the mutation of codon 439 of exon 5, which is disclosed as genetic polymorphism.
5. T β R-II mRNA was detected in all cancer cell lines, but it was slightly decreased as compared to that of normal oral mucosal cells.
6. In immunohistochemical staining, T β R-II protein was expressed positively in all squamous cell carcinomas.
7. The growth inhibitory effect of TGF- β 1 was reduced in 4 cell lines(YD-9, YD-10B, YD-17, YD-38) by MTT assay, when compared to that of normal oral mucosal cell.

From these results, the genetic mutations of TGF- β 1 type II receptor gene

were found in two cell lines and mRNA expression was slightly decreased. This study suggested that the altered regulation of TGF- β 1 function might play a role in the development of OSCC.

Key words: oral squamous cell carcinomas, TGF- β 1, TGF- β 1 type II receptor gene's mutation