

구강 전암 병소에서 암발생 예측을
위한 P53과 P63의 발현 분석

연세대학교 대학위

치 의 학 과

황 진 하

구강 전암 병소에서 암발생 예측을
위한 P53과 P63의 발현 분석

지도 김 진 교수

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학위

치 의 학 과

황 진 하

황진하의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2002년 6월 일

감사의 글

이 논문을 완성하기까지 도와주신 많은 분들께 마음 깊이 감사를 드립니다.

항상 끊임없는 지도와 자상한 배려를 아끼지 않으신 김 진 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 또한 각별한 격려와 조언으로 도와주신 차인호 교수님과 윤정훈 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

아울러 이 연구에 많은 도움을 주신 구강병리학 교실원 여러분께 감사를 드리며, 오늘이 있기까지 격려와 힘이 되어 주신 부모님과 장인, 장모님께 감사를 드리며, 힘든 상황에서도 묵묵히 돌봐준 사랑하는 아내와 두 아들들에게 기쁨과 감사를 보냅니다.

2002년 6월

황 진 하

목 차

그림 및 표 목차	ii
국문요약	iii
제1장 서론	1
제2장 연구대상 및 방법	4
1. 연구 대상	4
2. 연구 방법	4
1) 임상기록 검토	4
2) 병리 조직학적 관찰	4
3) p53과 p63의 면역 조직화학적 염색	5
제3장 연구 결과	7
1. 임상 소견	7
1) 연령 및 성별 분포	7
2) 발생 부위별 분포	7
3) 추적 관찰 기간	7
2. 조직학적 소견	8
3. p53과 p63의 면역 조직화학적 염색 결과	8
제4장 총괄 및 고찰	13
제5장 결론	18
그림	19
참고문헌	23
영문요약	30

그림 및 표 목차

Fig.1. H-E stain in oral leukoplakia	20
Fig.2. p53 expression in oral leukoplakia	21
Fig.3. p63 expression in oral leukoplakia	22
Table 1. Leukoplakia without malignant transformation	10
Table 2. Leukoplakia with malignant transformation	11
Table 3. Leukoplakia according to epithelial dysplasia	11
Table 4. p53 expression according to epithelial dysplasia	12
Table 5. p63 expression according to epithelial dysplasia	12

국문 요약

구강 점막의 전암병소는 악성으로 이행 가능성이 높은 병소를 의미하며, 백반증은 가장 대표적인 전암병소로 침윤성 암종으로 진행할 수 있다. 상피의 이형성 정도에 따라 5%에서 43%까지 암종으로 진행하며 50%이상은 자연적으로 소실되거나 악성 이행을 일으키지 않는다. 이러한 악성 이행의 위험성을 예측할 수 있는 인자로는 상피 이형성이 가장 신뢰할 만 하지만, 이형성의 경우 판단이 주관적이며 등급 결정에 명백한 기준이 없어 문제가 되고 있어, 생물학적 표지자를 이용하여 종양의 진행 여부를 예측할 수 있다면 객관성과 신뢰도를 높일 수 있다. 이 중 종양 유전자 혹은 종양 억제 유전자를 이용한 지표는 암종의 진행 단계를 분자생물학적 차원에서 분석할 수 있다는 점 때문에 종양 발생 위험도를 예측할 수 있는 표지자로 활용 가능성이 높은 것으로 생각할 수 있다.

이 연구에서는 종양 억제 유전자로서 구강 편평 세포 암종에 가장 높은 변이를 보이는 유전자인 p53과 증식성 기저 세포에서 높게 발현되는 p63의 발현 정도를 분석하여 암 발생 위험도를 예측할 수 있는 지표로서의 가능성을 알아보려고 하였다. 연세대학교 치과대학 구강병리학교실에 의뢰된 생검 표본 중에서 백반증으로 진단 받고 2년 이상 추적 관찰한 환자 28예를 대상으로 하였고 이들 중 암종으로 이행하지 않은 21예와 암종으로 이행한 7예, 대조군으로 정상 치은 조직 6예를 면역조직화학적으로 p53과 p63 발현을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. p53의 경우 정상 조직에서는 발현되지 않았으며, 전체 백반증 조직에서 28예 중 9예(32%)가 양성 반응을 보였고, 악성 이행이 없는 경우는 21

예 중 6예(29%), 악성 이행이 있는 경우는 7예 중 3예(43%)로 나타났다.

2. p63의 경우 전체 백반증 조직에서 28예 중 14예(50%)가 양성 반응을 보였고, 악성 이행이 없는 경우는 21예 중 9예(42%), 악성 이행이 있는 경우 7예 중 5예(71%)가 양성으로 나타나 악성 이행이 있는 경우 발현율이 높게 나타났다.

3. 병리조직학적 분석 결과 상피 이형성이 있는 경우 16예 중 7예(43%)가 악성 이행을 하였고 이 중 경도의 이형성인 경우 12예 중 3예(25%)가 중등도 이상인 경우 모두 악성 이행을 하여 이형성 정도가 암 발생 위험도 예측에 신뢰성이 높았다.

이상의 결과로 p53과 p63의 단백 발현이 전암병소에서 암 발생 위험도를 예측하는 표지자로서의 가능성이 있다고 생각된다. 하지만 암종으로 이행되면서 이형성 정도와 발현율이 비례하지 않았다. 따라서 효과적인 표지자로서의 가능성을 확인하기 위해서는 앞으로 더 많은 증례에 대하여 추적 조사와 관찰이 필요하다고 생각된다.

핵심 되는 말 : p53, p63, 백반증, 악성이행, 생물학적 표지자, 상피 이형성

구강 전암병소에서 암 발생 예측을 위한 p53과 p63 발현 분석

(지도교수 김 진 교수)

연세대학교 대학원 치의학과

황 진 하

제1장 서론

구강 점막의 전암병소는 악성으로 이행 가능성이 높은 병소를 의미하며 임상적으로 흔히 백반증이나 홍반증의 소견을 보인다(1-4). 이 중 백반증은 가장 대표적인 전암병소로 문질러서 벗겨지지 않으며 임상적으로나 조직학적으로 다른 질환으로 분류할 수 없는 구강 점막의 백색 병소로 정의한다(5). 백반증은 침윤성 암종으로 진행할 수 있어 임상적으로 중요한 의미를 갖는데, 상피의 이형성 정도에 따라 5%에서 43%까지 암종으로 진행하며 50%이상은 원인만 제거하면 자연히 소실된다(2). 그러므로 악성 이행의 위험성을 예측 할 수 있다면 위험성이 높은 병소는 근치적으로 절제하고, 위험성이 낮은 병소는 주기적으로 예후를 관찰하여 필요 이상의 치료는 피하면서 전암병소로부터 이행되는 구강암의 발생을 줄일 수 있을 것이다.

악성 이행의 위험성을 예측할 수 있는 인자로는 상피 이형성이 가장 신뢰할 만 하지만(6,7) 이형성의 경우 판단이 주관적이며 등급 결정에 명백한

기준이 없어 문제가 되고 있다(1). 따라서 조직학적 소견이 아닌 생물학적 표지자를 이용하여 악성 종양으로의 진행여부를 예측 할 수 있다면 객관성과 신뢰도를 높일 수 있을 것이다.

생물학적 표지자는 구강암의 발생이 발암 인자의 반복적 노출로 인한 유전자와 형태 변화의 축적으로 일어난다는 다단계 이론을 바탕으로 한 것으로 각 단계를 추정할 수 있는 특이한 생물학적 지표를 추적함으로써 암 이행의 가능성과 정도를 판단할 수 있는 지표를 말한다(8,9). 생물학적 표지자로는 세포의 증식능, 분화 정도, 종양 유전자, 종양 억제 유전자 분석, 성장 인자 및 그 수용체 등을 분석하는 방법이 있다. 이 중 구강암 발생에 관여하는 종양 유전자 혹은 종양 억제 유전자를 이용한 지표는 암으로의 진행 단계를 분자 생물학적 차원에서 분석할 수 있다는 점 때문에 암 발생 위험도를 예측할 수 있는 표지자로 활용 가능성이 높은 것으로 생각할 수 있다.

p53은 염색체 17p13에 위치하며 53kDa의 핵 인단백질(nuclear phosphoprotein)을 생성하는 유전자로(6) 세포 주기의 진행을 정지시키거나 세포사멸을 유발하여 잠재적인 악성 세포의 성장을 억제하는 매우 중요한 종양 억제 유전자로(7) p53 유전자의 돌연변이나 염기소실, 대립 유전자 소실에 의한 불활성화는 여러 종류의 악성 종양과 전암병소의 발암 과정에 관여하는 중요한 변화로 보고되고 있다(10,11). p53유전자의 돌연변이에 의한 발현율은 인체의 종양에서 발생 부위에 따라 35%에서 89%까지 발현을 보이며(12,13,14) 구강 편평 세포 암종 및 구강 전암병소에서도 세포의 이형성 정도에 따라 35%에서 58%까지 발현을 보인다(4,15,16).

최근에 밝혀진 p53 유전자과(family)인 p63은 p53과 구조적 상동성을 갖고 있는데(17,18,19) 과량 생성될 경우 p53에 반응하는 증진자(promotor)에서의 전사(transcription)를 활성화시켜 세포사멸을 유도해 낼 수 있다(20). p63은 p53과는 달리 인체 종양에서 돌연변이가 드물고 일부 조직에 한정되어 있는 특성이 있다(17,20,21,22). 더욱이 p63은 p53과 달리 여러 증진자와 교차분리(alternative splicing)에 의해 다 수의 동형(isoforms)을 갖고 있으며 특히 상피 줄기세포의 재생 능력과 관련되어 상피 세포의 분화와 세포사멸에 작용하고 종양 억제와 발생의 상반된 역할을 하는 것으로 보고되어 있다(23). p63은 피부 상피의 줄기세포 표지자로 알려져 있고 정상적으로 모낭과 기저 세포 층에서 발현되며 증식성 기저 세포에서 높게 발현된다(24). 편평 세포 암종에서 p63에 반응하는 세포의 수와 분포는 암종의 분화되는 정도에 따라 다르게 나타나는데, 고도로 분화된 암종의 경우 p63은 기저 막 주변의 세포 주위에 나타나며 덜 분화된 암종에서는 대부분의 세포가 p63에 양성 반응을 보여 편평 세포 암종의 역형성(anaplasia)의 진단적 표지자로 사용될 수 있다(25).

따라서 이 연구에서는 구강 전암병소 환자를 대상으로 이미 종양으로 진행된 환자와 2년 이상 추적기간 중 병변이 없어지거나 정지되어 있는 예들을 대상으로 종양 억제 유전자로서 구강 편평 세포 암종에 높은 변이를 보이는 유전자인 p53과 증식성 기저 세포에서 높은 발현을 보이는 p63의 발현 정도를 분석하여 암 발생 위험율을 예측할 수 있는 지표로서의 가능성을 알아보고자 한다.

제2장 연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

연세대학교 치과대학 구강병리학교실에 의뢰된 생검 조직 중에서 백반증으로 진단 받고 2년 이상 추적 관찰한 환자 28예를 대상으로 하였다. 이들 중 암종으로 이행이 없는 예가 21예, 암종으로 이행한 예가 7예였으며 대조군으로 정상 치은 조직 6예를 이용하였다.

2. 연구 방법

1) 임상 기록 검토

연구 대상 환자들의 임상 기록과 병리 보고지를 재검토하여 연령, 성별, 발생 부위를 조사하였고 추적 관찰을 위해 문진 혹은 추적 생검을 시행하였다.

2) 병리 조직학적 관찰

생검 조직을 10% 중성 포르말린 용액에 12시간 동안 고정하고 탈수 과정을 거친 뒤 파라핀에 포매하여 블록을 만들었다. 이를 4 μ m로 박절하여 hematoxylin-eosin 염색을 시행한 후 광학 현미경으로 관찰하여 이형성 정도를 평가하였다. 이형성이 기저 층과 기저 상층에만 국한된 경우를 경도,

기저 층에서부터 극세포 층의 중간 부분까지 분포한 경우는 중등도, 기저 층에서부터 상피 층의 중간 이상까지 분포한 경우는 고도로 판정하였다.

3) p53과 p63의 면역 조직화학적 염색

파라핀 블록을 4 μ m으로 박절하여 silane으로 처리된 슬라이드에 부착한 후 xylene으로 10분간 3회씩 탈파라핀 과정을 거친 후, 알코올로 단계적으로 함수과정을 거쳤다(100% 10분간 2회, 90% 3분, 70% 3분). 항원을 노출시키기 위해 citric buffer에 담가 microwave에 30분간 끓인 후, 내인성 과산화 효소의 활성을 억제하기 위하여 3.0% hydrogen peroxide/methanol에 10분간 처리하였다. 증류수와 phosphate buffer saline(PBS, pH.7.6)으로 세척하고, 비특이적 염색을 감소시키기 위하여 30분간 정상 말의 혈청으로 처리하였다.

일차항체인 p53(Novocastra, Newcastle, United Kingdom)과 p63(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) 단일 클론 항체를 각각 1:100, 1:50으로 희석하여 37℃에서 한 시간 반 동안 반응시키고 PBS 용액으로 수세한 뒤 biotin이 부착된 이차항체(Vector, Burlingame, USA)로 실온에서 30분간 반응시키고, PBS로 수세한 뒤 peroxidase가 결합된 horseradish streptavidin 용액(Vector, Burlingame, USA)으로 30분간 반응시켰다. 이 후 PBS로 3회 수세한 뒤 DAB(3,3'-diaminobenzidine) substrate kit(Vector, Burlingame, USA)를 이용하여 발색하였다. 이 후 nuclear fast red로 대조 염색한 후 봉입하였다.

음성 대조군으로는 일차항체 대신 PBS용액을 이용하였고, 양성 대조군

으로는 허의 편평 세포 암종을 이용하였다. 염색의 판정은 광학 현미경상 세포의 핵에 뚜렷이 염색된 경우를 양성으로 하였다.

악성이행과 관련지어 p53과 p63의 발현율을 Fisher's exact test로 검증하였다.

제3장 연구 결과

1. 임상 소견

1) 연령 및 성별 분포

발생 연령은 20대에서 70대까지 분포하였으며, 60대에 가장 많았다. 악성 이행이 없는 환자들의 초진 시 평균 연령은 56.9세였고, 악성 이행이 있는 경우는 63.3세였으며, 모두 50세 이상에 분포하였다.

성비는 악성 이행이 없는 경우가 남자 13예, 여자 8예였으며, 악성 이행이 있는 경우는 남자 4예, 여자 3예였다.

2) 발생 부위별 분포

발생 부위별로는 전체 백반증 28예 중 혀 10예, 협점막 8예, 치은 7예, 구개부 2예, 구강저 1예였으며, 이 들 중 혀 5예, 치은 1예, 구강저 1예에서 악성 이행이 있었다.

3) 추적 관찰 기간

추적 관찰 기간은 악성 이행이 없는 경우 평균 39.6개월로 최소 24개월에서 최대 74개월까지 추적이 가능하였고, 악성 이행이 있는 경우는 초기 생검 에서부터 악성 이행으로 진단 받기까지의 기간이 평균 14.3개월이었으며, 최소 1개월에서 최대 49개월까지 분포하였다(Table 1,2).

2. 조직학적 소견

백반증 28예 중 이형성 없이 과증식(hyperplasia)만 관찰된 경우는 12예였고, 경도의 이형성을 보인 경우는 12예, 중등도 이형성은 3예, 고도 이형성은 1예였다.

경도의 이형성을 보인 경우는 12예 중 3예(25%)가 암종으로 이행하였으며, 중등도 이상의 이형성을 보인 4예는 모두 암종으로 이행하였다.

악성 이행이 없는 경우는 21예 중 9예(43%)가 경도의 이형성을 보인 반면, 악성 이행이 있는 경우는 7예 모두 이형성을 보였는데, 이들 중 3예가 경도, 3예가 중등도, 1예가 고도의 이형성을 보였다.

백반증으로부터 이행된 악성 병소의 조직학적 분화도는 7예 중 미세 침윤이 3예, 중등도 분화도가 3예, 나쁜 분화도가 1예였다(Table 3, Fig.1)

3. p53, p63의 면역조직화학적 염색 결과

p53의 발현은 대조군인 정상 조직에서는 발현되지 않았고 전체 백반증 조직 28예 중 9예(32%)에서 양성 반응을 보였다. 악성 이행이 없는 경우는 21예 중 6예(29%)가 양성이고, 악성 이행이 있는 경우는 7예 중 3예(43%)가 양성으로 나타났으나 두 군 사이에 통계학적 유의성은 없었다 ($p=0.65$). 이 중 한 예는 백반증에서 양성 반응을 보였지만 악성으로 이행한 조직에서는 음성이었다(Table 4, Fig.2).

p63의 발현은 대조군인 정상 조직 6예 중 2예(33%)에서 기저 세포층을

포함한 2-3개 층에서 양성 반응을 나타내었고 전체 백반증 조직 28예 중 14예(50%)에서 양성 반응을 보였다. 악성 이행이 없는 경우는 21예 중 9예(42%)가 양성, 악성 이행이 있는 경우는 7예 중 5예(71%)가 양성으로 나타나 악성 이행이 있는 군에서 높은 발현 빈도를 보였지만 표본 수가 적어 통계적으로 유의성이 없었다($p=0.38$). 이 중 한 예에서 백반증에서는 음성이었지만 악성으로 이행되면서 양성 반응을 보였다(Table 5, Fig.3).

악성으로 이행하지 않은 경우 p53과 p63이 동시에 발현된 경우는 21예 중 2예(9%)이고, p53은 발현되었지만 p63이 발현되지 않은 경우는 4예(19%), p63만 발현된 경우는 7예(33%)였다.

백반증에서 이행된 암종의 경우 p53과 p63이 같이 발현된 경우는 2예(29%)이고 p53은 발현되었지만 p63이 발현되지 않은 경우는 없고, p63만 발현된 경우는 3예(43%)이며 p53과 p63이 동시에 발현되지 않은 경우는 1예(14%)였다.

Table 1. Leukoplakia without malignant transformation

age	sex	site	follow up(Mo)	Dysplasia	p53	p63
53	M	Buccal Mucosa	46	mild	-	+
78	F	Mx. Gingiva	27	mild	+	+
31	F	Mx. Gingiva	47	mild	-	-
65	F	Mn. Gingiva	74	mild	-	-
70	F	Buccal Mucosa	47	mild	-	-
68	M	Tongue	31	mild	+	+
67	M	Buccal Mucosa	24	mild	+	-
60	M	Buccal Mucosa	49	mild	-	+
65	M	Tongue	50	mild	-	-
60	M	Tongue	47	no	+	-
75	M	Tongue	26	no	+	-
48	M	Buccal Mucosa	39	no	-	+
23	M	Mn. Gingiva	34	no	+	-
37	F	Tongue	28	no	-	-
50	F	Buccal Mucosa	30	no	-	+
60	F	Buccal Mucosa	39	no	-	-
48	F	Buccal Mucosa	52	no	-	-
67	M	Mx. Gingiva	35	no	-	+
30	M	Palate	30	no	-	+
75	F	Palate	29	no	-	-
65	M	Mn. Gingiva	47	no	-	+

Mx: maxilla Mn: mandible M: male F: female Mo: month

Table 2. Leukoplakia with malignant transformation

age	sex	site	period(Mo)	LK	CA	p53		p63	
				dysplasia	grade	LK	CA	LK	CA
55	M	Tongue	1	mild	mod-well	+	+	+	+
62	F	Mn. Gingiva	16	mild	mod-well	+	+	+	+
51	M	Tongue	49	mild	mod-well	-	-	+	+
61	M	Tongue	17	mild-mod	micro	+	-	+	+
75	F	Tongue	2	mod	micro	-	-	-	+
64	F	Floor of mouth	14	mod	mod-poor	-	-	+	+
75	M	Tongue	1	mod-sev	micro	-	-	-	-

LK : leukoplakia CA : carcinoma

mod : moderate sev : severe micro : microinvasion

Table 3. Leukoplakia according to epithelial dysplasia

	hyperplasia	Dysplasia		
		mild	moderate	severe
LK without MT	12	9	0	0
LK with MT	0	3	3	1
Total	12	12	3	2

LK : leukoplakia MT : malignant transformation

Table 4. p53 expression according to epithelial dysplasia

	hyperplasia	Dysplasia			total
		mild	moderate	severe	
LK without MT	3/12	3/9	0	0	6/21(29%)
LK with MT	0	2/3	1/3	0/1	3/7(43%)
Total	3/12	5/12	1/3	0/1	9/28(32%)

LK : leukoplakia MT : malignant transformation (p=0.65)

Table 5. p63 expression according to epithelial dysplasia

	hyperplasia	Dysplasia			total
		mild	moderate	severe	
LK without MT	5/12	4/9	0	0	9/21(42%)
LK with MT	0	3/3	2/3	0/1	5/7(71%)
Total	5/12	7/12	2/3	0/1	14/28(50%)

LK : leukoplakia MT : malignant transformation (p=0.38)

제4장 총괄 및 고찰

p53 유전자는 대부분의 사람에서 발생하는 악성 종양에서 흔한 변이를 보이는 종양 억제 유전자이다(26). p53 유전자는 세포 주기 중 G0기에서 G1기로의 이행에 관여한다. 대부분의 정상 세포들은 p53 mRNA의 발현이 낮고 p53 단백질은 거의 검출되지 않으며 p53 mRNA 농도가 높은 정상적으로 분열하는 세포에서도 p53의 짧은 반감기 때문에 거의 검출되지 않는다(27).

대부분의 종양에서 p53 단백질의 기능이 소실되는데 이는 p53 유전자 자체의 돌연변이에 의하며, MDM2나 사람 유두종 바이러스(human papillomavirus E6)에 의해 p53 단백질이 분해되거나 어떤 암 유발성 자극에 대한 반응 능력을 잃어버린 경우이다. 반대로 종양 세포에서 p53의 기능이 회복되면 세포 주기의 진행을 정지시키거나 세포사멸을 유도하게 된다(28). 세포사멸은 세포의 발생, 분화, 성장 및 노화 등 전 과정에 걸쳐 일어나는 정상적인 과정으로 개체를 구성하는 세포들은 생존과 사멸의 균형을 통하여 항상성을 유지한다. 또한 이는 DNA가 손상된 세포, 비정상적인 세포들을 제거하는 과정으로 비정상적인 세포사멸의 조절은 암 발생 단계에서 중요한 역할을 한다(29). 정상형 p53 유전자는 종양 억제 능력을 갖고 있지만, 변형된 세포들이나 세포주나 종양 등에서 p53의 변이가 생기면 종양 유전자로 작용하여 성장 능력의 변화를 초래하는 단백질을 생성하여 결과적으로 악성 종양의 발생을 유도한다(30). 돌연변이형 p53은 구조적으로 안정화되어 침범된 세포 내에 축적되면 면역조직화학 염색으로 검출할 수 있고 이 염색에서 핵의 p53 단백질의 과발현은 반감기가 길어진 돌연변이형 단백질의 축적으로 간주할 수 있다. 그러므로 면역조직화학법으로 p53 단백질

이 검출되는 경우는 돌연변이를 암시한다(31).

p53 유전자의 돌연변이나 염기 소실, 대립 유전자 소실에 의한 정상형의 p53 유전자의 불활성화는 악성 종양과 전암병소에서 발암 과정에 관여하는 중요한 변화로 보고되어 있고(10), p53의 돌연변이는 구강 편평 세포암종에서 뿐만 아니라 구강 전암병소에서 흔히 발생한다(4,32,33).

그러나 p53의 세포내 안정화 기전은 매우 다양하며 정상형의 p53도 다양한 자극에 의해서 안정화 될 수 있어 p53의 검출이 종양을 의미하는 것은 아니다. 특히 자궁 경부 및 구강암의 발생 원인 중 의 하나로 여겨지는 사람 유두종 바이러스는 오히려 p53의 분해를 유발하여 종양을 초래한다(34).

사람의 다양한 종양에서 p53의 면역조직화학적 검출과 예후와의 상관관계를 연구하는 많은 시도들이 있었다. Yook 및 Kim은 p53 유전자의 점 돌연변이가 임상 병기나 발생 부위 등의 임상적 소견과 조직학적 분화도, 염증 세포 침윤 등의 조직학적 소견과는 연관성이 없으며 구강 편평 세포암종에서 p53의 발현율이 35%라고 보고하였고(15), Liu 등은 구강 점막의 전암병소에서 이형성 정도가 심해질수록 p53의 발현이 증가함을 보고하였다(35). 한 등은 타액선 종양에서 p53 단백질의 면역조직화학적 발현이 악성 타액선 종양에서 37%로 나타난다고 보고하였다.(12) 또한 이 등은 폐암에서 87%에서 양성으로(13), Goukon 등은 식도암에서 p53 발현과 종양과의 일치율이 89%라고 보고한 바 있다(14). Shin 등은 정상 조직과 두경부의 편평 세포암종에서 여러 부위를 생검하여 p53의 발현을 비교 조사하였는데 정상 조직에서는 발현되지 않고 종양 주변의 정상 세포에서는 31% 중

6예(19%), 과증식 병소에서 24예 중 7예(29%), 이형성 병소에서 26예 중 12예(46%), 편평 세포 암종에서 48예 중 28예(58%)가 양성으로 발현되어 암종으로 진행함에 따라 p53의 발현이 증가함을 보고하였다(16).

이 연구 결과에서는 p53의 발현은 정상 조직에서는 관찰되지 않았고 전체 백반증 조직에서 발현율은 32%이며 악성으로 이행하지 않은 경우 과증식이 25%, 경도의 이형성의 경우 33%로 나타났다. 악성으로 이행한 경우 경도의 이형성이 있는 경우 75%, 중등도 이상의 경우 발현되지 않은 것으로 나타났으며 암종에서의 발현율은 29%로 나타났다. p53의 발현 정도는 Liu 등의 결과와 마찬가지로 백반증에서 양성으로 나타난 것에 비해 암종의 경우 보다 강한 염색상을 보였다. 이 결과는 정상 조직과 과증식, 이형성에서의 p53 발현의 차이가 표지자로서의 가능성이 있다고 생각되지만 암종으로 이행되면서 이형성 정도와 발현율이 비례하지 않기 때문에 효과적인 표지자로서의 가능성을 확인하기 위해서는 앞으로 더 많은 증례에 대하여 추적 조사와 관찰이 필요하다고 생각된다.

또한 암종으로 이행하면서 백반증에서는 양성으로 나타났지만 암종으로 진행되어 p53이 검출되지 않은 경우가 이 연구에서 1예 있었는데 이는 사람 유두종 바이러스에 의한 종양 발생으로 p53 단백질의 분해가 유발된 경우 또는 p53 단백질이 MDM2에 의해 분해되는 경우로 생각할 수 있다(28).

p63은 p53과 매우 유사한 염기 배열의 상동성을 갖고 있으며(18,19) 염색체 3q27-28에 위치하고 있으며 교차 분리에 의해 다수의 동형이 생기는데 transactivation domain의 유무에 따라 TA와 Δ N형태의 동형으로 나눈다. p63은 특정한 동형이 표현되는 바에 따라 p53과 마찬가지로 종양 억제

유전자로 작용할 수 있고 종양 유발 유전자로 작용할 수도 있다(20).

TA p63과 Δ N p63은 기저 및 기저 상층 세포 내에 같이 존재하며 분화의 항상성 조절에 상호작용을 한다. TA p63은 증식성 기저 세포에서 기저 상층 세포로 분화할 때 positive regulator로 작용하고, Δ N p63은 증식과 분화 사이에서 상호 균형에 기여한다(23).

p63 유전자는 작은 colony-forming cells에서 나타나며, 최종 분화된 세포에서는 나타나지 않는다. 사람의 각화 세포에서는 Δ N p63이 TA p63보다 많이 나타나는데(20), 세포의 크기가 증가하면서 Δ N p63의 전사량은 줄어든다. 따라서 각화 세포의 분화는 Δ N p63의 소실과 연관이 있다고 생각된다(36). p63은 사람의 종양에서 돌연변이는 드물다(37). p63의 DNA 결합 영역에서 배선(germ-line) 돌연변이가 있는 경우는 종양에 의한 것보다는 발생학적 손상이 있는 경우이다. p63의 결손과 관련된 질환으로는 실험 동물과 유사한 표현형을 보이는 손가락 결손증, 외배엽 이형성증 등이 보고된 바 있어 p63의 기본적 역할이 외배엽 발생과 연관성이 있음을 시사한다(38,39,40).

p63은 피부 상피의 줄기세포 표지자로 알려져 있고 정상적으로 모낭과 기저 세포 층에서 발현되며, 많은 상피 조직의 증식성 기저 세포에서 높게 발현된다(24). 피부와 같은 중층 편평 상피로 이루어진 구강 점막 상피의 경우 기저 층에 줄기세포가 존재한다고 믿고 있으며, 줄기세포는 비대칭적 분열을 하여 딸세포는 줄기세포 역할을 지속적으로 수행하고 나머지 한 세포는 transient amplifying cell로 여러 차례의 세포 분열을 한 후 각화 세포로 분화, 성숙 과정을 거치게 된다. 따라서 구강 점막 상피의 기저 층과

기저 상층에서 주로 증식 능력을 보유하게 된다(41,42). p63은 증식능이 있는 세포에 주로 나타나며 기저 세포의 핵에서 강하게 염색되어 있고 분화가 계속되면서 점차 옅어지거나 없어지게 되며 최종 분화가 시작되는 극세포층에서는 p63이 나타나지 않는다(25,37). 한편 편평 세포 암종에서는 분화가 좋은 암종에 비해 분화가 안된 종양 세포에서 p63 양성 발현율이 증가하여 p63 발현이 암종의 역형성 정도를 나타내어 각화 세포 암종의 역형성의 진단적 표지자로 사용할 수 있다는 보고도 있다(25).

이 연구 결과 p63의 발현이 정상 조직에서 33%가 양성으로 나타났고 전체 백반증 조직에서 발현율은 50%이며 악성 이행이 없는 경우가 42% 악성 이행이 있는 경우가 71%로 나타났다. 정상 조직에서 양성으로 나타난 경우는 기저 세포층을 포함한 2-3개 층에서 발현되었는데 이는 p53과는 달리 p63은 정상 세포에서도 증식능이 있는 경우 발현될 수 있기 때문일 것으로 생각하였다. 전체 백반증 조직에서 악성 이행이 없는 경우 과증식과 정도의 이형성에서 42%의 같은 빈도로 발현되었고, 악성 이행이 있는 경우 71%로 나타났으며 암종의 경우는 86%로 높게 나타나 표지자로서의 가능성을 확인할 수 있었다. 그러나 p63의 발현이 증식능이 있는 정상 세포에서도 발현되기 때문에 표지자로 사용하기 위해서는 앞으로 많은 연구가 필요하다고 생각된다. 이상의 결과로 p53과 p63의 단백 발현이 전암병소에서 암 발생 위험도를 예측하는 표지자로서의 가능성이 있다고 생각된다. 하지만 암종으로 이행되면서 이형성 정도와 발현율이 비례하지 않았다. 따라서 효과적인 표지자로서의 가능성을 확인하기 위해서는 앞으로 더 많은 증례에 대하여 추적 조사와 관찰이 필요하다고 생각된다.

제5장 결론

연세대학교 치과대학 구강병리학교실에서 백반증으로 진단 받고 2년 이상 추적 관찰한 환자를 대상으로 암종으로 이행하지 않은 예와 암종으로 이행한 예를 면역조직화학법으로 p53과 p63의 발현을 비교 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. p53의 경우 정상 조직에서는 발현되지 않았으며 전체 백반증 조직에서 28예 중 9예(32%)가 양성 반응을 보였고, 악성 이행이 없는 경우는 21예 중 6예(29%), 악성 이행이 있는 경우는 7예 중 3예(43%)로 나타났다.

2. p63의 경우 는 전체 백반증 조직에서 28예 중 14예(50%)가 양성 반응을 보였고, 악성 이행이 없는 경우는 21예 중 9예(42%), 악성 이행이 있는 경우 7예 중 5예(71%)가 양성으로 나타나 악성 이행이 있는 경우 발현율이 높게 나타났다.

3. 병리조직학적 분석 결과 상피 이형성이 있는 경우 16예 중 7예(43%)가 악성 이행을 하였고 이 중 경도의 이형성인 경우 12예 중 3예(25%)가 중등도 이상인 경우 모두 악성 이행을 하여 이형성 정도가 암 발생 위험도 예측에 신뢰성이 높음을 알 수 있었다.

이상의 결과로 p53과 p63의 단백질 발현이 전암병소에서 암 발생 위험도를 예측하는 표지자로서의 가능성이 있다고 생각된다. 하지만 암종으로 이행되면서 이형성 정도와 발현율이 비례하지 않았다. 따라서 효과적인 표지자로서의 가능성을 확인하기 위해서는 앞으로 더 많은 증례에 대하여 추적 조사와 관찰이 필요하다고 생각된다.

Explanation for figures

Fig. 1-a The normal oral mucosa (H-E $\times 40$)

Fig. 1-b Leukoplakia without malignant transformation (H-E $\times 40$)

Fig. 1-c Leukoplakia transformed to squamous cell carcinoma(H-E $\times 40$)

Fig. 1-d Squamous cell carcinoma (H-E $\times 100$)

Fig. 2-a p53 was not found in the normal oral mucosa (p53 $\times 40$)

Fig. 2-b p53 was found in the basal and parabasal layers of the leukoplakia without malignant transformation (p53 $\times 40$)

Fig. 2-c p53 was found in the basal and parabasal layers of the leukoplakia transformed to squamous cell carcinoma(p53 $\times 40$)

Fig. 2-d p53 was strongly expressed in squamous cell carcinoma(p53 $\times 100$)

Fig. 3-a p63 was found in the basal and parabasal layers of the normal oral mucosa (p63 $\times 100$)

Fig. 3-b p63 was found in the basal and parabasal layers of the leukoplakia without malignant transformation (p63 $\times 100$)

Fig. 3-c p63 was found in toward the middle portion from the basal layers of the leukoplakia transformed to squamous cell carcinoma (p63 $\times 100$)

Fig. 3-d p63 was strongly expressed in squamous cell carcinoma (p63 $\times 400$)

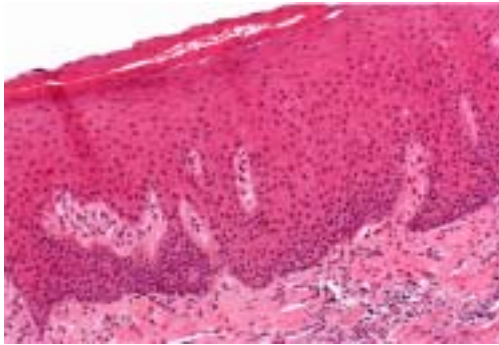


Fig 1-a Normal mucosa

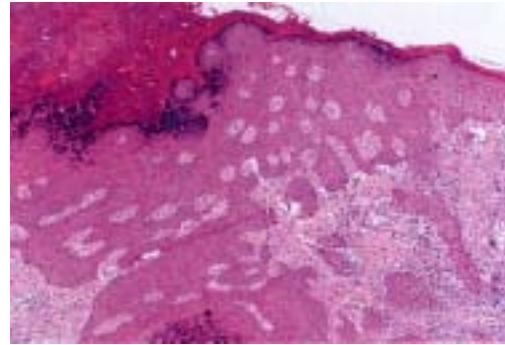


Fig 1-b Leukoplakia without malignant transformation

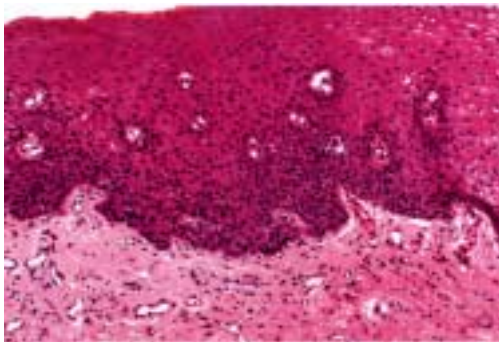


Fig 1-c Leukoplakia with malignant transformation

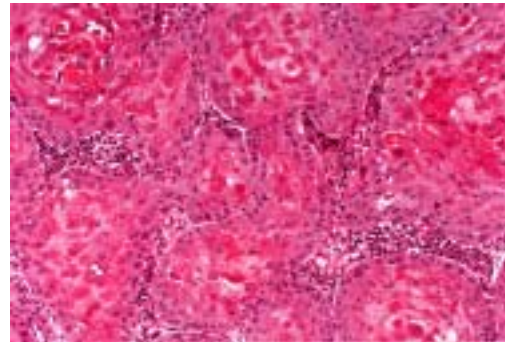


Fig 1-d Squamous cell carcinoma

Fig 1. H-E stain in oral leukoplakia



Fig 2-a Normal mucosa

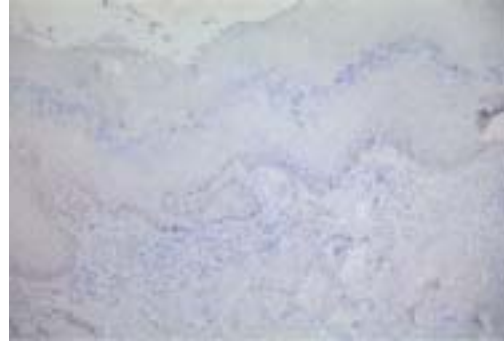


Fig 2-b Leukoplakia without malignant transformation

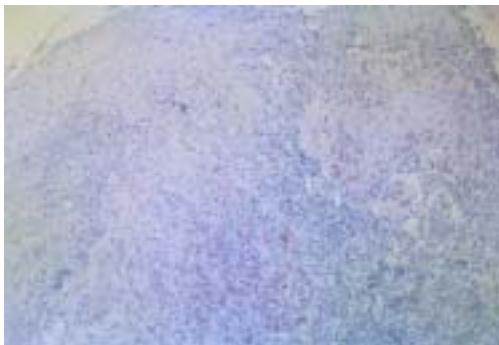


Fig 2-c Leukoplakia with malignant transformation

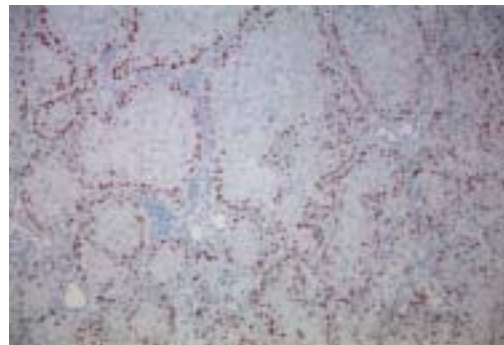


Fig 2-d Squamous cell carcinoma

Fig 2 p53 expression in oral leukoplakia

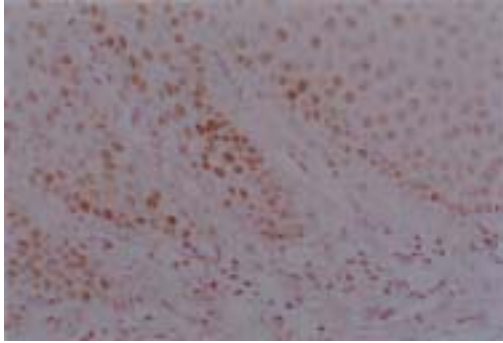


Fig 3-a Normal mucosa

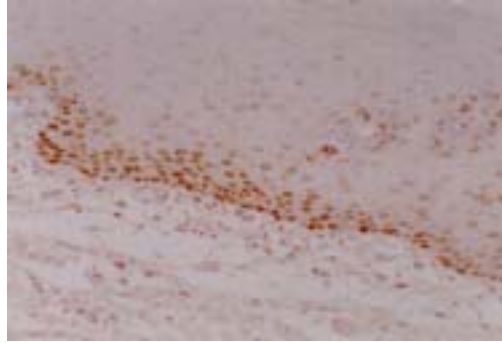


Fig 3-b Leukoplakia without malignant transformation

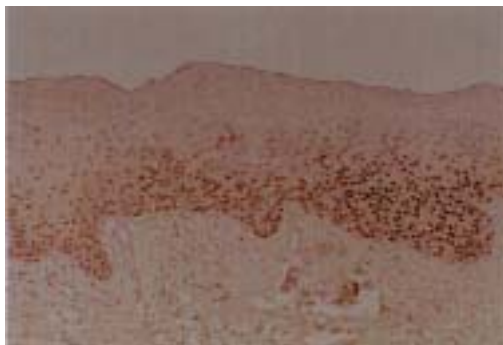


Fig 3-c Leukoplakia with malignant transformation

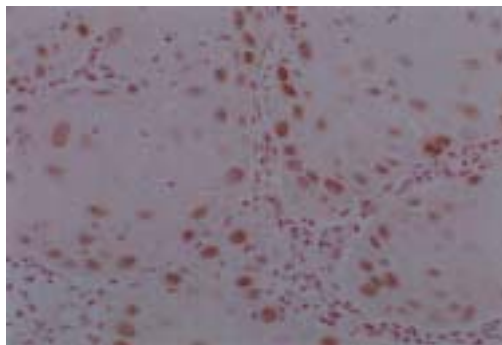


Fig 3-d Squamous cell carcinoma

Fig 3 p63 expression in oral leukoplakia

참고문헌

1. Pindborg JJ, Daftary DK, Mehta FS. : A follow-up study of sixty-one oral dysplastic precancerous lesions in Indian villagers. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 43:389-390, 1997.
2. Burkhard A : Advanced methods in the evaluation of premalignant lesions and carcinomas of the oral mucosa. J Oral Pathol. 14:751-778, 1985.
3. Silverman S, Gorsky M, Lozada F : Oral leukoplakia and malignant transformation : A follow-up study of 257 patients. Cancer. 53:563-568, 1984.
4. Qin GZ, Park JY, Chen SY, Lazarus P : A high prevalence of p53 mutations in premalignant oral erythroplakia. Int J Cancer. 80:345-348, 1990.
5. WHO collaborating centre for oral precancerous lesions : Definition of leukoplakia and related lesions : an aid to studies on oral precancer. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 46:518-539, 1978.
6. Hayward JR, Regezi JA : Oral dysplasia and in situ carcinoma : Clinicopathologic correlation of eight patients. J Oral Surg. 35:756-762,

1977.

7. Lumerman H, Freedman P, Kerpel S, Flushing NY : Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 79:321-329, 1995.
8. Karabult A, Reibel J, Therkildsen MH, Praetorius F, Nielsen HW, Dabelsteen E : Observer variability in the histologic assessment of oral premalignant lesions. J Oral Pathol Med. 24:198-200, 1995.
9. Kim J, Shin DM : Biomarkers of squamous cell carcinoma of the head and neck. Histol Histopathol. 12:205-218, 1997.
10. Chang F, Syrjnen S, Kurvinen K, Syrjnen K : The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. Am J Gastroenterol 88:174-186, 1993
11. Soussi T, Legros Y, Lubin R, Ory K, Schlichtholz B : Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer : a review. Int J Cancer. 57:1-4, 1994.
12. 한명단, 추정엽, 고재영 조남표 : 타액선 종양에서 p53, p63 및 p73 단백질의 면역조직화학적 발현. 대한구강악안면병리학회지 25:337-349, 2001.

13. 이상숙, 배지연, 강유나 등 : 기관지 도말 표본에서 p53 단백 발현 의 진단적 의미. 대한세포병리학회지. 7(2);163-168, 1996.
14. Goukon Y, Sasano H, Nishihara T, et al : p53 immunolocalization in cytology specimens: a study in human esophageal carcinoma. Diagn Cytopathol 11:113-118, 1994.
15. Yook JI, Kim J : Expression of p21WAF1/CIP1 is unrelated to p53 tumour suppressor gene status in oral squamous cell carcinoma. European J of cancer 34:198-203, 1998
16. Shin DM, Charuruks N, Lippmann SM, Lee JJ, et al : p53 protein accumulation and genomic instability in head and neck multistep tumorigenesis. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 10(6): 603-609, 2001.
17. Osada M, Ohba M, Kawahara C, et al. : Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. Nat Med. 4:839-843, 1998.
18. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, et al. : Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. Cell. 90:809-819, 1997.
19. Schmale H, Bamberger C : A novel protein with strong homology to

- the tumor suppressor p53. *Oncogene*. 15:1363-1367, 1997.
20. Yang A, Kaghad M, Wang Y et al. : p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell*. 2:305-36, 1998.
 21. Mai M, Yokomizo A, Qran CP, et al. ; Activation of p73 silent allele in lung cancer. *Cancer Res*. 58:2347-2349, 1998.
 22. Tsao H, Zhang X, Majewski P, Halusaka FG : Mutational and expression analysis of the p73 gene in melanoma cell line. *Cancer Res*. 59:172-174, 1999.
 23. Yasir S, oliver GO, Anjali A, et al: p63 expression is associated with p53 loss in oral-esophageal epithelia of p53-deficient mice. *Cancer Res* 61:6467-6473, 2001.
 24. Pelligrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, et al : p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3256-3161, 2001.
 25. Ramine Parsa, Annie Yang, Frank McKeon, Howard Green : Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 113:1099-1105, 1999.

26. Bates S, Vousden KH : p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. *Current opin Genet Dev.* 6:1-7, 1996.

27. Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB :Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:7492-7495, 1992.

28. William G Kaelin Jr : The p53 gene family. *Oncogene* 18:7701-7705, 1999.

29. Raff MC: Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356:397-400, 1992

30. Marshall CJ : Tumor suppressor genes. *Cell* 64:311-326, 1992.

31. Thomas DW : p53 in tumor pathology: can we trust immunocytochemistry? *J Pathol* 166:329-330. 1992.

32. Koh JY, Cho NP, Kong G, Lee JD, Yoon K : p53 mutations and papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinoma : correlation with apoptosis. *Br J Cancer.* 78:354-359, 1998.

33. Mao EJ, Schwartz SM, Darling JR, Oda D, Tickman L, Beckmann AM : Human papillomvirus and p53 mutations in normal, premalignant and malignant oral epithelia. *Int J Cancer.* 69:152-158,

1996.

34. Kubbutat MHG, Vousden KH : Keeping an old friend under control: regulation of p53 stability. *Mol Med Today* 4:250-256, 1998.
35. Liu SC, Hu Y, Sauter ER, Clapper ML, Chen SY, et al : Image analysis of p53 and cyclin D1 expression in premalignant lesions of the oral mucosa. *Analytic & Quantitative Cytology & Histology* 21(2):166-173, 1999.
36. Karin N, Philip JC, Peter A : Characterization of the expression pattern of p63 and Np63 in benign and malignant oral epithelial lesions. *Int J Cancer* 87:368-372, 2000.
37. Sabrina S, Mario R, Guilia F, Eliana M, Silvia S, et al : From p63 to p53 across p73. *FEBS Letters* 490:163-170, 2001.
38. Celli J, Duijf P, Hamel BCG, et al. : Heterozygous germline mutation in the p53 homolog p63 are the cause of EEG syndrome. *Cell*:143-153, 1999.
39. Yang A, Schweitzer R, Sun D, et al. : p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*. 398:714-718, 1999.

40. Mills AA, Zheng B, Wang Xj, Vogel H, Roop DR, Bradely A : p73 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. Nature. 398:708-713, 1999.
41. Potten CS and Morris RJ : Epithelial stem cells in vivo. J Cell Sci Suppl. 10:45-62, 1988.
42. Maidhof R and Hornstein OP : Autoradiographic study on some proliferative properties of human buccal mucosa. Arch Dermatol Res 256:165-172, 1979.

ABSTRACTS

The analysis of p53 and p63 expression for the risk assessment of malignant transformation in oral precancerous lesions

Jinha Whang DDS

Department of Dental Science, The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Jin Kim DDS, Ph.D)

The oral precancerous lesions have been considered as a target tissue for the early detection and chemoprevention study. The risk of malignant transformation in oral premalignant lesions should be accurately evaluated and properly treated to prevent from cancer development. Accordingly, the risk assessment and monitoring of chemoprevention effect are critically important to reduce cancer incidence. Epithelial dysplasia has been considered as a reliable histological hallmark to define premalignant lesions. But the subjectivity of evaluating the degree of epithelial dysplasia and the fact that the degree of epithelial dysplasia may not directly correlate to the rate of malignant transformation, require more reliable biomarkers to represent

their biologic behavior.

This study aimed to evaluate the usefulness of p53 and p63 expression as biomarkers for the risk assessment to malignant transformation in leukoplakia. This study used 21 cases of oral leukoplakia without malignant transformation and 7 cases with malignant transformation during more than 2 years follow-up period which were examined at the Department of Oral Pathology, Yonsei University College of Dentistry. Six cases of normal mucosa were used as a control. Monoclonal p53 and p63 antibodies were applied for immunohistochemical study.

The results were as follows:

1. p53 expression was shown in 6 of 21 cases(29%) of the leukoplakia without malignant transformation, and in 3 of 7 cases(43%) of the leukoplakia transformed to squamous cell carcinoma. Normal oral mucosa showed no detectable p53 expression.

2. p63 expression was detected in 9 of 21 cases(42%) of the leukoplakia without malignant transformation, and 5 of 7 cases(71%) of the leukoplakia transformed to squamous cell carcinoma. In normal mucosa 2 of 6 cases(33%) showed p63 expression in basal and parabasal layer.

3. Malignant transformation occurred in 7 out of 16 cases(43%) of the

leukoplakia with epithelial dysplasia, 3 out of 12 cases(25%) of mild epithelial dysplasia and all of moderate to severe epithelial dysplasia were transformed to squamous cell carcinoma.

These results suggest that p53 and p63 expression requires more intensive further study based on the longer period of follow-up and the larger scale-examination for the verification of the usefulness as a predictable biomarker assessing the risk of malignant transformation in oral precancerous lesions.

key words: p53, p63, leukoplakia, malignant transformation,
biomarker, epithelial dysplasia