



Biomarkers in oral premalignant lesions

연세대학교 치과대학 구강병리학교실

교수 김진

두경부를 비롯한 인체에 발생하는 대부분의 암종은 carcinogen에 노출된 field에 지속적으로 genetic damage가 축적되면서⁽¹⁾ 정상에서 전암단계를 거쳐 침윤성 암종으로 진행되는 다단계 과정^(2,3)을 밟아 발생된다고 알려져 왔다. 구강암은 field cancerization과 multistep process가 잘 설명되는 부위로서^(4,5), 전암병소 발견이 용이하여 전암병소에서 암으로의 진행을 미리 발견, 예방할 수 있다는 점 때문에 전암병소의 중요성이 강조되어 왔다⁽⁶⁾.

가장 흔하게 나타나는 구강점막의 전암병소인 백반증은 약 4.4% 내지 17.5%에서 암으로 이행된다고 보고되고 있으며^(7,8), 상피 이형성이 동반된 경우는 암발생율이 약 36%에 이른다⁽⁸⁾. 이러한 악성 전환의 위험성을 예측하는 인자로는 상피 이형성이 가장 신뢰할 만 하다고 평가되고 있으며, 이에 이형성의 기준을 마련하고 이형성과 악성 전환과의 상관 관계를 조사하고자 하는 노력들이 계속되어 왔다⁽⁹⁾.

그럼에도 병리 조직학적인 이형성 정도로만 암발생을 예측하는 것은 어려움이 따른다. 백반증은 진행성 병변으로 육안으로는 하얗게 덮혀있는 표면만 보일 뿐 진행의 정도를 구분할 수 없기 때문에 임상 의사가 진행된 부위를 생검하지 못할 수도 있으며, 이를 판독하는 데에도 이형성의 판단이 주관적이며, 등급 결정에 명확한 기준이 없어 문제가 되

고 있다. 따라서 조직 소견이 아닌 생물학적 표지자를 이용하여 종양의 진행 여부를 예측할 수 있다면 객관성과 신뢰도를 높일 수 있으리라 생각된다.

생물학적 표지자란 구강암의 발생이 발암 인자의 반복적 노출로 인한 유전자 및 형태 변화의 축적으로 일어난다는 '다단계 이론'을 바탕으로 한 것으로, 각 단계를 추정할 수 있는 특이한 생물학적 지표를 추적함으로써, 암이행의 가능성 및 정도를 판단할 수 있는 지표를 말한다⁽¹⁰⁾. 종양성 변화를 예측하는 생물학적 표지자는 몇 가지로 분류할 수 있는데, 유전자 지표, 증식능 지표, 분화도 지표가 그것이다.

먼저 유전자 지표는 비특이 유전자 지표와 특이 유전자 지표가 있다. 비특이 유전자 지표의 일종인 micronuclei는 특정한 유전인자 변화는 알 수 없으나 암유발물질에 노출된 부위에 DNA손상이 진행되고 있다는 것을 반영한다⁽¹¹⁻¹³⁾. 탈락세포를 이용한 검사이기 때문에 조직손상을 주지 않는 방법으로 암 발생 위험을 알 수 있는 가장 손쉬운 지표로서 주기적인 관찰에 도움이 되는 장점이 있다. 최근에는 분자생물학적 연구방법의 눈부신 발전으로 탈락세포를 이용하여 messenger RNA를 이용한 검사가 연구된 바 있으나 각화 세포로 terminal differentiation되는 과정에 이미 messenger RNA가 분해되기 때문에 이 검사법은 임상에 이용 가능



성이 희박하다고 생각된다⁽¹⁴⁾. Huang 등⁽¹⁵⁾은 탈락되는 구강상피세포를 이용하여 p53 유전자의 loss of heterozygosity를 연구한 바 조직손상 없이 탈락세포에서 유전자 변화를 조기에 진단할 수 있는 가능성을 보여줬다. 저자는 정상 점막, 백반증, 구강암 환자를 대상으로 micronuclei 검사를 시행하였다. 그 결과 연구방법은 간단한 반면, 몇가지 문제점을 안고 있었다⁽¹⁶⁾. 첫째 micronuclei를 판정하는 기준이 각기 다르다는 점이다. 즉, Belien은 모핵크기의 1/5이하로 둥근 형태만을 micronuclei로 취하였으나⁽¹⁷⁾, Robin는 작고 불규칙한 모양의 Feulgen염색 양성의 조각을 모두 포함시켰다⁽¹⁸⁾.

이와같이 학자에 따라 micronuclei를 판독하는 기준점이 달라 연구결과의 객관성이 문제되고 있다. 둘째로 field cancerization을 고려할 때 carcinogen에 노출된 부위마다 각기 유전적 손상정도가 다양할 것이기 때문에 세포를 채취하는 부위가 다른 정확한 유전적 손상정도를 분석하기 어렵다. 이와 같은 문제를 극복하기 위하여는 여러부위를 주기적으로 반복적으로 채취하는 것이 필요하다고 생각되지만 채취하는데 따른 환자의 협조 및 반복적인 채취로 인한 조직 손상이 문제가 될 것이다.

또한 염색시약의 신선도 정도에 따라 염색의 균질성이 달라져 염색 침전물이 핵주위에 결친 경우 micronuclei로 오인할 가능성이 있기 때문에 염색시약의 신선도 유지도 중요할 것으로 생각되었다. 따라서 조직손상이 적은 탈락세포를 이용한 검사를 임상에 활용하기 위해서는 연구결과에 객관성을 기하기 위하여 염색방법과 측정 오차를 줄이는 방법에 대한 연구가 개발되어야 하겠다⁽¹⁶⁾.

비특이 유전자 지표로서 인정받고 있는 방법으로 genetic instability를 측정하는 방법이 있다. Genetic instability란 암중 발생과정을 다단계로 볼 때 지속적인 유전적 변화가 축적되어 암으로 이행되기 때문에 genetic instability를 분석함으로써 암으로의 이행 가능성을 예측하는 것이다⁽¹⁹⁾. 구강에서 암발생의 다단계과정인 benign hyperplasia로부터 dysplasia를 거쳐, carcinoma로 이행되기까지 점

차적으로 genetic event가 축적되게 된다. 따라서 구강점막 질환에서 genetic instability에 대한 평가는 전암병소여부를 평가하는데 유용하리라고 판단된다. Genetic instability는 유전인자 변이, 유전인자 amplification, 염색체 구조 및 배열 이상, 염색체 소실 및 aneuploidy 등을 포함하며, 이 중 aneuploidy는 chromosome in situ hybridization (CISH)방법으로 파라핀 포매 조직에서도 형태학적인 특징을 고려한 평가가 가능하다⁽²⁰⁻²²⁾.

즉, Voravud 등⁽²³⁾은 두경부 암중에서 CISH방법으로 염색체의 aneuploidy를 분석하여 두경부 암중 발생단계에 따라 genetic instability가 증가함을 보고하였고, Lee 등⁽²⁴⁾은 구강 백반증에서 CISH방법으로 염색체의 aneuploidy를 분석하여 전암병소에서 암발생 위험정도를 평가하는데 유용할 것임을 시사하였다. 저자가 구강 백반증을 대상으로 chromosome 9에 대하여 in situ hybridization방법으로 염색체 9의 수를 분석하므로써 genetic instability의 정도를 분석한 결과 hyperplasia에서 dysplasia를 거쳐 암으로 이행될수록 chromosome polysomy index가 높아짐을 확인하였다. 또한 hyperplasia만 있는 백반증에 비하여 이형성이 있는 조직 주위의 hyperplasia에서 높은 genetic instability를 보임으로서 전암병소에서 암으로의 이행 가능성을 예측하는 표지자로서 광학현미경으로 관찰할 수 있는 상피 이형성보다 더 우수한 표지자임을 알 수 있었다⁽²⁵⁾.

특이 유전자 지표로서 구강암중에 가장 잘 알려진 암 억제 유전자인 p53 유전자에 대한 연구가 있다. Shin 등은 정상 조직과 두경부의 편평세포 암중에서 여러 부위를 생검하여 p53의 발현을 비교 조사하였는데 정상 조직에서는 발현되지 않고 종양 주변의 정상 세포에서는 31예 중 6예(19%), 과증식 병소에서 24예 중 7예(29%), 이형성 병소에서 26예 중 12예(46%), 편평세포 암중에서 48예 중 28예(58%)가 양성으로 발현되어 암중으로 진행함에 따라 p53의 발현이 증가함을 보고하였다⁽²⁶⁾.

저자의 연구결과에서는 p53의 발현은 정상 조직

에서는 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 암중에서의 발현율은 29%로 나타났다. p53의 발현정도는 Liu등의 결과와 마찬가지로 백반증에서 양성으로 나타난 것에 비해 암중의 경우 보다 강한 염색상을 보였다. 이 결과는 정상 조직과 과증식, 이형성에서의 p53발현의 차이가 표지자로서의 가능성이 있다고 생각되지만 암중으로 이행되면서 이형성 정도와 발현율이 비례하지 않기 때문에 효과적인 표지자로서의 가능성을 확인하기 위해서는 앞으로 더 많은 증례에 대하여 추적 조사와 관찰이 필요하다고 생각된다.

증식능의 측정은 구강암의 악성도 및 예후의 판정에 많이 이용되는 것으로 신뢰성이 있다고 알려져 있다⁽²⁷⁾. 증식능의 증가는 진행된 종양을 의미하며 다단계 암발생 과정에서 조절 기능의 이상이 발생했음을 의미한다. 증식능의 평가를 위해 PCNA, Mib-1, Cyclin D1, CENP-F 등이 생물학적 표지자로 사용되고 있으며, 최근에는 Cyclin D1을 포함한 세포주기 조절 인자의 이상이 많이 연구되고 있

다⁽²⁸⁾. 저자가 백반증에서 암중으로 이행한 전암 병소와 그렇지 않은 전암 병소를 비교하여 발현의 차이를 조사한 결과 Cyclin D1 발현은 암중으로 이행하지 않은 백반증의 경우 20%(5/25)가 양성 반응을 보였으며, 암중으로 이행한 경우 80%(8/10)가 양성 반응을 보여, 암중으로 이행한 군에서 현저히 높은 발현 빈도를 보였다. Cyclin D1 발현은 이형성이 있는 경우 50%(11/22)에서 양성 반응을 보인 반면, 이형성이 없는 경우는 15%(2/13)에서 양성 반응을 보여 이형성이 있는 경우에 발현 빈도가 높았다⁽²⁹⁾. 따라서 Cyclin D1이 백반증에서 암으로 이행되는 위험도를 예측하는데 도움이 된다고 생각하였다.

마지막으로 상피세포의 분화 정도를 이용한 marker분석으로 cytokeratin, involucrin, retinoic acid receptor(RAR)등이 연구된 바 있다. Cytokeratin의 경우 CK19(30)와 RAR- β (31)가 marker로서의 가능성에 대하여 유용한 것으로 보고된 바 있다. 그러나 현재까지 백반증에서 암으로의 이행 위험율을 예측하는 확실한 표지자는 없으며 더욱 정확도를 높이기 위한 표지자 개발이 이루어져야 한다.

참 고 문 헌

1. Slaughter, D.P., Southwick, H.W. and Smejkal, W. : "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. *Cancer* 6:963-968, 1953
2. Farber E. : The multistep nature of cancer development. *Cancer Res.* 44, 4217-4223, 1984.
3. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM, Bos JL : Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 319, 525, 1988.
4. Shibuya H, Amagasa T, Seto K, Ishibashi K, Horiuchi J, Suzuki S : Leukoplakia-associated multiple carcinomas in patients with tongue carcinoma. *Cancer* 57:843, 1986.
5. Robinson E, Neugut AI, Murray T, Rennert G : A comparison of the clinical characteristics of first and second primary head and neck cancers. A population based study. *Cancer* 68:189, 1991.
6. Boone CW, Kelloff GJ, and Steele VE : Natural history of intraepithelial neoplasia in humans with implications for cancer chemoprevention strategy. *Cancer Res* 52, 1651-1659, 1992.
7. Pindborg JJ, Renstrup G, Jolst O, Roed-Petersen B : Studies in oral leukoplakia : a preliminary report on the period prevalence of malignant transformation in leukoplakia based on a follow-up study of 248 patients. *J Am Dent Assoc* 76:767-771, 1968
8. Silverman S Jr, Gorsky, M., and Lozada, F. : Oral leukoplakia and malignant transformation. *Cancer* 53:563-568,1984.
9. WHO Collaborating Centre for Oral precancerous Lesions : Definition of leukoplakia and related

참고 문헌

- lesions: An aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978, 46:517-539
10. Kim J, Shin DM : Biomarkers of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Histol and Histopathol* 12:205-218, 1997.
 11. Prasad MPR, Mukundan MA, and Krishnaswamy K : Micronuclei and carcinogen DNA adducts as intermediate end points in nutrient intervention trial of precancerous lesions in the oral cavity. *Oral Oncol., Eur. J. Cancer* 1995;31(B) : 155-159.
 12. Stich HF, Rosin MP, Hornby P, Mathew B, Sankaranarayanan R, and Nair MK : Remission of oral leukoplakias and micronuclei in tobacco/betel quid chewers treated with beta-carotene and with beta-carotene plus vitamin A. In. *J. Cancer* 1988;42 : 195-199.
 13. Benner SE, Wargovich MJ, Lippman SM, Fisher R, Velasco M, Winn RJ, and Hong WK : Reduction in oral mucosa micronuclei frequency following alpha-tocopherol treatment of oral leukoplakia. *Cancer epidemiology, Biomarkers Prev* 1994;3 : 73-76.
 14. Klaassen I, Copper MP, Brakenhoff RH, Smeets SJ, Snow GB, Braakhuis BJM : Exfoliated oral cell messenger RNA : Suitability for biomarker studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev* 1998;7:469-472.
 15. Huang MF, Chang YC, Liao PS, Huang TH, Tsay CH, Chou MY : Loss of heterozygosity of p53 gene of oral cancer detected by exfoliative cytology. *Oral Oncol* 1999;35:296-301.
 16. 김진, 김경주, 차인호 : 구강점막의 탈락세포를 이용한 micronuclei 검사의 유용성 검토. *대한구강악안면병리학회지* 23:85-90, 1999.
 17. Belien JAM, Copper MP, Braakhuis MP, Snow GB, Baak JPA : Standardization of counting micronuclei : definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. *Carcinogenesis* 1996;10:2395-2400.
 18. Rosin MP : The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in human : a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents. *Mutation Res* 1992;267:265-276.
 19. Hittelman WN, Kim HJ, Lee JS, Shin DM, Lippman SM, Kim J, Ro JY, Hong WK : Detection of chromosome instability of tissue fields at risk : In situ hybridization. *J Cell Biochem* 25S:57-62, 1997.
 20. Arnolds EPJ, Dreef EJ, Noordermeer IA, Verheggen MM, Thierry RF, Peters ACB, Cornelisse CJ, Van der Ploeg M, and Raap AK : Feasibility of in situ hybridization with chromosome-specific DNA probes on paraffin wax-embedded tissue. *J Clin Pathol* 44 : 900-904, 1991.
 21. Dhingra K, Sahin A, Supak J, Kim SY, Hortobagyi G, and Hittelman WN : Chromosome in situ hybridization of formalin-fixed mammary tissue using non-isotopic, non-fluorescent probes : Technical considerations and biological implications. *Breast. Cancer Res. Treat.* 23 : 201-210, 1992.
 22. Kim SY, Lee JS, Ro JY, Gay ML, Hong WK, and Hittelman WN : Interphase cytogenetics in paraffin sections of lung tumors by non-isotopic in situ hybridization. Mapping genotype/phenotype heterogeneity. *Am J Pathol* 142 : 307-317, 1993.
 23. Voravud N, Shin DM, Ro JY, Lee JS, Hong WK, and Hittelman WN : Increased polysomies of chromosomes 7 and 17 during head and neck multistage tumorigenesis. *Cancer Res* 53 : 2874-2883, 1993.
 24. Lee JS, Kim SY, Hong WK, Lippman SM, RO JY, Gay ML, and Hittelman WN : Detection of chromosomal polysomy in oral leukoplakia, a premalignant lesion. *J. Natl. Cancer Inst.* 85 : 1951-1954, 1993.
 25. Kim J, Shin DM, Ele-Naggar A, Lee JS, Corrales C, Lippman SM, Hong WK, Hittelman WN : Chromosome polysomy and histologic characteristics in oral premalignant lesions. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2001;10:319-325.
 26. 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.
 27. Shin DM, Voravud N, Ro JY, Lee JS, Hong WK, and Hittelman WN. (1993). Sequential increases in proliferating cell nuclear antigen expression in head and neck tumorigenesis : A potential biomarker. *J. Natl. Cancer Inst.* 85, 971-978.
 28. Bravo R, Frank R, Blundell PA, and MacDonald-Bravo H. (1987). Cyclin/PCNA is the auxillary protein of DNA polymerase-delta. *Nature.* 326, 515-517.
 29. 백지영, 윤정훈, 육종인, 차인호, 김진 : 구강전암병소에서 암발생위험도 예측을 위한 cyclinD1 발현 분석. *대한구강악안면병리학회지* 25 : 1-15.
 30. Lindberg K, and Rheinwald JG. (1989). Suprabasal 40 kd keratin(K19) expression as an immunohistologic marker of premalignancy in oral epithelium. *Am. J. Pathol.* 134, 89-98.
 31. Lotan R, Xu X-C, Lippman SM, Ro JY, Lee JS, Lee JJ, Hong WK : Suppression of retinoic acid receptor- in premalignant oral lesions and its up regulation by isotretinoin, *New England Journal of Medicine* 332 : 1405-1410, 1995