

유방암에서 생물학적 치료를 위한 Terminal Restriction Fragment Length와 Telomerase의 반 정량적 비교

연세대학교 의과대학 ¹연세암센터, ²연세 암연구소, ³내과학교실, ⁴외과학교실

라선영^{1,2,3} · 박규현^{1,2} · 김태수^{1,2} · 김주황^{1,2,3} · 노재경^{1,2,3}
민진식^{1,2,4} · 이경식⁴ · 김병수^{1,2} · 정현철^{1,2,3}

Semi-quantitative Comparison of Terminal Restriction Fragment Length and Telomerase in Breast Cancer for Biotherapy

Sun Young Rha, M.D.^{1,2,3}, Kyu Hyun Park, Ph.D.^{1,2}, Tae Soo Kim^{1,2},
Joo Hang Kim, M.D.^{1,2,3}, Jae Kyung Roh, M.D.^{1,2,3}, Jin Sik Min, M.D.^{1,2,4},
Kyong Sik Lee, M.D.⁴, Byung Soo Kim, M.D.^{1,2} and Hyun Cheol Chung, M.D.^{1,2,3}.

¹Yonsei Cancer Center, ²Yonsei Cancer Research Institute,
³Department of Internal Medicine, ⁴General Surgery,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: We determined the clinical significance of telomerase activity and telomere length in breast cancer patients and also developed the measuring system of telomerase activity change with RNase A pre-treatment.

Materials and Methods: We measured the telomerase activity in 71 breast cancer tissues and paired normal tissues with TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) assay. Telomerase activity was calculated by computer-assisted densitometry compared to telomerase activity of the 293 control cell line. To develop the measuring system of telomerase activity modulation, we measured the telomerase activity after the treatment with RNase A, 150 μ g/ml, which inhibited 70% of telomerase activity compared to control in the 293 control cell line. In 59 paired tissues with telomerase activity, terminal restriction fragment (TRFs) length were measured using Southern blotting.

Results: Sixty-three out of 71 cancer tissues showed telomerase activity (88.7%), while no telomerase activity was detected in their paired normal tissues. Telomerase activity was correlated to the node metastasis ($p=0.02$) and stage ($p=0.005$), but not to the tumor size or the hormonal receptor status. TRFs were neither specific to tumor tissues nor related to any of the clinical parameters. However, changes of TRFs of the tumor tissues from their paired normal tissues were correlated to the telomerase activities. Also the patients with different TRFs between cancer and normal tissues were in more advanced stage. After pre-treatment with the 150 μ g/ml of RNase A, telomerase activity in the tumor tissues showed variable inhibition. Relative inhibition, the ratio of inhibited

telomerase activity in each tumor tissue compared to the inhibition of 293 control cell line, was proportional to the telomerase activity.

Conclusion: In breast cancer, telomerase activity was specific to the tumor tissues and correlated to tumor progression. A combination of telomerase activity and TRFs changes can be used as a guideline in detecting a better candidate for telomerase inhibition. Semi-quantitative assay with RI system can be used in evaluating the changes of telomerase activity after treatment with a new telomerase inhibitor with TRAP assay.

Key Words: Telomerase, TRF lengths, Relative inhibition, Breast cancer

서 론

세포가 노화 현상과 이에 의한 사멸을 극복하기 위해서는 transformation이나 immortalization이 발생해야 한다. 즉 immortality를 획득하기 위해서는 서로 다른 기전에 의해서 조절되는 mortality stage 1 (M1)과 mortality stage 2 (M2)를 극복할 수 있어야 한다. M1 stage는 정상세포가 더 이상의 분열을 하지 못하고 사멸되는 단계로, 바이러스 종양 단백질 혹은 유전자 변이 (p53, Rb 유전자)에 의해 극복된다(1~2). 일단 세포가 M1 stage를 극복하면 M2 stage까지는 세포증식능이 유지되어 생존기간이 연장되나, 대부분의 세포들은 M2 stage를 극복하지 못하고 사멸하게 되며, telomerase가 활성화되는 극히 일부 세포만 M2 stage를 극복함으로써 immortality를 얻게된다(3).

인간의 telomere는 모든 염색체의 말단부위에 TTAGGG의 6개 핵산이 규칙적으로 반복된 상태로 존재하며 DNA 복제과정시 'end replication problem'에 의해 매 세포 분열마다 유전자 말단부위의 손실이 발생하고 이 손실된 유전자는 손실된 상태로 자세포(daughter cell)에 전달된다(4~9). Telomere는 염색체 말단부위에서 이들 염색체가 서로 융합하거나 재조합하는 것을 방지할 뿐만 아니라 핵막주위의 nuclear matrix에 염색체를 부착시킴으로써 DNase에 의한 염색체의 파괴를 방지시킨다. 수 차례의 세포분열 끝에 체세포의 telomere 길이가 일정 길이 이하로 감소하게 되면

세포는 더 이상 분열을 하지 못하게 된다. 그러나 극소수의 세포에서는 telomerase의 활성이 가동됨으로써 손실된 telomere를 보충하게 되고 그 결과 immortality를 획득하게 된다. 일반적인 암 진단은 생물학적 분열능보다는 병리학적 형태에 의하므로, 형태학적 암세포는 M1 사멸기전은 극복하지만 반드시 M2 기전을 극복하지는 않는다. 즉 1개의 암세포가 M1 stage에서 transformation 되면, 이 세포는 충분히 M2 stage를 극복하지 않고서도 임상적인 종양형성이 가능하다. 그 이유는 이들 암세포가 M2 사멸기전에 도달하기 전에 적어도 50번은 분열할 수 있기 때문이다. 그러나 이와같이 M1과 M2 사멸기전 사이의 세포 분열수는 transformation이 된 세포주에서 계산한 결과이기 때문에 실제 인체내에서 이 기간동안에 발생하는 세포 분열수에 대해서는 아직까지 정확한 정보가 없다. 다시 말하면 대부분의 암세포가 immortality를 획득하지 못한 경우에는 종양이 자연 치유가 될 수도 있다는 것이다. 따라서 암의 치료방향은 암조각이 얼마나 많은 immortalized 세포로 구성되어 있는냐에 따라 정해진다는 개념을 제시할 수가 있다(10).

Telomerase는 RNA-dependent DNA polymerase로 TTAGGG의 염기서열을 반복적으로 생성시킴으로써 세포분열시에 발생하는 유전자 손실을 보충하는 중요한 역할을 담당한다. Telomerase activity는 사람의 경우에 난소와 고환의 germline 세포에서는 관찰되나 그의 정상 체세포에서는 관찰되지 않고 있다(11~15). 반면, telomerase의 활성증가는

암 진행의 전단계인 양성 종양조직과 암세포주 및 암조직에서 관찰되었다. 증가된 telomerase 활성이 난소암에서 최초로 보고된 이래, 혈액암, 위암, 폐암, 간암, 대장암, 뇌암, 전립선암, 두경부암, 유방암등 거의 모든 암에서 관찰되었다. 특히 위암과 neuroblastoma 에서는 telomerase 활성이 증가된 경우 예후가 불량하였다(16~27). Telomerase activity 측정은 민감도가 높은 polymerase chain reaction-based 방법 (telomeric repeat amplification protocol: TRAP)이 개발됨에 따라 아주 적은양의 조직으로도 telomerase의 활성 측정이 가능하게 되었다(11). 그러나 이 방법의 문제점은 객관적인 수치화가 어려우며 PCR Taq-polymerase의 억제물질에 의한 위 음성 가능성이 기술적으로 상존하고 있다는 점이다. 특히 세포 혹은 조직의 추출물에 다량의 단백질이 존재할 경우 이같은 현상이 자주 나타나기도 하여 telomerase 활성 증가를 임상적으로 직접 적용하기에는 아직 여러 가지 제약점이 제시되고 있다(28).

따라서 본 연구에서는 인체 유방암 조직에서 telomerase의 활성과 TRF의 변화를 조사하여 이들의 차이에 근거한 telomerase 억제 치료법에 대한 임상적 응용 가능성을 조사하였다.

대상 및 방법

1) 검체

1996년 1월부터 1997년 5월까지 연세대학교 의과대학 연세 암센터 및 연세의료원에 내원하여 유방암으로 진단받고 정상 및 암 조직의 추출이 가능하였던 환자 71예를 대상으로 하였다. 조직은 수술 즉시 채취하여 -80°C 에 보관하면서 실험을 진행하였다.

2) Telomerase assay (TRAP assay)

조직을 200 μl 의 냉장 lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 10% glycerol, 5 mM beta-mercaptoethanol, 0.1 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride, 0.5% 3-(3-cholamidopropyl-

dimethylamino-1-propane sulfonate)내에서 조직 균질화기를 사용하여 20,000 rpm으로 균질화시켰다. Suspension은 얼음위에서 30분간 방치한 다음 4°C , 14,000 g로 30분간 원심분리하여 상층액을 -80°C 에 급속 냉동시켰다. 단백질 정량은 Bradford assay (Bio-rad)법에 의해 시행한 다음 Kim등(11)의 방법에 의해 TRAP assay를 시행하였다. TRAP reaction은 검체 20 μl , TRAP 반응용액(20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl_2 , 63 mM KCl, 0.005% Tween 20, 1 mM EGTA), 50 μM deoxy-nucleoside triphosphate, 0.1 mg/ml BSA, 1 μg T4 Gene 32 protein, 0.1 μg TS oligonucleotide (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3')를 혼합한 50 μl 로 시행하였다. 먼저 실온에서 20분간 방치함으로써 telomerase에 의해 TS primer가 연장되도록 하였고, 반응물질을 94°C 에서 3분간 가열함으로써 telomerase를 비활성화 시킨다음, CX primer (5'-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3') 0.1 μg , α - ^{32}P dCTP 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, dNTPs 50 μM , MgCl_2 50 mM과 Taq polymerase 2.5 unit를 첨가하였다. 이 산물을 94°C 에서 30초, 50°C 에서 30초, 72°C 에서 90초간 반응하는 cycle을 30회 반복시켰으며, 추출한 PCR 산물을 12%의 non-denaturing polyacrylamide gel에서 분리시킨후 X-ray film에 감광시켰다. -70°C 에서 하루밤 exposure후 전형적인 6 bp의 사다리 모양이 관찰되고 그 밴드가 RNase A 처리 후 없어지면 양성으로 판정하였다. 각 검사시마다 양성 대조군으로 293 세포주의 추출물, 음성대조군으로는 lysis buffer만을 사용하였다. 검체에서 telomerase inhibitor의 존재 여부는 telomerase activity가 관찰되지않는 검체를 양성 대조군인 293 세포주 추출물에 희석하여 혼합한 후, TRAP을 시행하여 그 존재여부를 확인하였다.

조직들 간의 telomerase activity를 비교하고 telomerase 억제제처리후 그 효과판정을 객관적으로 시행하기 위한 semi-quantitation(반정량화) measuring system을 확립하기위하여, 각각의 band intensity를 computer-assisted image analyzer를 이용하여 (Bio-Profil, Vilber Lourmat Biotechnology, France)

수치화하였다. 양성대조군 293 세포주 검체 6 μg 을 투여시에 관찰되는 O.D.값을 arbitrary 100 단위로 정하고, 이를 기준으로 각 검체 6 μg 으로 측정된 telomerase activity를 수치화한 다음, 그 값을 비교하였다. 또한 모든 검체를 6, 0.6, 0.06 μg 으로 연속회석하면서 검사하여 위음성을 배제하고자 하였으며(18), 0.06 μg 에서 발현시는 high expression, 0.6 μg 에서 발현시는 intermediate expression, 6 μg 에서 발현시는 low expression으로 정하였다.

3) Telomere length assay using Southern blotting

Genomic DNA를 *HinfI* 제한효소 10 unit으로 37°C에서 12시간 반응시킨 후 65°C에서 20분간 가열하여 불활성화시킨 다음, 5 μg 의 DNA를 0.8% agarose gel에서 전기영동시켰다. Blotting 하기 전, gel을 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl에서 30분간 2회 변성시킨 다음, 1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-Cl(pH 8.0)로 30분간 2회 중화시켰다. gel을 10X SSC (pH 7.0)에서 Hybond-N⁺ membrane(Amersham, UK)으로 transfer 시킨 후, 자외선조사로 고정시켰다. Hybridization을 위해 ECL kit(Amersham, UK)를 사용하였다. 우선 telomerase specific probe(TTAGGG)_n에 DNA labeling 용액과 glutaraldehyde를 혼합한 후 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 얼음에 보관하며 10분 이내에 사용하였다. ECL hybridization 용액, 0.5 M NaCl, 5%(w/v) blocking reagent가 함유된 hybridization용액으로 42°C에서 1시간 pre-hybridization시킨 후 준비된 probe를 첨가하고 42°C에서 밤새 반응시켰다. 반응이 끝난 membrane을 0.5X SSC와 0.4% SDS, 6M urea가 함유된 세척액으로 20분간 42°C에서 2회 세척하였다. 다음 2X SSC로 실온에서 5분간 2회 세척하고 signal을 Hyperfilm-ECL (Amersham, UK)에 감광한 후 각각의 lane은 densitometer로 scan하여 telomere length를 측정하였다.

4) Relative inhibition (RI) 측정

양성대조군인 293 세포 추출물 6 μg 에 RNase A를 농도별로 회석하면서 37°C에서 30분간 처리

후 관찰되는 band의 density로서 standard curve를 구한 다음, telomerase activity가 band analysis상 70%로 감소되는 RNase A의 농도를 정하였다 (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$). 다음 이 농도의 RNase A를 각각의 6 μg 의 암조직 검체에 투여하고서 TRAP assay를 시행한 다음 293세포주의 감소정도와 비교하여 RI를 다음과 같이 구하였다.

$$RI = \frac{\text{암조직의 RNase 투여전과 후 telomerase activity 차이}}{\text{대조군 293 세포주의 RNase 투여전과 후 telomerase activity 차이}} \times 100$$

암조직에서의 RI 평균치는 $87 \pm 23\%$ 로, 평균보다 높은 경우를 high sensitivity group, 낮은 경우를 low sensitivity group으로 정하였다.

5) 병리학적 병기 설정

병리학적 병기는 TNM staging(29), 분화도는 Bloom & Richardson criteria(30)에 의해 시행하였다.

6) 통계적 방법

각군의 semi-quantitation에 의한 상관성은 Pearson's correlation 방법으로 구하였으며 categorical analysis는 chi-square test 및 Mann-Whitney 법으로 시행하였다(31).

결 과

1) 대상 환자의 임상적 특성

71예의 중앙연령은 49세 (범위: 36~66세)였다. T0 1예, T1 22예, T2 40예, T3 6예, T4 2예 였으며, 림프절 전이가 없는 경우가 37예였다. 병리학적 병기는 병기 0 1예, I 16예, II 42예, III 12예였다. 그외 임상적 특성은 Table 1과 같다.

2) 유방 조직에서 telomerase 발현 비교

정상 유방 조직 71예 모두에서 telomerase activity는 관찰되지 않았으며, 유방암 조직중 63예

Table 1. Patient characteristics

Number of patients	71
Age (years) median (range)	49 (36-66)
Size (cm) median (range)	3 (1-7)
T-factor	
T0	1
T1	22
T2	40
T3	6
T4	2
Node	
negative	37
positive	34
Stage	
0	1
I	16
IIA	22
IIB	20
IIIA	10
IIIB	2
Estrogen receptor	
negative	47
positive	22
unknown	2
Progesterone receptor	
negative	46
positive	23
unknown	2
Histologic grade	
1	22
2	31
3	9
unknown	9

(88.7%)에서 telomerase activity가 관찰되었다 ($p < 0.01$). 0.06 μg 의 검체에서도 telomerase activity가 관찰되는 high expression은 17예(23.9%), intermediate expression은 31예(43.7%), low expression은 15예(21.1%)에서 관찰되었다(Table 2).

3) Telomerase activity의 반 정량적 비교

양성대조군 293 세포주 검체 6 μg 을 투여시에 관찰되는 O.D.값을 arbitrary 100 단위로 정할 경우, 모든 유방암 조직의 telomerase activity는 75.3

Table 2. Incidence of telomerase activity expression in paired normal and breast tissues (n=71)

Tissue	Negative	Positive		
		Low	Intermediate	High
Normal	71 (100%)	0	0	0
Cancer	8 (11.3%)	15 (21.1%)	31 (43.7%)	17 (23.9%)

Table 3. Comparison of telomerase activity by clinical parameters

	Telomerase activity		p-value
	Negative-low	Intermediate-high	
T-factor			
T0 - T2	22	41	0.19
T3 - T4	1	7	
Node			
negative	17	20	0.02
positive	6	28	
Stage			
0 - II	23	36	0.005
III	0	12	
Receptor			
negative	11	30	0.60
positive	10	18	

± 17.9 였으며, low expression 군이 66.4 ± 12.0 , intermediate expression 군이 75.4 ± 14.3 , high expression 군이 82.7 ± 24.5 였다.

4) 각 임상 인자에 따른 telomerase 발현 비교

Histologic tumor grade, estrogen receptor, progesterone receptor 발현 및 종양의 크기에 따른 telomerase의 발현도에는 차이가 없었다. 반면, 림프절 전이가 있거나 병기가 진행된 경우 telomerase의 발현이 증가하였다(Table 3).

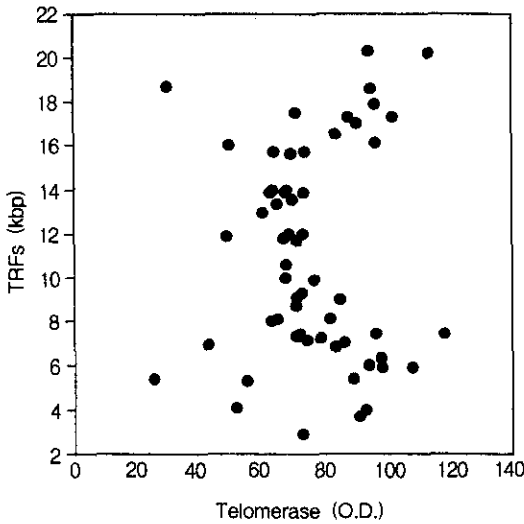


Fig. 1. Correlation of telomerase activity with TRFs in breast cancer tissues.

5) Telomerase activity와 terminal restriction fragment (TRFs) 길이의 변화 비교

Telomerase activity를 발현하는 59예의 환자에서 정상조직과 유방암 조직의 TRFs 길이를 측정하여 비교하였다. TRFs의 길이는 개인에 따라 차이가 심하였으며 암조직에서는 범위가 2.9~20.2 kbp인 반면, 정상조직에서는 7.6~15.8 kbp 였다. 정상 조직과 암조직의 TRFs 사이에 상관성은 없었으며, 암 조직내의 telomerase activity와 TRFs 길이 사이에도 상관성은 관찰되지 않았다(Fig. 1). 정상조직과 암조직의 TRFs 길이 비교시 20예에서는 암조직의 TRFs 길이가 짧았으며, 20예에서는 암조직의 TRFs 길이가 길었고, 19예에서는 정상조직과 암조직의 TRFs 길이가 동일하였다. 정상조직의 TRFs 길이와 암조직의 TRFs 길이가 같은군과 같지 않은 군(길거나 짧은 군)간의 비교시, 같지않은 군에서 telomerase 발현이 높았다(Table 4). 기타 다른 임상인자와 telomerase activity를 비교시, TRFs 길이가 같지 않은 군의 병기가 보다 진행되는 경향이였다(Table 5).

Table 4. Comparison of TRFs length with telomerase activity

Telomerase activity	Changes of TRFs between cancer & normal tissues		p-value
	Same (n=19)	Different (n=40)	
low	6	7	0.005
intermediate	12	17	
high	1	16	

Table 5. Comparison of TRFs length and clinical parameters

	Changes of TRFs between normal & cancer tissues		p-value
	Same (n=19)	Different (n=40)	
T-factor			
T0 - T2	18	33	0.19
T3 - T4	1	7	
Node			
negative	10	19	0.93
positive	9	21	
Stage			
0 - II	18	30	0.066
III	1	10	

6) RNase A 처치에 의한 telomerase activity 억제 정도(RI) 비교

양성대조군 293 세포주를 6 µg 투여하고 RNase의 투여량을 증가시키면서 TRAP assay를 시행하고 telomerase activity를 비교시에 투여 RNase 농도에 따라 dose-dependent 하게 telomerase activity가 감소하였다(Fig. 2). Telomerase activity가 관찰된 63예에서 검체 6 µg에 293 세포주의 telomerase activity를 70% 감소시키는 양의 RNase A를 전 처치후 각각의 환자에서 telomerase activity 억제 정도(RI)를 조사하였다. RI는 telomerase activity에 비례하여 증가하였으며 ($r^2=0.73$, $p<0.001$)(Fig. 3),

B

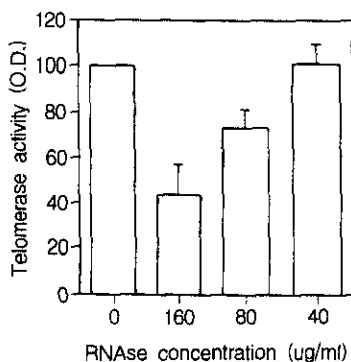


Fig. 2. A: Telomerase activity of 293 control cell line before and after RNase pre-treatment with various concentrations. B: A dose-dependent inhibition of telomerase activity based on RNase concentration.

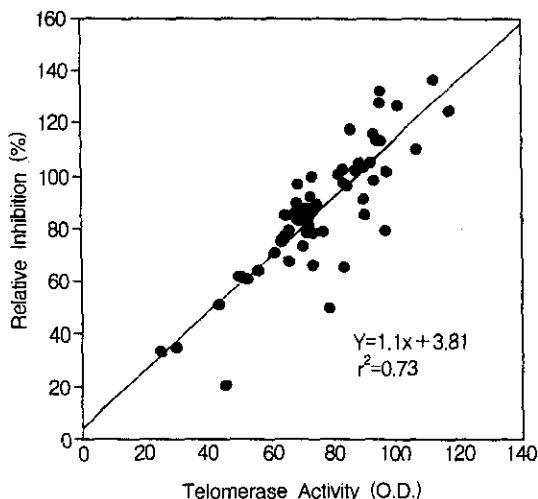


Fig. 3. Correlation of telomerase activity and relative inhibition (RI).

그의 임상적 인자와의 상관성은 관찰되지 않았다 (Table 6).

Table 6. Comparison of relative inhibition(RI) of telomerase activity with clinical parameters

	RI		p-value
	< 87%	≥ 87%	
T-factor			
T0 - T2	32	23	0.08
T3 - T4	2	6	
Node			
negative	21	11	0.10
positive	13	18	
Stage			
0 - II	30	21	0.10
III	4	8	
Telomerase			
low	13	2	0.003
intermediate-high	21	27	
TRFs differences			
same	15	7	0.09
different	16	22	

고 찰

Telomerase는 RNA-dependent DNA polymerase로 TTAGGG의 염기서열을 반복적으로 생성시킴으로써 세포분열시에 발생하는 유전자 손실을 보충

시킨다(3). 정상 체세포는 수차례의 세포분열 끝에 telomere 길이가 일정 길이 이하로 감소하면 더 이상 분열하지 못하고 사멸하는 반면, 일부 암세포는 telomerase가 활성화됨으로써 손실된 telomere를 보충하여 immortality를 나타낸다. 본 연구

에서도 유방암 환자의 정상 유방 조직은 71에 모두에서 telomerase의 발현이 관찰되지 않았다. 그러나 유방암 조직에서는 88.7%에서 발현이 관찰되었으며 그 발현정도가 조직에 따라 다름을 확인하였다. 이러한 발현정도의 차이는 유방암 조직내에서 telomerase의 활성화가 나타난 세포수에 차이가 있음을 의미한다. 즉, 대부분의 암세포는 M1 사멸기전은 극복하지만 M2 기전을 반드시 극복하지 않고도 종양형성이 가능하며 이는 암 세포가 M2 사멸기전에 이르기 전에 적어도 50번은 분열할 수 있기 때문이다. 따라서 본 연구에서 관찰된 바와 같이 암조직이 얼마나 많은 immortalized 세포로 구성되어 있느냐에 따라서 암환자의 치료방향이 정해질 수 있음을 제시한다 하겠다(34).

본 연구 결과, 종양의 크기, 암 분화도, 호르몬 수용체 발현등의 기존 예후인자와 telomerase 발현과의 상관성은 관찰할 수 없었다. 반면 림프절 전이가 발생 할수록, 혹은 유방암의 병기가 진행 할수록 telomerase activity가 증가하였다. 즉, 암이 진행할수록 여러가지 유전자 변화가 발생하며, 그 중 일부에서 telomerase 활성화되므로 이와같이 telomerase가 활성화되는 경우에는 여러가지 유전자의 변화가 있음에도 불구하고 M2기전을 극복하고 암세포가 생존할 수 있음을 의미한다 하겠다.

암 종양조직에서는 telomerase의 활성 변화뿐만 아니라 변화된 telomere의 길이도 보고되었고 그 길이는 종양조직에 따라 매우 다양하였다(32,33). 따라서 telomere의 길이가 짧은 암은 길이가 긴 암에 비해 세포분열이 보다 많이 발생하였다고 가정할 수가 있으며, 그 결과 전이 암조직에서의 telomere 길이는 정상 조직에 비해 차이가 있음을 발견하였다(7,32,33). 그러므로 terminal restriction fragment (TRF) 길이는 세포증식의 과거력으로 이용되거나 증식능을 대변할 수 있음이 제시되었다. 반면 pre-M2 stage에 있는 암세포는 telomere의 길이가 짧지도 않을뿐 더러 telomerase의 활성이 증가되어 있지 않다고 해석할 수가 있다. 이러

한 이유에서 현재까지 보고된 여러 문헌상 telomere의 변화 및 telomerase의 발현이 암조직에서 관찰되나 세포증식과의 상관성은 확인되지 않고 있다(15,19). 본 연구에서는 동일 환자에서 정상 유방조직과 유방 암조직의 TRFs를 측정하여 그 차이 발현 여부를 조사하였다. 정상조직과 암조직에서의 TRFs 길이는 개인차가 심하였으며, 정상조직과 암조직사이의 TRFs 사이에는 직접적인 관련성을 찾을 수가 없었다. 또한 TRFs 길이와 telomerase activity와의 상관성도 관찰할 수가 없었다. 이러한 결과는 저자들이 검사를 시행한 시점이 serial 변화를 추적한 것이 아니고 한 시점에서 측정하여 TRFs 길이와 telomerase activity를 비교하였기 때문에 나타난 현상일 가능성을 배제할 수 없었다. 따라서 동일 환자에서 정상조직과 암조직의 TRFs 길이를 비교하여 이들 사이에 차이가 있는 경우가 telomere에 변화가 나타나고 그 결과 telomerase 활성이 보다 증가 되어 있을 것으로 가정하였다. 이와같은 가정에서 정상조직과 종양에서의 TRFs의 변화에 따른 특성을 비교한 바, TRFs의 변화가 관찰되는 군에서 암의 병기가 보다 진행되어 있음을 관찰하여, TRFs의 변화가 발생할 경우 암의 진행에 관계하는 다른 유전자도 활성화되어 있을 가능성을 유추할 수 있었다. 또한 TRFs의 변화가 발생한 군에서 telomerase의 고발현군이 현저히 증가되어 있음을 확인할 수 있어, 이들 두 인자의 변화가 동시에 관찰되는 경우 보다 telomerase activity의 억제가 요구되는 시점으로 판단하였다. 따라서 telomerase의 억제를 치료개념으로 하는 새로운 암 치료법을 계획할 경우, 이와같이 TRFs와 telomerase activity의 변화가 동시에 관찰되는 환자가 보다 효과적인 대상 환자가 될 것으로 판단하였다.

Telomerase activity를 억제시키는 치료를 시행하고자 할 때, 치료효과의 판정을 위해 치료후의 telomerase activity 변화를 정확하게 추적할 수 있어야 한다. Telomerase activity를 측정하는 TRAP assay는 아주 적은 양의 조직으로도 telomerase의 활성 측정이 가능하나 이 방법의 문제점은 객관

적인 수치화가 어려워 임상적으로 응용하기에는 여러가지 제약점이 있다. 또한 PCR Taq-polymerase의 억제물질에 의한 위 음성 가능성이 기술적으로 상존하고 있다는 점이다. 따라서 본 연구에서는 telomerase 활성도의 객관적인 비교를 위해 telomerase activity를 양성대조군 293세포주의 활성도와 비교하는 semi-quantitation법을 개발하고자 하였다. 먼저 양성대조군 293 세포주의 추출물에 RNase A를 농도별로 반응시켰을 때 투여한 RNase A의 양에 따라 293 세포주에서 관찰되는 telomerase activity가 용량비례곡선을 나타냄을 확인하였다(Fig. 2). 다음 TRAP assay상 관찰되는 band density가 70% 억제되는 RNase의 양을 정하고 동량의 RNase A를, telomerase를 발현 하는 유방암 조직 추출물에 투여하고 TRAP assay상 관찰되는 band density의 변화를 추적하였다. 그 결과 동일한 각 조직의 추출물에 동일한 양의 RNase를 투여했음에도 불구하고 개체별로 억제되는 양은 서로 차이가 있음을 확인하였다. 이 경우 가능한 이유들로는 추출물내에 telomerase외에 다른 RNA들이 많이 존재하여 competition이 발생하였거나, PCR에 의한 과대증폭 혹은 telomerase의 발현에 필요한 activation protein들의 차이에서 발생할 가능성이 있다 하겠다(34). 이점을 확인하기 위해 먼저 telomerase activity와 RI를 비교한 바, telomerase activity가 높은 경우에 RI가 증가함을 확인할 수 있었다. 즉 telomerase mRNA의 억제를 목표로 하는 유전자치료 혹은 생물학적 치료를 시행할 경우에는 telomerase activity가 높은 경우에 보다 효과적으로 억제할 수 있음을 제시하였다. 또한 RI는 TRFs의 변화가 발생한 경우, 즉 임상적으로 telomerase activity가 증가한 상황에서 증가됨을 확인할 수 있었다. 따라서 추후 telomerase gene expression을 억제시키는 치료를 시행하는 경우 telomerase activity와 TRFs의 변화가 발생한 환자를 대상으로할 때 보다 효과적으로 치료 효과를 유도할 수 있는, 즉 치료 specificity를 증가시킬 수 있을 것으로 판단하였다.

암의 치료성적을 증가시키기 위해 시행되는 새

로운 시도는 새로운 약제의 개발 혹은 새로운 치료개념의 개발로 진행되고 있다. 최근들어 세포생물학과 분자생물학이 발달함에 따라 telomere와 telomerase를 치료대상으로 하는 생물학적 치료개념이 설립되었다. Telomere는 proliferation history 및 future proliferation capacity를 나타내므로 이를 정확하게 분석하여 현재 시행하는 표준 약물치료의 투여 schedule을 정하는 기본 척도로 사용하고, telomerase는 암세포 혹은 암조직의 변화된 유전자 상태와 immortality를 나타내므로 immortality를 나타내는 세포비를 계산하여 치료계획을 수립하는 근거로 사용하는 개념이 제시되고 있다(35~37). 본 연구에서는 이와는 달리 telomerase 자체 즉, telomerase expression을 억제시키는 치료를 계획하는 과정에서 TRFs와 telomerase activity를 치료대상 선정 기준으로 사용함으로써 보다 효과적으로 이와같은 치료를 시행할 수 있는 대상군을 선정하는 근거를 조사하였고, 치료후 그 효과를 비교할 수 있는 방법을 개발하였다.

결 론

유방암 조직에서의 telomerase activity는 유방암의 병기 및 TRFs의 변화와 비례함을 확인하였다. 또한 telomerase activity가 증가한 경우에 RNase 투여에 의한 telomerase activity가 TRAP assay 상 보다 효과적으로 감소함을 확인하였다. 따라서 telomerase gene expression의 억제를 치료 목표로 할 경우 TRFs와 telomerase activity가 치료대상 선정 기준으로 사용할 수 있을 것으로 기대되며, 그 효과를 판정하는데 semi-quantitative TRAP assay가 유용하리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Shay JW, Pereira-Smith OM, Wright WE. A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res* 1991; 196: 33-39.
2. Wright WE, Pereira-Smith OM, Shay JW. Reversible cellular senescence: implications for immortalization

- of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 3088-3092.
3. Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 1991; 256: 271-282.
 4. Watson JD. Origin of concatameric T7 DNA. *Nature New Biol* 1972; 239: 197-201.
 5. Zakian VA. Structure and function of telomeres. *Annu Rev Genet* 1989; 23: 579-604.
 6. Allshire RC, Dempster M, Hastie ND. Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 4611-4627.
 7. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG. Telomere function in human colorectal carcinoma and with aging. *Nature* 1990; 346: 866-868.
 8. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991; 350: 569-573.
 9. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB. Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* 1992; 225: 951-960.
 10. Shay JW, Wright WE, Brasiskyte D. E6 of human papilloma virus type 16 can overcome the M1 stage of immortalization in human mammary epithelial cells but not in human fibroblasts. *Oncogene* 1993; 8: 1407-1413.
 11. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011-2015.
 12. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10114-10118.
 13. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during aging of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345: 458-460.
 14. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO* 1992; 11: 1921-1929.
 15. de Lange T. Activation of telomerase in a human tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2882-2885.
 16. Landberg G, Nielsen NH, Nilsen P, Emdin SO, Cajander J, Roos G. Telomerase activity is associated with cell cycle deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 549-554.
 17. Mao L, El-Nagger AK, Fan YH, Lee JS, Lippman SM, Kayser S, Lotan R, Hong WK. Telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent tissues. *Cancer Res* 1996; 56: 5600-5604.
 18. Hiyama E, Yokoyama T, Tatsumoto N, Hiyama K, Imamura Y, Murakami Y, Kodama T, Piatyszek MA, Shay JW, Matsuura Y. Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 3258-3262.
 19. Bednarek AK, Sahin A, Brenner AJ. Analysis of telomerase activity levels in breast cancer: positive detection at the in situ breast carcinoma stage. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 11-16.
 20. Wan M, Li WZ, Duggan BD, Felix JC, Duggan D, Dubeau L. Telomerase activity in benign and malignant epithelial ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 437-441.
 21. Kyo S, Takakura M, Kohama T, Inoue M. Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res* 1997; 57: 610-614.
 22. Yoshida K, Sugino T, Tahara H, Woodman A, Bolo-deoku J, Nargund V, Fellows G, Goodison S, Tahara E, Tarin D. Telomerase activity in bladder carcinoma and its implication for noninvasive diagnosis by detection of exfoliated cancer cells in urine. *Cancer* 1997; 79: 362-369.
 23. Gupta J, Han LP, Wang P, Gallie BL, Bacchetti S. Development of retinoblastoma in the absence of telomerase activity. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1152-1157.
 24. Sommerfeld HJ, Meeker AK, Piatyszek MA, Bova GS, Shay JW, Coffey DS. Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue. *Cancer Res* 1996; 56: 218-222.
 25. Ueda M, Ouhitit A, Bito T, Nakazawa K, Lubbe J, Ichihashi M, Yamasaki H, Nakazawa H. Evidence for UV-associated activation of telomerase in human skin. *Cancer Res* 1997; 57: 370-374.
 26. Tahara H, Nakanishi T, Kitamoto M, Nakashio R, Shay JW, Tahara E, Kajiyama G, Ide T. Telomerase activity in human liver tissue: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 1995; 55: 2734-2736.
 27. Hohaus S, Cavallo S, Bellacosa A, Genuardi M, Galli J, Cadoni G, Almadori G, Lauriola L, Litwin S, Maurizi M, Neri G. Telomerase activity in human laryngeal squamous carcinomas. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1895-1900.
 28. Wright WE, Shay JW, Piatyszek MA. Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensi-

- tivity. *Nucleic Acid Res* 1995; 23: 3794-3795.
29. Beahrs OH, Meyers MH. *Manual for staging of cancer*, 4th ed. Philadelphia: Lippincott, 1992.
 30. Doussal VL, Tubiana-Hulin M, Friedman S, Hacerne K, Spyratos F, Brunet M. Prognostic value of histologic grade, nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson(SBR): an improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal carcinomas. *Cancer* 1989; 64: 1914-1922.
 31. Yates F. Analysis of contingency tables with grouping based on quantitative characters. *Biometrika* 1956; 35: 176-181.
 32. Rogalla P, Rohen C, Bonk U, Bullerdiek J. Telomeric repeat fragment lengths are not correlated to histological grading in 85 breast cancers. *Cancer Letters* 1996; 106: 155-161.
 33. Rogalla P, Rohen C, Henning Y, Deichert U, Bonk U, Bullerdiek J. Telomere repeat fragment sizes do not limit the growth potential of uterine leiomyomas. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 211: 175-182.
 34. Harrington L, McPhail T, Mar V, Zhou W, Oulton R, Amgen EST Program, Bass MB, Arruda I, Robinson MO. A mammalian telomerase-associated protein. *Science* 1997; 275: 973-977.
 35. Raymond E, Sun D, Chen SF, Windle B, von Hoff DD. Agents that target telomerase and telomeres. *Pharmaceutical Biotech* 1996; 7: 583-591.
 36. Parkinson EK. Do telomerase antagonists represent a novel anti-cancer strategy? *Br J Cancer* 1996; 73: 1-4.
 37. Zhang W, Piatyszek MA, Kobayashi T, Estey E, Andreeff M, Deisseroth AB, Wright WE, Shay JW. Telomerase activity in human acute myelogenous leukemia: inhibition of telomerase activity by differentiation-inducing agents. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 799-803.