대한소아혈액종양학회지
제 1 권 제 2 호 1994

신경아세포종에서 N-myc 유전자증폭에 관한 연구

연세대학교 의과대학 소아과학교실, 연세암센터, 암연구소, 병리학교실*

유 철 주 · 김 병 수 · 정 우 희*

=Abstract=

N-myc Amplification in Neuroblastoma

Chuhl-Joo Lyu, M.D., **Byung Soo Kim,** M.D. and **Woo Hee Jung,** M.D.*

Department of Pediatrics, Cancer Center and Institute for Cancer Research, Pathology, Yonsei University College of medicine, Seoul, Korea*

Background: Tumor specimens from 19 patients with untreated primary neuroblastoma were assayed for amplification of the N-*myc* oncogene to determine whether N-*myc* gene amplification correlated with clinical outcome.

Methods: Tumor DNA was extracted from 3 fresh frozen tissues and 16 paraffin embedded samples. N-*myc* amplification was analyzed by hybridization with the radiolabeled probe pNB-1.

Results: Amplification(over 3 copies) of the N-*myc* gene was found in 8 of the 19 patients(42%). Amplification was not found in 2 stage I, but it was found in 1 stage II, 1 of 6 with stage III, and 6 of 10 with stage IV tumors. 5 of 11 patients whose tumors had 1 copy number are alive without disease, while only 3 of 8 patients whose tumors had more than 3 copies are alive and 2 have a recurrence.

Conclusion: These results suggest that the genomic amplification of N-*myc* seems to be a prognostic indicator and this gene may play a role in the progression of certain neuroblastoma.

Key Words: N-*myc*, Neuroblastoma

서 론

신경아세포종은 소아에서 주로 발생되어지는 종양으로 소아의 5대 악성종양중 하나이며, 중추신경계 종양 다음으로 흔한 고형종양이다. 지난 수십년간 소아 종양의 치료에는 획기적인 발전이 있어, 급성 림프구성 백혈병과 윌름종양은 완치율이 상당히 높아졌으나 신경아세포종은 상대적으로 치료성적이 좋지 않고 생존율도 아직 낮은 상태이다. 최근에는 고용량의 항암요법이나 골수이식까지도 시도되어지고 있으나 치료에 따른 부작용과 실패율도 높아 이

†본 연구는 1993년도 연세대학교 의과대학 일반과제연구비(교수연구비)로 이루어졌음.

질환 치료에 난점이 많다. 어떤 경우에는 치료를 하지 않아도 자연적으로 퇴화되거나 분화되어지는 특징도 있어, 치료를 하여야 하는 유무와 사용 약제의 종류와 양을 결정하는 것도 매우 힘들다.

이 종양의 치료 결과를 예측할 수 있는 예후인자로는 진단당시 연령과 병기가 매우 중요하게 사용되어졌다. 또한 소변내 VMA(vanillylmandelic acid)/HVA(homovanillic acid) 비, 혈중 ferritin 치도 사용되어진다. 최근에는 종양세포의 DNA 양(DNA ploidy)과 N-*myc* 유전자증폭수(N-*myc* gene amplification)가 중요한 예후인자로 거론되어지고 있다.

본 연구에서는 신경아세포종 환아에서 종양세포내 N-*myc* 증폭수를 관찰하고 병기, 조직학적 소견등과 함께 치료결과와 비교관찰하여 보았다.

대상 및 방법

1976년부터 1991년까지 연세대학교 의과대학 세브란스병원과 영동세브란스병원에 입원하여 수술제거후 병리조직학 검사상 신경아세포종으로 진단받은 16명 환아의 사용가능한 paraffin 보관조직과 3명의 신선 냉동조직을 사용하였다. Paraffin 보관조직은 암세포 조직이 포함된 부위를 광학현미경으로 선별하여 사용하였다.

1. DNA 추출

Goelz등[1]이 추천한 방법으로 DNA를 추출하였다. 즉, 20 μm 두께의 paraffin 보관조직 절편 5개를 eppendorf tube에 넣은 후 65℃에서 paraffin을 녹여 제거하였다. 여기에 1ml의 xylene을 넣은 후 10분간 잘 혼합한 뒤 원심분리(14,000rpm, 10분간) 한 후, 상층액은 버리고, 99% ethanol을 사용하여 같은 방법으로 2차례 시행하였다. 또한 95% ethanol을 사용하여 같은 방법으로 1차례 시행하였다.

얻어진 sample을 건조한후 lysis buffer(10mM Tris.Cl, 10mM EDTA, 10mM NaCl, 0.5% SDS)와 proteinase K를 넣은 후 48℃에서 18시간 incubation 시켰다. Cell lysis가 끝난 것을 확인한 후 DNA를 추출하였다. DNA 추출은 phenol, chloroform, isoamyl alcohol을 사용하는 통상적인 방법으로 하였다[2]. 신선조직은 homogenize한 후에 같은 방법으로 cell lysis 후 DNA를 추출하였다.

2. pNB-1 균주 배양과 N-*myc* 소식자(probe) 추출

Human Kelly neuroblastoma 세포로부터 얻어진 N-*myc* 원형암유전자(protooncogene) plasmid를 포함한 E. coli HB101(pNB-1) 균주[3]를 ATCC (American Type Culture Collection)로 부터 구하여 증식배양후 DNA를 추출하여 소식자 분리후 사용하였다. 증식배양은 균주를 배양액(LB medium: yeast extract 5gm, bacto trypton 10gm, NaCl 5gm in 1L distilled water of pH 7.5)에서 흔들면서 overnight 배양하였다.

배양액을 7,000rpm에서 25분간 원심분리한 후 상층액을 버리고, 침전물을 모아 TE buffer 100ml에 녹이고, NaOH-SDS 200ml을 넣은 후 잘 섞었다. Potassium acetate 150ml을 넣고 잘 섞은 후 얼음에 담가 놓았다. 7,000rpm에서 약 50분간 원심분리한 후 상응액을 모아 cold ethanol을 2∼2.5배 넣고, 얼음에 담가 놓은 후(20∼30분간) 약 25분간 원심분리(7,000rpm)하여 상층액은 버린 후 건조시킨 것을 7ml의 증류수에 녹였다.

증류수에 녹아 있는 DNA에 7.5gm CsCl를 녹여 잘 흔들어 주고 800μl ethidium bromide를 넣은 후 ultracentrifuge(25℃ 65,000rpm, 24시간)를 시행하였다. 원심분리한 것중 closed circular plasmid DNA층과 linear 혹은 nicked circular DNA층을 취하였다. 취해진 용액에 동량의 isoamyl alcohol을 넣고 잘 흔든후 2,000rpm으로 5분간 원심분리후 상층액을 버렸다. 같은 방법을 4∼5차례 시행하였다. 2배의 TE buffer를 넣고, 최종량의 2.5∼3배의

absolute alcohol을 넣은 후 -20℃에서 overnight 시키고 14,000rpm에서 10분간 원심분리하여 침전물을 얻어 건조시킨후 증류수에 녹였다.

증류수에 녹여진 DNA를 EcoRI과 HindIII 유전자제한부위 절단효소로 절단한후 0.8% 한천겔에 전기영동하고 elution하여 N-*myc* 소식자를 얻었다.

3. 추출된 DNA로 Southern blotting과 소식자 교잡(probe hybridization) 및 판독

Paraffin 보관조직에서 추출된 DNA는 우선 양을 측정하였다. DNA sample을 spectophotometer로 측정하여 highly pure DNA(즉 $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$)로 추출된 sample 만을 사용하였다.

각 sample당 같은 양(10 μg)의 DNA를 취하여 EcoRI 유전자제한부위 절단효소로 절단하였다. 절단이 잘 되었는지 혹은 동량이 사용되었는지를 확인하기 위하여 모든 sample을 한천겔에 전기영동시킨후 UV light하에서 확인하였다. 절단이 확인된 각 sample DNA를 0.8% 한천겔에 전기영동한후, 한천겔을 denaturation과 neutralization 시킨후 nylon membrane(Hybond-N^+, Amersham)에 흡착시켰다. 통상적인 방법[2]으로 N-*myc* 소식자 표식(labeling) 및 교잡(hybridization)한 후 필름에 자가방사하여 기록시킨 것으로 판독하였다. 자가방사된 양은 densitometer(PDMS, Sakura Co.)로 측정하여 증폭정도를 판정하였다.

결 과

신경아세포종 조직에서 N-*myc* 유전자증폭을 확인하기전 기초실험을 시행하여 3명의 정상 성인의

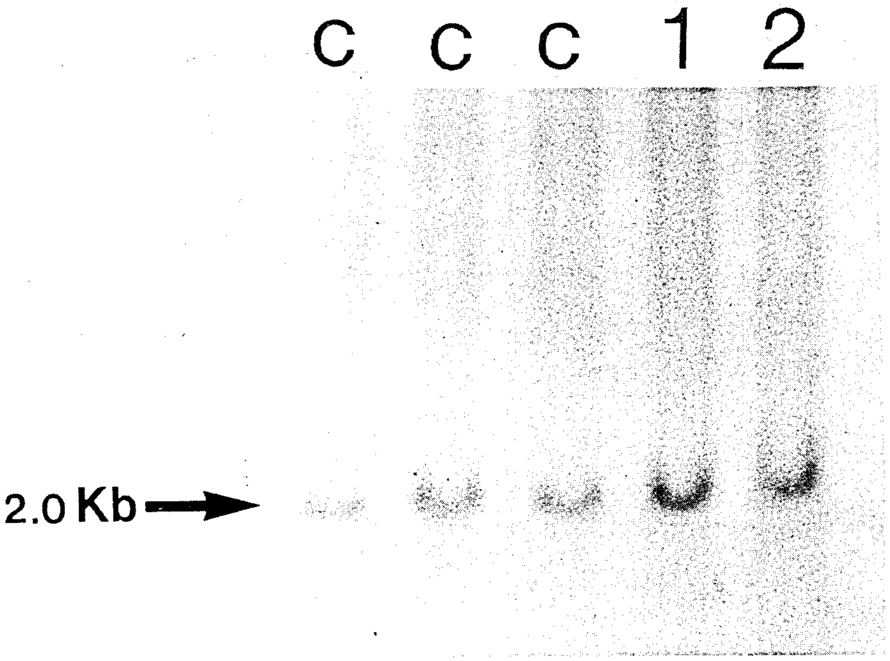

Fig. 1. Southern blot analyses showing single copy number of N-*myc* gene in 2 (case 1 and 2) untreated neuroblastoma tumors. EcoRI restriction endonuclease was used to digest 10μg of DNA from 3 control human WBC(C) and 2 fresh-frozen neuroblastoma tumor specimens(1, 2). ^{32}P-labeled N-*myc*(pNB-1) probe was used.

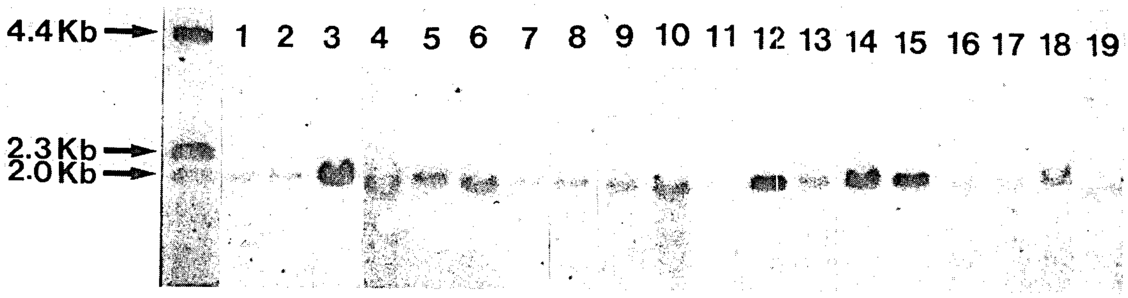

Fig. 2. Southern blot analyses of DNA from 19 untreated primary neuroblastomas.

Table 1. Patients distribution according to stage and N-*myc* amplification

Stage	N-*myc* copy number		
	1	3∼10	>10
I	2 (2)*		
II			1 (1)
III	5 (3)	1 (0)	
IV	4 (0)	3 (0)	3 (2)
Total	11 (5)	4 (0)	4 (3)**

* ( ): Number of long term survivors(more than 3 years)

** 2 out of 3 patients were relapsed

백혈구(control)에서 분리한 DNA와 2례의 신선냉동조직(신경아세포종 환아 case 1, 2)에서 분리한 DNA에서 N-myc 유전자증폭을 검사하였다(Fig. 1). 모두 하나의 복사(copy)가 존재함을 알 수 있었다.

총 19례의 신경아세포종 조직에서 DNA를 분리하여 N-*myc* 유전자증폭을 검사하였다(Fig. 2). 총 19례중 8례(42%)에서 3배이상의 증폭을 확인할 수 있었다. 10배이상의 복사를 보였던 경우는 4례(case 3, 12, 14, 15)였으며, 3∼10배의 복사를 보였던 경우는 4례(case 4, 5, 6, 10)였다.

Table 1은 병기와 N-*myc* 유전자증폭에 따른 환자의 분포를 나타낸 도표이다. III 병기 6례중 1례(17%), IV 병기에서는 10례중 6례(60%)에서 3배이상의 N-*myc* 유전자증폭을 관찰할 수 있었다. N-*myc* 유전자증폭이 존재하지 않았던 11례중 5례(45%)가 3년이상 무질병상태로 생존중에 있으며, 3∼10배의 증폭을 보인 4례는 모두 사망하였고, 10배이상의 증폭수를 보였던 4례의 환자중 II 병기였던 1례는 현재 무질병상태로 생존중이며, IV 병기였던 3례중 2례가 생존중이나 현재 재발되어 치료중에 있다.

고 찰

N-*myc* 유전자는 c-*myc* 원형암유전자(protooncogene)와 매우 비슷한 유전자 구조를 가지고 있는 것으로 신경아세포종 세포주로 부터 처음 분리되었다[4]. N-*myc* 유전자는 정상세포에서 2번 염색체 단완(short arm)의 23∼24에 위치하는 유전자로 정상세포에서 하나의 복사(copy)가 존재한다[5]. 그러나 신경계 기원의 종양인 신경아세포종, 망막아종, 소세포성 폐암에서 이 유전자의 증폭이 관찰되었다. 이러한 유전자의 증폭은 homogeneously staining regions(HSRs) 혹은 double minutes(DMs)로 부터 생겨진다고 할 수 있다[6]. N-*myc* 유전자증폭이 발견되어지는 신경아세포종은 소아에서 주로 발생되어지는 종양으로, 병이 진행되어 있는 경우에는 최근

의 발전된 여러 치료에도 불구하고 치료 성적이 좋지 않다. 현재로서는 예후인자를 확인하여 예후가 불량하리라 예상되는 경우 적극적인 치료를 하는 것이 치료 성적을 높힐 수 있는 방법이다. 이 종양의 예후인자로는 진단 당시 연령과 병기 이외에 소변내 VMA/HVA 비, 혈중 ferritin 치가 사용되어지며 최근에는 종양세포의 DNA 양과 N-*myc* 유전자증폭수가 중요한 예후인자로 거론되어지고 있다. Oppedal등[7]에 의하면 1.5세 이하인 경우 예후가 양호하여 진단당시 연령이 가장 중요한 예후인자라 하였다. 또한 병기와 조직의 분화정도가 중요한 예후인자였고, 이외에 종양조직의 DNA양이 중요한 예후인자로 작용한다고 결론지었다.

N-*myc* 유전자증폭이 병의 진행정도와 연관이 있다는 보고는 1984년 Brodeur등[8]에 의하여 처음 발표되었다. 63명의 치료전 냉동보관 조직에서 DNA를 분리하여 N-*myc* 유전자증폭을 알아본 결과 24명(38%)에서 3배이상의 증폭을 발견할 수 있었다. 병기별로는 I 병기인 5명, II 병기인 10명의 환아에서는 증폭이 없었던 반면 III 병기인 23명중 11명과 IV 병기인 25명중 13명에서 증폭이 존재하여 III, IV 병기에서만 50%(48명중 24명)의 환자에서 증폭이 관찰되었다. 이러한 결과는 N-*myc* 유전자증폭은 병이 진행되어 있는 것과 밀접한 연관성이 있음을 보여준다.

Seeger등[9]은 I 병기와 IV-S 병기 환자 모두에서 N-*myc* 유전자증폭이 없었던 반면 II 병기에서는 16명중 2명(12.5%), III 병기에서는 20명중 13명(65%), IV 병기에서는 40명중 19명(47.5%) 이 N-*myc* 유전자증폭을 가져온 결과를 보고, 치료전 신경아세포종 세포로 부터 N-*myc* 유전자증폭수는 진단 당시의 병의 진행정도와 밀접한 관계가 있다고 보고하였다. 또한 증폭 정도도 3～10배인 경우와 10배 이상인 경우를 비교하여 볼때 증폭수가 10배 이상인 경우일때 병이 많이 진행되어 있음을 확인하였고, 같은 치료를 하여도 증폭수가 많은 경우 생존율이 의의있게 낮음을 알았다. 결론적으로 I, II, III, IV-S 병기인 경우와 1세 미만의 IV 병기에서 N-*myc* 증폭수가 1이면 예후가 좋아 일반적인 치료로 충분하지만 병의 진행이 많고 N-*myc* 증폭수가 많은 경우에는 더욱 강력하고 적극적인 치료가 요한다고 하였다.

또한 Tsuda등[10]은 52명의 신경아세포종 환아의 N-*myc* 유전자증폭을 연구한 결과 I 병기에서는 증폭이 없었고, II 병기에서는 14%(7명중 1명), III 병기에서는 31%(13명중 4명), IV 병기에서는 67%(18명중 12명)의 N-*myc* 증폭을 관찰하고 이러한 N-*myc* 유전자증폭수는 예후와 밀접한 관계가 있으며 병기와 조직학적 소견과 더불어 예후를 결정하는 중요한 인자라고 결론지었다.

본 연구대상 환자 19례중 I, II 병기는 3례였고, III 병기가 6례, IV 병기가 10례로 대상환자중 많은 수가 III 병기 이상으로 진단당시 많이 진행되어 있었다. N-*myc* 유전자 증폭을 보인 경우는 8례(42%)였으며, 이와같은 결과는 유전자증폭을 보인 경우가 다른 논문에 비하여 상대적으로 적은 편이었다. 특히 III 병기의 6례중 1례만이 N-*myc* 유전자증폭을 보였다. N-*myc* 유전자증폭이 존재하지 않았던 11례중 5례가 장기간 무병생존하였던 반면, 3배이상의 증폭이 존재한 8례중 3례만이 생존중에 있고 이중 2례는 진단당시 IV 병기이고 치료시작후 반응이 좋았으나 각각 치료시작 18개월, 23개월에 재발하여 계속 치료중에 있다.

N-*myc* 유전자증폭은 질환의 진행정도와 밀접한 관계를 가지고 있다. 그러나 진단당시 많이 진행되어 있는 경우에도 상당수가 증폭을 보이지 않는 경우가 있으므로 단독으로 예후를 판정하기에는 약간의 어려움이 있다. 본 연구에서도 진단당시 IV 병기였던 10례중 4례에서는 유전자증폭을 보이지 않았으며 치료중 재발하여 모두 사망하였다. 그러므로 N-*myc* 유전자증폭 유무는 여러 다른 예후인자와 연관되어 사용되어야 할 것으로 생각되어진다.

결 론

신경아세포종으로 진단된 환자중 치료전 수술로 조직을 얻을 수 있었던 3례와 사용가능한 paraffin 보관조직이 있는 16례를 대상으로 종양세포조직으로 부터 추출된 DNA에서 N-*myc* 유전자증폭을 검사하여 본 결과 8례(42%)에서 3배이상의 증폭을 보였으며, 진단당시 I 병기였던 2례는 모두 증폭이 관찰되지 았았으며 모두 장기간 무병생존하였던 반면, 진단당시 IV 병기였던 10례중 6례에서 3배이상의 증폭이 관찰되었다. 증폭이 없었던 11례중 5례에서 장기간 생존중이나, 증폭이 있었던 8례에서는 3례만이 생존중이며 이중 2례는 재발되어 치료중에 있다.

결과적으로 신경아세포종에서 치료전 조직세포로 부터의 N-*myc* 유전자증폭 유무는 예후와 관련이 있는 것으로 생각되며, 다른 예후인자와 같이 고려된다면 치료방침과 예후판정에 중요한 역활을 하리라 생각된다.

참 고 문 헌

1) Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B: *Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. Biochem Biophys Res Commun 130: 118-126, 1985*
2) 김길영,유철주,오승환,양창현: 분자생물학적 방법을 이용한 소아 급성 림프구성 백혈병의 분류. 대한소아혈액종양학회지 *1: 69-78, 1994*
3) Stanton LW, Schwab M, Bishop JM: *Nucleotide sequence of the human N-myc gene. Proc Nathl Acad Sci USA 83: 1772-1776, 1986*
4) Kohl NE, Kanda N, Schreck RR, et al: *Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastoma. Cell 35: 359-367, 1983*
5) Schwab M, Varmus HE, Bishop JM, et al: *Chromosomal localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. Nature 308: 288-291, 1984*
6) Brodeur GM, Seeger RC, Sather H, et al: *Clinical implication of oncogene activation in human neuroblastomas. Cancer 58: 541-545, 1986*
7) Oppedal BR, Storm-Mathisen I, Lie SO, et al: *Prognostic factors in neuroblastoma. Clinical, histopathological, and immunohistochemical features and DNA ploidy in relation to prognosis. Cancer 62: 772-780, 1988*
8) Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, et al: *Amplification of N-myc in untreated human neuroblastoma correlates with advanced disease stage. Science 224: 1121-1124, 1984*
9) Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, et al: *Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastoma. N Engl J Med 313: 1111-1116, 1985*
10) Tsuda T, Obara M, Hirano H, et al: *Analysis of N-myc amplification in relation to disease stage and histologic types in human neuroblastoma. Cancer 60: 820-826, 1987*