

제 14 차 대한두경부종양학회

■ 심 포 지 음 ■

1

Carcinogenesis of Oral Cancer

입 인 경

이주대학교 의과대학 생화학교실

발암과정은 크게 발암개시기, 발암촉진기 그리고 암 세포진과기의 3 단계로 분류된다고 하겠다. 발암개시기에는 독특한 각종 발암원이 핵 내 DNA와 결합하여 carcinogen-DNA adduct를 형성하는 돌연변이를 이루며, 발암촉진기에는 발암촉진제의 작용으로 세포형태 변형 및 성장속도 촉진 등의 phenotype 변화를 유도한다. 이후, 일련의 유전자변이 현상들이 축적되면서 암세포를 형성하고 주변조직으로 침윤되는 암세포진과기가 수반된다. 전립선암의 발생과정과 함께 구강암을 비롯한 두경부종양의 발생과정은 이와같은 일련의 유전자변이를 특히 많이 요구하는 암종에 속한다고 한다 (Mol Carcinog 1993 ; 7 : 139-46).

구강상피암(Oral Squamous Cell Carcinoma) 발생빈도 및 발암원

Oral SCC 호발빈도는 전 세계 암발생의 6위에 해당한다고 하며(Johnson NW, Cambridge University Press, 1991), 호발지역으로는 인도대륙, 수단, 파프아 뉴기니아 그리고 아시아가 이에 속한다. 인도대륙에서 발생하는 구강암빈도는 전 구강암 발생의 47%를 차지하며 이는 연간 56,000명에 해당한다. 이에 반하여 영국에서 발생하는 것은 3% 미만이라 한다.

발암원으로서 tobacco, toombak(Sudan snuff) 등 흡연 ; lime 또는 betel nut 잎담배 씹기 ; 그리고 비타민 A, C, E, beta carotene 같은 항산화제 섭취부족 등에 의한다. 한편, 음주는 구강암 발생을 촉진하는

발암촉진제로 분류된다. 흡연을 통하여 체내에 전달되는 화학발암원은 nicotine alkaloid의 70~90%를 차지하는 nitrosamines(NNN, NNK, NAB, NAT)에 의한 발암기전이 동물모델에서 잘 알려져 있으며 이들은 DNA-carcinogen adduct를 형성하거나 DNA 사슬절단 또는 sister chromatid exchange를 유도한다. betel nut chewing은 구강점막의 손상을 통하여 HPV 감염을 초래하며 HPV type 16, 18의 E6 단백질은 암 억제유전자 p53 단백질 기능을 마비시킨다. lime 종류는 ROS(reactive oxygen species) 발생을 유도하여 구강점막세포 손상을 초래하는 것으로 알려져 있다. 구강암 발생에서 HSV, HPV 등의 바이러스는 co-carcinogen의 기능은 있으나, 그 자체만으로 완전한 발암원 기능은 갖추지 않은 것으로 사료된다.

구강암 발생 동물모델

1. Syrian hamster cheek pouch carcinogenesis

발암원으로는 nitrosamine 류의 7,12-DMBA를 16주간 투여한다. 투여 후 2주째 부터 핵형의 변화가 관찰되어서 tetraploidy 또는 near tetraploidy가 특징적이다. 또한, 12~16주 사이에 stromal eosinophilia가 관찰되며(78%), 이때 악성변환을 하는 상피세포가 발견된다. 이와같이, 암조직과 관련된 eosinophiles들은 TGF- α mRNA를 발현하고 있다.

7,12-DMBA 발암과정 중에 H-ras 유전자 exon 2 codon 61의 A→T 점돌연변이가 발생되고 발암과정 진행된다.

7,12-DMBA에 의한 발암과정에서 관찰되는 특징적 소견으로 doc-1(deleted in oral cancer) 유전자소실 현상을 들 수 있다. doc-1 유전자는 진화기간을 거치면서도 DNA 염기서열이 잘 보존되어 있던 것이나, oral keratinocytes의 악성변환에 의하여 LOH(loss of heterozygosity) 현상이 발생되고 유전자발현이 매우 감소되는 종양억제유전자라고 할 수 있다. 더욱 흥미로

은 것은 이 유전자 염기서열의 89%는 마우스 섬유아세포에 TNF- α 를 투여 할 때에 나타나는 7가지 특이한 유전자들 중의 하나와 완전 일치함을 알게 되었다.

doc-1 유전자를 종양억제유전자라고 할 수 있는 증거 중의 하나로써, hamster oral keratinocyte 악성변형세포에 doc-1 유전자 DNA transfection을 시도한 결과, 악성변형세포의 형질특성들이 사라지고 정상세포화 하는 실험 등을 통하여 확인되었다.

이로서 doc-1 유전자는 햄스터 구강암 발생과정을 억제하는 종양억제유전자라고 할 수 있겠다.

2. 4-NQO(4-nitroquinoline 1-oxide) induced F344 rat oral carcinogenesis

4-NQO는 고기나 생선 등을 고온, 고열 조리 시에 발생하는 단백질분해산물이면서 강한 돌연변이원으로 잘 알려져 있는 화학발암원이다. 이를 이용하여 F344 rat에서 구강발암을 유도하면서 xanthine oxidase inhibitor(ACA)를 동시에 처리하면 설암의 발생이 억제되며(93~100%, $p < 0.001$), 전암병변의 hyperplasia 감소(43~50%, $p < 0.05$), dysplasia 감소(34~48%, $p < 0.05$) 현상 등이 관찰된다. 또한, BrdU labeling index도 감소되고(23~32%, $p < 0.01$), 혀 조직의 polyamine levels이 의미있게 감소된다고 한다(35~40%, $p < 0.05$).

Proto-oncogene in Oral Carcinogenesis

Protooncogene이란 정상세포에 존재하는 유전자로서 세포의 성장과 분화를 조절하는 기능을 갖는 중요한 유전자이다. 두경부종양 발생과정에 관련되어 있는 protooncogene은 PRAD-1/CCND-1/cyclin D1, bcl-1 gene, hst-1/int-2, EGFR(epidermal growth factor receptor), bcl-2 gene, H-ras 1 gene 등의 변화가 잘 알려져 있다.

1. PRAD-1/CCND-1/cyclin D1 유전자증폭 현상

이 유전자의 분리동정은 parathyroid adenoma에서 gene rearrangement와 함께 유전자 발현과다 현상으로 알려지게 되었다. 그러나, PRAD-1은 본래 세포분열주기에 필수적인 G1 시기를 주장하는 cyclin D1을 만드는 유전자임을 알게되었다. PRAD-1은 염색체 11q13에 위치하며 인근에 bcl-1, hst-1, int-2 같은

유전자들이 공존한다.

두경부종양 조직의 30%에서 PRAD-1 유전자증폭 현상이 발견되며(2~10배), 유전자증폭 현상은 종양 진행도와 관련하여 T4 종양에서 61%, T1-T3 종양에서는 22%에서 나타난다. 또한, lymph node에 전이된 종양에서 유전자증폭 현상이 더욱 현저하며 이러한 종양세포의 증식능은 매우 활발한 것으로 알려져 있다.

2. bcl-1 유전자증폭 현상

bcl-1 역시 염색체 11q13 부위에 PRAD-1 gene과 250 kb 거리를 두고 위치한다. 본래는 B-cell lymphoma/leukemia에서 IgH chain locus와 reciprocal translocation t(11:14)(q13:q32)되는 것으로 알려졌다. 두경부암에서는 흔히 분화정도가 나쁜 신진한 종양조직에서 bcl-1 유전자증폭 현상이 관찰되며 bcl-1 rearrangement는 발견되지 않는다고 한다.

3. hst-1/int-2 유전자증폭

hst-1 유전자 역시 염색체 11q13.3 부위에 위치하며 int-2 유전자와 35 kb 떨어져 있으며 PRAD-1과 int-2는 1,000kb 거리에 있다. hst-1/int-2 두 유전자는 FGF(fibroblast growth factor) 가계에 속하는 성장 촉진인자, 세포변형인자이다.

식도암종에서 int-2 과발현이 발견되며 두경부종양에서 이들 유전자증폭 현상은 종양재발과 관련된다고 한다.

4. EGFR(epidermal growth factor receptor) 유전자 발현 증대

두경부종양 조직에서 발현되는 EGFR mRNA 발현은 정상인에 비하여 69배나 되며 두경부종양 환자의 종양 주변조직으로서 현미경 소견상 정상인 조직에서도 EGFR mRNA의 발현은 29 배나 증가되어 있다.

한편, 두경부종양 세포배양계에서 발견되는 EGFR mRNA 발현증대는 정상대조군의 77배나 된다.

5. bcl-2 유전자 발현변이

bcl-2는 non-Hodgkin's lymphoma나 follicular lymphoma 발생과정에 관여하며, 그 발현이 크게 증가되어 있음이 보고되었다. 유전자 발현변이 기전으로는 14q32에 있는 IgH chain locus와 염색체 18번의 bcl-2 유전자가 염색체 전위 t(14:18)에 의하여 그 발현이

증가된 것이다.

정상 구강점막 상피에서 bcl-2의 발현은 10% 미만이나 전암병변(leukoplakia, dysplasia)이나 침윤성 악성종양의 경우에 bcl-2 발현이 증가된 세포는 각각 10~30% 및 60% 이상 되는 것으로 보고 되었다.

p53이 apoptosis의 positive regulator 인데 반하여 bcl-2는 anti-apoptotic protein으로 알려져 있으며, 구강암 전암조직에서 관찰되는 bcl-2 발현변이는 p53 단백질변이와 함께 구강점막세포의 apoptosis 결함을 초래하여 암발생과정 및 암세포전파기에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

6. LOH of H-ras 1 and VTR rearrangement

H-ras-1은 정상세포에서 G-protein을 이루어 세포 내 신호전달계에 중요한 역할을 담당한다. 그러나, 구강암 환자의 39%에서 이 유전자의 LOH가 발견되며 구강암 발생과정 중 초기에 이미 H-ras gene VTR(variable tandem repeats) 부위의 DNA rearrangement가 관찰될 뿐만 아니라 ras gene 변이정도와 병변 진행정도 사이에 상관관계가 희박한 것으로 보아 구강암 발생과정 중에 ras gene 변이는 발암초기에 이미 발생되는 것으로 사료된다.

활성화된 ras gene transfection을 시도하면 상피세포변형이 유도되며, 이때 HPV 감염이 첨가되어 발암 과정이 촉진되는 것이 보고되었다.

Growth Factors and Receptor Mutations

두경부종양 발생과정 중에 관찰되는 세포성장 촉진 인자의 변이는 주로 TGF- α 발현증대 및 FGF 계 성장 인자 변이가 관계되며, 상피세포의 성장을 억제하는 강력한 cytokine TGF- β (hst-1/int-2)의 type II 수용체 변이가 보고되어 있다.

1. TGF- α mRNA 발현증가

두경부종양조직에서 TGF- α mRNA 발현은 정상세포에 비하여 5배 증가되어 있으며 두경부종양 세포배양계에서는 16배 증가되어 있다고 한다.

2. TGF- β RII mutation

TGF- β 에 의한 상피세포 성장억제 기전은 TGF- β type I 수용체와 함께 type II 수용체가 건전하여야

가능하다. TGF- β RII는 type II 수용체를 coding 하는데 이 수용체는 세포막에 걸쳐있는 단백질로서 c-terminal 쪽에 serine/threonine kinase domain이 있다. TGF- β 가 type II 수용체에 결합하면 type II 수용체에 인산화 반응이 진행되며 type I-type II 수용체 dimer를 이루어 핵 안으로 신호를 전달한다. 그러나, 두경부종양에서 발견되는 type II 수용체는 매우 특이하게 serine/threonine kinase 부위에 missense mutation 변이가 발견된다. 따라서 TGF- β 에 의한 세포성장억제가 방해되어 조직은 암세포화 된다.

TGF- β RII mutation은 Ser/Thr kinase domain에 발생하며 G : C \rightarrow C : G transversion으로써 Glutamate \rightarrow Glutamine, Arginine \rightarrow Proline이 대치되어 있다.

3. Retinoic acid receptors(RARs) and Retinoid X receptors(RXRs)

RARs은 all trans retinoic acids와 9-cis-retinoic acid에 대한 수용체로 작용하는데 반하여 RXRs은 9-cis-RA와 결합하여 세포질로부터 핵속으로 신호를 전달한다. 이때, RAR-RXR heterodimer를 형성하며 DNA 염기중 RARE(retinoic acid response element)에 결합한다. 이 중에서 특히 RAR- β 는 염색체 3p24에 위치하며 구강암 발생과정에 관여 되는 것이 보고되었다.

두경부종양 병력이 있는 leukoplakia 환자에게 13-cis retinoic acid(isotretinoin) 투여를 계속한 결과 발암과정이 억제되었으며 second primary tumor의 발생율이 크게 감소하였다. 이때, isotretinoin 투여로 전암병변에 감소되어 있던 RAR- β 발현이 의미있게 증가되는 것이 보고되었다. 흥미있는 것은, retinoic acid는 정상 구강점막의 증식은 증가시키는데 반하여 두경부종양세포의 성장은 억제할 뿐만 아니라 이들의 분화지표인 keratin K1, involucrine, Transglutaminase-1 등의 발현도 현저히 감소하였다고 한다.

Tumor Suppressor Genes

1. p16INK4/MTS1/CDK4/CDKN2

이 유전자는 9p21-22에 위치하며 MTS1(multiple tumor suppressor)/INK4(inhibitor of CDK4)/CDK

41/CDKN2 등의 이름을 가지고 있는 16 kDa의 단백질을 coding 하며 수십 가지 악성흑색종 세포에서 그 유전자 소실이 발생한다고 알려지고 있다. 또한, 장기로서는 lung, breast, brain, bone, skin, bladder, kidney, ovary, lymphocyte 등에 발생한 종양 DNA에서 homozygous deletion 현상이 보고되었다.

이러한 p16 단백질의 정상기능은 세포분열주기 G1 시기에 중요한 D-type cyclin과 결합하는 CDK4에 결합하여 RB 인산화를 방해함으로써 G1 to S 시기의 진행을 억제한다. 그러나 두경부종양에서는 9p21-22 부위의 결손(전체의 72%)이 진행됨으로써 세포분열주기에 관한 조절기능이 소실되어 발암과정이 시작된다.

한편, p16 유전자전사를 조절하는 것은 암억제유전자 RB이며, p16은 Rb의 활성을 조절하는 상호조절관계(feedback loop)를 갖는다. 따라서, 두경부종양 발암과정에서 p16 결손, cyclin D1(11q13) 유전자증폭과 함께 RB protein 결손 등의 변화가 관찰된다.

2. 3p loss

구강암발생과정 중에 나타나는 유전자 결손으로 두번째 흔한 것은 LOH of 3p 현상으로써 전 종양의 52%에서 관찰된다. 이때, 특징적인 것은 결손부위가 한군대 이상이라는 것이다(86%). 가장 흔한 부위는 3p13-3p21.1, 3p21.3, 3p23-25으로써 그 빈도는 LOH of 3p14.1-3 up to 44%, LOH of 3p21.31-3p22 up to 53%, LOH of 3p25 up to 44%로 보고 되었다. 이러한 사실은 3번 염색체 위에 적어도 3가지의 종양억제유전자의 존재를 시사한다고 하겠다.

3p24 위치에 RARb 수용체가 위치한다.

3. LOH and mutation of p53

p53 유전자는 1.18 kb coding capacity, 11 exons 가지고 있으며 20 kb 이상되는 DNA 부위에 걸쳐서 존재한다. p53은 apoptosis 유도인자이며, bcl-2는 반대로 anti-apoptotic protein으로 알려져 있다. 발암과정 중에 관찰되는 p53, bcl-2 발현변화, 즉 apoptosis 관련유전자발현을 측정해 보면 다음과 같다.

따라서, 구강암 발생과정에 관찰되는 p53, bcl-2 유

	Leukplakia	Dysplasia	Invasive cancer
p53 Exp. index	<10%	10 - 60%	>60%
p53 Exp. Index	<10%	10 - 60%	>60%

전자변이는 손상된 세포의 apoptotsis 결함을 초래하여 변형세포 증식을 촉진함을 알 수 있다.

p53 단백질은 TAD(transactivation domain), Core domain(102-292 aa), tetramerization 유도하는 C-terminal domain으로 되어 있으며, core domain 부위가 발암과정 중에 돌연변이를 유도하는 과녁이 된다. Core domain에 있는 R248, R273 아미노산들은 DNA 사슬과 결합하는 성질이 있으며, 이때 비로소 p53 단백질이 종양억제단백으로서의 역할을 수행하게 된다. 암세포에서 가장 흔하게 변이되는 p53 부위가 바로 protein-DNA interface(R248, R273)이다. 또한 p53단백질의 끝에는 p53단백질 tetramer-DNA complex 형성하게 하며 또한 protein-protein contacts 하는 부위가 존재한다.

4. Loss of 13q(RB)

두경부종양 발생과정 중에 관찰되는 LOH of 13q는 약 56% 정도 되며 이를 통하여 RB 종양억제단백의 기능이 소실된다. RB는 세포분열주기 상 G1-S 전환기에 가장 중요한 요소로서, cyclin E-CDK2 complex 또는 cyclin D-CDK4(CDK6) complex에 의하여 인산화되면 E2F 단백질을 유리하며 S phase에 필수적인 유전자 발현을 가능하게 한다. 그러나, 발암과정 중에 RB 단백질소실 또는 RB 돌연변이는 동시에 G1-S 전환기 조절기능의 소실이기도 하므로 세포증식과 성장에 관한 억제가 불가능하게 된다.

5. LOH of 5q

APC는 5q에 위치하는 대장암 발생을 억제하는 종양억제유전자로서 암세포 전이 및 신호전달계에 필수적인 b-catenin과 결합하는 것으로 알려져 있다. 두경부종양에서도 APC gene 또는 그 근처의 LOH가 발견되는 것으로 보아 두경부종양 발생과정에 APC locus 관련되어 있음을 알게된다.

두경부종양의 Allotype

염색체 각 부위의 microsatellite marker를 이용하여 두경부종양에서 발견되는 allotype와 그 빈도를 조사해 보면 다음과 같다

Loss of 9p(72%) : p16INK4

Loss of 3p(67%) : tumor suppressors

- LOH of 17p(50%) : mutation of p53
- Loss of 13q(56%) : inactivation of RB
- Loss of 4(38%)
- Loss of 6p(42%)
- Loss of 8(40%)
- Loss of 14q(39%)
- LOH of 11q13(47%) : amplification of int-2

References

- 1) David Sidransky, Cancer of the Head and Neck, *Cancer : Principles & Practice of Oncology, Fifth Edition*, edited by Vincent T. DeVita, Jr., Samuel Hellman, Steven A. Rosenberg, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997 : 735-740

2

Oncobiologic Modification and Chemoprevention

김 열 홍

고려대학교 의과대학 혈액종양내과학교실

서 론

두경부암은 전 세계적으로 매년 900,000명에 이르는 높은 발생 빈도를 보인다. 한국에서 두경부에 발생하는 종양의 빈도는 전체 악성종양의 약 3.1%를 차지하며 흡연인구의 증가에 따라 점점 발생빈도가 증가하고 있다. 그러나 최근 20여년간 여러 가지 새로운 시도의 도움으로 반응률이나 기관기능면(organ function)에서 향상을 가져 왔으나 다양한 치료 방법의 발전에도 불구하고 생존율의 개선은 매우 미미한 실정이다. 그 이유는 두경부에 국한된 국소 질환의 경우 완치를 노리는 치료후 두 가지 주된 치료 실패가 야기되기 때문으로 원발소에서의 재발과 이차성 원발암의 발생이 환자의 생존율을 떨어뜨린다. 질환의 치료 혹은 예방적 접근의 성공을 위하여서는 이러한 치료 실패를 초래하는 생물

학적 배경을 이해하여야 함은 매우 중요하다 하겠다. 두경부에 발생하는 악성종양의 조직형은 대부분 편평상피암(squamous cell carcinoma)으로 폐, 식도에 발생하는 편평상피암과 발생원인이나 발생과정이 비슷할 것으로 추정된다. 따라서 흡연에 의하여 편평상피암의 발생률이 높고 발생기전이 유사한 두경부, 폐, 식도를 upper aerodigestive tract로 통칭하며 장기간 다량의 흡연력이 있는 암발생 고위험군을 대상으로 시행 가능한 chemoprevention의 가장 적합한 대상 질환이다. 따라서 두경부암 발생의 배경이 되는 oncobiologic modulation과 chemoprevention의 최근 발전에 대하여 토의코자 한다.

Biology of Premalignant Epithelial Carcinogenesis

두경부 편평상피세포암의 주된 원인은 흡연이다. 따라서 담배연기가 닿을 수 있는 구강점막, 인후두, 기관지, 식도에 있는 정상세포에는 이미 여러 가지 변화가 있을 수 있다. 특히 두경부에는 구강 백반증이라는 대표적인 전 암성 병변이 있고 조직학적으로 이형성증(dysplasia)이라는 전 암성 변화가 있어 정상조직, 전 암성 조직, 그리고 암조직에서의 변화를 추적 조사함으로써 암발생의 생물학적 변화를 확인 할 수 있다. 두경부편평상피 세포암의 암화 과정에 대하여 가장 널리 알려진 이론적 배경은 1) field cancerization, 즉 carcinogen에 노출된 장기는 모두 암 발생의 전 단계로 암이 발생할 수 있는 가능성을 지니게 된다는 학설과 2) multistep carcinogenesis, 즉 암이 발생되기까지는 여러 가지 단계의 과정을 거치므로 중간 단계에서 차단 하면 암의 발생을 억제할 수 있다는 학설 등이다. 결국 두경부암은 전체 aerodigestive tract의 점막세포가 암 유발인자(흡연, 알코올등)에 노출됨으로써 전체 aerodigestive tract이 암발생의 위험도를 갖게 되며 실제로 aerodigestive tract에서 원발종양이 다발성으로 나타나는 양상을 보여 이를 증명한다. 치료후 국소재발 혹은 원격 재발등 치료의 실패는 이미 occult microscopic 종양세포가 치료 전부터 존재하였음을 시사하며 만약 재발이나 이차암 발생을 예측할 수 있는 biologic marker를 찾을 수 있다면 좀 더 적극적인 보조치료 또는 chemopreventive approach를 위한 대상 환