

Molecular Detection of Head and Neck Cancer

고려대학교 의과대학 내과학교실
신상원

서론-두경부암에서 적절한 Molecular Detection Technique의 필요성

상피 세포암은 다양한 유전적 변화(*genetic alternation*)가 축적되어 preneoplastic lesion을 거쳐 발생하는 것으로 인정되고 있다. 따라서 암 세포에는 다양한 유전적 변화가 축적되어 있으며 이러한 유전적 변화에 의한 oncogene, tumor suppressor gene의 변화, 수반되는 단백질의 변화가 나타나게 된다. 이러한 다양한 분자 생물학적 변화는 암의 진단뿐만 아니라 치료 효과의 판정과 예에 이용될 수 있으며, 따라서 다양한 암종에서 다양한 molecular marker에 대한

연구가 활발히 진행되고 있다(Fig. 1).

두경부 암은 상피 세포암의 발암 기전에 의하여 정상 세포에 *genetic alternation*이 축적되면서 preneoplastic lesion을 거쳐 발생하는 것으로 이해되고 있다. 이러한 발암 과정에서 암세포에서만 축적되는 *genetic alternation*을 분자 생물학적 기법으로 분석할 수 있게 됨에 따라 암의 조기 진단, 예후 판정, 치료 효과 판정 등 다양한 임상적 이용이 기대되고 있다. 최근 두경부암을 비롯한 여러 암에서 다양한 molecular marker가 이러한 목적으로 개발되어 다양한 임상적 혹은 연구적 목적으로 상요 가능성에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 이러한 연구는 특히 향후 두경부 암의 임상시험에서 surrogate marker로 사용됨은 물론 다양한 치료 효과의 판정, 미세 잔류 암의 존재 여부를 판정하는데 중요한 기준으로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

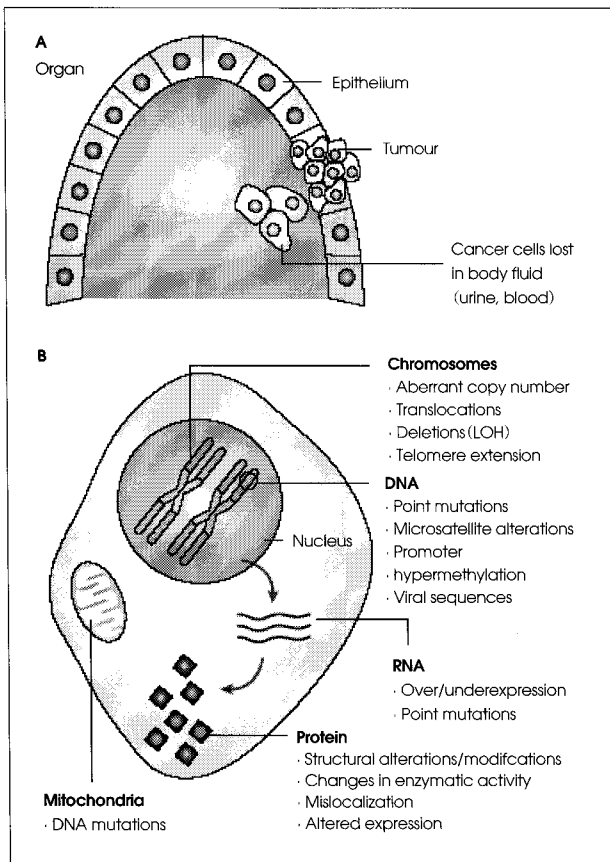


Fig. 1. 상피 세포암에서 사용되는 molecular marker.

DNA Marker

두경부 암에서 가장 많이 연구되고 있는 DNA marker는 *p53 gene*의 변화와 *microsatellite alternation*을 이용한 방법이다. *p53 gene*의 변화는 대부분 고형암의 초기 암화 과정에서 나타나며, 특히 림프절 전이 이전에 나타나는 것으로 알려져 있고, 이러한 변화는 암화 과정 전체에 걸쳐 유지되는 것으로 알려져 있다. 따라서 *p53 mutation assay*는 암과 양성 종양/정상 세포를 구분할 수 있는 유용한 molecular marker로서 사용될 수 있을 것으로 기대되었다. 1995년 Sidransky 등은 두경부암의 surgical margin에서 *p53 mutation*을 조사하여 임상적 이용 가능성을 보고하였다(Fig. 2). 25명의 *p53 mutation* 양성인 두경부암 환자의 조직학

Table 1. Selected molecular markers of head and neck cancer

Clinical samples	DNA marker	RNA Marker	Protein Marker
Surgical margin, Saliva, serum	TP53, microsatellite alterations, presence of HPV and EBV DNA	Cytokeratins	SCC, CD44, CYFRA, telomerase

적으로 negative surgical margin에서 13명의 환자가 *p53 mutation* positive margin을 갖는 것으로 판명되었다. 이들 *p53 mutation* positive margin을 갖는 13명 중 5명에서 국소 재발을 보인 반면, *p53 mutation* margin negative인 12명의 환자에서는 조사기간 동안 재발한 환자가 없었다. 이러한 결과는 소위 molecular marker를 이용한 암세포의 발견이 임상적으로 응용될 수 있다는 점을 시사하였다. 한편 이러한 *p53 mutation*는 두경부암의 약 50~60%에서만 발견되므로 모든 두경부암 환자에서 이용이 가능한 것은 아니다. 또한 *p53 mutation*이 유전자 전체에 걸쳐 다양하게 나타나므로 mutation의 상황을 파악하기 위해서는 gene 전체에 걸친 sequencing 작업이 요구되는데, 이러한 번거로운 작업과 이로 인한 여러 가지 기술적인 문제점으로 인하여 아직 유용한 임상적인 이용 단계에 이르지 못한 실정이다. 최근 *p53 mutation assay*을 보다 효과적으로 실시할 수 있는 다양한 분자 생물학적 기법들이 개발되고 있으며, 특히 Plaque hybridization 방법 등이 유용한 방법으로 기대되고 있다.

임상적으로 이용 가능성이 높은 다른 DNA marker는 *microsatellite marker*이다. 일반적으로 암세포는 정상 세포에 비하여 유전적 불안정성으로 인하여 염색체 전반에 걸친 다양한 변화, 즉 amplification, duplication, deletion, translocation 등 다양한 변화를 보이게 된다. 이러한 변화는 preneoplastic lesion부터 시작되어 암화과정 전반에 걸쳐 발생하는 것으로 알려지고 있다. 소위 allele-specific marker인 *microsatellite marker*를 이용한 PCR 증폭을 통하여 간편하게 이러한 유전적 이상을 밝힘으로서 암세포를 검출하게 된다. 이러한 *microsatellite marker*를 이용한 암

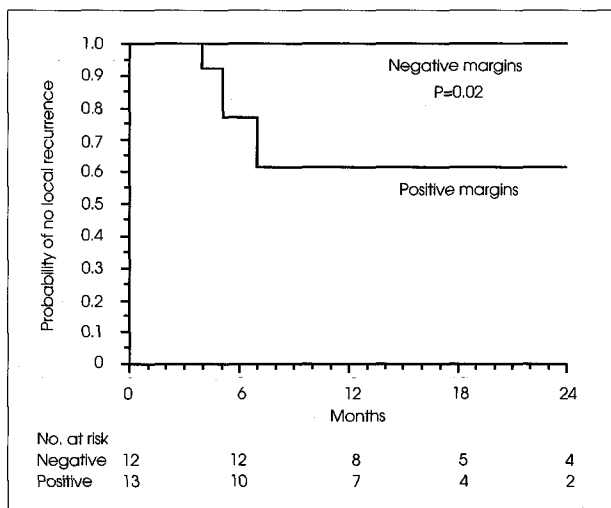


Fig. 3. 25명의 환자를 대상으로 조사한 surgical margin의 *p53 mutation analysis (sequencing)*에 따른 생존 곡선. (P0.02 by the log-rank test).

세포 검출법은 비교적 실험 방법이 간편하여 보다 적극적인 이용이 기대되고 있다. 최근 Teman 등은 tetranucleotide microsatellite marker를 이용하여 54명의 조직학적 surgical margin negative인 두경부암을 조사하였다(Fig. 3, 4). 5개의 tetranucleotide marker를 이용한 연구에서 molecular margin positive인 7명의 환자 중 5명이 국소 재발한 반면, molecular margin negative인 19명 중에서는 2명의 환자만이 국소 재발이 발견되었다. *Microsatellite marker*는 비교적 실험 방법이 간편하고 실험 소요 시간이 짧은 반면, 추출한 DNA에 포함된 암세포의 비율이 최소한 20% 이상인 경우에만 신뢰할 수 있는 적절한 검사 결과를 얻을 수 있다는 단점이 있다. 특히 두경부암의 경우 조직세포에서 암세포의 비율이 낮은 경우에는 결과를 신뢰할 수 없다는 단점이 있다. 또한 일반적으로 *p53 mutation assay*에 비하여 sensitivity는 낮은 것으로 보고 되고 있다.

DNA Methylation Marker

최근 각광을 받는 DNA marker 중 하나는 cancer-associate gene의 hypermethylation을 검출하는 것이다. 두경부암을 비롯한 여러 암세포가 tumor suppressor gene의 gene promotor region의 methylation이 보고되고 있으며 이를 PCR을 이용하여 간편하게 DNA의 methylated region을 검출하여 대략 1000개의 정상 세포중 하나의 암세포를 발견할 수 있는 높은 sensitivity를 기대할 수 있다. 두경부 암에서는 CDKN2A, MGMT, DAPK, RASSF1A 등의 cancer-associate gene이 이 이용되고 있다. 높은 sensitivity를 이용하여 특히 타액, 혈청에서의 두경부암 세포를 검출하는 방법이 보고되고 있으며, methylation assay를 정량적으로 분석함으로써 치료에 대한 효과 판정에 이용하

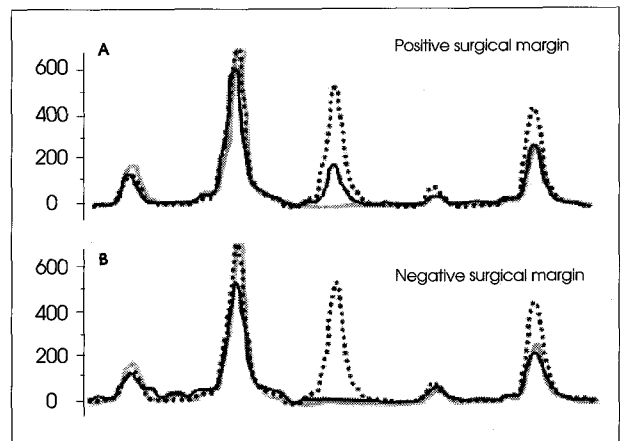


Fig. 4. Tetranucleotide microsatellite marker를 이용한 molecular assay (Gray line, lymphocyte DNA ; dotted line, tumor ; solid line, surgical margin).

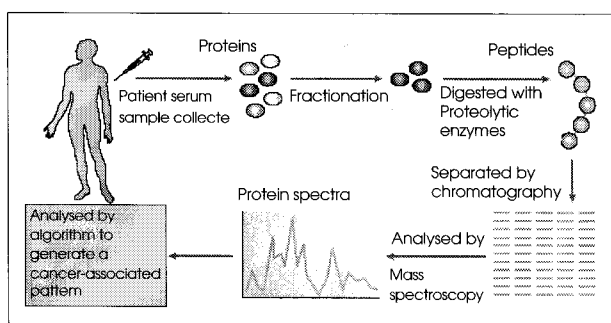


Fig. 4. Proteomic을 이용한 새로운 암세포 검출법의 개발.

Table 2. Hypermethylation marker in head and neck cancer

Primary Tumor	Serum and Saliva
CDKN2A, MGMT, DAPK, RASSF1A	CDKN2A, MGMT, DAPK

려는 시도도 보고되고 있다.

RNA 및 Protetin Marker를 이용한 암세포 검출

두경부암에서는 cytokeratin-mRNA 검출법이 대표적으로 이용되는 RNA marker이다. 혈액이나 림프절에서 cytokertin-mRNA를 검출함으로써 암세포를 검출할 수 있다. 일반적으로 두경부암에서 107 정상 세포 중 하나의 암세포를 검출할 수 있는 높은 sensitivity를 갖는 것으로 알려져 있으나 RT-PCR 기법이 갖는 소위 carry-over contamination에 의한 false-positive를 방지하는 것이 중요하다.

다양한 antibody-assay를 이용한 protein based assay도 최근 연구되고 있다. 또한 telomerase activity를 이용하여 암세포를 검출하려는 시도도 두경부 암에서 이루어지고 있다. Telomerase repeat amplification protocol(TRAP) assay는 구강암의 타액 등에서 암세포 검출법으로 연구되고 있다. 그러나 telomerase activity를 이용한 검출법은 림프구나 일부 정상 세포에서도 telomerase activity가 관찰되어 false-positive을 나타낼 수 있다는 점이 주요한 단점으로 지적되고 있다.

Moelcular Detection의 향후 발전 방향

최근 소위 high-output screening 방법의 개발이 이루어지면서 다양한 유전자와 단백질의 발현을 대량으로 쉽게 분석할 수 있게 되었다. 이러한 분자 생물학적 기술의 발

달은 새로운 cancer-associate molecule의 발견을 보다 쉽게 할 수 있을 것으로 기대된다. Micorassay을 이용한 방법이 대표적인 시도로 암세포와 정상 세포간의 유전자 발현 양상을 분석함으로써 기존의 PCR을 이용한 방법을 대체하고 있다. 이러한 방법은 단 한번의 실험으로 수많은 유전자의 발현을 분석할 수 있게 되어 암 연구의 새로운 장을 열고 있는 것으로 기대되고 있다. 특히 Serial analysis of gene expression(SAGE)을 이용하여 이미 알려진 유전자와 새로운 유전자의 발현 양상을 쉽게 분석할 수 있게 됨에 따라 발현율이 적은 low-copy number-gene의 발현 양상도 쉽게 관찰할 수 있게 되었다. 최근에는 proteomic approach를 통하여 spectroscopy를 이용하여 정상 세포와 암세포의 단백질의 정량적인 차이점을 분석함으로써 환자의 혈청에서 암세포를 검출하려는 방법도 개발되고 있다(Fig. 5).

References

- 1) Boudewijn JM, et al: A genetic explatation of Slaughter's concept of field Cancerization: Evidence and clinical implication *Cancer Research*. 2003;63:1727-1730
- 2) Vida MM, et al: Molecular assays for the detection of minimal resicual head and neck cancer: method, reliablility, pirfalls, and solutions. *Clin Can Res*. 2000;6:3083-3816
- 3) Sidransky D: Emerging molecular markers of cancer *Nat Rev Cancer*. 210-219
- 4) Brennan JA, et al: Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 1995;332:429-435
- 5) Mao L, et al: Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*
- 6) Spafford MF, et al: Detection of head and neck squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosal cells by microsatellite analysis. *Clin Cancer Res*. 2001;7:607-612
- 7) Nawroz H, et al: Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nature Med*. 1996;2:1035-1037
- 8) Lo YM, et al: Molecular prognostication of nasopharyngeal carcinoma by quantitative analysis of circulating Epstein-Barr virus DNA. *Cancer Res*. 2000;60:6878-6881
- 9) Taback B, et al: Detection of occult metastatic breast cancer cells in blood by a multimolecular marker assay: correlation with clinical state of disease. *Cancer Res*. 2001;61:8845-8850
- 10) Califano J, et al: Detection of telomerase activity in oral rinses from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Res*. 1996;56:5720-5722