

폐암 세포주에서 염색체 3p14.2에 위치한 FHIT 유전자의 발현 이상에 대한 연구*

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 의학연구원 폐연구소

김철현, 유철규, 이춘택, 한성구, 심영수, 김영환

= Abstract =

Expression of the *FHIT* gene Located in Chromosome 3p14.2 in Human Lung Cancer Cell Lines

Cheol Hyeon Kim, M.D., Chul Gyu Yoo, M.D., Choon-Taek Lee, M.D.,
Sung Koo Han, M.D., Young-Soo Shim, M.D., Young Whan Kim, M.D.

Department of Internal Medicine and Lung Institute, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

Background : The 3p deletions has been shown to be the most frequent alteration in lung cancers, strongly suggesting the presence of at least one tumor suppressor gene in this chromosomal region. However, no solid candidate for the tumor suppressor gene(s) on 3p has as yet been identified. Recent attention has focused on a candidate 3p14.2 tumor suppressor gene, *FHIT*, which is located in a region that is homozygously deleted in multiple tumor cell lines and disrupted by the hereditary renal cell carcinoma t(3;8) chromosomal translocation breakpoint. *FHIT* also spans FRA3B, the most common fragile sites in the human genome. In the present study, we have analyzed expression of the *FHIT* gene in lung cancer cell lines.

Methods : RNA from 21 lung cancer cell lines (16 NSCLC, 5 SCLC) were extracted using standard procedures. Random-primed, first strand cDNAs were synthesized from total RNA and PCR amplification of coding exons 5 to 9 was performed. The RT-PCR products were electrophoresed in 1.5% ethidium bromide-stained agarose gels.

Results : 12 of 21(57%) lung cancer cell lines exhibited absent or aberrant *FHIT* expression [7 of 16(44%) of non-small cell lung cancer and 5 of 5(100%) of small cell lung cancer cell lines].

Conclusion : The result shows that abnormal transcription of the *FHIT* gene is common in human lung cancer cell lines, especially in small cell lung cancer. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1998, 45 : 984-991)

Key words : Chromosome 3p14.2, Lung cancer, *FHIT*.

*이 논문은 1996년도 서울대학교병원 일반연구비(04-96-007) 지원에 의해 이루어진 것임

서론

Chromosome 3p의 deletion이 소세포폐암의 90% 이상에서 그리고 비소세포폐암의 80% 이상에서 발견되는, 폐암에서는 가장 흔하게 나타나는 genetic alteration이라는 것은 널리 알려진 사실이다¹⁻⁴. 또한 hyperplasia나 dysplasia 등의 병변과 carcinoma in situ와 같은 발암 단계의 초기에서도 chromosome 3p의 deletion이 잘 관찰되는 것으로 알려져 있다^{5,6}. 따라서 이 위치에 암억제유전자가 존재할 가능성이 매우 높다고 생각되어 과거부터 이에 대한 연구가 활발하게 진행되어오고 있다⁷⁻¹⁰. 하지만 현재까지는 몇몇 후보 유전자들이 밝혀져 있을 뿐, 확실한 암억제유전자를 규명해내지는 못하고 있는 실정이다.

이러한 후보 암억제유전자들 중 최근 Ohta 등이 발표한¹¹ 3p14.2에 위치하고 있는 *FHIT* 유전자가 주목을 받고 있다. 식도, 위, 두경부암 등의 여러 종양에서 이 위치의 homozygous deletion이 보고된 바 있으며¹¹⁻¹⁵, 서열 분석상 이 유전자가 human genome 중 손상에 가장 취약한 곳 중 하나인 FRA3B

fragile site¹⁶와 가족성 신세포암에서 잘 발견되는 t(3;8)(p14.2;p24) chromosomal translocation의 breakpoint를 포함하고 있기 때문이다¹¹(Fig. 1). 이와같은 구조적 특징과 함께 폐암에서 3p의 allelic loss가 특히 높은 빈도로 나타난다는 점에 주목하여, 연구자들은 폐암 세포주를 대상으로 *FHIT* 유전자의 발현 이상을 살펴봄으로써 암억제유전자로서의 가능성을 평가하고자 하였다.

대상 및 방법

실험 대상이 된 폐암 세포주는 총 21개로 비소세포폐암 세포주가 16개, 소세포폐암 세포주가 5개였다 (Table 1). 이를 배양하여 total RNA를 분리하였고, reverse transcription을 시행하여 single-strand cDNA를 합성하였다. reverse transcription은 5mM MgCl₂, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH8.3), 10mM DTT, 500μM dNTP, 50ng/μl oligo-dT, 0.3 μg/μl random primers, RNase inhibitor(Perkin Elmer) 20U, MuLV reverse tran-

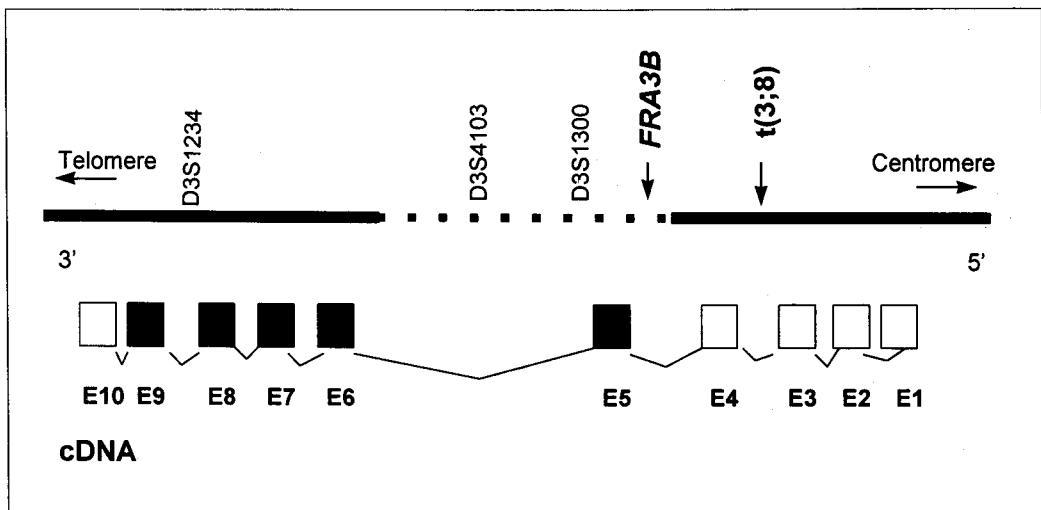


Fig. 1. *FHIT* gene organization showing the position of the internal microsatellite markers, the 3p14.2 *FRA3B* and the t(3;8) translocation break point. ■, *FHIT* protein-coding exons; □, untranslated exons.

Table 1. RT-PCR analysis of *FHIT* transcript

Cell line	Type ^a	exon 5 to 9 RT-PCR (459bp) ^b	Cell line	Type	exon 5 to 9 RT-PCR (459bp)
A549	ADC	N	NCI-H2009	LCC	N
Calu-3	ADC	N	NCI-H2066	LCC	N
NCI-H157	SCC	-	NCI-H208	ADC	N
NCI-H226	SCC	-	SK-MES-1	SCC	-
NCI-H441	ADC	N	SNU1327	ADC	N&A
NCI-H460	LCC	-	NCI-H69	SM	N&A
NCI-H522	ADC	N&A	NCI-H709	SM	-
NCI-H596	ADSCC	N	NCI-H792	SM	-
NCI-H1155	LCC	N	NCI-H841	SM	-
NCI-H1299	non-SM	-	NCI-H865	SM	-
NCI-H1785	ADC	N			

^aADC, adenocarcinoma ; SCC, squamous cell carcinoma ; LCC, large cell carcinoma ; ADSCC, adenosquamous cell carcinoma ; non-SM, non-small cell carcinoma ; SM, small cell carcinoma
^bN, normal-sized transcript ; -, absence of a RT-PCR product ; N&A, normal- & abnormal-sized transcript

scriptase(Perkin Elmer) 50U, RNA 1 μ g 을 포함한 총 20 μ l 의 혼합액에서 시행되었다. 이 혼합액을 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 incubation시킨후 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 유지하여 반응을 중지시켰다. 이렇게 만들어진 single-strand cDNA에 대해 *FHIT* 유전자의 exon 5에서 exon 9에 해당하는 coding region을 증폭할 수 있는 primer로 PCR을 시행하였다. 사용한 primer는 F1(5' - GATCGGATCCGAGGACATGTC GTTCAGATTTGGC - 3'), F2(5' - GATCGG ATCCACATCTGTGTC ACTGAAAGTAGAC - 3')였다. PCR은 reverse transcription product를 30 μ l 로 희석시킨후, 2mM MgCl₂, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH8.3), 50 μ M dNTP, 0.8 μ M each primer(F1, F2), AmpliTaq DNA polymerase(Perkin Elmer) 1.25U가 포함된 총 25 μ l 의 혼합액에 이 희석액 1 μ l 를 가하여 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 62 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 45초로 30 cycle을 시행하였다. 이 PCR product(459bp)를 ethidium bromide로 염색된 1.5% agarose gel에서 전기영동시켜

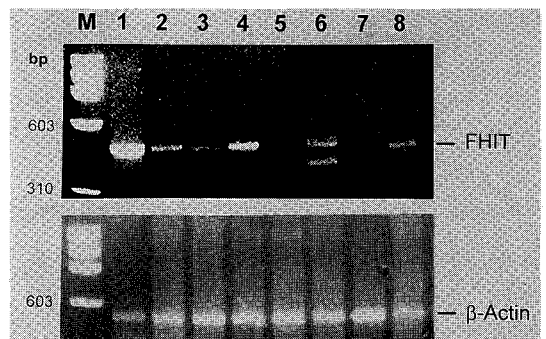


Fig. 2. Detection of *FHIT* transcripts by RT-PCR in lung cancer cell lines. The cell lines analyzed are indicated above the lanes with *FHIT* cDNA products in the top panel and β -actin cDNA products in the lower panel. No product was observed in NCI-H157 (lane 5) and NCI-H841 (lane 7). Shortened band was seen in NCI-H69 (lane 6). All cell lines exhibited comparable RT-PCR products in the control panel. The results were reproducible for both *FHIT* and β -actin in three independent experiments.

band를 관찰하였다. 한편, 동일한 cDNA로 β -actin에 대한 PCR을 시행하여 control로서 비교하였다. 사용한 primer는 B1(5' - GAAATCGTGCCTGACATTAAG - 3'), B2(5' - CTAGAAGCATTTGCGGTGGA - 3')였고 예상되는 PCR product는 511bp였다. PCR은 annealing temperature 57°C에서 30 cycle을 시행하였다.

결 과

Sozzi 등의 연구에서 염기 서열 분석상 exon 5에서 exon 9까지의 transcript가 intact한 것으로 알려져 있는¹⁷⁾ A549 cell line의 band를 정상 band의 기준으로 잡았을 때, 총 21개 폐암 세포주중 12개(57%) 세포주에서 RT-PCR product에 이상이 발견되었다. 즉, 정상 band외에 비정상적인 band가 같이 관찰된 세포주가 3개 있었고, band가 전혀 관찰되지 않은 세포주가 9개 있었다. control로 시행한 β -actin에 대한 RT-PCR에서는 모든 세포주에서 정상 band가 관찰되었다. 조직학적 형태에 따라 살펴보면, 비소세포폐암 세포주는 16개중 7개(44%)에서 비정상적인 band가 관찰되거나(2개), band가 관찰되지 않았고(5개), 소세포폐암 세포주에서는 5개(100%) 모두에서 비정상적인 band가 관찰되거나(1개), band가 관찰되지 않았다(4개)(Table 1, Fig. 2).

고 찰

FHIT 유전자가 주목을 받고있는 이유는 서론에서 전술한 바와 같이 식도, 위, 두경부암 등의 여러 종양에서 이 위치의 homozygous deletion이 높은 빈도로 보고된 바 있으며¹¹⁻¹⁵⁾, 이 유전자가 가족성 신세포암에서 발견되는 t(3; 8)(p14.2; p24) chromosomal translocation의 breakpoint에서 파괴되고, 더욱이 human genome 중 손상에 가장 취약한 곳 중 하나인 FRA3B fragile site¹⁶⁾를 포함하고 있기 때문이다¹¹⁾ (Fig. 1).

FHIT 유전자는 chromosome 3p14.2 위치에 있는 약 1Mb 정도의 genomic DNA로서 10개의 exon으로 구성되어 있으며 이로부터 1.1kb의 mRNA가 expression된다¹¹⁾. 10개의 exon중에서도 coding region은 exon 5에서 exon 9까지인데 이로부터 생산되는 16.8kDa의 단백질은 *Schizosaccharomyces pombe*가 생산하는, diadenosine 5', 5''-P₁,P₄-tetrphosphat. (Ap₄A)를 ATP와 AMP로 분해하는 효소인, Ap₄A asymmetrical hydrolase와 69%의 similarity를 보이는 것으로 밝혀졌다¹⁸⁾.

즉, diadenosine triphosphate hydrolase activity를 가지고 있으며¹⁹⁾, histidine triad (HIT) gene family에 속하기 때문에 Fragile histidine Triad gene의 약자로 *FHIT* gene이라 명명되었다.

FHIT 단백질이 실제로 세포내에서 어떠한 기능을 하는지에 대해서는 현재 연구중에 있다. 다만, diadenosine 대사에 관여할 것이라는 추측을 할 수 있는 정도이다. 이러한 dinucleotide oligophosphate metabolism과 tumorigenesis간의 관련성은 암억제 유전자 중에서도 *FHIT* 유전자에서 처음으로 제시된 것이라 할 수 있어 더욱 주목을 받고 있다.

본 연구에서 사용된 PCR primer는 coding region에 해당하는 exon 5에서 exon 9까지를 증폭할 수 있도록 선택되었다. 폐암 세포주를 대상으로 앞서 발표되었던 *FHIT* 유전자 상의 같은 위치에 대한 RT-PCR 결과와 본 연구 결과를 정리해 보면 Table 2와 같은데, sample size에 다소 차이가 있긴하지만 서로 판이한 양상을 보이고 있다^{17, 20-22)}. 비소세포폐암 세포주의 경우 sample size가 상대적으로 컸던 세 연구를 보면, Yanagisawa 등²⁰⁾의 연구에서는 약 29%에서, 본 연구에서는 약 44%에서 비정상적인 band가 관찰되거나 band가 관찰되지 않은 반면, Fong 등²²⁾의 연구에서는 90% 이상에서 이러한 현상이 발견되었다.

소세포폐암 세포주에서는 Yanagisawa 등²⁰⁾의 보고를 보면 0%로 다른 연구와 큰 차이를 보이고 있으

Table 2. Expression of cDNA transcripts by exons 5 to 9 RT-PCR (Comparison of current series with those of others)

	Sozzi et al.	Yanagisawa et al.	van den Berg et al.	Fong et al.	Current
NSCLC cell lines	n=1	n=24	n=2	n=31	n=16
wt ^a expression	100%	71%	100%	87%	69%
aberrant bands or no band	0%	29%	0%	≥90%	44%
SCLC cell lines	n=3	n=17	n=12	n=26	n=5
wt expression	67%	100%	100%	100%	20%
aberrant bands or no band	33%	0%	33%	≥96%	100%

^awt, wild type

며, van den Berg 등²¹⁾의 연구에서는 33%에서, Fong 등²²⁾의 연구에서는 96% 이상에서, 그리고 본 실험에서는 100%에서 비정상적인 band가 관찰되거나 band가 관찰되지 않았다. 한편 다른 네 연구에서는 모두 예상했던대로 소세포폐암 세포주에서 더 높은 빈도로 이러한 현상이 관찰된 반면, Yanagisawa 등²⁰⁾의 연구에서만 비소세포폐암 세포주에서 더 높은 빈도로 관찰되어서 의외의 결과를 보이고 있다.

한가지 흥미로운 점은 Sozzi 등¹⁷⁾, Yanagisawa 등²⁰⁾의 연구 이후에 발표된 연구들에서는(본 연구를 포함해서) 비정상적인 band가 관찰될 경우 wild type band가 같이 관찰되었다는 사실이다. Sozzi 등¹⁷⁾은 폐암 조직에서만 이러한 현상이 관찰되므로 이는 정상 조직에 의한 contamination 때문일 것이라고 설명했었지만 이후의 실험에서 폐암 세포주에서도 같은 현상이 관찰됨이 보고되고 있는 것이다. 이러한 현상은 전형적인 암억제유전자에서는 기대하기 어려운 것이라 할 수 있겠는데 아직 그 의미에 대해서는 알고 있지 못한 상태이다. 한 가지 가설은 aberrant transcript가 coding하고 있는 단백질이 dominant-negative한 방식으로 작용할 수 있지 않을까 하는 것인데 아직 그 근거는 없는 상태이다.

본 연구 결과를 요약해 보면, *FHIT* 유전자의 발현

이상은 폐암, 특히 소세포폐암에서 높은 빈도로 관찰되었으며, 이는 *FHIT* 유전자가 폐암 발생에 있어서 중요한 암억제유전자일 것이라는 가설을 뒷받침하는 소견이라 생각된다. 하지만 발암 과정에서의 그 명확한 역할을 규명하기 위해서는 wild-type *FHIT* 유전자를 *FHIT*-negative lung cancer cell line에 이입해 보는 것과 같은, *FHIT* 단백질에 대한 functional study가 뒤따라야 될 것으로 생각된다.

요 약

연구배경 :

폐암을 포함한 여러 종양에서 3p의 allelic loss가 매우 흔하게 관찰된다는 것은 널리 알려진 사실이다. 따라서 이 구역에 암억제유전자가 존재할 가능성이 높다고 생각되어 과거부터 이에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 하지만 현재까지는 몇몇 후보 유전자들이 밝혀져 있을 뿐, 확실한 암억제유전자를 규명해내지는 못하고 있는 실정이다. *FHIT* (Fragile Histidine Triad) 유전자는 최근 주목을 받고 있는 후보 암억제유전자로서 3p14.2에 위치하고 있으며 식도, 위, 두경부암 등의 여러 종양에서 이 위치의 homozygous deletion이 보고된 바 있다. 서열 분석상 이 유

전자는 human genome 중 손상에 가장 취약한 곳 중 하나인 FRA3B fragile site와 신세포암에서 잘 발견되는 t(3;8) chromosomal translocation의 breakpoint를 포함하고 있다. 이러한 구조적 특징과 함께 폐암에서 3p의 allelic loss가 특히 높은 빈도로 나타난다는 점에 주목하여, 연구자들은 폐암, 세포주를 대상으로 *FHIT* 유전자의 발현 이상을 살펴봄으로써 암억제유전자로서의 가능성을 평가하고자 하였다.

방 법 :

총 21개 세포주(비소세포폐암 : 16, 소세포폐암 : 5)를 배양하여 RNA를 분리하였고, reverse transcription을 시행하여 single-strand cDNA를 합성하였다. 이후 *FHIT* 유전자의 exon 5에서 exon 9에 해당하는 coding region을 PCR로 증폭하였다. 이 PCR product를 ethidium bromide로 염색된 1.5% agarose gel에서 전기영동시킨 후 band를 관찰하였다.

결 과 :

총 21개 폐암 세포주중 12개(57%) 세포주에서 비정상적인 band가 관찰되거나(3개), band가 관찰되지 않았다(9개).

16개의 비소세포폐암 세포주중 7개(44%)에서 비정상적인 band가 관찰되거나(2개), band가 관찰되지 않았다(5개).

5개의 소세포폐암 세포주에서는 5개(100%) 모두에서 비정상적인 band가 관찰되거나(1개), band가 관찰되지 않았다(4개).

결 론 :

이러한 결과를 살펴볼 때, *FHIT* 유전자의 발현 이상은 폐암, 특히 소세포폐암에서 높은 빈도로 관찰되었으며, 이는 *FHIT* 유전자가 폐암 발생에 있어서 중요한 암억제유전자일 것이라는 가설을 뒷받침하는 소견이라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Naylor SL, Johnson BE, Minna JD, Sakaguchi

AY : Loss of heterozygosity of chromosome 3p markers in small-cell lung cancer. Nature(London) 329 : 451, 1987

2. Brauch H, Johnson B, Hovis J, Yano T, Gazdar A, Pettengill OS, Graziano S, Sorenson GD, Poiesz BJ, Minna J, Linehan N, Zbar B : Molecular analysis of the short arm of chromosome 3 in small-cell and non-small-cell carcinoma of the lung. N Engl J Med 317 : 1109, 1987
3. Yokota A, Wada M, Shimosato Y, Terada M, Sugimura T : Loss of heterozygosity on chromosome 3, 13, 17 in small cell carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. Proc Natl Acad Sci USA 84 : 9252, 1987
4. Hibi K, Takahashi T, Yamakawa K, Ueda R, Sekido Y, Ariyoshi Y, Suyama M, Takagi H, Nakamura Y, Takahashi T : Three distinct regions involved in 3p deletions in human lung cancer. Oncogene 7 : 445, 1992
5. Sundaresan V, Ganly P, Hasleton P, Rudd R, Sinha G, Bleehen NM, Rabbitts P : p53 and chromosome 3 abnormalities, characteristic of malignant lung tumors, are detectable in preinvasive lesions of the bronchus. Oncogene 7 : 1989, 1992
6. Hung J, Kishimoto Y, Sugio K, Virmani A, McIntire DD, Minna JD, Gazdar AF : Allele-specific chromosome 3p deletions occur at an early stage in the pathogenesis of lung carcinoma. J Am Med Assoc 273 : 558, 1995
7. Killary AM, Wolf ME, Giamberrardi TA, Naylor SL : Definition of a tumor suppressor locus within human chromosome 3p21-p22. Proc Natl Acad Sci USA 89 : 10877, 1992
8. Kok K, Hosfra R, Pilz A, van den Berg A, Terpstra P, Buys CH, Carrit B : A gene in the chromosomal region 3p21 with greatly reduced expression in lung cancer is similar to the gene

- for ubiquitin activation enzyme. Proc Natl Acad Sci USA 90 : 6071, 1993
9. Daly MC, Xiang RH, Buchhagen D, Hensel CH, Garcia DK, Killary AM, Minna JD, Naylor SL : A homozygous deletion on chromosome 3 in a small cell lung cancer cell line correlates with a region of tumor suppressor activity. Oncogene 8 : 1721, 1993
 10. Sekido Y, Bader S, Latif F, Gnarr JR, Gadzar AF, Linehan M, Zbar B, Lerman MI, Minna JD : Molecular analysis of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene in human lung cancer cell lines. Oncogene 9 : 1599, 1994
 11. Ohta M, Inoue H, Coticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, Sibrashvili Z, Mori M, McCue P, Druck T, Croce CM, Heubner K : The *FHIT* gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. Cell 84 : 587, 1996
 12. Kastury K, Baffa R, Druck T, Ohta M, Coticelli MG, Inoue H, Negrini M, Rugge M, Huang D, Croce CM, Palazzo J, Huebner K : Potential gastrointestinal tumor suppressor locus at the 3p14.2 FRA3B site identified by homozygous deletions in tumor cell lines. Cancer Res 56 : 978, 1996
 13. Sozzi G, Alder H, Torielli S, Corletto V, Baffa R, Veronese ML, Negrini M, Pilotti S, Pierotti MA, Huebner K, Croce CM : Aberrant *FHIT* transcripts in Merkel cell carcinoma. Cancer Res 56 : 2472, 1996
 14. Negrini M, Monaco C, Vorechovsky I, Ohta M, Druck T, Baffa R, Huebner K, Croce CM : The *FHIT* gene at 3p14.2 is abnormal in breast carcinomas. Cancer Res 56 : 3173, 1996
 15. Virgilio L, Shuster M, Gollin SM, Veronese ML, Ohta M, Huebner K, Croce CM : *FHIT* gene alterations in head and neck squamous cell carcinomas. Proc Natl Acad Sci USA 93 : 9770, 1996
 16. Smeets DFCM, Scheres JMJC, Hustinx TWJ : The most common fragile site in man is 3p14. Hum Genet 72 : 215, 1986
 17. Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, Baffa R, Coticelli MG, Inoue H, Torielli S, Pilotti S, Gregorio LD, Pastorino U, Pierotti MA, Ohta M, Heubner K, Croce CM : The *FHIT* gene at 3p14.2 is abnormal in lung cancer. Cell 85 : 17, 1996
 18. Huang Y, Garrison PN, Barnes LD : Cloning of the *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding diadenosine 5' 5'''-P¹,P⁴-tetrphosphate (Ap₂A) asymmetrical hydrolase : sequence similarity with histidine triad (HIT) family. Biochem J 312 : 925, 1995
 19. Barnes LD, Garrison PN, Sibrashvili Z, Guranowski A, Robinson AK, Ingram SW, Croce CM, Ohta M, Huebner K : Fhit, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5', 5'''-P¹,P³ triphosphate hydrolase. Biochemistry 35 : 11529, 1996
 20. Yanagisawa K, Kondo M, Osada H, Uchida K, Takagi K, Masuda A, Takahashi T, Takahashi T : Molecular analysis of the *FHIT* gene at 3p14.2 in lung cancer cell lines. Cancer Res. 56 : 5579, 1996
 21. van den Berg A, Draaijers TG, Kok K, Timmer T, van der Veen AY, Veldhuis PMJF, de Leij L, Gerhartz CD, Naylor SL, Smith DI, Buys CHCM : Normal *FHIT* transcripts in renal cell cancer- and lung cancer-derived cell lines, including a cell line with a homozygous deletion in the FRA3B region. Genes Chromosom Cancer 19 : 220, 1997
 22. Fong KM, Biesterveld EJ, Virmani A, Wistuba I,

— Expression of the *FHIT* gene located in chromosome 3p14.2 in human lung cancer cell lines —

Sekido Y, Bader SA, Ahmadian M, Ong ST,
Rassool FV, Zimmerman PV, Giaccone G,
Gazdar AF, Minna JD: *FHIT* and FRA3B
3p14.2 allele loss are common in lung cancer and

preneoplastic bronchial lesions and are associated
with cancer-related *FHIT* cDNA splicing aberra-
tions. *Cancer Res* 57 : 2256, 1997