

비소세포 폐암에서의 Microsatellite Instability와 p53, K-ras, c-myc 암단백의 발현

나 석 주* · 광 문 섭*

=Abstract=

Microsatellite Instability and p53, K-ras, c-myc Oncoprotein Expression in Non-Small Cell Lung Carcinoma

Suk Joo Rha, M.D.*, Moon Sub Kwack, M.D.*

Background: Microsatellites are short-tandem repeated nucleotide sequences present throughout the human genome. Alterations of microsatellites have been termed microsatellite instability(MI). It has been generally known that microsatellite instability detected in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) reflects genetic instability that is caused by impairments of DNA mismatch repair system regarding as a novel tumorigenic mechanism. A number of studies reported that MI occurred at varying frequencies in non-small cell lung carcinoma (NSCLC). However, It has been unproven whether MI could be a useful marker of genetic instability and have a clinical significance in NSCLC. **Material and Method:** We have examined whether MI can be observed in thirty NSCLC using polymerase chain reaction, whether such alterations are associated with other molecular changes such as p53, K-ras and c-myc oncoproteins expression detected by immunohistochemical stain. **Result:** MI(+) was observed in 16.6%(5/30) and MI(-) was 83.3% (25/30). Average age was 50 ± 7.5 year-old in MI(+) group and 57 ± 6.6 year-old in MI(-) group. Two year survival rate in MI(+) group (20%, 1/5) was worse than MI(-) group (64%, 16/25) with a statistic difference. (P=0.04). The positive rate of K-ras oncoprotein expression and simultaneous expression of 2 or 3 oncoproteins expression were higher in MI(+) group than MI(-) group with a statistic difference.(P=0.05, P=0.01). **Conclusion:** From these results, the authors can conclude that MI is found in some NSCLC and it may be a novel tumorigenic mechanism in some NSCLC. We also conclude that MI could be used as another poor prognostic factor in NSCLC.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2000;33:60-7)

Key word : 1. Carcinoma, non-small cell, lung
2. Neoplasm marker
3. Lung neoplasm

* 가톨릭대학교 의과대학교 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Surgery, Catholic University Medical college

† 이 논문은 가톨릭의과대학교 의정부성모병원 임상의학연구비에 의해 연구되었음.

논문접수일 : 97년 8월 20일 심사통과일 : 11월 27일

책임저자 : 나석주 (480-130) 경기도 의정부시 금오동 65-1, 의정부성모병원 흉부외과. (Tel) 0351-820-3071, (Fax) 0351-847-0301

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

서 론

Microsatellite는 유전자 전반에 걸쳐 풍부하게 존재하는 짧은 반복 DNA로서 어떤 암에서는 이런 microsatellite의 반복 부분이 새로 늘어나거나 줄어들음으로서, 정상조직과 차이를 보이므로, 이 변화를 microsatellite instability (MI)라 명명하였고, 이들은 유전적 불안정성(genetic instability)을 의미하는 표식자로 사용되고 있다.¹⁾

최근의 분자 생물학적 연구에 의하면 유전적 불안정성이 발암기전에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀지고 있다. 즉 hMLH1, hMSH2, hPMS1, hPMS2같은 부정합 교정유전자(mismatch repair gene)들의 돌연변이에 의해 초래되는 유전적 불안정성이 정상적인 DNA 복제과정에서도 일어나는 돌연변이율을 증가시킴으로써, 원암유전자(proto-oncogene)나 암억제 유전자(tumor suppressor gene)들의 돌연변이를 유발하여 암이 발생한다는 것이다.²⁾

특히 이미 가족력이 알려진 유전성 비용종성 대장암(hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC)에서는 부정합 교정유전자들의 돌연변이가 MI를 일으키므로 이 유전자들의 돌연변이에 대한 표식자로서 MI가 제시되었고, MI가 암발생에 있어서 새로운 중요 기전으로 작용할 것이라고 하였다.³⁾

최근에는 비소세포 폐암을 포함한 폐암에서도 MI를 보이는 경우가 보고되고 있고, 비소세포 폐암의 발암과정 중에 p53, K-ras, c-myc 같은 유전자들의 암단백이 함께 작용하여 암이 발생하고, hMLH1같은 부정합 교정유전자에 의한 MI와 비소세포 폐암간의 연관성이 보고되고 있다.⁴⁻⁶⁾

또한 현재까지 암억제유전자인 p53과 원암유전자인 K-ras, c-myc 같은 여러 유전자들의 돌연변이 및 이들 암단백 발현이 폐암발생에 관여하고, 이 유전자들의 돌연변이 및 암단백의 발현이 있는 비소세포 폐암 환자의 예후가 나쁘다는 연구들이 보고되었다.^{5,6)}

저자들은 30예의 비소세포 폐암환자들을 대상으로 1p, 6q, 7p, 11q, 14q, 17q 등 6개의 microsatellite 좌에 대한 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 시행하여 MI의 발생빈도를 조사하고, 비소세포 폐암에서 불량예후인자들로 알려진 p53, K-ras, c-myc 암단백의 발현을 면역조직화학 염색법으로 관찰하여 MI발생과 비교함으로써 비소세포 폐암에서 아직 밝혀지지 않은 MI의 임상적 의의를 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험재료

1992년 1월부터 1994년 1월까지 강남 성모병원에서 비소

세포 폐암으로 진단되어 수술받은 환자 중 술 후 2년 이상 추적 조사가 가능한 30명(편평상피세포암 14예, 선암 16예)의 파라핀 포매조직에서 정상 및 암부위의 DNA를 각각 추출하여 사용하였다. 환자의 평균연령은 57.1세(42~69세)였으며, 남자 21예, 여자 9예였다. American Joint Committee of Cancer(AJCC)에 의한 술후 병기분류로 I기는 없었으며, II기는 11명, III기는 19명이었고, 술 후 추적조사하여 환자들의 2년 생존율을 구하였다.

2. 실험 방법

1) DNA의 추출

중성 포르말린에 고정된 환자들의 파라핀 포매조직 중 정상조직과 암조직에서 절편의 크기가 대략 1 cm² 되도록하여 각각 10 μm 두께로 5 장씩의 절편을 취하였고, 이때 사용한 칼날은 DNA의 오염을 막기 위하여 각 조직마다 교체하였다. 5매의 조직절편을 polypropylene tube에 넣고 xylene으로 파라핀을 제거한 뒤, 95% 및 70% ethanol로 세척하여 건조시킨 후, phenol-chloroform추출법으로 DNA를 추출하였고, sodium acetate와 ethanol로 DNA를 침전시킨 후 분광광도계(spectrophotometer)로 260/280 nm에서 DNA농도와 순도를 측정하여 기준치에 미달되는 재료는 재 정제하거나, 다시 DNA를 추출하여 최종농도 250 ng/μl, 순도는 260/280 nm 흡광도 비율이 1.75 이상 되게 준비하였다.

2) 중합효소 연쇄반응 및 polyacrylamide gel electrophoresis에 의한 MI의 측정과 판독

동일 환자에서 추출된 정상 및 암조직의 genomic DNA를 D1S116, D6S255, D7S57, D11S937, D14S52, D17S261 등 이미 다른 연구에서 사용되어 광범위한 microsatellite instability 발견에 많이 이용되는 6개의 서로 다른 염색체에 위치하는 dinucleotide microsatellite marker들을 이용하여 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 사용한 oligonucleotide primer들 (Pharmacia Biotech, Sweden)의 특성 및 구조는 Table 1 과 같다.

중합효소 연쇄반응액은 template DNA(250 ng/μl) 2 μl, 10x PCR buffer 1 μl, 4mM dNTP(Boehringer Mannheim, Germany) mixture 2 μl, 3 primer 1 μl, T₄ polynucleotide kinase (Pharmacia Biotech)를 이용하여 [³²P]ATP로 end-labelling 한 5' primer 1 μl와 Taq polymerase(Boehringer Mannheim) 0.2 μl 를 섞고, 증류수를 3 μl 첨가하여 총량이 10 μl 되게하였다. 중합효소 연쇄반응은 자동온도 변환장치(DNA thermal cycler 480, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, U.S.A.)를 사용하여 시행하였다. 중합효소 연쇄반응조건은 D1S116은 94°C에서 30초, 46°C에서 45초, 72°C에서 30초씩 30 cycle, D6S255는 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초씩 30 cycle,

Table 1. Oligonucleotide primers used for detection of microsatellite instability

Locus	Chromosome location	Primer sequence	End product size (bp*)
D1S116	1p31.2	5'-TACAAGGCAACCACATAATT 5'-CTTTTCCTAATTGTGTGTGT	77 ~ 217
D6S255	6q24-q25	5'-TCAGCATCAAGGTAGTTGAG 5'-TTAGTGCCTATGCAAGGCA	163 ~ 175
D7S57	7p	5'-CCCACACCAAACTGCCTGTATTAG 5'-TTGGTCAGTGTAGGCTGAACTCATG	180 ~ 205
D11S937	11q13-q23	5'-CTAATAAACAAATCCCTCTACD 5'-TAGTCAGTCAGGGACCCAAGT	23 ~ 264
D14S52	14q21-q22	5'-TTACTCCCTGCAAAACAAAC 5'-GATGAATTCAGAAATGGAG	79 ~ 99
D17S261	17q	5'-GGAAGAATCAAATAGACAAT 5'-GCTGGCCATATATATATTTAAACC	151 ~ 169

* ; base pair (bp)

D7S57은 94°C에서 1분, 66°C에서 1분씩 20 cycle, D11S937은 94°C에서 1분, 55°C에서 50초, 72°C에서 1분씩 30 cycle, D14S52는 94°C에서 30초, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 30 cycle, D17S261 은 94°C에서 1분, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초씩 30 cycle 시행하였다.

중합효소 연쇄반응 후 20 μ l의 정지용액 (95% formaldehyde, 20 mM EDTA, 0.05% xylene cyanol, 0.05% bromophenol blue)과 섞어 94°C에서 3분간 변성시키고 얼음에서 급랭시킨 뒤 각각 4 μ l 씩 취하여 미리 준비한 5.6 M urea가 포함된 7% polyacrylamide젤에 적제하고 55°C에서 80 Watt로 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 후 젤을 잘 분리하여 Whattman's paper에 부착시킨 다음 젤 건조기(Biorad model 483, Hercules, CA, U.S.A.)를 이용하여 진공 건조시킨 후, 영하 80°C에서 자기방사기록을 시행하였다.

결과의 판독은 6개의 marker들을 이용한 젤 상에서 정상조직에서 존재하는 밴드가 종양조직에서 나타나지 않거나 정상조직과 다른 이동양상을 보이면 MI(+), 그렇지 않으면 MI(-)라고 정의하였다.

3) 면역조직화학 염색

각 환자의 파라핀 포매조직을 5 μ m두께로 잘라 Probe-on Plus 슬라이드(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, U.S.A.)에 붙인 후 xylene으로 파라핀을 제거하고 95% 알콜과 증류수로 세척하였고, 항원노출을 증가시키기 위해 microwave oven에서 pH 6.0의 0.01 M citric acid monohydrate buffer에 넣어 5분간 끓인 후 실온에서 식혔다. 슬라이드를 증류수로 세척한 후 labelled streptavidine-biotin kit (DAKO corporation, Carpinteria, CA, U.S.A.)를 사용하여 염색하였다. 먼저 3% H₂O₂로 5분간 처리하고 증류수와 PBS완충액으로 세척한 후 차단항체

(blocking antibody) (DAKO)로 5분간 반응시켜 세척하지 않고, 각각의 1차 항체로 10분간 반응시켰다. 1차 항체로서 p53은 prediluted mouse anti-human p53 protein DO-7원액 (DAKO)을, c-myc은 mouse anti-human c-myc antibody (Novocastra, U.K.)를 1:20으로 희석하여 사용하였고, K-ras는 mouse antihuman c-K-ras(Ab-1) (Oncogene Science Inc., Uniondale, NY, U.S.A.)을 5 μ g/ml 농도로 사용하였다. 1차 항체를 완충액으로 세척한 후 결합항체 (DAKO)로 처리하여 10분간 반응시켜 세척하고, streptavidine peroxidase (DAKO)를 넣어 10분간 반응시킨 후 세척하였다. 발색을 위하여 3-amino-9-ethylcarbazole 용액 (DAKO)을 넣고 10분간 방치한 뒤, 증류수로 씻어내고, Meyer's hematoxylin으로 대조염색하여 결과를 관찰하였다.

암단백 발현은 p53 암단백의 경우에는 핵에서, c-myc은 세포질이나 핵에서, K-ras는 세포질에서 갈색 혹은 적갈색으로 염색된 세포가 10%이상 관찰될 때를 양성으로 하였다.

3. 통계분석

SAS (statistical analysis system)를 이용하여 생존율은 Kaplan-Meier방법으로 구하고 Log-rank test로 검정하였고, 각 군간의 비교는 Fischer's exact test와 Student's t test로 검정하였으며, 유의수준은 5% 미만으로 하였다.

결 과

1. MI의 출현 양상

저자들의 연구 결과에서 비소세포 폐암 30예 중 5예에서 MI가 관찰되었는데 자기방사기록상 특징적인 두가지 출현양상으로 나타났다. 즉 정상보다 길어지거나 짧아진 분절에 의한 새로운 밴드의 형성 (expansion)과 혼합변형 (mixed)된

Table 2. p53, K-ras and c-myc expression of 5 microsatellite instability (+) cases

Case	Age/Sex	Cell		Microsatellite loci						Oncoprotein expression			
		Type	Stage	D1S116	D6S255	D7S57	D11S937	D14S52	D17S261	p53(+)	K-ras(+)	c-myc(+)	multi*
1	42/F	S	II		+				+	+	+	+	Yes
2	60/M	S	III	+		+					+		No
3	44/F	A	III	+	+			+		+		+	Yes
4	50/M	A	II			+	+				+	+	Yes
5	55/M	A	III		+	+	+			+	+		Yes

*; Simultaneous 2 or 3 oncoproteins (+), S; Squamous cell carcinoma, A; Adenocarcinoma

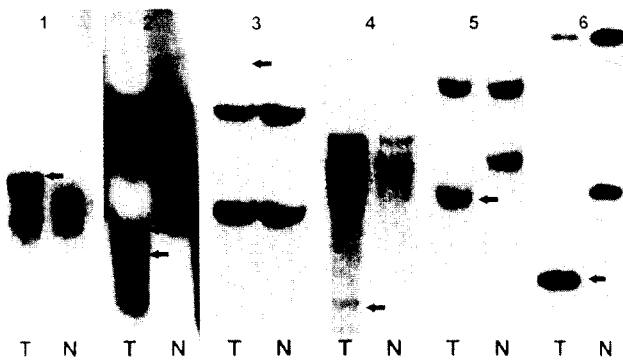


Fig. 1. Microsatellite instability in non-small cell lung carcinoma using 6 microsatellite loci. 1: D1S116, 2: D6S255, 3:D7S57, 4: D14S52, 5: D11S937, 6: D7S57, T: tumoral DNA, N: normal DNA, Arrows: expansion type abnormal band (1: D1S116, 2: D6S255, 3: D11S255, 4: D14S52) mixed type abnormal band (5: D11S255, 6: D17S261)

형태였다(Fig. 1).

2. MI의 발생 빈도와 임상적 특징과의 연관성

- 1) MI (+)의 출현빈도는 전체 30예 중 5예로 16.6%였으며, MI(-)는 25예로 83.3%였다. MI(+)-군 중 3예에서는 2개의 좌에서, 2예에서는 3개의 좌에서 동시에 MI가 발견되었고 1개의 좌에서만 MI를 보인 경우는 없었다(Table 2).
- 2) 임상적 특징에 따른 MI의 출현 빈도를 보면, MI(+)-군의 평균연령은 50±7.5세로 57±6.6세인 MI(-)군 보다 통계적으로 유의하게 낮았으며(P=0.01), 비교적 젊은 나이에서 MI가 출현하는 양상을 보였다. MI(+)-군과 MI(-)군의 성별 및 조직학적 암세포 유형간에는 유의한 차이가 없었다(Table 3). American Joint Committee of Cancer (AJCC) 폐암

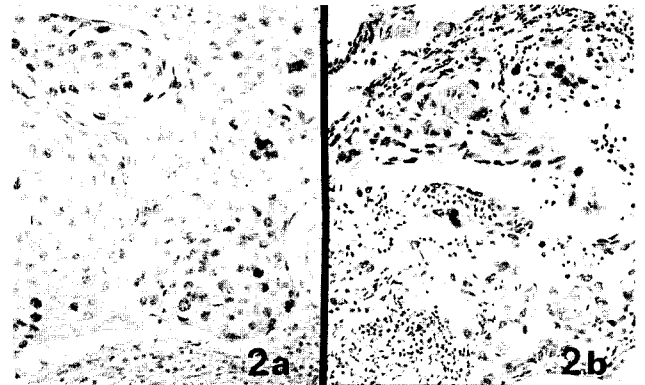


Fig. 2. Immunohistochemical stain for p53 oncoprotein. × 200. 2a : positive reaction in the nuclei of squamous cell carcinoma. 2b : positive reaction in the nuclei of adenocarcinoma.

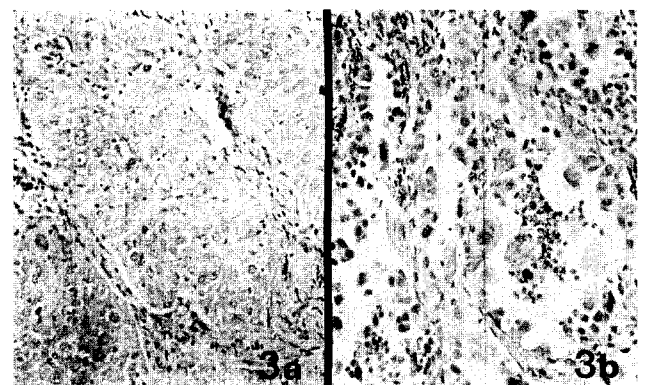


Fig. 3. Immunohistochemical stain for K-ras oncoprotein. × 200. 3a : positive reaction in the cytoplasm of squamous cell carcinoma. 3b : positive reaction in the cytoplasm of adenocarcinoma.

Table 3. Relationship between clinical characteristics and microsatellite instability of non-small cell lung carcinoma

rer	Age*	Sex		Cell type		Stage**		2 year survival*
		Male	Female	S	A	II	III	
MI (+) (n=5)	50 ± 7.5	3 (60%)	2 (40%)	2 (40%)	3 (60%)	2 (40%)	3 (60%)	20%
MI (-) (n=25)	57 ± 6.6	18 (72%)	7 (28%)	12 (48%)	13 (52%)	9 (36%)	16 (64%)	64%

MI ; Microsatellite Instability, * ; P<0.05, ** ; AJCC (Ameriacan Joint Committee of Cancer) stage of lung cancer
S ; Squamous cell carcinoma, A ; Adenocarcinoma, rer ; Replication error

Table 4. p53, K-ras and c-myc expression in non-small cell lung carcinoma

Cell type	Oncoprotein	p53 (+)	K-ras (+)	c-myc (+)	multi*
Squamous cell carcinoma		50% (7/14)	21% (3/14)	28% (4/14)	28% (4/14)
Adenocarcinoma		25% (5/16)	43% (7/16)	31% (5/16)	25% (4/16)
Total		40% (12/30)	33% (10/30)	30% (9/30)	26% (8/30)

* ; simultaneous 2 or 3 oncoproteins (+)

Table 5. p53, K-ras and c-myc expression in MI (+) and MI (-) group

MI	p53		K-ras*		c-myc		Multi**	
	+	-	+	-	+	-	+	-
MI (+) (n=5)	3 (60%)	2 (40%)	4 (80%)	1 (20%)	3 (60%)	2 (40%)	4 (80%)	1 (20%)
MI (-) (n=25)	9 (36%)	16 (64%)	6 (32%)	17 (68%)	6 (24%)	19 (76%)	4 (16%)	21 (84%)

* ; P < 0.05, ** ; P < 0.05, Multi ; simultaneous 2 or 3 oncoproteins (+)

병기분류에 의한 병기별 MI 출현빈도를 보면, MI(+)군에서는 II기가 2/5예 (40%), III기가 3/5예 (60%)였고, MI (-)종양의 경우는 II기 9/25예 (36%), III기 16/25예 (64%)였고, 2년 생존율은 MI (+)군이 20%로 MI (-)군의 64% 보다 낮은 생존율을 보였다 (P=0.04). (Table 3)

3. MI와 암단백발현과의 연관성

1) 면역조직화학 검사에서 30예의 종양 중 p53 암단백은 12/30예 (40%)에서 양성반응을 보였으며, K-ras 암단백은 10/30예 (33%)에서, c-myc 암단백은 9/30 예 (30%)에서 양성 반응을 보였다(Table 4) (Fig. 2, 3, 4).

2) p53 암단백의 발현은 MI (+)군이 3/5예 (60%), MI (-)군이 9/25예 (36%), c-myc 암단백 발현은 MI (+)군은 3/5예 (60%), MI (-)군은 6/25예 (24%)로 MI (+)군에서 높았지만 통계적 유의성은 없었다. 반면 K-ras 암단백의 발현 양성율은 MI(+)군이 4/5예 (80%), MI (-)군이 6/25예 (24%)로 MI (+)군에서 유의하게 높게 관찰되었다(P=0.03). (Table 5)

3) 두가지 이상의 암단백 양성은 8/30예 (26%)에서 발견되었으며, 이 중 1예에서는 세가지 암단백 모두에서 양성을 보였다. MI(+)군에서는 다발성 암단백 발현이 4/5예 (80%), MI (-)군에서는 4/25예(16%)에서 보여 MI(+)군에서 통계적으로 유의하게 높게 관찰되었다(P=0.01).(Table 5)

고 찰

세포 분열시 DNA의 정상적인 복제과정에서 DNA의 복제오류가 일정비율로 일어나게 되는데, 이 오류의 교정은 생명현상을 유지하는데 없어서는 안되는 과정이다. 이러한 오류의 교정은 hMLH1, hMSH2, hPMS1, hPMS2 같은 부정합 교정유전자 (mismatch repair gene)라고 불리는 유전자들에 의해 수행된다.¹⁾ Peltomaki등³⁾은 유전성 비용종성 대장암 (hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC)의 원인 유전자로 알려진 부정합 교정유전자들의 돌연변이가 replication error(RER)형태의 유전적 불안정성 (genetic instability)을 유발

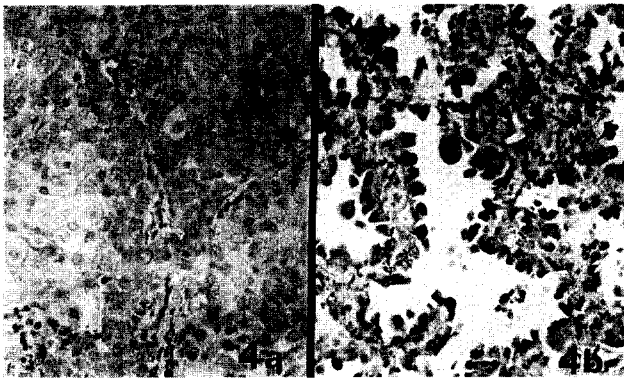


Fig. 4. Immunohistochemical stain for c-myc oncoprotein. ×200.
4a : positive reaction in the cytoplasm and some nuclei of squamous cell carcinoma. 4b : positive reaction in the cytoplasm and some nuclei of adenocarcinoma.

하며, 이 유전적 불안정성이 여러 유전자들의 돌연변이를 일으켜 유전성 대장암이 발생 한다고 하였다.

세포분열시 발생하는 복제오류들은 (CA)_n, (GT)_n과 같은 단순 반복되는 염기 구조들 즉 microsatellite에서 현저한데, 이는 이들 반복구조들이 복제과정에서 길어지거나 짧아지는 복제오류가 일어나기 쉽기 때문이다.¹⁾ 따라서 부정합 교정유전자의 돌연변이에 의한 복제오류의 수복불능은 복제오류율이 높은 microsatellite에서 가장 먼저 일어나 이를 microsatellite instability (MI)라 하고, 이후 p53, K-ras, c-myc 같은 세포의 분화나 성장을 조절하는 유전자들에 돌연변이가 일어났을 경우, 이를 적절히 수정하지 못하고, 이 돌연변이들이 축적되어 결국 암을 유발하게 된다고 한다. 이러한 MI 기전으로 발생하는 암을 특히 replication error 양성 [RER (+)] 종양이라 하며, 유전성 비용종성 대장암에서 처음 밝혀졌다. 그 후 MI에 의한 돌연변이가 유전성이 있는 암에서만 관련될 것으로 생각되었으나, 유전적 성향이 없는 여러종류의 산발성 암에서도 MI가 발견되어 새로운 암 발생 기전일 것으로 생각하고 있다⁷⁾. 최근에는 소세포 폐암과 비소세포 폐암에서도 MI를 보이는 종양이 보고되고 있다. Shridhar등⁴⁾과 Fong 등⁵⁾은 각각 비소세포 폐암의 34%와 6.5%에서 MI를 보인다고 보고한 바 있다. 우리들의 연구에서는 30명의 비소세포 폐암환자에서 MI를 보인 경우가 16.6% 였다.

이와 같이 보고자마다 큰 차이를 보이는 것은 선택한 marker의 microsatellite 좌에 따라 빈도의 차이가 나타날 수 있고, 인종이나 지리적 조건에 따라서도 차이가 있기 때문이다. MI는 microsatellite marker를 이용한 중합효소 연쇄반응을 통해 쉽게 발견할 수 있기 때문에 HNPCC와 같이 부정합 교정유전자의 돌연변이에 의해 MI를 보이는 종양, 즉 RER

(+) 종양의 지표로 사용된다. Smyrk⁸⁾에 의하면 대부분의 연구자들이 각기 다른 염색체에 위치한 microsatellite에 대한 marker를 무작위로 5~7개 선택하여 전기영동상 2개 이상의 좌에서 밴드의 이동 이상이 발견되는 종양을 RER (+) 종양이라고 평가한다. Lothe등⁹⁾의 연구에 의하면 한 좌에서만 변화를 보인 RER (+)종양과 RER (-)종양간에는 비슷한 임상상을 보인 반면, 2개이상의 좌에서 RER (+)인 종양과는 특징적으로 다른 임상상을 보인다고 하였다. 특히 위암이나 식도암에서도 1~2개의 좌에서 MI를 보인 환자의 임상상이 그 이상의 좌에서 MI를 보인 환자의 임상상과 차이를 보이므로 전자의 경우를 low level MI, 후자의 경우를 wide spread MI로 구분하여 발생기전이 서로 다를 것이라는 연구결과도 있었다.¹⁰⁾

Wieland등¹¹⁾은 비소세포 폐암에서 hMLH1유전자가 위치하는 염색체 3p21 의 이형 접합성상실이 43%에서 발견되었고 MI가 있는 경우 82%에서 3p21의 이형 접합성상실이 발견되어 비소세포 폐암 발생에 있어 hMLH1 유전자 돌연변이와의 연관성을 보고하였다. 또한 widespread MI를 보이는 유전성 비용종성 대장 암과는 달리 비소세포 폐암에서는 low level MI만 발견되므로 부정합 교정유전자의 돌연변이는 발암과정 중 비교적 후기 변화임을 시사하였다. 따라서 MI(+)인 비소세포 폐암에 있어 MI(-)인 경우와는 달리 부정합 교정 유전자의 돌연변이가 발암과정에 관여하는 것으로 생각되나, Fong등⁵⁾의 주장과 같이 비소세포 폐암에서 MI의 빈도가 낮은 것으로 보아 MI는 부정합 교정유전자의 돌연변이에 의한 것이 아니라 단지 광범위한 유전적 손상을 반영한다는 가설도 배제할 수는 없다. 저자들의 실험에서도 다른 보고자들의 결과와 비슷하게 MI(+)군에서 2 내지 3개의 좌에서만 MI가 발견되는 low level MI형태를 볼 수 있었다. Shridhar등⁴⁾은 조기 병기의 비소세포 폐암에서 MI가 발견되어 이와 같은 변화가 암전환의 초기 과정일 것이라고 시사하였다. 그러나 Adachi등¹²⁾은 비소세포 폐암 중 말기 암에서 MI가 38%로 초기 암의 4%보다 높은 발생율을 보이므로 발암과정의 후기에 관여할 것이라고 보고하여 Shridhar등⁴⁾과는 대조적인 결론을 내렸다. 저자들의 연구에서는 MI(+)군은 II기 40%, III기 60%로, II기 36%, III기 64%인 MI(-)군과 차이는 없었으나, 비교적 초기인 II기 폐암에서도 MI가 발견되는 것으로 보아 Shridhar등⁴⁾이 주장한 바와 같이 MI가 암발생 초기에 일어남을 시사하였다. 그러나 MI(+)군 중에서는 III기 암의 비율도 60%로 높아 Adachi등¹²⁾의 의견도 배제할 수는 없다.

MI(+)군의 평균연령은 50±7.5세로 57±6.6세인 MI(-)군보다 비교적 젊었으며 이는 Ryberg등⁶⁾이 비소세포 폐암에서 MI가 50세 이하의 젊은 환자에서 빈도가 높다고 보고한 것과 일치한다.

Shibata등²⁾은 MI가 발견된 대장암에서는 genomic DNA에 많은 돌연변이가 발생하며 이를 체내 면역체계가 인지해서 암성장을 억제하므로 비교적 좋은 예후를 보인다고 하여 MI가 좋은 예후인자일 것으로 보고했으나, Fong등⁵⁾은 MI가 발견된 비소세포 폐암에서는 불량 예후인자로 알려진 p53, K-ras같은 유전자들의 돌연변이율이 높으므로 MI가 오히려 나쁜 예후인자임을 시사하였다. p53은 암억제유전자 (tumor suppressor gene)로서 비소세포 폐암의 약 50%에서 돌연변이가 발견되며 암발생 기전에서 비교적 초기에 작용한다고 한다.¹³⁾ p53 유전자의 돌연변이에 의해 생성된 암단백은 반감기가 정상 p53 단백질보다 길어지므로 암세포의 핵에서 발견할 수 있다. 이 p53 단백질의 발현은 곧 p53유전자의 돌연변이의 지표로 사용되며, 비소세포 폐암에서 불량 예후인자라고 하였다.¹⁴⁾

K-ras 와 c-myc은 원암유전자 (proto-oncogene)로서 비소세포 폐암에서 각각 15~30%¹⁵⁾와 10~15%¹⁶⁾의 빈도로 돌연변이가 발견되고, 거의 같은 비율로 암단백 발현율을 보인다. 두 유전자 모두 비소세포 폐암 초기 발암과정에 기여하고, 이들 암단백의 발현은 역시 불량 예후인자라고 하였다.^{17,18)} K-ras 암단백은 세포질내에 위치하여 세포의 성장 신호전달에 관여하며, c-myc 암단백은 세포질에서 생산되어 핵내로 이동한 뒤 세포분화과정을 촉진하는 것으로 알려져 있으나, Royds등¹⁹⁾에 의하면 암세포에서는 c-myc 암단백이 핵보다는 오히려 세포질 내에서 많이 발견되는데 이는 c-myc 유전자의 돌연변이에 의해 c-myc 암단백 구조의 변화나 세포질 또는 핵내의 암단백 결합요소들의 변화, 그리고 c-myc 암단백의 핵내 이동기전의 변화등에 기인한다고 추정하였고, Williams등²⁰⁾도 암세포에서는 c-myc 암단백이 세포질 내에서 현저하게 발견된다고 보고 하였다. 저자들의 연구에서도 암세포의 핵보다는 주로 세포질에서 c-myc 암단백이 발견되었다.

저자들은 비소세포 폐암에서 MI의 유무와 불량 예후인자인 p53, K-ras, c-myc 암단백들의 발현과의 관계를 알기 위하여 본 실험을 시행한 결과, p53과 c-myc 암단백은 MI (+)군에서의 발현율이 MI (-)군보다 높았지만 통계적인 유의성은 없었고, K-ras 암단백의 발현과 2개 이상의 암단백 동시발현은 MI (+) 군에서 MI (-)군보다 통계적으로 유의하게 높았다. 이와 같이 불량 예후인자인 암단백들의 발현이 MI (+)군에서 높고 2년 생존율 역시 MI (+)군에서 낮은 것으로 보아 MI는 비소세포 폐암에서 불량 예후인자로서 환자의 예후 결정에 도움이 될 것으로 생각된다. 그러나 본 실험에서 발견된 MI가 수적으로 적어 좀 더 많은 환자들을 대상으로 실험을 확대하고, 또한 p53, K-ras, c-myc 유전자들의 돌연변이와의 연관성도 밝혀야 할 필요가 있을 것으로 생각된다.

결 론

이상과 같은 결과로 보아, Microsatellite instability는 비소세포 폐암 일부에서 발견되며 이는 기존 폐암 발생기전과는 다른 새로운 기전으로 일부 비소세포 폐암발생에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 또한 microsatellite instability는 비소세포 폐암에서 불량 예후인자인 K-ras 암단백의 과잉발현과 연관되고, 2년 생존율 역시 microsatellite instability가 발견된 비소세포 폐암환자에서 낮아 microsatellite instability가 비소세포 폐암환자에서 불량 예후 인자일 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Loeb LA. *Microsatellite instability: maker of a mutator phenotype in cancer.* Cancer Res 1994; 54:5059-63
2. Shibata D, Peinado MA, Ionov Y, Malkosyan S, Perucho M. *Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation.* Nature Genet 1994;6:273-80.
3. Peltomaki P, Lothe RA, Aaltonen LA, et al. *Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the Hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome.* Cancer Res 1993;53:5853-5.
4. Shridhar V, Siegfried J, Hunt J, Alonso MM, Smith DI. *Genetic instability of microsatellite sequences in many non-small cell lung carcinomas.* Cancer Res 1994;54:2084-7.
5. Fong KM, Zimmerman PV, Smith PJ. *Microsatellite instability and other molecular abnormalities in non-small cell lung cancer.* Cancer Res 1995;55:28-30.
6. Ryberg D, Lindstedt BA, Zienoldddy S, Haugen A. *A hereditary genetic marker closely associated with microsatellite instability in lung cancer.* Cancer Res 1995;55:3996-9.
7. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS. *Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer.* Science (Washington DC) 1993; 260: 812-6.
8. Smyrk T. *Commentary: Cancer syndrome meets molecular biology meets histopathology.* Am J Path 1994;145:1-6.
9. Lothe RA, Peltomaki P, Melling I, et al. *Genomic instability in colorectal cancer: Relationship to clinicopathological variables and family history.* Cancer Res 1993;53:5848-52.
10. Santos NR, Seruca R, Constancia M, Seixas M, Sobrinho-Simoes M. *Microsatellite instability at multiple loci in gastric carcinoma: clinicopathologic implications and prognosis.* Gastroenterology 1996;110:38-44.
11. Wieland I, Ammermuller T, Bohm M, Toezeck B, Rajewsky MF. *Microsatellite instability and loss of heterozygosity at the hMLH1 locus on chromosome 3p21 occur in a subset of non-small cell lung carcinoma.*

- Oncology Res 1996;8:1-5.
12. Adachi J, Shiseki M, Okazaki T, et al. *Microsatellite instability in primary and metastatic lung carcinoma.* Gene, Chromosome & Cancer 1995;14(4):301-6.
 13. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. *Mutations in the p53 tumor suppressor gene : Clue to cancer etiology and molecular pathogenesis.* Cancer Res 1994;54:4855-78.
 14. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. *The p53 tumor suppressor gene.* Nature 1991;351:453-6.
 15. Rodenhuis S, Slebos JC. *Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer.* Cancer Res(suppl.) 1992;52:2665-9.
 16. Berg JC. *Gene amplification in human lung cancer : The myc family genes and other protooncogene and growth factor genes.* Am Rev Respir Dis 1990;142:S20.
 17. Miyamoto H, Harada M, Isobe H, et al. *Prognostic value of nuclear DNA content and expression of the ras oncogene product in lung cancer.* Cancer Res 1991;51:6346-50.
 18. Johnson BE, Ihde DC, Makuch RW, et al. *Myc family oncogene amplification in tumor cell lines established from small cell lung cancer patients and its relationship to clinical status and course.* J Clin Invest 1992;79:1629-34.
 19. Royds JA, Sharrard RM, Wagner B, Polaczar SV. *Cellular localisation of c-myc product in human colorectal epithelial neoplasia.* J Path 1992;166:225-33.
 20. Williams ARW, Piris J, Wyllie AH. *Immunohistochemical demonstration of altered intracellular localization of c-myc oncogene product in human colorectal neoplasm.* J Path 1990;160:297-3.

=국문초록=

Microsatellite는 인체 게놈 전반에 걸쳐 존재하는 짧은 반복 DNA로서 Microsatellite의 일부 염기들이 소실 또는 연장되어 Microsatellite의 길이가 변화되는 것을 Microsatellite Instability (MI)라 한다. MI는 유전성 비용종성 대장암(Hereditary non-polyposis colorectal cancer)에서 처음으로 암 발생과의 연관이 발견되었고, DNA 부정합 교정 유전자의 돌연변이에 의한 유전적불안정성을 반영하는 새로운 암발생기전으로 알려졌다. 최근에 비소세포 폐암(Non-small cell lung cancer)에서도 MI가 보고되고 있으나 그 임상적 특징이나 의의에 대해서는 알려져 있지 않다. 저자들은 30명의 비소세포 폐암 환자에서 MI의 발생빈도를 중합효소 연쇄반응과 polyacrylamide gel 전기영동법으로 조사하고, 동일 환자에서 비소세포 폐암에서 불량 예후인자로 알려진 p53, K-ras, c-myc 암단백의 발현을 면역조직 화학염색법으로 조사하여 서로의 연관성을 밝힘으로서 비소세포 폐암에서 MI의 임상적 의의를 알고자 하였다. 결과는 MI(+)는 비소세포 폐암의 16.6% (5/30)에서 발견되었고, 평균연령도 MI(+)군이 50 ± 7.5 로 MI(-)군의 57 ± 6.6 보다 통계적으로 유의하게 적었다. 2년 생존율은 MI(+)군이 MI (-) 군보다 통계적으로 유의하게 불량하였고, K-ras 암단백의 발현과 2개이상의 암단백 동시발현은 MI (+)군에서 MI (-)군보다 통계적으로 유의하게 높았다. 따라서 MI가 일부 비소세포 폐암의 발생에 관여하는 새로운 기전일 것으로 생각되며, MI가 있는 비소세포 폐암은 비교적 젊은 나이에 발생하고 예후도 불량할 것으로 생각된다.

중심 단어 : 1. 비소세포 폐암
2. Microsatellite Instability
3. p53, K-ras, c-myc