

연부조직육종 환자에서 O⁶-MGMT 와 촉진자 과메틸화의 예후적 중요성

부산대학교 의과대학 정형외과학교실, 병리학교실*

서정탁 · 김정일 · 오종석 · 최경운*

서론: O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)는 DNA 염기 손상에 의해 형성된 O⁶-methylguanine에서 알킬기를 제거하여 DNA 염기 손상을 복구하는 역할을 한다. MGMT의 후생유전적 불활성화가 인체 종양에서 보고되고 있으며, 항암 치료에 대한 저항성에 영향을 주는 요소로 알려져 있다. 본 연구에서는 연부조직육종에서 이러한 MGMT 불활성화가 미치는 영향에 대해 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법: 총 62예의 연부조직육종조직에서 메틸화 특이 중합효소연쇄반응을 이용하여 MGMT 유전자의 촉진자 부위 메틸화 정도를 알아보고, 면역조직화학염색을 통하여 MGMT 단백질 발현의 소실 양상을 살펴보았다.

결과: MGMT 단백질 발현 소실은 진행성 병기(p=0.000), 조직학적 고등급(p=0.005), 종양의 재발 또는 전이(p=0.011), 그리고, 낮은 생존률(p=0.017)과 통계학적 유의성을 보였다. MGMT 유전자 촉진자 부위 메틸화는 조직학적 고등급, 종양의 재발 또는 전이, 그리고, 낮은 생존률과 관련성을 보였다. 또한, MGMT 단백질 발현의 소실은 MGMT 유전자 촉진자 부위 과메틸화와 높은 상관성을 나타내었다(p=0.000).

결론: 본 연구는 MGMT 단백질 발현의 소실과 MGMT 유전자 촉진자 부위 과메틸화가 연부조직 육종에서 흔히 발생하며 종양의 공격적인 양상 및 나쁜 예후와 관련성이 있다는 것을 보여준다. 또한 MGMT 단백질 발현의 소실은 대개 MGMT 유전자 촉진자 부위 과메틸화로 인해 발생한다는 사실을 보여주고 있다.

색인 단어: 연부조직육종, O⁶ methylguanine-DNA methyltransferase(MGMT), 과메틸화

서 론

대부분의 연부 조직 종양의 병인은 아직 밝혀져

있지 않다. 환경적 요인, 방사선, 바이러스, 면역 결핍 등의 몇몇 요인과 상호균형전좌, 변역, 결손, 돌연변이와 같은 유전적 변화가 연부조직 종양의 원인

*통신저자: 김정일

부산광역시 서구 아미동 1가 10번지

부산대학교병원 정형외과학교실

Tel: (051) 240-7248, Fax: (051) 247-8395, E-mail: osteokim@yahoo.co.kr

으로 보고되고 있으나 연부 조직 종양의 원인으로 명확히 증명된 것은 없다²⁶⁾. 기존의 genetics에 대별되는 개념으로 epigenetics의 기전들이 다양한 악성 종양에서 보고되고 있으며 그 중에서 메틸화에 의해 암억제 유전자의 전사가 정지되는 현상은 유전자 촉진자(promotor)의 CPG 염기 반복구역이 과메틸화 되면서 성장을 조절하는 유전자의 발현이 저

해되는 현상때문에 나타난다⁶⁾. 그러나 연부 조직 종양에서 이러한 유전자의 과메틸화에 대한 연구결과는 몇몇 연부 조직 종양에 국한되어 있다^{5,17,18,25,27)}. 그 예로 p16INK4a의 과메틸화가 연부조직에서 발생한 평활근육종에서 발견되었으며, 이 유전자는 나쁜 예후와의 관련성이 있는 것으로 나타났다¹⁸⁾. RASSF1A의 과메틸화 역시 연부조직 육종에서 일관적인 반응일 뿐 아니라 예후 인자로도 보고되고 있다²⁵⁾.

Table 1. Clinicopathologic parameters in 62 patients with soft tissue sarcomas

Clinicopathologic parameters	Cases
Age (median)	1~82(56)
Gender	
Male	31
Female	31
Histologic type	
Liposarcoma	20
MFH	17
RMS	9
LMS	6
SS	7
MPNST	3
Site	
Thigh	18
Upper arm	7
Retroperitoneum	5
Head and neck	5
Buttock	4
Forearm	4
Back	3
Others	16
Tumor size (cm)	
< 10	36
= 10	26
FNCLCC grade	
1	15
2	23
3	24
AJCC stage	
I and II	29
III and IV	33
Total	62

MFH, malignant fibrous histiocytoma; RMS, rhabdomyosarcoma; LMS, leiomyosarcoma; SS, synovial sarcoma; MPNST, malignant peripheral nerve sheath tumor

O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)는 정상 인간 세포에서 DNA 복구 효소이다. 이것은 돌연변이나 세포독성이 있는 부가물을 DNA의 guanine O⁶ 위치에서 제거하는 역할을 한다. MGMT 활성도가 없다면 이러한 부가물들이 제거되지 않고 DNA 복제시 thymine의 복구실패를 야기하여 O⁶ alkyl guanine의 G-to-A 전이를 허용하게 한다. 즉, MGMT는 O⁶-alkylating agent로부터 야기되는 돌연변이, 자매 염색분체교환, 재조합 그리고 염색체이상들과 같은 유해효과로부터 세포를 보호하는 역할을 한다^{2,7,8,9)}. 촉진자 부위 과메틸화와 관계하는 MGMT 유전자의 발현억제(silencing)는 다양한 종양에서 보고되고 있다^{1,2,8,11,13,15,16,21)}. 한 연구는 MGMT 촉진자 부위 과메틸화가 연부조직 종양의 약 15%에서 발견된다고 밝히면서 이는 종양의 악성도와 관련성이 있는 것으로 보고하였다⁷⁾. 몇몇 보고에 따르면 과메틸화의 이상이 MGMT 단백질의 소실과도 관련이 있다는 주장도 있다^{2,4,8,11,16,17,21)}. 면역조직화학법은 비교적 쉽게 파라핀 포매 조직을 고정하여 MGMT 단백질의 발현을 발견할 수 있는 아주 간단한 방법이다.

O⁶-guanine DNA의 생성물의 복구를 매개하는 단백질인 MGMT는 alkylating agents에 저항성을 가지는 종양과 연관이 있다^{6,9)}. 촉진자 부위 과메틸화로 인한 MGMT 발현 유전자의 발현억제(silencing)는 BCNU, temozolomide와 같은 alkylating agent를 투여한 신경교종 환자의 생존율 증가와 상관성이 있다^{4,14)}.

본 연구에서는 연부 조직 종양 환자에 있어 메틸화 특히 중합효소연쇄반응과 면역조직화학법을 이용하여 촉진자 부위 과메틸화와 MGMT의 발현 소실을 분석하고 MGMT의 불활성화와 임상 병리학적 특성과의 상관성을 평가하고자 한다. 그리고 특히

항암치료를 받은 군에 있어 전반적인 생존율에 영향을 미치는 MGMT의 중요성을 평가하고자 한다.

연구 방법 및 대상

1. 연부 조직 육종 조직 표본

1998년부터 2007년까지 부산대학교 병원에서 수술적 치료를 시행한 62명의 연부 조직 육종 환자로 부터 포르말린에 고정된, 파라핀 포매를 얻었으며, World Health Organization(WHO) classification에서 정의한 진단 기준을 이용하여 병리학적 소견을 통하여 진단하였다. 육종의 종류에는 지방육종이 20예, 악성 섬유성 조직구증이 17예, 횡문근육종이 9예, 평활근육종이 6예, 연골 육종이 7예, 악성 말초 신경막종이 3예였으며, 이들의 임상 기록과 컴퓨터 데이터 베이스를 이용하여 임상정보를 얻었다. 생존기간은 수술일로부터 사망일 또는 마지막 병원

내원일을 기준으로 계산하였으며, 무진행생존기간 (progression-free survival)은 수술일로부터 종양의 재발이 발견된 날로 계산하였다. 모든 환자들은 본원의 조직검사 동의서 지침에 대하여 서명하도록 하였다.

2. MGMT의 면역조직화학법

각각의 슬라이드는 표준 술식에 따라서 탈파라핀화, 재수화한 후, 120도 microwave pressure cooker에서 15분간 0.01M sodium citrate buffer (Ventana-Bio Tek solutions, Turson, AZ) 로 처리하였다. 각각의 Section들은 3% 과산화수소수에서 담구고, 5% normal goat serum에서 block하였다. 면역조직화학 염색은 Vectastain ABC elite kit (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)를 이용한 색원체인 Diaminobenzidine(DAB)을 이용한 avidon-biotin peroxidase complex 방법으로 하

Table 2. Expression status of MGMT protein in soft tissue sarcomas (n=62)

Clinicopathologic parameters	MGMT protein expression, n (%)		P value
	Loss (n=20)	Preserve (n=42)	
Gender			
Male (n=31)	10 (32.3%)	21 (67.7%)	0.607
Female (n=31)	10 (32.3%)	21 (67.7%)	
Histologic type			
Liposarcoma (n=20)	6 (30.0%)	14 (70.0%)	0.282
MFH (n=17)	9 (52.9%)	8 (47.1%)	
RMS (n=9)	1 (11.1%)	8 (88.9%)	
LMS (n=6)	2 (33.3%)	4 (66.7%)	
SS (n=7)	1 (14.3%)	6 (85.7%)	
MPNST (n=3)	1 (33.3%)	2 (66.7%)	
Tumor size (cm)			
< 10 (n=36)	10 (27.8%)	26 (72.2%)	0.419
= 10 (n=26)	10 (38.5%)	16 (61.5%)	
FNCLCC grade			
1 (n=15)	0 (0%)	15 (100%)	0.005
2 (n=23)	8 (34.8%)	15 (65.2%)	
3 (n=24)	12 (50.0%)	12 (50.0%)	
AJCC stage			
I and II (n=29)	2 (6.9%)	27 (93.1%)	0.000
III and IV (n=33)	18 (54.5%)	15 (45.5%)	

MFH, malignant fibrous histiocytoma; RMS, rhabdomyosarcoma; LMS, leiomyosarcoma; SS, synovial sarcoma; MPNST, malignant peripheral nerve sheath tumor

였다. 일차 항체는 쥐의 단일 클론 항체 MGMT (1:100 clone MT 3.1 Neomarkers, Fremont, CA, USA)를 사용하였다.

면역조직화학 염색은 두명의 병리학 의사가 판독 하였으며, 두명의 병리학 의사는 각각의 예에 대하여 진단과 예후에 대하여 맹검법을 적용하였다. 갈색조로 핵이 염색되는 경우를 양성 소견으로 간주하였고, MGMT에 대한 항체 염색에서, 중앙 세포의 10% 이하에서 양성으로 나타나는 경우 발현 소실로 판단하였다.

3. Methylation-Specific PCR (MSP)

DNA는 QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 보관된 포르말린 고정 파라핀 블록으로부터 추출하였다. CpGenome™ Fast DNA Modification Kit (Chemicon, S7824, Temecula, CA, USA)를 이용하여 2 µg genomic DNA를 bisulfite 처리하였다. DNA 표본들은 Wizard DNA Clean-Up system (Promega, Madison, WI)을 이용하여 정제한 후 NaOH, ethanol-precipitated로 처리한 후

Table 3. Expression status of MGMT protein in group 1A (n=26) and group 1B (n=27)

Clinicopathologic parameters	MGMT protein expression in group 1A (n=26), n (%)			MGMT protein expression In group 1B (n=27), n (%)		
	Loss (n=7)	Preserve (n=19)	P-value	Loss (n=10)	Preserve (n=17)	P-value
Gender						
Male	2 (18.2%)	9 (81.8%)	0.345	5 (33.3%)	10 (66.7%)	0.706
Female	5 (33.3%)	10 (66.7%)		5 (41.7%)	7 (58.3%)	
Histologic type						
Liposarcoma	1 (9.1%)	10 (90.9%)	0.177	4 (57.1%)	3 (42.9%)	0.145
MFH	4 (57.1%)	3 (42.9%)		4 (66.7%)	2 (33.3%)	
RMS	0 (0%)	2 (100.0%)		1 (16.7%)	5 (83.3%)	
LMS	1 (25.0%)	3 (75.0%)		1 (50.0%)	1 (50.0%)	
SS	1 (50.0%)	1 (50.0%)		0 (0%)	4 (100%)	
MPNST	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	2 (100%)	
Tumor size (cm)						
< 10	3 (23.1%)	10 (76.9%)	0.500	5 (29.4%)	12 (70.6%)	0.415
= 10	4 (30.8%)	9 (69.2%)		5 (50.0%)	5 (50.0%)	
FNCLCC grade						
1	0 (0%)	12 (100%)	0.008	0 (0%)	3 (100%)	0.328
2	2 (33.3%)	4 (66.7%)		4 (36.4%)	7 (53.8%)	
3	5 (62.5%)	3 (37.5%)		6 (46.2%)	7 (63.7%)	
AJCC stage						
I and II	1 (6.3%)	15 (93.7%)	0.005	1 (10.0%)	9 (90.0%)	0.042
III and IV	6 (60.0%)	4 (40.0%)		9 (52.9%)	8 (47.1%)	
Disease progression						
Progression-free	2 (14.3%)	12 (85.7%)	0.130	2 (16.7%)	10 (83.3%)	0.058
Progression	5 (41.7%)	7 (58.3%)		8 (53.3%)	7 (46.7%)	
Overall survival						
Alive	2 (14.3%)	14 (85.7%)	0.051	3 (17.6%)	14 (82.4%)	0.039
DOD	5 (50.0%)	5 (50.0%)		6 (66.7%)	3 (33.3%)	

group 1A : patients who didn't receive chemotherapy

group 1B : patients who received chemotherapy

MFH, malignant fibrous histiocytoma; RMS, rhabdomyosarcoma; LMS, leiomyosarcoma; SS, synovial sarcoma; MPNST, malignant peripheral nerve sheath tumor

물에서 재부유 시켰다.

MSP에서 처리된 DNA는 template로 사용하였고 과메틸화 또는 비메틸화 MGMT 촉진자 부위 각각은 Esteller 등의 기술에 따라 사용하였다. 비메틸화 반응에 있어 MGMT의 Primer sequences는 a93-bp product를 증폭시킨 5'-TTT GTG TTT TGA TGT TTG TAG GTT TTT GT-3' (sense)와 5'-AAC TCC ACA CTC TTC CAA AAA CAA AAC A-3' (antisense)였다. 메틸화 반응에 있어 MGMT의 sequences는 an81 pb product를 증폭시킨 5'-TTT CGA CGT TCG TAG GTT TTCGC-3'(sense)와 5'-GCA CTC TTC CGA AAA CGA AAC G-3' (antisense)였다.

PCR 혼합물은 PCR buffer 2.5 μ l(x10), primer 1.0 μ l, 2.5mM dNTP 2.5 μ l, hot start Taq polymerase (Takara) 0.2 μ l(1U)를 포함하며, 최종 반응량은 25 μ l이었다. 증폭 상태는 다음과 같았다: 95 $^{\circ}$ C에서 5분간, 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 33회, 59 $^{\circ}$ C에서 30초간, 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 40초간, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10 분간. PCR 반응물은 2.5% agarose gel에서 전기영동하고 ethium bromide로 염색한 후 UV illumination으로 가시화하였다.

메틸화-양성 DNA 대조군은 DNA 내 CpG dinucleotide의 모든 메틸화 cytosine인 SssI methylase (New England Biolabs, Beverly, MA)를 이용하여 생체 밖에서 만들었다. 정상 임파구의

DNA를 음성 대조군으로 사용하였고, 10개의 비종양 중간엽조직을 대조군으로 사용하였다.

4. 통계

통계 분석은 SPSS 13.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA)를 이용하였다. 변수들과의 상관성에 대하여 Fisher's exact test 또는 Pearson's chi square test를 이용하여 평가하였다. 생존 기간은 Kaplan-Meier log-rank test를 이용하여 계산하였다. MGMT 염색의 독립적 예후 인자를 평가하기 위한 다변량분석은 Cox regression을 이용하였다. P값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. Clinical and histopathological findings

임상병리학적 매개변수들은 table1에서 요약하였다. 가장 흔한 연부 조직 육종은 지방육종(n=20)과 악성섬유 조직구증(n=17)이었다. 가장 흔한 발생 부위는 허벅지였다(n=18). French Federation of Cancer Centers sarcoma group grading system에 따라서 62예의 육종 중에서 15예는 1단계, 23예는 2단계, 24예는 3단계에 해당되었다. American Joint Committee on Cancer (AJCC)

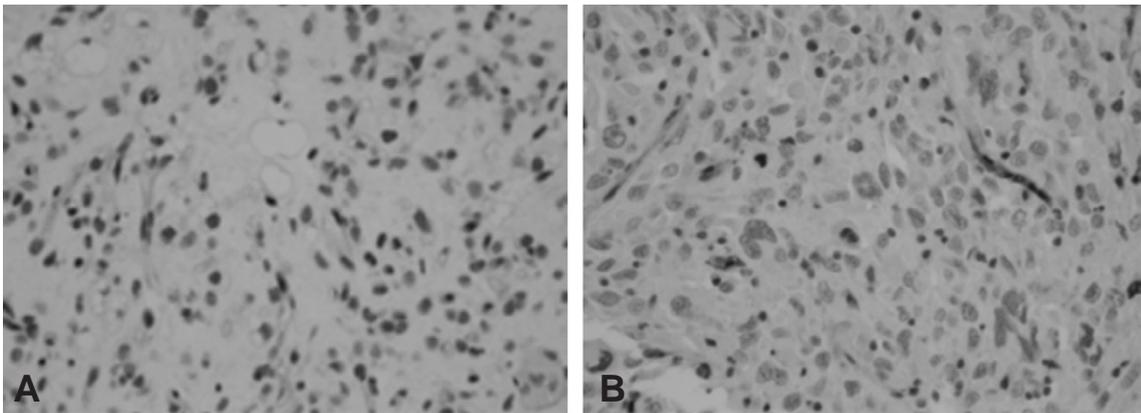


Fig. 1. Immunohistochemical staining for MGMT. Brown-colored nuclear staining was regarded as positive staining. (A) Tumor with positive staining. (B) tumor showing loss of MGMT expression. Intratumoral endothelial cells act as an internal positive control in the background ($\times 400$).

staging system에 따라서 분류하였을 때 13예가 병기 I, 16예가 병기 II, 31예가 병기 III, 그리고 2예가 병기 IV에 해당되었다. 병기 I, II는 조기 병기

로 병기 III, IV는 진행성 병기로 나누어서 후향적 분석을 시행하였다.

술 전 항암치료를 시행한 환자는 없었으며 최종 추

Table 4. Multivariate analysis of prognostic factors in group 1A (n=26)

Variables	Grouping	P value	Ratio of risk	95% CI
AJCC stag	III,IV vs I,I	0.005	27.51	2.65~285.22
FNCLCC grade	G2,G3 vs G1	0.773	0.78	0.14~4.27
MGMT protei	Loss vs expressio	0.356	0.32	0.03~3.60

CI, confidence interval

Table 5. Multivariate analysis of prognostic factors in group 1B (n=27)

Variables	Grouping	P value	Ratio of risk	95% CI
IAJCC stag	III,IV vs I,II	0.976	1.05	0.52~20.91
FNCLCC grade	G2,G3 vs G1	0.262	4.45	0.33~60.63
MGMT protei	Loss vs expressio	0.024	19.10	1.47~248.94

CI, confidence interval

Table 6. MGMT promoter hypermethylation status in soft tissue sarcomas (n=44)

Clinicopathologic parameters	MGMT promoter hypermethylation, n (%)		P value
	+(n=11)	-(n=33)	
Gender			
Male (n=22)	7 (31.8%)	15 (68.2%)	0.488
Female (n=22)	4 (18.2%)	18 (81.8%)	
Histologic type			
Liposarcoma (n=15)	2 (13.3%)	13 (86.7%)	0.282
MFH (n=10)	4 (40.0%)	6 (60.0%)	
RMS (n=8)	4 (50.0%)	4 (50.0%)	
LMS (n=3)	0 (0%)	3 (100%)	
SS (n=6)	1 (16.7%)	5 (8.3%)	
MPNST (n=2)	0 (0%)	2 (100%)	
Tumor size (cm)			
< 10 (n=28)	8 (28.6%)	20 (71.4%)	0.719
≥ 10 (n=16)	3 (18.8%)	13 (81.2%)	
FNCLCC grade			
1 (n=11)	0 (0%)	11 (100%)	0.000
2 (n=16)	1 (6.2%)	15 (93.8%)	
3 (n=17)	10 (58.8%)	7 (41.2%)	
AJCC stage			
I and II (n=25)	5 (20.0%)	20 (80.0%)	0.228
III and IV (n=19)	6 (31.6%)	13 (68.4%)	

MFH, malignant fibrous histiocytoma; RMS, rhabdomyosarcoma; LMS, leiomyosarcoma; SS, synovial sarcoma; MPNST, malignant peripheral nerve sheath tumor

시 관찰이 가능한 예는 53예였다. 24예가 (45.3%) 무진행생존군에 해당되었고, 29예에서(54.7%) 재발되거나 전이가 있었다. 평균 추시기간은 26개월 (1~180개월) 이었으며, 최종 추시상 34예(64.2%)에서 생존하였다. 26예는 술 후 항암 치료를 받지 않았으며(group IA), 27예는 술 후 항암치료를 받았다(group IB). 항암치료는 15예에서 MAID (Mesna, Adriamycin, Ifosfamide, Dacarbazine), 그 외에는 vincristine, cyclophosphamide, dactinomycin, taxotere, or cisplatin 등으로 치료하였다.

2. Loss of MGMT expression status and association with clinico pathological parameters

MGMT 면역조직화학법은 모든 종양에서 성공적으로 시행하였다. IHC 염색의 표본은 Fig. 1에 표시하였다. MGMT 발현의 소실은 20예에서 발견되었다(32.3%). MGMT 단백질은 대부분의 기질세포, 염증세포, 내피세포에서 정상적으로 발현된다. MGMT 발현의 소실은 FNCLCC grade(p=0.005)

Table 7. MGMT promoter hypermethylation in group 2A (n=21) and group 2B (n=21)

Clinicopathologic parameters	MGMT promoter hypermethylation in group 2A (n=21), n (%)			MGMT promoter hypermethylation in group 2B (n=21), n (%)		
	+(n=3)	-(n=21)	P value	+(n=7)	-(n=14)	P value
Gender						
Male	1 (11.1%)	8 (88.9%)	0.612	5 (41.7%)	7 (58.3%)	0.642
Female	2 (16.7%)	10 (83.3%)		2 (22.2%)	7 (87.8%)	
Histologic type						
Liposarcoma	1 (10.0%)	9(90.0%)	0.212	1 (20.0%)	4 (80.0%)	0.228
MFH	1 (20.0%)	4 (80.0%)		2 (50.0%)	2 (50.0%)	
RMS	0 (0%)	2 (100.0%)		4 (66.7%)	2 (33.3%)	
LMS	0 (0%)	2 (100.0%)		0 (0%)	1 (100%)	
SS	1 (100.0%)	0 (0%)		0 (0%)	4 (100%)	
MPNST	0 (0%)	1 (100.0%)		0 (0%)	1 (100%)	
Tumor size (cm)						
< 10	2 (16.7%)	10 (83.3%)	0.512	5 (35.7%)	9 (64.3%)	0.572
= 10	1 (11.1%)	8 (88.9%)		2 (28.6%)	5 (71.4%)	
FNCLCC grade						
1	0 (0%)	9 (100.0%)	0.013	0 (0%)	2 (100%)	0.045
2	0 (0%)	6 (100.0%)		1 (11.1%)	8 (88.9%)	
3	3 (50.0%)	3 (50.0%)		6 (60.0%)	4 (40.0%)	
AJCC stage						
I and II	1 (6.7%)	14 (93.3%)	0.184	3 (37.5%)	5 (62.5%)	0.557
III and IV	2 (33.3%)	4 (66.7%)		4 (30.8%)	9 (69.2%)	
Disease progression						
Progression-free	1 (6.3%)	15 (93.7%)	0.128	2 (18.2%)	9 (81.8%)	0.183
Progression	2 (40.0%)	3 (60.0%)		5 (50.0%)	5 (50.0%)	
Overall survival						
Alive	1 (5.9%)	16 (94.1%)	0.080	3 (27.3%)	11 (72.7%)	0.127
DOD	2 (50.0%)	2 (50.0%)		4 (57.1%)	3 (42.9%)	

group 2A : patients who didn't receive chemotherapy

group 2B : patients who received chemotherapy

MFH, malignant fibrous histiocytoma; RMS, rhabdomyosarcoma; LMS, leiomyosarcoma; SS, synovial sarcoma; MPNST, malignant peripheral nerve sheath tumor

와 AJCC stage(p=0.000)에 유의한 상관성을 보였다. 그 결과는 Table 2에서 요약하였다.

술 후 항암치료를 받지 않은 Group 1A(n=26)에서 MGMT 발현의 소실은 FNCLCC grade(p=0.008)와 AJCC stage(p=0.005)에 유의한 상관성을 보였다. MGMT 발현의 소실을 보인 7예 중 5예(71.4%)에서 재발하였고, MGMT 발현을 보인 19예 중 12예는(63.2%)는 재발이 없었다(p=0.130). MGMT 발현의 소실을 보인 군의 평균 생존율은 38%로, MGMT 발현을 보인 군의 평균 생존율 63.0%에 비해 유의하게 낮았다(p=0.051) (Table 3 and Fig.2A). 다변량해석에 있어 Table 4에 정의한 변수 중 독립적 예후 인자는 AJCC stage였다(Table 4).

술 후 항암치료를 받은 group 1B (n=27)에서 MGMT 발현의 소실은 AJCC stage(p=0.042)와 유의한 상관관계를 보였으며 무질병진생존(p=0.058)과

어느 정도의 상관성이 있는 것으로 나타났다. 이 결과는 다변량 해석에 있어 전체 생존기간과 유의한 상관성이 있으며(p=0.039)(Table 3), 통계적으로 유의한 독립예후인자로 간주할 수 있었다(p=0.024)(Fig. 2B, Table 5).

3. MGMT promoter hypermethylation status and association with clinicopathologic parameters

MSP에 의한 MGMT 촉진자 부위 메틸화의 결정은 전 표본중 44예에서 가능하였다. MGMT 촉진자 부위 메틸화의 빈도는 25.0%였다(11/44예). 표본은 Fig. 3에 표시를 하였다. MGMT 촉진자 부위 과메틸화와 FNCLCC grade 간에는 유의한 상관관계를 보였다(p=0.000) (Table 6).

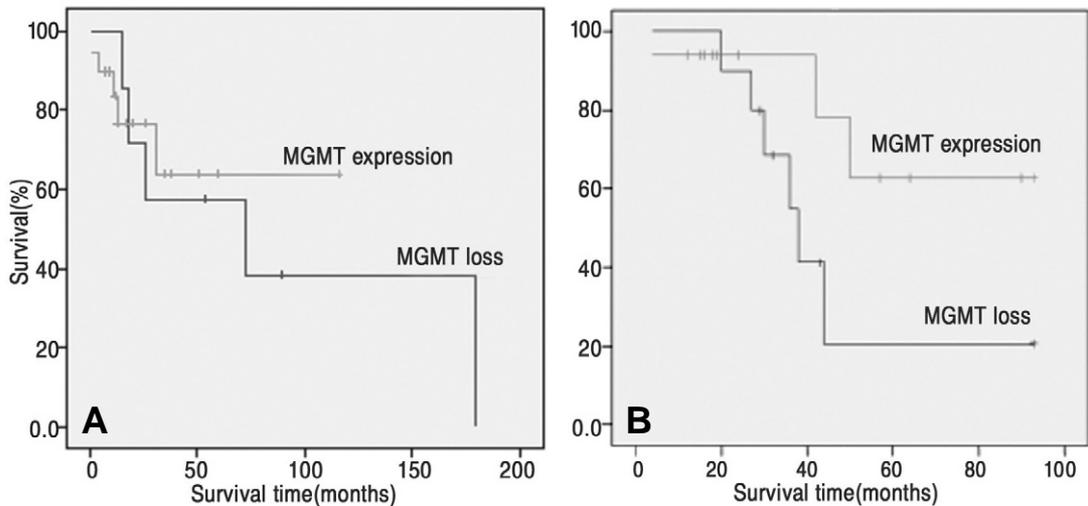


Fig. 2. Kaplan-Meier survival curves of patients with soft tissue sarcoma. **(A)** Loss of MGMT expression and overall survival in group A (n=26) who didn't receive chemotherapy (p=0.051). **(B)** Loss of MGMT expression and overall survival in group B (n=27) who received chemotherapy (p=0.039).

Table 8. Correlation between MGMT hypermethylation and MGMT protein expression in soft tissue sarcoma (n=44)

MGMT hypermethylation	MGMT protein expression		P value
	Loss	Preserve	
+	9	2	0.000
-	4	29	

술 후 항암 치료를 받지 않은 group 2A(n=21)에서 MGMT 촉진자 부위 과메틸화는 FNCLCC grade와 유의한 상관관계를 보였다(p=0.013). MGMT 촉진자 부위 과메틸화를 보인 3예 중 2예(66.7%)는 질병진행군이었고, MGMT 촉진자 부위 과메틸화를 보이지 않은 18예 중 14예(77.8%)는 무질병진행군이였다(p=0.128).

술 후 항암 치료를 받은 group 2B (n=21)에서 MGMT 촉진자 부위 과메틸화는 FNCLCC grade와 유의한 상관관계를 보였다(p=0.045). MGMT 과메틸화를 보이는 7예 중 4예에서(57.1%) 최종 추시상 사망하였고, MGMT 촉진자 부위 과메틸화를 보이지 않은 14예 중 3예에서(21.4%) 최종 추시상 사망하였다. MGMT 촉진자 부위 과메틸화는 나쁜 예후를 보이는 경향이 있으나, 통계학적 유의성은 없었다(p=0.183, p=0.127)(Table 7).

4. Correlation of loss of MGMT expression and MGMT promoter hypermethylation

이 연구는 MSP가 가능한 44예에서 MGMT 촉진자 부위 과메틸화 상태와 MGMT 발현 소실간의 연관성에 대하여 살펴보았다. MGMT 촉진자 부위 과메틸화는 총 11예에서 발견되었다(25.0%). MGMT 촉진자 부위 과메틸화를 보인 11예 중 9예에서(81.8%) MGMT 발현의 소실을 보였고, MGMT 촉진자 부위 과메틸화를 보이지 않은 33예에서는 4예에서 MGMT 발현의 소실을 보여 상호

관계가 있었다(12.1%)(p=0.000)(Table 8). 정상 조직에서는 메틸화 밴드를 보이지 않았다.

고 찰

MGMT는 촉진자 부위 과메틸화와 관련하여 종종 기능상실을 보이는데, 이것은 인간의 종양발생에 중요한 단계를 제공한다. MGMT 촉진자 부위 과메틸화의 범위는 종양에 따라 0%에서 75%까지 매우 다양하게 나타난다. MGMT 촉진자 부위 과메틸화 상태의 영향과 MGMT 단백질의 발현이 종양의 예후와 어떠한 관계가 있는지에 대한 연구가 최근 보고되고 있다^{1,2,4,8,11,13,15,16,17,21}. 신경교종, 대장암, 림프종, 전립선암은 MGMT 촉진자 부위 과메틸화의 빈도가 가장 높게 나타나는 종양이다^{1,8,13,16,21}.

현재까지 널리 연구되진 바에 의하여 신경교종은 MGMT 촉진자 부위 과메틸화가 생존율과 연관성이 있다고 보고되고 있다^{7,14}. 반대로 다른 몇몇 연구에서는 비메틸화 신경교종의 환자군에서 생존율이 더 높게 나타난 보고도 있고²⁰, MGMT 촉진자 부위 과메틸화와 생존율이 관계가 없다고 보고도 있다³. Brell 등⁴은 항암치료를 받은 환자에서 MGMT 단백질의 발현과 생존율의 상관성에 대하여 연구하였는데, 이들은 MGMT 발현이 없는 경우가 악성신경교종환자에서 양성예측도로 작용한다고 하였다. 그러나 이들은 MGMT 촉진자 부위 과메틸화와 생존율간의 상관성을 발견하지 못하였고, 통계학적 유의성이 없다고 하였다.

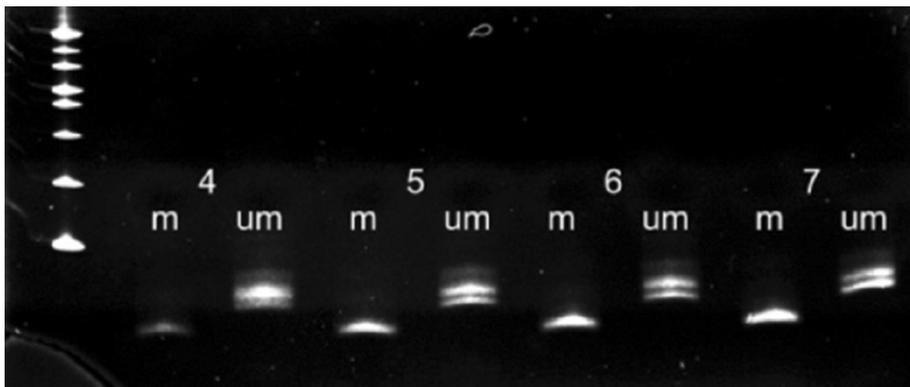


Fig. 3. Promoter hypermethylation status of MGMTgene by methylation-specific PCR. PCR products were amplified unmethylated (U) and methylated (M)-specific primers.

대장암에서 MGMT 촉진자 부위 과메틸화는 고전적인 선암종에서 여러 단계에 관여하고, MGMT 단백질 발현의 소실과 연관성이 있다²¹⁾. 위암에서 MGMT 촉진자 부위 과메틸화는 10~20%에서 발견되었는데, MGMT 촉진자 부위 과메틸화는 중앙의 임파선 및 혈관 침입 및 진행성 종양 및 생존율과 연관성이 있는 것으로 나타났다^{2, 22, 23)}.

Bae 등²⁾과 Oue 등²²⁾은 MGMT 발현 소실이 주로 MGMT 촉진자 부위 과메틸화에 의해 나타난다고 하였다. 비록 이런 다양한 결과들이 다른 protocol과 연구의 단일성 결여 때문이라 하더라도 MGMT의 촉진자 부위 메틸화가 안되는 종양에서 항암치료를 받았을 경우 생존율이 높다는 것은 DNA 손상의 복구가 MGMT로 인해 어려워진다는 것을 의미한다. 한편 MGMT 발현 소실은 다른 돌연변이에 대한 감수성을 증가시켜, 음성 예후 인자로 작용할 수 있다¹²⁾.

연부 조직 육종에 대한 기존의 연구에서는¹⁷⁾ MGMT 촉진자 부위 과메틸화가 15%에서 나타났고, 이 경우 종양은 보다 공격적인 성향을 보이는 것으로 나타났다. MGMT 촉진자 부위 과메틸화는 MGMT 발현 소실과 통계학적으로 유의한 상관관계를 보였다¹⁷⁾. 본 연구에서는 MSP와 면역조직화학법을 이용하여 MGMT 촉진자 부위 과메틸화와 MGMT 단백질 발현 소실 및 임상병리학적 변수와의 상관관계에 대하여 분석하였는데, 이 방법은 검체에서 MGMT 활동도를 발견하는데 보다 쉬운 방법이라 하겠다. MGMT 촉진자 부위 과메틸화를 보이는 종양과 MGMT 발현 소실을 보이는 종양의 비율은 각각 25.0%(44예중 11예)와 32.3%(62예 중 20예)였고, 이 비율은 이전의 연구 결과에 비하여 높은 수치이다. 최근 연구에서 MGMT 발현 소실과 MGMT 촉진자 부위 과메틸화의 상관성을 보여주었다. 이것은 MGMT 촉진자 부위 과메틸화가 MGMT 불활성화의 주요 메커니즘임을 나타낸다. Kawaguchi 등¹⁷⁾도 연부 조직 종양에서 MGMT 불활성화가 종양의 크기가 큰 경우, 종양이 재발한 경우, AJCC stage가 높은 경우에서 나타난다고 보고하였다. 이 연구에서 MGMT 촉진자 부위 과메틸화를 보이는 경우는 조직학적 등급이 높은 경우와 상관성이 있었다. 그리고 MGMT 발현 소실이 나타나는 전예에서 조직학적 고등급(FNCLCC stage II

and III)으로 나타났으며, 90%는 진행된 병기였다(AJCC stage III and IV). MGMT 발현 소실은 제 1A군과 IB군에서 더 나쁜 생존율과 상관성이 있었고, 나쁜 예후 인자로 간주할 수 있었다.

MGMT는 메틸화 매개체(MNU 또는 MNNG(N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine)포함)와 dacarbazine, procarbazine, temozolomide, lomustine, nimustine, carmustin(BCNU, 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea)와 같은 몇몇 약물에 노출된 후 발생하는 O⁶-methylguanine DNA 산물을 치유하는데 중요한 역할을 하기 때문에, 몇몇 연구들은 종양세포내의 MGMT 활성화 정도가 항암제의 역감수성과 연관이 있다고 밝혔다^{2, 8, 27)}. 따라서 MGMT-methylated (silenced) diffuse large B cell lymphoma(DLBCL)환자에서 흔히 사용하는 cyclophosphamide와 같은 alkylating agent는 MGMT 메틸화된 경우 좋은 예후를 보인다는 점을 설명할 수 있다¹⁾. 반면에, 난소암에서 항암치료를 받은 환자의 생존율과 MGMT 활성화 사이에 유의한 상관성은 없었다¹⁵⁾. 저자들은 MGMT 촉진자 부위 과메틸화의 역할과 항암치료를 받은 환자들에서의 MGMT 발현 소실을 설명하기 위하여 노력하였는데, 다변량분석에서 항암치료를 받은 연부 조직 육종에서 MGMT 발현 소실이 더 짧은 생존기간과 유의한 상관관계를 보였다.

결 론

본 연구에서는 MGMT 촉진자 부위 과메틸화와 MGMT 발현 소실은 임상병리학적 몇몇 매개변수와 상관관계가 있었다. 여기에 해당되는 매개변수는 FNCLCC grade가 높은 경우, 진행된 AJCC stage, 질병의 진행 정도, 보다 짧은 생존율 등이다. 실제로 MGMT 발현 소실은 항암치료를 받은 군에서 stage와 grade보다 더 강력한 음성 예후인자였다. 그리고 MGMT 발현 소실은 MGMT 촉진자 부위 과메틸화와 연관이 있었다.

REFERENCES

- 1) Al-Kuraya K, Narayanappa R, Siraj AK, Al-Dayel F, Ezzat A, El Solh H, et al.: High frequen-

- cy and strong prognostic relevance of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase silencing in diffuse large B-cell lymphomas from the middle east. *Hum Pathol*, 37:742-748, 2006.
- 2) **Bae SI, Lee HS, Kim SH, Kim WH:** Inactivation of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter CpG island hypermethylation in gastric cancers. *Br J Cancer*, 86:1888-1892, 2002.
 - 3) **Blanc JL, Wager M, Guilhot J, Kusy S, Bataille B, Chantreau T, et al.:** Correlation of clinical features and methylation status of MGMT gene promoter in glioblastomas. *J Neurooncol*, 68:275-283, 2004.
 - 4) **Brell M, Tortosa A, Verger E, Gil JM, Vinolas N, Villa S, et al.:** Prognostic significance of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expression in anaplastic gliomas. *Clin Cancer Res*, 11:5167-5174, 2005.
 - 5) **Brinck U, Schlott T, Storber S, Stachura J, Bortkiewicz P, Nagel WD, et al.:** Alterations of the retinoblastoma and p16 pathway correlate with promoter methylation in malignant fibrous histiocytomas. *Anticancer Res*, 26:3461-3465, 2006.
 - 6) **Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG:** A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*, 61:3225-3229, 2001.
 - 7) **Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al.:** Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*, 343:1350-1354, 2000.
 - 8) **Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG:** Inactivation of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res*, 59:793-797, 1999.
 - 9) **Esteller M, Herman JG:** Generating mutations but providing chemosensitivity: The role of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene*, 23:1-8, 2004.
 - 10) **Friedman HS, Pegg AE, Johnson SP, Loktionova NA, Dolan ME, Modrich P, et al.:** Modulation of cyclophosphamide activity by O⁶-alkylguanine-DNA methyltransferase. *Cancer Chemother Pharmacol*, 43:80-85, 1999.
 - 11) **Furonaka O, Takeshima Y, Awaya H, Kushitani K, Kohno N, Inai K:** Aberrant methylation and loss of expression of O-methylguanine-DNA methyltransferase in pulmonary squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *Pathol Int*, 55:303-309, 2005.
 - 12) **Gerson SL:** MGMT: Its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*, 4:296-307, 2004.
 - 13) **Grasbon-Frodl EM, Kreth FW, Ruiter M, Schnell O, Bise K, Felsberg J, et al.:** Intratumoral homogeneity of MGMT promoter hypermethylation as demonstrated in serial stereotactic specimens from anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Int J Cancer*, 121:2458-2464, 2007.
 - 14) **Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al.:** MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*, 352:997-1003, 2005.
 - 15) **Hengstler JG, Tanner B, Moller L, Meinert R, Kaina B:** Activity of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in relation to p53 status and therapeutic response in ovarian cancer. *Int J Cancer*, 84:388-395, 1999.
 - 16) **Kang GH, Lee S, Lee HJ, Hwang KS:** Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *J Pathol*, 202:233-240, 2004.
 - 17) **Kawaguchi K, Oda Y, Saito T, Yamamoto H, Takahira T, Kobayashi C, et al.:** DNA hypermethylation status of multiple genes in soft tissue sarcomas. *Mod Pathol*, 19:106-114, 2006.
 - 18) **Kawaguchi K, Oda Y, Saito T, Yamamoto H, Tamiya S, Takahira T, et al.:** Mechanisms of inactivation of the p16INK4a gene in leiomyosarcoma of soft tissue: Decreased p16 expression correlates with promoter methylation and poor prognosis. *J Pathol*, 201:487-495, 2003.
 - 19) **Kawaguchi K, Oda Y, Takahira T, Saito T, Yamamoto H, Kobayashi C, et al.:** Microsatellite instability and hMLH1 and hMSH2 expression analysis in soft tissue sarcomas. *Oncol Rep*, 13:241-246, 2005.
 - 20) **Komine C, Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, Yokoyama T, Fukushima T:** Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase is an independent predictor of shortened progression free survival in patients with low-grade diffuse astrocytomas. *Brain Pathol*, 13:176-184, 2003.
 - 21) **Nagasaka T, Goel A, Notohara K, Takahata T,**

- Sasamoto H, Uchida T, et al.:** Methylation pattern of the O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene in colon during progressive colorectal tumorigenesis. *Int J Cancer*, 122:2429-2436, 2008.
- 22) **Oue N, Shigeishi H, Kuniyasu H, Yokozaki H, Kuraoka K, Ito R, et al.:** Promoterhypermethylation of MGMT is associated with protein loss in gastric carcinoma. *Int J Cancer*, 93:805-809, 2001.
- 23) **Park TJ, Han SU, Cho YK, Paik WK, Kim YB, Lim IK:** Methylation of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene is associated significantly with K-ras mutation, lymph node invasion, tumor staging, and disease free survival in patients with gastric carcinoma. *Cancer*, 92:2760-2768, 2001
- 24) **Ryan CW, Dolan ME, Brockstein BB, McLendon R, Delaney SM, Samuels BL, et al.:** A phase II trial of O⁶-benzylguanine and carmustine in patients with advanced soft tissue sarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol*, 58:634-639, 2006.
- 25) **Seidel C, Bartel F, Rastetter M, Bluemke K, Wurl P, Taubert H, et al.:** Alterations of cancer-related genes in soft tissue sarcomas: Hypermethylation of RASSF1A is frequently detected in leiomyosarcoma and associated with poor prognosis in sarcoma. *Int J Cancer*, 114:442-447, 2005.
- 26) **Weiss SW, Goldblum JR:** *Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors. Vol 1. 5th ed. St. Louis: Mosby; 2008.*
- 27) **Yeager ND, Dolan ME, Gastier JM, Gross TG, Delaney S, Frick J, et al.:** O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase activity and promoter methylation status in pediatric rhabdomyosarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol*, 25:941-947, 2003.

Abstract

Prognostic Significance of O⁶-MGMT and Promotor Hypermethylation in Patients with Soft Tissue Sarcomas

Jeung Tak Suh, M.D., Jeung Il Kim, M.D., Jong Seok Oh, M.D., Kyung Un Choi, M.D.*.

Department of Orthopaedic Surgery, College of Medicine, Department of Pathology,
College of Medicine, Pusan National University, Pusan, Korea*

Purpose: The DNA repair protein, O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), removes alkyl adducts from the O⁶ position of guanine. Epigenetic inactivation of MGMT has been found in human neoplasia and considered one of the implicated factors in chemoresistance.

Materials and Methods: Sixty-two patients with soft tissue sarcomas (STS) were analyzed for the status of MGMT protein expression by immunohistochemistry and the promoter hypermethylation of the MGMT gene using methylation-specific PCR.

Result: The loss of MGMT expression was found in 20 cases (32.3%) of total 62 STS. MGMT promoter hypermethylation rate was 25.0% (11/44 cases). The loss of MGMT expression showed significant association with high AJCC stage, high FNCLCC grade, and aggressive behavior. However, when the group who received chemotherapy was analyzed (n=27), loss of MGMT expression was correlated with worse survival in multivariate analysis (p=0.024). MGMT promoter hypermethylation is associated with high FNCLCC grade. MGMT promoter hypermethylation status had a strong correlation with loss of MGMT expression (p=0.000).

Conclusion: Our results suggest that MGMT promoter hypermethylation and loss of MGMT expression had a tendency to be associated with poor prognosis and that loss of MGMT protein expression is frequently occurs via MGMT promoter hypermethylation.

Key Words: Soft tissue sarcoma, O⁶ methylguanine-DNA methyltransferase, Hypermethylation

Address reprint requests to

Jeung Il Kim, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, Pusan National University Hospital

1-10 Ami-Dong, Seo-Gu, Pusan 602-739, Korea

TEL: 82-51-240-7248, FAX: 82-51-247-8395, E-mail: Osteokim@yahoo.co.kr