

/RR-1153/92

두경부악성 종양의 분자유전학적 연구

Molecular Genetic Study of Head and Neck Cancer

KAERI

한국원자력연구소

제 출 문

소 장 귀하

본 보고서를 “두경부악성 종양의 분자유전학적 연구”과제의 최종보고서로 제출합니다.

1992년 12월 18일

연구실명 : 생화학 연구실

연구책임자: 이 용식

연구원 : 심 운상

이 제호

감수위원 직급: 책임의사

성명: 유 성렬

요 약 문

I. 제목: 두경부 악성종양의 분자유전학적 연구

(Molecular genetic study of head and neck cancer)

II. 연구의 목적 및 중요성:

본 연구는 두경부암의 발생기전에 관여하는 특이 종양억제유전자의 위치를 확인 하려는데 있으며 일차 목표는 17번 상동 염색체상에서 대립유전자 소실되는 것을 분석하는 것이다.

III. 연구 내용 및 범위

두경부 악성종양 15례에서 염색체 17번 염색체의 유전자 변이를 Southern blot법을 이용하여 분석하고자 함.

IV. 연구 결과 및 활용에 대한 건의

연구 결과 : 두경부암 15례중 7례에서 대립유전자를 확인할 수 있었다. p144D6와 pYYNZ22 를 probe로 이용한 경우 이 중 5례에서 대립유전자 소실을 관찰할 수 있었다. 이로써 두경부 악성종양에서도 17번 염색체 부위에서 대립유전자 소실을 보이며 대립유전자소실의 목표유전자가 p 53 유전자인지의 확인이 앞으로 필요하다.

활용 계획 : 대립유전자 소실을 보인 5례를 대상으로 p53 유전자부위에 대한 분자유전학적 분석을 함으로써 발암기전을 규명하는 기초자료로 삼고자 한다. 이는 장차 분자수준에서의 암치료연구의 기초자료로 활용가능할 것임.

S u m m a r y

I. TITLE

Molecular Genetic Study of Head and Neck Cancer

II. OBJECTIVES AND SIGNIFICANCE OF THE STUDY

To identify the tumor suppressor genes in head and neck carcinomas and locate the loci of the genetic changes on the chromosome 17p.

III. SCOPE AND CONTENTS OF THE STUDY

To identify the loci of the genetic change on chromosome 17p by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis.

IV. Results and Proposal for Applications

Results : Out of 7 informative cases which showed heterozygosity on chromosome 17p, 5 cases showed loss of heterozygosity (p144D6 and pYNZ22 /TaqI,PstI).

This result implies the high probability of the presence of tumor suppressor gene locus on chromosome 17p in head and neck malignancy.

Applications : It is possible to apply these molecular genetic data for the better diagnostic and therapeutic plans, and for the further study of the tumor suppressor genes relevant to head and neck cancer.

This result can be the basic data for the oncogenesis of head and neck malignancy.

목 차

제 1 장 서론	4
제 2 장 본론	5
제 1 절 연구내용및 방법	5
제 2 절 연구결과및 고찰	7
제 3 장 결론및 건의 사항	11
참고 문헌	12

제 1 장 서론

유전자의 변이에 의하여 암이 생긴다는 가설은 잘 알려져 있다. 이러한 유전자 변이에는 크게 두가지가 있는 바 종양유전자가 발현되거나¹⁾ 종양억제 유전자가 소실되거나 그 기능이 없어지는 현상이다.²⁾

이중 종양억제 유전자설은 그 간접적 증거로서 암세포와 정상세포를 결합시키는 실험에서 정상세포의 유전물질에 의하여 암의 성장이 멈추는 것으로 그 존재를 간접적으로 알 수 있었으며³⁾, 유전되는 암의 하나인 망막세포아종에서 그 존재가 처음으로 입증되었다.⁴⁾ RB gene으로 명명된 이 유전자는 이 병이 유전되는 양상과는 달리 세포내에서는 열성(recessive)으로 작용하여 이 유전자가 기능을 잃을때 암이 발생하였다. 이 유전자는 가계조사를 통하여 Knudson이 예견한 "Two-hit" 설을 뒷받침하였다. 그대로 만족시켰다.⁵⁾ 그후 특정암에 특이한 종양억제 유전자는 망막아세포 종양이나 Wilms' tumor와 같은 유전성 암에서 뿐만 아니라, 직장암, 폐암, 방광암, 간암등과 같은 성인암에서도 속속 밝혀지고 있다.⁶⁾⁻⁹⁾ 그리고 이러한 성인암에서는 단일 유전자변화보다는 여러개의 종양유전자및 종양억제 유전자가 관여하고 있음이 알려져 있다.¹⁰⁾ 그러나 대부분이 편평상피암인 두경부 암에 특이한 종양억제 유전자에 대한 연구는 별로 없는 상태이다. 이에 대한 연구의 첫과제로 저자는 여러가지 성인성 암의 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 17번 염색체 short arm의 유전자 변이를 검색하여 보는 것이 중요하다고 판단되어 Southern blots을 이용한 RFLP 분석을 시행하여 대립유전자가 소실되는 양상을 분석하고자 하였다.

제 2 장 본 론

제 1 절 연구 내용 및 방법

1. 연구 내용 및 방법 : 원자력병원 이비인후과에서 1992년 수술한 두경부암환자 15례의 (표 1) 종양조직과 정상조직 (근육 또는 말초혈액에서 분리한 임파구) 에서 각각 고분자 DNA를 뽑아서 제한효소로 자른후 Southern blot한 후 17번 염색체 short arm 부위의 소식자들을 이용하여 hybridization 시켰다.

2. 고분자 DNA의 추출: 종양조직은 수술장에서 떼어낸 후 1시간 이내에 섭씨-70도에 보관한 후 1 g가량의 조직을 액화 질소가스로 냉동시킨 상태에서 곱게 빻아 1xSSCE 19ml와 20% SDS 1ml를 섞은 용액에 넣고 Proteinase K를 가한 후 섭씨 37도에서 8시간이상 배양하였다. 다음날 phenol/chloroform용액을 이용하여 DNA를 추출한 후 에틸알코올로 침전시켜 얻은 DNA침전물을 얻고 이를 소량의 증류수로 녹였다. DNA 농도는 spectrometer로 측정하였다.

3. Probe의 제조: plasmid pBR322 에 들어있는 probe pYNZ22¹¹⁾, pMCT35.1, p144D6¹²⁾를 가진 박테리아를 진탕배양기에서 세균배양후 plasmid DNA를추출하여 EcoRI으로 잘라 선형 plasmidDNA로 만든 후 ³²P로 표지하여 probe로 사용하였다.

4. RFLP법을 이용한 대립유전자 소실의 관찰: 정상조직과 종양조직에서 추출한 고분자 DNA 15ug에 45 Unit의 PstI과 TaqI을 넣은후 각각 섭씨 37도와 65도에서 12시간 반응시킨 후 0.8 % agarose gel에서 26볼트, 12-16 시간 전기영동하였다. 전기영동을 끝낸 gel의 DNA를 10XSSC 용액 존재하에 24시간에 걸쳐 nylon막에 옮긴 후 (Southern blotting)¹¹⁾ 섭씨 80도의 진공상태의 오븐에서 2 시간 구워 고정시켰다. 이 나일론 막을 미리 만들어 둔 ³²P로 표지된 probe와 교합반응시킨 후 세척하고 섭씨-70도에서 2일간 감광시켰다. 사용된 probe와 염색체상의 위치는 표 1과 같다.

표 1. 사용된 DNA probe와 유전자좌 위치
(Table 1 DNA probes and loci)

Probe	Clone	Locus
pYNZ 22	17p13.3	D17S5
pMCT 35.1	17p13.1-11.2	D17S31
p144D6	17p13	D17S34

제 2 절 연구 결과 및 고찰

1. 결과 (표 2)

가. p144D6/PstI, Taq : 7례의 정상조직에서 두개의 대립유전자를 관찰할 수 있었으며 이중 5례의 종양 DNA에서 한개의 대립유전자소실을 관찰할 수 있었다.

이 5례는 설암 2례, 후두암, 구강저암, 연구개암 각 1례씩이며 모두 편평상피암이었다.

나. pMCT35.1/Pst, Taq : 15례 모두에서 대립 유전자를 관찰할 수 없었다.

다.. pYNZ22/Pst, Taq : 7례의 정상조직에서 두개의 대립유전자를 관찰할 수 있었으며 이중 5례의 종양 DNA에서 한 개의 대립유전자 소실을 관찰할 수 있었다.

표 2 염색체 17p 상의 대립유전자 소실

(Table 2. Loss of heterozygosity on chromosome 17p)

			DNA markers (enzyme)					
Patient			p144D6 (PstI, TaqI)		pMCT35.1 (PstI, TaqI)		pYNZ22 (PstI, TaqI)	
No.	Site	Histology	N	T	N	T	N	T
1.	Larynx	SCC	a/b	-/b	/	/	a/b	-/b
2.	FOM	SCC	/	/	/	/	/	/
3.	HPC	SCC	a/b	a/b	/	/	a/b	a/b
4.	Larynx	SCC	/	/	/	/	/	/
5.	Tongue	SCC	a/b	a/-	/	/	a/b	a/-
6.	FOM	SCC	a/b	a/b	/	/	a/b	a/b
7.	SMG	SCC	a/b	a/b	/	/	a/b	a/b
8.	SMG	MuEp	/	/	/	/	/	/
9.	HPC	SCC	a/b	a/-	/	/	a/b	a/-
10.	Thyroid	Anaplastic	a/b	a/b	/	/	a/b	a/b
11.	Tongue	SCC	a/b	-/b	/	/	a/b	-/b
12.	SP	SCC	a/b	-/b	/	/	a/b	-/b
13.	Larynx	SCC	/	/	/	/	/	/
14.	Larynx	SCC	/	/	/	/	/	/
15.	HPC	SCC	/	/	/	/	/	/

FOM: floor of mouth, HPC: hypopharynx carcinoma, SMG: submandibular gland
 SP: soft palate, SCC: squamous cell carcinoma, MuEp: mucoepidermoid,
 N: normal tissue DNA, T: tumor DNA, a: longer allele, b: shorter allele in
 each lane, -: deletion of allele, /: homozygous state.

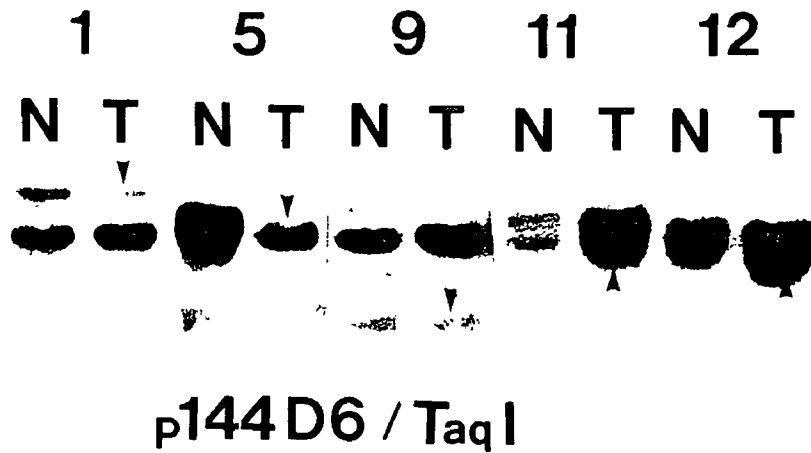


그림 1 두경부 편평상피암에서 염색체 17p에서의 대립유전자 소실을 보여주는 Southern blot 분석. N: 정상조직 T: 종양조직, 관찰부위: D17S34(p144D6). ▲ : 소실된 대립유전자부위. (Fig.1. Southern blot analysis demonstrating loss of heterozygosity on chromosome 17p in normal tissue(N) and tumor tissue(T) of head and neck cancers. The analyzed locus shown here is D17S34(p144D6) . The ▲ indicates loss of allelic fragment in tumor sample.

2. 고찰

암의 발생원인이 유전자 변이에 의한 것임은 이미 알려져 있으며 이들 유전자 변이 중에는 종양유전자와 종양 억제 유전자가 알려져 있다. 이 중 종양억제 유전자의 존재는 비교적 최근에 밝혀 졌으며 RB1, WT1, NF 유전자와 17p13부위에 존재하는 p53 유전자가 밝혀져 있을 뿐이다. p53 유전자 소실이 보고된 암은 대장암, 유방암, 폐암, 뇌암, 골육종, 백혈병 등이며 두경부암에서는 거의 보고가 없는 형편이다.¹⁴⁾ 대부분이 편평상피암인 두경부 암에서 일어날 수 있는 유전자 변이는 여러가지가 있을 수 있으나 이와 유사한 조직인 폐암등에서 17p의 변이가 보고 되어 있어 17p13부위의 유전자 변이를 검색하는 것이 매우 중요하다.

실험 결과에서 p144D6, pYNZ22/PstI, TaqI 에서 71%의 대립유전자 소실을 관찰할 수 있었던 것으로 미루어 유전자변이가 17p13 부위 근처에 있으며 이것은 두경부암의 경우에도 p53 부위에 유전자 변이가 있을 가능성을 의미한다. 따라서 다음의 연구는 PCR-SSCP법을 이용하여 p144D6부위의 유전자 변이가 p53부위인지를 확인하는 것이 중요하고 그 유전자 염기서열을 알아내어 point-mutation 여부를 분석해야할 것으로 판단된다. 또한 성인암의 경우 여러가지의 종양유전자나 억제유전자가 관여할 가능성이 있으므로 17번 염색체 외의 다른 염색체에 대하여도 대립유전자 소실 여부를 분석하여 두경부암의 종양억제유전자의 위치를 밝혀내는 것이 필요하다. 이러한 결과들은 향후 두경부암의 진단이나 치료에 중요한 분자유전학적 자료가 될 뿐만아니라 그 발생시전을 규명하는데 기여할 것으로 사료된다.

제 3 장 결론및 건의 사항

1. 결 론

가. Southern blot 과 RFLP법을 이용하여 두경부 편평상피세포암에서 유전자 변이를 검색한 결과 17번 염색체의 short arm의 D17S30과 D17S5부위에서 71%의 대립유전자 소실을 관찰할 수 있었다.

나. 본 실험에서 나타난 유전자 변이는 향후 PCR-SSCP 법을 이용하여 p53부위의 유전자 변이 유무를 확인하는 과정을 거쳐야 할 것 같다.

2. 건의 사항

가. 폐기물 처리를 위한 지속적이고 안전한 폐기물 처리 방법이 필요함.

나. 고장난 원심분리기의 수리가 너무 지연된다.

REFERENCES

1. Bishop JM : Cellular oncogenes and retroviruses. *Annu Rev Biochem* 52:301-305, 1983
2. Klein G : The approaching era of the tumor suppressor genes. *Nature* 238:1539-1545, 1987
3. Harris J : The genetic analysis of malignancy. *J Cell Sci(suppl)* 4:431-444, 1986
4. Yunis JJ, Ramsay N: Retinoblastoma and subband deletion of chromosome 13. *Am J Dis Child* 132:161-163, 1979
5. Knudson AG : Model hereditary cancers of man. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 29:17-25, 1983
6. Baker SJ, et al: Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colortectal carcinomas. *Science* 244:217-221,1989
7. Takashi T, et al: p53: A Frequent Target for Genetic Abnormalities in Lung Cancer. *Science* 246:491-494,1989
8. Romano JW, et al : Identification and characterization of a p53 gene mutation in a human osteosarcoma cell line. *Oncogene* 4:1483-1488, 1989
9. Toshimasa Kihana et al: High incidence of p53 gene mutation in human ovarian cancer and its association with nuclear accumulation of p53 protein and tumor aneuploidy. *Jpn J Cancer Res* 83:978-984, 1992
10. Vogelstein B, et al : Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 319:525-532, 1988
11. Kondoleon S, et al : A hypervariable RFLP on chromosome 17p13 is defined by an arbitrary single copy probe p144D6 [HGM No.D17S34]. *Nucleic Acid Res.* 15(24):10605,1987
12. Nakamura Y, et al : Variable number of tandem repeat(VNTR) markers for human gene mapping. *Science*,235:1616-1622,1987

13. Southern EM : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis J.Mol. Biol., 938:503-517,1975
14. Norris KL : Mutations of the p53 tumor suppressor gene are a frequent event in squamous carcinomas of the head and neck. Departments of Otolaryngology and pediatrics, Univ. of Texas Southwestern Medical Center. unpublished data.

서 지 정 보 양 식

수행기관보고서 번호	위탁기관 보고서번호	표준 보고서 번호	INIS 주제코드
KAERI/RR-1153			
제목/부제	두경부 악성종양에 대한 분자유전학적 연구		
연구책임자및 부서명	이 용 식 (이비인후과 3 과)		
연구자및 부서명	심 윤 상 (이비인후과 1 과) 이 제 호 (산부인과 4 과 , 생화학 연구실)		
발행지	서울	발행기관	한국원자력 연구소부설 원자력병원
발행일	1992.12		
페이지	15 P.	도표	유(0), 무()
크기	26cm		
참고 사항			
비밀 여부	공개(0), 대외비(),	급 비밀	보고서 종류
			연구 보고서
연구 위탁기관	과학기술처	계약 번호	
초 록	<p>두경부암의 발생에 관여할 것으로 생각되는 종양억제 유전자를 확인하기위해 일차적으로 17번 염색체의 short arm 주위의 대립유전자 소실을 Southern blot법을 이용하여 분석하였다. 총 15례의 두경부악성종양중 5례에서 pYNZ22와 p144D6로 확인되는 부위에 대립유전자 소실을 보임으로서 이 부위의 유전자가 종양억제 유전자일 가능성을 보여 주었다. 향후 이 5례의 환자를 대상으로 이 부위에 대한 정밀탐색을 함으로서 발암기전을 규명하고자 한다.</p>		
주제명 키워드	<p>두경부암, 대립유전자소실, 종양억제 유전자, 17p</p>		

BIBLIOGRAPHIC		INFORMATION		SHEET	
Performing Org. Report No.	Sponsoring Org. Report No.	Standard Report No.	INIS Subject Code		
KAERI/RR-1153					
Title/Subtitle	Molecular Genetic Study of Head and Neck Cancer				
Project Manager and Dept.	Yong-Sik Lee (Dept. Otolaryngology III)				
Researcher and Dept.	Youn Sang Shim (Dept. Otolaryngology I) Je Ho Lee (Dept.Obstetrics & Gynecology)				
Pub. Place	Seoul	Pub.Org.	KAERI, Korea Cancer Center Hosp.	Pub.Date	Dec.1992
Page	15 p.	Ill. and Tab.	Yes(0), No()	size	26cm
Note					
Classified	Open(0),Outside(),__ Class		Report Type		
Sponsoring Org.	MOST		Contract No.		
Abstract	<p>We analyzed 15 cases of head and neck cancer (13 out of 15 were squamous cell cancer.) by Southern blotting to identify the possible tumor suppressor gene. Firstly we searched the chromosome 17p with pYNZ22, pMCT35.1 and p144D6. 5 out of 7 informative cases showed loss of heterozygosity implying the loss of tumor suppressor gene near those loci. Afterwards analysis of these 5 cases is needed to identify the presence of tumor suppressor genes and the oncogenetic mechanism.</p>				
Subject Keywords	<p>Head and Neck Cancer, Loss of Heterozygosity, Tumor Suppressor Gene, 17p</p>				

두경부악성 종양의 분자유전학적 연구

1993年 1月 11日 印刷

1993年 1月 16日 發行

發行人 林 昌 生

發行處 韓國 原子力 研究所

大田直轄市 儒城區 德津洞 150

印刷所 新 友 社

믿는마음 지킨약속 다져지는 신뢰사회