



KR9700229

KAERI/RR-1645/96

비소세포 폐암에 대한 분자유전학적 연구 (II)

(비소세포폐암환자에 있어서 p53 유전자 변이연구 II)

Molecular biologic Study about the Non-small
cell lung carcinoma (II)

(p53 gene alteration in non-small cell lung carcinoma)

研究機關

原子力病院

韓國原子力研究所

29-01-

R

KAERI/RR-1645/96

비소세포 폐암에 대한 분자유전학적 연구 (II)

(비소세포폐암환자에 있어서 p53 유전자 변이연구 II)

Molecular biologic Study about the Non-small
cell lung carcinoma (II)

(p53 gene alteration in non-small cell lung carcinoma)

研究機關
原子力病院

韓國原子力研究所

제 출 문

한국원자력연구소장 귀하

본 보고서를 “비소세포 폐암에 대한 분자유전학적 연구 (II)” 과제의 최종보고서로 제출 합니다.

1996년 12월 31일

연구기관명 : 원자력병원

연구 책임자 : 박 종 호

연구 원 : 조 재 일

연구 원 : 백 회 종

연구 원 : 김 미 희

감 수 위 원 : 이 진 오

류 성 렬

요 약 문

I. 제 목 : 비소세포 폐암에 대한 분자유전학적 연구(II)

(비소세포 폐암 환자에 있어서 p53 유전자 변이 연구 II)

II. 연구의 목적 및 필요성

비소세포 폐암은 한국에서 두번째로 흔한 종양이며, 독특한 생물학적, 임상적 특징을 지닌 여러 종류의 종양으로 구성되어 있다. 현재로는 수술시 확인한 종양의 진행 정도가 환자의 임상적 예후를 예측할 수 있는 유일한 수단이지만, 각각의 환자 치료를 결정할 수 있는 독립된 예후인자의 발견이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

p53 유전자는 종양의 분자유전학적 연구에서 가장 활발히 연구되고 있는 종양 억제 유전자이며, 이의 변이는 모든 종류의 종양에서 가장 많이 발견되고 있는 유전자 변이이다. 외국에서는 폐암의 약 반 이상에서 이 유전자 변이가 보고되고 있다. 임상과 연관지어서 일부에서는 p53 유전자 변이가 있는 경우에 종양의 침윤성이 증가하고, 예후가 불량하다는 보고가 있는 반면, 일부에서는 이를 부정하고 있기도 하며, 이를 이용한 분자유전학적 치료방법이 연구되고 있는 실정이다.

본 연구자는 95년도 기본연구과제에서는 본원에서 수술한 43례의 폐암환자를 대상으로 DNA를 추출후 PCR-SSCP를 실시하여 mobility shift의 유무를 살펴

보고, 여기에서 shift가 있던 레에서는 direct sequencing을 실시하였다. 그 결과 전체 43례중에서 44.2%에서 p53 gene mutation을 발견 하였으며, 그 변이 양상을 살펴 보았고, 이를 임상성적과 비교하여 기존의 다른 결과와 다른 result, 즉 도리어 p53 mutation이 있던 군에서 좋은 예후를 보이고 있음을 알았다(1,2). 이에 더 많은 case 추가가 필요하다고 생각되어 올해에는 40례의 non-small cell lung cancer를 추가하여 p53 및 또 다른 tumor suppressor gene의 존재가 의심되는 3p에 대한 실험을 실시하였다. 그리고 각각의 gene alteration의 유무에 따라 두군으로 나누고 여러 임상성적 및 예후를 비교하였다. 또 gene alteration을 확인하는 방법으로 작년에 실시한 PCR-SSCP와 direct gene sequencing을 대신하여 좀더 간단하면서도 reliability가 좋은 microsatellite assay method가 복잡한 sequencing method와 오차가 심한 PCR-SSCP를 대신 할 수 있는지의 여부를 살펴 보았다.

이번 연구의 목적은 한국 비소세포폐암 환자에서의 p53 및 3p 유전자 변이의 발생빈도와 이들 유전자 변이 유무에 따른 여러 임상성적을 비교 분석하는데 있었으며, 더불어 유전자 변이 여부를 밝힐 수 있는 좀 더 간편한 방법인 PCR-LOH의 활용 여부를 검증하는데 있었다(3-5).

III. 연구개발의 내용과 범위

원자력병원에서 비소세포폐암의 진단을 받고 근치적 절제술을 받은 환자로부터 적출된 40례의 조직을 이용하였다. 이를 조직학적으로 분류하면 23례의 squamous cell carcinoma, 15례의 adenocarcinoma, 1례의 large cell carcinoma, 그리고 1례의 bronchoalveolar cell carcinoma가 있었다. 각각의 종양 sample에서 정상 폐조직과 폐암조직을 떼어내고 이들로 부터 phenol/chloroform 추출법

을 이용하여 DNA를 추출 하였다(6). p53 및 3p 유전자에 대한 연구를 위하여 먼저 PCR로 이를 증폭시킨후 microsatellite assay method를 이용하여 p53 gene and 3p gene alteration을 검색 하였다. 이중에서 loss of heterozygosity의 유무를 관찰 하였다. 다음에는 각각의 유전자에 대하여 LOH의 유무에 따라 두군으로 나눈후 여러 임상적 특징 및 예후를 비교 분석하였다.

IV. 연구개발결과

대상이 되었던 비소세포폐암 37.5%(15/40)에서 p53 유전자 변이가 발견되었고, 23.1%(9/39)에서 3p 유전자 변이가 발견 되었다.

p53 및 3p 유전자 변이의 유무에 따라 두군으로 나누어 여러 임상요소들을 비교하여본 결과, 유의한 차이를 보인 요소는 없었다. 즉 작년도의 기본연구과제와 함께 그 결과를 분석하여 보면 p53 유전자 변이는 비소세포폐암에서는 예후 인자가 아님을 알 수 있었다.

그리고 microsatellite assay method를 이용한 PCR-LOH는 아주 간단하면서도 비교적 정확하게 소량의 조직으로부터 특정 유전자 변이 여부를 알 수 있는 방법임을 알 수 있었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

금번 실험 결과는 우리 연구소가 궁극적으로 추구하는 유전자 치료의 기본 자료로 활용될 수 있을 것이다.

S U M M A R Y

I. Project Title

Molecular biologic study about the non-small cell lung carcinoma(II)
(p53 & 3p gene alteration in non-small cell lung carcinoma)

II. Objective and Importance of the Project

Lung cancer has become the second leading cause of death in Korea. Lung cancer consists of a heterogenous group of tumors with distinct biologic and clinical characteristics. While the extent of tumor found at surgery is currently the most important prognostic factor for clinical outcome, there is a growing need to identify other independent prognostic factors that will help clinicians tailor treatment for each patients.

Mutation of the p53 gene is one of the most common genetic abnormalities found in all types of human tumors and has been reported in approximately half of the lung tumor samples studied. In terms of clinical correlation, some

studies have linked p53 gene mutation to aggressive tumor behavior and poor prognosis, but others reported no such association. At present, several basic researches about the gene therapy of malignant diseases have been doing using this p53 gene.

Last year I had studied about the p53 gene alteration of non-small cell lung carcinomas to use the clinical cases of Korea Cancer Center Hospital. In these studies, I had found that 44.2% of the 43 cases had p53 gene mutations by using the PCR-SSCP & direct sequencing method. And I found that the p53 gene altered cases had better prognoses than no mutation group. So we added more clinical cases - 40 non-small cell lung cancer. And we have studied about the p53 and 3p gene alterations by using the microsatellite assay method.

In this research, efforts were initially directed toward identifying the prevalence of p53 and 3p gene mutations in lung cancer patients residing in Korea. Furthermore, we analyzed the relationship between the p53 & 3p gene mutations and the clinicopathologic results of lung cancer. In addition, we studied the PCR-LOH method to replace the other complex methods.

III. Scope and Contents of the Project

We have used the 40 samples obtained from the lung cancer patients who were diagnosed and operated curatively at Korea Cancer Center Hospital. These consisted of 23 cases of squamous cell carcinoma, 15 cases of adenocarcinoma, 1 case of large cell carcinoma, and 1 case of bronchoalveolar

cell carcinoma. High molecular weight DNA was isolated from the tumors and normal lung tissues according to the standard procedures with phenol/chloroform extraction. For the study of p53 gene alteration, we have amplified the DNA with PCR method and used the microsatellite assay method to detect the altered gene. In these studies, we tried to find the loss of heterozygosity.

Furthermore, we analyzed the relationship between the p53 & 3p gene alterations and clinicopathologic results of lung cancer patients.

VI. Results and Proposal for Applications.

We have found the p53 gene alteration in 37.5%(15/40) and the 3p gene alteration in 23.1%(9/39) of the non-small cell carcinoma studied.

There was no clinicopathologic factor to show difference statistically between the normal and mutated group. And we know that p53 gene alteration is not a prognostic factor. But we know that PCR-LOH using microsatellite assay method is a simple, exact method to study of a specific gene alteration using small tissue.

These results will be the basic data of the molecular biologic study for gene therapy.

C O N T E N T S

Chapter 1.	Introduction	1
Chapter 2.	The Internal & External Present Condition of The Development of New Technology	2
Chapter 3.	Scope and Contents of The Project	3
Chapter 4.	Achievement and Contribution of The Project	11
Chapter 5.	Proposal for Application of The Project	18
Chapter 6.	Reference	20

목 차

제 1 장.	서 론	1
제 2 장.	국내외 기술개발 현황	2
제 3 장.	연구개발수행 내용 및 결과	3
제 4 장.	연구개발목표 달성도 및 대외기여도	17
제 5 장.	연구개발결과의 활용계획	18
제 6 장.	참고문헌	20

제 1 장 서 론

폐암은 선진국에서는 발생률 및 사망률에서 제1위를 보이고 있으며, 한국에서도 1989년 보건사회부의 통계를 보면 성인 남자에서 위암 다음으로 발생률 제2위의 악성종양이다. 그리고 선진국의 과거 암발생 추세와 한국 사람들의 흡연률 등을 고려하여 보면 이 질환은 계속 증가할 것이다. 그러나 이에대한 치료방법 즉, 수술, 방사선 치료, 그리고 항암제 치료법은 그 한계에 와 있으며 이들을 대체할 수 있는 새로운 치료방법들이 연구되고 있는 실정이다. 최근 분자생물학적 기법의 발달로 암의 발생에 여러 종류의 암유전자(oncogene) 및 종양억제유전자(tumor suppressor gene)의 돌연변이와의 연관 관계가 알려지면서 폐암에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다. 그러나 한국에서는 폐암의 발생률에 비하여 분자생물학적 연구가 매우 저조한 실정이다. 폐암의 발생 원인은 정확히 규명되지는 않았지만 민족간의 식생활, 흡연습관, 발암물질의 피폭정도 등에 따라 다를 수 있으므로 외국에서 진행되고 있는 분자생물학적 연구의 결과를 한국에서 무조건적으로 수용하는데는 무리가 따른다.

이번 연구의 목적은 인간의 여러 악성종양의 발생에 가장 많이 관여하는 것으로 알려진 p53 및 새로운 종양억제 유전자가 있을 것으로 추정되는 3p 유전자 변이가 한국 폐암 환자에서는 얼마나 많이, 그리고 어떤 양상으로 나타나는지를 알아보는데 있으며, 이를 여러 임상요소와 비교하여 보았다. 그리고 기존의 PCR-SSCP와 Direct Sequencing Method를 대체할 수 있는 좀 더 간편하고 정확한 실험 방법의 모색도 이번 연구 목표중 한가지 이었다. 이번 실험은 원자력 병원 분자종양학 연구실이 궁극적으로 추진하려는 종양의 분자유전학적 치료방법 개발에 기본 자료로 이용될 것이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

많은 폐암조직에서 유전자 이상이 발견되고 있으며, 그중에서도 가장 많은 관심을 끄는 것은 3p21이다. 그러나 아직까지 모든 폐암에 특징적인 유전자 변화는 발견되지 않고 있다. 소세포암에서 광범위하게 연구되어온 p53 유전자의 변위는 비소세포암에서도 발견되고 있다. 역시 retinoblastoma 유전자의 점변위도 폐암에서 광범위하게 발견되고 있는 실정이다. 그리고 그동안 막연히 추측되어온 종양억제유전자인 MTS1유전자가 올해에 그 정체가 밝혀지고 있다. 폐암에서는 많은 종양 유발유전자들이 밝혀지고 있는데 대표적인 것들을 살펴보면 RAS, RAF, FUR, NEU, JUN, MYC, SIS, FES, FMS, FPS, FOS, 그리고 c-ERBB2 등이 있다. 그리고 폐암의 종류별로 다른 특성들이 밝혀지고 있다.

한국에서는 immunohistochemistry 방법에 의한 아주 제한된 연구만이 산발적으로 진행되었고, 폐암 유전자에 대한 분자유전학적 연구는 본 원자력병원에서 행하여진 다음의 3편의 연구가 전부이다.

- 1). 비소세포폐암에서의 K-ras 유전자의 돌연변이.
- 2). 비소세포폐암에서의 망막모세포종유전자의 소실.
- 3). 폐암에서의 p53 유전자의 변이.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 운영내용 및 방법

1. 종양 조직 및 임상 성적.

실험 대상 환자는 원자력병원에서 비소세포폐암의 진단을 받은후 근치적 수술을 받고 지속적인 외래 관찰을 받은 40명을 대상으로 하였다. 각각의 경우에 수술 직후 제거된 폐조직에서 정상부분과 종양조직을 떼어낸후 DNA 추출전까지 -80℃에서 보관 하였다. 폐암의 임상 성적과 연관이 있는 것으로 알려진 모든 요소(나이, 조직학적 분류, 병리학적 분류, 흡연습관 등등)들을 모아 비교 분석하였으며, 모든 분자생물학적 연구는 임상 결과를 모르는 상태에서 시작하였다. 40례의 조직학적 분류를 보면 23례의 squamous cell carcinoma, 15례의 adenocarcinoma, 1례의 large cell carcinoma, 그리고 1례의 bronchoalveolar cell carcinoma가 있었다. (Table 1)

2. DNA 추출

DNA 추출은 phenol/chloroform method를 이용하여 각각의 정상조직과 종양 조직으로 부터 고분자 DNA를 추출하였다. 약 1gm의 종양조직과 정상조직을 액화질소와 약질구를 이용하여 가는 분말로 만들었다. 이들 종양분말과 정상 조직

분말을 각각 19cc의 1X standard sodium citrate plus 0.01M EDTA와 1 cc의 20% sodium dodecyl sulfate 용액으로 용해시킨뒤 4mg의 proteinase K로 37.0℃에서 20분간 흔들면서 소화시켰다. 다음날 PCI-9 20 cc를 단백질이 분해된 용액에 첨가하여 3분 내지 5분간 흔들어 반응 시킨후, 4℃에서 8000rpm으로 원심 분리하고, 상층액을 조심스럽게 피펫으로 모았다. 다시 chloroform을 동량 첨가하고 반응 시킨뒤, 같은 조건하에 원심분리하여 상층액을 얻어냈다. 추출된 용액에 1/10 양의 pH 5.5의 3M sodium acetate를 넣고 두배의 ice-cold 100% 에탄올을 첨가하여 DNA를 침전시킨 다음, 이를 70% 에탄올로 세척한뒤 말렸다. 이를 적당량의 멸균된 증류수 또는 TE 완충액에 녹인 다음, 분광광도계 (spectrophotometer)로 농도를 측정하였다(6).

3. PCR-LOH

본 연구에서는 p53과 3p 유전자의 변이를 알아보기 위하여 보통 시행하는 PCR-SSCP와 Direct Sequencing Method를 대신 할 수 있는 Microsatellite Assay Method를 이용 하였다. Perkin-Elmer Cetus thermal cycler와 Perkin-Elmer Cetus 시약들을 이용하여 PCR을 실시하였으며, 사용한 marker들은 Table 2에 나타내었다. PCR 방법은 먼저 Taq start antibody 0.2n과 Dilution buffer 2n, 그리고 Taq polymerase 0.44n을 이용하여 Taq start mixture를 만든다. Reaction mixture는 10x buffer 381μl, dNTP 10μl, sense primer와 antisense primer 각각 5μl, ³²P dCTP 5μl, Taq start mixture 24μl, Template DNA 2μl에 증류수 381μl을 이용하여 만들었다. 이를 Table 3의 좀 복잡한 PCR program을 이용하여 PCR을 시행 하였다. PCR후 이를 Gel loading buffer와 1 : 1 로 mix한후 95℃에서 5분간 denaturation 시켰다. 이를 6% Urea Sequencing

Gel에 loading 시킨후 전기영동을 실시하였다. 전기영동은 4℃에서 1200 volts로 3-6시간 시켰으며, 젤을 건조기로 20분간 말린후 -70℃에서 16-24 시간동안 X-ray 필름에 노출 시켰다.

4. 통계 처리

유전자 변이와 여러 임상요소, 즉 나이, 병기, 및 흡연습관 사이의 관계는 chi-square test를 이용 하였다. 유전자 변이의 유무에 따라 두군으로 나눈후 양 군 사이의 생존률 분석은 Caplan-Meier method를 이용하여 생존률을 구한후 Log-Lank test를 이용하여 비교 분석하였다.

제 2 절 운영결과 및 고찰

1. 실험결과

가. 임상-병리 성적

(1). p53 유전자 변이

실험대상이 되었던 40명의 병리소견은 Table 1에 요약되어 있다.

p53 유전자 변이가 있었던 환자는 모두15명 이었으며, 나머지 25명에서는 p53 유전자 변이를 발견할 수 없었다. p53 유전자 변이의 유무에 따라 두군으로 나눈후 병리소견, 병의 진행정도, 치료방법, 그리고 흡연력 등을 비교분석하여 통

계적 유의성 유무를 확인하였다. 각각의 요소들을 chi-square test를 통하여 검증하였으나 통계적으로 유의한 차이를 보인 요소는 없었다.(Table 4)

두군의 survival curve를 Kaplan-Meier method를 이용하여 구한후, Log-Rank test를 이용하여 두군의 생존률을 비교하였으나 두군간에 통계적 유의성은 없었다.(Fig. 1)

(2). 3p 유전자 변이

PCR-LOH를 이용하여 확인이 가능 하였던 39명중 3p 유전자 변이를 보인 경우는 9례 이었다. 역시 유전자 변이 유무에 따라 두군으로 나눈후 위의 여러 요인들을 비교 분석 하였으나 통계적 유의성을 보인것은 없었다. (Table 5)

두군의 survival curve를 Kaplan-Meier method를 이용하여 구한후, Log-Rank test를 이용하여 두군의 생존률을 비교하였으나 역시 두군간에 통계적 유의성은 없었다(7-9). (Fig. 2)

나. PCR-LOH

Table 2의 3가지 marker를 이용하여 PCR-LOH를 실시 하였으며, 그 결과를 종합하면 Table 6와 같다. 3p에서는 39례에서 informative 하였으며, 이중 9례에서 LOH 또는 RER을 보였다. p53에서는 각각의 primer에 31.6%, 20.6%에서 mutation을 보였다. 이중 한가지라도 mutation 양상을 보인 경우는 15례로 전체의 37.5% 이었다. PCR-LOH의 양성 반응은 loss of heterozygosity 또는 replication error로 나타난다(10). Fig. 3-5은 각 primer에서 양성 반응을 보인 예들이다.

Pathologic Diagnosis	No.of Cases
Squamous cell carcinoma	23
Adenocarcinoma	15
Large cell carcinoma	1
Bronchoalveolar cell carcinoma	1
Total	40

Table 1. Pathologic classification of the patients.

Marker	Chromosomal location	Sequences of primers (5'-3')
D3S1537	3p24.2-p22	CTA TAA AAT GGC TAT ACC CAG CTA TTT TTG GAC CCA GTA ACC
p53(CA)repeat	17p	ACT GCC ACT CCT TGC CCC ATT C AGG GAT ACT ATT CAG CCC GAG GTG
p53AAAAT	17p	GAA TCC GGG AGG AGG TTG AAC AGC TCC TTT AAT GGC AG

Table 2. Markers used in PCR-LOH

94°C x 4 min
94°C x 30 sec, 63°C x 30 sec, 72°C x 30 sec x 2 cycle
94°C x 30 sec, 61°C x 30 sec, 72°C x 30 sec x 2 cycle
94°C x 30 sec, 59°C x 30 sec, 72°C x 30 sec x 2 cycle
94°C x 30 sec, 57°C x 30 sec, 72°C x 30 sec x 2 cycle
94°C x 30 sec, 55°C x 30 sec, 72°C x 30 sec x 32 cycle
72°C x 7 min
4°C

Table 3. PCR Program used in PCR-LOH

Parameter	Gr.with p53 alteration(n=15)	Gr.without p53 alteration(n=25)
Age	59.6+/-5.6	57.0+/-10.0
Sex (M : F)	13 : 2	20 : 5
Pathology		
Squamous cell ca	7	8
Non-squa cell ca	16	9
Stage		
I	2	3
II	3	4
IIIA	10	12
IIIB or IV	0	6
Tx modality		
Surgery	10	10
Surgery + RT	2	7
Surgery + ChemoTx	3	8
Smoking		
Smoker	13	19
Non-smoker	2	6

Table 4. Clinical profiles of lung cancer patients according to p53 gene alteration.

Parameter	Gr.with 3p alteration(n=9)	Gr.without 3p alteration(n=30)
Age	55.0+/-8.9	58.7+/-8.8
Sex (M : F)	7 : 2	25 : 5
Pathology		
Squamous cell ca	4	14
Non-squa cell ca	5	11
Stage		
I	1	4
II	1	4
IIIA	6	17
IIIB or IV	1	5
Tx modality		
Surgery	7	13
Surgery + RT	2	6
Surgery + ChemoTx	0	11
Smoking		
Smoker	6	25
Non-smoker	3	5

Table 5. Clinical profiles of lung cancer patients according to 3p gene alteration.

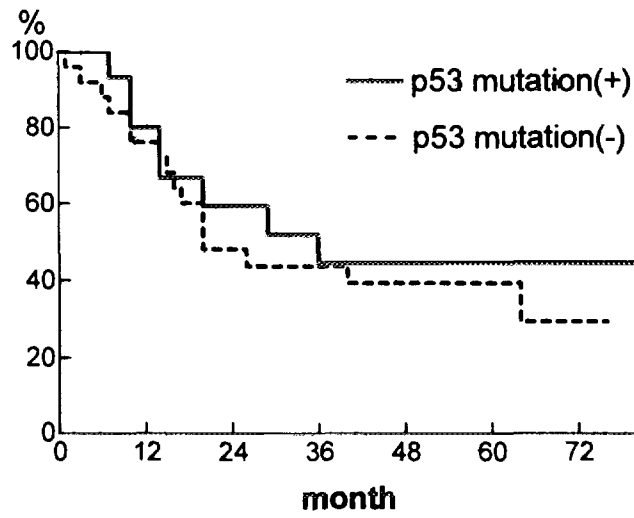


Fig 1. Actuarial survival curve of the group with p53 mutation and without p53 mutation.

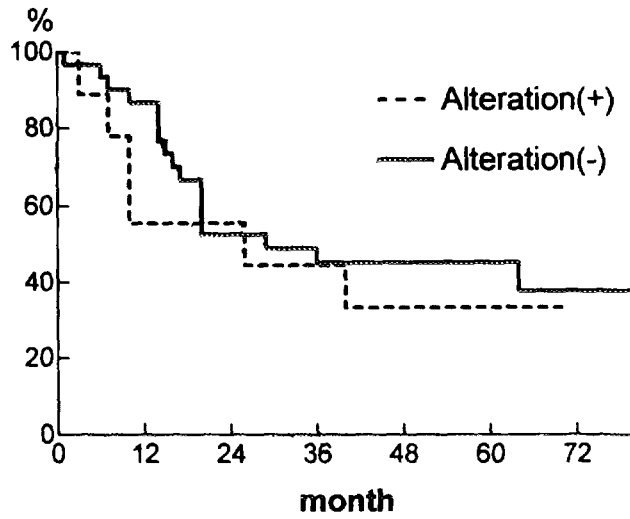


Fig 2. Actuarial survival curve of the group with 3p mutation and without 3p mutation.

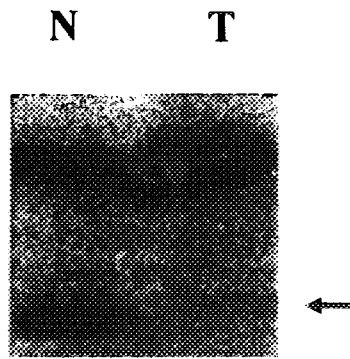


Fig. 3. PCR-LOH analysis with primer D3S1537.

Location : 3p24.2-p22

Arrow indicates LOH

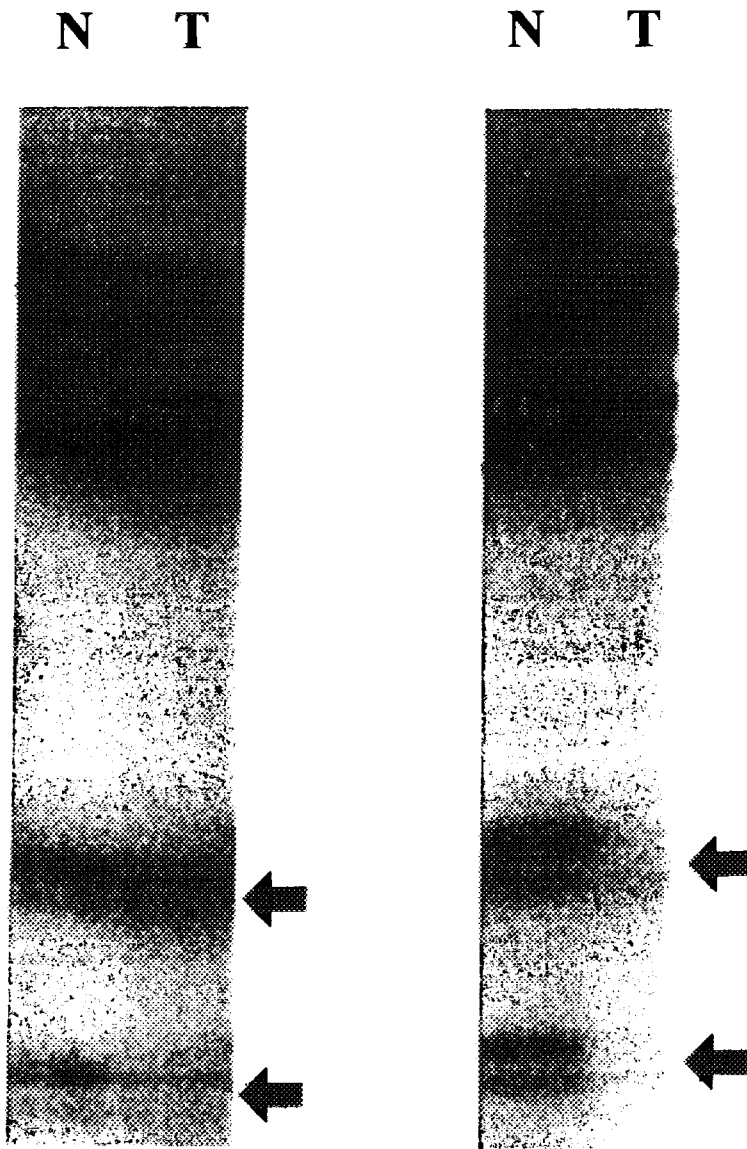


Fig. 4. PCR-LOH analysis with primer p53(CA)repeat
Arrows indicate the loss of heterozygosity.

N T N T N T



Fig. 5. PCR-LOH analysis with primer p53 AAAAT
Arrows indicate the loss of heterozygosity.

제 4 장. 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도

이번 연구의 결과 및 1995년 기본연구과제의 결과를 종합하면 한국 비소세포 폐암에서의 p53 유전자 변이의 발생 빈도는 매우 높다는 것을 알 수 있었으며 그 양상도 외국의 것과는 많은 차이점이 있었다는 것을 알았다. 먼저 외국의 일부에서 제기되고 있는 예후인자로서의 p53 유전자의 역할이 이번 실험 결과에서는 관계가 없음이 증명 되었다. 이는 비소세포폐암의 발생 원인이 나라마다 또는 개인마다 같지 않다는 것을 의미하며 이는 향후 한국에서의 환자 치료계획 설정에 귀한 자료로 활용될 수 있을 것이다.

또한 금년의 결과를 토대로 가장 활발히 연구되고 있는 p53 유전자 이외에도 또다른 종양억제 유전자가 있을 것으로 생각되고 있는 3p 유전자에서도 예상외로 높은 유전자 변이가 발견 되었다. 이는 이부분의 연구도 앞으로 활성화 될 가능성이 높음을 시사하고 있으며 앞으로는 다른 종양억제유전자들과의 상관 관계가 연구되어야 할 것이다.

또한 그동안 많은 시간 및 비용이 들어야만 가능 하였던 조직으로부터의 유전자 변이 연구가 PCR-LOH를 이용하면 아주 쉽게, 그리고 경제적으로 검사가 가능 할 것으로 여겨지며, 이의 임상에서의 활용이 가능 할 것으로 생각된다.

그리고 이상의 결과를 기본으로 비소세포폐암에서 가장 흔하게 발생하는 유전자 변이는 p53 유전자임을 알 수 있었으며, 이를 주 목표로 본 병원이 궁극적으로 추진하고자 하는 유전자 치료의 주 target을 정하는데 큰 도움이 되리라 생각 된다.

지난 이년간 실험의 가장 의미있는 내용은 그동안 외국의 실험 결과만을 인용 하던 것을 이제는 우리 자신의 결과를 가지고 실험 및 임상에 활용할 수 있게 되었다는 것이다.

제 5 장. 연구개발 결과의 활용 계획

폐암은 한국인에게 호발하는 암으로 현재까지 효과적인 치료방법이 없어 초기에 발견되어 수술하는 경우를 제외하고는 완치가 불가능한 현실이다. 그러므로 새로운 치료방법의 개발이 요구되고 있다. 최근들어 분자생물학적 기법의 발전에 따라 암의 발생 기전이 밝혀지고 세포에 대한 유전자 조작 기술이 발전하며 유전자 치료가 암의 새로운 치료법으로 각광을 받고 있다. p53 유전자는 종양억제 유전자중 가장 대표적인 유전자로 세포의 무절제한 증식을 억제하고 여러 원인으로 유전자의 손상을 받은 세포가 자체 회복이 안될 경우 세포가 apoptosis에 빠져 죽게되는 cell guardian의 역할을 한다. p53의 변이는 인체암에서 일반적으로 가장 흔히 발견되는 유전자의 이상으로 알려져 있다. 본 연구자는 95-96년 기본연구과제에서 한국 폐암 환자에서의 p53 유전자 변이율 및 발생 양상을 밝힌 바 있으며, 이를 기저로 폐암에 대한 유전자 치료를 계획하고 있다.

p53 유전자 변이는 종양 형성의 비밀을 알려주는 동시에 치료의 목표가 될 수 있다. 즉 p53 유전자 변이 암세포는 p53 기능이 소실되어 암세포로 변하였으며 유전자 치료를 이용하여 p53 유전자를 보충시 암세포가 더 이상 증식하지 못하고 apoptosis에 빠져 죽게 된다. 또 다른 치료법으로는 변이 p53 단백질이 종양 세포에 특이한 단백질이므로 이를 종양특이항원으로 이용하는 면역요법이 있다. 본 연구자는 전자의 종양억제유전자의 유전자 치료를 통한 보충요법을 폐암에서 시도하려고 한다. 현재 이런 연구는 국내에서는 시행되지 않고 있으며 외국에서는 MD Anderson Cancer Center를 중심으로 연구가 활발히 진행되고 있다.

암의 유전자 치료는 차세대의 암치료법으로 각광을 받고 있으며 경제적인 측면에서도 엄청나게 큰 잠재적인 수요가 있다. 현재 미국 등의 선진국에서는 막대한 연구비를 들이고 있어 국내의 연구가 없을 경우 향후 외국의 기술에 종속

되리라 생각된다. 따라서 본 연구결과는 국내의 유전자 치료법 개발에 중요한
발판이 되리라 기대된다.

제 6 장 . 참고문헌

1. Hung J, Kishimoto Y, Sugio K, et al. Allele-Specific Chromosome 3p Deletions occur at an early stage in the pathogenesis of lung carcinoma. JAMA. 1995;273(7):558-63.
2. Sundaresan V, Ganly P, Hasleton P, et al. p53 and chromosome 3 abnormalities, characteristic of malignant lung tumors, are detectable in preinvasive lesions of the bronchus. Oncogene 1992;7:1989-97.
3. El-Naggar AK, Hurr K, Batsakis JG, et al. Sequential loss of heterozygosity at microsatellite motifs in preinvasive and invasive head and neck squamous carcinoma. Cancer Res. 1995;55:2656-9.
4. Litt M, Hauge X, Sharma V. Shadow bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats: Some causes and cures. Biotechniques 1993;15(2):280-4.
5. Shridhar V, Siegfried J, Hunt J, et al. Genetic instability of microsatellite sequences in many non-small cell lung carcinomas. Cancer Research 1994;54:2084-7.
6. Hibi K, Takahashi T, Yamakawa K, et al. Three distinct regions involved in 3p deletions in human lung cancer. Oncogene 1992;7:445-9.

7. Susan EG, Stanley RH, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985;130(1):118-26.
8. Ogasawara S, Maesawa C, Tamura G, Satodate R. Frequent alterations on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 1995;55:891-94.
9. Horio Y, Takahashi T, Kurioshi T, et al. Prognostic significance of p53 mutations and 3p deletions in primary resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 1993;53:1-4.
10. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science.* 1993;260:812-6.

BIBLIOGRAPHIC INFORMATION SHEET

Performing Org. Report No.	Sponsoring Org. Report No.	Standard Report No.	INIS Subject Code
KAERI/RR-1645/96			
Title/Subtitle	Molecular biologic study about the Non-small cell lung carcinoma (II) (p53 gene alteration in non-small cell lung carcinoma II)		
Project Manager and Dept.	Jong Ho Park, M.D. (Dept. of Thoracic Surgery)		
Researcher and Dept	Jae Ill Zo, M.D. (Dept. of Thoracic Surgery) Hee Jong Baik, M.D. (Dept. of Thoracic Surgery) Mi Hee Kim (Dept. of Molecular Oncology)		
Pub. Place	Seoul	Pub. Org.	KCCH, KAERI
			Pub. Date
			Dec. 1996
Page	30	Fig. Table	Yes(o), No()
			Size
			26cm
Note			
Classified	Open(o), Outside(), Class		Report Type
			Research Report
Sponsoring Org.	MOST		Contract No.
			No
Abstract (About 300 Words)			
<p>The main purpose of this research was to identify of the p53 and 3p gene alteration in non-small cell lung cancer patients residing in Korea. Futhermore, we analyzed the relationship between the p53 & 3p gene alterations and the clinicopathologic results of lung cancer patients. And we have investigated the role of PCR-LOH in analyzing tumor samples for LOH of defined chromosomal loci. We have used the 40 samples obtained from the lung cancer patients who were diagnosed and operated curatively at Korea Cancer Center Hospital. We have isolated the high molecular weight DNA from the tumors and normal tissues. And we have amplified the DNA with PCR method and used the microsatellite assay method to detect the altered p53 and 3p gene.</p> <p>The conclusions were as follow :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. The 3p gene alteration was observed in 9/39(23.1%) and p53 gene alteration was observed in 15/40(37.5%) of resected non-small cell lung cancer. 2. There was no correlations between the 3p or p53 gene alterations and prognosis of patients, but further study is necessary. 3. PCR-LOH is a very useful tool for analyzing small amount of tumor samples for loss of heterozygosity of defined chromosomal loci. 			
Subject Keywords (About 10 Words)			
p53 and 3p gene alteration, non-small cell lung cancer			

서 지 정 보 양 식

수행기관 보고서번호	위탁기관 보고서 번호	표준보고서 번호	INIS 주제코드
KAERI/RR- 1645/96			
제목 / 부제	비소세포폐암에 대한 분자유전학적 연구 (II) (비소세포폐암 환자에 있어서 p53 유전자 변이 연구 (II))		
연구책임자 및 부서명	박 중 호 (흉 부 외 과)		
연구자 및 부서명	조 재 일 (흉 부 외 과) 백 회 중 (흉 부 외 과) 김 미 회 (분 자 종 양 학 연구 실)		
발행지	서 울	발행기관	한국원자력연구소 부설 원자력병원
페이지	30 p	도 표	유(o), 무()
참고사항		발행일	1996. 12
비밀여부	공개(0), 대외비(), ___급 비밀	보고서 종류	연구 보고서
연구위탁기관	과 학 기 술 처	계약 번호	없 음
초록(300단어 내외)	<p>이번 연구의 목적은 한국 비소세포폐암 환자에 있어서 p53 및 3p 유전자 변이의 발생 빈도를 알아 보는데 있었다. 더불어 p53 및 3p 유전자 변이의 유무에 따라두군으로 나눈후 각군의 임상 병리학적 요소들을 비교하여 분석 하였다. 그리고 조직의 특정 염색체 변이의 유무를 살펴 보는데 있어서 PCR-LOH의 역할을 점검하여 보았다. 대상 환자는 원자력병원에서 비소세포폐암의 진단을 받고 근치적 절제술을 받은 40명의 환자를 이용 하였다. 종양 및 정상조직으로부터 DNA를 추출 하여으며, 이를 PCR로 증폭 시켰다. 이렇게 증폭된 DNA는 microsaterllite assay method를 이용하여 p53 및 3p 유전자 변이의 유무를 검색 하였다. 실험 결과는 다음과 같았다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 3p 유전자 변이는 비소세포폐암 환자 39명중 9명(23.1%)에서, p53 유전자 변이는 40명중 15명(37.5%)에서 발견 되었다. 2. 환자의 예후와 3p 또는 p53 유전자 변이와는 무관 하였다. 3. PCR-LOH 방법은 소량의 조직으로부터 특정 유전자 변이 여부를 판별하는데 아주 간편하면서도 유용한 방법임을 알았다. 		
주제명 키워드 (10단어 내외)	p53 및 3p 유전자 변이, 비소세포 폐암		

주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 기관고유사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

비소세포 폐암에 대한 분자유전학적 연구 (II)

1996年 12月 26日 印刷

1996年 12月 30日 發行

發行人 김 성 년

發行處 韓國 原子力 研究所

大田廣域市 儒城區 德津洞 150

印刷所 東 和 社

믿는마음 지킨약속 다져가는 신뢰사회