



KR9800517

KAERI/RR-1770/97

악성 식도종양에 대한 분자유전학적 연구

Immunohistochemical Study of p53, pRb and p16 in
Esophageal Cancer

연구기관
원자력병원

한국원자력연구소

29 - 41

제 출 문

한국원자력연구소장 귀하

본 보고서를 "악성 식도 종양의 분자 유전학적 연구" 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

1998 년 1 월 20 일

연구실명 : 분자 종양학 연구실

연구 책임자 : 조 재 일

연구원 : 조 경 자

: 박 종 호

김 미 희

감수의원 : 진 수 일

홍 석 일

요 약 문

I. 제 목

악성 식도 종양의 분자 유전학적 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

악성 식도 종양은 세계적으로 지역적 발생 빈도의 차이를 심하게 보이고 있으며, 우리나라도 호발 지역의 하나로 국내 성인 남자에서 다섯번째로 흔한 종양이며, 최근 증가 추세이다. 적극적인 치료를 하여도 임상적으로 아직 타 종양에 비하여 예후가 극히 불량한 종양으로 알려져 있다. 최근 분자 유전학의 발달로 타 종양의 유전자 변화 및 암 발생 기전들이 밝혀지고, 이에 따라 유전자 치료의 시도 및 가능성 등의 연구가 진행되고 있는 반면, 식도 종양에 대하여는 국내는 물론 세계적으로도 아직 기초적 연구 단계에 머물고 있는 실정이다. 이에 본 연구자들은 국내에서 가장 많은 식도암 환자를 치료하는 본 병원에서 우리나라 식도암 발생의 기전 과 분자 유전학적 변화를 밝혀, 식도 종양의 진단과 예방, 궁극적으로 유전자 치료의 적용에 도움이 되리라 생각 한다.

본 병원에서 식도암 조직을 적출하여 분자 유전학적으로 분석한 결과 p53 유전자는 77%에서 유전자의 이상이 발견되었고, (1995) Retinoblastoma 유전자는 62.5%에서 유전자의 이상이 발견 되었으나(1994) MTS1 유전자는 5.7%

에서만 유전자의 이상이 발견 되었다(1996). 유전자 수준에서 발견된 종양 특이한 변화가 단백질 수준에서도 발견되는 지의 확인이 필요하며, 연구한 종양 특이 유전자, 특히 암 억제 유전자로 알려져 있는 p53 gene, Retinoblastoma gene, MTS1 gene에서 발현되는 단백질인 p53, pRB, p16 의 발현 여부를 확인 할 필요성이 있다. 아울러 병리학적 발암 단계별로 위의 종양 억제 유전자의 발현 여부를 확인하여 식도암의 발암 기전에 종양 억제 유전자의 미치는 역할을 추정하고, 발암 기전을 예측 해 볼 수 있을 것으로 생각 된다. 그리고 각 종양 억제 유전자들의 상호 관계도 예측 해 볼 수 있을 것으로 생각 된다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

(1) 종양 수집 및 Mapping: 식도암 환자에서 적출된 식도를 iodine staining 을 한 후 Formalin 고정을 하여 Mapping 을 한 다음, 정상 조직, Dysplasia (carcinoma in situ), invasive cancer 등을 부위별로 현미경 소견을 확인하여, Dysplasia 가 invasive cancer 와 분리 되어 나타난 specimen 을 수집 하였다. 총 15 명의 환자에서 조직을 수집하였다.

(2) Immunohistochemistry:

1. Tissue: 수집한 조직을 H&E staining 하여 각 단계별 병변이 잘 나타나는 전형적인 paraffin block 을 선정하였다. Immunohisto-chemistry를 위하여 5um 두께로 박절하여 3-amino-silane coating 된 슬라이드로 옮겨서 처리 하였다.

2. Antibodies: 사용한 antibody는 p53 는 anti-human p53 protein mouse monoclonal Ab(DAKO, M7001 IgG2b kappa) 을 1:100 희석하여 사용하였으며, pRb는 mouse monoclonal Ab(CALBIOCHEM, OP66, IgG1 kappa)를 3ug/ml로 희석하여

사용하였고, p16은 mouse monoclonal Ab(PHARMINGEN, 13251A, IgG1) 을 5ug/ml로 희석하여 사용하였다.

3. Immunohistochemistry: 박절한 slide를 deparaffinize 하고, citrate buffer에서 microwave oven으로 15분간 전처리를 한 후 3% hydrogen peroxide로 endogenous peroxidase 를 blocking 한 다음 primary Ab로 4 C에서 overnight 처리를 하였다. 분석은 diaminobenzidine(DAB)을 이용한 streptavidin-biotin-peroxidase 방법으로 하였다. (DAKO, S3000)

4. 판독: p16 과 pRb 는 cytoplasmic staining에 상관 없이 정상 조직의 nuclear staining 이 되었으면 immunolabelled 된 것으로 간주 하였으며(positive internal control) dysplasia 와 cancer 에서 nuclear staining이 된 세포의 분포가 10% 이하면 음성, 10-50% 이면 +, 50-90% 이면 ++, 90% 이상이면 +++ 로 판정하였다. Cytoplasmic staining 은 고려하지 않았다. p53 의 판독은 nuclear staining 이 된 세포의 분포가 10% 를 넘으면 양성으로 간주 하였다.

IV. 연구개발 결과

각 단계별로 immunohistochemistry를 시행한 결과, p53는 dysplasia 와 cancer에서 각각 60%, 47%에서 양성으로 나왔으며, pRb는 dysplasia 와 cancer에서 각각 91%, 72.7%에서 음성으로 나왔다. 그러나 p16은 dysplasia 와 cancer에서 각각 0%, 7% 만이 음성으로 판독 되었으며, 오히려 dysplasia 와 cancer에서 양성도 증가의 소견을 보인 예가 78.6%, 28.6% 나 되었다. 또한 pRb 와 p16이 동시에 음성인 경우는 없었으며, 동시에 양성인 예는 3예에서 관찰 되었다. p53 의 변이와 pRb, p16 과의 상관 관계는 발견할 수 없었다. 이상에서 한국의 식도암에서의 p53 와 pRb의 비활성화는 흔히 볼 수 있는 변화이며, 발암 단계 중에서 dysplasia 단계에서부터 관여하는 초기 발암 단계의 변화라고 생각 되며, p16의 이상은 드문 변화로서 오히려

dysplasia 단계에서는 정상 조직 보다 증폭 되어 나타나는 현상으로 보아, 증폭된 p16단백질이 정상이 아닐 가능성은 있지만, 지난해 결과에서 MTS1 유전자의 변이가 2/35(5.7%)라고 보고 하면서 hypermethylation에 의한 p16의 비활성화의 가능성을 제시 하였었는데, 오히려 p16 유전자 변이가 식도암에서는 발암 과정에 기여 할 가능성이 낮다고 생각 된다. Dysplasia 단계에서 invasive cancer로 이행하는 단계에 또 다른 유전자 변이가 있을 것으로 생각 된다. 발암 과정의 각 단계 별에 대한 분자 유전학적 연구가 더 필요할 것으로 생각 된다.

V. 연구개발결과의 활용계획

최근 여러 종양에서 높은 빈도로 발견되고 있는 p53, pRb, p16의 변이를 paraffin 조직에서 screening 하는 방법으로서의 immuno-histochemistry는 좋은 방법으로 생각 되며, 특히 p16 같이 hypermethylation 같은 기전으로 비활성화 될 가능성이 있는 유전자의 검색에 좋은 방법이라 생각 된다. 최근 식도에서의 severe dysplasia는 수술적 절제의 적응증이 되는 것을 고려하면, dysplasia 단계로의 이행 과정 및 dysplasia에서 invasive cancer로의 이행 과정에 대한 연구가 좀 더 필요할 것으로 생각 되며, dysplasia 중에서도 분자 유전학적으로 분류가 필요할 수 있으며, 변화의 복구에도 관심을 기울여 볼 만 하다.

Summary

I. Project Title

Molecular Genetic Study of Human Esophageal Cancer
- Immunohistochemical Study of p53, p16 and
Retinoblastoma protein in Esophageal Cancer

II. Objective and Importance of the Project

Objectives of this study was;

1. To confirm the expression of molecular genetic alterations of p53, pRb, p16 in esophageal cancer
2. To investigate the expression of p53, p16, pRb in esophageal cancer according to the pathologic steps of carcinogenesis

III. Scope and Contents of the Project

Materials; 15 resected esophageal cancer specimens
with multiple seperated lesions after
pathologic mapping

Methods; 1. Immunohistochemistry
; streptavidin-biotin-peroxidase method

2. Target gene

1.p53

2.pRb

3.p16

IV. Results and Proposal for Applications

The accumulation of mutant p53 was observed in 60% in dysplasia and 47% in invasive esophageal cancer by immunohistochemistry, while the Retinoblastoma protein was not detected in 91% of dysplasia and 72.7% of invasive esophageal cancer. But p16 was not observed in 0% in dysplasia and 7% of invasive cancer. Instead over-expression was found in 78.6% in dysplasia and 28.6% in invasive cancer. There was no simultaneous negative pRb and p16 expression. There were no relations between p53 and p16, pRb. As a results, inactivation of p53 and pRb was common and early event in esophageal carcinogenesis in Korea, but inactivation of p16 was a rare change. Over-expression of p16 in dysplasia can be explained with negative feedback hypothesis with pRb. Immunohistochemistry can be a useful methods for screening p53, pRb, p16 in paraffin embedded tissue especially for examination of p16 which can be inactivated by hyper-methylation, not by intragenic mutations. Further investigation of the dysplasia is also needed which is an candidate for surgical resection in esophagus as a precancerous lesion in these days.

Contents

1. Introduction
2. Current Status
3. Contents and Results
4. Accomplishment and Contribution
5. Proposal of application
6. Reference

목 차

제 1 장 서 론	10
제 2 장 국내외 기술개발 현황	13
제 3 장 연구 개발수행 내용 및 결과	15
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	24
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	25
제 6 장 참고문헌	26

1 장 서 론

식도암은 세계적으로 암 사망의 중요한 원인 중의 하나로 알려지고 있으며, 국내에서도 성인 남자의 5번째 흔한 악성 종양이며, 우리나라는 세계적인 식도암 발생 다발 지역 중의 하나이다. 식도암은 조기 발견이 힘들어 대부분의 환자가 3기에 치료를 시작하게 되며 이 경우 수술, 방사선 치료 및 항암 요법을 시행하여도 쉽게 치료되지 않고, 평균 생존 기간이 2년 미만인 예후가 나쁜 질환이다(1). 식도암은 조직학적으로 편평상피암과 선암으로 크게 나누어 지며, 편평상피암은 역학 조사상 음주, 흡연과 깊은 관계가 있으며, 선암은 Barrett 식도와 관계가 있는 것으로 되어 있다 (2). Barrett 식도는 계속적인 위식도 역류로 정상적인 식도의 편평상피세포에 이형성 원주상피가 존재하는 것으로 식도 선암의 발생 빈도가 높으므로 심한 이형성이 있는 경우 절제하여 주는 것이 원칙으로 되어 있으며, 미국이나 유럽 등에서는 흔한 질환이나 국내에서는 Barrett 식도가 흔하지 않아 대부분의 식도암은 편평상피암이 호발 한다. 식도암 발생의 원인으로는 여러 가지 환경적 요인과 문화의 차이에 의한 식이 방법과 음식 종류의 차이 등이 제시되고 있으나, 최근 분자 유전학적 연구가 활발히 진행되어 식도암에서도 여러 종류의 유전자 변이가 보고되고 있다. Epidermal growth factor 수용체 유전자와 c-myc 유전자의 증폭(3), hst-1과 int-2 유전자의 동시 증폭 (4), 등의 암유전자 변이와, 17p 염색체의 부분소실 (5), p53 종양억제 유전자 내의 점돌연변이 (6), RB 유전자의 부분소실 (7), APC/MCC 유전자 부위의 상동염색체 소실(8) 및 MTS1/CDKN2 유전자 변이(9,10) 등이다.

본 병원에서 식도암 조직을 적출하여 분자 유전학적으로 분석한 결과 p53 유전자는 77%에서 유전자의 이상이 발견되었고, (1995) Retinoblastoma 유전자는 62.5%에서 유전자의 이상이 발견 되었으나(1994) MTS1 유전자는 5.7%에서만 유전자의 이상이 발견 되었다(1996).

식도암은 병리학적으로 Normal, Dysplasia, carcinoma in situ, invasive cancer의 다단계의 변화를 거쳐서 암으로 진행되는 발암 과정을 나타내며, 한 환자의 적출된 식도암 조직에서 병변이 다발성인 경우가 많고, 병리학적 발암 단계의 여러 단계를 한 표본에서 동시에 관찰할 수 있는 경우가 많다. 이는 발암 물질에 동시에 노출될 가능성이 높기 때문이다.

유전자 수준에서 발견된 종양 특이한 변화가 단백질 수준에서도 발견되는 지의 확인이 필요하며, 연구한 종양 특이 유전자, 특히 암 억제 유전자로 알려져 있는 p53 gene, Retinoblastoma gene, MTS1 gene에서 발현되는 단백질인 p53, pRB, p16 의 발현 여부를 확인 할 필요성이 있다. 아울러 병리학적 발암 단계별로 위의 종양 억제 유전자의 발현 여부를 확인하여 식도암의 발암 기전에 종양 억제 유전자의 미치는 역할을 추정하고, 발암 기전을 예측 해볼 수 있을 것으로 생각 된다. 그리고 각 종양 억제 유전자들의 상호 관계도 예측 해 볼 수 있을 것으로 생각 된다.

이에 본 연구는 적출된 식도암 조직을 Mapping을 하여 다단계의 병변을 보이는 식도암 조직을 선택한 후, 종양 억제 유전자로 알려져 있는 p53 gene, Retinoblastoma gene, MTS1 gene 등의 단백질인 p53, pRb, p16 등을 적출된 식도암 조직에서, 정상 조직, dysplasia (carcinoma in situ) invasive cancer 의 각 부위별로 immunohistochemistry 를 시행하여 암 발생의 각 단계별로 종양 특이 단백질의 변화 추이를 관찰하여 분자 유전학적 변화와의 상관관계를 확인하고, 발암 과정에 따른 변화를 추정한다. 또한

1996년도의 연구 결과 식도암에서의 MTS1 유전자의 변이가 드문 현상이라는 결론이 p16 단백질의 발현에서도 동일한지의 여부도 판정이 가능하리라 본다. 아울러 Rb 단백질의 발현이 없었던 예에서 p16 단백질의 발현의 변화는 어느 정도 더 흔하며, 상호 보완적인 단백질 발현의 변화를 보이는지 관찰하였다.

2 장 국내외 기술개발 현황

최근 분자 유전학적 연구의 발전에 따라 식도암에서도 많은 연구가 발표되고 있다. Epidermal growth factor 수용체 유전자와 c-myc 유전자의 증폭(3), hst-1과 int-2 유전자의 동시 증폭 (4), 등의 암유전자 변이와, 17p 염색체의 부분소실 (5), p53 종양억제 유전자 내의 점돌연변이 (6), RB 유전자의 부분소실 (7), APC/MCC 유전자 부위의 상동염색체 소실(8) 및 MTS1/CDKN2 유전자 변이(9,10) 등이다.

이 중 p53 유전자의 변이는 거의 모든 암에서 발암기전에 관여 하는 것으로 잘 알려진 종양 억제 유전자이다. 식도암에서도 p53 유전자의 변이는 발암 기전에 관여하는 중요한 종양 억제 유전자로 알려져 있으나, p53 유전자의 변이와 돌연변이 p53 단백질의 발현은 꼭 일치하지는 않는다는(11) 보고도 있으며, mutant p53 단백질의 발현은 전암 단계에서 이미 발견될 수 있는 변화라는 보고도 있다.(12) MTS1/CDKN2 유전자 변이에 대하여는 p16 단백질이 세포분열의 결정적인 조절 인자로서 알려지면서(13) 많은 흔한 암들에서 연구가 되고 있는 유전자이다. 식도암의 발암 과정에 여러 유전자의 변이가 관여하고 있고 그 들이 각각 밝혀지고 있다. 그리고 MTS1/CDKN2 유전자의 변이가 Rb단백질의 비활성화와 상호 보완적으로 나타난다는 보고도 있다. 즉 glioblastoma 에서 MTS1/CDKN2 유전자의 변이가 발견되지 않은 예에서는 Rb유전자의 변이가 흔히 나타난다(14) 는 것이다. 즉 MTS1/CDKN2 유전자가 만드는 p16 단백질이 Rb단백질과 결합함으로써 세포 주기를 조절할 수 있으므로 두 단백질 중 하나에만 이상이 발생하여도 세포 주기의 조절 능력을 상실하게 되는 것이다. 그리고 p16 과 pRb 의 단백질이 negative feedback model로 작용한다는 가설도 있다.(15) 그리고 mutant p53 의 발현과 p16/pRb 단백질의 발현

결핍은 암 환자의 예후에 대하여 상호 상승 작용을 하여 나쁘다는 보고도 있다.(16,17)

국내에서는 식도암에 대한 분자 유전학적 연구가 거의 없는 상태로서 본 병원에서 1994년 Rb유전자의 변이에 대하여 연구한 것과 1995년 p53 유전자에 대하여 연구한 것, 그리고 1996년 MTS1 유전자 변이에 대한 연구 등이 고작이다. 이는 국내 식도암 환자의 상당 부분을 본 병원에서 수술하며 그 임상 자료의 축적도 본 원이 가장 잘 되어 있다. 또한 식도암 세포의 배양도 국내에서는 아직 시행하고 있는 기관이 없는 실정이다.

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절 수행 내용 및 방법

1. 종양 수집 및 Mapping

식도암 환자에서 적출된 식도 조직을 iodine staining 을 한 후 Formalin 고정을 하여 Mapping 을 한 다음, 정상 조직, Dysplasia (carcinoma in situ) invasive cancer 등을 부위별로 현미경 소견을 확인하여, Dysplasia 가 invasive cancer 와 분리 되어 나타난 specimen 을 수집하였다. 총 15 명의 환자에서 조직을 수집하였다. 병리학적으로 15예 전부 편평상피암이었다.

2. Immunohistochemistry

가. Tissue

수집한 조직을 H&E staining 하여 각 단계별 병변이 잘 나타나는 전형적인 paraffin block 을 선정하였다. Immunohistochemistry를 위하여 5um 두께로 박절하여 3-amino-silane coating 된 슬라이드로 옮겨서 처리 하였다.

나. Antibodies

사용한 antibody는 p53 는 anti-human p53 protein mouse monoclonal Ab(DAKO, M7001 IgG2b kappa) 을 1:100 희석하여 사용하였으며, pRb는 mouse monoclonal Ab(CALBIOCHEM, OP66, IgG1 kappa)를 3ug/ml로 희석하여 사용하였고, p16은 mouse monoclonal Ab(PHARMINGEN, 13251A, IgG1) 을 5ug/ml로 희석하여 사용하였다.

다. Immunohistochemistry

박절한 slide를 deparaffinize 하고, citrate buffer에서 microwave oven으로 15분간 전처리를 한 후 3% hydrogen peroxide로 endogenous peroxidase 를 blocking 한 다음 primary Ab로 4 C에서 overnight 처리를 하였다. 분석은 diaminobenzidine(DAB)을 이용한 streptavidin-biotin-peroxidase 방법으로 하였다. (DAKO,S3000)

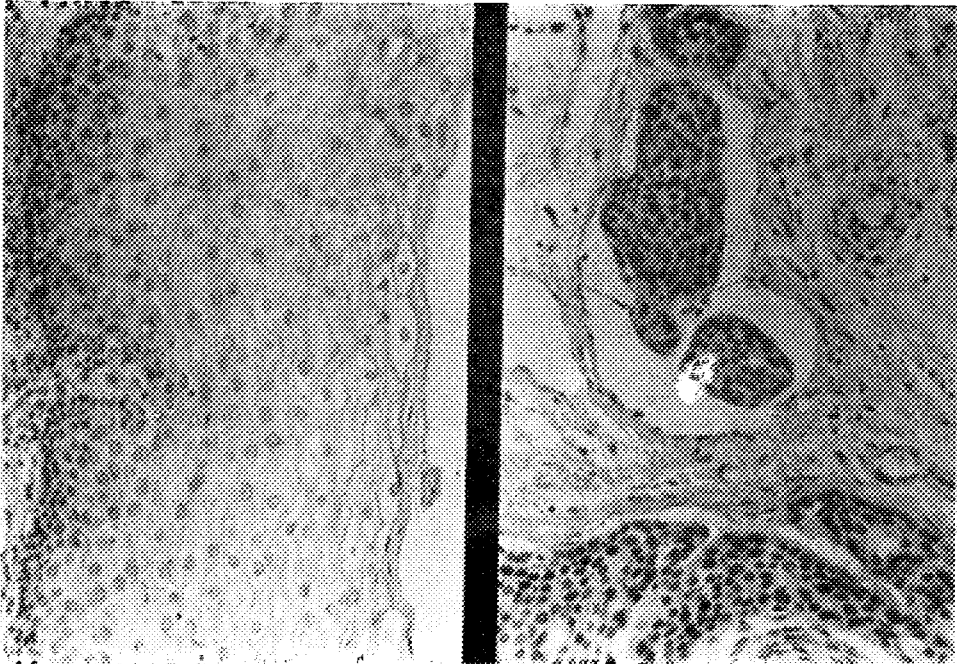
라. 판독

p16 과 pRb 는 cytoplasmic staining에 상관 없이 정상 조직의 nuclear staining 이 되었으면 immunolabelled 된 것으로 간주 하였으며(positive internal control) dysplasia 와 cancer 에서 nuclear staining이 된 세포의 분포가 10% 이하면 음성, 10-50% 이면 +, 50-90% 이면 ++, 90% 이상이면 +++ 로 판정하였다. Cytoplasmic staining 은 고려하지 않았다. p53 의 판독은 nuclear staining 이 된 세포의 분포가 10% 를 넘으면 양성으로 간주 하였다.

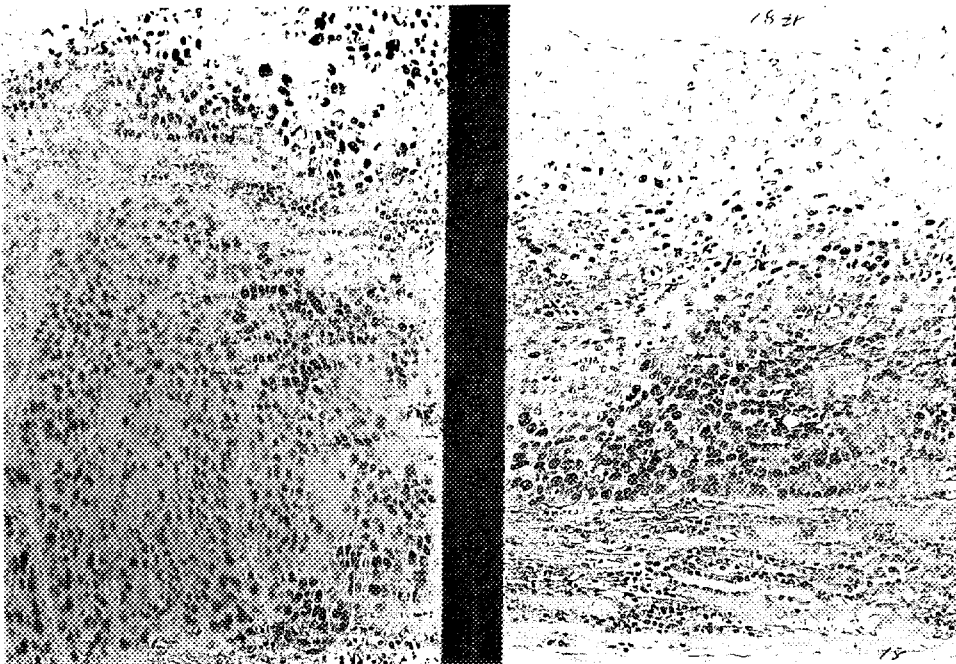
제 2 절 수행 결과

각 단계별로 immunohistochemistry를 시행한 결과, p53는 dysplasia 와 cancer에서 각각 60%, 47%에서 양성으로 나왔으며,(Fig.1,2) pRb는 dysplasia 와 cancer에서 각각 91%, 72.7%에서 음성으로 나왔다.(Fig.3,4,5) 그러나 p16은 dysplasia 와 cancer에서 각각 0%, 7% 만이 음성으로 판독 되었으며,(Table1) 오히려 dysplasia 와 cancer에서 양성도 증가의 소견을 보인 예가 78.6%, 28.6% 나 되었다.(Fig.6,7)(Table2) 또한 pRb 와 p16이 동시에 음성인 경우는 없었으며, 동시에 양성인 예는 3예에서 관찰 되었다. p53 의 변이와 pRb, p16 과의 상관 관계는 발견할 수 없었다. 이상에서 한국의 식도암에서의 p53 와 pRb의 비활성화는 흔히 볼 수 있는 변화이며, 발암 단계 중에서

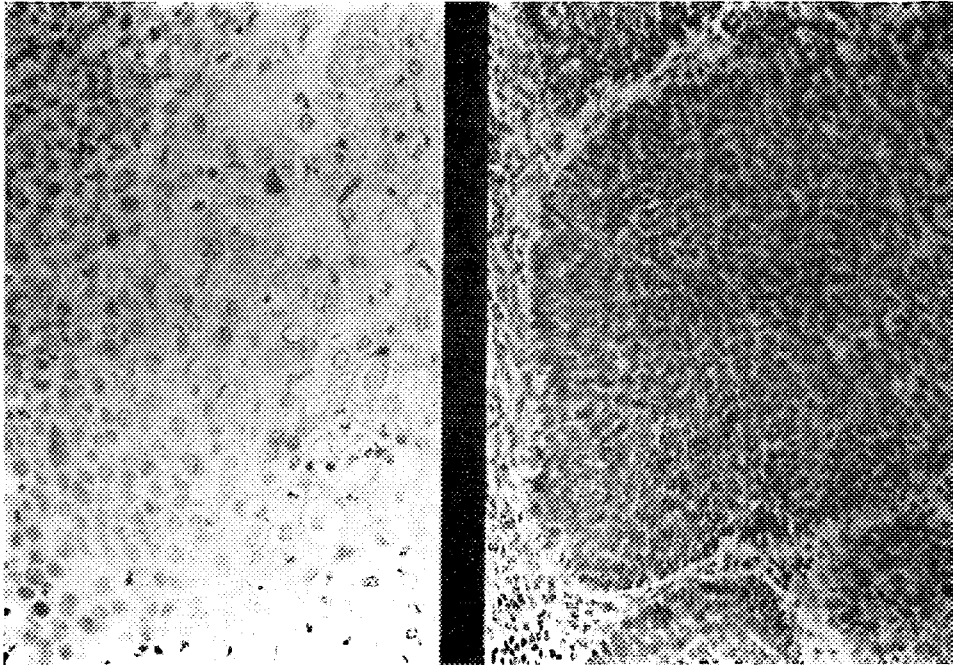
dysplasia 단계에서부터 관여하는 초기 발암 단계의 변화라고 생각되며, p16의 이상은 드문 변화로서 오히려 dysplasia 단계에서는 정상 조직 보다 증폭 되어 나타나는 현상으로 보아, (Fig.8) 증폭된 p16단백질이 정상이 아닐 가능성은 있지만, 지난해 결과에서 MTS1 유전자의 변이가 2/35(5.7%) 라고 보고 하면서 hypermethylation에 의한 p16의 비활성화의 가능성을 제시 하였었는데, 오히려 p16 유전자 변이가 식도암에서는 발암 과정에 기여 할 가능성이 낮다고 생각 된다. Dysplasia 단계에서 invasive cancer로 이행하는 단계에 또 다른 유전자 변이가 있을 것으로 생각 된다. 발암 과정의 각 단계 별에 대한 분자 유전학적 연구가 더 필요할 것으로 생각 된다.



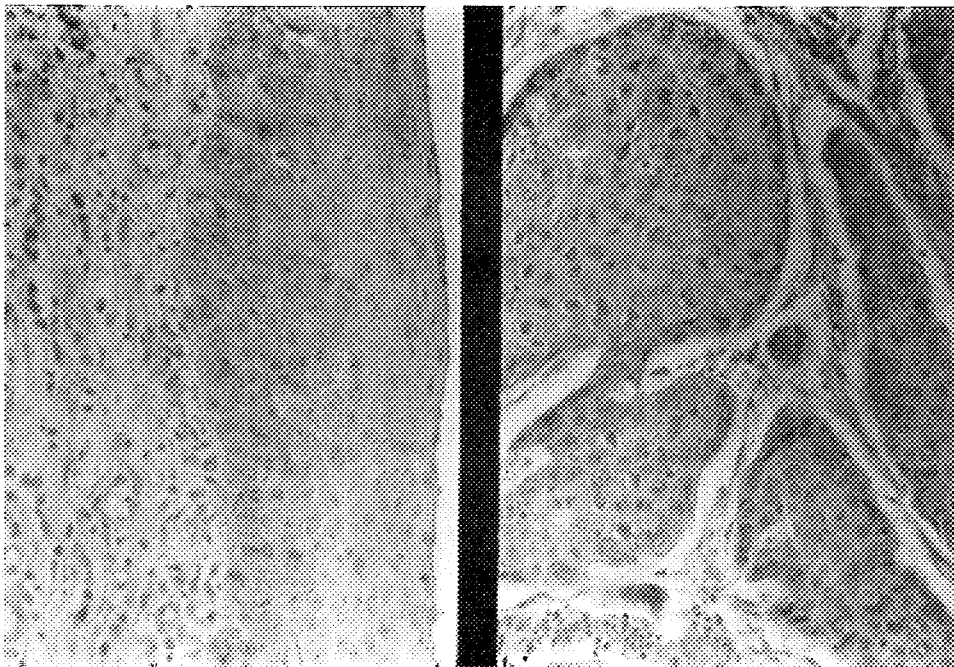
**Figure 1. case 6 (left) normal. P53 protein negative
(right) esophageal ca. P53 protein positive**



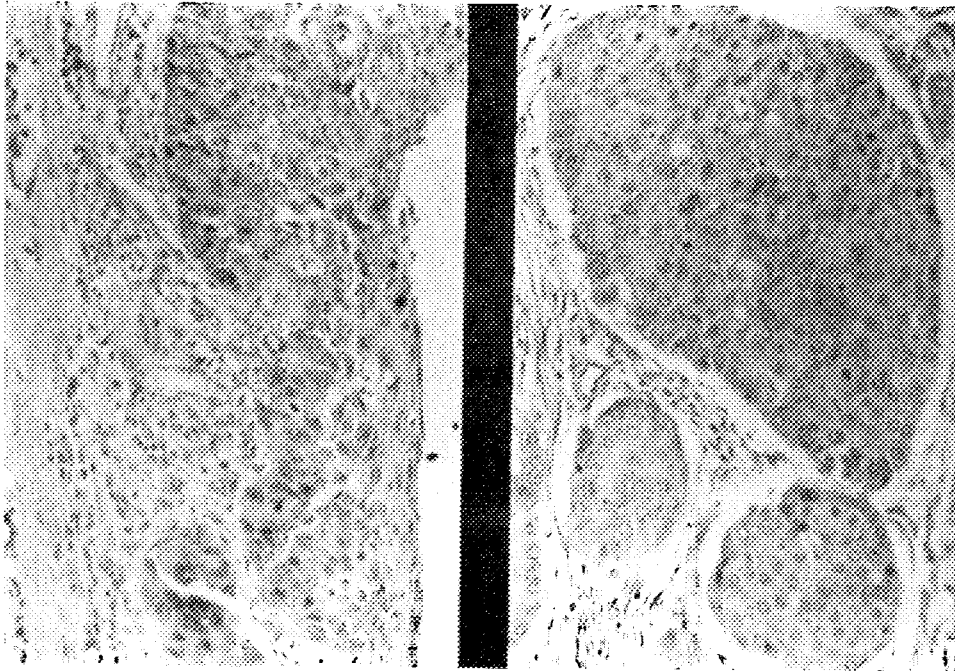
**Figure 2. Case 1 (left) esophageal ca. P53 protein positive
(right) dysplasia. p53 protein positive**



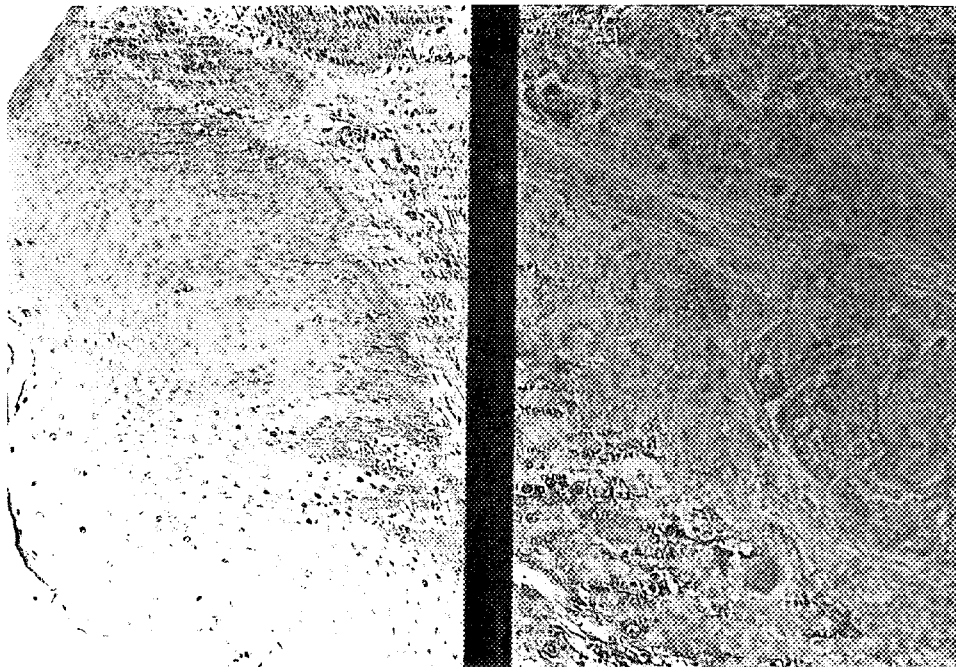
**Figure 3. case1 (left) normal. Rb protein positive
(right) dysplasia. Rb protein positive**



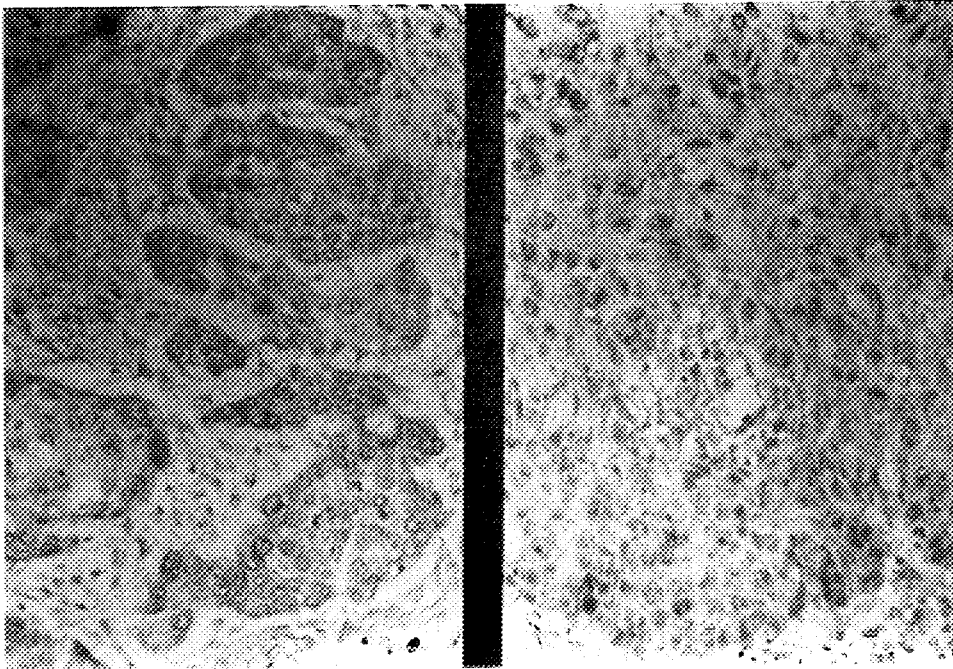
**Figure 4. Case 8 (left) normal. Rb protein positive
(right) esophageal ca. Rb protein negative**



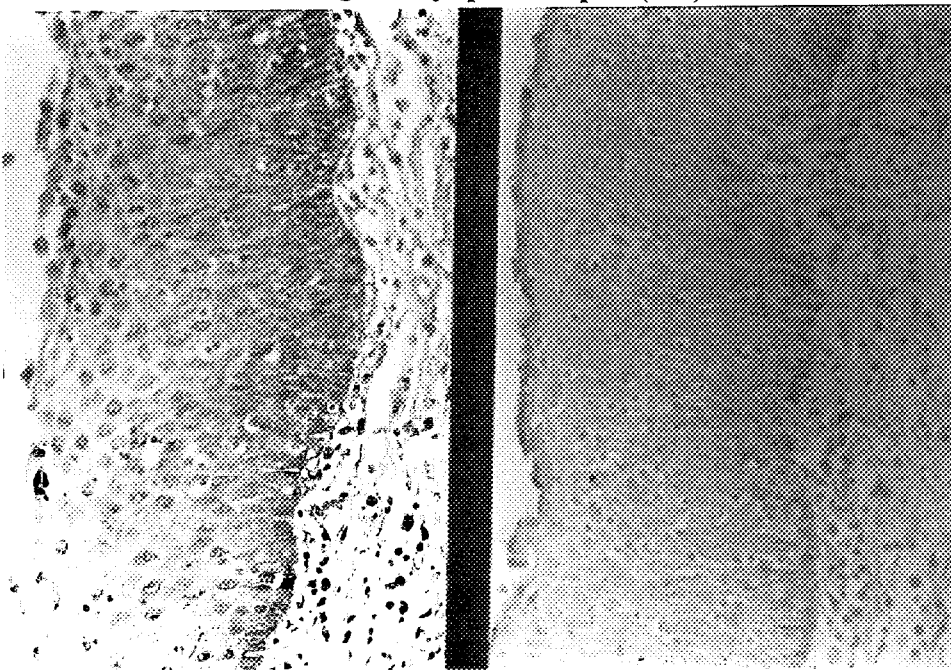
**Figure. 5 case 8 (left) dysplasia. Rb protein positive
(right) esophageal ca. Rb protein negative**



**Figure 6. Case7 (left) normal. p16 (+), dysplasia. p16(++)
(right) esophageal ca. p16(+)**



**Figure 7. Case 13 (left) esophageal ca. p16(+)
(right) dysplasia. p16(++)**



**Figure 8. Case 15 (left) dysplasia. p16(+)
(right) dysplasia. Rb protein. negative**

	Genetic alterations	protein expression by immunohistochemistry
p53	20/23(77%)	7/13(54%)
pRB	23/36(64%)	8/11(73%)
p16	2/36(6%)	1/14(7%)

Table 1. Comparison of genetic alterations and protein expression

	Dysplasia	Carcinoma
p53 expression	9/13(69%)	7/13(54%)
pRb loss of expression	10/11(91%)	8/11(73%)
p16 loss of expression	0/14(0%)	1/14(7%)
p16 over-expression	11/14(79%)	4/14(29%)

Table2. Comparison of protein expression in dysplasia and carcinoma

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

절제된 식도암 조직에서 그동안 시행하였던 p53, Retinoblastoma gene, MTS1/CDKN2 유전자 변이의 빈도와 그 양상을 관찰한 결과와 비교하여, 각각 발현 되는 단백질의 발현 양상 및 상관 관계를 분석 하여, 분자 유전학적으로 분석한 결과와 단백질 발현과의 상관관계를 비교하려는 분석 목표는 달성 되었으며, 1997년도 MTS1/CDK2 유전자의 변이에 대한 연구 결과 hypermethylation에 의한 p16 단백질의 비발현의 가능성은 식도암에서는 해당되지 않는 기전이었으며, 식도암에서의 p16 유전자의 발암 기전에 대한 역할은 크지 않을 것으로 사료 된다. 그러나 p53 유전자와 Retinoblastoma 유전자는 향후 유전자 치료에의 적용이나, 국내 식도암의 발암 과정의 분석 및 예방 진단 등에는 기본 자료로서 응용할 수 있는 가능성이 있다고 생각 된다. 또한 발암 과정 중에서 상당히 조기에 생기는 유전자 변이이므로 식도암의 전암 단계에 대한 연구나 암 예방 차원, 또한 치료 차원에서 이용이 가능 하리라 생각 된다. 그리고 p16 단백질의, Retinoblastoma 단백질의 비발현 예에서의 과 발현은 전암 단계에서 특히 잘 나타 났다. 이는 p16 과 retinoblastoma 단백질의 negative feedback 가설에 합당한 결과이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

최근 여러 종양에서 높은 빈도로 발견되고 있는 p53, pRb, p16의 변이를 paraffin 조직에서 screening 하는 방법으로서의 immuno-histochemistry는 좋은 방법으로 생각 되며, 특히 p16 같이 hypermethylation 같은 기전으로 비활성화 될 가능성이 있는 유전자의 검색에 좋은 방법이라 생각 된다. 최근 식도에서의 severe dysplasia는 수술적 절제의 적응증이 되는 것을 고려하면, dysplasia 단계로의 이행 과정 및 dysplasia에서 invasive cancer로의 이행 과정에 대한 연구가 좀 더 필요할 것으로 생각 되며, dysplasia 중에서도 분자 유전학적으로 분류가 필요할 수 있으며, 변화의 복구에도 관심을 기울여 볼 만 하다.

제 6 장 참고문헌

1. Franceschi S, Talamini R, Barra S, et al. Smoking and drinking in relation to cancer of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy. *Cancer Res.* 1990, 50:6502-6507

2. Hamilton SR and Smith RRL et al. Prevalence and characteristics of Barrett esophagus in patient with adenocarcinoma of the esophagus or esophagogastric junction. *Hum. pathol.* 1988,19:942-948

3. Lu SH, Hsieh LL, Luo FC, et al. Amplification of the EGF receptor and c-myc genes in human esophageal cancers. *Int J Cancer.* 1988, 42:502-505

4. Tsuda T, Tahara E, Kajiyama G, et al. High incidence of coamplification of hst-1 and int-2 genes in human esophageal carcinomas. *Cancer Res.* 1989, 49:5505-5508

5. Waqgata T, Ishizaki K, Imamura M, et al. Deletion of 17p and amplification of the int-2 gene in esophageal carcinomas. *Cancer Res.* 1991, 51:2113-2117

6. Hollstein MC, Metcalf RA, Welsh JA et al. Frequent mutation of the p53 gene in esophageal cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 1990,86; 9958-9961

7. Boynton RF, Huang Y, Blount PL, et al. Frequent loss of hetrozygosity at the retinoblastoma locus in human esophageal cancers. *Cancer Res.* 1991, 51:5766-5769

8. Boynton RF, Blount PL, Meltzer SJ, et al. Loss of heterozygosity involving the APC and MCC genetic loci

occurs in the majority of human esophageal cancers.
Proc Natl Acad Sci USA 1992, 89:3385-3388

9. Mori, T., Miura K., et al. Frequent somatic mutation of the MTS1/CDK4I (multiple tumor suppressor/cyclin dependent kinase 4 inhibitor) gene in esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Res., 54:3396-3397, 1994

10. Asuncion E, Ghyslaine MP, et al. Low frequency of p16/CDKN2 gene mutation in esophageal carcinomas. Int. J. Cancer. 66: 301-304, 1996

11. G Coggi, S Bosari, M Roncalli, et al. P53 protein accumulation and p53 gene mutation in esophageal cancer. Cancer 79:425-432, 1997

12. LD Wang, Q Zhou, JY Hong, et al. P53 protein accumulation and gene mutations in multifocal esophageal precancerous lesions from symptom free subjects in high incidence area for esophageal carcinoma in Henan, China. Cancer 77: 1244-1249, 1995

13. Okamoto A, et al: p16/INK4 mutations and altered expression in human tumors and cell lines. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 59:49-57, 1994

14. Ichimura K, Schmidt EE, et al. Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16/INK4A, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. Oncogene 13:1065-1072, 1996

15. M Sakaguchi, Y Fujii, H Hirabayashi, et al. Inversely correlated expression of p16 and Rb protein in non-small cell lung cancers: an

immunohistochemistry study. *Int. J. Cancer* 65: 442-445, 1996

16. I Kinoshita, H Dosaka-Akita, T Mishina, et al. Altered p16INK4 and retinoblastoma protein status in non-small cell lung cancer: potential synergistic effect with altered p53 protein on proliferative activity. *Cancer Res.* 56:5557-62, 1996

17. C Cordon-Cardo, ZF Zhang, G Dalbagni, et al. Cooperative effects of p53 and pRb alterations in primary superficial bladder tumors. *Cancer Res.* 57: 1217-21, 1997

서 지 정 보 양 식

수행기관 보고서번호	위탁기관 보고서 번호	표준보고서 번호	INIS 주제코드
KAERI/RR--1770/97			
제목 / 부제	악성 식도종양의 분자생물학적 연구/ 식도암에서 p53, pRb, p16 단백질의 발현에 대한 연구		
연구책임자 및 부서명	조 재 일 (분자종양학실)		
연구자 및 부서명	조 재 일 (흉부외과)		
발행지	서울	발행기관	한국원자력연구소 부설 원자력병원
페이지	28 P.	도표	유(v), 무()
발행일	1996.1	크 기	26 cm
참고사항			
비밀여부	공개(v), 대외비(), —급 비 밀	보고서 종류	연구보고서
연구위탁기관	과학기술처	계약 번호	
초록(300단어 내외)	<p>세계적으로 호발지역의 하나인 우리나라에서의 식도암의 분자유전학적 연구의 하나로 p53, pRb, p16 단백질의 발현이 유전자 변이의 양상과 어떤 상호 관계가 있는지를 분석하고, 병리학적 발암 단계별로 단백질의 발현이 어떤 변화를 보이는지를 분석하기 위하여, 다단계의 병변이 분리되어 발견된 식도암 조직 15예를 mapping을 한 후 immunohistochemistry를 시행하였다. p53는 dysplasia와 cancer에서 각각 60%, 47%에서 양성으로 나왔으며, pRb는 dysplasia와 cancer에서 91%, 72.7% 에서 음성으로 나왔다. 그러나 p16은 dysplasia와 cancer에서 0%, 7% 만이 음성으로 판독 되었으며, 오히려 dysplasia와 cancer에서 과발현 소견을 보 인예가 78.6%, 28.6%나 되었다. pRb와 p16이 동시에 음성인 경우는 없었으며, p53의 발 현과 pRb, p16과의 상관 관계는 발견할 수 없었다. 이상에서 한국의 식도암에서의 p53 과 pRb의 비활성화는 흔히 볼 수 있는 변화이며, 초기 발암 단계에서 부터 관여 하는 주요한 변화라 생각된다. p16의 비발현은 드문 변화로서, 오히려 dysplasia 단계에서는 과발현을 보이며, 특히 pRb 비발현 예에서 두드러 졌다.</p>		
주제명 키워드 (10단어 내외)	p53, pRb, p16, 식도암, 발암기전		
Immunohistochemistry			

BIBLIOGRAPHIC INFORMATION SHEET

Performing Org. Report No.	Sponsoring Org. Report No.	Standard Report No.	INIS Subject Code
KAERI/RR-1770/97			
Title/Subtitle	Molecular biologic analysis of esophageal cancer/ Immunohistochemical study of p53, pRb, p16 in esophageal cancer		
Project Manager and Dept.	Zo, Jae-III (Dept. of Molecular Oncology)		
Researcher and Dept.	Zo, Jae-III Dept. of Thoracic Surgery		
Pub. Place	Seoul	Pub. Org.	KCCH, KAERI
			Pub. Date
			Jan. 1996
Page	28 P.	Tab	Yes(v), No()
			Size
			26 cm
Note	'97 Basic research project		
Classified	Open(v), Outside(), Class	Report Type	Research report
Sponsoring Org.	MOST	Contract No.	
Abstract (About 300 Words)	<p>To confirm the expression of molecular genetic alterations of p53, pRb, p16 in esophageal cancer and to investigate the expression of p53, pRb, p16 in esophageal cancer according to the pathologic steps of carcinogenesis, immuno-histochemistry was performed in 15 resected esophageal cancer specimens with multiple seperated lesions after pathologic mapping. The accumulation of mutant p53 was observed in 60% of dysplasia and 47% of invasive cancer, while pRb was not detected in 91% of dysplasia and 72.7% of invasive cancer. But p16 was not observed in 0% in dysplasia and 7% of invasive cancer. Instead over-expression was found in 78.6% in dysplasia and 28.6% in invasive cancer. There was no simultaneous negative pRb and p16 expression. There was no relations between p53 and p16, pRb. As a results, the expression of p53, pRb, p16 was co-related well with molecular genetic changes and inactivation of p53 and pRb was common and early event in esophageal carcinogenesis in Korea, but inactivation of p16 was a infrequent change.</p>		
Subject Keywords (About 10 Words)	p53, pRb, p16, esophageal cancer, carcinogenesis, immunohistochemistry		

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.

약성 식도증양에 대한 분자유전학적 연구

1997年 12月 日 印刷

1997年 12月 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

민는마음 지킨약속 다져가는 신뢰사회