

성상세포종양에서 9p21, 17p13과 3p의 이형접합성 소실

이연수 · 강창석 · 동승명¹ · 이정용¹
심상인 · 김병기

가톨릭대학교 의과대학 임상병리학교실
병리학교실

접 수 : 2001년 3월 10일
게재승인 : 2001년 6월 1일

책임저자 : 이 연 수
우 137-040 서울시 서초구 반포동 505
강남성모병원 임상병리학교실
전화: 02-590-1592
Fax: 02-592-4190
E-mail: lys9908@cmc.cuk.ac.kr

Loss of Heterozygosity on Chromosome 9p21, 17p13 and 3p in Human Astrocytic Tumor

Youn Soo Lee, Chang Suk Kang, Seung Myung Dong¹, Jung Yong Lee¹
Sang In Shim and Byung Kee Kim

Departments of Clinical Pathology and ¹Pathology, The Catholic University of Korea, College of Medicine, Seoul, Korea

Background : The purpose of this study was to determine the genetic abnormalities of chromosomes 9p21, 17p13.1, 3p25 and 3p14.2 in the development and progression of astrocytic tumors. **Methods :** We performed loss of heterozygosity (LOH) analysis in 41 astrocytic tumors, including 20 astrocytomas, 11 anaplastic astrocytomas and 10 glioblastomas, and correlated the results of LOH at different histopathologic grades. LOH was determined by multiplex polymerase chain reaction analysis of the DNA, which was extracted by microdissection. **Results :** LOH of 9p21 was found in 55.6% of astrocytomas, 54.6% of anaplastic astrocytomas and 100.0% of glioblastomas. LOH of 17p13.1 was found in 21.4% of astrocytomas, 28.6% of anaplastic astrocytomas, and 66.7% of glioblastomas. LOH of 3p25 was found in 37.5% of astrocytomas, 16.7% of anaplastic astrocytomas, and 14.3% of glioblastomas. LOH of 3p14.2 was found in 16.7% of astrocytomas, 40.0% of anaplastic astrocytomas, and 42.9% of glioblastomas. LOH on chromosome 9p21 and 17p13.1 was closely related with the histopathologic grades. **Conclusions :** These results may suggest that LOH of 9p21, 17p13.1, 3p25 and 3p14.2 involves an early event of astrocytoma development and accumulates during progression. LOH of 3p25 may be involved in the tumorigenesis of astrocytoma. Identification of these LOH may illuminate the stepwise pathogenesis of astrocytic tumors and predict the possibility of malignant transformation.

Key Words : Astrocytoma, Loss of heterozygosity, 9p21, 17p13, 3p

성상세포종양은 중추신경계에서 가장 흔하게 발생하는 원발성 종양으로 병리조직학적 분류에 따라 양성 종양인 성상세포종, 중간 등급의 악성 종양인 역형성 성상세포종, 그리고 가장 고등급의 악성 종양인 교모세포종으로 구분한다. 성상세포종양의 악성도는 임상적으로 진행함에 따라 악성도가 증가될 수 있고 환자 연령의 증가와도 밀접한 관련이 있으며, 어떤 성상세포종양의 경우에는 양성에서 악성에 이르기까지 다양한 형태를 보일 수도 있다. 따라서 성상세포종은 치료가 불충분한 경우 악성 종양인 교모세포종으로 진행하는데, 이는 유전자들이 다단계적으로 이상 과정을 거쳐 세포 성장이 조절되지 않기 때문인 것으로 알려져 있다.¹

최근 성상세포종양에서 9p21의 $p16^{INK4a}$ 와 17p13.1의 $p53$ 종양억제유전자의 돌연변이나 이형접합성 소실(loss of heterozygosity)이 종양 발생과 관련이 있다고 보고되었다.² 염색체 9p21

부위에는 종양억제유전자인 $p16^{INK4a}$ 유전자가 위치하고 있으며, 이 유전자는 세포주기의 G1 checkpoint를 억제하는 것으로 알려져 있다.³ 종양 세포에서 $p16^{INK4a}$ 유전자의 변이는 p16 단백질의 구조적 이상을 초래함으로써 이런 억제 효과가 소실되어 비정상적인 세포증식을 유발하는 것으로 생각된다.³ 또한 염색체 17p13.1의 $p53$ 유전자 변이는 p53 단백질의 구조를 바꾸어 DNA에 결합하는 능력을 변형시키고, 결과적으로 p21, p27, p57과 같은 CIP/KIP family의 전사를 하지 못하게 하여 이들에 의한 G1 checkpoint 억제가 유도되지 않아 세포가 유전자적으로 불안정한 상태에서 계속적인 복제가 진행된다.⁴

그 외에 최근 알려진 von Hippel-Lindau (VHL) 종양억제 유전자는 염색체 3p25에 위치하고 있다. VHL 병에서 신경교종이 흔히 발생하는 것은 아니지만 최근 한 VHL 가족에서 저등급 성상세포종이 있었던 예가 보고되었다.⁵ 그러나 산발성 성상

세포종양의 발생과 *VHL* 유전자 이상과의 관련성에 대해서는 아직 밝혀진 바 없다. 또한 폐암, 식도암, 위암 및 대장암 등에서 흔히 관찰되는 염색체 3p의 이형접합성 소실에 대한 검색은 이 부위에 적어도 하나 이상의 종양억제유전자가 존재하고 있으리라는 추측을 할 수 있게 하였다. 이 중 3p14.2의 특정 부위에 위치하는 종양억제유전자인 *Fragile Histidine Triad (FHIT)* 유전자가 최근에 밝혀졌다.⁶ 이 *FHIT* 유전자에는 common fragile site인 FRA3B가 포함되어 있는데, 이 fragile site는 다양한 암세포주에서 동형접합성 결손이 발견되었으나⁷ 성상세포종양에서는 아직 보고된 바 없다.

이에 저자들은 9p21과 17p13.1의 이형접합성 소실이 성상세포종양 발생 단계에서의 역할과 악성화 정도에 미치는 관련성 여부에 대한 연구가 필요하리라 생각하였고, 최근에 밝혀진 종양억제유전자인 *VHL* 유전자와 *FHIT* 유전자가 각각 위치하는 부위인 3p25와 3p14.2의 이형접합성 소실을 검색하여 성상세포종양 발생과의 관련성 여부를 찾고자 하였다.

재료와 방법

재료

가톨릭대학교 의과대학 강남성모병원에서 1988년 1월부터 1996년 5월까지 중추신경계 성상세포종양으로 진단된 파라핀 포매 조직 41예(성상세포종: 20예, 역형성 성상세포종: 11예, 교모세포종: 10예)를 연구 대상으로 하였다. 각 예에서 성별, 나이, 위치를 조사하였다.

방법

성상세포종양의 병리조직학적 분류

핵의 다형성, 세포분열, 괴사, 혈관내피세포 증식 유무를 기준

으로 World Health Organization (WHO) 분류에 따라 악성도를 판정하여 성상세포종, 역형성 성상세포종, 교모세포종으로 분류하였다.

시료의 채취

총 41예의 파라핀 포매 조직 중 종양 조직과 정상 조직에서 각각 5 μ m 두께로 자른 절편 1매씩을 유리 슬라이드에 부착시켜 HE 염색을 하였다. HE 염색된 슬라이드를 cover glass가 없는 상태로 크실렌을 도포한 후 40-100배 광학현미경 시야에서 관찰하여, 정상 세포와 종양 세포가 서로 섞이지 않고 또한 괴사로 인한 DNA의 파괴가 없는 생존 세포들이 모인 부위에서 30 gauge 주사 바늘로 각각 약 500개의 종양 세포와 정상 세포를 긁어내는 미세절제술을 시행하여 각각 다른 시험관에 분리하여 모았다.

DNA분리

Proteinase K stock solution (20 mg/mL)을 TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)로 200배 희석하여 용해액을 만들었다. 이 용해액 20 μ L에 각 표본의 종양 부위와 정상 부위에서 얻은 각각의 500개 세포를 녹였다. 용해액 20 μ L에 담긴 세포를 50°C에서 하루동안 방치하여 단백질을 파괴한 후 10분간 끓여 proteinase K를 불활성화시켰다. 이 용액 2 μ L을 template DNA로 사용하였다.

이형접합성의 소실 검색

각 예의 성상세포종양 부위와 정상 부위에서 추출한 DNA를 9p21의 microsatellite marker 4개(D9S162, IFNA, D9S104, D9S165), 17p13.1의 marker인 TP53, 3p25의 marker인 D3S1038, 그리고 3p14.2의 marker인 D3S1300을 사용하여, 유전자 부위에 따라 각각 multiplex polymerase chain reaction (PCR)을 시행하였다.⁸

사용한 marker들(Research Genetics, Huntsvilli, AL,

Table 1. Microsatellite markers used for detection of loss of heterozygosity

Locus	Chromosome location	Sequence	End product size (bp)
D9S162	9p22-9p23	5'-GCAATGACCAGTTAAGGTTCC 5'-AATTCCCACAACAAATCTCC	172-196
IFNA	9p22	5'-CTCATTGACTAATGCATCATCTCACAC 5'-TCAGGTTATACTGTCAGGCTTGGCAT	138-150
D9S104	9p21	5'-GATCTGGGTATGTCITTTCTG 5'-ACGGGACTCAACTAATGT	181-199
D9S165	9p21-9q21	5'-GACTTTGGCTGCTAGATGTG 5'-CAGAGGATTACAAATATAGACAGG	202-226
TP53	17p13.1	5'-CAGCTTTATTTTCATAACCGCA 5'-AGAAGGCAAGCCCGGAG	103-135
D3S1038	3p26.1-3p25.2	5'-TCCAGTAAGAGGCTTCCTAG 5'-AAAGGGGTTTCAGGAAACCTG	-115
D3S1300	3p14.2	5'-AGCTCACATTCTAGTCAGCCT 5'-GCCAATTCCTCCAGATG	217-241

Table 2. Loss of heterozygosity of 9p21, 17p13.1, 3p25 and 3p14.2 in the 41 astrocytic tumors

Case No.	Age	Sex	Site	Pathologic grade	9p21				17p13.1	3p25	3p14.2
					D9S162	IFNA	D9S104	D9S165	TP53	D3S1038	D3S1300
1	52	M	frontotemporal lobe	A	-	-	-	-	NI	L	L
2	52	M	frontal lobe	A	-	-	L	NI	L	NI	NI
3	45	M	temporoparietal lobe	A	NI	L	NI	L	NI	NI	NI
4	29	F	temporoparietal lobe	A	NI	-	-	NI	NI	NI	-1
5	50	M	frontal lobe	A	-	L	-	-	-	NI	-
6	46	M	basal ganglia	A	NI	-	-	NI	L	NI	NI
7	47	M	frontotemporal lobe	A	L	-	NI	NI	L	-	NI
8	19	F	cerebellum	A	-	NI	-	-	NI	L	-
9	52	M	frontal lobe	A	NI	L	L	NI	-	NI	NI
10	42	M	temporal lobe	A	-	L	-	-	-	L	-
11	30	M	temporoparietal lobe	A	NI	-	-	-	NI	-	NI
12	36	F	frontal lobe	A	NI	L	-	-	-	NI	-
13	60	F	brainstem	A	-	-	-	L	-	NI	NI
14	21	F	frontal lobe	A	-	-	L	NI	NI	NI	NI
15	10	M	parietal lobe	A	NI	-	NI	-	-	NI	NI
16	34	F	temporal lobe	A	NI	NI	NI	NI	-	NI	NI
17	42	F	frontal lobe	A	NI	NI	NI	NI	-	-	NI
18	25	F	frontal lobe	A	NI	-	NI	NI	-	NI	NI
19	25	F	frontal lobe	A	NI	-	-	NI	-	-	NI
20	51	F	occipital lobe	A	-	L	NI	L	-	-	NI
21	39	M	frontal lobe	AA	NI	-	-	-	NI	NI	-
22	64	F	parietal lobe	AA	-	L	L	-	-	-	NI
23	42	F	occipital lobe	AA	-	-	-	-	-	-	L
24	30	M	temporoparietal lobe	AA	-	NI	-	NI	NI	-	NI
25	42	F	parietal lobe	AA	-	-	-	-	-	NI	NI
26	21	M	cerebellum	AA	-	NI	L	L	L	NI	L
27	16	F	temporal lobe	AA	-	L	-	-	NI	-	NI
28	71	F	cerebellum	AA	NI	L	-	NI	L	-	NI
29	47	M	frontal lobe	AA	L	NI	-	-	-	NI	-
30	39	F	temporal lobe	AA	NI	NI	NI	-	-	NI	-
31	50	F	temporal lobe	AA	NI	NI	-	L	NI	L	NI
32	41	F	temporal lobe	G	NI	L	-	-	NI	-	L
33	44	F	frontal lobe	G	L	NI	L	L	L	NI	-
34	65	M	frontal lobe	G	L	L	-	-	-	-	NI
35	36	F	basal ganglia	G	L	L	L	L	L	L	-
36	44	M	temporoparietal lobe	G	L	L	L	L	-	-	-
37	51	M	frontotemporal lobe	G	NI	NI	L	NI	NI	NI	-
38	69	F	parietal lobe	G	-	L	NI	L	L	-	L
39	54	M	parietal lobe	G	NI	L	NI	NI	L	-	L
40	55	F	occipital lobe	G	-	L	NI	L	-	-	NI
41	65	M	frontal lobe	G	-	L	L	-	NI	NI	NI

NI: non-informative or homozygous, L: Loss of heterozygosity, -: negative for allele loss (retention of both informative alleles), A: astrocytoma, AA: anaplastic astrocytoma, G: glioblastoma, M: male, F: female

U.S.A.)의 특성과 구조는 Table 1과 같다.

PCR 반응액을 template DNA 2 μ L, 각 primers 0.25 μ L, 1/2dCTP를 포함한 1.25 mM NTP 1 μ L, 1.5 mM MgCl₂ 0.6 μ L, 10X PCR buffer 1 μ L, 0.4U Tag polymerase 0.07 μ L 그리고 [³²P]- α dCTP (10 mCi/mL) 0.05 μ L를 넣고 증류수를 첨가하여 총량이 10 μ L가 되게 하였다. PCR은 94°C에서 40초간 denaturing, annealing 90초, 72°C에서 extension 90초간으로 32회 시행하였다. 이때 annealing temperature는 D9S165, D9S104, D9S162, IFNA는 55°C, TP53은 60°C이며,

D3S1038은 62°C, 그리고 D3S1300은 55°C에서 시행하였다. PCR 반응산물 10 μ L과 정지 용액 10 μ L (95% formaldehyde, 2 mM EDTA, 0.05% xylene cyanol, 0.05% bromophenol blue)를 섞어 90°C에서 3분간 변성시키고 얼음에서 급냉시킨 뒤 이 용액을 8 μ L씩 취하여 미리 준비한 8.3 M urea를 포함한 6% polyacrylamide sequencing gel에 적체하고 50°C에서 80 watt로 3시간 동안 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 gel을 잘 분리하여 3 mm Whatman's paper에 부착시킨 다음 gel 건조기를 이용하여 1시간 진공 건조시킨

후 영하 70°C에서 24시간 autoradiography를 하였다.

이형접합성의 소실은 정상 대립유전자에 비해 중앙의 한쪽 대립유전자가 완전 또는 거의 소실된 경우로 정의하였다.

통계학적 분석

성상세포종양의 악성도에 따른 이형접합성 소실 발생빈도의 증가 또는 감소 추세의 유의성에 대한 통계학적 분석은 Bartholomew 검정법으로 시행하였다. 본 연구는 이형접합성의 소실을 검색하는 것이므로 정상 조직에서 동형접합성을 보이는 경우는 통계학적 분석에서 제외하였다.

결 과

본 연구에 사용된 41예의 성상세포종양 모두 각각 선택된 microsatellite marker 중 적어도 하나 이상에서 이형접합성을 보였다. 각 염색체별 microsatellite marker의 이형접합성 소실 결과는 Table 2와 같다. 각 염색체별로 조직병리학적 악성도 등급에 따른 이형접합성 소실의 빈도는 Table 3과 같다.

9p의 이형접합성 소실

염색체 9p21 부위에 위치한 *p16^{INK4a}* 유전자의 microsatellite marker인 D9S162, IFNA, D9S104, D9S165는 성상세포종양 41예 중 39예(95.1%)가 하나 이상의 microsatellite marker에서 이형접합성을 보였는데, 이중 26예(66.7%)에서 하나 이상의 marker에서 이형접합성 소실을 보였다. 각 병리조직학적 등급에 따른 빈도 차이는 성상세포종양에서는 18예 중 10예(55.6%), 역형성 성상세포종 11예 중 6예(54.6%), 교모세포종 10예 중 10예(100.0%)에서 이형접합성 소실이 관찰되어 악성화 정도에 따라 발생빈도가 유의하게 증가하였다($p<0.05$). 각 marker 별로 보면 D9S162에서는 성상세포종 9예 중 1예(11.1%), 역형성 성상세포종 7예 중 1예(14.3%), 교모세포종 7예 중 4예(57.1%)에서 이형접합성 소실이 관찰되었으며 성상세포종양의 악성화 정도에 따라 이형접합성 소실 발생빈도가 유의하게 증가하였다($p<0.05$). IFNA에서는 성상세포종 17예 중 6예(35.3%), 역형성 성상세포종 6예 중 3예(50.0%), 교모세포종 8예 중 8예(100.0%)에서 이형접합성 소실이 관찰되었다. IFNA의 이형접

합성 소실의 빈도는 악성화 정도에 따라 이형접합성 소실 발생 빈도가 유의하게 증가하였다($p<0.05$). 이 IFNA는 9p21 부위의 marker 중 가장 높은 빈도로 관찰되었다. D9S104에서는 성상세포종 13예 중 3예(23.1%), 역형성 성상세포종 10예 중 2예(20.0%), 교모세포종 7예 중 5예(71.4%)에서 이형접합성 소실이 관찰되었으며 악성화 정도에 따라 발생빈도가 유의하게 증가하였다($p<0.05$). 그러나 D9S165에서는 성상세포종 10예 중 3예(30.0%), 역형성 성상세포종 9예 중 2예(22.2%), 교모세포종 8예 중 5예(62.5%)에서 이형접합성 소실이 관찰되었다.

17p의 이형접합성 소실

41예 성상세포종양 중 27예(65.9%)에서 이형접합성을 보였다. *p53* 유전자에 대한 marker인 TP53은 성상세포종 14예 중 3예(21.4%), 역형성 성상세포종 7예 중 2예(28.6%), 교모세포종 6예 중 4예(66.7%)에서 이형접합성 소실이 관찰되었으며 악성화 정도에 따라 발생 빈도가 유의하게 증가하였다($p<0.05$).

3p의 이형접합성 소실

41예 성상세포종양 중 30예(73.2%)에서 염색체 3p의 marker 중 하나 이상에서 이형접합성이었다. *VHL* 유전자의 marker인 D3S1038은 성상세포종 8예 중 3예(37.5%), 역형성 성상세포종 6예 중 1예(16.7%), 교모세포종 7예 중 1예(14.3%)에서 이형접합성 소실이 관찰되어 9p21이나 TP53과는 달리 악성화 정도와는 관련이 없었다. *FHIT* 유전자의 marker인 D3S1300은 성상세포종 6예 중 1예(16.7%), 역형성 성상세포종 5예 중 2예(40.0%), 교모세포종 7예 중 3예(42.9%)에서 이형접합성 소실이 관찰되어 악성화 정도에 따라 발생빈도가 증가하는 경향이 있지만 통계적으로 유의하지 않았다.

병리조직학적 등급별 이형접합성 소실의 특징

특히 교모세포종에서 증례 35번(Fig. 1)과 증례 36번(Fig. 2)은 9p의 모든 marker에서 이형접합성 소실이 관찰되었고 35번에서는 TP53과 D3S1038에서도 동시에 이형접합성 소실이 관찰되었다. D3S1038은 성상세포종에서 이형접합성 소실이 존재하는 경향이 있어 증례 10번(Fig. 3)의 경우 TP53과 D3S1300에서 관찰되지 않은 반면 D3S1038에서만 이형접합성 소실이 관찰되었다. 반면 TP53과 D3S1300의 경우 이형접합성 소실이 역형성 성상세포종과 교모세포종에서 더 빈번히 발생하여 교모세포종인 증례 38번(Fig. 4)인 경우 TP53과 D3S1300에서 동시에 관찰되었다. 증례 20번과 40번은 동일한 환자의 것으로 성상세포종(증례 20번)으로 진단 받은 후 3년 10개월만에 교모세포종(증례 40번)으로 진행된 경우이다. 성상세포종으로 진단 받을 당시 IFNA와 D9S165에서 이미 이형접합성 소실이 관찰되었다.

Table 3. Frequency of genetic changes in 41 astrocytic tumors

Tumor grade	9p21	17p13.1	3p25	3p14.2
Astrocytoma	10/18 (55.6%)	3/14 (21.4%)	4/12 (37.5%)	1/6 (16.7%)
Anaplastic astrocytoma	6/11 (54.6%)	2/7 (28.6%)	1/10 (16.7%)	2/5 (40.0%)
Glioblastoma	10/10 (100.0%)	4/6 (66.7%)	1/9 (14.3%)	3/7 (42.9%)
<i>p</i> value	<0.05	<0.05	NS	NS

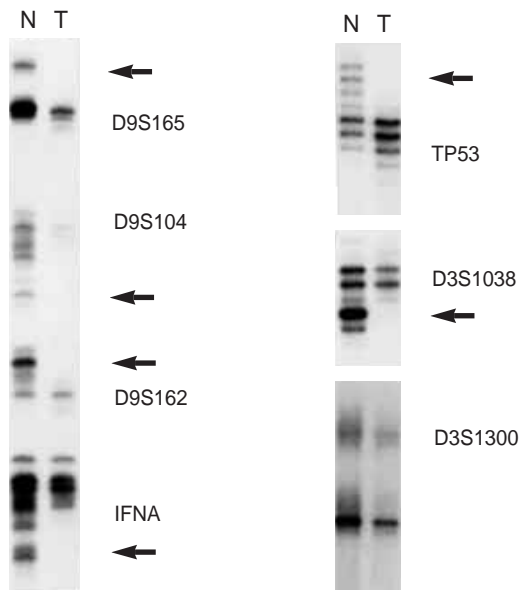


Fig. 1. Loss of heterozygosity (LOH) analysis in glioblastoma (case No.35) using microsatellite markers shows allele loss at all loci on chromosome 9p21, TP53 on chromosome 17p13.1 and D3S1038 on chromosome 3p25 and retention of heterozygosity at D3S1300 on chromosome 3p14.2. Arrows indicate alleles exhibiting LOH. N: normal tissue; T: tumor tissue.

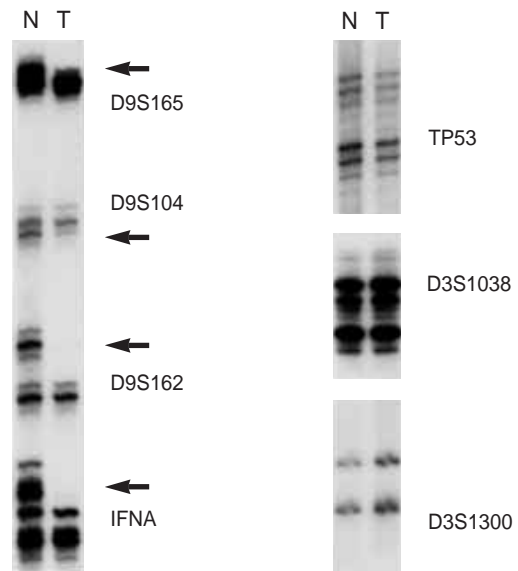


Fig. 2. Loss of heterozygosity (LOH) analysis in glioblastoma (case No.36) using microsatellite markers shows allele loss at all loci on chromosome 9p21 and retention of heterozygosity at TP53 on chromosome 17p13.1, D3S1038 on chromosome 3p25 and D3S1300 on chromosome 3p14.2. Arrows indicate alleles exhibiting LOH. N: normal tissue; T: tumor tissue.

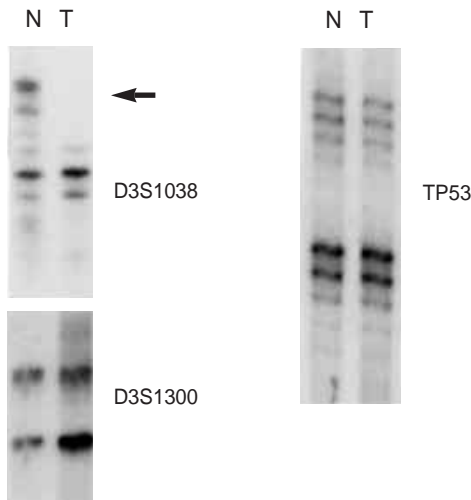


Fig. 3. Loss of heterozygosity (LOH) analysis in astrocytoma (case No.10) using microsatellite markers shows allele loss at D3S1038 on chromosome 3p25 and retention of heterozygosity at TP53 on chromosome 17p13.1 and D3S1300 on chromosome 3p14.2. Arrows indicate alleles exhibiting LOH. N: normal tissue; T: tumor tissue.

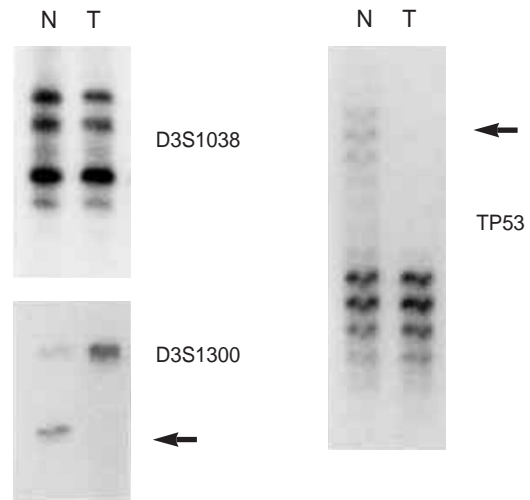


Fig. 4. Loss of heterozygosity (LOH) analysis in glioblastoma (case No.38) using microsatellite markers shows allele loss at TP53 on chromosome 17p13.1 and D3S1300 on chromosome 3p14.2 and retention of heterozygosity at D3S1038 on chromosome 3p25. Arrows indicate alleles exhibiting LOH. N: normal tissue; T: tumor tissue.

고찰

종양의 진행 과정에서 세포내 유전자에서의 주요 변화는 증폭, 전이, 이형접합성 소실 및 점 돌연변이들에 의한 종양유전자의

활성화와 종양억제유전자의 불활성화 등으로 대별될 수 있다.⁹ 이 중 종양억제유전자는 정상적으로 세포의 성장을 억제하는 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 이 유전자를 불활성화시키는 돌연변이는 세포 성장의 정상적인 억제 기능이 제거됨으로

써 종양의 진행 과정에 결정적인 역할을 하리라 생각된다. 종양 세포에서 흔히 관찰되는 염색체의 결손 부위는 종양억제유전자의 위치와 일치하기 때문에 microsatellite marker를 사용하여 염색체의 흔한 결손을 관찰하는 것이 종양억제유전자의 위치를 밝히는 유전자 mapping에 유용한 방법이다.¹⁰ 한편 유전자 변이 연구를 위한 종래의 종양 조직 DNA 추출법은 흔히 정상 조직이 포함되기 쉬워 간혹 결과 해석에 어려움이 많았다. 이러한 점을 해결하기 위하여 원하는 세포만 선택할 수 있는 정밀한 미세절제술이 최근 개발되었다.¹¹ 본 연구에서는 파라핀 포매 조직에서 미세절제술을 통해 정상과 종양조직의 DNA를 순수하게 분리하여 정상 세포가 오염되는 것을 방지함으로써 유전자 변이의 검출률을 높이고자 하였다. 성상세포종양은 정상 조직과 경계가 불분명하여 정상 세포와 종양 세포를 구분하기 어렵고, 괴사가 동반되어 DNA가 파괴된 세포가 많기 때문에 정상 세포가 섞이지 않으면서 괴사가 없는 생존 세포만을 선택하기 위해서는 미세절제술이 더욱 유용한 방법으로 생각된다. 성상세포종양에서는 미세절제술을 이용한 연구가 드문데,¹² 성상세포종양처럼 종양의 경계가 불분명하여 정상 세포가 포함되기 쉽고 괴사가 많은 종양에 특히 유용하리라 생각된다.

종양억제유전자가 있을 것으로 추측되는 9p, 10p, 10q, 11p, 13q, 17p, 19q와 22q 염색체 결손이 성상세포종양에서 관찰되었으며, 이로써 이 염색체 부위의 유전자들이 성상세포종양 발생에 관련이 있을 것으로 추측할 수 있게 되었다.¹³

특히 9p21에는 종양억제유전자 *p16^{INK4a}*가 위치하고 있으며 이 유전자의 생성 단백질인 p16은 세포주기의 G1후기에서 세포주기 진행에 관여하는 cyclin dependent kinase (CDK)의 억제자이다. CDK는 cyclin D와 결합하여 cyclin D/CDK 4 복합체를 형성하며 이것은 *retinoblastoma (Rb)* 종양억제유전자의 생성물(pRb)을 인산화시켜 G1후기에서 S기로 세포주기가 이행하게 된다. p16은 CDK4에 결합하여 CDK가 cyclin D와 결합하는 것을 방해하며 결과적으로 pRb의 인산화를 막아 G1후기에서는 세포주기가 멈추게 된다. *p16^{INK4a}*의 유전자 이상이 있을 경우 cyclin D/CDK4 복합체를 통한 G1 checkpoint가 조절되지 않아 S기로 세포주기가 계속 진행함으로써 종양이 발생하게 된다. *p16^{INK4a}* 유전자가 위치하고 있는 9p21의 결손과 재배열은 신경교종 외에 많은 악성 종양, 즉 백혈병, 악성 흑색종, 폐암, 중피종, 방광암, 식도암 및 췌장암 등에서 흔히 관찰되는 것으로 보고되어 있다.¹⁴ 9p21 결손은 처음에 interferon (IFN) 유전자 cluster에 대한 probe를 사용하여 발견되었는데, 이 IFN cluster의 microsatellite marker인 IFNA는 *p16^{INK4a}*와 가장 가까운 marker이다. Kamb 등¹⁵은 성상세포종 세포주의 82%에서 이 부위의 동형접합성 결손을 찾아냈고, Nobori 등¹⁴도 신경교종 세포주의 87.5%에서 동형접합성 상실이 있다고 보고하였다. 성상세포종 세포주에서 *p16^{INK4a}* 유전자 소실이 매우 높은 빈도로 발생하는 것은 이것이 성상세포종 발생에 중요한 역할을 하리라는 것을 암시하는 것이다. 그러나 세포주에서 얻은 성적은 cul-

ture artifact의 가능성도 배제할 수 없기 때문에 종양 세포의 상실 빈도가 중요하다. Walker 등¹⁶은 역형성 성상세포종의 52%, 교모세포종의 59%에서 9p21 소실을 관찰하였고, 성상세포종에서는 관찰할 수 없어 염색체 9p21의 종양억제유전자의 상실이 성상세포종양의 발생보다 악성화의 진행에 관여한다고 생각하였다. 하지만 본 연구에서는 성상세포종에서도 11.11%에서 35.29%의 빈도로 9p21의 이형접합성 소실이 관찰되었고 악성화에 따라 이형접합성 소실 발생 빈도가 유의하게 증가하였으며 교모세포종에서 가장 높은 빈도로 관찰되었다. 특히 교모세포종 2예(증례 35, 36번)에서는 시행된 9p21의 microsatellite marker 모두에서 이형접합성 소실이 관찰되었다. 그러므로 9p21의 이형접합성 소실은 악성화 단계에만 관여하는 것이 아니라 성상세포종양의 발생 과정의 초기단계에서도 이미 관여하고 있는 것으로 생각된다. 이것은 성상세포종(증례 20)에서 진행된 교모세포종(증례 40)의 경우 성상세포종 진단 당시 이미 IFNA와 D9S165에서 이형접합성 소실이 관찰된 것으로 뒷받침할 수 있다. 그러므로 이 증례의 악성화 단계에는 다른 종양억제유전자의 이상 또는 종양유전자의 활성화가 관여되었을 것으로 생각된다.

악성 종양에서 가장 흔하게 발견되는 변이 유전자인 17p13.1의 *p53* 종양억제유전자의 생성단백인 p53은 특이 염기서열의 DNA와 결합하는 단백질로서, DNA 손상에 대한 세포 반응에 관여하고 하위 조절 유전자인 *p21^{WAF1}*의 전사를 촉진하여 이 p21 단백질이 CDK 및 증식세포핵항원과 결합하여 G1기에서 S기로의 이행을 억제하는 기능을 가지고 있다. 그러나 만약 *p53* 유전자에 결손이 있으면 손상 받은 DNA가 복제되어 유전자의 변이나 증폭이 일어나며 점점 악성 세포로 이행할 가능성이 증가하게 된다. 성상세포종에서는 *p53* 종양억제유전자의 변이가 모든 등급의 성상세포종양에서 보고되었고, 특히 역형성 성상세포종과 교모세포종에서는 평균 30-35%의 변이가 관찰되었다.^{15,17,18} 따라서 17p13.1의 종양억제유전자의 상실이 성상세포종 형성의 초기 단계에 관여하리라 생각된다.¹⁹ Sidransky 등²⁰은 교모세포종으로 진행된 3개의 성상세포종에서 *p53* 변이 세포의 아군집(subpopulation)을 찾아내어 *p53* 변이 세포의 clonal expansion의 가능성을 제시하였다. 본 연구에서도 세 등급 모두에서 TP53의 이형접합성 소실이 발견되었고 악성화할수록 발생 빈도가 유의하게 증가하였다. 이러한 결과는 TP53의 이형접합성 소실이 성상세포종양 발생 과정의 초기 단계에 밀접한 연관이 있다는 사실을 뒷받침하며 악성으로의 진행 과정 동안 *p53* 변이를 가진 성상세포가 clonal expansion을 할 가능성을 추측하게 한다.

von Hippel-Lindau (VHL)병에서 열성 종양억제유전자로서 작용하는 *VHL* 유전자는 염색체 3p25에 위치하고 있다.²¹ *VHL* 유전자 단백질은 RNA polymerase II에 의해 전사를 연장시키는 Elongins B와 C에 단단히 결합하여 Elongin의 전사 활성도를 억제한다고 한다.²² Rubenstein과 Yaari⁵는 VHL 병을 9명 가진 푸에르토리코인의 가계도에서 이들 중 2명이 성상

세포종을 가지고 있었다고 보고하면서 *VHL* 종양억제유전자가 정상세포종에 관련되어 작용할지도 모른다는 가능성을 제시하였다. *VHL* 종양억제유전자와 정상세포종의 관련성에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았고 단지 1997년 Kanno 등²³에 의해 처음 시도되었다. Kanno 등²³에 의하면 정상세포종 6예 중 4예(66.7%), 역형성 정상세포종 4예 중 1예(25.0%), 교모세포종 6예 중 1예(16.7%)에서 이형접합성 소실이 관찰되어 악성도가 증가될수록 이형접합성이 유지되는 것으로 나타났으나 통계적으로 유의하지 않았다. 본 연구에서도 D3S1038에서의 정상세포종의 이형접합성 소실 발생 빈도는 37.5%, 역형성 정상세포종은 16.7%, 교모세포종은 14.3%로서 악성도가 될수록 이형접합성이 유지되는 결과를 나타내었으나 통계적 유의성은 없었다. 이상의 결과로 3p25의 이형접합성 소실이 정상세포종양의 발생에 관여할 가능성이 있으나 악성화 정도와는 관련이 없는 것으로 생각된다.

한편 3p 이형접합성 소실 검색을 위해 사용한 D3S1300은 3p14.2에 대한 microsatellite marker이다. 과거 Cohen 등²⁴이 양측성 투명세포형 신세포암중에서 t(3;8)을 발견하였고 Wang과 Perkins²⁵는 이 3번 염색체 breakpoint가 3p14.2에 위치하고 있음을 확인하였다. 3p14.2의 가장 흔한 세포유전학적 표지는 constitutive aphidicolin inducible fragile site인 FRA3B이다. FRA3B를 포함한 3p14.2의 200-300 kb되는 부위는 많은 종양 세포주에서 동형접합성 상실이 있다. 최근 Ohta 등⁶은 *fragile histidine triad gene*에 대한 *FHIT* 유전자로 명명한 부위를 확인하였다. *FHIT* 유전자의 생성 단백질은 *Schizosaccharomyces pombe*의 효소인 diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate (AP4A) asymmetrical hydrolase와 69%의 유사성을 가지고 있다. 이 효소는 AP4A를 ATP와 AMP로 비대칭적으로 분리시키는 역할을 한다. AP4A의 기능은 DNA 중합효소를 자극하는 것으로 추측되며, 또한 열, 산소나 DNA 손상 같은 대사적 스트레스에 대해 세포가 적응하는 능력을 유도하리라 생각된다. 그러나 *FHIT* 유전자의 기능 상실로 인해 AP4A가 축적되게 되면 증식을 자극하는 결과가 되고, 유전자적 손상의 원인이 되는 발암물질이나 바이러스에 의한 스트레스에 대해 세포가 적응하기 어렵게 될 것으로 추측된다. *FHIT* 유전자의 비정상적 전사는 식도, 위, 대장암 등의 소화기 암종과 폐암, 상기도암 등 호흡기암종에서 45-55%로 발견되고 있다.⁶ Fults 등²⁶은 EFD145 marker를 이용하여 정상세포종에서 3p의 이형접합성 소실을 11%정도 관찰하였지만 *FHIT* marker에 대한 이형접합성 소실을 검색한 보고는 없다. 본 연구에서는 3p14.2의 microsatellite marker인 D3S1300 이용한 검색에서 정상세포종 16.7%, 역형성 정상세포종 40.0%, 교모세포종 42.9%로 상당히 흔하게 발견되었고, 악성도가 증가될수록 빈도가 증가하였지만 통계적 의미는 없었다. 3p14.2의 이형접합성 소실이 정상세포종양의 모든 조직학적 등급에서 높은 빈도로 발생하는 것을 볼 때 정상세포종양의 발생 과정에서 일부 역할을 하고 있는 것으로

추측된다.

이상의 결과로 9p21, 17p13.1, 3p25 및 3p14.2의 이형접합성 소실이 정상세포종양의 발생과 관련이 있다고 여겨지며, 특히 9p21과 17p13.1의 이형접합성 소실은 정상세포종양의 악성화 정도와 관련이 있다고 생각된다. 이렇게 정상세포종양의 진행 과정을 매개하는 이형접합성 소실의 확인은 이들 종양의 단계적인 분자병리 기전을 밝히는 데 도움을 줄 것으로 기대된다. 그리고 양성 정상세포종에서 특정 염색체 부위의 이형접합성 소실을 확인함으로써 정상세포종의 악성화 가능성을 예측하는 데 도움을 줄 수 있을 것으로 생각한다. 또한 정상세포종양의 진행 과정에 대해 더 자세히 이해하기 위해서는 이에 관여하는 다른 유전자들에 대한 추후의 연구가 필요하리라 사료된다.

참고문헌

- Mueller W, Afra D, Schroeder R. Supratentorial recurrences of gliomas. Morphological studies in relation to time intervals with astrocytomas. *Acta Neurochir* 1977; 37: 75-91.
- Lang FF, Miller DC, Koslow M, Newcomb EW. Pathways leading to glioblastoma multiforme; a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J Neurosurg* 1994; 81: 427-36.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin/CDK4. *Nature* 1993; 366: 704-7.
- Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell* 1992; 70: 523-6.
- Rubenstein JL, Yaari H. Von Hippel-Lindau and the genetics of astrocytoma. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 13-4.
- Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, et al. The *FHIT* gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 1996; 84: 587-97.
- Rassol FV, Le Beau MM, Shen M, et al. Direct cloning of DNA sequences from the common fragile site region at chromosome band 3p14.2. *Genomics* 1996; 35: 109-17.
- Tarleton JC, Schwartz CE. The use of a new multiplex PCR assay significantly improves the rapid detection of deletions in the dystrophin gene (Letter). *Am J Hum Genet* 1991; 49: 461-2.
- Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991; 64: 235-48.
- Wilkie PJ, Krizman DB, Weber JL. Linkage map of chromosome 9 microsatellite polymorphisms. *Genomics* 1992; 12: 607-9.
- Zhuang Z, Bertheau P, Emmert-Buck MR, et al. A microdissection technique for archival DNA analysis of specific cell populations in lesions <1 mm in size. *Am J Pathol* 1995; 146: 620-5.
- Fujisawa H, Kurrer M, Reis RM, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki

- H. Acquisition of the glioblastoma phenotype during astrocytoma progression is associated with loss of heterozygosity on 10q25-qter. *Am J Pathol* 1999; 155: 387-94.
13. Moulton T, Samara G, Chung W, *et al.* MTS1/p16/CDKN2 lesions in primary glioblastoma multiforme. *Am J Pathol* 1995; 46: 613-9.
14. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994; 368: 753-6.
15. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, *et al.* A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor type. *Science* 1994; 264: 436-40.
16. Walker DG, Duan W, Popovic EA, Kaye AH, Tomlinson FH, Lavin M. Homozygous deletions of the multiple tumor suppressor gene 1 in the progression of human astrocytomas. *Cancer Res* 1995; 55: 20-3.
17. James CD, Carlom E, Nordenskjold M, Collins VP, Cavenee WK. Mitotic recombination of chromosome 17 in astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2858-62.
18. Fults D, Brockmeyer D, Tullous MW, Pedone CA, Cawthon RM. p53 mutations and loss of heterozygosity on chromosomes 17 and 10 during human astrocytoma progression. *Cancer Res* 1992; 52: 674-9.
19. El-Zouzi M, Chung RY, Farmer GE, *et al.* Loss of distinct regions on the short arm of chromosome 17 associated with tumorigenesis of human astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7186-90.
20. Sidransky D, Mikkelsen T, Schwechheimer K, Rosenblum M, Cavenee W, Vogelstein B. Clonal expansion of p53 mutant cells in associated with brain tumor progression. *Nature* 1992; 355: 846-7.
21. Latif F, Tory K, Gnarr J, *et al.* Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 1993; 260: 1317-20.
22. Duan DR, Pause A, Burgess WH, *et al.* Inhibition of transcription elongation by the VHL tumor suppressor protein. *Science* 1995; 269: 1402-6.
23. Kanno H, Shuin T, Konodo K, *et al.* Somatic mutations of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and loss of heterozygosity on chromosome 3p in human glial tumors. *Cancer Res* 1997; 57: 1035-8.
24. Cohen AJ, Li FP, Berg S, *et al.* Hereditary renal cell carcinoma associated with a chromosomal translocation. *N Engl J Med* 1979; 301: 592-5.
25. Wang N, Perkins KL. Involvement of band 3p14 in t(3;8) hereditary renal carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1984; 11: 479-81.
26. Fults D, Pedone CA, Thomas GA, White R. Allelotype of human malignant astrocytoma. *Cancer Res* 1990; 50: 5784-9.