

두경부암 세포주에서 TPEF 유전자의 methylation 변이

전소영¹ · 김정옥² · 홍수형¹ · 정유경¹ · 장현중³ · 손윤경² · 김정완¹

¹경북대학교 치과대학 구강미생물학교실, ²의과대학 병리학교실,

³경북대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2005;31:468-473)

DNA METHYLATION OF TPEF GENE IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA CELL LINES

So-Young Chun¹, Jung-Ock Kim², Su-Hyung Hong¹, Yu-Kyung Chung¹,
Hyun-Jung Jang³, Yoon-Kyung Shon², Jung-Wan Kim¹

¹Dept. of Oral Microbiology, School of Dentistry, ²Dept. of Pathology, School of Medicine,

³Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Kyungpook National University

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the sixth most common malignancy worldwide. The molecular mechanisms involved in the development and progression of these carcinomas are not well known. Abnormalities of genomic methylation patterns have been attributed a role in carcinogenesis and local de novo methylation at tumor suppressor loci was held to be involved in silencing of tumor suppressor genes. Using Ms AP-PCR, we previously isolated a hypermethylated fragment corresponded to the 5' end of TPEF gene from primary liver and lung cancer cells. To confirm the inactivation of TPEF gene by hypermethylation in HNSCC, we investigated correlation between methylation pattern and expression of TPEF in 10 HNSCC cell lines. In methylation analysis such as combined-bisulfite restriction analysis(COBRA) and bisulfite sequencing, only RPMI 2650 showed none methylated pattern and another 9 cell lines showed dense methylation. The TPEF gene expression level analysis using RT-PCR showed that these 9 cell lines had not or significantly low expression levels of TPEF as compared with RPMI 2650. In addition, the increase of TPEF re-expression by 5-AzaC as demethylating agent in 9 cell lines also indicated that TPEF expression was regulated by hypermethylation. These results of this study demonstrate that epigenetic silencing of TPEF gene by aberrant methylation could play an important role in HNSCC carcinogenesis.

Key words: Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), DNA methylation, Combined-bisulfite restriction analysis(COBRA)

I. 서 론

두경부암은 세계적으로 6번째로 빈번히 발생하는 암으로 조기진단에 필요한 marker가 확립되어 있지 않고 5년간 생존률이 대장암, 자궁경부암, 유방암보다 낮다¹⁾. 두경부암의 암화기전은 다른 상피세포암과 마찬가지로 발암물질에 의해 야기되는 genetic instability, 세포의 증식 및 분화조절 이상과 같은 genetic event 축적으로 생기는 invasive capacity 획득과 같은 다단계적인 일련의 반응에 의해 생기는 것으로 보고되고 있다²⁾.

최근에는 이러한 유전적 변이를 거치지 않고 유전자 발현에 변화를 초래하는 epigenetic event가 암화과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있으며, 이중 DNA 복제 후 methylation이 일어나 유전자발현이 억제되는 DNA methylation이 대표적인 예로 보고되고 있다³⁾. DNA methylation은 CpG dinucleotide의 cytosine 5번 탄소에 methyl기가 결합하여 5-methylcytosine (5-MC)이 형성되는 것으로 methylation에 의해 RNA polymerase 결합이 저해되고 histone deacetylation과 같은 chromatin 구조 변화로 유전자가 영구적으로 불활성화 되는 현상이다⁴⁾. 정상적인 CpG islands methylation에 의한 epigenic으로 여성의 X 염색체 불활성화⁵⁾, genomic imprinting⁶⁾, 포유류 발생과정중 유전자 발현조절⁷⁾ 등이 있으며, CpG island의 비정상적인 methylation은 종양⁸⁾, fragile-X syndrome⁹⁾, immunodeficiency centromeric region instability and facial anomalies syndrom¹⁰⁾과 노화세포¹⁰⁾등에서 보인다. 암화과정에서 methylation되는 부위는 유전자 발현을 조절하는 pro-

김정완

700-412 대구광역시 중구 삼덕동2가 188-1 번지
경북대학교 치과대학 미생물학교실

Jung-Wan Kim

Dept. of Oral Microbiology School of Dentistry, Kyungpook National Univ.
Samduck 2-Ga, 188-1, Jung-Gu, Daegu, 700-412, Korea
Tel: 82-53-660-6831 Fax: 82-53-422-6596
E-mail: jwkim@knu.ac.kr

※ 본 연구는 1995년 경북대학교 연구비에 의하여 연구되었습.

moter로서 종양억제 유전자들의 hypermethylation에 의한 불활성화가 보고되어 있다. 이러한 유전자로, estrogen receptor (유방암)¹¹⁾, glutathion S-transferase (전립선암)¹²⁾, VHL (신세포암)¹³⁾, RB (망막아세포종)¹⁴⁾, hMLH1(대장암)¹⁵⁾, 이외에도 HIC-1¹⁶⁾, p16¹⁷⁾, E-cadherin¹⁸⁾등과 같은 유전자들이 알려져 있다.

암화과정 동안 DNA methylation변이를 수반하는 분자 수준에서의 변화를 규명하여, 유용한 molecular marker의 역할을 할 수 있는 DNA 변이를 찾기 위하여 많은 시도가 행해지고 있다. 지금까지 유전자 염기서열분석¹⁹⁾, PCR을 이용한 methylation 분석²⁰⁾, Southern blotting²¹⁾등이 있으나 이러한 분석법들은 이미 알려진 유전자에 대한 methylation 분석만 가능하므로 알려지지 않은 특정 DNA 분석은 불가능하였다. 새로운 표지자를 찾기 위해서는 정상조직과 종양조직 전체 genome을 대상으로 hypermethylation이나 이에 영향을 받는 유전자를 탐색할 필요가 있다. 선행연구들의 문제점을 보완하기 위해 고안된 방법이 methylation-sensitive arbitrarily primed polymerase chain reaction(MS AP-PCR) 방법²²⁾이다. 이 방법은 gemonic DNA를 methylation-sensitive 및 -insensitive restriction enzymes (e.g., *Hpa* II and *Msp* I)을 미리 처리한 후 AP-PCR을 행하는 것이다. AP-PCR은 PCR의 변형된 방법으로, 임의의 10-20 nucleotide 정도 길이의 primer set를 이용하여 gemonic DNA의 특이한 지문을 얻을 수 있는데, 여러 연구에서 종양에서 일어나는 대립형질의 소실 또는 획득, 하나 또는 여러개의 염기의 소실 또는 삽입 등 다양한 유전자 변이를 탐색하는데 사용되었다. Ms AP-PCR은 비교적 간단하면서 재현성있는 fingerprinting 방법으로 gemonic DNA 모든 영역에서의 methylation 변이를 찾아낼 수 있는 것으로 보고되고 있다.

Liang 등²³⁾은 간암 및 폐암을 대상으로 Ms AP-PCR 방법에 의하여 methylation 변이가 일어난 DNA 단편을 탐색하는 연구를 행하여 왔는데, 그 결과 TPEF의 promoter 부위 및 exon 앞쪽에서 현저한 hypermethylation이 관찰되었다. TPEF는 결장-대장암, 전립선암 및 방과암의 종양화 과정에서도 methylation 변이에 의하여 불활성화 되는 것으로 나타나 암화과정과 밀접한 관련이 있는 것으로 추정되고 있다²⁴⁾.

따라서 본 연구에서는 두경부암 세포주에서도 이 유전자에 methylation 변이가 있는지를 제한효소 *Bst*UI을 이용한 COBRA assay, direct sequencing 방법으로 분석한 후 RT-PCR 방법으로 그 발현 정도를 조사하여 methylation 변이와의 관련성을 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포주 배양 및 DNA 분리

SCC 15, SCC 25, FaDU, CAL 27 그리고 RPMI 2650 등 5종의 세포주는 ATCC (American Type Culture Collection, USA)에서 구입하였고, SNU 585, SNU 899, SNU 1066, SNU 1076, SNU 1214 등 5종은 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Korea)에서 구입하

였다. 세포주의 기원 및 원발병소는 Table 1에 나타내었다.

SCC 15와 SCC 25는 0.4 μ g/ml hydrocortisone을 포함한 DMEM/han's F-12배지에서, FaDU와 RPMI 2650은 MEM 배지에서, CAL27은 DMEM 배지에서, SNU 세포주들은 RPMI 1640 배지에서 모두 10% fetal bovine serum을 첨가하여 5% CO₂ 농도에서 배양하였다. 이들 세포주로부터 DNA를 분리하기 위하여 Sambrook 등²⁵⁾의 방법을 이용하였다. 즉, 세포주를 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) 용액으로 2번 씻어준 후 1 ml의 extraction solution [10 mM TrisCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS, 20 μ l/ml pancreatic RNaseA]를 넣어 끓어 모은 후 centrifuge tube로 옮긴다. 37°C에서 한 시간 방치한 후, 30 μ l의 proteinase K (20 mg/ml)를 첨가하고 50°C에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응물은 각각 phenol (pH 8.0), phenol/chloroform, chloroform의 순서로 한번씩 추출한 후 5,000 \times g로 15분간 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 여기에 0.2 vol.의 10 M ammonium acetate와 0.8 vol.의 isopropanol을 더하여 DNA를 침전시킨 후 70%의 에탄올로 씻고 잘 말린 후 TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 녹여서 사용하였다.

2. Bisulfite Modification

Herman 등²⁶⁾의 방법을 변형하여 genomic DNA의 bisulfite modification을 수행하였다. 즉, genomic DNA 5 μ g을 bisulfite 반응이 잘 일어나게 *Rsa*I로 처리하고 에탄올로 침전시킨 뒤 건조시키고 초순수 50 μ l를 첨가하였다. 이를 최종농도 0.2 M NaOH로 37°C에서 10분간 반응시키고 10 mM hydroquinone 30 μ l와 3 M sodium bisulfite (pH 5.0) 520 μ l를 넣어 섞어 준 뒤 50°C에서 16시간 반응시켰다. Bisulfite modified DNA는 Wizard DNA clean-Up system (Promega, USA)을 이용하여 정제하고 50 μ l의 초순수로 elution한 후 최종농도 0.3M NaOH에서 5분간 37°C에서 반응시켰다. 반응이 끝난 DNA는 에탄올로 침전시킨 뒤 건조하고, 20 μ l의 TE buffer (pH 8.0)에 녹여 -20°C에 녹여 보관하면서 PCR에 사용하였다.

Table 1. Primaty sites and tumor sources of cell lines

Cell lines	Primary sites	Gender/Age, Race
SCC15	Tongue	M/55
SCC25	Tongue	M/70
FaDU	Pharynx	M/56, Caucasian
RPMI 2650	Nasal septum	unknown
CAL27	Tongue	M/56, Caucasian
SNU585	Larynx, supraglottic	M/56, Mongoloid
SNU899	Larynx, glottic	M/56, Mongoloid
SNU1066	Larynx, glottic	M/62, Mongoloid
SNU1076	Larynx, supraglottic	M/60, Mongoloid
SNU1214	Larynx, glottic	M/55, Mongoloid

3. COBRA assay를 이용한 TPEF methylation 분석

TPEF 유전자의 promoter의 methylation 정도를 조사하기 위해 간암과 폐암에서 비교적 methylation 변이가 빈번하게 일어난 것으로 밝혀진 부위를 PCR 방법으로 증폭하였다. 이때 사용된 DNA는 bisulfite에 의해 변형된 것이며 사용한 primers는 5'-TAG AGT TGT ACG AAT TAG TTA TGG TGT TGT(S) 및 5'-CAT CAA CAA TTC CCC TTA TTT CTC TAA A(AS) 이었다. PCR 반응주기는 95°C에서 5분 동안 변성한 후 95°C에서 1분간, 55°C에서 1분간, 72°C에서 1분간으로 35주기 실시하고 마지막으로 72°C에서 10분 동안 진행시켰으며 반응산물은 358 bp였다. 이 PCR 반응산물을 resin (JETSORB, Genomed)으로 정제하여 COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) assay²⁷⁾를 통하여 methylation 변화를 조사하였다. 즉, *BstU* I (New England Biolab)을 처리하여 60°C에서 3시간 반응시켜 2% agarose에서 전기영동하여 CGCG recognition site가 sodium bisulfite 처리 후에도 그대로 CGCG로 유지되어 절단되는지를 관찰하여 methylation 유무를 조사하였다(Fig. 2).

4. Bisulfite sequencing을 통한 TPEF methylation 분석

TPEF 유전자의 methylation된 염기서열을 분석하기 위하여 bisulfite가 처리된 DNA를 COBRA assay에서와 동일한 primer를 사용하여 증폭, 정제한 후 pGEM-T Easy Vector (Promega)에 삽입하고 *E. coli* JM109에 transformation하였다. 이들을 ampicillin (100 µg/ml)/IPTG (0.5 mM)/X-gal (80 µg/ml)이 함유된 LB plate에 도말하여 vector가 transformation된 white colony만 분리하였다. Ampicillin을 포함한 LB 액체배지에 이들을 배양하여 plasmid DNA를 추출하고 *EcoR* I 을 처리하여 2% agarose gel 상에서 원하는 DNA의 삽입을 확인하고 ABI 3100 (Applied Biosystems) automated DNA sequencer를 이용하여 T7 또는 SP6 primer로 염기서열을 분석하였다.

5. Demethylating agent, 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AzaC)의 처리

지름 100mm의 plate당 1×10⁶의 세포주를 분주하고 1.0 µM의 농도로 5-AzaC (Sigma, USA)를 매일 10% FBS를 포함하는 DMEM 1640 배지를 교체하면서 3일간 처리하였다. 그 후 5-AzaC를 넣지 않은 동일한 배지로 하루 더 배양한 뒤 PBS (pH 7.4)로 두 번 씻어내고 세포를 모아서 total RNA를 분리하여 RT-PCR에 사용하였다.

6. RT-PCR

TRIzol reagent (GIBCO BRL, USA)를 사용하여 분리한 total RNA 5 µg을 M-MuLV Reverse Transcription System (MBI Fermentas, Lithuania)을 이용하여 cDNA로 만든 후 다음과 같은

primer를 이용하여 PCR을 실시하였다. TPEF coding 부위에 속하는 289bp를 증폭하기 위하여 5'-ACA CTT TGC GAG GGC TTT T(S) 및 5'-TCT GGT AGC TCT CCC CAT TG(AS)를 primer로 사용하였다. RT-PCR의 내부 대조군으로 GAPDH를 사용하였으며 primer는 GAPDH-238S, 5'-GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT와 GAPDH-238AS, 5'-TTG ATT TTG GAG GGA TCT CG로 238bp를 증폭하였다. PCR의 반응조건은 95°C에서 5분 동안 변성한 후, 95°C에서 1분간, 55°C에서 2분간, 72°C에서 2분간으로 30주기 실시하고 마지막으로 72°C에서 7분 동안 진행시켰다. PCR의 반응산물은 2% agarose gel에서 전기영동 한 후 ethidium bromide로 염색하여 자외선상에서 확인하였다.

III. 결 과

1. COBRA assay를 이용한 TPEF methylation 분석

Genomic DNA를 sodium bisulfite 처리하여 변형 시킨 후 *BstU* I 을 처리한 COBRA assay에서는 조사대상 두경부암 세포주 10주 중 9주 (90%)에서 methylation이 확인되었다(Fig. 1A). RPMI 2650의 경우에는 *BstU* I에 의한 fragmentation 현상이 없는 것으로 보아 methylation이 되어 있지 않은 것으로 나타났다. 반면 다른 세포주에서는 모두 methylation 정도가 높은 것으로 관찰되었다.

2. RT-PCR을 통한 두경부암세포주의 TPEF 발현 양상

두경부암세포주 10례의 TPEF 발현양상을 RT-PCR을 통하여 분석한 결과 methylation이 전혀 관찰되지 않은 RPMI 2650에서는 TPEF 발현정도가 매우 높은 것으로 나타났다. 반면 SCC 15, SCC 25 및 SNU 1214에서는 거의 발현되지 않거나 그 정도가 매우 낮음을 알 수 있었다. 나머지 6주에서는 중간 정도의 발현양상을 나타내었다(Fig. 1B). 5-Aza 처리를 통한 TPEF 재발현 유도 실험에는 발현정도가 매우 낮았던 3주를 포함한 대부분의 세포주에서 발현이 증가하였다. Methylation이 관찰되지 않았던 RPMI 2650은 5-Aza 처리 전, 후에서 발현량의 변동이 없었다(Fig. 1B).

3. Bisulfite 변형 후 direct sequencing을 이용한 TPEF methylation의 분석

Genomic DNA를 sodium bisulfite로 변형한 후 PCR로 증폭, cloning한 후 direct sequencing을 이용한 TPEF methylation의 분석에서는 COBRA assay의 결과를 확인할 수 있었다. 이 부위 안에는 총 17개의 CpG site가 있는 것으로 확인되었으며, 이때 증폭된 5' 부위 및 sequencing 결과 methylation 된 것으로 확인된 CpG sites를 Fig. 2에 나타내었다. 각 세포주 별로 methylation 빈도를 살펴보면, 먼저 FaDU의 경우에는 5개의 clone에서 평균 15.4개 (90.6%)에서 methylation 이 확인되어 가장 높은 빈도를 보였으며, RPMI 2650의 경우에는 예상한 바와 같이 4개의 clone에서

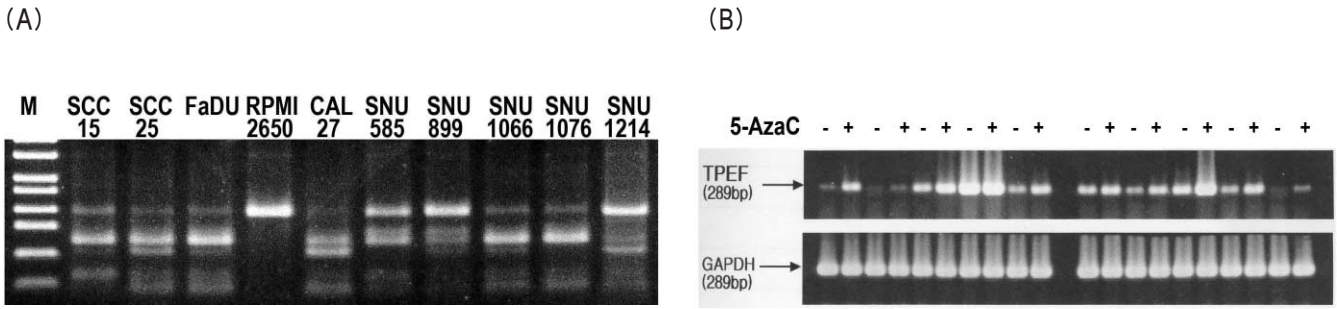


Fig. 1. COBRA assay (A), and TPEF expression by RT-PCR (B) of HNSCC cell lines. (A), A 358-bp PCR fragment cleaved by *Bst*UI when methylation is present in bisulfite-modified DNA. M, 100-bp DNA ladder. (B), cDNA from HNSCC cell lines either untreated (-) or treated (+) with demethylating agent, 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AzaC) was amplified by PCR using TPEF, or glyceraldehyde 3-phosphated dehydrogenase (GAPDH)-specific primers.



Fig. 2. (A) The 5' region of TPEF and PCR product (arrow). Each thick mark represents a CpG site. (B) Sequences of PCR products for COBRA assay and bisulfite sequencing analysis. ↓, *Bst*UI recognition sites for COBRA assay; Underlined sequences indicate the position of primers site of PCR from bisulfite-treated DNA for CpG islands. Positions of CpG sites are numbered 1-17 and are indicated by bold letters.

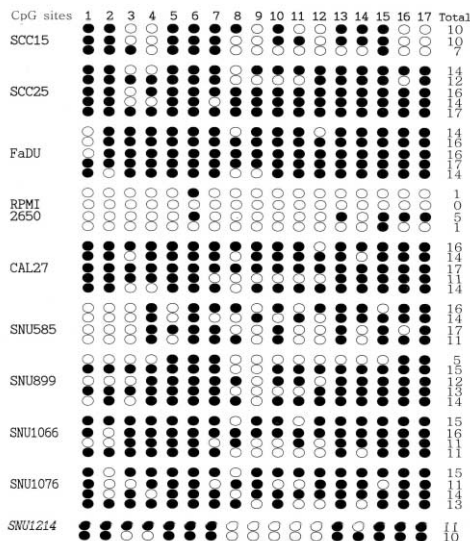


Fig. 3. Bisulfite sequencing data of the 5' region of TPEF in HNSCC cell lines. Closed circles, ●, represent methylated CpG sites, and open circles, ○, represent unmethylated CpG sites. Horizontal rows of circles indicate individual clones that were sequenced after PCR amplification and cloning of bisulfite-modified DNA.

Table 2. Bisulfite sequencing of TPEF in HNSCC cell lines

Cell lines	Total no.of clones	Methylated CpG sites, average(%)
SCC15	3	9.0 (52.9)
SCC25	5	14.6 (85.9)
FaDU	5	15.4 (90.6)
RPMI 2650	4	1.75 (10.3)
CAL27	5	14.4 (84.7)
SNU585	4	14.5 (85.3)
SNU899	5	11.8 (69.4)
SNU1066	5	13.3 (78.2)
SNU1076	4	13.3 (78.2)
SNU1214	2	10.5 (61.8)

평균 1.8개(10.6%)의 CpG site가 methylation 되어 가장 낮은 빈도를 나타내었다. 나머지 세포주에서도 평균 9개(52.9%) - 14.6개(85.9%)의 CpG site가 methylation 되어 있었다(Fig. 3). 이상의 결과를 Table 2에 정리하여 나타내었다.

IV. 고 찰

두경부암을 대상으로 한 DNA methylation 연구는 그리 활발한 편이 아니며, 대부분의 연구도 다른 종양에서와 마찬가지로 p16²⁸⁾, E-cadherin²⁹⁾ 등 잘 알려진 종양억제유전자들을 대상으로 실시되어져 종양화 과정에서 DNA methylation 변이에 영향을 받는 다른 유전자에 대한 보고가 미흡하고, 최근의 연구동향이 epigenetic mutation으로 확장되는 추세임을 감안할 때 두경부암에서 methylation과 관련된 새로운 유전자를 찾는 연구가 무엇보다도 필요하다.

본 연구팀은 Ms AP-PCR 방법을 이용하여 간암, 폐암조직을 대상으로 이러한 연구를 수행하던 중 정상조직과 다르게 hypermethylation 되어 있는 TPEF 유전자의 5' 부위를 분리하였고, 이 부위는 TPEF 5' UTR에서 시작하여 exon 1을 포함하는 전형적인 CpG island의 일부분이었다. TPEF는 Northern blot 분석을 통하여 성인의 측두엽, 시상, 해마 등 뇌영역과 전립선에서 태아의 forebrain에서 활발히 발현되는 것으로 알려져 있으며³⁰⁾, 구조적으로 2개의 follistatin domain과 1개의 EGF domain을 가지는 transmembrane protein으로, follistatin은 activin과 다수의 TGF- β family와 결합하여 그들의 작용을 저해하는 것으로 보고 되고 있다³⁰⁾. 그동안 TPEF와 종양과의 관계에 대한 보고들로, Young 등³¹⁾은 비유전성 대장직장암에서 HPP(=TPEF) 분석을 위해 RsaI 제한 효소 recognition site의 유무를 이용한 COBRA assay를 실시하여 대장직장암에서 46/55 (84%), 선종에서 6/9 (66%), 비대성 용종에서 17/27 (63%)의 높은 빈도로 TPEF가 methylation되어 있음을 관찰하였다. Liang 등³²⁾은 방광암에서 methylation이 높게 나타난 시료를 대상으로 15개의 CpG site의 methylation을 조사하여 그 빈도가 71%이며, methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE) assay를 실시하여 방광암 16례 중 11례 (69%), 대장암은 4례 중 3례 (75%)가 주변 정상조직보다 hypermethylation되어 있음을 보고하였고, 또한 종양조직뿐만 아니라 주위의 정상조직에서도 methylation이 증가하는 현상을 관찰하여 TPEF의 methylation 변이는 전암조직에서 시작되어 종양화 과정 중에 더욱 심화되는 것으로 추정하였다. Uchida 등³³⁾은 tomoregulin (=TPEF)이 MKN 28 위암세포주에서 erbB-4의 tyrosine phosphorylation의 촉진인자로 보고 하였으므로 TPEF가 위장관계의 proliferation, differentiation, 또는 apoptosis에도 관여하는 것으로 추정되고 있다.

본 연구에서는 10종의 두경부암 세포주에서 TPEF 5' 부위의 methylation 분석을 위하여 BstU1을 이용한 COBRA assay로 조사한 결과, RPMI 2650을 제외한 9주의 세포주에서 고밀도의 hypermethylation이 관찰되었다. 이러한 결과는 두경부암 세포주에서의 methylation 변이가 이전의 간암세포주 4/8(50%) 보다

훨씬 높은 빈도로 발생함을 보여준다. 또한 bisulfite sequencing 결과에서도 RPMI 2650을 제외한 모든 세포주에서 clone당 평균 52.9%-90.6%의 CpG site가 methylation되어 있음을 확인하였다. 실제로 이들 세포주의 total RNA를 대상으로 RT-PCR을 행한 결과 RPMI 2650에서 TPEF가 가장 많이 발현되는 것으로 나타났다으며, SCC 15 (52.9%), SCC 25 (85.9%), SNU 1214 (61.8%) 등 세포주에서는 거의 발현이 되지 않았다. 이러한 발현의 차이가 methylation 변이에 의한 것임을 확인하기 위하여 demethylating agent인 5-AzaC를 처리한 결과 RPMI 2650의 경우 전혀 영향을 받지 않았으나 TPEF가 거의 발현되지 않았던 세포주에서는 모두 발현이 증가하였다. 또한 FaDU (90.6%) 및 SNU 1066 (78.2%)의 경우에도 현저한 발현 증가를 보였으며, 나머지 세포주에서도 5-AzaC에 의해 발현정도가 다소 증가한 것으로 나타났다. 이러한 결과로 미루어 두경부암 세포주에서 TPEF의 methylation 유무와 발현정도 간에 관련성이 있는 것으로 확인되었다. 하지만 이러한 결과가 methylation 이외에 다른 negative factor에 의한 영향이거나, 대립형질 소실 등 유전적인 변이에 의한 현상일 수도 있으므로 이에 대한 보완분석이 필요할 것으로 여겨진다.

본 연구의 결과를 종합하면 TPEF는 현재까지 보고된 방광암, 대장직장암, 간암에 이어 두경부암 세포주에서도 methylation 변이에 의해 불활성화 되는 새로운 종양억제 유전자로 추정되며, TPEF promoter의 5' upstream 부위의 methylation 밀도와 발현량이 반비례함을 확인하였다. 앞으로 종양조직을 대상으로 한 연구를 실시하여 두경부암의 조기진단 및 치료에 대한 응용가능성을 모색할 필요가 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Nagler RM: Molecular aspects of oral cancer. *Anticancer Res* 2002;2:2977-2980.
2. Voravud N, Shin DM, Ro JY, Lee JS, Hong WK, Hittelman WN: Increased polysomies of chromosomes 7 and 17 during head and neck multistage tumorigenesis. *Cancer Res* 1993;53:2874-2883.
3. Reik W, Dean W, Walter J: Epigenetic programming in mammalian development. *Science* 2001;293:1089-1093.
4. Baylin SB, Herman JG, Graff JR: Alterations in DNA methylation-A fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 1998;72:141-196.
5. Singer-Sam J, Riggs AD: X chromosome inactivation and DNA methylation. *EXS* 1993;64:358-384.
6. Barlow DP, Stoger R, Herrmann BG, Saito K, Schweifer N: The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature* 1991;349:84-87.
7. Baylin SB, Makos M, Wu JJ, Yen RW, de Bustros A, Vertino P, Nelkin BD: Abnormal patterns of DNA methylation in human neoplasia: potential consequences for tumor progression. *Cancer Cells* 1991;3:383-390.
8. Hansen RS, Gartler SM, Scott RC, Chen SH, Laird CD: Methylation analysis of CGG sites in the CpG islands of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet* 1992;8:571-578.
9. Hansen RS, Wijmenga C, Luo P, Stanek AM, Canfield TK, Weemaes CM, Gartler SM: The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:14412-14417.
10. Issa J-P J, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB: Methylation of the estrogen receptor CpG island links

- aging and neoplasia in human colon. *Nat Genet* 1994;7:536-540.
11. Ottaviano YL, Issa JP, Parl FF, Smith HS, Baylin SB, Davidson NE: Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1994;54:2552-2555.
 12. Lee WH, Morton RA, Epstein JI: Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione-S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:11733-11737.
 13. Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S: Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9700-9704.
 14. Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW, Rapaport JM, Dryja TP: Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet* 1991;48:880-888.
 15. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB: Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:6870-6875.
 16. Kanai Y, Hui AM, Sun L, Ushijima S, Sakamoto M, Tsuda H, Hirohashi S: DNA hypermethylation at the D17S5 locus and reduced HIC-1 mRNA expression are associated with hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 1999;29:703-709.
 17. Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB: Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995;55:4525-4530.
 18. Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A, Shimoyama Y, Sugimura T, Hirohashi S: Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7416-7419.
 19. Pfeifer GP, Steigerwald SD, Mueller PR, Wold B, Riggs AD: Genomic sequencing and methylation analysis by ligation mediated PCR. *Science* 1989;246:810-813.
 20. Singer-Sam J, LeBon JM, Tanguay RL, Riggs AD: A quantitative HpaII-PCR assay to measure methylation of DNA from a small number of cells. *Nucl Acids Res* 1990;18:687.
 21. Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D: High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:3630-3633.
 22. Peinado MA, Malkhosyan S, Velazquez A, Perucho M: Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:10065-10069.
 23. Liang G, Salem CE, Yu MC, Nguyen HD, Gonzales FA, Nguyen TT, Nichols PW, Jones PA: DNA methylation differences associated with tumor tissues identified by genome scanning analysis. *Genomics* 1998;53:260-268.
 24. Liang G, Robertson KD, Talmadge C, Sumegi J, Jones PA: The gene for a novel transmembrane protein containing epidermal growth factor and follistatin domains is frequently hypermethylated in human tumor cells. *Cancer Res* 2000;60:4907-4912.
 25. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning : A laboratory manual*, Cold spring harbor Lab. NY, 2nd, 1998.
 26. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9821-9826.
 27. Xiong Z, Laird PW: COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 1997;25:2532-2534.
 28. Kim HS, Chung WB, Hong SH, Kim JA, Na SY, Jang HJ, Sohn YK, Kim JW: Inactivation of p16INK4a in primary tumors and cell lines of head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cells* 2000;10:557-565.
 29. Nakayama S, Sasaki A, Mese H, Alcalde RE, Tsuji T, Matsumura T: The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001;93:667-673.
 30. Patel K. Follistatin: *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:1087-1093.
 31. Young JP, Biden KG, Simms LA, Huggard P, Karamatic R, Eyre HJ, Sutherland GR, Herath N, Barker MA, Anderson GJ, Fitzpatrick D, Ramm GA, Jass JR, Leggett BA: HPP1: a transmembrane protein commonly methylated in colorectal polyps and cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:265-270.
 32. Uchida T, Wada K, Akamatsu T, Yonezawa M, Noguchi H, Mizoguchi A: A novel epidermal growth factor-like molecule containing two follistatin modules stimulates tyrosine phosphorylation of erbB4 in MKN28 gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;266:593-602.