

# 분화도 좋은 구강 편평상피세포암종에서 Dominant Negative p63 isoform의 발현

김인수 · 김철환 · 김경욱

단국대학교 치과대학 구강외과학교실

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2007;33:191-198)

## EXPRESSION OF DOMINANT NEGATIVE p63 ISOFORM IN WELL-DIFFERENTIATED ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

In-Su Kim, Chul-Hwan Kim, Kyung-Wook Kim

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Dankook University*

The p53 which is well known as tumor suppressor gene is located at 17p13. p53 is a sequence-specific DNA binding transcription factor that responds to certain cytotoxic stresses, such as DNA damage, by enhancing the transcription of genes that regulate cell-cycle progression as well as programmed cell death. The p63 gene that is located at 3q27-29, is recognized members of the p53 family, and responsible for the transcription of 6 isoforms. Three isoforms (TAp63 $\alpha$ , TAp63 $\beta$ , TAp63 $\gamma$ ) contain an N-terminal transactivation (TA) domain and can induce apoptosis. The other 3 isoforms ( $\Delta$ Np63 $\alpha$ ,  $\Delta$ Np63 $\beta$ ,  $\Delta$ Np63 $\gamma$ ) lack the TA domain and may function in a dominant-negative fashion by inhibiting the transactivation functions of p53 and TAp63 proteins, and thus act as oncoproteins.

A number of studies have investigated the role of p63 in human squamous cell carcinomas from different organs. Only a few studies have examined  $\Delta$ Np63 isoform in oral squamous cell carcinoma including normal epithelium. This study aimed to evaluate expression of  $\Delta$ Np63 isoform in human oral squamous cell carcinoma tissue and normal mucosa.

The 3 cases of well differentiated oral squamous cell carcinoma specimen including adjacent normal mucosa were examined, and immunohistochemical study with monoclonal antibody(4A4) and tumor cell apoptosis analysis with Transmission Electron Microscopy were studied. And, RT-PCR analysis was done for expression of  $\Delta$ Np63 isoform.

The results were as followed.

1. Normal gingiva showed the restricted p63 expression in basal cell layer.
2. Well differentiated squamous cell carcinoma showed mainly p63 expression in overall area of malignancy, especially in basal cell layer to adjacent stromal tissue.
3. Tumor cells around keratinized area with no p63 expression disclosed less micro-organelle in decreased size cytoplasm and severe chromatin margination with nuclear destruction that means apoptosis.
4. Comparison of mRNA expression of  $\Delta$ Np63 isoform by RT-PCR showed variable expression of  $\Delta$ Np63 isoform, but  $\Delta$ Np63 $\alpha$  was most highly expressed in all 3 tumor specimen.

From these results, it should be suggested that  $\Delta$ Np63 isoform expression in well differentiated squamous cell carcinoma was closely related to tumor oncogenesis, especially overexpression of  $\Delta$ Np63 $\alpha$  is a most important factor in tumor genesis of oral squamous cell carcinoma.

**Key words:** Oral squamous cell carcinoma, p63 gene

## I. 서 론

종양 발생의 원인 및 진행과정에 대하여는 많은 논란이 있어 왔으나, 분자생물학의 발달로 암의 발생을 유전자 변이로 이해하기 시작하여 많은 연구가 진행되어져 왔다. 암의 발생 및 발전에 관여하는 유전자는 현재 100여개 이상이 보고되고 있으며<sup>1)</sup>, 이는 세포성장과 증식을 조절하는 경로에 관여한다고 알려져 있다. 종양유전자의 비정상적 활성화나 종양억제유전자의 비활성화로 인하여 염색체의 구조 및 형태의 변화는 정

### 김 경 욱

330-716 충남 천안시 안서동 29

단국대학교 치과대학 부속병원 구강외과

**Kyung-Wook Kim**

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Dankook University,

29 Amseodong, Choeran, Chungnam, 330-716, Korea

Tel: 82-41-550-1994 Fax: 82-41-551-8988

E-mail: kkwoms@dku.edu

상세포를 암세포로 변화시킨다. 그중 현재 알려진 종양억제 유전자가 p53 유전자이다. p53은 염색체 17p13에 위치하는 53kDa의 핵인 단백을 생성하는 유전자로서<sup>2)</sup>, DNA 손상 등의 특정 세포 독성 스트레스에 반응하여 세포주기를 조절하는 유전자의 전사과정을 조절하여 이른바 세포예정사멸(programmed cell death) 과정에 참여한다<sup>3,7)</sup>.

p53 유전자의 변이는 인체 종양 중에서 가장 흔하게 나타나며, 특히 두경부에 발생하는 편평세포암종에서는 약 40-50%에서 유전자의 변이가 나타난다<sup>4,8,11)</sup>. 최근에 밝혀진 p53 유전자군 중에서 염색체 1p36에 위치한 p73과 염색체 3q27에 위치한 p63은<sup>12-16)</sup> 약 65 kb으로써, exon과 intron의 구조가 p53과 매우 유사하다<sup>17)</sup>. p63 유전자는 15개의 exon의 구조로 되어 있으며, 최소 6개의 protein을 전사한다. 5' terminal promotor 서 전사되는 mRNA는 전사활성 도메인(transcription activation domain: TA form)을 가지는 p63 isoform( $\alpha, \beta, \gamma$ )을 encoding하며, 3' promoter에서 전사되는 mRNA는 TA domain이 결핍된 domain을 가진 Dominant Negative( $\Delta N$  form)이라 일컫는 p63 isoform( $\alpha, \beta, \gamma$ )을 encoding한다. C-말단부위에 부착되는 각각 다른 TA,  $\Delta N$  isoform에 따라  $\alpha, \beta, \gamma$ 로 분류하여 p63 계통은 TAp63 $\alpha$ , TAp63 $\beta$ , TAp63 $\gamma$ ,  $\Delta Np63\alpha$ ,  $\Delta Np63\beta$ ,  $\Delta Np63\gamma$ 로 isoform이 존재한다<sup>18)</sup>. p63 isoform들은 서로 상호간에 반대적으로 작용하는 기능을 가지고 있으나, isoform들이 서로 조화를 이루며 정상조직의 성장에 관여하고 있다고 알려져 왔다. p63의 TA isoform들은 세포주기를 정지시키거나 세포사멸을 유도함으로써 종양억제 유전자로서 그 기능을 하며,  $\Delta N$  isoform은 그 반대의 기능을 가지며, p53과 TAp63 isoform의 기능에 반하여 stem cell의 성장 유도에 관여한다고 알려져 왔다<sup>15,19,22)</sup>. 또한 이러한 isoform들의 조절 양상은 상피조직의 분화에도 많은 영향이 있다는 것이 최근 밝혀지게 되었다<sup>23,24)</sup>.

p63의 발현에 대한 많은 연구가 시행되어 왔으나,  $\Delta Np63$  isoform과 구강 편평세포암종과 주위 정상조직과의 상관 발현 정도에 대하여 연구한 문헌은 드물다. 본 연구는 구강 편평상피세포암종에서 그 발현 양상을 관찰하고 암종의 치료 및 예후 관찰에 기여하고자 본 연구를 시행하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 연구재료

정상 구강상피조직이 포함된 구강 편평세포암종 조직을 이용하였다. 분화도가 좋은 편평세포암종 조직을 절취하여 중성

포르말린에 고정 후 4 $\mu$ m 파라핀 절편을 제작하고 통법에 의한 H&E 염색을 시행하였으며 광학현미경 하에서 조직병리학적 특징을 관찰하였다.

### 2. 면역조직화학적 검사

절취한 조직을 면역조직화학적 염색을 시행하여 조직병리학적 특성을 관찰하였다. 먼저 절취한 조직을 고정한 후 Poly-L-Lysine으로 처리된 슬라이드에 4-8 $\mu$ m 파라핀 절편을 제작하고 면역조직화학적 염색을 시행하기 위하여 절편을 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 5분간 부란시키고 10mM phosphate buffer solution(PBS)으로 세척한 후 제 1차 항체로 처리한 후(Table 1), LSAB(labelled streptavidin biotin)법으로 처리하고 난 후 발색제로 Diami-nobenzidine을 이용하였다. 조직표본을 발삼으로 봉입한 다음 Mayer's Hematoxylin으로 대조염색을 시행하여 광학현미경으로 200배 하에서 관찰하였다(Table 2).

### 3. 투과전자현미경(TEM)을 이용한 종양 세포의 관찰

종양 조직을 1mm의 크기로 잘라 2.5% glutaraldehyde에 넣은 후 고정액은 acetate veronal를 사용하여 pH 7.2로 완충시키고 1% osmium tetroxide를 사용하여 30-60분 후 고정한다. 고정액을 증류수로 씻어낸 후 알코올로 탈수시키고, n-butyl methacrylate에 침윤시킨 후, 젤라틴 캡슐에 포매하고, 60°C에서 중합하고 촉매제는 1% benzoyl peroxide를 사용하였다. 0.2mm 정도 되는 블록에서 초박 절편을 제작하고 탄소 격자상에 올려놓고 Uranyl acetate와 Lead citrate로 염색한 후 투과전자현미경(JEOL JEA CX II, JAPAN)으로 관찰하였다.

### 4. Total RNA 추출

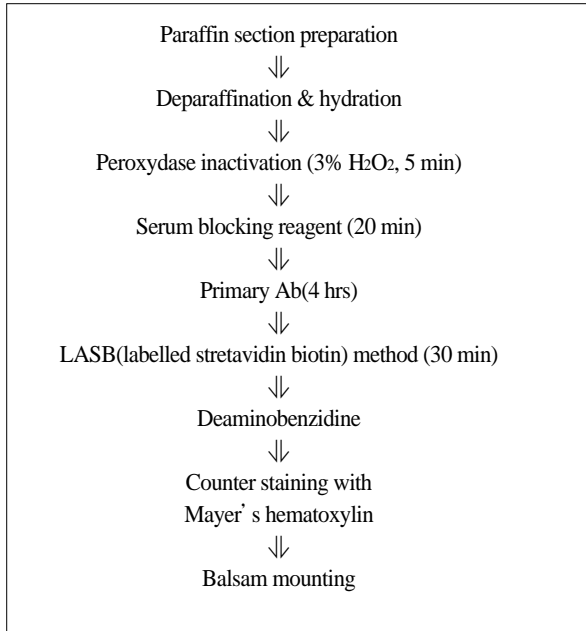
Total RNA를 추출하기 위하여 Guanidinium thiocyanate 방법을 사용하였다. 먼저 RNA 추출 버퍼를 위해 Guanidinium thiocyanate 용액(4 M guanidinium thiocyanate, 1% mercalpethanol, 0.1 M tris-Cl pH 7.5)을 첨가하고 rubber policeman을 사용하여 세포를 긁어 10% sodium lauryl sarcosinate 용액과 혼합하여 최종 농도가 0.5%가 되게 하였다.

10분간 원심분리하여 상층액을 분리한 후, 0.5 ml 2 M potassium acetate(pH 5.5)와 0.8 ml 1 M acetic acid를 첨가한 후, 찬 ethanol을 넣어 -20°C에서 2시간 방치하였다. 상층부를 4°C에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 실온에 말렸다. 건조된 압

**Table 1.** Specification of Primary Antibody Used in This Study

Antibody	Clone	Dilution	Manufacture
Anti-p63(4A4)	monoclonal	1:100	Santa Cruz Biotech, USA

**Table 2.** Procedure for Immunohistochemical Staining



착 결정을 Guanidine-HCl 용액(8 M guanidine-HCl, 0.1 M sodium acetate(pH7.0), 1%  $\beta$ -mercaptoethanol, 20mM EDTA)에 녹이고 -20°C에서 에탄올을 첨가한 후 20°C에서 2시간 방치하였다. 다시 4°C에서 20분간 원심 분리하여 말린 후, 20 mM EDTA(pH 8.0)를 첨가하여 녹인 후, 4:1 비율의 Chloroform/n-butanol을 첨가하여 혼합 후 10분간 원심분리한 후, 4 mM sodium acetate(pH 7.0)를 섞어 -20°C에서 2시간 보관하였다. 4°C에서 20분간 원심시킨 후 건조시켜 얻은 RNA 압착결정에 50  $\mu$ l diethyl pyrocarbonate(DECC)를 첨가하여 용해시켰다. Sodium acetate와 에탄올을 첨가한 후 -20°C에서 2시간 방치하였다. 분광광도계(Simatzu, Japan)를 이용하여 260nm에서 RNA의 양을 측정하였다.

total RNA를 확인하기 위하여 전기영동을 다음과 같이 시행하였다. 10X 3-[N-morpholino] propanesulfonic acid(MOPS), 50mM sodium acetate, 0.5M EDTA(pH 8.0), 10 N NaOH(pH 7.0) 용액에 1% 아가로스 젤을 만들고, 실온에서 젤을 굳힌 후, 3  $\mu$ l RNA, 1.25  $\mu$ l 10X MOPS, 2  $\mu$ l formaldehyde, 6.25  $\mu$ l formamide를 혼합하여 5분간 가열하고, 얼음에 식혔다. 1.25  $\mu$ l 젤 RNA 로딩용액을 섞고, 완충용액으로 1X MOPS를 사용하여, 120V/cm으로 하여 bromophenol blue의 푸른빛이 전체 젤의 2/3까지 나오도록 전기영동을 시행하였다.

5. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Amplification

Total RNA로부터 역전사를 시켜 cDNA를 다음과 같이 만들었다. cDNA는 1  $\mu$ g DNase I으로 처리된 total RNA에 random hexamer primers, 10mM dithiothreitol(DTT), 10mM dNTPs, 10U

**Table 3.** PCR Primers Used in This Study(in 5' -3' direction)

	Sense	Antisense
$\Delta$ Np63 $\alpha$	ATGTTGTACCTGGAAAAACAATG	TCACTCCCCCTCTCTTTG
$\Delta$ Np63 $\beta$	ATGTTGTACCTGGAAAAACAATG	TCAGACTTGCCAGATCCTG
$\Delta$ Np63 $\gamma$	ATGTTGTACCTGGAAAAACAATG	CTATGGGTACTACTGATCGG
Human $\beta$ -Actin	ACCAACTGGGACGATATGGAGAAGA	TACGACCAGAGGCATACAGGGACAA

RNase 및 200U/ $\mu$ l Superscript II reverse transcriptase(Gibco BRL社, USA)를 섞어 40  $\mu$ l를 만들어 42°C에서 60분간 처리하여 cDNA를 만들었다.

이 cDNA를 80  $\mu$ l H<sub>2</sub>O에 희석한 후, 이중 2.5  $\mu$ l cDNA를 사용하여 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH 8.3), 200  $\mu$ M dATP, dTTP, dGTP, biotinylated-dCTP, 각각의 primer 0.75  $\mu$ l, 1 unit Taq-polymerase로 반응물 총량 50  $\mu$ l로 하고 PCR을 사용하여 증폭시켰다. cDNA의 denaturation을 위하여 95°C에서 1분, 증폭을 위하여 95°C에서 30초, 54°C에서 1분, 70°C에서 1분(30cycle), 마지막 확장을 위하여 72°C에서 10분을 시행하였다. 이때 사용된 primer의 sequence는 Table 3과 같다. 대조군으로 사용된  $\beta$ -Actin(822bp)은 95°C에서 1분, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분(30cycle), 마지막 확장을 위하여 72°C 10분으로 시행하였다. PCR 반응물은 2% 아가로스 젤을 사용하여 분리한 후 젤 건조기에 말린 후 enhanced chemiluminescence(ECL), Gibco BRL, USA))방법을 사용하였다. 필름에 노출한 다음 현상을 시행한 후, 텐시토메터를 사용하여 반복 측정하였다. Semi-quantitative method로 각각 mRNA 수준을  $\beta$ -Actin mRNA 수준으로 나누어 평균을 구하여 상호 비교하였다.

III. 연구 결과

1. 면역조직화학적 염색 결과

1) 정상 조직 부위

정상 구강점막 조직세포 부위에서는 모두 p63에 양성반응을 나타내었으며, 정상 점막 세포의 기저층과 부기저층의 상피세포에 국한되어 강하게 발현되었다(Fig. 1).

2) 편평세포암종 부위

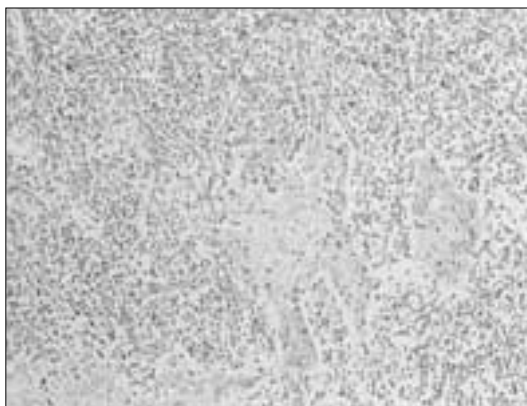
p63의 발현은 분화도가 좋은 편평세포암종에서는 잘 분화된 암종 세포의 염색성 결체조직 주위에 나타났으나 keratin 형성 부위에서는 p63의 발현은 나타나지 않았다(Fig. 2, 3, 4).



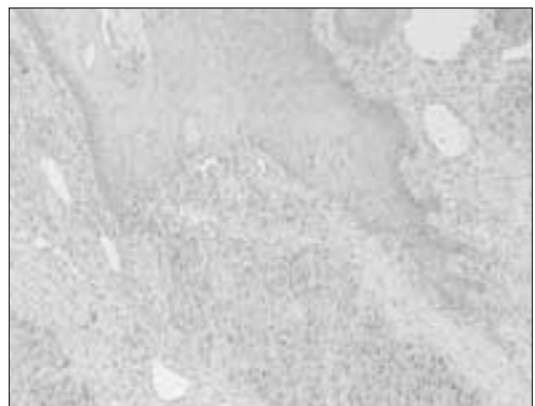
**Fig. 1.** Normal gingiva showed the restricted p63 expression in basal cell layer.



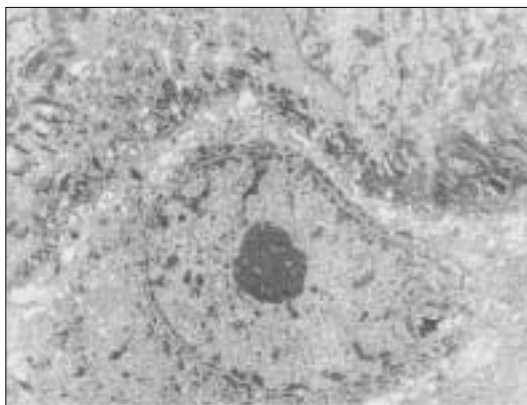
**Fig. 2.** The highest p63 expression in invasive islands of well differentiated squamous cell carcinoma in the back ground of inflammatory connective tissue was seen, but no expression of p63 was in tumor cells around keratinized area.



**Fig. 3.** The highest p63 expression in peripheral portion of invasive islands of well differentiated squamous cell carcinoma in the back ground of inflammatory connective tissue was seen.



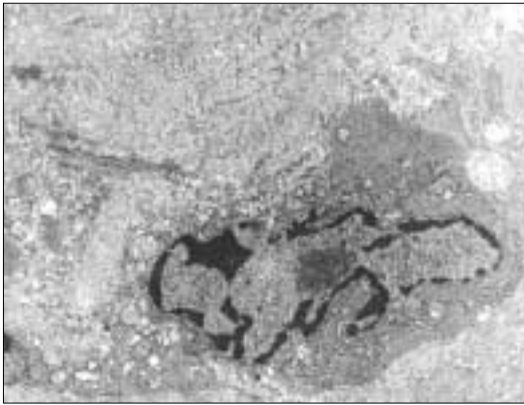
**Fig. 4.** More prominent p63 expression in invasive islands of well differentiated squamous cell carcinoma than main tumor mass showing scattered p63 expression.



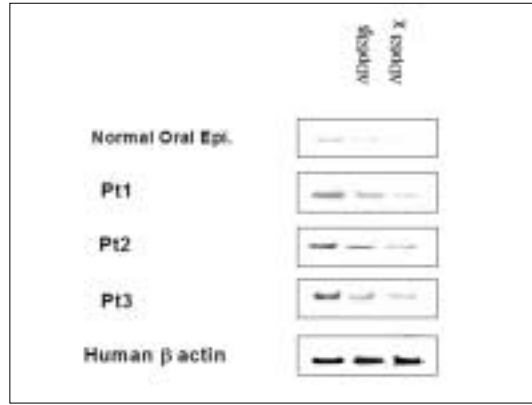
**Fig. 5.** Tumor cells in invasive island disclosed densely organized keratin filament bundles in cytoplasm, numerous villi, and increased n/c ratio with larger nucleoli.



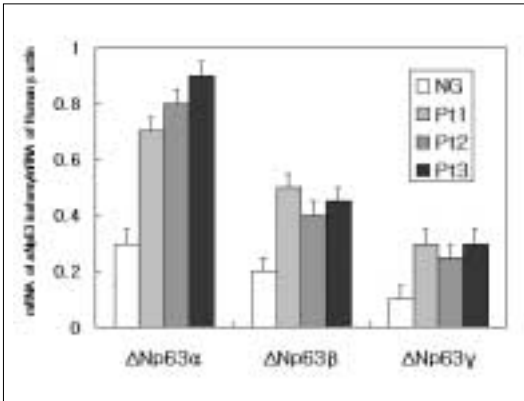
**Fig. 6.** Tumor cells around keratinized area with no p63 expression disclosed densely organized keratin filament bundle, decreased cytoplasm with less micro-organelle in cytoplasm and chromatin margination with nuclear destruction.



**Fig. 7.** Tumor cells around keratinized area with no p63 expression disclosed less micro-organelle in decreased size cytoplasm and severe chromatin margination with nuclear destruction.



**Fig. 8.** Comparison of mRNA expression of  $\Delta$ Np63 isoform by RT-PCR.



**Fig. 9.** Comparison of mRNA determination of  $\Delta$ Np63 isoform by RT-PCR.

### 2. 투과전자현미경(TEM)을 이용한 종양 세포의 관찰

p63의 발현이 없는 keratin 형성 부위의 종양세포는 세포질 내부에 치밀한 keratin bundle filament가 관찰되었으며, 많은 villi가 나타났고, chromatin의 파괴양상이 나타났다(Fig. 5). 또한 세포질 내 소기관의 감소와 염색질의 변연이동 및 핵의 파괴 부위도 관찰되었다(Fig. 6, 7).

### 3. $\Delta$ Np63 isoform mRNA 발현의 비교

정상 구강 각화상피조직 부위와 비교하여  $\Delta$ Np63 isoform mRNA의 발현은 다양하게 나타났으나, 특징적으로 모든 종양에서  $\Delta$ Np63 isoform 중  $\Delta$ Np63 $\alpha$  isoform의 발현이 종양 모두에서 높게 발현되었다(Fig. 8, 9).

## IV. 총괄 및 고찰

P53 종양억제유전자는 인체의 악성종양, 특히 구강의 악성종양에서 가장 널리 관여하는 유전자이다<sup>25</sup>. 최근 연구에 의하면 p53 유전자의 유사체인 p63과 p73의 존재에 대하여 밝혀졌으며<sup>26-28</sup>, 이 중 p63은 염기서열 3q27-29에 위치하며, 각각 다른 단백질의 isoform을 가진다. 이들은 각기 다른 promoter로 인해 전사활성 domain을 가지는 isoform을 TA p63 isoform(transcription-activation domain)이라하며, 전사활성 domain을 가지지 않는 isoform을  $\Delta$ Np63 isoform 이라 명명되어 진다<sup>12,17,29</sup>. C-말단부위에 부착되는 각각 다른 TA,  $\Delta$ N isoform에 따라  $\alpha, \beta, \gamma$ 로 분류하여 p63 계통은 TAp63 $\alpha$ , TAp63 $\beta$ , TAp63 $\gamma$ ,  $\Delta$ Np63 $\alpha$ ,  $\Delta$ Np63 $\beta$ ,  $\Delta$ Np63 $\gamma$ 로 isoform이 존재한다. 모든 p63 isoform들은 DNA binding domain과 hetero-olimerization domain을 가진다.  $\Delta$ Np63 isoform은 NH<sub>2</sub> 말단부위에 transactivation domain이 결여되어 있어 DNA binding site에 경쟁적으로 작용하여 p53 뿐만 아니라, TAp63 isoform의 반대 작용을 나타낸다. TAp63은 p53의 promoter, 즉 p21, GADD45, Bax, mDm2 등을 활성화시키는 역할을 하며, 특히 TAp63 $\alpha$ 에 비해 TAp63 $\beta$ , TAp63 $\gamma$  isoform은 세포사멸 작용을 유도한다고 알려져 있다<sup>12,20,30,31</sup>.  $\Delta$ Np63 isoform은 p53의 기능을 억제하는 작용을 나타낸다. 이 기능은 DNA 결합 부위에서 p53과 TAp63이 DNA binding을 억제함으로써 나타난다. 이는 p53이나 TAp63이 oligomerization domain이나 다른 domain을 통해  $\Delta$ Np63에 의해 격리되는 것으로 알려져 왔다<sup>32</sup>.

p63 유전자는 다양한 단백질을 생성하며, 다양한 isoform의 발현에 따라 그 기능은 종양 발생에 있어 p53과 유사하게 종양억제유전자로 작용하기도 하며, 또는 종양유발유전자로서도 작용하기도 한다<sup>9</sup>. p63에 대한 많은 연구가 인체 각 장기에 발생하는 편평세포암종에 있어 진행되어져 왔으나<sup>26,33-35</sup> p63 isoform에 대한 구강에 발생한 편평세포암종에 대한 그 연구는 빈

약하다. 지금까지 알려진 바로는 p63이 결손된 경우, 사지발달의 장애, 상피조직의 형성, 두개안면발육에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 왔다<sup>22,24</sup>.

최근, 종양질환에서의 연구에서 피부, 비인두, 방광, 후두 등에 발생한 편평상피세포암종에서  $\Delta$ Np63의 면역조직화학적 발현은 나타났으며, 본 연구의 구강 편평상피세포암종의  $\Delta$ Np63의 면역조직화학적 발현 또한 정상 구강점막 조직세포 부위에서는 모두 p63에 양성반응을 나타내었으며, 특히 정상 점막 세포의 기저층과 부기층의 상피세포에 국한되어 강하게 발현되었으며, 편평상피세포암종 부위에서도 발현되었다.

Nylander 등<sup>30</sup>의 최근 연구에 의하면 p63 isoform의 각각 다른 발현에 따라 그 생물학적 작용이 각기 다름을 보고하였다. 그 중  $\Delta$ Np63 isoforms은 G1 세포주기를 억제하여 세포사멸과정에 참여한다고 알려져 있다. 뿐만 아니라, TAp63과  $\Delta$ Np63의 isoform의 발현은 종양피의 중심부인 keratin pearl 형성부위에는 발현이 되지 않고, 주로 종양피의 주변부의 세포층에서 발현된다고 하였으며<sup>27</sup>, 본 연구에서도 위의 연구결과와 유사한 결과를 나타내었다.

TAp63 isoform은 p53-consensus sequence와 결합함으로써, p53 target 유전자를 유도하며, C-말단부위에 inhibitory domain이 존재하여 가장 약한 전사활성인자로 작용한다<sup>12</sup>. TAp63은 세포주기를 억제하며 세포사멸을 유도하는 역할을 한다<sup>15</sup>. 반면,  $\Delta$ Np63 isoform은 전사과정을 유도할 수 없다. 그러나  $\Delta$ Np63 isoform은 DNA binding domain을 가지고 있어, domain negative 방식으로 DNA binding site에 경쟁적으로 작용하거나, p53에 직접적으로 작용함으로써 불활성화를 유도한다. 따라서  $\Delta$ Np63 isoform은 세포사멸의 억제 작용을 나타내게 된다.  $\Delta$ Np63 isoform은 상피조직의 줄기세포에 많이 발현되며, 이는 줄기세포가 분화하기 위해 domain negative 방식으로 작용하여 p53과 TAp63 isoform이 세포주기의 억제나 세포사멸을 방지하는 기능을 하게 된다<sup>20</sup>. 따라서 TAp63과  $\Delta$ Np63의 isoform은 서로 반대의 작용을 나타낸다. 즉 TAp63 isoform은 종양억제의 작용을 가지며, 반면  $\Delta$ Np63 isoform은 종양유발 작용을 가진다. 본 연구의  $\Delta$ Np63 isoform mRNA 발현의 비교에서 정상 구강 각화상피조직 부위와 비교하여  $\Delta$ Np63 isoform mRNA의 발현은 다양하게 높게 발현되었다.

인체에 발생하는 종양의 돌연변이에 관한 연구에서 p63은 거의 돌연변이 현상이 일어나지 않으며, 종양억제의 기능을 하지 않고, 반면 p63 유전자의 증폭과  $\Delta$ Np63 isoform의 높은 발현이 나타나 이 isoform은 종양유도의 역할을 한다고 주장하였다<sup>21</sup>. p63의 발현에 관한 최초의 연구결과에서는 p63의 발현이 주로 중층상피조직의 기저층에서 나타난다고 보고하였으며<sup>18,27</sup>, 피부의 중층상피의 소실을 나타낸 p63이 결여된 동물에서의 유전자 연구에서 p63은 피부상피조직의 발생과정에 중요한 역할을 한다고 하였다<sup>22,24</sup>. 특히 이들의 연구에서는 p63이 각화상피세포의 줄기세포 분화에 특정한 역할을 하는 것을 의미하였다. 또 다른 조직에서, 자궁내막상피세포, 유방, 전립선 등을 포함하는 다양한 상피조직의 줄기세포 인자로도 작용하는

연구 결과들도 발표되었다<sup>12,38-41</sup>.

인체에 발생하는 종양조직 세포주에 관한 연구들에서 상피성 종양의 성장과 발생과정에 역할을 하는 것에 대한 많은 결과들이 발표되었으나<sup>21,27,33,34,37,40-47</sup>, 각각 다른 isoform의 p63의 작용기전에 대한 필요성이 나타나게 되었다. 또한 4A4 단클론 항체법을 이용한 단백질 발현에 관한 연구들이 있어 왔으나, 각각의 p63 isoform에 따른 역할을 규명하지는 못하였다<sup>41,43,45,46,48</sup>. 다클론 항체를 이용한 p63 isoform의 연구들과<sup>34,44,47</sup> RT-PCR 법을 이용한 mRNA 발현 분석법은 주로  $\Delta$ Np63과 TAp63 사이의 발현에 대한 연구에 이용되어져 왔다<sup>12,14,15,27</sup>. 이들의 많은 연구결과는 주로 정상조직과 종양조직에서의 p63 isoform의 발현차이를 규명하는데 초점이 맞추어졌다. 본 연구에서는 RT-PCR 법을 이용하여  $\Delta$ Np63 isoform mRNA 발현의 비교를 정상 구강 각화상피조직 부위와 종양세포와 비교하여  $\Delta$ Np63 isoform mRNA의 발현을 보고자 하였다.

본 연구의 결과에서 구강 편평상피세포암종에서 dominant negative p63 isoform은 종양유발인자로 작용하며 특히  $\Delta$ Np63 $\alpha$ 의 과발현이 종양 발생과정에서 중요한 인자로 생각되었다. 결론적으로 본 연구는 p63 isoform의 복잡한 발현 과정에서  $\Delta$ Np63 isoform인  $\Delta$ Np63 $\alpha$ ,  $\Delta$ Np63 $\beta$ ,  $\Delta$ Np63 $\gamma$ 이 종양 조직에서의 발현이 각기 다르게 나타남을 알 수 있었으며, 그 중  $\Delta$ Np63 $\alpha$  isoform이 종양발생과정에서 가장 높게 발현됨을 알 수 있었다. 그러나 종양발생과정에서의 p63의 isoform의 발현과 이상 조절은, 더 많은 p63에 대한 더 많은 유전자 연구가 따라야 할 것이며, 정상조직과 종양조직에서의 p63의 isoform 발현에 대한 연구도 시행되어야 할 것이다. 또한 p53과 p63의 상호관계에 대한 연구가 진행되어  $\Delta$ Np63 isoform에서의 p53 불활성화 기전을 밝히는 과정도 필요하리라 생각된다.

## V. 결 론

정상 구강상피조직을 포함하는 구강편평상피세포암종 조직을 이용하여, 암종 주위와 함께 조직을 절취하여 중성 포르말린에 고정 후 4  $\mu$ m 파라핀 절편을 제작하고 통법에 의한 H&E 염색을 시행하였으며 광학현미경 하에서 조직병리학적 특징을 관찰하고 Anti-p63(4A4)를 이용한 면역조직화학적 검사와 투과전자현미경상에서의 종양세포의 구조를 살펴보고, 종양조직의 RT-PCR법을 통한 dominant negative p63 isoform의 분석을 통해 조직병리학적 특성을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 면역조직화학적 소견에서는 주위 정상 구강조직에서는 기저 또는 부기층 세포에 양성반응이 국한되어 보였다.
2. 면역조직화학적 소견에서 암종에서의 p63발현이 전 세포층에서 관찰되었으나 대부분 간질세포와 인접하는 기저세포층에서 양성반응을 보였다.
3. 면역조직화학적 소견에서 암진주를 생성하는 주위세포에서는 음성반응 보였고, 이러한 세포들은 투과전자현미경상에서 세포사멸의 소견을 관찰할 수 있었다.

4. RT-PCR 소견에서는 dominant negative p63 isoform은 다양한 발현 양상을 보였으나,  $\Delta$ Np63 $\alpha$ 가 가장 과도한 발현을 나타내었다.

위의 결과에서 구강 편평세포암종에서 dominant negative p63 isoform은 종양유발인자로 작용하며 특히  $\Delta$ Np63 $\alpha$ 의 과발현이 종양 발생과정에서 중요한 인자로 생각되었다.

## 참고문헌

- Bishop JM: Viral oncogenes. Cell 1985;42:23.
- Hayward JR, Regezi JA: Oral dysplasia and in situ carcinoma: Clinicopathologic correlation of eight patients. J Oral Surg 1977; 35:756-762.
- Donehower LA, Harvey M, Slangle BL, McArthur M, Montgomery CA, Butel JS, et al: Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. Nature 1992;356:215-21.
- Levine AJ, Momand J, Finlay CA: The p53 tumor suppressor gene. Nature 1991;351:453-456.
- Irwin MS, Kaelin WG Jr: Role of the newer p53 family proteins in malignancy. Apoptosis 2001;6:17-29.
- Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA: The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. J Oral Pathol Med 2000;29:413-25.
- Prives C, Hall PA: The p53 pathway. J Pathol 1999;187:112-26.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC: p53 mutations in human cancers. Science 1991;253:49-53.
- Ahomadegbe C, Barrois M, Fogel S, Le Bihan ML, Douc-Rasy S, Duvillard P, et al: High incidence of p53 alterations (mutation, deletion, overexpression) on head and neck primary tumors and metastases; absence of correlation with clinical outcome. Frequent protein overexpression in normal epithelium and in early noninvasive lesions. Oncogene 1995;10:4855-78.
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC: Mutations in p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis-is. Cancer Res 1994;54:485-578.
- Ness M, Homann N, Discher H, Andl T, et al: Expression of mutated p53 occurs in tumor distant epithelia of head and neck cancers patients: A possible molecular basis for development of multiple tumors. Cancer Res 1993;53:4189-96.
- Yang A, Kagdah M, Wang Y, et al: p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. Mol Cell 1998;2:305-316.
- Kaelin WG: The p53 gene family. Oncogene 1999;18:7701-7705.
- Trink B, Okami K, Wu L, et al: A new human p53 homologue. Nat Med 1998;4:747-748.
- Osada M, Ohba M, Kawahara C, et al: Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. Nat Med 1998;4:839-843.
- Senoo M, Seki N, Ohira M, et al: A second p53-related protein, p73L, with high homology to p73. Biochem Biophys Res Commun 1998; 30:603-607.
- Marin MC, Kaelin WG Jr: p63 and p73: Old members of a new family. Biochem Biophys Acta 2000;1470:M93-M100.
- A. Yang, M. Kaghad, Y. Wang, E. Gillett, M.D. Fleming, V. Döttsch, N.C. et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29 encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant negative activities. Mol Cell 1998;2:305-316.
- K.M. Liefer, M.I. Koster, X.J. Wang, A. Yang, F. McKeon, D.R. Roop. Down-regulation of p63 is required for epidermal UV-B-induced apoptosis, Cancer Res 2000;60:4016-4020.
- A. Yang, F. McKeon. P63 and p73: p53 mimics, menaces and more. Nat Rev Mol Cell Biol 2000;1:199-207.
- K. Hibi, B. Trink, M. Patturajan, W.H. Westra, O.L. Caballero, D.E. et al. AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:5462-5467.
- A. Yang, R. Schweitzer, D. Sun, M. Kaghad, N. Walker, R.T. Bronson, C. Tabin, et al: p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. Nature 1999; 398:714-718.
- Tsujita-Kyutoku M, Kiuchi K, Danbara N, Yuri T, Senzaki H, et al. p63 expression in normal human epidermis and epidermal appendages and their tumors. J Cut Pathol 2003;30:11-7.
- Mills AA, Zheng B, Wang X-J, Vogel H, Roop DR, Bradley A: p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. Nature 1999;398:708-13.
- Donehower LA, Bradley A: The tumor suppressor p53. Biochim Biophys Acta 1993;1155:181-205.
- Choi HR, Batsakis JG, Zhan F, Sturgis E, Luna MA, El-Naggar AK: Differential expression of p53 gene family members p63 and p73 in head and neck squamous tumorigenesis. Hum Pathol 2002; 33:158-164.
- Crook T, Nicholls JM, Brooks L, O'Nions J, Allday MJ: High level expression of MNp63: a mechanism for the inactivation of p53 in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma (NPC). Oncogene 2000; 19:439-3444.
- Davison TS, Vagner C, Kaghad M, Ayed A, Caput D, Arrowsmith CH: p73 and p63 are homotetramers capable of weak heterotypic interactions with each other but not with p53. J Biol Chem 1999; 274:18709-18714.
- Strano S, Rossi M, Fontemaggi G, Munarriz E, Soddu S, Sacchi A, Blandino G: From p63 to p53 across p73. FEBS Lett 2001;490:163-170.
- Augustin M, Bamberger C, Paul D, Schmae H: Cloning and chromosomal mapping of the human p53-related KET gene to chromosome 3q27 and its murine homolog Ket to mouse chromosome 16. Mamm Genome 1998;9:899-902.
- Osada M, Ohba M, Kawahara C, Ishioka C, Kanamaru R, et al: Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. Nat Med 1998;4:839-843.
- Davison TS, Vagner C, Kaghad M, Ayed A, Caput D, Arrowsmith CH: p73 and p63 are homotetramers capable of weak heterotypic interactions with each other but not with p53. J Biol Chem 1999;274:18709-18714.
- Faridoni-Laurens L, Bosq J, Janot F, Vayssade M, et al: p73 expression in basal layers of head and neck squamous cell epithelium: a role in differentiation and carcinogenesis in concert with p53 and p63? Oncogene 2001;20:5302-5312.
- Nylander K, Coates PJ, Hall PA: Characterization of the expression pattern of p63 $\alpha$  and  $\Delta$ Np63 $\alpha$  in benign and malignant oral epithelial lesions. Int J Cancer 2000;87:368-372.
- Weber A, Bellmann U, Bootz F, Wittekind C, Tannapfel A: Expression of p53 and its homologues in primary and recurrent squamous cell carcinomas of the head and neck. Int J Cancer 2002;99:22-28.
- Nylander K, Vojtesek B, Nenutil R, Lindgren B, Roos G, et al: Differential expression of p63 isoforms in normal tissues and neoplastic cells. J Pathol 2002;198:417-427.
- Parsa R, Yang A, McKeon F, Green H: Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. J Invest Dermatol 1999;113:1099-1105.
- Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, et al: p63 identifies keratinocyte stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;13:3156-3161.
- O'Connell JT, Mutter GL, Cviko A, et al: Identification of a basal/reserve cell immunophenotype in benign and neoplastic endometrium: a study with the p53 homologue p63. Gynecol Oncol 2001;80:30-36.
- Quade BJ, Yang A, Wang Y, et al: Expression of the p53 homologue p63 in early cervical neoplasia. Gynecol Oncol 2001;80:24-29.
- Signoretto S, Waltgreny D, Dilks J, et al: p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. Am J Pathol 2000;157:1769-1775.
- Senoo M, Tsuchiya I, Matsumura Y, et al: Transcriptional dysregula-

- tion of the p73L/p63/p51/p40/KET gene in human squamous cell carcinomas: expression of  $\Delta$ Np73L, a novel dominantnegative isoform, and loss of expression of the potential tumour suppressor p51. *Br J Cancer* 2001;84:1235-1241.
43. Barbareschi M, Pecciarini L, Cangi MG, et al: p63, a p53 homologue, is a selective marker of myoepithelial cells of the human breast. *Am J Surg Pathol* 2001;25:1054-1060.
44. Hall PA, Campbell SJ, O'Neill M, et al: The expression of the p53 homologue, p63 $\alpha$  and Np63 $\alpha$  in normal and neoplastic cells. *Carcinogenesis* 2000;21:153-160.
45. Tannapfel A, Schmelzer S, Benicke M, et al: Expression of the p53 homologues p63 and p73 in multiple simultaneous gastric cancer. *J Pathol* 2001;195:163-170.
46. Di Como CJ, Urist MJ, Babayan I, et al: p63 expression profiles in human normal and tumor tissues. *Clin Cancer Res* 2002;8:494-501.
47. Hall PA, Woodman AC, Campbell SJ, Shepherd NA: Expression of the p53 homologue p63 $\alpha$  and Np63 $\alpha$  in the neoplastic sequence of Barrett's oesophagus: correlation with morphology and p53 protein. *Gut* 2001;49:618-23.
48. Faridoni-Laurens L, Bosq J, Janot F, et al: P73 expression in basal layers of head and neck squamous epithelium: a role in differentiation and carcinogenesis in concert with p53 and p63? *Oncogene* 2001;20:5302-5312.