

구강 편평세포암에서 E-cadherin 유전자의 과메틸화

표성운 · 김영실* · 박지영 · 김창현 · 이 원 · 박민규

가톨릭대학교 의과대학 치과학교실 구강악안면외과, *제주대학교 의과대학 병리학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2008;34:135-140)

THE HYPERMETHYLATION OF E-CADHERIN GENE IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Sung-Woon Pyo, Young-Sill Kim*, Ji-Young Park, Chang-Hyen Kim, Won Lee, Min-Kyu Park

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea,***Department of Pathology, College of Medicine, Cheju National University*

Loss of E-cadherin (E-cad) expression has been found in multiple cancers and is postulated to facilitate tumor cell dissociation and metastasis. Promotor methylation may provides an alternative pathway for loss of gene function. This study evaluated the role of hypermethylation in the down-regulation of E-cad in oral squamous cell carcinoma (OSCC). We examined the E-cad expression by immunohistochemical staining and detected methylation status by methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) in 20 OSCC tissues. Overallly, 12 (60%) cases of hypermethylation of E-cad were detected and we found there were no correlation between methylation and age, histologic grade, lymph node metastasis, tumor size and clinical stage. However, Eleven (73.3%) of 15 samples which was negative for E-cad staining showed hypermethylation of E-cad promotor region. On the other hand, only one (20%) of 5 E-cad positive sample was observed with methylated status. The underexpression of E-cad was found to be related to promotor hypermethylation ($p=0.035$). In conclusion, we suggest that hypermethylation play a role in inactivation of E-cad gene and may be a appreciable biomarker for diagnosis and treatment of OSCC.

Key words: Oral squamous cell carcinoma, E-cadherin, Hypermethylation, Methylation-specific PCR

I. 서 론

구강 편평세포암(구강암)의 발생 과정에 대한 광범위한 연구와 치료 방법의 개선에도 불구하고, 5년 생존율은 약 53%에 불과하며 이 수치는 25년째 큰 차이가 없다. 구강암의 특징은 주위 조직에 침습적이며 빈발하는 경부 임파절 전이로, 결과적으로 국소적 재발과 원격 장기의 전이를 일으킨다¹⁾. 그러므로 국소적 재발을 감소시키거나 억제하는 치료 술식은 구강암의 처치 효율의 제고와 생존율 향상에 큰 도움이 될 수 있다.

종양 세포의 침습과 전이는 세포의 구조 변화를 매개하는 단백질 분자에 의해 세포와 세포 사이 또는 세포와 기질과의 부

착이 조절됨으로써 세포의 탈락과 부착이 반복되는 복잡한 단계를 거쳐 일어난다. 종양 조직에서의 세포 부착 분자의 감소는 종양 세포의 탈분화를 유발하고, 세포 부착과 극성 배열의 소실로 세포와 세포간, 세포와 기저막간의 부착의 상실로 침습성을 갖게 되므로 종양에서 세포 부착 분자의 소실은 침윤과 전이에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁾.

E-cadherin(E-cad)은 주로 상피 세포에서 발현되는 세포 부착 단백질로 침습과 종양 억제 유전자의 하나로 인식하고 있다. E-cad의 발현 감소는 구강암을 포함한 상피성 악성 종양에서 세포 접착성의 감소와 악성도의 증가와 관련되어 있다³⁾. 따라서 E-cad의 down-regulation은 구강암을 비롯한 여러 암종에서 재발과 생존율이 관련된 매우 의미 있는 예후 인자이다. 본 연구진의 최근 연구에 의하면 E-cadherin의 표현 감소가 임파절 전이와 재발 양상에 유의한 의미를 갖는다고 밝혀진바 있다⁴⁾.

어떤 유전자의 발현(expression)은 유전자적 변화(genetic variation)보다 가역적인 후생학적 유전자 변화(epigenetic change)에 의해 불활성화 될 수 있다⁵⁾. 특히 종양 억제 유전자의 프로모터 메틸화 이상(aberrant promoter methylation)에 의한 후생학적 유

표 성 운420-717 경기도 부천시 원미구 소사동 2번지
가톨릭대학교 성가병원 치과, 구강악안면외과**Sung-Woon Pyo**Dept. of OMFS and Dentistry, Holy Family Hospital, The Catholic Univ. of Korea
2 Sosa-dong, Wonmi-ku, Bucheon, Kyunggi-do, 420-717, Korea
Tel: +82-32-340-2130 Fax: +82-32-340-2255
E-mail: spyo@catholic.ac.kr

*이 논문은 2007년도 가톨릭대학교 성가병원 임상 의학 연구비 지원으로 이루어졌음.

전자 변화는 인체 여러 암의 발생과 진행에 중요한 역할을 한다^{6,7)}. 구강암의 경우에도 p16INK4A와 p15INK4B 등 소수의 종양 억제 유전자의 프로모터 메틸화이상에 대한 연구가 보고되고 있다⁸⁾. 이에 따라 구강암의 발생과 진행에 핵심적인 역할을 하는 E-cad 유전자의 변화를 검사함으로써 더 정확하게 구강암을 진단하고 치료하려는 시도가 이루어지고 있다^{9,10)}.

본 연구는 국내에서의 연구가 현재까지 제한적으로 행해진 E-cad 유전자의 프로모터 부위에서의 메틸화 정도 및 단백 발현 양상을 파라핀 포매 조직과 해당 조직에서 얻어진 genomic DNA를 이용하여 methylation-specific polymerase chain reaction(MSP)과 면역 조직화학적 염색을 시행하고, 이 결과를 구강암의 임상적 지표와 관련하여 분석함으로써 구강암의 진단과 치료 후 추적 조사의 정확도를 높일 수 있는 새로운 분자 생물학적 진단법을 수립하려고 시행하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

1996년부터 2005년까지 가톨릭대학교 성가병원에서 구강 편평세포암으로 진단받은 20명의 환자를 대상으로 하였다. 환자의 분포는 12명의 남자(60%)와 8명의 여자(40%)로 평균 연령은 60.3세(범위 30-73세)이었다. 조직 검사 또는 외과적 절제술을 시행받은 후 원발성 부위의 조직을 통상적인 방법으로 포르말린으로 고정하고, 파라핀으로 포매된 절편을 이용하였다. 임상 자료와 추적 자료로써 나이, 성별, 흡연, 음주 습관, 종양의 원발 부위, 종양의 조직 병리학적 분화도(WHO에 따른 분류)와 UICC의 분류에 따른 임상적, 병리학적 TNM 병기 등을 조사하였다.

2. 조직에서 DNA 미세 분리(microdissection)

먼저 파라핀 포매 조직에서 4 μm 두께의 절편을 얻어 H & E 염색하여 종양 세포군을 확인 후, 10 μm 두께의 절편을 확보하여 현미경하에서 관찰하면서 미세 박리하여 표적 세포를 절취하였다. 각 절편으로부터 얻은 구강암 세포조직은 마이크로 튜브에서 xylene으로 2차례 처리하여 파라핀을 제거하였고, xylene은 에탄올을 이용하여 제거한 후 QIAamp tissue kit(Qiagen Inc, GmbH, Germany)를 이용하여 제조사의 지시대로 genomic DNA를 추출하였다.

3. Bisulfite를 이용한 DNA 변형(modification)과 methylation specific 증합효소 연쇄반응(MSP)

DNA의 변형은 문헌에 보고되는 방법¹¹⁾을 참조하여 Epitect Bisulfite kit(Qiagen Inc)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 시행하였다. 약술하면 genomic DNA를 0.2M NaOH에 혼합하여 99°C

에서 변성(denaturation) 후 sodium bisulfite 용액을 넣어 60°C에서 4시간 45분 동안 thermal cycler에서 반응시켜 DNA를 전환시켰다. 메틸화형 유전자 검색을 위해 최종 산물의 크기가 116bp인 M1 primer (TTA GGT TAG AGG GTT ATC GCG T, upstream, nt 846-868)과 M2 primer (TAA CTA AAA ATT CAC CTA CCG AC, downstream, nt 937-960)을 제작하였고, 반응 조건은 94°C에서 3분간 변성 후 94°C에서 30초간 변성, 57°C에서 30초간 결합(annealing), 72°C에서 45초간 연장(extension)을 35 주기(cycle) 시행 후 최종적으로 72°C에서 3분간 연장하였다. 또한 비메틸화형 유전자의 검색을 위해서 U1 (TAA TTT TAG GTTAGA GGG TTA TTG T, upstream, nt 841-864)과 U2 (CAC AAC CAA TCA ACA ACA CA, downstream, nt 918-938)를 제작하였고, 최종 산물의 크기는 97 bp이었다. 반응 조건으로 94°C에서 3분간 변성 후 94°C에서 30초간 변성, 53°C에서 30초간 결합, 72°C에서 45초간 연장을 35 주기 시행 후 최종적으로 72°C에서 5분간 연장하였다. MSP를 위해 genomic DNA 1 μl, 10× 완충액 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 2 μl, 0.2 mM dNTP, RedTaq polymerase (Sigma) 0.5 μl, 2mM 농도의 각각의 primer를 첨가한 후 증류수를 이용하여 최종 반응 용량을 20 μl로 맞추어 시행하였다. MSP 반응산물은 ethidium bromide을 포함한 3% agarose 겔에서 전기 영동 후 자외선을 조사하여 DNA 띠(band)를 관찰하였다.

4. 면역 조직화학적 연구

파라핀 포매조직에서 4 μm 두께의 절편을 얻어 슬라이드에 부착하고, xylene으로 15분 동안 파라핀을 제거하고, 3단계의 에탄올(100%, 95%, 80%)에 각각 담가 xylene을 제거하고 탈수하였다. 내인성 peroxidase의 작용을 막기 위해 조직 절편을 실온에서 0.3% 과산화수소에 30분간 반응시켰다. 항원 수득률을 높이기 위해 조직 절편을 citrate buffer(pH 6.0)에 담가 120°C에서 8분 동안 배양하였다. 비특이적 결합은 희석된 normal horse serum에 30분 동안 배양함으로써 배제하였다. 특이적 면역 반응의 관찰을 위해 제작한 단일클론항체(HECD-1)로 절편을 4°C에서 12시간동안 배양한 후에 biotinylated anti-mouse 2차 항체 (Jackson laboratory, Bar Harbor, MA, USA)를 30분간 적용 후, 완충액으로 수세하고 ABC complex로 다시 30분간 배양하였다. 마지막 발색 과정으로 조직 절편을 2분간 3,3'-diaminobenzidine hydrogen peroxide(DAB Substrate Kit, Vector, Burlingame, CA, USA)로 발색한 후, Mayer's haematoxylin(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)으로 대조 염색하고, 탈수한 조직 절편을 Permount(Fisher Scientific)로 밀봉하였다. 염색된 조직 절편은 임상적 정보가 전혀 없는 병리의사가 반정량적으로 판독하였다. 조직 절편들은 종양의 침범 부위 가장자리에서 세포막이 강하게 염색된 종양 세포의 비율에 따라 분류하였다. 75%이상의 종양 세포의 염색 결과를 보일 때 발현의 보존(positive)으로 정의하고, 75% 미만의 종양 세포가 염색 소견을 보일 때 발현의 감소(negative)로 정의하였다.

5. 통계 분석

E-cad 유전자의 과메틸화 여부에 따른 임상, 병리적 지표와의 연관성과 E-cad 다백의 발현 양상과의 관련성을 Chi-Square test를 사용하여 분석 후 Fisher's exact test로 검증하였고, 유의수준은 p값이 0.05이하일 경우로 하였다.

III. 연구 결과

1. E-cadherin MSP 결과

20례의 구강암 조직에서 genomic DNA를 추출하고 이를 Bisulfite로 변형하고 MSP를 이용하여 증폭하여 과메틸화 여부를 파악한 결과 12례(60%)에서 과메틸화된 프로모터 부위를 갖는 증례를 발견하였다. 과메틸화된 12례 중 10례에서는 M1/M2 primer에 의해서만 증폭되어 116kb의 띠를 관찰하였으나, 2례에서는 M1/M2 primer와 UM1/UM2 primer 둘 다에 의해 증폭되어 116, 97kb의 크기의 띠가 관찰되었다. 단지 UM1/UM2 primer에 의해서만 증폭된 예는 8례(40%)이었다. Fig. 1에서 MSP 시행 후 대표적인 DNA 띠의 관찰 결과를 제시하였다.

2. 연구 대상의 임상병리학적 특징과 과메틸화

20명의 구강암 환자의 증례에서 연령, 조직병리학적 분화도, 임파절 전이 여부, T-분류와 병기(stage)와 E-cad 유전자의 프로

모터부위의 과메틸화와의 관계를 MSP를 이용하여 분석하였다. 구강암 환자의 연령이 60세 이상인 경우 12례 중 9례(75%)에서 프로모터의 메틸화가 나타난 반면, 60세 미만에서 8례 중 3례(37.5%)만이 관찰되었다. 구강암의 조직병리학적 분화도의 경우, 모두 11례의 well-differentiated 증례 중 6례(54.5%), 7례의 moderately differentiated 단계의 증례 중 6례(85.7%)가 관찰되었으나, 분화도가 낮은 poorly differentiated type에서는 발견되지

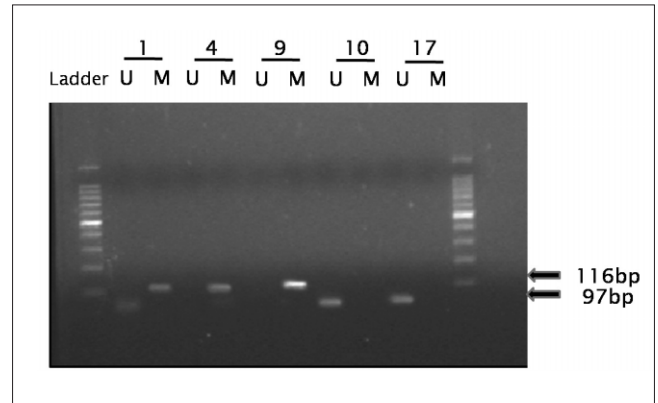


Fig. 1. Representative examples of methylation specific PCR analysis of E-cadherin gene in oral squamous cell carcinoma. Case 4 and 7 showed bands with M1/M2 primers (specific for methylated). On the other hand, case 10 and 17 resulted in amplification with the primers U1/U2 (specific for unmethylated). M: methylated, UM: unmethylated.

Table 1. E-cadherin methylation distribution according clinical variables

Variables	E-cadherin Methylation		p-value
	Presence, n (%)	Absence, n (%)	
Age			
≤60 (n=8)	3 (37.5)	5 (62.5)	p=0.094
>60 (n=12)	9 (75)	3 (25)	
Histologic grade			
Well (n=11)	6 (54.5)	5 (45.5)	p=0.079
Moderately (n=7)	6 (85.7)	1 (14.3)	
Poorly (n=2)	0	2 (100)	
Lymph node			
No (n=10)	8 (80)	2 (20)	p=0.068
Yes (n=10)	4 (40)	6 (60)	
Tumor size			
T1+T2 (n=9)	4 (44.4)	5 (55.6)	p=0.199
T3+T4 (n=11)	8 (72.7)	3 (17.3)	
Clinical stage			
S1+S2 (n=5)	3 (60)	2 (40)	p=1.00
S3+S4 (n=15)	9 (60)	6 (40)	
Total	12 (60)	8 (40)	

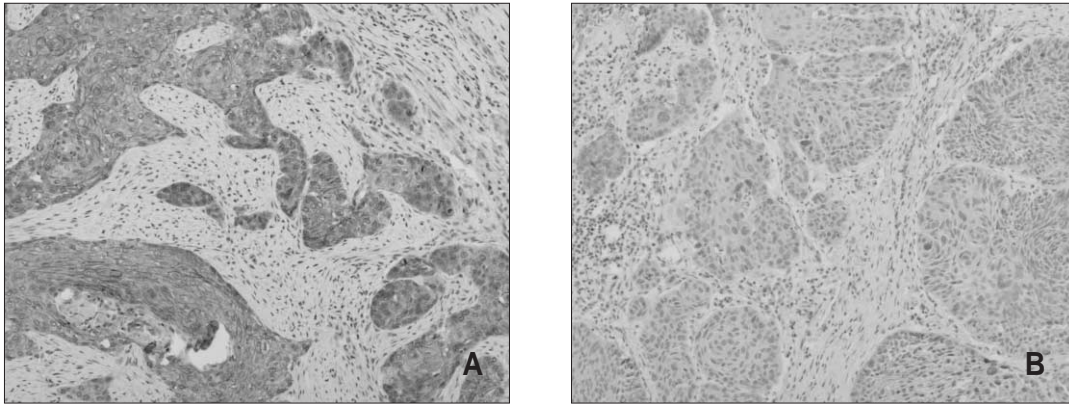


Fig. 2. Immunohistochemical staining pattern in oral squamous cell carcinoma. (A) Preserved staining of E-cadherin shows distinct and evenly distributed membrane staining and (B) reduced staining of E-cadherin with heterogeneous staining with mixed negative and positive cells (DAB staining, × 100).

Table 2. The correlation of E-cadherin expression and methylation

E-cadherin expression	Methylation		p-value
	Presence, (%)	Absence, (%)	
Negative (n=15)	11/15 (73.3)	4/15 (26.7)	p=0.035
Positive (n=5)	1/5 (20)	4/5 (80)	
Total	12 (60)	8 (40)	

않았다. 임파선 전이 여부에 따른 결과에서도 MSP 결과 임파선 전이가 있는 증례중 40%에서 과메틸화가 관찰되었으나, 임파선 전이가 없는 증례에서도 80%에서 과메틸화가 관찰되었다. 종양의 크기에 따른 분류에서 11례의 T3+T4에서 8례(72.7%)가 나타났으며, T1+T2 증례는 44.4%에서 관찰되었다. 임상적 병기와의 관계에서 S3+S4 12례중 9례(60%)에서 관찰되었으며, S1+S2 5례중 3례(60%)가 관찰되어 동일한 비율로 MSP 결과가 나타났다(Table 1).

3. E-cadherin 단백질의 면역조직화학 염색과 과메틸화

20개의 조직 표본중 5개(25%)에서 E-cad 단백질이 구강암 세포의 세포막에 분명하고 균질하게 분포된 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 15개(75%)의 증례에서는 E-cad 단백질이 세포막에서 부분적으로 발현되거나 또는 비균일한 염색 소견과 양성 세포와 음성 세포가 혼재된 양상을 나타내었다. 일부의 경우는 발현이 관찰되지 않아 감소된 것으로 판정하였다(Fig. 2).

E-cad 단백질의 발현이 보존된 경우에서 5례중 1례(20%)에서 그리고 발현이 감소된 15례에서 11례 (73.3%)에서 과메틸화가 관찰되었으나, 반대로 정상적인 E-cad 유전자 프로모터를 보인 증례에서는 발현이 보존된 5례중 4례(80%)에서, 그리고 발현이 감소된 경우는 15례중 4례(26.7%)에서 메틸화가 나타나

지 않았다. 따라서 E-cad 단백질의 발현의 감소는 E-cad 유전자의 과메틸화 경향과 서로 유의성이 있는 것으로 밝혀졌다 (p=0.035)(Table 2).

IV. 총괄 및 고찰

암은 암유전자의 활성화와 종양억제 유전자의 비활성화의 축적으로 발병한다. 종양억제 유전자의 기능이 상실되는 기전에는 유전학적 변화와 후생학적 유전자의 변화로 나눌 수 있다. 전자의 경우는 점 돌연변이(point mutation)나 탈락(deletion) 등 유전자의 부호 결정 염기 서열(coding sequence)이 변화되어 나타나며, 후자는 염기 서열의 변화없이 유전자의 발현에 변화가 오는 것으로 대표적 요인으로 프로모터의 메틸화 이상이다^{7,13,14}. 메틸화는 인체 genome의 DNA 염기중 CpG 서열(dinucleotide sequence)의 cytosine(Cp)에 메틸기(methyl基)가 붙는 것이다. 인체 genome DNA에는 유달리 CpG 서열이 집중되어 나타나는 부위가 있으며, 이를 CpG 제도(islands)라고 한다. CpG 제도는 주로 유전자의 앞(5' position)의 프로모터 부위에서 발견된다. 인체 유전자 중 약 절반의 경우 프로모터에 CpG 제도가 발견되며, 이는 정상적으로 메틸화가 없이 나타난다. 프로모터의 CpG 제도가 비정상적으로 메틸화가 되면, 그리고 그 정도가 심한 경우에는 그 하방의 표적 유전자의 발현은 차단

되며, 그 결과 그 유전자는 염기 서열이 정상적으로 존재함에도 불구하고 기능을 잃는다. 특히 종양 억제 유전자가 프로모터 메틸화로 기능을 상실하면 그 세포는 암세포화하기 쉽다^{13,15}.

E-cad의 발현 감소는 인체 여러 종류의 암과 구강암에서 종양의 침습성과 관련성이 있다^{3,4,11,16}. E-cad 발현 감소의 원인은 아직까지 완전히 규명되지 못하였다. E-cad 유전자의 대립형질(allelic loss)가 유방암, 전립선암의 30-50%에서 보고되었다^{17,18}. 그러나 E-cad 유전자의 염기 서열의 변이는 매우 드문 것으로 드러났으며¹⁹, 특히 구강암의 SSCP 분석에서 하나도 관찰되지 않았음이 보고된 바 있다²⁰. 반면 구강암을 비롯한 여러 종양에서 CpG 프로모터 부위의 메틸화가 유전자의 불활성화와 관계있음이 대두되고 있다^{6,7,20}.

이 연구에서 전체적인 메틸화의 빈도는 60%로 기존의 연구 결과와 같거나¹¹, 약간 낮았다¹⁰. 이는 파라핀에서 포매된 조직에서 소량의 구강암세포를 분리하여 이들 중에서 genomic DNA를 추출하여 증폭하는 과정 중에서 충분한 양의 DNA가 확보되지 못하였고 또한 조작 과정에서 DNA의 소실이 있었을 것이라고 추정되었다. 그러나 최철영 등⁸의 연구에서도 파라핀 포매 조직의 유용성을 주장한 바 있어 효율성 있는 검체라고 사료되며, 모든 검체 조직에서 GAPDH 유전자가 증폭되었으므로 위의 가능성 보다는 배제하였다. 향후 연구 과제로 과메틸화된 프로모터 부위의 sequencing을 통해 E-cad의 유전자 서열을 확인하는 것이 primer의 정확성과 실험적 오류를 피할 수 있는 방법으로 사료된다. Sequencing은 MSP의 한계를 보완하여 메틸화의 정도와 위치를 정확하게 알려주며, 과메틸화를 정확하게 확인할 수 있을 것이다²¹. 이번 연구에서는 메틸화 이상이 정상 유전자 상태와 혼재할 경우가 있을 때, 즉 U primer와 M primer에 동시에 증폭된 때가 관찰된 경우 CpG부위의 메틸화 이상이 있다고 판단하였다. 향후 sequencing을 통해 CpG부위 중 절반 이상이 메틸화되어 있을 경우에 한해서 과메틸화, 또는 메틸화 이상이 있다고 판정하여야, 과메틸화가 유전자의 발현을 차단하였다고 주장할 수 있으며, 이에 따라 구강암 진단에 중요한 가치가 있을 것으로 사료된다.

이 연구에서 구강암 환자의 연령이 60세 이상인 경우 12례 중 9례(75%)에서 프로모터의 메틸화가 나타난 반면, 60세 미만에서 8례 중 3례(37.5%)만이 관찰되었다. 이는 프로모터의 메틸화가 발암 뿐 아니라 발생과 성장등 생리 현상이나 노화(aging)과 관계있다는 기존의 연구에 일치된다²². 즉 노화에 따라 종양 억제 유전자의 하나인 E-cad의 부유전자적(epigenetic) 이상이 증가한다는 이론에 동조된다고 생각된다.

그리고 조직병리학적 분화도에 따른 메틸화의 빈도는, 모두 11례의 well-differentiated 증례 중 6례(54.5%), 7례의 moderately differentiated 단계의 증례 중 6례(85.7%)가 관찰되었으나 분화도가 낮은 poorly differentiated type에서는 발견되지 않았다. 잘 분화된 구강암보다는 분화도 낮은 암종에서 E-cad의 발현이 감소된다고 보고한 기존의 연구 결과에 상반되었으나²³, 과메틸화와 분화도 차이에 관한 통계적 유의성은 발견할 수는 없었다.

E-cad의 발현이 억제될 경우 경부 임파선으로 전이가 증가한다고 발표되었으며^{4,11}, 과메틸화에 따른 유전자 이상으로 발현이 저하될 수 있을 것으로 예상되었다. 그러나 MSP 결과 임파선 전이가 있는 증례 중 40%에서 과메틸화 경향이 있었으나, 임파선 전이가 없는 증례에서도 80%에서 과메틸화가 관찰되어 통계학적인 의미가 없었다. 종양의 크기에 따른 분류에서 종양이 국소적으로 많이 진전된 상태인 11례의 T3+T4에서 8례(72.7%)가 나타났으며, 타 해부학적 구조로의 침습이 없는 T1+T2증례는 44.4%에서 관찰되었다. 임상적 병기와 관계에서 크기와 주변 조직이나 임파절로 전이가 예상되는 진행된 증례인 S3+S4 12례 중 9례(60%)에서 관찰되었으며, 상대적으로 초기인 S1+S2 5례 중 3례(60%)가 관찰되어 동일한 비율로 MSP 결과가 나타났다. 현재까지 구강암의 유발 과정과 병소 진행에 따른 메틸화와 관계를 파악한 연구가 보고된 바 없으므로, 향후 다양한 단계를 갖는 증례의 연구 재료의 확대를 통해 실험 결과의 확인이 필요할 것이다.

여러 종류의 암에서 E-cad 프로모터의 과메틸화 이상이 원발 부위의 E-cad 단백질의 발현 감소를 유도하고 이에 따라 임파절 전이와 국소적 재발과 관계있음이 여러 논문에서 지적되고 있다^{24,25}. 이번 연구에서 과메틸화가 E-cad 단백질의 발현 감소와 유의한 상관 관계가 있음이 밝혀진 것을 감안할 때, 구강암의 발생과 전이에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 여겨진다. 따라서 정상 구강 점막 조직과 구강암 전암 병소를 포함하는 연구 재료의 추가 확보를 통해 이번 실험을 재현함으로써 이번 연구의 결과를 검증할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 E-cad 단백질의 발현이 감소된 15례 중 4례에서는 E-cad 유전자의 과메틸화를 발견할 수 없었음을 무시할 수는 없다. 이는 과메틸화가 E-cad 발현 상실의 주된 기전이지만 유전자의 결손 또한 중요한 요인으로 작용할 수 있거나 다른 기전이 있다고 사료된다.

본 연구를 통해 과메틸화가 구강암의 임상적 특징과 E-cad 발현에 기여하는 역할을 밝힘으로, 이 결과를 생물학적인 표지자로 사용하여, 진단 과정에서 치료 방법의 선택에 도움을 줄 수 있을 것이며, 이를 임상적으로 적용할 경우 국소적 치료 효율의 개선을 도모할 수 있으리라 사료된다. 향후 연구를 수행하여 E-cad 뿐 아니라 다른 전이 관련 유전자 간의 관계를 규명함으로써 구강암 발생 과정 면에서 중요한 정보를 제시하여, 구강암의 발생에 대한 이해를 높일 수 있으며, 새로운 전이 이론을 정립할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

20명의 구강암 환자의 파라핀 포매 조직에서 E-cad 유전자의 프로모터 부위에서의 메틸화 정도 및 E-cad의 단백질 발현 양상을 genomic DNA의 MSP 분석과 면역 조직화학적 염색을 시행하고, 구강암의 임상적 지표와 관련하여 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 20례중 12례(60%)에서 프로모터의 과메틸화가 관찰되었다.
2. 연령, 조직병리학적 분화도, 임파절 전이 여부, T-분류, 병기와 E-cad 유전자의 프로모터 부위의 과메틸화와의 관계는 통계적으로 유의하지 않았다.
3. E-cad 유전자의 과메틸화 상태는 단백질 발현의 감소와 밀접한 관련이 있었다(p=0.035).

참고문헌

1. Smith BD, Haffty BG: Molecular markers as prognostic factors for local recurrence and radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Radiat Oncol Invest* 1999;7:125-144.
2. Pignatelli M, Vessey CJ: Adhesion molecule ; Novel molecular tools in tumor pathology. *Hum Pathol* 1994;25:849-856.
3. Shiozaki H, Tahara H, Oka H, et al.: Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. *Am J Pathol* 1991;139:17-23.
4. 신재명, 김영실, 김창현, 표성운: 구강 편평세포암종에서 E-cadherin의 발현과 임상병리학적 지표와의 관계. *대구약외지* 2005;31:1-7.
5. Herman JG, Jen J, Merlo A, Baylin SB: Hypermethylation associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B1. *Cancer Res* 1996;56:722-7.
6. Widschwender M, Jones PA: DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene* 2002;21:5462-82.
7. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG: A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001;61:3225-9.
8. 최철영, 추정엽, 류숙경, 조남표: 구강 편평세포암종에서의 p16INK4A와 p15INK4B 발현과 메틸화의 관계. *대구약병지* 2003;27:177-185.
9. 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 carcinoma. *Int J Cancer* 2001;93:667-673.
10. Yeh KT, Shih MC, Lin TH, Chen JC, Chang JY, Kao CF, et al.: The correlation between CpG methylation on promoter and protein expression of E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2002;22:3971-6.
11. Chang HW, Chow V, Lam KY, Wei WI, Yuen APW: Loss of E-cadherin expression resulting from promotor hypermethylation in oral tongue carcinoma and tis prognostic significance. *Cancer* 2002;94:386-92.
12. Ribeiro-Filho LA, Franks J, Sasaki M, Shiina H, Li LC, Nojima D, et al.: CpG Hypermethylation of Promoter Region and Inactivation of E-cadherin Gene in Human Bladder Cancer. *Molecular Carcinogenesis* 2002;34:187-198.
13. Widschwender M, Jones PA: The potential prognostic, predictive, and therapeutic values of DNA methylation in cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:17-21.
14. Johnson PJ, Lo YM: Plasma nucleic acids in diagnosis and management of malignant disease. *Clin Chem* 2002;48:1186-93.
15. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Harada K, Virmani AK, Zochbauer-Muller S, et al.: Aberrant promotor methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathologic features. *Cancer Res* 2001;61:8659-63.
16. 표성운, 이광배, 김영실, 이상화: 구강 편평세포암종에서 E-cadherin과 β -catenin의 발현과 임상병리학적 특징. *대약성외지* 2006;28:396-402.
17. Sato T, Tanigami A, Yamakawa K, et al.: Allelotype of breast cancer; cumulative allele losses promote tumor progression in primary breast cancer. *Cancer Res* 1990;50:7184-9.
18. Carter BS, Ewing CW, Ward WS, et al.: Allelic loss of chromosomes 16q and 10q in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:8751-5.
19. Stone S, Bevan S, Cunningham E, et al.: Low frequency of germline E-cadherin mutations in familial and nonfamilial gastric cancer. *Br J Cancer* 1999;7:1935-7.
20. Saito H, Takazawa H, Uzawa K, Tanzawa H, Sato H: Reduced expression of E-cadherin in oral squamous cell carcinoma; relationship with DNA methylation of 5' CpG island. *Int J Oncol* 1998;12:293-8.
21. Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A: Bisulfite genomic sequencing; systemic investigation of critical experimental parameters. *Nucl Acids Res* 2001;29:E65-5.
22. Bornman DM, Mathew S, Alsrueh J, Herman JG, Gabrielson E: Methylation of the E-cadherin gene in bladder neoplasia and in normal uroepithelium from elderly individuals. *Am J Pathol* 2001;34:187-98.
23. Graff JR, Gabrielson E, Fujii H, Baylin SB, Herman JG: Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG islands are unstable and reflect dynamic, heterogenous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J Biol Chem* 2000;275:2727-32.
24. Nass SJ, Herman JG, Gabrielson E, Iversen PW, Parl FF, Davidson NE, et al.: Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5' CpG islands increases with malignant progression in human breast cancer. *Cancer Res* 2000;60:4346-8.
25. Tamura G, Yin J, Fleisher AS, Zou T, Abraham JM et al.: E-cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:569-73.