

대장암 조직에서 cDNA Microarray의 초기경험

원자력의학원 원자력병원 외과, ¹진단검사의학과, ²이화여자대학교 의과대학 외과학교실

김충수 · 이령아² · 홍영준¹ · 홍석일¹ · 황대용

Early Experience with a cDNA Microarray in Colorectal Cancer

Chung-Su Keum, M.D., Ryung-Ah Lee, M.D.², Young-Joon Hong, M.D.¹, Seok-Il Hong, M.D.¹, Dae-Yong Hwang, M.D.

Departments of Surgery and ¹Laboratory Medicine, Korea Cancer Center Hospital, Korea Institute of Radiological & Medical Sciences, Seoul, Korea, ²Department of Surgery, College of Medicine, Ewha Woman's University, Seoul, Korea

Purpose: A cDNA microarray is a systematic method to identify key molecules for prognosis and for treatment response by profiling thousands of genes expressed in a single cancer. The clinical value of cDNA microarray is still being investigated in various fields. This technique could be used in detecting molecules important for cancer to develop, to monitor the effect of new cancer therapeutics, and to give a prognosis for cancer patients. We now report the results of our initial cDNA microarray data to analyze the genome pattern of colorectal cancer tissues and to evaluate the possibility of using cDNA microarrays in a clinical setting for cancer patients.

Methods: We used the general cDNA microarray technique with a 2.4 K cDNA chip provided by Macrogen company. RNA extracted from seven colorectal cancer tissues was amplified by using RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction), and applied to a cDNA chip to produce an antigen-antibody reaction. The results were analyzed individually and hierarchically.

Results: All seven tested cancer tissues were harvested from operative specimens at the Korea Cancer Center Hospital. The male-to-female ratio was 4 to 3. Five patients were TNM stage II, and two patients were stage III. Eighteen genes were upregulated in stage II patients, and 51 in stage III patients. The number of genes discriminating stage was 69, including 8 control genes, 4 ribosomal genes, 5 EST genes, 10 known non-functional genes, 23 genes of

unknown function, and 19 possible cancer-related genes. A hierarchical graph showed similar patterns within a stage, which suggests that genetic patterns might affect clinical characteristics.

Conclusions: Seven colorectal cancer tissues were analyzed with the cDNA microarray technique using 2.4 K cDNA chip. Authors could identify 69 genes that showed the significant change of expression. Although our reports presented the preliminary results, we think that the cDNA microarray will be able to offer an informative results to predict cancer development and progression in colorectal cancer. *J Korean Soc Coloproctol 2003;19:341-348*

Key Words: Colorectal neoplasms, cDNA microarray
결장직장종양, cDNA microarray

서 론

인간의 유전자 지도가 완성되었다고 발표된 이후 많은 연구자들은 유전자의 기능을 확인하여 현재 중대한 보건 문제로 인정되는 여러 종류의 질환의 발생을 상당 부분 이해할 수 있을 것으로 기대하였다.^{1,2} 이러한 추세와 함께 과거에 개별적인 유전자에서 각각의 정보를 얻고 연구한 유전자가 그 질환과 관련이 있는지 알아보는 여러 단계의 실험을 시행하는 단계에서 많은 유전자들을 대량으로 한번에 확인하고 연관성을 파악하고자 하는 시도들이 시작되었다.

Complementary DNA microarray는 이러한 시도의 하나로써 약간씩 의미가 다르기는 하나 cDNA chip, gene microarray, gene chip, genome chip 등 여러 용어와 혼용되고 있는 최첨단 기술이며, 이는 실리콘이나 유리 등의 고체 표면 위에 수천~수만 가지의 DNA 조각을 정해진 위치에 부착시킨 chip이다. DNA library에서 가능성이 있는 수천 또는 수만의 유전자를 선택하여 그 cDNA를 정밀기계를 사용하여 특수한 작은 판에 미리 붙여두고 정보를 얻기 원하는 검체에서 추출한 RNA를 반응시켜 검체에서의 유전자 발현 정도를 정상 조직에서의 발현 정도와 비교하여 한번에 대량의 유전

책임저자: 이령아, 서울시 양천구 목 6동 911-1
이화여자대학교 목동병원 외과(우편번호: 158-710)
Tel: 02-2650-2659, Fax: 02-2644-7984
E-mail: ralee@ewha.ac.kr

본 연구의 요지는 2001년 제53차 대한외과학회 추계학술대회에서 구연 발표하였음.

본 연구는 원자력의학원 자체연구개발사업비의 지원으로 이루어졌음.

자 정보를 얻는 것이 기본 원리이다.³ 따라서, 과거 southern blot, northern blot, DNA sequencing 등의 방법을 이용하여 각각의 유전자 정보를 개별적으로 확인 하던 것을 단번에 미량의 시료만으로 대량의 정보를 얻을 수 있다는 것이 큰 장점이다. 또한 분석하고자 하는 DNA 조각에 형광물질을 표지하게 되므로 그 발광 정도를 측정하면 유전자의 발현의 정도도 확인할 수 있다. 임상적으로는 여러 종류의 희귀병과 유전병, 그리고 암 등의 질환의 진단, 치료 반응의 예측 등에 사용될 가능성이 있으며⁴ 그 외에도 신약개발이나 돌연변이나 유전자 다형성의 대량 분석,⁵ 병원균의 검출 등⁶의 분야에서도 활용 가능성이 매우 높으므로 현재 활발하게 연구가 진행 중이다.

대장암은 서구에서는 오래 전부터 주요 암종의 하나였고 국내에서도 최근 10년간 점차 증가하는 양상을 띠고 있다. 2001년 보건 복지부 자료에 의하면 남자의 경우 위암, 폐암, 간암에 이어 4위에, 여자의 경우는 유방암, 위암에 이어 3위의 발생빈도를 보고하고 있다. 또한 암관련 사망통계에서도 남녀 모두에서 대장암의 증가 추세를 확인할 수 있다. 특히 대장암은 유전적 성향이 강한 암종으로 알려져 있으므로 cDNA chip 등을 이용한 유전자 검색으로 많은 정보를 얻을 수 있을 것으로 기대되는 질환이다.^{7,8} 그러나, 아직까지는 이 방법이 통상적으로 사용하기 쉬운 방법은 아니며 비용-효율성의 측면에서도 효율성이 입증되지 못하였으므로 실제 임상에서 활용할 수 있는지 아직 미지수이다.

국내에서는 아직까지 대장암의 cDNA microarray 결과에 대한 보고가 없으므로 저자들은 대장암에서 cDNA chip을 이용한 대량 유전자 검색을 시도하여 이를 국내에서 임상적으로 활용할 수 있을지 그 가능성을 확인해 보고자 본 연구를 시도하였다.

방 법

본 연구는 원자력병원에서 대장암으로 진단받고 근치적 절제술을 시행 받은 7명의 환자를 대상으로 하였다. 수술 시 조직표본에서 암 부위와 정상 대장 조직을 약 1 cm² 크기로 절제하여 2 ml cryotube에 담아 이동식 액체질소 용기에 금속 냉동한 후 실험실로 운반하였다. 이렇게 운반된 조직에서 RNA extraction kit (Qiagen Co.)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 이렇게 추출된 RNA에 oligo-dT primer를 첨가하여 65°C에서 10분간 annealing 반응을 유도하였다. Pre-reaction mixture

(5x buffer, 0.1 M DTT, unlabeled dNTPs) 형광물질이 들어있는 reaction tube에 넣고 형광 표지 probe를 제조하였다. 이 때 대조군은 Cy3-dUTP로, 실험군은 Cy5-dUTP로 표지하였다.

제조된 형광 표지 cDNA를 에탄올로 정제하고 Microcon-30 tube에 넣어 원심분리한 후에 20x SSC와 10% SDS를 첨가하여 100°C에서 2분간 가열하여 변성 반응을 시켰다. 그 위에 반응할 chip을 올려놓은 후 표지된 DNA probe를 잘 섞어서 cover slip 바깥쪽에 대고 조심스럽게 넣었다. 이 때 사용된 chip은 2.4 K Magic chip (Macrogen Co. Korea)으로 1,900개의 알려진 유전자와 500개의 기능이 잘 알려져 있지 않은 유전자와 EST들을 포함하고 있다(Fig. 1). 뚜껑을 덮고 65°C 내에서 8~16시간 동안 교잡반응을 유도하였다. Cover glass를 제거한 후 chip plate를 2x SSC+0.2% SDS solution으로 1회, 0.1x SSC+0.2% SDS solution으로 2회, 0.1x SSC solution으로 3회 세척하고 상온에서 건조시켰다. 건조된 chip을 형광현미경으로 발현의 정도를 수적으로 계측화하는 프로그램인 Imagen 소프트웨어를 사용하여 분석하고 각각의 수치를 기록하였다(Fig. 2). 이렇게 기록된 수치들은 유전자 개체별로 계통적 분석(hierarchical analysis)을 시행하였다.

결 과

대상 환자는 모두 7명으로 평균연령은 62.1세였다. TNM 병기 분류로는 2기가 5명, 3기가 2명이었고, 남녀의 성비는 4 : 3이었다(Table 1). 원발병소로는 직장이 2예, 결장이 5예였다. 병기를 분류할 수 있는 유전자를 분석해 본 결과 2,400개 중에서 69개의 유전자가 병기별 차이를 나타내는 것으로 분석되었으며 이 유전자들 중 18개는 2기에서 과발현되어 있었고 48개는 3기에서 과발현된 양상을 보였다(Table 2). 2기 조직에서는 저발현된 양상의 유전자는 확인하지 못하였고, 3기에서는 3개의 유전자의 발현이 저하되어 있었다(Table 3). Table 2에 나타난 바와 같이 병기별로 다른 발현을 보이는 유전자들 중에서 이미 대장암과 관련성이 일부 보고된 유전자들도 있는데 cartilage oligomeric matrix protein (COMP),⁹ catenin,¹⁰ fibronectin, epithelin,¹¹ nitric oxide synthase (NOS),¹² caldesmon 등의 유전자는 암종에서의 역할에 대한 소수의 보고들이 있는 것들이며 RING3 단백질¹³은 IAP (inhibitor of apoptosis)군 등을 구성하는 domain으로서 기능적으로 암발생과 관련이 있을 가능성이 있다. 2기 환자 5명의

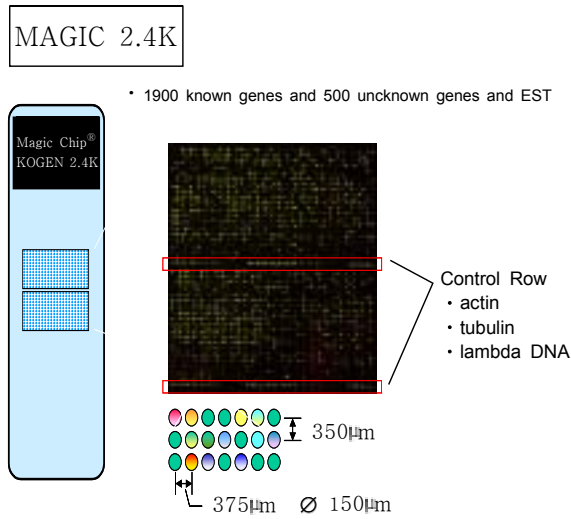


Fig. 1. cDNA chip used in this study.

검체에서 모두 2배 이상의 과발현을 보인 유전자는 모두 8개로 microtubular associated protein,¹⁴ osteopontin precursor,¹⁵ enolase,¹⁶ myelodysplasia/myeloid leukemia factor (MMLF) 2,¹⁷ hepatoma-derived growth factor (HDGF),¹⁸ IGF binding protein 2,¹⁹ elongation factor 2,²⁰ tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) 1²¹ 등이었다. 이들의 발현 양상을 그래프로 비교해 보았으나 통일된 양상은 확인할 수 없었다(Fig. 3). 요약하자면 cDNA microarray에 의해 병기간 식별이 가능한 유전자의 수는 69개였고, 이것은 8개의 control genes, 4개의 ribosomal genes, 5개의 EST genes, 10개의 known functional genes, 23개의 unknown functional genes, 그리고 19개의 암관련 유전자들을 포함하고 있다(Table 2).

계통적 분석을 해 본 결과 5명의 2기 환자들은 동일하

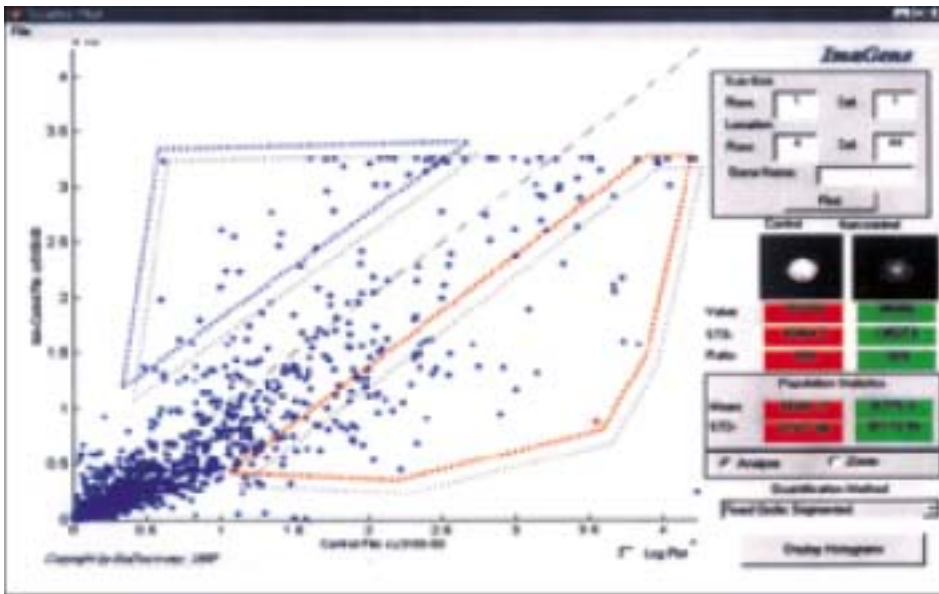


Fig. 2. Example of expression analysis by Imagene program.

Table 1. Patients characteristics

	Sex/age	Location	Operation	Differentiation	TNM stage	CEA/CA19-9
Stage II	F/71	TC	RHC	MD	T4N0M0	1.70/2.72
	F/79	RE	LAR	MD	T4N0M0	1.70/1.29
	M/47	SC	AR	MD	T3N0M0	1.09/11.03
	M/69	SC	AR	MD	T3N0M0	1.93/2.67
	M/63	AC	RHC	WD	T4N0M0	5.22/6.58
Stage III	F/54	AC	RHC	MD	T4N0M1	494/15.33
	M/52	RE	APR	MD	T3N1M0	1.57/19.36

M = male; F = female; TC = transverse colon; RE = rectum; SC = sigmoid colon; AC = ascending colon; RHC = right hemicolectomy; LAR = low anterior resection; AR = anterior resection; APR = abdominoperineal resection; WD = well differentiated; MD = moderately differentiated.

Table 2. Upregulated genes according to TNM stage

Upregulated genes in Stage II	Upregulated genes in Stage III
40S RIBOSOMAL PROTEIN S15	40S ribosomal protein S5
60S RIBOSOMAL PROTEIN L18	60S acidic ribosomal protein P0
60S RIBOSOMAL PROTEIN L35	Actin, gamma-enteric smooth muscle
Microtubule-associated protein 1B	Amiloride-sensitive amine oxidase
Osteopontin precursor	Calnexin
Alpha enolase	Cathepsin L precursor
Elongation factor 2	Chorionic somatomammotropin hormone CS-2
Myelodysplasia/myeloid leukemia factor 2	Cold-inducible RNA-binding protein
Ion channel homolog RIC	Dihydropyrimidinase-like 3 (DPYSL3)
Hepatoma-derived growth factor	Elongation factor 2
Insulin-like growth factor binding protein 2	EST179399 HCC cell line (metastasis to liver in mouse) II
CGI-91 protein	
HHR23A/RAD23A	EST72906 Ovary II Homo sapiens cDNA 5' end
PTR5.b2 PTR5 repetitive element	F-box protein Lilina (LILINA)
Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	G951332 Hypothetical 36.6 KD protein
cDNA clone 143154 5'	Growth hormone GH-2
Homo sapiens cDNA clone 2822006 3'	Guanine nucleotide-binding beta subunit-like protein
Tubulin, alpha k1	Antioxidant protein, Apo1/substrate protein for mitochondria
	DFN1 (deafness, X-linked 1, progressive, DDP (X-linked deafness dystonia protein)),
	HIV-1 TAR RNA binding protein (TARBP-b)
	Homo sapiens alpha-2 globin (HBA1)
	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1517377 3'
	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1666558 3'
	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1698404 3'
	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1711627 3'
	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2114573 3'
	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2157745 3'
	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2482583 5',
	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2543128 3'
	Homo sapiens chromosome 17, clone hCIT.175
	Homo sapiens mRNA for KIAA0647 protein, partial cds
	Laminin receptor
	Microtubule-associated protein-2 (MAP-2) gene, exon 1
	NADH-ubiquitine oxidoreductase chain
	Neuropeptide Y receptor Y1 (NPY1R)
	Prefoldin subunit 1
	Pregnancy specific beta-1 glycoprotein C precursor
	Pregnancy specific beta-1 glycoprotein D precursor
	Pyruvate kinase, M2 isozyme
	Ribosomal phosphoprotein P0, acidic
	Ribosomal protein S17 (RPS17)
	Scaffold attachment factor B (SAF-B)
	SH3BP1 gene for SH3-domain binding protein
	SRY (sex determining region Y)-box 4 (SOX4)
	Tat-binding protein 1
	TFAR19/apoptosis-related
	Thymosin beta-4
	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3
	Transcriptional activator hSNF2a

Table 3. Downregulated genes in stage III cancer

Idurnate 2-sulfatase precursor
PTR5 repetitive element
Fibulin-1, isoform C precursor

지는 않으나 유사한 발현의 양상을 보였으며 이것은 3기 환자의 발현 양상과는 다른 차이를 보였다(Fig. 4).

고 찰

대장암의 발생과정에는 여러 종류의 암 유전자, 종양 억제 유전자, 그리고 불일치 복구 유전자(mismatch repair gene) 등 다양한 유전자가 관여하는 것으로 알려져 있다. 이 중 K-ras 돌연변이,²² 18번 염색체 장완의 대립유전자 소실(DCC 돌연변이),²³ p53 유전자 이상, DNA 메틸화 이상이나 유전성 대장암과 관련되어 있는 hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 등의 유전자 돌연변이 등 많은 종류의 유전자 이상이 대장암과 관련되어 보고되어 있다. 앞서 기술한 대로 이들 각각의 유전자의 특성을 분석하고 이해하기에는 많은 시간과 노력이 필요하며 경우에 따라서는 상당 부분의 실험이 진행된 후 예상과 달리 원하는 결과를 얻지 못하는 경우도 많이 있다. 이런 가능성을 고려할 때 대상 질환과 연관성이 있을 것으로 예측되는 유전자들을 대량으로 검색할 수 있다면 불필요한 연구에 들이는 노력과 시간과 비용을 많이 절감시킬 수 있으며 최소한 몇 천배 이상의 유전자에 대한 정보를 단시간 내에 획득할 수 있다. 컴퓨터공학과 여러 종류의 미세작동기계의 발전에 힘입어 컴퓨터 칩의 이론을 생명공학 분야에 적용시키려는 시도가 발전되어 cDNA 칩이 개발되었다. 최근에는 DNA를 대상으로 하는 DNA 칩을 변형 발전시킨 유사한 형태의 기술이 개발되어 보고되고 있는데 이 중 tissue array,²⁴ protein chip,²⁵ DNA filter array²⁶ 등이 현재 연구 중이며 곧 임상에서 적용될 수 있을 것으로 기대된다.

악성 종양에서의 cDNA microarray 연구는 Alizadeh 등²⁷의 연구결과가 발표되면서 주목을 받기 시작했다. 이들은 diffuse large B cell lymphoma (DLBCL)를 대상으로 microarray를 시행하였는데 사용된 chip은 germinal center B cell library에서 12,069개의 cDNA를, 기타 DLBCL, follicular lymphoma, mantle cell lymphoma, chronic lymphocytic leukemia의 library로부터 2,338개의

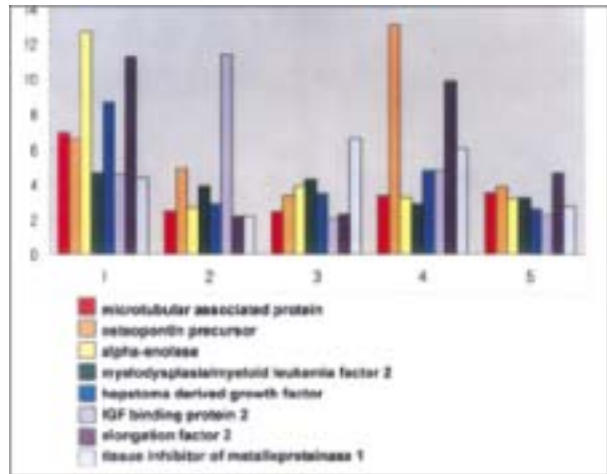


Fig. 3. Commonly upregulated genes in stage II colorectal cancer specimen.

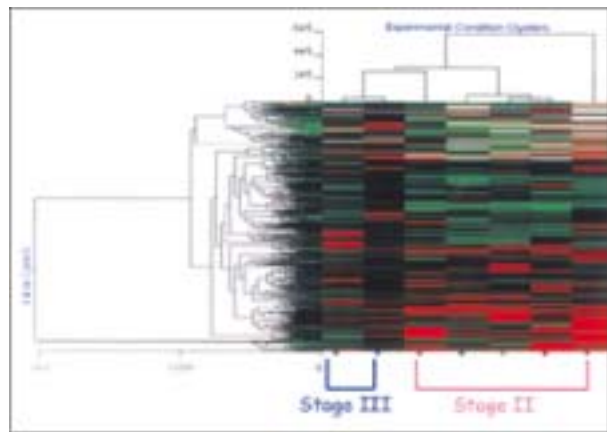


Fig. 4. Hierarchical analysis according to stage.

cDNA를, 그리고 암 발생과 관련된 3,186개의 유전자를 선택하여 제작된 것이었다. 과거 세포의 형태학적 차이나 임상적인 특징 등으로 예후를 예측하고자 하는 체계는 어떤 조합으로도 정확하게 환자의 예후나 치료제에 대한 반응도를 예측할 수 없었던 반면 이들의 연구 결과에 의한 계통분류는 거의 정확하게 치료의 반응도를 예측할 수 있었다고 하였다. 이는 B cell lymphoma의 유전자 발현의 특징이 두 가지 형태로 구별되며 이것은 환자의 예후와 일치한다고 보고하여 학계의 관심이 집중되었다. 이 보고는 microarray 기술을 임상적으로 적용시킬 수 있다는 긍정적인 측면이 부각되어 많은 반향을 일으켰다.

Kan 등²⁸은 식도암 조직에서 microarray를 이용하여 유전자의 발현 양상에 발표하였는데 이들은 10개의

식도 편평상피암 세포주와 4개의 선암세포주 그리고 8개의 식도암 조직을 대상으로 하였다. 보고에 따르면 식도암 조직과 암세포주 사이에는 matrix metalloproteinases, plasminogen activator, collagens, paxillin과 thrombospondin 2 등의 발현이 차이가 있었고, 예후에 따라서 23개의 유전자 발현의 양상이 차이가 있었다고 보고하였다. 또 Kihara 등⁴은 26예의 식도암 조직에서 9,216개의 유전자를 포함한 칩을 적용하여 그 결과가 환자의 예후와 항암제에 대한 반응도의 차이를 분석하였다. 환자의 예후와 항암제 반응성을 좌우하는 52개의 유전자를 확인할 수 있었으며 이 결과를 바탕으로 식도암 환자의 약제 반응성이나 예후를 보다 정확하게 예측할 수 있다고 주장하였다.

유방암은 여러 종양 중에서 유전적 특성이 비교적 잘 알려진 암종의 하나이다. Zhu 등²⁹은 1,176개의 알려진 유전자를 포함한 DNA chip을 이용하여 유방암조직의 중심부와 주변부를 microdissection하여 얻어진 검체로부터 RNA를 추출하여 이를 chip에 반응시켜 암의 중심부와 주변부에서 다르게 발현하는 22개의 유전자를 확인하여 발표하였다. 이러한 결과에 따라 작은 암종의 조직에서도 현미경적인 위치에 따라서 유전자의 발현양상의 차이가 있을 수 있다는 것을 알 수 있었다.

항암제에 대한 반응도를 microarray 발현 양상에 따라 예측하고자 하는 시도들이 진행되고 있다. Maxwell-Armstrong 등³⁰은 MCF-7 유방암 세포주와 H630 대장암 세포주, H630-R10 대장암 세포주에서 2,400개의 유전자를 포함한 microarray 방법을 이용하여 5-FU에 대한 암세포의 반응을 분석하였다. 이들에 의하면 5-FU 치료 후에 암세포에서 3배 이상의 발현이 증가되어 있는 유전자는 619개였다고 보고하고 있다. 이 중 5-FU 투여 시 활성화되는 유전자는 spermine/spermidine acetyl transferase (SSAT), MAT-8 (철분 이동과 관련된 경세포막 단백질의 일종), thymosin β -10, chaperonin10 등이었으며 이 중 MAT-8, thymosin β -10, chaperonin10 등은 p53 유전자가 불활성화하면 5-FU 투여 후 증가되었던 발현이 상쇄되었고 spermine/spermidine acetyl transferase (SSAT), annexin II는 p53의 기능 소실 시 의미있게 감소되었다고 보고하였다. 따라서, microarray를 이용하면 암세포에서 항암제에 대한 반응이나 저항성을 미리 예측할 수 있으며 이와 관련된 새로운 유전자를 쉽게 발견할 수 있다고 보고하였다.

근래에는 cDNA 칩의 비용이 고가이며 기술적으로 간단하지 않다는 점을 보완하기 위하여 보다 진보적

이고 변형된 기술들이 개발되어 발표되고 있다. Okuno 등²⁶은 대장암에서 새로운 형식의 DNA 분석 방법을 발표하였다. 이는 DNA array filter를 사용하는 방법으로 기본적인 원리는 기존의 칩과 같다. 이 방법을 사용하여 인간의 대장암 세포주인 RPMI 4788에서 유전자 발현을 측정된 결과 nm23, TIMP1, VEGF, cyclin E 등의 유전자가 암세포에서 발현이 증가되어 있었고 p53, SIVA, TOSO, beta-catenin, metallothionein 등의 유전자의 발현이 감소되어 있는 것을 알게 되었으며, 이 결과는 개개의 유전자 연구에서 밝혀진 것과 유사한 결과이므로 이 방법이 매우 유용한 방법임을 강조하고 있다. 저자들의 주장대로 기존의 cDNA 칩보다 경제적이고 사용이 간편하다면 그 실용성을 확인하기 위해서 실제 암조직을 대상으로 한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이와 같이 여러 암종에서 다양한 형태의 microarray의 효용성에 대한 연구가 진행되고 있으나 현재 전 세계적으로 대장암에서 cDNA microarray 결과에 대한 보고는 극소수이다. 국내 연구진들도 대장암에서 microarray 방법을 응용하여 유전자의 양상을 확인하고 새로운 암 관련 유전자를 찾아내고자 연구를 진행하고 있으나 아직까지는 국내 문헌 보고는 없다.

본 연구는 대장암 조직을 대상으로 microarray를 적용한 연구의 초기 결과이다. 그러나 연구대상이 7예이므로 본 논문의 결과로 대장암 전체의 유전자 발현 양상을 파악했다고 말할 수는 없다. 또한 전체 대상이 적은 만큼 각각의 병기에 해당하는 환자의 숫자도 소수이므로 병기 간의 분류에 어려움이 있었다. 그러나 기대 없이 시행하였던 hierarchical analysis에서 2기와 3기 환자의 유전자 양상에 확연한 차이가 있었으므로 세분화하여 분석해 보게 되었으며 그 결과 병기를 분류할 수 있는 유전자를 확인할 수 있었다. 병기 간 발현의 차이가 있는 유전자는 69개였고 이 중 2기에서 증가되어 있는 유전자는 18개, 3기에서 증가되어 있는 유전자는 48개, 3기에서 발현이 감소되어 있는 유전자는 3개였다. Table 2에서 나타난 것처럼 이 유전자들 중 기능이 알려져 있는 유전자는 극소수이며 대부분의 유전자들은 그 기능에 대해 알려진 바가 없다. 그러나 그 중 일부의 유전자는 대장암 외에 기타 여러 종류의 암과 관련성에 대해 보고된 바 있는 유전자들로서 이 실험의 결과 이러한 유전자들이 대장암의 발생이나 진행과도 관련이 있을 것으로 추측할 수 있다. 저자들은 2기 환자의 검체에서 일률적으로 2배 이상의 발현의 증가를 기록한 유전자를 검색하였으며 그 결과

Fig. 3에서 보는 바와 같이 microtubular associated protein, osteopontin precursor, alpha-enolase, myelodysplasia/myeloid leukemia factor 2, hepatoma derived growth factor, IGF binding protein 2, elongation factor 2와 tissue inhibitor of metalloproteinase 1 등 8개의 유전자의 발현이 암조직에서 2배 이상 증가되어 있음을 확인할 수 있었다. 검체에 따라 각각의 유전자 발현의 정도가 다르고 특정 양상을 보이지는 않으나 검체에서 모두 발현이 증가되어 있다는 것이 의미를 가질 수 있다고 추측한다. 따라서 추후 이 유전자들의 암관련성에 대한 개개의 유전자 연관성에 대한 연구가 필요하다. 3기 대장암에서 발현이 증가된 유전자의 목록을 살펴보면 Catenin beta, COMP, TIMP2, RING3, Hrs, p58, epithelin, NOS 등 이미 암발생과 관련성이 입증된 유전자들의 발현을 확인할 수 있었으며 이로 미루어 볼 때 대장암 진행과 관련성이 있을 것으로 생각되나 본 연구의 대상이 적고 아직은 초기 실험단계이므로 앞으로 더욱 많은 자료가 축적되어야 할 것이다.

본 연구에서는 다량의 유전자 발현의 변화를 칩 하나로 확인할 수 있었으며 이러한 결과는 대량 검색이라는 microarray 본연의 목적에 부합한다. 이미 시중에는 10 K 이상의 칩들이 상품화되어 있으며 이러한 칩이 보다 많이 공급된다면 앞으로 암조직에서의 유전자 발현의 변화에 대한 정보가 과거와는 비교될 수 없을 정도의 규모로 제공될 수 있을 것이다. 그러나, 아직까지는 microarray 기술을 임상적으로 적용하기에는 비용 효율성의 측면에서 효율성이 떨어지므로 아직 검증 절차가 더 필요하다. 또한 더 중요한 것은 적절한 분석 체계의 확립이다. 본 연구를 진행하면서 2,400개의 유전자를 각각 확인하는 것은 불가능하였으므로 전문적인 프로그램을 이용한 전문가에 의한 분석이 얼마나 중요한지 절감하였다. 현재 증가하는 microarray 실험 증가에 따라 미국 국립보건원이나 유수의 공과대학에서 다량의 유전자 정보를 분석하는 컴퓨터 시스템을 개발하기 위해 노력하고 있다. 이런 노력들이 결실을 이룬다면 일반인들이 쉽게 이용할 수 있는 프로그램이 조만간 제공될 것으로 생각된다.

DNA microarray는 적용 분야가 무궁무진한 첨단 기술로 앞으로 대장암의 발견이나 병기의 분류, 예후의 예측, 그리고 항암제에 대한 반응도 등 여러 분야에서 활용될 수 있을 것으로 기대되며 앞으로 더 많은 연구가 진행되어 이 기술을 이용한 database를 구축할 수 있기를 바란다.

결 론

저자들은 7예의 대장암 조직을 대상으로 2.4 K Macrogen DNA chip을 이용하여 cDNA microarray를 실시한 결과 의미있는 발현의 변화를 보이는 유전자를 69개 확인할 수 있었다. 이 유전자들은 2기와 3기 조직에서 발현의 차이가 있었으며 그중 일부의 유전자는 암발생 관련성이 알려져 있는 유전자들이므로 앞으로 이 유전자들의 개별적인 분석이 필요할 것으로 생각된다. 본 저자들의 결과는 예비적인 결과이나 microarray 기술을 대장암에서 이용하여 의미있는 결과를 얻을 수 있을 것으로 예측할 수 있는 긍정적인 결과라고 생각한다. 앞으로 더 많은 연구가 진행되어 대장암의 유전자 변화를 밝혀낼 수 있게 되기를 바란다.

REFERENCES

1. Oliver JL, Carpena P, Roman-Roldan R, Mata-Balaguer T, Mejias-Romero A, Hackenberg M, et al. Isochore chromosome maps of the human genome. *Gene* 2002; 300:117-27.
2. Yang RZ, Blaileanu G, Hansen BC, Shuldiner AR, Gong DW. cDNA cloning, genomic structure, chromosomal mapping, and fundamental expression of a novel human alanine aminotransferase. *Genomics* 2002;79:445-50.
3. Aitman TJ. DNA microarray in medical practice. *BMJ* 2001;323:611-5.
4. Kihara C, Tsunoda T, Tanaka T, Yamana H, Furukawa Y, Ono K, et al. Prediction of sensitivity of esophageal tumors to adjuvant chemotherapy by cDNA microarray analysis of gene-expression profiles. *Cancer Res* 2001; 61:6474-9.
5. Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R, Fucini R, Merigan TC, et al. Extensive polymorphism observed in the HIV-1 class B protease gene using high-density oligonucleotide array. *Nat Med* 1996;2:753-9.
6. Gingeras TR, Ghandour G, Wang E, Berno A, Small PM, Drobniewski F, et al. Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic mycobacterium DNA arrays. *Genome Res* 1998;8:435-48.
7. Arends JW. Molecular interactions in the vogelstein model of colorectal carcinoma. *J Pathol* 2000;190:412-6.
8. Faeron ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
9. Newton G, Weremowicz S, Morton CC, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, et al. Characterization of human and mouse cartilage oligomeric matrix protein. *Geno-*

- mics 1994;24:435-9.
10. van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 2002;111:241-50.
 11. Serrero G. Autocrine growth factor revisited: PC-cell-derived growth factor (progranulin), a critical player in breast cancer tumorigenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308:409-13.
 12. Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumor progression. *Lancet Oncol* 2001;2:149-56.
 13. Dang J, Kuo ML, Eischen CM, Stepanova L, Sherr CJ, Roussel MF. The RING domain of Mdm2 can inhibit cell proliferation. *Cancer Res* 2002;62:1222-30.
 14. Hisaoka M, Okamoto S, Koyama S, Ishida T, Imamura T, Kanda H, et al. Microtubule-associated protein-2 and class III beta-tubulin are expressed in extraskeletal myxoid chondrosarcoma. *Mod Pathol* 2003;16:453-9.
 15. Saeiki Y, Mima T, Ishii T, Ogata A, Kobayashi H, Ohshima S, et al. Enhanced production of osteopontin in multiple myeloma: clinical and pathologic implications. *Br J Haematol* 2003;123:263-70.
 16. Chang YS, Wu W, Walsh G, Hong WK, Mao L. Enolase-alpha is frequently down-regulated in non-small cell lung cancer and predicts aggressive biological behavior. *Clin Cancer Res* 2003;9(10 pt 1):3641-4.
 17. Tasak T, Lee S, Spira S, Takeuchi S, Hatta Y, Nagai M, et al. Infrequent microsatellite instability during the evolution of the myelodysplastic syndrome to acute myelocytic leukemia. *Leuk Res* 1996;20:113-7.
 18. Enomoto H, Yoshida K, Kishima Y, Kinoshita T, Yamamoto M, Everett AD, et al. Hepatoma-derived growth factor is highly expressed in developing liver and promotes fetal hepatocyte proliferation. *Hepatology* 2002;36:1519-27.
 19. Oh YS, Kim EJ, Schaffer BS, Kang YH, Binderup L, MacDonald RG, et al. Synthetic low-calcaemic vitamin D3 analogue inhibit secretion of insulin-like growth factor II and stimulate production of insulin-like growth factor-binding protein-6 in conjunction with growth suppression of HT-29 colon cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2001;183:141-9.
 20. Arora S, Yang JM, Kinzy TG, Utsumi R, Okamoto T, Kitayama T, et al. Identification and characterization of an inhibitor of eukaryotic elongation factor 2 kinase against human cancer cell lines. *Cancer Res* 2003;63:6894-9.
 21. Gillette KM, Forbes K, Sehgal I. Detection of matrix metalloproteinases (MMP), tissue inhibitor of metalloproteinase-2, urokinase and plasminogen activator inhibitor-1 within matrigel and growth factor-reduced matrigel basement membrane. *Tumori* 2003;89:421-5.
 22. Takayama T, Ohi M, Hayashi T, Miyanishi K, Nobuoka A, Nakajima T, et al. Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 2001;121:599-611.
 23. O'Boyle K. The role of the Deleted Colon Cancer (DCC) gene in colorectal and gastric cancer. *Cancer Invest* 2003;21:484-5.
 24. Jirstrom K, Ringberg A, Ferno M, Anagnostaki L, Landberg G. Tissue microarray analyses of G1/S-regulatory proteins in ductal carcinoma in situ of the breast indicate that low cyclin D1 is associated with local recurrence. *Br J Cancer* 2003;89:1920-6.
 25. Seong SY, Choi CY. Current status of protein chip development in terms of fabrication and application. *Proteomics* 2003;3:2176-89.
 26. Okuno K, Yasutomi M, Nishimura N, Arakawa T, Shiomi M, Hida J, et al. Gene expression analysis in colorectal cancer using practical DNA array filter. *Dis Colon Rectum* 2001;44:295-9.
 27. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503-11.
 28. Kan T, Shimada Y, Sato F, Maeda M, Kawabe A, Kaganoi J, et al. Gene expression profiling in human esophageal cancers using cDNA microarray. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;286:792-801.
 29. Zhu G, Reynolds L, Crnogorac-Jurcevic T, Gillett CE, Dublin EA, Marshall JF, et al. Combination of microdissection and microarray analysis to identify gene expression changes between differentially located tumour cells in breast cancer. *Oncogene* 2003;22:3742-8.
 30. Maxwell PJ, Longley DB, Latif T, Boyer J, Allen W, Lynch M, et al. Identification of 5-fluorouracil-inducible target genes using cDNA microarray profiling. *Cancer Res* 2003;63:4602-6.