

## 한국인의 호즈킨병에서 LMP-1 발암유전자의 결손 변이에 관한 연구

서울대학교 의과대학 병리학교실, <sup>1</sup>서울대학교 암연구소, <sup>2</sup>원자력병원 해부병리과,  
<sup>3</sup>울산대학교 의과대학 병리학교실

권기영 · 안우성 · 이보영<sup>1</sup> · 이승숙<sup>2</sup> · 허주령<sup>3</sup> · 김철우

### Deletion within LMP-1 Oncogene in Hodgkin's Disease in Korea

Ghee Young Kwon, Woo Sung Ahn, Bo Young Lee<sup>1</sup>, Seung Sook Lee<sup>2</sup>,  
Jooryung Huh<sup>3</sup>, and Chul Woo Kim

Department of Pathology, Seoul National University College of Medicine, Seoul 110-799, Korea  
<sup>1</sup>Cancer Research Center, <sup>2</sup>Department of Anatomic Pathology, Korea Cancer Center Hospital and  
<sup>3</sup>Department of Pathology, Ulsan University College of Medicine

LMP (latent membrane protein)-1 protein is one of the Epstein-Barr viral proteins and it is the most crucial one for the transforming activity. It is known to show considerable variation in its nucleic acid sequence and some biologic difference is reported to be associated with the variation. Twenty four cases of the EBV-associated Hodgkin's disease cases were searched for the 30-bp deletion within the C terminal intracytoplasmic domain of LMP-1 oncogene, one of the well-known genetic variation, by PCR and Southern blot using selected sets of primers and probes. The strain of the virus was also determined with PCR. Each case was positive both on LMP-1 immunostaining and *in situ* hybridization for EBER (Epstein-Barr encoded RNA). Deletion within LMP-1 oncogene was identified in 22 cases (92%), of which 5 cases showed wild form as well as a deleted form of LMP-1 at the same specimens. In seven cases showing the non-deleted form, pure or mixed with a deleted form, the distribution of sex and age was similar to that of the deleted form-only-group, but there was a slight tendency for a higher stage at presentation (4 of the 7 cases presented with stage IV). Those seven cases comprised of 4 cases of nodular sclerosis (NS), 2 cases of mixed cellularity (MC) and a case of lymphocyte depletion subtype while there were 9 and 12 cases of NS and MC among all the examined cases, respectively. Two cases with both a deleted form and the non-deleted form of LMP-1 showed type I and II strain of the virus while all the others contained only type of the. In conclusion, the rate of deletion in LMP-1 oncogene in our series was higher than that reported in western countries and there was a slight tendency for higher stages in cases detecting mixed deleted and non-deleted forms of LMP-1 than in cases a of deleted from of LMP-1. (Korean J Pathol 1998; 32: 638~646)

**Key Words:** Hodgkin's disease, Epstein-Barr virus, LMP-1, Deleted form of LMP-1

### 서 론

호즈킨병 (Hodgkin's disease)은 Epstein-Barr virus

접 수: 1997년 12월 4일, 게재승인: 1998년 8월 5일  
주 소: 서울시 종로구 연건동 28번지, 우편번호 110-799  
서울대학교 의과대학 병리학교실, 김철우

ISSN : 0379-1149

(EBV)와 병인적으로 연관되는 질병 중 하나로서 조직에서 EBV를 검출할 확률이 저자에 따라 30%에서부터 90%에 이르기까지 보고되어 있는데, 이 확률은 지역에 따라 상당한 차이를 보여 개발도상국에서 선진국에 비해 상당히 높게 나타나는 경향이 관찰되고 있으며<sup>1-3</sup> 우리나라의 경우, 70% 정도에서 EBER (Epstein-Barr encoded RNA)의 발현이 관찰되어 그 중간 썸의 빈도를

보이고 있다.<sup>4</sup> 호즈킨병은 EBV의 잠복감염형 중 제 2형에 속하여 종양 세포에서 EBNA (Epstein-Barr nuclear antigen)-1과 LMP (latent membrane protein)-1 및 2 단백질이 발현되는데<sup>5</sup> 이 중 LMP-1 단백질은 설치류의 섬유모세포에서 세포 모양을 변화시키고 저혈청 배지에서 성장할 수 있게 한다. 또한 contact inhibition과 anchorage dependence를 소실시키는 등의 변화를 일으키며 림프계 세포에서도 돌기를 내거나 뭉쳐서 자라는 양상을 만들어 세포의 모양에 변화를 일으키거나 CD23, CD40, ICAM-1, LFA-1, LFA-3와 같은 여러 가지 표면 항원의 변화를 유도하는 등 발암단백의 성질을 지니고 있는 것으로 알려져 있다.<sup>6,7</sup> LMP-1 단백질은 24개의 아미노산이 N 말단의 세포 내 영역에 존재하며 C 말단에는 200개의 아미노산이 있어 역시 세포 내 영역에 위치하고 그 사이에는 여섯개의, 세포막을 가로지르는 소수성 영역이 있으며 그 여섯개의 영역은 짧은 reverse turn에 의해 분리되어 있다.<sup>8</sup> 이 중 세포 전환을 일으키는 성질에 중요한 부분은 주로 N 말단에 위치한다고 생각되어 왔었지만<sup>6</sup> 최근의 연구 결과 N 말단은 강한 전하를 가져서 구조적으로 안정화시키는 역할을 하고 C 말단부가 2개의 'C-terminal activating region (CTAR-1 <residues 194~232>, CTAR-2 <residues 351-386>)'을 가져서 NF κB의 활성화나 세포 표면 표현형의 변화를 일으키는 등 세포 전환에 필수적인 역할을 하는 것으로 생각되고 있다.<sup>8,9</sup>

역시 EBV와 연관된 암종의 하나인 중국인에서 생긴 비인두암종 (nasopharyngeal carcinoma) 세포주인 CAO 세포주에서 LMP-1 유전자의 염기서열을 분석한 결과 유전자의 돌연변이를 관찰할 수 있었는데, 그 변이는 주로 C 말단에서 관찰되었고, 이는 아미노산 322에서 366에 위치한 exon 사이에서 나타난 30-bp의 결손과 7개의 단염기 변이었다. 세포 전환에 중요한 역할을 하는 C 말단에 생긴 변화이므로 생물학적 특성에 변화를 일으킬 수 있으리라 추측할 수 있었고, SCID 및 nude mice에서 종양형성 실험을 해본 결과, CAO 세포주의 LMP-1 단백질 야생형인 EBV strain B95.8의 LMP-1 단백질보다 종양을 더 잘 형성한다는 것을 알 수 있었다.<sup>10</sup> 따라서 이런 변이를 가지는 바이러스가 좀더 공격적인 행태를 보이는 것으로 생각되며 호즈킨병에서 조사해본 결과, 이와 같은 변이를 갖는 경우, 1) 혼합 세포형 아형 (mixed cellularity subtype)에 속하는 경우가 많고, 2) Reed-Sternberg (RS)세포가 좀 더 많이 관찰되고 3) 괴사된 부위가 나타나는 예가 흔하며 4) RS 세포의 모양이 비정형적인 경우가 흔히 관찰되는 등 이런 변이가 나타나지 않는 경우에 비해 좀 더 악성도가 높은 조직학적 양상을 보인다는 보고가 있었다.<sup>11</sup> 분자 생물학적인 측면에서 억제 요소의 결손이나 면역 반응의 결함<sup>12</sup> 등의 기전을 생각할 수 있겠지만 뚜렷히 밝혀진 바는 없고, 임상적인 측면에서의 검토 역시 충분히 이루어지지 않은 상태이며 표본의 숫자도 작았기 때문에 추가적

인 연구가 필요한 상황이라 하겠다. 한편, 이런 변이가 검출되는 빈도를 조사한 결과 유럽에서 시행한 초기 연구에서 호즈킨병의 10% 내외에서만 나타나서<sup>11</sup> 이와 같은 변이가 주로 아시아 지역에 집중되는 것으로 생각되었으나 이후의 연구에서는 약 30%의 빈도로 나타나는 것을 관찰했고 EBV와 연관된 peripheral T cell lymphoma (PTCL)의 경우 유럽의 증례에서도 절반 이상에서 이와 같은 변화를 관찰할 수 있었으므로<sup>12</sup> 지역적인 차이는 처음에 생각했던 것 보다는 크지 않을 가능성이 많다. 호즈킨병과 PTCL 이외에도 B 면역모세포형 림프종,<sup>13</sup> 전염성 단핵구증,<sup>14</sup> EBV 연관 림프증식증후군<sup>12</sup> 등에서도 이와 같은 변이가 보고된 바 있는데 우리나라에서는 아직 그에 대한 연구가 이루어진 바 없다.

한편 EBV는 주로 Epstein Barr nuclear antigens (EBNAs -2, 3A, 3B and 3C)에 의해 I형 및 II형으로 나누어지는데<sup>15,16</sup> 이 중 EBNA-2가 세포 전환에 있어 중요한 역할을 하며 두 가지 virus 형에서 비교해 본 결과 I형 EBV에서 세포 전환의 효율이 더 높다는 것이 알려져 있다.<sup>17,18</sup> 환자의 조직에서 조사할 때 대개의 경우는 I형 virus가 관찰되지만 AIDS 등 면역억제가 있는 경우에는 II형 virus가 검출되며 전술한 LMP-1 유전자의 결손 변이는 II형의 virus와 연관되는 경우가 많은 것으로 알려져 있다.<sup>14,19</sup>

우리나라의 경우 EBV의 감염 빈도 및 호즈킨병의 각 아형의 구성 등의 면에서 서구와는 차이를 보이고 있으며 따라서 주로 발견되는 EBV의 아형 및 LMP-1 유전자의 상태의 측면에서도 다른 양상을 보일 가능성이 많을 것으로 예측되어 본 연구를 시행하게 되었다.

## 연구재료 및 방법

### 1. 연구 재료

사용한 조직은 1986년에서 1996년 사이에 서울대학 병원 및 서울중앙병원, 원자력병원에서 호즈킨병으로 진단받은 환자 중 LMP-1 면역조직화학염색 및 EBER *in situ* hybridization으로 EBV와의 연관성을 확인한 24 증례이었으며 (Table 1) 전예에서 포르말린 고정, 파라핀 봉입조직을 사용했다.

### 2. 연구 방법

1) LMP-1 단백질에 대한 면역조직화학 염색 및 판독: 파라핀포매조직에서 5 μm 두께의 절편을 얻은 후 60°C 오븐에서 60분간 말리고 xylene에 3분씩 4회 넣어 탈파라핀과정을 거친 후 absolute alcohol에 2회, 90% alcohol에 2회, 80% alcohol에 1회, 70% alcohol에 1회씩 각 2분간 처리하여 함수시켰다. 증류수로 3번 수세 후 항원을 노출시키기 위하여 microwave oven으로 10분간 처리하고 다시 증류수로 3번 수세한 후 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 15분간 두어 내인성 peroxidase의 작용을 억제시켰다. 정상염소혈청으로 30분간 반응시켜 비특이성

Table 1. Clinical and histological profile of the 24 cases

Case	Age	Sex	Organ	Rye Classification	Stage
1	5	F	LN, neck	Mixed cellularity	I
2	5	M	Spleen	Mixed cellularity	III <sub>s</sub>
3	6	M	LN, neck	Lymphocyte depletion	IV
4	9	M	LN, neck	Mixed cellularity	II <sub>a</sub>
5	13	M	LN, neck	Nodular sclerosis	III <sub>s</sub>
6	13	M	LN, neck	Nodular sclerosis	
7	16	F	LN, perigastric	Lymphocyte depletion	IV
8	23	F	LN, neck	Nodular sclerosis	II <sub>a</sub>
9	24	F	LN, neck	Nodular sclerosis	
10	31	M	LN, neck	Mixed cellularity	IV
11	34	M	LN, inguinal	Mixed cellularity	IV
12	35	F	LN, supraclavicular	Nodular sclerosis	II <sub>a</sub>
13	38	M	LN, neck	Mixed cellularity	IV
14	43	M	LN, neck	Mixed cellularity	I <sub>a</sub>
15	46	M	LN, neck	Nodular sclerosis	II <sub>b</sub>
16	50	F	LN, supraclavicular	Nodular sclerosis	III <sub>b</sub>
17	50	M	LN, supraclavicular	Lymphocyte depletion	IV
18	52	M	LN, neck	Mixed cellularity	IV
19	58	M	LN, neck	Nodular sclerosis	IV
20	60	M	LN, neck	Mixed cellularity	I <sub>a</sub>
21	61	M	LN, iliac	Mixed cellularity	
22	63	M	LN, supraclavicular	Nodular sclerosis	III <sub>b</sub>
23	66	M	LN, axilla	Mixed cellularity	II <sub>a</sub>
24	27	F	Spleen	Mixed cellularity	

반응을 없앤 후 1차 항체를 작용시켜 4°C에서 24시간 두었다. 사용한 일차항체는 mouse anti-LMP antibody, clones CS1-4 (DAKOpatts, Glostrup, Denmark)로서 세 가지의 LMP-1 epitope을 인지할 수 있다. 이후 찬 phosphate-buffered saline (PBS)으로 5분동안 3번씩 수세하고 biotinylated goat anti-rabbit (mouse) antibody를 30분간 작용시킨 후 다시 PBS로 5분간 3번씩 수세했다. 이후 peroxidase-labelled streptavidin anti-rabbit (mouse) immunoglobulin으로 30분 반응시킨 후 PBS로 수세하고 DAB (3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride)를 이용하여 발색했다. Tris buffer 1 ml당 stock DAB 20  $\mu$ l와 34% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2/3  $\mu$ l를 혼합해서 사용했고 현미경 하에서 발색정도를 보면서 1~3분간 발색했다. 이후 수돗물로 수세후 Mayer Hematoxylin에서 1~2분간 대조염색했다.

판독은 광학현미경 하에서 종양세포질내에 갈색반응이 관찰됨을 양성으로 하였다.

양성 반응도는 양성 세포가 밀집한 부위의 100배 시야에서 양성인 세포의 수가 1~15, 15~30, 30개 이상인 예를 각각 1+, 2+, 3+ 등으로 표시하였다.

## 2) EBER in situ hybridization 및 판독: 파라핀에 포

매된 조직을 4  $\mu$ m 두께로 박절하여 silane 도포된 슬라이드에 얹은 후 LMP-1 단백질에 대한 면역조직화학염색시와 같은 방법으로 탈파라핀 한 후 재함수시켰다. 이후 proteinase K로 37°C 항온조에서 30분간 처리한 후 다시 수세하고 에탄올로 탈수한 뒤 상온에서 10분간 말렸다. 다음 fluorescein-conjugated EBV (EBER) oligonucleotide (DAKOpatts, Glostrup, Denmark) 1~2방울 (15~30  $\mu$ l)을 조직 위에 올려 놓고 커버 슬라이드를 덮은 채 4°C에서 14시간 방치한 후 커버 슬라이드를 제거하고 TBS 완충액으로 5분씩 3회에 걸쳐 수세하였다. 이후 DAKO ISH detection kit code No. K046을 이용하여 검출하였는데, 먼저 1:100으로 희석된 rabbit F(ab')<sub>2</sub> anti-FITC/AP 150  $\mu$ l로 30분간 반응시키고 TBS 완충액으로 3분씩 2회에 걸쳐 수세한 뒤 다시 물로 씻고 substrate buffer에 3분동안 담갔다. 이후 희석된 enzyme substrate (BCIP/NBT)로 30분간 처리한 후 증류수로 씻은 후 글리세롤로 봉입하여 광학 현미경 하에서 관찰하였다.

양성의 경우 핵내에 흑청색의 신호가 관찰되었다.

양성 반응도는 LMP-1 염색에서와 같은 기준을 적용하였다.

### 3) LMP-1 DNA의 결손변이 검색 및 EBNA-3C를 이용한 EBV 아형 확인을 위한 중합효소 연쇄반응

(1) DNA 추출; 20  $\mu$ m 두께의 파라핀 절편 3개를 얻어서 xylene 에서 탈파라핀한 후 에탄올로 함수시키고 phenol/chloroform extraction 방법을 이용하여 추출하였다 (genome DNA kit, Boehringer Mannheim). 먼저 cell suspension solution 1 ml와 RNase 50  $\mu$ l 및 cell lysis/denaturing solution 100  $\mu$ l를 가하고 침전이 생기지 않게 흔들어 혼합한 후 55°C 항온조에서 15분간 방치하였다. Protease 25  $\mu$ l를 다시 넣고 잘 흔든 뒤 55°C 항온조에서 1시간동안 반응시키고 salt out mixture 500  $\mu$ l를 첨가한 다음 4°C에서 10분간 유지시켰다. 다음 micro-centrifuge에서 최고 속도로 10분간 원침하여 분리된 상층 부유액 만을 10 ml 튜브에 담고 tissue extraction buffer (TE buffer) 2 ml와 100% 에탄올 8 ml를 가한 후 15분간 원침하여 남은 침전물에 TE buffer를 적당량 넣어 완전히 용해시켰다. 이후 spectrophotometry로 260 nm에서 optical density를 측정하여 정량했다.

(2) LMP-1 유전자의 검출 및 변이형 존재 유무를 알기 위한 중합효소 연쇄반응; 3)a)에서 추출한 DNA를 재료로 하여 중합효소 연쇄반응을 일으켰고 양성 대조군으로는 LCL (lymphoblastoid cell line)의 일종인 B95.8 세포에서 추출한 DNA를 사용했다.

사용한 primer는 3'쪽의 세포 내 부위에 결합하며 그 서열은 아래와 같고 생성 산물의 크기는 316 bp가 되는데 이와 같은 구성을 이용하면 LMP-1에서 흔히 변이를 보이는 부분을 포함하여 결손 변이가 있을 경우 band의 크기에 차이가 나타난다.

9: 5'-ATCATTTCAGCAGAGTCGCT-3'

11: 5'-TGATTAGCTAAGGCATTCCCA-3'

반응 혼합물은 sterile dd-H<sub>2</sub>O 19  $\mu$ l, 10 $\times$  PCR reaction buffer 3  $\mu$ l (50% glycerol, 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 5 mM DTT, 1.0% Triton X-100), dNTP mix 3  $\mu$ l, primers 1  $\mu$ l, target DNA 3  $\mu$ l 와 Taq polymerase 0.2 unit로 구성했다. Ericomp사의 thermal cycler를 이용하여 98°C에서 5분간 초기 변성을 시킨 후 94°C에서 1분간 변성, 50°C에서 1분 30초간 소환, 72°C에서 2분간 연장하여 35주기 시행하고 마지막 주기 후 72°C에서 10분간 더 연장했다.

얻어진 DNA를 동정하기 위해 반응 산물에서 10  $\mu$ l를 취하여 2% agarose gel에서 100 V로 20~30분간 전기 영동을 시행했다. 전기 영동 후 ethidium bromide로 염색한 후 polaroid 촬영하여 band를 확인했다.

(3) EBNA-3C를 이용하여 EBV 아형을 확인하기 위한 중합효소 연쇄반응; 반응 혼합물 구성 및 반응 조건은 3)b)과 동일하며 primer 서열은 아래와 같다.

5' AGAAGGGGAG CGTGTGTTGT 3'

5' GGCTCGTTTT TGACGTCGGC 3'

(4) Southern blot; 3)b)의 중합효소 연쇄반응에서 관찰된 band를 확인 및 동정하였다. 즉 3)b)에서 나온 band에서 그 크기를 관찰하여 결손 변이가 있는지 살펴본 후 deletion 부위에 대한 probe 및 공통 부위에 대한 probe를 각각 사용한 southern blot을 시행하여 deletion의 존재 여부를 확실히 규명하였다.

(1) 3)b)서 band를 확인한 후 gel을 1.5M NaCl과 0.5M NaOH로 구성된 denaturation 용액에 넣고 실온에 1시간 두었다.

(2) Tris base 및 1.5M NaCl, HCl, 증류수로 이루어진 neutralization solution에 30분간 담가 둔다.

(3) Nylon membrane을 filter paper에 싸놓고 12시간 이상, 긴 filter paper로 3M NaCl과 0.3M Na<sub>3</sub>Citrate. 2H<sub>2</sub>O로 이루어진 20X SSC 용액을 흡수하여 위에 쌓아 놓은 paper towel로 모세관 현상으로 이동하는 것을 이용하여 전이하였다.

(4) Membrane을 6X SSC에 5분동안 담가둔 후 30분간 건조시킨 후 자외선을 앞뒤로 쬐었다.

(5) 5X SSC, 0.1% hybridization buffer component, 0.02% SDS, 20 fold dilution of liquid block으로 이루어진 prehybridization buffer에 담그고 42°C에 30분간 두었다.

(6) Prehybridization buffer안에 5~10 ng의 probe를 넣고 42°C에서 2시간 둔다.

\* Probe의 서열은 30 bp 결손이 있는 형에 대한 것은 5'-TCATGATTCCGG CCAGGCGGCGGT-3'이며 common LMP-1에 대한 것은 5'-TTAGTGATAG TAGCTTAGCTGAACT-3'이다.

(7) 5X SSC/0.1% SDS으로 실온에서 5분동안 두번, 1X SSC/0.1% SDS로 50°C에서 15분간 두번, 0.15M NaCl과 0.1M Tris base로 구성된 buffer 1로 실온에서 1분간 수세하였다.

(8) 새로운 buffer 1에 20배 희석한 liquid block을 넣고 실온에서 30분 둔후 buffer 1로 1분 수세하였다.

(9) Horseradish peroxidase를 0.4M NaCl 및 0.1M Tris base로 이루어진 buffer 2에 1000배 희석하여 실온에 30분 둔후 buffer 2로 5분씩 4번 수세하였다.

(10) Detection buffer 1 : 2를 동량으로 섞은 후 2분간 담가 두었다.

(11) Cassette에 필름을 놓고 현상하였다.

\* Southern blot에 사용된 kit (hybridization buffer component, liquid block, detection buffer, HRP)는 Amersham life science (Buckinghamshire, England)의 제품임 (RPN 2130).

결 과

1. LMP-1에 대한 면역조직화학염색 및 EBER in situ hybridization

LMP-1에 대한 면역조직화학염색의 경우 모두 24예 중 증례 20을 제외하고 1+ 이상의 염색 반응을 보였고 (Fig. 1, Table 2) EBER insitu hybridization 검색에서는 2예 (증례 8과 17)를 제외하고 양성 소견을 보였다 (Table 2).

2. LMP-1 유전자의 결손 변이 조사 (Table 2)

중합효소 연쇄반응에서 양성 대조 (B95.8 세포주의 DNA)와 비슷한 크기의 반응 산물이 나타나고 (Fig. 2), 공통 부위에 대한 probe를 이용한 Southern blot에서 신호가 보이고 (Fig. 3) 결손 부위에 대한 probe를 이용한 Southern blot에서도 반응하는 경우 (Fig. 4) 야생형 (wild type, non-deleted form) LMP-1이 존재한다고 보았고 중합효소 연쇄반응에서 양성 대조에 비해 작은 크기의 산물이 보이고 결손 부위에 대한 probe를 이용한 Southern blot에서 신호가 나타나지 않은 경우 결손 변

이형 LMP-1 유전자가 있는 것으로 생각했다. 24예 중 17예에서는 결손 변이형의 유전자만이 존재했고 5예에서는 결손형 및 야생형이 함께 발견되었으며 야생형 유

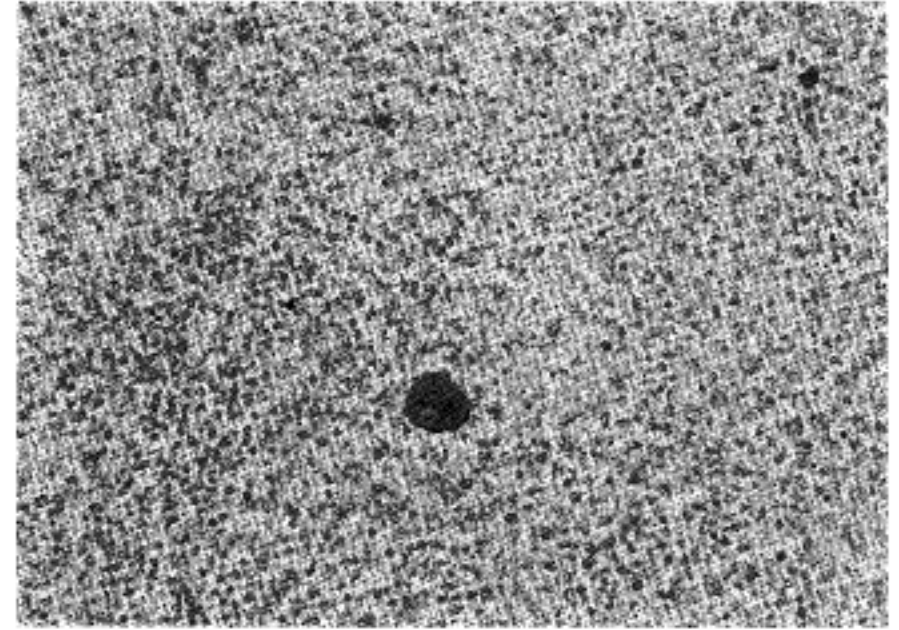
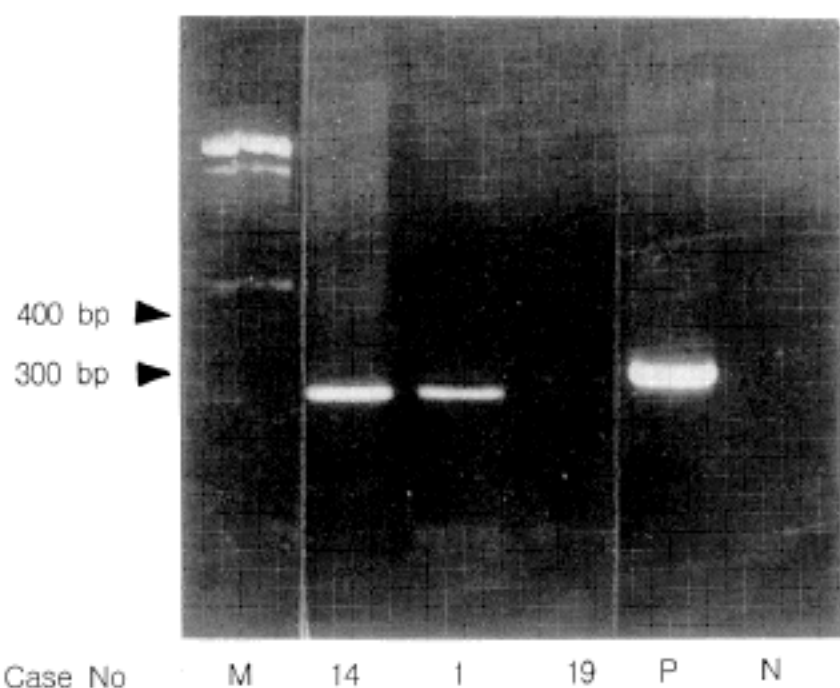


Fig. 1. On LMP-1 immunostaining, RS cells are positive in cytoplasm.

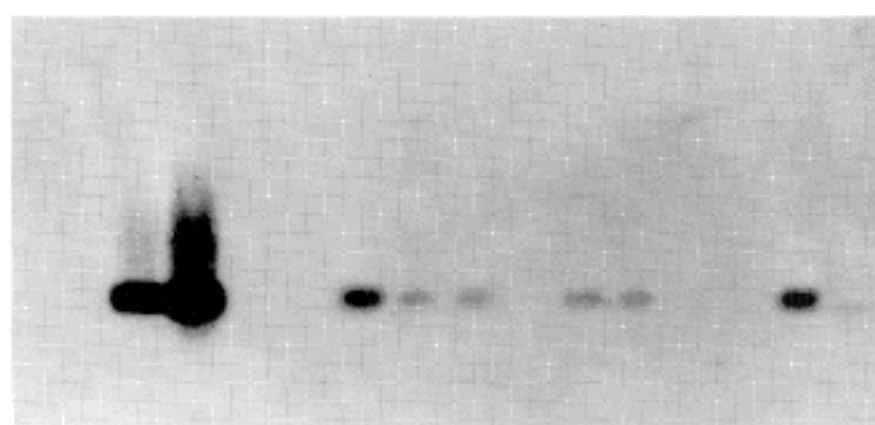
Table 2. Results of LMP immunostaining, EBER in situ hybridization, identification of LMP1 status and EBV typing

Case	Age	Sex	EBER	LMP-PAP	LMP-PCR	EBV-TYPE
1	5	F	3+	2+	D	I
2	5	M	1+	2+	D	I
3	6	M	1+	3+	ND	I
4	9	M	1+	1+	D	I
5	13	M	1+	3+	D+ND	I
6	13	M	1+	2-	D	I
7	16	F	1+	1+	D	I
8	23	F	-	2-	D	I
9	24	F	1-	1-	D	I
10	31	M	2-	1-	D+ND	I+II
11	34	M	1-	1-	D	I
12	35	F	1-	1-	D	I
13	38	M	2-	2-	D+ND	I
14	43	M	1-	3-	D	I
15	46	M	3-	2-	ND	I
16	50	F	3-	1-	D+ND	I+II
17	50	M	-	1-	D	I
18	52	M	2-	2-	D	I
19	58	M	3-	1-	D+ND	I
20	60	M	1-	-	D	I
21	61	M	3+	3+	D	I
22	63	M	1+	1+	D	I
23	66	M	2+	2+	D	I
24	27	F	1+	1+	D	I

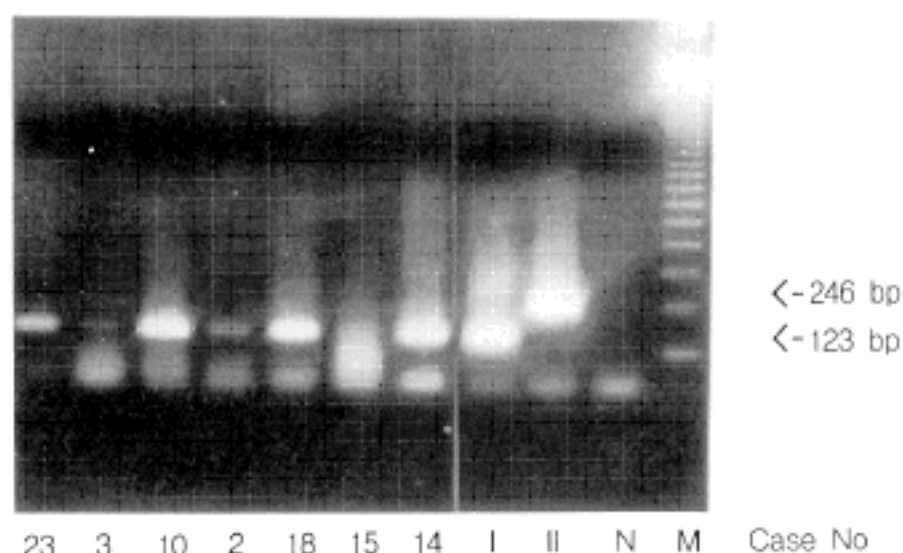
D: deleted form, ND: non-deleted form



**Fig. 2.** Identification of PCR product for LMP-1. P and N denote positive and negative control, respectively. One band slightly smaller than that in the positive control is seen in case 1 and 14. Case 19 shows two bands, one at the size comparable to that of the positive control and the other at the size similar to that of case 1 and 14.



**Fig. 4.** On Southern blotting with the probe specific for the commonly-deleted region of LMP-1, positive signal is found in cases 19, 13, 16, 3, 10 and 15. These cases harbor non-deleted form of LMP-1, while those cases with no signal have deleted form.



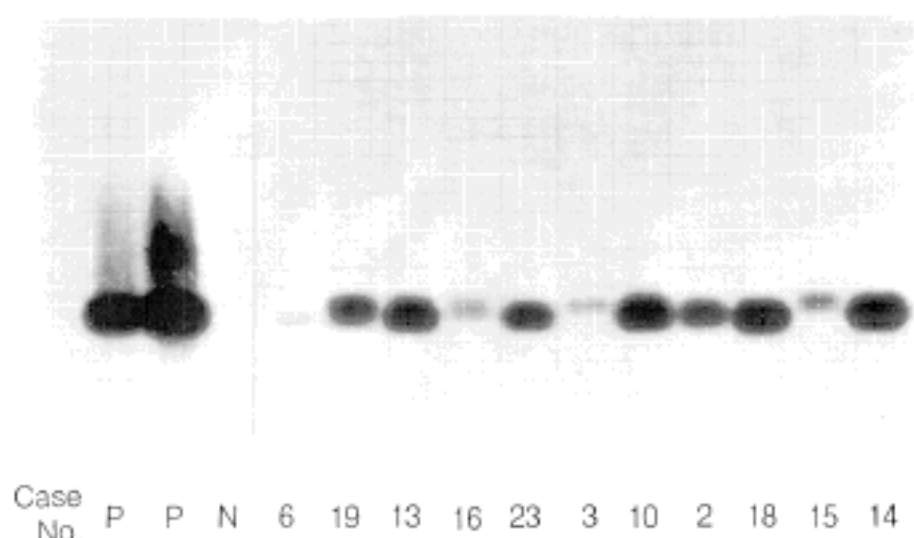
**Fig. 5.** The result of PCR for typing of viral strain with primer set for EBNA-3C. I and II represent positive control for type I and II. Case 10 shows two bands, one at the size of type I and the other type II. All the other cases show one band at the size of type I.

하여 바이러스의 형을 결정했다 (Fig. 5). 2예에서 I형 및 II형 바이러스가 같이 검출되었고 나머지 전 예에서는 I형 바이러스 만이 발견되었다.

#### 4. LMP-1 유전자의 상태와 임상 양상 및 조직학적 형태의 연관 관계 (Table 2)

1) 야생형 LMP-1을 단독적으로 혹은 결손 변이형 LMP-1과 같이 발현한 7예의 조직학적 아형은 혼합 세포형 (mixed cellularity)이 2예, 결절성 경화형 (nodular sclerosis)이 4예, 림프구 부족형 (lymphocyte depletion)이 1예이었다. 전체에서의 구성을 보면 혼합 세포형이 12예, 결절성 경화형이 9예로서 야생형 LMP-1을 갖는 경우 혼합 세포형이 차지하는 비율이 조금 줄어들음을 알 수 있었다.

2) 야생형 LMP-1을 단독적으로 혹은 결손 변이형



**Fig. 3.** Southern blotting for the common LMP-1 probe shows intense signal in almost all lanes. P and N represent positive and negative control respectively.

전자만이 검출된 경우는 2예 뿐이었다. Fig. 4의 증례 1과 14에서 결손형 probe에 대한 신호가 약하게 반응함을 관찰할 수 있었는데 이에 대해서는 비 특이적인 반응의 가능성과 Fig. 3의 표본을 stripping하는 과정에서 약간의 산물이 남아있을 가능성을 들 수 있다. 하지만 Fig. 3에서의 LMP-1반응중 대부분이 소실된 것으로 간주하여 결손변이형 LMP-1이 존재하는 것으로 결론지었다.

#### 3. EBV의 아형 (virus strain) 결정 (Table 2)

EBNA-3C에 대한 중합효소 연쇄반응을 일으킨 후 반응 산물의 크기를 관찰, I형 및 II형의 양성 대조와 비교

LMP-1과 같이 발현한 7예에서 병기를 조사해 본 결과 제 2, 3 및 4병기에 해당하는 수가 각 1예, 2예, 4예이었고 결손 변이형 유전자만을 갖는 17예 중 임상 정보를 얻을 수 있었던 13예에서 조사해 본 결과 4예만이 제 4병기에 속해서 야생형 유전자를 갖는 경우 결손 변이형 유전자만을 갖는 경우에 비해 좀 더 진행된 병기에 나타나는 경우가 많은 것을 알 수 있었다.

## 고 찰

본 연구에서 관찰된 특징적인 소견의 하나는 결손 변이를 보이는 증례가 상당히 많았다는 점이다. 즉 24예 중 19예에서는 결손형의 LMP-1 유전자가 발견되었고 5예에서는 결손형의 유전자와 야생형 (wild type)의 유전자가 같이 검출되어 92% (22/24)에서 결손형의 유전자가 발견되었는데 이는 10% 내지 30% 정도의 빈도를 보인 서구의 보고<sup>11,14</sup>와는 상당히 다른 수치이다. 먼저 실험 방법, 즉 본 연구에서 중합효소 연쇄반응에서 나타난 반응산물의 크기 차이 및 Southern blot을 이용하여 결손 변이를 검출하고 직접적인 sequencing을 실시하지 않은 것에 의한 차이를 생각해 볼 수 있다. 하지만 기존의 보고에서도 직접적인 sequencing을 한 경우<sup>11,14,20</sup>도 있지만 실시하지 않은 보고<sup>21</sup>도 있으며, 본 연구에서는 결손 변이형 LMP-1이 많은 증례에서 나타났는데 이는 두번째 시행한 Southern blot (즉 commonly-deleted portion에 대한 probe를 이용한 Southern blot)에서 음성 반응을 보인 것이고 따라서 Southern blot에서 나타날 수 있는 위양성에 의한 편차는 별로 없을 것이라고 짐작할 수 있다.

우리나라를 포함한 동양권에서는 서구와 비교할 때 EBV의 감염 빈도 및 호즈킨병의 아형의 분포 등의 측면에서 차이를 보이므로 본 연구에서 조사한 결손 변이의 빈도에서도 차이가 나타날 수 있다고 생각되는데 말레이시아의 PTCL<sup>14</sup>이나 홍콩인의 위, 폐 등의 부위에 생긴 암종 및 양성 림프조직에서 결손 변이형 유전자가 67~95% 등의 높은 빈도로 발견된다는 것 등은 그 가능성을 뒷받침하는 소견이라 할 수 있다.<sup>22</sup>

한편 이와 같은 동서양의 차이와 연관해서 염두에 둘 사항은 혼합 세포형 아형과 결손 변이형 LMP-1의 연관성이다. 본 연구에서 야생형 LMP-1이 있는 7예 중 4예가 결절 경화형이었고 2예만이 혼합 세포형이었는데 이는 이 연구에 포함된 24예 중 12예가 혼합 세포형 아형이었던 것에 비하면 통계적 의미는 없지만 비교적 적은 비율이라 할 수 있다. 호즈킨병의 각 아형이 차지하는 비율을 보면 서구의 경우 결절 경화형이 많고, 우리나라를 포함한 동양의 경우 본 연구에 포함된 증례들과 비슷한 양상을 보여 혼합 세포형이 많은 것으로 알려져 있다.<sup>4</sup> 이전의 보고들에서 각 아형과 LMP-1의 결손 변이가 있는 빈도의 연관성을 알아본 것을 살펴보면 혼합 세포형에서 LMP-1의 결손 변이가 나타나는 경우가 많

다는 보고가 있는데<sup>11</sup> 이는 본 연구에서 야생형 LMP-1이 있는 경우, 혼합 세포형 아형이 비교적 적은 것과 비교적 부합되는 소견이다. 따라서 본 연구에서 우리나라의 호즈킨병 환자의 경우 LMP-1 유전자의 결손 변이가 서구의 이전 보고에 비해 상당히 높은 빈도로 나타나는 것은 우리나라에서 혼합 세포형 아형의 빈도가 높은 것에 영향을 받은 것일 수 있다. 하지만 본 연구에서 혼합 세포형 이외의 아형에서도 결손 변이가 나타나는 빈도가 높았으므로 이것만으로 설명할 수는 없고 이외의 다른 요인도 존재할 것이라 생각된다.

본 연구에서 관찰된 소견 중 의외였던 것은 결손 변이형과 병기 (stage)와의 관계이다. 즉 야생형 (wild type, non-deleted) LMP-1을 가지는 7예에서 4예가 제 4병기를 보였고 결손 변이형만을 갖는 증례에서 조사한 경우 임상 정보 이용이 가능했던 13예 중 4예만이 제 4병기였고 3예가 제 1병기였으므로 야생형 LMP-1을 갖는 경우 통계적 유의성은 없지만 오히려 병기가 더 진행된 경향이 있었다. 따라서 지금까지의 보고에서 결손 변이형이 조금 더 공격적인 생물학적 특징을 보이고 조직학적으로 악성인 경향이 있다는 것과는 상반되는 결과라 할 수 있다. 하지만 이 결과는 결손 변이형 및 야생형 유전자를 같이 가지는 5예를 야생형 유전자를 갖는 군에 포함시켰을 때의 분석 결과이며 통계적 유의성이 있는 정도의 차이가 아니므로 단정적인 의미를 부여하기는 어려우리라 생각된다.

결손 변이형의 LMP-1 단백질의 생물학적 특성을 설명하기 위한 기전으로 제시되는 것으로는 반감기가 연장되어 세포 내에서 높은 수준으로 존재한다<sup>23</sup>는 점, T 세포 매개 세포독성을 회피할 수 있는 가능성,<sup>11</sup> 이외에 LMP-1 유전자에서 결손되는 부위가 NF- $\kappa$ B의 활성화에 중요한 역할을 하는 부위를 포함한다<sup>24</sup>는 사실 등을 들 수 있지만 직접적인 연관성을 설명할 수 있는 기전은 밝혀지지 않은 상태이다. 아직까지 결손 변이형 LMP-1 유전자를 가질 때 나타나는 임상적인 경과에 대한 대규모 연구는 없으며 결손 변이를 보이는 일부 증례에서 조사한 바에 따르면 병기나 예후와의 뚜렷한 상관 관계는 보이지 않았다<sup>11</sup>고 한다.

여러 장기를 침범한 호즈킨병 환자에서 조사해 본 결과 장기별로 LMP-1 유전자의 결손 변이 여부가 차이를 보이는 경우도 있고 동일한 경우도 있었다는 보고<sup>21</sup>는 이 LMP-1 유전자의 결손 변이가 이 종양의 악성화에 있어서 큰 중요성을 갖지 못하는 것이 아닌지 의심하게 한다. 또 유럽의 정상인에서 30% 정도의 빈도로 이같은 변이를 관찰할 수 있었다<sup>25</sup>는 사실은 이 LMP-1 유전자의 결손이 단순히 바이러스 유전자의 변화 과정에서 발생한 한 변형이며 발암성의 증대와 관련한 생물학적 의미는 미미할 가능성도 제시하는데 이에 관해서는 추후의 지속적인 실험적, 임상적 연구가 이루어져야 할 것이라 생각된다.

한편 본 연구에서 검색해 본 결과 5예에서 야생형 및

결손 변이형 LMP-1 유전자를 같이 관찰할 수 있었고 그 중 2예에서는 I형 및 II형 EBV가 같이 관찰되었다. I형 및 II형 바이러스가 같이 관찰된 것은 기존의 연구에서 알려진 바 있고,<sup>14</sup> 두가지 바이러스가 상호 전환될 가능성이 떨어지므로 항암제 치료 혹은 질병 자체로 인해 초래된 면역 억제 상태에서 II형 바이러스가 중복 감염된 것에 기인할 가능성이 있다. LMP-1 유전자가 동일 검체에서 두가지 형을 모두 발현하는 것은 홍콩의 보고<sup>22</sup>에서 관찰된 바 있는데 I형 및 II형의 혼합 감염과는 비슷한 과정을 거쳐 나타날 수도 있지만 다른 기전도 가능하다. 즉 야생형 및 결손 변이형 LMP-1 유전자는 한 환자의 다른 장기에서 각각 나타나는 양상<sup>21</sup>이 발견된 바 있으므로 야생형에서 결손 변이형으로의 변화가 비교적 빠른 시간 내에 가능하다고 생각된다. 따라서 I형 및 II형 바이러스의 혼합 감염과 달리 중복 감염 없이도 두가지 형태의 유전자를 보일 수 있을 것이다. 또한 본 연구에서 EBV의 유형을 EBNA-3C의 검색만으로 시행하였으나 EBNA-2, EBNA-3B 그리고 3A 등의 분석이 추가되면 이중형의 빈도가 보다 높을 가능성도 있다. 이와 같은 추정과 관련해 먼저 검토해 볼 것은 종양 세포인 RS cell과 주위의 반응성 세포라고 생각되는 림프계 세포에 각각 다른 형의 유전자가 들어 있을 가능성이 있다. 대개 LMP-1 단백질은 RS cell에만 국한해서 발현되는 것으로 알려져 있지만<sup>26-28</sup> 단백질 발현이 없어도 유전자는 검출될 수 있다. 그리고 본 연구에서 EBER *in situ* hybridization 결과, 소 림프구로 추정되는 작은 세포의 핵에 염색되는 것이 일부 관찰되었으므로 주위 림프구에 EBV가 감염되었을 수 있고 따라서 일부 LMP-1 유전자가 주변 비 종양성 림프구에서 유래한 것일 가능성이 있으며 이는 microdissection에 의한 단일 세포 분석 등 추후의 연구를 통해서 규명해야 할 부분이다.

## 결 론

한국인의 호즈킨병에서 나타나는 LMP-1 발암유전자의 결손변이를 조사해 본 결과 서구의 이전 보고들에 비해 상당히 높은 빈도로 관찰되었고, 일부 증례에서는 결손 변이형 및 야생형이 혼재하는 것이 나타났다. 또 그 중 일부에서는 I형 및 II형 EBV가 중복 감염되어 있었는데 이의 명확한 의미는 추후의 연구를 통해 규명해야 할 부분이다. 한편 LMP-1 유전자의 결손 변이형의 유무와 임상 양상과의 관계를 조사해 본 결과 결손 변이형이 있는 증례에서 야생형의 증례보다 임상 병기가 진행된 양상은 관찰되지 않아 두가지 LMP-1 유형 간의 생물학적 특성 차이는 확인할 수 없었다.

## 참 고 문 헌

1. Weiss LM, Chen Y-Y, Liu X-F, Shibata D. Epstein-Barr

- virus and Hodgkin's disease. A correlative *in situ* hybridization and polymerase chain reaction study. *Am J Pathol* 1991; 139: 1259-65.
2. Zhou XG, Hamilton-Dutrois SJ, Yan Q-H, Pallesen G. The association between Epstein-Barr virus and Chinese Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 1993; 55: 359-63.
3. Chang KL, Albuja PF, Chen YY, Johnson RM, Weiss LM. High prevalence of Epstein-Barr virus in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease occurring in Peru. *Blood* 1993; 81: 496-501.
4. Huh J, Park C, Juhng S, Kim CE, Poppema S, Kim CW. A pathologic study of Hodgkin's disease in Korea and its association with the Epstein-Barr virus infection. *Cancer* 1996; 77: 949-55.
5. Rickinson A, Kieff E. Epstein-Barr virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM eds. *Fields virology* 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996; 2397-446.
6. Wang D, Liebowitz D, Wang F, et al. Epstein-Barr virus latent infection membrane protein alters the human B-lymphocyte phenotype: deletion of the amino terminus abolishes activity. *J Virol* 1988; 62: 4173-84.
7. Wang F, Gregory C, Sample C, et al. Epstein-Barr virus latent infection membrane and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA2 and LMP cooperatively induce CD23. *J Virol* 1990; 64: 2309-18.
8. Kaye KM, Izumi KM, Mosialos G, Kieff E. The Epstein-Barr virus LMP1 cytoplasmic carboxy terminus is essential for B-lymphocyte transformation; fibroblast cocultivation complements a critical function within the terminal 155 residues. *J Virol* 1995; 69: 675-83.
9. Huen DS, Henderson SA, Croom-Carter D, et al. The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP-1) mediates activation of NF- $\kappa$ B activation and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene* 1995; 10: 549-60.
10. Hu LF, Zabarobvsky ER, Chen F, et al. Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP-1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J Gen Virol* 1991; 72: 2399.
11. Knecht H, Bachmann E, Brousset P, et al. Deletions within the LMP1 oncogene of Epstein-Barr virus are clustered in Hodgkin's disease and identical to those observed in nasopharyngeal carcinoma. *Blood* 1993; 82: 2937-42.
12. Keln C, Rothenerger S, Niemeyer C, et al. EBV-associated lymphoproliferative syndrome with a distinct 69 base-pair deletion in the LMP-1 oncogene. *Br J Hematol* 1995; 91: 938-40.
13. Knecht H, Bachmann E, Brousset P, et al. Mutational hot spots within the carboxy terminal region of the LMP1 oncogene of the Epstein-Barr virus are frequent in lym-



- phoproliferative disorders. *Oncogene* 1995; 10: 523-8.
14. Sandvej K, Peh S-C, Andresen BS, Pallesen G. Identification of potential hot spots in the carboxy-terminal part of the Epstein-Barr virus (EBV) BNLF-1 gene in both malignant and benign EBV-associated diseases: high frequency of a 30-bp deletion in Malaysian and Danish peripheral T cell lymphomas. *Blood* 1994; 84: 4053-60.
  15. Rowe M, Young LS, Cadwallader K, Petti L, Kieff E, Rickinson AB. Distinction between Epstein-Barr virus type A (EBNA-2A) and type B (EBNA-2B) isolates extends to the EBNA-3 family of nuclear proteins. *J Virol* 1989; 63: 1031-9.
  16. Sample J, Young L, Martin B, et al. Epstein-Barr virus type 1 and 2 differ in their EBNA-3A, 3B and 3C genes. *J Virol* 1990; 64: 4084-92.
  17. Rickinson A, Young L, Rowe M. Influence of the Epstein-Barr nuclear antigen EBNA2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *J Virol* 1987; 61: 1310-7.
  18. Cohen J, Wang F, Mannick J, Kieff E. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9558-62.
  19. Khanim F, Yao QY, Niedobitek G, et al. Analysis of Epstein-Barr virus gene polymorphisms in normal donors and in virus-associated tumors from different geographic locations. *Blood* 1996; 88: 3491-501.
  20. Knecht H, Bachmann E, Joske DJL, et al. Molecular analysis of the LMP (latent membrane protein) oncogene in Hodgkin's disease. *Leukemia* 1993; 7: 580-5.
  21. Mohammad AV, Kamel OW, Chen YY, Medeiros LJ, Weiss LM. Detection of Epstein-Barr virus in multiple sites involved by Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1995; 147: 1408-15.
  22. Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chan ASY, Wong MP. Prevalence of mutations and 30-bp deletion in the C-terminal region of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 oncogene in reactive lymphoid tissue and non-pharyngeal EBV-associated carcinomas in Hong Kong Chinese. *Int J Cancer* 1997; 72: 225-30.
  23. Marin J, Sugden B. Transformation by the oncogenic latent membrane protein correlates with its rapid turnover, membrane localization, and cytoskeletal association. *J Virol* 1991; 65: 3246-58.
  24. Devergne O, Hatzavassiliou E, Izumi KM, et al. Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: Role in NF- $\kappa$ B activation. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 7098-108.
  25. Sandvej K, Gramata JW, Munch M, et al. Sequence analysis of the Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein-1 gene and promoter region: Identification of four variants among wild-type EBV isolates. *Blood* 1997; 90: 323-30.
  26. Herbst H, Dallenbach F, Hummel M, et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4766-70.
  27. Murray PG, Young LS, Rowe M, Crocker J. Immunohistochemical demonstration of the Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein in paraffin sections of Hodgkin's disease. *J Pathol* 1992; 166: 1-5.
  28. Pallesen G, Hamilton-Dutrois SJ, Rowe M, Young LS. Expression of Epstein-Barr virus latent gene product in tumor cells of Hodgkin's disease. *Lancet* 1991; 337: 320-2.
-