

담낭암에서 DPC4/Smad4 유전자 변이에 관한 연구

서울대학교 의과대학 외과학교실 및 ¹인하대학교 의과대학 외과학교실

이건영¹ · 김선희 · 박상재 · 박윤찬 · 장진영 · 박용현

Mutations of DPC4/Smad4 Gene in Gallbladder Carcinoma

Keon-Young Lee, M.D.¹, Sun-Whe Kim, M.D., Sangje Park, M.D., Yoon-Chan Park, M.D., Jin-Young Jang, M.D. and Young-Hyun Park, M.D.

Purpose: The DPC4/Smad4 gene is known to perform a key role in the TGF- β group protein signaling pathway, which regulates cell proliferation, differentiation and death. DPC4/Smad4 gene mutation has been studied in cancers of the breast, ovary, esophagus, colo-rectum, bile duct, as well as the pancreas. The mutation rates depend on the kind of carcinoma sites, and range from 10% to around 50%, but no study has been performed on gallbladder carcinomas. This study was performed to search for mutation of the DPC4/Smad4 gene in the gallbladder carcinomas.

Methods: Eighteen surgically resected gallbladder cancers were screened for mutation of the exons; 8, 9, 10 and 11 of the DPC4/Smad4 gene using dideoxyfingerprinting (ddF), and single strand conformational polymorphism (SSCP). The results were confirmed using automatic DNA sequencing, and the expressions examined by immunohistochemical staining with the monoclonal anti-DPC4/Smad4 protein antibody, B8.

Results: DdF revealed 3 mutations in two of the exons, which were confirmed by direct sequencing. In one case, a single-base substitution mutation existed in exon 11 with codon change (missense mutation), whereas in two cases such mutations were detected in exon 9 without codon change (silent mutation). Immunohistochemical staining showed negative to weakly positive expression for all three mutated cases, but had high false-positive rates (7/11).

Conclusion: DPC4/Smad4 gene mutation exists in a certain proportion of gallbladder carcinomas, but the mutation rate seems to be low compared to organogenetically related pancreas or bile duct carcinomas. This suggests somewhat

different mechanisms may operate on the carcinogenesis of these organs. (J Korean Surg Soc 2002;62:233-242)

Key Words: Gallbladder carcinoma, DPC4, Smad4, Dideoxyfingerprinting

중심 단어: 담낭암, DPC4, Smad4, 유전자, 변이

Department of Surgery, Seoul National University College of Medicine, Seoul, ¹Department of Surgery, Inha University College of Medicine, Incheon, Korea

서 론

담낭암은 소화기암 중 다섯 번째로 빈발하는 악성종양이며 한국인 암등록소에 따르면 1980년대 이후 그 발생이 서서히 증가하고 있다. 담낭암은 예후가 극히 불량하여 방사선 요법 및 항암 화학요법에 잘 반응하지 않으며 근치적 수술이 가능한 환자가 20~30% 미만으로 추정되고 근치적 수술 후의 2년 생존율도 30~40%에 불과하다.(1) 따라서 담낭절제술 시에 우연히 발견된 초기 담낭암을 제외하면 그 예후는 매우 비관적이라는 견해가 지배적이며 보다 근본적인 치료적 접근을 위하여 발암의 원인을 규명하는 것이 요구된다. 그러나 다른 대부분의 고형암과 마찬가지로 담낭암의 원인은 명확히 규명되지 않고 있는 실정이다. 역학적으로 담낭암은 인종과 지역에 따른 발생 빈도의 현저한 차이를 보여 유전적 소인이나 식습관 등이 원인으로 작용할 것이 의심되지만 현재까지 어떤 직접적인 인과관계가 규명된 바는 없다. 또한 담석, 췌담관합류이상(anomalous pancreatobiliary ductal union, APBDU) 등을 포함한 어떠한 자극에 의하여 담낭 점막에 전암성 병변이 발생하고 담낭 선종(adenoma)을 포함한 이형성(dysplasia)도 전암성 병변이 될 수 있다는 주장이 제기되었다. 이는 담낭암 주위의 점막에서 이형성이 상당수 발견되고 80%의 담낭암에서 화생(metaplasia)이 발견되어 화생병변 및 이형성이 암종의 전구 병변임을 시사하기 때문이다.(2)

최근에는 분자생물학의 발달로 종양세포에서의 유전자 변이에 대한 연구가 활발해지면서 암의 발생 원인에 대한

책임저자 : 박용현, 서울특별시 종로구 연건동 28
☎ 110-744, 서울대학교병원 일반외과
Tel: 02-760-2324, Fax: 02-762-8851
E-mail: yhpark@plaza.snu.ac.kr

접수일 : 2002년 2월 8일, 게재승인일 : 2002년 2월 18일

연구도 역학적 접근과 함께 분자생물학적 접근이 이루어지고 있다. 담낭암의 발생과 관련하여 연구된 유전자로는 p53, c-erbB-2, K-ras 등이 비교적 활발하게 연구되었고 APC, c-fos 종양단백(oncoprotein), nm23 등도 보고되었다. 그러나 종양 억제 유전자로 알려진 DPC4/Smad4 유전자에 대하여는 연구된 바가 없다. DPC4/Smad4 유전자는 췌장암 조직에서 변이되거나 탈락되는 경우가 많아 종양 억제 유전자로서의 가능성이 시사된 이래 여러 암종에서 그 변이 여부가 연구되고 있다.(3) 담낭은 발생학적으로 췌장과 유사하여 췌장의 발암기전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 DPC4/Smad4 유전자가 담낭암의 발생과 진행에 있어서도 어떤 상당한 의의를 가질 것으로 생각되나 현재까지 이에 대한 연구보고는 이루어지지 않고 있다. 이에 본 연구는 담낭암에서 DPC4/Smad4 유전자의 변이와 그 빈도를 조사하고 다른 암종에서의 연구 결과와 비교하여 DPC4/Smad4 유전자가 발암에 관여하는 과정에 대한 연구의 기초 자료를 마련하는 동시에 향후 다양한 암 유전자 및 종양 억제 유전자와의 관련성을 연구하여 궁극적으로 담낭암의 발생 원인을 규명하고 이를 치료에 응용할 수 있게 하기 위한 토대를 마련할 목적으로 시행되었다.

방 법

서울대학교 병원 일반외과에서 담낭암으로 절제술(담낭절제술, 확대 담낭절제술)을 시행 받은 환자의 담낭암 조직 일부를 절제 즉시 -190°C의 액체 질소에 동결시켜 보관한 18예의 표본을 대상으로 하였다. 염기 서열의 대조군은 정상 위점막 조직을 사용하였다. 또 유전자 변이를 분석하는 조건을 검증하고자 DPC4/Smad4 유전자 변이가 가장 빈번하게 관찰되는 것으로 알려진 췌장암 조직 6예에 대해서도 실험을 시행하였다.

1) 조직 채취 및 DNA 추출

18예의 동결된 담낭암 조직을 cryostat microtome을 이용하여 4-µm의 절편으로 만든 후 헤마톡실린-에오신 염색을 하고 염색한 표본을 현미경하에서 관찰하여 암종 부위임을 확인하고 종양 세포의 비율이 50%를 넘는 표본만을 연구 대상에 포함시켰다. 20개 내지 40개의 12-µm의 절편을 만들고 마지막에는 다시 4-µm의 절편을 만들어 종양 세포의 비율을 확인하고 이를 기록한 후 유전자 분석 표본으로 삼았다. 조직을 미리 차갑게 해 둔 mortar에서 잘 갈아 미세하게 만든 후 조직 100 mg당 1.2 ml의 소화 완충액과 10 mg/ml의 단백 분해효소 K 12µl를 넣고 혼합하여 50°C에서 12~18시간 동안 잘 흔들면서 배양하였다. 배양된 검체에 0.5M Tris-HCl (pH 8.0)에 평형형성(equilibration)된 동량의 페놀 1.2 ml를 가하여 10분에 걸쳐 서서히 혼합시키고 반응액을 두 개의 시험관에 반씩 나누어 담은 후 4°C에서 4,000 rpm

으로 10분간 원심 분리하였다. 두 층으로 완전한 분리가 이루어지면, 상층 DNA만 분리하여 1/2부피의 7.5 M 아세트산 암모늄과 2배 부피의 100% 알코올을 넣고 4°C에서 3000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 DNA를 분리하였다. 직경이 큰 피펫을 이용하여 침사(pellet)가 손상되지 않도록 상층액만 잘 분리하고 다시 70% 알코올 1 ml를 가하여 원심 분리한 후 70% 알코올은 버리고 DNA 침사를 건조시켰다. 이 DNA 침사를 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)의 수용체 4 ml에 4°C에서 OD₂₇₀이 0.05 미만이 될 때까지 투석하였다. 투석용기의 표본의 용적이 1.5 내지 2배로 증가되도록 하여 260 nm와 280 nm에서 DNA의 흡광도를 분석하였다. 이때 A₂₆₀과 A₂₈₀의 비율이 1.75보다 크도록 기준을 잡았는데, 이 비율이 낮으면 추출물 가운데 단백질이 상당량 남아 있음을 의미하며 이 때에는 sodium dodecyl sulfate (SDS)를 0.5%까지 증량하여 위의 DNA 추출과정을 반복하여 시행하였다. 추출된 DNA를 4°C에 보관하여 다음 실험의 주형(template)으로 사용하였다.

2) 중합 효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)

중합 효소 연쇄반응 용액은 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM 염화 칼륨, 1.5 mM 염화 마그네슘을 넣은 10 x 증폭 완충액 2µl에 2 mM dNTP 2µl, 20 pM의 각각의 시동체(primer, GIBCO), Taq 중합효소(Dakara) 0.2µl (1 unit) 그리고 genomic DNA 20 ng을 넣고 증류수를 넣어서 최종 용적이 20µl가 되도록 하였다. 연쇄반응은 Perkin Elmer Cetus사에서 나온 thermal cycler (version 1.0)를 이용하여 94°C에서 5분간 예열한 후 94°C에서 30초, 57°C에서 30초, 72°C에서 1분간 처리하는 방법으로 35회를 시행한 후 마지막에 72°C에서 10분간 유지하였다. 중합 효소 연쇄반응 후에 반응 용액을 spin down시킨 후 -20°C에 보관하고 일부를 취하여

Table 1. Primer sequence

Primer종류*	Sequence	Base pair
Exon 8S	5'-TTTCTCATGGGATTTGGTTC-3'	20
Exon 8AS	5'-CAATTTTTTAAAGTAACTATCTGAC-3'	25
Exon 9aS	5'-TATTAAGCATGCTATAACAATCTG-3'	23
Exon 9aAS	5'-CTGTCTAAGTAGTAACTCTG-3'	20
Exon 9bS	5'-CAAAGGTGTGCAGTTGGAATG-3'	21
Exon 9bAS	5'-CTTCCACCCAGATTTCAATTC-3'	21
Exon 10S	5'-GAATTTTCTTTATGAACTCATAG-3'	23
Exon 10AS	5'-TTTAAAAAGAATGAAAAGCATAAC-3'	24
Exon 11aS	5'-CTGATGCTTCCAACCTCTTTTCTG-3'	24
Exon 11aAS	5'-GGCATGGTATGAAGTCATTCGTC-3'	23
Exon 11bS	5'-CTGATGCTTCCAACCTCTTTTCTG-3'	25
Exon 11bAS	5'-TGTATTTTGTAGTCCACCATC-3'	21

*S = sequence sense; AS = sequence antisense.

2% 순수 우무 겔(agarose gel)에 전기영동을 하여 증폭 반응에 의한 표적 띠를 확인하였다. 시동체는 DPC4/Smad4 유전자의 기능에 관여하는 exon 8~11에서 250 base pair 이하의 DNA 조각을 만들 수 있게 설계되었으며, exon 9와 exon 11에서는 ddF의 편의를 위해 2 부분으로 겹치게 설계하여 총 6쌍의 시동체가 사용되었다(Table 1).

3) Dideoxyfingerprinting (ddF)

ddF 분석을 위해, 상기에 언급한 중합 효소 연쇄반응 조건에 맞추어 100 μ l 부피로 연쇄반응을 수행하였다. 이 중합 효소 연쇄반응 결과물을 High Pure PCR product purification kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, USA)를 사용하여 정제하였다. ddF sequencing reaction을 위하여 sequencing kit (AccuPower DNA sequencing kit, Bioneer, Chungbuk, Korea)를 사용하였다. Sequencing kit는 G, A, T, C가 각각의 시험관에 따로 미리 혼합되어 있으며, 이 시험관 중 하나만을 이용하여 실험하였다. 시험관에 200 ng 이상의 중합 연쇄반응 결과물과 3'에서 5' 방향의 시동체(10 pmol), 증류수를 10 μ l가 되도록 넣고, 0.2 μ l의 동위원소 [α -³³P]dCTP (2500 Ci/mmol, Amersham pharmacia biotech, Buckinghamshire, UK)를 첨가하였다. 상기에 언급한 동일한 중합 연쇄반응 조건으로 thermal cycler를 이용하여 반응시킨 후, 각 시험관에 sequencing stop solution 4 μ l를 넣어 주어 반응을 종료시켰다. 이 반응 혼합물을 95°C에서 5분간 가열하고, 얼음에 보

관하였다가 즉시 0.5×MDE nondenaturing gels (FMC Bioproducts, Rockland, Maine, USA)에 4 μ l씩 loading하였다. 이것을 45W, 50°C로 2~3시간 동안 전기 영동하고, 겔을 3 M 용지에 옮겨 80°C에서 2시간 동안 잘 말린 후, 24시간 동안 X-ray 필름에 노출하였다. 대조 DNA 표본의 결과와 비교하여 비정상적인 띠 이동을 보인 경우를 유전자 변이가 있는 것으로 판독하였다.

4) 염기 서열의 검색 및 이상 염기 서열의 결정

염기 서열 분석은 자동 염기 서열 분석기를 이용하여 시행하였다. 염기 서열 분석을 위한 중합 연쇄 반응액은 10x 중합 연쇄반응 완충액(Boehringer Mannheim) 5 μ l, 2.5 mM dNTP 1 μ l, 각각의 시동체 0.5 μ l, Taq 중합효소 0.2 μ l, genomic DNA 200 ng을 넣은 후 증류수로 최종 용적이 50 μ l가 되도록 하였고 증폭시킨 중합 연쇄반응 산물은 QIAquick PCR purification kit (QIAGEN)를 이용하여 중합 연쇄반응 산물만을 정제해 냈다. 이 정제 산물을 GeneQuant (Pharmacia)를 이용하여 정량하였다.

Cycle Sequencing 반응은 GeneAmp PCR system 9600 (model 9600 Perkin-Elmer)을 사용하였으며, 미리 96°C까지 예열시켰다가 10초 동안 온도를 유지한 후 96°C에서 30초, 50°C에서 15초, 60°C에서 4분씩 총 25회 반응시켰다. 반응되지 않은 뉴클레오티드는 Centri-sep (Centri-Sep™ spin columns Princeton Separations)을 사용하여 제거하였으며,

Table 2. Demographic data

Case No.	Age/Sex*	Operation name	Pathology
1	71/M	Palliative cholecystectomy	Adenocarcinoma
2	61/F	Palliative hepaticojejunostomy	Adenocarcinoma
3	78/F	Palliative cholecystectomy	Undiff. carcinoma
4	67/F	Palliative cholecystectomy	Adenocarcinoma
5	52/F	Palliative cholecystectomy	Adenocarcinoma
6	64/F	Extended cholecystectomy	Adenocarcinoma
7	61/F	Extended cholecystectomy	Adenocarcinoma
8	57/F	Extended cholecystectomy	Adenocarcinoma
9	36/M	Cholecystectomy	Adenocarcinoma
10	56/M	Palliative cholecystectomy	Adenosquamous ca.
11	48/M	Extended cholecystectomy	Anaplastic ca.
12	73/F	Palliative cholecystectomy	Adenocarcinoma
13	76/M	Cholecystectomy	Adenocarcinoma
14	59/M	Cholecystectomy	Adenocarcinoma
15	77/F	Extended cholecystectomy	Adenocarcinoma
16	56/M	Palliative hepaticojejunostomy	Adenocarcinoma
17	87/F	Extended cholecystectomy	Adenocarcinoma
18	51/F	Cholecystectomy	Adenocarcinoma

*M = male; F = female.

sequencing product는 Speed Vac (Savane Instruments)에서 건조시켰다. 전기영동을 시행하기 전 검체를 90°C에서 2분간 열을 가하고 얼음에 담아 두었다가 4μl의 탈 이온화 된 formamide에 녹인 후 4.75%의 denaturing polyacrylamide gel 에 올렸다. 전기영동은 30 W로 12시간 시킨 후 ABI 373A Sequence software version 1.2.1을 사용하여 결과를 분석하였다.

5) 면역조직화학 염색

면역조직화학 염색은 각 증례에 대하여 보관 중인 파라핀 블록을 사용하였다. 각 블록으로부터 5-μm의 절편의 슬라이드를 만들어 헤마톡실린-에오신 염색을 한 후 종양 조직의 유무를 광학 현미경으로 검사하였다. 종양이 확인된 블록에서 다시 슬라이드를 만들어 통상적인 방법으로 파라핀을 제거한 후 0.01 M 구연산 나트륨 완충액(pH 6.0)에 담고 고, 중, 저단파에서 각각 5분씩 가열하였다가 차가운 인산염 완충 용액에 담았다. 슬라이드를 1 : 100으로 희석된 DPC4/Smad4 단클론 항체(B8, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)와 상온에서 2시간 동안 배양한 후 인산염 완충 용액으로 씻었다. 다시 2차 항체에 30분간 배양한 후 avidin-biotin 복합체와 30분, 디아미노벤지딘 용액에 2분간 배양한 후 흐르는 물에 씻어 반응을 중지시키고 각 슬라이드를 헤마톡실린으로 대조 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다. 판독은 세포질 내의 염색 부위를 기준으로 다섯 단계로 나누어 음성(-)(<5%), 약양성(+/-)(5~10%), 양성(+)(10~25%), 강양성(++)(25~50%), 강강양성(+++)(>50%)으로 구분하였고 핵 내의 염색 정도는 음성(-), 국소성(focal) 및 미만성(diffuse)로 구분하였다.

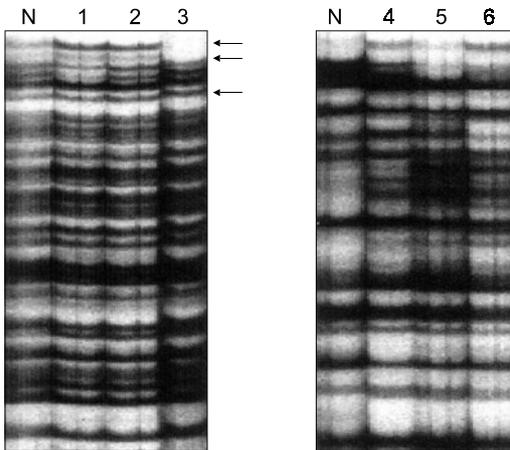


Fig. 1. ddF results of exon 9b in normal control (N) and pancreatic carcinoma specimens. Arrows indicate band shift in specimen No.3.

결 과

1) 환자의 특성, 수술 방법 및 병리조직검사 결과

18예의 담낭암 중 남자가 7예, 여자가 11예였으며 연령 분포는 36세부터 87세까지였고 연령의 중앙값은 62세였다. 수술은 근치적 절제가 10예에서 이루어졌고 8예에서는 고식적 수술만이 가능하였다. 근치적 수술로는 확대 담낭절제술이 6예, 담낭절제술이 4예 시행되었고 고식적 수술로는 담낭절제술이 6예, 담낭절제술 및 간-공장 문합술이 2예 시행되었다. 최종 병리조직검사 결과 선암이 15예였고 미분화암, 퇴행암(anaplastic carcinoma) 및 선편평암(adeno-

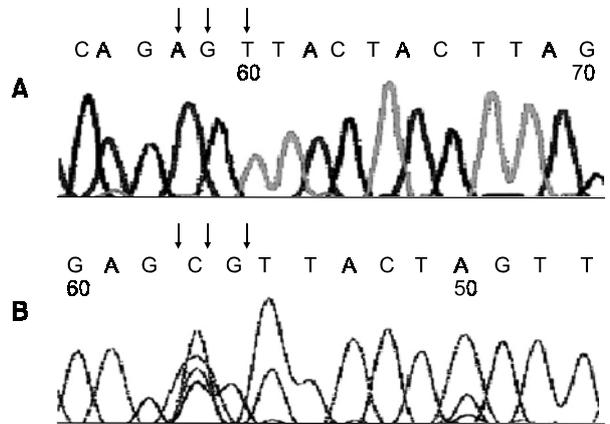


Fig. 2. Automatic sequencing results of exon 9b in normal control (A) and pancreatic carcinoma specimen No.3 (B). Arrows indicate the site of point mutation.

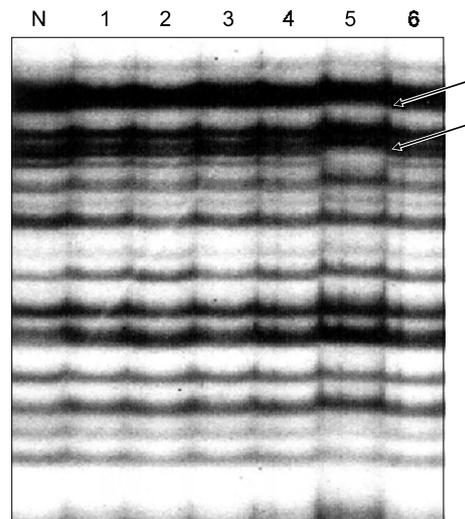


Fig. 3. ddF results of exon 11a in normal control (N) and pancreatic carcinoma specimens. Arrows indicate band shift in specimen No.5.

squamous carcinoma)이 각각 1예씩 있었다(Table 2).

2) ddF 및 자동 염기서열 분석결과

중합효소 연쇄 반응 및 ddF의 조건을 확인하기 위하여 현재까지 DPC4/Smad4 유전자의 변이가 가장 흔한 것으로 알려진 췌장암 조직 6예에 대하여 ddF 및 direct DNA sequencing을 시행하였다. 분석 결과 6예의 췌장암 조직 중 2예에서 DPC4/Smad4 유전자의 변이가 관찰되었다. Exon 9b의 ddF 결과 3번 검체에서 band shift가 나타났고(Fig. 1) 자동 염기서열 분석에서 point mutation에 의해 exon 9b의 41번째 염기(전체적으로는 1,360번째)가 adenine (A)에서 cytosine (C)으로 치환됨으로서(substitution mutation) codon은 serine (AGT)에서 arginine (CGT)으로 변화된 것이 확인되었다(missense mutation)(Fig. 2). 또한, exon 11a의 분석에서는

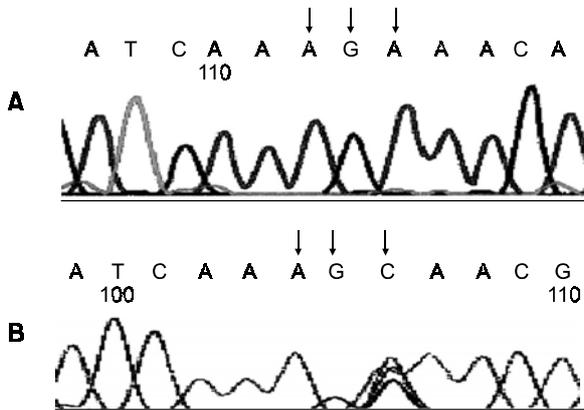


Fig. 4. Automatic sequencing results of exon 11a in normal control (A) and pancreatic carcinoma specimen No.5 (B). Arrows indicate the site of point mutation.

5번 검체에서 band shift가 나타났고(Fig. 3) exon의 83번째(전체적으로는 1,673번째) 염기가 adenine에서 cytosine으로 치환되어 codon은 arginine (AGA)에서 serine (AGC)으로 변환되었다(Fig. 4).

췌장암 조직에서 DPC4/Smad4 유전자의 변이를 확인한 후 동일한 조건에서 담낭암 조직으로 ddF 및 자동 염기서열 분석을 시행한 결과 18예의 담낭암 조직중 3예에서 2개의 exon에 유전자 변이가 있었다. Exon 9b의 ddF 결과 증례 1과 2에서 band shift가 관찰되었으며(Fig. 5), 염기서열의 분석에서 정상적인 염기서열인 exon 9b의 37번째(전체적으로는 1,356번째) 염기가 adenine에서 guanine (G)으로 치환되었

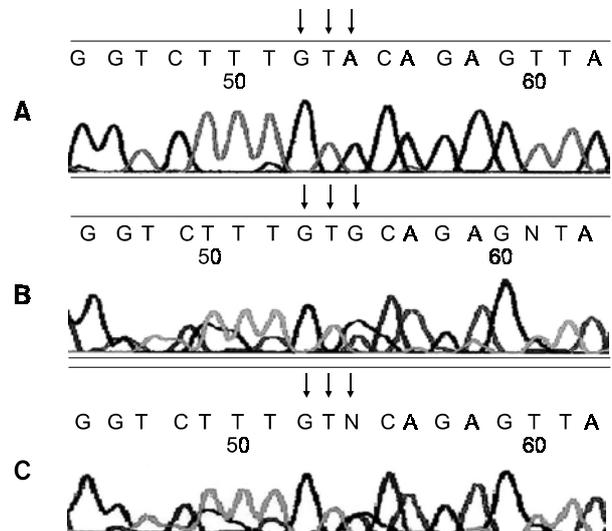


Fig. 6. Automatic sequencing results of exon 9b in normal control (A) and gallbladder carcinoma specimen No.1 (B) and No.2 (C). Arrows indicate the sites of point mutations.

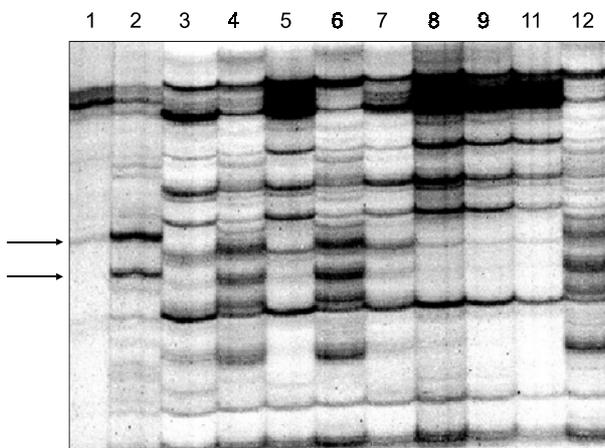


Fig. 5. ddF results of exon 9b in gallbladder carcinoma specimens. Arrows indicate band shifts in specimen No.1 and No.2.

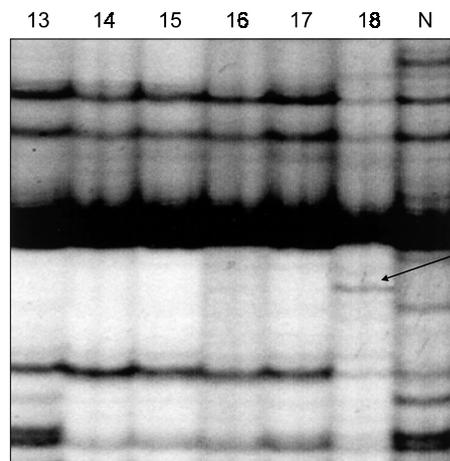


Fig. 7. ddF results of exon 11a in gallbladder carcinoma specimens and normal control (N). Arrows indicates band shift in specimen No.18.

으나 codon은 valine (GTA)에서 valine (GTG)으로 동일한 아미노산이었다(silent mutation)(Fig. 6). Exon 11a의 ddF에서는 증례 18에서 band shift가 관찰되었고(Fig. 7) 염기서열 분석 결과 136번째(전체적으로는 1,724번째) 정상 염기인 thymine (T)이 cytosine으로 치환되어 codon이 leucine (TTA)에서 serine (TCA)으로 변환되었다(Fig. 8). ddF에서 비정상적인 band shift를 보인 exon (9b, 11b)에서의 정상 대조 DNA(위점막 조직)에서는 유전자 변이가 없는 정상적인 유전자 배열을 보였다.

3) 면역조직화학 염색

DPC4/Smad4 유전자의 발현을 보기 위하여 면역조직화학 염색을 시행하였다(Table 3). 18예 중 4예는 보관된 paraffin

block이 없어 면역조직화학 염색 대상에서 제외하였다. 제외된 4예의 증례 중에는 DPC4 유전자의 변이가 발견된 증례는 없었다. 정상 담낭 점막에서는 강강양성(+++)으로 나타난 반면(Fig. 9) 변이가 확인된 3예의 증례에서는 음성 혹은 약양성을 보였다. Silent mutation인 증례 1과 증례 2에서도 면역조직화학 염색에서는 음성으로 나타났으며(Fig. 10) missense mutation인 증례 3에서는 약양성으로 나타났

Table 3. Summary of results

Case No.	Mutations detected		Immunohistochemical stain	
	By ddF	By sequencing	Expression	Nuclear stain
1	+	+	-	-
2	+	+	-	-
3	-	-	+++	Diffuse
4	-	-	+/-	Focal
5	-	-	No slide	
6	-	-	+/-	Focal
7	-	-	-	-
8	-	-	+++	Diffuse
9	-	-	+++	Focal
10	-	-	++	Focal
11	-	-	+/-	Focal
12	-	-	No slide	
13	-	-	No slide	
14	-	-	+/-	Focal
15	-	-	+/	Focal
16	-	-	No slide	
17	-	-	-	Focal
18	+	+	+/-	Focal

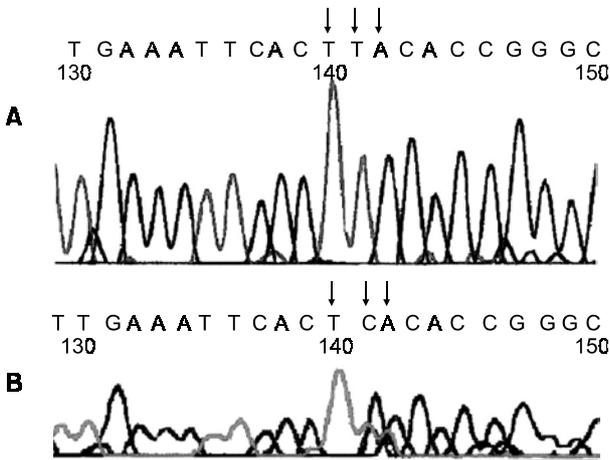


Fig. 8. Automatic sequencing results of exon 11a in normal control (A) and gallbladder carcinoma specimen No.18 (B). Arrows indicate the sites of point mutation.

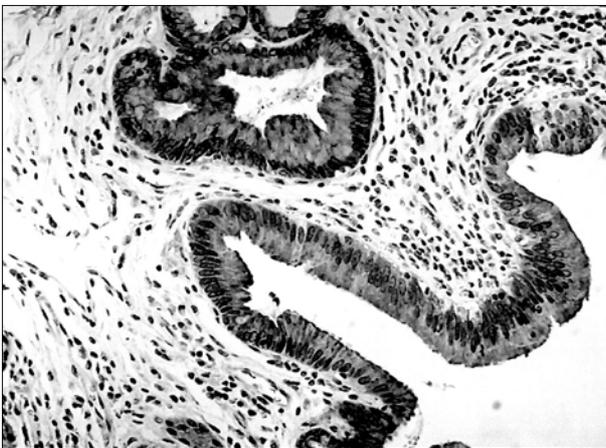


Fig. 9. Immunohistochemical staining of normal gallbladder mucosa. Densely stained nuclei and cytoplasm suggest strong and uniform expression of DPC4 (grading +++)(×200).

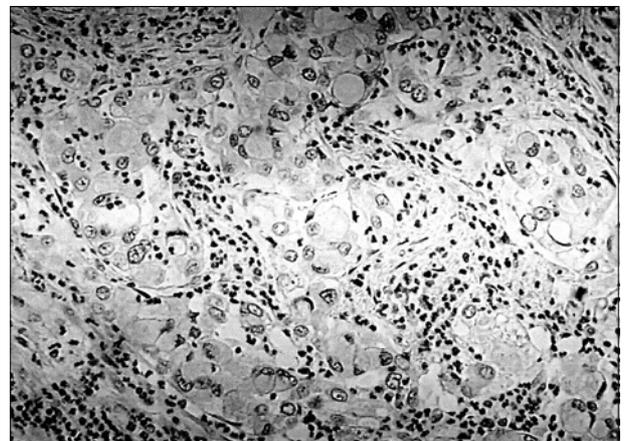


Fig. 10. Immunohistochemical staining of gallbladder carcinoma specimen. Loss of expression of DPC4 with negative (grading -) result (×200).

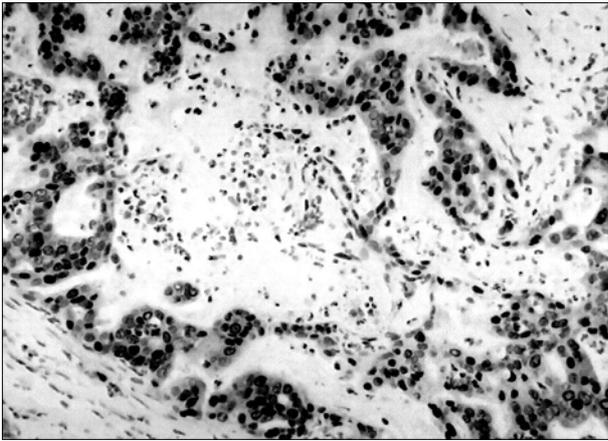


Fig. 11. Immunohistochemical staining of gallbladder carcinoma specimen. Strong and uniform expression of DPC4 showing positive (grading +++) result ($\times 200$).

다. 변이가 없는 11예 중 4예에서는 강양성(++) 혹은 강양성을 나타냈으나(Fig. 11) 7예에서는 음성 혹은 약양성으로 나타났다.

고 찰

DPC4 유전자는 사람의 염색체 18q21.1에 위치하는 유전자로서 Smad4와 동일한 유전자로 알려져 있는데 이들은 Transforming growth factor β (TGF- β)군 단백질들의 신호 전달 체계에 중심적인 역할을 하는 것으로 생각된다.(4) TGF- β 군 단백질은 구조적으로 유사한 여러 종류의 단백질군으로 구성되며 세포의 증식, 분화, 인식 및 사멸을 조절하여 주로 발생의 조절, 조직 재순환과 재생에 관여한다. 여기에 속하는 것으로는 Decapentaplegic (DPP) 단백질과 activin, BMP (bone morphogenic protein), TGF- β 등이 있으며 이들은 포유동물의 BMP2와 BMP4 및 초파리(Drosophila)에서 이에 상응하는 DPP를 연구하는 과정에서 발견되었다. TGF- β 군 단백질은 Type I과 Type II 수용체로 알려진 두 개의 transmembrane serine/threonine kinase에 동시에 접촉함으로써 신호를 전달한다. 이렇게 형성된 복합체의 신호 생성 과정에서 가장 중요한 과정은 Type I 수용체의 인산화(phosphorylation)이며 이 과정에서 Type II 수용체가 촉매작용을 하는 것으로 생각된다. 인산화는 Type I 수용체의 N-말단부의 다섯 개의 serine과 threonine의 다발에서 일어나는데, 이 부위는 상당히 보존적인 부분이며 여기에 변이가 발생하면 신호 전달이 차단되고 그 정도는 변이된 다발의 수에 비례한다. 요컨대, ligand는 수용체 활성 효소인 Type II 수용체에 기질인 Type I 수용체를 끌어오는 역할을 한다고 볼 수 있다. 또한 이러한 일련의 단계적인 조합에 의하여 하나의 ligand에 의하여 다양한 효과를 나타낼 수 있게 된다.(5)

초파리에서 이 수용체에 의하여 발생된 신호가 핵으로 전달되는데 필요한 유전자가 Mad (Mothers against dpp) 유전자와 Medea 유전자이며(6) 선충류(Caenorhabditis elegans)에서 Mad 유전자의 상동 유전자는 sma 유전자로(7) 사람을 포함한 포유 동물에서 발견된 Smad 유전자는 Mad와 sma의 합성어이다. 포유동물에서 Mad와 관련된 단백질은 Smad1부터 Smad5까지 다섯 가지로 이들은 TGF- β , activin, BMP2 및 BMP4의 신호 전달에 관여한다. 현재까지 알려진 Mad, sma2, sma3의 null mutation은 이들 유전자의 극도로 보존된 C-말단부의 아주 좁은 부위에서 일어나는 missense 혹은 nonsense mutation이다.(6-8) 특히 이 유전자의 C-말단부는 ligand에 대한 특이성을 나타내며 췌장암을 비롯한 각종 암에서 missense mutation을 보이는 부분은 이 C-말단부의 매우 국한된 부분으로서 이는 C-말단부의 3차원적 구조가 DPC4/Smad4 유전자의 신호 전달에 중요한 역할을 함을 시사한다.(9)

Schutte 등(10)은 췌장암의 약 48%에서 DPC4/Smad4의 변이가 발견되는 반면, 유방암과 난소암에서는 10% 미만으로 발견되어 종양의 종류에 따라 DPC4/Smad4 유전자의 변이가 갖는 의미가 다르다고 보고하였다. Rozenblum 등(11)은 42예의 췌장암에서 K-ras, p16, p53 그리고 DPC4/Smad4 유전자의 변이를 조사하였다. 그들은 DPC4/Smad4의 변이와 p16의 변이가 공존하는 경우가 유의하게 높았다고 보고하면서 p16의 비활성화가 뒤이은 DPC4/Smad4의 변이를 용이하게 할 가능성이 있다고 하였다. 또한 1997년 Grau 등(12)은 췌장암 세포주 중에서 DPC4/Smad4가 발현한 세포주에서는 TGF- β 가 cdk (cyclin-dependent kinase) 억제물질인 p21^{waf1}을 유도하지만 DPC4/Smad4가 없으면 이런 현상이 발생하지 않아 DPC4/Smad4의 비활성화가 췌장암에서 TGF- β 에 의한 세포 증식 억제 기능을 상실시킨다고 하였다. 최근에는 Hahn 등(13)이 현재까지 알려진 췌장암에서의 유전자의 변이를 요약하여 K-ras 종양 유전자 및 p16, p53의 변이가 높은 비율로 나타나는 것으로 미루어 세포주기 조절기능의 교란이 이 종양의 유력한 발생기전이고 DPC4/Smad4의 변이도 높은 비율로 나타나는 것을 볼 때 TGF- β 신호전달 체계도 췌장암의 발생에 영향을 미친다고 하였다. Hahn 등(14)은 또 32예의 담도암에서 DPC4/Smad4 유전자의 변이를 조사하여 5예(16%)에서 변이를 발견하였고 특히 총수담관암은 8예 중 4예에서 DPC4/Smad4 유전자의 변이가 있어 그 역할이 특히 중요하다고 주장하였다. 현재까지 DPC4/Smad4 유전자의 변이가 연구된 소화기계의 다른 종양으로는 식도암, 대장-직장암 등이 있으며 소화기계 이외의 암종에서는 전립선암, 유방암, 폐암, 신경아세포종 및 두경부 편평상피암 등이 있는데 각 암종에서의 변이 정도는 차이가 커서 이 유전자 변이가 발암에 관여하는 중요성은 암에 따라 다를 것으로 생각된다.

담낭암의 발암 원인에 대한 분자생물학적 연구는 제한적

으로 이루어지고 있는데 이는 다량의 종양 조직을 얻기가 어렵고 수술 당시 근치적 절제가 불가능한 경우가 많기 때문이다. 본 연구의 대상이 된 환자군에서도 18예 중 10예에서만 근치적 수술이 가능했다. 따라서 암유전자 및 종양 억제 유전자에 관한 기존의 연구는 위암이나 대장암 등에 비하여 그다지 활발하게 이루어지지 못하고 있는 실정이며 더욱이 종양 억제 유전자의 가능성이 시사된 DPC4/Smad4 유전자의 변이에 관한 연구는 아직 문헌상에 보고된 바가 없다. 본 연구의 과정에서 유전자 변이를 보기 위한 선별검사로 사용된 방법들도 담낭암이 아닌 다른 종양에서 연구된 것을 적용하였으므로 그 조건을 설정하는 데에 어려움이 따랐다. 일반적으로 핵산의 염기 배열의 변이를 조사하는 방법으로는 dideoxy 혹은 Sanger법으로 알려진 direct genomic sequencing이 표준으로 인정되어 왔다.(15) 그러나 이 방법은 높은 민감도와 특이도에도 불구하고 시간과 노력이 많이 요구되어 다량의 검체를 대상으로 유전자 변이의 선별 검사를 시행하는 데는 실용적이지 못하다.(16) 현재로서는 자동 염기서열 분석기를 이용하는 방법이 가장 빠르고 정확하다고 할 수 있겠으나 검체의 수가 많을 때는 분석에 필요한 비용이 많이 든다. 따라서 몇 가지 선별 검사법이 개발되었는데, single strand conformational polymorphism (SSCP),(17,18) denaturing gradient gel electrophoresis, (19) heteroduplex analysis,(20) RNase A cleavage,(21) dideoxyfingerprinting (ddF)(22,23) 등이 그것이다. SSCP는 빠르다는 장점이 있지만 전기영동의 온도, PCR 산물의 크기 등 조건에 민감하고 시행자에 따라 결과의 차이가 발생할 여지가 많아 연구자에 따라서는 60% 내지 75% 정도의 민감도를 가지는 것으로 알려져 있다.(16-18) 본 연구에서도 처음에는 SSCP로 유전자의 변이를 조사하고자 하였으나(결과는 제시하지 않음) 담낭암 18예 모두에서 변이가 관찰되지 않았다. 그러나 이 결과만으로는 DPC4/Smad4 유전자의 SSCP 조건이 부적당하였는지 혹은 SSCP 방법 자체의 민감도가 낮기 때문인지를 구별할 수 없었다.

ddF는 dideoxy sequencing과 SSCP의 방법을 조합한 형태로 볼 수 있는데, PCR로 증폭된 산물을 한 종류의 dideoxy analogue (예를 들면 ddCTP 등)로 sequencing을 종료시킨 후 발생된 DNA 조각들을 SSCP를 이용하여 전개하는 것이다.(22) 이 때 band가 이동하는 거리는 DNA 가닥의 크기와 이차 구조에 의하여 결정되며 유전자에 변이가 발생하면 종료되는 sequencing의 위치가 변하여 정상 유전자의 전개와 다른 형태를 나타내게 된다. 최근 발표된 연구들에 의하면 ddF에 의한 방법은 SSCP에 비하여 조건에의 의존성이 적어 거의 100%에 가까운 민감도를 가진다고 한다.(16,23) 본 연구에서도 자동 염기서열 분석결과와 비교하여 볼 때 췌장암 2예와 담낭암 3예에서 모두 ddF로 유전자 변이를 찾아낼 수 있었다. 이 결과는 DPC4/Smad4 유전자의 변이를 연구하는 데 SSCP보다는 ddF를 이용하는 것이 효과적일 수

있음을 시사한다. 1996년 Martincic과 Whitlock(16)도 SSCP를 이용하여 p53의 변이를 본 기존의 연구결과들이 변이의 빈도를 낮게 보고하였을 가능성이 있다는 주장을 하였다.

유전자의 변이 자체보다도 변이에 의한 결과를 보는 데는 유전자에 대한 항체를 이용한 면역조직화학 염색법이 이용된다. 본 연구에서 DPC4/Smad4 유전자의 변이가 있었던 3예 모두에서 면역조직화학 염색상 음성 혹은 약양성으로 나타났으나 이 중 2예는 silent mutation이었다. 이러한 결과가 나온 이유를 생각해 보면 첫째로 면역조직화학법이 DPC4/Smad4 변이의 검사에서 높은 위양성률(즉, 염색 결과에서 음성 혹은 약양성)을 가질 가능성이 있겠다. 최근 시행된 한 연구에서는 유방암에서 p53 유전자의 변이를 관찰하고 자동 염기서열 분석과 비교하였는데 면역조직화학 법으로는 유전자 변이의 33%를 감지하지 못하였으며 위양성률도 30%로 나타났다.(24) DPC4/Smad4 유전자의 변이를 면역조직화학 염색으로 관찰한 연구에서는 췌장 상피내 종양의 이형성도가 증가할수록 DPC4/Smad4의 발현이 감소함이 관찰되었으나 이 연구는 염기서열의 분석을 시행하지 않아 DPC4/Smad4의 변이와 면역조직화학 염색 결과와의 상관관계는 알 수 없었다.(25) 둘째로는 자동 염기서열 분석이 거의 100%에 가까운 정확도를 가진다는 점을 고려할 때 담낭암에서 DPC4/Smad4 유전자의 변이가 본 연구에서 검사한 exon 8~11 이외의 구역에 존재할 가능성이 있다. 그러나 기존의 연구들은 DPC4/Smad4 유전자의 기능에 중요한 부분이 C-말단부에 존재함을 보고하고 있고(6,7-9) DPC4/Smad4 유전자의 변이를 연구한 보고들도 대부분 exon 8~11의 변이를 본 것이다.(13,14) 세 번째의 가능성은 silent mutation이 유전자 혹은 단백질의 생물학적 특성에 변화를 초래하였을 가능성으로, DPC4/Smad4 유전자에서 silent mutation을 보고한 연구들(26)은 그 의미를 분석하지 않았다. 따라서 현재까지의 연구결과들을 종합하면 본 연구에서 DPC4/Smad4 유전자의 silent mutation이 면역조직화학 염색에서 염색이 되지 않은 것은 위양성으로 해석하는 것이 타당할 것으로 생각되며 향후 DPC4/Smad4 유전자의 변이와 면역조직화학 염색을 비교하는 연구가 지속되어야 할 것이다.

현재까지 담낭암에서 DPC4/Smad4 유전자의 변이에 대한 연구는 알려진 바가 없다. 이는 전술한 바와 같이 충분한 수와 양의 조직을 얻기 어렵다는 데에 그 원인이 있을 것으로 생각된다. 그러나 본 연구를 통하여 담낭암에도 DPC4/Smad4 유전자의 변이가 존재할 수 있음이 확인되었으며 변이가 발견되는 빈도는 증례의 수가 적어 오차는 크겠지만 일단 3/18 (약 17%) 내외일 것으로 추정된다. 이 빈도는 담도암에서 보고된 일부 연구결과와 비슷하다.(14) 그러나 이 중 2예는 silent mutation으로서 의미가 없다고 해석하면 그 빈도는 1/18 (약 6%)이 되며 이는 췌장암 및 담도암에서의 변이 빈도에 비하여 낮게 나타난 것이다. 결과적으로 담낭암의 일부에서는 종양 억제 유전자인 DPC4/Smad4의 변이

가 발암의 원인이 될 수 있으나 그 역할은 크지 않을 것으로 생각되며 췌장암, 담도암 등과는 다른 발암 과정을 가질 가능성이 많으므로 향후 더욱 많은 증례로 연구가 지속되어야 할 것이다. 특히 발암 과정의 규명을 위하여는 담낭암의 원인이라고 추정되는 다른 요인들과의 연관성에 대한 연구가 필요한데, 동일한 증례에 대하여 다양한 유전자 변이 연구와 임상적, 해부 병리학적 연구가 병행될 수 있다면 보다 가치 있는 결과를 기대할 수 있으리라 생각된다.

또 본 연구의 예비 연구에서 6예의 췌장암 조직 중 2예에서 DPC4/Smad4 유전자의 변이가 관찰되었는데 췌장암 조직과 담낭암 조직 모두에서 DPC4/Smad4 유전자 변이는 exon 9b와 exon 11a에서 발견되었다. 이 결과 역시 보다 폭넓은 연구가 계속되어야 하겠지만 DPC4/Smad4 유전자 중에서도 기능적으로 중요한 부위를 찾아내고 나아가 발암 과정을 정확히 규명하는 데에 기여할 것으로 기대된다.

결 론

담낭암의 일부에서도 DPC4/Smad4 유전자의 변이가 있음을 확인할 수 있었으며 본 연구는 향후 더욱 많은 수의 증례를 가지고 다른 종양 유전자 및 종양 억제 유전자와 병행하여 분석하는 연구의 기초자료로 활용될 수 있으리라 생각한다. 또한 임상적, 해부병리학적 지표들과의 상관관계를 연구함으로써 담낭암의 발생 기전을 규명하고 담낭암의 고위험군에 대한 선별검사를 개발하는 데 도움이 될 것이다.

REFERENCES

- 1) Lim SB, Kim KH, Kim SH, Yoon YB, Park YH. A clinical study of prognostic factors in gallbladder cancer. *J Korean Surg Soc* 1998;55:120-31.
- 2) Laitio M. Histogenesis of epithelial neoplasms of human gallbladder I. Dysplasia. *Pathol Res Pract* 1983;178:51-6.
- 3) Hahn SA, Schutte M, Hoque ATM, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996;271:350-3.
- 4) Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massague J. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF- β signaling pathways. *Nature* 1996;383:832-6.
- 5) Wrana JL, Attisana L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 1994;370:341-7.
- 6) Sekelsky JJ, Newfeld SJ, Raftery LA, Chartoff EH, Gelbart WM. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1995;139:1347-58.
- 7) Savage C, Das P, Finelli AL, Townsend SR, Sun CV, Baird SE, et al. *Caenorhabditis elegans* genes sma-2, sma-3 and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:790-4.
- 8) Liu F, Hata A, Baker JC, Doody J, Carcamo J, Harland RM, et al. A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature* 1996;381:620-3.
- 9) Shi Y, Hata A, Lo RS, Massague J, Pavletich NP. A structural basis for mutational inactivation of the tumor suppressor Smad4. *Nature* 1997;388:87-93.
- 10) Schutte M, Hruban RH, Hedrick L, Cho KR, Nadasdy GM, Weinstein CL, et al. DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Res* 1996;56:2527-30.
- 11) Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Penzer S, Zahurak M, et al. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 1997;57:1731-4.
- 12) Grau AM, Zhang L, Wang W, Ruan S, Evans DB, Abbruzzese JL, et al. Induction of p21waf1 expression and growth inhibition by transforming growth factor β involve the tumor suppressor gene DPC4 in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 1997;57:3929-34.
- 13) Hahn SA, Schmiegel WH. Recent discoveries in cancer genetics of exocrine pancreatic neoplasia. *Digestion* 1998;59:493-501.
- 14) Hahn SA, Bartsch D, Schroers A, Galehdari H, Becker M, Ramaswamy A, et al. Mutations of the DPC4/Smad4 gene in biliary tract carcinoma. *Cancer Res* 1998;58:1124-6.
- 15) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-7.
- 16) Martincic D and Whitlock JA. Improved detection of p53 point mutations by dideoxyfingerprinting (ddF). *Oncogene* 1996;13:2039-44.
- 17) Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2766-70.
- 18) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989;5:874-9.
- 19) Myers RM, Lumelsky N, Lerman LS, Maniatis T. Detection of single base substitutions in total genomic DNA. *Nature* 1985;313:495-8.
- 20) White MB, Carvalho M, Derse D, O'Brien SJ, Dean M. Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics* 1992;12:301-6.
- 21) Myers RM, Larin Z, Maniatis T. Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage at mismatches in RNA: DNA duplexes. *Science* 1985;230:1242-6.
- 22) Sarkar G, Yoon H-S, Sommer SS. Dideoxy fingerprinting (ddF): a rapid and efficient screen for the presence of mutations. *Genomics* 1992;13:441-3.
- 23) Blaszyk H, Hartmann A, Schroeder JJ, McGovern RM, Sommer SS, Kovach JS. Rapid and efficient screening for p53 gene

- mutation: by dideoxy fingerprinting. *Biotechniques* 1995;18: 256-60.
- 24) Sjogren S, Inganas M, Norberg T, Lindgren A, Nordgren H, Holmberg L, et al. The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:173-82.
- 25) Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, et al. Loss of expression of DPC4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res* 2000;60:2002-6.
- 26) Kong XT, Choi SH, Inoue A, Xu F, Chen T, Takita J, et al. Expression and mutational analysis of the DCC, DPC4, and MADR2/JV18-1 genes in neuroblastoma. *Cancer Res* 1997; 57:3772-8.
-