



KR9700228

KAERI/RR-1644/96

# 악성 식도종양에 대한 분자유전학적 연구

The Genetic Alteration of MTS1/CDKN2 Gene  
in Esophageal Cancer

研究機關

原子力病院

韓國原子力研究所

29-01

R

KAERI/RR-1644/96

# 악성 식도종양에 대한 분자유전학적 연구

The Genetic Alteration of MTS1/CDKN2 Gene  
in Esophageal Cancer

研究機關  
原子力病院

韓國原子力研究所

## 제 출 문

한 국 원 자 려 연 구 소 장 귀하

본 보고서를 " 악성 식도 종양의 분자유전학적 연구" 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

1997 년 1 월 20 일

연구실명 : 분자 종양학 연구실  
연구 책임자 : 조 재 일  
연구원 : 백 희 중  
          : 박 중 호  
          : 김 미 희  
감수의원 : 이 진 오  
          : 류 성 렬

## 요 약 문

### I. 제 목

악성 식도 종양의 분자 유전학적 연구

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

악성 식도 종양은 세계적으로 지역적 발생 빈도의 차이를 심하게 보이고 있으며, 우리나라도 호발 지역의 하나로 국내 성인 남자에서 다섯번째로 흔한 종양이며, 최근 증가 추세이다. 적극적인 치료를 하여도 임상적으로 아직 타 종양에 비하여 예후가 극히 불량한 종양으로 알려져 있다. 최근 분자 유전학의 발달로 타 종양의 유전자 변화 및 암 발생 기전들이 밝혀지고, 이에 따라 유전자 치료의 시도 및 가능성 등의 연구가 진행되고 있는 반면, 식도 종양에 대하여는 국내는 물론 세계적으로도 아직 기초적 연구 단계에 머물고 있는 실정이다. 이에 본 연구자들은 국내에서 가장 많은 식도암 환자를 치료하는 본 병원에서 우리나라 식도암 발생의 기전 과 분자 유전학적 변화를 밝혀, 식도 종양의 진단과 예방, 궁극적으로 유전자 치료의 적용에 도움이 되리라 생각 한다.

MTS1/CDKN2 유전자는 염색체 9p21에 위치하는 유전자로서, 세포 증식에 관여하는 cdk4단백질의 활성화를 방지하는 단백질인 p16을 만드는 유전자이다. p16-cdk2복합체는 Rb단백질의 phosphorylation을 저해함으로써, 세포분열의 G1 phase에서 S phase로의 이행을 막는다. 최근 MTS1/CDKN2

유전자의 homozygous deletion이 뇌암, 유방암, 골육종, 흑색종, 신장암, 난소암 등의 암세포주에서 많이 보고 되고 있으며, 췌장암, 뇌암, 중피암 등의 적출암에서도 보고 되고 있다. 식도암에서도 MTS1/CDKN2 유전자의 변이에 대하여 최근 보고가 있었으며, 보고된 나라에 따라 52%에서 0% 까지 유전자의 변이가 보고 되고 있다. 우리나라의 식도암에서는 어느 정도의 MTS1/CDKN2 유전자의 변이가 동반되며, 임상적인 병의 침윤 정도와 연관이 있는 지 관찰하였다. 이는 MTS1/CDKN2 유전자가 식도암의 발암과정에 관여하는 지 여부 및 임상 소견과의 연관 관계를 관찰 하여 예후 관련 인자로서의 가치를 판단하고, 향후 이를 이용한 유전자 치료의 적용 여부에 대한 기본 자료가 되리라 생각한다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

수술로 적출된 종양 조직과 정상 조직에서 고단위 DNA를 추출하고, 이를 이용하여 종양 특이 유전자를 PCR을 시행하여 충분한 양을 얻은 후, 정상 조직과 같이 paired PCR analysis를 시행하고, 다시 PCR 을 시행한 후 적당한 제한 효소로 소화 시킨 후 PCR-SSCP를 시행한다. PCR-SSCP상 mobility shift 가 있는 예는 Sequencing 을 시행하여 유전자의 염기 구조 상의 변화를 알아보고, 발암 기전에 관여 하는가의 여부를 추정하며, 임상 자료를 같이 분석하여 예후 인자 등의 가능성 등을 확인 한다.

(1) 종양 수집: 식도암 환자에서 식도를 적출한 직후, 종양 부분과 정상 부분을 각각 1g씩 주위 조직과 잘 분리하여 얻었다. 총 36 명의 환자에서 조직을 수집하였다.

(2) DNA 추출: 수집한 조직을 분자생물학적 분석을 위하여 Phenol/chloroform 추출법을 이용하여 고분자의 DNA를 추출하였고, 추출한 DNA는 Spectrophotometer 를 이용하여 농도와 순도를 측정하였음.

(3) Paired PCR analysis: 정상 조직과 종양 조직의 고분자 DNA를 MTS1의 exon 2 부분을 PCR을 시행하여 Homozygous deletion 여부를 screening하고, homozygous deletion이 있으면 multiplex PCR 을 통하여 확인한다.

(4) PCR-SSCP analysis: MTS1 gene exon 2 에 대하여 primer를 만들어 종양 조직의 DNA 를 PCR로 증폭을 시킨 다음, Rsa I 제한 효소로 소화를 시킨 후, 6% Polyacrylamide gel에서 전기 영동하여 Autoradiogram 을 분석하였다.

(5) Direct sequencing: PCR-SSCP에서 mobility shift 가 관찰된 예와 Retinoblastoma gene 의 alteration 이 없는 종양의 MTS1 gene 의 exon 2 를 PCR하여 dideoxy chain termination 방법으로 염기 서열을 결정하였다.

(6) 임상자료 분석: MTS1/CDKN2 유전자의 변이가 발견된 환자와 발견되지 않은 환자의 임상자료를 비교 분석 한다.

#### IV. 연구개발 결과

Paired PCR 을 시행한 35예 중 homozygous deletion 을 관찰 할 수 있는 예는 없었다. PCR-SSCP를 시행한 결과, mobility shift 가 의심된 4예 중에서 direct sequencing을 시행한 결과, 1예에서는 Codon 100 위치에 GAT-TAT(Asp-Tyr)로 mis-sense mutation이 있었으며, 1예에서는 Codon 97 위치의 GAC 중 C의 결손이 관찰 되었다. 나머지 2예에서는 mutation이 발견되지 않았다. PCR-SSCP의 모호함을 감안하여 Rb gene의 변이를 관찰할 수 없었던

10예를 Direct sequencing 하였으나 somatic mutation 은 발견할 수 없었다. MTS1 유전자에 이상이 발견된 2예는 Rb 유전자의 변이도 발견되었던 예이며, 임상 자료상에서도, 특기할 차이점이 없었다. 이상에서 한국의 식도암에서의 MTS1 유전자의 변이는 2/35(5.7%) 로 흔하지 않은 변화이며, Homozygous deletion 도 나타나지 않았다. 최근 methylation에 의한 MTS1 inactivation 기전에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료 된다.

## V. 연구개발결과의 활용계획

국내의 식도암 환자의 종양 조직에서 MTS1/CDKN2 유전자의 변이는 주로 intragenic mutation이었으나, 그 빈도가 상당히 낮은 수준이었으며, 예후와 연관된 소견도 발견할 수 없었다. Rb유전자의 변이가 62.5% 였던 것에 비하여 발암 기전에 관여할 것이라는 근거도 찾기 어려웠다. Rb 유전자의 변이가 없었던 예에서도 발견되지는 않았지만, Rb유전자의 변이의 발견율이 낮을 수 있는 가능성 등을 고려 하여야 할 것으로 생각되며, 최근 methylation에 의한 p16 단백질의 비활성화가 보고 되고 있는 것을 고려하면, intragenic mutation 이외에 MTS1/CDKN2 유전자의 비활성화 기전이 다른 형태로 있을 가능성을 고려하여야 할 것이다. 현재로서는 최근의 유전자 치료 접근 방법으로는 후보자가 될 수 없는 유전자이며, 혹시 methylation 등의 epigenetic 변화에 대한 접근 방법이 시도 되면 가능성이 있다고 하겠다.

## Summary

### I. Project Title

Molecular Genetic Study of Human Esophageal Cancer  
- Genetic Alterations of MTS1/CDKN2 in Esophageal  
Cancer

### II. Objective and Importance of the Project

Objectives of this study was;

1. To investigate the incidence of MTS1/CDKN2 gene mutation in esophageal cancer
2. To study the characteristics and patterns of MTS1/CDKN2 gene mutation in esophageal cancer
3. To find the correlation between MTS1/CDKN2 gene mutation and clinical data

### III. Scope and Contents of the Project

Materials; 36 resected esophageal cancer specimens and  
paired normal specimens

Methods; 1. Sampling of the specimen  
2. Extraction of the DNA



3. paired PCR analysis
4. PCR-SSCP
5. Direct sequencing
6. Clinical data review

#### IV. Results and Proposal for Applications

There was no homozygous deletion of MTS1/CDKN2 gene in 35 paired PCR analysis, which was frequent event in cancer cell lines. On screening of exon 2 of MTS1/CDKN2 by PCR-SSCP, 4 cases out of 36 specimens showed mobility shift. We detected one mis-sense mutation at codon 100 which changed TAT(Tyr) from GAT(Asp) and another one base deletion at codon 97 which showed GAO from GAC. But there were no intragenic mutations in the other two cases. MTS1/CDKN2 gene alterations were not detected in all 12 cases which did not show Rb gene alterations. Clinical data of the patients which tumor showed MTS1/CDKN2 gene alterations did not shows clinical tumor progression than without gene alteration cases. Therefore the MTS1/CDKN2 gene mutations were infrequent events and do not appear to play a major role in the group of patients examined. Recently there were many trials of gene therapy with p53 gene in other cancers. Our data suggested that MTS1/CDKN2 gene in esophageal cancers can not be a good candidate for gene therapy and more study for contribution of methylation in MTS1/CDKN2 gene for inactivation of p16 should be done before application of gene therapy of MTS1/CDKN2.

## Contents

1. Introduction .....	1
2. Current Status .....	4
3. Contents and Results .....	6
4. Accomplishment and Contribution .....	15
5. Proposal of application .....	16
6. Reference .....	17

## 목 차

제 1 장	서론	1
제 2 장	국내외 기술개발 현황	4
제 3 장	연구 개발수행 내용 및 결과	6
제 4 장	연구개발목표 달성도 및 대외기여도	15
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	16
제 6 장	참고문헌	17

## 1 장 서 론

식도암은 세계적으로 암 사망의 중요한 원인 중의 하나로 알려지고 있으며, 국내에서도 성인 남자의 5번째 흔한 악성 종양으로서 세계적인 식도암 발생 다발 지역 중의 하나이다. 식도암은 조기 발견이 힘들어 대부분의 환자가 3기에 치료를 시작하게 되며 이 경우 수술, 방사선 치료 및 항암요법을 시행하여도 쉽게 치료 되지 않고, 평균 생존기간이 2년 미만인 예후가 나쁜 질환이다(1).

식도암은 조직학적으로 편평상피암과 선암으로 크게 나누어지며, 편평상피암은 역학 조사상 음주, 킷연과 깊은 관계가 있으며, 선암은 Barrett 식도와 관계가 있는 것으로 되어 있다 (2). Barrett 식도는 지속적인 위식도 역류로 정상적인 식도의 편평상피세포에 이형성 원주상피가 존재하는 것으로 식도 선암의 발생 빈도가 높으므로 심한 이형성이 있는 경우 절제하여 주는 것이 원칙으로 되어 있으며, 미국이나 유럽 등에서는 흔한 질환이나 국내에서는 Barrett 식도가 흔하지 않아 대부분의 식도암은 편평상피암이 호발한다. 식도암 발생의 원인으로는 여러 가지 환경적 요인과 문화의 차이에 의한 식이 방법과 음식 종류의 차이 등이 제시되고 있으나, 최근 분자 유전학적 연구가 활발히 진행되어 식도암에서도 여러 종류의 유전자 변이가 보고되고 있다. Epidermal growth factor 수용체 유전자와 c-myc 유전자의 증폭(3), hst-1과 int-2 유전자의 동시 증폭 (4), 등의 암유전자 변이와, 17p 염색체의 부분소실 (5), p53 종양억제 유전자 내의 점돌연변이 (6), RB 유전자의 부분소실 (7), APC/MCC 유전자 부위의 상동염색체 소실(8) 및 MTS1/CDKN2 유전자 변이(9,10) 등이다.

이 중 MTS1/CDKN2 유전자 변이에 대하여는 p16 단백질이 세포분열의 결정적인 조절 인자로서 알려지면서(11) 많은 흔한 암들에서 연구가 되고 있는 유전자이다. 식도암의 발암 과정에 여러 유전자의 변이가 관여하고 있고 그 들이 각각 밝혀지고 있다. MTS1/CDKN2 유전자의 변이도 최근 식도암에서 연구 결과가 나오고 있으나, 연구 대상의 지정학적 차이 등에 의해 그 발생 빈도가 다르게 보고 되고 있으며, Rb단백질의 비활성화와 상호 보완적으로 변이를 보일 수 있다는 보고도 있다. 아울러 식도암에서 연구된 것은 아니지만 임상적으로 암의 진행 정도와 비례하여 유전자의 변이가 발견된다는 보고도 최근 나타나고 있다.

이에 본 연구에서는 우리나라 식도암 조직에서의 MTS1/CDKN2 유전자의 변이의 빈도를 관찰하고, MTS1/CDKN2 유전자의 변이가 식도암의 발암 기전에 어느 정도 기여하는가를 판단하고, 배양된 암세포에서 주로 나타나는 homozygous deletion이 어느 정도 나타나며, intragenic mutation의 빈도는 어느 정도이고, 그 변이 형태의 특이성은 없는지 확인 하려 하였다. 아울러 Rb 유전자의 이상이 발견되지 않았던 예에서 MTS1/CDKN2 유전자의 변이는 어느 정도 더 흔하며, 상호 보완적인 유전자의 변이를 보이는지 관찰하였으며, 임상적인 자료상, MTS1/CDKN2 유전자의 변이가 있었던 예에서의 암의 진행 정도와의 연관성이 없는지 확인 하였다. 그 방법으로 식도암 조직과 정상 조직에서 DNA를 추출하여, PCR로 MTS1/CDKN2 유전자 부분을 증폭하여 정상 조직과 종양 조직을 paired PCR을 시행하여 우선 homozygous deletion 여부의 screening을 하였다. 이상이 발견되면 multiplex PCR 이나 Southern blot 분석으로 확인하려 하였다. 그리고 MTS1/CDKN2 유전자의 exon2 부분을 primer 를 만들어서 PCR을 시행한 후 적당한 제한 효소로 소화한 후 PCR-SSCP 를 시행하여 mobility shift 여부를 관찰한다. Mobility shift가 있는 예와 Rb 유전자의 변이가 발견되지 않았던

예를 direct sequencing을 시행하여 intragenic mutation의 유무를 확인하고 그 양상을 분석한다. Sequencing을 하여 얻은 결과를 분석하여 MTS1/CDKN2 유전자의 변이가 있었던 예와 없었던 예를 비교하여 임상 자료를 분석하였으며, 상호 연관 관계를 알아 보았다. 점 돌연변이의 양상을 분석하여 우리나라의 식도암의 발생에 관여하는 발암 인자를 외국의 경우와 비교하여 분석하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

최근 분자 유전학적 연구의 발전에 따라 식도암에서도 많은 연구가 발표되고 있다. Epidermal growth factor 수용체 유전자와 c-myc 유전자의 증폭(3), hst-1과 int-2 유전자의 동시 증폭 (4), 등의 암유전자 변이와, 17p 염색체의 부분소실 (5), p53 종양억제 유전자 내의 점돌연변이 (6), RB 유전자의 부분소실 (7), APC/MCC 유전자 부위의 상동염색체 소실(8) 및 MTS1/CDKN2 유전자 변이(9,10) 등이다.

이 중 MTS1/CDKN2 유전자 변이에 대하여는 p16 단백질이 세포분열의 결정적인 조절 인자로서 알려지면서(11) 많은 흔한 암들에서 연구가 되고 있는 유전자이다. 식도암의 발암 과정에 여러 유전자의 변이가 관여하고 있고 그 들이 각각 밝혀지고 있다. MTS1/CDKN2 유전자의 변이도 최근 식도암에서 연구 결과가 나오고 있으나, 연구 대상의 지정학적 차이 등에 의해 그 발생 빈도가 다르게 보고 되고 있다. 1994년 Mori 등(9)이 일본의 식도암을 분석하여 약 52%의 MTS1/CDKN2 유전자 변이율을 보고하면서 식도암의 비발암 기전에 중요한 역할을 할 것이라고 한 이후, Zhou 등(11)과 Suzuki 등(12)은 미국의 식도암 조직에서 각각 21%, 14%의 MTS1/CDKN2 유전자 변이율을 보고 하였다. Asuncion 등(10)은 이태리와 남프랑스의 식도암에서 약 10%의 유전자 변이율을 보고 하였고, Okamoto 등(13)은 중국의 식도암 조직에서 MTS1/CDKN2 유전자의 변이가 발견되지 않았다고 하였다. 결국 식도암의 호발 국가별로 발암 기전이 다를 수 있다는 견해에 따르면, 식도암의 호발 국가별로 유전자의 변이의 양상도 다를 수 있고, 이는 향후 식도암의 유전자 치료에의 적용에 국내 식도암의 유전자 변이의 양상에 대한 기본 자료의 필요성을 나타낸다. 그 외에 MTS1/CDKN2 유전자의 변이가 Rb 단백질의 비활성화와 상호 보완적으로 나타난다는 보고도 있다. 즉 glioblastoma

에서 MTS1/CDKN2 유전자의 변이가 발견되지 않은 예에서는 Rb유전자의 변이가 흔히 나타난다(14)는 것이다. 즉 MTS1/CDKN2 유전자가 만드는 p16 단백질이 Rb단백질과 결합함으로써 세포 주기를 조절할 수 있으므로 두 단백질 중 하나에만 이상이 발생하여도 세포 주기의 조절 능력을 상실하게 되는 것이다. 또한 악성 흑색종에서는 MTS1/CDKN2 유전자의 변이가 임상적으로 암의 진행과 연관이 있는 예후 인자로서 가치가 있다는 보고(15)도 있다. 식도암에서도 예후 인자로서의 의미가 있다면 이는 향후 식도암 환자의 치료에 보강 치료 등을 결정하는 주요 고려 사항으로 생각될 수 있다.

국내에서는 식도암에 대한 분자 유전학적 연구가 거의 없는 상태로서 본 병원에서 1994년 Rb유전자의 변이에 대하여 연구한 것과 1995년 p53 유전자에 대하여 연구한 것이 고작이다. 이는 국내 식도암 환자의 상당 부분을 본 병원에서 수술하며 그 임상 자료의 축적도 본 원이 가장 잘 되어 있다. 또한 식도암 세포의 배양도 국내에서는 아직 시행하고 있는 기관이 없는 실정이다.



## 제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

### 제 1 절 수행 내용 및 방법

#### 1. 종양 수집

식도암 환자에서 식도를 적출한 직후, 종양 부분과 정상 부분을 각각 1g씩 주위 조직과 잘 분리하여 얻었다. 총 36명의 환자에서 조직을 수집하였다. 이중 편평상피암이 30예, 소세포암이 2예, 선편평상피암이 2예, 그리고 가성육종성 암종이 1예씩 있었다.

#### 2. DNA 추출

수집한 조직을 분자생물학적 분석을 위하여 Phenol/chloroform 추출법을 이용하여 고분자의 DNA를 추출하였고, 추출한 DNA는 Spectrophotometer 를 이용하여 농도와 순도를 측정하였다.

#### 3. Paired PCR analysis

정상 조직과 종양 조직의 고분자 DNA를 MTS1의 exon 2 부분을 PCR을 시행하여 Homozygous deletion여부를 screening하고, homozygous deletion이 있으면 multiplex PCR 을 통하여 확인한다.

#### 4. PCR-SSCP analysis

MTS1 gene exon 2 에 대하여 primer를 만들어 종양 조직의 DNA 를 PCR로 증폭을 시킨 다음, Rsa I 제한 효소로 소화를 시킨 후, 6% Polyacrylamide gel에서 전기영동하여 Autoradiogram 을 분석하였다.

#### 5. Direct sequencing

PCR-SSCP에서 mobility shift 가 관찰된 예와 Retinoblastoma gene 의 alteration 이 없는 종양의 MTS1 gene 의 exon 2 를 PCR하여 dideoxy chain termination 방법으로 염기 서열을 결정하였다.

#### 6. 임상자료 분석

MTS1/CDKN2 유전자의 변이가 발견된 환자와 발견되지 않은 환자의 임상자료를 비교 분석 한다.

## 제 2 절 수행 결과

### 1. Paired PCR analysis

정상 조직과 종양 조직의 고분자 DNA를 MTS1의 exon 2 부분을 PCR을 시행하여 Homozygous deletion 여부를 screening하였다.(Fig.1) 정상 조직과 종양 조직에서 모두 같은 PCR 결과를 볼 수 있었다. 즉 정상 조직에서는 PCR product 가 나타나고 종양 조직에서는 PCR product 가 보이지 않는 homozygous deletion은 관찰할 수 없었다.

### 2. PCR-SSCP analysis

MTS1 gene 의 exon 2 에 대하여 primer를 만들어 종양 조직의 DNA 를 PCR로 증폭을 시킨 다음, Rsa I 제한 효소로 소화를 하여 PCR product를 자른 후, 6% Polyacrylamide gel에서 전기 영동하여 Autoradiogram 을 분석하였다. 분석한 결과 4예에서 mobility shift 가 의심되었다.(Fig.2)

### 3. Direct sequencing

PCR-SSCP에서 mobility shift 가 관찰된 4 레와 Retinoblastoma gene 의 alteration 이 없었던 종양 10 레에서, MTS1 gene 의 exon 2 를 PCR하여 dideoxy chain termination 방법으로 염기 서열을 결정하였다. PCR-SSCP에서 mobility shift가 의심 되었던 4레 중에서 1예에서는 Codon 100 위치에 GAT-TAT(Asp-Tyr)로 mis-sense mutation이 있었으며(Fig.3), 1예에서는 Codon 97 위치의 GAC 중 C의 결손이 관찰 되었다(Fig.4). 나머지 2예에서는

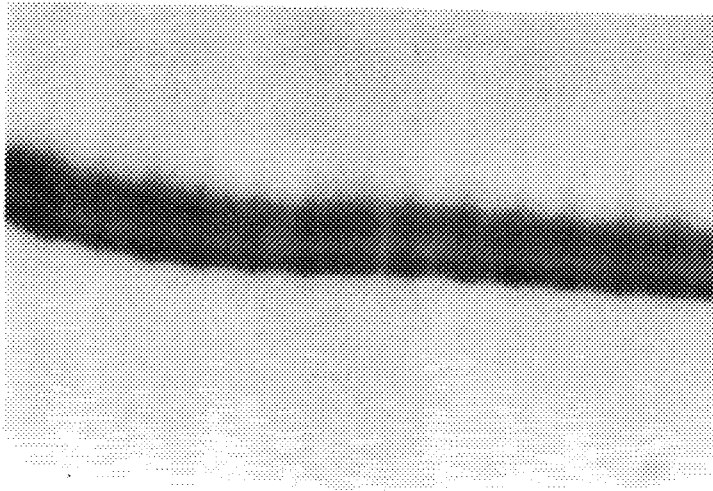
mutation이 발견되지 않았다. PCR-SSCP의 모호함을 감안하여 Rb gene의 변이를 관찰할 수 없었던 10예를 Direct sequencing 하였으나 somatic mutation 은 발견할 수 없었다. MTS1 유전자에 이상이 발견된 2예는 Rb 유전자의 변이도 발견되었던 예이다.

#### 4. 임상자료 분석

MTS1/CDKN2 유전자의 변이가 발견된 환자와 발견되지 않은 환자의 임상 자료를 비교 분석 하였으나, MTS1/CDKN2 유전자의 변이가 발견된 예가 2 예 밖에 되지 않았으며, 유전자의 이상이 있었던 예에서도 T3N1M0 와 T3N0M0 의 병기로 각각 III 기와 IIA기로 진단 되어 나머지 유전자의 이상이 없었던 예에 비하여 병기가 더욱 진행된 경우라고 보기 어려웠다.

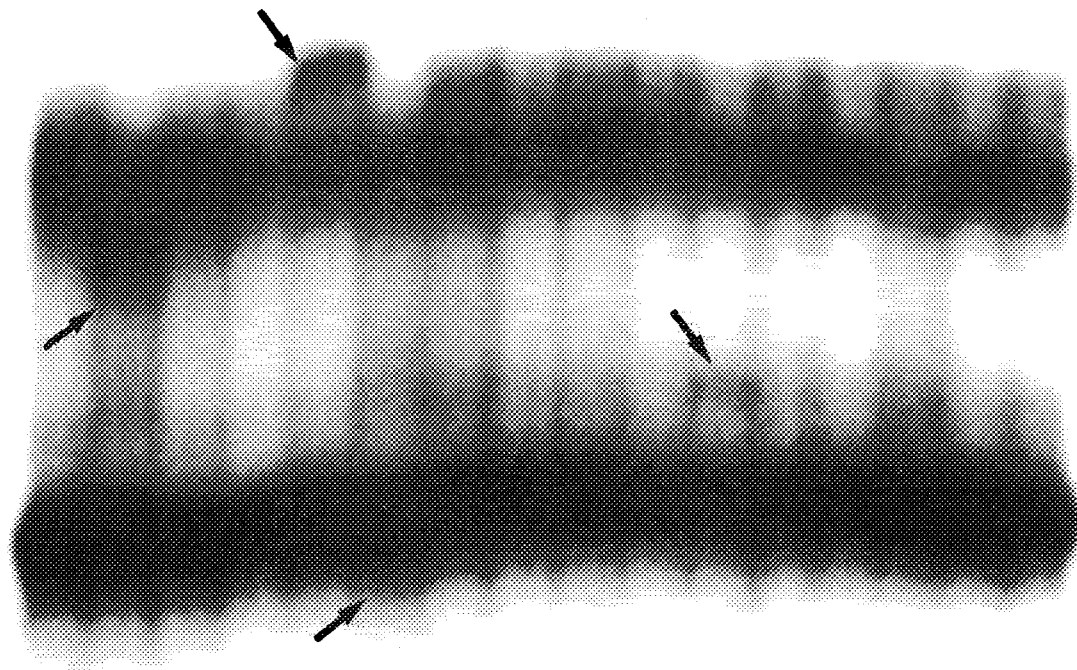
이상에서 한국의 식도암에서의 MTS1 유전자의 변이는 2/35(5.7%) 로 흔하지 않은 변화이며, Homozygous deletion 도 나타나지 않았다. PCR-SSCP 는 4예에서 mobility shift 가 의심 되었으나 Sequencing 결과 intragenic mutation이 있었던 예는 2 예 뿐이었다. Rb 유전자의 이상과 상호 보완적인 유전자의 이상도 발견하기 어려웠다. MTS1/CDKN2 유전자의 이상과 임상 자료상의 상관관계도 발견하기 어려웠다.(Table1) 최근 methylation에 의한 MTS1 inactivation 기전이 주목 받고 있는 바, 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료 된다.

36 35 34 33 32 31 30  
TN TN TN TN TN TN TN

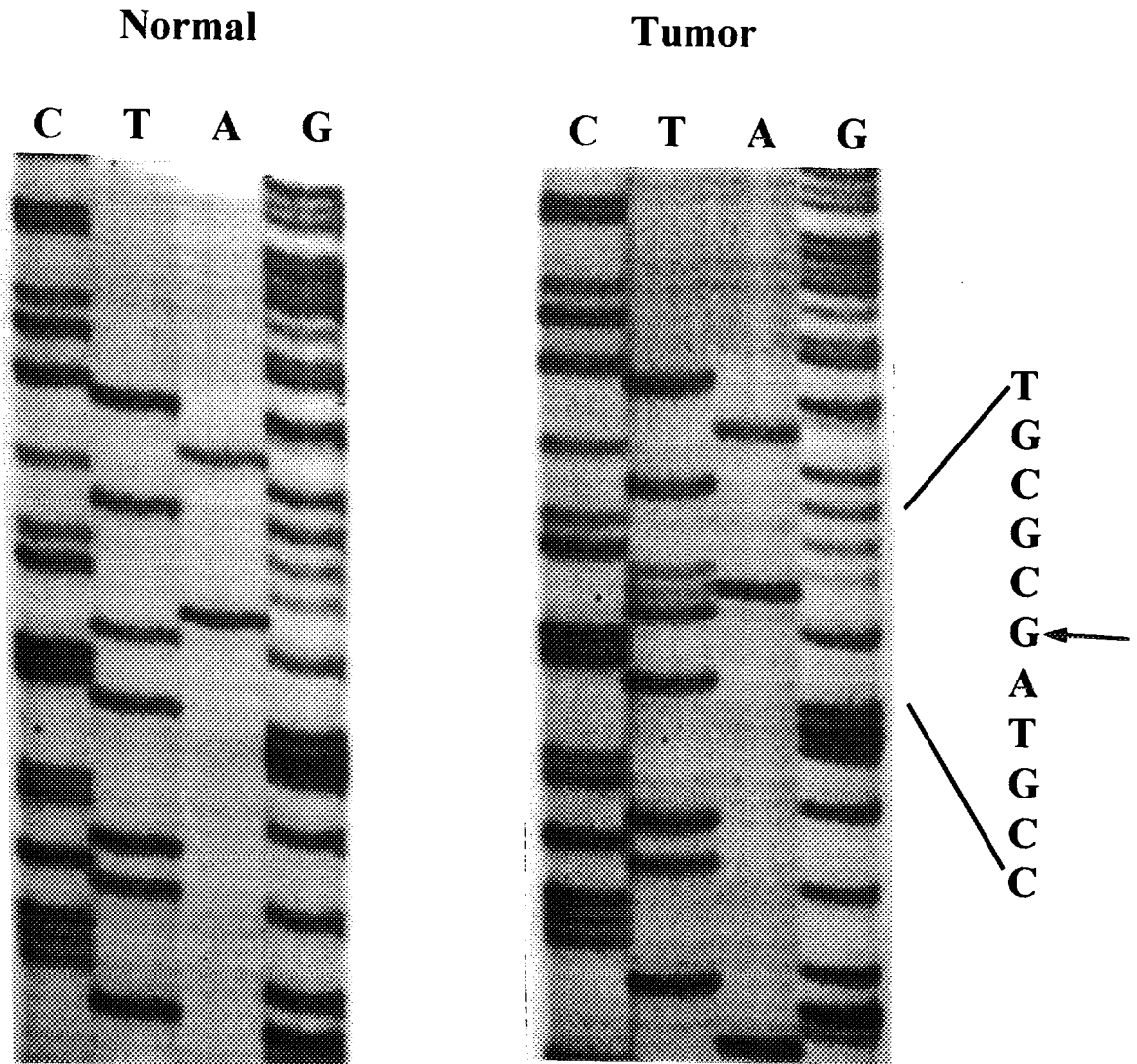


**Figure 1. Paired PCR analysis**

22 23 24 26 31 31 32 32 33 34 35 36 37 38 39 40  
T T T T N T N T T T T T T T T

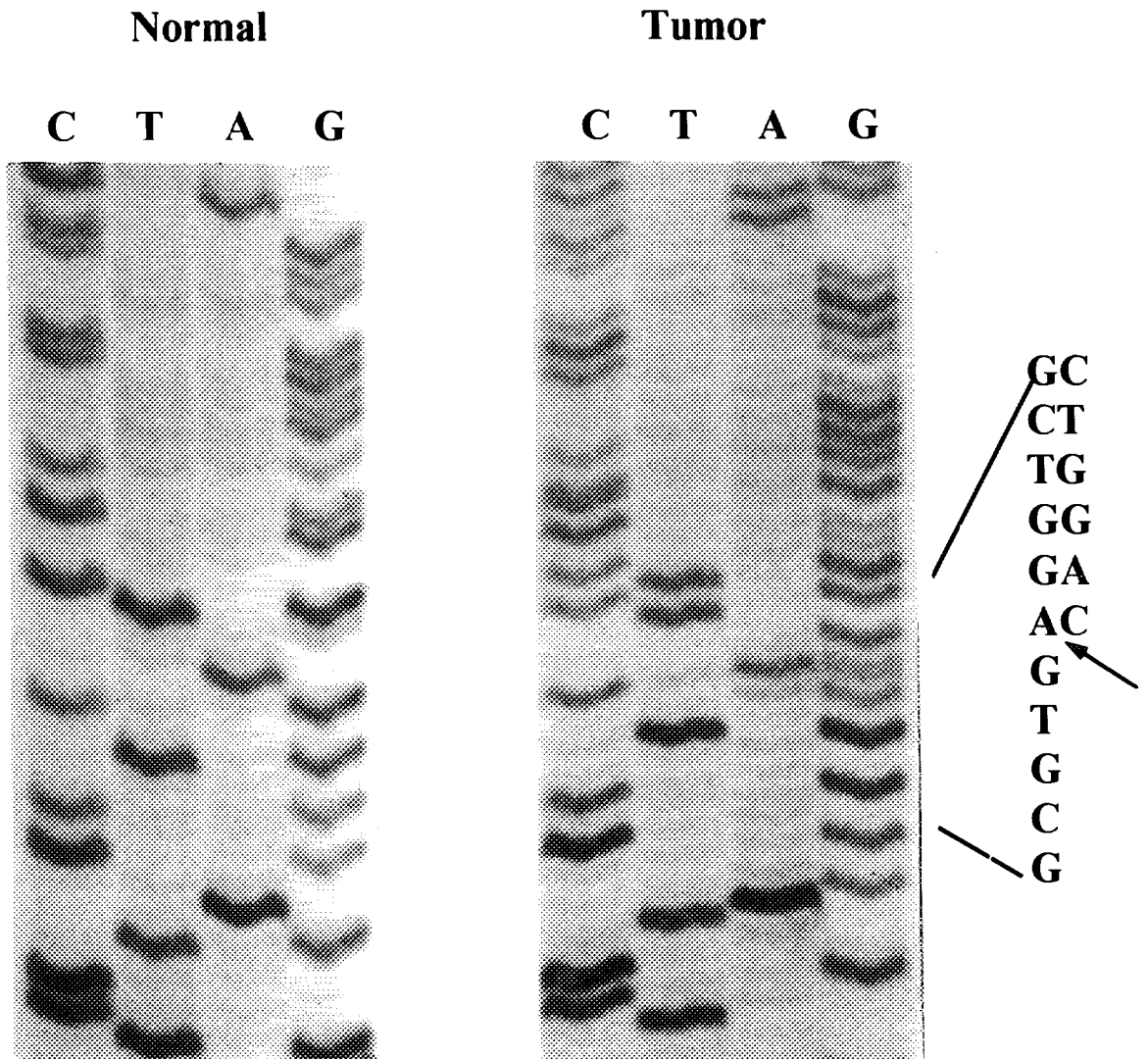


**Figure 2. PCR-SSCP results**



**Figure 3. Sequencing result of #31 eso. ca**

**Mis-sense mutation in codon 100(GAT-TAT)**



**Figure 4. Sequencing result of #39 eso.ca  
Deletion of C in codon 97(GAC)**



## Results

1. Homozygous deletion : 0/35
2. Mobility shift in PCR-SSCP : 4/35
3. Somatic mutations in  
PCR-SSCP(+) cases : 2/4  
Rb alteration(-) cases : 0/12
4. Frequency of p16 alterations : 2/35(5.7%)
5. Clinical data shows no relations to stage progression

### Table 1. Results

## 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

국내의 식도암 환자에서의 MTS1/CDKN2 유전자 변이의 빈도와 그 양상을 관찰하고, Rb 유전자의 변이와의 상관관계를 분석하며, 유전자 변이가 있는 환자의 임상 자료를 분석하려는 목표는 달성 되었으나, 1994년과 1995년의 Rb 유전자 변이 검색이나 p53 유전자 검색과 같은 긍정적인 결과를 얻지는 못하였다. 그러나 향후 유전자 치료에의 적용이나, 국내 식도암의 발암 과정의 분석 및 예방 진단 등에는 기본 자료로서 응용할 수 있는 가능성이 있고, MTS1/CDKN2 유전자가 세포 주기의 조절 인자로서의 기능이 중요한 만큼 발암 과정에 관여하는 유전자의 후보로서 그 기능의 의미를 알 수 있다. 앞으로 intragenic mutation 에 의한 유전자의 비활성화가 아닌 methylation 등에 의한 p16 단백질의 비활성화에 대한 연구가 발전하면 다른 방향에서의 유전자 치료를 접근할 수도 있을 것이다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

국내의 식도암 환자의 종양 조직에서 MTS1/CDKN2 유전자의 변이는 주로 intragenic mutation이었으나, 그 빈도가 상당히 낮은 수준이었으며, 예후와 연관된 소견도 발견할 수 없었다. Rb유전자의 변이가 62.5% 였던 것에 비하여 발암 기전에 관여할 것이라는 근거도 찾기 어려웠다. Rb 유전자의 변이가 없었던 예에서도 발견되지는 않았지만, Rb유전자의 변이의 발견율이 낮을 수 있는 가능성 등을 고려 하여야 할 것으로 생각되며, 최근 methylation에 의한 p16 단백질의 비활성화가 보고 되고 있는 것을 고려하면, intragenic mutation 이외에 MTS1/CDKN2 유전자의 비활성화 기전이 다른 형태로 있을 가능성을 고려하여야 할 것이다. 현재로서는 최근의 유전자 치료 접근 방법으로는 후보자가 될 수 없는 유전자이며, 혹시 methylation 등의 epigenetic 변화에 대한 접근 방법이 시도 되면 가능성이 있다고 하겠다.

## 제 6 장 참고문헌

1. Franceschi S, Talamini R, Barra S, et al. Smoking and drinking in relation to cancer of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy. *Cancer Res.* 1990, 50:6502-6507

2. Hamilton SR and Smith RRL et al. Prevalence and characteristics of Barrett esophagus in patient with adenocarcinoma of the esophagus or esophagogastric junction. *Hum. pathol.* 1988,19:942-948

3. Lu SH, Hsieh LL, Luo FC, et al. Amplification of the EGF receptor and c-myc genes in human esophageal cancers. *Int J Cancer.* 1988, 42:502-505

4. Tsuda T, Tahara E, Kajiyama G, et al. High incidence of coamplification of hst-1 and int-2 genes in human esophageal carcinomas. *Cancer Res.* 1989, 49:5505-5508

5. Waqgata T, Ishizaki K, Imamura M, et al. Deletion of 17p and amplification of the int-2 gene in esophageal carcinomas. *Cancer Res.* 1991, 51:2113-2117

6. Hollstein MC, Metcalf RA, Welsh JA et al. Frequent mutation of the p53 gene in esophageal cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 1990,86; 9958-9961

7. Boynton RF, Huang Y, Blount PL, et al. Frequent loss of hetrozygosity at the retinoblastoma locus in human esophageal cancers. *Cancer Res.* 1991, 51:5766-5769

8. Boynton RF, Blount PL, Meltzer SJ, et al. Loss of heterozygosity involving the APC and MCC genetic loci

occurs in the majority of human esophageal cancers.  
Proc Natl Acad Sci USA 1992, 89:3385-3388

9. Mori, T., Miura K., et al. Frequent somatic mutation of the MTS1/CDK4I (multiple tumor suppressor/cyclin dependent kinase 4 inhibitor) gene in esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Res., 54:3396-3397, 1994

10. Asuncion E, Ghyslaine MP, et al. Low frequency of p16/CDKN2 gene mutation in esophageal carcinomas. Int. J. Cancer. 66: 301-304, 1996

11. Kamb A, Gruis NA, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. Science 246:436-440, 1993

12. Suzuki H, Zhou X, et al. Intragenic mutations of CDKN2B and CDKN2A in primary human esophageal cancers. 4: 1883-1887, 1995

13. Okamoto A, et al: p16/INK4 mutations and altered expression in human tumors and cell lines. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 59:49-57, 1994

14. Ichimura K, Schmidt EE, et al. Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16/INK4A, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. Oncogene 13:1065-1072, 1996

15. Reed JA, Loganzo F, et al. Loss of expression of the p16. cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. Cancer Res. 55:2713-2718, 1995

BIBLIOGRAPHIC INFORMATION SHEET

Performing Org. Report NO.	Sponsoring Org. Report NO.	Standard Report NO.	INIS Subject Code
KAERI/RR- 1644/96			
Title / Subtitle	Molecular biologic analysis of esophageal cancer/ The genetic alteration of MTS1/CDKN2 gene in esophageal cancer		
Project Manager and Dept.	Zo, Jae-Il (Department of thoracic surgery)		
Pub. Place	Seoul	Pub. Org.	KCCH, KAERI
Pub. Date	DEC. 1996		
Page	27 P.	Fig. and Tab	Yes(v), NO( )
Size	26 cm.		
Note	'96 Basic Research Project		
Classified	Open(v), Outside( ), --Class	Report Type	Research Report
Sponsoring Org.	MOST	Contract NO.	
Abstract (About 300 Words)	<p>MTS1/CDKN2 gene plays a key role in cell cycle regulation, and there have been many studies about the significance of this gene in tumorigenesis. To investigate the frequency of MTS1/CDKN2 gene alteration in Korean esophageal cancer, we studied 36 esophageal cancer tissues with paired PCR analysis to detect homozygous deletion and PCR-SSCP method to find minute mutations, if any. In the cases with abnormalities, the nucleotide sequence analysis was performed. And in cases without RB gene alterations, direct sequencing analysis was also done. There was no homozygous deletions. Mobility shift by PCR-SSCP was observed in four cases at exon 2, which showed 1 bp deletion in codon 97 of MTS1/CDKN2 gene resulting in frame shift mutation, and another mis-sense mutation in codon 100 which changed TAT(Tyr) from GAT(Asp). But there were not MTS1/CDKN2 gene alterations in cases without Rb gene alterations. Analysis of clinical data did not show any differences depending upon MTS1/CDKN2 gene alterations. Therefore the MTS1/CDKN2 gene mutations were infrequent events and do not play a major role in the group of patients examined. More study for contribution of methylation in MTS1/CDKN2 gene for inactivation of p16 should be done before evaluation and application of MTS1/CDKN2 gene in tumorigenesis and as an candidate of gene therapy</p>		
Subject Keywords (About 10 Words)	Esophageal cancer, MTS1/CDKN2 gene PCR-SSCP, tumorigenesis		

서 지 정 보 양 식

수행기관보고서번호	위탁기관보고서번호	표준보고서번호	INIS 주제코드
KAERI/RR-1644/96			
제목 / 부제	악성 식도종양에 대한 분자 유전학적 연구/ 식도암에서 MTS1/CDKN2 유전자 변이에 대한 연구		
연구책임자 및 부서명	조 재 일 (흉부외과)		
연구자 및 부서명	조 재 일 외 3명		
발행지	서울	발행기관	한국원자력연구소
발행일	1996.12.		
페이지	27 P.	도표	유(v), 무( )
크기	26 cm		
참고사항	'96 기본연구과제		
비밀여부	공개(v), 대외비( ), _급비밀	보고서종류	연구보고서
연구위탁기관	과학기술처	계약 번호	
초록 (300단어 내외)	<p>MTS1/CDKN2 유전자는 염색체 9p21에 위치하는 유전자로서, 세포 증식에 관여하는 cdk4단백질의 활성화를 방지하는 단백질인 p16을 만드는 유전자이다. 최근 MTS1/CDKN2 유전자의 발암 역할에 대하여 많은 연구 결과가 보고 되고 있다. 한국의 식도암에서의 Mts1/CDKN2 유전자의 변이에 대하여 알아 보기 위하여, 36예의 식도암 조직에서 paired PCR 과 PCR-SSCP를 시행하였으며, PCR-SSCP에서 mobility shift 가 관찰된 4례와 Rb 유전자의 변이가 관찰되지 않았던 12 례에서 direct sequencing을 시행하였다. Mobility shift를 나타낸 일 예에서는 codon 97에서 염기 하나가 소실되어 frame shift 돌연변이가 관찰되었다. 다른 일 예에서는 codon 100에서 GAT(Asp). 가 TAT(Tyr) 으로 변하는 돌연변이가 관찰되었다. 그러나 Rb유전자의 변이가 없었던 예에서는 MTS1/CDKN2 유전자의 변이가 관찰되지 않았다. 임상 자료상에도 MTS1/CDKN2 유전자 변이에 따른 차이는 없었다. 결국 우리나라 식도암에서 MTS1/CDKN2 유전자 변이의 빈도는 흔하지 않았으며, 식도암의 발암 기전에 중요한 역할을 한다고는 할 수 없다. 그리고 MTS1/CDKN2 유전자의 methylation 이 p16의 비활성화에 관여하는가에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.</p>		
주제명 키워드 (10단어 내외)	식도암, MTS1/CDKN2 유전자, PCR-SSCP, 돌연변이		

## 주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 기관고유사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

### 약성 식도종양에 대한 분자유전학적 연구

1996年 12月 26日 印刷

1996年 12月 30日 發行

發行人 김 성 년

發行處 韓國原子力研究所

大田廣域市 儒城區 德津洞 150

印刷所 東 和 社

믿는마음 지킨약속 다져가는 신뢰사회