

두경부암의 염색체 연구*

제명대 학교 의과대학 해부학교실

장 성 익·최 인 장

제명대 학교 의과대학 이비인후과교실

송 달 원·김 중 강

Abstract

Chromosome Analysis on the Head and Neck Tumor

Sung Ik Chang, MD; In Jang Choi

Department of Anatomy, Keimyung University
School of Medicine, Taegu, Korea

Dal Won Song, MD; Joong Gahng Kim, MD

Department of Otolaryngology, Keimyung University
School of Medicine, Taegu, Korea

The author performed chromosome analysis from the patients with laryngeal cancer and nasopharyngeal cancer with newly development technique for cell segregation by using enzyme treated method. Segregated cells were incubated for overnight and chromosomes were obtained with routine fixation and staining methods.

The results are summarized as follows;

A structural abnormality involving chromosome 1 with break point located on long arm was found in the laryngeal cancer and in the nasopharyngeal cancer break points were found on distal segment of short arm in chromosome 3. The N-RAS and SK oncogenes are located near these segment of chromosome 1 and E-B virus is concerned with nasopharyngeal cancer. It should be confirmed to how develope the cancer in the future.

서 론

1960년 Nowell과 Hungerford¹⁾는 말성풀수성백혈병(이하 CML)환자에서 염색체검사를 한 결과 22번염색체의 장원(long arm)이 소실되는 것을 발견

하여 소위 philadelphia (ph+)염색체라고 명명하면 서부터 종양과 염색체이상과의 관계에 대한 연구가 이루어져 왔다. 1970년 Casspersson 등²⁾에 의해 염색체 band법이 개발된 후 1973년 Rowley³⁾는 CML에서 제22번염색체의 장원이 소실되었(ph+)이 제 9번염색체의 장원원위점(distal segment of long

* 본 논문은 1985년도 제명대 학교 특수파세 연구비로 이루어졌다.

arm)에 전좌(translocation)되어 있음을 보고 하였다. 즉 t(9:22)(q34:q11)이다. 이 보고에 의하면 CML 환자에서 90%가 염색체로 진단이 가능하다는 회기적인 발표를 한 바 있다. 1981년 Yunis⁴⁾는 다시 high resolution (H-R) band법을 개발하여 CML 환자에게 적용한 결과 거의 모든 환자(99%)에서 염색체로 진단할 수 있었다(9q34.1:22q11.21). 이와같이 염색체조작기술의 발달로서 암연구의 새로운 국면을 맞이하였다. 지난 10년동안 약 20종의 종양에서 각각 다른형태의 염색체이상이 발표되어 왔으며 암세포에서는 반드시 염색체이상을 발견할 수 있었다. 그러나 고형암(solid tumor)에서는 암세포마다 다른형태의 염색체가 나타나고 있어 아직까지 확실한 결론이 없다. 최근에 와서 암유전자 연구가 급속한 발전을 하고 있는 가운데 이것의 염색체에서의 위치도 거의 규명되어 있다⁵⁾. 대체로 염색체에서 절단부위에 암유전자위치가 존재하고 있다. 예를들면 CML에서 9q에는 C-abl 유전자가 있고 22q에는 면역 globulin의 lambda light chain이 있다. 그러므로 22q가 9q로 전좌되었을 때 9q에 있는 C-abl 유전자의 활성화(activation)가 말암의 원인이 되지 않나 짐작된다. 그러나 아직 여기에 관하여는 연구의 초기단계이며 앞으로 많은 문제점들이 더 규명되어야 한다. 한편으로 일차성종양(primary tumor)에서 homogenous staining region (HSR) 염색체 혹은 double minutes (DMs) 염색체가 발견되나 그 의미에 대한 규명이 확실치 않다⁶⁾. Alitalo 등⁷⁾은 전장암에서 HSR 혹은 DMs가 나타나는 것은 C-myc 암유전자의 증폭작용(amplification)을 반영하는 것으로서 암세포로 변형(transformation)되는 것을 의미하며⁸⁾ trisomy가 나타나는 것도 같은 의미이며⁹⁾ 이것은 결국 암화과정(carcinogenesis)을 뜻하는 것 같다. 그러나 양성종양(benign tumor)에서는 항상 일정한 염색체양상이 발견되어 매우 흥미롭다. 예를들면 meningioma에서 22번염색체의 소실¹⁰⁾이라든가, 타액선종양에서 3번과 8번 염색체의 전좌(3p21:8q12)¹⁰⁾, 같은 것이다. 양성종양과 암유전자의 관계에 대하여는 아무런 보고가 없다. 저자들은 두경부에 있는 후두암 및 비인두암에 대한 염색체 검사를 새로운 염색체조작기술을 도입하여 검사를 실시한 결과 흥미있는 사실과 유익한 성적을 얻었기에 보고하는 바 이다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

치료를 받지않은 후두암환자의 암세포 및 비인두암세포.

2. 실험방법

각각의 암조직을 PBS(-)로 잘 셋은 다음 lamina hood 내에서 면도날로 절개 썰어(1 mm^3 이하) 0.1% trypsin(4°C)에 overnight 시킨 뒤 MEM 배양액으로 두번 세척하여 이를 다시 0.1% collagenase 10ml를 첨가하여 진탕항온기(shaking incubator)에 10분간 둔 후 부유세포를 얻었으며 이런과정을 4번 반복 실시한 후 부유세포전부를 한데 모아 2000 rpm으로 원심분리를 10분간 하여 상층액은 버리고 다시 MEM 배양액(10% FBS 포함) 10 ml를 첨가하여 4시간 두었다. (37°C 항온기) cell harvest 3시간 전에 colchicine 0.1mg/ml를 투여하여 염색체가 중기애 모이게 하였다. 염색체조작은 routine 방법으로서 간략하면 다음과 같다. 37°C 의 저장액인 0.1% sodium citrate에 15분간 두고 고정액은 Carnoy 액을 사용하였으며 30분내지 1시간동안 두었다. 고정된 세포 slide는 Giemsa 염색을 하였으며 1,000 배의 광학현미경으로 관찰한 후 필요한 염색체는 사진을 찍었으며 slide 당 10개의 염색체를 조사하여 관찰하였다.

실험성적

후두암과 비인두암세포를 세로 진보된 방법으로 세포를 분리하여 염색체를 검사한 결과 다음과 같은 염색체이상을 발견할 수 있었다.

후두암세포에서는 염색체 개수가 46개를 나타내는 것이 제일 많았으며 hypotripliody 혹은 hypotetraploidy도 있었다(photo 3). 그러나 염색체이상 가운데 제 1번염색체의 장원에서 절단과 2종의 통원체가 특징적으로 나타났다(photo 1,2). 그러나 고형암에서 볼수있는 HSR 염색체나 DMs 염색체 등은 없었다.

비인두암세포에서는 염색체 개수가 모두 46개인 것이 특징이었고 HSR 혹은 DMs 염색체도 없었으며 제 3번 염색체의 장원에서 절단(photo 4)과 제 2번염색체의 장원과 제 3번염색체의 단원원위절에서 절단(photo 5)을 특징적으로 관찰할 수 있었다.

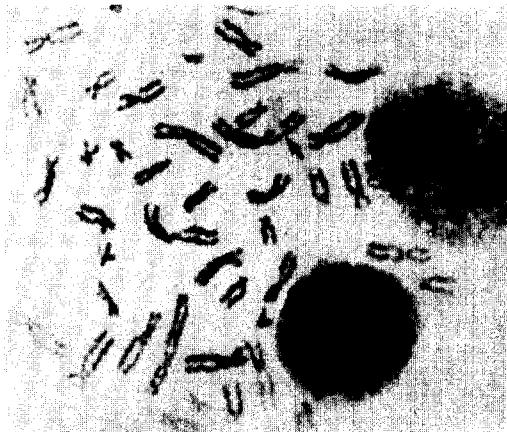


Photo I. Human chromosome from patient with laryngeal cancer. arrow: break point on long arm of chromosome 1.



Photo II. Human chromosome from patient with laryngeal cancer. arrow: double centromere on chromosome 1.



Photo III. Tetraploid chromosome from patient with laryngeal cancer.



Photo IV. Human chromosome from patient with nasopharyngeal cancer. arrow: break point on long arm of chromosome 3.

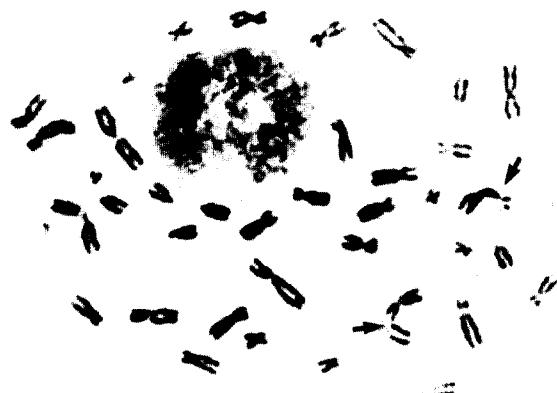


Photo V. Human chromosome from patient with nasopharyngeal cancer. arrow: break point on long arm of chromosome 2 and distal segment of short arm of chromosome 3.

고 칠

암은 nucleotide의 국소변이(point mutation)에 의한 유전자의 변이로서 발생된다는 것이 현재 정설로 되어 있는 것 같다. 일단 유전자가 바뀌면 증폭작용(amplification)에 의하여 변형(transformation)되고 이 과정이 여러번 되풀이 된다. 그러므로 단일기원(clonal origin)이라고 할 수 있으며¹¹⁾ 어떤 원인, 즉 화학물질, 환경인자 혹은 virus 등이 여기에 관여된다고 믿어진다.

대부분의 암에서는 염색체의 솟직 증가현상과 구조적 이상을 나타내는 대 최초에 돌연변이에 의해 바뀌어진 DNA 가닥이 증폭작용을 일으켜 여러가지 형태의 염색체이상을 볼수있다. Mitelman 등¹²⁾은 CML 환자에서 볼 수 있는 염색체이상을 도식으로 Fig. 1과 같이 설명하였다. 즉 66명의 ph¹염색체를 나타내는 CML 환자에서 88%가 다시 제2의 염색체 이상을 나타냈으며 이들 이상이 있는 염색체를 끼리 전파를 일으켜 결국 2ph¹, +8, i(17q)의 이종

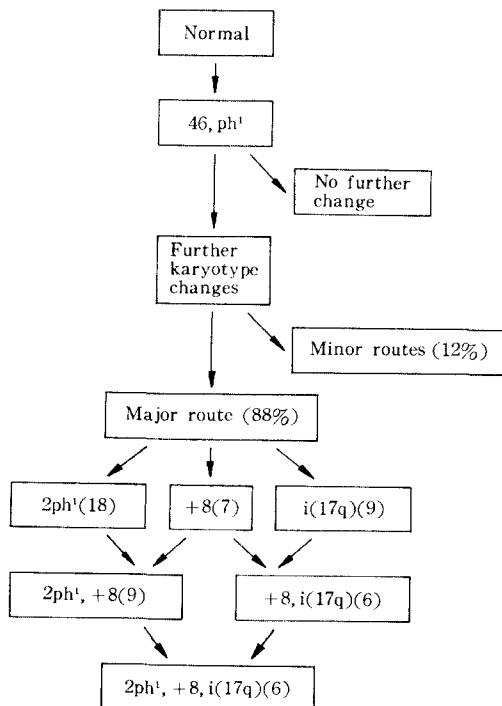


Fig. 1. chromosome abnormalities in addition to the ph¹ chromosome in 66 cases of chronic myeloid leukemia. Figures in parentheses in the lower part of the diagram indicate the number of cases showing the chromosome abnormality(Mitelman et al., 1976).

전좌형까지 나타난다고 발표했다. 한편 암의 발생 과정을 설명하는 데 있어 염색체의 솟직변화가 특징 한 염색체부위에 나타난다는 것이다.¹³⁾ 예를들면 8번 염색체는 주로 trisomy이고, 7번염색체는 장완의 복제형(duplication)이 많은 편 반해 5번과 20번염색체는 결손(deletion)이 많고 17번염색체는 장완에서 동원 염색체(isochromosome)가 많다는 흥미로운 사실이다. 이런 변화는 임상증상이나 병의 예후와 관계가 있을 것으로 생각하고 있다. Sandberg¹⁴⁾는 빙광암에서 제 1번염색체에서 marker 염색체가 발견되며 암의 진행과정과 관계없이 환자의 예후가 좋지 않다고 발표했다. 본 실험에서 후두암의 염색체이상을 보면 솟직 증가현상이 있었으며 제 1번염색체의 장완에서 결단부위가 있었다. 제 1번염색체에서는 N-RAS와 SK 암유전자가 있는 것으로 알려져 있어¹⁵⁾ 주목된다. 이를 암유전자가 빌암에 어떻게 작용할 것인지는 앞으로 규명되어야 할 주제이다. 제 1번염색체의 장완에서 이상을 주로 나타내는 암의 종류로는 악성임파종¹⁶⁾, 힐구세포암¹⁷⁾, 난소암¹⁸⁾ 그리고 Burkitt 암파종¹⁹⁾ 등이 보고되어 있다. 그러나 이들 암의 공통된 소견은 아직 아무도 모르고 있다. 한편으로 Burkitt 암파종은 Epstein-Barr (EB) virus에 의해 발생된 것으로 알려져 있으며²⁰⁾, 염색체는 제 8번과 제 14번의 전좌 즉 t(8:14) (q24:q32.3)이 대부분이며 일부에서는 제 2번 염색체의 단완과 제 22번 염색체의 장완의 전좌 즉 t(2:22)(p11:q11)이 특징이다. 8번 염색체의 장완에는 C-myc 유전자가 있으며 14번염색체에는 면역 globulin의 heavy chain을 담당하는 유전자가 있고 2번염색체의 단완에는 kappa light chain이, 22번 염색체에는 lambda light chain의 유전자가 각각 존재한다. 이들의 관계는 정확히 모르나 면역 globulin이 암유전자 자리에 전좌되면 암유전자의 활성화가 일어나지 않나 생각된다.

최근에는 E-B virus가 비인두암의 원인이 될 것 이란 보고²¹⁾가 있었다. 이 보고에 의하면 염색체의 변화로서는 3번염색체에서 결단부위와 복제 그리고 marker 염색체였다. 본 실험에서도 Mitelman²¹⁾등의 보고와 비슷 하였다. 암조직을 전자현미경으로 virus를 관찰하지 않아 확정적으로 말할수는 없지만 염색체이상의 양상을 미루어보아 E-B virus가 주된 원인이 아닌가 생각된다. 제 3번염색체에서는 아직 암유전자가 보고되어있지 않다. 거의 모든 암이 암유전자의 발현으로 설명하고 있는 현재 다소

Table 1. Thirty cases reported in the literature with an engagement of chromosome 3.

Tumor type	Reference
Acute myeloid leukemia	Oshimura et al., 1976 ²²⁾
Chronic myeloid leukemia	Verhest et al., 1980 ²³⁾
Acute myelomonocytic leukemia	Rowley and Potter, 1976 ²⁴⁾
Erythroleukemia	Beger et al., 1980 ²⁵⁾
Acute lymphocytic leukemia	Kaneko et al., 1980 ²⁶⁾
Malignant lymphoma	Reeves and Pickup, 1980 ²⁷⁾
Adenoma	Mark et al., 1981 ²⁸⁾
Idiopathic thrombocytopenia	Norrby et al., 1982 ²⁹⁾
Retinoblastoma	Gardner et al., 1982 ³⁰⁾
Carcinoma	Kakati et al., 1975 ³¹⁾ Sonia and Sandberg, 1978 ³²⁾ Mark et al., 1981 ²⁸⁾ Whang-Peng et al., 1982 ³³⁾

의 외의 결론으로 간주된다. 암유전자가 제 3번 염색체에서도 존재하고 있는지 아니면 virus가 직접 발암을 유발하고 있는지는 현재의 기술로는 증명이 불가능하다. Mitelman 등²¹⁾의 보고에 의하면 비인두암이 특히 제 3번 염색체에서도 3q 25, 3q 27의 band 부위에서 결단부위가 나타났다. 이 부위에서 결단이 있는 비인두암 이외의 종양에 대하여 문현을 종합해 보면 3번 염색체의 구조적이 이상과 암을 연관시켜볼 아무런 증거도 찾아볼 수 없다. 암세포는 염색체의 전체 번호에서 이상이 보고되어 있어 암의 발생과정을 염색체검사로서 증명한다는 것은 불가능한 것 같다. 그러나 본 실험에서와 같이 특정한 암에서 특정한 부위의 염색체이성이 있음을 규명하므로서 앞으로 암유전자와의 관계나 발암물질, 특수한 환경 등이 어떻게 암을 유발시키는지를 규명하는 데 큰 도움이 되지 않을까 생각한다.

요약

저자들은 최근에 개발한 효소작용을 이용한 세포 분리법을 도입하여 치료를 받지 않은 환자의 후두암과 비인두암 세포를 분리하여 overnight 배양한 후 염색체를 얻어 조사한 결과는 다음과 같다.

후두암세포에서는 제 1번 염색체의 장원에서 결단부위가 있었으며 비인두암에서는 제 3번 염색체의 단단 원위절에서 결단부위를 특정적으로 볼 수 있었다.

전자암의 결단부위는 N-RAS 와 SK 암유전자와 관계가 있는 듯 하며 후자암은 E-B virus에 기인한

것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Nowell PC, Hungerford DA: A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960; 132: 1497.
- Caspersson T, Zech L, Johansson C: Quinacrine mustard fluorescence of human chromosomes. *Exp Cell Res* 1970; 61: 474-475.
- Rowley JD: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 243: 290-293.
- Yunis JJ: New chromosome techniques in the study of human neoplasia. *Hum Pathol* 1981; 120: 540-549.
- Rowley JD: Human oncogene locations and chromosome aberrations. *Nature* 1983; 301: 290-291.
- Marx JL: Oncogenes amplified in cancer cells. *Science* 1984; 223: 40-41.
- Alitalo K, Schwab M, Lin CC, et al: Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*

- 1983; 80: 1707—1711.
8. Gilbert F: Chromosomes, genes, and cancer: a classification of chromosome abnormalities in cancer. *J Matl Cancer Inst* 1983; 71: 1107—1114.
 9. Zankl H, Zang KD: Correlations between clinical and cytogenetical data in 180 human meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1980; 1: 351—356.
 10. Mark J, Dahlfors R, Ekedahl C: Cytogenetics of the human benign mixed salivary gland tumour. *Hereditas* 1983; 99: 115—129.
 11. Nowell PC: The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194: 23—28.
 12. Mitelman F, Levan G, Nilsson P, et al: Non-random karyotypic evolution in chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer* 1976; 18: 24—30.
 13. Nowell PC: Cytogenetics, in Becker FF (ed): *Cancer: A comprehensive treatise*, ed 2. New York, Plenum, 1982, Vol 1, pp 3—46.
 14. Sandberg AA: *The chromosomes in human cancer and leukemia*, New York, Elsevier North-Holland, 1979.
 15. Balazs I, Grzeschik KH, Stavnezer E: Assignment of the human homologue of a chicken oncogene to chromosome 1. Human gene mapping (1984): Seventh International Workshop on Human Gene Mapping. *Cytogenet Cell Genet* 1984; 37: 410—411.
 16. Bloomfield CD, Arthur DC, Frizzera G, Levine EC, Peterson BA, Gajl-Peczalska KJ: Non-random chromosome abnormalities in lymphoma. *Cancer Res* 1983; 43: 2975—2984.
 17. Rowley JD: Mapping of human chromosomal regions related to neoplasia: evidence from chromosomes 1 and 17. *Proc Natl Acad Sci* 1977a; 74: 5792—5793.
 18. Atkin NB, Baker MC: Chromosome 1 in 26 carcinomas of the cervix uteri. *Cancer* 1979; 44: 604—613.
 19. Berger R, Berhneim A: Cytogenetic studies on Burkitt's lymphomaleukemia. *Cancer* Genet Cytogenet 1982; 7: 231—244.
 20. Yunis JJ: Clinical significance of high resolution chromosomes in the study of acute leukemias and non-Hodgkins lymphomas, in Fairbanks VF (ed): *Current hematology*, New York, Wiley, 1984, Vol 3, pp 353—391.
 21. Mitelman F, Mark-Vendel E, Mineur A, Giovannella B, Klein G: A 3a⁺ marker chromosome in EBV-carrying nasopharyngeal carcinomas. *Int J Cancer* 1983; 32: 651—655.
 22. Oshimura M, Hayata I, Kakati S, Sandberg AA: Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. III. Banding studies in acute myeloblastic leukemia (AML). *Cancer* 1976; 38: 748—761.
 23. Verhest A, Lustman F, Debusscher L: 9q⁺ marker chromosome in chronic myelogenous leukemia without the ph¹. *Br J Haematol* 1980; 46: 493—494.
 24. Rowley JD, Potter D: Chromosomal banding patterns in acute nonlymphocytic leukemia. *Blood* 1976; 47: 705—721.
 25. Berger R, Bernheim A, Le Conlat M, Vecchicne D, Schaison G: Chromosomal studies of leukemic and preleukemic Fanconi's anemia patients. *Hum Genet* 1980; 56: 59—62.
 26. Kaneko Y, Rowley JD, Check I, Variakojis D, Moohr JW: The 14q⁺ chromosome in pre-B-ALL. *Blood* 1980; 56: 782—785.
 27. Reeves BR, Pickup VL: The chromosome changes in-Burkitt lymphomas. *Hum Genet* 1980; 53: 349—355.
 28. Mark J, Dahlfors R, Ekedahl C: Chromosomal deviations and their specificity in human mixed salivary gland tumours. *Anticancer Res* 1981; 1: 49—57.
 29. Norrby A, Ridell B, Swolin B, Westin J: Rearrangement of chromosome No.3 in a case of preleukemia with thrombocytosis. *Cancer Genet Cytogenet* 1982; 5: 527—263.
 30. Gardner HA, Gallie BL, Knight LA, Phillips RA: Multiple karyotypic changes in retinoblastoma tumor cells: presence of nor-

- mal chromosome No.13 in most tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1982; 6: 201-211.
31. Kakati S, Hayata I, Oshimura M, Sandberg AA: Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. X. Banding patterns in cancerous effusions. *Cancer* 1975; 36: 1729-1738.
32. Sonia SI, Sandberg AA: Chromosomes and causation of human cancer and leukemias.
- XXX. Banding studies of primary intestinal tumors. *Cancer* 1978; 41: 164-173.
33. Whang-Peng J, Bunn JR PA, Kao-Shn CS, Lee EC, Carney DN, Gazdar A, Minna JD: A non-random chromosomal abnormality, del 3p(14-23), in human small cell lung cancer (SCIG). *Cancer Genet Cytogenet* 1982; 6: 119-134.