

갑상선 유두암에서 p16^{INK4A} 촉진자 과메틸화와 p16^{INK4A}, cyclin D1 및 Rb 발현

계명대학교 의과대학 ¹내과학교실, ²병리학교실

김윤정¹ · 김혜순¹ · 하유진¹ · 이호영¹
박근규¹ · 김미경¹ · 권선영²

p16^{INK4A} promoter hypermethylation and expression of p16^{INK4A}, cyclin D1, and Rb in papillary thyroid carcinoma

Yoon-Jung Kim, M.D.¹, Hye-Soon Kim, M.D.¹, Yu-Jin Ha, M.D.¹, Ho-Young Lee, M.D.¹,
Keun-Gyu Park, M.D.¹, Mi-Kyung Kim, M.D.¹, and Sun-Young Kwon, M.D.²

Departments of ¹Internal Medicine and ²Pathology, Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea

Background/Aims: Dysregulation of the cell cycle is believed to be important in human neoplasia. p16^{INK4a}, a regulator of the retinoblastoma protein, is inactivated by several mechanisms, including hypermethylation of the promoter. The aim of this study was to assess the relationship between p16^{INK4a} methylation status and the expression of p16^{INK4a}, cyclin D1, and retinoblastoma protein in papillary thyroid cancer.

Methods: Thirty-five surgically resected papillary thyroid cancer cases treated at Keimyung University Dongsan Medical Center from Jan 2003 to Dec 2005 were included in the study. We examined promoter hypermethylation of p16^{INK4a} and immunohistochemically analyzed p16^{INK4a}, cyclin D1, and retinoblastoma protein expression.

Results: Aberrant hypermethylation of 5' CpG islands of the p16^{INK4a} gene promoter was observed in 17 (48.6%) out of 35 cases, and the p16^{INK4a} protein was lost in 18 (51.4%) cases. With the exception of one case, p16^{INK4a} promoter hypermethylation correlated with the loss of p16^{INK4a} protein expression ($p<0.0001$). Overexpression of cyclin D1 was found in 27 (77.1%) cases and retinoblastoma immunostaining was detected in 10 (28.6%) cases. There was an inverse relationship between p16^{INK4a} and pRb immunostaining ($p<0.018$, $r=-0.398$), and a strong direct correlation between cyclin D1 and pRb immunostaining ($p<0.0001$, $r=0.710$). Cyclin D1 expression was significantly associated with the pathologic T stage of cancer ($p=0.04$).

Conclusions: These data suggest that promoter hypermethylation is a major mechanism underlying the inactivation of p16^{INK4a} and alterations in the p16^{INK4a}/cyclin D1/retinoblastoma pathway, which are thought to be very important in papillary thyroid cancer. (Korean J Med 78:333-340, 2010)

Key Words: Cyclin D1; Methylation; p16^{INK4a}; Retinoblastoma; Thyroid Neoplasm

• Received: 2009. 1. 7

• Accepted: 2009. 10. 26

• Correspondence to Hye-Soon Kim, M.D., Department of Internal Medicine, Keimyung University School of Medicine, 194 Dongsan-dong, Jung-gu, Daegu 700-712, Korea E-mail: hsk12@kmu.ac.kr

서론

갑상선암은 조직학적으로 크게 갑상선 상피세포에서 기원하는 유두암, 여포암 그리고 미분화암과 갑상선 부여세포에서 기원하여 칼시토닌을 분비하는 갑상선 수질암으로 분류할 수 있다¹⁾. 이 중 갑상선 유두암은 전체 갑상선암의 약 80% 이상을 차지하며 10년 생존율이 90% 이상으로 보고되고 있다²⁾.

세포주기에 관여하는 단백질의 하나인 p16^{INK4a}는 cyclin-dependent kinase (CDK)를 억제하는 물질로 CDK4 및 CDK6와 결합하여 cyclinD-CDK4 복합체의 형성을 저해하며, 결과적으로 Retinoblastoma (Rb) 유전자의 인산화를 억제하여 세포주기의 G1기 진행을 차단하는 종양억제 인자이다³⁾. p16^{INK4a} 유전자의 비활성은 방광, 유방 및 전립선 암 등을 비롯한 암 발생에 관여하는 것으로 보고되고 있으며, 이러한 종양억제 인자의 비활성화 기전으로는 동종접합체 결손, 유전자 변이 및 촉진자의 과메틸화 등이 있다^{4,5)}. 최근 p16^{INK4a} 유전자 비활성의 원인으로 동종접합체 결손이나 유전자 변이 등이 없이 p16^{INK4a} 유전자 촉진자 부위의 과메틸화로 인한 유전자의 비활성화가 폐암, 신경교종, 유방, 전립선암 및 신장암 등의 발생과 연관이 있다는 연구들이 보고되었다⁶⁻⁸⁾. Cyclin D1은 CDK4 및 CDK6와 결합하여 세포 주기의 G1기 진행을 촉진하여 종양의 발생에 관여한다. 종양억제인자 Rb는 저인산화 형태에서 세포주기의 G1 정지기의 조절인자로 작용하는데, p16^{INK4a}/cyclin D1/Rb 경로의 이상은 인간의 종양 발생에 있어서 세포주기 조절 기전에 손상을 가져와 암 발생에 중요한 인자로 작용하는 것으로 알려져 있다⁹⁾.

최근 갑상선암 발생이 급격히 증가하고 있으나 아직까지 국내에서는 갑상선 암 발생에 있어서 세포주기 조절에 관여하는 경로의 하나인 p16^{INK4a}/cyclin D1/Rb 이상에 대한 연구가 이루어지지 않았으므로 갑상선 유두암 조직에서 p16^{INK4a} 촉진자의 과메틸화 여부와 p16^{INK4a}, cyclin D1 및 Rb의 발현과의 관계에 대해 알아보고 암의 임상양상과 상관관계가 있는지 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 환자

환자는 2003년 1월부터 2005년 12월까지 계명대학교 동산의료원에서 갑상선 절제술 후 전형적인 갑상선 유두암으로 진단된 35예를 대상으로 하였다. 환자들의 임상 정보는

의무기록조사를 이용해 수집하였고, 수술조직 슬라이드를 확인하였다. 암의 병기는 American Joint Committee on Cancer (AJCC)의 2002년 권고안을 따라 분류하였다¹⁰⁾.

2. DNA 추출

수술조직 1 cm³을 파쇄기로 균질화하고 75% 알코올 2 mL를 첨가하여 섞은 후 상온에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 남은 침전물을 건조시켰다. TE9 용액(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.9) 4.5 mL를 첨가하여 진탕 및 부유 후 0.5 mL sodium dodecyl sulfate (SDS)와 proteinase K 혼합액을 넣고 60°C에서 48~60시간 반응시킨 후 다시 0.1 mL SDS와 proteinase K 혼합액을 첨가하여 60°C에서 24~48시간 반응시켰다. 10분간 끓는 물에 담근 후 상온에서 서서히 식히고 phenol/chloroform/isoamyl alcohol 5 mL를 넣고 혼합한 후 원심분리하고, 상부 수액층을 옮겨 10 mmol/L ammonium acetate 2 mL와 무수알코올 20 mL를 첨가하여 섞은 후 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 10,000 g에서 60분간 원심분리하여 DNA를 침전시킨 후 70% 알코올로 세척하여 건조시켜 500 µL LOTE (3 mmol/L Tris, 0.2 mmol/L EDTA, pH 7.5)에 녹여 4°C에서 보관하였다.

3. p16^{INK4a} 촉진자의 메틸화 분석(methylation analysis)

p16^{INK4a} 촉진자의 메틸화는 Herman 등¹¹⁾이 발표한 메틸화 분석법을 이용하여 분석하였다. 메틸화된 cytosine은 bisulfite modification에 따라 thymidine으로 변환되나 메틸화되지 않은 cytosine은 uracil로 변환되므로 이를 PCR로 증폭하여 cytosine의 메틸화 여부를 확인하였다. 추출한 DNA를 sodium bisulfite, hydroquinone 그리고 sodium hydroxide와 반응시킨 후 탈아미노 반응으로 메틸화하지 않은 cytosine을 uracil로 변환시켜 Wizard DNA purification kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA)를 이용하여 DNA를 분리하고, sodium hydroxide로 탈숄론화 반응을 유도한 후 에탄올 침전시켜 PCR 증폭을 하였다. 메틸화된 DNA 증폭을 위한 sense primer로 5'TTATTAGAGGGTGGGCGGATCGC3', antisense primer는 5'GACCCGAACCGCGACCGTAA3'를 사용하였고, 메틸화되지 않은 DNA 증폭에는 5'TTATTAGAGGGTGGG GTGGATTGT3'와 5'CAACCCCAACCACAACCATAA3'가 각각 사용되었다. PCR 완충액에 dNTP 250 mmol/L, primer 10 pmol/L, DNA 50 ng, MgCl₂ 1.25 mmol/L 그리고 Taq polymerase 0.5 U를 95°C에서 5분 반응시킨 후 95°C에서 30초, 65°C

Table 1. Clinical data and pathological features

No	Sex	Age	Size (cm)	pT*	ET†	Multi‡	LN§	MSP ¶	p16	cyclinD1	pRb
1	F	12	2.5	T2	N	N	N	1††	0**	1	0
2	F	53	2.0	T1	N**	Y¶	Y	1	0	1	0
3	F	60	1.5	T3	Y	Y	N	1	0	1	0
4	F	50	1.6	T1	N	Y	Y	0	1	0	1
5	F	35	4.6	T3	Y	N	Y	0	1	1	0
6	F	33	2.2	T2	N	N	N	0	1	1	0
7	F	52	3.0	T2	N	N	N	0	1	0	1
8	F	19	2.5	T2	N	N	N	1	0	1	0
9	M	53	4.5	T3	N	N	N	1	0	1	0
10	F	34	0.8	T1	N	N	N	1	0	1	0
11	F	37	1.6	T1	N	N	N	0	1	0	0
12	F	51	1.1	T1	N	N	N	1	0	1	0
13	F	49	2.5	T2	N	Y	N	0	1	1	1
14	F	41	1.7	T3	Y	Y	N	0	0	1	0
15	F	63	2.5	T2	N	Y	N	0	1	1	0
16	F	49	1.1	T3	Y	Y	N	1	1	1	0
17	F	63	1.1	T3	Y	Y	N	0	1	1	0
18	F	69	1.9	T3	Y	Y	Y	1	0	1	1
19	M	54	2.6	T2	N	N	N	0	1	0	1
20	F	33	2.5	T2	N	Y	Y	1	0	1	0
21	F	53	2.0	T1	N	N	N	1	0	1	0
22	F	56	1.8	T1	N	Y	Y	0	1	0	1
23	F	45	1.5	T1	N	Y	N	0	1	0	1
24	F	51	4.8	T3	N	N	Y	0	1	1	0
25	F	63	2.2	T2	N	Y	N	1	0	1	0
26	F	72	1.8	T1	N	Y	N	0	1	0	1
27	F	30	1.4	T1	N	N	Y	1	0	1	0
28	F	42	1.5	T1	N	N	N	1	0	1	0
29	F	31	1.2	T1	N	N	Y	0	1	0	1
30	F	53	1.5	T1	N	N	N	1	0	1	0
31	F	57	2.0	T3	Y	N	Y	0	1	1	0
32	F	62	1.1	T1	N	N	N	0	0	1	1
33	F	33	2.9	T2	N	N	N	1	0	1	0
34	M	66	3.0	T3	Y	N	Y	1	0	1	0
35	F	43	2.2	T2	N	N	N	0	1	1	0

pT, pathologic tumor stage; †ET, extrathyroidal extension; ‡Multi, multicentricity; §LN, lymph node metastasis; ¶MSP, methylation; ¶Y, yes; **N, no; ††1, expression; **0, nonexpression.

에서 30초, 72°C에서 30초 반응을 36회 반복한 후 72°C에서 5분 반응시켜 1% agarose gel에 전기영동 하였다.

4. 면역조직화학 염색

면역조직화학 염색을 위해 갑상선 절제술 후 파라핀으로

처리하여 보관 중인 조직을 사용하였다. 10% 포르말린 용액에 고정 후 파라핀 포매된 조직을 4 µm 두께의 절편으로 깎은 후 슬라이드에 붙여 60°C 오븐에서 1시간 동안 가열하고 histoclear와 크실렌을 3:1로 혼합된 탈랍제(dewaxing agent)에 60°C에서 3회, 실온에서 1회 처리하여 탈파라핀화 하였다.

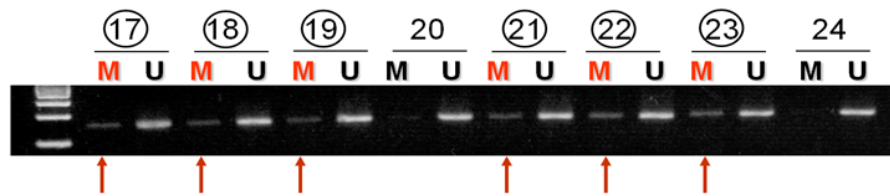


Figure 1. Representative data for methylation-specific PCR for CpG islands of the p16^{INK4a} gene promoter in papillary thyroid cancer. The presence of a visible PCR product in lane U indicates an unmethylated gene; the presence of a product in lane M indicates a methylated gene.

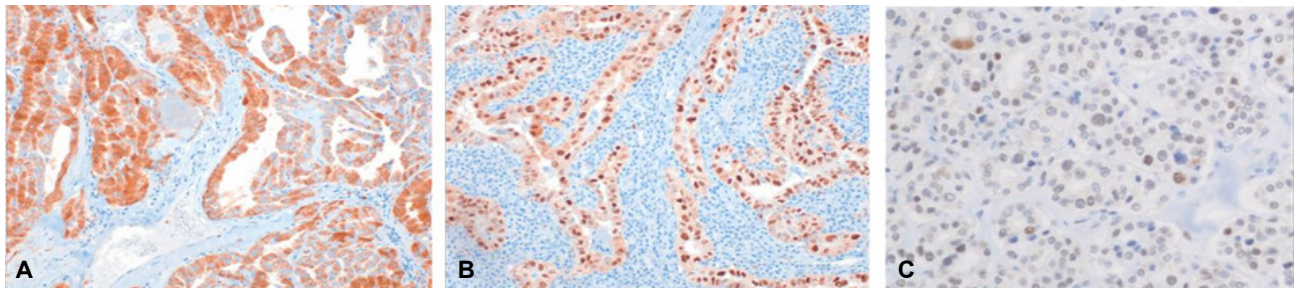


Figure 2. Typical images of p16^{INK4a}, cyclin D1 and pRb expression in papillary cancer by immunohistochemistry (×100). (A) positive p16^{INK4a} immunostaining, (B) positive cyclin D1 immunostaining, and (C) positive pRb immunostaining.

실온에서 무수알코올 4회 처리하여 함수시키고 내재성 과산화소 활성을 없애기 위하여 0.3% H₂O₂-methanol을 40°C에서 2분 동안 가한 후 완충액으로 세척하였다. p16^{INK4a}, cyclinD1 및 pRb 발현을 보기 위해 CINtecTM p16^{INK4a} Histology Kit (Dako, USA), NCL-CyclinD1-GM (Novocastra Laboratories, UK) 및 anti-pRb monoclonal antibody (BDbiosciences, USA)를 각각 1:40, 1:25 및 1:6,000으로 희석하여 사용하였다.

5. 통계 분석

임상양상 사이의 상관관계는 Pearson Chi-Square test로 분석하였다. 대상군 간의 다양한 변수 비교에는 independent-samples *t*-test와 Pearson Chi-Square test를 이용하였으며 기대 도수가 5 미만인 경우에는 Fisher's exact test를 사용하였다. 변수들의 상관관계는 Pearson 상관분석으로 평가하였다(correlation coefficient, *r*). 통계처리는 SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였으며 통계적 유의수준은 *p* value 0.05 미만으로 정하였다.

결 과

1. 임상 및 병리학 소견

세계보건기구의 조직학적 분류에 따라 여포성변종, 원주

세포변종, 고형변종 및 유두상미소암 등의 아형을 제외한 전형적인 갑상선 유두암으로 진단된 환자 35명이 연구에 포함되었다¹²⁾. 평균 연령은 47.6세였고, 이 중 남자가 3명, 여자가 32명이었다. AJCC에 따른 암의 병기 및 임상양상을 표 1에 정리하였다.

2. p16^{INK4a} 촉진자의 메틸화 분석

p16^{INK4a}의 발현이 억제되는 기전의 하나인 촉진자 부위의 과메틸화를 분석한 결과 p16^{INK4a} 유전자 촉진자 5' CpG의 과메틸화는 35명 중 17명(48.6%)에서 관찰되었다(그림 1). 갑상선유두암에서 p16^{INK4a} 촉진자의 과메틸화는 한 예를 제외하고 조직의 p16^{INK4a} 단백질 소실과 일치하였다(*p*<0.0001).

3. p16^{INK4a}, cyclinD1 및 pRb 면역조직화학염색

갑상선 유두암 조직에서 p16^{INK4a}, cyclin D1 및 pRb 발현 여부를 면역조직화학염색을 이용하여 알아보았다. 갑상선 유두암에서 p16^{INK4a} 단백질은 35명 중 18명(51.4%)에서 소실되었다(그림 2A). 세포 주기에서 cyclin D1은 CDK4 및 CDK6와 결합하여 G1→S기의 과정을 촉진하여 종양의 발생을 유발시키게 되는데, 이 연구에서 갑상선 유두암 환자 35명 중 27명(77.1%)에서 cyclin D1이 과발현 되었다(그림 2B). E2F와 복합체를 형성함으로써 세포 주기 G1에서 S phase로

Table 2. Relationship between p16^{INK4a} expression and clinicopathological parameters in papillary thyroid cancer

	p16 ^{INK4a}		<i>p</i>
	+	-	
	(n=17)	(n=18)	
Tumor size			0.78
≤2.0 cm	9	11	
>2.0 cm, 4 cm ≥	6	6	
>4 cm	2	1	
LN metastasis			0.63
Absent	11	13	
Present	6	5	
Multiplicity			0.41
Absent	9	12	
Present	8	6	
pT stage			0.84
1	6	8	
2	6	5	
3	5	5	
Extrathyroidal ext.*			0.93
Absent	13	14	

*Extrathyroidal ext., extrathyroidal extension.

의 진행을 억제하는 유전자인 Rb는 cyclin D1에 의해 인산화가 되면 E2F에서 분리되어 세포주기 조절 기능을 상실하게 되는데 pRb 면역조직화학염색이 35명 중 10명(28.6%)에서 관찰되었다(그림 2C). pRb와 p16^{INK4a} 발현은 역비례 관계였고($p<0.018$, $r=-0.398$), pRb와 cyclinD1의 발현은 양의 상관관계를 보였다($p<0.0001$, $r=0.710$).

4. p16^{INK4a}, cyclineD1 및 pRb 발현여부에 따른 갑상선 유두암의 특성

마지막으로 p16^{INK4a}, cyclineD1 및 pRb의 면역조직화학 염색 결과와 임상-병리조직학적 인자들과의 상관관계에 대하여 조사하였다. 갑상선 유두암 조직에서 p16^{INK4a} 발현여부에 따른 갑상선 유두암의 특성을 살펴본 결과, p16^{INK4a} 단백질이 소실된 군과 소실되지 않은 군에서 암종의 크기, 림프절 전이, 다발성 유무, 조직학적 병기, 갑상선의 조직 침윤 차이는 통계적 유의성이 없었다(표 2). 갑상선 유두암 조직에서 cyclin D1이 발현된 군과 발현되지 않은 군 사이에 암종의 크기, 림프절 전이, 다발성 유무 그리고 갑상선 외 조직 침윤은 차이가 없었으나, 조직학적 병기는 cyclin D1 발현군에서

Table 3. Relationship between cyclin D1 expression and clinicopathological parameters in papillary thyroid cancer

	Cyclin D1		<i>p</i>
	+	-	
	(n=27)	(n=8)	
Tumor size			0.42
≤2.0 cm	14	6	
>2.0 cm, 4 cm ≥	10	2	
>4 cm	3	0	
LN metastasis			0.67
Absent	19	5	
Present	8	3	
Multiplicity			0.51
Absent	17	4	
Present	10	4	
pT stage			0.04
1	8	6	
2	9	2	
3	10	0	
Extrathyroidal ext.*			0.09
Absent	19	8	
Present	8	0	

*Extrathyroidal ext., extrathyroidal extension.

유의하게 높았다($p=0.04$, 표 3). 갑상선 유두암 조직에서 pRb 발현여부에 따른 차이는 관찰되지 않았다(표 4).

고 찰

갑상선 유두암은 내분비계에 발생하는 악성 종양 중 가장 흔한 암으로, Rearranged in transformation/Papillary thyroid carcinomas (RET/PTC) 유전자 재배열이 서구지역 성인 2.6~34%에서 ras 변이는 10~20%로 보고되고 있고, BRAF 변이는 29~83%로 가장 흔히 관찰되는 유전자 변이로 생각되고 있다^{13,14}. 국내에는 갑상선 유두암에서 BRAF 변이에 따른 암 발생 및 예후인자와 관련된 보고가 있었으며¹⁵, 정 등¹⁶은 갑상선 유두암에서 p53, p21과 bcl-2 종양 단백질의 발현과의 관계에 대한 조사를 통해 p21 염색 양성군에서 종양의 다발성이나 갑상선의 조직 침범이 통계적으로 의미있게 증가함을 보고하였다.

암의 발생 및 진행에 있어서 종양 억제 유전자의 비활성화가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, 최근 종양

Table 4. Relationship between pRb expression and clinicopathological parameters in papillary thyroid cancer

	pRb		<i>P</i>
	+	-	
	(n=10)	(n=25)	
Tumor size			0.43
≤2.0 cm	7	13	
>2.0 cm, 4 cm ≥	3	9	
>4 cm	0	3	
LN metastasis			0.49
Absent	6	18	
Present	4	7	
Multiplicity			0.13
Absent	4	17	
Present	6	8	
pT stage			0.21
1	6	8	
2	3	8	
3	1	9	
Extrathyroidal ext.*			0.25
Absent	9	18	
Present	1	7	

*Extrathyroidal ext., extrathyroidal extension.

억제 유전자인 p16^{INK4a} 촉진자 부위의 과메틸화가 암 발생에 기여한다는 연구들이 보고되고 있다⁶⁻⁸⁾. p16^{INK4a}은 염색체 9p21에 존재하며 156개의 아미노산으로 구성된 핵단백질로, CDK4/6에 특이적으로 결합하여 CDK4/6/cyclinD의 결합을 억제하고 결과적으로 Rb의 인산화를 막음으로써 Rb와 E2F의 결합을 지속시켜 세포주기의 진행을 억제하는 역할을 한다¹⁷⁾. p16^{INK4a}의 변이 및 유전자 소실은 여러 상피세포암, 췌장암 및 흑색종 등에서 발견되며, 갑상선 종양에서도 여포암과 유두암의 2/3 및 1/2에서 p16^{INK4a} 유전자 결손이 관찰된 반면 정상 조직에서는 p16^{INK4a} 유전자 결손이 없음을 보고하였다¹⁸⁾. Ram 등¹⁹⁾은 44명의 갑상선 유두암 조직에서 p16^{INK4a} 단백질 발현과 mRNA 변이 및 촉진자 부위의 과메틸화를 분석하였으며, p16^{INK4a} 유전자 변이가 갑상선 유두암의 병리 기전에 중요한 작용을 할 것이라 제시하였다. 정상 및 갑상선 종양 조직을 비교한 연구에서는 p16^{INK4a} 촉진자의 과메틸화가 p16^{INK4a} 단백질의 소실과 연관이 있었으며, 종양의 병기와 환자의 나이 및 성별에 따른 과메틸화 차이는 관찰되지 않았다고 보고하였다⁸⁾. 또한, 갑상선 유두암 39예에

서 p16^{INK4a}, p14^{ARF}, RB1, p27^{KIP1} 및 O⁶-MGMT 등의 유전자들을 분석한 연구에서는 p14^{ARF} 유전자의 변이가 갑상선 유두암의 만성 염증화에 관여하는 반면 p16^{INK4a} 유전자의 과메틸화가 종양의 성장에 관여함을 발표하였다²⁰⁾. 이는 특정 종양 억제 유전자의 과메틸화가 종양의 생성, 분화 및 진행 초기에 중요한 소견임을 나타내는 결과라 하겠다. 본 연구에서는 면역화학염색 결과 p16^{INK4a} 단백질의 발현이 35명 중 18명(51.4%)에서 소실되어 갑상선 유두암에서 p16^{INK4a} 단백질의 소실이 종양의 발생 및 진행에 관여하는 인자의 하나로 예측할 수 있었으며, p16^{INK4a} 단백질이 소실된 조직 18예 중 17예에서 촉진자의 5'CpG 부위 과메틸화가 관찰되어 p16^{INK4a} 발현을 억제하는 주요 원인이 촉진자 과메틸화임을 알 수 있었다.

갑상선 유두암 조직에서 Cyclin D1의 면역조직화학염색을 실시한 결과 35명 중 27명(77.1%)에서 발현이 증가하였고, 암의 조직학적 병기와 통계적으로 유의한 상관관계를 보였고, 갑상선의 침윤은 증가하는 경향이 관찰되었다. 염색체 11q13에 위치하는 cyclin D1은 세포주기에서 CDK4/6와 복합체를 형성하여 Rb 유전자를 인산화시킴으로써 세포주기 G1 phase로의 이동을 가속화시켜 종양 유전자의 과발현을 통해 다양한 암을 유발하는 것으로 알려져 있다²¹⁾. 135명의 폐암 조직에서 cyclin D1의 발현이 24.5%에서 관찰되었으며 종양의 분화도 및 림프절 전이와 연관성을 보이고 낮은 생존율을 나타내는 연구가 보고된 바 있으며²²⁾, Carlos A 등²³⁾은 35명의 갑상선 유두암 환자를 대상으로 cyclin D1의 과발현 및 이와 관련된 병기 및 예후인자들을 조사한 결과 cyclin D1의 과발현은 종양의 재발 및 사망에 밀접한 관계가 있음을 보고하였다.

종양억제 유전자 Rb는 염색체 13q14에 존재하며 110~114 KD로 이루어진 핵단백질로 모든 세포에서 발현되며 비인산화형태에서 종양 억제 유전자로 작용한다. 비인산화 형태의 Rb는 E2F와 복합체를 형성함으로써 세포 주기 G1에서 S phase로의 이동을 억제하게 되는데, cyclin D1의 과발현은 Rb를 인산화시킴으로써 E2F와의 복합체 형성을 억제한다⁹⁾. Anwar 등²⁴⁾은 갑상선 유두암에서 Rb 활성의 감소를 관찰하였고, Rb의 활성 여부가 양성 및 악성 갑상선 질환의 구별에 도움이 된다고 발표하였다. 본 연구에서도 pRb의 발현이 갑상선 유두암 환자 35명의 조직 중 10명(28.6%)에서 관찰되었으며 cyclin D1의 발현과 유의한 상관관계를 보였다. 이는 cyclin D1의 과발현으로 인한 Rb의 인산화가 세포 주기 조절에 이상을 초래하게 되는데, 갑상선 유두암 조직에서 p16^{INK4a}

의 과메틸화로 p16^{INK4a}/cyclin D1/Rb 경로의 이상이 발생함을 알 수 있었다.

결론적으로, p16^{INK4a} 촉진자 부위의 과메틸화로 인한 p16^{INK4a} 감소가 세포주기 조절 기전에 손상을 가져와 암 발생의 중요한 인자 중 하나로 작용할 것으로 예측되며, 특히 cyclin D1의 과발현은 암의 조직학적 병기와 유의한 상관관계를 보였고, 갑상선외 침윤이 증가하는 경향이 관찰되어 갑상선 유두암 예후와 관련한 예측인자 및 치료목표로서의 가능성을 제시하여 주었다고 생각된다. 앞으로 더 많은 갑상선 유두암 조직에서 p16^{INK4a}, cyclin D1 및 Rb를 비롯한 세포주기 이상을 알아보고 치료 경과 및 예후와의 연관성을 관찰하는 것이 갑상선 유두암의 발생기전을 이해하고 치료 및 예후를 판정함에 있어서 도움을 줄 것으로 사료된다.

요 약

목적: 종양억제인자 Rb는 세포주기의 G1 정지기의 조절 인자로 작용하며 p16^{INK4a}/cyclin D1/Rb 경로의 이상은 인간의 종양에 중요한 인자로 작용하는 것으로 알려져 있다. p16^{INK4a}는 촉진자의 과메틸화를 포함한 여러 가지 기전으로 비활성화된다. 이 연구는 갑상선 유두암에서 p16^{INK4a} 촉진자의 과메틸화 여부와 p16^{INK4a}, cyclin D1 및 Rb의 발현 양상에 대해 알아보고자 하였다.

방법: 2003년 1월부터 2005년 12월까지 계명대학교 동산의료원에서 갑상선 절제술 후 전형적인 갑상선 유두암으로 진단된 35예를 대상으로 하였다. p16^{INK4a} 촉진자의 과메틸화 여부를 관찰하고, 조직에서 p16^{INK4a}, cyclin D1 및 Rb의 단백질 발현을 면역조직화학염색을 이용하여 분석하였다.

결과: p16^{INK4a} 유전자 촉진자의 5' CpG 부위 과메틸화는 35명 중 17명(48.6%)에서 관찰되었으며, p16^{INK4a} 단백질은 35명 중 18명(51.4%)에서 소실되었다. 한 예를 제외하고는, p16^{INK4a} 촉진자의 과메틸화는 p16^{INK4a} 단백질 소실과 일치하였다($p<0.0001$). cyclin D1의 과발현은 35명 중 27명(77.1%)에서 관찰되었고, pRb 면역염색은 35명 중 10명(28.6%)에서 관찰되었다. pRb와 p16^{INK4a} 면역염색은 역비례 관계였으며($p<0.018$, $r=-0.398$), pRb와 cyclinD1 면역염색은 양의 상관관계를 보여주었다($p<0.0001$, $r=0.710$). 또한 cyclinD1의 발현은 종양의 T 병기와 연관성이 있었고($p=0.04$), 갑상선외 침윤이 증가하는 경향이 관찰되었다.

결론: 촉진자의 과메틸화에 의한 p16^{INK4a} 비활성화 및 이와 연관된 cyclin D1 과발현 및 Rb 인산화가 갑상선 유두암

병인의 주요한 기전의 하나일 가능성을 제시하고 있다.

중심 단어: Cyclin D1; 메틸화; p16^{INK4a}; Retinoblastoma; 갑상선신생물

REFERENCES

- 1) Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. *A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995*. Cancer 83:2638-2648, 1998
- 2) Gilliland FD, Hunt WC, Morris DM, Key CR. *Prognostic factors for thyroid carcinoma: a population-based study of 15,698 cases from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program 1973-1991*. Cancer 79:564-573, 1997
- 3) Serrano M, Hannon GJ, Beach D. *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4*. Nature 366:704-707, 1993
- 4) Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, Tokino K, Califano J, Merlo A, Mao L, Herath J, Jenkins R, Westra W, Rutter JL, Buckler A, Gabrielson E, Tockman M, Cho KR, Hedrick L, Bova GS, Isaacs W, Koch W, Schwab D, Sidransky D. *Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours*. Nat Genet 11:210-212, 1995
- 5) Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB. *Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers*. Cancer Res 55:4525-4530, 1995
- 6) Calabro V, Strazzullo M, La Mantia G, Fedele M, Paulin C, Fusco A, Lania L. *Status and expression of the p16INK4 gene in human thyroid tumors and thyroid-tumor cell lines*. Int J Cancer 67:29-34, 1996
- 7) Kim DH, Cho M, Kim DH, Joo KR, Park NH, Yang US. *Methylation of the p16 tumor suppressor gene in Korean patients with colon cancer and adenoma*. Korean J Med 64:396-404, 2003
- 8) Boltze C, Zack S, Quednow C, Bettge S, Roessner A, Schneider-Stock R. *Hypermethylation of the CDKN2/p16INK4A promoter in thyroid carcinogenesis*. Pathol Res Pract 199:399-404, 2003
- 9) Hartwell LH, Kastan MB. *Cell cycle control and cancer*. Science 266:1821-1828, 1994
- 10) Green FL. *AJCC cancer staging manual*. 6th ed. p. 77-79, New York, Springer-Verlag Press, 2002
- 11) Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. *Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands*. Proc Natl Acad Sci USA 93:9821-9826, 1996
- 12) Eszlinger M, Krohn K, Hauptmann S, Dralle H, Giordano TJ, Paschke R. *Perspectives for improved and more accurate classification of thyroid epithelial tumors*. J Clin Endocrinol Metab 93:3286-3294, 2008
- 13) Patel KN, Singh B. *Genetic considerations in thyroid cancer*.

- Cancer Control* 13:111-118, 2006
- 14) Puxeddu E, Moretti S, Elisei R, Romei C, Pascucci R, Martinelli M, Marino C, Avenia N, Rossi ED, Fadda G, Cavaliere A, Ribacchi R, Falorni A, Pontecorvi A, Pacini F, Pinchera A, Santeusano F. *BRAF(V599E) mutation is the leading genetic event in adult sporadic papillary thyroid carcinomas. J Clin Endocrinol Metab* 89:2414-2420, 2004
 - 15) Rha SY, Lee JC, Kwon KH, Lee HJ, Kim KS, Jo YS, Ku BJ, Shong M, Kim YK, Ro HK. *The relationship between the BRAF mutations in thyroid papillary carcinomas and the prognostic factors. J Korean Soc Endocrinol* 20:224-229, 2005
 - 16) Jung TS, Kim KS, Oh YL, Jung JH, Lee EY, Jung HS, Min YK, Lee MS, Lee MK, Kim KW, Chung JH. *p53, p21 and bcl-2 protein expressions and the clinical significance in papillary thyroid carcinoma. J Korean Soc Endocrinol* 22:98-104, 2007
 - 17) Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. *Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. Biochim Biophys Acta* 1602:73-87, 2002
 - 18) Jones CJ, Shaw JJ, Wyllie FS, Gaillard N, Schlumberger M, Wynford-Thomas D. *High frequency deletion of the tumour suppressor gene P16INK4a (MTS1) in human thyroid cancer cell lines. Mol Cell Endocrinol* 116:115-119, 1996
 - 19) Lam AK, Lo CY, Leung P, Lang BH, Chan WF, Luk JM. *Clinicopathological roles of alterations of tumor suppressor gene p16 in papillary thyroid carcinoma. Ann Surg Oncol* 14:1772-1779, 2007
 - 20) Ishida E, Nakamura M, Shimada K, Higuchi T, Takatsu K, Yane K, Konishi N. *DNA hypermethylation status of multiple genes in papillary thyroid carcinomas. Pathobiology* 74:344-352, 2007
 - 21) Alao JP. *The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. Mol Cancer* 6:24, 2007
 - 22) Caputi M, Groeger AM, Esposito V, Dean C, De Luca A, Pacilio C, Muller MR, Giordano GG, Baldi F, Wolner E, Giordano A. *Prognostic role of cyclin D1 in lung cancer: relationship to proliferating cell nuclear antigen. Am J Respir Cell Mol Biol* 20:746-750, 1999
 - 23) Muro-Cacho CA, Holt T, Klotch D, Mora L, Livingston S, Futran N. *Cyclin D1 expression as a prognostic parameter in papillary carcinoma of the thyroid. Otolaryngol Head Neck Surg* 120:200-207, 1999
 - 24) Anwar F, Emond MJ, Schmidt RA, Hwang HC, Bronner MP. *Retinoblastoma expression in thyroid neoplasms. Mod Pathol* 13:562-569, 2000