두경부암에서 MAGE 1-6 mRNA를 검출하는 새로운 MAGE Common Primer의 의의

고신대학교 의과대학 이비인후과학교실,[1] 병리학교실[2]
대구가톨릭대학교 의과대학 임상병리학교실,[3] 계명대학교 의과대학 면역학교실[4]
이강대[1] · 이정삼[1] · 이환호[1] · 이영선[1] · 장희경[2] · 전창호[3] · 박종욱[4]

Experimental Studies on the Significance of New MAGE Common Primers Detecting MAGE 1-6 mRNA in Head and Neck Cancers

Kang Dae Lee, MD[1], Cheong Sam Lee, MD[1], Hwan Ho Lee, MD[1], Young Sun Lee, MD[1], Hee Kyung Chang, MD[2], Chang Ho Jean, MD[3] and Jong Wook Park, MD[4]

[1]Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery and [2]Pathology, College of Medicine, Kosin University, Pusan; and [3]Department of Clinical Pathology School of Medicine, Catholic University of Taegu; and [4]Department of Immunology, Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : MAGE (melanoma antigen gene) gene, coding for a tumor antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes, is expressed specifically in a variety of cancers, but not in normal tissues that exclude those of the testis. Therefore, most studies of MAGE gene are reported for the cancer immunotherapy. There are, however, few reports for the molecular diagnosis of cancers with MAGE gene. The purpose of this study is to evaluate the MAGE common primers in discriminating the malignant from benign lesions of the head and neck. **Materials and Methods** : Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and the nested PCR with the MAGE common primers (C1/C2, C3/C4) designed to detect MAGE 1-6 genes in this study were conducted in 37 cancer tissues (27 squamous cell carcinomas and 10 nonsquamous cell carcinoma lesions) and 18 benign tumors and 20 normal tissues of the head and neck. The PCR product was also assayed by RT-PCR with the MAGE 1-6 specific primer (M1-M6) to investigate which MAGE isotypes were detected. **Results** : At least more than one isotype of MAGE 1-6 genes were detected in 70.4% (19/27) of squamous cell carcinomas and 30% (3/10) of non-squamous cell carcinoma lesions. But there was no MAGE expression in 18 benign lesions and 20 normal tissues. **Conclusion** : MAGE common primers designed in this study showed high sensitivity and specificty in discriminating the malignant from benign lesions of the head and neck. This result suggests MAGE gene might be a potential tumor marker in the head and neck cancer. **(Korean J Otolaryngol 2001;44:736-43)**

KEY WORDS : MAGE · Tumor markers · Head and neck neoplasms.

서 론

종양 면역 연구의 목표중 하나는 정상세포와 암세포와의 차이점을 규명하여 암세포를 선택적으로 찾아낼 수 있는 진단법과 치료 방법을 개발하는데 있다. 그러기 위해서는 암세포에 특이적으로 발현되는 종양항원이 필요하다. Van der Bruggen 등[1]은 흑색종 세포주로부터 암세포에 특이적으로 발현되고 동시에 세포독성 림프구(cytotoxic T lymphocyte, CTL)에 의해 인식되는 종양항원 유전자를 찾아내는데 성공하였고 이 유전자를 melanoma antigen gene(MAGE gene, MAGE 유전자)이라고 명명하였다. MAGE 유전자는 적어도 12개 이상의 유전자로 구성되며, chromosome Xq에 위치한다.[2] MAGE 유전자는 흑색종뿐만 아니라 두경부암,[3-5] 위암,[6] 식도암,[7] 대장암,[8] 폐암,[9] 유방암,[10] 난소암,[11] 간암[12] 등 인체의 대부분의 암조직에서는 발현되지만, 정상조직에서는 고환이외는 발현이 없는 것으로 알려져있다. 현재까지

논문접수일 : 2001년 1월 12일 / 심사완료일 : 2001년 5월 17일
교신저자 : 이강대, 602-702 부산광역시 서구 암남동 34
고신대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (051) 240-6470 · 전송 : (051) 245-8539
E-mail : kdlee@ns.kosinmed.or.kr

MAGE 유전자에 관한 연구는 대부분 암치료를 위한 면역요법에 관한 것이며 암진단에 활용한 보고는 매우 드물다. 각종 암의 치료 방법의 발전에도 불구하고 진행암의 치료성적은 불량하기 때문에 암 연구자들은 암의 조기 진단에 많은 관심을 갖고 있다. 암의 진단은 육안적 및 방사선학적 소견과 궁극적으로는 조직학적 검사에 의해 이루어지나 최근에는 역전사-중합효소연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)을 이용하여 소수의 암세포로부터 암항원 또는 암관련 항원을 검출하는 분자생물학적 진단법이 연구되고 있다. RT-PCR법으로 암을 진단하는데 있어서 가장 중요한 사항은 검출할 목적 유전자(target gene)를 선정하는 것이다. 이상적인 종양표식자(tumor marker)는 암에서 특이하게 발현이 되고, 가능한 많은 암에서 발현이 되며 또 발현 빈도가 높아야 한다. 이러한 관점에서 볼 때 MAGE 유전자는 이상적인 종양 표식자로서의 요건을 갖추고 있다고 생각된다.

본 연구에서는 12 종류 이상으로 이루어진 MAGE gene family 중 비교적 많은 연구가 이루어져 있는 MAGE 1에서 MAGE 6 유전자를 대상으로 이들 유전자를 선택적으로 검출할 수 있는 sense 및 antisense primer를 유전자 염기서열의 상호 비교를 통해 각각 2종류씩 고안하였다. 이들 primer(이하 common primer로 칭함)로 nested RT-PCR을 시행하여, common primer가 두경부 영역의 암과 양성 질환을 구분해내는지 여부와 common primer를 이용한 암의 조기 진단 가능성을 알아보고자 한다.

대상 및 방법

조직의 채취

고신의대 복음병원에서 1998년 1월부터 1999년 12월까지 두경부 수술로부터 편평세포암종 27예와 비편평세포암종 10예(갑상선 유두상암종 3예, 악성 림프종 3예, 선양낭성암종 1예, 악성 혼합종 1예, 육종 1예, 융기성 피부섬유육종 1예) 등 모두 37예의 암조직을 채취하여 -70℃에 보존한 후 수일내에 RNA를 분리하였다. 대조군으로는 다형성 선종을 비롯한 양성종양과 비종양성 질환을 포함한 두경부의 양성질환의 신선 조직 18예와 두경부의 정상조직(구강, 인두, 비강 점막) 20예를 사용하였으며 같은 방법으로 처리하였다(Table 1).

Table 1. Materials

Pathology	No. of cases
Malignant tumor	37
Squamous cell ca.	27
Papillary thyroid ca.	3
Lymphoma	3
Malignant mixed tumor	1
Sarcoma	1
Dermatofibrosarcoma protuberance	1
Adenoid cystic carcinoma	1
Benign tumor	18
Pleomorphic adenoma	14
Papilloma	2
Neurogenic tumor	2
Normal tissue	20

MAGE 유전자 분석 및 common primer 제작

GenBank에 등록된 MAGE 1에서 MAGE 6까지의 유전자 정보를 찾은 뒤 이들의 단백질 지령부위(coding sequence, CDS)를 DNAsis program(Hitachi Co., Japan)을 이용하여 분석하였다. 각 유전자의 CDS의 염기서열을 서로 비교하여 DNA 동질성을 분석하고 동질성이 높은 부위를 선택하여 primer를 고안하였다. 특히 intron의 전후에 존재하는 exon의 염기서열을 primer로 선택함으로써 genomic DNA의 오염에 의한 위양성 반응을 없앴다. Nested RT-PCR은 1차로 RT-PCR을 한 후 2차로 nested PCR을 하기 위해 2종류의 sense 및 antisense primer를 제작하였다. 첫 번째 RT-PCR에 사용되는 primer는 MAGE 1에서 MAGE 6까지의 유전자로부터 828 924 bp의 cDNA가 증폭될 수 있도록 고안하였고, 이것을 C1/C2라고 명명하였다. 두 번째 PCR인 nested PCR의 primer는 469 493 bp의 cDNA가 증폭되게 고안하였으며 이것을 C3/C4라고 하였다(Fig. 1). MAGE common primer를 이용한 1차 RT-PCR 및 2차 PCR을 시행한 후 얻어진 PCR 산물에 대해 MAGE 1에서 MAGE 6까지의 유전자 각각에 특이적으로 반응하는 primer를 사용하여 common primer로 얻어진 MAGE 유전자 산물의 종류를 확인하였다. Nested RT-PCR에 사용되는 sense 및 antisense primer의 염기서열을 Table 2에 정리하였다.

Nested PCR

RNA 분리

암조직에 2 ml의 RNAzolB(Biotecx, USA)를 첨가한 후 조직분쇄기를 이용하여 암조직을 갈은 다음 분쇄된 조직액으로부터 total RNA를 추출하였다. 방법은 조직이 용해된 RNAzolB용액에 1/10량의 chloroform을 첨가하여 진탕 혼합한 후 12,000 rpm으로 15분간 원심하여 단백질 층과 RNA

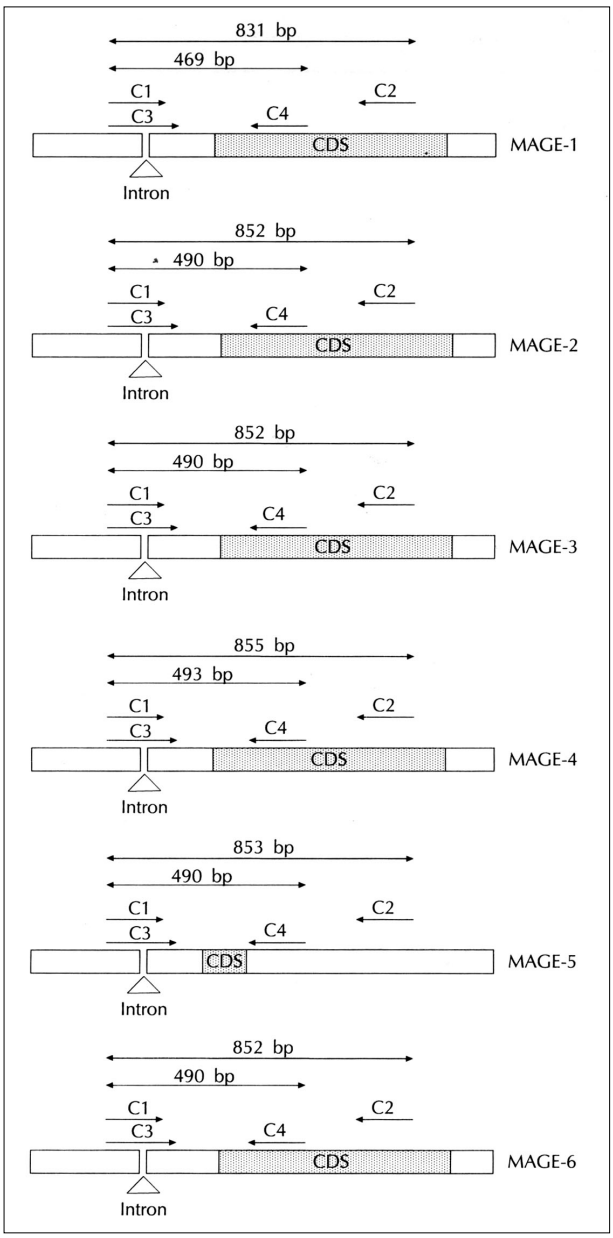

Fig. 1. Schematic structure of the MAGE 1 - 6 genes and the location of MAGE common primers on exons for the nested RT-PCR. C1 : sense primer for the first round of RT-PCR, C2 : antisense primer for the first round of RT-PCR, C3 : sense primer for the second round of PCR, C4 : sense primer for the second round of PCR, CDS : coding sequence.

를 분리하였으며, 분리된 상층의 RNA용액을 조심스럽게 수거하여 1.5 ml 시험관에 옮겼다. RNA용액에 동량의 100% isopropanol을 첨가하여 혼합한 후 - 20℃에 16시간 이상 보관하여 RNA를 침전시켰다. RNA - isopropanol 혼합액을 12,000 rpm으로 원심 분리하여 RNA pellet을 만든 뒤 상층액을 제거하였다. 여기에 icecold 70% ethanol을 1 ml 첨가하여 RNA pellet을 세척한 뒤 원심 분리하여 상층의 ethanol용액을 완전히 제거하고 RNA pellet을 DEPC - DW (diethyl pyrocarbonate - distilled water)에 녹인 후 spectrophotometer로 260 nm 파장에서 측정된 OD_{260}을 이용하여 RNA 농도(RNA농도=OD_{260}×40 μg/ml×희석배수)를 측정하였다. 순도는 OD_{260}/OD_{280}의 비율로 평가하였으며 1.7 2.0 사이인지를 확인하였다. RNA의 분리를 확인하기 위해 전기영동 후 rRNA band를 확인하였다.

역전사 (Reverse transcription) 에 의한 cDNA의 합성

Total RNA 용액을 70℃ 수조에 10분간 두어 RNA를 변성시킨 뒤 얼음에 보존하였다. 먼저 5× RT buffer 2 μl, 10 mM dATP 0.25 μl, 10 mM dGTP 0.25 μl, 10 mM dTTP 0.25 μl, 10 mM dCTP 0.25 μl, MMLV reverse transcriptase(200 U/μl, Promega, USA) 0.25 μl, RNase inhibitor(28 U/μl, Promega, USA) 0.25 μl, 50 μM oligo dT primer 0.5 μl, DEPC - DW 4 μl를 PCR tube에 넣어 RT - mixture를 만들었다. RT - mixture에 얼음에 보존한 total RNA용액(1 μg/μl)을 2 μl 첨가한 뒤 mineral oil을 1방울 떨어뜨리고 실온에 10분간 두었다. 이 시험관을 42℃에서 60분 간 열처리하여 cDNA를 합성하였으며, 이 역전사 반응물을 DW로 1 : 1 희석한 뒤 PCR에 이용하였다.

MAGE 1-6 유전자에 대한 1차 PCR

각 검체간의 mRNA를 일정하게 보정시키기 위해 모든 세포에 공통적으로 존재하는 house keeping gene 중에서 GAPDH를 대상으로하여 PCR을 시행 하였다. 사용된 primer는 300 bp의 PCR 산물이 얻어질 수 있도록 고안된 sense primer : 5 '- CGTCTTCACCACCATGGAGA - 3 ', anti -

Table 2. Common primer sequences for the detection of MAGE 1 - 6 genes

Primer	Type	Use	Sequence	Size (bp)
C1	S*	RT-PCR	CTGAAGGAGAAGATCTGCC	828 - 924
C2	AS†	RT-PCR	CTCCAGGTAGTTTTCCTGCAC	
C3	S	Nested PCR	CTGAAGGAGAAGATCTGCCW‡GTG	469 - 493
C4	AS	Nested PCR	CCAGCATTTCTGCCTTTGTGA	

*S : sense primer, † AS : antisense primer, ‡ W : A or T

sense : 5 ' - CGGCCATCACGCCACAGTTT - 3 '를 사용하였고 반응 조건은 94℃에서 3분간 가열 후 94℃ 30초, 56℃ 45초, 72℃ 45초를 30 cycle 반복하고 마지막으로 72℃에서 5 분간 처치하였다. 여기서 얻은 자료를 토대로 하여 각 검체간의 mRNA 양을 일정하게 조절한 다음 MAGE 1 - 6 gene에 대한 PCR을 시행하였다. 먼저 10× PCR buffer 3 μl, 25 mM $MgCl_2$ 1.8 μl, 10 mM dATP 0.3 μl, 10 mM dGTP 0.3 μl, 10 mM dTTP 0.3 μl, 10 mM DcTP 0.3 μl, 50 μM sense 및 antisense common primer 0.25 μl, Taq polymerase(5 U/μl, Promega, USA) 0.25 μl를 혼합하고 여기에 DW를 넣어 최종 반응액이 25 μl가 되게 하여 PCR mixture를 만들었다. PCR mixture를 PCR tube에 넣고 여기에 역전사 반응물을 5 μl 넣어 혼합하였다. 다음으로 mineral oil을 1방울 떨어뜨리고 PCR 기계(Cetus 480, Perkin Elmer Co., U.S.A.)에 넣어 다음의 조건으로 1차 PCR을 실시하였다. 먼저 94℃에서 5분간 가열한 후 94℃ 30초, 57℃ 45초, 72℃ 45초를 1 cycle로 하여 35 cycle 반응시켜 DNA를 증폭시켰으며, 최종적으로 72℃에서 5분간 처치하여 PCR을 완료하였다.

MAGE 1-6 유전자에 대한 2차 PCR

PCR산물을 DW로 10배 희석한 후 2차 PCR에 사용하였다. 상기한 바와같이 PCR mixture에 희석한 PCR 산물 2 μl와 DW를 3 μl 첨가하였다. PCR시약이 들어 있는 시험관에 mineral oil을 1방울 떨어뜨린 후 다음의 조건으로 2차 PCR인 nested PCR을 실시하였다. 먼저 94℃에서 5 분간 가열한 후 94℃ 30초, 57℃ 45초, 72℃ 45초를 1 cycle로 하여 35 cycle 반응시켜 DNA를 증폭시켰으며, 최종적으로 72℃에서 5분간 처치하여 PCR을 완료하였다. 1% agarose gel에 PCR 산물을 접종하고 전기영동한 뒤 UV transilluminator를 이용하여 증폭된 DNA band를 관찰하였다.

MAGE 유전자의 specific primer를 이용한 MAGE 1-6 유전자 mRNA의 검출

편평세포암종에서 C1/C2, C3/C4 common primer에 의해 검출된 MAGE유전자 산물이 어떤 종류의 유전자를 가지고 있는지를 알아보고자 MAGE specific primer(M1 - M6)(Table 3)를 고안하여 C1/C2로 1차 PCR 후 C3/M1 - 6 primer로 2차 PCR을 위와 동일한 조건으로 시행하였다.

통계처리

대상에서 MAGE 유전자 발현의 통계학적 유의성에 대해서는 χ^2 - test를 사용하였고, $p<0.05$일 때 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

Common primer C1/C2와 C3/C4를 이용한 MAGE 1 - 6 유전자 mRNA의 검출

두경부 암조직과 양성종양으로부터 MAGE 1 - 6 유전자 발현을 찾아낼 수 있도록 고안된 common primer인 C1/C2와 C3/C4를 이용하여 nested RT - PCR을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

두경부 암에서의 MAGE 1 - 6 유전자 mRNA검출

두경부암종 37예 중 편평세포암종은 27예이었고 이중 19예인 70.4%에서 469 493 bp에 걸쳐 common primer에 의해 MAGE 유전자 mRNA가 검출되었다(Fig. 2). 두경부의 비편평세포암종은 모두 10예로 이중 갑상선의 유두상암종은 3예에서 모두 음성이었고, 림프종은 3예 중 1 예, 선양낭성암종과 악성 혼합종은 각각 1예로 모두 양성으로 나왔으며 육종과 융기성 피부섬유육종 각각 1예는 모두 음성으로 비편평세포암종 10예 중 3예(30%)에서 양성으로 검출되었다(Fig. 3). MAGE 유전자의 발현 빈도는 비편평세포암종에 비해 편평세포암종에서 높았다($p<0.056$).

대조군에서의 MAGE 1 - 6 mRNA유전자 검출

양성종양 18예 중 전예에서 암조직과는 대조적으로 MAGE 1 - 6 유전자mRNA가 전혀 검출되지 않았다(Fig. 4)($p<0.0001$). 두경부 정상조직 20예에서도 같은 결과를 얻

Table 3. MAGE 1 - 6 genes specific primer sequences

Target	Primer	Type	Sequence	Size (bp)
MAGE-1	M1	AS	CGGAACAAGGACTCCAGGATACAA	377
MAGE-2	M2	AS	GAAAGAAGTCCTGGCAATTTCTGAG	523
MAGE-3	M3	AS	CCAAAGACCAGCTGCAAGGAACT	569
MAGE-4	M4	AS	CGTCAATGCCAAAGATCATCTTCAG	580
MAGE-5	M5	AS	CCTTTGTGACCAGCTCCTTGACTTA	478
MAGE-6	M6	AS	CCAGGCAGGTGGCAAAGATGTACAC	628

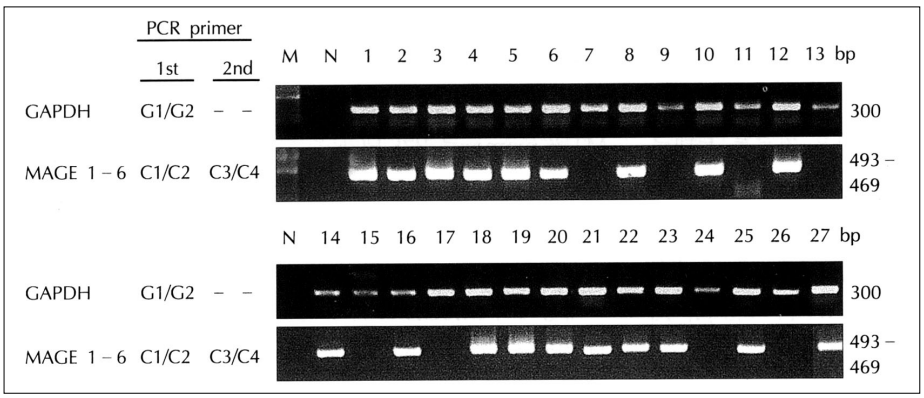

Fig. 2. Amplification of MAGE cDNA common to MAGE 1-6 genes in squamous cell carcinomas of the head and neck by nested RT-PCR using common primers. G1 : sense primer for GAPDH, G2 : nonsense primer for GAPDH, M : size marker (100 bp ladder), N : no cDNA.

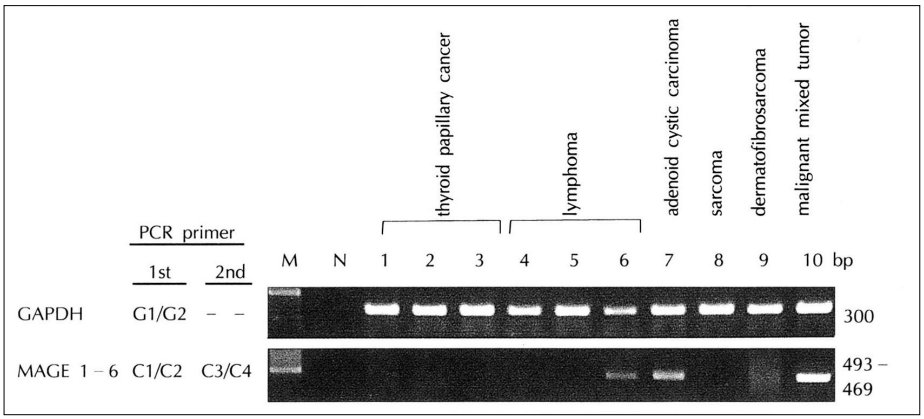

Fig. 3. Amplification of MAGE cDNA common to MAGE 1-6 genes in non-squamous cancers of the head and neck by nested RT-PCR using common primers. G1 : sense primer for GAPDH, G2 : nonsense primer for GAPDH, M : size marker (100 bp ladder), N : no cDNA.

었다(Fig. 5).

두경부 편평세포암종에서 MAGE 1-6 유전자의 specific primer를 이용한 MAGE 유전자 mRNA의 검출

두경부 편평세포암종 중 C1/C2, C3/C4 common primer에 의해 유전자 증폭이 확인된 19예에서 각각의 MAGE 유전자의 발현율을 알아보고자 MAGE specific primer을 이용하여 C1/C2로 1차 PCR 후 C3/M1-6 primer로 2차 PCR을 시행하였다. 19예 중 MAGE 1-6 유전자 각각의 발현율은 31.6 78.9%로 MAGE 3 유전자의 검출율이 가장 높은 반면 MAGE 1 유전자는 가장 낮았다(Fig. 6A and B, Table 4). 두경부의 편평세포암종 27예 전체에서 common primer에 의한 MAGE 1-6 유전자의 발현율은 MAGE 1이 22.2%로 가장 낮았고, MAGE 3은 55.6%로 가장 높았다(Table 4).

MAGE 유전자 mRNA가 양성으로 검출된 19예의 각각의 편평세포암종은 적어도 하나 이상의 MAGE 1-6 유전자를 발현하고 있다. 양성으로 검출된 MAGE 유전자가 1개인 암종은 3예, 2개인 경우가 4예, 3개인 경우가 4예, 4개 및 5개가 각각 2예, 6개를 모두 발현한 암종이 4예에서 있었다. 그러므로 27예의 편평세포암종 중 적어도 한 종류 이상의 MAGE 1-6 유전자를 발현하는 빈도는 70.4%(19/27)이었다(Table 5).

고 찰

암의 진단은 궁극적으로 병리조직학적 소견에서 암세포를 찾아냄으로써 가능하지만 최근에는 암의 진단에 분자생물학적 기법을 도입하려는 시도가 많이 이루어지고 있다. 이를 위해서는 암 진단에 도움이 될 수 있는 적절한 종양표식자를 선택해야 한다. MAGE 유전자는 세포독성 림프구에 의해 인식되는 종양항원으로 고환을 제외한 정상조직에서는 발현이 되지 않는 반면 두경부암, 흑색종, 위암, 식도암, 대장암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암등 각종 암조직에서 발현된다.[2-12] 그러므로 MAGE 유전자는 암의 진단과 치료에 응용될 수 있는 매력적인 목적 유전자라고 할 수 있다.

MAGE 유전자는 12 종류이상의 gene family로 구성되어 있기 때문에 두경부암을 포함한 대부분의 암조직에서의 MAGE 유전자의 발현에 대한 실험은 각각의 유전자에 대한 specific primer를 필요로 한다. 본 연구에서는 RT-PCR로 각각의 MAGE 1-6 유전자를 검출하는 방법보다는 많은 MAGE 유전자를 동시에 증폭시켜 검출할 수 있는 co-

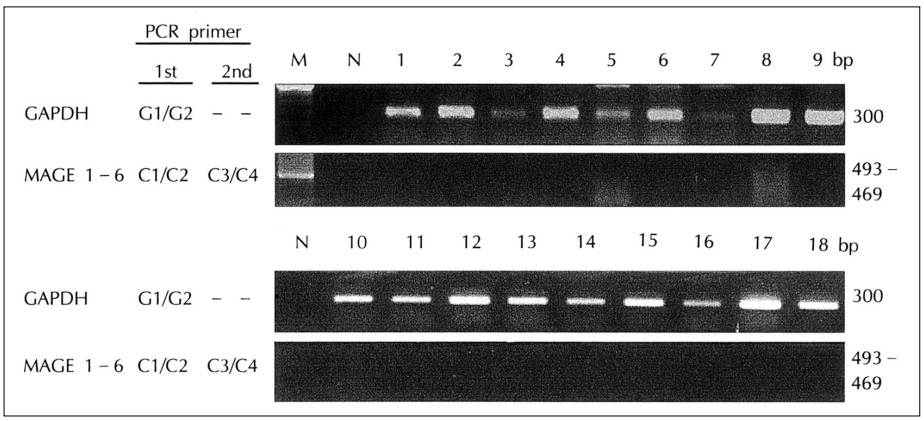

Fig. 4. Amplification of MAGE cDNA common to MAGE 1 - 6 genes in benign tumors of the head and neck by nested RT-PCR using common primers. G1 : sense primer for GAPDH, G2 : nonsense primer for GAPDH, M : size marker (100 bp ladder), N : no cDNA.

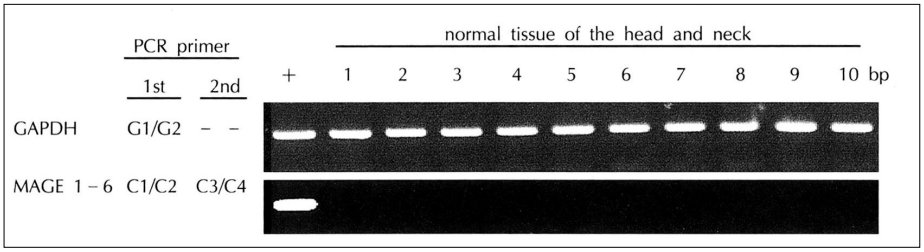

Fig. 5. Amplification of MAGE cDNA common to MAGE 1 - 6 genes in normal tissues of the head and neck by nested RT-PCR using common primers. G1 : sense primer for GAPDH, G2 : nonsense primer for GAPDH, + : positive control.

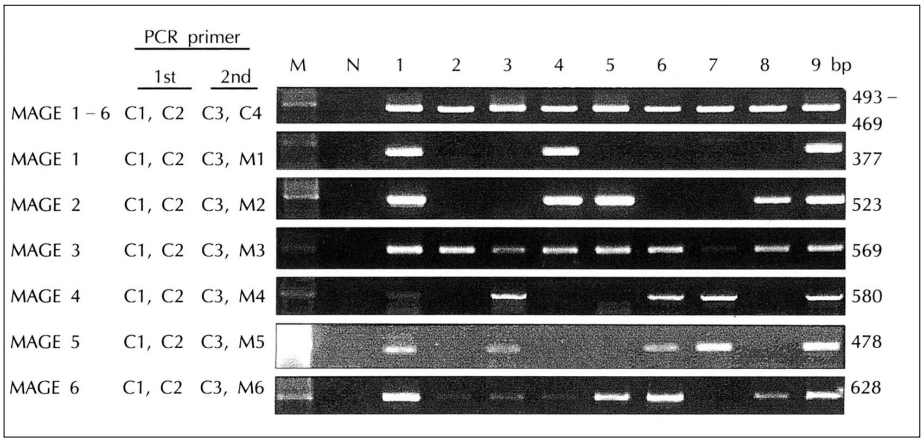

Fig. 6A. Amplification of each MAGE 1 - 6 gene in squamous cell carcinomas of the head and neck by RT-PCR using MAGE 1 - 6 genes specific primers. M : size marker (100 bp ladder), N : no cDNA.

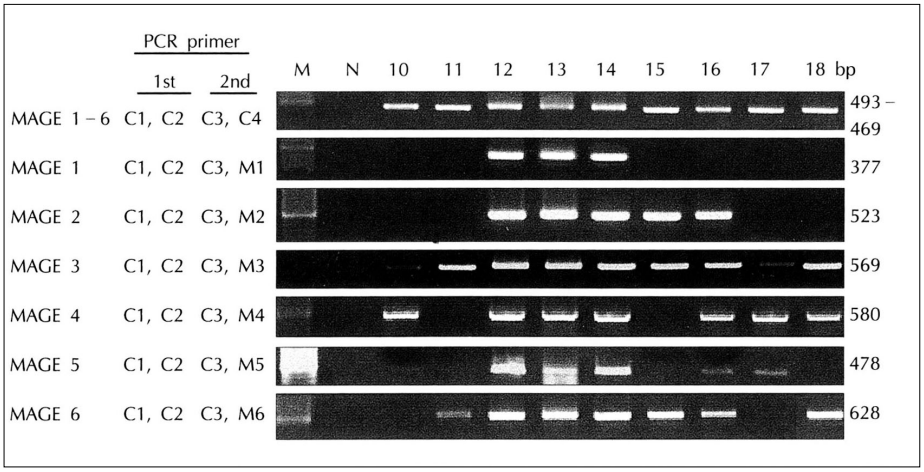

Fig. 6B. Amplification of each MAGE 1 - 6 gene in squamous cell carcinomas of the head and neck by RT-PCR using MAGE 1 - 6 genes specific primers (continued). M : size marker (100 bp ladderis), N : no cDNA.

Table 4. Expression rate of MAGE 1 - 6 genes in squamous cell carcinomas of the head and neck

Positive MAGE genes	In MAGE positive SCC (n=19)	In all SCC (n=27)
MAGE 1	31.6% (6/19)	22.2% (6/27)
MAGE 2	52.6% (10/19)	37.0% (10/27)
MAGE 3	78.9% (15/19)	55.6% (15/27)
MAGE 4	57.9% (11/19)	40.7% (11/27)
MAGE 5	52.6% (10/19)	37.0% (10/27)
MAGE 6	68.4% (13/19)	48.1% (13/27)

SCC : squamous cell carcinoma

Table 5. Numbers of positively detected MAGE 1 - 6 genes in squamous cell carcinomas of the head and neck

No. of positively detected MAGE genes	No. of case	Detection rate (%)
6	4	21.1
5	2	10.5
4	2	10.5
3	4	21.1
2	4	21.1
1	3	15.6
Total	19	70.4 (19/27)

mmon primer를 고안하여 MAGE 유전자를 검출하고자 하였다. 여러 MAGE 유전자를 동시에 검출하려는 이유는 MAGE 유전자를 종양표식자로 활용하는데 있어서 MAGE 1 - 6 유전자를 구분하여 검사하는 것이 큰 의미가 없으며, 둘째는 여러 MAGE 유전자를 각각 측정하게 되면 시간 및 경비의 소모가 크기 때문이다. 저자는 MAGE 유전자 family 중 비교적 많은 보고가 이루어져 있는 MAGE 1에서 MAGE 6까지의 유전자를 동시에 검출하기 위해 우선 각 MAGE의 유전자를 찾아 서로간 동질성을 비교하여 4부분에서 염기서열의 동질성이 높은 부위를 찾았다. 특히 genomic DNA 오염에 의한 위양성 반응을 없애기 위해 primer를 intron의 전후에 존재하는 exon의 염기서열을 primer로 선택하였다. 이들 4부분 중 2곳을 sense primer로 나머지 2곳을 anti - sense primer로 합성하였다. 저자는 우선 이 primer가 두경부 영역의 암과 양성 질환을 구분해내는지를 알아보았다. 본 연구에서 고안된 MAGE common primer C1/C2와 C3/C4를 사용하여 두경부암 37예 중 편평세포암종 27예에서 19예인 70.4%에서 MAGE 유전자를 검출할 수 있었다. 그리고 MAGE 유전자가 양성으로 검출된 편평세포암종 19예에서 MAGE 유전자 각각의 발현율을 알아보기 위해 C1/C2, C3/M1 - 6로 구성된 MAGE specific primer을 이용하여 다시 1, 2차 PCR을 한 결과 MAGE 1에서 MAGE 6 유전자까지의 발현율이 각각 31.6%, 52.6%, 78.9%, 57.9%, 52.6%, 68.4%라는 결과를 얻었다. MAGE 1 - 6 유전자 중에서 MAGE 3 유전자의 발현율이 가장 높았고, MAGE 1 유전자는 가장낮았다. 반면에 대조군인 양성종양 18예와 정상조직 20예에서는 단 한 예에서도 MAGE 유전자의 발현이 없어 이 common primer가 암세포를 선택적으로 검출해낼 수 있다고 생각되었다.

두경부 분야에서 MAGE 유전자가 정상조직이나 양성종양조직에서는 발현이 없고 암세포에서만 선택적으로 나타난다는 것에 대해서는 Eura 등,[3] Lee 등[4)5)]이 보고 한 바 있다. Eura 등[3]은 두경부 편평세포암종의 MAGE 유전자 발현에 대해 저자와 달리 각각의 MAGE specific primer를 사용하였다. Eura의 보고에 의하면 두경부 편평세포암종 88예 중에서 MAGE 1, 2, 3, 4, 41, 6 유전자의 발현이 각각 33%, 41%, 43%, 27%, 19%, 42% 등으로[3] 저자가 고안한 primer가 더 높은 빈도로 MAGE 유전자를 검출할 수 있었다. Lee 등[5]은 두경부 편평세포암종 40예와 양성종양과 정상조직 40예를 대상으로 MAGE 3 유전자에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하여 두경부 편평세포암종의 45%에서 MAGE 항원이 세포질내 단백질로서 암세포에 특이적으로 발현되었으나 대조군에서는 전혀 발현이 없음을 보고하였다. 저자의 결과에서 MAGE 유전자가 양성으로 검출된 예는 모두 19예로 이들 각각의 편평세포암종은 적어도 하나 이상의 MAGE 1 - 6 유전자를 발현하고 있다. 즉 양성으로 검출된 MAGE 유전자가 1개인 암종은 3예, 2개인 경우가 4예, 3개인 경우가 4예, 4개 및 5개가 각각 2예 그리고 6개의 유전자를 모두 발현한 암종이 4예에서 있었다. 그러므로 27예의 편평세포암종 중 적어도 한종류 이상의 MAGE 1 - 6 유전자를 발현하는 빈도는 70.4%(19/27)이다. 이러한 결과는 Eura 등[3]이 보고한 71%와 거의 일치한다.

한편 두경부의 비편평세포암종에서는 10예 중 3예(30%)에서 MAGE 유전자가 양성으로 검출되어 편평세포암종에 비해 발현 빈도가 낮았다. Lee 등[4]도 두경부의 비편평세포암종의 MAGE 1, 2, 3, 4, 6 유전자의 발현을 각각 25%, 41.7%, 33.3%, 8.3%, 33.3%로 보고하여 저자의 결과와 유사하게 편평세포암종보다 MAGE 유전자의 발현율이 낮다고 하였다.

본 실험에서 common primer로 사용하여 2차례의 PCR을 함으로써 MAGE 1 - 6 유전자를 한번에 검출하는 것이 가능하였고, 두경부 편평세포암종과 비편평세포암에서 이들 유전자가 각각 70%와 30%의 발현율을 나타낸 반면, 양성질환 및 정상조직에서는 발현이 없는 결과를 얻었다. 갑상선 암을 제외한 대부분의 두경부 암이 편평세포암종이라는 점을 감안하면 MAGE common primer가 양성 및 악성 종

양의 여부를 감별하는데 매우 유용할 것이라고 생각한다.

두경부암 이외에도 Mori 등[13]은 184예의 위암, 식도암 및 대장암 환자의 암조직과 정상조직에서 10종의 MAGE 유전자를 RT-PCR법으로 측정하여 정상조직에서는 MAGE 유전자를 검출할 수 없었으나, 암조직에서는 위암의 경우 검출한 MAGE 유전자 종류에 따라 9 46%, 식도암이 13 79%, 대장암은 5 44%가 발현된다고 하였다. 이 결과에서 위암 조직중 한 개이상의 MAGE 유전자를 발현할 확율은 82%, 식도암의 경우 94%, 대장암의 경우 88%임을 나타내어 MAGE 유전자 각각의 발현빈도는 다양하지만 전체중 한 종류이상을 발현할 확율은 매우 높아짐을 알 수 있다.

저자의 결과와 타보고자의 연구에서 알 수 있듯이 MAGE 유전자는 대부 분의 암에서 암 특이적으로 발현된다. 이러한 MAGE 유전자의 특성은 암 진단 혹은 screening test의 한 수단으로서 MAGE 유전자가 활용될 수 있음을 시사하지만 아직까지 이에 대한 연구는 미미하다. 최근 보고에 의하면 혈액 내에 존재하는 극소수의 암세포를 RT-PCR로 검출하는 것이 가능하다고 한다.[13)14)16)] Mori 등[13)14)]은 혈액 내의 세포 1×10^7개 중 CEA를 발현하는 암 세포가 1 10개, 그리고 MAGE 유전자는 혈액 내의 세포 1×10^6 개 중에 하나의 암세포가 존재하면 RT-PCR로 암세포를 검출할 수 있다고 하였다. 또 Mori 등[13)]은 18명의 위암환자의 혈액에서 MAGE-1, -3, -4, -9, -11를 측정하여 이들 중 한 개 이상이 발현되는 경우가 6예(33%)임을 보고하여 혈액에서도 극소수의 암세포에서 종양표식자를 얻을 수 있음을 보고하였다. 이러한 보고는 MAGE 유전자가 혈액을 위시한 여러 종류의 체액을 검사함으로써 조기 암진단의 선별검사로서 활용될 수 있음을 암시한다. 이것이 가능하다면 MAGE common primer는 MAGE 유전자를 종양표식자로서 활용하는데 있어 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각한다.

결 론

저자들은 본 연구에서 고안된 MAGE common primer가 두경부 조직의 양, 악성 여부, 특히 두경부의 대표적인 암인 편평세포암종과 양성종양을 감별할 수 있음을 확인하였다. 앞으로 MAGE 유전자를 암 진단에 도움이 될 수 있는 종양표식자로 활용하기 위해서는 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

중심단어 : MAGE · 종양표식자 · 두경부종양.

REFERENCES

1) van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, *et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. Science 1991;254:1643-7.*
2) De Plaen E, Arden K, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora JP, DeSmet C, *et al. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. Immunogenetics 1994;40:360-9.*
3) Eura M, Ogi K, Chikamatsu K, Nakano K, Masuyama K, Itoh K, *et al. Expression of the MAGE gene family in human head-and-neck squamous-cell carcinomas. Int J Cancer 1995;64:304-8.*
4) Lee KD, Eura M, Ogi K, Nakano K, Chikamatsu K, Masuyama K, *et al. Expression of the MAGE-1, -2, -3, -4, and -6 genes in non-squamous cell carcinoma lesions of the head and neck. Acta Otolaryngol (Stockh) 1996;116:633-9.*
5) Lee KD, Chang HK, Jo YK, Kim BS, Lee BH, Lee YW, *et al. Expression of MAGE 3 Gene Product in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck. Anticancer Research 1999;19:5037-42.*
6) Inoue H, Li J, Honda M. *AGE-1 mRNA expression in gastric carcinoma. Gastroenterol 1995;109:1522-5.*
7) Inoue H, Mori M, Honda M. *Human esophageal carcinomas frequently express the tumor-rejection antigens of MAGE genes. Int J Cancer 1995;63:523-6.*
8) Mori M, Inoue H, Mimori K. *Expression of MAGE genes in human colorectal carcinoma. Ann Surg 1996;224:183-8.*
9) Weynants P, Lethe B, Brasseur F, Marchand M, Boon T. *Expression of MAGE genes by non-small cell lung carcinomas. Int J Cancer 1994;56:826-9.*
10) Russo M, Traversari C, Verrecchia A. *Expression of MAGE gene family in primary and metastatic human breast cancer: Implications for tumor-specific immunotherapy. Int J Cancer 1995;64:216-21.*
11) Russo V, Dalerba P, Ricci A, Bonazzi C, Leone BE, Mangioni C, *et al. MAGE, BAGE and GAGE genes expression in fresh epithelial ovarian carcinomas. Int J Cancer 1996;67:457-60.*
12) Yamashita N, Ishibashi H, Hayashida K, Kudo J, Takenaka K, Itoh K, *et al. High frequency of the MAGE-1 gene expression in hepatocellular carcinoma. Hepatology 1996;24:1437-40.*
13) Mori M, Mimori K, Tanaka F, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T. *Molecular Diagnosis of circulating cancer cells using MAGE gene assay. JA-MA 1997;278:476-7.*
14) Mori M, Mimori K, Ueo H, Karimine N, Barnard GF, Sigimachi K, *et al. Molecular detection of circulating solid carcinoma cells in the peripheral blood: The concept of early systemic disease. Int J Cancer 1996;68:739-43.*
15) Mori M, Mimori K, Ueo H, Tsuji K, Shiraishi T, Barnard GF, *et al. Clinical significance of molecular detection of carcinoma cells in lymph nodes and peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction in patients with gastrointestinal or breast carcinomas. J Clin Oncol 1998;16:128-32.*
16) Johnson P, Burchill S, Selby P. *The molecular detection of circulating tumor cells. Brit J Cancer 1995;72:268-76.*