

## 한국인 간세포암에 있어서 p15INK4B/p16INK4A 및 Methylthioadenosine Phosphorylase 유전자의 이상 검색

계명대학교 의과대학 <sup>1</sup>미생물학교실 및 <sup>2</sup>면역학교실, <sup>3</sup>서남대학교 의과대학 미생물학교실  
<sup>4</sup>대구효성 가톨릭대학교 의과대학 병리학교실

변호영<sup>1</sup> · 조재위<sup>3</sup> · 백원기<sup>1</sup> · 박종욱<sup>2</sup> · 박재복<sup>4</sup> · 서민호<sup>1</sup> · 서성일<sup>1</sup>

### Alterations of p15INK4B, p16INK4A and Methylthioadenosine Phosphorylase Gene in Korean Hepatocellular Carcinoma

Ho-Young Pyun, M.D.<sup>1</sup>, Jae-We Cho, M.D.<sup>3</sup>, Won-Ki Baik, M.D.<sup>1</sup>, Jong-Wook Park, M.D.<sup>2</sup>  
Jae-Pok Park, M.D.<sup>4</sup>, Min-Ho Suh, M.D.<sup>1</sup> and Seong-Il Suh, M.D.<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Microbiology and <sup>2</sup>Immunology, Keimyung University School of Medicine, Daegu;  
<sup>3</sup>Department of Microbiology, Seonam University, Namwon; <sup>4</sup>Department of Pathology,  
Taegu Hyosung Catholic University, College of Medicine, Daegu, Korea

**Purpose:** We analyzed the gene status of p16INK4A, p15INK4B and MTAP (methylthioadenosine phosphorylase) in Korean hepatocellular carcinoma (HCC) to investigate whether the inactivation of these genes participated in hepatocarcinogenesis, and evaluated MTAP-targeted chemotherapy in MTAP-deficient cell lines.

**Material and Methods:** We examined eleven primary HCC and 8 SNU cell lines using PCR, Southern blot analysis, PCR-SSCP, DNA sequencing, methylation-specific PCR, Western blot analysis, MTT assay, and crystal violet staining.

**Results:** Mutations or deletion of the p16INK4A, 15INK4B, and MTAP genes were rare, but methylation of the p16INK4A promoter region was common in HCC. The base alterations of 3' untranslated region of p16INK4A exon 3 were also detected in 3 samples. In SNU cells, p16INK4A was not detectable, when treated with demethylating agent, high levels of re-expressed p16INK4A protein were detected. In MTAP-targeted chemotherapy experiment, methylthioadenosine (MTA) was able to rescue MTAP positive cell lines but not MTAP negative cell lines from growth inhibition by depletion of methionine and MTX treatment.

**Conclusion:** These results suggest that de novo methylation of the p16INK4A promoter region seems to play an important role in the pathogenesis of HCC. And treatment of MTX, combined with methionine depletion in the presence of MTA, may be a high selective treatment for MTAP negative HCC.

**Key Words:** Hepatocellular carcinoma, p16INK4A, Methylation, Methylthioadenosine phosphorylase

책임저자 : 서성일, 대구광역시 중구 동산동 194번지, 계명대학교 의과대학 미생물학교실, 700-310

Tel: 053-250-7442, Fax: 053-255-1398, E-mail: seong@dsmc.or.kr

본 연구는 1998년도 계명대학교 의학유전학연구소 특수과제연구비로 이루어진 것임.

접수일 : 1999년 12월 21일, 게재승인일 : 2000년 3월 21일

## 서 론

간세포암은 전 세계적으로 가장 흔한 종양 중 하나인데 그 발병 원인은 아직 잘 알려져 있지 않다(1). 역학조사에 따르면 간 경변, B 또는 C형 간염 바이러스에 의한 만성 지속성 간염 그리고 진균독 등이 간암 발생과 밀접한 관계가 있을 것으로 생각되고 있다. 또한 간암의 병인은 대장암의 병인과 마찬가지로 여러 종류의 유전자 변이에 의해 생겨나는 것으로 생각되고 있다(2).

인간의 종양의 형성 중 일어날 수 있는 유전자 변이는 주로 암유전자 및 항암유전자에서 그 변이를 볼 수 있는데, 주로 세포증식의 억제 기능을 가지는 것으로 알려진 항암유전자의 기능소실은 정상세포의 암화와 관계가 깊음이 알려져 있다. 특히 최근에 G1세포주기에서 S세포주기 이행에 관여하는 유전자 중 p16INK4A, p15INK4B, cyclin dependent kinase (CDK) 4/6, cyclin D1, 그리고 retinoblastoma (RB) 유전자 등의 이상은 인간에 있어서 여러 종류의 암의 발생과 관련이 있음이 보고되고 있다(3). 이들 유전자 중에서 염색체 9번의 단완(염색체 9p21)에 위치하여 세포주기의 G1→S 이행을 억제한다고 알려진 p15INK4B 및 p16INK4A 유전자의 결손, 점돌연변이 그리고 promoter 및 exon주변의 CpG island의 메틸화 등에 의한 비활성화가 여러 종류의 암에서 관찰되고 있다(3~6).

백혈병을 비롯한 여러 종류의 암에서는 항암유전자의 대립유전자가 동시에 소실된 경우를 흔히 볼 수 있는데, 이런 경우에는 항암유전자 뿐만 아니라 주변의 유전자의 결손도 동반되는 수가 많다. 이러한 항암유전자의 주변 유전자의 결손은 항암유전자산물 뿐만 아니라 정상적으로 세포의 생리적 현상에 관여하는 주변 유전자의 단백질 발현이 동시에 소실되어 항암유전자가 단독으로 결손된 경우와는 다른 세포생리를 나타낼 수 있으며 단적으로 어떤 치료약제에 대한 감수성의 변화가 초래될 수도 있다. 항암유전자와 주변유전

자의 동시 소실이 일어나는 대표적인 예는 여러 종류의 암세포에서 발견되는 염색체 9p21-22부위의 결손이다. 염색체 9p21부위에는 p16INK4A 및 p15INK4B 유전자가 위치하고 있는데 15INK4B 및 p16INK4A 유전자의 동시 결손이 여러 암세포에서 보고되고 있다(7,8). 또한 p16INK4A로부터 telomere쪽에 MTAP (methylthioadenosine phosphorylase)유전자가 위치하고 있는데 p16INK4A 유전자가 결손된 경우에 MTAP유전자의 결손의 동반이 많이 보고되고 있다(7~13). MTAP유전자산물은 purine 및 methionine대사(salvage pathway)에 관여하는 효소로서 MTAP유전자가 결손된 암세포는 de novo purine합성억제제에 의해 성장억제가 이루어질 수 있다(11~14). 이때 purine 및 methionine의 근원이 되는 MTA (methylthioadenosine)를 동시에 투여하면 MTAP유전자가 정상인 세포는 MTA를 이용할 수 있기 때문에 선택적으로 암세포만 죽일 수 있는 Enzyme-target therapy가 가능하다(11~13).

본 연구는 이러한 배경을 바탕으로 하여 간세포암 조직 및 세포주에 있어서 p15INK4B, p16INK4A 그리고 MTAP 유전자의 이상을 조사하여 이들 유전자와 간세포암의 발생과의 관계를 알아보았으며, 아울러 de novo purine합성 억제제인 methotrexate (MTX)치치 및 methionine결핍 유도시 MTA를 동시에 처치하면 MTAP유전자가 결손된 한국인 유래 간세포암 세포주만이 선택적으로 사멸될 수 있는지를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1) 간세포암 세포주 및 간세포암 조직으로 부터 DNA 및 RNA분리

대구효성 가톨릭대학병원에서 수술 중 적출된 간세포암 조직 11예를 액체질소에 보관하면서 사용하였으며, 간세포암 세포주는 한국세포주은행으로부터 분양 받아 사용하였으며 RPMI1640 및 10% fetal bovine serum이 첨가된 배지를 이용하였다. 간세포암 조직 및 간세포암 세포주(SNU 182,

354, 368, 387, 398, 423, 449, 475)로부터 DNA 및 RNA분리는 Qiagen회사제품(Santa Clarita, CA)을 이용하여 분리 사용하였다.

**2) 종합효소연쇄반응을 이용한 염색체 9p21 부위 유전자 결손 검색**

염색체 9p21부위에 존재하는 유전자의 결손유무를 알아보고자 D9S171 (7), p15INK4B exon 1 (15) 및 exon 2 (5'GCTCTGACCATTCTGTTCTC3' 및 5'CAGATCATCAGTCCTCACCT3'), p19ARF exon 1 β (5'CTGCTCACCTCTGGTGCCAA3' 및 5'-TTCTAGGAAGCGGCTGCTGC3'), p16INK4A exon 1 α (4), exon 2 (5'GCTCTGACCATTCTGTTCTC3' 및 5'CAGATCATCAGTCCTCACCT3') 및 exon 3 (8), MTAP exon 1 및 8 (14), interferon(IFN)A (14) 그리고 IFNB (14)에 대한 primer를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 실시하였다. 이 때 양성 대조군으로는 WI38세포로 분리한 DNA를 그리고 음성대조 군으로는 Jurkat 세포로부터 분리한 DNA를 이용하였다. 그리고 염색체 3번(3q28)에 위치한 pseudo-MTAP유전자에 대한 primer로 PCR을 실시하여 추출한 DNA의 상태를 검증하였다(10).

**3) PCR-SSCP (single strand conformational polymorphism) Analysis 및 염기서열분석**

p15INK4B 및 p16INK4A 유전자의 돌연변이 유무를 검색하고자 PCR-SSCP 및 염기서열분석법을 시행하였다. PCR-SSCP방법은 Orita등(16)의 방법에 준하였고 돌연변이가 있다고 추정된 PCR산물은 pGEM-T (Promega Co, Madison, WI)로 cloning 한 후 automatic DNA sequencing machine을 이용하여 염기서열을 결정하였다. p16INK4A 유전자의 exon 2에 돌연변이가 있다고 알려진 HL60 세포주(17)를 실험에 같이 이용하였다.

**4) RT (reverse transcription)-PCR 및 Western blot analysis를 이용한 유전자 및 단백질 발현조사**

Methyltransferase (MTase)유전자에 대한 RT-PCR

은 Perkin-Elmer회사(Branhburg, NJ) 제품을 이용하여 실시하였으며, primer는 5'ATCTAGCTGCC-AAACGGAGG3' 및 5'CACTGAATGCACTTGGG-AGG 서열로 합성하여 실험하였다. Western blot analysis는 Matsushime등(18)의 방법에 준하여 실시하였다.

**5) p15INK4B 및 p16INK4A 유전자 Promoter 의 CpG island에 Methylation 유무 검색**

Herman등(19)의 methylation-specific PCR (MSP) 방법에 준하여 실시하였다. 간략하면 추출한 DNA를 sodium bisulfite, hydroquinone 및 sodium hydroxide와 반응시켜 deamination을 유도하여 메틸화되어 있지 않은 cytosine을 uracil로 변화시켰다. 그런 후 Wizard DNA purification kit (Promega Co, Madison, WI)을 이용하여 DNA를 순수 분리한 다음 sodium hydroxide로 desulfonation시킨 후 ethanol로 침전시킨 다음 PCR을 실시하였다. p16INK4A 유전자의 promoter의 CpG에 메틸화되어 있는 DNA를 증폭하기 위해서 p16MM-S (5'TTATTAGAGG-GTGGGGCGGATCGC3') 및 p16MM-AS (5'GACC-CCGAACCGCGACCGTAA3')를 primer를 이용하였으며, 메틸화되어 있지 않은 DNA를 증폭하기 위해서는 p16UM-S (5'TTATTAGAGGGTGGGGT-GGATTGT3') 및 p16UM-AS (5'CAACCCCAAACCA-CAACCATAA3')를 primer로 이용하였다. p15INK4B 유전자의 promoter의 CpG에 메틸화되어 있는 DNA를 증폭하기 위해서 p15MM-S (5'GCGTTTCG-TATTTTGC GGTT3') 및 p15MM-AS (5'CGTACA-ATAACCGAACGACCG A3')를 primer를 이용하였으며, 메틸화되어 있지 않은 DNA를 증폭하기 위해서는 p15UM-S (5'TGTGATGTGTTTGTATTTTGTGGTT3') 및 p15UM-AS (5'CCATACAATAACCA-AACAACCAA3')를 primer로 이용하였다.

**6) Methionine 제거, MTX 처치 및 MTA 처치에 따른 세포사멸실험**

세포주를 6-well plate에 1~2×10<sup>5</sup>개/ml로 하여 methionine이 제거된 또는 첨가된 RPMI배지에

MTAP 효소가 거의 존재하지 않는다고 알려진 horse serum을 10% 되도록 첨가하여 배양하면서 생존 세포수를 trypan blue dye exclusion 방법으로 측정하였으며 또한 1% crystal violet으로 염색하여 측정하였다. 또한 MTX에 의한 MTAP 유전자가 결손된 세포주의 선택적 세포사멸 여부 그리고 MTA 투여에 의한 MTAP 유전자가 정상인 세포주의 methionine 결핍 및 MTX 처치에 따른 세포사의 억제 등을 조사하였다(11,13). MTX를 처치하는 경우에는 MTX에 의한 purine 합성 억제 효과만을 보기 위하여 20  $\mu$  M의 thymidine을 동시에 투여하였다(13).

## 결 과

염색체 9p21부위에 존재하는 유전자의 결손유

무를 알아보기 위하여 간세포암 세포주 및 간암 조직 으로부터 DNA를 분리한 다음 D9S171, p15INK4B exon 1 및 2, p19ARF exon 1 $\beta$ , p16INK4A exon 1 $\alpha$ , 2 및 3, MTAP exon 1 및 8, IFNA 그리고 IFNB에 대한 primer를 이용하여 PCR을 실시한 결과 SNU387 및 449 세포주에서 p15INK4B, p16INK4A, MTAP, INFA 및 B 유전자의 결손이 관찰 되었다(Fig. 1). PCR-SSCP 및 염기서열방법에 의해 p16INK4A 및 p15INK4B 유전자에 돌연변이 유무를 검색한 결과를 Fig. 2 및 3에 나타내었다. p15INK4B 유전자에서는 돌연변이를 관찰 할 수 없었다. p16INK4A 유전자에 돌연변이가 관찰된 경우의 염기순서는 GenBank Accession number L27211에 준하여 표기하였다. p16INK4A의 경우는 1개의 간암조직(L7)에서 66번째 codon인 CAG

**Fig. 1.** Detection of homozygous deletions in the p15INK4B, p16INK4A and MTAP genes in primary hepatocellular carcinoma tissue samples and SNU hepatocellular carcinoma cell lines. DNA from primary hepatocellular carcinoma tissue samples and SNU cell lines was amplified by PCR using the primers indicated. The PCR products were separated in 2% agarose gel and visualized by staining with ethidium bromide. Lane numbers (1~5) indicate representative primary hepatocellular carcinoma tissue samples. M, molecular size marker; N, no template.



**Fig. 4.** (A) Methylation specific PCR analysis of the p16INK4A promoter was performed as described in Materials and Methods in primary hepatocellular carcinoma tissue samples (1 ~ 11) and SNU hepatocellular carcinoma cell lines. Reverse images of the ethidium bromide stained gels are displayed. M denotes the molecular size marker. Bisulfite treated DNA from WI38 cell lines was used as a normal control. (B) RT-PCR analysis for DNA methyltransferase (MTase) and GAPDH in SNU hepatocellular carcinoma cell lines.

보고자 SNU 세포주에서 RT-PCR을 이용하여 MTase 유전자의 발현을 조사한 결과 MTase 유전자 발현은 세포주간에 큰 차이가 없었다(Fig. 4B). 염색체 9p21결손이 관찰되지 않았던 6종의 세포주 중 p16INK4A 유전자의 단백질 발현이 SNU 182 및 368세포주에서만 관찰되었다. 이 결과는 MSP에 의해 관찰된 결과와 일치한다. 하지만 5-aza-deoxycytidine (5-AZA)을 5일간 처리한 후에 p16INK4A 단백질의 재발현이 SNN 354, 398, 423 및 475에서 관찰되어 이들 세포주에서 p16INK4A 유전자의 발현은 promoter의 메틸화에 의해 발현이 저해되고 있음이 확인되었다(Fig. 5). MTAP 유전자의 결손이 관찰된 SNU 387 및 449와 결손이 없는 SNU 182 및 354세포주를 이용하여 MTAP-targeted chemotherapy의 가능성을 조사하였다. 먼

**Fig. 5.** (A) Western blot analysis of p16INK4A from total cell extracts in SNU hepatocellular carcinoma cell lines. (B) 5-aza-2'-deoxycytidine leads to re-expression of p16INK4A. Cells were treated for 5 day with (+) or without (-) 3  $\mu$ M 5-aza-2'-deoxycytidine.

**Fig. 6.** Rescue of MTAP positive cell lines (SNU 182 and 354) from methionine depletion by methylthioadenosine. MTAP positive and negative (SNU 387 and 449) cells were plated at a density of  $5 \times 10^5$  cells/ml in complete RPMI media with (C) or without (Mth) methionine or with 40  $\mu$ M methylthioadenosine (MTA). The viable cell number was determined by 1% crystal violet staining after 6 days.

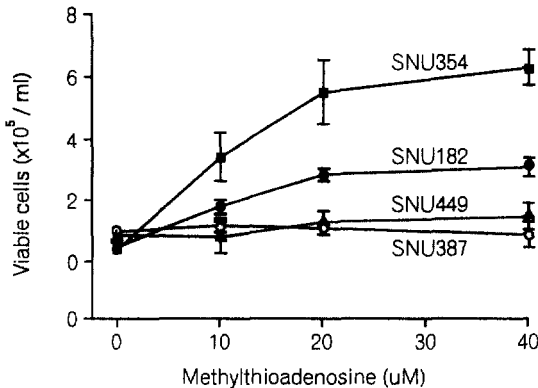


Fig. 7. Rescue effects of increasing concentration of methylthioadenosine on MTAP positive SNU 182 and 354 cells from methotrexate toxicity. MTAP positive and negative (SNU 387 and 449) cells were plated at a density of  $5 \times 10^5$  cells/ml in RPMI complete media without methionine. Cells were treated with  $100 \mu\text{M}$  methotrexate and increasing concentrations of methylthioadenosine for 6 days. The viable cell number was determined by trypan blue dye exclusion.

지 methionine을 제거한 배지에서 MTAP의 기질인 MTA를 10, 20, 40  $\mu\text{M}$  농도로 처리하여 6일간 배양한 결과, SNU 182 및 354 세포주의 성장은 MTA 농도에 비례하여 성장이 증가됨이 관찰되었으나 MTA 농도가 100  $\mu\text{M}$  이상에서는 세포독성이 나타나 MTAP-targeted chemotherapy 실험은 MTA 농도를 40  $\mu\text{M}$  로 하여 실시하였다. 그러나 SNU 387 및 449의 경우에는 MTA를 처리하지 않은 경우와 별다른 차이가 없었다. Fig. 6은 MTA 농도를 40  $\mu\text{M}$  로 하여 methionine 결핍 배지에서 6일간 배양하여 crystal violet으로 염색한 결과이다. MTAP 유전자가 결손된 SNU 387 및 449 세포주가 SNU 182 및 354 세포주에 비해 성장 억제가 높음을 보여준다. MTX에 의한 세포독성이 MTA에 의해 억제될 수 있는지를 조사하기 위하여, MTT 검사를 시행하여 IC50 농도의 MTX (100  $\mu\text{M}$ )와 40  $\mu\text{M}$ 의 MTA를 동시에 투여한 후 생존 세포수를 산정한 결과 (Fig. 7) SNU 182 및 354 세포주가 MTAP 유전자가 결손된 SNU 387 및 449 세포주에 비해 세포사가 2배에서 6배 정도로 억제됨이 관찰되었다.

## 고 찰

염색체 9p21부위에는 CDK 4/6의 활성억제에 관여하는 p16INK4A 및 p15INK4B 유전자가 위치하고 있다. 이들 유전자의 결손, 돌연변이 그리고 최근에는 promoter 부위의 메틸화로 인한 유전자 발현 저해 등이 암 발생과 관련이 있음이 알려져 있다(3~6, 15, 17, 21~25). 본 연구는 한국인 간세포암 조직 및 세포주를 이용하여 이들 유전자의 이상을 조사하였으며 아울러 p16INK4A 및 p15INK4B 유전자 주변에 위치한 유전자(MTAP 및 INF)들도 함께 조사하였다. 본 연구에서 간세포암 조직에서는 염색체 9p21에 위치한 유전자의 결손이 관찰되지 않았으나 8종의 한국인 유래 간세포암 세포주 중 2종의 세포주에서만 염색체 9p21부위 전체의 결손이 관찰되어 이들 유전자의 결손과 간세포암의 발생의 관계는 미미하다고 할 수 있다. 그리고 p15INK4B, p16INK4A 또는 MTAP 유전자의 단독 결실이 관찰되지 않아 간세포암 조직을 이용하여 세포주를 확립할 때 염색체 9p21부위의 결손이 초래된 결과로 생각된다. p15INK4B 및 p16INK4A 유전자의 돌연변이 또한 세포주기의 이상을 초래할 수 있는데, Biden 등(22) 그리고 Iolascon 등(23)은 간세포암에서 p15INK4B 및 p16INK4A 유전자의 돌연변이의 빈도가 낮음을 보고하였는데, 본 연구에서도 p15INK4B 유전자에서는 돌연변이를 볼 수 없었을 뿐 아니라, p16INK4A 유전자의 exon 2의 경우도 1개의 간암 조직(L7) 및 1종의 세포주(SNU 368)에서만 관찰되어 이들 유전자의 돌연변이도 간세포암의 발생과는 큰 관계는 없는 것으로 생각된다. 한편 exon 3에 PCR-SSCP 상 이상 이동이 3예에서 관찰되었는데 염기서열 분석결과 intron 2 및 3'UTR에 위치한 염기의 치환이 관찰되었는데 과거에 본 연구진이 자궁경부암에서도 p16INK4A의 3'UTR의 염기치환을 보고한 바 있다(24). 그러나 아직까지 이러한 염기치환이 p16INK4A의 발현 및 기능에 어떠한 영향을 미치는지는 아직 보고된 바 없다. p15INK4B 및

p16INK4A 유전자의 promoter부위의 CpG의 메틸화는 이들 유전자의 전사억제를 초래할 수 있어 이는 p15INK4A 및 p16INK4B 유전자의 결손 및 돌연변이와 같은 효과를 나타낼 수 있다(4,15,20, 21). MSP방법으로 15INK4B 및 p16INK4A 유전자의 promoter부위의 메틸화 유무를 조사한 결과 p15INK4B 유전자의 경우에는 메틸화를 관찰할 수 없었다. p16INK4A 유전자의 경우는 11예의 간암조직 중 4예에서 그리고 6예의 간암세포주중 5예에서, 즉 총 19예 중 9예(47.3%)에서 promoter에 메틸화가 관찰되었다(Fig. 4A). 그러므로 간세포암의 경우 p15INK4B, p16INK4A 및 MTAP 유전자의 이상 중에서 p16INK4A 유전자의 promoter의 메틸화가 가장 높은 빈도로 관찰되어 이 유전자의 promoter부위의 메틸화가 간세포암의 발생과 관계가 깊을 것으로 생각된다. 이는 Liew등(25)의 보고와 일치한다. 그러나 CpG에 메틸화와 관계있는 MTase 유전자 발현은 SNU세포주에서 p16INK4A 유전자의 promoter부위의 메틸화에 관계없이 발현되는 것으로 보아 MTase 유전자의 과잉발현과 메틸화와의 관계없는 것으로 생각된다.

p16INK4A 유전자뿐만 아니라 항암유전자 및 전이억제 유전자로 알려진 Von Hippel-Lindau, RB 및 E-cadherin 등의 유전자의 메틸화가 암발생 및 암전이와 관련이 깊음이 알려지고 있다(4). 본 연구에서도 높은 빈도의 p16INK4A 유전자의 promoter부위의 메틸화가 발견되었으며, 탈메틸화 약제에 의해 p16INK4A 유전자의 발현이 재개됨이 보고되었다(20,21). 그리고 탈메틸 약제에 의한 p16INK4A 단백질의 재 발현은 세포를 G1주기에 정지 및 노화와 같은 상태를 유발함이 알려졌다(20, 21). 본 연구에서도 5-AZA를 세포주에 처리한 결과 p16INK4A 유전자의 발현이 재개됨이 관찰되어 이들 세포주의 p16INK4A 단백질의 재발현이 promoter의 탈메틸화와 관계 있음을 알 수 있었다.

일반적으로 대부분의 항암제는 암세포뿐만 아니라 정상세포에도 독성을 나타내는데, 만약 암세포 및 정상세포간의 대사활성정도의 차이를 알 수 있다면 이를 이용하면 선택적으로 암세포만을

사멸시킬 수 있는 방법의 개발이 가능할 것이다. 대표적인 예가 adenine 및 methionine의 salvage합성에 관여하는 MTAP유전자의 결손이다(7~13). MTAP유전자 산물은 adenine 및 methionine의 salvage합성에 관여하는 중요한 효소이다. 특히 polyamine합성시 산생된 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine (MTA)는 MTAP에 의해 adenine과 5-methylthioribose-1-phosphate (MTR-1-P)로 분해되는데 adenine은 adenine phosphoribosyl transferase에 의해 adenine monophosphate로 되며 MTR-1-P는 2-keto-4-methylthiobutylate를 거쳐 산화반응에 의해 methionine으로 변환된다. 그러므로 MTAP유전자가 결실된 암세포는 MTA를 이용한 adenine 및 methionine salvage합성이 이루어지지 않게 되고 따라서 암세포가 생존하기 위해서는 외부에서 공급되는 영양분에 의존성이 높아지게 된다. 그러므로 MTAP유전자가 결실된 암세포는 de novo purine합성억제 약제 또는 methionine결핍 유도에 의해 사멸될 수 있다. 이때 purine 및 methionine의 근원이 되는 MTA를 동시에 투여하면 MTAP유전자가 정상인 세포는 MTA를 이용할 수 있기 때문에 암세포 및 정상세포간의 대사활성 차이를 이용하면 암세포만을 선택적으로 사멸할 수 있다(11~13). 본 연구는 de novo purine합성 억제제인 MTX처치 및 methionine결핍 유도시 MTA를 동시에 처치하여 MTAP유전자가 결실된 한국인 유래 간세포암 세포주만이 선택적으로 사멸될 수 있는지를 조사하였다. MTAP유전자의 결손이 관찰된 SNU 387 및 449와 결손이 없는 SNU 182 및 354세포주를 이용하여 먼저 methionine을 제거한 배지에서 MTAP의 기질인 MTA를 10, 20, 40  $\mu$ M 농도로 처치하여 6일간 배양한 결과, SNU 182 및 354세포주의 성장은 MTA농도에 비례하여 성장이 증가됨이 관찰되었으나 MTA농도가 100  $\mu$ M 이상에서는 세포독성이 나타나 MTA농도를 40  $\mu$ M로 하여 실시하였다. 그러나 SNU 387 및 449의 경우에는 MTA를 처치하지 않은 경우와 별 다른 차이가 없었다. MTA농도를 40  $\mu$ M로 하여 methionine결핍 배지에서 6일간 배양하여 crystal violet으로 염색한 결



과, MTAP유전자가 결손된 SNU 387 및 449 세포주가 SNU 182 및 354세포주에 비해 성장 억제가 높음을 보여 단순히 methionine결핍을 유도한 후 MTAP의 기질인 MTA만 투여하여도 MTAP유전자가 결실된 암세포주를 MTAP 양성 세포주에 비해 세포사멸정도가 상대적으로 높음을 알 수 있다. 그러므로 methionine이 결핍된 식이요법 또한 어느 정도는 MTAP 음성 암세포의 선택적 사멸에 효과를 보일 수도 있을 것으로 예상된다. 그리고 MTAP 양성 세포주에서 de novo purine합성억제제인 MTX에 의한 세포독성이 MTA에 의해 억제될 수 있는 지를 조사하기 위하여, MTX (100  $\mu$ M)와 40  $\mu$ M의 MTA를 동시에 투여한 후 생존 세포수를 산정한 결과(Fig. 7), SNU 182 및 354의 세포주가 MTAP유전자가 결손된 SNU 387 및 449세포주에 비해 세포사가 2배에서 6배 정도로 억제됨이 관찰되어 이런 경우에 MTAP 양성 세포에 대한 독성이 음성세포에 비해 낮음을 알 수 있다. 그러므로 MTAP 음성 암조직에 대한 항암요법시 MTX와 같은 항암제와 MTA를 동시에 투여할 수 있는 방법이 개발된다면 MTAP 양성인 체내 정상 세포에 대한 독성의 예방이 가능하리라 생각된다. 그러나 MTA의 자체 독성뿐 아니라 생체내 혈청에 존재하는 MTAP 및 MTAP양성세포에 의해 외부에서 투여한 MTA가 adenine으로 분해될 수 있어(9), 이러한 암세포 및 정상세포간의 대사활성 차이를 이용한 암치료법은 아직까지 해결해야 할 문제가 많은 실정이다.

## 결 론

간세포암에서 p15INK4B, p16INK4A 그리고 MTAP 유전자의 이상을 조사한 결과, 이들 유전자의 돌연변이 및 결손에 비해 p16INK4A유전자 promoter의 메틸화가 가장 높은 빈도로 관찰되었으며, 또한 5-AZA를 투여한 경우 p16INK4A의 재발현이 유도되는 것으로 보아 p16INK4A 유전자의 promoter부위의 메틸화와 간세포암 발생과는 밀접한 관계가 있을 것으로 생각된다. 아울러

MTAP유전자가 결손된 간세포암을 치료하는데 있어 de novo purine 합성억제제 투여시 methionine결핍 상태를 유도하면서 MTA를 동시에 투여하면 MTAP음성 암세포만의 선택적 사멸이 유도되는 것으로 보아 암세포 및 정상세포간의 대사활성 차이를 이용한 암치료법의 개발 가능성을 시사한다.

## 참 고 문 헌

1. Okuda K. Hepatocellular carcinoma: recent progress. *Hepatology* 1992;15:948-963.
2. Sugimura T. Multistepcarcinogenesis: a 1992 perspective. *Science* 1992;258:603-607.
3. Hall M, Peters G. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res* 1996;68:67-108.
4. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 1998;72:141-196.
5. Hur K, Yang HK, Jang JJ, Kim JP, Kim DY. Genetic alterations of p16INK4A and p15INK4B in gastric carcinomas. *J Korean Cancer Assoc* 1999;31:887-897.
6. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitigian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994;264:436-440.
7. Cheng JQ, Jhanwar SC, Lu YY, Testa JR. Homozygous deletions within 9p21-22 identify a small critical region of chromosomal loss in human malignant mesothelioma. *Cancer Res* 1993;53:4761-4763.
8. Cheng JQ, Jhanwar SC, Klein WM, Bell DW, Lee WC, Altomare DA, Nobori T, Olopade OI, Buckler AJ, Testa JR. p16 alterations and deletion mapping of 9p21-22 in malignant mesothelioma. *Cancer Res* 1994; 54:5547-5551.
9. Chen ZH, Zhang H, Savarese TM. Gene deletion chemosensitivity: codeletion of the genes for p16INK4A, methylthioadenosine phosphorylase, and the  $\alpha$ - and  $\beta$ -interferons in human pancreatic cell carcinoma lines and its implication for chemotherapy. *Cancer Res* 1996;56:1083-1090.
10. Schmid M, Malicki D, Nobori T, Rosenbach MD, Campbell K, Carson DA, Carrera CJ. Homozygous deletions of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP)

- are more frequent than p16INK4A (CDKN2) homozygous deletions in primary non-small cell lung cancers (NSCLC). *Oncogene* 1998;17:2669-2675.
11. Batova A, Diccianni MB, Nobori T, Vu T, Yu J, Bridgeman L, Yu AL. Frequently deletion in the methyladenosine phosphorylase gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia: strategies for enzyme-targeted therapy. *Blood* 1996;88:3083-3090.
  12. Kamatani N, Nelson-Rees WA, Carson DA. Selective killing of human malignant cell lines deficient in methylthioadenosine phosphorylase, a purine metabolic enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:1219-1223.
  13. Hori H, Tran P, Carrera CJ, Hori Y, Rosenbach MD, Carson DA, Nobori T. Methyladenosine phosphorylase cDNA transfection alters sensitivity to deletion of purine and methionine in A549 lung cancer cell. *Cancer Res* 1996;56:5653-5658.
  14. Nobori T, Takabayashi K, Tran P, Orvis L, Batova A, Yu A, Carson DA. Genomic cloning of methylthioadenosine phosphorylase: a purine metabolic enzyme deficient in multiple different cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6203-6208.
  15. Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, Nguyen T, Beart RW, Van Tornout JM, Jones PA. Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res* 1995;55:4531-4535.
  16. Orita M, Suzuki Y, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutation and DNA polymorphisms using polymerase chain reaction. *Genomics* 1989;5:874-879.
  17. Nakamaki T, Kawamata N, Schwaller J, Tobler A, Fey M, Lee YY, Kim BK, Fukuchi K, Tsuruoka N, Kaha J, Miller CW, Koeffler HP. Structural integrity of the cyclin-dependent kinase inhibitor genes p15, p16, and p18 in myeloid leukemias. *Br J Hematol* 1995;91:139-149.
  18. Matsushima H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ, Kato JY. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1994;14:2066-2076.
  19. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin B, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9821-9826.
  20. Bender CM, Pao MM, Jones PA. Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human cell lines. *Cancer Res* 1998;58(1):95-101.
  21. Timmermann S, Hinds PW, Munger K. Re-expression of endogenous p16<sup>INK4A</sup> in oral squamous cell carcinoma lines by 5-aza-2'-deoxycytidine treatment induces a senescent-like state. *Oncogene* 1998;17:3445-3453.
  22. Biden K, Young J, Buttenshaw R, Searle J, Cooksley G, Xu DB, Leggett B. Frequency of mutation and deletion of the tumor suppressor gene CDKN2A (MTS1/p16) in hepatocellular carcinoma from an Australian population. *Hepatology* 1997;25:593-597.
  23. Iolascon A, Giordani L, Moretti A, Basso G, Borriello A, Ragione FD. Analysis of CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, and cyclin Ds gene status in hepatoblastoma. *Hepatology* 1998;27:989-995.
  24. Suh SI, Choi EJ, Baek WK, Suh MH, Cho CH, Lee TS, Cha SD. Mutational analysis of p53 p21WAF1, p16INK4A in human cervical carcinoma. *J Korean Soc Microbiol* 1998;33:415-423.
  25. Liew CT, Li HM, Lo KW, Leow CK, Chan JY, Hin LY, Lau WY, Lai PBS, Lim BK, Huang J, Leung WT, Wu S, Lee JCK. High frequency of p16<sup>INK4A</sup> gene alterations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1999;18:789-795.