

## 두경부 악성 종양에서의 분자 세포 유전학

부산대학교 의과대학 이비인후과학교실

노 환 중

### Tumor Molecular Cytogenetics in Head and Neck Cancer

Hwan-Jung Roh, M.D.

Department of Otorhinolaryngology, College of Medicine,  
Pusan National University, Pusan, Korea

#### I. 서 언

악성 종양이 발생하고 진행하는데는 복합적 유전학적 변화(multiple genetic events)를 동반한다. 악성 종양의 세포 유전학적 규명은 암을 이해하고 치료하는 데 많은 도움이 되어 왔으며 이러한 유전학적 변화에 관한 초기 정보는 종래의 세포 유전학적 방법에 의하여 악성 종양으로부터 얻어진 중기(metaphase) 세포의 핵형 분석(karyotypic analysis)을 통하여 시작되었다. 종양과 연관된 이러한 염색체 변화의 규명은 종양의 진단, 치료 방침의 결정 및 예후 추정의 지표로서 활용되어져 왔으며, 더구나 특수한 염색체 변화가 특징적인 생물학적 현상과 연관되어 있다는 사실은 구조적으로 변화된 염색체 상에 존재할 것으로 예상되는 유전자에 초점을 맞추게 하였고, 이러한 유전자의 기능과 종양의 발생, 진행 및 전이와의 관계를 규명하려고 하였다.

그러나 앞에서 언급한 이러한 사실은 이전까지는 대부분 혈액 종양에만 국한되어 왕성하게 연구되어지는 경향이였다. 두경부 종양을 포함한 고형 악성 종양은 종래의 세포유전학

적방법으로 유전학적 변화를 규명하기에는 여러 가지 제약을 가지고 있어서 혈액 종양에 비해서는 발전이 느린 것은 사실이나 최근 이를 해결하기 위한 다양한 분자 세포 유전학적 방법이 시도되고 있어서 premature chromosome condensation(PCC)법, *in situ* hybridization(ISH)법 중 fluorescence ISH(FISH), non-fluorescence ISH법 및 multicolor 핵형 분석 그리고 comparative genomic hybridization (CGH)법 등이 개발되게 되었다. 이에 저자는 이러한 방법이 두경부 악성 종양의 유전학적 변화를 어떻게 규명하고 그 임상적 적용과 미래 전망에 대해 소개하고자 한다.

#### II. 종래의 세포 유전학적 방법 (Conventional Cytogenetics)

과거부터 사용되고 있는 전통적인 세포 유전학적 핵형 분석은 세포 주기 중에서 중기 세포의 염색체에서만 가능하고 간기(interphase) 세포는 핵내에 염색질이 산만히 퍼져 있으므로 하나의 염색체 단위로 분석할 수

KEY WORDS : Cytogenetics · *in situ* Hybridization · FISH

본 논문은 부산대학교 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

없었다. 고형 종양은 생체 내에서 비교적 천천히 성장하므로 종양 세포 중 증식에 있는 세포 비율은 5% 미만으로 극히 적어서 고형 종양을 단일 세포 부유액(single tumor cell suspension) 상태로 만든 후 단기간 또는 장기간의 세포 배양을 통하여 증식율을 증가시킨 후 colcemid 등으로 처리하여 종양 세포를 동기화(synchronization)시킨 후 핵형을 분석하였다. 이렇게 하여 염색체의 수적 변화와 5Mb DNA 이상의 구조적 변화 및 종양성 비정상 핵형(clonal abnormality)과 그 전개(evolution) 등의 관찰이 가능하였다.

그러나 고형 종양 조직을 종래의 방법으로 분석하는 데는 몇 가지 한계와 문제점을 가지고 있다. 첫째, 고형 종양 조직내 증식에 있는 종양 세포의 비율은 극히 미비하다. 둘째, 고형 종양을 단위 세포로 성장시키기 위해서는 종양 조직을 잘게 부수어야 하므로 조직 구조를 보존할 수 없으며 섬유아 세포 등 결합 조직 세포가 포함되어 배양 기간(*in vitro*) 동안에 선택적으로 자랄 수 있으며 원하는 종양 세포는 증식이 억제될 수도 있다. 셋째, 염색체 변화가 실제 생체(*in vivo*) 상태가 아닌 배양 기간 동안에 추가로 생길 수 있으므로 본래의 종양 세포 집단의 상태를 정확히 반영하지 못한다. 넷째, 상기에서 언급한 단점을 극복한다고 하더라도 양질의 증기 염색체를 얻기 힘들고 악성 종양의 복잡한 핵형 때문에 판독하는데 상당한 어려움이 따른다.

그러나 종양 세포 유전학적 분석에서는 제외할 수 없는 가장 기본적인 검사이기 때문에 저자가 사용하고 있는 *in situ* coverslip 배양법을 소개하면 다음과 같다.

1. 수술 용기에 들어 있는 조직을 오염이 되지 않도록 주의하면서 60mm 배양 접시로 옮기고 3~5ml의  $\alpha$ -minimum essential medium (MEM)을 더한다. 조직 덩어리가 매우 크거나 혹은 혈액이 포함되어 있으면 150mm 접시에 놓고 5~10ml의  $\alpha$ -MEM을 더한다.

2. Collagenase(Type V)는  $\alpha$ -MEM으로 1 mg/ml 농도가 되게 녹여서 여과 멸균한 다음,

각 60mm 배양 접시에 5~7ml씩 넣는다.

3. 조직을 collagenase 접시에 옮기고 멸균된 수술용 칼을 사용해서 작은 조각이 되게 잘라서 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 2~24시간 배양한다.

4. 현미경하에 조직이 분리되어 가는 것을 관찰하고, 세포들이 하나씩 떠다니는 것이 많이 보이면 배지액을 시험관에 옮겨서 1,000 rpm으로 10분간 원심분리한다.

5. 상층을 버리고 다시 배양액을 넣어서 세포를 잘 부유시킨 다음, coverslip이 들어 있는 배양 접시와 flask에 옮겨서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에 배양한다.

6. 3~4일 후에 coverslip과 flask를 관찰해서 부착되어 자라나는 세포 집락이 많으면 배양액을 갈아준다.

7. 4일째부터 coverslip을 매일 관찰하여 각 coverslip당 3개 혹은 그이상의 증기 세포를 보이는 집락이 있으면 10  $\mu$ g/ml의 colcemid를 26G 주사 바늘을 사용해서 한 방울씩 떨어뜨리고 37°C에서 20분간 배양한다.

8. 배양액을 모두 제거한 뒤 미리 37°C로 가온한 0.8% sodium citrate를 coverslip이 들어 있는 배양 접시에 2ml씩 넣고 20분간 반응시킨다.

9. Methanol과 acetic acid를 3:1의 비율로 혼합한 고정액으로 3회 반복하여 세포를 고정시키고 coverslip을 배양 접시에서 떼내어 alcohol lamp위에서 말린다.

10. 이후 통상적인 방법으로 trypsin 처리에 의한 G-banding을 실시하고 Giemsa 염색하여 핵형 분석을 한다.

11. 결과의 판독은 1,000배 확대 광학 현미경하에서 적어도 20개 이상의 증기 세포를 관찰하고, 종양성 비정상 핵형은 2개 이상의 동일한 구조적 이상 혹은 염색체의 수적 증가를 보일 때와 3개 이상의 동일한 염색체의 수적 감소를 보일 때로 한다(그림 1).

이와 같이 가장 기본적인 유전학적 변화에 대한 초기 정보를 얻을 수 있는 종래의 세포 유전학적 분석에 의해 밝혀진 두경부 종양에

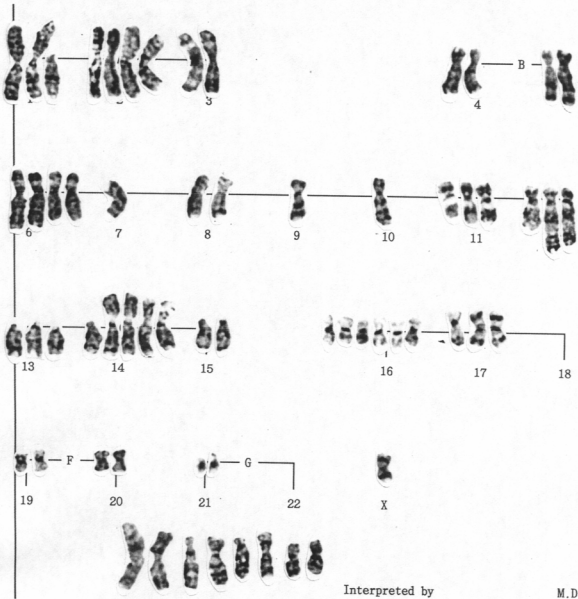


그림 1. 하인두암 레에서 *in situ* coverslip 배양법을 이용한 핵형분석.

악성 종양의 복잡한 염색체 변화로 인해서 소실, 결실, 다양한 이수배수체, 파생 염색체 및 표지 염색체 등의 염색체 변화가 보인다.

특수하고도 공통된 염색체 변화는 없으나 많은 보고에 의하면 염색체 3p, 7q, 8p, 9p, 11q, 13p, 14p, 15p의 소실(loss) 빈도가 높아 이 부위에 두경부 종양의 발생에 중요한 암억제유전자(tumor suppressor gene)가 존재할 가능성을 암시하였고, 반면에 염색체 1q, 3q, 8q, 15q는 획득(gain)의 빈도가 비교적 높다고 알려져 있다. 좀 더 정밀히 알기 위해서 분자 생물학적

방법을 이용한 대립 유전자의 불균형(allelic imbalance) 또는 이종 접합성 상실(loss of heterozygosity, LOH)의 연구를 통해 염색체 3p, 5q, 6p, 9p, 11q, 17p의 소실 빈도가 비교적 일정하다고 보고되었고 따라서 이 부위에 존재할 가능성이 있는 새로운 암억제유전자를 찾기 위한 노력이 현재 진행중이다.

### III. Premature Chromosome Condensation(PCC)

정상적으로 염색체는 세포 주기 동안 유사 분열(mitosis) 기간에서만 직접 볼 수 있다. 1970년 Johnson과 Rao가 빠르게 증식하는 중기 세포를 인위적으로 간기 세포와 Sendai 바이러스 등으로 접합(fusion) 시킴으로써(그림 2) 간기 세포의 핵이 즉시 전기와 유사한(prophase-like) 반응을 일으켜서 초기에 염색질이 농축되어 간기 핵에 있는 염색체가 마치 중기와 같이 하나의 떨어진 염색체 형태로 보여질 수 있는 현상(PCC, 그림 3)을 발견한 이후 중기를 통하지 않고 간기에 있는 염색체도 관찰할 수 있게 되었다. 이러한 PCC는 간기 중의 종양 세포가 대부분을 차지하고 있는 고형 종양에서 세포 유전학적 연구에 상당한 장점을 가지게 되었으며 흥미롭게도 PCC의 형태는 접합 당시 간기 중의 세포가 세포 주기 중에서 어떤 시점( $G_1$  또는  $G_2$ )에 있는지를 잘 반영하고 간기의 PCC를 염색함으로써 중기 염색체의 핵형 분석과 같이 염색체 분석을 할 수 있게 되었다(그림 4).

PCC법이 종래의 세포 유전학적 방법에 비해 갖는 장점으로서의 첫째, 간기 중의 세포가 대

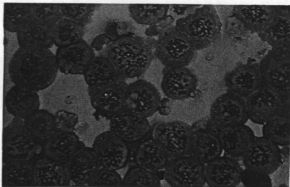


그림 2. 중기에 동기화 시킨 CHO 세포와 간기인 후두 악성 종양 세포의 접합. 중기 세포의 염색체 뿐만 아니라 간기 세포의 염색체도 초기에 농축되어 염색체의 형태로 보이고 있다.

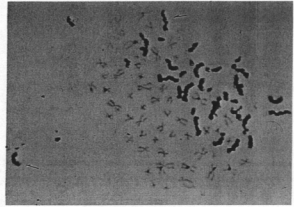


그림 3. PCC 슬라이드.

그림 2의 접합된 중기와 간기 세포 모두를 저장액에 부풀려 터뜨려서 각 세포로부터 나온 염색체가 보인다. 양 chromatid로 보이는 것이 중기 세포의 염색체이고 보다 진하게 채색된 간기 세포의 염색체는 형태적으로 접합 당시의 시점이  $G_1$  PCC임을 보여준다.

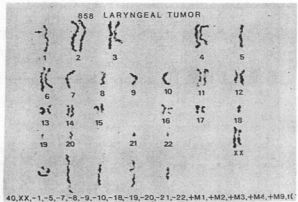


그림 4. 후두 악성 종양 레에서 PCC 염색체의 핵형 분석.

부분인 고형 종양에서 간기 중의 세포를 중기로 동기화시키지 않고도 간기 중의 염색체를 직접 관찰할 수 있다. 둘째, PCC의 형태는 세포 주기 중 접합 당시를 반영하므로 해당 세포 집단(target cell population)의 세포 주기 분포를 알 수 있다. 셋째, PCC 방법으로 얻은 간기의 염색체 수는 중기 때의 수와 같아서 세포당 염색체 수를 관찰할 수 있고 G-band 염색을 하면 직접 핵형 분석이 가능하므로 수적



변화뿐 아니라 구조적 이상도 관찰 가능하다. 반면에 PCC법은 보고자 하는 종양 세포가 세포 단위로 비교적 많이 필요하며, 접합 반응과 염색질 농축은 일종의 세포 대사이고 염색질 성숙 촉진 인자(maturation promotion factor)가 필요하므로 유도 세포(inducer cell)로서 왕성히 분열하는 다량의 유사 분열 세포(mitotic cell)가 필요하다는 점이 단점으로 지적되고 있다.

그 방법을 간단히 설명하면, 접합 전날에 유도 세포로서의 유사 분열 세포는 간기 중의 세포보다 크기가 큰 것으로서 대개 Chinese hamster ovary(CHO) cell 또는 HeLa cell 등을 이용하며, 접합 하루 전에 유사 분열 세포를 계대 배양하여 16~20시간 뒤에 100mm 배양 접시에 90% 이상의 confluency가 도달할 수 있게 한다. 분석하고자 하는 고형 종양은 수술실에서 무균적으로 채취하여 gentamicin과 fungizone이 포함된 이동 배지(transport media)인  $\alpha$ -MEM에 담아 실험실로 가져온다. 고형 종양 조직을 예리한 칼로 잘게 만든 다음 collagenase B와 DNase로 접합 당일까지 1°C에서 처리하여 조직내 세포를 유리(dissociation)시킨다.

접합 당일에 유사 분열 세포가 있는 배양 접시를 새 배지로 바꾼 후 colcemid( $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ )를 더하고 37°C 배양기에서 3.5시간 동안 두어 증기로 동기화시킨 뒤 유사 분열 세포가 배양 접시로부터 등글게 모양이 변하면서 떨어지는 것을 관찰한다. 한편 유리된 고형 종양 세포(대부분이 간기 중의 세포)를 cytospin 슬라이드 하에서 관찰하여 세포의 유리 정도, 형태, 생존 유무 등을 관찰한다.

접합을 위해서는 유사 분열 세포와 고형 종양에서 유리된 간기 세포를 동일한 수로 섞은 다음 Hank's solution에 두 번 세척한 후 상층액은 버리고 세포 침전물(cell pellet)은 자의 선으로 불활성화된 Sendai 바이러스가 들어 있는 Hank's solution에 녹인다.

이러한 PCC법은 간기 세포가 대부분인 두 경부 종양 세포에서 염색체 변화를 종래의 방

법인 인위적 증기를 거쳐 염색체 변화를 보지 않고 직접 정확히 관찰할 수 있다. 따라서 종양 조직과 종양 주변 정상 조직에 대한 염색체 변화의 직접적인 관찰을 통해 두경부 종양 발생에 있어서 영역 암화(field cancerization) 현상과 다단계 발생(multistep carcinogenesis)론을 검증할 수 있고, 더 나아가 50대 이상의 흡연자 등과 같이 종양 발생의 위험성이 있는 고위험군(high risk group)을 대상으로 구강 점막 등 쉽게 조직 생검할 수 있는 부위에서 정상 조직을 PCC 방법으로 염색체 핵형 변화를 관찰하여 만일 염색체 변화를 동반하는 경우는 상부 소화 기도(upper aerodigestive tract)가 병리 조직학적으로는 정상일지 몰라도 담배 등의 발암 물질에 의해 유전학적으로는 벌써 변화가 있는 것을 암시하며, 이러한 사실은 향후 상부 소화 기도에 악성 종양 발생의 가능성이 많음을 의미하므로 암의 화학적 예방(chemoprevention) 등과 같이 적극적인 예방이 필요함을 의미한다. 또한 특수 probe를 이용하여 ISH와 같은 방법을 PCC 방법에 추가하면 두경부 악성 종양의 발생과 침습 및 전이에 관여하는 유전학적 변화를 보다 더 구체적으로 규명할 수 있을 것이다.

#### IV. *in situ* Hybridization(ISH)

암의 발생과 진행에는 복합적 유전학적 변화를 수반한다는 사실은 이미 밝혀져 있으며 이러한 사실에 관한 초기 정보는 종래의 세포 유전학적 방법, 즉 암세포 증기 염색체의 핵형 분석으로부터 시작되었으나 앞에서 언급한 바와 같이 두경부 종양과 같은 고형 종양은 많은 문제와 한계를 갖고 있었다. 최근의 분자 생물학적 방법도 고형암의 복합적 유전학적 변화를 규명하기에는 한계가 있다. 예를 들어 Southern 분석은 유전자 재배열의 검출과 암유전자(oncogene)증폭이나 암억제유전자의 결함시 일어나는 DNA 복제수(copy number)의 변화에 관한 정보와, 그리고 DNA 증폭에 사용되는

표 1. 분자 세포 유전 학적으로 ISH로 분석할 수 있는 종류

Chromosome Identification
Aneuploidy Detection
Interphase Cytogenetics
Centromere Analysis
Marker Chromosomes
Heteromorphism
Painting
Single Copy Sequence
Human Genome Research

표 2. ISH에 이용되는 probe 종류

1. Satellite
• Alpha
• Beta
• Classical
• Midi
• Cocktail
2. Unique Sequence Probes
• Cosmid
• Telomere-Specific
3. Whole Chromosome Paint
• Chromosome-Specific
• Total Genomic

표 3. ISH에 이용되는 표적 검체

Metaphase Chromosomes
Interphase Nuclei
Formalin-Fixed, Paraffin Embedded Tissue
Whole Cells in Culture

중합 효소 반응(polymerase chain reaction, PCR)은 작른 종양에 관한 정보는 줄 수 있지만 종양 조직내 암세포 사이의 이질성(heterogeneity) 그리고 대부분의 암세포가 동시에 갖는 유전학적 변화에 관한 정보는 얻기가 힘들며, 더구나 이러한 분석은 종양 조직내에도 정상 간질 세포와 임파구가 포함되어 있으므로 암세포 단독에 관한 정보와는 혼동하기 쉽다. 따라서 암의 전개(tumor evolution)에 관해서는 더욱 유용한 정보를 제공하기가 어렵다.

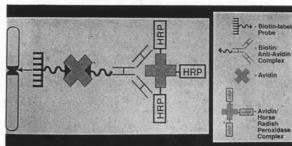


그림 5. 효소적 ISH법.

biotin이 부착된 probe를 표적 DNA와 결합시킨후 avidin-antiavidin으로 증폭시킨후 avidin에 부착된 horse radish peroxidase를 면역 화학적 방법으로 본다.

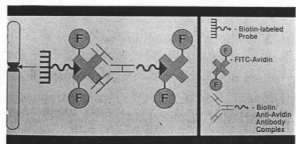


그림 6. 형광 ISH법(FISH).

그림 5와 유사하나 avidin-antiavidin으로 증폭시킨후 avidin에 부착된 FITC의 색으로 본다.

보고자 하는 표적 DNA 또는 RNA에 probe를 결합(hybridization)시켜 관찰하는 ISH는 이러한 문제점을 해결하였으며 고형 종양에서도 분자 세포 유전학적 연구를 할 수 있는 토대를 마련하였다. ISH는 형광(fluorescence ISH, FISH) 혹은 효소 및 방사선 동위원소를 이용하여 결합 신호(hybridization signal)를 볼 수 있으며, 분자 세포 유전학적으로 ISH로 분석할 수 있는 종류는 표 1과 같으며 여기에 사용되는 probe 종류와 표적은 각각 표 2, 3과 같다.

대략적인 원리는 그림 5, 6과 같으며, 보편적으로 많이 이용되고 있는 DNA를 표적으로 한 FISH 방법을 예를 들자면 관찰하고자 하는 DNA 염기 배열 순서와 상호 보완적인 염기 배열을 가진 probe를 표적 DNA와 결합시킨다.

이 probe에는 biotin이나 digoxigenin이 부착되어 있어서 결합 후 avidin-antiavidin-avidin 또는 antidigoxigenin으로 다시 결합시키고 여기에 형광 물질인 fluorescein isothiocyanate (FITC)나 rhodamine 등을 부착시켜 형광 현미경하에서 관찰한다.

ISH 후 원하는 결합 신호를 성공적으로 보기 위해 특히 세심한 주의를 요하는 과정들이 있는데, 먼저, 실험하고자 하는 검체가 간기나 중기의 염색체가 아닌 파라핀에 포매된 조직일 경우에는 세포막과 세포질을 용해시키는 과정이 필요하며, 이때 시간과 온도의 조절이 대단히 중요하고 이는 조직과 조직간에도 차이가 있을 수 있으므로 주의를 요한다. 과용해(overdigestion)나 저용해(underdigestion)가 되면 결합이 제대로 되지 않는다. 이중 나선 구조의 DNA를 단일 구조로 푸는 데 필요한 변성(denaturation)과정 또한 시간과 온도가 염색체 형태를 유지하는 데 중요해서 대개 중기의 염색체일 경우 2~4분 동안 70% formamide용액에 70°C 전후로, 파라핀에 포매된 조직일 경우 4~12분 동안 90~95°C의 온도가 필요하다. 그리고 결합후 세척(post-hybridization wash) 과정도 중요해서 probe와 표적간에 비특이적 결합을 제거하고 원하는 특이 결합을 높이기 위해 표적의 종류에 따라 stringency와 저 stringency의 세척 완충액을 적절히 사용해야 하며 대개 stringency 경우 65% formamide/2X SCC가, 저 stringency일 경우 50% formamide/2X SCC가 사용된다. 마지막으로 검출(detection)과정에서는 사용되어진 probe가 2종류이고 이를 두 가지 색으로 보고자 할 때, biotin으로 연결된 probe는 biotin과 친화력이 강하고 FITC(녹색)가 연결된 avidin-antiavidin-avidin으로 증폭시켜 보고 digoxigenin 일 경우 rhodamine(적색)이 연결된 antidigoxigenin으로 관찰한다(그림 7).

저자가 사용하고 있는 ISH의 종류와 가장 최근에 발표되어 각광을 받고 있는 multiplex FISH에 관해서 두경부 종양에서의 그 임상적 응용 및 미래 전망을 소개하면 다음과 같다.

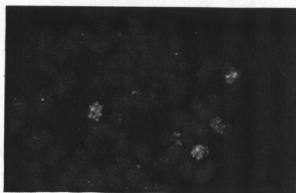


그림 7. MDA-886 세포주에서 INT-2와 염색체 11번에 대한 2색 FISH.

INT-2 cosmid probe에는 biotin을 부착시켜서 avidin-antiavidin-avidin-FITC(녹색)의 형태로, 염색체 11번은 digoxigenin을 부착시켜 antidigoxigenin-rhodamine(적색)의 형태로 관찰하면 INT-2 유전자가 원래 위치한 염색체 11q13 지역에는 single copy 유전자만 존재하고, 증폭은 군집의 형태로 다른 염색체에서 보인다.

#### 1. ISH with alpha satellite probe

전체 염색체에 대한 변화의 분석은 암의 진단에 상당한 의의를 갖고 특히 고형 종양일 경우는 이수배수체(an euploidy)의 가능성이 높으며 어떤 한 염색체 전체의 소실이나 획득은 악성 종양의 진행과 연관이 있다고 알려져 있다. 염색체의 중심체 근처에는 DNA 염기 배열이 몇 백 배 내지 몇 천 배 반복되는 부위가 있는데 이것을 이용한 probe가 alpha satellite이며, ISH 결과 결합 강도가 높아서 결합 신호는 중기 염색체 뿐아니라 간기 핵에서도 잘 관찰될 수 있어 흔히 이용된다. 정상 세포에서는 결합 신호가 각 염색체당 한 개씩 보이므로 결합 신호의 수를 계산함으로써 염색체의 수적 변화를 관찰할 수 있다. 이러한 기법은 종양 세포를 배양하지 않아도 가능함으로 고형 종양에서 특히 강점을 가지고 있고 임상 외과 의사들이 흔히 접하는 파라핀 포매된 조직을 사용해서 형광 또는 방사선 동위원소적인 방법을 통하지 않고 효소적(주로 peroxidase)인 방법으로도 비교적 쉽게 ISH를 할 수 있다.

두경부 악성 종양의 대부분은 상피 세포에서 기원한 편평 상피암이며 광학 현미경하에서 종양 병변 주위에 인접 정상(adjacent normal) 상피, 과형성(hyperplastic) 상피 및 이형성(dysplastic) 상피 등의 인접 상피를 흔히 보게 된다. 본 저자의 경우 염색체 7번과 17번의 alpha satellite probe를 이용하여 파라핀 포매된 비흡연자인 정상인의 구강 점막 상피와 25례의 두경부 악성 종양에서의 이러한 상피 병변에 ISH를 적용한 결과 정상인의 구강 점막 상피 세포는 염색체의 다배수체(polysomy, 세포당 3개 이상의 결합 신호수를 갖는 것)가 없는데 비해서(그림 8) 두경부 악성 종양에서는 인접 정상 상피, 과형성 상피, 이형성 상피 및 종양 부위로 갈수록 다배수체를 갖는 세포 수가 증가하였다(그림 9). ISH에 의한 염색체 결합 신호의 판정 및 분석을 위해서는 Hopman(1989, 1991)의 기준을 응용하여 적용하였다. 결합에서 생길 수 있는 인공 산물들을 극소화하기 위해 stringency가 높은 실험 조건을 만들었음에도 불구하고 조직 절편에 내부 대조군의 필요성이 대두되어 같은 조직 절편에 있는 정상 림프구를 종양 세포의 결합 신호와 비교하기 위한 내부 대조군으로 사용하였다.

인접 정상 상피, 과형성 상피 및 이형성 상피에서 다배수체를 갖는 세포가 있다는 사

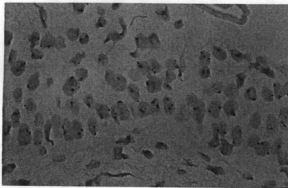


그림 8. 비흡연자인 정상인 구강 점막에서 염색체 7번의 alpha satellite probe를 이용한 효소적 ISH. 각 상피 세포내에 결합 신호가 3개 이상인 세포는 없고 모두 2개 이하이다.

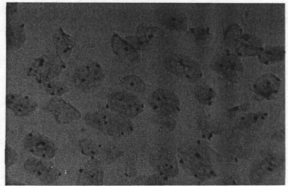


그림 9. 두경부 종양 병변 주위의 이형성 상피에서 염색체 7번의 alpha satellite probe를 이용한 효소적 ISH. 결합 신호가 3~4개인 이형성 상피 세포가 보인다.

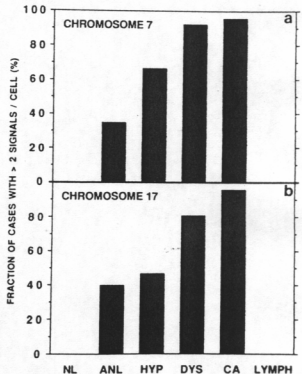


그림 10. 각 병변에 따른 3개 이상의 결합 신호를 보이는 세포의 분획.

염색체 7번과 17번의 alpha satellite probe를 이용한 효소적 ISH 결과, 3개 이상의 결합 신호를 가진 세포가 비흡연자인 정상인과 내부 대조군으로 이용된 림파구에서는 없고, 인접 정상 상피(ANL), 과형성 상피(HYP), 이형성 상피(DYS) 및 종양 병변으로 갈수록 증가한다.

실은 두경부 종양 발생에 있어서 영역 암화 현상을, 또한 이러한 다배수체를 갖는 세포 수의 빈도가 병변이 진행할수록 증가한다는 사실은 다단계 형성론의 개념을 뒷받침한다(그림 10). 이러한 사실은 이미인후과 임상자에게 중요한 의미를 갖는다. 즉 종양의 외과적 절제 범위에 있는 조직의 병리 조직학적인 진단이 악성이 아닐 경우에도 상기 ISH 기법을 이용한 결과가 많은 유전적 변화의 소견을 보인다면 이는 향후 증식 조절이 불가능한 악성 세포로 변할 가능성이 다분히 있음을 암시하며 따라서 이차성 원발성 종양(second primary cancer)이 병발할 수도 있음을 의미하므로 보다 세심한 추적 관찰 및 화학적 예방과 같은 적극적 치료가 필요할 수도 있음을 시사한다.

이와 같이 파라핀 포매된 조직에 alpha satellite probe를 이용한 ISH는 전체 유전적 이상의 추적 정도(whole genomic instability)를 규명할 수 있고, 조직 구조가 보존되므로 조직 절편을 유전적으로 지도화(mapping)해서 원하는 조직 부위에서 유전형(genotype)과 병리 조직학적 표현형(phenotype)과의 상관관계를 직접 검사할 수 있고 또한 ISH한 슬라이드는 영구히 보관할 수 있는 장점이 있다. 따라서 향후 이러한 기법을 이용한 염색체 변화를 유전형의 표지(genotypic marker)로서 활용하여 악성도 평가와 예후 측정의 지표로서 과거부터 이용하던 TNM 분류 및 병리 조직학적 소견 외에도 생물학적 병기(biological stage)에 이용할 수 있을 것이다.

악성 종양의 가장 좋은 치료는 조기 발견이며 그 보다 더 효과적인 것은 예방이다. 두경부 종양의 발생 가능성이 있는 50대 이상의 흡연자와 같은 고위험군을 대상으로 기본 검색 검사(routine screening test)로서 간단한 조직 생검을 하여 기본적인 병리 조직 검사 외에 앞으로 발전될 상기 ISH 기법을 이용한 유전학적 변화에 대해 분석을 한다면 향후 두경부 악성 종양이 생길 수 있는 가능성을 예측하게 할 수 있을 뿐 만 아니라 그 예방도 가능하게 할 것으로 사료된다.

## 2. ISH with whole painting probe

종래의 세포 유전학적 분석을 통해서 밝혀진 두경부 종양에서 비교적 빈발하는 염색체 변화에 대해서 whole painting probe를 이용한 ISH를 응용하면 각 염색체 별로 구조적 이상을 분석할 수 있다. 그러나 조직이나 간기 세포에서는 사용이 힘들며 중기 염색체에 적용 가능하고 원하는 어떤 염색체의 전체적인 변화를 관찰할 수 있다. 따라서 중기 염색체의 질이 나쁘더라도 보고자 하는 염색체를 정확히 확인할 수 있고 구조적 이상도 같이 분석할 수 있으며 특히 전좌(translocation)의 검출에 민감하다.

두경부 종양 영역에서 최근 관심이 집중하고 있는 염색체 11q13 지역은 INT-2, HST-1, Cyclin D<sub>1</sub>/PRAD<sub>1</sub>, GST  $\pi$ , BCL-1과 같은 악성 종양의 발생에 밀접한 유전자들이 밀집되어 있고 따라서 염색체 11번의 유전자 재배열(genetic rearrangement) 현상을 자주 동반한다고 알려져 있다. 저자가 MDA-886 두경부 종양 세포주를 이용하여 중기 염색체 슬라이드를 만든 후 염색체 11번 whole painting probe로서 FISH한 결과 전좌 등의 염색체 구조 이상을 관찰할 수 있었다(그림 11).

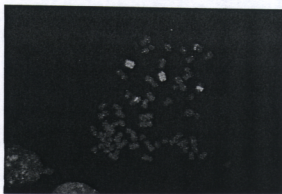


그림 11. MDA-886 세포주에서 염색체 11번 whole painting probe를 이용한 FISH. 두개의 염색체 11번 외에 전좌와 같은 염색체 구조 이상이 보인다.

### 3. ISH with unique sequence probe

복합적 유전학적 변화 중 암유전자의 증폭 또는 암억제유전자와 같은 어떤 특수한 유전자의 변화는 그 결과로 인한 생물학적 현상을 동반하고 악성 종양의 진행과 연관을 가지므로 분자 세포 유전학적 측면에서 이를 규명하는 것이 중요하다. 특정 염기 서열(unique sequence)을 가진 유전자를 cosmid 매개체에 부착시키거나 또는 염색체 말단(telomere)부위도 염기 배열이 특징적이므로 ISH에 응용할 수 있다.

두경부 종양에서의 INT-2 유전자의 증폭은 원격 전이 및 빠른 진행과 관련이 있다고 알려져 있으며 FISH는 이러한 유전자의 변화를 세포 단위로 관찰할 수 있어서 고형 종양내의 세포간 이질성에 관한 정보를 줄 수 있다. 저자의 경우 INT-2 유전자가 두경부 종양에서 증폭되는 형태를 MDA-886 두경부 종양 세포주에서 FISH하여 관찰한 후(그림 12), INT-2 유전자가 염색체 11번에 존재한다는 사실에 착안하여 INT-2 probe에 biotin을 부착하여 avidin-antiavidin-avidin-FITC 형태(녹색)로, 염색체 11번 whole painting probe에는 digoxigenin으로 부착하여 antidigoxigenin-rhodamine 형태(적색)로 관찰한 결과 INT-2의 증폭이 원래 위치한 11q13 부위가 아닌 다른 염색체에서 군집(cluster)의 형태로 증폭됨을 관찰할 수 있었고 원래 위치한 11q13 부위에는 단지 원래의 single copy 유전자 형태로 존재할 뿐이었다(그림 7). 이는 분자 세포 유전학적으로 암유전자가 악성 종양에서 증폭할 때 알려진 두 가지 증폭 기전 중 double minute 형태 보다는 homogeneously staining region(HSR) 형태로 증폭됨을 의미한다. 이 INT-2 유전자 probe를 상기 종양 세포주가 유래한 본래의 파라핀 포매된 조직의 종양 부위에도 FISH 방법으로 관찰 분석한 결과 조직에서는 모든 종양 세포가 증폭 신호를 갖지 않고 일부분만 증폭 신호를 갖는 종양 조직내 세포간 이질성의 특징을 잘 관찰할 수 있었다(그림 13). 이러한 사실은 분자 생물학적 방법 중 Southern

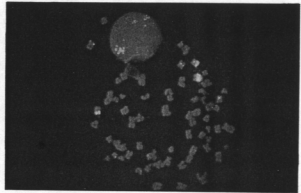


그림 12. MDA-886 세포주에서 INT-2 cosmid probe를 이용한 FISH. INT-2의 single copy 유전자가 보이고 증폭은 군집의 형태로 산재되어 있다.

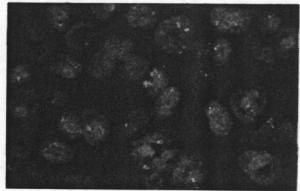
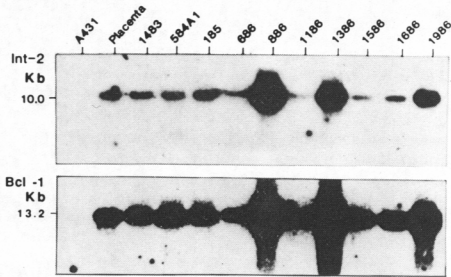


그림 13. 파라핀 포매된 조직에서 INT-2 cosmid probe를 이용한 FISH. MDA-886 세포주가 유래한 본래의 종양 조직에서는 일부분의 종양 세포만 증폭 신호를 보여 같은 종양 조직내 세포간 이질성의 특징을 보여 주고 있다.

분석이 특정 유전자의 증폭 정도에 대한 정보 밖에 줄 수 없는데 비해서(그림 14) 분자 세포 유전학적인 방법인 FISH는 증폭 정도 외에도 보고자 하는 유전자의 공간적 분포, 증폭의 기전 및 종양 조직내 세포간 이질성에 관한 정보도 제공해 주어서 상당한 강점을 갖는 것으로 사료된다.

### 4. Multiplex FISH

FISH는 단일 유전자 혹은 단일 세포 수준에



Λ

그림 14. 각 세포주에서의 INT-2에 대한 Southern 분석.  
INT-2 유전자의 DNA 증폭 정도를 알 수 있고, Bcl-1 유전자는 INT-2와 같은 염색체 11q13에 존재하여 동반 증폭 현상을 보여 준다.

서 유전자와 염색체의 변이를 검출하는 강력한 수단이 되고 있다. 만일 여러 가지 형광 물질을 조합하여 사용하거나 그 표지 비율을 적절히 조절한다면 동일 검체에서 여러 표적 유전자나 염색체를 동시에 관찰하는 것이 가능하게 된다.

Speicher(1996) 등은 FITC와 Cy3, Cy3.5, Cy5와 Cy7의 4가지 cyanine 염색액으로 된 총 5가지의 형광 물질과 해당하는 광학 필터의 조

합을 응용하여 22쌍의 상염색체와 X 및 Y 염색체를 포함한 24개 염색체를 동시에 관찰하는 painting probe를 고안하였다. 이러한 multi-fluor FISH에 의하면 종래의 G-banding으로 분석이 가능하였던 염색체의 전좌(translocation), 결실(deletion), 삼염색체(trisomy) 및 홀염색체(monosomy) 등을 그 breakpoint까지 정확하게 찾을 수 있을 뿐만 아니라, 특히 두경부 악성 종양 세포주에 응용하였을 때 G-

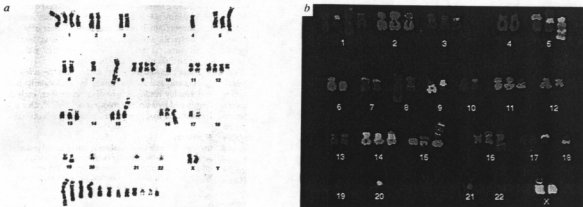


그림 15. Multiplex FISH.  
종래의 핵형 분석으로 분류하기 힘들었던 좌측(a) 하단에 있는 표지 염색체를 비롯한 복잡한 염색체 변화를 우측(b)의 multiplex FISH를 이용하면 복잡한 핵형 분석이 가능하다 (참고문헌 19로부터 언급).

banding으로서는 확실한 기원을 찾을 수 없었던 염색체 재배열(chromosome rearrangement)나 과거에 핵형 분석시 분류하기 어려웠던 표지 염색체(marker chromosome)와 같은 복잡한 핵형의 분석도 가능하게 되었다(그림 15).

## V. Comparative Genomic Hybridization(CGH)

고형 종양에서의 핵형 분석은 상기에서 언급한 바와 같이 양질의 중기 세포를 다량 얻을 수 없는 것과 염색체 변화가 매우 복잡하다는 등의 판독상의 제한점이 있고, 종양 DNA를 재료로 한 분자 유전학적 연구는 흔히 알려져 있는 대립 유전자의 소실이나 변이 또는 유전자 증폭 등을 검출하는 데에는 보다 성공적이었으나 이 또한 한 번에 어떤 특정 유전자나 염색체 영역만을 실험 대상으로 할뿐이고 나머지 대다수의 유전자에 관한 정보는 얻을 수 없는 단점이 지적되고 있다.

Kallioniemi(1992) 등에 의해서 처음 시도된 일종의 분자 세포 유전학적 기법인 CGH 는 종양 검체의 DNA와 정상 세포로부터 얻은 DNA를 비교 분석하여 종양에서 어떤 염색체 부위가 상대적으로 소실되었는지 혹은 증가되었는지를 검토할 수가 있다. 따라서 일회의 실험

으로 전 염색체 중에서 어느 부위가 소실되었는지 아니면 증폭되었는지를 알 수 있고, 종양 세포를 배양한다거나 중기 세포를 얻어야 할 필요가 없으며, 단지 소량의 종양 세포 DNA만으로도 분석이 가능하다는 장점들이 있다.

CGH의 기본 원리의 첫 단계로서는 종양 조직의 DNA는 biotin을 결합시키고 정상 조직의 DNA는 digoxigenin을 결합시켜서 동량으로 혼합하여 정상인에게서 제작한 중기 염색체와 동시에 반응시킨다. 종양 조직 DNA와 정상 중기 염색체와의 결합 결과는 녹색의 FITC-avidin 형광색으로 검출하고, 정상 조직 DNA와 정상 중기 염색체와의 결합 반응은 적색인 rhodamine-antidigoxigenin에 의해 검출한다. 따라서 정상 중기 염색체에 결합된 종양과 정상 조직 DNA의 상대적인 양은 각 염색체의 각 부위에서 두 개 DNA 사이에 해당하는 DNA 염기 서열이 얼마나 포함되어 있는가에 따라 결정되며 컴퓨터 분석에 의해서 녹색과 적색의 형광 비율로써 측정되어 진다. 따라서 종양 조직 중에 유전자 증폭이나 염색체의 증첩이 있다면 녹색 형광 비가 적색에 비해서 증가하게 되고, 만약에 염색체의 소실이나 수적 감소가 있다면 녹색의 형광 비율이 감소하게 된다(그림 16).

시판되고 있는 각종 암세포주를 사용한 실험

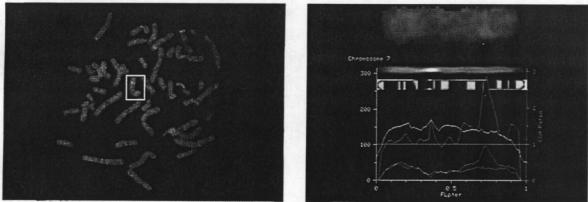


그림 16. Comparative genomic hybridization(CGH).

좌측의 정상 중기 염색체에 종양 조직 DNA(녹색)와 정상 조직 DNA(적색)와의 비교적인 결합을 우측의 컴퓨터 분석에 의해서 녹색과 적색의 형광 비율로써 측정하며, 예로서 보고자 하는 염색체 7번에 대한 유전자 증폭, 염색체의 부분 소실 등을 알 수 있다 (참고문헌 14로부터 언급).



혈외에도 실제로 방광암, 유방암, 전립선암을 비롯한 고형 종양 외에 급성 골수성 백혈병과 만성 임파구성 백혈병과 같은 혈액 종양에도 그 연구가 확대되고 있다. 두경부 악성 종양에 있어서도 연구가 진행 중이며 종래의 G-banding을 이용한 핵형에 추가로 중요한 자료를 제공하고 종양 발생에 관여하는 기전과 유전자를 검색하는 데에 향후 중요한 연구 수단이 될 것이다.

## VI. 결 언

두경부 악성 종양과 같은 고형 종양에서 분자 세포 유전학의 발전은 간지 세포의 유전학적 변화에 대한 분석을 가능하게 하였다. 두경부 종양의 대부분을 차지하는 편평 상피암에서 비록 같은 부위, 같은 병기 및 같은 병리 조직학적 표현형이라도 그 생물학적 성격은 달라서 암의 진행과 전이 양상이 항상 같지 않다는 것은 사실은 알려져 있고 또 실제로 임상에서 경험하기도 한다. 따라서 여태까지 악성도 평가와 예후 측정의 지표로 이용하던 TNM 분류와 병리 조직학적 소견의 방식에서 탈피하여 각종 유전자들을 포함한 총체적 유전적 변화와 그에 상응하는 생물학적 현상에 의해 분류되는 생물학적 병기(biological staging)의 필요성이 대두되고 있는 실정이며, 분자 세포 유전학이 그 한 방법으로 이용 될 수 있을 것으로 사료된다.

암의 전구 조직, 조기 암 및 잔존 종양과 같이 작은 병변에서 병리 조직학적 진단을 하기에 조직 양이 불충분하거나 그 소견이 애매하여 진단을 하기에 어려운 경우에도 분자 세포 유전학적 방법은 세포 단위별로 유전형을 분석할 수 있으므로 병리 조직학적 표현형의 대안으로 향후 유용할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 기본 검색 검사로서 아주 간단한 생검을 하여 병리 조직학적 소견 외에 분자 세포 유전학적 기법을 이용한 각 세포의 유전학적 변화에 관한 분석은 두경부 악성 종양이 생길

가능성이 있는 고위험군을 찾아내어 세심한 추적 관찰과 함께 화학적 예방과 같은 적극적인 조치를 취할 수 있게하므로 향후 두경부 악성 종양의 발생을 현저히 줄일 수 있을 것으로 사료된다.

이와 같이 첨단 과학의 발달과 더불어 분자 세포 유전학의 발전은 궁극적으로 암에서 일어나는 모든 유전학적 변화에 대한 분석과 규명을 가능하게 하여 이를 바탕으로 한 암의 예방과 치료에 획기적인 변화가 올 것으로 기대한다.

## 참 고 문 헌

- 1) Bentz M, Huck K, du Manoir S, et al : Comparative genomic hybridization in chronic B-cell leukemias shows a high incidence of chromosomal gains and losses. *Blood* 85 : 3610~3618, 1995
- 2) Cowan JM, Beckett MA, Swan SA, et al : Cytogenetic evidence of the multistep origin of head and neck squamous cell carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 84 : 793~797, 1992
- 3) du Manoir S, Speicher MR, Joos S, et al : Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* 90 : 590~610, 1993
- 4) Gray JW, Pinkel D : Molecular cytogenetics in human cancer diagnosis. *Cancer* 69 : 1536~1542, 1992
- 5) Heim S, Mitelman F : Tumors of the respiratory tract. In *Cancer Cytogenetics*, 2nd Ed. New York, Wiley-Liss, Inc., pp 310~349, 1995
- 6) Hittelman WN : Premature chromosome condensation for the detection of mutagenic activity. In *Cytogenetic Assays of Environmental Mutagens*(ed. Hsu TG),

- New Jersey, Allanheld & Osmun Publishers Inc., pp 353~384, 1982
- 7) Hittelman WN, Voravud N, Shin DM, et al : Early genetic changes during upper aerodigestive tract tumorigenesis. *J Cell Biochem, Supplement 17F* : 233~236, 1993
  - 8) Hittelman WN, Wang ZW, Cheong N, et al : Premature chromosome condensation and cytogenetics of human solid tumors. *Cancer Bull 41* : 298~305, 1989
  - 9) Hopman AHN, Ramaekers FCS, Raap AK, et al : In situ hybridization as a tool to study numerical chromosome aberrations in solid bladder tumors. *Histochem J 89* : 307~316, 1988
  - 10) Hopman AHN, Poddighe PJ, Smeets AWGB, et al : Detection of numerical chromosome aberrations in bladder cancer by in situ hybridization. *Am J Pathol 135* : 1105~1117, 1989
  - 11) Hopman AHN, van Hooren E, van de Kaa CA, et al : Detection of numerical chromosome aberrations using in situ hybridization in paraffin sections of routinely processed bladder cancers. *Mod Pathol 4* : 503~513, 1991
  - 12) ISCN(1985) : An international system for human cytogenetic nomenclature. Report of the Standing Committee an Human Cytogenetic Nomenclature(ed. Harnden DG, Klinger HP, Jensen JT, Kaelbling M), S. Karger, Basel, 1985
  - 13) ISCN(1991) : Guidelines for cancer cytogenetics. Supplement to an International System for Human Cytogenetic Nomenclature(ed. Mitelman F), S. Karger, Basel, 1991
  - 14) Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Sudar D, et al : Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science 258* : 818~821, 1992
  - 15) Liang BC, Meltzer PS, Guan XY, et al : Gene amplification elucidated by combined chromosomal microdissection and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet 80* : 55~59, 1995
  - 16) Nacheva E, Grace C, Holloway TL, et al : Comparative genomic hybridization in acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet 82* : 9~16, 1995
  - 17) Rubin CM : Technical advances in the cytogenetic analysis of malignant tissues. *Cancer 69* : 1567~1571, 1992
  - 18) Rao PN : The discovery(or rediscovery?) of the phenomenon of premature chromosome condensation. *BioEssays 12* : 193~198, 1990
  - 19) Speicher MR, Ballard SG, Ward DC, et al : Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genetics 12* : 368~375, 1996
  - 20) Voravud N, Shin DM, Ro JY, et al : Increased polysomies of chromosomes 7 and 17 during head and neck multistage tumorigenesis. *Cancer Research 53* : 2874~2883, 1993