



CDH1 5' CpG Island Methylation and Reduced Expression of E-Cadherin in Oral Squamous Cell Carcinoma

전북대학교 치과대학 구강병리학교실
부교수 조남표, 민명기

서론

구강 및 인후부 암종은 전세계적으로 사람에서 6 번째로 흔히 발생하는 악성종양으로¹⁾, 약 90%가 편평세포암종이다. 구강 편평세포암종의 가장 중요한 발암인자는 흡연과 음주로 알려져 있으며²⁾, 상피성장인자 및 그 수용체, 세포 내 신호전달인자인 H-ras, 전사인자인 C-myc 등의 종양유전자와 p53과 같은 종양억제유전자들이 분자수준에서 구강 편평세포암종의 발생과 관련된 것으로 보고되어 있다³⁾.

E-cadherin은 상피세포들의 결합구조인 부착띠(zonula adherens)를 구성하는 세포유착 단백질로 세포의 유착, 분화 및 이동에 정상적으로 관여한다. E-cadherin은 인접된 세포의 세포막 표면에 존재하는 동일 E-cadherin 간에 서로 결합하는(homotypic) 특성을 지니며^{4,5)}, 또한 E-cadherin의 세포 내 구조는 β - 또는 γ -catenin과 결합한 후 α -catenin을 통해 세포골격 구조인 actin과 결합한다(Fig. 1).

상피암종 대부분의 발생과정에서 E-cadherin 발현이 감소된다고 보고되어 있으며⁶⁾, 주된 감소기전은 돌연변이, 전사감소, 해독 후(post-translational) 기전 및 catenin의 발현감소 등으로 알려져 있다⁷⁾. 구강암의 경우 Saito 등이 52예의 구강암을 대상으로 CDH1의 돌연변이 유무를 검색한 결과, 돌연변

이가 전혀 없음을 보고한 바 있으며⁸⁾, 최근에는 E-cadherin 단백질 발현 감소기전으로 CDH1 5' promoter 영역에 존재하는 CpG island에서의 과메틸화가 주목되고 있다. 이러한 5' CpG island의 과메틸화는 CDH1 외에도, p53, 세포주기 조절을 통해 세포증식에 관여하는 효소인 p15 및 p16, 여러 종류의 수용체, DNA 수복효소 등 세포증식에 관련된 다양한 유전자들에서 보여진다고 보고되고 있다⁹⁻¹¹⁾.

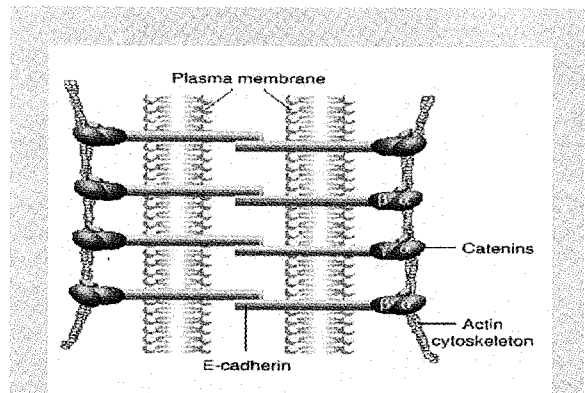


Figure 1. The adherens junction in epithelial tissue consists of a zipper of interdigitating E-cadherin molecules. The figure shows interaction between single E-cadherin molecules from one cell and identical molecules from the adjacent cell, resulting in the formation of anti-parallel dimers. On the cytoplasmic side of the membrane, E-cadherin interacts with either β - or γ -catenin to the actin cytoskeleton.

본 연구는 구강암을 대상으로 methylation-specific PCR을 이용하여 CDH1, p15 및 p16 유전자의 methylation 정도를 분석한 후 면역조직화학적 검색, 병리조직학적 분화도 및 임상적 변수들과 비교, 분석한 결과이다.

본 론

1. 실험예의 임상 및 병리조직학적 특성에 따른 분류

본 실험에 사용된 36예의 구강 편평세포암종 예들을 병리조직학적 분화도 및 임상변수에 따라 구분한 결과(Table 1), 고분화 암종이 21예(58.3%), 저분화 암종에 해당되는 경우는 1예만 존재하였다. 본 연구에 사용된 시료는 종양의 크기, 국소 림프절의 침범 및 임상병기에 따라 아래와 같이 분류되었다.

2. E-cadherin의 면역조직화학적 검색

Table 1. Distribution of 36 oral squamous cell carcinomas according to clinicopathological characteristics

Clinical and histopathological characteristics	No.
Benign epithelial hyperplasia	33
Oral squamous cell carcinoma	36
<u>Histopathological differentiation</u>	
Well-differentiated/Moderately- or Poorly-differentiated	21/15
<u>Tumor size</u>	
T1,T2/T3,T4	14/22
<u>Regional Lymph Node Involvement</u>	
N0/N1,N2,N3	21/15
<u>Clinical staging</u>	
SI,SII/SIII,SIV	10/12

E-cadherin에 대한 면역조직화학적 염색 결과, 구강점막의 증식성 상피조직 및 상피세포 기원의 종양세포는 일반적으로 세포질 주변을 선상으로 둘러싸는 그물모양의 양성반응을 보였다(Fig. 2). 그러나 일부조직은 세포질 주위를 둘러싸는 양성

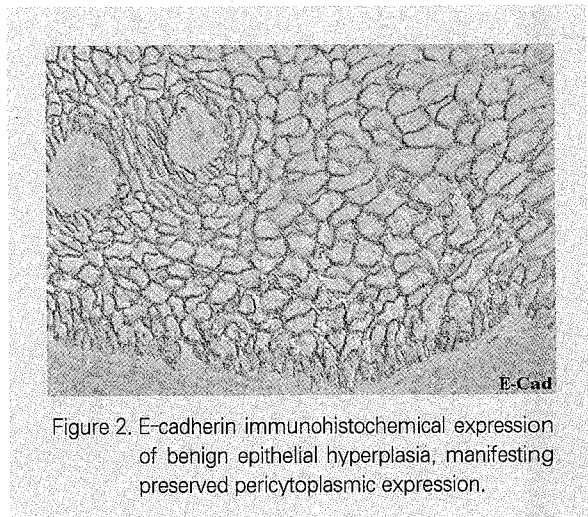


Table 2. E-cadherin expression according to clinicopathological characteristics and methylation status

Clinicopathological Characteristics (sample size)	E-cadherin expression(%) (Mean±SD)	P value
Benign(33) vs. SCC(36)	10.38±5.25 vs. 5.50±3.40	P<0.01**
<u>Squamous cell carcinoma(SCC)</u>		
<u>Histopathological differentiation</u>		
WD(21)/MD or PD(15)	6.75±3.36 vs. 3.73±2.68	P<0.01**
<u>Methylation status of CDH1</u>		
<u>Squamous cell carcinoma</u>		
U(7)/M(5)	6.98±3.31 vs. 4.02±2.79	P<0.01**
<u>Benign epithelial hyperplasia</u>		
U(10)/M(0)		

† Student's t-test: * Statistical significance: p<0.05
WD: well-differentiated, MD: moderately differentiated, PD: poorly differentiated, U: unmethylated, M: methylated.

반응의 연속성이 상실되거나 세포질 내에서 양성 반응을 보였으며, 단백발현이 거의 안되는 경우도 있었다.

실험대상의 면역조직화학적 발현정도를 'analySIS' 영상분석 프로그램을 이용하여 백분율로 측정 후 임상 및 병리조직학적 분류와 methylation 상태에 따라 비교한 결과는 Table 2와 같다. 단백발현의 정도는 편평세포암종이 양성병소에 비해 유의하게 낮았으며, 편평세포암종의 경우 중등도 및 저분화 암종이 고분화 암종보다 단백발

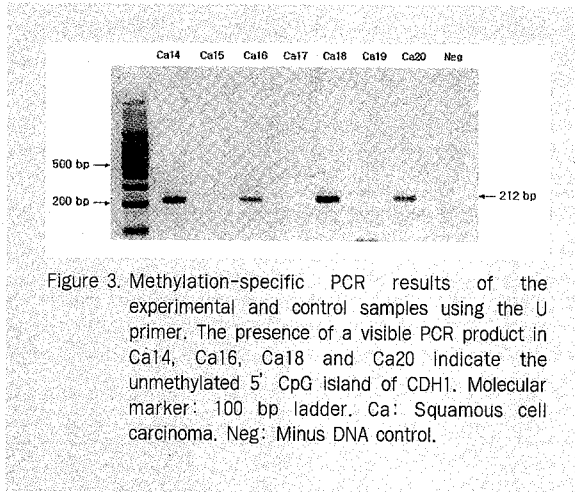


Figure 3. Methylation-specific PCR results of the experimental and control samples using the U primer. The presence of a visible PCR product in Ca14, Ca16, Ca18 and Ca20 indicate the unmethylated 5' CpG island of CDH1. Molecular marker: 100 bp ladder. Ca: Squamous cell carcinoma. Neg: Minus DNA control.

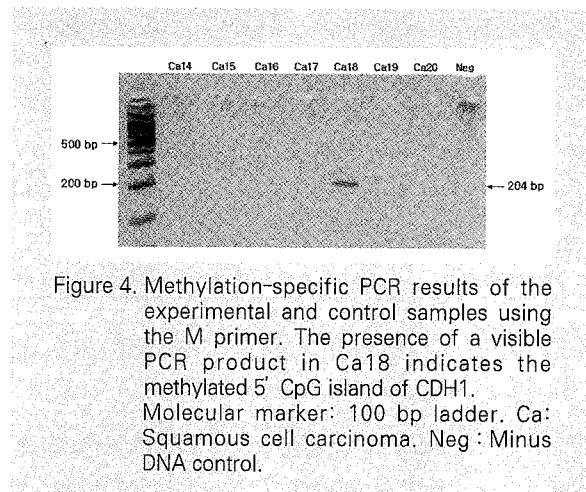


Figure 4. Methylation-specific PCR results of the experimental and control samples using the M primer. The presence of a visible PCR product in Ca18 indicates the methylated 5' CpG island of CDH1. Molecular marker: 100 bp ladder. Ca: Squamous cell carcinoma. Neg: Minus DNA control.

Table 3. Summary of p15 5' CpG island hypermethylation in oral squamous cell carcinomas and benign epithelial hyperplasias

Methylation status	The number of samples	
	Benign epithelial hyperplasia	Squamous cell carcinoma
Unmethylated	0	3
Methylated	4	14
Un-/Methylated	3	1

현이 유의하게 낮았으나, 종양의 크기, 국소 림프절의 침범 및 임상병기에 따른 구분은 유의한 차이를 보이지 않았다. CDH1 유전자의 methylation 상태에 따른 E-cadherin 단백질 발현은 unmethylated 상태가 methylated 상태보다 유의하게 높았다.

3. Methylation-specific PCR (MSP) 실험결과

sodium bisulfite로 unmethylated cytosine을 변형시킨 후 methylation 상태에 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 행한 결과, CDH1 유전자의 경우 10예의 양성병소와 12예의 구강편평세포암종에서 증폭을 보였다(Fig. 3, 4). MSP 결과를 토대로 증폭된 실험대상의 methylation 상태를 분석한 결과, 10예의 양성병소는 모두 unmethylated 상태였으며, 12예의 편평세포암종은 병소는 unmethylated 7예, methylated 5예였다(Table 2). p15 및 p16 유전자를 대상으로 행한 MSP의 결과는 Table 3과 같으

Table 4. Summary of p16 5' CpG island hypermethylation in oral squamous cell carcinomas and benign epithelial hyperplasias

Methylation status	The number of samples	
	Benign epithelial hyperplasia	Squamous cell carcinoma
Unmethylated	6	14
Methylated	0	0
Un-/Methylated	0	1

며, p15 유전자의 경우 악성 및 양성상피성 병소 둘 다 높은 methylation 상태를 보였고, p16 유전자는 거의 unmethylation 상태임을 보였다(Table 3, 4).

결론

이상의 결과를 종합하면, E-cadherin의 발현감소는 구강 편평세포암종의 진행에 영향을 미칠 것으로 보여지며, CpG island의 hypermethylation이 단백질 발현 감소에 부분적으로 관련된다고 여겨진다. 또한 p16의 경우 구강 편평세포암종 및 양성병소에서 hypermethylation 빈도가 매우 낮았으나 p15의 경우는 hypermethylation 빈도가 매우 높게 보여졌다. 이러한 소견을 고려할 때 구강 편평세포암종 및 일부 양성증식성 병소의 진행과정에서 종양억제 유전자들의 유전적 변화 외에 "epigenetic" 기전이 병소유발에 중요한 역할을 할 것으로 예상된다.

참 고 문 헌

1. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer* 1993;54:594-606.
2. Khan FA, Robinson PG, Warnakulasuriya KAAS, Newton JT, Gelbier S, Gibbons DE. Predictors of tobacco and alcohol consumption and their relevance to oral cancer control amongst people from minority ethnic communities in the South Thames health region, England. *J Oral Pathol Med* 2000;29:214-9.
3. Sapp JP, Eversole LR, Wysocki GP. *Contemporary oral maxillofacial pathology*. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc., 1997;174-175.
4. Aberle H, Schwartz H, Kemler R. Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J Cell Biochem* 1996;61(4):514-23.
5. Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7(5):619-27.
6. Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 1999;24(2):73-6.
7. Guilford P. E-cadherin downregulation in cancer: fuel on the fire? *Mol Med Today*. 1999;5(4):172-7.
8. Saito Y, Takazawa H, Uzawa K, Tanzawa H, Sato K. Reduced expression of E-cadherin in oral squamous cell carcinoma: relationship with DNA methylation of 5' CpG Island. *Int J Oncol*. 1998;12(2):293-8.
9. Kang JH, Kim SJ, Noh DY, Park IA, Choe KJ, Yoo OJ, Kang HS. Methylation in the p53 promoter is a supplementary route to breast carcinogenesis: correlation between CpG methylation in the p53 promoter and the mutation of the p53 gene in the progression from ductal carcinoma in situ to invasive ductal carcinoma. *Lab Invest*. 2001;81(4):573-9.
10. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res*. 1999;59(4):793-7.
11. Millar DS, Ow KK, Paul CL, Russell PJ, Molloy PL, Clark SJ. Detailed methylation analysis of the glutathione S-transferase pi (GSTP1) gene in prostate cancer. *Oncogene*. 1999;18(6):1313-24.