

폐암환자의 객담에서 Melanoma Antigen Gene(MAGE)과 Synovial Sarcoma on X chromosome (SSX)의 발현

정언섭, 김송명, 김종인

고신대학교 의과대학 흉부외과학교실

Expression of Melanoma Antigen Gene(MAGE) and Synovial Sarcoma on X Chromosome(SSX) in Sputum of Lung Cancer

Eon-Sup Jung, Song-Myung Kim, Jong-In Kim

Department of Thoracic & Cardiovascular Surgery, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Background : MAGE and SSX genes have been recently discovered as number of cancer/testis antigen, which are showed useful potential for anti-tumor immunotherapy and tumor mark. Expression rates of MAGE genes are disclosed in many cancer cases. Study of expression rate of MAGE and SSX genes in same time in lung cancer cases are rare. We studied about expression of both genes in sputum of lung cancer patients simultaneously.

Material and method : Total 75 cases of patients studied, control group was 32 cases of benign lung disease, 43 cases of lung cancer patients were divided into two groups of non small cell lung cancer and small cell lung cancer groups. Patients sputum collected before treatment and extracted mRNA and identify MAGE genes and SSX genes by nested PCR method. Expression rates of both genes werestudied according to cell types, gender, LN metastasis and cancer stage.

Results : In benign lung disease cases, expression rates of MAGE and SSX genes were 40.6% and 37.5% respectively, and was 12.5% in both genes. The expression rate of MAGE genes is higher in male patients and expression rate of SSX genes is higher in female patients ($p < 0.01$). Expression rate of MAGE genes in NSCLC group was 61.8%, and this is higher than that of control group. In squamous carcinoma, expression rate of MAGE genes is 76.9% and this is higher than that of adenocarcinoma. Expression rate in adenocarcinoma and small cell cancer are lower than control and squamous cell cancer. Expression rate of SSX genes in NSCLC group is 17.6% and is 11.1% in SCLC group. It is lower than that of control group. Expression rate of SSX genes is lower than MAGE genes in lung cancer cases and not found any relationship of expression of between both genes. No significant gene expressions between gender was observed. The present study suspect lymphnode involvement and cancer stage influence on expression of both genes in this study, but not significant statistically. Co-expression rate of both genes are 14.7% in NSCLC group, 11.1% in SCLC group and 12.5% in control group.

Conclusion : MAGE genes are more applicable to diagnosing squamous cell cancer than SSX genes, but it's role seems to be still limited to additive as a mark, because of expression in benign lung disease cases and lower expression rate in small cell carcinoma and adenocarcinoma. Not found any relationship on both gene expression in this study.

Key words : MAGE, SSX, Lung Cancer, Sputum

서론

폐암은 발병 빈도가 높고 사망률이 높은 악성종양이며, 그 발병률이 매년 증가 추세에 있으며 암 사망률에

있어서도 1위의 자리를 점하고 있다.¹⁾ 폐암에 관련된 연구에는 여러 전문적 분야에서부터 폐암 발생과 치료에 까지 완전한 해결을 위하여 노력하고 있으며 그 중 진단과 함께 면역학적인 치료 영역의 연구도 지속되어야 할 현재의 중요한 과제라고 생각된다.²⁾ 종양세포에서도 비교적 특이적으로 발현되는 종양 관련 항원은 종양의 조기 진단이나 면역 치료에 이용하려는 연구가 최근 많이 시도되고 있다.²⁾ 면역요법의 적절성을 알아보기 위해서

교신저자 : 김 송 명

주소: 602-702, 부산광역시 서구 압남동 34번지

고신대학교 의과대학 흉부외과

TEL : 051-990-6236, Fax : 051-990-3066

E-mail : smkim@kosinmed.or.kr

조사되어야 할 항목은 일차적으로 종양세포에서 면역 반응을 유도할 수 있는 종양 항원이 존재하는가이다.³⁾ 종양의 종류에 따라 발현되는 종양 항원의 종류도 다르며, 발현률의 차이는 더욱 다양하다. 또한 종양이 성장하고 진화함에 따라 종양 항원의 발현 양상이 이질성을 보임으로서 발현되는 종양 항원의 종류가 많을수록 치료 방법에서 선택의 폭이 넓어진다.⁴⁾ 종양 고환 항원은 종양 면역에서 중요한 역할을 하며 지금까지 Melanoma Antigen Gene(MAGE)^{5,7)}, GAGE⁸⁾, Synovial Sarcoma on X chromosome(SSX)^{9,11)} 등 20여개의 항원이 발견되었다. 이 중 MAGE는 가장 잘 알려져 있는 종양 고환 항원으로 악성 흑색종 및 여러 악성 종양에서 발현되며, 12개 이상의 유전자로 구성되며 이 중 MAGE A1-6 유전자가 각종 종양에서 비교적 발현률이 높은 것으로 보고되고 있다.^{12,13)} SSX는 활액막 육종에서 18번 염색체의 전위에 관여한다고 최초로 보고되었으나 최근 종양-고환 항원에 속한다고 밝혀졌으며 SSX 1-9까지 9개의 유전자로 구성되어 있다고 밝혀져 있으나 폐암의 분야에서는 아직 밝혀지지 못한 부분이 많다.^{9-11,15)} MAGE와 SSX 유전자의 연구는 대부분 역전사 중합효소연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reactin: RT-PCR)으로 유전자의 아형별로 각각 검출하는 방법이 이용되어져 왔으며 악성 종양의 종류와 조사되어지는 유형에 따라 그 발현 빈도가 보고자마다 다양하다. 그러나 각 유전자의 공통시발체(common primers)를 이용하는 경우에 개개의 아형의 시발체를 이용하여 여러 번 PCR하는 것보다 빠르고 경제적으로 유전자의 발현을 검출할 수 있으며 검출률 또한 높다.^{4,12,14,16)}

종양 주변에 침윤된 림프구가 조직적합 항원의 방법으로 종양 세포를 인지한다는 사실을 통하여 폐암과도 관련된 면역계가 존재한다는 사실이 이미 알려져 있다.¹⁷⁾ 폐암의 종양 항원 발현에 관한 연구가 많지 않으며 발현률을 알아보는 것이 면역 요법실시에 선행되어야 할 것이다. 본 연구의 목적은 폐암 환자의 객담에서 폐암환자의 임상 병리학적인 여러 인자들과 관련된 기능적 역할을 밝히기 위함과 MAGE 1-6와 SSX 1-9의 암 특이성 항원유전자의 표현들을 평가하는 것이다.

재료 및 방법

1. 재료

고신의대 흉부외과학 교실에서 2003년 9월 1일부터 2004년 3월 10일까지 흉부외과와 호흡기내과 에서 치료한 환자 75례를 전체 연구대상으로 하였다.

평균 연령은 57.3 ± 13.99 세이며 최고 85세에서 최저 22세 이었으며 이 중 남자가 57례로 평균연령은 57.8 ± 12.96 세이며 여자가 18례로 평균연령은 56 ± 17.0 세였다. 폐암 환자는 43례로 평균 연령은 60.7 ± 11.69 세이며 이 중 편평세포암종 26례, 선암이 8례로 합하여 비소세포암종이 34례이며, 소세포암종은 평균연령 62.4 ± 8.6 세이며 9례 이었다.

대조군으로는 양성폐질환 및 폐염, 기관지염과 같은 염증성 질환을 합한 32례(평균연령은 51.2 ± 14.84 세)를 연구 대상으로 하였다(Table 1).

Table 1. General characteristics and experimental groups

Total cases(mean age±S.D. yrs)		75	(57.08±14.12)
Male(mean age±S.D. yrs)		57	(57.68±12.96)
Female(mean age±S.D. yrs)		18	(55.17±17.58)
Age range(yrs)		22~85 yrs	
I	Malignant cases	Lung cancer group	43 (Male: 35, Female: 8)
		(mean age ±S.D. yrs)	(60.7±11.73)*
		NSCLC group	34 (60.24±12.49)
II		(SCC+AC)	
		SCLC group	9 (62.4±8.60)
III		Control group	32 (Male: 22, Female: 10)
		(Benign or	(51.2±14.84)*
		inflammatory groups)	

NSCLC=Non small cell lung cancer SCC=Squamous cell carcinoma

SCLC= Small cell carcinoma

AC=Adeno carcinoma S.D : standard deviation yrs : years

*P<0.01 NSCLC group VS Control group

확진 방법은 기관지경 검사, 경피하폐생검과 수술 등으로 채취한 병리학적 조직 검사에 의하여 이루어졌으며 모든 환자로부터 수술 전 채취한 객담들을 본 연구의 시료로 사용하였다.

2. 방법

(1) 객담의 채취와 mRNA의 분리

객담에서 MAGE A mRNA의 발현을 보는 시기는 치료 전 객담검사로 하였으며 객담을 얻는 방법은 환자로 하여금 기침을 강하게 하여 가능한 많은 세포가 객담에

떨어져 나오도록 한후 50 ml 시험관에 객담을 빨게한다. 객담 처리법은 이강대 등, 전상훈 등이 고안한 방법으로서 객담의 액화, 세포용해 및 RNA 보존 등을 동시에 실시할 수 있는 방법이다. 이를 간략히 기술하면 50 ml 시험관에 모아둔 객담에 3-5 ml 정도의 보존제(Guanidium thiocyanate, Triton X-100)를 넣고 강하게 혼합하여 완전히 액화시킨다. Magnetic bead(AB-gene, Epsom, U.K) 150 μ l(7.5 mg)을 액화된 객담에 주입하고 30분간 실온에 혼합하면서 방치한 다음 1,100rpm에서 2분간 원심하여 상층액은 버리고 세척액으로 magnetic bead를 부유시켜서 1.5ml 시험관으로 옮긴다. 4회 세척한 다음 세척액을 모두 제거하고 magnetic bead에 결합된 핵산은 용출액으로 부유시킨 다음 이를 70°C에서 1400rpm으로 10분간 혼합한다. 부유된 용출액은 새 시험관에 옮긴 다음 biotin이 결합된 oligo (dT) 20 (10 pmol/ μ D 3 μ l를 혼합한 핵산 결합 시약 150 μ l를 상기 시험관에 주입한다. SMP (Streptavidin Magnetic Particles, 10mg/ml, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 완전히 부유시키고 보존용액을 제거한 다음 혼합된 핵산 용출액을 주입하여 37°C에서 10분간 반응시킨다. SMP 세척액을 주입하여 3회 세척하고 자석으로 SMP를 붙인 다음 상층액을 제거한다. 핵산 분해효소가 함유되지 않은 3차 증류수를 20 μ l 가하여 SMP를 부유시킨 다음 70°C에서 2분간 반응시켜 mRNA를 용출한다.

(2) 역전사(Reverse Transcription, RT) 및 nested PCR

역전사(Reverse transcription)에 의한 cDNA의 합성 5X RT buffer 3 μ l, 10 mM dNTP mix 1.5 μ l, MMLV 역전사 효소(200 U/l, Promega USA) 0.5 μ l, RNase inhibitor (40 U/L Promega USA) 0.5 μ l, 100 pM oligo dT primer 1.5 μ l를 PCR tube에 넣어 RT-mixture를 만들었다. RT-mixture에 mRNA 용액 13 μ l첨가한 뒤 mineral oil을 한방울 떨어뜨리고 실온에 10분간 두었다. 이 시험관을 42°C에서 60분간 염처리하여 cDNA를 합성하고 이 cDNA를 일차 PCR에 이용하였다.

(3) MAGE A1-6 유전자에 대한 일차 PCR

GAPDH(sense:CGTCTTCACCACCATGGAGA, antisense:CGGCCATCACGCCACAGTT T)를 사용하여 mRNA가 성공적으로 분리된 것을 확인한 후에 MAGE A1-6 gene에 대한 PCR을 시행하였다. 먼저 10X PCR

buffer 3 μ l, 25mM MgCl₂ 1.8 μ l, 10 mM dATP 0.3 μ l, 10mM dGTP 0.3 μ l, 10mM dTTP 0.3 μ l, 10mMdCTP 0.3 μ l, 50 μ m sense 및 antisense primer 0.25 μ l, Taq polymerase (5 U/ μ l, promega Co.,USA)0.25 μ l를 혼합하고 여기에 증류수를 넣어 최종 용액량이 25 μ l되게 하여 PCR mixture를 만들었다. PCR mixture를 PCR tube에 넣고 여기에 역전사 반응물을 5 μ l넣어 혼합하였다. 다음 mineral oil을 1방울 떨어뜨리고 PCR 기계 (Cetus 480, Perkin Elmer Co.,USA)에 넣어 다음의 조건으로 C1/C2 common MAGE primer를 이용한 1차 PCR을 실시하였다. 먼저 94°C에서 5분간 가열한 후 94°C에서 30초, 57°C에서 45초, 72°C에서 45초를 1 cycle로 하여 35cycle 반응시켜 cDNA를 증폭시켰으며 최종적으로 72°C에서 5분을 처치하여 PCR을 완료하였다(Table 2).

Table 2. Common primers for MAGE 1-6 by nested RT-PCR

MAGE Common	Oligonucleotide sequence
1 sense	CTGAAGGAGAAGATCTGCC
2 antisense	CTCCAGGTAGTTTTCCTGCAC
3 sense	CTGAAGGAGAAGATCTGCCWGTG
4 antisense	CCAGCATTTCTGCCTTTGTGA

(4) MAGE A1-6 유전자에 대한 nested PCR

일차 PCR 산물을 증류수로 10배 희석한 후 nested PCR에 사용하였다. 상기한 바와 같이 PCR mixture에 희석한 PCR 산물 2 μ l와 증류수를 3 μ l첨가하였다. PCR 시액이 들어있는 시험관에 mineral oil을 1방울 떨어뜨린후 PCR machine에 넣어 다음의 조건으로 C3/C4 primer를 이용하여 nested PCR을 실시하였다. 먼저 94°C에서 5분간 가열한 후 94°C에서 30초, 57°C에서 45초, 72°C에서 45초를 1 cycle로 하여 35cycle 반응시켜 cDNA를 증폭시켰으며 최종적으로 72°C에서 5분을 처치하여 PCR을 완료하였다. 1% agarose gel에 PCR 산물을 점종하고 전기영동 한뒤 자외선 투시(UV transilluminater)를 이용하여 관찰하였다.

(5) SSX 1-9 공통 시발체를 이용한 1,2차 PCR

94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 30초를 1cycle 로 하여 25 cycle 반응시켜 DNA를 증폭시켰으며 72°C에서 5분간 반응시킨 후 완료하였다. 2차 PCR은 1차 PCR산물을 DW로 10배 희석한 후 이 PCR산물 2 μ l에 DW3 μ l이 들어있는 시험관에 mineral oil 1방울을 넣은 후 94°C에서

2분간 가열한 후 94℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 30초를 1cycle로 하여 25cycle로 반응시켰으며 72℃에서 5분간 처치하여 완료하였다. 나머지는 MAGE 반응과 동일하였다(Table 3).

Table 3. Common primers for SSX 1-9 by nested RT-PCR

SSX Common	Oligonucleotide sequence
1st set	
sense	GTGCCATGAACGGAGACGA
Antisense	GTCTGTGGGTCCAGGCATGT
2nd set	
sense	GTGCCATGAACGGAGACGA
Antisense	TGTTTCCCCCTTTTGGGTCC

(6) 통계처리방법

연구대상에서 MAGE A 유전자와 SSX 1-9 유전자 발현의 통계학적 유의성에 대해서는 χ^2 -test를 사용하였고 $p < 0.05$ 일때 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 실험대상군 및 성별에 따른 평균 연령

전체 75례의 평균 연령은 57.08 ± 14.12 세이었고, 악성 원발성 폐암 환자 43례의 평균 연령은 60.7 ± 11.73 세이며, 비암성 대조군 32례의 평균 연령은 51.2 ± 14.84 세로서 약 9.5세 정도의 차이가 있었다($p < 0.01$). 비소세포암종 34례와 소세포 폐암종 9례 사이에는 소세포 폐암종 환자에서 약 2세 정도 차이가 많았다(Table 1).

2. 대조군 비암성 환자에서의 MAGE 1-6 와 SSX 1-9 유전자의 발현

비암성 대조군 32례 중 MAGE 1-6 유전자 양성률은 14례로 43.8%이었으며, SSX 1-9 유전자 양성률은 8례로 25.0%이어서, MAGE가 SSX보다 높은 양성률을 보였다. 양 유전자 모두에 양성률은 4례로 12.5%이었다. 남녀 성별에 따른 차이를 보이고 있는데 MAGE 1-6 유전자 양성률은 남자는 11례로 50.0%, 여자는 3례로 30%이며, SSX 1-9 유전자 양성률은 남자가 9.1%, 여자에서는 60%이었다. MAGE 1-6 유전자는 남성에서, SSX 1-9 유전자는 여성($P < 0.01$)에서 높게 나타났다(Table 4).

Table 4. The expression of MAGE 1-6 and SSX 1-9 in non-cancer control group

	MAGE 1-6(+)			SSX 1-9(+)			Both(+)
	Male [†]	Female [‡]	Total [§]	Male [†]	Female [‡]	Total [§]	
	(T=22)	(T=10)	(T=32)	(T=22)	(T=10)	(T=32)	(T=32)
Positive rates	11	3	14	2	6	8	4
%	50.0	30.0	43.8	9.1	60.0	25.0	12.5

* $P < 0.01$ SSX 1-9 male VS female

[†] $\chi^2 = 0.863$ $P = 0.537$ Male MAGE VS SSX

[‡] $\chi^2 = 0.833$ $P = 0.650$ Female MAGE VS SSX

[§] $\chi^2 = 0.066$ $P = 1.0$ MAGE VS SSX

3. 조직 진단명에 따른 MAGE 1-6와 SSX 1-9 유전자의 발현

제 1군 비소세포 폐암 34례 중 MAGE 1-6 유전자 양성률이 21/34례로 61.8%이었고, 이 중 편평세포암종에서는 20/26례로 76.9%이며 선암은 1/8례 12.5%이었다. 제 2군 소세포암종 9례 중 MAGE 1-6 유전자 양성률은 3/9례로 33.3%이었다. MAGE 1-6 유전자는 대조군 32례의 14/32례 43.8%에 비해 제 1군 비소세포암종과 편평세포 암종은 높은 양성률을 보이므로 대조군과 제 1군 사이에($p < 0.01$) 그리고 대조군과 편평세포암종간에($p \leq 0.008$) 유의한 차이가 있었으며, 선암과 소세포암종은 대조군에 비하여 오히려 양성률이 낮았다. SSX 1-9 유전자 양성률은 제 1군 비소세포암종은 6/34례로 17.6%이었고 그 중 편평세포암종이 4/26례로 15.4%, 선암이 2/8례로 25%이었다. 제 2군 소세포암종은 1/9례로 11.1%이었다. 대조군 8/34례 25.0%에 비하면 모두 낮은 양성률을 나타내었다. MAGE 1-6와 SSX 1-9 유전자의 양성률들은 통계적으로 유의한 의미는 없었으나 레수를 증가시키면 유의성이 있을 가능성이 있다(Table 5).

Table 5. The expression of MAGE 1-6 and SSX 1-9 genes according to histologic diagnosis

Groups	Number of patients	MAGE 1-6		SSX 1-9	
		+(%)	- (%)	+(%)	- (%)
I NSCLC group	34	21(61.8)*	13(38.2)*	6(17.6)	28(82.4)
Squamous cell carcinoma	26	20(76.9)	6(23.1)	4(15.4)	22(84.6)
Adeno carcinoma	8	1(12.5)	7(87.5)	2(25)	6(75)
II SCLC group					
Small cell carcinoma group 9	9	3(33.3)*	6(66.7)*	1(11.1)	8(88.9)
III Control group					
Non-cancer benign or inflammation	32	14(43.8)	18(56.2)	8(25.0)	24(75.0)

NSCLC= nonsmall cell carcinoma

SCLC= small cell carcinoma

* $P \leq 0.01$ MAGE 1-6 NSCLC VS Control

4. 편평세포암종 환자에서 MAGE 1-6와 SSX 1-9 유전자 발현

비소세포암종 환자 중 편평세포암종 26례만을 대상으로 하여 MAGE 1-6 유전자와 SSX 1-9 유전자 양성률을 성별로 분석한 결과는 MAGE 1-6 유전자 양성률은 26례 중 19례로 73.1%이며 남자 중에는 14/20례 70%, 여자는 5/6례 83.3%의 차이를 보이며, SSX 1-9 유전자 양성률은 26례 중 4례로 15.4%이며 남자는 15%, 여자는 16.7%를 보이고 있다. MAGE 1-6와 SSX 1-9 유전자 양성률이 남녀간에는 유의성이 없었다 (Table 6) ($p \leq 0.922$).

Table 6. Positive rates of MAGE 1-6 and SSX 1-9 in squamous cell carcinoma

	Male	Female	Total
MAGE 1-6			
Positive	14/20 [†]	5/6 [†]	19/26
%	70	83.3	73.1
SSX 1-9			
Positive	3/20 ^{*†}	1/6 ^{*†}	4/26
%	15	16.7	15.4

^{*} $\chi^2=0.392$ P=1.0 Kappa=0.1 P=0.531 MAGE 1-6 VS SSX 1-9

[†] $\chi^2=12.379$ P=0.001 MAGE 1-6 VS SSX 1-9 of male

[‡] $\chi^2=5.333$ P=0.080 MAGE 1-6 VS SSX 1-9 of female

[§] $\chi^2=0.417$ P=0.646 MAGE 1-6 male VS female

^{||} $\chi^2=0.010$ P=0.922 SSX 1-9 male VS female

5. 임파절 전이 환자에서 MAGE 1-6와 SSX 1-9 유전자 발현

임파절 전이가 있는 N₁과 N₂ 병기 이상의 폐암환자 20례에서 MAGE 1-6 유전자 발현률은 10/20례로 50%이었고 SSX 1-9 유전자 발현률은 3/20으로 15%이었으며 양자 모두에 양성인 경우는 1례가 있었으며, 임파절 전이 환자에서 병기 진행함에 따라서 발현간의 차이가 없었다(Table 7).

Table 7. Positive rates of MAGE 1-6 and SSX 1-9 in the cases of lymphnode involvement

	Number of positive(%)	Number of negative(%)
MAGE 1-6	10(50)	10(50)
SSX 1-9	3(15)	17(85)
MAGE 1-6 and SSX 1-9	1(5)	8(40)

6. 병기에 따른 폐암 환자의 발현

폐암 병기가 확진된 환자 34례에서 I-II 병기이하와 III-IV 병기로 임의로 나누어 MAGE 1-6와 SSX 1-9 유전자의 양성률을 조사하였다. MAGE 1-6 유전자에서는 I-II 낮은 병기에서 15/24례로 62.5%이었고, III-IV 진행된 병기에서 5/10례로 50%의 양성률을

보였으며 전체적으로는 20/34례로 58.8%의 양성률이였다. SSX 1-9 유전자에서는 I-II 낮은 병기에서 3/24례로 12.5%이었고, III-IV 진행된 병기에서 3/10례로 30%로 병기의 진행에 따라 양성률이 증가하였으나 유의성은 없었다(Table 8).

Table 8. Positive rates of MAGE & SSX genes according to confirmed cancer stage

Stage	MAGE 1-6 [*]		SSX 1-9 [†]	
	Positive(%)	Negative(%)	Positive(%)	Negative(%)
I - II	15(62.5)	9	3(12.5)	21
III - IV	5(50.0)	5	3(30.0)	7
Total	20(58.8)	14	6(17.6)	28

^{*} $\chi^2=0.455$

P=0.704

[†] $\chi^2=1.487$

P=0.328

Table 9. Co-expression of MAGE 1-6 and SSX 1-9 in lung cancer

	No. of positive cases(%)				co-expression	
	MAGE 1-6	mRNA gene	SSX 1-9	mRNA gene		
NSCLC	21/34	61.8%	6/34	17.6%	5/34	14.7%
SCLC	3/9	33.3%	1/9	11.1%	1/9	11.1%
Control	14/32	43.8%	8/32	25.0%	4/32	12.5%

No. : number

7. MAGE 1-6와 SSX 1-9 양 유전자 발현

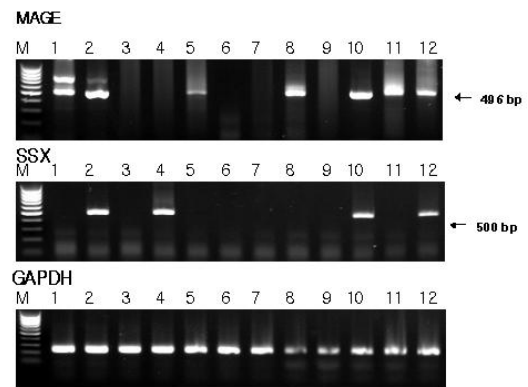


Fig. 1 Electrophoretic analysis of nested RT-PCR amplification products with common primers

Detection of MAGE and SSX mRNA in the sputum of the lung cancer and control patients.

M: Size marker GAPDH. Lane 1-12. Expression of MAGE and SSX are noted in lung cancer.

폐암환자에서 MAGE 1-6와 SSX 1-9 유전자 모두에 양성을 보인 경우가 제 1군 비소세포암종 환자에서는 5/34례로 14.7%이었고, 제 2군 소세포폐암 환자에서는 1/9례로 11.1%의 양성률을 나타냈으며, 제 3군

대조군에서는 4/32례로 12.5%의 양성률을 보여 제 I군, 제 II군, 그리고 제 III군의 높은 순서이었다(Table 9).

고 찰

폐암의 사망률이 최근 학계의 관심으로 증가하고 있으며 치료법 중 수술은 지금까지는 완전 절제를 하기 위한 방향으로 시도되어 왔으나 현실적으로 완전 절제가 불가능할 경우가 많으며 그로 인한 재발률의 증가가 또한 심각한 문제이다. 뿐만 아니라 진단시에도 과거보다는 수술 성공률이 25-40% 이상으로 향상된 것은 사실이나 아직까지도 수술불가능한 경우가 상당하다는 것은 모두가 인정하는 현상이며, 5년 생존률은 15% 미만에 머물고 있다. 심지어 심폐기능의 부전으로 인한 문제와 고령으로 인한 것들과 합하여 사실상 수술적 치료 자체도 근치적 수술도 적용되지만 경우에 따라서는 제한적 절제술로 진행되기도 한다.^{18,19)} 폐암의 생존률은 조기 발견하여 수술할 경우 약 70%의 완치률을 얻을 수 있으나¹⁷⁾, 폐암 조기 발견을 위한 mass screening이 사망률을 낮추지 못하였고 효과가 없는 것으로 결론이 났다. 그러므로 조기 발견을 위한 무증상 고위험군에는 American cancer society에서는 개인적인 검진을 권하고 있어서, 면역학적 또 분자 암 표지자와 같은 새로운 방법을 모색하여야 할 시점에 와 있다.^{20,21)} 이와 같은 검사법 중 하나는 객담 또는 기관지 폐포세척액에서 분자 생물학적으로 폐암 세포를 검출하는 방법이다. PCR 방법을 이용하여 객담 또는 기관지 폐포세척액의 세포에서 간 혹은 p53 암 유전자의 돌연변이를 검사하는 방법으로 아직은 감수성이 높지 않은 실정이다.²¹⁾ 객담은 호흡기 질환시 일차적으로 나타나는 증상이며 소견이다. 객담을 이용한 검사는 오래전부터 진단에 이용되어 왔으며, 그 장점으로는 가장 쉽게 얻을 수 있고 높은 진단적 예민성과 여러번 반복하여 검체를 얻을 수 있으며 검사비가 기관지경 검사나 침습적인 검사법에 비하여 1/10 혹은 1/20 이하로 저렴하다는 데 있다. 객담을 채취하는 방법으로는 자발적인 기침으로도 좋은 결과를 얻을 수 있지만 인위적으로 유발시키는 방법이 많이 사용된다. 객담을 검사시까지 보관하는 방법으로는 Saccomanno 보존제²²⁾를 이용한 고정액이 사용되기도 하나 증기화된 생리 식염수와 propylene glycol 의 혼합물을 사용하기도 한다. 객출해내는 세포성분으로는 호흡 상피, 기관지

점막세포, 폐포, 말초기관지, 대식세포와 염증성 세포들이다. 경우에 따라서는 암세포가 포함되지 않을 수 있고, 타액이 많이 함유되므로 세포수가 적어질 수 있으며, 무기폐로 인하여 암세포 배출이 차단 될 수도 있으므로 1회 객담에서 진단률은 50% 정도이며 3회 검사를 한다면 90%까지 진단률을 증가시킬 수 있다. 확진된 폐암 환자의 객담검사에서도 폐암 진단률은 비유발 객담에서는 52% 정도이나, 유발된 객담에서는 84%까지 증가시킬 수 있다.¹⁷⁾ 암유전자에 대한 검사의 시료에는 종양 조직²³⁻²⁵⁾을 이용하는 방법과 폐암 세포주에 대한 방법^{3,12,23,26)}과 체액을 이용하는 방법등이 있으나 저자는 이강대, 진상훈등¹³⁾과 같이 객담을 이용하였다. MAGE 항원이 백신개발 대상으로 적합한 이유를 박종욱¹⁴⁾ 등은 2가지 이유로 설명하고 있다. MAGE는 CTL(Cytolytic T lymphocytes)을 유발할 수 있는 항원으로 MAGE의 일부 항원 결정기는 조직적합항원 더불어 전달되며 이러한 전달이 CTL을 유발시킬 수 있다고 한다. 둘째는 항원의 발현 특이성으로서 MAGE는 고환을 제외한 정상조직에서는 표현되지 않기 때문에 상당한 암특이성이 있다고 생각되기 때문이다. 그러나 MAGE 유전자에 대한 면역 치료가 가능해진 시점에 그 효과가 성공적이었다면 이미 몇 개의 종양의 완전 분해나 치료의 혁신을 이루었을 것이나 현재까지는 완전히 성공적이지는 못하다는 결론이 저자의 견해이다. 임상적 진단과정에서 객담 MAGE 검사 양성은 조직학적 진단없이 폐암이라고 확진하고 있지 못하고 다만 보조적인 역할 수준에 머물고 있음을 들 수 있다. 이와 같이 MAGE는 이미 종양 표지자로서 위치를 거의 확보한 상태이나 SSX는 현재까지는 미흡한 상태에 있다. MAGE나 SSX 유전자들은 모두 multigene family이므로 MAGE 유전자는 염색체에 존재하는 위치에 따라 A, B, C, D 등으로 분류하고 그 중 A는 적어도 12개 이상의 유전자로 구성되며 chromosome Xq 28번에 위치하고 있음이 밝혀져 있다.^{27,28)} SSX 유전자는 활막 육종에서 18번 X 염색체의 전위에 관여한다고 최초로 보고된²⁹⁾ 이래, 1-9번까지의 9개의 완전한 유전자로 구성되어 있고¹⁶⁾ 유전자 Sp II 위에 위치하면서 다양한 조직학적 아형과 암의 vaccine-bases 면역 치료의 연구 발전에 이용되고 있다.^{15,26)} MAGE와 SSX 유전자는 고환 내에서 정상적으로도 표현되고 있으며 초기에는 어느 정상 조직에서도 발현이 안되는 것으로 알려졌다나 동시에 여러 인체 종양에서나 최근에는 여러 정상 조직에서도

나타나고 있다.³⁰⁾ 저자의 연구에 MAGE 1-6와 SSX 1-9을 동시에 선택한 이유는 첫째 양자 모두 암/고환 항원에서 기원한다는 것과 둘째는 두 조직적합 complex class 1 molecules이 아니므로 암 면역 치료를 위한 약속이 될 수 있는 가능성 때문이다. 또한 MAGE 1, 3와 NY-ESO-1은 이미 peptides 사용하여 임상에서 시행된 바 있으나 SSX에 대해서는 보고된 바가 없다.

MAGE 유전자의 경우 양성종양 환자에서도 발견되는 현상을 볼 수 있는데 이러한 것은 악성과 양성 종양을 감별하는 데는 매우 불리한 조건이다. 저자들의 비암성 질환인 제 III, 대조군안에는 폐결핵 결핵종, 고립성 폐결절, 염증과 anthracosis 같은 질환이 포함되어 있었다. 저자의 연구결과 MAGE는 가양성 발현이 40.6%, SSX는 37.5%으로 조사되었다. 이러한 대조군의 결과는 이강대 등⁴⁾, 전상훈 등¹³⁾의 결과 보다는 매우 높은 상이한 결과라고 생각되고 검토의 기회가 되어야 할 것이다. 이강대 등⁴⁾은 위양성의 원인으로는 nested RT-PCR의 높은 민감도, 검사 과정에서 발생할 수 있는 RNA의 오염, 객담내 세포의 초기암화 과정인 dysplasia나 세포분열 등이 관련될 수 있다고 지적하고 있다. 저자는 추가하여 폐결핵의 염증으로 인한 조직의 치즈양 괴사가 영향을 주었을 것으로 보이며 또한 시료의 보관에 문제가 있을 수 있다고 생각된다. MAGE 유전자의 표현은 promotor 부위 내 CPG sites의 탈methyl화에 의하여 이루어지므로^{25,26)} 암조직 뿐만 아니라 결핵의 치즈양 괴사나 객담 시료의 장기간 보관으로 인한 세포변성으로 가양성률이 증가할 가능성이 있을 것으로 생각된다. 그러므로 염증, 특히 결핵성 염증인 치즈양 괴사에 대한 연구가 추후 이루어져야만 할 것이다. 그러나 모든 악성종양에서 발현된 것이 아니라 양성 종양에서도 발현되었기 때문에 보조인자로 이용되어야 할 것이며 MAGE가 SSX 보다 적용 범위와 암특이성 측면에서 보다 바람직한 표적 종양 항원으로 추정된다. 이강대 등⁴⁾, 전상훈 등¹³⁾, 박종욱 등¹⁴⁾은 초기 두경부암종에 대한 암표지자로서 MAGE를 연구해 왔으나 오히려 폐암으로 또는 타장기의 암종으로 연구들의 범위들이 파급되고 있으나 저자의 성적으로는 편평세포암종에 더욱 예민한 표지자로서 의미가 있다고 확인하였다. MAGE에 대한 연구 결과들은 많은 편이나 SSX에 대한 연구결과는 매우 미흡하고 MAGE와 SSX 함께 연구한 경우는 매우 드물다. 현재까지 알려진 결과들은 매우 높은 발현률들을 보고하여 약 76%,

80%¹³⁾까지 보고하고 있으며 저자가 본 논문에서 보고한 MAGE 1-6 유전자 발현률이 비소세포 폐암에서 16.8%와 편평세포암종에서 76.9%로서 타 연구자들과 거의 유사한 성적을 보이고 있었다. 편평세포암종에서 역시 최고로 높고 선암이나 소세포암종에서는 보다 낮은 것으로 되어 있는 것은 저자 결과의 경향과는 같으나 절대 수치에 많은 차이를 보이고 있다. MAGE와 SSX 유전자가 표현 기전이 매우 유사하면서도 서로 상관관계가 없다는 사실은 Tajma 등¹⁶⁾이 처음 기술한 바 있으며 저자의 연구에서도 동일한 결론을 내린 바 있다. 두 가지 유전자에 모두 양성일 발현률에 대하여 본 연구에서는 제 I군 14.7%, 제 II군 11.1%, 대조군이 12.5%로서 전상훈 등¹⁵⁾의 34.1%, Tajma 등¹⁵⁾의 54%정도이나 이들의 성적은 모두 폐암조직에서 나온 성적이므로 높았던 것으로 보이며 저자의 성적은 객담에서의 성적으로 좀더 낮았으나 향후 면역 치료에 도움이 될 것으로 추정된다.

결론

MAGE가 SSX 보다도 편평세포암종의 폐암에 발현률이 높았으며 소세포암종이나 선암에서와 같은 폐암형에 낮게 발현되며, 양유전자의 발현은 연관성이 없이 독립적으로 기능하며, 양성종양이나 대조군에서도 발현이 되고 있기 때문에 아직은 보조적인 표지자로 이용되어야 하고 본 종양 항원을 이용한 진단 및 면역 치료에는 더욱 세밀한 연구가 필요하다고 생각된다.

참고문헌

- 1) 통계청. 2006년 사망원인 통계결과. 2007.
- 2) McWilliams A, MacAulay C, Gazdar AF, Lam S: Innovative molecular and imaging approaches for the detection of lung cancer and its precursor lesions. *Oncogene* 21: 6949-59, 2002
- 3) Lucas S, De Smet C, Arden KC: Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis. *Cancer Res.* 58: 743-52, 1998
- 4) 이강대, 손성완, 문효성, 이영수, 정언, 김주연, 이환호, 장희경, 전창호, 박종욱: 두경부암환자의 객담으로부터 Common MAGE primer를 이용한 MAGE A1-6 mRNA의 검출의 의의 - 예비보고. *Korean J. Otolaryngol* 46: 1076-6, 2003
- 5) van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P: A gene coding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254: 1643-4, 1991
- 6) Chomez P, De Backer O, Bertrand M: An overview of the

- MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res.* 61(14): 5544-51, 2001
- 7) Thurmer B, Haendle I, Roder C: Vaccination with MAGE-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced IV melanoma. *J Exp. Med.* 190: 1669-78, 1999
 - 8) De Backer O, Arden KC, Boretto M: Characterization of the MAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testes. *Surg. Oncol* 67(2): 126-9, 1998
 - 9) Chen Y-T, Scanlan MJ, Obata Y, Old LJ: Identification of human tumor antigens by serological expression cloning (SEREX). in Rosenberg. *Biologic Therapy of cancer*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 557-70, 2000
 - 10) Clark : Identification of novel genes. SYT and SSX. involved in the (X:18)(p11.2;q11.2) translocation found in human synovial sarcoma. *Nat. Genet* 7: 502-0, 1994
 - 11) Crew AJ : Fusion of SYT to two genes. SSX1 and SSX2. encoding proteins with homology to the Kuppel-associated box in human synovial sarcoma. *EMBO* 14:2333-40, 1995
 - 12) Tahima K, Obata Y, Tamaki H : Expression of cancer/testis(CT) antigens in lung cancer *Lung cancer* 42:23-33, 2003
 - 13) Jheon S, Hyun D, Lee S : Lung cancer detection by a RT-nested PCR using *Lung cancer* 43: 29-37, 2004
 - 14) Park J, Kuon T, Kim I : A new strategy for the diagnosis of MAGE-expressing cancers. *J. Immunological Methods* 266: 79-86, 2002
 - 15) Tornkvist M, Brodin B, Bartolazzi A, Larsson O : A novel type of SYT/SSX fusion ; Methodological and biological implications. *Mod Pathol* 15: 679-85, 2002
 - 16) Gure AO, Wei JJ, Old LJ, Chen Y : The SSX gene family; characterization of 9 complete genes *Int. J. Cancer* 101: 448-53, 2002
 - 17) Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH, Turrisi AT: *Lung Cancer. Principles and practice*. Philadelphia. Lippincott-Raven Co. 145: 382-95, 1996
 - 18) Miller JL, Grossman GD, Hatcher CR : Pulmonary function criteria for operability and pulmonary resection. *Surg Gynecol Obstet.* 153: 893-95, 1981
 - 19) Lee W, Benedict DT, Thomas A, Donna M : Limited resection for non-small cell lung cancer: Observed local control with implantation of I-125 brachytherapy seeds. *Ann Thorac Surg.* 75: 237-43, 2003
 - 20) Eddy D : Screening for lung cancer. *Ann Intern Med* 111: 232-37, 1989
 - 21) McWilliam A, MacAulay C, Gazdar AF, Lam S : Innovative molecular and imaging approaches for the detection of lung cancer and its precursor lesions. *Oncogene* 21 : 6949-59, 2002
 - 22) Saccomanno G, Saunders R, Ellis H : Concentration of carcinoma or atypical cells in sputum. *Acta Cytol(Baltimore)* 7: 305, 1963
 - 23) Chi SN, Cheung NK, Cheung IY : Expression of SSX-2 and SSX-4 genes in neuroblastoma. *Int. J. Biol Markers* 17(4): 219-23, 2001
 - 24) Weyants P, Lethe B, Brasseur F, Marchand M, Boon T : Expression of MAGE genes by non-small-cell lung carcinomas. *Int J Cancer* 56: 826-9, 1994
 - 25) Marchand M, Weynants P, Rankin E : Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3. *Int J Cancer* 63:883-5, 1995
 - 26) Gure AO, Tureci O, Sahin U : SSX a multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer. *Int J Cancer* 72: 965-71, 1997
 - 27) Nathalie Z, Laurence L, Francis B : DNA microarray to monitor the expression of MAGE-A genes. *Clin Chem* 48:25-34, 2002
 - 28) De Plaen E, Arden K, Traversari C : .Structure chromosomal localization and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 40: 360-9, 1994
 - 29) Marchand M, van Naren N, Weynants P: Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer.* 80: 219-30, 1999
 - 30) Yamada A, Kataoka A, Shichiyo S : Expression of MAGE 1, MAGE 2, MAGE-3/-6 and MAGE-4a/-4b genes in ovarian tumors. *Int J Cancer* 20:64(6): 338-93, 1995