

갑상선암에서 MAGE 1-6 mRNA를 검출하는 MAGE common primer의 의의

남철우, 최영식, 박요한, 이강대¹⁾

고신대학교 의과대학 내과학교실, 이비인후과학교실¹⁾

Significance of MAGE Common Primers Detecting MAGE 1-6 mRNA in Thyroid Cancers

Chul-Woo Nam, M.D., Young-Sik Choi, M.D., Yo-Han Park, M.D., Kang-Dae Lee, M.D.,¹⁾

*Department of Internal Medicine, Department of Otolaryngology¹⁾
Kosin University College of Medicine, Pusan, Korea*

Abstract

Background: MAGE (melanoma antigen gene) was named as cancer/testis specific antigens since their expression is only detected in the testis or cancer cells. Because of their relatively specific expression in the cancer cells, they have been considered as the early diagnosis of several cancers, or the appropriate targets for the specific immunotherapy mediated by cytotoxic T lymphocytes. Therefore, there were many reports about the expression of MAGE genes in various types of malignant tumors, but only a few reports in human thyroid neoplasms. The purpose of this study was to determine whether the MAGE common primers expressed in different histological types of thyroid tumors and to see the clinical usefulness of MAGE common primers on the thyroid tumors.

Methods: Fifty-nine patients who underwent thyroidectomy at Kosin Medical Center from January, 2001 to April, 2002 were included in the study. Of the 59 patients 40 were papillary carcinoma, 4 follicular carcinoma, 3 medullary carcinoma, 1 anaplastic carcinoma, 4 nodular hyperplasia, 3 adenomatous goiter, and 4 follicular adenoma. Total cellular mRNA was extracted from those 48 cancer tissues, 11 benign tissues and additional eleven normal control thyroid tissues. Nested reverse transcriptase-polymerase chain reactions (nested RT-PCR) with the MAGE common primers designed to detect MAGE 1-6 genes were employed in this study. With probes confirmed by DNA sequencing.

Results: Of those 48 cases of thyroid carcinomas 10 cases (20.8%) were expressed MAGE common primers. In the 40 papillary carcinoma, MAGE common primers were expressed in 17.5%. In the four follicular carcinoma, they were expressed in two cases, and in one case of one anaplastic carcinoma. However, in the three cases of medullary carcinoma, MAGE gene was not expressed. None of 11 benign tumors and 11 normal tissues expressed any of these MAGE common primers. The sensitivity of MAGE common primers in thyroid tumors was 20.8% and the specificity was 100%.
Conclusion: These results suggested that MAGE common primers were expressed low in the malignant thyroid tumors but it was not expressed in benign tumors and normal tissues. It is suggested that MAGE common primers can be used for preoperative differential diagnosis of follicular carcinoma from benign follicular adenoma which cannot be made by fine needle aspiration cytology of thyroid tissue. However, further study is needed for clinical application of MAGE common primers expression as tumor markers in the thyroid tumors.

Key words : MAGE, Common primer, Thyroid tumor, Tumor marker

서론

교신저자 : 최영식

주소: 602-703, 부산광역시 서구 압남동 34번지
고신대학교 복음병원 내분비내과
TEL. 051-990-6641, 6102 FAX. 051-248-5686
E-mail: yschoi@ns.kosinmed.or.kr

암에 대한 연구의 목적은 암을 조기에 진단할 뿐 아니라, 암의 발생에 관여하는 여러 가지 기전을 이해함으로

써 치료에 이용하는데 있다. 갑상선암은 다른 조직에서 발생한 암에 비해 비교적 천천히 자라고 예후가 양호하여, 갑상선암 진단에 종양유전자를 이용한 연구는 다른 암에 비해 늦다. 갑상선암의 진단에는 갑상선 스캔과 초음파 검사 등이 이용되지만 악성 여부를 감별 하는데는 유용하지 않아, 현재는 세침흡인세포 검사를 시행하여 양성결절과 악성결절을 감별하는데 이용하고 있다. 그러나 세침흡인세포 검사로도 수술 전 여포상 선종과 여포선암을 감별하기는 어려우므로, 수술 전에 이를 감별할 수 있는 종양지표의 개발의 필요성이 매우 절실하다.

MAGE(melanoma antigen gene)는 Van der Bruggen 등¹⁾에 의해 흑색종 세포주에서 처음으로 발견된 종양특이 항원으로 흑색종 뿐 아니라 유암,^{2,3)} 두경부암,⁴⁻⁶⁾ 폐암,⁷⁾ 난소암,⁸⁾ 간암⁹⁾ 등에서도 발현이 되나, 정상조직에서는 고환의 생식세포에서만 발현되는 것으로 알려져 있다. MAGE 유전자는 X 염색체에 존재하며, X 염색체에 위치하는 부위에 따라 A(Xq28), B(Xp21), 및 C(Xq26)로 나누는데 그 중에서도 MAGE A를 이용한 연구가 많이 되고 있으며, 현재까지 약 12개의 subtype이 알려져 있다.¹⁰⁾ 이들 유전자는 정상세포에서는 비활성화된 DNA 상태로 존재하지만, 종양세포에서는 promoter 부위가 비특이적으로 demethylation 되면서 활성화되는 것으로 추정하고 있는데 그 역할에 대해서는 아직까지 확실히 밝혀져 있지 않다.^{11,12)}

MAGE 유전자에 의해 얻어진 항원 펩타이드는 암세포의 HLA(human leukocyte antigen)에 의해 cytotoxic T lymphocyte(CTL)로 제시된다. 제시된 HLA이 CTL에 의해 인식된 후 종양세포는 CTL에 의해서 용해되기 때문에 흑색종을 포함한 몇 종류의 악성종양에서는 이들 항원을 이용한 면역치료가 시도되고 있으나,¹³⁻¹⁵⁾ MAGE 유전자를 암진단에 활용한 보고는 드물게 보고되어 있으나, 갑상선암에서 MAGE 유전자에 관한 연구는 매우 드물다. Ruschenburg 등¹⁶⁾은 세침흡인세포 검사로 감별하기 어려운 유두상 증식종과 유두선암의 감별 진단에 MAGE-1과 GAGE-1/-2 유전자 발현을 이용하여 연구한 결과 MAGE와 GAGE 유전자가 악성종양에서만 발현됨을 보고하였으며, 국내에서는 MAGE -1, -2, -3, -4, -5 및 -10 유전자의 발현에 관한 최 등¹⁷⁾의 연구가 보고되어 있다.

MAGE 유전자가 암 세포에 특이하게 발현되는 점을 감안할 때 MAGE 유전자 각각의 형의 발현보다는, 한 번의 RT-PCR법으로 가능한 많은 종류의 MAGE 유전자를 검출하는 것이 암의 검색을 위해서는 더 나은 방법이라고 생각한다. 최근 12 종류 이상으로 이루어진 MAGE gene family 중 비교적 많은 연구가 이루어져 있는 MAGE 1에서 MAGE 6 유전자를 선택적으로 검출할 수 있는 MAGE common primer를 이용한 대장직장암에 대해 연구가 보고되어 있으나,¹⁸⁾ 갑상선암에 관한 연구 없는 실정이다.

이에 저자는 MAGE 1에서 MAGE 6 유전자를 선택적으로 검출할 수 있는 MAGE common primer가 갑상선 종양에서의 발현여부와 갑상선 종양의 악, 양성 여부를 감별하는데 도움이 되는지를 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

가. 대상 및 조직획득

2001년 1월부터 2002년 4월까지 고신의료원에서 갑상선절제술을 받은 환자에서 획득한 48예의 악성종양(유두선암은 주위조직 침범 1예를 포함하여 40예, 여포선암 4예, 수질암 3예, 역형성암 1예)와 대조군으로 양성종양 11예(결절성 증식증 4예, 선양종 3예, 여포선종 4예)와 결절주변의 정상조직으로부터 얻은 11예의 정상조직을 대상으로 연구를 시행하였다(Table 1).

Table 1. Pathologic classification of materials

Pathology	Number of cases
Malignant tumor	48
Papillary carcinoma	40
Follicular carcinoma	4
Medullary carcinoma	3
Anaplastic carcinoma	1
Benign tumor	11
Nodular hyperplasia	4
Adenomatous goiter	3
Follicular adenoma	4
Normal tissues	11
Total	70

절제된 조직은 -70 °C에 보존 후 수일 내에 RNA를 분리하였다.

나. MAGE common primer의 특성

MAGE 1에서 MAGE 6까지의 각 유전자의 CDS의 염기서열을 서로 비교하여 DNA 동질성을 분석하고 동질성이 높은 부위를 선택하여 고안된 common primer kit(iC&G, Daegu, Korea)를 이용하여 RT-PCR과 nested PCR을 시행하였다. 첫번째 RT-PCR에 사용되는 primer는 MAGE 1에서 MAGE 6까지의 유전자로부터 828-924 bp의 cDNA가 증폭될 수 있도록 되어 있고, 이것을 C1/C2라고 명명하였다. 두 번째 PCR인 nested PCR의 primer는 469-493 bp의 cDNA가 증폭되게 되어있으며 이것을 C3/C4라고 하였다(Fig. 1). Nested PCR에 사용되는 sense 및 antisense primer의 염기서열을 Table 2에 정리하였다.

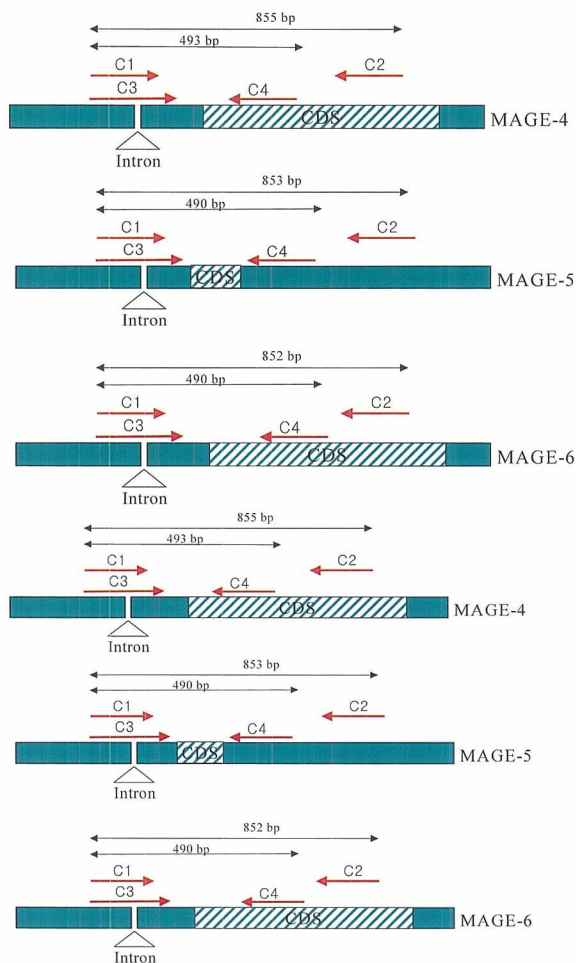


Fig. 1. Schematic structure of the MAGE 1-6 genes and the location of MAGE common primers on exons for the nested RT-PCR. C1, sense primer for the first round of RT-PCR; C2, antisense primer for the first round of RT-PCR; C3, sense primer for the second round of PCR; C4, sense primer for the second round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

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

Primer	Type	PCR	Sequence	size (bp)
C1	S*	RT-PCR	CTGAAGGAGAAGATCTGCC	831-855
C2	AS**	RT-PCR	CTCCAGGTAGTTTCTCTGCAC	
C3	A	Nested PCR	CTGAAGGAGAAGATCTGCCGTG	469-493
C4	AS	Nested PCR	CCAGCATTTCTGCCTTTGTGA	

S*, Sense primer; AS**, antisense primer

다. RT-PCR과 nested PCR

1. RNA 분리

암조직에 2 ml의 RNAzolB(Biotechx, USA)를 첨가한 후 조직분쇄기를 이용하여 암조직을 간 다음 분쇄된 조직액으로부터 total RNA를 추출하였다. 방법은 조직이 용해된 RNAzolB용액에 1/10 량의 chloroform을 첨가하여 진탕 혼합한 후 12,000 rpm으로 15분간 원심하여 단백질을 침전시키고 RNA를 분리하였으며, 분리된 상층의 RNA용액을 조심스럽게 수거하여 1.5 ml 시험관에 옮겼다. RNA용액에 동량의 100% isopropanol을 첨가하여 혼합한 후 -20°C에 16시간 이상 보관하여 RNA를 침전시켰다. RNA-isopropanol 혼합액을 12,000 rpm으로 원심 분리하여 RNA pellet을 만든 뒤 상층액을 제거하였다. 여기에 ice-cold 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 260nm 파장에서 측정된 OD260을 이용하여 RNA 농도(RNA농도 = OD260 × 40 ug/ml × 희석배수)를 측정하였다. 순도는 OD260/OD280의 비율로 평가하였으며 1.7 - 2.0 사이인지를 확인하였다. RNA의 분리를 확인하기 위해 전기영동 후 16S와 26S의 rRNA band를 확인하였다.

2. 역전사(reverse transcription)에 의한 cDNA의 합성

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

3. MAGE 1-6 유전자에 대한 1차 PCR

각 검체간의 mRNA를 일정하게 보정시키기 위해 모든 세포에 공통적으로 존재하는 house keeping gene 중에서 GAPDH를 대상으로 하여 PCR을 시행하였다. Primer는 300 bp의 PCR 산물이 얻어질 수 있도록 고안된 sense primer 5' - CGTCTTACCAACCATGGAGA-3', antisense primer 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 검체 간의 mRNA 양을 일정하게 조절한 다음 MAGE 1-6 gene에 대한 PCR을 시행하였다. 먼저 10X PCR buffer 3 μ l, 25 mM MgCl₂ 1.8 μ l, 10 mM dATP 0.3 μ l, 10 mM dGTP 0.3 μ l, 10 mM dTTP 0.3 μ l, 10 mM dCTP 0.3 μ l, 50 μ M sense 및 antisense common primer 0.25 μ l, Taq polymerase(5U/ μ l, Promega, USA) 0.25 μ l를 혼합하고 여기에 DW를 넣어 최종 반응액이 25 μ l가 되게 하여 PCR mixture를 만들었다. PCR mixture를 PCR tube에 넣고 여기에 역전사 반응물을 5 μ l 넣어 혼합하였다. 다음으로 mineral oil을 1방울 떨어뜨리고 PCR 기계(Cetus 480, Perkin Elmer Co., U.S.A.)에 넣어 1차 PCR을 실시하였다. 먼저 94℃에서 5분간 가열한 후 94℃ 30초, 57℃ 45초, 72℃ 45초를 1 cycle로 하여 35 cycle 반응시켜 DNA를 증폭시켰으며, 최종적으로 7

2℃에서 5분간 처치하여 PCR을 완료하였다.

4. MAGE 1-6 유전자에 대한 nested PCR

PCR산물을 DW로 10배 희석한 후 2차 PCR에 사용하였다. 상기한 바와 같이 PCR mixture에 희석한 PCR 산물 2 μ l와 DW를 3 μ l 첨가하였다. PCR 시약이 들어 있는 시험관에 mineral oil을 1방울 떨어뜨린 후 다음의 조건으로 2차 PCR인 nested 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. 1% agarose gel에 PCR 산물을 점종하고 전기영동한 뒤 UV transilluminator를 이용하여 증폭된 DNA band를 관찰하였다.

라. PCR product의 Cloning

1. Ligation

PCR로 확인된 MAGE 1-6 common gene의 DNA sequencing을 하기 위해서 pT7Blue T-vector(Novagen, USA)를 사용하여 cloning을 시행하였다. 전기영동이 끝난 PCR DNA band 중에서 목적인 부분을 잘라낸 다음 GeneClean II kit을 사용하여 용출하였다. 용출한 insert DNA 7 μ l(200-500ng)를 새로운 microfuge tube에 옮기고, pT7Blue T-vector(50ng/ μ l) 1 μ l, ligase buffer 1 μ l 그리고 T4 DNA ligase를 1 unit를 혼합하여 최종부피가 10 μ l되게 한 다음 16℃에서 밤새 반응시켰다.

2. Transformation

Ligation반응으로 재 조합된 plasmid DNA는 CaCl₂를 이용해서 대장균주 DH5 α 체내에 형질 전환시켰고, 형질 전환체들은 X-gal, IPTG, ampicillin이 각각 40 μ g/ml, 5mM, 그리고 100 μ g/ml로 첨가된 LB plate에서 blue/white 색 분별법으로 선별하였다. 선별된 흰색 colony를 대상으로 colony PCR을 수행하여 insert DNA의 삽입여부를 재 확인하였다.

마. Sequencing

Sequencing에 사용할 template DNA는 Wizard

plus SV minipreps kit을 이용하였고 전반적인 과정은 kit의 안내서에 따라서 실시하였으며, 배양균액 5ml에 대하여 최종적으로 50 μ l의 멸균수에 녹인 다음 UV spectrophotometer에서 농도를 측정하였다. DNA sequencing은 부경대학교 공동실습관에 의뢰하였으며, sequencing 결과는 NCBI (NIH, USA) blast search에서 비교, 분석하였다.

결 과

가. MAGE Common primer를 이용한 MAGE 유전자의 검출

갑상선 암조직과 양성종양으로부터 MAGE 1-6 유전자를 찾아낼 수 있도록 고안된 MAGE common primer kit를 이용하여 RT-PCR 및 nested PCR을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 갑상선암에서의 MAGE 1-6 유전자 검출

갑상선암 48예 중 10예(20.8%)에서 common primer에 의해 MAGE 유전자가 검출되었다. 이 중 유두선암은 40예 중 주위조직을 침범한 1예를 포함하여 7예인 17.5%에서, 여포선암은 4예 중 2예에서, 역형성암은 1예중 1예에서 양성을 보였으나, 수질암은 3예 모두 음성으로 나왔다(Fig. 2).

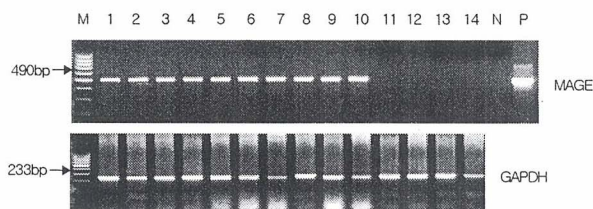


Fig. 2. Amplification of MAGE cDNA common to MAGE 1-6 genes in the thyroid cancer by nested RT-PCR using common primers. M, size marker(100bp ladder); N, no cDNA.

2. 대조군에서의 MAGE 유전자 검출

대조군인 양성 갑상선종양 11예와 정상조직 11예 모두에서 암조직과는 대조적으로 MAGE 유전자가 검출되지 않았다(Fig. 3).

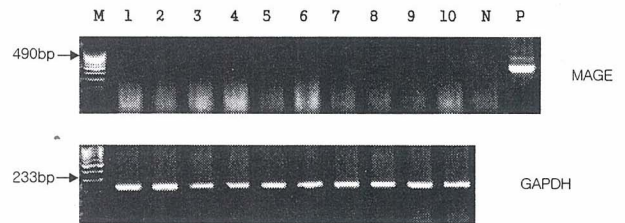


Fig. 3. Amplification of MAGE cDNA common to MAGE 1-6 genes in benign tumors of the thyroid by nested RT-PCR using common primers. M, size marker (100bp ladder); N, no cDNA.

3. MAGE Common primer의 양, 악성종양 감별에 대한 민감도와 특이도

갑상선암 48예와 양성종양 11예 및 정상조직 11예에서 MAGE common primers의 민감도는 20.8%로 낮았으나, 양성종양 11예와 정상조직 11예 모두 음성의 결과를 얻어 특이도는 100%이었다. 위양성률은 0%이고, 위음성률은 79.2%이었다. 양성 예측도는 100%였으며, 정확도는 45.9%였다(Table 3).

Table 3. Comparison of MAGE common primers and pathologic findings

MAGE gene	Pathologic Findings		
	Malignant	Benign and Normal	Total
Positive	10	0	10
Negative	38	22	60
Total	48	22	70

나. DNA sequencing 결과

PCR로 확인하고 pT7Blue T-vector에 subcloning한 MAGE cDNA들을 대상으로 automatic DNA sequencing system을 이용하여 DNA 염기 서열을 얻고, 이를 NCBI Genebank에 등재된 MAGE 유전자들과 비교하여, 최종적으로 MAGE 유전자 염기서열을 확정하였다(Fig. 4).

갑상선암에서 MAGE 1-6 mRNA를 검출하는 MAGE common primer의 의의

```

1  gtragagaga agcgagctgc tgtctgacca gcagcttggg attggtggaa ggaagcaggc
61  caggccctgt gaggagtcaa gggtctgagc agacaggcca accggaggac aggattccct
121  ggaggccaca gaggagcacc aaggagaaga tctgcctgtg ggtccccatt gccagcttt
181  tgcctgcact ctgctctgct gccctgagca gactcatcat gtctctgag cagaagagtc
241  agcactgcaa gctcgaggaa ggcgttgagg cccaagaaga ggccctgggc ctggtgggtg
301  cacaggctcc tactactgag gaggcaggag ctgctgtctc ctctctctct cctctggtcc
361  ctggcaccct ggaggaagtg cctgctgtg agtcagcagg tctctcccag agtcctcagg
421  gaggctctgc cttaacct accatcagct tcaattgctg gaggcaacc aatgagggtt
481  ccagcagcca agaagaggag ggccaagca cctcgctga cgcagagtc ttgtccgag
541  aagcactcag taacaagggt gatgagttgg ctctttttt gctccgaag tatcgagcca
601  aggagctggt cacaaggcca gaaatgctgg agagagtcac caaaaattac aagcgtgct
661  ttctgtgat ctctggcaaa gcctccgagt ccctgaagat gatcttggc attgacgtga
721  aggaagtggg cccaccagc aacacctaca cctgtctac ctgctgggc ctctctatg
781  atgctctgct gggtataat cagatcttc ccaagacagg ccttctgata atgctctgg
841  gcacaattgc aatggagggc gacagcgctc ctgaggagga aatctgggag gagctgggtg
901  tgatgggggt gtagtgggg agggagcaca ctgctatgag ggagccagg aaactgctca
961  cccaagattg ggtcgaggaa aactacctgg agtaccggca ggtaccggc agtaactctg
1021  cgcgctatga gttctgtgg ggtccaagg ctctgctga aaccagctat gtagaagtc
1081  tggagcatgt ggtcagggtc aatgcaagag ttgcattgc ctacccatcc ctgctggaag
1141  cagctttgtt agaggaggaa gaggaggtct gagcatgagt tgcagccagg gctgtgggga
1201  aggggagagg ctggccagt gcatctaaca gccctgtgca gcagcttccc ttgctcgtg
1261  taacatgagg cccattctc actctgtttt aagaaaatag tcagttgtct tagtagtggg
1321  ttctattttt gttgtagac ttggagattt atctctgtt cctttacaa ttgttgaat
1381  gttcctttta atggatgggt gaattaaact cagcatccaa gtttatgaat ctagtgaac
1441  gtatattgct gtaatatag tttaggagta agagctgtgt ttttattca gattgggaaa
1501  tccgttctat ttgtgaatt tgggacataa taacagcagt ggagtaagta ttgagaagtg
1561  tgaattcacc gtaaaatagg tgagataaat taaaagatac ttaattcccg ccttatgctt
1621  cagctatctc tgtaaaattt aaaaaatata tatgcatacc tggatttctc tggcttcgtg
1681  aatgtaagag aaattaaatc tgaataaata attcttctg ttaaaaaaaa aaaaaaaa
1741  aa

```

Fig. 4. Automated DNA sequencing data of a part of MAGE common gene.

고찰

최근의 분자생물학과 유전공학의 비약적인 발달로 정상 세포에서 암세포로 진행되는 과정에 관여하는 여러 유전자들의 이상이 발견되고, 또 그 기능이 규명되기 시작하여 암의 진단과 치료에 새롭고 다양한 방법이 시도되고 있다.¹⁹⁻²³⁾ 이러한 방법은 암의 조기진단 및 감별진단에 이용될 수 있으며, 치료적인 면에서도 조기에 수술적 처치, 전암 상태나 진행된 암에서의 손상된 유전자를 정상유전자로 바꿔 주는 유전자치료 및 변형된 이상세포들을 인체의 면역기구가 더 잘 감시하여 제거할 수 있도록 해 주는 면역요법 등 지금까지와는 다른 차원의 새로운 치료를 가능성을 제시해 준다.²⁴⁾

현재 갑상선암의 진단에는 주로 세침흡인세포 검사

를 이용하고 있으며, 세침흡인세포 검사의 특이도는 약 90% 정도이고, 민감도는 보고자에 따라 차이가 있으나 대개 55-71%로 보고되고 있다.²⁵⁾ 세침흡인세포 검사를 시행한 경우 약 16% 정도에서는 검체가 획득되지 않아 이를 보완하기 위해 초음파 유도하 세침흡인세포 검사를 시행하여 획득율을 높이기도 하지만, 진단이 애매한 (indeterminate-diagnosis) 경우 뿐아니라 수술하기 전에는 선종과 암을 감별하기 어려운 여포상 신생물을 흔히 경험하게 된다. 이러한 결점을 보완하기 위한 시도로서 Wallin 등²⁶⁾의 갑상선종양에서의 DNA 함량을 이용한 연구나 Kung 등²⁷⁾의 갑상선 종양에서의 종양특이유전자 발현에 관한 연구가 있었으나, 악성과 양성 종양의 감별에 도움이 되지 못하였다. 반면, Weiss 등²⁸⁾은 세침흡인세포 검사시에 획득한 흡출물에서 mucin-1(MUC1) 유전자에 대한 RT-PCR 및 Southern blotting을 시행하여, 갑상선 유두선암 8예 중 7예에서 MUC1 유전자가 발현이 되고, 양성종양 13예에서는 발현이 되지 않음을 보고하였다. Weiss 등의 연구는 갑상선암의 진단에 종양유전자를 이용할 수 있음을 보여준다. 암진단에 사용되는 종양표식자로서의 요건은 암세포에 특이적으로 발현이 되고, 많은 암에서 나타나며, 발현 빈도가 높은 것이 이상적이다. MAGE 유전자는 세포독성 림프구에 의해 인식되는 종양항원으로 고환을 제외한 정상조직에서는 발현이 되지 않는 반면 두경부암, 흑색종, 위암, 식도암, 대장암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 갑상선암 등 각종 암조직에서 발현된다.²⁻⁹⁾ 그러므로 MAGE 유전자는 암의 진단과 치료에 응용될 수 있는 매력적인 목적 유전자(target gene)라고 할 수 있다.

갑상선에서 MAGE 유전자를 이용한 Ruschenburg 등¹⁶⁾의 연구에서 MAGE-1 유전자가 유두선암 20예 중 4예 (20%)에서 발현되었으나, 양성종양인 유두상 증식증의 경우 10예 모두에서 발현되지 않음을 보고하여 갑상선암의 감별진단에 MAGE 유전자를 이용할 수 있음을 보여주었다. 특히 이들의 연구에서는 검체를 세침흡인세포 검사시 도말된 슬라이드에서 취하여 RT-PCR법을 이용하였다. 이러한 방법은 비록 신선 동결조직이나, 세침흡인세포 검사시에 획득한 흡출물을 이용한 연구보다 민감도는 낮으나 세침흡인세포 검사시 진단이 애매한 경우에도 도움이 될 뿐 아니라, 수술 전 악성결절을 감별할 수 있

으므로 불필요한 수술을 줄일 수도 있다.

MAGE 유전자는 12 종류이상의 gene family로 구성되어 있기 때문에 갑상선암을 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 MAGE common primer kit를 이용하여 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. 이 연구에서 MAGE common primer는 갑상선암 48예 중 유두선암 40예 중 7예(17.5%)로 Ruschenburg 등¹⁶⁾의 연구에서 유두선암 20예 중 4예(20%) 보다 약간 낮았다. 유두선암 외에 여포선암은 4예 중 2예에서 역형성암은 1예 중 1예에서 양성을 나타내었으며, 대조군에서는 발현되지 않아 갑상선결절에서 악성과 양성결절을 구분하는데 도움이 됨을 알 수 있었다. 또한 증례 수는 적으나 주위조직을 침범한 유두선암 1예와 역형성암 1예에서 MAGE 유전자가 양성을 보인 것은 MAGE 유전자가 미분화 갑상선암에 상대적으로 더 잘 발현되는 것으로 생각된다. MAGE common primer를 이용한 대장직장암 연구에서는¹⁸⁾ 42.1%의 높은 발현을 보인 반면 갑상선암에서 발현 빈도가 낮은 것은 MAGE 유전자가 상대적으로 분화가 덜 된 종양에서 발현이 더 높을 것으로 생각된다. 이 연구에서 증례수는 부족하나 여포상 선종 4예에서 MAGE 유전자가 발현되지 않았으며, 여포선암 4예 중 2예에서 MAGE 유전자가 발현되는 것을 보면 세침흡인세포 검사상 여포상 신생물로 진단이 될 경우, 이에 대한 감별진단에 또한 MAGE 유전자가 도움이 될 것으로 생각된다. Van der Bruggen 등¹⁾의 연구에서는 수질암 1예에서 MAGE-1, -2 및 MAGE-3 유전자가 발현되었고, 최 등¹⁷⁾의 연구에서도 수질암 1예에서 MAGE-1, -2, -4 및 MAGE-5 유전자가 발현되었으나, MAGE common primer를 이용한 본 연구에서 수질암 3예 모두에서 음성을 보였다.

이 연구를 통하여 갑상선 종양에서 MAGE common

primer kit를 이용할 경우 민감도는 20.8%로 낮았으나, 특이도는 100%로 MAGE common primer가 갑상선결절에서 양, 악성을 감별하는데 도움이 될 수 있음을 알 수 있었다.

갑상선암 이외의 종양에서의 MAGE 유전자의 발현에 관한 연구들을 고찰해 보면 Yamanaka 등²⁹⁾은 신세포암의 50예 중 MAGE-1, -2, -3 및 -4 유전자가 각각 22%, 16%, 76% 및 30% 발현되었으나 정상조직에서는 발현되지 않음을 보고하였고, Kobayashi 등³⁰⁾은 16예의 간암생검조직에서 MAGE-1과 -2 유전자가 각각 67% 및 39% 발현됨을 보고하였다. 폐암의 경우 Yoshimatsu 등³¹⁾의 연구에서는 57예의 폐암조직 중 MAGE-1, -2 및 -3 유전자는 각각 20.9%, 30.2% 및 45.8% 발현을 보고하였고, Li 등³²⁾ 및 Tanaka 등³³⁾은 184예의 위암, 식도암 및 대장암 환자의 암조직과 정상조직에서 10종의 MAGE 유전자들에 대해 RT-PCR법으로 연구를 시행한 결과, 정상조직에서는 MAGE 유전자가 발현되지 않았으나, MAGE 유전자의 종류에 따라 위암은 9-46%, 식도암 13-79%, 대장암 5-44%가 발현됨을 보고하였다. 또한 한 개 이상의 MAGE를 발현할 확률은 위암 82%, 식도암 94%, 대장암 88%임을 나타내어 MAGE 유전자 각각의 발현빈도는 다양하지만 전체중 한 종류이상을 발현할 확률이 매우 높음을 알 수 있었다.

Brasseur 등³⁴⁾의 연구에서 피부, 림프절 및 내장기관에 전이된 흑색종 145예에서 MAGE-1, -2, -3 및 -4 유전자가 각각 48%, 70%, 76% 및 22% 발현되는 것을 보고하였다. 또한 Marchand 등³⁵⁾은 전이된 흑색종 25예에 대해 MAGE-3 유전자를 이용하여 면역치료를 시행한 결과 7예에서 현저한 종양의 퇴행(regression)을 경험하였으며, 이 중 3예는 완전 퇴행을, 2예에서는 disease free 상태를 보여 전이된 종양에 MAGE 유전자가 치료로 이용될 수 있음을 보여주었다. 저자의 연구에서 유두선암이 전이된 림프절 3예 중 2예에서 MAGE 유전자가 발현이 되었다. 최근 유전공학의 발달로 혈액 내에 존재하는 극소수의 암세포를 RT-PCR로 검출하는 것이 가능하다고 한다. Mori 등³⁶⁾은 혈액 내의 세포 1×10^7 개 중 CEA를 발현하는 암 세포가 1-10개 정도이면 RT-PCR로 검출할 수 있다고 하였다. MAGE 유전자의 경우는 혈액내 세포 1×10^6 개 중 하나의 암세포가 존재하면 진단이 가능하며, 실제 18명

의 위암환자의 혈액에서 MAGE-1, -3, -4, -9 및 -11 유전자를 측정 한 연구에서는 6예(33%)에서 적어도 한 개 이상의 MAGE 유전자가 발현되었다.³⁷⁾ 또한 Miyamoto 등³⁸⁾은 MAGE-1 및 -3 유전자를 이용한 간암의 미세전이(micrometastasis)에 관한 연구에서 MAGE-1 및 -3 유전자가 각각 12.7%, 4.8% 검출되었으며, 간암에 특이적인 α -fetoprotein은 15.9% 검출되어 간암의 미세전이의 진단에 α -fetoprotein과 더불어 MAGE-1 및 -3 유전자도 도움이 될 수 있음을 보고하였다. 이상의 연구는 MAGE 유전자가 혈액내에 존재하는 극소수의 암세포를 찾을 수 있는 종양표식자(tumor marker)로 이용될 수 있음을 보여준다. 갑상선 유두선암의 30-50%는 진단 당시에 경부 및 림프절의 전이가 있으며, 5%에서는 원격전이가 동반된다. 또한 수술 후 5-20%의 환자에서 원격전이가 발생하고, 원격전이가 발생한 경우 5년 생존율은 50% 정도로 감소하므로 원격전이는 갑상선암의 주요한 사인으로 작용한다. 그러나 일부에서는 원격전이가 있더라도¹³⁾ 스캔검사로 발견되지 않는 경우가 있다. 이런 경우 혈액에서의 MAGE 유전자를 측정하는 것은 갑상선암의 원격전이의 진단에 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

결론적으로 이 연구에서 MAGE common primer가 비록 민감도가 낮았으나 갑상선암 조직에서만 발현되었고, 갑상선 양성 결절 및 정상조직에서는 전혀 발현되지 않음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 MAGE 유전자를 이용하면 수술 전 진단이 애매한 갑상선종양 및 원격전이의 진단에 도움이 될 수가 있으며, 세침흡인세포 검사로 진단이 어려운 여포성 종양의 양성 및 악성 여부를 수술 전 감별할 수 있는 가능성을 제시해준다. 그러나 MAGE 유전자를 암 진단에 도움이 될 수 있는 종양표식자로 활용하기 위해서는 향후 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

이 연구는 암특이적으로 발현되는 것으로 알려진 MAGE 유전자가 갑상선 종양에서의 발현 유무와 갑상선 종양의 양, 악성 여부를 감별하는데 도움이 되는지를 알아보고자, MAGE 1-6까지의 유전자를 선택적으로 검출할 수 있는 MAGE common primer를 이용하여 갑상선암

48예, 양성종양 11예 및 정상조직 11예를 대상으로 RT-PCR 및 nested PCR을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 갑상선암 48예 중 10예(20.8%)에서 양성소견을 보였다. 이 중 유두선암은 40예 중 7예(주위조직을 침범한 1예 포함)에서, 여포선암 4예 중 2예, 역형성암 1예 중 1예에서 MAGE common primer가 양성을 보였으나, 수질암은 3예 모두 음성으로 나왔다. 반면 대조군인 양성 갑상선종양 11예와 정상조직 11예 모두에서 암조직과는 대조적으로 MAGE 유전자가 검출되지 않았다. 갑상선암 48예와 양성종양 11예 및 정상조직 11예에서 MAGE common primers의 민감도는 20.8%로 낮았으나, 특이도는 100%이었다. 위양성률은 0%이고, 위음성률은 79.2%이었다. 양성 예측도는 100%였으며, 정확도는 45.9%였다.

결론적으로 이 연구에서 MAGE common primer가 다른 악성종양에 비해 발현율은 낮지만 갑상선암에서만 발현되고, 갑상선 양성 결절 및 정상조직에서는 전혀 발현되지 않음을 알 수 있었다.

참고 문헌

1. Van den Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254: 1643-1647, 1991
2. 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* 64 : 216-221, 1995
3. Fujie T, Mori M, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T: Expression of MAGE and BAGE genes in Japanese breast cancers. *Ann Oncol* 8: 369-372, 1997
4. Eura M, Ogi K, Chikamatsu K, Nakano K, Masuyama K, Itoh K, Ishikawa T: Expression of the MAGE gene family in human head-and-neck squamous-cell carcinomas. *Int J Cancer* 64: 304-308, 1995
5. Lee KD, Eura M, Ogi K, Nakano K, Chikamatsu K, Masuyama K, Ishikawa T: 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)* 116: 633-639, 1996
6. Lee KD, Chang HK, Jo YK, Kim BS, Lee BH, Lee YW, Lee HK, Huh MH, Min YG, Spagnoli GC, Yu TH: Expression of MAGE 3 Gene Product in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck. *Anticancer Research* 19(6):

- 5037-5042, 1999
7. Weynants P, Lethe B, Brasseur F, Marchand M, Boon T: Expression of MAGE genes by non-small cell lung carcinomas. *Int J Cancer* 56: 826-829, 1994
8. Russo V, Dalerba P, Ricci A, Bonazzi C, Leone BE, Mangioni C, Allavena P, Bordignon C, Traversari C: MAGE, BAGE and GAGE genes expression in fresh epithelial ovarian carcinomas. *Int J Cancer* 67: 457-460, 1996
9. Yamashita N, Ishibashi H, Hayashida K, Kudo J, Takenaka K, Itoh K, Niho Y: High frequency of the MAGE-1 gene expression in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 24 : 1437-1440, 1996
10. Kirkin AF, Dzhandzhugazyan K, Zeuthen J: Melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. *APMIS* 106: 665-679, 1998
11. De Plaen E, Arden K, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora JP, De Smet C, Brasseur F, Van der Bruggen P, Lethe B, Lurquin C, Brasseur R, Chomez P, De Backer O, Cavenee W, Boon T: Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 40: 360-369, 1994
12. De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T: The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7149-7153, 1996
13. Marchand M, Weynants P, Rankin E, Arienti F, Belli F, Parmina G, Cascinelli N, Ourlond A, Vanwijck R, Humblet Y, Canon JL, Laurent C, Naeeyaert JM, Plagne R, Deraemaeker R, Knuth A, Jager E, Brasseur F, Herman J, Coulie PG, Boon T: Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3. *Int J Cancer* 63: 883-885, 1995
14. Nesstle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burt G, Schadendorf D: Vaccination of melanoma patients with peptide-or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nature Medicine* 4: 328-332, 1998
15. Kawakami Y, Robbins PF, Wang RF, Parkhurst M, Kang X, Rosenberg SA: The use of melanomal proteins in the immunotherapy of melanoma. *J Immunother* 21:237-246, 1998
16. Ruschenburg I, Kubitz A, Schlott T, Korabiowska M, Droese M: MAGE-1, GAGE-1/-2 gene expression in FNAB of classic variant of papillary thyroid carcinoma and papillary hyperplasia in nodular goiter. *Int J Mol Med* 4(4):445-8, 1999
17. 최영식, 임학, 박요한, 이강대, 이재화, 장희경:갑상선암에서 MAGE 유전자의 발현. *대한내분비학회지* 16:467-480, 2001
18. Park MS, Park JW, Jeon CH, Lee KD, Chang HK: Expression of Melanoma Antigen-Encoding Genes(MAGE) by Common Primers for MAGE A1 to A6 in colorectal Carcinoma Among Koreans. *J Korean Medical Science* 4: 497-501, 2002
19. Bishoip JM : Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64: 235-248, 1991
20. Boguski MS, McCormick F : Proteins regulating ras and its relatives. *Nature* 366: 643-654, 1993
21. Hinds PW, Weinberg RA: Tumor suppressor genes. *Curr Opin Gene Dev* 4: 135-141, 1994
22. Gibb JB, Oliff A: Pharmaceutic research in molecular oncology. *Cell* 79: 193-198, 1994
23. Hartwell LH, Kasten MB: Cell cycle control and cancer. *Science* 266: 1321-1328, 1994
24. Oliff A, Gibb JB, McCormick F: New molecular targets for cancer therapy. *Sci Am* 275: 144-149, 1996
25. Cochand-Priollet B, Guillausseau P-J, Changnon S, Hong C, Guillausseau-scholer C, Chanson P, Dahan H, Warnet A, Huy PTB, Valleur P: The diagnostic value of fine needle aspiration biopsy under ultrasonography in nonfunction thyroid nodules: A prospective study comparing cytology and histologic findings. *Am J Med* 97:152-157, 1994
26. Wallin, G Askensten U, Backdahl M, Grimelius LLundell G, Auer G: Cytochemical assessments of the nuclear DNA distribution pattern by means of image and flow cytometry in thyroid neoplasms and non-neoplastic thyroid lesions. A comparative methodological study. *Acta chir Scand* 155:251-258, 1989
27. Kung IT, Chan SK, and Lo ES: Application of the immunoperoxidase technique to cell block preparations from the fine needle aspirates. *Acta cytol* 34: 297-303, 1990
28. Weiss M, Baruch A, Keydar I, Wreschner DH: Proliferative diagnosis of thyroid papillary carcinoma by revers transcriptase polymerase chain reaction of the MUC1 gene. *Int J Cancer*. 66: 55-59, 1996
29. Yamanaka K, Miyake H, Hara I, Gohji K, Arakawa S, Kamidono S: Expression of MAGE genes in renal cell carcinoma. *Int J Mol Med* 2:57-60, 1998
30. Kobayashi Y, Higashi T, Nouse K, Nakatsukasa H, Ishizaki M, Kaneyoshi T: Expression of MAGE, GAGE, and BAGE genes in human liver diseases: utility as molecular markers for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 32:612-7, 2000
31. Yoshimatsu T, Yoshino I, Ohgami A, Takenoyama M, Hanagiri T, Nomoto K: Expression of the melanoma antigen-encoding gene in human lung cancer. *J Surg Oncol* 67:126-9, 1998
32. Li J, Yang Y, Fujie T, Baba K, Ueo H, Mori M: Expression of BAGE, GAGE, and MAGE genes in human gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2:1619-25, 1996
33. Tanaka F, Mori M, Li J, Takesako K, Sette A, Celis E: High frequency of the expression of the MAGE gene family in human esophageal carcinoma. *Int J Oncol* 10:1113-17, 1997
34. Brasseur F, Rimoldi D, Lienard D, Lethe B, Carrel S, Arienti F: Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 63:375-80, 1995
35. Marchand M, Van Baren N, Weynants P, Brichard V, Dreno B, Tessier MH: Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with antigenic peptide encoded

갑상선암에서 MAGE 1-6 mRNA를 검출하는 MAGE common primer의 의의

- by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* 80:219-30, 1999
36. Mori M, Mimori K, Ueo H, Karimine N, Barnard GF, Sugimachi K: Molecular detection of circulating solid carcinoma cells in the peripheral blood: The concept of early systemic disease. *Int J Cancer* 68:739-43, 1996
37. Mori M, Mimori K, Tanaka F, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T: Molecular Diagnosis of circulating cancer cells using MAGE gene assay. *JAMA* 278:476-77, 1997
38. Miyamoto a, Fujiwara Y, Sakon M, Nagano H, Sugita Y, Kondo M: Development of a multiple maker RT-PCR assay for detection of micrometastases of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 45:1376-82, 2000