인간 대장암에서 Bone Morphogenetic Protein 2 유전자의 후향적 변이에 관한 연구

장용선 · 김 광 · 윤민영¹ · 최선근 · 김경래 · 장준혁² · 구지회³

인하대학교 의학전문대학원 외과학교실, ¹미즈메디병원 외과, ²인하대학교 의학전문대학원 생화학교실,

³인천의료원 외과

A Study of Epigenetic Alteration of the Bone Morphogenetic Protein-2 Gene in Human Colorectal Cancer

Yong Sun Jang, Kwang Kim, Min Young Yun¹, Sun Keun Choi, Kyung Rae Kim, Jun-Hyeog Jang², Ji Hoe Koo³

Department of Surgery, Inha University School of Medicine, Incheon; ¹Department of Surgery, Mizmedi Hospital, Seoul; ²Department of Biochemistry, Inha University School of Medicine, Incheon; ³Department of Surgery, Incheon Medical Center, Incheon, Korea

Purpose: Bone morphogenetic proteins (BMPs) are members of the transforming growth factor-beta family and play an important role in cellular growth. Recent reports suggest that exogenous bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) acts as an antiproliferative agent in a variety of cell lines. We will study whether BMP-2 is altered in human colorectal cancer.

Methods: We analyzed 40 colorectal cancer cases and 6 colorectal cancer cell lines by using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) to determine the expression of BMP-2.

Results: Thirteen of 40 colorectal cancers (33%) and 3 of 6 colorectal cancer cell lines (50%) revealed decreased expression of BMP-2. The rates of decreased expression were 0% (0/7), 42.1% (8/19), 28.6% (2/7), 33.3% (2/6), and 100% (1/1) in stages I, II, III, and IV, respectively. Histologically, the rates were 33.3% (2/6), 32.2% (10/21), 50% (1/2), and 0% (0/1) in well-differentiated, moderately-differentiated, poorly-differentiated and mucinous cancers, respectively. As for location, the rates for colon and rectal cancers were 27.8% (5/18) and 36.4% (8/22), respectively. We identified methylation in the CpG island of the BMP-2 gene in 60% of colorectal cancer cells and in 50% of colorectal cancer cell lines. The 13 cases without BMP-2 gene expression showed no significant correlation with clinicopathological factors. Epigenetic silencing through DNA methylation is one of the key steps during carcinogenesis.

Conclusion: We found, through an analysis using the methylation-specific polymerase chain reaction technique, CpG island methylation of the BMP-2 promoter region in colorectal cancer. Thus, aberrant BMP-2 methylation and the resultant loss of BMP-2 expression may be related to colorectal carcinogenesis.

Keywords: Colorectal cancer; BMP-2; Colorectal carcinogenesis

중심단어: 대장암; BMP-2; 대장암 형성

서 론

Bone morphogenetic protein (BMP)-2는 transforming

growth factor- β (TGF- β) 계통의 한 종류로서 생체 내에서 정상 골조직이 이외의 장소에서 연골 및 골 생성을 하는 기능을 가진 것으로 알려져 있다.¹ TGF- β 와 유사하게 BMPs는 특이적인 type I과 type II serine-threonine kinase 수용체 (bone morphogenetic protein receptor, BMPR)를 통하여 작용하는 것으로 알려져 있다. II형 수용체와 BMP-2의 결합은 수용체 복합체의 올리고화를 유도하여 I형 수용체의 인산화 일으킨 후, 신호 단백질인 Smad1, Smad5와 Smad8로

Received : August 26, 2009 Accepted : October 26, 2009

Correspondence to : Ji Hoe Koo, M.D.

Department of Surgery, Incheon Medical Center, 318-1
Songnim-dong, Jung-gu, Incheon 401-711, Korea
Tel : +82-32-580-6642, Fax : +82-32-580-6306
E-mail : killoth@yahoo.com

Copyright © 2010 The Korean Society of Coloproctology

신호를 전달한다.² 여러 연구에서 Smad1은 BMPR 신호의 표적으로서 많은 연구가 이루어지고 있는데, BMPR에 의해 Smad1이 인산화되면 Smad4와 이형 중합체를 형성하고 핵 안으로 들어가서 전사인자의 역할을 하게 된다.³

BMP-2는 과거에는 골 조직 이외의 장소에서 골 형성에 관여하거나 또는 전립선암, 유방암 등의 골 전이에 관여하는 것으로 연구되어 왔으나, 정상 소화기관 내의 세포에서 BMP-2 발현이 확인되었다. 특히 인체의 정상 대장세포에서도 높게 발현되고 있으며, 세포 내에서 앞서 설명한 기전을 통하여 세포 자멸과 분화를 촉진하며, 세포의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다. 또한 가족성 용종증 환자의 선종 내에서 BMP-2의 소실을 보이고 있고 이러한 소실은 가족성 용종증에서의 암 발생과 연관되어 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 BMP-2 유전자의 역할은 대장암에서 암 억제 유전자로서의 가능성을 제시하고 있다.⁴ 그러나 아직까지 대장암의 발생과 BMP-2 유전자의 연관성에 관한 연구는 미미한 실정이다.

메틸화에 의한 genomic DNA의 후향적 변이는 몇몇 암 억제 유전자의 유전자 기능 소실에서 중요한 역할을 하고 있다. 거의 모든 유핵 세포에서 DNA 메틸화는 정상적으로 CpG dinucleotide 내의 cytosine 잔기에서 발생한다.⁵ 이러한 형태의 변이는 전사요소의 결합을 방해하여 직접적으로 유전자의 발현을 억제하거나, methyl-CpG-binding protein (MeCP2)과 histone deacetylase로 구성된 복합체를 유도함으로써 간접적으로 유전자의 발현을 억제한다.⁶ 유전적인 변이와 더불어, CpG islands 촉진구역 내의 DNA 과메틸화는 암 억제 유전자의 억제성 전사를 야기하기 때문에 암 발생과정의 한 단계로서 많이 연구되고 있다. 이러한 후향적 변이는 여러 암세포에서 흔히 발견되고 있다. 특히 대장암의 발생 기전인 선종-암화 과정에서, 초기선종의 단계에서 메틸화가 관찰되고 있다.^{7,8} 이러한 메틸화는 여러 암 종류에서 비특이적으로 발생한다고 알려져 있었으나, 최근에는 암 종류에 따라 특이적으로 발생하기도 한다고 알려지고 있다.⁹

저자는 본 연구를 통하여 인간의 대장암 조직에서의 BMP-2 유전자의 발현 여부를 확인하고 이들과 대장암의 임상병리학적 요인들과의 상호 연관관계에 대해 알아보고자 하였으며, 메틸화에 의한 BMP-2의 발현 여부에 관하여 연구하였다.

방 법

본 연구는 2005년 12월부터 2006년 7월까지 인하대병원 외과학교실에서 대장암으로 진단받고, 수술 당시 근치적 절

제술을 시행받은 40예를 대상으로 하였다. 대상 환자의 평균 연령은 64.7세로 29세부터 83세까지의 연령 분포를 보였으며 남자는 25예, 여자 15예가 있었고 모든 환자에서 가족성 용종증(familial adenomatosis polyposis) 및 소아성 용종증(juvenile polyposis) 등의 가족력은 없었다. 세포주와 조직 검출을 위해 6예의 인간 대장암 세포주(SW480, SW620, HCT116, LOVO, DLD-1, LS174T)와 40예의 대장암 환자의 정상 조직과 암 조직을 가지고 이루어졌다. 모든 정상 및 암 조직은 수술 직후 병리과의 도움으로 채취되었으며, 이러한 조직의 채취 및 전 연구 과정은 임상시험 심사위원회의 승인 아래 환자의 자발적인 동의를 얻어 시행하였다. 세포 배양 과정에서 인간 대장암 세포주 SW480, SW620, HCT116, LOVO, DLD-1, LS174T (Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)는 37°C에서 RPMI 1640 (Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA) 배양액에 10% (v/v) heat-inactivated bovine calf serum (Life Technologies Inc.)와 1:100 dilution of a penicillin-streptomycin-fungizone solution (Life Technologies Inc.)을 첨가한 후 사용하였다.

암세포와 정상세포에서 DNA 및 RNA를 분리하였다. 이를 위해 조직을 digestion buffer (50 mM Tris HCl, pH 8.5, 1 mM EDTA, 0.5% Tween 20, 400 µg proteinase K)가 든 1.5 mL Eppendorf tube에 넣어 55°C에서 24시간 부란하였다. 부란 후 proteinase K의 활성을 억제하기 위하여 97°C에서 5분간 처리하였고 그 후 phenol/chloroform으로 DNA를 추출하였다. 추출 과정은 65°C 0.5% sodium sarcosine의 buffer-saturated phenol을 300 µL씩 시료에 넣어 vortex시켜 homogenous emulsion을 만든 후 3,500 g으로 원심분리하였다. 그 후 상층액을 깨끗한 Eppendorf tube에 옮긴 후 300 µL의 chloroform isoamyl alcohol을 첨가하여 vortex로 잘 섞어 3,500 g로 원심분리하였고, 이 과정을 3회 반복하였다. 그 후 상층액을 새 tube에 옮긴 후 1/10 volume의 3 M sodium acetate와 2× volume의 100% 에탄올을 첨가하여 조심스럽게 섞은 후 -70°C에 1시간 방치하여 DNA를 침전시켰다. 그 후 3,500 g으로 5분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 침전물을 70% 에탄올로 수세 후 재 원심분리하여 DNA를 침전시키고 DNA pellet을 공기 중에 건조시킨 후 멸균 증류수로 용해시켰다. 추출한 DNA의 순도는 분광계로 260 nm와 280 nm의 파장에서 수치를 읽어 이 수치의 비 260/280가 1.8 이상인 DNA를 시료로 사용하였고 순도가 이 수치 이하인 경우에는 phenol/chloroform 추출을 다시 하였다. 이렇게 추출한 DNA는 1% 한천 겔에 전기영동하여 DNA를 확인

하였다.

Total RNA는 acid-guanidinium thiocyanate chloroform (AGPC) 추출 방법을 응용한 TRIZOL 시약을 이용하여 분리하였다. 분리된 RNA는 분광계를 사용하여 RNA mode (260과 280 nm)에서 정량하였다.

합성된 cDNA로부터 역전사 중합효소반응(RT-PCR)을 이용한 분석을 위해 역전사 반응 후 1st strand cDNA를 각 1 μ L 씩 취하여 1× Tag Buffer, dNTP (10 mM)와 각각의 primer 쌍과 1.25 unit Taq DNA 중합효소를 섞어 PCR을 수행하였다. PCR은 Perkin-Elmer thermal Cyclor (GeneAmp PCR system, PerkinElmer Life Science, USA)을 사용하였고 온도 조건은 94°C에서 30초, 56°C에서 30초 70°C에서 1분의 조건으로 30회 반복하였다.

BMP-2 유전자의 메틸화 분석을 위해 50 μ L 용액 중 1 μ g의 DNA를 최종농도 0.2 M의 NaOH용액으로 37°C에서 10분간 처리하여 DNA를 변성시켰다. 그후 urea/sodium bisulfite로 DNA를 변환시키기 위하여 50 mL의 Falcon tube에 7.5 g의 요소를 넣고 여기에 10 mL의 증류수를 첨가하여 vortex 하면서 녹였다. 여기에 실온에서 7.6 g의 sodium metabisulfite (Sigma, USA)를 넣고 증류수 20 mL로 용해시키면서 진탕하여 녹이면서 용액의 pH를 10 M NaOH로 5.0으로 조절하였다. 이렇게 만든 urea/sodium bisulfite 용액과 hydroquinone을 변성시킨 DNA에 최종농도가 각각 5.36 M, 3.44 M 및 0.5 mM이 되도록 DNA 용액 22.2 μ L, urea/sodium bisulfite 208 μ L 및 10 mM의 신선한 hydroquinone 용액 12 μ L씩 혼합하였다. 그 후 혼합 용액을 0.5 mL의 PCR tube에 넣고 55°C에서 15분, 이어서 95°C에서 30초 반응시키는 과정을 20회 반복하였다. 이러한 과정이 끝난 modified DNA는 Wizard DNA purification resin (Promega, Madison, WI, USA)으로 정제 후 다시 NaOH (final concentration 0.3 M)로 실온에서 5분간 처리 후 에탄올로 침전시켜 멸균 증류수로 녹였다.

PCR 반응을 위한 primer는 인간의 BMP-2 유전자의 pro-

moter/exon 1 부위 중 일부를 증폭하도록 설계하여 사용하였다. DNA의 nucleotide 중 메틸화된 cytosine을 관찰하기 위하여 DNA를 urea/sodium bisulfite로 화학 반응시켜 메틸화된 cytosine과 메틸화가 되지 않은 cytosine이 uracil로 변환되는 것으로 메틸화의 여부를 알 수 있으며 이렇게 처리된 DNA를 PCR로 증폭함으로 uracil로 변환된 cytosine은 PCR 산물에서 thymidine으로 치환된 것을 알 수 있다.

PCR 증폭에 쓰이는 primer set는 BMP-2U (bone morphogenetic protein unmethylated), CpG island의 cytosine에 메틸화된 DNA를 특이적으로 증폭할 수 있도록 제작된 primer BMP-2M (bone morphogenetic protein methylated), CpG island에 메틸화가 안 된 DNA를 증폭할 수 있도록 제작된 BMP-2U 시발체 등을 각각 사용하였다(Table 1).

반응은 20 μ L의 반응으로 1×PCR buffer에 dNTP 각각 250 mM, 각각의 primer 10 pM, DNA/modified DNA 50 ng, 1.25 mM MgCl₂, Taq 중합효소 0.5 U들을 넣어 반응시켰고 반응조건은 95°C에서 5분 반응 후 95°C에서 30초, 65°C에서 30초, 72°C에서 30초 반응시키고 이 과정을 35회 반복하였다. 그 후 72°C에서 5분 연장한 후 반응을 종결하였다. 이렇게 반응시켜 얻은 PCR 산물은 1% 한천 겔에 전기영동하여 확인하였다.

BMP-2 발현의 감소에 따른 다른 임상병리학적 인자와의 연관성 비교는 SPSS ver. 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용한 χ^2 -test를 통해 검증하였고 P값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 관련성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

대상 환자의 평균 나이는 64.7±11.4세이었으며 최저 29세 최고 83세이었다. 남자는 25명(62.5%), 여자 15명(37.5%)으로 남녀 비는 1.671이었고, 우측 대장암이 4예(10%)이었으며, 좌측 대장암은 36예(90%)이었다. 이들의 수술 전 암태아성 항원(CEA) 농도는 21.4 ng/mL이었고, 수술 후 CEA는 6.7 ng/

Table 1. Summary of BMP-2 primer sequence, annealing temperatures (°C)

	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Temperatures (°C)
BMP-2U	ATGGTTGTTTGGATTATGGGTTGT	CTTAAAAACCAACACCCAAAAACACA	58
BMP2M	GGTGTTCGAGTTATGGGTAGC	ACCAACGCCCCGAAAAACGCG	58
RT-PCR	CCTAAGGAGGACGACAGCAC	GAGACCGCAAGTCCGTCTAAG	52

BMP-2U=bone morphogenetic protein-2 unmethylated; BMP-2M=bone morphogenetic protein-2 methylated; RT-PCR=reverse transcriptase-polymerase chain reaction.

mL이었다. 종양의 분화도에 따라 구분한 결과 고분화형이 6예(15%), 중등도 분화형 31예(77.5%), 저분화형 2예(5%), 점액성암 1예(2.5%)이었다. 27예(67.5%)에서는 대장 주위 림프절 전이가 없었으나 13예(32.5%)에서 주위 림프절 전이가 있었으며 이들의 평균 림프절 수는 4.8개(1개-18개)이었다. Stage I 7예(17.5%), Stage II 19예(47.5%), Stage III 13예(32.5%), 그리고 Stage IV 1예(2.5%)이었다(Table 2).

40예의 대장직장암 환자에서 BMP-2 mRNA 발현을 RT-PCR을 통해 분석하였다. BMP-2 mRNA 발현을 정상 세포의 발현과 암세포 사이의 발현과의 비로 정량화하였을 때 수치가 0 인 경우를 발현의 소실로 정의하고 수치가 0.9 미만인 경우를 발현의 감소로 정의하였고 40예의 정상조직 모두에서 BMP-2 mRNA가 발현되었으나, 대장암 조직 40예 중 13예(32.5%)에서 BMP-2 mRNA 발현이 감소되거나 소실됨을 보였다(Fig. 1).

대장암 세포주 6예 중 3예(50%)에서 BMP-2 mRNA 발현의 감소를 보였다. SW480, LOVO와 DLD-1에서 BMP-2 mRNA의 양성 발현을 보였으나, SW620, HCT116, LS174T에서는 BMP-2 mRNA가 발현되지 않거나 아주 약한 발현을 보였다(Fig. 2).

메틸화 특이적 중합효소 연쇄반응(methylation-specific

Table 2. Clinicopathological characteristics of the patients (n=40)

Characteristics	Values
Age (yr)	64.7 ± 11.4
Sex	
Male	25 (62.5)
Female	15 (37.5)
Location	
Right colon	4 (10)
Left colon	36 (90)
CEA Level (ng/mL)	
Pre-operative	21.4
Post-operative	6.7
Histologic grade	
Well differentiated	6 (15)
Moderately	31 (77.5)
Poorly	2 (5)
Mucinous	1 (2.5)
AJCC stage	
I	7 (17.5)
II	19 (47.5)
III	13 (32.5)
IV	1 (2.5)

Values are presented as number (%) unless otherwise indicated. CEA=carcinoembryonic antigen; AJCC=American Joint Committee on Cancer.

polymerase chain reaction, MSP)을 시행하기에 앞서 BMP-2 유전자의 CpG islands를 분석하였다. 분석 결과 4개의 CpG islands를 발견하였으며, 3번째 CpG islands를 중심으로 탈메틸화를 확인하기 위한 MSP를 시행하였다(Fig. 3). Urea/sodium bisulfite로 처리한 정상조직은 모두 BMP-2U primer로 증폭되었으며 종양조직의 DNA는 BMP-2M primer로는 40예 중 24예(60%)에서 증폭이 확인되었다(Fig. 4). 증폭된 24예는 RT-PCR에서 BMP-2의 발현이 저하된 13예 모두를 포함하였다(No. 4, 8, 9, 16, 24, 27, 29, 30, 32, 34, 38, 52, 62). 또한 대장암 세포주의 경우 총 6예 중 3예인 SW480, SW620, HCT116에서 메틸화가 확인되었으며 이 중 SW620과 HCT116에서는 BMP-2의 발현이 소실된 세포주였다(Fig. 5).

메틸화에 의한 BMP-2 발현조절을 확인하기 위해 BMP-2의 mRNA의 발현이 억제되어 있는 대장암 세포주인 HCT-

Fig. 1. Profiles of BMP-2 expression in colorectal carcinomas. The BMP-2 mRNA expression level was examined by using RT-PCR in 40 colorectal cancer cell lines. β -actin expression was used as an internal loading control for RT-PCR. The cycle numbers for BMP-2 and β -actin were 30 and 25, respectively. BMP-2=bone morphogenetic protein-2; N=normal; C=cancer.

Fig. 2. BMP-2 expression in colorectal cancer cell lines. The BMP-2 mRNA expression level was examined by using RT-PCR in six colorectal cancer cell lines. β -actin expression was used as an internal loading control for RT-PCR. The cycle numbers for BMP-2 and β -actin were 30 and 25, respectively. BMP-2=bone morphogenetic protein-2.

116 세포주에 BMP-2 유전자 발현을 탈메틸화 시약인 5-aza-2'-deoxycytidine (1 μ M) 처리 후 RT-PCR로 분석한 결과 BMP-2의 발현이 유도됨을 관찰하였다(Fig. 6). 따라서 CpG 메틸화에 의한 BMP-2 유전자 발현이 조절됨을 시사해준다.

남자의 경우 25예 중 8예에서(32.0%)에서 BMP-2 발현이 감소되었고, 여자에서는 15예 중 5예(33.3%)에서 감소하였다. 상행, 횡행 결장을 포함한 우측 대장암 조직 4예 중 1예(25%)에서 BMP-2의 발현이 감소되었고 하행, 구불 결장 및 직장을 포함한 좌측 대장암 조직에서는 36예 중 12예(33%)에서 감소되었다. 수술 전 CEA 수치에 따른 BMP-2 발현 감소는 CEA의 수치가 정상범위 내에 있었던 30예 중 9예(30.0%)에서 나타났고, 정상범위보다 높았던 10예 중 4예(40%)에서 감

Fig. 3. Schematic representation of the human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 gene. Arrows denote the locations of the distal (at 1) and the proximal (at 735) transcription start sites. The lower panel shows a schematic representation of the human BMP-2 gene (GenBank Accession No. AL035668). The arrow indicates the transcription start site. Boxes indicate exons, including coding (black) and non-coding (white) regions. Vertical bars show CpG sites. Black arrows below the CpG sites indicate the regions subjected to methylation specific polymerase chain reaction (MSP) and bisulfite sequencing (BS).

소를 나타내었다. 조직학적 분화도에 따른 BMP-2 발현 감소는 고분화 분화암에서 6예 중 2예(33.3%), 중등도 분화암에서 31예 중 10예(32.2%), 저분화암에서 2예 중 1예(50%)에서 나타났다. 점액성 암의 1예에서는 BMP-2의 감소가 나타나지 않았다. 종양이 점막하층에 국한된 T1 병변 2예와 고유근층에 국한된 T2 병변 5예에서는 BMP-2 발현의 감소가 나타나지 않았으나, 고유근층을 넘어서 점막하까지 침윤된 T3에서는 31예 중 11예(35.3%)에서, 장막을 투과하거나 타장기 혹은 조직에 직접적으로 침윤된 T4에서는 2예 모두에서 BMP-2 발현의 감소가 나타났다. 주위 림프절 전이 유무에 따른 BMP-2 발현의 감소는 림프절 전이가 없는 경우 27예 중 9예(33.3%)에서, 림프절 전이가 있는 경우 13예 중 4예(30.8%)에서 나타났다. 병기에 따른 BMP-2 발현의 감소는 I기 7예에서는 보이지 않았으나 II기 19예 중 8예(42.1%), III기 13예 중 4예(30.8%) 그리고 IV기 1예 중 1예(100%)에서 발현의 감소를 보였다. BMP-2 발현의 소실과 대장암의 임상병리학적 요인들과의 연관성에 관하여 알아보았으나 각 요인들과 BMP-2 발현 정도와는 통계적으로 상호 연관성을 보이지는 않았다(Table 3).

고 찰

본 연구는 지금껏 대장암의 암 유전자로 알려진 앞서 설명한 유전자들 이외에 BMP-2 유전자와 대장암과의 연관성을 알아보려고 하였다. 최근 연구들은 위장관을 포함한 여러 장기의 암 발생에서 BMP 신호전달과의 연관성을 제시하였다.

Fig. 4. Methylation specific polymerase chain reaction (MSP) analyses of the CpG island methylation status of the bone morphogenetic protein-2 promoter region in colorectal cancer cell line samples. U=unmethylated alleles; M=methylated alleles.

Fig. 5. Methylation specific polymerase chain reaction (MSP) analyses of the CpG island methylation status of the bone morphogenetic protein-2 promoter region in colorectal cancer cell line samples.

U=unmethylated alleles; M=methylated alleles.

Fig. 6. RT-PCR analysis after treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza). Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) gene expression was reactivated after treatment with 5-aza-20-deoxycytidine in HCT-116 cell lines. β -actin was amplified as an internal control (30 cycles of PCR). - and + denote with and without 5-aza-20-deoxycytidine treatment, respectively.

U=unmethylated alleles; M=methylated alleles.

먼저 시험관 내에서의 rhBMP-2는 전립선암, 위암, 대장암 세포에서 항증식 작용을 하는 것으로 알려졌으며, 두 번째로는 전립선암과 대장암 등에서 BMP-2 발현이 감소되거나 정상 대장 세포에서는 BMP-2의 발현이 높다고 보고하고 있다.⁴ 세 번째로는 BMPRI와 Smad4에서의 돌연변이는 소아성 용종증(juvenile polyposis)과 연관되어 있음을 보고하고 있으며, 이러한 환자들은 위장관암의 발생 위험성이 있다.¹⁰ 본 연구에서도 정상 대장 세포 전체에서는 BMP-2 유전자가 발현 되었으나, 40예의 대장암세포와 6예의 대장암 세포주에서는 각각 32.5%와 50%의 낮은 비율로 BMP-2 유전자의 감소 또는 소실을 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때 향후에도 많은 연구가 필요하겠지만 BMP-2 유전자도 암억제 유전자로 알려진 p53, DCC, APC 유전자와 같이 대장암 발생에서 억제 유전자로서의 가능성이 있다.

암 억제 유전자의 CpG island 내에서 비정상적인 과메틸화는 억제 유전자의 기능의 소실을 야기하며, 이는 암 발생 기전

Table 3. The correlation between histopathologic factors and the loss of the expression of BMP-2 in colorectal cancer cell

Variable	BMP-2		P-value
	Expression	Loss	
No. of patients	27 (67.5)	13 (32.5)	
Sex			0.931
Male	17 (68.0)	8 (32.0)	
Female	10 (66.7)	5 (33.3)	
Location			0.736
Right colon	3 (75)	1 (25)	
Left colon	24 (66.7)	12 (33.3)	
Pre-op CEA (ng/mL)			0.559
Normal	21 (70.0)	9 (30.0)	
Abnormal	6 (60.0)	4 (40.0)	
Histologic grade			0.858
Well	4 (66.7)	2 (33.3)	
Moderated	21 (67.8)	10 (32.2)	
Poorly	1 (50.0)	1 (50.0)	
Tumor depth			0.054
T1	2 (100)	0	
T2	5 (100)	0	
T3	20 (64.7)	11 (35.3)	
T4	0 (0)	2 (100)	
Lymph node			0.871
Negative	21 (70.0)	9 (30.0)	
Positive	6 (60.0)	4 (40.0)	
Stage			0.139
I	6 (100)	0 (0)	
II	12 (60)	8 (40)	
III	9 (69.2)	4 (30.8)	
IV	0 (0)	1 (100)	

Values are presented as number (%).

BMP-2=bone morphogenetic protein-2; Pre-op=pre-operation; CEA=carcinoembryonic antigen.

을 설명하는 중요한 기전 중의 하나로 연구되고 있다.^{11,12} 대장암 발생의 유전자 모델로 알려진 선종-암화 과정 단계에서의 메틸화의 변화는 암 유전자나 암 억제 유전자의 변이를 가져오고 특히 촉진구역 내의 CpG island의 과메틸화는 교정유전자뿐만 아니라 억제 유전자의 소실을 초래한다.¹³ 본 연구에서는 대장암세포 60%에서 메틸화를 확인하였으며, 이는 대장암에서의 메틸화를 연구한 다른 연구의 결과들과 유사하였다.¹⁴⁻¹⁶ 특히 BMP-2 유전자의 발현이 감소되거나 소실된 13예 모두에서 메틸화가 발생하였다. 또한 메틸화에 의해 BMP-2 유전자 발현이 소실된 세포주 HCT116에 탈메틸화 시약인 5'-aza-2'-deoxycytidine으로 처리하였을 때 메틸화가 발생하지 않고 BMP-2 유전자의 발현이 나타났으며 이러한 결과는 다른 연구에서도 확인할 수 있었다.^{17,18} 이는 CpG 메틸화에 의한 BMP-2 유전자 발현이 조절됨을 시사해준다. 이러한 결과로

볼 때, BMP-2 유전자의 발현이 소실되거나 감소된 대장암에서는 BMP-2 CpG islands의 메틸화가 나타나며, BMP-2 유전자가 높게 발현되는 세포에서는 CpG islands 메틸화가 나타나지 않음을 알 수 있었다. 그러므로 대장암 세포에서의 BMP-2 유전자 발현의 소실은 BMP-2 유전자 촉진자의 메틸화와 강한 연관이 있음을 알 수 있다.

메틸화가 일어났으나 BMP-2 유전자의 정상 발현을 보인 11예의 경우 BMP-2 유전자의 발현의 저하나 감소가 일어나지 않은 것은 이들이 메틸화 이후에 유전자의 소실이 일어나는 과정의 초기 단계이기 때문이라 생각되나 정확한 원인을 찾기 위한 연구가 필요할 것이다.

본 연구에서 BMP-2 유전자 발현 감소 여부와 임상병리학적 인자들 간의 상호 연관관계를 알아보았으나 통계학적으로 의의는 없었다. 이는 본 연구가 적은 수를 대상으로 시행되었고 단기간에 이루어진 통계학적인 오류를 포함시켜야 하겠지만, 대장암의 발생에 있어서 메틸화에 의한 유전자의 변이는 선종-암화 과정의 여러 단계에서 산발적으로 발생하는 것으로 알려져 있고,¹⁹ 또한 다른 암 유전자와 암의 예후와 연관된 임상 병리학적 인자들 간의 관계에 대해서는 발표된 문헌이 부족한 편이다.^{20,21} 그러므로 BMP-2 유전자 발현의 소실 여부와 대장암의 예후와 연관된 여러 임상병리학적 인자들 간의 상호 관계를 확인하기 위해서는 향후 많은 대상을 통한 연구와 함께 대장암 세포 내에서의 작용 기전에 대한 연구가 필요할 것이다.

결 론

대장암 환자의 정상 대장직장 조직과 암 조직에서 BMP-2 유전자 발현 정도를 비교하였을 때, 정상 조직에서 BMP-2 유전자가 40예 모두에서 발현되었고 암 조직 40예 중 13예에서 발현 감소가 있었으며, 이러한 유전자 발현 감소에 CpG island의 메틸화가 관여함을 확인할 수 있었다. 그러므로 BMP-2 유전자도 다른 암 억제 유전자들과 유사하게 대장암 발생 과정에서 하나의 억제 유전자로서 기능을 가지고 있으리라 추측되나, 발현의 억제를 가져오는 CpG island의 메틸화의 발생원인과 대장암의 선종 암화 과정의 어느 단계에서 발생하는가에 대한 연구는 지속되어야 하겠다.

REFERENCES

1. von Bubnoff A, Cho KW. Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev Biol* 2001;239:1-14.
2. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997;390:465-71.
3. Liu F, Hata A, Baker JC, Doody J, Carcamo J, Harland RM, et al. A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature* 1996;381:620-3.
4. Hardwick JC, Van Den Brink GR, Bleuming SA, Ballester I, Van Der Brande JM, Keller JJ, et al. Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon. *Gastroenterology* 2004;126:111-21.
5. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415-28.
6. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998;19:187-91.
7. Farber E. Cancer development and its natural history. A cancer prevention perspective. *Cancer*, 1988;62(Suppl.8):1676-9.
8. Cairns J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* 1975;255:197-200.
9. Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 2000;24:132-8.
10. Howe JR, Bair JL, Sayed MG, Anderson ME, Mitros FA, Petersen GM, et al. Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. *Nat Genet* 2001;28:184-7.
11. Issa JP, Vertino PM, Wu J, Sazawal S, Celano P, Nelkin BD, et al. Increased cytosine DNA-methyltransferase activity during colon cancer progression. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1235-40.
12. Toyota M, Ho C, Ahuja N, Jair KW, Li Q, Ohe-Toyota M, et al. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res* 1999;59:2307-12.
13. Paz MF, Fraga MF, Avila S. A systematic profiles of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res* 2003;63:1114-21.
14. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8681-6.
15. Park SJ, Rashid A, Lee JH, Kim SG, Hamilton SR, Wu TT. Frequent CpG island methylation in serrated adenomas of the colorectum. *Am J Pathol* 2003;162:815-22.
16. Bariol C, Suter C, Cheong K, Ku SL, Meagher A, Hawkins N, et al. The relationship between hypomethylation and CpG island methylation

1. von Bubnoff A, Cho KW. Intracellular BMP signaling regulation in

- in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 2003;162:1361-71.
17. Li H, Myeroff L, Kasturi L, Krumroy L, Schwartz S, Willson JK, et al. Chromosomal autonomy of hMLH1 methylation in colon cancer. *Oncogene* 2002;21:1443-9.
 18. Suter CM, Norrie N, Ku SL, Cheong KF, Tomlinson I, Ward RL. CpG island methylation is a common finding in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2003;88:413-9.
 19. Kim HC, Rho SA, Ga IH, Kim JS, Yu CS, Kim JC. CpG island methylation as an early event during adenoma progression in carcinogenesis of sporadic colorectal cancer. *Gastroenterol* 2005;20:1920-6.
 20. Ogunbiyi OA, Goodfellow PJ, Herfarth K, Gagliardi G, Swanson PE, Birnbaum EH, et al. Confirmation that chromosome 18q allelic loss in colon cancer is a prognostic indicator. *J Clin Oncol* 1998;16:427-32.
 21. Martinez-Lopez E, Abad A, Font A, Monzo M, Ojanguren I, Pifarre A, et al. Allelic loss on chromosome 18q as a prognostic marker in stage II colorectal cancer. *Gastroenterology* 1998;114:1180-7.

편집인의 글

Bone morphogenetic protein (BMP)들은 transforming growth factor-beta (TGF- β) superfamily에 속하는 sub-family이며 TGF- β family는 두 개의 군으로 나뉘며 하나는 BMP 군이며 다른 하나는 TGF- β /Activin 군이다. BMP는 생체에서 뼈와 연골 형성을 유도하는 단백질로 처음 발견되었으나 다양한 종류의 세포들에서 생물학적인 활성을 조절하는 역할을 한다.¹ 사람에서 BMP/TGF- β 신호전달에 관련된 유전자의 돌연변이는 암을 포함한 다양한 유전병들을 일으킨다. 특히 신호전달과정 중 Type II 수용체 돌연변이는 대장암과 위암의 원인이 되며 Smad-2, 4의 돌연변이는 췌장암의 원인이라고 알려졌다. BMP 신호전달의 조절은 세포 내외, 수용체 등 세 수준에서 조절이 가능하다.² 세포내의 조절은 Smad 1, 5, 8 등 Co-Smad/R-Smad 결합체, Smad ubiquitination regulatory factor (Smurf)는 수용체를 분해함으로써, BAMBI (BMP and Activin membrane-bound inhibitor)는 선택적으로 BMP와 Type I과 II 수용체들의 결합을 방해하여 신호전달을 조절한다.^{3,4}

본 연구는 산발성대장암과 대장암 세포주에서 종양억제유전자인 BMP-2의 발현여부와 후생유전학적(epigenetic)에 관한 연구이다. 현재까지 BMP2, BMPR2의 연구는 그다지 많지 않은 것으로 보인다. 반면 앞서 언급한 것처럼 억제유전자이지만 암화과정의 다른 연구와는 달리 BMP가 종양이 이미 상당히 진행된 경우나 grade와 관련이 있다는 연구도 있으므로 유전자다양성 등 이에 대한 정립이 필요하다.

BMP의 연구는 이외에도 최근 대장암의 발생에 관여하는 과오종성용종의 발암기전 특히, 연소기용종증에 관한 연구, 장관의 상피와 간엽조직(mesenchyme)에서 신호전달에 관한 연구가 진행 중이다.^{5,6} 대장암 발달의 개시(initiation)와 진행은 유전과 후생유전학적 변화의 점진적인 축적이 특징이

며 이러한 변화는 길며 지속적으로 발전하지만 사실 이러한 변형이 관련유전자가 원인인지 아니면 암으로 발전하여 나타난 결과로 어떠한 단계에서 변형되었는지는 알수 없다. 가족성 선종성 용종증에서 APC 유전자와 Wnt 경로처럼 이미 유전자변형이 암화의 개시단계에 관여하는 유전자도 알려졌고 이러한 유전자의 신호전달경로의 연구는 매우 흥미로운 것이다.

아직 한계는 있으나 BMPs가 정상 상피의 유형, 발달 그리고 유지에의 연관성 과오종성 증후군, 대장암화와 관련된 연구는 이론적으로는 치료 전략으로서도 연구가 필요하다. 대장암 발생의 유전적 위험요인 측에서 본다면 BMP 신호 경로의 분자적 기초연구와 질병과의 관련성에 대한 보다 면밀한 연구는 가치가 있을 것이다.

과오종성 용종의 발생을 유도하는 돌연변이, 과오종의 형성 기전에서 간엽조직(mesenchyme)의 잠재적인 역할의 연구도 임상적으로도 가치가 있을 것이다. 비록 동물에서 과오종의 형성과정에서 염색세포의 BMP 신호의 소실의 지지할만한 연구가 있으나 이들 결과가 장관상피의 wild-type SMAD4 대립 유전자의 손실이 있는 연소기용종증환자에서의 연구결과와의 연관성은 아직 확실치 않다.⁵⁻⁷

산발성대장암 연구분야에서는 상피에서 BMP신호전달의 손실은 흔히 일어나나 이것이 종양의 개시자로는 작동하지 않는다.⁵ 대신 산발성대장암에서 BMP 신호의 손실은 TGF β 의 신호경로, adenomato-carcinoma 이행과정에서 SMAD4 혹은 BMPR2의 손실과 현저하게 유사하게 보이므로 종양의 진행에 두 분자의 신호경로가 관여하는 것을 의미한다.

마지막으로 향후 대장암의 예후인자로서 MSI (MSS), TGF β , SMAD 등 BMP 신호전달과 관련 있거나 유사한 유전자들에 관련된 연구를 진행하여 치료의 반응과 생존율의 비교분석을 기대해 본다.

REFERENCES

1. D'ucy P, Karsenty G. The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int* 2000;57:2207-14.
2. Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Grawinkel V, Delius H, Massague J, Niehrs C. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 1999;401:480-5.
3. Balemans W, Van Hul W. Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev Biol* 2002;250:231-50.
4. Massague J, Blain SW, Lo RS. TGF-beta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 2000;103:295-309.
5. Hardwick JC, Kodach LL, Offerhaus GJ, van den Brink GR Bone morphogenetic protein signaling in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:806-12.
6. Loh K, Chia JA, Greco S, Cozzi SJ, Buttenshaw RL, Bond CE, et al. Bone morphogenetic protein 3 inactivation is an early and frequent event in colorectal cancer development. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47:449-60.
7. Beck SE, Jung BM, Fiorino A, Gomez J, Rosario ED, Cabrera BL, et al. Bone morphogenetic protein signaling and growth suppression in colon cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291:G135-G145.

연세원주의대
김익용