

# 기관고유연구사업 최종보고서

(과제번호 : 1110170-1 )

## 연구과제명 (국문)

갑상선 유두암에서 예후관련 유전자 DNA 메틸화의 임상적 의의

## 연구과제명 (영문)

DNA Methylation of prognosis associated genes in papillary thyroid carcinoma

과제책임자 : 정 기 욱

국립암센터

(뒷면)

(측면)

↑  
5cm  
↓

과  
제  
명

1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구사업 최종보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다.

(14 pont, 고딕체)

국  
립  
암  
센  
터

↑  
3cm  
↓

↑  
6cm  
↓

# 제 출 문

## 목 차

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “갑상선 유두암에서 예후관련 유전자 DNA 메틸화의 임상적 의의” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2011. 12 . 31

국립암센터

과 제 책 입 자 : 정기욱

연 구 원 : 정유석

” : 박민지

### < 요약 문 >

(한글)

(영문)

1. 연구의 최종목표
2. 연구의 내용 및 결과
3. 연구결과 고찰 및 결론
4. 연구성과 및 목표달성도
5. 연구결과의 활용계획
6. 참고문헌
7. 첨부서류

**< 요약 문 >**

|   |                                    |  |           |  |
|---|------------------------------------|--|-----------|--|
| 연구분야(코드)  | I-3                                | 과제번호   | 1110170-1 |  |
| 과제명   | 갑상선 유두암에서 예후관련 유전자 DNA 메틸화의 임상적 의의 |  |           |  |
| 연구기간/연구비<br>(천원)  | 합계                                 | 2011년 1월 1일~2011년 12월 31일                                | 45,000    |  |
|   | 1차년도                               | 2011년 1월 1일~2011년 12월 31일                                | 45,000    |  |
|   | 2차년도                               | 년 월 일 ~ 년 월 일  |           |  |
|   | 3차년도                               | 년 월 일 ~ 년 월 일  |           |  |
| 과제책임자   | 성명                                 | 정기욱  | 소속        | 갑상선암센터   |
|   | 전화번호                               | 031-920-1639   | 전자우편      | <a href="mailto:jcameron@ncc.re.kr">jcameron@ncc.re.kr</a> |
| 책임단어  | 국문                                 | 갑상선 유두암, CBX7, BRAF, DNA 메틸화                             |           |  |
|   | 영문                                 | papillary thyroid carcinoma. CBX7, BRAF, DNA methylation |           |  |
| <p><b>◆ 연구목표</b></p> <p>&lt;최종목표&gt;<br/>         갑상선 유두암에서 예후 관련 유전자들의 DNA 메틸화 양상을 검색하고 갑상선 유두암의 임상적 예후인자와의 연관성을 분석, 새로운 분자적 예후 표지자를 발굴함.</p> <p>&lt;당해년도 목표&gt;<br/>         갑상선 유두암에서 예후 관련 유전자인 MIG6, FOXA2, CBX7 의 DNA 메틸화 양상을 검색하고 갑상선 유두암의 임상적 예후인자와의 연관성을 분석함</p>   |                                    |  |           |  |
| <p><b>◆ 연구내용 및 방법</b></p> <p>1)연구내용</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- paraffin 고정 블록을 이용하여 58개의 갑상선 유두암 조직 및 match되는 중앙주위 정상 갑상선 조직 수집</li> <li>- MS-HRM (Methylation specific High Resolution Melting analysis)를 이용하여 목표 유전자의 methylation이 활발한 부위를 검색하고 MS-PCR primer를 design함</li> <li>- 수집한 갑상선 유두암조직과 중앙주위 정상 갑상선 조직에서 목표 유전자인 MIG6, FOXA2, CBX7의 DNA 메틸화 양상을 Metylation specific PCR을 이용하여 검색함</li> <li>- PCR을 이용하여 목표 유전자인 MIG6, FOXA2, CBX7의 갑상선 유두암 세포주 내에서의 유전자발현감소와 메틸화의 관련성을 분석함</li> <li>- 갑상선 유두암 세포주에서 DNA 목표 유전자의 메틸화 양상을 검색 후 항메틸화 제제 처리로 메틸화의 역전을 유도하고 이에 따른 목표 유전자 발현의 변이를 검색하여 실험 성과를 validation 함.</li> <li>- MAPK 신호 자극요소인 BRAF mutation을 검색하여 BRAF mutation과 목표 유전자의 메틸화와의 관련성을 분석함.</li> <li>- 수집된 갑상선암에서의 알려진 임상병리학적 예후인자를 검색하여 DNA 메틸화와의 연관성을 분석함.</li> </ul> |                                    |  |           |  |

| <p>2) 연구결과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- MIG6와 FOXA2에서는 대상 유전자 promotor region의 모든 CpG island를 대상으로 한 primer를 디자인하여 분석하였으나 methylation과 unmethylation이 분리되지 않음</li> <li>- CBX7에서는 primer 7-4와 primer7-5에서 분리되어 이 region을 대상으로 MS-PCR을 실험함</li> <li>- CBX7은 대상 갑상선 유두암의 17.2% (10/56)에서 methylation되어 있었음. (Figure 2)</li> <li>- pairwise matching한 모든 정상조직에서는 unmethylation 되어 있었음</li> <li>- 실험에 사용한 세포주중 HRM에서 분리된 모든 세포주 (BCPAP, FRO, FTC133)에서 CBX7 gene DNA에 대하여 MS-PCR 시행함</li> <li>- 대조군으로 normal rat thyrocyte인 FRTL5 세포주 사용함</li> <li>- 사용된 모든 세포주에서 CBX7 은 메틸화 되어 있었고 CBX7의 발현도 감소되어 있었음- 갑상선암 세포주에서 5'aza를 처리하였을때 methylation -&gt; demethylaiton 되는 것을 확인함</li> <li>- 갑상선암세포주에서 CBX7 expression change after administration of 5'aza (demethylating agent): 모든 세포주에서 demethylation됨에 따라 CBX7의 발현이 증가되는 것을 확인함</li> <li>-CBX7의 methylation status와 대상 갑상선 유두암의 clinico pathologic characteristic의 corelation을 조사하여 보았을 때 CBX7이 methylation되었는 군에서 BRAF mutation이 100.0%(10/10), unmethylation된 군에서는 BRAF mutation이 75.% (36/48)로 유의하게 많음. (p=0.023)</li> <li>- 전체 대상 갑상선 유두암에서 CBX7 methylation과 알려진 임상병리학적인자 (연령, 성별, 종양크기, 갑상선피막침윤, 림프관침윤, 혈관침윤, 림프절전이유무, TNM 병기등과 비교해 보았을때 유의한 차이는 없었음. 단 림프절전이유무를 볼 때 CBX7 methylation이 있는 군에서 림프절전이가 더 흔하게 나타나는 경향을 보임. 단 통계적으로 유의하지는 않음</li> </ul> |                       |                      |    |                       |        |           |     |   |      |  |  |       |  |  |
|--|-----------------------|----------------------|----|-----------------------|--------|-----------|-----|---|------|--|--|-------|--|--|
| <p><b>◆ 연구성과</b></p> <p>-정량적 성과</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>달성치/목표치<sup>1)</sup></th> <th>달성도(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SCI 논문 편수</td> <td>0/1</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>IF 합</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>기타 성과</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>-정성적 성과<br/>         갑상선 유두암에서 CBX7 expression이 DNA methylation에 의해 조절되는 것을 확인함. 또 이러한 methylation은 BRAF돌연변이와 연관관계가 있음 .</p>  |                       |                      | 구분 | 달성치/목표치 <sup>1)</sup> | 달성도(%) | SCI 논문 편수 | 0/1 | 0 | IF 합 |  |  | 기타 성과 |  |  |
| 구분   | 달성치/목표치 <sup>1)</sup> | 달성도(%)               |    |                       |        |           |     |   |      |  |  |       |  |  |
| SCI 논문 편수  | 0/1                   | 0                    |    |                       |        |           |     |   |      |  |  |       |  |  |
| IF 합   |                       |                      |    |                       |        |           |     |   |      |  |  |       |  |  |
| 기타 성과  |                       |                      |    |                       |        |           |     |   |      |  |  |       |  |  |
| <p><b>◆ 참여연구원</b><br/>(최종연도 참여인원)</p>  | <p>성명</p>             | <p>정기욱, 정유석, 박민지</p> |    |                       |        |           |     |   |      |  |  |       |  |  |

## Project Summary

|  |  |
|--|--|
| <b>Title of Project</b>  | DNA Methylation of prognosis associated genes in papillary thyroid carcinoma |
| <b>Key Words</b>   | papillary thyroid carcinoma. CBX7, BRAF, DNA methylation                     |
| <b>Project Leader</b>  | KI-WOOK CHUNG  |
| <b>Associated Company</b>  | none   |
| <p>1. Aim:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- To analyze DNA methylation status of prognosis associated genes in papillary thyroid carcinomas</li> <li>- To find auxiliary prognostic marker in papillary thyroid carcinoma</li> </ul> <p>2. Methods.</p> <p>We investigated DNA methylation status of MIG6, CBX7 and FOXA2, which are known to be associated with prognosis of PTC. We also investigated association of DNA methylation and known prognostic markers including BRAF mutation. 58 paraffin embedded PTC tissues and normal adjacent thyroid tissues were collected from archives. Methylation specific high resolution melting analysis (MS-HRM) was performed to validate DNA methylation status of target genes using cell lines. Then methylation specific PCR was performed to find DNA methylation of target genes using DNAs from paraffin embedded tissues. Significant association between DNA methylation and clinicopathological factors were defined as p value was less than 0.05.</p> <p>3. Result</p> <p>We failed to find anticipated DNA methylation site in MIG6 and FOXA2 genes. However, CBX7 gene was methylated in cell lines by HRM analysis. CBX7 DNA was methylated in twelve out of fifty-eight (%) PTC tissues. All normal tissues were unmethylated. CBX7 DNA WAS also methylated in BCPAP, FRO and FTC133 cell lines while TPC1 and FRTL5 (rat normal thyrocyte) cell lines. CBX7 expression was not observed in methylated cell lines and CBX7 expression was restored after treatment of 5' AZA. Methylation of CBX7 were not associated with known prognostic factors. However, BRAF mutation is more frequently found in CBX7 methylated PTCS. (10/10 vs. 36/48, p=0.023)</p> <p>4. Conclusion:</p> <p>CBX7 expression in PTC is regulated by CBX7 DNA methylation. CBX7 methylation is associated with BRAF mutation.</p> |  |

### 1. 연구의 최종목표

가. 최종목표: 갑상선 유두암에서 BRAF 유전자와 같이 예후에 관련되는 유전자들의 메틸화 양상을 검색하여 알려진 갑상선 유두암 예후인자와의 관련성을 분석하여 새로운 예후인자로서의 가능성을 탐색함

나. 당해연도 목표:

- 1) 갑상선 유두암에서 예후 관련 유전자인 MIG6, CBX7, FOXA2의 DNA 메틸화 양상을 검색하고
- 2) 유전자 메틸화와 유전자 발현과의 관계를 분석함
- 3) 갑상선 유두암의 임상적 예후인자와의 연관성을 분석함
- 4) 갑상선 유두암에서 BRAF 돌연변이와 목표 유전자 메틸화와의 연관성을 분석함

### 2. 연구의 내용 및 결과

가. Patients and methods

1) Tissue samples

- 국립암센터에서 갑상선 유두암으로 갑상선절제술을 시행받은 환자의 갑상선 유두암 조직 58개 (paraffin block에서 DNA 추출함)

- BRAF mutation 음성은 12개 (20.7%), BRAF mutation 양성은 46개 (79.3%)였고 양군간의 임상병리학적 인자는 통계적인 차이는 없었으나 BRAF mutation 양성군에서 림프절 전이가 54.3%로 많은 경향을 보였다. (p=0.070)

(Table 1. clinicopathologic characteristics of patients).

- 대조군 : 총 58례: 동일 환자의 갑상선암 주변의 정상 갑상선 조직 58개 (갑상선 유두암 조직과 동일 환자에서 pairwise)

- 세포주 : 갑상선암 세포주 5종 (FRTL5, BCPAP, FRO, TPC, FTC133) 이중 BCPAP은 BRAF 돌연변이 양성이고 FRO, TPC1 은 음성, 그리고 FTC133은 갑상선 여포암 세포주임. FRTL5는 rat normal thyroid follicular cell임.

| variable (no., %)            |                     | BRAF (-)     | BRAF (+)     | total        |
|------------------------------|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| Age                          | < 45                | 5/12 (41.7)  | 16/46 (34.8) | 21/58 (36.2) |
|                              | ≥ 45                | 7/12 (58.3)  | 30/46 (65.2) | 37/58 (63.8) |
| Sex                          | male                | 1/12 (8.3)   | 9/46 (19.6)  | 10/58 (17.2) |
|                              | female              | 11/12 (91.7) | 37/46 (80.4) | 48/58 (82.8) |
| Op. method                   | Lobectomy           | 1/12 (8.3)   | 4/46 (8.7)   | 5/58 (8.6)   |
|                              | Total thyroidectomy | 11/12 (91.7) | 42/46 (91.3) | 53/58 (91.4) |
| T stage                      | T1                  | 2/12 (16.7)  | 12/46 (26.1) | 14/58 (24.1) |
|                              | T2                  | 1/12 (8.3)   | 4/46 (8.7)   | 5/58 (8.6)   |
|                              | T3                  | 9/12 (75.0)  | 30/46 (65.2) | 39/58 (67.2) |
| N stage*                     | N0                  | 9/12 (75.0)  | 21/46 (45.7) | 30/58 (51.7) |
|                              | N1a                 | 2/12 (16.7)  | 20/46 (43.5) | 22/58 (37.9) |
|                              | N1b                 | 1/12 (8.3)   | 5/46 (10.9)  | 6/58 (10.3)  |
| Extrathyroidal extension     | negative            | 3/12 (25.0)  | 16/46 (34.8) | 19/58 (32.8) |
|                              | positive            | 9/12 (75.0)  | 30/46 (65.2) | 39/58 (67.2) |
| mean tumor size (cm)         |                     | 1.267 ± 1.01 | 1.115±0.55   |              |
| No. of metastatic lymph node |                     | 0.92±1.88    | 1.57±2.46    |              |

Table 1. Clinic-pathological characteristics of the patients.

## 2) 세포주로부터 RNA 추출

Quiagen 사의 RNeasy Mini kit를 이용하여 제작사의 recommendation에 따라서 cell pellet으로부터 RNA를 추출함. RNA의 quality check을 위하여 개개의 샘플에 대하여 Bioanalyzer (Agilent)를 이용하여 RNA의 quality를 검사하여 실험에 적절한 지를 판단함.

## 3) 파라핀 고정 조직으로부터 DNA추출 및 PCR

- 조직을 바로 조직의 mm2 당 40 µl 의 버퍼 용액(50mM Tris-HCl(pH 8.0), 1mM EDTA, 0.5% Tween 20, 200 µg/ml proteinase K)으로 처리하고 55°C에서 72시간 동안 반응시킨 뒤 바로 PCR을 시행함.

- PCR 용액(0.2 mM deoxynucleotide triphosphate, 1.5 unit of Pwo polymerase: Roche Molecular Biochemicals, 1 pmol primer, 1x PCR buffer 용액)을 미리 준비한 뒤, 조직 1-2 µl 와 반응 버퍼 49 µl를 혼합한 후, mineral oil 1 방울을 첨가함.

- Perkin Elmer 9600 Thermal Cycler를 이용하여 PCR을 시행함.

- 94°C에서 3분간 처리 후 94°C에서 30초, 50°C에서 60초, 그리고 72°C에서 30초간 25회 시행.

- PCR 산물을 2% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후, ethium bromide로 염색하여 관찰함.

- PCR 산물을 phenol/chloroform 용액으로 1회 정제한 후 에탄올에 침전시키고, DNA를 20 µl의 증류수에 녹인 후 2% agarose gel 전기영동으로 분리하고 각각의 DNA를 QIAEX II gel extraction kit를 이용하여 순수 정제하여 15 µl 증류수로 씻어 분리함.

- PCR에 사용된 primer는 다음과 같음

\* MIG6

F: AGG CGG CTA TGA GAG GTT TT

R: CAC TGC CGA GGT AGA GGA AG

\* CBX7

F: CTT GGA CGT GTT GGA GGA AT

R: AAT GGC CTC AGG GAA AAA CT

\* FOXA2

F: GTC CAG CAC AAA GAT GCA GA

R: CAG CGT CTT CAT GGC ACT TA

## 4) HRM (High resolution melting analysis)

- 1. <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>에서 gene name 입력 후 genomic sequence를 찾아 promoter sequence를 collecting

- Collecting한 promoter sequence에서 CpG island search후 HRM용 primer를 design 함

- LC-480 (Roche)를 이용하여 Real-time quantitative reverse transcription- PCR (qRT-PCR, HRM)DMF 시행함 .

- 1ul(20ng) template DNA, 0.2uM 의 primer, 0.5mM dNTP, 3mM MgCl2, 0.5 unit of Taq polymerase (HotStarTaq DNA Polymerase, Roche), 0.5ul of reso-light dye (Light cyclers 480 Reso light dye, Roche) 그리고 1ul of 10X buffer를 mix하여 a total volume 을 10ul f 맞춤.

- The PCR cycling 조건은 다음과 같음:

45 cycles after a 15 min pre-denaturing step at 95 °C, with a 20 s denaturing step at 95 °C, a 1 min annealing step at 52 °C, and a 20 s extension step at 72 °C. The final extension step was 5 min at 72 °C.

## 4) Methylation specific PCR (MSP)

- 다음과 같은 primer를 사용하여 methylation specific PCR을 시행함

\* CBX7

CBX7/M/FW-5 CGGAGGGAGGGTAGTTTC

CBX7/M/RV-5 CTCCTACTAAAAACCCGACGTC

CBX7/UM/FW-5 GATTGGAGGGAGGGTAGTTTT

CBX7/UM/RV-5 CCTCACTAAAAACCAACATCAT

## 5) 5'AZA treatment for demethylation of cell line

메틸화가 확인된 각각의 세포주에서 5'AZA로 탈 메틸화시킨 후 목표 유전자의 발현에 미치는 영향을 분석함. 처치하지 않은 세포주를 대조군으로 하였고 각각 0.2 µM, 1 µM 2 µM, 5 µM로 24

시간 처치 후 목표 유전자의 발현 변화를 검색함.

6) Statistical analysis

BRAF 돌연변이 유무를 포함한 수집된 환자의 임상병리학적 정보와 목표 유전자 DNA 메틸화 유무와의 연관관계를 STATA 10.0 software를 이용하여 분석하였다. 범주변수는 chi-square test를 이용하였고 연속변수는 independent-t test를 이용하여 평균의 차이를 분석하였다. p<0.05 미만일 경우 유의한 차이를 보이는 것으로 간주하였다.

나. 결과

1) 갑상선암 세포주에서 HRM 에 의한 methylation 여부 결정

- 전술한 4개의 세포주에서 HRM을 통하여 METHYLATION PRIMER를 결정함. TPC1에서는 모두 분리되지 않음.
- MIG6와 FOXA2에서는 대상 유전자 promotor region의 모든 CpG island를 대상으로 한 primer를 디자인하여 분석하였으나 methylation과 unmethylation이 분리되지 않음
- CBX7에서는 primer 7-4와 primer7-5에서 분리되어 이 region을 대상으로 MS-PCR을 실험함 (Fig.1)

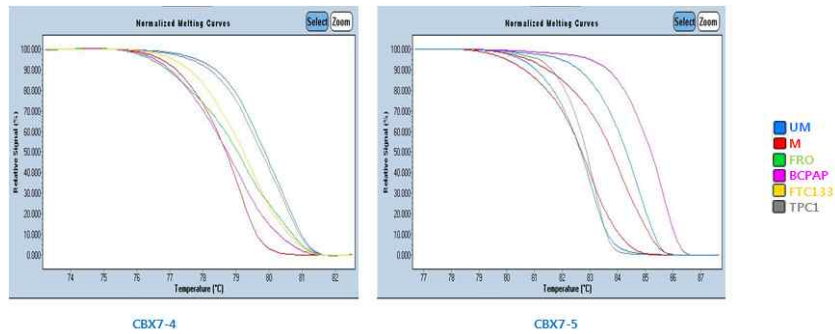


Fig1-(a)



Fig1-(b)

Fig.1 (a) Result of HRM for CBX7. TPC1을 제외한 FRO, BCPAP, FTC133에서 methylation curve와 unmethylation curve가 분리되어 있음. (b) 결정된 primer를 control에서 MS-PCR을 시행함

2) 갑상선 유두암 조직에서의 target gene CBX7 DNA methylation status

- CBX7은 대상 갑상선 유두암의 17.2% (10/56)에서 methylation되어 있었음. (Figure 2)
- pairwise matching한 모든 정상조직에서는 unmethylation 되어 있었음

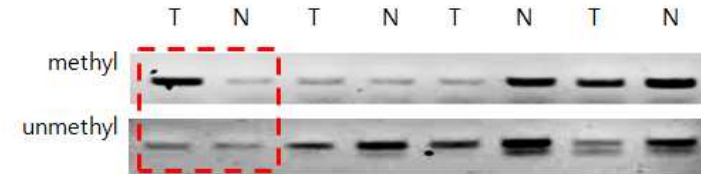


Figure 2. Representative feature of CBX7 methylation in paraffin embedded tissue

3) 갑상선암세포주에서 DNA methylation에 따른 target gene CBX7 expression 양상

- 실험에 사용한 세포주중 HRM에서 분리된 모든 세포주 (BCPAP, FRO, FTC133)에서 CBX7 gene DNA에 대하여 MS-PCR 시행함
- 대조군으로 normal rat thyrocyte인 FRTL5 세포주 사용함
- 사용된 모든 세포주에서 CBX7 은 메틸화 되어 있었고 CBX7의 발현도 감소되어 있었음(Figure 3)

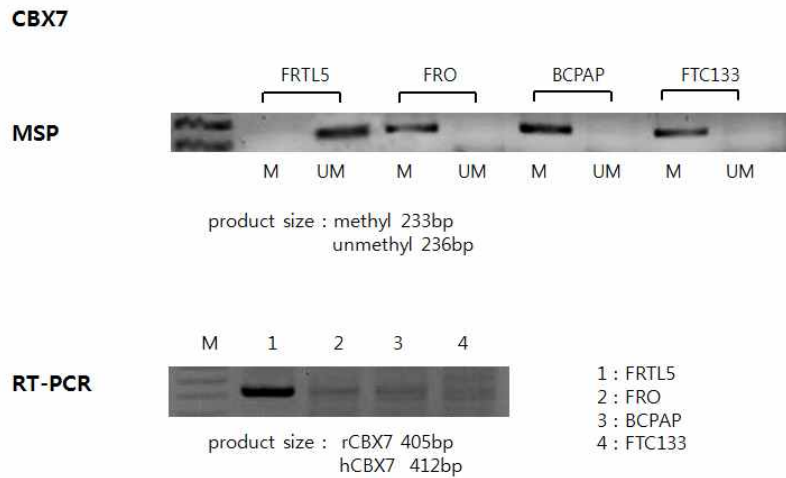


Fig 3. Expression of CBX7 and CBX7 methylation

4) 갑상선암 세포주에서 **denethylating agent** 처리에 의한 **target gene expression**의 변화.

- 갑상선암 세포주에서 5'aza를 처리하였을때 methylation -> demethylaiton 되는 것을 확인함 (fig4)

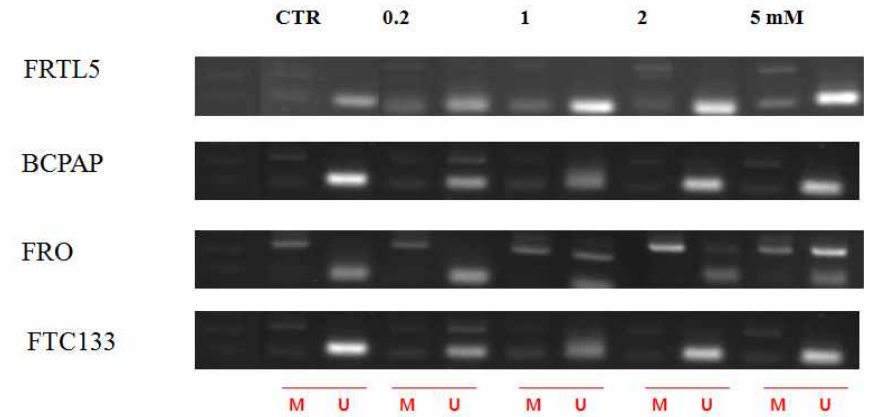


Fig.4 Methylation change of DUSP6 promotor after administration 5'AZA. Methylated promoters are demethylated in all three thyroide ancer cell lines. Unmethylated DNA in FRTL5 remained unmethylated after treatment.

- 갑상선암세포주에서 CBX7 expression change after administration of 5'aza (demethylating agent): 모든 세포주에서 demethylation됨에 따라 CBX7의 발현이 증가되는 것을 확인함 (Figure 5)

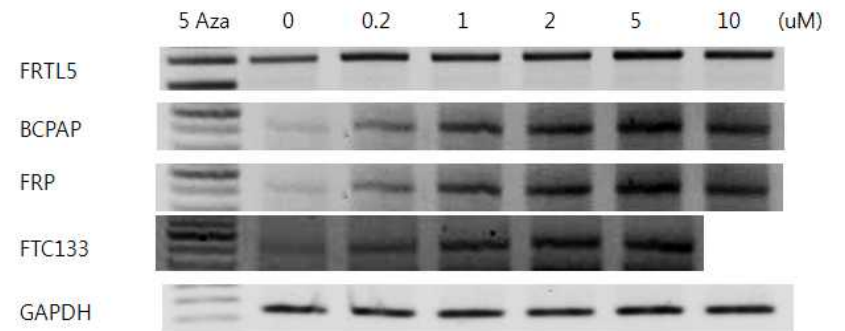


Figure 5. (a) CBX7 expression change after administration of 5'AZA. Expression increased after adminstration of 5'AZA in all cell lines. In FRTL5 (normal rat thyrocyte), no expression change were observed.

5) **CBX7 methylation status**와 갑상선 유두암의 임상병리학적 예후 인자와의 연관관계

-CBX7의 methylation status와 대상 갑상선 유두암의 clinico pathologic characteristic의 correlation을 조사하여 보았을 때 CBX7이 methylation된 군에서 BRAF mutation이 100.0%(10/10), unmethylation된 군에서는 BRAF mutation이 75.%(36/48)로 유의하게 많음. (p=0.023) (Table 2)

|                   | BRAF(-)      | BRAF(+)       | Total        |
|-------------------|--------------|---------------|--------------|
| Methylated (n, %) | 36/48 (75.0) | 10/10 (100.0) | 10/58 (17.2) |
| Unmethylated      | 12/48 (25.0) | 0/10 (0)      | 48/58 (82.8) |
| p value           |              |               | 0.024        |

Table 2. Correlation between SERPINA5 methylation and BRAF mutation

- 전체 대상 갑상선 유두암에서 CBX7 methylation과 알려진 임상병리학적인자 (연령, 성별, 종양크기, 갑상선피막침윤, 림프관침윤, 혈관침윤, 림프절전이유무, TNM 병기등과 비교해 보았을 때 유의한 차이는 없었음. 단 림프절전이유무를 볼 때 CBX7 methylation이 있는 군에서 림프절전이가 더 흔하게 나타나는 경향을 보임. 단 통계적으로 유의하지는 않음 (p=0.114) (Table 3)

|           | CBX7        |              |              |
|-----------|-------------|--------------|--------------|
|           | Methyl      | Unmethyl     | Total        |
| N0 (n, %) | 3/10 (83.3) | 27/48 (56.3) | 11/16 (68.7) |
| N1        | 7/10 (16.7) | 21/48 (56.3) | 5/16 (31.3)  |
| p value   |             |              | 0.114        |

Table 3. Correlation between LN metastasis and CBX7 methylation.

### 3. 연구결과 고찰 및 결론

본 연구에서는 갑상선 유두암의 예후와 관련되어 있다고 알려져 있는 CBX7의 발현이 갑상선 유두암에서 감소되어 있고 이러한 발현감소의 원인은 CBX7 유전자 promotor의 methylation임을 보였다.

유전자 발현을 조절하는 기전에는 여러 가지가 있지만 최근 epigenetic mechanism에 대한 연구가 활발하다. DNA 메틸화는 유전자의 발현을 조절하는 대표적인 기전 중 하나로서 종양억제 유전자의 발현을 억제하여 암의 발생 및 침윤에 중요한 역할을 한다. 갑상선 유두암에서도 NIS등의 종양 억제 유전자의 메틸화가 알려져 있으나 아직 초기적인 연구만 이루어져 왔다. 갑상선 유두암에서는 PTEN, RASSF1A, TIMP3, DAPK등의 종양억제 유전자의 methylation이 알려져 있고 TIMP3 종양억제 유전자의 methylation은 갑상선암의 예후와 관련되어 있다. 본 연구진의 기존 연구에서는 MAPK 신호전달체계의 하위유전자인 tPA의 inhibitor인 SERPINA5가 갑상선 유두암 조

직에서 발현감소됨을 보고한 바 있고 이러한 발현감소의 기전중 하나가 SERPINA5의 methylation임을 밝혔다. 또한 이러한 발현감소는 항 메틸화 제제를 이용하여 갑상선 유두암 세포주의 SERPINA5유전자를 demethylation시킴으로써 역전 되었다. 그러므로 항메틸화제제를 이용하여 갑상선 유두암에서 SERPINA5를 재발현 시킴으로써 갑상선 유두암의 침범을 억제시킬 수 있는 가능성을 보여주었다. 실제로 타 연구에서도 RAR beta유전자를 demethylation시켜 갑상선암 세포주의 방사성 요오드 섭취를 증가시킬 수 있음을 보인다.

CBX7은 22q13.1에 위치한 유전자로 세포의 성장에 관여하며 유전자 전사과정을 억제하는 것으로 알려져 있다. CBX7은 갑상선암중 공격적인 성질을 가지고 있는 미분화 갑상선암에서 발현이 억제되며 CBX7 발현 저하 분율이 양성종양에서 미분화갑상선암으로 갈수록 더 커지고, CBX7을 restoration할 때 cancer cell의 성장속도가 감소함을 보여주고 있어, loss of CBX7이 갑상선암의 progression에 기여한다고 볼 수 있다. 그러므로 CBX7 은 종양억제 유전자로서의 역할을 가지고 있다는 가정이 가능하며 promotor에 CpG island를 풍부하게 가지고 있으므로 methylation에 의해 발현이 조절됨을 알 수 있고 본연구에서 입증하였다.

두번째로 본 연구에서는 CBX7의 methylation이 BRAF돌연변이와 연관이 있음을 보였다. BRAF 돌연변이는 갑상선 유두암에서 가장 각광받고 있는 분자 현상으로 갑상선 유두암의 발암기전에 관여할 뿐 아니라 갑상선 유두암의 예후인자로서도 주목받고 있다. 그러나 우리나라의 경우 BRAF돌연변이의 발생빈도가 56-85%에 달할 정도로 아주 높으므로 BRAF돌연변이가 갑상선 유두암의 공격적인 행동을 예측한다면 우리나라 갑상선 유두암의 일반적인 양호한 치료성적을 설명할 수 없다. 그러므로 BRAF돌연변이가 있는 갑상선 유두암 중에서도 BRAF 신호 전달체계의 하위에 위치하고 있는 유전자의 발현에 따라 BRAF의 효과가 생체된다고 가설을 세울 수 있다. 이러한 BRAF돌연변이와 CBX7 DNA methylation간의 연관관계는 SERPINA5 methylation의 기전에 BRAF돌연변이가 작용할 가능성을 유추할 수 있게 해주며 추가로 양 유전자 현상간의 기전을 밝히기 위한 연구가 필요하다. 흥미로운 사실은 갑상선암에서 다양한 유전자의 메틸화가 보고되고 있는데 공통적으로 BRAF돌연변이가 있는 군에서 더 많은 메틸화를 보인다는 점이다.

비록 본 연구에서는 sample숫자가 적었기 때문에 CBX7 methylation이 있는 군과 없는 군간에 임상병리학적 인자에 통계적인 차이를 보이지는 않았지만 methylation이 있는 군에서 림프절 전이가 더 많은 경향을 보였다.

본 연구에서 target으로 삼았던 MIG6는 EGFR 신호전달체계의 억제 유전자 역할을 하며 갑상선 유두암에서 발현 감소시 재발이 더 많은 것으로 알려져 있고 BRAF 돌연변이가 있는 군 내에서도 MIG6의 발현 유무에 따라서 다른 예후를 보인다. FOXA2는 HIF 에 의해 발현이 조절되는 forkheadbox protein 으로 갑상선 유두암에서 발현이 감소되어 있고 PTC cell line에 FoxA2를 transfection 시키면 cell 성장이 억제된다.

MIG6와 FoxA2 gene은 모두 CpG island를 promotor에 가지고 있고 종양억제 유전자로서의 기능을 가지고 있으므로 갑상선암에서 발현이 감소된다면 발현조절기전은 DNA methylation일 가능성이 높다. 그러나 본 연구에서는 methylation을 확인하지 못하였다. Methylation을 연구하는데 있어서 가장 문제점은 CpG island가 다량으로 존재할 경우 실제로 메틸화되는 부분이 어디일 것인가 하는 문제이다. 모든 CpG island에 메틸화가 일어나는 것은 아니므로 임의로 MS-PCR을 위한 primer를 작성할 경우 실제로 메틸화가 일어나지 않는 부분을 targeting하여 위음성의 결과를 초래할 수 있다. Methylation specific high resolution melting analysis (MS-HRM)은 이러한 문제를 해결하기 위한 최선의 방법으로 미리 전체 promotor sequence에서 methylation되어있는 부분과 unmethylation되어 있는 부분을 확인 후 실제의 methylation PCR용 promoter를 작성하게



되므로 민감도와 특이도가 가장 높은 방법이라 할 수 있다. 그러나 두 유전자의 경우 사용한 3종의 cell line에서 모두 methylation되어 있는 promotor region을 찾지 못하였다. 물론 사용한 세포주가 methylation 되어 있지 않은 종양에서 기원한 세포주일 가능성도 있지만 일부의 신선조직에서 실험한 결과도 특정 메틸화 부분을 찾지는 못하였다. 또 하나의 가능성으로는 CpG island가 너무 조밀하게 있는 경우 primer design에 기술적인 난점이 있으므로 primer 작성과정에서 기술적인 오류를 범했을 가능성도 배제할 수는 없지만 HRM의 정확도를 고려할 때 MIG6와 FOXA2의 유전자 메틸화에 대해서는 회의적으로 생각되어진다.

결론적으로 갑상선 유두암 세포주에서 종양억제 유전자인 CBX7의 발현 감소는 DNA promotor의 methylation이 기전이며 이러한 발현 감소는 demethylation agent에 의해 역전 될 수 있고 CBX7의 methylation은 BRAF돌연변이 양성과 관련이 있었다. 추후 demethylating agent의 치료제로서의 가능성에 대한 연구와 BRAF돌연변이와 종양억제 유전자의 methylation사이의 상관관계에 대한 추가 연구가 필요하다.

#### 4. 연구성과 및 목표달성도

##### (1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

| 논문명 | 저자<br>(저자구분 <sup>1)</sup> ) | 저널명(IF.) | Year;<br>Vol(No):Page | 구분 <sup>2)</sup> | 지원과제번호 <sup>3)</sup> |
|-----|-----------------------------|----------|-----------------------|------------------|----------------------|
|     |                             |          |                       |                  |                      |
|     |                             |          |                       |                  |                      |

\* 논문 작성중 Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism (IF 6.342) 접수 예정

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

| 논문명   | 저자  | 학술대회명                    | 지역 <sup>1)</sup> | 지원과제번호  |
|---|-----|--------------------------|------------------|---------|
| DNA methylation of prognosis associated genes in papillary thyroid carcinomas | 정기욱 | 대한 갑상선학회<br>춘계학술대회 구연 채택 | 국내               | 1110170 |
|   |     |                          |                  |         |

다. 산업재산권

| 구분 <sup>1)</sup> | 특허명 | 출원인 | 출원국 | 출원번호 |
|------------------|-----|-----|-----|------|
|                  |     |     |     |      |
|                  |     |     |     |      |

1) 구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저서

| 저서명 | 저자 | 발행기관(발행국, 도시) | 쪽수 | Chapter 제목, 쪽수 |
|-----|----|---------------|----|----------------|
|     |    |               |    |                |

| (공저일 경우) |  |  |  |  |
|----------|--|--|--|--|
|          |  |  |  |  |
|          |  |  |  |  |

마. 연구성과의 정부정책 기여

| 보고서명 | 정부정책 | 기여내용 |
|------|------|------|
|      |      |      |
|      |      |      |

바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

| 최종목표                      | 연차별목표 | 달성내용  | 달성도(%) |     |     |
|---------------------------|-------|---|--------|-----|-----|
|                           |       |   | 연차     | 최종  |     |
| 갑상선 유두암, 정상 조직에서 메틸화 양성검색 | 1차년도  | 갑상선 유두암, 정상 조직에서 MIG6, CBX7, FOXA2의 메틸화 양성검색      | 100    | 100 |     |
|                           |       | 갑상선 유두암 세포주에서 CBX7의 메틸화가 CBX7 유전자 발현과 관련이 있음을 확인함 | 100    | 100 |     |
|                           |       | 갑상선 유두암 조직에서 CBX7 메틸화와 갑상선 유두암 예후 인자와의 연관성 확인     | 100    | 100 |     |
|                           | 2차년도  | CBX7 메틸화와 BRAF 돌연변이와의 연관성 검색                      | 연관 있음  | 100 | 100 |
|                           |       |   |        |     |     |
|                           |       |   |        |     |     |
| 3차년도                      |       |   |        |     |     |
|                           |       |   |        |     |     |

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

| 평가의 착안점                          | 자 체 평 가                         |
|----------------------------------|---------------------------------|
| 대상환자 및 대조군 설정의 적절성 여부            | 적절히 선정되었음                       |
| 입상데이터 수집의 충실성 여부                 | 모든 대상환자의 암상 DATA를 수집하였음         |
| BRAF 돌연변이 검색방법의 정확성              | double check로 BRAF돌연변이를 적절히 수집함 |
| DNA 메틸화와 유전자 발현간의 상관관계 여부        | CBX7 유전자의 메틸화가 유전자 발현에 영향을 미침   |
| DNA 메틸화의 기능분석과 실험의 validation 여부 | HRM을 통하여 메틸화 여부를 정확히 파악함        |
| DNA 메틸화와 알려진 예후인자와의 상관관계 여부      | BRAF mutation과 상관관계가 있었음        |

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

| 구 분       | 건 수 | 비 고  |
|-----------|-----|--|
| 학술지 논문 게재 | 1   | Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism (6.342) |
| 산업재산권 등록  |     |  |
| 기 타       |     |  |

(2) 연구성과의 활용계획

1) CBX7 유전자의 DNA methylation과 갑상선 유두암의 예후인자와의 상관관계

CBX7 유전자의 발현억제가 갑상선 유두암의 예후인자로 생각되어지는 BRAF 유전자의 돌연변이와 상관이 있으므로 BRAF 돌연변이의 보조적인 예후인자로써의 가능성을 탐색하기 위한 연구를 수행할 예정이다. 림프절전이와 상관이 있는 경향을 보였으므로 보다 많은 환자의 조직을 수집하여 different pathway에서 CBX7 유전자의 역할에 대한 연구를 수행할 계획임.

2) MAPK 신호전달 억제 유전자의 methylation과 유전자 발현과의 상관관계.

유전자의 발현기전에는 여러 가지가 기전이 작용하고 있지만 epigenetic mechanism이 중요한 역할을 하고 있으며 CBX7의 발현 역시 promotor methylation에 의해 조절 받는다. CBX7은 tumor invasion에 중요한 역할을 하는 유전자로 demethylation에 의해 발현이 증가하므로 치료 약제로서의 가능성을 생각해 볼 수 있다. 그러므로 갑상선 유두암 세포주에서 demethylation agent 처리 후에 세포의 침윤 능력에 변화가 있는지를 확인하는 연구를 계획 중이며 확인될 경우 치료제로써의 가능성을 탐구할 수 있다.

6. 참고문헌

- 1) 암등록 중앙통계 2009 국립암센터 중앙암등록본부
- 2) DeGroot LJ Kaplan EL, McCormick M, Straus FH 1990 Natural history, treatment, and course of papillary thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab. 71:414-424
- 3) Hundahl SA, Flemming ID, Fremgen AM, Menck HR 1998 A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995. Cancer. 83:2638-2648
- 4) Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, Carson KA, Vasko V, Larin A, Tallini G, Tolaney S, Holt EH, Hui P, Umbricht CB, Basaria S, Ewertz M, Tufano AP, Califano JA, Ringel MD, Zeiger MA, Sidransky D, Ladenson PW. 2005 BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab. 90:6373-9
- 5) Fugazzola L, Puxeddu E, Avenia N, Romei C, Cirello V, Cavaliere A, Faviana P, Mannavola D, Moretti S, Rossi S, Sculli M, Bottici V, Beck-Peccoz P, Pacini F, Pinchera A, Santeusano F, Elisei R 2006 Correlation between B-RAFV600E mutation and clinico-pathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italian study and review of the literature. Endocr Relat Cancer. 13:455-64
- 6) Chung KW, Yang SK, Lee GK, Kim EY, Kwon S, Lee SH, Park DJ, Lee HS, Cho BY, Lee ES, Kim SW 2006 Detection of BRAFV600E mutation on fine needle aspiration specimens of thyroid nodule refines cyto-pathology diagnosis, especially in BRAF600E mutation-prevalent area. Clin Endocrinol (Oxf.) 65:660-666
- 7) Mitsutake N, Miyagishi M, Mitsutake S, Akeno N, Mesa C Jr, Knauf JA, Zhang L, Taira K, Fagin JA 2006 BRAF mediates RET/PTC-induced mitogen-activated protein kinase activation in thyroid cells: functional support for requirement of the RET/PTC-RAS-BRAF pathway in papillary thyroid carcinogenesis. Endocrinology. 147:1014-9
- 8) Carpi A, Mechanick JL, Saussez S, Nicolini A. Thyroid tumormarker genomics and proteomics: diagnostic and clinical implications. J Cell Physiol. 2010 Sep; 224(3):612-9.
- 9) Lee MH, Lee SE, Kim DW, Ryu MJ, Kim SJ, Kim SJ, Kim YK, Park JH, Kweon GR, Kim JM, Lee JU, De Falco V, Jo YS, Shong M. Mitochondrial localization and regulation of BRAFV600E in thyroid cancer: a clinically used RAF inhibitor is unable to block the mitochondrial activities of BRAFV600E. J Clin Endocrinol Metab. 2011 Jan;96(1):E19-30.
- 10) Ruan DT, Warren RS, Moalem J, Chung KW, Griffin AC, Shen W, Duh QY, Nakakura E, Donner DB, Khanafshar E, Weng J, Clark OH, Kebebew E. Mitogen-inducible gene-6 expression correlates with survival and is an independent predictor of recurrence in BRAF(V600E) positive papillary thyroid cancers. Surgery. 2008 Dec;144(6):908-13;
- 11) Lee HS, Cho SB, Lee HE, Kim MA, Kim JH, Park do J, Kim JH, Yang HK, Lee BL, Kim WH. Protein expression profiling and molecular classification of gastric cancer by the tissue array method. Clin Cancer Res. 2007 Jul 15;13(14):4154-63.
- 12) Pallante P, Federico A, Berlingieri MT, Bianco M, Ferraro A, Forzati F, Iaccarino A, Russo M, Pierantoni GM, Leone V, Sacchetti S, Troncone G, Santoro M, Fusco A Loss of the CBX7 gene expression correlates with a highly malignant phenotype in thyroid cancer. Cancer Res. 2008 Aug 15;68(16):6770-8.

(13) Gil J, Bernard D, Martínez D, Beach D Polycomb CBX7 has a unifying role in cellular lifespan. *Nat Cell Biol.* 2004 Jan;6(1):67-72

(14) Bernard D, Martinez-Leal JF, Rizzo S, Martinez D, Hudson D, Visakorpi T, Peters G, Carnero A, Beach D, Gil J CBX7 controls the growth of normal and tumor-derived prostate cells by repressing the Ink4a/Arf locus. *Oncogene.* 2005 Aug 25;24(36):5543-51.

(15) Bernstein E, Duncan EM, Masui O, Gil J, Heard E, Allis CD. Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin *Mol Cell Biol.* 2006 Apr;26(7):2560-9.

(16) Ruan DT, Warren RS, Moalem J, Chung KW, Griffin AC, Shen W, Duh QY, Nakakura E, Donner DB, Khanafshar E, Weng J, Clark OH, Kebebew E. Mitogen-inducible gene-6 expression correlates with survival and is an independent predictor of recurrence in BRAF(V600E) positive papillary thyroid cancers. *Surgery.* 2008 Dec;144(6):908-13

(17) Qi J, Pellicchia M, Ronai ZA The Siah2-HIF-FoxA2 axis in prostate cancer - new markers and therapeutic opportunities. *Oncotarget.* 2010 Sep;1(5):379-85

## 7. 첨부서류