기관고유연구사업 결과보고서

(과제번호 : 0810100-1)

연구과제명 (국문) 갑상선 유두암에서 MAPK 신호전달 억제 유전자 DNA 메틸화의 임상적 의의

연구과제명 (영문) DNA Methylation of MAPK signaling inhibiting genes in papillary thyroid carcinoma

과제책임자 : 정기욱

국 립 암 센 터

(뒷면)

(측면)

1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구사업 결과보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다.

↑
6cm ↓

↑
5cm
↓

갑상선
유두암
에서
MAPK
신호
전달
억제
유전자
DNA
메틸화의
임상적
의의

국
립
암
센
터

↑
3cm
↓

편집순서 2 : 제출문

제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 " 갑상선 유두암에서 MAPK 신호전달 억제 유전자 DNA 메틸화의 임상적 의의 " 과제의 결과보고서로 제출합니다.

2008. 12 . 31

국 립 암 센 터

과 제 책 임 자 : 정기욱

연 구 원 : 민혜숙

목 차

< 요 약 문 > ---------- 1

(한글)

(영문)

1. 연구사업의 최종목표 ---------- 3

2. 연구사업의 내용 및 결과 ---------- 4

3. 연구결과 고찰 및 결론 ---------- 13

4. 연구성과 및 목표달성도 ---------- 14

5. 연구결과의 활용계획 ---------- 15

6. 참고문헌 ---------- 16

7. 첨부서류 ---------- 17

< 요 약 문 >

연구분야(코드)	실용화 (B-3)	과제번호	0810100-1
과 제 명	갑상선 유두암에서 MAPK 신호전달 억제 유전자 DNA 메틸화의 임상적 의의		
연구기간/연구비(천원)	합계	2008년 1월 1일 ~2008년 12월 31일	
	1차년도	2008년 1월 1일 ~2008년 12월 31일	

과제책임자	성 명	정기욱	주민등록번호	
	전화번호	031-920-1639	전 자 우 편	jcameron@nc.re.kr

색인단어	국문	갑상선 유두암, MAPK, DUSP4, DUSP6, SERPINA5, BRAF
	영문	papillary thyroid carcinoma, MAPK, DUSP4, DUSP6, SERPINA5, BRAF

◆ 연구목표

<최종목표>

- 갑상선 유두암에서 MAPK 신호전달 억제 유전자들의 DNA 메틸화 양상을 검색하고 갑상선 유두암의 임상적 예후인자와의 연관성을 분석, 새로운 분자적 예후 표지자를 발굴함.

<당해연도목표>

갑상선 유두암에서 MAPK 신호전달 억제 유전자인 DUSP4, TIMP3의 DNA 메틸화 양상을 검색하고 갑상선 유두암의 임상적 예후인자와의 연관성을 분석함

◆ 연구내용 및 방법

배경 : 갑상선 유두암은 일반적으로 좋은 예후를 보이나 일부의 갑상선 유두암은 공격적인 생물학적 행동양상을 보임. 분자적인 예후인자로 BRAF 돌연변이 유무를 사용하는 방법이 제안되고 있지만 모든 BRAF돌연변이 양성 유두암이 나쁜 예후를 보이는 것은 아님 . 그러므로 BRAF신호전달체계의 하위 유전자들의 발현이 임상적으로 어떤 의미를 가지는 것을 DNA메틸화 검색을 통하여 알아보고자 함

검체 및 방법 : - paraffin 고정 블록을 이용하여 76개의 갑상선 유두암 조직, 10개의 종양주위 정상 갑상선 조직 수집

- 수집한 갑상선 유두암조직, 선종 조직과 종양주위 정상 갑상선 조직에서 목표 유전자인 DUSP4, TIMP3의 DNA 메틸화 양상을 Metylation specific PCR과 sequencing을 이용하여 검색함
- PCR을 이용하여 목표 유전자인 DUSP4, TIMP3의 갑상선 유두암 세포주 내에서의 유전자발현 감소와 메틸화의 관련성을 분석함
- 갑상선 유두암 세포주에서 DNA 목표 유전자의 메틸화 양상을 검색 후 항메틸화 제재 처리로 메틸화의 역전을 유도하고 이에 따른 목표 유전자 발현의 변이를 검색하여 실험 성과를 validation 함.
- MAPK 신호 자극요소인 BRAF mutation을 검색하여 BRAF mutation과 목표 유전자인 DUSP4, TIMP3의 메틸화와의 관련성을 분석함.
- 수집된 갑상선암에서의 알려진 임상병리학적 예후인자를 검색하여 DNA 메틸화와의 연관성을 분석함.

결과 :

- 모든 세포주에서 DUSP4와 DUSP6는 발현되어 있었고 methylation되어 있지 않았다. SERPINA5는 WRO와 TPC 세포주에서 발현이 감소되어 있었으며 promotor가 methylation되어 있었고 demethylating agent인 5'AZA cd로 처리하였을 때 unmethylation되면서 발현이 증가하였다.
- 76개의 갑상선암 조직에서 DUSP4와 DUSP6는 모두 unmethylation되어 있었으며 SERPINA5는 82.9% (63/76)에서 methylation되어 있었다.
- SERPINA5의 methylation status와 대상 갑상선 유두암의 clinico pathologic characteristic의 corelation을 조사하여 보았을 때 SERPINA5가 methylation되있는 군에서 BRAF mutation이 84.1%(53/63), unmethylation된 군에서는 BRAF mutation이 53.8% (7/13)로 유의하게 많았다. (p=0.024)
- 전체 대상 갑상선 유두암을 BRAF mutation 양성군과 음성군으로 나누어 분석할 때 BRAF mutation음성군에서는 림프절 전이가 SERPINA5 methylation 군에서는 40% (4/10), SERPINA5 unmethylation군에서는 16.7% (1/6)으로 methylation 군에서 림프절 전이가 더 흔한 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. (p=0.114)

결론 : MAPK신호전달 억제 유전자인 SERPINA5의 발현은 갑상선 유두암에서 억제되어 있으며 억제 기전은 SERPINA5 promotor의 methylation과 관련되어 있으며 SERPINA5 methylation된 군에서 BRAF mutation이 많이 발견된다. SERPINA5의 methylation은 BRAF 돌연변이 음성군에서 림프절 전이와 연관이 있을 수 있다.

◆ 연구성과

-정량적 성과 :

Clinical endocrinology 에 게출 예정 (SCI급, IF 3.358)

-정성적 성과: 갑상선 유두암에서 SERPINA5 유전자의 발현이 감소되어 있음을 확인하였고 이러한 발현 감소는 DNA promotor methylation에 의한 것임. SERPINA5 methylation이 있는 군에서 BRAF 돌연변이가 더 흔했고 BRAF돌연변이 음성군에서는 SERPINA5 methylation이 있는 군에서 림프절전이가 더 흔한 경향을 보임. 이는 SERPINA5 methylation이 갑상선 유두암에서 나쁜 예후와 관련있을 가능성을 보임.

◆ 참여연구원 (최종연도 참여인원)	성 명	정기욱, 민혜숙, 양선경
	주민등록번호	

Project Summary

Title of Project	DNA Methylation of MAPK signaling inhibiting genes in papillary thyroid carcinoma
Key Words	papillary thyroid carcinoma, MAPK, DUSP4, DUSP6, SERPINA5, BRAF
Project Leader	Ki-Wook Chung
Associated Company	None

Purpose : the purpose of this research was to identify methlation status of MAPK signaling inhibiting genes located sgenes that are differently expressed in papillary thyroid cancer according to BRAF mutaiton status and clinical

Method : 76 PTC paraffin embedded tissue and 5 PTC cel lines were studied. DUSP4, DUSP6 and SERPINA5 gene expression and promotor methylation was serched using methylation specific PCR and validiated through bisulfite sequencing. In cell lines, expression change was confirmed after treatment of demethylating agent 5'AZA cd. Clinico-pathological characteristics are compared according to BRAF mutation status and each gene promotor methylation status.

Results : DUSP4 and DUSP6 expression increased in all cell line and DNA of two gene was unmethylated. SERPINA5 gene expression decreased in two cell line and those was associated with promotor expression. SERPINA5 methylation is associated with higher BRAF mutation rate. SERPINA5 methylation group showed higher lymphnode metastasis rate than unmethylated group in BRAF mutation negative PTC.

Conclusion : MAPK signaling inhibiting gene SERPINA5 expression decreased in PTC cell line and and its expression is regulated by promotor methylation. SERPINA5 methylation is associated with higher BRAF mutation rate.

1. 연구사업의 최종목표

(1) 최종목표 :

갑상선 유두암에서 BRAF에 의해 활성화되는 MAPK 신호전달체계를 억제하는 유전자들의 메틸화 양상을 검색하여 알려진 갑상선 유두암 예후인자와의 관련성을 분석하여 새로운 예후인자로서의 가능성을 탐색함

<당해연도목표>

갑상선 유두암에서 MAPK 신호전달 억제 유전자인 DUSP4, TIMP3의 DNA 메틸화 양상을 검색하고 갑상선 유두암의 임상적 예후인자와의 연관성을 분석함

(2) 연차별 목표 및 내용

(단위 : 천원)

구분	목표	내용 및 범위	연구비
1차년도 (2008)	갑상선 유두암, 선종, 정상 조직에서 DUSP4 와 TIMP3의 메틸화 양상검색	표적 유전자의 메틸화 양상과 임상양상과의 연관성을 분석하고 BRAF 돌연변이와의 상관성을 분석.	40,000

2. 연구사업의 내용 및 결과

가. Patients and methods

1) Tissue samples

- 국립암센터에서 갑상선 유두암으로 갑상선절제술을 시행받은 환자의 갑상선 유두암 조직 76개
- BRAF mutation 음성은 16개 (21.1%), BRAF mutation 양성은 60개 (79.9%)였고 양군간의 임상병리학적 인자는 통계적인 차이는 없었으나 stage3가 BRAF mutation양성군에서 63.3%로 유의하게 많았다. (p=0.045)

(Table 1. clinicopathologic characteristics of patients).

- 대조군 : 총 10례: 갑상선암 주변의 정상 갑상선 조직 10개 (갑상선 유두암 조직과 동일 환자에서 pairwise)
- 세포주 : 갑상선 유두암 세포주 5종 (NPA, TPC1, WRO, DRO, XTC)

variable (no., %)		BRAF (-)	BRAF (+)	total
Age	< 45	8/16 (50)	28/60 (46.7)	36/76 (47.4)
	≥ 45	8/16 (50)	32/60 (53.3)	40/76 (52.6)
Sex	male	4/16 (25)	10/60 (16.7)	14/76 (18.4)
	female	12/16 (75)	50/60 (83.3)	62/76 (81.6)
Op. method	Lobectomy	1/16 (6.3)	4/60 (6.7)	5/76 (6.6)
	Total thyroidectomy	15/16 (93.7)	56/60 (93.3)	71/76 (93.4)
T stage	T1	7/16 (43.8)	24/60 (40)	3/76 (40.8)
	T2	1/16 (6.2)	0/60 (0)	1/76 (1.3)
	T3	8/16 (50)	36/60 (60)	44/76 (57.9)
N stage*	N0	11/16 (68.8)	27/60 (45)	38/76 (50)
	N1	5/16 (31.3)	33/60 (55)	38/76 (50)
Stage¶	S1	9/16 (56.3)	20/60 (33.3)	29/76 (38.2)
	S2	1/16 (6.3)	0/60 (0)	1/76 (1.3)
	S3	5/16 (31.3)	38/60 (63.3)	43/76 (56.6)
	S4	1/16 (6.3)	2/60 (3.3)	3/76 (3.9)
Extrathyroidal extension	negative	7/16 (43.8)	17/60 (28.3)	24/76 (31.6)
	positive	9/16 (56.3)	43/60 (71.7)	52/76 (68.4)
mean tumor size (cm)		1.20 ± 0.66	1.40±0.67	
No. of metastatic lymph node		2.75±4.66	2.68±4.74	

Table 1. Clinic-pathological characteristics of the patients. (* p=0.045, ¶ p=0.079)

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℃에서 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℃에서 3분간 처리 후 94℃에서 30초, 50℃에서 60초, 그리고 72℃에서 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

* DUSP4
F: AGG CGG CTA TGA GAG GTT TT
R: CAC TGC CGA GGT AGA GGA AG

* DUSP6
F: CTT GGA CGT GTT GGA GGA AT
R: AAT GGC CTC AGG GAA AAA CT

* SERPINA 5
F: GTC CAG CAC AAA GAT GCA GA
R: CAG CGT CTT CAT GGC ACT TA

4) Methylation specific PCR (MSP)

_ 다음과 같은 primer를 사용하여 methylation specific PCR을 시행함

* DUSP6

M F: GTT TTA ATG ATT GAA ACG TTT C
M R: ATT ACC GAA CTC CTC TCC G

UM F: AGG TTT TAA TGA TTG AAA TGT TTT
UM R: AAA TTA CCA AAC TCC TCT CCA

* DUSP4
MF: GTC GCG TTT TAT TTA AGT TTC G
MR: AAA ATT TAT TAA TAC TCC TCC GCG

UM F: GGT TGT GTT TTA TTT AAG TTT TGG
UM R: AAA ATT TAT TAA TAC TCC TCC ACA CT

* SERPINA 5
MF: GTT TGT AGG TAG GTT TGT TGG TC
MR: ACA TCG ATA CTT ACT ATA TCC CGT A

UM F: GTT TGT AGG TAG GTT TGT TGG TTG
UM R: ACA TCA ATA CTT ACT ATA TCC CAT A

5) Bisulfite sequencing for validation of MSP

DNA 1-2 μl(50 ng)을 automatic DNA sequencer(377 DNA Sequencer, PE Applied Biosystem)를 이용하여 fluorescence cycle sequencing 방법으로 DNA 양쪽가닥 모두에 대하여 염기서열을 결정. PCR에 사용된 primer들을 sequencing primer로 이용하고 확인된 염기서열을 clustal w program(ver. 1.5)으로 methylation 여부를 검색함.

나. 결과

1) 갑상선 유두암세포주에서 BRAF 돌연변이 및 DNA methylation에 따른 target gene expression 양상

- BRAF mutation status of PTC cell lines (Figure 1): 실험에 사용한 5종류의 세포주 중 NPA와 DRO는 BRAF mutant이고 WRO, XTC, TPC 세포주는 BRAF wild type이었다

- DUSP 4 expression and metylation status: 5개의 세포주 모두에서 DUSP4 expression은 증가되어 있었으며 DUSP4 promotor는 metylation되어 있지 않았다. (Figure 2-(a))

- DUSP6 expression and methylation status: 역시 5개의 세포주 모두에서 DUSP6 가 발현되어 있었으며 DUSP6 promotor도 methylation되어 있지 않았다. (figure 2-(b))

- SERPINA5 expression and methylation status: WRO와 TPC세포주에서는 발현이 감소되어 있었고 XTC, DRO, NPA에서는 발현이 감소되어 있지 않았다. 발현이 감소된 WRO와 TPC세포주에서는 SERPINA5의 promotor가 methylation되어 있었다. (Figure 2-(c))

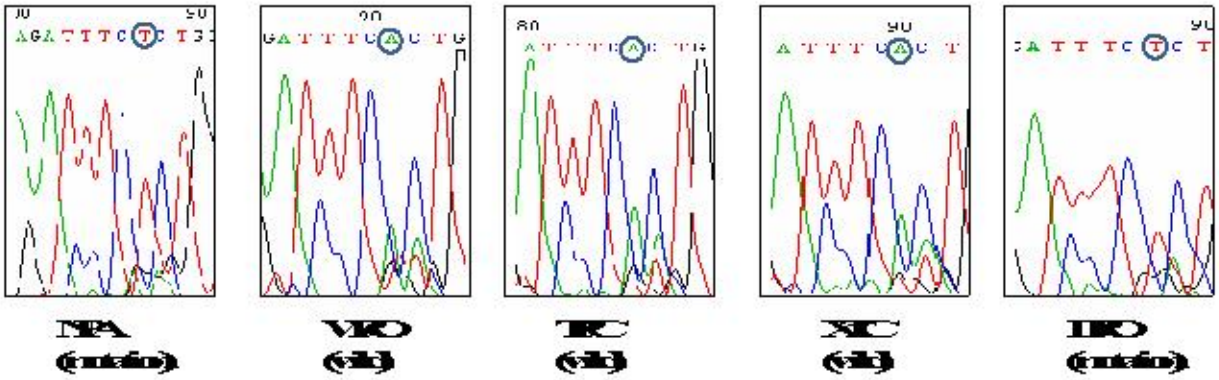
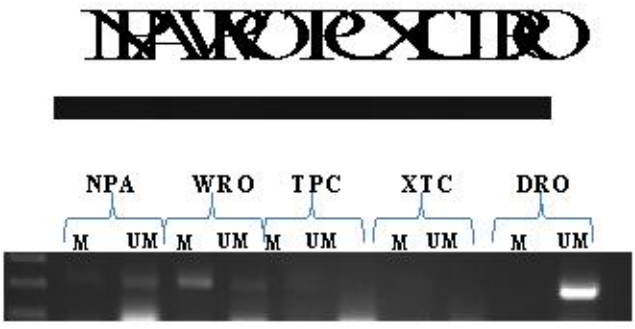
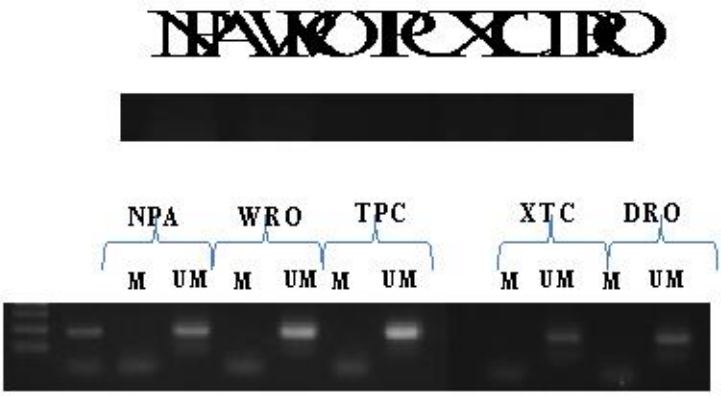


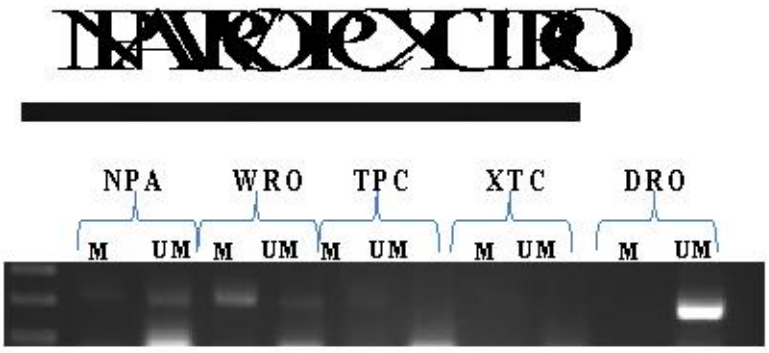
Fig 1. BRAF mutation status of each papillary thyroid carcinoma cell liones.



(a)



(b)



(c)

Fig 2. Target gene expression and DNA methylation status of each cell line. (a) DUSP 4 expression and metylation status. (b) DUSP6 expression and methylation status (c) SERPINA5 expression and methylation status

2) Validation of methylation status using bisulfite sequencing.

- MSP의 정확성을 validation하기 위하여 종양조직 25개와 정상조직 5개에서 bisulfite sequecing을 실시하였다. 모든 조직에서 MSP 결과와 bisulfite sequencing 결과는 match되었다. (Figure 3)

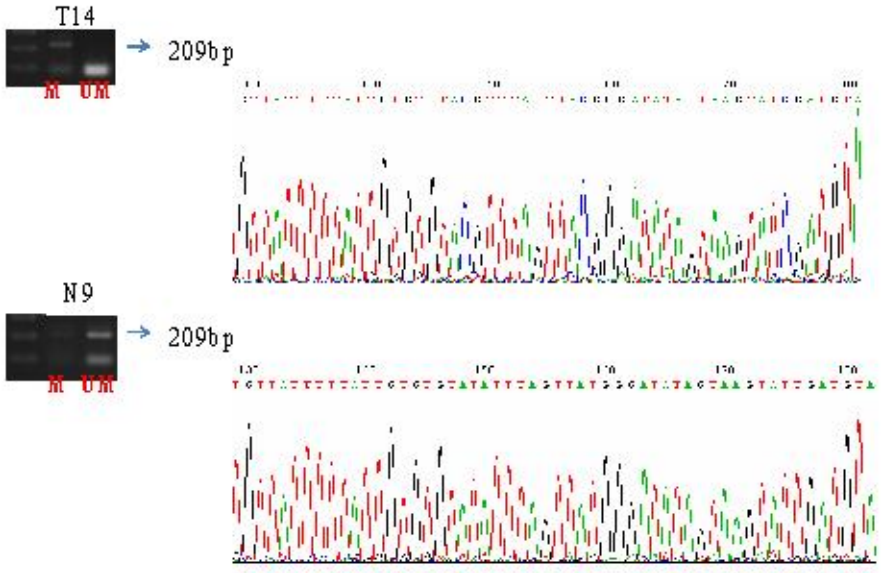


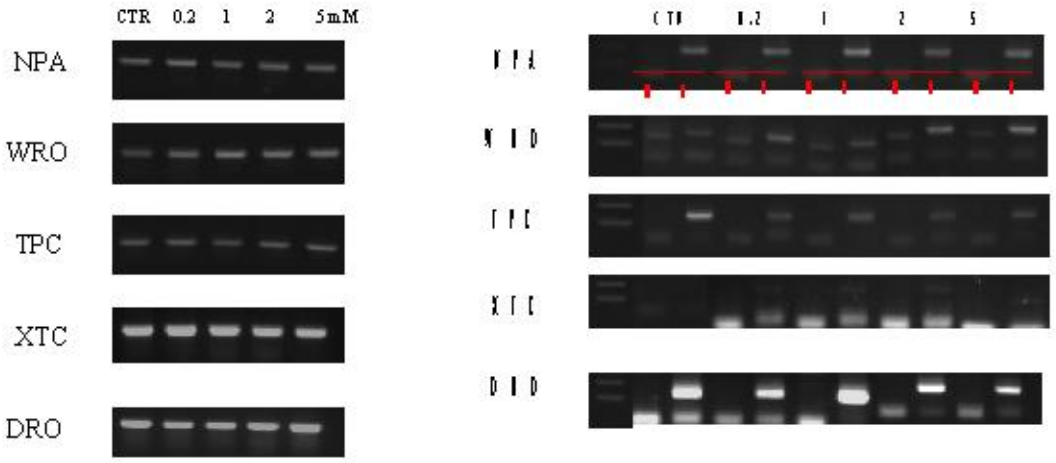
Figure 3 Validation of MSP by bisulfite sequencing. (a) Serpina 5 methylation by MSP and bisulfite sequencing. methylation되지않은 N9 sample에서는 bisulfite처리 후 CpG island가 T로 치환되어 있음.

3) 갑상선 유두암 세포주에서 demethylating agent 처리에 의한 target gene expression의 변화.

- DUSP 4 expression change after administration of 5'aza (demethylating agent): 5개의 세포주 모두에서 처리 후 유전자 발현과 methylation status모두 변화 없었음 (Figure 4-(a), 4-(b))

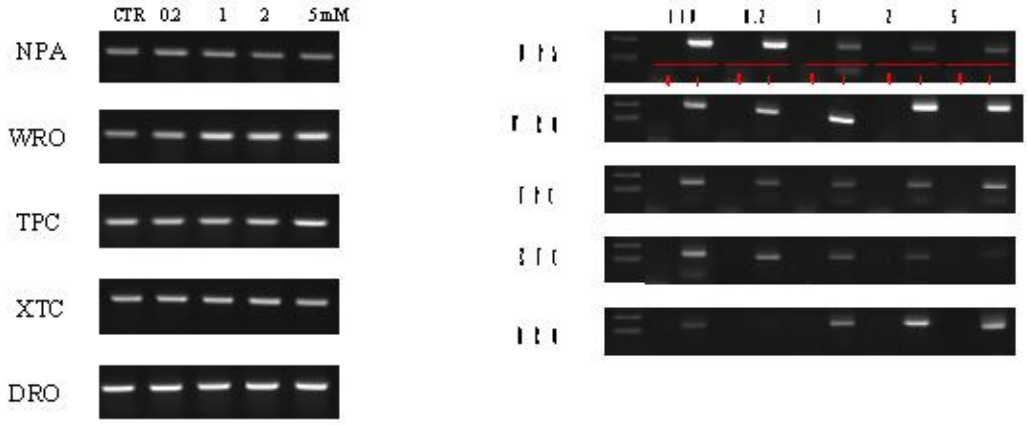
- DUSP 6 expression change after administration of 5'aza (demethylating agent): 5개의 세포주 모두에서 처리 후 유전자 발현과 methylation status모두 변화 없었음 (Figure 5-(a), 5-(b))

- SERPINA5 expression change after administration of 5'aza (demethylating agent): WRO 와 TPC 세포주에서 demethylation됨에 따라 SERPINA5의 발현이 증가되었고 이 두 세포주에서는 demethylation이 확인됨. (Figure 6-(a), 6-(b))



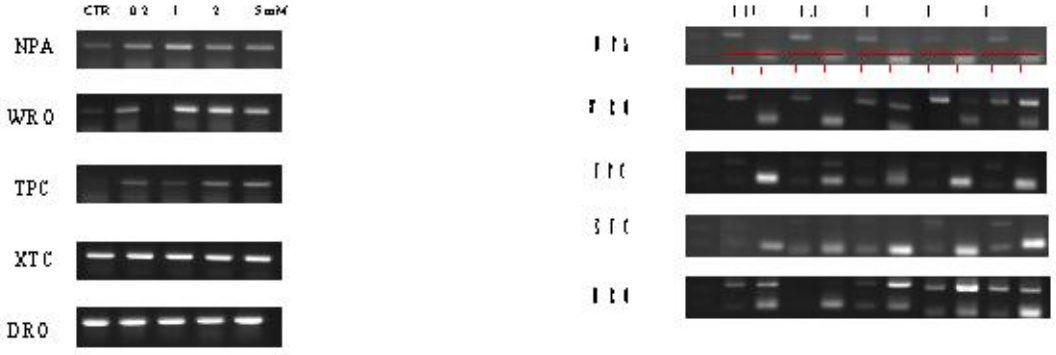
(a) (b)

Figure 4. (a) DUSP4 expression change after administration of 5'AZA. No expression changes were observed after adminstration. (b) Methylation change of DUSP4 promotor after administration. all promotors remained unmethylated.



(a) (b)

Figure 5. (a) DUSP6 expression change after administration of 5'AZA. No expression changes were observed after adminstration. (b) Methylation change of DUSP6 promotor after administration. all promotors remained unmethylated.



(a) (b)

Figure 6. (a) SERPINA5 expression change after administration of 5'AZA. Expression increased after adminstration of 5'AZA in WRO and TPC cell line. (b) Methylation change of DUSP6 promotor after administration 5'AZA. Methylated promotors are demethylated in WRO and TPC cell line..

4) 갑상선 유두암 조직에서의 target gene DNA methylation status

- DUSP4와 DUSP6는 대상 갑상선 유두암 조직 모두에서 unmethylation 되어 있었다.

- SERPINA5는 대상 갑상선 유두암의 82.9% (63/76)에서 methylation되어 있었다. (Figure 7)

- 각각 10개의 정상조직과 종양조직에서의 methylation양상을 비교하여 보았을 때 methylation된 tumor와 match되는 정상조직은 모두 unmethylated 되어 있었다.(Figure 8)

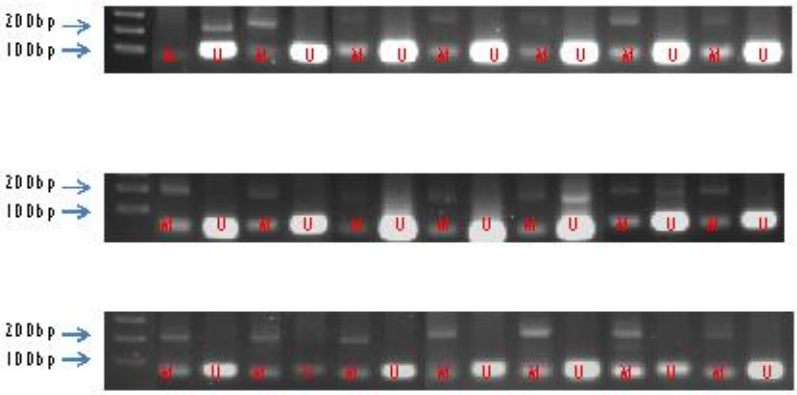


Figure 7. Representative feature of SERPINA5 methylation in paraffin embedded tissue

Figure 8. Comparison of SERPINA5 methylation in tumor and normal thyroid tissue

5) SERPINA5 methylation status와 갑상선 유두암의 임상병리학적 예후 인자와의 연관관계

- SERPINA5의 methylation status와 대상 갑상선 유두암의 clinico pathologic characteristic의 corelation을 조사하여 보았을 때 SERPINA5가 methylation되있는 군에서 BRAF mutation이 84.1%(53/63), unmethylation된 군에서는 BRAF mutation이 53.8% (7/13)로 유의하게 많았다. (p=0.024) (Table 2)

	BRAF(-)	BRAF(+)	Total
Methylated (n, %)	6/13 (46.2)	7/13 (53.8)	13/76 (17.1)
Unmethylated	10/63 (15.9)	53/63 (84.1)	63/76 (82.9)
p value			0.024

Table 2. Correlation between SERPINA5 methylation and BRAF mutation

- 전체 대상 갑상선 유두암을 BRAF mutation 양성군과 음성군으로 나누어 분석할 때 BRAF mutation음성군에서는 림프절 전이가 SERPINA5 methylation 군에서는 40% (4/10), SERPINA5 unmethylation군에서는 16.7% (1/6)으로 methylation 군에서 림프절 전이가 더 흔한 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. (p=0.114) (Table 3)

	BRAF(-)			BRAF(+)		
	Methyl	Unmethyl	Total	Methyl	Unmethyl	Total
N0 (n, %)	5/6 (83.3)	6/10 (60)	11/16 (68.7)	4/7 (57.1)	23/53 (43.4)	27/60 (45)
N1	1/6 (16.7)	4/10 (40)	5/16 (31.3)	3/7 (42.9)	30/53 (56.6)	33/60 (55)
p value			0.114			0.386

Table 3. Correlation between LN metastasis and SERPINA5 methylation according to BRAF mutation

3. 연구결과 고찰 및 결론

본 연구에서는 갑상선암의 발생기전에 중요한 역할을 하는 BRAF 유전자 돌연변이의 신호전달체계인 MAPK 신호전달체계의 하위 유전자인 SERPINA5의 발현이 갑상선 유두암에서 감소되어 있고 이러한 발현감소의 원인은 SERPINA5 유전자 promotor의 methlation임을 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. SERPINA5는 tPA의 inhibitor로 종양의 기저막 침범을 억제하는데 중요한 역할을 한다. 그러므로 SERPINA5의 발현감소는 종양의 기저막 침윤 기전에서 중요한 역할을 한다고 유추할 수 있다. 실제로 본 연구자의 예비연구에서도 갑상선 유두암 조직에서 SERPINA5의 감소를 보고한 바 있다. 본 연구에서는 이러한 발현감소의 기전중 하나가 SERPINA5의 methylation임을 밝혔다. 또한 이러한 발현감소는 항메틸화 제재를 이용하여 갑상선 유두암 세포주의 SERPINA5유전자를 demethylation시킴으로써 역전 되었다. 그러므로 항메틸화제재를 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 보인바 있다. 그러므로 본 연구에 추가적으로 SERPINA5의 demethylation이 유두암 세포의 침윤능을 변화시킬 수 있는지에 대한 추가 연구가 필요할 것이다.

두번째로 본 연구에서는 SERPINA5의 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 의 하위에 위치하고 있는 유전자의 발현에 따라 BRAF의 효과가 생쇄된다고 가설을 세울 수 있다. 그러나 본 연구에서는 BRAF 돌연변이 양성인 환자들에서 SERPINA5의 발현이 대폭 감소되어 있었기 때문에 BRAF돌연변이 양성군 중 SERPINA5의 methylation이 있는 군과 없는 군간에 알려진 임상병리학적 예후인자의 차이를 보이지 않았다. 다만 이러한 BRAF돌연변이와 SERPINA5 DNA methylation간의 연관관계는 SERPINA5 methylation의 기전에 BRAF돌연변이가 작용할 가능성을 유추할 수 있게 해주며 추가로 양 유전자 현상간의 기전을 밝히기 위한 연구가 필요하다. 흥미로운 사실은 통계적인 유의성은 없었지만 BRAF돌연변이가 없는 군에서는 SERPINA5의 methylation이 갑상선 유두암의 전이와 관계있는 경향을 보였는데 이러한 사실은 BRAF돌연변이가 그 하위에 있는 effector molecule의 발현을 조절할 수 있는 기전이 있음을 시사한다.

결론적으로 갑상선 유두암 세포주에서 종양억제 유전자인 SERPINA5의 발현 감소는 DNA promotor의 methylation이 기전이며 이러한 발현 감소는 demethylation agent에 의해 역전 될 수 있고 SERPINA5의 methylation은 BRAF돌연변이 양성과 관련이 있었다. 추후 demethylating

agent의 치료제로서의 가능성에 대한 연구와 BRAF돌연변이와 종양억제 유전자의 methylationt사이의 상관관계에 대한 추가 연구가 필요하다.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

현재 자료를 정리하여 제 1저자로 국외 SCI저널에 발표를 준비하고 있음
과제와 관련하여 acknowledgement를 작성하여 과제 관련성을 평가할 것임

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

구분	세부연구목표	가중치(%)	달성 여부
1차년도 (2008)	대상환자군 및 대조군의 선정	5	목표치의 50% (76명 달성하였음)
	임상데이터 수집	5	100% (모든 대상환자의 임상 데이터가 수집되었음)
	BRAF 돌연변이 검색	20	100% (모든 대상환자의 BRAF 돌연변이 여부를 검색함_
	메틸화 특성 PCR과 순열검사를 이용, 메틸화 검색	40	100% (대상환자중 100%에서 검색이 가능하였음)
	세포주를 이용하여 메틸화와 유전자 발현의 상관관계분석	10	100% (세포주에서 TAREGT GENE 모두에 대하여 연관성을 검색함)
	메틸화와 예후인자와의 연관성 분석	20	100% (메틸화 검색이 이루어진 모든 환자에서 예후인자 분석을 시행함)

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
대상환자 및 대조군 설정의 적절성 여부	적절히 설정 되었음
임상데이터 수집의 충실성 여부	모든 대상환자의 임상데이터를 수집하였음
BRAF 돌연변이 검색방법의 정확성	double check로 BRAF돌연변이를 적절히 수집함
DNA 메틸화와 유전자 발현간의 상관관계 여부	SERPINA5유전자의 메틸화가 유전자 발현에 영향을 미침
DNA 메틸화의 기능분석과 실험의 validation 여부	DNA sequencing결과와 메틸화 PCR결과가 일치함
DNA 메틸화와 알려진 예후인자와의 상관관계 여부	BRAF mutation과 림프절 전이 유무와 상관관계가 있었음

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	1	Clinical Endocrinology(IF :3.358)
산업재산권 등록		해당없음
기 타		

(2) 연구성과의 활용계획

1) SERPINA5 유전자의 DNA methylation과 갑상선 유두암의 예후인자와의 상관관계

SERPINA5 유전자의 발현억제가 갑상선 유두암의 예후인자로 생각되어지는 BRAF 유전자의 돌연변이와 상관이 있으므로 BRAF 돌연변이의 보조적인 예후인자로써의 가능성을 탐색하기 위한 연구를 수행할 예정임. 또한 BRAF 돌연변이 음성인 환자에서 림프절전이와 상관이 있는 경향을 보였으므로 보다 많은 BRAF 돌연변이 음성환자의 조직을 수집하여 different pathway에서 SERPINA5 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 SERPINA5의 발현 역시 promotor methylation에 의해 조절 받는다. SERPINA5는 tumor invasion에 중요한 역할을 하는 유전자로 demethylation에 의해 발현이 증가하므로 치료약제로서의 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) Akagi T, Luong QT, Gui D, Said J, Selektar J, Yung A, Bunce CM, Braunstein GD,

Koeffler HP. Induction of sodium iodide symporter gene and molecular characterisation of HNF3, beta/FoxA2, TTF-1 and C/EBP beta in thyroid carcinoma cells. Br J Cancer. 2008 Sep 2;99(5):781-8.

2) Guan H, Ji M, Hou P, Liu Z, Wang C, Shan Z, Teng W, Xing M. Hypermethylation of the DNA mismatch repair gene hMLH1 and its association with lymph node metastasis and T1799A BRAF mutation in patients with papillary thyroid cancer. Cancer. 2008 Jul 15;113(2):247-55.

3) Ferrario C, Lavagni P, Gariboldi M, Miranda C, Losa M, Cleris L, Formelli F,

Pilotti S, Pierotti MA, Greco A. Metallothionein 1G acts as an oncosupressor in papillary thyroid carcinoma. Lab Invest. 2008 May;88(5):474-81. Epub 2008 Mar 10.

4) Ishida E, Nakamura M, Shimada K, Higuchi T, Takatsu K, Yane K, Konishi N. DNA hypermethylation status of multiple genes in papillary thyroid carcinomas. Pathobiology. 2007;74(6):344-52. Epub 2007 Dec 13.

5) Provenzano MJ, Fitzgerald MP, Krager K, Domann FE. Increased iodine uptake in thyroid carcinoma after treatment with sodium butyrate and decitabine (5-Aza-dC).

Otolaryngol Head Neck Surg. 2007 Nov;137(5):722-8.

6) Smith JA, Fan CY, Zou C, Bodenner D, Kokoska MS. Methylation status of genes in papillary thyroid carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2007 Oct;133(10):1006-11.

7) Joseph B, Ji M, Liu D, Hou P, Xing M. Lack of mutations in the thyroid hormone receptor (TR) alpha and beta genes but frequent hypermethylation of the TRbeta gene in differentiated thyroid tumors. J Clin Endocrinol Metab. 2007 Dec;92(12):4766-70. Epub 2007 Oct 2.

8) Cuozzo C, Porcellini A, Angrisano T, Morano A, Lee B, Di Pardo A, Messina S, Iuliano R, Fusco A, Santillo MR, Muller MT, Chiariotti L, Gottesman ME,Avvedimento EV. DNA damage, homology-directed repair, and DNA methylation. PLoS Genet. 2007 Jul;3(7):e110.

9) Kondo T, Zheng L, Liu W, Kurebayashi J, Asa SL, Ezzat S. Epigenetically controlled fibroblast growth factor receptor 2 signaling imposes on the RAS/BRAF/mitogen-activated protein kinase pathway to modulate thyroid cancer progression. Cancer Res. 2007 Jun 1;67(11):5461-70.

10) Lee JJ, Geli J, Larsson C, Wallin G, Karimi M, Zedenius J, Höög A, Foukakis

T. Gene-specific promoter hypermethylation without global hypomethylation in

follicular thyroid cancer, Int J Oncol, 2008 Oct;33(4):861-9.

11) Miasaki FY, Vivaldi A, Ciampi R, Agate L, Collecchi P, Capodanno A, Pinchera A, Elisei R. Retinoic acid receptor beta2 re-expression and growth inhibition in thyroid carcinoma cell lines after 5-aza-2'-deoxycytidine treatment, J Endocrinol Invest, 2008 Aug;31(8):724-30.

12) Hou P, Ji M, Xing M. Association of PTEN gene methylation with genetic alterations in the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in thyroid tumors, Cancer, 2008 Nov 1;113(9):2440-7.

13) 암등록 중앙통계 2002 국립암센터 중앙암등록본부

14) 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

15) 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

16) 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, Tufaro 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

17) 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, Santeusanio 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

18) 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

19) 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

20) Mingzhao Xing 2007 Mini Review: Gene Methylation in Thyroid Tumorigenesis Endocrinology 2007 148: 948-953

7. 첨부서류 : 해당없음