



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

2010년 2월

박사학위논문

선양낭성암종과 다형선종의
감별에서 MAGE A의 유용성

조선대학교 대학원

의학과

박 준 희

선양낭성암종과 다형선종의
감별에서 MAGE A의 유용성

Differential diagnosis of adenoid cystic carcinoma and
pleomorphic adenoma using of MAGE A

2010년 2월 25일

조선대학교 대학원
의학과

박 준 희

선양낭성암종과 다형선종의 감별에서 MAGE A의 유용성

지도교수 도 남 용

이 논문을 의학박사학위신청 논문으로 제출함.

2009년 10월 일

조선대학교 대학원

의학과

박 준 희

박 준희의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 조현진 인

위 원 조선대학교 교수 임성철 인

위 원 조선대학교 교수 조성일 인

위 원 조선대학교 교수 최지윤 인

위 원 조선대학교 교수 도남용 인

2009년 12월 일

조선대학교 대학원

목 차

표목차.....	i
도목차.....	ii
Abstract.....	1
서론.....	2
재료 및 방법.....	4
결과.....	7
고찰.....	11
결론.....	17
참고문헌.....	19

표목차

Table 1. Primers, probes and thermal cycling conditions of real-time PCR	23
Table 2. MAGE A expression in pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma of the salivary gland	24
Table 3. MAGE-A4 expression in pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma of the salivary gland	25

도목차

Figure 1. Immunohistochemical staining of pleomorphic adenoma for MAGE A	26
Figure 2. Immunohistochemical staining of adenoid cystic carcinoma for MAGE A	27
Figure 3. Immunohistochemical staining of adenoid cystic carcinoma for MAGE-A4	28
Figure 4. Real-time amplification plot of MAGE-A3, -A4	29
Figure 5. Real-time amplification plot of MAGE-A1	30

Abstract

Differential diagnosis of adenoid cystic carcinoma and pleomorphic adenoma using of MAGE A

Park, Jun-Hee

Advisor: Prof. Do, Nam-Yong, Ph.D.

Department of Medicine,

Graduate School of Chosun University

Even though salivary gland tumors, pleomorphic adenoma(PA) and adenoid cystic carcinoma(ACC) are clinically different, the same histological patterns shared between them make diagnosis of specimens obtained from biopsy, partial excision, and even total excision of tumor difficult. Many researchers suggested useful markers for the differential diagnosis of the tumors, but most of them were turned out to be unpractical. Therefore, the study examined the utility of using MAGE as a diagnostic method in the differential diagnosis of PA and ACC.

For 48 paraffin-embedded tissue specimens, who were diagnosed as PA(n=31) and ACC(n=17), immunohistochemical stains using MAGE A and MAGE-A4 were performed. Moreover, for the fresh frozen specimens of PA(n=3) and ACC(n=4), MAGE gene was extracted by real time RT-PCR to show the justification of performing immunohistochemical stains.

In the immunohistochemical stain, the expression of MAGE A was not observed in 84% of the PA, on the other hand, the expression of that was observed in 100% of ACC. Expression of MAGE-A4 was not observed in 97% of the PA, but the expression of that was observed in 100% of ACC. In the real time RT-PCR, any MAGE gene was not expressed in PA, but MAGE-A3 and -A4 were expressed significantly in ACC.

Therefore, the study suggests that the immunohistochemical stain using MAGE could be a useful diagnostic tool for the differential diagnosis of PA and ACC.

Key words : pleomorphic adenoma, adenoid cystic carcinoma, MAGE

서 론

타액선 종양은 전체 두경부 종양 중 3% 미만의 낮은 발생을 보이지만, 복잡하고 다양한 조직학적 특성을 나타내어 12개의 양성 종양과 22개의 원발성 악성 종양 및 전이성 악성 종양, 림프 세포 증식 질환, 유종양 질환 (tumor-like lesion) 등이 혼재해 있으며(WHO classification, 1992), 다른 종류의 타액선 종양에서 같은 조직학적 특징이 관찰되는 경우가 있다.

타액선 종양 중 가장 흔한 양성 종양인 다형선종과 점액 표피 낭종에 이어 두 번째로 흔한 악성 종양인 선양낭성암종은 임상적으로 큰 차이를 보이는 극히 다른 종양임에도 이의 조직학적 소견은 유사점이 많아 진단에 어려움이 있다. 수술전에 시행하는 세침흡인세포검사나 국한된 조직의 생검, 부분 절제 시는 물론 종양 전적출술을 통한 검체를 대상으로 하여도 진단에 어려움을 겪는 경우가 허다하다. 이에 많은 연구자들이 이들 종양을 감별진단하는데 유용한 표지자를 제시하고 있지만 실용적이지는 못하다.

Melanoma antigen gene(MAGE)는 악성 흑색종 세포주에서 세포 독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte)에 의해 인지되는 항원의 합성을 지령(code)하는 유전자로서 염색체가 존재하는 위치에 따라 A, B, C, D 등의 아군(subtype)으로 분류된다(Van der Bruggen et al., 1991). MAGE는 위암, 식도암, 직장암, 폐암, 유방암, 간세포암, 난소암 등 여러 악성 세포에서는 발현되지만 고환, 태반을 제외한 정상세포에서는 발현되지 않는다고 알려져 있다(Eura et al., 1995; Lee et al., 1999; Inoue et al., 1995; Mori et al., 1996; Weynants et al., 1994; Ruso et al., 1995; Yamashita et al., 1996). 이 중 MAGE A는 MAGE 유전자의 네가지 아군(subtype)중의 하나로 12개의 유전자로 구성되어지며 300-370 아미노산의 단백질 합성과 관련되어 있다.

현재까지 MAGE 유전자는 암치료를 위한 면역요법에 대해 연구가 활발히 진행되어져 왔으나 최근 들어 악성 종양의 진단과 조기 검진의 방법으로 이

용되고 있다. 더 나아가 MAGE 유전자의 아군(subtype)에 관한 연구가 진행되어 피부의 편평 세포암에서 MAGE-A4의 발현이 보고되고 있고(Bolli et al., 2005), 호지킨 림프종 환자의 림프 조직에서 MAGE-A4가 검출되는 것도 알려지는 등(Hervé et al., 2000), 암 진단에 중요한 표지자로서 연구되어지고 있다. 또한 MAGE 유전자 발현의 검출을 용이하게 하기 위해 cDNA에 특별히 고안된 시발체(primer)를 반응시켜 보다 다양한 MAGE 유전자가 한꺼번에 발현되게 하는 역전사 중합 효소 연쇄반응(reverse transcriptase polymerase chain reaction)도 연구되고 있다(Lee et al., 2001; Park et al., 2002). 이렇듯 MAGE는 많은 종류의 종양에서 발현되고, 종양 세포에 매우 특이적으로 발현 되기에 종양 진단에 중요한 역할을 할 수 있다.

따라서 이 연구는 MAGE의 발현 양상이 다형선종과 선양낭성암종의 감별 진단에 유용한 표지자가 될 수 있는지 알아보고, MAGE A의 유전자 발현을 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(Real-time RT-PCR) 이용하여 관찰하여 이를 통해 다형선종과 선양낭성암종의 감별 진단의 도구로서 효율성과 정당성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구 재료

연구에 사용된 증례는 1993년부터 2002년까지 주타액선의 타액선 종양으로 진단되어 절제된 다형선종(pleomorphic adenoma) 31예, 선양낭성암종(adenoid cystic carcinoma) 17예이다. 대조군으로는 타석증 등의 원인으로 제거된 비종양성 타액선염 조직을 사용하였다. 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(Real-time RT-PCR)을 위해서는 -70°C 에 보관되어 있는 신선 동결 조직 중에서 보관 상태가 양호한 다형선종 3예와 선양낭성암종 4예를 사용하였다.

2. 연구방법

1) 광학현미경적 검사

임상기록과 병리과 조직 슬라이드 파일을 대상으로 재검토하여 연구 목적에 부합되는 증례를 선택하였다. 10% 중성 포르말린에 12시간 고정후 제작한 파라핀 포매 조직을 $4\mu\text{m}$ 두께로 박절하여 hematoxylin-eosin 염색이 실시된 병리 조직 슬라이드 파일을 2인의 병리과 전문의가 재검토하여 연구목적에 부합되는 증례를 선택하였다.

2) 면역 조직화학적 염색

면역 조직화학적 염색에 사용된 항체는 Santa Cruz사(Santa Cruz, CA, U.S.A.)의 MAGE-A mouse monoclonal antibody(1:200)와 ABGENT사(Sandiego, CA, USA)의 MAGE-A4 rabbit polyclonal antibody(1:200)를 이용하였으며, Golden Bridge(WA, U.S.A.)사의 Polink-2 HRP plus mouse DAB detection system과 Polink-2 HRP plus rabbit DAB detection system

을 각각 사용하였다. 파라핀 포매 조직을 4 μ m 두께로 박절하여 X-tra™ 슬라이드(Surgipath, Richmond, U.S.A.)에 부착하여 xylene에 탈파라핀한 뒤 무수 알코올, 90%, 75% 및 50% 에탄올에 각각 2 분씩 처리하여 함수시켰다. 조직 절편내의 내인성 과산화효소의 활성을 억제하기 위하여 0.3% hydrogen peroxide-methanol에 10 분간 처리후 증류수로 세척하였다. 항원성 회복을 위하여 citrate완충액 (10 mM, pH 6.0)에 슬라이드를 담가 전자오븐에 15 분간 끓인 후 실온에 방치시켜 20 분간 식힌 후 Tris 완충용액(TBS)으로 수세한후 차단 항체를 10 분간 반응시켰다. 일차 항체를 37°C에서 1 시간 반응시킨 후 Tris 완충용액(TBS)으로 씻은후에 antibody enhancer를 10 분간 반응시키고 다시 TBS로 수세하였다. 그리고 polymer-HRP (horseradish peroxidase)를 각 슬라이드마다 10 분간 반응시켰다. TBS수세후 5 분동안 DAB detection system에서 배양 후 항체를 발색하였다. Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 시행하고, universal mount로 봉입하였다.

매 염색시 MAGE의 양성 대조는 조기태반 조직을 이용하였으며, 음성 대조군은 1 차 항체를 goat serum으로 대체한 것으로 염색하였다.

3) 실시간 역전사 중합 효소 연쇄반응(Real-time RT-PCR)

실시간 역전사 중합 효소 연쇄반응(Real-time RT-PCR)에 사용된 시발체(primer)는 MAGE -A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10, -A12 유전자 검출률을 증가시키기 위해 고안된 것으로 연구에 사용된 primer와 probe 및 반응 조건은 다음과 같았다(Table 1).

Total RNA는 MFX-2100(Toyobo, Osaka, Japan) auto-nucleic acid purification system인 MagExtractor® 이용하여 추출하였다. 200 unit의 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (In vitro)와 oligo (dT) primer를 사용하여 각 표본 조직으로부터 5 μ g씩의 RNA가 37°C에서 1 시간동안 반응을 거쳐 역전사시켰다.

Tagman Master Mix(Roche)을 사용하는 Light Cycler 2.0 instrument

(Roche, Mannheim, Germany)를 통해 실시간 증합효소 연쇄반응(Real-time PCR)을 시행하였다.

각각의 반응에는 cDNA 4, primer와 probe를 각각 10 pmol씩, 그리고 Master Mix를 함유한 bufferr 4 μ l, dNTPs, Mgcl2, Tag polymerase가 이용되었다. 데이터 분석은 Ligth Cycler software version 4.0(Roche)를 사용하였다.

4) 면역 조직화학적 염색의 결과 판정

염색의 평가는 주관성을 배제하기 위해 2 명의 병리 전문의의 도움으로 시행하였고, 현미경적 관찰은 종양의 중심부에서 시행하였으며, 염색강도는 편차가 심하여 비교대상으로 삼지 않고, 염색된 세포의 비율로 평가하였다. MAGE A 및 MAGE-A4 모두 뚜렷한 핵 염색을 양성 반응으로 판정하였는데, 면역 조직화학적으로 1%미만인 경우를 음성, 1%이상인 경우를 양성으로 판정하였고, 1~25%인 경우를 약한 양성(1+, weak positive), 26~49%인 경우를 중등도 양성(2+, moderate positive), 50%이상인 경우를 강한 양성(3+, strong positive)으로 분류하였다(Beda et al., 2006).

5) 통계학적 분석

다형선종과 선양낭성암종에서의 MAGE A 발현과 MAGE A4 발현의 상관관계 및 양성 발현을 비교는 χ^2 test를 사용하였고, $p < 0.05$ 일 때 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. MAGE A의 면역 조직화학적 발현

대조군으로 염색한 정상 타액선 조직과 비종양성 병변인 타액선염에 대한 염색에서는 음성으로 관찰되었다. 다형선종은 5 예(16%)만 양성 소견을 보였고, 그러나 5 예 모두 약한 양성 소견으로 MAGE A의 발현은 통계학적 유의성은 없었다. 26 예(84%)에서는 MAGE의 발현을 관찰 할 수 없었다(Fig. 1). 선양낭성암종은 17 예(100%) 모두에서 양성 소견을 보였는데, 그 중 8 예(47%)가 강한 양성(Fig. 2), 7 예(41%)가 중등도 양성 그리고 2 예(11%)가 약한 양성 소견을 보여(Table 2), 선양낭성암종과 MAGE A의 발현은 통계학적으로 유의한 상관 관계가 있었다($p < 0.05$).

2. MAGE-A4의 면역 조직화학적 발현

대조군으로 염색한 정상 타액선 조직과 비종양성 병변인 타액선염에 대한 염색에서는 음성으로 관찰되었다. 다형선종은 1 예에서만 MAGE-A4에 약한 양성 반응을 보여 통계학적 상관 관계가 없었으며, 선양낭성암종은 1 예를 제외하고 16 예(95%)에서 양성 소견을 보여 MAGE-A4와의 발현은 상호 유의한 상관관계가 있었다($p < 0.05$). 선양낭성암종에서 MAGE-A4의 발현을 각각 살펴보면 4 예(24%)에서 강한 양성 반응을(Fig. 3), 9 예(53%)에서 중등도 양성 반응, 그리고 3 예(18%)에서는 약한 양성 반응을 보였다(Table 3).

3. 동시 검정(Simultaneous testing)를 이용한 MAGE A와 MAGE-A4 상호 발현의 진단적 유용성

다형선종과 선양낭성암종에 대해 동시에 MAGE A와 MAGE-A4로 염색을 시행한 후 면역조직화학적으로 염색된 세포가 1~25%인 약한 양성 반응(1+, weak positive)을 기준으로 다형선종과 선양낭성암종을 감별 진단할 경우 통

계학적 분석 결과 총민감도는 77.3%이며 총특이도는 100%였다.

4. 축차 검정(Sequential testing)을 이용한 MAGE와 MAGE-A4 상호 발현의 진단적 유용성

먼저 MAGE A를 이용하여 면역 조직화적 염색을 시행 한 후 MAGE A에 약한 양성 반응을 보인 다형선종 5 예와 양성반응을 보인 선양낭성암종 17 예를 대상으로 MAGE-A4를 이용한 면역 조직화학적 염색을 시행하였다. 그 후 MAGE-A4에 약한 양성반응을 감별진단의 기준으로 제시하고 통계학적 분석을 실시한 결과 총민감도는 동시검정에 비해 94.1%로 상승하였고, 총특이도는 87.8%로 하락하였다.

또한 면역 조직화학적 염색 순서를 달리하여 먼저 MAGE-A4에 염색된 세포가 1~25%의 약한 양성(1+, weak positive)반응을 보인 다형선종 1 예와 MAGE-A4에 양성 반응을 보인 16 예의 선양낭성암종에 대해 MAGE A를 이용한 면역 조직화학적 염색에서도 총민감도와 총특이도는 처음에 시도한 축차 검정과 동일하였다.

5. MAGE A만을 이용한 면역 조직화학적 염색시 염색 평가 기준에 따른 진단의 유용성

다형선종 31 예와 선양낭성암종 17 예 대해 MAGE A만을 이용한 면역 조직화학적 염색에서 약한 양성(1+, weak positive)반응을 감별기준으로 제시했을 경우 민감도는 77.3%이고, 특이도는 87.8%였다. 이에 반하여 염색된 세포가 26~49%인 중등도 양성(2+, moderate positive)을 감별진단의 기준으로 한 경우에 민감도는 88.2%로 다소 증가되고 특이도는 100%로 상승하였다.

6. MAGE-A4만을 이용한 면역 조직화학적 염색시 염색 평가 기준에 따른 진단의 유용성

다형선종 31 예와 선양낭성암종 17 예에 대해 MAGE-A4만 이용한 면역조직화학적 염색시 약한 양성(1+, weak positive)반응을 감별기준으로 제시했을 경우 민감도는 94.1%이고, 특이도는 97.6%였다. 이에 반하여 염색된 세포가 26~49%인 중등도 양성(2+, moderate positive)을 감별진단의 기준으로 한 경우에 민감도는 76.5%로 다소 감소되나 특이도는 100%로 상승하였다.

7. 동시 검정(Simultaneous testing), 축차 검정(Sequential testing), MAGE A와 MAGE-A4 단독 면역 조직화학적 염색시 상호 통계적 검증에 따른 진단의 유용성

다형선종과 선양낭성암종의 감별진단에 있어서 가장 높은 민감도를 보이는 경우는 MAGE-A4만을 이용해 면역 조직화학적 염색을 시행하고 감별 기준으로 뚜렷한 핵 염색이 1~25%인 약한 양성(1+, weak positive)반응을 제시하였을 때고, 가장 높은 특이도를 보이는 경우는 MAGE A와 MAGE-A4로 동시 검정(Simultaneous testing)를 시행한 경우와 또는 MAGE-A4만을 단독으로 사용하여 면역 조직화학적 염색을 시행하고 중등도 양성(2+, moderate positive)반응을 감별 진단의 기준으로 제시한 경우였다. 각각의 경우 민감도와 특이도는 94.1%와 100%였다.

8. 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(Real-time RT-PCR)을 이용한 MAGE A 유전자 발현의 결과

MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10, -A12 유전자 각각을 발현 할 수 있도록 각기 다른 primer를 이용하여 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 시행 후 다음과 같은 결과를 얻었다. 3예의 다형선종의 조직에서는 어떠한 MAGE 유전자 발현도 측정되지 않았다. 선양낭성암종의 조직을 이용한 MAGE 유전자 발현에서는 MAGE-A3와 MAGE-A4는 4예 모두 발현되었으며(Fig. 4), MAGE-A6와 -A10은 각각 2 예에서 발현되었고, MAGE-A12는 1예에서 발현되었다. MAGE-A1, -A2는 다형선종이나 선양낭성암종 모두

발현되지 않았다(Fig. 5).

고찰

타액선 종양은 전체 종양의 1%, 두경부 종양의 3%로 정도로 발견되지만 (Spiro et al., 1986), 다양한 병리 조직학적 소견, 안면신경, 설하신경, 설신경과 같은 중요 신경분지와 해부학적 근접성, 다른 종양과 구분되는 생물학적 특성(biological behavior)으로 인해 적절한 치료 방침 수립에 많은 어려움이 있다.

전체 타액선 종양의 65%를 차지 하는 가장 흔한 양성 종양인 다형선종과 점액표피암종에 이어 두 번째로 흔한 악성 종양인 선양낭성암종은 임상적으로 큰 차이를 보임에도 불구하고 병리조직학적으로 유사점이 많아 감별 진단에 어려움을 겪는 경우가 종종 있다. 타액선에 병변이 생기면 기본 검사로 세침흡인세포검사가 일차 검사로써 사용되는데, Layfield 등(1987)은 다형선종과 분화가 잘 된 선양낭성암종과의 세포학적 감별 진단의 어려움을 보고하였고, Nagel 등(1999)은 선양낭성암종으로 진단된 31 예중 77%인 24예에서만 세침흡인세포검사에서 진단이 되었다고 보고하는 등 기본 검사로 세침흡인세포검사의 제한점이 나타났다. 이런 어려움을 해결하고자 많은 연구자들이 타액선 종양에 특이적인 표지자를 이용한 면역 조직화학적 염색방법을 시도하고 있으나 그 효율성에 대한 논란이 지속되고 있다. 또한 수술로서 얻어진 조직 대한 현미경적 소견에서도 감별 진단에 어려움을 겪는 경우가 있어 본 연구는 조직학적으로 확진된 예를 대상으로 MAGE를 이용하여 면역 조직화학적 염색을 실시하여 두 종양의 감별 진단에 있어서 MAGE의 유용성을 알아보고자 하였다.

Van der Bruggen 등(1991)은 악성 흑색종 세포주로부터 암세포에 특이적으로 발견되고 동시에 세포 독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte)에 의해 인식되는 종양항원 유전자를 찾아내고 이를 melanoma antigen gene(MAGE)이라 명명하였다. MAGE 유전자는 염색체에 존재하는 위치에 따라 MAGE A, B, C, D 등의 아군(subtype)으로 분류되고 MAGE A는 적어도 12개 이상

의 유전자로 구성되며, chromosome Xq28에 위치한다.

MAGE 유전자는 고환, 태반을 제외한 정상 조직에서는 발현되지 않고, 두경부암, 흑색종, 위암, 식도암, 대장암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암 등 각종 암조직에서 발현되는데(Eura et al., 1995; Lee et al., 1999; Inoue et al., 1995; Mori et al., 1996; Weynants et al., 1994; Ruso et al., 1995; Yamashita et al., 1996), 이는 촉진부(promotor region)의 탈메틸화에 의하며, 정상 조직에서 발현되지 않는 것은 과메틸화에 의한 것으로 알려져 있다(Jaenisch et al., 2003). 이런 MAGE 유전자의 특성을 이용하여 암의 진단과 치료에 활용하고자 하는 연구가 시도 되어왔다.

Eura 등(1995)과 Lee 등(1999)은 두경부 영역에서 MAGE 유전자가 정상 조직이나 양성 조직에서는 발현이 없고, 암 특이적으로 비교적 높은 빈도로 발현됨을 보고하였다. Eura 등(1995)의 연구에 의하면 두경부 편평세포 암종 88예에서 MAGE A가 암특이적으로 27~47%의 빈도로 발현되었다고 한다. Lee 등(1999)은 두경부 편평세포암종 40예와 양성 종양과 정상 조직 40 예를 대상으로 단클론 항체 57B를 사용한 면역 조직화학 염색을 시행하여 두경부 편평세포암종의 45%에서 MAGE 항원이 세포질내 단백질로서 암세포에 특이적으로 발현됨을 보여주었다. 이 연구에서도 정상 타액선 조직과 비종양성 병변인 타액선염에 대한 면역 조직화학적 염색에서는 MAGE A의 발현이 전혀 관찰되지 않았고, 다형선종에서는 5 예를 제외한 26 예(84%)에서 MAGE A의 발현을 관찰 할 수 없었으나, 선양낭성암종은 17예(100%)에서 모두 양성 소견을 보여 유의한 상관 관계가 관찰되었다. 이는 MAGE 유전자가 암 특이적으로 발현된다는 기존의 연구와 잘 부합되는 결과이다.

Hervé 등(2000)은 호지킨병(Hodgkin disease) 환자로부터 채취한 조직 53 예에서 단클론 항체를 이용한 면역 조직화학적 염색 방법으로 11 예(21%)에서 MAGE-A4가 선택적으로 발현됨을 보고하였고, 이를 토대로 MAGE-A4 항원을 이용한 면역 치료의 가능성을 제시하였다. Bolli 등(2002)은 피부의 기저 세포암과 편평세포암에서 MAGE-A4가 발현됨을 밝혀내었고, 이를 토대

로 Beda 등(2007)은 MAGE-A4를 발현시킬 수 있는 단클론 항체 57B가 피부 종양의 치료와 진단에 유용한 방법임을 입증하였다. 물론 앞서 기술한 바와 같이 두경부 편평세포암종에서 MAGE-A3 같은 유전자 산물이 세포질내 단백질로서 암세포에 특이적으로 발현됨을 관찰하여 MAGE-A3의 유전자 산물이 암 면역치료의 목표물이 될 수 있음을 확인한 연구 등(Lee et al., 1998), MAGE A의 다른 아형에 대한 많은 연구가 보고되고 있지만(Park JW et al., 2002; Urs et al., 2009), 본 연구에서는 MAGE-A4 토끼 다클론 항체(1:200)를 이용하여 면역 조직화학적 염색을 시행하였다. 그 결과 정상 타액선 조직과 비종양성 병변인 타액선염에 대한 염색에서는 그 발현을 관찰 할 수 없었고, 다형선종 1 예에서는 양성 소견을 보였으나 그 발현이 미미하여 통계학적 연관성은 없었다. 또한 선양낭성암종의 16 예(95%)에서는 양성 소견을 보여 MAGE-A4가 선양낭성암종과 다형선종의 감별에 있어서 의미있는 진단 도구가 될 수 있음을 시사 하였다.

암의 진단은 최종적인 방법이 조직학적 검사에 의해 완성되어지나 최근에는 암의 조기 진단을 위해 다양한 영상학적 진단법이나 혈액 검사 등이 이루어지고 있으며 많은 연구자들이 소수의 암세포로부터 암항원 또는 암관련 항원을 검출하기 위해 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction)을 이용하고 있다. 이에 따라 MAGE 유전자에 대한 연구도 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용하여 다양한 암으로 그 유용성을 넓혀가고 있다. 예를 들어 혈액내의 세포 1×10^7 개중 CEA를 발현하는 암세포가 1~10개, MAGE 유전자는 혈액 내의 세포 1×10^6 개 중에 하나의 암세포가 존재 한다면 역전사 중합효소 연쇄반응으로 암세포를 검출 할 수 있다고 한다(Mori et al., 1996).

Lee 등(2001)은 MAGE-A1에서 MAGE-A6까지의 유전자를 한번의 nested RT-PCR로 검출 할 수 있는 공통 시발체(common primer)를 고안하여 두경부 암조직과 양성종양, 정상 조직을 대상으로 연구한 결과 두경부 편평세포암종 27 예중 19 예에서 최소 한 개이상의 MAGE A의 아형이 관찰됨을 제

시하였다. 즉 MAGE-A1에서 MAGE-A6 유전자까지의 발현율이 각각 31.6%, 52.6%, 78.9%, 57.9%, 52.6%, 68.4%라는 결과를 산출했으며, 이상의 결과로 MAGE-A3의 유전자 발현이 가장 높았고, MAGE-A1의 발현이 가장 낮음을 보고 하였다.

두경부암의 연구 영역을 벗어나 다양한 암에 대해서 MAGE 유전자는 연구 되어지고 있다. Mori 등(1997)은 184 예의 위암, 식도암, 대장암 환자의 암조직과 정상 조직에서 10 종의 MAGE 유전자를 역전사 중합효소 연쇄반응으로 측정하여 정상 조직에서는 유전자의 검출이 없었고, MAGE 유전자 종류에 따라 위암의 경우 9~46%, 식도암의 경우 13~79%, 대장암의 경우 5~44%의 발현이 있음을 알아내었고, 한 개이상의 MAGE 유전자를 발현할 확률이 위암은 82%, 식도암 94%, 대장암은 88%임을 보고하였다.

Urs 등(2009)은 구강 편평세포암종을 대상으로 RT-PCR, qrt-PCR 그리고 MAGE A 항체(57B)를 이용한 면역 조직화학적 염색방법 등으로 연구한 결과 MAGE-A2, -A3, -A6의 발현이 뚜렷하며 MAGE-A10 발현은 극히 미미함을 보고 하였다. 본 연구에서는 Lee 등(2001)이 고안한 공통 시발체(common primer)를 이용하지 않고, MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10, -A12 유전자 각각을 발현 할 수 있도록 각기 다른 primer를 이용하여 역전사 중합효소 연쇄반응을 시행 하였으나 다른 연구자들이 앞서 보고했던 바와 같이 선양낭성암종과 같은 두경부 암종에서는 MAGE-A3와 -A4의 발현이 뚜렷이 관찰되었고, 다형선종에서는 어떠한 MAGE 유전자의 발현도 없었다. 이는 다른 연구자들이 두경부암종에서 MAGE 유전자 각각의 발현빈도는 다양하지만 전체중 한 종류이상이 발현 할 확률이 높다고 보고한 것과 의미를 같이 하나 실험에 사용된 동결 신선 조직의 양이 적은 관계로 통계적 유용성은 검증 할 수 없었다. 하지만, MAGE 유전자 발현을 위한 역전사 중합효소 연쇄반응은 다형선종과 선양낭성암종의 감별진단에 또 하나의 유용한 진단 도구가 되리라 생각되어진다.

MAGE에 대한 연구는 신선 동결 조직이나 파라핀에 포매된 조직의 연구 단

계를 벗어나 혈액을 포함한 각종 체액에서 MAGE의 발현을 측정하고자 하는 연구가 시도되고 있다. 18명의 위암 환자의 혈액에서 MAGE -A1, -A3, -A4, -A9, -A11의 발현을 측정하여 33%인 6예에서 이들 중 한 개 이상이 발현됨을 보고한 연구가 있다(Mori et al.,1997).

Lee 등(2003)은 두경부 편평세포암종 17 예를 포함한 22 명의 두경부 암환자로부터 채취한 객담에서 두경부 편평세포암종의 경우 MAGE A1-6mRNA의 발현빈도가 76.5%임을 보고하여 객담내 암세포수가 많고 적음이 아니라 MAGE A유전자를 발현하는 암세포 자체가 존재하기만 하면 비교적 조기 암에서도 암의 진단이 가능함을 보여주었다. 이러한 객담내에서의 MAGE A 유전자 검출을 기초를 두고 객담에는 후두, 인두의 세포뿐만 아니라 폐에서도 떨어져 나온 세포가 섞인 사실에 착안하여 폐암의 조기 진단에 임상적으로 이용되기도 한다. Kim 등(2009)은 기관지 내시경상 보이지 않는 변연부 폐 결절을 가진 환자 42 명을 대상으로 기관지 내시경 검사시 시행한 기관지 세척액(bronchial washing specimen)을 이용하여 MAGE A1-6 RT-nested PCR을 시행하였다. 그 결과 MAGE A1-6 RT-nested PCR을 이용한 변연부 폐암의 진단이 기존에 이용되어지던 일반적인 세포 검사(conventional cytology test)보다 폐암의 진단율이 더 높을뿐 아니라 침습적 방법인 경피적 세침흡인 검사(percutaneous needle aspiration biopsy)와 유사한 진단율을 보인다고 하여 변연부 폐암의 진단에 효과적인 방법임을 제시하였다.

Ingo 등(2007)은 MAGE 유전자 발현이 전립선암 환자의 14.9%에서 관찰되고, 골수(bone marrow)에서는 16.1%가 발현됨을 보고하였다. 또한 골수에서 MAGE 유전자의 발현은 향후 원격전이를 예측하는 위험인자가 된다는 사실을 밝혀내어 MAGE 연구를 암의 전이를 예측하는 수준까지 끌어올렸다.

본 연구에서는 MAGE 유전자의 발현이 정상 조직중 고환과 태반을 제외한 정상 조직에서는 발현되지 않고, 암 특이적으로 발현된다는 사실을 이용하여 MAGE A와 MAGE-A4를 이용한 면역 조직화학적 염색을 다형선종과 선양낭성암종에 시행하여 두 종양간에 발현에 있어서 통계학적으로 유의한 차이

가 있음을 확인하였다. 또한 신선 동결 조직과 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 MAGE 유전자의 검출에서도 다른 연구자들이 보고하였듯이 MAGE-A3, -A4의 발현이 저명하게 확인되었다. 하지만 MAGE 유전자에 대해 많은 연구가 진행 될수록 기존 연구에서 암조직에서는 발현이 없다고 생각되어지던 MAGE-A10, -A12도 일부 암에서 발현이 보고 되고 있어 다양한 암에 대한 더 광범위한 추가적인 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결 론

조직학적으로 유사점이 많아 진단시 많은 어려움을 겪는 다형선종과 선양낭성암종의 감별 진단에 MAGE A와 MAGE-A4를 이용한 면역 조직화학적 검사법의 유용성을 알아보고자 정상 타액선 조직과 비종양성 병변인 타액선염 조직 10 예, 다형선종 31 예, 선양낭성 암종 17 예를 대상으로 면역 조직화학적 염색을 시행하고, 또한 다형선종 3 예와 선양낭성암종 4 예의 신선동결 조직으로부터 역전사 중합효소 연쇄반응을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. MAGE A는 다형선종에서 26 예(84%)에서는 발현을 관찰 할 수 없었으며, 선양낭성암종은 모든 예에서 100%(17/17)에서 양성 소견을 보여, 선양낭성암종과 MAGE A의 발현은 통계학적 유의성이 있었다.
2. MAGE-A4는 다형선종 1 예에서만 약한 양성 반응을 보여 통계학적 상관관계가 없었으나, 선양낭성암종에서는 16 예(95%)에서 양성 소견을 보여 MAGE-A4와 선양낭성암종은 상호 유의한 상관관계가 있었다.
3. 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 MAGE A 유전자 검출에서도 선양낭성암종에서 MAGE -A3, -A4의 발현이 뚜렷이 관찰되었다.
4. 두 종양의 감별 진단에 있어서 가장 높은 민감도를 보이는 검사는 MAGE-A4만을 이용해 면역 조직화학적 염색을 시행하고 감별 기준으로 약한 양성(1+, weak positive) 반응을 제시하였을 때이며, 가장 높은 특이도를 보이는 검사 MAGE A와 MAGE-A4로 동시 검정(Simultaneous testing)를 시행한 경우와 또는 MAGE-A4만을 단독으로 이용한 후 중등도 양성(2+, moderate positive) 반응을 감별 진단의 기준으로 제시한 경우이다.

이상의 연구 결과로 미루어 암 특이적으로 발현되는 MAGE 유전자의 특성이 다형선종과 선양낭성암종에서 면역 조직화학적 염색시에 발현의 현격한 차이를 보여줌으로써 두 종양의 감별 진단의 어려움을 극복하는 유용한 표지

자가 되리라 생각한다. 하지만, MAGE A의 다른 아형에 대해서도 감별진단의 도구로서 유용성을 검증하기 위해 더 많은 증례를 이용한 추가적 검토가 필요하리라 생각된다.

참 고 문 헌

Bolli M, Kocher T, Adamina M, Guller U, Dalquen P, Haas P, et al. Tissue microarray evaluation of Melanoma antigen E (MAGE) tumor-associated antigen expression: potential indications for specific immunotherapy and prognostic relevance in squamous cell lung carcinoma. *Ann Surg* 236:785-93, 2002

Bolli M, Schultz-Thater E, Zajac P, Guller U, Feder C, Sanguedolce F, et al. NY-ESO-1/LAGE-1 coexpression with MAGE-A cancer/testis antigens: a tissue microarray study. *Int J Cancer* 115:960-6, 2005

Eura M, Ogi K, Chikamatsu K, Nakano K, Masuyama K, Itoh K, et al. Expression of the MAGE gene family in human head-and-neck squamous-cell carcinomas. *Int J Cancer* 64:304-8, 1995

Hervé Chambost, Nicolas Van Baren, Francis Brasseur, Danièle Godelaine, Luc Xerri, Sylvaine Just Landi, et al. Expression of gene MAGE-A4 in Reed-Sternberg cells. *Blood* 95:3530-3533, 2000

Inoue H, Li J, Honda M. AGE-1 mRNA expression in gastric carcinoma. *Gastroenterol* 109:1522-5, 1995

Inoue H, Mori M, Honda M. Human esophageal carcinomas frequently express the tumor-rejection antigens of MAGE genes. *Int J Cancer* 63:523-6, 1995

Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 Suppl:245-54, 2003

Kim HR, Kim TH, Chung JH, Yoon HI, Lee CT, Kang CH, et al. The detection of peripheral lung cancer by MAGE A1-6 RT-nested PCR in

bronchial washing specimens. Lung Cancer 65:166-9, 2009

Layfield LJ, Tan P, Glasgow BJ. Fine-needle aspiration of salivary gland lesions. Comparison with frozen sections and histologic findings. Arch Pathol Lab Med 111:346-53, 1987

Lee KD, Chang HK, Jo YK, Kim BS, Lee BH, Lee YW, et al. Expression of MAGE 3 Gene Product in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck. Anticancer Research 19:5037-42, 1999

Lee KD, Lee CS, Lee HH, Lee YS, Chang HK, Jeon CH, et al. Experimental studies on the significance of new MAGE common primers detecting MAGE 1-6 mRNA in head and neck cancers. Korean J Otolaryngol-Head Neck Surg 44:736-43, 2001

Lee KD, Son SH, Moon HS, Lee YS, Chung H, Kim JY, et al. Significance of MAGE A1-6 mRNA Expression in sputa of the head and neck cancer patients—a preliminary report. Korean J Otolaryngol Head Neck Surg 46:1070-6. 2003

Mecklenburg I, Weckermann D, Zippelius A, Schoberth A, Petersen S, Prang N, et al. A multimarker real-time RT-PCR for MAGE-A gene expression allows sensitive detection and quantification of the minimal systemic tumor load in patients with localized cancer. J Immunol Methods 323:180-93, 2007

Mori M, Inoue H, Mimori K. Expression of MAGE genes in human colorectal carcinoma. Ann Surg 224:183-8, 1996

Mori M, Mimori K, Tanaka F, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T. Molecular Diagnosis of circulating cancer cells using MAGE gene assay. JA-MA 278:476-7, 1997

Mori M, Mimori K, Ueo H, Karimine N, Barnard GF, Sigimachi K, et al. Molecular detection of circulating solid carcinoma cells in the peripheral blood: The concept of early systemic disease. *Int J Cancer* 68:739-43, 1996

Muehleisen B, Schaerer L, Dummer R, Burg G, Hofbauer GF. Cancer/testis antigen MAGE-A4 expression pattern differs in epithelial skin tumors of organ-transplant recipients and immunocompetent patients. *J Cutan Pathol.* 34(1):1-6, 2009.

Nagel H, Hotze HJ, Laskawi R, Chilla R, Droese M. Cytologic diagnosis of adenoid cystic carcinoma of salivary glands. *Diagn Cytopathol* 20:358-66, 1999

Park JW, Kwon TK, Kim IH, Sohn SS, Kim YS, Kim CI, et al. A new strategy for the diagnosis of MAGE-expressing cancers. *J Immunol Methods* 266:79-86, 2002

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* 64:216-21, 1995

Russo V, Dalerba P, Ricci A, Bonazzi C, Leone BE, Mangioni C, et al. MAGE, BAGE and GAGE genes expression in fresh epithelial ovarian carcinomas. *Int J Cancer* 67:457-60, 1996

Spiro RH. Salivary neoplasms: overview of a 35-year experience with 2,807 patients. *Head Neck Surg* 8:177-84, 1986

Urs DA Müller-Richter, Albert Dowejko, Tobias Reuther, Johannes Kleinheinz, Torsten E Reichert, Oliver Driemel. Analysis of expression profiles of MAGE-A antigens in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Head & Face Medicine* 5:10, 2009

Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254:1643-7, 1991

Weynants P, Lethe B, Brasseur F, Marchand M, Boon T. Expression of MAGE genes by non-small cell lung carcinomas. *Int J Cancer* 56:826-9, 1994

Yamashita N, Ishibashi H, Hayashida K, Kudo J, Takenaka K, Itoh K, et al. High frequency of the MAGE-1 gene expression in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 24:1437-40, 1996

Table 1. Primers, probes and thermal cycling conditions of real-time PCR.

Gene	Sense (5' → 3')	Antisense (5' → 3')	Probe (5' → 3')	Annealing- extension
MAGEA1	GCCGAAGGAACCTGACC	ACTGGGTTGCCTCTGTCG	TGTGTGCAGGCTGCCACCTCCT	90 s, 65°C
MAGEA2	AAGTAGGACCCGAGGCACTG	GAAGAGGAAGAAGCGGTCTG	CATTGAAGGAGAAGATCTGCCTGTGGGTCTTC	1 min, 60°C
MAGEA3	GTCGTCGGAAATTGGCAGTAT	GCAGGTGGCAAAGATGTACAA	AAAGCTTCCAGTTCCTT	1 min, 62°C
MAGEA4	CCACTACCATCAGCTTCACTTGC	CTTCTCGGAACAAGGACTCTGC	AGGCAACCCAATGAGGGTTCCAGC	1 min, 63°C
MAGEA6	GTCGTCGGAAATTGGCAGT	GCAGGTGGCAAAGATGTACAC	TGCAAGGAATCGGAAGC	1 min, 65°C
MAGEA10	TACTGCACCCCTGAGGAGGTC	TGTGGTGGCAATCTGTCTCTG	AAATGGGAGTGATCCAAGATCCTTCCCAC	1 min, 64°C
MAGEA12	GGTGGAAAGTGGTCCGCATCG	GCCCTCCACTGATCTTTAGCAA	AGGCATCTGATGGGAGG	1 min, 60°C
β -actin	GGAATCTGACGGATCGGA	GGAATGGAACGCCTGGAAC	TGCTCCTGAAGAAGTCGTCATGCCTCC	1 min, 60°C

Table 2. MAGE A expression in pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma of the salivary gland.

Tumors	MAGE A expression				Positive (%)
	Negative	Positive			
		Weak	Moderate	Strong	
PA(n=31)	26	5	0	0	5 (16.0)
ACC(n=17)	0	2	7	8	17 (100.0)*

PA : Pleomorphic adenoma

ACC : Adenoid cystic carcinoma

* : Statistically significant $p < 0.05$

Table 3. MAGE-A4 expression in pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma of the salivary gland

Tumors	MAGE-A4 expression				Positive (%)
	Negative	Positive			
		Weak	Moderate	Strong	
PA(n=31)	30	1	0	0	1 (3.0)
ACC(n=17)	1	3	9	4	16 (94.0)*

PA : Pleomorphic adenoma

ACC : Adenoid cystic carcinoma

* : Statistically significant $p < 0.05$

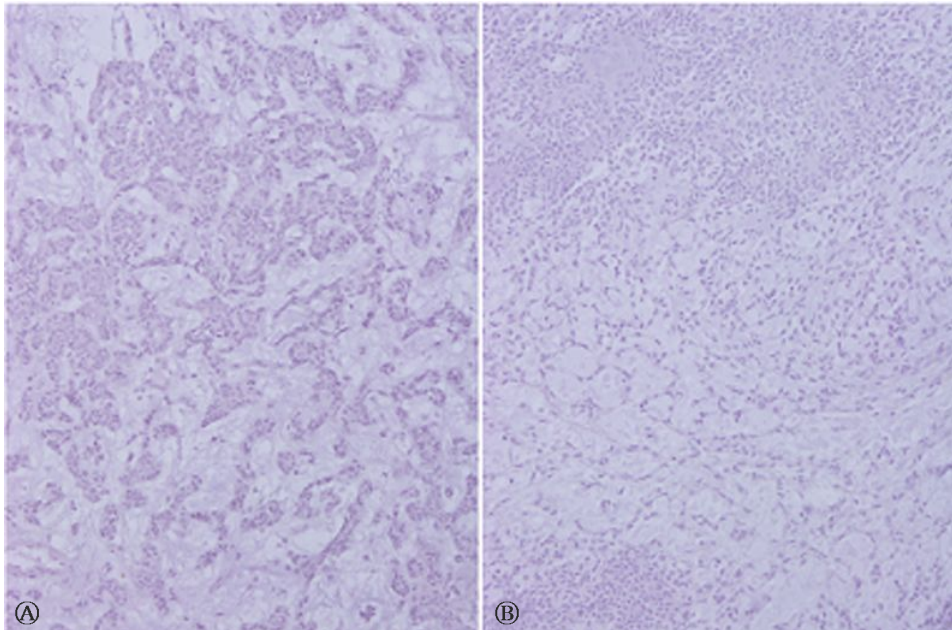


Figure. 1. Immunohistochemical staining of pleomorphic adenoma for MAGE-A.
No immunohistochemical reaction was identified. Polink-2 HRP plus
mouse DAB detection system, counterstained by hematoxylin.
A, B : x100

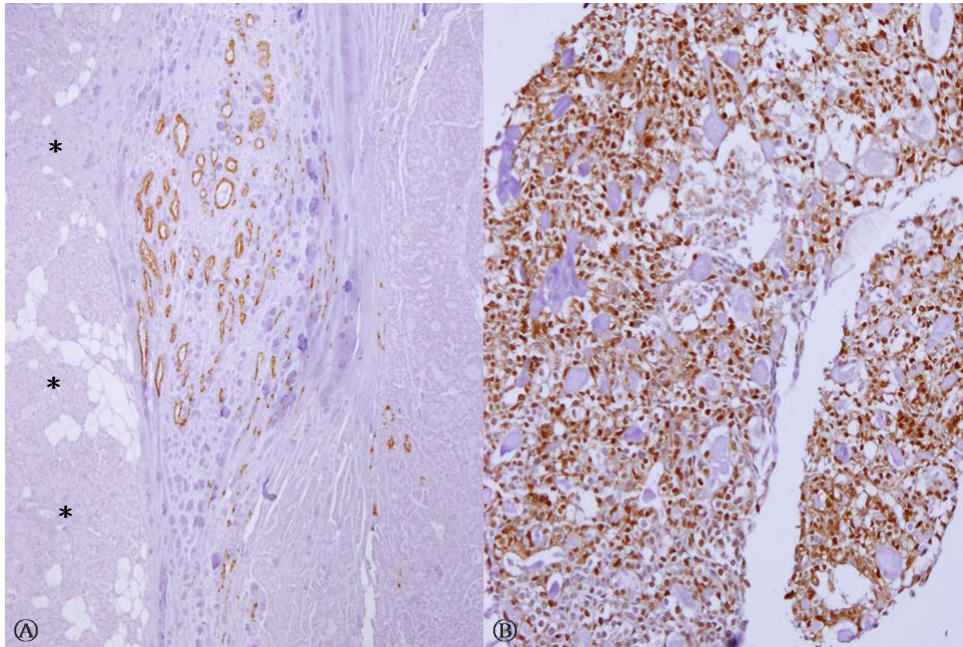


Figure 2. Immunohistochemical staining of adenoid cystic carcinoma for MAGE A.
A: Strong positive nuclear immunoreaction was identified. Adjacent normal salivary tissue (asterisks) was completely negative for MAGE A.
B: Diffuse positive immunoreaction was demonstrated in tumor cells.
Polink-2 HRP plus mouse DAB detection system, counterstained by hematoxylin.
A: x40, B: x100

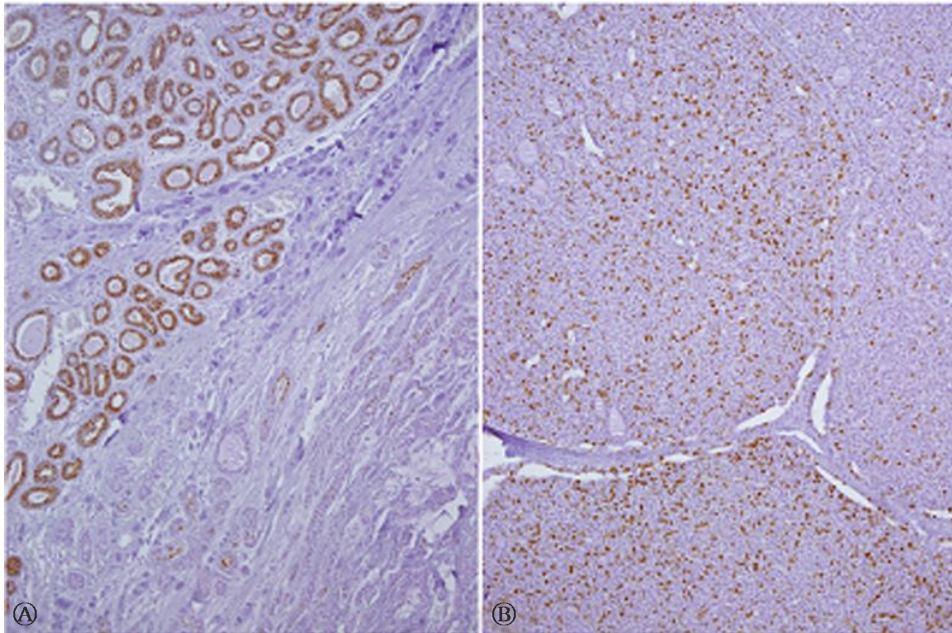


Figure 3. Immunohistochemical staining of adenoid cystic carcinoma for MAGE-A4.
A: Strong positive nuclear staining was identified in tubular structures.
B: Diffuse positive immunoreaction was identified in the solid portion of tumor.
Polink-2 HRP plus rabbit DAB detection system, counterstained by hematoxylin,
A, B: x100

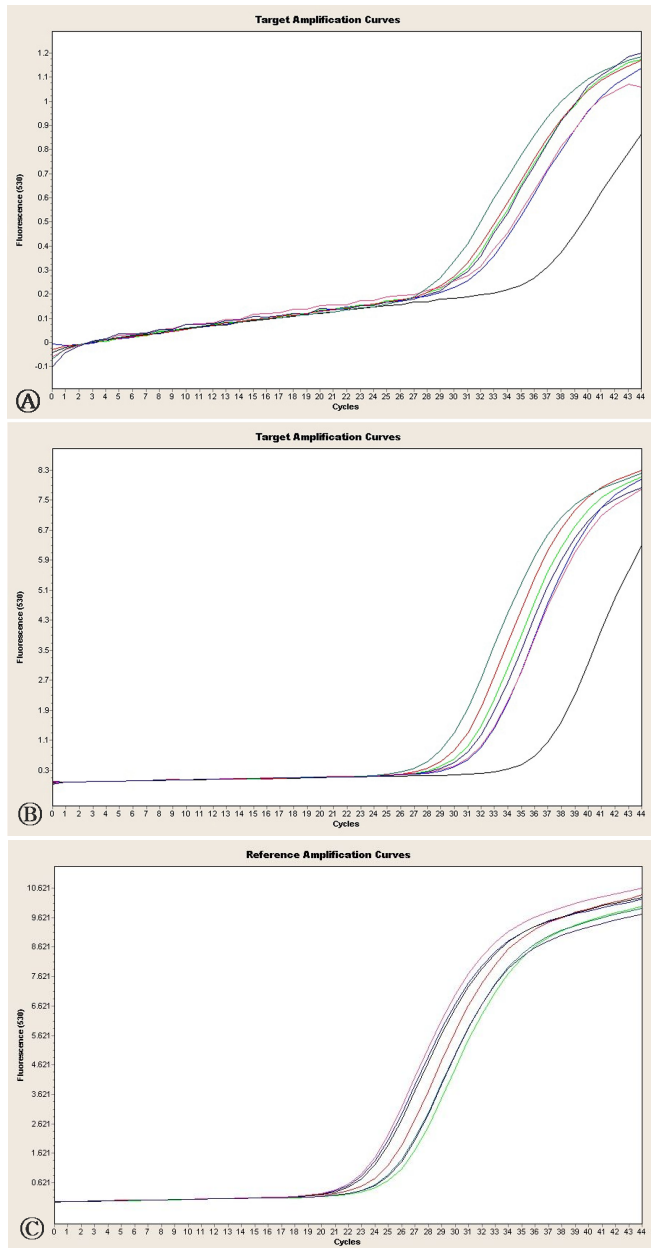


Figure 4. Real-time amplification plot of MAGE.

Any MAGE gene was not expressed in PA, but MAGE-A3 and-A4 were expressed in ACC.

A: MAGE -A3, B: MAGE-A4, C: Reference Curve

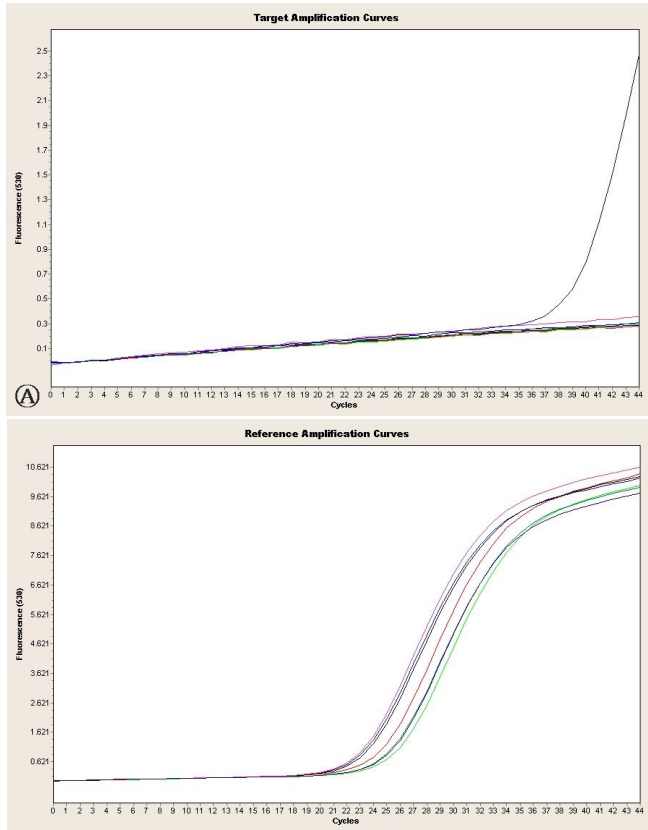


Figure 5. A: Real-time amplification plot of MAGE-A1.
The expression of MAGE-A1 gene was not observed in either of PA or ACC.
B: Reference Curve.

