

## Molecular Biology of Bladder Cancer

충북대학교 의과대학 비뇨기과학교실

김 원 제

방광암의 진단 및 치료에 있어서 비뇨기과 의사들이 가장 해결하고 싶어하는 것은 재발방지와 병기의 진행을 막고자 하는 것이다. 이를 위하여 수많은 지표들이 방광암의 병기, 분화도, 예후인자로서 가치가 있는지 여부가 조사되어 왔으며, 특히 최근 수년사이 분자생물학의 급진적인 발전에 힘입어 분자생물학적 진단을 시도하려는 노력도 두드러지게 나타나고 있다. 그 결과, 일부에서는 종양의 병기, 분화도 및 예후와 관련이 있다는 보고도 심심치 않게 접하게 되었다. 그러나 현재 이들을 임상에 직접 적용할 수 있는 지는 아무도 모르는 상태이고, 이러한 분자생물학적 결과를 개개의 환자에게 적용하기 위하여는 얼마간의 기간이 더 요구되리라고 생각한다. 여기서는 현재까지 방광암의 지표로 사용되었거나 현재 연구되고 있는 지표들에 관하여 분자생물학적 측면에서 살펴보고자 한다.

### Chromosomal Analysis

대부분의 종양에서와 마찬가지로 종양의 분화도가 나쁘거나 악성도가 심할수록 염색체의 이상이 많이 관찰된다. 통상 marker chromosome이란 chromosomal abnormalities (duplication, amplification, translocation, monosomies, trisomies, deletion etc.)를 지칭하는 것으로 cytogenetic study를 통하여 검색할 수 있다. 표재성 방광암에서 관찰되는 염색체의 이상은 9번 염색체에서 가장 빈번히 관찰되며 CIS나 침윤성 방광암에서는 17번 염색체의 이상이 흔히 관찰된다. 전 염색체를 방광암에서 조사한 보

고들을 분석해 보면 항상 결과가 일정하지는 않으나 3p와 4p의 LOH가 20-22%정도에서 관찰된다. 5p의 gain이 종양 병기의 진행과 관련이 있다는 최근의 보고도 있다. EGFR이 위치하고 있는 7번염색체의 이상(특히 수의 증가) 역시 종양의 분화도 및 증식도와 관련이 있다는 보고가 있다. 8번 염색체에는 *c-myc*, *NAT1*, *NAT2* 및 *NATP* 유전자가 위치하는데 8p22 deletion 및 8q24 gain이 침윤성과 관계가 있다는 보고가 있다. 전술한 바와 같이 9번 염색체 이상은 방광암에서 가장 흔히 관찰되는 소견으로서 약 50%에서 9p21의 LOH가 관찰되며 9q deletion도 흔히 관찰된다. 그러나 정상이나 transitional cell carcinoma에서 LOH의 차이가 없다는 보고들도 있으며 이는 LOH의 결과 판독상에 문제로 지적되고 있다. 또한 9번 염색체의 결손이 종양의 재발과 관련이 있다는 보고들도 있다. 특히 9p21에는 *p15/CDKN2B/INK4B/MTS2*, *p16/CDKN2A/INK4A/MTS1*, *DASI* (growth arrest-specific gene) 및 *PTC* (human homologue of the *Drosophila* patched gene)가 위치하는데 이 중 *p15* 및 *p16* tumor suppressor gene이 방광암과 관련이 있다는 보고들이 있다. 10q와 11p-도 방광암에서 관찰되며 Rb tumor suppressor gene이 있는 13번 염색체의 이상도 방광암의 예후와 관련이 있다. 17번 염색체는 침윤성 방광암 혹은 CIS에서 주로 변이나 결손이 관찰되는데 여기에는 *p53* tumor suppressor gene이 위치하며 *p53*의 이상과 종양의 분화도, 병기, 재발 및 예후와 관련이 있다는 증거가 상당히 많다. 그 밖에 14, 15, 18 및 Y 염색체의 이상도 방광암에서

관찰된다. 그러나 염색체의 이상에 관한 연구 결과는 연구자들마다 상당히 차이를 보이고 있다.

### Oncogene

Oncogene은 growth factor receptor, hormone receptor, transcription factor, GTPase 및 tyrosine kinase의 역할을 하는데 방광암에서 관찰되는 이들의 주된 변이는 point mutation이며 proto-oncogene의 과발현도 종양의 발생에 주된 역할을 한다. 방광암의 약 10% 정도에서 ras의 변이가 관찰되지만 mRNA의 overexpression은 *K-ras*와 *N-ras*에서는 58%, *H-ras*에서는 38%가 관찰된다. *c-myc*의 변이가 재발 및 병기의 진행과 관련이 있다는 보고가 있으며 *c-jun*과 *c-src*도 방광암과 관련이 있으나 그 관계는 그다지 중요한 것 같지는 않다.

### Tumor Suppressor Gene

방광암과 관련하여 연구되고 있는 분야 중 가장 활발한 것이 *p53*과 방광암의 관계이다. *p53*에 관하여는 SSCP와 direct DNA sequencing을 통한 mutation pattern의 관찰과 면역조직화학적염색을 통한 염색양상의 차이에 관한 연구가 가장 활발히 진행되고 있으며 또한 cell cycle과 관련하여 apoptosis, growth arrest, DNA repair 및 cell cycle progression과 종양과의 관계도 현재 심도있게 연구되고 있다. 임상에 적용할 수 있는 molecular marker 가운데 가장 실용화의 가능성이 높은 것 중의 하나가 *p53*에 관한 것이 아닌가 생각된다. *p53*의 결손 혹은 mutation은 방광암의 악성도 및 예후와 많은 관련이 있다. 또한 target gene의 transcriptional activation은 *p53*과 여러 growth regulatory process (cell cycle progression-*p21*, DNA repair-*GADD45*, apoptosis-*bax*) 사이에 functional regulation이 필요하기 때문에 방광암의 재발과 병기의 진행이 이들과 관련이 있는지의 여부를 현재 집중적으로 연구

하고 있다. 그 밖에 방광암과 관련된 tumor suppressor gene으로는 13q14에 있는 Rb, 9p21에 있는 *p15*, *p16*과 그 밖에 *del27*, *APC*, *DCC* 및 *NFI* 등이 있다.

### Detoxification System

2-naphthylamine, benzidine, 4-aminobiphenyl 등의 arylamine이 방광암에 원인으로 간주되고 있어 이와 관련된 효소체계가 방광암과 연관이 있을 것으로 여겨져 왔다. NAT (N-acetyl-transferase)와 CYP1A2 (cytochrome P450-1A2)는 arylamine-induced bladder cancer에 결정적인 역할을 하는 두가지의 주된 효소이다. NAT는 인체에서 polymorphism을 보이는데 대조군에 비하여 slow acetylator의 표현형을 보이는 경우 빈번하게 방광암이 발생한다. bladder cancer susceptibility에 slow acetylator가 중요한 이유는 arylamine의 detoxification을 효과적으로 수행하지 못하기 때문에 요중 N-hydroxy metabolites가 증가한다. 요가 산성인 상태에서는 N-hydroxy-arylamines이 arylnitrenium ions로 되어 이것이 urothelium과 작용하여 neoplasia를 initiation하게 된다. 유전적으로 2가지 형태의 NAT가 있는데 NAT1은 개인 차가 거의 없기 때문에 monomorphic NAT라고 부르며 NAT2는 개인차가 있어서 polymorphic NAT라고도 부른다. NAT2는 arylamine과 같은 polymorphic substrates를 acetylation 시키는 enzyme activity에 차이가 있어서 slow, intermediate, fast acetylator의 표현형을 보인다. 인종 및 보고자들에 따라서 결과의 차이가 있으며 현재 slow acetylator에서 방광암의 발생 빈도가 높다는 보고가 대부분이지만 반대의 경우도 있기 때문에 아직 이에 대한 결과는 논란의 대상이 되고 있다. CYP1A2는 개인마다 50-70배의 효소활성도의 차이를 보인다. 이 효소의 활성도가 높으면 발암제의 활성을 높이기 때문에 이론적으로는 방광암의 발생이 증가할 것으로 생각된다. 아직 연구 단계이

기는 하지만 CYP1A2의 phenotype이 방광암 발생에 중요한 역할을 할 것으로 여겨진다. 그밖에 CYP2C19, CYP2D6 및 CYP3A도 방광암과 관련이 있는 것으로 보고되고 있는데, 이 중 CYP2D6의 발현이 높은 경우 *Rb* gene의 loss나 mutation이 빈번하게 관찰되며, p53이 변이를 일으키거나 과발현된 경우에는 CYP3A의 활성도가 낮은 것으로 보고되고 있다. 현재까지 저자들의 연구에 의하면 한국인에 있어서는 slow acetylator가 전체 인구의 10% 미만을 차지하며 방광암과 흡연 및 acetylation상태와는 관련이 없는 것으로 조사되고 있다.

Glutathione-s-transferase mu1 (GSTM1)은 정상인에 있어서 있는 경우도 있고 없는 경우도 있는데 서구인의 경우 약 반에서 이 유전자가 없다. 이 유전자가 없는 cigarette smoker에서는 이 유전자를 가진 자에 비하여 약 1.8배의 방광암의 위험도가 있다는 보고가 있다. 현재 GSTM1 뿐 아니라 GSTT1에 대해서도 환자의 혈액으로부터 얻은 genomic DNA의 polymorphism을 조사하여 방광암 발생과의 관련 여부에 대한 연구가 진행중이다. 또한 다중약제내성(multi-drug resistance : MDR)과 관련된 물질들도 다중약제내성 뿐 아니라 암의 발생, 병기의 진행 및 예후와 관련이 있다는 보고가 있다. 따라서 이들 즉 *mdr1* 유전자의 산물인 p-glycoprotein, MRP (multidrug resistance-associated protein), glutathione system (GSH, GST, glutathione peroxidase, glutathione reductase) 및 DNA topoisomerase II와 방광암의 임상적 경과에 관하여도 연구가 진행중이다.

### Angiogenic Regulators

종양이 lamina propria를 침범하고 전이가 이루어지기 위하여는 angiogenesis가 활발히 이루어져야 한다. 많은 in vivo 및 in vitro 실험에서 angiogenesis에 관여하는 여러 물질들이 밝혀져 있는데 방광암에서 병기 및 예후와 관련되어 조사되고 있

는 것들로 invasion과 metastasis에 관여하는 AMF (autocrine motility factor), FGF, heparin-binding GF family의 일원인 MK (midkine), 침윤성 방광암 환자의 urine에서 높게 관찰되며 과발현되고 재발과 병기의 진행을 예견하는 지표로 고려되는 VEGF (vascular endothelial growth factor), stromal cell에서 생산되는 scatter factor 등으로 이들이 표재성 방광암에서 병기의 진행을 예견할 수 있는 지표로서 가치가 있는지를 현재 다각도로 조사 중이다. 또한 이와 반대로 angiogenesis를 억제하는 물질을 조사하여 방광암의 진행을 막아보고자 하는 시도도 진행 중인데 이 중 대표적인 것이 TSP (thrombospondine-1)이다. TSP는 ECM (extracellular matrix)성분으로써 강력한 angiogenesis 억제제이며 tumor suppressor function을 가지고 있고 또한 p53에 의하여 발현이 증가된다.

### ECM (Extracellular Matrix) and Cell Adhesion Molecules

표재성 방광암이 침윤성 방광암으로 진행하기 위하여는 일차적으로 세포사이의 adhesiveness가 소실되어야 하고 ECM을 뚫고 들어가야 한다. 그러기 위하여 종양세포는 어떠한 경로를 거치든간에 세포들 사이의 adhesiveness를 감소시키거나 motility를 증가시켜야 하고 또한 collagenase IV와 같은 protease를 생산하여 ECM을 파괴하여야 한다. 방광암에서도 이와 관련된 물질들에 관한 연구가 활발하다. E-cadherin은 wnt 유전자에 의해서 조절되는 catenin과의 상호작용을 통해서 ECM의 integrity를 유지시켜주는데 침윤성 방광암에서는 E-cadherin의 감소가 관찰되며 integrin  $\alpha 6\beta 4$ 의 감소도 관찰된다. E-cadherin- $\gamma$  catenin complex가 환자의 예후와 관련이 있다는 연구가 최근 발표되었으며, fibronectin이 많이 분비되는 경우 BCG immunotherapy의 효과가 감소되어 재발의 위험도가 증가하며 laminin, ICAM-1 및 C-CAM의 변화도 방광암에서 관찰된

다. 그밖에 cell-cell interaction, cell-ECM interaction, cell traffic에 관여하는 CD44의 변화도 방광암에서 관찰된다. 이러한 물질들을 표준화 및 정량화할 수만 있다면 표재성 방광암의 위험인자로 이용할 수 있을 것으로 기대한다.

### Apoptosis

우리는 흔히 apoptosis를 단순히 p53에 의해서 이루어지는 programmed cell death로 생각하는 경향이 있으나 이 과정은 상당히 복잡하며 단지 한 유전자에 의해서 이루어지는 것이 아니라 여러 유전자들의 상호작용과 정상 혹은 종양 세포가 처한 상황에 따라 일어나는 역동적 과정인 것이다. 대부분의 증식성이 강한 세포나 악성도가 높은 암세포의 경우 proliferation index의 증가와 아울러 apoptosis의 증가를 동시에 관찰하게 된다. 단순히 말하면 apoptosis는 p53-bax-FAS의 상호작용에 의하여 주도되며 apoptosis의 억제는 bcl-2 및 bcl-x에 의하여 이루어진다. 이때 bax와 bcl-2의 상호관계는 매우 중요한데 이들은 heterodimer를 형성하여 apoptosis를 증진시키지만 bax의 기능이 떨어지게 되면 조직에 따라서 hyperplasia 혹은 hypoplasia가 발생하기도 하며 bax와 bcl-2의 ratio의 변화에 따라서 표재성 방광암의 악성도에도 변화를 보인다.

### Cell Cycle Regulators

암의 경과를 관찰하고 조사하는 과정에서 세포주기의 변화는 무척 중요한 역할을 한다는 사실을 인지하게 됨에 따라, 현재 종양의 예방 및 경과를 예측하는 지표로서 가장 활발히 연구되는 분야 중의 하나가 cell cycle regulator로 여겨진다. 세포주기는 크게 regulatory molecule인 cyclin과 catalytic subunit인 cdk (cyclin dependent kinase)에 의해서 조절된다. G1 progression의 조절은 cyclin D1-cdk4 혹은 cdk-6에 의해서 이루어지며 여기에 p21, p15,

p16, p27 및 Rb가 관여한다. S phase로의 초기 진행은 cyclin E-cdk2에 의해서 이루어지는데 p21과 p27이 cell cycle inhibitor로서의 역할을 수행한다. S phase 동안은 cyclin A-cdk2가 관여하며 역시 p21과 p27이 cell cycle inhibitor로서의 역할을 수행한다. 초기 M phase의 조절은 cyclin B-cdk1에 의해서 이루어지며 inhibitor로서 p21과 p27이 작용한다.

cdk inhibitor (CKI)로 알려진 것들로는 6번 염색체에 있는 p53 regulator인 WAF1/p21/CIP1, p15, p16, p18 및 p27 등이 있으며 특히 TGF $\beta$  induced cell cycle arrest는 p18과 p27에 의해서 수행된다. 그 외에 cell cycle에 관여하는 것들로는 G2 check point function을 수행하는 gelsolin, terminal differentiation에 관여하는 Rb, DNA repair/apoptosis에 관여하는 p53, cell cycle progression을 촉진시키는 c-myc 등이 포함된다. 이들과 방광암의 특성사이의 관계는 조만간 우리에게 환자를 치료하는데 많은 도움을 주리라고 생각한다.

p16은 대표적인 cdk 억제제이지만 mouse의 실험을 통하여 기존의 p16/CDKN2A/INK4a로 알려진  $\alpha$ -transcript 외에 새로운 종류의  $\beta$ -transcript가 있음이 발견되었는데 이는 p16의 exon 2와 3을 공유하면서 새로운 conx 1- $\beta$ 를 갖는 alternative transcript로서 p19라 알려졌으며 이후 human에서 p14/ARF로 명명되었다. p16과 p14는 서로 다른 promoter region에 의해서 조절되며 그 산물인 protein 역시 전혀 유사성이 없고 각기 독특한 기전으로 cell cycle regulation에 관여하게 된다. 즉 p16이 CDK4/6과 complex를 형성하여 CDK의 기능을 억제함으로써 pRb의 phosphorylation (inactivation)을 저하시키고 따라서 unphosphorylated pRb는 transcriptional factor인 E2F와 결합하여 cell cycle 억제기능을 하는 반면, p14/ARF는 p53의 pathway에 관여하여 억제기능을 수행하게 되는데 p53을 upregulating 시키거나 또는 p53을 degradation 시키는 MDM2와 complex를 형성함으로써 cell cycle arrest를 유발하

게 된다. 이후 지속적으로 *p16/pRb* 그리고 *p14/p53/MDM2*의 관계를 보는 연구들이 진행되어 왔는데 *p14/ARF*는 tumor suppressor gene으로써 *p53* pathway에 관여하여 cell cycle regulation의 기능을 담당하고 있음이 밝혀졌다. 종양발생에 있어서 *p14*의 역할에 대해서는 조사가 진행되고 있지만 *p16/CDKN1A*의 deletion에 동반되어 homozygous deletion이 관찰된다는 보고가 있으며 아직까지 mutation의 보고는 없다. 현재 우리 실험실에서는 방광암에서 *p14/ARF*의 alteration에 대하여 조사를 실시하고 있다.

### GF (Growth Factor) and GF Receptor

방광암과 관련하여 GF 및 GF receptor의 발현 및 분포상황은 병기, 분화도 및 재발과 관련이 있는 것 같다. EGF receptor와 방광암의 악성도 사이에 관련이 있다는 보고가 많으며, TGF $\beta$ 의 발현이 증가하면 증식도가 떨어지고 좀 더 양성의 경과를 취하나, *c-erbB-2*가 amplification 된 경우에 대한 결과는 연구가들에 따라 다르다. Urokinase receptor의 변화가 방광암의 invasiveness와 관련이 있다는 연구와 PD-ECGF/dTDRase의 변화가 방광암의 예후와 관련이 있다는 보고도 있으며, 그 밖에 HB-EGF (heparin-binding EGF-like GF), EGF, TGF $\alpha$ 와 방광암과의 관계도 연구되고 있으나 그 결과는 주로 단편적인 것 같다.

### Cell Surface Ag

가장 오래된 방광암의 marker로서 조사되었던 것이 ABO (H) blood group Ag인데 malignant transformation이 진행됨에 따라 방광암에서 ABO (H) blood group Ag의 소실이 관찰된다. 또한 malignant transformation이 진행됨에 따라 Lewis<sup>x</sup> Ag expression이 증가되며 T-Ag (Thomsen-Friedenreich Ag)의 소실과 muscle invasive bladder cancer

및 나쁜 예후와 관련이 있다는 보고도 있다. blood group Ag 발현의 변화는 방광암의 marker로서 뿐 아니라 질환의 진행과도 관련이 있을 것으로도 여겨지는데 blood group Ag의 변화는 glycosylation의 변화를 의미하기 때문에 EGFR, *c-erbB-2* R, FGFR, AMF receptor 등의 growth factor receptor와 cell surface hormone의 glycosylation의 변화도 함께 초래할 수 있고 따라서 ligand binding site의 변화와 ECM 등의 변화도 초래하여 방광암의 발생, 진행 및 예후와도 관련이 있을 것으로 여겨진다.

그 밖의 tumor-associated Ag 혹은 marker로 연구되고 있는 것들로는 superficial bladder cancer의 70%에서 관찰되는 M344, survival 및 recurrence와 관련이 있다는 T138, recurrence와 관련이 있을 것으로 추정하는 19A211, EMA (epithelial membrane Ag), 방광암 환자의 urine에서 80% 검출된다는 DD23, urine cytology의 효과를 높이기 위하여 사용되는 BTA (bladder tumor Ag), FDP 및 poor prognosis와 관련이 있다는 CA125, invasion과 metastasis와 연관이 있다는 hyaluronidase, 방광암에서 90%의 sensitivity를 보인다는 telomerase activity, differentiation과 관련된 G-actin 및 F-actin의 상관관계 등이 방광암에서 연구되고 있다.

### Markers of Proliferation

종양의 악성도는 얼마나 암세포가 빨리 증식을 하느냐와도 중요한 연관이 있다. 이를 측정하는 방법으로는 FCM (flow cytometry), PCNA (proliferating cell nuclear Ag), Ki-67, mib-1, BrdU (bromodeoxyuridine), AgNOR 등이 있다. proliferation index와 종양의 악성도 사이에 밀접한 관계가 있으며 이와 oncogene, tumor suppressor gene 등의 발현 및 변이와도 상당히 연관성이 있다.

## Quantitative Image Analyzer

고형종양은 세포 집단이 상당히 heterogenous하기 때문에 전체의 세포들의 평균 상황을 살펴보는 FCM을 통해서는 그다지 많은 정보를 얻을 수 없다. Quantitative Image Analyzer를 이용하여 AgNOR, nuclear DNA content, MNA (mean nuclear area), 2cDI (2c deviation index), 5cER (5c exceeding rate)을 측정하여 방광암과 비교한 결과 2cDI와 5cER이 중요한 의미가 있는 것으로 나타났다. 그러나 기체가 상당히 고가이고 기존의 다른 방법을 통해서 얻은 결과 이상의 이득이 없기 때문에 이 방법이 임상에 보편화되기는 어려울 것으로 여겨진다.

## Others

NMP (nuclear matrix protein)는 gene regulation

과 DNA replication에 관여하는 것으로서 특정한 DNA organization에 관여하는데 cancer에서는 이의 변화가 자주 관찰되며 방광암에서도 이의 변화와 방광암 사이에 관계가 있다는 보고가 있으며 최근 들어서는 gap junction에 관여하는 connexin과 방광암이 관련이 있다는 보고들이 있다.

그밖에 methylation의 변화, metastasis suppressor gene 및 유전자가 손상된 경우 이를 repair해 주는 유전자들에 관한 연구도 현재 활발히 진행 중에 있다.

현재 수많은 molecular marker들이 표재성 방광암의 재발, 병기의 진행 및 예후 등과 관련하여 연구되고 있으나 많은 보고들이 비록 어떤 의미를 부여한다고 하여도 이들 molecular marker들을 임상 환자에게 적용하기에는 아직 시기상조라고 생각한다. 따라서 좀 더 많은 임상적 경험과 시간이 필요할 것으로 생각된다.

---

## 김 원 재

1. 1980년 서울대학교 의과대학 졸업
2. 1988년 2월 박사학위 취득
3. 1994년 - 95년 일본 교토대학 연수
4. 1990년 - 현재 충북대학병원 비뇨기과 주임교수