

전립선 선암종에서 Methylenetetrahydrofolate Reductase 유전자형에 따른 CpG 섬 좌, LINE-1 및 Alu의 메틸화 양상 분석

김정호 · 조남윤¹ · 김백희 · 김욱연
김보성 · 문경철 · 강경훈

서울대학교 의과대학 병리학교실
¹암연구소

The Relationship between the Methylenetetrahydrofolate Reductase Genotypes and the Methylation Status of the CpG Island Loci, LINE-1 and Alu in Prostate Adenocarcinoma

Jung-Ho Kim, Nam-Yun Cho¹, Baek-Hee Kim, Wook Youn Kim, Bo Sung Kim, Kyung Chul Moon and Gyeong Hoon Kang

Department of Pathology and ¹Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), in association with the influence of MTHFR upon DNA methylation, may cause differences of the methylation profile of cancer. Thus, we investigated the relationship between the methylation status of prostate adenocarcinoma and the genetic polymorphism of MTHFR. **Methods :** We examined 179 cases of prostate adenocarcinoma for determining the genotypes of MTHFR 677 and 1298, the methylation status of 16 CpG island loci and the methylation levels of the LINE-1 and Alu repeats with using polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism, methylation-specific polymerase chain reaction and combined bisulphite restriction analysis, respectively. **Results :** There was a higher proportion of the CT genotype of MTHFR 677 in the prostate adenocarcinoma than that in the normal control. The TT genotype of MTHFR 677 showed the highest frequency of methylation in six out of nine major CpG island loci, and these were which were frequently hypermethylated in prostate adenocarcinoma. The CT type showed the lowest methylation levels of LINE-1 and Alu among the MTHFR 677 genotypes. Interestingly, the CC type of MTHFR 1298 demonstrated favorable prognostic factors. **Conclusions :** Our study is the first to examine the methylation profile of prostate adenocarcinoma according to the MTHFR genotypes. The differences of the cancer risk, the genomic hypomethylation and the prognosis between the MTHFR genotypes in prostate adenocarcinoma should be further explored.

Key Words : Methylenetetrahydrofolate reductase; CpG islands; DNA methylation; Prostate; Adenocarcinoma

접수 : 2008년 8월 26일
제재승인 : 2008년 10월 29일

책임저자 : 강경훈
우 110-744 서울시 종로구 연건동 28
서울대학교 의과대학 병리학교실
전화: 02-2072-3312
Fax: 02-743-5530
E-mail: ghkang@snu.ac.kr

엽산(folate)은 과일과 채소 등에서 많이 발견되는 수용성 B 비타민의 일종으로 그 동안 여러 연구들을 통해 엽산결핍이 발암 과정과 관련이 있을 것으로 생각되어 왔다. 엽산의 결핍이 암의 위험성을 높이는 데는 두 가지 분자적 기전이 관여할 것으로 여겨지는데, 첫째로 DNA 내에 우라실(uracil)이 잘못 끼어 들어 가게 함으로써 염색체의 절단이나 돌연변이를 유도하는 작용을 할 수 있고, 두 번째로 DNA의 이상 메틸화(aberrant methylation)를 일으켜 원발암 유전자나 종양 억제 유전자의 정상적인 발현을 변화시킬 수 있다.^{1,2}

엽산 섭취가 부족한 것 못지 않게 엽산 대사에 관여하는 효소의 유전적 다형성이 암 발생에 취약한 인자로 작용할 수 있을 것이라는 가설이 여러 연구자들에 의해 세워졌고, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)가 대표적으로 연구되어 왔다. MTHFR은 엽산 대사에 있어 핵심적인 효소로 5,10-methylenetetrahydrofolate를 체내 순환 형태인 5-methyltetrahydrofolate로 전환시키는 역할을 한다. MTHFR의 유전적 다형성으로는 C677T와 A1298C, 두 가지가 가장 흔한 것으로 알려져 있다. MTHFR 유전자의 뉴클레오타이드 위치 677 bp에서

C→T 치환이 일어나게 되면, 야생형(wild type) CC 유전자형에 비해 효소 활성도가 35% 가량 감소된 CT 이형접합체(heterozygote) 또는 70% 가량 감소된 TT 동형접합체(homozygote)가 만들어진다.³ 또한 뉴클레오타이드 위치 1,298 bp에서 A→C 치환의 경우에도 CC 동형접합체에서 정상에 비해 60% 정도의 효소 활성을 나타낸다는 보고가 있었다.⁴

MTHFR 반응의 기질인 5,10-methylenetetrahydrofolate는 DNA 합성을 촉진하는 작용을 하는데, 구체적으로 우라실로부터 타이미딜산(thymidylate)을 합성함으로써 우라실이 잘못 끼어들어가 염색체 절단이 일어나는 것을 최소화하고 적절한 복구(mismatch repair)가 일어날 수 있도록 한다. MTHFR 반응의 산물인 5-methyltetrahydrofolate는 호모시스테인(homocysteine) 아미노산이 메티오닌(methionine)으로 전환될 수 있도록 단일 탄소 그룹을 공급하는 역할을 하며, 메티오닌은 DNA 메틸화의 단일 탄소 공여자로 널리 작용하는 S-아데노실메티오닌(S-adenosylmethionine)의 전구체이다. 이상의 대사 기전들을 종합해 볼 때 MTHFR의 유전적 다형성으로 인한 효소 기능의 감소가 더욱 많은 업산을 공급함으로써 DNA 합성과 복구에 기여하여 암 발생의 위험을 낮추거나, 혹은 메틸기의 가용성을 감소시킴으로써 복구 과정에 관여할 수 있다는 가설들이 가능하다.⁵ 따라서 이에 관련된 기존 연구들이 다수 있었고 급성 백혈병, 자궁 내막암 및 대장암 등에서 연관성이 있을 것으로 연구된 바 있으나,⁶⁻⁹ 암이 발생한 장기 혹은 인종에 따라 다양한 양상으로 나타나며 식이섭취와 나이 등의 인자에 따라 영향을 받는 등 아직까지는 암의 발생과 MTHFR 유전자 다형성 간의 역학적 및 분자적 상관성이 명확하지 않은 상태이다.¹⁰⁻¹²

유전자의 프로모터(promoter) 부위에 집중적으로 존재하는 시토신-구아닌의 반복적 서열인 CpG 섬(CpG island)에서 시토신의 5번 탄소에 메틸화가 일어나게 되면 종양 억제 유전자 등의 정상적인 발현이 억제될 수 있다. 전립선 선암종(prostate adenocarcinoma)은 CpG 섬 과메틸화(hypermethylation)에 의한 여러 종양 억제 유전자의 발현 저하가 주요한 발암 기전으로 여겨지는 암종이다.¹³ 본 연구진은 기존의 연구에서 전립선 선암종에서 일어나는 메틸화 양상을 분석한 바 있다.¹⁴ 암종에서의 메틸화는 특정 CpG 섬에서의 과메틸화와 유전체에서의 광범위 저메틸화(hypomethylation)를 특징으로 하는데, 저메틸화 현상은 유전체의 불안정성을 유도하여 복구 과정에 기여할 수 있을 것으로 여겨지나 구체적인 기전과 각 암종에서의 특징적 양상에 대해서는 좀 더 많은 연구가 필요한 실정이다.^{15,16} 그동안 유전체의 광범위 저메틸화를 알아보기 위하여 유전체 DNA 서열 중 상당부분을 차지하고 있는 반복적 요소(repetitive element)인 LINE-1과 Alu에서의 메틸화가 대표적으로 연구되어 왔다.¹⁷

MTHFR의 대사 기전으로부터 유추할 수 있듯이 변이형 MTHFR은 효소 활성이 감소되어 메틸기의 공급 저하를 통해 DNA의 저메틸화를 초래할 가능성이 있고, 실제 MTHFR의 변이형 유전자와 유전체 DNA의 저메틸화 간에 연관성이 있다는

이전의 몇몇 보고들이 있었다.¹⁸⁻²⁰ MTHFR의 DNA 메틸화에 미치는 영향을 고려해 보았을 때 암종에서 MTHFR 유전자형에 따라 CpG 섬과 유전체의 메틸화 양상이 어떤 식으로 나타날 것인가가 의문점이 될 수 있고, 특히 이상 메틸화가 주요 발암 기전으로 작용하는 전립선 선암종에서 MTHFR 유전자형과 메틸화 양상을 비교해 본 기준 연구가 없었다는 점에 주목할 필요가 있다. 이에 따라 본 연구에서는 전립선 선암종에서 여러 대표적인 유전자의 CpG 섬, LINE-1 및 Alu에서의 메틸화 양상과 MTHFR 유전자 다형성 간의 연관성을 분석해 보고자 한다.

재료와 방법

본 연구에 사용된 전립선암 환자군 재료와 메틸화 특이적 중합효소 연쇄반응을 이용한 각 CpG 섬 좌의 메틸화 및 결합적 중야황산 제한효소 분석법을 이용한 LINE-1과 Alu의 메틸화 분석은 본 연구진의 기존 연구에서 이미 수행된 결과를 이용하였다.¹⁴

연구 재료

1999년 1월에서 2004년 12월 사이에 서울대학교병원에서 전립선 선암종으로 진단받고 근치적 전립선 절제술(radical prostatectomy)을 시행 받은 환자군을 대상으로 하였다. 이중 무작위로 추출된 179예에 대해서 절제술 검체 조직 슬라이드의 병리학적 재검을 시행하였으며 이들 환자의 수술 전 및 수술 후 추적 관찰상의 혈중 PSA 수치와 병리학적 재검상의 Gleason 점수, AJCC 병기(stage) 및 종양 부피에 대한 자료를 취합하였다. 전립선암 등 기타 질병이 없는 것으로 확인된 224예의 만성 위염 환자가 MTHFR 유전자형의 정상 대조군으로 포함되었다. 전립선 절제술 검체의 대표적 파라핀 블록을 4 μm 두께로 박절하고 헤마톡실린-에오진 염색을 한 후 광학 현미경의 100배 배율로 검정하면서 70% 이상의 종양세포 밀도를 보이는 부분에 대하여 표시하였다. 표시된 부분에 해당하는 부위를 파라핀블록에 표시하고 이를 칼을 이용하여 얇게 긁어 내어 마이크로튜브에 모았다. 자일렌과 알코올을 교대로 처리하여 파라핀을 제거한 후, proteinase K를 이용하여 조직을 용해시키고, 이를 통상적인 페놀-클로로포름-이소아밀알코올처리 방법을 이용하여 DNA를 추출하였다.

MTHFR 유전자형 분석

이전에 기술된 중합효소 연쇄 반응/제한효소 절편 길이 다형성(polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism, PCR/RFLP) 방법을 이용하여 MTHFR 유전자형을 분석하였다.²¹⁻²³ MTHFR C677T 분석은 상향 시발체

(forward primer)로 5'-TGAAGGAGAAGGTGTGCGGG-GA-3', 하향 시발체(reverse primer)로 5'-AGGACGGTG-CGGTGAGAGTG-3'을 이용하였으며, A1298C 분석은 상향 시발체 5'-GCAAGTCCCCAAGGAGG-3', 하향 시발체 5'-GGTCCCCACTTCCAGCATC-3'을 이용하였다. PCR 산물에 대하여 뉴클레오파이드 677의 경우 *HinfI* (New England Biolabs, Bad Homburg, Germany)을, 뉴클레오파이드 1298의 경우 *MboII* (New England Biolabs)를 제한효소로 사용하였으며 37°C에서 최소 2시간 이상 처리하였다. 3% 아가로스 겔에서 전기영동 하였고, C677T 다형성의 경우 C 대립유전자는 198 bp, 변형 대립유전자는 175 bp와 23 bp의 밴드를 나타내었다. A1298C 다형성에서는 29, 37, 79 bp의 세 절편으로 이루어진 경우 A 대립유전자를 뜻하고 변형 대립유전자에서는 37, 108 bp의 두 절편으로 구성된다.

중아황산 나트륨 변환(sodium-bisulfite modification) 및 메틸화 특이적 중합효소 연쇄 반응(methylation specific PCR, MSP)

유전체 DNA에 대한 중아황산 나트륨 변환과 MSP는 이전에 기술된 바와 같이 시행하였다.¹⁴ 5 μg의 DNA를 100°C에서 10분간 변성시킨 후 0.3 M NaOH 처리하여 42°C에서 20분간 배양하였다. 50°C에서 16시간 동안 차광된 상태로 2.5 M 메타중아황산 나트륨(sodium metabisulfite) 용액을 처리하여 중아황산 변환을 시행하였으며 이전에 기술된 바와 같이 QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)를 사용하여 DNA를 정제하였다.¹⁷ 상온에서 15분간 0.077 M NaOH 용액을 처리하여 배양하면서 탈설폰화(desulphonation) 시킨 후 1 M HCl 10 μL로 중화하였으며, QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)를 사용하여 DNA를 재차 정제하였다. 80 μL의 분리된 샘플이 얻어졌고 MSP를 이용하여 메틸화 분석을 시행하였다.

MSP에 사용된 16개 CpG 섬 좌(CpG island loci)의 시발체는 이전에 기술된 바와 같다.¹⁴ 중아황산 변환된 각 CpG 섬 좌에 대한 증폭을 위하여 1개의 PCR 원총액, 데옥시뉴클레오파이드 삼인산(deoxynucleotide triphosphate) 각 1 mM, 시발체 각 10 pmol, 중아황산 변환된 DNA 30-50 ng를 혼합시킨 총 25 μL 부피의 PCR 혼합물을 사용하였다. PCR 반응은 98°C에서 5분간 시작하였고 Taq 중합효소 0.75 unit을 첨가한 후 35주기 증폭 및 최종 10분 연장하였다. 2.5% 아가로스 겔에서 전기영동 하였고, 3.5 ng의 표지자보다 크게 나타난 신호를 메틸화되었다고 판정하였으며 이보다 약하게 나타난 신호에 대해서는 MSP를 재차 시행하여 일관된 결과가 보이면 메틸화되었다고 판정하였다. *Ss1* 메틸기 전이효소(*Ss1* methyltransferase) 처리된 림프구 DNA와 DNA 없는 증류수를 각각 양성 및 음성 대조군으로 사용하였다.

LINE-1과 Alu의 메틸화 분석

LINE-1과 Alu의 메틸화 분석은 결합적 중아황산 제한효소 분석(combined bisulfite restriction analysis, COBRA) 방법을 이용하여 이전에 기술한 바와 같이 시행하였다.^{24,25} LINE-1 PCR 산물은 *TaqI* 2 U와 *TasI* 8 U을 1개의 *TaqI* buffer (MBI Fermentas, Hanover, MD, USA)에 첨가한 총 10 μL의 혼합물로 65°C에서 익일까지 배양하였고 폴리아크릴아미드 겔(polyacrylamide gel)에서 전기영동 하였다. DNA 절편들의 강도는 ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>)를 이용하여 측정하였다. LINE-1 메틸화 정도는 *TaqI* 절편 밴드 강도와 *TasI* 절편 밴드 강도의 합에 대한 *TaqI* 절편 밴드 강도의 분율로서 표시할 수 있다. Alu 메틸화 분석은 Alu 증폭산물을 *MboI* (MBI Fermentas) 10 U로 절편낸 후 12% 비변성 폴리아크릴아미드 겔에서 전기영동 하였다. 여기서 절편 밴드들은 메틸화된 대립유전자로 볼 수 있고, 절편되지 않은 밴드들은 메틸화되지 않았거나 돌연변이가 있는 대립유전자를 뜻한다. Alu 메틸화 정도는 *MboI* 절편 밴드 강도와 절편되지 않은 밴드 강도의 합에 대한 *MboI* 절편 밴드 강도의 분율로서 표시할 수 있다.

통계 분석

통계 분석은 SPSS version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 Pearson 카이제곱 검정과 다항 로지스틱 회귀분석(multinomial logistic regression) 및 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 시행하였으며 p-value 0.05 미만을 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

전립선 선암종에서 MTHFR 유전자형의 분포

전립선 선암종과 정상 대조군에서 MTHFR 677 및 1298의 유전자형 분포는 Table 1과 같다. MTHFR 677의 경우 전립선 선암종과 정상 대조군 모두에서 CT형의 비율이 가장 높았고 다음으로 CC, TT형의 순이었다. 전립선 선암종에서 정상 대조군에 비하여 높은 CT형 비율(58.1% vs 44.6%)을 나타내는 것을 알 수 있고, 다항 로지스틱 회귀분석을 시행하였을 때 CT형의 교차비(odds ratio)가 1.94로 나타났으며 이는 통계적으로 유의하였다($p=0.005$). MTHFR 1298의 경우 전립선암과 정상 대조군 모두에서 AA형의 비율이 가장 높았으며 AC형과 CC형의 순으로 나타났다. 전립선 선암종과 정상 대조군 사이에서 AC형(32.4% vs 27.2%)과 CC형(2.2% vs 4.5%)의 분포 차이는 크지 않았다. 이상의 결과를 볼 때 전립선 선암종에서의 MTHFR 유전자형 변이 비율은 정상 대조군에서의 분포와 크게 다르지 않

으나, MTHFR 677 CT형의 비율이 정상에 비해 상당히 높게 나타나는 것을 특징으로 볼 수 있고 통계적으로 유의한 위험도를 나타내어 CT형의 전립선암 발병 가능성이 높음을 시사한다.

MTHFR 유전자형에 따른 16개 CpG 섬 좌의 메틸화 양상

저자들이 시행한 이전의 연구에서,¹⁴ 179예의 전립선암에 대해 22개의 CpG 섬 좌(*RASSF1A*, *GSTP1*, *RARB*, *MDR1*, *APC*, *TNFRSF10C*, *CDH13*, *ASC*, *BCL2*, *COX2*, *THBS1*, *RBP1*, *TIG1*, *CD44*, *p16*, *RUNX3*, *TNFRSF10D*, *NEUROG1*, *CDH1*, *HLTF*, *p14*, *HPP1*)에 대하여 MSP를 이용하여 DNA 과메틸화를 분석하였고, 이 중 6개(*CDH13*, *CDH1*, *HLTF*, *p14*, *HPP1*, *NEUROG1*)를 제외한 16개 CpG 섬 좌가 전립선암 특이적인 DNA 과메틸화를 보였다. 이를 16개 CpG 섬 좌의 MTHFR 유전자형에 따른 메틸화 빈도는 Table 2에 정리하였다. 메틸화 빈도가 가장 높게 나타난 것은 *RASSF1A*로 155예에서 메틸화 양성으로 나타났으며(86.6%), 가장 낮은 메틸화 양성

빈도를 나타낸 것은 *RUNX3*로 단 29예에서만(16.2%) 메틸화 되었다.

전립선암 특이적인 과메틸화를 나타낸 16개 CpG 섬 좌에 대해서 각 MTHFR 유전자형에 따른 메틸화된 CpG 섬 좌의 평균 개수를 비교해 보았을 때, MTHFR 677 CC형에서 7.6개, CT형에서 6.7개, TT형에서 8개로 TT형의 전립선암종에서 가장 높았지만 통계학적으로 유의하지 않았다(One-way ANOVA, p=0.222) (Fig. 1A). MTHFR 1298에서는 AA형은 7.2개, AC형은 7.4개, CC형은 3.3개이었고, CC형에서 가장 낮은 메틸화 빈도를 나타내었지만 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(p=0.131) (Fig. 2A).

전립선 선암종에서 흔하게 메틸화되는 것으로 잘 알려져 있는 *GSTP1*의 경우 131예에서 메틸화되어 73.2%의 메틸화 빈도를 보였고, 각 MTHFR 677 유전자형에 따른 빈도를 보면 CC형이 44예 중 28예(63.6%), CT형이 104예 중 78예(75.0%), TT형이 31예 중 25예(80.7%)에서 메틸화됨으로서 CC형에 비하여 CT형 및 TT형에서 메틸화 빈도가 높게 나타나고 특히 TT형에서

Table 1. Distribution of MTHFR 677 and 1298 genotypes in prostate adenocarcinoma (n=179) and normal control (n=224) and association test for the MTHFR polymorphism with prostate adenocarcinoma risk

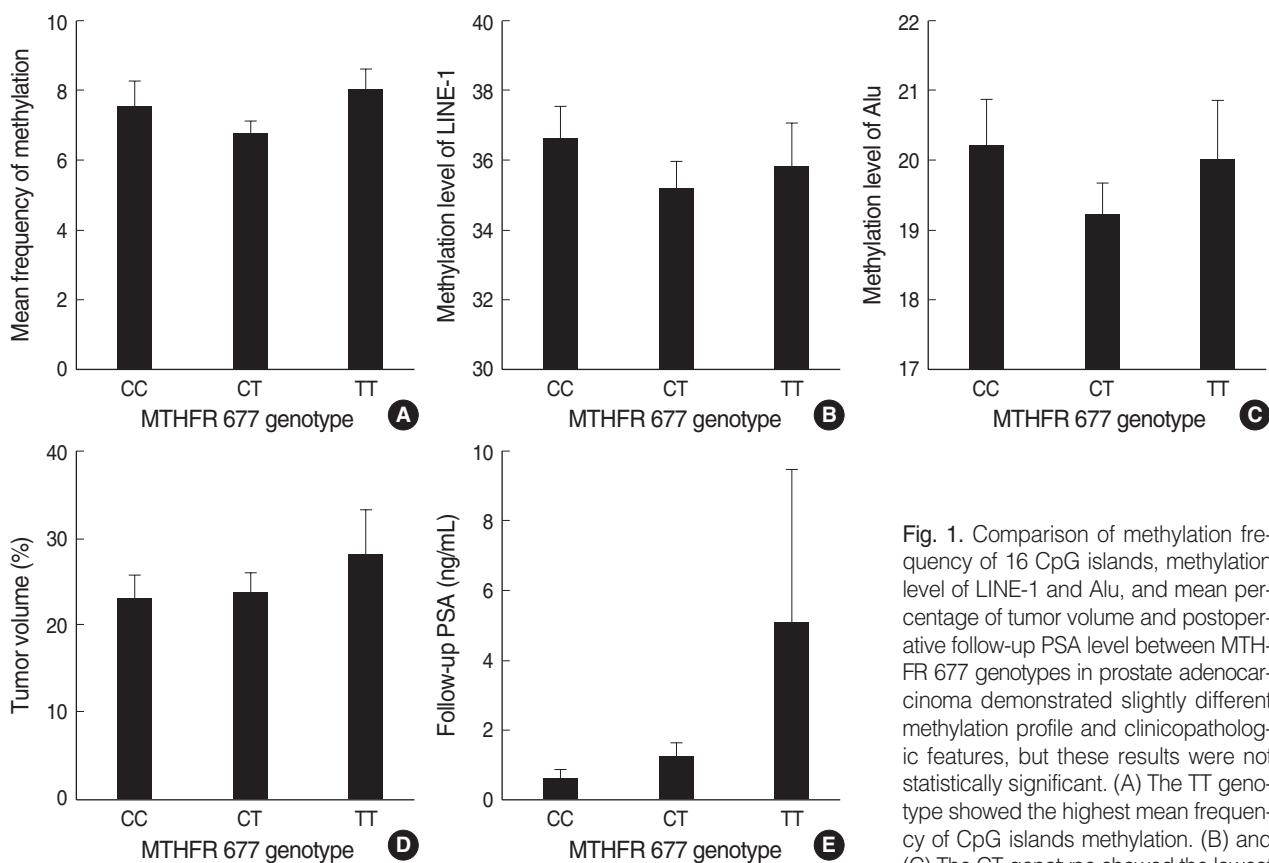
	Genotype	No. of PCa (%)	No. of NC (%)	OR (95% CI)	p-value
MTHFR 677	CC	44 (24.6)	82 (36.6)	1.00 (reference)	
	CT	104 (58.1)	100 (44.6)	1.94 (1.23-3.06)	0.005
	TT	31 (17.3)	42 (18.8)	1.38 (0.76-2.48)	0.290
MTHFR 1298	AA	117 (65.4)	153 (68.3)	1.00 (reference)	
	AC	58 (32.4)	61 (27.2)	1.24 (0.81-1.92)	0.324
	CC	4 (2.2)	10 (4.5)	0.52 (0.16-1.71)	0.283

PCa, prostate adenocarcinoma; NC, normal control; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

Table 2. Methylation frequency of 16 CpG island loci according to genetic polymorphism of MTHFR 677 and 1298 in prostate adenocarcinoma (n=179)

CpG island loci	MTHFR 677 n (%)			p-value	MTHFR 1298 n (%)			p-value*
	CC	CT	TT		AA	AC	CC	
<i>RASSF1A</i>	37 (84.1)	91 (87.5)	27 (87.1)	0.853	102 (87.2)	52 (89.7)	1 (25.0)	0.635
<i>GSTP1</i>	28 (63.6)	78 (75.0)	25 (80.7)	0.212	91 (77.8)	39 (67.2)	1 (25.0)	0.133
<i>RARB</i>	29 (65.9)	71 (68.3)	23 (74.2)	0.739	81 (69.2)	41 (70.7)	1 (25.0)	0.843
<i>TNFRSF10C</i>	30 (68.2)	66 (63.5)	21 (67.7)	0.820	77 (65.8)	39 (67.2)	1 (25.0)	0.851
<i>APC</i>	29 (65.9)	63 (60.6)	25 (80.7)	0.119	79 (67.5)	37 (63.8)	1 (25.0)	0.623
<i>BCL2</i>	26 (59.1)	48 (46.2)	19 (61.3)	0.184	59 (50.4)	34 (58.6)	0 (0)	0.307
<i>MDR1</i>	23 (52.3)	52 (50.0)	16 (51.6)	0.964	58 (49.6)	31 (53.4)	1 (25.0)	0.707
<i>ASC</i>	20 (45.5)	43 (41.3)	15 (48.4)	0.754	48 (41.0)	29 (50.0)	1 (25.0)	0.260
<i>TIG1</i>	18 (40.9)	42 (40.4)	15 (48.4)	0.722	47 (40.2)	27 (46.6)	1 (25.0)	0.421
<i>RBP1</i>	18 (40.9)	25 (24.0)	14 (45.2)	0.028	36 (30.8)	20 (34.5)	1 (25.0)	0.620
<i>COX2</i>	15 (34.1)	29 (27.9)	8 (25.8)	0.681	32 (27.4)	19 (32.8)	1 (25.0)	0.459
<i>TNFRSF10D</i>	13 (29.5)	26 (25.0)	6 (19.4)	0.605	29 (24.8)	16 (27.6)	0 (0)	0.690
<i>THBS1</i>	14 (31.8)	22 (21.2)	8 (25.8)	0.382	28 (23.9)	15 (25.9)	1 (25.0)	0.780
<i>CD44</i>	13 (29.5)	17 (16.3)	9 (29.0)	0.116	26 (22.2)	12 (20.7)	1 (25.0)	0.817
<i>p16</i>	10 (22.7)	16 (15.4)	10 (32.3)	0.106	26 (22.2)	9 (15.5)	1 (25.0)	0.297
<i>RUNX3</i>	10 (22.7)	12 (11.5)	7 (22.6)	0.137	21 (17.9)	8 (13.8)	0 (0)	0.486

*In significance test of MTHFR 1298, CC type was excluded due to too small number of cases.



mean level of LINE-1 and Alu methylation. (D) and (E) The TT genotype showed the highest tumor volume and follow-up PSA level. (Error bars show mean \pm 1.0 standard error).

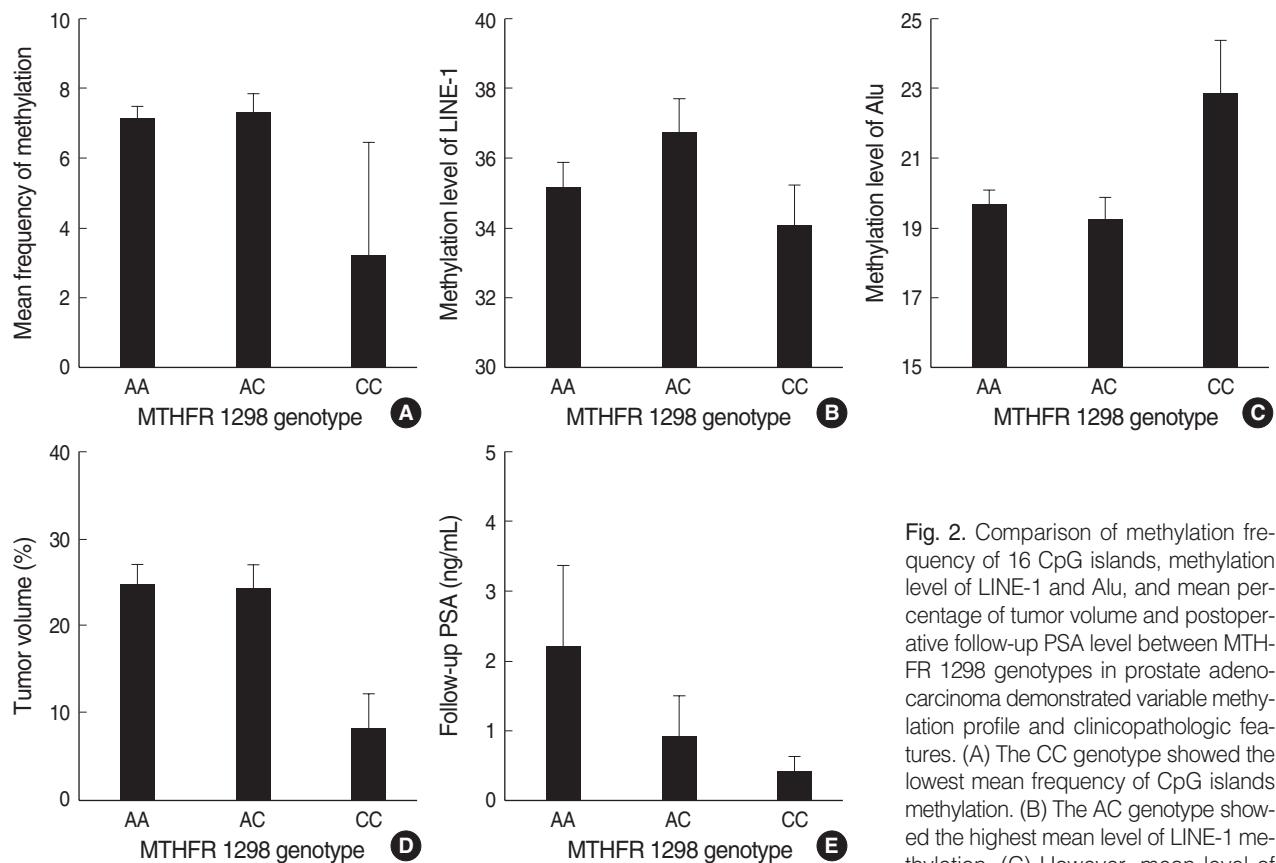
높게 나타남을 알 수 있다. 이와 유사한 양상으로 나타나는 다른 CpG 섬 좌로는 *RARB*가 있는데 MTHFR 677 CC형이 44예 중 29예(65.9%), CT형 104예 중 71예(68.3%), TT형 31예 중 23예(74.2%)에서 메틸화되어 CT형과 TT형으로 갈수록 순차적인 메틸화 증가 양상이 있음을 확인할 수 있다. APC의 경우 MTHFR 677 CC형 44예 중 29예(65.9%), CT형 104예 중 63예(60.6%), TT형 31예 중 25예(80.7%)에서 메틸화되어 역시 TT형에서 상대적으로 높은 메틸화 빈도를 나타낸다.

이와 같이 몇몇 메틸화 빈도가 높은 CpG 섬 좌에서 CC형에 비하여 CT형과 TT형의 메틸화 빈도가 높은 경향을 볼 수는 있었으나, MTHFR 677 각 유전자형에 따른 메틸화 빈도의 차이가 통계적으로 유의하게 나타나는 CpG 섬 좌는 *RBPI* 밖에 없었다(Pearson chi-square test, $p=0.028$). *RBPI*의 경우 CT형에서 104예 중 25예만이 메틸화되어 상대적으로 CC형과 TT형에 비하여 24%의 낮은 메틸화 빈도를 나타내었고 이는 *THBS1*, *CD44*, *p16*, *RUNX3*와 같이 전립선암 특이적 과메틸화가 나타난 16개 CpG 섬 좌 중 전체 전립선암에서의 메틸화 빈도가 상대적으로 낮은 CpG 섬 좌들에서 CT형의 메틸화 빈도가 낮게 나타나는 공통의 경향이 있는 것과 연관지어 볼 수 있겠다.

MTHFR 677 유전자형 중 TT형에서 가장 높은 메틸화 빈

도를 나타낸 CpG 섬 좌가 8개(*GSTP1*, *RARB*, *APC*, *ASC*, *BCL2*, *RBPI*, *TIG1*, *p16*)였고 CC형에서 가장 높은 메틸화 빈도를 나타낸 CpG 섬 좌가 7개(*MDR1*, *TNFRSF10C*, *COX2*, *THBS1*, *CD44*, *RUNX3*, *TNFRSF10D*), CT형에서 가장 높은 메틸화 빈도를 나타낸 CpG 섬 좌가 1개(*RASSF1A*)였다. 이상의 결과를 보았을 때 MTHFR 677 TT형에서 높은 메틸화 빈도를 나타낸 CpG 섬 좌가 가장 많았고, CT형과 TT형을 합한 T-변이형과의 비교에서도 메틸화 빈도를 높게 나타낸 CpG 섬 좌는 CC형과 T-변이형에서 각각 7개, 9개이었다. 전체 전립선암 179예에서 메틸화 빈도가 40% 이상으로 높게 나타난 9개의 주요 CpG 섬 좌(*RASSF1A*, *GSTP1*, *RARB*, *MDR1*, *APC*, *TNFRSF10C*, *ASC*, *BCL2*, *TIG1*)를 대상으로 하였을 때는 TT형에서 메틸화 빈도가 가장 높게 나타난 CpG 섬 좌가 6개(*GSTP1*, *RARB*, *APC*, *ASC*, *BCL2*, *TIG1*)로 가장 많았다.

MTHFR 1298 유전자형의 경우 AC형에서 가장 높은 메틸화 빈도를 나타낸 CpG 섬 좌가 11개(*RASSF1A*, *RARB*, *MDR1*, *TNFRSF10C*, *ASC*, *BCL2*, *COX2*, *THBS1*, *RBPI*, *TIG1*, *TNFRSF10D*)로 가장 많았고, 야생형인 AA형에서 가장 높은 메틸화 빈도를 나타낸 CpG 섬 좌가 4개(*GSTP1*, *APC*, *CD44*, *RUNX3*), CC형에서 가장 높은 메틸화 빈도를 나타낸 CpG 섬



Alu methylation in AC genotype was the lowest. (D) and (E) The CC genotype showed the lowest tumor volume and follow-up PSA level. However, these differences (A-E) were not statistically significant. (Error bars show mean \pm 1.0 standard error).

좌가 1개(*p16*)였다. 전체 전립선암 중 메틸화 빈도가 40% 이상으로 높게 나타난 주요 CpG 섬 좌 9개를 대상으로 하였을 때도 AC형에서 가장 높은 메틸화 빈도를 나타낸 CpG 섬 좌가 7개(*RASSF1A*, *RARB*, *MDR1*, *TNFRSF10C*, *ASC*, *BCL2*, *TIG1*)로 AA형 2개(*GSTP1*, *APC*)에 비하여 월등히 많았다.

MTHFR 유전자형에 따른 LINE-1 및 Alu의 메틸화 양상

이전의 연구에서,¹⁴ 전립선암 전체 179예 중 173예에 대하여 COBRA를 이용하여 LINE-1 및 Alu의 메틸화를 조사하였었고, 전립선암에서 LINE-1 메틸화 수준은 평균 35.7%였으며, Alu 메틸화 수준은 평균 19.7%를 나타내었다.

LINE-1 메틸화의 MTHFR 677 유전자형에 따른 차이를 보면 CC형은 LINE-1 메틸화 수준이 평균 36.6%, CT형은 35.2%, TT형은 35.8%였다(Fig. 1B). CT형에서 가장 낮은 LINE-1 메틸화를 나타냄을 알 수 있으나 유의한 차이를 보이지는 않았다(One-way ANOVA, $p=0.551$). MTHFR 677 유전자형에 따른 Alu 메틸화 양상을 보면 CC형에서 Alu 메틸화 레벨이 평균 20.2%, CT형 19.2% 및 TT형 20.0%이었다(Fig. 1C). LINE-1의 결과와 유사하게 역시 CT형에서 가장 낮은 Alu 메틸화를

보였으나 유의한 차이는 아니었다($p=0.426$).

MTHFR 1298 유전자형에 따른 LINE-1 메틸화 수준을 비교해보면, AA형에서 평균 35.2%, AC형 36.8%, CC형 34.1%로 나타났다(Fig. 2B). AC형에서 가장 높은 LINE-1 메틸화를 나타내고 CC형에서 가장 낮은 메틸화를 나타냈으나 모두 유의한 차이는 아니었다($p=0.375$). Alu 메틸화 양상은 AA형이 평균 19.7%, AC형 19.3%, CC형 22.9%로(Fig. 2C), AC형에서 가장 낮은 메틸화가 나타나고 CC형에서 가장 높은 메틸화가 나타났으나 역시 모두 통계적으로 유의하지 못하였다($p=0.353$).

MTHFR 유전자형과 전립선암의 임상병리학적 특성과의 관계

마지막으로 전립선암의 임상병리학적 특성으로서 중요 예후인자인 수술 전 PSA 수치, 조직학적 Gleason 점수, AJCC 병기, 종양 부피(tumor volume) 및 재발 예측 인자로서의 수술 후 추적 관찰상 혈중 PSA 수치 등이 MTHFR 유전자형에 따라 어떠한 차이를 나타낼 것인가를 알아보았다. 전체 전립선암 179예의 수술 전 혈중 PSA 평균치는 14.0 ng/mL이었으며 MTHFR 677 각 유전자형에 따른 평균치는 CC형에서 15.8 ng/mL, CT

Table 3. Distribution of Gleason score according to MTHFR genotypes in prostate adenocarcinoma (n=179)

Gleason score	MTHFR 677 n (%)			p-value	MTHFR 1298 n (%)			p-value
	CC	CT	TT		AA	AC	CC	
≤7	35 (79.5)	80 (76.9)	23 (74.2)	0.861	88 (75.2)	46 (79.3)	4 (100)	0.453
8≤	9 (20.5)	24 (23.1)	8 (25.8)		29 (24.8)	12 (20.7)	0 (0)	

Table 4. Distribution of AJCC stages according to MTHFR genotypes in prostate adenocarcinoma (n=179)

AJCC stage	MTHFR 677 n (%)			p-value	MTHFR 1298 n (%)			p-value
	CC	CT	TT		AA	AC	CC	
II	22 (50)	52 (50)	17 (54.8)	0.988	61 (52.1)	26 (44.8)	4 (100)	0.196
III	19 (43.2)	43 (41.3)	10 (32.3)		43 (36.8)	29 (50)	0 (0)	
IV	3 (6.8)	9 (8.7)	4 (12.9)		13 (11.1)	3 (5.2)	0 (0)	

형에서 13.6 ng/mL, TT형 12.7 ng/mL으로 CC형에서 CT형, TT형으로 갈수록 낮아지는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다(oneway ANOVA, p=0.587). MTHFR 1298 유전자형의 경우 AA형 13.2 ng/mL, AC형 16.0 ng/mL, CC형 7.4 ng/mL의 평균치를 나타내어, AA형에 비하여 AC형에서 높아지고 CC형에서 현저히 낮은 수치를 보여주었으나 역시 통계적으로 유의한 결과는 아니었다(p=0.268).

전립선 선암종의 조직학적 등급으로 중요 예후인자라 할 수 있는 Gleason 점수의 분포를 각 MTHFR 유전자형에 따라 정리한 결과는 Table 3과 같다. MTHFR 677 유전자형 모두에서 Gleason 점수 7점에 가장 많은 빈도를 나타내었고 다음으로 9점의 순이었으며 전반적으로 7점 이하의 분포가 8점 이상 보다 월등히 많았으나 통계적으로 유의하지는 않았다(p=0.861). 이는 전체 전립선암 179예의 Gleason 점수 분포와 유사하였고 또한 각 유전자형에 따른 Gleason 점수 평균치는 유의한 차이를 나타내지 못하였다(oneway ANOVA, p=0.903). MTHFR 1298 유전자형 역시 AA형과 AC형에서 7점의 빈도가 가장 많았고 다음으로 9점의 순이었으며 7점 이하의 분포가 8점 이상 보다 많았으나 통계적으로 유의하지는 않았다(p=0.453). 특이할 점은 CC형의 경우 모두 7점 이하에만 분포하여 상대적으로 낮은 점수를 나타내었으나 단 4예 밖에 되지 않아 유의성을 부여하기는 어려웠다.

또 다른 중요 예후인자인 AJCC 병기의 분포는 Table 4와 같다. MTHFR 677의 경우 각 유전자형에 따른 병기의 빈도가 유사한 양상으로서 II기가 가장 많고 IV기로 갈수록 순차적으로 줄어들었으며 유전자형 간의 차이는 통계적으로 유의하지 않았다(oneway ANOVA, p=0.988). MTHFR 1298 AA형의 경우 MTHFR 677과 유사하게 II기가 가장 많고 IV기로 갈수록 줄어드는 양상이었으나, AC형에서는 III기의 가장 빈도가 높았고 CC형은 모두 II기에만 국한되어 있는 특징을 보였다. 그러나 CC형이 4예 밖에 되지 않아 유의성을 부여하기 어렵고 통계적으로 이를 유전자형 간의 차이는 유의하지 않았다(p=0.196).

조직병리학적 재구성을 통해 측정한 종양 부피의 평균은 MTHFR 677 CC형에서 23.1%, CT형 23.8%, TT형 28.3%로 CC형에서 TT형으로 갈수록 소폭 증가하는 양상을 보였으나 유의하지는 않았다(Fig. 1D)(oneway ANOVA, p=0.593). MTHFR 1298의 경우 AA형 24.9%, AC형 24.4%로 유사하였고 CC형에서 8.3%로 상대적으로 매우 낮은 평균 종양 부피를 보였으나 역시 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 2D)(p=0.320).

마지막으로 수술 후 재발 여부를 기준하는 척도인 추적 관찰상의 혈중 PSA 평균치는 MTHFR 677 CC형에서 0.61 ng/mL, CT형 1.24 ng/mL이었으며, TT형에서 5.08 ng/mL로 급격히 증가하는 양상을 보였으나 유의한 차이는 아니었다(Fig. 1E)(oneway ANOVA, p=0.144). MTHFR 1298 AA형에서는 평균 PSA 수치가 2.20 ng/mL로 높게 나타났고 AC형에서 0.92 ng/mL, CC형에서 0.41 ng/mL로 순차적으로 낮아지는 양상을 보였다(Fig. 2E). 그러나 이러한 차이는 통계적으로 유의하지는 못하였다(p=0.722).

고 찰

MTHFR은 생리적으로 염산 대사의 기전에 관여하는 핵심적인 효소로서 인체 내에서 유전학적(genetic) 및 외유전학적(epigenetic) 변화에 간접적으로 영향을 미칠 수가 있다. 유전학적으로는 MTHFR의 기질이 되는 5,10-methylenetetrahydrofolate가 우라실이 타이미딜산으로 전환되는 것을 촉진함으로서 염색체의 절단이나 돌연변이가 일어나는 것을 방지하게 되며, 외유전학적 측면에서는 MTHFR를 통한 반응 산물인 5-methyl-tetrahydrofolate가 단일 탄소 그룹을 공급하여 호모시스테인을 메티오닌으로 전환시키고 메티오닌은 다시 S-아데노실메티오닌으로 전환되어 DNA 메틸화를 위한 탄소 공여자로서의 역할을 하게 된다. 암이 각종 유전자의 돌연변이 등을 통한 유전학적 변화와 DNA 메틸화로 대변되는 외유전학적 변화로 초래된다는

것을 생각해볼 때, 이와 같이 MTHFR이 유전학적 및 외유전학적 변화와 연관되어 있다는 것은 빨암 과정에도 관여할 여지가 크다는 것을 시사한다. 따라서 그 동안 MTHFR 유전자형의 차이가 암 발생에서의 차이를 나타낼 것이라는 가설을 검증하기 위한 연구들이 시도되었지만 일관된 결과를 도출하지는 못 하였으며, 아직 명확한 상관관계가 밝혀지지 않은 실정이다.⁶⁻¹²

MTHFR은 유전적 다형성을 지니는데, 뉴클레오파이드 677과 1298에서 변이형이 존재한다는 것이 널리 알려져 있다. 677의 야생형은 CC형이고 T-변이형으로 CT와 TT가 있으며, 1298의 경우 AA형이 야생형으로서 C-변이형인 AC형과 CC형이 존재하게 된다. 변이형일 경우 MTHFR의 효소 활성이 감소되는 등의 차이가 있을 수 있다는 기준 보고들이 있으며^{3,4} 따라서 MTHFR 677과 1298의 유전자형의 차이가 암 발생의 차이 및 암의 분자생물학적 변화 양상의 차이와 연관될 가능성이 있다. 본 연구에서는 MTHFR이 DNA 메틸화에 미칠 수 있는 영향을 고려하여, CpG 섬 과메틸화가 주요 빨암 기전으로 인정되고 있는 전립선 선암종에서 MTHFR 677과 1298 유전자형의 차이에 따른 메틸화 양상의 차이를 규명하고자 하였다.

우선 전립선암과 정상 대조군에서 MTHFR 유전형의 빈도를 비교해 보았을 때, MTHFR 677 CT형의 비율이 전립선암에서 높게 나타남을 알 수 있었다. 변이형의 생물학적 활성도 차이가 빨암과정에 미치는 영향에 그대로 적용된다면 이형접합체 변이형인 CT형에서의 경향이 동형접합체 변이형인 TT형에서 더욱 강화되어 나타날 것으로 예상할 수 있지만, TT형이 정상 대조군에 비하여 전립선암에서 근소하게 낮은 비율을 나타내어 T-변이형 유전자를 지닌 사람들이 모두 전립선암의 발병에 취약할 것이라는 가정은 어려울 것으로 보인다. 최근 MTHFR 677 다형성이 전립선암 발병 위험도에 미치는 영향을 대규모의 전립선암군과 대조군에 대하여 조사한 연구에서는 역학적으로 명확한 상관성이 없는 것으로 드러난 바 있다.^{26,27} 그러나 본 연구 결과에서는 CT형이 정상 대조군에 비하여 전립선암에서 그 비율이 상당히 높아지고 통계적으로 유의한 수준의 위험도를 나타내어 CT형 유전자를 지닌 사람들이 상대적으로 전립선암의 발병에 취약할 수 있음을 알 수 있으며 앞으로 더 구체적인 역학적 연구와 증거가 필요할 것으로 보인다.

다음으로 16개 CpG 섬 좌에 대한 메틸화 여부에 대한 이전의 연구자료를 활용하여 MTHFR 유전자형에 따른 양상의 차이를 보고자 하였다. MTHFR 677 TT형의 경우 전립선암에서 메틸화 빈도가 높게 나타나는 주요 CpG 섬 좌 9개 중 6개인 *GSTP1*, *RARB*, *APC*, *ASC*, *BCL2*, *TIG1*에서 CC형 및 CT형에 비하여 높은 메틸화 빈도를 나타내었다. 특히 *GSTP1* 80.7%, *APC* 80.7%로 전체 전립선암에서의 메틸화 빈도와 비교해 보았을 때 (각각 73.2%, 65.4%) 상당히 높은 메틸화 빈도를 나타낸다. 앞서(Table 1)의 분포에서 보았듯이 정상 대조군에 비하여 전립선암에서 TT형의 비율이 특별히 차이가 난다고 하기 어렵고, 전체 MTHFR 677 유전자형 중 가장 낮은 비율을 차지

하는 것이 TT형인 것을 감안할 때 상대적으로 TT형을 지닌 군의 전립선암 발병에 CpG 섬 과메틸화가 더 강하게 관련될 수 있다는 추정을 해 볼 수 있다.

MTHFR 1298 유전자형 간의 비교에서는 전립선암에서 메틸화 빈도가 높게 나타나는 주요 CpG 섬 좌 9개 중 7개인 *RA-SSF1A*, *RARB*, *MDR1*, *TNFRSF10C*, *ASC*, *BCL2*, *TIG1*에서 AC형이 AA형 및 CC형에 비하여 높은 메틸화 빈도를 보였다. 즉 MTHFR 1298 유전자형의 경우 야생형인 AA형에 비하여 변이형인 AC형에서 전립선암 발병에 CpG 섬 과메틸화가 보다 광범위하게 나타날 수 있음을 알 수 있다. 그러나 동형접합체 변이형인 CC형의 경우는 전체 전립선암 179예 중 단 4예만을 차지하고 있고, 그 중 CpG 섬 메틸화가 광범위하게 나타나는 1예를 제외하고는 나머지 3예에서 16개 CpG 섬 좌의 메틸화가 거의 나타나지 않아 전립선암 발병에 CpG 섬의 과메틸화가 다른 유전자형에 비하여 특별히 더 연관이 있을 것이라는 추정을 하기 어려웠다.

대장암 등의 여러 암종에서 DNA 메틸화는 특징적으로 종양 억제 유전자의 발현 억제 등이 관련되어 있는 CpG 섬 좌에서의 과메틸화와 유전체에서의 광범위한 저메틸화가 공존하는 모습을 보인다.²⁸ 유전체 DNA의 저메틸화 현상을 알아보기 위하여 LINE-1과 Alu에서의 메틸화를 측정하는 방법이 널리 쓰이고 있으며, 본 연구진은 기준의 연구를 통하여 전립선암에서 LINE-1과 Alu의 메틸화가 양성 전립선 비대증 대조군에 비하여 유의하게 낮아져 있음을 밝힌 바 있다.¹⁴ 그렇다면 전립선암에서 MTHFR의 각 유전자형에 따라 LINE-1과 Alu의 메틸화 정도가 차이를 보일 것인가가 의문이 될 수 있고, 본 연구의 결과 LINE-1과 Alu 모두에서 MTHFR 677 CT형의 메틸화가 가장 낮았고 다음으로 TT형, CC형의 순으로 점차 높아지는 양상을 보였다. 비록 이러한 메틸화 정도가 근소한 차이였고 통계적으로 유의하지는 못 하였으나, 앞서 살펴보았듯이 정상 대조군에 비하여 전체 전립선암에서 차지하는 비율이 CT형은 높아지고 TT형은 비슷하며 CC형에서 낮아지는 결과와 연관지어 볼 때, MTHFR 유전자형에 따라 유전체 메틸화 정도가 낮을수록 빨암 빈도가 높아질 수 있는 가능성을 생각해 볼 수 있다. 또한 변이형의 MTHFR이 효소 활성도가 감소된다는 연구 결과들을 통하여 유추해 볼 때^{3,4} 감소된 효소 활성도로 인하여 메틸화에 필요한 탄소의 공급이 저하되어 유전체의 저메틸화를 초래할 가능성이 있고, 따라서 야생형인 CC형에 비하여 변이형인 CT형에서 LINE-1과 Alu의 메틸화 정도가 낮아지는 본 연구에서의 결과를 설명해 볼 수 있다. 다만 CT형에 비하여 더욱 감소된 효소 활성도를 보인다는 TT형에서 CT형에 비하여 높은 LINE-1과 Alu의 메틸화 정도를 보이는 것은 이러한 단순 기전적인 유추만으로는 설명하기가 어려운 점이 있다. 더욱이 앞서 보았듯이 주요 CpG 섬 좌의 메틸화 양상에서 TT형이 가장 높은 메틸화 빈도를 나타내었던 점을 고려해 볼 때 TT형의 경우 효소 활성도의 저하를 통해 메틸화에 미치는 영향 외의 다른 요소가 복합적으로 관여될 여지가 있

다고 하겠다.

MTHFR 1298의 경우 LINE-1에서는 CC형이 가장 낮은 메틸화 정도를 보이고 다음으로 AA형, AC형의 순이었으며 Alu에서는 AC형이 가장 낮은 메틸화 정도를 나타내고 AA형, CC형의 순으로 높아지는 양상을 보였다. 이들 모두 근소한 차이였으며 통계적으로 유의한 차이는 아니었다. MTHFR 677과는 다르게 1298의 유전자형에서는 LINE-1과 Alu에서 동일한 경향을 보이지 않았으며 오히려 상반되는 양상을 띠게 됨으로써 결과의 해석에 어려움이 있다. 덧붙이자면 MTHFR 1298의 유전자형 중 동형접합체 변이형인 CC형은 정상 대조군에서 4.5%를 차지하고 또한 전체 179예의 전립선암 중 2.2%인 단 4예만을 차지하여 상당히 낮은 비율로 나타나고 있기 때문에 MTHFR 1298 유전자형을 대상으로 하는 연구 결과가 보다 분명해지기 위해서는 포함되는 연구 재료의 규모가 상당히 커야 될 것으로 생각된다.

수술 전 혈중 PSA 수치, 조직학적 Gleason 점수, AJCC 병기, 종양 부피 및 수술 후 추적 관찰상의 PSA 수치는 모두 전립선암의 주요 임상병리학적 특성들이다. 전립선암의 예후와 밀접한 관련이 있는 이들 인자가 MTHFR 각 유전자형에 따라 어떠한 차이를 나타낼 수 있는가가 또한 관심의 대상이었고, 이들 간의 비교 분석에서는 모두 유의한 결과를 도출해 내지는 못하였으나 몇 가지 흥미로운 사실을 발견할 수 있었다. MTHFR 677의 경우 CC형에 비하여 CT형과 TT형으로 갈수록 수술 전 PSA 수치의 점진적인 감소 경향이 있어 좋은 예후를 나타낼 가능성이 있으나, 종양 부피와 수술 후 PSA 수치의 경우에는 이와는 정반대의 경향으로 나타나 TT형에서 가장 큰 종양 부피와 높은 수술 후 PSA 수치를 보였다. 이들 인자를 통하여 보았을 때 MTHFR 677의 T-변이형인 야생형에 비해 전립선암에서 좋은 예후를 보일지 혹은 나쁜 예후를 보일지 혼란스러울 수 있어 실제 환자에서 예후와의 관련성에 대하여 더 많은 연구가 필요 할 것으로 보인다.

MTHFR 1298 CC형은 AA형과 AC형에 비하여 수술 전 및 수술 후 혈중 PSA 수치가 현저히 낮고 종양 부피가 작으며 Gleason 점수가 모두 7점 이하인 점 및 AJCC 병기상으로도 모두 II기 이하에 포함되는 점 등으로 보아 전립선암에서 상대적으로 좋은 예후를 보일 가능성이 매우 높다고 하겠다. 다만 CC형의 낮은 빈도로 인하여 본 연구에서 통계적으로 유의한 결론을 도출하기 어려웠던 점을 감안하여 대규모의 집단을 대상으로 한 연구가 의미를 가질 수 있을 것이다.

결론적으로 본 연구는 전립선 선암종을 대상으로 16개 CpG 섬 좌의 과메틸화, LINE-1 및 Alu에서의 저메틸화, 수술 전 및 수술 후 PSA 수치와 종양 부피, Gleason 점수, AJCC 병기 등의 임상병리학적 특성들이 MTHFR 677 및 1298 유전자형의 차이에 따라 어떻게 다른 양상으로 나타날 것인가를 규명해보는 최초의 시도였다는 의의가 있다. MTHFR 677의 변이형인 CT형은 정상 대조군에 비하여 전립선암에서 높은 비율을 차지하며

유의한 위험도를 나타내었고, 또한 유의한 결과는 아니었으나 LINE-1과 Alu에서의 저메틸화 경향과 부합되는 양상을 보여 이들간의 관련성에 대하여 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다. MTHFR 1298 CC형은 여러 임상병리학적 인자들과의 분석을 통하여 전립선암에서 좋은 예후를 나타낼 가능성을 제시할 수 있고, 실제 예후와의 관련성에 대해서는 대규모의 심화된 역학적 연구가 진행되어야 할 것이다.

참고문헌

- Blount BC, Mack MM, Wehr CM, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 3290-5.
- Kim YI. Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 511-9.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-3.
- Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998; 64: 169-72.
- Friso S, Choi SW. Gene-nutrient interactions in one-carbon metabolism. *Curr Drug Metab* 2005; 6: 37-46.
- Pereira TV, Rudnicki M, Pereira AC, Pombo-de-Oliveira MS, Franco RF. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and acute lymphoblastic leukemia risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 1956-63.
- Esteller M, Garcia A, Martinez-Palones JM, Xercavins J, Reventos J. Germ line polymorphisms in cytochrome P450 1A1 (C488T CYP1A1) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes and endometrial cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 1997; 18: 2307-11.
- Ma J, Stampfer M, Giovannucci E, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 1098-102.
- Hubner RA, Houlston RS. MTHFR C677T and colorectal cancer risk: a meta-analysis of 25 populations. *Int J Cancer* 2007; 120: 1027-35.
- Larsson SC, Giovannucci E, Wolk A. Folate intake, MTHFR polymorphisms, and risk of esophageal, gastric, and pancreatic cancer: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2006; 131: 1271-83.
- Kono S, Chen K. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and colorectal cancer and adenoma. *Cancer Sci* 2005; 96: 535-42.

12. Le Marchand L, Wilkens LR, Kolonel LN, Henderson BE. The MTHFR C677T polymorphism and colorectal cancer: a multiethnic cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1198-203.
13. Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 366-81.
14. Cho NY, Kim BH, Choi M, et al. Hypermethylation of CpG island loci and hypomethylation of LINE-1 and Alu repeats in prostate adenocarcinoma and their relationship to clinicopathological features. *J Pathol* 2007; 211: 269-77.
15. Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 2003; 300: 489-92.
16. Karpf AR, Matsui S. Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65: 8635-9.
17. Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, et al. Analysis of repetitive element DNA methylation by MethylLight. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 6823-36.
18. Cadieux B, Ching TT, VandenBerg SR, Costello JF. Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation. *Cancer Res* 2006; 66: 8469-76.
19. Graziano F, Kawakami K, Ruzzo A, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase 677C/T gene polymorphism, gastric cancer susceptibility and genomic DNA hypomethylation in an at-risk Italian population. *Int J Cancer* 2006; 118: 628-32.
20. Castro R, Rivera I, Ravasco P, et al. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C→T and 1298A→C mutations are associated with DNA hypomethylation. *J Med Genet* 2004; 41: 454-8.
21. Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, et al. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 4862-4.
22. Kimura F, Franke KH, Steinhoff C, et al. Methyl group metabolism gene polymorphisms and susceptibility to prostatic carcinoma. *Prostate* 2000; 45: 225-31.
23. Shen H, Xu Y, Zheng Y, et al. Polymorphisms of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and risk of gastric cancer in a Chinese population: a case-control study. *Int J Cancer* 2001; 95: 332-6.
24. Chalitchagorn K, Shuangshoti S, Hourpail N, et al. Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. *Oncogene* 2004; 23: 8841-6.
25. Yang AS, Estecio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JP. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: e38.
26. Johansson M, van Guelpen B, Hultdin J, et al. The MTHFR 677C→T polymorphism and risk of prostate cancer: results from the CAPS study. *Cancer Causes Control* 2007; 18: 1169-74.
27. Cicek MS, Nock NL, Li L, Conti DV, Casey G, Witte JS. Relationship between methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C genotypes and haplotypes and prostate cancer risk and aggressiveness. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 1331-6.
28. Bariol C, Suter C, Cheong K, et al. The relationship between hypomethylation and CpG island methylation in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 2003; 162: 1361-71.