

아교모세포종에서 메틸화특이적 중합효소연쇄반응과 Pyrosequencing을 이용한 MGMT 유전자 프로모터 메틸화 분석에 대한 고찰

이상화 · 황태숙 · 고영조¹ · 김욱연
한혜승 · 김완섭 · 고영신 · 임소덕

건국대학교병원 병리과 및 ¹신경외과

A Consideration of MGMT Gene Promotor Methylation Analysis for Glioblastoma Using Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction and Pyrosequencing

Sang Hwa Lee · Tae Sook Hwang · Young-Cho Koh¹ · Wook Youn Kim
Hye Seung Han · Wan Seop Kim · Young Sin Ko · So Dug Lim

Departments of Pathology and ¹Neurosurgery, Konkuk University Medical Center, Konkuk University School of Medicine, Seoul, Korea

Background: O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene promoter methylation is currently the most promising predictive marker for the outcome and benefit from temozolomide treatment in patients with glioblastoma, but there is no consensus on the analysis method for assessing the methylation status in the molecular diagnostic field. The objective of this study was to evaluate methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) and pyrosequencing methods for assessing MGMT gene promotor methylation of glioblastoma as well as assessing the MGMT protein expression by immunohistochemistry. **Methods:** Twenty-seven cases of glioblastoma from the archives at the Department of Pathology Konkuk University Hospital were selected. MGMT promoter methylation was evaluated by MSP and the pyrosequencing methods. The MGMT expression was also measured at the protein level by immunohistochemistry. **Results:** Overall, MGMT hypermethylation was observed in 44.4% (12/27 cases) of the case of glioblastoma using either MSP or pyrosequencing. The concordant rate was 70.3% (19/27 cases) between MSP and pyrosequencing for MGMT methylation. There was no correlation between MGMT methylation and the protein expression. No significant differences in progression free survival and overall survival were seen between the methylated group and the unmethylated group by using either MSP or pyrosequencing. The status of the MGMT protein expression was correlated with progression free survival ($p=0.026$). **Conclusions:** In this study the concordance rate between MSP and the pyrosequencing methods for assessing MGMT gene promotor methylation was relatively low for the cases of glioblastoma. This suggests that more reliable techniques for routine MGMT methylation study of glioblastoma remain to be developed because of quality control and assurance issues.

Key Words: Glioblastoma; MGMT protein, human; Pyrosequencing; Methylation-specific polymerase chain reaction; Temozolomide

접수: 2010년 10월 4일
제재승인: 2010년 10월 18일

책임저자: 임 소 덕
우 143-729 서울시 광진구 화양동 4-12
건국대학교병원 병리과
전화: +82-2-2030-5643
Fax: +82-2-2030-5629
E-mail: sdlim@kuh.ac.kr

*This paper was supported by Konkuk University in 2009.

원발성 뇌종양은 뇌-척수조직이나 이를 싸고 있는 막에 생기는 종양으로 흔하지는 않지만 지속적으로 증가 추세에 있다. 그 중 아교모세포종(glioblastoma)은 신경아교종(glioma)의 60-70%를 차지하는 가장 흔한 악성 종양으로 예후가 매우 좋지 않은데,¹⁻⁴ 그동안 아교모세포종 환자에게는 수술 후 방사선치료가 표준 치료요법이었으며, 약물요법에 대해서는 상반된 결과가 보고되어 왔다. 그러나 최근 수년간 경구용으로 사용되어 오던 알킬화약물인 테모졸로미드(temozolomide)가 아교모세포종 환자의 생존 기간을 현저히 연

장해 주는 획기적인 약물요법으로 주목받고 있다.^{1,2,5,6}

테모졸로미드는 구아닌(guanine) 염기의 O⁶를 포함한 DNA 내 알킬기를 전이하여 DNA를 손상시키는 대표적인 알킬화약물이고, O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)는 알킬화약물 치료 시 생기는 유전자 독성인 O⁶ alkylguanine을 제거하여 DNA 손상을 복구하는 유전자다.^{5,7} 그동안 많은 문헌들은 불활성화된 MGMT를 가진 아교모세포종 환자들의 치료 반응률 및 생존율이 우수하다고 보고하였는데, MGMT 유전자 불활성화의 주된 기전은

프로모터 메틸화(promotor methylation)로 알려져 있다.^{1,2,6,8} Hegi 등은 *MGMT* 메틸화된 아교모세포종의 환자가 비메틸화된 종양의 환자들보다 생존율이 더 높으며, 테모졸로미드와 방사선 치료를 병행한 환자군의 생존율이 더욱 우수한 것으로 보고하였다. 따라서 *MGMT* 유전자의 프로모터 메틸화 여부는 아교모세포종 환자의 생존율과 치료 결과를 예측할 수 있는 중요한 인자로 간주된다.

유전자의 과메틸화 유무를 확인하는 방법으로는 bisulfite sequencing, combined bisulfite restriction analysis (COBRA), 그리고 pyrosequencing과 메틸화 특이중합효소연쇄반응(methylation-specific polymerase chain reaction, MSP) 등이 있다.^{5,8,9} 그동안은 정성적 MSP법이 연구와 임상 영역에서 가장 널리 사용되어 왔으나, 최근 들어 pyrosequencing 등의 정량적 검사법이 점차 확대되고 있는 추세이다.^{8,9} 그런데, MSP법은 파라핀포매 조직에서 신뢰도가 떨어지며 적은 양의 조직에서는 제한적이고 정량적 데이터를 얻을 수 없다는 단점이 있다.^{6,9} 반면에 pyrosequencing은 앰플리콘 내 각 CpG의 메틸화를 정량적으로 계측할 수 있고, 결과의 재현성이 높다는 장점이 있다.^{6,9} 위 방법들 외에 *MGMT* 메틸화 여부를 확인할 수 있는 방법으로 MGMT 면역조직화학염색이 있는데, 이것은 비교적 싼 값에 빠르게 검사할 수 있다는 장점이 있지만, 결과를 해석하는데 있어 관찰자 간 차이가 크다는 단점이 있다.^{10,11}

그동안 뇌종양에서 MSP법을 이용한 *MGMT* 메틸화에 관한 몇 개의 국내 임상 연구논문들이 발표되었지만,¹²⁻¹⁴ pyrosequencing법을 이용한 아교모세포종의 *MGMT* 메틸화 연구논문이나 검사방법에 대한 비교 연구는 없었다. 따라서 아교모세포종 환자를 대상으로 한 *MGMT* 메틸화 여부에 대한 임상 요구가 많으나, 표준화된 검사법이나 질적 관리가 없어 이에 대한 연구와 토론이 필요한 실정이다.

이에 본 연구는 아교모세포종에서 MSP와 pyrosequencing을 이용한 *MGMT* 메틸화와 단백 발현을 검색하고, 분자진단 영역에서 이 검사법들에게 제기된 문제점들과 관련 문헌을 검토하고자 한다.

재료 및 방법

대상

2006년 3월부터 2009년 6월까지 건국대학교병원에서 진단된 아교모세포종 중 슬라이드를 검토하여 *MGMT* 메틸화와 면역염색 검사들을 시행할 수 있을 정도로 충분한 양의 종양조직을 포함한 27예를 대상으로 하였다. 각 검사에서는 괴사나 출혈 등 이차변성이 30% 이하인 대표적인 조직을 선택하였다. 대조군은 지주막하 출혈이나 뇌실질 내 출혈로 뇌감압술 시행 시 생검된 9예의 비종양성 뇌실질 조직을 사용하였다.

연구는 기관윤리위원회의 심의를 받았으며, 규정에 따라 환자의 개인정보는 익명으로 처리되고 암호화된 상태에서 환자의 나이, 연령 등 임상병리학적 정보를 수집하였다. 질병 진단일부터 무병생존

율(progression free survival)과 전체생존율(overall survival)을 계산하였고, 무병생존율은 질병 진단일부터 3개월 이내 뇌 영상의학적 소견상 종양의 재발이 있는 시점으로 계산하였다.

MGMT에 대한 면역조직화학검색

파라핀 블록은 2.5 μm 두께로 잘라 유리슬라이드에 부착시키고, 크실렌으로 파라핀을 제거하였으며 알코올로 탈수과정을 거쳤다. 전처치는 pH 6.0의 구연산을 이용하여 121°C의 autoclave에서 15분간 실시하였다. 그런 다음 3% 과산화수소로 15분간 내인성 과산화효소를 소비시킨 후 일차 항체 *MGMT* (1:1,000, MT23.2, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)를 분주하고 상온에서 2시간 반응시켰으며, 완충액으로 세척하고 이차 항체로 30분간 반응시킨 후 streptavidin과 과산화효소가 결합된 용액에 반응시키고 3,3'-diaminobenzidine으로 발색시켰다. 그리고 마지막으로 혼마톡실린으로 대조 염색하였다.

이때 음성 대조군은 일차 항체 반응 없이 진행하였고, 양성 대조군은 조직 내 혈관 내피세포의 양성 염색 여부로 판단하였다. 종양의 *MGMT* 면역염색의 판독은 현미경 200배 시야에서 5군데 이상을 관찰한 후 핵에 강하게 염색된 종양세포의 백분율을 구하고, 이를 반정량적인 방법으로 다시 세 군으로 분류하였다. 즉, 음성인 경우는 등급 0, 종양의 25% 이하는 등급 1, 그리고 종양의 25% 이상은 등급 2로 분류하였다. 또한 조직 내 혈관 내피세포와 혈관 주위의 침윤된 림프구는 면밀히 살펴 양성세포 수에서 배제하였다.

DNA 추출과 bisulfite modification

파라핀에 포매된 조직의 슬라이드에서 괴사나 출혈이 30% 이하인 조직을 얻은 후 10% resin^o 들어 있는 DNA extraction buffer (50 mM Tris-Cl pH 8.5, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid pH 8.0, 0.05% Tween 20)를 넣고 95°C에서 탈파라핀한 후 식혔다. 그런 다음 56°C에서 200 μg/mL proteinase K를 30분 정도 처리한 후 100°C에서 다시 10분 동안 처리했다. 그리고 13,000 rpm에서 10-15분 동안 원심분리하고 상층액을 뽑아 사용했다. 이때 핵산 20 μL (200-500 ng)의 bisulfite modification을 위하여 EZ DNA methylation-gold kit (Zymo Research Co., Orange, CA, USA)를 이용하여 시행하였다. 그리고 양성 대조군(CpGenome universal unmethylated DNA, Chemicon, Tamecula, CA, USA)과 음성 대조군(CpGenome universal methylated DNA, Chemicon) 핵산 또한 각각 bisulfite modification을 시행하여 사용하였다.

메틸화 특이적 중합효소연쇄반응

MGMT 프로모터 메틸화 유전자 증폭을 위해 시동체(primer)는 methylation 시동체(MF: 5'-tttcgacgttcgtaggtttgcg-3', MR: 5'-gcacttccggaaaacgaaacg-3')와 unmethylation 시동체(UMF: 5'-tttgtgttttgat-

gtttttaggttttgt-3', UMR: 5'-aactccacactttccaaaaacaaaaca-3')를 각각 이용하여 bisulfite 전처리된 DNA, 양성 대조군(methylated DNA), 그리고 음성 대조군(unmethylated DNA) 각 1 μL를 동시에 증폭시켰다. 이때 polymerase chain reaction (PCR) 반응액은 각 시동체 0.4 pmol에 1× PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 그리고 1.5 U Immolase DNA taq polymerase (Bioline, London, UK)를 포함하여 총 20 μL를 thermocycler에서 반응시켰으며, PCR 조건은 94°C 5분, 35 cycles (94°C 45초, 59°C 45초, 72°C 1분), 72°C 5분으로 PTC-220 thermocycler (MJ Research, San Diego, CA, USA)를 이용하여 증폭하였다. 그리고 증폭된 DNA를 4% agarose에 전기영동하여 메틸화군(80 bp)과 비메틸화군(92 bp) DNA 증폭 밴드를 확인하였다.

Pyrosequencing 분석

MGMT 프로모터 메틸화 유전자 증폭을 위해 시동체는 forward 5'-GGTTTTAGGAGGGAGAGATT-3', reverse 5'-biotin-CCTAACCCRAATAACCCITTC-3'를 이용하여 bisulfite 전처리된 DNA를 증폭시켰다. 이때 PCR 반응액은 각 0.4 pmol 시동체에 1× PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 그리고 1.5 U immolase DNA taq polymerase (Bioline)를 포함, 총 20 μL를 thermocycler에서 반응시켰고, PCR 조건은 94°C 5분, 45 cycles (95°C 15초, 58°C 30초, 72°C 15초), 72°C 5분으로 PTC-220 thermocycler (MJ Research)를 이용하여 증폭하였다. 그리고 증폭된 DNA를 2% agarose에 전기영동하여 290 bp DNA 증폭 밴드를 확인하였다.

또 pyrosequencing 분석을 위하여 biotin이 결합된 증폭산물 20 μL를 streptavidin-separose bead (Amersham Biotechnology, Uppsala, Sweden)가 있는 결합 완충액(Biotage, Uppsala, Sweden)과 혼합하여 실온에서 10분 동안 교반하고, 증폭산물을 bead에 결합시켰다. 그리고 증폭산물이 결합된 streptavidin-separose bead는 96 magnetic ejectable microcylinder (Biotage)를 포함한 PSQ 96 샘플 브雷普에 흡착시키고, streptavidin-separose bead에 결합된 증폭산물을 변성 및 수세한 후, 염기분석 시동체(sequencing primer: F1 5'-GTAGTAGTTAGAGTAGGAT-3', F2 5'-TTTTAGAGAGTTT-TAGGAT-3', 5'-AAATTAAGGTATAGAGTTT-3')가 들어 있는 어닐링 완충액(Biotage)에 bead를 넣고, 80°C에서 2분간 변성시켰다. 그 다음 10분 동안 실온에서 염기분석 시동체와 증폭산물이 상보적으로 결합할 수 있도록 한 후, SNP 시약 키트 PSQ96MA System (Biotage)을 이용하여 분석하였다. 분석기계는 PyroMark ID (Biotage)를 사용하였고, 키트와 기계회사에서 제공된 매뉴얼에 따라 시행하였다.

통계 분석

통계 분석은 SPSS ver. 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 사용하였으며 각 군 간 정성적인 변수에 대해서는 chi-square

test를 사용했고, 정량적인 변수의 관련성은 Mann-Whitney test로 분석하였다. 질병 진단일부터 무병생존율과 전체생존율을 계산하여 이에 대한 Kaplan-Meier 생존곡선과 log-rank test의 통계적 유의값을 구하였다. 이때 p값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 결과라고 보았다.

결과

환자들은 두통, 근위약감, 기억력 감퇴, 발작 등을 주소로 내원하였는데, 환자의 평균 나이는 52.3세(범위, 16-82세)였고, 성별 분포는 남자가 15명(55.6%), 여자가 12명(44.4%)이었다(Table 1). 종양의 위치는 우측반구를 침범한 종양이 16예(59.3%), 좌측반구를 침범한 종양이 10예(37%), 양측 모두 침범한 종양이 1예(3.7%)였으며, 수술 범위는 17예(62.9%) 모두에서 전체 종양 제거가 가능했다(Table 1). 수술 후 치료법은 방사선치료와 테모졸로미드 투약을 동시에 받은 후 경구용 테모졸로미드 투약을 받은 환자가 18예(66.7%), 방사선치료나 기타 항암치료만 받은 환자가 6예(22.2%), 그리고 환자의 전반적 상태가 좋지 않아 아무 치료도 받지 않은 환자가 3예(11.1%)였다 (Table 1).

Table 1. Clinical data of the 27 cases of glioblastomas

Patients	n=27
Age (range, yr)	52.3 (16-82)
Sex	
Male	15 (55.6)
Female	12 (44.4)
Symptom	
Headache	9 (33.30)
Weakness	9 (33.30)
Memory loss	5 (18.50)
Seizure	3 (11.10)
Tumor location	
Left	10 (37)
Right	16 (59.3)
Both	1 (3.7)
Extent of surgery	
Gross total resection	17 (62.9)
Others	10 (37.1)
Initial treatment after surgery	
RT+TMZ followed by TMZ alone	18 (66.7)
Other	6 (22.2)
No treatment	3 (11.1)
Follow-up, average (range, mo)	
All patients	16.3 (2-42)
Final event	
Dead	8 (29.6)
Alive	7 (25.9)
Die of others	1 (3.7)
Lost	11 (40.7)

Values are presented as number (%).

RT, radiotherapy; TMZ, temozolomide.

MSP법에 의해 *MGMT* 프로모터의 메틸화 양성군(methyl-MSP)은 12예(44.4%), 음성군(unmethyl-MSP)은 15예(56%)였는데(Table 2), 두 군 간에 연령, 성별, 종양의 크기와 위치의 차이는 없었다(data not shown).

또 pyrosequencing 검사에서 각 아교모세포종의 *MGMT* 프로모터 메틸화는 13개 CpG 모든 부위의 백분율에 대한 평균을 구하였고, 이를 평균메틸화백분율(average methylation percentage)이라 명명했다. 그 결과 전체 27개 종양에서 모든 13개 CpG 부위의 평균 메틸화백분율은 methyl-MSP와 unmethyl-MSP군 사이에서 유의한 차이를 보였다(31.9 ± 20.7 vs 9.5 ± 5.3) (Table 2). 그리고 13개의 CpG 부위 중 8개의 CpG 부위가 methyl-MSP와 unmethyl-MSP 사이에 통계적으로 유의하였다(Table 2).

한편 각 종양에서 pyrosequencing에 의한 *MGMT* 프로모터 과메틸화 여부는 비종양성 뇌조직의 평균메틸화백분율에 대한 95% 신뢰구간의 상한치를 cutoff 수치로 하여 판단하였다.^{5,9} 본 연구의 대조군에서 *MGMT* 메틸화의 평균메틸화백분율은 평균 12.6% (표준 편차 7.5%)였고, 95% 신뢰구간의 상한치는 15.1%였다. 따라서 15.1%를 cutoff 수치로 하여 15.1% 이상을 메틸화군(methyl-pyrosequencing [PS]), 15.1% 미만을 비메틸화군(unmethyl-PS)으로 정의하였다.

이에 따르면 전체 27예 중 12예(44.4%)가 메틸화군(methyl-PS)이며, 15예(55.6%)가 비메틸화군(unmethyl-PS)이었다(Table 3). 그리고 전체 13개 CpG 부위 모두에 대한 평균메틸화백분율은 methyl-PS군에서 32.9%, unmethyl-PS군에서 8.7%로 관찰되었다(Table 3). 13개 CpG 부위 중 10개 CpG 부위가 methyl-PS군과 unmethyl-PS군 사이에서 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$) (Table 3).

Methyl-MSP군의 66.7%가 methyl-PS로 관찰되었고, unmethyl-

Table 2. Quantification of *MGMT* promotor methylation as assessed by pyrosequencing for the groups analyzed using the MSP assay

Cases	Total (n=27)	Methyl-MSP (n=12) (44.4%)	Unmethyl-MSP (n=15) (55.6%)	p-value ^b
Pyrosequencing^a				
CpG1	17.1 ± 25.8	34.3 ± 30	3.2 ± 8.1	0.003
CpG2	36 ± 25.2	52 ± 26.3	23.2 ± 15.6	0.006
CpG3	22.5 ± 23.2	37.3 ± 25.9	10.7 ± 11.7	0.003
CpG4	27.5 ± 28	47 ± 29.5	11.9 ± 13.4	0.001
CpG5	24.2 ± 27.3	44 ± 28.3	8.3 ± 12.5	0
CpG6	25.4 ± 20.5	31.4 ± 21.6	20.7 ± 19	0.256
CpG7	11.7 ± 21.5	23.8 ± 27.2	2.1 ± 4.5	0.041
CpG8	35.2 ± 19.6	42 ± 23.4	29.7 ± 14.5	0.356
CpG9	17.5 ± 20.7	29.8 ± 23.4	6.5 ± 10.2	0.004
CpG10	9.8 ± 20.2	19.8 ± 27.3	1.8 ± 4.5	0.032
CpG11	7.8 ± 19.8	16.3 ± 27.9	1 ± 2.7	0.83
CpG12	7.6 ± 16.4	13.7 ± 22.6	2.7 ± 6.2	0.39
CpG13	11.2 ± 22.4	23 ± 29.8	1.7 ± 3.7	0.21
All CpGs	19.5 ± 18.1	31.9 ± 20.7	9.5 ± 5.3	0

^aAverage \pm standard deviation (%); ^b $p < 0.05$, considered statistically significant.

MGMT, O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase; MSP, methylation-specific polymerase chain reaction; Methyl-MSP, methylated by MSP assay; Unmethyl-MSP, unmethylated by MSP assay.

MSP군의 73.3%가 unmethyl-PS로 관찰되었으며, MSP와 pyrosequencing 방법은 70.3% (19예)의 일치율을 보였다(Table 4).

면역조직화학염색에서는 *MGMT* 단백 발현이 없는 등급 0이 6예 (22.2%), 등급 1 (종양의 25% 이하 발현)이 14예(51.9%), 그리고 등급 2 (종양의 25% 이상 발현)가 7예(25.9%)였다(Fig. 1). 한편 methyl-MSP군에서 등급 0은 25%이며, unmethyl-MSP군에서 등급 0은 20%로 두 군 간 *MGMT* 단백 발현의 차이는 보이지 않았다($p = 0.168$) (Fig. 2A). 또 pyrosequencing에 의한 methyl-PS군에서 *MGMT* 면역 염색은 등급 0이 33.3%이고, unmethyl-PS군에서는 등급 0이 13.3%로 차이를 보였으나, 통계적으로 유의하지 않았다($p = 0.139$) (Fig. 2B).

환자의 추적기간은 평균 16.3개월(중간값, 13.6; 범위, 2~42개월)이

Table 3. Analysis of *MGMT* promotor methylation using pyrosequencing

Cases	Cutoff value (15.1%) ^a			p-value ^b
	Total (n=27)	Methyl-PS (n=12, 44.4%)	Unmethyl-PS (n=15, 55.6%)	
CpG1	17.1 ± 25.8	34.4 ± 30.6	3.2 ± 6.2	0.01
CpG2	36 ± 25.2	53.4 ± 24.8	22.1 ± 15	0
CpG3	22.5 ± 23.2	40.2 ± 22.8	8.4 ± 10.3	0
CpG4	27.5 ± 28	49.1 ± 26.6	10.1 ± 13.1	0
CpG5	24.2 ± 27.3	46.4 ± 25.2	6.4 ± 11.2	0
CpG6	25.4 ± 20.5	35.8 ± 19.4	17.2 ± 17.9	0.016
CpG7	11.7 ± 21.5	23.8 ± 27.2	2.1 ± 4.5	0.041
CpG8	35.2 ± 19.6	42.9 ± 23.3	28.9 ± 14.1	0.075
CpG9	17.5 ± 20.7	26.8 ± 24.6	9.5 ± 12.3	0.067
CpG10	9.8 ± 20.2	21.1 ± 26.6	0.8 ± 2.5	0.005
CpG11	7.8 ± 19.8	15.9 ± 28.1	1.3 ± 2.9	0.217
CpG12	7.6 ± 16.4	15.5 ± 22.3	1.2 ± 3.2	0.025
CpG13	11.2 ± 22.4	22.4 ± 30.3	2.3 ± 4	0.075
All CpGs	19.5 ± 18.1	32.9 ± 19.7	8.7 ± 4.4	0

All data, average \pm standard deviation (%).

^a $\geq 95\%$ reference range (mean normal brain \pm standard deviation) for non-neoplastic brain; ^b $p < 0.05$, considered statistically significant.

MGMT, O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase; PS, pyrosequencing; Methyl-PS, methylated by pyrosequencing; Unmethyl-PS, unmethylated by pyrosequencing.

Table 4. Concordance rate between MSP and pyrosequencing

Cases (n=27)	Methyl-MSP (n=12)	Unmethyl-MSP (n=15)
Cutoff value ^a	(≥ 15.1)	(< 15.1)
Methyl-PS (n=12)	8 (29.6)	4 (14.8)
Unmethyl-PS (n=15)	4 (14.8)	11 (40.7)
Cutoff value ^b	(≥ 9)	(< 9)
Methyl-PS (n=19)	12 (44.4)	7 (25.9)
Unmethyl-PS (n=8)	0	8 (29.6)

Values are presented as number (%).

^a $\geq 95\%$ reference range (mean normal brain \pm standard deviation) for non-neoplastic brain; ^b $\geq 95\%$ reference range (mean normal brain \pm standard deviation) for nonneoplastic brain [6].

MSP, methylation-specific polymerase chain reaction; Methyl-MSP, methylated by MSP assay; Unmethyl-MSP, unmethylated by MSP assay; Methyl-PS, methylated by pyrosequencing; Unmethyl-PS, unmethylated by pyrosequencing.

었으며, 추적기간 중 8예(29.6%)가 질병으로 사망하였고 11예(40.7%)는 추적이 불가능하였다(Table 1). 각 MSP와 pyrosequencing법을

이용한 MGMT 프로모터 메틸화 결과와 전체생존율을 Kaplan-Meier 곡선으로 구했을 때 통계적 유의성이 없었다(Table 5, Fig. 3A, B).

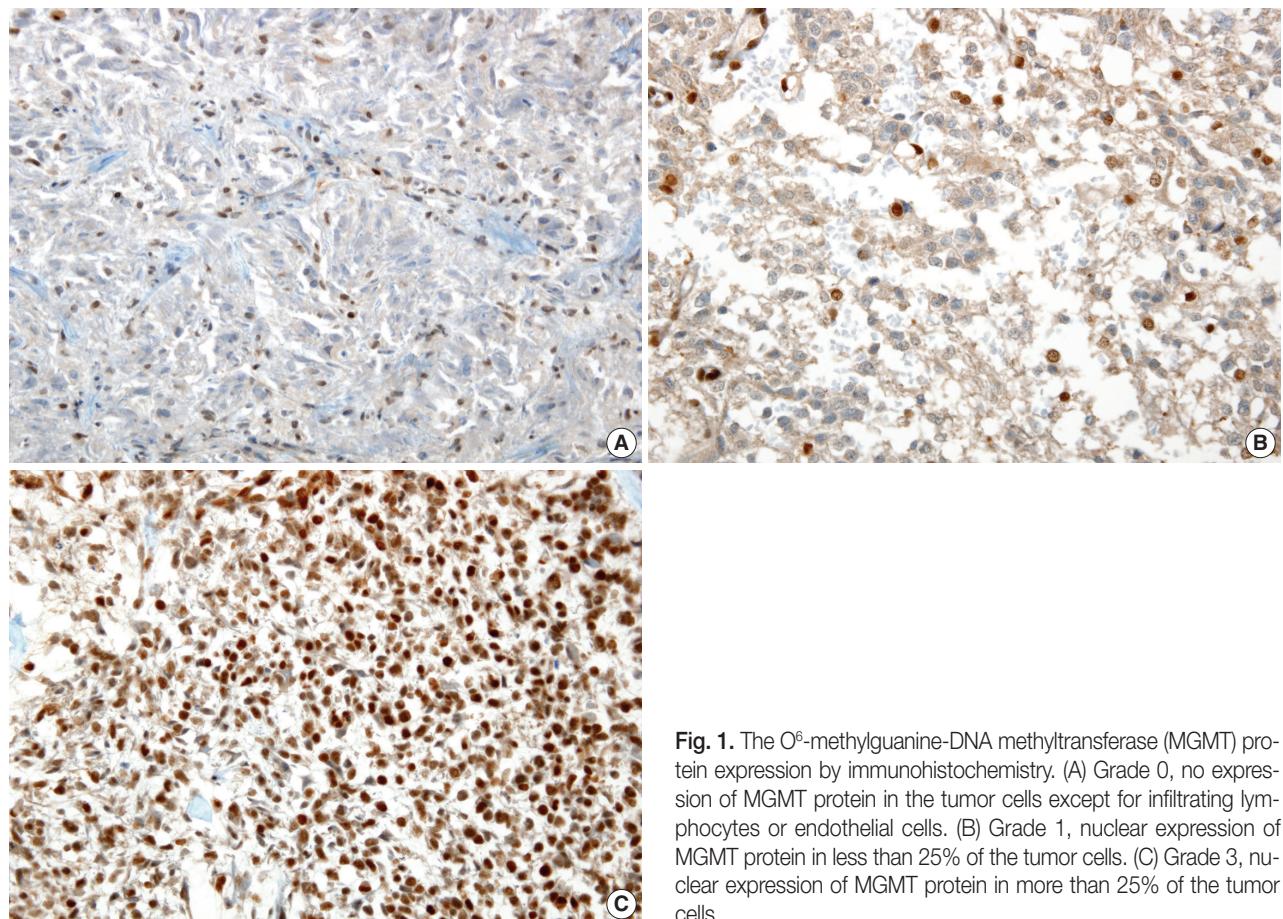


Fig. 1. The O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) protein expression by immunohistochemistry. (A) Grade 0, no expression of MGMT protein in the tumor cells except for infiltrating lymphocytes or endothelial cells. (B) Grade 1, nuclear expression of MGMT protein in less than 25% of the tumor cells. (C) Grade 3, nuclear expression of MGMT protein in more than 25% of the tumor cells.

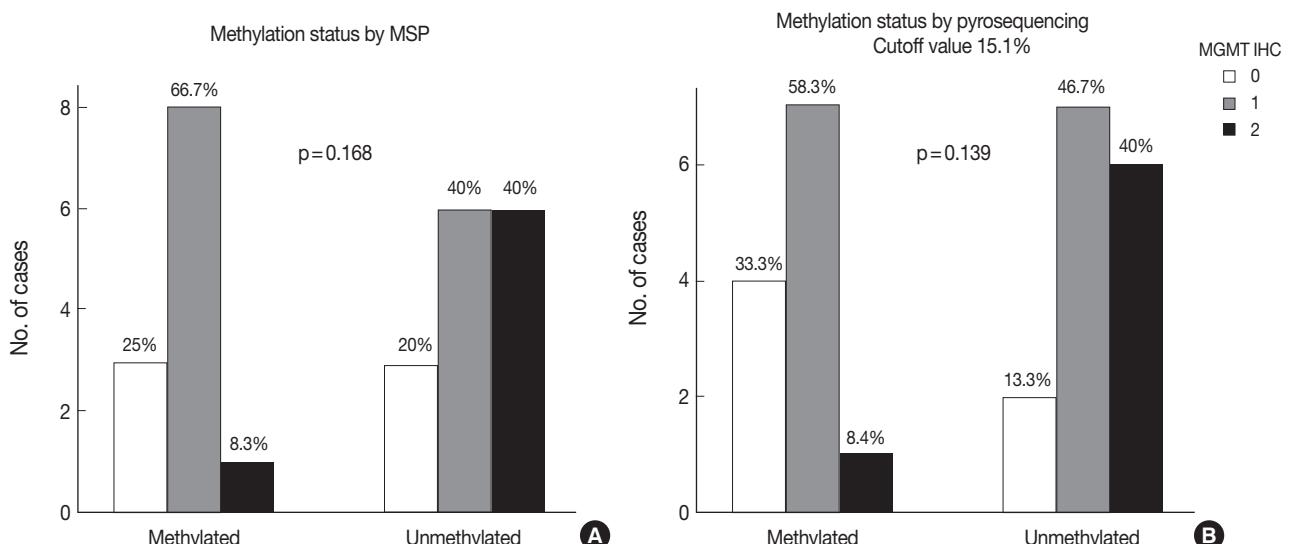


Fig. 2. Relationship between the O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) protein expression and MGMT promoter methylation as assessed by methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) (A) and pyrosequencing (B) (MGMT immunohistochemistry, MGMT immunohistochemistry grades 0, 1 and 2). IHC, immunohistochemistry.

Table 5. MGMT data and the survival analysis

	Progression free survival average (95% CI, mo)	p-value ^b	Overall survival average (95% CI, mo)	p-value
Methyl-MSP (n=12)	14.5 (9.4-19.8)		29.9 (24.5-35.3)	
Unmethyl-MSP (n=15)	6.7 (4.5-9)	0.07	21.5 (11.2-31.7)	0.198
Cutoff value 15.1%				
Methyl-PS (n=12)	13 (7.4-18.6)	0.435	32.3 (20.7-43.9)	0.14
Unmethyl-PS (n=15)	11 (5.6-16.3)		21.1 (13.7-28.6)	
Cutoff value 9%				
Methyl-PS (n=19)	13.2 (8.8-17.6)	0.093	30.4 (21.6-39.3)	0.103
Unmethyl-PS (n=8)	4.8 (3.3-6.3)		17.6 (7.3-28)	
MGMT IHC ^a				
0	26.8 (13.9-39.6)	0.026	26.8 (13.9-39.6)	0.928
1	23.8 (14.5-33.1)		23.8 (14.5-33.1)	
2	20.8 (11.2-30.5)		20.8 (11.2-30.5)	

^aProtein expression by immunohistochemistry: grade 0, 1, 2; ^bp<0.05, considered statistically significant.

MGMT, O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase; CI, confidence interval; MSP, methylation-specific polymerase chain reaction; PS, pyrosequencing; Methyl-MSP, methylated by MSP assay; Unmethyl-MSP, unmethylated by MSP assay; Methyl-PS, methylated by pyrosequencing; Unmethyl-PS, unmethylated by pyrosequencing; IHC, immunohistochemistry.

한편 methyl-MSP군이 unmethyl-MSP군에 비해 좀 더 긴 무병생존율을 보였으나, 통계적 유의성이 없었고(p=0.07) (Table 5, Fig. 3C), pyrosequencing법을 이용한 메틸화 결과에 대한 무병생존율은 통계적으로 유의하지 않았다(Table 5, Fig. 3D). 면역조직화학검사의 MGMT 단백 발현 등급에 따라 분석했을 때, 면역 단백 발현이 낮을수록 무병생존율이 길게 관찰되었는데 이는 통계적으로 유의하였으며(p=0.026) (Fig. 3E), 전체생존율은 차이가 없었다(Fig. 3F).

Dunn 등⁶이 pyrosequencing법을 이용해 제시한 비종양성 뇌조직 cutoff 수치 9%를 기준으로 본 연구자료를 분석한 결과를 Table 4와 5에 추가하였다.

고 찰

아교모세포종은 뇌종양 중에서도 가장 흔하고 침습적인 종양인데, 이 질환에 대한 표준 요법은 가능한 범위에서 수술로 종양을 절제하고 방사선으로 보조 치료를 하는 것이다. 그러나 최근에 이러한 표준 요법 외에 난치성 뇌종양을 치료하는 방법으로 암밀화약물인 테모졸로미드가 각광을 받고 있다.^{1,2,5} 특히 테모졸로미드를 사용할 때 종양의 MGMT 유전자는 활성 정도에 따라 치료반응과 전체 생존율이 달라진다는 것이 연구를 통해 밝혀져, MGMT 유전자의 활성화 여부를 검사하는 것이 매우 중요하게 부각되고 있다.^{1,5}

MGMT 유전자의 활성도를 측정하는 방법은 단백질 정량¹⁵ 및 면역염색^{11,16} mRNA 측정^{17,18} 등 여러 가지가 있는데, MGMT 유전자의 후생유전적 변화(epigenetic change)인 MGMT 프로모터 과메틸화가 환자의 생존율이나 암밀화약물에 대한 반응 여부를 가장 잘 예측한다고 알려져 있다.^{1,5}

본 연구에서는 44.4%의 아교모세포종에서 MGMT 과메틸화가 관찰되었고, 문헌에도 35-67.9%까지 다양하게 보고되고 있다.^{1,5,6,19}

그런데 실제 MGMT 메틸화가 MGMT 유전자의 mRNA나 단백 발현과 일치하지 않는다는 보고가 많고, 또 메틸화에 대한 생존분석 연구에서도 다소 상이한 결과들이 보고되어 왔다.^{5,6,18,19} 이는 MGMT 분석기법의 민감도와 메틸화 분석방법의 차이에 의한 것으로 간주된다.^{5,6,9} 또 그동안 MGMT 프로모터 메틸화를 검사하는 수단으로 비용절감 면에서 효율적인 MSP법이 연구나 실제 임상영역에서 가장 많이 사용되어져 왔는데,^{5,6,20} MSP법은 특히 파라핀포매 조직에서 추출된 DNA의 양과 질에 따라서 위양성과 위음성이 높고 신뢰도가 떨어지며 정량적 데이터를 얻을 수 없다는 단점이 있다.^{7,9,21}

이에 Mikeska 등⁹은 MSP, bisulfite sequencing, COBRA, SNUPE ion pair-reverse phase high-performance liquid chromatography, pyrosequencing 등의 MGMT 프로모터 메틸화 분석방법들을 비교 분석하였는데, 분석 결과 pyrosequencing법이 분자병리진단 영역에서 가장 효율적이고 신뢰할 수 있는 방법이라고 제시하였다.

Pyrosequencing 방법은 재현성이 높고, CpG 부위에 대한 정량적 분석이 가능하며, 다른 정량적 분석방법에 비해 검사가 빠르고 비용절감 면에서 효율적인 것으로 보고되고 있다.^{6,8,9} 특히 신선조직과 파라핀포매 조직, 포르말린이나 알코올 고정 등 조직상태에 영향을 거의 받지 않으며 1 mm² 이하의 적은 조직의 양도 분석 가능하다는 장점이 있다.^{6,9} 또한 pyrosequencing법은 정량적 분석법으로 종양과 관련하여 더 유용한 자료와 정보를 얻을 수 있다고 본다.^{6,21}

Everhard 등²¹은 54예의 아교모세포종에서 pyrosequencing법을 이용한 MGMT의 52개 CpG 부위에 대한 메틸화를 검사한 후 정량적 자료를 계층적 클러스터링(hierarchical clustering)으로 분석했다. 이들은 과메틸화군 내에서도 메틸화 정도가 뚜렷이 구분되는 경향을 보였는데, 우선 종양의 63%는 높은 과메틸화를 갖는 종양군과 메틸화가 없는 군으로 뚜렷이 나뉘며, 나머지 37%는 일부 CpG 부위만 메틸화되고 일부는 메틸화되지 않아 전체적으로 중간 정도의 메틸화를 보였다고 보고하였다. Dunn 등⁶도 아교모세포종 환자

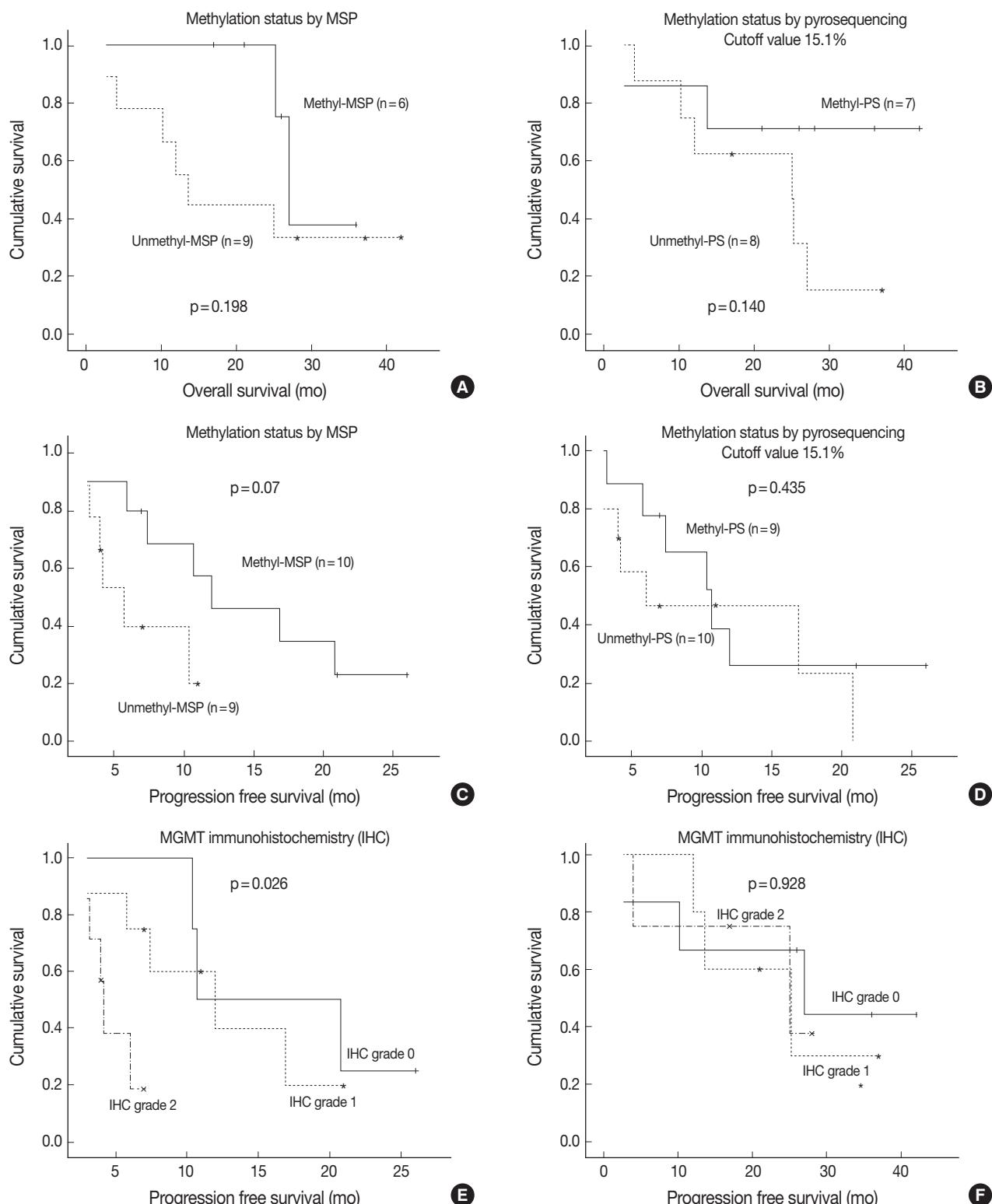


Fig. 3. Kaplan-Meier curve showing the O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) promotor methylation status with the overall survival (A, B) and progression free survival (C, D). Kaplan-Meier curve showing the *MGMT* protein expression with the progression free survival (E) and overall survival (F). MSP, methylation-specific polymerase chain reaction; PS, pyrosequencing; Methyl-MSP, methylated by MSP assay; Unmethyl-MSP, unmethylated by MSP assay; Methyl-PS, methylated by pyrosequencing; Unmethyl-PS, unmethylated by pyrosequencing.

에게서 pyrosequencing법을 이용한 *MGMT* 과메틸화 군을 분석했는데, 메틸화 정도에 따라 뚜렷이 구분되는 세 개의 집단(9-20%, 20-35%, 그리고 35% 이상)이 무병생존율과 전체생존율에서 의미 있는 차이를 보였다고 발표하였다.

한편으로 이런 정량적 결과와 임상병리학적 자료분석에서 논의되어야 할 중요한 부분이 cutoff 수치인데^{5,6,21} pyrosequencing법에 의한 *MGMT* 과메틸화 여부는 비종양성 뇌조직 샘플들에 대한 평균메틸화백분율의 95% 상한치를 cutoff 수치로 정하였다.^{6,21} *MGMT* 메틸화나 유전자 발현은 종양조직의 종류와 종양의 아형마다 차이가 있고, 뇌종양에서 상대적으로 낮게 보고된 반면 비종양성 뇌조직에서는 상대적으로 높다고 알려져 있다.²² 본 연구에서 비종양성 뇌조직의 메틸화는 12.6% (95% 신뢰구간 상한치, 15.1%)로 나타났는데, 이는 Dunn 등⁶이 보고한 대조군의 평균메틸화백분율 3.2% (95% 신뢰구간 상한치, 9%)와 Everhard 등²¹이 보고한 평균메틸화백분율 범위 6-11%에 비해 다소 높은 편이었다. 그 이유는 본 연구에서 뇌출혈이나 혈관기형과 같은 병변의 환자샘플을 대조군으로 사용하였기 때문일 가능성이 있다.

본 연구에서 Dunn 등⁶이 제시한 9% cutoff 수치를 기준으로 분석했을 때, 전체 아교모세포종의 과메틸화는 70.4% (19/27)으로 본 연구의 cutoff 수치 15.1% 기준에 비해 상당히 높았고, MSP법과 pyrosequencing법의 일치율은 74.1%로 비슷하게 관찰되었다(Table 4).

제시된 두 가지의 cutoff 수치에서 MSP와 pyrosequencing법의 일치율은 각각 70.3%와 74.1%로 큰 차이를 보이지 않았는데, 9% 기준에서 unmethyl MSP군의 25.9% (7례)가 methyl-PS군으로 분류된 것으로 미뤄볼 때, 이는 아마도 MSP의 위음성률에 의하거나 pyrosequencing의 cutoff 수치가 너무 낮게 제시되었기 때문으로 생각된다.^{5,21,23}

Lee 등²³이 *MGMT* 등 암과 관련된 유전자의 메틸화에 대해 두 MSP와 pyrosequencing법을 비교 분석하였을 때, 세포주에서는 메틸화 결과가 유사하게 일치하는 반면 인체조직을 대상으로 했을 때는 cutoff 수치에 따라 84.5%까지 두 방법의 일치율이 다양하다고 보고하였다. 본 연구에서도 두 방법의 일치율은 70-74%로 다소 낮게 보였으므로 MSP와 pyrosequencing법에 대한 좀 더 큰 규모의 비교 연구가 추가적으로 필요하다고 본다. 특히 대조군으로 사용된 비정상 뇌조직과 뇌종양 조직은 지방이 많으며 세포밀도가 떨어지는 등 일반 인체조직과 다르므로 DNA 추출 과정부터 메틸화 결과에 영향을 미칠 수 있는 요인이 산재해 있다. 따라서 향후 pyrosequencing법뿐 아니라 *MGMT* 메틸화에 대한 정량적 검사법은 방대한 코hort 연구를 통해 임상적으로 유관한 cutoff 수치를 검증하는 것이 중요한 과제라고 할 수 있다.^{5,6,21} 또 본 연구에서 *MGMT* 면역 단백 발현과 무병생존율이 의미있는 연관성이 있었는데, 이는 좀 더 큰 코hort 연구에서 검증할 필요가 있다고 생각된다.

한편 *MGMT* 프로모터 메틸화와 *MGMT* 면역 단백 발현 사이의 연관성은 관찰되지 않았는데, 그동안 여러 문헌에서도 *MGMT* 메틸화와 단백 발현의 결과 불일치에 대한 보고가 있어 왔다.^{11,21} 이는 Preusser 등¹¹이 지적한 면역염색 결과 분석 시 관찰자 간 또는 관찰

자 내 재현성이 떨어지는 문제도 있지만, Everhard 등²¹이 지적한 10개 내외의 CpG 부위 분석이 *MGMT* 전체 프로모터 메틸화를 대변할 수 없다는 점도 간과할 수 없다. 이들은 52개 CpG 부위의 메틸화를 대량으로 분석했는데, 이때 *MGMT* 메틸화는 *MGMT* mRNA 나 면역 단백 발현과 80% 이상의 높은 일치율을 보였다고 보고하였다. 본 연구에서는 *MGMT* 프로모터의 13개 CpG 부위를 검색했는데, 이는 Hegi 등¹이 MSP법에서 사용한 9개 CpG 부위와 Dunn 등⁶이 검색한 12개 CpG를 모두 포함한 것이다. 이러한 CpG 검사 부위의 제한성이 *MGMT* 메틸화 검사의 상호 일치율을 감소시키는 데 작용할 수 있으며, 이외에도 *MGMT*가 아닌 다른 유전자의 메틸화나 메틸화 기전이 아닌 histone modification과 같은 기전으로 유전자의 발현이 이뤄지는 등의 요인이 관여할 수 있다.^{7,24,25} 한편 *MGMT* 메틸화 검사는 정위수술 생검(stereotactic biopsy)에서 얻어진 적은 양의 검체나 종양 내 종양이질성으로 인한 위음성 등의 문제점을 갖고 있다.^{6,8,10}

뇌종양에서 *MGMT* 프로모터 메틸화와 검사기법들을 비교 분석한 문헌들이 많지 않아 *MGMT*에 대한 정량적 메틸화 검사와 생존 분석에 대해 큰 규모의 코hort 연구가 필요한 시점이다. 본 연구에서 MSP와 pyrosequencing법의 메틸화 결과에 대한 무병생존율과 전체생존율을 분석했을 때 유의한 결과를 얻지 못했다.

본 연구는 연구 대상의 수가 적고 추적관찰이 불가능했던 예도 있었으며, 치료 방법도 달라 생존분석에 적합하지 않은 면이 있었지만, 앞으로 다기관 연구를 통해 이러한 한계점을 보완한다면 더 의미 있는 국내자료를 얻을 수 있다고 본다. 또한 향후 아교모세포종뿐 아니라 다른 신경아교종에서 *MGMT* 메틸화가 표적치료제 개발에 따른 치료적 및 예후적 인자로서 더욱 검증될 수 있도록 분자 진단병리 영역에서 *MGMT* 메틸화에 대한 표준화 검사법이나 질적 관리 부분이 좀 더 심도 있게 연구되어야 할 것이다.

참고문헌

- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al. *MGMT* gene silencing and benefit from temozolamide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352: 997-1003.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolamide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352: 987-96.
- Costello JF, Futscher BW, Tano K, Graunke DM, Pieper RO. Graded methylation in the promoter and body of the O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (*MGMT*) gene correlates with *MGMT* expression in human glioma cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 17228-37.
- Lee CH, Jung KW, Yoo H, Park S, Lee SH. Epidemiology of primary brain and central nervous system tumors in Korea. *J Korean Neurol Surg Soc* 2010; 48: 145-52.
- Weller M, Stupp R, Reifenberger G, et al. *MGMT* promoter methyl-

- ation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol* 2010; 6: 39-51.
6. Dunn J, Baborie A, Alam F, et al. Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolamide and radiotherapy. *Br J Cancer* 2009; 101: 124-31.
 7. Iafrate AJ, Louis DN. "MGMT for pt mgmt": is methylguanine-DNA methyltransferase testing ready for patient management? *J Mol Diagn* 2008; 10: 308-10.
 8. Karayan-Tapon L, Quillien V, Guilhot J, et al. Prognostic value of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods. *J Neurooncol* 2010; 97: 311-22.
 9. Mikeska T, Bock C, El-Maari O, et al. Optimization of quantitative MGMT promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis. *J Mol Diagn* 2007; 9: 368-81.
 10. Grasbon-Frodl EM, Kreth FW, Ruiter M, et al. Intratumoral homogeneity of MGMT promoter hypermethylation as demonstrated in serial stereotactic specimens from anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Int J Cancer* 2007; 121: 2458-64.
 11. Preusser M, Charles Janzer R, Felsberg J, et al. Anti-O⁶-methylguanine-methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry in glioblastoma multiforme: observer variability and lack of association with patient survival impede its use as clinical biomarker. *Brain Pathol* 2008; 18: 520-32.
 12. Jung TY, Jung S, Moon KS, et al. Changes of the O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation and MGMT protein expression after adjuvant treatment in glioblastoma. *Oncol Rep* 2010; 23: 1269-76.
 13. Cao VT, Jung TY, Jung S, et al. The correlation and prognostic significance of MGMT promoter methylation and MGMT protein in glioblastomas. *Neurosurgery* 2009; 65: 866-75.
 14. Park CK, Park SH, Lee SH, et al. Methylation status of the MGMT gene promoter fails to predict the clinical outcome of glioblastoma patients treated with ACNU plus cisplatin. *Neuropathology* 2009; 29: 443-9.
 15. Wiewrodt D, Nagel G, Dreimüller N, Hundsberger T, Perneczky A, Kaina B. MGMT in primary and recurrent human glioblastomas after radiation and chemotherapy and comparison with p53 status and clinical outcome. *Int J Cancer* 2008; 122: 1391-9.
 16. Christmann M, Nagel G, Horn S, et al. MGMT activity, promoter methylation and immunohistochemistry of pretreatment and recurrent malignant gliomas: a comparative study on astrocytoma and glioblastoma. *Int J Cancer* 2010; 127: 2106-18.
 17. Vlassenbroeck I, Califice S, Diserens AC, et al. Validation of real-time methylation-specific PCR to determine O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene promoter methylation in glioma. *J Mol Diagn* 2008; 10: 332-7.
 18. Felsberg J, Rapp M, Loeser S, et al. Prognostic significance of molecular markers and extent of resection in primary glioblastoma patients. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 6683-93.
 19. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, et al. MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2192-7.
 20. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000; 343: 1350-4.
 21. Everhard S, Tost J, El Abdalaoui H, et al. Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas. *Neuro Oncol* 2009; 11: 348-56.
 22. Margison GP, Povey AC, Kaina B, Santibáñez Koref MF. Variability and regulation of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis* 2003; 24: 625-35.
 23. Lee ES, Issa JP, Roberts DB, et al. Quantitative promoter hypermethylation analysis of cancer-related genes in salivary gland carcinomas: comparison with methylation-specific PCR technique and clinical significance. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 2664-72.
 24. Brell M, Tortosa A, Verger E, et al. Prognostic significance of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expression in anaplastic gliomas. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5167-74.
 25. Chinot OL, Barrié M, Fuentes S, et al. Correlation between O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase and survival in inoperable newly diagnosed glioblastoma patients treated with neoadjuvant temozolomide. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1470-5.