

악성림프종에서 SV40 Large T Antigen의 검색

김영아 · 장미수 · 백진호¹ · 윤선욱¹
전윤경¹ · 김철우¹ · 김지은

서울대학교 보라매병원 병리과
서울대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2008년 7월 2일
게재승인 : 2009년 3월 25일

책임저자 : 김 지 은
우 156-707 서울 동작구 신대방 2동 425
서울대학교 보라매병원 병리과
전화: 02-870-2642
Fax: 02-831-0261
E-mail: pathgirl@paran.com

*This study was supported by a grant from Seoul National University Hospital (04-2005-022-0).

Detection of SV40 Large T Antigen in Malignant Lymphomas

Young A Kim, MeeSoo Chang, Jinho Paik¹, Sun Och Yoon¹, Yoon Kyung Jeon¹,
Chul Woo Kim¹ and Ji Eun Kim

Department of Pathology, Seoul National University Boramae Hospital, Seoul;
¹Department of Pathology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : The association of simian virus 40 (SV40) with certain types of human cancers, including malignant lymphomas, has been a topic of interest for some time. Although the virus is distributed worldwide, its incidences vary according to the specific types of tumors, and the epidemiological areas. The aim of this study was to investigate the frequency of SV40 in malignant lymphomas among Korean patients. **Methods :** One hundred seventy three cases of malignant lymphomas were evaluated by immunohistochemical staining for SV40 large T antigen (TA_g), using an extremely sensitive, tyramide based, catalyzed signal amplification method. **Results :** From 158 non-Hodgkin's lymphomas, including 115 diffuse large B-cell lymphomas, and 15 Hodgkin's lymphomas, none of the cases were positive for SV40 TA_g. **Conclusions :** SV40 does not appear to be related to the pathogenesis of malignant lymphomas among Koreans.

Key Words : Simian virus 40; Antigens, Polyomavirus transforming; Lymphoma; Korea

Simian virus 40 (SV40)은 인체 및 레서스 원숭이에게 악성 증괴종, 골격암, 뇌암 및 악성림프종 등을 유발하는 polyoma DNA virus이다.¹ SV40은 1955년부터 1963년 사이에 이 바이러스에 오염된 소아마비 백신이 전 세계적으로 유통됨에 따라 큰 문제를 일으켰고, 더욱이 뒤늦게 이 바이러스의 종양 발생능이 알려짐으로 인해 지대한 관심을 끌게 되었다.²

그러나 이후에 시행된 다양한 역학 조사에 따르면 오염된 백신 접종 여부와 무관하게 인간 배설물 등에 의한 수평 감염을 통해 오염된 접종 시약에 노출되지 않은 사람들 사이에서도 SV40이 전파된다고 알려졌다.^{3,4} 특히 SV40의 감염률 및 관련 악성 종양들과의 연관성은 지역에 따라 각기 다른 결과를 보이고 있는데, 미국 등 북미 지역에서는 매우 높은 검출률을 보이는 데 반해 영국, 프랑스 등 유럽 지역에서는 검출률이 극히 낮으며 인접 국가인 일본도 상당히 높은 빈도로 검출되고 있다.^{2,5-9}

SV40이 검출되는 종양 중 악성림프종의 발병 과정에서 SV40이 일정한 역할을 하고 있다고 의심되고 있는데, 유형별로는 미만성대세포B형림프종에서 특히 검출률이 높다. 그러나 이러한 결과 역시 지역적인 편차가 매우 심할 뿐 아니라 검출 방법에 따른 차이도 크게 나타나고 있다.^{3,8}

현재까지 한국인을 대상으로 SV40의 관련성에 대한 연구는

보고된 적이 없으므로 본 연구는 악성림프종을 대상으로 SV40 단백질 검출 여부를 조사하고, 그 결과와 악성림프종 각각의 유형에 따른 관련성을 고찰하고자 하였다.

재료와 방법

대상 환자

1998년 1월부터 2001년 12월 사이에 서울대학교 보라매병원과 서울대학교병원에서 악성림프종으로 진단받은 173예를 선정하였다. 악성림프종의 진단은 2001년에 발표된 WHO 분류에 근거하였으며,¹⁰ 세 명의 혈액 병리 전문의가 판독한 결과지를 참조로 하였다. 또한 환자의 성별, 연령, 장기 및 진단을 제외한 개인 정보는 모두 익명 처리하였으며, 연구 계획은 보라매병원 기관윤리위원회의 심의 및 승인을 받았다.

Tissue microarray block 제작

면역염색의 효율성을 높이고 반복 실험을 원활히 하기 위해

미만성대세포B형림프종 증례에 한해 두 개의 tissue microarray (TMA) 블록을 제작하였다. TMA 방법은 이미 여러 문헌에서 그 대표성과 실효성이 입증되었고^{11,12} 이미 악성림프종의 면역조직화학적 연구에도 이용된 바 있다.¹³ 미만성대세포B형림프종은 비교적 균일한 종양 세포 패턴을 보이므로 TMA로 확인하고자 하였고, 나머지 아형의 악성림프종 증례들은 원본 블록을 사용하였다. 각각의 TMA 블록은 원본 블록에서 펀치를 이용하여 2.0 mm 너비의 가장 대표적인 부위의 조직만을 채집한 후 순서대로 새로운 array block에 심는 방식으로 제작되었다(Superbiochips Laboratories, Seoul, Korea). 두 개의 TMA 블록은 각각 58예 및 57예의 미만성대세포B형림프종 증례들을 포함하였고, 또한 방향을 알 수 있도록 시작 부위에 지방 조직을 음성대조군으로 심어 표시하였다.

SV40 면역조직화학적 염색

TMA 블록과 양성 대조군 블록을 모두 4 μm 두께로 박절하여 탈파라핀 과정을 거친 후 면역염색을 시행하였다. 그리고 SV40의 확인을 위해 SV40 large T antigen (TAg)에 대한 항체를 사용하였는데, 이 TAg은 SV40의 대표적인 종양 단백질로서 감염된 세포 핵의 게놈에 결합하는 단백질이다.^{3,14} 이때 사용된 항체는 Oncogene사(Oncogene, San Diego, CA, USA)의 SV40 TAg로 1:25로 희석해 사용하였다. 또한 항원 회복을 위해 표본 슬라이드들을 pH 6.0의 citrate 완충액에 침잠시켜 마이크로웨이브 오븐으로 가열하였다.

양성대조군으로는 SV40에 의해 핵산 전달 감염된 아프리카 원숭이의 콩팥 세포주인 COS-7¹⁵과 SV40 TAg을 보유하고 있는 인간 콩팥 상피 세포주인 293T 세포주¹⁶를 사용하였는데, 두 세포주를 모두 최적의 상황에서 배양하여 세포 수를 충분히 늘린 후 파라핀에 포매한 cell block을 제작하였다.

그리고 면역염색의 민감도를 높이기 위해 catalyzed signal amplification (CSA) 방법을 사용하였으며, CSA kit는 Dako사의 제품(Dako, Carpinteria, CA, USA)을 사용하였고 제작자의 지침을 충실히 이행하였다.

결 과

임상 정보 및 각 유형별 분포

연구에 포함된 악성림프종 환자들의 임상 정보 등은 Table 1에 기록하였다. 총 173명인 환자들의 연령대는 6세부터 82세까지 분포하였으며, 평균 연령은 62세였다. 이 중 여자가 78명, 남자가 95명이고 15세 이하 소아는 4명이었으며, 비호지킨림프종이 158예, 호지킨림프종이 15예, B형 세포 림프종이 126예, T 세포 림프종이 25예 그리고 NK/T세포 림프종이 7예 등이었다.

Table 1. Clinical profiles of the patients according to the types of malignant lymphomas

Diagnosis	Involvement	No	M:F	Age (mean)
NHL		158	78:95	6-82 (62)
DLBCL	LN	80	41:39	6-82 (62)
	GI tract	30	18:12	31-71 (61)
	Brain	4	3:1	55-72 (62)
	Testis	1	1:0	62
FL	LN	3	1:2	46-68 (62)
MZBL	Stomach	5	3:2	27-62 (48)
	Conjunctiva	2	0:2	55-61 (57)
MCL	LN	1	1:0	52
PTCL	LN	11	5:6	43-80 (60)
	Soft tissue	3	2:1	40-72 (55)
	Skin	2	1:1	57-63 (60)
AILT	LN	6	3:3	42-86 (68)
NKTL	PNS	7	6:1	36-71 (49)
ALCL	LN	2	2:0	30-62 (46)
	Psoas muscle	1	1:0	53
HL		15	7:8	12-72 (49)
NS	LN	10	4:6	12-67 (46)
MC	LN	5	3:2	45-72 (60)

NHL, non-Hodgkin's lymphoma; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; LN, lymph node; GI tract, gastrointestinal tract; FL, follicular lymphoma; MZBL, extranodal marginal zone B-cell lymphoma; MCL, mantle cell lymphoma; PTCL, peripheral T-cell lymphoma; AILT, angioimmunoblastic T-cell lymphoma; NKTL, extranodal NK/T-cell lymphoma; PNS, paranasal sinus; ALCL, anaplastic large cell lymphoma; HL, Hodgkin's lymphoma; NS, nodular sclerosis; MC, mixed cellularity.

WHO 분류에 따른 림프종의 각 아형별 빈도 역시 Table 1에 기록하였다.

SV40 TAg 면역조직화학적염색 결과

면역염색을 시행한 모든 증례들에서 SV40 TAg의 양성 반응은 발견되지 않았으며(Fig. 1), 극히 일부 증례에서 종양 세포나 림프구가 아닌 조직구 세포질 내에 미약한 발색 소견이 관찰되었으나, 음성으로 판독하였다. 양성대조군으로 쓰인 COS-7 세포와 293T 세포는 모두 핵 부위에서 매우 강한 양성 반응을 보였다(Fig. 2).

고 찰

본 연구는 국내에서 악성림프종의 SV40 발현을 조사한 최초의 연구이다. 그동안 SV40과 인체 종양과의 관계는 주로 북미 지역에서 주도해왔으며,^{9,17} 보고자 등에 따라 검출률이 0%¹⁸부터 43%⁷에 이르는 편차를 보여 왔고, 북미^{3,7,9}와 아프리카¹⁹ 지역에서 비교적 높은 연관성을 보이는 데 비해 유럽 쪽에서는 그 빈도가 매우 낮게 보고되었다(Table 2).^{5,8,20}

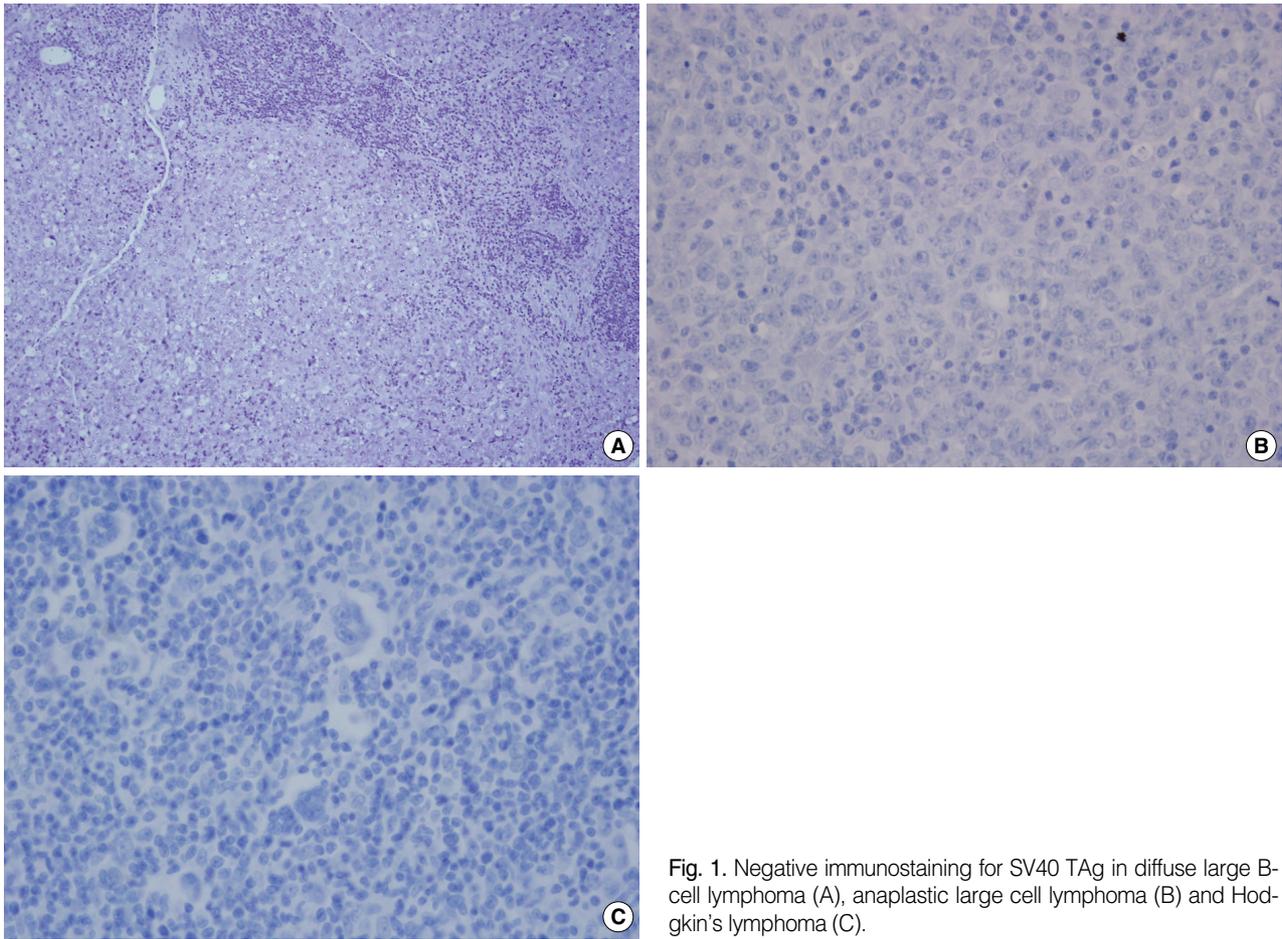


Fig. 1. Negative immunostaining for SV40 TAg in diffuse large B-cell lymphoma (A), anaplastic large cell lymphoma (B) and Hodgkin's lymphoma (C).

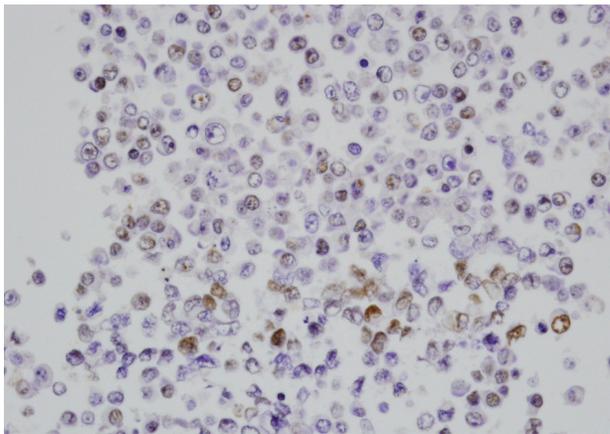


Fig. 2. Strong positive signals of TAg are found in 293T cell nuclei used as controls.

또한 아시아 국가들에서는 아직 발표된 보고가 많지 않으나, 일본에서 악성림프종과 SV40과의 관계를 연구한 결과에 따르면, 정상인의 말초 혈액에서 SV40의 양성률은 4.7%인데 비해 악성림프종에서는 11%, 특히 미만성 대세포 B 림프종의 경우에서 19%에서 양성으로 나온 바 있다.⁶ 동일한 연구에서 SV40

에 의해 오염된 소아마비 백신을 접종받았을 가능성이 있는 1951-1963년 즈음의 출생자들과 그 전후 출생한 환자들과의 SV40 검출률을 비교한 결과 유의한 차이를 보이지 않아, SV40의 전파 경로가 백신 접종이 아니라 사람 사이의 접촉을 통한 것일 거라고 추정하고 있다.⁶

특히 미국과 영국에서는 1961년 이후에 오염된 백신 사용이 금지되었지만 일부 유럽 국가들에서는 1970년대까지도 SV40이 오염된 백신을 그대로 사용하였음에도 불구하고 유럽인들에게서 오히려 SV40 검출률이 낮은 점은¹⁹ 바이러스의 감염 경로가 백신 접종과 크게 관계 없음을 뒷받침한다. 우리나라의 경우 소아마비 백신 접종이 1965년에 시작되었으므로 백신에 의한 SV40 감염 가능성은 거의 없다고 볼 수 있다.

본 연구가 비록 악성림프종에 국한되었고 두 기관의 제한된 증례들에서 시행되었다는 한계를 지니고 있으나, 전 증례에서 SV40가 음성인 점은 일본과 달리 우리나라에서의 감염률은 매우 낮다는 것을 예측할 수 있다. 따라서 향후 정상인과 환자군을 대상으로 한 대규모의 비교 연구가 시행되어야 위의 가설을 입증할 수 있을 것으로 생각된다.

SV40은 동종 polyoma virus인 JCV나 BKV와 매우 상동성을 가지고 있고, 이 두 바이러스들은 인체에서 매우 빈번하게

Table 2. Detection of SV40 DNA sequences or TAg in various countries

References	Countries	Diseases	Methods	Frequencies
Nakatsuka <i>et al.</i> ⁶	Japan	Malignant lymphoma	PCR-southern blot	14/122 (11%)
Vilchez <i>et al.</i> ⁹	USA	Malignant lymphoma	RQ PCR	64/149 (43%)
Shivapurkar <i>et al.</i> ⁷	USA	Malignant lymphoma	PCR-southern blot	29/68 (43%)
Sui <i>et al.</i> ⁸	Australia	Malignant lymphoma	PCR-dot blot	0/50
Mackenzie <i>et al.</i> ⁵	UK	Malignant lymphoma	PCR	0/152
Vilchez <i>et al.</i> ¹⁷	USA	PTLD	PCR-sequencing	2/16 (13%)
Brousset <i>et al.</i> ²⁰	France, Canada	Malignant lymphoma	Immunohistochemistry	0/482
Amara <i>et al.</i> ¹⁹	Tunisia	DLBCL	PCR	63/108 (56%)
Jin <i>et al.</i> ²²	Japan	Malignant mesothelioma	PCR-sequencing	8/18 (%)

PTLD, posttransplant lymphoproliferative disorder; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; RQ PCR, real time quantitative PCR.

감염되는데,²¹ 이 SV40 검출률이 각 나라별, 질환별로 극심한 편차를 보이는 이유는 검출 방법의 다양성 및 정확도의 차이에 기인한다는 주장이 제기되고 있다.⁸ 이러한 SV40의 검출은 일반적으로 중합효소연쇄반응(PCR) 기법과 TAg에 대한 면역염색, 서던 교합법, 염기 서열 분석, 제자리부합법 및 정량적 실시간 PCR (real time quantitative PCR, RQ PCR) 등의 기법들을 이용해왔는데^{5,6,8,20} 초기에 높은 연관성을 보인 결과들이 대부분 PCR을 이용한 결과임이 드러나 결과의 신빙성에 대한 논란이 있는 이후로 PCR 검사는 점점 사용되지 않고 있다.¹⁸ 본 연구에서도 비교적 SV40에 특이적이고 많이 인용되는 여러 가지 시동체와 파라핀 블록에서 추출한 DNA를 이용하여 PCR 검사를 시행하였으나,^{6,18,21} 일관성이 없는 결과를 얻었다(data not shown).

최근 연구 동향은 RQ PCR을 주로 이용하고 있는데, 이는 500 ng DNA당 한 단위 copy number의 SV40까지 발견할 정도로 매우 민감하며 특이적이므로 가장 이상적인 검출 방법이라고 할 수 있다.¹⁶⁻²³ 그러나 고비용의 부담과 양질의 DNA를 필요로 한다는 점에서 본 연구에서는 시행되지 못하였다.

또한 TAg에 대한 면역조직화학연구는 PCR에 비해 민감도는 떨어지지만 종양 세포에서 SV40 양성 여부를 볼 수 있다는 장점이 있다. 특히 본 연구에서 사용한 CSA 방법은 horseradish peroxidase/DAB 외에 tyramide를 이용하여 신호를 대량 증폭하는 것으로 통상의 면역염색 방법보다 약 50배까지 신호를 증폭한다고 알려져 있으므로²⁰ RQ PCR의 차선택으로 인정될 수 있다고 하겠다.

한편 CSA를 이용한 TAg 면역염색에서 모든 종양 세포가 음성이었으나, 일부 조직구로 생각되는 세포의 세포질 내에 열은 갈색 발색 반응이 보였다. 본 연구는 이를 음성으로 간주하였으나, 일부 연구에서는 SV40이 단핵구/탐식 세포에서 발견된다고 보고한 바 있어^{24,25} 이에 대한 추가 연구도 필요할 것으로 보인다.

SV40이 과연 관련 종양들을 유발하는 병원체인가에 대한 의문은 현재까지 해결되지 않은 문제이다. 비록 동물 실험에서는 종양 발생능이 증명되었으나, 인체에 대한 연구는 아직 불충분한 실정이라 2002년에 국제백신안전위원회(Immunization Safety Review Committee of the Institute of Medicine, IOM)는 오

염된 소아마비백신이 인체의 종양을 유발한다는 증거가 아직 불충분하다고 결론 내리며 SV40 검출 방법의 표준화와 인간을 통한 전염성 여부에 대한 연구를 지속하도록 권고한 바 있다.^{18,26} 그러나 최근 장기이식 후 면역결핍성 환자 또는 AIDS 환자에서 검출 빈도가 증가하고 있어 주의가 요망된다.^{17,27}

본 연구에서 SV40은 악성림프종 중 한 예에서도 검출되지 않았으나, 본 연구가 SV40과 림프종과의 관계를 조사한 국내 최초의 연구라는데 그 의미를 찾을 수 있겠다. 따라서 향후 연구는 RQ PCR 등을 이용해 보다 민감하고 정량적인 기법을 도입해야 할 것이고, 무엇보다 대규모의 정상인 대조군 실험이 이루어져야 정확한 역학적 사실 및 병인을 규명할 수 있을 것으로 보인다.

참고문헌

1. Vilchez RA, Kozinetz CA, Arrington AS, Madden CR, Butel JS. Simian virus 40 in human cancers. *Am J Med* 2003; 114: 675-84.
2. Fraumeni JF Jr, Ederer F, Miller RW. An evaluation of the carcinogenicity of simian virus 40 in man. *JAMA* 1963; 185: 713-8.
3. Barbanti-Brodano G, Sabbioni S, Martini F, Negrini M, Corallini A, Tognon M. Simian virus 40 infection in humans and association with human diseases: results and hypotheses. *Virology* 2004; 318: 1-9.
4. O'Neill FJ, Carroll D. Amplification of papovavirus defectives during serial low multiplicity infections. *Virology* 1981; 112: 800-3.
5. MacKenzie J, Wilson KS, Perry J, Gallagher A, Jarrett RF. Association between simian virus 40 DNA and lymphoma in the United Kingdom. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1001-3.
6. Nakatsuka S, Liu A, Dong Z, *et al.* Simian virus 40 sequences in malignant lymphomas in Japan. *Cancer Res* 2003; 63: 7606-8.
7. Shivapurkar N, Harada K, Reddy J, *et al.* Presence of simian virus 40 DNA sequences in human lymphomas. *Lancet* 2002; 359: 851-2.
8. Sui LF, Williamson J, Lowenthal RM, Parker AJ. Absence of simian virus 40 (SV40) DNA in lymphoma samples from Tasmania, Australia. *Pathology* 2005; 37: 157-9.

9. Vilchez RA, Madden CR, Kozinetz CA, *et al.* Association between simian virus 40 and non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 2002; 359: 817-23.
10. Jaffe E. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC, 2001.
11. Chang MS, Lee HS, Kim HS, *et al.* Epstein-Barr virus and microsatellite instability in gastric carcinogenesis. *J Pathol* 2003; 199: 447-52.
12. Lee HS, Cho SB, Lee HE, *et al.* Protein expression profiling and molecular classification of gastric cancer by the tissue array method. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4154-63.
13. Paik JH, Jeon YK, Park SS, *et al.* Expression and prognostic implications of cell cycle regulatory molecules, p16, p21, p27, p14 and p53 in germinal centre and non-germinal centre B-like diffuse large B-cell lymphomas. *Histopathology* 2005; 47: 281-91.
14. Heinsohn S, Golta S, Kabisch H, zur Stadt U. Standardized detection of Simian virus 40 by real-time quantitative polymerase chain reaction in pediatric malignancies. *Haematologica* 2005; 90: 94-9.
15. Gluzman Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 1981; 23: 175-82.
16. Numa F, Hirabayashi K, Tsunaga N, *et al.* Elevated levels of syndecan-1 expression confer potent serum-dependent growth in human 293T cells. *Cancer Res* 1995; 55: 4676-80.
17. Vilchez RA, Jauregui MP, Hsi ED, Novoa-Takara L, Chang CC. Simian virus 40 in posttransplant lymphoproliferative disorders. *Hum Pathol* 2006; 37: 1130-6.
18. Shah KV. SV40 and human cancer: a review of recent data. *Int J Cancer* 2007; 120: 215-23.
19. Amara K, Trimeche M, Ziadi S, *et al.* Presence of simian virus 40 DNA sequences in diffuse large B-cell lymphomas in Tunisia correlates with aberrant promoter hypermethylation of multiple tumor suppressor genes. *Int J Cancer* 2007; 121: 2693-702.
20. Brousset P, de Araujo V, Gascoyne RD. Immunohistochemical investigation of SV40 large T antigen in Hodgkin and non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 2004; 112: 533-5.
21. Doerries K. Human polyomavirus JC and BK persistent infection. *Adv Exp Med Biol* 2006; 577: 102-16.
22. Jin M, Sawa H, Suzuki T, *et al.* Investigation of simian virus 40 large T antigen in 18 autopsied malignant mesothelioma patients in Japan. *J Med Virol* 2004; 74: 668-76.
23. Vilchez RA. Standardized detection of SV40 by real time quantitative polymerase chain reaction. *Haematologica* 2005; 90: 6.
24. Martini F, Dolcetti R, Gloghini A, *et al.* Simian-virus-40 footprints in human lymphoproliferative disorders of HIV- and HIV+ patients. *Int J Cancer* 1998; 78: 669-74.
25. Vivaldi A, Pacini F, Martini F, *et al.* Simian virus 40-like sequences from early and late regions in human thyroid tumors of different histotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 892-9.
26. Stratton K, Alamario D, McCormick M. Immunization safety review: SV40 contamination of polio vaccine and cancer. National Academy Press, 2003.
27. Vilchez RA, Lopez-Terrada D, Middleton JR, *et al.* Simian virus 40 tumor antigen expression and immunophenotypic profile of AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma. *Virology* 2005; 342: 38-46.