

방광암의 분자생물학적 연구

아주대학교 의과대학 비뇨기과학교실, ¹연세대학교 의과대학 비뇨기과학교실

김 세 중 · 최 영 득¹

서 론

방광암은 90% 이상이 이행상피세포에서 기원한다. 방광암의 약 75%는 진단 당시 표재성암인데, 적절한 치료에도 불구하고 재발이 잦고, 그 중 10-20%는 침윤성암으로 진행된다. 방광암의 25%는 처음부터 침윤성암으로 나타나며 표재성암에 비해 예후가 나쁘다. 대부분의 침윤성암은 진행 가능성이 높은 비정형 상피세포나 상피내암을 거쳐 발생된다. 많은 분자유전학 및 생물학적 방법으로 방광암 발생기전에 대한 이해가 넓어지고 있으며, 현재 임상에서 응용되는 방법을 보완할 수 있는 종양표식자에 관련된 연구를 비롯하여 궁극적으로 방광암의 진단 및 치료에 대해 이해를 넓히고자 본 장을 기술한다.

클론형성능 (clonality)

방광암의 특징은 다발성과 잦은 재발로, 이러한 특성에 대해 두 가지 이론이 있다. 유전학적 결함을 야기하는 물질에 의해 전체 요로상피가 동시에 영향을 받는다는 “field defect” 이론은 다발성암이 전환된 이행상피세포의 독립적인 클론으로부터 발생하고, 여기에 다른 유전자적 손상이 더해질 경우 더 악성 형태로 진행한다는 것이다. 클론형성 이론은 방광암의 동시성 (synchronous), 이시성 (metachronous) 다발성의 특징에 대한 것으로 유전학적 변화는 한 세포에서만 일어나며 이것이 다른 부분의 요로상피에 이식되어 다발성을 나타낸다는 것이다.

정상 요로상피세포는 약 120mm² 크기의 단클론부착포 (monoclonality patch)로 단지 200-300개의 모세포에서 나타난다. 이에 방광암의 다발성 형성은 서로 다른 세포 부착포

가 각기 다르게 관여하여 암을 형성한다는 “field defect”를 설명하고 있다. 한편 다발성 지역의 각 조직에서 동일한 X 염색체의 비활성화가 관찰되었고, 염색체 (2q, 4p, 4q, 8p, 9q, 9p, 11p, 17p)에서 80%가 동일 부위에 microsatellite 변화를 가지며, 원발암 조직과 동일 환자의 재발된 조직에서 p53과 pRb의 상태가 일치하기 때문에 재발이나 다발성 요로상피암은 이식에 의한 클론형성에 의해 발생됨을 설명하고 있다. Field defect나 클론형성 모두 방광암의 다발성이나 재발에서 어떠한 역할을 하는지는 아직 확실치 않은 상태이며 많은 연구가 필요하다.

방광이행상피세포암 형성의 분자유전학적 경로

1. 염색체 이상

방광이행상피세포암에서 구조적 변화나 염색체 이상들이 밝혀지고 있다. 염색체 수의 염색체고배수성 (hyperdiploidy) 또는 염색체이수성 (aneuploidy), 표지 염색체들, 염색체 크기나 모양의 변화와 같은 염색체 이상 등이 방광암의 재발 및 진행에 밀접한 관련이 있다. 방광암에서 3p, 6q, 9q, 11p, 17p 및 18q와 같은 몇몇 염색체의 완들의 결손이 밝혀졌다. 9q 결손이 고분화 및 저분화 암에서 모두 관찰됨은 9q의 결손이 방광암 발생 과정의 초기 변화일 가능성을 시사한다. 표재성암의 초기 변화 중에 11p, 8p의 결손과 8q, 1q의 추가도 관찰되고 있다. 한편 17p의 결손은 표재성암에서는 관찰되지 않지만, 침윤성암의 약 60%에서 17p의 이형접합성소실 (loss of heterozygosity; LOH)을 보인다. 이는 이 부위의 소실이 방광암의 진행에 관여함을 암시한다.

2. Microsatellite instability (MSI)

MSI는 게놈의 단순 반복 서열의 크기 변화를 말한다. 이는 DNA 부조화 회복 유전자들 (hMSH2, hMLH1, hMSH6, PMS1, PMS2)의 기능장애로 발생하며, DNA 복제 실수 축적을 유도한다. 중요한 성장 조절 유전자들의 부호화된 서열에 이런 변화들이 존재하는 경우 종양이 발생한다. 즉,

교신저자 : 김세중, 아주대학교병원 비뇨기과
경기도 수원시 영통구 원천동 산 5번지, ☎ 443-721
Tel: 031-219-5272, Fax: 031-219-5276
E-mail: sejong@ajou.ac.kr

MSI의 정도에 의해 DNA 복제 실수가 결정되며, 이는 발암 과정이 시작될 때 체세포돌연변이의 빠른 축적을 유발한다. 따라서 DNA 복제 실수 상태가 향후 종양의 예후와 적절한 치료 전략을 결정하는 중요한 요인이 된다. 방광암에서 microsatellite 변화들이 침윤성암과 젊은 연령 환자에서의 방광암 발생과 연관이 있다. 많은 연구에서 소변이나 방광세척요세포에서 변화되는 DNA 띠 (band)를 발견함으로써, 방광암의 조기 진단과 추적관찰에 microsatellite 변화 유형이 이용될 수 있는지를 조사하고 있다.

3. 변위 DNA 메틸화 (aberrant DNA methylation)

종양에서 클론 확장은 새로 획득한 특성이 유전성을 가진다. 유전은 유전자 서열의 정보 계승이지만, 이와는 반대로 후생유전 (epigenetic) 변화도 유전자 발현 정도의 측면에서 정보의 계승을 의미한다. 시토신 (cytosine) 잔기 (residue)의 C-5 부위에 효소 메틸화는 유전자 발현을 변화시키고, 세포 분열을 통해 DNA 메틸화 형태를 전달함으로써 후생적 유전에 영향을 미친다. 그러므로 DNA 메틸화는 이미 잘 알려진 인간 DNA의 돌연변이 부위 탈아미노화 뿐만 아니라, 종양의 유전자 비활성화를 유도할 수 있다.

방광암에서 많은 유전자 메틸화가 관찰되는데, 종양억제 유전자 촉진자 부위의 메틸화와 발현성 소실 (silence) 사이의 관계에 관한 연구가 많다. 표재성암에서 p16INK4A 유전자의 촉진자 부위에 과메틸화가 보고되는데 이는 이행상피 세포암 발생의 초기 변화로 생각된다. 방광암 주변의 정상 방광 점막에서는 발견되지 않지만 이행상피세포암에서만 촉진자 부위의 이상 메틸화를 보이는 여러 유전자들이 발견되는데, DBCCR1 (deleted-in bladder cancer 1 gene)과 epidermal growth factor와 follistatin 영역 domain을 포함하는 막 단백질 (transmembrane protein)의 5' 말단이 여기에 포함된다. 또한 cadherin 가족 (CDH1과 CDH13), 최근에 종양억제 유전자로 추측되는 RASSF1A와 APC의 유전자들이 자주 메틸화된다. 이들 유전자의 메틸화는 특히 고등급, 근육층 침범, 나쁜 생존율과 밀접한 관계를 보인다. 방광암 환자의 소변에서 LAMA3, LAMB3의 메틸화와 MI는 불량한 예후 인자들 (분화도와 병기, 성장 모양, 침윤, ploidy 양상)과 관련되는 반면, LAMC2의 메틸화와 MI는 환자의 낮은 생존율과 관련되었다. 표재성암에서 hMLH1과 O6-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT), p16, Von Hippel-Lindau (VHL), death-associated protein kinase (DAP-kinase), glutathione S-transferase P1 (GST-P1), E-cadherin의 유전자들에서 촉진자 부위의 과메틸화도 연구되어 재발 간에 밀접한 연관성이 보고되고 있다.

방광이행상피세포암 형성의 세포주기관련 경로

세포주기는 G1, S, G2, M 단계로 나뉘며, 세포기능 정지 단계를 G0기라 한다. 세포주기 조절은 세포주기를 어느 단계에서 정지시켜 과정 중에 발생한 DNA 손상 등을 복구할 시간을 주고 복구가 안될 경우 문제가 있는 세포를 고사시키는 등의 역할을 한다. 만약 세포주기 조절 기능이 상실될 경우, 손상된 유전자들이 그대로 딸세포들로 넘어가 종양 형성의 시초가 된다. 세포주기 조절은 G1기에서 S기로 넘어갈 때 (G1S checkpoint)와 G2기에서 M기로 넘어가는 과정 (G2M checkpoint)에서 주로 일어난다.

정상적인 세포증식이 지속되기 위한 세포주기의 진행은 cyclin과 cyclin-dependent kinase (CDK)로 구성된 단백질 복합체에 의해 조절된다. 이 복합체는 세포주기를 통해 세포주기의 전환시점에 관여하는 중요한 단백질을 인산화시킴으로써 세포주기의 진행을 조절한다. 세포주기 조절의 실패는 종양 형성과 궁극적으로는 암 진행의 시초 단계이다.

세포주기의 진행은 CDK에 의하여 촉진되고, cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs)에 의해 억제된다. 세포주기에 관여하는 cyclin 중 G1기에는 cyclin D, E가 작용하며 G1과 S기에는 cyclin A가, G2와 M기에는 cyclin B가 필요하다. 각각의 cyclin은 CDK와 짝을 이루고 있다. G1S checkpoint에서의 cyclin-CDK complex는 cyclin A-CDK2, cyclin E-CDK2, cyclin D-CDK4, cyclin D-CDK6이 있다. 이런 cyclin-CDK는 세포가 G1기에서 S기로 넘어가는 데 중요한 역할을 한다.

세포주기, 세포증식, 세포고사 경로를 조절하는 인자들에 대한 많은 연구로 발암의 병리기전에 대한 이해가 넓어지고 있다. 그 중 p53과 pRb는 종양억제유전자로 연구되고 있다. p53은 G1S checkpoint의 가장 중요한 조절인자이며, pRb도 G1 세포주기 checkpoint에서 DNA 복제의 진행에 중요한 역할을 수행한다. 이런 유전자의 돌연변이나 손실은 방광암의 발생이나 항암제 및 방사선과 같은 DNA에 손실을 가하는 인자들에 대한 반응에 대해서도 밀접한 영향을 미친다.

1. 종양유전자 (oncogene)와 성장 촉진

종양유전자란 정상세포를 암세포로 변환시킬 수 있는 능력을 가진 단백질을 인코딩할 수 있는 유전자로, 정상 상태에서 세포증식 기능과 연관을 가진 유전자가 돌연변이를 일으켜 생긴다. 방광암에 관계되는 것으로는 성장인자 수용체 (growth factor receptor; e.g. c-erbB-2), 세포내신호전달 분자 (intracellular signaling molecule; e.g. RAS), 핵전사 인자 (nuclear transcription factor; e.g. c-MYC) 등이 있다.

1) ras: ras 유전자 계열은 H-ras, K-ras, N-ras 등으로 구성된다. 이들은 종양유전자가 될 수 있는 잠재능을 가지고 있고, 여기서 인코딩되는 모든 단백질은 생화학적으로 비슷한 구조를 가진다. 방광암 형성에는 H-ras 돌연변이만이 중요한 역할을 한다. K-ras 돌연변이는 주로 췌장, 폐, 대장암에서 나타나고, N-ras는 조혈세포암의 발생에 중요한 역할을 한다. Guanine- nucleotide-binding 단백질인 ras는 세포증식과 분화 중의 신호전달에 관여한다. 암 형성을 유도하는 가장 중요한 기전은, 유전자의 돌연변이에 의해 ras가 GTP에 결합하는 성질은 변함없이 유지되면서 GTP의 가수분해를 억제시키는 데 있다. 이 기전에 의해 단백질은 계속적으로 활성화되고 이에 세포분열을 유도하는 신호가 계속적으로 유발된다. 돌연변이가 빈번한, 소위 'hot spot'으로 불리는 codon 12의 glycine에서 valine에 이르는 곳과 codon 13에서 glycine과 cysteine 사이, codon 61의 glutamine에서 arginine, lysine, leucine에 이르는 곳이다.

방광암에서 H-ras 돌연변이가 5-16% 보고되고, 일부 30-45%까지 이른다. H-ras의 과발현과 표재성암의 빠른 재발에 유의한 연관성이 있다는 보고가 있다. 그러나 일부에서 H-ras의 codon 12, 13, 61에서의 점 돌연변이가 보고되나 이러한 H-ras의 돌연변이는 종양의 등급이나 병기와는 관련이 없는 것으로 알려져 있다.

2) Epidermal growth factor (EGF) 수용체: ErbB-2와 EGFR은 receptor tyrosine kinase 계열에 속한다. EGFR에 배위자(ligand)인 EGF와 transforming growth factor (TGF)- α 가 붙으면 활성화된다. 활성화된 수용체는 이합체화(dimerization)가 되어 구조가 변경되고, 이에 따른 자체적인 수용체의 인산화가 일어난다. EGFR의 주요 역할은 세포증식 조절이다. 정상 요로상피와 암세포에서 EGFR과 EGF는 양쪽 모두에서 비슷한 결합력을 보이나, 결합 후의 세포반응, 상피조직에서의 EGFR 군집화, 발현된 분자량에서 큰 차이가 관찰된다. 따라서 EGF가 정상 요로상피에 부착될 때보다 악성 종양이나 과형성 요로상피에 부착될 경우 세포의 성장 및 증식이 더 강하게 일어난다. 이에 EGF가 선택적인 성장 촉진 효과에 의해 암세포의 성장과 재발을 유발한다. 또한 EGFR의 조직 내 분포도 정상세포와 암세포 사이에 차이가 있다. 정상 요로상피 조직에서는 EGFR이 존재하는 세포는 기저막에 국한되어 있는 반면, 분화가 잘 안되었거나 혹은 고분화된 이행상피세포암에서 EGFR은 기저세포에서 표면까지 요로상피 전층에 걸쳐 발현된다.

방광암의 고등급, 고병기에서 EGFR이 강하게 발현되어 종양의 병기와 관계없이 고등급 암에서 EGFR 발현이 독립적인 예후인자라는 주장도 있고, 진행성암에서 독립적인 예후인자라는 주장도 있다. 전이부위 암종에서 EGFR의 발

현은 항암요법이나 방사선요법에 노출되어도 원발 병소 방광암에서의 발현과 상관관계를 가진다.

ErbB-2 또한 성장인자의 수용체를 인코딩한다. ErbB-2는 유방암에서 중요하지만 방광암에서는 중요성이 덜하다. ErbB-2의 증폭과 erbB-2의 생산물인 p185의 과발현이 방광암에서 보고되고 있다. c-erbB-2의 과발현은 높은 종양 등급과 종양 특이 생존율, 전이성 병변의 발생과 연관이 있으나 종양병기와 등급 이상의 추가적인 예후적 정보를 주지 못한다는 보고도 있다. c-erbB-2의 생성물(*Her-2/neu*)은 방광암에서 종종 발현된다. *Her-2/neu*에 대한 배위자는 잘 밝혀지지 않았으나 이 유전자가 증폭되거나 과발현되면 나쁜 예후인자로 작용한다. *Her-2/neu*는 유전자 증폭이 없이 *Her-2/neu*가 빈번하게 과발현된다. 침윤성암의 경우 *Her-2/neu*는 원발성암의 28%에서 과발현되나 생존율에는 연관이 없으며, 과발현의 발생율은 원발암에 비해 전이암에서 의미있게 높다. *Her-2/neu* 양성 원발암은 일관되게 *Her-2/neu* 양성 전이암을 나타내나, *Her-2/neu* 음성암의 경우 전이 림프절의 45%와 전이 병변의 67%에서 *Her-2/neu* 양성을 나타낸다. 따라서 *Her-2/neu*의 상태는 특히 원발병소보다 전이병소에서 과발현이 나타난다.

3) myc: c-myc는 8번 염색체의 장완에 위치하며, 방광암에서 고등급, 고병기와 관계가 있고, Ki-67의 발현과도 밀접한 관계가 있다. c-myc 생성물의 발현은 방광암의 예후인자, 진행 및 생존율과 연관성은 없는 것으로 여겨지고 있다.

4) mdm-2: mdm-2 증폭은 방광암에서 드물게 관찰된다. mdm-2 과발현은 방광암의 20-30%에서 보고되며, 최근 연구에서 mdm-2의 발현은 아무런 예후적인 연관성이 없다는 보고도 있다. 그러나 mdm-2와 p53을 동시에 고려 시, 다변량 분석에서 암의 진행과 생존에 독립적인 인자라는 보고도 있다.

2. 종양억제유전자와 성장억제

종양유전자는 활성화 과정을 거쳐 암 형성을 유발하는 반면, 종양억제유전자는 각각의 유전자가 비활성화됨으로써 종양 형성이 유발된다. 세포성장은 항상 종양유전자에 의한 성장을 촉진시키는 신호와 종양억제유전자에 의한 억제하는 신호 사이의 상호작용에 의해 조절된다. 종양억제유전자가 비활성화 될 경우 조절되지 않는 세포의 성장이 일어난다.

1) Retinoblastoma gene (pRb): pRb는 G1S checkpoint에서 세포주기 조절에 중요한 역할을 한다. pRb는 13번 염색체의 q14에 위치한다. pRb의 조절은 인산화에 의해 나타나는데 인산화는 가역적인 변화로 여러 종류의 단백질활성효소(protein kinase)에 의해 촉진된다. 인산화된 pRb와 탈인산화

된 pRb는 전사인자들과 결합하는 능력에서 큰 차이가 있다. G1기에서 pRb는 거의 인산화되어 있지 않은 반면, G1기 끝부분에서 유사분열의 말기까지는 강하게 인산화되어 있고, 세포분열 후 다시 탈인산화된다. G1기에서 pRb는 탈인산화되면 활성화되는데 이는 E2F라는 전사인자와 결합하여 이를 비활성화시킨다. 따라서 DNA 합성에 필요한 유전자들이 저지되고, 세포는 S기로 들어갈 수 없게 된다. pRb가 CDK2, CDK4나 CDK6 등에 의해 인산화되면 E2F 전사인자는 pRb와 떨어져 활성화되고 S기로의 세포주기의 진행에 필수적인 유전자의 전사를 일으킨다. 인산화된 pRb는 전사인자인 E2F에 결합할 수 없게 되고 pRb가 붙지 않은 유리 E2F는 DP-1, DP-2와 heterodimer를 형성하여 DNA 복제에 중요한 유전자인 DNA polymerase- α 나, 세포주기에서 중요한 역할을 하는 E2F-1 등을 활성화시킨다.

pRb의 비활성화는 많은 암에서 종양형성 및 진행에 관여한다. 방광암에서 pRb의 비활성화는 염색체 13q의 결손에 의해 일어나며, 빈도는 14-80%로 보고되며 전체빈도는 대략 30%이다. pRb의 손실이나 변형에 의한 비활성화는 고등급, 고병기 암에서 많이 발생한다. 방광암 조직에서 pRb를 측정할 결과 표재성암에서는 10%, 침윤성암에서는 34%에서 pRb의 변형된 발현이 검출되었고, 생존율도 pRb가 음성인 경우 나쁘다. T1 방광암을 대상으로 한 연구에서도 pRb 단백질의 과발현과 유전자의 손실이 무진행 생존율과 관련이 있다는 보고도 있다. pRb 단백질 또는 p53 어느 쪽이든 비정상 발현을 가진 환자는 방광암이 진행될 위험이 높다.

2) p53: p53은 염색체 17p에 위치하며 여러 원인에 의한 DNA 손상을 최소화하여 유전자를 안정적으로 보전해준다. p53은 세포주기 checkpoint를 조절하는 유전자(p21^{WAF1/CIP1})나 세포고사(BAX), DNA 복구(GADD45), 혈관형성(thrombospondin)을 조절하는 유전자의 발현을 활성화시키는 전사인자로서 작용한다.

p53은 G1S checkpoint의 가장 중요한 조절인자로 G1S checkpoint의 경우 직접적인 DNA 손상이나 저산소증과 같은 세포내외의 신호가 전달되면 p53은 이런 신호에 반응하여 CDK 억제제인 p21^{WAF1/CIP1}을 활성화시킨다. p21^{WAF1/CIP1}은 세포주기의 다음 단계로 진행하는데 필요한 CDK2에 붙어서 이의 작용을 억제한다. 이에 세포주기가 지연되고 이 휴식기간에 DNA 복구가 일어난다. p53이 돌연변이 등에 의해 이러한 정상적인 기능을 수행하지 못하게 되는 경우, 손상된 DNA를 복구할 수 있는 세포주기의 휴식이 없어지고 손상된 DNA는 그대로 딸세포로 전해져 종양이 발생된다. Wild-type p53은 반감기가 매우 짧아 검출에 어려움이 있다. 돌연변이 p53은 반감기가 길고 복합체를 만들어 wild-type p53을 비활성화시키고, 조절되지 않는 세포성장을 유

발한다.

p53의 돌연변이는 인간 암에서 발견되는 가장 많은 유전자적 결함이다. 방광암에서도 p53은 중요한 역할을 하며, 17p에서 두개 중, 한 대립인자의 결실이 많은 방광이행상피 세포암에서 나타난다. p53 돌연변이는 종양의 고등급과 고병기, 상피내암의 존재 등 종양의 진행과 연관이 있고, 재발의 위험도 높고 생존기간도 짧다. 홀배수체(Aneuploid) 종양의 많은 부분이 p53 양성인 반면, 표재성암의 경우 일부분에서만 p53이 양성으로 나타난다. 미분화 암의 60% 이상에서 17p의 결실이 관찰된다. 또한, 진행성 표재성암에서는 이런 특별한 결실이 더 높은 빈도로 나타난다. 암의 진행을 보면 p53이 음성인 경우 단지 20%에서만 진행했지만, p53이 양성인 암의 경우 50% 이상에서 진행했다는 보고가 있다. 침윤성, 미분화 암은 표재성, 고분화 암에 비해 p53의 돌연변이율이 더 높다. p53의 돌연변이는 침윤성암의 50% 이상에서 발견된다. 대부분의 경우, p53이 과발현되거나 돌연변이를 가진 p53이 발현된 암은 역시 염색체 17p에 LOH를 나타낸다. 특히 요로상피암의 경우 p53에 복합적인 돌연변이를 나타내는 경우가 많다. 17p의 LOH는 암 등급과도 깊은 연관이 있다. 고등급일수록 17p에 LOH를 나타내는 경우가 많다.

일부 연구에서 p53이 방광암의 경과에 있어 단변량 분석에서는 암 진행의 의미있는 예후인자이지만 다변량 분석에서는 아니고, 또한 병기, 등급과 비교하여 다변량 분석에서 p53의 발현이 추가적인 정보를 주지 못한다는 보고도 있어 예후인자로서 p53의 정확한 가치는 더 연구되어야 한다.

3) p21^{WAF1/CIP1}: CDKI는 CDK가 세포주기 조절에 작용하는 것을 막음으로써 세포증식을 일으키는 과정을 막는다. CDKI 중 방광암과 연관된 인자는 p21, p27이 있다. p53에 의해 조절되는 세포주기 정지는 본질적으로 p53에 독립적으로 발현되는 CDKI인 p21^{WAF1/CIP1}을 유발시켜 나타난다. 핵내 축적된 p53은 방광암에서 암 진행과 생존에 있어서 중요한 표식자다. 그러나 p53 변환을 가진 모든 방광암이 진행하거나 재발하는 것은 아니다. 세포주기 조절에 대한 p53의 활성화는 p21^{WAF1/CIP1}에 의해 조절된다. p21은 이어서 CDK2와 결합하여 cyclin E의 활동을 억제한다. p53의 변환은 p21 발현을 막고 그 결과 조절되지 않는 세포성장이 일어난다. 하지만, p21의 발현은 변환된 p53 여부에 상관없이 p53과 독립적인 다른 경로에 의해서도 유지될 수 있다. 따라서 현재까지의 이론으로는 p21의 검출은 p53의 발현 외에 다른 정보를 제공할 수 있어 p21에 관한 실제 연구에서는 매우 다양하다.

p21은 방광암의 예후인자로 여겨지나, p53 및 pRb와는 달리 p21^{WAF1/CIP1} 자체의 돌연변이는 방광암에서는 극히 드물다. 방광암에서의 p21발현과 종양의 재발, 생존율, 종양내

p53 등의 관계에 대한 연구 결과에서 p21 발현은 병리학적 병기와 림프절 전이 등과 유의한 연관을 보여, 병기가 낮을수록 p21의 발현은 높았다. 종양의 재발률도 p21 양성인 경우 48%, p21 음성인 경우 79%로 차이가 있었다. p53이 변형되었으나 p21의 발현이 보전된 경우 p53이 정상인 환자군과 생존율에서 비슷한 결과가 보고되었다. 반면 양자가 모두 변형된 경우는 아주 나쁜 예후를 보여주었다.

p21 발현이 높은 경우 예후가 나쁘다는 보고도 있다. 이것은 p21이 높은 병기와 직접적인 연관을 가지며 p53의 변형이 암 진행의 주요기전이 아닌 종양에서는 아마도 다른 경로의 조절불능 상태를 반영하는 것으로 설명될 수 있을 것이다.

4) p27: p27 (Kip1)은 G1기와 S기 사이의 전환시점에 작용하는 CDKI이다. p27은 CDKI 중 p21과 더불어 방광암의 예후인자로 생각되고 있다. 이도 p53과 pRb와는 달리 p27/Kip1 자체의 돌연변이는 방광암에서는 극히 드물다. 방광암에서 p27은 저등급, 표재성, 유두상, 천천히 증식하는 암에서 유의하게 많이 발현된다. p27의 발현이 적으면 전체 생존율 및 재발 후 생존율이 낮다는 보고가 있고, 다변량분석에서 Ki-67/p27 상태는 침윤성암의 생존율과 높은 연관성을 가진다.

5) Cyclin D/E: G1 cyclin의 대표적인 cyclin D는 CDK4와 CDK6와 결합하여 S기로의 이행을 촉진시키고, cyclin D에 비해 조금 늦게 출현하는 cyclin E는 CDK2와 반응하여 G1기에서 DNA의 합성이 일어나는 S기로 완전히 이행하게 한다. 이러한 G1 cyclin은 조절억제인자에 의해 조절되는데 cyclin D는 p16에 의해, cyclin E는 p21, p27에 의해 매개된다. 한편 p21은 p53에 의해 조절되므로 G1 cyclin은 다양한 세포회로인자억제인자들과 매개하여 세포의 조절에 중요한 역할을 한다.

방광암에서 cyclin D1은 원발성 방광암에서 저등급, 저병기 유두상 종양의 성장과 연관이 있고, 암의 진행에 있어서도 중요한 역할을 한다. 방광이행상피세포암에서 cyclin D1의 발현정도와 p53, pRb, Ki-67의 발현과 연관된 상관관계를 분석한 연구 결과 cyclin D1의 발현은 침윤성암에서 생존율과 관계된 독립적인 예후인자라는 보고도 있다.

방광암에서 p27, cyclin E, Ki-67의 연관관계를 보면 p27이 낮은 경우 cyclin E가 낮아지고, Ki-67 지표 (index)가 높아지며, 미분화 등급, 재발, 침윤성, 림프절 전이 등이 잘 일어난다. 재발성 표재성암에서 낮은 병기에 머무르는 경우 p27 및 cyclin E의 수치가 높은 반면, 침윤성암으로 진행되는 암의 경우 시간이 갈수록 p27 및 cyclin E 수치가 떨어졌다. 이런 현상은 cyclin E의 발현 소실이 암의 진행 및 낮은 생존율과 관련이 있다는 연구를 뒷받침한다.

Telomerase 활성도

정상 세포분열 과정 중 telomere가 짧아지면 세포의 노화가 야기되고 세포의 '사멸'을 주관한다. Telomere는 telomerase 효소에 의해 정상 줄기세포에서 유지된다. 그러나 이 효소가 비정상적인 발현을 하는 경우 세포의 불멸화와 암세포의 병리학적 기전에 기여한다. Telomerase는 ribonucleo-complex이며, catalytic subunit인 human telomerase reverse transcriptase는 암세포의 전형적인 특징인 세포 불사화에 매우 중요한 역할을 한다.

방광암 환자에서 telomerase의 활성도를 측정한 결과 40개의 검체 중 조기암에 해당하는 1개를 제외한 모든 검체에서 발현된 반면 정상조직에서는 telomerase가 발현되지 않았다. Telomerase 활성도의 발현은 병리학적인 등급 및 병기와 밀접한 연관이 있다. Telomerase 활성도가 높은 대부분의 암은 진행된 암이다. 그러나 이러한 활성도는 아마도 종양형성 과정 중 초기에 생기는 것으로 보인다. 몇몇 연구에 의하면 telomerase 활성도는 방광이행상피세포암 조직, 이행상피세포암 환자의 방광세척액에서 검출된다. 따라서 특히 저등급, 저병기 암에서 telomerase 활성도의 측정은 세척된 요세포검사보다 더 믿을 수 있는 검사로 방광암의 진단 및 추적에 유용할 것으로 생각한다.

세포고사와 세포증식

인체 기관이 정상적인 기능을 유지하기 위해서는 세포증식과 세포고사 사이에 균형이 이루어져야 하며, 불균형시 질병이 야기된다. 세포고사는 세포의 항상성 조절을 위한 생리적 현상으로 퇴행성 변화나 암의 성장 및 소멸에 관여한다. 세포고사는 세포회로의 조절인자에 따라 결정되는데 G1 critical checkpoint가 봉쇄되면 세포는 G1기에서 정지하여 고사가 야기된다. 세포회로의 G1기를 조절하여 세포고사를 야기시키는 인자로 transforming growth factor (TGF)- β , p53, myc, APO-1/Fas, bcl-2, bax 등이 있다.

1. 세포고사 유도체

1) p53: p53에 의해 유도되는 세포고사는 세포고사를 유발하는 유전자들을 활성화시키고 억제하는 유전체를 비활성화 시킴으로써 진행된다. p53 유발 세포고사는 bcl-2 계열을 통해 조절되는데, bax, bak, bok 등의 proapoptotic 계열과 bcl-2, bcl-xL, bcl-w 등의 antiapoptotic 계열이 있다.

2) bax: p53에 의해 활성화된 bax는 dimer로 세포내 미토콘드리아막에 결합, 채널을 형성하여 막투과성을 증가시

킨다. 미토콘드리아막의 투과성이 증가되면 cytochrome C가 세포 내로 유출되는데 이는 APAF-1이라는 물질을 이합체화(dimerization)시키고, 여기에 procaspase 9이 결합하면 이것이 caspase 3이나 7과 같은 집행(executioner) caspase를 활성화시켜 세포고사가 야기된다.

3) Fas/Fas 배위자 복합체 (ligand complex): 세포고사를 조절하는 또다른 체계는 Fas/Fas 배위자 복합체이다. Fas/Fas 배위자 복합체는 막단백질로 TNF/TNF 수용체 계열에 속한다. 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte)와 NK 세포가 활성화되면 세포 표면에 Fas 배위자(Fas-L)가 활성화된다. Fas에 Fas-L이 결합하면 Fas가 발현된 세포고사가 유발된다. 방광암의 28%에서 돌연변이 Fas가 나타나고, 이것은 Fas 유전자의 변이가 세포고사 기능의 손실을 야기하여 방광암에 관여함을 암시한다.

수용성 Fas는 anti-Fas 항체나 Fas 배위자 관련 사멸(ligand-mediated killing)을 길항할 수 있는 재접합 변형물이다. 수용성 Fas는 ELISA에 의해 검출될 수 있다. 가용 Fas의 혈청 농도는 대조군에 비교하여 방광암 환자에서 더 높고, 농도가 높은 경우 생존율은 줄어든다.

2. 세포고사억제제

1) Bcl-2: Bcl-2는 bax 등의 proapoptotic 계열에 결합하여 미토콘드리아막에 붙지 못하게 한다. 종양유전자에 의해 인코딩되는 bcl-2 단백질은 세포고사에 음성적으로 작용한다. Bcl-2/bax의 비율이 높으면 암 재발이 잘 되고, 병기 및 등급에 상관없는 독립적인 예후인자라는 보고가 있다. 정상 이행세포와 표재성암에서 bcl-2는 기저막에서 관찰되나 침윤성암에서는 관찰되지 않는다. Bcl-2는 조직학적 등급과 반비례하며, 전체 생존율과 의미있는 연관성은 없다. 젊은 환자군에서는 세포질 bcl-2의 과발현이 대부분의 암에서 발견되었으나 진행이나 재발과는 연관성이 없다. Bcl-2는 세포고사를 억제하는데 중요한 역할을 하여 항암요법이나 방사선치료에 대한 반응을 억제시킨다. 이에 antisense bcl-2 발현 치료제의 개발이 지속되고 현재 임상 실험 단계에 있다.

2) Survivin: 최근 연구되는 새로운 표식자로 세포고사의 억제제인 survivin이 있다. 여러가지 암에서 발현되고, 암이 아닌 조직에서는 발현이 안되는 것으로 알려져 있다. Survivin의 발현은 방광암의 등급 및 재발과 연관이 있는 것으로 밝혀졌으나 p53과 bcl-2과는 연관이 없었다. 현재 더 많은 연구가 필요하다.

3. 세포증식

세포증식은 유사분열지수(mitotic count), silver-stained nu-

cleolar organizer region (AgNORs), Ki-67, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), bromodeoxyuridine (BrdU)을 이용한 조직표시 등 여러 기법에 의해 측정된다.

1) Ki-67: Ki-67은 증식 중인 세포의 핵에 존재하는 항원으로, 정지기나 휴지기의 세포의 핵에서는 관찰되지 않는다. G1기부터 축적되어 유사분열시 최고도에 오른다. Ki-67은 Ki-67과 MIB-1에 대한 단일클론 항체에 의해 면역화학적으로 검출될 수 있다.

Ki-67은 재발 및 진행과 관련이 있으며, 발현될 경우 생존율도 짧다. 다변량 분석에서 Ki-67은 방광암의 진행과 재발의 독립적인 예후인자로 인식되고 있다.

2) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): PCNA는 DNA polymerase- δ 에 대한 cofactor로서 DNA 복제 장치의 한 구성원으로 작용한다. 그러나 PCNA는 반감기가 Ki-67에 비하여 길어서 증식 표식자로는 이상적이지 않다. 이는 반감기가 길 경우 유사분열 후 세포가 더 이상 증식하지 않음에도 불구하고 PCNA가 검출될 수 있기 때문이다. 더욱이 PCNA는 DNA 복제뿐만 아니라 DNA 수리에도 필요하다. 따라서 증식 중이 아닌 세포에서도 PCNA는 양성일 수 있다.

방광암에 대하여는 PCNA 발현이 종양의 병기 및 등급과 밀접한 관계가 있다는 보고가 있다. 표재성암을 대상으로 한 연구에서 PCNA가 발현될 경우 재발이 잘 되며, 결국에는 침윤성암으로 발전할 가능성이 높다.

3) Minichromosomal maintenance proteins (MCM): MCM은 증식 전 단계 복합체의 일종으로 세포증식에 필수적인 역할을 한다. 면역조직화학적으로 MCM의 하향조절은 분화된 혹은 정지된 세포에서 나타난다. 방광암 환자에서 MCM은 전 층을 포함하여 발현되는 반면 정상 요로상피에서는 증식 중인 기저세포층에서만 발현된다. 항체의 발현은 방광암의 등급과 연관이 있다. 방광암 환자의 소변검체에서 면역형광적 검출로 8명 중 7명에서 암을 진단하였고, 방광경에서 종양이 없는 것으로 진단된 28명 중 1명에서만 위양성 소견을 나타낼 정도로 특이도가 높다.

종양혈관형성 (angiogenesis)과 종양억제

종양혈관형성은 종양의 성장과 전이에 필수적이며, 종양 세포나 종양에 침투한 비종양세포에서 분비되는 혈관형성을 촉진하는 인자와 저해하는 여러 인자들 사이의 균형에 의해 조절된다. Fibroblast growth factor (FGF), EGF, VEGF, angiogenin, IL-8과 같은 촉진자들과 thrombospondin-1, angiostatin, endostatin, interferon, IL-1, IL-12 등과 같은 억제자들에 의해 조절된다. 종양혈관형성을 조절하는 인자들과 vessel

density 자체가 방광암의 예후인자로 작용한다.

1. 성장인자 (growth factor)

방광암의 조직, 혈청, 소변에서 FGF나 VEGF의 증가가 보고되었다. VEGF는 종양의 혈관형성을 주관하는 기본적인 촉진자이다. VEGF는 방광암 환자의 소변에서 높이 검출되고, 종양의 재발 및 등급과 연관이 있다고 한다. 생존율과는 연관이 없다는 보고도 있다. 방광암에서의 PDEGF의 발현이 병기나 등급에 비례하며, proangiogenic activity를 가지는 cytokine인 IL-8은 방광암의 침윤과 전이를 증가시킨다. 표재성암에서 VEGF mRNA의 발현이 증가하면 조기 재발이 잘 되고, 침윤성암으로 진행되는 경우가 많다는 보고가 있다. 다양한 성장인자가 혈관생성에 영향을 주며 방광암의 병기, 등급, 재발 등에 영향을 미친다.

2. 혈관밀도 (vascular density)

Factor VIII 또는 CD34에 대한 항체를 가진 혈관내피세포 (vascular endothelial cell)의 면역조직화학적 염색은 혈관표면밀도 (vascular surface density, VSD)나 미세혈관밀도 (microvessel density, MVD), 또는 미세혈관수 (microvessel number, NVES)로 정의되는 종양혈관도를 측정하는 데 사용될 수 있다.

MVD가 증가되면 전이가 될 확률이 높고 방광암을 포함한 여러 종류의 암에서 나쁜 예후인자로 밝혀졌다. 방광암 환자에서 암 조직의 평균 MVD가 높으면 재발률이 높고 생존율도 떨어진다. 종양혈관형성은 암에서 암의 진행과 생존율의 독립적인 예후적 인자로 여겨진다. pT1G3 방광암에서 VSD와 NVES는 다변량 분석에서 암 진행의 독립적인 인자로 입증되었다.

3. Thrombospondin-1

이는 종양혈관형성의 억제자이다. 방광암의 경우 thrombospondin-1의 발현은 종양의 진행과 전체 생존율과 연관이 있다고 한다. Thrombospondin-1의 수치가 낮으면, 정상이거나 정상보다 높은 군에 비해 재발률이 높고 생존율도 낮다. Thrombospondin-1은 방광적출 환자에서 암의 재발과 전체 생존율 면에서 독립적인 예후인자로 작용한다.

세포부착분자 (cell adhesion molecule)

세포는 세포와 세포 사이, 또는 세포와 세포의 기질을 연결하는 많은 세포부착 구조물을 통하여 상호관계를 유지한다. 이런 상호반응의 주요 구성은 cadherin, integrin, selectin, 결합체 (desmosome)나 반결합체 (hemidesmosome)와 같은 im-

munoglobulin-like cellular adhesion molecule들로 이루어진다. 이것들은 세포간 신호전달이나 인식, 세포고사 등 다양한 측면에서 여러가지 역할을 수행한다. 세포부착분자는 비노기계암을 포함한 다양한 종양에서 암 침윤과 전이에 관여한다.

1. Cadherin

Cadherin은 세포간 연락체계에 작용하는 막 당단백으로 염색체 16q22.1에 위치한다. Cadherin은 칼슘 의존성 세포내 부착장치로, 세포 외 영역, 막연쇄 (transmembrane sequence)와 세포 내 영역 등의 구조를 갖는다. Cadherin의 세포 내 부분은 catenin 복합체로 알려진 단백질을 통해 cytoskeleton과 결합되며, L-CAM (Liver cell adhesion molecule), cadherin P (placental), N (neural), E (epithelial) 등이 있다. 생체 외 및 생체 내 실험에서 침윤을 억제하는 유전자로 작용하며, E-cadherin-mediated adhesion의 소실은 여러 가지 암의 진행에서 중요한 과정으로 거론된다.

정상 요상피세포는 E-cadherin을 분비하는데, E-cadherin의 소실은 방광암을 비롯한 기타 암에서 나타나며, 나쁜 예후를 보인다. E-cadherin의 감소는 암의 근침윤과 원격전이와 연관성을 가지고, 고등급, 고병기 암과 연관이 있다. 방광암 환자의 혈청에 수용성 E-cadherin 수치가 높은 경우, 조직학적 등급이 나쁘고, 다발성이며 보다 조기에 재발한다. 혈청내 수용성 E-cadherin의 수치와 종양에 의한 비정상 E-cadherin의 발현 사이에는 상관이 없다. 그러나 일부에서 수용성 E-cadherin은 건강한 사람과 방광암 환자의 소변 모두에서 검출되며 정상인보다 방광암 환자에서 더 높았지만 큰 차이는 없다는 보고도 있다.

2. Integrin

Integrin은 laminin, collagen, fibronectin과 같은 세포외 기질 단백질에 대한 transmembrane heterodimeric receptor에 속한다. Integrin은 세포의 부착과 이동성을 조절하는 것으로 heterodimer로 구성되며, 특이한 세포외 기질 구성원과 반응한다. 정상 방광 상피세포에서 몇가지 다른 형태의 integrin이 관찰되었다 (α2β1, α3β1, α6β4). 그 중 α2β1은 침윤성암에서 발현이 소실되며, α3β1은 대부분의 암에서 유지된다. α6β4 integrin은 정상 이행상피세포에서 collagen VII와 같이 존재한다. α6β4 integrin은 대부분의 방광암에서 강하게 발현되며, 정상 요상피에서 관찰되는 α6β4 integrin과 collagen VII의 co-localization은 방광암에서 소실된다. α6β4 integrin이 약한 경우, 아예 발현되지 않거나 과발현을 보인 경우보다 생존율이 높았다는 보고가 있다. 이런 연구들은 integrin이 결손될 경우 세포사이의 부착기능

이 약해지며, 이에 따라 침윤성암이 안으로 더 자랄 수 있는 환경을 제공해 준다는 것을 암시한다.

3. Immunoglobulin superfamily (IgSF)

여기에 속하는 세포부착분자들은 세포사이의 상호작용 (cell-cell adhesion molecules; C-CAM)이나 세포와 세포외 기질 (substrate adhesion molecule; SAM)의 상호작용에서 중요한 역할을 한다. 방광암과의 예후관계에 대한 연구는 미미하나, intercellular-cell adhesion molecule-1 (I-CAM-1)이나 -2가 발현되지 않았다는 보고가 있으며, 다른 임상적 예후인자와의 연관성도 없다는 보고도 있다. 반면에 C-CAM-1이 방광암 조직에서는 떨어졌다는 보고가 있다.

세포외기질 단백질분해효소 (extracellular matrix proteinase)

1. Laminin-P1

Laminin-P1은 주요 기저막 단백질인 laminin의 단백질분해 절편으로 기저막이 파괴되면 혈청 laminin P1은 상승된다. Mungan 등은 방광암 환자의 혈청 Laminin-P1 수치는 종양의 크기 및 수와는 상관이 있으나 등급과는 상관이 없다고 하였고, 혈청 Laminin-P1 수치가 높은 경우 처음 치료 후 3개월째 재발률이 높았다.

2. Cathepsin D

종양의 침윤과 전이에는 cathepsin D와 같은 protease에 의한 세포외 기질의 파괴가 있어야 한다. Cathepsin D의 발현은 EGF와 연관을 가진다. 종양 변연에 있는 cathepsin D(+) macrophage like cell의 존재는 좋은 예후의 독립적인 인자로 입증되었다. 그러나 종양세포에 의한 cathepsin D의 발현이 종양의 병기와 등급과 비교할 때, 재발과 생존의 독립적인 예후인자는 아니라는 주장도 있고, cathepsin D 발현이 음성인 경우 무병 및 전체 생존율이 유의하게 낮다는 보고도 있다.

3. Urokinase-type plasminogen activator (u-PA)

u-PA는 plasmin을 활성화시키는 protease로서 세포외 기질을 분해하고 다른 protease를 활성화시킨다. 표재성암에서 u-PA의 발현을 측정할 결과 u-PA 상승은 병기, 등급, 다발성 여부, 크기와 비교하여 암의 침윤과 전이에 가장 중요한 위험인자라는 보고가 있다.

4. Matrix metalloproteinase (MMPs)

MMP는 세포외 기질이나 기저막을 분해하는 효소로 세포의 이동과 침윤을 자극하면서 암의 성장과 전이에 중요

한 역할을 한다. MMP는 tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)와 membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs)에 의해 조절된다.

방광암에서 MMP-1, 2, 9 등이 연구되어 MMP-2, 9 및 TIMP-2가 고등급, 고병기 및 재발에 관여함이 보고되고 있다. 조직내의 MMP-2, TIMP-2, MT1-MMP는 낮은 생존율과 연관된다는 보고가 있다. MMP와 TIMP에 의한 억제, 이 두 가지 사이의 조율은 암의 침윤과 전이에서 중요하게 작용한다. MMP-2, 9의 경우 방광암 환자의 소변에서 검출되며, 임상적 응용에도 연구되고 있다.

결 론

방광이행상피세포암은 서로 다른 전이 잠재능을 가지는 이형적인 세포군의 혼합물이다. 이행상피세포암은 일반적인 다단계 종양형성기전을 따르며 두가지의 분명히 다른 유전자 경로를 통해 진행된다는 점이 세포유전학적 및 항원학적 연구를 통해 밝혀지고 있다. 저등급 암에서는 CDKI의 비활성화, 고등급 암에서는 초기 p53에 의해 매개되는 변화가 관여한다. 이행상피세포암의 진행에는 유전자의 불안정성과 주로 p53, pRb, 여러 가지 성장인자에 관여하는 여러 유전자 변형의 축적과 연관이 있다. 침윤성암에서 전이능이 높은 것은 VEGF, laminin 결합의 증가 및 E-cadherin 소실과 연관이 있다. 그러나 이런 인자들 사이의 기능적 생물학적 관계는 아직 확실치 않다. 특히 침윤성암에서 연구가 필요하며 이런 연구들을 통해 환자 치료를 향상시킬 수 있을 것이다.

REFERENCES

1. Al-Sukhun S, Hussain M. Molecular biology of transitional cell carcinoma. Crit Rev Oncol Hematol 2003;47:181-93
2. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. Trends Genet 2000;16:168-74
3. Christensen M, Wolf H, Orntoft TF. Microsatellite alterations in urinary sediments from patients with cystitis and bladder cancer. Int J Cancer 2000;85:614-7
4. Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Dalbagni G, Drobnjak M, Charytonowicz E, Hu SX, et al. Cooperative effects of p53 and pRb alterations in primary superficial bladder tumors. Cancer Res 1997;57:1217-21
5. Fadl-Elmula I, Kytola S, Pan Y, Lui WO, Derienzo G, Forsberg L, et al. Characterization of chromosomal abnormalities in uroepithelial carcinomas by G-banding, spectral karyotyping and FISH analysis. Int J Cancer 2001;92:824-31
6. Falor WH, Ward-Skinner RM. The importance of marker chromosomes in superficial transitional cell carcinoma of the blad-

- der: 50 patients followed up to 17 years. *J Urol* 1988;139: 929-32
7. Hara I, Miyake H, Hara S, Arakawa S, Kamidono S. Significance of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinase expression in the recurrence of superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2001;165: 1769-72
 8. Jimenez RE, Hussain M, Bianco FJ, Vaishampayan U, Tabazcka P, Sakr WA, et al. Her-2/neu overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic significance and comparative analysis in primary and metastatic tumors. *Clin Cancer Res* 2001;7:2440-7
 9. Kamai T, Takagi K, Asami H, Ito Y, Oshima H, Yoshida KI. Decreasing of p27 (Kip1) and cyclin E protein levels is associated with progression from superficial into invasive bladder cancer. *Br J Cancer* 2001;84:1242-51
 10. Kyo S, Kunimi K, Uchibayashi T, Namiki M, Inoue M. Telomerase activity in human urothelial tumors. *Am J Clin Pathol* 1997;107:555-60
 11. Leonard CJ, Canman CE, Kastan MB. The role of p53 in cell-cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Important Adv Oncol* 1995:33-42
 12. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Harada K, Virmani AK, Zochbauer-Muller S, et al. Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res* 2001;61:8659-63
 13. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Harada K, Virmani AK, Zochbauer-Muller S, et al. Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res* 2001;61:8659-63
 14. Miyamoto H, Kubota Y, Noguchi S, Takase K, Matsuzaki J, Moriyama M, et al. C-ERBB-2 gene amplification as a prognostic marker in human bladder cancer. *Urology* 2000;55: 679-83
 15. Przybojewska B, Jagiello A, Jalmuzna P. H-RAS, K-RAS and N-RAS gene activation in human bladder cancers. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;121:73-7
 16. Richter J, Wagner U, Kononen J, Fijan A, Bruderer J, Schmid U, et al. High-throughput tissue microarray analysis of cyclin E gene amplification and overexpression in urinary bladder cancer. *Am J Pathol* 2000;157:787-94
 17. Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* 2001;20:3139-55
 18. Sardi I, Bartoletti R, Occhini I, Piazzini M, Travaglini F, Guazzelli R, et al. Microsatellite alterations in superficial and locally advanced transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncol Rep* 1999;6:901-5
 19. Sharp JD, Hausladen DA, Maher MG, Wheeler MA, Altieri DC, Weiss RM. Bladder cancer detection with urinary survivin, an inhibitor of apoptosis. *Front Biosci* 2002;7:e36-41
 20. Stein JP, Ginsberg DA, Grossfeld GD, Chatterjee SJ, Esrig D, Dickinson MG, et al. Effect of p21WAF1/CIP1 expression on tumor progression in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:1072-9
 21. Uchida T, Wang C, Wada C, Iwamura M, Egawa S, Koshiba K. Microsatellite instability in transitional cell carcinoma of the urinary tract and its relationship to clinicopathological variables and smoking. *Int J Cancer* 1996;69:142-5
 22. Wang L, Habuchi T, Takahashi T, Mitsumori K, Kamoto T, Kakehi Y, et al. Cyclin D1 gene polymorphism is associated with an increased risk of urinary bladder cancer. *Carcinogenesis* 2002;23:257-64