

산발성 대장암 조직에서의 hMSH2, hMLH1 단백질 발현

단국대학교 의과대학 외과학교실, ¹소화기연구센터

정재영·박동국·신지현¹

= Abstract =

Expression of hMSH2, hMLH1 Protein in Sporadic Colorectal Cancer and Corresponding Normal Tissue

Jae Young Jung, M.D., Dong Kook Park, M.D. and Ji Hyun Shin, M.D.¹

*Department of Surgery and ¹Research Center for Gastroenterology,
Dankook University College of Medicine*

Purpose: DNA mismatch repair gene is responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. But it is not well known its role in sporadic colorectal cancer patients. We analysed normal hMSH2, hMLH1 protein expression in colorectal adenocarcinoma tissues and corresponding normal tissues to find out the role of mismatch repair gene in sporadic colorectal cancer by Western blotting. **Methods:** Normal hMSH2 and hMLH1 protein expression was studied on 25 colorectal cancer and corresponding normal tissue by Western blot with hMSH2 and hMLH1 monoclonal antibody. Normal protein band was expressed on 100 kD in hMSH2 and 87 kD in hMLH1. SW480 and LoVo cell line was used as positive and negative control for hMSH2 and LoVo and SW480 as positive and negative for hMLH1. And we analysed the relation between the hMSH2, hMLH1 protein expression and clinicopathological parameters. **Results:** It was 2 cases (8%) that both hMSH2 and hMLH1 protein expression was not observed. Three cases (12%) were negative for hMSH2 and 2 cases (8%) for hMLH1. One or both hMSH2, hMLH1 protein expression was not observed in 7 cases (28%) in total. There was no correlation for proximal occurrence (25% vs 35%), young age (37.5% vs 23.5%) and lymph node metastasis (50% vs 47%). But poorly and mucinous differentiation was regarded as having relation with negative expression of hMSH2 and hMLH1 (50% vs 17.6%) but not significant statistically. **Conclusion:** Sporadic colorectal cancer with negative expression of normal hMSH2 and hMLH1 protein showed no relation to younger age, proximal site preference and lymph node metastasis. But it was suggested that mismatch repair gene protein was involved in cancer cell differentiation in sporadic colorectal cancer.

Key Words: hMSH2, hMLH1, Sporadic, Colorectal cancer, Mismatch repair gene

책임저자 : 박동국, 충남 천안시 안서동 산 28번지, 단국대학교 의과대학 외과학교실(우편번호: 330-714)
(Tel: 0417-55-3931, Fax: 0417-561-4372, E-mail: dkpark@anseo.dankook.ac.kr)

- * 이 논문은 1998년도 대한대장항문학회 추계학술대회에서 발표하였음.
- * 이 연구는 단국대학교 대학 연구 지원비의 지원으로 연구되었음.

서 론

대장암의 발생기전에는 몇 가지의 학설이 있지만 현재까지 가장 인정을 받는 것은 선종-암의 다단계의 암화 과정이다. 한 세포가 암으로 변형되기 위해서는 여러 유전자의 변이가 일어나야 하는데 암이 생기는 데는 3가지 종류의 유전자가 관여한다고 알려져 있다. 즉 1) 세포의 증식을 증가시키는 암 유전자, 2) 세포의 증식을 억제하는 종양 억제 유전자, 3) 세포 증식을 조절하는 유전자들의 돌연 변이율을 억제함으로써 간접적으로 세포 증식을 조절하는 DNA 부정합 보수 유전자(MMR)가 있다.

사람 체 세포의 돌연 변이율은 약 1.4×10^{-10} mutations/base pair/cell generation이다.¹ 한 개 혹은 몇 개의 세포에서 암이 발생한다고 생각하면 정상 세포의 돌연 변이율은 각 종양에서 약 2개 혹은 3개의 유전자 변이만을 일으킬 수 있고 보고된 것 같은 많은 유전자 변이를 일으킬 수 없다. 그래서 대부분의 종양에서의 많은 유전자 변이를 설명할 수 있는 고 변이 표현형(mutator phenotype)이라는 개념을 받아들여 암세포의 게놈이 불안정성이 있고 이 불안정성이 암세포가 몸의 조절 과정을 피할 수 있는 일련의 변이를 일으키게 할 수 있다는 가설을 이루게 되었다.²

이 고 변이 표현형에 DNA 부정합 보수 유전자가 관여하는 것으로 알려졌고 최근에 부정합 보수 유전자는 유전성 비 용종증 대장암(HNPCC)과 관계가 있는 것으로 밝혀졌으며 유전성 비 용종증 대장암은 상 염색체 우성으로 유전되고 최소한 4가지 중 하나 혹은 그 이상의 유전자의 변이에 의한 것으로 밝혀졌다. 사람의 부정합 보수 유전자의 전형인 MSH2는 세균의 mutS 유전자와 동일하며 이 유전자의 산물이 GTBP과 결합하여 이것이 DNA의 부정합 염기 쌍을 인식한다. 또 mutL 유전자 산물이 여기에 결합하여 부정합 손상 복구에 필요한 nuclease, polymerase, 다른 단백질들을 보급하게 한다. 그 외에 3가지의 mutL homo-

logue- hMLH1, hPMS1, hPMS2가 유전성 비 용종증 대장암과 관련이 있다.

부정합 보수 유전자의 결핍은 몸의 모든 재생되는 세포 군에 모두 관여할 것으로 예상할 수 있는데 실제로 유전성 비 용종증 대장암 환자에서 발생하는 대다수의 암은 다른 부위에도 소수로 생기는는 하지만 주로 대장과 자궁내막에 국한하여 생긴다. 아직 부위에 특이하게 작용하는 것에 대한 이유는 알려진 것이 적고 특히 유전성이 아니고 가족력이 없는 산발성 대장암에서 부정합 보수 유전자의 변이가 있을 때 암의 발생에 어떤 의미가 있고 암의 진행 및 전이 등과 어떤 상관관계가 있는지는 잘 알려져 있지 않다.

본 연구자들은 유전성의 증거가 없고 가족력이 없는 대장, 직장암 환자의 암 조직, 정상 조직에서의 부정합 보수 유전자중 가장 돌연변이 빈도가 높은 hMSH2와 hMLH1 정상 유전자 단백질을 western blot을 이용하여 검출하였고 암 조직에서의 정상 hMSH2, hMLH1 단백 검출 유, 무와 환자들의 병력, 병기, 병리학적 특징들과 비교하여 정상 hMSH2, hMLH1 단백 발현의 변화의 의미를 알고자 하였다.

재료 및 방법

1) Patients Selection and Histopathologic Analysis

1997년부터 1998년 3월까지의 본원에서 수술한 대장-직장암 환자중 산발성 대장, 직장암 환자가 연구에 포함되었으며 수술 후 즉시 암 조직에서 괴사 조직을 제거한 1 cm³ 정도의 암 조직과 암 조직에서 가장 멀리 떨어진 곳의 정상 점막을 각각 다른 냉동용 튜브에 넣어 즉시 질소 탱크에 넣어 보관하였다. 환자 수는 32명이었고 이중 2명은 복수에서 암세포를 채취하여 체외에서 배양 후 배양된 암세포를 이용하였고 1명은 전이된 난소에서 조직을 채취하였다. 7예는 정상 조직의 대조군이 없어 본 연구에서는 제외하고 25예에서 hMSH2, hMLH1 단백 발현을 분석하였다.

병리학적인 분석에서 세포 분화도의 결정은 선와의 형성에 기초를 두었으며 90% 이상의 암세포가 선와를 형성하였을 때를 고 분화암, 30~90%의 암세포가 선와를 형성하였을 때를 중간 분화암, 30% 이하의 암세포가 선와를 형성하였을 때를 저 분화암으로 분류하였다.

환자를 나이, 병기, 암 발생 부위, 암의 분화도 등 특히 DNA 부 정합 보수 유전자의 변이와 관련이 있다고 알려진 임상 병리학적 인자들을 중심으로 포함하여 분석하였다. 환자의 병기는 변형 Astler-Coller 병기 분류법을 사용하였다.

2) Western blot을 이용한 hMSH2의 검출

정상 hMSH2, hMLH1 단백질에 대한 항체로는 MSH2 단일 클론 항체(clone GB12, Oncogene Research Products), MLH1 단일 클론 항체(clone 14, Oncogene Research Products)를 사용했다. hMSH2 단백질은 western blotting시 100 kD에서 발현되며 양성 대조로는 SW480 세포주, 음성 대조로는 LoVo 세포주를 사용하였고 hMLH1 단백질은 87 kD에서 발현되며 양성 대조로는 LoVo 세포주를, 음성 대조로는 SW480을 사용하였다.

-70°C에서 보관된 환자의 조직을 얼음 하에서 녹인 후 homogenizing buffer (0.1 M sodium phosphate buffer, pH6.1, 1 mM EDTA, 1 mM dithio-

threitol, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM benzamidine)로 3번 세척하여 혈액이나 세포 외 조직을 제거하였다. 멸균된 가위를 이용하여 조직을 2~5 mm로 잘게 잘라서 homogenizing jar로 옮긴 후 4~5배 부피의 냉각된 homogenizing buffer를 넣고 homogenization하였고 바로 얼음 위에서 냉각한 후 4°C, 12,000 rpm에서 2분간 원심 분리하여 얻은 상등 액을 시료로 이용하였다.

위에서 얻은 시료를 Laemmli sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 0.01% bromophenol blue) 950 µl와 β-mercaptoethanol 50 µl를 혼합한 용액으로 1:2로 희석하여 SDS polyacrylamide gel electrophoresis을 실행하였다. SDS-PAGE를 실행하기 위한 겔의 조성은 Table 1과 같이 준비하였다.

단백질 크기의 표시 자로는 Prestained SDS-PAGE Standards (Bio-RAD, high range)를 사용하였다. 시료의 loading이 끝난 후 electrode (running) Buffer (1x=25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3)로 15 mA에서 20분, 30 mA에서 60분 동안 SDS-PAGE를 실행하였다. 전기영동 장치에서 겔을 분리하고 Towbin buffer (25 mM Tris, 192 M glycine, 20% methanol)에 acrylamide gel을 넣어 60분 동안 equilibration시켰다. Transfer시킬 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (Bio-

Table 1. Formulations for SDS-PAGE separating and stacking gels

Monomer concentration	Separating gel (.375M Tris, pH 8.8)	Stacking gel (.125M Tris, pH 6.8)
	10%	4%
Acrylamide/bis (40%)	2.5 ml	1 ml
Distilled water	4.85 ml	6.4 ml
1.5M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 ml	-
0.5M Tris-HCl, pH 6.8	-	2.5 ml
10% (w/v) SDS	100 µl	100 µl
10% ammonium persulfate (fresh)	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	10 µl
Total Monomer	10 ml	10 ml

RAD)과 filter paper도 Towbin buffer에 10분 정도 넣어 충분히 적셨다. Trans-Blot SD cell (Bio-RAD)의 아래 부분부터 filter paper, membrane, equilibrated gel, filter paper의 순으로 올려놓고 15V에서 15분 동안 단백질을 PVDF membrane으로 transfer시

켰다.

Transfer가 끝난 membrane은 TBS (20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 7.5)에 충분히 적시고 blocking solution (3% gelatin-TBS)으로 실온에서 orbital shaker를 이용하여 1시간 동안 blocking하였다. Block-

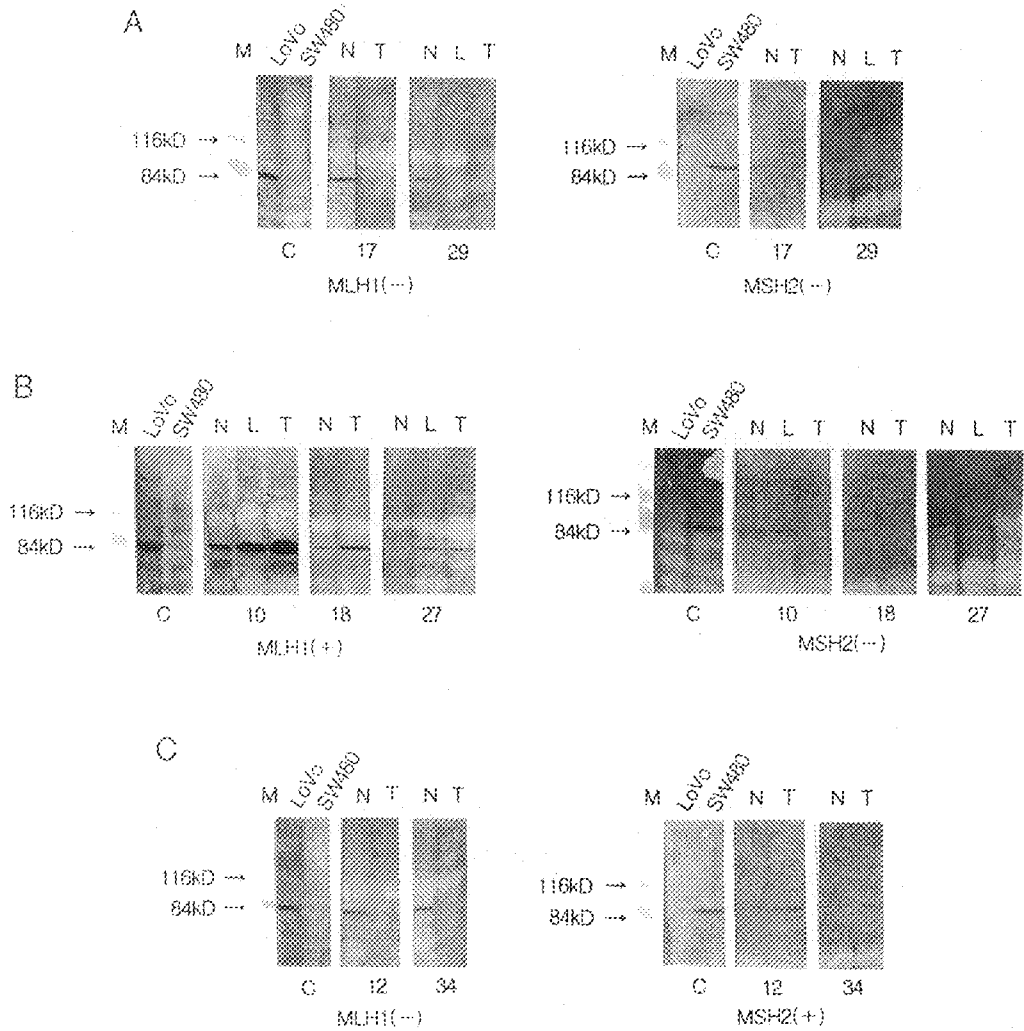


Fig. 1. A. Representative western blot analysis of *hMLH1* and *hMSH2* protein. Negative *hMLH1* and *hMSH2* protein expression are demonstrated in tumor tissue compared to corresponding normal tissue. M: Marker, C: control cell lines, N: normal tissue, L: lymph node, T: tumor tissue.
 B. Positive *hMLH1* and negative *hMSH2* protein expression are demonstrated in tumor tissue compared to corresponding normal tissue.
 C. Negative *hMLH1* and positive *hMSH2* protein expression are demonstrated in tumor tissue compared to corresponding normal tissue.

ing 용액을 제거하고 TTBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5)로 실온에서 천천히 교반하면서 10분 동안 막을 세척하였다. TTBS를 제거하고 일차 항체로 hMSH2와 hMLH1 단일클론 항체를 antibody buffer (1% gelatin-TTBS)에 1 µg/ml이 되도록 희석하여 발색 반응을 시켰다. 단백질과 반응하지 않은 일차 항체는 TTBS로 5분 동안 2회 세척하여 제거하였다. TTBS를 제거하고 이차 항체로 alkaline phosphatase anti-mouse IgG (Vector Laboratories)를 1/1000로 희석하여 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 이차 항체를 제거하고 막을 TTBS로 5분 동안 2회 세척하고 마지막으로 TBS로 5분 동안 실온에서 세척하여 막의 표면에 남아 있는 Tween-20을 제거하였다.

Alkaline phosphatase blot을 실행하기 위하여 Alkaline Phosphate Conjugate Substrate Kit (Bio-RAD)을 이용하였다. AP color reagent A 1 ml과 AP color reagent B 1 ml을 100 ml의 1x AP color development buffer에 넣은 후 발색시켜서 purple bands를 확인하였다.

3) 통계

통계 처리는 발생 연령, 발생 부위, 분화도는 Fisher's Exact Test를 이용하여 분석하였으며 입과 절 건이여부는 Chi-square test로 분석하였고 two-sided P value가 0.05 이하를 의미 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1) 대장암 조직과 정상 조직에서의 hMSH2와 hMLH1 단백질 표현

SDS-PAGE 전기 영동시 hMSH2는 100 kD에서, hMLH1은 87 kD에서 정상 조직에서는 밴드를 확인하였으나 암 조직에서는 밴드가 보이지 않는 경우(Fig. 1. A, B, C)를 단백질 표현 음성으로, 정상 조직과 암 조직에서 단백질 양에는 변화가 있지만 100 kD과 87 kD에서 모두 표현이 되는 경우(Fig. 2)를 단백질 표현이 정상인 경우로 판정하였다.

암 조직에서 정상 hMSH2, hMLH1 단백질 발현이 모두 없었던 경우가 2예(8%), hMSH2 단백질 발현만 없는 경우가 3예(12%), hMLH1 단백질 발현만 없는 경우가 2예(8%)로 두 가지중 한 가지 이상의 단백질 발현이 없었던 경우가 7예(28%)였고 나머지 18예에서는 암조직에서도 정상 조직에서와 마찬가지로 hMSH2, hMLH1 단백질 발현이 정상이었다 (Table 2, 3).

2) 정상 hMSH2 단백질 발현과 임상 병리학적 요소와의 관계

유전성 비용종증 대장암 환자의 특징적인 임상, 병리적 요인으로 알려진 젊은 나이, 근위부 대장에서의 암 발생, 미분화암과 점액성 암의 빈도 등을 hMSH2 단백질 발현의 정도와 비교하였다.

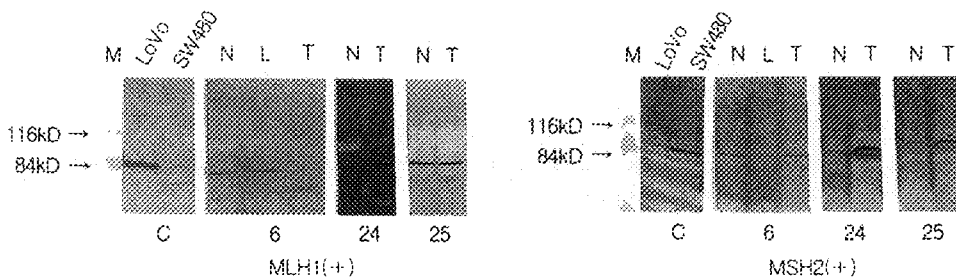


Fig. 2. Representative western blot analysis of hMLH1 and hMSH2 protein. Positive hMLH1 and hMSH2 protein expression are demonstrated in tumor tissue compared to corresponding normal tissue. M: marker, C: control cell lines, N: normal tissue, L: lymph node, T: tumor tissue.

Table 2. Clinicopathologic features of the patients with negative expression of hMSH2 or/and hMLH1 protein in tumor tissue compared to corresponding normal tissue

Case No.	Age	Sex	Tumor				hMSH2	hMLH1
			Site	Stage	Diff	L/N metastasis		
17	40	M	R	C2	W/D	1/10	-	-
29	57	M	S	C2	P/D	3/18	-	-
10	43	M	C	C2	P/D	13/53	-	+
18	49	M	A	C2	M/D	1/14	-	+
27	69	M	R	B2	Mucinous	0/30	-	+
12	58	M	R	B2	W/D	0/28	+	-
34	56	M	S	B1	P/D	0/1	+	-

C: Cecum, R: Rectum, A: Ascending colon, S: Sigmoid colon, W/D: Well differentiated, M/D: Moderate differentiated, P/D: Poorly differentiated

Table 3. Clinicopathologic features of the patients with normal expression of hMSH2 and hMLH1 protein in tumor tissue compared to corresponding normal tissue

Case No.	Age	Sex	Tumor				hMSH2	hMLH1
			Site	Stage	Diff	L/N metastasis		
1	59	M	R	B2	W/D	0/19	+	+
2	63	F	R	B1	W/D	0/10	+	+
3	38	M	R	B2	W/D	0/16	+	+
4	55	F	A	C2	M/D	6/17	+	+
5	47	M	A	C2	P/D	2/43	+	+
6	50	M	T	B1	W/D	0/25	+	+
7	54	F	A	B2	W/D	0/16	+	+
8	45	F	D	C2	W/D	1/34	+	+
9	56	M	R	C2	W/D	3/7	+	+
11	50	F	A	C2	M/D	6/48	+	+
23	67	M	R	C1	W/D	1/18	+	+
24	51	M	R	C2	M/D	9/24	+	+
25	38	F	R	B2	M/D	0/8	+	+
26	83	F	C	B2	P/D	0/22	+	+
31	65	M	R	C2	W/D	3/29	+	+
32	65	M	R	C2	P/D	13/17	+	+
33	58	M	R	A	M/D	0/7	+	+
35	70	M	R	B1	W/D	0/6	+	+

T; Transverse colon, D; Descending colon, R; Rectum, C: Cecum, A; Ascending colon, W/D: Well differentiated, M/D: Moderate differentiated, P/D: Poorly differentiated

환자의 나이는 50세를 기준으로 나누었고 암의 발생 부위는 비장 굴곡부를 중심으로 그 상부를 근위부로, 하부를 원위부로 나누었으며 세포의 분

화도는 미분화암 및 점액성 암과 고분화 및 중간 분화암과 나누어 비교하였다.

hMSH2와 hMLH1 두 가지중 한 가지 이상의 단

Table 4. Relation between hMHS2 and hMLH1 protein expression in tumor tissue and clinicopathological factors

	Negative expression	Normal expression	p value
Age			
> 50	3	4	p=0.3554
< 50	4	14	
Site			
Proximal	2	6	p=1.0
Distal	5	12	
Differentiation			
Well & mod	3	15	p=0.0664
Poorly & mucinous	4	3	
L/N metastasis			
0	3	9	p=0.7519
1~3	3	5	
< 4	1	4	

백 발현이 없는 경우에 근위부 발생(25% vs 35%, p=1.00), 젊은 발생 연령(37.5% vs 23.5%, p=0.3554), 임파절 전이 개수(50% vs 47%, p=0.7519), 병기등에 따른 차이는 없었다. 그러나 저분화 암 및 점액성 암의 빈도는 hMHS2와 hMLH1의 정상 단백질 발현이 없는 경우에서 통계학적으로 의미가 없게 나왔지만 높게 나타나는 경향을 보였다(50% vs 17.6%, p=0.0664)(Table 4).

고 찰

대장암의 발생기전에는 몇 가지의 학설이 있지만 현재까지 가장 인정을 받는 것은 선종-암의 다단계의 암화 과정이다. 한 세포가 암으로 변하기 위해서는 여러 유전자의 변이가 일어나야 하는데 여기에는 최소한 3가지 종류의 유전자가 관여한다고 생각한다. 즉 1) 세포의 증식을 증가시키는 암 유전자, 2) 세포의 증식을 억제하는 종양 억제 유전자, 3) 세포 증식을 조절하는 유전자들의 변이를 억제함으로써 간접적으로 세포 증식을 조절하는 DNA 부정합 보수 유전자가 있다.

현재까지 유전체의 1만 부위 정도에서 단순

반복 서열 부위가 발견되었으며 아마 전 유전체의 약 10%정도를 차지할 것으로 생각하고 있다. 이 반복 서열은 전사되어 단백질로 발현되지 않기 때문에 이 곳에서 발견되는 변이가 암 발생에 중요한 역할을 할 것으로는 생각되지 않았다. 이 반복 서열의 특징은 DNA 사슬의 미끄럼(DNA slippage)이 자주 일어나며 일부분에서 형성된 부정합 사슬 (mismatch strand)만 부정합 보수체계에 의하여 원래대로 교정된다. 그러나 이 유전자 보수체계에 이상이 생기면 미끄러진 염기쌍의 사슬이 그대로 복제된다. 그래서 반복서열의 불안정성은 암세포가 부정합 보수 기능을 상실함으로써 나타나는 고 변이 표현형이라고 할 수 있다.

사람 체 세포의 변이율은 약 1.4×10^{-10} mutations/base pair/cell generation이다. 한 개 혹은 몇 개의 세포에서 암이 발생한다고 생각하면 정상 세포의 변이율은 각 종양에서 약 2개 혹은 3개의 유전자 변이만을 일으킬 수 있고 보고된 것 같은 많은 유전자 변이를 일으킬 수 없다. 그래서 대부분의 종양에서의 많은 유전자 변이를 설명할 수 있는 mutation-driven clonal repopulation에 근거를 두는 고 변이 표현형이라는 개념을 받아들여 암세포의 게놈이 불안정성이 있고 이 불안정성이 암세포가 몸의 조절 과정을 피할 수 있는 일련의 변이를 일으키게 할 수 있다는 가설을 이루게 되었다.

최근에 DNA 부정합 보수 유전자는 유전성 비용종증 대장암과 관계가 있는 것으로 밝혀졌으며 유전성 비용종증 대장암은 AD로 유전되고 1) 가족 중에 최소한 3명 이상의 병리조직학적으로 확인된 대장암 환자가 있어야 하며 그들 중 한 명이 다른 두 명에 대하여 1대로 연관되어야 하고, 2) 최소한 2세대 이상에 환자가 분포되어야 하며, 3) 그들 중 한 명 이상이 50세 이전에 대장암이 발병하여야 한다는 기준이 있다.³ 이 유전성 비용종증 대장암의 원인은 최소한 hMHS2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 등 4가지 중 하나 혹은 그 이상의 유전자의 변이에 의한 것으로 밝혀졌다. 사람의 DNA 부정합 보수 유전자의 전형인 MSH2는 세균의 mutS

gene과 동일하며 이 유전자의 산물이 두 번째의 mutS homologue인 GTBP과 결합하여 이것이 DNA의 mismatched base pair를 인식한다. 또 mutL gene 산물이 mutS 산물과 반응하여 손상 복구에 필요한 nuclease, polymerase, 다른 단백들을 보급한다. 3가지의 mutL homologue- hMLH1, hPMS1, hPMS2가 유전성 비 용종증과 관련이 있다. Mismatch repair 유전자 기능의 기전이 아직은 완전하게 밝혀지지 않았지만 DNA 복제 과정 중 복제 착오가 일어나면 hMSH2 단백질이 잘못된 DNA염기 서열에 GTBP (G-T mismatch binding protein, hMSH6)와 함께 heterodimer로써 (hMutS- α complex)와 결합하고 이어 hMLH1과 hPMS2가 (hMutL- α complex) hMSH2-GTBP에 결합하여 heteroduplex complex를 이룬다. hMutS- α complex와 hMutL- α complex가 결합한 후 nick이 일어난 부위에서 mismatch가 일어난 부위까지 DNA 가닥이 제거되면 DNA polymerase가 올바른 염기서열로 제거된 부위를 채우고 마지막으로 DNA ligase가 새롭게 합성된 가닥을 이어 mismatch된 부위를 복구하게 된다. 한 염기의 치환은 hMSH2-hMSH6 complex를, 한 염기의 삽입이나 결손을 복구하기 위해서는 hMSH2-hMSH6 complex 혹은 hMSH2-hMSH3 complex를 이용하며, 보다 많은 염기의 삽입이나 결손에는 hMSH2-hMSH3 complex를 이용하는 것으로 알려졌다. 이들중 어느 하나라도 잘못되면 mismatch repair기능을 소실하게 된다.

위나 소장 혹은 대장에서 hMSH2 단백질의 반응은 점막 상피 선와의 아래 반 정도에서만 국한되어 나타난다. 또한 hMSH2는 여러 가지의 정상 조직에서 특히 분열이 왕성한 부위에 국한되어 단백질 발현되었으며 양성종양 조직이나 mismatch-repair가 결손이 없는 암 조직에서는 hMSH2 단백질 발현이 있었으나 germline hMSH2 mutation이 있는 대장암 조직에서는 단백질 발현이 없었다.⁴

MMR 결핍이 있으면 몸의 모든 재생되는 세포 군에 모두 관여할 것으로 예상할 수 있는데 실제로 유전성 비용종증 대장암 환자에서 발생하는 대다수의 암은 다른 부위에 소수로 생기는 하

지만 주로 대장과 자궁내막에 국한하여 생긴다. 아직 이런 이유에 대하여 알려진 것이 적고 또한 유전성이 아니고 가족력이 없는 산발성 대장암에서 MMR의 변이가 어떤 의미가 있고 대장암의 병기 및 암의 진행과 상관관계가 잘 알려져 있지 않다.

산발성 대장암에서의 약 10~16%정도의 DNA replication error (RER)가 있다.^{5,6} 하며 여러 보고마다 빈도는 다르지만 일반적으로 유전성 비용종증 대장암 환자에서 hMSH2가 60%정도, hMLH1이 30% 정도를 차지한다고 하였다.⁷ 그러나 부수체 불안정성이 있는 산발성 대장암에서는 hMSH2보다 hMLH1의 변이가 더 많았다는 보고도 있다.⁸ 또한 한국에서의 유전성 비용종증 대장암 환자에서 hMLH1 유전자의 배선 돌연변이는 약 32%에서 발견되었지만 hMSH2 유전자 돌연 변이는 발견할 수 없었으며 유전성 대장암을 강하게 의심할 수 있는 환자 군에서는 약 23%의 hMLH1 (16%), hMSH2 (7%)의 배선 돌연변이를 발견하였다고 하였다. 그러나 유전성의 소인이 없고 단지 40세 이전에 대장암이 발병한 환자 군에서는 hMSH2의 배선돌연변이만 2%에서 발견되어⁹ 한국에서의 유전성 비용종증 대장암의 발생에는 hMSH2보다는 hMLH1 유전자의 이상이 더욱 중요할 것으로 생각된다.

산발성 대장암에서 RER양성인 환자의 임상적, 병리학적 특징은 RER음성인 환자와는 차이점이 많다. 즉 RER양성인 환자들은 비교적 젊은 나이에, 근위부에 발생하였으며 돌출하여 자라고, 크기가 크고, 세포 외로 많은 점액질을 생산하는 특징을 보였고 Crohn's 병과 같은 양상의 입파구 반응, p53 유전자의 과 발현 등의 경향을 보인다고 하였다.¹⁰ 본 연구에서는 microsatellite 불안정성을 검출한 것은 아니지만 다른 연구 보고에서 microsatellite instability가 없는 종양은 모두 정상 hMSH2, hMLH1 단백질의 발현을 보인 데 비해 microsatellite instability 양성인 종양은 93% 이상의 경우에서 western blotting으로 정상 hMSH2 단백질이 검출되지 않던지 감소하는 양상을 보여¹¹ 본 실험의 western blotting에서도 정상 hMSH2, hMLH1 단

백이 발현되지 않은 경우에 microsatellite instability 양성인 환자와 비슷한 임상적, 병리학적 특징을 보일 것으로 기대하였다.

본 연구에서 비록 숫자가 적지만 정상 hMSH2, hMLH1 단백질의 발현이 없는 군과 발현이 정상인 군과 50세 이하에서의 암 발생, 근위부 암 발생, 임파절 전이 개수, 환자의 병기 및 암의 분화도 등과 상관관계가 없는 것으로 나타났으나 다만 암의 분화도에서 미분화암 및 점액성 암의 빈도가 hMSH2, hMLH1 단백질 발현이 없는 경우에 단백질 발현이 정상인 경우보다 증가하는 경향을 보여 산발성 대장암에서는 hMSH2나 hMLH1 단백질 발현이 유전성 비용종증 대장암의 임상, 병리학적 특징들과 관련이 없는 것을 것으로 예상하며 다만 암세포의 분화도에 관련이 있지 않을까 추측할 수 있다. DNA 부정합 보수 유전자와 암세포의 분화와의 관계에 대한 추가 연구가 진행되어야 할 것이다.

결 론

유전적 소인이 없고 대장암의 가족력이 없는 산발성 대장암 환자에서 암조직과 주위의 정상 점막 조직에서의 DNA mismatch 유전자인 hMSH2, hMLH1 단백질의 발현을 western blot 방법으로 검출하고 발현 정도와 환자들의 임상, 병리학적 요인들과 비교한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 암 조직에서 정상 hMSH2, hMLH1 단백질 발현이 모두 없었던 경우가 2예(8%), hMSH2 단백질 발현만 없는 경우가 3예(12%), hMLH1 단백질 발현만 없는 경우가 2예(8%)로 두 가지중 한 가지 이상의 단백질 발현이 없었던 경우가 7예(28%)였다.

2) hMSH2와 hMLH1 두 가지중 한 가지 이상의 단백질 발현이 없는 경우에 근위부 발생(25% vs 35%, p=1.0), 젊은 발생 연령(37.5% vs 23.5%, p=0.3554), 임파절 전이 개수(50% vs 47%, p=7519), 병기 등에 따른 차이는 없었다.

3) hMSH2와 hMLH1 두 가지중 한 가지 이상의 단백질 발현이 없는 경우에 저분화 암 및 점액성 암

의 빈도는 hMSH2와 hMLH1의 정상 단백질 발현이 있는 경우보다 통계학적으로 유의하지는 않지만 높게 나타나는 경향을 보였다(50% vs 17.6%, p=0.0664).

결론적으로 유전성 소인이 없는 산발성 대장암에서 hMSH2와 hMLH1 정상 단백질 발현과 DNA mismatch repair 유전자의 변이에 의해 발생하는 유전성 비용종증 대장암의 특성과는 연관 관계가 없으며 단지 저분화 암 및 점액성 암의 빈도만 hMSH2와 hMLH1의 정상 단백질 발현이 없는 경우에 통계학적으로 유의하지는 않지만 높게 나타나는 경향을 보여 hMSH2와 hMLH1 단백질 변이가 산발성 대장암의 세포 분화에 관여하지 않을까 생각한다.

REFERENCES

1. Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 1991; 51: 3075-3079.
2. Loeb LA. Microsatellite instability: Marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 5059-5063.
3. Vasen HFA, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The international collaborative group on hereditary non-polyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 424-425.
4. Leach FS, Polyak K, Burrell M, Johnson KA, Hill D, Dunlop MC, et al. Expression of the human mismatch repair gene hMSH2 in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 1996; 56: 235-240.
5. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363: 558-561.
6. Aaltonen LA, Peltomaki P, Mecklin JP, Jarvinen H, Jass JR, Green JS, et al. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1994; 54: 1645-1648.
7. Nystrom-Lahti M, Parsons R, Sistonen P, Pylkkanen L, Aaltonen LA, Leach FS, et al. Mismatch repair genes on chromosomes 2p and 3p account for a major share of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families evaluable by linkage. *Am J Hum Genet* 1994;

- 55: 659-665.
8. Herfarth KF, Kodner IJ, Whelan AJ, Ivanovich JL, Bracamontes JR, Wells S, et al. Mutations in MLH1 are more frequent than in MSH2 in sporadic colorectal cancer with microsatellite instability. *Genes Chrom Cancer* 1997; 18: 42-49.
 9. Yuan Y, Han HJ, Zheng S, Park JG. Germline mutations of hMLH1 and hMSH2 genes in patients with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic early-onset colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1998; 41: 434-440.
 10. Kim HJ, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1994; 145: 148-156.
 11. Kim HJ, Piao Z, Kim JW, Choi JS, Kim NK, Lee JM, et al. Expression of hmSH2 and hMLH1 in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Pathol Res Pract* 1998; 194: 3-9.
-