

## 대장암의 발육 양상에 따른 임상병리학적 특성 및 종양억제 단백질 발현양상의 비교

국립의료원 일반외과 및 <sup>1</sup>해부병리과

곽관수 · 팽성숙<sup>1</sup> · 장희진<sup>1</sup> · 박세혁 · 최경우

= Abstract =

### Comparative Analysis of Clinicopathologic Features and Tumor Suppressor Genes Expression According to Growth Patterns in Colorectal Carcinomas

Gwan Soo Kwak, M.D., Sung Suk Paeng, M.D.<sup>1</sup>, Hee Jin Chang, M.D.<sup>1</sup>  
Sei Hyuk Park, M.D. and Kyong Woo Choi, M.D.

*Departments of General Surgery and <sup>1</sup>Pathology, National Medical Center, Seoul, Korea*

**Purpose:** Growth patterns of colorectal carcinomas can be divided into polypoid growth (PG) and nonpolypoid growth (NPG). This study was intended to find characteristic clinicopathologic features and the expression status of p53, p21, and p16 with relation to growth patterns in colorectal carcinomas. **Methods:** Sixty-one surgically resected colorectal carcinomas including 43 PG and 18 NPG carcinomas were reviewed in this study. Immunohistochemical stains for p53, p21, and p16 were done, and the results were analyzed with respect to growth patterns, and other prognostic parameters. **Results:** PG carcinomas were significantly correlated with adenoma ( $p=0.0001$ ), and with favorable histology group ( $p=0.04$ ). On the contrary, NPG carcinomas were significantly correlated with unfavorable histology group ( $p=0.04$ ). In NPG carcinomas, the frequency of positive expression of p53 was higher and the expression of p16 was lower than that of PG carcinomas. But there was no statistical significance ( $p=0.150$ ,  $0.210$  respectively). The expression of p21 has no difference between NPG and PG carcinomas ( $p=0.953$ ). **Conclusions:** As a result, it can be thought that the tendency of higher expression of p53 and lower expression of p16 in NPG carcinomas than in PG carcinomas may suggest more aggressive biologic behavior of NPG carcinomas.

---

**Key Words:** Colorectal cancer, Polypoid and nonpolypoid growth

## 서 론

1989년 Shimoda등<sup>1</sup>은 대장암을 형태학적으로 암의 축연이 정상 점막에 의해 덮이지 않는 용종성 발육형(polypoid growth, 이하 PG로 명함)과 정상 점막에 의해 덮히는 비용종성 발육형(nonpolypoid growth, 이하 NPG로 명함)의 두 가지 형태로 분류하였고 각각의 종양 발생기전도 PG암은 대부분이 선종-암종 연속성의 발생과정을 거치는 반면 NPG암은 선종의 동반이 적다고 하였다. 또, 최근들어 Yamagata등,<sup>2</sup> Wada등<sup>3</sup>도 용종형 암과 비용종형 암의 발생 기전이 다르다는 연구결과를 보고하였다. 즉, 종양 발생 기전의 차이가 형태학적 차이로 나타날 수 있다는 것이다.

한편, 대장암의 발암과정에 관련된 유전인자와 각각 인자들의 상호관계는 많이 밝혀져 있다. 세포주기의 활성화에 관여하는 세포주기관련 단백질, 특히 G<sub>1</sub>-S 이행기에 관여하는 세포주기관련 단백질은 정상세포의 암화과정에서 매우 중요한 역할을 한다. 대표적인 세포주기관련 단백질로는 cyclin, cdk (cyclin-dependent kinase), cdk억제인자

(cdk inhibitor) 등이 있고, 세포주기 관련 종양억제 유전자로는 p53, p21, p16단백 등이 있다. 저자들은 이 연구에서 PG 대장암과 NPG 대장암의 임상 병리학적 특징 및 p53, p21, p16단백 발현양상을 조사하여 대장암의 발육형태에 따른 임상상 및 발암기전의 차이를 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

1979년부터 1997년까지 국립의료원 일반외과에서 수술치험한 대장암 환자 중 면역조직화학염색이 가능한 61예를 무작위로 추출하여, 입원 및 외래 의무기록지, 병리조직검사 결과지들을 후향적으로 조사하여 종양의 위치와 크기, 분화도, 침윤 정도, 림프관 침습 여부, 혈관 침습 여부, 림프절전이 유무 및 선종의 존재 유무 등의 임상병리학적 특징들을 조사하였다. 이 때, 종양의 위치는 맹장, 상행결장 및 횡행결장 부위에서 발생한 경우를 우측암으로, 하행결장, S자형결장 및 직장에서 발생한 경우를 좌측암으로 단순하게 분류하였으며, 분화도는 고분화도군과 중·저분화도군으로 나누었으며, 종양의 장벽 침윤도는 점막 및 점



Fig. 1. Non-polypoid growth (NPG) pattern of colon cancer. The lateral surface of the protruded lesion is covered by normal mucosa.

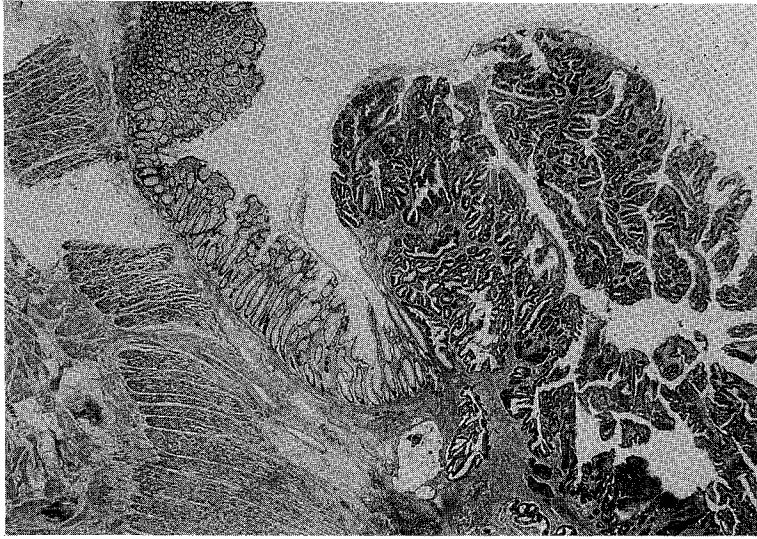


Fig. 2. Polyoid growth (PG) pattern of colon cancer. The lateral surface of the protruded lesion is covered by tumor cells.

막하층 근층, 장막하층 및 장막층으로 구분하였다.

보관되어 있는 염색표본을 판독하여 점막층에서 돌출형 성장을 보이면서 돌출부의 측면이 정상 점막으로 덮이지 않고 종양으로 대체되어 있는 형태를 PG암, 점막층내 돌출형 형태를 보이지 않으면서 종괴의 측면을 정상 점막이 둘러싸고 있는 형태를 NPG암으로 각각 분류하였다(Fig. 1, 2).

p53, p21 및 p16단백들의 발현 양상은 조직 보존상태가 양호하면서 기존의 헤마톡실린-에오신 염색표본과 대조하여 병소부위를 대표할 수 있는 포르말린 고정 파라핀 포매조직을 박절하여 슬라이드에 부착시킨 후 항온기에서 67°C에서 한시간 가온하고 통상의 방법으로 탈파라핀한 뒤 각각 다른 농도의 알콜로 함수한 후에 증류수로 수세하였다. 내인성 과산화효소의 활성을 억제시키기 위해 3% 과산화수소를 사용하여 10분간 처리한 후 Tris 완충액으로 씻고, 차단항체를 실온에서 10분간 반응시킨 뒤 일차항체를 실온에서 한 시간 반응시켰다. 일차항체로는 p53DO-7 (mouse monoclonal, Biogenex, 1 : 50), p21 (Zymed, 1 : 50), p16 (Zymed, 1 : 50)에 대한 단클론 항체를 사용하였다. 다시 Tris 완충용액으로 수세하고 biotin이

결합된 2차 항체를 가하여 실온에서 40분동안 반응시킨 후, Tris 완충용액으로 수세하였다. 그 후 peroxidase가 결합된 streptavidin 용액을 가하여 20분간 반응시키고 Tris 완충액으로 수세하고 AEC (3-amino-9-ethylcarbazole)로 발색하였다. Hematoxylin으로 대조염색하고 알코올로 탈수한 후 봉입하였다.

결과의 판정은 p53, p21, p16단백 모두 병소 종양세포의 5% 이상에서 핵에 파립상의 갈색 염색반응이 분명한 경우를 양성으로 판정하였고, 5% 미만인 경우는 음성으로 판정하였다(Fig. 3-a, b, c).

각종 조사자료는 Excel (Microsoft Corporation, 1997) 프로그램에 입력하여 기본자료파일로 이용하였다. 발육 형태별로 임상병리학적 특징들과 p53, p21 및 p16단백들의 발현양상의 차이는 Windows 용 SPSS (Release 7.51, SPSS Inc)를 이용하여 Chi-square test로 분석하였으며, p값이 0.05 미만인 경우 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

### 1) 임상병리학적 소견

총 61예의 대장암 중 PG암과 NPG암은 각각 43

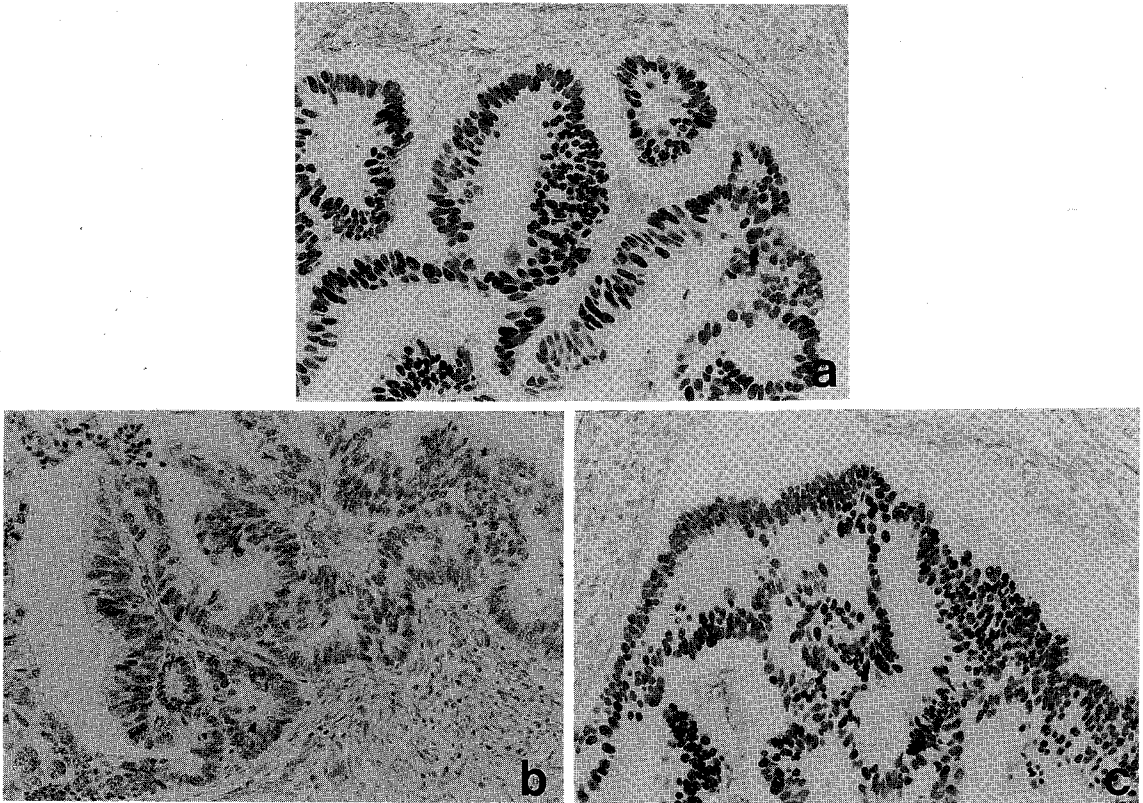


Fig. 3. a. Immunohistochemical stain for p53 showing nuclear staining ( $\times 200$ ), b. Immunohistochemical stain for p16 showing nuclear staining ( $\times 200$ ), c. Immunohistochemical stain for p21 showing nuclear staining ( $\times 200$ ).

예(70%), 18예(30%)였고, 종양의 위치를 좌, 우측으로 구분하였을 때, PG암에서는 각각 35예(81%), 8예(19%)였고, NPG암에서는 각각 16(89%), 2예(11%)였다.

종양의 평균 크기는 PG암에서 4.36 cm (range: 1~10 cm)였고, NPG암이 4.13 cm (range: 1.5~10 cm)로 유의한 차이는 없었다.

PG암에서 선종이 24예(56%)에서 동반되었고, NPG암에서는 1예(5.6%)에서만 동반되었고 이는 통계학적으로 유의한 차이를 보였다( $p < 0.05$ ).

종양의 분화도를 고분화군과 중저분화군으로 나누었을 때, PG암에서는 고분화군이 33예(77%), 중저분화군이 10예(23%)였고, NPG암의 경우는 각각 9예(50%), 9예(50%)로서, PG암의 분화도가 훨씬 좋았고 통계학적으로도 유의한 차이를 보였다

( $P < 0.05$ ).

종양의 침윤도에 따라 점막층 또는 점막하층까지 침윤한 암과 근층이상을 침윤한 암으로 나누었을 때, PG암은 점막 또는 점막하층까지 침윤한 예가 8예(19%), 근층이상을 침윤한 예가 35예(81%)였고, 근층이상을 침윤한 예가 많았지만 NPG암에서도 각각 2예(11%), 16예(89%)로 두 군간에 유의한 차이는 없었다.

림프관 침습이 있었던 예는 PG암이 28예(65%), NPG암이 14예(78%)였고, 혈관침습이 있었던 예는 PG암이 1예(2%), NPG암이 2예(11%)로 NPG암에서 림프, 혈관침습이 많았으나 유의한 차이는 없었으며, 림프절 전이는 PG암에서 8예(19%), NPG암에서 4예(22%)로 차이는 없었다(Table 1).

**Table 1.** Clinicopathologic features of PG and NPG colorectal cancers

	PG (n=43)	NPG (n=18)	P value
Location			
Right	8 (19%)	2 (11%)	0.708
Left	35 (81%)	16 (89%)	
Tumor size			
> 4 cm	22 (52%)	11 (58%)	0.642
< 4 cm	20 (48%)	8 (42%)	
Differentiation			
Well	33 (77%)	9 (50%)	0.040
Moderately/poor	10 (23%)	9 (50%)	
Depth of Invasion			
m/sm	8 (19%)	2 (11%)	0.708
pm/ss/se	35 (81%)	16 (89%)	
Adenoma			
Yes	24 (56%)	1 (5.6%)	0.0001
No	19 (44%)	17 (94.4%)	
Lymphatic invasion			
Yes	28 (65%)	14 (78%)	0.381
No	15 (35%)	4 (22%)	
LN metastasis			
Yes	8 (19%)	4 (22%)	0.736
No	35 (81%)	14 (78%)	
Angioinvasion			
Yes	1 (2%)	2 (11%)	0.205
No	42 (98%)	16 (89%)	
Metastasis			
Yes	0 (0%)	1 (6%)	0.295
No	43 (100%)	17 (94%)	

**2) 발육형태에 따른 p53, p21 및 p16단백의 발현양상**

p53단백의 양성발현율은 PG암이 53%(43예중 24예), NPG암이 78%(18예중 14예)로서 NPG암의 발현율이 높게 나왔으며, p21단백의 양성발현율은 PG암이 67%(43예중 29예), NPG암이 67%(18예중 12예)로서 서로간의 차이는 없었으며, p16단백은 PG암에서 72%(43예중 31예)였고, NPG암에서는 56%(18예중 10예)에서 양성발현을 보여 PG암에서 더 많이 발현되었으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(Table 2).

**Table 2.** Expression status of p53, p21 and p16 according to the growth patterns

	PG (n=43)	NPG (n=18)	P value
p53			
Positive	24 (56%)	14 (78%)	0.150
Negative	19 (44%)	4 (22%)	
p21			
Positive	29 (67%)	12 (67%)	0.953
Negative	14 (33%)	6 (33%)	
p16			
Positive	31 (72%)	10 (56%)	0.210
Negative	12 (28%)	8 (44%)	

**3) PG암과 NPG암에서 분화도에 따른 p53, p21 및 p16단백의 발현양상**

PG암과 NPG암에서 분화도에 따른 p53 단백질의 발현양상을 보면, 고분화군의 PG암에서 p53단백의 양성발현율은 54.5%(33예중 18예), NPG암에서는 77.7%(9예중 7예)였고, 중저분화군에서는 각각 60%(10예중 6예), 77.7%(9예중 7예)였으며, p21단백의 발현양상은 고분화군의 PG암에서 p21단백의 양성발현율은 66.7%(33예중 22예)였고, NPG암에서는 44.4%(9예중 4예)였으며, 중저분화군에서는 각각 70%(10예중 7예), 88.8%(9예중 8예)였고, 한편 p16단백의 발현양상은 고분화군의 PG암에서 69.7%(33예중 23예), NPG암에서는 66.7%(9예중 6예)였으며, 중저분화군에서는 각각 80%(10예중 8예), 44.4%(9예중 4예)였지만 통계학적으로 유의한 차이는 없었다.

**고찰**

대장암의 발생 기전과 연관된 분자생물학적 변화는 널리 알려져 있으며 이와 관련한 많은 연구가 이루어지고 있다.<sup>17-20</sup> 오늘날까지 알려진 분자생물학적 연구는 대장암의 발생 기전 중 선종-암종 연속성과 연관된 연구가 대부분이었으나, 최근에는 de novo pathway와 관련된 연구 또한 활발히

진행되고 있다.<sup>3,23</sup> 대장암의 성장형태에 따라 암의 발생과정이 다르다는 것이 1989년 Shimoda등<sup>1</sup>에 의해 제시되었다. 대장암을 용종형 암과 비용종형 암으로 구분해서 비교해 볼 때, 용종형 암은 대부분이 선종-암종 연속성의 발생 과정을 거치며, 비용종형 암보다 종양의 크기는 크지만 침윤 정도가 더 얕다. 반면, 비용종형 암은 선종의 동반이 적고 림프관 및 혈관 침습이 많고, 생물학적 양상이 용종형 암에 비해 양호하지 못하다고 알려져 있다. Yamagata,<sup>2</sup> Wada,<sup>3</sup> Minamoto,<sup>21</sup> Watanabe<sup>22</sup> 등도 대장암이나 선종이 형태학적 차이에 따라 발생과정이나, 생물학적 양상, 종양 발생에 관여하는 유전자도 다르다고 보고하였다. 본 연구에서도 PG암이 NPG암보다 선종의 동반율이 유의하게 높고, 분화가 좋았으며, 통계학적으로 유의한 차이는 아니었으나 대체로 종양의 크기가 크고, 침습 깊어도 얕고, 림프관 및 혈관 침습, 림프절 전이가 적은 경향을 보여 Shimoda등<sup>1</sup>의 보고들과 유사한 결과를 관찰할 수 있었다.

P53 종양억제유전자는 17번 염색체의 단원에 위치하며 세포가 G1단계에서 S단계로 넘어가는 것을 억제하여 세포의 주기를 조절하고 세포의 기능을 억제한다. P53 종양억제유전자는 세포주기 조절에 관여하여 이상세포의 증식을 억제하지만, 변이형 p53단백은 조절능력의 이상으로 종양세포의 증식을 초래한다. Muller등<sup>4</sup>에 의하면 대장암을 비롯한 많은 악성종양에서 p53 종양억제 유전자의 이상이 있다고 하였다. 대장암의 발육형태에 따른 p53연구에서 Wada등<sup>3</sup>은 종양의 형태, 발생기전과는 상관없이 p53단백이 발현된다고 하였다. 본 연구에서는 PG암에서의 p53발현율은 56%(43예중 24예), NPG암에서 발현율은 78%(18예중 14예)를 보여 두 군간에 약간의 차이를 보였지만 통계적으로 유의하지는 않았다.

cdk억제인자의 하나인 p21단백은 G1기에서 DNA 손상후에 야생형 p53단백의 활성화로 유도되며, cdk의 보편적인 억제자로 밝혀졌고 이는 정상세포에서 cyclin, cdk, proliferating cell nuclear antigen (PCNA)와 결합하여 quaternary complex를 형성하

여 세포가 G1에서 S기로 전환하는 것을 막아주고, cyclin E-cdk2, cyclin A-cdk2 및 cyclin D1-, D2-, & D3-cdk4 complex를 불활성화시킨다.<sup>5,7</sup> 또한 p21 단백질은 세포조절주기의 역조절자로 작용하여 세포 증식을 억제하는 역할을 하기도 한다.<sup>5,7</sup> P21 단백질 과발현의 생물학적 의미에 대하여는 다양한 보고들이 있다. 치료전의 유방암 환자에서는 불량한 예후와 연관성이 있다고 하였고<sup>8</sup> 대장이나 난소의 종양에서는 p21단백 과발현이 암종의 진행과 연관성이 있었으며 위암에서는 상반된 결과를 보이는 예들도 있었다.<sup>9,10</sup> 흔히 p53단백은 병기와 분화도가 진행될수록 양성 발현율이 높고<sup>10</sup> p21단백은 그 반대로 예상된다. P21단백이 소실되면 암종의 진행이나 전이를 일으켜 예후인자로서의 가치가 있다고 보고된 바가 있다.<sup>9</sup>

p21단백의 활성화는 DNA손상에 의한 p53단백의 활성화 혹은 여러가지 성장인자를 포함한 세포의 유사분열 물질에 의한 p53단백의 활성화 등 두 가지 서로 다른 경로에 의해서 유도된다.<sup>11</sup> P53 종양억제 유전자는 세포주기 조절에 관여하여 이상세포의 증식을 억제하지만, 변이형 p53단백의 조절능력 이상으로 종양세포 증식을 초래하기도 하고 이 단백질의 양성염색은 p53단백의 돌연변이를 말하며 p21단백의 발현을 p53단백의 의존성 경로로 말하자면 p21과 p53단백의 염색양상은 역관계가 되어야 하며 p53 비의존형 경로상에서는 정상관계가 되어야 한다. Polyak등<sup>26</sup>은 대장암에서는 주로 낮은 p21단백의 발현과 높은 p53변이단백의 발현이 일반적으로 나타나지만, 이질성(heterogeneity)도 있어 p21단백의 과발현을 보이는 경우도 종종 있다고 보고하였다. 본 연구 결과, p21단백의 발현율은 PG암과 NPG암이 모두 67%로서 차이가 없었으며, 이는 대상 예가 적어서 발생하는 부분이라 생각된다.

세포주기의 G1에서 cyclin D와 cdk4/6의 결합을 억제함으로써 종양형성을 억제하는 p16단백은<sup>24,25</sup> 염색체 9번 단원에 있으며 악성흑색종,<sup>13</sup> 이형성모반,<sup>22</sup> 방광암<sup>23</sup> 등에서 흔히 대립형질의 소실 및 돌연변이를 보이고 있으며, 이러한 p16유전자의

**Table 3.** Expression status of p53, p21 & p16 of PG & NPG carcinoma according degree of differentiation

	Well differentiation (n=42)		P value	Moderately/poor differentiation (n=19)		P value
	PG (n=33)	NPG (n=9)		PG (n=10)	NPG (n=9)	
p53			0.218			0.434
Positive	18 (54.6%)	7 (77.7%)		6 (60%)	7 (77.7%)	
Negative	15 (45.4%)	2 (22.3%)		4 (40%)	2 (22.3%)	
p21			0.152			0.720
Positive	22 (66.7%)	4 (44.4%)		7 (70%)	8 (88.8%)	
Negative	11 (33.3%)	5 (55.6%)		3 (30%)	1 (11.2%)	
p16			0.866			0.120
Positive	23 (69.7%)	6 (66.7%)		8 (80%)	4 (44.4%)	
Negative	10 (30.3%)	3 (33.3%)		2 (20%)	5 (45.6%)	

변이는 주로 종양의 성장 및 진행에 관련되어 있는 것으로 추측되고 있다. 이러한 사실과 관련하여 현재까지 대장암에서의 p16유전자와 임상적 결과와의 비교에 대한 조사는 아직은 미미한 실정이다. 본 연구에서, p16단백의 발현율은 PG암이 72%, NPG암이 56%로서, NPG암에서 종양억제유전자의 기능이 불활성화 혹은 상실됨을 유추할 수 있었다.

현재까지 대장암의 경우, PG암 및 NPG암에서 분화도에 따른 p53, p21 및 p16단백들의 발현율에 대한 연구는 아직까지 보고된 바 없다. 본 연구에서는 PG암과 NPG암에서의 p53, p21, p16단백유전자의 발현율을 비교하였을 때, p53단백은 PG 및 NPG암에서 각각 56%, 78%였고, p21단백의 경우, 두군 모두에서 67%로 같았으며, p16단백은 PG암에서 72%, NPG암에서 56%의 발현율을 보여, NPG암에서 p53단백의 발현율이 높고, p16단백의 발현율이 낮게 나와 이들 종양억제 유전자의 변이가 NPG암에서 많이 발생한다고 유추할 수 있었으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 또한 PG암과 NPG암에서 분화도의 차이가 나타나 종양억제 유전자 단백질 발현에 미치는 차이를 배제하기 위하여 분화도에 따라 고분화군과 중저분화군으로 구분하여, PG암과 NPG암에서의 p53, p21, p16단백의 발현율을 알아 보았다. P53단백의 경우 고분

화도, 중저분화도군 모두에서 NPG암의 발현율이 높게 나왔으며, p16단백의 경우 고분화군에서는 두군에서 차이가 없었으나, 중저분화군에서는 NPG암의 발현율이 낮게 나와서 분화도를 고려하지 않았을 때와 유사한 결과를 보였으나, p21단백의 경우에는 고분화군에서 NPG암의 발현율이 낮게 나왔으나, 중저분화군에는 NPG암의 발현율이 높게 나타나 상반되는 결과를 보여 주었으며, 이는 전체 대상예가 적었고 고분화군에 비해 중저분화군의 수가 비교적 적다는 점이 결과에 영향을 미친 것으로 생각된다(Table 3).

이상의 소견으로 PG암과 NPG암은 분화도에 있어서 유의한 차이가 있음을 알 수 있었으며, 발생 배경이나 생물학적 양상이 다를 수 있었고, 종양의 형태가 각종 임상병리학적 특징과 관련되어 서로 다르게 나타남을 알 수 있었다.

용종형 암에서는 선종을 동반하는 경우가 많고 크기가 비교적 더 크므로 조기 검진을 통해서 진단이 가능하지만, 발육양상이 다른 비용종형 암에서는 조기 발견이 더 어려우므로 병력, 이학적 소견, 방사선 및 대장내시경 등 술전 검사시 더 많은 주의와 관심을 가져야 하며, 철저한 외래추적 및 종양표식자 검사와 방사선 검사를 통해서 조기진단과 조기치료를 시행하여야 할 것으로 여겨진다.

## 결 론

PG암이 NPG암에 비해 선종의 동반율이 훨씬 높음을 알 수 있었고, 분화도가 높아 생물학적 양상이 양호함을 알 수 있었으며, PG암과 NPG암의 p53, p21, p16단백유전자의 발현율을 비교시, p53 단백질은 PG암에서 56%, NPG암에서 78%였고, p21 단백질은 두군 모두에서 67%로 같았으며, p16단백은 PG암에서 72%, NPG암에서 56%로 나타나 NPG암에서 p53단백 발현율이 높고, p16단백 발현율이 낮게 나와 종양억제 유전자의 변이가 NPG암에서 많이 발생한다는 것을 유추할 수 있었지만 통계학적인 유의성은 없었다.

## REFERENCES

1. Shimoda T, Ikegami M, Fujisaki J, Matsui T, Aizawa S, Ishikawa E. Early colorectal carcinoma with special reference to its development de novo. *Cancer* 1989; 64:1138-46.
2. Yamagata S, Muto T, Uchihiro M, Higuchi Y, Sawada T, Horooka T. Polypoid growth and K-ras codon 12 mutation in colorectal cancer. *Cancer* 1995;75:953-744.
3. Wada R, Matsukuma S, Hiroshi A, Kuwabara N, Suda K, Arakawa A, et al. Histopathologic studies of superficial type early colorectal cancer. *Cancer* 1996; 77:44-50.
4. Muller J, Muller E, Hoepner I, et al. Expression of bcl-2 and p53 in de novo and ex-adenoma colon carcinoma: A comparative immunohistochemical study. *J Pathol* 1996;180:259-65.
5. Xiong Y, Hannon G, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinase. *Nature* 1993;16:701-4.
6. Li CY, Suardet L, Little JB. Potential role of WAF1/CIP1/p21 as a mediator of TGF- $\beta$  cytoinhibitory effect. *J Biol Chem* 1995;270:4971-4.
7. Harper JW, Adami GR, Wei N, Kwyomarski K, Ell-edge SJ. The p21 cdk-interacting protein CIP1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinase. *Cell* 1993;75:805-16.
8. Caffo O, Dogioni C, Veronesi S, et al. Prognostic value of p21 and p53 expression in breast carcinoma: an immunohistochemical study in 261 patients with long-term follow up. *Clin Cancer Res* 1996;2:1591-9.
9. Yasui W, Akama Y, Kuniyasu, et al. Expression of cyclin dependent kinase inhibitor p21<sup>WAF1/CIP1</sup> in non-neoplastic mucosa and neoplasia of the stomach: Relationship with p53 status and proliferative activity. *J Pathol* 1996;180:122-8.
10. Gomyo Y, Ikeda M, Osaki M, et al. Expression of p21<sup>(waf1/cip1/sdi1)</sup>, but not p53 protein, is a factor in the survival of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer* 1997;79:2067-72.
11. Digiuoseppe JA, Redston NS, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. P53-independent expression of the cyclin dependent kinase in pancreatic carcinoma. *Am J Pathol* 1995;147:884-8.
12. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994;368:753-6.
13. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Pre-singer AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal tumor development. *New Engl J Med* 1988; 319:525-32.
14. Alexander RJ, Buxbaum JN, Raicht RF. Oncogene alterations in primary human colon tumors. *Gastroenterology* 1986;91:1503-10.
15. Iacoppeta B, Digrandi S, Dix B, et al. Loss of heterozygosity of tumor suppressor gene loci in human colorectal carcinoma. *Eur J Cancer* 1994;30A:664-70.
16. Lothe RA, Fossli T, Danielsen HE, Stenwig AE, Nesland JM, Gallie B, et al. Molecular genetic studies of tumor suppressor gene regions on chromosome 13 and 17 in colorectal tumors. *J Natl Cancer Inst* 1992;84: 1100-8.
17. Minamoto T, Sawaguchi K, Ohta T, et al. Superficial-type adenomas and adenocarcinomas of the colon and rectum: a comparative morphologic study. *Gastroenterology* 1994;106:1436-43.
18. Watanabe T, Muto T, Sawada T, et al. Flat adenoma as a precursor of colorectal carcinoma in hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. *Cancer* 1996;77: 627-34.
19. Ikegami M. A pathologic study on colorectal cancer from de novo carcinoma to advanced carcinoma. *Acta Patholo Jpn* 1987;37:21-37.
20. Kumamoto S, Oohara T. How to colorectal cancers develop? *Cancer* 1995;75:1534-8.
21. Minamoto T, Mai M, Ogino T, et al. Early invasive colorectal carcinomas metastatic to the lymph node



- with attention to their nonpolypoid development. *Am J Gastroenterol* 1993;88:1035-9.
22. Ikeda M, Orimo H, Moryyama E, et al. Close correlations of E2F4 and hMSH3 genes in colorectal cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 1998; 58:594-8.
  23. Grady WM, Rajputt A, Myeroff L, et al. Mutation of the type II transforming growth factor-beta receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. *Cancer Res* 1998; 58:3101-4.
  24. Matsuoka S, Edwardss M, Bai C, et al. P57kip2, a structurally distinct member of the p21Cip1 cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Gene Dev* 1995;9:650-62.
  25. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D-cdk4. *Nature* 1995;366:704-7.
  26. Polyak K, Hamilton SR, Vogelstein B, et al. Early alteration of cell cycle regulated gene expression in colorectal neoplasm. *Am J Pathol* 1996;149:381-8.
-