대한대장항문학회지 제 17권 제 1호
JKSCP Vol. 17, No. 1, 2001

□ 원 저 □

산발성 대장암에서 hMLH1/hMSH2의 발현 양상과 임상적 의의

경희대학교 의과대학 외과학교실, [1]병리학교실

강재희 · 이길연 · 이기형 · 윤 충 · 오수명 · 이주희[1]

hMLH1/hMSH2 Protein Expression in Sporadic Colorectal Carcinoma and Its Clinicopathological Significance

Jae-Hee Kang, M.D., **Kil-Yeon Lee,** M.D., **Kee-Hyu Lee,** M.D., **Choong Yoon,** M.D., **Soo-Myung Oh,** M.D. **Joo Hee Lee,** M.D.[1]

Departments of Surgery and [1]Pathology, Kyung-Hee Univer Hospital, Seoul, Korea

Purpose: DNA replication errors (RERs) in repeated nu tide sequences (microsatellite instability) is cause tive mismatch repair (MMR) genes. Ninety percent colorectal carcinomas in hereditary nonpolyposis co cancer (HNPCC) patients and 10 15% of sporadic col rectal cancers show microsatellite instability. In t of colorectal cancers with microsatellite instabili fective MMR gene is *h*MLH1 or *h*MSH2. The author examined immunohistochemical expression of *h*MLH1 an *h*MSH2 in 75 cases of colorectal carcinomas exclu HNPCC, based on Amsterdam criteria for investigating copathological characteristics and prognosis in *h*MLH1 negative cases.

Methods: Formalin fixed, paraffin blocks obtaine tumors of 75 cases of colorectal cancers were staine two monoclonal antibodies (*h*MLH1 and *h*MSH2). The cor relation between *h*MLH1/*h*MSH2 negativity, and cli pathological feature and prognosis were statisticall

Results: Twelve cases (16.0%) showed *h*MLH1/*h*MSH2 negativity. Negative expression of *h*MLH1/*h*MSH2 was sociated with early onset (under age 50), proximal l multiplicity, mucinous histologic type and poor d tiation. There was a significant survival advantage with *h*MLH1/*h*MSH2 negative colorectal carcinoma.

Conclusions: This study shows that *h*MLH1/*h*MSH2 neg tive colorectal carcinomas have the same clinicopath characteristics of colorectal carcinomas with micr instability. The immunohistochemical test for *h*MLH1/ protein can be a simple screening method routinely cable. The result of this test is available for e guidelines for management, and an independent progn factor for sporadic colorectal cancers. **JKSCP 2001; 46**

책임저자: 이기형, 서울시 동대문구 회기동 1
경희대학교 부속병원 외과(우편번호: 130-702)
Tel: 02-958-8266, Fax: 02-966-9366
E-mail: keehlee@chollian.net

Key Words: Sporadic colorectal cancer, *h*MLH1, *h*MSH2, Microsatellite instability, Immunohistochemistry
산발성 결직장암, 부소체 불안정성, 면역조직화학

서 론

1988년 Vogelstein[1]이 대장암에서 전암 병변으로부터 암 유전자 및 암 억제 유전자의 변형이 연속적으로 일어나면서 암종으로 진행해 가는 다단계 암화 과정의 유전학적 모형(선종암 연속설, adenoma-carcinoma sequence)이 제시한 이래 대장암의 유전학적 분석에 관한 연구는 매우 빠른 속도로 발전하고 있다.

최근에는 유전성 비용종성 대장암(Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, HNPCC) 환자에서 발생하는 대장암에 대한 연구를 통해 deoxyribonucleic acid (DNA) 부정합 교정 유전자(mismatch repair gene, MMR)의 불활성화가 암종의 발생과 진행에 있어 또 다른 경로임이 밝혀졌다.[2] 이들 부정합 교정 유전자에 변이가 발생하여 기능을 제대로 하지 못하는 경우 복제 과오(replication errors, RER)가 발생하게 되는데 이 때 특히 단순한 염기 배열의 반복 구조가 존재하는 DNA 부위(부소체, microsatellite)에서의 자발적인 mutation 발생 빈도가 매우 증가하게 되는데, 이러한 특징적인 유전학적 표현형을 부소체 불안정성(microsatellite instability, 이하 MSI)라 한다.[3,4]

유전성 비용종성 대장암(Hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC) 환자에게서 발생하는 대장암의 약 90%에서 MSI를 보이고 이러한 환자의 대부분에서 *h*MLH1 또는 *h*MSH2의 배선 돌연변이(germline mutation)가 관찰된다.[5-7] 유전성 비용종성 대장암은 비교적 젊은 나이에 주로 우측 결장에 발생하며, 다발성 대장암이나 대장 이외의 부위에 다발성 암종이 잘 발생하고 비교적 예후가 좋은 것으로 알려져 있다. 10 15%의 산발성 대장암에서도 MSI를 보이는데[8,9] 이러

한 대장암은 앞서 언급한 유전성 비용종성 대장암 환자에서 발생하는 대장암의 임상 병리학적 특징과 유사한 특성을 가지는 것으로 보고되고 있다.[3,10,11]

지금까지는 부정합 교정 유전자 변이가 있는 대장암을 선별해 내기 위해서 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용한 MSI test를 시행해 왔으나 이 방법은 DNA를 추출하기 위한 특별한 장비가 필요하므로 비용이 많이 들고, 시간이 많이 소요되는 방법으로서 임상에서 쉽게 시행하기에는 이상적이지 못했다. 최근 부정합 교정 유전자 중 산발성 대장암과 유전성 비용종성 대장암 모두에서 돌연변이 빈도가 가장 높은 것으로 알려져 있는 *h*MLH1과 *h*MSH2 유전자 단백질에 대한 단클론 항체가 개발되면서 이것을 이용한 면역 조직 화학 염색법으로 이들 유전자의 결함 유무를 찾아내는 방법이 소개되었으며 이 두 가지 유전자 단백질만을 가지고 면역 조직 화학 염색을 실시해 본 결과, PCR을 이용한 MSI test와 결과가 거의 일치하는 것으로 보고되었다.[12,13]

본 연구에서는 상기한 단클론 항체를 이용한 면역 조직 화학 염색법을 통해 산발성 대장암에서 *h*MLH1/*h*MSH2 단백 발현 상태를 조사하고자 하였으며 그 결과를 바탕으로 *h*MLH1/*h*MSH2 단백 발현이 소실된 대장암 군에서 공통적으로 나타나는 임상 병리학적 특징을 알아보고, *h*MLH1/*h*MSH2 단백 발현이 소실된 환자군과 정상인 환자군간에 생존율을 비교함으로써 *h*MLH1/*h*MSH2 단백 발현 여부가 독립적인 예후 인자로서 의미를 가질 수 있을 것인가에 대하여 평가해 보고자 하였다.

방 법

1) 연구 대상

1994년 1월부터 1995년 6월까지 경희대학교병원 외과에서 대장암으로 진단되어 수술을 받은 환자 중 5년 이상 추적 관찰이 가능했던 75예를 대상으로 하였으며 이시성 다발성 대장암 환자의 경우 가장 최초에 진단 받은 대장암 조직을 대상으로 하였다. Amsterdam criteria[14]에 포함되는 유전성 비용종성 대장암 환자는 대상에서 제외하였다. 종양의 위치는 비장 굴곡부를 기준으로 하여 그 상부에 생긴 암종을 근위암으로, 하부에 생긴 경우를 원위암으로 정의하였다. TNM 병기는 AJCC (American Joint Committee on Cancer Criteria)의 기준에 따라 분류하였다.

2) 방법

(1) 병리 조직 검사: 병리 조직 슬라이드를 환자의 *h*MLH1/*h*MSH2 발현 상태를 모르는 한 명의 병리 의사가 검사하여 종양의 조직학적 유형 및 분화도를 결정하였다. 조직학적 유형은 선암종, 점액성 암종, 미분화암으로 분류하였다. 조직학적 분화도는 선와형성 정도에 따라 고분화암, 중분화암, 저분화암으로 분류하였다.

(2) 면역조직화학적 염색: 면역조직화학적 염색은 *h*MLH1 단백질에 대한 monoclonal antibody (clone G168-15, PharMingen, SanDiego, California, USA)와 *h*MSH2 단백질에 대한 monoclonal antibody (clone G219-1129, PharMingen, SanDiego, California, USA)를 가지고 Avidin-Biotin-Peroxidase법을 이용하여 염색하였다.

파라핀 포매 조직을 4 μm로 박절하여 poly-L-lysine coated glass slide를 사용하여 하룻밤 동안 대기에 건조시켜 고정한 후 xylene과 무수알코올로 처리하여 파라핀 제거 과정 및 함수 과정을 거쳤다. Endogenous peroxidase의 활성을 억제하기 위하여 3% hydrogen peroxidase를 충분히 조직 슬라이드에 떨어뜨려 실온에서 15분간 방치한 후 5분간 수세하였다. 항원 회복(antigen retrieval) 과정으로 citrate buffer (pH 6.0)에 microwave를 15분간 방치한 후 수세하고 Tris buffer (pH 7.6)에 담가 비특이적 결합이 발생하는 것을 막았다.

*h*MLH1과 *h*MSH2 모두 1 : 50으로 희석하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 biotinated antirabbit, anti-mouse immunoglobulin을 충분히 조직을 덮을 수 있을 정도로 떨어뜨린 후 실온에서 15분간 방치하고 다시 streptavidine을 떨어뜨린 후 실온에서 15분간 방치하였다. Diaminobenzidine을 발색원(chromagen)으로 사용하여 반응을 관찰하였으며 hematoxylin으로 대조염색하였다.

두 가지 항체를 모두 사용하지 않고 그 외의 다른 과정은 모두 위와 동일하게 처리한 슬라이드를 한 장 만들어 두 가지 항체에 대한 음성 대조군으로 사용하였다.

결과 판정은 종양 주위 정상 상피 세포, 기질 세포, 림프구를 양성 대조군으로 하여 한 명의 병리 의사가 광학 현미경으로 관찰하여 정상 조직의 핵에 염색이 잘 된 상태에서 주위 종양 세포의 핵에는 염색된 부분을 전혀 관찰할 수 없는 경우를 음성으로 판정하였다.

3) 통계 처리

통계 분석은 SPSS 8.0 for Windows 프로그램을 이용하였다. 임상 및 병리학적 소견과 *h*MLH1/*h*MSH2 단백 발현과의 상관 관계는 Pearson Chi-square test 또는 Fisher's exact test로 하여 P값이 0.05 미만인 경우를 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

생존율 분석은 각 환자의 외래 의무 기록을 통하여 술후 5년간 생존 여부를 조사하여 *h*MLH1/*h*MSH2 단백 발현 여부와 생존율과의 관계를 Kaplan-Meier법으로 분석하였다. 생존 곡선의 비교는 log-rank test를 하여 P 값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1) 대상 환자군의 분포

연령은 33세에서 82세, 평균 연령은 58.3세였으며 성별은 남자 47명(62.7%), 여자 28명(37.3%)이었다. 종양의 발생 위치에 따라 근위암 19예(25.3%), 원위암 56예(74.7%)으로 분류되었다. 한 환자에서 발생한 암종의 개수는 단일암 64예(85.3%), 다발성 대장암 11예(14.7%)였는데, 다발성 대장암은 동시성 4예(5.3%), 이시성 7예(9.4%)였다. 이시성 대장암 중 대장 이외 부위에 종양이 있는 경우가 5예 있었다. 육안적 소견상 돌출형 33예(44.0%), 비돌출형 42예(56.0%)였다. 조직학적 유형은 선암종 69예(92%), 점액성 암종 6예(8.0%)였으며, 미분화 암종은 없었다. 조직학적 분화도는 고분화암 25예(33.3%), 중분화암 45예(60.0%), 저분화암 5예(6.7%)였다. 환자의 병기는 1기 10예(13.3%), 2기 26예(34.7%), 3기 35예(46.7%)였으며, 4예(5.3%)에서 원격 전이가 있어 4기로 분류되었다.

2) 대장암 조직에서 *h*MLH1/*h*MSH2 단백 발현

면역 조직 염색 결과 *h*MLH1 단백 발현 음성인 경우가 9예(12%), *h*MSH2 단백 발현 음성인 경우가 4예(5.3%)로 나타났다. 이 중 *h*MLH1과 *h*MSH2 두 가지 항원에 모두 음성을 나타낸 경우가 1예 있었으므로 총 89예 중 *h*MLH1과 *h*MSH2 중 한 가지 이상의 단백 발현이 없는 경우는 12예(16.0%)였다.

Table 1. Comparison of clinicopathological features of *h*MLH1/*h*MSH2 negative and positive colorectal carcinoma

Features	Variables	Total number of cases	Number of *h*MLH1/*h*MSH2 negative cases (%) (n=12)	Number of *h*MLH1/*h*MSH2 positive cases (%) (n=63)	P value
Age	＜50 yr	19	7 (58.3)	12 (19.0)	0.004
	＞50 yr	56	5 (41.7)	51 (81.0)	
Sex	M	47	9 (75.0)	38 (60.3)	*N.S.
	F	28	3 (25.0)	25 (39.7)	
Location of tumor	Proximal	19	7 (58.3)	12 (19.0)	0.004
	Distal	56	5 (41.7)	51 (81.0)	
Multiplicity	Single	64	8 (66.7)	56 (88.9)	0.046
	Multiple	11	4 (33.3)	7 (11.1)	
Gross type	Exophytic	33	4 (33.3)	29 (46.0)	*N.S.
	Nonexophytic	42	8 (66.7)	34 (54.0)	
Histologic type	Non-mucinous	69	8 (66.7)	61 (96.8)	0.005
	Mucinous	6	4 (33.3)	2 (3.2)	
Diffrentiation	Well	25	3 (25.0)	22 (34.9)	0.021
	Moderate	45	6 (50.0)	39 (61.9)	
	Poor	5	3 (25.0)	2 (3.2)	
TNM stage	I	10	1 (8.3)	9 (14.3)	*N.S.
	II	26	6 (50.0)	20 (31.7)	
	III	35	5 (41.7)	30 (47.6)	
	IV	4	0 (0.0)	4 (6.3)	

*N.S. = not significant.

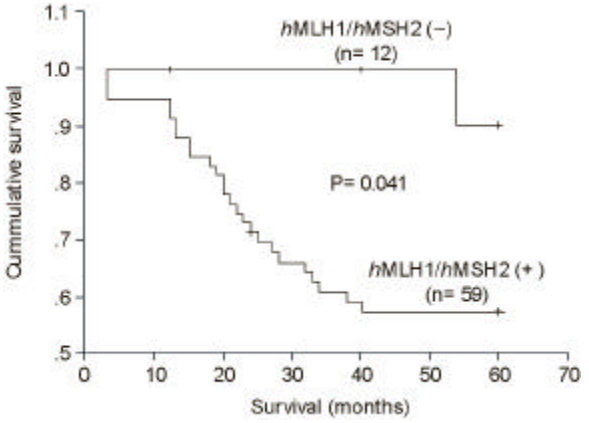

Fig. 1. Kaplan-Meier survival curves for the expression of *h*MLH1/*h*MSH2 protein. Four cases of stage IV were excluded from the total 75 cases and the remaining 71 cases were used in this survival analysis. A significantly increased patient survival (p=0.041) was associated with the 12 *h*MLH1/*h*MSH2 negative cases (9 lacking *h*MLH1, 4 lacking *h*MSH2 and one lacking both *h*MLH1 and *h*MSH2) versus the 63 *h*MLH1/*h*MSH2 positive cases.

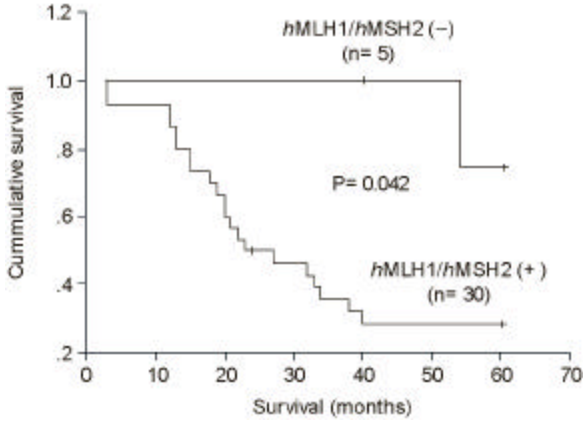

Fig. 2. Kaplan-Meier survival curves for the expression of *h*MLH1/*h*MSH2 protein in 35 cases of stage III. A significantly increased patient survival (p=0.042) was associated with the 5 *h*MLH1/*h*MSH2 negative cases (4 lacking *h*MLH1, 1 lacking *h*MSH2) versus the 30 *h*MLH1/*h*MSH2 positive cases.

3) *h*MLH1/*h*MSH2 단백 발현 음성인 대장암의 임상 및 조직학적 특성

*h*MLH1/*h*MSH2 단백 발현 음성인 환자들의 연령은 35세에서 79세로 평균 52.4세였으며 *h*MLH1/*h*MSH2 단백 발현 양성인 환자들의 연령은 33세에서 82세로 평균 59.4세인 것과 비교하여, 통계학적 유의성은 없지만(p=0.17, T-test) *h*MLH1/*h*MSH2 음성인 환자군이 약간 젊은 편이었다. 그러나 50세를 기준으로 한 연령군간의 비교에서는 통계학적으로 유의하게 50세 이하군에서 *h*MLH1/*h*MSH2 단백 발현 음성률이 높은 것으로 나타났다. 종양의 위치로는 근위암에서, 종양의 수에 있어서는 다발성 대장암에서 *h*MLH1/*h*MSH2 단백 발현 음성률이 높게 나타났다. 병리학적 특징상 점액성 암종 및 저분화암에서 *h*MLH1/*h*HMSH2 단백 발현 음성률이 높은 것으로 나타났다. 그 밖에 종양의 육안적 소견이나 성별, TNM 병기는 *h*MLH1/*h*HMSH2 단백 발현이 소실된 군과 정상인 군간에 통계학적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다 (Table 1).

4) *h*MLH1/*h*MSH2 단백 발현 양상과 5년 생존율과의 연관성

전체 75명 환자에 대한 추적 관찰 기간의 평균은 42.8개월이었고 중앙값은 60개월이었다. 75명 중 진단 당시 원격 전이가 있었던 4명을 제외한 나머지 71명에 대한 5년 생존율을 분석한 결과 *h*MLH1/*h*MSH2 단백 발현 음성인 환자에서 5년 생존율이 의미 있게 높은(p=0.041) 것으로 나타났다(Fig. 1).

각각의 병기별 생존 분석 결과에서는 1기와 2기 대장암 환자의 경우 *h*MLH1/*h*HMSH2 단백 발현이 음성인 군과 양성인 군간에 유의한 생존율의 차이를 보이지 않았으나, 3기 대장암 환자군 내에서는 *h*MLH1/*h*MSH2 단백 발현 음성인 환자에서 5년 생존율이 의미 있게 높은(p=0.042) 것으로 나타났다(Fig. 2).

고 찰

부정합 교정 유전자의 변이로 인하여 유전자 복제 과정 중에 발생하는 부정합을 교정하지 못하여 발생하는 유전학적 불안정성(replication errors 또는 MSI)이 암종의 발생과 진행에 과정에 관련이 있다는 것은 유전성 비용종성 대장암 환자에서 발생하는 대장암에 대한 연구를 통해 알려졌다. 산발성 대장암에서도 MSI와 관련된 여러 가지 연구가 시행되고 발전되어 왔는데 그 결과 MSI를 보이는 대장암은 공통적으로 독특한 임상 병리학적 특성을 가진다는 것이 밝혀지면서 산발성 대장암 내에서 하나의 새로운 부류를 형성하게 되었다. 그 특성들은 젊은 나이에 발생하고 우측 대장에 주로 발생하며 육안적 소견상으로는 돌출형(exophytic type) 암이, 조직학적으로 점액성 암종 및 저분화도 암이 많다는 것이다.[8,10,15] 그 밖에

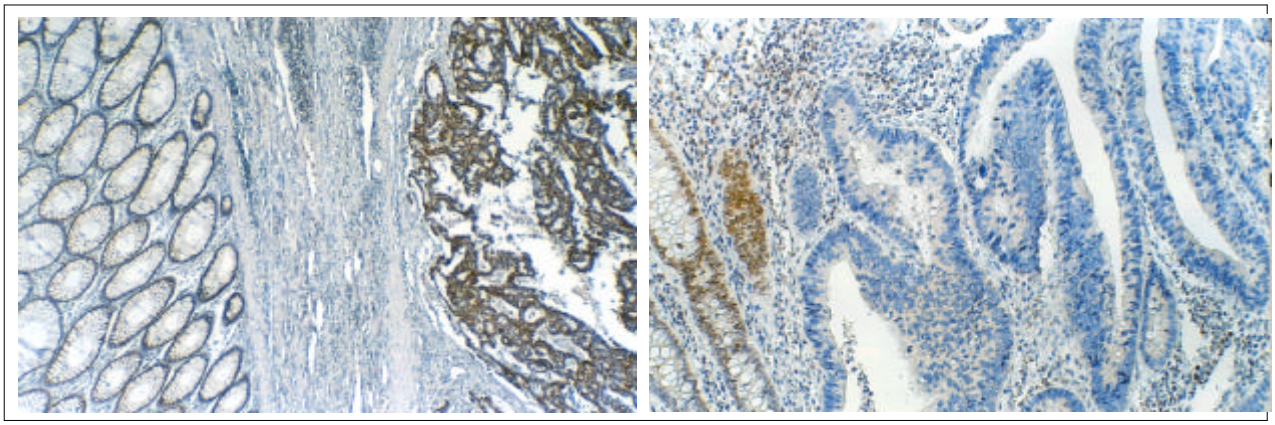

Fig. 3. Immunohistochemical staining of *h*MLH1 and *h*MSH2. A. Diffuse, uniform nuclear staining of normal control mucosa and adjacent tumor cells with *h*MLH1 (×40). B. Positive staining of normal control mucosa and lymphocytes with *h*MLH1; absence of staining in adjacent tumor nuclei is clearly evident (× 100).

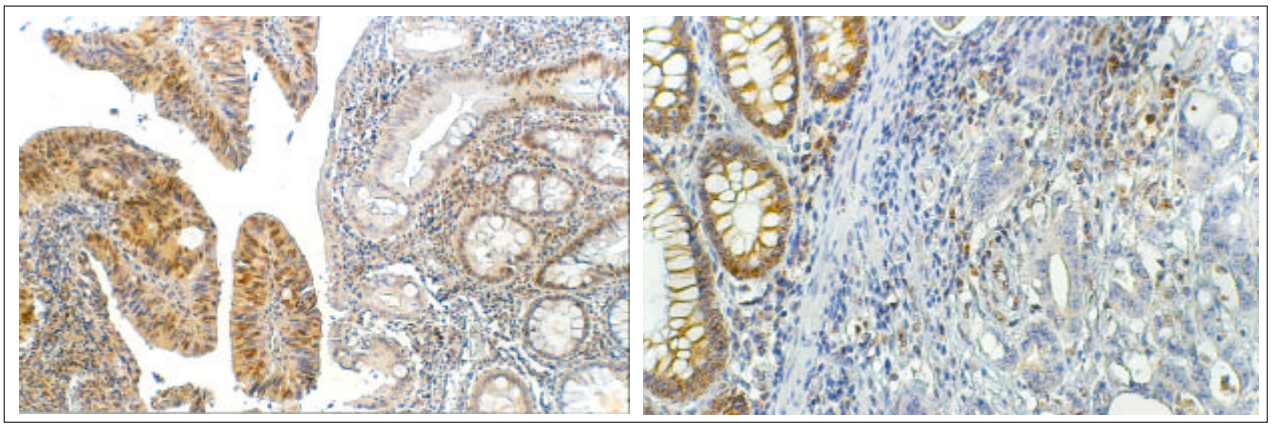

Fig. 4. A. Positive staining of normal control mucosa and adjacent tumor cells with *h*MSH2 (× 100). B. Loss of *h*MSH2 expression in tumor cell. Normal mucosa, lymphocytes, and intervening stromal cells are positive (×200).

크론병에서 보이는 것과 유사한 림프구 반응을 보이는 경우도 많은 것으로 알려져 있다. 이러한 특성들은 유전성 비용종성 대장암에서 나타나는 특성들과 매우 유사하다.[3,10,11]

부정합 교정 유전자는 human *mut*L homologue1 (*h*MLH1), human *mut*S homologue2 (*h*MSH2), *h*MSH3, *h*MSH6, *h*MPS1, *h*MPS2 6가지 정도가 알려져 있다. 유전성 비용종성 대장암에서는 *h*MSH2의 결함이 있는 경우가 가장 흔하여 약 40 60%에서 발견된다. 두번째로 흔한 것이 *h*MLH1의 결함이 있는 경우로 약 30% 정도에서 발견된다.[5,16] 그 결과 유전성 비용종성 대장암에서 나타나는 MSI는 거의 모든 경우에서 high frequency MSI (MSI-H)이고 주로 세포 증식 억제에 관여하는 transforming growth factor β (TGF-β)나 세포 자연사(apoptosis)에 관여하는 BAX 유전자에 존재하는 부소체의 불안정성으로 나타난다.[17]

산발성 대장암에서 MSI를 보이는 경우는 많게는 20%까지 보고한 문헌도 있기는 하지만 대개 10 15%로 보고하는데[8,18] 이 경우에도 *h*MLH1과 *h*MSH2의 결함이 있는 경우가 가장 흔한 것으로 알려져 있다. Thibodeau등[18]은 low frequency MSI (한 개의 부소체에만 이상이 있는 경우)가 *h*MLH1이나 *h*MSH2 유전자 이상과 관련이 없다고 한다.

이러한 사실에 기초하여 *h*MLH1과 *h*MSH2 두 가지 유전자 단백질에 대한 단클론 항체만으로 면역 조직화학 염색을 시행하여 발현 여부를 검사한 결과 문헌에 따라 약간의 차이는 있지만 대개 PCR을 이용한 MSI검사 결과와 75%에서 많게는 100% 일치한다는 보고도 있으므로[12,13] 이 방법이 선별 검사로서 MSI test를 대치하는 것이 가능하리라 생각한다.

본 연구에서 *h*MLH1과 *h*MSH2 두 유전자 단백 중 하나 이상 발현이 없는 경우(*h*MLH1/*h*MSH2 음성)는 16.0%였으며 *h*MLH1 음성인 경우가 *h*MSH2 음성인 경우보다 5배 정도 많다는 기존 연구 결과에 비해 *h*MLH1 음성인 경우가 2.25배 정도로 많아서 상대적으로 *h*MSH2 음성인 경우가 차지하는 비중이 높았다.

임상 및 병리학적 특성상 젊은 나이, 근위부 대장암, 조직학적으로 점액성 암종 및 저분화암에서 *h*MLH1/*h*MSH2 음성인 경우가 의미 있게 많은 것으로 나타나 기존에 MSI를 보이는 대장암의 임상 및 병리학적 특성으로 문헌에 보고된 것들과 거의 동일한 결과를 보였는데, 육안적 소견상 돌출형이 더 많다고 알려진 것에 반해 돌출형과 비돌출형 대장암간에 *h*MLH1/*h*MSH2 음성률에 유의한 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다.

MSI를 보이는 대장암의 경우 다발성 대장암이 발생할 가능성도 높은 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 대장 이외 부위에 암이 발생한 경우를 포함한 다발성 대장암의 *h*MLH1/*h*MSH2 음성률이 높게 나타난 것은 이와 같은 사실을 뒷받침한다고 볼 수 있다. 이러한 사실에 근거하여 *h*MLH1/*h*MSH2 음성인 대장암의 경우 다발성 대장암의 가능성을 고려하여 전체 대장에 대한 검사가 반드시 필요하며 술후 일반적으로 추천되는 것보다 더 장기간의 대장 내시경을 통한 추적 관찰도 필요할 것으로 생각된다. 나아가서 추적 관찰시, 다른 장기에도 이시성 원발성 암이 발생할 가능성이 있다는 것을 항상 염두에 두고 주의를 기울여야 할 것이다. 적어도 10년간 대장 내시경을 통한 추적 관찰해야 한다고 주장하는 학자들도 있으며,[13] Shigehikon등[19]은 *h*MLH1/*h*MSH2 음성인 좌측 대장암에서 이시성 대장암의 발생 가능성이 더 높다고 주장하면서 이러한 환자의 경우 술후 일반적으로 추천되는 것보다 더 자주 대장 내시경을 통해 추적 관찰할 것을 제안하기도 하였다. 얼마나 자주, 술후 언제까지 추적 관찰해야 할 것인지에 대한 정확한 기준에 대해서는 아직 논란의 여지가 있다.

MSI와 생존율간의 상관 관계에 있어 일부에서는 MSI를 보이는 대장암군과 그렇지 않은 대장암군간에 생존율의 차이가 없다는 보고도 있으나[20] 대부분의 문헌에서 MSI를 보이는 대장암군에서 예후가 좋다고 보고하고 있다. 본 연구에서도 4기 대장암을 제외한 나머지 환자들의 5년 생존율을 분석한 결과 *h*MLH1/*h*MSH2 음성인 대장암군에서 의미 있게(p= 0.041) 5년 생존율이 높은 것으로 나타났다. 여기서 *h*MLH1/*h*MSH2 음성인 대장암군과 양성인 대장암군의 TNM 병기 분포에는 유의한 차이가 없었다. 또한 TNM 병기에 따른 5년 생존율 분석 결과 1기와 2기 대장암에서는 *h*MLH1/*h*MSH2 발현 여부에 따른 생존율 차이가 없었으나 3기 대장암, 즉 림프절 전이가 있는 대장암에서는 *h*MLH1/*h*MSH2 음성인 경우가 의미 있게 (p=0.042) 5년 생존율이 높은 것으로 나타났다. 따라서 *h*MLH1/*h*MSH2 발현 여부는 특히 림프절 전이가 있는 대장암의 경우에 병기 분류를 보충할 수 있는 독립적인 예후 지표로서 가치가 인정된다고 하겠다. 1기와 2기 대장암의 경우, 생존율 자체가 매우 높기 때문에 *h*MLH1/*h*MSH2 발현 여부에 따른 생존율 차이를 보이지 않은 것으로 해석된다.

MSI를 보이는 대장암에서 일반적인 항암 화학 요법에 잘 반응하지 않을 수 있다는 일부 주장과,[21,22] 예후 자체가 좋기 때문에 항암 화학 요법이 불필요할 수도 있다는 주장들이 있는데 3기 대장암에서 *h*MLH1/*h*MSH2 음성이 대장암에서 생존율이 높게 나타난 본 연구 결과는 이와 같은 주장들을 간접적으로 뒷받침한다고 볼 수도 있겠다.

유전성 비용종성 대장암이 유전성 질환이며 다발성으로 대장 또는 그 이외의 장기에 종양이 잘 발생한다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다. 유전학적 검사를 통하여 부정합 교정 유전자의 이상이 확인되어 유전성 비용종성 대장암으로 확진되면, 환자와 그 가족을 일정한 지침에 따라 정기적으로 추적 관찰하여 발생하는 암종을 예방하거나 조기에 치료하는 것이 가능하게 되므로 유전성 비용종성 대장암을 정확히 진단해내는 일은 매우 중요하다. 반면에 유전자 이상 유무 검사는 고가의 검사이기 때문에 비용에 비한 그 효용 가치의 정도에 대한 것과, 검사를 하는 환자나 그 가족에게 있어 윤리적인 측면의 문제가 결부되어 있으므로 어떤 환자에게서 유전학적 검사를 시행해야 할 것인가를 결정하는 일은 매우 어려운 문제라고 할 수 있다. 전통적으로 유전성 비용종성 대장암의 진단 기준이 되어 온 Amsterdam criteria는 너무 엄격하고 특히 2대 이상에 걸친 전체 가족의 병력 조사를 한다는 것이 매우 어렵거나 불가능한 경우도 적지 않다는 점 때문에 이 기준만으로 유전성 비용종성 대장암을 진단하는 데에는 어려움이 있다. 본 연구에서도 Amsterdam criteria에 맞는 유전성 비용종성 대장암 환자는 제외하였지만 나머지 환자들 중 정확한 가족력 조사가 불가능하였거나 유전성 비용종성 대장암이 의심되었지만 Amsterdam criteria에 완

전히 맞지 않았던 경우도 있었는데 이러한 환자의 일부가 실제 유전성 비용종성 대장암일 가능성을 배제할 수는 없다. 유전성 비용종성 대장암의 90%에서 *h*MLH1과 *h*MSH2 유전자에 대한 배선 돌연변이가 원인이 된다는 점을 고려하여 볼 때, 이와 같은 Amsterdam criteria의 문제점을 보충하고 유전성 비용종성 대장암에 대한 유전학적 검사를 해야 할 환자를 좀 더 정확히 선별해 내기 위한 방법으로서 *h*MLH1/*h*MSH2 유전자 단백 발현 여부에 대한 면역 조직 화학적 염색 검사가 그간 제안되었던 여러 진단 지침들(Bethesda guideline,[23] Japanease criteria[24] 등)과 함께 보조적인 기준으로서 의미를 가질 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

대장암에 있어 *h*MLH1/*h*MSH2 단백 발현 여부에 대한 검사는 적절한 치료 방법을 결정하고 예후를 예측하며 환자의 추후 추적 관찰계획을 수립하는 데 있어 매우 중요한 지침이 될 수 있으며 유방암에서의 ER/PR과 같이 종양의 병기 분류를 보충할만한 새로운 독립된 예후 지표로서도 가치가 있을 것으로 기대된다. 나아가서 Amsterdam criteria를 적용했을 때 놓치게 되는 유전성 비용종성 대장암 증후군 환자를 발견해 내고, 유전자 검사를 해야 할 환자를 정하기 위한 선별 검사법으로서도 의미가 있을 것으로 생각된다.

이에 비교적 임상에서 쉽게 시행할 수 있는 면역조직 염색 방법을 이용한 *h*MLH1 /*h*MSH2 유전자 단백 검사법을 모든 대장암에 기본 검사로서 시행하는 것이 좋을 것으로 생각한다.

REFERENCES

1. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Lezppert M. Genetic alterations during colorectal tumor development. N Engl J Med 1988;319: 525-32.
2. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. Cell 1996;87:159-70.
3. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. Science 1993;260:812-6.
4. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A national cancer institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer Res 1998; 58:5248-57.
5. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HT, Watson P, et al. Analysis of mismatch repair genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. Nat Med 1996;2:169-74.
6. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Nature 1994; 368:258-61.
7. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, et al. The human mutator gene homologue MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Cell 1993;75:1027-38.
8. Lothe RA, Peltomaki P, Meling GI, Altonen LA, Nystrom-Lahti M, Pylkkanen L, et al. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to cilinicopathological variables and family history. Cancer Res 1993;53:5849-52.
9. Marra G, Boland CR. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes and historical perspectives. J Natl Cancer Inst 1995;87:1114-25.
10. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Cilinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. Am J Pathol 1994;145:146-56.
11. Horii A, Han HJ, Shimada M, Yanagisawa A, Kato Y, Ohta H, et al. Frequent replication errors at microsatellite loci in tumors of patients with multiple primary cancers. Cancer Res 1994;54:3373-5.
12. Victoria AM, Lisa M, Robert G, Hyeja K, Kelvin S, Anna M, et al. Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. Am J Surg Pathol 1999;23:1248-55.
13. Cawkwell L, Gray S, Murgatoryd H, Sutherland F, Haine L, Longfellow M, et al. Choice of management strategy for colorectal cancer based on a diagnostic immunohistochemical test for defective mismatch repair. Gut 1999; 45:409-15.
14. Vasen HFA, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The international collaborative group on hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Dis Colon Rectum 1991;34: 424-5.
15. Jass JR, Do KA, Simms LA, Iino H, Wynter C, Pillay SP, et al. Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. Gut 1998;42:673-9.
16. Miyaki M, Konishi M, Muraoka M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Iwama T, et al. Germline mutations of hMSH2 and hMLH1 genes in Japanese families with

hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC): usefulness of DNA analysis for screening and diagnosis of HNPCC patients. J Mol Med 1995;73:515-20.
17. Jonathan P, Terdiman MD, Peggy G, Conrad MS, Marvin HS. Genetic testing in hereditary colorectal cancer: indication and procedure. Am J Gastroenterol 1999;94: 2344-56.
18. Bubb VJ, Curtis LJ, Cunningham C, Dunlop MG, Carothers AD, Morris RG, et al. Microsatellite instability and the role of hMSH2 in sporadic colorectal cancer. Oncogene 1996;12:2641-9.
19. Shigehiko M, Fumio K, Kazutomo T, Tomomi O, Shingo S, Kazuhisa S, et al. The significance of microsatellite instability in predicting the development of metachronous multiple colorectal carcinomas in patients with nonfamilial colorectal carcinoma. Cancer 1999;85:1917-24.
20. Shingo S, Fumio K, Tomomi O, Hiroshi K, Kyotaro K, Michiko M, et al. Clinicopathologic and genetic features of nonfamilial colorectal carcinomas with DNA replication errors. Cancer 1998;82:279-85.
21. Branch P, Hamson R, Karran P. DNA mismatch binding defects, DNA damage tolerance, and mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines. Cancer Res 1995;55:2304-9.
22. Boland CR. Roles of the DNA mismatch repair genes in colorectal tumorigenesis. Int J Cancer 1996;69:47-9.
23. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, et al. A national cancer jnstitute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. J Natl Cancer Inst 1997;89:1758-62.
24. Kenichi K, Hideki M, Mariko E. Two types of sporadic multiple colorectal cancers with and without HNPCC-like genetic instability. Hepatogastroentero 1999;46:3115-3120.

편집인의 글

유전성 비용종증 대장암은 대장암을 비롯하여 다른 장기에 각종 암이 발생할 위험성이 증가하는 질환이며 유전성 종양 중 가장 빈도가 높다. 암 발생의 위험도가 높은 가계에 대한 조기 발견 및 치료, 정기 추적 검사를 통한 암으로의 발생 전 선종 제거 등의 예방적 치료를 위해서는 진단이 절대적으로 중요하다. 그러나 가계도를 기준으로 한 암스테르담 진단 기준은 너무 엄격하여 실제 임상에서 적용하는 데는 어려움이 있다. 이 기준에 만족하는 경우 약 50%에서 유전자 돌연변이가 발견되었다.

가장 정확한 진단 방법인 유전자의 직접 염기서열 결정법(DNA sequencing)은 유전자의 크기나 종류가 많아 실제적이지 못하다. 또한 연관 분석을 위해서는 질환에 이환된 가족 구성원이 여러 명 필요하기 때문에 진단에 제한이 있다. 또한 약 77% 정도에서 짧아진 단백을 생산해 내기 때문에 단백 절단 검사법을 이용할 수 있다.

현재로는 유전성 비용종증 대장암의 진단 선별에는 유전자 불안정성(이하 MSI) 검사가 가장 널리 이용된다. 유전성 비용종증 대장암의 경우에는 95%에서 MSI를 나타내는 반면 가족성 용종증이나 산발성 대장암에서는 선종 혹은 점막내암에서는 3%, 침윤성 암에서는 13 24%, 또 간 전이가 있는 경우는 35%에서 MSI를 나타낸다. MSI를 보이는 유전성 비용종성 대장암의 50%에서 MSH2 혹은 MLH1의 생식 세포 혹은 체세포 돌연변이가 있는데 반해 산발성 대장암의 경우는 단지 6%의 MSI를 보이는 종양만이 상기 유전자의 체세포 변이가 있었다. 그래서 상당 부분의 MSI를 나타내는 산발성 대장암은 복제 실수 교정 유전자가 아닌 MSI를 나타내는 다른 유전자의 이상이 있을 것으로 생각한다.

산발성 대장암에서는 유전성 비용종성 대장암보다 TGF βRII의 변이는 적게 발견되는 반면 APC, p53, K-ras 변이나 종양억제 유전자의 LOH는 더 흔히 나타나 MSI가 유전성 비용종성 대장암에서는 암 발생 과정의 초기에 관여하는데 비해 산발성 대장암에서는 비교적 암 발생 과정의 후기에 작용할 것으로 보고되었다. 산발성 대장암에서 MSI의 빈도는 약 9 17% 정도 보고되었으며 MSI를 보이는 산발성 대장암에서도 임상-병리학적 특성이 유전성 비용종성 대장암과 비슷한 양상을 보인다. 또한 복제 실수 교정 유전자가 비활성화되면 정상 세포에 독성이 있는 DNA alkylation에 대한 저항성이 증가하며 이런 세포들이 G2/M check point를 피해서 증식을 하기 때문에 이런 종양세포들의 성장이 잘된다. 또한 복제 실수 교정 유전자가 결손되면 항암제에 대해 비교적 저항성이 있다고 보고되었다.

산발성 대장암에서도 MSI를 나타내는 대장암 환자들은 임상-병리학적 특성이 MSI를 보이지 않는 암과 구별되고 비교적 예후가 좋은 것으로 보고되어 산발성 대장암에서 MSI를 보이는 암들을 찾아내는 치료와 추적 검사에 적용하려는 노력들이 있다.

물론 MSI를 검사하는 것이 가장 좋은 방법이지만 본 논문에서와 같이 임상에서 손쉽게 행할 수 있는 면역조직화학염색으로 MSI에 관여하는 *h*MLH1과 *h*MSH2 단백 발현을 조사하여 유전성의 가능성이 있는 환자

군과 산발성 대장암에서 비교적 예후가 양호하며 임상-병리학적 소견이 다른 환자 군을 구별할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 MSI를 보이는 산발성 대장암의 상당 부분에서 *h*MLH1, *h*MSH2, *h*PMS1, *h*PMS2 등 복제 실수 교정 유전자와는 다른 유전자의 변이에 의한 것으로 추측되어 단지 *h*MLH1과 *h*MSH2의 면역 조직화학염색만으로는 MSI의 극히 일부분만을 찾아낼 수 있는 약점이 있을 것으로 생각하며 또한 임상-병리학적 특성이 비슷하고 MSI를 나타낸다 하여도 산발성 대장암에서의 MSI와 유전성 비용종증 대장암에서의 MSI의 기전이 다를 것으로 생각되어 앞으로 면역 조직 화학염색의 결과와 실제 MSI 표지자를 이용한 MSI 결과를 비교하여 산발성 대장암에서 *h*MLH1, *h*MSH2 유전자의 돌연변이 혹은 다른 유전자 이상에 대한 연구가 이어져야 할 것으로 생각된다.

단국대학교 의과대학 외과
박 동 국