

## 다발성 용종성 및 산발성 대장-직장암에서 유전적 불안정성과 부정합 보수 유전자 및 p53 유전자 변이

가톨릭대학교 의과대학 외과학교실

천 성 원 · 장 석 균

### Genetic Instability and Mutations of Mismatch Repair (MMR) and p53 Gene in Colorectal Cancers with Multiple Polyps and Sporadic Colorectal Cancers

Sung Won Chun, M.D., Suk Kyun Chang, M.D.

Department of Surgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

**Purpose:** General conceptions of carcinogenic mechanisms by recent reports are ras-p53 gene pathway in sporadic colorectal cancers (SCC), MMR gene pathway in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and APC gene in familial adenomatous polyposis (FAP). But in the colorectal cancer with multiple polyps (CCMP), the carcinogenic pathway is not still defined exactly. In order to find out the which carcinogenic pathway control the CCMP and SCC, genetic instability were studied in CCMP and SCC.

**Methods:** In this study, genetic instability on D2S123, D3S1029, D5S107, D6S87 and AP $\Delta$ 3 foci and gene mutations of hMLH1 (exon 2, 16, 19), hMSH2 (exon 11, 12, 13, 14) gene of MMR gene, p53 gene (exon 5, 6, 7, 8, 9) were studied on the 60 DNA samples of CCMP (30 cases) and SCC (30 cases).

**Results:** 1. Observed positive genetic instability was higher in CCMP (30%) than SCC (20%), and was higher in right colon cancers (33%) than left colon cancers (23%) or rectal cancers (17%), but not significant statistically. And observed positive genetic instability was lower in moderate differentiated cancers (16%) than well (67%) or poorly (60%) differentiated cancers (P=0.005). 2. Any mutations of hMLH1 and hMSH2 gene of MMR gene were not observed in both of CCMP and SCC, but 3 cases (2 CCMPs and 1 SCC) point mutations of intron of hMSH<sub>2</sub> gene, which were higher in positive genetic instability than negative (P=0.002). 3. This 3 cases point mutations were C for T which were on 6th bases upstream from codon 669. 4. From the results of SSCP for nucleotide sequencing of p53 gene, the abnormal bands were observed in 30% (9 of 30) of CCMP and SCC.

Also the abnormal bands were observed in both of positive or negative genetic instability without differences.

**Conclusions:** With above results the authors suggested that the mechanism of genetic instability and mutations of p53 gene strongly affect the mechanism of carcinogenesis in SCC and CCMP. And there are relationship between genetic instability and point mutation at intron region of hMSH<sub>2</sub> gene. However further evaluation and research is needed to establish relation between APC gene and other different kind of MMR gene. **J Korean Soc Coloproctol 2002;18: 353-363**

**Key Words:** Sporadic colorectal cancer, Colorectal cancer with multiple polyps, Genetic instability, p53 gene

산발성 대장-직장암, 다발성 용종성 대장-직장암, 유전적 불안정성, p53 유전자

### 서 론

암발생은 다단계적 다발성 유전자 변화가 체세포에 단계적으로 축적되어 세포의 성장 조절능력이 상실되어 일어나는 것으로 알려져 있으며<sup>1,2</sup> 암유전자의 활성화(oncogene activation), 유전자 이전(gene translocation), 암억제유전자 비활성화(tumor suppressor gene inactivation) 등의 기전이 규명되어 있다. 일반적으로 대장-직장암은 임상적으로 100개 이상의 용종을 동반하며 우성유전을 하는 가족성 대장용종증(Familial adenomatous polyposis of colon, FAP), Amsterdam criteria I과 II가 적용되는 가족성 비용종성 대장-직장암(hereditary non-polyposis colorectal cancers, HNPCC), 가족력이 없고 용종도 동반하지 않는 산발성 대장-직장암(sporadic colorectal cancers, SCC)으로 분류하며, 여러 연구자들의 보고에 의하면, 가족성 대장용종증에는 주로 APC (adenomatous polyposis coli) 유전자가, 산발성 대장-직장암에는 K-ras, APC유전자도 영향이 있지만 주로 p53 유전자, MCC (mutated in colorectal cancer)

책임저자: 장석균, 서울특별시 영등포구 여의도동 62번지 가톨릭대학교 의과대학 성모병원 외과 (우편번호: 150-713)  
Tel: 02-3779-1175, Fax: 02-786-0802/3779-1112  
E-mail: skchang@catholic.ac.kr

유전자, DCC (deleted in colorectal cancer) 유전자 등이 암발생에 관여한다고 알려져 있다.<sup>3-6</sup> 한편 환자들 중에는 Amsterdam criteria I이나 II에 해당되지도 않고 가족력도 뚜렷하지 않으면서 수 개 내지는 수십 개의 용종을 동반하며 발암기전도 명확하게 설명되지 않는 환자군이 있어 이 환자군을 가칭 용종을 동반하는 다발성 용종성 대장-직장암(colorectal cancers with multiple polyps, 이하 CCMP)이라고 하였다.

암발생 과정의 초기 단계에 전체 게놈(genome)에 걸쳐 유전자의 변이에 의해 유전적 불안정성(genetic instability)이 선행되어야 다발성 변이의 축적이 일어날 수 있다고 하였다.<sup>7</sup> 반복서열의 불안정성은 유전자 손상 후 복원되는 과정에서 복제착오의 결과라는 의미로 복제착오(replication error, RER)로 명명되며 유전적 불안정성의 한 표현형으로 볼 수 있다.<sup>8-13</sup> 최근 보고에 의하면 유전적 불안정성이 양성인 대장암 세포주들에서 음성인 경우보다 100배 정도의 변이율 증가가 있다고 하며<sup>11</sup> 부정합보수 유전자의 변이 시 반복서열 불안정성이 빈번히 발견된다는 사실이 밝혀져 암발생 초기에 있어 부정합 보수 유전자의 변이가 중요한 역할을 할 것이라고 생각되고 있다.<sup>9,14</sup> 또한 부정합보수유전자(mismatch repair gene, MMR)의 변이를 유전성 비용종성 대장-직장암(HNPCC)의 50~80%에서 관찰할 수 있어,<sup>15-17</sup> DNA 보수 유전자가 암발생의 제 3의 기전으로 대두되고 있으나 CCMP나 SCC에서 DNA 보수유전자의 역할은 아직 잘 규명되어 있지 않다. 본 연구에서는 SCC 또는 CCMP 환자에서 유전적 불안정성 검사중 하나인 microsatellite instability (이하 MSI)검사를 위하여 D2S123, D3S1029, D5S107, D6S87, AP $\Delta$ 3 등 서로 다른 유전자 부위에 대한 반복서열 불안정성 검사를 시행하고 부정합 보수유전자와 p53 유전자의 염기서열 변이를 검사를 위해 hMLH1과 hMSH2 유전자 및 p53 유전자 분석을 시행하여 부정합보수 유전자와 p53 유전자의 영향을 비교 분석하였다.

방 법

1) 대상

1992년 3월부터 1997년 9월까지 성모병원에서 대장-직장암으로 진단되어 수술 받은 환자 중 병리조직학적으로 대장-직장암으로 확진된 환자에서 CCMP 환자 30예와 SCC 환자 30예를 대상으로 하였다. 병리 조직학적 분화도에 따라 분류하면 고분화 선암이 6예, 중등도 분화선암이 49예, 미분화 선암이 5예로 중등도 분화선암이 대부분을 차지하였다. 대장-직장암의 병기를 Dukes' 기준에 의하여 분류하면 A병기는 2예, B병기는 20예, C병기는 32예, D병기는 6예이었고 발생 위치별로 보면 우측 결장이 24예, 좌측 결장이 13예, 직장이 23예이었다.

2) 연구방법

(1) DNA 분리: DNA는 정상조직과 암조직에서 QIAamp Tissue DNA isolation kit (Qiagen Inc., Cat. No. 29304, 28159 Avenue Stanford, Santa Clarita, CA 91355, USA)를 사용하여 각각의 DNA를 분리하였다.

(2) Microsatellite Instability의 분석: MSI 분석을 위하여 여러 저자들의 보고에 의한 반복서열 불안정성 양성 부위 중에서 D2S123, D3S1029, D5S107, D6S87 (Research Genetics, Huntsville, AL, USA), AP $\Delta$ 3 (Bio-neer Inc., Chungwon, Korea) 등 5 곳의 유전자부위에 대한 시발체(primer)를 사용하여(Table 1) 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 중합효소연쇄반응은 감지시발체(sense primer) 20  $\mu$ mol, 항감지시발체(antisense primer) 20  $\mu$ mol, dNTP (Boehringer Mannheim, Cat. No. 1051440, Sandhofer Strasse 116, Mannheim, Germany), Taq DNA polymerase (Boehringer Mannheim, Cat. No. 1418432, Sandhofer Strasse 116, Mannheim, Germany) 0.5 units로 최종 농도 200 $\mu$ m로 혼합하였고, thermal

Table 1. The sequences of primers for microsatellite instability detection

	Sense primer	Antisense primer
D2S123	AAACAGGATGCCTGCCTTAA	GGACTTTCCACCTATGGGAC
D3S1029	ATACTCTGGACCCAGATTGATTAC	TAATTCCCAAATGGTTTAGGGGAG
D5S107	GATCCACTTTAACCCAAATAC	GGCATCAACTTGAACAGCAT
D6S87	ACAGAGTGAGACCGTGTAAC	AGAGAAGCATCTCACTTAGT
AP $\Delta$ 3	GAGGCCAGCAATCTGCACT	AAATCAGTATAAGAAAGGAA

cycler (Perkin Elmer, Gene Amp PCR system, Norwalk, CT, 06859, USA)를 이용하여, 첫 단계에서 95°C, 5분간 DNA를 변성시킨 후 55~60°C에서 1분간 시발체와 DNA를 결합시킨 다음, 두 번째 단계에서는 72°C에서 1분, 94°C에서 30 sec, 55~60°C에서 30 sec의 반응을 30~35회를 반복하여 증폭시키고 72°C에서 5분간 연장반응을 시킨 후 25°C에서 정지하였다.<sup>18</sup> 증폭된 유전자는 일차적으로 2% 한천젤(agarose gel)로 유전자 증폭산물을 확인한 후 loading buffer (95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenolblue, 0.05% xylene cyanol)로 10~30배로 희석하여 7% 변성 젤(denaturing gel)에서 2,000 volt로 2~3시간 전기영동한 후 은염색으로 시행하여 관찰하였다. 은염색은 고정액(10% glacial acetic acid)에 20분간 DNA를 고정시키고 3차 증류수로 3회 세척한 후 은염색(Silver nitrate, Silverstar™ Staining System, Bioneer corp., Chungwon, Korea)을 30분간 시행하고 발색 용액에 넣어 DNA 띠가 보일 때까지 흔들어 준 다음 띠가 보이면 정지 용액으로 2분간 처리하여 실온에서 건조시킨 후 관찰 판독하였다.

(3) hMLH1, hMSH2 유전자변이 분석: hMLH1, hMSH2 유전자변이를 위한 분석은 먼저 중합효소 연쇄반응을 시킨 유전자 증폭산물로 MDE (mutation de-

tection enhancement) gel을 사용하여 단일쇄형태변환다형성 (single stranded conformation polymorphism, 이하 SSCP)을 시행한 후 변이가 있다고 판독되는 유전자를 직접 염기서열 분석법(PCR product direct sequencing analysis)으로 확인하였다.<sup>19</sup>

① 단일쇄형태변환다형성; hMLH1 유전자의 엑손 2, 16, 19와 hMSH2 유전자의 엑손 11, 12, 13, 14에 대한 각각의 시발체를 사용하여(Table 2) 중합효소 연쇄반응으로 얻어진 증폭산물을 10~30배로 희석하여 95°C에서 5분간 변성시킨 후 MDE 젤(FMC, Bioproducts, corp. Rockland, Maine, USA) (0.5×MED, 0.6×TBE, 10% glycerol)에 3μl씩 적재한 후 전기영동(800 volt, 8~16시간)을 실시한 다음 은염색을 실시하여 결과를 관찰 판독하였다.

② 직접 염기서열 분석법(PCR products direct sequencing analysis); SSCP검사에서 변이가 있다고 판단된 증폭산물들은 Gene clean kit II (Bio 101 Inc., Vista, CA 92083, USA)를 이용하여 중합효소연쇄반응 증폭산물 속에 존재한 dNTP와 시발체 등을 제거, 정제하여 순수한 중합효소연쇄반응 증폭산물만을 얻은 다음, 4d/ddNTP로 혼합된 Accupower™ DNA sequencing kit (Bioneer corp., Chungwon, Korea)를 이용한 염기서

Table 2. The sequences of primers for hMLH1 and hMSH2 gene amplification

		Sense primer	Antisense primer
hMLH1	Exon 2	GAAAGGTCCTGACTCTTCC	ATCTACATTAGAGTAGTTGC
	Exon 16	TTTATGGTTTCTCACCTGCC	GTTATCTGCCACCTCAGC
	Exon 19	TCCCAAAGAAGGACTTGCT	AGTATAAGTCTTAAGTGCTACC
hMSH2	Exon 11	CAAATTGACTTCTTTAAATG	AATTGTCAATATTTCTTCAG
	Exon 12	GCTATGTAGAACCAATGCAG	GATGTTCCACATCATTACTG
	Intron/Exon border	CGCGATTAATCATCAGTG	GGACAGAGACATACATTTCTATC
	Exon 13	GCCCAATATGGGAGGTAAA	GAAACTGCTTCTATCCTCAG
	Exon 14	GTCTGCAACCAAAGATTCAT	GCTTTATCAGGTGAAGAAG

Table 3. The sequences of primers for p53 gene amplification

		Sense primer	Antisense primer
Exon5-exon9		GTAGGAATTCACCTTGTGCCTGACTTG	CATCGAATTCTGGAAACTTTCCACTTGAT
Exon 5		GACTTTCAACTCTGTCTC	CTGGGGACCCTGGGCAAC
Exon 6		GAGACGACAGGGCTGGTT	CCACTGACAACCACCTT
Exon 7		GAGGCAAGCAGAGGCTGG	CCAAGGCGCACTGGCCTC
Exon 8		CCTTACTGCCTCTTGCTTC	TGAATCTGAGGCATAACTGC
Exon 9		TTATGCCTCAGATTCACCTTT	TGATTCACCTTTCAAAGGTC

열 분석을 위해 중합효소연쇄반응을 시행한 후 7% 변성 젤로 전기영동(2,000 volt, 1~3시간)한 다음 은염색을 실시하여 염기서열을 분석 관찰하였다.

(4) p53 유전자의 변이 분석: p53 유전자변이에 대한 검사는 엑손 5, 6, 7, 8, 9에서 시행하였는데, 분석의 특이도를 높이기 위하여 이중중합효소연쇄반응(double PCR)을 시행하였다. 1차 중합효소연쇄반응은 엑손 5에서 엑손 9를 모두 포함시킨 1.8 Kb 크기의 유전자 DNA를 95°C에서 5분간 변성시킨 다음, 55°C에서 1분간 시발체(Table 3)와 결합시킨 후 94°C에서 1분간, 55°C에서 1분간, 72°C에서 2분간의 반응을 30회 반복 증폭한 후 72°C에서 5분간 연장반응시키고 25°C에서 정지하였다. 여기서 증폭된 DNA를 시료로 하여 각 엑손을 2차 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 2차 중합효소연쇄반응은 94°C에서 30초, 55~60°C에서 30초, 72°C에서 1분간의 반응을 30회 반복 증폭시킨 후 MDE 젤을 사용한 SSCP를 시행하여 변이가 있다고 판독된 유전자 증폭산물들을 정제과정을 거친 후 직접 염기서열 분석을 시행하여 결과를 판독하였다. 여기서 시행된 SSCP와 정제과정, 직접염기서열 분석법은

hMLH1과 hMSH2 분석과 동일한 방법으로 시행하였다.

(5) 통계분석: MSI의 빈도와 해부학적 위치와의 관계, hMSH2와 p53 유전자 변이의 발현 빈도는 비율차이에 의한 Z-검정을 시행하였고 MSI과 병리조직학적 분화도, hMSH2 유전자 변이, p53 유전자 변이와의 관계는 카이제곱 검정방법으로 비교하였다.

결 과

1) MSI 양성 또는 음성 판정과 빈도

MSI 양성의 판정은 반복서열 불안정성이 있는 5개의 유전자 부위에 대한 유전자 증폭산물을 전기영동시킨 젤상에서 적어도 2곳 이상의 부위에서 정상조직에서 볼 수 없었던 비정상적인 띠가 발견된 경우나 정상조직에서 볼 수 있었던 띠가 없어진 경우를 MSI 양성으로 판정하였다.<sup>20</sup> 본 실험에서는 AP△3을 제외한 D2S123, D3S1029, D5S107, D6S87의 모든 유전자 부위에서 Fig. 1과 같은 양상의 반복서열 이상발현을 관찰할 수 있었으며 총 60예 중 D2S123 부위에 12예, D3S1029 부위에 10예, D5S107 부위에 6예, D6S87 부

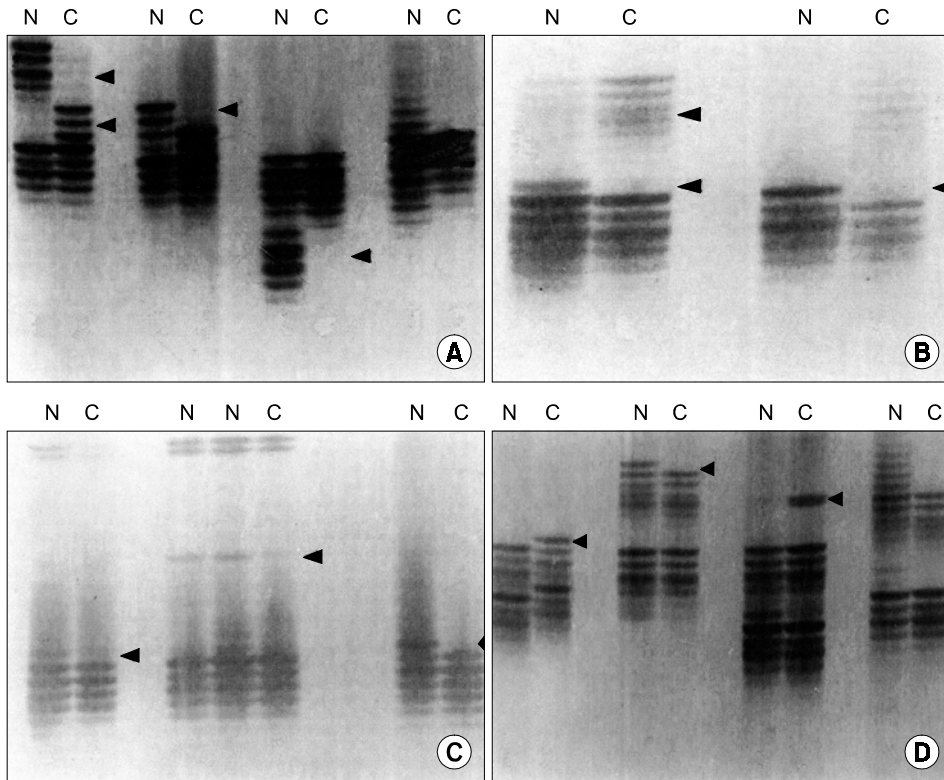


Fig. 1. Microsatellite instability patterns in multiple polyposis and sporadic cancers using 4 microsatellite loci. A = D2S123; B = D6S87; C = D5S107; D = D3S1029; N = Normal DNA; C = Cancer DNA. Arrows = expansion or reduce type abnormal band.

위에 9예의 반복서열이상이 있었다. MSI 양성은 CCMP에서 30예 중 9예(30%), SCC 경우 30예 중 6예(20%)로 총 15예에서 관찰되었다. 반복서열 이상이 한곳 이상에서 있던 경우는 CCMP에서 11예, SCC에서 8예로 총 19예이었다(Table 4).

**2) MSI 양성과 병리조직학적 분화도 또는 병기와의 관계**

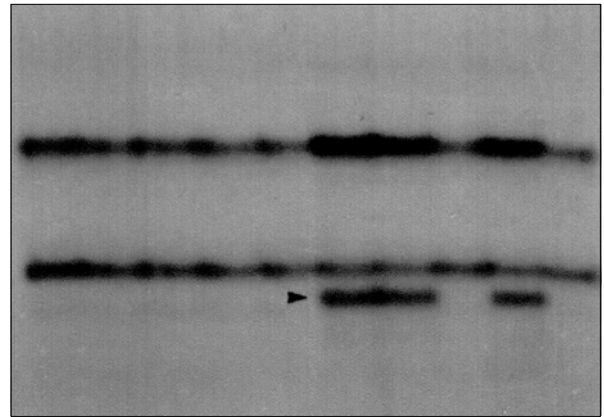
MSI 양성과 종양의 해부학적 위치의 관계를 보면 MSI 양성이 우측결장암 24예 중 8예(33%), 좌측결장암 13예 중 3예(23%), 직장암 23예 중 4예(17%)였으며 좌,우로 나누어 본다면 우측이 33% (8/24예), 좌측이 19% (7/36예)로 우측에서 의의 있게 증가된 MSI 양성 반응이 관찰되었다(P=0.01). MSI와 암조직분화도를 보면 MSI 양성인 경우가 고분화암에서 6예 중 4예(67%), 중등도분화암 49예 중 8예(16%), 저분화암 5예 중 3예(60%)로 저분화암에서 중등도분화암보다 의의 있게 높은 양성반응이 관찰되었으나(P=0.005) 고분화암과는 비슷한 반응을 보였다. 또한 SCC에서 MSI 양성인 경우가 중등도분화암이 5% (2/24예)로 고분화암 67% (2/3예) 및 저분화암 67% (2/3예)보다 의의 있게 낮은 반응을 보였다(P=0.006). Dukes씨 병기와의 관계를 보면 MSI 양성이 A병기에서 0% (0/2예), B병기에서 35% (7/20예), C병기에서 22% (7/32예), D병기에서 17% (1/6예)로 B병기에서 MSI 양성이 많이 관찰되었으나 통계학적 의의는 없었다(Table 4).

**3) hMLH1 유전자 및 hMSH2 유전자 변이**

SSCP 결과 암조직 또는 정상부위 조직 대부분에서 변이를 보이지 않았으나, hMSH2 유전자의 엑손 12와 13 사이의 인트론부위에서 3예의 변이(CCMP 2예, SCC 1예)가 관찰되었으며(Fig. 2) 이들의 염기서열 분석 결과 3예 모두에서 엑손 13 시작 코돈 669에서 상류로 6번째의 T가 C로 치환되었다(Fig. 3). 이 3예의 변이 모두 MSI 양성이었다(20%, 3/15예).

**4) p53 유전자 변이**

엑손 5, 6, 7, 8 부위에 대한 SSCP 결과(Fig. 4), CCMP



**Fig. 2.** SSCP results of exon 12 and 13 intron border of hMSH2. Arrow = abnormal band.

**Table 4.** Relation between genetic instability and clinicopathological variables

		Genetic instability (+)			Genetic instability (-)		
		Total (n=15)	CCMP* (n=9)	Sporadic <sup>†</sup> (n=6)	Total (n=45)	CCMP (n=21)	Sporadic (n=24)
Location	Right (n=24)	8	5	3	16	9	7
	Left (n=13)	3	2	1	10	3	7
	Rectum (n=23)	4	2	2	19	9	10
Differentiation	Well (n=6)	4	2	2	2	1	1
	Moderately (n=49)	8 <sup>‡</sup>	6	2 <sup>‡</sup>	41 <sup>‡</sup>	19	22 <sup>‡</sup>
	Poorly (n=5)	3	1	2	2	1	1
Dukes' stage	A (n=2)	0	0	0	2	2	0
	B (n=20)	7	5	2	13	9	4
	C (n=32)	7	4	3	25	8	17
	D (n=6)	1	0	1	5	2	3

\*CCMP = Colorectal cancer with multiple polyps; <sup>†</sup> Sporadic = Sporadic colorectal cancer; <sup>‡</sup> Statistically significant (p<0.01) in comparison between genetic instability positive and negative.

의 경우 MSI 양성의 33% (3/9예)에서, MSI 음성의 29% (6/21예)에서 p53 유전자 변이가 관찰되었으며 SCC의 경우 MSI 양성의 33% (2/6예)에서, MSI 음성의 33% (8/24예)에서 p53 유전자 변이가 관찰되었다(Table 5).

SSCP 결과 p53 유전자 변이가 양성인 19예에서 DNA 염기서열 분석결과 모두 점 변이를 나타냈으며 코돈 175에서 GCG→GCA가 3예(exon 5), 코돈 219에서

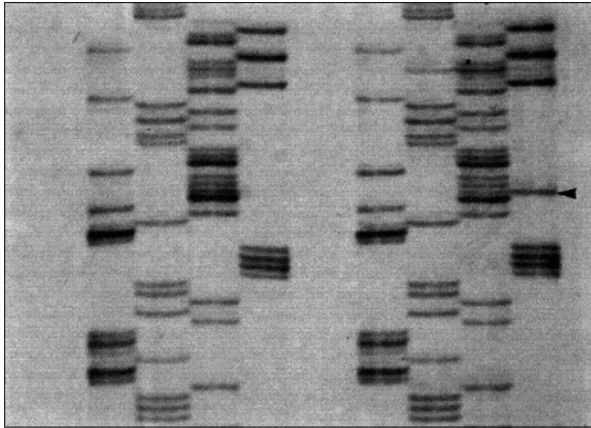


Fig. 3. Sequence for hMSH2 exon 13 showing a point mutation (C for T) in the intronic splice acceptor site 6 bases upstream of position 2006. Arrow = point mutation (C for T).

GCC→GCA 경우가 2예(exon 6), 코돈 234에서 CTA→CTG 경우가 2예(exon 7), 코돈 244에서 GGG→GGA 경우가 2예(exon 7), 코돈 245에서 CGG→CGA 경우가 4예(exon 7), 코돈 273에서 CGC→CGT 경우가 6예(exon 8)이었다. 점 변이에 대한 분석 결과를 보면 G→A 치환이 19예 중 9예로 가장 많았고, C→T 치환이 6예, A→G 치환이 2예, C→A 치환이 2예순이었다(Fig. 5).

또한 해부학적 위치, 병리조직학적 분화도 및 병기와의 관계를 보면 우측 결장암 33% (8/24예), 좌측결장암 30% (4/13예), 직장암 30% (7/23예)로 비슷한 빈도의 p53 점변이를 보였으며, 좌, 우를 비교하여도 좌측이 33% (11/36예), 우측이 33% (8/24예)로 비슷하였다. 분화도의 경우 고분화 암에서 33% (2/6예), 중등도분화 암에서 34% (15/44예), 미분화 암인 경우 40% (2/5예)로 비슷하였으며, Dukes씨 병기 중 A병기는 50% (1/2예), B병기는 30% (6/20예), C병기는 31% (10/32예), D병기는 33% (2/6예)로 모두 30%에서 40% 정도의 비슷한 p53 점 변이를 보였다(Table 6). 또한 CCMP인 경우 30% (9/30예), SCC에서는 33% (10/30예)의 점 변이가 있었으며 MSI 양성인 경우 33% (5/15예), 음성인 경우 32% (14/45예)의 점 변이를 나타냈다(Table 5).

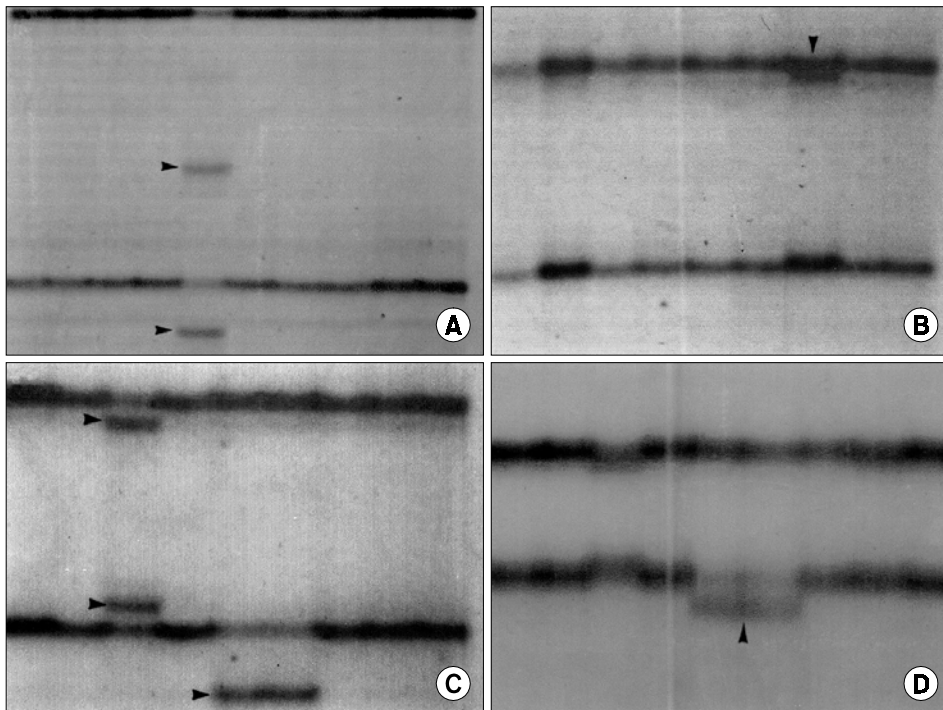


Fig. 4. SSCP results of exon 5, 6, 7, 8 of p53 gene. A = exon 5; B = exon 6; C = exon 7; D = exon 8. Arrow = abnormal band.

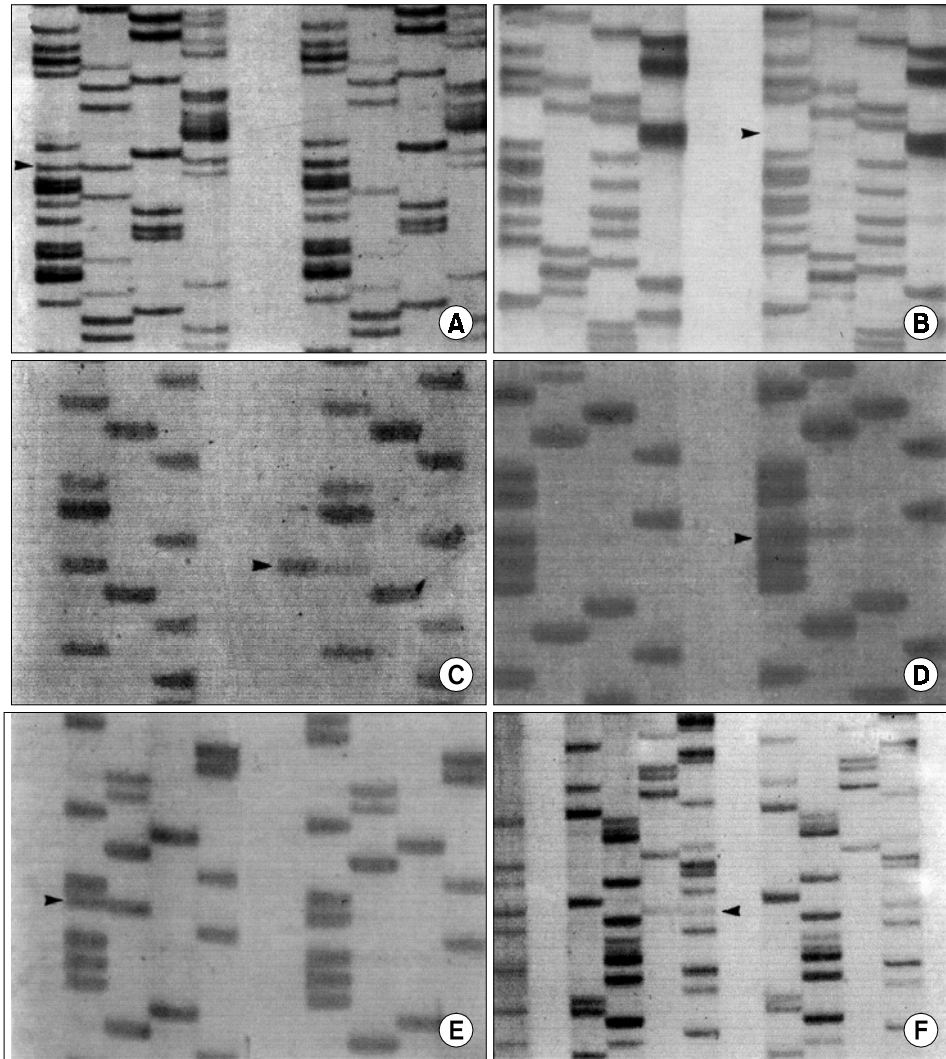


Fig. 5. Sequence for exon 5, 6, 7 and 8 of p53 showing a point mutation. A = exon 5 codon 175 A for G; B = exon 6 codon 219 A for C; C = exon 7 codon 234 G for A; D = exon 7 codon 244 A for G; E = exon 7 codon 245 A for G; F = exon 8 codon 273 T for C.

### 고 찰

일반적으로 대장-직장암 중 FAP에는 주로 APC 유전자가, SCC에는 K-ras, APC 유전자의 영향도 있지만 주로 p53, MCC 및 DCC 유전자 등이 암발생에 관여한다고 알려져 있으나,<sup>3,6</sup> 환자들 중에는 분류가 모호하며 또한 발생기전이 잘 알려져 있지 않은 환자군이 있는데 Fearon (1993)<sup>7</sup>은 이들을 FAP의 attenuated form 또는 category로 정의하기도 하고 Rossi (2002) 등은 HNPCC의 범주라고 하기도 하는데 저자들은 이 환자군을 가칭 CCMP (colorectal cancers with multiple polyps.)라 하고 본 연구를 시행하였다.

유전적 불안정성(genetic instability)의 한 표현형으로

볼 수 있는 반복서열 불안정성(microsatellite instability, 이하 MSI)은 암발생의 제 3의 기전으로 대두되고 있지만 CCMP나 SCC에서의 DNA 보수유전자의 역할은 아직 잘 규명되어 있지 않다. MSI의 양성 또는 음성(유전적 불안정성) 판정에 대하여 Motoko 등<sup>16</sup>과 Thibodeau 등<sup>22</sup>은 1개 이상의 반복서열 이상을, Aaltonen 등<sup>23</sup>은 서로 다른 2개 이상의 반복서열 이상을 보인 경우를 MSI 양성으로 정의하였는데, 저자들은 적어도 서로 다른 2개 이상의 반복서열 이상을 보인 경우 MSI 양성으로 간주하였다. 그 이유는 자연적인 체세포 변이를 보이는 다형성(pleomorphism)의 빈도가 아직까지 밝혀져 있지 않아 한 부위에서만 반복서열 이상을 보인 경우는 이 부위에 취약성이 있는 것

Table 6. Relationship between hMSH2 CpG instability and hMSH2, pathologic variables

		Genetic instability (+) Differentiation				Genetic instability (-)						
		Total (n=45)	Lt (n=13)	CCMP (n=23)	Sporadic (n=6)	Mod (n=49)	Total (n=45)	A (n=2)	CCMP (n=20)	C (n=32)	Sporadic (n=26)	
hMSH2	TTCCT <sup>†</sup> →TTCCT <sup>‡</sup>	3	3 <sup>§</sup>	0	2 <sup>§</sup>	0	0	1	0 <sup>§</sup>	1	20 <sup>§</sup>	0
p53	CCodon 1735 (CCCCG→CCCA)	2	1	0	1	1	0	0	1	0	2	2
	CCodon 2199 (CCCCC→CCCA)	0	0	1	0	1	0	0	1	1	2	0
	CCodon 2344 (CTAA→CTTG)	1	0	1	0	0	1	1	2	0	1	2
	CCodon 2444 (CCCCG→CCCA)	0	0	0	0	2	1	0	2	1	0	1
	CCodon 2455 (CCCCG→CCCA)	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1	4
	CCodon 2733 (CCCCC→CCCT)	3	2	1	1	2	0	1	2	1	5	2
Total	Total	8	5	4	3	7	1	2	6	10	14	2

\*CCMP = Colorectal cancer with multiple polyps; <sup>†</sup> Sporadic = Sporadic colorectal cancer; <sup>‡</sup> A point mutation in the intronic splice acceptor site 6 bases upstream of position 2006; <sup>§</sup> Statistically significant (p<0.01) in comparison between genetic instability positive and negative.

으로 생각되기 때문이다.<sup>21</sup> MSI 양성 또는 음성(유전적 불안정성)을 정의하기 위하여 얼마나 많은 유전자 부위에 대하여 반복서열 검사를 시행해야 하는가에 대한 명확한 규정은 여러 저자들에 의하면 여러 염색체 내에서 서로 다른 위치에 있는 5~7개 사이의 유전자 부위에서 반복서열을 검사하여 MSI 양성 또는 음성(유전적 불안정성)을 판정하였으며<sup>14,21,24,25</sup> 저자들도 서로 다른 염색체에 위치한 5개의 유전자부위 중 반복서열을 검사하였다.

MSI 양성의 빈도를 보면 Motoko 등<sup>16</sup>은 HNPCC 경우 95%, SCC 경우 13~24%로 보고하였고, Aaltonen 등<sup>23</sup>은 가족력이 있는 대장-직장암이 13%, Thibodeau 등<sup>22</sup>은 우측 결장암에서 28%로 보고하였고 Leichman<sup>34</sup>은 MSI 양성률은 right colon location, younger age of onset, poor histologic differentiation with mucin production, peritumoral lymphoid response와 관련이 있다고 하였고 새로이 진단되는 colon cancer의 15%에서 MSI 양성을 나타냈다고 하였다.

저자의 실험에서 보면 SCC에서 20%의 MSI양성을 관찰할 수 있어 다른 보고들과 비슷하였으며, CCMP에서도 30%의 MSI 양성을 관찰할 수 있어 SCC에서 보다 높은 빈도를 나타냈으나 통계적 의의는 없었다. 또한 본 실험에서도 우측결장에서 MSI 양성인 경우가 33%로 좌측결장의 19%보다 많이 관찰되었고, 암종의 분화도와와의 관계를 보면 MSI 양성인 경우가 미분화암 60% (3/5예)로 분화암 22% (12/55예)보다 많이 관

찰되었으나(P=0.005) 미분화 암이 5예로 예가 적어 추후 더 많은 예에서 조사가 필요할 것으로 생각된다. Dukes씨 병기와와의 관계를 보면 A병기 0%, B병기 35%, C병기 22%, D병기 7%로 관찰되었으나 통계학적 의의는 없었다. 이것 역시 A병기(n=2)와 D병기(n=6)가 B병기(n=20), C병기(n=32)보다 수가 매우 적으므로 더 많은 경우에서 조사되어야 할 것이다.

부정합 보수유전자 체계는 아직까지 자세히 밝혀지지 않았지만 현재까지 보고에 의하면 염색체 2번 단완에 위치한 hMSH2, 3번 염색체 단완에 위치한 hMLH1, 2번 염색체 장완에 위치한 hPMS1 그리고 7번 염색체 장완에 위치한 hPMS2, 2번 장완16에 위치한 hMSH6 (GTBP) 등 5종의 유전자 변이가 알려져 있다.<sup>15,27-29</sup> HNPCC에 관계한다고 현재까지 알려진 5가지 부정합 보수 유전자 중 가장 중요한 것은 hMSH2로 이것은 DNA 복제 착오 복구 과정 중 염기상 오류 부위를 인지하고 이를 복구하는 데 관여하는 유전자로서, 박테리아 MutS 단백질의 동류이며 HNPCC의 50~60%에서 유전자 변이가 나타나고, 이외에 hMLH1는 HNPCC의 약 30%에서 유전자 변이가 나타나며 그 외에도, hPMS1, hPMS2, hMSH6의 변이가 나타난다고 한다.<sup>21,29,30</sup> 또한 Liu 등<sup>30</sup>이 HNPCC 가계 중 29 가계에서 hMSH2를 이용하여 9가지 형태의 변이를 보고한 이후 현재까지 약 80여종의 변이가 보고되고 있다.<sup>30-32</sup>

저자들은 가장 많은 유전자 변이가 알려져 있는 hMLH1의 엑손 2, 16, 19와 hMSH2의 전 구조 중 대장



균과 *Saccharomyces cerevisiae*의 hMSH2와 구조에서 약 85% 이상의 동일한 구조를 갖고 있는 코돈 598부터 789 사이가 가장 중요한 기능적 역할을 할 것으로 생각하여,<sup>31</sup> hMSH2의 엑손 11, 12, 13, 14에 대한 변이를 조사하였다. 저자들의 실험에서 보면 CCMP와 SCC 모두에서 hMLH1의 엑손 2, 16, 19와 hMSH2의 엑손 11, 12, 13, 14에서 변이를 관찰할 수 없었다. 이는 MSI 양성인 CCMP 30%, SCC 20%가 나타난 것으로 보아 MMR의 유전자 변이가 있을 것으로 생각되나 저자들이 빈도가 높다고 판단되는 일부분에서 변이를 조사하였기 때문이라고 생각된다. 한편 관찰대상이 아닌 다른 곳의 sequence가 계속적으로 이상을 보여 다시 그 부위를 조사하여 primer 새로 만들어 intron 부분의 sequence 검사한 결과 CCMP에서 MSI 양성인 경우 중 2예와 SCC에서 MSI 양성인 경우 중 1예에서 엑손 13이 시작되는 곳인 코돈 669부위의 상부 6번째 염기가 T에서 C로 치환된 것을 관찰할 수 있었는데, Leach 등<sup>29</sup>은 HNPCC에서도 발견되지만 정상인에서도 관찰할 수 있다고 하여 변이라고 보기보다는 DNA의 다형성이라고 하였는데, 본 실험에서는 이와 같은 DNA다형성이 MSI 양성인 경우에서만 관찰되었다(P=0.002).

상기 두 가지 실험결과를 종합하여 보면 CCMP의 MSI 양성인 30%로 SCC의 MSI 양성(20%)보다 많이 발견되어 MMR의 변이가 예상되지만 hMLH1 또는 hMSH2의 염기서열 변화를 관찰할 수 없고 오히려 인트론부위의 다형성만이 관찰되어 저자들이 검사하지 않은 다른 부분의 부정합 보수유전자 변이가 있을 것으로 생각되며 또는 또 다른 복구 유전자의 이상도 가능성이 있을 것으로 추정되며 이에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

p53 유전자의 변이에 대하여 Greenblatt 등<sup>32</sup>은 지금까지 보고된 자료들을 종합하여 분석한 결과 대장-직장암에서 전체적인 p53의 변이율은 50%에 달하며 4종류의 점변이와 결손(deletion) 및 삽입(insertion), 6종류의 전이(transition)가 있었다고 하였다. 또한 점 변이만을 볼 때 36%의 변이율을 나타냈으며 G-A 치환이 가장 많다고 하였다. 저자들의 실험에서도 SSCP와 염기서열분석 결과 유전자 변이 양성인 19예(32%) 모두에서 점 변이를 나타냈으며 CCMP에서 30% (9/30예), SCC에서 33% (10/30예)의 변이율을 보여 비슷한 결과를 나타냈으며 점 변이의 종류도 G-A 치환이 47% (9/19예)로 가장 빈도가 높았다. 한편 DNA 복구 유전자 중 부정합 보수유전자와 p53 유전자와의 관계에 대하여 Greenblatt 등<sup>32</sup>은 HNPCC에서 특이한 관계를 발

견할 수 없다고 하였으나 Leichman<sup>34</sup> MSI 양성인 직장암에서는 APC 유전자나 p53 유전자의 변이가 적다고 하였고 p53 유전자 변이는 좌측 결장에 더 많이 발생한다고 하였으며 MSI 양성인 암은 MSS (microsatellite stable) 암보다 less aggressive biologic behavior를 가지며 5년 생존율도 높다고(76% vs 54%)하였다. 저자들의 경우에서도 MSI 양성인 경우 33% (5/15예), MSI 음성인 경우 31% (14/45예)에서 p53의 염기서열 변이를 관찰할 수 있어 차이가 없었으며 좌, 우측을 비교하면 좌측이 31% (11/36예), 우측이 33% (8/24)로 비슷한 결과를 나타냈다. 생존율에 대한 추적은 향후 계속 할 예정이다. 분화도와와의 관계를 보면 분화 암 39% (17/55예), 미분화 암 40% (2/5예)이었고 Dukes 병기와의 관계를 보아도 A병기(50%), B병기(30%), C병기(31%), D병기(33%)에서 모두 30%에서 40%의 p53 점 변이를 보여 병리조직학적 분화도 및 Dukes씨 병기 모두 p53 변이와는 상관관계가 없음을 알 수 있었다.

## 결 론

이상의 결과를 종합하여 보면 CCMP에 적용되는 기전은 HNPCC에는 해당하지 않을 것으로 생각되며 APC 유전자 검사가 이루어지지 않아 FAP 변형에 대한 기전은 확실하지 않으나 MSI 양성률과 p53 유전자 변이를 보면 SCC와 유사한 기전을 갖지만 부분적으로 유전적 성향을 가진 변형의 가능성을 배제할 수 없다. 향후 APC 유전자와 다른 종류의 MMR 유전자에 대한 연구가 필요하다고 생각한다.

## REFERENCES

- Weinberg R. Oncogenes, anti-oncogenes, and the molecular basis of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 1989; 49:3713-8.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
- Baker SJ, Fearon E, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal cancer. *Science* 1989;244: 217-21.
- Fearon ER, Cho KR, Nigro JM. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990;247:49-56.
- Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991;66:589-600.

6. Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, et al. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 1991;251:1366-70.
7. Fearon ER. Cancers of the gastrointestinal tract. In: cancer 6th Philadelphia: Lippin Cott Williams and Wilkins 1993:1037.
8. Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 1991;51:3075-9.
9. Economou EP, Bergen AW, Warren AC, Antonarakis SE. The polydeoxyadenylate tract of Alu repetitive element is polymorphic in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2951-4.
10. Riply LS. Frameshift mutation determinants of specificity. *Ann Rev Genet* 1990;24:189-225.
11. Modrick P. Mechanism and biological effect of mismatch repair. *Ann Rev Genet* 1991;25:229-39.
12. Parsons R, Li GM, Longly MJ, Longley MJ, Fang WH, Papadopoulos N, et al. Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell* 1993;75:1227-36.
13. Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 1993;365:274-6.
14. Shibata D, Peinado MA, Ionov S, Ionov Y, Malkhosyan S, Perucho M. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nature Genet* 1994;6:273-81.
15. Nicolaidis NC, Papadoulis N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Science* 1991;253:665-9.
16. Motoko K, Rei KY, Kiyoko T, Masatoshi M, Asaka O, Yukako O, et al. Molecular Nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterology* 1996;111:307-7.
17. Nickolas P, Annika L. Molecular basis of HNPCC: Mutations of MMR genes. *Human Mutation* 1997;10:89-99.
18. 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;55:659-5.
19. Kogan SC, Doherty M, Gitschier J. An improved for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *N Engl J Med* 1987;317:985-90.
20. Ainsworth PJ, Surh LC, Coulter-Mackie MB. "Diagnostic single-Strand Conformational Polymorphism,(SSCP): A simplified non-radioisotopic method as applied to a Tay-Sachs B1 Variant". *Nucleic Acids Res* 1991;19:405-6.
21. Lothe RA, Peltomaki P, Meling GI, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, Pylkkanen L, et al. Genomic instability in colorectal cancer: relationship of clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 1993;53:5849-52.
22. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-9.
23. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, et al. Clues to the pathogenesis of family colorectal cancer. *Science* 1993;260:812-6.
24. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558-61.
25. Peltomaki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M. Mutations of a muts homology in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993b;75:1215-25.
26. Erilichman C. Adjuvant Treatment in Stage II Colon Cancer. *American Society of Clinical Oncology, 2000 Clinical Practice Forum Book* 2000:107-9
27. Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 1994;263:1625-9.
28. Matsutani A, Janssen R, Donis-Keller H, Permutt NA. A polymorphic (CA)<sub>n</sub> repeat element maps the human glucokinase gene (GCK) to chromosome 7p. *Genomics* 1992;12:319-25.
29. Leach FS, Nicolaidis NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, et al. hMSH2 mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds. *Cancer Res* 1994a;54:4590-4.
30. Liu B, Parsons RE, Hamiton SR, Petersen GM, Lynch HT, Watson P, et al. hMSH2 mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds. *Cancer Res* 1994a;54:4590-4.
31. Wijnen J, Fodde R, Khan PM. DGGE polymorphism in intron 10 of MSH2, the HNPCC gene. *Hum Mol Genet* 1994;3:2268.
32. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994;54:4855-78.
33. Rossi BM, Lopes A, Ferreira FO, Nakagawa WT, Ferreira CN, Rocha JC, et al. hMLH1 and hMSH2 gene mutation in Brazilian families with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Surgical Oncol* 2002;9(6):555-61.

34. Leichman L. Molecular biology in the management of colorectal cancer: a clinical perspective and brief overview at 2000. p100-106; American Society of Clinical Oncology/2000 clinical practice forum book.

편집인의 글

대장암의 발생기전은 암 유전자, 암 억제 유전자의 변이에 의한 기전과 부정합 보수 유전자의 변이에 의한 기전 등으로 알려져 있다. 두 기전에 의한 환자 군을 정확하게 구분할 수는 없으나 임상적 소견 및 가족력 등으로 추정을 할 수는 있다. 그러나 실제 임상에서는 수술 표본에서 암 부위뿐 아니라 다른 부위에 많은 용종이 동반되는 것을 흔히 관찰할 수 있어 이런 범주의 환자를 가족성 용종증 혹은 산발성 대장암 또는 HNPCC 등 어떤 범주에도 포함시키기 어려운 경우가 많다. 보통은 이런 경우 선종-암 단계를 거치는 산발성 대장암의 범주에 포함시키는 것이 타당하다고 생각된다. 본 연구에서는 이런 종류의 대장암을 다발성 용종성 대장-직장암으로 명명하고 이 범주의 환자 군에서 부정합 보수 유전자와 p53 유전자의 변이를 비교하였다. 다발성 용종성 대장-직장암 군이 산발성 대장암 군보다 MSI의 빈도가 다소 높았으나(30% vs 20%) p53 유전자 변이의 빈도도 산발성 대장암과 비슷하여 이 부류의 환자 군은 산발성 대장암의 범주에 속할 것으로 보인다. 다만 저자들의 결론에서 이런 군의 환자들 이 MSI 빈도가 증가한 것으로 보아 부분적으로 유전성의 경향을 보일 수 있으며 다른 종류의 부정합 보수 유전자의 변이가 있을 것으로 추정하였으나 이는 부정합 보수 유전자의 변이에 의한 MSI 증가로 보기보다는 MLH1 유전자의 promoter 부위의 hypermethylation에 의한 MSI로 해석하는 것이 더 타당할 것으로 생각되어 이 군의 환자에서 MLH1 promoter hypermethylation에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

단국대학교 의과대학 외과학교실  
박 동 국