

대장암에서의 Microsatellite Instability와 임상적 의의

건국대학교 의과대학 외과학교실, ¹고려대학교 의과대학 외과학교실, ²병리학교실, ³한림대학교 의과대학 병리학교실

김경래 · 정순섭 · 문홍영¹ · 채양석² · 조성진³

Microsatellite Instability and Clinicopathologic Significance in Colon Cancer Patients

Kyong Rae Kim, M.D., Soon Sup Chung, M.D., Hong Yong Moon, M.D.¹, Yang Seok Chae, M.D.² and Seong Jin Cho, M.D.³

Purpose: Colon cancer shows various genetic alterations in its development and progression. Recently, microsatellite instability (MSI) has been related to a novel mechanism of carcinogenesis, and might be a useful prognostic factor in several gastrointestinal malignancies. The loss of heterozygosity (LOH) is known to be related with the allelic loss of various tumor suppressor genes, however, MSI, which has been found to result from an erroneous DNA mismatch repair system, has been known to be involved in the carcinogenesis of hereditary non-polyposis colon cancers and some aspects of sporadic colorectal cancers. In this study, the status of MSI was examined in sporadic colon cancers, and its correlation with various clinico-pathological parameters investigated.

Methods: Fifty sporadic colorectal cancers, treated by surgery alone, were analyzed for the presence of MSI using microsatellite markers, and tumor and normal DNA, obtained from formalin-fixed paraffin-embedded archival tissues. MSIs were examined at the BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 and D17S250 loci, as recommended in the 1997 NIH International Workshop on Microsatellite Instabilities and RER phenotypes.

Results: MSI was detected in 11 cases (22%), and was more frequently detected in the non-metastatic adenocarcinoma and Astler-Coller stages A+B1+C1 groups than in the metastatic and B2+C2+D groups. Also, there were no metastatic cases in the MSI-high group, where more than 3 loci had MSI. LOH was detected in three of the recom-

mended markers, and was observed in 17 cases (34%). LOH was more highly detected in the metastatic and B2+C2+D groups, but there was no correlation with the clinico-pathological parameters. However, no LOH-positive cases were found in the MSI-positive group.

Conclusion: These results suggest that MSI may be partially involved in colorectal carcinogenesis and the metastasis mechanism. Also, the clinical use of the MSI status may help in determining the prognosis of colorectal cancer patients. (*J Korean Surg Soc* 2003;65:234-240)

Key Words: Microsatellite instability, Loss of heterozygosity, Colorectal cancer

중심 단어: 현미부수체 불안정성, 이형접합소실, 대장직장암

Department of Surgery College of Medicine, Konkuk University, Chungju, Departments of ¹Surgery and ²Pathology, College of Medicine, Korea University, ³Department of Pathology, College of Medicine, Hallym University, Seoul, Korea

서 론

대장암은 우리나라에서 최근 그 빈도가 급증하는 추세에 있으며,⁽¹⁾ 증상 발현이 늦어 환자의 반수 정도에서는 진단 시 이미 초기에 암의 전이가 발생하여 높은 사망률을 보인다. 결직장암의 발생 기전에 대한 분자종양학적인 연구는 Vogelstein 등⁽²⁾에 의해 종양억제유전자 중 하나인 p53 유전자의 역할이 규명되면서 이른바 다단계 발암기전에 의거하여 선종에서 암종으로 진행되는 ‘adenoma-carcinoma sequence’라는 기전으로 잘 정립되었고, 이 기전을 중심으로 많은 다양한 암억제 유전자, 발암유전자가 관여함이 규명되어 왔으며,⁽³⁾ 이러한 병리조직학적 이외의 인자들이 종양 수술 후 치료 및 예후 판정에 많이 응용되고 있다.^(4,5)

한편, 최근 염색체의 다형성 표지자 (polymorphic marker)에서의 이형접합소실 (loss of heterozygosity: 이하 LOH) 등의 현미부수체(microsatellite) 변이가 미지의 종양억제 유전자의 존재를 암시한다고 보고되고 있으며, LOH는 종양억

책임저자 : 문홍영, 서울시 구로구 구로동 80
☎ 136-705, 고려대학교 의과대학 구로병원 외과
Tel: 02-818-6673, Fax: 02-859-5941
E-mail: hymoon@korea.ac.kr

접수일 : 2002년 12월 31일, 게재승인일 : 2003년 6월 18일
본 논문의 요지는 2002년 대한외과학회 추계학술대회에서 구연 발표되었음.

계유전자의 결손과 관련되는 기전으로 알려져 있다. 이 같은 LOH의 검출에는, 길이의 다형성을 보이고 계놈 전체에 걸쳐 분포되어 있는 short tandem repeat로 구성된 microsatellite가 유용한 표지자로 사용될 수 있으며, 이 microsatellite의 미세한 유전적 변이는 전기영동에서 종양 DNA의 이동 변화로 나타나므로 microsatellite 표지자를 사용한 LOH의 분석은 거의 모든 장기의 종양에서 최근 규명되고 있다. 결직장암종을 대상으로 한 최근까지의 연구에서는 거의 모든 암세포의 다양한 좌위에서 지역적, 인종적으로 다른 양상으로 LOH가 빈번하게 일어남이 보고되었다.(6-8) 한편, 소화기계 장기의 발암 기전에 종양유전자, 종양억제 유전자의 변이 및 LOH 외에도 복제오류 교정 유전자 (mismatch repair gene)들이 관여한다고 밝혀지고 있다. 즉, 이는 DNA의 복제 오류 교정에 관여하는 유전자들에서 장애가 생겨 발암화되는 새로운 기전으로서 microsatellite instability (이하 MSI)가 그 척도로서 밝혀졌으며 유전성 비 용종성 대장암 외에도 단일 대장암, 위암의 일부에서도 MSI가 발암 기전으로 작용한다고 보고되고 있다.(9,10) 그러나 MSI 기전이 대장암종에서 어떤 기전으로 발암 기전에 작용하는지, 그리고 임상병리학적으로는 어떤 특성을 갖는 지에 대해 아직 확실하게 밝혀진 바는 없으며 의외로 그에 대한 연구가 드물다.

대장암 환자의 예후를 결정할 때 기존의 임상병리학적 인자들 외에도 다양한 유전자의 변이를 참고하게 되지만, 기존의 대부분의 문헌들은 특정 개개의 유전자 변이 또는 암세포 좌위에서의 microsatellite 변이에 국한된 연구들이 대부분이며, 결직장암을 대상으로 MSI를 LOH와 함께 종합적으로 조사하여 상호관계를 규명한 연구는 드문 실정이다. 이에 본 연구에서는 대장암에서의 microsatellite 변이의 기전과 임상적인 특성을 파악하기 위해 50예의 대장암을 대상으로 하여 MSI, LOH를 조사했으며, 여러 임상, 병리학적 인자들과의 연관성을 규명하고자 하였다.

방 법

1) 연구 대상

고려대학교 의료원에서 1995년 1월부터 1996년까지 대장암으로 진단 받고 외과적 절제술을 시행 받은 증례 중 환자의 임상 추적 기록과 파라핀 블록 상태가 양호한 50예를 연구대상으로 하였다. 이때 각 증례 당 종양 세포의 분포가 50% 이상이 되는 파라핀 블록과 종양에서 멀리 떨어져 위치한 정상 조직의 블록 등 2개를 선정하였다.

2) 실험 방법

(1) 미세절제술(Microdissection) 및 DNA 추출: 조직 내의 DNA 채취를 위하여 각 증례 당 파라핀 포매 조직을 6µm 두께의 연속절편으로 만들어 H&E 염색을 한 후, 슬라이드

를 2% glycerol 용액에 2분간 담가두었다가 꺼내, 현미경하에서 저배율로 관찰하면서 30 gauge 주사 바늘을 이용하여 슬라이드로부터 긁어내었다. 미세절제술로 얻어진 생검 조직 또는 파라핀 포매조직을 1.5 ml Eppendorf tube에 담그고, 기타 모든 시약 및 기구들은 소독하거나 1회용을 사용하였다. 이들 파라핀 조직을 xylene으로 2회 탈파라핀하고 0.5 ml 무수에탄올 1로 pellet을 2회 세척한 후 2~3방울의 아세톤을 가한 다음 58°C 에서 15분간 방치하였다. 건조된 시료를 DNA extraction buffer(100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1% Tween 20, 0.1 mg/ml proteinase K)가 들어 있는 1.5 ml eppendorf tube에 넣은 후, 52°C 수욕조에서 2일 동안 방치시켰다. 반응이 끝난 시료는 끓는 물에 10분간 방치하여 proteinase K의 반응을 불활성화시킨 후, 이 중 500µl를 새 튜브로 옮기고 여기에 동일 부피의 phenol/chloroform (1 : 1) 를 넣고 추출하였다. 깨끗한 DNA용액을 얻을 때까지 이 작업을 계속 반복하고, 50µl의 3.5 M sodium acetate와 1 ml의 100% ethanol을 넣고 -20°C에서 30분간 방치한 후, 14,000 rpm 4°C로 30분간 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. DNA는 1 ml의 70% ethanol로 수세한 후 Speed-Vac Concentrator로 건조시키고, DNA pellet을 증류수 200µl로 녹이고 4°C에 보관하면서 이 중 용액 1µl를 중합효소연쇄반응(이하 PCR) 증폭시 주형 DNA로 사용하였다.

(2) Microsatellite alteration 분석: 분석하려는 microsatellite 표지자는 다음의 BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250 등 5가지로 그 시발체는 GIBCO사(USA)에서 제작된 것을 사용하였으며, 염기 서열은 표로 나타내었다(Table 1). 우선 종양 부위와 정상 부위에서 추출한 DNA를 주형으로 하여 각각 PCR을 시행하였으며, 각각의 PCR 용액은 주형 DNA 1µl, 0.2 mM dNTP, 10x buffer, 10 pmol/µl primer, 1U Taq polymerase에 증류수를 가하여 12µl로 되게 하였고, PCR은 각 표본에 대하여 35주기를 반복 실시하였다. 모든 반응은 thermal cycler (Perkin Elmer Cetus 9700, USA)에서 시행하였다. 기본적으로는 각 주기 당 변성 반응은 94°C에

Table 1. DNA sequences used in this study

| Microsatellite analysis | |
|-------------------------|--|
| BAT25 | (f) 5'-TCGCCTCCAAGAATGTAAGT-3' (r) 5'-TCTGCATTTTAAGTATGGCTC-3' |
| BAT26 | (f) 5'-TGACTACTTTTGACTTCAGCC-3' (r) 5'-AACCATTCAACATTTTTAACCC-3' |
| D2S123 | (f) 5'-AAACAGGATGCCTGCCTTTA-3' (r) 5'-GGACTTTCCACCTATGGGAC-3' |
| D5S346 | (f) 5'-ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG-3' (r) 5'-AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT-3' |
| D17S250 | (f) 5'-GGAAGAATCAAATAGACAAT-3' (r) 5'-GCTGGCCATATATATATTTAAACC-3' |

서 30초, 결합반응은 55~60°C에서 30초, 연장반응은 72°C에서 40초씩 시행하고 마지막 주기의 연장반응은 72°C에서 10분간 반응시키고, 증폭된 PCR 산물 3μl를 2% agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

이후 3μl의 PCR 산물과 formamide loading dye (95% formamide, 20 mM EDTA, 10 mM NaOH, 0.05% bromphenol blue, 0.05% xylene cyanol) 3μl를 취해 98°C에서 5분간 끓여 변성시킨 후, 얼음으로 급히 냉각시킨 다음 3μl를 취해 전기영동에 사용하였다. 전기영동을 1,400 V에서 1시간 반 동안 시행한 후 gel을 은 염색하였다. 은 염색은 binding solution에 의해 gel이 붙어 있는 유리판 쪽을 그대로 염색용기에서 10% acetic acid로 30분간 고정시킨 후, 증류수로 3분씩 2회 반복하여 세척하고, silver nitrate 용액에서 30분간 반응시킨 다음 증류수에서 신속히 세척을 한 후, sodium carbonate 용액에서 띠가 뚜렷이 보일 때까지 발색시킨 후, 앞 과정에서 사용한 고정액 10% acetic acid를 혼합하여 반응을 중지시킨 후 띠의 소실여부를 관찰하였다.

3) 임상 및 조직 병리학적 검사

모든 증례의 병리 조직은 2명의 해부병리 전문의가 재판독을 실시하였고 WHO와 UICC에서 규정한 조직학적 등급과 TNM staging에 따라 임상 정보를 정리하였다.

4) 결과판정과 통계처리

MSI 및 LOH 판정은 Gel 상의 band를 밀도측정기를 이용하여 측정하고 정상조직에 비해 추가 띠가 생긴 경우는 MSI로 판정하였고, 정상 조직에 비해 중앙조직에서 band의 길이(length)와 진하기(intensity)의 50% 이상의 소실이 있는 경우를 LOH로 판정하였다(Fig. 1). 또한 각 증례 당 MSI, LOH 모두 3개 표지자 이상에서 검출되면 MSI-High, LOH-High 군으로 분류하였다. 실험결과 중 동형접합성을 보이는 경우와 중앙세포와 대조군 세포 중 어느 하나에서라도 PCR이 되지 않아 유전자 변이를 확인할 수 없는 경우

(non-informative)는 제외시켰다.

통계학적 분석으로는 각 환자의 검체 당 각 microsatellite marker에 대한 MSI와 LOH 및 p53 단백 발현 빈도를 백분율로 분석하였다. 환자의 임상 병기 및 제반 임상 소견 및 예후 인자들과의 상관관계를 상호 비교하고 Chi-square 검정으로 연관성을 검증하였고, P value가 0.05 이하인 경우를 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1) 임상 및 조직학적 소견

병리조직학적 검사 결과 총 50예의 결직장암 증례는 남성 30예(60%), 여성 20예(40%)이었으며, 조직학적 분화도는 고

Table 2. Clinicopathologic findings of colorectal adenocarcinomas

| Clinicopathologic parameters | No. of case (%) |
|------------------------------|-----------------|
| Tumor grade | |
| Well | 17 (34) |
| Moderate | 28 (56) |
| Poor | 1 (2) |
| Mucinous | 4 (8) |
| Astler-Coller stage | |
| A | 5 (10) |
| B1 | 9 (18) |
| B2 | 13 (26) |
| C1 | 3 (6) |
| C2 | 14 (28) |
| D | 6 (12) |
| LN metastasis | |
| (+) | 23 (46) |
| (-) | 27 (54) |

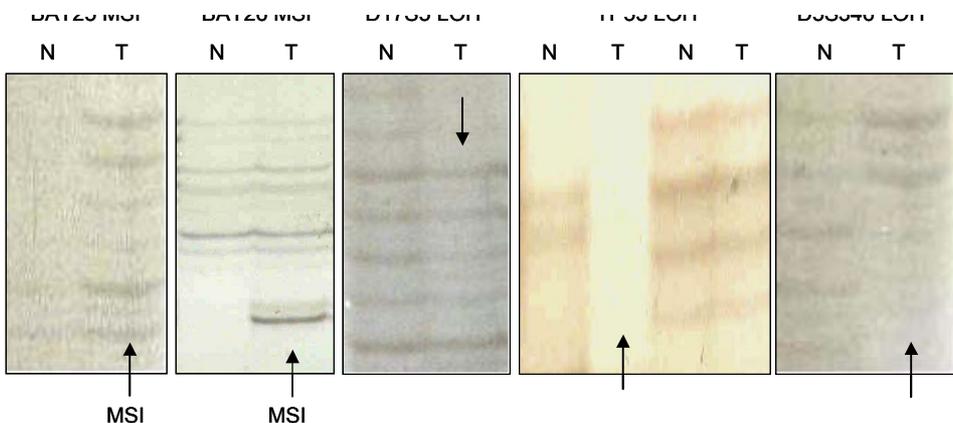


Fig. 1. Microsatellite alterations.

분화도가 17예(34%), 중등도 분화도가 28예(56%), 저분화도가 1예(2%), 점액암종 4예(8%)이었다. 선암종의 Astler-Coller 병기에 따른 분류로는 A 5예(10%), B1 9예(18%), B2 13예(26%), C13예 (6%), C2 14예(28%), D 6예(12%)이었으며, 림프절 전이는 23예(46%)에서 있었고, 27예(54%)는 전이가 없었다(Table 2).

2) Microsatellite alteration 검출(Table 3)

(1) Microsatellite instability 및 Loss of heterozygosity 검출 양상: MSI는 NIH International workshop에서 권고한 BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250 등 5개 표지자로 검출하였다. MSI를 보인 증례는 총 11예(22%)이었으며, 11예 모두 BAT26 표지자에서 MSI가 검출되었다. BAT25 표지자는 49예의 informative 증례 중 6예(12.2%)에서 MSI를 보였으며, D2S123, D5S346, D17S250의 MSI는 각각 44예, 42예, 44예의 informative 증례 중 2예(4.5%), 4예(9.5%), 3예(6.8%)이었다.

LOH는 NIH 권고 표지자 5개 중 BAT25, BAT26을 제외한 D2S123, D5S346, D17S250 표지자 등 3개 표지자에서 검출되었으며, LOH를 보인 증례는 총 17예(34%)였고, 각 표지자는 42예, 45예, 44예의 informative 증례 중 각각 5예(11.9%), 9예(20.0%), 8예(18.2%)에서 LOH가 검출되었다. 한편 MSI-High군은 5예(10.0%)이었고, LOH-High군은 없었다.

(2) MSI와 임상병리학적 특성과의 상관관계: 종양의 분화도에 따른 MSI는 고분화성 암종 17예 중 4예 (23.5%), 중등도 분화 암종 28예 중 6예(21.4%), 저분화성 종양 1예 중 0예, 점액암종 4예 중 1예(25%)에서 검출되어 분화도와 MSI간에는 상관 관계가 없었다($P > 0.05$).

종양의 침윤 정도에 따른 MSI는 A 병기 5예 중 2예(40%),

B1 9예 중 3예(33.3%), C1 3예 중 0예, B2 13예 중 3예(23.1%), C2 14예 중 3예(21.4%), D 6예 중 0예가 검출되었으며, 고유근층까지만 종양 침윤이 있는 A+B1+C1군의 경우 17예 중 5예(29.4%)에서, 고유근층 이상을 침범한 B2+C2+D군에서는 33예 중 6예(18.2%)의 MSI가 검출되어 종양의 침윤 깊이에 따라 MSI 검출률이 낮은 경향을 보였으나 통계학적인 유의성은 없었다($P > 0.05$).

림프절 전이 여부에 따른 MSI는 비전이성 종양에서 27예 중 8예(29.6%), 전이성 종양 23예 중 3예(13.0%)에서 검출되어 비전이성 종양이 전이성에 비해 MSI 검출률이 유의성 있게 높았다($P = 0.021$).

한편 MSI-high 증례는 A, B1, B2군에서 각각 1, 2, 2예씩 검출되었으며, B2+C2+D군에서는 매우 낮게 검출되었으나, 전이성 종양에서는 없었고 이는 통계학적으로 유의하였다($P < 0.001$). MSI-L 군이나 MSI-S 군에서는 종양의 침윤 깊이와 전이성 여부와는 상관관계가 없었다.

3) LOH와 임상병리학적 특성과의 상관관계

종양의 침윤 정도에 따른 LOH는 A 병기 0예(0%), B1 3예(33.3%), C1 2예(66.7%), B2 6예(46.2%), C2 4예(28.6%), D 2예(33.3%)에서 검출되었으며, A+B1+C1군의 경우 5예(29.4%)에서, B2+C2+D군에서는 12예(36.4%)의 LOH가 검출되어 종양의 침윤 깊이가 클수록 LOH 검출 빈도가 높았지만, 통계학적인 유의성은 없었다($P > 0.05$).

림프절 전이 여부에 따른 LOH는 비전이성 종양에서 9예(33.3%), 전이성 종양 8예 (34.8%)에서 검출되어 전이성 종양이 비전이성에 비해 LOH가 다소 높았으나, 유의성은 없었다 ($P = 0.14$). 한편 LOH-High 증례는 한 예도 없었다.

한편, MSI와 LOH 간의 상관 관계를 보면 LOH를 보인

Table 3. Results of microsatellite alterations

| Case no | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| BAT25 | | | | | ○ | | | | | ○ | | | | | | | | | | N | | | | | ○ | | | N |
| BAT26 | | | | | ○ | | | N | | ○ | | | | | ○ | | | | | N | | | ○ | | ○ | ○ | | |
| D2S123 | ● | N | N | | | | | | ● | | ● | N | ● | N | | | | | | | | | ○ | | | ○ | | N |
| D5S346 | ● | | | ● | ○ | ● | N | | | | | | | N | ● | N | ● | | | | | | | ● | | | | |
| D17S250 | N | ● | | N | N | | | | | | N | | ● | ○ | | | | ● | | ● | | | | | ○ | | | ● |

| Case no | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | LOH (%) |
|---------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------------|
| BAT25 | ○ | | | | | | | ○ | | | | | | | | | | | | ○ | N | | |
| BAT26 | ○ | | N | | | ○ | | N | | | | | | ○ | | | | | | ○ | ○ | | |
| D2S123 | N | | | | N | | | | | | | | | | N | | | | | | | ● | 5/42 (11.9) |
| D5S346 | | | ● | N | ○ | | | | | | | N | ● | ● | | | | | ○ | ○ | | | 9/45 (20.0) |
| D17S250 | | N | | | | | | | ● | | | | ● | ● | ● | N | | | | ○ | | | 8/44 (18.2) |

○ = MSI; ● = LOH; N = non-informative case.

Table 4. MSI and LOH according to the clinicopathological parameters (%)

| Px* factors | Case no. | MSI (high) | MSI-H (low) | MSI-L (stable) | MSI-S | LOH |
|-----------------------|----------|------------|-------------|----------------|-----------|-----------|
| Stage | | | | | | |
| A | 5 | 2 (40) | 1 (20) | 1 (20) | 3 (60) | 0 (0) |
| B1 | 9 | 3 (33.3) | 2 (22.2) | 1 (11.1) | 6 (66.7) | 3 (33.3) |
| B2 | 13 | 3 (23.1) | 2 (15.4) | 1 (7.7) | 10 (76.9) | 6 (46.2) |
| C1 | 3 | 0 (0.0) | 0 (0) | 0 (0) | 3 (100) | 2 (66.7) |
| C2 | 14 | 3 (21.4) | 0 (0) | 3 (21.4) | 11 (78.6) | 4 (28.6) |
| D | 6 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 6 (100) | 2 (33.3) |
| Invasion depth | | | | | | |
| A+B1+C1 | 17 | 5 (29.4) | 3 (17.6) | 2 (11.8) | 12 (70.6) | 5 (29.4) |
| B2+C2+D | 33 | 6 (18.2) | 2 (6.1) | 4 (12.1) | 27 (81.8) | 12 (36.4) |
| LN Metastasis | | | | | | |
| LN (-) | 27 | 8 (29.6) | 5 (18.5) | 3 (11.1) | 19 (70.4) | 9 (33.3) |
| LN (+) | 23 | 3 (13.0) | 0 (0) | 3 (13.0) | 20 (87.0) | 8 (34.8) |

*Px = prognosis.

증례 중 MSI가 검출된 증례도 한례도 없어서 MSI와 LOH 사이에는 역상관 관계가 관찰되었다(P=0.001).

고 찰

일반적으로 암의 진행 과정에는 광범위한 유전자 및 염색체의 이상이 수반되어 있다고 알려져 있고, 특정한 종양 별로 특이하게 발생하는 돌연변이 등이 많이 규명되었다. 이로 인해 발암화, 종양의 진행 및 악성화와 관련된 유전자의 규명과 분자적으로 임상적 예후를 판단하는 것이 가능해졌다. 또한 암 발생에는 복수의 발암유전자나 암억제유전자의 이상이 한 종양 세포 내에서 여러 단계에 걸쳐 축적 내지는 발현되는 것으로 입증되고 있다.(2,6) 동시에 많은 발암화 관련 유전자들의 염색체상에서의 위치가 규명되면서 염색체 이상과의 상관성을 밝히려는 많은 연구들이 진행되어 왔다.(11) 이 중에서 암억제 유전자의 불활성화에 대한 기전을 대립유전자의 결손으로부터 극소위 좌위의 돌연변이 (mutated microsatellite loci) 형태로 파악할 수 있는데, 많은 종양에서 이 돌연변이를 검출하는 기법으로 LOH와 MSI 표지자를 사용하고 있다.(6-8) 즉 microsatellite alteration은 microsatellite DNA 염기서열의 다양한 돌연변이로 야기되는 것이며 microsatellite는 DNA 복제 중에 소실되기 쉬운 것으로 어느 특정 유전자의 DNA 보다 불안정성이 있고, 주로 유전자가 아닌 non-coding DNA에 위치하는 특성이 있다. microsatellite는 세대 간에 걸쳐 잘 유지되며 복수 염기서열의 단순한 반복 구조이자 다형성(polymorphism)이 심하고 한 쌍의 대립 유전자 내에서도 염기 반복 배열 수가 차이가 나는 특성이 있어서 primary gene mapping과

genetic linkage analysis에 사용되어 왔고, 또한 LOH의 검출로 염색체에서의 어느 특정 부분의 결손(allelic loss)을 파악할 수 있다.(12,13) 한편, 복제오류 교정 유전자의 이상이 microsatellite의 반복 염기서열의 변화를 야기시킨다는 사실이 밝혀졌는데 이 같은 DNA 수복 기능의 결함을 나타내주는 특성을 돌연변이 발생률이 증가된 mutator phenotype으로 명명하고 MSI가 그 척도가 될 수 있다고 한다.(14-17) 즉, DNA 복제 오류 교정 유전자의 불활성화에 기인한 이른바 mutator pathway로 인해 돌연변이들이 repetitive genomic sequence에 광범위하게 축적되며 MSI가 바로 이 같은 mutator pathway를 나타내주는 표지자가 된다. 최근 이러한 MSI가 유전성 비용종성 대장암 증후군에서 발생하는 대장암에서 높은 빈도로 검출된다고 알려져 있으며, MSI가 단일 결직장암, 위암, 식도암, 담관암, 갑상선암 등 다양한 여러 암종의 약 10~15%에서도 발암 기전으로 작용한다는 보고들도 많이 발표되고 있다.(18-25)

대장암에서의 개별적인 유전자 변이, LOH, MSI에 대한 연구는 많이 이루어졌지만 국내에서의 문헌 발표는 많은 편이 아니며, 더욱이 LOH, MSI, 유전자 발현을 포괄적으로 분석하여 임상병리학적 인자와의 상관성을 규명한 연구는 드문 실정이다. 본 연구에서는 MSI 검출을 위해 1997년 NIH에서 임상적 적용을 위해 권고한 BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250 5가지 표지자를 사용하였다.(26) BAT26 좌위와 D2S123 좌위는 2p21-2p16에 위치하고 hMSH2 유전자와 연관이 있고, D5S346은 5q21에 위치하고 APC 유전자와 연관이 있으며, D17S250 좌위는 염색체 17q11.2-q12에 위치하며, BRCA 유전자와 연관되어 있다. 본 연구에서 MSI는 총 11예(22%)에서 검출되었으며, 모

든 예에서 BAT26에서의 MSI가 있었다. 특히 BAT26은 MSI 여부를 조사하는 데 민감도가 매우 높고 위양성, 위음성 정도가 낮아서 유용한 표지자로 알려져 있고(27) 본 실험에서도 유사한 결과로 확인되었다. 다만 MSI 검출률이 다른 문헌들에 비해 많은 비율인 22%에서 검출되었는데 이는 MSI-high 군이 아닌 MSI-low 군이 다수 검출되었기 때문으로 추정되며 Halford 등(28)의 연구 결과와 부합되었다. 게다가 비전이성 종양과 고유근층 이상을 침윤하지 않은 군에서 MSI가 높게 검출되었고, 병기 C1 및 D 군에서는 MSI가 한 예도 검출되지 않았으며, MSI-high 증례는 모두 비전이성이었다. 또한 MSI를 보이지 않는 MSI-S군은 종양의 침윤 깊이와 전이 여부와는 상관 관계가 전혀 없어서 MSI는 좋은 임상적 예후를 나타내 주는 지표로 판단된다. 이는 MSI+ 종양의 발암기전은 p53 등 중요 암억제유전자의 불활성화 기전과는 다른 방식의 발암 기전을 갖는 것으로 추정된다.

LOH는 MSI 검출용 5가지 표지자 중 D2S123, D5S346, D17S250 표지자 등 3개 표지자에서도 검출되었으며, D5S346 표지자에서 가장 높게 검출되었다. 총 34%에서 LOH를 보였으며, LOH-High군은 없었다. LOH는 전이성 암종과 침윤 깊이가 깊을수록 다소 높게 검출되었지만, 통계학적인 유의성이 없었고, 다만, MSI와는 역상관 관계를 보였다.

일반적으로 DNA의 복제 이상이 있는 대장암종은 MSI가 많이 관찰되는 것을 특징으로 하며, 주로 우측 대장에 위치하고 젊은 나이에 발생하고, 저분화암종이고, 점액질을 분비하고 이배수체이며 예후가 좋다고 알려져 있으나 본 연구에서는 MSI가 예후가 좋은 임상병리학적 특성을 보인 점을 제외하고는 특이 사항이 없었다. 한편 위암에서는 MSI의 역할을 두고 상반된 결과들이 있는데 본 연구와 비슷하게 MSI가 좋은 예후 인자로 작용한다는 보고도 있지만,(21) 위암의 약 43%에서 MSI가 관찰되고 림프절 전이 및 종양의 나쁜 분화도와 연관이 있다는 보고도 있어서,(24) 여러 장기의 암종을 대상으로 더욱 많은 MSI에 대한 데이터가 분석되어야 할 필요성을 제시해 준다.

이상의 결과로 대장암의 발생과 진행에 LOH와 MSI가 각각 독립적으로 관여하는 것으로 추정되며, MSI, LOH 기전에 p53 등의 암억제 유전자 발현 등의 기전이 독립적으로 발암 과정에 기여할 가능성도 제시될 수 있다. 궁극적으로는 대장암의 예후 판정에 MSI와 LOH가 유용한 지표로 판단되므로 향후 더 많은 microsatellite 표지자를 대상으로 연구할 필요성이 제기된다.

결 론

50예의 대장암을 대상으로 BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250 등 5가지의 microsatellite marker를 사용하

여 MSI, LOH를 검출하고 면역조직화학적 방법으로 p53 단백질 발현을 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

(1) MSI는 11예(22%)에서 검출되었으며, 비전이성 종양이 전이성에 비해 MSI가 유의성 있게 높은 검출률을 보였고, 고유근층까지 침윤한 경우도 그 이상 침윤한 경우에 비해 MSI가 높게 검출되는 경향을 보여 좋은 예후를 보였다. 특히 MSI-High 증례는 모두 비전이성 암종에서만 검출되었으며, MSI-S군과 MSI-L군에서는 임상적 예후인자와의 상관관계가 관찰되지 않았다.

(2) LOH는 17예(34%)에서 검출되었으며, 전이성 암종 및 고유근층 이상을 침범한 군에서 다소 높은 검출률을 보였지만, 유의성은 없었다. 또한 LOH와 MSI 간에는 역상관관계가 관찰되었다.

이상의 결과로 대장암의 발생과 진행에 LOH와 MSI가 각각 독립적으로 관여하는 것으로 판단되며, 주요 암억제 유전자의 변이가 역시 독립적으로 MSI에 의한 발암 과정에 기여할 것으로 추정된다. 대장암의 예후 판정에 MSI와 LOH가 유용한 지표로 판단되므로 향후 더 많은 microsatellite 표지자를 대상으로 연구할 필요성이 제기된다.

REFERENCES

- 1) Central Cancer Registry Center in Korea, ministry of Health and Welfare, Republic of Korea. 2001(1999.1-1999.12)
- 2) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525-32.
- 3) Levine AJ. The p53 tumor suppressor gene. *N Engl J Med* 1992;326:1350-2.
- 4) Robbins BA, de la Vega D, Ogata K, Tan EM, Nakamura RM. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Pathol Lab Med* 1987;111:841-5.
- 5) McCann A, Dervan PA, Johnston PA, Gullick WJ, Carney DN. C-erbB2 oncoprotein expression in primary human tumors. *Cancer* 1990;65:88-92.
- 6) Laurent-Puig P, Blons H, Cugnenc PH. Sequence of molecular genetic events in colorectal tumorigenesis. *Eur J Cancer Prev* 1999;Suppl 1:39-47.
- 7) Berney C, Fisher R, Yang J, Russell P, Crowe P. Genomic alterations (LOH, MI) on chromosome 17q21-23 and prognosis of sporadic colorectal cancer. *Int J Cancer* 2000;89:1-7.
- 8) Massa M, Iniesta P, Gonzalez-Quevedo R, de Juan C, Caldes T, Sanchez-Pernaute A, et al. Differential prognosis of replication error phenotype and loss of heterozygosity in sporadic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1999;35(12):1676-82.
- 9) Fishel R, Lescoe M, Rao M, Copeland N, Jenkins N, Garber J, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;75:1027-38.

- 10) Rhyu MG, Park WS, Meltzer SJ. Microsatellite instability occurs frequently in human gastric carcinoma. *Oncogene* 1994; 9:29-32.
- 11) Weinberg RA. Oncogenes, antioncogenes and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 1989;49: 3713-21.
- 12) Weisenbach J, Gyapay G, Dib C. A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 1992;359:794-801.
- 13) 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;363:558-61.
- 14) Loeb L. Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 1994;54:5059-63.
- 15) Borresen A, Lothe R, Meling G, Lystad S, Morrison P, Lipford J, et al. Somatic mutations in the hMSH2 gene in microsatellite unstable colorectal carcinomas. *Hum Mol Genet* 1995;4: 2065-72.
- 16) Leach F, Nicolaides N, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993;75:1215-25.
- 17) Eshleman J, Markowitz S. Mismatch repair defects in human carcinogenesis. *Hum Mol Genet* 1996;5:1489-94.
- 18) Aaltonen L, Peltomaki P, Leach F, Sistonen P, Pykkanen L, Mecklin J, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993;260:812-6.
- 19) Peltomaki P, Lothe R, Aaltonen L, Pykkanen L, Nystrom-Lahti M, Seruca R, et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 1993;53:5853-5.
- 20) Lothe RA, Arzimanoglou II, Gilbert F, Barber HRK. microsatellite instability in human solid tumors. *Cancer(phila)* 1998;82:1808-20.
- 21) Miyoshi E, Haruma K, Hiyama T, Tanaka S, Yoshihara M, Shimamoto F, et al. Microsatellite instability is a genetic marker for the development of multiple gastric cancers. *Int J Cancer* 2001;95:350-3.
- 22) Momoi H, Itoh T, Nozaki Y, Arima Y, Okabe H, Satoh S, et al. Microsatellite instability and alternative genetic pathway in intrahepatic cholangiocarcinoma. *J of Hepatology* 2001;35: 235-244.
- 23) Dobosz T, Lukienczuk T, Sasiadek M, Kuczynska A, Janowska E, Blin N. Microsatellite instability in thyroid papillary carcinoma and multinodular hyperplasia. *Oncology* 2000;58: 305-10.
- 24) Wu MS, Lee CW, Shun CT, Wang HP, Lee WJ, Sheu JC, et al. Clinicopathological significance of altered loci of replication error and microsatellite instability-associated mutations in gastric cancer. *Cancer Res* 1998;58:1494-7.
- 25) Boland CR, Sato J, Saito K, Carethers JM, Marra G, Laghi L, et al. Genetic instability and chromosomal aberrations in colorectal cancer: a review of the current models. *Cancer Detect Prev* 1998;22:377-82.
- 26) 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.
- 27) Hoang JM, Cottu PH, Thuille B, Salmon RJ, Thomas G, Hamelin R. BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res* 1997; 57:300-3.
- 28) Halford S, Sasieni P, Rowan A, Wasan H, Bodmer W, Talbot I, et al. Low-level microsatellite instability occurs in most colorectal cancers and is a nonrandomly distributed quantitative trait. *Cancer Res* 2002;62:53-7.