梨花醫大誌 : 第 27 卷 第 2 號 2004
Ewha Med J Vol. 27, No. 2, 2004

산발성 대장암에서 MSI와 다른 예후인자와의 상관관계

이화여자대학교 의과대학 병리학교실
이 시 내

= Abstract =

Correlation MSI Status and Other Prognostic Factors in Sporadic Colorectal Cancer

Shi Nae Lee

Department of Pathology, College of Medicine, Ewha Womans University

Objectives : The purpose of this study was to evaluate MSI status in sporadic colorectal cancer and to correlate it with clinicopathologic variables.

Methods : Total 45 cases of surgically resected colorectal cancers retrospectively were reviewed about clinicopathologic findings and analyzed for microsatellite instability.

Results : The microsatellite instability (MSI) was found in 5 of 45 cases (11.1%). A significant association was found between MSI+ tumors and location in the right colon (40%), and high histological grade (100.0%), and mucinous phenotype (33.3%). There was no significant difference for age, sex, growth pattern, lymph node metastases, vessel invasion, or Duke's stage.

Conclusion : These data indicate that MSI frequently occur in colorectal cancers of the right side and in tumors with poorly differentiated or mucinous histology.

KEY WORDS : Colorectal cancer · Microsatellite instability · Clinicopathologic variables.

서 론

대장암은 전세계적으로 암 사망에 있어서 폐, 위, 간암에 이어 4위(7.7%)를 차지하는 암 종으로서 국내의 발생빈도를 보면 남자에서는 위암, 폐암, 간암에 이어 4위를 차지하며 여자에서도 위암, 유방암, 자 궁경부암에 이어 4위를 차지한다. 대장암의 발생요인으로 식이 습관, 환경적 요인, 전암성 질환, 유전적 요인, 인종적 요인 등이 거론되고 있으며 특히 종양유전자와 관련하여 다단계의 유전적 변화가 축적되어 발생하는 것으로 알려져 있다. 이러한 종양 유전자뿐만 아니라 최근에는 유전성 비용종성 대장암에서 높은 빈도로 검출되는 microsatellite instability (MSI)가 암 발생의 한 원인으로 제시되고 있다. MSI는 DNA의 복제과정 동안 일어나는 오류를 복구하는 DNA mismatch repair (MMR) system에 이상이 생기는 것이다. 이 들 오류교정에 관여하는 hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2와 같은 mismatch repair gene들의 이상으로 잘못 복제된 유전정보가 분열된 체세포에 계속 유전되어 결국에는 암 발생이 일어나게 되는 것으로 알려져 있다. 이에 저자는 대장암에서 MSI의 빈도를 조사하고 다른 예후인자들과의 연관성을 알아보고자 하였다.

Collection @ ewha

대상 및 방법

1. 연구대상

2003년 3월부터 2004년 1월까지 이화여자대학교 의과대학 부속 목동 병원 병리과에 의뢰된 대장암 진단 하에 절제된 대장 및 직장 조직 총 45예를 대상으로 하였다.

2. 연구방법

1) 임상소견

병록지와 병리검사서를 중심으로 환자의 연령, 성별, 위치, 병변의 크기, 타 장기 전이들을 조사하였다.

2) 병리학적 검색

의뢰된 대장 및 직장 조직을 절개한 후 종양의 크기와 형태를 조사하고 절단면에서 종양의 침습 정도를 육안검색하고 주위 지방조직에서 림프절을 찾아내었다. 절취된 조직은 10% 중성 포르말린 고정과 파라핀 포매를 거쳐 통상의 조직처리방법에 의하여 헤마톡실린 염색을 시행한 슬라이드를 반복 판독하였다.

3) MSI 분석

(1) DNA 추출

각각의 예에서 파라핀에 포매 된 대장암 부위와 정상 부위를 DNeasy Tissue kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 DNA를 추출하였다.

(2) Microsatellite 분석

Microsatellite instability를 검출하기 위하여 BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 and D17S250의 primer를 사용하였고 한쪽 primer에 fluorescent tag(FAM and NED)을 부착시켜 검출에 이용하였다. PCR반응 2 μl of 10x buffer(Roche, Mannheim, Germany), 1.75 ~3mM $MgCl_2$, 0.4 μM primer pairs, 250 μM deoxynucleoside triphosphate, and 2.5 units of DNA polymerase(Roche, Mannheim, Germany)를 가하여 총 용적이 20 μl가 되게 하였다. PCR조건은 94℃에서 2분, 30주기(94℃에서 45초, 55℃에서 45초, 72℃에서 45초), 그리고 72℃에서 5분으로 구성되었다. 형광물질로 표시된 PCR산물을 Applied Biosystems 3100 automated DNA sequencer(Applied Biosystems, Foster, USA)에서 전기영동 시킨 후, Genescan software (version 2.7 ; Applied Biosystems)을 이용하여 분석하였다.

4) 통계적 분석

통계학적 분석은 Chi-square test를 이용하였으며 $p<0.05$일 때 두 군간에 의미 있는 차이가 있다고 하였다.

결 과

대상환자들의 연령은 32세부터 85세까지 분포하였고 평균 연령은 62세 이었다. 성별은 남자 22명, 여자 23명이었다. 육안검색에서 외장성 종양은 8예, 내장성 종양은 37예 이었고, 침윤성 샘암종이 42예, 점액성 암종이 3예 이었다. 침윤성 샘암종 중에서 고등도의 분화를 보이는 경우가 2예(4.8%), 중등도의 분화를 보이는 경우가 38예(90.4%), 저등도의 분화를 보이는 경우가 2예(4.8%)이었다. 종양의 크기는 3cm 미만인 예가 5예(11.1%), 3cm에서 4.9cm 사이인 예가 19예(42.2%), 5cm을 넘은 예가 21예(46.7%)이었다. 종양의 부위를 좌측과 우측으로 구분해 보면 좌측이 35예(77.8%), 우

Table 1. Correlation between MSI status and clinicopathologic variables

	Categories	MSI[a]		P-value[b]
		+	−	
Growth type	Exophytic	1 (12.5%)	7 (87.5%)	1.0
	Endophytic	4 (10.8%)	33 (89.2%)	
Location	Right	4 (40.0%)	6 (60.0%)	0.007
	Left	1 (2.9%)	34 (97.1%)	
Differentiation	Well	0 (0.0%)	2 (100.0%)	0.000
	Moderate	2 (5.3%)	36 (94.7%)	
	Poor	2 (100.0%)	0 (0.0%)	
	Mucinous	1 (33.3%)	2 (66.7%)	

a : microsatellite instability, b : by Chi-square test

dCollection @ ewha

측이 10예(22.2%)이었다. 림프절 전이가 없는 경우(N0)가 18예(40%), 있는 경우가 27예(60%)였으며, 림프절 전이가 있는 경우 주에서 1~3개의 림프절에 전이한 예(N1)가 17예(63%), 4개 이상의 림프절에 전이한 예(N2)가 10예(37%)이었다. 림프관이나 혈관 내 침윤이 발견된 경우는 15예(33.3%), 없는 경우는 30예(66.7%)이었다. modified Duke 병기는 A병기가 5예(11.1%), B병기가 4예(8.9%), C병기가 35예(77.8%), D병기가 1예(2.2%) 이었다. Microsatellite instability는 전체 45예 중 5예(11.1%)에서 관찰되었다. MSI인 5예 중 4예가 우측 대장에서 발생하였고 저등도의 분화를 보이는 암종에서 더 높은 빈도를 보였다. 이들의 P값은 0.05이하로 통계적 유의성을 보였다(Table 1). 종양의 크기는 Microsatellite instability인 경우 5.50±1.86cm, Microsatellite stability경우 4.35±1.79cm로 수치적으로 차이가 있었으나 통계적 의의는 없었다. 그 외 환자의 나이, 성별, 육안소견, 림프절 전이 및 개수, 맥관침윤, 병기 등은 microsatellite instability와 의미 있는 연관성이 없었다.

고 안

대장암에서 암 유발유전자의 활성 변이, 암 억제 유전자의 불활성화 같은 다양한 DNA의 변화들이 관찰되었고[1] 최근에는 또 다른 중요한 기전이 대장암 발생과정에 관여하는 것으로 알려졌다. 인간의 유전자에는 2개 내지 5개의 짧은 염기 배열이 반복되는 유전자의 조합인 microsatellite가 약 30,000개 정도가 존재하는 것으로 알려져 있는데[2-3] 이 부위를 증폭시 다형성이 관찰된다는 보고[4]가 있었다. 이후 MSI가 유전성 비용종성 대장암과 깊은 연관성이 있는 것으로 밝혀졌고 그 원인으로 ***hMSH2***나 ***hMLH1*** 같은 mismatch repair gene (MMR)의 결함에 의하여 복제 이상이 발생하는 것으로 알려졌다[3)5)]. 그러나 MSI는 유전성 대장암에만 국한된 것이 아니고 가족력이 없는 대장암에서도 관찰되었다[6-8]. 산발성 대장암에서 Microsatellite instability는 9~17% 정도의 빈도로 관찰된다[2)9-13)]. 본 연구에서는 산발성 대장암에서 11.1%의 microsatellite instability를 보였다. 이전의 연구들에서 산발성 MSI+ 대장암의 경우 근위부 대장부위에 호발하며, 특징적인 육안소견, 종양의 크기, 조직학적 경계, 림프구 침윤, 종양의 분화도, 점액성 물질 생산, p53단백 발현여부등과 연관성이 있는 것으로 알려졌다[6)12)14-18)]. 본 연구에서 우측에서 발생한 대장암 10예 중 MSI+인 경우는 4예로 40%의 빈도를 보인 반면 좌측 종양은 전체 35예 중 1예(2.9%)에서만 MSI+를 보여 우측 대장에서 더 높은 빈도로 MSI가 관찰되었다. 종양의 분화도 와의 관계에서도 고등도의 분화를 보이는 2예 모두 microsatellite instability를 보이지 않았고(0%) 중등도 분화를 보이는 37예 중 2예(5.3%)에서 MSI+의 빈도를 보여 비교적 낮은 MSI+빈도를 보였다. 한편, 저등도의 분화를 보이는 2예의 경우에서는 모두 MSI+를 보였고(100%). 점액성 암종 33.3%의 MSI+의 빈도를 보여 MSI가 저등도의 분화도를 보이거나 점액성 암종에서 더 높은 빈도로 관찰되는 것을 알 수 있었다. 이런 결과들은 이전의 연구들과 일치되는 소견을 보였다[6)19)]. 그러나 종양의 육안소견, 종양의 크기, 림프구 전이 및 맥관 침윤, Duke 병기 등과 microsatellite instability와는 연관성이 없었다. 종양의 크기비교에서는 MSI+의 경우(5.50±1.86cm)가 MSI−의 경우(4.35±1.79cm)보다 수치적으로 크기는 하였으나 통계적 유의성은 없었고 이를 <3cm, 3~5cm, ≥5cm 세 군으로 나누어 관찰하였을 때도 같은 결과를 보였다. 환자의 성별이나 연령에 따른 차이는 없었다. 이러한 결과는 본 연구의 증례수가 적어서 제한된 결과를 보여주는 것이라 생각된다. 본 연구에서 증례의 수가 제한되어서 종양의 위치와 분화도를 제외한 그 외의 대장암 예후에 관여하는 여러 가지 다른 인자들과 MSI의 연관성을 관찰하지 못하였으나 추후의 더 많은 증례에서 이들과의 연관성을 알아보는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

목 적 :

산발성 대장암에서 microsatellite instability의 빈도를 조사하고 대장암의 여러 다른 예후 인자와의 연관성을 알아보고자 하였다.

방 법 :

절제된 대장 및 직장 조직 총 45예를 대상으로 MSI 분석을 시행하여 임상, 병리조직학적 소견과 비교하였다.

결 과 :

Microsatellite instability는 전체 45예 중 5예(11.1%)에서 관찰되었다. MSI인 5예 중 4예(40%)가 우측 대장

dCollection @ ewha

에서 발생하였고 고등도(0%)나 중등도(5.3%)의 분화를 보이는 암종보다 저등도의 분화를 보이는 암종(100%)과 점액성 암종(33.3%)에서 더 높은 빈도를 보였다. 이들의 P값은 0.05 이하로 통계적 유의성을 보였다. 종양의 크기는 Microsatellite instability인 경우 5.50±1.86cm, Microsatellite stability경우 4.35±1.79cm로 수치적으로 차이가 있었으나 통계적 의의는 없었다. 그 외 환자의 나이, 성별, 육안소견, 림프절 전이 및 개수, 맥관 침윤, 병기 등은 microsatellite instability와 의미 있는 연관성이 없었다.

결 론 :

MSI+ 산발성 대장암은 우측 대장에 호발하고 저등도의 분화도를 보이거나 점액성 암종에서 더 높은 빈도를 나타내었다. 그 외 대장암 예후에 중요한 림프절 전이와 병기등과의 연관성을 보이지 않았으나 추후의 더 많은 증례에서 연구를 해야 할 것으로 생각되었다.

중심 단어 : 대장암 · Microsatellite instability · 임상병리학적 소견.

References

1) Fearon ER, Vogelstein B : *A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990 ; 61 : 759-767*

2) 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 : 812-816*

3) Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, et al : *Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. Science 1994 ; 263 : 1625-1629*

4) Weber JL, May PE : *Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am J Hum Genet 1989 ; 44 :388-396*

5) 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 non-polyposis colon cancer. Nature 1994 ; 368 : 258-261*

6) Kim H, 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*

7) Risio M, Reato G, di Celle PF, Fizzotti M, Rossini FP, Foa R : *Microsatellite instability is associated with the histological features of the tumor in nonfamilial colorectal cancer. Cancer Res 1996 ; 56 : 5470-5474*

8) Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, Tester D, Burgart LJ, Roche PC, et al : *Microsatellite instability in colorectal cancer : different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. Cancer Res 1998 ; 58 : 1713-1718*

9) Thibodeau SN, Bren G, Schaid D : *Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. Science 1993 ; 260 : 816-819*

10) 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 : 5248-5257*

11) 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*

12) Lothe RA, Peltomaki P, Meling GI, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, Pylkkanen L, et al : *Genomic instability in colorectal cancer : relationship to clinicopathological variables and family history. Cancer Res 1993 ; 53 : 5849-5852*

13) Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, et al : *Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. N Engl J Med 2000 ; 342 : 69-77*

14) Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Muraoka M, Onda A, Okumura Y, et al : *Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. Gastroenterology 1996 ; 111 : 307-317*

15) Schlegel J, Bocker T, Zirngibl H, Hofstadter F, Ruschoff J : *Detection of microsatellite instability in human colorectal carcinomas using a non-radioactive PCR-based screening technique. Virchows Arch. 1995 ; 426 (3) : 223-227.*

16) Bocker T, Schlegel J, Kullmann F, Stumm G, Zirngibl H, Epplen JT, et al : *Genomic instability in colorectal carcinomas : comparison of different evaluation methods and their biological significance. J Pathol 1996 ; 179 : 15-19*

Collection @ ewha

17) Watatani M, Yoshida T, Kuroda K, Ieda S, Yasutomi M : *Allelic loss of chromosome 17p, mutation of the p53 gene, and microsatellite instability in right- and left-sided colorectal cancer. Cancer 1996 ; 77 : 1688-1693*
18) Feeley KM, Fullard JF, Heneghan MA, Smith T, Maher M, Murphy RP, et al : *Microsatellite instability in sporadic colorectal carcinoma is not an indicator of prognosis. J Pathol 1999 ; 188 : 14-17*
19) Ward R, Meagher A, Tomlinson I, O'Connor T, Norrie M, Wu R, et al : *Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. Gut 2001 ; 48 : 821-829*

Collection @ ewha