

산발성 대장직장암에서 MLH1과 MSH2 단백질에 대한 면역조직화학염색법은 미소위성체 불안정성 확인에 유용한가?

중앙대학교 의과대학 내과학교실, 병리학교실*

도재혁 · 장세경 · 안지용 · 차봉기 · 정승문 · 김대원 · 정혜령 · 김형준 · 김재규 · 이태진* · 박언섭* · 박실무

Is Immunohistochemistry for MLH1 and MSH2 Proteins a Useful Method for Detection of Microsatellite Instability in Sporadic Colorectal Cancer?

Jae Hyuk Do, M.D., Sae Kyung Chang, M.D., Ji Yong Ahnn, M.D., Bong Ki Cha, M.D.,
Seung Moon Cheong, M.D., Dae Won Kim, M.D., Hey Ryung Cheong, M.D.,
Hyung Joon Kim, M.D., Jae Gyu Kim, M.D., Tae Jin Lee, M.D.*,
Eon Sub Park, M.D.*, and Sill Moo Park, M.D.

Departments of Internal Medicine and Pathology, Chung Ang University School of Medicine, Seoul, Korea*

Background/Aims: In order to identify microsatellite instability (MSI), the test based on the polymerase chain reaction (PCR) can be used. However, PCR is not routinely performed in all hospital laboratories. Recently, immunohistochemistry (IHC) for MLH1 and MSH2 proteins has been reported as a rapid and useful method for MSI. However, the efficacy of IHC in the detection of the MSI has not been well established. The aim of this study was to evaluate the usefulness of IHC in the detection of the MSI by comparing it with the test results using PCR in colorectal cancer (CRC). **Methods:** Paraffin-embedded normal and tumor tissues from seventy-five patients who underwent surgical resection of CRC were used. Abnormal expression of MLH1 and MSH2 protein was determined by IHC using MLH1 and MSH2 antibodies. Normal and tumor DNAs were obtained from thirty CRC tissues that showed abnormal expression of MLH1 and MSH2 proteins by IHC. The MSI status was confirmed by PCR using five markers. **Results:** Thirty tumors showed abnormal expression of MLH1 and MSH2 proteins by IHC, but only three tumors out of them were confirmed to have MSI by PCR. **Conclusions:** This result suggests that IHC with MLH1 and MSH2 antibodies does not seem to be a useful method to identify MSI in CRC, therefore PCR is required for detection of the MSI. (*Korean J Gastroenterol* 2003;42:369-376)

Key Words: Colorectal neoplasms; Microsatellite instability; Immunohistochemistry; Polymerase chain reaction

접수: 2003년 2월 28일, 승인: 2003년 9월 26일
연락처: 장세경, 140-013, 서울시 용산구 한강로 3가 65-207
중앙대학교부속 용산병원 내과
Tel: (02) 748-9302, Fax: (02) 798-4745
E-mail: mdskc@cau.ac.kr

* 본 연구는 2001년 중앙대학교 연구지원처의 연구비 일부 보조로 이루어졌음.

Correspondence to: Sae Kyung Chang, M.D.
Department of Internal Medicine, ChungAng University Yongsan Hospital
65-207 Hankangro 3-ga, Yongsan-gu, Seoul 140-757, Korea,
Tel: +82-2-748-9302, Fax: +82-2-798-4745
E-mail: mdskc@cau.ac.kr

서 론

종양 발생과 진행에 관여하는 것으로 알려져 있는 유전자는 종양억제유전자(tumor suppressor gene), 종양유전자(oncogene), DNA 불일치교정유전자(DNA mismatch repair gene) 등이 있다.¹ 불일치교정유전자는 DNA 복제 중 발생하는 염기의 불일치를 교정시켜 계속되는 세포분화를 통한 유전체(genome)의 정확도를 유지시켜 주는 역할을 하는 유전자로 종양 발생에 관여한다.² 유전체에는 정확한 기능은 알려져 있지 않으나 한 개에서 여섯 개 정도의 같은 염기가 200 염기쌍 이하의 길이로 계속 짧게 반복되는 부위가 있는데 이를 미소위성체(microsatellite)라 한다.³ 미소위성체 부위는 DNA 복제 중 염기의 불일치가 일어나기 쉬운 부위로 불일치교정유전자 이상이 있으면 DNA 복제 중 발생하는 미소위성체 부위 염기의 불일치가 교정되지 않아 정상 조직과 비교하여 종양 조직에서 미소위성체의 길이가 길어지거나 혹은 짧아지는 현상이 발생하는데 이런 현상을 미소위성체 불안정성(microsatellite instability, MSI)이라 하며 이는 불일치교정유전자 이상의 표현형이다.⁴⁻⁷ 미소위성체 불안정성은 유전성 대장직장암인 유전성 비용종성 대장암(hereditary non-polyposis colorectal cancer)의 약 90% 이상에서 발견되며,^{8,9} 산발성 대장직장암의 약 10~17%에서 나타난다.¹⁰⁻¹³ 미소위성체 불안정성이 있는 산발성 대장직장암은 미소위성체 불안정성이 없는 산발성 대장직장암과 임상병리학적, 분자생물학적으로 여러 가지 차이가 있고^{11,13-16} 수술 후 항암치료에도 상대적으로 반응이 좋은 것으로 알려져 있어^{17,18} 대장직장암에서 미소위성체 불안정성 확인은 임상적 측면에서도 중요하다.

대장직장암에서 미소위성체 불안정성을 확인하는 방법은 BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250 등 다섯 가지의 미소위성체 부위를 표지자로 중합효소연쇄반응을 실시하여 종양 조직 미소위성체 길이가 정상 조직 미소위성체와 비교하여 두 가지 표지자 이상에서 길이의 차이가 있으면 고빈도 미소위성체 불안정성(high frequency microsatellite instability), 한 가지 표지자에서 차이가 있으면 저빈도 미소위성체 불안정성(low frequency microsatellite instability), 차이가 없으면 미소위성체 안정성(microsatellite stable)으로 진단하는 것이 정확한 방법으로 알려져 있다.⁴ 저빈도 미소위성체 불안정성 종양은 미소위성체 안정성 종양과 특별한 차이가 없어^{12,19} 고빈도 미소위성체 불안정성이 의미 있는 것으로 여겨지고 있다. 최근에는 다섯 가지 미소위성체 부위 중 BAT26 단독을 표지자로 하여 중합효소연쇄반응을 시행하여도 고빈도 미소위성체 불안정성 확인에 유용하다는 연구들이 있다.^{20,21} 그러나 중합효소연쇄반응은 비용, 시간 그리고 검사를 위한 여러 장비가 필요하

여 일반적으로 시행하기에는 제한이 있다.

사람에서의 불일치교정유전자는 현재까지 *MLH1*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH4*, *MSH5*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*, *MLH3*, *PMS2L3*, *PMS2L4* 등 11가지가 발견되어 있고⁶ 이 중 *MLH1*과 *MSH2* 이상이 불일치교정유전자 이상의 대부분을 차지한다.²²⁻²⁷ 그러므로 쉽고 간편하게 미소위성체 불안정성을 확인하는 방법으로 *MLH1*과 *MSH2* 단백질의 항체를 이용한 면역조직화학염색법이 유용하다는 연구들이 대두되었다.^{13,16,25,27-29} 그러나 면역조직화학염색법이 미소위성체 불안정성 확인을 위한 방법으로 부적절하다는 연구들도³⁰⁻³¹ 있어 미소위성체 불안정성 확인을 위한 방법으로 면역조직화학염색법이 유용한지에 대해서는 정확히 밝혀져 있지 않다.

본 연구의 목적은 산발성 대장직장암에서 미소위성체 불안정성 확인에 면역조직화학염색법이 유용한지에 대해 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

1998년 10월부터 2001년 3월까지 중앙대학교부속병원에서 대장직장암으로 진단되어 수술을 실시한 환자들의 의무기록을 후향적으로 조사하여 과거 염증성 장질환의 과거력이 있는 환자, 수술 전 항암요법이나 방사선요법을 받은 환자, 유전성 비용종성 대장암이 의심되는 환자를 제외한 75명을 대상으로 하였다. 남자 50명, 여자 25명으로 평균 연령은 60.2 ± 13.9 세였다.

2. 방법

1) 면역조직화학염색법

종양 부위와 정상 부위가 포함된 파라핀 포매 조직을 5 mm 두께로 2개의 절편을 만들어 50~60℃의 항온기 내에서 부착시킨 후 xylene을 이용하여 탈파라핀화시키고 100%, 95%, 80%, 70%의 알코올을 단계별로 사용하여 함수 과정을 거친 후 조직내 내인성 peroxidase 활성을 제거하기 위해 0.3% H_2O_2 로 30분간 처리하였다. 증류수로 수세 과정을 거친 후 0.01 M citric acid 완충액(pH 6.0)을 사용하여 5분간 2단계의 초단파(microwaving) 처리를 실시하여 항원 복구(antigen retrieval)를 시행한 후 비특이적 결합을 억제하기 위해 1.5% 정상 면역혈청(goat serum)을 이용하여 20분간 반응시켰다. 면역조직화학염색은 ABC 방법으로 실시하였다. 일차항체는 *MLH1*과 *MSH2* 항체(Zymed, Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA)를 각각 1:50과 1:200으로 희석하여 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 0.05 M Tris buffer (pH 7.6)를 이용하여 각각 5분간 3단계의 수세 과정을 거친 후

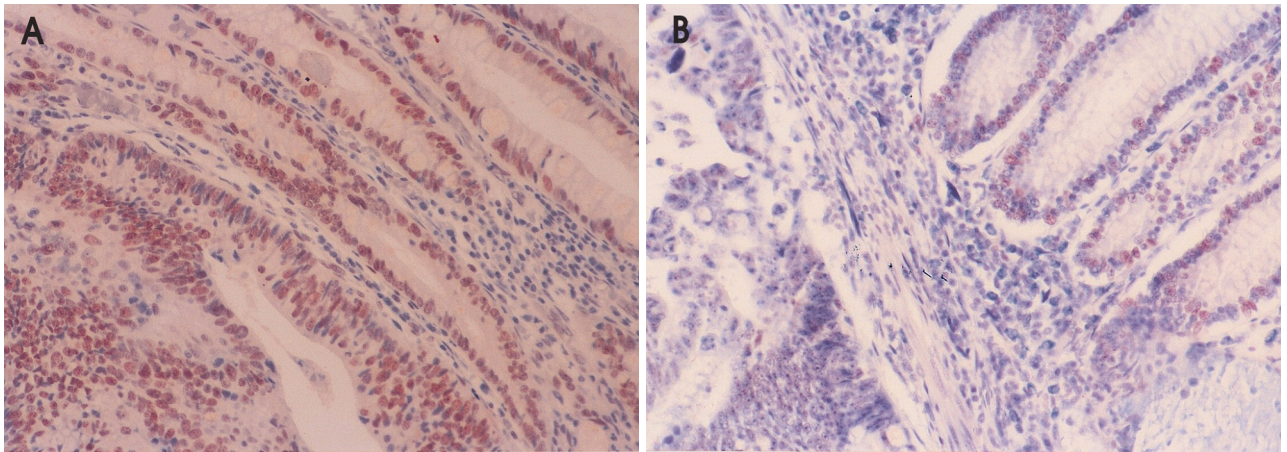


Fig. 1. Immunohistochemical staining for MLH1 and MSH2 proteins in normal colon and colorectal cancer. (A) Normal colon mucosa (right upper) and tumor glands (left lower) show intense nuclear staining of MLH1 and MSH2 ($\times 200$). (B) Normal colon mucosa (right) shows intense nuclear staining of MLH1 and MSH2, but this staining is not observed in tumor glands (left) ($\times 200$).

biotin과 결합한 항생쥐 면역 혈청인 이차항체를 가하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 0.05 M Tris buffer (pH 7.6)를 이용하여 각각 5분간 3단계의 수세 과정을 거친 후 streptavidin과 결합한 과산화효소 복합체를 가하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 AEC (3-amino-9-ethylcarbazole, Zymed Laboratories Inc.)를 이용하여 양성 세포를 발현시킨 후 Mayer's hematoxyline으로 대조 염색을 하고 Ultramount (Labvision Inc., Fremont, CA, USA)로 봉입하여 광학현미경으로 검정하였다.

2) 판정

정상 조직과 비교하여 전체 종양세포의 10% 이상에서 핵 내에 MLH1과 MSH2 단백질이 모두 발현이 되면 불일치 교정유전자 발현 이상이 없는 것으로 판정하였으며 종양세포 핵 내에 MLH1, MSH2 단백질 중 한 가지 또는 두 가지 모두 발현이 되지 않으면 불일치교정유전자 발현 이상이 있는 것으로 판정하였다(Fig. 1).²⁵

3) DNA 추출

면역조직화학염색법으로 불일치교정유전자 발현 이상이 있는 것으로 판정된 30예의 종양 부위와 종양 주위 정상 부위가 포함된 파라핀 포매된 조직을 현미경으로 검정하여 종양 조직과 정상 조직을 분리한 후 eppendorf tube에 넣고 100% xylene 1 mL을 넣어 60℃에서 20분간 2회 반응시킨 후 xylene을 제거하였다. 이 후 100%, 90%, 80%, 70% 에탄올에 반응시킨 후 공기 중에서 건조시켜 조직을 분리하였다. 분리된 조직에 용해 완충용액(0.5M Tris-HCl, pH 8.0, 1% sodium dodecyl sulfate, 10 mM EDTA, 20 mg/mL proteinase K) 1 mL을 넣고 37℃에서 2시간 배양 후 PCI

(phenol:chloroform: isoamylalcohol)용액 1 mL을 넣고 4℃, 13,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다. 상층액을 새 eppendorf tube에 담은 후 동량의 chloroform:isoamylalcohol을 넣은 후 4℃, 13,000 rpm으로 15분간 원심분리 후 상층액을 새 eppendorf tube에 담아 상층액 2배 용량의 100% 에탄올과 1/10 용량의 3M sodium acetate를 넣어 1시간 이상 방치 후 4℃, 13,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 70% 에탄올 1 mL을 넣고 4℃, 13,000 rpm으로 5분간 원심분리 후 상층액을 제거한 후 공기 중에 건조하여 DNA 압착결정을 얻은 후 적당량의 증류수에 녹였다. 추출한 DNA는 분광광도계로 확인한 후 1% 한천겔에 전기 영동하여 총 DNA를 확인 후 사용하였다.

4) 중합효소연쇄반응

미소위성체 불안정성을 확인하기 위해 BAT25, BAT26, D5S346, D17S250, D2S123을 표지자로⁴ 하여 중합효소연쇄반응을 실시하여 정상 조직과 비교하여 종양 조직에서 5가지 표지자 중 2가지 이상의 표지자에서 미소위성체의 길이가 길어지거나 혹은 짧아지는 경우 또는 미소위성체의 소실이 있는 경우 미소위성체 불안정성이 있다고 판정하였다. 중합효소연쇄반응을 위해 정방향 시발체(sense)와 역방향 시발체(antisense)로 BAT25는 5'-TCGCCCTCCAAGAA TGTAAGT-3', 5'-TCTGCATTTTAACTATGGCTC-3'을 사용하였고 BAT26은 5'-TGACTACTTTTGACTTCAGCC-3', 5'-AACCATTCAACATTTTAAACCC-3'을 D5S346은 5'-ACTCACTCTAGTGATAAATCG-3', 5'-AGCAGATAAGAC AGTATTACTAGT T-3', D17S250은 5'-GGAAGAATCAA ATAGACAAT-3', 5'-GCTGGCCATATATATATTTAAACC-3', D2S123은 5'-AAACAGGATGCCTGCCTTTA-3', 5'-GG

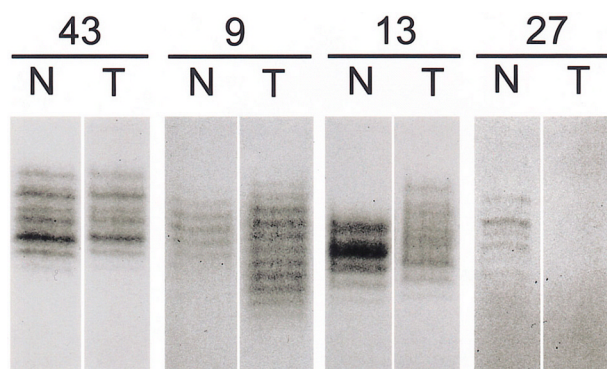
Table 1. Expression Rate of MLH1 or MSH2 Proteins with Immunohistochemistry in 75 Cases of Sporadic Colorectal Cancer

Loss of expression of MLH1 or MSH2	30 (40%)
MLH1 and MSH2 loss	8 (11%)
MLH1 loss	22 (29%)
MSH2 loss	0 (0%)
Expression of MLH1 and MSH2	45 (60%)

Table 2. Microsatellite Instability Status in 30 Cases with Loss of Expression of MLH1 or MSH2

MSI status confirmed by PCR	Loss of expression of MLH1 or MSH2 by IHC		
	MLH1 and MSH2	MLH1	MSH2
3 MSI (10%)	0	3	0
27 MSS (90%)	8	19	0

MSS, microsatellite stable; IHC, immunohistochemistry.

**Fig. 2.** Colorectal cancers with microsatellite stability (MSS) and microsatellite instability (MSI). The MSS colorectal cancer (case 43) has identical bands in normal (N) and tumor (T) DNA at 5 microsatellite loci. The MSI colorectal cancers (case 9, 13 and 27) show shift or loss of tumor (T) DNA bands unlike normal (N) DNA bands.

ACTTTCCACCTATGGGAC-3'을 사용하였다.

중합효소연쇄반응을 위한 반응액은 DNA 1 μ L, 10X PCR반응 완충용액 2 μ L, 2.5 mM dNTP 2 μ L, MgCl₂ 1.2 μ L, Taq-polymerase 0.12 μ L, [α -³⁵S] dATP(1.25 μ Ci/ml) 0.7 μ L에 정방향 시발체와 역방향 시발체(10 pmol/ml)를 각각 2 μ L씩 혼합하여 총 20 μ L 용량이 되게 준비하였다.

중합효소연쇄반응은 95℃에서 50초간 변성, 58℃에서 50초간 결합반응, 72℃에서 1분간 연장 반응을 35주기 실시하였다. 중합효소 연쇄 반응 산물은 SequiGen sequencing chamber (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 6% polyacrylamide urea gel에서 전기 영동을 실시한 후 3MM Whartmann 용지에 전이시켜 현상 후 판정하였다.

3. 통계

미소위성체 불안정성에 따른 임상병리학적 차이는 chi-square test를 이용하여 p값이 0.05 이하인 경우 유의한 차이가 있다고 판정하였다.

결 과

1. 면역조직화학염색법에 의한 불일치교정유전자 발현 이상

면역조직화학염색법으로 30예(40%)에서 불일치교정유전자 발현 이상이 관찰되었고 45예(60%)에서는 불일치교정유전자 발현 이상이 없었다(Fig. 1). 불일치교정유전자 발현이상이 있는 30예 중 22예(73%)에서 MLH1 단백질 발현되지 않았고 8예(27%)에서는 MLH1과 MSH2 단백질 모두 발현되지 않았으며 MSH2 단백질 단독으로 발현되지 않았던 경우는 없었다(Table 1).

2. 중합효소연쇄반응에 의한 미소위성체 불안정성

면역조직화학염색법으로 불일치교정유전자 발현 이상이 있는 것으로 판정된 30예의 종양 중 중합효소 연쇄반응으로는 3예에서 고빈도 미소위성체 불안정성이 있었고 저빈도 미소위성 불안정성 종양 8예를 포함하여 27예에서는 미소위성체 불안정성은 없었다(Fig. 2). 중합효소연쇄반응으로 고빈도 미소위성체 불안정성이 확인된 3예는 면역조직화학염색에서는 MLH1만 발현이 되지 않았던 종양이었고, 면역조직화학염색법에서 불일치교정유전자 발현이상이 있는 것으로 판정되었으나 중합효소연쇄반응에서 미소위성체 불안정이 없는 것으로 판정된 27예 중 8예는 면역조직화학염색에서 MLH1과 MSH2 모두 발현이 되지 않았았고, 19예는 MLH1만 발현이 되지 않았던 종양이었다(Table 2).

3. 중합효소연쇄반응에 의한 미소위성체 불안정성에 따른 임상병리학적 차이

면역조직화학염색법으로 불일치교정유전자 발현 이상이 있는 것으로 판정된 30예의 종양 중 중합효소연쇄반응에 의해 고빈도 미소위성체 불안정성이 확인된 3예와 저빈도 미소위성체 불안정성 종양 8예를 포함한 미소위성체 안정성 종양 27예의 임상병리학적 차이는 관찰되지 않았다(Table 3).

Table 3. Clinicopathological Differences Related to Microsatellite instability by PCR in Sporadic Colorectal Cancer

		MSI	MSS	p value
Sex	Male	1 (33.3%)	23 (85.1%)	NS
	Female	2 (66.7%)	4 (14.9%)	
Tumor location	Rectum	2 (66.7%)	8 (29.7%)	NS
	Distal colon	0	6 (22.2%)	
	Proximal colon	1 (33.3%)	13 (48.1%)	
Age*		65±10.5	59.2±14.0	NS
CEA*		1.7±0.2	25.2±53.1	NS
Depth of invasion	T1	0	0	NS
	T2	1 (33.3%)	4 (14.8%)	
	T3	2 (66.7%)	21 (77.8%)	
	T4	0	2 (7.4%)	
Lymph node invasion	N0	1 (33.3%)	15 (55.6%)	NS
	N1	1 (33.3%)	6 (22.2%)	
	N2	1(33.3%)	6 (22.2%)	
Histologic type	AD WD	0	3 (11.1%)	NS
	AD MD	2 (66.7%)	21 (77.8%)	
	AD PD	0	0	
	AD MC, SC	1 (33.3%)	3 (11.1%)	
Metastasis	Yes	0	1 (3.7%)	NS
	No	3 (100%)	26 (96.3%)	
TNM stage	I	1 (33.3%)	4 (14.8%)	NS
	II	0	10 (37%)	
	III	2 (66.7%)	11 (40.8%)	
	IV	0	2 (7.4%)	

MSS, microsatellite stable; AD, Adenocarcinoma; WD, well differentiated; MD, moderately differentiated; PD, poorly differentiated; MC, mucinous; SC, signet ring cell.

*Data are expressed as mean±SD.

고 찰

여러 가지 환경적 또는 내인적 요인에 의해 DNA에 손상이 발생할 수 있으며 이 손상이 교정되지 않으면 유전자적 불안정성(genetic instability)으로 인해 종양이 발생한다. 손상이 발생한 DNA는 염기제거 교정체계(base excision repair system), 핵산제거 교정체계(nucleotide excision repair system)와 불일치교정유전자에 의해 교정된다.⁶ 이 중 불일치교정유전자는 DNA 복제 중 발생하는 염기의 불일치를 교정시켜 주는 역할을 하는 유전자로² 전핵세포에서 발견된 후 사람에서는 유전성 대장직장암인 유전성 비용종성 대장암 발생의 원인 유전자로 밝혀졌다.³² 미소위성체는 유전체 전반에 걸쳐 고루 분포되어 있어 유전자 지도 작성에 있어 유용한 표지자로 사용된다. 이 미소위성체를 유전자 지도 작성의 표지자로 이용하여 대장직장암의 원인 유전자

에 대한 연구 중 종양 조직에서 정상 조직과 비교하여 미소위성체의 길이가 길어지거나 혹은 짧아지는 미소위성체 불안정성 현상이 발견되어^{7,9,33} 대장직장암 발생의 새로운 기전으로 생각되었으나 미소위성체 불안정성은 불일치교정유전자 이상에 의해 DNA 복제 중 미소위성체 부위에 발생하는 염기의 불일치가 교정되지 않아 생기는 불일치교정유전자 이상의 표현형으로 밝혀졌다. 즉 불일치교정유전자 이상에 의해 발생하는 종양은 종양유전자나 종양억제유전자 이상에 의해 발생하는 종양과 같이 염색체의 상실, 증폭 또는 전이 등으로 인해 대규모의 DNA 염기 변이가 발생하는 것이 아니라 미소유전자적 변이(microgenetic alteration)가 발생한다.

대장직장암에서 미소위성체 불안정성 진단을 위해서는 5가지의 미소위성체 부위를 표지자로 중합효소연쇄반응을 실시하여 종양 조직과 정상 조직의 미소위성체 길이를 비

교하는 방법이 기준안으로 제시되어 있다.⁴ 그러나 중합효소 연쇄반응은 일반적으로 시행하기에는 제한이 있어 시간과 비용이 많이 들고 일반적으로 시행하기 어려운 분자생물학적인 방법보다 쉽고 간편하게 미소위성체 불안정성을 확인하는 방법으로 대두된 것이 불일치교정유전자에 대한 면역조직화학염색법이다. MLH1과 MSH2 이상이 불일치교정유전자 이상의 대부분을 차지하는 것으로 알려진 후,²²⁻²⁷ MLH1과 MSH2 단백질체를 이용한 면역조직화학염색법이 중합효소 연쇄반응과 비교하여 여러 연구에서 높은 예민도, 특이도, 양성 예측도 그리고 음성 예측도를 보여 미소위성체 불안정성을 확인하는 간편하고 유용한 방법으로 알려져 있다.^{13,16,25-29} 본 연구에서는 면역조직화학염색법에서의 불일치교정유전자 이상은 대부분 MLH1 이상으로 기존의 연구들과 유사한 결과를 보였으나,^{12,13,16,30} 면역조직화학염색법에서 40%에서 불일치교정유전자 발현 이상이 있는 것으로 판정되어 기존의 연구 결과들과 달리 매우 높은 양성률을 보였다. 그러나 면역조직화학염색법에서 불일치교정유전자 발현 이상이 있는 것으로 확인된 종양을 대상으로 중합효소 연쇄반응을 실시한 결과 3예에서만 미소위성체 불안정성이 확인되어 면역조직화학염색법은 높은 위양성이 관찰되어 면역조직화학염색법이 미소위성체 불안정성 판정에 유용하지 않았다. 본 연구 결과 기존의 연구들과 다르게 면역조직화학염색법에서 높은 불일치교정유전자 발현 이상이 관찰되었다. 이러한 결과는 대상 선택과 면역조직화학염색의 방법 그리고 염색 후 판정 과정에서 오류가 발생하였을 가능성을 배제할 수 없다. 그러나 본 연구는 연구 대상 선정은 후향적으로 대상 환자의 외래와 입원 의무기록을 면밀히 검토하여 의무기록에서 과거력과 가족력 기록이 확실하지 않거나 유전성 비용종성 대장암이 의심되는 대상들은 제외하였기 때문에 대상 선정에서 오류가 발생하였을 가능성은 적다. 또한 본 연구에서 실시한 면역조직화학염색법은 숙련된 연구자가 기존의 연구에서²⁷ 시행한 방법으로 면역조직화학염색을 실시하였으므로 염색 과정에서 오류가 발생하였을 가능성도 적을 것으로 생각된다. 판정 과정에서의 오류는 MLH1과 MSH2 단백질 양이 적은 경우 발현 정도가 매우 약하게 염색이 되기 때문에 판정 과정에서 발현 이상이 있다고 판정되었을 가능성이 있다. 면역조직화학염색법은 단백질을 발현을 확인하는 것으로 미소위성체 불안정성은 불일치교정유전자 단백질의 양이 부족하여 발생하는 것이 아니고 단백질의 소실에 의한 것으로^{34,35} 불일치교정유전자 이상은 없으나 단백질의 발현량이 적은 경우 분자생물학적으로는 미소위성체 불안정성이 없는 것으로 판정되나 면역조직화학염색법으로는 불일치교정유전자 발현 이상이 있는 것으로 판정될 수 있으므로 본 연구와 같이 면역조직화학염색법에서 불일치교정유전자 발현 이상이

많이 판정된 것은 MLH1과 MSH2 단백질 발현이 미약한 결과일 가능성이 클 것으로 생각되며 확인을 위해 면역조직화학염색법에서 불일치교정유전자 발현 이상이 있는 것으로 판정된 종양을 대상으로 발현된 불일치교정유전자 단백질 양을 확인하는 추후 연구가 필요할 것으로 생각된다. 불일치교정유전자 단백질 발현 정도에 따른 판정 이상은 분자생물학적방법으로 미소위성체 안정성이 확인된 대장직장암에서 면역조직화학염색법을 실시한 결과 14%에서 MLH1, 19%에서 MLH2 발현이 관찰되지 않은 결과를 보인 연구가 있다.³⁶ 그러므로 불일치교정유전자 발현 이상을 확인하기위해 면역조직화학염색법을 시행하고 이를 판정하는 데 있어서는 발현 유무만을 보지 말고 발현된 불일치교정유전자 단백질의 양을 염두해 판정에 신중을 기하는 것이 중요할 것으로 생각된다. 미소위성체 불안정성 진단을 위한 면역조직화학염색법의 유용성에 대해 불일치교정유전자의 과오 변이(missense mutation)나 구간 변이(truncating mutation)가 있는 경우에 기능이 없는 단백질이 생성되어 분자생물학적으로는 미소위성체 불안정성이 있으나 면역조직화학염색법으로는 단백질이 발현되어 미소위성체 불안정성이 없는 것으로 판정된다는 연구가 있고,³⁰ MLH1과 MSH2가 발현이 되는 경우에도 미소위성체 불안정성이 있으므로 면역조직화학염색법은 미소위성체 불안정성을 확인하는 방법으로는 부적합하다는 연구가 있다.³¹

대장직장암에서 미소위성체 불안정성은 대장직장암 전체의 약 1~3%를 차지하는^{37,38} 유전성 대장암인 유전성 비용종성 대장암의 90% 이상²² 그리고 산발성 대장직장암의 10~17%를 차지하는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁻¹³ 특히 미소위성체 불안정성 확인은 유전성 비용종성 대장암의 진단에 있어 Amsterdam 진단기준보다 정확하다는 연구가 있다.³⁹ 미소위성체 불안정성 산발성 대장직장암은 미소위성체 안정성 산발성 대장직장암과 비교하여 임상병리학적으론 여러 차이가 있다.^{11,13-16} 미소위성체 불안정성 산발성 대장직장암은 여성¹³, 젊은 나이에 발생한 종양에 많고,^{11,15} 위치상 비만곡 근위부의 우측 결장에 많이 발생하며^{11,13,15} 동시성(synchronous), 이시성(metachronous) 인 경우가 많다.^{11,16,40} 미소위성체 불안정성 산발성 대장직장암은 조직학적으로 미분화암이 많으나^{11,13,15} 종양의 상피세포내 임파구 침윤이 많고^{13,15} 종양의 침윤 깊이는 깊으나¹¹ 주위 임파관이나 장기로 전이가 적어¹¹ 전체적인 병기는 낮아^{11,13} 미소위성체 안정성 대장직장암에 비해 생존율이 좋아^{13,14} 산발성 대장직장암에서 미소위성체 불안정성은 예후 추정에 있어 독립적인 예측 인자라는 연구가 있다.¹¹ 한 보고¹³에서는 우측 결장에 종양이 위치해 있는 경우, 상피세포내 임파구 침윤이 많은 종양은 미소위성체 불안정성을 예측할 수 있는 임상병리학적 지표로 제시하였다. 본 연구에서는 면역조직화

학염색법에서 불일치교정유전자 발현 이상이 있는 것으로 판정되어 중합효소연쇄반응으로 미소위성체 불안정성을 확인한 3예와 저빈도 미소위성체 불안정성 종양 8예를 포함한 미소위성체 불안정성이 없는 27예 사이에는 임상병리학적으로 특별한 차이를 보이지 않았다. 이는 중합효소연쇄반응으로 미소위성체 불안정성이 확인된 예의 수가 적은 결과로 생각되며 추후 더 많은 환자를 대상으로 한 연구가 필요할 것이다.

이상의 연구 결과 MLH1과 MSH2를 이용한 면역조직화학염색법은 미소위성체 불안정성 확인을 위한 방법으로는 유용하지 않을 것으로 생각된다.

요 약

목적: 미소위성체 불안정성을 확인하는 가장 유용한 방법은 중합효소연쇄반응법이나 이 방법은 복잡하고 시간이 많이 걸려 일반적으로 시행하기에는 제한이 있다. 최근 미소위성체 불안정성을 쉽고 간단하게 진단하는 방법으로 면역조직화학염색법이 유용하다는 주장이 있으나 그 유용성에 대해서는 논란이 있다. 이에 본 연구는 미소위성체 불안정성 확인에 면역조직화학염색법이 유용한지에 대해 알아보고자 하였다. **대상 및 방법:** 산발성 대장직장암으로 진단되어 수술을 시행받은 75예를 대상으로 MLH1과 MSH2 단백질에 대한 면역조직화학염색을 실시하여 불일치교정유전자 발현 이상을 확인한 후 면역조직화학염색법에서 불일치교정유전자 발현 이상이 있는 것으로 판정된 산발성 대장직장암을 대상으로 중합효소연쇄반응을 실시하여 미소위성체 불안정성을 확인하였다. **결과:** 면역조직화학염색법으로 30예(40%)에서 불일치교정유전자 발현 이상이 있는 것으로 판정되었고 30예 중 22예(73%)에서는 MLH1 단백질이 발현되지 않았고 8예(27%)에서는 MLH1과 MSH2 단백질이 모두 발현되지 않았다. 면역조직화학염색법에서 불일치교정유전자 발현 이상이 있는 것으로 판정된 30예를 대상으로 중합효소연쇄반응을 실시한 결과 3예(10%)에서 고빈도 미소위성체 불안정성이 있었고 8예(20%)에서 저빈도 미소위성체 불안정성이 확인되었다. **결론:** 면역조직화학염색법은 미소위성체 불안정성 확인을 위한 방법으로는 유용하지 않을 것으로 생각되며 미소위성체 불안정성 확인을 위해서는 중합효소연쇄반응이 필요할 것으로 생각된다.

색인단어: 산발성 대장직장암, 미소위성체 불안정성, 면역조직화학염색법, 중합효소연쇄반응

참 고 문 헌

1. Laurent-Puig P, Blons H, Cugnenc PH. Sequence of molecular genetic events in colorectal tumorigenesis. *Eur J Cancer Prev* 1999;8:S39-S47.
2. Chung DC, Rustgi AK. DNA mismatch repair and cancer. *Gastroenterology* 1995;109:1685-1699.
3. Rasmann K, Schlotterer C, Tautz D. Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction based DNA fingerprinting. *Electrophoresis* 1991;12:113-118.
4. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR 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.
5. Wheeler JM, Bodmer WF, Mortensen NJ. DNA mismatch repair genes and colorectal cancer. *Gut* 2000;47:148-153.
6. Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T. Human DNA repair genes. *Science* 2001;291:1284-1289.
7. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993;260:812-816.
8. Aaltonen LA, Peltomaki P, Mecklin JP et al. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1994;54:1645-1648.
9. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Peruch M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558-561.
10. Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, et al. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet* 1995;9:48-55.
11. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000;342:69-77.
12. Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principle involvement of hMLH1. *Cancer Res* 1998;58:1713-1718.
13. Ward R, Meagher A, Tomlinson I, et al. Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut* 2001;48:821-829.
14. Lothe R, Peltomaki P, Meling GI, et al. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 1993;53:5849-5852.
15. 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.
16. Cawkwell L, Gray H, Murgatroyd H. Choice of management strategy for colorectal cancer based on a diagnostic immunohistochemical test for defective mismatch repair. *Gut* 1999;45:409-415.
17. Elsaleh H, Joseph D, Griew F, Zeps N, Spry N, Iacopetta B. Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet* 2000;355:1745-1750.
18. Hemminki A, Mecklin JP, Jrvinen H, Aaltonen LA, Joensuu H. Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Gastroenterology* 2000;119:921-928.
19. Laiho P, Launonen V, Lahermo P, et al. Low-level microsatellite instability in most colorectal carcinomas. *Cancer Res* 2002;62:1166-1170.
20. Hoang JM, Cottu PH, Thuille B, Salmon RJ, Thomas G, Hamelin R. BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancer cell lines. *Cancer Res* 1997;57:300-303.
21. Loukola A, Eklin K, Laiho P et al. Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cancer Res* 2001;61:4545-4549.
22. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87:159-170.
23. Peltomaki P, Vasen HF. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The international collaborative group on hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 1997;113:1146-1158.
24. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, et al. Analysis of mismatch repair gene in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nature Med* 1996;2:169-174.
25. Thibodeau SN, French AJ, Roche PC, et al. Altered expression of hMSH2 and hMLH1 in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair genes. *Cancer Res* 1996;56:4836-4840.
26. Bapat BV, Madlensky L, Temple LK, et al. Family history characteristics, tumor microsatellite instability and germline MSH2 and MLH1 mutations in hereditary colorectal cancer. *Hum Genet* 1999;104:167-176.
27. Marcus VA, Madlensky L, Gryfe R, et al. Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. *Am J Surg Pathol* 1999;23:1248-1255.
28. Terdiman JP, Gum Jr, Conrad PG, et al. Efficient detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer gene carriers by screening for tumor microsatellite instability before germline genetic testing. *Gastroenterology* 2001;120:21-30.
29. Chiaravalli AM, Furlan D, Facco C, et al. Immunohistochemical pattern of hMSH2/hMLH1 in familial and sporadic colorectal, gastric, endometrial and ovarian carcinomas with instability in microsatellite sequences. *Virchows Arch* 2001;438:39-48.
30. Salahshor S, Koelble K, Rubio C, Lindblom A. Microsatellite instability and hMLH1 and hMSH2 expression analysis in familial and sporadic colorectal cancer. *Lab Invest* 2001;81:535-541.
31. Wahlberg SS, Schmeits J, Thomas G, et al. Evaluation of microsatellite instability and immunohistochemistry for the prediction of germ-line MSH2 and MLH1 mutations in hereditary nonpolyposis colon cancer families. *Cancer Res* 2002;62:3485-3492.
32. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;75:1027-1038.
33. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-819.
34. Shin KH, Park JG. Microsatellite instability is associated with genetic alteration but not with low levels of expression of the human mismatch repair proteins hMSH2 and hMLH1. *Eur J Cancer* 2000;36:925-931.
35. Miyakura Y, Sugano K, Konishi F, et al. Extensive methylation of hMLH1 promoter region predominates in proximal colon cancer with microsatellite instability. *Gastroenterology* 2003;121:1300-1309.
36. Jansson A, Arbman G, Zhang H, Sun XF. Combined deficiency of hMLH1, hMSH2, hMSH3 and hMSH6 is an independent prognostic factor in colorectal cancer. *Int J Oncol* 2003;22:41-49.
37. Evans DG, Walsch S, Jeacock J, et al. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a population-based study of 1137 consecutive cases of colorectal cancer. *Br J Surg* 1997;84:1281-1285.
38. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, et al. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998;338:1481-1487.
39. Liu T, Wahlberg S, Burek E, Lindblom P, Rubio C, Lindblom A. Microsatellite instability as a predictor of a mutation in a DNA mismatch repair gene in familial colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;27:17-25.
40. Masubuchi S, Konishi F, Togashi K, et al. The significance of microsatellite instability in predicting the development of metachronous multiple colorectal carcinomas in patients with nonfamilial colorectal carcinoma. *Cancer* 1999;85:1917-1924.