

DNA 복제이상인 있는 대장암의 병리학적 특성

연세대학교 의과대학 병리학교실

김호근 · 진윤미 · 심정연 · 박찬일

Pathologic Characteristics of Colorectal Cancers with DNA Replication Errors

Hoguen Kim, M.D. Yoon Mi Jeon, M.D.

Jeong Yeon Shim, M.D. and Chanil Park, M.D.

Department of Pathology, Yonsei University College of Medicine

Unstable microsatellite repeat sequences or DNA replication errors(RER) due to defective mismatch repair genes have been reported in a subset of sporadic colorectal tumors and in most tumors of patients of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma(HNPCC). To elucidate the clinicopathological correlation of these RER-positive cancers, we examined 16 cases of colorectal carcinoma of different histologic subtypes(6 cases of carcinoma with no gland formation, 5 cases of mucinous carcinoma and 5 cases of gland forming carcinoma). We detected RER in five cases. The patients with RER-positive cancers had a marked preponderance of carcinoma with no gland formation(4 out of 6 carcinomas with no gland formation were RER-positive cancers) and of cancers proximal to splenic flexure(all of the RER-positive cases were proximal colon carcinomas). We conclude that RER-positive cancers have unique pathologic features that may be useful for the screening and counselling of patients with hereditary colon cancers. (**Korean J Pathol 1995; 29: 590~595**)

Key Words: DNA replication errors, Colon cancer

서 론

암은 체세포의 유전학적 변화에 의하여 발생한다는 사실은 잘 알려져 있다¹. 현재까지 암발생은 여러 가지 유전자가 각기 다른 시기에 변화되어 작용하는

것으로 생각되며, 이들의 작용기전으로는 종양유전자의 활성화와 종양억제유전자의 비활성화가 암발생의 각 시기마다 복합적으로 작용한 결과로 생각된다². 대장암의 경우 종양의 형성과정중 여러 유전자, 즉 ras, p53, DCC gene, APC gene 등의 돌연변이 혹은 대립유전자의 소실이 전암단계부터 각 시기마다 작용하여 발생하는 것으로 알려져 있다³⁻⁸. 이와 같은 전형적인 분자유전학적 암발생 기전 외에도 최근 대장암 발생에 새로운 분자유전학적 암발생기전의 가능성이 제시되었다. 유전성 대장암에 관련된 유전자를 찾는 연구과정에서 일부 대장암세포에 매우 광범위한 nucleotide 순서의 변화가 알려졌는데 이러한

접 수:1994년 12월 1일, 게재승인:1995년 4월 24일

주 소:서울시 서대문구 신촌동 134, 우편번호 120-752

연세대학교 의과대학 병리학교실, 김호근

*이 연구는 1994년도 연세의대 CMB-YUHAN 연구비로 이루어졌음.

변화는 핵내에 존재하는 cytosine-adenine dinucleotide 반복부위를 검색하는 과정에서 이들의 반복된 숫자가 정상과 많은 차이를 보이는 DNA 복제이상(DNA replication error [RER], 이상 RER로 약함)임이 밝혀졌다⁹⁻¹¹. 이와 같은 변화는 세균이나 효모 등에서는 이미 알려져 있었는데 이의 기전은 부적합하게 배열된 nucleotide를 교정하는데 관여하는 유전자의 이상에 의한 것으로 밝혀져 있다^{12,13}. RER은 선천성 비용종성 대장암(hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome, HNPCC) 환자에서 발생한 대부분의 종양에서 발견되었고, 특발성 대장암 환자의 12~17%에서 발견된다고 보고되었다⁹⁻¹¹. 분자유전학적으로 RER 양성 종양은 종양억제유전자의 변화나 대립유전자의 소실이 없어⁹ 현재까지 알려진 종양유전자의 활성화 및 종양억제유전자의 비활성을 거치는 암발생기전과 다른 암발생기전임을 알 수 있다. 병리학적으로 특발성 대장암중 RER 양성인 종양은 조직학적으로 미분화된 경우가 많고 주변 염증세포의 침윤이 많으며 세포외 점액 분비가 많은 소견을 보여 HNPCC 환자의 임상적 병리학적 특징과 유사한 것으로 생각된다¹⁴. 이상과 같은 사실로부터 RER이 암발생의 중요한 과정임을 알 수가 있으나 이러한 변화가 대장암에 특이한 것인지 아닌지 밝혀지지 않았고, RER양성의 종양에서 RER의 변화가 암발생 과정에서 어떤 시기에 나타나는지가 밝혀지지 않았다.

본 연구자들은 한국인에서 발생한 대장암 환자의 조직에서 DNA 복제이상을 조사하고 이들의 임상적 병리학적 특성을 밝혀 향후 우리나라에 발생하는 유전성 대장암 환자의 조사 및 판별에 도움을 줄 수 있는 병리학적, 분자유전학적 근거를 마련하고자 일차적 실험을 시행하였다.

재료 및 방법

1. 연구대상 환자의 선정

연구대상 환자로는 연세대학교 의과대학 병리학교실에서 대장암으로 진단 받은 후 근치적 절제술을 시행한 16예를 선정하였다. 실험대상군의 선정 기준은 본 연구의 목적이 DNA 복제 이상이 일어난 대장암의 임상적 조직학적 대상군을 선별하는데 있기 때문에 조직학적으로 미분화선암(선형성을 거의 안하고 분화가 나쁜 유형), 점액성 선암(점액형성을 하는 부위가 50% 이상인 유형) 및 중등도의 분화를 보이며 점액형성이 없는 유형의 3형으로 구분하여 각각 6예, 5예, 5예씩 수집하였다. 이들중 미분화선암은 1989년부터 1992년 사이에 있었던 대장암중 전

예를 포함시켰고, 점액성 선암과 중등도 분화선암은 1992년도에 수술한 대장암 중 순서에 따라 무작위로 수집하였다.

2. DNA 추출 및 RER 검사

조직내 DNA 채취는 포르말린에 고정된 후 파라핀에 포매된 조직에서 실시하였는데 암조직의 채취는 현미경하에서 대장암 부위를 직접 확인한 후 이를 분리 수거하였고, 정상 조직은 주변에 전이가 없었던 림프절에서 채취하였다. 이상과 같이 채취한 조직은 xylene으로 파라핀을 제거하고 50µg/ml proteinase K (Sigma, St Louis, MO)로 효소처리한 후에 phenol-chloroform법¹⁵을 통해서 DNA를 추출하였고 ethanol을 첨가하여 DNA를 침전시켰다.

3. 조직내 DNA 복제이상 측정

DNA 복제이상을 검색하기 위해 대장암 발생에서 중요한 변화 부위로 알려진 18번 염색체 장지와 17번 염색체 단지를 선택하였다. 18번 염색체 장지에서는 2개의 표식자(D18S58, D18S61)를 선택하였고, 17번 염색체 단지에서는 1개의 표식자(D17S520)를 선택하여 DNA 복제이상을 판정하였다. DNA 복제이상의 검사는 이전에 기술된 방법에 따라 시행하였는데⁹ 간략히 요약하면 조직으로부터 분리된 DNA로부터 α^{32} PdCTP가 첨가된 중합효소연쇄반응을 통하여 DNA를 합성하였고 그다음 DNA를 6% polyacrylamide gel로 분리한 뒤 film에 노출시켜 DNA 복제이상을 분석 평가 하였다. 정상조직에서 합성된 DNA보다 3개 이상의 다른 크기의 합성 DNA가 종양조직에 존재하는 경우를 DNA 복제이상으로 하였고 3개의 표식자 중 적어도 1개 이상에서 DNA 복제 이상이 있을때 양성으로 판정하였다.

결 과

1. 암조직내 DNA 복제이상

정상 및 암조직으로부터 추출한 DNA로부터 3개의 표식자 부위의 DNA를 중합효소연쇄반응으로 합성한 결과 16예중 5예에서 암조직에서만 RER을 발견하였다(Fig. 1).

RER이 발견된 5예는 표식자 D18S58의 경우 5예, D18S61의 경우 3예, D17S520의 경우 4예였다(Table 1).

2. DNA 복제이상에 따른 대장암의 임상적 특성

DNA 복제 이상이 관찰된 예와 DNA 복제 이상이 없는 예의 평균연령은 각각 59.5세, 55.5세였다.

DNA 복제이상(미분화선암)이 있는 5예 모두 우측대장(비장굴곡상부)에서 발생하였고 DNA 복제이상(미분화선암)이 없는 11예중

8예가 우측대장에서, 3예가 좌측대장에서 발생하였다(Table 2).

3. DNA 복제이상에 따른 병리학적 특성

DNA 복제이상(미분화선암)이 있는 5예중 육안형태가 돌출형인 경우가 2예, 궤양형이 3예였고, DNA 복제이상(미분화선암)이 없는 11예중 돌출형이 4예, 궤양형이 7예로 두 집단간의 차이는 관찰되지 않았다. 조직유형은 DNA 복제이상(미분화선암)이 있는 5예중 미분화선암이 4예, 점액성 선암이 1예였고 DNA 복제이상(미분화선암)이 없는 11예는 미분화선암이 2예, 점액성 선암이 4예, 중등도분화암이 5예로 DNA 복제이상(미분화선암)이 있는 대부분의 종양은 미분화선암의 소견을 보였다(Table 3).

4. 암조직의 대립유전자 소실

본예에서 실험한 3곳의 표식자 부위에서 합성한 DNA를 6% polyacrylamide gel로 분리한 결과 DNA

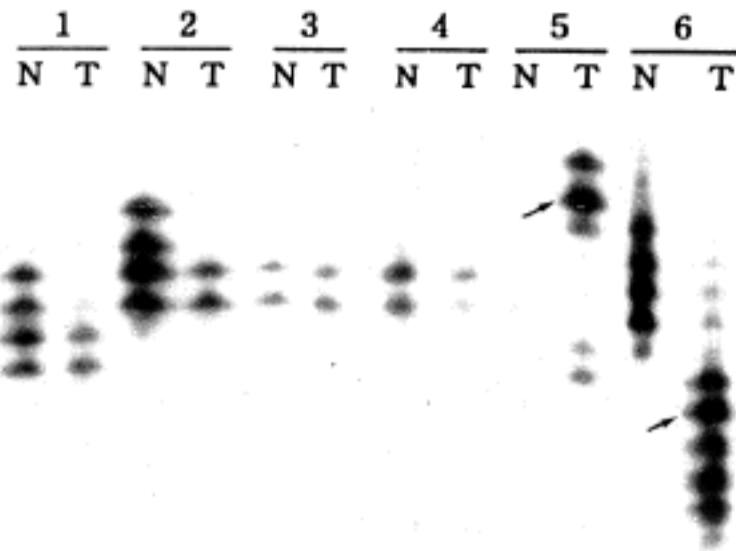


Fig. 1. Examples of DNA RERs in colorectal cancers. Patients numbers are shown above the lanes. In each cases, the T lane contains PCR product from the tumor and the N lane contains PCR product from the non-neoplastic colorectal mucosa of the same patient. In the non-neoplastic mucosa, two alleles showing one major band and one or two minor bands are present(case 1, 2, 5 and 6). In RER-positive colorectal cancers(case 5 and 6) many minor bands(arrows) which are absent in the matched non-neoplastic tissue are seen. Allelic loss is noted in case 1 and 2.

Table 1. Genetic changes of chromosomal loci in colon cancers

| Microsatellite markers | RER | Allelic loss | No change |
|------------------------|-----|--------------|-----------|
| D18S58 | 5 | 4 | 7 |
| D18S61 | 3 | 4 | 9 |
| D17S520 | 4 | 2 | 10 |

Table 2. Clinical characteristics of colon cancers according to RER*

| RER | No | Age(yrs) | Sex | | Site | |
|----------|----|----------|------|--------|-------|------|
| | | | Male | Female | Right | Left |
| Positive | 5 | 59.5 | 2 | 3 | 5 | 0 |
| Negative | 11 | 55.5 | 8 | 3 | 8 | 3 |

* RER: DNA replication error

Table 3. Pathologic characteristics of colon cancers according to RER*

| RER | Gross feature | | Histologic feature | | |
|----------|---------------|------------|--------------------|----------|---------------|
| | Fungating | Ulcerative | No gland forming | Mucinous | Gland forming |
| Positive | 2 | 3 | 4 | 1 | 0 |
| Negative | 4 | 7 | 2 | 4 | 5 |

* RER: DNA replication error

복제이상과 더불어 대립유전자의 소실을 관찰할 수 있었다. D18S61과 D18S58는 16예중 4예에서 D17S520는 16예중 2예에서 대립유전자의 소실을 발견하였으며, D18S61과 D18S58는 16예중 2예에서 동종 대립유전자를 갖고 있었고, D17S는 16예중 4예에서 동종 대립유전자를 보였다(Table 1). DNA 복제이상과 대립유전자의 소실이 동시에 관찰된 예는 없었다.

고 안

본 실험은 우리나라에 발생한 일부의 대장암에서 DNA 복제이상을 보이는 경우가 있다는 것을 밝혔고 이들은 대장암의 특정 조직유형(미분화선암)과 밀접한 관계가 있다는 것을 알게 되었다. 이들중 일부는 유전성 대장암의 형태임을 추측할 수 있으므로 이러한 결과는 대장암 발생기전에 관한 이해에 도움을 줄 뿐만 아니라 DNA 복제이상으로 대장암이 발생한 환자 및 가족의 진단과 대장암의 예방에 도움을 줄 수 있는 가능성을 제시하고 있다고 생각된다.

DNA 복제이상을 보이는 대장암은 어떤 원인으로든 대장암조직에 DNA 복제이상에 관여하는 유전자의 변이에 의한 것인데 이러한 유전자의 변이에 의한 변화는 매우 광범위하게 나타나는 것으로 알려져 있다⁹. 본 실험에서도 DNA 복제이상을 보인 5예중 3예에서 검색한 3개의 표식자부위 모두에서 RER이 관찰되었다. 이와 같은 부정확한 DNA 복제가 어떠한 임상적 병리학적 특징을 보이는지 최근에 이르러 연구되고 있으며¹⁴ 본 실험의 결과를 보면 DNA 복제 이상과 관련된 대장암은 미분화선암이 대부분이고 일부에서 점액성 선암이 유발되는 것을 알 수 있었다. 대장암중 미분화된 암의 일부는 예후가 좋고 주변조직에 염증반응을 많이 동반하며 유전성 대장암의 한 형태로 나타난다는 보고가 있는데¹⁶ 이와같이 미분화된 암이면서도 예후가 좋은 예들은 본 실험에서 밝힌 바와 같이 DNA 복제이상에 의한 암발생이 일어난 예들로서 종양 증식과정에 종양에 대한 숙주의 강한 면역반응에 기인한 것으로 사료된다. 이러한 병리학적 특징외에도 본 실험에서 RER양성으로 판정한 5예 모두 근위부 대장암이었다. 이러한 임상병리학적 특성은 유전성 대장암중 선천성 비용종성 대장암의 특성과 일치하며¹⁶ 외국에서 보고된 RER양성 종양의 특징과도 일치하는 결과이다¹⁴. 이전의 결과와 본 실험의 결과를 종합해 보면, DNA 복제이상에 의한 암발생은 그 원인에 상관없이 대부분 근위부 대장암에서 미분화선암의 형태로 발생하

는데 이에 대한 이유는 현재로서는 알 수가 없으며, 향후 DNA 복제이상에 의한 암발생의 자세한 유전학적 과정과 기전이 밝혀져야 그 이유를 알 수 있다고 사료된다. 우리나라에서의 대장암 발생은 그 빈도가 타종양에 비하여 증가하는 추세이며 이러한 현상은 서구화된 식생활 습관이 하나의 원인이 아닌가 추정되고 있다. 그러나 현재까지 우리나라에 발생하는 대장암 중 유전성 대장암과 특발성 대장암의 빈도와 비율은 알려지지 않았으며, 따라서 유전성 대장암가족을 상담하고 대장암을 예방하는 근거가 마련되어 있지 않다. 현재 유전성 대장암은 수많은 용종을 형성하는 가족성 선종성 용종증(Familial adenomatous polyposis[FAP] 이하 FAP로 약함)에서 발생한 경우와 한 가계에 3명 이상에서 대장암이 발생하여 가족성 대장암으로 분류되나 비교적 자주 선종을 형성하지 않으며, 3명 이상 대장암을 가지고 있는 가족중 2명 이상이 연속적인 세대이며 적어도 1명이 50세 이전에 대장암으로 진단받는 경우로 정의되는 선천성 비용종성 대장암(hereditary non-polyposis colorectal carcinoma[HNPCC], 이하 HNPCC로 약함)¹⁷이 대부분을 차지한다. 이중 FAP에서 발생한 대장암은 미국의 경우 대장암 전체에 1% 이하를 차지하고 우리나라의 경우도 유사한 빈도로 나타나며 이들은 암 발생 과정중 용종증을 먼저 형성하기 때문에 조기진단 및 예방이 비교적 용이하다. 이에 반하여 HNPCC는 구미의 경우 전체 대장암 환자의 10~30%를 차지한다고 알려져 있어 HNPCC에 속하는 환자를 찾아내어 그 가족들에 대한 유전학적 상담 및 예방이 매우 중요한 과제이나 HNPCC의 경우는 암발생 과정상 특별한 전암병변이 없기 때문에 HNPCC의 조기진단 및 예방이 어렵다. 최근에 HNPCC의 원인이 되는 유전자는 2번 유전자의 단지 혹은 3번 유전자의 단지에 있음이 연관분석(linkage analysis)에 의해 알려졌고^{18,19} 이 유전자는 잘못 복제된 DNA를 교정하는데 관여하며 또한 DNA의 유전학적 안정성을 유지하거나 유전자 교환시 길이를 조절하는데 작용하기 때문에 이 유전자에 이상이 있는 경우 dinucleotide 반복부위의 길이의 변화가 생겨 RER이 나타난다고 알려져 있다^{20,21}. 본 실험에서 밝힌 5예의 DNA 복제이상이 양성인 예들은 이들이 HNPCC에 의한 대장암일 수도 있고 특발성으로 발생한 대장암일 수도 있는데, 이의 감별은 환자 자신 뿐만 아니라 환자가족들의 유전학적 상담을 위하여도 매우 중요하다. 이러한 감별은 DNA 복제이상 교정에 관여하는 유전자들의 변이를 환자의 종양조직과 정상 체세포에서 함께 조사함으로써 가능하다. 따라서 본

실험에서 확인한 환자의 종양조직내 DNA 복제이상
은 유전성 대장암의 가능성이 높은 환자군을 식별하
는데 유용한 방법이며 향후 유전학적 상담에도 유용
하게 사용되리라 기대된다.

결 론

본 연구는 한국인에서 DNA 복제이상을 보이는
대장암을 조사하고 그 임상적, 병리학적 특성을 알
기 위하여 일차적으로 대장암 11예를 택하여 중합효
소연쇄반응을 이용하여 DNA 복제이상을 검사하였
다. 11예 중 5예에서 DNA 복제이상이 관찰되었고
이들은 모두 우측대장에서 발생하였으며 대부분 미
분화선암의 형태를 취했다. 이와같은 결론은 향후
우리나라에서 유전성 대장암의 가능성이 높은 환자
군을 식별하는데 도움을 주며 대장암의 병인론을 이
해하는데 도움이 될것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Fialkow PJ. Clonal origin of human tumors. *Biochem Biophys Acta* 1976; 458: 283-321.
2. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-67.
3. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B. Presence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987; 327: 293-7.
4. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Presinger AC, Jessup JM, van Tuinen P, Ledbetter DH, Baker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244: 217-21.
5. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Presinger AC, Thomas G, Kinzler KW, Vogelstein B. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990; 247: 49-56.
6. Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu ZF, Levitt RC, Sistonen P, Kinzler KW, Vogelstein B. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994; 331: 213-21.
7. Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hamilton SR, Hedge P, Markham A, Carlson M, Joslyn G, Groden J, White R, Miki Y, Miyoshi Y, Nishisho I, Nakamura Y. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science*

- 1991; 251: 1366-70.
8. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992; 359: 235-7.
9. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Meckin J-P, Järvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, Petersen GM, Kinzler KW, Vogelstein B, de la Chapelle A. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 812-6.
10. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260: 816-9.
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: 558-61.
12. 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.
13. Kunkel TA. Slippery DNA and diseases. *Nature* 1993; 365: 207-8.
14. 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: 148-56.
15. Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 130: 118-26.
16. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri J, Boland CR. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an update review. *Gastroenterology* 1993; 104: 1535-49.
17. Vasen HFA, Mecklin JP, Kahn PM, Lynch HT. The international collaborative group on hereditary non-polyposis colorectal cancer(ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 424-5.
18. Peltomäki P, Aaltonen LA, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin J-P, Järvinen H, Green JS, Jass JR, Weber JL, Leach FS, Petersen JM, Hamilton SR, de la Chapelle A, Vogelstein B. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 1993; 269: 810-2.
19. Lindblom A, Tammergard P, Werelius B, Nordenskjöld M. Genetic mapping of a second locus pre-

- disposing to hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature Genet* 1993; 5: 279-82.
20. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomäki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nystran-Lahti M, Guan X-Y, Zhang J, Meltzer PS, Yu J-W, Kao F-T, Chen DJ, Cerosaletti KM, Fournier REK, Todd S, Lewis T, Leach RJ, Naylor SL, Weissenbach J, Mecklin J-P, Järvinen H, Petersen GM, Hamilton SR, Green J, Jass J, Watson P, Lynch HT, Trent JM, de la Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B. Mutation of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993; 75: 1215-25.
21. Fishel R, Lesco MK, Rao MRS, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; 75: 1027-38.
-