

상피성 난소 종양에서 microsatellite instability 분석

경북대학교 의과대학 산부인과학교실
김 삼 식 · 박 일 수

목적 : Microsatellite는 개인의 각각의 세포에 일생동안 고정된 염기서열을 가지며 유전체에 분포하는 nucleotide의 짧은 일렬반복(tandem repeat)이다. Microsatellite instability (MSI)는 DNA 복제과정에서 일어나는 mismatch repair의 이상에 의해 초래되고 이로 인해 생긴 하나의 nucleotide의 변이가 축적되어 microsatellite 염기서열의 길이의 변화를 초래하게 된다. 이러한 MSI는 mismatch repair의 가장 중요한 지표가 되어 대장암 외 유방암, 자궁내막암, 위암 등 다른 장기의 암에서도 연구가 활발히 진행되고 있다.

연구 방법 : 본 연구에서는 경북대학교병원에서 수술로 절제된 난소 조직 중 양성, 경계성 및 악성종양 각 20예 등 총 60예의 상피성 난소종양을 대상으로 하였다. 종양조직과 정상조직을 종양세포와 정상세포를 보다 세밀하게 분리할 수 있는 미세절제술을 이용하여 MSI 변이의 빈도가 높다고 알려진 11종의 microsatellite marker를 이용, MSI 분석을 하여 양성, 경계성 및 악성 종양에서 유전자의 변이를 조사하고자 한다.

결과 : 11종의 microsatellite marker 중 D2S123과 D5S346은 양성종양에서는 MSI 변이가 발견되지 않았지만 경계성 종양에서는 각각 30% 및 25%, 악성종양에서는 각각 60% 및 55%에서 변이가 있는 것으로 각각 분석되었다. D11S860의 경우, 악성종양에서 20예 중 10예가 변이를 보였으며 양성종양과 경계성 종양의 경우 각각 20예 중 4예에서 변이가 발견되었다. 나머지 marker에서는 1예나 2예에서 변이를 보였을 뿐이며 양성종양과 경계성 종양에서도 1예 정도는 변이가 발견되었다. Microsatellite marker 분석 결과를 NCI의 정의에 따라 MSI-H, MSI-L, microsatellite stable (MSS)로 분류하면, 양성종양에서 MSI-H인 경우는 없었으며 대부분이 MSS로 분석되었다. 경계성 종양에서는 MSI-H 2예, MSI-L 8예, MSS는 10예로 나타나 양성종양보다는 변이가 일어난 예가 증가했음을 알 수 있다. 반면, 악성종양에서는 MSS 6예, MSI-L 2예, MSI-H가 12예로 나타나 양성종양(0%)이나 경계성 종양(10%)에 비해 MSI-H의 비율(60%)이 크게 증가했음을 확인하였다.

결론 : 연구에서 사용한 microsatellite marker 중 D2S123과 D5S346의 변이가 악성종양에서 높은 비율로 발견되었으며 D11S860은 양성종양이나 경계성 종양에서 비교적 높은 비율로 변이가 검출되는데 이러한 소견은 이 염색체에 포함된 종양 억제 유전자 등이 난소암의 악성진행 또는 초기발생에 관여되었을 것이라 추정한다. 앞으로 더 많은 예의 양성, 경계성 및 악성종양을 포함한 신선한 난소종양조직으로 미세절제술 방법을 적용해 microsatellite 분석을 한다면 보다 정확한 결과를 산출해 낼 수 있을 것으로 기대한다.

중심단어 : Microsatellite instability, 상피성 난소종양

서 론

대장암의 발암 과정에서 microsatellite instability (MSI)의 기전이 알려지면서 여러 장기의 종양에서 microsatellite의 변화에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.¹⁻³ Microsatellite는 유전체에 분포하는 nucleotide의 짧은 일렬반복(tandem repeat)으로 개인의 각각의 세포에 일생동

안 고정된 염기서열을 갖는다. MSI는 DNA 복제과정에서 일어나는 mismatch repair의 이상에 의해 초래되며 이로 인해 생긴 하나의 nucleotide의 변이가 축적되어 microsatellite 염기서열의 길이의 변화를 초래하게 된다.^{4,5} 이러한 MSI는 mismatch repair의 가장 중요한 지표가 된다. 대장암, 특히 유전성 비폴립성 대장암(herededitary non-polyposis colorectal cancer; HNPCC)의 90% 이상에서 MSI가 관찰되며 비유전성 대장암의 약 20%에서도 MSI가 관찰된다.⁶⁻⁸ MSI는 HNPCC를 포함한 대장암에서 가장 많은 연구가 이루어졌으며 그 외 유방암, 자궁내막암, 위암, 난소암 등 다른 여러 장기의 암에서도

논문접수일 : 2006년 9월 21일 채택일 : 2006년 11월 24일
교신저자 : 박일수, 700-721 대구광역시 중구 삼덕 2가 50번지
경북대학교 의과대학 산부인과학교실
전화 : (053) 420-5731 · 전송 : (053) 423-7905
E-mail : parkis@knu.ac.kr

MSI의 연구가 활발히 진행되고 있다.⁹⁻¹¹

난소암은 우리나라에서 여성 생식기계 암 중에서 자궁경부암 다음으로 많으며 평균수명이 길어지면서 점차 증가하고 있는 추세이다. 난소 종양 중에서는 상피성 난소 종양이 가장 흔하며 조직학적으로 장액, 점액, 자궁내막모양, 투명세포, 이행 세포 및 혼재세포종양 등 여러 종류의 형태가 있으나, 장액과 점액 종양이 가장 많다. 조직학적으로 양성, 경계성 및 악성 종양으로 나눈다.¹² 난소암은 대장암과 같이 유전 소인이 높은 종양의 하나이며 전체 난소암의 5-10%는 가족력을 가지는 유전성 암이다. 유전 소인을 가진 여성은 일반 여성에 비하여 난소암이 생길 확률이 4배 정도 높다.^{13,14} 대부분의 유전성 난소암은 17번 염색체에 위치한 BRCA1 유전자의 변이와 연관되어 있으며¹⁵⁻¹⁸ 일부에서는 13번 염색체에 위치한 BRCA2 유전자와 관련이 있다.¹⁹ 전체 난소암의 약 5%에서 BRCA1 유전자의 변이가 관찰된다고 한다.²⁰ 나머지 90% 이상의 유전 소인이 없는 산발성 난소암의 경우에도 체세포의 염색체의 변이가 관찰된다. 난소암의 이형접합체 상실(loss of heterozygosity)에 대한 연구에서 종양억제유전자와 연관이 있는 여러 종류의 염색체에서 다양한 빈도의 이형접합체 상실을 나타낸다.²¹ 전체 난소암의 25-40%에서 5, 6, 7, 9, 13, X 염색체의 대립유전자의 결손이 있었고 11, 17, 18, 22번 염색체에서는 60% 이상의 대립유전자 결손이 관찰된다.²²⁻²⁵

대장의 샘종-샘암종 발생기전과 유사하게 난소암의 경우 난소암의 발암기전에서 양성 및 경계성 종양이 난소암의 초기단계로 생각된다. 따라서 정상 상피조직에서 양성, 경계성 및 악성 종양으로의 진행과정에 유전자 변이와 같은 많은 체세포의 유전학적 변화가 관여한다.^{26,27} 이러한 초기병변에서의 유전자의 변이에 대한 분석이 축적됨으로서 난소암 발암기전의 연구에 많은 기여를 할 것으로 생각된다. 그러나 지금까지 초기병변의 유전자 변이에 대한 분석은 부족한 실정이다.

DNA 복제과정에서 일어나는 mismatch repair의 분석에는 in vitro assay, MSI, MMR mRNA를 이용한 reverse transcription-PCR 및 면역조직화학적염색 등 다양한 방법이 있으며 그 중 microsatellite marker를 이용한 MSI 분석법이 가장 널리 사용되고 있다.²⁸ 여기에 정상조직과 종양조직을 세밀하게 구분할 수 있는 미세절제술을 이용하면 좀 더 정확한 결과가 있을 것으로 생각한다.

본 연구에서는 양성, 경계성 및 악성 종양을 포함한 난소의 상피성 종양 60예를 대상으로 종양조직과 정상조직을 미세절제하여 MSI 변이의 빈도가 높다고 알려진 microsatellite marker를 이용, MSI 분석을 하여 양성, 경계성 및 악성 종양에서 유전자의 변이를 조사하고자 한다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 재료

연구 재료는 본원에서 수술로 절제된 난소 조직 중 장액성 및 점액성 상피성 종양으로 진단된 증례 중 비교적 보존 상태가 양호한 파라핀 포매괴 60예를 실험대상으로 선정하였다.

조직학적 유형은 전체 60예의 상피성 난소 종양 중 장액성 종양 24예, 점액성 종양 36예이며, 장액성 종양은 양성 10예, 경계성 6예, 악성 8예이며, 점액성 종양은 양성 10예, 경계성 14예, 악성 12예였다. 전체 양성, 경계성 및 악성 종양은 각각 20예이다(Table 1).

2. 광학현미경 관찰

절제된 난소종양 조직을 10% 중성 포르말린에 고정하고, 파라핀에 포매한 후, 통상적인 hematoxylin-eosin 염색을 시행하였다. 광학현미경 관찰에서 종양세포의 형태학적 분류를 하여 장액성과 점액성 종양으로 나누고, 각각의 종양을 양성, 경계성 및 악성으로 분류하였다.

3. Microsatellite instability 분석

1) 미세절제술에 의한 암 조직의 분리 및 DNA 분리
포르말린 고정된 파라핀 조직을 10μm 두께로 잘라 슬라이드 위에 부착하고 탈파라핀 과정을 거쳐 톨루이

Table 1. Histologic type of serous and mucinous tumors of ovary

	Serous tumor (n=24)	Mucinous tumor (n=36)	Total (n=60)
Benign	10	10	20
Borderline malignancy	6	14	20
Malignant	8	12	20

딘 청 염색을 한 뒤 공기 중에서 건조하였다. 슬라이드를 2% glycerol을 포함하는 TBE 용액에 약간 적신 후 100배 현미경 시야에서 32 gauge 주사바늘을 이용하여 선정 부위 세포를 수거한 다음 주사바늘 끝에 묻어 있는 세포를 20 μ l의 DNA 추출 용액(10 mM Tris-HCl: pH 8.0, 1 mM EDTA, 5% Tween 20, 400 μ g/ml Proteinase K)에 옮겼다. 이런 방법으로 100-200개의 세포들을 수거하였으며, 1 μ l 용해액에 약 5-10개의 세포가 포함되게 하였다. 55°C에서 3일간 반응하였다. 반응이 끝난 시료는 95°C에서 5분간 두어 proteinase K를 불활화하였다. 이 용액을 원심분리하여 상층액만 새로운 튜브로 옮겨 냉장 보관하면서 이중 1 μ l를 PCR을 위한 주형 DNA로 사용하였다.

2) Polymerase chain reaction (PCR)

실험에 사용한 microsatellite marker로는 NCI²⁹에서 제시한 BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250 marker와 Zborovskaya 등이 보고한³⁰ marker 중 비교적 변이의 빈도가 높은 D1S160, D1S162, D7S522, D11S860, D17S855, D17S932 등을 선정하여 microsatellite instability의 분석에 이용하였다(Table 2). PCR은 프라이머를 각 10 pmole, 주형 DNA 1 μ l를 Bioneer의 PCR premix에 넣고 최종 반응액 부피를 20 μ l로 하여 반응하였다. PCR 과정은 95°C에서 10분간 전변성 과정을 거친 후 95°C에서 30 초, 50°C에서 30 초, 72°C에서 30 초의 과정을 40회 반복 수행하였고, 72°C에서 10분간 반응함으로써 PCR 과정을 종결하였다. PCR 증폭산물은 EtBr을 함유하는 2% agarose gel에서 150 V로 25분간 전기영동한 다음 UV를 투영하여 증폭 정도를 확인하였다.

PCR 증폭산물 2-5 μ l를 동량의 loading dye (80% formamide, 10 mM NaOH, 1 mM EDTA, 0.1% xylene cyanol FF, 0.1% bromo phenol blue)와 혼합하여 95°C에서 5분간 변성한 다음 얼음에 5분 방치한 후 7% polyacrylamide gel (7 M Urea)에서 300 V로 2-4시간 동안 전기영동하였다.

Bio-rad의 silver stain plus kit을 사용하여 염색하였다. 짧게 기술하면, 먼저 5% acetic acid와 methanol 75 ml, fixative enhancer solution 15 ml, 3차 증류수 45 ml의 조성으로 제조하여 잘 섞어준 후 적당한 용기에 붓고, 전기영동이 끝난 젤 조각을 넣어 20분간 고정하였다. 3차 증

Table 2. Sequences of primers

Marker		Sequence (5'-3')
D2S123	F	AAACAGGATGCCTGCCTTTA
	R	GGACTTTCCACCTATGGGAC
D5S346	F	ACTCACTCTAGTGTAATCGGG
	R	AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT
D17S250	F	GGAAGAATCAAATAGACAAT
	R	GCTGGCCATATATATATTTAAACC
BAT25	F	TCGCCTCCAAGAAATGTAAGT
	R	TCTGCATTTTAACTATGGCTC
BAT26	F	TGACTACTTTTGACTTCAGCC
	R	AACCATTCAACATTTTAAACCC
D1S160	F	GCATCTAGCAACAGCATGTG
	R	GCTGGAGGGCAGTGAAACT
D1S162	F	GGGGGAAGAAGTCCGAGTAG
	R	ATAAGGGGAACAGGTCTGGG
D7S522	F	GCCAACTGCCACTTCTC
	R	ACGTGTTATGCCACTCCC
D11S860	F	TAGTATTGCCATAGAAGAAGC
	R	GCAACACGTACACACTGAGACA
D17S855	F	GGATGGCCTTTTAGAAAGTGG
	R	ACACAGACTTGTCCTACTGCC
D17S932	F	GCTAAAAATACACGGATGG
	R	TGCAAGACTGCGTCTC

류수로 10분간 두 번 흔들어주면서 세척하였으며, 증류수 28 ml과 kit에 포함된 silver complex solution 4 ml, reduction moderator solution 4 ml, image development reagent 4 ml을 잘 섞어준 다음 붓기 직전 development accelerator solution 40 ml을 넣고 잘 섞은 용액을 젤에 부어 주었다. 젤에서 밴드가 원하는 정도의 강도로 염색이 되면 5% acetic acid를 부어 반응을 멈추었다.

3) Microsatellite instability 분석

Microsatellite 분석은 NCI의 정의에 따라 5개의 marker 중 2개 이상의 marker에서 변이가 관찰될 경우에 MSI-H, 하나의 marker에서만 변이가 있을 경우에는 MSI-L, 모든 marker에서 변이가 관찰되지 않는 경우에 microsatellite stable (MSS)로 분류하였다.

4. 통계분석

Microsatellite marker에 대한 MSI 빈도와 임상적 인자로서 연령, 종양의 크기, 조직학적 등급과 양성, 경계성 및 악성종양과의 상관관계를 비교하기 위하여 통계 프

Table 3. Incidence of MSI in benign, borderline, and malignant ovarian tumor

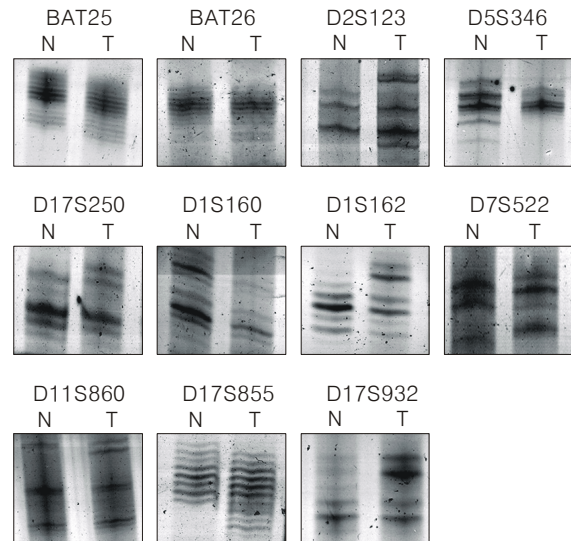
Microsatellite marker	Benign	Borderline	Malignancy
D2S123	0	6	12
D5S346	0	5	11
D17S250	1	0	1
BAT25	1	0	2
BAT26	0	0	3
D1S160	1	0	2
D1S162	1	0	2
D7S522	1	1	2
D11S860	2	4	10
D17S855	1	1	1
D17S932	0	2	1

로그랩인 SPSS 11 for windows (SPSS Inc. Chicago, U.S.A.)을 이용한 chi-square test를 하였다. Fisher 정확 검정결과를 사용하였으며 $p\text{-value} < 0.05$ 일 때 통계학적 유의성이 있는 것으로 하였다.

결 과

양성 샘플 20예, 경계성 20예, 악성종양 20예 등 60예의 상피성 난소종양에서 BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250, D1S160, D1S162, D7S522, D11S860, D17S855, D17S932 등 11종의 microsatellite marker에 대한 유전자 변이 분석의 결과는 다음과 같다(Table 3, Fig. 1).

11종의 microsatellite marker 중 D2S123은 양성종양에서는 MSI 변이가 발견되지 않았지만 경계성 종양에서는 6예(30%), 악성종양에서는 12예(60%)에서 변이가 있는 것으로 각각 분석되었고 D5S346은 양성종양에서는 MSI 변이가 발견되지 않았고 경계성 종양에서는 5예(25%), 악성종양에서는 11예(55%)에서 변이가 관찰되었다. D11S860의 경우, 악성종양에서 20예 중 10예가 변이를 보였으며 양성종양과 경계성 종양의 경우 각각 20예 중 2예와 4예에서 변이가 발견되었다. 나머지 marker에서는 1예나 2예에서 변이가 보였을 뿐이며 양성종양과 경계성 종양에서도 1예 정도는 변이가 발견되었다. 양성종양에서는 1예에서만 두 종류의 marker에서 변이가 관찰되었고 4예에서는 한 종류의 marker 변이가 있었고 나머지 4예에서는 MSI 변이가 관찰되지 않았다. 경계성 종양에


Fig. 1. Microsatellite analysis in ovarian tumor.

서는 3예에서 MSI 변이가 관찰되지 않았고 3예에서는 한 종류의 marker 변이가 있었고 나머지 4예에서는 두 종류의 marker에서 변이가 관찰되었다. 악성종양에서는 20예 모두에서 한 종류 이상의 marker에서 MSI 변이가 관찰되었다. 악성종양 1예에서는 6종류의 marker에서 변이가 관찰되었고 5종류의 marker에서 변이를 보인 경우는 1예, 4종류의 marker에서 변이를 보인 경우는 2예, 3종류의 marker에서 변이를 보인 경우는 1예, 2종류의 marker에서 변이를 보인 경우는 2예, 1종류의 marker에서 변이를 보인 경우는 3예이었다.

Microsatellite marker 분석 결과를 NCI의 정의에 따라 MSI-H, MSI-L, microsatellite stable (MSS)로 분류하면, 양성종양에서 MSI-H인 경우는 없었으며 대부분이 MSS로 분석되었다. 경계성 종양에서는 MSI-H 2예, MSI-L 8예, MSS는 10예로 나타나 양성종양보다는 변이가 일어난 예가 증가했음을 알 수 있었다. 반면, 악성종양에서는 MSS 6예, MSI-L 2예, MSI-H가 12예로 나타나 양성종양(0%)이나 경계성 종양(10%)에 비해 MSI-H의 비율(60%)이 크게 증가했음을 확인하였다. MSI와 세포상태가 관련성은 Fisher의 정확 검정결과 유의한 것으로 나타났다($p < 0.001$). 또한 연관성(association)을 나타내는 Kendall-tau-b가 0.479 ($p < 0.001$)로 나타나 종양세포에서 MSI-H가 많이 나타나는 경향이 있었다(Table 4).

Table 4. Microsatellite analysis in benign, borderline, and malignant ovarian tumor

	MSI-H (%)	MSI-L (%)	MSS (%)
Adenoma	0 (0)	4 (20)	16 (80)
Borderline	2 (10)	8 (40)	10 (50)
Carcinoma	12 (60)	2 (10)	6 (30)

p<0.001

고 찰

종양의 발생과정은 종양유전자와 종양억제유전자의 변이를 포함하는 다단계의 유전적 과정을 거쳐 발생한다.³¹ 종양의 발생, 진행 및 예후는 다수의 종양 유전자와 종양 억제 유전자의 변이가 축적되면서 유전자의 활성화 또는 비활성에 의한 기능의 변화와 관련이 있다. 이러한 유전자들은 동일한 종양에서 가족적 발생뿐만 아니라, 산발적 발생과도 관련이 있다. 따라서 특별한 유전자 소실이나 이형접합성 소실을 밝히는 것이 암의 진행에 관여하는 유전자나 혹은 종양억제유전자의 역할을 하는지를 알아내는 방법으로 사용할 수 있을 것이다. Microsatellite instability (MSI)는 mismatch repair의 지표가 되며 MSI의 분석은 유전자의 변이를 분석하는 데 널리 사용되는 방법이다. MSI는 대장암 외 유방암, 자궁내막암, 위암 등 다른 장기의 암에서도 연구가 활발히 진행되고 있다.⁹⁻¹¹

다른 종양의 경우에서와 같이 난소암에서도 많은 연구가 진행되고 있으며 미국의 국립암센터(NCI)에서는 대장암에서 MSI의 빈도가 높은 5종류의 marker를 선정하기도 하였다.²⁹ 지금까지의 연구 결과를 보면 microsatellite marker의 종류와 수에 따라 침윤성 난소암에서 MSI를 보이는 경우는 5-50%로 매우 차이가 많다.^{32,33} 더욱이 양성 및 경계성 종양과 같은 초기병변의 유전자 변이에 대한 분석은 많이 부족한 실정이다. 그래서 본 연구에서는 미세절제술을 이용하여 종양세포와 정상세포를 보다 세밀하게 분리함으로써 난소암에서 MSI의 발생 빈도를 좀 더 정확하게 분석하고자 하였다. 양성, 경계성 및 악성종양 각 20예 등 총 60예의 상피성 난소종양에서 유전자 변이를 점검해 보았다. 유전자 변이 검사를 위해 NCI에서 유효한 것으로 선정한 다섯 종류의 micro-

satellite marker (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250)와 그 외의 연구에서 난소암에서 MSI의 빈도가 높다고 보고한 여섯 종류의 microsatellite marker (D1S160, D1S162, D7S522, D11S860, D17S855, D17S932)를 선정해 조직학적 분류와의 상관성에 대해 분석하였다.

NCI에서 선정한 marker 중 D2S123과 D5S346은 양성 종양에서는 변이가 발견되지 않았지만 경계성 종양에서는 20예 중 6예와 5예, 악성종양에서는 20예 중 12예와 11예가 변이가 있는 것으로 각각 분석되었다. 하지만 나머지 marker에서는 별다른 차이점을 발견할 수가 없었다. 다섯 종류의 marker를 종합했을 때, 양성종양에서 MSI-H인 경우는 없었으며 대부분이 MSS로 분석되었다. 경계성 종양에서는 MSI-H가 2예, MSI-L은 8예, MSS는 10예로 나타나 양성종양보다는 변이가 일어난 예가 증가했음을 알 수 있었다. 또, 악성종양에서는 MSS가 6예, MSI-L이 2예에 그쳤고 12예가 MSI-H로 나타나 양성종양(0%)이나 경계성 종양(10%)에 비해 MSI-H의 비율(60%)이 크게 증가하였음을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 약 12%만이 MSI-H로 나타난 Sood 등의 연구 결과와²⁹ 차이가 나는데 이는 Sood 등의 연구에서는 시료를 동결 건조한 다음 DNA를 추출해 사용하였지만 본 연구에서는 formalin에 고정시킨 조직으로부터 DNA를 추출하여 MSI의 분석에 이용한 것이 D2S123과 D5S346에서 높은 비율로 변이가 검출된 원인이 될 수도 있을 것이다. 하지만 다른 marker를 사용했을 때는 큰 차이가 없는 것을 보면 이러한 원인에 의해 D2S123과 D5S346에서 변이 빈도가 높은 것을 설명하기에는 부족함이 있다. 또 다른 원인으로 생각할 수 있는 요인은 Sood 등의 연구에서는 동결 건조된 종양 조직 전체에서 추출한 DNA를 서로 비교하였기 때문에 민감도가 떨어질 수가 있다.²⁹ 왜냐하면 종양 조직 속에는 여전히 정상 세포가 다수 포함되어 있기 때문이며 실제 정상 세포가 많이 포함된 조직에서 DNA를 추출했을 경우 변이에 대한 검출률이 상당히 낮아진다는 것은 쉽게 판단할 수 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 본 연구에서는 미세절제술이라는 방법을 적용시켰다. 현미경을 보면서 종양 부위와 정상 부위를 구분해 DNA 추출에 이용하였기 때문에 좀 더 정확한 분석이 가능했을 것으로 생각된다. 따라서 미세절제술과 같은 분류 기술을 이용한다면 종양 조직에 대한 순도가 높아져 종양 조직에서 발견되는 변이의 비율

이 높아질 것이라 생각되며 실제로 이런 기술을 적용했을 때 높은 비율로 변이를 보이는 marker들을 확인한 연구 보고도 있다.³⁶ DNA 복제과정에서 일어나는 mismatch repair의 분석에는 in vitro assay, MSI, MMR mRNA를 이용한 reverse transcription-PCR 및 면역조직화학적염색 등 다양한 방법이 있으며 각각의 방법의 장단점이 있으나 microsatellite marker를 이용한 MSI 분석법이 가장 널리 사용되고 있다. 그러나 각각의 연구에서 보고하는 MSI의 빈도는 큰 차이를 보인다.³⁷⁻⁴¹ 이는 조직의 채취 방법, 보존 및 분석 방법의 차이에 의해 발생할 수 있으며 특히 정상조직과 종양조직을 세밀하게 구분할 수 있는 미세절제술을 이용하면 그 오차를 좀 더 줄일 수 있을 것으로 생각한다.

Zborovskaya 등은 난소암 발생기전에 관한 연구의 일환으로 양성, 경계성 및 악성종양에서 다양한 microsatellite marker를 사용해 상관성을 연구한 바 있다.³⁰ 이들의 연구 결과에 의하면 D1S160, D1S162, D7S522, D11S860, D17S855, D17S932 등의 microsatellite marker에서 양성 및 경계성 종양에서 보다 악성종양에서 더 높은 유전자 변이의 빈도를 보였다 한다. 본 연구에서는 이들의 연구결과와는 달리 D11S860을 제외하고는 높은 변이율을 보이는 marker는 없었다. D11S860의 경우, 악성종양에서는 10예 중 6예가 변이를 보였으며 양성종양과 경계성 종양의 경우도 각각 10예 중 2예에서 변이가 발견되었다. 그 이외의 marker에서는 악성 종양과 양성종양의 뚜렷한 차이를 발견할 수 없었다. 그러나 D11S860의 변이 결과를 보면, Zborovskaya 등의 연구 결과와 비슷한 점을 발견할 수 있다. D11S860은 양성종양이나 경계성 종양에서 비교적 높은 비율로 변이가 검출되는데 이는 이 부분이 포함된 11p15의 18.6-Mb 부분이 난소암의 발생 초기에 관여되었을 것이라 추정한다. 따라서 난소암의 진행과정에서 중요한 역할을 하는 종양 억제 유전자가 이 부분의 염색체에 포함되었을 수도 있다고 생각한다.

본 연구에서 사용한 microsatellite marker 중 D2S123과 D5S346의 변이가 악성종양에서 높은 비율로 발견되었으며 D11S860은 양성종양이나 경계성 종양에서 비교적 높은 비율로 변이가 검출되는데 이러한 소견은 이 염색체에 포함된 종양억제 유전자 등이 난소암의 악성진행 또는 초기발생에 관여되었을 것이라 추정한다. 앞으로

더 많은 예의 양성, 경계성 및 악성종양을 포함한 신선한 난소종양조직으로 미세절제술 방법을 적용해 microsatellite 분석을 한다면 보다 정확한 결과를 산출해 낼 수 있을 것으로 기대한다.

난소암의 발암기전에서 정상 상피조직에서 양성, 경계성 및 악성 종양으로의 진행과정에 유전자 변이와 같은 많은 체세포의 유전학적 변화가 관여한다. 이러한 초기병변에서의 유전자의 변이에 대한 분석이 축적됨으로써 난소암 발암기전의 연구에 많은 기여를 할 것으로 생각된다. 그러나 지금까지 초기병변의 유전자 변이에 대한 분석은 많이 부족한 실정이다. 본 연구에서는 난소의 양성, 경계성 및 악성 종양 60예를 대상으로 미세절제한 종양조직과 정상조직에서 BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250, D1S160, D1S162, D7S522, D11S860, D17S855, D17S932 등 11 종의 microsatellite marker를 이용한 MSI 분석을 하여 양성, 경계성 및 악성 종양에서 유전자의 변이를 조사하고자 하였다.

11종의 microsatellite marker 중 D2S123과 D5S346은 양성종양에서는 변이가 발견되지 않았지만 경계성 종양에서는 각각 30% 및 25%, 악성종양에서는 각각 60% 및 55%에서 변이가 있는 것으로 각각 분석되었다. D11S860의 경우, 악성종양에서 20예 중 10예가 변이를 보였으며 양성종양과 경계성 종양의 경우 각각 20예 중 2예와 4예에서 변이가 발견되었다. 나머지 marker에서는 1예나 2예에서 변이를 보였을 뿐이며 양성종양과 경계성 종양에서도 1예 정도는 변이가 발견되었다. 양성종양에서는 1예에서만 두 종류의 marker에서 변이가 관찰되었고 4예에서는 한 종류의 marker 변이가 있었고 나머지 4예에서는 MSI 변이가 관찰되지 않았다. 경계성 종양에서는 3예에서 MSI 변이가 관찰되지 않았고 3예에서는 한 종류의 marker 변이가 있었고 나머지 4예에서는 두 종류의 marker에서 변이가 관찰되었다. 악성종양에서는 20예 모두에서 한 종류 이상의 marker에서 MSI 변이가 관찰되었고 1예에서는 6종류의 marker에서 변이가 관찰되었다. Microsatellite marker 분석 결과를 종합하면, 양성종양에서 MSI-H인 경우는 없었으며 대부분이 MSS로 분석되었다. 경계성 종양에서는 MSI-H 2예, MSI-L 8예, MSS는 10예로 나타나 양성종양보다는 변이가 일어난 예가 증가했음을 알 수 있다. 반면, 악성종양에서는 MSS 6예, MSI-L 2예, MSI-H가 12예로 나타나 양성종양(0%)이나

경계성 종양(10%)에 비해 MSI-H의 비율(60%)이 크게 증가했음을 확인하였다.

이상의 결과에 따르면 본 연구에서 사용한 micro-satellite marker 중 D2S123과 D5S346의 변이가 양성종양에서 높은 비율로 발견되었으며 D11S860은 양성종양이나 경계성 종양에서 비교적 높은 비율로 변이가 검출되는데 이러한 소견은 이 염색체에 포함된 종양억제 유전자 등이 난소암의 악성진행 또는 초기발생에 관여되었을 것이라 생각한다.

참고문헌

- Thibodeau SN, Bren G, Schaid DJ. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260: 816-9.
- Peltomaki P, Aaltonen LA, Sistonen P, Pylkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 810-2.
- Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkanen L, Mecklin JP, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 812-6.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 1985; 314: 67-73.
- Arzimanoglou II, Gilbert F, Barber HR. Microsatellite instability in human solid tumors. *Cancer* 1998; 82: 1808-20.
- Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Watson P, Jass JR, et al. Analysis of mismatch repair genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 1996; 2: 169-74.
- Marra G, Boland CR. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: The syndrome, the genes, and historical perspectives. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1114-25.
- Ruschoff J, Bocker T, Schlegel J, Stumm G, Hofstaedter F. Microsatellite instability: New aspects in the carcinogenesis of colorectal carcinoma. *Virchows Arch* 1995; 426: 215-22.
- Gurin CC, Federici MG, Kang L, Boyd J. Causes and consequences of microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59: 462-6.
- Leung WK, Kim JJ, Kim JG, Graham DY, Sepulveda AR. Microsatellite instability in gastric intestinal metaplasia in patients with and without gastric cancer. *Am J Pathol* 2000; 156: 537-43.
- Arzimanoglou II, Lallas T, Osborne M, Barber H, Gilbert F. Microsatellite instability differences between familial and sporadic ovarian cancers. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1799-804.
- Scully RE, Young RH, Clement PB. Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, fallopian tube, and broad ligament. Armed forces institute of pathology. Washington, D.C: Third Series Fascicle 23; 1992. p.27-50.
- Greggi S, Genuardi M, Benedetti-Panici P, Cento R, Scambia G, Neri G, et al. Analysis of 138 consecutive ovarian cancer patients. Incidence and characteristics of familial cases. 1990; 39: 300-4.
- Piver MS, Baker TR, Jishi MF, Sandecki AM, Tsukada Y, Natarajan N, et al. Familial ovarian cancer. A report of 658 families from the Gilda Radner Familial Ovarian Cancer Registry, 1981-1991. *Cancer* 1993; 71: 582-8.
- Easton DF, Bishop DT, Ford D, Crockford GP. Breast Cancer Linkage Consortium. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: Results from 214 families. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 678-701.
- Foulkes WD, Black DM, Stamp GWH, Solomon E, Trowsdale J. Very frequent loss of heterozygosity throughout chromosome 17 in sporadic ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 1993; 54: 220-5.
- Narod SA, Ford D, Devilee P, Barkardottir RB, Lynch HT, Smith SA, et al. An evaluation of genetic heterogeneity in 145 breast-ovarian cancer families. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 254-64.
- Takahashi H, Behbakht K, McGovern PE, Chiu HC, Couch FJ, Weber BL, et al. Mutation analysis of the BRCA1 gene in ovarian cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 2998-3002.
- Takahashi H, Chiu HC, Bandera CA, Behbakht K, Liu PC, Couch FJ, et al. Mutations of the BRCA2 gene in ovarian carcinomas. *Cancer Res* 1996; 56: 2738-41.
- Stratton JF, Gayther SA, Russell P, Dearden J, Gore M, Blake P, et al. Contribution of BRCA1 mutations to ovarian cancer. *N Engl J Med* 1997; 336: 1125-30.
- Jacobs I, Lancaster J. The molecular genetics of sporadic and familial epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 1996; 6: 337-55.
- Sato T, Saito H, Morita R, Koi Lee JH, Nakamura Y. Allelotype of human ovarian cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 5118-22.
- Gallion HH, Pieretty M, Depriest PD, Van Nagell JR. The molecular basis of ovarian cancer. *Cancer* 1995; 76: 1992-7.
- King BL, Carcangiu ML, Carter D, Kiechle M, Pfisterer J, Pfisterer A, et al. Microsatellite instability in ovarian neoplasms. *Brit J Cancer* 1995; 72: 376-82.
- Kerr J, Leary JA, Harst T, Shih YC, Antalis TM, Fridlander M, et al. Allelic loss on chromosome 7q in ovarian adenocarcinomas: Two critical regions and a rearrangement of the PLANH1 locus. *Oncogene* 1996; 13: 1815-8.
- Iwabuchi H, Sakamoto M, Sakunaga H, Ma YY, Carcangiu ML, Pinkel D, et al. Genetic analysis of benign, low-grade, and high-grade ovarian tumors. *Cancer Res* 1995; 55: 6172-80.
- Chenevix-Trench G. Analysis of loss of heterozygosity and KRAS2 mutations in ovarian neoplasms: Clinicopathological correlations. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 18: 75-83.
- Boland RC, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshelman JR, Burt RW, et al. 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.
- Sood AK, Holmes R, Hendrix MJC, Buller RE. Application of the national cancer institute international criteria for determination of microsatellite instability in ovarian cancer.

- Cancer Research 2001; 61: 4371-4.
30. Zborovskaya I, Gasparian A, Karseladze A, Elcheval I, Trofimova E, Driouch K, et al. Somatic genetic alterations (LOH) in benign, borderline and invasive ovarian tumours: Intratumoral molecular heterogeneity. *Int J Cancer* 1999; 82: 822-6.
 31. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-67.
 32. Cass I, Kholodilov N, Runowicz CD, Klinger HP. Microsatellite instability in ovarian carcinoma. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1996; 37: 544.
 33. Hickey KP, Boyle KP, Jepps HM, Andrew AC, Buxton EJ, Burns PA. Molecular detection of tumour DNA in serum and peritoneal fluid from ovarian cancer patients. *Br J Cancer* 1999; 80: 1803.
 34. Allen HJ, DiCioccio RA, Hohmann P, Piver MS, Tworek H. Microsatellite instability in ovarian and other pelvic carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 117: 163-6.
 35. Fujita M, Enomoto T, Yoshino K, Nomura T, Buzard GS, Inoue M, et al. Microsatellite instability and alterations in the hMSH2 gene in human ovarian cancer. *Int J Cancer* 1995; 64: 361-6.
 36. Brown MR, Chuaqui R, Vocke CD, Berchuck A, Middleton LP, Emmert-Buck MR, et al. Allelic loss on chromosome arm 8p: Analysis of sporadic epithelial ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 1999; 74: 98.
 37. Marcus VA, Madlensky L, Gryfe R, Kim H, So K, Millar A, et al. Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: A practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 1248-55.
 38. Fidalgo P, Almeida MR, West S, Gaspar C, Maia L, Wijnen J, et al. Detection of mutations in mismatch repair genes in Portuguese families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) by a multimethod approach. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: 49-53.
 39. Friedrich M, Villena-Heinsen C, Meyberg R, Woll-Hermann A, Reitnauer K, Schmidt W, et al. Immunohistochemical analysis of DNA "mismatch-repair" enzyme human Mut-S-Homolog-2 in ovarian carcinomas. *Histochem J* 1999; 31: 717-22.
 40. Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Ruschoff J. Diagnostic microsatellite instability: Definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 1997; 57: 4749-56.
 41. Samimi G, Fink D, Varki NM, Husain A, Hoskins WJ, Alberts DS, et al. Analysis of MLH1 and MSH2 expression in ovarian cancer before and after platinum drug-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1415-21.

Microsatellite instability analysis on epithelial ovarian tumor

Sam-Sik Kim, Il-Soo Park

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu, Korea

Objective : Some genetic alterations are involved in ovarian carcinogenesis. Since some benign and borderline tumors may represent early steps in ovarian carcinogenesis, analysis of precursor lesions could provide evidence that an accumulation of genetic events is required in order for normal ovarian epithelium to generate benign, borderline, malignant tumors. Few pre-invasive ovarian tumors have been studied so far.

Methods : 60 cases of ovarian epithelial tumors, including benign, borderline, and malignant tumors, were analyzed for microsatellite instability (MSI) by gel analysis of paired germ line and tumor DNA. PCR amplification was performed using the panel of 5 microsatellite markers recommended by the NCI (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250) and 6 additional markers (D1S160, D1S162, D7S522, D11S860, D17S855, D17S932).

Results : In this study, D2S123 and D5S346 were the most frequently altered markers in malignant ovarian tumors and D11S860 locus showed MSI in 4 adenomas, 4 borderline tumors, and 10 malignant tumors. Other markers displayed instability with only one or two tumors showing MSI. On the basis of NCI criteria, most benign tumors demonstrated microsatellite stable (MSS). In the borderline tumors, 10 tumors revealed MSS, 8 tumors had low-frequency MSI (MSI-L), and two tumors had high frequency MSI (MSI-H). In the malignant tumors, 6 tumors revealed MSS, 2 tumors had MSI-L, and 12 tumors had high MSI-H.

Conclusion : According to the results, MSI-H is more frequently seen in the malignant tumors. D2S123 and D5S346 were the most frequently altered markers in the malignant tumors, and D11S860 locus may be involved in early step of carcinogenesis.

Key Words : Microsatellite instability, Epithelial ovarian tumor