

ORIGINAL ARTICLE

유방의 침윤성 관암에서의 현미부수체 불안정성

정덕현 · 정진철 · 박찬흔 · 권미정¹ · 조성진¹ · 남은숙¹ · 신형식¹ · 김관석²한림대학교 의과대학 외과학교실, ¹병리학교실, ²김관석 의원

Microsatellite Instability in Invasive Ductal Carcinomas

Duck Hyoun Jeong, Jin Cheol Jeong, Chan Heun Park, Mi Jung Kwon¹, Seong Jin Cho¹, Eun Sook Nam¹, Hyung Sik Shin¹, Kwan Seok Kim²Departments of Surgery and ¹Pathology, Hallym University College of Medicine, Seoul; ²Dr. Kim's Clinic, Seoul, Korea

Purpose: Breast cancer shows various molecular and genetic alterations in its development and progression. Microsatellite alterations, and especially microsatellite instability (MSI) and loss of heterozygosity (LOH), have recently been postulated as a novel mechanism of carcinogenesis and as a useful prognostic factor for several gastrointestinal malignancies. LOH is related to the allelic loss of various tumor suppressor genes; however, MSI has been found to be the result of an erroneous DNA mismatch repair system and this has been known to be involved in the carcinogenesis of the hereditary non-polyposis colon cancers and some portion of the sporadic colorectal or gastric cancers. Yet MSI has rarely been studied in invasive ductal carcinoma. Our objectives were to evaluate the MSI and p53 protein expression in invasive ductal carcinomas and to correlate this with various clinicopathological factors.

Methods: The MSI analysis was performed by using polymerase chain reaction with five polymorphic microsatellite markers (the BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 and D17S250 loci as recommended by the 1998 NCI International Workshop on Microsatellite Instability and RER phenotypes) in

50 surgically resected tumors and each of their non-tumorous counterpart. The p53 protein expression was studied using immunohistochemistry.

Results: MSI and a p53 protein expression were detected in 22% and 54% of the tumors and non-tumorous tissues, respectively. MSI was more frequently detected in tumor grade I, T-stage I, non-metastatic tumor and tumor stage I. Also there were rare cases showing a high grade and stage with metastasis in the MSI-high group, in which more than 3 microsatellite loci had MSI. The p53 expression results correlated well with a higher tumor grade. Correlation between MSI and the p53 expression was not found.

Conclusion: These results may suggest that MSI may be involved in some portions in mammary carcinogenesis and tumor invasion. Also the clinical use of the MSI status may help to determine a better prognosis among invasive ductal cancer patients. (*J Breast Cancer 2007;10:77-84*)

Key Words : Invasive ductal carcinoma, p53, MSI, Immunohistochemistry

중심단어 : 침윤성 유방암, p53, 현미부수체 불안정성, 면역조직화학

서론

국내외적으로 암의 조기 검진에 대한 일반인들의 인식과 암 질환 진료의 의료수준이 선진화되었음에도 불구하고 여전히 암 발생률과 암 사망률은 감소하지 않고 있다. 21세기 들어 국내 암 통

계에서 유방암이 국민의 5대 암 군에 진입하였고 여성에서 제일 높은 발생률을 보임에 따라 유방암 환자들에 대한 새로운 차원의 진단과 진료가 요구되고 있다. (1) 특히 유방암은 국민 보건상 매우 중요하게 강조되어 와서 조기 발견을 위한 다양한 이학적 검사기법, 세포병리 진단 및 영상 진단을 적극적으로 실시하고는 있지만 암종으로 진단될 때에는 상당히 진행된 채로 발견되는 경우가 대부분이다. (2, 3) 따라서 유방암의 종양생물학적 성상과 발암, 진행 기전에 대한 분자생물학적 연구는 매우 중요하다고 할 수 있다.

일반적으로 유방암의 분자적 발생 기전도 위, 장관 종양을 비롯

책임저자 : 박찬흔

134-701 서울시 강동구 길1동 445, 한림대학교 강동성심병원 외과

Tel: 02-2224-2226, Fax: 02-2224-2570

E-mail : hhh@hallym.or.kr

접수일 : 2007년 1월 24일 게재승인일 : 2007년 3월 7일

한 주요 장기의 암종 같이 복수의 유전자 이상이 한 종양 세포내에서 종양의 진행 단계에 따라 차례로 축적되는 것으로 알려져 있다. 그러나 유방암은 전암 병변, 상피내암, 초기 암, 진행성 암으로 이어지는 이른바 다단계 발암 기전이 제시되지 못하고 있다.

최근 종양 분자생물학의 연구 추세는 다양한 암 유전자, 암억제 유전자의 단순한 돌연변이 개념을 넘어서 새로운 작용 기전을 모색하며 발전하고 있다. 이 중 암억제 유전자의 불활성화 기전에서 방대한 규모의 microsatellite (현미부수체)에서의 결손이 중요하게 작용하는 대립 유전자의 이형접합 소실(loss of heterozygosity, LOH)은 이미 중요한 발암 기전으로 인정되었고 그 결손 정도와 임상 특성과의 연관성에 대해 많은 연구가 이루어져 왔다. 한편, LOH처럼 현미부수체에서 변이가 일어나지만 변이 기전이 복제오류 교정 유전자(mismatch repair gene)들이 관여하는 것이며, 변이 양상은 이들 유전자들의 증폭이 일어나는 새로운 기전으로서 현미부수체 불안정성(microsatellite instability, MSI)이 최근 10년간 연구되어 왔다.(4-9) MSI는 원래 유전성 비용종성 대장암의 주요 발암기전으로 알려진 것이지만(10, 11) 단일 대장암, 위암 및 다양한 장기의 산발성(sporadic) 암종의 일부에서도 MSI가 발암 기전으로 작용한다고 보고되고 있다.(12-15) 게다가 MSI는 임상적으로도 중요하여 그 검사기법이 국내에서 보험 급여 항목으로 인정되고 있지만 국내적으로는 MSI 기전에 대한 연구는 드문 실정이며, 외국에서도 MSI가 유방암에서 어떤 양상으로 발암 기전에 작용하는지, 그리고 임상 및 병리학적으로는 어떤 특성을 갖는지에 대해 아직 확실히 밝혀진 바는 없으며 의외로 그에 대한 연구가 드물다.

이에 본 연구에서는 유방의 침윤성 관암에서 MSI를 연구하고자 하며, 또한 MSI 같은 새로운 기전을 평가하는데 이해를 돕기 위해 기존에 유방암에서 많은 연구가 이루어지고 예후 인자들과의 연관성이 비교적 잘 규명된 객관적인 종양생물학적 인자의 발현을 동시에 실험하여 단순 비교하는 것이 의의가 있다고 판단하였다. 이에 거의 모든 장기에서 종양의 악성화와 종양의 진행성 성장에 관여하는 것으로 잘 알려진 p53 유전자의 단백 발현도 동시에 연구하고 침윤성 관암의 임상적 특성 및 중요 예후 인자와의 연관성을 분석하고자 하였다.(16, 17)

방 법

1. 연구대상

한림대학교 의료원에서 1999년 1월부터 2003년 1월까지 유방의 침윤성 관암으로 진단받고 유방 절제술 및 액와 림프절 청소술을 시행한 중례 중 수술 전 항암화학요법을 받지 않았으며 환자의 임상 기록이 잘 보관되어 있고 임상 추적 기록과 파라핀 블록 상

태가 양호한 50예를 연구대상으로 하였으며, 모든 중례들은 수술 전날에 연구 목적으로의 조직 사용에 동의한 중례들이었다. 한편, 이들 환자들의 적출된 유방 조직 중 정상 부분 50예는 MSI 실험 기법에서 '정상 대조군'으로 사용되었으며 이 정상 대조군 중 20예에서 비종양 대조군에 대한 결과를 얻었다.

2. 연구 방법

1) 병리조직학적 검색

모든 검체는 10% 중성 포르말린에 양호하게 고정된 후 통상 병리진단을 위한 처리과정을 거친 파라핀 포매 조직을 이용하였으며 각 예에서 암종과 비암종 부위가 포함된 파라핀 블록을 선택하여 hematoxylin and eosin 염색을 시행하였다. 50예의 침윤성 관암 중례들은 광학현미경으로 조직학적 등급을 Bloom과 Richardson 체계의 변형인 Nottingham 방법(21)에 따라 세 등급으로 재분류하였으며, 종양의 크기는 2 cm 이하인 예를 T1, 2 cm보다 크고 5 cm 이하인 경우를 T2, 5 cm보다 큰 경우를 T3으로 구분하였다.

2) 5가지 현미부수체 표식자의 MSI 분석

DNA는 모두 파라핀 블록에서 획득하였으며, 각 예당 유방의 침윤성 관암 조직과 정상 조직 등 2개의 파라핀 포매 조직을 6 μ m 두께의 연속절편으로 만들어 파라핀을 제거한 후 H&E 염색을 매우 약하게 한 후, 슬라이드를 2% 글리세롤 용액에 2분간 담가두었다가 광학현미경 하에서 관찰하면서 미세절제기를 이용하여 슬라이드상의 순수 암종과 비암종을 조직을 1 mL 주사기 바늘로 긁어내고 각각 DNA 추출 완충액(100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1% Tween 20, 0.1 mg/mL proteinase K)이 들어 있는 1.5 mL eppendorf tube에 넣었다. 이때 슬라이드가 바뀔 때마다 조직이 서로 오염되지 않도록 알코올 솜으로 충분히 칼을 닦아냈으며, 중례가 바뀔 때마다 오염을 방지하기 위해 새로운 칼을 사용하였다. 그 후 eppendorf tube는 2일간 52°C 수조에 두었다. 그 후 시료는 끓는 물에 10분간 방치하여 proteinase K의 반응을 불활성화시킨 후, 분광광도계로 DNA 농도를 측정한 다음 -20°C에서 냉장 보관하면서 이 중 용액 1 μ L를 중합효소연쇄반응(PCR) 증폭시 주형 DNA로 사용하였다.

MSI를 검출하기 위해 분석하려는 5가지 염색체의 현미부수체 표식자는 1997년 NIH International workshop에서 권고한 BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250 등 5가지이며 그 시발체는 GIBCO사(Carlsbad, CA, USA)에서 제작된 것을 사용하였고, 염기 서열은 Table 1과 같다. 그리고 암종, 비암종 부위에서 추출한 DNA를 주형으로 각각 PCR을 시행하였다. 우선 종양 부위와 정상 부위에서 추출한 DNA를 주형으로 하여 각

Table 1. DNA sequences of 5 microsatellites in MSI study

BAT25	(f) 5'-TCGCCTCCAAGAATGTAAGT-3' (r) 5'-TCTGCATTTTAACTATGGCTC-3'
BAT26	(f) 5'-TGACTACTTTTGACTTCAGCC-3' (r) 5'-AACCATTCAACATTTTAAACCC-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'-GCTGCCATATATATTTAAACC-3'

각 PCR을 시행하였으며, 각각의 PCR 용액은 주형 DNA 1 μ L, 0.2 mM dNTP, 10 \times buffer, 10 pmol/ μ L primer, 1U Taq polymerase에 증류수를 가하여 12 μ L로 되게 하였고, PCR은 각 표본에 대하여 35내지 40주기를 반복 실시하였다. 모든 증합효소 연쇄반응은 thermal cycler (Perkin Elmer Cetus 9700, PerkinElmer Inc., MA, USA)에서 시행하였다. 기본적으로는 각 주기 당 변성반응은 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 결합반응은 55-60 $^{\circ}$ C에서 30초, 연장반응은 72 $^{\circ}$ C에서 40초씩 시행하고 마지막 주기의 연장반응은 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시키고, 증폭된 PCR 산물 3 μ L를 2% agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

이후 3 μ L의 PCR 산물과 formamide loading dye (95% formamide, 20 mM EDTA, 10 mM NaOH, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol) 3 μ L를 취해 98 $^{\circ}$ C에서 5분간 끓여 변성시킨 후, 얼음으로 급히 냉각시킨 다음 3 μ L를 취해 전기영동에 사용하였다. 전기영동을 1,400 V에서 1시간 반 동안 시행한 후 gel을 염색하였다. 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) p53 단백에 대한 면역조직화학 염색

10% 중성 포르말린 고정과 파라핀 포매를 거친 조직을 4 μ m 두께로 연속절편을 만들어 100% xylene으로 3-5분간 탈파라핀하고, 증류수로 함수시킨 후 p53 단백에 대하여 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 이들 단백에 대한 면역조직 화학적 염색은 단백질의 항원성을 유지하기 위해 pressure cooker를 이용하였고 끓는 phosphate buffered saline (PBS)에 5분간 처리하였다. 4 $^{\circ}$ C의 PBS에 다시 5분간 처리한 후, 내인성 peroxidase의 활성을 억제하기 위해 3%의 과산화수소를 도포한 후, 1:100으로 희석

된 단클론성의 1차 p53 항체(DO-7, Novocastra, UK)를 상온에서 2시간 반응시킨 후 PBS액으로 세척하였다. 2차 항체인 biotinylated link antibody (LSAB kit, DAKO, Carpinteria, CA, USA)와 20분간 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. Streptavidin (Zymed, CA, USA)과 peroxidase가 결합된 용액에 30분간 반응시키고, 이후 발색반응은 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, Korea)로 발색시킨 다음 Meyer's hematoxylin으로 대조염색 후 흐르는 물에 세척하여 실온에 건조시킨 후 봉입하였다.

4) 결과 판정과 통계 처리

(1) MSI 판정

MSI 판정은 gel 상의 띠(band)를 밀도측정기를 이용하여 측정하고 정상조직에 비해 추가 띠가 생긴 경우는 MSI로 판정하였고, MSI의 경우 3개 이상의 표지자에서 검출되면 MSI-High군으로 분류하였다. 실험결과 중 동형접합성을 보이는 경우와 종양 세포와 대조군 세포 중 어느 하나에서라도 PCR이 되지 않아 유전자 변이를 확인할 수 없는 경우(non-informative)는 결과 분석에서 제외시켰다.

(2) 면역조직화학 염색 판정

p53 단백 발현 판정은 광학현미경 400배 고배율 하에서 실시하였다. 종양세포의 핵이 진한 적갈색으로 염색되는 경우로서 세포의 수를 세어 백분율을 구했고, 5% 이상의 염색을 보일 경우 그리고 대조군인 정상 관상피에서 발현이 없을 경우 양성으로 판정하였다.

(3) 통계학적 분석

각 증례의 각 microsatellite 표지자에 대한 MSI의 빈도와 p53 단백 발현 결과 등과 제반 임상병리학적 소견 및 예후 인자들과의 상관관계를 Chi-square 검정을 이용하여 구하였으며, p 값이 0.05 미만인 것을 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 임상 정보 및 조직학적 소견

대상 환자들 총 50예의 연령 분포는 29세부터 67세까지였고 평균연령은 44.5세였다. 종양의 크기는 2 cm 이하인 T1 등급이 14예(28%), 5 cm 이하인 T2 등급이 20예(40%), 5 cm보다 큰 T3 등급이 16예(32%)이었다. 조직학적 분화도는 Nottingham I 등급이 10예(20%), II 등급이 25예(50%), III 등급이 15예(30%)이었다. 림프관 전이가 있었던 예는 23예(46%)이었고, 전이가 없었

던 예는 27예(54%)이었다. 병기별로는 I기가 13예 (26%), II기는 25예(50%), III기는 12예(24%)이었다(Table 2).

2. MSI 검출과 p53 단백질 발현 양상

침윤성 관암에서 MSI를 보인 증례는 총 11예(22%)이었다. BA-T25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250 표식자의 분석에서 유전자변이를 확인할 수 있는(informative) 증례는 각 표식자 당 39예, 41예, 36예, 35예, 32예이었고 그 중 각각 8예(20.5%), 7예(17.1%), 4예(11.1%), 6예(17.1%), 4예(12.5%)에서 MSI를 보였으며, 5개의 표식자 중 BAT25 표식자에서 MSI 검출률이 20.5%로 가장 높았으며, D2S123에서 11.1%로 MSI 검출률이 가장 낮았다. 5가지 표식자 중 최소 3개 이상의 MSI를 보인 MSI-high군의 증례는 총 4예(8%)이었다. 한편, 정상 대조군 조직에서는 MSI가 검출되지 않았다(Fig 1, Table 3). 따라서 5가지 microsatellite에서의 MSI는 암종에서만 유의하게 검출되었다($p=0.020$).

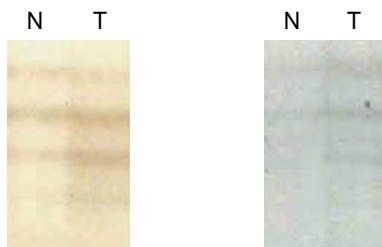


Fig 1. Representative MSI pattern of BAT25 (left) and D17S250 (right) markers in invasive ductal carcinoma. Each T lane shows mid-lower band gain. N=normal; T=Tumor.

Table 2. Clinicopathologic findings of 50 invasive ductal carcinomas

Clinicopathologic parameters	Number of case (%)
Age	
Below 35	9 (18)
Above 35	41 (82)
Grade	
I	10 (20)
II	25 (50)
III	15 (30)
Size	
≤ 2 cm	14 (28)
2-5 cm	20 (40)
> 5 cm	16 (32)
LN metastasis	
Positive	23 (46)
Negative	27 (54)
Stage	
I	13 (26)
II	25 (50)
III	12 (24)

한편, 면역조직화학적 방법에 의해서 검출된 p53 단백질 발현은 종양 세포에서는 모두 세포의 핵에서 양성으로 염색되었고, 비종양 부분과 주변 간질 세포 및 혈관 등에서는 전혀 염색성을 보이지 않았다. p53 단백질은 총 27예(54%)에서 발현되었으며, 암종에서만 특이적으로 발현이 관찰되었다($p=0.001$) (Fig 2, Table 3).

3. MSI 검출과 임상병리학적 인자와의 상관관계

MSI 검출률은 35세를 기준으로 구분할 경우 연령에 따른 유의성 있는 차이는 없었다.

종양의 분화도에 따른 MSI 검출률은 I 등급 증례 10예 중 4예(40.0%), II 등급 25예 중 6예(24.0%), III 등급 15예 중 1예(6.7%)로서 분화도와 MSI 검출률간에는 유의한 역상관계가 있었다($p=0.033$). 종양의 크기에 따른 MSI 검출률은 T1군에서 5예(35.7%), T2군에서 4예(20.0%), T3군에서 2예(12.5%)로서 T3군에서 MSI 검출률이 낮은 경향을 보였으나 유의성은 없었다. 림프절 전이에 따른 MSI 검출률은 전이성 암종에서 4예(17.4%), 비전이성 암종에서 7예(25.9%)로서 전이성인 경우 MSI 검출률이 낮은 경향을 보였으나 유의성 있는 차이는 없었다. 병기에 따른 MSI 검출률은 I기 13예 중 5예(38.5%), II기 25예 중 4예(16.0%), III기 12예 중 2예(16.7%)로서 병기별로 MSI 검출률의 차이는 없었지만, 병기 I기와 II+III기로 구분하면 병기 I기에서 유의성 있게 높은 검출률을 보였다($p=0.038$).

Table 3. p53 protein expression and MSI detection rate according to the clinicopathological factors (%)

	Total	p53 Protein (%)	MSI (%)
Tumor vs. Normal			
Tumor	50	27 (54)	11 (22)
Normal	20	0 (0)	0 (0)
Age			
Below 35	9		
Above 35	41		
Tumor grade			
I	10	3 (30.0)	4 (40.0)
II	25	13 (52.0)	6 (24.0)
III	15	11 (73.3)	1 (6.7)
Tumor size			
Below 2 cm	14	8 (57.1)	5 (35.7)
2-5 cm	20	9 (45.0)	4 (20.0)
Above 5 cm	16	10 (62.5)	2 (12.5)
LN Metastasis			
(-)	27	12 (44.4)	7 (25.9)
(+)	23	15 (65.2)	4 (17.4)
Tumor stage			
I	13	8 (61.5)	5 (38.5)
II	25	9 (45.0)	4 (16.0)
III	12	10 (83.3)	2 (16.7)

MSI=microsatellite instability; LN=lymph node.

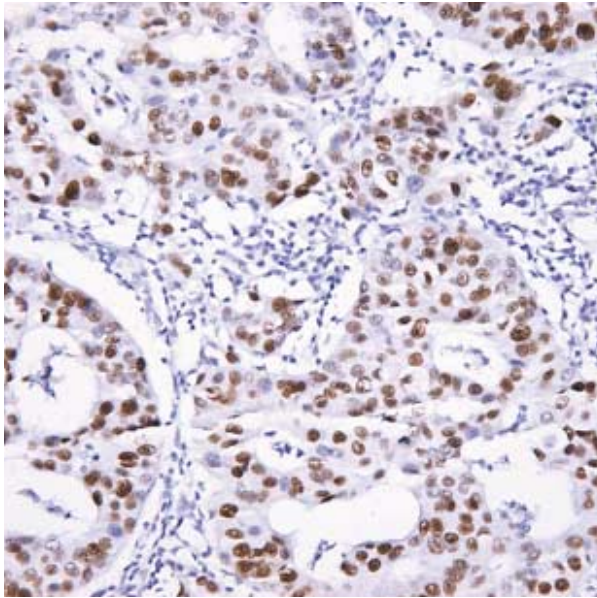


Fig 2. On immunohistochemical stain for p53, the tumor cells of invasive ductal carcinoma show strong nuclear expression.

한편, MSI-high군 4예를 별도로 분석하면 종양의 분화 등급 III 등급의 증례는 없었으며, T1군이 3예이었고, 병기 I기군이 3예, 비전이성인 경우 3예이었으나, 통계적 유의성은 없었다.

4. p53 단백질 발현과 임상병리학적 인자와의 상관관계

p53 단백질 발현은 35세를 기준으로 구분할 경우 연령에 따른 유의성 있는 차이는 없었다.

종양의 분화도에 따른 p53 단백질은 I 등급 증례 중 3예(30.0%), II 등급에서 13예(52.0%), III 등급에서 11예(73.3%)로서 저분화도일수록 단백질 발현 비율이 높아졌으며 이는 통계적으로 유의하였다($p=0.044$). 종양의 크기에 따른 단백질 발현은 T1군에서 8예(57.1%), T2군에서 9예(45.0%), T3군에서 10예(62.5%)로서 유의성 있는 차이는 없었다. 림프절 전이에 따른 단백질 발현은 전이성인 경우 15예(65.2%), 비전이성인 경우 12예(44.4%)로서 전이성 암종에서 높은 발현의 경향을 보였지만 유의성 있는 차이는 없었다. 병기에 따른 단백질 발현은 I기 8예(61.5%), II기 9예(45.0%), III기 10예(83.3%)로서 병기 III기에서 높은 단백질 발현의 경향이 있었으나 병기별 유의성 있는 단백질 발현 차이는 없었다($p=0.133$).

5. MSI와 p53 단백질 발현과의 상관관계

MSI와 p53 단백질 발현과의 상관관계를 보면 양자 모두 양성인 증례는 7예(14%), MSI만 검출된 증례는 4예(8%), p53 단백질 발현만 있는 경우 20예(40%)이었고, 양자 모두 음성인 증례는 19예(38%)이었으며, 양 검사법간의 통계적 유의성은 없었다(Table 4).

Table 4. Correlation between MSI & p53 protein expression

	p53 protein expression	
	(+)	(-)
MSI (+)	14	8
MSI (-)	40	38

고찰

최근 국내의 암 발생 빈도가 크게 변화되어 유방암이 한국인의 5대암에 속할 정도로 유방암 발생률이 증가되고 있는 추세이며, 35세 미만의 젊은 여성에서도 유방암에 대한 조기 발견과 관리가 더욱 중요하게 되었다. (1) 게다가 동일한 병기의 암종이라도 치료 성적과 재발, 암 전이 양상이 차이가 나고 나쁜 예후를 보이는 경우도 많으므로 암의 침윤 및 전이에 관련된 다양한 분자, 종양생물학적 인자들의 임상적인 적용에 대한 연구는 중요하다. (16-21) 암의 발생과 진행은 복수의 발암유전자나 종양억제 유전자들의 이상이 한 종양 세포내에서 여러 단계에 걸쳐 축적되는 복잡한 기전이 병인론으로 제시되고 있으며, 동시에 많은 발암화 관련 유전자들의 염색체상에서의 위치가 알려지면서 암의 발생과 염색체 이상과의 상관성을 밝히려는 연구들이 진행되어 왔다. (4, 5) 이중 종양억제 유전자는 세포주기, 세포 증식, 전사 및 신호전달 체계 등의 과정을 조절하여 종양의 발생을 억제하는 기능을 하므로 종양억제 유전자의 비활성화는 정상세포에서 암이 발생하는 생생기전 중에 가장 많이 확인된 유전학적 변이라고 할 수 있다. 이에 특정 부위 종양억제 유전자의 두개의 대립유전자가 모두 변이 및 소실되어 일어나는 종양억제 유전자의 비활성화는 현미부수체 표식자를 이용한 LOH의 확인을 통해 알아낼 수 있다. 현미부수체는 생체내의 게놈(genome) 전반에 걸쳐 풍부하게 존재하는 짧은 염기로 단순하게 반복되는 형태의 DNA로 단백질 합성에 직접 관여하지 않는 비전사(non-coding) DNA에 위치하며, 부모 세대로부터 자손에게 유전되어 세대간에 걸쳐 잘 유지되며 다형성이 커서 염색체 결손 검사와 유전자 지문(DNA fingerprinting) 검사에 활용된다. (4, 5) 이러한 특성을 보이는 현미부수체를 이용하여 염색체상에서 LOH를 검출하는 기법이 최근 발전되어 왔으며 동시에 DNA의 복제 오류 교정에 관여하는 유전자들에서 장애가 생겨 발암화 되는 새로운 기전인 현미부수체 불안정성(MSI)에 대한 연구도 발전되어 왔다.

복제오류 교정 유전자의 이상이 현미부수체의 반복되는 염기서열의 큰 변화를 야기시킨다는 사실이 밝혀졌으며 이 같은 DNA 수복 기능의 결함을 나타내주는 특성을 돌연변이 발생률이 증가되어 현미부수체의 반복 염기서열에 광범위하게 축적된 소위 'mutator phenotype'으로 명명되고 MSI가 그 척도라고 할 수 있다. (6, 7)

최근 이러한 MSI가 유전성 비용종성 대장암 증후군(HNPCC)에서 발생하는 대장암에서 높은 빈도로 검출된다고 알려져 있으며, (8, 9) 몇 차례에 걸쳐 HNPCC의 임상 진료 차원에서 MSI의 국제적인 표준화를 위한 국제적 합의가 이루어질 정도이다. (18, 19) 한편, MSI 기전은 HNPCC 이외에도 단일형(sporadic) 결직장암, 위암, 식도암, 담관암, 갑상선암 등 다양한 여러 암종의 약 10–15%에서 발암 기전으로 작용한다는 보고들도 많이 발표되고 있다. (12–15) 이 같은 현미부수체 변이들에 대한 연구가 초기에는 소화기계 암종 위주로 많이 이루어졌지만 최근에는 거의 모든 장기의 암종에서 연구되어 왔지만, 국내에서의 연구는 많은 편이 아니며 특히 유방암을 대상으로 한 MSI 연구는 국내외적으로 미진하다고 할 수 있다. 본 연구에서는 MSI 검출을 위해 1998년 미국 NIH NCI에서 임상적 적용을 위해 MSI의 표준화를 위해 권고한 BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250 등 5가지 표식자를 사용하였다. (18, 19) 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 침윤성 관암 중 11예(22%)에서 검출되었으나, 이를 평가하기 위해 참고가 될 만한 국내에서의 연구가 미흡할 뿐만 아니라 또한 외국의 연구와는 실험 방법이 동일하지 않으므로 분석이 용이하지 않다. 우선 본 연구는 1998년 NCI 학회에서 권고된 5가지의 표준화된 표식자들을 사용하였지만 많은 연구들은 표준화된 표식자들을 사용하지 않고 나름대로의 다양한 염색체의 좌위들을 사용하였다. Siah 등(20)은 침윤성 관암에서 306개의 표식자를 연구하였으며 증례의 35.5%에서 MSI 검출되었으나 평균적으로 표식자의 2.9%에서만 검출되었음을 보고하여 비교적 낮은 MSI 검출률을 보였다. Molist 등(21)의 보고에서는 사용한 표식자에서 어떤 MSI도 검출되지 않았다. 반면 Murata 등(22)은 5개의 표식자를 사용하여 15개의 MSI가 검출하였으며, 그 중 6예는 MSI-High군이었다. 또한 Pizzi 등(23)은 8개의 표식자를 사용하였으며 증례의 36.5%에서 최소 2개 이상의 MSI가 있음을 보고하여 다소 높은 비율의 MSI 검출률을 보고하였다. Mendez 등(24)은 5개의 표식자를 사용하여 2개 이상의 MSI가 검출된 증례가 11.6%이었음을 보고하여 8%의 MSI-High군을 보인 본 연구와 MSI 검출률이 유사하였다. 국내 문헌에서는 참고할 문헌이 드물었지만 외국에 발표된 국내 문헌을 참고하면 Kim 등(25)은 염색체 11p15.5 상에 있는 IGF-II와 관련된 D11S922, D11S988에서 높은 비율의 검출률을 보였고 D11S922 표식자는 침윤성 관상피암의 45.3%에서 MSI가 검출되었음을 보고하여 매우 높은 검출률을 보였다. 또한, 본 연구에서 BAT25, BAT26

이 두가지 표식자는 각각 8예, 7예에서 MSI를 보였으며, BAT25, BAT26에서의 높은 검출률이었다. 특히 BAT26은 MSI 여부를 조사하는데 민감도가 매우 높고 위양성, 위음성 정도가 낮아서 유용한 표지자로 알려져 있고(26) 본 실험에서도 어느 정도 부합되는 것으로 판단된다. 다만, Siah 등(20)은 BAT25, BAT26에서 MSI가 없었다고 보고하여 본 연구 결과와 큰 차이가 있었다.

본 연구 결과를 임상 및 병리학적 인자들의 특성에 따라 분석하면 MSI 검출률은 높은 등급의 분화도일수록 유의하게 낮게 검출되었으며, 종양의 크기가 큰 T3군에서 그리고 전이성 암종에서 MSI 검출률이 낮은 경향을 보였다. 또한, 병기별로 MSI의 검출률의 차이는 없었지만, 병기 I기와 II+III기로 구분하면 병기 I기에서 유의성 있게 높은 MSI의 검출률을 보였다. 한편, MSI-high 군 4예의 경우를 기술하면 분화도 III 등급의 증례는 없었으며, T1 군이 3예이었고, 병기 I기군이 3예, 비전이성인 경우 3예 이므로 비록 통계적 유의성은 없지만 본 연구에서는 MSI를 갖는 암종이 보다 좋은 예후를 보이는 것을 제시하였다. 외국 문헌을 참고하면 MSI와 LOH를 동시에 연구한 Regitnig 등(27)은 40예의 재발성 유방암에서 3예에서만 MSI가 검출되었고, 반면 각 증례 당 평균 4개의 LOH가 검출을 보고하여 LOH와 MSI가 예후에 역상관성이 있음을 제시하였다. 반면 Pizzi 등(23)은 MSI를 보인 증례들이 큰 종양 크기, 높은 림프절 전이능 및 높은 병기를 보였다고 보고하여 본 연구와 상반된 결과를 보였다. 그러나 Iwase 등(28)은 MSI를 갖는 증례 중에는 높은 전이능, 낮은 분화도 및 나쁜 예후를 보이는 증례들이 없음을 보고하여 본 연구 결과와 부합되었다.

아울러 본 연구에서는 MSI 검출 결과를 검증하고 객관적으로 판단하는데 도움을 주기 위해 MSI와는 직, 간접적인 연관성이 없으면서 기존에 이미 많은 연구가 이루어진 p53 단백질 발현을 참고하여 비교해 보았다. p53 유전자 발현과 관련된 대다수의 연구 문헌에서는 종양의 높은 악성도, 종양의 침윤 및 전이와 p53 유전자 이상 또는 단백질 발현 사이에 관계가 있다고 일반적으로 제시되고 있다. (16, 17, 29) 본 연구에서 면역조직화학 방법으로 검출한 p53 단백질 발현은 암종의 54%에서 관찰되었고, 정상 조직에서는 발현이 없어서 암종과 정상 조직의 구분에 특이성이 있었다. 또한 p53 단백질 발현은 종양의 크기, 림프절 전이 여부, 병기와는 유의성 있는 차이가 없었지만, 종양의 분화도가 낮을수록 발현이 유의성 있게 높았고, 전이성 암종과 병기 III기 암종에서 높은 발현의 경향을 보여 비록 MSI와 p53 단백질 발현 간에는 어떤 유의한 상관성을 볼 수 없었지만 MSI와는 일반적으로 상반되는 예후를 보이는 양상을 보였다. 참고로 Molist 등(21)은 MSI와 p53 유전자의 LOH를 동시에 연구하고 MSI는 검출되지 않았으나 p53 LOH는 17%의 검출률을 보였다고 보고하여 본 연구 결과와 어느 부분에서는 부합되는 결과를 보였다.

결론적으로 본 연구를 종합하면 비록 국내에서의 연구 보고가 매우 미흡하여 비교 분석 문헌이 드물고 또한 외국의 연구들과 다소 상이한 부분들이 있지만 MSI는 유방의 침윤성 관상피암종에서 비록 검출률이 미약하지만 기존의 종양억제 유전자의 불활성화와 발암유전자의 활성화 기전과는 다른 차원의 발암 기전으로 작용할 수 있음을 시사하며, 암종 중에서는 비교적 양호한 예후를 보여 임상적인 유용성이 있을 것으로 판단된다. 아울러 p53 단백질 발현이 있는 27예 중 20예에서 MSI가 검출되지 않았으므로 일부의 침윤성 유방 관상피암종의 발암 과정상 p53이 불활성화되는 기전과는 다르게 독립적으로 작용하는 것으로 보이지만 일부의 암종에서는 두 기전이 동시에 발암 기전에서 작용하는 것으로 판단된다. 아울러 많은 연구 그룹마다 MSI를 적용하는 기준과 그 결과가 크게 상이하지만 더 많은 현미부수체 표식자를 대상으로 연구하는 것이 바람직한 것만은 사실이다. 향후에는 더 많은 침윤성 관상피암종 증례를 대상으로 가능한 많은 현미부수체 표식자를 연구하는 것은 물론이거니와 전구 병변 증례까지도 포함하는 포괄적인 연구가 요구된다고 본다.

결 론

유방의 침윤성 관암에서 5개 염색체상의 5가지 현미부수체 표식자 BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250에서의 MSI 및 p53 단백질 발현을 연구하고 임상 및 병리학적 소견과 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

MSI와 p53 단백질 발현은 암종에서만 관찰되었고 정상에서는 검출되지 않았다. MSI는 증례의 22%에서 검출되었으며 MSI-High군은 8%이었다. MSI 검출률은 분화도와 역상관성이 있었고 병기 I기에서 유의하게 높은 검출률을 보였으며, 또한 통계적 유의성은 없지만 T3군과 전이성 암종에서 낮은 MSI 검출률의 경향을 보였다. 한편, MSI-high군 4예를 별도로 분석하면 종양의 분화 등급 III 등급의 증례는 없었으며, T1군이 3예이었고, 병기 I 기군이 3예, 비전이성인 경우 3예이었다. p53 단백질 발현은 증례의 54%에서 관찰되었으며 암종의 분화 등급과 상관관계를 보였으나 다른 인자들과의 상관성은 없었다.

MSI는 유방의 침윤성 관암에서 비록 낮은 검출률을 보였지만 기존의 종양억제 유전자에 의한 발암 기전과는 다른 양상의 발암 기전으로 작용할 가능성이 있는 것으로 판단되며, 암종 중에서는 비교적 양호한 예후를 보여 임상적인 유용성이 있을 것으로 판단된다. 아울러 p53 단백질 발현이 있는 27예 중 20예에서 MSI가 검출되지 않았으므로 일부의 유방의 침윤성 관암의 발암 과정상 p53이 불활성화되는 기전과는 다르게 독립적으로 작용하는 것으로 보이지만 일부의 암종에서는 두 기전이 동시에 발암 기전에서 작

용하는 것으로 판단된다.

참고문헌

1. 2002 Annual Report of the Central Cancer Registry in Korea. Ministry of Health and Welfare. Republic of Korea 2003;11.
2. Lo S, Johnston SR. Novel systemic therapies for breast cancer. *Surg Oncol* 2003;12:277-87.
3. Hollingsworth AB, Singletary SE, Morrow M, Francescatti DS, O'Shaughnessy JA, Hartman AR, et al. Current comprehensive assessment and management of women at increased risk for breast cancer. *Am J Surg* 2004;187:349-62.
4. Weisenbach J, Gyapay G, Dib C. A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 1992;359:794-801.
5. 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.
6. Loeb L. Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 1994;54:5059-63.
7. Eshleman J, Markowitz S. Mismatch repair defects in human carcinogenesis. *Hum Mol Genet* 1996;5:1489-94.
8. 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.
9. Peltomäki P, Løthe 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.
10. Aaltonen L, Peltomäki P, Leach F, Sistonen P, Pykkanen L, Mecklin J, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993;260:812-6.
11. Peltomäki P, Løthe 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.
12. Løthe RA, Arzimanoglou II, Gilbert F, Barber HR. microsatellite instability in human solid tumors. *Cancer* 1998;82:1808-20.
13. 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.
14. Momoi H, Itoh T, Nozaki Y, Arima Y, Okabe H, Satoh S, et al. Microsatellite instability and alternative genetic pathway in intrahepatic

- cholangiocarcinoma. *J Hepatology* 2001;35:235-44.
15. Dobosz T, Lukieniczuk T, Sasiadek M, Kuczyńska A, Jankowska E, Blin N. Microsatellite instability in thyroid papillary carcinoma and multinodular hyperplasia. *Oncology* 2000;58:305-10.
 16. Jo HJ, Yun KJ, Moon HB. Expression of p21, p53 and bcl-2 proteins in invasive ductal carcinoma of the breast. *Korean J Pathol* 2003;37:393-9.
 17. Kim JK, Song YJ, Cho SI, Ryu DH, Yun HY, Sung RH. Clinicopathologic significance of p53 and c-erbB-2 protein expression in breast carcinoma. *J Korean Surg Soc* 2002;62:282-7.
 18. 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.
 19. 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.
 20. Siah SP, Quinn DM, Bennett GD, Casey G, Flower RL, Suthers G, et al. Microsatellite instability markers in breast cancer: a review and study showing MSI was not detected at 'BAT 25' and 'BAT 26' microsatellite markers in early-onset breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2000;60:135-42.
 21. Molist R, Remvikos Y, Dutrillaux B, Muleris M. Characterization of a new cytogenetic subtype of ductal breast carcinomas. *Oncogene* 2004;23:5986-93.
 22. Murata H, Khattar NH, Kang Y, Gu L, Li GM. Genetic and epigenetic modification of mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1 in sporadic breast cancer with microsatellite instability. *Oncogene* 2002;21:5696-703.
 23. Pizzi C, Panico L, De Marchis L, Mastranzo P, Di Maio M, D'Amico C, et al. p53 expression is decreased in primary breast carcinomas with microsatellite instability. *Breast Cancer Res Treat* 2002;73:257-66.
 24. Mendez O, Manas S, Peinado, Fabra A, Escobedo A, Moreno A, et al. Microsatellite instability is associated with the loss of apoptosis in ductal breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 2001;65:171-7.
 25. Kim DJ, Park JY, Lee MH, Sohn YK. The role of microsatellite instability at chromosome 11p15.5 in the progression of breast ductal carcinoma. *J Korean Med Sci* 2004;19:698-703.
 26. 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.
 27. Regitnig P, Moser R, Thalhammer M, Luschin-Ebengreuth G, Ploner F, Papadi H, et al. Microsatellite analysis of breast carcinoma and corresponding local recurrences. *J Pathol* 2002;198:190-7.
 28. Iwase H, Iwata H, Toyama T, Hara Y, Omoto Y, Ando Y, et al. The clinical value of microsatellite instability and a loss in heterozygosity in sporadic breast cancers. *Breast Cancer* 1997;4:234-8.
 29. Park JH, Kim SJ, Choi UJ, Lee KM. Correlation of the Immunohistochemical Coexpression of p53 and HER-2/neu and the Prognosis of Breast Cancer. *J Breast Cancer* 2005;8:41-7.