

위장관 간질종양에서 *c-kit* 유전자 돌연변이 및 면역조직화학적 발현

강동욱 · 김주현 · 김동훈 · 김경희
박미자 · 강대영¹

울지대학교 의과대학 병리학교실
충남대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2003년 4월 8일
게재승인 : 2003년 7월 26일

책임저자 : 강 대 영
우 301-131 대전광역시 중구 문화 1동 6
충남대학교 의과대학 병리학교실
전화: 042-580-8232
Fax: 042-581-5233
E-mail: dykang@cun.ac.kr

*이 연구는 2002년도 범석학술장학재단 지원으로 이루어졌음.

c-kit Mutation and Immunohistochemical Expression in Gastrointestinal Stromal Tumors

Dong Wook Kang, Joo Heon Kim, Dong Hun Kim, Kung Hee Kim, Mee Ja Park and Dae Young Kang¹

Department of Pathology, Eulji University School of Medicine, Daejeon; ¹Department of Pathology, Chungnam National University College of Medicine, Daejeon, Korea

Background : Gastrointestinal stromal tumor (GIST) is the most common non-epithelial neoplasm arising in the gastrointestinal tract. The aim of this study is to investigate the correlation among the clinicopathologic features, presence of *c-kit* mutation, and immunohistochemical expression of *c-kit* in 61 cases of GISTs. **Methods :** We divided the GISTs into three groups as benign, boderline and malignant, according to histologic grade. Exon 11 of the *c-kit* was amplified by PCR and sequenced. We performed immunohistochemical study for CD117, CD34, vimentin, SMA, desmin, and S-100 protein. **Results :** Twenty-one cases were diagnosed as benign GISTs, 14 cases as borderline GISTs, and 26 cases as malignant GISTs. The shape, atypia, cellularity, and necrosis showed good correlations with the histologic grades of the GISTs. Mutations of exon 11 of the *c-kit* were detected in 3 benign GISTs, 4 borderline GISTs, and 13 (%) malignant GISTs. Sequence analysis confirmed the deletion mutation (n=16) and the single base pair mutation (n=4). The immunohistochemical stainings showed myogenic differentiation (n=20), neurogenic differentiation (n=15), and neither myogenic or neurogenic differentiation (n=34). **Conclusions :** The GIST is the primitive mesenchymal tumor capable of divergent differentiation, and the mutation of the *c-kit* is a good parameter for the malignant GIST.

Key Words : Gastrointestinal Stromal Tumor-Protooncogene Protein *c-kit*-Immunohistochemistry

위장관 간질종양(gastrointestinal stromal tumor, GIST)은 식도와 위장관에서 발생하는 중간엽 종양의 대부분을 차지하고, 평활근종, 평활근육종 및 신경집종 등과 구별되는 고유의 조직소견과 면역조직화학적 특징을 갖고 있다.¹⁻³ 그러나 GIST는 형태학적으로 평활근 종양을 포함한 다른 중간엽 종양과 유사한 조직학적 소견이 있어 이들 종양과의 감별 진단이 어렵고, 조직소견만으로 종양의 양성과 악성 판별이 어렵다.⁴⁻⁶ 또한 다양한 면역조직화학적 표현이 인지되어 종양세포의 기원은 끊임없는 논란의 대상이 되어 왔다.^{7,8}

최근 위장관 고유근층에서 관찰되는 Cajal 사이질세포(interstitial cell of Cajal, ICC)가 GIST 종양세포와 전자현미경적 소견이 유사하고, CD117 *c-kit* 단백질에 대한 면역조직화학 염색에 ICC와 GIST 모두 양성으로 발현되며, 위장관의 중간엽성 전구세포에서 ICC와 평활근육세포의 분화가 관찰되는 점⁹⁻¹² 등으로

보아 GIST 발생에 ICC가 연관이 있음이 알려졌다. 여러 문헌들¹⁴⁻¹⁹에서 *c-kit* 유전자 돌연변이, 특히 엑손 11의 결손, 침부 및 점 돌연변이와 같은 돌연변이가 GIST의 발생 및 악성도와 연관이 있다고 보고된 바 있다. 국내의 GIST에 대한 문헌²⁰⁻²³들은 전자현미경, 면역조직화학 염색 결과와 조직소견을 기준으로 악성과 예후 인자와의 연관성을 연구한 것과 CD117 발현이 GIST와 평활근종양의 감별에 유용하다는 보고는 있으나, *c-kit* 유전자 돌연변이에 대한 연구는 시행된 바 없다. 이에 저자들은 지난 10년 동안 위장관에서 발생한 GIST를 모아 CD117, CD34, α -smooth muscle actin (SMA), desmin 및 S-100 단백질 항원의 면역조직화학 염색 발현의 특징을 알아보고, 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)과 염기서열 분석에 의한 *c-kit* 유전자 돌연변이 유무 및 예후와의 관련성을 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다.

재료와 방법

재료

1992년 1월부터 2002년 12월까지 을지의과대학교 병원과 충남대학교 병원에서 적출술과 용종 절제술을 한 후, 조직검사가 시행된 비상피성 위장관 중간엽 종양 증례들 중 두 기관의 병리의사의 진단이 일치된 GIST를 대상으로 하였다. GIST의 진단은 Miettinen³ 등이 제시한 조직조건과, 각 기관에서 진단시 시행한 일부 면역조직화학 염색 결과를 참고하였다. GIST로 진단한 증례들은 모두 61예로 10% 중성 포르말린에 고정된 후 파라핀에 포매되어 블록으로 보관된 조직이었고, 슬라이드 검색 및 보관 상태가 양호하였다.

병리학적 검색

증례에 대한 병리보고서와 병력지를 검토하여 환자의 연령, 성, 종양의 발생 위치, 크기, 육안조건 및 전이 유무를 확인하고, 광학현미경(Olympus BX 50, Japan)으로 유사분열 수, 세포모양, 세포밀도 및 이형성 검색을 시행하였다. 조직학적 악성도는 Amin 등⁶이 제시한 유사분열 수와 종양의 크기에 따른 등급별 분류를 기준으로 하였다. 유사분열 수는 세포밀도가 높은 부위에서 연속하여 5회 이상 유사분열수를 세어 고배율 시야(대물렌즈 $\times 40$)로 50시야당 평균 값으로 하였다. 유사분열 수가 5개 미만이고 종괴의 크기가 5.0 cm 미만일 경우 양성 GIST, 유사분열 수가 5개 미만이고 종괴의 크기가 5.0 cm 이상일 경우 경계성 GIST, 종양의 크기와 관계없이 유사분열수가 5개 이상일 경우 악성 GIST로 분류하였다. 종양세포의 모양은 둥글거나 타원형의 세포가 종양의 25% 미만일 때 방추형, 25-50%를 차지할 때 혼합형, 50% 이상을 구성할 때 상피모양으로 하였다. 세포밀도는 정도에 따라 저도, 중등도, 고도로 구분하였고, 이형성은 세포밀도가 높은 부위를 관찰하여 없음, 저도, 중등도, 고도의 4등급으로 표기하였다.

Genomic DNA 추출과 PCR을 통한 *c-kit* 유전자 염기순서 분석

DNA 추출

파라핀 포매조직에서 종양의 표면적이 80% 이상을 차지하고 상태가 양호한 조직을 20 μm 두께로 절편한 다음 Eppendorf 튜브에 넣고 크실렌을 첨가한 후 65°C에서 1시간 부화시켰다. 각각 95%, 70% 에탄올을 이용하여 검체를 세척한 후 건조시킨 다음, 소화 완충액(100 mM Tris-HCl, pH 8.5, 1% SDS, 5 mM EDTA, proteinase K 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 200 μL 를 첨가하여 55°C에서 하룻밤 놓아두었다. DNA 분리를 위해 phenol/chloroform/isoamyl alcohol 혼합액(25:24:1) 1 mL를 첨가하여

30초간 혼탕 후 4°C, 12,000 rpm에서 15분간 원심분리한 다음 상층액을 각각 100% 에탄올과 3 M sodium acetate (pH 5.2)와 혼합하여 -70°C에서 보관하였다.

PCR

시발체는 Lasota 등¹⁹이 *c-kit* 유전자의 돌연변이 유무를 알아보기 위해 사용한 것으로 GenBank No. 1817732 (89,603 bp)에서 인트론이 포함된 엑손 11 (75,594-75,784, 191 bp)을 바이오니아(Bioneer, Korea)에 의뢰하여 합성하였다. 염기서열은 5'-CCG GAG TGC TCT AAT GAC TG-3와 5'-ACT CAG CCT GTT TCT GGG AAA CTC-3 이었다. PCR은 추출한 DNA 5 μL , 전위와 후위 시발체 각각 3 μL 를 premix (Taq DNA 중합효소, dNTP, Tris-HCl, KCl, MgCl₂, Bioneer, Korea)에 넣고 증류수를 첨가하여 50 μL 를 만든 다음 PCR thermal cycler (Gene cycler, Biorad, USA)에서 시행하였다. 95°C에서 5분간의 변성 과정을 거친 다음, PCR은 95°C에서 1분, 56°C에서 1분, 72°C에서 2분간 35회 반복 시행을 하고, 마지막으로 72°C에서 2분간 두었다.

염기순서 분석

증폭된 DNA 100 ng, 시발체 1.6 pM, sequencing mix 1 μL 와 sequencing buffer 2 μL 를 넣고 최종 부피가 10 μL 이 되도록 증류수를 첨가하였다. 그리고 95°C에서 10초간 부화한 후 50°C에서 5초간 annealing, 72°C에서 4분간 extension 과정을 25회 반복하고 건조시켰다. 건조된 시료에 주형억제시약(template suppression reagent, Perkin Elmer, USA) 20 μL 를 첨가한 후 자동 염기서열 분석기(ABI 310 automatic sequencer, PE biosystem, USA)를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

면역조직화학염색

면역조직화학 염색은 anti-rabbit CD117 (1:50, polyclonal, Dako, Japan), anti-mouse CD34 (1:25, QBEnd-10, Novocastra, USA), anti-mouse vimentin (1:50, V9, Novocastra, USA), anti-mouse SMA (1:50, $\alpha\text{sm-1}$, Novocastra, USA), anti-mouse desmin (1:50, DE-R-11, Novocastra, USA)과 anti-mouse S-100 단백질(1:200, polyclonal, Novocastra, USA) 항체를 사용하였다. 조직절편을 4 μm 두께로 세절한 후 probe-on plus slide (Fisher Scientific, USA)에 부착시켜 건조시켰다. 그리고 탈파라핀 후 합수시키고 0.01 M citrate buffer (pH 6.0)를 이용해 microwave oven에 15분간 전처리하였다. 조직내 과산화효소의 작용을 억제하기 위하여 3% H₂O₂에 10분간 처리한 후, 조직내의 항원과 비특이적 단백질결합을 억제하기 위해 정상 혈청으로 단백질을 차단시켰다. 그리고 일차 단일항체에 1시간 동안 부착시킨 다음 완충액으로 수세하였다. LSAB kit (ScyTek, USA)를 이용하여 biotin이 부착된 이차항체에 30분간 반응시킨

다음 streptoavidin-HRP를 결합시켰다. 발색은 3-amino-9-ethyl carbazole (ScyTek, USA)를 이용하여 10분간 반응시킨 후 Mayer's hematoxylin으로 1분간 대조염색을 시행하였다. CD117과 CD34는 종양세포의 세포막에, vimentin, SMA, desmin 및 S-100 단백질은 종양세포의 세포질에 발현되고 전체 종양 세포의 5% 이상일 때 면역조직화학 염색 양성으로 판단하였다.

통계학적 분석

GIST의 조직학적 등급별 악성도와 *c-kit* 유전자의 돌연변이 유무 및 면역조직화학 염색 발현의 연관성을 살펴보기 위하여, SPSS version 10.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) 통계 프로그램을 이용한 일원분산 분석, Pearson의 Chi-square (χ^2) 검정과 Fisher의 정확검정을 실시하였다. 통계학적 유의성은 p 값이 0.05 이하인 것으로 하였다.

결 과

임상 및 병리학적 소견

GIST의 평균 연령은 55.1세였고 연령 분포는 21세에서 77세였다. 남녀 각각 35명과 26명으로 남자가 1.4배 많았다. 발생 부위는 위 35명(57.4%), 작은창자 16명(26.2%), 큰창자 3명(4.9%), 창자사이막 3명(4.9%), 식도 2명(3.3%), 배막 2명(3.3%)였다. 수술 소견과 추적검사 결과, 간 전이 8명, 배막 전이 5명 및 재발 1명이 있었다. 평균 전이 기간은 16.3개월이었다. 조직학적 악성도에 따른 GIST의 분류 및 임상병리학적 소견과의 상관관계는 Table 1과 같다. GIST의 조직학적 악성도와 이형성, 세포밀도, 괴사 및 타장기로의 전이 사이에는 통계학적 유의성이 있었으나($p < 0.05$), 종양세포의 모양과는 통계학적 유의성이 없었다($p = 0.105$). 악성도에 따른 GIST의 임상 및 병리학적 소견은 다음과 같다.

양성 GIST

양성 GIST는 21명이었다. 연령 분포는 21세에서 75세(평균 54.8세)였고 남녀 각각 13명과 8명이었다. 발생부위는 위 14명(66.7%), 작은창자 5명(23.8%), 창자사이막 2명(9.5%)였다. 육안소견에서 종괴의 평균 장경은 2.7 cm였고, 절단면상 경계가 뚜렷하고 회백색을 띠며 충실하고 단단하였다(Fig. 1A). 종양을 구성하는 세포는 핵의 이형성이 없거나 대부분 중등도 이하였다. 세포모양은 방추형 12명, 혼합형 5명, 상피모양 4명였고, 주로 짧은 다발, 소용돌이 모양 또는 판상구조를 보였다. 그리고 호산성의 길다란 세포질과 타원형의 핵, 세포질에 공포가 관찰되었다(Fig. 1B). 유사분열 수는 50개의 고배율 시야당 평균 1.9개였다.

경계성 GIST

경계성 GIST는 14명이었다. 연령 분포는 32세에서 70세(평균

54.5세)였고 남녀 각각 8명과 6명이었다. 수술당시 간 전이 1명, 배막 전이 1명이 있었고, 추적검사 중 재발 1명과 배막 전이 1명이 있었다. 발생 부위는 위 8명(57.1%), 작은창자 3명(21.4%), 배막 2명(14.3%), 큰창자 1명(7.1%)였다. 위에서 발생한 종괴는 대부분 체부에 존재하며 용종성 또는 내강으로 돌출하는 종괴였다. 종괴의 장경은 평균 8.6 cm였고, 10명(71.4%)에서 중앙부에 출혈 또는 괴사가 존재하였다. 종괴의 절단면은 경계가 뚜렷하고 분엽상 모습을 보이며 회백색의 생선살 또는 충실성이 대부분이었다(Fig. 1C). 종양세포 모양은 혼합형 6명, 이형성은 중등도가 4명으로 가장 많았다. 종양세포들은 짧은 다발, 소용돌이 모양, 판상구조 등의 배열을 보였다. 유사분열 수는 50개의 고배율 시야당 평균 2.4개였다(Fig. 1D).

악성 GIST

악성 GIST는 총 26명이었다. 연령 분포는 25세에서 77세(평균 55.8세)였고 남녀 각각 14명과 12명이었다. 수술 당시 간 전이 2명, 배막 전이 1명이 있었고, 추적검사 중 간 전이 5명과 배막 전이 2명이 있었다. 종양의 발생 부위로는 위가 13명(50.0%), 작은창자 8명(30.8%), 큰창자 2명(7.7%), 식도 2명(7.7%), 창자사이

Table 1. Correlation between tumor groups and clinicopathologic findings of GISTs

	Benign (n=21)	Borderline (n=14)	Malignant (n=26)	Total (%)
Age (years)	54.8	54.5	55.8	55.1
Sex (male:female)	13:8	8:6	14:12	35:26
Tumor site				
esophagus	0	0	2	2 (3.8)
stomach	14	8	13	35 (57.4)
small intestine	5	3	8	16 (26.2)
large intestine	0	1	2	3 (4.9)
other	2	2	1	5 (8.2)
Size \pm SD (cm)	2.7 \pm 1.9	8.6 \pm 3.9	8.8 \pm 5.1	6.7 \pm 4.8
Mitosis \pm SD	1.9 \pm 1.4	2.4 \pm 1.3	9.1 \pm 3.4	5.1 \pm 4.2
Cell shape ($p = 0.15^a$)				
spindle	12	5	6	23 (37.3)
mixed	5	7	16	28 (45.9)
epithelioid	4	2	4	10 (16.4)
Cellular atypia ($p < 0.001^a$)				
none	7	4	1	12 (19.7)
mild	7	3	1	11 (18.0)
moderate	7	7	19	33 (54.1)
severe	0	0	5	5 (8.2)
Cellularity ($p = 0.017^a$)				
sparse	4	1	0	5 (8.2)
moderate	11	9	9	29 (47.5)
dense	6	4	17	27 (44.3)
Necrosis/Hemorrhage ($p < 0.001^b$)	7	10	23	40 (65.6)
Metastasis/Recurrence ($p = 0.002^a$)	0	4	10	14 (23.0)

Size: maximum diameter; Mitosis: numbers/50 high power fields.

^a: Fisher's exact test; ^b: χ^2 test.

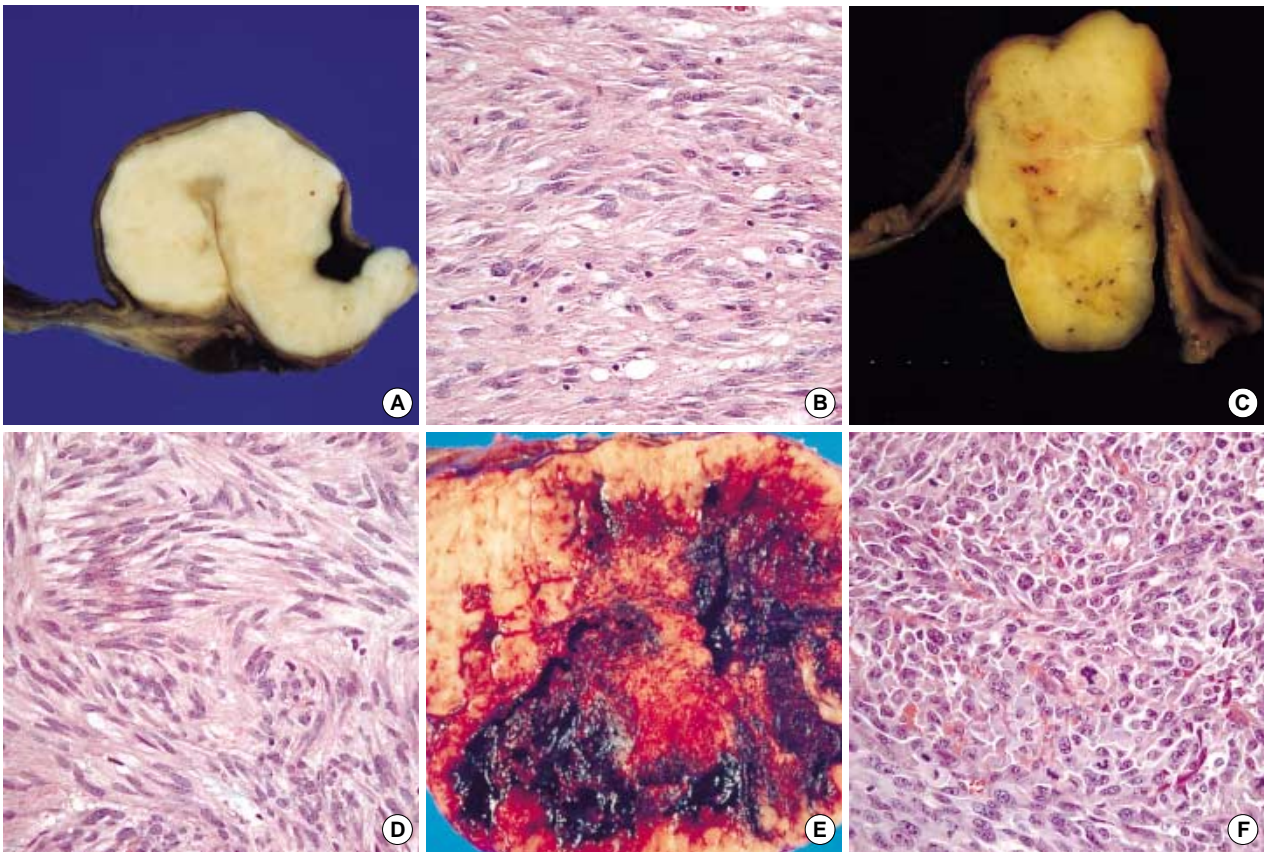


Fig. 1. (A) A benign GIST of the stomach; the cut surface is grayish white, hard and homogeneous. (B) Microscopic features of the benign GIST showing a fascicular arrangement of uniform spindle cells. (C) A borderline GIST of the stomach demonstrates both exophytic and endophytic growing patterns. (D) Microscopic features of the borderline GIST show intersecting fascicles of spindle cells with moderate cellularity and atypia. (E) A malignant GIST of the small intestine demonstrates a bulky, exophytic growing pattern. The cut surface shows diffuse hemorrhage and necrosis. (F) Microscopic features of malignant GIST show high cellularity, atypism and increased mitotic activity. In this case the tumor cells reveal epithelioid features.

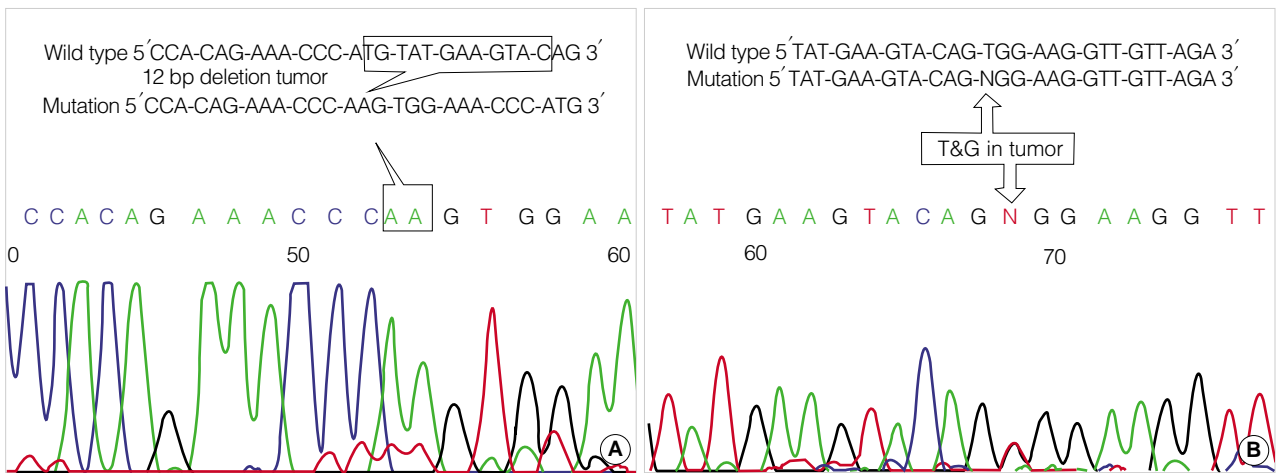


Fig. 2. Sequence analysis of exon 11 of *c-kit* reveals 12 base pair deletion (A) and single base pair mutation (B).

막 1예(3.8%)였다. 종괴는 주로 점막하층, 또는 내강으로 돌출하고 있었으며 중앙부는 껍양을 형성하고 있었다. 절단면에서 대부분 뚜렷한 경계가 관찰되었지만, 피막은 없었고 점막층 또는 창

자사이막으로 침윤성 성장이 관찰되었다. 종괴는 회백색의 생선살 같은 충실성 단면을 보였으며 대부분 광범위한 괴사 및 출혈을 동반하였다(Fig. 1E). 중앙세포의 배열과 모양은 경계성 GIST

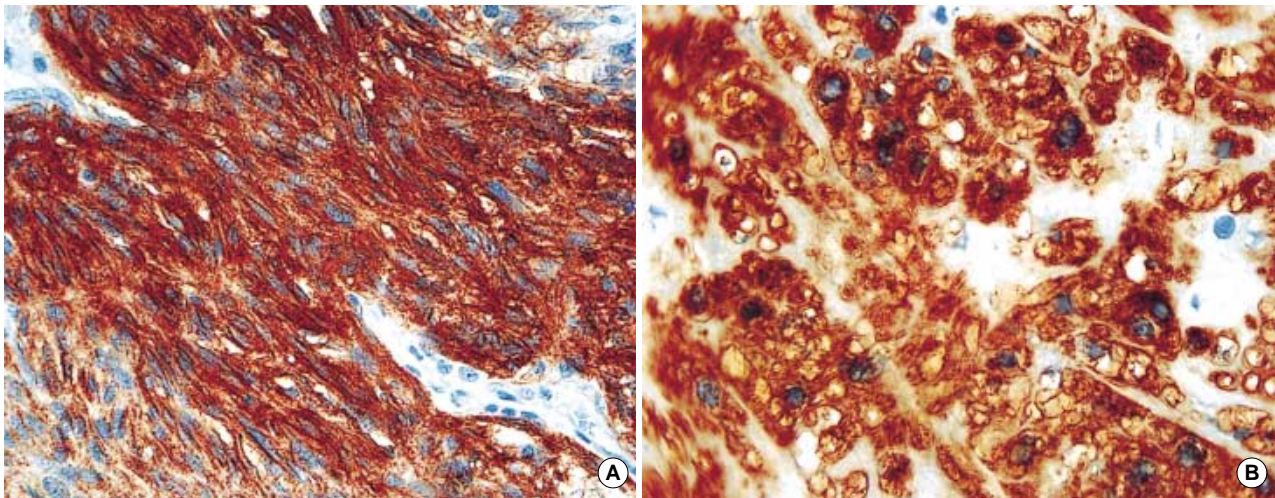


Fig. 3. (A) Immunohistochemical stain for CD117 showing strong positive reaction in the cell membrane and cytoplasm of the tumor cells. (B) Immunohistochemical stain for CD34 showing strong positive reaction in the cell membrane and cytoplasm of the tumor cells.

Table 2. Correlation between exon 11 mutation of *c-kit* and clinicopathologic findings of GISTs

	Exon 11 mutation of <i>c-kit</i>		p value
	present (n=20) (%)	not present (n=41) (%)	
Mitosis \pm SD	7.2 \pm 4.4	4.1 \pm 3.8	0.062 ^a
Size \pm SD (cm)	8.3 \pm 5.3	5.9 \pm 4.3	0.005 ^a
Histologic grade			0.030 ^b
benign	3 (15.0)	18 (43.9)	
borderline	4 (20.0)	10 (24.4)	
malignant	13 (65.0)	13 (31.7)	
Cell shape			0.362 ^b
spindle	8 (40.0)	15 (36.6)	
mixed	7 (35.0)	21 (51.2)	
epithelioid	5 (25.0)	5 (12.2)	
Cellular atypia			0.146 ^c
none	4 (20.0)	8 (19.5)	
mild	3 (15.0)	8 (19.5)	
moderate	9 (45.0)	24 (58.5)	
severe	4 (20.0)	1 (2.4)	
Cellularity			0.125 ^c
sparse	0 (0.0)	5 (12.2)	
moderate	8 (40.0)	21 (51.2)	
dense	12 (60.0)	15 (36.6)	
Necrosis/Hemorrhage	17 (85.0)	23 (56.1)	0.043 ^b
Metastasis/Recurrence	6 (30.0)	8 (19.5)	0.517 ^c

^a: One-way ANOVA; ^b: χ^2 test; ^c: Fisher's exact test.

와 유사하였으나, 대부분 중등도 이상의 세포밀도와 이형성이 관찰되었다(Fig. 1F). 유사분열수는 50개의 고배율 시야당 평균 9.1 개였다.

c-kit 유전자 엑손 11의 돌연변이

자동 염기순서 분석기를 이용하여 *c-kit* 유전자 엑손 11 염기

순서 분석을 한 결과 돌연변이는 20예(32.8%)가 있었으며 이들은, 양성 GIST 3예(15.0%), 경계성 GIST 4예(20.0%), 악성 GIST 13예(65.0%)였다. *c-kit* 유전자 돌연변이도 6-45개 염기의 결손 돌연변이가 16예(80.0%)가 있었으며, 나머지 4예(20.0%)는 단일 염기 돌연변이였다(Fig. 2). 본 연구에서 격자 이동 돌연변이, 첨가 및 중복 돌연변이는 관찰되지 않았다. 돌연변이는 아미노산 codon 550-580 사이에서 관찰되었다. *c-kit* 유전자의 돌연변이와 종괴의 크기, 악성도, 출혈 또는 괴사 유무는 통계학적 유의성이 있었으나($p < 0.05$) 유사분열 수, 세포모양, 이형성, 세포밀도 및 전이와는 통계학적 유의성이 없었다($p > 0.05$). *c-kit* 유전자 엑손 11 돌연변이와 임상 및 병리학적 소견과의 상관관계는 Table 2와 같다.

면역조직화학 염색 소견

CD117에 대한 면역조직화학 염색에서 54예(88.5%)가 양성 반응을 보였으며, 양성 GIST 16예(76.2%), 경계성 GIST 13예(92.9%), 악성 GIST 25예(96.2%)였다. CD117의 발현과 종괴의 출혈 또는 괴사와는 통계학적 유의성이 있었으나($p = 0.042$), 악성도, 세포모양, 이형성, 세포밀도 전이 및 *c-kit* 유전자 돌연변이 유무와는 통계학적 유의성이 없었다. CD34는 56예(91.8%)에서 양성 반응을 보였으며, 양성 GIST 19예(92.9%), 경계성 GIST 13예(100.0%), 악성 GIST 24예(92.3%)였다. CD117과 CD34는 중앙세포의 세포막 또는 세포막과 세포질을 따라 진한 갈색으로 발현되었고, 중앙 전체에 미만성으로 발현되었다(Fig. 3). CD34와 CD117이 동시에 발현되는 예는 50예(82.0%), CD34와 CD117 모두 음성 반응을 보이는 예는 1예였다. GIST의 면역조직화학 염색 결과는 Table 3에 요약하였다. CD34는 악성도, 세포모양, 이형성, 세포밀도, 괴사, 전이 및 *c-kit* 유전자 돌연

Table 3. Summary of immunohistochemical stains in 61 GISTs

	CD117+/CD34+ (n=50)	CD117+/CD34- (n=4)	CD117-/CD34+ (n=6)	CD117-/CD34- (n=1)	Total (n=61; %)
SMA+	13	2	4	0	19 (31.1)
Desmin+	3	1	3	0	7 (11.5)
S-100 protein+	12	1	2	0	15 (24.6)
<i>c-kit</i> mutation	18	0	2	0	20 (3.8)

+, positive reaction; -, negative reaction; SMA, α -smooth muscle actin.
c-kit mutation: mutation of exon 11 of *c-kit*.

Table 4. Correlation between CD117 and CD34 expression with clinicopathologic findings of GISTs

	CD117			CD34		
	positive (n=54)	negative (n=7)	p value	positive (n=56)	negative (n=5)	p value
Grade			0.135			1.000
benign	16	5		19	2	
borderline	13	1		13	1	
malignant	25	1		24	2	
Cell shape			0.129			0.461
spindle	18	5		20	3	
mixed	27	1		27	1	
epithelioid	9	1		9	1	
Cellular atypia			0.054			0.424
none	9	3		12	0	
mild	9	2		10	1	
moderate	32	1		30	3	
severe	4	1		4	1	
Cellularity			0.187			1.000
sparse	3	2		5	0	
moderate	26	3		26	3	
dense	25	2		25	2	
Necrosis/Hemorrhage	38	2	0.042	36	4	0.651
Metastasis/Recurrence	14	0	0.187	12	2	0.322
<i>c-kit</i> mutation	18	2	0.409	20	0	1.000

p value: Fisher's exact test. *c-kit* mutation: mutation of exon 11 of *c-kit*.

변이 유무 등과 통계학적 유의성이 없었다. Vimentin은 모두 양성 반응을 보였으며 등급별, 종양세포 모양별, 위치별 염색 정도의 차이는 없었다. SMA은 19예(31.1%)의 GIST에서 강양성 혹은 국소적 양성 반응을 보였고, 대장의 경우 6예 모두 양성이었다. Desmin은 7예(11.5%)에서 양성 반응을 보였고, SMA 양성인 예에서 desmin에 음성인 예는 14예(18.9%), SMA 음성인 예에서 desmin에 양성인 예는 1예였다. 15예(24.6%)에서 S-100 단백질에 양성 있었고, 소장에서 발생한 GIST는 16예 중 8예가 S-100 단백질에 양성이었다. CD117과 CD34에 양성인 예에서 *c-kit* 유전자 돌연변이는 각각 18예(33.3%)와 20예(35.7%)였다. CD117과 CD34의 면역화학조직 염색과 임상 및 병리학적 소견의 상관관계는 Table 4에 요약하였다.

고찰

위장관의 원발성 비상피성 중간엽 종양은 평활근 종양, 신경

성 분화를 보이는 종양, 그리고 GIST로 구분된다.^{1,2} 그러나 조직학적 소견과 생물학적 특징이 중복되는 점이 많아 이들 종양을 명확히 구분하기 어렵다. 현재 GIST는 위장관에서 순수한 평활근 또는 신경성 분화를 보이지 않는 비상피성 중간엽 종양으로 정의되고 있다.¹⁻⁴ 과거에 소화기계에서 발생한 간엽종양 대부분이 장관벽내에 위치하면서 방추모양을 띠고 장관벽내의 평활근세포에서 유래된 종양으로 인식되어, GIST는 평활근종, 평활근모종, 평활근육종 등으로 기술되었다.⁵ 그러나 GIST는 면역조직화학 염색 및 전자현미경적 연구를 통하여 종양세포의 기원이 다양하며 복잡한 분화를 보인다는 사실이 밝혀졌다.⁷⁻⁹ Rosai⁵는 GIST를 다섯 가지의 군으로 분류하였다. 제1군은 면역조직화학 염색과 형태학적으로 평활근 분화를 보이는 군, 제2군은 상피모양 모습을 보이는 군, 제3군은 전자현미경 소견상 신경 분화를 보이는 군, 제4군은 평활근과 신경성 분화가 동시에 표현되는 군, 제5군은 면역조직화학염색과 전자현미경 검사를 통하여 어떠한 분화도 확인할 수 없는 군으로 분류하였다. 조직학적으로 GIST는 평활근종보다 세포밀도와 상피모양 세포들의 비율이 높고, 고형상, 소

용돌이모양, 책상배열, 미만성 등 다양한 양상을 보이며 세포질의 호산성이 낮다.³ 본 연구에서 종양세포는 대부분 중등도 이상의 세포밀도와 이형성이 관찰되었고, 방추형과 상피모양의 세포들이 다양한 구조를 보여 평활근종과의 구분이 비교적 가능하였다.

GIST의 악성도는 조직학적 소견만으로 판별하기 어렵다. 여러 저자에 의하여 악성의 조직학적 기준이 제시되었는데, 일반적인 중간엽 세포에서 기원한 암종의 분류와 같이 종양의 유사분열 수, 세포밀도, 이형성, 괴사 및 출혈 유무 등으로 악성도를 나누었다.^{5,6} 본 연구에서 Amin 등⁶이 기술한 유사분열 수와 종양의 크기에 따라 GIST를 분류한 결과, 조직학적 악성도와 전이 유무와는 통계학적 유의성이 있었으나 경계성 GIST에서 전이와 재발이 관찰되었다. 따라서 조직학적 소견만으로 악성도를 판단하기에는 어렵고 임상 및 다양한 예후 인자들의 종합적인 판단으로 악성도를 결정해야 할 것으로 생각되었다. 객관적인 예후 판정의 지표 및 세포 증식능을 이용하여 종양의 악성도를 알아보기 위해 유세포추정기를 이용한 DNA 함량분석,²⁴ PCNA 발현과 은호기성을 이용한 Ag-NORs 수 측정²⁵ 등이 시도되었다. 그러나 이러한 방법들은 측정과정에서 개인의 주관적 요소로 인해 관찰자간에 오차가 발생할 수 있고, 자동화된 방법을 이용하더라도 한 종양에서도 부위에 따라 결과의 차이가 날 수 있으며, 조직의 고정 상태, 반응 시간 등에 따라 그 결과가 크게 좌우되는 단점이 있다.

CD117과 CD34에 대한 면역조직화학 염색은 GIST의 발생 기원 연구에 중요한 단서를 제공하고 있고, 특히 CD117은 GIST의 진단에 가장 중요한 표지자로 알려져 있다.^{10,11} CD117은 염색체 4번의 장완에 존재하는 *c-kit* 유전자의 부산물인 타이로신 카이네이즈 수용체로, 골수섬유증, 만성골수성백혈병, 생식세포종, 비만세포종의 표지자이다.^{13,14} CD34는 조혈 줄기세포로 알려진 항원으로서 혈관내피세포, 섬유아세포에서 정상적으로도 발현되며 고립섬유종, 용기성 피부섬유종, 혈관주위세포종, 방추세포지방종, 상피모양육종, 근섬유아종양 등과 같은 원시 간엽세포에서 기원된 종양세포의 유용한 표지자이다.^{26,27} 본 연구에서 CD117과 CD34에 대한 면역조직화학염색 결과 각각 54예(88.5%)와 56예(91.8%)에서 양성반응을 보여 국내에서 김 등²³의 CD117 발현율 82.1%와 성 등²²의 CD34 발현율 91.3%와 비슷한 발현율을 보였다. Michael 등²⁷은 GIST에서 CD34 발현이 악성보다는 양성 GIST에서 발현이 더 높았다고 보고하였으나, 저자들의 CD117 및 CD34 발현은 등급별 악성도, 세포모양, 이형성, 세포밀도, 전이 유무 및 *c-kit* 유전자 돌연변이 등과 통계학적 유의성은 없었다. SMA 또는 desmin이 발현되어 평활근세포 분화를 보이는 GIST는 20예(32.8%)였고, S-100 단백에 양성인 신경세포 분화를 보이는 GIST는 15예(24.6%)였다. S-100 단백질과 SMA 또는 desmin에 양성인 8예는 종양세포가 미성숙 간엽 세포에서 평활근세포와 신경세포로 동시에 분화되는 GIST로 판단하였다. S-100 단백질과 SMA 또는 desmin에 대해 음성인 34예(55.7%)는 미분화 GIST로 판단하였다. CD117 음성인 GIST는 7예(11.5%)로 위에 6예, 큰창자에 1예가 있었지만 타 장기는 없었

다. 이들 종괴는 주로 양성 GIST(5예)와 방추형(5예)이 많았고, 이형성은 1예를 제외하고는 없거나 중등도 미만으로 낮았다. CD117 음성인 GIST는 CD117 양성인 GIST보다 desmin, SMA, S-100 단백질 발현 비율이 높았고, CD34 음성인 GIST보다 평활근세포 또는 신경세포로 분화함을 알 수 있었으나, 증례 수가 적어 좀더 많은 예의 CD117 음성 GIST에 대한 조직학적, 면역조직화학염색 및 분자생물학적 관찰이 필요할 것으로 생각된다.

1990년 후반부터 GIST의 발생 기전을 유전자 수준에서 규명하려는 연구가 진행되어 왔다. 여러 문헌들¹⁵⁻¹⁹은 위장관의 중간엽성 전구세포에서 ICC와 평활근세포의 분화가 관찰됨에 따라 ICC와 GIST의 종양세포가 생성기원이 같고, *c-kit* 유전자의 gain-of-function mutation이 GIST의 발생을 유발한다고 보고하고 있다. *c-kit* 유전자는 타이로신 카이네이즈 수용체를 만드는 유전자이며 HZ4 feline sarcoma virus의 v-kit 종양유전자와 상동물이다.¹³ 타이로신 카이네이즈 수용체 구조는 리간드와 결합하는 세포외 영역(extracellular domain), 막 영역(transmembrane domain), 근처막 영역(juxtamembrane domain)과 카이네이즈 영역(kinase domain)으로 구성되어 있다.^{13,14} 타이로신 카이네이즈 수용체는 혈소판 유래 성장인자(platelet derived growth factor)와 줄기세포 인자(stem cell factor) 수용체군과 구조적으로 유사하여 이들의 아형으로 알려져 있다. 타이로신 카이네이즈와 리간드인 줄기세포 인자의 결합은 ICC의 발생과 성장, 분화 및 이주에 중요한 역할을 한다.^{13,14,28} ICC는 소화기관의 소화신경전달의 매개체 또는 신경조율의 역할을 하는 세포로, ICC 전구세포가 수용체와 리간드 결합해 위장관 근육층으로 이주하여 ICC로 분화하고 그렇지 못한 경우 바깥쪽 고유근층의 평활근육으로 분화된 다.²⁸ Taniguchi 등¹⁶은 *c-kit* 유전자의 엑손 11에서 결손, 첨가, 중복 및 점 돌연변이 등 다양한 형태의 유전자 변이가 나타났고, 이것이 예후 결정에 중요한 인자로 작용한다고 보고하였다. Lasota 등¹⁹은 평활근종과 평활근육종의 염기서열 분석 결과 *c-kit* 유전자의 돌연변이는 관찰되지 않아, GIST와 이들 종양의 감별 진단에 중요하다고 하였다. 본 연구에서 GIST의 염기서열 분석 결과 엑손 11의 돌연변이는 20예(32.8%)에서 발견되었고, 양성 GIST 3예(15.0%)와 비교하여 경계성 GIST (4예, 20.0%) 또는 악성 GIST (13예, 65.0%)에서 많은 돌연변이가 관찰되었다. 또한 전이 및 재발을 보인 GIST 중 6예(42.8%)가 *c-kit* 유전자의 돌연변이가 관찰되어 유사분열 수, 세포밀도, 핵의 이형성, 괴사 및 출혈 유무 등과 더불어 중요한 예후 인자임을 알 수 있었다. 저자들에 따라 엑손 11의 돌연변이를 경계성과 악성 GIST에 국한하여 유전자 돌연변이의 발생율을 30-60%로 보고하였다.^{16,17} 본 연구에서도 경계성과 악성 GIST에 국한하면 42.5%(17예)에서 *c-kit* 유전자의 돌연변이가 관찰되어 비슷한 결과를 얻었다. 현재까지 밝혀진 GIST의 유전자 돌연변이는 주로 엑손 11에서 발견되었고, 드물게 엑손 9와 엑손 13에서 일어났다.¹⁷ 비교 유전자 잡종검사에서 염색체 14번과 22번의 DNA 복제수의 변이가 관찰된 점²⁹ 등으로 보아 GIST 발생기전이 매우 다양함을 알

수 있었다.

저자들은 문헌 고찰과 연구 결과를 통하여 GIST가 다른 중간엽종양과 발생기원이 다르고, 미성숙 중간엽 세포에서 유래되어 평활근육 및 신경분화가 있음을 관찰할 수 있었으며, 엑손 11의 돌연변이는 유사분열 수, 크기, 세포밀도, 출혈 및 괴사 등과 더불어 예후와 관련된 중요한 지표임을 알 수 있었다. 향후 *c-kit* 유전자의 모든 엑손에 대한 염기서열 분석과 돌연변이의 유무, 다른 원종양 유전자의 돌연변이의 발견 및 발생학적 계통 연구가 기대된다.

참고문헌

- Hamilton SR, Aaltonen LA. Pathology and genetics of tumours of the digestive system. World health organization classification of tumours. Lyon: IARC, 2000; 62-5.
- Lewin KJ, Appelman HD. Tumors of the esophagus and stomach. Atlas of tumor pathology. Washington DC: AFIP, 1996; 401-56.
- Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: recent advances in understanding of their biology. Hum Pathol 1999; 30: 1213-20.
- Trupiano JK, Stewart RE, Misick C, Appelman HD, Goldblum JR. Gastric stromal tumors: a clinicopathologic study of 77 cases with correlation of features with nonaggressive and aggressive clinical behaviors. Am J Surg Pathol 2002; 26: 705-14.
- Rosai J. Ackerman's surgical pathology. 8th ed. St. Louis: Mosby, 1996; 645-7.
- Amin MB, Ma CK, Linden MD, Kubus JJ, Zarbo RJ. Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen index in gastric stromal tumors. Correlation with mitotic count and clinical outcome. Am J Clin Pathol 1993; 100: 428-32.
- Mazur MT, Clark HB. Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis. Am J Surg Pathol 1983; 7: 507-19.
- Evans HL. Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract: a study of 56 cases followed for a minimum of 10 years. Cancer 1985; 56: 2242-50.
- Saul SH, Rast ML, Brooks JJ. The immunohistochemistry of gastrointestinal stromal tumors. Am J Surg Pathol 1987; 11: 464-73.
- Seidal T, Edvardsson H. Expression of *c-kit* (CD117) and Ki-67 provides information about the possible cell of origin and clinical course of gastrointestinal stromal tumors. Histopathology 1999; 34: 416-24.
- Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Barusevicius A, Miettinen M. CD117, a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. Mod Pathol 1998; 11: 728-34.
- Robinson TL, Kanishka S, Bryan R, et al. Gastrointestinal stromal tumors may originate from a subset of CD34-positive interstitial cells of Cajal. Am J Pathol 2000; 156: 1157-63.
- Ma Y, Longley BJ, Wang X, Blount JL, Langley K, Caughey GH. Clustering of activating mutations in *c-kit*'s juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. J Invest Dermatol 1999; 112: 165-70.
- Tian Q, Frierson HF Jr, Krystal GW, Moskaluk CA. Activating *c-kit* gene mutations in human germ cell tumors. Am J Pathol 1999; 154: 1643-7.
- Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, et al. Gain-of-function mutations of *c-kit* in human gastrointestinal stromal tumors. Science 1998; 279: 577-80.
- Taniguchi M, Nishida T, Hirota S, et al. Effect of *c-kit* mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. Cancer Res 1999; 59: 4297-300.
- Wardelmann E, Neidt I, Bierhoff E, et al. *c-kit* Mutations in gastrointestinal stromal tumors occur preferentially in the spindle rather than in the epithelioid cell variant. Mod Pathol 2002; 15: 125-36.
- Lux ML, Rubin BP, Biase TL, et al. KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. Am J Pathol 2000; 156: 791-5.
- Lasota J, Jasinski M, Sarlomo-Rikala M, Miettinen M. Mutations in exon 11 of *c-kit* occur preferentially in malignant versus benign gastrointestinal stromal tumors and do not occur in leiomyomas or leiomyosarcomas. Am J Pathol 1999; 154: 53-60.
- Ko HM, Kim KS, Lee JH, Juhng WS, Juhng SW. Immunohistochemical and ultrastructural studies of gastric smooth muscle tumor. Korean J Pathol 1996; 30: 245-54.
- Cho MY, Hong SW, Jung SH, Kim H, Park C. Flow cytometric DNA analysis of gastrointestinal stromal tumors. Korean J Pathol 1997; 31: 608-16.
- Sung SH, Cho MS, Han WS. CD34 antigen expression in gastrointestinal stromal tumors. Korean J Pathol 1997; 31: 1166-71.
- Kim JK, Kwon OJ, Kim BH. Immunohistochemical expression of CD117, CD34, vimentin and α -smooth muscle actin in gastrointestinal stromal tumors. Korean J Pathol 2001; 35: 506-12.
- Cooper PN, Quirke P, Hardy GJ, Dixon MF. A flow cytometric, clinical and histological study of stromal neoplasm of the gastrointestinal tract. Am J Surg Pathol 1992; 16: 163-70.
- Yu CC, Fletcher CD, Newman PL, Goodlad JR, Burton JC, Levison DA. A comparison of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining, nucleolar organizer region (AgNOR) staining, and histological grading in gastrointestinal stromal tumours. J Pathol 1992; 166: 147-52.
- Natkunam Y, Rouse RV, Zhu S, Fisher C, van De Rijn M. Immunoblot analysis of CD34 expression in histologically diverse neoplasms. Am J Pathol 2000; 156: 21-7.
- Michael AI, Bacchi CE, Zarbo RJ, Ma CK, Gown AM. CD34 expres-

- sion in stromal tumors of the gastrointestinal tract. *Appl Immunohistochem* 1994; 2: 89-93.
28. Torihashi S, Ward SM, Sanders KM. Development of *c-kit* positive cells and the onset of electrical rhythmicity in murine small intestine. *Gastroenterology* 1997; 112: 144-55.
29. Breiner JA, Meis-Kindblom J, Kindblom L, *et al.* Loss of 14q and 22q in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 120: 111-6.