

산발성 위암에서 Microsatellite Instability 빈도와 *hMLH1* 촉진자부위 메틸화

울산대학교 의과대학 서울아산병원 외과학교실

김희철 · 노선애 · 육정환 · 오성태 · 김병식 · 유창식 · 김진천

Microsatellite Instability and Promoter Methylation of *hMLH1* in Sporadic Gastric Carcinoma

Hee Cheol Kim, M.D., Sun Ae Roh, M.S., Jeong Hwan Yook, M.D., Sung Tae Oh, M.D., Byung Sik Kim, M.D., Chang Sik Yu, M.D. and Jin Cheon Kim, M.D.

Department of Surgery, University of Ulsan College of Medicine and Asan Medical Center, Seoul, Korea

Background: An aberrant function of the mismatch repair system has been reported to underlie carcinogenesis in several tumors, including colorectal and gastric carcinomas, and to induce the typical genotype of microsatellite instability (MSI).

Purpose: We aimed to determine the frequency of MSI in early-onset sporadic gastric carcinoma and elucidate the role of promoter methylation in *hMLH1* as the mechanism of MSI.

Materials and Methods: Thirty-six early-onset sporadic gastric carcinomas were analyzed to determine the status of MSI and the frequency of methylation of the promoter region in *hMLH1*. MSI was determined using five markers recommended by NCI: MSI-H (high), MSI-L (low), and MSS (Microsatellite stable). Methylation specific PCR (MSP) and direct automated genomic sequencing analysis with DNA modified by sodium bisulfite have been performed to confirm promoter region methylation. All the data were analyzed regarding characteristics of molecular changes, and clinicopathologic variables.

Results: The microsatellite status was determined as MSI-H in five cases (13.8%), MSI-L in 13 cases (36.1%), and MSS in 18 cases (50.0%). *hMLH1* was methylated in seven cases (19.4%). In all cases of MSI-H, promoter of *hMLH1* was methylated, and in two of the 13 cases of MSI-L, *hMLH1*

promoter methylation was identified. Methylation was not found in any cases of MSS. Promoter methylation in *hMLH1* was significantly correlated with MSI status ($P < 0.001$). We could not find any relationship between MSI and clinicopathologic parameters.

Conclusion: These results suggest that an abnormal function of the mismatch repair system may be associated with gastric carcinogenesis in more than 10% of early-onset gastric carcinomas and MSI appeared to be closely related to the promoter methylation in *hMLH1*. (J Korean Gastric Cancer Assoc 2003;3:50-55)

Key Words: Gastric carcinoma, *hMLH1*, Microsatellite instability, Promoter methylation

중심 단어: 위선암, *hMLH1*, Microsatellite instability, 촉진자 메틸화

서론

위암은 가장 빈번하게 발생하는 암종의 하나로 우리나라의 경우 발생률 제1위의 암이다.(1) 위암의 발암기전은 다단계 암종과 마찬가지로 다단계의 과정으로 이루어지며, 발암에 관여하는 유전자의 기능이상을 초래하는 genetic 혹은 epigenetic 변화가 축적되어 암이 발생하게 된다.(2)

Microsatellite instability (MSI)는 과오수정유전자군의 기능 이상으로 발현되며, 산발성 대장암의 경우 약 15%에서 MSI가 나타나고 이의 기전으로는 주로 *hMLH1* 유전자의 촉진자부위 메틸화가 관여하는 것으로 알려져 있다.(3-5) 위암의 경우 지역적 편차가 있지만 약 7~50%에서 MSI가 나타나는 것으로 보고되고 있으며,(6) 이 경우 특이한 임상, 병리적 양상을 나타내는 것으로 알려져 있다.(7,8)

위암의 경우 연령에 따른 병리적 양상의 차이가 있고, 유전학적 변화도 차이가 있는 것으로 보고되고 있다. 또한 노년층에 발생한 위암의 경우 식이 및 염증성 질환에 대한 영향이 비교적 크다. 본 연구에서는 비교적 동일한 환경적 요인과 유전적 요인을 가진 군에서의 MSI 및 epigenetic 변화를 분석하기 위한 목적으로, 비교적 젊은 호발연령인 50세 이하에서 발

책임저자: 김희철, 서울특별시 송파구 풍납동 388-1
울산대학교 의과대학 외과학교실, 138-736
Tel: 02-3010-3937, Fax: 02-474-9027
E-mail: hckim@amc.seoul.kr

이 연구는 아산재단 아산생명과학연구소의 연구비 지원으로 시행되었음(2001-234).

접수일: 2003년 1월 31일, 게재승인일: 2003년 2월 17일

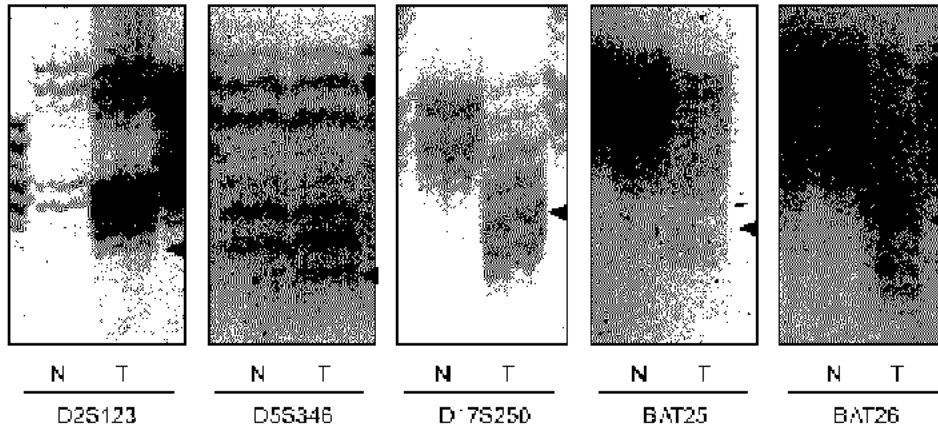


Fig. 1. Microsatellite instability in five markers. Arrows indicate additional bands that present instability. N, normal mucosa; T, tumor tissue.

생한 산발성 위암만을 대상으로 하였으며, 대상군에서의 MSI의 발현 양상을 살펴보고 MSI를 나타내는 기전으로서 *hMLH1* 유전자의 촉진자 메틸화를 살펴보고자 하였다.

방 법

1) 대상 환자

36예의 위암 환자를 대상으로 하였다. 대상군은 발암이 50세 이하의 비교적 약년층에서 일어나고 병리적으로 위선암으로 판정되었으며, 충분한 중앙 및 정상점막 조직을 확보하기 위해 위절제를 시행한 군으로 하였다. 가족성 위암 및 유전성대장암환자를 제외하기 위하여 1도 가계 내에 위암이나 대장암 환자가 있는 예는 제외하였다.

2) DNA의 추출

DNA의 추출은 통상적인 방법을 이용하였다. 즉 대상조직을 600µl의 nucleic lysis 용액이 첨가된 상태에서 조직과 쇄 후, 용해질(lysate)을 옮겨 65°C에서 약 30분가 배양시켰다. 3µl RNase 용액을 첨가한 후 37°C에서 약 30분간 배양시켰다. 200µl의 단백침전용액을 첨가하고 원심분리 한 후 상청액을 isopropanol과 혼합하였다. 원심분리 후 상청액을 버리고 70% 에탄올을 첨가해 원심분리 후 침전물을 말렸다. 100µl의 DNA rehydration solution을 첨가하여 DNA를 용해시켰다.

3) Microsatellite instability 검정

위암의 MSI에 대한 판정은 5개의 표식자에 대한 검정 후 판정하였다. 5개의 표식자는 NCI에서 표준적으로 제시한, BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250을 이용하였으며, 이중 BAT25, BAT26는 단염기(mononucleotide)의 반복서열이, D2S123, D5S346, D17S250는 두 개의 염기(dinucleotide)의 반복서열이 있는 부위이다.(9) PCR은 60 ng의 genomic

DNA, 2 pmol의 각 primer, 50 mM KCl, 10 mM Tris, 0.4 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂와 0.5 unit의 Taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI, U.S.A.)를 포함하는 10µl의 최종용적으로 시행하였다. PCR의 첫 단계는 4분 동안 94°C의 denaturation step을 거쳐 다음 단계는 30초 94°C, 30초 45~55°C, 45초 72°C의 35 cycle의 과정을 거쳐, 7분 동안 72°C에서 마지막 단계인 extension step을 거쳤다. PCR 산물에 loading buffer (95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% xylene cyanol, 0.05% bromophenol blue)를 동량 넣고 97°C에서 5분간 가열한 후 50% urea를 포함하는 6% polyacrylamide 겔로 2시간 동안 전기영동(1,800 V, 60 mA)하였다. 전기영동이 끝나면 silver 염색을 시행하여 microsatellite instability 유무를 판정하였다(Fig. 1).

MSI의 판정은 5개의 표식자 중 2개 이상에서 불안정성을 보인 경우는 MSI-H (High)로, 1개의 표식자에서 불안정성을 보인 경우는 MSI-L (Low)로, 불안정성을 보이지 않는 경우는 MSS (microsatellite stable)로 판정하였다.(9)

4) Methylation specific PCR (MSP)

MSP법은 DNA를 bisulfite로 처리했을 경우 메틸화가 되지 않은 cytosine은 uracil로 변형되고, 메틸화가 된 경우는 변형되지 않는 것을 이용하여 메틸화된 allele과 비메틸화된 allele을 구분하는 방법이다.(10) DNA 1 g을 NaOH 처리하여 denaturation시킨 후 Sodium bisulfite로 변형시켰다. DNA 시료는 Wizard DNA purification resin (Promega)을 이용하여 정제한 후 ddH₂O로 부유시켰다. 메틸화 분석을 시행한 primer 염기서열은 unmethylated allele의 경우 TTAATAGGAAGAGTGGATAGTG 및 TCTATAAAATTACTAAATCTCTTCA, methylated allele은 TTAATAGGAAGAGCGGATAGC 및 CTATAAAATTACTAAATCTCTTCG이었다.(10) PCR 반응은 10x PCR buffer (16.6 mM ammonium sulfate, 67 mM Tris (pH 8.8), 6.7 mM MgCl₂, and 10 mM 2-mercaptoethanol), dNTPs

(each at 1.25 mM), primers (300 ng each per reaction), and bisulfite 변형 DNA (50 ng)를 포함하여 최종용적이 50 μ l되게 하였다. 모든 PCR 반응은 95°C 5분 후 1.25 units of Taq polymerase를 넣는 방식의 hot start를 시행하였다. 35 회(30 s at 95°C, 30 s at 56~58°C, then 30 s at 72°C)의 PCR 반응을 Hybaid OmniGene temperature cycler (Hybaid, U.K.)에서 시행하였다. PCR 산물은 3% agarose 겔에 전기영동하여 띠를 분석하였다. 양성 control로 SW48 세포주에서 추출한 DNA를 이용하였다.

5) Bisulfite 변형 DNA의 염기서열 분석

Sodium bisulfite를 사용하여 변형시킨 DNA를 PCR 증폭시킨 후 ABI 377 prism sequencer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT)를 이용하여 염기서열을 분석하였다. MSP에 이용된 DNA의 bisulfite 변형의 성공여부를 확인하기 위한 방식으로 *hMLH1* 유전자를 대상으로 시행하였으며 3개의 primer를 이용한

nested PCR로 DNA를 증폭하였다.(11)

6) 자료분석 및 통계

실험에서 획득된 유전자 변이 및 기능이상에 관한 자료는 임상적, 병리적 자료와 상호 연관분석을 시행하였다. 통계치리는 t-test, chi-square test, Fisher's exact test를 이용하였으며, IBM 컴퓨터용 SPSS (version 9.0, SPSS Inc) 통계 프로그램을 사용하였다.

결 과

1) 대상군의 임상적, 병리적 양상

대상 환자군 36예의 남, 녀비는 25 : 11이었고, 평균연령은 43 (26~50)세이었으며 40대 이전이 10예, 40대 이후가 26예이었다. 병변의 부위는 유문부(antrum) 17예, 체부(body) 10예, 위저(fundus) 8예, 전체 위에 걸쳐 병변이 있는 경우가 1예이었다. 술 전 혈청암태아성항원치(CEA)는 6 ng/ml 이하 30예, 20 ng/ml 이상이 3예이었다. 병변의 육안적 분류는 Borrmann 분류 I, II, III, IV형이 각각 1, 13, 18, 4예이었다. 조직형은 interstinal 형이 8예, diffuse 형이 28예이었다. 20예에서 림프혈관 침습이 관찰되었으며, 병기는 I, II가 17예, III, IV가 19예이었다. 수술은 24예에서 원위절제술(distal gastrectomy)이, 11예에서 전체위절제술(total gastrectomy)이, 1예에서 근위위절제술(proximal gastrectomy)이 시행되었다(Table 1).

2) Microsatellite instability 및 *hMLH1* 촉진자부위 메틸화

36예의 위암의 microsatellite 상태를 확인하였을 때 2개 이상의 marker에서 불안정성을 보인 MSI-H는 5예(13.8%), 1개의 marker에서 불안정성을 보인 MSI-L는 13예(32.5%), 모든 marker에서 안정성을 보인 MSS는 18예(55%)이었다. 36예 중 7예(19.4%)에서 촉진자부위 메틸화를 보였다(Fig. 2). *hMLH1* 촉진자부위 메틸화와 MSI를 연관 분석하면 MSI-H인 5예 모두 *hMLH1* 유전자의 촉진자부위 메틸화를 보였고, MSI-L인 13예 중 2예에서 *hMLH1* 촉진자 부위 메틸화를 보였으며, MSS를 보인 예에서는 *hMLH1*의 메틸화를 발견할 수 없었다. *hMLH1* 촉진자부위 메틸화와 MSI간에는 밀접한 관계가 있음을 보였다(P<0.001) (Table 2).

Table 1. Clinicopathologic characteristics according to MSI*

	MSI (+)	MSI (-)	No (%)	P value
Sex				0.510
Male	4	21	25 (69.4)	
Female	1	10	11 (30.6)	
Age group				0.603
<40	2	8	10 (27.8)	
40~50	3	23	26 (72.2)	
Location				0.338
Antrum	4	14	18 (50.0)	
Body, Fundus	1	17	18 (50.0)	
Histology				0.305
Diffuse	3	25	28 (77.8)	
Intestinal	2	6	8 (22.2)	
Borrmann type				0.606
I, II	3	11	14 (39.9)	
III, IV	2	20	22 (60.1)	
Total	5	31	36 (100)	

*MSI = microsatellite instability, MSI-H

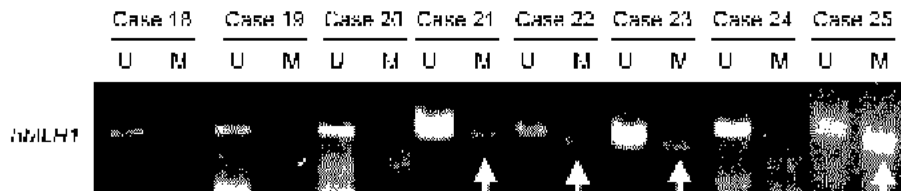


Fig. 2. Methylation specific PCR in *hMLH1*, U presents unmethylated allele and M presents methylated allele. Arrows indicate bands for methylation.

Table 2. Relationship between MSI and promoter methylation in hMLH1

	Total no. (%)	MSI-H	MSI-L	MSS	P-value
Methylation (+)	7 (19.4)	5	2	0	<0.001
Methylation (-)	29 (80.6)	0	11	18	

3) MSI 및 hMLH1 촉진자부위 메틸화와 임상적, 병리적 요소와의 상관분석

성별, 연령별, 암종의 위치 등 임상적 요소와 세포형, 암종의 육안적 분류, 병기를 MSI, 촉진자부위 메틸화 등과 상관분석을 시행하였을 때 의미 있는 연관성을 보이는 요소는 발견할 수 없었다(Table 1).

고 찰

위암의 발암기전에 대한 연구가 진행되면서 위암 및 위암의 전구 병변에 대한 분자생물학적 변화가 점차 밝혀지고, 발암관련 유전자인 다양한 종양유전자(oncogene)와 종양억제유전자(tumor suppresser gene)의 기능 이상 및 그를 초래하는 다양한 genetic 및 epigenetic 변화가 보고되고 있는 실정이다. 그러나 비교적 병리적, 임상적 양상의 공통점을 가지고 있으며, 같이 연결된 장관에서 발생하는 대장암의 발암기전이 그 체계적으로 체계화되고 각 유전자 변화간의 상호관계가 폭 넓게 이해되고 있는 데 비하여 위암의 경우는 유전적 변화 및 이의 위암의 발암기전의 연관분석은 미흡한 바 있다.

과오수정유전자는 hMLH1, hMSH2, hPMS1, hPMS2, hMSH3, hMSH6 등이 있으며 DNA 복제 시 오류가 발생하는 경우 이를 수정하여 정상적인 복제가 일어나도록 작용한다.(12) 이와 같은 과오수정유전자군의 기능 이상이 발생하는 경우 유전변이의 오류가 수정되지 않고, 지속적인 변이의 축적은 암 발생을 유도하게 된다. 이와 같은 발암기전은 최초 유전적비용종증대장암이 과오수정유전자군의 유전자 중 하나의 배선변이에 의하여 발생하는 것이 보고되면서 알려졌다.(13,14) 산발성 대장암의 경우에도 약 15%에서 과오수정유전자군의 기능 이상이 발암기전에 밀접하게 관여하는 것으로 여겨지고 있다.(4,5) 과오수정유전자의 기능 이상이 있는 경우 microsatellite instability라는 유전자형이 표현되며, 이는 비교적 짧은 서열의 염기가 반복되는 부위(microsatellite)가 불안정성을 나타내는 것을 말한다.

최근 종양억제유전자의 기능 상실의 주요 기전으로 촉진자부위 메틸화가 연구되고 있는데, 유전자의 촉진자에 다수 분포하는 CpG island의 메틸화는 유전자의 기능을 상실시키는 중요한 변화로 알려져 있으며, 이러한 변화는 다수의 유전자에서 보고되었다.(15,16) 다수의 유전자의 촉진자

부위 메틸화가 일어나서 기능소실이 유발되고 발암이 진행되는 표현형을 CpG island methylation phenotype (CIMP)라고 칭하기도 한다. hMLH1 유전자의 경우도 촉진자부위 메틸화가 보고되고 있으며, 산발성 대장암 중 MSI를 일으키는 기전의 대부분이 hMLH1 유전자의 촉진자부위 메틸화로 알려져 있다.

위암에서 MSI의 빈도는 다양하게 보고되고 있고, 사용된 marker의 종류나 개수에 따라 차이가 있지만 약 30%에서 MSI를 나타낸다.(17,18) Han 등(19)은 저분화암에서는 64%, 고분화암에서는 17%의 MSI를 보고한 바 있고, Rhyu 등(20)은 31%에서 MSI가 나타났다고 보고했다. 위암에서 MSI를 보이는 경우 조직학적으로 심한 림프구의 침윤을 볼 수 있으며 예후는 비교적 양호한 것으로 알려져 있다.(7,8) 본 연구에서는 약 12.5%에서 MSI-H, 32.5%에서 MSI-L를 보여서 Marker의 종류나 MSI-L를 어느 범주에 포함시키는가에 따라 달라지지만 비교적 타 연구결과에 비해서 낮은 비율의 위암에서 MSI를 나타냈다. 이는 본 연구의 증례의 적은 수 및 사용한 marker 차에 기인할 수도 있지만 대장군의 선정과 관련이 있을 가능성을 배제할 수 없다. 약년층에서 발생한 위암의 경우 발암기전에서 과오수정유전자 기능이상의 관련이 낮을 가능성이 있고, 실제로 위암의 발생연령에 따라 MSI의 비율 및 그 기전으로서 hMLH1의 촉진자부위 메틸화 비율에 차이를 보이는데, 연령이 증가할수록 MSI가 많이 나타난다는 보고가 있다.(21) MSI-H를 보인 예는 모두 hMLH1의 촉진자 부위 메틸화를 보여서 위암의 MSI를 유발하는 주요 기전은 산발성 대장암과 유사하게 hMLH1 촉진자의 메틸화임을 알 수 있다. 그러나 MSI-L인 13예에서는 단지 2예에서만 hMLH1 촉진자 메틸화를 보였다. MSI-L군에 대한 규명은 아직 많은 논란이 있는 부분이며, MSI-L군의 경우 MSI-H보다는 MSS군과 비슷한 임상적, 병리적 양상 및 유전자변화를 보이기 때문에 MSI-H와는 구분하는 경우가 많다.(9) MSI-L는 비교적 다양한 군의 모임이라고 파악되는데 첫째로는 과오수정유전자의 기능 이상이 비교적 최근에 발생하여 아직 충분한 수의 불안정 marker를 형성하지 못해서 MSI-L로 발현된 경우로, 이 경우에는 MSI-H와 유전자 변화가 흡사하고 장기적으로는 MSI-H군으로 이행할 것으로 추정되며 본 연구에서 hMLH1의 촉진자부위 메틸화를 보인 2예의 경우 여기에 속할 가능성이 크다고 할 수 있다. 그러나 최근에는 MSI-L를 일으키는 기전으로 과오수정유전자군과 다른 DNA repair에 관여하는 유전자의

이상 시 MSI-L가 나타난다는 이론이 있으며, 미약한 정도의 불안정성을 유발하는 후보 유전자로는 MGMT이 거론되고 있는데, MGMT의 촉진자 메틸화와 MSI-L가 상관관계를 가진다는 연구보고가 있다.(16,22) 그 외 자연적인 변이 비율 내에서 변이가 일어나 일시적으로 MSI-L를 보이는 경우로 이 경우는 전적으로 MSS와 같은 군으로 취급해야 할 것이다. 본 연구결과만으로 위암에서 MSI-L군의 역할 및 발암기전을 규명하기는 어렵지만, 위에서 서술한 다양한 군의 총체가 MSI-L로 나타날 가능성은 제시할 수 있다. MSI 유무와 기타 임상적, 병리적 양상의 상관관계는 확인할 수 없었는데 이는 충분한 증례의 보충이 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서 위암의 발암 중 과오수정유전자계의 이상이 관여하고 이의 기전이 주로 *hMLH1* 유전자의 촉진자부위 메틸화임을 살펴볼 수 있었으나, 향후 더 많은 증례의 보강을 통하여, 이러한 분자생물학적 변화를 가지는 암종의 특이 표현형과 예후 인자로서의 활용에 대한 연구가 필요할 것으로 보이며, 과오수정유전자 기능 외 흔히 발암과 관련이 알려진 다수의 유전학적 변화와의 상관연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결 론

약 15%의 위암은 과오수정유전자군의 이상과 관련을 맺고 발암하며, 이 경우 MSI는 *hMLH1*의 촉진자부위 메틸화와 밀접하게 관련이 있을 것으로 추정된다. 본 연구에서는 각 MSI 및 *hMLH1* 유전자의 촉진자부위 메틸화와 임상, 병리적 양상과의 상호 연관성을 발견하지는 못했지만, 지속적인 증례의 보강과 후속 연구를 통하여 위암의 발암기전을 규명하고, 이를 통한 체계적이고 구체적 예방 및 치료방법의 고안이 이루어져야 할 것이다.

REFERENCES

- Bae JM, Won YJ, Jung Kwon, Suh KA, Ahn DH, Park JG. Annual report of the central cancer registry in Korea-1999: based on registered data from 128 hospitals. *Cancer Res Treatment* 2001;33:367-372.
- Tahara E. Molecular mechanism of stomach carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1993;119:265-272.
- Chung DC, Rustgi AK. DNA mismatch repair and cancer. *Gastroenterology* 1995;109:1685-1699.
- 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.
- Feeley KM, Fullard JF, Heneghan MA, Smith T, Maher M, Murphy RP, O'Gorman TA. Microsatellite instability in sporadic colorectal carcinomas is not an indicator of prognosis. *J Pathol* 1999;188:14-17.
- Sepulveda AR, Santos AC, Yamaoka Y, Wu L, Gutierrez O, Kim JG, Graham DY. Marked differences in the frequency of microsatellite instability in gastric cancer from different countries. *Am J Gastroenterol* 1999;94:3034-3038.
- Wu MS, Lee CW, Shun CT, Wang HP, Lee WJ, Sheu JC, Lin JT. Distinct clinicopathologic and genetic profiles in sporadic gastric cancer with different mutator phenotype. *Genes Chromosom Cancer* 2000;27:403-411.
- Chong JM, Fukayama M, Hayashi Y, Takizawa T, Koike M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Miyaki M. Microsatellite instability in the progression of gastric carcinoma. *Cancer Res* 1994;54:4595-4597.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. 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.
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9821-9826.
- Nakagawa H, Nuovo GJ, Zervos EE, Martin EW Jr, Salovaara R, Aaltonen LA, de la Chapelle A. Age-related hypermethylation of the 5' region of MLH1 in normal colonic mucosa is associated with microsatellite-unstable colorectal cancer development. *Cancer Res* 2001;61:6991-6995.
- Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87:159-170.
- Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen 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;260:812-816.
- Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*. 1999;116:1453-1456.
- Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 1998;72:141-196.
- Haydon A, Jass JR. Emerging pathways in colorectal cancer development. *Lancet* 2002;3:83-88.
- Yokozaki H, Yasui W, Tahara E. Genetic and epigenetic changes in stomach cancer. *Int Rev Cytology* 2001;204:49-95.
- Lee J, Abraham SC, Kim H, Nam J, Choi C, Lee M, Park CS, Juhng SW, Rashid A, Hamilton SR, Wu TT. Inverse relationship between APC gene mutation in gastric adenomas and development of adenocarcinoma. *Am J Pathol* 2002;

- 161:611-618.
19. Han HJ, Yanagisawa A, Kato Y, Park JG, Nakamura Y. Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. *Cancer Res* 1993;53:5087-5589.
20. Rhyu MG, Park WS, Meltzer SJ. Microsatellite instability occurs frequently in human gastric carcinoma. *Oncogene* 1994;9:29-32.
21. Nakajima T, Akiyama Y, Shiraishi J, Arai T, Yanagisawa Y, Ara M, Fukuda Y, Sawabe M, Saitoh K, Kamiyama R, Hirokawa K, Yuasa Y. Age-related hypermethylation of the hMLH1 promoter in gastric cancer. *Int J Cancer* 2001;94:208-211.
22. Whitehall VL, Walsh MD, young J, Leggett BA, Jass JR. Methylation of O-6-methylguanine DNA methyltransferase characterizes a subset of colorectal cancer with low-level DNA microsatellite instability. *Cancer Res* 2001;61:827-830.
-