

산발성 장형 위선암 환자의 Microsatellite Instability와 병리학적 양상

조창희¹, 홍유찬¹, 안지현³, 최경현², 이상호², 신영명², 윤기영³, 정민정³, 장희경³

고신대학교 의과대학 예방의학교실

Microsatellite Instability and Pathologic Characteristics of Sporadic Intestinal Type Adenocarcinoma of Stomach.

Chang-Hee Cho¹, Yu-Chan Hong¹, Ji-Hyun Ahn³, Kyung-Hyun Choi², Sang-Ho Lee², Young-Myeong Shin²,
Ki-Young Yoon², Min-Jung Jung³, Hee-Kyung Chang³

Second grade student of Kosin University College of Medicine¹, Department of Surgery² and Pathology³,
Kosin University College of Medicine

Abstract

Background : Through many researches, microsatellite is expected to be a good diagnostic and prognostic factor in colorectal cancer, endometrial cancer, gastric cancer, and the others. The prevalence of microsatellite instability (MSI) in gastric carcinoma has reported variously, 13 ~ 44%.

Purpose : We aimed to determine the prevalence of MSI-high and the relationship between MSI and pathological characteristics of sporadic intestinal type adenocarcinoma of stomach.

Material and Methods : We analyzed 106 sporadic intestinal type adenocarcinoma specimens excised from patients who were over thirty-five years old to determine the status of microsatellite by DNA sequencing. The tissues were formalin-fixed and paraffin embedded. DNA were extracted and amplified by polymerase chain reaction (PCR). MSI was determined using five markers recommended by National Cancer Institute (NCI). Specimens were also studied with five pathological factors-differentiation of tumor cells, depth of invasion, lymph node metastasis, vessel invasion, and perineural invasion- to determine pathological state.

Result : The microsatellite status was determined as MSI-High in 5 cases (4.7%), no MSI-low, and MSS (microsatellite stable) in 101 cases (95.3%). Within the frequency, there was no large gap in the distinction of gender in MSI cases, but in MSS cases, there was three-times more cases in male. MSI cases had moderate-to-poor differentiation and trend to invade toward serosa. All MSI cases showed no perineural invasion. But we could not find any statistical significance between MSI and pathological characteristics of sporadic intestinal type adenocarcinoma.

Conclusion : Results suggest that MSI can not make any certain pathological significance in sporadic intestinal type adenocarcinoma. Even though less than 5% of sporadic intestinal type adenocarcinoma patients showed MSI, it can be used as a influential prediagnostic factor of gastric cancer. Further study with large scale of cases will be followed to verify these results.

Key words : Stomach cancer, MSI, Microsatellite Instability, intestinal type

서 론

교신저자 : 장 희 경
주소 : 602-702, 부산광역시 서구 압남동 34번지
고신대학교 의과대학 병리학교실,
복음병원 병리과
TEL : 051-990-6323, FAX : 051-241-7420
E-mail : changhkg@ns.kosinmed.or.kr

본 논문은 학생연구원 장학금 지원과 고신대학교 의과대학 연구비로 이루어졌음

Microsatellites는 1 ~ 4개의 염기쌍으로 이루어진 유전자 서열로 유전체 안에서 반복적으로 나타난다. Microsatellites는 coding strand 이든 non-coding strand 이든 돌연변이가 일어날 경우에는 여러 장애와 연관된다. 특히 DNA mismatch repair deficient tumor의 발암 기전에서 중요한 역할을 하는데 대장암, 직장암, 자궁내막암, 다른 여러 암의 발암기전 중 15% 정도가 Microsatellite 돌연변이에 기인한다.¹⁾ 따라서 Microsatellite의 불안정성

(Microsatellite Instability, MSI)은 암 진단과 예후 판정에 좋은 척도가 될 수 있을 것으로 보인다.

위암 환자에서 MSI의 빈도는 증례 집단과 MSI를 검사하는 표지자의 종류에 따라 13~44%로 다양하게 나타난다.^{1,2)} 지역에 따라 임상 및 병리학적인 형태와 그 예후의 차이가 심하다. 그동안의 연구를 통하여 MSI가 발암기전에 중요한 역할을 한다는 것은 전반적으로 통감하고 있다. 그러나 연구 별로 결과 차이가 심하였기 때문에 그 뚜렷한 임상적 의미를 규명하기는 어려웠다. 본 연구에서는 위암 중에서도 산발적인 장형 위선암에서 MSI와 병리학적 양상의 연관성을 밝혀보고자 한다.

방 법

1) 대상 환자

35세 이상(평균연령 58세)의 산발적인 장형 위선암 환자를 대상으로 하였다. 2004~2005년 사이에 고신 의료원에서 절제된 106예의 위암 검체로부터 표본을 만들고 조직 검사 및 MSI 검정을 실시하였다.

2) 조직학적 관찰

조직을 포르말린으로 고정하고 H&E 염색을 한 후 분화도, 침투 깊이, 림프절 전이, 혈관 침투, 주위 신경 조직 침투 등 5가지로 나누어 광학 현미경으로 관찰하였다.

3) DNA 추출

QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany)을 사용하여 DNA를 추출하였다. normal과 tumor 조직을 1.5ml microcentrifuge tube에 각각 넣었다. 단백질을 제거를 위해 180ul의 ATL buffer와 20ul의 proteinase K를 넣어준 후, 15초간 vortexing하고, 56도에서 완전히 녹을 때까지 방치하였다. 완전히 녹은 후 AL buffer 200ul를 넣고 20초간 vortexing하여 70℃에서 10분간 반응시켰다. 200ul의 100% 에탄올을 첨가하여 15분간 vortexing하고, 완전히 섞인 용액을 QIAamp spin column (QIAGEN, Hilden, Germany)에 넣은 후 8000rpm에서 1분 간 원심분리 하였다. Column에 500ul의 AW1 buffer를 넣고 8000rpm에서 1분간 원심분리하여 washing하였다. 그 다음 2차 washing 단계로 AW2 buffer 500ul를 넣어 13000rpm에서 3분간

원심분리하였다. Column을 깨끗한 1.5ml microcentrifuge tube에 옮기고, AE buffer 200ul를 넣어 1분간 방치한 후 8000rpm에서 1분간 원심분리하여 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA는 nanodrop을 이용하여 정량하고 -20℃에서 보관하였다.

4) MSI 검정

MSI 검정에는 NCI에서 제시한 5개의 표지자, BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250를 사용하여 Fluorescence-based PCR을 시행하였다. BAT25, BAT26는 한 개의 염기가 반복되어 서열을 이루고 있고 D2S123, D5S346, D17S250는 두 개의 염기가 반복되어 서열을 이루고 있다. 각 마커마다 6FAM 또는 NED로 표지하고 각 마커에 대해 Template 1ul-3ul (50-100ng/ul), marker 1S 1ul (10pmole/ul), marker 1AS 1ul (10pmole/ul), 2X HotstarTaq 5ul, D.W Up to 10ul의 조건으로 총 10ul의 PCR 반응액을 만들었다. 그 후 GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystems, Foster, CA, U.S.A)를 이용하여 95℃ 15분 1cycle 후, 94℃ 1분, 57℃ 1분, 72℃ 1분 과정을 30cycles, 마지막으로 72℃ 5분을 시행하여 PCR을 마쳤다. 반응이 끝난 시료 1ul에 GeneScan-500 ROX size standard (Applied Biosystems, Foster, CA, U.S.A) 1ul와 Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, Foster, CA, U.S.A) 10ul를 넣어 섞은 후 95℃에서 2분간 반응시키고 얼음에 넣어 차갑게 하였다. 위 시료를 96 well plate에 옮긴 후, 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster, CA, U.S.A)에 장착하여 fragment analysis를 실시하였다.

5) 자료 분석 및 통계

조직 검사와 MSI 검정을 통해 얻은 자료는 MSI 여부, 성, 분화도, 침투의 깊이, 림프절 전이, 혈관 침투, 주위 신경 조직 침투의 항목으로 나누어 SPSS 통계 프로그램을 통해 빈도 분석과 상관 분석을 시행하였다.

결 과

1) 대상군의 임상 및 병리적 양상

대상 환자군 106예에서 남자는 78명, 여자는 28명이었다. 조직 검사 결과 좋은 분화도를 보인 것은 15예, 중간 분

화도와 나쁜 분화도를 보인 것은 각각 52예, 39예이었다. 림프절 전이를 보인 것은 50예, 보이지 않은 것은 56예이었다. 림프관과 정맥 혈관에서 모두 침투를 보인 것은 27예, 모두 보이지 않은 것은 65예, 림프관에서만 보인 것은 13예, 정맥 혈관에서만 보인 것은 1예이었다. 주위 신경 조직으로 침투를 보인 것은 34예, 보이지 않은 것은 72예이었다. (Table 2, Fig 1.)

Table 2. Pathologic characteristics according to MSI

		MSI-H*(n)	MSS†(n)	Total (N)
Sex	Male	2	76	78
	Female	3	25	28
Differentiation	Well	0	15	15
	Moderate	2	50	52
	Poor	3	36	39
Depth of invasion	Mucosa	1	26	27
	Submucosa	0	11	11
	Muscularis propria	0	13	13
	Subserosa	0	22	22
	Serosa	4	29	33
Lymph node metastasis	-	3	53	56
	+	2	48	50
Vessel invasion	lymphatic and venous (-)	3	62	65
	lymphatic and venous (+)	1	26	27
	lymphatic (-) but venous (+)	0	1	1
	lymphatic (+) but venous (-)	1	12	13
Perineural invasion	-	5	67	72
	+	0	34	34

* : Microsatellite instability -High

† : Microsatellite stable

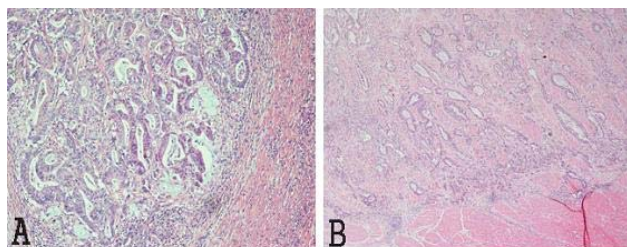


Figure 1. Sporadic intestinal type adenocarcinoma. A : MSI-H, B : MSS

2) Microsatellite Instability 검정 결과.

106예 중 MSI-high를 보인 것은 5예(4.7%)로 5개의 표지자 중 2개 이상에서 불안정성을 보인 것을 기준으로 판정하였다. 1개의 표지자만 불안정성을 보인 경우 (MSI-low)는 없었고 모든 표지자에서 안정성을 보인 MSS (microsatellite stable) 는 101예(95.3%)가 있었다. (Table 1, Fig 2.)

Table 1. The result of microsatellite analysis

	No. of patients	percent (%)	significant percent (%)
MSI-H*	5	4.7	4.7
MSS	101	95.3	95.3
Total	106	100.0	100.0

* : Microsatellite instability -High

† : Microsatellite stable

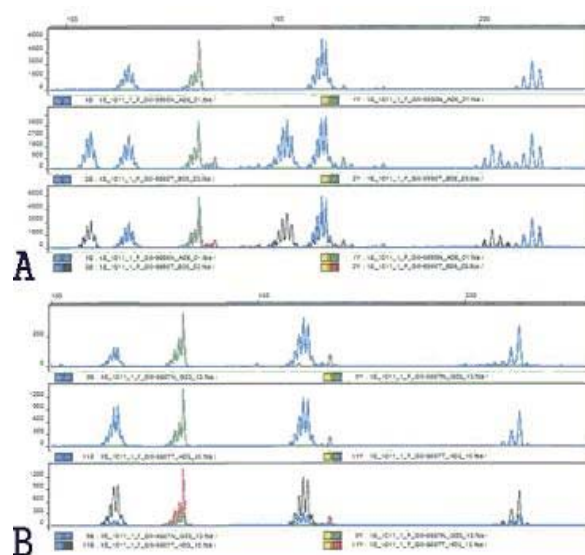


Figure 2. Microsatellite analysis results. Compared with MSS (B), MSI-H (A) have various-sized bands.

3) Microsatellite Instability와 임상 및 병리학적 양상과의 상관 분석

빈도 면으로 보았을 때 MSI는 남성 전체 78예 중에 2예, 2.6%로 나타났고 여성에서는 28예 중 3예, 10.7%로 나타나 여성에서의 빈도가 더 높았다. 침투의 깊이에서는 MSI가 MSS보다 serosa 쪽으로 더 많이 침투하는 것으로 나타났으나 림프절 전이나 혈관 침투에서는 MSS와 큰

차이가 없었다. 주위 신경 조직 침투에서는 모든 MSI에서 음성 결과를 보였다. 또한 빈도상으로 MSI가 MSS보다 나쁜 분화도를 보이는 것을 알 수 있었다. 하지만 상관 분석 결과, 통계학적으로 유의한 요소는 발견할 수 없었다.

고 찰

1965년 Lauren은 위선암을 미만형과 장형으로 분류하고 각기 다른 병리학적 발병과정을 가진다고 발표하였다.⁴⁾ 미만형은 흔히 증식 부위에서 관찰되고 전암 병변 없이 발생하는 반면에 장형은 만성 위염, 만성 위축성 위염, 장상피 화생 및 이형성 전암 병변을 거쳐 암종에 이르게 된다.⁵⁾ 장상피 화생과 이형성은 위선암을 발생시키는 단계적인 과정 중 초기 표현형 변화로 고려된다. 몇 연구에서 어떤 위선암은 이와 같은 전암 병변의 비정상적인 유전자 변화가 축적되면서 일어난다고 발표하였다.⁶⁾ 장형 위선암의 발암 기전에는 환경적인 요인 뿐만 아니라 숙주 요인, 유전 요인이 다각적으로 관여한다고 알려져 있다.

Microsatellite는 인간 유전체 안에서 불규칙하게 무수히 산재하는 1~4 염기쌍의 짧은 유전자 서열로 그 기능은 제대로 알려져 있지 않다. 다만 유전성 비용종성 대장암(Hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome, HNPCC)이 Microsatellite 불안정성(microsatellite instability, MSI)과 깊은 연관이 있는 것으로 알려져 다른 암들과도 연관성이 있는지 현재 여러 곳에서 연구 중에 있다.⁷⁾ MSI는 DNA mismatch repair gene에 기능 이상이 생길 시에 나타나는 유전자형을 말한다.⁸⁾ DNA mismatch repair(MMR) gene은 DNA 복제 시 오류가 발생하는 경우 이를 수정하여 정상적인 복제가 일어나도록 작용하며 그 종류에는 hMLH1, hMSH2, hMLH3, hMSH6, hPMS1, hPMS2 등이 있다.⁹⁾ 이와 같이 MMR gene에 기능 이상이 생기면 유전자의 변이가 수정되지 않게 되고 지속적으로 변이가 축적되면서 암 발생이 유도된다. MSI-high는 주로 hMLH1과 hMSH2에 손상이 생겨 표현된다.¹⁰⁾

산발성 위암의 경우에는 hMLH1과 hMSH2의 somatic mutation이나 germline mutation보다는 hMLH1 promotor의 과메틸화 때문인 것으로 알려져 있다.¹¹⁻¹³⁾ MSI-high인

경우에는 선종이나 이형성 같은 전암 병변이 없는 경우에도 미만형보다는 장형 위선암으로 진행되는 것으로 발표되었다.¹⁴⁾ 위선암과 관련 없는 위선종이나 이형성보다는 위선암과 관련있는 위선종, 이형성에서 MSI-high의 빈도가 더 높게 나왔다.¹⁵⁾ 이로 보아 MSI가 세포 안에서 지속적으로 축적되면서 위선암 진행과정 중 말기에 그 기능을 하는 것으로 생각된다. 또한 최근 메틸화를 통한 RAB 32의 epigenetic 불활성화가 MSI 하에서 hMLH1의 메틸화와 강한 연관이 있다는 보고가 나왔다. RAB32의 메틸화는 미토콘드리아 생리에 변화를 주고 RAS 신호 경로와 상호 작용을 함으로써 발암과정에 관여할 것이라 예상하고 있다.¹⁶⁾ H. pylori도 MSI에 의한 발암 과정에 관여한다고 알려져 있다. H. pylori는 IARC (International Agency for Research on Cancer) 분류에 따라 type 1 발암 물질에 분류 된다. 하지만 H. pylori 감염만으로 암이 발생하는 것이 아니라 위 점액층에 있는 MMR gene의 기능에 이상이 생겨 제 역할을 하지 못할 때 H. pylori가 암을 일으키는 것으로 발표되었다.¹⁷⁾

위암에서의 MSI 빈도는 증례 집단과 MSI를 검사하는 표지자의 종류에 따라 13~44%로 다양하게 나타난다.²⁻³⁾ 본 연구에서의 MSI 비율은 4.7%로 증례 수가 106건으로 적지 않고 일반적으로 고령으로 갈수록 MSI의 비율이 높아짐¹⁸⁾ 불구하고 다른 연구보다 낮게 나타났다. 통계상으로는 환자군에서 MSI 빈도와 유의성을 갖는 다른 특정한 요소들을 찾아 볼 수 없었다. 그렇기 때문에 MSI의 빈도가 어느 특정한 요소와 연관된다기보다는 지역, MSI 판정기준, 표지자의 종류, 증례 수, 인종 등에 따라 천차만별로 나타난다는 다른 연구들의 결론을 뒷받침해주는 것으로 볼 수 있겠다.¹⁹⁾ 보통 위암 환자 전체에서 남성의 비율이 여성보다 2배 이상 많이 나타난다. 그런데 본 연구에서 MSI-high를 보이는 위선암의 발생 빈도는 남성 위선암 환자 중에서 2.6%, 여성 위선암 환자에서 10.7%로 오히려 여성에서 더 높게 나타났다. 다른 연구에서도 이와 비슷한 결과를 보이는 것이 있어 더 많은 증례를 통한 통계적 연구가 필요할 것으로 보인다.^{5,10,19)} 위암에서 MSI를 가진 경우 좋은 예후를 보인다는 발표가. de Mazoni G.등의 연구에서 MSI를 보이는 위선암 환자에서 R0 외과적 절제술 후 5년 내 재발률이 22%에 불과한 반면에, MSS인 위선암 환자에서는 84%의 재발률을 보였

다.¹⁾ 본 연구 결과에서는 MSI-high인 위선암은 중간에서 나쁜 분화도를 보이고 5예 중 4예에서 serosa를 넘어 침투하였다. TNM staging에 따라 분류하면 5예의 MSI-high의 위선암은 평균적으로 stage II ~ IIIA의 middle stage를 보이고 있는 것으로 나타났다. 이것은 MSI인 위암이 주로 early stage를 보인다는 다른 연구들의 결과^{10,21,22)}와는 조금 어긋나는 것이었다. 더군다나 림프절 전이나 혈관 침투와 같은 다른 병리학적 형태에서도 MSS인 위선암과의 별다른 차이점을 찾을 수 없었다. 따라서 MSI-high가 병리학적으로 유리한 상태이기 때문에 좋은 예후를 보이는 것으로 보이지는 않는다. 왜 좋은 예후를 보이는지는 환자들의 생존률과 재발률을 추적 관찰하고 환자들의 다른 정보들과 상관 분석을 시행한 후에 결론을 내릴 수 있을 것으로 생각된다. 장형의 위암에는 유전 요인 뿐만 아니라 환경 요인, 숙주 요인도 발암 과정에 관여하므로 식습관, 음주 및 흡연 여부를 포함한 생활 습관, 지역 환경 등에 대한 광범위한 연구가 이루어져야 할 것으로 보인다.

결 론

106예의 장형의 산발성 위선암을 관찰, 분석한 결과, MSI-high인 위선암과 MSS인 위선암의 병리학적인 형태에서 유의할 만한 차이점은 찾을 수 없었다. 그러나 MSI는 국내 안에서도 지역과 증례의 성향에 따라 빈도의 차이가 큰 만큼 국내 환자들을 대상으로 한 광범위한 연구가 이루어진다면 발암 과정에는 어떠한 역할을 하고 예후에는 어떤 영향을 미치는지 알 수 있을 것으로 기대된다. 이를 통해 MSI가 진단과 예후 판정에 어떠한 역할을 할 수 있는지 지속적으로 연구되어야 할 것이다.

참고문헌

1. Woerner SM, Kloor M, von Knebel Doeberitz M, Gebert JF : Microsatellite instability in the development of DNA mismatch repair deficient tumors. *Cancer Biomark.* 2:69-86, 2006
2. Wirtz HC, Muller W, Noguchi T, Scheven M, Ruschoff J, Hommel G, Gabbert HE : Prognostic value and clinicopathological profile of microsatellite instability in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 4:1749-1754, 1998
3. Moskaluk CA, Rumpel CA : Allelic deletion in 11p15 is a common occurrence in esophageal and gastric adenocarcinoma. *Cancer* 83:232-239, 1998
4. Lauren P : The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 64:31-49, 1965
5. 손태성, 이광수, 최성호, 김용일, 조윤희, 공구 : 위암 환자에서 Microsatellite DNA 불안정성의 빈도와 임상적 의의. *대한외과학회지* 56:539-547, 1999
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* 56:537-543, 2000
7. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Koloner R. : The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75:1027-1038, 1993
8. Hee Cheol Kim, Sun Ae Roh, Jeong Hwan Yook, Sung Tae Oh, Byung Sik Kim, Chang Sik Yu, Jin Cheon Kim : Microsatellite Instability and Promoter Methylation of hMLH1 in Sporadic Gastric Carcinoma. *J Korean Gastric Cancer Assoc* 3:50-55, 2003
9. Kinzler KW, Vogelstein B. : Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 7:159-170, 1996
10. Kevin C. Halling, Jeffrey Harper, Christopher A. Moskaluk, Stephen N. Thibodeau, Gina R. Petroni, Aron S. Yustein, Piero Tosi, Chiara Minacci, Franco Roviello, Paolo Piva, Stanley R. Hamilton, Charles E. Jackson, Steven M. Powell : Origin of Microsatellite Instability in Gastric Cancer. *American Journal of Pathology* 155:208, 1999
11. Keller G, Grimm V, Vogelsang H, Bischoff P, Mueller J, Siewert JR, Hofler H : Analysis for microsatellite instability and mutations of the DNA mismatch repair gene hMLH1 in familial gastric cancer. *Int J Cancer* 68:571-576, 1996
12. Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, Kim C-Y, Roche PC, Burgart LJ, Thibodeau SN : Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 58:3455-3460, 1998
13. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB : Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 6870-6875
14. Jae-Hyuk Lee, Susan C. Abraham, Hyun-Soo Kim, Jong-Hee Nam, Chan Choi, Min-Cheol Lee, Chang-Soo Park, Sang-Woo Juhng, Asif Rashid, Stanley R. Hamilton, Tsung-Teh Wu : Inverse Relationship between APC Gene Mutation in Gastric Adenomas and Development of Adenocarcinoma. *American Journal of Pathology* 161: 615-617, 2002
15. Isogaki J, Shinmura K, Yin W, Arai T, Koda K, Kimura T, Kino I, Sugimura H : Microsatellite instability and K-ras mutations in gastric adenomas, with reference to associated gastric cancers. *Cancer Detect Prev* 23:204-214, 1999

16. David Shibata, Yuriko Mori, Kun Cai, Li Zhang, Jing Yin, Abul Elahi, Richard Hamelin, Yick F. Wong, Wing K. Lo, Tony K.H. Chung, Fumiaki Sato, Martin S. Karpeh Jr. Stephen J. Meltzer : RAB32 hypermethylation and microsatellite instability in gastric and endometrial adenocarcinomas. *Int. J. Cancer* 119:801-806, 2006
17. Jian-Hua Li, Xian-Zhe Shi, Shen Lv, Min Liu, Guo-Wang Xu : Effect of Helicobacter pylori infection on p53 expression of gastric mucosa and adenocarcinoma with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 11:4363-4366, 2005
18. 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* 94:208-21, 2001
19. Ping Liu, Xiao-Yong Zhang, Yun Shao, Dao-Fu Zhan : Microsatellite instability in gastric cancer and pre-cancerous lesions. *World J Gastroenterol* 11:4904-4907, 2005
20. de Manzoni G, di Leo A, Castelli A, Tomezzoli A, Tasselli S, Pedrazzani C, Bonfiglio M, Scarpa A : Advanced gastric adenocarcinoma with RER+ phenotype presents a good prognosis after 5 years of curative resection. *G Chir.* 22:9-13, 2001
21. Han HJ, Yanagisawa A, Kato Y, Park JG, Nakamura Y : Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. *Cancer Res* 53:5087-9, 1993
22. Sakata K, Tamura G, En Y, Ohmura K, Ogata S, Motoyama T : Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in solitary and multiple gastric cancers with microsatellite instability. *Br J Cancer* 86:564-67, 2002