대장암의 분자병리학적 분류

한국원자력의학원 원자력병원 병리과

박 선 후

Classification of Colorectal Cancer Based on Clinical, Morphological and Molecular Features

Sunhoo Park, M.D.

Department of Pathology, Korea Institute of Radiological and Medical Science, Korea Cancer Center Hospital, Seoul, Korea

Colorectal cancer (CRC) has been assumed for many years to be a homogenous condition with the vast majority developing within preexisting adenomas. However, over the last two-decades, it has become clear that CRC evolves through multiple pathways at the genetic and the epigenetic level. Each of these processes is associated with a unique genetic or epigenetic signature identifiable in the tumor cells. The pathway may be defined on the basis of three molecular features: 1) chromosomal instability (CIN), 2) microsatellite instability (MSI), and 3) CpG island methylator phenotype (CIMP). Those molecular pathways are determined at an early evolutionary stage and are fully established within early cancer. Recently, five subgroups were outlined by using morphological findings and associated molecular changes: type 1 (CIN-stable/MSI-H/CIMP-H), type 2 (CIN-stable/MSI-L or MSS/CIMP-H), type 3 (CIN-unstable/MSI-L or MSS/CIMP-L), type 4 (CIN-unstable/MSS/CIMP-neg), and type 5 (CIN-stable/MSI-H/CIMP-neg). This approach to the classification of CRC should accelerate understanding of causation and will have an impact on clinical management in the areas of both prevention and treatment. **J Korean Soc Coloproctol 2008;24:497-504**

Keywords: Colorectal cancer, Genetic, Epigenetic, Pathway, Classification
결장직장암, 유전적, 후생학적, 기전, 분류

서론

병리의사의 진단은 단순히 질환의 분류 및 명명에 있지 않고, 환자의 예후를 예측하거나, 향후 환자의 치료 방향에 도움을 주는 정보 제공을 목적으로 한다. 전통적인 병리 진단은 종양의 육안 및 현미경적 소견을 기초로 하여, 육안 및 조직학적 형태에 따라 질환 및 병기를 분류하고 예후와 관련된 예측 인자를 찾고자 하였다. 지난 20여 년간 종양의 발생 및 진행과 관련된 분자 생물학(molecular biology) 연구가 활발히 진행되고 있었으며 많은 의미 있는 결과들이 나오고 있다. 종양 발생이 여러 단계에 걸친 세포의 유전적(genetic) 변화 또는 후생학적(epigenetic) 변화와 관련이 있음은 이미 잘 알려진 사실이다. 정상 세포가 종양으로 변환하기 위해서는 세포의 자가증식, 세포 자멸사(apoptosis) 방지, 혈관 형성, 종양의 침습 및 전이 등의 특성들이 획득되어야 한다, 이러한 세포학적인 변화는 다양한 유전자의 점진적인 변이 및 축적의 결과임이 보고되고 있다.¹ 집적된 많은 자료를 근거로, 최근에는 암 발생 및 진행 기전과 관련된 분자 생물학적 소견, 임상 소견 및 형태학적 변화를 접목한 분자 병리학적 분류 체계를 세우고자 하는 노력들이 있다.

형태학적으로 선종-암종(adenoma-carcinoma) 연계를 보이는 대장암은 암 발생의 분자 생물학적 기전을 이해하는 중요 모델로 연구되어 왔다. 역학적으로 서구에서 발생하는 대장암의 약 15%는 가족 내 유전적 발생 성향을 보인다.² 이 중 선종-암종 연계(adenoma-carcinoma sequence)를 보이는 가족성 용종증(Familial

접수: 2008년 11월 5일, 승인: 2008년 12월 4일
책임저자: 박선후, 139-706, 서울시 노원구 공릉동 215-4
한국원자력의학원 원자력병원 병리과
Tel: 02-970-1274, Fax: 02-970-2430
E-mail: sunhoo@kcch.re.kr

Received November 5, 2008, Accepted December 4, 2008
Correspondence to: Sunhoo Park, Department of Pathology, Korea Institute of Radiological and Medical Science, Korea Cancer Center Hospital, 215-4, Gongneung-dong, Nowon-gu, Seoul 139-706, Korea
Tel: +82-2-970-1274, Fax: +82-2-970-2430
E-mail: sunhoo@kcch.re.kr

Adenomatous Polyposis: FAP)과 유전성 비용종성 대장암(Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer: HNPCC)은 대표적인 유전적 결장직장암종이다. Herrera 등³이 5q 염색체의 소실을 보고한 이래 가족성 용종증과 유전성 비용종성 대장암의 유전적 변화에 대한 다양한 연구 결과가 보고되고 있으며, 두 질환을 기본 모델로 이에 상응하는 산발성 대장암(sporadic colorectal carcinoma)의 발생기전이 정립되고 있다. 본 고찰에서는 결장직장암의 대표적 발생기전인 i) 염색체 불안정성 Chromosomal Instability: CIN, ii) 현미부수체 불안정성 Microsatellite Instability: MSI, iii) CpG island 메틸화 표현형(CpG island methylator phenotype: CIMP)에 대해 살펴보고 연관된 병리학적 특성을 알아보려고 한다.

본 론

1) 염색체 불안정성 Chromosomal Instability: CIN

염색체 불안정성에 의한 발생 기전은 “microsatellite-stable pathway (MSS)” 또는 “APC / β -catenin pathway”로 불리며 문지기 유전자(Gatekeeper gene)인 APC (adenomatous polyposis coli) 유전자 변이를 특징적으로 한다. 염색체 불안정성은 APC 유전자의 배선 돌연변이(germline mutation)에 의한 가족성 용종증 환자와 약 80%의 산발성 암종의 발생과 연관이 있는 것으로 보고되고 있다.² β -catenin 단백질은 다양한 유전자 전사(gene translation)에 관여하며, APC 단백질에 의해 불활성화된다. 대장암에서 APC 유전자 변이는 대부분 APC 단백질의 절단(truncation)에 의한 불활성화를 초래하며, 세포질로부터 핵 내로 β -catenin 축적을 유도하여 세포

증식능을 증가시킨다. 초기 APC 유전자 변이에 의한 점막 이형성(aberrant crypt foci)의 발생 이후 유발된 *K-ras*, *p53*, *DCC*, *SMAD2*, *SMAD4* 등의 종양 유전자의 활성화 및 종양 억제 유전자의 불활성화가 선종 및 암종으로의 진행과 연관된 것으로 설명하고 있다(Fig. 1).¹ 임상적으로 이러한 발생 기전의 종양은 좌측 결장 및 직장 에 호발하며, 분자 병리학적으로 홀배수체(Aneuploidy) 및 염색체 1p, 2p, 3p, 5q, 17p, 18q의 이형접합성 소실(loss of heterozygosity: LOH)이 나타난다. CIN의 발생 기전은 분명히 알려져 있지는 않으나 *p53*, APC 유전자 변이가 비정상적인 세포 분열을 유도한다는 보고가 있다.⁴

2) 현미부수체 불안정성 Microsatellite Instability: MSI

현미부수체 불안정성(MSI)은 유전성 비용종성 환자에서 특징적으로 나타난다. 1966년, Henry Lynch는 용종증을 동반하지 않는 가족성 대장암 증후군에 대해 기술하였다.⁵ Lynch syndrome으로도 명명되는 유전성 비용종성 대장암은 전체 대장암의 약 1~6%에서 나타나며, 임상적으로 위암, 소장 종양, 신장암, 및 자궁내막암 등과 동반되기도 한다. 1990년대 초 Thibodeau 등은 본 종양에서 광범위한 현미부수체 불안정성(Microsatellite instability-high: MSI-H)이 나타나며, 이는 염색체 불일치 복구 유전자(mismatch repair genes: MMR gene)의 배선 돌연변이(germline mutation)에 기인함을 보고하고 있다.⁶⁻⁸ 유전자 불일치 복구단백은 유전자 복제 과정에서 발생하는 염기서열 오류를 인지하고 복구시키는 역할을 하며, 최소 다섯 종류(hMLH1,

Fig. 1. Schematic view of the morphologic and the molecular changes in the adenoma-carcinoma sequence showing CIN. The loss of one normal copy of the tumor suppressor gatekeeper gene APC is postulated to occur early. The loss of a normal copy of the APC gene follows. Mutations of the oncogene K-RAS seem to occur next. Additional mutations or losses of heterozygosity inactivate the tumor suppressor gene p53 (chromosome 17p) and DCC (Chromosome 18q), leading finally to the emergence of a carcinoma, in which additional mutations occur. CIN = chromosomal instability; APC = adenomatous polyposis coli; DCC = deleted in colorectal cancer; LOH = loss of heterozygosity; and TSG = tumor suppressor gene.

Fig. 2. Microsatellite analysis and immunostaining of hMLH1 in a MSI-H colorectal carcinoma. (A) All markers show microsatellite instability (arrow). (B) A high-power view of the immunohistochemical staining showed loss of hMLH1 protein expression in the area of the adenocarcinoma (arrow, $\times 400$).

hMSH2, hMSH6, hPMS1, hPMS2) 이상이 알려져 있다.⁹⁻¹¹ 염기서열 복제가 비정상적으로 일어날 경우 hMSH2/hMSH6와 hMSH2/hMSH3 단백질복합체는 복제 오류를 인지, 복제 부위에 결합하여 hMLH1, hPMS2의 유전자 제거를 유도한다. DNA 복제 오류는 짧은 염기서열이 반복되는 핵산 반복체(nucleotide repeats)나 현미부수체(microsatellite)에서 빈번히 발생하며, 이때 종양 조직의 현미부수체는 정상 조직에 비해 길이가 길어지거나 짧아지는 소견을 보인다(Fig. 2). 현미부수체의 대부분은 인트론(intron) 내에 있으나, 최근 다양한 종양 관련 유전자들이 암호화 영역(coding sequence) 내 현미부수체를 포함하고 있어 이들 특정 유전자의 불활성화 및 변이가 종양의 진행과 연관성이 있을 것으로 생각되고 있다.¹² 이들 “target” 유전자 중 *transforming growth factor- β receptor II* (*TGF β RII*) 종양 억제 유전자는 전체 MSI-H 종양의 약 75~90%에서 발견되고 있다. *TGF β RII* 이외에도 *insulin-like growth factor 2 receptor* (*IGF2R*), *BAX* (*Bcl associated X-protein*), *Caspase 5*, *MSH3*, *MSH6*, *APC*와 *β -catenin* 유전자 내의 현미부수체 불안정성에 의한 유전자 변이가 보고되고 있다(Table 1).¹³⁻²⁰ 현재 현미부수체 불안정성의 판정을 위해서는 다섯 개의 microsatellite marker (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250)²¹가 사용되고 있으며, 이 중 둘 이상의 표지자에서 불안정성이 보이면 MSI-H (high), 하나에서만 불안정성이 보이거나 없는 경우 MSI-L (low), MSS (microsatellite-stable)로 분류한다.

HNPCC 암종의 경우 LOH나 DNA-Aneuploidy 등의 염색체 변화가 없으며, 결장 근위부에 호발한다. 조직

Table 1. Summary of incidence of target gene mutation in microsatellite instability

Target gene	Incidence of in MSI colorectal cancer, %	References
<i>TGF βRII</i>	75~90	19, 20
<i>APC</i>	70	17
<i>E2F4</i>	65	18
<i>BAX</i>	41~52	13, 20
<i>Caspase5</i>	62	20
<i>β-catenin</i>	16~25	15, 18
<i>IGF2R</i>	6~8	13, 14

TGF β RII = transforming growth factor- β receptor II; *APC* = adenomatous polyposis coli; *E2F4* = E2F transcription factor 4; *IGF2R* = insulin-like growth factor 2 receptor.

학적으로는 다수의 림프구 침윤을 동반한 점액양의 저분화 암종의 소견을 보이며, 동일병기에서 CIN 암종에 비해 예후가 좋은 것으로 알려져 있다.^{8,7}

3) CpG Island Methylator Phenotype: CIMP

Liu 등이 산발성 암종에서 현미부수체 불안정성이 나타남을 보고한 이래,²² 산발성 대장암의 약 10%에서 현미부수체 불안정성과 연관됨이 알려졌다. 비용종성 대장암과 달리 이들 종양에서 *hMLH1*, *hMSH2* 유전자 변이는 매우 드물다.²³⁻²⁵ 최근 들어 다수의 논문들은 DNA 메틸화: DNA methylation와 히스톤 아세틸화: histone acetylation 등에 의한 유전자의 후생학적 변화를 CIN과 MSI 등 전통적인 유전자 변이를 동반한 암 발생기전에 이은 “세 번째 기전”으로 보고하고 있다.²⁴⁻²⁷

메틸화(Methylation)란 핵 염기체에 methyl 기(CH_3)

Fig. 3. Histological findings of a serrated adenocarcinoma. (A) Low-power view of a serrated adenocarcinoma showing a saw-tooth appearance (arrow, H&E, $\times 100$). (B) A deeper area of the tumor shows abundant mucin production with lymphocytic infiltration in the area of the carcinoma (arrow, H&E, $\times 200$).

를 붙여주는 생화학적 반응을 일컬으며,²⁸ DNA 메틸화는 guanosine이나 phosphoguanosine 앞에 위치하는 cytosine (CG 또는 CpG dinucleotide)에 일어난다. “CpG islands”란 다수의 CpG 염기 서열을 포함한 0.3-2 kb의 짧은 DNA 분절을 칭하며, 유전자 촉진자(Promoter)의 50~60%에서 발견된다. 생물학적으로 DNA 메틸화는 개체의 발생과정 초기에 나타나며 촉진자 내 CpG islands의 과메틸화는 유전자 전사를 억제(“gene silencing”) 유전자 발현을 억제한다.²⁹⁻³¹ 정상조직에서 대부분의 CG 서열 및 70% 이상의 CpG 서열이 메틸화되어 있는 것과는 대조적으로 대부분의 “CpG islands”는 비메틸화 상태를 유지한다.

Toyota와 Issa는 CpG islands의 과메틸화가 나타나는 유전자가 정상 조직의 노화과정과 종양형성 과정에서 각기 다른 양상을 보여준다고 보고하였는데 이를 각각 Type A (age-related)와 Type C (Cancer-related) 메틸화로 분류하고 있다.³² *IGF2* 유전자 등 Type A에 분류된 유전자는 세포의 성장 및 분화와 연관된 유전자가 다수이며 주변 정상 조직 및 종양 세포 모두에서 나타난다. 반면, Type C는 암종에서 특징적으로 나타나며 주변 점막조직에서는 정상 소견을 보인다. *p16*, *p14*, *APC*, *MGMT* (*O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase)와 *hMLH1* 등의 종양억제 유전자가 Type C 유전자의 대표적 예이며, 촉진자의 과메틸화로 인한 종양 억제 단백질 발현 감소를 주 암 발생 기전으로 해석하고 있다.^{26,33,34} MSI와 달리 CIMP 분석 유전자는 연구에 따라 다소 차이를 보인다. 초기 CIMP 여부는 Toyota의 Type C 유전자(*p16*, *p14*, *APC*, *MGMT*, *hMLH1*)의 메틸화로 판별하였으나, 다양한 유전자에서의 메틸화가 발

견됨에 따라 새로운 유전자 panel을 제시하는 연구들도 있다.^{35,36} Samowitz 등은 *p16*, *MINT* (methylated in tumor)1, *MINT2*, *MINT3*, *hMLH1* 5개의 표지자를 사용, 총 864예 선암종의 CIMP 및 MSI 분석을 시행하여 특징에 따른 임상 소견 및 *K-RAS*, *p53*, *BRAF600E* 유전자와 관련성을 살펴보았다.³⁷ 다섯 개의 표지자 중 2개 이상에서 메틸화가 나타난 경우(CIMP-high), *BRAF600E*의 변이가 의미 있게 증가하고 *KRAS* 및 *p53*은 정상이었으며, 임상적으로 근위부 결장에 호발하며 조직학적으로 거치상 선암종(Serrated adenocarcinoma) 또는 점액성 암종의 형태로 나타났다(Fig. 3). 이런 경향은 CIM-low/MSS 암종에 비해 CIM-high/MSI 암종에서 두드러지게 나타났다. 반면 CIMP-low에서는 *KRAS* 변이가 증가하는 소견을 보여 두 군이 다른 분자 생물학적, 병리학적 소견을 보인다. 거치상 선암종(Serrated adenocarcinoma)은 Jass와 Smith에 의해 처음 기술되었다.³⁸ 형태학적으로 종양세포의 톱니 모양의 증식 및 과다한 점액 생성을 특징으로 하며, 거치상 선종(Serrated adenoma) 또는 과증식 선종(hyperplastic polyp)이 전구 병변으로 알려져 있다.³⁹⁻⁴³ O'Brien 등³⁹은 분자생물학적 분석을 통해 *BRAF* 변이가 과증식성 용종, 거치상 선종, 거치상 선암종에서의 각각 76.3%, 82.8%, 81.8% CIMP-High가 47.4%, 79.3%, 90% 나타남을 보고하며 초기 *BRAF* 변이 - 유전자 메틸화 - MSI high 암종으로 진행되는 sessile serrated pathway를 CIMP-high 암종의 기전으로 제시하고 있다(Fig. 4, 5). Sessile serrated pathway에서 *hMLH1* 유전자의 methylation이 특징적으로 보이며 이에 의한 유전자 복구 기능의 상실은 현미부수체 불안정성 유발이 기전으로 받아들여

Fig. 4. Schematic view of a sessile serrated pathway (CIMP-high). BRAF mutation initiates a histological change in an early lesion, CpG island methylation is accumulated with a more advanced histological stage, and MSI-h occurs in the carcinoma.

Fig. 5. Schematic view of the sessile and the traditional serrated pathways. HP = hyperplastic polyp; MSI-H/L = microsatellite instability-high/low; and MSS = microsatellite stable.

지고 있다. 그러나 CIMP-low 암종에서는 현미부수체 불안정성 없거나 낮은 것으로 보고되고 있으며, 임상 병리학적으로 선종-암종 연계 기전을 따르는 CIN-instable 경로 중양의 특성을 보인다. Makinen은 CIMP-low 암종에서 특징적으로 *KRAS* 변이 및 *MGMT* 메틸화가 보임을 제시하며 이를 sessile serrated pathway와 분류하여 Traditional serrated pathway로 분류하고 있다(Fig. 5).⁴¹

4) Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features

이제까지 대장암 발생기전을 간단히 정리하였다. 요약하면 대장암은 아래 3가지 기전의 상호 작용에 의한 유전적, 후생학적 변화에 의함을 알 수 있다(Fig. 6).

1. Chromosomal instability status: CIN(-), CIN(+)

2. Microsatellite instability: MSI-high, MSI-low, Microsatellite-stable

3. CpG island methylator phenotype: CIMP-negative, CIMP-low, CIMP-high

최근 Jass⁴⁴는 암종의 임상-병리학적 소견과 연관된 중양의 분자생물학적 변이를 다섯 가지 그룹으로 분류하고 있다(Table 2, 3).

1. CIMP-high, methylation of *MLH1*, *BRAF* mutation, chromosomally stable, MSI-H, origin in sessile serrated polyp, known generally as sporadic MSI-H (12%)

2. CIMP-high, partial methylation of *MLH1*, *BRAF* mutation, chromosomally stable, MSS/MSI-L, origin in sessile serrated polyp (8%)

3. CIMP-low, methylation of *MGMT*, *KRAS* mutation, chromosomally unstable, MSS/MSI-L, origin in ad-

Fig. 6. Schematic view of the genetic and the epigenetic pathways in sporadic colorectal cancer. Accumulation of the epigenetic pathway leads to CpG island methylator phenotype-high/ MSI-H.

Table 2. Molecular characteristics based on Jass classification⁴⁴

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
%	12	8	20	57	3
CIN	Stable	Stable	Instable	Instable	Stable
MSI	MSI-H	MSS/MSI-L	MSS/MSI-L	MSS	MSI-H
CIMP	CIMP-H	CIMP-H	CIMP-L	CIMP-neg	CIMP-neg
Ploidy	Diploidy	Diploidy	Aneuploidy	Aneuploidy	Diploidy
Mutation	<i>BRAF</i>	<i>BRAF</i>	<i>KRAS</i>	<i>APC/p53</i>	MMR genes
Methylation	<i>hMLH1</i>	Partly <i>MLH1</i>	<i>MGMT</i>	-	-

CIN = chromosomal instability; MSS = microsatellite stable; MSI-H/-L = microsatellite instability-high/ -low; CIMP-H/-L/-neg = CpG island methylator phenotype- high/ -low/-negative; MMR genes = mismatch repair genes.

Table 3. Clinical and morphologic features of colorectal cancer based on Jass classification⁴⁴

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
Location	Right	Right	Left	Left	Right
Gender	Female	Female	Male	Male	Male
Precursor	SSA	SSA	SP/AD	AD	
Serration	+++	+++	+	+/-	+/-
Mucinous	+++	+++	+	+	++
Necrosis	+	+		+++	+
Differentiation	Poor	Poor	Well/moderate	Well/moderate	Poor
Circumscribed	+++	+		++	++
Tumor budding	+/-	+		+++	+
Lymphocyte	+++	+		+	+++

SSA = sessile serrated adenoma; SP = serrated polyp; AD = adenoma.

enoma or serrated polyp (20%)

4. CIMP-negative, chromosomally instable, mainly MSS, origin in adenoma (57%)
5. CIMP-negative, chromosomally stable, *BRAF* mutation negative, MSI-H, origin in adenoma: HNPCC (3%)

Group 5는 유전성 비용종성 대장암에 해당된다. 이

미 언급한 바와 같이 우측 결장에 호발하며, 형태학적으로 분화가 나쁜 암종 또는 점액성 암종 소견을 보이고 종양 내 림프관 침윤이 다수 관찰된다. *K-ras* 및 *P53* 유전자 변이가 보일 수도 있으나, *hMLH1*, *hMSH2* 유전자의 배선 돌연변이(germline mutation)가 주기전이다. Jass는 Chromosomal instability를 보이는 80%의 대장암을 CIMP 동반 여부에 따라 Group 3 및 4로 분류

하고 있다. Group 4는 전체 암종의 약 57%에 해당하며 선종 - 암종 진행을 보이는 전통적 개념의 산발성 대장암 발생 이전에 부합된다. Chromosomal instability를 보이나 CIMP-low가 동반된 경우 Group 3으로 분류하였다. 분자생물학적으로 *MGMT* 유전자 메틸화와 *KRAS* 변이가 보이며, 거치상 용종(serrated polyp)이 전구 병변이다. 좌측 결장에 호발하며 남성에서 다발하는 점은 Group 4와 유사한 소견을 보이나, 조직학적으로 CIMP-high 암종의 특성을 일부 보이기도 한다. CIMP-high, chromosomally stable일 경우 MSI 여부에 따라 Group 1과 2로 분류하였으며, Group1의 경우 상대적으로 여성에 호발하며, *BRAF* 유전자 변이가 특징적이거나 이외의 *hMLH1* 변이, 임상 소견, 예후 및 조직학적 소견은 HNPCC와 동일하여, 유전성 암종에 상응하는 산발암종으로 생각된다. Group 2는 임상적으로 Group 1과 유사하나, *K-ras* 변이가 동반되기도 한다(Table 2, 3).

결론

이상에서 간략히 대장암의 분자 병리학적 분류와 조직 소견의 차이를 알아보았다. 과거 20여 년 동안 단순히 형태학적 분류를 넘어서, 종양의 발생 이전에 근거한 분자 생물학적 분류를 하고자 하는 노력이 지속되어 왔다. 이는 단순한 학문적 차원을 넘어 유전적 변이에 따른 종양의 진행 단계를 이해하여 향후 환자의 예후 예측 및 치료방침 결정의 지침을 만들고자 함이다. 이에 형태학적, 분자생물학적으로 유용한 조기진단 인자의 개발에 목표를 두고 있다. 많은 논문들이 분자 생물학적 이전에 근거하여 다양한 분자 생물학적 표지자를 제시하고 있으나, 획일적 적용은 시기상조인 것으로 판단된다. Vogelstein 이래 Jass에 이르기까지 대장암의 발생기전 및 이에 따른 임상 병리학적 소견은 세분화되고 있다. 앞으로 이 결과들을 기초로 한 지속적 연구 및 임상 결과의 축적이 필요할 것이다.

REFERENCES

1. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525-32.
2. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87:159-70.
3. Herrera L, Kakati S, Gibas L, Pietrzak E, Sandberg AA.

- Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q. *Am J Med Genet* 1986;25:473-6.
4. Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, et al. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 1998;392:300-3.
5. Lynch HT, Schuelke GS, Lynch JF. Genetics of rectal cancer. *Bull Cancer* 1984;71:1-15.
6. 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.
7. 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.
8. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-9.
9. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994;263:1625-9.
10. Perucho M. Microsatellite instability: the mutator that mutates the other mutator. *Nat Med* 1996;2:630-1.
11. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;75:1027-38.
12. Duval A, Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res* 2002;62:2447-54.
13. Ouyang H, Furukawa T, Abe T, Kato Y, Horii A. The BAX gene, the promoter of apoptosis, is mutated in genetically unstable cancers of the colorectum, stomach, and endometrium. *Clin Cancer Res* 1998;4:1071-4.
14. Ouyang H, Shiwaku HO, Hagiwara H, Miura K, Abe T, Kato Y, et al. The insulin-like growth factor II receptor gene is mutated in genetically unstable cancers of the endometrium, stomach, and colorectum. *Cancer Res* 1997;57:1851-4.
15. Mirabelli-Primdahl L, Gryfe R, Kim H, Millar A, Luceri C, Dale D, et al. Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. *Cancer Res* 1999;59:3346-51.
16. Ikeda M, Orimo H, Moriyama H, Nakajima E, Matsubara N, Mibu R, et al. Close correlation between mutations of E2F4 and hMSH3 genes in colorectal cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 1998;58:594-8.
17. Huang J, Papadopoulos N, McKinley AJ, Farrington SM, Curtis LJ, Wyllie AH, et al. APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9049-54.

18. Kitaeva MN, Grogan L, Williams JP, Dimond E, Nakahara K, Hausner P, et al. Mutations in beta-catenin are uncommon in colorectal cancer occurring in occasional replication error-positive tumors. *Cancer Res* 1997;57:4478-81.
19. Percesepe A, Kristo P, Aaltonen LA, Ponz de Leon M, de la Chapelle A, Peltomaki P. Mismatch repair genes and mononucleotide tracts as mutation targets in colorectal tumors with different degrees of microsatellite instability. *Oncogene* 1998;17:157-63.
20. Schwartz S Jr, Yamamoto H, Navarro M, Maestro M, Reventos J, Perucho M. Frameshift mutations at mononucleotide repeats in caspase-5 and other target genes in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res* 1999;59:2995-3002.
21. 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.
22. Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, Willson JK, Parsons RE, Jen J, et al. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet* 1995;9:48-55.
23. Hawkins N, Norrie M, Cheong K, Mokany E, Ku SL, Meagher A, et al. CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. *Gastroenterology* 2002;122:1376-87.
24. Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:988-93.
25. Issa JP. The epigenetics of colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2000;910:140,53; discussion 153-5.
26. Shen L, Issa JP. Epigenetics in colorectal cancer. *Curr Opin Gastroenterol* 2002;18:68-73.
27. Rashid A, Issa JP. CpG island methylation in gastroenterologic neoplasia: a maturing field. *Gastroenterology* 2004;127:1578-88.
28. Bird A. The essentials of DNA methylation. *Cell* 1992;70:5-8.
29. Brandeis M, Ariel M, Cedar H. Dynamics of DNA methylation during development. *Bioessays* 1993;15:709-13.
30. Brandeis M, Kafri T, Ariel M, Chaillet JR, McCarrey J, Razin A, et al. The ontogeny of allele-specific methylation associated with imprinted genes in the mouse. *EMBO J* 1993;12:3669-77.
31. Chan AO, Broadbudd RR, Houlihan PS, Issa JP, Hamilton SR, Rashid A. CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *Am J Pathol* 2002;160:1823-30.
32. Toyota M, Issa JJ. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol* 1999;9:349-57.
33. Shen L, Kondo Y, Rosner GL, Xiao L, Hernandez NS, Vilaythong J, et al. MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1330-8.
34. Toyota M, Issa JP. The role of DNA hypermethylation in human neoplasia. *Electrophoresis* 2000;21:329-33.
35. Ogino S, Brahmandam M, Kawasaki T, Kirkner GJ, Loda M, Fuchs CS. Epigenetic profiling of synchronous colorectal neoplasias by quantitative DNA methylation analysis. *Mod Pathol* 2006;19:1083-90.
36. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006;38:787-93.
37. Samowitz WS, Albertsen H, Herrick J, Levin TR, Sweeney C, Murtaugh MA, et al. Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* 2005;129:837-45.
38. Jass JR, Smith M. Sialic acid and epithelial differentiation in colorectal polyps and cancer--a morphological, mucin and lectin histochemical study. *Pathology* 1992;24:233-42.
39. O'Brien MJ, Yang S, Mack C, Xu H, Huang CS, Mulcahy E, et al. Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points. *Am J Surg Pathol* 2006;30:1491-501.
40. Kirchner T, Reu S. Development of molecular-pathologic entities of colorectal cancer. *Pathologe* 2008;29:264-9.
41. Makinen MJ. Colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology* 2007;50:131-50.
42. Tuppurainen K, Makinen JM, Junttila O, Liakka A, Kyllonen AP, Tuominen H, et al. Morphology and microsatellite instability in sporadic serrated and non-serrated colorectal cancer. *J Pathol* 2005;207:285-94.
43. Horkko TT, Makinen MJ. Colorectal proliferation and apoptosis in serrated versus conventional adenoma-carcinoma pathway: growth, progression and survival. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:1241-8.
44. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007;50:113-30.