

## 기관고유연구사업 결과보고서

(과제번호 :0510210-3)

연구과제명 (국문) 위암의 병리 진단 및 악성도 예측에 대한  
면역조직화학 염색 표지자의 활용

연구과제명 (영문) Application of immunohistochemical  
staining marker to pathologic diagnosis and risk  
prediction of gastric cancer

과제책임자 : 국 명철

국 립 암 셴 터

(뒷면)

(측면)

<div data-bbox="252 1088 1125 1653" style="border: 1px solid black; padding: 20px; margin: 20px auto; width: 80%;"> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구 사업 결과보고서입니다.</li> <li>2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다.</li> </ol> <p style="text-align: center;">(14 pont, 고딕체)</p> </div>	<p>↑ 5cm ↓</p> <p>과 제 명</p> <p>위 예 표 암 측 지 의 에 자 대 의 병 한 리 활 진 면 용 단 역 조 및 직 화 활 학 성 염 도 색</p> <p>국 립 암 센 터</p> <p>↑ 3cm ↓</p>
---	--

↑  
6cm  
↓

# 제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “위암의 병리 진단 및 악성도 예측에 대한 면역조직화학 염색 표지자의 활용” 과제의 결과보고서로 제출합니다.

2007. 12 .31

국 립 암 센 터

과 제 책 임 자 : 국 명철

# 목 차

## < 요약 문 >

(한글) -----	1
(영문) -----	3
1. 연구사업의 최종목표 -----	4
2. 연구사업의 내용 및 결과 -----	4
3. 연구결과 고찰 및 결론 -----	14
4. 연구성과 및 목표달성도 -----	15
5. 연구결과의 활용계획 -----	16
6. 참고문헌 -----	17
7. 첨부서류 : 없음	

## < 요약 문 >

연구분야(코드)	실용화연구	과제번호	0510210-1,2,3
과제명	위암의 병리 진단 및 악성도 예측에 대한 면역조직화학 염색 표지자의 활용		
연구기간/연구비 (천원)	합계	2005년 3월 1일 ~ 2007년 12월 31일	125,000
	1차년도	2005년 3월 1일 ~ 2005년 12월 31일	50,000
	2차년도	2006년 1월 1일 ~ 2006년 1월 31일	40,000
	3차년도	2007년 1월 1일 ~ 2007년 12월 31일	35,000
과제책임자	성명	국명철	주민등록번호
	전화번호	031-920-1745	전자우편
			mckook@ncc.re.kr
색인단어	국문	위암, 면역조직화학	
	영문	gastric cancer, immunohistochemistry	
<p><b>◆ 연구목표</b></p> <p>위암종과 관련된 물질들의 면역조직화학염색 발현양상을 위암 진단 및 악성도 예측에 활용하는 방안 마련.</p>			
<p><b>◆ 연구내용 및 방법</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 2006년 수술 또는 점막절제술로 절제된 위암 237 증례와 재생성상피병변 49 증례를 대상으로 각 증례의 대표적인 병변을 한 부위씩 선정하여 tissue array block 제작. (대표적 부분으로는 정상 점막, 점막병변, 침윤병변, 림프절전이병변, 원격전이병변 등을 각각 선정함.)</li> <li>- 위암종에서 암종발생 및 예후관련인자로 보고된 p53, Ki67, CD44, E-cadherin, c-erbB2, MLH1, MSH2, nm23, TFF-1, TFF-2, Fas, FasL, Pepsinogen I and II, MUC5AC, MUC6, HGM, CD10 에 대한 면역조직화학 염색 실시</li> <li>- intramucosal differentiated neoplastic lesion(adenoma, differentiated adenocarcinoma)와 regenerative lesion 그룹간에 각 물질의 발현양상을 비교분석</li> <li>- 암종을 조직학적 유형에 따라 differentiated adenocarcinoma와 undifferentiated adenocarcinoma로 분류하고 각각의 그룹내에서 침윤깊이에 따른 발현양상 비교분석 및 림프절전이여부에 따른 비교분석 실시함.</li> </ul>			

◆ 연구결과

- Regenerative lesion과 neoplastic lesion 간에 CD44s, Ki67, p53의 발현양상 차이를 관찰함.  
종양병변의 경우 점막의 surface layer와 layer1의 upper area에서도 강한 양성을 보이며 점막 전층에서 양성소견을 보이는 특성이 관찰됨.
  - 점막내종양과 점막하종양의 감별에 있어 MUC6, HGM, p53 면역염색의 유용성 관찰.  
Intramucosal differentiated neoplastic lesion에서 MUC6가 증가되어 있으며 submucosal undifferentiated carcinoma에서 HGM이 소실되고 p53 양성빈도가 증가되어있음.
  - 림프절전이그룹에서 TFF-1의 양성빈도가 증가되어있음.
- ; 결론 : Regenerative lesion과 neoplastic lesion 간의 감별진단에 CD44s, Ki67, p53의 면역염색이 도움이 됨. 점막내종양과 점막하종양의 감별에 있어 MUC6, HGM, p53 면역염색이 유용함.

◆ 연구성과

-정량적 성과

구분	달성치/목표치 <sup>1)</sup>	달성도(%)
SCI 논문 편수	10점	0
IF 합		
기타 성과		

1) 총연구기간내 목표 연구성과로 기 제출한 값

-정성적 성과

.

◆ 참여연구원  
(최종연도 참여인원)

성 명

국명철, 배정현

주민등록번호

※ 요약문의 총분량은 2page 이내로 제한함

## Project Summary

<b>Title of Project</b>	Application of immunohistochemical staining marker to pathologic diagnosis and risk prediction of gastric cancer
<b>Key Words</b>	immunohistochemistry, gastric cancer
<b>Project Leader</b>	Myeong-Cherl Kook
<b>Associated Company</b>	
<p>&lt;purpose&gt;            Examination and establishment of the differential immunohistochemical staining patterns between the normal, regenerative lesions and gastric neoplasms</p> <p>&lt;methods and results&gt;            - 237 cases of resected gastric adenocarcinomas or adenomas and 49 cases of regenerative lesions were examined and tissue microarray blocks were prepared. Immunohistochemical stain was done with antibodies for p53, Ki67, CD44, E-cadherin, c-erbB2, MLH1, MSH2, nm23, TFF-1, TFF-2, Fas, FasL, Pepsinogen I and II, MUC5AC, MUC6, HGM, CD10.            - There were the significant differences of CD44s, Ki67 and p53 expression between regenerative lesion and intramucosal differentiated neoplastic lesions. In neoplastic lesions, the markers were strong positive in the surface layer and upper part of 1st layer.            - The expression level of MUC6, HGM and p53 were significant in the prediction of the submucosal invasion. MUC6 was positive in the cases of differentiated intramucosal carcinoma and HGM was negative and p53 positivity was increased in the cases of undifferentiated submucosal carcinomas.            - The positivity of TFF-1 was increased in the nodal positive cases.</p> <p>&lt;Conclusion&gt;            - Immunohistochemical stains for CD44s, Ki67 and p53 were helpful for the differential diagnosis between regenerative lesions and differentiated intramucosal neoplastic lesions.            - Useful parameters for prediction of the submucosal invasion were MUC6, HGM and p53.</p>	

※ 연구사업의 목표, 연구방법, 연구성과를 영문으로 요약하여 2쪽이내의 분량으로 작성

## 1. 연구사업의 최종목표

위 암종과 관련된 물질들의 면역조직화학염색 발현양상을 위암 진단 및 악성도 예측에 활용하는 방안을 마련함.

- 고분화 암종의 특징적인 면역조직화학 표지자 선정.
- 전암성 병변 중 고위험군의 구별.
- 암종의 침윤성 및 전이 위험도 예측.

## 2. 연구사업의 내용 및 결과

### 1) 연구 배경 :

#### (1) 면역조직화학염색 표지자의 필요성 :

위암의 진단에 있어서 여러 분야에서 많은 발전이 있었으나 최종적으로 암을 진단하는 병리학 적 진단과정에서는 대부분 HE 염색슬라이드에 대한 형태학적 소견에 의존하고 있다. 이러한 형태학적 기준에 의한 진단이 현재까지 가장 확실하며 효율적인 진단방법이지만 최근 몇가지 한계에 부딪히고 있다. 특히 위암의 조기발견률이 증가함에 따라 전구병변에 대한 관심이 높아지고 있으나 일부 재생성 비정형성 상피(regenerative atypical epithelium) 또는 고증식성 화생상피(hyperproliferative metaplastic epithelium)의 경우 선종이나 고도의 고분화 암종과 감별이 어려운 경우가 있다. 또한 고등급 선종/이형성(high grade adenoma/dysplasia)과 암종의 구분에 있어서 침윤 여부가 확실히 관찰되지 않는 경우 병리의사들 간에 많은 진단 불일치를 보이고 있다.<sup>1,2,3</sup> 수술전 종양의 범위 예측 및 수술 방법 결정을 위해 내시경 및 방사선학적 검사를 시행하지만 실제 절제후 조직검사결과와 불일치 되는 경우가 흔히 존재하며 최근 내시경을 통한 위점막절제술이 도입되었으나 이 시술의 시행이 확대되기 위해서는 점막하 침윤 및 림프절 전이 여부를 정확히 판단 할 수 있는 기법이 요구되고 있다. 수술전 생검 조직에서는 형태학적 등급을 분류하여 이러한 악성도 예측에 기여하고 있으나 한계가 있는 실정이다. 이러한 형태학적 소견의 한계를 극복하기 위하여 병리 진단시 암종 발생 및 진행과 관련된 것으로 알려져 있는 물질들에 대한 발현양상 분석을 병행하여 전구병변의 판정, 진단의 정확도 향상 및 악성도 예측에 활용하고자 한다.

(2) 검색대상 물질 선정 : 암종 발생 및 진행과 관련성있는 tumor suppressor gene, proliferative marker, growth factor, adhesion molecule 등의 물질군에 대하여 위암종에서의 발현 양상에 대한 논문들이 발표되어있다. 이러한 물질 중 위암종에서 유의한 관련성이 있는 것으로 보고된 바 있는 물질들을 대상으로 선정하였다.

- Tumor suppressor genes : p53 alteration은 다양한 암종에서 관찰되는 대표적인 유전자 이상소견으로 위암의 경우 30-50%에서 mutation 또는 LOH가 관찰되고 있다.<sup>4,5</sup> p53 overexpression 소견은 고분화 암종의 감별진단에 사용되고 있으나 이러한 이상소견은 암종의 50% 내외에서만 관찰되며 고도 선종/이형성과 고분화 암종과의 감별에는 도움이 되지 않는다.<sup>6,7</sup>

- Proliferation marker : Ki-67은 proliferation cycle에 들어있는 세포핵에 나타나는 항원으로

정상상피의 경우 gastric glands 내의 일부 부위에 국한되어 나타나지만 종양의 경우 특정부위에 국한되지 않고 glands의 아래쪽에서부터 위쪽까지 전체적으로 분포하는 양상을 보여 감별에 도움을 주는 것으로 알려져 있다.<sup>6,7</sup> 그러나 정상조직이 아닌 재생성 상피의 경우에도 역시 Ki-67이 증가되는 병변으로 감별이 요구된다.

- Adhesion molecules : CD44는 세포간 유착에 작용하는 물질로 여러 종양에서 CD44의 전사변이체가 관찰되고 있으며 정상 위상피에서는 6v, 7v 형이 관찰되나 위암종에서는 모든 증례에서 정상과는 다른 5v, 9v, 10v등의 전사변이체가 발견되는 것으로 보고되어 있다.<sup>8,9,10,11</sup> E-cadherin은 세포간 유착에 관련된 물질로 diffuse type의 위암종의 약 50%에서 발현이 감소되어 있으며 특히 가족성 위암종의 일부에서 germ-line mutation이 보고되어 위암 가족력이 있는 경우 예방적 차원의 검사가 필요한 것으로 주장되고 있다.<sup>12,13</sup>

- Growth factors : c-erbB-2는 고분화 암종의 20%에서 증가되어 있으며 특히 간 전이와 밀접하게 관련되어 있는 것으로 보고되어 있다.<sup>14</sup>

- Mismatch repair gene : MLH1과 MSH2는 대표적인 mismatch repair gene으로 이 단백질의 발현감소가 다발성 종양과 관련된 것으로 알려져 있다.<sup>15,16</sup>

- 그 외 종양관련 유전자 : nm23 단백질의 발현감소는 여러 종양에서 전이능력의 증가와 연관된 것으로 알려져 있으며 위암종에서도 이러한 관련성이 보고되어 있다.<sup>17</sup> TFF-1은 위 상피와 장형화생에서도 발현되나 암종이 되면 발현이 감소하며 TFF-1 lacking mice에서 위 선종 및 점막내 암종이 발생하는 것이 보고되어 있다.<sup>18</sup> FasL의 발현이 위암종의 약 70%에서 증가된다.<sup>19</sup> Pepsinogen II는 정상 조직 및 저등급 선종에 비해 고등급 선종이나 암종에서 발현이 감소하며 일부 저등급 선종에서도 발현이 감소되어 있다.<sup>20</sup>

- 최근 기존의 조직소견에 따른 분류법외에 종양에서 생산하는 물질의 종류에 따른 분류법이 제기되고 있다. MUC5AC 또는 MUC6에 양성일 경우 gastric type, MUC2 또는 CD10에 양성일 경우 intestinal type으로 분류하며 이에 따른 종양발생 및 악성도의 차이에 대해 연구가 되고 있다.<sup>21,22,23</sup>

### (3) 증례선정 :

- 위암종에서 종양관련물질의 발현양상에 대한 많은 논문이 보고되어 있으나 실제 진단과정에서 감별진단의 대상이 되는 regenerative glands와 adenoma 및 differentiated adenocarcinoma에 대한 비교검색이 실시된 논문은 드물다. 따라서, 본 연구에서는 differentiated intramucosal neoplastic lesions과 regenerative lesions의 비교검색을 실시하여 감별진단에 사용할 수 있는 소견을 찾고자 하였다.

- 또한, 최근 내시경을 통한 위점막절제술이 도입되었으나 이 시술에 적합한 증례를 선별하기 위해서는 종양내 undifferentiated component의 존재 여부, submucosal invasion 및 nodal metastasis 여부를 정확히 판단 할 수 있는 기법이 요구되고 있다. 점막절제술의 대상이 되는 differentiated adenocarcinoma 증례를 intramucosal cases와 beyond submucosal invasion cases로 구분하여 두 그룹간의 차이를 비교하였다.

## 2. 연구수행방법

- (1) 증례 : 2005년에서 2006년 사이의 위절제술 또는 내시경점막절제술에 의한 절제 검체에서 종양 187 증례에 대하여 tissue array block 제작하였다. HE 염색 슬라이드를 검색하여 각 증례별로 normal mucosa, intestinal metaplasia, tumor 부위에서 core를 선정하였다. Submucosa 이상 침윤한 종양에서는 종양의 대표적인 조직학적 소견을 보이는 부위에서 intramucosal area와 deep invasive area에서 각각 core를 선정하였다. Nodal 또는 distant metastasis가 있는 증례에서는 각각의 부위에서 core를 선정하였다. 육안적으로 별개인 종양이 존재하는 경우 각각을 하나의 증례로 취급하여 각각 core를 취하였다. 원격전이기가 있어서 내시경생검만 시행한 경우 30예에서는 내시경생검 조직만을 취하였다. 종양의 총 증례는 237예이다. 각 종양증례의 임상병리학적 소견은 male 152, female 85로 male:female=6.4:3.6이었다. 평균 나이는 57세이다. Gastric cancer의 진단으로 위절제술을 받은 조직에서 regenerative lesion을 49예 선정하여 tissue array block을 제작하였다.
- (2) 병리학적 검색 : Adenocarcinoma의 조직학적 분류는 일본위암학회의 분류기준에 따라 differentiated type과 undifferentiated type으로 분류 하였다.<sup>24</sup> WHO분류기준<sup>25</sup>에 따르면 differentiated type에는 well or moderately differentiated tubular adenocarcinoma, papillary adenocarcinoma가 해당되며 undifferentiated type에는 signet ring cell carcinoma, poorly differentiated tubular adenocarcinoma가 해당된다. Vienna classification<sup>2</sup>의 V3, V4, V5.1에 해당하는 병변을 differentiated intramucosal neoplastic lesions으로 하였으며 이중 V5.1 intramucosal adenocarcinoma는 differentiated type 만을 포함시켰다.

[Sex]	
male : female	152:85 (1.78:1)
[Age]	57 ± 12.2
[Histologic type]	
Adenoma, (V3,V4)	34 (14.3%)
Differentiated adenocarcinoma	92 (38.8%)
Undifferentiated adenocarcinoma	111 (46.8%)
[Invasion depth]	
mucosa	102(49.3%)
submucosa	48 (23.2%)
more than muscle	57 (27.5%)

- (3) 사용항체 및 면역조직화학염색 : 파라핀 블록을 3um 두께로 절편하여 탈파라핀 및 함수과정을 거친 후 120℃에서 각 항체에 따라 15분 - 30분간 antigen retrieval 과정을 거쳤다.. 특이항체를 각 항체의 반응조건에 따라 32분 - 12시간 반응 시킨 후 이차항체, avidin-biotin complex, DAB 발색제 등을 반응 시킨 후 hematoxylin stain 하여 관찰하였다. 특이항체와

같은 종의 동물에서 얻어진 non-immunized sera를 negative control 로 사용하였다. 사용항체는 p53, Ki67, CD44s, CD44v3, CD44v5, CD44v6, E-cadherin, c-erbB2, MLH1, MSH2, nm23, TFF-1, TFF-2, Fas, FasL, Pepsinogen I and II, MUC2, MUC5AC, MUC6, CD10 등에 대한 항체를 사용하였다.

#### (4) 면역조직화학염색의 판독

점막내 위치에 따른 발현양상의 차이를 관찰하기 위해 점막층을 위내강표면에서 고유근층까지 3등분하여 가장 위쪽을 upper 1/3 layer(layer1,L1), 중간을 middle 1/3 layer(layer2,L2), 가장 아래쪽을 lower 1/3 layer(layer3,L3)로 구분하였고 각각의 layer에 대하여 염색정도를 판정하였다. 또한, layer1을 보다 세분하여 위내강에 접해있는 부분을 surface layer로 구분하였고 surface layer에서 layer1의 중간레벨까지를 1st upper layer로 구분하였다. 염색빈도는 염색된 세포가 1%미만인 경우 0, 10% 미만인 경우 1+, 10-50%인 경우 2+, 50%이상인 경우 3+로 판독하였으며 이 중 0과 1+는 negative, 2+와 3+는 positive 로 판정하였다. CD44s의 경우 염색강도를 별도로 판독하였는데 점막내 정상 림프구와 동일하거나 강한 정도를 strong positive, 보다 약한 정도를 weak positive로 하였다.

(5) 통계처리 : 각 그룹에 대한 변수의 비교를  $\chi^2$  test를 통하여 검증하였으며 P-value <0.05를 유의한 결과로 판정하였다.

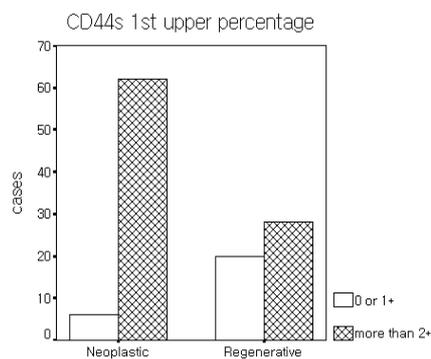
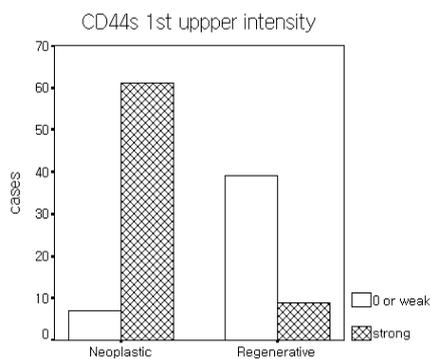
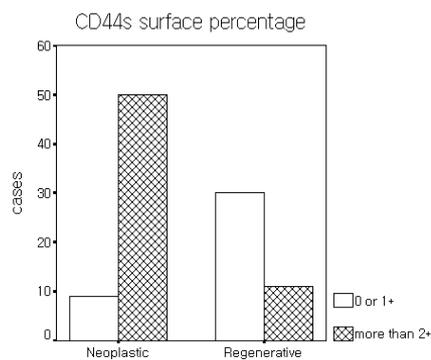
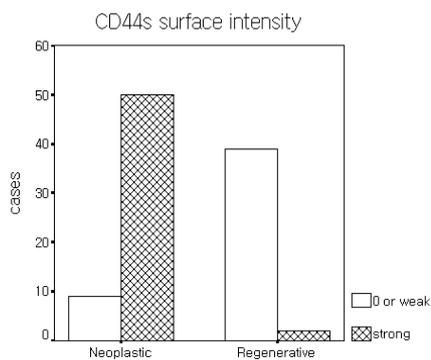
### 3. 연구수행 내용 및 결과

#### 1) Regenerative lesions과 differentiated intramucosal neoplastic lesions의 비교

CD44s, Ki67 및 p53 발현양상에 대해 두 그룹간에 유의한 차이가 관찰되었다.

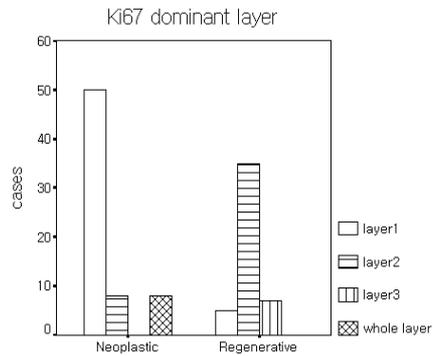
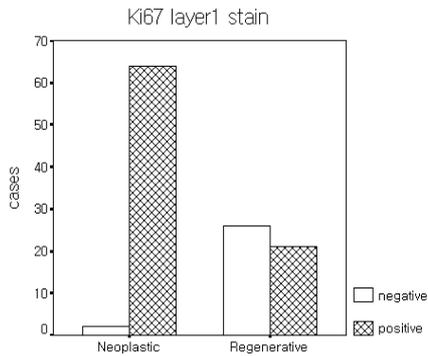
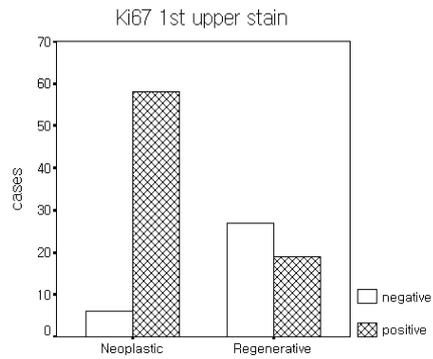
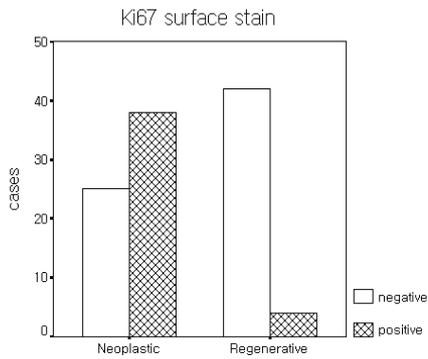
(1) CD44s expression : CD44s는 점막내 lymphocytes 전체에 강하게 발현되었다. 정상상피에서도 발현이 되는데 발현정도는 점막내 위치에 따라 차이가 있었다. Pyloric mucosa에서는 layer2와 layer3의 foveolar epithelial cell, mucous neck cell, glandular cell에는 대부분의 세포에 강한 염색소견을 보였으나 layer1에 위치한 foveolar epithelial cell에서는 대부분 발현이 되지않거나 약하게 염색되었다. 1st upper layer나 surface layer에 염색되는 경우는 극히 예외적이었다. Fundic mucosa에서도 layer1의 염색소견은 pyloric mucosa와 동일하였다. Layer2와 layer3에서는 대부분의 세포가 양성소견을 보이는 점은 pyloric mucosa와 동일하였으나 염색정도는 약하였는데 이는 fundic glands를 이루는 chief cell이 상대적으로 약한 염색정도를 보였기 때문이었다. 정상상피와는 달리 regenerative lesion과 neoplastic lesion에서는 layer1까지 강한 염색성을 보이는 세포들이 올라온 것을 볼 수 있었다. 그러나, 그 정도에 있어서는 두 병변에서 차이를 보였다. Layer1내에서 양성세포들의 비율은 양쪽 병변이 유의한 차이를 보이지 않았으나 양성세포들의 염색강도는 유의한 차이를 보여서 neoplastic lesion의 경우에는 대부분 증례에서 강한 양성을 보였으나 regenerative lesion에서는 약한 양성인 경우가 더 많았다. 이러한 차이는 surface에 가까워 질수록 보다 명확해졌다. 1st upper layer에서 염색강도를 비교하였을 경우 강한 양성을 보인 증례가 neoplastic lesion은 89.7%인데 비해 regenerative lesion의 경우는 18.8%였다. Surface layer에서의 결과는 더욱 명확한데 neoplastic lesion은 84.7%이나 regenerative lesion의 경우는 4.9%에 불과하였다. 따라서, neoplastic lesion과 regenerative lesion에서는 surface layer로 갈수록 염색양상에 차이를 보이며 특히 염색강도에 있어서 감별이 명확해짐을 관찰할 수 있었다.

CD44s staining grade		Intramucosal neoplasm lesions (N)	Regenerative lesions (R)
surface intensity (N:R P <0.001) $\lambda=0.732$	0 or weak strong	9 (15.3%) 50 (84.7%)	39 (95.1%) 2 (4.9%)
surface percentage (N:R P <0.001) $\lambda=0.512$	0 or 1+ more than 2+	9 (15.3%) 50 (84.7%)	30 (73.2%) 11 (26.8%)
1st upper intensity (N:R P <0.001) $\lambda=0.667$	0 or weak strong	7 (10.3%) 61 (89.7%)	39 (81.3%) 9 (18.8%)
1st upper percentage (N:R P <0.001) $\lambda=0.292$	0 or 1+ more than 2+	6 (8.8%) 62 (91.2%)	20 (41.7%) 28 (58.3%)
upper 1/3 intensity (N:R P <0.001) $\lambda=0.500$	0 or weak strong	6 (8.8%) 62 (91.2%)	30 (62.5%) 18 (37.5%)
upper 1/3 percentage (not significant)	0 or 1+ more than 2+	6 (8.8%) 62 (91.2%)	8 (16.7%) 40 (83.3%)
middle 1/3 intensity (not significant)	0 or weak strong	9 (13.2%) 59 (86.8%)	9 (18.4%) 40 (81.6%)
middle 1/3 percentage (not significant)	0 or 1+ more than 2+	6 (8.8%) 62 (91.2%)	2 (4.1%) 47 (95.9%)
lower 1/3 intensity (N:R P = 0.04)	0 or weak strong	13 (23.6%) 42 (76.4%)	4 (8.7%) 42 (91.3%)
lower 1/3 percentage (N:R P = 0.05)	0 or 1+ more than 2+	7 (12.7%) 48 (87.3%)	1 (2.2%) 45 (97.8%)



(2) Ki67 expression :

Ki67 staining pattern		Intramucosal neoplasm lesions (N)	Regenerative lesions (R)
surface involvement (N:R P <0.001) $\lambda=0.370$	negative	25 (39.7%)	42 (91.3%)
	positive	38 (60.3%)	4 (8.7%)
1st upper involvement (N:R P <0.001) $\lambda=0.457$	negative	6 (9.4%)	27 (58.7%)
	positive	58 (90.6%)	19 (41.3%)
upper 1/3 involvement (N:R P <0.001) $\lambda=0.511$	negative	2 (3.0%)	26 (55.3%)
	positive	64 (97.0%)	21 (44.7%)
middle 1/3 involvement (not significant)	negative	9 (13.8%)	3 (6.4%)
	positive	56 (86.2%)	44 (93.6%)
lower 1/3 involvement (N:R P = 0.03)	negative	22 (45.8%)	8 (22.9%)
	positive	26 (54.2%)	27 (77.1%)
dominant layer (N:R P <0.001) $\lambda=0.723$	layer 1	50 (75.8%)	5 (10.6%)
	layer 2	8 (12.1%)	35 (74.5%)
	layer 3	0 (0.0%)	7 (14.9%)
	whole layer	8 (12.1%)	0 (0.0%)

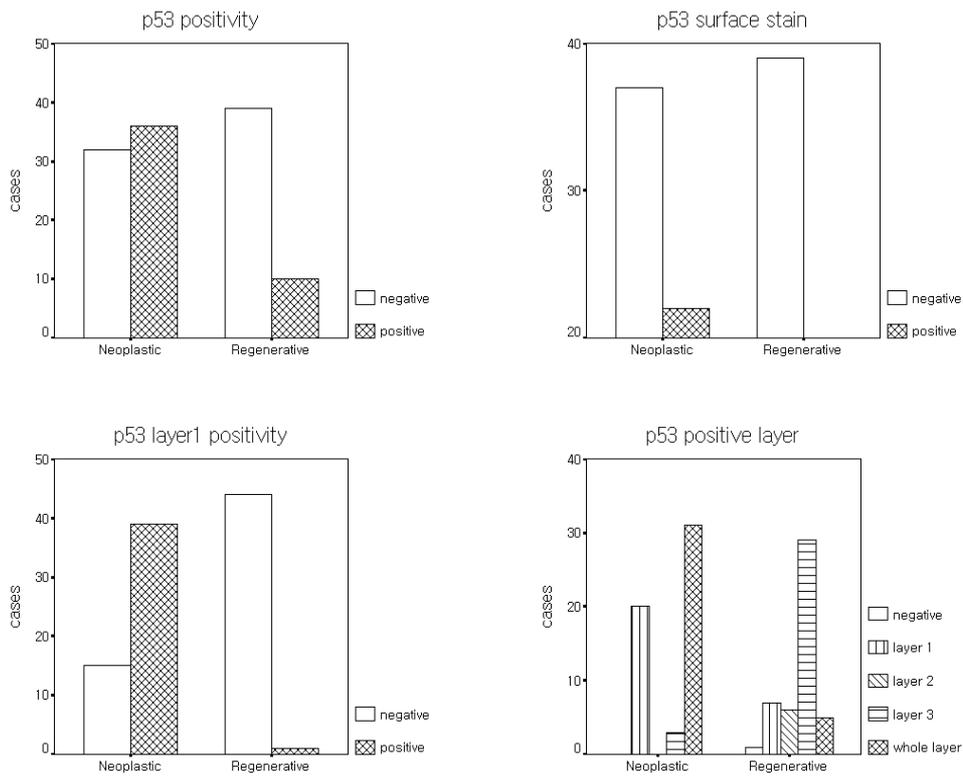


Ki67 positive cell은 정상 pyloric mucosa의 경우 주로 layer1과 2의 경계에 걸쳐서 또는 layer2에 밀집되어 관찰된다. Fundic mucosa에서도 마찬가지로 소견을 보이면서 pyloric mucosa보다는 보다 layer1쪽으로 보다 높게 올라가 있는 소견을 보인다. 정상과 비교하여 neoplastic lesion과 regenerative lesion에서 모두 layer1의 positivity가 증가하였다. 두 병변간의 비교에서는 CD44s에서와 유사하게 surface layer로 갈수록 positivity가 구별되는 소견을 보여서 surface layer, 1st upper layer, layer1 involvement 여부에서 유의한 차이를 보였다. Ki67 positive cell의 빈도가 가장 높은 dominant layer를 판정하였을 때 neoplastic lesion은 layer1에 positive cell들이 주로 모여 있거나 또는 전체에 걸쳐 동일한 정도를 보여 주는 데 비해 regenerative lesion은 layer2가 dominant layer인 경우가 높았다. 이러한 dominant layer의 판정은  $\lambda=0.610$ 으로 Ki67 staining pattern에서 유의하게 나타난 여러 소견중 가장 높은 수치를 보여주었다.

(3) p53 expression :

정상조직에서는 pyloric mucosa와 fundic mucosa 모두에서 소수의 p53 positive cell이 layer2에 존재하지만 전체 세포의 1% 미만으로 p53 positivity는 음성이다. Neoplastic lesion과 regenerative lesion 양 그룹에서 p53 positivity가 증가되었다. 두 그룹간에 발현정도와 발현부위에 따른 유의한 차이가 관찰되었으며 mucosa 내에서 upper layer로 갈수록 그 차이가 명확하였다. Neoplastic lesion의 경우 layer1에서 음성인 경우는 27.8%인데 반하여 regenerative lesion은 단 1층만을 제외하고 모두 음성이었다. Regenerative lesion은 surface layer에서는 모든 층이 음성이었다. 또한 Neoplastic lesion의 경우 positive cell들이 주로 layer1에 있거나 또는 점막전체에 균일하게 분포하는 양상이었으나 regenerative lesion의 경우에는 layer3에서 주로 관찰되었다.

p53 staining pattern		Intramucosal neoplasm lesions (N)	Regenerative lesions (R)
surface involvement (N:R P <0.001) $\lambda=0.050$	0 or 1+	37 (62.7%)	39 (100%)
	more than 2+	22 (37.3%)	0 (0.0%)
upper 1/3 involvement (N:R P <0.001) $\lambda=0.644$	0 or 1+	15 (27.8%)	44 (97.8%)
	more than 2+	44 (72.2%)	1 (2.2%)
middle 1/3 involvement (N:R P <0.001) $\lambda=0.447$	0 or 1+	18 (34.0%)	39 (83.0%)
	more than 2+	35 (66.0%)	8 (17.0%)
lower 1/3 involvement (N:R P = 0.01) $\lambda=0.294$	0 or 1+	17 (45.9%)	27 (79.4%)
	more than 2+	20 (54.1%)	7 (20.6%)
p 53 positivity (N:R P <0.01) $\lambda=0.143$	0 or 1+	32 (47.1%)	39 (79.6%)
	more than 2+	36 (52.9%)	10 (21.7%)
dominant positive layer (N:R P <0.001) $\lambda=0.688$	negative	0 (0.0%)	1 (2.1%)
	layer 1	20 (37.0%)	7 (14.6%)
	layer 2	0 (0.0%)	6 (12.5%)
	layer 3	3 (5.6%)	29 (60.4%)
	whole layer	31 (57.4%)	5 (10.4%)



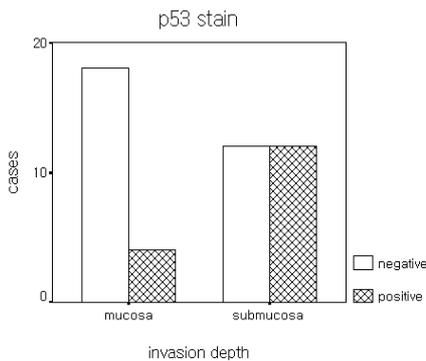
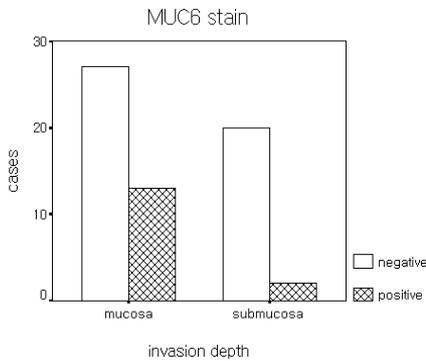
## 2) Invasion depth에 따른 비교

종양의 조직분화유형을 differentiated type과 undifferentiated type으로 나누어 관찰 하였을때 종양의 침윤정도와 일정한 유의성을 가지는 소견들이 일부 관찰되었다. Differentiated carcinoma 에서 mucosal cancer와 submucosal cancer 그룹간에 MUC6 염색에 차이를 보였다. Submucosal cancer에서는 대부분의 증례가 MUC6 negative 였다. Undifferentiated carcinoma 증례에서도 유사한 경향이 관찰되었으나 유의한 수준은 아니었다. Undifferentiated carcinoma에서는 mucosal cancer와 submucosal cancer 간에 HGM 염색과 p53 염색에서 차이를 보였다. Mucosal cancer의 증례가 모두 HGM positive 였다. Differentiated carcinoma 증례에서는 두 그룹간에 유의한 차이 없이 높은 염색 빈도를 보였다. p53은 mucosal cancer에 비해 submucosal cancer에서 발현이 증가 되었다.

Submucosal carcinoma와 proper muscle 이상 침윤한 증례간의 비교에 있어서는 CD10이 muscle invasion 그룹에서 증가되는 양상을 보였으나 유의한 수준은 아니었으며 그 외 물질에서는 특이한 소견을 보이지 않았다.

c-erbB2, MLH1, MSH2 등은 그룹간에 유의한 경향성을 보여주지 못했다. MLH1 및 MSH2의 발현이 소실된 증례는 각각 MLH1 7.6%, MSH2 2.7%에 불과하였다. 단, 두 물질에서 함께 결함을 보였던 3 증례는 모두 muscle layer 이상을 침윤하는 증례에 속하였다.

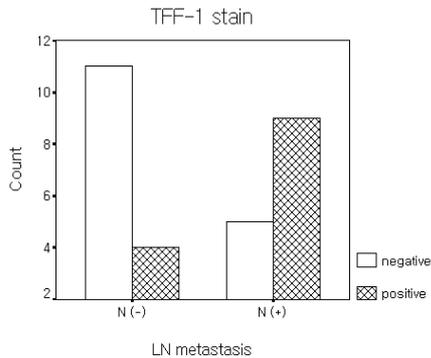
significant markers in T stage		T1a	T1b
MUC6 in Differentiated ca. (T1a:T1b P <0.05) $\lambda=0.000$	negative	27 (67.5%)	20 (90.9%)
	positive	13 (32.5%)	2 (9.1%)
HGM in Undifferentiated ca. (T1a:T1b P <0.01) $\lambda=0.222$	negative	0 (0.0%)	11 (61.1%)
	positive	9 (100.0%)	7 (38.9%)
p53 in Undifferentiated ca. (T1b:T2이상 P <0.05) $\lambda=0.273$	negative	18 (81.8%)	12 (50.0%)
	positive	4 (18.2%)	12 (50.0%)



### 3) LN metastasis 에 따른 비교

Mucosal cancer 중 림프절 전이가 있는 경우는 단 1층레이었으므로 mucosal cancer를 제외하고 submucosa 이상 침윤한 증례들에 대하여 림프절 전이의 여부에 따라 비교하였다. 역시 종양의 조직분화유형에 따라 두 그룹으로 나누어서 분석을 시행하였을 때, undifferentiated carcinoma 중 림프절 전이가 있는 그룹에서 TFF-1 양성의 빈도가 증가하는 소견이 관찰되었다. 그 외 물질은 유의한 차이를 보이지 않았다. Differentiated carcinoma 증례들에서는 유의한 차이를 보이는 물질이 없었다.

significant markers in LN metastasis		N-	N+
TFF-1 in Undifferentiated ca. (N-:N+ P <0.05) $\lambda=0.357$	negative	11 (73.3%)	5 (35.7%)
	positive	5 (26.7%)	9 (64.3%)



4) CD44 variants의 발현양상

CD44 variant중 3번, 5번, 6번 에 대하여 면역염색을 시행하였다. 3종류의 variants 모두 squamous epithelium의 basal layer에서 높게 발현되므로 esophagus mucosa를 positive control로 사용하였다. CD44v3은 정상 조직, regenerative glands, neoplastic lesion 모두에서 전혀 발현되지 않았다. CD44v6도 정상조직과 regenerative glands에서 전혀 발현되지 않았다. 종양조직에서는 모두 10 증례(4.7%)에서만 발현이 관찰되었으며 조직학적 유형이나 종양병기 등과 특별한 관련성이 관찰되지 않았다. CD44v5는 정상조직에서 pyloric mucosa의 neck 부위나 layer2의 foveolar epithelial cell, intestinal metaplasia에 약하게 염색이 되었다. Regenerative lesion에서는 43.9%에서 염색이 관찰되었는데 주로 layer2를 중심으로 epithelial cell에 염색이 되었다. Neoplastic lesion에서는 45.3%에서 양성이었으며 주로 layer1에서 양성세포들이 관찰되었다. 종양의 조직학적 분류에 따른 특별한 연관성이 없으며 다른 변수와도 유의한 상관관계가 관찰되지 않았다.

CD44v5 stain	Regenerative lesion	Adenoma	Differentiated adenocarcinoma	Undifferentiated adenocarcinoma
negative	23 (56.1%)	10 (52.6%)	38 (49.4%)	58 (59.2%)
positive	18 (43.9%)	9 (47.4%)	39 (50.3%)	40 (40.8%)

5) 기타 물질 발현양상 : Pepsinogen I은 종양에서 전혀 발현되지 않았으며 Pepsinogen II는 20%에서 발현이 되었으나 종양세포의 극히 일부에서만 관찰되었다. TFF-2는 pyloric glands와 mucus neck cells에 양성이며 종양에서는 모든 증례에서 음성이었다. 그러나, 장형화생이나 재생성상피에서도 역시 음성이어서 종양의 진단표지자로 사용하기에는 부적절 하였다. nm23, Fas, FasL 등은 종양과 비종양성 병변에서 특별한 차이점을 보이지 않았다.

### 3. 연구결과 고찰 및 결론

1) 정상조직, Regenerative lesions, intramucosal neoplasia의 병변들을 비교한 결과, CD44s, Ki67, p53의 발현정도와 발현부위에 차이가 있음을 관찰하였다. CD44는 대부분의 상피세포와 혈구세포에서 발현되는 표적인 cell adhesion molecule로 주로 세포외기질에 존재하는 hyaluronate가 ligand이며 림프구가 혈관내피세포에 부착하는 과정과 상피세포의 재생과정에서 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다.<sup>8</sup> Ki67은 증식성세포에서 발현이 증가되며 p53은 세포증식과정중 유전자 변이를 방지하는 역할을 하고 있으며 따라서 역시 증식세포에서 정상적으로 높게 발현될 수 있다. 종양의 발생에서 관찰되는 과발현 양상은 돌연변이에 의한 기능상실이 발생된 p53단백이 제거되지 못하고 과축적되는 상태로 나타나는 것으로 알려져 있다.<sup>4</sup> 이 물질들은 정상 pyloric mucosa에서는 점막의 중간부위인 layer2에, 정상 fundic gland에서는 layer1과 layer2의 경계에 걸쳐서 주로 발현되었는데 이는 이미 잘 알려진 정상적인 proliferative zone에 해당하는 부위이다.<sup>26</sup> 본 연구의 결과 regenerative lesions에서 proliferative zone이 정상보다 더 확장되어서 layer1과 layer3의 일부분까지 Ki67양성세포가 관찰되었으며 p53과 CD44s 양성세포의 확장도 동반되었다. 그럼에도 그 주된 양성부위는 layer2에 위치하고 layer1의 upper portion과 surface layer까지는 이러한 양성세포의 증가가 관찰되지 않았는데 이는 재생상피에서도 surface layer 쪽으로의 정상분화과정이 일어나기 때문일 것이다.<sup>1,2,27</sup> 그러나 Adenoma 또는 adenocarcinoma에서는 이와는 다르게 주로 layer1에 양성세포가 존재하며 layer1의 upper portion과 surface layer에도 양성소견을 보여서 정상적인 proliferative zone과 mature zone의 상실이 일어났음을 알 수 있었다. 한편, 점막하층부로 가면서 CD44s의 염색강도와 빈도가 감소하거나 p53의 양성세포가 주로 layer1에만 존재하는 소견들이 관찰되는 것은 아래쪽 방향으로의 maturation 양상을 보이는 것으로 생각할 수도 있다. 실제로 adenoma에서는 layer3에서 neoplastic cell들이 pyloric type glands로 transition 되는 소견이 관찰된다. Neoplastic lesions에서는 또 다른 특징으로 adenocarcinoma의 일부 증례에서는 점막의 전체 층에 걸쳐서 동일한 정도로 양성세포가 분포하는데 이는 neoplasm 자체적으로 가지고 있던 비정상적인 maturation마저 상실한 결과일 것으로 생각 해 볼 수 있다. 따라서, proliferative zone은 regenerative lesion이 되면서 정상위치에서 확장되고 neoplasm에서는 layer1으로 전환되며, maturation zone은 regenerative lesion에서 축소되지만 남아있다가 neoplasm이 되면서 역시 layer3로 전환되고 adenocarcinoma로 진행되면서 maturation의 일정한 방향이 상실되는 것으로 생각되며 이러한 소견은 regenerative lesion과 점막내 고분화 종양간의 감별에 활용될 수 있는 중요한 소견으로 판단된다.

2) 종양의 침윤도 및 림프절 전이와 관련된 병리학적 인자로 undifferentiated type과 lymphatic invasion이 잘 알려져 있다.<sup>25</sup> Tumor suppressor gene, trefoil factors, mucin phenotype, nm23, HER-2, Metalloproteinase 등 여러 물질에 대해 림프절전이 또는 환자예후와의 관련성이 있다는 보고들이 있다. 본 연구에서는 기존의 연구결과에서 알려진 물질들에 대하여 실제 진단과정상황에서와 유사하게 조직학적 유형에 따라 별도로 구분하여 각각에서 점막하침윤 및 림프절전이와 관련된 인자를 조사하였다.

다양한 mucin에 대한 면역조직화학염색의 발달로 최근 gastric adenocarcinoma를 gastric marker와 intestinal marker의 발현양상에 따라 분류하여 연구하는 논문들이 많이 보고되었다. 이러한 분류에서 gastric phenotype일때 림프절 전이가 높다는 보고가 있다.<sup>22,23</sup> 반면, 종양의 크기가

매우 작은 경우 gastric phenotype를 보이다가 종양이 진행하면서 intestinal marker가 발현된다는 보고도 있어서 이러한 분류법의 임상적 의미는 아직 불명확하다.<sup>28</sup> 본 연구 결과 mucosa 또는 submucosa까지 진행된 differentiated adenocarcinoma의 증례들에서 MUC6가 발현되는 증례의 86.7%는 mucosa에 국한된 cancer인 것이 관찰되었다. 또한, undifferentiated adenocarcinoma의 경우 HGM의 발현이 사라진 경우에는 항상 submucosal carcinoma 였다. MUC6와 HGM은 각각 정상 pyloric mucosa의 glandular cell과 foveolar epithelial cell에서 발현되는 물질로 gastric differentiation의 지표로 사용되는 물질이다. 이러한 물질들의 발현이 상실되는 것은 조직학적 소견상 같은 분화도에 해당하는 종양이더라도 보다 낮은 분화를 보이는 것으로 생각될 수 있으며 이런 경우에 종양이 더 진행된 단계에 있을 것으로 해석할 수 있을 것이다.<sup>29</sup> 내시경생검후 내시경절제술을 실시하는데 있어서 종양의 집막하침윤 여부와 림프절전이 여부가 시행여부를 결정하는 중요한 인자이다. 현재 병리학적인 판단기준은 종양의 분화도가 differentiated carcinoma인지 undifferentiated carcinoma인지를 판정하는 것이다.<sup>30</sup> 본 연구 결과는 내시경 생검을 통해 조직유형을 확인한 상황에서 이러한 집막하침윤 및 림프절 전이를 예측하고자 할 때, 이러한 종양의 분화도에 추가하여 보다 세부적인 판단기준으로 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

Trefoil peptides는 mucin을 분비하는 위장관세포에서 주로 관찰되는 secretory peptides로 집막층을 형성하여 위상피세포를 보호하는 것으로 알려져 있다.<sup>18</sup> TFF-1은 정상 위점막의 foveolar epithelial cells에서 TFF-2는 pyloric glands에서 각각 발현된다. 종양세포에서 TFF-2의 발현이 높은 T, N 병기와 관련있으며<sup>31</sup> TFF-1은 tumor suppressor gene의 효과가 있어 cell cycle을 억제하며 knockout mice에서 multiple gastric neoplasms이 발생하였다는 보고가 있다.<sup>18</sup> 본 연구에서 undifferentiated adenocarcinoma에서 TFF-1의 발현이 nodal metastasis 증가와 관련성이 있는 것으로 관찰되었다. 아직까지 TFF-1과 종양의 악성도와 관련된 보고는 없으며 비록 본 연구에서 발현된 증례가 적기는 하나 관심을 가지고 연구해야할 부분이라고 생각된다.

3) 종양에서 CD44s의 발현이 증가되는 현상이 관찰됨에 따라 CD44 variants의 발현을 살펴보고자 하였다. CD44 variants는 alternative splicing에 의해 나타나며 여러 종류의 종양에서 invasiveness와 nodal metastasis와 관련되어 보고되어 있다.<sup>8,9</sup> Gastric cancer에서는 CD44 variant 6이 nodal metastasis 증가와 관련성이 있다는 보고가 있는데<sup>10,11</sup> 본 연구에서는 variant 6은 종양과 정상조직 모두에서 발현되지 않았으며 variant 5는 많은 종양에서 발현이 되나 adenoma와 adenocarcinoma 간에 유사하게 발현되며 tumor progression에도 유의한 관련성이 없는 것으로 관찰되어서 다른 연구 보고들과 일치하지 않는 점이였다.

## 4. 연구성과 및 목표달성도

### (1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청 : 논문 작성 중

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

다. 산업재산권 : 해당 사항 없음

라. 저 서 : 해당 사항 없음

마. 연구성과의 정부정책 기여 : 해당 사항 없음

바. 기타연구성과

## (2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
위암 진단 및 악성도 예측에 활용 할 수 있는 면역조직 화학 표지자 선정	1차년도	고분화 암종의 특징적인 면역조직화학 표지자 선정	절제된 점막내 고분화암종과 정상 조직에 대한 검색 실시.	100	100
	2차년도	암종의 침윤성 및 전이 위험도와의 상관성 분석.	점막내병변과 점막하,근층이상 침윤 증례에 대한 검색 실시.	100	100
	3차년도	CD44 variants에 대한 발현양상 검색 중양과 재생성 상피 병변의 비교	variant 3,5,6번에 대한 검색 실시. 고분화암종과 재생성상피에 대한 검색 실시.	100	100

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
위암 절제 증례 검색하여 Tissue array block 제작.	209증례에 대하여 제작.
면역조직화학염색 실시.	21종의 항체에 대하여 염색실시.
각 군간 표지자 발현양상의 상관성 관찰.	염색소견판독 및 분석실시.

## 5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	2	게재 예상 전문학술지명, SCI급 학술지인 경우 Impact Factor 기록
산업재산권 등록		특허 등록 예상 국가, 예상 특허명 등
기 타		

## (2) 연구성과의 활용계획

- 재생성상피와 점막내 고분화종양병변간에 관찰된 유의한 차이점에 대하여 진단 과정중 활용가능한지 여부를 판정하기 위해 전향적 연구가 필요함.
- 점막내 암종과 점막하 침윤 암종의 구별소견이 내시경 생검조직의 판독시에도 가능할 것인지 추가적인 연구 필요함.

## 6. 참고문헌

1. Rugge M et al. Gastric dysplasia. The Padova International classification. Am J Surg Pathol 2000;24(2):167-176.
2. Schlemper RJ et al. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. Gut 2000;47:251-255.
3. Sugai T et al. Analysis of mucin, p53 protein and Ki-67 expressions in gastric differentiated-type intramucosal neoplastic lesions obtained from endoscopic mucosal resection samples. Pathol Int 2004;54:425-435.
4. TP53 and gastric carcinoma. A review. Hum Mutat. 2003;21(3):258-270.
5. Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. World J Gastroenterol 2006;12(2):192-198.
6. Niimi C et al. Usefulness of p53 and Ki-67 immunohistochemical analysis for preoperative diagnosis of extremely well differentiated gastric adenocarcinoma. Am J Clin Pathol 2002;118:683-692.
7. Zolota V et al. Immunohistochemical expression of TGF-beta1, p21WAF1, p53, Ki67 and angiogenesis in gastric carcinomas. Int J Gastrointest Cancer 2002;32(2-3):83-89.
8. Goodison S, Urquidi V and Tarin D. CD44 cell adhesion molecules. J Clin Pathol:Mole

Pathol 1999;52:189-196.

9. Fox SB et al. Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms. *Cancer Res* 1994;54:4539-4546.

10. Chen JQ et al. Expression of heparanase gene, CD44v6, MMP7 and nm23 protein and their relationship with the invasion and metastasis of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2004;10(6):776-782.

11. Gulmann C et al. CD44v6; a potential marker of malignant transformation in intestinal metaplasia of the stomach? An immunohistochemical study using tissue microarrays. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:981-986.

12. Fricke E et al. Relationship between E-cadherin gene mutation and p53 gene mutation, p53 accumulation, bcl-2 expression and Ki67 staining in diffuse type gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2003;104:60-65.

13. Chun YS et al. Germline E-cadherin gene mutations. Is prophylactic total gastrectomy indicated? *Cancer* 2001;92:181-187.

14. Park DI et al. HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2006;51:1371-1379.

15. Shia J et al. The utility of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair gene proteins. *Virchows Arch* 2004;445:431-441.

16. Fang DC et al. Mutation and methylation of hMLH1 in gastric carcinomas with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2003;9(4):655-659.

17. Ni X et al. Isolation and characterization of a novel human NM23-H1B gene, a different transcript of NM23-H1. *J Hum Genet* 2003;48:96-100.

18. Yio X et al. Trefoil factor family-1 mutations enhance gastric cancer cell invasion through distinct signaling pathways. *Gastroenterology* 2006;130(6):1696-706.

19. Osaki M et al. Expression of Fas ligand in human gastric adenomas and intestinal-type carcinomas: correlation with proliferation and apoptosis. *Gastric Cancer* 2001;4(4):198-205.

20. Fernandez R et al. Expression and prognostic significance of pepsinogen C in gastric carcinoma. *Annals Surg Oncol* 2000;7(7):508-514.

21. Kushima R et al. Gastric type well differentiated adenocarcinoma and pyloric gland adenoma of the stomach. *Gastric Ca.* 2006;9:177-184.
22. Nakamoto J et al. Clinicopathological evaluation of biological behavior of submucosal invasive gastric carcinomas. *J Med Invest* 2007;54:99-108.
23. Koseki K et al. Distinction of differentiated type early gastric carcinoma with gastric type mucin expression. *Cancer* 2000;89: 724-731
24. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese classification of gastric carcinoma 2nd English edition. *Gastric cancer* 1998;1:10-24.
25. Hamilton SR, Aaltonen LA(eds). WHO Classification of Tumours: Tumours of the Digestive system. IARC Press. Lyon. 2000. p38-52.
26. Lee ER, Leblond CP. Dynamic histology of the antral epithelium in the mouse stomach: II. Ultrastructure and renewal of isthmal cells. *Am J Anat* 1985;172:205-224.
27. Lauwers GY. Defining the pathologic diagnosis of metaplasia, atrophy, dysplasia, and gastric adenocarcinoma. *J Clin Gastroenterol* 2003;36(suppl.1):S37-S43.
28. Shiroshita H et al. Re-evaluation of mucin phenotypes of gastric minute well-differentiated-type adenocarcinomas using a series of HGM, MUC5AC, MUC6, M-GGMC, MUC2 and CD10 stains. *Pathol Int* 2004;54:311-321.
29. Nakamura T et al. Loss of phenotypic expression is related to tumour progression in early differentiated adenocarcinoma. *Histopathology* 2005;47:357-367.
30. Gotoda T, Yamamoto H, Soetikno RM. Endoscopic submucosal dissection of early gastric cancer. *J Gastroenterol* 2006;41:929-942.
31. Dhar DK et al. Expression of cytoplasmic TFF2 is a marker of tumor metastasis and negative prognostic factor in gastric cancer. *Lab Invest* 2003;83(9):1343-52.

## 7. 첨부서류

없음.