

c-kit, PDGFRA의 면역조직화학적 발현 양상과 변이 분석을 통한 위장관기질종양 진단의 접근

김정식 · 김재훈 · 오현진 · 서인수
김종광¹ · 강병욱¹ · 유완식² · 정호영²
배한익

경북대학교병원 병리과, ¹혈액종양내과 및
²외과

An Approach to Diagnosing Gastrointestinal Stromal Tumors Using Immunohistochemistry of c-kit and PDGFRA with Molecular Analysis

Jeong Shik Kim · Jae Hoon Kim · Hyun Jin Oh · In Soo Suh · Jong Gwang Kim¹
Byung Wook Kang¹ · Wan Sik Yu² · Ho Young Chung² · Han Ik Bae

Departments of Pathology, ¹Hemato-Oncology, and ²Surgery, Kyungpook National University
Hospital, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu, Korea

Background : Gastrointestinal stromal tumors (GIST) are the most common mesenchymal tumors in the gastrointestinal tract. Recently, many methods for the diagnosis of GIST have been developed including molecular diagnosis. **Methods :** We selected 90 cases of GIST that had presented at Kyungpook National University Hospital between 1998 and 2007. Tissue microarrays were made using core areas of tumor tissues. Immunohistochemical staining for c-kit, protein kinase C-theta, and platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA) was done. Direct sequencing of hot spot exonal areas for *c-kit* and *PDGFRA* were done using extracted DNAs of all 90 paraffin block tissues. **Results :** Among the 90 cases, 83.3% (75/90) were c-kit positive, 16.6% (15/90) were c-kit negative, 93.3% (84/90) were PDGFRA positive, and 6.6% (6/90) cases were PDGFRA negative. Fifteen cases of c-kit negative GIST included 1 case of PDGFRA negative and 5 cases of PDGFRA negative GIST were c-kit positive. The one case in which both c-kit and PDGFRA were negative, showed a *c-kit* mutation in exon 11. **Conclusions :** Combined immunohistochemical staining of c-kit, discovered on GIST 1 (DOG1) and PDGFRA is helpful for the diagnosis of GIST. When all staining tests are negative for immunoreactivity, *c-kit* mutation analysis for exon 11, 9 should be done. Genotyping of *kit* and *PDGFRA* do not need to be examined initially, if it is only for the diagnosis of GIST.

Key Words : Gastrointestinal stromal tumors; c-kit; Receptors, platelet-derived growth factor alpha (PDGFRA); Mutation; Sequence analysis

접 수 : 2009년 10월 9일
게재승인 : 2009년 11월 3일

책임저자 : 배 한 익
우 700-422 대구광역시 중구 동인 2가 101
경북대학교 의학전문대학원 병리학교실
전화: 053-420-4853
Fax: 053-426-1525
E-mail: baehi@knu.ac.kr

위장관기질종양(gastrointestinal stromal tumor, GIST)은 위장관, 장간막 또는 그물막에서 발생하는 비교적 드문 종양이지만, 위장관에서 발생하는 간엽종양(mesenchymal tumor) 중에서는 가장 흔해 전체 간엽종양 중 5%를 차지한다. 또 식도와 위장관에서 발생하는 중간엽종양의 대부분을 차지하고, 평활근종, 평활근육종, 신경집종 등과 구별되는 고유의 조직 소견과 면역조직화학적 특징을 가지고 있다.¹⁻³

위장관기질종양은 과거에는 수술적 완전 절제만이 치료 방법이었으며, c-kit와 90% 이상의 연관성이 규명되기² 전에는 통상의 헤마톡실린-에오진 염색 및 CD34, vimentin 등에 대한 면역조직화학 검사의 양성 반응을 통해 진단하였다. 이때 위장관

기질종양의 기원이 되는 interstitial cell of Cajal은 위장관계 전체에 걸쳐 분포하며, 위장관기질종양의 일부는 S-100, smooth muscle actin (SMA) 등의 면역조직화학 염색에서도 양성을 보인다.³ 이러한 기질종양의 발생 양상, 위치, 크기, 유사분열의 수와 관련된 예후에 대한 연구는 국내외 여러 논문에서 보고되어 있는데,¹⁻⁴ 대한의사협회지에서는 대한민국에서 발생한 위장관기질종양에 관한 진단과 치료 지침을 제시한 바도 있다.⁵ 현재는 c-kit 면역조직화학 염색이 도입되기 이전에 진단되었던 위장관기질종양을 파라핀 블록에서 후향적으로 확인하는 면역조직화학적 및 분자병리학적 연구도 시도되고 있다.⁶⁻¹¹

본 연구는 1998년부터 2007년까지 경북대학교병원에서 진단

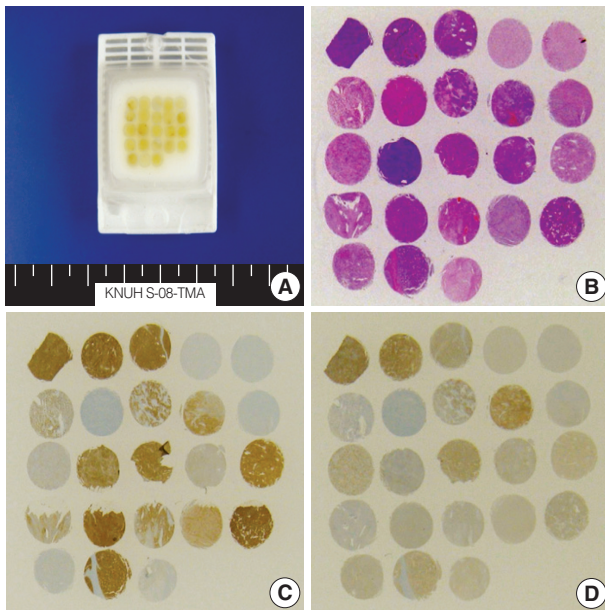


Fig. 1. Tissue microarray and slides. (A) Tissue microarray, (B) hematoxylin and eosin, (C) c-kit, (D) platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA). The second core in the 2nd row shows all negative immunoreactivity for c-kit and PDGFRA.

된 위장관기질종양을 모아서 조직미세배열(tissue microarray, TMA) 파라핀 블록을 만들고(Fig. 1), c-kit, protein kinase C (PKC)-theta와 platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA) 발현의 차이를 조사하고자 하였다. 또한 *KIT*와 *PDGFRA*의 변이 분석을 직접 염기서열법(direct sequencing)으로 시행하여 면역조직화학염색의 결과를 보충하고,¹²⁻¹⁶ 다른 문헌의 성적과 비교한 후, 위장관기질종양을 진단하기 위한 알고리즘을 정립하고자 하였다.

재료 및 방법

위장관기질종양 환자의 파라핀 블록 선정과 조직미세배열(TMA)의 제작

1998년부터 2007년까지 경북대학교 병원에서 진단된 위장관 기질종양 환자들을 소회하여 파라핀으로 포매되어 보관되어 있던 조직(파라핀 블록)을 찾고, 각각의 조직에 헤마톡실린-에오진(hematoxylin and eosin, H&E) 염색 슬라이드 및 면역조직화학염색을 재검사하였다. 이때 환자의 병력지 및 병리조직 검사 보고서를 다시 검토하여 위장관기질종양으로 진단된 92예를 선정, 파라핀 블록을 찾고 이를 TMA용으로 제공하였다. 또한 기존의 H&E 염색 슬라이드를 재검하여 종양 세포가 충실한 조직 각 2곳을 선택, 직경 2 mm, 슬라이드 1장 당 23개의 조직 기둥을 가지는 TMA 4개를 각각 쌍으로 만들어 총 8매의

TMA 파라핀 블록을 만들었다.

GIST TMA 슬라이드의 면역조직화학염색

TMA 파라핀 블록을 3-5 μ m 두께로 잘라 슬라이드에 붙인 후, 67°C 항온기에 밤새(12시간 동안) 두었다. 그런 다음 xylene으로 파라핀을 제거한 뒤 다단계 농도의 알코올로 탈수시키고, 항원성 회복을 위해 EDTA buffer 속에서 극초단파로 20분간 가열한 후 실온에서 식혔다. 이때 토끼 단클론 항체 CD34 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)와 S-100 (DAKO, Carpinteria, CA, USA), 토끼 다클론 항체 SMA (DAKO) 그리고 토끼 다클론 항체인 동일회사의 c-kit, PKC-theta, PDGFRA (DAKO) 등을 이용하였다.

이후 자동화 면역염색기(BenchmarkTM XT, Ventana, Tucson, AZ, USA)를 이용하여 면역조직화학염색을 시행한 과정은 다음과 같다. 즉 내인성 과산화효소 활성을 억제하기 위해 30분간 0.3%의 과산화수소수 용액으로 처리하고, 1:100으로 희석한 c-kit, PKC-theta, 1:200으로 희석한 PDGFRA 일차 항체로 실온에서 30분간 처리한 후 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하였다. 이때 양성 여부는 종양 세포의 세포질과 세포막에서 강한 염색을 보이는 경우를 강양성(2+, 75% 이상의 양성), 약양성(1+, 10% 이상 75%의 양성) 그리고 세포의 10% 이하만 염색되는 경우를 음성(-)으로 하였다. 또 종양 부분에 대해서는 c-kit 및 PDGFRA 면역조직화학염색에서 모두 음성인 경우에 혼한 hot spot 즉 exon 11, exon 9에 대해 direct sequencing을 시행하여 변이 분석을 하였다.

본 연구의 재료가 된 파라핀 DNA는 경북대학교병원 기관생명윤리위원회(IRB)의 승인을 거쳤으며, 보건복지가족부 산하 경북대학교병원 한국인체자원 거점 은행의 자원을 분양 받아 이루어졌다.

결 과

본 연구의 시작 시점에서 총 92예를 검토했는데, 그 중 2예가 대부분 면역조직화학염색에서 음성을 보였고, SMA 염색에서만 양성이었다. 또한 c-kit 및 PDGFRA exon의 여러 유전형 검사에서도 변이를 발견하지 못하여, 진단을 평활근종으로 수정하였다.

c-kit 도입 이전의 위장관기질종양 분석

본원에 c-kit 면역조직화학염색이 도입되기 전인 1998년부터 2001년까지 경북대학교 병원에서 진단된 위장관기질종양 34예를 찾아 분석하였다. 이때 남녀 구성은 남자 10명, 여자 24명이었으며, 진단 당시 평균 나이는 55.3세(25-74세)였다. 위장관기

질종양의 발생 위치를 살펴보면 위장 21예, 소장 6예, 대장 5예였고, 2예는 장간막에 존재하였다. 이를 2002년에 Fletcher 등이 발표한 위장관기질종양의 위험도 분류에 따라 정리하면, very low risk 3예, low risk 11예, intermediate risk 11예 그리고 high risk 9예였다.

종양의 크기는 평균 6.6 cm (2-17 cm)였으며, TMA를 만들 수 있었던 예들을 대상으로 c-kit 면역조직화학염색을 시행하였다. 이 중 c-kit에 강양성을 보이는 것은 24예, 약양성은 1예, 음성은 9예였는데, 약양성 증례의 경우는 intermediate risk로 위장에서 발생하였다. 음성의 경우, 발생 위치에 따라 위험도를 살펴보면 위장 8예 중 very low risk 1예, low risk 3예, intermediate risk 4예였으며, very low risk 1예는 대장이었다.

c-kit 도입 이후의 위장관기질종양 분석

2002년 이전까지의 조사와 마찬가지로 2002년부터 2007년까지 경북대학교 병원에서 진단된 위장관기질종양 56예를 찾아 분석하였다. 남녀 구성은 남자 31명, 여자 25명으로 평균 58.5세 (24-86세)였으며, 종양의 크기는 평균 5.5 cm (1.3-21 cm)였고, 발생 위치는 위장 38예, 소장 14예, 대장 3예, 장막 1예였다. 이들의 위험도는 very low risk 4예, low risk 21예, intermediate risk 17예 그리고 high risk 14예였다. 1998년부터 2001년까지의 양상과 그 이후의 양상을 비교해 보면 조직학적이나 임상적으로 유의한 차이점은 없었다. 이들 종양의 위험도와 병변의 위치는 표와 같다(Table 1).

이 중 TMA의 c-kit 면역조직화학염색에서 강양성은 50예, 음성은 6예였는데, 음성 6예는 위장 4예, 소장 1예, 대장 1예였다. 또한 위장에 나타난 음성 4예 중 very low risk는 1예, intermediate risk는 3예였으며, 소장과 대장에서 나타난 음성은 모두 low risk였다.

위장관기질종양에서의 PDGFRA 면역조직화학적 발현 양상

본 연구에서 PDGFRA 면역조직화학염색은 강양성 82예, 약

Table 1. Risk assessment according to Fletcher *et al.*¹ of gastrointestinal stromal tumors (1998-2007)

Risk	Size (cm)	Mitotic figures (HPF)	Esophagus	Stomach	Small intestine	Large intestine	Omentum
Very low	< 2	< 5/50	0	4	2	1	0
Low	2-5	< 5	0	21	10	2	0
Intermediate	< 5	6-10	0	23	3	2	0
	5-10	< 5					
High	> 5	> 5	0	11	5	3	3
	> 10	> 10					
	any size	any mitosis					

HPF, high power field.

양성 2예, 음성 6예로 나타났다. 이들 중 c-kit 음성은 총 15예였으며, c-kit 음성, PDGFRA 양성인 경우는 14예였는데 이 중 2예는 모두 약양성을 보였다. 또한 c-kit 양성, PDGFRA 음성인 경우는 5예였는데, 이들 중 c-kit와 PDGFRA 모두 음성을 보인 것은 1예로, direct sequencing을 이용한 c-kit 변이 분석을 시행하여 exon 11에서 점 변이(point mutation)를 찾아내 위장관기질종양으로 진단하였다(Fig. 2).

한편 1998년부터 2001년까지는 강양성 28예, 약양성 2예, 음성 4예였으며, 2002년부터 2007년까지는 양성 54예, 음성 2예였다. 이들의 상관 관계를 분석한 바를 표로 나타내었다(Table 2).

c-kit와 PDGFRA 변이 분석

Exon 11, exon 9에 대하여 변이 분석을 시행한 결과, exon 11의 변이 분석상 검사가 가능했던 85예 중 32예(37.6%)에서 변이가 나타났으며, exon 9의 경우에는 검사가 가능했던 80예 중 2예(2.4%)에서 변이를 관찰할 수 있었다. 또한 면역조직화학염색상 c-kit 음성, PDGFRA 양성인 3예에 대해서는 PDGFRA exon 12, exon 18에서 direct sequencing을 통한 변이 분석이 가능했으며, 이들 모두 wild type으로 나타났다.

고 찰

본 연구에서는 최근 표적항암제인 imatinib (Glivec, Novar-

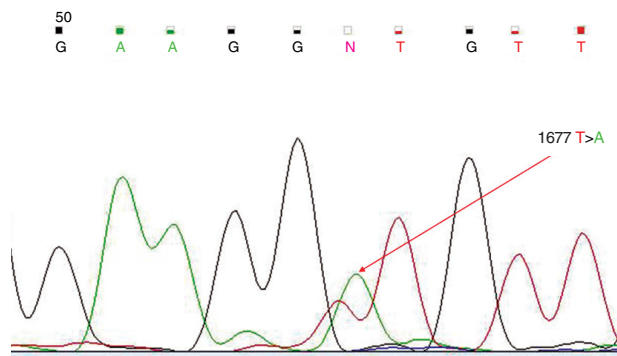


Fig. 2. The result of direct sequencing showing a point mutation. The normal base T is transformed into the mutated base 1677T>A, 559 amino acid change from valine to aspartic acid (V559D).

Table 2. Analysis of 90 cases for c-kit and platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA)

	1998-2001	2002-2007	Total
c-kit(+), PDGFRA(+)	23	47	70
c-kit(+), PDGFRA(-)	2	3	5
c-kit(-), PDGFRA(+)	8	6	14
c-kit(-), PDGFRA(-)	1	0	1

tis, Basel, Switzerland)이 등장하면서 새로운 진료 방침이 나온 위장관기질종양을 대상으로 TMA를 사용, 기존의 c-kit과 비교한 PDGFRA의 면역조직화학적 양상을 분석하였으며, 변이 분석을 통해 나타난 결과들을 다른 문헌들과 비교하고 그 차이를 살펴보고자 하였다. 그리고 대한의사협회지에 나타난 한국인의 진료 지침을 참고하여 더 발전된 진단적 접근을 시도하였다.

본원에서 확진되었던 증례를 모아 후향적으로 c-kit와 PDGFRA 염색을 비교한 결과, PDGFRA의 양성률이 더 높게 나타났는데, 이를 다른 여러 문헌을 통해 살펴보면 PDGFRA 염색 발현 비율에 다소 차이는 있지만(65.5-89.7%), 위장관기질종양에서는 c-kit보다 높은 양성률을 보인다는 것을 알 수 있다. 또한 위장관기질종양이 아닌 다른 연부 조직의 종양에서도 양성 반응을 보일 수 있지만, 이는 위장관기질종양과 비교했을 때 그 양성률이 낮고(25%), 양성일지라도 염색상이 미약한 것으로 보고된 바 있다.^{17,18}

한편 면역조직화학 검사의 민감도와 특이도가 높아서 GIST 진단을 위한 면역조직화학 검사법이 많이 보고되고 있는데, 그 예로 앞서 말한 PDGFRA 외에도 PKC theta, bcl-2, DOG1에 관한 연구가 많이 보고되고 있다.¹⁹⁻²⁵ 본 연구에서 면역조직화학 염색으로 사용한 PDGFRA는 GIST 및 glioblastoma 등의 암종에서 유전자 발현이 증가하는 성장 인자의 한 수용체로서, 3형 tyrosine kinase이므로 tyrosine kinase 억제제인 imatinib에 잘 듣는다는 점이 c-kit 단백질과 비슷하지만, alpha isoform인 경우에 양성률이 beta isoform보다 더 높게 나타내며, 위장관기질종양과 발생 부위가 비슷한 desmoid tumor에서는 양성일 수 있다는 점이 보고되기도 하였다.²⁶ 따라서 위장관기질종양의 진단에 있어 PDGFRA의 사용과 그 의의에 대해서는 앞으로 충분한 연구 검토가 필요할 것으로 생각된다.

또한 위장관기질종양에서 bcl-2의 면역조직화학적 발현 양상을 연구한 문헌이 있으나, 문헌마다 그 발현 양상이 매우 다양하게 나타나 위장관기질종양의 진단에 있어서는 그 효용성이 낮을 것으로 생각된다.

Motegi 등¹⁹은 PKC-theta 면역조직화학염색이 위장관기질종양의 85%에서 양성이라고 발표하였으며,²⁰ Espinosa 등²¹이 발표한 DOG1 면역조직화학염색은 87%대 74%로 c-kit보다 더 양성률이 높다고 하였다.²² 이에 저자들은 본 연구에서 시중에 출시된 항체를 이용하여 동일한 재료와 방법으로 c-kit와 PKC-theta 염색을 비교하고자 하였다.

여러 연구에서 PKC-theta가 위장관기질종양의 진단에 있어 크게 도움을 주는 것으로 보고되어 있으나,^{19,20} 본 원에서 진행한 연구 결과, 수차례 반복 염색(Benchmark™ XT 자동 염색법 및 수동 염색)을 하고, 버퍼의 종류(EDTA buffer 및 citrate buffer), 시약 등 여러 조건을 변화시키며 염색을 시도하였지만, 미약한 양성 반응 외에는 진단에 도움을 줄만한 성적을 얻을 수 없었다. 이에 대해서는 좀 더 염색 방법에 대한 논의가 필요할 것이다. 예를 들어, 적출된 검체는 증성 포르말린을 이용하고,

12-24시간 동안 고정하는 단계에서부터 철저히 관리하여 파라핀으로 포매된 조직에서도 항원성이 잘 보존되도록 해야 할 것이다.

한편 위장관기질종양의 약 60% 이상에서 c-kit 변이가 관찰되는 것으로 보고되고 있는데,²⁷⁻³⁰ 이는 주로 exon 11과 exon 9에서 많이 관찰되며, 일부에서는 exon 13, exon 17에서도 변이가 관찰된다. 또한 exon 9, 11, 13, 17 모두에서 변이가 나타나지 않을 경우, PDGFRA exon 12, exon 18에서 변이 분석을 하여 위장관기질종양의 진단율을 높일 수 있을 것으로 생각한다.

그러나 위에서 언급한 변이 분석에서도 나타나지 않는다면 헤마톡실린-에오진 염색 및 CD34, c-kit, PDGFRA 면역조직화학염색을 고려했을 때, 위장관기질종양으로 진단을 내리기는 어려울 것으로 생각된다. 실제로 본 연구 증례 중 2건이 과거 GIST로 진단되었다가 본 연구를 진행하면서 평활근종으로 진단이 바뀌었다.

본원에서 direct sequencing이 가능했던 경우는 90예 중 85예(94.4%)였는데, 이들 중 mutation type은 34예(37.8%)로 나타나 다른 문헌에서 검토한 결과(약 76%)^{29,30}와는 성적이 많이 떨어졌다. 그러나 상대적으로 최근 2002년에서 2007년까지 파라핀 블록 DNA만으로 구성하면 GIST의 genotyping 결과는 52.8% (28/53)이다. 이는 DNA의 질이 파라핀 포매 조직 제작

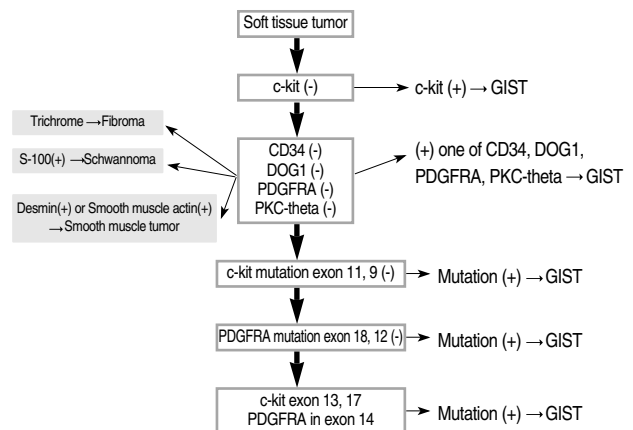


Fig. 3. Algorithmic approach to diagnosis of gastrointestinal stromal tumors (GIST). When there is a soft tissue tumor composed of spindle cells around the gastrointestinal tract, it is helpful for the diagnosis of GIST to use c-kit, CD34, S-100, and desmin. If one GIST is c-kit negative, and platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA), discovered on GIST 1 (DOG1), and protein kinase C (PKC)-theta are positive on supplemental immunohistochemistry, it should be considered that staining immunoreactivity is generating false positives. If all immunostaining is negative for c-kit, then exon 11, exon 9 mutation analysis is the first step towards diagnosis. Then, genotyping of PDGFRA exon 12, exon 18 is recommended. If the tumor shows mostly fibroblasts on Masson's trichrome staining, it is a fibroblastic tumor. If a tumor shows only S-100 immunoreactivity, it is of Schwann cell origin; if only smooth muscle actin or desmin are positive, it is of muscular origin.

에 있어서 적절한 고정 및 파라핀 블록의 보관 상태와 관련된다. 는 것을 보여주는 것인데, 본 연구에서 나타난 바와 같이 최근 파라핀 블록에서 더 높은 양성률을 보이는 것은 보관 기간의 경과가 양질의 DNA 획득을 저해할 수도 있음을 시사한다. 즉 장기간 보관된 파라핀 포매 조직을 이용했기 때문에 c-kit 면역조직화학염색의 양성률이 다른 문헌들보다 낮게 나타난 것으로 생각된다.

이에 본 연구자들은 GIST 진단을 위한 알고리즘을 개발하였다. 즉 위장관 주변에서 방추상 세포를 보이는 연부종괴가 관찰되면 c-kit, CD34, S-100, desmin 염색을 시행하여 GIST 진단에 도움을 받을 수 있다. 그러나 c-kit 음성인 GIST일 경우, 보조적인 염색 방법으로 PDGFRA, DOG1, PKC- θ 를 권장하기도 하는데 이는 위양성 등의 논란이 있으므로 정설로 정착시키기에는 적지 않은 애로점이 있다. 따라서 여러 염색에서 음성일 경우는 우선 c-kit exon 11, exon 9 돌연변이 검사를 시행하고, 여기에서도 나타나지 않으면 PDGFRA exon 12, exon 18의 검사를 권장한다.

결국 Masson's trichrome 염색으로 섬유성 종양, S-100 양성만 보여줄 경우는 신경초 유래 종양 그리고 SMA와 desmin에서만 양성으로 보일 경우는 평활근 유래 종양으로 진단하였다 (Fig. 3). 이 알고리즘을 통한다면 분자병리적인 접근이 제한적인 환경에서도 효과적으로 위장관기질종양의 진단율을 높일 수 있을 것으로 생각한다.

최근 의료계에서 대두되는 문제인 비용 대비 효과(cost effectiveness)를 고려한다면, 위장관에서 발생한 모든 위장관기질종양에 대하여 과연 처음부터 분자병리적 검사를 시행할 필요가 있는 지는 의문이다. 특히 대한의사협회지에서 발표한 c-kit 면역조직화학에 기초한 진단 지침을 더 확대시켜 접근한다면, 진단율이 100%에 가까울 것으로 예상되므로, 저자는 위장관기질종양의 진단적인 접근을 위해서 모든 exon에 대한 분자병리 분석이 꼭 필요할 것이라고 생각하지는 않는다.

참고문헌

1. Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, *et al.* Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a consensus approach. *Hum Pathol* 2002; 33: 459-65.
2. Kim KM, Kang DW, Moon WS, *et al.* Gastrointestinal stromal tumors in Koreans: its incidence and the clinical, pathologic and immunohistochemical findings. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 977-84.
3. Kang DW, Kim JH, Kim DH, Kim KH, Park MJ, Kang DY. c-kit mutation and immunohistochemical expression in gastrointestinal stromal tumors. *Korean J Pathol* 2003; 37: 246-54.
4. Seok SH, Kim JM, Bae JM, *et al.* Prognosis of gastrointestinal stromal tumors arising in the stomach and small intestine: a retrospective study of 126 cases from a single institution. *Korean J Pathol* 2008; 42: 335-43.
5. Kang YK. Clinical practice guideline for adequate diagnosis and effective treatment of gastrointestinal stromal tumor in Korea. *J Korean Med Assoc* 2007; 50: 830-41.
6. Rubin BP. Gastrointestinal stromal tumours: an update. *Histopathology* 2006; 48: 83-96.
7. Fletcher JA, Rubin BP. KIT mutations in GIST. *Curr Opin Genet Dev* 2007; 17: 3-7.
8. Hornick JL, Fletcher CD. The role of KIT in the management of patients with gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol* 2007; 38: 679-87.
9. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 1466-78.
10. Blay JY, Bonvalot S, Casali P, *et al.* Consensus meeting for the management of gastrointestinal stromal tumors: report of the GIST Consensus Conference of 20-21 March 2004, under the auspices of ESMO. *Ann Oncol* 2005; 16: 566-78.
11. Kitamura Y. Gastrointestinal stromal tumors: past, present, and future. *J Gastroenterol* 2008; 43: 499-508.
12. Streutker CJ, Huizinga JD, Driman DK, Riddell RH. Interstitial cells of Cajal in health and disease. Part I: normal ICC structure and function with associated motility disorders. *Histopathology* 2007; 50: 176-89.
13. Streutker CJ, Huizinga JD, Driman DK, Riddell RH. Interstitial cells of Cajal in health and disease. Part II: ICC and gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* 2007; 50: 190-202.
14. Tornillo L, Duchini G, Carafa V, *et al.* Patterns of gene amplification in gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Lab Invest* 2005; 85: 921-31.
15. Wong NA, Mangwana S. KIT and PDGFR alpha mutational analyses of mixed cell-type gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* 2007; 51: 758-62.
16. Gomes AL, Bardales RH, Milanezi F, Reis RM, Schmitt F. Molecular analysis of c-Kit and PDGFRA in GISTs diagnosed by EUS. *Am J Clin Pathol* 2007; 127: 89-96.
17. Peterson MR, Piao Z, Weidner N, Yi ES. Strong PDGFRA positivity is seen in GISTs but not in other intra-abdominal mesenchymal tumors: immunohistochemical and mutational analyses. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006; 14: 390-6.
18. Zheng S, Chen LR, Wang HJ, Chen SZ. Analysis of mutation and expression of c-kit and PDGFR-alpha gene in gastrointestinal stromal tumor. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 2285-90.
19. Motegi A, Sakurai S, Nakayama H, Sano T, Oyama T, Nakajima T. PKC θ , a novel immunohistochemical marker for gastrointesti-

- nal stromal tumors (GIST), especially useful for identifying KIT-negative tumors. *Pathol Int* 2005; 55: 106-12.
20. Blay P, Astudillo A, Buesa JM, *et al.* Protein kinase C theta is highly expressed in gastrointestinal stromal tumors but not in other mesenchymal neoplasias. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4089-95.
21. Espinosa I, Lee CH, Kim MK, *et al.* A novel monoclonal antibody against DOG1 is a sensitive and specific marker for gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 210-8.
22. Miwa S, Nakajima T, Murai Y, Takano Y, Sugiyama T. Mutation assay of the novel gene DOG1 in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *J Gastroenterol* 2008; 43: 531-7.
23. Steinert DM, Oyarzo M, Wang X, *et al.* Expression of Bcl-2 in gastrointestinal stromal tumors: correlation with progression-free survival in 81 patients treated with imatinib mesylate. *Cancer* 2006; 106: 1617-23.
24. Lee HE, Kim MA, Lee HS, Lee BL, Kim WH. Characteristics of KIT-negative gastrointestinal stromal tumours and diagnostic utility of protein kinase C theta immunostaining. *J Clin Pathol* 2008; 61: 722-9.
25. Kim KM, Kang DW, Moon WS, *et al.* PKC theta expression in gastrointestinal stromal tumor. *Mod Pathol* 2006; 19: 1480-6.
26. Turner MS, Goldsmith JD. Best practices in diagnostic immunohistochemistry: spindle cell neoplasms of the gastrointestinal tract. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133: 1370-4.
27. Kang HJ, Nam SW, Kim H, *et al.* Correlation of KIT and platelet-derived growth factor receptor alpha mutations with gene activation and expression profiles in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene* 2005; 24: 1066-74.
28. Subramanian S, West RB, Corless CL, *et al.* Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) with KIT and PDGFRA mutations have distinct gene expression profiles. *Oncogene* 2004; 23: 7780-90.
29. He HY, Fang WG, Zhong HH, *et al.* Status and clinical implication of c-kit and PDGFRA mutations in 165 cases of gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2006; 35: 262-6.
30. Du CY, Shi YQ, Zhou Y, Fu H, Zhao G. The analysis of status and clinical implication of KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumor (GIST). *J Surg Oncol* 2008; 98: 175-8.