

국소 진행성직장암에서
cDNA microarray-based
comparative genomic hybridization
(Microarray-CGH)을 이용한 항암 약
물 방사선 치료 효과 예측 유전자군
탐색

연세대학교 대학원

의과학과

이 귀 연

국소 진행성 직장암에서
cDNA microarray-based
comparative genomic hybridization
(Microarray-CGH) 을 이용한 항암
약물 방사선 치료 효과 예측 유전자군
탐색

지도교수 정 현 철

이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

2004년 12월

연세대학교 대학원

의과학과

이 귀 연

이귀연의 석사 학위 논문을 인준함

심사위원	_____	인
심사위원	_____	인
심사위원	_____	인

연세대학교 대학원

2004년 12월

감사의 글

임상의학 연구센터에서의 2년이란 대학원 생활이 어떻게 흘러갔는지, 아직도 부족함 투성의 모습으로 졸업이란 문턱에 왔습니다. 현재 여기까지 올 수 있도록 격려와 도움을 주신 분들께 감사의 마음을 전하고자 합니다.

새로운 학문과 환경에서 다양한 경험의 기회를 주시고, 부족한 제게 가르침과 격려와 학문에 매진하시며, 과학을 하는 사람이라면의 본보기를 보여주신 정현철 교수님께 진심으로 감사드립니다. 학업에 있어서는 과학자의 사고로 혼계를 아끼시 않으시고, 또한 바다와 같은 넓은 마음으로 위로와 격려를 아끼시지 않은 라선영 교수님과 바쁘신 와중에 논문 심사로 시간을 내주시고, 격려의 말을 해주신 성진실 교수님께 진심으로 감사드립니다. 따뜻한 마음의 소유자이며 실험적인 조언을 아끼지 않으신 정희철 교수님, 아무것도 모르던 제게 여러 방향으로 사고할 수 있는 방법을 가르쳐주시고, 따뜻한 말로 격려해주시던 양상화 교수님께 감사드립니다.

센터에 찾을 때면 항상 웃음으로 맞아주시던 박규현 선생님, 샘플과 관련되어 항상 귀찮게 했음에도 불구하고 특유의 웃음으로 항상 죄송한 마음을 갖게 했던 김태수 선생님께 감사드립니다. 넉넉한 웃음으로 반겨주시던 심응호 선생님, 멋쟁이와 유머러스한 말투로 항상 웃음을 선사해주신 정범오빠, 서른이 넘었을 거라고는 짐작조차도 할 수 없는 어린 왕자 유근오빠, 한 가정의 가장이 되어 열심히 살고 계시는 우영오빠, 많은 말은 못했지만 온유한 표정의 소유자 영이오빠, 새침한 소녀의 모습으로 예쁘게 거울을 들여다보는 정옥언니, 무뚝뚝하지만 마음은 그 누구보다 더 따뜻한 연호언니, 생긴거와는 많이 다르게 너무나도 털털한 우선이, 샘플 찾아달라고 귀찮게 함에도 불구하고 항상 웃음으로 도와준 원주, 아부성말들의 대가라고 불리고, 너무나도 귀여운 막내 은정이까지 센터에 계신 모든 여러분께 감사드립니다.

실험실에서 저의 일거수 일투족을 속속히 들여다보며, 부족함이 뭔지 깨닫게 해주며, 나의 눈물샘을 자극한 여인, 지금은 수의사가 되어 하나님의 기쁨이 되고자 하는 그녀, 항상 고마움 마음을 떨쳐 버릴 수 없는 민영언니, 무뚝뚝함 속에서 넉넉한 사랑이 넘치는 하진오빠, 논문 쓰면서 아주 많이 귀찮게 해서 눈치도 봤지만, 결국 제일로 많이 귀찮게 했던 찬희오빠, 지금은 이곳에 없지만 실험을 하는데 많이 가르쳐주고 분이 되었던 지혜언니, 똥똥이 스머프의 원조격으로 지금은 사회생활에 매진하시는 세원오빠, 따끔한 충고와 따뜻한 격려를 아끼지 않았던 상철오빠, 넉넉한 마음으로 조언과 격려를 아끼지 않았던 주혜언니께 진심으로 감사드립니다. 옆에서 항상 큰

위로가 되며, 이런 저런 고민을 함께 나누는 귀한 친구 연주, 군에도 가지 않고 학업에 매진하기 위해 임상의학연구센터에 와서 최고 꽃미남으로 자리 잡은 재준이, 이것저것 시켜가며 귀찮게도 많이 했지만, 몇 번은 싫다고 대답해도 결국엔 도와주고 멋진 목소리로 격려의 말 한마디 던져주는 동혁오빠, 시원스레 솔직한 대답으로 나의 속을 뺨뺨 뚫어주는 임산부 선정언니, 특유의 눈웃음으로 생활의 활력소를 가져다 준 승희오빠 (오빠 목소리 최고~), 생물학에 몸바치겠다고 굳은 다짐을 하고 온 막내 지은이까지 너무나도 감사드립니다.

대학 때부터 대학원 졸업하는 이 시기까지 곁에서 위로와 큰 힘이 되어준 진주와 현진이, 그리고 공부가 너무 좋아 또 다른 학문에 발을 내딛기 위해 아직도 열심히 공부하고 있는 경희, 너희들이 있기에 지금까지 밝은 모습으로 견뎌낼 수 있었다고, 감사의 마음을 표현하고 싶습니다. 항상 먼저 된 사람으로서 후배인 저를 챙겨주고 격려해주시고, 맛있는 것들로 위로해주신 정안언니와 동은언니, 그리고 동수오빠 (오빠~결혼 축하드려요. 행복하세요. 나의 영원한 케이지 오빠~)께 감사드립니다.

인도에서 시작된 귀한 인연인 사랑하는 친구 애진 (승택오빠)과 에디오피아 선교를 품고 있는 유진이, 귀가길에 전화통화로 이런저런 얘기로 격려해주던 유일한 이성친구라 생각하는 평안이, 인도네시아에서 시작되어 대학, 대학원 시절에 큰 기쁨이 되어준 윤정이, 느지막히 대학원에 진학하여 열심히 공부하는 멋진 예술가 지희 (좋은 선생님이 될거야~), 나와 너무나도 비슷한 점을 많이 지녀 나를 잘 아는 민혜, 옆 동네 이대에서 나의 투정을 모두 받아준 자은언니, 웃음을 잃지 않게 만들어준 중현, 래연, 기석, 예원, 서영, 가영이, 영아 3부 모두에게 감사의 마음을 전합니다.

부족한 자를 위해 기도해주시고 격려해주신 황명하 전도사님과 명성교회 청년부 새가족지기들, 하나님의 귀한 말씀으로 쓰러져가는 육신을 일으켜주시고 말씀으로 새 힘을 얻게 해주신 김삼환 목사님, 이필산 목사님, 이준호 목사님께 감사드립니다.

지금까지 길러주시고 물심양면으로 지원해주신 사랑하는 부모님, 그리고 티격 태격하면서도 나에겐 하나밖에 없는 동생 영준이에게 감사의 마음을 전하며, 이런 귀한 가정을 허락해주신 하나님께 진심으로 감사드립니다.

대학원 2년의 생활을 소중한 경험과 새로운 앞날에 무엇을 하던지 겸손하고, 성실하게 노력하는 모습으로 한걸음 한걸음 조심스레 내딛겠습니다.

2004년 12월 이 귀 연 드림

목 차

국문요약.....	1
I. 서론.....	3
II. 재료 및 방법.....	7
1. 대상 환자 및 검체 채취.....	7
2. DNA 추출.....	8
3. cDNA microarray based genomic hybridization (Microarray-CGH) 실험 수행	9
4. 생물 정보학 기법을 이용한 결과 분석 및 유전자 이상 빈도 관찰...	11
5. 후보 유전자 군의 기능 해설	13
III. 결과	15
1. Microarray-CGH 결과 전 처리 과정.....	15
2. Unsupervised Hierarchical clustering을 이용한 Microarray-CGH 전체 결과 양상 관찰	20
3. 항암 약물 방사선 병행요법 효과 예측 유전자군 선별	22
가. 치료 효과를 예측할 수 있는 후보 유전자군 선정.....	22
나. 치료에 대한 반응 군과 비 반응 군의 유전적 변이 양상 관찰...	27
다. 치료의 효과를 예측할 수 있는 후보 유전자 군의 기능해설 ...	31
4. 항암 약물 방사선 병행요법 부작용 예측 유전자군 선별	32
가. 치료에 대한 부작용을 예측할 수 있는 후보 유전자 군 선정...	32

나. 치료에 대한 부작용을 나타내는 환자 군과 부작용을 보이지 않는 환자 군의 유전적 양상 관찰.....	37
다. 치료의 부작용을 예측할 수 있는 후보 유전자 군의 기능해설·	41
5. 5-FU 관련 유전자 양상	42
6. 치료 효과와 부작용 예측 중복 유전자 관찰	45
IV. 고찰.....	49
V. 결론.....	60
참고문헌.....	61
영문요약.....	69

그림 차례

Figure 1. Study and analysis scheme

Figure 2. Representative scanned image of Microarray-CGH

Figure 3. M-A plots before and after normalization

Figure 4. Box plots before and after normalization

Figure 5.

A. Hierarchical clustering of overall experiments

B. Two-way hierarchical clustering of paired samples

Figure 6.

A. Hierarchical clustering with response predictive 103 genes in biopsy

B. Hierarchical clustering with response predictive 52 genes in biopsy

C. Hierarchical clustering with response predictive 29 genes in biopsy

Figure 7.

A. Hierarchical clustering with toxicity predictive 95 genes in biopsy

B. Hierarchical clustering with toxicity predictive 40 genes in biopsy

C. Hierarchical clustering with toxicity predictive 31 genes in biopsy

Figure 8.

A. Observation of TS log ratio range in responder and non-responder

B. Observation of TS log ratio in patient with toxicity and patient with non-toxicity

Figure 9.

A. Hierarchical clustering of 10 overlap genes between responder and non-responder

B. Hierarchical clustering of 10 overlap genes between patient with toxicity and patient with non-toxicity

표 차례

Table 1. Components of patients sample

Table 2. List of 29 response predictive genes

Table 3. Observation of genetic alteration frequency of response predictive genes (%)

Table 4. List of 31 G IV neutropenia predictive genes

Table 5. Frequency of genetic alteration G IV Neutropenia predictive genes (%)

Table 6. List of 10 overlap genes between response and toxicity in CCRT

국문요약

국소 진행성 직장암에서 cDNA microarray-based
comparative genomic hybridization (Microarray-CGH)을
이용한 항암약물 방사선치료 효과 예측 유전자군 탐색

<지도교수 정 현 철>

연세대학교 대학원 의과학과

이 귀 연

국소 진행성 직장암 치료는 항암 약물 방사선 병행 요법을 시행하여 종양의 크기를 최소화함으로써 수술을 가능하게 하고 있다. 그러나 항암 약물 방사선 병행 요법을 시행 받은 환자들의 치료 효과와 부작용은 환자에 따라 다양하게 나타나고 있다. 그러므로 환자들에게 항암 약물 방사선 병행 요법 시행 전에 치료의 효과와 부작용을 미리 예측하는 것은 개인 맞춤 치료를 하는데 중요한 정보를 제공해 줄 수 있다. 본 연구에서는 항암 약물 방사선 병행 요법에 대하여 효과와 부작용을 예측할 수 있는 생물학적 표지자를 찾기 위해 진단 당시 생검 조직 28예, 치료 후 정상 조직 15예, 종양 조직 14예와 항암 약물 방사선 병행 요법 시행 전의 림프구 20 예를 대상으로 7.5K cDNA Microarray를 이용하여 cDNA microarray-based comparative genomic hybridization (Microarray-CGH)를 수행하였다. 진단 당시 조직 생검의 Microarray-CGH 결과에서 치료 후에 반응군과 비 반응군을 비교하여 치료의 효과를 예측할 수 있는 유전자를 false discovery rate (FDR) 기준으로 103개 (FDR 24 %), 52개 (FDR 20 %), 29개 (FDR 14.9 %) 유전자를 선별하였다. 림프구의 Microarray-CGH 결과에서 GIV neutropenia 를 예측하는 95 (FDR 17.1 %), 40 (FR 14.9 %), 31개 (FDR 11 %)의 유전자를 선별하였다.

본 연구에서는 Microarray-CGH 기법을 이용하여 항암 약물 방사선 병행 요법에 대하여 치료의 효과를 예측할 수 있는 29개의 후보 유전자군을, GIV neutropenia를 예측할 수 있는 31개의 후보 유전자군을 탐색하였다. 선별된 유전자군들의 유전학적 수준의 관찰은 항암 약물 방사선 병행 요법에 대한 효과와 부작용을 예측하여 개인 맞춤 치료에 있어 중요한 기반을 제공할 것으로 생각된다

핵심되는 말: 항암 약물 방사선 병행 요법 (Concurrent chemoradiotherapy, CCRT), cDNA microarray-based comparative genomic hybridization (Microarray-CGH), 생물학적 표지자, 예측

국소 진행성 직장암에서 cDNA microarray-based
comparative genomic hybridization (Microarray-CGH)을
이용한 항암 약물 방사선 치료 효과 예측 유전자군 탐색

<지도교수 정현철>

연세대학교 대학원 의과학과

이 귀 연

I. 서론

전 세계적인 암 발생률의 2 번째를 차지하는 직장암은 식생활의 변화에 따라 우리나라에서도 발생 빈도가 매우 빠르게 증가하고 있다¹. 직장암의 치료는 종양의 크기, 위치, 분화 정도 및 전이 유무 등을 고려하여 외과적, 항암 약물 치료, 그리고 방사선 치료를 병행하는데, 암이 전이가 되지 않았을 경우 외과적 수술을 통한 치료 방법이 표준 치료로 이용되고 있다. 국소 진행성 직장암의 경우에는 수술 전 방사선 치료 (radiotherapy)와 항암 약물 치료 (chemotherapy) 방법을 병행하여 종양의 크기를 줄이고, 수술을 가능하게 하는 항암 약물 방사선 병행요법 (concurrent chemoradiotherapy; CCRT)을 통해 치료 효과를 높이고자 노력하고 있다²⁻⁴. 그러나 수술 전 치료에 대한 환자의 반응은 종양의 크기가 줄어드는 환자, 치료 후에도 종양의 크기가 줄어들지 않는 환자, 또는 치료

중 암이 진행되는 환자 등 다양한 반응을 보이게 된다. 이러한 치료의 효과는 생존율과 밀접한 연관성을 보이고 있으므로, 치료 전에 각 환자에 대하여 치료의 효과를 예측 할 수 있다면 환자에 맞는 맞춤형 치료법 (individualized therapy)을 통하여 치료의 효과를 높일 수 있을 것이다.

현재 임상에서는 병기, carcinoembryonic antigen (CEA) 등의 표지자를 사용하고 있지만, 이들 임상 표지자만으로는 치료의 효과를 정확하게 예측하기 어렵기 때문에, 이를 극복하기 위하여 종양의 생물학적 특징에 근거한 생물학적 표지자를 찾아 임상에 적용하고자 하는 노력이 시도되고 있다⁵⁻⁸. 직장암에서 항암약물 방사선 병행 요법의 치료 효과에 대해 알려진 생물학적 표지자로는, 종양세포 증식과 관련된 표지자로서 세포 주기와 세포 사멸을 조절하는 p53, bcl-2 등이 있다⁹⁻¹⁰. 일반적으로 p53 은 DNA 손상에 대해 회복과 관련되어 G1 arrest 와 세포 사멸을 조절하고, 세포의 성장을 조절하는데 중요한 인자이다. 직장암의 50-80 %에서 변이된 p53 의 과발현이 보고 되는데, 이는 암의 진행을 급속도로 진행시키게 된다¹¹. 변이된 p53 의 발현은 방사선과 약물치료가 유도하는 세포 사멸을 피하게 됨으로써 치료에 대해 저항성을 갖게 한다¹²⁻¹⁴. 직장암에서 bcl-2 의 과발현은 33-67 % 가 보고 되고 있다. 이와 같이 현재 직장암에서 알려진 생물학적 표지자로는 p53, B-cell leukemia/lymphoma-2 (Bcl2), Ki-67¹⁵ 등이 있으나, 이러한 인자들의 변이나 과발현이 치료 효과 및 부작용을 예측 가능성과 실제 임상학적인 관련성은 계속적으로 연구가 진행되고 있다. 하지만 암의 발생이나 진행, 약제에 대한 반응 등 모든 생물학적 현상이 복잡한 경로를 거쳐 이루어지기 때문에 이와 같은 한 두 가지의 생물학적 표지자만으로 치료 효과나 약제에 반응을 예측하기는 불가능하다¹⁵⁻¹⁶.

국소 진행성 직장암에서 항암 약물 방사선 병행요법에 많이 사용되고 있는 항암제인 5-Fluorouracil (5-FU)는 DNA 의 합성에 관여하는 thymidylate synthase (TS)의 작용을 방해하여 DNA 의 합성을 억제할

뿐만 아니라, DNA 와 RNA 에 손상을 주어 세포사멸을 일으키게 하는 약제이다¹⁶. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD)는 5-FU 의 분해에 관여하는 효소로써, DPD 의 수준이 높은 환자의 경우 5-FU 에 대한 치료 효과와 부작용이 동시에 감소하는데 반하여, DPD 의 수준이 낮은 환자의 경우는 위와 상반된 결과가 나타날 것으로 예상된다². 이러한 약의 효과는 각 환자의 종양 내 TS 의 발현 정도와 개개인 DPD 의 수준에 따라 영향을 받게 되리라는 것을 예상할 수 있다. 그러나 5-FU 의 효과나 부작용을 예측하기에는 단순히 TS, DPD 의 발현 수준만으로는 일관적으로 설명하지 못하는 많은 결과들이 보고되고 있다. 즉, 한 두 가지 인자로 생물학적 현상을 설명하지 못함을 보여주고 있다¹⁶.

이러한 치료의 효과와 부작용을 개개인의 특성에서 이해하기 위하여 분자 생물학적인 분야에서 genome scale 의 다양한 실험 방법들이 제시되고 있는데, cDNA microarray 를 기반으로 한 high-throughput 기법으로 RNA 단계에서 유전자의 발현 정도를 관찰 할 수 있는 gene expression profiling 과 DNA 단계에서의 유전자 변이를 관찰할 수 있는 comparative genomic hybridization (Microarray-CGH) 가 있다¹⁷⁻²⁴. cDNA microarray 를 기반으로 한 Microarray-CGH 방법은 생물학적 표지자로서의 가능성이 있는 다양한 유전자 변화를 DNA 수준에서 확인하여 염색체 조각이 아닌 관련 유전자 수준에서 밝힐 수 있으며, 동시에 RNA 수준의 유전자의 발현 정도와 비교할 수 있는 장점 때문에 질병과 관련된 생물학적 표지자를 찾는 데 시도되고 있다²⁵. 개인 맞춤형 치료에 있어, 치료 전, 후의 종양에서 다른 환자와 구분되는 환자 개인의 특징적인 유전양상을 이해하는 것이 중요한데 치료 전, 후의 종양 조직이 나타내는 유전 양상에서 차이가 없이 개인의 특성을 나타낸다면, 치료 전의 조직만을 이용하여 치료에 대한 효과와 부작용을 예측할 수 있다. 하지만, 치료 전과 후의 종양 조직에서 유전자 양상이 변하게 된다면, 개인의

특성을 이해하기 보다 치료의 영향이 나타날 수 있게 되므로, 개인 맞춤 치료를 하는데 있어서 치료 전과 후, 두 가지 종양을 이용하여 치료에 대한 효과와 부작용 여부를 비교하여 맞춤 치료에 대한 정보를 제공하여야 한다.

본 연구에서는 Microarray-CGH 실험 방법을 이용하여 국소 진행성 직장암 환자의 항암 약물 방사선 병행요법 결과를 바탕으로 치료에 대한 효과와 부작용을 예측할 수 있는 생물학적 표지자를 분자 유전학 수준에서 탐색, 선정하여 제시, 검증함으로써 개인 맞춤 치료의 근간을 제공하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 대상 환자 및 검체 채취

2002년 10월부터 2004년 8월까지 연세대학교 의과대학 신촌 세브란스병원, 연세 암센터에 내원하여 국소 진행성 직장암으로 진단 받은 환자들을 대상으로 임상 및 병리학적 인자인 종양의 크기, 모양, 세포 분화 정도 등을 평가하였다. 국소 진행성 직장암 환자에게서 직장암 진단 시 생검 조직, 항암 약물 방사선 병행요법 후 수술 시 정상과 종양 조직을 채취하여 액체 질소에 보관하였다. 직장암 진단 시와 항암 약물 방사선 병행요법 중에 혈액을 채취하여 림프구를 분리 한 후, -80 °C에 보관하였다. Microarray-CGH의 대조군으로 사용하기 위해 정상 태반 신선 조직을 연세대학교 의과대학 세브란스병원 산부인과에서 성별로 수집하였다.

임상 결과에서 항암 약물 방사선 병행요법 수행 후 치료의 반응은 종양이 줄어서 완전히 제거된 경우 (complete response, CR), 종양의 크기가 50 %이상 줄었을 경우 (partial response, PR), 종양의 크기에 변화가 없는 경우 (stable disease, SD), 종양의 분화가 진행된 경우 (progressive disease, PD)로 나누어 평가하였다.

치료 중 부작용 평가는 NCI CTC criteria V. 3.0을 사용하였다.

2. DNA 추출

환자로부터 얻은 조직과 정상 태반 조직은 액체 질소에서 균질화 한 후, 1ml 의 lysis buffer [10 mM Tris PH 7.6, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.2 % SDS, 200 ug/ml Proteinase K] 를 첨가한 후 42 °C 에서 12-24 h 반응시켰다. 그리고 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA) 을 처리하여 단백질로부터 핵산을

분리하였다. DNA는 10 M ammonium acetate 150 μ l, 2 μ l의 glycogen과 100 % 에틸 알코올로 침전시켰다. 침전된 핵산은 70 % 에틸 알코올로 수세하고 상온에서 남아있는 알코올을 건조시킨 뒤, ultra-pure water에 녹였다. DNA의 양과 질은 Gene-Spec III spectrophotometer (Hitachi Inc, Tokyo, Japan)으로 확인하고, 흡광도가 1.7 이상인 것만 실험에 사용하였다. 추출한 genomic DNA는 실험 전까지 -20 °C에 보관하였다. 항암 약물 방사선 병행요법 수행 전에 환자에게서 채취한 혈액을 Ficoll hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden)을 이용하여 4 °C, 800 G 에서 25분간 원심 분리 후, 단핵구 층 (peripheral blood mononuclear cell) 을 분리하였다. 상기와 동일하게 phenol/chloroform/isoamylalcohol (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA) 방법으로 단핵구에서 genomic DNA를 추출하고 조직 검체와 동일한 방법으로 양과 질을 측정하고 보관하였다.

3. cDNA microarray based CGH (Microarray-CGH) 실험 수행

Microarray-CGH 실험은 본 연세의대 암전이 연구센터 (Cancer Metastasis Research Center (CMRC), Yonsei Univ., Korea)에서 확립한 방법을 이용하였다²⁶. cDNA microarray 는 CMRC 에서 제작한 7500 개의 유전자가 점적된 7.5K cDNA microarray 를 사용하였고, 실험은 test sample 과 동일한 성별의 placenta 를 reference 로 하는 indirect-design 방법을 사용하였다.

7 μ g의 genomic DNA 를 Dpn II (NEB, Beverly, MA, USA) 10 Unit 으로 절편화시켜 QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Dusseldorf, Germany)로 정제하였다. 절편화 된 DNA 는 1 % agarose gel 에서 전기영동 하여 300-1000 bp 의 크기를 확인하였다. 절편화 된 DNA 는 Bioprime Labeling kit (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA)를 이용하여 random-priming 방법으로 형광물질인 Cyanine 3-dUTP (Cy3-

dUTP; DuPont NEN Life Science, Boston, MA, USA), Cyanine 5-dUTP (Cy5-dTUP; NEN Life Science, Boston, MA, USA) 를 표지하였다. 환자에게서 얻은 DNA 는 0.6 mM Cy5-dUTP (DuPont NEN Life Sciences, Boston, MA, USA)와 대조군으로 사용되는 태반 DNA 는 0.6mM Cy3-dUTP (DuPont NEN Life Sciences, Boston, MA, USA)와 10X low dUTP-dNTP mix (각각 1.2 Mm 의 dATP, dGTP, dCTP 와 0.6 mM dUTP; GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA)와 혼합하여 빛을 차단한 상태에서 37 °C 에서 2 시간 반응시켰다. 2 시간 후에 반응을 멈추기 위해 stop buffer (GIBCO-BRL, MD, USA) 5 μ l 를 처리하였다.

형광 물질 표지 과정과 동시에 3.5X SSC, 0.1 % SDS, 10 mg/ml Albumin-Bovine (BSA; AMRESCO, Ohio, USA) 와 물로 구성된 blocking 용액은 MFS-25 (MFS Inc, Pleasanton, CA, USA) 로 여과시킨 후 7.5K microarray 를 42 °C 에서 1 시간 pre-hybridization 시켰다. Pre-hybridized 슬라이드는 물과 isopropanol 에 담금질 후 500 rpm 에서 5 분 동안 원심 분리하여 이용하여 건조시켰다. Cy3-dUTP 와 Cy5-dUTP 로 표지 된 probe 와 Human Cot-1 DNA (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA) 30 μ g, yeast tRNA (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA) 100 μ g 과 poly (dA)-poly(dT)(Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) 20 μ g 을 섞었다. Hybridization 용액은 Microcon-30 filter (Amicon, Bedford, MA, USA) 를 이용하여 48 μ l 로 농축시키고 3.4X SSC 10.2 μ l 와 0.3 % SDS 1.8 μ l 로 최종 부피를 60 μ l 로 맞추었다. Hybridization 용액은 100 °C 에서 2 분 동안 denature 시킨 후, 13000 rpm 에서 2 분 동안 원심 분리 후, 슬라이드에 올리고, 65 °C 에서 16 시간 반응시켰다 0.5X SSC-0.01 % SDS, 0.06X SSC-0.01 % SDS 와 0.05X SSC wash 용액으로 수세하고 1000 rpm 에서 5 분간 원심 분리하면서 건조시켰다. Hybridization 이 끝난 마이크로어레이는 GenePix 4000B 스캐너 (Axon Instruments, Foster City,

CA, USA)로 이미지를 읽고 GenePix Pro4.1 software (Axon Instruments, Foster City, CA, USA)로 수치화 된 결과를 얻었다.

4. 생물 정보학 기법을 이용한 결과 분석 및 유전자 이상 빈도 관찰

얻어진 Microarray-CGH 결과는 실험간의 variation 을 줄이기 위하여 intensity-dependent within pin-tip group Lowess normalization²⁷ 방법을 이용하여 표준화 하였다. 실험간의 80 % 이상이 분포하는 유전자만을 선별하고 (No-missing proportion 80 %), 결측치는 *k*-Nearest Neighbor (*k*-NN, *n*=10) 방법으로 보정하였으며, 중복 유전자는 평균값을 취하여 분석을 시행하였다. 이렇게 얻어진 전체자료들을 이용하여 unsupervised hierarchical clustering 을 시행하여 전체 환자 군의 경향을 파악하였다 (Eisen software, Stanford Univ.)²⁸. Treeview (Eisen software, Stanford Univ.)²⁸ 에서 보여지는 결과에서 녹색은 유전자의 결실을, 빨간색은 유전자의 증폭을 검정색은 변화없음을 나타낸다.

치료의 효과가 다른 두 군간의 유의한 유전자를 선정하기 위하여는, *t*-test 알고리즘을 바탕으로 분산의 영향을 최소화하고, 두 그룹 이상을 비교할 수 있는 알고리즘이 추가되어 마이크로어레이 결과를 분석할 수 있도록 개발된 Significance Analysis of Microarray (SAM)²⁹ 을 사용하였다. 항암 약물 방사선 병행 요법에 대하여 효과에 대한 반응군과 비 반응군에서 차이를 보이는 유전자 선정을 위하여 2-class SAM 을 시행하였다 (Figure 1-A).

유전자가 잘못 선별될 비율인 false discovery rate (FDR)을 10% 수준에서 선별하고, 선별된 유전자로 2-way hierarchical clustering 을 수행하여 효과가 다른 두 환자 군의 구분 여부를 시각화하여 관찰하였다.

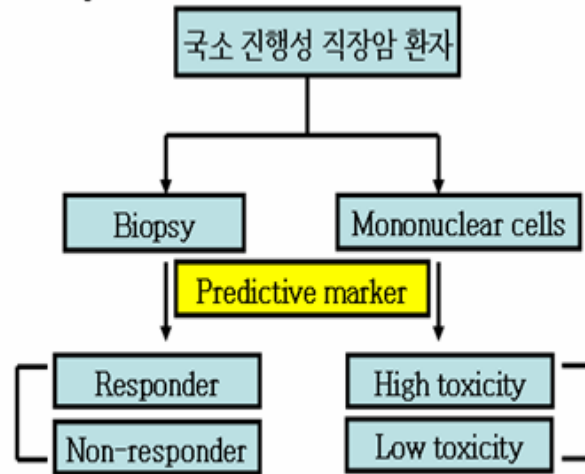
유전자 증폭, 유전자 결실은 CMRC 에서 결정한 기준에 근거하여, 유전자 이상 범위 log ratio ± 0.3 을 기준으로 결정하였고, 선별된 유전자의 증폭과

결실의 빈도를 관찰하였다³⁰. 동일한 방법으로 약물 치료 중, 나타나는 부작용 차이에 따른 환자 군을 비교하여 치료에 대한 부작용을 예측 할 수 있는 후보 유전자 군을 단핵구 결과에서 선정하였다 (Figure 1-B).

5. 후보 유전자 군의 기능 해설

통계적 방법과 생물 정보학 기법을 통하여 선별된 항암 약물 방사선 병행 요법에 대한 효과와 부작용을 예측할 수 있는 선별된 최적의 후보 유전자들의 기능적인 부분과 유전자위는 University of Stanford 와 National Institutes of Health (NIH) 에서 제공하는 웹사이트인 <http://source.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch> (SOURCE) 와 <http://apps1.niaid.nih.gov/david> (DAVID) DATABASE 를 이용하여 검색하였으며, 각 사이트에서 제공 되는 유전자의 기능 정보가 다를 경우, 그 두 가지의 정보를 모두 참고하였다.

A. Study scheme



B. Analysis scheme

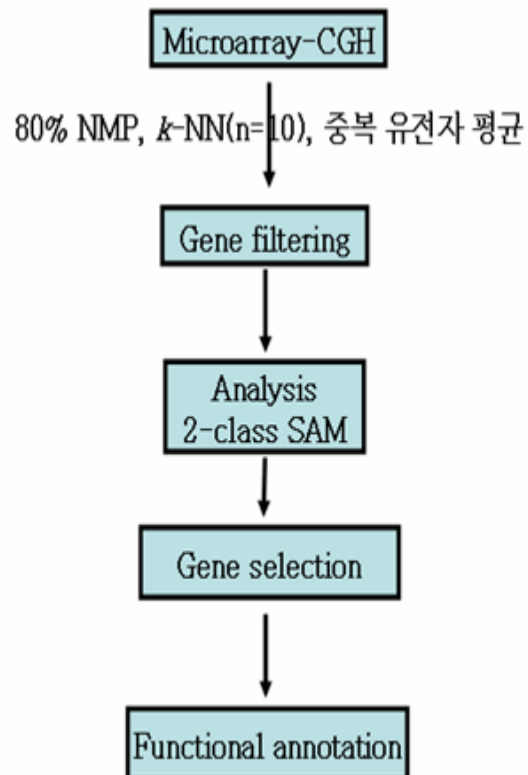


Figure 1. Study and analysis scheme

III. 결과

1. Microarray-CGH 결과 전 처리 과정

국소 진행성 직장암 환자들에게서 항암 약물 방사선 병행 요법 후 나타나는 치료의 효과와 부작용을 예측하기 위하여 국소 진행성 직장암으로 판정받은 33명 환자에게서 얻은 생검 조직, 종양조직, 정상조직 그리고 말초혈액 단핵구 총 77예의 유전적 변화를 Microarray-CGH를 수행하였다 (Table 1). Table 1에서 (+)로 보여지는 것은 실험을 진행하여 결과까지 얻어진 것을 의미하고, 환자군들 중에 (-)으로 되어 있는 것은 치료 후 수술이 진행되지 않은 경우를, NA는 실험을 하는데 적합하지 않은 DNA의 양질이나 양의 부족으로 실험이 진행되지 않은 경우이다. 전체 실험에서 flag %는 25 ± 5 %로 실험간에 나타나는 variation은 차이가 없음을 확인하였으며, 일정한 실험 pattern을 관찰하였다 (Figure 2).

Microarray-CGH 의 수치화된 결과는 실험간의 variation을 줄이기 위하여 표준화 하였으며, 표준화 수행 하기 전과 후의 변화 정도를 M-A plot 과 Box plot을 이용하여 관찰하였다 (Figure 3, 4). M-A plot에서 검정색은 표준화 수행 전에 각 spot이 갖는 log ratio와 intensity를 나타내는 것이고, 주황색은 표준화 수행 후에 보정되어 나타난 값을 의미한다. 표준화 전과 후에서 큰 변화가 많지 않아 양질의 실험과 실험의 재현성을 확인하였다.

표준화 수행 후, NMP 80%를 취하여, 중복 유전자는 평균을 하였으며, 보정한 후 4,656 개의 유전자를 분석에 사용하였다.

Table 1. Components of patients samples

Patient	Biopsy	Normal	Tumor	Mononuclear cells
1	+	-	-	NA
2	+	-	-	+
3	+	-	-	NA
4	+	-	-	NA
5	+	-	-	NA
6	+	-	-	NA
7	+	-	-	+
8	+	-	-	+
9	+	-	-	+
10	NA	-	-	+
11	+	-	-	NA
12	NA	+	+	NA
13	+	-	-	NA
14	+	+	+	+
15	+	-	-	NA
16	+	+	+	+
17	+	+	+	+
18	+	-	-	NA
19	NA	+	+	+
20	+	+	+	+
21	+	+	+	+
22	+	+	+	+
23	+	+	+	+
24	+	-	-	+
25	NA	+	-	+
26	+	+	+	NA
27	+	+	+	+
28	NA	+	+	+
29	+	+	+	+
30	+	+	+	+
31	+	-	-	+
32	+	-	-	NA
33	+	-	-	NA

The (+) represents completed experience. The (-) represents incompleting experience, because of patients could not operate, so we could not obtain sample tissues. The (NA) means incompleting experience, because of inadequate DNA qualities or DNA quantities for experience.

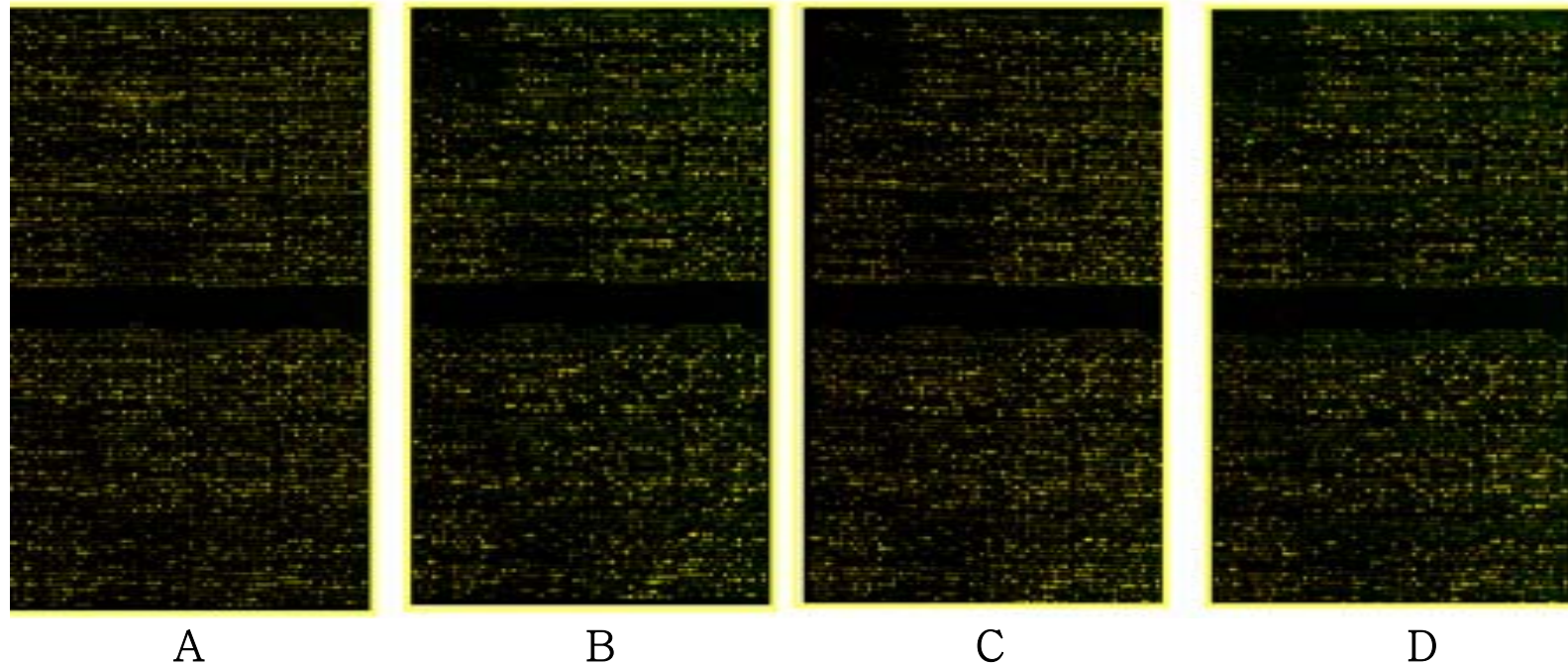


Figure 2. Representative scanned image of Microarray-CGH

(A) Biopsy tissue before CCRT treatment (B) Mononuclear cell before CCRT treatment (C) Normal tissue after CCRT treatment at a time of operation (D) Tumor tissue after CCRT treatment at a time of operation

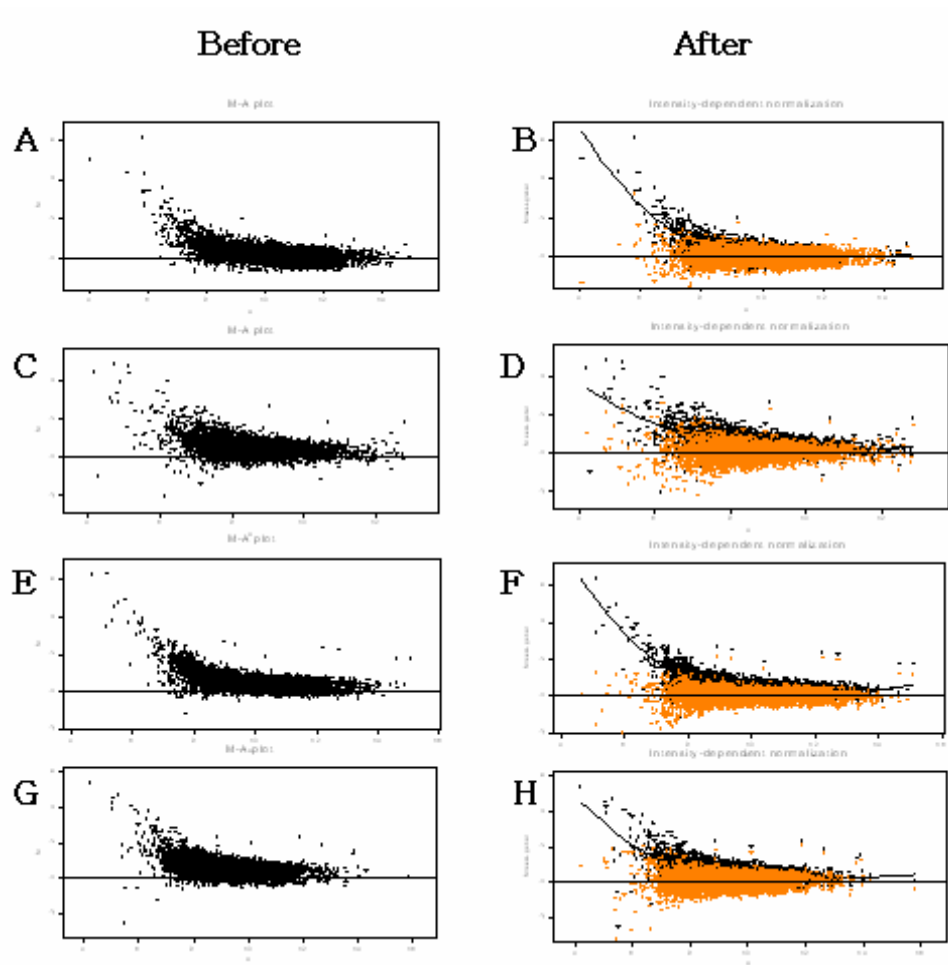


Figure 3. M-A plot before and after normalization

(A, B) Biopsy tissue before CCRT treatment, (C, D) Mononuclear cells before CCRT treatment, (E, F) Normal tissue after CCRT treatment at a time of operation, (G, H) Tumor tissue after CCRT treatment at a time of operation. The log ratios ($M = \log_2 R/G$) are plotted on the y -axis against the log of the geometric mean of the signal intensities ($A = \log_2 \sqrt{R/G}$) for each spot on the slides.

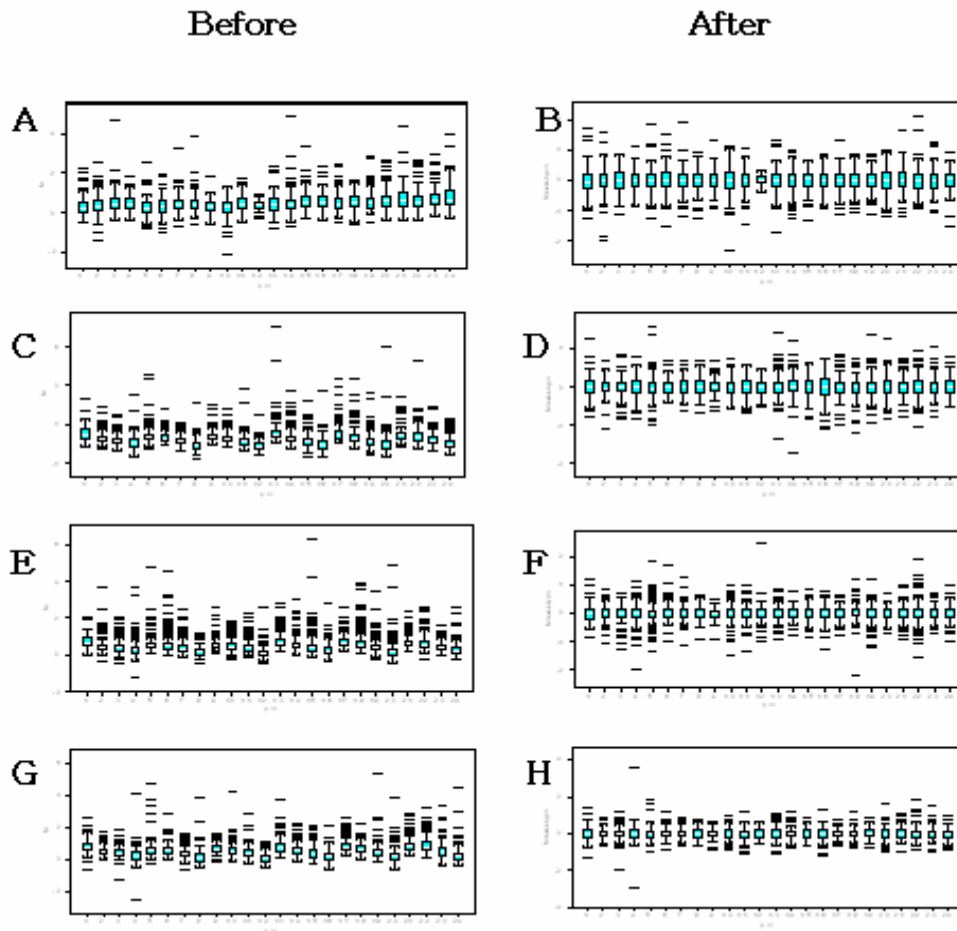


Figure 4. Box plot before and after normalization

(A, B) Biopsy tissue before CCRT treatment, (C, D) Mononuclear cells before CCRT treatment, (E, F) Normal tissue after CCRT treatment at a time of operation, (G, H) Tumor tissue sample after CCRT treatment at a time of operation. This plot displays a statistical summary consisting of the median, upper, and lower quartiles as well as the range. The central box in a plot represents the the Inter Quartile Range, which is defined as the difference between 75th and 25th percentile, or the upper and lower quartiles.

2. Unsupervised Hierarchical clustering을 이용한 Microarray-CGH 전체 결과 양상 관찰

Microarray-CGH 실험을 수행 한, 전체 77예의 DNA 수준에서의 유전적 변화 양상을 2차원 계층 군집 분석을 수행하여 관찰하였다 (Figure 5-A). 20예 중에서 10예의 단핵구가 조직과는 다르게 조직 특이적으로 가깝게 묶이는 결과를 보였다. 33명의 환자 샘플 중에서 생검 조직, 정상 조직, 종양 조직, 단핵구 등 4개의 샘플이 모두 있는 10명의 유전적 변화 양상을 관찰하였다 (Figure 5-B). 단핵구는 다른 조직과는 다르게 묶이는 것을 확인하였다. 또한, 10명의 샘플 중에서 종양 특성을 갖는 진단 당시의 생검 조직과, 치료 후의 종양 조직의 양상을 살펴 보았을 때, 개인특성으로 인하여 생검 조직과 종양 조직이 가깝게 묶이는 결과는 한 예도 없었다. 본 결과에서 개인의 생검 조직과 종양 조직의 유전적 양상이 다르게 나타나는 것을 관찰하였다. 이후의 분석에서는 생검 조직만을 사용하였고, 종양 조직에서의 분석은 하지 않았다.

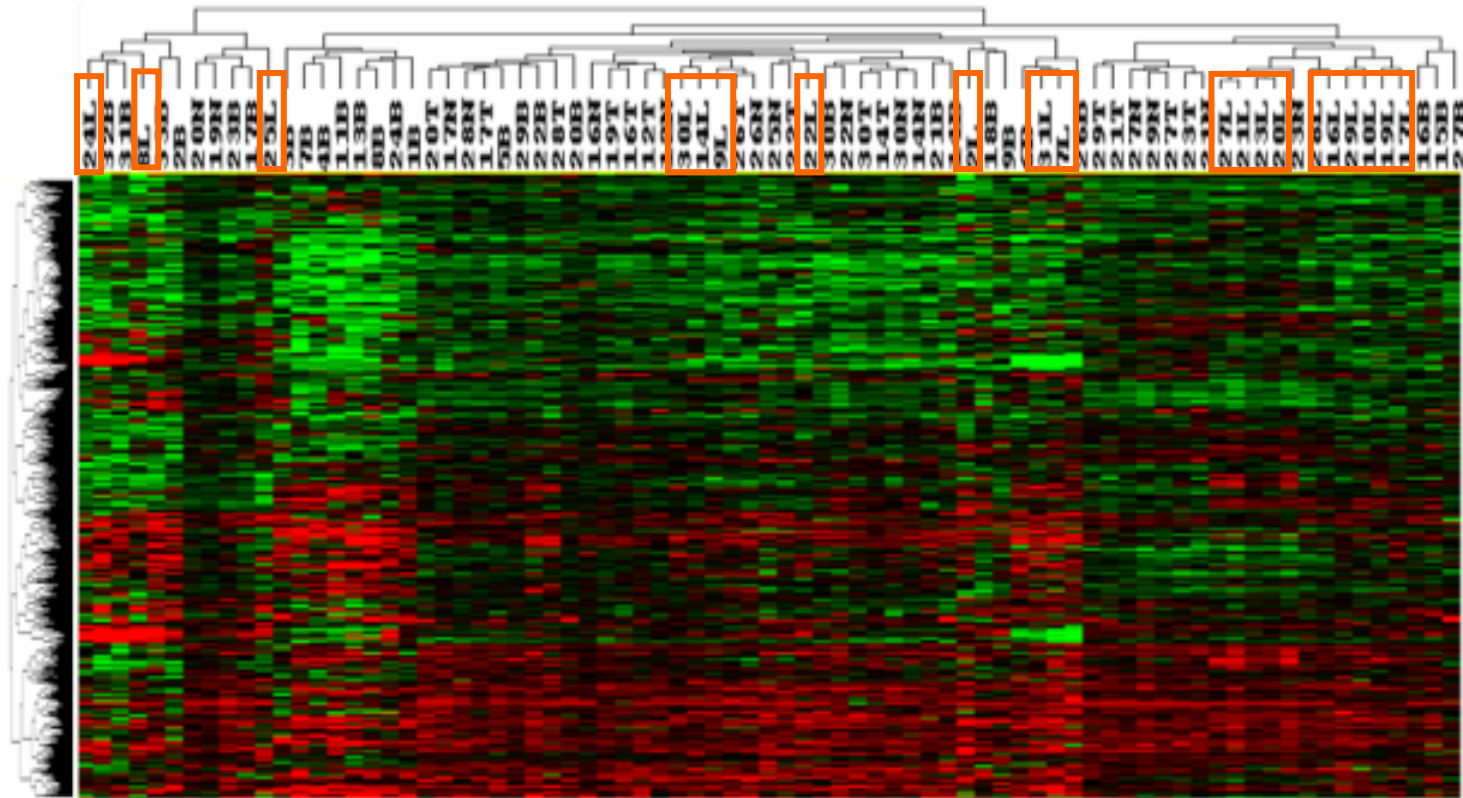


Figure 5-A. Two-way hierarchical clustering of all experiments.

The B, L, N and T represent biopsy, mononuclear cells, normal and tumor tissue, respectively. A number represents each patient's sample.

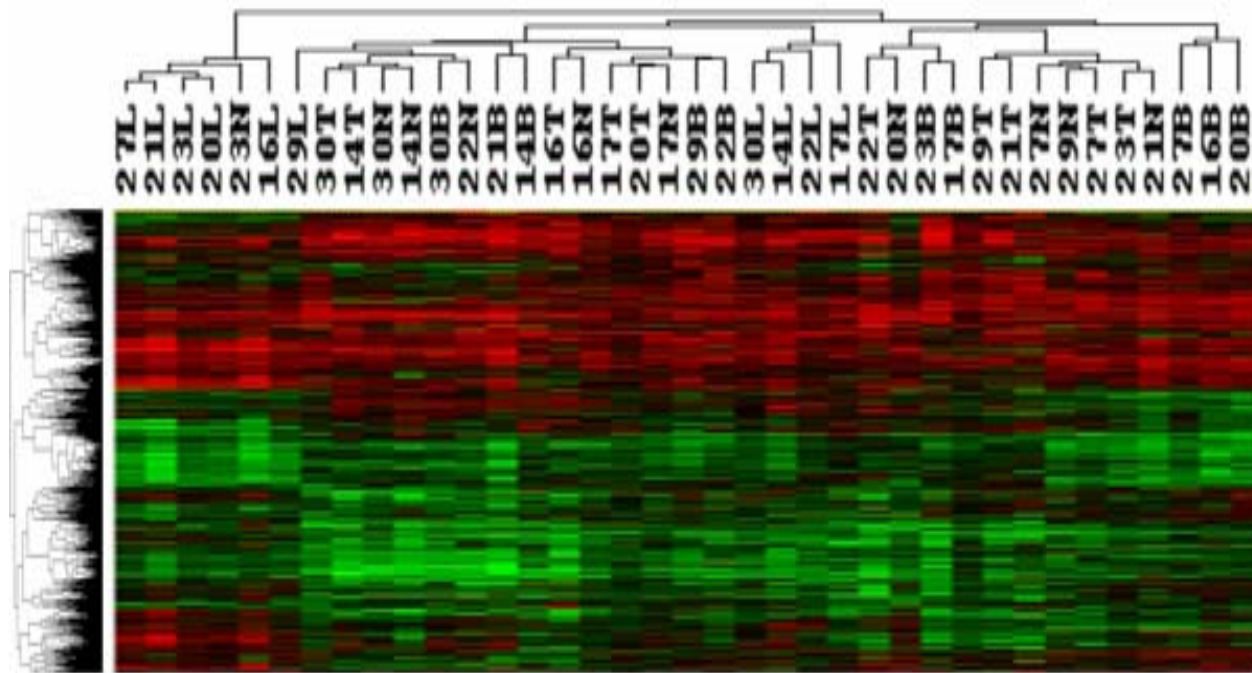


Figure 5-B. Two-way hierarchical clustering of paired samples.

3. 항암 약물 방사선 병행요법 효과 예측 유전자군 선별

가. 치료 효과를 예측할 수 있는 후보 유전자군 선정

치료의 효과를 예측할 수 있는 후보 유전자군을 선정하기 위하여 진단 당시 생검 조직 중에서 임상 자료를 바탕으로 임상 자료가 정리 되어진 16예의 결과를 분석에 이용하였다. 분석에 사용된 16예는 치료의 효과를 보이는 8예와 효과가 없는 8예의 환자 군으로 나뉘었다. 두 군에서 차이나는 유전자를 알아보기 위해서 two-class SAM을 통하여 FDR을 기준으로 103개 (FDR 24.4 %), 52개 (FDR 20 %), 29개 (FDR 14.9 %)의 유전자 군을 선별하였다. 각 유전자들은 SAM을 통하여 선별된 순서대로 나열하였으며, 반응군과 비반응군의 각 유전자가 갖는 log ratio값을 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 를 취하여 유전자 이상의 빈도를 관찰하였다 (Table 2). FDR 14.9 %에서 선정된 29개의 유전자 군에는 1번 (RBM15, KCNN3), 3번 (RPL29, ESDN), 10번 (KIAA0187, PRG1) 11번 (MEN1, POLD3), 17번 (KIF1C, CCL3) 염색체에 위치한 유전자가 각각 2개, 6번 염색체에 위치한 유전자는 6개 (MAP3K5, C6orf64, PSORS1C1, VPS52, MGC62004, COL11A2)가 포함되어 있었다. 29개의 유전자 중에서 상위 10위 이내에 6번 염색체에 위치하는 유전자는 4개가 포함되어 있었으며, 그 중 6p21에 위치하는 유전자가 3개였다.

선별된 29개 유전자들을 염색체 상에서 유전자 증폭이나 결실을 관찰하기 위하여 ± 0.3 log ratio를 기준으로 하여 각 반응군에서의 유전자를 빈도수를 확인하였다 (Table 3). 반응군에서는 19개의 유전자에서 12.5-75 % 빈도의 유전적 결실을 보인 반면, 비반응군에서는 단 하나의 유전자만이 25 %의 유전적 결실을 보였다. 또한 반응군에서 4개의 유전자가 12.5-25 % 빈도의 유전적 증폭을 나타냈고, 비반응군에서는 22개의 유전자가 12.5-100 %의 빈도로 유전적 증폭을

나타나는 것을 확인하였고, 이를 바탕으로 선별된 유전자의 양상이 치료 반응군에 따라 다르게 나타나는 것을 확인하였다.

Table 2. List of 29 response predictive genes

ID	Symbol	Location	*Responder range	*Non-responder range
AA916857	KIAA1443	14q11.2	-0.21±0.21	0.27±0.17
AA243439	MEN1	11q13	-0.27±0.17	0.09±0.09
AA150828	MAP3K5	6q23	0.18±0.17	0.76±0.37
AA504204	POLD3	11q14	-0.10±0.10	0.19±0.15
AI457164	KIF1C	17p13.3	-0.02±0.29	0.72±0.47
AA668388	PTAFR	1p35-p34.3	-0.07±0.07	0.08±0.06
AA151214	G3BP2	4q21.21	-0.07±0.13	0.34±0.30
AA886775	C6orf64	6p21.2	-0.28±0.14	-0.04±0.11
W95595	PSORS1C1	6p21.3	-0.02±0.26	0.47±0.31
AA460927	TSN	2q21.1	-0.04±0.14	0.18±0.08
AA454836	VPS52	6p21.3	-0.27±0.23	0.02±0.07
AA910208	ESTs	—	-0.03±0.19	0.26±0.14
AI018613	RPL29	3p21.3-p21.2	0.05±0.10	0.27±0.12
AA458848	RBM15	1p13	0.001±0.21	0.3±0.12
AA677522	CCL3	17q11-q21	0.30±0.29	0.11±0.21
AI768802	WWP2	16q22.1	0.11±0.25	0.46±0.16
AA521340	FLJ31657	8q12.2	-0.11±0.30	0.56±0.26
AA915891	KIAA0187	10q11.21	0.27±0.13	0.01±0.19
AA826368	MGC62004	6p21.1	0.25±0.23	0.08±0.15
AA278759	PRG1	10q22.1	-0.05±0.10	0.28±0.16
N22033	COL11A2	6p21.3	-0.17±0.22	0.14±0.13
AA279070	ESTs	—	0.13±0.25	0.22±0.17
AA443998	NUDT1	7p22	-0.01±0.17	0.33±0.25
AA879118	FUT1	19q13.3	-0.20±0.12	0.002±0.09
AA991514	POLK	5q13	-0.07±0.20	0.22±0.15
AI302412	ESDN	3q12.2	-0.31±0.15	-0.08±0.10
AI002416	ESTs	—	-0.61±0.26	-0.24±0.20
AA987359	ESTs	—	-0.14±0.23	0.23±0.18
AA491238	KCNN3	1q21.3	0.03±0.19	0.19±0.29

*range : each group's log ratio mean \pm SD

Responder n=8, Non-responder n=8

ID means Genebank ID, Symbol means abbreviation of gene name, Location means location of gene on chromosome. These information obtained DAVID and SOURCE website.

Table 3. Observation of genetic alteration frequency of response predictive genes (%)

Function	ID	Responder		Non-responder	
		Gain %	Loss %	Gain %	Loss %
Ribosome biogenesis	AA915891	—	50	12.5	—
DNA recombination	AA460927	—	—	12.5	—
Mismatch repair	AA504204	—	—	12.5	—
Signaltransducer activity	AA677522	—	50	25	—
Cell adhesion	AI302412	—	37.5	—	—
Cell growth	AA458848	12.5	—	37.5	—
Ion channel activity	AA491238	—	37.5	—	—
Regulation of transcription	AA243439	—	12.5	50	—
triphosphatase activity	AA443998	—	12.5	50	—
Motor activity	AI457164	—	12.5	75	—
catalytic activity	AI018613	—	—	12.5	—
fucosyltransferase activity	AA879118	—	25	—	—
Ligase activity	AI768802	12.5	—	87.5	—
Protein transporter activity	AA151214	—	—	50	—
Immune response	AA668388	—	—	—	—
Structural constituent of cytoskeleton	AA987359	—	25	25	—
Cell adhesion	N22033	—	12.5	12.5	—
unknown	AA991514	—	25	12.5	—
Function	AA454836	—	25	—	—
	AA916857	—	37.5	50	—
	AA886775	—	25	—	—
	AA521340	25	12.5	75	—
	AA150828	25	—	100	—
	AA278759	—	—	50	—

Table 3. *continued*

W95595	—	12.5	62.5	—
AA826368	—	25	12.5	—
AA279070	—	12.5	25	—
AI002416	—	75	—	25
AA910208	—	—	37.5	—

*(-) : 유전자 변화 없음

Responder n=8, Non-responder n=8

나. 치료에 대한 반응 군과 비 반응 군의 유전적 변이 양상 관찰

치료의 효과를 예측할 수 있는 3개의 유전자군을 이용하여 환자군을 clustering 하였다. 각 유전자의 FDR 값은 각각 차이를 보였지만 선정된 3개의 유전자군 모두 반응군과 비반응군으로 구별 할 수 있는 유전자군임을 확인하였다 (Figure 6-A, B, C).

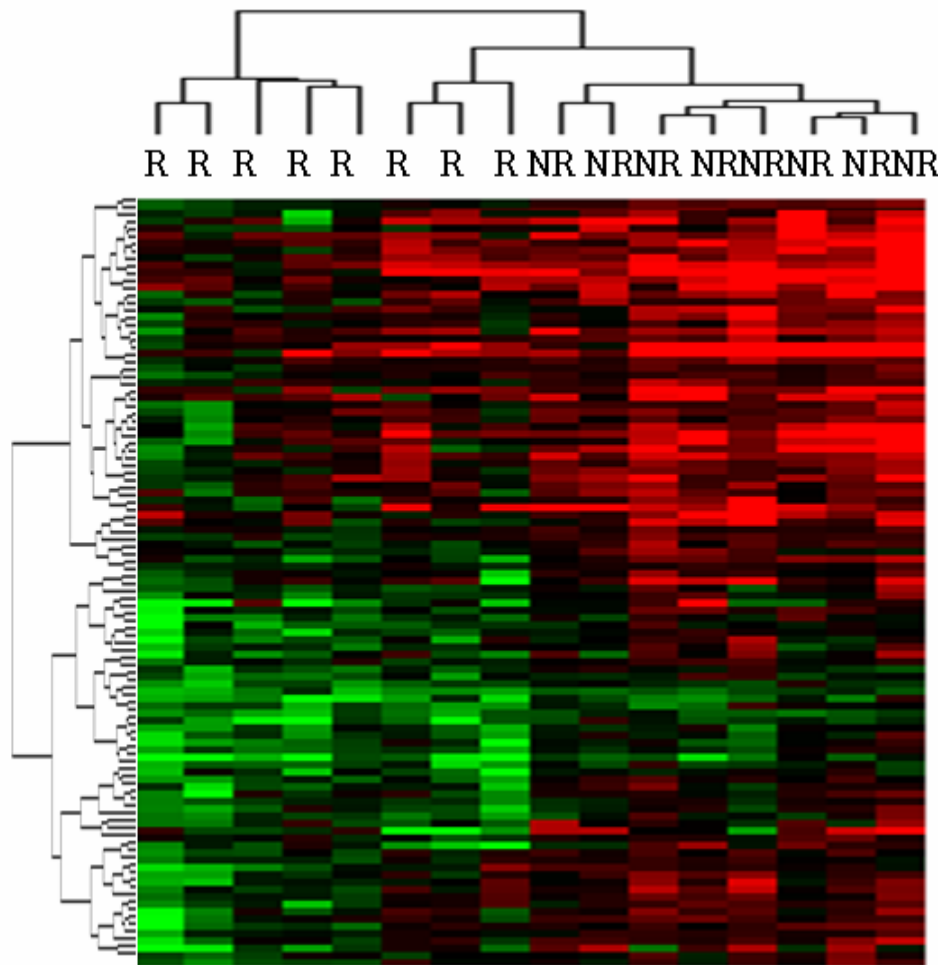


Figure 6-A. Genetic alteration patterns distinguishing responder from non-responder. Hierarchical clustering of 103 genes (FDR 24.4 %) whose genetic alteration differentiating responders (R) from non-responders (NR).

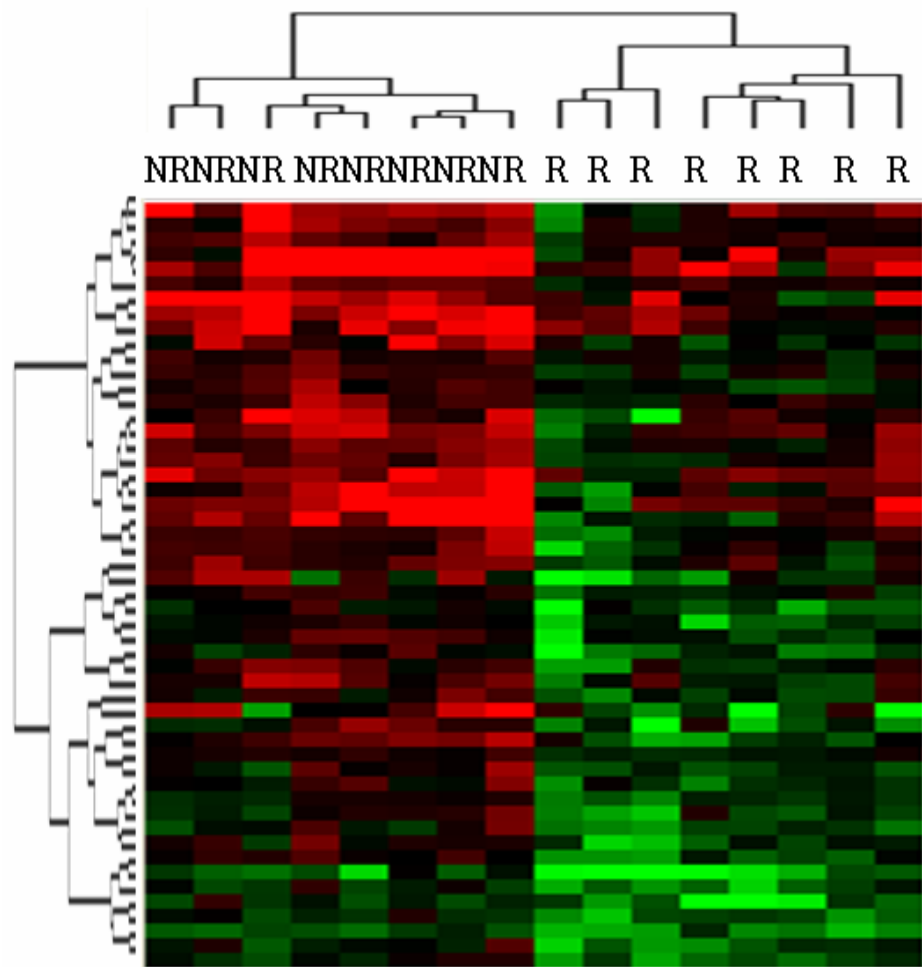


Figure 6-B. Genetic alteration patterns distinguishing responder from non-responder. Hierarchical clustering of 52 genes (FDR 20 %) whose genetic alteration differentiating responders (R) from non-responders (NR).

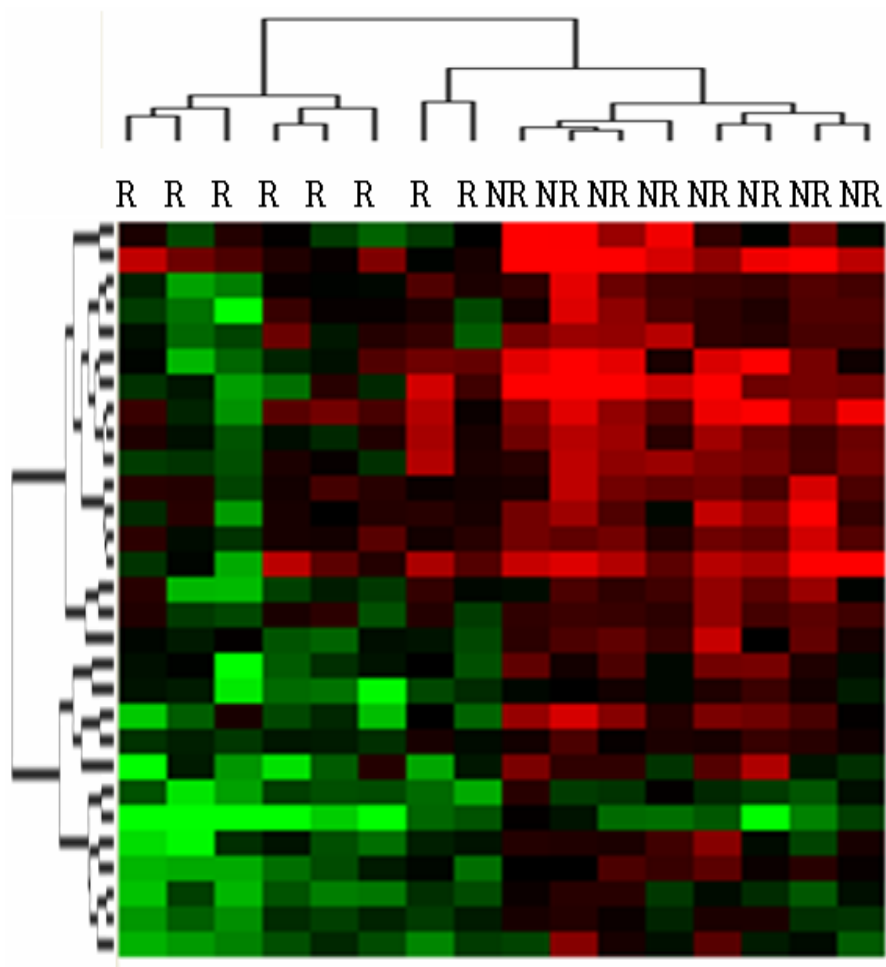


Figure 6-C. Genetic alteration patterns distinguishing responder from non-responder. Hierarchical clustering of 29 genes (FDR 14.9 %) whose genetic alteration differentiating responders (R) from non-responders (NR).

다. 치료의 효과를 예측할 수 있는 후보 유전자 군의 기능해설

치료의 효과를 예측 할 수 있는 29개의 유전자 군의 기능을 Stanford University 와 National Institutes of Health (NIH) 에서 제공하는 웹사이트인 <http://source.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch> (SOURCE)와 <http://apps1.niaid.nih.gov/david> (DAVID) DATABASE를 이용하여 검색하였다. 선별된 유전자 군을 기능에 따라 크게 ribosome biogenesis, DNA recombination, mismatch repair, catalytic activity, cell growth, cell adhesion, regulation of transcription 등으로 나눌 수 있었다 (Table 3). MAP3K5 (AA150828)은 apoptosis 관련 molecule로써 비반응군에서 100 %의 빈도로 유전자 증폭을 보였다. 면역 반응과 관련된 PTAFR (AA668338)에서는 유전자 이상이 관찰되지 않았지만, signal transducer activity를 갖는 CCL3 (AA677522)는 반응군에서 50 % 빈도의 유전자 결실이, 비반응군에서는 25 %의 유전자 증폭이 관찰되었다. DNA repair와 관련되어 triphosphatase activity를 갖는 NUDT1 (AA443998)와 POLK (AA991514)가 포함되어 있었고, cell adhesion 과 cell growth를 조절하는 RBM15 (AA458848), COL11A2 (N22033), ESPN (AI302412)가 있었다.

4. 항암 약물 방사선 병행요법 부작용 예측 유전자군 선별

가. 치료에 대한 부작용을 예측할 수 있는 후보 유전자 군 선별

국소 진행성 직장암 환자에게 항암 약물 방사선병행요법에 대하여 부작용을 예측할 수 있는 유전자 선별을 위하여 치료 시행 전에 채취한 단핵구의 Microarray-CGH 결과를 이용하였다. 임상 자료를 바탕으로 항암 약물 방사선 병행 요법을 시행 받은 환자의 주된 부작용은 백혈구 감소증 (neutropenia) 이다. 백혈구 감소증을 예측할 수 있는 유전자군을 선별하기 위하여 4도 백혈구 감소증을 나타내는 8명의 환자와 4도 백혈구 감소증을 보이지 않는 5명의 환자를 두 개의 군으로 나누어 two-class SAM을 수행하여, FDR을 기준으로 95개 (FDR 17.1 %), 40개 (FDR 14.9 %), 31개 (FDR 11 %)의 유전자 군을 선별하였다. 31개의 유의한 유전자를 부작용군과 비부작용군에서 각 유전자가 갖는 log ratio를 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 를 취하여 부작용군과 비부작용군에서, 유전자 이상의 빈도를 관찰하였다 (Table 4, 5). Table 4는 선별된 31개의 유전자를 상위 ranking 순서로 나열한 것이다. 이 중에서 12개의 EST가 포함되어 있었다.

백혈구 감소증에서 선별된 유전자의 유전자위 구성을 확인하였을 때 3번 (HSPC016, CTNNB1), 16번 (CYB5-M, EST), 6번 (C6orf64, LOC116254, KIAA1423, CRSP3) 염색체에 각각 2, 2, 4개의 유전자가 속해있었다. 유전자 결실과 증폭을 관찰하기 위하여 ± 0.3 을 기준으로 유전자 이상의 빈도를 관찰하였다. 부작용군에서 11개의 유전자가 유전자 증폭을 나타낸 반면, 비부작용군에서는 15개의 유전자에서 유전자 결실을 보였다. EST (AA864968), FOXM1 (AA136566)은 부작용군 특이적으로 각각 37.5 %의 유전자 증폭을 나타내었다. 부작용과 관련되어 선별된 31개의 유전자 중에서 가장 상위를 차지한 HCP15 (R53311)은 비부작용군에서만 60 %의 빈도로 유전자 결실을 보였다. 본 결과에서

12개의 EST는 전체적으로 비부작용군에서 유전적 결실이 일어났거나, 부작용군에서 유전적 증폭이 일어났음을 확인하였다.

Table 4 에서 반응군과 비반응군에서의 각각의 유전자 범주는 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 로 관찰하였다.

Table 4. List of 31 G IV neutropenia predictive genes

ID	Symbol	Location	*Patients with toxicity range	*Patient with non-toxicity range
R53311	HCP15	—	-0.04±0.12	-0.34±0.06
AI337434	EST	—	0.25±0.16	-0.10±0.09
AA491249	HSPC016	3p21.31	0.23±0.07	0.01±0.09
AA886775	C6orf64	6p21.2	-0.01±0.10	-0.28±0.13
AA872402	EIF4B	12q13.13	0.29±0.15	-0.04±0.14
AI017846	PHGDHL1	13q32.3	0.08±0.10	-0.14±0.07
AI015570	EST	—	0.07±0.06	-0.11±0.09
AA917489	EST	—	-0.15±0.20	-0.50±0.12
AA865644	EST	—	0.10±0.11	-0.12±0.09
AW058504	CTNNB1	3p21	0.08±0.11	-0.27±0.09
AA283030	METAP2	12q23.1	-0.02±0.17	-0.33±0.13
AA903253	LOC116254	6q24.3	0.06±0.09	-0.12±0.07
AA946743	C20orf80	20q11	0.11±0.20	-0.26±0.17
AA976851	KIAA1423	6q25.3	0.23±0.18	-0.07±0.05
AI000214	EST	—	0.001±0.05	-0.15±0.07
AA903935	KIAA2025	1q24.2	0.06±0.09	-0.14±0.10
AW005659	VAT1	17q21	0.13±0.15	-0.14±0.07
AA864968	EST	—	0.26±0.09	0.03±0.12
AI352362	ATP8B1	18q21-q22	-0.11±0.13	-0.35±0.10
AA858026	SERPINA3	14q32.1	-0.03±0.04	-0.23±0.15
AA136125	EST	—	0.01±0.17	-0.31±0.17
AA894776	EST	—	-0.03±0.19	-0.52±0.37
AA862450	EST	—	0.11±0.09	-0.17±0.20
AA504481	CRSP3	6q22.33-q24.1	0.26±0.07	0.07±0.12
AA136566	FOXMI	12p13	0.25±0.18	-0.09±0.18
AA505135	C10orf4	10q23.33	0.22±0.08	0.04±0.08
AA970729	CYB5-M	16q22.1	0.23±0.08	0.04±0.10
AA931124	EST	—	-0.04±0.18	-0.34±0.08

Table 4. *continued*

AA976427	IDS	Xq28	0.003±0.13	-0.23±0.05
AA625632	EST	16q21	-0.06±0.12	-0.30±0.13
AA278387	EST	—	0.23±0.10	-0.08±0.25

*range : each group's log ratio Mean±SD

Patient with toxicity n=8, Patient with non-toxicity n=5

Table 5. Frequency of genetic alteration G IV Neutropenia predictive genes (%)

Function	ID	Patient with toxicity		Patient with non-toxicity	
		Gain %	Loss %	Gain %	Loss %
ATPase activity	AI352362	—	12.5	—	80
Hydrolase activity	AA976427	—	—	—	20
Hydrolase activity	AA283030	—	—	—	40
Microtubule motor activity	AA864968	37.5	—	—	—
Serine-type endopeptidase inhibitor activity	AA858026	—	—	—	20
Transcription factor activity	AA136566	37.5	—	—	—
Cell growth	AW005659	12.5	—	—	—
Cell adhesion	AW058504	12.5	—	—	40
Protein biosynthesis	AA872402	12.5	—	—	—
Catalytic activity	AA976851	12.5	—	—	—
	AA903935	—	—	—	—
	AA505135	12.5	—	—	—
	AA491249	—	—	—	—
	AA886775	—	—	—	40
Nucleoside-triphosphatase activity	AA903253	—	—	—	—
Regulation of transcription	AA504481	25	—	—	—
Electron transport	AA970729	25	—	—	—
Unknown function	AI017846	—	—	—	—

Table 5. *continued*

AA946743	12.5	—	—	60
AA625632	—	12.5	—	40
AA136125	—	—	—	40
R53311	—	—	—	60
AI337434	25	—	—	—
AI015570	—	—	—	—
AI000214	—	—	—	—
AA931124	—	—	—	60
AA917489	—	25	—	100
AA278387	—	25	—	20
AA865644	—	—	—	—
AA894776	—	—	—	60
AA862450	—	—	—	40

*(-) : 유전자 변화 없음

Patient with toxicity n=8, Patient with non-toxicity n=5

나. 치료에 대한 부작용을 나타내는 환자 군과 부작용을 보이지 않는 환자 군의 유전적 양상 관찰

백혈구 수치 저하를 예측할 수 있는 95개, 40개, 31개의 후보 유전자군의 cluster 결과는 백혈구 수치 저하를 보이는 8명의 환자군과 백혈구 수치 저하를 보이지 않는 5명의 환자군을 구별할 수 있었다 (Figure 7-A, B, C).

FDR 17.1 %로 선정된 95개의 유전자를 사용하여 cluster를 시행한 결과 (Figure 7-A) 에서 1예의 비부작용군이 부작용군에 섞이는 결과를 보였다.

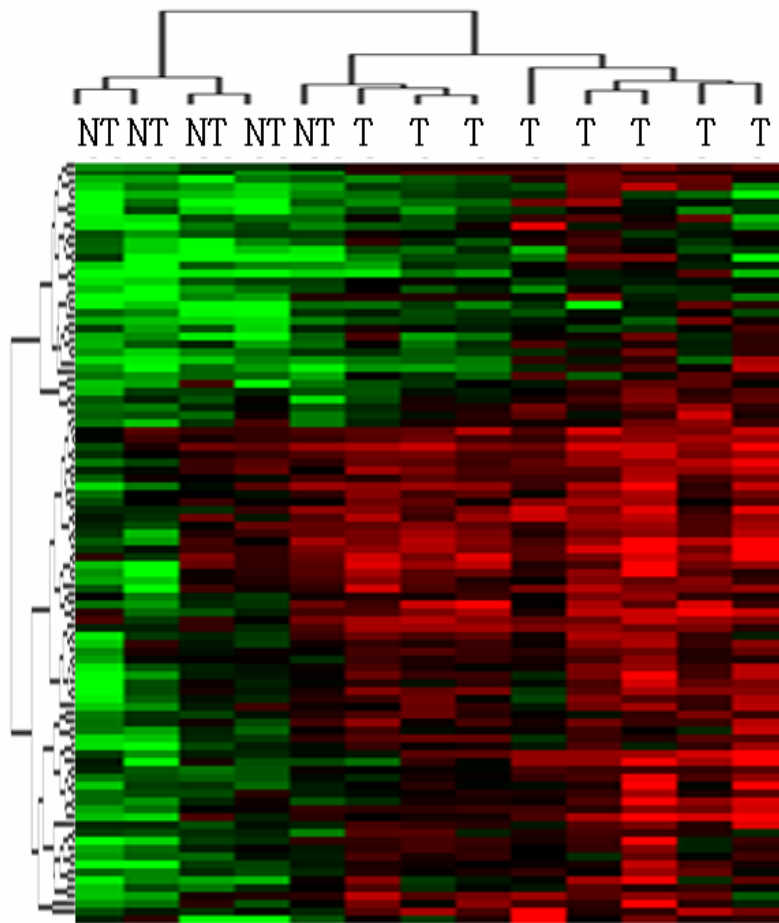


Figure 7-A. Genetic alteration patterns distinguishing responder from non-responder. Hierarchical clustering of 95 genes (FDR 17.1 %) whose genetic alteration differentiated patient with toxicity (T) from patient with non-toxicity (NT)

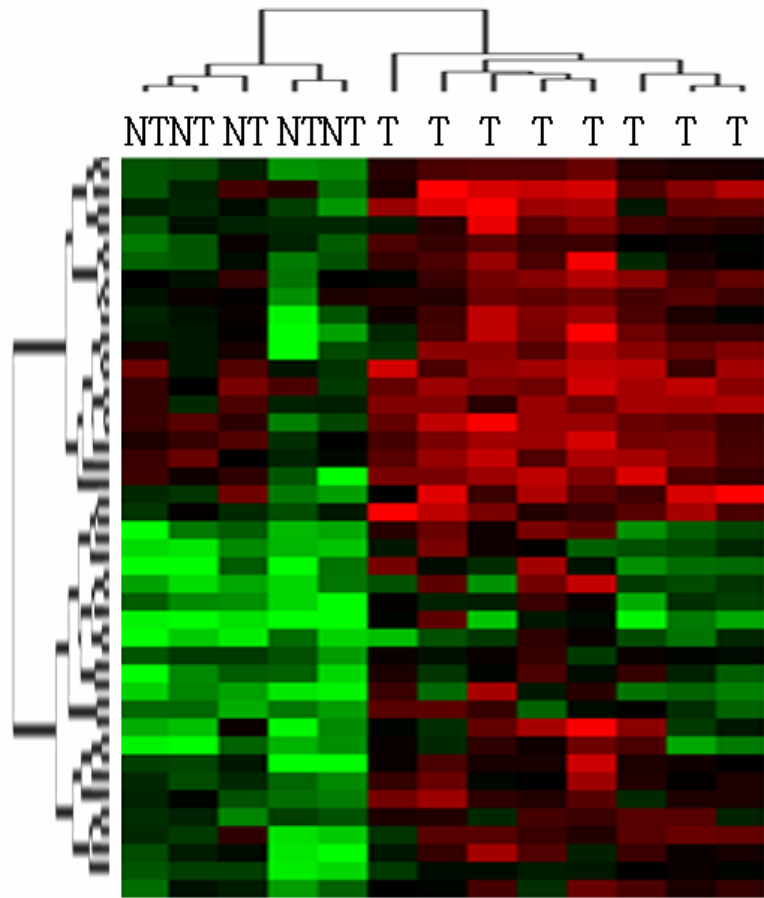


Figure 7-B. Genetic alteration patterns distinguishing responder from non-responder. Hierarchical clustering of 40 genes (FDR 14.9 %) whose genetic alteration differentiated patient with toxicity (T) from patient with non-toxicity (NT)

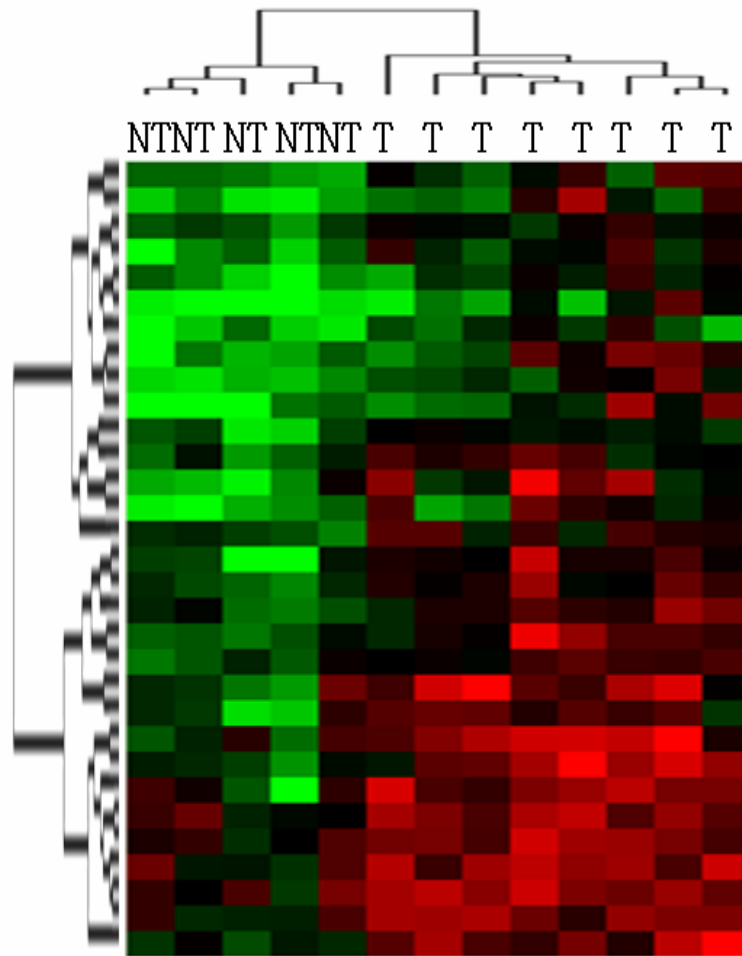


Figure 7-C. Genetic alteration patterns distinguishing responder from non-responder. Hierarchical clustering of 31 genes (FDR 11 %) whose genetic alteration differentiated patient with toxicity (T) from patient with non-toxicity (NT)

다. 치료의 부작용을 예측할 수 있는 후보 유전자 군의 기능해설

치료의 효과를 예측 할 수 있는 후보 유전자 군과 마찬가지로 항암 약물 방사선 병행 요법에 대하여 나타나는 부작용인 백혈구 수치 저하 부작용을 예측 할 수 있는 후보 유전자 31개의 유전자 군의 기능을 검색하였다. 선별된 31개의 유전자는 기능에 따라 크게 catalytic activity, cell growth, cell adhesion, regulation of transcription 등으로 나눌 수 있었다 (Table 5). Catalytic activity 기능군에 속하는 유전자중에서 ATPase activity를 갖는 ATP8B1 (AI352362)와 microtubule motor activity를 갖는 DAHP5 (AA864968)이 있었다. 그리고 염증반응에 관여하는 SERPINA3 (AA858026)이 속해 있었다. Transcription factor activity를 갖는 FOXM1 (AA136566)과, translation initiation을 조절하여 단백질 생합성에 관여하는 EIF4B (AA872402)와 hydrolase activity로 translation 단계를 조절하는 METAP2 (AA283030)이 있었다. Cell adhesion과 관련된 CTNN1 (AW058504)가 있었다.

5. 5-FU 관련 유전자 양상 관찰

본 연구의 항암 약물 방사선병행 요법에 사용된 항암제인 5-FU와 관련된 유전자의 변이 양상을 살펴보았다. 5-FU의 표적인자인 TS, TP와 대사효소인 DPD 중에서 본 실험에 사용된 microarray에 포함된 TS (AA663310)의 유전자 양상을 조직검사 자료에서 관찰하였다. 반응군과 비반응군에서 TS (AA663310)의 log ratio는 각각 -0.10 ± 0.36 , -0.34 ± 0.49 의 범위로, 치료의 효과가 없는 비반응군에서 유전자 결실의 양상을 보여주고 있다. TS의 유전자 이상을 빈도로 살펴보았을 때, 반응군에서는 12.5 %의 유전적 결실이, 비반응군에서는 75 %의 유전자 결실을 관찰하였다. 즉, TS의 발현 감소는 5-FU의 치료 효과를 떨어뜨리게 되는데, 비반응군에서 보이는 TS의 유전자 결실은 이를 뒷받침 해주는 결과였다.

치료 효과에서와 마찬가지로 부작용 여부에 따라 TS (AA663310)의 유전자 이상을 단핵구 결과에서 관찰하였다. 부작용군과 비부작용군에서 TS (AA663310)의 log ratio는 각각 -0.40 ± 0.19 , -0.002 ± 0.21 의 범위로 나타났다. 또한 부작용군에서 TS (AA663310)는 37.5 % 빈도의 유전자 결실을 보이는 반면, 비부작용군에서는 유전자 이상이 관찰되지 않았다.

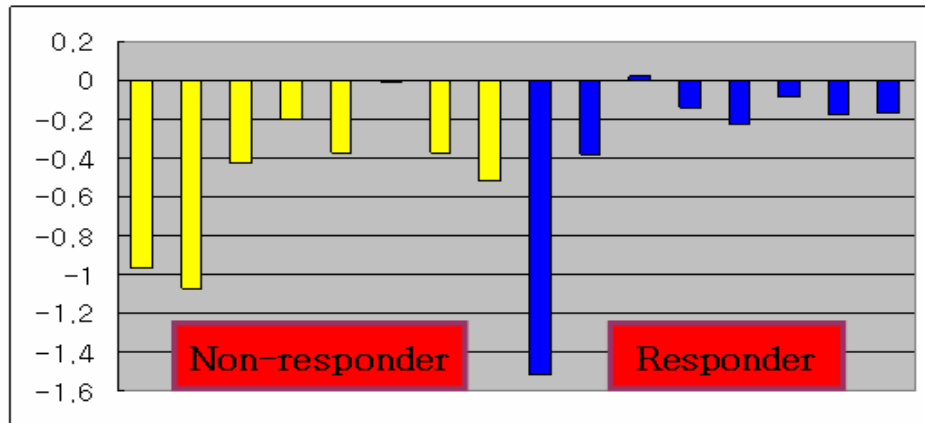
5-FU에 대한 치료의 효과를 보이면 심한 부작용 또한 나타나게 되는데 본 결과에서 반응군 8예 중에서 2예는 부작용군에 속해있었다. 8예의 결과에서 25 %의 빈도로 치료의 효과와 부작용이 동시에 나타나는 것을 확인하였다.

Figure 8-A는 반응군과 비반응군에서 보여지는 TS 유전자의 log ratio를 각각 막대 그래프로 나타낸 것이다. Figure 8에서 x축은 환자군을 나타내고 y축은 각 환자군에서 보이는 TS의 log ratio를 나타낸다. 두 군 모두 유전적 결실의 양상을 보이고 있는데, 전체 양상으로 볼 때, 반응군의 한 예를 제외한 나머지 7예를 살펴보면 비반응군과 비교하였을 때 유전적

이상이 보이지 않는 것을 알 수 있다.

Figure 8-B는 부작용군과 비부작용군에서 TS의 log ratio 값을 막대 그래프로 나타낸 것이다. 마찬가지로 부작용군에서는 전체 8예 모두 유전적 결실의 양상을 보이고 있는 반면, 비부작용군에서는 두 예는 유전적 증폭을, 나머지 3예는 유전적 결실을 보였다.

A.



B.

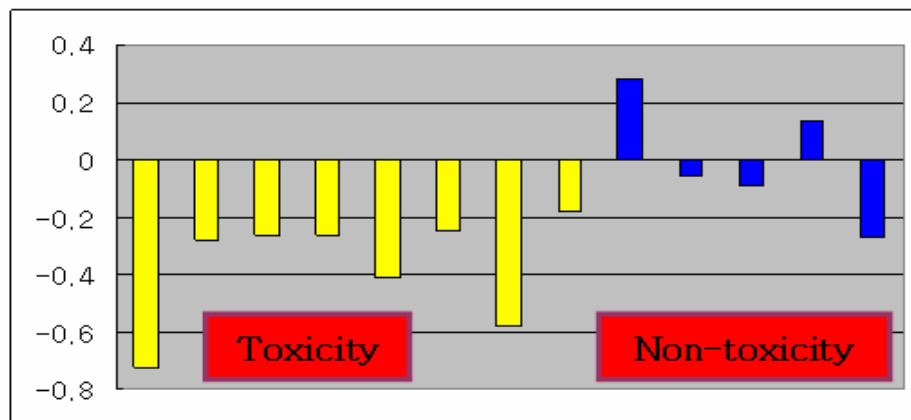


Figure 8. Observation of TS level in patients.

A. There are TS log ratio range in responder and non-responder. B. There are of TS log ratio in toxicity and non-toxicity

6. 치료 효과와 부작용 예측 중복 유전자 관찰

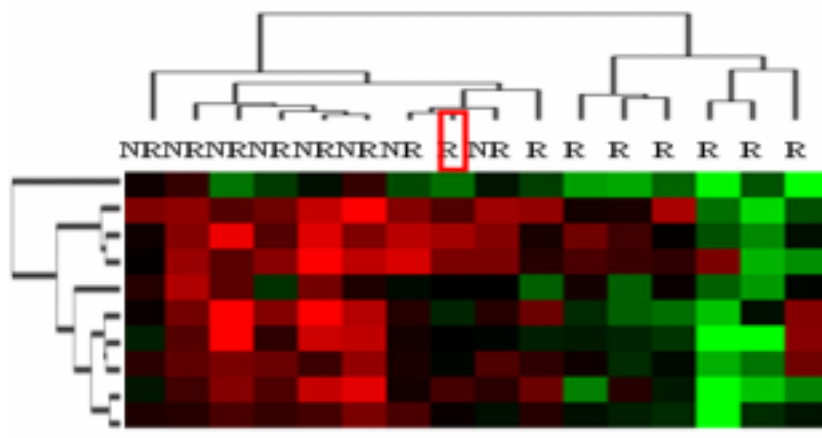
국소 진행성 직장암에서 시행되는 항암 약물 방사선 병행요법에 대한 치료의 효과와 부작용을 예측하기 위한 유전자를 선별하였다. 효과 예측 유전자 29개와 부작용 예측 유전자 31개에서 중복되는 유전자는 C6orf64 (AA886775, 6p21) 한가지였다. 유전자 수를 늘려 효과 예측 유전자 103개, 부작용 예측 유전자 95개중에서 살펴 보았을 때, 중복되는 유전자는 10개였다 (Table 6). 10개의 유전자를 이용하여 반응군과 비반응군 (Figure 9-A), 부작용군과 비부작용군이 구분되어지는지 살펴보았다 (Figure 9-B). 치료의 효과를 보이는 반응군 1예가 비반응군에 속하는 결과를 보였고 나머지 7예의 반응군과 8예의 비반응군의 구분되어졌다. 10개의 유전자로 부작용 여부에 따라서 부작용군과 비부작용군이 구분되어짐을 확인하였다.

10개의 유전자들을 살펴보았을 때, 이 유전자들은 반응군 8개 유전자에서는 유전적 결실을, 비반응군에서는 7개 유전자에서 유전적 증폭을 나타냈다. 또 부작용군에서는 4개의 유전자에서 유전적 증폭을, 비부작용군에서는 7개의 유전자에서 유전적 결실을 나타냄을 관찰하였다.

Table 6. List of 10 overlap genes between response and toxicity in CCRT

ID	Location	Symbol	Responder %		Non-responder %		Patient with toxicity %		Patient with non-toxicity %	
			Gain	Loss	Gain	Loss	Gain	Loss	Gain	Loss
AA013268	3q27	MAP3K13	—	12.5	—	—	—	25	—	100
AA521401	3p21.1-p14.2	PDHB	—	12.5	25	—	12.5	—	—	40
AA865590	12pter-q12	BCAT1	—	12.5	—	—	—	12.5	—	40
AA886775	6p21.2	C6orf64	—	50	—	—	—	—	—	40
AA888182	Xq13.1	RPS4X	—	25	37.5	—	—	—	—	20
AA917489	9	EST	—	12.5	37.5	—	25	—	—	20
AA918743	20q12	PRO0628	—	12.5	37.5	—	25	—	—	—
AI337434		EST	12.5	—	37.5	—	12.5	—	—	—
AI474891	12q24.31	15E1.2	—	25	25	—	—	—	—	—
AW005659	17q21	VAT1	—	—	12.5	—	—	—	—	20

A.



B.

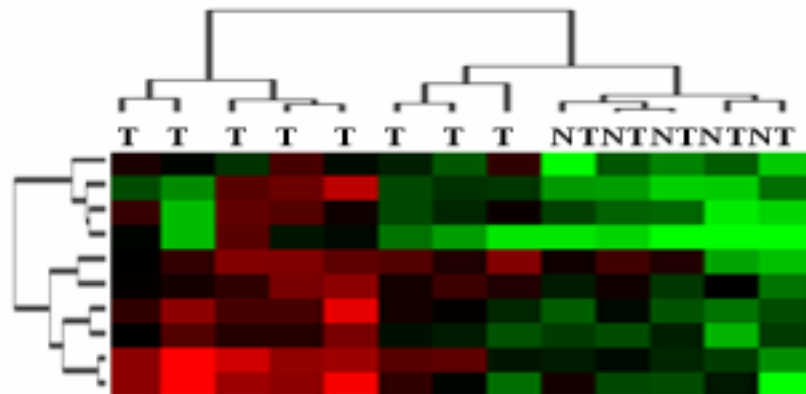


Figure 9. Hierarchical clustering of 10 overlap genes in response and toxicity.

A. Overlap genes whose genetic alteration differentiated patient with responder (R) from patient with non-responder (NR) B. Overlap genes whose genetic alteration differentiated patient with toxicity (T) from patient with non-toxicity (NT)

IV. 고찰

암 환자 치료에 있어 부작용을 최소화하며 치료 효과를 높이기 위해서는 각 개인에 맞는 맞춤 치료가 바람직하다. 치료의 효과는 생존율과 밀접한 연관성을 보이고 있으므로, 치료의 효과를 예측할 수 있는 생물학적 표지자 (bio marker)의 선정은 환자 치료 결정에 많은 도움이 되리라 생각하고 최근에는 이러한 생물학적 표지자를 찾고자 하는 연구가 다양하게 진행되고 있다. 하지만 현재 사용되고 있는 임상적인 표지자들 만으로는 암의 발생이나 진행, 약제에 대한 반응 등 복잡한 생물학적 현상을 설명하기 어려워 임상적용의 한계를 나타내고 있다.

본 연구에서는 생물학적 표지자를 찾기 위해서, 한번의 실험으로 수천 개의 유전자 변화를 관찰할 수 있는 cDNA microarray 를 기반으로 한 Microarray-CGH 를 수행하였다. cDNA microarray 는 암 치료에 있어, 치료의 저항성이나 효과를 설명할 수 있는 새로운 pathway 나 유전자 target 을 찾을 수 있는 고도의 실험기술로써 사용되고 있다³¹⁻³³. cDNA microarray 기법을 이용한 Microarray-CGH 는 유전자 수준에서 DNA 와 RNA 의 변화 양상을 직접적으로 비교할 수 있으며, 실험을 단시간에 수행하고 결과를 관찰할 수 있는 장점을 가지고 있다. 뿐만 아니라, 신선 조직 외에도 paraffin-embedded tissue 에서 추출한 genomic DNA 를 이용한 실험도 가능하여 기존의 보관조직을 사용할 수 있는 장점이 있다.

이러한 Microarray-CGH 의 장점을 이용하여 33 명의 국소 진행성 직장암 환자로부터 얻은 sample 로 항암 약물 방사선 병행요법에 대한 치료 효과 유무, 부작용의 유무를 예측할 수 있는 유전자군을 선별하고자 하였다.

먼저, 실험의 유의성을 확인하기 위하여 각 실험에서의 flag %를 계산하였고, 표준화 전후의 데이터를 비교하여 양질의 실험임을 확인하고 결과를 얻을 수 있었다. 전체 77 예의 unsupervised hierarchical clustering 결과 (Figure 5-A) 에서는 조직과 단핵구의 조직적 차이를 몇 예에서 보이고 있었다. 단핵구와 정상 조직을 비교하였을 때, 같은 정상 특성을 지녔음에도 불구하고 차이가 나는 것은 조직과 단핵구의 세포 구성에서의 차이가 나기 때문이라고 생각할 수 있다.

유방암의 경우에서 치료 전과 후의 종양 타입에서 cDNA microarray 를 이용하여 RNA 수준에서의 발현 정도를 비교하여 종양의 heterogeneity 를 설명하기 어려우며 개인간의 생검 조직과 치료 후의 종양 조직에서의 유전자 발현 양상은 유사하게 나타남으로써, 개인의 특성을 나타낸다고 보고된바 있다³¹. 하지만, 본 결과에서는 11 명의 생검 조직과 종양 조직에서 개인끼리 묶이는 결과를 보이지 않았다. 각 개인에서 치료 전과 후 조직의 유전자 양상이 다르게 나타나는 이유로는 첫째, 치료의 영향을 생각할 수 있다. 종양 조직에 방사선 치료와 약물 치료를 수행 할 경우 치료를 받는 동안의 유전자 발현 양상은 변하게 된다고 보고 된바 있다³²⁻³⁴. 또한, 유방암과 대장암은 기관의 차이나 기존에 치료 전, 후 개인의 특성을 보고한 결과는 RNA 수준에서의 발현 양상이지만, 본 논문에서는 DNA 수준에서의 유전 양상을 관찰 한 것이기 때문에 달라질 수 있을 것이다³¹⁻³⁴. 치료 전과 후의 유전양상에서 개인의 특성이 나타나지 않은 본 결과에서는 치료 전의 생검 조직을 이용하여 치료에 대한 효과와 부작용을 예측할 수 있는 후보 유전자군을 선별하였고, 치료 후의 종양 조직을 이용해서는 분석을 하지 않았다.

치료 후에 치료에 대한 반응군과 비반응군의 치료의 영향이 없는 조직 생검 결과의 유전적 변이를 비교하여, 치료의 효과를 예측할 수 있는 유전자를 다양한 FDR 값을 갖는 3 개 (103, 52, 29)의 후보 유전자 군을 선별하였다. 유전자를 잘못 선별하는 오차율인 FDR 이 비교적 크게 나타난

것은, 생물학적 특성에서 종양과 정상과 같은 큰 차이를 보이는 것과는 달리 직장암 내에서 특성이 다른 세부군을 찾는 과정이므로 비교적 유사한 특성을 갖는 것으로 생각된다. 또한 비교하고자 하는 반응군과 비반응군의 n 수가 적었기 때문에 상대적으로 FDR 값이 커졌을 것이라 사료된다. 하지만 선별된 이들 각 군의 후보 유전자들은, 치료에 대한 반응군과 비반응군을 나눌 수 있었다. 반응군에서 2 예는 비반응군과 유전적 양상에서 비슷한 결과를 보였다.

항암 약물 방사선 병행 요법에 대한 치료 효과를 예측하고자 선별된 유전자 군에서 FDR이 가장 낮은 29개의 유전자의 양상을 살펴보았을 때, 기능면에서 크게 3가지로 나눌 수 있었다. 각각의 군에 속하는 유전자를 치료 효과에 따른 환자군에서 유전적 양상을 관찰하였다.

MAP3K5 (AA150828, 6q23)은 DNA repair와 apoptosis 관련 유전자로써, DNA replication이 일어날 때, mismatched pair가 이루어지면 MMR system과 p38 pathway가 활성화 되어 mismatched pair가 이루어진 nucleotide를 repair시킨다. Repair가 되지 않을 경우에는 apoptosis를 유도하여 유전자 이상이 생긴 DNA를 더 이상 존재하지 않게끔 하게도 한다. 많은 보고에 의하면, 모든 종양에서 6q23 지역이 증폭되어 있다고 보고되고 있으며 이 지역 내에 MAP3K5가 일부가 포함되어 있다고 한다³⁵⁻³⁸. 그리고 6q23 지역에 TNFAIP3 유전자도 위치해 있는데, TNFAIP3는 TNF-mediated apoptosis로부터 세포를 보호하는 기능을 갖는다³⁸⁻⁴¹. 본 연구 결과에서 MAP3K5 는 반응군과 비반응군에서 각각 25 %, 100 %의 유전자 증폭을 모두 보였다. 국소 진행성 직장암이라는 특성으로 6q23 지역이 모두 증폭되었고, 보고된 결과에 상응하는 결과라고 할 수 있다. 빈도수에 따른 차이가 크게 나타난 것은 이 지역의 증폭이 치료의 효과와 밀접한 관계가 있음을 시사한다 할 수 있겠다. 또한 선별된 29개의 유전자 중에서 6번 염색체의 위치하는 유전자가 6개로 다른 지역에 비하여 생물학적으로 항암 약물 방사선 병행요법의 치료 반응과 관련된 염색체

지역이라고 생각할 수 있으며, 이 방법으로 single gene뿐 아니라 BAC이나 FISH와 같은 실험에서 detect가 가능한 지역으로 사료된다. MAP3K5 유전자도 마찬가지로 항암 약물 방사선 병행요법 후보 예측 유전자 군으로 의미를 부여할 수 있겠다. POLD3 (AA504204, 11q14)는 치료 반응 후보 예측 유전자 군에서 상위 4번째인 유전자로써, DNA mismatched repair 관련 유전자로써, 비반응군에서 12.5 %의 유전자 증폭을 보임으로써 항암 약물 방사선 병행요법에 대하여 resistance를 보인다고 할 수 있다.

DNA repair와 관련된 NUDT1 (AA443998, 7p22), POLK (AA991514, 5q13)은 반응군에서 각각 12.5 %, 25 %의 유전자 결실을, 비반응군에서 각각 50 %, 12.5 %의 유전자 증폭을 보이는데 이는 반응군에 따라 치료에 대하여 종양 세포가 손상을 받게 되었을 때, DNA repair 정도에 따라 치료에 대한 반응 정도가 달라진다고 생각할 수 있다. 29개의 후보 유전자군 중에서 기능이 알려지지 않은 세 개의 EST (AA279070, AI002416, AA987359)는 반응군에서 상대적으로 높은 유전자 결실을 보이고, 비반응군에서는 AI002416을 제외한 두 개의 EST는 유전자 증폭을 나타냄으로써, 치료 효과가 생물학적으로 다르게 나타나는 것을 설명할 수 있으리라 생각되고, 추후 이 EST들에 대한 정보 조사가 이루어져야 할 것이다.

치료효과와 관련되어 환자군의 유전적 양상을 살펴 보았을 때, 29개의 유전자 중에서 반응군의 경우 19개의 유전자에서 유전적 결실을 보인 반면, 비반응군에서는 22개의 유전자에서 유전적 증폭을 나타냄으로써, 반응군에 따라 유전자 양상에서 차이를 나타내고 있음을 확인하였다. 또한 반응군에서는 유전적 결실을, 그에 반하여 비반응군에서 유전적 증폭을 보이는 유전자는 19개로 반응과 관련되어 상반된 유전자 양상 또한 관찰함으로써, 유전자 양상의 차이를 다시 한번 확인했다고 할 수 있다.

항암 약물 방사선 병행 요법에 대하여 나타나는 백혈구 수치 저하 부작용을 예측하고자 선별된 95, 40, 31개 또한 FDR이 높게 나타났다.

40개의 유전자까지는 부작용군과 비부작용으로 두 개의 군이 명확히 나뉘었지만, 유전자수를 늘려 95개의 유전자로 cluster한 결과 한 예의 비부작용군이 부작용군에 가깝게 묶이는 결과를 보였다. 이는 유전자수를 늘렸을 때, FDR값이 커졌기 때문에 보이는 결과로 사료된다. 이 역시 비교하고자 하는 n수를 늘리고 비교군 수가 평형을 이루게 되면 FDR이 보다 낮은 최적의 유전자군을 선별할 수 있을 것으로 생각된다. 31개의 의미있는 유전자중에서 유전자 정보가 있는 것은 24개였으며, 유전자 기능이 알려지지 않은 EST가 7개 포함되어 있었다. 이 중에서 3, 16번 염색체에 위치한 유전자들이 각각 2개씩이었고, 치료 효과 후보 예측 유전자군과 마찬가지로 6번 염색체에 위치하는 유전자들이 4개였지만, 효과 관련 유전자군과 겹치는 유전자는 없었다. 하지만 치료 효과, 부작용 예측 관련 후보 유전자군 중에서 6번 염색체에 위치한 유전자가 상당수 포함되어 있는 것이 생물학적으로 의미가 있는 유전자위라고 생각할 수 있겠다. FDR이 11 %로 높게 나타났지만, 선별된 31개의 유전자를 이용하여, clustering을 수행하여 얻어진 결과는 임상결과에 따라 나뉘어 지는 부작용군과 비부작용 두 개의 군으로 구분할 수 있었다. 31개의 유전자군 중에서 유전자 전사와 해석에 관련된 5개 유전자의 양상을 살펴보면, METAP2 (AA283030, 12q23)에서만 비부작용군에서 40 %의 유전자 결실을 보이고, 나머지 4개 EIF4B (AA872402, 12q13), CTNNB1 (AW058504, 3p21), CRSP3 (AA504481, 6q22-24), FOXM1 (AA136566, 12p13)은 부작용군에서 각각 12.5 %, 12.5 %, 25 %, 37.5 %의 유전자 증폭을 보임으로써 항암 약물 방사선 병행요법에 대하여 나타나는 부작용 유무에 따라 유전자의 발현을 조절하는 유전자 양상에서의 차이를 보임을 관찰하였다. 그리고 이 중에서 12번 염색체에 위치한 유전자가 3개로, 12번 염색체 일부 지역이 부작용과 높은 관련이 있다고 생각할 수 있다.

세포간 adhesion과 유전자 전사를 조절하는 CTNNB1 (β -catenin)은 cadherin과 상호 작용하여 Wnt signaling을 유도한다고 알려져 있고,

다양한 악성 종양에서 CTNNB1의 유전적 이상인 mutation과 exon 3번의 결실이 보고되고 있다⁴². CTNNB1은 부작용군에서 12.5 %의 증폭을, 비부작용군에서는 40 %의 결실을 보였다. CTNNB1의 유전자 결실은 tumor suppressor의 가능성을 높인다고 보고된 바 있는데⁴³, 비부작용군에서 40 %의 유전자 결실은 치료에 대한 직접적인 tumor suppressor의 가능성을 설명할 수 없지만, 치료의 효과와 더불어 부작용을 유도하지 않는다는 점에서 의미 있는 결과라고 생각할 수 있다.

Metastasis suppressor gene으로 알려진 CRSP3 (AA504481, 6q22-24)는 metastasis가 일어난 tumor의 경우에서 발현이 저하되어 있다고 보고 되어 있다⁴⁴. 이 유전자에 관하여 *in vivo* 에서의 cell line 실험에서 metastasis 관련 여부가 입증되어 있다. 항암 약물 방사선 병행 요법 부작용과 관련하여 선별되었지만, 전체 실험군에서의 CRSP3의 유전적 이상의 관찰과 전이 여부를 확인하고, CRSP3가 실제 본 연구에서 전이 여부를 설명할 수 있을지에 대하여 생각해야 할 것이다.

본 연구에 사용된 약제로는 5-FU와 leucovorin으로 5-FU는 thymidine synthase (TS)를 차단함으로써 DNA 합성을 저해하고, 종양세포의 apoptosis를 유도한다. 5-FU와 leucovorin병용시 과량의 intracellular reduced folate가 TS와 5-FU의 결합을 증강시켜 5-FU의 항암 효과와 독성을 증가시킨다. 방사선 치료 또한 종양세포에 방사선을 쬐임으로써 DNA damage를 주어 세포의 apoptosis를 유도함으로써 종양세포를 저해하게 된다. 5-FU의 약제 활성도와 관련된 유전자인 TS (AA663310)의 유전자 이상의 빈도는 치료에 대한 반응군에서는 12.5 %의 유전적 결실이 있었고, 비반응군에서는 75 %의 유전자 결실이 관찰되었다. 5-FU의 표적 인자가 되는 TS (AA663310)의 결실은 5-FU의 기능을 감소시킴으로써 치료의 효과를 떨어뜨리는데 항암 약물 방사선 병행 요법에 대한 비반응군에서 TS (AA663310)의 결실은 이를 뒷받침 하는 결과라고 생각해 볼 수 있다. 또한 치료 효과가 나타나면 그에 따라 부작용도 더불어

나타나는 경우도 있는데 본 결과에서는 2명의 환자에서 그러한 결과를 보였다. Figure 8 (A, B)를 살펴 보았을 때, TS가 치료 반응과 부작용에 따라 보이는 유전적 양상이 다른 것을 확인할 수 있었다.

부작용과 관련되어 환자군의 유전적 양상을 살펴 보았을 때, 31개의 유전자 중에서 부작용군의 11개의 유전자에서 유전적 증폭을 보인 반면, 비부작용군에서는 10개의 유전자에서 유전적 결실을 나타냄으로써, 부작용 여부에 따라 유전자 양상에서 차이가 나타나고 있는 것을 확인하였다. 비부작용군에서는 31개의 유전자 중에서 유전적 증폭을 보이는 경우는 없었다. 또한 부작용군 특이적으로 9개의 유전자는 유전적 증폭을 보였고, 비부작용군에서는 아무런 변화를 보이지 않았다.

본 실험 결과에서는, 항암 약물 방사선 병행요법에 대한 치료효과와 부작용을 예측할 수 있는 선별된 후보 유전자군들 중에서 C6orf64 (AA886775, 6p21.2) 하나의 유전자만이 두 가지 결과에서 모두 선별되었다. C6orf64는 반응군에서 40 %의 유전적 결실과 비부작용군에서 40 %의 유전적 결실을 보였다. 다양한 악성 종양에서 6번 염색체의 증폭과는 다르게, 국소 진행성 직장암에서 치료의 효과를 보이고, 부작용이 없는 경우에 6번 염색체에 위치한 C6orf64는 유전적 결실을 보임으로써 6번 염색체 지역이 치료의 효과와 부작용에 있어 생물학적으로 중요하다는 정보를 제시해 줄 수 있겠다. 비교하고자 하는 유전자 수가 적었기 때문에, FDR을 늘려 치료 효과 예측에서 선별된 103개, 부작용 예측에서 선별된 95개의 유전자를 비교하였다. 이때, 10개의 중복되는 유전자를 관찰할 수 있었다. 비록 FDR은 커졌지만, 이 유전자들은 치료의 효과와 부작용을 동시에 예측할 수 있는 의미있는 유전자 군이라고 할 수 있다. 10개의 유전자 중에서 cell growth, proliferation에 관련된 유전자로 BCAT1 (AA865590, 12pter-q12), PRO0628 (AA918743, 20q12), VAT1 (AW005659, 17q21) 가 포함되어 있었다. Figure 9-A에서 한 예의 반응군이 비반응군에 속하는 결과를 나타냈는데 이는 FDR 24.4 %의

오류로 나타나는 결과로 생각되어진다. 10개의 유전자군은 부작용에 따른 환자군은 구분할 수 있었다. 이 유전자군은 선별된 최적의 유전자군보다는 FDR이 높았지만, 효과, 부작용여부에 따른 환자군을 구분함으로써 의미있는 예측 유전자군이라고 할 수 있겠다.

또한, 치료효과와 관련되어 선별된 후보 유전자군중에서 4개의 EST, 부작용과 관련된 후보 유보 유전자군중에서 12개의 EST로 상당수 포함되어 있었다. 이러한 EST는 아직까지 유전자 정보가 알려져 있지는 않지만 치료효과와 부작용을 예측할 수 있는 새로운 후보 생물학적 표지자라고 생각 할 수 있겠다.

이상의 Microarray-CGH 실험 결과들로 single gene 수준에서, 항암 약물 방사선 병행 요법에 대한 치료 효과, 부작용 예측을 위한 후보 유전자군들을 생물학적 관점에서 관찰하였다. 이 때, 선별된 개개별의 유전자들의 생물학적 의미를 찾아 모두 기능연구를 하기는 어렵지만 선별된 다수의 유전자군은 103, 52, 29개의 유전자들이 함께 조합이 이루어졌을 때, 항암 약물 방사선 병행요법에 대한 효과 예측이 가능하고, 31개의 유전자군은 부작용 예측 유전자 군으로서의 가능성을 갖을 것이라고 사료된다.

이후에, 치료 후의 종양 조직을 이용하여 생검 조직의 결과와 마찬가지로 치료에 대한 반응과 부작용을 예측할 수 있는 후보 유전자군을 선별하고, 각각의 유전자군을 이용하여 판별 분석 프로그램인 Prediction Analysis of Microarray (PAM, Stanford Univ.)²²를 수행하여 치료 반응과 부작용 여부를 정확히 예측할 수 있는지 비교, 검증한 후에 새로운 환자군의 시료로 실험이 진행되어지면 선별된 유전자로 치료의 효과와 부작용을 예측하고 추후 정리되어지는 임상 결과와 비교함으로써 선별된 후보 예측 유전자군의 가능성을 살펴보아야 할 것이다.

치료수행 전에 치료에 대한 효과와 부작용을 예측하는 것은 환자 개인 특성에 맞는 맞춤 치료를 제공함으로써 치료의 효율과 생존률을 높일 수

있기 때문에 매우 중요하다. 하지만 현재 밝혀져 있는 소수의 생물학적 표지자만으로는 복잡한 생물학적 현상을 이해하기 어려운 실정이었다. 본 연구에서는 항암 약물 방사선 병행 요법에 대한 효과와 부작용과 관련된 후보 유전자군을 분자적 수준에서 탐색하고자 하였고, 각각을 예측할 수 있는 후보 유전자군을 high-throughput 기법인 Microarray-CGH를 통하여 다수의 후보 유전자군을 탐색하였다. 본 연구에서 항암 약물 방사선 병행요법 수행 전에 치료에 대한 효과와 부작용을 예측하기 위하여 선별된 다양한 후보 유전자군은 복잡한 생물학적 경로의 여러 측면에서 이해할 수 있는 척도를 제공해 줄 수 있으리라고 생각되어진다. 이후에, 대상 환자의 수를 늘리고, 치료 후의 종양 조직을 이용한 치료 반응과 부작용 예측 유전자군을 함께 비교하여 후보 유전자군의 유전적 양상을 관찰한다면 국소 진행성 직장암 각 개인 환자에게 맞는 맞춤 치료에 대한 정보를 제공할 수 있으리라고 여겨진다.

V. 결론

본 연구에서는 cDNA microarray based comparative genomic hybridization 을 기반으로 한 Microarray-CGH 기법을 이용하여 국소 진행성 직장암 치료법인 항암 약물 방사선 병행 요법에 대한 효과와 부작용을 예측할 수 있는 유전자를 찾고자 하였다.

조직 검체의 Microarray-CGH 결과를 이용하여 치료의 효과가 있는 환자 군과 효과를 보이지 않는 환자 군에서 유의하게 차이를 보이는 유전자를 103개에서 52개, 29개까지 선별하였고, 부작용인 neutropenia를 보이는 환자 군과, 보이지 않는 환자 군에서 유의한 차이를 보이는 유전자를 95, 40, 31개까지 선별하였다. 선별된 유전자군들의 유전학적 수준의 관찰은 항암 약물 방사선 병행 요법에 대한 효과와 부작용을 예측하여 개인 맞춤 치료에 있어 중요한 기반을 제공할 것으로 생각된다.

참고 문헌

1. Sakamoto J, Ohashi Y, Hamada C, Buyse M, Burzykowski T, Piedbois P. Efficacy of oral adjuvant therapy after resection of colorectal cancer: 5-year results from three randomized trials. *J Clin Oncol* 2004; 22: 484-492.
2. Iqbal S, Lenz HJ. Molecular Predictors of treatment and outcome in colorectal cancer. *Curr Gastroenterol Rep* 2003; 5: 399-405.
3. Bendardaf R, Lamlum H, Ristamaki R, Algars A, Collan Y, Pyrhonen S. Response to chemotherapy (Irinotecan plus 5-Fluorouracil) in colorectal carcinoma can be predicted by tumour DNA content. *Oncol* 2004; 66: 46-52.
4. Rodel C, Grabenbauer GG, Papadopoulos T, Bigalke M, Gunther K, Schick C, et al. Apoptosis as a cellular predictor for histopathologic response to neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with rectal cancer. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2002; 52: 294-303.
5. Ishida H, Miwa H, Tatsuta M, Masutani S, Imamura H, Shimizu J, et al. Ki-67 and CEA expression as prognostic markers in Dukes' C colorectal cancer. *Cancer Letters* 2004; 207: 109-115
6. Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, et al. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2001; 344: 1196-1206.
7. Galanis E, Alberts SR, O'Connell MJ. New adjuvant therapy for colon cancer: justified hope or commercial hype. *Surg Oncol Clin North Am* 2000; 49: 813-823.

8. Chung DC. Molecular prognostic markers and colorectal cancer : the search goes on. *Gastroenterol* 1998; 114: 1330-1332. .
9. Elsaleh H, Robbins P, Joseph D. Can p53 alterations be used to predict tumour response to pre-operative chemo-radiotherapy in locally advanced rectal cancer? *Radiother Oncol* 2000; 56: 239-244.
10. Tannapfel A, Nu"lein S, Fietkau R, *et al.* Apoptosis, proliferation, Bax, Bcl-2 and p53 status prior to and after preoperative radiochemotherapy for locally advanced rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 41: 585-591.
11. Jessup JM, Loda M. Prognostic markers in rectal cancer. *Semin Surg Oncol* 1998; 15: 131-140.
12. McIlwrath AJ, Vasey PA, Ross GM. Cell cycle arrest and radiosensitivity of human tumor cell lines: Dependence on wild-type p53 for radiosensitivity. *Cancer Res* 1994; 54: 3718-3722
13. Xia F, Wang X, Wang YH. Altered p53 status correlates with differences in sensitivity to radiation-induced mutation and apoptosis in two closely related human lymphoblast lines. *Cancer Res* 1995; 55:12-15.
14. Ribeiro JCC, Barnetson AR, Fisher RJ, *et al.* Relationship between radiation response and p53 status in human bladder cancer cells. *Int J Radiat Biol* 1997;72: 11-20.
15. Kim NK, Park JK, Lee KY, Yang WI, Yun SE, Sung JS, *et al.* p53, BCL-2, and Ki-67 expression according to tumor response after

- concurrent chemoradiotherapy for advanced rectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2001; 8: 418-424.
16. Robyn PMS, Matthew M, David K, Michael F, Graham S, Stephen C, et al. p53, deleted in colorectal cancer gene, and thymidylate synthase as predictors of histopathologic response and survival in low, locally advanced rectal cancer treated with preoperative adjuvant therapy. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 192-202.
 17. Alex B, Hong L, Jia L, Paul W, Stephen L, Andrew JH, et al. Distinctive patterns of gene expression in premalignant mucosa and gastric cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 2569-2577.
 18. Sakakura C, Hagiwara A, Nakanishi M, Shimomura K, Takagi T, Yasuoka R, et al. Differential gene expression profiles of gastric cancer cells established from primary tumour and malignant ascites. *Br J Cancer* 2002; 87: 1153-1161.
 19. Hiroshi I, Ayumi M, Koshi M, Hiroaki U, Masaki M. Prognostic score of gastric cancer determined by cDNA microarray. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3475-3479.
 20. Jianhua W, Shishu C. Screening and identification of gastric adenocarcinoma metastasis-related gene using cDNA microarray coupled to FDD-PCR. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128: 547-553.
 21. Marjan MW, Ernst JK, Cindy P, Antoine MS, Ivar S, Daniel P, et al. Genomic profiling of gastric cancer predicts lymph node status and survival. *Oncogene* 2003; 22: 1870-1879.
 22. Suguru H, Yoichi F, Meihua L, Seiji S, Tatsushi K, Takeshi W, et al. Genome-wide analysis of gene expression in intestinal-type

- gastric cancers using a complementary DNA microarray representing 23,040 genes. *Cancer Res* 2002; 62: 7012–7017.
23. Liu LX, Liu ZH, Jiang HC, Qu X, Zhang WH, Wu LF, et al. Profiling of differentially expressed genes in human gastric carcinoma by cDNA expression array. *World J Gastroenterol* 2002; 4: 580–585.
 24. Carolyn DH, Heike F, Philippa C, Sarah W, Nigel PC, Margaret AK, et al. High resolution analysis of genomic copy number alterations in bladder cancer by microarray based comparative genomic hybridization. *Oncogene* 2004; 1–14.
 25. Hippo Y, Taniguchi H, Tsutsumi S, Machida N, Chong JM, Fukayama M, et al. Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays. *Cancer Res* 2002; 62: 233–240.
 26. Seo MY, Rha SY, Yang SH, Kim SC, Lee GY, Park CH, et al. The pattern of gene copy number changes in bilateral breast cancer surveyed by cDNA microarray based comparative genomic hybridization. *Int J Mol Med* 2004; 13:17–24.
 27. Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucl Acids Res* 2002; 30:e15
 28. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 14863–14868.
 29. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 5116–5121.
 30. Park CH, Jeong HJ, Jung JJ, Lee GY, Kim SC, Kim TS, et al.

- Fabrication of high quality cDNA microarray using a small amount of cDNA. *Int J Mol Med* 2004; 13:675-679.
31. Jenni CC, Eric CW, Anna T, Susan GH, M Carolina G, Richard E, et al. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet* 2003; 362: 362-369
 32. Gene HM, John ES, Geoffrey KM. Radiation induced histopathologic changes of the breast. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 47-53
 33. Stephanie SL, Annie NYC, Hextan YSN. Differential gene expression in cervical cancer cell lines before and after ionizing radiation. *Int J Oncol* 2003; 22: 1091-1099
 34. Paul AC, Mark LG, Sandra E, David C, R. Ian S, Mark E, et al. Molecular pharmacology of cancer therapy in human colorectal cancer by gene expression profiling. *Cancer Res* 2003; 63: 6855-6863
 35. Kudoh K, Ramnanna M, Ravat R, Elkahloun A, Bittner M, Meltzer P, et al. Monitoring the expression profiles of doxorubicin induced and doxorubicin resistant cancer cells by cDNA microarray. *Cancer Res* 2000; 60: 4161-4166
 36. Sotiriou C, Powles T, Dowesett M, Jazaeri A, Feldman A, Assersohn L, et al. Gene expression profiles derived from fine needle aspiration correlate with response to systemic chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002; 4: R3
 37. Zembutsu H, Ohnishi Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Katagiri T, Ueyama Y, et al. Genome-wide cDNA microarray screening to correlate gene expression profiles with sensitivity of 85 human cancer xenografts

- to anticancer drugs. *Cancer Res* ; 2002; 62: 518–527
38. Wolf XS, Diener K, Jannuzzi D, Trollinger D, Tan TH, Lichenstein H, Zukowski M, et al. Complexity of 12q13–22 amplicon in liposarcoma: microsatellite repeat analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 18: 66–70
 39. Albertson DG, Ylstra B, Se Graves R, Collins C, Dairkee SH, Kowbel D, et al. Quantitative mapping of amplicon structure by array–CGH identifies CYP24 as a candidate oncogen. *Nat Genet* 2000; 25: 144–146
 40. Liu L, Ichimura K, Pettersson EH, Goike HM, Collins VP. The complexity of the 7p12 amplicon in human astrocytic gliomas: detailed mapping of 246 tumors. *J Neuro Pathol Exp Neurol* 2000; 59: 1087–1093
 41. Fritz B, Schubert F, Wrobel G, Schwaenen C, Wessendorf S, Nessling M, et al. Microarray–based copy number and expression profiling in dedifferentiated and pleomorphic liposarcoma. *Cancer Res* 2002; 62: 2993–2998
 42. Eastman Q, Grosschedl R. Regulation of LEF–1/TCF transcription factors by Wnt and other signal. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 233–240
 43. Kikuo S, Yoshitaka S, Noriyasu U, Shoichi M, Mitsuo S, Yoshitsugu H, et al. Genetic alteration of the b–catenin gene (CTNNB1) in human lung cancer and malignant mesothelioma and identification of a new 3p21.3 homozygous deletion. *Oncogene* 2001; 20: 4249–4257
 44. Steven F, Mary E, Naohito H, Minoru T, Carrie P, Leonard P, et al. Melanoma metastasis suppression by chromosome 6: evidence for a pathway regulated by CRSP3 and TXNIP. *Cancer Res* 2003; 63:

ABSTRACT

Selection of efficacy predictive genes in locally advanced rectal cancer after the concurrent chemoradiotherapy (CCRT) using cDNA microarray-based comparative genomic hybridization (Microarray-CGH)

Gui Youn Lee

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Hyun Cheol Chung)

In locally advanced rectal cancer, preoperative concurrent chemoradiotherapy (CCRT) is performed to reduce tumor size and improve operability. As the patients showed various responses to CCRT, the prediction of efficacy and toxicity of CCRT is very important in clinical practice to maximize the efficacy and minimize the toxicity of each patient. To identify the predictive markers of response and toxicity

of CCRT in genome scale, we performed cDNA microarray-based comparative genomic hybridization (Microarray-CGH). 7.5K cDNA microarray was used with 28 biopsy tumor tissues and 20 peripheral mononuclear cells of locally advanced rectal cancer patients at the time of diagnosis and normal, tumor tissues after CCRT. Microarray-CGH was performed in indirect design using sex-matched placenta tissue as a reference. After the preprocessing and normalization, we used 2-class SAM (Significance Analysis of Microarray, Stanford Univ.) for selection of differentially expressed genes between 2 groups. Then we performed the hierarchical cluster using the selected genes, and searched for ontological information of these genes using DATABASE (SOURCE and DAVID).

We selected the efficacy predictive genes of 103 genes (FDR 24 %), 52 genes (FDR 20 %), 29 genes (FDR 14.9 %) and using 2-class SAM analysis are between 8 responders and 8 non-responders after CCRT using the the of biopsied tissues. we could identify 95 (FDR 17.1 %), 40 (FDR 14.9 %), 31 (FDR 11 %) predictive genes for grade IV neutropenia from the CCRT with peripheral blood mononuclear cell DNAs. In conclusion, Microarray-CGH could be used as an investigative tool for searching candidate predictive genes of efficacy and toxicity in locally advanced rectal cancer patient treated with CCRT.

Key words : Concurrent chemoradiotherapy (CCRT), cDNA microarray based-CGH (Microarray □ CGH), Bio marker, prediction