

교모세포종에서 치료 전, 후 p53, Bcl-2,
caspase-3, O⁶-methyguanine-DNA
methlytransferase 의 변화와
뇌 자기 관류 영상의 연관성

연세대학교 대학원
의학과

심 규 원

교모세포종에서 치료 전, 후 p53, Bcl-2, caspase-3, O⁶-
methyguanine-DNA methlytransferase 의 변화와 뇌 자기

관류 영상의 연관성

지도교수 김 동 석

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2009 년 12 월

연세대학교 대학원

의학과

심 규 원

심규원의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2009년 12월

감사의 글

언제나 학위 논문을 준비할 때면 “조금만 더 잘 할걸”하는 생각을 하게 됩니다. 석사 학위를 할 때는 전문의 시험과 학기가 겹쳐 아쉬움이 남았고, 이번에도 전임 강사, 조교수를 거치며 임상 활동과 학회 활동이 늘어나 시간 투자를 넉넉하게 하지 못한 아쉬움이 남습니다. 이러한 중에 학위를 마칠 수 있도록 도와 주시고, 임상에서 어려운 점을 자문해 주시고 도와주신 지도교수 김동석 선생님께 감사 드립니다. 또한 저를 도와 실험실에서 함께 실험을 진행해 준 정희진 대학원생에게 고마운 마음을 전합니다. 바쁜 임상에 학위 준비한다고, 바쁜 저를 위해 함께하는 시간을 희생해 준 저의 가족에게 미안한 마음을 전합니다. 뭔가를 이루려면 혼자만의 힘으로는 좋은 성과를 얻기 어려운 것 같습니다. 석사 논문 지도에 이어 박사 학위에도 많은 지도를 아끼지 않으신 영상의학과 김동익 선생님, 먼 곳에 있지만 애써주신 안성환 선생님, 또 몸이 열 개면 좋을 것 같은 장중희 선생님께 감사 드립니다. 건강이 좋지 못 하여 논문의 완성을 보시지 못 하셨지만 연구시작부터 많은 조언과 도움을 주셨던 안정용 선생님의 쾌유를 빌면서 감사의 말씀을 마칩니다.

<차 례>

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 환자 및 조직	7
2. 세포 배양	7
3. 면역 염색	8
4. 자기 공명 관류 영상	10
5. 통계 분석	11
III. 결과	12
1. 환자군	12
2. 세포 배양	13
3. 면역염색 결과	14
가. MGMT	14
나. Bcl-2	17
다. Caspase-3	19
라. p53	21
4. 자기 공명 관류 영상; CBV	23
IV. 고찰	27
V. 결론	39
참고문헌	40
영문요약	52

그림 차례

그림 1. Representative immunohistochemical stain·····	10
그림 2. CBV in perfusion MRI·····	11
그림 3. Results of MGMT immunohistochemistry·····	14
그림 4. Kaplan-Meier survival curve for MGMT expression ···	16
그림 5. Results of Bcl-2 immunohistochemistry·····	17
그림 6. Kaplan-Meier survival curve for Bcl-2 expression·····	18
그림 7. Results of caspase-3 immunohistochemistry·····	20
그림 8. Kaplan-Meier survival curve for caspase-3 expression·	20
그림 9. Results of p53 immunohistochemistry·····	21
그림 10. Kaplan-Meier survival curve for p53 expression·····	22
그림 11. Change of rCBV·····	25

표 차례

표 1. Summary of antibodies used in this study·····	9
표 2. Summary of patients enrolled in this study·····	13
표 3. Results of MGMT immunohistochemistry·····	15
표 4. Results of Bcl-2 immunohistochemistry·····	18
표 5. Results of caspase-3 immunohistochemistry·····	19
표 6. Results of p53 immunohistochemistry·····	22
표 7. Summary of MRI perfusion (CBV) status·····	25
표 8. Summary of immunohistochemical results and rCBV·····	26

국문요약

교모세포종에서 치료 전, 후 p53, Bcl-2, caspase-3, O⁶-methyguanine-DNA methlytransferase의 변화와 뇌 자기 관류 영상의 연관성

악성 뇌종양 중 교모 세포종은 뇌종양 중 가장 많은 빈도를 보이기도 하지만 예후가 매우 나쁘기 때문에 많은 비용과 노력을 들여 치료 중 환자 삶의 질 향상 및 예후 향상에 노력하고 있지만 현재까지도 2 년을 넘겨 생존하는 것이 어려운 실정이다. 방사선 조사 기술의 발달로 정상 뇌의 피해를 최소화하면서 종양에 조사되는 방사선량을 기존의 치료에 비해 증가시킨데다, temozolomide 이 개발되어 치료로 인한 피해는 괄목할 만한 감소를 보이고 있다. 하지만 방사선량이 늘고 temozolomide 를 병용요법으로 사용하면서 치료로 인한 방사선 괴사는 증가 추세에 있고, 치료에 좋은 반응을 보이는 환자일수록 이러한 방사선 괴사가 많은 빈도로 나타난다. 방사선 괴사는 영상의학적인 검사에서 명확한 구분은 어려우며 일부 종양이 생존하여 진행되는 경우도 있다. 생존 기간이 증가하면서 종양이 진행하여 종양 제거를 추가로 받는 경우도 늘어나며, 방사선 괴사가 심하여 환자가 견디기 어려운 경우 이를 제거하기도 한다. 이때에 조직에 존재하는 종양의 운명에 따라 환자의 예후와 치료 방향이 결정되는 것인데, 형태학적인

구분만으로 잔존 종양세포의 운명을 알기는 어려운 실정이다. 본 연구에서는 자기공명관류 영상과 종양 표지자 p53, MGMT, Bcl-2, caspase-3 의 치료 전, 후 조직에서 변화를 측정하고 연관성을 분석하였다. p53 은 CBV 증가에 기여하며 ($p=0.010$), MGMT 의 발현 증가는 CBV 의 증가와 연관이 있다고 생각된다. Bcl-2 의 증가가 뚜렷하고 다른 인자는 감소 또는 변화를 보이지 않는 경우 형태학적으로 괴사를 보인다고 해서 치료에 반응할 것으로 기대해서는 안 된다. 종양 세포에 MGMT 및 Bcl-2 의 증가가 뚜렷하지 않은 대신 caspase-3 의 활성 증가가 뚜렷하여 결국 치료에 좋은 반응을 보이고 생존할 것으로 생각된다. CBV 가 증가한 부분에 존재하는 종양 세포가 Bcl-2 의 활성이 증가한 경우는 종양이 진행할 가능성이 높고, MGMT 발현이 감소하고 caspase-3 활성이 증가한 경우는 종양세포 사멸로 갈 가능성이 높다고 할 수 있겠다.

핵심 되는 단어; 교모세포종, 방사선 괴사, MGMT, Bcl-2, Caspase-3, p53, 자기공명관류영상. 세포사멸

교모세포종에서 치료 전, 후 p53, Bcl-2, caspase-3, O⁶-methyguanine-DNA

methlytransferase 의 변화와 뇌 자기 관류 영상의 연관성

<지도교수 김동석>

연세대학교 대학원 의학과

심규원

I. 서론

근래에 뇌 악성 종양에 대한 치료는 많은 발전과 연구를 거듭하여 생존율의 향상을 보이고 있다. 특히 경구 항암제인 temozolomide 가 개발되어 널리 이용 되고 있고 악성 교종 및 특히 회돌기 세포종 (LOH 1p19q)에서 고무적인 치료 결과를 보여주고 있다¹. Temozolomide 는 alkylating agent 이므로 O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase 의 활동도에 영향을 받으며 이에 대한 연구가 지속적으로 시행되고 있으며 효소의 활성이 떨어진 환자를 가려내는 소극적인 방법에서 효소의 활성도를 감소시키는 약제를 병행 투여하여 약효를 증대시키는 적극적인 방법으로 발전하고 있다²⁻¹⁰. 특히 Stupp¹¹ 등이 제시한 방사선 및 항암치료의 병용 요법의 시행 이후 전체 생존율의 향상 및 삶의

질은 향상을 보고 있다고 생각된다. 하지만 방사선 치료 기술의 발달과 방사선 치료의 효과를 증강시키는 이러한 알킬화 작용을 하는 항암제의 병용 치료는 정상 뇌에 조사되는 방사선의 양은 줄어든 반면 종양에 조사되는 양은 증가되어 종양의 괴사 가능성이 높아지고 정도도 심해졌다. 방사선 치료를 마치고 대부분의 경우 항암치료를 계속해서 받게 되는데, 방사선에 의한 종양 괴사 또는 종양의 진행은 이 시기 또는 이후에 많이 볼 수 있다. 그러나 임상적 영사학적 진행 또는 악화가 반드시 종양의 진행을 의미하는 것은 아니며 방사선 괴사일 수도 있다는 것이다¹²⁻¹⁶. 하지만 MRI 에서 조영 증강 부분의 크기가 증가하고 주변의 부종이 진행되는 상황이라면 보통의 경우는 종양의 진행이나 재발을 먼저 생각하게 된다. 그러나 이러한 상황에서 종양의 진행이 아니라는 근거가 있다면 치료를 계속하여 효과를 기대할 수 있을 것이나 현재까지 알려진 방법으로는 이를 구분하기에 충분치 않은 것으로 알려져 있으며^{13, 17-19}, 일부의 경우에서만 제한적으로 가능하다고 알려져 있고, 이것조차 신뢰도는 높지 않다²⁰⁻²⁵. 종양의 진행과 방사선 괴사의 구분은 아직까지 매우 어려운 부분이며, 치료를 계속할 것인지 중단할 것인지 판단하는 중요한 선택에 놓이게 된다. 하지만 현재까지 알려진 어떠한

검사법도 이것을 정확히 구분해 내지 못 하고 있으며, 최근 들어 치료 중 또는 치료 후에 종양이 진행되는 것처럼 보이는 경우를 “가성 진행, pseudoprogession”으로 지칭하고 이에 대한 연구들이 이루어 지고 있으나 영상의학적인 판단에 의존하는 상황이며 약 15-47%에서 이러한 “가성진행”을 보인다고 한다²⁶⁻²⁸. 하지만 결국 magnetic resonance spectroscopy 나 positron emission tomography 등의 기준에 불완전한 것으로 알려진 방법의 추가 시행을 제시하고 있다²⁹. 그렇다면 임상적으로 상태 악화를 보이고 영상 검사에서 병변이 진행되는 것으로 보이는 모든 환자를 수술적 치료의 대상으로 해야 하는가는 아직 의문으로 남아 있으며 방사선 치료 후에 병리학적으로 남아있다고 보고되는 종양이 앞으로 어떤 방향으로 진행할 것인지 알려진 바가 없다. 결국은 남은 종양의 유전자적 특성에 따라 사멸을 길을 걸을 것인지 계속 생존하여 진행할 것인지 결정된다고 생각할 수 있겠다. 그렇다면 종양 세포가 남아 있다고 진단된 경우는 어떻게 하는 것이 좋은가? 치료의 효과가 없다고 판단하는 것이 옳은가 아니며 앞으로 사멸할 것이니 그냥 두는 것이 옳은가? 이차 수술 후 종양의 정확한 운명을 결정하여 치료의 결과를 판단하고 향후 환자의 치료 방침을 결정하기 위한 조치가 필요하며 이를 위해

방사선 치료 후 남은 종양에 대한 생존 가능성 검증 및 유전적 특성에 대한 연구가 필요하다. 또한 근래에 들어 MRI 관류 영상에서 국소적인 뇌혈류 및 혈액량의 차이가 별모양 세포종에서 악성도와 연관성이 있고 상당한 상관관계를 보인다는 보고가 있다. 따라서 치료 전, 치료 도중 MRI 관류 영상을 시행하여 종양의 진행 정도를 판단할 수 있다면 불필요할 수 있는 재 수술을 피할 수 있을 것이다³⁰⁻³¹. 이에 뇌 교모세포종에서 치료 전, 후 유전자 변이 및 MRI 관류 영상의 연관성을 알아보려고 한다.

II. 재료 및 방법

치료 전, 후 조직을 얻을 수 있었던 환자를 대상으로 세포의 생존 가능 여부 판단을 위해 세포 배양을 시도하였다. 세포 사멸에 관여하는 것으로 알려진 것 중에 가장 잘 알려진 p53, Bcl-2, caspase-3를 사용하였고, 교모세포종의 치료 반응을 보기 위해 methyl-guanine methyl-transferase (MGMT)를 이용하였다.

1. 환자 및 조직

최근 10년 이내에 병리학적으로 교모 세포종을 진단받고, 정해진 약속에 따른 방사선 및 항암 치료의 병합요법(Stupp¹¹)을 마치고, 재수술을 하여 조직을 얻은 환자를 대상으로 하였다. 조직 배양을 위한 신선 조직을 제외한 조직은 영하 80도에서 보관하고, 조직 염색을 위해 formalin에 고정 후 paraffin으로 처리하였다.

2. 세포 배양

치료 후의 종양 조직에 대해 종양 세포의 생존 가능성에 대해 알아보고자 조직 배양을 시행함. 조직은 HBSS(Hank's balanced salt solution GIBCO)로 처리한

다음 0.5mm³이 되도록 잘라낸다. 1000rpm에서 5분 동안 원심분리 후 상층액은 버린다. 600unit의 collagenase(Sigma) 와 0.05% trypsin-EDTA로 45분 동안 37°C incubation 시킨다. Dulbecco's minimum essential medium(supplemented 10% FBS) 배지로 처리한 뒤 cell strainer로 filtering한 다음 25T flask에 분주한다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한다.

3. 면역 염색

조직은 paraffin 처리 후 5 µm 두께로 절편을 내어 준비 하였다. Paraffin으로 처리된 조직의 파라핀을 제거하기 위해 섭씨 60도에서 한 시간 동안 가열하고, xylene에 5분씩 세 번 세척한다. Acetone에 두 번 세척하고 alcohol의 농도(100%, 90%, 70%)에 따라 세척한다. Endogenous peroxidase의 활성을 막기 위해 H₂O₂(3%)에 10분 정도 담근 후 물에 세척한다. 항원의 회복을 위해 pH 6.0의 citrate buffer에서 pressure-cooking 하였다. 조직은 phosphate buffer로 행군 뒤 primary antibody를 붙여준다. 사용한 항체는 표 1에 제시하였다.

Table 1. Summary of antibodies used in this study.

Antibody	Clone	Dilution	Source
p53	DO-7	1:100	Neomarkers, Fremont, CA, USA
Bcl-2	124	1:50	DAKO, Carpinteria, CA, USA
MGMT	Ab-1(MT3.1)	1:20	Neomarkers, Fremont, CA, USA
caspase-3	E-8	1:100	Santa Cruz, CA, USA

MGMT; methyl-guanine methyl transferase, PHLPP; PH domain leucine-rich repeat protein

상온에서 1시간 섭씨 4도에서 하루 incubation한 후 phosphate buffer로 행균 후, 20분간 secondary antibody와 반응시키고 phosphate buffer로 세척한다. Streptavidin-horseradish peroxidase 복합체 (LSAB kit, Dako)와 20분간 반응시킨 후 phosphate buffer로 세척한다. 3,3'-diaminobenzidien chromogen (DAB, Dako)을 완충용액(imidazole-HCl buffer [pH 7.5] with H₂O₂ 및 항생제 용액)을 떨어뜨려 발색여부를 확인한 후 hematoxylin으로 대조 염색시킨다. 조직은 저배율(40배)과 고배율(100배, 400배)에서 관찰하였다. 항체 반응의 평가는 조직슬라이드에서 종양세포의 형태가 가장 전형적인 부분을 선택하여 1000개의 종양 세포를 세어서 이중에 항체에 양성을 보이는 세포의 비율을 내어 판독하였다³². ‘-’는 음성, 1+는 <10%, 2+는 10-50%, 3+는 50% 이상을 의미한다 (Figure 1).

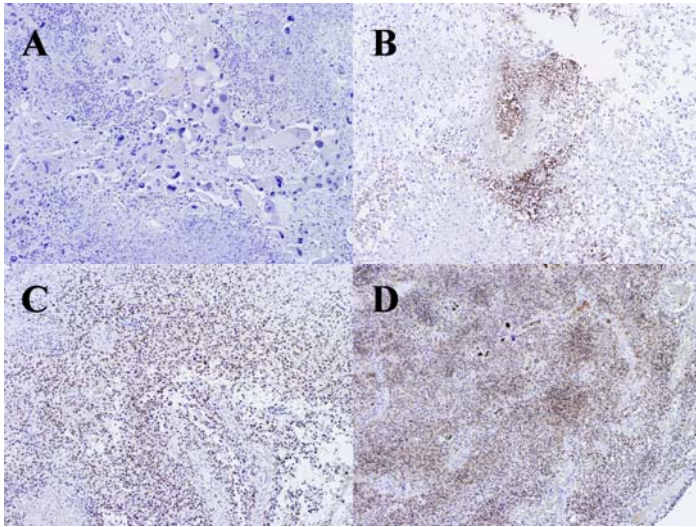


Figure 1. Representative immunohistochemical stain. 고배율(X100)에서 종양세포를 세어 면역 염색 양성 정도를 비율로 나타내고 정도를 표시함. ‘-‘는 음성, 1+는 <10%, 2+는 10-50%, 3+는 50%<. A; negative, B; 1+, C; 2+, D; 3+

4. 자기 공명 관류 영상

자기 공명 영상은 1.5 Tesla system (Gyrosan intera, Philips Medical system, Best, the Netherlands)을 이용하였으며, 0.2mmol/kg의 gadopentetate dimeglumine (Magnevist; Schering AG, Berlin, Germany) 조영제를 주입한 후 영상을 얻었다. 영상자료는 Philips system의 Easy vision[®] (Philips Medical System)을 이용하여 각 대뇌 반구의 대뇌 혈액량 (CBV: cerebral blood volume)을 구하고 지도화하였다. 영상의학과 전문의의 자문을 구하여 종양 부위의 CBV의 증가 감소 여부를 판독하였다.

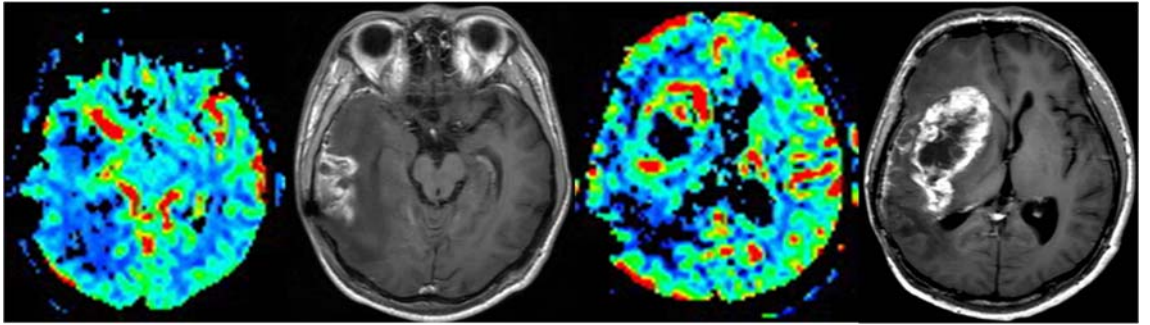


Figure 2. CBV in perfusion MRI. 우측; negative, 좌측; marked increased CBV.

5. 통계 분석

SPSS 12.0 을 이용하여 분석하였다. 통계 분석 기법은 대상의 수가 적으므로 Wilcoxon signed-rank test, Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis test 등 비모수적 검정방법을 사용하였다. 생존분석을 위해 Kaplan-Meier survival analysis 법과 Cox regression 을 이용하였다. 치료 전, 후의 값이 모두 존재하는 처음과 첫 수술 후 값을 통계 분석에 사용하였다.

III. 결과

1. 환자군

교모 세포종으로 진단받고, 표준 치료를 마친 후 재수술을 받은 환자 총 11 명이 선정되었다. 남녀 비는 8:3 이었고, 진단 당시 나이는 평균 31.7 (5-58 세)세였다. 무병생존율(progression free survival)은 4 - 40 개월(중양값 median; 19 개월), 전체생존율(overall survival)은 8 - 102 개월 (중양 값 median; 33 개월)이었다. 추적 기간 중에 종양에 진행한 경우는 8 예이고, 종양 진행이 없었던 경우는 3 예였다. 첫 번째 재수술에서 종양의 재발로 진단한 경우는 8 예, 종양 및 종양 괴사를 보인 경우는 2 예, 종양 괴사를 보인 경우는 1 예 있었다. 환자 # 6 는 두 번째 수술에서는 종양의 재발로 진단하였으나, 세 번째에는 종양 괴사로 진단하여 현재까지 무병 생존 중이다. 연구 종료 시점에 생존 중인 환자는 5 명이였다. 전체 치료 기간 중에 3 차례 이상의 수술을 받은 환자는 4 명 patient# 1, 3, 5, 6)이었다. 이들의 생존 기간은 26, 70, 96, 102 개월이었다 (Table 2). 두 번 이상 수술을 한 경우를 생각하면 모두 17 회의 수술을 받았다. 모든 환자에서 최초 진단에서 표준 치료를 받았기에

재발 또는 진행의 경우는 제한적으로 추가 방사선 치료 (patients #8), 추가 항암치료 (temozolomide; patients # 1, 3, 5, 6, 9, Avastin plus irrinotecan; patients #1) 나 방사선 수술 (gamma knife surgery; patients # 1, 5)등을 시행하였다.

Table 2. Summary of patients enrolled in this study

Pa tie nt #	sex	age at diagnosis	PI 1 (Ms)	1 st ReOp	PI 2 (Ms)	2 nd ReOp	PI 3 (Ms)	3 rd ReOp	OS (Ms)	final status	final diseas e status
1	F	21	33	GM	18	GM			70	alive	P
2	M	45	13	GM					22	dead	P
3	M	25	10	GM(N)	9	GM(N)	3	GM	26	dead	P
4	M	58	11	GM					22	dead	P
5	M	36	23	GM	46	RN			96	alive	F
6	M	14	22	GM	66	GM			102	alive	F
7	M	19	19	GM					33	alive	P
8	F	48	40	GM					86	dead	F
9	F	30	29	GM(N)	8	GM			36	dead	P
10	M	5	9	GM					23	dead	P
11	M	48	4	N					8	alive	P

PI; progression interval, OS; overall survival, P; progression, F; free, GM; glioblastoma, N; necrosis, GM(N); glioblastoma with necrosis RN; radiation necrosis, ReOp; reoperation, Ms; months

2. 세포 배양

배양을 시도했던 모든 환자의 종양 세포는 생존에 실패하였다. 1, 2 세대

배양에는 일부 생존하였으나 이후 배양에서는 모두 생존에 실패하였다.

3. 면역염색 결과

모든 경우에서 최초 수술과 재 수술이 이루어졌으므로 이에 따른 결과를 얻을 수 있었으나, 3 차, 4 차 수술에 따르는 결과는 일부 환자에서만 얻을 수 있었다.

3 차, 4 차 수술을 받은 경우는 표준 치료 이외에 추가 치료를 시행하였으므로, 통계 분석에서는 제외하고, 경향을 살펴 보았다.

가. MGMT

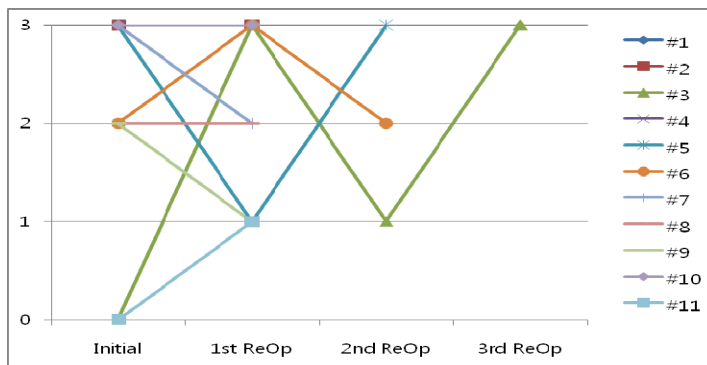


Figure 3. Results of MGMT immunohistochemistry. 수술의 반복에 따른 면역 염색 결과의 변화.

#3, 5, 6, 7, 9, 11 의 환자가 치료 전과 후에 MGMT expression 의 차이를 보였으나, 유의미한 차이를 두기 어려운 것으로 판단된다($p=1.000$). # 2, 4, 10 의 환자는 MGMT 발현율이 계속 높은 경향을 보이며, 본 연구의 중앙 생존율에 미치지 못 하는 생존율을 보인다. #1 환자는 역시 계속 MGMT 발현율이

높으면서 생존하고는 있으나 종양은 현재 진행 중인 것으로 판단 되었다.

MGMT 의 면역 염색 반응이 비교적 높은 경우에도 중앙 생존율을 넘어 생존하는 경우가 있으며 (patient #1, 5, 6, 7), 특히 환자 #5, 6 은 비록 두 차례의 수술을 받고 추가 치료를 하였으나 무병 생존 중이다. #9, 11 환자는 상대적으로 MGMT 발현율은 낮으나 치료에 대한 반응은 좋지 못한 것으로 보인다.

Table 3. Results of MGMT immunohistochemistry

Patient #	Initial	PI 1 (ms)	1 st ReOp	2 nd ReOp	3 rd ReOp	OS (ms)	final status	final disease status
1	3+	33	3+			70	alive	P
2	3+	13	3+			22	dead	P
3	-	10	3+	1+	3+	26	dead	P
4	3+	11	3+			22	dead	P
5	3+	23	1+	3+		96	alive	F
6	2+	22	3+	2+		102	alive	F
7	3+	19	2+			33	alive	P
8	2+	40	2+			86	dead	F
9	2+	29	1+			36	dead	P
10	3+	9	3+			23	dead	P
11	-	4	1+			8	alive	P

ReOp; reoperation, OS; overall survival, P; progression, F; free, PI; progression interval ms; months

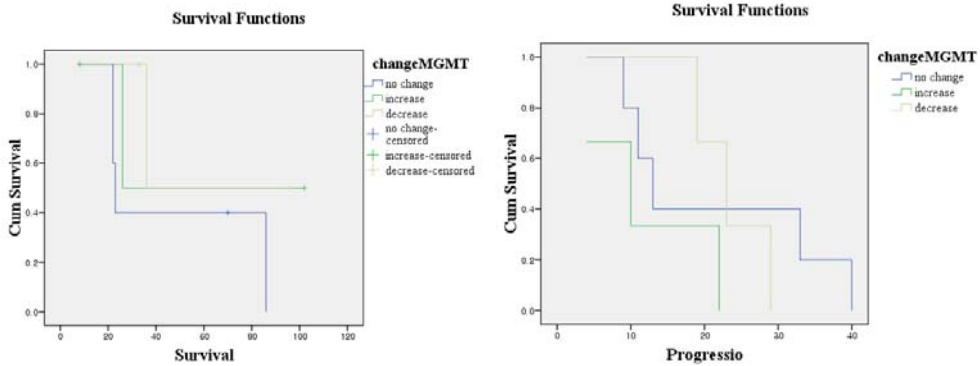


Figure 4. Kaplan-Meier survival curve for MGMT expression. 좌; Overall survival, 우; progression free survival

MGMT 발현율의 증가, 감소, 변화 없음에 따라 그룹을 나누어 분석하였다. 중앙 생존율 부근에서 전반적으로 급격한 생존율 감소를 보이지만 이후는 환자 수의 부족으로 생존에 차이가 있는지 여부를 알 수 없었다. 다만 발현율에 변화가 있는 경우가 변화 없는 경우보다 약 10% 정도 높은 생존율을 한동안 유지하는 것을 볼 수 있다 (Figure 3). 생존 곡선을 보면 MGMT 발현이 변화 없거나 증가되는 경우는 중앙 진행에 관계가 있어 보이며, 전체 생존율의 초기에 영향을 주는 경향을 보인다. MGMT 발현이 감소되는 경우가 생존 초기에는 진행이 늦어 보이지만 후기에 가서는 곡선이 역전되는 형태를 보인다. 이는 환자 수가 충분치 않으므로 결론짓기는 어렵다고 본다.

나. Bcl-2

Bcl-2 에 대한 치료 전, 후의 비교에서는 의미 있는 차이를 보이는 것으로 판단된다($p=0.039$). 8 명의 환자에서 Bcl-2 의 발현이 증가되는 쪽으로 변화가 일어났으며, 변화 없거나 감소되는 경우는 3 명 이었다 (Figure 4). Survival curve 에서 보듯 Bcl-2 발현율의 증가를 보이는 경우는 생존율의 감소를 보이지만 역시 중앙 생존율 부근을 지나면 생존율 감소는 둔화되는 경향을 보인다(Figure 5). Bcl-2 가 증가된 경우는 중앙 무병 생존 기간 19 개월 조금 전까지는 급격한 생존율 감소를 보이고 이후에도 꾸준히 감소하는 것을 보여준다.

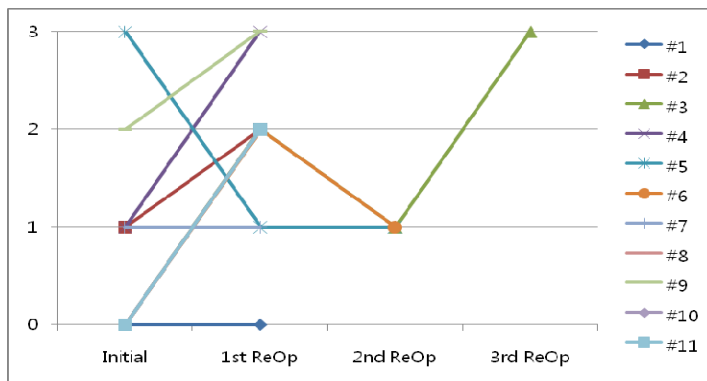


Figure 5. Results of Bcl-2 immunohistochemistry. 수술의 반복에 따른 면역 염색 결과의 변화

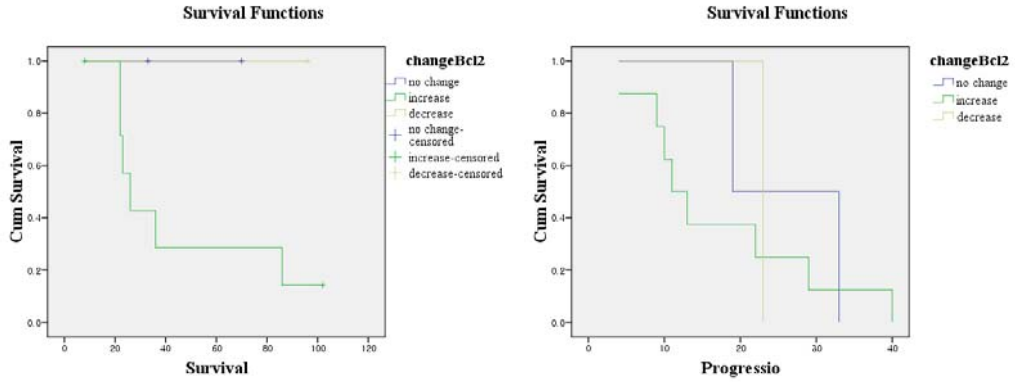


Figure 6. Kaplan-Meier survival curve for Bcl-2 expression. 과 ; Overall survival, 우 ; progression free survival

Table 4. Results of Bcl-2 immunohistochemistry

Patient #	Initial	PI 1 (ms)	1 st ReOp	2 nd ReOp	3 rd ReOp	OS (ms)	final status	final disease status
1	-	33	-			70	alive	P
2	1+	13	2+			22	dead	P
3	-	10	2+	1+	3+	26	dead	P
4	1+	11	3+			22	dead	P
5	3+	23	1+	1+		96	alive	F
6	-	22	2+	1+		102	alive	F
7	1+	19	1+			33	alive	P
8	-	40	2+			86	dead	F
9	2+	29	3+			36	dead	P
10	-	9	2+			23	dead	P
11	-	4	2+			8	alive	P

ReOp; reoperation, OS; overall survival, P; progression, F; free, PI; progression interval ms; months

다. Caspase-3

치료 전, 후의 caspase-3 활성은 의미 있는 차이를 보인다($p=0.010$). Bcl-2 의 변화 경향과는 다른 형태를 보이고 있으며, 대부분 치료 후에 증가하는 경향을 보임 (Figure 6.).

Table 5. Results of caspase-3 immunohistochemistry

Patient #	Initial	PI 1 (ms)	1 st ReOp	2 nd ReOp	3 rd ReOp	OS (ms)	final status	final disease status
1	-	33	3+			70	alive	P
2	2+	13	2+			22	dead	P
3	2+	10	2+	3+	2+	26	dead	P
4	2+	11	3+			22	dead	P
5	-	23	2+	3+		96	alive	F
6	-	22	3+	3+		102	alive	F
7	-	19	3+			33	alive	P
8	1+	40	1+			86	dead	F
9	1+	29	3+			36	dead	P
10	-	9	2+			23	dead	P
11	1+	4	3+			8	alive	P

ReOp; reoperation, OS; overall survival, P; progression, F; free, PI; progression interval ms; months

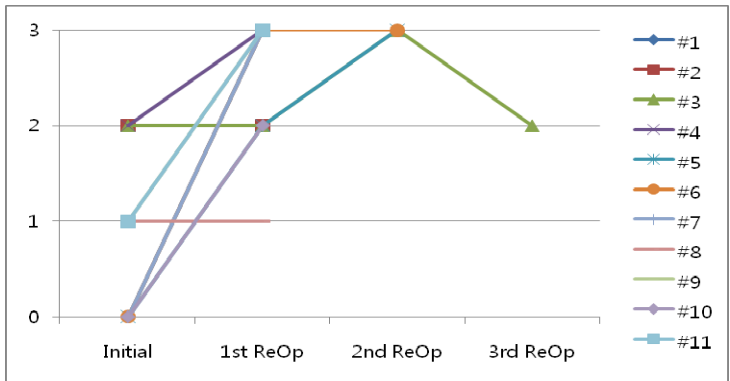


Figure 7. Results of caspase-3 immunohistochemistry. 수술의 반복에 따른 면역 염색 결과의 변화.

하지만 caspase-3 발현의 변화가 무병 생존율에는 영향을 주지 못 하나 전체 생존율에는 영향을 주는 것으로 보인다(Figure 7). 전체 생존 곡선에서 후반부에 생존율을 유지하는 경향을 보인다.

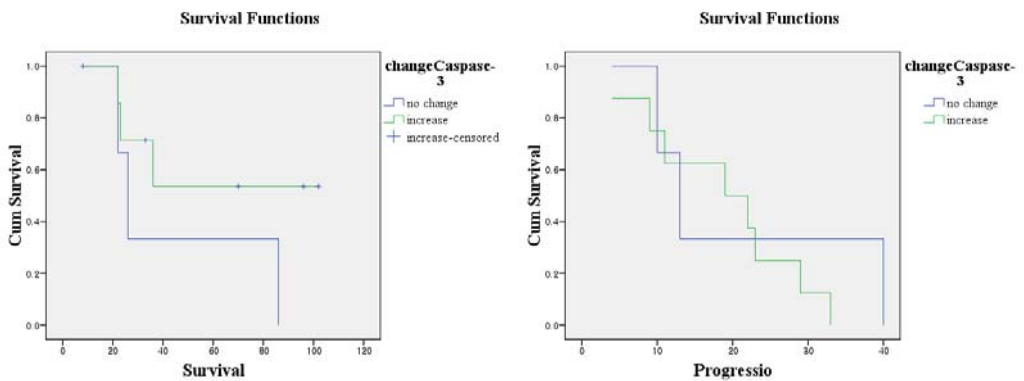


Figure 8. Kaplan-Meier survival curve for caspase-3 expression. 좌; Overall survival, 우; progression free survival

라. p53

치료 전, 후 p53 의 발현은 통계적 유의한 수준의 변화를 보이지는 않으나 ($p=0.063$), 의미 있는 변화를 보인다 할 수 있겠다.

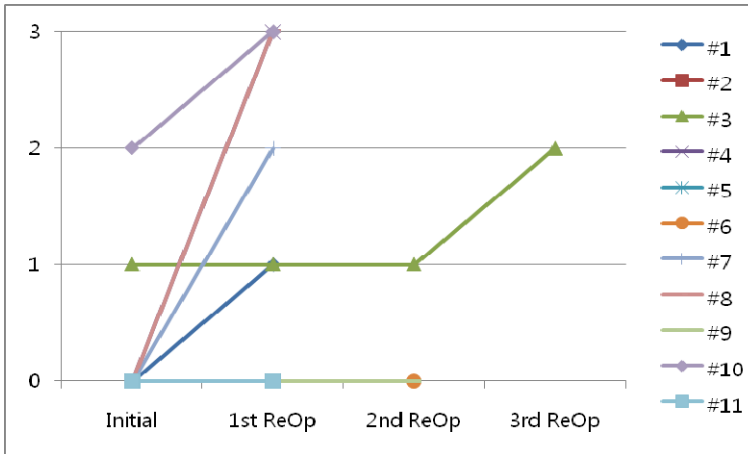


Figure 9. Results of p53 immunohistochemistry

#3, #10 의 환자에서만 최초에 양성을 보이는 것은 이들의 나이가 어리므로 primary 교모세포종의 가능성이 있다. 생존에 미치는 영향은 Figure 9 의 생존곡선에서 중앙 생존기간을 넘어서게 되면 p53 이 증가된 경우 생존율이 유지되는 것을 볼 수 있다. 무병 생존에 대한 영향에서는 환자수가 적어 곡선이 거칠기는 하지만 p53 이 증가된 경우 종양의 진행이 조금 늦는 것을 볼 수 있다. 하지만 환자 #4, #7 을 보면 p53 의 증가에도 한 환자는 사망하였고 다른 환자는 생존해 있지만 종양은 계속 진행 중이다.

Table 6. Results of p53 immunohistochemistry

Patient #	Initial	PI 1 (ms)	1 st ReOp	2 nd ReOp	3 rd ReOp	OS (ms)	final status	final disease status
1	0	33	1+			70	alive	P
2	0	13	0			22	dead	P
3	1+	10	1+	1+	2+	26	dead	P
4	0	11	3+			22	dead	P
5	0	23	0			96	alive	F
6	0	22	0	0		102	alive	F
7	0	19	2+			33	alive	P
8	0	40	3+			86	dead	F
9	0	29	0	0		36	dead	P
10	2+	9	3+			23	dead	P
11	0	4	0			8	alive	P

ReOp; reoperation, OS; overall survival, P; progression, F; free, PI; progression interval, ms; months

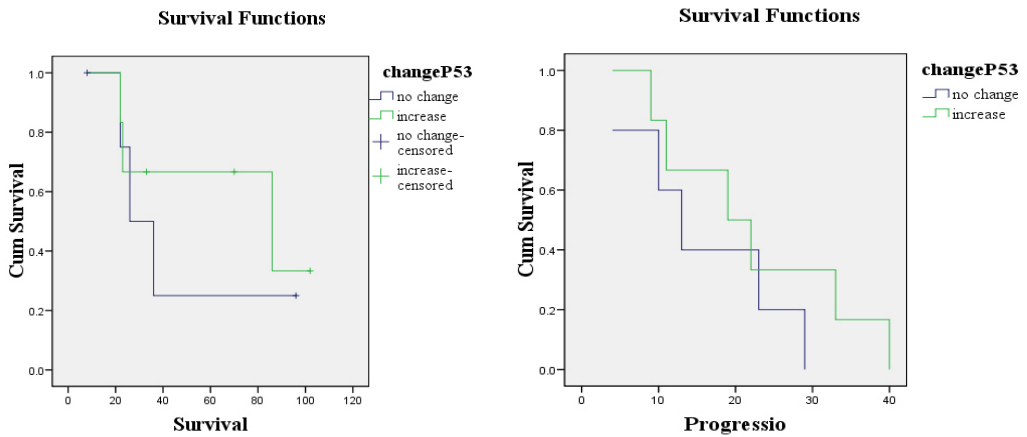


Figure 10. Kaplan-Meier survival curve for p53 expression. ω ; Overall survival, ω ; progression free survival

4. 자기 공명 관류 영상

관류 영상의 변화는 table 7 에 정리한 바와 같이 병리 결과에 어느 정도 부합하는 결과를 보여 주며, 이는 현재까지 문헌에 보고된 바와도 일치하는 것으로 보인다. 다만 patient #3 에서 CBV 증가가 없는 상태로 재수술하였으나 잔여 종양과 괴사가 함께 병리 진단되었다. 2 차 재수술에는 CBV 의 증가를 보이는 상태이지만 괴사와 종양 진행이 함께 혼재하였다. 3 차 수술에서는 종양괴사 없이 종양의 진행으로만 병리 진단되었다. 환자 #9 도 CBV 의 증가를 보이지만 종양괴사가 섞여 있는 것으로 진단되었고, 종양 괴사로 진행하지 않고 8 개월 후에 종양의 진행을 보였다. 환자 # 5, #11 은 CBV 의 증가 없고 병리에서 종양괴사로 진단하였고, 이후 종양 진행은 없다 (Figure 9).

관류 영상과 종양 표지자 등의 관계는 table 8 과 같다. 각각의 인자들의 변화는 p53 ($p=0.023$) 외에 CBV 변화와 통계적인 유의성을 보이지는 않으나, MGMT 의 변화 ($p=0.059$)는 환자수의 증가에 따라 CBV 에 대한 영향은 통계적인 유의성을 보일 것으로 기대할 만하다. 하지만 모든 변수의 CBV 에 대한 영향을 고려할 때 Kruskal-Wallis test 에 의해 MGMT ($p=0.177$), Bcl-2 ($p=0.154$), caspase-3 ($p=0.384$), p53 ($p=0.010$) 중 여전히 p53 의 변화가 통계적인

유의성을 보였고, Bcl-2, MGMT 의 변화가 유의 수준에 근접하는 결과를 보인다.

전체 생존(overall survival)에 대한 각 인자의 변화 및 CBV 의 변화는 Cox regression 분석에서 MGMT 의 변화 ($p=0.095$)와 CBV 의 변화 ($p=0.073$) 는 통계적인 근사 유의성을 보이고 Bcl-2 ($p=0.199$), caspase-3 ($p=0.123$), p53 ($p=0.573$)의 변화는 통계적인 유의성은 보이지 않는다. 무병 생존율 (progression free survival) 에 대한 영향은 CBV 의 변화 ($p=0.025$)가 통계적인 유의성을 가지면서 무병 생존율에 영향을 보여준다. 즉, CBV 의 증가 정도는 종양의 진행을 시사한다는 기존의 보고와 일치하는 결과로 생각된다. Bcl-2 ($p=0.135$)는 환자 수가 충분하다면 통계적 유의성 범주에 들 것으로 기대하지만, MGMT ($p=0.182$), caspase-3 ($p=0.482$), p53 ($p=0.353$) 등의 변화는 전체 환자 군의 수가 늘더라도 통계적 유의성의 범주에 들어올 것으로 기대하기는 어려울 것으로 보인다.

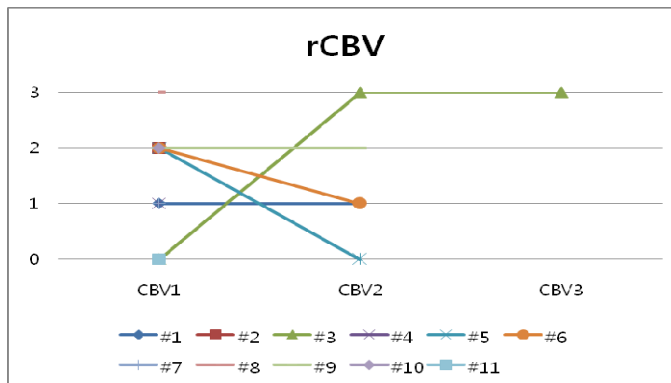


Figure 11. Change of rCBV.

Table 7. Summary of MRI perfusion (CBV) status

Pa tie nt #	PI 1 (Ms)	1 st ReOp CBV	Path Dx	PI 2 (Ms)	2 nd ReOp CBV	Path Dx	PI 3 (Ms)	3 rd ReOp CBV	Path Dx	OS (ms)	final statu s	final disea se statu s
1	33	↑	GM	18	↑	GM				70	alive	P
2	13	↑↑	GM							22	dead	P
3	10	-	GM (N)	9	↑↑↑	GM(N)	3	↑↑↑	GM	26	dead	P
4	11	↑	GM							22	dead	P
5	23	↑↑	GM	46	-	RN				96	alive	F
6	22	↑↑	GM	66	↑	GM				102	alive	F
7	19	↑	GM							33	alive	P
8	40	↑↑↑	GM							86	dead	F
9	29	↑↑	GM (N)	8	↑↑	GM				36	dead	P
10	9	↑↑	GM							23	dead	P
11	4	-	N							8	alive	P

PI; progression interval, OS; overall survival, P; progression, F; free, ReOp; reoperation, Path Dx; pathological diagnosis, Ms; months

Table 8. Summary of immunohistochemical results and rCBV

Patient #	Change of MGMT	Change of Bcl-2	Change of caspase-3	Change of p53	rCBV	OS (ms)	final status	final disease status
1	0	0	3	1	1	70	alive	P
2	0	1	0	0	2	22	dead	P
3	3	2	0	0	0	26	dead	P
4	0	1	1	3	1	22	dead	P
5	-1	-1	2	0	2	96	alive	F
6	1	2	3	0	2	102	alive	F
7	-1	0	3	2	1	33	alive	P
8	0	2	0	3	3	86	dead	F
9	-1	1	2	0	2	36	dead	P
10	0	2	2	1	2	23	dead	P
11	1	2	2	0	0	8	alive	P

-1; decreased, 0; no change, 1; increased, 2; moderately increased, 3; markedly increased, ms; months

IV. 고찰

악성 뇌종양의 대부분을 차지하고 그 중에서도 가장 많은 비율로 발생하고 치료도 어려운 교모세포종(glioblastoma)는 수술적 제거 후 방사선, 항암 치료 병합 요법을 기본 치료로 한다. 근래에는 경구 제재인 temozolomide가 개발되어 그 효과와 안전성으로 상당한 정도의 생존율 향상 및 삶의 질 향상을 보인다고 생각된다. 특히 2005년 Stupp 등이 제안한 방사선 항암 치료 동시 요법은 중앙 생존율을 12개월에서 14개월로 향상시키고, 2년 생존율을 방사선 단독 치료 10.4%에서 26.5%로 향상시켰다¹¹. 이후 이 방사선 항암제 동시 요법은 교모세포종의 표준치료로 자리하게 되었다. 하지만 이 치료 프로토콜은 방사선 치료를 하면서 함께 temozolomide를 사용하고, 이후에 MRI를 시행하여 치료의 지속 여부를 판단하여 추가로 4회를 더 사용하여 종양의 반응 정도를 MRI를 통해 판단, 남은 종양이 줄어들거나 그대로 유지가 되면 효과가 있다고 판단하여 치료를 계속하고 그렇지 않은 경우는 치료를 중단하고 다른 방법을 동원하도록 하고 있다¹¹. 하지만 방사선 치료 후 2차 치료까지는 이미 수 개월이 시일이 지난 시점이어서 진행이 급속으로 이루어 지는 경우는 환자나 의료진

에게 어려운 상황을 맞도록 한다. 따라서 치료 시작 전에 치료에 대한 반응을 예측하고 이를 바탕으로 치료 계획을 세우는 것이 비용과 시간 측면에서 유리할 것으로 본다. 이에 MGMT promoter 의 메틸화를 치료 시작 시점에 검출하여 temozolomide에 대한 반응을 예측한 연구가 진행되었고, MGMT promoter hypermethylation은 통계적 유의성을 보이며 알킬화 항암제의 작용을 향상시키고 생존율 증가에 기여하는 것으로 보고되었다³³. 특히 교모세포종에 대해서는 MGMT promoter가 메틸화된 경우는 그렇지 않은 경우에 비해 무병 생존기간을 9.2개월에서 21.9개월로 늘이고, 전체 생존기간을 16.8개월에서 43.6개월로 향상시킨다는 보고가 있다³⁴. MGMT가 메틸화된 경우나 MGMT expression가 감소 또는 결여된 경우는 알킬화 항암제에 반응이 좋고³⁵, 좋은 예후를 시사한다. 그러나 MGMT의 메틸화된 경우는 p53과 K-ras에 transition point mutation을 증가시키는 경향이 있어, 치료를 하지 않을 경우 더욱 나쁜 예후를 보일 소지가 있다³³. 게다가 지속적인 유지요법이 생존율을 향상시킨다는 증거는 부족하지만 지속적인 temozolomide의 투여는 결과적으로 MGMT를 감소 또는 고갈시킬 수 있으므로 치료 계속은 정당하다고 할 수 있다³⁶.

알킬화 항암제의 치료 반응의 개선에는 nitrosourea 계통의 BCNU(bis-chloroethyl -nitrosourea)를 포함한 항암치료 및 방사선 치료의 기술적 발전이 기여한 바가 큰데, DNA 에서 alkylation 되는 부위 중에서 가장 중요한 곳이 deoxy-guanosine 의 O⁶ 위치로 알려져 있다³⁷. Alkyl adduct 는 DNA 를 crosslink 시키고 이는 DNA 에 lethal lesion 을 만들게 된다. 하지만 인간의 세포 내에서는 crosslink 이전에 O⁶-alkylguanine 은 O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase 에 의해 교정된다. 이 효소는 alkyl adduct 를 자신의 peptide chain 중 145 position 에 위치한 cystein residue 에 이동시키고 비활성화 된다. 따라서 이러한 ‘자살 기전’에 의해 DNA repair 가 이루어지므로 이용 가능한 효소의 수에 따라 repair 기전의 제한을 받게 된다³⁸. Alkyltransferase 의 활동이 없는 인간 종양세포의 유전자 발현형을 'Mer-'라고 부르며 BCNU 를 포함하여 O⁶-alkylguanine 을 만드는 약제에 상당히 민감하다³⁹⁻⁴⁰. Alkyl-transferase 의 활성도와 치료에 대한 반응은 Michael Belanich 등과 Kurt A. Jaeckle 의 연구에서 잘 알 수 있듯이 효소의 활동도 만으로도 환자의 예후를 예측하는 지표로 활용이 가능한 것으로 되어 있고 뇌 악성 종양 이외의 다른 장기 악성 종양에서도 보고되고 있다^{37, 41-43}. O⁶-benzylguanine 은 free base inhibitor 로서

세포의 alkyltransferase 의 활성을 고갈시켜 약제 내성을 고갈시키고 BCNU 에 대한 저항성을 소실시킨다⁴⁴. 따라서 O⁶-benzylguanine 이든 temozolomide 자체든 MGMT 메틸화가 없는 경우라 할지라도 계속 투여하면 MGMT 의 감소나 고갈로 효과를 볼 수 있을 것으로 기대 한다⁴⁵⁻⁴⁶. MGMT expression 은 MGMT promoter 의 메틸화 상태에 따라 달라 질 수 있겠으나, epigenetic modification 이나, 다른 요인으로 인해 비교적 상관관계는 떨어지는 것으로 알려져 있다. MGMT promoter 의 메틸화가 temozolomide 등의 알킬화 계열의 항암제의 효과를 증대시킨다고 알려져 있지만, 반대로 MGMT 의 높은 발현은 직접적으로 이러한 항암제의 효과를 떨어뜨린다고 생각해 볼 수 있겠다. 효소의 발현은 DNA level 에서 결정되지만, 발현되는 단백질의 실제 action 은 단백질의 몫이므로, 단백질의 검출이 치료의 반응이나 이에 따르는 예후에 더 상관관계를 보일 수 있다는 결과도 보고되고 있다⁴⁷⁻⁴⁹. 특히나 이 보고들은 그 측정의 신뢰도가 타 검사법에 비해 현저히 떨어진다는 면역염색법을 이용 단순히 단백질 발현을 이용한 결과를 보고한 것이다. 실제 임상에서는 실험실에서 사용하는 방법을 동원하는 것이 어렵다. 정량적, 정성적인 DNA, RNA, 그리고 protein 수준의 다양한 검출 방법이 있으나 실제로 적용하기에는

시간, 비용적인 문제가 있으므로 가장 효율적인 것을 가려 내는 것이 필요하다.

치료 프로토콜 중간에 시행하는 조영 증강 MRI 는 종양의 진행 여부를 판단하는데 있어 그 신뢰도는 근래에 들어 상당한 위협을 받고 있다. 방사선 치료 기술의 발전으로 같은 부위라도 상당히 고용량 방사선을 비교적 안전하게 조사할 수 있게 되어 방사선에 의한 효과가 단시간에 특히 2 차 약물 치료를 마치고 효과를 판단할 시기에 혼재되어 나타나는 경우가 종종 있다²⁸⁻²⁹. 이러한 경우 종양의 진행이나 재발로 판단하여 재수술을 하면 종양의 상당 부분이 방사선 괴사를 보이고 있어 진행여부를 명확히 알 수 없는 경우가 많다. 하지만 MRI 에서 조영 증강 부분의 크기가 증가하고 주변의 부종이 진행되는 상황이라면 보통의 경우는 종양의 진행이나 재발을 먼저 생각하게 된다. 그러나 이러한 상황에서 종양의 진행이 아니거나 치료에 좋은 반응을 보이는 조건을 보인다는 근거가 있다면 치료를 계속하여 효과를 기대할 수 있을 것이나, 현재까지 알려진 방법으로는 충분치 않다¹⁸⁻¹⁹. 치료 중 또는 후에 종양의 진행으로 보이지만 실제로는 치료에 반응하는 과정인 것을 가성진행(pseudoprogession)이라 하며 최근에 15 - 47% 정도 보고 되고

있는데 ²⁶⁻²⁸, 이는 MGMT 메틸화의 경우 높은 빈도로 보이며 치료에 좋은 반응을 시사하여 가성 진행을 보이는 경우 무병생존율 및 전체 생존율이 높은 것으로 보고된다 ³⁴. 본 연구에서도 MGMT 의 발현이 치료 후 감소된 경우는 초기 종양 진행을 늦추는 경향을 보이며, MGMT 의 발현이 변화 없거나 증가하는 경우는 초기 생존율에 좋지 않은 영향을 주는 경향을 보였다.

MGMT promoter 메틸화가 가성 진행을 더 유발하는 경향을 보이는 것으로 보고하고 있으나, 본 연구에서는 MGMT 발현이 치료 후 감소한 경우는 초기 종양 진행을 늦추는 경향을 보여 영상 검사에서 반대의 소견을 보일 수 있겠다. 하지만 치료 전, 후에 MGMT 발현에 변화가 있다는 것은 단지 환자 각각에 특이한 상황이 발생하는 것인지, 치료 관련 일반화할 수 있는 변화가 있는 것인지, 추후 충분한 수의 환자를 확보하여 MGMT promoter 메틸화 상태와 연관하여 연구해 볼 과제로 생각한다. MGMT promoter 메틸화와 MGMT 단백질의 발현에는 상관 관계가 없다는 보고가 있지만, 치료 후에 어떤 변화를 보이는가는 것은 알아볼 필요가 있다고 본다 ⁴⁹. 유전자 특정 부위의 methylation 여부를 알고자 하는 경우 매우 다양한 방법을 시도해 볼 수 있고 ⁴⁸, DNA, RNA, 및 단백질 각각의 수준에서 MGMT 에 관한 평가가 가능하다.

Bisulfite sequencing, combined bisulfite restriction analysis (COBRA), melting curve analysis-based semiquantitative real time polymerase-chain reaction, methylation-sensitive high resolution melting, methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA), methylation-specific polymerase chain reaction (MSP), methylation-specific SYBR-green-based quantitative polymerase-chain reaction, pyrosequencing, real-time quantitative MSP (rt-MSP), regional methylation elongation assay 등을 DNA 수준에서 시행할 수 있고, RNA 수준에서는 nested in situ rt-RT-PCR, real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (rt-RT-PCR), 그리고 단백질 수준에서는 activity assay, immunohistochemistry, Western blot 을 할 수 있다. Methylation 상태를 볼 수도 있고, 단백질 발현을 볼 수도 있다. Methylation 상태를 보기 위해 임상적으로 가장 많이 사용하는 methylation-specific polymerase chain reaction (MSP)⁵⁰⁻⁵¹ 법은 비용대비 효율이 좋은 검사법이지만 정량적이지 않고, 파라핀으로 처리된 조직의 경우 DNA 의 상태에 따라 가성 양성이나 음성이 나올 수 있다. 이에 bisulfite sequencing of multiple clones 의 방법이 반정량적이고 조직의 질이 다소 낮더라도 신뢰도 높은 결과를 제시하는 것으로 제시되고 있다. 하지만 비용

대비 이득이 적고 임상에 적용하기에는 검사 속도도 적당하지 않다⁵². 임상에서 가장 적용 가능하고 신뢰도가 높을 것으로 문헌에 제시되는 방법은 pyrosequencing assay 이다⁵². 그러나 아직은 국내에서 널리 이용하는 방법은 아니고 MSP 에 비해 적지 않은 비용을 요구하는 검사법이다. 현재와 같이 파라핀 처리된 조직으로 이루어지는 검사 방법에서는 다양한 제약과 문제점이 있을 수 있으며, 다양한 방법간의 신뢰도 비교 및 효율의 평가가 있어야 할 것으로 생각된다⁵³.

MGMT 의 발현 증가는 CBV 의 증가와 근사 유의성($p=0.059$)을 보이고 있는데, 환자 수가 충분하다면 통계적 유의 수준으로 들어올 것으로 판단한다. CBV 가 증가한 부분에서도 병리학적인 종양 괴사 부분이 진단되지만 이것이 세포 사멸로 갈 것인가 하는 것은 별개의 문제이고, 본 연구의 환자 #3 과 #9 에서 이러한 현상을 보이는데, Bcl-2 의 증가가 뚜렷하고 다른 인자는 감소 또는 변화를 보이지 않는다. 이런 경우 형태학적으로 괴사를 보인다고 해서 치료에 반응할 것으로 기대해서는 안 된다. 이 환자들은 결국 계속 진행, 사망하였다. 이것이 반드시 Bcl-2 의 활성 증가인가는 적은 수의 환자로는 결론 내릴 수 없는 부분이다. 반대의 현상도 볼 수 있는데, 환자 #1, 6, 7 은

2 차 수술에서 CBV 의 증가를 보였지만 가상 진행과 진성진행을 감별하기 어려운 상태였고 병리학적 진단은 괴사 없는 종양 진행이었다. 하지만 이 종양 세포는 MGMT 및 Bcl-2 의 증가가 뚜렷하지 않은 대신 caspase-3 의 활성화 증가가 뚜렷하여 결국 치료에 좋은 반응을 보이고 생존하였다. 그렇다면 CBV 가 증가한 부분에 존재하는 종양 세포가 Bcl-2 의 활성화가 증가한 경우는 종양이 진행할 가능성이 높고, MGMT 발현이 감소하고 caspase-3 활성화가 증가한 경우는 종양세포 사멸로 갈 가능성이 높다고 할 수 있겠다. 관류 영상을 이용한 뇌항법장치를 이용 관심 부위의 종양, 주변부, 경계부 (종양과 정상이 섞여있을 것으로 예상하는 부위), 및 정상부위를 선택하여 조직을 얻어 비교할 수 있다면 더 신뢰도 있는 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대하며, 이러한 방법은 Hu 등이 소개한 대로 영상을 조준하고 뇌항법장치에 등록하여 원하는 부위의 조직을 얻을 수 있겠다.⁵⁴ 또한 Sugahara⁵⁵ 등이 제시한 cut-off 값은 이러한 조직을 조준하고 정하는 것에 도움이 될 것으로 기대한다. CBV 의 변화 비율이 2.6 을 넘어서는 경우는 종양 세포가 존재하는 종양 부위일 가능성이 매우 높고, 0.6 보다 작은 값인 경우는 종양보다는 괴사나 반흔일 가능성이 높으므로 이러한 기준으로 종양, 주변부, 정상을 구분하여

조직을 얻는 다면 좀 더 체계적으로 조직을 얻는 것이 가능할 것으로 생각한다. 본 연구에서는 임상적인 제한점으로 이러한 조직의 위치에 따르는 차이를 구분하여 분석하지 못 하였으나 부위에 따른 차이는 분명히 있을 것으로 예상하며, 주요 인자의 활성화도 차이가 있을 것으로 생각한다. 주요인자 특히 MGMT 의 활성화 비율을 검출한다면 항암제 반응이 좋은 부위와 그렇지 못 할 부위를 가려내는 것이 가능하며, 남은 종양 세포가 장차 치료에 잘 반응할 것으로 예상할 수 있다면 치료를 계속하여 좋은 결과를 얻을 것을 기대할 수 있겠다.

Yao ⁵⁶ 등은 교모세포종 세포주(cell line)에 이온화 방사선을 조사하여, 세포주기에 관여하는 인자들의 반응을 관찰하였다. 방사선에 세포사멸 반응이 높게 나타난 종양 세포주에서 G₁ arrest 에 관여하는 p27 과 p16 이 방사선 노출 24 시간 이내에 일시적으로 증가된 것을 발견하였다. 본 연구에서 p53 의 발현이 치료 후에 증가하고 이것이 종양 생존율 이후 생존율 유지에 기여하는 경향을 보이며, 종양 진행을 늦추는 경향을 보이는 것은 p53 본연의 세포주기 조절 및 세포사멸 기능에 의한다고 할 수 있겠다. 하지만, Bcl-2 발현이 치료 후에 증가하는 경향을 보이고, 초기 종양 진행이 가속화되는 것은 이와는 반대

현상이며 Yao 등의 연구와는 반대 현상으로 해석되지만 장기 생존에 어떤 영향을 줄지는 본 연구만으로 결론 내기는 어렵다. 그러나 자세히 보면 Bcl-2 의 증가로 초기에 종양 진행이 가속화된 것이 p53 에 의해 억제되는 경향으로 해석할 수 있겠다. 하지만 본 연구의 Cox regression 분석에서는 어느 쪽도 영향이 없는 것으로 나타났다. 워낙 적은 수의 환자를 분석한 것이므로 단정지을 수는 없겠다. 다만 caspase-3 의 활성화는 대개 증가하는 경향을 보여 Bcl-2 와 같은 방향의 변화를 보인 것은 좀 더 연구가 필요한 부분이라고 생각한다. Caspase-3 단독으로 예후나 치료반응을 결정하기는 어려울 것으로 생각할 수 있다. Caspase cascade 조절 인자들의 활성화 비율에 따라 이 효소의 활성이 결정되므로 단순히 검출이 많다고 하여 좋은 경우로만 볼 수는 없을 것이다.

세포 배양에서 모든 경우에 배양에 생존에 실패한 것은 배양 환경이 실제 뇌와 같지 않았던 것으로 생각하지만, 현재로서는 명확한 원인을 알기는 어렵다. 1, 2 세대까지 일부 생존하기는 하였으나 그 이상의 생존은 없었다, 이미 방사선 및 항암제에 노출한 탓으로 세포의 생존 잠재능이 떨어져 그렇다고 하기에는 많은 수의 환자가 종양 진행으로 인해 사망하였기에 세포의 생존 잠재능에 문제가 있다고 하기는 어려울 것으로 본다. 아마도

실제 빠른 성장을 보이며, 방사선 및 항암제의 투여로 복잡한 조건에 있을 것이므로 이 조건을 충족시키지 못한 것이 문제였을 것으로 생각된다.

MGMT 발현이 변화 없거나 증가되는 경우는 중앙 진행에 관계가 있어 보이며, 전체 생존율의 초기에 영향을 주는 경향을 보인다. MGMT 발현이 감소되는 경우가 생존 초기에는 진행이 늦어 보이지만 후기에 가서는 곡선이 역전되는 형태를 보인다. Bcl-2 발현율이 증가를 보이는 경우는 생존율의 감소를 보이지만 역시 중앙 생존율 부근을 지나면 생존율 감소는 둔화되는 경향을 보인다. Bcl-2 가 증가된 경우는 중앙 무병 생존 기간까지는 급격한 생존율 감소를 보이지만 p53 의 영향으로 후기 생존율은 유지되는 경향을 보인다. Caspase-3 발현의 변화가 무병 생존율이나 전체 생존율에 영향을 주는 것으로 보이지 않지만, 무병 생존곡선의 초기에 진행을 조금 늦추는 것으로 보인다. p53 의 변화는 CBV 에 의미 있는 영향을 주며, MGMT 의 변화는 환자수의 증가에 따라 CBV 에 대한 영향이 통계적인 유의성을 보일 것으로 기대할 만하다. 특정 인지와 관류 영상의 연관성을 고려한 분석은 환자 치료 방향과 예후 예측에 유용할 것으로 생각된다.

v. 결론

P53, Bcl-2, caspase-3, O6-methylguanine-DNA methyltransferase 은 치료 전, 후에 의미 있는 변화를 보이며, 부위에 따른 관류 영상과 이들 인자간의 연관성을 분석하여 잔류 종양 세포의 운명을 예측하는 것이 가능할 것으로 보인다. 특히, MGMT 는 치료반응에 연관을 보이며, Bcl-2 는 종양 진행에 관여한다. CBV 와의 연관성은 p53 이 가장 뚜렷하다. 하지만 이들 인자간의 상호간 균형이 종양 진행 및 환자 생존의 예측에 활용되어야 할 것으로 생각된다.

참고 문헌

1. Brandes AA, Tosoni A, Cavallo G, Reni M, Franceschi E, Bonaldi L, et al. Correlations between O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation status, 1p and 19q deletions, and response to temozolomide in anaplastic and recurrent oligodendroglioma: a prospective GICNO study. *J Clin Oncol* 2006;24(29):4746-53.
2. Quinn JA, Desjardins A, Weingart J, Brem H, Dolan ME, Delaney SM, et al. Phase I trial of temozolomide plus O6-benzylguanine for patients with recurrent or progressive malignant glioma. *J Clin Oncol* 2005;23(28):7178-87.
3. Ryan CW, Dolan ME, Brockstein BB, McLendon R, Delaney SM, Samuels BL, et al. A phase II trial of O6-benzylguanine and carmustine in patients with advanced soft tissue sarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006;58(5):634-9.
4. Neville K, Blaney S, Bernstein M, Thompson P, Adams D, Aleksic A, et al. Pharmacokinetics of O(6)-benzylguanine in pediatric patients with central nervous system tumors: a pediatric oncology group study. *Clin Cancer Res* 2004;10(15):5072-5.
5. Paz MF, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, Reynes G, Pollan M, Aguirre-Cruz L, et al. CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts

response to temozolomide in primary gliomas. *Clin Cancer Res* 2004;10(15):4933-8.

6. Kaina B, Muhlhausen U, Piee-Staffa A, Christmann M, Garcia Boy R, Rosch F, et al. Inhibition of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by glucose-conjugated inhibitors: comparison with nonconjugated inhibitors and effect on fotemustine and temozolomide-induced cell death. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;311(2):585-93.

7. Rhines LD, Sampath P, Dolan ME, Tyler BM, Brem H, Weingart J. O6-benzylguanine potentiates the antitumor effect of locally delivered carmustine against an intracranial rat glioma. *Cancer Res* 2000;60(22):6307-10.

8. Wedge SR, Newlands ES. O6-benzylguanine enhances the sensitivity of a glioma xenograft with low O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity to temozolomide and BCNU. *Br J Cancer* 1996;73(9):1049-52.

9. Ranson M, Middleton MR, Bridgewater J, Lee SM, Dawson M, Jowle D, et al. Lomeguatrib, a potent inhibitor of O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase: phase I safety, pharmacodynamic, and pharmacokinetic trial and evaluation in combination with temozolomide in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2006;12(5):1577-84.

10. Rabik CA, Njoku MC, Dolan ME. Inactivation of O6-alkylguanine DNA alkyltransferase as a means to enhance chemotherapy. *Cancer Treat Rev* 2006;32(4):261-76.
11. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352(10):987-96.
12. Levin VA, Wara WM, Davis RL, Silver P, Resser KJ, Yatsko K, et al. Northern California Oncology Group protocol 6G91: response to treatment with radiation therapy and seven-drug chemotherapy in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer treatment reports* 1986;70(6):739-43.
13. Burger PC, Dubois PJ, Schold SC, Jr., Smith KR, Jr., Odom GL, Crafts DC, et al. Computerized tomographic and pathologic studies of the untreated, quiescent, and recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of neurosurgery* 1983;58(2):159-69.
14. Zamorano L, Katanick D, Dujovny M, Yakar D, Malik G, Ausman JI. Tumour recurrence vs radionecrosis: an indication for multitrajectory serial stereotactic biopsies. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1989;46:90-3.

15. Forsyth PA, Kelly PJ, Cascino TL, Scheithauer BW, Shaw EG, Dinapoli RP, et al. Radiation necrosis or glioma recurrence: is computer-assisted stereotactic biopsy useful? *Journal of neurosurgery* 1995;82(3):436-44.
16. McGirt MJ, Bulsara KR, Cummings TJ, New KC, Little KM, Friedman HS, et al. Prognostic value of magnetic resonance imaging-guided stereotactic biopsy in the evaluation of recurrent malignant astrocytoma compared with a lesion due to radiation effect. *Journal of neurosurgery* 2003;98(1):14-20.
17. Doms GC, Hecht S, Brant-Zawadzki M, Berthiaume Y, Norman D, Newton TH. Brain radiation lesions: MR imaging. *Radiology* 1986;158(1):149-55.
18. Bagley LJ, Grossman RI, Judy KD, Curtis M, Loevner LA, Polansky M, et al. Gliomas: correlation of magnetic susceptibility artifact with histologic grade. *Radiology* 1997;202(2):511-6.
19. Siegal T, Rubinstein R, Tzuk-Shina T, Gomori JM. Utility of relative cerebral blood volume mapping derived from perfusion magnetic resonance imaging in the routine follow up of brain tumors. *Journal of neurosurgery* 1997;86(1):22-7.
20. Valk PE, Budinger TF, Levin VA, Silver P, Gutin PH, Doyle WK. PET of

malignant cerebral tumors after interstitial brachytherapy. Demonstration of metabolic activity and correlation with clinical outcome. *Journal of neurosurgery* 1988;69(6):830-8.

21. Glantz MJ, Hoffman JM, Coleman RE, Friedman AH, Hanson MW, Burger PC, et al. Identification of early recurrence of primary central nervous system tumors by [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Annals of neurology* 1991;29(4):347-55.

22. Langleben DD, Segall GM. PET in differentiation of recurrent brain tumor from radiation injury. *J Nucl Med* 2000;41(11):1861-7.

23. Chao ST, Suh JH, Raja S, Lee SY, Barnett G. The sensitivity and specificity of FDG PET in distinguishing recurrent brain tumor from radionecrosis in patients treated with stereotactic radiosurgery. *International journal of cancer* 2001;96(3):191-7.

24. Dowling C, Bollen AW, Noworolski SM, McDermott MW, Barbaro NM, Day MR, et al. Preoperative proton MR spectroscopic imaging of brain tumors: correlation with histopathologic analysis of resection specimens. *Ajnr* 2001;22(4):604-12.

25. Rock JP, Hearshen D, Scarpace L, Croteau D, Gutierrez J, Fisher JL, et al. Correlations between magnetic resonance spectroscopy and image-guided histopathology,

with special attention to radiation necrosis. *Neurosurgery* 2002;51(4):912-9; discussion 9-20.

26. Chamberlain MC, Glantz MJ, Chalmers L, Van Horn A, Sloan AE. Early necrosis following concurrent Temodar and radiotherapy in patients with glioblastoma. *J Neurooncol* 2007;82(1):81-3.

27. Taal W, Brandsma D, de Bruin HG, Bromberg JE, Swaak-Kragten AT, Smitt PA, et al. Incidence of early pseudo-progression in a cohort of malignant glioma patients treated with chemoradiation with temozolomide. *Cancer* 2008;113(2):405-10.

28. Jefferies S, Burton K, Jones P, Burnet N. Interpretation of early imaging after concurrent radiotherapy and temozolomide for glioblastoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2007;19(3 Suppl):S33.

29. Chaskis C, Neyns B, Michotte A, De Ridder M, Everaert H. Pseudoprogession after radiotherapy with concurrent temozolomide for high-grade glioma: clinical observations and working recommendations. *Surg Neurol* 2009.

30. Law M, Yang S, Babb JS, Knopp EA, Golfinos JG, Zagzag D, et al. Comparison of cerebral blood volume and vascular permeability from dynamic susceptibility contrast-

enhanced perfusion MR imaging with glioma grade. *Ajnr* 2004;25(5):746-55.

31. Hakyemez B, Erdogan C, Ercan I, Ergin N, Uysal S, Atahan S. High-grade and low-grade gliomas: differentiation by using perfusion MR imaging. *Clinical radiology* 2005;60(4):493-502.

32. Tajima Y, Molina RP, Jr., Rorke LB, Kaplan DR, Radeke M, Feinstein SC, et al. Neurotrophins and neuronal versus glial differentiation in medulloblastomas and other pediatric brain tumors. *Acta Neuropathol (Berl)* 1998;95(4):325-32.

33. Esteller M, Herman JG. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene* 2004;23(1):1-8.

34. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, Blatt V, Pession A, Tallini G, et al. MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients. *J Clin Oncol* 2008;26(13):2192-7.

35. Weinstein JN. Pharmacogenomics--teaching old drugs new tricks. *The New England journal of medicine* 2000;343(19):1408-9.

36. Brandes AA, Tosoni A, Cavallo G, Bertorelle R, Gioia V, Franceschi E, et al. Temozolomide 3 weeks on and 1 week off as first-line therapy for recurrent glioblastoma: phase II study from gruppo italiano cooperativo di neuro-oncologia (GICNO). *Br J Cancer* 2006;95(9):1155-60.
37. Belanich M, Pastor M, Randall T, Guerra D, Kibitel J, Alas L, et al. Retrospective study of the correlation between the DNA repair protein alkyltransferase and survival of brain tumor patients treated with carmustine. *Cancer Res* 1996;56(4):783-8.
38. Lindahl T, Demple B, Robins P. Suicide inactivation of the *E. coli* O6-methylguanine-DNA methyltransferase. *Embo J* 1982;1(11):1359-63.
39. Yarosh DB, Foote RS, Mitra S, Day RS, 3rd. Repair of O6-methylguanine in DNA by demethylation is lacking in Mer- human tumor cell strains. *Carcinogenesis* 1983;4(2):199-205.
40. Belanich M, Ayi TC, Li BF, Kibitel JT, Grob DW, Randall T, et al. Analysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in individual human cells by quantitative immunofluorescence microscopy. *Oncol Res* 1994;6(3):129-37.

41. Sato K, Kitajima Y, Koga Y, Miyazaki K. The effect of o6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and mismatch repair gene (hMLH1) status on the sensitivity to alkylating agent 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea(A CNU) in gallbladder carcinoma cells. *Anticancer Res* 2005;25(6B):4021-8.
42. Pollack IF, Hamilton RL, Sobol RW, Burnham J, Yates AJ, Holmes EJ, et al. O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression strongly correlates with outcome in childhood malignant gliomas: results from the CCG-945 Cohort. *J Clin Oncol* 2006;24(21):3431-7.
43. Jaeckle KA, Eyre HJ, Townsend JJ, Schulman S, Knudson HM, Belanich M, et al. Correlation of tumor O6 methylguanine-DNA methyltransferase levels with survival of malignant astrocytoma patients treated with bis-chloroethylnitrosourea: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1998;16(10):3310-5.
44. Yan L, Donze JR, Liu L. Inactivated MGMT by O6-benzylguanine is associated with prolonged G2/M arrest in cancer cells treated with BCNU. *Oncogene* 2005;24(13):2175-83.
45. Dolan ME, Stine L, Mitchell RB, Moschel RC, Pegg AE. Modulation of

mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in vivo by O6-benzylguanine and its effect on the sensitivity of a human glioma tumor to 1-(2-chloroethyl)-3-(4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea. *Cancer Commun* 1990;2(11):371-7.

46. Dolan ME, Pegg AE. O6-benzylguanine and its role in chemotherapy. *Clin Cancer Res* 1997;3(6):837-47.

47. Anda T, Shabani HK, Tsunoda K, Tokunaga Y, Kaminogo M, Shibata S, et al. Relationship between expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase, glutathione-S-transferase pi in glioblastoma and the survival of the patients treated with nimustine hydrochloride: an immunohistochemical analysis. *Neurological research* 2003;25(3):241-8.

48. Nakasu S, Fukami T, Baba K, Matsuda M. Immunohistochemical study for O6-methylguanine-DNA methyltransferase in the non-neoplastic and neoplastic components of gliomas. *Journal of neuro-oncology* 2004;70(3):333-40.

49. Brell M, Tortosa A, Verger E, Gil JM, Vinolas N, Villa S, et al. Prognostic significance of O6-methylguanine-DNA methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expression in anaplastic gliomas. *Clin*

Cancer Res 2005;11(14):5167-74.

50. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1996;93(18):9821-6.

51. Derks S, Lentjes MH, Hellebrekers DM, de Bruine AP, Herman JG, van Engeland M. Methylation-specific PCR unraveled. Cell Oncol 2004;26(5-6):291-9.

52. Mikeska T, Bock C, El-Maarri O, Hubner A, Ehrentraut D, Schramm J, et al. Optimization of quantitative MGMT promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis. J Mol Diagn 2007;9(3):368-81.

53. Preusser M. MGMT analysis at DNA, RNA and protein levels in glioblastoma tissue. Histology and histopathology 2009;24(4):511-8.

54. Hu LS, Baxter LC, Smith KA, Feuerstein BG, Karis JP, Eschbacher JM, et al. Relative cerebral blood volume values to differentiate high-grade glioma recurrence from posttreatment radiation effect: direct correlation between image-guided tissue histopathology and localized dynamic susceptibility-weighted contrast-enhanced

perfusion MR imaging measurements. *Ajnr* 2009;30(3):552-8.

55. Sugahara T, Korogi Y, Tomiguchi S, Shigematsu Y, Ikushima I, Kira T, et al.

Posttherapeutic intraaxial brain tumor: the value of perfusion-sensitive contrast-enhanced MR imaging for differentiating tumor recurrence from nonneoplastic contrast-enhancing tissue. *Ajnr* 2000;21(5):901-9.

56. Yao KC, Komata T, Kondo Y, Kanzawa T, Kondo S, Germano IM. Molecular

response of human glioblastoma multiforme cells to ionizing radiation: cell cycle arrest, modulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, and autophagy. *J*

Neurosurg 2003;98(2):378-84.

Abstract

Alteration of p53, Bcl-2, caspase-3, O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase after treatment and correlation with perfusion MRI in human glioblastoma

Kyu-Won Shim

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Dong-Seok Kim)

The glioblastoma is the most common and dismal malignant brain tumor. The treatment protocols have been improved as the development of temozolomide and new irradiation techniques. The temozolomide is under influence of methyl-guanine methyl-transferase (MGMT). The methylation of the CpG island of MGMT gene promoter will guarantee the good response of temozolomide to glioblastoma. Because the most popular protocol begins with concomitant radiation and temozolomide the incidence of early radiation necrosis, pseudoprogression, is increasing. We will confuse the meaning of tumor cell within the specimen from necrotic tumor which considered as pseudoprogression. Will the tumor cell disappear as time goes by? So the real characteristics of the tumor cell within the necrotic tumor will be helpful to determine whether treatment continue or not. And also the imaging correlation with these characteristics will be more helpful. In this

study we analyzed the most popular factors which have a part in cell cycle or apoptosis, p53, Bcl-2, caspase-3. And MGMT expression will be added to this test as the marker for response to temozolomide. Balance between these factors and CBV in perfusion MRI will influence the progression of residual tumor and the survival of patient. Especially, MGMT was correlated with the treatment response and Bcl-2 influenced the progression of tumor. P53 influenced the change of CBV in perfusion MRI. However interrelationship of these factors should be considered to expect the progression of tumor or survival of patients.

Keywords; glioblastoma, radiation necrosis, MGMT, Bcl-2, Caspase-3, p53, perfusion MR, apoptosis