



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학 석사학위 논문

대장암의 예후 인자로서 Thymidylate
Synthase 유전자의 다형성의 의의

아주대학교 대학원

의학과

김주형

대장암의 예후 인자로서 Thymidylate
Synthase 유전자의 다형성의 의의

지도교수 서 광 욱

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2004년 2월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

김 주 형

김주형의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 서 광 욱 인

심사위원 김 영 배 인

심사위원 최 진 혁 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2003년 12월 19일

대장암의 예후 인자로서 Thymidylate Synthase 유전자의 다형성의 의의

대장암은 최근 국내에서도 발생률이 급격히 증가하고 있어 항 후 국내에서도 현재의 구미와 같이 가장 흔한 암이 될 것으로 예견된다. 진행성 대장암에 대하여 근치 수술 후 보조 요법으로서 fluoropyrimidine계의 약물요법은 대장암의 항암 치료에 필수적인 요소로 알려져 있다. Thymidylate synthase (TS)는 대장암을 비롯한 인체 고형암 치료의 대표적인 항암화학 약물인 5-fluorouracil (5-FU)의 표적물질이며, 대장암에서 암 조직 내에서의 TS 단백질의 발현은 예후인자로서 뿐 아니라 5-FU 등의 항암 화학 요법에 대한 반응을 예측하는 인자로서 그 유용성에 대한 연구가 많이 이루어져 왔다. 인체의 TS 단백질을 제어하는 유전자는 다형성을 가지고 있는 것으로 보고 되는데 그것은 28개의 염기쌍이 두개 혹은 세개의 tandem repeat를 보이는 것으로서 이 염기쌍은 59 terminal의 조절 유전자내의 cap site로 downstream을 하게 된다. In vitro 실험에서 이 59 terminal에 링크되어 있는 보고유전자(reporter gene)의 활동도는 3개의 tandem repeat를 보이는 유전자가 두개의 tandem repeat를 보이는 유전자보다 2.6배 높은 것이 밝혀진 바 있다. 따라서 TS 유전자 내의 다형성 영역이 TS 단백질의 발현에 직접적인 연관이 있으며 발현 정도와도 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다. 따라서 저자는 본 연구를 통해 TS 유전자의 다형성이 대장암의 예후인자로서 의의가 있는지를 알아보고자 하였다. 1994년 10월부터 2001년 12월까지 아주대학교병원 외과에서 대장암으로 진단받고 근치적 절제술을 시행 받은 환자들

가운데 TNM 병기에서 제2기 및 3기로 진단 후 5-FU 등으로 보조 항암 치료를 받고 추적조사가 가능한 121명을 대상으로 본 연구를 시행하였다. 대상 환자들의 파라핀 포매조직 검체에서 TS 유전자 다형성을 검색하여 강한 표현군과 약한 표현군으로 나누어 두 군 간의 장기 생존율을 분석 비교하였다. 대상 환자 121명 중 68예(56.2%)가 triple tandem repeat에 homozygous (L/L)했으며 53예(43.8%)가 heterozygous (S/L)하거나 double tandem repeat에 homozygous (S/S)하였다. TS 다형성과 치료성적의 관계는 환자들의 생존율을 비교하여 분석하였다. 전체적인 5년 생존율은 제2기 대장암 환자군과 제3기 대장암 환자군 간에 통계학적으로 유의한 차이를 관찰할 수 있었다(87% vs. 63%, $P=0.0320$). TS 다형성과 5년 생존율을 비교하였을 때 약한 표현군(S/S 혹은 S/L)에서 강한 표현군(L/L)에 비해 통계학적으로 유의하게 높은 생존율을 관찰할 수 있었다(80% vs. 53%, $P=0.0481$). 특히 제2기 환자군에서 약한 표현군과 강한 표현군 간에 유의한 생존율의 차이는 관찰되지 않았으나(86% vs. 43%, $P=0.1678$) 제3기 환자군에서는 두 군 간에 유의한 생존율의 차이가 관찰되어(77% vs. 41%, $P=0.0414$) TS 유전자의 다형성은 특히 3기 병변에서 유의한 예후인자임을 알 수 있었다. 따라서 TS 유전자의 다형성이 근치적 절제가 가능했던 대장암 환자들에 대해서 독립적인 예후인자로 역할을 할 수 있음을 확인하였다.

핵심되는 말: 대장암, thymidylate synthase 유전자 이형성, 예후인자

차 례

국문요약	1
차례	3
그림 차례	4
표 차례	5
I. 서론	6
II. 대상 및 방법	9
A. 대상 환자군의 선택	9
B. 환자의 추적 및 재발의 진단	9
C. TS 유전자 다형성의 검색	10
D. 통계학적 분석	11
III. 결과	13
A. TS 다형성의 종류	13
B. TS 다형성과 치료성적의 관계	14
IV. 고찰	19
V. 결론	23
참고문헌	24
영문요약	28

그림 차례

Fig 1. The PCR findings of TS gene in colorectal cancer -----	12
Fig 2. Overall survival rate according to the stage -----	15
Fig 3. Overall survival rate according to the TS polymorphism -----	16
Fig 4. Survival rate of stage 2 patients according to the TS polymorphism -----	17
Fig 5. Survival rate of stage 3 patients according to the TS polymorphism -----	18

표 차례

Table 1, Study population	-----	13
---------------------------	-------	----

I. 서 론

국내에서 대장암의 발생률은 1980년대 이후 꾸준히 증가하고 있으며 2001년 중앙 암등록 본부의 자료에 의하면 연간 9695예(결장암 4796예, 직장암4899예)가 등록되어 전체 암 등록 건수의 10.5%를 차지하고 있다. 이는 미국의 대장암 발생 빈도인 연간 11.5%와 거의 비슷한 수치로서 21세기에는 현재의 구미와 같이 국내에서도 가장 흔한 암이 될 것으로 예견된다. 이와 같은 전망은 향후 수년 내에 연간 수만 명의 새로운 대장암 환자들이 발생한다는 것을 시사하며, 국가적으로도 엄청난 의료문제가 된다는 것을 암시한다.

지난 수십 년간 대장암에 대한 분자 생물학적인 병인론, 그리고 진단 기술의 발전과 새로운 약물 요법 등이 소개 되었음에도 불구하고 여타의 인체 고형 암들과 마찬가지로 대장암도 현재로서는 조기에 진단하여 적절한 수술적 치료가 시행되는 것만이 완치를 기대할 수 있는 유일한 방법이다. 그러나 진행성 대장암에 대하여 근치 수술 후 보조 요법으로서 항암 화학 약물요법의 유용성은 이미 많은 임상 연구를 통해 효과가 증명되었으며,¹ 특히 fluoropyrimidine계의 약물요법은 대장암의 항암 치료에 필수적인 요소로 알려져 있다.

모든 암의 치료에서와 마찬가지로 대장암의 치료에서도 치료 성적을 예측할 수 있는 예후인자들에 대한 철저한 분석이 중요하다. 대장암에서는 통상적으로 조직학적인 병기가 가장 중요한 예후인자로 알려져 있으며² 혈중 암태아항원 (serum carcinoembryonic antigen, CEA)치,³ 암 조직에서의 혈관⁴이나 신경침윤 정도⁵ 그리고 DNA 배수성⁶ 등도 중요한 예후인자로 밝혀져 있다. 아울러 직장암에서는 골반강이라는 제한된 공간에서 수술이 이루어지는 특성 때문에 절제 수

슬 중에 결정되는 외측방연의 암세포 침윤 정도⁷가 매우 중요한 예후인자로 알려져 있고 그 외에 male sexuality 등이 불량한 예후인자로 보고 되기도 한다.⁸ 이러한 예후인자들의 분석은 단순히 환자의 예후를 평가하는 지표만이 아니라 근치적 수술 후 보조 항암 화학 요법 등의 보다 적극적인 치료를 할 것인가를 결정하는데 중요한 이론적 근거를 제시한다.

지난 20여 년간 대장암의 발암과정에서의 유전자 변이에 대한 연구와 암의 전이에 대한 수많은 기초연구들이 시행되어 왔고 특히 원격전이에 관여하는 암단백질들이 밝혀져 왔다. 특히 대장암의 원격전이와 관련이 있는 것으로 알려진 대표적인 물질로는 vascular endothelial growth factor (VEGF),⁴ hepatocyte growth factor (HGF),⁹ 그리고 E-cadherin¹⁰ 등이 알려지고 있다. 이들 단백질의 예후인자로서의 의의에 대해서 많은 기관에서 연구가 진행 중이며, 현재까지는 많은 양성 결과들이 발표됨에도 불구하고 확고한 예후인자로 인정되기에는 아직 더 많은 임상연구가 필요한 상태이다.

현재까지 제시된 대장암의 수많은 예후인자들 중 Thymidylate synthase (TS)는 deoxyuridine monophosphate (d-UMP)를 deoxythymidine monophosphate (d-TMP)로 변환시키는 효소로서 DNA 생성과 보수에 반드시 필요한 물질이다.¹¹ TS는 대장암을 비롯한 인체 고형암 치료의 대표적인 항암 화학 약물인 5-fluorouracil (5-FU)의 표적물질이기도 하다. TS의 기질(substrate)인 5,10-methylene-teretrahydrofolate (THF) 역시 엽산의 대사산물로서 싸이미딘과 퓨린의 생성 고리에 필수적이며, DNA methylation에 필요한 methyl 기를 제공하는 중요한 물질이다.¹²

대장암에서 암 조직 내에서의 TS 단백질의 발현은 예후인자로서 뿐 아니라 5-FU 등의 항암 화학 요법에 대한 반응을 예측하는 인자로서 그 유용성에 대한

연구가 많이 이루어져 왔다.¹³⁻¹⁵ 이론적으로 TS 단백질의 발현 정도는 그 어떤 분자생물학적인 표지자들보다도 유의한 예후인자가 될 수 있음에도 불구하고 많은 연구 보고들에서 일관성이 없는 결과들이 보고 되고 있는데 이는 TS 단백질 발현의 정량적 분석을 위해서 단클론 항체를 이용한 면역조직화학 검사를 이용하기 때문인 것으로 생각된다.¹⁶ 특히 파라핀 포매조직을 이용하는 후향적인 연구에서 면역조직화학 염색법은 종양조직의 고정방법, 시약의 종류, 염색방법 등에 의한 기술적인 문제에 따른 염색 양상의 차이가 있을 수 있고 실제로 면역조직화학 염색을 이용한 많은 연구들이 상반된 결과를 보고하는 경향이 있다.¹⁷

인체의 TS 단백질을 제어하는 유전자는 다형성을 가지고 있는 것으로 보고 되는데 그것은 28개의 염기쌍이 두개 혹은 세개의 tandem repeat를 보이는 것으로서 이 염기쌍은 5' terminal의 조절 유전자내의 cap site로 downstream을 하게 된다.¹⁸ In vitro 실험에서 이 5' terminal에 링크되어 있는 보고유전자 (reporter gene)의 활동도는 3개의 tandem repeat를 보이는 유전자가 두개의 tandem repeat를 보이는 유전자보다 26배 높은 것이 밝혀진 바 있다. 따라서 TS 유전자 내의 다형성 영역이 TS 단백질의 발현에 직접적인 연관이 있으며 발현 정도와도 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다.¹⁹ 따라서 저자는 본 연구를 통해 TS 유전자의 다형성이 대장암의 예후인자로서 의의가 있는지를 알아보하고자 하였다.

II. 대상 및 방법

A. 대상 환자군의 선택

1994년 10월부터 2001년 12월까지 아주대학교병원 외과에서 대장암으로 진단 받고 근치적 절제술을 시행 받은 환자들 가운데 동일한 외과의사로부터 수술이 시행되었고 수술 후 적어도 24개월 이상 완벽하게 추적이 가능했으며 TNM 병기에서 제2기 및 3기로 진단된 환자 121명을 대상으로 본 연구를 시행하였다. 제2기 환자는 49명, 3기 환자는 72명이었다. 대상 환자들 모두 수술 후 보조 항암 화학요법을 시행하였는데 제2기 환자들에 대해서는 12개월간 경구 5-FU 제재 (deoxyfluridine, 매일 900 mg 3회 분복)를 그리고 제3기 환자들에 대해서는 6주기의 5-FU와 leukovorin 주사요법이 1회 5일 4주 간격으로 시행되었다. 경구 5-FU는 수술 후 평균 20일째부터 투약을 시작 하였으며, 주사요법은 수술 후 평균 15일에 첫번째 주기가 시작되었는데, 5-FU의 주사용량은 하루용량을 1000 mg/M^2 으로 하여 지속적으로 점적하였으며, 매일 5-FU 시작과 동시에 leukovorin 30 mg이 정주되었다. 대상 환자들의 파라핀 포매조직 검체에서 TS 유전자 다형성을 검색하여 강한 표현군과 약한 표현군으로 나누어 두 군 간의 장기 생존율을 분석 비교하였다.

B. 환자의 추적 및 재발의 진단

대상 환자들은 수술 후 첫 2년 동안 매 3개월마다, 2년 이후에는 6개월 간격으로 검진하였다. 환자의 검진은 매 3개월 마다 이학적 검사 및 혈중 암태아항원을

측정하였으며 1년마다 복부 전산화 단층촬영과 대장 조영술 그리고 단순 흉부 촬영을 시행하였다. 원격전이와 국소재발 모두 원칙적으로 생검을 통해 조직진단이 가능했던 경우로 정의하였으나 원격전이의 경우 영상진단 소견에서 명백한 전이성 병변이 보이는 경우는 조직진단 없이 재발로 진단하였다. 혈중 CEA만 증가했던 경우(정상치 5 ng/ml 미만)는 재발에 포함시키지 않았다. 환자의 생사 여부는 의무기록과 전화상담을 통해 121예 모두에서 가능하였으며, 최종추적일은 수술일로부터 사망일까지로 정의하였다.

C. TS 유전자 다형성의 검색

아주대학교병원 병리과의 조직은행에서 대상 환자들의 파라핀에 포매된 종양 조직을 구하여 QiaAmp 키트(QIAGEN Inc., Chatsworth, CA)로 DNA를 추출하였다. TS 유전자의 promoter 영역은 다음의 primer를 이용하여 연쇄 증합효소반응(polymerase chain reaction, PCR)을 시행하였다.

Primer 1 (sense): 5'-GTGGCTCCTGCGTTTCCCC-3'

Primer 2 (antisense): 5'-GCTCCGAGCCGGCCACAGGCATGGCGCGG-3'

1.25 mM MgCl₂를 함유한 반응액 25 ml를 thermal cylinder (PTC-100 TM, MJ Research Laboratories, Watertown, MA)에 이동하여 35 주기 동안 증폭하였다. 각 주기는 96°C에서 1분, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분 그리고 72°C에서 5분간 마지막 extension phase로 구성되었다. PCR 산물은 4% agarose gel에서 전기영동하여 분석하였다. triple tandem repeat (250 bp)가 homozygous한 경우를

L/L로 지칭하였으며 double tandem repeat (220 bp)가 homozygous한 경우를 S/S로, 그리고 220 bp와 250 bp가 heterozygous한 경우를 S/L로 각각 지칭하였다(Fig. 1).²⁰

D. 통계학적 분석

각 군에서의 임상변수의 차이는 chi-square test 와 student t-test를 이용하여 P-value를 구한 후 $P < 0.05$ 인 경우를 유의 있다고 판정하였고,²¹ 생존곡선은 Kaplan-Meier 방법²²을 이용하였으며 통계적 검정은 log-rank test로 하였다.²¹

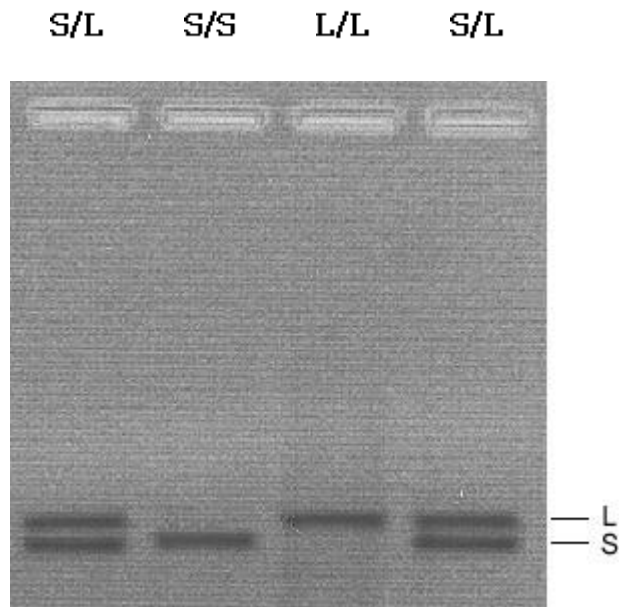


Fig. 1. The PCR findings of TS gene in colorectal cancer, 68 subjects were homozygotes for the triple repeat variant (L/L, 250-bp, strong expression group), 53 subjects (weak expression group) were either homozygotes for the double repeat variant (S/S, 220-bp), or heterozygotes (S/L, 220 and 250-bp).

III. 결 과

A. TS 다형성의 종류

강한 표현군과 약한 표현군 간의 나이, 성별, 병기 및 임파선의 수 등에서는 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 대상 환자 121명 중 68예(56.2%)가 triple tandem repeat에 homozygous (L/L) 했으며 53예(43.8%)가 heterozygous (S/L) 하거나 double tandem repeat에 homozygous (S/S)하였다(Table 1).

Table 1. Study population (n=121)

	All eligible patients	Strong (n=68)	Weak (n=53)	P-value
Age	60.0 (22-83)	64.9 (22-83)	62.8 (24-79)	0.3153
Sex				0.4321
Male	70	40	30	
Female	51	28	23	
Stage				0.1876
II	49	24	25	
III	72	44	28	
Lymph node				0.1617
0	49	24	25	
1-3	38	29	9	
> 3	34	15	19	

B. TS 다형성과 치료성적의 관계

수술 후 생존자의 증양추적기간은 34.5개월 이었다. TS 다형성과 치료성적의 관계는 환자들의 생존율을 비교하여 분석하였다. 전체적인 5년 생존율은 제2기 대장암 환자군과 제3기 대장암 환자군 간에 통계학적으로 유의한 차이를 관찰할 수 있었다(87% vs. 63%, $P=0.0320$, Fig. 2). TS 다형성과 5년 생존율을 비교하였을 때 약한 표현군(S/S 혹은 S/L)에서 강한 표현군(L/L)에 비해 통계학적으로 유의하게 높은 생존율을 관찰할 수 있었다(80% vs. 53%, $P=0.0481$, Fig. 3). 제2기 환자군에서 약한 표현군과 강한 표현군 간에 유의한 생존율의 차이는 관찰되지 않았으나(86% vs. 43%, $P=0.1678$, Fig. 4) 제3기 환자군에서는 두 군 간에 유의한 생존율의 차이가 관찰되어(77% vs. 41%, $P=0.0414$, Fig. 5) TS 유전자의 다형성은 특히 3기 병변에서 유의한 예후인자임을 알 수 있었다.

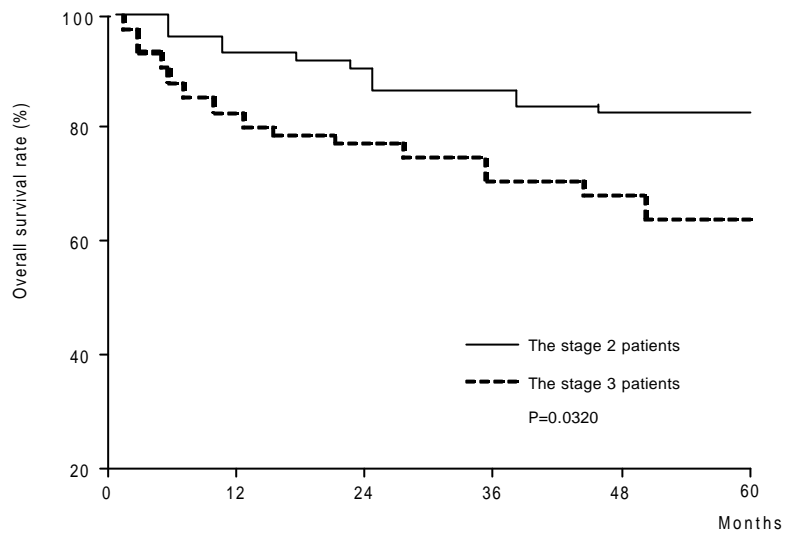


Fig. 2 Overall survival rate according to the stage.

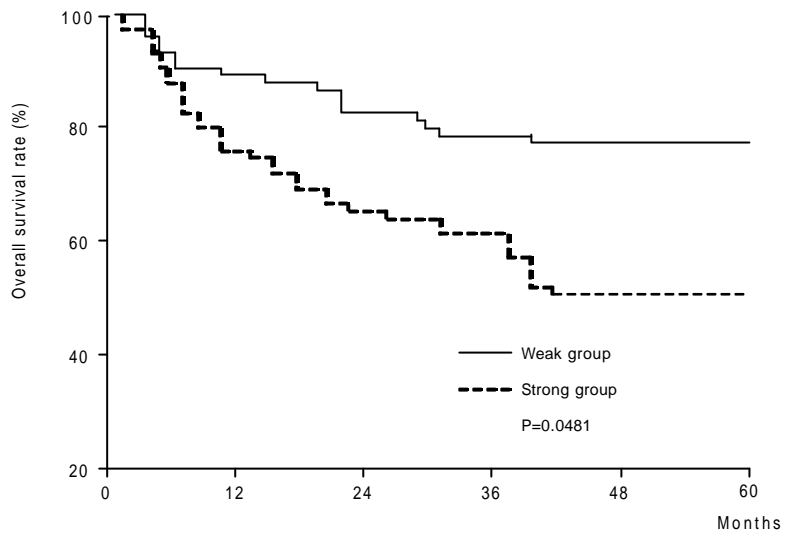


Fig. 3. Overall survival rate according to the TS polymorphism.

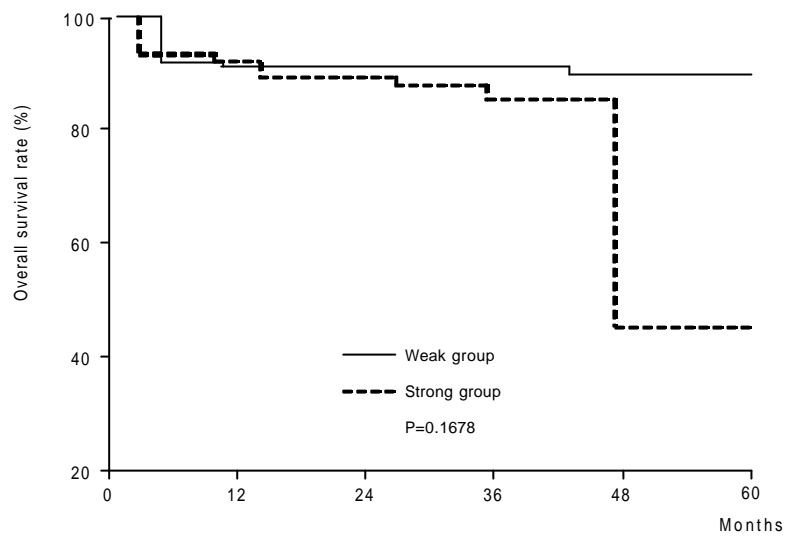


Fig 4 Survival rate of stage 2 patients according to the TS polymorphism (n=49).

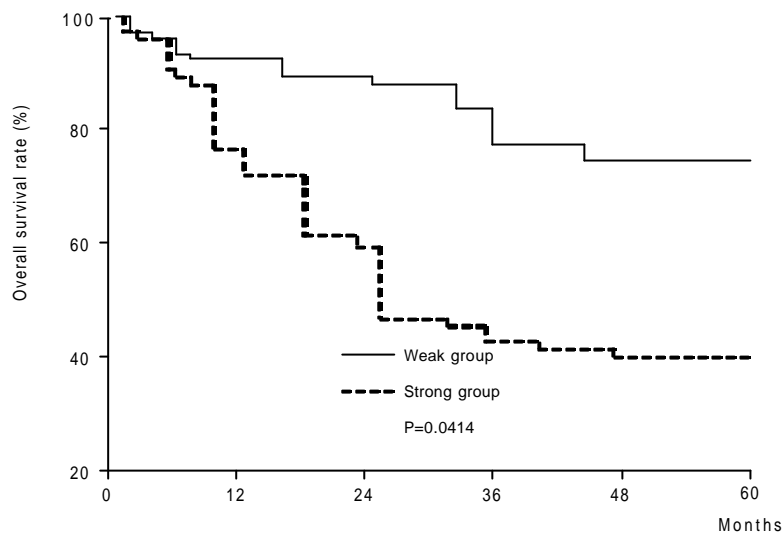


Fig 5. Survival rate of stage 3 patients according to the TS polymorphism (n=72).

IV. 고 찰

대장암의 치료성적을 예측하는데 가장 중요한 인자는 조직 병리학적 병기임은 두 말 할 나위 없지만, 같은 병기 내에서도 국소재발율이나 원격재발율이 다른 것을 설명하기 위해 좀 더 세분화되고 객관적인 예후인자들을 규명하기 위해 많은 연구가 시행되어 왔다. 임상적으로는 대장폐쇄증 여부,²³ 성⁸ 등이 부수적인 인자로 알려져 있고 현미경적으로는 미세혈관 침윤⁴이나 신경침윤 여부,⁵ 그리고 암세포의 분화도²⁴ 등이 관련 있는 예후인자로 알려진 바 있다. 최근 분자 생물학 기법이 발전되면서 대장암의 발암기전에 관여하는 것으로 알려진 18번, 17번, 8번 염색체 등의 유전자 결손여부, 그리고 극소위체 불안정성(microsatellite instability) 여부 등이 연구자들에 따라 차이는 있으나 비교적 유의한 예후인자로서 알려져 있다.²⁵ 본 연구 역시 좀 더 객관화된 예후인자로서는 물론 치료에 직접적인 연관성을 가지는 인자를 분석하고자 TS의 발현여부를 예후와 비교분석한 결과 병리학적 병기가 가장 유의한 예후 인자임을 재확인하였고 TS 단백질을 제어하는 유전자내의 다형성 여부가 유의한 예후인자임이 증명되어 임상적인 유용성을 가질 것으로 생각되었다.

TS 단백질은 deoxyuridylate를 thymidylate로 methylation 시키는데 필요한 효소로서 이 효소는 DNA의 생성과 손상된 DNA를 보수하는데 반드시 필요하다.¹¹ Pyrimidine 대사에서의 이러한 중요한 역할 때문에 지난 40여 년간 이 단백질은 항암 화학 요법의 주 표적이 되어왔다. Fluoropyrimidine 계열의 항암제가 바로 이 단백질을 억제하는 약물로 개발되었고 TS 단백질을 표적으로 한 항엽산 제제 등의 새로운 제제의 약재가 현재 개발 중이다. 몇몇 동물 실험과 임상 시험에서 TS 단백질의 상대적인 양이 TS를 표적으로 하는 항암제에 대한 세포의 감수

성을 좌우한다는 사실이 알려졌고 이후 여러 연구들이 TS가 항암제에 대한 감수성을 예측하는 인자로서 뿐 아니라 대장암의 예후를 판정하는 독립적인 인자로서 역할을 할 수 있는가를 측정하여 왔다.^{13,14}

TS 단백질의 대장암에 대한 예후인자로서의 가능성에 대한 첫번째 임상 연구는 Johnston 등의 National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-01에 포함되었던 294명에 대한 후향적 연구였다.¹³ 단클론항체(TS 106)를 이용하여 암 조직 내에서 TS 단백질의 표현을 면역조직화학 염색을 통해 분석한 연구에서 이들은 병기와 TS 단백질의 발현은 직접적인 상관관계를 보여 진행성 병변일수록 TS 단백질이 많이 발현되고 따라서 전반적인 예후는 불량해지는데 비해 5-FU 치료는 오히려 TS 단백질이 많이 발현된 군에서 치료 반응이 높아 TS 고 발현 군에서 무병 생존율이 유의하게 증가함을 보고하였다.¹³ 그러나 이후에 보고된 연구들의 결과들은 Johnston 등의 결과와 상이한 것들이 많아 종양 조직 내에 TS 단백질이 많이 표현될수록 예후가 불량한지 아니면 양호한지 결론을 내리기 어려울 뿐 아니라 fluoropyrimidine 항암제 치료에 대한 반응도 확실하지 않아 논란이 되고 있다.¹⁴⁻¹⁷

TS가 이론적으로는 매우 매력적인 예후인자임에도 불구하고 보고자에 따라 그 유의성이 상이한 것은 TS 단백질을 측정하는 실험방법들 때문인 것으로 알려져 있다. 현재까지 세 가지의 대표적인 실험방법이 이용되어 왔는데, 그것은 삼중수소를 부착한 deoxyuridine monophosphate (d-U³MP)를 이용하여 TS 단백질의 활성도(activity)를 측정하는 생화학적 분석법,²⁵ TS 단백질의 존재 유무나 양상을 형태학적으로 확인할 수 있는 면역조직화학 염색법,¹³ 그리고 TS 제어 유전자로부터 전사된 전령(messenger) RNA를 측정하는 역전사 중합효소 반응법¹⁶ 등이다. 실험 방법에 따라서도 결과에 차이가 있는 것을 관찰할 수 있고 여기에

는 기술적인 차이도 있지만 연구대상이 그 수에 있어 부족하거나 대상군이 이질적인 경우가 많고 후향적인 연구가 대부분이다. 또한 대장암 치료의 근간이라 할 수 있는 수술적 치료가 아직 많은 기관에서 표준화되지 않아 수술이 이루어진 환자의 경우 치료범위나 정도가 달라질 수 있다는 심각한 bias의 위험을 가지고 있다. 본 연구에서는 이러한 문제들을 최대한 극복하기 위하여 단일기관에서, 한 명의 외과 의사에 의해 시행된 대장암 환자들을 선택함으로써 결과의 신뢰도를 높이고자 하였다.

TS 단백질의 발현 정도를 전반적인 대장암의 예후인자로 분석하는 것은 앞서 설명한 바와 같은 기술적, 임상적 어려움이 따르기 때문에 5-FU 치료 후의 반응 정도를 예측하는 연구가 많이 시행되고 있는데,¹⁶ 이런 연구에서는 비교적 빠른 관찰기간동안에 end point인 생존율을 비교하기 위하여 전이성 혹은 범발성 대장암 환자들을 대상으로 하는 것이 일반적이다. 전이성 혹은 범발성 대장암에 대한 5-FU 제재의 약물요법은 전반적인 반응율도 낮을 뿐 아니라 약물의 독성과 생존율이 환자들 간에 큰 차이가 있어서 치료 전에 5-FU에 대한 반응여부를 예측하는 것은 큰 임상적 의의를 가진다. 최근에는 종양 조직 내에서의 TS의 전령 RNA를 측정함으로써 5-FU에 대한 반응과 생존율을 예측한 연구가 시행되었는데 이 연구들은 TS의 전령 RNA가 적게 발현될수록 5-FU에 대한 치료반응이 우수하고 생존율도 유의하게 높았다고 보고하고 있는데¹⁶ Leichman 등²⁷은 TS 전령 RNA 치가 4.1을 넘는 경우 5-FU 항암요법에 전혀 반응하지 않았다고 보고하기도 하였다. 이러한 결과들은 전이성 혹은 범발성 대장암 환자들에 대한 5-FU 치료 반응여부로서 본 연구와 재료는 다르지만 L/L 유전형(genotype)인 경우가 예후가 불량한 사실은 본 연구의 결과와 유사함을 알 수 있었다.

종양 조직 내에서 TS 단백질이 발현되는 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않았

으나 최근의 연구에 의하면 p53 유전자의 변이와 TS 단백질의 발현정도 간에 직접적인 상관관계를 관찰할 수 있었다고 하여 TS 단백질이 높은 경우에 예후가 불량한 이유를 p53 유전자의 변이로 설명하고 있다. Pullarkat 등²⁰은 원발 대장암으로부터 간으로 전이된 증례들에 대해서 TS 전령 RNA를 측정하였는데, 간내에서 전이성 암조직에서 인접된 정상 간조직에 비해 유의하게 높은 TS 전령 단백질의 발현을 관찰할 수 있었다고 보고하였다. 이런 결과를 바탕으로 TS 유전자의 이형성은 태생적으로 정해진 것이지만 암화과정 중에 DNA로부터 전사(transcriptional)되는 과정이나 전사후(post-transcriptional) 과정 중에 과발현(overexpression)되는 것으로 추정하고 있다. 이러한 과발현에 p53 유전자의 변이 등이 관여할 것으로 생각된다. 뿐만 아니라 TS 유전자가 L/L형인 경우 TS 전령 RNA의 발현이 암조직에서만 증폭되는 것이 아니라 정상 조직에서도 L/S형이나 S/S형에 비해 증가되어 있는 것이 관찰 되는데 이는 5-FU 치료시 나타나는 독성의 차이를 설명할 수 있는 기전으로서 TS 전령 RNA가 증가된 정상세포들이 5-FU로부터 덜 손상받기 때문인 것으로 생각되고 있다.¹⁶

V. 결 론

본 연구에서 저자는 객관화된 예후인자로서는 물론 치료에 직접적인 연관성을 가지는 인자를 분석하고자 TS의 발현여부를 근치적 절제가 시행된 121예의 대장암 환자들의 조직 표본에서 TS 유전자의 다형성 종류를 환자들의 생존율과 비교하였다. 유전자에서의 다형성이 전령 RNA를 통해 TS 단백질의 발현과 직접적인 관계가 있다는 연구결과를 바탕으로 TS 유전자의 다형성이 근치적 절제가 가능했던 대장암 환자들에 대해서 독립적인 예후인자로 역할을 할 수 있음을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Moertel DG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Goodman PJ, et al: Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma, *N Engl J Med* 322:352-8, 1990
2. D'Eredita G, Serio G, Neri V, Polizzi RA, Barberio G and Losacco T: A survival regression analysis of prognostic factors in colorectal cancer, *Aust N Z J Surg* 66:445-51, 1996
3. Wiggers T, Arends JW, Schutte B, Volovics L and Bosman FT: A multivariate analysis of pathologic prognostic indicators in large bowel cancer, *Cancer* 61:386-95, 1988
4. Takahashi Y, Tucker SL, Kitadai Y, Koura AN, Bucana CD, Cleary KR, et al: Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer, *Arch Surg* 132:541-6, 1997
5. Krasna MJ, Flancbaum L, Cody RP, Shneibaum S and Ben Ari G: Vascular and neural invasion in colorectal carcinoma, Incidence and prognostic significance, *Cancer* 61:1018-23, 1988
6. Lanza G, Gafa R, Santini A, Maestri I, Dubini A, Gilli G, et al: Prognostic significance of DNA ploidy in patients with stage II and stage III colon carcinoma: a prospective flow cytometric study, *Cancer* 82:49-59, 1998
7. Ng IO, Luk IS, Yuen ST, Lau PW, Pritchett CJ, Ng M, Poon GP, et al: Surgical lateral clearance in resected rectal carcinomas, A multivariate

- analysis of clinicopathologic features, *Cancer* 71:1972-6, 1993
8. Fisher B, Wolmark N, Rockette H, Hedmond C, Deutsch M, Wickerham DL, et al: Postoperative adjuvant chemotherapy or radiation therapy for rectal cancer: results from NSABP protocol R-01, *J Natl Cancer Inst* 80:21-9, 1988
 9. Herynk MH, Stoeltzing O, Reinmuth N, Parikh NU, Abounader R, Laterra J, et al: Down-regulation of c-Met inhibits growth in the liver of human colorectal carcinoma cells, *Cancer Res* 63:2990-6, 2003
 10. Kanazawa T, Watanabe T, Kazama S, Tada T, Koketsu S and Nagawa H: Poorly differentiated adenocarcinoma and mucinous carcinoma of the colon and rectal show higher rates of loss of heterozygosity and loss of E-cadherin expression due to methylation of promotor region, *Int J Cancer* 102:225-9, 2002
 11. Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, Mooren D, Griesbach L, Duschinsky R, et al: Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds, *Nature* 170:663-6, 1957
 12. Danenberg PV: Thymidylate synthetase-a target enzyme in cancer chemotherapy, *Biochim Biophys Acta* 473:73-92, 1977
 13. Johnston PG, Fisher ER, Rockette HE, Fisher B, Wolmark N, Drake JC, et al: The role of thymidylate synthase expression in prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer, *J Clin Oncol* 12:2640-7, 1994
 14. Edler D, Hallstrom M, Johnston PG, Magnusson I, Ragnhammar P and

- Blomgren H: Thymidylate synthase expression: an independent prognostic factor for local recurrence, distant metastasis, disease-free and overall survival in rectal cancer. *Clin Cancer Res* 6:1378-84, 2000
15. Lenz HJ, Danenberg KD, Leichman CG, Florentine B, Johnston PG, Groshen S, et al: p53 and thymidylate synthase expression in untreated stage II colon cancer: associations with recurrence, survival, and site. *Clin Cancer Res* 4:1227-34, 1998
16. Tomiak A, Vicent M, Earle CC, Johnston PG, Kocha W, Taylor M, et al: Thymidylate synthase expression in stage II and III colon cancer: a retrospective review. *Am J Clin Oncol* 24:597-602, 2001
17. Yamachika T, Nakanishi H, Inada K, Tsukamoto T, Kato T, Fukushima M, et al: A new prognostic factor for colorectal carcinoma, thymidylate synthase, and its therapeutic significance. *Cancer* 82:70-7, 1998
18. Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H and Takeishi K: Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struc Funct* 20:191-7, 1995
19. Horie N, Chimoto M, Nozawa R and Takeishi K: Characterization of regulatory sequences and nuclear factors that function in cooperation with the promoter of the human thymidylate synthase gene. *Biochim Biophys Acta* 1216:409-16, 1993
20. Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A, et al: Thymidylate synthase gene polymorphism determines response

- and toxicity of 5-FU chemotherapy, *Pharmacogenomics J* 1:65-70, 2001
21. Zar JH(ed): *Biostatistic analysis*, Englewood-Cliffs NJ, Prentice-Hall, 1984
 22. Kaplan EL and Meier P: Nonparametric estimation for incomplete observations, *J Am Stat Assoc* 53:457-81, 1958
 23. Turunen MJ: Colorectal cancer obstruction: a challenge to improve prognosis, *Ann Chir Gynaecol* 72:317-23, 1983
 24. Ponz de Leon M and Di Gregoric C: Pathology of colorectal cancer, *Dig Liver Dis* 33:372-88, 2001
 25. 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* 344:1196-206, 2001
 26. Etienne MC, Chazal M, Laurent Puig P, Magne N, Rosty C, Formento JL, et al: Prognostic value of tumoral thymidylate synthase and p53 in metastatic colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based chemotherapy: phenotypic and genotypic analysis, *J Clin Oncol* 20:2832-43, 2002
 27. Leichman CG, Lenz HJ, Leichman L, Danenberg K, Baranda J, Groshen S, et al: Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted-infusion fluorouracil and weekly leucovorin, *J Clin Oncol* 15:3223-9, 1997

- ABSTRACT -

Thymidylate Synthase Gene Polymorphism as a Prognostic Factor for the Colorectal Cancer

Joo-Hyung Kim

Department of Medical Sciences
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Associate Professor Kwang Wook Suh)

Purpose: Thymidylate synthase (TS) expression in the colorectal cancer is regarded as both a prognostic marker and as a predictor of response to fluoropyrimidine-based therapies targeting TS. However, results from immunohistochemical stain of TS show wide discrepancy. The human TS gene promoter is polymorphic, having either double or triple tandem repeats of a 28-bp sequence. Here we determined the significance of this polymorphism in the prediction for clinical outcome of patients with operable colorectal cancer treated by curative resection.

Methods: 121 patients with stage II and III colorectal cancer who underwent curative surgery were reviewed. After DNA extraction from paraffin-embedded tissues, the promoter region of the TS gene was amplified

by PCR.

Results: 68 subjects were homozygotes for the triple repeat variant (L/L, 250-bp, strong expression group), 53 subjects (weak expression group) were either homozygotes for the double repeat variant (S/S, 220-bp) or heterozygotes (S/L, 220 and 250-bp). Difference between stage II and stage III patients was significant with regard to the 5-year-actuarial survival (87% vs. 63%, $P=0.0320$). Examining the survival according to the TS polymorphism, there was also a significant difference between weak and strong expression group (80% vs. 53%, $P=0.0481$). In patients with the stage II disease, difference in survival rates between weak and strong expression groups did not reach a statistical significance (86% vs. 43%, $P=0.1678$). However, the difference was significant in the patients with stage III disease (77% vs. 41%, $P=0.0414$).

Conclusions: We found the TS polymorphism a significant and independent prognostic factor for the operable colorectal cancer. We think assay of TS polymorphism can overcome the technical pitfalls of immunohistochemical stain and give a more solid prognostic information in the treatment of colorectal cancer.

Key Words: colorectal cancer, thymidylate synthase gene polymorphism, prognostic factor