

전립선암 진단을 위한 바이오마커 패널

조정기 · 김영희

호서대학교 벤처대학원 융합공학과

A Panel of Serum Biomarkers for Diagnosis of Prostate Cancer

Jung Ki Cho and Younghee Kim

Department of Convergence Technology, Graduate School of Venture, Hoseo University

(Manuscript received 14 September 2017 ; revised 18 October 2017 ; accepted 27 October 2017)

Abstract: Cancer biomarkers are using in the diagnosis, staging, prognosis and prediction of disease progression. But, there are not sufficiently profiled and validated in early detection and risk classification of prostate cancer. In this study, we have devoted to finding a panel of serum biomarkers that are able to detect the diagnosis of prostate cancer. The serum samples were consisted of 111 prostate cancer and 343 control samples and examined. Eleven biomarkers were constructed in this study, and then nine biomarkers were relevant to candidate biomarkers by using t test. Finally, four biomarkers, PSA, ApoA2, CYFRA21.1 and TTR, were selected as the prostate cancer biomarker panel, logistic regression was used to identify algorithms for diagnostic biomarker combinations(AUC = 0.9697). A panel of combination biomarkers is less invasive and could supplement clinical diagnostic accuracy.

Key words: Serum biomarker, Prostate cancer, algorithm

271

1. 서 론

전립선암은 미국의 남성에서 가장 흔하게 발생하는 암으로, 전체 남성암 중 가장 높은 유병율인 25%의 비율을 차지하며, 사망원인으로는 폐암에 이어 2위를 차지하고 있다 [1-4]. 현재 국내에서 전립선암의 유병률은 다섯번째로 다소 낮지만, 노령 인구의 증가, 식생활의 서구화, 전립선암 진단 기술의 발달로 발병률이 빠르게 증가하고 있으며, 그 증가율이 12.6%로 갑상선암에 이어 두 번째로 급증하는 추세다. 진행속도가 다른 암에 비해 다소 느린 편이지만, 증상이 없는 경우가 대다수이기 때문에 진단 당시 이미 병이 상당히 진행된 상태로 발견되는 경우가 많다. 국내의 경우 고위험군의 전립선암 비율이 높고, 그 수가 감소하지 않는 추세이며, 선진국에 비해 높은 사망률을 보인다.

전립선암은 다른 암에 비해 생존 기간이 길고 진행이 느리지만, 전립선암 진단 후의 생존율은 진단 당시의 병기에 의해 크게 차이가 난다. 병기가 전립선에 한정된 경우나 국소 진행성의 경우 생존율은 거의 100%에 달하지만, 원격 전이가 있는 경우의 생존율은 29.3%에 불과하다[5]. 전립선암의 스크리닝에는 보편적으로 직장수지검사가 이용되었는데, 이 검사는 검사자에 따라 결과의 차이가 생길 수 있고, 직장수지검사를 통해 전립선암으로 진단된 대부분의 환자들은 전립선암이 많이 진행된 경우가 많은 단점을 가지고 있다[6,7]. 따라서 전립선암은 조기 발견과 치료가 각별히 필요한데, 현재 조기 검진을 위해 가장 많이 사용하는 방법이 단일 바이오마커인 혈중 전립선 특이항원(PSA)의 측정이다. PSA 도입 후 광범위하게 선별검사가 시행되면서 전립선암의 조기발견이 크게 늘어나고 있다. 하지만 전립선암의 조기발견뿐만 아니라 수술 전 후 사망률의 차이가 없는 저위험도 전립선암의 빈도도 꾸준히 증가하고 있으며, 현재는 이렇게 임상적으로 무의미한 저위험도 전립선암이 전체 전립선암의 절반을 차지하는 병기의 변화현상을 보이고 있다[8]. 또한 PSA가 전립선암보다는 전립선 자체에서 특이

Corresponding Author : Young Hee Kim
Graduate School of Venture, Hoseo University 2497 Nam-
busoonwhanro seochogu Seoul
TEL: +82-10-3900-1217 / E-mail : yhkim514@hoseo.edu
이 연구는 “암환자에 대한 스마트 암검진 시스템 임상연구” (보건복지부 과제)의 지원을 받아 수행하였음.

적으로 반응을 보이는 바이오마커이기 때문에 전립선염이나 비대증의 경우에도 수치가 증가하게 되어 불필요하게 조직 검사를 받는 경우가 다수 발생하고, 이로 인한 합병증이 나타나는 경우도 있어 문제점이 제기된다. PSA 선별검사가 전립선암으로 인한 사망률에 미치는 영향을 알아보기 위해 실시한 연구에서도 PSA 선별검사가 전립선암의 사망률을 20% 정도 감소시키기는 효과를 나타내지만, 1명의 전립선암 환자의 사망을 줄이기 위해 48명의 전립선암 환자의 치료를 필요로 하는 과잉 진단 및 치료의 문제점을 지적한바 있다[9]. 이러한 단일 바이오마커 분석이 가지는 단점을 보완하기 위해서는 다양한 다중 바이오마커에 대한 연구가 필수적이다.

바이오마커는 정상과 질병을 구분할 수 있거나 치료반응을 예측하고 객관적으로 측정할 수 있는 지표로, 질환이 발생할 때의 변화를 조기에 찾아낼 수 있는 감별 표지자를 말한다. 바이오마커의 개발은 암 관련 질환에 대하여 가장 활발히 진행되고 있으며, 암의 조기진단을 위한 것뿐만 아니라 표적항암치료제의 개발을 위한 연구에도 관심이 집중되어 있다. 특히 단백질 바이오마커는 선택적 스플라이싱, 번역 후 수식화, 단백질 상호작용에 의한 역가변화 등의 특징으로 발굴하는데 있어서 중요한 가치를 지니며, 이를 개발을 위한 단백질체 정량분석기술이 나날이 발전하고 있다. 현재 서구에서는 전립선암의 진단 및 전립선암에 대한 예측의 정확도가 월등한 바이오마커들이 실제 임상에 사용되고 있다. 미국 FDA의 승인을 받은 전립선암 표지자인 PCA3는 개발 이후, 제품화하여 FDA 승인을 받기까지 약 14년의 시간이 걸렸다. 그만큼 새로운 바이오마커는 연구개발뿐만 아니라 임상 검사로 적용하기 위해서 복잡하고 광범위한 접근이 필요하다. 하지만 아직까지 국내에서의 바이오마커 개발에 대한 투자는 다른 선진국에 비해 부족하고, 특히 전립선암에 대한 연구는 미미한 실정이다.

본 논문에서는 11개의 바이오마커에서 측정된 데이터를 바탕으로 전립선암을 진단할 수 있는 바이오마커 조합 패널을 선택하였고, 알고리즘을 통하여 선택된 바이오마커 조합 패널의 성능을 평가하였다.

II. 연구 방법

1. 검체 정보

혈중 바이오마커의 농도를 측정하기 위한 대상 시료는 전립선암의 혈청으로 하였고, 정상 대조군의 혈청을 병행하여 사용하였다. 전립선암의 대상시료는 확진된 환자로부터 수술 전에 채취한 혈액에서 분리한 혈청이며, 계명대 동산의료원에서 111개의 샘플을 제공받아 사용하였다(표 1) (IRB 허가번호 : 2013-08-012, DSMC). 전립선암 혈청은 병기

표 1. 검체의 정보.

Table 1. The information of patients.

	Total	~49	50~49	60~69	70~
Healthy donor	343	62	152	94	35
Prostate cancer	111	2	13	52	44
Stage					
1	2	0	0	2	0
2	55	1	8	25	21
3	50	1	5	23	21
N/A	4	0	0	2	2

별로 1기부터 3기까지의 분류되었다(표 1). 정상 대조군으로는 서울대학교 가정의학과로부터 현재 질병을 앓고 있지 않은 정상인 343개의 혈청을 제공받아 실험하였다(표 1) (IRB 허가번호 : H-1308-076-514, SNUH).

2. 바이오마커의 측정

바이오마커의 측정은 자동화 장비인 Cobas c501(Roche)을 사용하여 분석하였다. 본 연구에 사용된 바이오마커는 ApoA1(apolipoprotein a1), ApoA2(apolipoprotein a2), AFP(alpha-fetoprotein), PSA(prostate specific antigen), CEA(carcinoembryonic antigen), CA125(cancer antigen 125), CA19.9(Cancer antigen 19-9), TTR(transferrin), B2M(β 2 microglobulin), CRP(C-reactive protein), CYFRA 21.1(cytokeratin fragment 21.1) 총 11가지이며, 이 바이오마커들은 현대의 암 연구에서 많이 거론되고 있는 후보군들과 자체연구를 통해 얻은 후보군들 중 선별을 통하여 최종적으로 선택된 바이오마커들이다.

3. 바이오마커의 유효성에 관한 통계적 입증

상기 11개의 바이오마커에 대한 전립선암 환자와 정상인 간의 발현량 차이의 유의성을 T-test를 통해 확인하였다. 실험값에 \log_{10} 변환을 취하고, T-test 결과 p-value 0.1이하이면 유의한 바이오마커로 판단하였다.

T-test를 통해 선별된 바이오마커들 중 어떠한 바이오마커 조합 패널이 전립선암과 정상인 집단 사이에 가장 적합한 통계적 유의성을 나타내는지 확인하기 위해 바이오인포매틱스(bioinformatics) 및 통계적 분석방법인 R 통계 패키지[10] 방법을 이용하여 분석하였다. 유의한 바이오마커로 판정된 9개의 후보마커들을 대상으로 로지스틱 회귀분석(logistic regression)모형을 사용하였고, 최적화된 바이오마커 패널을 찾기 위해 마커들의 모델내 기여도를 구하였다. 이렇게 측정된 기여도를 바탕으로, 기여도가 낮은 마커들을 제거하면서 가장 최적의 성능을 보이는 바이오마커 조합 패널을 구성하였다.

바이오마커 패널 조합별 로지스틱 회귀모형의 타당성을 검증하기 위해 10배수 교차 검증법(10 fold cross validation)을 이용하였다. 10배수 교차 검증법은, 먼저 데이터를 무작위로(random)로 10개의 조각으로 분할하며 1개의 조각을 남기고 9개의 조각으로 로지스틱 회귀모형을 생성하고 남은 1개의 조각을 이용하여 검증하게 된다. 위의 과정을 모든 조각에 대하여 반복 실행하였다. 바이오마커 패널 검증을 위한 예측 결과의 성능은 ROC(Receiver-Operating Characteristic) 곡선의 AUC(Area Under the Curve) 값으로 확인하였다. 결과 성능을 평가하는 방법으로는 민감도(질환자를 질환으로 판단), 특이도(질환이 없는 사람을 정상으로 판단)를 사용하였다. 민감도와 특이도는 한쌍의 수치 값(백분율)으로 표시하며, 최적화된 민감도와 특이도를 결정하기 위해서 ROC 곡선을 사용한다. ROC 곡선은 X축은 1-특이도, Y축은 민감도로 표현하며, 민감도와 특이도의 결과 값들을 x,y 좌표에 표시한다. 이렇게 표시된 좌표값들을 선으로 연결하여 ROC 곡선을 얻을 수 있으며, 민감도가 크고 특이도가 큰 ROC 커브일수록 AUC(곡선의 아래 면적) 값이 커지게 된다. 즉, AUC 값이 1에 가까울수록 예측 결과 성능이 우수한 것으로 판단한다. 안정적인 결과 성능을 얻기 위해 이러한 과정을 1000번 반복하여 1000개의 AUC 값을 얻었고, 그 값의 평균을 계산하여 상기 모형이 얼마나 전립선암과 정상인의 분류에 적합한지 판단하였다.

III. 연구 결과 및 고찰

1. 바이오마커의 선택

암에 있어서 바이오마커는 암의 발병 가능성 및 존재를 알아보는데 국한되어 있는 것이 아니라, 초기 암의 진행 정도와 치료 과정 등의 정보를 제공하는 데에도 유용하게 활

용될 수 있다. 본 연구에서는 이러한 바이오마커들의 후보군을 선정하기 위하여, 전립선암과 정상인 혈청에서 11개의 바이오마커(ApoA1, ApoA2, AFP, PSA, CEA, CA125, CA19.9, TTR, B2M, CRP, CYFRA 21.1)의 수치를 T-test를 이용하여 측정하였다. 11개의 바이오마커는 139개의 전립선암 혈청과 2066개의 정상인 혈청을 이용하여 2차원 전기영동법 및 SELDI-TOF MS 방법 통해 발굴하였으며, 그 외에 문헌고찰을 통해 발굴한 바이오마커들을 추가하여 암환자와 정상인 혈청에서 차이를 보이는 단백질 바이오마커들을 선정하였다. 그 결과 ApoA1, ApoA2, AFP, PSA, CA125, TTR, B2M, CRP, CYFRA 21.1에서 정상인과 전립선암 간의 유의한 차이를 나타냈다($p < 0.01$) (표 2). 각 바이오마커의 Box plot은 그림 1과 같다. 본 연구에서 정상인과 전립선암 사이에 가장 좋은 결과를 나타낸 바이오마커는 PSA($p < 0.000000001$)였으며, 그 다음으로는 ApoA2, CYFRA 21.1, TTR, ApoA1, CRP, B2M, CA125, AFP 순이었다. 본 실험에 사용된 전립선암 검체들에서 유독 PSA의 농도가 높게 측정된 것은, PSA 선별검사를 통해 수치가 증가한 것으로 확인되어 전립선암 검사를 받게 된 환자들의 검체를 사용하였기 때문인 것으로 추측된다.

2. 바이오마커 조합 성능 평가

T-test를 통해 선별된 바이오마커들 중 어떤 조합의 패널이 전립선암에 있어서 가장 적합한 성능을 지니고 있는지로 로지스틱 회귀분석을 이용하여 평가하였다. 바이오마커 패널은 기본적으로 t-test 수행시 가장 큰 유의성을 보였던 PSA를 중심으로 구성하였다. 선택된 전체 9개의 바이오마커를 모두 포함한 패널을 필두로, 기여도에 따라 순차적으로 바이오마커를 하나씩 제거하여 패널을 구성하였으며, 단일 바이오마커인 PSA만 분석한 패널까지 총 9가지 패널에

표 2. 각 바이오마커 평균/표준편차 및 유의성 검토(T-test).

Table 2. Biomarker average/standard deviation and significance study(T-test).

	Average	SD	T value	DF	p-value
ApoA1	1,263,653.2	1.180	-11.220	181.860	0.0000
ApoA2	275,470.5	1.294	-14.207	162.394	0.0000
AFP	2.7	1.627	-5.073	181.253	0.0000
PSA	1.4	2.800	19.616	183.078	0.0000
CEA	1.8	1.866	-0.964	180.112	0.3361
CA125	8.3	1.556	-3.079	184.890	0.0024
CA19.9	7.3	2.283	-1.306	172.516	0.1933
TTR	329,062.5	1.255	-7.394	136.640	0.0000
B2M	1,583.3	1.248	2.961	167.969	0.0035
CRP	669.2	2.946	7.117	186.022	0.0000
CYFRA21.1	1.7	1.585	-5.310	218.012	0.0000

SD = standard deviation, Df = degree of freedom

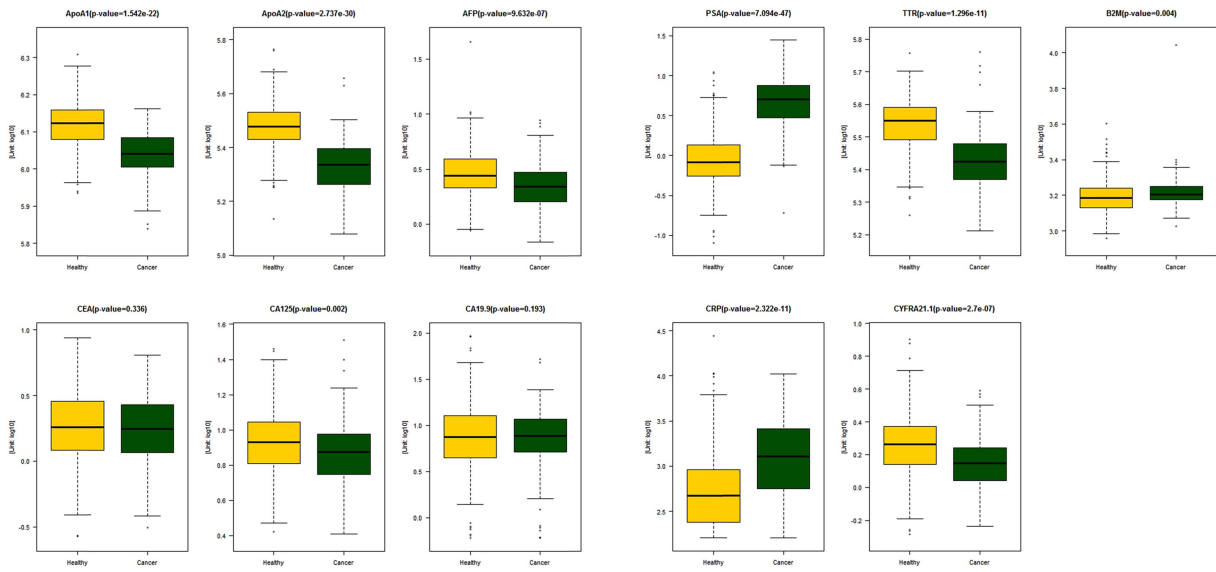


그림 1. 각 바이오마커의 Box plot(log₁₀ Scale).
Fig. 1. Box plot of biomarkers(log₁₀ Scale).

대한 검증을 실시했다. 표 3에서 나타낸 바와 같이 바이오마커의 수가 3개까지는 AUC 값이 기하급수적으로 증가하지만 4개 이상부터는 비슷한 AUC 값을 나타냈다. 이에 비슷한 AUC 값을 가지는 바이오마커 패널 조합 중 비용 효율성등의 이득과 최대한의 민감도 보장시 가장 높은 특이도를 보이는 기준으로 최적의 바이오마커 패널 조합을 선정하였다. AUC 성능이 가장 좋은 PSA, ApoA2, CYFRA21.1, TTR, ApoA1, CRP, B2M, CA125 마커 패널(AUC = 0.9698)은 2번째(PSA, ApoA2, CYFRA21.1, TTR 조합

(AUC = 0.9697)), 3번째(PSA, ApoA2, CYFRA21.1(AUC = 0.9693)) 성능을 보이는 마커 패널에 비해 마커 수가 많아 비용효율성의 이유로 선택에서 배제하였다. PSA, ApoA2, CYFRA21.1, TTR 마커 패널은 동일한 민감도 기준으로 특이도를 비교했을 때 PSA, ApoA2, CYFRA21.1 마커 패널 보다 뛰어난 결과를 나타내어, 최종적으로 전립선암의 바이오마커 패널 조합으로 선택하였다(AUC = 0.9697) (표 4). 해당 바이오마커 패널은 특이도 91.18% 기준일 때

274

표 3. 알고리즘 분류에 따른 바이오마커 패널의 AUC 측정.
Table 3. AUC of classification algorithm with biomarker panels.

Biomarker panel	AUC
PSA,ApoA2,CYFRA21.1,TTR,ApoA1,CRP,B2M,CA125,AFP	0.9679
PSA,ApoA2,CYFRA21.1,TTR,ApoA1,CRP,B2M,CA125	0.9698
PSA,ApoA2,CYFRA21.1,TTR,ApoA1,CRP,B2M	0.9691
PSA,ApoA2,CYFRA21.1,TTR,ApoA1,CRP	0.9690
PSA,ApoA2,CYFRA21.1,TTR,ApoA1	0.9690
PSA,ApoA2,CYFRA21.1,TTR	0.9697
PSA,ApoA2,CYFRA21.1	0.9693
PSA,ApoA2	0.9640
PSA	0.9443

AUC = area under the curve(An AUC value close to 1 indicates an excellent diagnostic test)

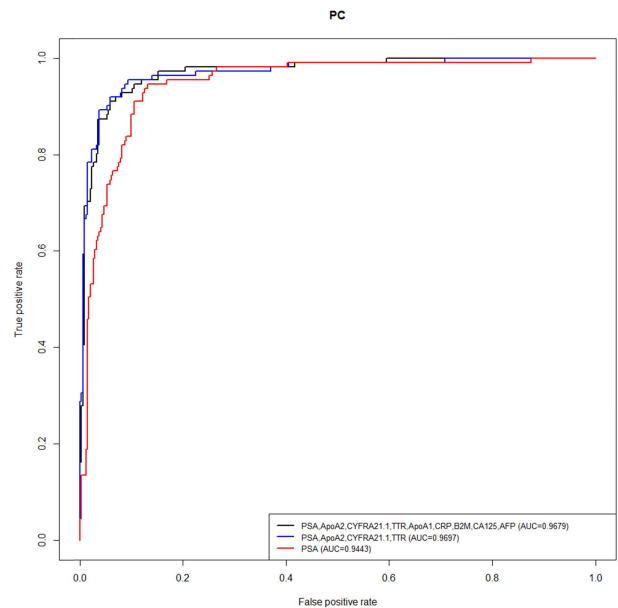


그림 2. 바이오마커 패널별 ROC curve.
Fig. 2. ROC curve of biomarker panel.

표 4. 바이오마커 패널별 민감도에 따른 특이도의 변화.

Table 4. The change of specificity according to the sensitivity of biomarker panels.

No.	Sensitivity	Specificity	
		PSA,ApoA2, CYFRA21.1,TTR	PSA,ApoA2, CYFRA21.1
1	98.63%	52.94%	50.00%
2	98.60%	54.41%	51.47%
3	98.54%	57.35%	52.94%
4	98.46%	58.82%	54.41%
5	98.20%	63.24%	58.82%
6	98.08%	64.71%	60.29%
7	97.50%	70.59%	67.65%
8	97.35%	72.06%	69.12%
9	96.97%	75.00%	73.53%
10	96.80%	76.47%	75.00%
11	96.43%	79.41%	79.41%

민감도 93.5%와 total accuracy 91.74%를 나타냈다(표 5). 또한 전립선암을 병기별로 분류하여 예상수치(predicted score) 분포도를 살펴본 결과, late stage (3기) 뿐만 아니라 early stage (1~2기)의 전립선암에서도 높은 분별력을 나타냈다(표 5) (그림 3). 현재 임상에서 널리 사용되고 있는 PSA 단일마커의 경우 비교적 높은 AUC 값을 나타냈지만(AUC = 0.9443), 특이도 95.63% 기준일 때 민감도는 63.96%로 현저히 낮았다. 또한 전립선암의 모든 병기에서 바이오마커 패널 조합에 비해 PSA 단일마커는 낮은 민감도를 나타냈다(early stage : 47.37%, late stage : 82.00%). 따라서 PSA 단일마커에 비해 PSA, ApoA2, CYFRA21-1, TTR 바이오마커 패널 조합의 분류 성능이 우수함을 검증하였다.

전립선암은 40세 이하의 남성에서는 거의 발생하지 않고, 50세 이후부터 연령이 증가함에 따라 발생빈도가 점차 증가하여 70대에 가장 높으며, 80% 이상이 65세 이후에 진단된다. 이에 본 연구에서도 전립선암 검체들의 연령별 분포도를 분석해본 결과, 연령이 증가함에 따라 환자의 수가 함께 증가하는 경향을 보였다. 하지만 그에 비해 정상인 검체에서는 연령별로 큰 차이를 나타내지 않았다(표 1). 따라서 선택된 바이오마커들의 수치가 연령에 영향을 받는지 알아보기 위해, 각 바이오마커들을 연령별로 분류하여 수치의 분

표 5. PSA, ApoA2, CYFRA 21.1, TTR 패널의 진단 성능.

Table 5. Diagnostic performance of PSA, ApoA2, CYFRA 21.1 and TTR panel.

Spec	Sens	Sens. early	Sens. late	Acc	Thres
91.18%	93.50%	92.97%	93.37%	91.74%	0.1913

Spec = specificity; Sens = sensitivity; Acc = accuracy, Thres = threshold

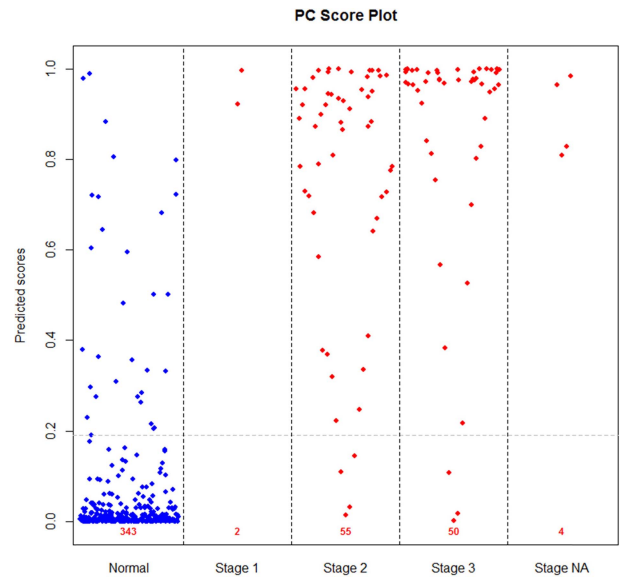


그림 3. 전립선암 병기에 따른 예상수치의 분포.

Fig. 3. The distribution of predicted scores in the stage of prostate cancer.

포를 확인하였다. 그 결과 연령에 따른 바이오마커 수치의 증감은 발견되었지만 전립선암과 정상인 간에 동일한 양상을 나타냈으며, 연령과 관계 없이 전립선암의 PSA, ApoA2, CYFRA21-1, TTR의 수치는 정상인과 유의한 차이를 나타내는 것을 확인하였다(그림 4).

IV. 결 론

본 연구는 전립선암을 찾기 위해 전립선암군과 정상인군 두 집단을 분류하는 바이오마커 패널 알고리즘을 탐색해 보았다. 분류 성능을 비교해본 결과 전립선암을 선별하는데 있어서 PSA, ApoA2, CYFRA 21.1, TTR을 포함하는 바이오마커 패널이 가장 적합하였으며, 민감도 및 특이도 또한 우수하였다. 이러한 저침습(less-invasive)적 방법인 바이오마커 패널은 향후 전립선암 환자의 징후를 판단함에 있어 정확성을 높일 수 있는 좋은 방법이 될 것이다. 추후 전립선암 진단의 발전을 위하여 보다 더 다양한 바이오마커 및 알고리즘을 이용한 패널 구축 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

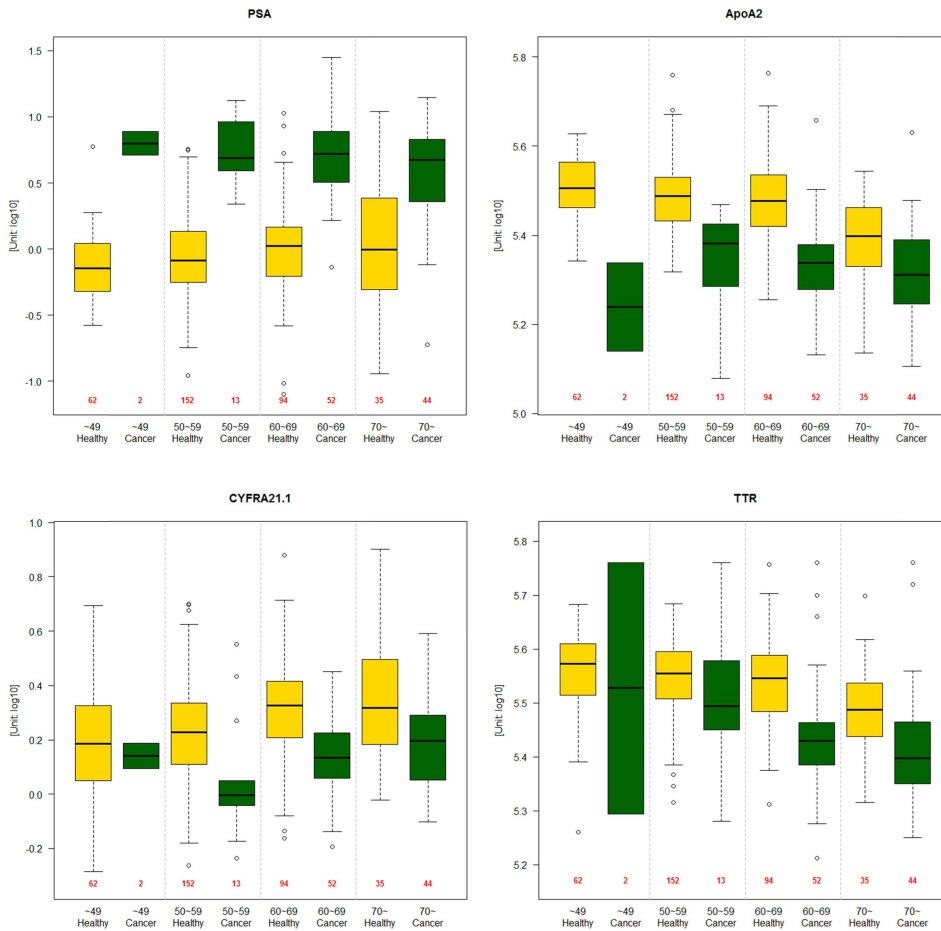


그림 4. PSA, ApoA2, CYFRA 21.1, TTR의 연령별 분포.
 Fig. 4. Age distribution of PSA, ApoA2, CYFRA 21.1 and TTR.

Reference

[1] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E and Forman D. "Global cancer statistics", *Ca-A Cancer Journal For Clinicians*, vol. 61, no. 2, pp. 69-90, 2011.

[2] Boyle P and Ferlay J. "Cancer incidence and mortality in Europe, 2004", *Annals of Oncology*, vol. 16, no. 3, pp. 481-488, 2005.

[3] Quinn M and Babb P. "Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons", *BJU International*, vol. 90, no. 2, pp. 174-184, 2002.

[4] Parkin DM, Bray FI and Devesa SS. "Cancer burden in the year 2000. The global picture", *European Journal of Cancer*, vol. 37, no. 8, pp. 4-66, 2001.

[5] Jaeryun Lee, "The Clinical Lecture _ Guidelines of Cancer Care for general practitioner : Prostate Cancer", *Korean Journal of Internal Medicine Autumn*, vol. 2013, no. 2, pp. 116-120, 2013.

[6] Smith DS and Catalona WJ. "Interexaminer variability of digital rectal examination in detecting prostate cancer", *Urology*, vol. 45, no. 1, pp. 70-74, 1995.

[7] Chodak GW, Keller P and Schoenberg HW. "Assessment of screening for prostate cancer using the digital rectal examination", *Journal of Urology*, vol. 41, no. 5, pp. 1136-1138, 1989.

[8] Cooperberg MR, Broering JM, Kantoff PW and Carroll PR. "Contemporary trends in low risk prostate cancer: risk assessment and treatment", *Journal of Urology*, vol. 178, no. 3, pp. 14-19, 2007.

[9] Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, Kwiatkowski M, Lujan M, Lilja H, Zappa M, Denis LJ, Recker F, Berenguer A, Mänttinen L, Bangma CH, Aus G, Villers A, Rebillard X, van der Kwast T, Blijenberg BG, Moss SM, de Koning HJ and Auvinen A. "Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study", *The New England Journal of Medicine*, vol. 360, no. 13, pp. 1320-1328, 2009.

[10] R Development Core Team, "A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria : the R Foundation for Statistical Computing", ISBN 3-900051-07-0, [http://www.R-project.org], 2007.