

순환 종양 표지자

부산대학교 의과대학 내과학교실, 부산대학병원 소화기내과

한성용, 김동욱

Circulating Tumor Marker

Sung Yong Han, Dong Uk Kim

Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Internal Medicine, and Biomedical Research Institute, Pusan National University Hospital, Pusan National University School of Medicine, Busan, Korea

Over the past decade, circulating tumor cell have received tremendous attention as new biomarkers and basic research subjects. In recent years, research on circulating tumor DNA, exosomes and microRNAs has also been actively conducted. These circulating tumor markers have the potential to become the basis of precision medicine, such as determining the genome / immune profile, monitoring response and tolerance, and selecting therapeutic agents beyond the early diagnosis and prognosis prediction. In this article, we introduce the diagnostic methods, efficacy, meaning, and applicability of various circulating tumor markers.

Key Words: Circulating tumor cell, Precision medicine, Liquid biopsy

서 론

암을 조기에 진단하고 예후를 예측하며, 치료반응을 모니터링하기 위한 노력은 오랫동안 지속되어 왔다. 최근에는 정밀 의학(Precision medicine)의 개념이 대두되면서 질병의 유전적 기초에 대한 이해를 바탕으로 환자 개인별 맞춤형 치료를 제공하기 위하여 표적 표지자(targeted biomarker)에 대한 관심도 높아지고 있다. 대규모 암 게놈 분석 프로젝트 덕분에 다양한 유전자 변형에 대한 정보들을 확인하게 되었고, 기술 발전에 따라 저렴한 비용으로 종양의 게놈(genome)을 분석할 수 있게 됨에 따라 암 환자에서 단백유전체 분석 중심의 임상 관리 전략이 자리잡고 있다.

하지만 아직까지 암을 정확히 진단 및 예측할 수 있는

방법은 없으며, 암 환자에서 이러한 유전적 변이를 확인하는 최소 침습적인 방법에 대한 해결책도 없다. 침습적 방법으로 병변의 연속적이고 반복적인 생검만이 암을 진단하고 맞춤형 유전정보를 얻을 수 있는 방법이었다. 최근 혈액 내의 순환 종양 세포(Circulating Tumor cells, CTCs), 순환 종양 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA), 그리고 종양에서 유래한 엑소좀(exosome) 및 microRNA (miRNA) 등을 얻어 분석을 시행하는 연구가 활발히 진행되고 있다(Fig. 1). 이러한 순환 종양 표지자들은 조기 진단 및 예후 예측을 넘어서 게놈/면역 프로필을 결정하고, 반응 및 내성을 모니터링 하며, 치료제 선택을 하는 등 정밀의학의 기본이 될 수 있는 잠재력을 가지고 있다. 이러한 여러가지의 순환 종양 표지자들에서 검사 방법 및 효용성과 그 의미, 그리고 활용성 등에 관해 살펴보고자 한다.

본 론

1. CTCs (circulating Tumor cells)

순환종양세포(CTCs)는 1869년에 오스트리아 의사에 의해

Received: Nov. 28, 2018 Accepted: Dec. 16, 2018
Corresponding author: **Dong Uk Kim**, MD, PhD
Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Internal Medicine, Pusan National University Hospital, Pusan National University School of Medicine, Gudeokro 179, Seo-Gu, Busan 49241, Korea
Tel: +82-51-240-7869, Fax: +82-51-244-8180
E-mail: amlm3@hanmail.net

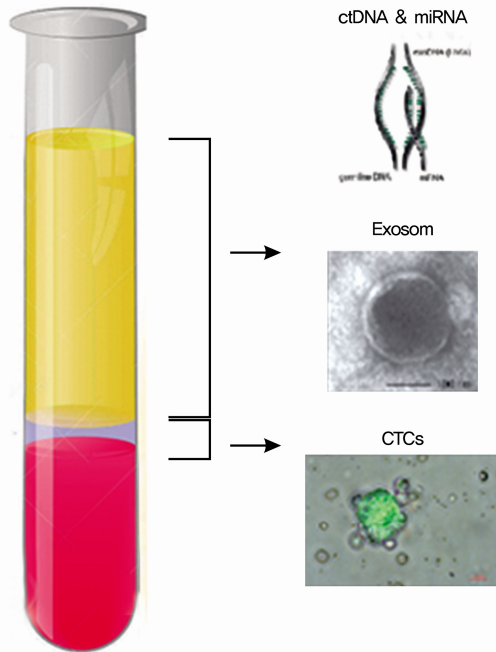


Fig. 1. 액체생검의 주요 검체 종류.

처음으로 기술되었으며,¹ 원발종양세포와 유사한 혈액 내의 순환 세포가 현미경을 통해 확인되었다. 이러한 CTCs는 암 조직에서 떨어져 나와 혈관을 따라 순환하면서, 암의 전이 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{2,3} CTCs는 혈액 내에 매우 드물게 존재하여 암 환자에서 혈액 10 mL당 1-10개 사이의 낮은 농도로 종종 발견된다.⁴ 오랜 기간 동안 CTCs의 분리 및 검출이 힘들어 많은 연구가 없다가 최근 기술의 발전으로 인해 효율적인 CTCs의 분리가 가능해지면서 활발한 연구들이 진행되고 있다.

암으로 진행되는 동안 아군집(subpopulation) 세포들은 상피간엽이행(epithelial to mesenchymal transition, EMT)라고 하는 과정을 통해 운동성과 침습성을 획득하게 된다. 따라서 CTCs는 원발 종양이 증상이 나타나기 전에 골수 혹은 타장기에서 휴면상태로 머무를 가능성도 있다.⁵ 이러한 휴면상태의 세포들이 재활성화되는 기전들은 아직 잘 알려져 있지 않다. 아직까지 CTCs의 연구들에는 많은 제약점들이 산재해 있다. 검출된 CTCs 아군집의 재현성의 문제가 있을 수 있다. CTCs는 크기가 커서 말초혈관에 붙잡혀 있을 수 있다. CTCs는 혈류에 들어간 지 1-2시간 뒤면 세포사멸(apoptosis)을 하게 되어, 검출된 작은 비율의 CTCs는 이렇게 순환하지 못하는 CTCs만이 검출될 것일 수 있다. 또한 양성세포

와의 감별 등의 문제이다. 한 대장의 양성질환의 연구에서 약 11-19%의 환자들이 CTCs로 간주되어 지는 상피세포를 지니고 있었다.⁶ 이러한 이유로 CTCs 검출 방법은 보통 EMT를 상실한 이후에 상피세포 부착분자(Epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)을 사용하게 되며, 이는 CTCs의 수치가 과소평가 되고 중요한 소집단이 누락될 가능성이 있다.⁷ 마지막으로 진짜 CTCs로 밝혀지더라도, 과연 이것의 환자의 악성종양을 대표하여 나타낼 수 있는지 여부는 여전히 확실하지 않다.

CTCs를 측정하는 데에는 중요한 두가지 단계가 있다. 세포의 농축(enrichment)과 분석(analysis)이다. 세포의 농축은 생물학적, 그리고 물리적인 특성을 이용하여 시행한다. 단백질 기반의 기술은 CTCs의 양성 선택(positive selection)을 가능하게 하고 항체에 의해 감지되는 특정 마커에 의존한다. ‘완벽한’ CTC 마커는 모든 CTC에서 발현되지만 혈구 세포에서는 발현되지 않으며, 침입 및 순환 과정에서 결코 억제되지 않는 것이다. 가장 처음 그리고 많이 사용되는 것이 상피세포 부착분자(EpCAM)에 대한 항체를 활용하는 것이다. 또한 CK8, CK18 및 CK19와 같은 cytokeratins 계열도 선호된다. 그러나 EMT 과정 중에는 상피 마커의 발현을 감소시킬 수 있어 이러한 cytokeratins의 활용의 경우 위음성 결과를 초래한다. 따라서, EMT 동안 상향 조절된 표적 간판 마커를 이용해야 하지만 이러한 제한을 극복할 수 있다. 그 중 하나가 N-cadherin과 Vimentin이며, 이는 중간엽마커이다.⁸ 하지만 vimentin의 경우 주변의 모든 혈구 세포에서 광범위하게 발현을 하기 때문에 종양 특이적 계층 변화를 탐지하기 위해서는 보완적인 FISH 분석이 필요할 수 있다. 음성선택(negative selection)의 방법을 보자면, CD45(백혈구에만 발현되는 마커)에 대한 항체를 이용하여 백혈구를 제거할 수 있다.⁴ CTC를 농축하게 하는 다른 방법으로는 물리적 특성을 사용하여 CTC를 구별하는 것이다. 최근에는 미국 FDA에 승인을 받은 Cell Search system (Janssen Diagnostics, Raritan, NJ, USA)의 cytometry 방법을 이용하여 전이성 유방암, 대장암, 전립선암에서 CTCs를 탐지하는 기술로써 사용되어지고 있다.⁹ EpCAM의 항체로 코팅된 마그네틱비드에 양성인 세포들만 농축하게 된다. 이렇게 모아진 세포들 중 핵을 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)로 염색하여 양성인 확인되고, 동시에 cytokeratin 양성인면서 CD45가 음성인 경우 CTCs로 판단한다.¹⁰

최근 대장 암 환자에서 얻은 수백 개의 CTCs에 대한 단세포 분석을 한 연구^{11,12}에 따르면 KRAS 돌연변이는 환자간

뿐만 아니라 한 환자 내에서도 이질성이 높은 것으로 나타났다. 따라서 KRAS 돌연변이를 가진 CTCs의 조기 발견은 개별 환자의 맞춤형 치료를 결정하는데 도움이 될 수 있다.

2. 순환 종양 DNA (ctDNA)

인간 혈액에서 무세포 DNA (cell free DNA, cfDNA)의 존재는 1948년에 처음 기술되었지만, cfDNA의 잠재적인 가치는 불과 몇 년 전부터 강조되기 시작하였다. ctDNA는 암세포의 괴사 혹은 세포사멸 등으로 혈류로 방출되지만, 이뿐 아니라, 양성 병변, 염증성 질환 및 외상을 앓고 있는 환자에게서도 나타난다.¹³ 또한 임신부의 경우에도 생리학적으로 태아의 cfDNA가 관찰되며, 이는 주수와 연관되어 증가한다.¹⁴ cfDNA의 평균 크기는 세포사멸에 의해 생성될 경우 70-200 bp (base pair) 정도로 작을 수 있으며, 괴사에 의해 생성될 경우 0.2-21 kbp (kilo base pairs) 정도까지 다양하게 존재한다.¹⁵ 암세포의 DNA의 약 3% 정도가 매일 혈액으로 들어가는 것으로 알려져 있으며, 암세포에서 유래한 ctDNA의 비율은 암의 상태와 크기에 따라 1.4에서 47.9%로 다양하다.¹⁶ 하지만 이러한 ctDNA는 혈액 내에서 매우 빠르게 제거되며, 반감기는 15분에서 몇 시간 정도로 알려져 있고, 따라서 이것을 확인하는 것은 쉽지 않은 일이다. ctDNA는 혈액뿐 아니라, 소변이나 흉막 삼출액, 복수 등에서도 추출될 수 있으나, 실제로 혈액에서 고도의 민감한 digital PCR 방법을 이용하여 정량적으로 분리하고 있다. 최근 검사 방법의 발전으로 wild-type의 cfDNA와 다른 ctDNA의 유전자 돌연변이를 찾아낼 수 있다. 이를 시행하기 위해서는 대규모 병렬 시퀀싱 기술과 차세대 시퀀싱 (next-generation sequencing, NGS)가 결합된 이중 시퀀싱이 필요하다. 이러한 검사를 통하여 0.001% 미만 수준에서 존재하는 돌연변이 ctDNA도 검출할 수 있다.¹⁶ ctDNA를 분석하기 위한 다른 분석법들도 존재하지만, 아직 민감도와 특이도가 낮아서 현재는 널리 사용되지 않는다. 이러한 ctDNA를 활용한 임상 접근을 본다면, 먼저 췌장암에서의 CA19-9는 병의 진단 및 예후 예측 인자로서 의미를 가지고 있다. 하지만 모든 환자에서 CA19-9가 증가하는 것은 아니며, Lewis 항원 음성인 환자에서는 CA19-9가 상승하지 않으며, 한국인의 10-15% 정도가 이에 해당한다. Maire 등¹⁷은 ctDNA를 통한 KRAS의 확인이 췌장암의 진단하는 데에는 민감도 47%, 특이도 87%로 낮지만, 만약 KRAS 변이와 CA19-9를 같이 활용한다면 그 민감도는 98%, 특이도는 77% 정도로 높아지는 것으로 확인하였다. 2017년 shoda 등¹⁸은 위암환자에서

치료 진행동안 HER2 비율의 임상적 유용성 및 digital droplet PCR (ddPCR) 방법을 사용한 실시간 HER2 상태의 평가의 유용성에 대해 발표하였다. 이 논문에 따르면 수술 당시 HER2 음성이었던 13명의 재발된 위암 환자 중 7명의 환자(7/13, 53.84%)에서 HER2가 양성으로 확인되며, 이러한 정보들이 환자의 추후 치료 계획을 세우는데 도움을 줄 수 있음을 입증하였다. 가까운 미래에 NGS 기술을 이용하여 상기 논문에서와 같은 제한된 데이터가 아니라 게놈의 변화 등의 정보를 얻기 위한 업무에서 ctDNA를 분석하는데 일반적으로 이용할 수 있게 될 것이다. 그러나 아직은 검사들의 사전 및 사후 분석 단계의 표준화와 분석 검증 등에서 미흡한 점들이 있기에 추가적인 연구 및 기술의 발전들이 필요할 것이다.

3. 마이크로 RNA (miRNA)

ctDNA의 정량적 검사 이외에도 순환하는 전사물이 암환자의 혈액에서 검출 가능하다. 그것 중 하나가 miRNA 같은 coding or non-coding RNA이다. 악성종양의 경우 순환하는 RNase의 비율이 증가되어 있지만, miRNA는 안정적으로 관찰된다. 사실 대부분의 miRNA는 세포사멸체, 미세 소포 또는 exosome에 포함되어 있으며, RNase에 저항할 수 있다. miRNA는 길이가 19-25 뉴클레오타이드(nt)인 단일 가닥의 작은 RNA의 부류이며, 모든 단백질 코딩 유전자의 50% 이상의 음성역전사조절(negative post-transcriptional regulation)에 필수적인 역할을 한다. 이러한 RNA의 중요한 공급원으로는 CTCs, 암세포의 exosome, 그리고 종양에 교육된 혈소판 (tumor educated platelets) 등이 있다.¹⁹ miRNA의 검출 및 확인은 microarray 기술 또는 역전사 qRT-PCR을 통해 시행할 수 있다. qRT-PCR은 miRNA 발현을 평가하는 가장 보편적인 방법이다. 현재 miRNA의 분석에 대한 한가지 접근법은 암의 예후 예측, 그리고 암의 진행의 monitoring을 예측할 수 있는 유의미한 miRNA를 찾는 것이며, 다수의 연구들에서 이를 초점으로 하고 있다.

최근 Tsai 등²⁰의 연구에 따르면 miR-196a/b의 표현이 위암 환자에서 CA19-9/CEA 같은 암표지자 보다 높은 민감도와 특이도로 진단에 도움이 됨을 확인하였고, 또한 miRNA가 TNM 병기와 연관성이 있고, 낮은 생존율과 좋지 않은 예후를 가짐을 확인하여 혈청 내의 miR-196a/b가 위암에서의 진단과 예후의 예측 인자로서 의미가 있다고 하였다. 또한 Qu 등²¹의 연구에 따르면 여러 miRNA 중 miRNA-21-5p가 췌장암에서 진단적 의미를 가지며, 이의 민감도는 77%, 특이

도는 80% 정도인 것으로 보고하였다. 이러한 많은 노력에도 불구하고, 아직까지 통일된 기준으로 사용되는 예측 인자는 없는 실정이다. miRNA의 경우 기준점을 찾는 것은 암의 종류에 따라 개인간의 차이, 그리고 개인간 위험도 등이 달라 매우 어렵다. 때문에 보편적으로 받아들여지는 miRNA 분석에 대한 합의가 아직 부족한 실정이다.

4. 엑소좀(Exosome)

엑소좀 또한 혈액을 통해 검출 할 수 있는 물질이다. 이 작은 입자(30-120 nm)는 단백질, 지질, DNA, miRNA 및 긴 RNA를 사용하여 세포간의 상호작용에 중요한 역할을 한다. 암세포에서 기인한 exosome은 자체적으로 miRNA의 처리가 가능하여 세포질을 통하지 않고도 miRNA를 성숙한 miRNA로 변화 시킬 수 있다. 이러한 Exosome은 전이를 일으킬만한 틈새를 만들기 위해 숙주의 미세환경을 조절하는 역할을 하기 때문에 조기암이 있는 환자의 진단에 유용할 것으로 기대된다. 예를 들어 쥐실험에서 보면, 췌장에서 선암(adenocarcinoma)에서 유래한 exosome은 간에서 전이성병변이 발생하기 전 전이틈새(pre-metastatic niches)를 유도하여 결과적으로 간의 전이를 많이 할 수 있게 유도한다. 이러한 전이성병변의 전이틈새를 유도하는 것은 엑소좀에서 기인한 독특한 integrin의 발현 패턴 때문일 것으로 추정한다. 2015년에 발표한 Hoshino 등²²의 연구에 따르면 exosomal integrin $\alpha 6 \beta 4$ 와 $\alpha 6 \beta 1$ 이 폐전이와 관련이 있는 반면에, exosomal integrin $\alpha v \beta 5$ 는 간전이와 관련이 있음을 보여주었다. 미래에는 이러한 integrin의 발현에 따른 장기의 특이적 전이를 예측하며, 치료의 계획에 영향을 줄 수 있을 것으로 기대된다. 또한 진단 및 예후 평가에 대한 연구들도 진행이 되고 있으며, 2015년도에 발표된 Melo 등²³의 연구에 따르면 세포 표면 프로테오글리칸(proteoglycan)인 glypican-1 (GPC-1)을 밝혀내었고, 이 세포들은 암세포에서 추출된 엑소좀에 특화되어 있다. GPC-1 양성 엑소좀은 유동세포계측법(flow cytometry)을 사용하여 췌장암 환자 및 쥐의 혈청에서 검출하였으며, 100%의 민감도와 특이도를 가지고 있다. 이 엑소좀은 건강한 사람 및 양성 췌장 질환 환자와 조기 및 후기 췌장암 환자를 구별 할 수 있었다. GPC1+엑소좀의 수준이 종양 크기 및 수술 전후 환자의 생존과 상관 관계가 있다는 추가적인 발견도 있었다. 또한 이 GPC 1+엑소좀은 유방암 환자에서도 검출되었고, 이는 이 GPC1이 췌장암하고만 연관된 인자가 아니라 많은 암세포에서 발현되는 인자이며, 현재 췌장암에서 가장 풍부한 발현이 되는 것으로 결론내렸다.

엑소좀 안에 있는 miRNA나 ctDNA를 활용하여 추가적인 분석을 하고 있으며, 이것은 혈액 내에서 얻어지는 miRNA나 ctDNA보다 검체의 질이 좋고 암세포와 더욱 연관성이 있는 정보 분석이 가능하다. 엑소좀의 분석법의 발전과 함께 향후 많은 역할을 할 것으로 기대된다.

결론

감염으로 인해 입원한 환자의 경우 혈액 검사를 시행하여 염증에 관한 표지자들과 영상의학적인 검사를 같이 진행하여 현재 병의 치료 정도 및 향후 예후를 예측하게 된다. 암도 비슷하게 접근할 수 있게 될 것이라 생각한다. 순환 종양 표지자들과 영상의학적인 검사를 병행하고 암환자의 치료 정도와 향후 예후 및 치료 방향을 결정할 수 있을 것이다. 같은 암이라 할지라도 각 환자에 따라, 그리고 환자 안에서도 다양한 암의 이질성(heterogeneity)으로 인해 개별적인 접근을 해야 한다. 이러한 다양성, 그리고 치료 도중 발생하게 되는 다양한 변이들을 감시를 하려면 혈액과 같이 암의 상태가 변하고, 환자의 컨디션이 변하더라도 반복적으로 검체를 확보할 수 있어야 할 것이다. 아직은 각 검사에 따른 한계점과 제한점들이 있지만 앞으로 더 많은 연구들을 통하여 상호보완적인 방법으로 각종 검사들을 시행함으로써 정밀의학을 실현하는 기틀을 마련할 수 있을 것이다.

Acknowledgments

This work was supported by clinical research grant from Pusan National University Hospital in 2018.

국문 초록

지난 10 년 동안 순환하는 종양 세포는 새로운 바이오마커 및 기초 연구 대상으로 엄청난 주목을 받았다. 최근에는 순환 종양 DNA, 엑소좀 및 마이크로 RNA에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있다. 순환 종양 표지자는 계층 / 면역 프로필 결정, 반응 및 내성 모니터링, 조기 진단 및 예후 예측 이상의 치료제 선택과 같은 정밀 의학의 기본이 될 잠재력을 가지고 있다. 여기에서는 다양한 순환 종양 표지자의 진단 방법, 효능, 의미 및 적용 가능성을 소개하고자 한다.

REFERENCES

1. Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust Med J.* 1869;14:146.
2. Onuigbo WB. An index of the fate of circulating cancer cells. *The Lancet* 1963;282:828-831.
3. Robinson K, McGrath R, McGrew E. Circulating cancer cells in patients with lung tumors. *Surgery* 1963;53:630-636.
4. Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nature Reviews Cancer* 2014;14:623.
5. Riethdorf S, Wikman H, Pantel K. Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. *International journal of cancer* 2008;123:1991-2006.
6. Pantel K, Denève E, Nocca D, et al. Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clinical chemistry* 2012;58:936-940.
7. Grover P, Cummins A, Price T, et al. Circulating tumour cells: the evolving concept and the inadequacy of their enrichment by EpCAM-based methodology for basic and clinical cancer research. *Annals of Oncology* 2014;25:1506-1516.
8. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cellular and molecular life sciences* 2011;68:3033-3046.
9. Andree KC, van Dalum G, Terstappen LW. Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system. *Molecular oncology* 2016;10:395-407.
10. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 2007;450:1235.
11. Gasch C, Bauernhofer T, Pichler M, et al. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor status and mutations of KRAS/PIK3CA in circulating tumor cells of patients with colorectal cancer. *Clinical chemistry* 2013;59:252-260.
12. Mostert B, Jiang Y, Sieuwerts AM, et al. KRAS and BRAF mutation status in circulating colorectal tumor cells and their correlation with primary and metastatic tumor tissue. *International journal of cancer* 2013;133:130-141.
13. Swaminathan R, Butt AN. Circulating nucleic acids in plasma and serum. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006;1075:1-9.
14. Heitzer E, Perakis S, Geigl JB, et al. The potential of liquid biopsies for the early detection of cancer. *npj Precision Oncology* 2017;1:36.
15. Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer research* 2001;61:1659-1665.
16. Leary RJ, Sausen M, Kinde I, et al. Detection of chromosomal alterations in the circulation of cancer patients with whole-genome sequencing. *Science translational medicine* 2012;4:162ra154-162ra154.
17. Maire F, Micard S, Hammel P, et al. Differential diagnosis between chronic pancreatitis and pancreatic cancer: value of the detection of KRAS2 mutations in circulating DNA. *British journal of cancer* 2002;87:551.
18. Shoda K, Ichikawa D, Fujita Y, et al. Monitoring the HER2 copy number status in circulating tumor DNA by droplet digital PCR in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* 2017; 20:126-135.
19. Best MG, Sol N, Kooi I, et al. RNA-Seq of tumor-educated platelets enables blood-based pan-cancer, multiclass, and molecular pathway cancer diagnostics. *Cancer cell* 2015;28:666-676.
20. Tsai M-M, Wang C-S, Tsai C-Y, et al. Circulating microRNA-196a/b are novel biomarkers associated with metastatic gastric cancer. *European Journal of Cancer* 2016;64:137-148.
21. Qu K, Zhang X, Lin T, et al. Circulating miRNA-21-5p as a diagnostic biomarker for pancreatic cancer: evidence from comprehensive miRNA expression profiling analysis and clinical validation. *Scientific reports* 2017;7:1692.
22. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T-L, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 2015; 527:329.
23. Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* 2015;523:177.