

기관고유연구사업 결과 보고

결	과제책임자	과 장	부 장
재			

※ 협조 :

- 사업단 소속 연구직의 경우 국가암관리사업단장
- 연구(의사직), 의사직, 의학물리학직의 경우 소속 센터장

본인이 수행한 2009~2009년도 기관고유연구사업 과제 연구결과를 붙임과 같이 보고합니다.

과제명	조기위암 환자에서 림프절 전이를 예측할 수 있는 인자 발굴
과제책임자 (소속, 성명)	위암연구과 이준호
총연구비	35,000천원 (2009년: 35,000천원)
총연구기간	2009년 3월 1일 ~ 2009년 12월 31일

붙임 : 기관고유연구사업 최종보고서 1부

2009 년 12 월 24 일

과제책임자 이 준 호

기관고유연구사업 최종보고서

편집순서 1 : 겉표지 (앞면)

(과제번호 : 0910540-1)

조기위암 환자에서 림프절 전이를 예측할 수 있는 인자 발굴
(A development of markers for predicting lymph node metastasis in
patients with early gastric cancer)

과제책임자 : 이 준 호

국 립 암 센 터

편집순서 1 : 겉표지 (측면, 뒷면)

(뒷면)

(측면)

1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구사업 최종보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다.

조기위암 환자에서 림프절 전이를 예측할 수 있는 인자발달
국립암센터

제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “조기위암환자에서 림프절 전이를 예측할 수 있는 인자 발굴” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2009. 12 .24

국립암센터

과 제 책 임 자 : 이 준 호

연 구 원 : 김 영 우

” : 홍 은 경

” : 류 근 원

” : 국 명 철

” : 엄 방 을

” : 조 민 정

목 차

< 요약 문 >

(한글)조기위암환자에서 림프절 전이를 예측할 수 있는 인자 발굴

(영문)A development of markers for predicting lymph node metastasis in patients with
early gastric cancer

1. 연구의 최종목표	9
2. 연구의 내용 및 결과	10
3. 연구결과 고찰 및 결론	13
4. 연구성과 및 목표달성도	14
5. 연구결과의 활용계획	16
6. 참고문헌	17
7. 첨부서류	17

※ 여러개의 세부과제로 과제가 구성된 경우 위 목차와 동일하게 세부과제 별로 작성함

(I. 총괄과제, II. 제1세부과제, III. 제2세부과제.....)

< 요약 문 >

연구분야(코드)	B-3		과제번호	0910540-1
과제명	조기위암환자에서 림프절 전이를 예측할 수 있는 인자 발굴			
연구기간/연구비 (천원)	합계	2009년 3월 1일 ~ 2009년 12월 31일		350,000
	1차년도	2009년 3월 1일 ~ 2009년 12월 31일		350,000
	2차년도			
	3차년도			
과제책임자	성명	이준호	주민등록번호	*****-*****
	전화번호	031-920-1629	전자우편	kosmas@ncc.re.kr
색인단어	국문	위암, 림프절, 전이		
	영문	Gastric cancer, Lymph node, Metasrtasis		
<p>◆ 연구목표</p> <p><최종목표> 조기위암환자에서 림프절 전이를 예측할 수 있는 인자를 발굴함</p> <p><당해년도 목표></p> <ul style="list-style-type: none"> - 조기위암에서 과발현되는 맥관형성인자 규명 - 조기위암환자에서 발현되는 맥관형성인자 중 림프절 전이와 관련 있는 인자 발굴 - 근치적 절제술을 받은 위암환자에서 발현되는 맥관형성 인자의 예후적 의의 규명 				
<p>◆ 연구내용 및 방법</p> <p>- 대상환자 대상 환자는 2001년 10월부터 2003년 12월까지 국립암센터 위암센터에서 위선암으로 위절제술을 시행 받은 794명의 환자 중 근치적 절제술을 받은 753명의 환자들로 이들은 기존 연구에서 tissue microarray (TMA)가 제작되어 있으며 이중 조기위암환자는 350명임. 이렇게 기 제작되어 있는 TMA와 여기에 matching되는 조직은행의 신선조직, 혈액을 대상으로 함.</p> <p>- 면역화학염색 기 제작되어 있는 TMA paraffin-embedded tissue를 4-μm section으로 cutting하여 glass slide에 mounting한 후 section을 xylene으로 탈파라핀화하고 rehydration함. section은 10 mmol/L citrate buffer로 15분동안 incubation함. lymphangiogenesis와 관련 있는 항체(SOX18, periostin, endoglin, emilin1, neurophilins, adrenomedullin, p53, placental growth factor, hepatocyte growth factor, Prox1, Foxc2에 대한 면역염색용 항체)를 apply한 후 슬라이드를 ES automatic stainer에서 염색 후 염색 정도를 scoring함.</p> <p>- 신선조직과 혈액에서의 정량 IRB를 득한 뒤 조직은행에서 TMA에 상응하는 lymphatic invasion 유무에 따라 신선조직과 혈액을 찾은 후에 이를 이용하여 조직에서의 lymphangiogenesis와 관련 있는 gene들(SOX18, periostin, endoglin, emilin1, neurophilins, adrenomedullin, p53, placental growth factor,</p>				

hepatocyte growth factor, Prox1, Foxc2)을 quantitative RT-PCR법으로 정량하고 동일한 환자들의 혈액을 이용하여 ELISA를 이용하여 단백질을 정량함.

- 통계적인 고려

All of the statistical analyses were performed using the statistical software 'Statistical Package for Social Science' (SPSS) version 9.0 for Windows (SPSS, Inc, Chicago, IL,USA). Intergroup comparisons of the clinical and pathological variables were analyzed using the Student's test for continuous variables and two-tailed chi-square tests for discrete variables. The follow-up of patients was completed at death or at the cut-off date of December 31, 2008. At the time of the last follow-up, 46 patients (6.1%) had been lost to follow-up. The median follow-up interval, for 753 patients alive at the cut-off date, was 51 months (range 1-64 months). The cases lost to follow up and operative deaths were treated as censored data for the survival analysis. The Kaplan-Meier method was used for calculating the survival rate and the difference between the curves was assessed using the log-rank test. The accepted level of significance was a $P < 0.05$.

◆ 연구성과

-정량적 성과

구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)
SCI 논문 편수		
IF 합		
기타 성과		

1) 총연구기간내 목표 연구성과로 기 제출한 값

-정성적 성과

.

**◆ 참여연구원
(최종연도 참여인원)**

성 명

김영우, 홍은경, 류근원, 국명철, 임방운, 조민정

주민등록번호

*****-*****, *****-*****, *****-*****,
*****-*****

※ 요약문의 총분량은 2page 이내로 제한함

Project Summary

Title of Project	A development of markers for predicting lymph node metastasis in patients with early gastric cancer
Key Words	Gastric cancer, Lymph node, Metastasis
Project Leader	Lee Jun Ho
Associated Company	
<p>Treatment options for early gastric cancer include endoscopic mucosal dissection (ESD), wedge resection, laparoscopy or robot-assisted gastrectomy (LAG) and open gastrectomy. The possibility of lymph node metastasis is critical to the assessment of the type of resection to perform in patients with early gastric cancer: for example, the absence of lymph node metastasis is a prerequisite for ESD. Given that the accuracies of preoperative computed tomography (CT) and endoscopic ultrasonography (EUS), for the detection of lymph node metastasis are 50% to 70%, clinical/pathological factors, including the presence of ulcers, tumor size, depth of tumor invasion, and tumor differentiation are important features to consider for the risk of lymph node metastasis.</p> <p>This study was designed to develop a marker for prediction of lymph node metastasis in patients with early gastric cancer.</p> <p>We screened 10 molecules associated with lymphangiogenesis using PCR method in 120 gastric cancer patients among 326 patients whose tumor and normal tissues were stored in tissue bank. Those molecules were SOX18, endoglin, emilin-1, periostin, adrenomedullin, p53, HGF, PGF, prox1, foxc2. Circulating levels of those molecules were also measured using ELSIA method in 180 gastric cancer patients. Eight of 10 genes were elevated in tumor tissues compared with those normal tissues. However, only 2 genes expressed in tumor tissues, including HGF and foxc2 were associated with lymph node metastasis in gastric cancer. Unexpectedly, SOX18 was not correlated with lymph node metastasis. It was not correlated with any other clinicopathological factors but correlated with prognosis of patients.</p> <p>SOX18 has been known as a lymphangiogenic and angiogenic factor so that higher expression of SOX18 can be correlated with poor prognosis. However, our results was contradictory. Patients with higher level of SOX18 in tumor tissues showed better prognosis than those with low level of SOX18.</p> <p>Those paradox should be studied and we found that SOX18 is a novel prognostic factor in patients with gastric cancer. We will confirm these results using tissue microarray.</p>	

1. 연구의 최종목표

- 최종목표는 조기위암환자에서 림프절 전이를 예측할 수 있는 인자를 발굴하는 것으로 이를 위해 우선 조기위암에서 과발현되는 맥관형성인자 규명하고, 조기위암환자에서 발현되는 맥관형성인자 중 림프절 전이와 관련 있는 인자 발굴하여 근치적 절제술을 받은 위암환자에서 발현되는 맥관형성 인자의 예후적 의의 규명하고자 함.

- 대상 환자는 2001년 10월부터 2003년 12월까지 국립암센터 위암센터에서 위선암으로 위절제술을 시행 받은 794명의 환자 중 근치적 절제술을 받은 753명의 환자들로 이들은 기존 연구에서 tissue microarray (TMA)가 제작되어 있으며 이중 조기위암환자는 350명이었음. 이렇게 기 제작되어 있는 TMA와 여기에 matching되는 조직은행의 신선조직, 혈액을 대상으로 하고자 하였으나 조직은행에 보관되어 있는 조직들은 모두 진행성위암환자들로 본 연구에서 목표로 하는 조기위암환자들의 신선조직들은 보관되어 있지 않음. 하지만 진행성위암환자들이라도 림프절 전이가 없는 환자들의 조직이 다수 포함되어 있어 연구를 진행하는 데는 큰 문제가 없으리라 판단됨.

- IRB와 조직은행사용허가를 득한 뒤 조직은행에서 TMA에 포함되어 있는 신선조직과 혈액을 찾은 후에 이를 이용하여 조직에서의 lymphangiogenesis와 관련 있는 gene들(SOX18, periostin, endoglin, emilin1, neurophilins, adrenomedullin, p53, placental growth factor, hepatocyte growth factor, Prox1, Foxc2)을 RT-PCR법으로 정량하고 환자들의 혈액을 이용하여 ELISA를 이용하여 혈액에서의 단백질을 정량함.

- PCR로 선별된 gene들을 대상으로 기 제작되어 있는 TMA paraffin-embedded tissue를 4- μ m section으로 cutting하여 glass slide에 mounting한 후 section을 xylene으로 탈파라핀화하고 rehydration함. section을 10 mmol/L citrate buffer로 15분동안 incubation함. lymphangiogenesis와 관련 있는 항체(SOX18, periostin, endoglin, emilin1, neurophilins, adrenomedullin, p53, placental growth factor, hepatocyte growth factor, Prox1, Foxc2에 대한 면역염색용 항체)를 apply한 후 슬라이드를 ES automatic stainer에서 염색 후 염색 정도를 scoring함.

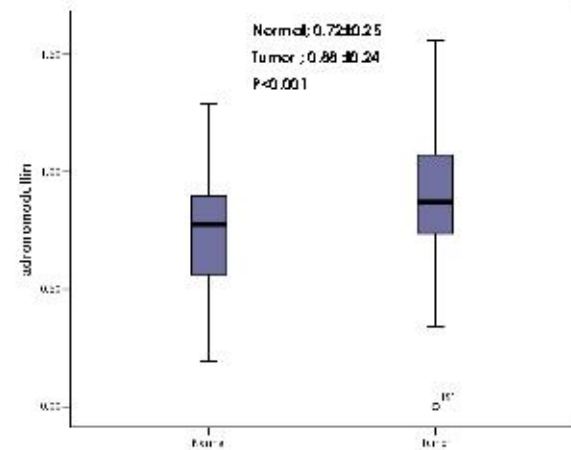
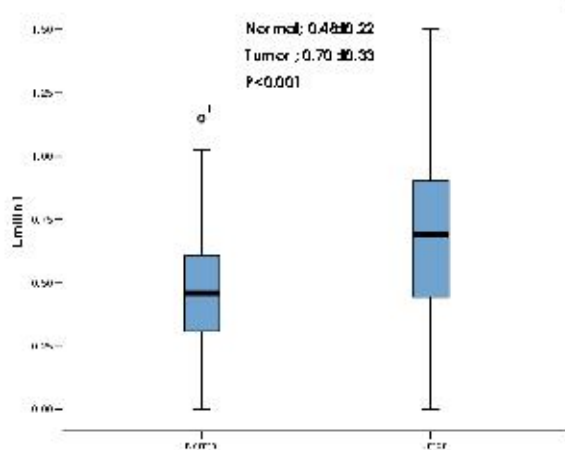
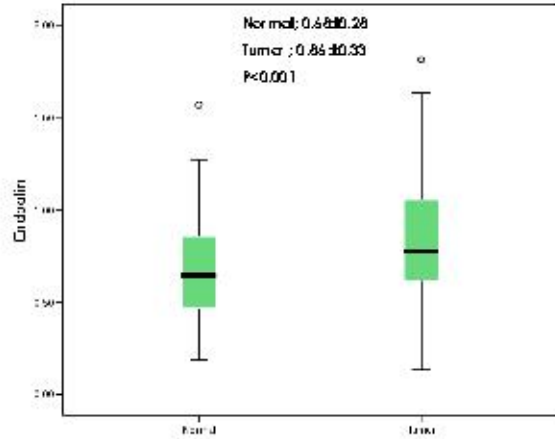
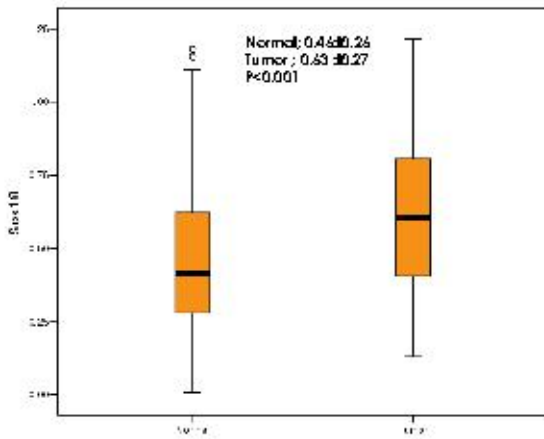
- All of the statistical analyses were performed using the statistical software 'Statistical Package for Social Science' (SPSS) version 9.0 for Windows (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA). Intergroup comparisons of the clinical and pathological variables were analyzed using the Student's test for continuous variables and two-tailed chi-square tests for discrete variables. The follow-up of patients was completed at death or at the cut-off date of December 31, 2008. At the time of the last follow-up, 46 patients (6.1%) had been lost to follow-up. The median follow-up interval, for 753 patients alive at the cut-off date, was 51 months (range 1-64 months). The cases lost to follow up and operative deaths were treated as censored data for the survival analysis. The Kaplan-Meier method was used for calculating the survival rate and the difference between the curves was assessed using the log-rank test. The accepted level of significance was a $P < 0.05$.

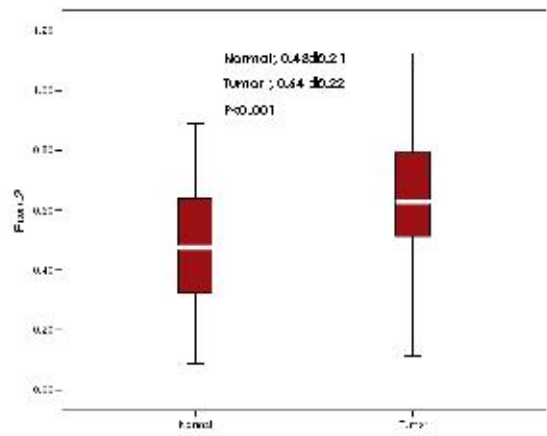
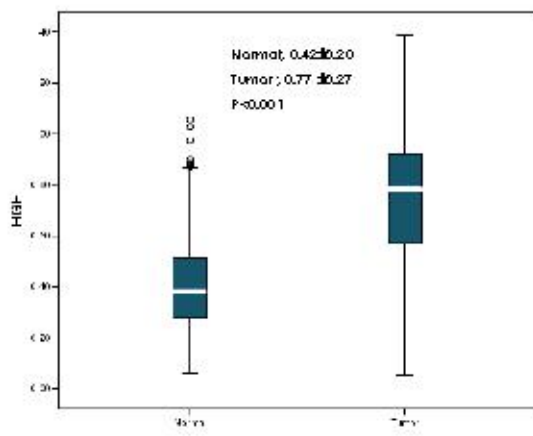
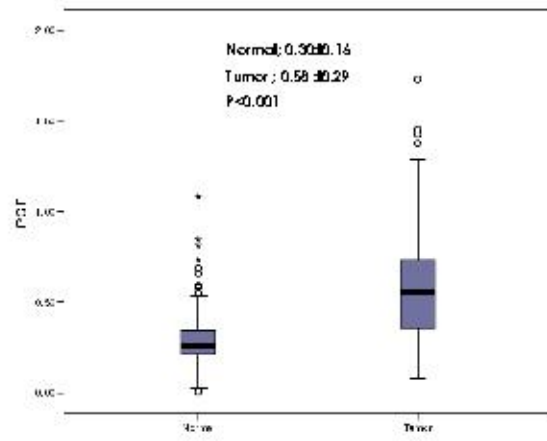
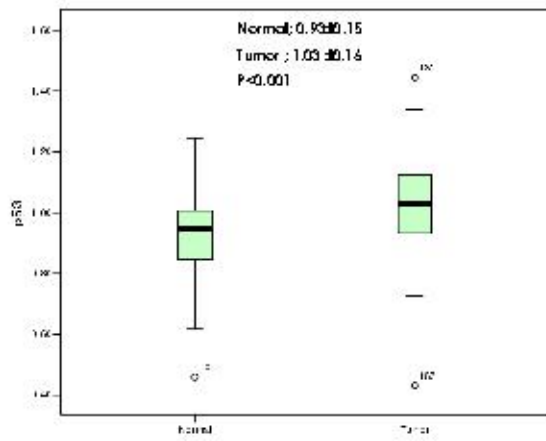
2. 연구의 내용 및 결과

-선별한 10개의 gene들은 최근 lymphangiogenesis와 관련이 있는 것으로 알려진 유전자들로 이 중 위암에서 발현이 알려진 유전자들을 우선적으로 정량하였음.

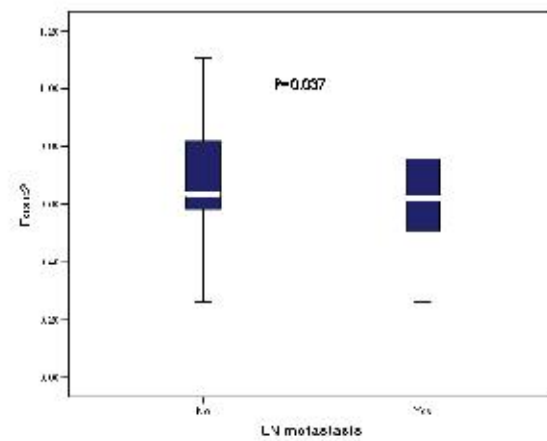
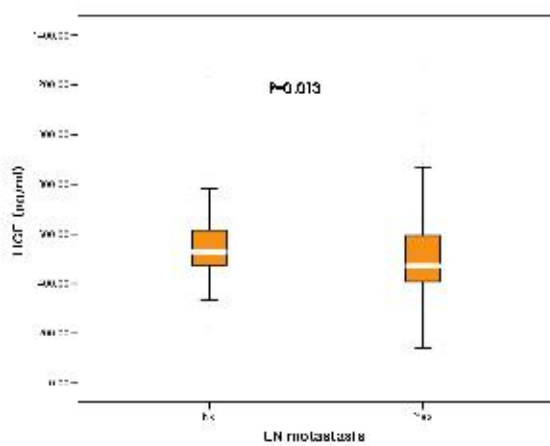
- 각 유전자들의 primer를 제작하여 RT-PCR을 이용하여 반정량적으로 정상조직과 암조직에서의 발현량을 측정하였으며 상용화된 ELISA kit를 이용하여 혈액 내에서의 농도를 측정함. 연구가 늦게 시작된 관계로 아직 예정되어 있던 실험이 진행 중이며 RT-PCR은 120명, ELISA는 180에서 모두 측정하였으며 이 중 림프절 전이와 상관관계가 있는 HGF와 Foxc2, 그리고 예후와 관련성이 있는 SOX18을 대상으로 TMA를 이용한 면역화학염색을 시행할 예정임.

- 정상조직과 암조직에서 각 유전자들의 발현

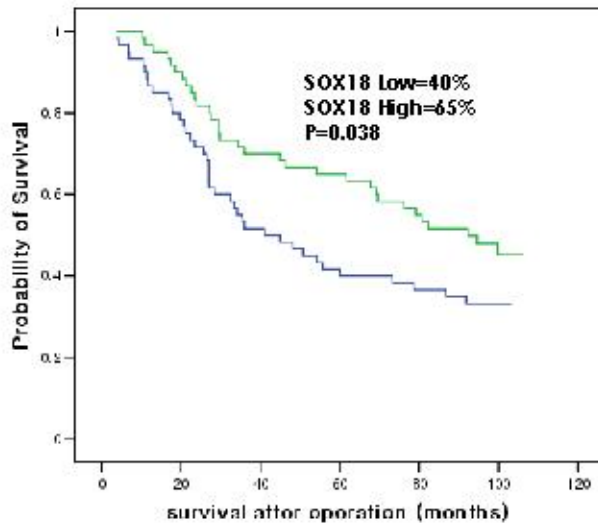




- 림프절 전이 여부에 따른 발현차이



- 발현 정도와 예후와의 상관관계



- SOX18과 다른 임상병리학적 인자들과의 상관관계

Variable	SOX18 expression		P value
	Low	High	
Sex			0,025
Male	42 (70,0)	30 (50,0)	
Female	18 (30,0)	30 (50,0)	
Age	57,5±12,9	56,1±12,8	0,414
Gross type			0,257
EGC	2 (3,3)	7 (11,9)	
I	1 (1,7)	0	
II	13 (21,7)	13 (22,0)	
III	38 (63,3)	33 (50,8)	
IV	6 (10,0)	9 (15,3)	
Location			0,933
Upper 1/3	13 (21,7)	14 (23,3)	
Mid 1/3	11 (18,3)	12 (20,0)	
Low 1/3	36 (60,0)	34 (28,3)	
Differentiation			0,648
Differentiated	13 (21,7)	11 (18,3)	
Undifferentiated	47 (78,3)	49 (81,7)	

Lymphatic invasion			0,612
No	9 (32,1)	7 (25,9)	
Yes	19 (67,9)	20 (74,1)	
Tumor invasion			0,178
T1	2 (3,3)	7 (11,7)	
T2	22 (36,7)	22 (36,7)	
T3	34 (56,7)	31 (51,7)	
T4	2 (3,3)	0	
LN metastasis			0,822
No	13 (21,7)	12 (20,0)	
Yes	47 (78,3)	48 (80,0)	
TNM stage			0,811
I	9 (15,0)	13 (21,7)	
II	11 (18,3)	11 (18,3)	
III	26 (43,3)	24 (40,0)	
IV	14 (23,3)	12 (20,0)	
Tumor size	7,3±3,0	6,8±3,0	0,372

3. 연구결과 고찰 및 결론

- 림프관형성을 일으키는 10개의 유전자 중 8개의 유전자가 암조직에서의 발현율이 높은 것으로 보아 잘 알려진대로 암의 성장에 따라 림프관형성이 심화되며 암조직 자체에서 림프관형성을 유발하는 다양한 물질을 만들어내는 것으로 보임.

- 높은 정도로 발현된 8개의 인자 가운데 림프절전이와 관련성을 보인 인자는 HGF와 Foxc2로 HGF의 경우 위암에서 발현되며 예후와 상관관계가 있는 것으로 알려져 있는 유전자로 이번 연구결과에서는 예후와의 상관성은 없었으나 말초혈액에서 측정된 정도가 림프절 전이와 상관관계를 보여 림프절 전이를 예측할 수 있는 후보물질로 생각됨.

- HGF의 경우 림프절 전이와 관련은 있으나 검사를 한 대상자가 충분하지 않아 적절한 cut-off value를 정하지 못하나 지속적인 연구와 정상인에서의 발현정도를 비교해 보아 결론을 낼 수 있을 것으로 사료됨.

- SOX18의 경우 기대와 달리 림프절 전이 여부와 아무런 상관관계를 보이지 않았으며 그 외의 위암 환자의 예후인자로 알려진 다른 임상병리학적 인자들과도 상관관계를 보이지 않으나 예후와는 분명한 상관관계를 보였으며 특히 다변량분석에서도 독립적인 예후인자로 밝혀져 의미있는 예후인자가 될 가능성이 있음.

- 하지만 SOX18이 기존에 알려진 대로 transcriptional factor로써 혈관생성이나 림프관생성과 관련이 있으며 양의 상관관계가 있다고 보고되어 있으나 이번 연구에서는 오히려 SOX18이 높은 환자

들의 예후가 좋은 것으로 분석됨.

- 이러한 paradox는 추후 연구가 되어져야 될 부분으로 SOX18이 위암환자에서 혈관생성이나 림프관생성이외에 다른 역할을 하는 것으로 생각되며 예를 들어 dendritic cell infiltration 등의 면역학적 역할을 하는 것으로 추정됨.

- 림프절 전이와 관련이 있는 것으로 밝혀진 HGF, Foxc2와 예후와 관련이 있는 SOX18에 대해 기존에 보유하고 있는 TMA를 이용해 면역화학염색을 시작하였으며 현재 조건을 잡고 있어 곧 결과를 분석하여 추가 보고를 계획하고 있음.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 ¹⁾)	저널명 (I.P.)	Year: Vol(No):Page	구분 ²⁾	지원과제번호 ³⁾
The chemokine receptor CCR4 is expressed and associated with a poor prognosis in patients with gastric cancer	이준호 (제1)	Annals of Surgery (8,46)	2009: 249(6):933-41	국외 SCI	0710411
Preoperative serum angiopoietin-2 levels correlate with lymph node status in patients with early gastric cancer	이준호 (교신)	Annals of Surgical Oncology (3,917)	2009: 53(3):339-45	국외 SCI	0710411, 0710340
Factors associated with detection failure and false negative sentinel node biopsy findings in gastric cancer: results of prospective single center trial	이준호 (제1)	Journal of Surgical Oncology (2,384)	2009: 99:137-142	국외 SCI	06105002
Sentinel node mapping and skip metastases in patients with early gastric cancer	이준호 (교신)	Annals of Surgical Oncology (3,917)	2009: 16:603-608	국외 SCI	0710411

1) 저자구분 : 교신, 제1, 공동

2) 구분 : 국내, 국내 SCI, 국내 SCIE, 국외, 국외SCI, 국외SCIE 등

3) 지원과제번호(Acknowledgement)

- 과제번호를 연차 표시(-1, -2, -3 등)를 생략하고 7자리로 기재하고, 과제와 관련성은 있으나 불가피하게 Acknowledgement가 누락된 경우에는 '없음'으로 기재

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 ¹⁾	지원과제번호

1) 지역 : 국내, 국외

다. 산업재산권

구분 ¹⁾	특허명	출원인	출원국	출원번호

1) 구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저서

저서명	저자	발행기관(발행국, 도시)	쪽수	Chapter 제목, 쪽수 (공저일 경우)

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별 목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
조기위암환자에서 림프절 전이를 예측할 수 있는 인자를 발굴함	1차년도	조기위암에서 과발현되는 맥관형성인자 규명	10개의 유전자를 대상으로 선별한 결과 8개의 맥관형성인자들이 과발현되는 것으로 확인됨.	100	
		조기위암환자에서 발현되는 맥관형성인자 중 림프절 전이와 관련된 인자 발굴	위암환자에서 HGF와 FOXc2가 림프절전이와 관련이 있는 것으로 밝혀졌으나 조기위암환자에서의 역할은 좀 더 연구가 필요함.	70	
		근치적 절제술을 받은 위암환자에서 발현되는 맥관형성인자의 예후적 의의 규명	SOX18의 발현정도가 위암환자의 예후와 밀접한 관련이 있는 것으로 밝혀짐	100	

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	2	Annals of Surgical Oncology (3,917)
산업재산권 등록		특허 등록 예상 국가, 예상 특허명 등
기 타		

(2) 연구성과의 활용계획

(가) 임상적인 측면

- 조기위암환자의 림프절 전이 유무를 치료 시작 전 알게 됨으로써 치료방법의 선택에 도움을 줄 수 있을 것으로 예상됨.
- 맥관형성인자의 발현 여부로 위암환자의 예후를 예측할 수 있을 것으로 예상됨.

(나) 지식 및 기술적인 측면

- 맥관형성인자와 림프절 전이의 관계를 밝힘으로써 위암환자의 림프절 전이기전을 이해하는 데 필요한 기초 자료를 제공.
- 조기위암환자의 림프절 전이를 예측하는데 필요한 혈액검사 방법을 개발하는데 필요한 자료를 제공

6. 참고문헌

1. François M, Caprini A, Hosking B, et al. Sox18 induces development of the lymphatic vasculature in mice. *Nature*. 2008 Dec 4;456(7222):643-7.
2. Pimanda JE, Chan WY, Wilson NK, et al. Endoglin expression in blood and endothelium is differentially regulated by modular assembly of the Ets/Gata hemangioblast code. *Blood*. 2008 Dec 1;112(12):4512-22.
3. Spessotto P, Bulla R, Danussi C, et al. EMILIN1 represents a major stromal element determining human trophoblast invasion of the uterine wall. *J Cell Sci*. 2006 Nov 1;119(Pt 21):4574-84.
4. Ajiya K, Hirakawa S, Ma B, et al. Hepatocyte growth factor promotes lymphatic vessel formation and function. *EMBO J*. 2005 Aug 17;24(16):2885-95.
5. Fritz-Six KL, Dunworth WP, Li M, Caron KM. Adrenomedullin signaling is necessary for murine lymphatic vascular development. *J Clin Invest*. 2008 Jan;118(1):40-50.
6. Takanami I, Abiko T, Koizumi S. Expression of periostin in patients with non-small cell lung cancer: correlation with angiogenesis and lymphangiogenesis. *Int J Biol Markers*. 2008 Jul-Sep;23(3):182-6.
7. Oka M, Iwata C, Suzuki HL, Kiyono K, Morishita Y, Watabe T, Komuro A, Kano MR, Miyazono K. Inhibition of endogenous TGF-beta signaling enhances lymphangiogenesis. *Blood*. 2008 May 1;111(9):4571-9.
8. Petrova TV, Karpanen T, Norrmén C, et al. Defective valves and abnormal mural cell recruitment underlie lymphatic vascular failure in lymphedema distichiasis. *Nat Med*. 2004 Sep;10(9):974-81.
9. Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, et al. Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell*. 2007 Nov 2;131(3):463-75.
10. Brouillard P, Vikkula M. Vascular malformations: localized defects in vascular morphogenesis. *Clin Genet*. 2003 May;63(5):340-51.
11. Lee JH, Cho YS, Lee JY, et al. The chemokine receptor CCR4 is expressed and associated with a poor prognosis in patients with gastric cancer. *Ann Surg*. 2009 Jun;249(6):933-41.
12. Jo MJ, Lee JH, Nam BH, et al. Preoperative serum angiopoietin-2 levels correlate with lymph node status in patients with early gastric cancer. *Ann Surg Oncol*. 2009 Jul;16(7):2052-7.
13. Lee SE, Lee JH, Ryu KW, et al. Sentinel node mapping and skip metastases in patients with early gastric cancer. *Ann Surg Oncol*. 2009 Mar;16(3):603-8.

7. 첨부서류

