

기관고유연구사업 결과보고서

기관고유연구사업 결과보고서
(과제번호 : 0510410)

연구과제명 (국문): 비호지킨성 림프종의 예후 예측 및
치료반응표지자로서의 혈관신행지표 평가

연구과제명 (영문): Evaluation of angiogenic parameters as prognostic
and predictive markers for Non-Hodgkin's Lymphoma

과제책임자 : 공 선 영

국 립 암 셴 터

(뒷면)

(측면)

	↑ 5cm ↓
<p>1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구 사업 결과보고서입니다.</p> <p>2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다.</p> <p>(14 pont, 고딕체)</p>	국 립 암 센 터 ↑ 3cm ↓

↑
6cm
↓

제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “NCC-0510410” 과제의 결과보고서로 제출합니다.

2007. 12. 28

국립암센터

과제책임자: 공선영

목 차

< 요약 문 >

I. 연구사업결과 요약문

(한글)	1
(영문)	3

II. 연구사업결과

1. 연구사업의 최종목표	4
2. 연구사업의 내용과 결과	4
3. 연구결과 고찰 및 결론	23
4. 연구성과 및 목표달성도	24
5. 연구결과의 활용계획	26
6. 참고문헌	26
7. 첨부서류	27

I. 연구사업결과 요약문

연구분야(코드)			과제번호	0510410
과제명	비호지킨성 림프종의 예후 예측 및 치료 반응 표지자로서의 혈관신생지표 평가			
연구기간/연구비 (천원)	합계	2005년 8월 ~ 2007년 12월		142,000
	1차년도	2005년 8월 ~ 2005년 12월		37,000
	2차년도	2006년 1월 ~ 2006년 12월		50,000
	3차년도	2007년 1월 ~ 2007년 12월		55,000
과제책임자	성명	공선영	주민등록번호	
	전화번호	031-920-1735	전자우편	ksy@ncc.re.kr
색인단어	국문	비호지킨성 림프종, 혈관신생지표, 예후 표지자, 치료 반응 표지자		
	영문	Non-Hodgkin's lymphoma, Angiogenic cytokines, Predictive marker, Prognostic marker		

◆ 연구목표

<최종목표>

- 1) 혈관신생지표가 비호지킨 림프종의 예후 예측 및 치료 반응 표지자로서의 사용 가능한지 규명함.
- 2) 연구 결과를 토대로 치료의 객관적 지표로 사용.

<당해년도 목표>

- 1) 혈관신생지표의 임상적 유용성 평가
- 2) 혈관신생지표의 유전자 다형성에 따른 농도 변화 확인
- 3) 혈관신생지표의 예후 및 치료 반응 연관성 평가
- 4) 요 혈관신생지표의 보정값의 임상적 유용성 평가
- 5) 림프종 세포주의 IL-6, VEGF 발현 및 상호작용

◆ 연구내용 및 방법

<연구방법>

- 1) 대조군과 환자군 모집; 대조군 131명과 환자군 87명 모집하고 임상 양상을 정리함.
- 2) 혈관신생지표를 ELISA로 측정함. 대조군에서 측정된 혈관신생지표를 근거로 참고 범위를 설정하고 성별이나 연령에 따른 차이가 있는지 검증함.
- 3) 혈관신생지표의 유전자다형성 중 functional polymorphism을 문헌 고찰하여 유전자다형성과의 관련성을 관찰함. 총 14개의 유전자 다형성을 Taqman MGF probe를 이용하여 fluorogenic 5' nuclease assay를 이용하여 genotyping을 시행하고 혈관신생지표의 농도를 비교함.
- 4) 대조군과 환자군에서 혈관신생지표들 간의 상관 관계 분석하고 상관계수를 비교함.
- 5) 대조군과 환자군 간 13종의 혈관신생지표들의 농도 차이가 있는지 비교함.
- 6) 진단적 표지자로서의 유용성 평가를 위해 ROC curve 분석 시행함.
- 7) 대조군과 환자군의 유전자 다형성 빈도가 차이가 있는지 검증함.
- 8) 환자군의 주요 임상양상에 따라 혈관신생지표 농도의 차이가 있는지 비교 분석 시행
- 9) 치료 전 혈관신생지표의 농도와 치료 반응 간의 관련이 있는지 분석
- 10) 치료 경과에 따른 혈관신생지표의 변화가 유의한지 분석
- 11) 혈관신생지표의 농도에 따른 전체 생존율 및 무진행 생존율 차이가 있는지 분석
- 12) IPI 의 지표 중 하나인 LDH 대신 plasma VEGF, serum IL-6를 고려하여 분석하여 기존 IPI와 비교
- 13) 10개의 림프종 세포주에서 VEGF 와 VEGF receptor, IL-6, IL-6 receptor 발현을 확인
- 14) 세포 증식 및 항암제 처리 후 세포 생존능에 미치는 VEGF-A, IL-6의 영향
- 15) 림프종 세포주에서 IL-6와 VEGF-A의 상호 작용

<연구결과>

- 혈관신생지표의 참고 범위를 설정하고 연령 및 성별에 따른 차이가 있는지 검증함.
- 유전자형에 따른 측정 농도의 차이는 VEGF -1154를 제외하고는 뚜렷하지 않았음.
- 대조군에서 같은 종류의 혈관신생지표의 검체 별 상관관계를 평가한 결과 VEGF, HGF는 혈청과 혈장의 지표들 간 상관관계수가 높았으나 bFGF는 낮았음. 혈장과 요 지표는 대부분 상관 계수가 낮았으며 VEGF와 circulating VEGF-receptor 역시 유의한 상관관계수가 관찰되지 않았음. (Table 4). 상관계수를 환자군에서 분석한 결과 대조군에 비해 환자군에서 상

호 유의한 상관지표를 보이는 빈도가 높았음.

- 대조군과 치료 전 환자군의 혈액 혈관신생관련지표를 비교한 결과 5개의 지표에서 유의한 차이가 관찰됨. serum and plasma VEGF 와 serum IL-6, urine IL-8, plasma bFGF,는 환자군에서 통계적으로 유의하게 높은 결과를 보였으며, serum VEGFR2 은 환자군에서 통계적으로 유의하게 낮은 결과를 보임. ROC curve를 분석한 결과 혈청 IL-6 (0.8616), 혈장 VEGF (0.8456), 요 IL-8/Cr (0.8291) 이 수위였음. 이들 지표는 현재 임상에서 이용되고 있는 LDH (0.6879) 에 비해 모두 우수하였음.

- 대조군과 환자군의 genotype 빈도는 유의한 차이가 관찰되지 않았음.

- Plasma VEGF, serum IL-6는 병기 증가에 따라 증가하고 림프절 외 침범 이 있을 경우 높은 농도를 보임. IPI에 따른 농도를 비교한 결과 serum IL-6과 urine IL-6는 IPI가 높은 군에서 높은 농도로 관찰됨. Plasma VEGF 의 치료 전 농도가 non-responder에서 유의하게 높은 것으로 관찰됨.

- 치료 전 baseline, 처음 follow-up (3-4 주), clinical response 평가일 (6-8 주) 3회에 걸쳐 plasma VEGF, serum IL-6를 측정하여 임상 양상에 따라 농도의 차이가 있는지 검증한 결과 CR인 환자군에서만 serum IL-6의 baseline과 2nd follow-up 수치가 유의한 차이를 보이는 것을 확인함 (baseline-1st follow-up; P=0.066, baseline-2nd follow-up; P=0.003). Baseline과 1st follow-up 수치는 통계적으로 유의하지 않아 조기에 반응을 예측하는 지표로는 적절하지 않은 것으로 판단됨. Plasma VEGF는 임상 반응군에서 통계적으로 유의한 결과를 보이지 않아 치료에 대한 반응 평가에 있어서는 serum IL-6가 더 유용한 지표로 보임.

- Serum IL-6와 plasma VEGF의 median 값을 기준으로 log rank test 시행한 결과 serum IL-6 (P=0.109), plasma VEGF(P=0.632) 모두 유의한 차이가 관찰되지는 않았으나 Kaplan-Meier graph에서 serum IL-6가 plasma VEGF 보다는 survival과 관련성이 높은 것으로 보임. Progression free survival 에 대해 유사한 결과를 보임.

- IPI의 구성 요소인 LDH와 plasma VEGF, serum IL-6를 비교한 결과 serum IL-6가 LDH에 비해 예후와의 관련성이 높음. Serum IL-6를 참고범위인 8.6 pg/mL를 기준으로 LDH 대신 고려한 IPI-IL-6 점수를 계산하여 HR을 고려한 결과 HR=3.44 (95% CI: 1.11-10.70, P=0.033)으로 IPI 의 HR=4.37 (95% CI:1.41-13.59, P=0.011)보다는 낮은 것으로 관찰됨.

- 각 림프종 세포주의 VEGF, VEGF-R, IL-6, IL-6-R 발현을 RT-PCR로 관찰한 결과 세포주 별 gene expression의 차이가 있음을 관찰함. Western blotting, flow cytometry 로 protein expression을 관찰한 결과 방법에 따라 expression 차이가 있어 secretion 되고 세포 내 남은 protein expression이 gene expression과 일치하는 않는 것인지, post-transcriptional modification 때문인지 등의 원인을 고려해야 할 것으로 보임.

- IL-6 및 VEGF 처리 후 유의한 cell proliferation의 증가는 관찰되지 않았음. Doxorubicin을 처리한 후 IL-6 및 VEGF-A를 media에 일정 농도로 유지하게 한 후 세포주 생존능을 MTS assay로 확인한 결과 약간의 생존한 세포수가 많으나 통계적으로 유의하지는 않음(P=0.700).

- IL-6 처리후 VEGF-A 발현 증가, VEGF-A 처리 후 IL-6 발현 증가를 관찰. MEK1 inhibitor 처리 시 IL-6 추가에도 VEGF secretion이 증가되지 않음을 확인.

◆ 연구성과

-정량적 성과

구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)
SCI 논문 편수	1/2	50%
IF 합	1.7/6.0	28%
기타 성과		

1) 총연구기간내 목표 연구성으로 기 제출한 값

Clinical chemistry and laboratory medicine (IF:1.725): in press

Cytokine (IF:2.355): submitted

-정성적 성과

NHL 의 혈관신생지표 중 가장 진단적 표지자, 임상적 연관성이 우수한 지표는 plasma VEGF, serum IL-6 이며, survival의 risk factor로서의 유용성은 높지 않으나 현재 사용되고 있는 위험도인 IPI 계산에서 LDH 대신 혈관신생지표를 사용할 수 있음. 세포주 실험을 통해 IL-6, VEGF-A 서로 expression을 증가시킴을 확인.

◆ 참여연구원

(최종연도 참여인원)

성 명	공선영, 엄현석, 윤탁, 박원서, 이도훈, 이혜린
주민등록번호	

Project Summary

Title of Project	Evaluation of angiogenic parameters as prognostic and predictive markers for Non-Hodgkin's Lymphoma
Key Words	Non-Hodgkin's lymphoma, Angiogenic parameter, Predictive marker, Prognostic marker
Project Leader	Kong Sun-Young
<p>◆ Research Purposes <Final Goal></p> <p>-This project is focused to evaluate of angiogenic cytokines as prognostic and predictive markers in Non-Hodgkin's lymphoma (NHL).</p> <p>◆ Research contents and methods</p> <p>-To evaluate circulating angiogenic cytokines were useful markers in NHL, 131 controls and 87 patients with NHL were recruited. Their blood and urine samples were collected and we measured angiogenic cytokines (VEGF, HGF, bFGF, IL-6, IL-8, VEGFR1, VEGFR2) by ELISA. Reference intervals were evaluated using by CLSI guideline (Table 1). Genotyping of angiogenic cytokine polymorphism were performed using TaqMan probe assay. The effect of polymorphism were not apparent on circulating angiogenic cytokine levels. The frequencies of genotype between controls and patients were not different. The concentrations of plasma VEGF, serum IL-6, urine IL-8, and plasma bFGF showed significantly elevated in patients with NHL than those of controls. In ROC curve analysis, serum IL-6 and plasma VEGF were represented useful diagnostic markers. Of many cytokines, plasma VEGF and serum IL-6 showed association with aggressive clinical characteristics such as stage and extra-nodal involvement. The reduction of plasma VEGF were significant only in patients with complete response. Although plasma VEGF and serum IL-6 did not show significant hazard ratio for overall survival and progression free survival, serum IL-6 could be used one of IPI parameter with significance. In malignant lymphoid cell lines, VEGF, IL-6, and their receptors represented different expression on each cell line and both of IL-6 and VEGF were effector on secretion of other cytokine.</p> <p>◆ Outcomes</p> <p>- Publications: 1 [IF: 1.725]: Clinical chemistry and laboratory medicine (in press)</p> <p>- The study represented that plasma VEGF and serum IL-6 were useful diagnostic markers with association of aggressive characteristics of NHL, however, the prognostic effect of circulating VEGF and IL_6 was not apparent.</p> <p>- Both of VEGF-A and IL-6 were effector of In malignant lymphoid cell lineson gene regulation and damage checkpoint by histone methyltransferases in fission yeast might provide insights into understanding the functions of human homologues in carcinogenesis.</p>	

II. 연구사업결과

1. 연구사업의 최종목표

□ 최종연구목표

: 혈관신생지표가 비호지킨 림프종의 예후 예측 및 치료 반응 표지자로서의 사용 가능한지 규명하기 위해 중요한 혈관신생지표인 VEGF, HGF, bFGF, IL-6, IL-8, VEGFR1, VEGFR2를 중심으로 혈액과 요 검체에 대한 분석을 시행하고 이를 환자의 임상 양상과 비교, 예후를 평가하여 예후 인자인지 규명하고 이를 통해 치료의 객관적 지표로 사용하는 것을 최종 목표로 두고 있음.

2. 연구사업의 내용 및 결과

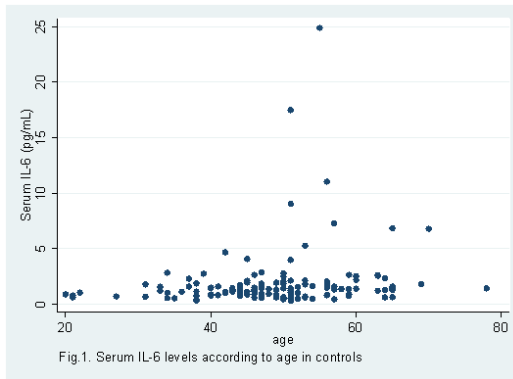
1) 혈관 신생 지표의 참고 범위 설정 (Reference intervals for angiogenic cytokines)

- 7종류의 혈관신생지표 (VEGF, IL-6, IL-8, HGF, bFGF, VEGFR1, VEGFR2)를 혈청, 혈장, 요 검체 중 시약 제조사에서 측정 가능하다고 명시한 검체에서 ELISA로 측정하여, 131명의 대조군에서 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) guideline (C28-A2) 에 따라 계산하여 참고범위를 설정함 (Table 1).

Table 1. Reference intervals for blood and urine angiogenic cytokines

Angiogenic cytokines	Total N=131	Male N=68	Female N=63
VEGF, serum, pg/mL	88.7 - 1048.7	99.1-1014.1	82.8-971.6
VEGF, plasma, pg/mL	3.0 - 84.9	4.5-78.8	2.9-93.6
IL-6, serum, pg/mL	0.4 - 8.6	0.4-9.7	0.4-5.5
IL-6, urine, pg/mL	0.0 - 57.7	0.0-21.8	0.0-73.4
IL-6/Cr, urine, pg/mg Cr	0.0 - 25.2	0.0-8.4	0.0-28.0
IL-8, serum, pg/mL	15.9-430.4	7.54-84.4	17.1-232.8
IL-8, urine, pg/mL	0.0 - 64.8	0.02-3.4	0.01-37.8
IL-8/Cr, urine, pg/mg Cr	0.02-8.4	0.01-3.0	0.07-5.6
HGF, plasma,pg/mL	476.3 - 1624.0	559.1-1642.7	467.2-1267.9
bFGF, plasma, pg/mL	0.0 - 1.0	0.0-1.0	0.0-0.9
bFGF, urine,pg/mL	0.0 - 13.3	0.0-8.2	0.0-15.8
bFGF/Cr, urine, pg/mg Cr	0.0-7.2	0.0-4.9	0.0-9.6
VEGFR1, serum,pg/mL	49.0 - 160.0	51.3-164.7	49.2-154.3
VEGFR2, serum,pg/mL	5129.4 - 10784.2	5882.0-10905.9	4904.9-9837.0

- 대조군은 정중 연령 49세 (20-78세), 남자 68명, 여자 63명임. 대조군에서 연령에 따른 혈관신생지표



의 차이가 있는지 분석한 결과 plasma HGF (< 50 vs. ≥ 50 ; 733 ± 285 vs. 821 ± 260 pg/mL, $P = 0.0026$), serum IL-6 (1.3 ± 0.8 vs. 2.6 ± 4.0 pg/mL, $P = 0.0352$) 가 50세 이상에서 높은 수치를 보이는 것으로 관찰됨. 따라서 serum IL-6의 결과 분석 시 연령을 고려한 분석이 필요할 것으로 판단됨.

- 기존의 논문과 참고치를 비교한 결과 plasma VEGF 농도가 나이가 많아질 때 증가하는 것으로 보고되었으나 (Berrahmoune H et al. Clinical chemistry 2006;52:504-10), 연령-plasma VEGF 의 상관성을 분석한 결과 대조군에서 연령에 따른 차이는 관찰할 수 없었음. 이는 기존 논문이 비교적 큰 규모의 인구를 대상으로 한 연구였으나 정중 연령이 남자 38세, 여자 36세로 주 연령층이 낮아서 생긴 차이일 수 있다고 판단함.

- 대조군에서 성별에 따른 혈관신생지표의 차이가 있는지 분석한 결과 plasma VEGF, IL-8, serum VEGFR2에서 성별에 따른 유의한 차이가 관찰됨. IL-8는 serum, urine 검체 모두에서 차이를 보였으나 기존에 이에 대한 보고가 없었고 이론적 근거가 명확하지 않은 상태임.

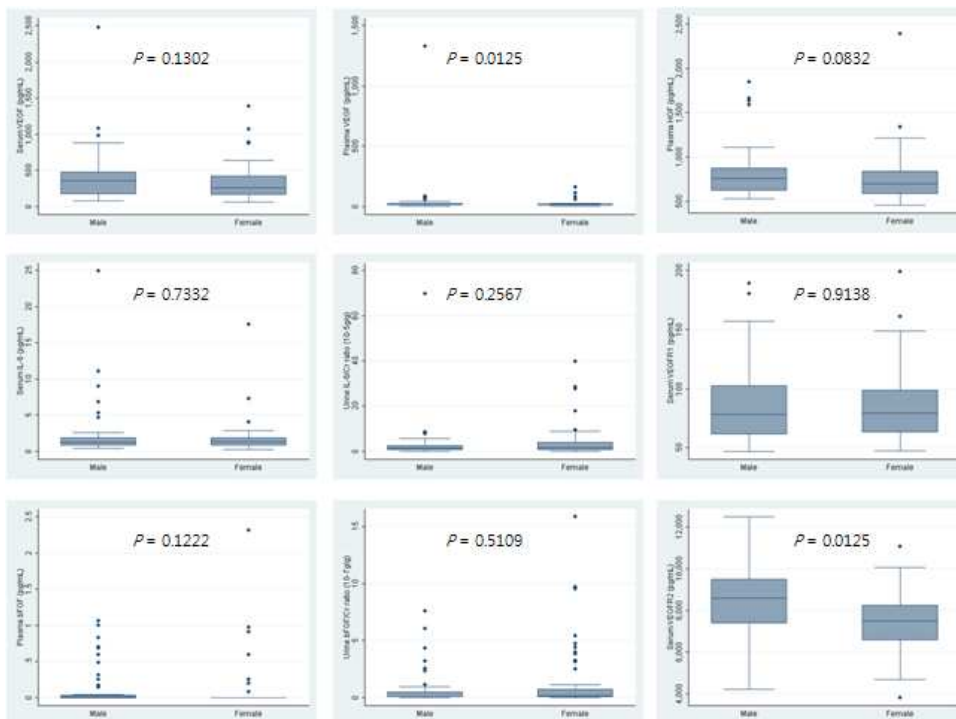


Fig.2. Box-whisker plots of angiogenic cytokine in normal controls according to sex.

2) 대조군에서 혈관신생지표의 유전자 다형성과 혈액 농도와의 관련성 (Association between genotype and concentration of angiogenic cytokines in controls)

- 혈관신생지표 중 유전자다형성과 혈액의 측정값이 관련 있다고 보고된 바 있는 functional

polymorphism을 문헌 고찰하여 유전자다형성과의 관련성을 관찰함. 총 14개의 유전자 다형성을 Taqman MGF probe를 이용하여 fluorogenic 5' nuclease assay를 이용하여 131명의 대조군에서 관찰함.

- 각각의 유전자다형성과 circulating angiogenic cytokine의 농도와의 관련성을 Kruskal-Wallis test를 이용하여 분석함. 유전자 다형성의 빈도가 정상적인지 검증하기 위해 Hardy-Weinberg equation을 따르는지 chi-square test를 이용하여 검정하였음.

- 분석결과 유전자형 빈도는 Hardy-Weinberg equation을 따르는 것으로 관찰되었고 IL-6의 -174, -598 부위는 homozygote만 관찰되어 population의 minor allele frequency가 1% 미만일 것으로 예상되어, 향후 IL-6 SNP 연구에서 MAF 빈도를 고려하여 연구할 때 제외해도 될 것으로 판단됨(Table 2).

Table 2. Frequencies of functional polymorphism in genes encoding angiogenic cytokines

Gene	rs no.	Position	Genotype	Controls (%)	P value
<i>VEGF</i>	rs699947	-2578	CC	70 (53.4)	0.73
			CA	49 (37.4)	
			AA	12 (9.2)	
	rs833061	-1498	TT	70 (53.4)	0.73
			TC	49 (37.4)	
			CC	12 (9.2)	
	rs1570360	-1154	GG	90 (68.7)	0.57
			GA	35 (26.7)	
			AA	6 (4.6)	
	rs2010963	-634	GG	40 (30.5)	0.99
			GC	65 (49.6)	
			CC	26 (19.9)	
rs3025039	936	CC	83 (63.4)	0.82	
		CT	44 (33.6)		
		TT	4 (3.1)		
<i>HGF</i>	rs2286194	Intron 8	TT	87 (66.4)	0.97
			TA	40 (30.5)	
			AA	4 (3.1)	
rs2074725	Intron 13	CC	91 (69.5)	0.67	
		CA	38 (29.0)		
		AA	2 (1.5)		
<i>bFGF</i>	rs1449683	CC	95 (72.5)	0.82	
		CT	32 (24.4)		
		TT	4 (3.0)		
<i>IL-6</i>	rs1800796	-634	CC	68 (51.9)	0.58
			CG	56 (42.8)	
			GG	7 (5.3)	
	rs1800797	-598	GG	131 (100.0)	Not reached.
	rs1800795	-174	GG	131 (100.0)	Not reached.

The P values for the Hardy Weinberg Equilibrium (HWE) were calculated using the chi-square test.

- *VEGF* SNP 결과를 토대로 PHASE program으로 haplotype을 분석한 결과 빈도가 5% 이상으로 분류되는 haplotype은 총 6개로 관찰됨. Ht1: CTGCC at -2578/-1498/-1154/-634/+936 locus

(36.6%), Ht2: CTGGC (26.3%), Ht3: ACAGC (11.5%), Ht4: CTGCT (7.3%), Ht5: ACGGT (5.7%), Ht6: ACAGT (5.7%). *VEGF* 유전자의 promoter와 5'UTR 부분 중 -2578 에서 -1498 region 까지는 complete linkage disequilibrium (correlation coefficient, $r^2 = 1.0$; Lewontin's D' , $D' = 1.0$)로 관찰됨. -2578에서 -1154까지는 complete LD는 아니지만 strong linkage disequilibrium ($r^2 = 0.495$; $D' = 0.935$)를 보기도 Haploview analysis에서 single block으로 관찰됨 (Fig.3.)

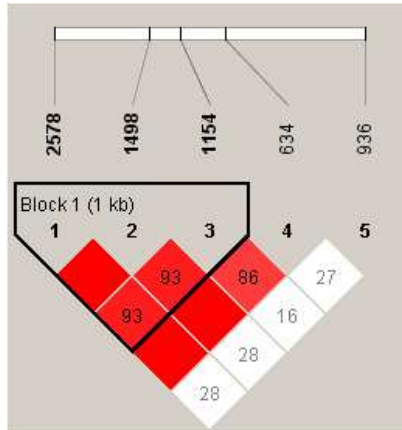


Fig.3. The linkage disequilibrium (LD) pattern for *VEGF* gene in 131 controls Haplotype block structure, as depicted by Haploview, is shown. The numbers in box indicate pair-wise D' value and the box shading change (red to white) according to increasing D' .

- *HGF* SNP 결과를 토대로 haplotyp을 분석한 결과 intron 8 (rs2286194) 과 intron 13 (rs207425) 에 대해 TA (77.5%), TC (18.9%), AC (3.6%) 빈도를 보였고 D' 값은 높지만 r^2 는 0.043 으로 낮고 block 은 형성되지 않는 양상임.
- 유전자형에 따른 측정 농도의 차이는 *VEGF* -1154를 제외하고는 뚜렷하지 않았으며 AA genotype 빈도가 낮고 outlier로 판단할 수 있는 값이 있어 유의한 결과라고 보기 어려움 (Table 3 and Fig.4.).

Table 3. The levels of angiogenic cytokines according to polymorphism in controls

Gene	SNP site	Angiogenic Cytokines	Major homozygote	Heterozygote	minor homozygote	<i>P</i>
<i>VEGF</i>	-2578	Plasma <i>VEGF</i> (pg/mL)	127.35±378.01	23.54±29.36	18.31±14.30	0.66
		Serum <i>VEGF</i> (pg/mL)	558.74±627.51	340.23±212.96	347.85±269.71	0.22
	-1498	Plasma <i>VEGF</i> (pg/mL)	127.35±378.01	23.54±29.36	18.31±14.30	0.66
		Serum <i>VEGF</i> (pg/mL)	558.74±627.51	340.23±212.96	347.85±269.71	0.22
	-1154	Plasma <i>VEGF</i> (pg/mL)	238.53±533.54	23.38±29.66	19.04±17.15	0.53
		Serum <i>VEGF</i> (pg/mL)	819.52±822.92	320.13±202.62	351.15±257.90	0.05
-634	Plasma <i>VEGF</i> (pg/mL)	50.76±207.65	23.05±25.79	16.72±11.77	0.62	
	Serum <i>VEGF</i> (pg/mL)	377.99±419.82	358.14±228.21	358.76±269.14	0.63	
936	Plasma <i>VEGF</i> (pg/mL)	20.03±22.43	51.33±197.75	10.57±4.94	0.29	
	Serum <i>VEGF</i> (pg/mL)	361.98±261.75	374.36±384.83	302.49±86.57	0.99	
<i>HGF</i>	intron13	Plasma <i>HGF</i> (pg/mL)	772.05±290.98	793.62±241.25	661.98±148.67	0.36
	intron8	Plasma <i>HGF</i> (pg/mL)	759.19±238.04	811.42±348.30	807.92±224.90	0.78
<i>bFGF</i>		Plasma <i>bFGF</i> (pg/mL)	0.09±0.31	0.13±0.31	0.01±0.02	0.96
		Urine <i>bFGF</i> (pg/mL)	1.34±3.23	2.10±5.74	3.39±5.04	0.14
		Urine <i>bFGF</i> /Cr	0.76±1.63	0.93±2.06	4.26±7.74	0.39

IL-6	-634	Serum IL-6 (pg/mL)	2.04±3.51	1.91±2.23	1.38±0.59	0.55
		Urine IL-6 (pg/mL)	7.48±15.69	7.13±16.07	8.71±9.64	0.28
		Urine IL-6/Cr	3.71±9.03	3.04±6.76	3.06±3.12	0.30

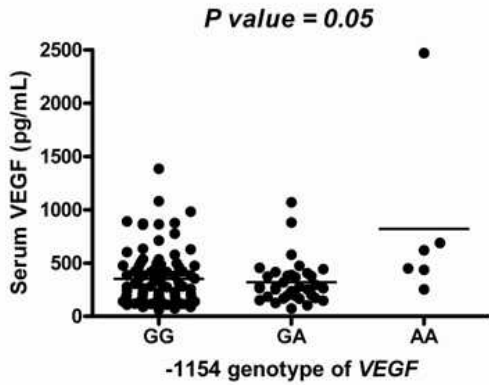


Fig.4. Serum VEGF concentration according to -1154 genotype of VEGF gene.

3) 대조군에서 혈관 신생 지표의 상관성 (Correlations between angiogenic cytokines in controls)

- 대조군에서 같은 종류의 혈관신생지표의 검체 별 상관관계를 평가한 결과 혈청과 혈장 VEGF는 상관계수 $r=0.68$ ($p<0.001$)로 높았고, HGF 역시 혈청과 혈장에서 $r=0.69$ ($p<0.001$)로 높은 상관계수가 관찰됨. 혈청과 혈장 bFGF는 $r=0.38$ ($p=0.005$)로 VEGF와 HGF에 비해 낮은 상관계수가 관찰됨. 혈청과 혈장 두 가지 검체로 측정했던 VEGF는 혈장과 비교해 혈청에서 약 10배 높은 수치가 관찰되었으며 이는 기존의 보고된 바와 같이 혈청에는 혈소판의 활성화 (activation) 시 생성된 VEGF가 포함되기 때문일 가능성이 높음.

- 혈청과 요의 지표는 IL-6는 $r=0.06$ ($p=0.52$), IL-8은 $r=-0.09$ ($p=0.30$), 혈장 bFGF는 요bFGF와 $r=-0.03$ ($p=0.75$)로 유의한 상관관계는 관찰되지 않았음. 요 분비량을 고려하여 Cr으로 보정한 요 지표와 혈액지표의 상관관계 역시 IL-6, bFGF, IL-8에서 $r=0.10$ ($p=0.26$), $r=-0.01$ ($p=0.88$), $r=-0.05$ ($p=0.55$)로 유의한 관계가 관찰되지 않았음. 따라서, 혈청과 요의 혈관 신생 지표는 각각 임상적 의미가 다를 수 있다고 보임.

- 대조군의 혈액 내 VEGF와 circulating VEGF-receptor와의 상관관계를 확인한 결과 유의한 상관계수가 관찰되지 않았음. 유의한 상관관계를 보인 지표들은 plasma, serum VEGF와 serum IL-8, plasma HGF와 serum IL-6, serum HGF와 serum VEGFR1 임 (Table 4).

- 혈관신생지표가 검체에 따라 영향을 받는지 확인하기 위해 대조군의 백혈구, 적혈구, 혈소판 수치와 각 혈관신생지표와의 연관성을 분석한 결과 대조군에서 백혈구 수치와 관련성이 있는 혈관신생지표는 혈청 VEGF, 혈장 HGF, 혈청 HGF 였고 상관계수는 각각 $r=0.28$ ($p=0.002$), $r=0.38$ ($p<0.001$), $r=0.50$ ($p<0.001$)로 높지 않았음. ANC (absolute neutrophil count)와의 관련성을 평가한 결과 상관계수는 각각 $r=0.29$ ($p<0.001$), $r=0.33$ ($p<0.001$), $r=0.50$ ($p<0.001$)로 전체 백혈구 수치와 비슷한 결과가 관찰됨. 적혈구 및 혈소판 수치와 혈관신생지표와는 유의한 상관관계가 관찰되지 않아 혈소판 활성화가 혈소판 수치와 직접 상관관계가 있는 것은 아닐 수 있음을 시사하는 소견을 보임.

Table 4. Correlation coefficient between angiogenic cytokines in controls

	Plasma VEGF	Serum VEGF	Plasma HGF	Serum HGF	Serum IL-6	Serum bFGF	Plasma bFGF	Serum IL-8	Serum VEGFR1	Serum VEGFR2
Serum VEGF	0.6809									
Plasma HGF	0.0114	0.0839								
Serum HGF	0.1074	0.0938	0.6851							
Serum IL-6	0.0311	0.2139	0.4244	0.5642						
Serum bFGF	0.0269	0.2474	-0.1047	-0.0462	0.0156					
Plasma bFGF	-0.0248	-0.0343	0.2123	0.1637	0.1272	0.3769				
Serum IL-8	0.3241	0.3081	0.0700	0.1399	0.1190	0.4004	-0.0876			
Serum VEGFR1	0.0512	0.0839	0.2851	0.4345	0.1551	0.0043	-0.0088	0.0331		
Serum VEGFR2	0.1059	0.1548	-0.0832	-0.0480	-0.0205	-0.1444	-0.1129	0.1199	0.0243	

4) 환자군의 임상 양상 (Clinical characteristics of patients with NHL)

- 환자군은 정중 연령 57세 (25-80세) 로 male (62%)이 많고 histologic type은 B-cell이 많았으며 B-cell type의 lymphoma 중 66명 (88%)가 diffuse large B cell lymphoma로 가장 많았음. Stage는 II가 가장 많았고, IPI 는 4를 제외하고는 고른 분포를 보였음.

Table 5. Clinical characteristics of 87 patients with non-Hodgkin's lymphoma (NHL)

	No. of Patients (%)		No. of Patients (%)
Age (median, range)	57, 25-80	Extranodal involvement	
Sex		absent	51 (58.62)
Male	54 (62.07)	present	36 (41.38)
Female	33 (37.93)	IPI	
Histologic type		0	23 (26.44)
B cell	75 (86.21)	1	24 (27.59)
T-cell	12 (13.79)	2	22 (25.29)
ECOG		3	14 (16.09)
0	35 (40.23)	4	4 (4.60)
1	49 (56.32)	BM involvement	
2	3 (3.45)	absent	82 (96.47)
Stage		present	3 (3.53)
I	15 (17.24)	Therapeutic regimen	
II	40 (45.98)	R-CHOP	76 (87.36)
III	17 (19.54)	CHOP	5 (5.75)
IV	15 (17.24)	Others	6 (6.90)

5) 대조군과 환자군의 혈관 신생 지표 비교 (Angiogenic cytokines between controls and patients with NHL)

- 대조군과 치료 전 환자군의 혈액 혈관신생관련지표를 Mann-Whitney U test 비교한 결과 5개의 지표에서 유의한 차이가 관찰됨. serum and plasma VEGF 와 serum IL-6, urine IL-8, plasma bFGF,는 환자군에서 통계적으로 유의하게 높은 결과를 보였으며, serum VEGFR2 은 환자군에서 통계적으로 유의하게 낮은 결과를 보임.

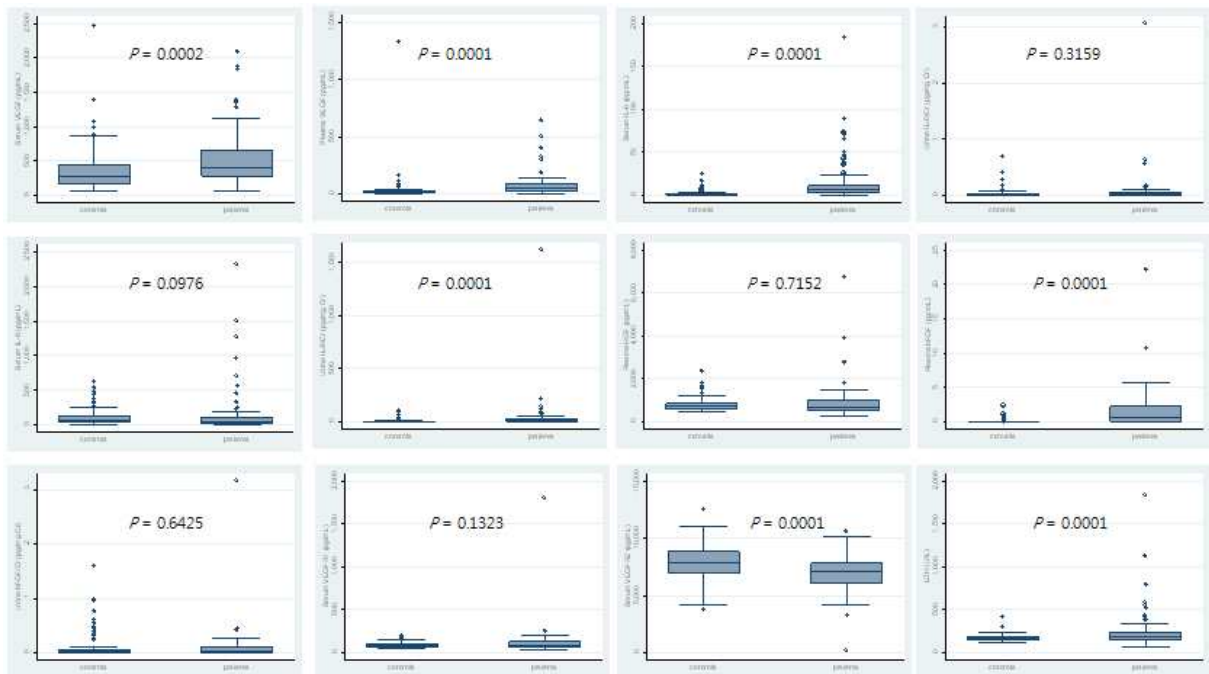


Fig.5. Box-whisker plots of angiogenic cytokine in controls and patients with NHL.

6) 혈관신생지표의 진단적 표지자로서의 유용성 평가를 위한 ROC 분석 (ROC analysis of angiogenic cytokines)

- ROC (receiver operating characteristics) curve를 분석한 결과 대조군과 환자의 감별진단에 유용한 지표는 혈장 및 혈청 VEGF, 혈청 IL-6, 요 IL-8, 혈장 bFGF, 혈청 VEGFR2 임. ROC 분석에서 얻은 AUC (area under the curve)순위는 혈청 IL-6 (0.8616), 혈장 VEGF (0.8456), 요 IL-8/Cr (0.8291) 이 수위였음. 이들 지표는 현재 임상에서 이용되고 있는 LDH (0.6879) 에 비해 모두 우수하였음. 따라서, IPI의 한 지표인 LDH 대신 이들 지표를 이용한 IPI를 계산하여 이용하는 것을 고려할 수 있다고 판단하여 예후 예측에서 평가함.

- ROC 분석에서 sensitivity, specificity가 각각 90%인 cutoff 수치를 확인함. 혈청 IL-6는 cutoff level 1.4 pg/mL에서 sensitivity 90%, specificity 56% 이고 2.7 pg/mL 에서 sensitivity 76%, specificity 90%를 보임. 혈장 VEGF는 cutoff 19.01 pg/mL에서 sensitivity 90%, specificity 63%이고 36.3 pg/mL에서 sensitivity 59%, specificity 90% 임.

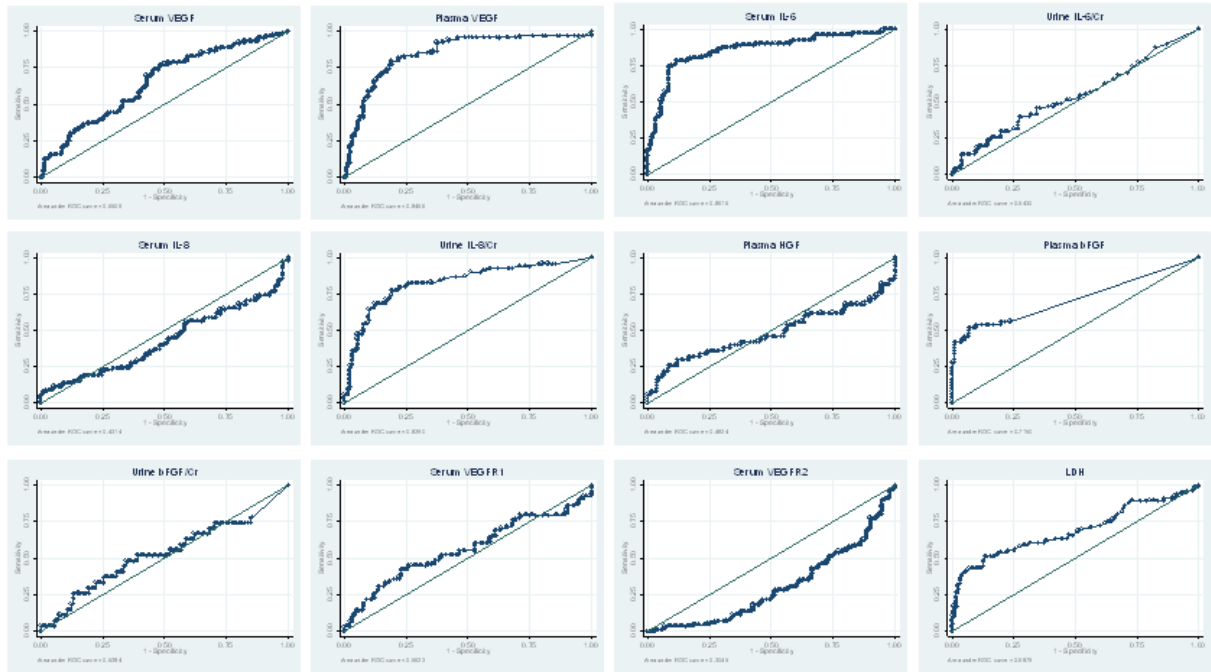


Fig.6. ROC curves of angiogenic cytokines.

7) 환자군에서 혈관 신생 지표의 상관성 (Correlations between angiogenic cytokines in patients with NHL)

- 혈관생성지표간의 상관관계를 상관계수 (correlation coefficients)를 환자군에서 분석한 결과 대조군에 비해 환자군에서 상호 유의한 상관지표를 보이는 빈도가 높았음. 이는 혈관신생지표가 림프종에서의 직접 분비 혹은 간접 분비에 의해 증가했음을 시사하는 소견임.

Table 6. Correlation coefficients between angiogenic cytokines in patients with NHL

	Plasma VEGF	Serum VEGF	Plasma HGF	Serum IL-6	Plasma bFGF	Serum IL-8	Serum VEGFR1
Serum VEGF	0.51						
Plasma HGF	0.01	0.30					
Serum IL-6	0.40	0.57	0.12				
Plasma bFGF	0.02	0.13	0.11	-0.13			
Serum IL-8	-0.06	0.31	-0.06	0.23	-0.15		
Serum VEGFR1	0.06	0.23	0.84	0.14	0.12	0.01	
Serum VEGFR2	-0.17	-0.05	-0.24	-0.07	0.03	0.18	-0.16

- 특히, 혈장 및 혈청 VEGF와 혈청 IL-6가 대조군에서는 $r=0.03$, $r=0.21$ 로 낮은 상관 계수를 보였으나 환자군에서는 $r=0.40$, $r=0.57$ 로 상관 계수가 증가된 양상으로 NHL 환자에서 VEGF-IL-6 분비가 관련성이 있음을 보임.

8) 대조군과 환자군의 혈관신생지표의 유전자 다형성의 빈도 (Genotype frequencies of the angiogenic cytokine functional polymorphism in NHL patients and controls)

Table 7. Genotype frequencies of the angiogenic cytokine polymorphism in controls and NHL patients

Gene	SNP site	Genotype	Controls	Patients	<i>P</i>	
VEGF	-2578	AA	12 (9.16)	10 (12.99)	0.685	
		CA	49 (37.40)	28 (36.36)		
		CC	70 (53.44)	39 (50.65)		
	-1498	CC	12 (9.16)	10 (12.99)	0.685	
		CT	49 (37.40)	28 (36.36)		
		TT	70 (53.44)	39 (50.65)		
	-1154	AA	6 (4.58)	3 (3.90)	0.940	
		GA	35 (26.72)	22 (28.57)		
		GG	90 (68.70)	52 (67.53)		
	-634	CC	26 (19.25)	11 (14.29)	0.241	
		GC	65 (49.62)	34 (44.16)		
		GG	40 (30.53)	32 (41.56)		
	HGF	936	CC	83 (63.36)	51 (66.23)	0.599
			CT	44 (33.59)	22 (28.57)	
			TT	4 (3.05)	4 (5.19)	
intron13		AA	2 (1.53)	1 (1.30)	0.782	
		CA	38 (29.01)	19 (24.68)		
		CC	91 (69.47)	57 (74.03)		
bFGF	intron8	AA	4 (3.05)	1 (1.30)	0.614	
		TA	40 (30.53)	21 (27.27)		
		TT	87 (66.41)	55 (71.43)		
IL-6	-634	CC	95 (72.52)	62 (80.52)	0.193	
		CT	32 (24.43)	15 (19.48)		
		TT	4 (3.05)	0 (0.00)		
IL-6	-634	CC	68 (51.91)	44 (55.70)	0.782	
		CG	56 (42.75)	30 (37.97)		
		GG	7 (5.34)	5 (6.33)		
	-598	GG	131 (100.00)	77 (100.00)		
-174	GG	131 (100.00)	77 (100.00)			

- 대조군과 환자군의 유전자 다형성의 genotype 빈도는 유의하지 않았음.

9) 혈관신생지표와 임상적 지표의 관련성 분석 (Association between angiogenic cytokines and clinical variables)

- 환자군의 임상 성상에 따라 치료 전 혈관신생지표의 농도가 유의한 차이를 보이는지 Mann-Whitney U test 또는 Kruskal-Wallis test로 검증함.
- 성별에 따른 차이가 있는지 확인한 결과 대조군과 마찬가지로 urine IL-8가 여성에서 높게 관

찰됨. 그 외 다른 지표는 성별에 따른 차이가 유의하지 않았음.

Table 8. The concentrations (mean±SD) of angiogenic cytokines according to sex in patients with NHL

Sex	Male N=54	Female N=33	<i>P</i> value
VEGF, serum, pg/mL	573.16±443.19	487.44±364.64	0.208
VEGF, plasma, pg/mL	82.56±122.63	58.68±40.07	0.753
IL-6, serum, pg/mL	14.84±21.77	16.32±34.77	0.669
IL-6/Cr, urine, pg/mg Cr	4.2±9.9	17.4±59.88	0.193
IL-8, serum, pg/mL	186.05±413.08	118.53±244.54	0.655
IL-8/Cr, urine, pg/mg Cr	0.16±0.17	1.03±3.12	0.012
HGF, plasma, pg/mL	1141.04±1238.03	699.13±318.40	0.243
bFGF, plasma, pg/mL	1.80±4.26	1.73±1.69	0.155
bFGF/Cr, urine, pg/mg Cr	0.93±1.53	3.65±9.83	0.364
VEGFR1, serum, pg/mL	134.82±249.28	89.51±38.20	0.424
VEGFR2, serum, pg/mL	6950.60±1414.51	6750.20±1646.11	0.807

- 세포 type (B 세포 계열 vs. T 세포 계열)에 따른 혈관신생지표의 차이는 유의하지 않았음.

Table 9. The concentrations (mean±SD) of angiogenic factors according to cell types of lymphoma

Cell type	B-cell N=75	T-cell N=12	<i>P</i> value
VEGF, serum, pg/mL	563.12±424.30	400.20±332.83	0.176
VEGF, plasma, pg/mL	79.35±106.10	36.94±27.74	0.098
IL-6, serum, pg/mL	16.52±29.10	9.01±11.18	0.926
IL-6/Cr, urine, pg/mg Cr	10.02±41.43	5.13±4.65	0.121
IL-8, serum, pg/mL	134.59±318.59	301.61±522.05	0.955
IL-8/Cr, urine, pg/mg Cr	0.53±2.13	0.28±0.39	0.862
HGF, plasma, pg/mL	988.97±1093.40	999.09±793.61	0.930
bFGF, plasma, pg/mL	1.82±3.86	1.58±1.91	0.772
bFGF/Cr, urine, pg/mg Cr	2.13±6.56	0.87±1.10	0.410
VEGFR1, serum, pg/mL	123.29±215.41	87.79±38.40	0.551
VEGFR2, serum, pg/mL	6947.63±1453.65	7083.55±1826.76	0.514

- Plasma VEGF, serum IL-6는 병기 증가에 따라 유의하게 증가하는 양상이 관찰됨.

Table 10. The concentrations (mean±SD) of angiogenic cytokines according to stage

Stage	I N=15	II N=40	III N=17	IV N=15	<i>P</i>
VEGF, serum, pg/mL	354.53±193.91	478.75±318.73	693.65±516.04	718.42±568.29	0.079
VEGF, plasma, pg/mL	38.81±35.66	50.90±35.06	62.26±31.88	181.19±200.63	0.007
IL-6, serum, pg/mL	11.84±20.57	8.72±13.65	25.73±46.57	23.76±27.31	0.030
IL-6/Cr, urine, pg/mg Cr	4.75±5.92	11.55±53.79	7.32±15.24	8.92±16.65	0.041
IL-8, serum, pg/mL	282.58±497.28	99.74±179.15	275.08±593.14	76.93±115.95	0.761
IL-8/Cr, urine, pg/mg Cr	0.20±0.41	0.77±2.84	0.31±0.28	0.23±0.17	0.163
HGF, plasma, pg/mL	812.43±888.06	882.06±735.53	1481.06±1783.40	808.15±350.42	0.069
bFGF, plasma, pg/mL	0.19±0.49	2.34±4.91	2.01±1.91	1.29±1.90	0.078
bFGF/Cr, urine, pg/mg Cr	0.11±0.16	0.85±1.27	5.14±10.81	0.16±2.70	0.354
VEGFR1, serum, pg/mL	96.65±45.71	90.47±36.35	210.48±440.54	106.24±61.26	0.834
VEGFR2, serum, pg/mL	6939.88±1755.8	6900.75±1684.8	7102.97±936.53	6513.05±1276.50	0.499
	8	3			

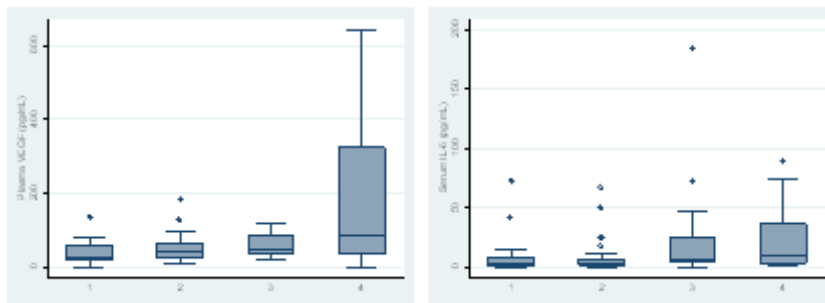


Fig. 7. Plasma VEGF and serum IL-6 levels according to stage.

- plasma VEGF, serum IL-6는 림프절 외 침범 이 있을 경우 높은 농도를 보임.

Table 11. The concentrations (mean±SD) of angiogenic factors according to extranodal involvement

Extranodal involvement	Absent N=51	Present N=36	<i>P</i> value
VEGF, serum, pg/mL	481.82±351.15	623.99±484.72	0.2553
VEGF, plasma, pg/mL	47.85±30.54	109.83±144.66	0.024
IL-6, serum, pg/mL	12.16±29.47	19.89±23.62	0.008
IL-6/Cr, urine, pg/mg Cr	9.94±47.51	8.05±15.21	0.043
IL-8, serum, pg/mL	182.68±412.57	129.60±268.48	0.737
IL-8/Cr, urine, pg/mg Cr	0.66±2.51	0.24±0.25	0.922
HGF, plasma, pg/mL	967.65±742.22	1028.54±1419.90	0.418
bFGF, plasma, pg/mL	2.15±4.28	1.17±1.91	0.226
bFGF/Cr, urine, pg/mg Cr	0.94±1.41	4.64±11.89	0.436
VEGFR1, serum, pg/mL	90.46±36.37	156.14±303.72	0.282
VEGFR2, serum, pg/mL	6869.04±1605.76	6895.94±1359.76	0.945

- IPI에 따른 angiogenic cytokines의 농도를 비교한 결과 serum IL-6과 urine IL-6는

High/High-intermediate IPI (IPI ≥ 3)에서 Low/Low-intermediate IPI (IPI ≤ 2)에 비해 유의하게 높은 농도가 관찰됨.

Table 12. The concentrations (mean \pm SD) of angiogenic cytokines according to international prognostic index (IPI)

IPI	Low/Low-intermediate N=69	High/High-intermediate N=18	P value
VEGF, serum, pg/mL	515.77 \pm 396.19	636.02 \pm 481.13	0.271
VEGF, plasma, pg/mL	56.82 \pm 55.33	137.45 \pm 181.35	0.070
IL-6, serum, pg/mL	14.51\pm29.02	18.52\pm20.44	0.043
IL-6/Cr, urine, pg/mg Cr	8.40\pm41.43	11.94\pm19.75	0.005
IL-8, serum, pg/mL	184.35 \pm 399.92	76.87 \pm 108.21	0.400
IL-8/Cr, urine, pg/mg Cr	0.54 \pm 2.20	0.29 \pm 0.22	0.070
HGF, plasma, pg/mL	889.96 \pm 690.76	1310.09 \pm 1747.61	0.481
bFGF, plasma, pg/mL	1.74 \pm 3.94	1.88 \pm 2.12	0.213
bFGF/Cr, urine, pg/mg Cr	0.83 \pm 1.22	4.58 \pm 11.01	0.873
VEGFR1, serum, pg/mL	93.69 \pm 37.64	202.69 \pm 415.15	0.623
VEGFR2, serum, pg/mL	7005.60 \pm 1536.41	6399.36 \pm 1280.79	0.068

10) 치료 전 혈관신생지표의 농도와 치료 반응 (Association between angiogenic cytokines at pre treatment and clinical response)

- 치료 반응 평가는 Cheson et al. (Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. J Clin Oncol 1999;17: 1244.) 등이 기술한 바와 같이 complete response (CR), CRu (uncertain), partial response (PR), stable disease (SD), progressive disease (PD) 로 나누어 평가함. 혈관신생지표와의 관련성을 평가할 때는 CRu는 CR로 분류함. 등재된 환자 62명에서 반응을 평가할 수 있었고 CR 51명, PR 4명, SD 1명, PD 6명에서 관찰됨. CR과 PR을 responder로 SD와 PD를 non-responder로 분류하여 통계적 유의성이 있는지 검증함.

- 치료 전 혈관신생지표의 농도와 치료 반응 간의 상관성이 있는지 평가한 결과 plasma VEGF의 치료 전 농도가 non-responder에서 유의하게 높은 것으로 관찰됨.

Table 13. The baseline concentrations (mean \pm SD) of angiogenic cytokines according to response group

Response group	Responser N=55	Non-Responser N=7	P value
VEGF, serum, pg/mL	484.93 \pm 373.19	775.68 \pm 668.75	0.456
VEGF, plasma, pg/mL	49.24\pm47.23	189.93\pm238.96	0.034
IL-6, serum, pg/mL	14.47 \pm 28.47	29.24 \pm 36.68	0.178
IL-6/Cr, urine, pg/mg Cr	2.70 \pm 3.92	4.67 \pm 3.90	0.073
IL-8, serum, pg/mL	156.24 \pm 298.06	56.40 \pm 33.10	0.894

IL-8/Cr, urine, pg/mg Cr	0.29±0.39	0.17±0.23	0.472
HGF, plasma,pg/mL	934.99±1075.59	1146.03±367.84	0.059
bFGF, plasma, pg/mL	1.26±2.05	1.79±2.59	0.559
bFGF/Cr, urine, pg/mg Cr	0.78±1.34	0.34±4.27	0.916
VEGFR1, serum,pg/mL	117.22±233.69	117.15±50.74	0.095
VEGFR2, serum,pg/mL	7063.50±1195.76	6276.11±1658.29	0.171

11) 치료 경과에 따른 혈관신생지표의 변화 (Change of angiogenic cytokine according to clinical response)

- 치료 전 baseline, 처음 follow-up (3-4 주), clinical response 평가일 (6-8 주) 3회에 걸쳐 plasma VEGF, serum IL-6를 측정하여 baseline, 첫 번째 follow-up, response 평가일의 수치가 clinical response 군별로 유의한 차이가 있는지 paired t-test를 이용해 검증함. 검증 결과 CR로 치료 반응을 보인 환자군에서만 serum IL-6의 baseline과 2nd follow-up 수치가 유의한 차이를 보이는 것을 확인함 (baseline-1st follow-up; P=0.066, baseline-2nd follow-up; P=0.003). Baseline 과 1st follow-up 수치는 통계적으로 유의하지 않아 조기에 반응을 예측하는 지표로는 적절하지 않은 것으로 판단됨. Plasma VEGF는 각 임상 반응군에서 통계적으로 유의한 결과를 보이지 않아 치료에 대한 반응 평가에 있어서는 serum IL-6가 더 유용한 지표임.

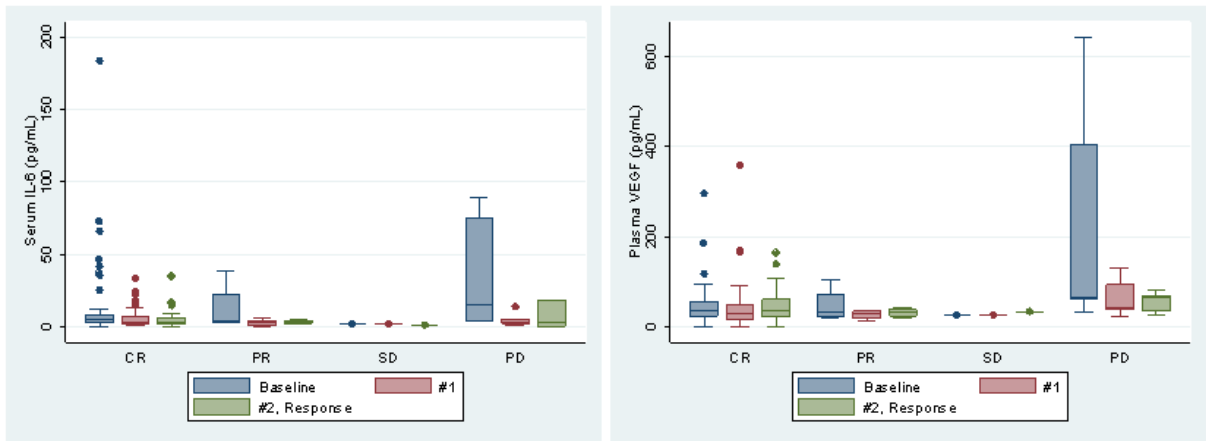


Fig.8. Dynamics of serial concentrations of plasma VEGF and serum IL-6 during therapy according to clinical response.

12) 혈관신생지표의 농도에 따른 생존율 (Prognostic effect of angiogenic cytokines for overall survival and progression free survival)

- Median follow-up은 29개월로 2007-11-30을 기준으로 하여 확인한 결과 사망한 환자는 8명이었음. Clinical characteristics 중 overall survival에 유의한 영향을 주는 factor를 log-rank test로 검증한 결과 T-cell type lymphoma에서 사망이 많았고, IPI와 stage와 관련 있음을 확인함.

Table 14. Clinical characteristics for overall survival from diagnosis in 87 patients with NHL by log-rank test

	Events observed	Events expected	<i>P</i> value		Events observed	Events expected	<i>P</i> value
<i>Sex</i>			<i>0.143</i>	<i>Extranodal involvement</i>			<i>0.158</i>
Male	7	4.99		absent	3	4.93	
Female	1	3.01		present	5	3.07	
<i>Histologic type</i>			<i>0.044</i>	<i>IPI</i>			<i>0.040</i>
B cell	5	6.93		Low/low-intermediate	4	6.34	
T-cell	3	1.07		High/high-intermediate	4	1.66	
<i>ECOG</i>			<i>0.103</i>	<i>Stage</i>			<i>0.005</i>
0	3	3.99		I	0	1.42	
1	4	3.85		II	2	3.72	
2	1	0.16		III	1	1.54	
				IV	5	1.32	

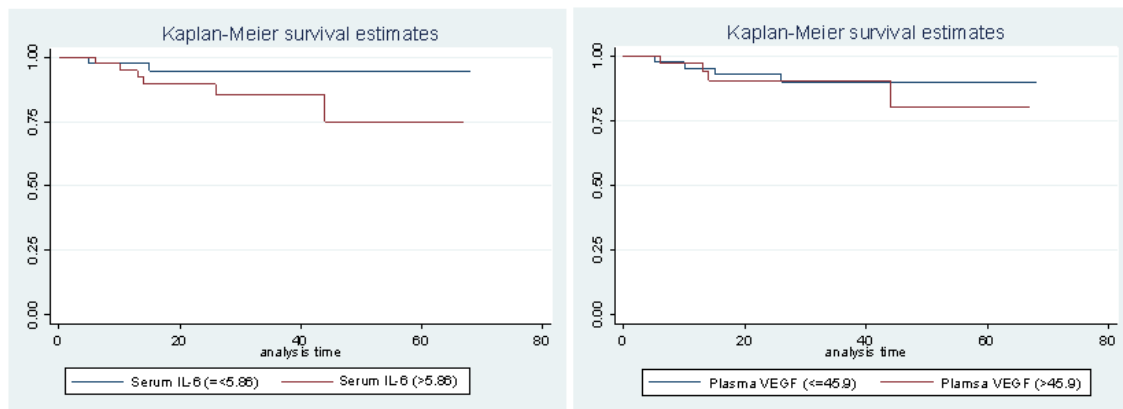


Fig. 9. Overall survival after diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma in patients with each high and low levels of the serum IL-6 and plasma VEGF.

- Serum IL-6와 plasma VEGF의 median 값을 기준으로 log rank test 시행한 결과 serum IL-6 ($P=0.109$), plasma VEGF($P=0.632$) 모두 유의한 차이가 관찰되지는 않았으나 Kaplan-Meier graph에서 serum IL-6가 plasma VEGF 보다는 survival과 관련성이 높은 것으로 보임.
- Progression survival 에 유의한 영향을 주는 clinical characteristics는 overall survival에 영향을 미치는 factor와 동일한 것으로 관찰됨. Serum IL-6와 plasma VEGF 역시 overall survival과 유사한 결과를 보임. Cox proportional regression analysis를 통해 hazard ratio (HR)를 구하면 clinical characteristics 중 IPI가 가장 높은 HR을 보임. IPI를 2개 group으로 분리하여 plasma VEGF, 또는 serum IL-6를 median 값으로 나눈 두 개의 group과 함께 progression free survival에 대한 risk를 고려한 결과 두 factor 모두 HR은 유의하지 않은 것으로 관찰됨.
- IPI의 구성 요소인 LDH와 plasma VEGF, serum IL-6를 비교한 결과 serum IL-6가 LDH에 비해 예후와의 관련성이 높음. 따라서, serum IL-6를 참고범위인 8.6 pg/mL를 기준으로 LDH 대신 고려한 IPI-IL-6 점수를 계산하여 HR을 고려한 결과 HR=3.44 (95% CI: 1.11-10.70, $P=0.033$)으로 IPI의 HR=4.37 (95% CI:1.41-13.59, $P=0.011$)보다는 낮은 것으로 관찰됨.

Table 15. Clinical characteristics for progression free survival from diagnosis in 87 patients with NHL by log-rank test

	Events observed	Events expected	<i>P</i> value		Events observed	Events expected	<i>P</i> value
<i>Sex</i>			<i>0.133</i>	<i>Extranodal involvement</i>			<i>0.392</i>
Male	10	7.48		absent	6	7.44	
Female	1	4.52		present	6	4.56	
<i>Histologic type</i>			<i>0.049</i>	<i>IPI</i>			<i>0.005</i>
B cell	8	10.35		Low/low-intermediate	6	9.76	
T-cell	4	1.65		High/high-intermediate	6	2.24	
<i>ECOG</i>			<i>0.428</i>	<i>Stage</i>			<i>0.007</i>
0	5	5.91		I	0	2.31	
1	6	5.78		II	3	5.88	
2	1	0.31		III	4	2.12	
				IV	5	1.69	

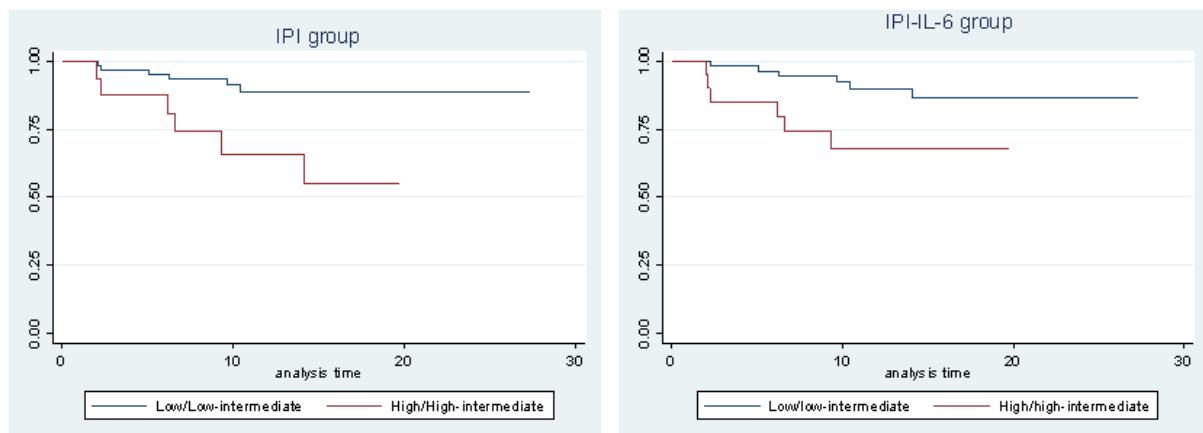


Fig. 10. Progression free survival after diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma in patients with each high and low values of IPI and IPI-IL6.

13) 림프종 세포주 별 VEGF, VEGF receptor, IL-6, IL-6 receptor 발현 확인 (VEGF, VEGF receptor, IL-6, and IL-6 receptor expression in malignant lymphoid cell lines)

- 10개의 림프종 세포주를 배양하여 RT-PCR로 VEGF, VEGF receptor, IL-6의 발현을 관찰함. 림프종 세포주는 염색체 이상과 세포면역표현형을 고려하여 환자에서 관찰될 수 있는 다양한 림프종의 특징을 반영할 수 있는 종류로 선택하였음.

- 각 림프종 세포주의 VEGF-A, B, C, D 및 VEGF-R1, 2, 3, IL-6, IL-6 receptor, NRP-1,2의 발현을 RT-PCR로 관찰한 결과 세포주 별 gene expression의 차이가 있음을 관찰함. VEGF-B는 모든 종류의 세포주에서 발현이 관찰되고 차이가 없었으나 그 외의 ligand 와 receptor는 발현의 차이가 관찰됨.

Table 16. The characteristics of malignant lymphoid cell lines

Designation	Disease	Antigen expression	Cytogenetics
1 RL	NHL	CD10+19+20+DR+Lambda+	T(14;18)
2 Farage	NHL (EBV+)	CD10+/-19+20+DR+	+11
3 Toledo	NHL	CD10+19+20+	
4 Raji	Burkitt lymphoma (EBV+)		Diploid
5 Daudi	Burkitt lymphoma		Diploid
6 BJA-B	B-lymphoblast		
7 Jurkat	T-ALL	CD3+	46,XY,-2,-18,del(2)(p21p23),del(18)(p11.2)
8 Granta519	leukemic mantle cell lymphoma (EBV+)	CD10-19+20+37+80+138+HLA-DR+Lambda+	Diploid, T(11;14)(q13;q32)
9 SU-DHL-4	diffuse large cell cleaved cell type	CD10+19+20+37+80+138-HLA-DR+Kappa+	Hyperdiploid, T(14;18)
10 WSU-NHL	nodular histiocytic lymphoma	CD10+19+20+37+80+138+DR+Lambda+	Hypodiploid, T(14;18)

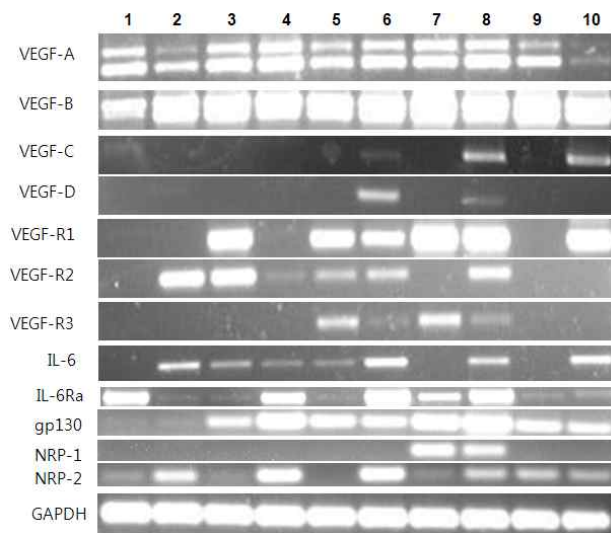


Fig.11. VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3, IL-6, IL-6a, gp130, NRP-1, NRP-2 expression in lymphoma cell lines by RT-PCR. 1. RL 2. Farage 3. Toledo 4. Raji 5. Daudi 6. BJA-B 7. Jurkat 8. Granta519 9. SU-DHL-4 10. WSU-NHL.

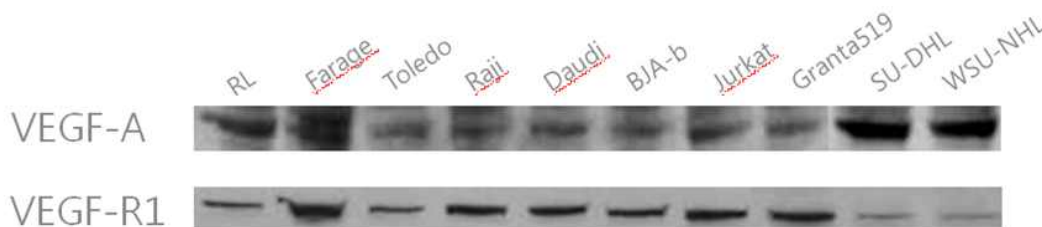


Fig.12. VEGF-A and VEGF-R1 expression in malignant lymphoma cell lines by Western blotting.

- Western blotting으로 VEGF-A, VEGF-R1 단백질 발현을 관찰한 결과 RT-PCR 결과와 expression의 차이가 관찰되었고, Flow cytometry 로 VEGF-A, VEGF-R2에 대한 expression을 추가로 관찰하여 비교한 결과 관찰한 방법에 따라 expression 차이가 있어 secretion 되고 세포 내 남은 protein expression이 gene expression과 일치하는 않는 점, post-transcriptional modification을 고려해야 할 것으로 보임. 추후에 VEGF expression을 RNA에서 관찰할 것인지 protein 으로 관찰할 것인지에 따라 결과가 상이할 수 있음을 시사하는 소견임.

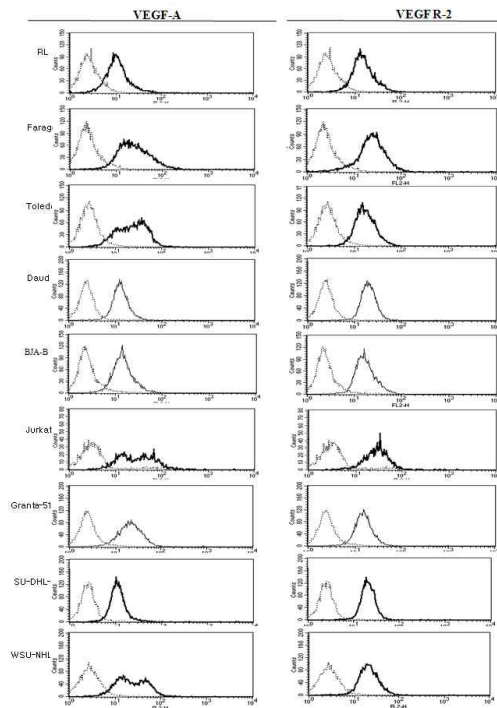


Fig.13. VEGF-A and VEGF-R2 expression in malignant lymphoid cell lines by flow cytometry.

14) 세포 증식 및 항암제 처리 후 세포 생존능에 미치는 VEGF-A, IL-6의 영향 (Effect of VEGF-A and IL-6 on cell proliferation and cell survival after doxorubicin treatment)

- IL-6 및 VEGF의 세포주의 proliferation에 미치는 영향을 확인하기 위해 RL cell line에 media의 final concentration을 VEGF-A 165는 2, 10, 50 ng/mL로, IL-6는 1, 5, 10 ng/mL 농도로 되도록 용해시켜 6h, 24h 후 MTS assay로 cell proliferation을 관찰한 결과 유의한 cell proliferation의 증가는 관찰되지 않았음.

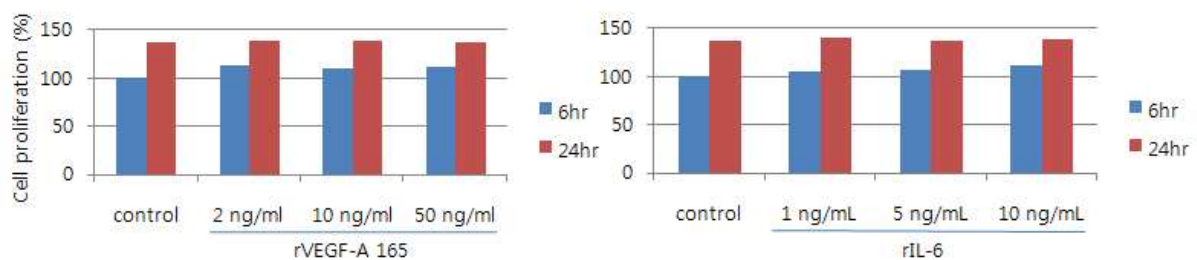


Fig.14. RL cell proliferation after treatment of rVEGF-165 and rIL-6 in culture media by MTS assay.

- VEGF-A, IL-6가 항암제와 반응시킨 세포주에서 세포 생존능에 영향을 미치는지 확인하기 위해 NHL에서 항암제로 사용되는 doxorubicin을 처리한 후 IL-6 및 VEGF-A를 media에 일정 농도로 유지하게 한 후 세포주 생존능을 MTS assay로 확인함. VEGF-A 165는 2, 10 ng/mL로, IL-6는 1, 5 ng/mL 농도로 되도록 처리한 후 doxorubicin 5 ug/mL로 처리하여 24h, 48h 후 MTS assay로 cell proliferation을 관찰한 결과 24시간에는 VEGF, IL-6 처리 시 doxorubicin만 처리한 cell에 비해 약간의 생존한 세포수가 많으나 통계적으로 유의하지는 않음(P=0.700). 48 시

간에는 VEGF 10 ng/mL 처리 시에는 doxorubicin 처리에도 불구하고 cell proliferation이 증가하는 결과를 보임.

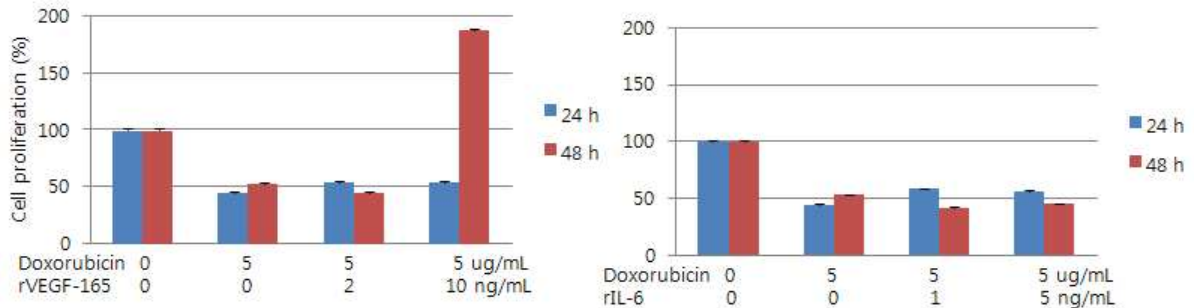


Fig.14. RL cell proliferation after treatment of doxorubicin plus rVEGF-165 or rIL-6 in culture media.

15) 림프종 세포주에서 IL-6와 VEGF-A의 상호 작용 (Interaction of VEGF-A and IL-6 on malignant lymphoid cell lines)

- VEGF-A(0.5, 1, 10 ng/mL)와 doxorubicin을 농도별 (0, 0.5, 1, 5 ug/mL)로 처리해 RL cell line에서 *VEGF-A*, *VEGF-B*, *VEGF-R1*, *VEGF-R2*, *IL-6*, *IL-6R*, *Gp130*의 gene expression을 24시간 후 RT-PCR로 관찰한 결과, VEGF-A 처리 후 IL-6, IL-6R, VEGF-B 발현이 증가함. Doxorubicin 처리 후 VEGF-A 발현은 감소하고 IL-6는 증가 후 doxorubicin 농도가 높아지면 감소하는 양상임. VEGF-R1, VEGF-R2는 VEGF에 의해 발현이 증가하지 않아 autocrine loop의 activation이 뚜렷하지 않음을 확인함.

- IL-6 (0.5, 1, 5 ng/mL)와 doxorubicin을 농도별로 처리해 RL cell에서 gene expression 관찰 결과 IL-6 처리 후 IL-6R, VEGF-A의 발현이 증가함. Doxorubicin 처리 후 IL-6와 IL-6R 발현은 증가하고, VEGF-R1, VEGF-R2는 doxorubicin을 처리 후 발현되며 그 농도가 높아질수록 감소함.

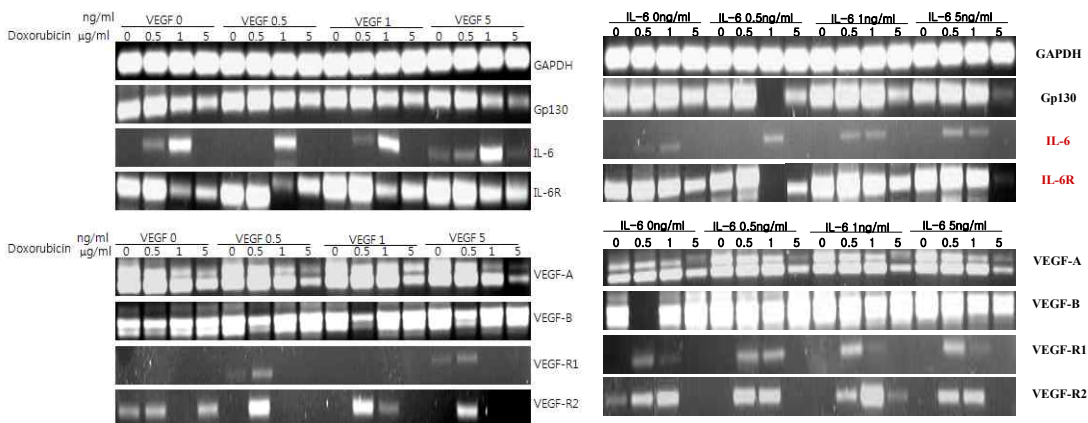


Fig.15. *VEGF-A*, *VEGF-B*, *VEGF-R1*, *VEGF-R2*, *IL-6*, *IL-6R*, *Gp130* expression in lymphoma cell line (RL cell) by RT-PCR after VEGF or IL-6 and doxorubicin treatment.

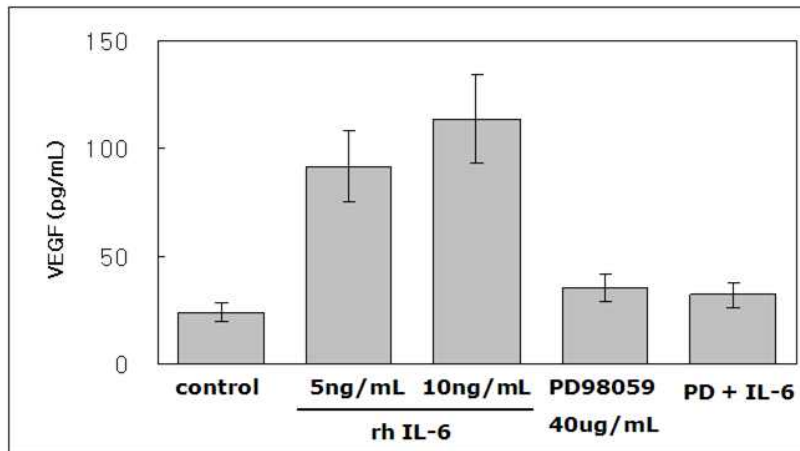


Fig 16. PD98059 inhibition of VEGF secretion by IL-6. Cells were incubated in the presence or absence of PD98059 (40uM) with or without IL-6 (10ng/mL) for 24 h. After the culture period, the conditioned media were collected and VEGF levels were measured by ELISA assay.

- RL cell에서 IL-6가 VEGF stimulation 하는 pathway를 확인하기 위해 MEK1 inhibitor인 PD98059로 처리한 결과 media내로의 VEGF secretion이 감소하는 결과를 확인할 수 있음.

3. 연구결과 고찰 및 결론

□ 대조군의 혈관신생지표

- ① 동일 대조군에서 여러 종류의 혈관신생지표를 측정된 결과는 처음 보고됨 (CCLM, in press). 기존에 보고된 몇 종에 대한 참고 범위와 비교한 결과 VEGF는 본 결과의 참고 범위 상한치가 기존 보고에 비해 높은 것으로 관찰되었는데 이는 이전 연구의 참고치 설정의 대상 population의 나이가 주로 40대까지를 포함하기 때문에 다를 가능성이 있다고 해석하였음.

▶ 향후 혈관신생지표를 측정하여 해석할 때 본 연구 결과를 기초로 사용할 수 있음.

□ 비호지킨성 림프종 환자에서 혈관신생지표

- ① 혈관신생지표는 암의 진행, 예후와 관련 있다고 알려진 지표이며, 비호지킨성 림프종에서 혈관신생지표가 예후와 관련 있다는 보고가 있음. 본 연구에서는 혈액과 요에서 측정 가능한 circulating 혈관신생지표를 측정하여 기존의 논문들과 비교한 결과 예후와 관련된다고 알려진 bFGF, HGF는 plasma, serum 두 검체 모두에서 진단적 표지자로서의 유의성과 임상적 연관성이 높지 않음. VEGF의 경우 어떤 검체를 사용하는 것이 적절한가에 대한 논의가 아직 남아있고 암종별로도 권장되는 검체가 다른데 비호지킨성 림프종의 경우 plasma VEGF가 serum VEGF에 비해 진단적 표지자로서의 유의성과 임상적 연관성이 높다는 장점이 있음을 확인하였음.
- ② 치료 반응을 확인한 환자들 중 CR이었던 환자에서만 plasma VEGF의 감소가 유의한 것으로 나타났다. Serum IL-6는 기존 연구에서 4주 이내 조기에 변화하는 것이 치료 반응과 관련 있다고 보고되었으나 ((Lars MP et al. Ann Hematol,2005;84;510-6) 본 연구에서 plasma VEGF, serum IL-6 모두 3-4주 내에 변화가 유의하지는 않았음. 따라서, 조기 치료 표지자로 사용되기는 어려울 것으로 보임.
- ③ 예후 인자로서 평가를 위해 median 값을 기준으로 serum IL-6, plasma VEGF를 평가한 결과 통계적 유의성은 관찰되지 않았으나 Kaplan-Meier analysis에서 serum IL-6가 plasma VEGF에 비해 관련성이 높은 것으로 관찰되었음.
- ④ 요 혈관신생지표는 기존의 연구 결과가 없는 영역으로 혈액에 비해 검체 채취가 비침습적이므로 검체의 채집이 용이하다는 장점이 있음. 하지만, 분석 결과 혈액의 혈관신생지표에 비해 임상적 관련성이 낮은 것으로 보이고 이는 요의 분비능을 보정하기 위해 Cr로 보정한 결과에서도 동일하여 혈액 혈관신생지표가 더 유의한 것으로 판단됨.

▶ 치료 반응 표지자로 plasma VEGF, serum IL-6를 이용할 수 있으면 예후 관련 factor인 IPI를 구할 때 IL-6 사용 가능함. 임상에서 사용 가능성이 높은 지표로 두 가지가 활용될 수 있을 것으로 기대됨.

□ 림프종 세포주에서 IL-6, VEGF 상호 작용

- ① IL-6 처리 시 VEGF 분비 증가, VEGF 처리 시 IL-6 분비가 증가하는 결과를 확인하였음. 림프종 세포주에서는 두 factor 간의 pathway에 대한 기존 보고가 없으며 MEK1 inhibitor 처리 시 IL-6에 의한 VEGF 분비가 관찰되지 않는 것으로 보아 multiple myeloma cell line에서와 마찬가지로 MAPK pathway를 통해 이루어지는 것으로 보임.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분)	저널명(I.F.)	Vol(No)Page	구분	과제 관련성
Reference Intervals for Circulating Angiogenic Cytokines	공선영(교신)	Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (1.725)	in press	국외SCI	상
Association between VEGF Gene Polymorphisms and Survival in Hepatocellular Carcinoma Patients	공선영(제1)	Hepatology (10.446)	2007:Jul 20;46(2):446-455	국외SCI	중
Host MHC Class II+ antigen-presenting cells and CD4 cells are required for CD8-mediated graft-versus-leukemia responses following delayed donor leukocyte infusions.	엄현석(제1)	Blood (10.131)	2006:108(6):2106-2113,	국외SCI	중
Predicting tissue HER2 status using serum HER2 levels in patients with metastatic breast cancer	공선영(제1)	Clinical chemistry (7.717)	52(8):1510-5	국외SCI	하
The UGT1A7 haplotype is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers	공선영(제1)	Cancer science (3.869)	in press	국외SCI	하
Serum HER-2 concentration in patients with primary breast cancer	공선영(제1)	J Clin Pathol (2.619)	59(4):373-376	국외SCI	하
Simultaneous and sensitive measurement of nicotine and cotinine in small amounts of human hair using liquid chromatography/tandem mass spectrometry.	공선영(공동)	Rapid Commun Mass Spectrom (3.087)	2006:20(18):2781-2.	국외SCI	하
The comparison of two smoking biomarkers in various biological samples	공선영(공동)	Clin Chim Acta (2.3)	2007:Aug;383(1-2):180-181	국외SCI	하
The epidermal growth factor receptor status in anaplastic thyroid carcinoma	공선영(공동)	J Clin Pathol (2.17)	2007:Aug;60(8):881-4.	국외SCI	하
Neural Stem Cell Transplant Survival in Brains of Mice: Assessing the Effect of Immunity and Ischemia by using Real-time Bioluminescent Imaging	엄현석(공동)	Radiology (1.605)	2006:241(3):822-830	국외SCI	하
Novel mutations of RET gene in Korean patients with sporadic Hirschsprung's disease.	공선영(공동)	J Pediatr Surg. (1.25)	2006 Jul;41(7):1250-4.	국외SCI	하
Multicenter study of intravenous busulfan, cyclophosphamide, and etoposide (i.v. Bu/Cy/E) as conditioning regimen for autologous stem cell transplantation in	엄현석(공동)	Bone marrow transplant (0.873)	2007: 40(10):919-924	국외SCI	하

patients with non-Hodgkin's lymphoma Consideration of aggressive therapeutic strategies for primary testicular lymphoma	엄현석(공동)	Am J Hematol (0.556)	2007: 82(9):840-845	국외SCI	하
---	---------	-------------------------	------------------------	-------	---

※저자구분 : 교신, 제1, 공동

※구분 : 국내, 국내 SCI, 국내 SCIE, 국외, 국외SCI, 국외SCIE 등

※과제관련성 : 상(Acknowledgement 가 있는 경우), 중, 하

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역	과제 관련성
Clinical usefulness of circulating angiogenic factors in non-Hodgkin's lymphoma	이혜린(1), 공선영*	2006 한.일 암학회	국내	상
Clinical usefulness of circulating angiogenic factors in non-Hodgkin's lymphom	이혜린(1), 공선영*	2007 AACR (American Association for Cancer Research)	국외	상
High urine levels of interleukin-8 (IL-8) in patients with non-Hodgkin's lymphoma (NHL)	하세운(1), 공선영*	2007 AACR Centennial Conference: Translational Cancer Medicine	국외	상

※지역 : 국내, 국외

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
1) 혈관신생지표 가 비호지킨 림프종의 예후 예측 및 치료 반응 표지자로서의 사용 가능한지 규명함. 2) 연구 결과를 토대로 치료의 객관적 지표로 사용	1차년도	대조군, 환자군 모집	100%	100	10
		혈액 혈관신생지표 참고치 설정	100%		
	2차년도	혈액 혈관신생지표 참고치 설정	100%	90	40
		혈액 혈관신생지표의 진단적 표지자로 역할 규명	100%		
		임상 양상에 따른 혈관신생지표 평가	100%		
		혈액혈관신생지표 중 조기 치료 반응 표지자 발굴	100%		
		림프종 코어 생검에서 혈관신생지표 평가	90%		
	3차년도	혈관신생지표의 예후 연관성 평가	95%	90	35
		혈관신생지표의 치료 반응 반영도 평가	100%		
		혈관신생지표의 유전자 다형성에 따른 농도 변화	100%		
		림프종 세포주의 IL-6, VEGF 발현 및 상호작용	90%		
		요 혈관신생지표의 보정값의 임상적 유용성 평가	100%		

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	2	· British journal of haematology (IF: 4.498) · Cytokine (IF: 2.355)
산업재산권 등록		특허 등록 예상 국가, 예상 특허명 등
기 타		

(2) 연구성과의 활용계획

가. 기대효과 및 활용계획

□ 림프종의 혈관신생지표:

- ① 현재 림프종에서의 circulating 혈관신생지표의 연구는 확립된 단계가 아니며, 임상 지표와의 관련성 등을 고려할 때 serum IL-6, plasma VEGF는 유용한 지표로 사용될 수 있을 것으로 기대됨.
- ② 현재 연구에 속한 환자군은 혈관신생지표에 대한 표적 치료를 수행하지 않았지만 다른 암종의 혈관신생지표에 대한 표적 치료 수행 시 circulating 혈관신생지표의 수치를 평가하고 해석하는데 본 연구에서 제시된 참고치가 활용될 것으로 기대됨.

□ 림프종 세포주의 IL-6, VEGF 상호작용 연구:

- ① 본 과제에서 수행한 세포주 실험에서 IL-6, VEGF 상호 secretion을 증가시킨다는 것을 확인할 수 있었고 doxorubicin 처리 후 VEGF 발현은 감소하나 IL-6 는 감소하지 않아 IL-6 혹은 관여하는 pathway를 표적으로 하는 치료제의 효과가 기대됨.

6. 참고문헌

:텍스트에 삽입함.

7. 첨부서류

消息: Your submission CCLM-D-07-00448R2: Accept

no. CCLM-D-07-00448R2

Sun-Young Kong, Ph.D. & M.D.; Hye Lin Lee, Hyeon-Seok Eom, Ph.D. & M.D.; Weon-Seo Park, Ph.D. & M.D.; Tak Yun, M.D.; Hyun-Ju Kim, Byung-Ho Nam, Ph.D.; Moon-Woo Seung, Ph.D. & M.D.; Do-Hoon Lee, Ph.D. & M.D.

Reference Intervals for Circulating Angiogenic Cytokines

Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

Dear Dr Kong,

I would like to thank you for sending the revised submission of your article. I have read the revised manuscript and the cover letter. In my opinion you have satisfactorily responded to the comments that were raised by the reviewers.

Therefore, I am pleased to inform you that the manuscript has now been accepted for publication in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.

The editorial office in Berlin will contact you regarding correction of the proofs within the coming weeks.

Thank you again for considering Clinical Chemistry and Laboratory Medicine(CCLM) for publishing your work.

Kind regards

Professor CWK Lam

AustralAsian Editor of the Journal CCLM