<붙임 4>

기관고유연구사업 결과 보고

결재	과제책임자	과 장	부 장

※ 협조 :

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

본인이 수행한 20 ~20 년도 기관고유연구사업 과제 연구결과를 붙임과 같이 보고합니다.

과제명	전립선암의 분자생물학적 병기II : PSMA, PSCA, PCA3를 이용한 분자생물학적 병기의 유용성 연구
과제책임자 (소속, 성명)	비뇨생식기암연구과 이강현
총연구비	180,000천원 (2008년: 60,000, 2009년: 60,000, 2010년: 60,000)
총연구기간	2008년 1월 1일 ~ 2010년 12월 31일

붙임 : 기관고유연구사업 최종보고서 1부

2010 년 12 월 31 일

과제책임자 이강현

(과제번호 : 0810220-1)

전립선암의 분자생물학적 병기 II: PSMA, PSCA, PCA3를 이용한 분자생물학적 병기의 유용성 연구

Molecular Staging of Prostate Adenocarcinoma(II): The Efficacy of PSMA, PSCA, PCA3 in Molecular Staging of Prostate Adenocarcinoma

과제책임자 : 이 강 현

국 립 암 센 터

(뒷면) (측면)

	↑ 5cm ↓ 과 제 명
1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구사업 최종보고서입니다. 2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다. (14 pont, 고딕체) ↑ 6cm↓	국 립 암 센 터 ↑ 3cm ↓

제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “전립선암의 분자생물학적 병기” 과제의 결과보고서로 제출합니다.

2010. 12. 31

국 립 암 센 터

과 제 책 임 자 : 이 강 현
연 구 원 : 박 원 서
〃 : 정 재 영
〃 : 조 인 창
〃 : 권 휘 안
〃 : 김 정 은
〃 : 최 문 경

.

참여기업명 : 없음

목　　　　차

< 요 약 문 >

(한글)---------------------------------------1

(영문)---------------------------------------3

1. 연구의 최종목표---------------------------- 5

2. 연구의 내용 및 결과------------------------- 5

3. 연구결과 고찰 및 결론----------------------19

4. 연구성과 및 목표달성도---------------------21

5. 연구결과의 활용계획------------------------27

6. 참고문헌------------------------------------28

7. 첨부서류

< 요 약 문 >

연구분야(코드)			과제번호	0810220-1
과 제 명	전립선암의 분자생물학적 병기II : PSMA, PSCA, PCA3를 이용한 분자생물학적 병기의 유용성 연구			
연구기간/연구비 (천원)	합계	년 월 일 ~ 년 월 일	300,000	
	1차년도	년 월 일 ~ 년 월 일	100,000	
	2차년도	년 월 일 ~ 년 월 일	100,000	
	3차년도	년 월 일 ~ 년 월 일	100,000	
과제책임자	성 명	이강현	주민등록번호	
	전화번호	031-920-1676	전 자 우 편	uroonco@ncc.re.kr
색인단어	국문	전립선, 선암, 분자생물학적 병기		
	영문	prostate, adenocarcinoma, molecular staging		

◆ 연구목표

<최종목표>

전립선 선암환자의 혈액내 순환 세포 및 전립선암 조직에서의 전립선암의 주요 표지자인 PSCA, PSMA, PCA3의 발현을 확인하여 전립선암 DB 구축을 통해 얻은 기존의 예후 인자와의 상관관계를 확인하고 임상 경과와 비교하여 재발 및 진행의 예측인자로서의 가치를 검증함으로써 병기 결정시의 미세전이의 진단, 미세전이의 여부를 고려한 맞춤 치료에 적용하고자 한다.

<당해년도 목표>

- 60명의 환자에서 PSMA, PSCA, PCA3 의 발현 연구
- 전립선암 환자에서 PSCA 유전자의 genetic polymorphims 연구
- 전립선 종양 샘플의 동결 보관 프로토콜 확립
- Transcriptone analysis (next generation sequencing) 연구 기반 구축

◆ 연구내용 및 방법

-RT-PCR

말초단핵구의 분리 및 RNA의 분리

EDTA처리된 전혈로부터 유핵세포분획을 Percoll gradient (Pharmacia, Freiburg, Germany) 원심분리로 얻는다. 총 RNA를RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany)로 분리한 후 즉시 얼려 -70C에 보관한다. 조직의 RNA는 TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 분리한다.

-역전사

RNA (1.5 g)와 0.5 g의 oligo d(T) (Promega, Heidelberg, Germany)를 11ul로 반응 시킨다. 70C 에서 10분 간 반응 시킨후 즉시 얼음에 방치한다. 각각의 RNA 검체에, 4ul의 반응완충액, 2u L of distilled water, 1uL of dNTP (10 mmol/Leach) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), 1uL (10 units) of RNase inhibitor (Boehringer Mannheim), and 1uL of M-MLV reverse transcriptase (Promega))를 추가한다. 즉시 잠깐 원심분리 후 37C에서 90분간 반응시킨 후 최종 cDNA를 -20C에 보관하거나 즉시 PCR에 이용한다.

-PCR 산물의 분석.

10 ul의 PCR product을 6x loading dye 2ul와 섞은 후에 1.5% agarose gel in TBE buffer [0.1 mol/L Tris (pH 8.4), 90 mmol/L boric acid, and 1 mmol/L EDTA)에 assay한다. 젤을 ethidium bromide로 염색한 후 PCR산물을 UV-transilluminator위에 올려놓고 판독 및 촬영을 시행한다. 대표적인 PCR산물은 효소 절단 및 염기 서열분석을 시행한다.

면역조직화학적 염색.

-면역조직화학적 염색.

환자의 생검 또는 절제된 전립선조직의 파라핀블록을 병리과에서 검색하여 면역조직화학적 검색을 시행한다.

-Tissue microarray (TMA)

환자의 생검조직에 대한 tissue microarray를 제작하여 면역조직화학 염색을 시행한다. 종양과 정상조직을 각각 샘플마다 3군데씩 현미경 관찰 하에 선택한다. 선택된 부분에 해당하는 파라핀블록을 3mm의 core을 잘라내어 TMA제작을 시행한다. 이후 면역조직화학염색은 위에 기술한 바와 같이 시행한다.

-Genetic polymorphism in PSCA gene

현재 전립선암의 연구에 관심을 받고 있는 여러 생물학적 표지자 중 전립선암에 높은 특이도를 보이는 prostate stem cell antigne (PSCA) gene의 genetic polymorphism이 한국인의 전립선암의 발생과 연과성이 있다는 가정하에 한국인에서 PSCA gene의 SNPs와 haplotype을 알아보았다. SEQUENOM Mass Array system을 이용하여 Hospital-based mached case-control study를 시행하였다.

◆ 연구성과

-정량적 성과

구분	달성치/목표치[1]	달성도(%)
SCI 논문 편수	8/3	
IF 합	13.9/8	
기타 성과		

1) 총연구기간내 목표 연구성과로 기 제출한 값

-정성적 성과

분자생물학적 병기 방법을 전립선암에서 수술 후 재발을 예측할 수 있는 예후 인자로 적용하여 환자 맞춤치료를 적용하는데 있어 표지자로 적용할 수 있을 것으로 기대

한국인에 있어 전립선암의 발생과 관련성이 있는 genetic polymorphism of PSCA gene을 확인함으로써 전립선암의 선별검사가 필요한 대상을 구체화할 수 있을 것으로 기대·

◆ 참여연구원 (최종연도 참여인원)	성 명	이강현, 박원서, 정재영, 조인창, 권휘안, 김정은. 최문경
	주민등록번호	

Project Summary

Title of Project	Molecular Staging of Prostate Adenocarcinoma(II): The Efficacy of PSMA, PSCA, PCA3 in Molecular Staging of Prostate Adenocarcinoma
Key Words	prostate, adenocarcinoma, molecular staging
Project Leader	Lee Kang Hyun
Associated Company	None

Main objectives: We performed this study to identify the clinical efficacy of PSCA, PSMA, PCA3 expression in predicting the prognosis of prostate cancer.

Particular objectives as follow:

To identify the expression of PSCA and PSMA in the tissue of prostate cancer

To detect the PSCA, PSMA, PCA3 mRNA-bearing cells in peripheral blood of the patients with prostate cancer by RT-PCR assay

To evaluate the relationship between those biomarkers' expression and clinicopathologic facotors

To find the critical role of biomarkers as prognostic factors, especially in high-risk localized prostate cancers

To identify the genetic polymorphism of PSCA of prostate cancer by SNPs study in Korean men

To establish the protocols for reserve the fresh tumor samples from prostate specimen

Methods:

-We used nested reverse transcriptase-polymerase chain (RT-PCR) assay to detect PSMA mRNA-bearing cells in peripheral blood, and analyzed the ability of PSMA/PSCA mRNA positivity to predict biochemical recurrence (BCR) after surgery. Radcial prostatectomy specimens obtained from these patients were analyzed for the expression of AMACR (Alpha-methylacyl-CoA racemase), PSMA, PSCA, EFGR, bcl-2, p53, Bcl-2 using tissue microarray. The values of Bcl-2 and other clinicopathologic factors were evaluated.

-Twelve SNPs of the PSCA gene were genotyped for 194 cases and 196 healthy controls. Genotyping was performed by the iPLEX Gold assay on the Mass ARRAY® platform (Sequenom) based on MALDI-TOF spectrometry.

The protocol was established to get and reserve the fresh tumor tissue from prostate specimen.

Results:

PSMA-mRNA was detected in 24 (17.9%) patients by RT-PCR. Multivariate analysis showed that positivity for PSMA mRNA (HR: 3.697, 95%CI 1.285-10.634, P = 0.015) was independent preoperative predictors of BCR.

In high risk localized prostate cancer, PSCA-mRNA was detected in 17 (16.5%). Cox regression hazards model analysis revealed that a RT-PCR PSCA positivity (HR, 3.222; 95%CI, 1.280-8.113; P=0.013) independently increased the risk of BCR. As for bcl-2 expression in tumor tissue, multivariate Cox proportional hazards analysis revealed that BCR was significantly associated with a high prostate specific antigen level (p=0.047), SVI (p<0.001), a positive surgical margin (p=0.004) and Bcl-2 expression (p=0.012).

In SNP study, subjects with the rs1045531 AA genotype had a higher risk of prostate cancer compared to subjects with the CC genotype (adjusted OR, 1.99; 95% CI, 1.00-3.96; Cochran-Armitage trend test, *P*=0.032). In haplotype analysis, individuals with the CCCGAGGTACGG haplotype had a significantly increased risk of prostate cancer (OR, 13.40; 95% CI, 1.33-134.67; P = 0.028). With regard to the banking fresh tissue based on the established protocol, we have reserved 260 vials of normal, 257 vials of tumor, and 45 vials of HGPIN.

Conclusions:

The presence of PSMA mRNA in peripheral blood could be used to predict BCR after radical prostatectomy. As for high-risk prostate cancer, PSCA mRNA in peripheral blood is a significant predictor of BCR after radical prostatectomy. Bcl-2 expression in RP specimens is associated with a significantly worse outcome, suggesting a potential clinical role for Bcl-2. Post-operative Bcl-2 could be a significant predictor of outcome after RP.

In addition, we found that individuals with the rs1045531 AA genotype of PSCA had a higher risk for prostate cancer. The established protocol to get fresh frozen prostate cancer tissue could be useful to reserve the high quality materials for the following studies in the part of prostate cancer.

1. 연구의 최종목표

가. 최종목표

전립선 선암환자의 혈액 순환 세포 및 전립선 암조직에서의 전립선암의 주요 표지자인 PSCA, PSMA, PCA3의 발현을 확인하여 전립선암 DB 구축을 통해 얻은 기존의 예후 인자와의 상관관계를 확인하고 임상 경과와 비교하여 재발 및 진행의 예측인자로서의 가치를 검증함으로써 병기 결정시의 미세전이의 진단, 미세전이의 여부를 고려한 맞춤 치료에 적용하고자 한다.

나. 세부목표

-전립선암환자의 전립선 조직에서의 PSCA, PSMA, PCA3의 발현을 면역화학 염색을 통해서 확인.
-전립선암 환자의 말초혈액 세포에서 real time RT-PCR 기법을 이용하여 PSCA, PSMA, PCA3을 발현을 분석함으로써 혈액내 순환하는 전립선암 세포의 존재를 확인.
-조직 및 혈액에서의 PSCA, PSMA, PCA3의 발현과 병리학적 특성사이의 연관성을 확인하여 생물학적 표지자로서의 유용성을 확인.
-고위험군 국소 전립선암 환자의 종양표지자 PSCA, PSMA, PCA3에 대한 RT-PCR을 통하여 혈중 순환하는 전립선암 세포의 확인을 통하여 수술 후 재발 가능성을 미리 예측함으로써 맞춤치료를 통하여 전립선암 치료 결과를 향상 시키고자함.
-Single nucleotide polymorphism (SNP) 연구를 통한 PSCA 유전자의 polymorphism이 한국인에서 전립선암 관련 유무를 확인하고자 함
-전립선 종양 샘플의 동결 보관의 프로토콜 확립
-Transcriptone analysis (next generation sequencing) 선행연구 시행

2. 연구의 내용 및 결과

가.연구수행방법

RT-PCR

말초단핵구의 분리 및 RNA의 분리

EDTA처리된 전혈로부터 유핵세포분획을 Percoll gradient (Pharmacia, Freiburg, Germany) 원심분리로 얻는다. 총 RNA를RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany)로 분리한 후 즉시 얼려 -70C에 보관한다. 조직의 RNA는 TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 분리한다.

역전사

RNA (1.5 g)와 0.5 g의 oligo d(T) (Promega, Heidelberg, Germany)를 11ul로 반응 시킨다. 70C에서 10분 간 반응 시킨후 즉시 얼음에 방치한다. 각강의 RNA 검체에, 4ul의 반응완충액

(consisting of 250 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 358 mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl2, 50 mmol/Ldithiothreonine(DTT), 2u L of distilled water, 1uL of dNTP (10 mmol/Leach) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), 1uL (10 units) of RNase inhibitor (Boehringer Mannheim), and 1uL of M-MLV reverse transcriptase (Promega))를 추가한다. 즉시 잠깐 원심 분리 후 37C에서 90분간 반응시킨 후 최종 cDNA를 -20C에 보관하거나 즉시 PCR에 이용한다.

RT-PCR측정의민감도.

RT-PCR 측정의 민감도는 LNCaP 세포를 음성 대조군의 말초 단핵세포로 희석하여 측정한다. 말초단핵 세포는 앞에 기술된바와 같이 분리하고 세포 수를 측정한다. LNCaP 세포는 말초단핵세포에 다음의 비로 희석한다; $0{:}10^7$, $1{:}10^7$, $10{:}10^7$, $100{:}10^7$, 및 $1{,}000{:}10^7$. RNA 분리 및 RT-PCR을 시행한다.

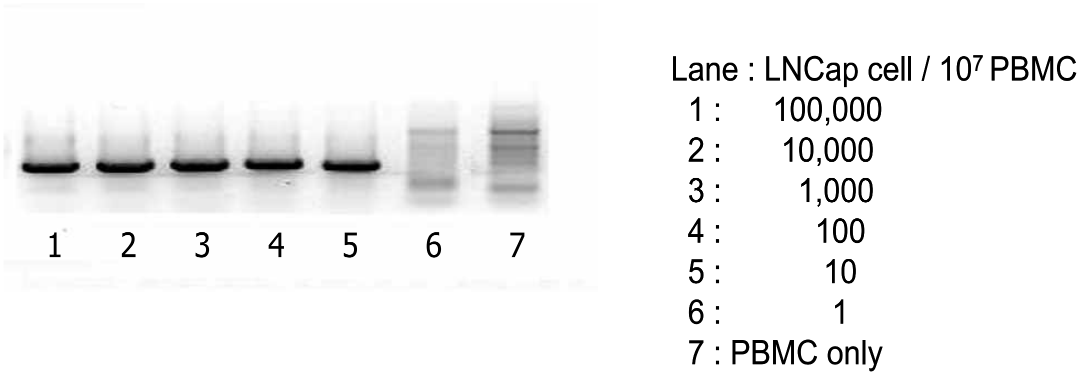
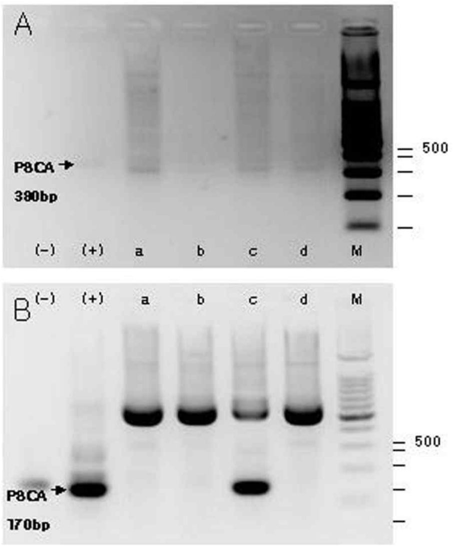


Figure 1. RT-PCR assay sensitivity test: dilution of LNCaP cells into 10^7 peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of normal donors.

PCR산물의분석.

10 ul의 PCR product을 6x loading dye 2ul와 섞은 후에 1.5% agarose gel in TBE buffer [0.1 mol/L Tris (pH 8.4), 90 mmol/L boric acid, and 1 mmol/L EDTA)에 assay 한다. 젤을 ethidium bromide로 염색한 후 PCR산물을 UV-transilluminator위에 올려놓고 판독 및 촬영을 시행한다. 대표적인 PCR산물은 효소 절단 및 염기 서열분석을 시행한다.

Figure 2. Detection of PSCA-mRNA. (A) single PCR, (B) nested PCR in 4 samples (a-d)



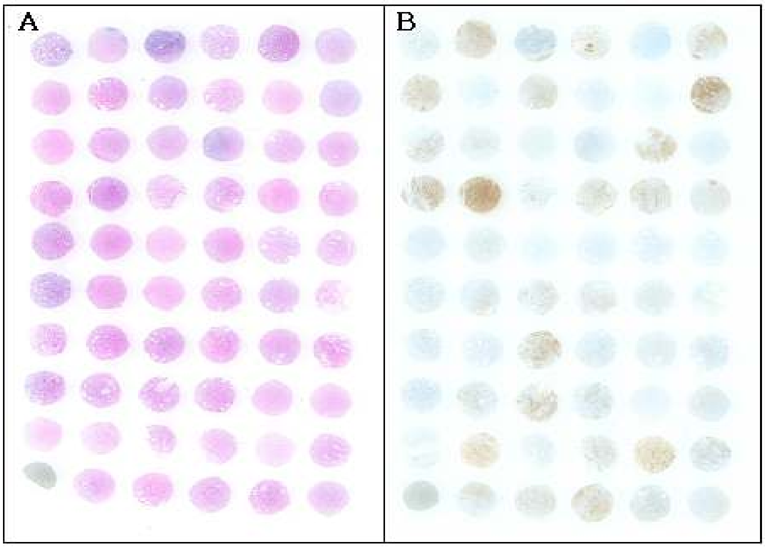
면역조직화학적염색.

환자의 생검 또는 절제된 전립선조직의 파라핀블록을 병리과에서 검색하여 면역조직화학적 검색을 시행한다. 파라핀 포매 조직을 박절하여 탈 파라핀 후 SLAB kit (Dako Co., Carpinteria, USA)를 이용하여 면역 조직 화학 염색을 시행한다. 먼저 과산화수소수로 조직의 peroxidase 활성을 없애고, 정상 염소혈청을 1시간 반응시켜 비특이적 반응을 억제한 후 일차 항체(PSMA, PSCA, PCA3)를 18시간 반응시키고, 연결항체(linking antibody)로 정제된 바이오틴을 붙인 마우스 IgG에 대한 염소의 항체 (goat anti-mouse IgG)를 적용하고, 스트렙트아비딘과 서양고추냉이 과산화효소(horseradish peroxidase)복합체를 첨가한다. 발색은 diaminobenzidine (DAB, Dako)을 이용하며,과산화수소를 첨가한 DAB용액을 가한 후 양성 대조군 조직이 양성을 보이는 순간에 증류수로 세척하여 반응을 중지시킨다. 각 반응 사이에는 인산화 완충 식염수 (phosphate buffered saline, PBS)로 세척하고, 반응 양상은 헤마톡실린을 동시에 시행하여 현미경 검경을 시행하여 분석한다.

Tissuemicroarray(TMA)

환자의 생검조직에 대한 tissue microarray를 제작하여 면역조직화학 염색을 시행한다. 종양과 정상조직을 각각 샘플마다 3군데씩 현미경 관찰 하에 선택한다. 선택된 부분에 해당하는 파라핀블록을 3mm의 core을 잘라내어 TMA제작을 시행한다. 이후 면역조직화학염색은 위에 기술한 바와 같이 시행한다.

Figure 3. Tissue microarray construction (each 3 mm in diameter); Sections of each prostate tissue array block are transferred to glass slides. (A) H&E stain, (B) PSCA stain



Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH)
전립선 종양의 paraffin embedded tissue에서 추출한 DNA를 Cy3로 표지하고, 정상세포에서 추출한 DNA는 Cy5로 표지한 후 cot-1 DNA를 포함한 부합완충액 (hybridization buffer)에 탐침자를 혼합하여 70°C에서 15분간 변성시킨 후 37°C에서 60분간 미리 결합시킴. 위치가 이미 규명된 클론이 plating된 microarray template를 이용. microarray template를 변성시킨 다음, 혼합된 탐침자와 결합시키고, 이를 정해진 process에 따라 처리한 후 template의 pattern을 image capture하고 고안된 software를 이용, 염색체 증가, 감소의 양상을 분석한다.

전립선 종양 샘플의 동결 보관
4년 동안의 연구는 환자의 혈액 및 포르말린 고정 및 파라핀 포매된 조직을 이용한 연구로 일정부분 한계가 있었다. 이에 종양조직의 동결(액체 질소)보관을 추진하려 한다. 전립선 종양은 육안으로 구분이 어려우며 조직 채취시 병리 진단에 방해가 될 수 있는 바, 거의 모든 병원에서 시도되지 못하고 있다. 이에 본 연구에서는 전립선 선암 조직을 동결 보관하기위한 샘플을 얻는 과정을 시도해보고 프로토콜을 확립 한다.

Genetic polymorphism in PSCA gene
현재 전립선암의 연구에 관심을 받고 있는 여러 생물학적 표지자 중 전립선암에 높은 특이도를 보이는 prostate stem cell antigne (PSCA) gene의 genetic polymorphism이 한국인의 전립선암의 발생과 연관성이 있다는 가정하에 한국인에서 PSCA gene의 SNPs와 haplotype을 알아보았다. SEQUENOM Mass Array system을 이용하여 Hospital-based mached case-control study를 시행하였다.

Transcriptone analysis (next generation sequencing)

Genome project가 끝남에 따라 전체 게놈 뿐만 아니라 각각 유전자의 transcriptone의 발현에 관한 연구가 각광받고 있으며 대개의 연구는 DNA chip을 이용한 mRNA의 expression 증감을 연구

하고 있다. 본 연구에서는 서울의대 아시아 게놈 센터와 함께 mRNA의 양과 유전자 변이를 동시에 측정할수 있는 transcriptone analysis(next generation sequencing)를 시행하고자 한다. Transcriptone analysis는 새로운 연구 방법이고, prostate라는 장기의 특성상 RNA를 추출할 수 있는 암조직을 확보하는 것이 극히 어렵다. 2009년에 breast cancer를 대상으로 한 연구가 nature에 발표된바 있다. 따라서 본 연구가 시행되면 전립선암을 대상으로는 전세계적으로 최초의 연구가 될 수 있으며, 또한 개인별 맞춤의학을 위한 획기적인 전기가 마련되리라고 생각한다. 이 연구는 연구의 특성상 비용이 많이 들기 때문에 먼저 pilot study를 시행.

대상환자.

국립암센터의 비뇨기종양클리닉의 환자 중 환자 또는 보호자의 동의를 얻은 경우 본 연구를 시행한다. 대상 환자는 생검 또는 절제술로 전립선 선암으로 최종 진단된 환자들을 대상으로 한다. 선행 연구 결과를 참고하여 일차년도에 30명을 대상으로 시행하며, 2차년도에는 50례, 3차년도에는 60례 이상을 목표로 하여 전체 187명을 대상으로 하였다. PSCA gene의 polymorphism을 확인하기 위한 SNP 연구에서의 실험군은 194명의 전립선암 환자 대조군은 건강검진을 목적으로 암예방검진센터에 방문한 건강한 169명의 남성을 대상으로 하였다.

통계학적분석.

Primary endpoints: 국소 전립선암 환자의 수술 후 생화학적 재발의 예측 인자로서 PSCA, PSMA, PCA3 발현의 유용성을 확인.

Secondary endpoints:
-전립선 피막 외로의 종양 침윤, 골반 임파절 전이 등의 전립선암의 병리학적 병기와 PSCA, PSMA, PCA3 발현사이의 연관성을 확인.
-전립선암의 Gleason score와 PSCA, PSMA, PCA3 발현 사이의 연관성을 확인.

대상 환자 수의 선정과 세부적인 통계 분석
-Molecular staging of prostate adenocarcinoma (I) 선행연구의 103명의 중간 결과 분석 결과 말초 혈액에서의 reverse transcriptase-PCR을 이용한 PSMA, PSCA의 검출율은 각각 14%, 16%으로 확인이 되었으며 PSMA/PSCA overall positivity는 Cox regression hazard model을 이용한 다변량 분석을 통해 근치적 전립선절제술 후의 생화학적 재발을 예측할 수 있는 인자로서의 가능성을 확인하였음 (OR, 2.942; 95% CI, 0.944-9.165; P, 0.063). 본 연구를 통해 real time-PCR을 이용한 말초 혈액에서의 PSMA, PSCA의 발현을 정량적으로 분석하고 전립선암에 특이성을 가지고 있는 PCA3의 발현을 함께 분석함으로 140례를 포함하는 연구에서는 의미 있는 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단됨.
-혈액 sample의 PSCA, PSMA, PCA3에 대한 real time-PCR의 결과와 진단 당시의 serum PSA level, pathologic stage (extraprostatic extension, seminal vesicle invasion and metastasis), Gleason score, 그리고 면역화학염색의 결과 등의 임상 자료와의 상관관계를 Chi-square (or Fisher's exact test)를 이용하여 확인한다.
-전립선 피막 외로의 종양 침윤과 골반 임파절 전이를 예측할 수 있는 위험 인자를 확인하기 위해 real time-PCR을 통한 혈액에서의 PSCA, PSMA, PCA3의 발현, 면역화학염색을 통한 조직에서의 PSCA, PSMA, PCA3의 발현, 진단 당시 serum PSA level 그리고 Gleason score 등의 결과를 Logistic regression model를 이용하여 분석한다.
-근치적 전립선절제술 후의 생화학적 재발의 예측인자로서의 유용성을 확인하기 위해 real time-PCR 및 면역화학염색 결과를 Cox proportional hazard model 등을 이용하여 통계분석을 시행한다. Real time-PCR 양성 유무에 따른 생화학적 재발 여부를 확인하기 위해 Kaplan-Meier 생존분석을 적용한다.
-전립선암의 발생과 관련있는 PSCA gene의 SNPs와 haplotypes을 확인한다.
- 모든 통계학적 분석은 STATA 9.0 프로그램을 이용하며 $P < 0.05$ 경우를 통계학적으로 의미 있는 것으로 정의한다.

나. 연구수행 내용 및 결과

1) 대조군을 이용한 real time PCR 의 조건 확립과 대상 환자의 말초 혈액에서의 mRNA 검출

환자의 샘플을 이용한 real time PCR을 위하여 mRNA를 cDNA로 reverse transcription 시켜놓음. Applied biosystems사로부터 internal primer 및 probe (18S, cycloxgenase, PO 등)와 target molecule에 대한 primer 및 probe(PSMA, PSCA, PSA 및 PCA3)를 구입하여 PCR을 setting 함.

2) 기존의 RT-PCR 을 통해 대상 환자의 말초 혈액에서의 mRNA 검출

전립선암 환자 혈액에서 PSMA, PSCA, PSA, 및 hK2의 mRNA를 확인함으로써 혈액 중에 존재하는 전립선암종세포의 존재를 간접적으로 확인할 수 있었다.

3) 연구 대상의 임상적 특성

2008년 1월부터 2010년 11월까지 187명의 전립선암 환자를 대상으로 연구를 시행하였으며 분석 시기까지 RT-PCR 결과가 확인 된 187명을 대상으로 결과를 분석하였다. 대상 환자들의 전립선암 진당 당시 임상적 특성은 Table 1 과 같다.

Table 1. Patients characteristics (n=187)

Variables	No. of patients (%)
PSA(ng/ml)	
< 4.1	10(5.3)
4.1-10.0	100(53.5)
10.1-20.0	36 (19.3)
> 20.0	41 (21.9)
Gleasonscore(biopsy)	
2-6	96 (51.3)
7	56 (29.9)
8-10	35 (18.7)
Clinicalstage	
cT1N0M0	80 (42.8)
cT2N0M0	89 (47.6)
cT3N0M0	12 (6.4)
LN or M1	6 (3.2)
Treatment	
RP	133(71.1)
NHT+RP	54 (28.9)

RP, radical prostatectomy; NHT, neoadjuvant hormonal therapy

근치적 전립선절제술을 시행 받은 환자는 187명으로 수술 후 최종 병리학적 병기는 pT0N0M0 가 6명 (3.2%), pT2N0M0 병기가 120명 (64.2%)이었으며 전립선 피막 외로의 침윤이 있는 pT3N0M0가 44명 (23.5%)이었다. 그리고 17명 (9.1%)에서 LN 전이가 확인되었다 (Table 2).

Table 2. Pathologic characteristics in RP specimen

Variables	No. of patients (%)
Path.stage	
pT0N0M0	6(3.2)
pT2N0M0	120(64.2)
pT3N0M0	44(23.5)
N1 or M1	17(9.1)
Gleasonscore(surgical)	
NA	34(18.2)
2-6	62(33.2)
7	61(32.6)
8-10	30(16.0)

LVinvasion	
(+)	14(7.5)
(-)	173(92.5)
SVinvasion	
(+)	34(18.2)
(-)	153(81.8)
SurgicalMargin	
(+)	53(28.3)
(-)	134(71.7)

RP, radical prostatectomy; LV, lymphovascular; SV, seminal vesicle

4) RT-PCR 결과와 임상-병리학적 특성

187명의 대상 환자 중에 PSCA는 56명 (29.9%), PSMA는 38명 (20.3%), kallikrein는 3명 (1.6%), 그리고 PCA3은 40명 (21.4%)에서 RT-PCR 양성 소견을 보여 4가지 표지자 중에 한 개라도 양성인 RT-PCR overall positivity가 108명 (57.8%)으로 확인되었다 (Table 3).

Table 3. Comparison of RT-PCR positivity with clinicopathologic parameters (n=187)

Variabl	No	PSCA(+) n=56(29.9%)	PSMA(+) n=38(20.3%)	kallikrein(+) n=3(1.6%)	PCA3(+) n=40(21.4%)	overall(+) n=108(57.8%)
PSA(ng/ml)						
< 4.1	10	5(50.0)	4(40.0)	0(0)	4(40.0)	8(80.0)
4.1-10.0	100	29(29.0)	22(22.0)	2(2.0)	21(21.0)	58(58.0)
10.0-20.0	36	12(33.3)	6(16.7)	1(2.8)	6(16.7)	18(50.0)
> 20.0	41	10(24.4)	6(14.6)	0(0)	9(22.0)	24(58.5)
Gleason score						
non-available	34	11(32.4)	4(11.8)	0(0)	9(26.5)	20(58.8)
2-6	62	11(17.7)	12(19.4)	0(0)	13(21.0)	33(53.2)
7	61	24(39.3)	15(24.6)	3(4.9)	11(18.0)	36(59.0)
8-10	30	10(33.3)	7(23.3)	0(0)	7(23.3)	19(63.3)
Path. stage						
pT0N0M0	6	3(50.0)	2(33.3)	0(0)	1(16.7)	4(66.7)
pT2N0M0	120	31(25.8)	22(18.3)	3(100.0)	24(20.0)	65(54.2)
pT3N0M0	44	20(45.5)	12(27.3)	0(0)	11(25.0)	31(70.5)
N1 or M1	17	2(11.8)	2(11.8)	0(0)	4(23.5)	8(47.1)
Surgical margin						
+	53	16(30.2)	9(17.0)	1(1.9)	7(13.2)	28(52.8)
-	134	40(29.9)	29(21.6)	2(1.5)	33(24.6)	80(59.7)
LV invasion						
+	14	4(28.6)	2(14.3)	0(0)	1(7.1)	7(50.0)
-	173	52(30.1)	36(20.8)	3(1.7)	39(22.5)	101(58.4)
SVI						

+	34	5(14.7)	8(23.5)	0(0)	9(26.5)	18(52.9)
-	153	51(33.3)	30(19.6)	3(2.0)	31(20.3)	90(58.8)
NHT						
+	54	15(27.8)	7(13.0)	0(0)	11(20.4)	78(58.6)
-	133	41(30.8)	31(23.3)	3(2.3)	29(21.8)	30(55.6)

LV, lymphovascular; SVI, seminal vesicle invasion; NHT, neoadjuvant hormonal therapy

근치적 전립선절제술을 시행 받은 환자에서 임상-병리학적 특성에 따른 RT-PCR 결과를 살펴보면 PSCA는 GS 7이상에서 GS 6이하의 경우에 비해 높게 검출이 되었으며 이러한 경향은 병리학적 병기가 높은 경우 정낭 침윤이 있는 경우 높은 검출을 보였다. PCA3의 경우에는 수술 절제면과 LVI 여부와 상반되는 연관성을 보였다. 그 외 RT-PCR 결과와 임상병리학적 인자 사이에는 통계적으로 의미 있는 연관성은 확인되지 않았다 (Table 4-5).

Table 5. Relationship between RT-PCR positivity and clinicopathologic parameters (n=122)

	PSCA(+)	PSMA(+)	kallikrein(+)	PCA3(+)	overall(+)
serum PSA	0.430	0.298	0.742	0.721	0.403
Gleason score	0.065	0.488	0.098	0.872	0.811
Path. stage	0.020	0.391	0.636	0.730	0.209
Surgical margin	0.964	0.475	0.847	0.013	0.391
LV invasion	0.907	0.560	0.619	0.017	0.541
SV invasion	0.032	0.607	0.410	0.694	0.530
NHT(+)	0.680	0.111	0.266	0.948	0.698

LV, lymphovascular; SVI, seminal vesicle invasion

5) 전립선피막외침윤의 예측인자

근치적 전립선절제술을 시행 받은 환자 중 병리학적으로 전립선 피막 외로의 침윤이 확인된 T3 병기 이상의 환자는 61명 (32.6%)으로 이러한 전립선 밖으로의 침윤을 예측하는 인자로는 serum PSA≧20ng/ml, Gleason score≧7, 임상적 병기≧cT3 가 독립적인 예측 인자로 확인되었으며 RT-PCR을 이용한 말초 혈액에서의 표지자의 검출 유무는 유의한 결과를 보이지 않았다 (Table 6-7).

Table 6. Univariate analysis of predicting factors for extraprostatic extension(n=187)

	HR	95%CI	p-value
PSA≧20ng/ml*	6.529	3.091-13.792	<0.001
Gleason score≧7*	6.538	3.245-13.172	<0.001
Clinical stage≧cT3*	6.525	1.984-21.452	0.002
RT-PCR			
PSCA(+)	14721	0.767-2.827	0.246

PSMA(+)	1.227	0.584-2.581	0.589
PCA3(+)	1.470	0.913-2.368	0.113
overall(+)	1.524	0.813-2.856	0.189

*; P < 0.05

Table 7. Multivariate analysis of predicting factors for extraprostatic extension

	HR	95%CI	p-value
PSA≧20ng/ml*	3.484	1.473-8.238	0.004
Gleason score≧7*	4.419	2.062-9.469	<0.001
Clinical stage≧cT3*	2.155	0.578-8.041	0.253
RT-PCR PSCA(+)	1.847	0.719-4.745	0.203
RT-PCR PCA3	1.616	0.871-2.999	0.128
RT-PCR overall (+)	0.840	0.317-2.225	0.726

*, P < 0.05

6)면역조직화학검사(Immunohistochemistry)

적출된 전립선 및 침생검 된 전립선암 조직에서의 AMACR (Alpha-methylacyl-CoA racemase), PSMA, PSCA, EFGR, bcl-2, p53, 그리고 Rb 의 발현을 면역화학 염색을 통하여 확인하였으며 각각의 항체에 대한 양성도는 PSMA와 AMACR이 각각 97.6%, 83.5%으로 높게 나왔으며 EGFR과 p53가 각각 22.4%, 24.7%으로 낮게 나타났다.

Table 8. Results of Immunohistochemistry

Immunohistochemistry	Incidence of positive staining (%)
AMACR	71(83.5)
PSMA	83(97.6)
PSCA	55(64.7)
EGFR	19(22.4)
bcl-2	28(32.9)
P53	21(24.7)
Rb	48(56.5)

조직에서의 AMACR, PSA, PSMA, PSCA의 발현과 serum PSA, Gleason score, pathologic stage 사이에는 발현의 차이를 보이지 않았다 (Table 9).

Table 9(A). Comparison of immunohistochemical results with clinicopathologic parameters (n=85)

Variables	No	AMACR(+)	PSMA(+)	PSCA(+)	EGFR(+)	bcl-2(+)	P 53(+)	Rb(+)
		n=71(83.5%)	n=83(97.6)	n=55(64.7)	n=19(22.4)	n=28(32.9)	n=21(24.7)	n=48(56.5)
PSA(ng/ml)								
< 4.1	6	5(83.3)	6(100.0)	4(66.7)	1(16.7)	3(50.0)	1(16.7)	4(66.7)
4.1-10.0	47	40(85.1)	45(95.7)	33(70.2)	10(21.3)	18(38.3)	14(29.8)	28(59.6)
10.1-20.0	12	10(83.3)	12(100.0)	6(50.0)	3(25.0)	1(8.3)	2(16.7)	6(50.0)
> 20.0	20	16(80.0)	20(100.0)	12(60.0)	5(25.0)	6(30.0)	4(20.0)	10(50.0)
Gleason score								
2-6	44	35(79.5)	43(97.7)	27(61.4)	9(20.5)	13(29.5)	9(20.5)	24(54.5)
7-10	41	36(87.8)	40(97.6)	28(68.3)	10(24.4)	15(36.6)	12(29.3)	24(58.5)
Path. stage								
pT0N0M0	4	0(0)	4(100.0)	2(50.0)	2(50.0)	3(75.0)	0(0)	1(25.0)
pT2N0M0	53	47(88.7)	51(96.2)	37(69.8)	12(22.6)	17(32.1)	11(20.8)	35(66.0)
pT3N0M0	19	16(84.2)	19(100.0)	11(57.9)	2(10.5)	6(31.6)	7(36.8)	7(36.8)
N1 or M1	9	8(88.9)	9(100.0)	5(55.6)	3(33.3)	2(22.2)	3(33.3)	5(55.6)

*, $P < 0.05$

Table 9(B). Relationship between TMA positivity and clinicopathologic parameters (n=85)

	AMACR(+)	PSMA(+)	PSCA(+)	EGFR(+)	Bcl-2	P53(+)	Rb(+)
serum PSA	0.966	0.647	0.580	0.965	0.190	0.679	0.805
Gleason score	0.305	0.960	0.504	0.663	0.490	0.346	0.711
Path. stage	<0.001	0.744	0.637	0.270	0.295	0.305	0.087

7)근치적전립선절제술후생화학적재발의예측인자

근치적 전립선 절제술을 시행 받은 환자 187명 중 술 후 3개월 이상의 관찰 기간을 가지고 종양의 재발을 진단하기 위한 혈청 PSA 검사를 시행한 환자를 대상으로 생화학적 재발을 확인하였다. 중간 관찰 기간 (median f/u) 은 16.2개월 (1-34개월) 으로 관찰기간 동안 26명 (13.9%)에서 생화학적 재발이 발생하였다. 단변량 회귀분석을 통해 PSA≥20ng/ml, Gleason score≥7, 정낭 침윤, LVI 이 근치적 전립선절제술 후 생화학적 재발에 대한 예측 인자로 확인되었으며 (Table 10) 이 중 PSA≥20ng/ml, Gleason score≥7 은 독립적인 예측인자로 확인하였다 (Table 11). 말초혈액에서의 표지자의 검출여부는 생화학적 재발과의 연관성을 확인되지 않았다.

Table 10. Univariate analysis of prognostic factors for biochemical recurrence following RRP (n=187)

Variables	HR	95%CI	p-value
PSA≧20ng/ml*	8.729	3.883-19.621	<0.001
Gleason score≧7*	6.822	2.349-19.815	<0.001
LVI*	3.352	1.262-8.902	0.015
Surgical Margin	1.397	0.634-3.079	0.407
SVI*	4.308	1.973-9.406	<0.001
RT-PCR			
PSCA(+)	1.214	0.551-2.677	0.631
PSMA(+)	1.050	0.396-2.787	0.922
kallikrein(+)	5.167	0.688-38.822	0.110
PCA3(+)	1.349	0.804-2.262	0.256
Overall(+)	1.523	0.661-3.506	0.323

*, $P < 0.05$

Table 11. Multivariate analysis of prognostic factors for biochemical recurrence following RRP (n=187)

	HR	95%CI	p-value
PSA≧20ng/ml*	5.042	1.950-13.037	0.001
Gleason score≧7	2.988	0.928-9.622	0.067
LVI	1.653	0.522-5.236	0.393
SVI	1.635	0.615-4.347	0.324
RT-PCR PSCA(+)	2.117	0.698-6.423	0.185
RT-PCR PCA3(+)	1.571	0.782-3.155	0.204
RT-PCR overall(+)	0.833	0.241-2.874	0.772

*, $P < 0.05$

8) 전립선 종양 샘플의 동결 보관

5년 동안의 연구는 환자의 혈액 및 포르말린 고정 및 파라핀 포매된 조직을 이용한 연구로 일정부분 한계가 있었다. 이에 종양조직의 동결(액체 질소)보관을 추진하였다. 전립선 종양은 육안으로 구분이 어려우며 조직 채취시 병리 진단에 방해가 될 수 있는 바, 거의 모든 병원에서 시도되지 못하고 있다. 이에 본 연구에서는 전립선 선암 조직을 동결 보관하기위한 샘플을 얻는 과정을 시도해보고 프로토콜을 확립하였다. 매번 수술 검체를 병리 전무의가 직접 육안 검사후 종양이 의심되는 부위를 동결 절편으로 검사후 정상, HGPIN, 선암 부위를 각각 동결 하였다. 총 29예에 대하여 시행하였으며 총 562개의 tube에 조직을 동결 하였다. 종양이 257례, 정상 조직이 260례, 그리고 HGPIN이 45례를 확보하였다.

9) PSCA gene polymorphism

전립선암 환자에서의 genetic polymorphism 관련 초기 연구로 PSCA gene에 대한 SNP 연구를 시행하였으며 PSCA SNPs 중 rs1045531 AA 유전자형을 가지는 경우 CC 유전자형에 비해 전립선암의 발생이 높은 것을 확인하였으며 (adjusted OR, 1.99; 95% CI, 1.00-3.96; Cochran-Armitage trend test, *P*=0.032),haplotype분석결과, CCCGAGGTACGG haplotype을 가지는 경우 전립선암의 발생 위험이 높았다 (OR, 13.40; 95% CI, 1.33-134.67; P = 0.028). 대상 환자의 특성, genotype, 그리고 haplotype 분석 결과는 다음 표와 같다 (Table 12-14).

Table 12. Clinical and demographic characteristics of study populations

Variables	Patient	Control
sample size	194	169
Age	66.52 ± 7.16	60.13 ± 3.30
serum PSA	21.28 ± 28.15	1.47 ± 1.63
BMI	24.35 ± 2.60	24.41 ± 2.35
Smoking (pack of years)		
<20	101 (52.06%)	62 (51.24%)
>20	93 (47.94%)	59 (48.76%)
Drinking		
never	70 (36.08%)	26 (17.57%)
ever	124 (63.92%)	122 (82.43%)
Family history of CaP		
no	186 (95.88%)	146 (98.65%)
yes	8 (4.12%)	2 (1.35%)

Table 13. SNP analysis of PSCA gene and association analysis with prostate cancer risk

SNP	genotype	case	control	OR(uni)	adjusted OR (multi)	p-value
rs3736001	G/G	145(75.1%)	129(76.8%)			
	G/A	43(22.2%)	37(22.0%)	1.03	0.97	0.918
	A/A	5(2.59%)	2(1.19%)	2.22	4.83	0.098
	G/A+A/A	48(24.8%)	39(23.2%)	1.10	1.11	0.729
rs1045531	C/C	34(18.5%)	44(26.7%)			
	C/A	93(50.1%)	83(50.3%)	1.45	1.31	0.382
	A/A	57(31.0%)	38(23.0%)	1.94	1.99	0.050
	C/A+A/A	150(81.5%)	121(73.3%	1.60	1.52	0.152

Table 14. Haplotype analysis (using Haploview 4.1)

	Haplotype frequencies			
	E(freq)	Case(n=386)	Control(n=336)	p[a]
Haplotype (1-12)				
CCCGAGGTCCGG	0.489	0.460	0.523	0.0897
TCTGGGACATAA	0.344	0.349	0.339	0.7887
TGTGGAACATAA	0.127	0.132	0.122	0.6851
TGTGGGACATAA	0.017	0.026	0.006	0.0370
CCCGAGGTACGG	0.012	0.020	0.003	0.0418
Haplotype (1-3, 5-12)				
CCCAGGTCCGG	0.491	0.463	0.523	0.1034
TCTGGACATAA	0.345	0.351	0.339	0.7450
TGTGAACATAA	0.127	0.132	0.122	0.6853
TGTGGACATAA	0.017	0.025	0.009	0.1037
CCCAGGTACGG	0.012	0.020	0.003	0.0455
Haplotype (2, 3, 6, 9)				
CCGC	0.492	0.462	0.526	0.0872
CTGA	0.344	0.348	0.339	0.8009
GTAA	0.129	0.135	0.122	0.6123
GTGA	0.017	0.025	0.009	0.1095
CCGA	0.014	0.022	0.003	0.0279
Haplotype (2, 5, 6, 9)				
CAGC	0.492	0.463	0.526	0.0876
CGGA	0.345	0.351	0.339	0.7450
GGAA	0.129	0.135	0.122	0.6122
GGGA	0.017	0.025	0.009	0.1037
CAGA	0.012	0.020	0.003	0.0455
Haplotype (2, 6, 9)				
CGC	0.479	0.443	0.519	0.0427
CGA	0.371	0.390	0.350	0.2700
GAA	0.129	0.135	0.122	0.6118
GGA	0.020	0.030	0.009	0.0499

3. 연구결과 고찰 및 결론

전립선암은 서구 남성에 있어 가장 흔하게 발생하는 암이며 암에 의한 사망 중 2번째 암으로, 최근 우리나라에서도 발생 빈도가 급속히 증가하고 있다. 현재 전립선암의 치료 방법을 결정하고 예후를 예측하는데 있어 가장 중요한 과정은 암의 정확한 병기를 결정하는 것이다. 현재 진단 당시 혈중 PSA, 조직검사에서 확인된 GS, 그리고 임상적 병기를 기준으로 하여 치료 방법과 예후를 예측하고 있다. 그러나 각각의 예측인자가 가지는 한계점으로 인해 치료 전 정확한 병기를 예측할 수가 없으며 이를 보완하기 위해 여러 가지 생물하적인 예측인자에 대한 연구가 계속되어 왔다. 연구자들은 본 연구의 선행 연구인 전립선암의 분자생물학적 병기연구를 통해서 전립선암의 환자의 전립선암 조직 및 혈액에서의 전립선줄기생포항원 (PSCA) mRNA를 RT-PCR을 이용하여 검출함으로써 수술 후 생화학적 재발을 예측하는 예후인자로서의 가능성을 확인할 수 있었다. 현재 임상적 국소전립선암의 경우에도 여러 기준을 통해서 1차적인 근치적 치료 후 재발의 위험도에 따라 저위험군, 중등도 위험군, 고위험군으로 분류하여 치료를 적용하고 있다. 저위험군의 경우에는 수술, 방사선치료, 혹은 HIFU와 냉동치료 등의 최소침습적 치료를 적용해도 그 예후가 좋은 것으로 알려져 있으나 고위험군의 경우에는 수술 및 방사선 치료를 적용하는 경우에 생화학적 재발이나 임상적 재발의 빈도가 높다. 본 연구를 통해서 연구자들은 고위험군 전립선암 환자에서 PSCA를 발현하는 세포를 검출함으로써 수술 후 전립선암 재발의 가능성을 예측하기 위한 심화연구를 시행하였다. 103여명의 고위험군 전립선암 환자를 대상으로 이들의 말초혈액에서 역전사중합효소반응을 시행한 결과 17명 (16.5%)의 혈액에서 전립선암줄기세포항원을 발현하는 전립선암 세포를 확인할 수 있었으며 또한, 전립선암줄기세포항원을 발현하는 세포가 검출된 환자에서 수술 후 재발이 흔하게 발생하는 사실을 알 수 있었다. 결론적으로 고위험군 국소 전립선암 환자의 말초혈액에서 PSCA를 발현하는 전립선암세포의 검출은 수술 후 전립선암의 재발을 예측하는 인자로서의 유용성을 확인하였다.

Prostate specific membrane antigen은 750개의 아미노산으로 이루어진 세포벽의 당단백질로서 전립선에 특이도가 높아 전립선암의 생물학적 표지자로 관심을 받아왔으며 전립선암의 표적치료 및 백신 등의 개발에 종양항원으로 이용되고 있다. 본 연구에서는 근치적 전립선절제술 후 생화학적 재발의 예측인자로서 prostate specific membrane antigen (PSMA)의 유용성을 알아보았다. 연구 기간 중 근치적 전립선절제술이 예정되어 있는 환자 134명을 대상으로 하였으며 수술 전 RT-PCR assay를 이용하여 말초혈액에서의 PSMA mRNA 검출 여부를 확인하고 수술 후 생화학적 재발과의 연관성을 분석한 결과, PSMA-mRNA는 24명 (17.9%)의 환자에서 검출되었으며 20개월 (범위, 3 to 46 months)의 중간 관찰기간 동안 생화학적 재발은 15명 (11.2 %)에서 발생하였으며 생화학적 재발까지의 기간의 중간 값은 7개월 (범위, 3 to 25 months)이었다. Kaplan-Meier 곡선에서 PSMA mRNA의 검출 유무에 따라 생화학적 재발에 차이를 보였으며 (log rank

p=0.0039), 다변량 분석에서 PSMA mRNA (HR: 3.697, 95%CI 1.285-10.634, P = 0.015)의 검출과 biopsy Gleason score ≥7 (HR: 4.500, 95%CI 1.419-14.274, P = 0.011)이 생화학적 재발의 의미 있는 예측인자였다. 결론적으로 PSMA mRNA를 발현하는 말초혈액내 순환하는 전립선암세포의 확인은 근치적 전립선절제술 후 생화학적 재발의 예측인자로서 가치가 있음을 확인할 수 있었다.

조직에서의 생물학적 표지자들의 발현을 확인하기 위한 TMA를 이용한 면역화학염색 연구를 통해서 AMACR (Alpha-methylacyl-CoA racemase), PSMA, PSCA, EFGR, bcl-2, p53, 그리고 Rb 의 발현여부를 확인하였으며 특히, bcl-2 의 발현은 24.6%에서 확인되었고 전립선암 조직에서의 bcl-2의 발현 유무는 근치적 절제술 후 재발의 예측 인자임을 확인하였다. 그러나, 전립선암의 연구에 있어 이러한 포르말린 고정 및 파라핀 포매된 조직을 이용한 연구는 일정 부분 한계가 있는 것이 사실이다. 이를 극복하기 위해 전립선암의 신선 조직을 얻기 위한 시도들이 있었으나 전립선암의 육안적 병리 소견 상 육안으로 암 조직을 구분하기가 힘이 들며 이로 인해 신선암조직의 확보 노력이 병리학적 진단에 방해를 줄 수가 있다. 본 연구에서 전립선암 조직을 동결 보관하는 프로토콜을 확립하여 현재 550례 이상의 조직을 확보함으로써 향 후 전립선암의 연구에 중요한 자료를 확보하였다. 향후 신선조직이 필요한 전립선암 전사체 연구 등에 유용하게 사용 가능하리라 기대 된다.

또한, 한국인 전립선암 환자의 유전적 다형성을 확인하기 위한 초기 연구로 본 연구에서는 PSCA 유전자의 알려진 12개의 SNP을 대상으로 환자-대조군 연구를 시행한 결과, 전립선암의 발생 위험성과 상관관계가 있는 genotype과 haplotype 들을 확인할 수 있었다. 이는 한국인 전립선암의 유전적 소인을 밝히는데 있는 선행연구로 큰 의미를 가지며 현재까지 PSCA 관련 genetic polymorphism에 대한 연구 결과가 보고된 바가 없어 더욱 큰 의미를 가질 수 있다. 기타 유전체 연구나 전사체 연구를 통해 전립선암의 발생 및 임상적 특성과 연관이 있을 것으로 판단되는 있는 유전자의 유전적 다형성을 한국인에서 검증하고 새로운 유전적 다형성을 확인하는 근간이 될 것으로 기대된다.

결론적으로 본 연구를 통해 전립선암 환자들을 대상으로 혈중 순환하는 PSCA, PSMA를 발현하는 전립선암 세포와 술 후 재발 예측인자로써의 가치를 확인하고 , TMA를 이용한 bcl-2, EFGR 등 종양표지자를 대상으로한 면역조직화학검사의 임상적 유용성을 밝히고, 향후 전립선암 조직의 전사체 연구를 위한 전립선암 신선조직을 충분히 확보하였으며, PSCA SNP 와 전립선암 발생과 관련성에 대해 유의한 결과를 얻었다.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분[1])	저널명(I.F.)	Year; Vol(No):Page	구분[2]	지원과제번호[3]
Pulmonary metastasis from renal cell carcinoma: characterization using contrast-enhanced CT attenuation value measurements.	이강현(공동)	J Comput Assist Tomogr(1.448)	2009 Jan-Feb 33(1):54-7	국외 SCI	없음
Lymphovascular Invasion in Transurethral Resection Specimens as Predictor of Progression and Metastasis in Patients With Newly Diagnosed T1 Bladder Urothelial Cancer.	이 강 현 (교신)	J Urol (4.053)	2009 Dec 182: 2625-31	국외 SCI	0810220
Prostate Stem Cell Antigen mRNA in Peripheral Blood as a Potential Predictor of Biochemical Recurrence in High-Risk Prostate Cancer	이 강 현 (교신)	J Surg Oncol 2.478	2009 Dec 101(2):145-8	국외 SCI	0810220
The development of the conditionally replication-competent adenovirus: replacement of E4 orf1-4 region by exogenous gene	이강현(공동)	J Gene Med 2.968	2010 April 12(5): 453-62	국외 SCI	없음
Pretreatment assessment of tumor enhancement on contrast-enhanced computed tomography as a potential predictor of treatment outcome in metastatic renal cell carcinoma patients receiving antiangiogenic therapy	이강현(공동)	Cancer 5.418	2010 116(10): 2332-42	국외 SCI	없음
Renal safety and efficacy of cisplatin-based chemotherapy in patients with a solitary kidney after nephroureterectomy for urothelial carcinoma of the upper urinary tract	이 강 현 (교신)	Cancer Chemother Pharmacol 2.654	2010 April	국외 SCI	0810220
Prognostic Value of p53 and Ki-67 Expression in Intermediate-risk Patients With Nonmuscle-invasive Bladder Cancer Receiving Adjuvant Intravesical Mitomycin C Therapy	이 강 현 (교신)	Urology 2.365	2010 April	국외 SCI	0810220
Prostate Specific Membrane Antigen mRNA in Blood as a Potential Predictor of Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy	이 강 현 (교신)	JKMS 0.838	2010 February 25: 1291-5	국내 SCI	0810220
A Prospective Evaluation of Conventional Cystography for Detection of Urine Leakage at the Vesicourethral Anastomosis Site after Radical Prostatectomy Based on Computed Tomography	이 강 현 (교신)	Clinical Radiology 1.645	2010, On-line	국외 SCI	0810220
Incidental prostate cancer detected by cystoprostatectomy in Korean men	이 강 현 (교신)	Urology (2.134)	2009; 73; 153-157	국외 SCI	0 5 1 0 2 0 0

					(후속과제)
Pulmonary metastasis from renal cell carcinoma: Characterization using contrast enhanced CT attenuation value measurements	이강현 (공동)	J Comput Assist Tomogr (1.509)	2009; 33: 54-57	국외 SCI	없음
Lymphovascular Invasion on Transurethral Resection Specimen as a Predictor of Progression and Metastasis in Patients with Newly Diagnosed T1 Urothelial Carcinoma of the Bladder	이강현 (교신)	J Urol(3.952)	2009 Oct 15 (Epub ahead of print)	국외SCI	없음
Single institutional experience of bladder-preserving trimodality treatment for muscle invasive bladder cancer	이 강 현 (교신)	JKMS (0.824)	2008; 23: 598-603	국내 SCI	0510200 (후속과제)
Docetaxel Chemotherapy of Korean Patients with Hormonerefractory Prostate Cancer : Comparative Analysis between 1st-line and 2nd-line Docetaxel	이강현 (교신)	YMJ (0.781)	2008;49(5): 775-82	국내 SCIE	0510200 (후속과제)
Epidermal growth factor receptor as predicting factor on biochemical failure after radical prostatectomy: A prospective study	이강현 (교신)	J Korean Urology	2008(accepted)	국내	0510200 (후속과제)
Identification of Immunohistochemical Factors that Predict the Synchronous or Metachronous Development of Bladder Tumors in Patients with Upper Urinary Tract Tumors	이 강 현 (교신)	Urol Int (0.82)	2008; 81(3): 306-11	국외 SCIE	0510200 (후속과제)
Clinical Value of PTEN in Patients with Superficial Bladder Cancer	이 강 현 (교신)	Urol Int (0.82)	2008; 80(3):264-9	국외 SCIE	0110150
RESULTS OF REPEAT TRANSURETHRAL RESECTION FOR A SECOND OPINION IN PATIENTS REFERRED FOR NON-MUSCLE INVASIVE BLADDER CANCER: THE REFERRAL CANCER CENTER EXPERIENCE AND REVIEW OF THE LITERATURE	이강현 (교신)	J Endourology (1.779)	2008: 22 In press	국외 SCI	0710330
Percent free prostate specific antigen does not enhance the specificity of total prostate specific antigen for the detection of prostate cancer in Korean men 50 to 65 years old: a prospective multicenter study.	이 강 현 (교신)	Journal of Urology (4.053)	2008; 179:111-116	국외 SCI	없음
Methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin combination regimen as salvage chemotherapy for patients	이 강 현 (공동)	Br J Cancer (4.635)	2008; 98:89-90	국외 SCI	없음

with advanced or metastatic transitional cell carcinoma after failure of gemcitabine and cisplatin chemotherapy.					
The Efficacy of Transureteroureterostomy for Ureteral Reconstruction during Surgery for a Non-Urologic Pelvic Malignancy	이 강 현 (공동)	J Sug Oncol (2.384)	2008; 98(1): 49-53	국외 SCI	없음
Factors influencing pain during transrectal ultrasonography-guided prostate biopsy	이강현 (교신)	Prostate Cancer and Prostatic Disease (2.024)	2008; 11(2):139-42	국외 SCI-E	없음

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
근치적 방광절제술 후 추적관찰에서 발생한 요관암 1례	이강현 (교신)	대한비뇨기종양학회,2010	국내	없음
후복막에 재발한 혼합성 지방육종 1례	이강현 (교신)	대한비뇨기종양학회,2010	국내	없음
The association of Prostate Stem Cell Antigen SNP with Prostate Cancer Risk	이강현 (교신)	대한비뇨기종양학회,2010	국내	0810220
Bcl-2 as a Predicting Factor on Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy: A Prospective Study	이강현 (교신)	2010 유럽비뇨기과학회	국외	0810220
Cardiovascular and renal toxicity of sunitinib and sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma	이강현 (공동)	Controversy in urology 2010	국외	없음
병리학적 T2, T3군에서 전립선 용적, 전립선내 종양 용적, 전립선내 종양 비율의 예후적 가치	이강현 (교신)	대한비뇨기과학회 2010	국내	0810220
임상적 T1 병기의 전립선암의 PET 영상에서 11C-acetate 섭취의 의미: 초기연구	이강현 (교신)	대한비뇨기과학회 2010	국내	0710330
근치적 전립선적출술 후 생화학적 재발의 예측인자로서 다섯 가지 생화학적 표지자의 발현: 염색강도와 구역비율을 이용한 연구	이강현 (교신)	대한비뇨기과학회 2010	국내	0810220
방광-전립선 절제술의 검체에서 우연히 발견된 전립선암의 특성	이강현 (교신)	대한비뇨기과학회 2010	국내	0810220
8q24 Genotype is Associated with Risk of Prostate Cancer in Korean Men	이강현 (교신)	대한비뇨기과학회 2010	국내	0810220

Prostate Stem Cell Antigen mRNA in Peripheral Blood as a Potential Predictor of Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy	이강현 (교신)	2009 유럽비뇨기과학회	국외	0810220
Lymphovascular Invasion on Transurethral Resection Specimen as a Predictor of Progression and Metastasis in Patients with Newly Diagnosed T1 Urothelial Carcinoma of the Bladder	이강현 (교신)	2009 유럽비뇨기과학회	국외	없음
Value of PET/CT for Intraprostatic Localization of Prostate Cancer: Prospective Intra-patient Comparison of MR Imaging, 18F-FDG PET/CT, 11C-acetate PET/CT Using Histopathologic Analysis	이강현 (교신)	2009 유럽비뇨기과학회	국외	0710330
전립선암의 진단을 위한 양전자방출단층촬영/자기공명영상 융합 영상 기법의 개발에 관한 초기 연구	이강현 (교신)	대한비뇨기과학회 추계학술대회 2009	국내	0710330
근치적 전립선절제술 후 재발의 예측인자로서 Prostate Specific Membrane Antigen의 유용성	이강현 (교신)	대한비뇨기과학회 추계학술대회 2009	국내	0810220
상부요로 이행세포암으로 신요관적출술 후 단일신 상태에서 시행한 씨스플라틴 기반의 항암화학요법이 신기능에 미치는 영향	이강현 (교신)	대한비뇨기과학회 추계학술대회 2009	국내	없음
근치적 전립선적출술 후 생화학적 재발의 예측인자로서 Bcl-2의 발현: 전향적 연구	이강현 (교신)	대한비뇨기과학회 추계학술대회 2009	국내	0810220
골전이성 비뇨기암 환자의 치료에 있어서 조메타 사용의 부작용	이강현 (교신)	대한비뇨기과학회 추계학술대회 2009	국내	없음
전이성 신세포암 환자에서 표적치료로 인한 심혈관계 및 신장독성	이 강 현 (공동)	대한비뇨기과학회 추계학술대회 2009	국내	없음
전이성 투명 신세포암 환자에서 sunitinib과 sorafenib의 치료 효과와 이상반응 비교	이 강 현 (공동)	대한비뇨기과학회 추계학술대회 2009	국내	없음
장기간 3주 주기의 ocetaxel-Prednisolone 항암요법 후 완전관해를 이룬 57세 전립선암 환자 1례	이강현 (교신)	대한비뇨기종양학회 정기학술대회 2009	국내	없음
육종양암 변이성 방광 이행성 상피세포암	이강현 (교신)	대한비뇨기종양학회 정기학술대회 2009	국내	없음
호르몬 불응성 전립선암에서 Docetaxel 투여 후 PSA flare 현상의 의의	이강현 (교신)	대한비뇨기종양학회	국내	0810220
고위험군 국소 전립선암 환자에서 근치적 절제술 후 생화학적 재발의 예측인자로서 Prostate Stem Cell Antigen의 유용성	이강현 (교신)	대한비뇨기과학회	국내	0810220
근치적 전립선적출술 후 생화학적 재발의 예측인자로 Epidermal Growth Factor Receptor의 발현	이강현 (교신)	대한비뇨기과학회	국내	0810220

Value of PET/CT for Intraprostatic Localization of Prostate Cancer: Prospective Intra-patient Comparison of MR Imaging, 18F-FDG PET/CT, 11C-acetate PET/CT Using Histopathologic Analysis	이강현 (교신)	대한비뇨기종양학회	국내	0710330
근치적 전립선적출술 후 방광요도문합 부위의 요누출에 대한 검사 방법으로서 컴퓨터 단층촬영을 이용한 방광조영술의 유용성	이강현 (교신)	대한비뇨기종양학회	국내	0710330
T1G3 방광이행세포암에서 생화학적 지표의 발현이 예후에 미치는 영향	이강현 (교신)	대한비뇨기종양학회	국내	0110150
T1 방광이행세포암으로 처음 진단된 환자에서 림프관/혈관침범의 임상적 의의	이강현 (교신)	대한비뇨기과학회	국내	0110150
Results of repeated transurethral resection for a second opinion in patients referred for nonmuscle invasive bladder cancer: the referral cancer center experience and review of the literature	이강현 (교신)	World Congress of Endourology	국외	0710330
전이성 투명 신세포암 환자에서 Sunitinib의 치료 효과와 이상반응에 대한 보고	이강현 (공동)	대한비뇨기과학회	국내	없음
전이성 투명 신세포암에서 multiple tyrosine-kinase inhibitor 치료 후 전이 병변의 크기 감소	이강현 (공동)	대한비뇨기과학회	국내	없음
전이성 투명 신세포암 환자에서 일차 표적치료제와 이차 표적치료제로서 sorafenib의 효과에 대한 분석	이강현 (공동)	대한비뇨기과학회	국내	없음

1) 지역 : 국내, 국외

다. 산업재산권

구분	특허명	출원인	출원국	출원번호

※구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저 서

저서명	저자	발행기관(발행국, 도시)	쪽수	Chapter 제목, 쪽수 (공저일 경우)
전립선암 진료지침	비뇨기종양학회	의학문화사(서울)	59-76	방사선치료 및 최소침습치료
방광암 진료지침	비뇨기종양학회	의학문화사(서울)	82-109	침윤성방광암치료: 수술, 방사선치료

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
전립선암환자의 전립선 조직에서의 PSCA, PSMA, 그리고 최근에 밝혀진 유전자인 PCA3의 발현을 확인하여 전립선암의 예후를 예측하고 적절한 치료를 선택하는데 유용하게 적용	1차년도	real time-RT-PCR의 조건 확립	조건 확립함	100	100
		40명의 환자에서 PSMA, PSCA, PCA3의 검출	64례의 환자 혈액 채취 및 RT-PCR 시행		
	2차년도	50명의 환자에서 60 명의 환자에서 PSMA, PSCA, PCA3의 검출	74례의 환자 혈액 채취 및 RT-PCR 시행, 대상 환자의 면역 조직 화학 검사 시행 및 tissue microarray 제작 완료 임상정보와의 상관 관계를 분석하여 초기 결과를 보고	100	100
	3차년도	60명의 환자에서 PSMA, PSCA, PCA3를 검출하고 예후 예측인자로서의 가치 및 유용성을 검증	전체 187례의 환자의 혈액을 채취, RT-PCR 및 면역 조직 화학 검사 시행, 임상 정보와의 상관 관계를 분석하여 결과 발표 전립선암 환자에서 PSCA 유전자의 genetic polymorphims 연구결과 발표 전립선 종양 샘플의 동결 보관 프로토콜 확립 Transcriptone analysis (next generation sequencing) 확립 및 선행연구 시행	100	100

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
목표한 검체수에 대한 RT-PCR	목표한 검체수에 대한 RT-PCR을 초과 달성함
목표한 검체수에 대한 면역조직화학검사	목표한 검체수에 대한 면역조직화학검사를 초과 달성하였으며 bcl-2의 임상적 유용성을 보고

PSCA SNP 연구를 통해 한국인 전립선암 환자에서는 polymorphism을 확인	전립선암 환자에서 PSCA 유전자의 genetic polymorphims 연구결과 발표
조직 및 혈액에서의 생물학적 표지자의 발현과 임상정보와의 상관관계 확인 및 예후 예측인자로서의 유용성 검증	임상정보와의 상관관계를 분석하였고 PSCA와 PSMA의 혈액에서의 검출이 국소 전립선암, 특히 고위험군 국소전립선암의 수술 후 재발을 예측하는 예후 인자로서의 유용성 확인

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	5	Urology(IF 2.365), Journal of Urology(IF 4.053), Jornal of Surgical Oncology(2.478) 등
산업재산권 등록		특허 등록 예상 국가, 예상 특허명 등
기 타		500례 이상의 전립선암 혈액 및 조직 은행 구축

(2) 연구성과의 활용계획

본 연구를 통해 확인한 전립선암의 근치적 수술 후 재발을 예측하는 데 있어 PSCA, PSMA의 임상적 유용성을 이용하여 국소 전립선암 환자의 치료 선택에 있어 유용한 예후인자로 실제 적용이 가능하며 환자 맞춤형 치료에 있어 기존의 임상적 병기, 분화도 등의 예후인자와 더불어 큰 도움이 될 것으로 기대된다. 특히, 고위험군 국소 전립선암 환자의 치료 결정에 있어 PSCA의 발현 유무를 예후인자로 적용할 수 있을 것으로 생각된다. SNP 연구를 이용한 한국인 전립선암 환자에서의 PSCA 유전적 다형성증을 확인함으로써 전립선암의 유전적 요인에 대한 인식을 가지게 되었으며 향 후 검증연구와 기능적 연구를 통해 전립선암의 진단 및 치료에 적용할 예정이다. 현재까지 500례 정도의 전립선암 환자의 혈액과 신선동결조직을 보관하는 프로토콜을 확립함으로써 향 후 지속적인 전립선암의 생물학적 연구의 기반을 구축하게 되었다.

6. 참고문헌

Joung JY, Lee KH et al,: Prostate Stem Cell Antigen mRNA in Peripheral Blood as a Potential Predictor of Biochemical Recurrence in High-Risk Prostate Cancer. J Surg Oncol 101:145, 2009

Joung JY, Lee KH et al,: Prostate Specific Membrane Antigen mRNA in Blood as a Potential
Predictor of Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy. JKMS 25:1291, 2010

Thomas, G., Jacobs, K. B., Yeager, M. et al.: Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer. Nat Genet, 40:310,2008

Yeager, M., Orr, N., Hayes, R. B. et al.: Genome-wide association study of prostate cancer identifies a second risk locus at 8q24. Nat Genet, 39:645,2007

Zheng, S. L., Sun, J., Wiklund, F. et al.: Cumulative association of five genetic variants with prostate cancer. N Engl J Med, 358:910,2008

Gudmundsson, J., Sulem, P., Manolescu, A. et al.: Genome-wide association study identifies a second prostate cancer susceptibility variant at 8q24. Nat Genet, 39:631,2007

Chen, M., Huang, Y. C., Yang, S. et al.: Common variants at 8q24 are associated with prostate cancer risk in Taiwanese men. Prostate, 70:502,2010

Liu, M., Kurosaki, T., Suzuki, M. et al.: Significance of common variants on human chromosome 8q24 in relation to the risk of prostate cancer in native Japanese men. BMC Genet, 10:37,2009

Zheng, S. L., Hsing, A. W., Sun, J. et al.: Association of 17 prostate cancer susceptibility loci with prostate cancer risk in Chinese men. Prostate, 70:425,2010

Wang, L., McDonnell, S. K., Slusser, J. P. et al.: Two common chromosome 8q24 variants are associated with increased risk for prostate cancer. Cancer Res, 67:2944,2007

Reiter, R. E., Gu, Z., Watabe, T. et al.: Prostate stem cell antigen: a cell surface marker overexpressed in prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A, 95:1735,1998

Gu, Z., Thomas, G., Yamashiro, J. et al.: Prostate stem cell antigen (PSCA) expression increases with high gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer. Oncogene, 19:1288,2000

Sakamoto, H., Yoshimura, K., Saeki, N. et al.: Genetic variation in PSCA is associated with susceptibility to diffuse-type gastric cancer. Nat Genet, 40:730,2008

Wang, S., Tang, J., Wang, M. et al.: Genetic variation in PSCA and bladder cancer susceptibility in a Chinese population. Carcinogenesis, 31:621,2010

Gabriel, S., Ziaugra, L., Tabbaa, D.: SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. Curr Protoc Hum Genet, Chapter2:Unit212,2009

Firth, D.: Bias reduction of maximum likelihood estimates. Biometrika, 80:27,1993

Gao, X., Starmer, J., Martin, E. R.: A multiple testing correction method for genetic association studies using correlated single nucleotide polymorphisms. Genet Epidemiol, 32:361,2008

Wu, X., Ye, Y., Kiemeney, L. A. et al.: Genetic variation in the prostate stem cell antigen gene PSCA confers susceptibility to urinary bladder cancer. Nat Genet, 41:991,2009

Drysdale, C. M., McGraw, D. W., Stack, C. B. et al.: Complex promoter and coding region beta 2-adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness. Proc Natl Acad Sci U S A, 97:10483,2000

Egan, J. B., Thompson, P. A., Ashbeck, E. L. et al.: Genetic polymorphisms in vitamin D receptor VDR/RXRA influence the likelihood of colon adenoma recurrence. Cancer Res, 70:1496,2010

Karami, S., Brennan, P., Rosenberg, P. S. et al.: Analysis of SNPs and haplotypes in vitamin D pathway genes and renal cancer risk. PLoS One, 4:e7013,2009

Menashe, I., Rosenberg, P. S., Chen, B. E.: PGA: power calculator for case-control genetic association analyses. BMC Genet, 9:36,2008

D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, et al: Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. Jama 1998;280:969 - 974.

Ofer Yossepowitch, James A. Eastham: Radical prostatectomy for high-risk prostate cancer. World J Urol 2008;26:219 - 224.

Joung JY, Yang SO, Jeong IG, et al: Reverse transcriptase-polymerase chain reaction and immunohistochemical studies for detection of prostate stem cell antigen expression in prostate cancer: Potential value in molecular staging of prostate cancer. Int J Urol 2007;14:635-643.

Jenkins RB, Qian J, Lieber MM, Bostwick DG:Detectionofc-myconcogeneamplificationandchromosomalanomaliesinmetastaticprostaticcarcinomabyfluorescenceinsituhybridization.Cancer Res 1997;57:524-531.

Yossepowitch O, Eggener SE, Bianco FJ Jr, et al: Radical prostatectomy for clinically localized, high risk prostate cancer: critical analysis of risk assessment methods. J Urol 2007; 178:493 - 499; discussion 499.

Yossepowitch O, Eggener SE, Serio AM, et al: Secondary therapy, metastatic progression, and cancer-specific mortality in men with clinically high-risk prostate cancer treated with radical prostatectomy. Eur Urol 2008;56:950-959.

Zippelius A, Pantel K: RT-PCR-based detection of occult disseminated tumor cells in peripheral blood and bone marrow of patients with solid tumors. An overview. Ann. NY Acad. Sci. 2000;906:110 - 123.

Reiter RE, Gu Z, Watabe T, et al: Prostate stem cell antigen: a cell surface marker overexpressed in prostate cancer. Proc. Natl Acad. Sci. USA 1998;95:1735 - 1740.

Gao CL, Dean RC, Pinto A, et al: Detection of circulating prostate specific antigen expression prostatic cells in the bone marrow of radical prostatectomy patients by

sensitive reverse transcriptase polymerase chain reaction. J Urol 1999;161:1070 - 1076.

Oefelein MG, Ignatoff JM, Clemens JQ, et al: Clinical and molecular followup after radical retropubic prostatectomy. J Urol 1999;162:307 - 311.

Okegawa T, Noda H, Kato M, et al: Value of reverse transcription polymerase chain reaction assay in pathological stage T3N0 prostate cancer. Prostate 2000;44:210-218.

7. 첨부서류