기관고유연구사업 결과 보고

결재	과제책임자	과 장	부 장
	엄현석	박원서	이강현

본인이 수행한 2008~2010년도 기관고유연구사업 과제 연구결과를 붙임과 같이 보고합니다.

과제명	혈액암 환자의 진단 및 맞춤치료를 위한 표지자 개발
과제책임자 (소속, 성명)	혈액암연구과 엄현석
총연구비	200,000천원 (2008년:70,000천원, 2009년:65,000천원, 2010년:65,000천원)
총연구기간	2008. 3. ~ 2010. 12. 31

붙임 : 기관고유연구사업 최종보고서 1부

2010년 12월 31일

과제책임자 엄현석

기관고유연구사업 최종보고서

(과제번호 : 0810440)

혈액암 환자의 진단 및 맞춤치료를 위한 표지자 개발

Discovery of New Biomarkers for Diagnosis and Tailored Therapy in Hematologic Malignancies

과제책임자 : 엄현석

국 립 암 센 터

제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 "혈액암 환자의 진단 및 맞춤치료를 위한 표지자 개발" 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2010. 12. 31

국 립 암 센 터

과 제 책 임 자 : 엄 현 석

연 구 원 : 공 선 영

〃 : 윤 탁

〃 : 박 원 서

〃 : 박 소 희

〃 : 한 미 화

〃 : 남 명 현

〃 : 김 인 숙

목　　　차

< 요 약 문 >

(한글)

(영문)

1. 연구의 최종목표

2. 연구의 내용 및 결과

3. 연구결과 고찰 및 결론

4. 연구성과 및 목표달성도

5. 연구결과의 활용계획

6. 참고문헌

7. 첨부서류

<요 약 문>

연구분야(코드)			과제번호	0810440
과 제 명	혈액암 환자의 진단 및 맞춤치료를 위한 표지자 개발			
연구기간/연구비 (천원)	합계	2008년 03월 일 ~ 2010년 12월 31일		200,000
	1차년도	2008년 03월 일 ~ 2008년 12월 31일		70,000
	2차년도	2009년 01월 일 ~ 2009년 12월 31일		65,000
	3차년도	2010년01월 일 ~ 2010년 12월 31일		65,000
과제책임자	성 명	엄현석	주민등록번호	
	전화번호	010-7726-6778	전 자 우 편	hseom@ncc.re.kr
색인단어	국문	혈액암, 맞춤 치료, 표지자, 림프종, 다발성 골수종		
	영문	Hematologic malignancies, Tailored therapy, Diagnosis, Biomarker, Lymphoma, Multiple myeloma		

◆ 연구목표

<최종목표>

- 혈액암 환자에서 단백체, 유전체 분석을 통한 진단 및 맞춤치료 표지자 개발

<당해년도 목표>

- 임상 검체 확보
- 혈액암 환자의 혈청(Serum) 및 뇨(Urine) 이용한 단백체 분석 및혈액암 표지자 동정 및 검증
- 항체 치료제의 약물 반응에 관여하는 유전자 다형성 (Fc gamma receptor) 과 치료 반응 및 생존 분석
- MAGE의 치료제 타겟으로서의 가능성에 대한 검토 및 케이스 증가의 필요성

◆ 연구내용 및 방법

- 임상 검체 확보 및 임상 데이터 축적
  - ▪ 국립암센터에서 진단받고 치료 받는 환자 중 외래를 내원하고 있는 환자들에서 연구 동의를 얻어 추가 검체를 확보함

- 림프중 환자의 혈청을 이용한 단백체 분석 및 혈액암 표지자 동정 및 검증

▪ 림프종 환자 중 치료 후 재발된 환자와 재발되지 않은 환자의 관해 시기 검체를 이용해 단백체 분석을 시행. 발굴된 CK9과 CK10 에 대해 검증을 수행함.

- 림프종 치료전 환자 혈청 및 소변을 통하여 SDS-PAGE 분석 후 LC-MS/MS 분석을 시행하여 단백체 분석 및 혈액암 표지자 동정 및 검증.

▪ 소변 (Urine)을 통하여 SDS-PAGE 분석 후 LC-MS/MS 분석 후 Hypoxanthine 단백체 동정하여 혈액암에 대한 진단적 스크리닝이 가능할 것으로 판단됨

- MAGE의 림프종 치료제 타겟으로서 가능성을 확인하기 위해 in vitro 상 MAGE를 target으로 한 후

▪ DLBCL cell line에 siRNA 로 유도된 MAGE-A3 down regulation 이 cell survival 의 감소로 나타남을 MTT assay 로 확인

- 항체 치료제의 약물 반응에 관여하는 유전자 다형성 (Fc gamma receptor) 과 생존 분석
  - 항체형 치료제의 반응을 위해 체내에서 반응하는 면역 세포들과의 결합력을 결정하는 유전자 다형성의 기초 데이터 분석. 현재까지 rituximab 에 대해서는 유의성에 대해 논란이 많은 상황이므로 최근까지의 Hapmap data 및 dbSNP 데이터 확인하여 유전자다형성 빈도 및 기존 논문에 보고된 기능과의 관련성 확인함
  - Functional SNP 인지 고려한 후 minor allele frequency 와 TagSNP 위치를 고려하여 target SNP 을 selection
  - Target SNP 을 결정한 후 genotyping 시행, 혈액검체에서 DNA 추출이 가능한 환자의 경우 Taqman genotyping 을 이용, 과거에 치료 받은 환자중 bone marrow aspiration slide 만 남아 있는 환자의 경우 sequencing 으로 genotyping을 시행
  - Genotyping 완료 후 임상 자료와의 관련성 분석

◆ 연구성과

-정량적 성과

구분	달성치/목표치[1]	달성도(%)
SCI 논문 편수	4/2	
IF 합	7/5	
기타 성과	2*	

1) Profiling of Low Mass Ions in Urine to Predict Non-Hodgkin Lymphoma. (BMC Cancer. 3.08)

2) Detection of Circulating Lymphoma Cells in Patients with Non-Hodgkin Lymphoma using MAGE-A3 Gene Expression in Peripheral Blood. (Leukemia Research. 2.39)

3) Glutathione-S-Transferase genotypes influence the risk of chemotherapy-related toxicities and prognosis in Korean patients with diffuse large B-cell lymphoma. Cancer Genetics and Cytogenetics (1.482)

4) DNA repair gene XRCC1 polymorphisms and haplotypes in DLBL in a korean population. Cancer Genet Cytogenet (1.482)

-정성적 성과

· 요(urine) 내에 존재하는 물질의 GC-MS 분석을 통한 요내 당류 물질의 정량적 변화 확인
· 저분자 질량값을 가지는 대사체 물질의 비교 분석을 위한 표준화 작업 완성
· 혈액암 환자의 요 분석을 통한 혈액암 screening system 개발
· 혈액암 환자의 말초혈액 검체 RT-PCR 를 이용한 순환암세포 (circulating tumor cell) 검출
 림프종 환자 95명 중 45명에서 MAGE-A3 양성 발현 확인 (47.37%), 정상 대조군 40명 중 0명에서 MAGE-A3 양성 발현 확인 (0%)
· 림프종 환자의 임상 양상 및 생존과 MAGE-A3 관련성 분석
· 림프종 환자 반응군/비반응군의 혈청 단백질을 이용한 2DE-MALDI TOF 및 SDS-PAGE 로 단백질 set 확인
· 항체 치료제의 약물 반응에 관여하는 유전자 다형성 (Fc gamma receptor) 과 치료 반응 및 생존 분석

◆ 참여연구원 (최종연도 참여인원)	성 명	엄현석, 공선영, 윤탁, 박원서, 박소희, 한미화, 남명현, 김인숙
	주민등록번호	

Project Summary

Title of Project	Discovery of New Biomarkers for Diagnosis and Tailored Therapy in Hematologic Malignancies
Key Words	Hematologic malignancies, Tailored therapy, Diagnosis, Biomarker, Lymphoma, Multiple myeloma
Project Leader	Hyeon-Seok Eom

Non-Hodgkin lymphoma (NHL) is a hematologic malignancy for which good diagnostic and tailored therapy markers are lacking. Despite continued improvement in our understanding of NHL, efforts to identify these markers have yielded dismal results.
Therefore, we first translated low-mass-ion information in urine samples from patients with NHL. After testing of variable parameters before MALDI-TOF analysis of low-mass ions in urine was done to reduce an error. Urine from 30 controls and 30 NHL patients was analyzed as a training set for NHL prediction. All individual peak areas were normalized to total area up to 1000 m/z. The training set analysis was repeated four times. Low-mass peaks that were not affected by changes in experimental conditions were collected using MarkerViewTM software. Human Metabolome Database (HMDB) searches and ESI LC-MS/MS analyses were used to identify low-mass ions that exhibited differential patterns in control and NHL urines. Identified low-mass ions were validated in a blinded fashion in 95 controls and 66 NHL urines to determine their ability to discriminate NHL patients from controls. The 30 highest-ranking low-mass-ion peaks were selected from the 60-urine training set, and three lowmass-ion peaks with high intensity were selected for identification. Of these, a 137.08-m/z ion showed lower masspeak intensity in urines of NHL patients, a result that was validated in a 161-urine blind validation set (95 controls and 66 NHL urines). The 130.08-m/z ion was identified from HMDB searches and ESI LC-MS/MS analyses as hypoxanthine (HX). The HX concentration in urines of NHL patients was significantly decreased ($P < 0.001$) and was correlated with the mass-peak area of the 137.08-m/z ion. At an HX concentration cutoff of 17.4 μM, sensitivity and specificity were 79.2% and 78.4%, respectively. This result represents a good example of low-mass-ion profiling in the setting of disease screening using urine.

Then we focused the meaning of circulating lymphoma cells (CLCs) using lymphoma-specific gene expression in peripheral blood. MAGE-A3 is widely expressed in solid tumors and is a potent candidate for immunotherapy. To determine whether MAGE-A3 expression would be a useful marker for CLCs in NHL, we assessed MAGE-A3 mRNA expression in the peripheral blood of NHL patients and controls.MAGE-A3 gene expression in ten lymphoma cell lines (Farage, RL, SU-DHL, Toledo,WSU-NHL, BJA-B, Daudi, Raji, Granta-519 and Jurkat) using nested RT-PCR showed positivity in four lymphoma cells (RL, Farage, Toledo and Raji) and the detection sensitivity was 1 in 1000 cells. MAGE-A3 expression was determined in buffy coat samples of 40 controls and 95 NHL patients prior to treatment. and represent that present in 45 of 95 (47.3%) patients with NHL, but in none of the 40 controls. Clinical characteristics (e.g., cell lineage) and international prognostic indices, including age, performance, LDH, stage and extra-nodal involvement, were evaluated and related to MAGE-A3 expression.Hazard ratios, reflecting risk for overall survival and progression-free survival, were also evaluated.Follow-up MAGE-A3 expression was evaluated at two time points: after 3 - 4 cycles of chemotherapy (80patients) and after 6 - 8 cycles of chemotherapy (74 patients). MAGE-A3 expression prior to treatment was not associated with clinical features or patient survival. During follow-up, only six patients (7.5%) were positive for MAGE-A3 after 3 - 4 cycles of chemotherapy and three (4.1%) were positive after - 8 cycles. The results showed that MAGE-A3 gene expression was frequent in NHL patients and decreased after effective chemotherapy, suggesting that MAGE-A3 can be used as a tumor marker for CLCs in patients with NHL. However, MAGE-A3 expression showed no prognostic value in this group of patients. Moreover, we tried to find functional effects of MAGE-A3 in lymphoma using lymphoma cell line. Since siRNA treatment, cell survival decreased which means MAGE-A3 has importance in survival pathway for lymphoma cell lines.

Third, polymorphisms in detoxification enzymes of the glutathione S-transferase (GST) family, known associated with treatment response, resistance, and drug-related toxicity, was studied to investigate the influence of the genetic polymorphisms GSTM1, GSTT1, and GSTP1 on treatment response in 94 Korean patients with de novo diffuse large B-cell lymphoma, who had received rituximab plus cyclophosphamide/doxorubicin/vincristine/prednisone (R-CHOP) as a front-line regimen. Deletions of the GSTM1 and GSTT1 genes were detected using a multiplex polymerase chain reaction technique, and the functional GSTP1 polymorphism, Ile105Val, was genotyped using the TaqMan assay. The treatment response rate did not differ according to GST polymorphisms. Patients with the GSTT1-null genotype, however, showed more frequent grade IIIeIV chemotherapy-related toxicities, including leukocytopenia [odds ratio (OR)53.1; 95% confidence interval (95%CI), 1.2e8.0; P50.025], fever (OR55.3; 95% CI, 1.4e19.7; P50.009), and mucositis (OR54.6; 95% CI, 1.4e15.1; P50.012). Patients with the GSTM1/T1 double-null genotype had more grade IIIeIV thrombocytopenia (OR57.8; 95% CI, 1.5e41.1; P50.002) compared to those with other genotypes. In male patients, the GSTM1/T1 double-null genotype was associated with a shorter event-free survival period (P50.02). This study suggests that GSTT1 deletion may significantly increase the risk of drug-related toxicity after R-CHOP chemotherapy in patients with DLBCL, and is associated with worse prognosis in males. Another polymorphism with associated of prognosis has been reported in lymphoma with association of antibody drug effect is Fc gamma receptor polymorphism. We analyzed genotyping in way to overcome pseudogene effect. However, there was no prognostic impact in these gene polymorphism.

편집순서 6 : 연구결과

1. 연구의 최종목표

○ 당초 연구계획을 참고하기 위한 자료임. 선정당시 「과제계획서」와 전년도 제출하였던 「연차실적·계획서」상의 내용과 동일하게 작성해야 함. 연구사업의 목적, 범위 등에 대해 기술

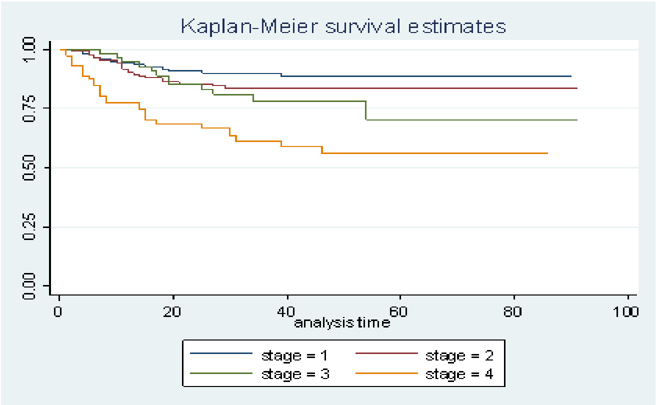
<최종목표>

- 혈액암 환자에서 단백체, 유전체 분석을 통한 진단 및 맞춤치료 표지자 개발

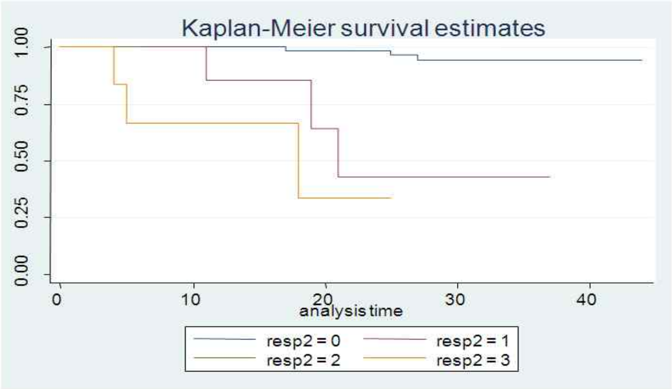
2. 연구의 내용 및 결과

1] 혈액암 환자의 임상 자료 분석

- overall survival (n=399) of Non-Hodgkin lymphoma patients according to stage

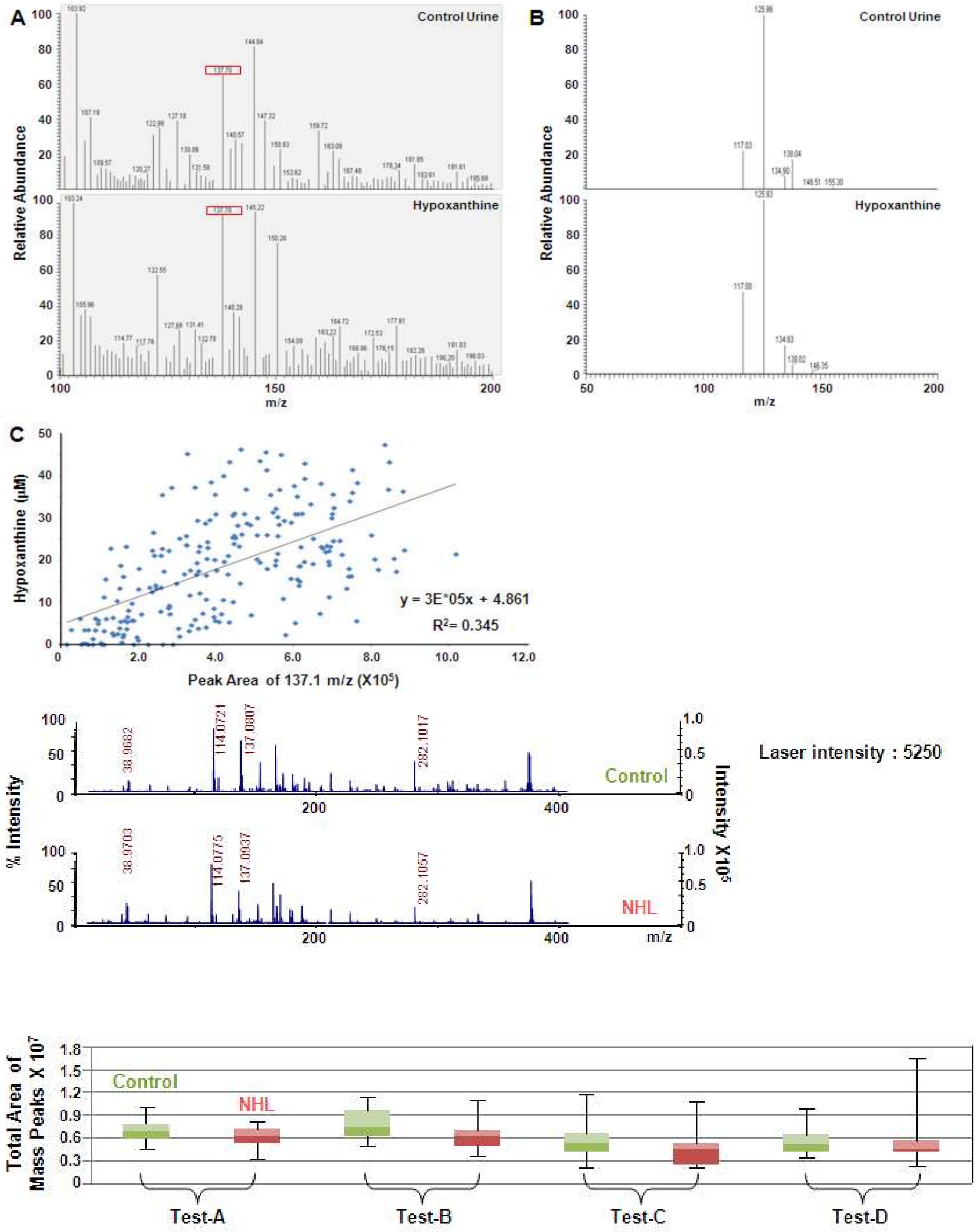


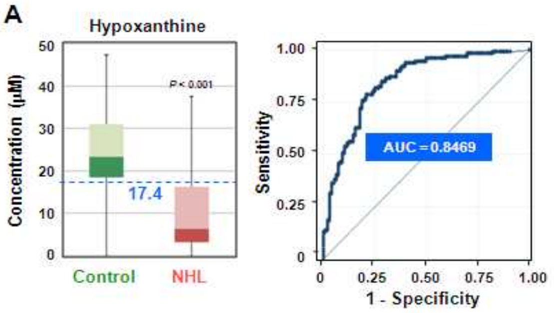
- overall survival (n=399) of Non-Hodgkin lymphoma patients according to response



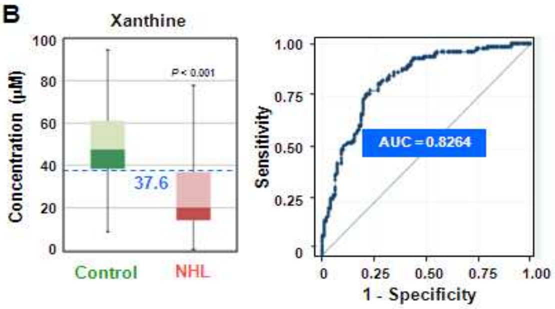
2] 요 내 저분자 질량값 물질 동정

- Candidate mass peak : database
- Validation by alternative methods
- Confirmation by material adding experiments

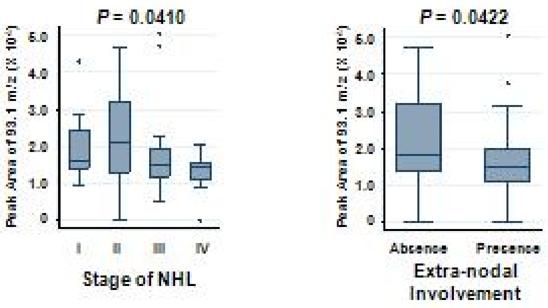

A
Control Urine
Hypoxanthine
Relative Abundance
m/z
B
Control Urine
Hypoxanthine
Relative Abundance
m/z
C
Hypoxanthine (μM)
y = 3E*05x + 4.861
R²= 0.345
Peak Area of 137.1 m/z (X10⁵)
38.9662
114.0721
137.0807
282.1017
Control
38.9703
114.0775
137.0937
282.1057
NHL
% Intensity
Intensity X10⁵
m/z
Laser intensity : 5250
Total Area of Mass Peaks X 10⁷
Control
NHL
Test-A
Test-B
Test-C
Test-D



	Predicted Control	Predicted NHL
True Control	98 (78.4%)	27 (21.6%)
True NHL	10 (20.8%)	76 (79.2%)



	Predicted Control	Predicted NHL
True Control	95 (76.0%)	30 (24.0%)
True NHL	21 (21.9%)	75 (78.1%)



- Association with clinical data

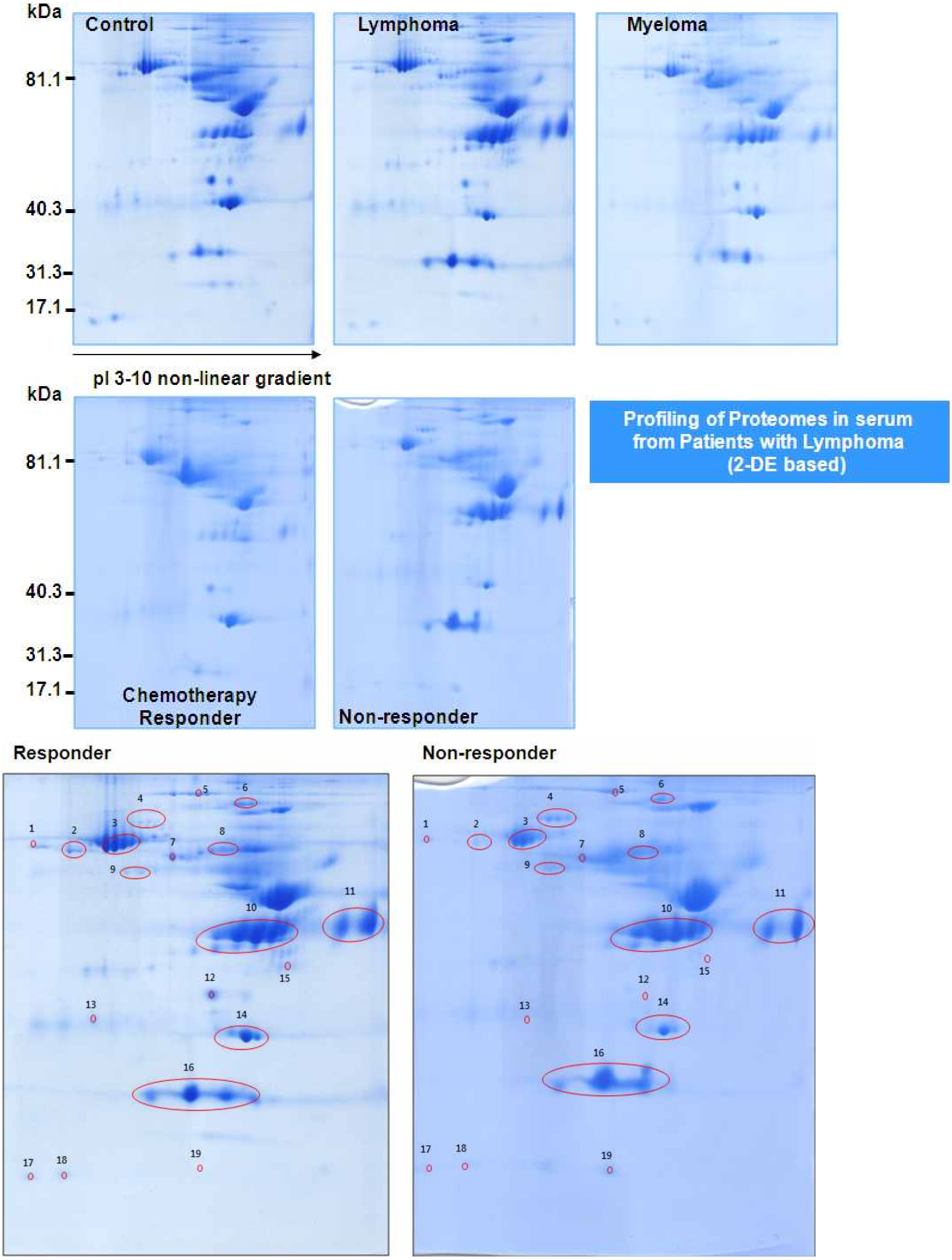
Stage 증가와 extra-nodal involvement 가 있을 경우 유의하게 감소하는 양상임

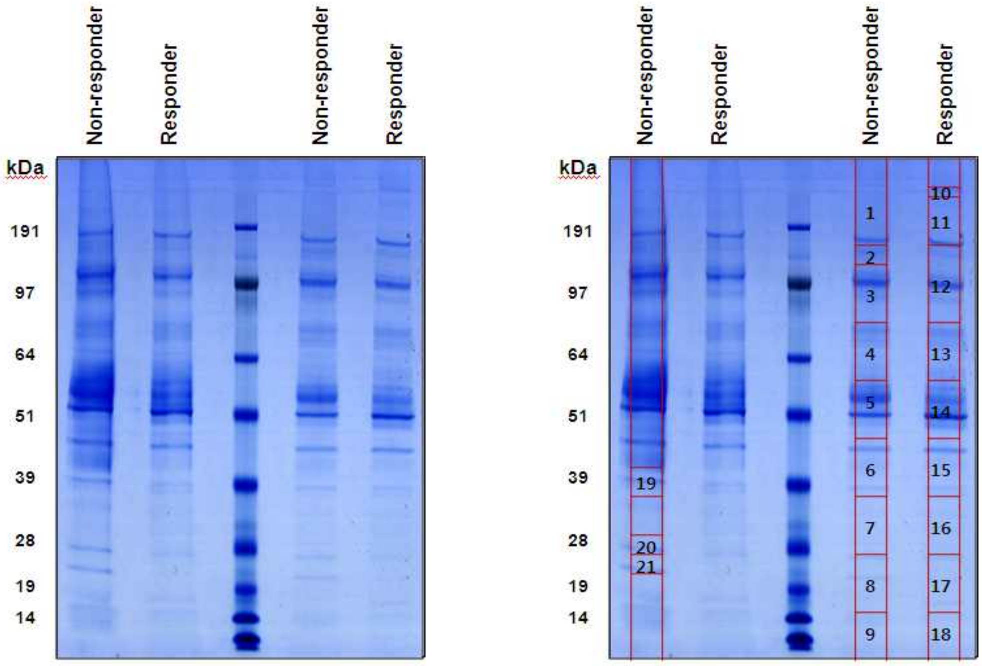
3] 림프종 환자 중 R-CHOP 항암제 반응군/비반응군의 단백체 분석

- 2D based proteome profiling

- 2D gel 분석 후 MALDI-TOF/TOF 분석

- SDS-PAGE gel 분석 후 LD-MS/MS 분석


kDa
Control
Lymphoma
Myeloma
81.1
40.3
31.3
17.1
pI 3-10 non-linear gradient
kDa
81.1
40.3
31.3
17.1
Chemotherapy
Responder
Non-responder
Profiling of Proteomes in serum
from Patients with Lymphoma
(2-DE based)
Responder
Non-responder
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19



- 데이터베이스 분석으로 후보 단백질 확인

: 2DE and TOF/MS-MS 분석에서 serum amyloid A protein spot 이 non-responder에서 증가된 양상임

: SDS-PAGE 후 LD-MS/MS 분석 시 Responder 에서는 관찰되지 않고 non-responder 에서만 증가된 10개의 후보 peptide 관찰

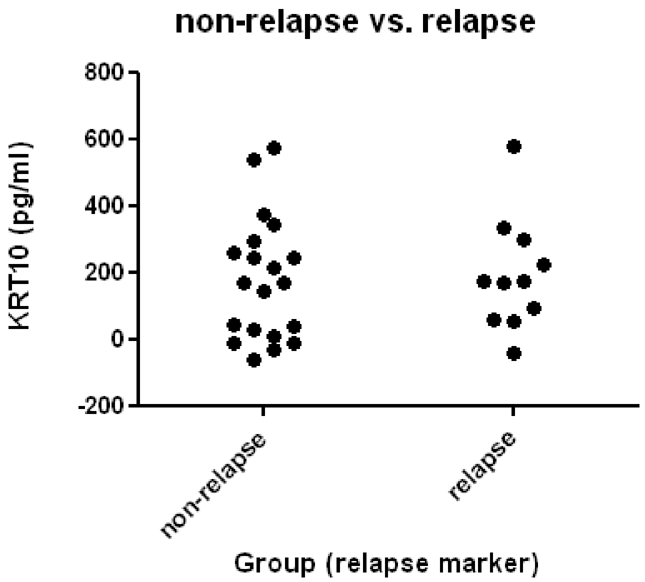
: SDS-PAGE 후 LC-MS/MS 분석 시 non-responder 에서는 관찰되지 않고 responder 에서만 증가된 14개의 후보 protein 관찰

MARKER	PROTEIN		MARKER	PROTEIN
Relapse	Apolipoprotein L1 precursor (ApoL-I)		Non-Relapse	Alpha-S1 casein precursor
Relapse	Beta-2-glycoprotein I precursor (B2GPI)		Non-Relapse	AMBP protein precursor
Relapse	Complement C2 precursor (C3/C5 convertase)		Non-Relapse	Apolipoprotein D precursor (Apo-D)
Relapse	F2 Prothrombin		Non-Relapse	Hemoglobin alpha-3 chain
Relapse	Complement C1q subcomponent subunit C (C1QC)		Non-Relapse	Hemoglobin alpha-D chain
Relapse	Alpha-1B-glycoprotein (A1BG)		Non-Relapse	Ig lambda chain V-III region LOI
Relapse	Keratin, type I cytoskeletal 9 (Cytokeratin 9)		Non-Relapse	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 precursor (ITI heavy chain H3) (SHAP)
Relapse	Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin 1)		Non-Relapse	Keratin, type I cytoskeletal 10 (KRT10)
Relapse	Kininogen precursor (Alpha-2-thiol proteinase inhibitor)		Non-Relapse	Complement factor H-related protein 1 (CFHR1)
Relapse	Vitamin K-dependent protein S precursor		Non-Relapse	similar to complement component C3, partial
			Non-Relapse	Keratin, type I cytoskeletal 10 (Cytokeratin 10)
			Non-Relapse	Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin 1)
			Non-Relapse	Prothrombin precursor (Coagulation factor II)
			Non-Relapse	Von Willebrand factor precursor (vWF)

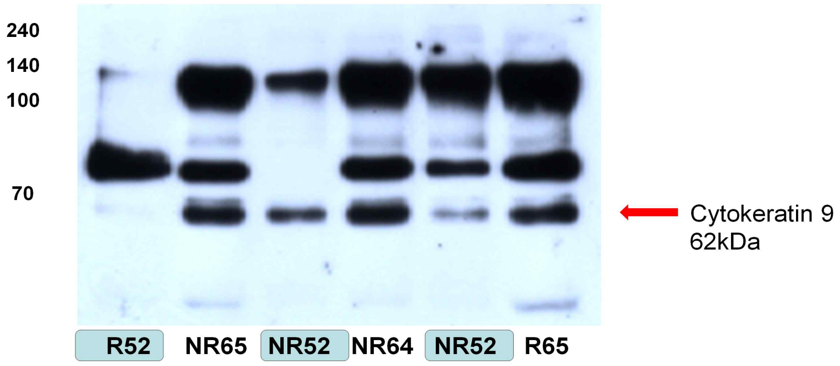
- Lymphoma 및 다른 암종에서 상기 단백질의 증감이 관찰된 예가 있는지 문헌 고찰을 시행한 결과 CK9 이 colorectal cancer 에서 5FU treatment 와 과 관련 있는 것으로 보고된 논문과 (Oncol Rep

2008:20(1):89-98. Identification of 5-fluorouracil response proteins in colorectal carcinoma cell line SW480 by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry), Gelsolin precursor 가 leukemia 의 vincristine resistant 와 관련된 결과를 확인함 (Proteomics. 2006;6(5):1681-94. Proteomic analysis reveals a novel role for the actin cytoskeleton in vincristine resistant childhood leukemia-an in vivo study)

- Candidate 단백질 중 대부분의 marker 는 응고인자와 관련된 factor 이고 증가된 cytokeratin 의 subtype 의 차이가 있어 cytokerain 9 과 cytokerain 10 의 validation 을 진행함
  - Cytokerain 10은 ELISA kit를 이용해 serum level을 validation 한 결과 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았음



  - CK9 의 경우 ELISA kit 나 이용할 수 있는 정량 kit 가 개발되지 않은 상태라 albumin을 제거한 후 serum 검체를 이용해 Western blotting 으로 level의 차이를 확인한 결과 SDS-PAGE의 결과와 상반되거나 뚜렷한 차이가 없었음.



4] 림프종 환자의 말초혈액 검체를 이용한 순환암세포 (circulating tumor cell) 검출

- 림프종 세포주의 Myeloma Antigen-Encoding Genes (MAGE-A3) 발현

: 총 10종의 혈액암 세포주 중 4개에서 발현되었으며, 발현된 4개의 세포주는 모두 B-cell lineage lymphoma에서 유래된 세포주임. Detection senstivity는 1000개 중 1개 이상 있을 때 detection이 가능함.
: Lymphoma cell lines 10종에서의 MAGE-A3 발현 확인 (Fig.1A 참조)

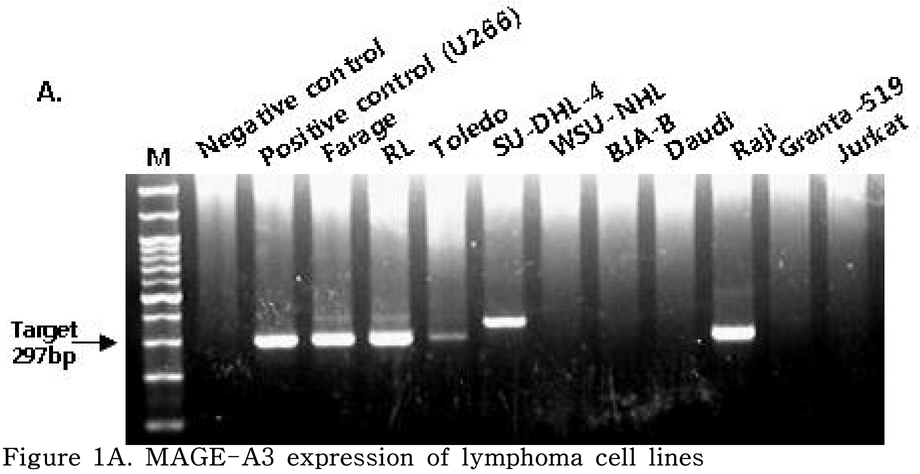
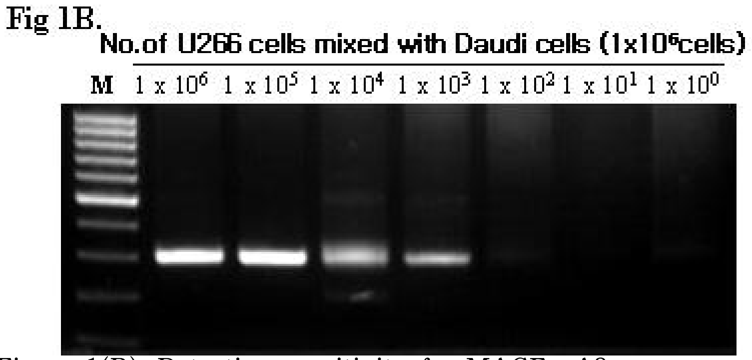


Figure 1A. MAGE-A3 expression of lymphoma cell lines

RT-nested PCR analysis for the expression of the MAGE-A3 was performed on lymphoma cell lines. Products amplified by RT-nested PCR are shown in lane 1 : negative control; lane 2 : positive control (U266); lane 3 : Farage lane 4 : RL;lane 5 : Toledo; lane 6 : SU-DHL4;lane7 : WSU-NHL; lane 8 : BJA-B; lane 9 : Daudi: lane10 : Raji lane11 : Granta519: lane12 : Jurkat. Lane 1 shows the lack of an amplification product when RT-PCR was performed in the absence of cDNA template. MAGE-A3 expression was observed in 4/10 (40%) lymphoma cell lines including Farage, RL, Toledo and Raji.

- Detection sensitivity



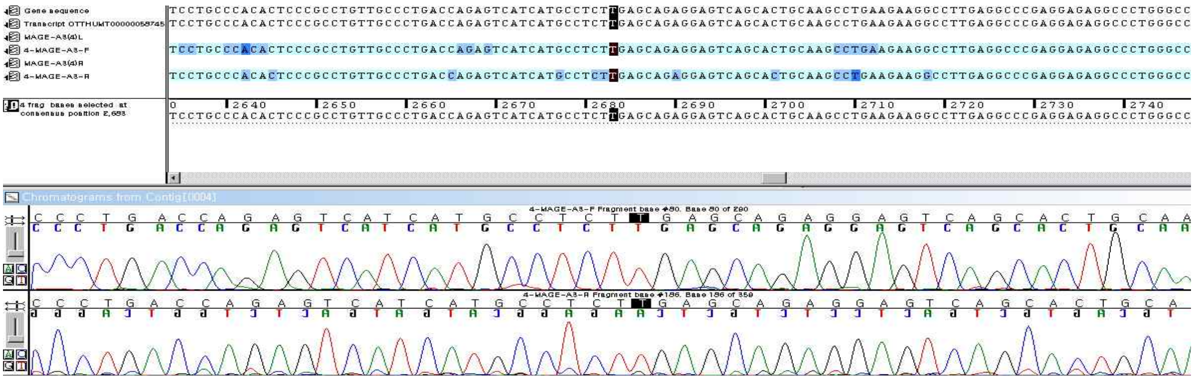
: Figure 1(B). Detection sensitivity for MAGE- A3

Melanoma antigen gene (MAGE) detection sensitivity was determined. Positive control cell line (U266) were mixed with negative control Daudi lymphoma cells at various concentrations with range $1\text{-}10^{6}/10^{6}$ cells, and the total RNA (1μg) isolated from mixed cells was used for MAGE-A3 expression. 5μl of the first PCR product as the template for the second (nested) PCR and the same condition.

- MAGE-A target product의 sequencing 확인 (Fig.1C 참조)

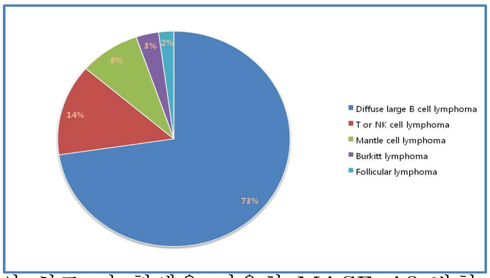
PCR product 가 MAGE-A3 인지 확인을 위해 sequencing 을 시행하여 sequence를 확인함 (Fig.1C 참조)

Figure 1(C). Sequencing of Target product



5) 비호지킨 림프종 환자의 혈액에서의 MAGE-A3 발현

- 비호지킨 림프종 환자의 혈액에서 RNA을 분리하여 MAGE-A3 유전자 발현을 확인. 총 95명의 환자와 대조군으로 정상인 40명의 혈액에서 분리된 RNA을 사용하여 확인한 결과 총 95명 중 45명 47.3% MAGE-A3 유전자 발현을 보였으며, 정상인 40명에서는 발현되지 않음을 확인하였다.
- 환자 질환별 분류 graph



- 혈액암 환자의 치료 전 혈액을 이용한 MAGE-A3 발현 (Fig.2 참조)

Fig 2.

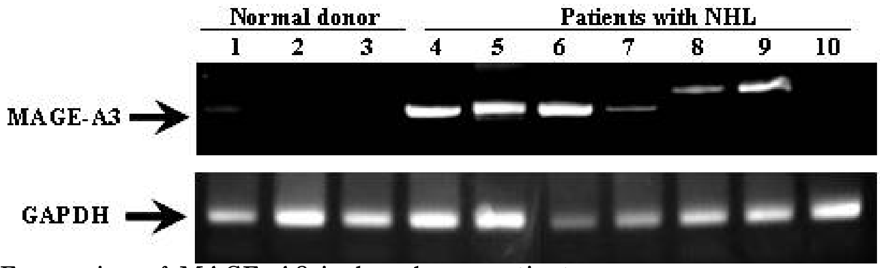


Figure 2. Expression of MAGE-A3 in lymphoma patients

RT-neted PCR analyses for the expression of the MAGE-A3 and GAPDH genes were performed on patients samples. Amplified products were visualized on a 3% agarose gele stained with 10mg/ml ethidium bromide. Products amplified by RT-nested PCR are shown in lanes 1-3 : normal donor and lane 4-10 : patients with NHL. MAGE-A3 gene expression was not detected in 40 normal donor but was detected in 45 of 95 patients (47.3%)

6) 비호지킨 림프종 환자의 임상 양상과 MAGE-A3 유전자 발현 유무의 상관성

Table 1. Association between clinical characteristics and peripheral blood MAGE-A3

expression in NHL patients

characteristics	MAGE-A3 (-) N(%)	MAGE-A3 (+) N(%)	*P* value
sex			0.095
Male	36 (59.0%)	25 (41.0%)	
Female	14 (41.2%)	20 (58.8%)	
Cell lineage			0.304
B cell	43 (55.8%)	34 (44.2%)	
T cell	7 (38.9%)	11 (61.6%)	
Performance status			0.597
0	17 (54.8%)	14 (45.2%)	
1	30 (50.0%)	30 (50.0%)	
2	3 (75.0%)	1 (25.0%)	
Stage			0.832
I	10 (52.6%)	9 (47.4%)	
II	18 (47.4%)	20 (52.6%)	
III	9 (56.3%)	7 (43.7%)	
IV	13 (59.1%)	9 (40.9%)	
Extra-nodal involvement			0.242
Absent	26 (59.1%)	18 (40.9%)	
Present	24 (47.1%)	27 (52.9%)	
IPI*			0.080
Low/Low-intermediate	36 (48.0%)	39 (52.0%)	
High/High-intermediate	14 (70.0%)	6 (30.0%)	
Bone marrow involvement			0.700
Absent	45 (51.1%)	43 (48.9%)	
Present	3 (60.0%)	2 (40.0%)	

*IPI : international prognostic index

Table 2. Hazard ratio for overall survival of Clinical characteristics & MAGE-A3 expression

	No. of patients(%)	HR (95%CI)*
Age, years (Median, rage)	57, 23-87	1.00 (0.96-1.03)
Sex		
Male	61 (64.2)	1.00
Female	34 (35.8)	0.27 (0.06-1.21)
Cell lineage		
B-cell	77 (81.1)	1.00
T-cell	18 (18.9)	4.02 (1.31-12.30)
Performance status		
0	31 (32.6)	1.00
1	60 (63.2)	1.25 (0.36-4.36)
2	4 (4.2)	7.76 (1.40-43.13)
Stage		
I	19 (20.0)	1.00
II	38 (40.00)	1.12 (0.10-12.35)
III	16 (16.8)	3.60 (1.37-36.62)
IV	22 (23.2)	9.09 (1.11-74.55)

	No. of patients(%)	HR (95%CI)*
Extra-nodal involvement		
Absent	44 (46.3)	1.00
Present	51 (53.7)	5.47 (1.21-24.84)
IPI		
Low	53 (55.8)	1.00
Low-intermediate	16 (16.8)	0.92 (0.10-8.87)
High-intermediate	21 (22.1)	5.73 (1.42-23.09)
High	5 (5.3)	57.06 (9.47-343.88)
Bone marrow involvement		
Absent	89 (93.7)	1.00
Present	5 (5.3)	1.57 (0.20-12.07)
Not identified	1 (1..0)	N.D.
MAGE-A3 expression at baseline		
Absent	50 (52.6)	1.00
Present	45 (47.4)	0.45 (0.14-1.48)

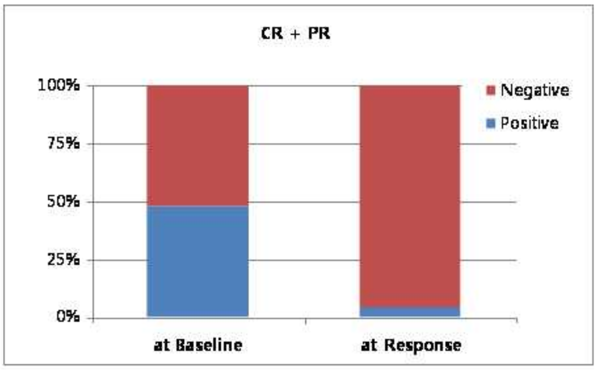
7) 비호지킨 림프종 환자의 치료 반응과 치료 전 후 MAGE-A3 유전자 발현 유무의 상관성

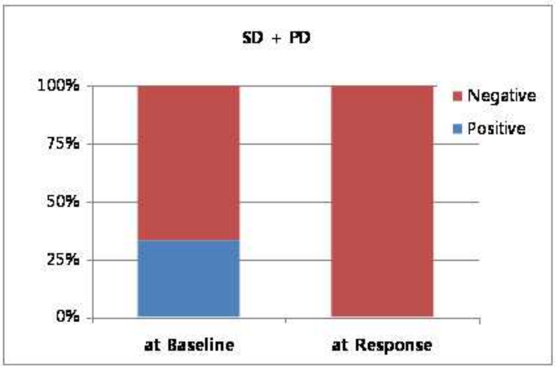
- Chemotherapy 후 두 시점 3-4cycles, 6-8cycles에 속하는 그룹의 혈액에서 MAGE-A3 유전자 발현의 변화를 확인해 보았다. follow up 기간의 MAGE-A3 발현변화를 보았을 때 3-4cycles에서 6명 (7.5%), 6-8cycles에서 3명 (4.1%) 에서만 발현됨을 확인하였다. (Fig.3 참조)

CR+PR		
	Baseline	Response
Positive	33	3
Negative	36	66

SD+PD		
	Baseline	Response
Positive	2	0
Negative	4	6

figure 3. The association of MAGE-A3 expression at both baseline and response evaluation and Tumor Response of NHL





8) 비호지킨 림프종 환자의 생존률과 MAGE-A3 유전자 발현의 상관성

- 비호지킨 림프종과 MAGE-A3 유전자의 발현이 임상양상 및 예후와 관련성이 있는지 확인하기 위해 Overall survival과 progression-free survival을 평가하였으며, 그러나 MAGE-A3 발현과 환자의 생존과는 연관성이 없는 것으로 확인되었다.

· NHL 과 DLBCL 환자 검체의 MAGE-A3 발현에 따른 생존율 비교 (Fig.4 참조)

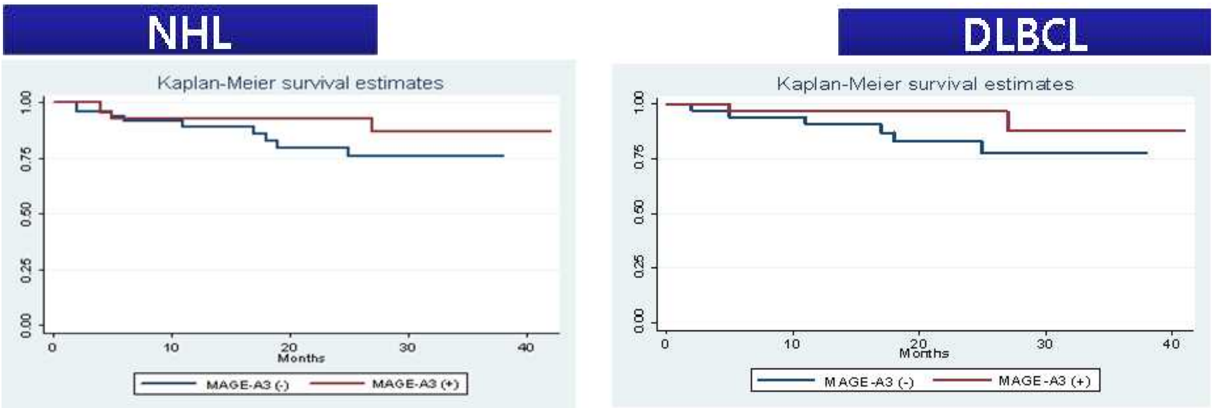
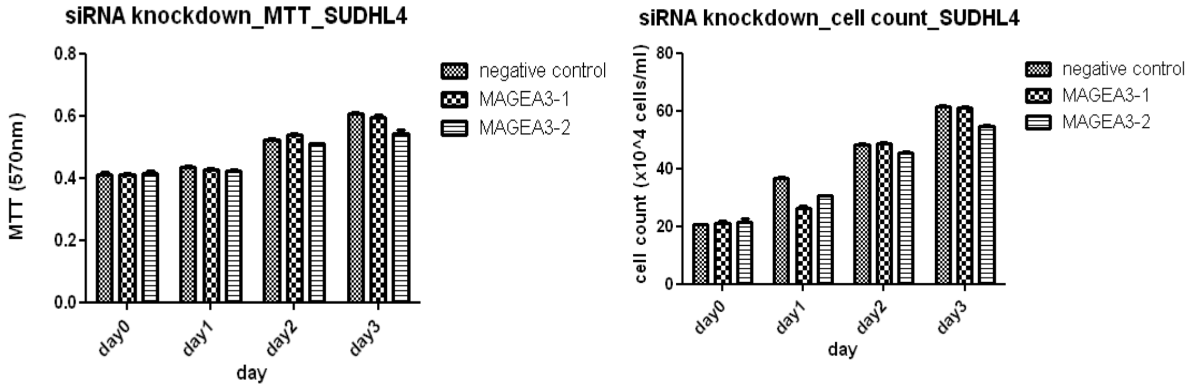


Figure 4. Overall survival according to MAGE-A3 expression

9) MAGEA3 siRNA transfection을 통한 cell viability 영향 확인

- siRNA treatment 후 cell count, MTT assay에서 cell viability 의 감소를 확인함.



4] Fc gamma Receptor Genotype

- Fc gamma Receptor (FcgR) 의 genetic polymorphism 에 따른 amino acid change 는 antibody dependent cytotoxicity (ADCC) 의 차이를 일으킬 수 있음
- 현재 림프종에서 사용 중인 항체형 약물인 rituximab 의 약물 반응이 FCGR의 genetic polymorphism 과 관련 있는지 관찰을 위해 genotyping 을 수행함
- FCGR 중 주요 genetic polymorphism 인 FCGR2A 와 FCGR3A 의 polymorphism 관찰을 위해 기존 논문에서 가장 흔히 사용된 RFLP 법을 진행함
- RFLP 법 진행 결과 gel 농도와 온도 등에 민감하게 반응하여 반복 실험에서 동일한 결과가 관찰되지 않아 TaqMan assay genotyping 법으로 시행함

Fig.1. FcgR 3A rs396991 genotyping by RFLP

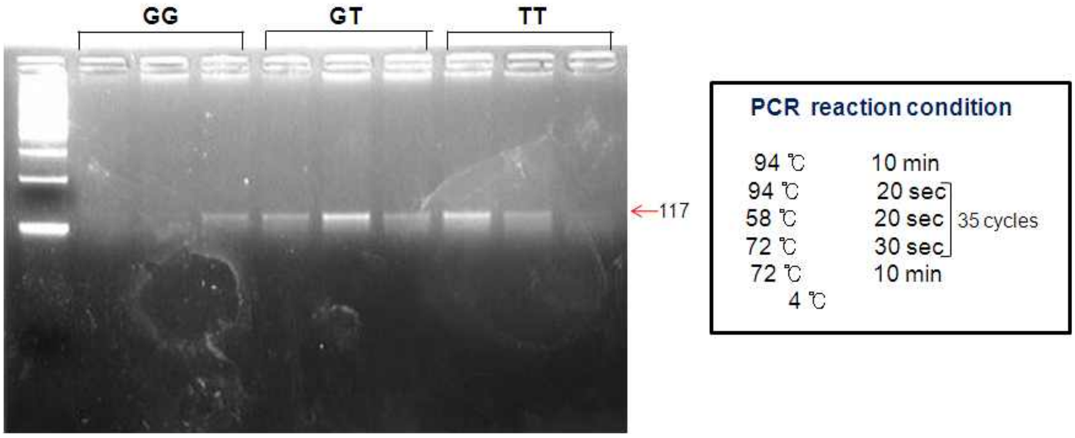
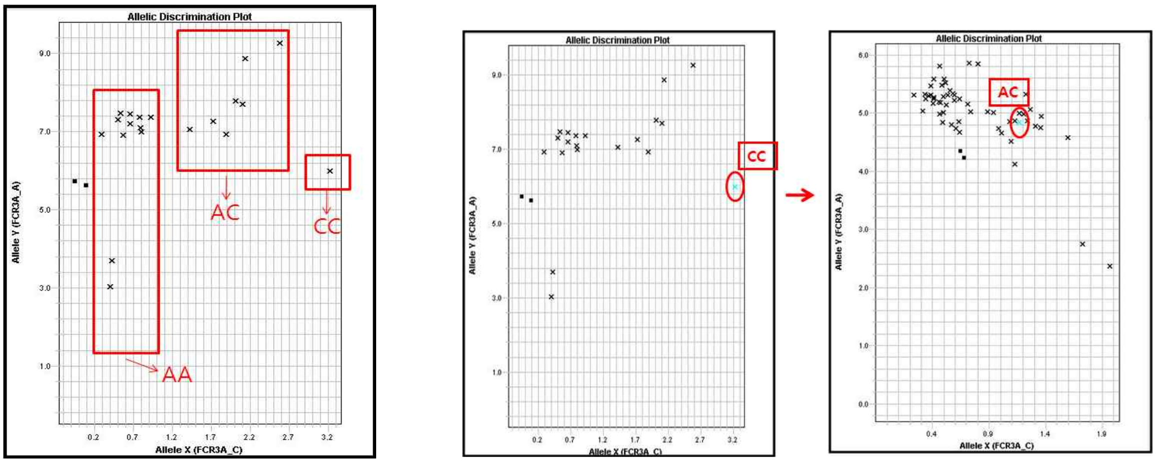


Fig.2. FcgR 3A rs396991 Taqman genotyping 시행

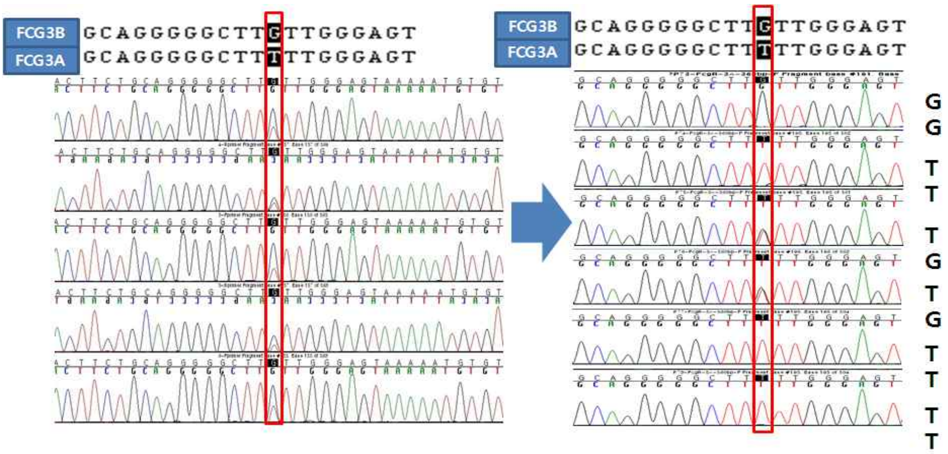


- TaqMan genotyping 시행 결과 FCGR2A 의 경우 문제없이 진행되었으나 FCGR3A의 경우 일반적 반응결과와 달리 2개의 형광 중 1개의 형광 강도가 크고 분석이 애매한 genotyping 이 다수 관찰됨
- FCGR3A sequence 는 FCGR3B 와 sequence homoloty 가 90 % 에 이르고 주요 polymorphic site 가 FCGR3B 의 reference genotype 과 동일하여 기존에 보고된 방법들로 genotyping 이 어려움.
- 일반 PCR 법으로 진행한 결과 FCGR3A 에 specific 한 primer 를 이용한 경우에도 FCGR3B region 에 binding 하여 2개의 sequence 가 모두 같이 증폭되는 것으로 관찰됨

(Nested PCR 에서 300bp 정도에서 5군데의 차이를 보임)

- Homology 가 적은 sequence 를 찾아 다양한 primer 를 제작하여 long PCR 을 시행 후 다양한 primer 로 nested PCR 를 시행해 최적의 genotype 조건을 수립함

Fig.3. FCGR3AB 다양한 primer 제작 후 sequence 확인 결과 FCG3A specific nested PCR 조건을 수립함



- FCGR3A 의 genotyping 결과를 고려하여 NHL 환자의 survival을 분석한 결과 유의한 상관관계는 관찰되지 않음

3. 연구결과 고찰 및 결론

- Lymphoma 의 diagnostic and tailored therapy marker를 proteomics 와 cancer specific gene expression을 이용한 circulating lymphoma cells로 분석한 결과 urine에서 lymphoma patient 에 specific 한 hypoxanthine marker를 관찰했으면 MAGEA3 의 expression 이 중요한 marker 임을 확인함.

- 기존에 다른 암종에서 확인된 두 가지 polymorphism 의 치료 반응을 확인한 결과 GST genotype이 R-CHOP으로 치료 받는 환자의 toxicity와 관련있음을 확인하였으나 FCGR3A 의 경우 기존의 보고와는 달리 R-CHOP 으로 치료 받은 환자의 예후와의 관련성은 없는 것으로 관찰됨

- 치료 전 혈청 및 뇨 분석시 Hypoxantine 결과 추가

- MAGEA3 의 예후적 의미는 non-significant 한 것으로 관찰되었으나 cell line을 이용한 실험 결과 MAGEA3 의 suppression 이 cell survival을 감소시킴을 관찰하여 lymphoma cell에서 MAGEA3 가 cell survival과 관련됨을 확인함

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

○ 과제시작시점부터 과제종료시점까지의 연구성과(학술지 게재, 학회발표, 학위논문, 산업재산권 출원·등록, 워크샵 또는 심포지움 개최, 전시회 참가, 임상응용, 기술성과 이전, 벤처 창업 등의 실적)를 기재하되, 본 과제와 관련성이 있는 성과에 한하여 기재
※ 논문, 특허성과는 과제 시작시점이후 게재 신청 또는 출원된 실적만 기재.
다만, 후속과제의 경우는 예외

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분[1])	저널명(I. F.)	Year; Vol(No):Page	구분[2]	지원과제번호[3]
Identification of Hypoxanthine as a Urine Marker for Non-Hodgkin Lymphoma by Low-Mass-Ion Profiling	Byong Chul Yoo 1), Sun-Young Kong, Sang-Geun Jang, Kyung-Hee Kim, Sun-A Ahn, Weon-Seo Park, Tak Yun, Sohee Park, Hyeon-Seok Eom 교신)	BMC cancer (3.08)	2010 Feb 23;10:55	국외 SCI	0810440
Detection of Circulating Tumor Cells using Melanoma Antigen Gene Expression in Non-Hodgkin Lymphoma	Mi Hwa Han 1), Hyeon-Seok Eom 1), Weon-Seo Park, Tak Yun, Hyun-Ju Kim, So-Hee Park, Sun-Young Kong 교신)	Leukemia Research (2.390)	2010 Sep 34(9):1127-31	국외 SCI	0810440
Glutathione-S-Transferase genotypes influence the risk of chemotherapy-related toxicities and prognosis in Korean patients with diffuse large B-cell lymphoma.	Hyun-Jung Cho 1) Hyeon-Seok Eom, Hyun-Ju Kim,In-Suk Kim,Gyeong Won Lee,Sun-Young Kong 교신)	Cancer Genetics and Cytogenetics (1.482)	2010 Apr1 198(1):40-6.	국외 SCI	0810440
Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia-AF10-positive acute leukemias: A report of 2 cases with a review of the literature	Huh JY, Chung S, Oh D, Kang MS, Eom HS, Cho EH, Han MH, Kong SY	The Korean Journal of Laboratory Medicine	2010 Apr1 130(2):117~12	국내	없음
DNA repair gene XRCC1 polymorphisms and haplotypes in diffuse large B-cell lymphoma in a Korean population	Kim IS, Kim DC, Kim HG, Eom HS, Kong SY, Shin HJ, Hwang SH, Lee EY, Kim S,Lee GW (공동저자)	Cancer Genet Cytogenet (1.482)	2010 Jan1 196(1):31-7.	국외 SCI	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
Detection of Circulating Tumor Cells using Melanoma Antigen Gene Expression in	Mi Hwa Han, Hyeon-Seok Eom, Weon-Seo Park, Tak	AACR	국외	0810440

Non-Hodgkin Lymphoma	Yun, Hyun-Ju Kim, So-Hee Park, Sun-Young Kong*			
Identification of Hypoxanthine as a Urine Marker for Non-Hodgkin lymphoma by Low-mass-ion Profiling	Byong Chul Yoo, Sun-Young Kong, Sang-Geun Jang, Kyung-Hee Kim, Sun-A Ahn, Weon-Seo Park, Tak Yun, Hyeon-Seok Eom	대한암학회	국내	0810440

1) 지역 : 국내, 국외

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
혈액암 환자에서 단백체 분석을 통한 표지자 개발	1차년도	임상 검체 확보	- 동정된 단백질을 검증할 수 있는 임상 검체를 수집, 임상 데이터를 정리했고 전체 목표 검체량은 달성했음 - non-reponsder에 대한 검체는 일부 확보되었으나 validation 을 위한 검체량으로는 부족함	70	100
	2차년도	임상 검체 확보	- 동정된 단백질을 검증할 수 있는 임상 검체를 수집, 임상 데이터를 정리했고 전체 목표 검체량은 달성했음 - non-reponsder에 대한 검체는 일부 확보되었으나 validation 을 위한 검체량으로는 부족함	70	90
		요(urine) 내에 존재하는 혈액암 표지자의 동정 연구 및 검증	- 1차년도의 연구를 통해 확보된 혈액암 2개의 특이적 요 내의 저분자 질량값 물질의 동정 완료함		
			- 선발된 mass peak이 식이나 약제의 영향을 받는 peak 이 아닌지 문헌 분석을 통해 확인함		
			- 검체 분리 전 방치 시간에 따라 선발된 mass peak 의 값이 변하는지 검증은 시행하지 못함		
			- GC-MS 분석 방법의 확대 도입을 통한 요내의 당류 물질에 대한 정량적 Data 추가 확보 및 기존에 보고된 분석법인 spectrophotometry를 이용한 방법과 비교하였음		
		혈액암 환자의 혈청을 이용한 단백체 분석 및 혈액암 표지자 동정 및 검증	- 1차년도의 연구를 통해 구축된 2-DE gel 들의 단백질 spot 이미지 를 MALDI-TOF 로 분석함.		
			- 추가로 SDS-PAGE 를 시행하여 LC-MS/MS 를 이용해 분석함		
			- 예비 단백질을 확보한 상태로 아직 동정이 완료되지 않았음		
		혈액암 환자의 말초혈액 검체를 이용한 순환암세포(circulating tumor cell) 검출	- 림프종 세포주 10종에서 RNA 추출 및 cDNA합성 RT-nested PCR 수행 - 정상인 혈액 검체에서 RNA 추출 및 cDNA 합성 RT-nested PCR 수행 - 혈액암 환자의 말초혈액 검체에서 RNA를 추출 및 cDNA합성하여 RT-nested PCR을 수행 - 혈액암 환자 중 혈액 검체를 이용하여 MAGE-A3 gene의 발현 유무를 통해 표지자 확인		
	3차년도	임상 검체 확보	- Responder vs. Non-reponder proteomics 분석의 validation 을 위한 검체량이 부족한 상태이므로 후향적 환자 동의 및 타병원 검체 확보 예정. 공동의 검체 확보에 동의한 병원은 경상대 병원이며 영남대와 고려대 병원과 협력을 위해 논의할 예정임	80	80
		혈액암 환자의	- 현재 확보한 예비 표지자 외의 추가 표지자		

		혈청을 이용한 단백체 분석 및 혈액암 표지자 동정 및 검증	확보를 위해 SDS-PAGE 분석 후 LC-MS/MS 분석을 시행하여 단백질 동정이 완료되면 항암제 반응군/비반응군 검체로 검증을 시행함		
		항체 치료제의 약물 반응에 관여하는 유전자 다형성 (Fc gamma receptor) 과 치료 반응 및 생존 분석	- Homology 가 적은 sequence 를 찾아 다양한 primer 를 제작하여 long PCR 을 시행 후 다양한 primer 로 nested PCR 를 시행해 최적의 genotype 조건을 수립함		
			- Fc gamma Receptor (FcgR) 의 genetic polymorphism 에 따른 amino acid change 는 antibody dependent cytotoxicity (ADCC) 의 차이를 일으킬 수 있음		
			- 현재 림프종에서 사용 중인 항체형 약물인 rituximab 의 약물 반응이 FCGR의 genetic polymorphism 과 관련 있는지 관찰을 위해 genotyping 을 수행함		
		MAGE의 치료제 타겟으로서의 가능성에 대한 검토 및 케이스 증가의 필요성	- 항체형 약물의 in vivo 효과를 관찰하기 위해 in vivo ADCC 법을 수립함		
			- MTT 법으로 cell viability 를 측정한 결과 MAGEA3 suppression 시 cell viability 의 감소 관찰됨		

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

구분	세부연구목표	가중치(%)	평가의 착안점 및 척도
3차년도 (2010)	임상 검체 확보	15	- Responder vs. Non-reponder proteomics 분석의 validation 을 위한 검체량이 부족한 상태이므로 후향적 환자 동의 및 타병원 검체 확보 예정. 공동의 검체 확보에 동의한 병원은 경상대 병원이며 영남대와 고려대 병원과 협력을 위해 논의할 예정임
	MAGE의 치료제 타겟으로서의 가능성에 대한 검토 및 케이스 증가의 필요성	10	- In vitro 실험에서 MAGE를 target으로 siRNA treatment 등으로 inhibition 을 시행한 후 현재 임상에서 사용되고 있는 가장 potent 한 치료제인 rituximab 등을 포함한 치료제에 대한 반응성 증감 여부를 확인
	혈액암 환자의 혈청을 이용한 단백체 분석 및 혈액암 표지자 동정 및 검증	10	- 2-DE gel 들의 단백질 spot 이미지를 MALDI-TOF 로 분석함.
		15	- 추가로 SDS-PAGE 를 시행하여 LC-MS/MS 를 이용해 분석함
		15	- 예비 표지자의 검증을 시행함

	항체 치료제의 약물 반응에 관여하는 유전자 다형성 (Fc gamma receptor) 과 치료 반응 및 생존 분석	5	- Homology 가 적은 sequence 를 찾아 다양한 primer 를 제작하여 long PCR 을 시행 후 다양한 primer 로 nested PCR 를 시행해 최적의 genotype 조건을 수립함
		10	- Fc gamma Receptor (FcgR) 의 genetic polymorphism 에 따른 amino acid change 는 antibody dependent cytotoxicity (ADCC) 의 차이를 일으킬 수 있음
		10	- 현재 림프종에서 사용 중인 항체형 약물인 rituximab 의 약물 반응이 FCGR의 genetic polymorphism 과 관련 있는지 관찰을 위해 genotyping 을 수행함
		10	genotyping 완료 후 임상 자료와의 관련성 분석

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

- FcGR3A 의 유전자형에 따른 예후결과를 정리해 논문으로 출간할 예정임

구　　분	건　　수	비　　　고
학술지 논문 게재	1	Leukemia Research (2.39)
산업재산권 등록		
기　　타		

(2) 연구성과의 활용계획

- 혈액암 환자의 뇨 (Urine)의 SDS-PAGE 분석 후 LC-MS/MS 분석을 시행하여 단백질 Hypoxantine이 동정됨으로써 혈액암에 대한 진단적 스크리닝이 가능할 것으로 판단됨

- MAGEA3 의 기능에 관해 아직까지 많은 보고가 이루어지고 있지 않은 상태이므로 lymphoma cell line에서 관찰된 결과를 근거로 추가후속 연구가 필요함

6. 참고문헌

1) Identification of Hypoxanthine as a Urine Marker for Non-Hodgkin Lymphoma by Low-Mass-Ion Profiling Byong Chul Yoo, Sun-Young Kong, Sang-Geun Jang, Kyung-Hee Kim, Sun-A Ahn, Weon-Seo Park, Tak Yun, Sohee Park, Hyeon-Seok Eom, BMC cancer. 2010 Feb23;10:55

2) Detection if Circulating Tumor Cells using Melanoma Antigen Gene Expression in Non-Hodgkin.
Mi Hwa Han 1), Hyeon-Seok Eom 1), Weon-Seo Park, Tak Yun, Hyun-Ju Kim, Leukemia Research. 2010 Sep. 34(9):1127-31

3) Glutathione-S-Transferase genotypes influence the risk of chemotherapy-related toxicities and prognosis in Korean patients with diffuse large B-cell lymphoma.
Hyun-Jung Cho 1) Hyeon-Seok Eom, Hyun-Ju Kim,In-Suk Kim,Gyeong Won Lee,Sun-Young Kong, Cancer Genetics and Cytogenetics 2010 Apr1 198(1):40-6.

4) DNA repair gene XRCC1 polymorphisms and haplotypes in diffuse large B-cell lymphoma in a Korean population. Kim IS, Kim DC, Kim HG, Eom HS, Kong SY, Shin HJ, Hwang SH, Lee EY, Kim S,Lee GW Cancer Genet Cytogenet 2010 Jan1 196(1):31-7.

5) Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia-AF10-positive acute leukemias: A report of 2 cases with a review of the literature. Huh JY, Chung S, Oh D, Kang MS, Eom HS, Cho EH, Han MH, Kong SY The Korean Journal of Laboratory Medicine 2010 Apr1 l30(2):117~12

7. 첨부서류

○ 본 연구의 성과로 논문, 저서, 산업재산권, 정책정책 기여 등이 있을 경우 관련 증빙자료를 첨부토록 함