

기관고유연구사업 결과 보고

결 재	과제책임자	과 장	부 장
	김석기	김석기	김인후

본인이 수행한 2009~2010 년도 기관고유연구사업 과제 연구결과를 붙임과 같이 보고합니다.

과제명	갑상선암에서의 분자생물학적 기법을 이용한 진단, 치료 및 예후인자에 관한 연구
과제책임자 (소속, 성명)	분자영상치료연구과 김석기
총연구비	285,000 천원 (2009년: 150,000 천원, 2010년: 135,000 천원)
총연구기간	2009년 1월 1일 ~ 2010년 12월 31일

붙임 : 기관고유연구사업 최종보고서 1부

2010년 12월 31일

과제책임자 김 석 기

기관고유연구사업 최종보고서

(과제번호 : 0910030)

연구과제명 (갑상선암에서의 분자생물학적 기법을 이용한
진단, 치료 및 예후인자에 관한 연구)

연구과제명 (Research on diagnosis, therapy and
prognostic factor of thyroid cancer using
molecular biologic method)

과제책임자 : 김 석 기

국 립 암 센 터

(뒷면)

(측면)

	↑ 5cm ↓
	과 제 명
<div data-bbox="252 1037 1125 1603" style="border: 1px solid black; padding: 10px;"><ol style="list-style-type: none">1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구 사업 최종보고서입니다.2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다.<p style="text-align: center;">(14 pont, 고딕체)</p></div>	국 립 암 센 터
↑ 6cm ↓	↑ 3cm ↓

제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “갑상선암에서의 분자생물학적 기법을 이용한 진단, 치료 및 예후인자에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2010. 12 .

국립암센터

과제책임자 : 김석기

제1세부과제명(과제책임자) : 김석기

제2세부과제명(과제책임자) : 정기욱

.

제3세부과제명(과제책임자) : 이유진

.

I. 총괄 과제

총괄과제명 : 갑상선암에서의 분자생물학적 기법을 이용한 진단, 치료 및
예후인자에 관한 연구

총괄과제책임자(성명/소속) : 김석기/분자영상치료연구과

목 차

< 요약 문 >

(한글) 갑상선암에서의 분자생물학적 기법을 이용한 진단, 치료 및
예후인자에 관한 연구

(영문) Research on diagnosis, therapy and prognostic factor
of thyroid cancer using molecular biologic method

<u>1. 연구의 최종목표</u>	-----	6
<u>2. 연구의 내용 및 결과</u>	-----	6
<u>3. 연구결과 고찰 및 결론</u>	-----	20
<u>4. 연구성과 및 목표달성도</u>	-----	24
<u>5. 연구결과의 활용계획</u>	-----	28
<u>6. 참고문헌</u>	-----	28
<u>7. 첨부서류</u>	-----	28

< 요약문 >

연구분야(코드)	실용화 연구 B-2	과제번호	0910030
과제명	갑상선암에서의 분자생물학적 기법을 이용한 진단, 치료 및 예후인자에 관한 연구		
연구기간/연구비 (천원)	합계	2009년 1월 1일 ~ 2010년 12월 31일	285,000
	1차년도	2009년 1월 1일 ~ 2009년 12월 31일	150,000
	2차년도	2010년 1월 1일 ~ 2010년 12월 31일	135,000
과제책임자	성명	김석기	주민등록번호
	전화번호	031-920-1731	전자우편
색인단어	국문	갑상선암, 예후인자, 분자치료	
	영문	Thyroid cancer, Prognostic factor, Therapeutics	

제 1세부과제: 분자영상을 이용한 재분화 치료법 개발

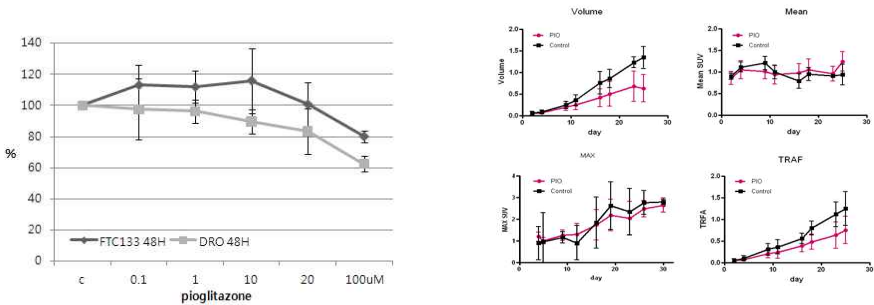
◆ 연구목표

- 분자영상과 결합된 갑상선암의 재분화유도 치료법을 개발한다.
- 재분화유도 치료에서 분자영상 영상과 관련된 분자생물학적 기전을 조사한다.

◆ 연구내용 및 방법

A) 갑상선암 세포주의 재분화유도치료 효과 확인, 동물모델 작성

B) 재분화유도치료모델에서 FDG PET/CT(분자영상)의 적용



재분화유도제에 의한 세포사멸 (CCK-8 assay)

advanced DRO 종양모델에서 재분화 유도제 (pioglitazone)치료 후, FDG PET 분자영상

C) 요약/결론: 갑상선암 동물모델을 성공적으로 작성하였고, 분화가 나쁜 갑상선암에서 재분화유도치료의 효과를 확인하였고 치료효과는 FDG PET/CT를 이용하여 모니터링할 수 있었음. 하지만 분화된 여포성갑상선암에서는 치료효과도 뚜렷하지 않고 FDG PET/CT로도 차이가 없었음. 미분화암의 특성인 NIS 소실은 본연구의 재분화유도치료를 통해서 회복되지 않았고 방사성요오드 병합치료와 분자영상에서 변화를 관찰할 수 없었음.

제 2세부과제: 갑상선 유두암에서 Proteomics기법을 이용한 새로운 예후인자의 발굴

◆ 연구목표

- 갑상선 유두암조직에서 BRAF 돌연변이 유무에 따른 MAPK 신호전달 관련 단백질 등의 발현양상을 PROTEOMICS기법을 이용하여 분석하여 발현에 차이가 있는 단백질을 발굴하고 관련 단백질의 발현이 갑상선 유두암의 임상적 예후인자와의 연관성이 있는지 분석하여 새로운 예후인자로서의 사용가능성을 탐색함.
- 갑상선암 세포주에서 BRAF돌연변이와 관련되어 나타나는 MAPK 신호 억제제 처리 후 나타나는 발현 단백질의 차이를 분석

◆ 연구내용 및 방법

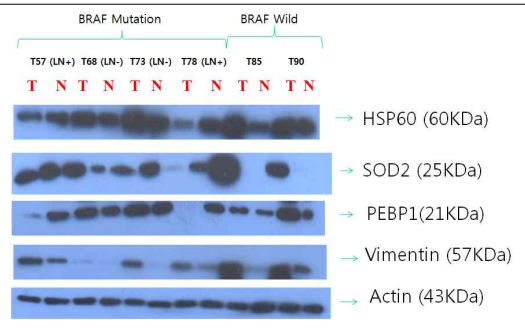
1) BRAF 돌연변이 양성군/ 림프절전이 유무와 단백질 발현양상

- BRAF 돌연변이 양성군에서 HSP60의 발현 유무에 따라 림프절 전이여부에 차이가 남을 확인함. HSP60가 발현되어 있는 경우 림프절 전이가 적게 나타남.

2) BRAF 돌연변이 유무, MAPK 억제제 치료전후 등에 따라 단백질 발현양상에 차이가 나타남.

- MAPK inhibitor로 처리하였을 때 단백질의 발현양상 변화가 BRAF 돌연변이 유무에 따라 다르게 나타남

3) 요약/결론: BRAF 변이에 따라 다르게 발현되는 단백질을 정량적 단백질 분석으로 동정하고 생체 조직을 이용하여 확인하였으며, BRAF변이를 예측할 수 있는 새로운 표지자를 제안할 수 있었다. 또한 HSP60 단백질이 림프절 전이에 영향을 미치는 종양억제 유전자로서의 가능성이 있다는 것을 확인 하였다.



HSP60, SOD2, PEBP1, and vimentin expression status were matched with 2D gel electrophoresis results. T: tumor, N: Normal tissue.

		LN negative	LN positive	P-value
overall	HSP 60	N _i (%)	N _i (%)	
	negative	5/21 (23.8)	16/21 (76.2)	
	positive	53/100 (53.0)	47/100 (47.0)	0.015
BRAF positive	HSP 60	N _i (%)	N _i (%)	
	negative	4/19 (21.1)	15/19 (78.9)	
	positive	46/79 (58.2)	33/79 (41.8)	0.003
BRAF negative	HSP 60	N _i (%)	N _i (%)	
	negative	1/2 (50.0)	1/2 (50.0)	
	positive	7/21 (33.3)	14/21 (66.7)	0.585

Proteomic 기법으로 동정된 단백질

Spot No.	Protein Name	SwissProt no.	Mascot score	Calculated pI	% coverage	Subcellular location
1,15	Calreticulin	P27797	110	4.29	10	ER lumen
2	Tubulin β	P07437	101	4.78	9	
3	ATP synthaseβ	P06576	57	5.26	16	Mitochondrion
4	Nucleophosmin	P06748	52	4.64	21	Nucleus
5	PDI A3	P30101	48	5.98	15	ER
6,10,13	Vimentin	P08670	111	5.06	33	
7	HSP 90-α	P07900	65	4.94	9	Cytoplasm
8	Calumenin	O43852	173	4.47	22	ER
9	α-enolase	P06733	169	7.01	68	Nucleus
11,14	HSP60	P10809	135	5.70	28	Mitochondrion
12	SOD	P04179	66	8.35	39	Mitochondrion

동정된 단백질의 변화로 갑상선암의 예후인자인 BRAF 돌연변이를 찾는 검사예민도

BRAF mutation /Proteoms	Sensitivity(%)	Specificity(%)	PPV(%)	NPV(%)
Calreticulin	71.8	48.8	80.0	37.7
HSP60	73.3	73.9	88.0	51.5
SOD	51.5	73.9	73.9	51.5
Vimentin	70.6	34.8	61.5	44.4
Nucleophosmin	53.8	50.0	60.0	43.8

제 3세부과제: 중간형 갑상선결절에서 악성과 양성 감별을 위한 마이크로어레이 분석

◆ 연구목표

-갑상선결절에서 미세침흡인 세포검사 시 5-30%에 이르는 중간형 결절에서 불필요한 수술 및 자원 낭비를 줄이기 위해 악성 및 양성 여부를 감별할 수 있는데 도움이 되는 지표를 찾기 위함

◆ 연구내용 및 방법

- 1) 개원 이후 본원에서 갑상선 엽절제술 및 전절제술을 시행한 환자 3038명 중 미세침흡인검사서 중간형 결과를 보인 명단 114명 및 본원 수술 환자 중 갑상선암 조직 확보 명단 476명의 차트 및 병리기록을 리뷰
- 2) microarray analysis
 - illumina HumanRef-8 v3 Expression BeadChip (Illumina, INc., San Diego, CA)
 - 양성결절과 악성결절 사이에 유의한 차이를 보이는 유전자는 발견되지 않았음.
 - 양성결절 대 갑상선유두암, 갑상선여포암의 비교에서도 유의하게 차이나는 유전자는 없었음.
- 3) 환자들의 임상적, 병리적, 초음파적 특성 분석
 - 수술 전의 환자 성별, 진단나이, 갑상선기능 등은 각 군간에 차이를 보이지 않았다. 하지만 갑상선유두암은 유의하

계 양성결절 군에 비해 작았으며 (양성 2.4±1.2cm vs. 여포성 변이 유두암 1.2±0.7cm, 유두암 0.8±0.1cm, $p < 0.05$), 갑상선여포암은 유의하게 큰 결과(미세침습여포암 2.9±1.9cm, 광범위침습여포암 4.3±1.3cm, $p < 0.05$)를 보였다.

- 중간형 결절에서 주감별 대상인 갑상선여포암과의 비교시에는 유의하게 수술 전 티로글로불린(thyroglobulin, Tg) 수치가 양성결절 군에 비해, 악성결절 군에서 높음을 확인할 수 있었다 (양성결절: 미세침습여포암: 광범위침습여포암, 15 ± 229 : 188 ± 2285 : 2762 ± 2079 ng/ml)
 - 수술전 초음파 소견을 바탕으로 양성결절 및 악성결절(여포암)에서의 소견 차이를 분석한 결과 악성결절일수록 불규칙한 경계를 가지는 빈도가 높았으며 (양성 vs. 미세침습여포암 vs. 광범위침습여포암, 7(9.1%) vs. 6 (20.7%) vs. 2 (50.0%), $p = 0.012$), 악성결절에서는 저에코, 양성결절에서는 등에코성결절이 유의하게 많았으며 ($p < 0.05$), 악성결절군에서는 결절둘레로 저에코성 띠가 보이지 않는 경우가 유의하게 많았다 (저에코 띠, 양성 vs. 미세침습여포암 vs. 광범위침습여포암, 50 (64.9%) vs. 9 (31.0%) vs. 1 (25.0%), $p < 0.05$). 또한 유의하게 악성결절에서 석회화소견이 많았다 (양성 vs. 미세침습여포암 vs. 광범위침습여포암, 11 (14.5%) vs. 12 (41.4%) vs. 3 (75.0%), $p < 0.05$).
- 4) 요약/결론: 이상의 결과들을 바탕으로 요약하자면, 갑상선여포암에 있어서는 아직 양성종양과 유의한 차이를 보이는 유전자를 발견할 수 없었으며, 임상에서 환자가 갑상선결절로 내원하여 시행한 미세침습인 세포검사에서 중간형 소견을 보이는 경우에는 나이, 성별, 종양의 크기나 초음파 소견 등의 위험인자와 더불어 serum Tg 레벨을 측정하는 것이 도움이 될 것으로 생각된다.

◆ 연구성과

-정량적 성과

구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)
SCI 논문 편수	0/3	
IF 합	-/-	
기타 성과	특허 2건 출원 국내논문 1편 국내외 학회 발표 4회 국외논문 투고 3편	

-정성적 성과

- 갑상선암 동물모델을 작성하고 소동물 영상장비를 이용하여 분자영상을 시행하는 기반 마련.
- 마우스에서 갑상선전절제술을 확립함.
- 재분화 유도 효과를 소동물 영상장비(PET-CT/ SPECT)를 이용하여 확인하였음.
- 체외실험과 동물모델을 이용하여 재분화치료의 세포분자적 양상을 확인함.
- BRAF 돌연변이 양성인 갑상선 유두암에서도 HSP60 단백질 발현 유무에 따라 림프절 전이 양상이 다름을 확인함.
- HSP60 단백질이 갑상선 유두암에서 종양억제 유전자로서 기능할 가능성 확인
- 장기 추적검사를 통하여 분자적 표지자로서의 가능성 확인 계획
- BRAF 돌연변이 유무에 따라 단백질의 발현이 다르게 나타남을 확인함
- BRAF 돌연변이 유무에 따라 단백질의 발현이 다르게 나타남을 확인함
- 임상에서 흔히 마주치지 않지만 마주치게 되면 감별이 어려운 중간형 결절에 있어서 갑상선여포암의 진단 정확도를 높이는데 수술전 혈청 Tg 레벨이 도움이 될 수 있음을 새롭게 제시하였음.

◆ 참여연구원

(최종연도 참여인원)

성 명

김석기, 이상진, 김태성, 백남석, 정기욱, 김석원, 이유진, 민혜숙, 김정민, OOO

주민등록번호

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

Project Summary

Title of Project	Research on diagnosis, therapy and prognostic factor of thyroid cancer using molecular biologic method
Key Words	Thyroid cancer, Prognostic factor, Therapeutics
Project Leader	Seok-ki Kim
Associated Company	
<p>Subproject 1: Development of redifferentiation induced therapeutics using molecular imaging</p> <p>◆ Purpose: we aimed to establish re-differentiation treatment supported by molecular imaging in thyroid cancer using xenograft model, and assess the correlation of molecular imaging and re-differentiation treatment.</p> <p>◆ Method: we established thyroid cancer xenograft models combined with thyroidectomy using various human thyroid cancer cell lines. The re-differentiation treatments were performed using pioglitazone. The treatment effects were assessed in DRO and FTC tumor models. Molecular imaging such as FDG PET/CT and Tc-99m pertechnetate SPECT were done before and after treatment. Pathologic analysis such as GLUT-1 and NIS immunohistochemistry were taken.</p> <p>◆ Results: various thyroid cancer models were established and used on-going study successfully. Total thyroidectomy could be done in the mice with tolerable success rate. After pioglitazone treatment, poorly differentiated thyroid cancer model (DRO) showed moderate but robust decrease of tumor growth rate. but, follicular thyroid cancer model (FTC) did not. FDG PET/CT showed FDG accumulation decrease corresponding to the growth decrease. GLUT-1 expression of DRO model increased after treatment, but not in FTC model. On the contrary to FDG, Tc-99m SPECT, which reflects the expression of NIS, were not different after treatment. Immunohistochemical assessment showed no difference of NIS expression.</p> <p>◆ Conclusion: we established successfully the basis for the research using thyroid cancer animal model and re-differentiation treatment. The treatment effect of redifferentiation agents could be monitored with molecular imaging with some limitation.</p>	
<p>Subproject 2: Establishment of new prognostic factor of papillary thyroid carcinoma using proteomics approach</p> <p>◆ Purpose : the purpose of this research was to identify proteins associated with MAPK signaling pathways using proteomics in papillary thyroid carcinomas. the other purpose was to find new molecular prognostic factors along with BRAF mutation</p> <p>◆ Method : 11 fresh frozen PTC tissue and 3 PTC and 1 FTC cell lines were studied. Using 2D gel electrophoresis and MALDI - TOF, protein expression was researched.</p>	

Expression analysis was performed according to BRAF mutation status, LN metastasis, MAPK inhibitor treatment. Identified proteins validated with IHC and western blot. Clinico-pathological characteristics are compared according to identified protein expression.

◆ **Results** : Protein expression was different between PTCs with BRAF mutation and without it. Protein expression was changed after application of MAPK inhibitor. Protein change was different according to BRAF mutation status. HSP 60 expression was associated with less frequent LN metastasis in BRAF mutation (+) PTCs,

◆ **Conclusion** : Protein expression status was different according to BRAF mutation status. HSP60 protein may serve as tumor inhibitor in BRAF (+) PTCs.

Subproject 3: microarray analysis to differentiate follicular thyroid cancer from indeterminate thyroid nodule

◆ **Purpose** : We performed microarray analysis and compared clinical, sonographical, and pathological parameters between benign and malignant thyroid nodules to differentiate follicular thyroid carcinoma from benign thyroid nodules.

◆ **Method** : We enrolled 164 subjects who underwent thyroid surgery in National Cancer Center because of the results of indeterminate cytology. We reviewed patients' age at diagnosis, sex, preoperative thyroglobulin (Tg) and anti-Tg antibody levels, free T4, TSH level, sonographic findings including tumor size, and pathological findings. We compared benign and malignant group using the general cDNA microarray technique with illumina HumanRef-8 v3 Expression BeadChip (Illumina, Inc., San Diego, CA).

◆ **Results** : We cannot find significantly different genes in microarray analysis between benign and follicular cancer group. But, among clinical and sonographical findings, we could find several risk factors showing significant differences. Young age, male, larger tumor size, preoperative high Tg level, hypoechoic nodule without hypoechoic rim on sonography increased cancer probability significantly in multivariate analysis. With cut-off value 187.5 ng/ml, sensitivity and specificity was 54.8% and 90.1%, respectively. AUC was 0.748 and p-value was 0.000.

◆ **Conclusion** : Microarray analysis did not show significant differences between benign and malignant thyroid nodules. But, preoperative Tg levels had very high specificity in predicting follicular thyroid cancer. Therefore it may be very excellent tools to differentiate follicular thyroid cancer from benign thyroid nodules.

1. 연구의 최종목표

< 최종목표 - 과제중간 평가후 구체적으로 수정 >

제 1 세부과제

- 분자영상과 결합된 갑상선암의 재분화유도 치료법을 개발한다.
- 재분화유도 치료에서 분자영상 영상과 관련된 분자생물학적 기전을 조사한다.

제 2 세부과제

- 갑상선 유두암조직에서 BRAF 돌연변이 유무에 따른 MAPK 신호전달 관련 단백질등의 발현양상을 PROTEOMICS기법을 이용하여 분석하여 발현에 차이가 있는 단백질을 발굴하고 관련 단백질의 발현이 갑상선 유두암의 임상적 예후인자와의 연관이 있는지 분석하여 새로운 예후인자로서의 사용가능성을 탐색한다.
- 갑상선암 세포주에서 BRAF돌연변이와 관련되어 나타나는 MAPK 신호 억제제 처리 후 나타나는 발현 단백질의 차이를 분석한다.

제 3 세부과제

- 갑상선결절에서 미세침흡인 세포검사 시 5-30%에 이르는 중간형 결절에서 불필요한 수술 및 자원 낭비를 줄이기 위해 악성 및 양성 여부를 감별할 수 있는데 도움이 되는 지표를 찾는다.

2. 연구의 내용 및 결과

<제 1세부 과제: 분자영상을 이용한 재분화 치료법 개발>

1) 갑상선암 세포주는 재분화유도의 표적인 PPAR gamma 수용체가 발현된다.

갑상선암 세포 주에서 PPAR gamma의 발현을 Western Blot으로 확인함. 모든 갑상선암 세포 주에서 발현됨을 확인하였음.



그림 1. 여러 가지 갑상선암에서 PPAR gamma의 발현 (Western Blot)
미분화암 (anaplastic thyroid cancer): DRO90, FRO
여포암 (Follicular thyroid cancer): FTC133
유두암 (Papillary thyroid cancer): TPC

2) 갑상선암 세포주를 이용하여 갑상선이 절제된 동물모델을 작성하였다.

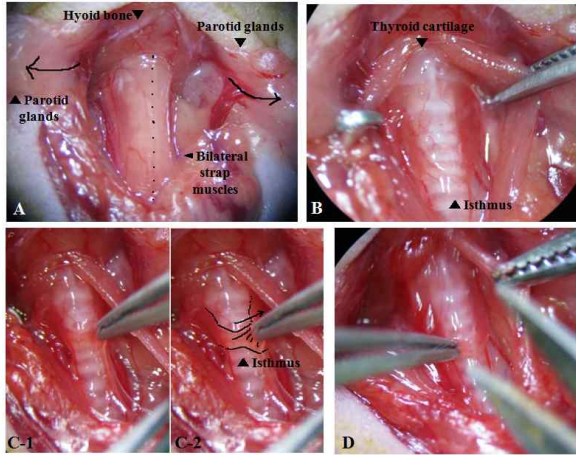


그림 2. 수술용 현미경을 이용한 갑상선 제거과정

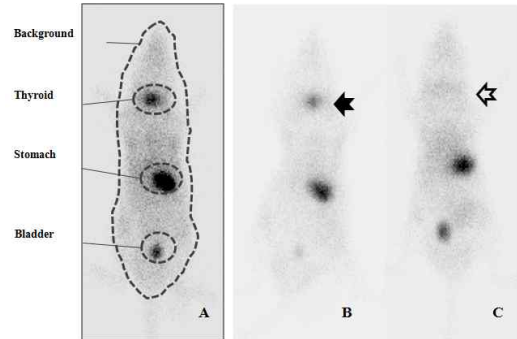


그림 3. 갑상선절제술 전후 갑상선스캔영상. 갑상선전절제술이 성공적으로 시행됨.

3) 갑상선암 세포주에서 재분화유도제(Pioglitazone)는 약한 세포독성을 보임.

- 선별한 갑상선암 세포 주에서 PPAR gamma agonist(Pioglitazone)에 의한 세포독성을 평가하기 위해, 각각의 세포 주에 0.1, 1, 10, 20, 100uM Pioglitazone을 처리한 후, 48h에 Cell counting kit(CCK-8)를 이용하여 알아봄.
- 미분화암 DRO90, 여포암 FTC133 모두 Pioglitazone의 농도에 따라 세포수가 감소되어짐을 확인함. 분화가 나쁜 갑상선암세포주 (DRO90)에서 세포독성이 뚜렷함.

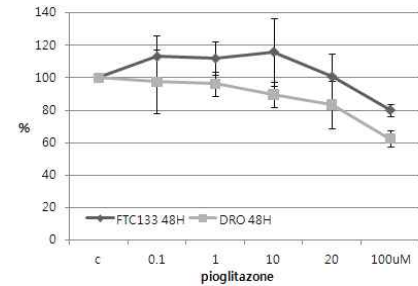


그림 4. 재분화유도제에 의한 세포사멸 (CCK-8 assay)

4) 분화가 나쁜 갑상선암 세포주는 재분화유도제(Pioglitazone)에 의해 FDG 섭취가 떨어졌으나 분화된 여포성갑상선암 세포주 (FTC)는 FDG의 섭취의 변화가 관찰되지 않았다.

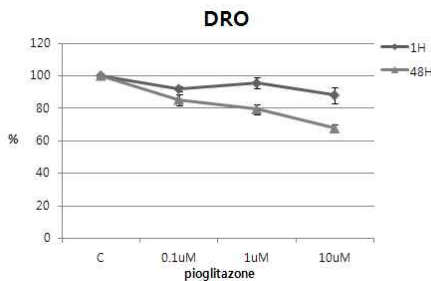
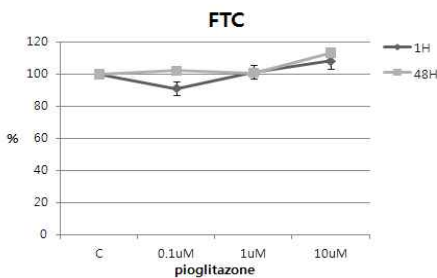


그림 5. 재분화유도제에 의한 FDG 섭취정도 a. FTC 세포주, b. DRO 세포주 (FDG uptake test)

- 갑상선암의 조직형에 따른 재분화유도제의 세포독성의 차이와 관련이 있는 것으로 보임.

5) 갑상선암 세포주에서 재분화유도제에 의한 재분화유도 중 NIS 발현은 강도가 약하고 일시적이었다.

- 갑상선암 세포 주에서 PPAR gamma agonist(Pioglitazone)에 의한 재분화 정도를 평가하기 위해 재분화 지표인 Sodium Iodide symporter(NIS)의 발현 양을 RNA와 단백질 수준에서 확인함.

- FTC, DRO 모두 Pioglitazone처리 24시간 후, RNA양이 증가하였다가 48, 72시간에 감소되어지며, 단백질양은 48시간에 소량 증가되어짐이 보였음.

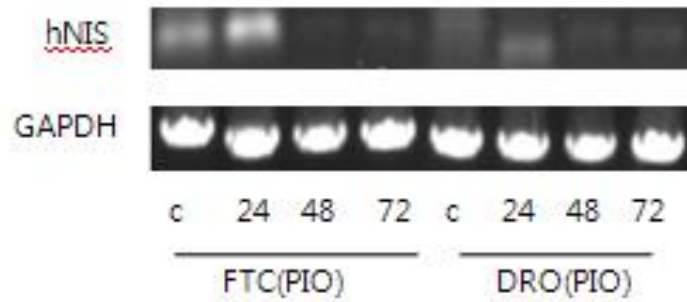


그림 6. 재분화유도제에 의한 NIS mRNA 발현 (RT-PCR)

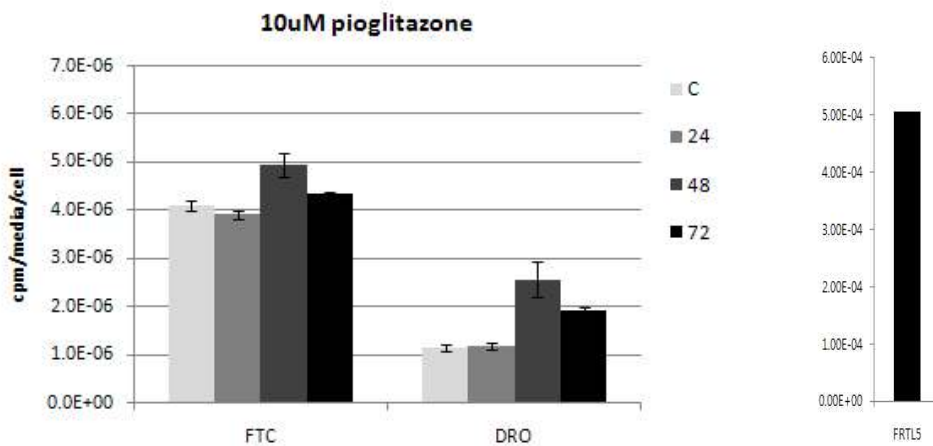
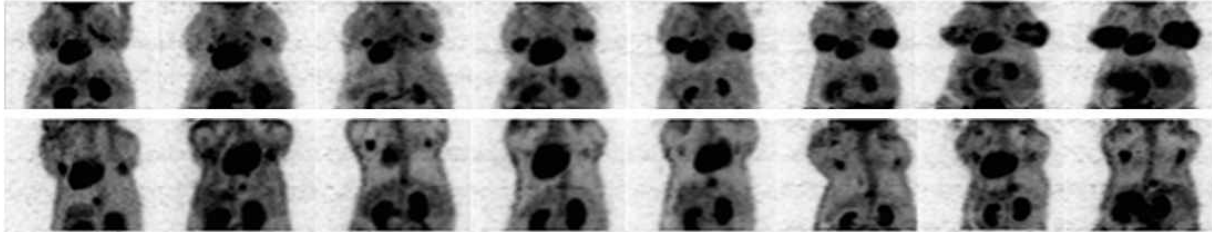


그림 7. 재분화유도제에 의한 NIS 단백질 발현 (Tc99m uptake test)

6) 갑상선암 동물모델에서 FDG PET-CT을 이용하여 재분화유도제(pioglitazoen)에 의한 치료효과 영상화함. 분화가 나쁜 갑상선암 동물모델에서는 재분화유도 치료에 따라 비교군에 비해 종양의 성장억제와 FDG 섭취의 감소가 관찰됨. 분화된 갑상선암 동물모델에서는 뚜렷하지 않음.

a



b.

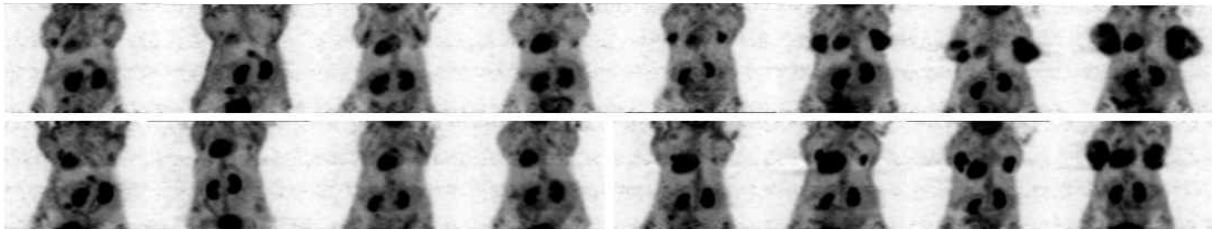


그림 8. 갑상선암동물모델에서 FDG-PET a. DRO90 종양모델 b. FTC133종양모델 (위; 대조군 아래; 재분화유도제(Pioglitazone) 처리군)

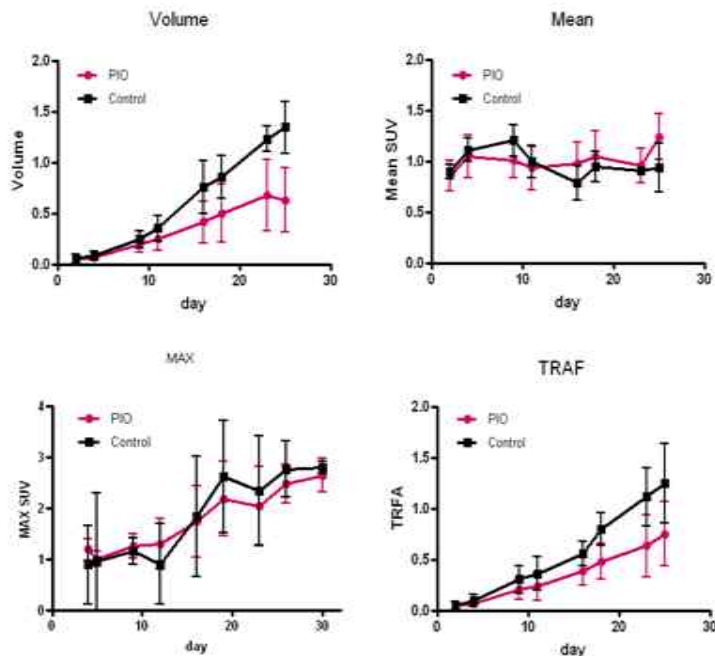


그림 9. advanced DRO 종양모델에서 재분화 유도제 (pioglitazone) 치료 후, FDG PET 분자영상 (volume: PET/CT에서 측정된 종양부피, mean: 종양의 평균 FDG 섭취, max: 종양의 최고 FDG 섭취값, TRAF: total regional FDG accumulation)

7) 갑상선 절제 동물모델에서 재분화유도제(pioglitazone)에 의한 NIS 발현증가 (재분화효과)는 분자영상으로 명확히 관찰되지는 않았음.

- 실험결과 갑상선 재분화치료 모델에서 뚜렷한 Tc99m의 섭취가 보이지 않았음. FTC133의 대조군에서 종양 부피와 meanSUV값은 1790.9mm^3 , 0.0103683 , 재분화유도 처리군에서는 1736.7mm^3 , 0.0157314 이며 DRO90의 대조군에서 종양 부피와 meanSUV값은 705.1mm^3 , 0.0103201 , 재분화유도 처리군에서는 1362.2mm^3 , 0.0115601 이었음.
- NIS 발현을 병리조직으로 확인하였으나 차이를 발견하지 못함.

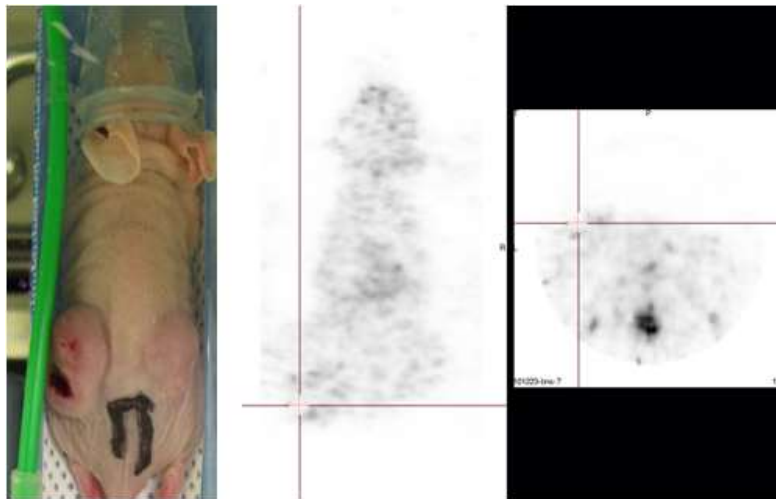


그림 10. 재분화유도제(Pioglitazone)처리한 갑상선암모델에서 NIS발현을 반영하는 분자영상 - Tc-99m pertechnate SPECT 영상. 좌; FTC133 우;DRO90

8) 재분화유도제와 I-131 병합치료를 시행하였으나 기존의 문헌의 효과를 확인하지는 못함. NIS 와 관련된 분자영상과 병리결과와 부합하는 결과임. 현존하는 재분화유도치료에 대하여 좀더 체계적인 연구가 필요할 것으로 판단됨.

<제 2세부과제: 갑상선 유두암에서 Proteomics기법을 이용한 새로운 예후인자의 발굴>

1) BRAF 돌연변이와 MAPK 신호전달 단백질의 발현의 관련성 탐구

- 연구방법

- A. 11개의 신선 동결된 갑상선 유두암 조직 수집, 임상적으로 림프절전이 유무 확인
- B. 암조직에서 DNA 염기서열분석 - MAPK 신호 자극요소인 BRAF mutation 확인
- C. 2D gel electrophoresis를 이용하여 단백질검색
- D. BRAF 돌연변이 유무, 림프절전이 유무에 따라 차이가 나는 단백질을 검색
- E. MALDI-TOF를 이용하여 정성적으로 검색하고 동정
- F. 갑상선암 조직에서 Western blot과 면역조직화학염색을 통해 후보 단백질의 발현 유무확인
- G. 수집된 갑상선암에서의 알려진 임상병리학적 예후인자와 비교

- 연구결과

A. BRAF 돌연변이 양성군에서 림프절 전이여부에 따른 단백질 발현양상의 차이

2D gel/ Western blot

림프절전이군에서 증가한 단백질 선별: HSP60, SOD2, PEBP1, and vimentin



그림 11. HSP60, SOD2, PEBP1, and vimentin expression status were matched with 2D gel electrophoresis results. T: tumor, N: Normal tissue.

B. HSP60 면역조직화학염색 결과와 림프절전이

BRAF 돌연변이 양성군에서 HSP60 양성은 림프절전이음성과 관련 있음을 보여줌.

	LN negative	LN positive	P-value
overall	HSP 60 N,(%)	N,(%)	
	negative 5/21 (23.8)	16/21 (76.2)	
	positive 53/100 (53.0)	47/100 (47.0)	0.015

	LN negative	LN positive	P-value
BRAF positive	HSP 60 N,(%)	N,(%)	
	negative 4/19 (21.1)	15/19 (78.9)	
	positive 46/79 (58.2)	33/79 (41.8)	0.003

	LN negative	LN positive	P-value
BRAF negative	HSP 60 N,(%)	N,(%)	
	negative 1/2 (50.0)	1/2 (50.0)	
	positive 7/21 (33.3)	14/21 (66.7)	0.585

그림 12.

2) BRAF 돌연변이, MAPK 억제제와 관련된 단백질 검색 및 임상적 의의

갑상선암 세포주를 이용한 단백질 동정

세포주 선정

SNU790	BRAF mutation cell line
TPC1, XTC	BRAF wild type cell line
FTC133	Negative control cell line

2D gel Electrophoresis & MALDI-TOF

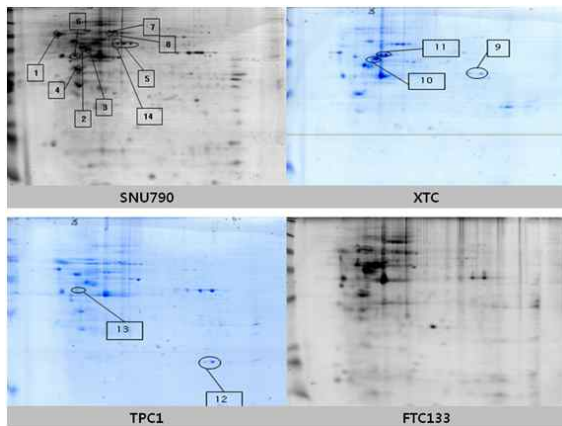


그림 13. <2DE protein profiles of XTC, TPC1, SNU790 and FTC133 cell line>

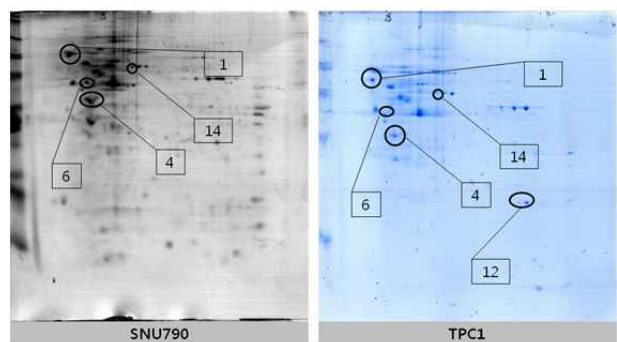


그림 14. <Different protein spots between SNU790 and TPC1 cell line>

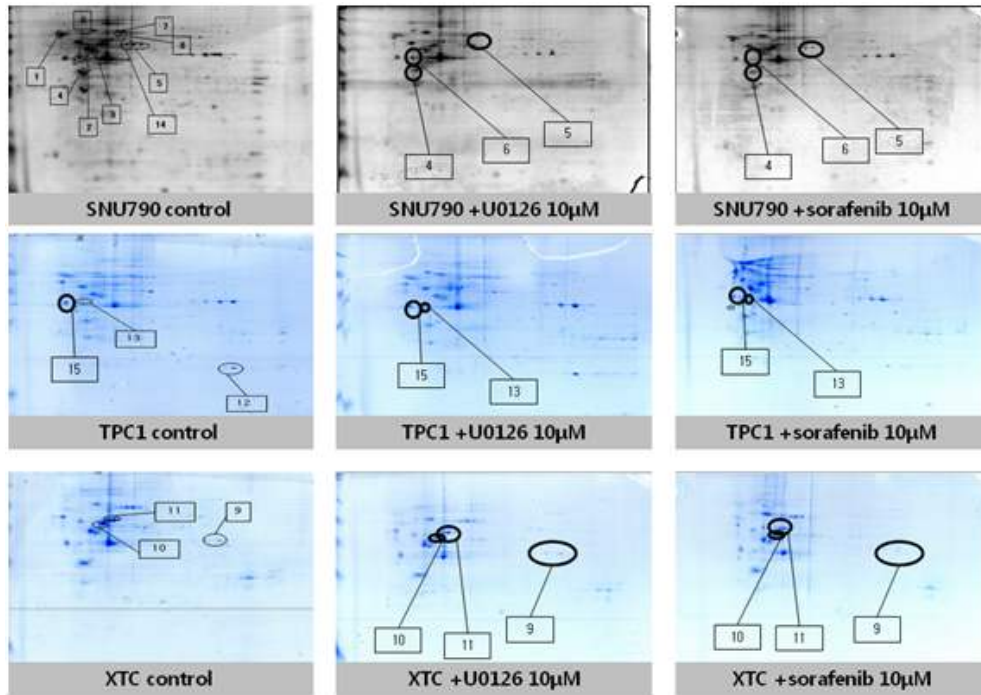


그림 15. <Different expression of proteins after treatment of U0126 and Sorafenib>

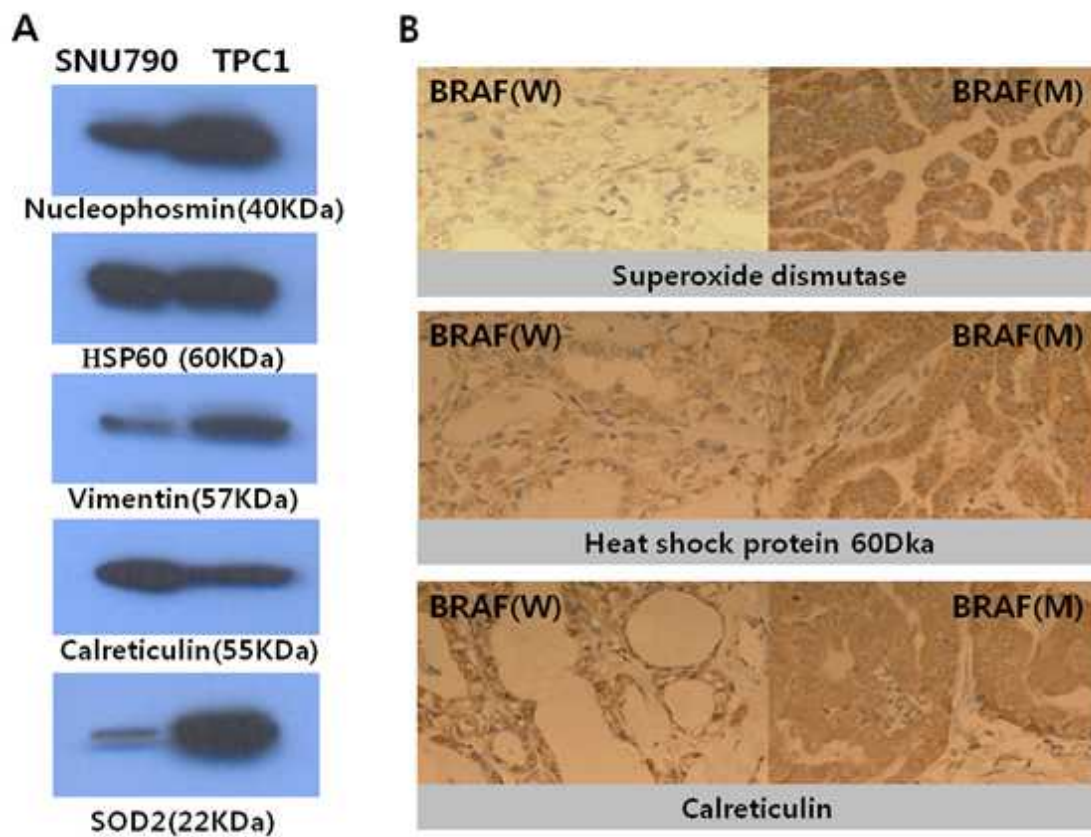
동정된 단백질

Spot No.	Protein Name	SwissProt no.	Mascot score	Calculated pI	% coverage	Subcellular location
1,15	Calreticulin	P27797	110	4.29	10	ER lumen
2	Tubulin β	P07437	101	4.78	9	
3	ATP synthase β	P06576	57	5.26	16	Mitochondrion
4	Nucleophosmin	P06748	52	4.64	21	Nucleus
5	PDI A3	P30101	48	5.98	15	ER
6,10,13	Vimentin	P08670	111	5.06	33	
7	HSP 90- α	P07900	65	4.94	9	Cytoplasm
8	Calumenin	O43852	173	4.47	22	ER
9	α -enolase	P06733	169	7.01	68	Nucleus
11,14	HSP60	P10809	135	5.70	28	Mitochondrion
12	SOD	P04179	66	8.35	39	Mitochondrion

BRAF 돌연변이와 동정된 단백질의 차이

<Western blot and Immunohistochemistry of SNU790 (BRAF(M)) and TPC1 (BRAF(W)) cell line >

A: Western blot, B: Immunohistochemistry, W, wild type ; M, mutation



파라핀 블록에 대한 면역화학염색 결과

	BRAF(W),N(%)	BRAF(M),N(%)	<i>p</i>
SOD			
Negative	17(73.9)	16(48.5)	0.057
Positive	6(26.1)	17(51.5)	
HSP60			
Negative	17(73.9)	16(26.7)	<0.001
Positive	6(26.1)	44(73.3)	
Calreticulin			
Negative	20(48.8)	33(28.2)	0.021
Positive	21(51.2)	84(71.8)	

각 단백질의 BRAF 변이에 대한 검사 예민도

BRAF mutation /Proteoms	Sensitivity(%)	Specificity(%)	PPV(%)	NPV(%)
Calreticulin	71.8	48.8	80.0	37.7
HSP60	73.3	73.9	88.0	51.5
SOD	51.5	73.9	73.9	51.5
Vimentin	70.6	34.8	61.5	44.4
Nucleophosmin	53.8	50.0	60.0	43.8

<제 3세부과제: 중간형 갑상선결절에서 악성과 양성 감별을 위한 마이크로어레이 분석>

1) 대상환자 선별

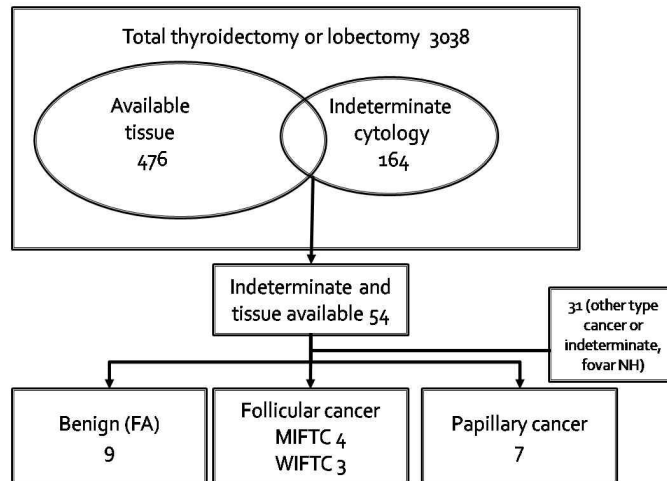


그림 16. 대상군 선정

미세침흡인 세포검사상 중간형 결과를 보인 164례 --> 미세침흡인 세포검사상 중간형 54례 --> 양성결절 9례, 악성결절 14례

2) microarray analysis

- RNA를 추출/ illumina HumanRef-8 v3 Expression BeadChip (Illumina, INC., San Diego, CA)
- 양성결절과 악성결절 사이에 유의한 차이를 보이는 유전자는 발견되지 않았음.
- 양성결절 대 갑상선유두암, 갑상선여포암의 비교에서도 유의하게 차이나는 유전자는 없었음.

3) 환자들의 임상적, 병리적, 초음파적 특성 분석

- 미세침흡인 세포검사상 중간형 결과를 보인 164례
- 임상적, 병리적 특성을 분석
- 양성결절/갑상선유두암(PTC)/여포변이갑상선유두암(PTC,FC)/미세침흡여포암(MIFTC)/광범위침습여포암(WIFTC)

- 수술 전의 환자 성별, 진단나이, 갑상선기능 등은 각 군간에 차이를 보이지 않았다. 하지만 갑상선유두암은 유의하게 양성결절 군에 비해 작았으며 (양성 2.4±1.2cm vs. 여포성 변이 유두암 1.2±0.7cm, 유두암 0.8±0.1cm, $p < 0.05$), 갑상선여포암은 유의하게 큰 결과(미세침습여포암 2.9±1.9cm, 광범위침습여포암 4.3±1.3cm, $p < 0.05$)를 보였다.
- 중간형 결절에서 주 감별 대상인 갑상선여포암과의 비교시에는 유의하게 수술 전 티로글로불린 (thyroglobulin, Tg) 수치가 양성결절 군에 비해, 악성결절 군에서 높음을 확인할 수 있었다 (양성결절: 미세침습여포암: 광범위침습여포암, 15 ± 229: 188 ± 2285: 2762 ± 2079 ng/ml median ± SD]).

	Benign	MIFTC	WIFTC
Number	88(53.7)	31(18.9)	4(2.4)
Female, n (%)	77(87.5)	22(71.0)	4(100)
Age at Dx	48 ± 11	50 ± 13	50 ± 17
tumor size	2.4 ± 1.2	2.9 ± 1.9*	4.3 ± 1.3*
TSH (mU/L)	1.6 ± 1.2	1.2 ± 1.1	1.5 ± 0.7
Tg (ng/ml)	90 ± 229	1315 ± 2285*	2762 ± 2909*
Tg (median)	15	188	2079
TgAb (U/ml)	1203 ± 7083	39 ± 59	52 ± 46
TgAb (median)	<20	<20	49
TPOAb (U/ml)	217 ± 568	14 ± 29	<30
Hashimoto, n (%)	17 (19.3)	3 (9.7)	0 (0.0)

그림 17. 양성결절과 갑상선여포암의 임상 특성 비교 (* p value <0.05 when compared with benign group)

- 수술전 초음파 소견을 바탕으로 양성결절 및 악성결절(여포암)에서의 소견 차이를 분석한 결과 악성결절일수록 불규칙한 경계를 가지는 빈도가 높았으며 (양성 vs. 미세침습여포암 vs. 광범위 침습여포암, 7(9.1%) vs. 6 (20.7%) vs. 2 (50.0%), $p = 0.012$), 악성결절에서는 저에코, 양성결절에서는 등에코성결절이 유의하게 많았으며 ($p < 0.05$), 악성결절군에서는 결절둘레로 저에코성 띠가 보이지 않는 경우가 유의하게 많았다 (저에코 띠, 양성 vs. 미세침습여포암 vs. 광범위침습 여포암, 50 (64.9%) vs. 9 (31.0%) vs. 1 (25.0%), $p < 0.05$). 또한 유의하게 악성결절에서 석회화 소견이 많았다 (양성 vs. 미세침습여포암 vs. 광범위침습여포암, 11 (14.5%) vs. 12 (41.4%) vs. 3 (75.0%), $p < 0.05$).

		Benign	MIFTC	WIFTC	p
Number		88(53.7)	31(18.9)	4(2.4)	
margin	regular	70 (90.9)	23 (79.3)	2 (50.0)	0.012
	irregular	7 (9.1)	6 (20.7)	2 (50.0)	
Component	solid	75 (97.4)	29 (100)	4(100)	NS
	solid & cystic	2 (2.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Echogenicity	Markedly hypoechoic	0 (0)	3 (10.3)	0 (0.0)	0.000
	Hypoechoic	22 (28.6)	16 (55.2)	4 (100)	
	isoechoic	55 (71.4)	10 (34.5)	0 (0.0)	
Hypoechoic rim	no	27 (35.1)	20 (69.0)	3 (75.0)	0.001
	yes	50 (64.9)	9 (31.0)	1 (25.0)	
vascularity	None	8 (18.6)	6 (31.6)	1 (25.0)	NS
	Peripheral	10 (23.3)	2 (10.5)	2 (50.0)	
	Poor to moderate	17 (39.5)	7 (36.8)	1 (25.0)	
	Moderate to rich	8 (18.6)	4 (21.1)	0 (0.0)	
calcification	present	11(14.5)	12 (41.4)	3 (75.0)	0.000

그림 18. 양성결절과 갑상선여포암의 초음파 특성 비교

- 이들을 대상으로 여포암의 위험도에 대한 다변량 분석 결과 진단 젊은 나이, 남성, Tg 수치가 높은 경우, 석회화, 저에코 결절 등이 유의하게 갑상선여포암의 위험도를 높이는 것으로 분석되었다.

	Exp (B)	95% Confidence interval	p
Age	0.917	0.850-0.990	0.026
Male	8.036	1.230-52.499	0.030
TSH	0.804	0.410-1.575	0.525
Tg	1.987	1.248-3.165	0.004
TgAb	0.768	0.232-2.540	0.665
Hashimoto	4.643	0.300-71.831	0.272
Irregular margin	0.422	0.039-4.556	0.477
Calcification	6.413	1.091-37.712	0.040
Hypoechoic nodule	5.662	1.126-28.466	0.035
Hypoechoic rim	0.190	0.035-1.024	0.053

그림 19. 갑상선여포암의 발생위험도에 대한 다변량 분석

- ROC curve를 이용하여 진단 나이 및 Tg 값의 진단 민감도 및 특이도에 대해 분석하였다. 나이의 경우 AUC 0.524 (95% confidence interval 0.404-0.645), $p = 0.674$ 로 cut-off value 52.5세의 경우 민감도 48.5%, 특이도 68.2%를 보였으며 양군간에 유의한 차이를 보이지 않았다(date not shown). 하지만 Tg 값의 경우 cut-off value 187.5로 하였을 때 민감도 54.8%, 특이도 91.5% 로 AUC 0.748 (95% confidence interval 0.634-0.861), $p = 0.000$ 으로 유의한 차이를 보였다 (그림 2). 종양크기에 대해서 살펴보았을 때 AUC 0.663 (95% confidence interval 0.562-0.764, $p = 0.005$) 로 1.65cm 이상인 경우 민감도 95.7%, 특이도 46.6%를 보였다.

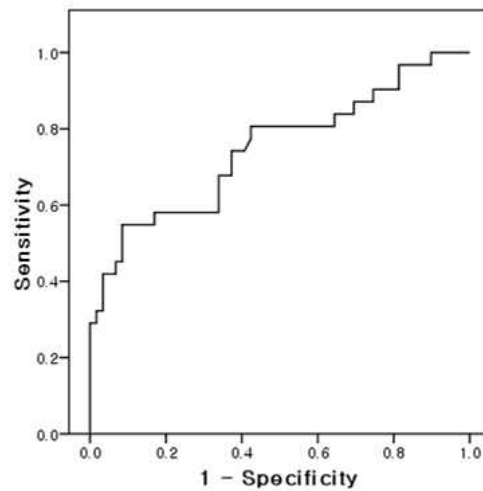


그림 20. Tg 결과에 대한 ROC curve

3. 연구결과 고찰 및 결론

제 1세부과제: 분자영상을 이용한 재분화 치료법 개발

1) 예후불량 갑상선암의 치료 - 재분화유도 치료

- 갑상선암은 비교적 치료가 잘되는 것으로 알려져 있으나 매우 높은 유병율과 발병율에 불구하고 일부 환자군은 극히 예후가 불량하다. 이 예후불량군을 예후가 좋은 군과 구별하는 진단법이 존재하지 않고 기존의 치료법이 효과가 없음.
- 예후가 나쁜 갑상선암을 치료하기 위한 방법의 하나로 **재분화 유도치료**가 제안되고 있음. rosiglitazone 혹은 pioglitazone 등은 과거 여러 종양에서 시행되던 레티노이드에 비해 갑상선암에서 치료효과가 좋은 것으로 기대됨. 하지만 이들 재분화유도치료제의 연구는 초기단계임. 연구가 미비하지만 유전자치료 등의 다른 대안에 비해 현실적으로 쉽게 임상사용이 가능한 방법으로 판단되고 이전의 레티노이드를 이용한 치료 등으로 가능성을 인정받았음.
- 하지만 이들 재분화유도치료제의 치료기전, 치료효과를 평가할 방법 등은 체계적으로 확립되어 있지 않음. 약제별로 세포주, 동물모델, 임상시험 순으로 체계적인 연구가 시행되지 못한 상태임.
- 재분화유도 치료와 같이 갑상선암의 분자생물학적 특성의 변화를 유도하는 치료법에서는 분자생물학적 변화를 스크리닝하고 모니터하는 방법이 필요하며 분자영상은 매우 적절한 방법임. 갑상선암에 대해서는 이미 방사성요오드를 이용한 치료와 진단 영상이 널리 사용되고 있고 최근 FDG PET도 방사성요오드의 제한점을 보충하는 분자영상으로 널리 사용됨. 재분화유도 치료에서 치료반응을 모니터하는 분자영상방법은 재분화유도 치료법이 적절한 치료법으로 확립되기 위해서는 반드시 필요함.

2) 재분화유도치료와 FDG PET/CT 분자영상

- FDG 섭취변화로 재분화유도치료효과의 판정

재분화유도치료가 분화가 나쁜 암인 DRO에서는 재분화유도치료의 효과를 관찰할 수 있다는 실험적 근거를 확인하였으나, 재분화유도치료의 세포분자적 변화로 거론되어온 NIS의 발현변화는 in vitro에서는 일부 관찰되었으나 동물모델에서는 뚜렷하지 않았음.

- DRO 세포주에서 FDG PET/CT를 이용한 재분화유도치료 효과의 영상화

분화가 나쁜 갑상선암 세포주 DRO의 종양은 FDG 섭취가 치료후에 대조군에 비해 감소하였음. FDG 섭취의 감소는 절대적이지 않고 종양의 성장속도와 FDG 섭취의 증가속도가 대조군에 비해 감소함. 또한 FDG의 섭취의 강도가 크게 감소하기 보다 종양의 크기가 느리게 증가하는 데 따른 현상으로 판단됨 (그림 16, 그림 17).

DRO 종양의 크기증가 속도감소는 이미 종양이 크게 자란 진행성종양모델보다는 종양이 작을 때부터 약제를 투여하는 조기종양모델에서 더욱 뚜렷하였다 (그림 18).

DRO 종양이 FDG PET/CT로 재분화유도치료의 효과를 관찰할 수 있는 것은 병리결과에서 유도치료후 증가한 GLUT-1 발현과 관련이 있어 보인다. 다만 GLUT-1의 증가가 종양의 재분화정도와의 관련성은 알 수 없으나, 재분화유도치료의 결과로 보임.

- FTC 세포주에서 FDG PET/CT를 이용한 재분화유도치료 효과의 영상화

분화가 좋은 FTC 세포주는 in vitro결과와 같이, 종양모델에서는 진행성모델, 조기종양모델 모두에서 대조군과 종양성장속도가 차이가 없었음 (그림 19).

이러한 결과는 병리결과와도 합치하는 결과로 FTC는 재분화유도치료후에도 GLUT-1의 발현에 차이가 없었다.

- DRO, FTC 세포주의 결과로 볼 때 FDG PET이 세포주의 재분화유도치료에 대한 반응을 반영하는 것으로 판정할 수 있지만 이들 세포주들의 반응은 예상보다 매우 적음을 알 수 있었음.

3) 재분화유도치료와 NIS 표적 분자영상

- 재분화치료에 따른 NIS 발현 등 재분화 효과 분석

NIS는 *in vitro* 실험에서 pioglitazone처리후 약하게 상승하였으나 그 효과는 지속되지 않음. FTC, DRO 모두 pioglitazone처리후 24시간째 RNA level 증가하였으나 48시간이후 감소하였고 NIS단백질은 48시간에 소량 증가하였음.

- 종양모델의 방사성요오드 스캔이나 Tc-99m pertechnate 스캔에서 DRO와 FTC는 매우 미약한 섭취를 보였음 (그림 20). 이러한 낮은 섭취는 재분화유도치료를 통해서도 변화하지 않았음.
- 방사성요오드치료를 병합한 경우에도 이러한 낮은 섭취는 개선되지 않음 (그림 21).
- 동물모델의 종양을 적출하여 치료전후 FDG섭취와 관련된 GLUT-1과 요오드섭취와 관련된 NIS의 발현을 면역화학염색을 통해 관찰하였음. 치료전후에 유의한 차이점은 발견하지 못하였음. 이전의 연구의 결과와 잘 일치하는 결과는 아님.

4) 결론

결론적으로 본연구를 통하여 갑상선암 세포주를 이용하여 재분화유도치료의 개발 및 연구에 필요한 여러 가지 동물모델을 확립하였음. 재분화유도치료의 효과는 FDG PET과 같은 분자영상으로 관찰할 수 있었다. 이 효과는 기대와 달리 재분화의 지표중 하나인 NIS발현에 의한 결과는 아니었음. 또한 재분화유도치료의 효과는 분화가 나쁜 갑상선암에서만 관찰되었음.

다만 몇 가지의 제한점이 이 연구의 수행중에 확인되었는데, 예상과는 달리 재분화유도치료는 모든 갑상선암에서 일관적으로 효과적이지는 않았음. 분화가 된 여포성 갑상선암인 FTC에서는 치료가 없었다. 재분화유도치료 자체의 효과가 이전의 연구결과와 달리 갑상선암에서 높지 않음을 확인하였음.

제 2세부과제: 갑상선 유두암에서 Proteomics기법을 이용한 새로운 예후인자의 발굴

갑상선 유두암에서 가장 흔하게 발생하는 BRAF 변이에 따른 단백질 발현 양상에 대한 연구는 드물다. 본 연구에서는 BRAF변이에 따라 다르게 발현되는 단백질을 정량적 단백질 분석을 이용하여 동정하고, 면역조직화학 염색법을 이용하여 각 단백질의 발현 양상을 생체 조직에서 확인하였다.

본 연구에서는 MALDI-TOF/TOF를 이용하여 BRAF 변이가 있는 세포주에서 발현 양상이 변화하는 단백질로 vimentin, calreticulin, nucleophosmin, HSP60, SOD를 확인할 수 있었다. 이중 HSP60은 림프절전이와의 관련성을 생체 시료에서 확인하였다. HSP60은 mitochondria 안으로 단백질을 이동시키는데 관여하며, 이동된 단백질의 folding을 교정하는 작용을 촉진하며 misfolding을 억제하고 refolding을 도와 unfolded polypeptide의 적절한 조합이 가능하도록 하는 역할을 할 것으로 생각된다.

갑상선 유두암에서 BRAF 돌연변이는 예후인자로서의 가능성이 논의 되고 있지만 우리나라처럼 75%이상의 갑상선 유두암이 BRAF 돌연변이를 가지고 있는 상황에서는 BRAF 돌연변이 단독으로 예후인자가 되기에는 전반적인 갑상선 유두암의 좋은 예후를 설명하지 못한다. 그러므로 BRAF 돌연변이외에 그 하부 신호 전달체계에 직통하는 다른 분자적 표지자가 있을 가능성이 있다. 본 연구에서는 HSP60 발현 여부에 따라 BRAF 돌연변이가 있는 갑상선 유두암에서도 림프절 전이가 다르게 나타남을 알 수 있었다. HSP60은 STRESS 단백질로 일반적으로 ISCHEMIA나 스트레스 상황에서 세포의 고사를 막는 역할을 한다고 알려져 있다. 그러므로 본 연구의 결과와 같이 종양억제 유전자로서의 역할은 모순된 것처럼 보이나 실제로 다양한 암에서 HSP60의 발현이 종양의 예후에 긍정적인 영향과 부정적인 영향을 모두 끼칠 수 있는 것으로 보고 되고 있으므로 갑상선 유두암에서의 역할을 주목할 수 있다. 장기간의 추적관찰과 기전 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 MAPK inhibitor가 단백질 발현 양상에 미치는 영향을 확인하고자 각 세포주별 MALDI-TOF를 실시하여 세포주별로 발현 양상을 달리하는 여러가지 단백질을 동정할 수 있었다. BRAF 변이가 없는 XTC세포주와 TPC1 세포주 사이에 약제 처리 후 공통적으로 발현이 감소하는 단백질은 vimentin이었으며, vimentin은 BRAF 변이 세포주인 SNU790에서도 약제 처리 후 발현이 감소되는 양상을 보였다. Western blot 결과에서 vimentin의 발현이 감소하는 경우는 Sorafenib을 처리한 TPC1 세포주에서만 확인이 되었으나, 정량적 분석 결과를 고려할 때 Sorafenib 약제가 구조 단백질인 vimentin에 영향을 미친다는 것을 예측할 수 있었다. XTC 세포주에서 발현이 감소하는 alpha-enolase는 다양한 기능을 수행하는 효소로서, 당분해 작용에 관여하며, 성장 조절, 혐기상황에 대한 적응과 알리지 반응등에서 중요한 역할을 한다. 또한, 혈관내부 및 세포간 섬유용해작용에도 관여할 것으로 생각되고, immunoglobulin생산을 자극하는 것으로 알려져 있다. SNU790 세포주에서 약제 처리 후 발현이 감소되는 PDI A3와 nucleophosmin그리고 TPC1 세포주에서 발현이 감소하는 calreticulin은 모두 단백질의 folding과 단백질 합성 및 조절에 관여한다. Western blot에서는 TPC1 세포주와 SNU790 모두에서 sorafenib을 처리하였을 때에만 발현이 감소되는 것으로 나타났다. Sorafenib은 MAPK pathway에서 RAF/MEK/ERK pathway를 차단하는 약제로, 주로 serine/threonine kinase(c-RAF)에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 또한, U0126은 MEK1/2의 phosphorylation를 방해함으로써 갑상선 유두암 세포의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있는데, 이는 sorafenib보다 좀 더 하위 경로를 억제하는 것이다. 본 연구의 western blot 결과는 생체 조직에서의 확인을 하지 못했다는 한계점이 있으나, sorafenib 처리 후에만 발현이 감소되는 vimentin, nucleophosmin 및 calreticulin의 결과를 보아 이들 단백질이 RAF/MEK/ERK pathway의 상위 경로에 영향을 미치는 단백질일 가능성도 고려할 수 있겠다.

요약하면, 본 연구에서는 BRAF 변이에 따라 다르게 발현되는 단백질을 정량적 단백질 분석으로 동정하고 생체 조직을 이용하여 확인하였으며, BRAF변이를 예측할 수 있는 새로운 표지자를 제안할 수 있었다. 또한 HSP60 단백질이 림프절 전이에 영향을 미치는 종양억제 유전자로서의 가능성이 있다는 것을 확인 하였다. 이는 추후 전향적 연구들이 이루어진다면 임상적 이용도 고려할 수 있을 것이다.

또한, MAPK inhibitor와 BRAF 변이의 상관 관계 및 약제에 의한 단백질 발현의 차이를 확인하여 RAF/MEK/ERK pathway와의 관계도 예측해 볼 수 있었으나 대사 경로에 대한 연구는 좀 더 필요할 것으로 보인다.

제 3세부과제: 중간형 갑상선결절에서 악성과 양성 감별을 위한 마이크로어레이 분석

갑상선암의 진단에 있어서 가장 정확하고 널리 시행되고 있는 검사는 미세침흡인세포검사이다. 진단정확도가 95% 이상으로 gold standard 인 검사이지만, 이 검사만으로는 악성 및 양성을 정확하게 진단할 수 없는 중간형 결절은 적게는 5%에서 많게는 30-40%에 이르러 이들의 경우 정확한 진단을 위하여 수술을 시행해야 한다. 하지만 이들 중 암의 빈도는 15-47% 정도로 반 이상의 환자가 암이 아님에도 수술을 시행 받아야 하며, 암으로 확인되더라도 나머지 열절제술을 위한 재수술이 필요하게 되는 등 많은 불편함이 있다.

최근 분자유전 분야에서의 진단기법에 대한 연구가 활발하여, BRAF 돌연변이는 매우 높은 특이도로 갑상선유두암을 진단하는데 도움이 되는 도구로 사용되고 있다. 이에 여포암에서의 진단에 도움이 되는 유전자를 찾기 위하여 이 실험을 진행하였다. 하지만, microarray 결과를 여러번 반복하였음에도 불구하고, 양성결절과 갑상선여포암 사이에 유의한 발현 차이를 보이는 유전자는 찾을 수가 없었다.

이에 유전자 수준에서의 차이 외에 임상상, 초음파 영상 소견, 병리소견 등의 인자들을 리뷰하였고, 본 연구에서는 다른 연구들의 결과와 비교적 일관되게 젊은 연령, 큰 결절 크기 등이 갑상선여포암의 가능성을 높이는 인자로 분석되었다. 이 외에 티로글로불린(thyroglobulin, Tg) 수치가 새로이 갑상선여포암의 가능성을 예측할 수 있는 인자로 제시되었다.

Tg는 정상적으로 갑상선조직에서 생성되는 단백질로 갑상선암 뿐 아니라 증식성 갑상선 질환에서도 그 값이 증가하여 갑상선암의 진단에는 도움이 되지 않으므로 갑상선학회에서는 수술 전 Tg의 수치를 측정하는 것이 의미가 없다고 언급하고 있다. 가장 흔한 종류의 암인 갑상선분화암, 그 중에서 갑상선유두암에 있어서는 위의 가이드라인과 동일하게 이 연구에서도 Tg 수치의 유의한 차이가 나타나지 않았다(표 1). 하지만 범위를 양성결절과 갑상선여포암으로 좁혔을 때 Tg 수치는 유의하게 악성결절에서 높았으며, 양성, 미세침습여포암, 광범위침습여포암으로 갈수록 유의하게 증가하는 경향을 보였다.

cut-off value 187.5를 기준으로 이보다 Tg 수치가 높으면 갑상선암일 가능성이 유의하게 증가하였고, 민감도 54.8%, 특이도 91.5%로 AUC 0.748 로 비교적 높은 진단정확도를 가질 것으로 예측할 수 있었다. 민감도가 다소 낮긴 하나 Tg 수치가 187.5 ng/ml를 넘지 않으면 거의 대부분에서 갑상선여포암의 가능성을 배제할 수 있는 좋은 진단인자가 될 것으로 생각된다.

이상의 결과들을 바탕으로 요약하자면, 갑상선여포암에 있어서는 아직 양성종양과 유의한 차이를 보이는 유전자를 발견할 수 없었으며, 임상에서 환자가 갑상선결절로 내원하여 시행한 미세침흡인세포검사상 중간형 소견을 보이는 경우에는 나이, 성별, 종양의 크기나 초음파 소견 등의 위험인자와 더불어 serum Tg 레벨을 측정하는 것이 도움이 될 것으로 생각된다.

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⁾
Total Thyroidectomy and the Application to Non-thyroidal Tumor Implantation Model using the Human Sodium/Iodide Symporter Gene	Hye-kyung Shim, M.D., Seog gyun Kim, M.D., Tae-Sung Kim, M.D., Seok-ki Kim, M.D.	Nuclear Medicine and Molecular Imaging	게재확정	국내	09100312
HSP 60 as new prognostic marker in papillary thyroid carcinomas: proteomic approach	이유진 (제일) 정기욱 (교신)	Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism (6.026)	게재 신청 중	국외 SCI	09100312
Differential protein expression in papillary thyroid carcinoma cell lines according to BRAF mutation status	민선영 (제일) 정기욱 (교신)	Thyroid (2.02)	게재 신청 중	국외 SCI	0010032
Preoperative thyroglobulin as a useful predictive marker to differentiate follicular thyroid cancer from benign nodules in indeterminate nodules	이유진, 이은경, 정기욱, 김석기		in preparation		

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 ¹⁾	지원과제번호
In vivo monitoring of PPAR-gamma agonist treatment in the anaplastic thyroid cancer model using an animal PET-CT	백남석	분자영상학회	국내	09100312
Total thyroidectomy and establishment of thyroid cancer model in the mouse	김석기	International thyroid congress	국외	09100312
HSP 60 as new prognostic marker in papillary thyroid carcinomas: proteomic approach	정기욱	International Thyroid Congress	국외	0010032
Preoperative thyroglobulin as a useful predictive marker to differentiate follicular thyroid cancer from benign nodules in indeterminate nodules	이유진, 이은경, 정기욱, 김석기	대한갑상선학회	서울	

다. 산업재산권

구분 ¹⁾	특허명	출원인	출원국	출원번호
발명특허	종양 및 감시림프절에 특이적인 [Tc-99m] Tc 표지된 엽산 결합 인혈청 알부민	김석기, 강세훈, 백남석, 김영상, 김서일	대한민국	제10-2010-0055655

발명특허	형광 센싱 프루브 및 이를 이용한 형광 검출 방법	김석기, 이병일	대한민국	제10-2010-0124466
------	-----------------------------	----------	------	------------------

라. 저 서

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

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표	달성내용	달성도(%)	
			연차	최종
분자영상과 결합된 갑상선암의 재분화유도 치료법을 개발한다.	분화가 나쁜 갑상선암 세포주를 이용하여 동물모델을 만든다.	여러세포주를 이용하여 동물모델을 작성하였음.	2009	100%
	갑상선육소치료를 위한 치료모델을 만든다.	방사성요오드를 이용한 기능적 갑상선절제술을 시행하여 요오드치료를 시행할 수 있는 치료모델을 작성함.		
	갑상선암 동물모델에서 분자영상을 시행한다.	방사성요오드를 이용한 분자영상을 시행함. 소동물PET를 이용한 분자영상을 시행함.		
	대상환자군 및 대조군의 선정	11개의 동결절편 조직을 이용, BARF돌연변이 양성군, 음성군을 선정함		
	임상데이터 수집	수집완료		
	BRAF 돌연변이 검색	검색완료		
	PROTEOMICS기법을 이용한 갑상선유두암 특이 단백질 발굴 및 동정	동정 완료		
	조직에서 면역화학염색 및 Western blot을 이용한 단백질 발현의 validation	완료		

2차년도	단백질 발현과 갑상선 유두암의 예후인자와의 연관성 분석	분석 완료	2010	100%
	대상환자군 수집	환자군의 임상, 초음파, 병리 데이터 리뷰 및 해당 대상 추출		
	microarray 분석	array 분석을 통해 유의하게 차이를 보이는 유전자 확인		
	갑상선암 동물모델에서 재분화유도 치료 시행	여러세포주를 이용하여 재분화유도 치료 동물모델 작성함.		
	갑상선육소치료를 위한 치료모델을 만든다.	갑상선절제술을 시행하여 요오드 치료를 시행할 수 있는 치료모델을 작성함.		
	재분화유도 치료효과를 분자영상으로 확인	소동물PET과 SPECT를 이용한 분자영상을 시행함.		
	재분화유도 치료의 분자적 기전을 분자영상을 통하여 확인	Tc99m을 이용하여 SPECT로 확인함.		
	대상 세포주의 선정	4개의 갑상선암 세포주 선정		
	MAPK 신호전달체계 억제제의 투여 후 갑상선암 세포주의 형태학적 변화 및 성장 변화 관찰	완료		
	각 세포주에서 ERK phosphorylation 차단 확인	완료		
	처리 후 세포주에서 단백질 추출 및 PROTEOMICS분석	완료		
	조직에서 면역화학염색 및 Western blot을 이용한 단백질 발현의 validation	완료		
	단백질 발현과 갑상선 유두암의 예후인자와의 연관성 분석	완료		
차이 나는 유전자를 실제 임상 검체에 적용	유의하게 차이를 보이는 유전자를 찾지 못해 시행하지 못함			
임상, 병리 데이터를 기준으로 진단인자 분석	Tg 수치에 대한 내용 새로 얻음			

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

구분	평가의 착안점 및 척도	자체평가
1차년도 (2009)	갑상선암세포주를 이용한 동물모델을 만들었나?	미분화암(DRO, FRO) 여포암(FTC)에서 작성함.
	동물모델에서 재분화유도 치료를	재분화유도제(Pioglitazone)을 이용하여 시행함

	시행하였나?	
	분자영상을 시행하였나?	소동물 PET과 SPECT를 이용한 분자영상을 시행함.
	동물모델에서 재분화유도 치료의 효과를 분자영상으로 확인하였나?	동물용 SPECT, 동물용 PET을 이용하여 확인함 (I-131, Tc-99m, FDG)
	재분화유도 치료의 분자적 기전을 분자영상을 통하여 확인하였나?	I-131와 Tc99m을 이용한 SPECT로 확인함.
	예후와 관련된 분자영상의 결과를 적용하여 재분화유도 치료를 분석하였는가?	
	대상환자 및 대조군 설정의 적절성 여부	적절히 수집되었음
	임상데이터 수집의 충실성 여부	충실히 수집됨
	BRAF 돌연변이 검색방법의 정확성	BRAF 돌연변이 검색을 정확히 수행함
	특이 단백질 동정 여부	특이 단백질 동정 됨
	조직과 조직에서 면역화학염색 및 Western blot을 이용한 단백질 발현의 validation	충실히 수행되었음
	단백질 발현과 알려진 예후인자와의 상관관계 여부	갑상선 유두암에서 림프절 전이와 관련된 단백질 동정됨
	중간형 결절로 수술 예정인 환자들의 미세침흡인 세포검사 검체 수집	충실히 수집됨
	임상데이터 수집	충실히 수집됨
2차년도 (2010)	갑상선암 재분화유도치료를 갑상선암 동물모델에 적용하고 효과를 분석하였나?	적용하였고 분석하였음.
	재분화유도치료 전후 분자영상을 시행하였나?	FDG PET, Tc-99m SPECT를 이용하여 시행함.
	치료전후 분자생물학적 변화의 기전을 동물모델에서 분석하였나?	시도하였음.
	예후와 관련된 분자영상의 결과를 적용하여 재분화 유도치료를 분석하였는가?	분석하였음.
	대상 세포주 선정의 적절성 여부	적절히 수집되었음
	MTT assay 및 형태학적 변화 확인 여부	확인됨
	적정 dose 및 적정 처치 시간 결정 여부	확인됨
	특이 단백질 동정여부	4개의 단백질 동정됨
	조직에서 검색가능 여부	면역염색으로 확인 가능함
	특이 단백질 발현과 알려진 예후인자와의 상관관계 여부	BRAF mutation과 관련된 단백질을 세포주에서 확인함
	미세침흡인 세포검사 검체에 유전자검사 적용	잘 적용하였으나 유의한 결과를 얻지는 못함
	검사결과와 악성 진단의 민감도, 특이도, 진단정확도 등을 분석	차이나는 유전자 대신 다른 임상 위험인자를 반영, 분석함 분석 자체는 충실히 수행됨

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	4	FDG PET/CT after Pioglitazone treatment (국외논문 1편).
		1. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism (6.202) 2. Thyroid (2.602)
		1. 갑상선학회 초록 발표 및 저널 submission 예정
산업재산권 등록	2	중앙 및 감시림프절에 특이적인[Tc-99m] Tc 표지된 염산 결합 인혈청 알부민(FSA)
		형광 센싱 프루브 및 이를 이용한 형광 검출 방법
기 타	2	대한분자영상학회 포스터 2010 ITC 포스터 2010

(2) 연구성과의 활용계획

- 재분화치료법이 효과적인 경우 환자를 대상으로 하는 연구로 확대할 수 있음.
- 연구된 분자영상을 이용하여 환자에서 재분화치료법을 시행할 수 있음.
- 갑상선 유두암 동물 모델에서 MAPK inhibitor 치료 전후 발현이 달라진 단백질들의 발현 상황을 확인
- 치료 반응 유무에 따른 단백질 발현 검색
- 발현이 다르게 나타난 단백질들의 발현기전 탐색: epigenetic change 탐색
- HSP60 발현 여부에 다른 환자들의 장기 추적 결과 확인: 보조적 병기 결정인자로서의 간섭성 탐색

6. 참고문헌

- 각 세부과제별로 나열함.

7. 첨부서류

- 각 세부과제별로 나열함.

II. 제1세부과제

세부과제명 : 분자영상을 이용한 재분화 치료법 개발

세부과제책임자(성명/소속) : 김석기/분자영상치료연구과

목 차

< 요약 문 >

(한글) 분자영상을 이용한 재분화 치료법 개발

(영문) Development of redifferentiation induced therapeutics using
molecular imaging

<u>1. 연구의 최종목표</u>	-----	34
<u>2. 연구의 내용 및 결과</u>	-----	34
<u>3. 연구결과 고찰 및 결론</u>	-----	52
<u>4. 연구성과 및 목표달성도</u>	-----	57
<u>5. 연구결과의 활용계획</u>	-----	59
<u>6. 참고문헌</u>	-----	60
<u>7. 첨부서류</u>	-----	60

< 요약 문 >

연구분야(코드)	I-1	과제번호	0910031-2
과제명	분자영상을 이용한 재분화 치료법 개발		
연구기간/연구비 (천원)	합계	2009년 01월 01일 ~ 2010년 12월 31일	95,000
	1차년도	2009년 01월 01일 ~ 2009년 12월 31일	50,000
	2차년도	2010년 01월 01일 ~ 2010년 12월 31일	45,000
과제책임자	성명	김 석 기	주민등록번호
	전화번호	031-920-1731	전자우편
색인단어	국문	갑상선암, 분자영상, 분자치료, 재분화치료	
	영문	Thyroid cancer, Molecular imaging, Molecular therapeutics, Redifferentiation	

◆ 연구목표

<최종목표>

분자영상과 결합된 갑상선암의 재분화유도 치료법을 개발한다.
재분화유도 치료에서 분자영상 영상과 관련된 분자생물학적 기전을 조사한다.

1차년도 목표: 난치성 갑상선암 동물모델과 치료모델을 작성하고 분자영상을 시행
2차년도 목표: 분화가 나쁜 갑상선암 동물모델에서 재분화유도치료를 시행하고 분자영상으로 분석

◆ 연구내용 및 방법

연구배경

- 갑상선암은 비교적 치료가 잘되는 것으로 알려져 있으나 매우 높은 유병율과 발병율에 불구하고 일부 환자군은 극히 예후가 불량하다. 이 예후불량군을 예후가 좋은 군과 구별하는 진단법이 존재하지 않고 기존의 치료법이 효과가 없음.
- 예후가 나쁜 갑상선암을 치료하기 위한 방법의 하나로 재분화 유도치료가 제안되고 있음. rosiglitazone 혹은 pioglitazone 등은 과거 여러 종양에서 시행되던 레티노이드에 비해 갑상선암에서 치료효과가 좋은 것으로 기대됨. 하지만 이들 재분화유도치료제의 연구는 초기단계임.
- 생체내의 분자생물학적 정보를 살펴보기 위해서는 분자영상을 적용하는 것이 유리함. 재분화유도 치료와 같이 갑상선암의 분자생물학적 특성의 변화를 유도하는 치료법에서는 분자생물학적 변화를 스크리닝하고 모니터링하는 방법이 필요하며 분자영상은 매우 적절한 방법임.
- 갑상선암에 대해서는 이미 방사성요오드를 이용한 치료와 영상이 널리 사용되고 있고 최근 FDG PET도 방사성요오드의 제한점을 보충하는 분자영상으로 널리 사용됨. 재분화유도 치료에서 치료반응을 모니터링하는 분자영상방법은 재분화유도 치료법이 적절한 치료법으로 확립되기 위해서는 반드시 필요함. 갑상선암 세포주 동물모델을 이용하여 재분화유도치료를 개발하고 확인하는 것이 필요함.

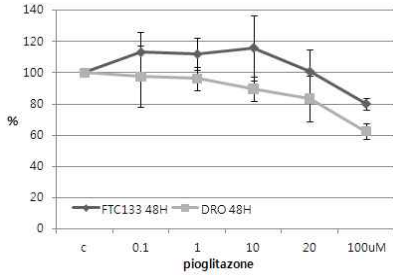
연구내용 및 방법/결과

A) 갑상선암 동물모델 작성과 재분화치료 효과 확인

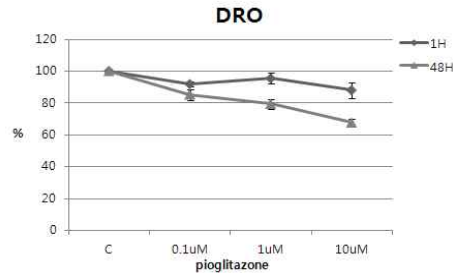
- 1) 갑상선암 세포주 특성확인 및 선택
 - PPAR gamma receptor 발현확인 (Western Blot)/ 재분화유도제(Pioglitazone)에 의한 세포독성 평가
- 2) 갑상선암 동물모델 작성
 - 다양한 갑상선암 세포주의 동물모델 시스템 확립 (갑상선절제)
 - Pioglitazone, 방사성요오드치료모델 확립

B) 재분화유도치료모델에 FDG PET/CT(분자영상)의 적용

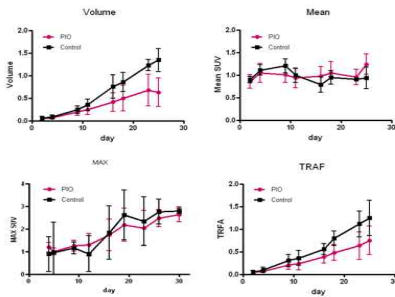
- FDG PET/CT, 방사성요오드스캔의 마우스에서 적용



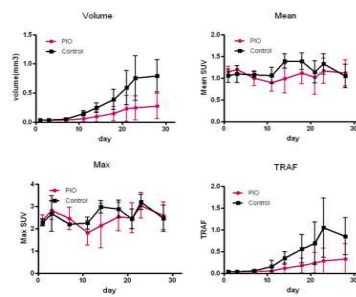
재분화유도제에 의한 세포사멸 (CCK-8 assay)



재분화유도제에 의한 FDG 섭취의 변화 - DRO 세포주



advanced DRO 종양모델에서 재분화 유도제 (pioglitazone)치료 후, FDG PET 분자영상



early DRO 종양모델에서 재분화 유도제 (pioglitazone)치료 후, FDG PET 분자영상

C) 요약/결론: 갑상선암 동물모델을 성공적으로 작성하였고, 분화가 나쁜 갑상선암에서 재분화유도치료의 효과를 확인하였고 치료효과는 FDG PET/CT를 이용하여 모니터할 수 있었음. 하지만 분화된 여포성갑상선암에서는 치료효과도 뚜렷하지 않고 FDG PET/CT로도 차이가 없었음. 미분화암의 특성인 NIS 소실은 본연구의 재분화유도치료를 통해서 회복되지 않았고 방사성요오드 병합치료와 분자영상에서 변화를 관찰할 수 없었음.

◆ 연구성과

< 정량적 성과 >

구분	달성치/목표치	달성도(%)
SCI 논문 편수	0 / 1	
IF 합	-	
기타 성과	국내특허출원 2건, 국내논문 1편 국외학회 발표 1편	

< 정성적 성과 >

- 갑상선암 동물모델을 작성하고 소동물 영상장비를 이용하여 분자영상을 시행하는 기반마련.
- 마우스에서 갑상선전절제술을 확립함.
- 재분화 유도 효과를 소동물 영상장비(PET-CT/ SPECT)를 이용하여 확인하였음.
- 체외실험과 동물모델을 이용하여 재분화치료의 세포분자적 양상을 확인함.

◆ 참여연구원

(최종연도 참여인원)

성명	김석기, 김태성, 백남석
주민등록번호	*****-*****, *****-*****, *****-*****, *****-*****

Project Summary

Title of Project	Development of redifferentiation induced therapeutics using molecular imaging
Key Words	Thyroid cancer, Molecular imaging, Molecular therapeutics, Redifferentiation
Project Leader	Seok-ki Kim
Associated Company	
<p>◆ Purpose: we aimed to establish re-differentiation treatment supported by molecular imaging in thyroid cancer using xenograft model, and assess the correlation of molecular imaging and re-differentiation treatment.</p> <p>◆ Method: we established thyroid cancer xenograft models combined with thyroidectomy using various human thyroid cancer cell lines. The re-differentiation treatments were performed using pioglitazone. The treatment effects were assessed in DRO and FTC tumor models. Molecular imaging such as FDG PET/CT and Tc-99m pertechnate SPECT were done before and after treatment. Pathologic analysis such as GLUT-1 and NIS immunohistochemistry were taken.</p> <p>◆ Results: various thyroid cancer models were established and used on-going study successfully. Total thyroidectomy could be done in the mice with tolerable success rate. After pioglitazone treatment, poorly differentiated thyroid cancer model (DRO) showed moderate but robust decrease of tumor growth rate. but, follicular thyroid cancer model (FTC) did not. FDG PET/CT showed FDG accumulation decrease corresponding to the growth decrease. GLUT-1 expression of DRO model increased after treatment, but not in FTC model. On the contrary to FDG, Tc-99m SPECT, which reflects the expression of NIS, were not different after treatment. Immunohistochemical assessment showed no difference of NIS expression.</p> <p>◆ Conclusion: we established successfully the basis for the research using thyroid cancer animal model and re-differentiation treatment. The treatment effect of redifferentiation agents could be monitored with molecular imaging with some limitation.</p>	

1. 연구의 최종목표

<최종목표>

- 분자영상과 결합된 갑상선암의 재분화유도 치료법을 개발한다.
- 재분화유도 치료에서 분자영상 양상과 관련된 분자생물학적 기전을 조사한다.

구분	목표	내용 및 범위	연구비
1차년도 (2009)	난치성 갑상선암 동물모델과 치료모델을 작성하고 분자영상을 시행	1. 분화가 나쁜 갑상선암세포주를 이용한 동물모델과 치료모델을 만들고 분자영상을 시행함.	500,000
2차년도 (2010)	분화가 나쁜 갑상선암 동물모델에서 재분화유도치료를 시행하고 분자영상으로 분석	1. 동물모델에서 재분화유도치료 시행 2. 동물모델에서 재분화유도치료의 효과를 분자영상으로 확인. 3. 재분화유도치료의 분자적 기전을 분자영상을 통하여 확인.	45,000

2. 연구의 내용 및 결과

A) 갑상선암 동물모델 작성과 특성확인

1) 갑상선암 세포주 특성확인 및 선택

가) 갑상선암 세포주의 PPAR gamma 수용체 발현확인 (Western Blot)

PPAR gamma agonist를 이용한 재분화 유도를 하기위해 적절한 갑상선암 세포 주를 선별하고자 함. 여러 가지 갑상선암 세포 주에서 PPAR gamma의 발현을 Western Blot으로 확인함. 각 세포 주들의 PPAR gamma 발현은 (그림1) 에서 분화정도와 관계없이 모든 갑상선암 세포 주에서 발현됨을 확인하였음.

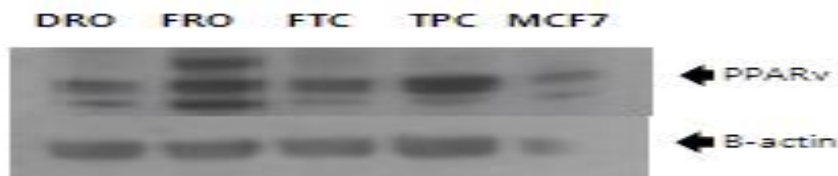


그림 1 여러 가지 갑상선암에서 PPAR gamma의 발현 (Western Blot)

미분화암 (anaplastic thyroid cancer): DRO90, FRO
 여포암 (Follicular thyroid cancer): FTC133
 유두암 (Papillary thyroid cancer): TPC

나) 갑상선암 세포주에서 재분화유도제에 의한 세포독성 평가

갑상선암 세포에서 PPAR gamma agonist (Pioglitazone) 에 의한 세포독성을 평가하기 위해, 각 각의 세포 주에 0.1, 1, 10, 20, 100uM Pioglitazone을 처리한 후, 48시간후에 Cell counting kit (CCK-8)를 이용하여 세포독성을 평가함. 미분화암 DRO90, FRO와 여포암 FTC133, 유두암 TPC 모두 Pioglitazone의 농도에 따라 세포수가 감소함 (그림2). 여러 가지 갑상선암에서의 재분화유도제의 효과를 알아보기 위해 갑상선암 종류에 따라 미분화암중에서 DRO90, 여포암에서 FTC133, 유두암에서 TPC를 선별함.

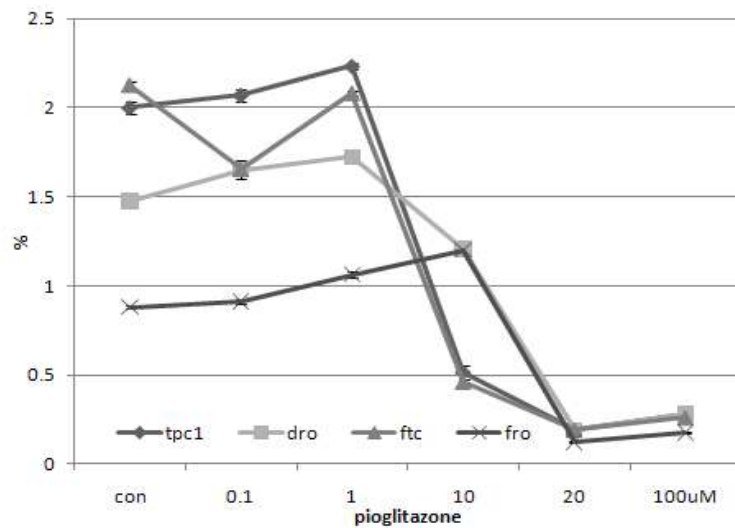
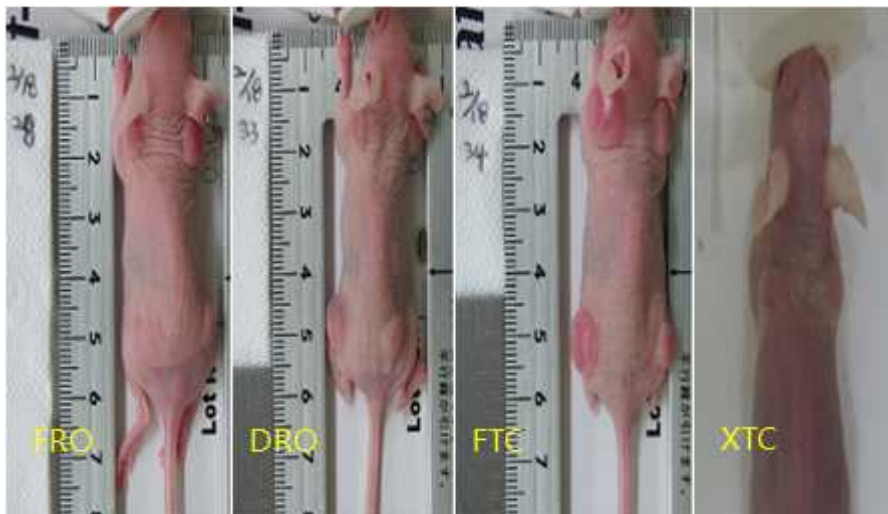


그림 2 재분화유도제에 의한 세포사멸 (CCK-8 assay)

2) 갑상선암 세포주를 이용한 동물모델 작성

가) 다양한 갑상선암 세포주의 동물모델 시스템 확립 (그림3)

- 각 세포주는 5-6 x 100만개의 세포주를 접종하고 종양형성의 유무를 관찰하였음.
- BRAF mutation 유무 등 PPAR-gamma이외의 특성에 따라 XTC (Thyroglobulin positive follicular thyroid cancer)와 SNU790 (BRAF mutation positive)를 추가하여 동물모델을 작성함.
- 암컷 누드마우스에서 별다른 조작 없이 세포주를 피하주사한 경우 DRO, FRO, FTC 세포주에서는 100%의 성공률을 보이며 종양을 형성하였다. 유두암인 TPC 세포주, XTC 세포주, SNU790 세포주는 종양이 형성되지 않았음.
- 누드마우스에서 종양을 형성하지 못한 세포주는 SCID마우스에서 matrigel을 이용하여 추가로 종양을 형성하는 지 평가하였음. XTC 세포주는 SCID 마우스에 matrigel을 이용하여 피하 주사하였을 때 종양을 잘 형성함. 형성된 종양으로 primary culture하여 만든 세포주를 다시 누드마우스에 접종하였을 때 100%의 성공률로 종양을 형성하였음. TPC와 SNU790는 SCID 마우스에서도 종양이 형성하지 않았음.



세포주	접종세포 수	육안관찰가능시기	접종후 크기			발생포인 트	성공율	생성된 종양양상
			1주	2주	3주			
FRO	5*10 ⁶		3-5	4-8	—	4/4p	100%	
DRO	5*10 ⁶		3-5	4-8	—	4/4p	100%	
FTC	5*10 ⁶		3-5	4-9	—	4/4p	100%	
TPC	1*10 ⁷	SCID matrigel	—	—	—	0/10p	0%	
XTC	1*10 ⁷	SCID matrigel	—	—	—	4/4p	100%	
SUN790	1*10 ⁷	SCID matrigel	—	—	—	/10p	0%	

그림 3 갑상선암세포주의 동물모델 성공률

나) 갑상선 절제 동물모델 시스템 확립 (thyroidectomy)

- 갑상선절제 동물모델의 필요성: 갑상선암의 치료중 방사성요오드치료는 갑상선전절제술을 시행한 경우에 시행할 수 있고, 흔히 시행하는 방사성요오드전신촬영도 정상갑상선이 모두 절제되어야 시행할 수가 있음.
- 갑상선 절제는 마우스에서는 기술적으로 어렵고, 절제후 사망률이 높음. 비수술적으로 방사성요오드를 이용하는 방법과 수술적으로 제거하는 방법이 있음. 두가지 방법으로 모두 적용하여 가능성을 살펴보았음.
- 방사선옥소를 이용한 비수술적인 기능적 갑상선 절제 마우스 모델: 방사성요오드 1 mCi 처리 후 3달 동안 관찰하였으나 변화 없었음. 갑상선이 완전히 제거되지 않았음.
- **수술현미경을 이용한 외과적 갑상선 전절제술 (그림 4 - 7):**
수술을 통해 갑상선을 제거함. 외과적 수술을 통한 갑상선제거를 위해 턱밑에서 귀와 수평선 끝 지점까지 피하박리 한 후, 침샘을 돌려 나누어 양 측으로 당겨 고정하고 투명 막을 제거함. 이때 보이는 띠 근육을 양쪽으로 벌리고 갑상선을 제거함. 제거한 갑상선은 H&E 조직 염색과 SPECT 촬영으로 확인하였음.

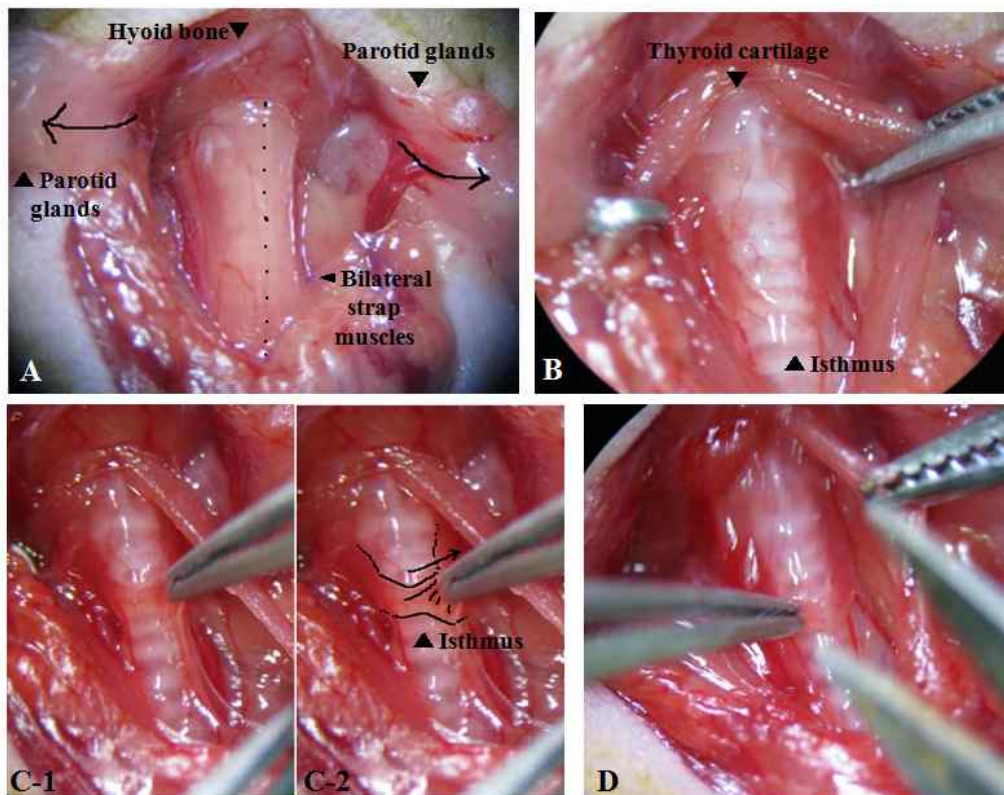


그림 4. 갑상선 제거과정 1. Bilateral parotid glands were gently divided along the midline and placed laterally upon the skin, and bilateral strap muscles were then exposed under the investing fascia (A). Bilateral sternocleidomastoid muscles were also exposed in this image. Thyroid cartilage and the hyoid bone were visualized along with multiple tracheal rings in this figure (B). The figure shows bilateral thyroid glands with a flat and transparent isthmus. The isthmus was being pulled up with forceps (C-1, C-2) and cut vertically (D).

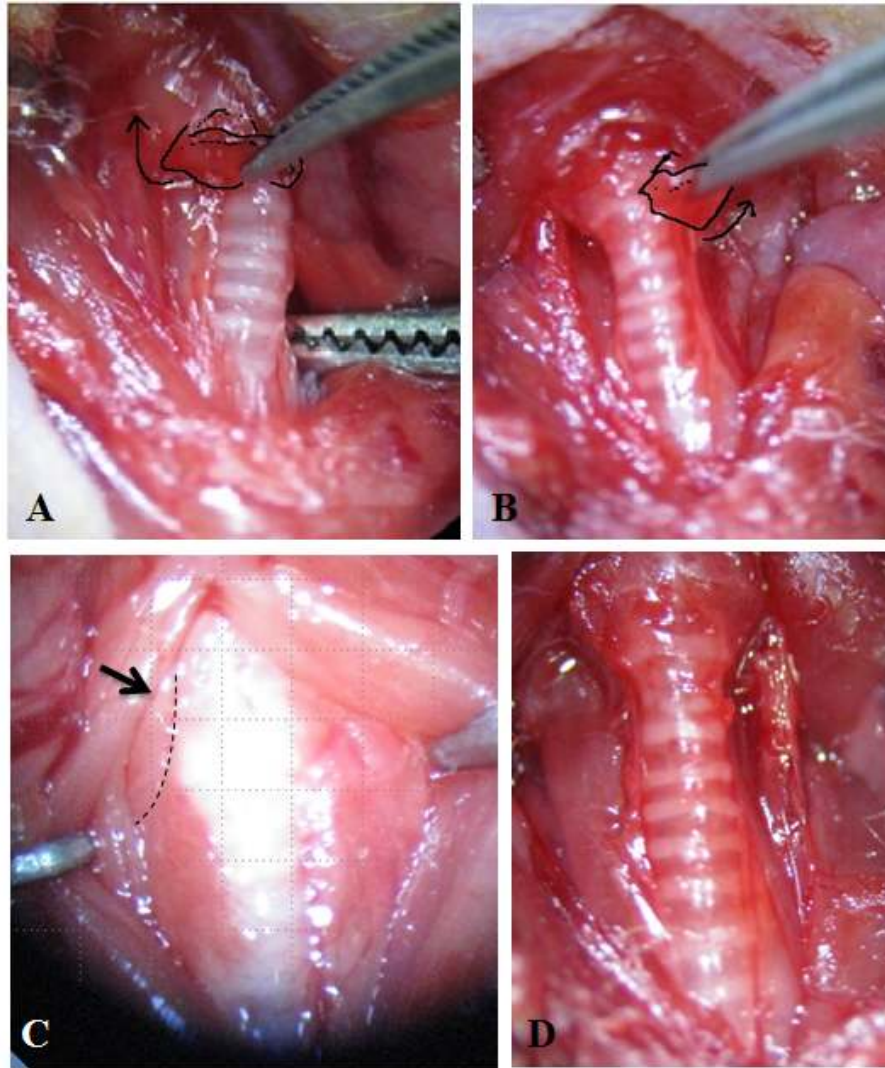


그림 5. 갑상선 제거과정 2. Upon cutting in half with scissors in the isthmus, the bilateral lobes of the thyroid were grasped on the medial side and dissected upward and laterally (A, B). The sternothyroid muscles were located in the upper pole of bilateral lobes (C), which were retracted along with the strap muscles before dissecting. Minor bleeding was easily controlled by gentle pressure with a piece of cotton. After total thyroidectomy, the trachea was visualized without the thyroids (D). After saline irrigation, musculature, lymphatic tissues and parotid glands were repositioned and skin was sutured.

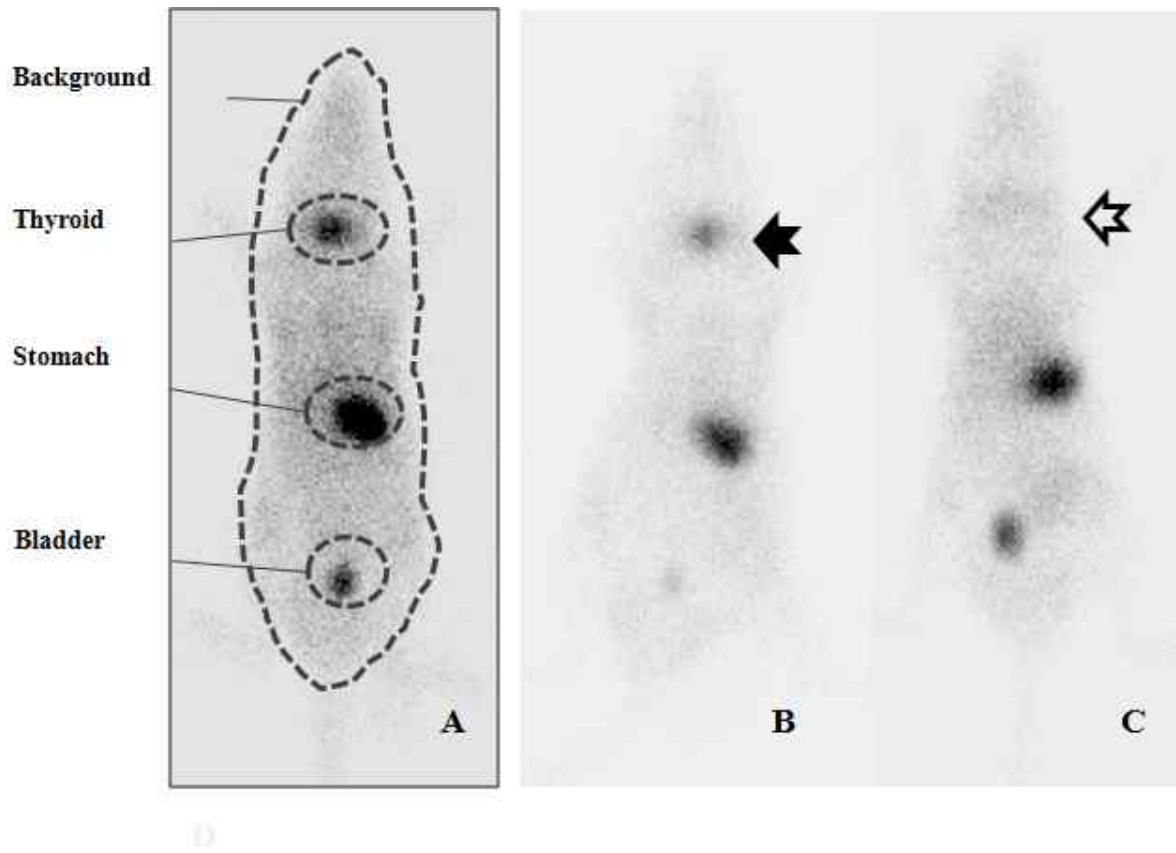


그림 6. 갑상선절제술 전후 갑상선스캔영상. The ^{99m}Tc -pertechnetate whole-body scans were done for each mouse in the small animal SPECT system. Figure (A) represents the region of interests in the neck, stomach, bladder and totalbody. For background correction, remnant thyroid/corrected background (wholebody-remnantthyroid - stomach-bladder, if visible) was calculated. Figure (B) shows intense radiolabel uptake in the neck area before surgery (blackarrow). Figure (C) shows the image taken after total thyroidectomy. Compared with the pre-operative scan, the post-operative scan shows faint remnant radiolabel uptake.

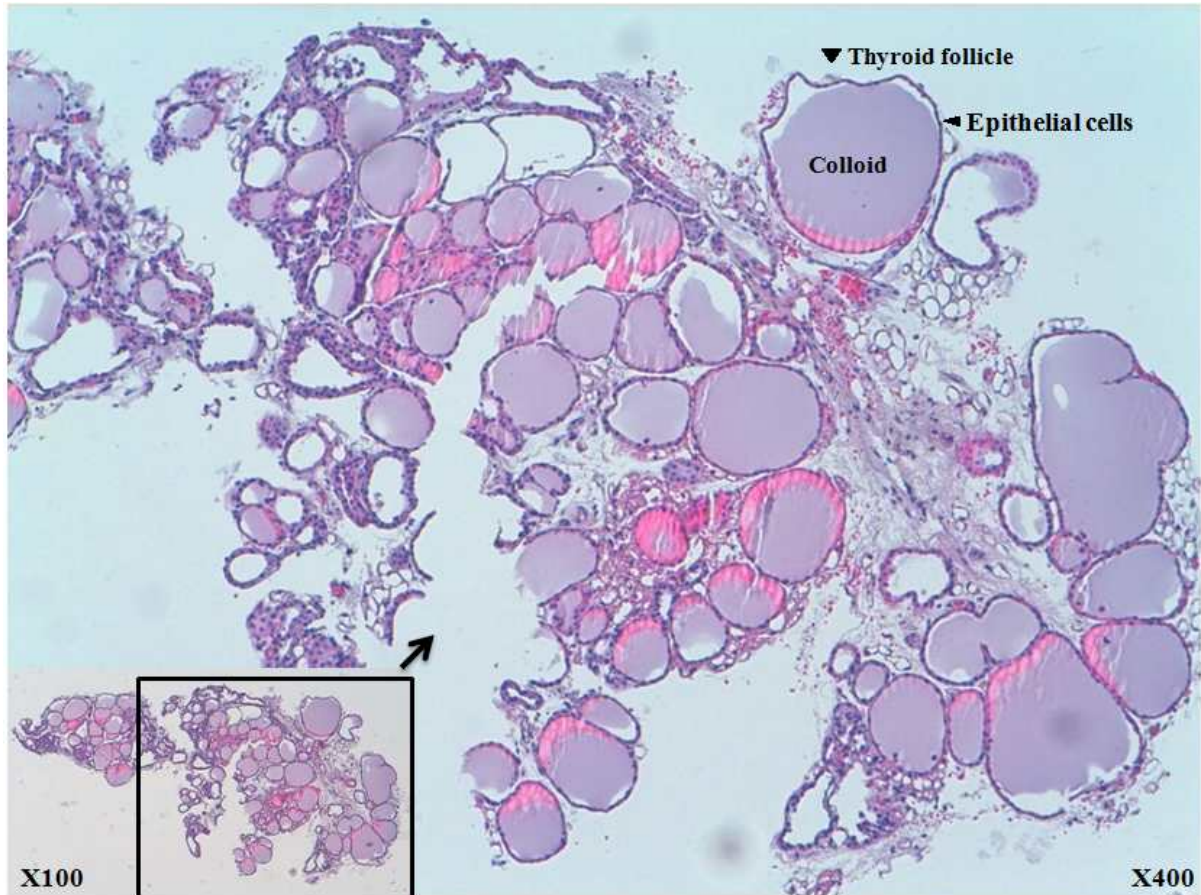


그림 7. 제거된 갑상선 H&E조직 염색. The removed thyroid glands were stained with Hematoxylin and Eosin (H & E), and examined under the microscope. The 100x image in the lower right square box is included, and part of the image is enlarged to 400x magnification. The glands were composed of many spherical hollow sacs called thyroid follicles. In this tissue section, each follicle appeared as an irregular circle of cells. These follicles were filled with colloids. The stromal structures were visible between the colloids.

3) 갑상선암 동물모델의 치료적용 모델

가) 재분화유도제(Pioglitazone) 단독 치료모델

- 배양한 갑상선암 세포주를 누드마우스의 양쪽 어깨에 접종하여 종양모델을 만듦.
- 접종 4일 후부터, 대조군과 시약 처리 군으로 나누어 대조군에는 DMSO, 시약 처리 군에는 25mg/kg의 pioglitazone을 매일 섭취시킴.

나) 재분화유도제 + 방사선요오드 병합 치료모델

- 누드마우스에서 갑상선전절제술을 시행함.
- 수술후 1주, 배양한 갑상선암 세포주를 누드마우스의 양쪽 옆구리에 접종하여 종양모델을 만듦.
- 접종 7일 후부터, 대조군과 시약 처리 군으로 나누어 대조군에는 DMSO, 시약 처리 군에는 25mg/kg의 pioglitazone을 매일 2주간 섭취시킴.
- 병합요법군은 이후 1.5mCi I131을 정맥 주사함.

B) 재분화유도치료와 분자영상

1) 분자영상의 선택

- 갑상선암 치료모델에서 재분화유도제(Pioglitazone)에 의한 치료효과를 영상화하기 위해 갑상선암의 분화정도에 따른 FDG 섭취 비교를 위한 PET-CT촬영과 재분화지표인 NIS(Sodium iodide symporter)의 발현에 따른 I-131, Tc-99m의 섭취정도를 확인하기 위한 SPECT촬영을 진행함.

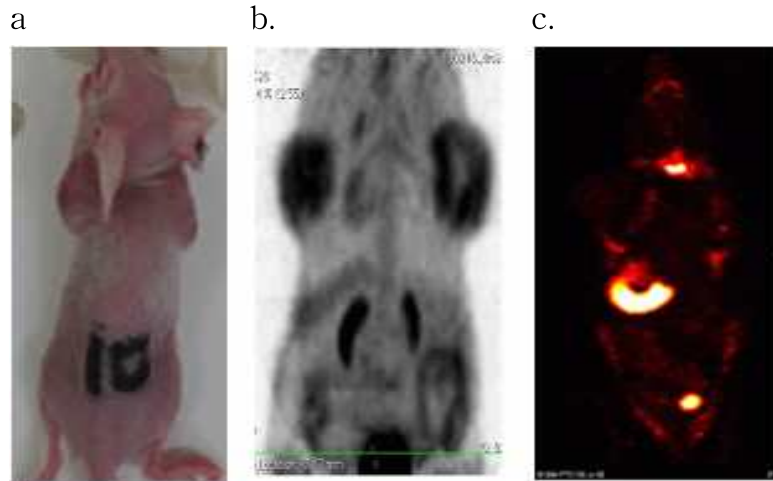


그림 8 갑상선암치료모델의 분자영상 a. 갑상선암 동물모델, b. FDG PET-CT영상 c.Tc99m에 의한 SPECT영상

- 갑상선암의 분화도: FDG PET-CT촬영
- 갑상선암의 재분화지표중 NIS (Sodium iodide symporter)의 발현에 특이적인 분자영상: I-131/Tc-99m Gamma Scan 혹은 SPECT 촬영.

2) FDG PET/CT 치료효과 판정 분자영상

- 재분화유도제의 치료효과를 영상화하는 데 적절한 프로토콜을 정하기 위해, 재분화유도제를 투여하는 시점을 두 가지로 나누어 종양이 가시적으로 자란 후에 치료제를 투여하기 시작하는 모델 (진행성 종양모델, advanced tumor model)과 종양세포를 접종하기 전부터 치료제를 투여하기 시작하는 모델 (초기 종양모델, early stage tumor model)을 적용함 (그림 9).

- 진행성 종양모델

배양한 갑상선암 세포 주(DRO, FTC133)를 양어깨에 접종 하여 종양모델을 만들고 접종 4일 후, 대조군과 시약 처리 군으로 나누어 대조군에는 DMSO, 시약 처리 군에는 25mg/kg의 pioglitazone을 매일 섭취시킴. 일주일에 2번 4주 동안 PET-CT 촬영함.

- 초기 종양모델

Pioglitazone을 5일 동안 우선 섭취시킨 마우스에 갑상선암 세포(DRO, FTC133) 200백만 개를

양 어깨에 접종하여 종양모델을 만든 후, 대조군과 시약 처리 군으로 나누어 시약 처리 군에는 25mg/kg pioglitazone을 매일 섭취시킴. 대조군에서는 DMSO를 섭취시켜 실험함. 일주일에 2번 4주 동안 PET-CT 촬영함.

- PET촬영은 마우스를 8시간이상 절식하고 체온을 유지하면서 적절히 마취한 후 소동물용스캐너를 이용하여 촬영하였음 (그림 10).



그림 9 갑상선암 치료모델 분자영상 스케줄. 윗그림 - advanced tumor model, 아래그림 - early stage tumor model.



그림 10. 소동물용 PET/CT - FDG 섭취영상을 촬영.

3) Tc-99m SPECT/ Gamma 영상

- 갑상선세포는 특이적으로 요오드를 섭취하고 축적하는 성격을 가지며, 방사성요오드를 투여하는 경우 특이적으로 섭취됨. 요오드의 섭취에 결정적인 역할을 하는 것은 세포막에 존재한 NIS 이며 이는 분화된 갑상선세포에 높게 분포함.
- 갑상선암은 분화도가 높은 경우 NIS가 잘 발현되며, 방사성요오드를 잘 섭취하여 치료가 잘되고 예후도 좋음. 분과제에서 목표로 하는 재분화유도치료의 경우 분화도를 높여 NIS의 발현을 높이고 이어 방사성요오드치료효과를 높이는 것을 목표로 함.
- NIS의 발현을 영상화하는 방법으로는 방사성요오드를 이용하거나 Tc-99m pertechnate와 같은 4가음이온을 이용하는 방법이 있음. Tc-99m pertechnate는 방사성요오드와 흡사한 섭취를 보여서 NIS의 발현을 간접적으로 영상화 할수 있음.
- 방사성요오드나 Tc-99m pertechnate 를 이용한 감마영상이나 SPECT는 전용 소동물용 스캐너를 이용하여 촬영함 (그림 11). 동물처치는 PET촬영과 동일하게 함.



그림 11. 소동물용 감마카메라/ SPECT

C) 재분화유도치료와 분자영상을 이용한 평가

1) 재분화유도 단일치료와 분자영상

가) 갑상선암 세포주에서 재분화유도제(Pioglitazone)에 의한 세포독성 평가

- 선별한 갑상선암 세포 주에서 PPAR gamma agonist(Pioglitazone)에 의한 세포독성을 평가하기 위해, 각 각의 세포 주에 0.1, 1, 10, 20, 100uM Pioglitazone을 처리한 후, 48h에 Cell counting kit(CCK-8)를 이용하여 알아봄.
- 미분화암 DRO90, 여포암 FTC133 모두 Pioglitazone의 농도에 따라 세포수가 감소되어짐을 확인함 (그림12).

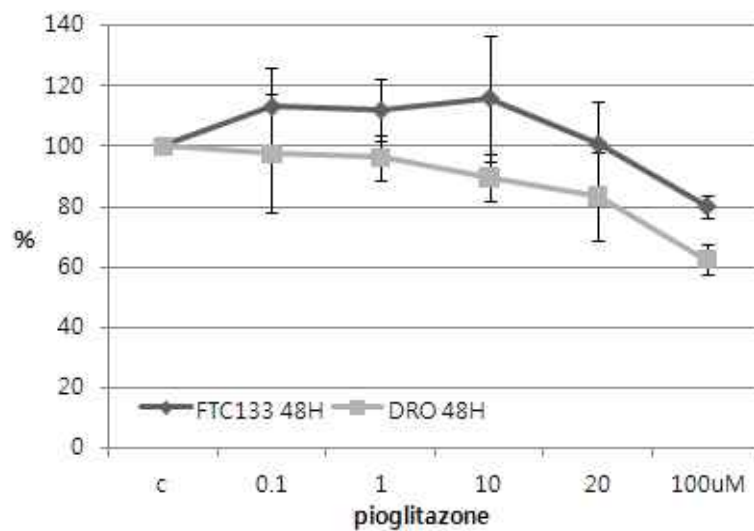


그림 12. 재분화유도제에 의한 세포사멸 (CCK-8 assay)

나) 갑상선암 세포주에서 재분화유도제(Pioglitazone)에 의한 FDG 섭취 정도 비교

- 갑상선암 세포 주에서 PPAR gamma agonist (Pioglitazone)에 의한 FDG 섭취정도를 알아 보기 위해, 각 각의 세포 주에 0.1, 1, 10uM Pioglitazone을 처리한 후, 1h, 48h에 FDG 섭취를 평가함.
- 미분화암 DRO에서는 농도와 시간에 따라 FDG 섭취가 감소되어지나, 여포암 FTC에서는 차이가 보이지 않았음 (그림 13).

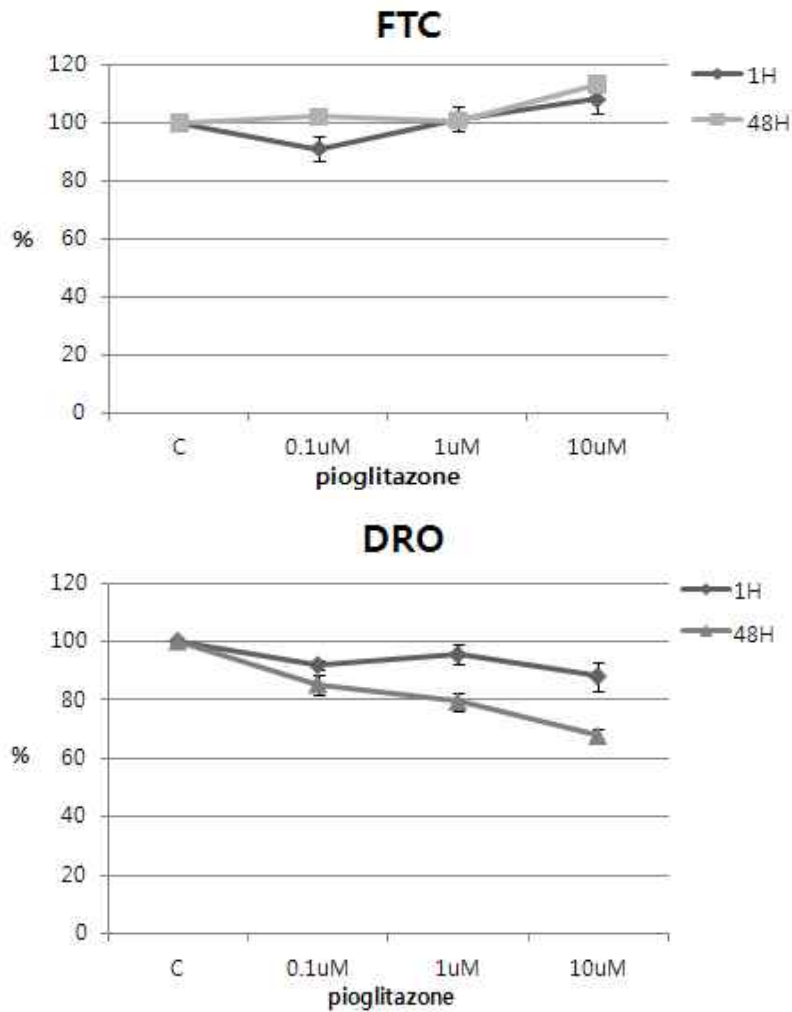


그림 13. 재분화유도제에 의한 FDG 섭취정도 a. FTC 세포주, b. DRO 세포주 (FDG uptake test)

다) 갑상선암 세포주에서 재분화유도제에 의한 재분화 평가 (NIS 발현)

- 갑상선암 세포 주에서 PPAR gamma agonist(Pioglitazone)에 의한 재분화 정도를 평가하기 위해 재분화 지표인 Sodium Iodide symporter(NIS)의 발현 양을 RNA와 단백질 수준에서 확인함.
- 각 각의 세포 주에 10uM pioglitazone을 24, 48, 72시간 처리하고 RT-PCR (그림 14) 과 Tc99m을 이용한 uptake test (그림 15) 를 시행함.
- FTC, DRO 모두 Pioglitazone처리 24시간 후, RNA양이 증가하였다가 48, 72시간에 감소되어지며, 단백질양은 48시간에 소량 증가되어짐이 보였음.

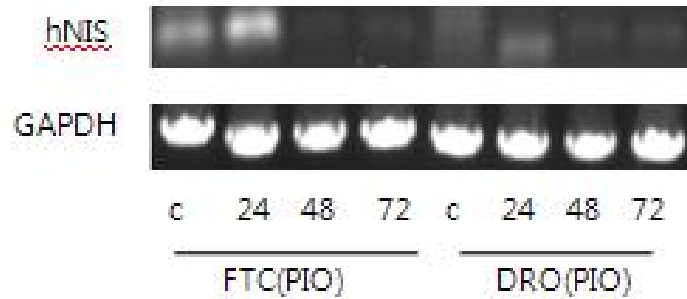


그림 14. 재분화유도제에 의한 NIS mRNA발현 (RT-PCR)

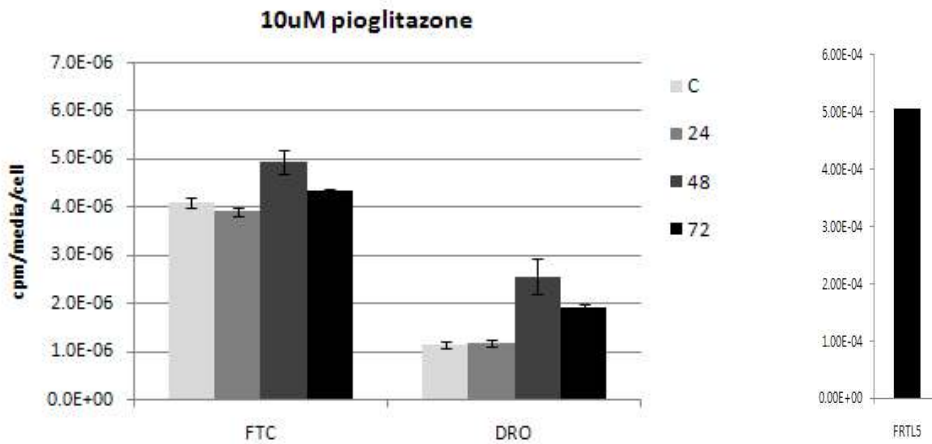
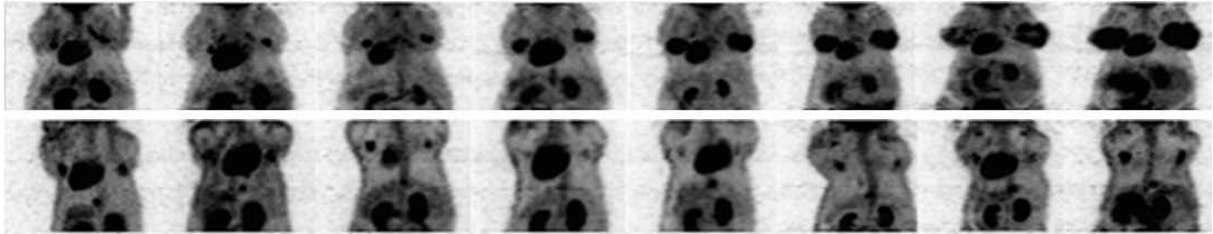


그림 15. 재분화유도제에 의한 NIS 단백질 발현 (Tc99m uptake test)

라) FDG PET-CT을 이용하여 재분화유도제(pioglitazoen)에 의한 치료효과 영상화

- 갑상선동물 치료모델에서 재분화유도제(Pioglitazone)에 의한 치료효과를 영상화하기 위해 FDG를 이용하여 PET-CT 촬영함. 치료모델은 재분화유도제의 치료시기에 따라 advanced, early stage model로 나누어 시행함.
- 재분화유도 치료에 따라 종양의 성장 억제와 FDG의 감소가 확인되어짐 (그림16).
- 치료모델의 종양은 실험대조군에서 보다 10일 이전에 크기의 차이가 나기 시작하며 그 성장의 억제정도가 advanced 모델보다 early stage에서 좀 더 차이가 남을 확인함 (그림17, 18).
- FDG의 감소는 SUV mean 값에서는 크게 차이가 나지 않으나 TRAF (종양크기에 따른 SUV mean 값)에 따라 유의한 결과가 보여짐. 여포암(FTC133)은 early stage model로 실험을 진행하였음.

a



b.

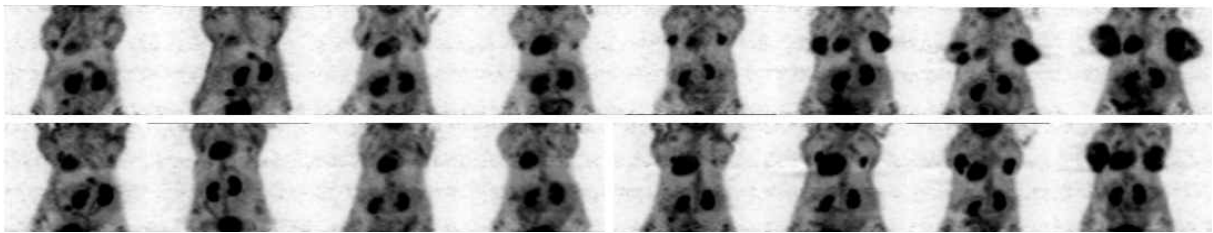


그림 16. 갑상선암동물모델에서 FDG-PET a. DRO90 종양모델 b. FTC133종양모델 (위; 대조군 아래; 재분화유도제(Pioglitazone) 처리군)

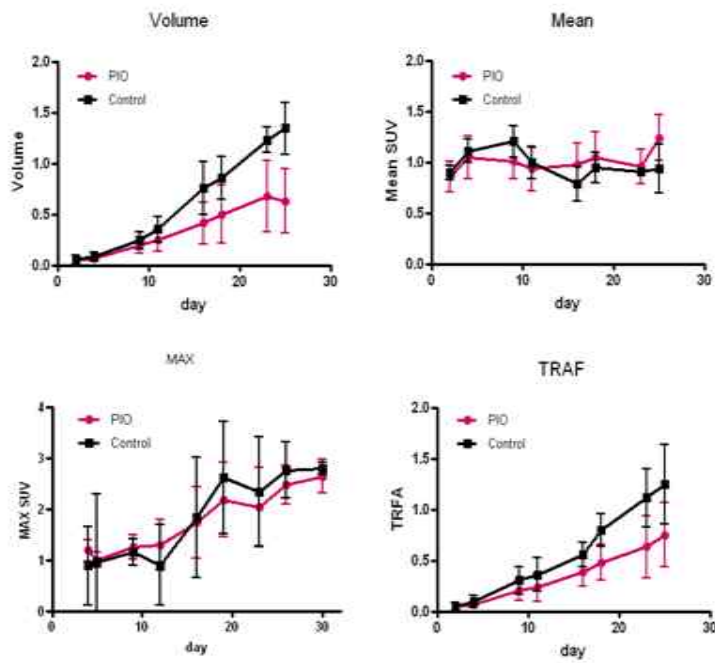


그림17. advanced DRO 종양모델에서 재분화 유도제 (pioglitazone)치료 후, FDG PET 분자영상

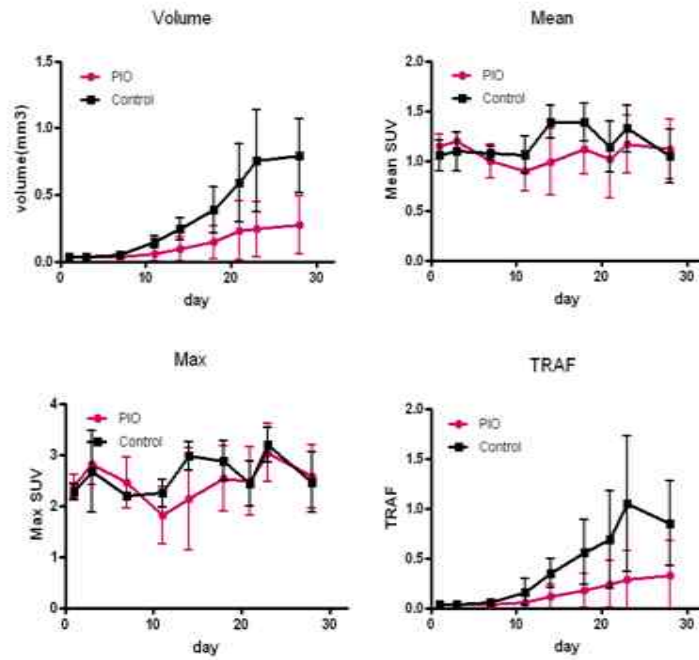


그림18. early DRO 종양모델에서 재분화 유도제 (pioglitazone)치료 후, FDG PET 분자영상

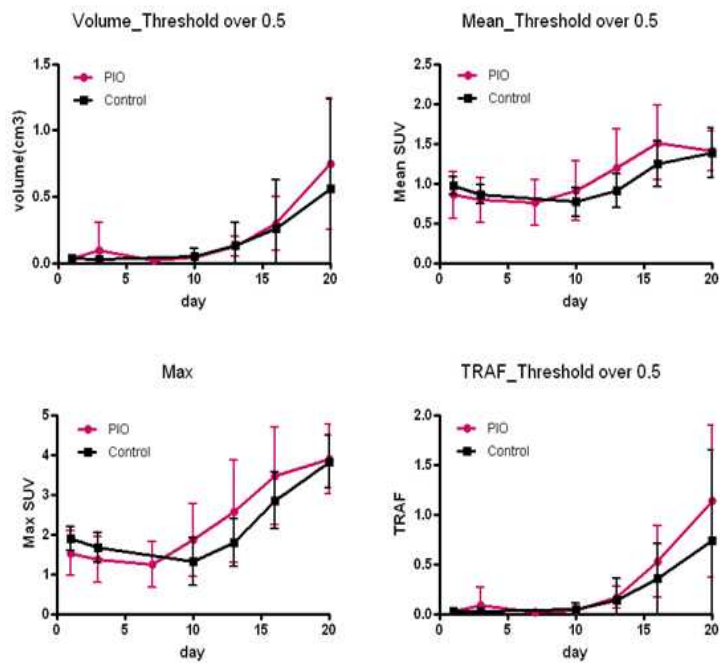
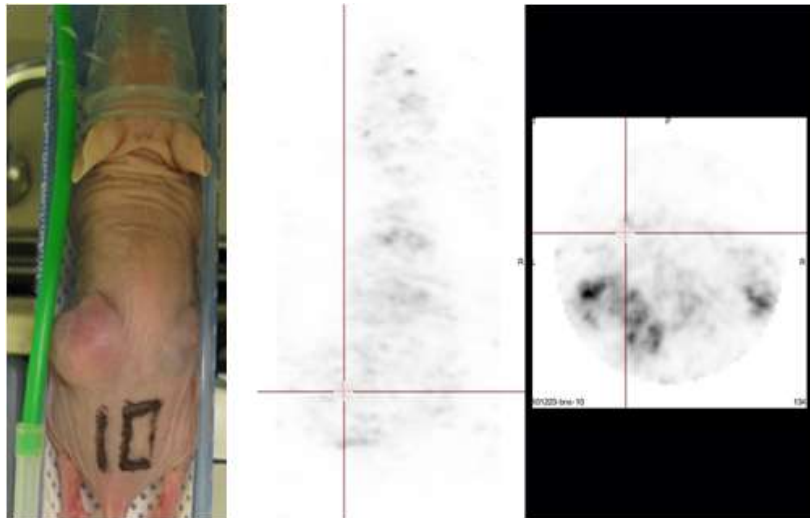


그림19 FTC 동물모델에서 재분화 유도제 (pioglitazone)치료 후, FDG PET 분자영상

마) 갑상선 절제 동물모델에서 재분화유도제(pioglitazone)에 의한 재분화효과 분석

- 방법; 갑상선 절제를 수행한 동물모델에 배양한 갑상선암 세포주(우;DRO, 좌;FTC133) 2백만 개를 양 엉덩이에 접종 하여 중앙모델을 만들고 접종 7일 후, 25mg/kg 재분화유도제(pioglitazone)를 2주 동안 섭취시켜 재분화지표인 NIS에 의한 Tc99m의 섭취정도를 SPECT를 이용해 영상화함. 대조군에서는 DMSO를 섭취시킴.
- 실험결과 갑상선 재분화치료 모델에서 뚜렷한 Tc99m의 섭취가 보이지 않았음. FTC133의 대조군에서 중앙 부피와 meanSUV값은 1790.9mm^3 , 0.0103683 , 재분화유도 처리군에서는 1736.7mm^3 , 0.0157314 이며 DRO90의 대조군에서 중앙 부피와 meanSUV값은 705.1mm^3 , 0.0103201 , 재분화유도 처리군에서는 1362.2mm^3 , 0.0115601 이었음.

A.



B.

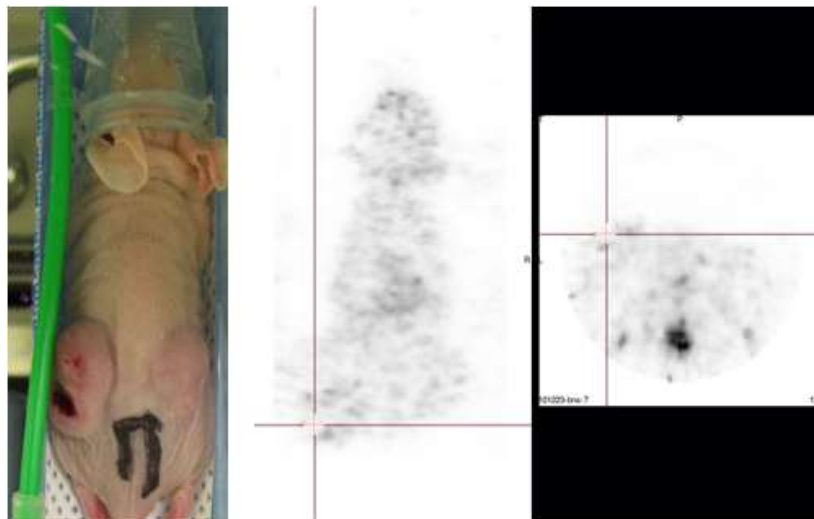


그림20. 갑상선암모델에서 SPECT 이미지. 좌; FTC133 우;DRO90
A control(DMSO)처리군 B. 재분화유도제(Pioglitazone)처리 군,

2) 재분화유도제와 I-131 병합치료와 분자영상

- 실험방법; 갑상선 절제를 수행한 동물모델에 배양한 갑상선암 세포주(DRO, FTC133) 2백만 개를 양어깨에 접종 하여 종양모델을 만들고 접종 7일 후, 25mg/kg 재분화유도제(pioglitazone)를 2주 동안 섭취시킴. 이후 1.5mCi I131을 주입하고 일주일후 Tc99m 1mCi를 피하주사 1시간 후, SPECT를 이용해 영상화함.
- 뚜렷한 치료효과를 관찰되지는 않음.

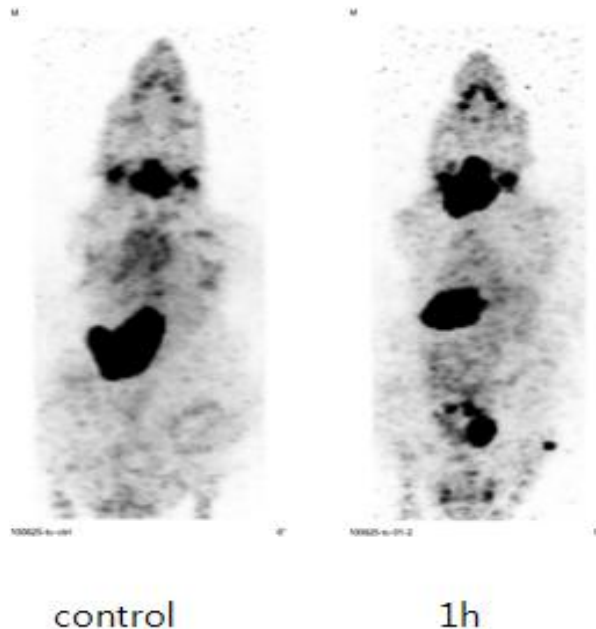


그림 21. 갑상선암 치료모델에서 SPECT 영상.

3) 재분화유도 치료와 기전이해를 위한 병리적 분석

- 갑상선암 동물모델에서 PET-CT와 SPECT를 통해 영상으로 확인한 재분화유도제(Pioglitazoen)에 의한 치료 효과를 재분화 지표인 NIS(Sodium iodide symporter)와 FDG운송에 관여하는 Glut-1의 조직 면역학 염색을 통해서 비교하였음.
- Glut-1 염색결과는 DRO 종양과 FTC의 결과가 달라, DRO 종양은 재분화유도제 처리 군에서 대조군에 비해 Glut-1 염색이 더 많이 되었음. 하지만 FTC 종양은 차이가 없었다.
- NIS의 발현정도는 DRO 종양과 FTC 종양모두에서 차이가 없었다.

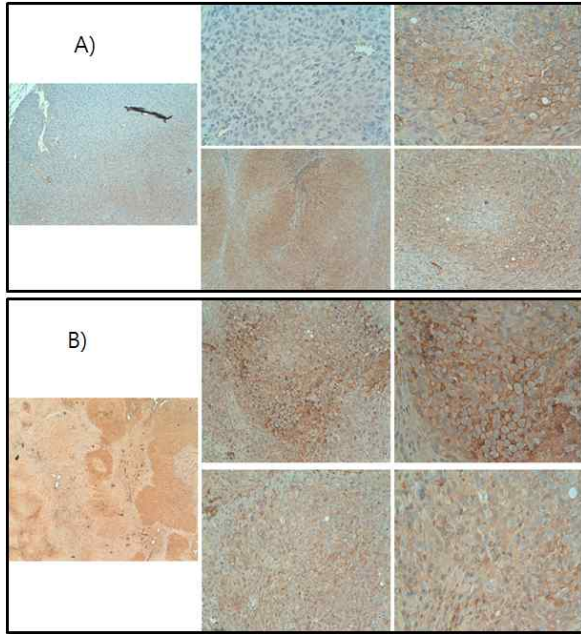


그림 22. DRO90 조직에서 GLUT1 조직염색. A. control(DMSO)처리군 B. 재분화유도제 (Pioglitazone) 처리군

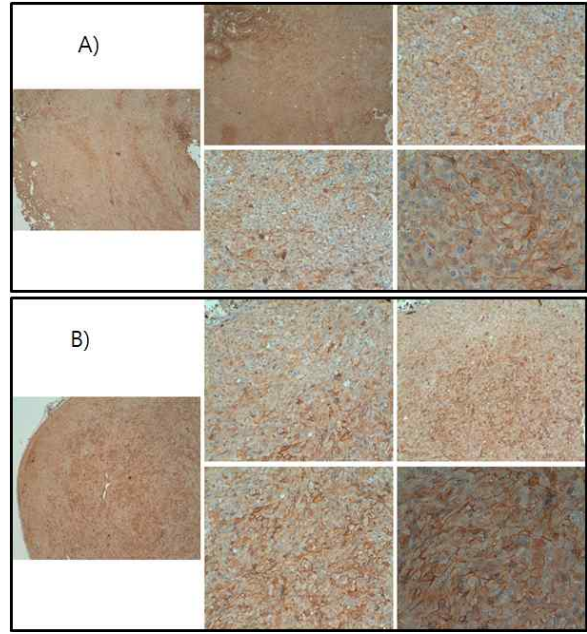


그림 23. FTC133 조직에서 GLUT1 조직염색. A control (DMSO) 처리군 B. 재분화유도제 (Pioglitazone) 처리군

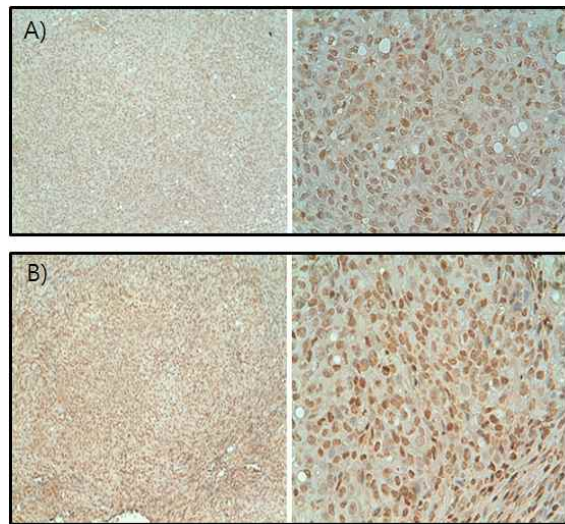


그림 24. DRO90 조직에서 NIS(Sodium iodide symporter) 조직염색. A control(DMSO)처리군 B. 재분화유도제 (Pioglitazone) 처리군

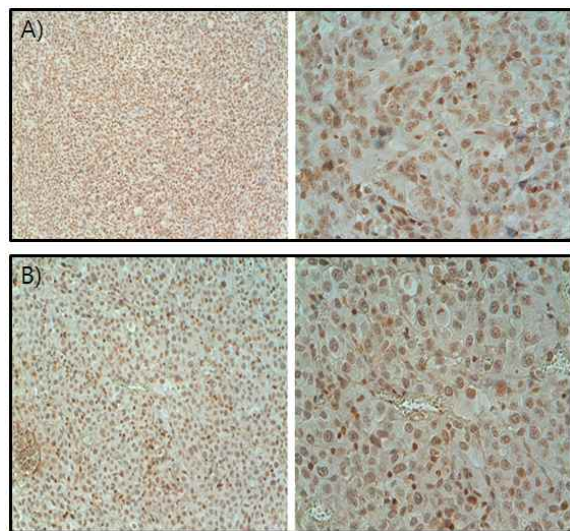


그림 25. FTC133조직에서 NIS(Sodium iodide symporter) 조직염색. A. control (DMSO)처리 군 B. 재분화유도제 (Pioglitazone)처리 군

3. 연구결과 고찰 및 결론

< 현황, 전망, 기술동향 >

갑상선암의 예후의 특성과 예후예측의 필요성

- 갑상선암은 비교적 치료가 잘되는 것으로 알려져 있으나 매우 높은 유병율과 발병율에 불구하고 예후가 불량한 일부 환자군을 정확히 예측하지 못함. 이로 인하여 대부분이 예후가 좋은 환자임에도 거의 모든 갑상선암에서 거의 같은 진단과 치료가 시행된다. 또한 높은 유병율과 발생율로 인하여 갑상선암의 진단과 치료에 많은 의료자원이 사용되어 사회의료적 문제가 되고 있다.
- 많은 환자가 예후가 좋아 집중적인 치료가 필요하지 않을 가능성이 있으나 일부 환자에서는 예후가 매우 불량하며 불행히 이러한 일부 예후 불량군을 현재까지는 정확히 구별해 내지 못하고 있다. 또한 이들 예후 불량군은 기존의 치료법이 효과가 없어 새로운 방법이 요구되고 있다.

분자영상을 이용한 예후 예측

- 현재 분자생물학적으로 연구된 예후인자와 면역조직염색으로 예후가 불량한 환자를 예측하는 연구는 널리 진행 중임. 조직에서 확인해야만 하는 이러한 예후인자는 생체내의 분자적 기전을 직간접적으로 영상화하는 분자영상을 이용하여 비침습적으로 예측가능할 것으로 생각됨.
- 최근 질병의 분자생물학적 기전에 대한 연구를 바탕으로 분자영상을 이용한 진단, 치료효과판정, 분자표적치료 등이 여러 질환에서 활발하게 연구되고 있고 일부 임상에 적용되고 있음. 갑상선암에서도 임상적으로 널리 쓰이는 분자영상인 FDG PET를 재발성 갑상선암 등 제한된 경우부터 사용하기 시작하여 그 쓰임이 넓어지고 있음. FDG PET는 갑상선암절제술 후 추적진료에서나 저에코음영/저기능 갑상선결절에서 갑상선암 수술전에 많이 시행된다. 초기의 연구에서 anaplastic thyroid cancer와 Hurthle cell carcinoma에서 FDG 섭취가 높은 것이 관찰되었고, 악성갑상선결절과 양성을 SUV 5를 기준으로 나눌 수 있음이 보고되기도 하였다. 또 다른 연구에서는 43명의 갑상선환자를 대상으로 한 연구에서는 모든 갑상선암과 oncocytic adenoma에서 FDG의 섭취가 증가되었다. FNAB와 수술전 FDG PET를 비교한 연구에서 FDG PET가 음성예측도가 높다고 보고하였다. 최근 follicular proliferation의 cytologic diagnosis를 가진 24명의 환자에서 FDG PET는 indeterminate cytology인 경우 follicular adenoma와 follicular carcinoma를 구별할 수 있다고 보고하였다.
- 유두상 갑상선암에서는 여러 가지 종양표지자가 보고되어 있다. 대표적으로 COX-2, MMP-2, VEGF-C, Bcl-2, Ki-67, p21 등이 보고되어 있다. Cox-2는 apoptosis를 억제하고 angiogenesis를 자극하며 종양의 침범과 전이 potential을 증가시킨다. VEGF-C는 lymphangiogenesis를 자극하며 많은 종양에서 발현이 증가되어 있다. MMP-2는 종양의 침범과 전이를 증진시키는 단백질분해 효소이다. MMP-2의 발현은 유두상갑상선암에서 더 aggressive한 양상과 연관이 있다. BCL-2는 apoptosis를 억제하며 갑상선암에서는 BCL-2의 발현은 dedifferentiation과 관련이 있으며 undifferentiated cancer에서 발현이 낮아진다. p21은 cyclin-dependent kinase inhibitor로 suppressing cell proliferation이다. 갑상선암에서는 p21이 많이 발현되면 림프절전이와 나쁜 예후와 관련이 있다. 유두상갑상선암에서 재발을 반복하는 경우 점점 종양의 proliferation index가 증가하며 Ki-67이나 PCNA(proliferating cell nuclear antigen)이 증가한

- 다. 예후가 나빠지는 고연령에서 Ki-67은 증가한다. Galectin-3, Cytokeratin 19, p53, and Ki-67은 갑상선암의 감별진단을 위해 도움이 된다.
- 그 외 survivin과 hTert도 주요한 예후인자이다. Survivin은 세포고사(apoptosis)의 억제제로 작용하는 단백질로 세포분열에 역할을 한다. 대부분의 악성종양에서 강하게 발현 되며 일부 항암치료에 대한 저항성과 관련함이 알려져 있다. 갑상선암에서도 항암치료에 저항성을 보이는 악성도가 높은 경우 발현이 증가되어 있음. hTERT(human telomerase reverse transcriptase)는 악성종양에서 발현되는 것으로 알려져 있고 양성병변에서는 발현이 잘 나타나지 않는 것으로 알려져 있음. Survivin과 hTERT는 갑상선암중에서도 나쁜 예후의 갑상선암, 분화도가 떨어지는 갑상선암과 관련이 있음.
 - 갑상선암에서 FDG PET와 이러한 biologic marker와의 관계에 대한 연구는 부족하다. BRAF 등 oncogene등의 gene level에서의 변화와 FDG PET의 양상, 선형적관계에 대한 연구도 제대로 이루어지지 않았다. 특히 갑상선전체술전의 분자영상(FDG PET)과 예후인자와의 관계는 아직 불확실하며 국내에서 40명의 갑상선암에서 진행된 연구결과에서는 갑상선절제후 추적시의 결과와 달리 수술전 FDG PET에서 기존의 연구와 달리 섭취가 있는 등 추가적인 연구를 필요로 하고 있음.
 - 갑상선암의 예후를 비침습적으로 진단하는 방법은 환자를 진료하는 데도 도움이 되고 국가적으로 의료자원의 효율적 이용에도 도움이 됨.

예후불량 갑상선암의 치료 - 재분화유도 치료의 현황

- 분자영상등의 방법으로 예후가 불량한 갑상선암을 구별하더라도 현재 대부분의 갑상선암과 달리 분화가 나쁜 갑상선암은 현재 별다른 치료방법이 없다. 이러한 갑상선암은 임상적으로 처음부터 매우 공격적인 양상을 보이기도 하지만 많은 경우 처음에는 임상적으로 다른 예후가 좋은 갑상선암과 같지만 어느 순간 분화가 나빠지면서 공격적인 양상을 보인다. 이러한 차이를 보이는 근본적인 원인을 분자생물학적 기법을 이용하여 진단초기에 혹은 분화가 나빠지는 초기에 발견하고 치료하는 것이 유용하겠다.
- 예후가 나쁜 갑상선암을 치료하기 위한 방법의 하나로 재분화 유도치료를 이용할 수 있을 것으로 예상됨. rosiglitazone 혹은 pioglitazone 등은 과거 여러 종양에서 시행되던 레티노이드에 비해 갑상선암에서 치료효과가 좋은 것으로 기대됨. 하지만 이들 재분화유도치료제의 치료기전, 치료효과를 평가할 방법 등은 체계적으로 확립되어 있지 않음. 약제별로 세포주, 동물모델, 임상시험 순으로 체계적인 연구가 시행되지 못한 상태임.
- 연구가 미비하지만 유전자치료 등의 다른 대안에 비해 현실적으로 쉽게 임상사용이 가능한 방법으로 판단되고 이전의 레티노이드를 이용한 치료 등으로 가능성을 인정받았음.

갑상선암의 동물모델, 치료모델

- 분화가 나쁜 갑상선암의 동물모델을 이용하여 재분화유도 치료의 효과와 기전을 확인할 필요가 있음. 또한 여러 재분화유도 치료제 중 적절한 것을 선택하는 데도 동물모델이 필요하다.
- 동물모델에서 재분화유도 치료제를 투여하고 방사성요오드치료를 적용하는 모델을 작성하고 분자영상을 이용하여 재분화유도 치료의 효과예측, 모니터링 기법을 개발할 수 있음. 동물모델에서 재분화유도 치료의 효과를 확인한 기존의 연구는 부족하며 또한 분자영상을 적용한 연구

는 찾아보기 힘들다.

- 동물모델로 임상시험에서는 하기 힘든 다양한 분자영상기법, 예를 들어 FLT PET, 예후인자에 대한 분자영상등,을 널리 사용할 수 있다. 추후의 갑상선암의 기전연구나 치료제 연구, 전임상 실험등에 널리 쓰일 수 있음. 현재 활용중인 표적물질 뿐 만 아니라 갑상선암의 여러 후보예후 인자에 대해서 분자영상과의 관련성을 밝혀 낼 수 있는 실험적 기초기술로 활용이 가능함.

<연구결과 및 고찰, 결론>

갑상선암 동물모델의 작성

- 재분화유도치료에 적합한 갑상선세포주이면서 동물모델로 이용할 수 있는 세포주로 DRO90, FTC133세포주를 확인하였음. 이들 세포주에서 재분화유도치료에 의한 in vitro 세포독성을 확인하였음. 이는 이전의 보고와 일치하는 내용으로 동물모델등 in vivo 나아가 임상적으로 재분화유도치료를 적용할 만한 근거가 되는 것으로 판단하였음.
- 갑상선암세포들은 본 연구에서 재분화유도제로 이용하려는 PPAR-gamma agonist에 대한 수용체가 발현되어 있었고 실제로 PPAR-gamma에 의한 세포독성이 in vitro에서 10 umol을 전후하여 세포독성을 보임. 강한 세포독성을 보이는 것은 아니나 갑상선암세포주에 일관성있게 세포독성을 보임.
- 재분화유도치료를 포함하여 갑상선암의 치료효과를 보기위하여 기본적으로 갑상선암세포주를 이용하고 정상갑상선을 제거한 갑상선암 연구에 적합한 동물모델을 성공적으로 확립하였음. 특히 마우스에서 갑상선을 절제하는 기술을 획득하였고 분자영상을 이용하여 절제결과를 확인할 수 있었음.

재분화유도치료와 분자영상

- 예후인자 등 표적물질이나 생체내의 분자생물학적 정보를 살펴보기 위해서는 분자영상을 적용하는 것이 유리하다. 재분화유도 치료와 같이 갑상선암의 분자생물학적 특성의 변화를 유도하는 치료법을 개발하기 위해서는 분자생물학적 변화를 스크리닝하고 모니터링하는 방법이 필요하며 분자영상은 매우 적절한 방법이다. 생체내부를 영상화하는 영상 기술은 CT, MR, 초음파등 주로 해부학적 구조를 보여주는 방법과 생체내에서 일어난 대사과정등 기능적인 변화를 영상으로 보여주는 SPECT나 PET방법 등이 개발되어 있다. 최근 SPECT와 PET등은 앞서 기술한 분자영상학의 발전성과와 결합되어 병변에 해부학적 변화에 앞서 나타나는 분자생물학적 변화를 생물체가 살아있는 상태에서도 영상화할 수 있는 단계에 이르렀다. 따라서 종양의 특성을 변화시키는 재분화유도등의 치료법에 적합하다. 그 외 형광이나 발광을 이용한 광분자영상(optical imaging)의 방법도 동물영상단계에서는 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단됨.
- 재분화유도 치료의 대상인 고위험군을 선정하기 위한 방법, 재분화유도에 의한 치료대상 갑상선암의 변화-분화도의 변화등을 직간접적으로 모니터링하는 비침습적인 방법은 재분화유도 치료법이 적절한 치료법으로 확립되기 위해서는 반드시 필요한 것이다. 이러한 용도에는 분자영상적 기법인 FDG PET이 가장 적절할 것으로 판단됨. 또한 갑상선암이 다른 조직과 달리 특이적

- 요오드를 섭취하는 능력이 있어 방사성요오드 스캔도 적절한 분자영상임.
- 동물모델에서 재분화유도치료의 효과를 관찰하기에는 분자영상을 이용하는 것은 매우 유용하고 편리함. 비침습적이어서 반복적인 평가가 가능한 점은 매우 유용한 특성임.
 - 본 연구에서는, 현재 난치성 갑상선암의 치료방법으로 부상하고 있는 재분화유도치료의 효과를 판정하는 데 분자영상의 소견을 확인하고자 하였음. *in vitro* 실험을 통하여 재분화유도치료 전 후에 FDG 섭취의 변화를 살펴 보았음. 재분화유도치료를 통해 분화가 나쁜 DRO세포주는 세포사멸을 약하게 보이면서 FDG섭취도 용량에 의존적으로 감소함을 보여주었음. 하지만 분화가 좋은 FTC는 그러한 효과가 관찰되지 않았음.

재분화유도치료와 FDG PET/CT 분자영상

- FDG 섭취변화로 재분화유도치료효과의 판정

재분화유도치료가 분화가 나쁜 암인 DRO에서는 재분화유도치료의 효과를 관찰할 수 있다는 실험적 근거를 확인하였으나, 재분화유도치료의 세포분자적 변화로 거론되어온 NIS의 발현변화는 *in vitro*에서는 일부 관찰되었으나 동물모델에서는 뚜렷하지 않았음.

- DRO 세포주에서 FDG PET/CT를 이용한 재분화유도치료 효과의 영상화

분화가 나쁜 갑상선암 세포주 DRO의 종양은 FDG 섭취가 치료후에 대조군에 비해 감소하였음. FDG 섭취의 감소는 절대적이지 않고 종양의 성장속도와 FDG 섭취의 증가속도가 대조군에 비해 감소함. 또한 FDG의 섭취의 강도가 크게 감소하기 보다 종양의 크기가 느리게 증가하는 데 따른 현상으로 판단됨 (그림 16, 그림 17).

DRO 종양의 크기증가 속도감소는 이미 종양이 크게 자란 진행성종양모델보다는 종양이 작을 때부터 약제를 투여하는 조기종양모델에서 더욱 뚜렷하였다 (그림 18).

DRO 종양이 FDG PET/CT로 재분화유도치료의 효과를 관찰할 수 있는 것은 병리결과에서 유도치료후 증가한 GLUT-1 발현과 관련이 있어 보인다. 다만 GLUT-1의 증가가 종양의 재분화정도와의 관련성은 알 수 없으나, 재분화유도치료의 결과로 보임.

- FTC 세포주에서 FDG PET/CT를 이용한 재분화유도치료 효과의 영상화

분화가 좋은 FTC 세포주는 *in vitro*결과와 같이, 종양모델에서는 진행성모델, 조기종양모델 모두에서 대조군과 종양성장속도가 차이가 없었음 (그림 19).

이러한 결과는 병리결과와도 합치하는 결과로 FTC는 재분화유도치료후에도 GLUT-1의 발현에 차이가 없었다.

- DRO, FTC 세포주의 결과로 볼 때 FDG PET이 세포주의 재분화유도치료에 대한 반응을 반영하는 것으로 판정할 수 있지만 이들 세포주들의 반응은 예상보다 매우 적음을 알수 있었음.

재분화유도치료와 NIS 표적 분자영상

- 재분화치료에 따른 NIS 발현 등 재분화 효과 분석

NIS는 *in vitro* 실험에서 pioglitazone처리후 약하게 상승하였으나 그 효과는 지속되지 않음. FTC, DRO 모두 pioglitazone처리후 24시간째 RNA level 증가하였으나 48시간이후 감소하였고 NIS단백질은 48시간에 소량 증가하였음.

- 중앙모델의 방사성요오드 스캔이나 Tc-99m pertechnate 스캔에서 DRO와 FTC는 매우 미약한 섭취를 보였음 (그림 20). 이러한 낮은 섭취는 재분화유도치료를 통해서도 변화하지 않았음.
- 방사성요오드치료를 병합한 경우에도 이러한 낮은 섭취는 개선되지 않음 (그림 21).
- 동물모델의 중앙을 적출하여 치료전후 FDG섭취와 관련된 GLUT-1과 요오드섭취와 관련된 NIS의 발현을 면역화학염색을 통해 관찰하였음. 치료전후에 유의한 차이점은 발견하지 못하였음. 이전의 연구의 결과와 잘 일치하는 결과는 아님.

결론적으로 본연구를 통하여 갑상선암 세포주를 이용하여 재분화유도치료를 개발 및 연구에 필요한 여러 가지 동물모델을 확립하였음. 재분화유도치료를 효과는 FDG PET과 같은 분자영상으로 관찰할 수 있었다. 이 효과는 기대와 달리 재분화의 지표중 하나인 NIS발현에 의한 결과는 아니었음. 또한 재분화유도치료를 효과는 분화가 나쁜 갑상선암에서만 관찰되었음.

다만 몇 가지의 제한점이 이 연구의 수행중에 확인되었는데, 예상과는 달리 재분화유도치료는 모든 갑상선암에서 일관적으로 효과적이지는 않았음. 분화가 된 여포성 갑상선암인 FTC에서는 치료가 없었다. 재분화유도치료 자체의 효과가 이전의 연구결과와 달리 갑상선암에서 높지 않음을 확인하였음.

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⁾
Total Thyroidectomy and the Application to Non-thyroidal Tumor Implantation Model using the Human Sodium/Iodide Symporter Gene	Hye-kyung Shim, M.D., Seog gyun Kim, M.D., Tae-Sung Kim, M.D., Seok-ki Kim, M.D.	Nuclear Medicine and Molecular Imaging	2012	국내	0910031-2

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 ¹⁾	지원과제번호
In vivo monitoring of PPAR-gamma agonist treatment in the anaplastic thyroid cancer model using an animal PET-CT	백남석	분자영상학회	국내	0910031-2
Total thyroidectomy and establishment of thyroid cancer model in the mouse	김석기	international thyroid congress	국외	0910031-2

다. 산업재산권

구분 ¹⁾	특허명	출원인	출원국	출원번호
발명특허	종양 및 감시림프절에 특이적인 [Tc-99m] Tc 표지된 엽산 결합 인혈청 알부민	김석기, 강세훈, 백남석, 김영상, 김서일	대한민국	제 10-2010-0055655
발명특허	형광 센싱 프루브 및 이를 이용한 형광 검출 방법	김석기, 이병일	대한민국	제 10-2010-0124466

라. 저 서

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

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
분자영상과 결합된 갑상선암의 재분화유도 치료법을 개발한다.	1차년도	분화가 나쁜 갑상선암 세포주를 이용하여 동물모델을 만든다.	여러세포주를 이용하여 동물모델을 작성하였음.	2009	100%
		갑상선옥소치료를 위한 치료모델을 만든다.	방사성요오드를 이용한 기능적 갑상선절제술을 시행하여 요오드치료를 시행할 수 있는 치료모델을 작성함.		
		갑상선암 동물모델에서 분자영상을 시행한다.	방사성요오드를 이용한 분자영상을 시행함. 소동물PET를 이용한 분자영상을 시행함.		
	2차년도	갑상선암 동물모델에서 재분화유도 치료 시행	여러세포주를 이용하여 재분화유도 치료 동물모델 작성함.	2010	100%
		갑상선옥소치료를 위한 치료모델을 만든다.	갑상선절제술을 시행하여 요오드 치료를 시행할 수 있는 치료모델을 작성함.		
		재분화유도 치료효과를 분자영상으로 확인	소동물PET과 SPECT를 이용한 분자영상을 시행함.		
		재분화유도 치료의 분자적 기전을 분자영상을 통하여 확인	Tc99m을 이용하여 SPECT로 확인함.		

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

구분	평가의 착안점 및 척도	자체평가
1차년도 (2009)	갑상선암세포주를 이용한 동물모델을 만들었나?	미분화암(DRO, FRO) 여포암(FTC)에서 작성함.
	동물모델에서 재분화유도 치료를 시행하였나?	재분화유도제(Pioglitazone)을 이용하여 시행함
	분자영상을 시행하였나?	소동물 PET과 SPECT를 이용한 분자영상을 시행함.
	동물모델에서 재분화유도 치료의 효과를 분자영상으로 확인하였나?	동물용 SPECT, 동물용 PET을 이용하여 확인함 (I-131, Tc-99m, FDG)
	재분화유도 치료의 분자적 기전을 분자영상을 통하여 확인하였나?	I-131와 Tc99m을 이용한 SPECT로 확인함.
	예후와 관련된 분자영상의 결과를 적용하여 재분화유도 치료를 분석하였는가?	
2차년도 (2010)	갑상선암 재분화유도치료를 갑상선암 동물모델에 적용하고 효과를 분석하였나?	적용하였고 분석하였음.
	재분화유도치료 전후 분자영상을 시행하였나?	FDG PET, Tc-99m SPECT를 이용하여 시행함.

	치료전후 분자생물학적 변화의 기전을 동물모델에서 분석하였나?	시도하였음.
	예후와 관련된 분자영상의 결과를 적용하여 재분화 유도치료를 분석하였는가?	분석하였음.

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	1	FDG PET/CT after Pioglitazone treatment (국외논문 1편).
산업재산권 등록	2	중양 및 감시립프절에 특이적인 [Tc-99m] Tc 표지된 엽산 결합 인혈청 알부민(FSA)
		형광 센싱 프루브 및 이를 이용한 형광 검출 방법
기 타	2	대한분자영상학회 포스터 2010 International Thyroid Congress 2010 포스터

(2) 연구성과의 활용계획

- 재분화치료법이 효과적인 경우 환자를 대상으로 하는 연구로 확대할 수 있음.
- 연구된 분자영상을 이용하여 환자에서 재분화치료법을 시행할 수 있음.

6. 참고문헌

1. Peter Lind, MD, and Susanne Kohlfürst, MD. Respective Roles of Thyroglobulin, Radioiodine Imaging, and Positron Emission Tomography in the Assessment of Thyroid Cancer. *Semin Nuci Med.* 2006 Jul;36(3):194-205
2. Rubello D, Pelizzo MR, Casara D, Piotto A, Toniato A, Fig L, Gross M. Techniques. Radio-guided Surgery for Non-131I-avid Thyroid Cancer. *THYROID.* 2006 Nov;16(11):1105-11.
3. Hall NC, Kloos RT. PET imaging in differentiated thyroid cancer: where does it fit and how do we use it?. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007 Jul;51(5):793-805.
4. Rubello D, Salvatori M, Ardito G, Mariani G, Al-Nahhas A, Gross MD, Muzzio PC, Pelizzo MR. Iodine-131 radio-guided surgery in differentiated thyroid cancer: outcome on 31 patients and review of the literature. *Biomed Pharmacother.* 2007 Sep;61(8):477-81.
5. Rubello D, Salvatori M, Casara D, Piotto, Toniato A, Gross MD, Al-Nahhas A, Muzzio PC, Pelizzo MR. A99mTc-sestamibi radio-guided surgery of loco-regional 131Iodine-negative recurrent thyroid cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2007 Sep;33(7):902-6
6. Rubello D, Salvatori M, Pelizzo MR, Rampin L, Fanti S, Gregianin M, Mariani G. Radio-guided surgery of differentiated thyroid cancer using (131)I or 99mTc-Sestamibi. *Nucl Med Commun.*2006 Jan;27(1):1-4
7. Hung-Jen Hsieh, Sheng-Hsiang Lin, Ko-Han Lin, Chien-Ying Lee, Cheng-Pei Chang, Shyh-Jen Wang The feasibility of 11C-methionine-PET in diagnosis of solitary lung nodules/masses when compared with 18F-FDG-PET. *Ann Nucl Med* (2008) 22:533-538
8. Richard T. Kloos, Approach to the Patient with a Positive Serum Thyroglobulin and a Negative Radioiodine Scan after Initial Therapy for Differentiated Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab,* May 2008, 93(5):1519-1525
9. Phan HT, Jager PL, Plukker JT, Wolffenbittel BH, Dierckx RA, Links TP. Comparison of 11C-methionine PET and 18F-fluorodeoxyglucose PET in differentiated thyroid cancer. *Nucl Med Commun.*2008 Aug;29(8):711-6.
10. Johnson NA, Tubin ME, Postoperative surveillance of differentiated thyroid carcinoma: rationale, techniques, and controversies. *Radiology.* 2008 Nov;249(2):429-44.
11. P. G. H. M. Raijmakers, M. A. Paul, P. Lips, Sentinel Node Detection in Patients with Thyroid Carcinoma: A Meta-analysis. *World J Surg* 2008 Sep;32(9):1961-1967
12. Kim MJ, Kim EK, Kim BM, Kwak JY, Lee EJ, Park CS, Cheong WY, Nam KH. Thyroglobulin measurement in fine-needle aspirate washouts: the criteria for neck node dissection for patients with thyroid cancer. *Clinical Endocrinology* 2009 Jan;70(1):145-151

7. 첨부서류

Ⅲ. 제 2 세부과제

세부과제명 : 갑상선 유두암에서 Proteomics기법을 이용한 새로운 예
후인자의 발굴

세부과제책임자(성명/소속) : 정기욱/갑상선암센터

목 차

< 요약 문 >

(한글) 갑상선 유두암에서 Proteomics기법을 이용한 새로운 예후인자의 발굴

(영문) Establishment of new prognostic factor of papillary thyroid carcinoma using proteomics approach

<u>1. 연구의 최종목표</u>	-----	66
<u>2. 연구의 내용 및 결과</u>	-----	66
<u>3. 연구결과 고찰 및 결론</u>	-----	74
<u>4. 연구성과 및 목표달성도</u>	-----	76
<u>5. 연구결과의 활용계획</u>	-----	78
<u>6. 참고문헌</u>	-----	79
<u>7. 첨부서류</u>	-----	79

<요약문>

연구분야(코드)	I-1	과제번호	0910032-2
과제명	갑상선 유두암에서 Proteomics기법을 이용한 새로운 예후인자의 발굴		
연구기간/연구비 (천원)	합계	2009년 1월 1일 ~ 2010년 12월 31일	95,000
	1차년도	2009년 1월 1일 ~ 2009년 12월 31일	50,000
	2차년도	2010년 1월 1일 ~ 2010년 12월 31일	45,000
과제책임자	성명	정기욱	주민등록번호
	전화번호	031-920-1639	전자우편
색인단어	국문	갑상선 유두암, BRAF 돌연변이, 프로테오믹스, 예후인자	
	영문	papillary thyroid carcinoma, BRAF mutation, proteomics, prognostic factor	

◆ 연구목표

<최종목표>

- 갑상선 유두암에서 MAPK 신호전달관련 단백질들의 발현을 proteomics기법을 사용하여 검색하고 갑상선 유두암의 임상적 예후인자와의 연관성을 분석, 새로운 분자적 예후 표지자를 발굴함. 발굴된 단백질의 세포내 작용기전을 밝혀 임상적인 이용가능성을 탐색함

<2009년도 목표>

- 갑상선 유두암조직에서 BRAF 돌연변이 유무에 따른 MAPK 신호전달 관련 단백질들의 발현양상을 PROTEOMICS기법을 이용하여 분석하여 발현에 차이가 있는 단백질을 발굴하고 관련 단백질의 발현이 갑상선 유두암의 임상적 예후인자와의 연관이 있는지 분석하여 새로운 예후인자로서의 사용가능성을 탐색함.

<2010년도 목표>

- 갑상선암 세포주에서 BRAF돌연변이와 관련되어 나타나는 MAPK 신호 억제제 처리 후 나타나는 발현 단백질의 차이를 분석

◆ 연구내용 및 방법

A. 1차년도

1) 연구방법

- 11개의 신선동결된 갑상선 유두암 조직 수집
- 갑상선 유두암에서 BRAF 돌연변이 양성군 중 림프질 전이가 있는 군과 없는 군의 2군으로 나누어 단백질을 추출 후 2D gel electrophoresis와 MALDI-TOF를 이용하여 정성적으로 검색하고 동정
- 갑상선암 조직에서 Western blot과 면역조직화학염색을 통해 후보 단백질의 발현 유무를 validation 함
- 수집된 갑상선암에서의 알려진 임상병리학적 예후인자를 검색하여 단백질 발현양상의 차이와의 연관성을 분석함

2) 연구결과

- BRAF 돌연변이 양성군에서 HSP60의 발현 유무에 따라 림프질 전이여부에 차이가 남을 확인함. HSP60가 발현되어 있는 경우 림프질 전이가 적게 나타남.

B. 2차년도

1) 연구방법

- 갑상선암 세포주 선정: BRAF 돌연변이 양성인 SNU790, 돌연변이 음성인 XTC, TPC, 대조군으로 여포성 갑상선암 세포주 FTC133세포주 이용한다.
- 각 세포주에서 MAPK 신호억제제인 U0126과 sorafenib을 dose와 처치 시간을 달리하여 투여 후 형태학적 변화와 proliferation 변화 유무를 검색한다,
- 처치 후 각 단계에서 ERK와 pERK의 발현을 western blot으로 검색하여 검색하여 MAPK 신호가 차단 되었는지 확인함.
- 각각의 세포주에서 MAPK 신호 차단 전과 차단 후의 단백질 발현에 차이가 있는지를 PROTEOMICS기법을 이용해 검색함
- 갑상선 유두암 조직에서 발굴 단백질의 발현 유무를 검색 후 임상양상과 비교.

2) 연구결과

- BRAF 돌연변이 유무에 따라 단백질 발현양상에 차이가 나타남

BRAF mutation /Proteoms	Sensitivity(%)	Specificity(%)	PPV(%)	NPV(%)
Calreticulin	71.8	48.8	80.0	37.7
HSP60	73.3	73.9	88.0	51.5
SOD	51.5	73.9	73.9	51.5
Vimentin	70.6	34.8	61.5	44.4
Nucleophosmin	53.8	50.0	60.0	43.8

- MAPK inhibitor로 처리하였을 때 단백질의 발현양상 변화가 BRAF 돌연변이 유무에 따라 다르게 나타남

◆ 연구성과

-정량적 성과

구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)
SCI 논문 편수	0/2	0
IF 합		
기타 성과		

-정성적 성과

- BRAF 돌연변이 양성인 갑상선 유두암에서도 HSP60 단백질 발현 유무에 따라 림프질 전이 양상이 다름을 확인함.
- HSP60 단백질이 갑상선 유두암에서 종양억제 유전자로서 기능할 가능성 확인
- 장기 추적검사를 통하여 분자적 표지자로서의 가능성 확인 계획
- BRAF 돌연변이 유무에 따라 단백질의 발현이 다르게 나타남을 확인함
- BRAF 돌연변이 유무에 따라 단백질의 발현이 다르게 나타남을 확인함

◆ 참여연구원

(최종연도 참여인원)

성명	정기욱, 양전경,
주민등록번호	

Project Summary

Title of Project	Establishment of new prognostic factor of papillary thyroid carcinoma using proteomics approach
Key Words	papillary thyroid carcinoma, BRAF mutation, proteomics, prognostic factor
Project Leader	KI-WOOK CHUNG
Associated Company	NONE

Purpose : the purpose of this research was to identify proteins associated with MAPK signaling pathways using proteomics in papillary thyroid carcinomas. the other purpose was to find new molecular prognostic factors along with BRAF mutation

Method : 11 fresh frozen PTC tissue and 3 PTC and 1 FTC cell lines were studied. Using 2D gel electrophoresis and MALDI - TOF, protein expression was researched. Expression analysis was performed according to BRAF mutation status, LN metastasis, MAPK inhibitor treatment. Identified proteins validated with IHC and western blot. Clinico-pathological characteristics are compared according to identified protein expression.

Results : Protein expression was different between PTCs with BRAF mutation and without it. Protein expression was changed after application of MAPK inhibitor. Protein change was different according to BRAF mutation status. HSP 60 expression was associated with less frequent LN metastasis in BRAF mutation (+) PTCs,

Conclusion : Protein expression status was different according to BRAF mutation status. HSP60 protein may serve as tumor inhibitor in BRAF (+) PTCs.

1. 연구의 최종목표

- 최종목표: 갑상선 유두암에서 BRAF mutation 등, MAPK 신호전달관련 단백질들의 발현을 proteomics 기법을 사용하여 검색하고 갑상선 유두암의 임상적 예후인자와의 연관성을 분석, 새로운 분자적 예후 표지자를 발굴함. 발굴된 단백질의 세포내 작용기전을 밝혀 임상적인 이용가능성을 탐색함
- 2009년도 목표: 갑상선 유두암조직에서 BRAF 돌연변이 유무에 따른 MAPK 신호전달 관련 단백질들의 발현양상을 PROTEOMICS기법을 이용하여 분석하여 발현에 차이가 있는 단백질을 발굴하고 관련 단백질의 발현이 갑상선 유두암의 임상적 예후인자와의 연관이 있는지 분석하여 새로운 예후인자로서의 사용가능성을 탐색함.
- 2010년도 목표: 갑상선암 세포주에서 BRAF돌연변이와 관련되어 나타나는 MAPK 신호 억제제 처리 후 나타나는 발현 단백질의 차이를 분석 갑상선 암 신호전달체계에 따르는 단백질의 발현 변화를 검색하고 기능을 탐색한다.

2. 연구의 내용 및 결과

1) 1차년도

- 연구방법

- A. 11개의 신선동결된 갑상선 유두암 조직 수집
- B. 수집한 갑상선 유두암조직에서 MAPK 신호 자극요소인 BRAF mutation을 DNA sequencing을 이용하여 검색함.
- C. 갑상선 유두암에서 BRAF 돌연변이 양성군과 음성군의 2군으로 나누어 단백질을 추출 후 2D gel electrophoresis를 이용하여 BRAF 돌연변이 유무에 따라 발현에 차이가 나는 단백질을 검색함.
- D. 갑상선 유두암에서 BRAF 돌연변이 양성군 중 림프절 전이가 있는 군과 없는 군의 2군으로 나누어 단백질을 추출 후 2D gel electrophoresis를 이용하여 BRAF 돌연변이 유무에 따라 발현에 차이가 나는 단백질을 검색함.
- E. 차이가 나는 단백질을 MALDI-TOF를 이용하여 정성적으로 검색하고 동정중임.
- F. 갑상선암 조직에서 Western blot과 면역조직화학염색을 통해 후보 단백질의 발현 유무를 validation
- G. 수집된 갑상선암에서의 알려진 임상병리학적 예후인자를 검색하여 BRAF 돌연변이 유무에 따르는 단백질 발현양상의 차이와의 연관성을 분석

- 연구결과

- A. BRAF 돌연변이 양성군에서 림프절 전이여부에 따른 단백질 발현양상의 차이

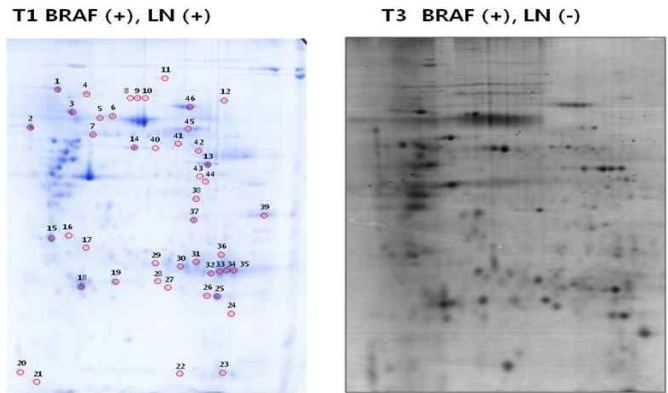


그림 1. 림프절전이 양성군에서 발현 증가한 단백질 (10개): Calreticulin, HSP60, gelsolin, tropomyosin alpha, Cathepsin B, PEBP1, SOD2, LAMININ A, Triosephosphate isomerase, LAP3, 림프절전이 음성군에서 발현이 감소한 단백질 (2개): Aconitate hydratase, vimentin

B. Western blot validation of protein expression

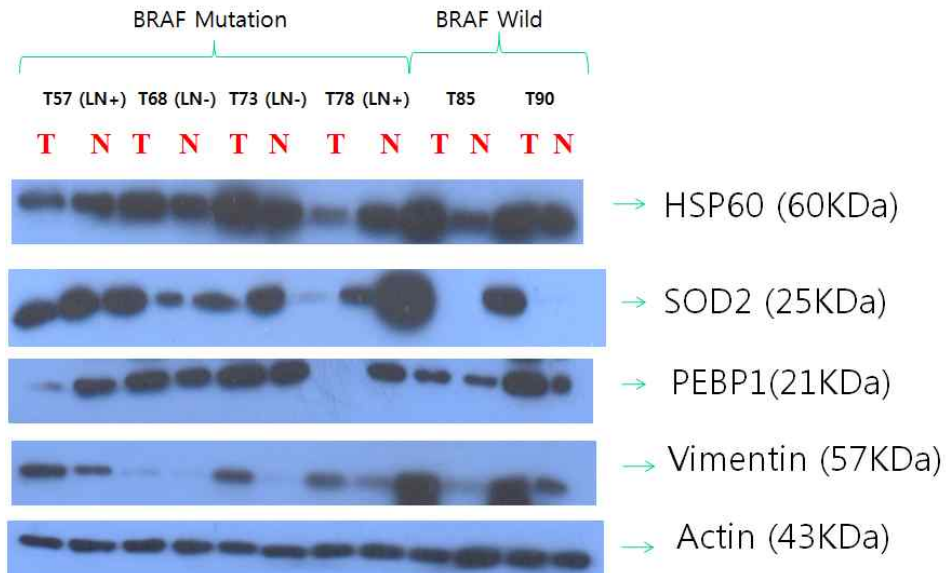


그림 2. HSP60, SOD2, PEBP1, and vimentin expression status were matched with 2D gel electrophoresis results.

C. IHC result in validation set.

LN metastasis	HSP60			SOD2		
	negative	positive	P-value	negative	positive	P-value
negative	3/19 (15.8%)	16/19 (84.2%)	0.003	5/19 (26.3%)	14/19 (73.7%)	0.248
positive	12/19 (63.2%)	7/19 (36.8%)		8/19 (42.1%)	11/19 (57.9%)	
Overall	15/38 (39.5%)	23/38 (60.5%)		13/38 (34.2%)	25/38 (65.8%)	
	PEBP1			VIMENTIN		
	negative	positive	P-value	negative	positive	P-value
negative	7/19 (36.8%)	12/19 (63.2%)	0.364	4/19 (66.7%)	15/19 (33.3%)	0.330
positive	5/19 (26.3%)	14/19 (73.7%)		2/19 (46.9%)	17/19 (53.1%)	
overall	12/38 (31.6%)	26/38 (68.4%)		6/38 (15.8%)	22/38 (84.2%)	

그림 3. HSP60 expression was associated with less frequent LN metastasis

D. IHC result of HSP expression in test set.

		LN negative	LN positive	P-value
overall	HSP 60	N,(%)	N,(%)	
	negative	5/21 (23.8)	16/21 (76.2)	
	positive	53/100 (53.0)	47/100 (47.0)	0.015
BRAF positive	HSP 60	N,(%)	N,(%)	
	negative	4/19 (21.1)	15/19 (78.9)	
	positive	46/79 (58.2)	33/79 (41.8)	0.003
BRAF negative	HSP 60	N,(%)	N,(%)	
	negative	1/2 (50.0)	1/2 (50.0)	
	positive	7/21 (33.3)	14/21 (66.7)	0.585

2) 2차년도

- 연구방법

A. Cell line culture

갑상선암 세포주인 SNU790, TPC1, XTC 및 FTC133의 4개 세포주를 이용

BRAF 변이에 따른 단백질 발현의 차이를 확인하기 위하여, BRAF mutation cell line인 SNU790을 실험군으로 선정하였고, BRAF wild type cell line인 TPC1과 XTC를 대조군으로 하였으며, Negative control cell line으로 FTC133을 선택함.

각 세포주를 10% fetal bovine serum, non-essential amino acid mixture, 1mM sodium pyruvate, 2mM L-glutamine이 포함된 RPMI 1640에서 배양.

B. MAPK pathway inhibitor and MTT assay

MAPK inhibitor: Sorafenib tosylate와 U0126 ethanolate을 이용

<MTT assay>

각각의 세포주를 현탁액으로 만들어 96 well plate에 1×10^3 개씩 넣고 각각의 시약을 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M의 농도로 처리한 후 3시간에서 72시간에 걸쳐 시간별로 세포변화를 관찰. 이 결과에 따라, U0126은 10 μ M의 농도로 24시간, Sorafenib은 10 μ M의 농도로 48시간 배양 조건이 약물에 의한 세포의 apoptosis를 유발하지 않으면서 세포 성장을 억제하는 것으로 확인.

C. Extraction and Precipitation of Proteins

각 세포주에 대하여 약물을 처리하지 않은 군, U0126을 처리한 후 24시간 배양한 군, Sorafenib 처리 후 48시간 배양한 군으로 나누어 각 세포주에 대해 단백질 분석을 시행

D. 2D gel Electrophoresis & MALDI-TOF

이차적 전기영동인 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 를 시행 후, 차이가 나는 단백질 spot 에 대하여 정량 분석을 시행함.

E. Western blot and Immunohistochemistry

동정된 단백질이 세포주와 실제 갑상선 유두암 조직에서 차이를 보이는 지를 확인하기 위하여 BRAF 변이 세포주인 SNU790과 BRAF 변이가 없는 유두암 세포주인 TPC1에 대한 Western blot을 시행하였고, 갑상선 유두암 조직에 대해서는 면역조직화학 염색을 시행함. 총 158개의 파라핀 블록이 사용되었음.

F. Statistical analysis

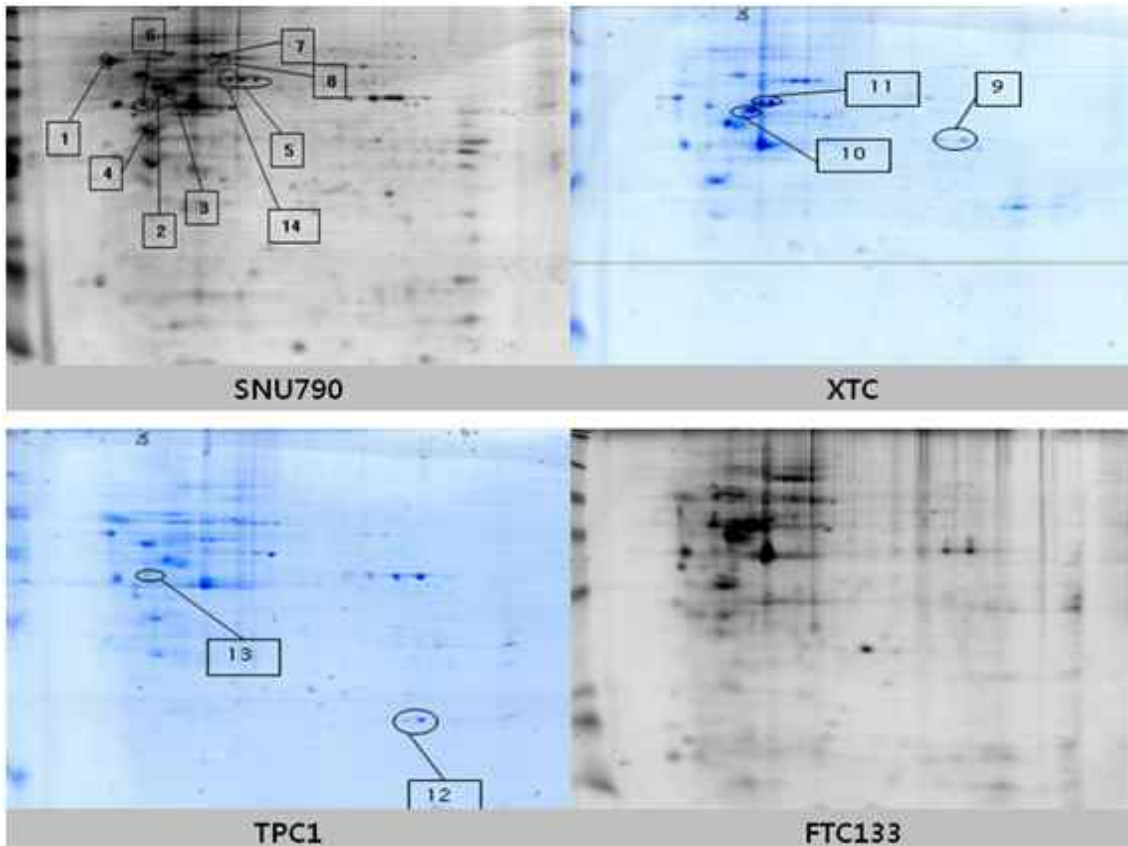
BRAF 변이 유무에 따라 각 단백질 발현에 차이가 있는지 확인하기 위하여 발현 양성 여부에 대해 chi-square test 및 Fisher's exact test를 시행하였으며, 모든 분석의 통계적 유의성 여부는 양측 유의수준 5%이하에서 판단하였음.

- 연구결과

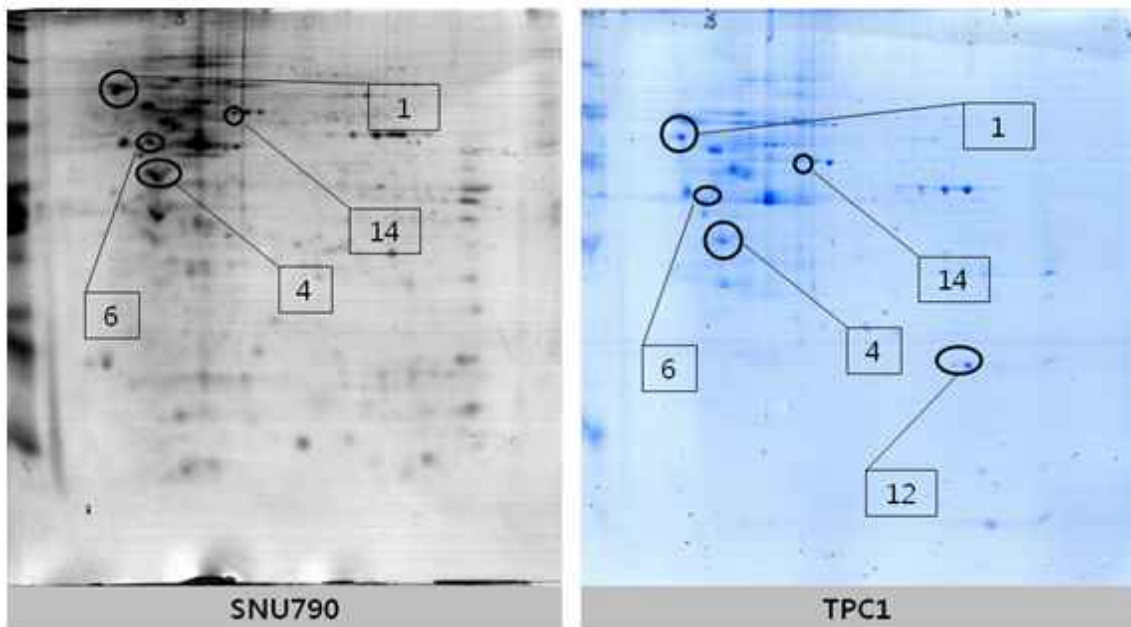
A. 동정된 단백질

Spot No.	Protein Name	SwissProt no.	Mascot score	Calculated pI	% coverage	Subcellular location
1,15	Calreticulin	P27797	110	4.29	10	ER lumen
2	Tubulin β	P07437	101	4.78	9	
3	ATP synthase β	P06576	57	5.26	16	Mitochondrion
4	Nucleophosmin	P06748	52	4.64	21	Nucleus
5	PDI A3	P30101	48	5.98	15	ER
6,10,13	Vimentin	P08670	111	5.06	33	
7	HSP 90- α	P07900	65	4.94	9	Cytoplasm
8	Calumenin	O43852	173	4.47	22	ER
9	α -enolase	P06733	169	7.01	68	Nucleus
11,14	HSP60	P10809	135	5.70	28	Mitochondrion
12	SOD	P04179	66	8.35	39	Mitochondrion

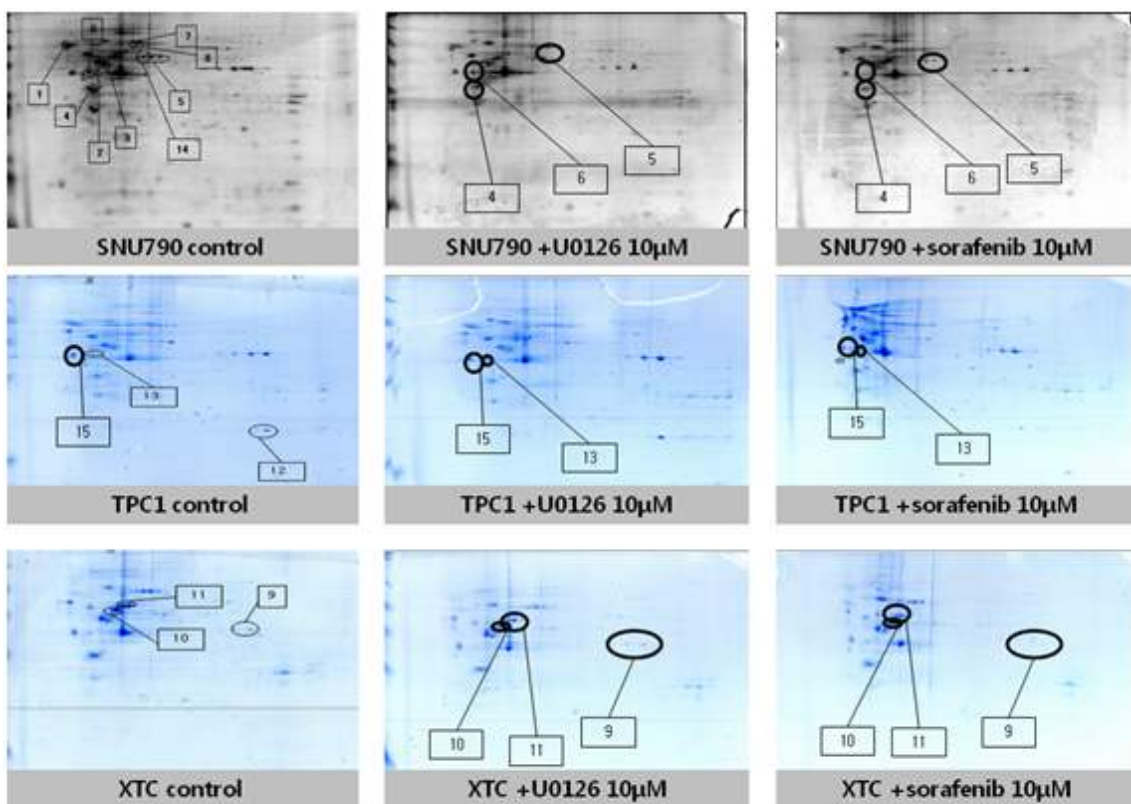
<2DE protein profiles of XTC, TPC1, SNU790 and FTC133 cell line>



<Different protein spots between SNU790 and TPC1 cell line>



<Different expression of proteins after treatment of U0126 and Sorafenib>



B. 파라핀 블록에 대한 면역화학염색 결과

		BRAF(W),N(%)	BRAF(M),N(%)	<i>p</i>
SOD	Negative	17(73.9)	16(48.5)	0.057
	Positive	6(26.1)	17(51.5)	
HSP60	Negative	17(73.9)	16(26.7)	<0.001
	Positive	6(26.1)	44(73.3)	
Calreticulin	Negative	20(48.8)	33(28.2)	0.021
	Positive	21(51.2)	84(71.8)	

<Western blot and Immunohistochemistry of SNU790 and TPC1 cell line >

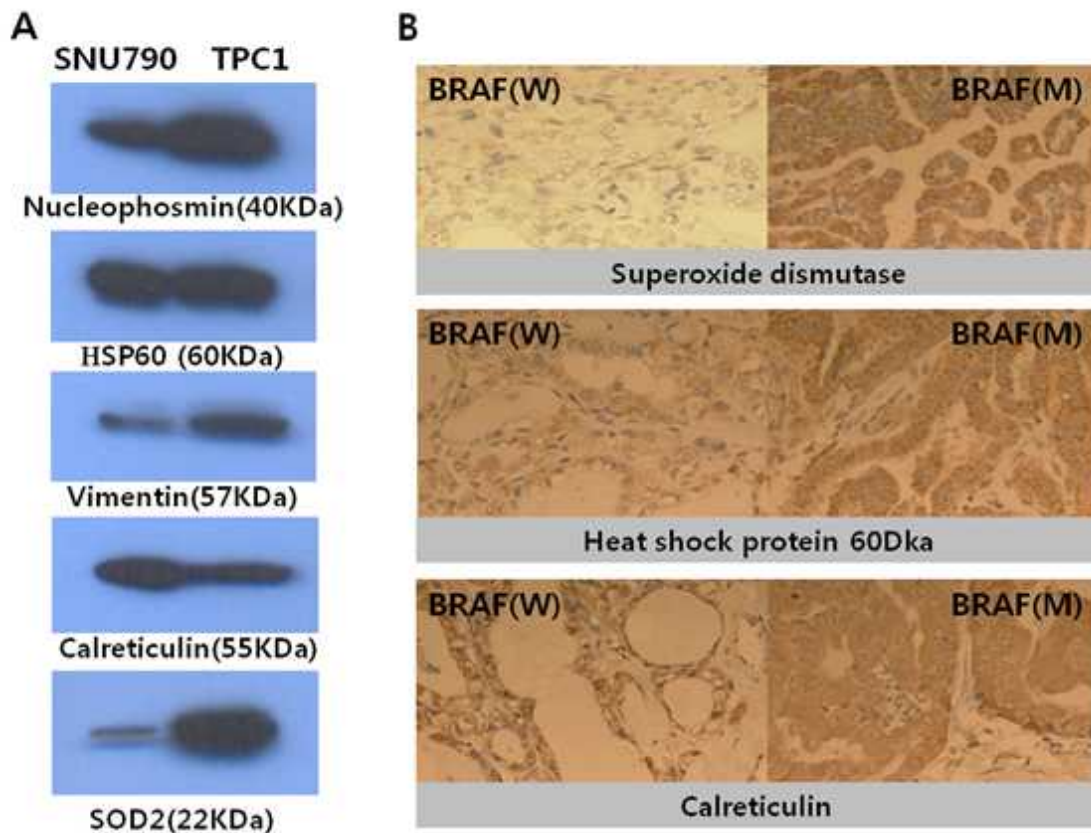
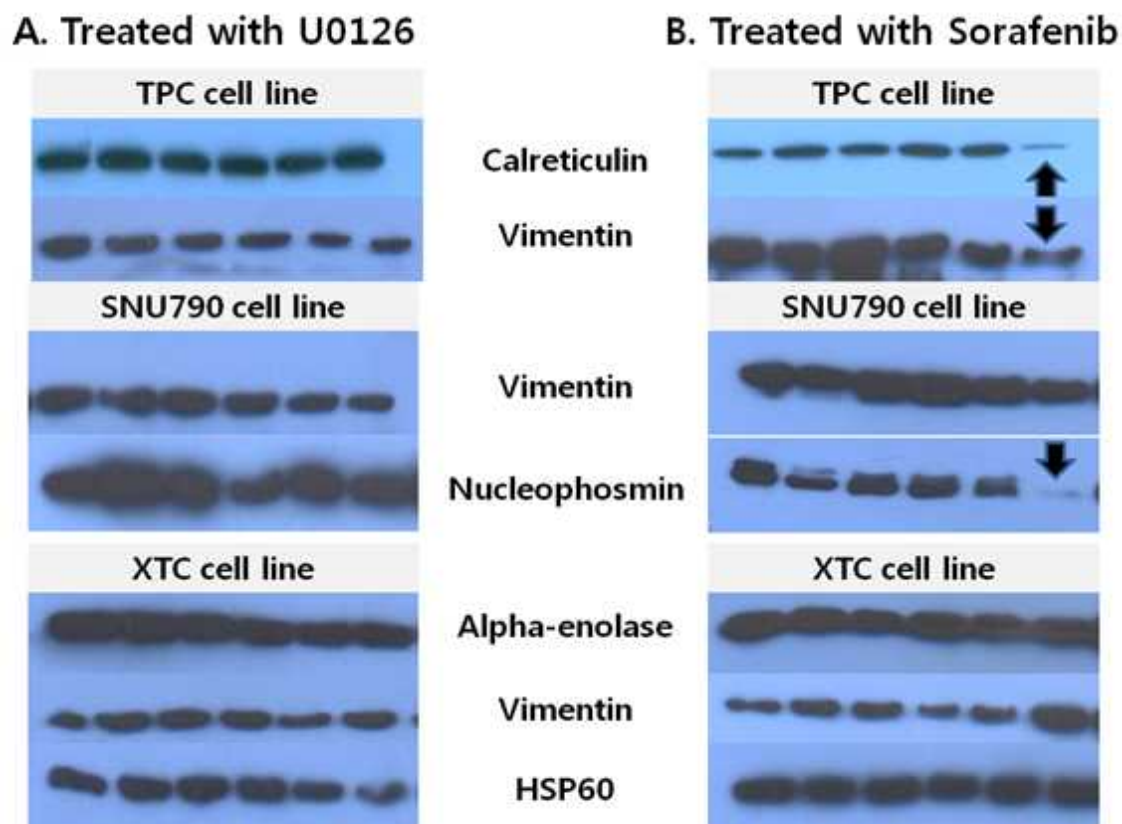


Figure A: Western blot, figure B: Immunohistochemistry
W, wild type ; M, mutation

<Western blot of XTC, SNU790 and TPC1 cell line (treated with U0126 and Sorafenib)>



Bold arrow, decreased expression

C. 각 단백질의 BRAF 변이에 대한 검사 예민도

BRAF mutation	Sensitivity(%)	Specificity(%)	PPV(%)	NPV(%)
/Proteoms				
Calreticulin	71.8	48.8	80.0	37.7
HSP60	73.3	73.9	88.0	51.5
SOD	51.5	73.9	73.9	51.5
Vimentin	70.6	34.8	61.5	44.4
Nucleophosmin	53.8	50.0	60.0	43.8

3. 연구결과 고찰 및 결론

MALDI-TOF를 이용하여 갑상선 질환 및 갑상선 암에서 발현되는 단백질을 정량적으로 분석하는 연구와 BRAF 변이에 대한 유전자적 연구는 보고된 바 있다. Netea-Maier등은 갑상선 여포 종양과 여포암 사이의 단백질 발현 양상의 차이를 보고하였고, Brown 등은 정상 갑상선 조직과 갑상선 유두암 조직 사이의 단백질 발현 차이를 보고하였다. 하지만, 갑상선 유두암에서 가장 흔하게 발생하는 BRAF 변이에 따른 단백질 발현 양상에 대한 연구는 부족한 상황이다. 본 연구에서는 BRAF변이에 따라 다르게 발현되는 단백질을 정량적 단백질 분석을 이용하여 동정하고, 면역조직화학 염색법을 이용하여 각 단백질의 발현 양상을 생체 조직에서 확인하였다.

본연구에서는 MALDI-TOF/TOF를 이용하여 BRAF 변이가 있는 세포주에서 발현 양상이 변화하는 단백질인 vimentin, calreticulin, nucleophosmin, HSP60, SOD을 확인할 수 있었다. 이들 단백질의 기능은 Mascot(<http://www.matrixscience.com/>)에서 검색할 수 있었으며, 이 중 vimentin은 구조단백질로 class III intermediate filaments로 알려져 있다. Calreticulin은 단백질의 folding을 돕는 calcium-binding chaperone으로 thyroperoxidase를 포함하여 다양한 glycoprotein을 합성하는데 중요한 역할을 하는 ER 단백질이다. Nucleophosmin은 ribosome 생합성, centrosome 복제, 단백질의 chaperoning, histone 조합, 세포 증식 및 p53등의 종양억제 유전자 조절에 관여한다. 또한, HSP60은 mitochondria 안으로 단백질을 이동시키는데 관여하며, 이동된 단백질의 folding을 교정하는 작용을 촉진하며 misfolding을 억제하고 refolding을 도와 unfolded polypeptide의 적절한 조합이 가능하도록 하는 역할을 할 것으로 생각된다. SOD는 잘 알려진 단백질로, 세포내에서 정상적으로 발생되면서 생물학적 시스템에 독성을 보이는 radical을 파괴하는 역할을 한다. 본 연구에서는 동정된 단백질 중에서 calreticulin과 HSP60을 생체 시료에서 확인함으로써 BRAF 변이를 예측할 수 있는 새로운 표지자로 제시할 수 있었다.

본연구에서는 MAPK inhibitor가 단백질 발현 양상에 미치는 영향을 확인하고자 각 세포주별 MALDI-TOF를 실시하여 세포주별로 발현 양상을 달리하는 여러가지 단백질을 동정할 수 있었다. BRAF 변이가 없는 XTC세포주와 TPC1 세포주 사이에 약제 처리 후 공통적으로 발현이 감소하는 단백질은 vimentin이었으며, vimentin은 BRAF 변이 세포주인 SNU790에서도 약제 처리 후 발현이 감소되는 양상을 보였다. Western blot 결과에서 vimentin의 발현이 감소하는 경우는 Sorafenib을 처리한 TPC1 세포주에서만 확인이 되었으나, 정량적 분석 결과를 고려할 때 Sorafenib 약제가 구조 단백질인 vimentin에 영향을 미친다는 것을 예측할 수 있었다. XTC 세포주에서 발현이 감소하는 alpha-enolase는 다양한 기능을 수행하는 효소로서, 당분해 작용에 관여하며, 성장 조절, 혐기상황에 대한 적응과 알리지 반응등에서 중요한 역할을 한다. 또한, 혈관내부 및 세포간 섬유용해작용에도 관여할 것으로 생각되고, immunoglobulin생산을 자극하는 것으로 알려져 있다. SNU790 세포주에서 약제 처리 후 발현이 감소되는 PDI A3와 nucleophosmin그리고 TPC1 세포주에서 발현이 감소하는 calreticulin은 모두 단백질의 folding과 단백질 합성 및 조절에 관여한다. Western blot에서는 TPC1 세포주와 SNU790 모두에서 sorafenib을 처리하였을 때에만 발현이 감소되는 것으로 나타났다. Sorafenib은 MAPK pathway에서 RAF/MEK/ERK pathway를 차단하는 약제로, 주로 serine/threonine kinase(c-RAF)에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 또한, U0126은 MEK1/2의 phosphorylation를 방해함으로써 갑상선 유두암 세포의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있는데, 이는 sorafenib보다 좀 더 하위 경로를 억제하는 것이다. 본 연구의 western blot 결과는 생체 조직에서의 확인을 하지 못했다는 한계점이 있으나, sorafenib 처리 후에만 발현이 감소되는 vimentin, nucleophosmin 및 calreticulin의 결과를 보아 이들 단백질이

RAF/MEK/ERK pathway의 상위 경로에 영향을 미치는 단백질일 가능성도 고려할 수 있겠다.

갑상선 유두암에서 BRAF 돌연변이는 예후인자로서의 가능성이 논의 되고 있지만 우리나라처럼 75%이상의 갑상선 유두암이 BRAF 돌연변이를 가지고 있는 상황에서는 BRAF 돌연변이 단독으로 예후인자가 되기에는 전반적인 갑상선 유두암의 좋은 예후를 설명하지 못한다. 그러므로 BRAF 돌연변이외에 그 하부 신호 전달체계에 직용하는 다른 분자적 표지자가 있을 가능성이 있다. 본 연구에서는 HSP60 발현 여부에 따라 BRAF 돌연변이가 있는 갑상선 유두암에서도 림프절 전이가 다르게 나타남을 알 수 있었다. HSP60는 STRESS 단백질로 일반적으로 ISCHEMIA나 스트레스 상황에서 세포의 고사를 막는 역할을 한다고 알려져 있다. 그러므로 본 연구의 결과와 같이 종양억제 유전자로서의 역할은 모순된 것처럼 보이나 실제로 다양한 암에서 HSP60의 발현이 종양의 예후에 긍정적인 영향과 부정적인 영향을 모두 끼칠 수 있는 것으로 보고 되고 있으므로 갑상선 유두암에서의 역할을 주목할 수 있다. 장기간의 추적관찰 과 기전 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구는 몇 가지 한계점을 지니고 있는데, 첫째, 이 연구에서 확인된 단백질은 대부분 세포를 구성하고, 세포의 합성과 대사에 관여하는 일반적인 단백질로, BRAF 변이와 관계된 MAPK pathway의 하위 경로를 밝힐 수는 없었다. 둘째, BRAF 변이와 관계된 모든 spot을 연구한 것이 아니며, 발현 차이가 큰 spot들만을 대상으로 정량적 분석을 한 것이므로 본 연구에서 확인된 단백질보다 많은 단백질을 확인할 수 있는 연구가 필요할 것으로 보인다. 마지막으로, 밝혀진 단백질들의 일반적인 기능 이외 BRAF 변이 혹은 MAPK inhibitor 작용과 관련된 기능에 대한 연구는 이루어지지 않았으므로 추후 이 단백질들의 역할에 대한 연구가 더 필요할 것으로 판단된다.

결론적으로 요약하면, 본 연구에서는 BRAF 변이에 따라 다르게 발현되는 단백질을 정량적 단백질 분석으로 동정하고 생체 조직을 이용하여 확인하였으며, BRAF변이를 예측할 수 있는 새로운 표지자를 제안할 수 있었다. 또한 HSP60 단백질이 림프절 전이에 영향을 미치는 종양억제 유전자로서의 간으성이 있다는 것을 확인 하였다. 이는 추후 전향적 연구들이 이루어진다면 임상적 이용도 고려할 수 있을 것이다. 또한, MAPK inhibitor와 BRAF 변이의 상관 관계 및 억제에 의한 단백질 발현의 차이를 확인하여 RAF/MEK/ERK pathway와의 관계도 예측해 볼 수 있었으나 대사 경로에 대한 연구는 좀 더 필요할 것으로 보인다.

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⁾
HSP 60 as new prognostic marker in papillary thyroid carcinomas: proteomic approach	이유진 (제일) 정기욱 (교신)	Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism (6.026)	게재 신청 중	국외 SCI	0010032
Differential protein expression in papillary thyroid carcinoma cell lines according to BRAF mutation status	민선영 (제일) 정기욱 (교신)	Thyroid (2.02)	게재 신청 중	국외 SCI	0010032

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 ¹⁾	지원과제번호
HSP 60 as new prognostic marker in papillary thyroid carcinomas: proteomic approach	정기욱	International Thyroid Congress	국외	0010032

다. 산업재산권

구분 ¹⁾	특허명	출원인	출원국	출원번호

1) 구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저서

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

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별 목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
갑상선 유두암에서 BRAF mutation 등, MAPK 신호전달관련 단백질들의 발현을 proteomics기법을 사용하여 검색하고 갑상선 유두암의 임상적 예후 인자와의 연관성을 분석, 새로운 분자적 예후 표지자를 발굴함. 발굴된 단백질의 세포 내 작용기전을 밝혀 임상적인 이용가능성을 탐색함	1차년도	대상환자군 및 대조군의 선정	11개의 동결절편 조직을 이용, BARF돌연변이 양성군, 음성군을 선정함	1차년도	100%
		임상데이터 수집	수집완료		
		BRAF 돌연변이 검색	검색완료		
		PROTEOMICS기법을 이용한 갑상선유두암 특이 단백질 발굴 및 동정	동정 완료		
		조직에서 면역화학염색 및 Western blot을 이용한 단백질 발현의 validation	완료		
		단백질 발현과 갑상선 유두암의 예후인자와의 연관성 분석	분석 완료		
갑상선 유두암에서 BRAF mutation 등, MAPK 신호전달관련 단백질들의 발현을 proteomics기법을 사용하여 검색하고 갑상선 유두암의 임상적 예후 인자와의 연관성을 분석, 새로운 분자적 예후 표지자를 발굴함. 발굴된 단백질의 세포 내 작용기전을 밝혀 임상적인 이용가능성을 탐색함	2차년도	대상 세포주의 선정	4개의 갑상선암 세포주 선정	2차년도	100%
		MAPK 신호전달체계 억제제의 투여 후 갑상선암 세포주의 형태학적 변화 및 성장 변화 관찰	완료		
		각 세포주에서 ERK phosphorylation 차단 확인	완료		
		처리 후 세포주에서 단백질 추출 및 PROTEOMICS분석	완료		
		조직에서 면역화학염색 및 Western blot을 이용한 단백질 발현의 validation	완료		
		단백질 발현과 갑상선 유두암의 예후인자와의 연관성 분석	완료		

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

- 1차년도

평가의 착안점	자 체 평 가
대상환자 및 대조군 설정의 적절성 여부	적절히 수집되었음
임상데이터 수집의 충실성 여부	충실히 수집됨

BRAF 돌연변이 검색방법의 정확성	BRAF 돌연변이 검색을 정확히 수행함
특이 단백질 동정 여부	특이 단백질 동정 됨
조직과 조직에서 면역화학염색 및 Western blot을 이용한 단백질 발현의 validation	충실히 수행되었음
단백질 발현과 알려진 예후인자와의 상관관계 여부	갑상선 유두암에서 림프절 전이와 관련된 단백질 동정됨

- 2차년도

평가의 착안점	자 체 평 가
대상 세포주 선정의 적절성 여부	적절히 수집되었음
MTT assay 및 형태학적 변화 확인 여부	확인됨
적정 dose 및 적정 처치 시간 결정 여부	확인됨
특이 단백질 동정여부	4개의 단백질 동정됨
조직에서 검색가능 여부	면역염색으로 확인 가능함
특이 단백질 발현과 알려진 예후인자와의 상관관계 여부	BRAF mutation과 관련된 단백질을 세포주에서 확임함

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	2	1. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism (6.202) 2. Thyroid (2.602)
산업재산권 등록		
기 타		

(2) 연구성과의 활용계획

- 갑상선 유두암 동물 모델에서 MAPK inhibitor 치료 전후 발현이 달라진 단백질들의 발현상황을 확인
- 치료 반응 유무에 따른 단백질 발현 검색
- 발현이 다르게 나타난 단백질들의 발현기전 탐색: epigenetic change 탐색
- HSP60 발현 여부에 다른 환자들의 장기 추적 결과 확인: 보조적 병기 결정인자로서의 간으성 탐색

6. 참고문헌

1. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, *et al* .Clinical implication of hot spot BRAF mutation ,V599E inapillary thyroid cancers. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88 (9):4393-7.
2. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M,*et al* .BRAFmutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. J Clin Endocrinol Metab 2003;88(11):5399-404.
3. Fugazzola L, Puxeddu E, Avenia N,*et al* .Correlation between B-RAF V600E mutation and clinico-pathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italian study and review of the literature. EndocrRelatCancer 2006;13(2):455-64.
4. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. Endocr Relat Cancer 2005;12(2):245-62.
5. Brown LM, Helmke SM, Hunsucker SW,*e tal* .Quantitative and qualitative differences in protein expression between papillary thyroid carcinoma and normal thyroid tissue. Mol Carcinog 2006;45(8):613-26.
6. Salvatore G, De Falco V, Salerno P,*et al*.BRAF is a therapeutic target in aggressive thyroid carcinoma.Clin Cancer Res 2006;12(5):1623-9.
7. Henderson YC, Ahn SH, Kang Y, Clayman GL. Sorafenib potently inhibits papillary thyroid carcinomas harboring RET/PTC1 rearrangement. Clin Cancer Res 2008;14(15):4908-14.
8. Netea-Maier RT, Hunsucker SW, Hoevenaars BM,*et al* .Discovery and validation of protein abundance differences between follicular thyroid neoplasms. CancerRes 2008;68(5):1572-80.
9. Le Fourn V, Siffroi-Fernandez S, Ferrand M, Franc JL. Competition between calnexin and BiP in the endoplasmic reticulum can lead to the folding or degradation of human thyroperoxidase. Biochemistry 2006;45(23):7380-8.
10. Fayadat L, Siffroi-Fernandez S, Lanet J, Franc JL. Calnexin and calreticulin binding to human thyroperoxidase is required for its first folding step(s) but is not sufficient to promote efficient cell surface expression. Endocrinology 2000;141(3):959-66.
11. Grummitt CG, Townsley FM, Johnson CM, Warren AJ, Bycroft M. Structural consequences of nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia. J Biol Chem 2008;283(34):23326-32.
12. Magen D, Georgopoulos C, Bross P,*et al* .Mitochondrial hsp60 chaperonopathy causes an autosomal-recessive neurodegenerative disorder linked to brain hypomyelination and leukodystrophy. AmJ Hum Genet 2008;83(1):30-42.
13. Nomiyama T, Tanaka Y, Piao L,*et al* .The polymorphism of manganese superoxide dismutase is associated with diabetic nephropathy in Japanese type2 diabetic patients. J Hum Genet 2003;48(3):138-41.
14. Liu L, Cao Y, Chen C,*et al* .Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway inhibits tumor angiogenesis and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. Cancer Res 2006;66(24):11851-8.
15. Wallace EM, Lyssikatos JP, Yeh T, Winkler JD, Koch K. Progress towards therapeutic small molecule MEK inhibitors for use in cancer therapy. Curr Top Med Chem 2005;5(2):215-29.

7. 첨부서류

IV. 제3세부과제

세부과제명 : 중간형 갑상선결절에서 악성과 양성 감별을 위한 마이크로
어레이 분석

세부과제책임자(성명/소속) : 이유진/갑상선암센터, 유방내분비암연구과

목 차

< 요약 문 >

(한글) 중간형 갑상선결절에서 악성과 양성 감별을 위한 마이크로어레이 분석

(영문) microanalysis analysis to differentiate follicular thyroid cancer from indeterminate thyroid nodule

<u>1. 연구의 최종목표</u>	-----	85
<u>2. 연구의 내용 및 결과</u>	-----	85
<u>3. 연구결과 고찰 및 결론</u>	-----	90
<u>4. 연구성과 및 목표달성도</u>	-----	91
<u>5. 연구결과의 활용계획</u>	-----	92
<u>6. 참고문헌</u>	-----	93
<u>7. 첨부서류</u>	-----	94

< 요약 문 >

연구분야(코드)	I-1		과제번호	0910032-3
과제명	중간형 갑상선결절에서 악성과 양성 감별을 위한 마이크로어레이 분석			
연구기간/연구비 (천원)	합계	2009년 1월 1일 ~ 2010년 12월 31일	95,000	
	1차년도	2009년 1월 1일 ~ 2009년 12월 31일	50,000	
	2차년도	2010년 1월 1일 ~ 2010년 12월 31일	45,000	
과제책임자	성명	이유진	주민등록번호	
	전화번호	011-239-1028	전자우편	euleemd@gmail.com
색인단어	국문	중간형, 갑상선 결절, 감별진단, 마이크로어레이		
	영문	indeterminate, thyroid nodule, differential diagnosis, microarray		

◆ 연구목표

<최종목표>

갑상선결절에서 미세침흡인 세포검사 시 5-30%에 이르는 중간형 결절에서 불필요한 수술 및 자원 낭비를 줄이기 위해 악성 및 양성 여부를 감별할 수 있는데 도움이 되는 지표를 찾기 위함

<당해년도 목표>

중간형 결절로 진단되어 수술한 결절을 대상으로 악성 결절 및 양성 결절 조직을 이용하여 DNA를 추출, 마이크로어레이(microarray) 분석을 통하여 둘 간을 구별할 수 있는 유전자를 찾아내고, 이 차이는 유전자를 실제 검체에 이용하여 양성, 악성 결절 여부를 감별하는 데에 도움이 될 수 있는지 확인함

◆ 연구내용 및 방법

- 갑상선암은 내분비계에서 가장 흔한 암이며 최근 전세계적으로 그 발생빈도가 증가하고 있으며 우리나라에서도 여성암 중 1위를 차지함
- 갑상선암은 처음에 갑상선 결절로 발견되며, 암을 진단하는 가장 좋은 방법은 미세침흡인 세포검사인데, 이러한 미세침흡인 세포검사를 시행하면 5-30%에서 악성 및 양성을 명확히 구분할 수 없는 중간형 (indeterminate) 결절이 진단됨. 중간형 결절의 경우 추적관찰 중 반복 시행한 검사에서 양성으로 나오거나 크기가 줄어들어 악성의 가능성을 배제할 수 있는 경우도 있으나 그 비율은 높지 않으며, 반복 검사에도 중간형으로 나오는 경우에는 진단적 수술이 요구됨. 이들 중 암은 15-47% 정도로 보고되며, 암이 진단되는 경우 나머지 협의 절제를 위한 재수술이 요구되는 등 자원 낭비가 큰 상태임.
- 중간형 결절 중 악성 및 양성결절을 구별하기 위한 여러 연구가 있었으며, 병력 및 임상소견 중 단일결절, 4cm 이상의 결절, 젊은 연령, 고정된 결절 등은 암에서 유의하게 더 많은 것으로 보고되었지만, 우리나라의 결과는 고정된 결절 외에는 차이가 없다고 보고하였으며, 다른 연구들 사이에도 결과가 많이 달라 일관적으로 양성, 악성결절을 감별할 수 있는 소견은 아직 뚜렷치 않음.
- 이 외 galectin-3 발현 유무, DNA 메틸화(methylation)의 정도, BRAFV600E, RET/PTC 돌연변이 유무, hTERT(인간 텔로미어 역전사효소; human telomere reverse transcriptase) 발

현 정도를 관찰하여 감별하고자 하는 시도가 있었으며, 6개의 갑상선암과 관련된 유전자들의 조합(multigene assay)을 이용하여 발현 양상을 보아 악성과 양성결절을 구별하려는 시도가 있었음.

- 이들 중 6개 유전자의 조합을 이용한 방법은 그 양성, 음성 예측도 및 민감도, 특이도가 매우 높은 감별에 유용한 방법이나 6개나 되는 유전자 발현을 모두 봐야 하기 때문에 임상에서 적용하기에 쉬운 방법은 아니라는 단점이 있음.
- 현재로서 가장 임상에서 손쉽게 적용하는 방법은 환자의 임상양상, 결절의 특징, galectin-3 발현 유무 등을 조합하여 판단하는 방법임.
- 이에 중간형 갑상선결절의 감별진단을 용이하게 할 수 있는 marker를 찾기 위해서 중간형 결절로 수술한 환자들의 조직을 이용하여 양성결절과 악성결절에서 다르게 발현되는 유전자들을 마이크로어레이 법을 이용하여 가려내고 이를 실제 임상에 적용할 수 있는지 살펴보고자 함.
- 중간형 갑상선결절로 수술한 환자들의 조직 50개를 양성결절, 악성결절로 구분하고 각 군에서 RNA를 추출, 각각 형광물질로 표지함. 이렇게 만들어진 cDNA 탐식자(probe)를 DNA칩에 교잡(hybridization)시켜 각 유전자의 발현 여부, 발현 정도를 확인하고 양성결절, 악성결절에서 차이가 나는 유전자를 찾아냄.
- 이들 유전자 중 갑상선 및 갑상선암과 연관성이 높은 유전자를 선별하여 양성, 악성결절에서의 민감도, 특이도, 양성 및 음성 예측률이 높은 유전자 혹은 유전자의 조합을 찾아냄.
- 대상군의 임상적 특성과 결합하여 실제 진단에 도움이 될 수 있는 예측 인자를 찾아냄

◆ 연구성과

-정량적 성과

구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)
SCI 논문 편수	0/1	0
IF 합	0/4-5	0
기타 성과		

1) 총연구기간내 목표 연구성과로 기 제출한 값

-정성적 성과

- 임상에서 흔히 마주치지지는 않지만 마주치게 되면 감별이 어려운 중간형 결절에 있어서 갑상선여포암의 진단 정확도를 높이는데 수술전 혈청 Tg 레벨이 도움이 될 수 있음을 새롭게 제시하였음.

◆ 참여연구원 (최종연도 참여인원)	성 명	이유진, 이은경, 신수영
	주민등록번호	*****-*****, *****-*****, *****-*****

Project Summary

Title of Project	microanalysis analysis to differentiate follicular thyroid cancer from indeterminate thyroid nodule
Key Words	indeterminate, thyroid nodule, differential diagnosis, microarray
Project Leader	You Jin Lee
Associated Company	none

Purpose : We performed microarray analysis and compared clinical, sonographical, and pathological parameters between benign and malignant thyroid nodules to differentiate follicular thyroid carcinoma from benign thyroid nodules.

Methods : We enrolled 164 subjects who underwent thyroid surgery in National Cancer Center because of the results of indeterminate cytology. We reviewed patients' age at diagnosis, sex, preoperative thyroglobulin (Tg) and anti-Tg antibody levels, free T4, TSH level, sonographic findings including tumor size, and pathological findings. We compared benign and malignant group using the general cDNA microarray technique with illumina HumanRef-8 v3 Expression BeadChip (Illumina, INC., San Diego, CA).

Results : We cannot find significantly different genes in microarray analysis between benign and follicular cancer group. But, among clinical and sonographical findings, we could find several risk factors showing significant differences. Young age, male, larger tumor size, preoperative high Tg level, hypoechoic nodule without hypoechoic rim on sonography increased cancer probability significantly in multivariate analysis. With cut-off value 187.5 ng/ml, sensitivity and specificity was 54.8% and 90.1%, respectively. AUC was 0.748 and p-value was 0.000.

Conclusions : Microarray analysis did not show significant differences between benign and malignant thyroid nodules. But, peroperative Tg levels had very high specificity in predictgin follicular thyroid cancer. Therefore it may be very excellent tools to differentiate follicular thyroid cancer from benign thyroid nodules.

1. 연구의 최종목표

<최종목표>

갑상선결절에서 미세침흡인 세포검사 시 5-30%에 이르는 중간형 결절에서 불필요한 수술 및 자원 낭비를 줄이기 위해 악성 및 양성 여부를 감별할 수 있는 데 도움이 되는 지표를 찾기 위함

<당해년도 목표>

중간형 결절로 진단되어 수술한 결절을 대상으로 악성 결절 및 양성 결절 조직을 이용하여 DNA를 추출, 마이크로어레이(microarray) 분석을 통하여 둘 간을 구별할 수 있는 유전자를 찾아내고, 이 차이나는 유전자를 실제 검체에 이용하여 양성, 악성 결절 여부를 감별하는 데에 도움이 될 수 있는지 확인함

2. 연구의 내용 및 결과

1) 대상환자 선별

본원에서 갑상선절제술을 시행한 환자 3038례 중 미세침흡인 세포검사상 중간형 결과를 보인 164례를 추출, 이들의 병리 기록 및 slide를 리뷰하였다. 이들 중 54개의 조직이 미세침흡인 세포 검사상 중간형(favor follicular neoplasm 혹은 indeterminate, follicular neoplasm vs nodular hyperplasia, 혹은 favor nodular hyperplasia)에 합당하였고, 이들 중 악성 가능성이 낮은 favor nodular hyperplasia 소견을 제외한 검체에 대해 병리, 세침흡인검사 결과를 리뷰하였다.

최종적으로 연구에는 양성결절 9례, 악성결절 14례가 포함되었으며, 악성 결절 14례 중 갑상선 유두암이 7례, 갑상선여포암이 7례였다. 미세침흡여포암과 광범위침습여포암은 각 4, 3례였다 (그림1)

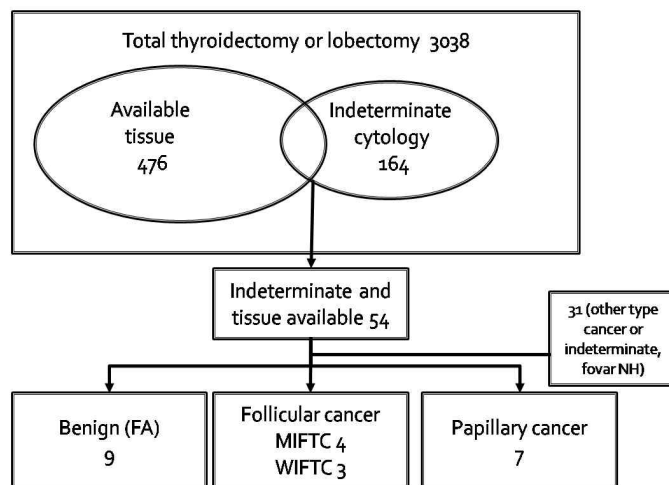


그림 1. 대상군 선정

2) microarray analysis

각 조직에서 RNA를 추출하여 illumina HumanRef-8 v3 Expression BeadChip (Illumina, Inc., San Diego, CA)를 이용하여 microarray analysis를 시행하였다.

실험은 3회 반복하였고 유전자들의 cluster에서 각 유전자의 형광물질의 강도를 비교하여 2배 이상 차이 나며 p value가 0.05 이하인 경우 유의한 유전자 발현의 차이가 있다고 해석하였다.

시행한 실험에서 양성결절과 악성결절 사이에 유의한 차이를 보이는 유전자는 발견되지 않았으며, 양성결절 대 갑상선유두암, 갑상선여포암의 비교에서도 유의하게 차이 나는 유전자는 없었다. 갑상선여포암을 미세침습여포암 및 광범위침습여포암으로 나누어서 양성 대 미세침습여포암, 양성 대 광범위침습여포암, 미세침습여포암 대 광범위침습여포암으로 분석해 보았으나 역시 유의하게 차이 나는 유전자는 찾을 수 없었다.

3) 환자들의 임상적, 병리적, 초음파적 특성 분석

본원에서 갑상선절제술을 시행한 환자 3038례 중 미세침흡인 세포검사상 중간형 결과를 보인 164례에 대해서는 위의 실험에 더해 임상적, 병리적 특성을 분석하였다.

양성 결절이 88례 (53.7%), 악성결절이 76례 (46.3%) 였으며, 악성 결절은 갑상선유두암 32례, 여포변이 갑상선유두암(papillary thyroid cancer, follicular variant) 9례, 미세침습여포암 31례, 광범위침습여포암 4례였다.

이들의 임상적 특성 및 수술 전 혈액검사 결과를 표1에 정리하였다.

수술 전의 환자 성별, 진단나이, 갑상선기능 등은 각 군간에 차이를 보이지 않았다.

하지만 초음파상 갑상선결절의 크기는 군간에 유의한 차이를 보였다. 갑상선유두암은 유의하게 양성결절 군에 비해 작았으며 (양성 $2.4 \pm 1.2\text{cm}$ vs. 여포성 변이 유두암 $1.2 \pm 0.7\text{cm}$, 유두암 $0.8 \pm 0.1\text{cm}$, $p < 0.05$), 갑상선여포암은 유의하게 큰 결과(미세침습여포암 $2.9 \pm 1.9\text{cm}$, 광범위침습여포암 $4.3 \pm 1.3\text{cm}$, $p < 0.05$)를 보였다.

중간형 결절에서 주 감별 대상인 갑상선여포암과의 비교시에는 유의하게 수술 전 티로글로불린(thyroglobulin, Tg) 수치가 양성결절 군에 비해, 악성결절 군에서 높음을 확인할 수 있었다 (표 2, 양성결절: 미세침습여포암: 광범위침습여포암, 15 ± 229 : 188 ± 2285 : 2762 ± 2079 ng/ml median \pm SD)

	Benign	MIFTC	WIFTC	PTC, FV	PTC, classic
Number	88(53.7)	31(18.9)	4(2.4)	9(5.5)	32(19.5)
Female, n (%)	77(87.5)	22(71.0)	4(100)	8(88.9)	27(84.4)
Age at Dx	48 ± 11	50 ± 13	50 ± 17	45 ± 10	46 ± 12
tumor size	2.4 ± 1.2	2.9 ± 1.9*	4.3 ± 1.3*	1.2 ± 0.7*	0.8 ± 0.1*
TSH (mU/L)	1.6 ± 1.2	1.2 ± 1.1	1.5 ± 0.7	2.4 ± 1.5	1.6 ± 1.3
Tg (ng/ml)	90 ± 229	1315 ± 2285	2762 ± 2909	75 ± 140	28 ± 44
TgAb (U/ml)	1203 ± 7083	39 ± 59	52 ± 46	10 ± 22	48 ± 162
TPOAb (U/ml)	217 ± 568	14 ± 29	<30	54 ± 90	743 ± 2359
Hashimoto, n (%)	17 (19.3)	3 (9.7)	0 (0.0)	3 (33.3)	3 (9.4)

표1. 대상군의 병리진단에 따른 임상소견 비교

* p value <0.05 when compared with benign group

	Benign	MIFTC	WIFTC
Number	88(53.7)	31(18.9)	4(2.4)
Female, n (%)	77(87.5)	22(71.0)	4(100)
Age at Dx	48 ± 11	50 ± 13	50 ± 17
tumor size	2.4 ± 1.2	2.9 ± 1.9*	4.3 ± 1.3*
TSH (mU/L)	1.6 ± 1.2	1.2 ± 1.1	1.5 ± 0.7
Tg (ng/ml)	90 ± 229	1315 ± 2285*	2762 ± 2909*
Tg (median)	15	188	2079
TgAb (U/ml)	1203 ± 7083	39 ± 59	52 ± 46
TgAb (median)	<20	<20	49
TPOAb (U/ml)	217 ± 568	14 ± 29	<30
Hashimoto, n (%)	17 (19.3)	3 (9.7)	0 (0.0)

표2. 양성결절과 갑상선여포암의 임상 특성 비교

* p value <0.05 when compared with benign group

수술전 초음파 소견을 바탕으로 양성결절 및 악성결절(여포암)에서의 소견 차이를 분석한 결과 악성결절일수록 불규칙한 경계를 가지는 빈도가 높았으며 (양성 vs. 미세침습여포암 vs. 광범위침습여포암, 7(9.1%) vs. 6 (20.7%) vs. 2 (50.0%), $p = 0.012$), 악성결절에서는 저에코, 양성결절에서는 등에코성결절이 유의하게 많았으며 ($p < 0.05$), 악성결절군에서는 결절둘레로 저에코성 띠가 보이지 않는 경우가 유의하게 많았다 (저에코 띠, 양성 vs. 미세침습여포암 vs. 광범위침습여포암, 50 (64.9%) vs. 9 (31.0%) vs. 1 (25.0%), $p < 0.05$). 또한 유의하게 악성결절에서 석회화소견이 많았다 (양성 vs. 미세침습여포암 vs. 광범위침습여포암, 11 (14.5%) vs. 12 (41.4%) vs. 3 (75.0%), $p < 0.05$) (표 3).

		Benign	MIFTC	WIFTC	p
Number		88(53.7)	31(18.9)	4(2.4)	
margin	regular	70 (90.9)	23 (79.3)	2 (50.0)	0.012
	irregular	7 (9.1)	6 (20.7)	2 (50.0)	
Component	solid	75 (97.4)	29 (100)	4(100)	NS
	solid & cystic	2 (2.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Echogenicity	Markedly hypoechoic	0 (0)	3 (10.3)	0 (0.0)	0.000
	Hypoechoic	22 (28.6)	16 (55.2)	4 (100)	
	isoechoic	55 (71.4)	10 (34.5)	0 (0.0)	
Hypoechoic rim	no	27 (35.1)	20 (69.0)	3 (75.0)	0.001
	yes	50 (64.9)	9 (31.0)	1 (25.0)	
vascularity	None	8 (18.6)	6 (31.6)	1 (25.0)	NS
	Peripheral	10 (23.3)	2 (10.5)	2 (50.0)	
	Poor to moderate	17 (39.5)	7 (36.8)	1 (25.0)	
	Moderate to rich	8 (18.6)	4 (21.1)	0 (0.0)	
calcification	present	11(14.5)	12 (41.4)	3 (75.0)	0.000

표3. 양성결절과 갑상선여포암의 초음파 특성 비교

이들을 대상으로 여포암의 위험도에 대한 다변량 분석 결과 진단 젊은 나이, 남성, Tg 수치가 높은 경우, 석회화, 저에코 결절 등이 유의하게 갑상선여포암의 위험도를 높이는 것으로 분석되었다 (표4).

ROC curve를 이용하여 진단 나이 및 Tg 값의 진단 민감도 및 특이도에 대해 분석하였다. 나이의 경우 AUC 0.524 (95% confidence interval 0.404-0.645), $p = 0.674$ 로 cut-off value 52.5세의 경우 민감도 48.5%, 특이도 68.2%를 보였으며 양군간에 유의한 차이를 보이지 않았다(date not shown). 하지만 Tg 값의 경우 cut-off value 187.5로 하였을 때 민감도 54.8%, 특이도 91.5% 로 AUC 0.748 (95% confidence interval 0.634-0.861), $p = 0.000$ 으로 유의한 차이를 보였다 (그림 2). 종양크기에 대해서 살펴보았을 때 AUC 0.663 (95% confidence interval 0.562-0.764, $p =$

0.005) 로 1.65cm 이상인 경우 민감도 95.7%, 특이도 46.6%를 보였다.

	Exp (B)	95% Confidence interval	p
Age	0.917	0.850-0.990	0.026
Male	8.036	1.230-52.499	0.030
TSH	0.804	0.410-1.575	0.525
Tg	1.987	1.248-3.165	0.004
TgAb	0.768	0.232-2.540	0.665
Hashimoto	4.643	0.300-71.831	0.272
Irregular margin	0.422	0.039-4.556	0.477
Calcification	6.413	1.091-37.712	0.040
Hypoechoic nodule	5.662	1.126-28.466	0.035
Hypoechoic rim	0.190	0.035-1.024	0.053

표4. 갑상선여포암의 발생위험도에 대한 다변량 분석

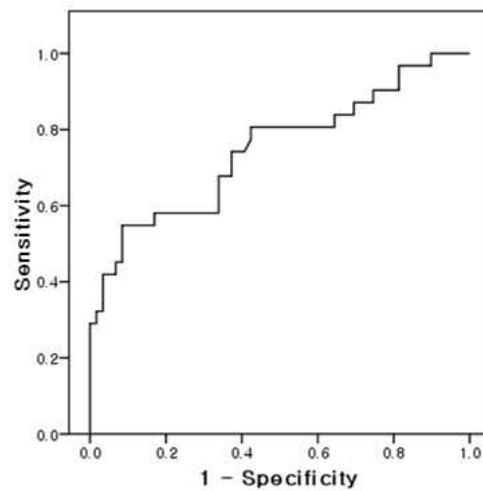


그림 2. 그림2. Tg 결과에 대한 ROC curve

3. 연구결과 고찰 및 결론

갑상선암의 진단에 있어서 가장 정확하고 널리 시행되고 있는 검사는 미세침흡인세포검사(fine needle aspiration; FNA)이다. 진단정확도가 95% 이상으로 gold standard 인 검사이지만, 이 검사만으로는 악성 및 양성을 정확하게 진단할 수 없는 중간형 결절은 적게는 5%에서 많게는 30-40%에 이르러 이들의 경우 정확한 진단을 위하여 수술을 시행해야 한다. 하지만 이들 중 암의 빈도는 15-47% 정도로 반 이상의 환자가 암이 아님에도 수술을 시행받아야 하며, 암으로 확인되더라도 나머지 열절제술을 위한 재수술이 필요하게 되는 등 많은 불편함이 있다.

이에 중간형 결절을 좀더 정확히 악성, 양성으로 구분하기 위한 여러 연구가 있었으나, 이를 통해 밝혀진 인자들이 실제 임상에서 결절을 구별하는데 큰 도움은 되지 않고 있는 것이 현실이다.

최근 분자유전 분야에서의 진단기법에 대한 연구가 활발하여, BRAF 돌연변이는 매우 높은 특이도로 갑상선유두암을 진단하는데 도움이 되는 도구로 사용되고 있다.

이에 여포암에서의 진단에 도움이 되는 유전자를 찾기 위하여 이 실험을 진행하였다.

하지만, microarray 결과를 여러번 반복하였음에도 불구하고, 양성결절과 갑상선여포암 사이에 유의한 발현 차이를 보이는 유전자는 찾을 수가 없었다.

이에 유전자 수준에서의 차이 외에 임상상, 초음파 영상 소견, 병리소견 등의 인자들을 리뷰하였고, 본 연구에서는 다른 연구들의 결과와 비교적 일관되게 젊은 연령, 큰 결절 크기등이 갑상선여포암의 가능성을 높이는 인자로 분석되었다.

이 외에 티로글로불린(thyroglobulin, Tg) 수치가 새로이 갑상선여포암의 가능성을 예측할 수 있는 인자로 제시되었다.

Tg는 정상적으로 갑상선조직에서 생성되는 단백질로 갑상선암 뿐 아니라 증식성 갑상선 질환에서도 그 값이 증가하여 갑상선암의 진단에는 도움이 되지 않으므로 갑상선학회에서는 수술 전 Tg의 수치를 측정하는 것이 의미가 없다고 언급하고 있다.

가장 흔한 종류의 암인 갑상선분화암, 그 중에서 갑상선유두암에 있어서는 위의 가이드라인과 동일하게 이 연구에서도 Tg 수치의 유의한 차이가 나타나지 않았다(표 1). 하지만 범위를 양성결절과 갑상선여포암으로 좁혔을 때 Tg 수치는 유의하게 악성결절에서 높았으며, 양성, 미세침흡여포암, 광범위침습여포암으로 갈수록 유의하게 증가하는 경향을 보였다.

cut-off value 187.5를 기준으로 이보다 Tg 수치가 높으면 갑상선암일 가능성이 유의하게 증가하였고, 민감도 54.8%, 특이도 91.5%로 AUC 0.748로 비교적 높은 진단정확도를 가질 것으로 예측할 수 있었다. 민감도가 다소 낮은 하나 Tg 수치가 187.5 ng/ml를 넘지 않으면 거의 대부분에서 갑상선여포암의 가능성을 배제할 수 있는 좋은 진단인자가 될 것으로 생각된다.

이상의 결과들을 바탕으로 요약하자면, 갑상선여포암에 있어서는 아직 양성종양과 유의한 차이를 보이는 유전자를 발견할 수 없었으며, 임상에서 환자가 갑상선결절로 내원하여 시행한 미세침흡인세포검사상 중간형 소견을 보이는 경우에는 나이, 성별, 종양의 크기나 초음파 소견 등의 위험인자와 더불어 serum Tg 레벨을 측정하는 것이 도움이 될 것으로 생각된다.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 ¹⁾)	저널명(IF.)	Year; Vol(No):Page	구분 ²⁾	지원과제번호 ³⁾
Preoperative thyroglobulin as a useful predictive marker to differentiate follicular thyroid cancer from benign nodules in indeterminate nodules	이유진, 이은경, 정기옥, 김석기		in preparation		

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 ¹⁾	지원과제번호
Preoperative thyroglobulin as a useful predictive marker to differentiate follicular thyroid cancer from benign nodules in indeterminate nodules	이유진, 이은경, 정기옥, 김석기	대한갑상선학회	서울	

1) 지역 : 국내, 국외

다. 산업재산권

구분 ¹⁾	특허명	출원인	출원국	출원번호

1) 구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저 서

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

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
	1차년도	대상환자군 수집	환자군의 임상, 초음파, 병리 데이터 리뷰 및 해당 대상 추출	1차년도	100%
		microarray 분석	array 분석을 통해 유의하게 차이를 보이는 유전자 확인		
	2차년도	차이나는 유전자를 실제 임상 검체에 적용	유의하게 차이를 보이는 유전자를 찾지 못해 시행하지 못함	2차년도	100%
		임상, 병리데이터를 기준으로 진단인자 분석	Tg 수치에 대한 내용 새로 얻음		

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
중간형 결절로 수술 예정인 환자들의 미세침흡인 세포검사 검체 수집	충실히 수집됨
임상데이터 수집	충실히 수집됨
미세침흡인 세포검사 검체에 유전자검사 적용	잘 적용하였으나 유의한 결과를 얻지는 못함
검사결과와 악성 진단의 민감도, 특이도, 진단정확도 등을 분석	차이나는 유전자 대신 다른 임상 위험인자를 반영, 분석함 분석 자체는 충실히 수행됨

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	2	갑상선학회 초록 발표 및 저널 submission 예정
산업재산권 등록		
기 타		

(2) 연구성과의 활용계획

임상에서 중간형 갑상선결절로 진단 받는 환자들을 대상으로 실제 Tg 및 TgAb 검사를 통해 앞으로의 진단정확도에 관한 data를 모아볼 예정.

6. 참고문헌

1. 암등록 중앙통계2003-2005년 암발생률. 보건복지가족부 중앙암등록본부
2. Vander JB, Gaston EA, Dawber TR: The significance of nontoxic thyroid nodules. Final report of a 15-year study of the incidence of thyroid malignancy. *Ann Intern Med* 69:537-540, 1968
3. Horlocker TT, Hay JE, James EM, Reading CC, Charboneau JW: Prevalence of incidental nodular thyroid disease detected by high-resolution parathyroid ultrasonography. In: Medeiros-Neto G, Gaitan E eds. *Frontiers in thyroidology*. vol 2. pp1309-1312, New York: Plenum Medical, 1985
4. 임창훈, 오한진, 정호연, 한기욱, 장학철, 윤현구, 한인권, 한병희, 이경상, 조병제. 건강검진 수신 여성에서 초음파검사를 이용한 갑상선결절의 유병률. *대한내분비학회지* 17: 183-188, 2002
5. 김정현, 박상준, 김상억, 이광희, 조일권, 장선익, 이진관, 서금수, 권혁포, 정성창. 건강검진 수신 성인 남성에서 초음파검사를 이용한 갑상선결절의 유병률. *대한내분비학회지* 22: 112-117, 2007
6. 석지혜, 김태용, 김미경, 김원배, 김홍규, 전성훈, 송영기. 갑상선 질환의 기왕력이 없는 성인에서 갑상선 초음파 선별검사로 발견된 갑상선 결절의 유병률. *대한내분비학회지* 21: 389-393, 2006
7. Rosen JE, Stone MD: Contemporary diagnostic approach to the thyroid nodule. *J Surg Oncol* 94:649-661, 2006
8. Tamez-Perez HE, Gutierrez-Hermosillo H, Forsbach-Sanchez G, et al. Nondiagnostic thyroid fine needle aspiration cytology: outcome in surgical treatment. *Rev Invest Clin* 59:180-3, 2007
9. Jogai S, Al-Jassar A, Temmim L, Dey P, Adesina AO, Amanguno HG. Fine needle aspiration cytology of the thyroid: a cytohistologic study with evaluation of discordant cases. *Acta Cytol* 49:483-488, 2005
10. 이선화, 김선욱, 박도준, 김원배, 김성연, 조보연, 이홍규, 고창순. 미세침흡인 세포검사상 중간형의 갑상선결절에서 악성의 가능성이 높은 임상 지표들. *대한내분비학회지* 14: 505-513, 1999
11. Rago T, Di Coscio G, Basolo F, et al. Combined clinical, thyroid ultrasound and cytological features help to predict thyroid malignancy in follicular and Hupsilonrthle cell thyroid lesions: results from a series of 505 consecutive patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 66: 13-20, 2007
12. Baloch ZW, Fleisher S, LiVolsi VA, Gupta PK. Diagnosis of "follicular neoplasm": a gray zone in thyroid fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* 26:41-44, 2002
13. Camargo RY, Tomimori EK, Knobel M, Medeiros-Neto G. Preoperative assessment of thyroid nodules: role of ultrasonography and fine needle aspiration biopsy followed by cytology. *Clinics* 62: 411-418, 2007
14. Sahin M, Gursoy A, Tutuncu NB, Guvener DN. Prevalence and prediction of malignancy in cytologically indeterminate thyroid nodules. *Clin Endocrinol (Oxf)* 65: 514-518, 2006
15. Kim MJ, Kim HJ, Hong SJ, Shong YK, Gong G. Diagnostic utility of galectin-3 in aspirates of thyroid follicular lesions. *Acta Cytol* 50: 28-34, 2006

16. Bartolazzi A, Orlandi F, Saggiorato E, et al. Galectin-3-expression analysis in the surgical selection of follicular thyroid nodules with indeterminate fine-needle aspiration cytology: a prospective multicentre study. *Lancet Oncol* 9: 543-549, 2008
17. Hu S, Ewertz M, Tufano RP, et al. Detection of serum deoxyribonucleic acid methylation markers: a novel diagnostic tool for thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 98-104, 2006
18. Rosen J, He M, Umbricht C, et al. A six-gene model for differentiating benign from malignant thyroid tumors on the basis of gene expression. *Surgery* 138: 1050-1057, 2005
19. Sapio MR, Posca D, Raggioli A, et al. Detection of RET/PTC, TRK and BRAF mutations in preoperative diagnosis of thyroid nodules with indeterminate cytological findings. *Clin Endocrinol (Oxf)* 66: 678-683, 2007
20. Chung KW, Yang SK, Lee GK, et al. Detection of BRAFV600E mutation on fine needle aspiration specimens of thyroid nodule refines cyto-pathology diagnosis, especially in BRAF600E mutation-prevalent area. *Clin Endocrinol (Oxf)* 65: 660-666, 2006
21. Kebebew E, Peng M, Reiff E, McMillan A. Diagnostic and extent of disease multigene assay for malignant thyroid neoplasms. *Cancer* 106: 2592-2597, 2006
22. Freitas BC, Cerutti JM. Genetic markers differentiating follicular thyroid carcinoma from benign lesions. *Mol Cell endocrinol* 321:77-85, 2010
23. Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular diagnostics and predictors in thyroid cancers. *Thyroid* 19:1351-1361, 2009

7. 첨부서류