

기관고유연구사업 최종보고서

편집순서 1 : 겉표지 (앞면)

(과제번호 : 0910121)

연구과제명 (국문): 구강암에서 apelin/APJ signaling의
angiogenesis관련 역할 규명

연구과제명 (영문):Role of apelin/APJ signaling related
tumor angiogenesis in oral cancer

과제책임자 : 최 성 원

국립암센터

편집순서 1 : 겉표지 (측면, 뒷면)

(뒷면)

(측면)

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

국립암센터 연구사업 결과물
연구과제명: apelin/APJ signaling과 tumor angiogenesis 관련 연구

제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “구강암에서 apelin/APJ signaling의 angiogenesis 관련 역할 규명” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2012. 1 . 31

국립암센터

과 제 책 임 자 : 최성원

연 구 원 : 이해영

” : 박종배

” : 박주용

” : 김윤희

” : 허 균

목 차

< 요약 문 >

(한글) 구강암에서 apelin/APJ signaling의 angiogenesis관련 역할 규명

(영문) Role of apelin/APJ signaling related tumor angiogenesis
in oral cancer

1. 연구의 최종목표
2. 연구의 내용 및 결과
3. 연구결과 고찰 및 결론
4. 연구성과 및 목표달성도
5. 연구결과의 활용계획
6. 참고문헌
7. 첨부서류

편집순서 4 : 요약문 (한글)

< 요약문 >

| | | | | |
|------------------|--|--|---------|--------------------|
| 연구분야(코드) | 실용화 | 과제번호 | 0910121 | |
| 과제명 | 구강암에서 apelin/APJ signaling의 angiogenesis관련 역할 규명 | | | |
| 연구기간/연구비 (천원) | 합계 | 2009년 1월 1일 ~ 2011년 12월 31일 | 205,000 | |
| | 1차년도 | 2009년 1월 1일 ~ 2009년 12월 31일 | 85,000 | |
| | 2차년도 | 2010년 1월 1일 ~ 2010년 12월 31일 | 60,000 | |
| | 3차년도 | 2011년 1월 1일 ~ 2011년 12월 31일 | 60,000 | |
| 과제책임자 | 성명 | 최성원 | 소속 | 특수암연구과 |
| | 전화번호 | 031-920-1750 | 전자우편 | choiomfs@ncc.re.kr |
| 색인단어 | 국문 | 구강암에서 apelin/APJ signaling의 angiogenesis관련 역할 규명 | | |
| | 영문 | Role of apelin/APJ signaling related tumor angiogenesis in oral cancer | | |

◆ 연구목표

<최종목표>

-구강암에서 apelin/APJ signaling이 종양의 angiogenesis 관련 역할을 규명하고 이를 토대로 apelin/APJ signaling을 표적으로 하는 치료방법을 탐색.

<당해년도 목표>

- apelin/APJ signaling의 구강암에서 tumorigenicity, angiogenesis 관련 역할 규명을 규명
- apelin level, APJ receptor의 유전적 다형성과의 구강암 예후 관련성 규명

◆ 연구내용 및 방법

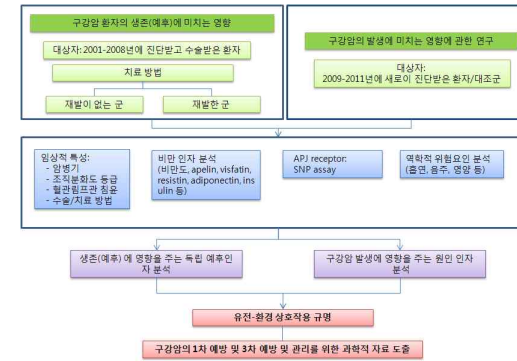
(1) apelin이 구강암의 tumorigenicity, angiogenesis 관련 역할 규명 (in vitro and in vivo)

- apelin 과발현 stable cell line의 cell proliferation, migration, survival, angiogenesis평가
- MTS assay, migration assay, invasion assay, FACS analysis, tube formation assay
- apelin 과발현 세포주를 접종후 4주간 종양형성을 관찰하며 1주에 2회씩 체중 및 종양크기 측정 4주후 mice를 희생하여 종양조직을 채취하고 CD31, apelin/APJ, VEGF/VEGFR의 발현을 면역조직염색 및 immunofluorescence staining을 시행하여 대조군과 비교

(2) 구강암에서 apelin/APJ signaling의 차단을 이용한 종양 억제효과 평가

- 예비실험을 통하여 apelin 치료용 항체의 최적 용량을 설정한다.
- 구강세포주 및 구강암 orthotopic 모델에서 4주간 대조군, apelin 치료용항체, 투여군의 종양억제효과를 평가

-(3) Apelin 및 APJ receptor 유전자의 유전적 다형성과 구강암의 관련성에 관한 분자역학적 연구



◆ 연구성과

-정량적 성과

| 구분 | 달성치/목표치 ¹⁾ | 달성도(%) |
|-----------|-----------------------|--------|
| SCI 논문 편수 | 1 | 100 |
| IF 합 | 3.013 | 100 |
| 기타 성과 | | |

-정성적 성과

- : 구강암에서 새로운 예후인자로서 apelin의 역할을 처음으로 입증함.
- : 구강암세포주에서 hypoxia에 의한 apelin의 induction 확인함.
- : HUVEC 세포주에서 apelin의 angiogenesis 역할을 확인함.
- : 새로운 druggable target으로서 아펠린의 가능성을 확인함.

◆ 참여연구원
(최종연도 참여인원)

성명

이해영, 박주용, 박종배, 허균, 김윤희

편집순서 5 : 요약문 (영문)

Project Summary

| | |
|---|--|
| Title of Project | Role of apelin/APJ signaling related tumor angiogenesis in oral cancer |
| Key Words | Apelin/APJ, oral cancer, tumor angiogenesis |
| Project Leader | Sung Weon Choi |
| Associated Company | |
| <p>1. Final research goal The final goal of this study is to investigate the role of apelin/APJ signaling related tumor angiogenesis in oral cancer, which will develop the new treatment for oral cancer.</p> <p>2. Study methods</p> <p>1) Role of apelin/APJ receptor in oral cancer cell lines in vitro - Analysis of apelin on migration, tube formation assay</p> <p>2) The role of hypoxia for induction of apelin in oral cancer cells - Analysis of apelin expression by RT-PCR, ELISA assay under normoxia and hypoxia</p> <p>3) Effect of knockdown of apelin in oral cancer cell lines - Analysis of ERK signaling change, effect of cell proliferation and migration - western blot analysis, MTT assay, transwell chamber migration assay</p> <p>4) Effect of knockdown of apelin in vivo model - establishment of orthotopic nude mice model for oral tongue cancer - Analysis of tumorigenesis in orthotopic nude mice model by injection of ShApelin oral cancer cells</p> <p>5) Clinical correlation of apelin expression in oral cancer patients - Analysis of apelin expression by immunohistochemistry and analysis of clinical correlation between apelin expression and clinicopathologic factors</p> <p>3. Results</p> <p>-apelin immunoreactivity was localized in the cytoplasm of oral squamous cell carcinoma at various intensities. Strong apelin expression significantly correlated with tumor recurrence and disease free survival.</p> <p>-apelin expression was up-regulated under hypoxic conditions and exogenous apelin enhanced proliferation and migration in oral cancer cells (oral oncology 2012 in press).</p> | |

편집순서 6 : 연구결과

1. 연구의 최종목표

(1) 최종목표 :

- 구강암에서 apelin/APJ signaling이 종양의 angiogenesis 관련 역할을 규명하고 이를 토대로 apelin/APJ signaling을 표적으로 하는 치료방법을 탐색.

(2) 연차별 목표 및 내용

(단위 : 천원)

| 구분 | 목표 | 내용 및 범위 | 연구비 |
|-------------------------------|---|---|--------|
| 1차년도 (2009.1.1-2009.12.31) | 구강암에서 apelin의 tumorigenicity, angiogenesis 관련 역할 규명을 규명 | 확립된 apelin 과발현 세포주 및 HUVEC의 in vitro angiogenesis 평가 및 환자구강암조직에서의 apelin 발현 분석 | 85,000 |
| | 구강암 발병 및 예후에 미치는 apelin APJ receptor의 유전적 다형성과의 관련성 규명 | apelin과 구강암 예후와의 관련성 규명과 APJ receptor 유전자의 단일염기변이를 분석하여 개별 유전자의 유전적 다형성과 구강암의 발생에 대한 영향을 규명 | |
| 2차년도 (2010.1.1-2010.12.31) | 구강암에서 apelin의 tumorigenicity, angiogenesis 관련 역할 규명을 규명 | 구강암 orthotopic mice model에서 apelin knockdown 세포주의 tumor growth 평가 | 60,000 |
| 3차년도 (2011.1.1-2011.12.31) | 구강암에서 apelin signaling의 차단을 이용한 치료법 탐색 | 구강암 in vitro, in vivo orthotopic model에서 anti-apelin 치료용 항체의 anti-tumor 효과 탐색 | 60,000 |

연구사업의 필요성

(1) 구강암 치료의 현실

- 구강암은 5년 생존율이 50%로 다른 호발암에 비하여 완치율이 높은 암이다. 그러나 림프절 전이나 전신전이 발생하면 완치가능성이 전이가 발생하지 않은 환자에 비하여 50% 감소함. 현재 구강암의 치료법은 수술 및 방사선이 주를 이루고 있으며 전이를 예방하거나 전이가 발생한 환자의 치료는 기존의 5-FU 또는 cisplatin 약제를 이용한 항암화학요법이 주된 치료방법으로 만족할 만한 결과를 얻지 못하고 있어 구강암의 예후를 현저하게 저하시키는 전이 및 침습적 재발의 주된 기여 인자들의 발굴 및 분자수준의 기전연구와 함께 적절한 치료법이 절실히 요구되는 상황임.

- tumor angiogenesis는 구강암의 전이나 진행을 위하여 필수적인 요소이다. 따라서 tumor

angiogenesis에 관여하는 다양한 인자를 표적으로 하는 치료방법이 개발된다면 구강암 환자의 치료효과를 획기적으로 증진시킬 수 있을 것이다. 지금까지 알려진 proangiogenic factors 중 가장 대표적인 vascular endothelial growth factor (VEGF)는 다양한 암종에서 과발현 되고 있으며, 특히 VEGF-A는 pathologic angiogenesis에서 가장 중요한 역할을 하는 기여인자로 알려져 있다 (Ferrara et al., 2003). 최근에는 VEGF-C가 VEGF-A와 함께 구강암의 전이에 중요한 역할을 한다는 결과가 보고 되었다 (Nakazato et al., 2006).

(2) Antiangiogenic therapy

- 위에서 언급한대로 VEGF-A가 tumor angiogenesis에 중요한 역할을 하는 표적이 분명한 만큼 VEGF/VEGFR(vascular endothelial growth factor receptor) 신호전달 경로를 차단하는 치료용 항체나 tyrosine kinase inhibitors들이 만들어져 전임상 또는 임상시험 단계에 투입되어 치료효과를 높인다는 많은 연구보고 되고 있다 (Kerbel., 2006).

- 그러나 한편으로는 다른 angiogenic factor의 과발현을 통하여 VEGF/VEGFR 표적으로 하는 치료제에 저항성이 발생하는 보고가 있어(Casanovas et al., 2005), VEGF 단독 표적으로 하는 antiangiogenic therapy에는 한계가 있음을 알 수 있다. 따라서 tumor angiogenesis에 관여하는 다른 다양한 proangiogenic factor를 발굴하여 VEGF와 상호 관련성을 밝히고 또한 VEGF 경로와 다른 angiogenesis 경로를 밝히는 것이 기존의 알려진 치료제의 내성을 극복하고 치료효과를 높이는 데 중요하다 하겠다.

(3) Physiologic angiogenesis에서의 apelin/APJ signaling

- APJ (angiotensin receptor like-1)는 ligand인 Apelin의 receptor 로 G-protein coupled receptor이다. APJ receptor 는 Human immunodeficiency virus (HIV) 의 coreceptor 로 알려져 HIV 치료와 관련하여 알려지기 시작하였다. zebrafish 모델에서, *APJ* homologues (*angiotensin receptor like 1b*)를 knock-out 하였을 때 혈관발생의 perturbation이 되지 않으며 hypoxia 상태에서 혈관의 재생이 감소된다는 결과가 보고 되었다 (Cox et al., 2006). 또한 apelin null mouse에서는 wild type에 비하여 혈관형성이 지연되며 혈관의 직경을 조절한다는 결과를 보고 하였다 (Kasai et al., 2008).

- 또한 apelin은 혈관내피세포의 migration과 proliferation을 증가시키며 matrigel assay에서 angiogenesis를 유발함 (Masri et al., 2004).

- 위의 연구결과 보고로 부터 apelin/APJ signaling이 embryonic angiogenesis와 physiologic angiogenesis에서 VEGF와 마찬가지로 중요한 역할을 하는 것을 할 수 있다. 이와 함께 pathologic angiogenesis 특히 악성종양의 혈관형성에도 관여할 수 있음.

(4) Tumor angiogenesis에서의 apelin/APJ signaling

- tumor angiogenesis에서의 apelin/APJ 경로의 역할은 단 2개의 논문에서 언급하고 있을 정도

로 초기단계의 연구상태이다. 유방암세포주에 apelin을 과발현시킨 세포주를 동물 모델에 주입하면 종양의 초기단계 성장을 억제하며 종양조직에서 CD31이 과발현 되는데 이는 종양증식이 apelin이 paracrine 효과에 의한 tumor angiogenesis를 촉진한다는 사실을 보여주는 결과이다 (Audigier et al., 2007).

- 최근 연구보고에서 다양한 암조직에서 apelin 발현을 분석한 결과 간암, 방광암, 위암에서는 비교적 발현정도 약하며 반면에 대장암이나. 피부암, 췌장암에서 비교적 과발현 된다는 보고가 있음 (Audigier et al., 2007).

- 또한 뇌종양중 고악성도인 glioblastoma multiforme 조직의 혈관증식 부위에 apelin/APJ이 과발현되어 tumor angiogenesis와에 관여 한다고 하였음 (Kalin et al., 2007).

(4) apelin/APJ의 구강암에서의 역할 규명

- 최근 apelin이라는 물질이 비만 관련인자로 연구되고 있음. Apelin은 7-transmembrane domain receptor 계열의 orphan G protein-coupled receptor인 APJ receptor의 endogenous ligand 인데, 비만의 발병기전과 관련하여 최근 여러 가지 연구가 활발히 이루어지고 있음. 또한 APJ receptor 유전자의 유전적 다형성과 비만, 심혈관질환, 당뇨 등의 관련성 연구가 최근 시작되고 있는데, 이는 유전자의 유전적 다형성과 비만, 또는 비만 관련인자와의 상호작용에 의해 질병 발생에 기여하는지를 연구하는 것임.

- 또한 apelin은 혈관내피세포의 migration과 proliferation을 증가시키며 matrigel assay에서 angiogenesis를 유발함 (Masri et al. 2004). 또한 이러한 angiogenesis 관련 역할이 adipogenesis에서도 중요하며 apelin은 adipocyte에서 분비되는 것으로 알려짐. 지금까지 알려진 결과 보고로 부터 apelin/APJ signaling이 embryonic angiogenesis와 physiologic angiogenesis에서 VEGF와 마찬가지로 중요한 역할을 하는 것을 할 수 있다. 이와 함께 pathologic angiogenesis 특히 악성종양의 혈관형성에도 관여할 수 있음.

- 본 연구에서는 apelin이 구강암세포주에서도 분비되고 구강암세포증식에 관여하며 endothelial cell의 증식이나 이동에도 관여하여 angiogenesis에 관여한다는 사실을 토대로 하여 apelin/APJ signaling이 구강암에서 paracrine and autocrine mechanism으로 tumor angiogenesis에 작용하는 중요한 인자라고 생각하였다 (Fig. 1). 따라서 본 과제에서는 apelin/APJ signaling이 종양의 angiogenesis 관련 역할을 규명하고 또한 구강암환자에서의 apelin level과 APJ receptor유전적 다형성의 구강암환자의 예후 관련성을 평가하여 이를 토대로 apelin/APJ signaling을 표적으로 하는 치료방법이 새로운 antiangiogenic 치료로서 적용할 수 있는지를 평가하고자 한다.

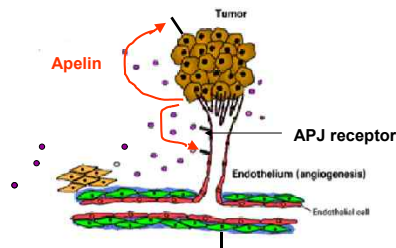


Fig 1. Model of apelin and tumor angiogenesis in oral cancer

2. 연구의 내용 및 결과

A. 구강암에서 apelin의 tumorigenicity, angiogenesis 관련 역할 규명을 규명

1) 연구수행방법

(1) 수술한 구강편평상피조직 파라핀 블록 62예를 apelin, VEGF, carbonic anhydrase IX을 염색하고 다양한 예후인자와 관련성을 분석함.

(2) Hypoxic condition에서 구강암세포주의 apelin 발현 정도 확인

정상 세포 (HUVEC, HBMEC, MSC)와 유방암세포 (MDA-MB-231, MCF7), 뇌종양세포 (U87, U373, LN229, LN428, A172), 구강암세포 (HSC-2, HSC-3, OSC-19)를 normoxia와 hypoxia에서 키운 뒤 각각의 세포를 lysis 하여 (Qiazol, Qiagen) RNA를 추출한 후 reverse transcriptase (Promega)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 그 후, 합성된 cDNA와 apelin primer를 이용하여 PCR을 수행하였다.

RNA extraction

- 각 cell 마다 Qiazol reagent 1ml씩 넣고 harvest 한 후 chloroform 200ul를 첨가하고 30초간 vortexing
- 3분간 상온에서 incubation한 후 4°C, 12,000g로 15분간 centrifugation해서 RNA와 DNA, protein을 분리
- 분리된 층이 섞이지 않게 조심해서 제일 위층의 RNA를 깨끗한 tube로 옮겨 담고, iso-propanol을 500ul 넣어준 다음 잘 섞어서 4°C, 12,000g로 10분간 centrifugation
- Pellet이 떨어지지 않게 조심해서 isopropanol을 제거하고 70% ethanol 1ml 첨가 후 4°C, 7500g로 5분간 centrifugation

- Ehtanol을 깨끗이 제거한 후 상온에서 pellet 5분간 dry

- RNase-free water로 pellet을 녹인 후 정량

RT-PCR

- RNA 1 ug을 0.5 ul oligo(dT)₁₈와 섞은 후 70°C에서 5분간 incubation

- Reverse transcriptase 1 ul 와 RNase inhibitor 0.5 ul, buffer 5 ul를 섞고 RNase-free water로 volume이 25ul이 되게 맞추는 다음 42°C에서 1시간 incubation해서 cDNA를 합성

- 1시간 후 남아있는 reverse transcriptase의 활성을 없애기 위해 75°C에서 15분간 incubation

- 합성된 cDNA 1ul와 apelin primer (100pmole) 0.3ul, 2X Ex-Taq premix를 섞은 후 PCR (95°C에서 5분간 denaturation, 94°C 30초, 50°C 30초, 72°C 30초의 사이클을 25회 반복)

- PCR reaction이 끝난 후 2% agarose gel에 loading 하여 band를 확인

(3) Apelin이 angiogenesis에 미치는 영향 분석

1) Apelin이 angiogenesis를 유도한다는 가정하에 *in vitro* angiogenesis를 확인하기 위해 HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell)을 이용하여 tube formation assay를 수행하였다.

Tube formation assay

- Matrigel coating: 96 well culture plate의 각 well 마다 growth factor reduced Matrigel (BD Biosciences) 원액 70ul를 넣고 37°C에서 30분간 incubation

- HUVEC seeding: 1×10^5 개의 cell을 seeding. 이 때 media에 signal molecules (5% serum, 10ng/ml VEGF와 1nM, 10nM, 100nM apelin)를 각 well 마다 처리함

- 37°C에서 24시간 incubation 후 tube formation 정도를 확인

2) TCM을 이용한 tube formation assay: OSC-19 cell을 density가 70~80%가 되게 seeding 하고 (serum free DMEM) normoxia와 hypoxia에서 24시간 incubation 한 뒤 collection 하였다. 그 후, HUVEC에 OSC-19 cell의 TCM을 처리하여 tube formation 여부를 확인하였다.

(4) Apelin 발현이 knock-down된 stable cell line 확보

1) Apelin mRNA의 발현을 억제하기 위해 5 종류의 putative sequences로 si-Apelin을 제작한 후 (삼천리 제약에 의뢰) 만들어진 si-Apelin을 OSC-19 cell에 transfection 하여 실제 apelin 발현 감소 여부를 RT-PCR을 통해 확인하였다.

Lipofectamine 2000 transfection

- 24well culture plate에 OSC-19 seeding. 이 때 antibiotics free DMEM을 이용
 - 다음 날 50 ul의 OPTI-MEM 에 si-Apelin 과 Lipofectamine 2000 0.5 ul를 각각 dilution 후 상온에서 5분간 incubation
 - 5분 뒤 dilution 한 si-Apelin과 Lipofectamine 2000을 섞고 상온에서 20분간 incubation
 - Mixture를 전날 seeding한 cell에 뿌려준 후 37°C에서 incubation
 - Transfection 4시간 후에 10% FBS DMEM으로 media를 교체
- sh-Apelin trnsfection 24시간 후에 OSC-19 cell을 hypoxia chamber로 옮겨 다시 24시간 incubation 하고, RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하여 mRNA knock-down 여부를 확인 하였다.

2) 5개의 si-Apelin중 가장 효율적인 것으로 확인된 si-APLN4를 이용하여 Lentiviral construct를 제작하였다. Lentiviral vector로는 pLL3.7 vector를 사용하였다.

Lentiviral cloning

- si-APLN4의 sequence를 pLL3.7 vector와 ligation 시키기 위해 XhoI과 HpaI restriction enzyme을 이용해야 하므로 sense 와 anti-sense sequence에 XhoI, HpaI이 인식하는 6개의 sequence를 이어 oligo를 합성 (Bioneer)

Forward oligo:

AACCCCTGTGTTCAATGTTTGTAACTCGAGTTACAAACATTGAACACAGGGTTTTTC
 APLN Sense APLN anti-sense

Backward oligo:

TCGAGAAAAACCCCTGTGTTCAATGTTTGTAACTCGAGTTACAAACATTGAACACAGGGG
 TT

APLN Sense

APLN anti-sense

- 합성된 sense와 anti-sense oligo를 annealing forward와 backward oligo 각각 5 ul와 annealing buffer (100 mM K-acetate, 30mM HEPES, 2mM Mg-acetate) 5 ul를 섞고 3차 증류수로 50 ul volume을 맞춰준 후, 95°C에서 4분, 70°C에서 10분간 incubation 후 상온에서 천천히 식힘
- 만들어진 sh oligo를 pLL3.7 vector와 ligation 먼저, pLL3.7 vector를 XhoI과 HpaI restriction enzyme으로 digestion한 다음 만들어 놓은 sh oligo와 ligation 시킴 (T4 ligase, Promega)
- Ligation 된 construct를 E.coli에 transformation (Heat shock) DH5-α 50ul에 pLL3.7 vector와 pLL3.7-sh-apelin4를 각각 2 ul씩 넣고 42°C에서 1분 30초 간 heat shock을 준 뒤, ice에 2분간 놓아둔 뒤 ampicilin이 들어있는 LB 배지에 spreading 후 37°C에서 overnight incubation
- 다음 날 colony를 따서 LB배지 3ml씩 넣고 키운 후 DNA preparation을 하고 sh-apelin 와 pLL3.7 vector가 ligation이 잘 이루어졌는지 확인하기 위해 XhoI과 HpaI을 처리한 다음 37°C에서 2시간 incubation 후 agarose gel을 이용해서 band를 확인
- Size가 일치하는 construct의 정확한 sequence를 DNA sequencing을 통해 확인

(5) 구강암 orthotopic nude mice model의 확립 및 sh-apelin 세포주의 in vivo tumorigenicity 확인

- OSC19세포주 1x10⁴, 5x10⁴, 1x10⁵, 5x10⁵ 를 혀에 접종하여 4주 동안 관찰하여 설암 형성을 위한 적정 세포주수 확인
- 형성된 설암조직을 채취하여 조직학적으로 관찰(apelin 면역염색, H-E staining)
- apelin knockdown 된 세포주의 in vivo tumorigenesis 확인
- 설암의 orthotopic 모델로 nude mice의 혀에 발생한 종양의 육안적 비교
- apelin knockdown 세포주를 접종후 4주간 종양형성을 관찰하며 1주에 2회씩 체중 및 종양크기 측정함
- 4주 후 mice를 희생하여 종양조직을 채취하고 CD31염색하여 microvessel density를 측정함.

2) 연구결과

(1). 아펠린 과발현은 구강암의 불량한 예후와 관련됨.

- 62례의 구강편평상피세포암 조직을 apelin, VEGF, carbonic anhydrase IX (CA9)을 면역염색을 시행하고 예후인자와의 관련성을 분석하였음 (Fig. 2.)

- Apelin의 발현정도를 weak (1+), moderate (2+), strong (3+)의 3단계로 분류하여 3+와 1,2+의 두그룹으로 나누어 분석하였음. apelin의 과발현은 진행된 병기와 관련성이 있었으며 VEGF intensity와 관련성이 있었음 (Table 1). 예후인자와 관련하여 univariate Cox regression 분석에서는 apelin, 환자의 연령, N stage, 병기, 분화도, CA9이 관련성이 있었지만 VEGF는 구강암의 예후인자와 관련성이 없었음 (Table 2). multivariate analysis에서도 CA9, 연령과 함께 apelin이 중요한 예후인자임 (Table 3).

- apelin의 과발현은 worse disease free survival과 관련성이 있었음 (Fig. 3)..

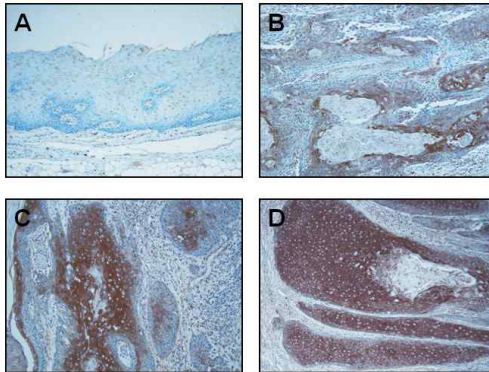
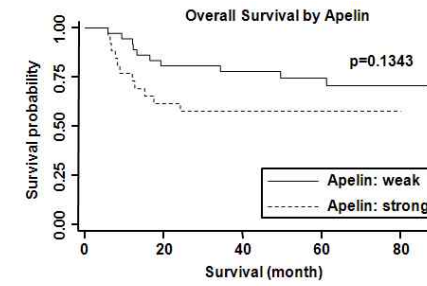


Fig. 2. Immunohistochemical staining of expression of apelin oral squamous cell carcinoma tissues. A.normal squamous epithelium adjacent to tumor. B. 1+ apelin expression of tumor. Weak and focal immunostaining is identified. C. 2+ , focal and strong apelin expression. D. 3+ apelin expression. Diffuse and strong immunostaining is identified. (Original magnification x100, A-D)



B

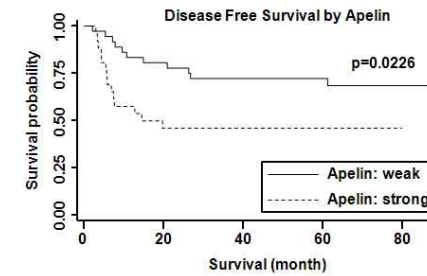


Fig.3. Kaplan- Meier curves for the overall (A) and disease free survival(B) of the patient with OSCC, according to apelin expression as determined by immunohistochemistry. Strong expression of apelin in the tumors was a significant prognostic factor for disease free survival: n=62.

Table 1. Correlation of clinicopathologic factors and expression of apelin in patients with oral squamous cell carcinoma

| | | No. of patients (%) | Apelin | | p-value |
|----------------------------|------------|---------------------|------------|------------|---------|
| | | | Weak(%) | Strong(%) | |
| Age (Median: 56.5 [24-80]) | <40 | 8 (12.90) | 3 (37.50) | 5 (62.50) | 0.262 |
| | ≥40 | 54 (38.71) | 33 (61.11) | 21 (87.10) | |
| Gender | Male | 37 (59.68) | 22 (59.46) | 15 (40.54) | 0.787 |
| | Female | 25 (40.32) | 14 (56.00) | 11 (44.00) | |
| Smoking | Non Smoker | 24 (38.71) | 14 (58.33) | 10 (41.67) | 0.973 |
| | Smoker | 38 (61.29) | 22 (57.89) | 16 (42.11) | |
| Primary Lesion | Tongue | 37 (59.68) | 24 (64.86) | 13 (35.14) | 0.187 |
| | Other | 25 (40.32) | 12 (48.00) | 13 (52.00) | |
| Secondary Lesion | No | 51 (82.26) | 30 (58.82) | 21 (41.18) | 0.794 |
| | Yes | 11 (17.74) | 6 (54.55) | 5 (45.45) | |
| T stage | 1/2 | 37 (59.68) | 23 (62.16) | 14 (37.84) | 0.426 |
| | 3/4 | 25 (40.32) | 13 (52.00) | 12 (48.00) | |
| N Stage | N0 | 33 (53.23) | 22 (66.67) | 11 (33.33) | 0.143 |
| | N+ | 29 (46.77) | 14 (48.28) | 15 (51.72) | |
| Stage | Early | 19 (30.65) | 14 (73.68) | 5 (26.32) | 0.098 |
| | Advanced | 43 (69.35) | 22 (51.16) | 21 (48.84) | |
| Differentiation | Well | 33 (53.23) | 19 (57.58) | 14 (42.42) | 1.000* |
| | Moderate | 26 (41.94) | 15 (57.69) | 11 (42.31) | |
| | Poor | 3 (4.84) | 2 (66.67) | 1 (41.94) | |
| Recurrence | Yes | 24 (37.71) | 10 (41.67) | 14 (58.33) | 0.038 |
| | No | 38 (61.29) | 26 (68.42) | 12 (31.58) | |
| CA9 expression | weak | 19 (30.65) | 11 (57.89) | 8 (42.11) | 0.887 |
| | moderate | 22 (35.48) | 12 (54.55) | 10 (45.45) | |
| | strong | 21 (33.87) | 13 (61.90) | 8 (38.10) | |
| VEGF expression | weak | 23 (37.10) | 16 (69.57) | 7 (30.43) | 0.327 |
| | moderate | 21 (33.87) | 10 (47.62) | 11 (52.38) | |
| | strong | 18 (29.03) | 10 (55.56) | 8 (44.44) | |

Table 2 Univariate analysis of various prognostic factors in patients with oral squamous cell carcinoma

| | Hazard ratio | P-value | 95% CI for hazard ratio | |
|--------------------------|--------------|---------|-------------------------|--------|
| Apelin | | | | |
| Weak | 1.0 | | | |
| Strong | 2.447 | 0.027 | 1.106 | 5.416 |
| Age | | | | |
| <40 | 1.0 | | | |
| ≥40 | 0.246 | 0.002 | 0.101 | 0.601 |
| Gender | | | | |
| Male | 1.009 | 0.983 | 0.452 | 2.248 |
| Smoking | | | | |
| Non Smoker | 1.106 | 0.809 | 0.488 | 2.506 |
| Primary Lesion | | | | |
| Tongue | 1.0 | | | |
| Other | 0.788 | 0.568 | 0.348 | 1.784 |
| Secondary Primary | | | | |
| Yes | 1.35 | 0.554 | 0.50 | 3.70 |
| T stage | | | | |
| 1/2 | 1.0 | | | |
| 3/4 | 1.195 | 0.349 | 0.823 | 1.735 |
| N stage | | | | |
| N0 | 6.960 | <.0001 | 2.586 | 18.733 |
| Stage | | | | |
| Early | 1.0 | | | |
| Advanced | 2.380 | 0.002 | 1.371 | 4.133 |
| Differentiation | | | | |
| Well | 1.0 | | | |
| Moderate | 2.761 | 0.022 | 1.157 | 6.590 |
| Poor | 6.684 | 0.006 | 1.747 | 25.581 |
| CA9 | | | | |
| Weak | 1.0 | | | |
| Moderate | 3.459 | 0.059 | 0.952 | 12.576 |
| Strong | 4.948 | 0.014 | 1.390 | 17.537 |
| VEGF | | | | |
| Weak | 1.0 | | | |
| Moderate | 1.255 | 0.641 | 0.483 | 3.260 |
| Strong | 1.250 | 0.656 | 0.468 | 3.338 |

Table 3 Multivariate analysis of various prognostic factors in patients with oral squamous cell carcinoma

| | Hazard ratio | P-value | 95% CI for hazard ratio | |
|------------------------|--------------|---------|-------------------------|--------|
| Apelin | | | | |
| Weak | 1.0 | | | |
| Strong | 3.279 | 0.012 | 1.298 | 8.289 |
| Age | | | | |
| <40 | 1.0 | | | |
| >=40 | 0.232 | 0.025 | 0.064 | 0.834 |
| N stage | | | | |
| | 3.203 | 0.035 | 1.085 | 9.459 |
| Stage | | | | |
| Early | 1.0 | | | |
| Advanced | 1.748 | 0.138 | 0.836 | 3.656 |
| Differentiation | | | | |
| Well | 1.0 | | | |
| Moderate | 2.384 | 0.078 | 0.908 | 6.259 |
| Poor | 2.231 | 0.369 | 0.387 | 12.856 |
| CA9 | | | | |
| Weak | 1.0 | | | |
| Moderate | 6.822 | 0.028 | 1.227 | 37.935 |
| Strong | 8.577 | 0.010 | 1.660 | 44.309 |

(2) 아펠린은 구강암세포주의 proliferation과 migration을 증가시킴 (Fig.4).

-HSC-3 세포주에 apelin 처리 하면 구강암세포주의 증식과 함께 migration이 증가하는 것을 확인함

-이와 함께 구강암세포주에 처리한 apelin에 의하여 pERK활성이 증가됨을 확인함.

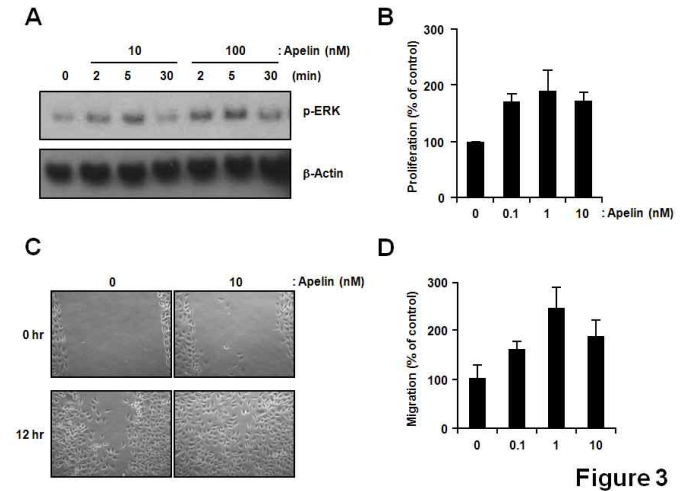


Fig. 4. Apelin stimulates proliferation and migration of HSC-3 oral squamous cells. (A) Western blot using antibodies against phosphorylated form of ERK and b-actin from cells treated with 10 or 100 nM of apelin for indicated times. (B) Proliferation of HSC-3 cells was measured by MTT assay after 96 hrs treatment with 0.1, 1, or 10 nM of apelin. (C) HSC-3 cells were grown in 6-well plates and wounded by scratch with pipette and treated with or without 10 nM of apelin. The pictures ($\times 100$) were taken at the same place at 0 and 12 hrs after the wound. (D) HSC-3 cells were plated in the upper chamber of a Boyden chamber transwell system. Apelin (0, 0.1, 1, or 10 nM) was added to the lower chamber, and the cells were allowed to migrate 6 hrs. Cells were fixed and stained with Diff-Quick reagent. All migrated cells were counted in the membrane field by a blind observer at $\times 100$ magnification.

(3) 아펠린은 hypoxia에 의하여 그 발현이 증가되며 HIF-a 경로에 의하여 조절됨(Fig.5).

-구강암세포주 HSC-2, HSC-3, OSC-19, KB, Ca9.22 의 apelin 발현량과 hypoxic condition에서의 apelin mRNA, 단백질 발현을 확인하기 위해 RT-PCR과 ELISA assay를 시행함. 그 결과, 대부분의 구강암세포주에서 normoxia보다 hypoxia상태에서 apelin mRNA와 단백질 발현이 증가됨을 확인함.

- 구강암세포주에서 hypoxia에 의한 apelin expression이 HIF-1a의 조절을 받는 것인지를 알기 위하여 HIF-1a siRNA를 이용하여 apelin mRNA의 발현정도를 평가하였음. hypoxia 상태에서 siHIF-1a에 의하여 apelin 발현이 감소함.

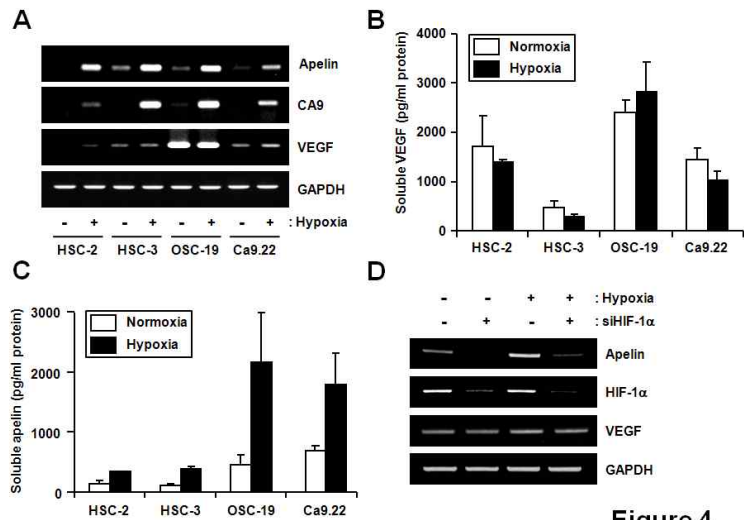


Fig. 5. Hypoxia activates induction and secretion of apelin. (A) HSC-2, HSC-3, OSC-19, and Ca9.22 cells were cultured under normoxic (N) or hypoxic (H) conditions for 8 hrs. Total RNA was isolated from cells and the levels of apelin, CA9, VEGF, and GAPDH were determined by RT-PCR. The levels of soluble VEGF (B) or Apelin (C) were measured by ELISA kit.

(4) apelin은 혈관내피세포(HUEVC)의 혈관생성을 증가시킴(Fig 6).

-Apelin이 angiogenesis를 유도하는지 확인하기 위해 HUVEC을 이용하여 in vitro tube formation assay를

수행한 결과, 10 nM의 apelin을 처리했을 때 tube forming이 잘 이루어지는 것을 확인함.

-apelin을 분비하는 OSC-19 cell의 conditioned media를 이용해서 tube formation assay를 수행함.. normoxia와 hypoxia에서 24 시간동안 OSC-19 배양후 수집한 media를 HUVEC에 처리하고 tubeformation을 수행한 결과 tube forming이 잘 이루어지는 것을 확인함.

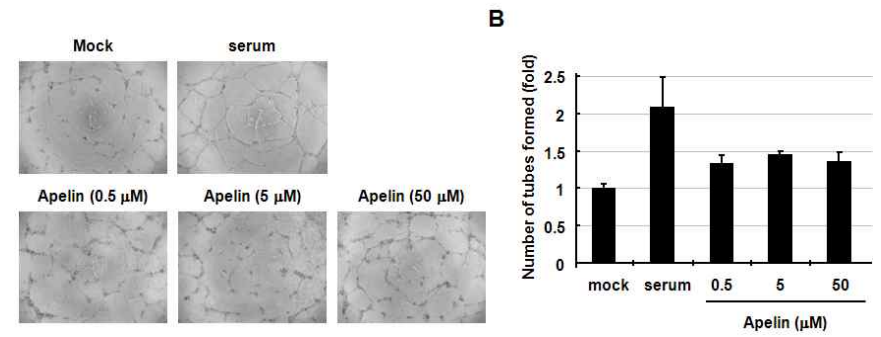


Fig.6, Apelin induced tube formation in HUVEC

(5) 설암동물모델에서 Apelin knockdown에 의한 종양형성 감소는 관찰되지 않았음.

- 구강암세포주에서 apelin knockdown을 시행하고 (Fig.7) 설암동물모델에서 종양형성이 감소될 것을 기대하였으나 control과 비교하여 변화가 없었음 (Fig.8)

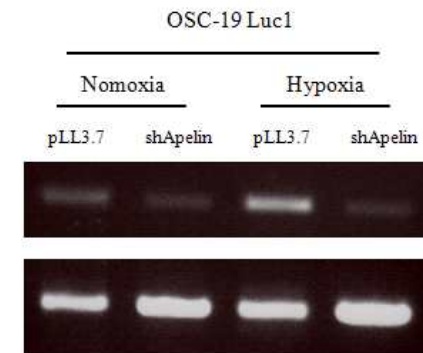


Fig.7 Establishment of pLL3.7-shApelin in OSC-19 oral cancer cell line

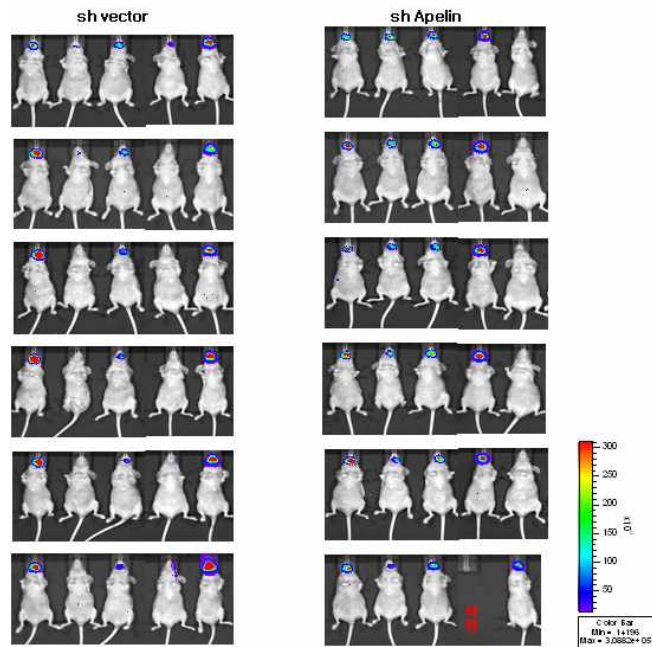


Fig. 8. Apelin suppression does not inhibit tumorigenesis in orthotopic in vivo model of tongue cancer

B. 구강암 발병 및 예후에 미치는 apelin APJ receptor의 유전적 다형성과의 관련성 규명

1) 연구수행방법

(1) 연구대상자

① 연구 대상자1

2000년부터 2008년까지 구강암으로 진단받고 수술/치료를 받은 환자중 조직학적으로 확진되고 IHC가 판독 가능한 환자 170명

② 연구 대상자2

구강암으로 처음 진단되어 조직학적으로 확진되고 연구에 참여하기로 동의한 환자군(n=90명)과 조직 검사를 통해 암이 발견되지 않은 정상대조군 (n=90내외)을 대상으로 함(1차년도 30명 목표, 2차년도 30명 목표, 3차년도 30명 목표). 35세 미만이거나 70세 이상인자와 간경변, 신부전, 고혈압을 제외한 심혈관계 질환자와 기대 만성질환자, 그리고 유전성암 환자와 정신과적 질환으로

치료병력이 있거나 알콜 중독자는 제외되었음.

(2) 기관윤리심사위원회 및 생명윤리 심사위원회 심의

본 연구의 환자 모집 방법, 조사 내용(개인 정보 및 유전자 검사), 가능한 부작용, 연구 참여자의 권익 등 연구 전반에 관한 윤리적 검토를 받음. 고지된 동의서 문구에 대한 심의를 받음(2009년 2월 16일: **Protocol No. NCCNCS-09-219**).

(3) 임상 조사

임상양상 및 임상경과 조사(연도별 환자 수, 환자 분포 % , 생존율, 병기별 생존율, 임파선전이 %), 병기, 조직분화도 등급의 차이, 혈관림프관침윤 차이, 폐경 여부, 치료 방법 등 조사.

(4) 위험요인 및 생활습관 조사

인구학적 요인, 생식력, 흡연력, 음주력, 사회경제적 요인, 질병력, 가족력 등, 기타 관련 요인.

(5) 신체계측

- 신장

신장계는 영점 보정을 정기적으로 시행하며, 표준 측정 자세 (발뒤꿈치, 엉덩이, 등, 머리의 뒷부분이 수직판에 접촉)를 확인한 후에 측정하였으며, 0.1cm 단위까지 측정.

- 체중

체중계의 영점을 확인 후에 계기판의 숫자가 고정될 때를 읽어 체중을 측정. 100 g단위까지 측정.

(5) 혈장 Apelin 농도

ELISA 방법을 이용하여 측정(Human apelin-12 ELISA kit, Catalog Nr. EK-057-23, Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA, USA)

(6) 혈장 visfatin, resistin, adiponectin, insulin 농도

Fasting blood로부터 혈장을 분리한 후 분석 전까지 -80°C에서 보관함. Visfatin과 resistin은 commercial enzyme immunoassay kits (Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA and Phoenix Pharmaceuticals)를 이용하여 분석. Adiponectin과 insulin 농도는 commercial solid-phase ELISA kits (B-Bridge International, Sunnyvale, CA and BioSource, Nivelles, Belgium)를 이용하여 분석.

(7) 식품섭취 조사

개발된 SQFFQ(semiquantitative food frequency questionnaire)를 이용하여 최근 1년간의 식습관에 대하여 각 식품 항목의 평균섭취 빈도와 1회 섭취분량을 조사하여 영양소계산 소프트웨어를 이용하여 영양소로 전환한 후 범주형 로짓 회귀분석을 통한 구강암의 상대 위험도를 추정함

(8) 혈액으로부터 genomic DNA 추출

혈액에서 얻은 buffy coat로부터 DNA를 추출 (QIAamp DNA Blood Midi kit, QIAGEN, Hilden, Germany)하고 DNA quantity/quality를 측정 (Spectrophotometry, GeneQuant II, Pharmacia, Cambridge, UK)한 후 SNP 분석에 이용.

(9) 유전적 다형성 분석

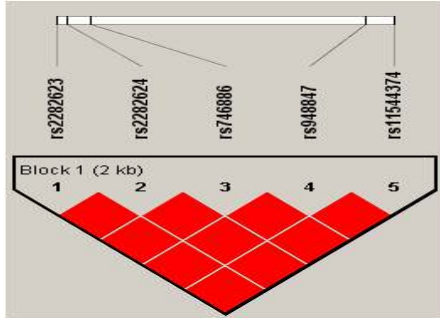
| Name | Features | Position | Genepos | Alle |
|----------------------------|----------|----------------|-----------|------------|
| rs12389693 | | chrX:128601533 | 14756 A/G | Downstream |
| rs12559080 | V HFG | chrX:128599504 | 16785 C/T | Downstream |
| rs12559440 | V | chrX:128605173 | 11116 C/T | Downstream |
| rs12689891 | | chrX:128622652 | -6364 C/T | Promoter |

| | | | | |
|----------------------------|-------|----------------|------------|-------------------|
| rs12861986 | V | chrX:128606216 | 10073 C/T | Downstream |
| rs16999530 | V HFG | chrX:128624031 | -7743 C/T | Promoter |
| rs16999531 | V HFG | chrX:128624631 | -8343 C/T | Promoter |
| rs16999532 | V HFG | chrX:128626519 | -10231 G/T | Promoter |
| rs17267847 | V HFG | chrX:128604715 | 11574 C/T | Downstream |
| rs17314547 | V HFG | chrX:128597140 | 19149 C/T | Downstream |
| rs17314554 | V HFG | chrX:128597598 | 18691 C/T | Downstream |
| rs2142779 | V | chrX:128618413 | -2125 A/G | Promoter |
| rs2235306 | V HFG | chrX:128611779 | 4510 C/T | Intron |
| rs2235307 | V HFG | chrX:128612513 | 3776 C/T | Intron |
| rs2235308 | V HFG | chrX:128612893 | 3396 A/G | Intron |
| rs2235309 | V HFG | chrX:128612982 | 3307 C/T | Intron |
| rs2235310 | V HFG | chrX:128613984 | 2305 C/T | Intron |
| rs2235311 | V HFG | chrX:128614355 | 1934 A/G | Intron |
| rs2235312 | V HFG | chrX:128614776 | 1513 A/G | Intron |
| rs2281068 | V HFG | chrX:128615454 | 835 C/T | Intron |
| rs2281069 | V | chrX:128616395 | -107 A/G | 5' UTR |
| rs2362931 | V HFG | chrX:128603624 | 12665 C/T | Downstream |
| rs3115757 | V HFG | chrX:128610093 | 6196 C/G | Intron |
| rs3115758 | V HFG | chrX:128609545 | 6744 G/T | 3' UTR |
| rs3115759 | V HFG | chrX:128609197 | 7092 A/G | 3' UTR |
| rs3115837 | V HFG | chrX:128600335 | 15954 A/G | Downstream |
| rs3115838 | V | chrX:128602915 | 13374 A/G | Downstream |
| rs3115840 | V HFG | chrX:128621759 | -5471 C/G | Promoter |
| rs3116753 | V | chrX:128601488 | 14801 G/T | Downstream |
| rs3116754 | V HFG | chrX:128603256 | 13033 A/T | Downstream |
| rs3131263 | V HFG | chrX:128597089 | 19200 A/C | Downstream |
| rs3131264 | V HFG | chrX:128605307 | 10982 G/T | Downstream |
| rs3131266 | V HFG | chrX:128606018 | 10271 A/G | Downstream |
| rs3131268 | V HFG | chrX:128625186 | -8898 A/G | Promoter |
| rs35018661 | | chrX:128619001 | -2713 A/G | Promoter |
| rs35758587 | | chrX:128607941 | 8348 G/T | 3' UTR |
| rs35974509 | | chrX:128600044 | 16245 A/G | Downstream |
| rs3761578 | V HFG | chrX:128618837 | -2549 G/T | Promoter |
| rs3761579 | | chrX:128618511 | -2223 A/C | Promoter |
| rs3761580 | | chrX:128618401 | -2113 G/T | Promoter |
| rs3761581 | V HFG | chrX:128617402 | -1114 G/T | Promoter |
| rs41310464 | | chrX:128607738 | 8551 C/T | 3' UTR |
| rs41334247 | | chrX:128610238 | 6051 A/G | Intron (boundary) |
| rs41402051 | V HFG | chrX:128625081 | -8793 C/T | Promoter |
| rs4140652 | | chrX:128612445 | 3844 A/T | Intron |
| rs41462146 | | chrX:128607464 | 8825 G/T | 3' UTR |
| rs55770920 | V | chrX:128606888 | 9401 C/T | Downstream |
| rs56132499 | | chrX:128625687 | -9399 A/G | Promoter |
| rs56204867 | V | chrX:128618148 | -1860 A/G | Promoter |
| rs56769211 | | chrX:128597074 | 19215 A/C | Downstream |
| rs57031213 | | chrX:128622756 | -6468 C/T | Promoter |
| rs57967681 | V | chrX:128612617 | 3672 C/G | Intron |
| rs59010477 | V | chrX:128612553 | 3736 A/C | Intron |
| rs59022370 | | chrX:128624343 | -8055 A/G | Promoter |
| rs59147522 | | chrX:128609670 | 6619 C/T | Intron (boundary) |
| rs5932643 | V HFG | chrX:128597343 | 18946 A/G | Downstream |
| rs59614429 | | chrX:128597150 | 19139 C/T | Downstream |
| rs5975126 | V | chrX:128608073 | 8216 C/G | 3' UTR |
| rs5975128 | | chrX:128619922 | -3634 A/T | Promoter |
| rs5975129 | V | chrX:128620283 | -3995 A/G | Promoter |
| rs5975130 | V | chrX:128625494 | -9206 A/G | Promoter |
| rs5977123 | V HFG | chrX:128597340 | 18949 C/T | Downstream |
| rs5977124 | V HFG | chrX:128600140 | 16149 C/G | Downstream |
| rs5977126 | V | chrX:128610217 | 6072 A/G | Intron (boundary) |

| | | | | |
|----------------------------|-------|----------------|-----------|-------------------|
| rs5977127 | | chrX:128612064 | 4225 C/T | Intron |
| rs5977128 | | chrX:128613559 | 2730 C/T | Intron |
| rs5977129 | | chrX:128613923 | 2366 C/G | Intron |
| rs5977130 | V | chrX:128616071 | 218 C/T | Intron |
| rs5977131 | | chrX:128619766 | -3478 G/T | Promoter |
| rs5977132 | V | chrX:128619777 | -3489 A/G | Promoter |
| rs59833359 | | chrX:128598716 | 17573 A/G | Downstream |
| rs59924651 | | chrX:128598189 | 18100 A/C | Downstream |
| rs60106611 | V | chrX:128612103 | 4186 A/T | Intron |
| rs60142615 | | chrX:128619221 | -2933 A/G | Promoter |
| rs60893260 | V | chrX:128611858 | 4431 C/T | Intron |
| rs61247277 | V | chrX:128612980 | 3309 A/G | Intron |
| rs61363233 | | chrX:128608023 | 8266 C/G | 3' UTR |
| rs62608321 | | chrX:128597904 | 18385 C/T | Downstream |
| rs6637637 | V HFG | chrX:128602462 | 13827 C/T | Downstream |
| rs6637638 | | chrX:128608065 | 8224 A/C | 3' UTR |
| rs6637639 | | chrX:128610975 | 5314 C/T | Intron |
| rs70680876 | V HFG | chrX:128602362 | 13927 A/T | Downstream |
| rs70961723 | | chrX:128607938 | 8351 G/T | 3' UTR |
| rs73225572 | V | chrX:128605572 | 10717 A/G | Downstream |
| rs734975 | V HFG | chrX:128611565 | 4724 A/G | Intron |
| rs73555100 | V | chrX:128605421 | 10868 C/G | Downstream |
| rs73556887 | V | chrX:128622986 | -6698 C/T | Promoter |
| rs73556890 | V | chrX:128624126 | -7838 C/T | Promoter |
| rs73556894 | V | chrX:128625014 | -8726 A/G | Promoter |
| rs73556900 | V | chrX:128625357 | -9069 C/T | Promoter |
| rs73556902 | V | chrX:128626151 | -9863 A/G | Promoter |
| rs73633911 | | chrX:128601466 | 14823 G/T | Downstream |
| rs73633912 | | chrX:128613955 | 2334 A/G | Intron |
| rs73633913 | | chrX:128614454 | 1835 A/G | Intron |
| rs7473814 | | chrX:128624277 | -7989 C/T | Promoter |
| rs760696 | V HFG | chrX:128599082 | 17207 C/T | Downstream |
| rs7878332 | | chrX:128609881 | 6408 C/T | Intron |
| rs7888268 | | chrX:128619047 | -2759 A/G | Promoter |
| rs880738 | V HFG | chrX:128598428 | 17861 A/G | Downstream |
| rs909656 | V HFG | chrX:128610243 | 6046 G/T | Intron (boundary) |
| rs909657 | V HFG | chrX:128611248 | 5041 A/G | Intron |

| APLNR | chr11:56757630-56761503 | | NM_005161 | | | |
|---------|-------------------------|----------|------------|-------------|-------|--------|
| tag No. | rs number | Position | Annotation | Location | MAF | Allele |
| tag1 | rs2282624 | 56758487 | 2568A/G | 3' UTR | 0.477 | T:C |
| | rs746886 | 56758687 | 2368C/T | 3' UTR | 0.467 | G:A |
| | rs2282623 | 56758402 | 2653A/G | 3' UTR | 0.465 | C:T |
| tag2 | rs11544374 | 56761153 | -99A/G | promoter | 0.318 | C:T |
| | rs948847 | 56760920 | G45G | coding exon | 0.378 | T:G |
| | rs3115759 | | | | | |
| | rs3115758 | | | | | |
| | rs3761581 | | | | | |
| | rs909656 | | | | | |
| | rs5977126 | | | | | |

G6070C
T-1860C
rs5975126

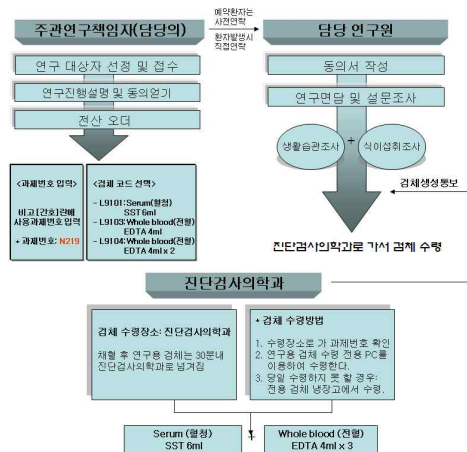


(10) 생존율 분석

침윤성과 비침윤성을 포함하는 전체 대상 자료에 대해 생존율을 산출하고, 침윤성 자료만을 대상으로 한 생존율을 따로 구함.

2) 연구결과

1) 구강암 역학연구 프로토콜 개발



1) 대상자 선정 및 접수 ▶ 담당의

(1) 담당의가 연구대상자로 적합한 대상자 선정

※ 전적으로 담당의의 판단에 의함.

가. Inclusion criteria

- ㄱ. 2001-2008년에 구강암으로 진단받은 대상자 (F/U 대상자)
- ㄴ. 구강암으로 진단되어 조직학적으로 확진된 대상자 (신환)
- ㄷ. 연구 참여에 동의한 대상자

나. Exclusion criteria

- ㄱ. 유전성암 환자
- ㄴ. 정신과적 질환으로 치료병력이 있는 대상자
- ㄷ. 알코올 중독자
- ㄹ. 연구에 영향을 미칠 정도의 중증의 기타 만성질환자

(2) 연구 참여 구두 동의

가. 연구 진행에 필요한 설문조사에 대해 간략히 설명

(3) 대상자 연구원 인계

① 추적관찰 대상자

가. 대상자의 예약시간 확인 후, 담당 선생님이 연구원에게 연락.

담당연구원: 유 민정(암역학연구과) / 구내☎22212

나. 연락 후 정해진 시간 및 장소에서 대상자 면담조사 실시

② 신환

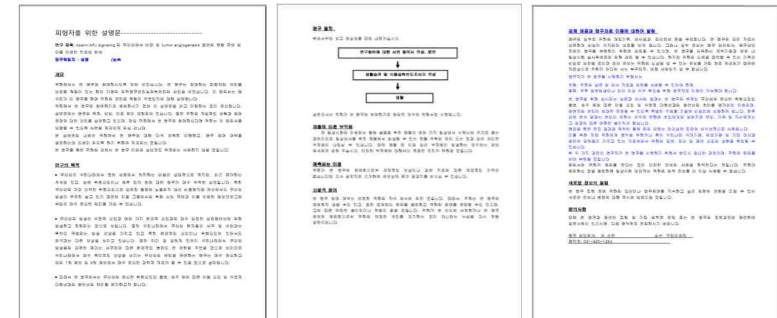
가. 신환 발생시, 적절한 시간에 맞추어 외래에서 담당 연구원에게 연락

나. 담당 연구원은 정해진 시간에 대상자와 면담 실시

※ 만약, 외래 진료시 대상자 면담조사 미실시시에는, 대상자 수술 후 병동에서 면담조사를 실시하도록 함. 담당의의 확인 필수

2) 연구 면담 및 동의서 작성 ▶ 담당 연구원

가. 환자에게 구강암 연구에 대해 다시 간략하게 설명하고 동의서 서명.



<피험자 설명문>

ㄱ. 피험자 연구참여 동의문

- 내용 숙지 후 동의하는 항목에 체크함.
- 나. 피험자 검체제공 동의문
 - 내용 숙지 후 동의하는 항목에 체크함.
- 다. 피험자 연구자료이용 동의문
 - 내용 숙지 후 동의하는 항목에 체크함.
- 라. 피험자 서명란
 - 연구참여 동의, 검체제공 동의, 연구자료이용 동의를 모두 한 대상자에 한하여 피험자의 서명을 받음.
 - 가장 하단에는 담당의 서명을 반드시 받도록 함.

(가) 아래 내용을 읽으시고 네모 안에 v표시하여 주십시오.

본인은 이 동의서를 읽었고, 내용을 충분히 이해합니다. 예 아니오

본인을 알람의 사람부터 자세하게 설명을 받고 궁금한 사항이 있으면 질문을 하였고 적절한 답변을 들었습니다. 예 아니오

본인을 자발적으로 이 연구에 참여합니다. 예 아니오

본인은 임상시험 기간 중 언제든지 중도에 임상시험 참여를 거부하거나 중단할 수 있습니다. 또 본인은 이 연구 참여를 중단하더라도 본인에게 어떠한 불이익도 없다는 것을 알고 있습니다. 예 아니오

(나) 관제 제공에 대하여

본인이 본 연구에 참여하여 제공한 정보는 질병 유무 진단을 위한 검사와 유전자 분석에 사용되는 것에 동의합니다. 예 아니오

본인의 정보를 이용하여 파생한 결과나 개발에 대한 저작권 및 권리가 본인에게 있음을 이해합니다. 예 아니오

본인이 본 연구에 계속 참여하기를 원치 않을 때는 언제든지 본 연구의 참여를 거부하고 제공한 정보를 파기하도록 요구할 수 있고, 또한 이에 따른 본인에 대한 어떠한 불이익도 없음을 이해합니다. 예 아니오

(다) 연구자료 이용에 대하여

연구자가 본인의 자료와 검체를 사용하는 것에 대해 동의합니다. 예 아니오

연구자가 우리나라 국가기관, 의료기관 및 기타 건강과 관련된 단체들의 자료원에 있는 본인의 질병과 건강에 관련된 정보를 검색하는데 동의합니다. 예 아니오

본인이 향후 질병이 발생할 경우, 연구자가 본인의 질병 진단의 정확성과 치료의 적절성에 대한 정보를 확인하기 위해 본인의 의무기록을 열람하는 것에 동의합니다. 예 아니오

(라)

날 짜 200__년__월__일__시__분
 피험자 _____(인) 또는 서명
 진 화 _____

본인을 연구에 대하여 피험자 또는 피험자에게 충분히 설명하였음을 확인합니다.
 날 짜 200__년__월__일__시__분
 담당 의사 _____(인) 또는 서명

1. 검사대상자 (가) 생년월일

| | | | |
|---------|----|-----|------|
| 검사대상자 | 성명 | (가) | 생년월일 |
| 법정대리인 | 성명 | | 생년월일 |
| 상담자 | 성명 | (L) | 생년월일 |
| 동의서작성일자 | 년 | 월 | 일 |

2. 검사대상물의 처리: 검사 후 즉시 폐기 보존

3. 보존한다면 검사대상물의 보존기간: 5년 동의권자가 결한 기간: (10_년)

4. 본래 목적 외로 검사대상물을 이용하거나 타인에게 제공하는 것에 대한 동의 여부: 동의하지 않음 동의함

5. 검사대상물을 이용하거나 타인에게 제공하는 때에 개인정보 포함여부: 개인정보 제외할 것 개인정보 포함

서명 검사대상자 (가)
 법정대리인 (L)
 상 담 자 (L)

- 가. 피험자 서명란.
- 나. 담당연구원 서명란.
- 다. 검체 제공 동의서의 항목 중 검사 대상물 처리에 관한 항목으로 반드시 설명 후 표기

- (3) 연구번호 부여
 - 연구번호는 **시스템 등록 시 부여되는 번호** 및 연구원이 **직접 부여**하는 연구번호 총 2개의 연구번호로 관리한다.
 - 부여되는 2개의 연구번호는 대상자를 식별하는 고유기호로서 겹치지 않도록 관리하며 대상자에게서 발생하는 모든 연구자료(설문지, 동의서, 검체 등)에 연구번호를 기록한다.
 - 연구번호체계 (8자리) / 직접 부여하는 연구번호 : 병원번호(H12) + "1" + 일련번호3) 면접설문조사 실시
- 4) 설문조사: 일반사항 조사
 - 실제 조사 설문지(일부)

나. 유전자 검사 동의서

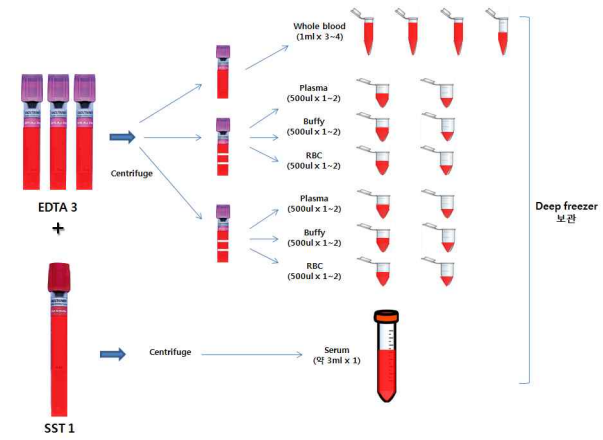
그림. 식품섭취빈도조사지

2) 준비사항

- (1) FFQ 시작 전에 조사목적을 밝혀 환자의 적극적 태도를 유도한다.
(예. '지금부터 영양소 종류에 따른 섭취량을 파악하기 위한 조사를 시작하겠습니다.')
- (2) 식습관 변화가 있기 전을 기준으로 최근 1년의 평균 섭취량을 파악하도록 한다. 1년중 10회 정도 섭취하는 식품은 월 1회로 기록하며, 10회 미만의 경우 섭취안함에 해당한다.
- (3) 대상자와 안정된 공간에서 1:1 면접으로 실시하며, 인터뷰어가 직접 기록한다.
- (4) 평상시 섭취량에 가장 가까운 식품섭취량을 조사하는 것이 중요하다.

▪ 생체시료 채취

전체적인 모식도는 아래의 그림과 같다. 진단검사의학과에서 받은 각 환자당 EDTA 8ml(4ml X 3)와 Plain 6ml(6ml x 1)의 총 18ml의 생체시료를 준비한다.



그리고 사전에 웹상에서 출력한 고유의 bar code를 분주될 새로운 tube에 부착한다. 먼저 EDTA(4ml) 3개 중에서 1개는 원심분리를 하지 않고 1.5ml tube에 1ml로 나누어서 분주하고 마지막으로 남은 나머지는 1ml이 되지 않더라도 분주하여 보관 한다.

그리고 EDTA(4ml) 3개 중에서 2개는 각각 원심분리를 하여 3개의 층으로 구분되면 제일 위에 있는 상층액 부터 plasma, buffy, RBC 순으로 500ul 단위로 각 tube에 분주하며 남은 양은 500ul가 되지 않더라도 분주하여 보관한다.

또한, Plain(=SST)는 원심 분리하여 상층액을 15ml tube에 분주하여 보관한다. 따라서 한명의 환자당 Whole blood(3~4개), Plasma(1~2개), Buffy(1~2개), RBC(1~2개), Serum(약 3ml)이 생성 되며 분주된 모든 시료는 -70℃의 deep freezer(-70℃)에 보관한다.

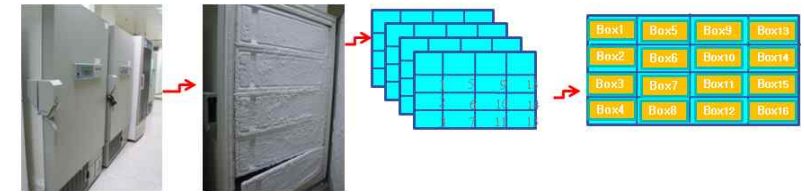


그림. 생체시료 보관

(2) Bar code 사용 세부연구센터

- 웹 시스템에 등록된 대상자의 Bar code를 출력하여 각 micro tube에 부착하도록 함



그림. 바코드 사용

■ 임상검사결과 자료 수집

1. 수집 자료 목록

1) 병원임상결과(방문일별)

| 항목 | 내용 |
|----------------|--|
| 등록번호 | 8자리의 숫자 |
| 환자명 | 이름, 성명 |
| 성별 | 남자, 여자 |
| 나이 | 수술시 나이 |
| 생년월일 | (년-월-일) |
| 입원일 | (년-월-일) |
| 퇴원일 | (년-월-일) |
| 혈액형 ABO | A, B, O, AB |
| 교육수준 | 초졸이하, 중졸, 고졸, 대졸, 대학원이상 |
| 종교 | 기독교, 불교, 천주교, 기타 |
| 신장 | 124~180 (cm) |
| 체중 | 34~98 (kg) |
| BMI | 14~46 (비만도 : kg/cm ² *10000) |
| 진단일 | 구강암으로 진단받은 날짜 |
| 진단명 | SCC |
| 부위 | 암발생 부위 |
| 수술일 | 수술받은 날짜 |
| 치료방법 | 수술+방사선치료 |
| Tstage | T1, T2, T3, T4 |
| Nstage | N0, N1, N2, N3, N+ |
| Stage | stage1(T1N0), stage2(T2N0), stage3(T3N0,T2N1), stage4(T4N0,T2N2) |
| 분화도 | well, moderate, poor |
| 방사선치료(Y/N) | 방사선치료의 유무(Yes, No) |
| second primayr | second primayr(Yes, No) |
| 상병이력 | 고혈압, 당뇨, 기타질환 |
| 약물복용(Y/N) | 약물복용의 유무(Yes, No) |
| 흡연(Y/N) | 흡연경험의 유무(Yes, No) |
| 흡연량 | 1갑을 켜 경우에는 20개피 |
| 음주 | 음주경험의 유무(Yes, No) |
| 음주량 | 1병기준으로 4잔이면 0.5병 |
| 횟수 | 30일 기준 |
| 음주기간 | 1년 기준 |
| 가족력(Y/N) | Yes, No |
| 가족관계1 | 아버지 |
| 가족관계2 | 어머니 |
| 가족관계3 | 형제, 자매 |
| 가족관계4 | 친인척 |
| 재발 | Yes, No |
| 재발날짜 | (년-월-일) |
| 최종 F/U | 마지막 외래방문일자 |
| 사망일 | (년-월-일) |

※ 위 진단명은 프로토콜에 따라 작성 후 담당의의 확인을 거쳐 최종 확인을 할 수 있도록 한다.

The top screenshot displays a detailed patient record for P42 in an Excel spreadsheet. The data includes:

- Demographics:** 30012530, F, 39, 2001-05-31, 2001-06-30, O, 대졸, 기독교, 161, 44, 16.97, 2001-05-29, scc, Tongue, 2001-06-07, 수술+방사선
- Medical History:** 20006475, M, 34, 2001-06-25, 2001-07-07, A, 고졸, 무교, 163.6, 60.3, 22.53, 2001-06-18, scc, Tongue, 2001-06-28, 수술+방사선
- Family History:** 30037786, F, 75, 2001-09-18, 2001-10-20, O, 초졸이하, 무교, 146.6, 60.8, 28.29, 2001-08-17, scc, Tongue, 2001-09-20, 수술
- Current Patient:** 30072556, M, 65, 2001-12-01, 2001-12-29, B, 중졸, 무교, 170, 59, Tongue, 2001-11-19, scc, Tongue, 2001-12-04, 수술
- Other Patients:** 30115181, M, 29, 2002-03-04, 2002-06-05, AB, 고졸, 무교, 177.5, 73.8, 23.42, 2002-02-22, scc, Tongue, 2002-03-07, 수술+방사선
- Additional Data:** 30141490, F, 66, 2002-05-07, 2002-05-18, AB, 초졸이하, 기독교, 142.5, 53, 26.10, 2002-04-22, scc, Tongue, 2002-05-09, 수술
- Family History (continued):** 30145872, M, 31, 2002-05-20, 2002-06-25, O, 중졸, 무교, 177.8, 99.85, 31.59, 2002-05-06, scc, Tongue, 2002-05-23, 수술+방사선
- Other Patients:** 30181520, F, 73, 2002-08-01, 2002-08-06, A, 한글학특목과, 무교, 138.2, 37.2, 19.48, 2002-07-12, scc, other, 2002-07-12, 방사선
- Family History (continued):** 30187713, M, 73, 2002-08-19, 2002-09-21, A, 초졸이하, 무교, 163.8, 59, 21.46, 2002-07-29, scc, Mouth floor, 2002-08-22, 수술+방사선
- Other Patients:** 30195149, M, 52, 2002-08-31, 2002-11-15, AB, 대졸, 무교, 166.6, 74.6, 26.88, 2002-08-07, scc, Tongue/soft palate, 2002-09-05, 수술+방사선
- Family History (continued):** 30253539, M, 69, 2002-12-10, 2003-01-11, A, 중졸, 가톨릭, 154.7, 44.7, 18.68, 2003-01-25, scc, buccal cheek, 2002-12-12, 수술+방사선
- Other Patients:** 30254721, M, 63, 2003-01-30, 2003-02-18, B, 대졸, 무교, 164, 44, 16.36, 2002-11-29, scc, Mouth floor, 2003-02-10, 수술+방사선
- Family History (continued):** 20088749, M, 81, 2003-01-18, 2003-02-07, B, 초졸이하, 무교, 158, 53, 21.23, 2003-01-06, scc, other, 2003-01-21, 수술
- Other Patients:** 30282393, M, 74, 2003-01-21, 2003-04-15, B, 초졸이하, 무교, 157.5, 50.9, 20.52, 2003-01-17, scc, palate, 2003-01-30, 수술+방사선
- Family History (continued):** 30260935, M, 64, 2003-02-03, 2003-03-20, O, 초졸이하, 무교, 166, 77, 27.94, 2003-01-24, scc, Mouth floor, 2003-02-13, 수술+방사선
- Other Patients:** 20093411, M, 48, 2003-02-06, 2003-04-29, B, 초졸이하, 무교, 168, 80, 28.34, 2003-01-17, scc, buccal cheek, 2003-02-11, 수술+방사선
- Family History (continued):** 30289486, F, 72, 2003-03-03, 2003-04-03, O, 초졸이하, 기독교, 152, 43, 18.61, 2003-02-05, scc, Tongue, 2003-03-06, 수술+방사선
- Other Patients:** 30339886, F, 82, 2003-05-23, 2003-06-20, B, 언중, 가톨릭, 144.5, 62.4, 29.88, 2003-05-21, scc, Tongue, 2003-05-29, 수술
- Family History (continued):** 30337602, F, 38, 2003-05-31, 2003-07-25, O, 중졸, 무교, 160, 73, 26.52, 2003-05-15, scc, Tongue, 2003-05-05, 수술+방사선
- Other Patients:** 30341834, M, 54, 2003-06-09, 2003-06-30, O, 언중, 무교, 163.8, 72.5, 27.02, 2003-05-26, scc, Tongue, 2003-06-13, 수술+방사선
- Family History (continued):** 30344972, M, 70, 2003-06-16, 2003-06-19, A, 대졸, 무교, 175.5, 86.6, 28.12, 2003-05-30, scc, Tongue, 2003-06-24, 수술+방사선
- Other Patients:** 30333484, M, 62, 2003-05-12, 2003-05-16, A, 초졸이하, 무교, 158.3, 46.9, 18.72, 2003-05-07, scc, Tongue, 2003-05-07, 수술
- Family History (continued):** 30363050, F, 43, 2003-07-05, 2003-07-19, O, 언중, 무교, 169, 72, 25.21, 2003-06-27, scc, Tongue, 2003-07-08, 수술
- Other Patients:** 30360950, M, 70, 2003-07-10, 2003-09-20, O, 초졸이하, 무교, 166.9, 65.9, 23.66, 2003-05-05, scc, other, 2003-07-14, 수술+방사선
- Family History (continued):** 30385524, M, 70, 2003-08-16, 2003-09-05, A, 중졸, 무교, 168.4, 62.9, 22.18, 2003-08-08, scc, other, 2003-08-19, 수술+방사선
- Other Patients:** 30378432, M, 38, 2003-08-19, 2003-09-30, AB, 대졸, 기독교, 160.7, 56.8, 21.99, 2003-07-25, scc, Tongue, 2003-08-21, 수술+방사선
- Family History (continued):** 30418099, F, 63, 2003-10-11, 2003-11-13, B, 언중, 무교, 161.7, 55.4, 21.19, 2003-10-10, scc, retromolar trigone, 2003-10-14, 수술+방사선
- Other Patients:** 30421817, M, 39, 2003-10-17, 2003-11-12, A, 고졸, 무교, 170.3, 79, 25.17, 2003-10-17, scc, other, 2003-10-18, 수술+방사선
- Family History (continued):** 30449442, F, 67, 2003-12-10, 2004-03-27, O, 초졸이하, 기독교, 150, 57.5, 25.56, 2003-10-08, scc, Tongue, 2003-12-12, 수술+방사선
- Other Patients:** 30448324, M, 67, 2003-12-20, 2004-03-06, B, 언중, 무교, 159.1, 52.7, 20.82, 2003-12-05, scc, retromolar trigone, 2003-12-13, 수술+방사선
- Family History (continued):** 30454381, M, 47, 2003-12-29, 2004-01-20, AB, 고졸, 무교, 171, 67.1, 22.95, 2003-12-17, scc, Tongue, 2003-12-30, 수술+방사선
- Other Patients:** 30457892, F, 71, 2004-01-10, 2004-02-04, O, 언중, 기독교, 149, 52.9, 23.83, 2003-12-29, scc, Tongue, 2004-01-13, 수술+방사선
- Family History (continued):** 30468715, M, 68, 2004-01-12, 2004-02-12, AB, 한글학특목과, 무교, 163.5, 58.5, 21.36, 2004-01-08, scc, other, 2004-01-15, 수술
- Other Patients:** 30464939, M, 67, 2004-01-26, 2004-02-28, B, 초졸이하, 무교, 156.8, 66.6, 27.09, 2004-01-05, scc, retromolar trigone, 2004-01-27, 수술
- Family History (continued):** 30475047, M, 63, 2004-02-09, 2004-02-18, A, 고졸, 무교, 171, 80, 27.36, 2004-01-30, scc, Tongue, 2004-02-10, 수술
- Other Patients:** 30496283, M, 61, 2004-03-04, 2004-03-29, A, 고졸, 무교, 171.8, 80.75, 27.36, 2004-02-27, scc, Tongue, 2004-03-05, 수술

The bottom screenshot shows a summary table for H20 in an Excel spreadsheet. The data includes:

- Columns:** M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W
- Row 1:** BMI, 진단일, 진단명, 부위, 수술일, 치료방법, Tstage, Nstage, U, V, 분화도, 방사선치료Y
- Row 2:** 16.97, 2001-05-29, scc, Tongue, 2001-06-07, 수술+방사선, 2, NO, 2, 2, Y
- Row 3:** 22.53, 2001-06-18, scc, Tongue, 2001-06-28, 수술+방사선, 1, NO, 1, 1, Y
- Row 4:** 18.71, 2001-07-11, scc, Tongue, 2001-07-20, 수술+방사선, 2, NO, 2, 1, Y
- Row 5:** 28.29, 2001-08-17, scc, Tongue, 2001-09-20, 수술, 2, N+, 3, 3, N
- Row 6:** 23.42, 2002-02-22, scc, Tongue, 2002-03-07, 수술+방사선, 2, N+, 3, 1, Y
- Row 7:** 26.10, 2002-04-22, scc, Tongue, 2002-05-09, 수술, 1, NO, 1, 1, N
- Row 8:** 31.59, 2002-05-06, scc, Tongue, 2002-05-23, 수술+방사선, 1, N+, 4, 1, Y
- Row 9:** 21.46, 2002-07-29, scc, Mouth floor, 2002-08-22, 수술+방사선, 1, NO, 1, 2, Y
- Row 10:** 26.88, 2002-08-07, scc, Tongue/soft palate, 2002-09-05, 수술+방사선, 3, NO, 3, 1, Y
- Row 11:** 18.68, 2002-11-25, scc, buccal cheek, 2002-12-12, 수술+방사선, 2, N+, 3, 2, Y
- Row 12:** 16.36, 2002-11-29, scc, Mouth floor, 2003-02-10, 수술+방사선, 4, N+, 4, 2, Y
- Row 13:** 21.23, 2003-01-06, scc, other, 2003-01-21, 수술, 2, NO, 2, 1, N
- Row 14:** 20.52, 2003-01-17, scc, palate, 2003-01-30, 수술+방사선, 2, N+, 3, 2, Y
- Row 15:** 27.94, 2003-01-24, scc, Mouth floor, 2003-02-13, 수술+방사선, 1, N+, 4, 2, Y
- Row 16:** 28.34, 2003-01-17, scc, buccal cheek, 2003-02-11, 수술+방사선, 4, N+, 4, 1, Y
- Row 17:** 18.61, 2003-02-05, scc, Tongue, 2003-03-06, 수술+방사선, 2, NO, 2, 1, Y
- Row 18:** 29.88, 2003-05-21, scc, Tongue, 2003-05-29, 수술, 1, NO, 1, 2, N
- Row 19:** 28.52, 2003-05-15, scc, Tongue, 2003-06-05, 수술+방사선, 2, N+, 4, 3, Y
- Row 20:** 27.02, 2003-05-26, scc, Tongue, 2003-06-13, 수술+방사선, 2, NO, 2, 2, Y
- Row 21:** 28.12, 2003-05-30, scc, Tongue, 2003-06-24, 수술+방사선, 4, N+, 4, 1, Y
- Row 22:** 18.72, 2003-05-07, scc, other, 2003-07-01, 수술, 3, N+, 3, 2, N
- Row 23:** 25.21, 2003-06-27, scc, Tongue, 2003-07-08, 수술, 1, NO, 1, 1, N
- Row 24:** 23.66, 2003-06-25, scc, other, 2003-07-14, 수술+방사선, Tx, N+, 3, 2, Y

■ 구강암역학연구 Web system 구축 및 자료 수집

1. Case-control study 결과

Table 4. Distribution of potential risk factors in cases and controls by gender.

| | Male | | | Female | | |
|--|-------------|-------------|----------------------|-------------|-------------|----------------------|
| | Case | Control | p value ¹ | Case | Control | p value ¹ |
| Age, year | 55.2 ± 0.7 | 43.2 ± 1.1 | <.0001 | 56.4 ± 1.2 | 50.7 ± 0.8 | <.0001 |
| BMI(body mass index),kg/m ² | 22.6 ± 0.2 | 23.8 ± 0.2 | 0.615 | 24.1 ± 0.3 | 23.2 ± 0.2 | 0.009 |
| Height, cm | 167.1 ± 0.3 | 171.3 ± 0.4 | <.0001 | 154.1 ± 0.5 | 157.5 ± 0.3 | <.0001 |
| Weight, kg | 66.1 ± 0.6 | 69.8 ± 0.6 | <.0001 | 57.3 ± 0.7 | 58.0 ± 0.5 | 0.409 |
| Smoking status | | | | | | |
| Non-smoker | 211 (62.2) | 75 (38.5) | | 12 (6.6) | 14 (5.2) | |
| Smoker | 128 (37.8) | 120 (61.5) | <.0001 | 170 (93.4) | 255 (94.8) | 0.535 |
| Duration of smoking (year) | | | | | | |
| Non-smoker | 134 (39.0) | 120 (61.5) | | 173 (93.5) | 260 (96.7) | |
| 0-10 | 22 (6.4) | 23 (11.8) | | 5 (2.7) | 5 (1.9) | |
| 11-20 | 47 (13.7) | 17 (8.7) | | 4 (2.2) | 0 (0.0) | |
| 21-30 | 69 (20.1) | 23 (11.8) | | 1 (0.5) | 2 (0.7) | |
| >30 | 72 (20.9) | 12 (6.2) | <.0001 | 2 (1.1) | 2 (0.7) | 0.129 |
| Pack-year | | | | | | |
| Non-smoker | 138 (40.1) | 119 (61.0) | | 173 (93.5) | 258 (95.9) | |
| 0-10 | 30 (8.7) | 28 (14.4) | | 7 (3.8) | 7 (2.6) | |
| 11-20 | 88 (25.6) | 41 (21.0) | | 2 (1.1) | 3 (1.1) | |
| >20 | 88 (25.6) | 7 (3.6) | <.0001 | 3 (1.6) | 1 (0.4) | 0.522 |
| Alcohol consumption | | | | | | |
| Non-drinker | 181 (53.4) | 152 (78.0) | | 19 (10.4) | 130 (48.3) | |
| Drinker | 158 (46.6) | 43 (22.1) | <.0001 | 163 (89.6) | 139 (51.7) | <.0001 |
| Duration of drinking (year) | | | | | | |
| Non-drinker | 196 (57.0) | 48 (24.6) | | 168 (90.8) | 146 (54.3) | |
| 1-10 | 17 (4.9) | 50 (25.6) | | 5 (2.7) | 49 (18.2) | |
| 11-20 | 44 (12.8) | 43 (22.1) | | 8 (4.3) | 44 (16.4) | |
| 21-30 | 54 (15.7) | 31 (15.9) | | 1 (0.5) | 22 (8.2) | |
| >30 | 33 (9.6) | 23 (11.8) | <.0001 | 3 (1.6) | 8 (3.0) | <.0001 |

¹p value¹ : p values are from t-test for continuous variable and from χ^2 -test for categorical variables.

The screenshots show the following components of the web system:

- Top Left:** Home page with navigation menu and a search bar.
- Top Right:** Main menu with options like '연구정보', '자료', '질문자 답변', and '공지사항'.
- Middle Left:** '대상자등록관리' (Subject Registration Management) table showing columns for ID, name, gender, and date of birth.
- Middle Right:** '대상자등록관리' (Subject Registration Management) form with fields for '대상자번호' and '생년월일'.
- Bottom Left:** '대상자등록관리' (Subject Registration Management) table with columns for '대상자번호', '성명', '성별', '생년월일', '입학일자', and '조사일자'.
- Bottom Right:** '대상자등록관리' (Subject Registration Management) table with columns for '대상자번호', '성명', '성별', '생년월일', '입학일자', and '조사일자'.

Table 5. Odds Ratios (ORs) and their 95% confidence intervals (CIs) of oral cancer in relation to body mass index.

| | Male | | | | Female | | | |
|--------------------------------------|--------------|-----------|--------------------------|--------------------------|--------------|-----------|--------------------------|--------------------------|
| | Control N(%) | Case N(%) | OR (CI 95%) ¹ | OR (CI 95%) ² | Control N(%) | Case N(%) | OR (CI 95%) ¹ | OR (CI 95%) ² |
| Body mass index (kg/m ²) | | | | | | | | |
| <23 | 80(41.0) | 149(43.3) | 1 (ref) | 1 (ref) | 136(50.6) | 78(42.2) | 1 (ref) | 1 (ref) |
| 23~25 | 56(28.7) | 81(23.6) | 0.78(0.50-1.20) | 0.74(0.45-1.23) | 62(23.1) | 35(18.9) | 0.98(0.60-1.62) | 0.85(0.49-1.48) |
| 25≤ | 59(30.3) | 114(33.1) | 1.04(0.69-1.57) | 1.08(0.67-1.74) | 71(26.4) | 72(38.9) | 1.77(1.15-2.72) | 1.48(0.91-2.42) |
| <i>p</i> for linear trend | | | 0.938 | 0.7963 | | | 0.012 | 0.133 |
| Age <50 (year) | | | | | | | | |
| Body mass index (kg/m ²) | | | | | | | | |
| <23 | 53(42.4) | 45(39.1) | 1 (ref) | 1 (ref) | 69(72.6) | 35(53.9) | 1 (ref) | 1 (ref) |
| 23~25 | 32(25.6) | 31(27.0) | 1.14(0.61-2.15) | 0.84(0.41-1.71) | 17(17.9) | 8(12.3) | 0.93(0.37-2.36) | 1.13(0.33-3.82) |
| 25≤ | 40(32.0) | 39(33.9) | 1.15(0.63-2.08) | 0.73(0.38-1.43) | 9(9.5) | 22(33.9) | 4.82(2.01-11.57) | 5.04(1.51-16.82) |
| <i>p</i> for linear trend | | | 0.639 | 0.3629 | | | 0.001 | 0.0114 |
| Age ≥50 (year) | | | | | | | | |
| Body mass index (kg/m ²) | | | | | | | | |
| <23 | 27(38.6) | 104(45.4) | 1 (ref) | 1 (ref) | 67(38.5) | 43(35.8) | 1 (ref) | 1 (ref) |
| 23~25 | 24(34.3) | 50(21.8) | 0.54(0.28-1.03) | 0.70(0.34-1.44) | 45(25.9) | 27(22.5) | 0.94(0.51-1.72) | 1.02(0.51-2.04) |
| 25≤ | 19(27.1) | 75(32.8) | 1.03(0.53-1.98) | 1.94(0.91-4.16) | 62(35.6) | 50(41.7) | 1.26(0.74-2.14) | 1.21(0.65-2.27) |
| <i>p</i> for linear trend | | | 0.916 | 0.1146 | | | 0.399 | 0.5457 |

OR(CI95%)¹:Univariate logistic regression.

OR(CI95%)²:Multivariate logistic regression, adjusted for age, smoking status, alcohol consumption.

Table 6. Odds Ratios (ORs) and their 95% confidence intervals (CIs) of oral cancer in relation to body mass index by smoking and alcohol drinking.

| | Male | | | | Female | | | |
|----------------------------------|--------------|-----------|--------------------------|--------------------------|--------------|-----------|--------------------------|--------------------------|
| | Control N(%) | Case N(%) | OR (CI 95%) ¹ | OR (CI 95%) ² | Control N(%) | Case N(%) | OR (CI 95%) ¹ | OR (CI 95%) ² |
| Smokingstatus ³ | | | | | | | | |
| non-smoker | | | | | | | | |
| <23 | 53(44.2) | 52(40.6) | 1 (ref) | 1 (ref) | 129(50.6) | 65(38.2) | 1 (ref) | 1 (ref) |
| 23-25 | 34(28.3) | 27(21.1) | 0.81(0.43-1.53) | 0.73(0.34-1.54) | 57(22.4) | 35(20.6) | 1.22(0.73-2.04) | 0.98(0.55-1.74) |
| 25≤ | 33(27.5) | 49(38.3) | 1.51(0.84-2.71) | 1.56(0.79-3.08) | 69(27.1) | 70(41.2) | 2.01(1.29-3.15) | 1.58(0.95-2.63) |
| <i>p</i> for linear trend | | | 0.192 | 0.223 | | | 0.002 | 0.083 |
| smoker | | | | | | | | |
| <23 | 27(36.0) | 92(43.6) | 1 (ref) | 1 (ref) | 7(50.0) | 10(83.3) | 1 (ref) | 1 (ref) |
| 23-25 | 22(29.3) | 54(25.6) | 0.72(0.37-1.39) | 0.90(0.43-1.89) | 5(35.7) | 0(0.0) | - | - |
| 25≤ | 26(34.7) | 65(30.8) | 0.73(0.39-1.37) | 0.99(0.49-2.01) | 2(14.3) | 2(16.7) | 0.70(0.08-6.22) | 0.62(0.06-6.12) |
| <i>p</i> for linear trend | | | 0.317 | 0.976 | | | 0.303 | 0.265 |
| Alcohol consumption ⁴ | | | | | | | | |
| non-drinker | | | | | | | | |
| <23 | 20(46.5) | 67(42.4) | 1 (ref) | 1 (ref) | 62(44.6) | 64(39.3) | 1 (ref) | 1 (ref) |
| 23-25 | 9(20.9) | 35(22.2) | 1.16(0.48-2.82) | 1.15(0.46-2.86) | 34(24.5) | 33(20.3) | 0.94(0.52-1.70) | 0.91(0.50-1.65) |
| 25≤ | 14(32.6) | 56(35.4) | 1.19(0.55-2.58) | 1.31(0.59-2.90) | 43(30.9) | 66(40.5) | 1.49(0.89-2.50) | 1.42(0.83-2.42) |
| <i>p</i> for linear trend | | | 0.644 | 0.500 | | | 0.143 | 0.206 |
| drinker | | | | | | | | |
| <23 | 60(39.5) | 77(42.5) | 1 (ref) | 1 (ref) | 74(56.9) | 11(57.9) | 1 (ref) | 1 (ref) |
| 23-25 | 47(30.9) | 46(25.4) | 0.76(0.45-1.29) | 0.60(0.32-1.14) | 28(21.5) | 2(10.5) | 0.48(0.10-2.31) | 0.40(0.07-2.20) |
| 25≤ | 45(29.6) | 58(32.0) | 1.00(0.60-1.68) | 1.02(0.55-1.89) | 28(21.5) | 6(31.6) | 1.44(0.49-4.27) | 2.13(0.59-7.65) |
| <i>p</i> for linear trend | | | 0.946 | 0.999 | | | 0.655 | 0.388 |

OR (CI 95%)¹: Univariate logistic regression.

OR (CI 95%)²: Multivariate logistic regression, adjusted for risk factors.

Smoking status³: adjusted for age, alcohol consumption.

Alcohol consumption⁴: adjusted for age, smoking status.

Table 7. Odds Ratios (ORs) and their 95% confidence intervals (CIs) of oral cancer in relation to smoking.

| | Male | | | | Female | | | |
|----------------------------|--------------|-----------|--------------------------|--------------------------|--------------|-----------|--------------------------|--------------------------|
| | Control N(%) | Case N(%) | OR (CI 95%) ¹ | OR (CI 95%) ² | Control N(%) | Case N(%) | OR (CI 95%) ¹ | OR (CI 95%) ² |
| Smoking status | | | | | | | | |
| non-smoker | 75(38.5) | 211(62.2) | 1 (ref) | 1 (ref) | 14(5.2) | 12(6.6) | 1 (ref) | 1 (ref) |
| smoker | 120(61.5) | 128(37.8) | 0.38(0.26–0.55) | 0.32(0.21–0.48) | 255(94.8) | 170(93.4) | 0.78(0.35–1.72) | 0.71(0.32–1.58) |
| <i>p</i> for linear trend | | | <.0001 | <.0001 | | | 0.536 | 0.397 |
| Duration of smoking (year) | | | | | | | | |
| non-smoker | 120(61.5) | 128(37.9) | 1 (ref) | 1 (ref) | 255(96.6) | 170(93.4) | 1 (ref) | 1 (ref) |
| ≤ 20 year | 40(20.5) | 69(20.4) | 1.62(1.02–2.57) | 3.73(2.15–6.47) | 5(1.9) | 9(5.0) | 2.70(0.89–8.20) | 3.45(1.12–10.58) |
| > 20 year | 35(18.0) | 141(41.7) | 3.78(2.42–5.90) | 2.75(1.71–4.42) | 4(1.5) | 3(1.7) | 1.13(0.25–5.09) | 1.03(0.22–4.81) |
| <i>p</i> for linear trend | | | <.0001 | <.0001 | | | 0.259 | 0.200 |
| Pack-year | | | | | | | | |
| non-smoker | 119(61.0) | 127(38.1) | 1 (ref) | 1 (ref) | 255(95.9) | 170(93.4) | 1 (ref) | 1 (ref) |
| ≤ 10 | 28(14.4) | 30(9.0) | 1.00(0.57–1.78) | 1.22(0.65–2.32) | 7(2.6) | 7(3.9) | 1.50(0.52–4.35) | 1.77(0.60–5.19) |
| > 10 | 48(24.6) | 176(52.9) | 3.44(2.29–5.15) | 3.91(2.51–6.07) | 4(1.5) | 5(2.8) | 1.88(0.50–7.08) | 1.98(0.52–7.55) |
| <i>p</i> for linear trend | | | <.0001 | <.0001 | | | 0.245 | 0.172 |

OR (CI 95%)¹ : Univariate logistic regression.

OR (CI 95%)² : Multivariate logistic regression. Adjusted for age, BMI (body mass index).

2. Survival study 결과

Table 8. Distribution of potential risk factors in cases and controls by recurrence.

| | Recurrence | | <i>p</i> value ¹ |
|--------------------------------------|------------|------------|-----------------------------|
| | non-recur | recur | |
| Age, year | 57.6 ± 1.2 | 51.2 ± 3.7 | 0.05 |
| BMI(bodymassindex) kg/m ² | 24.2 ± 0.3 | 23.4 ± 0.6 | 0.34 |
| Smoking status | | | |
| Non-smoker | 58(46.4) | 11(42.3) | 0.7 |
| Smoker | 67(53.6) | 15(57.7) | |
| Duration of smoking (year) | | | |
| Non-smoker | 58(46.8) | 11(42.3) | 0.92 |
| ≤20 | 26(21.0) | 6(23.1) | |
| >20 | 40(32.3) | 9(34.6) | |
| Pack-year | | | |
| Non-smoker | 58(48.3) | 11(44.0) | 0.93 |
| ≤10 | 18(15.0) | 4(16.0) | |
| >10 | 44(36.7) | 10(40.0) | |
| Alcohol consumption | | | |
| Non-drinker | 65(52.0) | 13(50.0) | 0.85 |
| Drinker | 60(48.0) | 13(50.0) | |
| Duration of drinking (year) | | | |
| Non-drinker | 65(52.0) | 13(52.0) | 0.19 |
| ≤20 | 23(18.4) | 8(32.0) | |
| >20 | 37(29.6) | 4(16.0) | |

p value¹ : *p* values are from t-test for continuous variable and from x²-test for categorical variables.

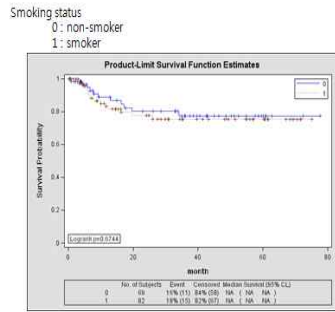


Fig 1. Association between smoking status and oral cancer survival. Kaplan-Meier survival curve (Log-rank test).

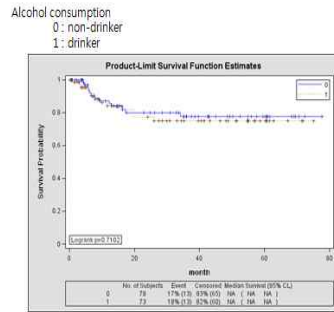


Fig 4. Association between Drinking consumption and oral cancer survival. Kaplan-Meier survival curve (Log-rank test).

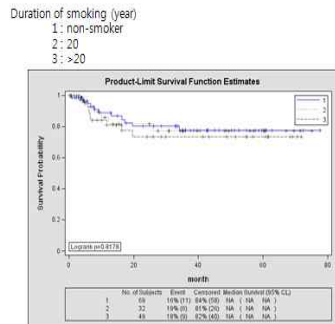


Fig 2. Association between duration of smoking (year) and oral cancer survival. Kaplan-Meier survival curve (Log-rank test).

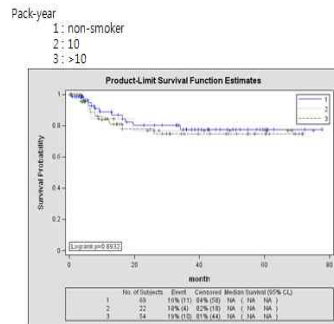


Fig 3. Association between pack-year and oral cancer survival. Kaplan-Meier survival curve (Log-rank test).

Table 9. Hazard Ratios (ORs) and their 95% confidence intervals (CIs) of oral cancer.

| | Recurrence | |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | HR (95% CI) ¹ | HR (95% CI) ² |
| Smoking status | | |
| Non-smoker | 1 (ref) | 1 (ref) |
| Smoker | 1.18 (0.54–2.57) | 1.23 (0.50–3.02) |
| <i>p</i> for linear trend | 0.67 | 0.65 |
| Duration of smoking (year) | | |
| Non-smoker | 1 (ref) | 1 (ref) |
| ≤20 | 1.07 (0.39–2.88) | 0.89 (0.30–2.67) |
| >20 | 1.32 (0.55–3.19) | 1.81 (0.63–5.21) |
| <i>p</i> for linear trend | 0.54 | 0.29 |
| Pack-year | | |
| Non-smoker | 1 (ref) | 1 (ref) |
| ≤10 | 1.13 (0.36–3.54) | 1.26 (0.36–4.47) |
| >10 | 1.23 (0.52–2.90) | 1.36 (0.52–3.59) |
| <i>p</i> for linear trend | 0.63 | 0.54 |
| Alcohol consumption | | |
| Non-drinker | 1 (ref) | 1 (ref) |
| Drinker | 1.16 (0.54–2.50) | 0.90 (0.37–2.21) |
| <i>p</i> for linear trend | 0.71 | 0.81 |
| Duration of drinking (year) | | |
| Non-drinker | 1 (ref) | 1 (ref) |
| ≤20 | 1.69 (0.70–4.07) | 1.10 (0.36–3.37) |
| >20 | 0.63 (0.21–1.93) | 0.63 (0.19–2.07) |
| <i>p</i> for linear trend | 0.61 | 0.48 |

HR (95% CI)¹ : Cox proportional hazards regression.

HR (95% CI)² : Cox proportional hazards regression with adjustments for age, smoking status, alcohol consumption.

3. 연구결과 고찰 및 결론

- Apelin/APJ signaling이 구강암에서의 예후 관련성을 보고한 연구결과는 본 연구에서 처음으로 보고함.

- 최근 apelin/APJ signaling이 endothelial cell에서의 physiologic angiogenesis에 중요한 역할을 한다는 보고가 있음. APJ (angiotensin receptor like-1)는 ligand인 Apelin의 receptor로 G-protein coupled receptor이다. APJ receptor는 Human immunodeficiency virus (HIV)의 coreceptor로 알려져 HIV 치료와 관련하여 알려지기 시작함. zebrafish 모델에서, APJ homologues (*angiotensin receptor like 1b*)를 knock-out 하였을 때 혈관발생의 perturbation이 되지 않으며 hypoxia 상태에서 혈관의 재생이 감소된다는 결과가 보고됨 (Cox et al., 2006). 또한 apelin null mouse에서는 wild type에 비하여 혈관형성이 지연되며 혈관의 직경을 조절한다는 결

과가 보고됨. (Kasai et al., 2008). 또한 apelin은 혈관내피세포의 migration과 proliferation을 증가시키며 matrigel assay에서 angiogenesis를 유발함 (Masri et al., 2004).

-악성종양에서는 유방암 동물모델에서 아펠린은 신생혈관의 증가를 통하여 종양생성을 증가시킨다는 보고를 하였음. 또한 폐암에서도 유방암에서처럼 신생혈관형성 증가를 통하여 tumorigenicity가 증가되며 아펠린의 과발현은 불량한 예후와 관련이 있다고 보고하였음.

- 본 연구 결과를 요약하면 아펠린의 과발현은 불량한 예후와 관련이 있었음. 구강암세포주에 exogenous 아펠린을 투여하면 구강암세포주의 증식과 migration을 증가시키며 또한 ERK signaling을 활성화시키는 것을 관찰함. 또한 hypoxia 상태에서 apelin의 mRNA 발현이 증가하였으며 이러한 상태에서 구강암세포주에서 apelin의 분비가 증가되는 사실을 확인함. HUVEC 세포주에 아펠린을 투여시 tube formation이 증가하여 in vitro angiogenesis 를 확인하였으나 in vivo model에서는 확인하지 못함.

- 본 연구결과를 토대로 apelin/APJ signaling이 구강암의 tumorigenesis에 관여하는 중요한 target으로 생각되며 또한 구강암의 예후인자로서 사용될 수 있을 것으로 사료됨. 구강암의 수술 또는 방사선치료후 재발과 관련된 예후인자로서도 의미 있는 표지자로 생각됨.

-또한 hypoxia와 VEGF에 의하여 apelin/APJ signaling 발현이 조절되는 결과를 고려할 때 apelin signaling은 구강암에서 tumor angiogenesis에도 중요한 역할을 할 것으로 사료되어 본 연구에서 관련성을 연구하였으나 동물모델에서 angiogenesis 축진을 통한 tumorigenicity 증가 소견은 관찰되지 않았음. 이와 관련하여서는 향후 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료됨.

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⁾ |
|--|-----------------------------|--|-----------------------|------------------|----------------------|
| Hypoxia-induced up-regulation of apelin is associated with a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients | 최성원 (교신) | Oral Oncology (3,103) | 2012 in press | 국외 SCI | 0910121 |
| Association of body mass index with oral cancer risk | 최성원 (제1) | J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg | 2006; 53(3):339-45 | 국내 | 0910122 0510540 |

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

| 논문명 | 저자 | 학술대회명 | 지역 ¹⁾ | 지원과제번호 |
|--|-------------|-------------|------------------|---------|
| Clinical significance of apelin expression in oral squamous cell carcinoma | 최성원 (교신) | 대한구강악안면외과학회 | 국내 | 0910121 |
| Hypoxia induced apelin expression in oral cancer cells | 최성원 (교신) | 세계두경부종양학회 | 국외 | 0910121 |

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 |
|------|------|------|
| | | |
| | | |

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

| 최종목표 | 연차별목표 | 달성내용 | 달성도(%) | |
|--|--|---|---------------|-----|
| | | | 연차 | 최종 |
| 구강암에서 apelin/APJ signaling이 종양의 angiogenesis 관련 역할을 규명하고 이를 토대로 apelin/APJ signaling을 표적으로 하는 치료방법을 탐색 | 1차년도 | apelin이 구강에서 angiogenesis관련 역할 규명(in vitro) | 2009 (1년차) | 100 |
| | | 신규연구대상자 등록 연구 대상자의 임상/병리 자료 정리 | | |
| | 구강암 환자의 생존율 분석 | 신규 구강암 환자 등록(2009년) -샘플채취 연구 대상자의 임상/병리 자료 정리(2001~2008년 환자) 구강암 환자의 생존율(overall survival, disease-free survival) 분석 -유전자의 유전적 다형성을 분석하고, 각기 다른 유전형이 구강암 생존에 미치는 영향을 규명 | | |
| 2차년도 | apelin이 구강에서 angiogenesis관련 역할 규명(in vivo) | apelin knockdown된 구강암세포주 확립 shApelin의 in vivo tumorigenity 확인 | 2010 (2년차) | 100 |
| | 3차년도 | 구강암에서 apelin/APJ signaling의 차단을 이용한 치료법 탐색 | | |

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

| 평가의 착안점 | 자 체 평 가 |
|---|--|
| hypoxia에 의한 apelin expression 증가 확인 | hypoxia에 의하여 apelin/APJ 발현이 조절됨. 이는 apelin signaling이 구강암에서 tumor angiogenesis에 관여한다는 중요한 근거가 될 것으로 사료됨. |
| apelin knockdown된 구강암세포주 확립 및 in vitro in vivo effect분석 | 아펠린 knockdown에 의한mRNA, 아펠린 단백질의 변화확인함. in vitro HUVEC의 tube formation증가 확인함. 그러나 in vivo 모델에서 아펠린 억제에 의한 종양형성 감소는 확인하지 못함. |
| 환자 조직에서의 아펠린 발현과 예후 관련성 규명 | 5년 이상 추적관찰한 수술과 방사선치료를 시행받은 구강편평상피세포암 환자 62명에서 치료후 재발과 아펠린 과발현과 연관성이 있었으며 또한 아펠린 과발현은 불량한 생존율과 연관성이 있었음. |

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

| 구 분 | 건 수 | 비 고 |
|-----------|-----|-------------------------------|
| 학술지 논문 게재 | 1 | Clinical Cancer Research(6.3) |
| 산업재산권 등록 | | |
| 기 타 | | |

(2) 연구성과의 활용계획

- 본 연구결과를 토대로 구강암이 아닌 다른 악성종양에서의 아펠린의 예후 관련성과 함께 angiogenesis 관련성 연구를 통하여 예후인자로 적용 가능함.

- 기존 anti-VEGF 치료제를 사용하면서 이러한 치료제에 내성이 발생한 종양이나 환자에서 아펠린 관련성을 연구하여 기존 항신생혈관치료의 내성을 극복할 수 있는지 추가적인 연구가 필요함.

-본 연구결과를 토대로 apelin/APJ signaling을 표적으로 하는 치료법을 시도할 수 있을 것으로

사료됨. 아펠린 receptor인 APJ는 G-protein coupled receptor (GPCR)로 이러한 GPCR은 신약 개발의 좋은 target으로 APJ receptor antagonist 개발을 통하여 기존의 항신생혈관계와 병용 사용시 치료효과를 증가시킬 수 있을 것으로 사료됨.

- 또한 아펠린은 hypoxia에서 발현이 되며 HIF1-a의 downstream 단백질이며 구강암환자조직에서 수술과 방사선치료후 재발 관련인자 임을 고려하면 아펠린은 치료저항성과 관련된 인자로 생각되며 특히 방사선치료 저항성과 관련이 높을 것으로 사료됨. 추후에 아펠린의 방사선치료 저항성관련 연구도 진행하는 것이 필요할 것으로 생각됨.

6. 참고문헌

1. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251:471-476.
2. Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S, Fujii R, Habata Y, Hinuma S, et al. Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J Biol Chem* 2000;275:21061-21067.
3. Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, Hosoya M, Fujii R, Hinuma S, et al. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim Biophys Acta* 2001;1538:162-171.
4. Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y, Nishiwaki S, Iguchi T, Harada S, et al. Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. *J Biol Chem* 2004;279:26274-26279.
5. De Mota N, Reaux-Le Goazigo A, El Messari S, Chartrel N, Roesch D, Dujardin C, et al. Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:10464-10469.
6. Szokodi I, Tavi P, Foldes G, Voutilainen-Myllyla S, Ilves M, Tokola H, et al. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res* 2002;91:434-440.
7. Kasai A, Shintani N, Oda M, Kakuda M, Hashimoto H, Matsuda T, et al. Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:395-400.
8. Cox CM, D'Agostino SL, Miller MK, Heimark RL, Krieg PA. Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Dev Biol* 2006;296:177-189.

9. Sorli SC, Le Gonidec S, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin is a potent activator of tumour neoangiogenesis. *Oncogene* 2007;26:7692–7699.

10. Berta J, Kenessey I, Dobos J, Tovari J, Klepetko W, Jan Ankersmit H, et al. Apelin expression in human non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis. *J Thorac Oncol* 2010;5:1120–1129.

7. 첨부서류

ARTICLE IN PRESS

Oral Oncology xxx (2012) xxx–xxx

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Oral Oncology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/oraloncology



Hypoxia-induced up-regulation of apelin is associated with a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients

Kyun Heo^{a,c}, Yun Hee Kim^{a,c}, Ho Jin Sung^a, Hai Ying Li^a, Chong Woo Yoo^a, Joo Young Kim^a, Joo Yong Park^a, Ui Lyong Lee^b, Byung Ho Nam^a, Eun Ok Kim^a, So Young Kim^a, Seung Hoon Lee^a, Jong Bae Park^{a,*}, Sung Weon Choi^{a,*}

^aResearch Institute and Hospital, National Cancer Center, 323 Ilsan-ro, Ilseong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do 410-769, Republic of Korea
^bDepartment of Oral and Maxillofacial Surgery, Chung-Ang Medical Center, Seoul, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 September 2011
Received in revised form 22 December 2011
Accepted 24 December 2011
Available online xxxxx

Keywords:
Apelin
Oral squamous cell carcinoma
Prognosis
Hypoxia

SUMMARY

Recently, apelin has been shown to be a novel angiogenic factor in various cancers including lung, breast and brain cancer. However, there is limited information regarding the expression and role of apelin in oral cavity cancer. In this study, we determined that apelin expression was localized in the cytoplasm of oral squamous cell carcinoma at various intensities. Strong apelin expression significantly correlated with tumor recurrence and disease-free survival. Using a multivariate analysis, we demonstrated that apelin was an independent prognostic factor for on disease-free survival, age, lymph node metastasis and CA9 expression. Moreover, apelin expression was up-regulated under hypoxic conditions, and exogenous apelin enhanced the proliferation and migration of oral cancer cells. Based on these results, we propose that the presence of hypoxia-induced apelin is a new prognostic factor and potential therapeutic target for oral squamous cell carcinoma.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Oral cavity cancer accounts for approximately 3% of all malignancies worldwide, and most of oral cavity cancers are oral squamous cell carcinomas (OSCCs).¹ OSCCs are highly aggressive with rapid local tumor growth and exhibit early metastasis to the regional lymph node.² Standard treatments for OSCC include surgery, radiation therapy, and chemotherapy. Despite aggressive treatment, the 5-year survival rate has not significantly changed and remains at 50–55%.³

In clinical practice, treatment planning and prognosis evaluation for OSCC is primarily based on the tumor node metastasis (TNM) staging system.⁴ However, TNM classification provides limited information regarding the biological aggressiveness, treatment response, and prognosis of OSCC patients because it is impossible to accurately predict prognosis, even in patients with the same TNM stage. Therefore, new molecular markers for predicting patient prognosis and tumor aggressiveness must be studied for individualized cancer treatment of OSCC.

Apelin is a bioactive peptide that was first identified in the gastrointestinal tract and is known to be an endogenous ligand

for the G-protein-coupled receptor, APJ.⁵ Apelin and APJ are ubiquitously expressed in various tissues including the heart, lung, liver, brain and bone.^{6,7} Apelin regulates blood pressure, body fluid homeostasis, and cardiac contractility.^{8–10} In addition, apelin increases the migration, proliferation and capillary-like tube formation of retinal endothelial cells and is required for normal vascular development in the frog embryo.^{11,12} These findings indicate that apelin is an important factor in physiologic angiogenesis.

A recent study has reported that apelin overexpression increases tumor growth in a murine breast-cancer model.¹³ A separate study has shown that high levels of apelin expression are associated with poor prognosis in lung cancer patients, and apelin overexpression stimulates tumor growth and microvessel densities and perimeters *in vivo*.¹⁴ These results suggest that apelin may be a new prognostic factor that is involved in tumor angiogenesis.

In this current study, we evaluated the correlation between apelin expression and clinical outcomes in OSCC. Furthermore, we examined the role of apelin in oral cancer cells.

Materials and methods

Patients and samples

A total of 62 OSCC tissue samples were obtained from patients who underwent primary surgery with curative intent between

* Corresponding authors. Tel.: +82 31 920 2450; fax: +82 31 920 2006 (J.B. Park), tel.: +82 31 920 1264; fax: +82 31 920 1268 (S.W. Choi).

E-mail addresses: jbp@ncc.re.kr (J.B. Park), choiwm@ncc.re.kr (S.W. Choi).

[†] These authors contributed equally to this work.

Association of Body Mass Index with Oral Cancer Risk

Sung-Weon Choi¹, Jong-Ho Lee^{2*}, Joo-Yong Park, Young Mi Yun¹, Mi Kyung Kim¹

¹Oral Oncology Clinic, ¹Cancer Epidemiology Branch, Research Institute and Hospital, National Cancer Center,

²Department of Oral and Maxillofacial Surgery and Dental Research Institute, College of Dentistry, Seoul National University

Abstract

Purpose: Although obesity is a well-established risk factor for many cancers, the effect of body mass index (BMI) on oral cancer risk remains controversial. We therefore investigated the effect of BMI on oral cancer risk in a case-control study in Korea.

Methods: Overall, 364 patients with oral cancer and 439 community controls were enrolled. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) were estimated using logistic regression models, adjusted for age, smoking status and alcohol consumption.

Results: We found no overall significant evidence of an association between oral cancer risk and BMI in either gender. However, when the relationship between BMI and oral cancer risk was examined according to female age groups (<50 and ≥50 years), there was a significant association between oral cancer risk and high BMI in female subjects younger than 50 years of age (OR=3.92, 95% CI 1.05~14.9, *P* for trend=0.04), but not in older (≥50 years) female subjects (OR=1.11, 95% CI 0.55~2.24, *P* for trend=0.76). There was no significant relationship between BMI and oral cancer risk in any of the male age subgroups.

Conclusion: Our study provides the first epidemiological evidence supporting an association between obesity and an increased risk of oral cancer.

Key words: Oral cancer, Obesity, Body mass index

Introduction

Obesity has become one of the major risk factors for cancer and one of the leading causes of death in Western and Asian countries [1-4].

World Cancer Research Fund (WCRF) and the International Agency for Research on Cancer provided evidence that obesity is causally linked to cancer of the colon-rectum, breast, pancreas, endometrium, kidney, and esoph-

agus [5,6].

However, little evidence regarding the relationship between obesity and oral cancer (including precancerous lesions) is available, and the study results have thus far been inconsistent. Although some populations exhibit inverse relationships between body mass index (BMI) and oral cancer risk as well as the premalignancy of oral cancer, other populations do not show correlation between BMI and oral cancer risk because the prevalence and degree

RECEIVED July 1, 2011, REVISED August 18, 2011, ACCEPTED September 1, 2011

Correspondence to: Mi Kyung Kim
Cancer Epidemiology Branch, Research Institute and Hospital, National Cancer Center
809, Madu 1-dong, Goyang 410-769, Korea
Tel: 82-31-920-2202, Fax: 82-31-920-2006, E-mail: almad@ncc.re.kr
*These authors contributed equally.

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.