대한대장항문학회지 제 21 권 제 3 호
J Korean Soc Coloproctol Vol. 21, No. 3, 2005

□ 원 저 □

대장암에서 5-FU 감수성의 지표로서 현미부수체 불안정성과 Dihydropyrimidine Dehydrogenase 발현의 연관성에 대한 연구

[1]이화여자대학교 의과대학 외과학교실, 경희대학교 의과대학 [2]외과학교실 및 [3]진단검사의학과, [4]송도병원 외과

류재현[1,4] · 이석환[2] · 이우인[3] · 이령아[1] · 김광호[1] · 정순섭[1] · 박응범[1]

Relationship between Microsatellite Instability and Dihydropyrimidine Dehydrogenase Expression as a Predictor of Response to 5-Fluorouracil Chemotherapy for Colorectal Cancer

Jai-Hyun Rhyou, M.D.[1,4], **Suk-Hwan Lee,** M.D.[2], **Woo-In Lee,** M.D.[3], **Ryung-Ah Lee,** M.D.[1], **Kwang-Ho Kim,** M.D.[1], **Soon-Sup Chung,** M.D.[1], **Eung-Bum Park,** M.D.[1]

[1]Department of Surgery, College of Medicine, Ewha Womans University, Departments of [2]Surgery and [3]Laboratory Medicine, College of Medicine, Kyung Hee University, [4]Department of Surgery, Songdo Colorectal Hospital, Seoul, Korea

Purpose: Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) is a rate-limiting enzyme in 5-FU catabolism, so the enzymatic activity of DPD reflects the 5-FU response. Moreover, recent studies have revealed that microsatellite instability (MSI) status correlates well with the prognosis and the 5-FU chemosensitivity in colorectal cancer (CRC). This study aimed to determine whether DPD mRNA expression is related with the MSI status of primary CRC as a prognostic predictor. **Methods:** Tumor samples and adjacent normal colonic mucosal tissues were collected from 59 patients. DPD mRNA expression was calculated by using the real-time RT-PCR method. The MSI status was examined by using multiplex fluorescent PCR with five reference markers. The results of DPD mRNA expression and MSI status were compared with the clinicopathologic variables and with each other. **Results:** The mean age of the 59 patients was 59 (range: 36~81) years. In 55 patients (93.2%), the colorectal cancers were histologically well or moderately differentiated. Forty-nine of the tumors (49, 83.1%) were located distal to the splenic flexure, and 46 patients (78%) had TNM stage II (n=17) or stage III (n=29) cancer. The DPD mRNA expression level was informative in all 59 cases. The median expression level was 2.5 (range: 0~67.33). There was no correlation between the DPD mRNA expression level and age, gender, location, or TNM stage. MSI status was informative in 43 cases (72.9%). Thirty-six cases (36, 83.7%) were microsatellite-stable (MSS), 4 cases (9.3%) showed low-level microsatellite instability (MSI-L), and 3 cases (7.0%) showed high-level microsatellite instability (MSI-H). Proximal CRC showed a higher proportion of MSI-H than distal CRC (25% vs. 2.9%, P=0.03). We could not find any correlation between the DPD mRNA expression level and the MSI status in tumor tissues (r=0.29, P=0.09). **Conclusions:** The expression level of DPD mRNA raried among the tumors studied. The relatively low frequency of MSI in distal CRC prohibits the use of MSI status as a predictor of 5-FU chemosensitivity. We suggest that a well-designed large-scale study would be helpful to confirm the relation between DPD mRNA expression and MSI status as a predictor of 5-FU chemosensitivity in CRC patients. **J Korean Soc Coloproctol 2005;21:157-166**

Key Words: 5-Fluorouracil, Dihydropyrimidine dehydrogenase, Microsatellite instability, Chemosensitivity

5-Fu, DPD, 현미부수체 불안정성, 항암제감수성

서 론

대장암의 치료는 수술이 근본적인 치료이지만 수술 후 적절한 보조 항암 화학요법과 방사선 치료 등을 병행하면 환자의 생존율을 향상시킬 수 있으므로 보조

접수: 2004년 9월 30일, 승인: 2005년 6월 2일
책임저자: 박응범, 110-783, 서울시 종로구 종로 6가 70번지 이화여자대학교의료원 동대문병원 외과
Tel: 02-760-5165, Fax: 02-765-5681
E-mail: ebpark@ewha.ac.kr

Received September 30, 2005, Accepted June 2, 2005
Correspondence to: Eung-Bum Park, Department of Surgery, Ewha Womans University College of Medicine, Dongdaemoon Hospital, 70 Jongno 6-ga, Jongno-gu, Seoul 110-783, Korea.
Tel: +82-2-760-5165, Fax: +82-2-765-5861
E-mail: ebpark@ewha.ac.kr

치료 요법의 역할의 중요성이 강조되고 있다.[1,2] 대장암에서 보조 항암 화학요법에 가장 많이 사용되는 약물은 5-fluorouracil (5-FU)이고 가장 효과가 좋은 것으로 알려져 있으나, 진행성 대장암에서의 반응률은 약 25% 정도이며 folinic acid 등의 보조제를 사용한 경우에도 40% 이상의 반응률을 기대하기는 어렵다.[3-7] 최근 5-FU의 생체 내 약리학적 과정에 대한 이해가 높아지면서 이화과정이나 동화과정에 관련된 효소를 변화시킴으로써 약물의 효과를 증폭시키고자 하는 시도들이 진행되고 있으며, 5-FU 투약 전에 약제 감수성을 예측할 수 있는 지표로 사용할 수 있는가에 대한 연구들이 진행 중이다.

Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD)는 5-FU의 대사과정 중 이화과정에 관여하는 중요한 효소로서 속도 조절 효소(rate-limiting enzyme)이다. 5-FU는 DPD에 의해 dihydrofluorouracil로 변환되어 이화작용이 진행되며, 이 과정을 통해 생체 내에 투여된 5-FU의 80%가 분해되고, 단지 1～3%만이 동화과정을 통해 항암효과를 나타낸다고 한다.[8,9] 실험연구들의 결과에 의하면 암세포주의 DPD 발현량에 따라 5-FU 반응도에 차이가 있다고 하며,[10-12] 이러한 결과는 같은 5-FU를 투여해도 환자 개개인의 반응률이 차이가 있는 것이 DPD 발현량과 관계가 있을 가능성을 보여준다.

또한 현미부수체 불안정성(microsatellite instability, MSI)은 대장암의 발생과정에서 MSI 경로를 통하여 암화과정이 진행되는 것을 시사하는 중요한 생물학적인 지표로서 환자의 예후와 치료에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 최근 연구에 의하면 전체 대장암에서 MSI의 발현은 약 15% 정도로 MSI가 발현된 경우는 대장암의 5-FU 감수성이 높은 것으로 알려져 있으나,[13,14] 아직까지 5-FU 대사과정과의 직접적인 연관성이나 정확한 경로에 대해 알려진 바가 없다. 저자들은 본 연구에서 대장암에서 5-FU 감수성의 중요한 지표로 알려져 있는 대장암 조직의 DPD mRNA를 정량 측정하고, 또한 MSI의 빈도를 측정하여 임상 및 병리학적 인자들과의 연관성을 분석하여 5-FU 감수성에 대한 지표로써의 가능성을 알아보고, DPD mRNA 발현과 MSI와의 상호 관계를 규명하고자 하였다.

방 법

1) 연구대상

2001년 9월부터 2003년 4월까지 이화여자대학교 동대문병원 외과에서 대장암으로 진단받고 수술을 받은 환자들 중 수술 시 정상조직과 대장암조직을 냉동보관하였던 59예를 연구대상으로 하였다. 환자들의 임상 및 병리학적 소견은 전향적으로 기록하여 분석하였다.

2) DPD mRNA 정량

대장암 조직으로부터 RNA를 추출하는 것은 high pure RNA tissue kit (Roche Diagnostics, Manheim, Germany)를 이용하였으며 방법은 제조사의 방법에 따랐다. 조직 25 mg과 500μl의 용해/융합 완충제를 혼합하여 진탕하였다. 고정제 여과관(high pure filter tube)에 검체를 분주한 후 13,000 g, 30초간 원심 분리하여 하층의 용액은 버리고 여과관에 RNA가 붙도록 하였다. DNase I을 잘 섞어서 남아있는 DNA를 처리하고 세척 완충제로 두 차례의 세척과정을 통해 불순물을 제거하였다. 마지막으로 분리 완충제 100μl를 여과관에 첨가하여 800g, 1분간 원심분리하여 정제된 RNA를 얻었다. 얻어진 RNA의 정확도를 확인하기 위해 2% agarose gel에 전기영동하고 ethidium bromide 염색 하에 28s, 18s의 두 밴드를 확인하였다.

역전사는 DPD mRNA의 상대적인 정량을 위해서 기준 유전자(reference gene)와 DPD 유전자를 각각 이용하여야 하므로 환자의 RNA를 기준 유전자, DPD 유전자로 분리하여 각각 역전사하였다. 역전사는 LightCycler® DPD mRNA quantification kit PLUS (Roche Diagnostics, Manheim, Germany)의 방법에 따랐다. 환자의 RNA 10μl, H_2O 2μl, 역전사효소 반응 혼합물 2μl, 2 mM DPD 혹은 기준 유전자 시발체, 1 mM dNTP, 40 U RNase inhibitor, 25 U 역전사 효소를 잘 혼합하고 25°C에서 10분, 42°C에서 60분, 94°C에서 5분간의 과정을 통하여 역전사하였다. 이때 제조사에서 제공한 보정기(calibrator)도 함께 역전사하였다. 만들어진 cDNA는 실시간 중합효소 연쇄반응에 즉시 이용하거나 그렇지 못한 경우는 -20°C 냉동 보관하였다.

LightCycler®를 이용하여 DPD와 기준 유전자(G6PDH를 이용)를 정량하기 위해 이미 만들어 놓은 각각의 cDNA 4μl를 Taq DNA 중합효소, 완충제, dNTP가 혼합되어 있는 효소액 2μl, DPD (혹은 G6PDH)유전자에 대한 특화 시발체(specific primer)와 부합화 탐침(hybridization probe)이 혼합되어 있는 검출 혼합물 6μl, 25 mM $MgCl_2$ 1.6μl, 순수 H_2O 6.4μl를 잘 섞어 최종 20μl의 용액을 만들었다. 이때 음성 대조군과 양성 보정기도 함께 제조하였다. DPD 정량을 위한 시발체의 염기 서열은 다음과 같다.

DPD-1740F T7-GGTCTTGCTAGCGCAACTCC
DPD-1989R CCTTTAGTTCAGTGACACTTTGA

이들 염기서열은 250 bp의 중합연쇄 반응 산물을 만들며, DPD 유전자의 염기서열 1,740에서 1,989를 증폭하도록 설계되었다.

각 20μl의 반응 혼합물을 모세관에 넣고 700 g에서 5초간 침전하고 중합효소 연쇄반응을 하였다. 중합효소 연쇄반응은 일반적으로는 40주기를 원칙으로 하였으나 필요한 경우에는 10주기를 더하였다. 변성과정(denaturation)은 95°C에서 5분간 1회 시행하였고, 증폭과정(amplification)은 95°C에서 10초, 62°C에서 10초, 72°C에서 10초로 40주기를 시행하였다. 반응이 끝나면 40°C에서 30초간 냉각한 후에 반응을 끝냈다.

DPD mRNA의 정량은 LightCycler®에서 형광의 변화를 이용하여 측정하였으며, F2/F1 channel에서 측정하였다. 형광의 변화는 교차점(crossing point)에 기초하여 측정하였으며, 교차점은 중합효소 연쇄반응의 지수기(exponential phase)가 시작되는 주기의 수를 말하며 이는 각 검체의 초기핵산 농도를 반영하는 것이다. 또한 측정된 각 환자 검체의 실질적 수량화는 LightCycler®의 상대적 수량화 프로그램을 이용하여 중합효소 연쇄반응의 효능, 각 검체의 시작농도의 차 등을 교정하여 정량하였다(Fig. 1). DPD mRNA의 정량은 중합효소 연쇄반응시 DPD 유전자 시발체와 기준 유전자인 G6PDH 유전자의 시발체에 부착된 형광의 양을 상대적으로 계산한 표준화 비율(normalized ratio)로 표시하였다.

3) MSI 분석

DNA의 추출은 파라핀 포매조직을 이용하여 대장암으로 진단된 조직을 Hematoxylin & Eosin 염색하여 대표적인 암조직과 정상조직을 획득하였다. 각각의 조직으로부터 암세포와 정상세포를 11번 외과수술용 칼로 미세절개하여 proteinase K가 함유된 용해 완충제가 담긴 Eppendorf 관에 보관한 후 50°C에서 하룻밤 단백 분해하였다. Phenol/chloroform ethanol 추출법으로 각각의 조직으로부터 DNA를 추출하였다.

MSI 분석은 형광표시 중합효소 연쇄반응 시발체를 이용하여 미국 국립 암 연구소에서 권장하는 5개의 현미부수체 표지자(microsatellite marker; BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250)를 중합효소 연쇄반응을 통하여 측정하였다.[15] 다중 시발체 중합효소 연쇄반응(multiplex PCR)은 초기 변성과정을 94°C에서 2분간 시행한 후, 94°C에서 10초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초로 총 30주기를 시행한 후, 최종 증폭과정을 72°C에서 7분간 시행하였다.

중합효소 연쇄반응의 산물을 GeneScan® 프로그램이 내장된 ABI Prism 377 DNA sequencer (Perkin-Elmer, Santa Clara, CA)에서 분석하였다. 정상 DNA와 종양 DNA에서 현미부수체 표지자의 불안정성이 없는 경우를 MSS (Fig. 2), 한 개의 표지자에서 불안정성이 발견된 경우를 MSI-L로 정의하였고, 최소 2개 이상의 현미부수체 표지자에서 불안정성이 있는 경우를 MSI-H로 분류하였다(Fig. 3). 통계분석은 MSI-H는 현미부수체 불안정군으로, 그리고 MSI-L와 MSS는 현미부수체 안정군으로 분류하여 시행하였다.

4) 통계분석

각 군 간의 비교를 위해서는 각 변수의 성격과 검증방법에 따라 student t-test 와 chi-square test등의 방법을 사용하였으며, P값이 0.05미만인 경우를 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다. DPD mRNA의 정량 분석

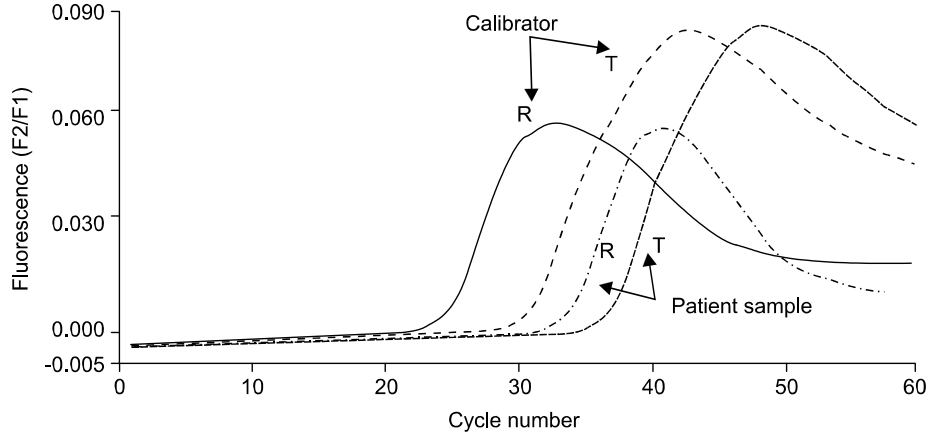

Fig. 1. Amplification plots of DPD (Target, T) and G6PDH (Reference, R) from the calibrator RNA and a patient sample.

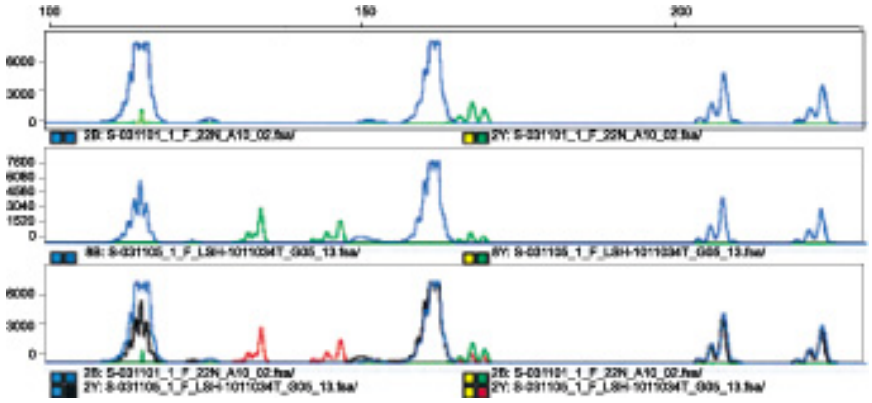

Fig. 2. Example of microsatellite stable (MSS) tumor. All 5 marker from normal colonic mucosa (A) and tumor tissue (B) showed same DNA fragment pattern. (C) Panel represents the combination of upper and middle panel.

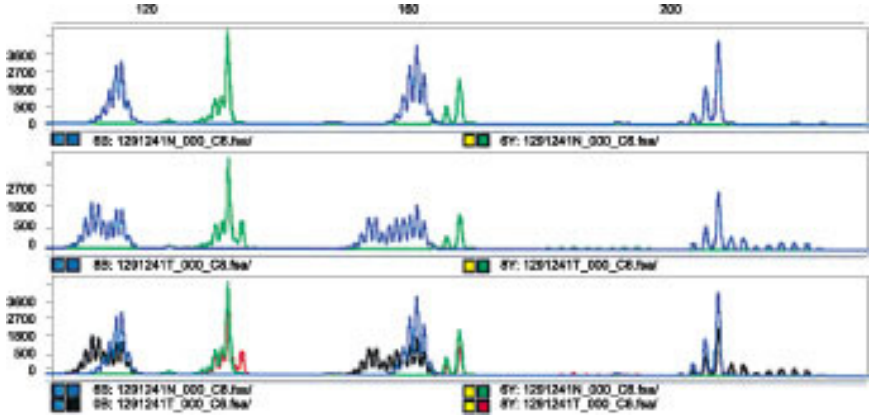

Fig. 3. Example of high-level microsatellite instability (MSI-H). Fragment pattern of amplified PCR products from a tumor that is unstable at all five analyzed microsatellite loci.

결과와 MSI의 상관관계는 Pearson 상관분석을 하여 상관계수를 구하였다.

결 과

1) 임상 및 병리학적 소견

대상환자들의 평균 연령은 59세(58.8±10.5: 범위 36~81세)였으며, 성별 분포는 남자 35명, 여자 24명이었다.

선암의 분화도는 고분화 및 중등도 분화암이 55예(93.2%)였으며, 미분화암이 4예(6.8%)였다. 암종의 분포는 비장만곡을 중심으로 근위부 암과 원위부 암으로 분류하였는데, 근위부 암이 10예(16.9%)였으며, 원위부 암이 49예(83.1%)였다.

병기별 분포는 TNM 병기 분포를 기준으로 하였으며, stage I가 7명(11.9%), stage II가 17명(28.8%), stage III가 29명(49.2%), stage IV가 6명(10.2%)이었다(Table 1).

2) 분자생물학적 소견

대장암 조직의 DPD mRNA 정량은 59예에서 분석하였는데, 기준 유전자인 G6PDH와 DPD cDNA를 함께 중합효소 연쇄반응을 하여, 중합효소 연쇄반응 과정의 형광의 변화를 상대적으로 계산하여 표준화 비율(normalized ratio)로 표시한 결과 DPD mRNA의 양은 0부터 67.3으로 평균값은 5.1±9.6이었으며, 중앙값은 2.5였다.

대장암 조직의 MSI 양상 분석은 43명에서 가능하였으며, MSS가 36예(83.7%), MSI-L이 4예(9.3%), MSI-H가 3예(7.0%)였다.

MSI-L을 보인 4예는 남자가 2명, 여자가 2명이었으며, 암종의 분포는 모두 원위부 암으로 에스 결장암이 1예, 직장암이 3예였다. D2S123 locus와 D5S346 locus에 불안정성을 보인 예가 각각 1예였으며, 2예는 D17S250 locus에서만 불안정성을 보였다.

MSI-H를 보인 예는 총 3예로 2예는 고령의 여자로 상행결장암이었고, 1예는 36세 남자로 직장암이었다.

3) 분자생물학적인 소견과 임상 및 병리학적 인자와의 상호관계

DPD mRNA 발현량의 중간값인 2.5를 기준으로 2.5

미만인 군과 2.5 이상인 군으로 구분한 후 DPD mRNA 발현량과 임상병리학적 인자들과의 연관성을 분석해 본 결과(Table 2), DPD mRNA의 발현량은 환자의 성별, 연령, 암세포의 분화도, 암종의 위치와는 무관하였으며, 림프절 전이의 유무만이 통계적인 유의성을 확인할 수 있었다. 즉 림프절 전이가 없는 군의 DPD mRNA 발현이 더 높은 것으로 나타났다(P=0.04).

Table 1. Clinicopathologic findings

Variables		N (%)
Differentiation*	Well or Mod	55 (93.2)
	Poor or Muc	4 (6.8)
Location†	Proximal	10 (16.9)
	Distal	49 (83.1)
pT‡	T1	1 (1.7)
	T2	8 (13.6)
	T3	50 (84.7)
pN§	N0	24 (40.7)
	N1	35 (59.3)
pM‖	M0	53 (89.8)
	M1	6 (10.2)
Stage	I	7 (11.9)
	II	17 (28.8)
	III	29 (49.2)
	IV	6 (10.2)

*Differentiation: Well = well differentiated adenocarcinoma, Mod = moderately well differentiated adenocarcinoma, Poor = poorly differentiated adenocarcinoma, Muc = mucinous adenocarcinoma; † Location: Proximal = cancer located proximal to splenic flexure, Distal = cancer located distal to splenic flexure; ‡ pT = pathologic tumor stage; §pN = pathologic nodal status; ‖ pM = pathologic metastasis.

MSI 양상을 MSS군과 MSI-L군을 현미부수체 안정군으로 분류하고 MSI-H군을 현미부수체 불안정군으로 분류하여 환자들의 임상 및 병리학적 인자들이 관계가 있는지 분석한 결과(Table 3), MSI는 환자의 성별, 연령, 암세포의 분화도, 암종의 병기와는 무관하였으나, 근위부 암의 MSI 빈도(25%)가 원위부 암의 MSI 빈도(2.9%)에 비해 통계학적으로 유의하게 높게 나타났다(P=0.03).

DPD mRNA의 발현량과 MSI와의 연관관계를 Pearson 상관 분석한 결과 상관계수가 0.294로 두 가지 검사치의 연관성은 매우 낮은 것으로 나타났다(P=0.09) (Table 4).

고 찰

3기 이상의 대장암과 일부 2기 대장암에서 5-FU를 포함한 항암 화학요법은 필수적인 것으로 인정되고 있다. 그러나 5-FU에 대한 약제 반응은 매우 다양하여 같은 장기의 동일한 병기에서도 개개인에 따라 5-FU에 대한 반응도는 현격한 차이를 보여,[16] 전체적으로는 단일요법 시 20% 정도의 반응도를 나타낸다. 이런 관점에서 최근 들어서는 항암제 감수성을 고려하여 항

Table 2. Relationship between DPD mRNA expression and clinicopathologic variables

Variables		DPD* < 2.5	DPD ≥ 2.5	P-value
Gender	Male	20 (57.1%)	15 (42.9%)	NS¶
	Female	9 (37.5%)	15 (62.5%)	
Differentiation†	Well or Mod	28 (50.9%)	27 (49.1%)	NS
	Poor or Muc	1 (25.0%)	3 (75.0%)	
pT‡	T1 and T2	6 (66.7%)	3 (33.3%)	NS
	T3	23 (46.0%)	27 (54.0%)	
pN§	N0	8 (33.3%)	16 (66.7%)	P=0.04
	N1	21 (60.0%)	14 (40.0%)	
Stage	I & II	8 (33.3%)	16 (66.7%)	P=0.04
	III & IV	21 (60.0%)	14 (40.0%)	
Location‖	Proximal	4 (40.0%)	6 (60.0%)	NS
	Distal	25 (51.0%)	24 (49.0%)	

*DPD = Dihydropyrimidine dehydrogenase; † Differentiation: Well = well differentiated adenocarcinoma, Mod = moderately well differentiated adenocarcinoma, Poor = poorly differentiated adenocarcinoma, Muc=mucinous adenocarcinoma; ‡ pT = pathologic tumor stage; §pN = pathologic nodal status; ‖ Location: Proximal = cancer located proximal to splenic flexure, Distal = cancer located distal to splenic flexure; ¶NS = not significant.

Table 3. Relationship between MSI status and clinicopathologic variables

Variables		MSS*	MSI†	P-value
Gender	Male	27 (96.4%)	1 (3.6%)	NS**
	Female	13 (86.7%)	2 (13.3%)	
Differentiation‡	Well or Mod	37 (94.9%)	2 (5.1%)	NS
	Poor or Muc	3 (75.0%)	1 (25.0%)	
pT§	T1 and T2	4 (100%)	0 (0%)	NS
	T3	36 (92.3%)	3 (7.7%)	
pN‖	N0	13 (92.9%)	1 (7.1%)	NS
	N1	27 (93.1%)	2 (6.9%)	
Stage	I & II	14 (93.3%)	1 (6.7%)	NS
	III & IV	26 (92.9%)	2 (7.1%)	
Location¶	Proximal	6 (75.0%)	2 (25.0%)	P=0.03
	Distal	34 (97.1%)	1 (2.9%)	

*MSS = microsatellite stable; † MSI = microsatellite instability; ‡ Differentiation: Well = well differentiated adenocarcinoma, Mod = moderately well differentiated adenocarcinoma, Poor = poorly differentiated adenocarcinoma, Muc = mucinous adenocarcinoma; §pT = pathologic tumor stage; ‖ pN = pathologic nodal status; ¶Location: Proximal = cancer located proximal to splenic flexure, Distal = cancer located distal to splenic flexure; **NS = not significant.

Table 4. Relationship between DPD mRNA expression and MSI status

	MSS*	MSI-H†	Total
DPD‡ <2.5	23 (100%)	0 (0%)	23
DPD≥2.5	17 (85.0%)	3 (15.0%)	20
Total	40	3	43

*MSS = microsatellite stable; † MSI = microsatellite instability; ‡ DPD = Dihydropyrimidine dehydrogenase DPD mRNA expression level was presented by normalized ratio.

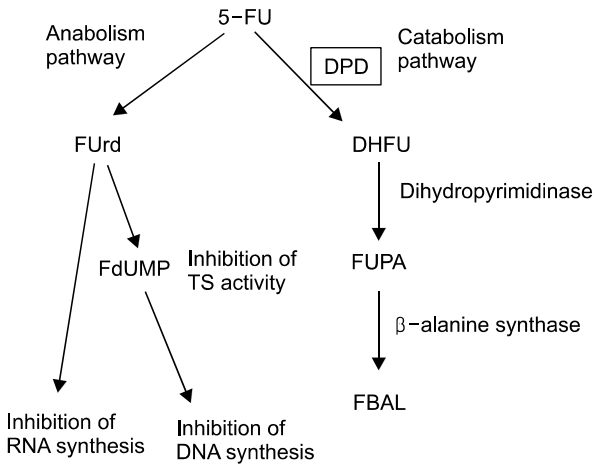

Fig. 4. Diagram of 5-FU metabolism. DPD = dihydropyrimidine dehydrogenase; DHFU = 5',6'-dihydrofluorouracil; FUPA = α-fluoro-β ueidopropionic acid; FBAL = 5-fluoro-β-alanine; FUrd = fluorouridine; FdUrd = fluorodeoxyuridine; FdUMP = fluorodeoxyuridine monophosphate; TS = thymidylate synthase.

암 화학요법을 환자에 따라 개별화, 최적화하고자 하는 노력이 시도되고 있고 이런 추세에 따라 좀 더 효과적인 항암제를 찾고자 하는 측면에서 5-FU의 활성도를 증가시킬 수 있는 약제에 대한 개발 노력과 함께 5-FU의 작용기전에 대한 연구들이 많이 진행되고 있다. 그 중에서도 일부 연구자들은 5-FU의 이화작용에 중점을 두어 이를 조절하여 5-FU의 활성을 변화시키는 연구를 시도하고 있다.[17]

5-FU의 대사에 작용하는 효소들 중 DPD는 110 kDa 크기의 두개의 subunit으로 구성된 효소로써 5-FU의 약물대사 과정 중 이화작용에 관여한다. 이는 5-FU 대사의 속도 조절 효소로 생체에 투여된 5-FU의 80% 이상이 DPD에 의해 배설된다(Fig. 4).[18] 이론적으로 종양조직 내에 존재하는 DPD의 양이 많으면 5-FU가 항암효과를 나타내는 세포독성 물질로 전환되기 전에 불활성화되어 5-FU의 항암효과를 감소시키게 된다. DPD는 주로 세포질에 존재하며 간 조직에서 가장 높은 발현을 나타낸다고 한다. DPD의 양은 개체마다 다양하고 같은 개체 내에서도 circardian rhythm에 따라 다르게 나타난다.[12,17] 그러나 DPD의 생리학적 역할이나 DPD 활성에 관여하는 조절기전에 대해서는 아직 알

려진 바가 많지 않으며 최근의 in vitro 연구에 의하면 종양세포 내 DPD 활성도와 5-FU 감수성이 매우 중요한 관계가 있다고 한다.[10,12,13,17] Etienne 등[17]은 DPD 활성도와 5-FU 항암 화학요법과의 관계를 임상적으로 비교한 결과, 항암 화학요법에 완전 관해를 보인 환자군이 부분 관해나 효과가 없었던 환자군에 비해 DPD의 양이 통계학적으로 유의하게 감소되었다고 보고하였다. 또한 DPD 활성도를 종양조직과 비종양조직, 즉 정상조직에서 각각 측정하여 5-FU 항암 화학요법에 대한 완전 관해군과 비 반응군에서 비교해 보았을 때 비종양조직의 DPD 활성도에는 차이가 없었다고 한다. 이런 점에서 5-FU 감수성에 대해서는 종양조직의 DPD 활성도가 임상적으로 중요할 것으로 추정된다. 나아가 DPD 억제제를 이용함으로써 5-FU의 이화작용을 감소시켜 약물의 감수성을 증가시키고 5-FU의 부작용을 최소화할 수 있다는 연구도 보고된 바 있다.[19]

본 연구에서 대장암 조직에서 DPD mRNA를 정량분석한 결과 0부터 67.3으로 개개의 암종에 따라 매우 다양하게 나타났다. 본 연구에서는 항암 화학요법의 결과에 근거한 DPD mRNA의 발현량의 기준수위를 정할 수 없어 중앙값인 2.5를 기준으로 구분하여 통계학적 분석을 시행하였다. 다른 연구보고에서와 마찬가지로 DPD mRNA의 발현량은 종양의 침윤도나 종양의 분화도, 병기들과는 무관하였으나, 림프절 전이 유무에 따라 차이를 보였다(P=0.04). 본 연구에서 림프절 전이가 없는 군의 증례가 상대적으로 적어 그 의의를 확인하기 위해서는 보다 많은 증례에 대한 연구가 필요할 것으로 생각한다.

DPD mRNA의 발현량과 항암제 감수성을 비교한 많은 연구들은 4기 대장암 환자를 대상으로 하였다. 보고된 대부분의 임상연구들은 원발 종양의 DPD mRNA량이 전이된 이차병소의 DPD mRNA량을 대변한다는 근거에 기초하여 4기 대장암 환자의 예도 함께 포함하여 분석하였다. 그러나 전이된 병소와 원발 병소의 분자 생물학적 특성은 서로 다른 것으로 점차 알려지고 있으며, 약제 감수성 또한 다르다는 연구가 있다.[20] 그러므로 5-FU 감수성의 예측인자로DPD mRNA 발현량의 의미를 정확히 분석하기 위해서는 향후 원발 병소의 DPD mRNA양과 전이된 병소의 DPD mRNA양 및 항암제 감수성을 각각 비교하는 연구 또한 필요할 것으로 생각한다.

또한 5-FU 감수성에는 DPD외에도 thymidylate synthase, thymidine phosphorylase과 같은 약물대사에 관여하는 다른 효소들과 p53 등 여러 가지 인자들이 관여하는 것으로 알려지고 있으므로[12,13,15,21-27] 대상 환자를 보조 항암 화학요법이 생존율의 향상에 도움이 되는 3기 대장암 환자군으로 국한하고, 보다 많은 분자생물학적 표지자들을 함께 분석한다면 좀 더 정확한 연관성을 밝힐 수 있을 것으로 생각한다.

MSI는 DNA 복제 오류를 교정해주는 DNA 부정합 교정 유전자(mismatch repair gene)의 돌연변이로 발생하는 것으로 알려져 있다. MSI는 대장암뿐 아니라 다른 암에서도 나타나지만 가족성 비용종성 대장암에서 약 90% 이상 관찰되며, 산발성 대장암에서도 약 15%에서 발견된다. MSI를 나타내는 대장암은 여러 특징이 관찰되어 관심의 대상이 되어 왔다. 즉 우측대장에 호발하고, 세포의 미분화 및 점액성이 많은 것이 특징이며, 종양 주위에 림프구 침윤이 많고, 덜 공격적이어서 예후가 좋은 것으로 보고되고 있다.[14,28-30] 또한 5-FU를 이용한 항암치료의 결과도 물론 MSI를 보이지 않는 제3 병기 대장암 환자에서도 환자의 생존율에 도움이 되기는 하지만 MSI를 나타내는 경우엔 더욱 감수성이 높아 생존율에 차이를 보인 연구 결과도 있어 MSI를 나타내는 대장암의 예후가 좋은 이유 중 하나가 5-FU 항암제에 감수성이 높은 것이 한 요인으로 생각되고 있다.[14,27]

본 연구에서는 MSI 양상분석이 가능했던 43예 중 3예(7.0%)에서 MSI-H를 나타냈는데 다른 연구의 보고에 비해 낮게 관측되었다. 이는 우리나라의 대장암 분포가 서구에 비해 아직까지 직장암을 포함한 원위부 대장암의 비율이 높고,[31] 본 연구의 대상에서 직장암의 비중이 높았기 때문인 것으로 생각한다. 우리나라의 대장암에서 MSI를 측정하였던 김 등[28]의 보고에 의하면 총 107예의 대장암 중 직장암 38예에서 MSI를 나타낸 예는 없었다고 한다. MSI가 적게 관찰되는 원위부 좌측대장암이 많이 포함된 것이 5-FU 항암제 감수성의 예측인자로써 MSI의 의미를 감소시킨 것으로 생각된다. 또한 원위부 대장암 중에서도 직장암만 국한하여 본다면 이는 항암 화학요법뿐 아니라 방사선 요법의 병용치료를 실시하고 있는 실정으로[31] 이런 경우에 있어 방사선 감수성을 고려치 않고 항암제 감수성에 대한 판단만으로 치료의 방향을 정하기에는 무리가 있다.

본 연구는 대장암에서 개개의 암종마다 5-FU 항암제 감수성에 차이가 있는 점을 약물대사에 작용하는 속도 조절 효소인 DPD와 MSI를 분석 비교하여 감수성의 예측인자로써 DPD와 MSI가 어떤 연관성이 있는지 알아보고자 한 기초적인 연구이다. 그러나 대장암

조직에서 DPD mRNA 발현량은 각 종양마다 매우 다양하게 나타났으며, 임상 및 병리학적인 인자와의 특별한 연관성을 찾을 수 없었다. 아직까지 우리나라에서의 대장암 분포양상은 근위부 암에 비해 MSI를 보이는 경우가 적은 직장암을 포함한 원위부 대장암이 많아서 MSI 자체의 의미도 정확히 알기가 힘들다. 또한 DPD mRNA 발현량과 MSI 사이의 연관성도 찾을 수가 없었다. 그러므로 향후에는 근위부 암을 위주로 같은 병기의 증례를 선별하여 5-FU 감수성의 지표로써의 DPD와 MSI를 연구해야 보다 정확한 DPD와 MSI 발현의 의미와 그 연관성을 밝힐 수 있지 않을까 생각한다.

결 론

대장암에서 DPD mRNA의 발현량은 임상 및 병리학적 소견과 관계없이 개개의 암종에 따라 다양하게 나타났으며, MSI와의 연관성을 밝힐 수는 없었다. 5-FU에 대한 반응과 관계가 있는 것으로 알려진 DPD와 MSI는 서로 다른 생물학적 경로를 통하여 항암제 감수성에 관여하는 것으로 생각한다. 또한 MSI는 원위부 대장암에서 발생 빈도가 매우 낮아 이에 따른 한계도 있으므로 향후 동일 병기의 근위부 대장암에 국한된 환자를 대상으로 선정하여 5-FU의 생체 내 대사에 관여하는 여러 가지 효소들의 변화 양상을 확인하여 5-FU 감수성의 지표로써의 DPD와 MSI의 의미를 더욱 정확히 하고 DPD와 MSI와의 연관성도 밝히는 것이 5-FU 항암 화학요법시의 환자 선택에도 도움이 될 것으로 기대한다.

REFERENCES

1. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen CM, et al. Fluorouracil plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection ofstage III colon carcinoma: a final report. Ann Intern Med 1995;122:321-6.
2. Mamounas E, Wieand S, Wolmark N, Bear HD, Atkins JN, Song K, et al. Comparative efficacy of adjuvant chemotherapy in patients with Dukes' B versus Dukes' C coloncancer: results from four National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project adjuvant studies (C-01, C-02, C-03, and C-04). J Clin Oncol 1999;17:1349-55.
3. Ardalan B, Singh G, Silberman H. Randomized phase I and II study of short-term infusion of high-dose fluorouracil with or without N-(phosphonacetyl)-L-aspartic acid in patients with advanced pancreatic and colorectal cancers. J Clin Oncol 1988;6:1053-8.
4. Poon MA, O'Connell MJ, Moertel CG, Wieand HS, Cullinan SA, Everson LK, et al. Biochemical modulation of fluorouracil: evidence of significant improvement of survival and quality of life in patients with advanced colorectal carcinoma. J Clin Oncol 1989;7:1407-18.
5. Wadler S, Schwartz EL, Goldman M, Lyver A, Rader M, Zimmerman M, et al. Fluorouracil and recombinant alfa-2a-interferon: an active regimen against advanced colorectal carcinoma. J Clin Oncol 1989;7:1769-75.
6. Hill M, Norman A, Cunningham D, Findlay M, Nicolson V, Hill A, et al. Royal marsden phase III trial of fluorouracil with or without interferon alfa-2b in advanced colorectal cancer. J Clin Oncol 1995;13:1297-302.
7. Leichman CG, Fleming TR, Muggia FM, Tangen CM, Ardalan B, Doroshow JH, et al. Phase II study of fluorouracil and its modulation in advanced colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study. J Clin Oncol 1995;13:1303-11.
8. Daher GC, Harris BE, Diasio RB. Metabolism of pyrimidine analogues and their nucleosides. Pharmacol Ther 1990;48: 189-222.
9. van Kuilenburg AB, Haasjes J, Richel DJ, Zoetekouw L, Van Lenthe H, De Abreu RA, et al. Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: identification of new mutations in the DPD gene. Clin Cancer Res 2000;6: 4705-12.
10. Beck A, Etienne MC, Cheradame S, Fischel JL, Formento P, Renee N, et al. A role for dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase in tumour sensitivity to fluorouracil. Eur J Cancer 1994;30A:1517-22.
11. Takebe N, Zhao SC, Ural AU, Johnson MR, Banerjee D, Diasio RB, et al. Retroviral transduction of human dihydropyrimidine dehydrogenase cDNA confers resistance to 5-fluorouracil in murine hematopoietic progenitor cells and human CD34+-enriched peripheral blood progenitor cells. Cancer Gene Ther 2001;8:966-73.
12. Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, et al. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. Clin Cancer Res 2000;6:1322-7.
13. Elsaleh H, Powell B, McCaul K, Grieu F, Grant R, Joseph D, et al. P53 alteration and microsatellite instability have predictive value for survival benefit from chemotherapy in stage III colorectal carcinoma. Clin Cancer Res 2001;7(5):1343-9.
14. Hemminki A, Mecklin JP, Jarvinen H, Aaltonen LA, Joensuu H. Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. [comment]. Gastroenterology 2000;119:921-8.
15. Saw RP, Morgan M, Koorey D, Painter D, Findlay M, Stevens G, et al. p53, deleted in colorectal cancer gene, and

thymidylate synthase as predictors of histopathologic response and survival in low, locally advanced rectal cancer treated with preoperative adjuvant therapy. Dis Colon Rectum 2003;46:192-202.
16. Etienne MC, Cheradame S, Fischel JL, Formento P, Dassonville O, Renee N, et al. Response to fluorouracil therapy in cancer patients: the role of tumoral dihydropyrimidine dehydrogenase activity. J Clin Oncol 1995;13:1663-70.
17. Diasio RB, Harris BE. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. Clin Pharmacokinet 1989;16:215-37.
18. Ahmed FY, Johnston SJ, Cassidy J, O'Kelly T, Binnie N, Murray GI, et al. Eniluracil treatment completely inactivates dihydropyrimidine dehydrogenase in colorectal tumors. J Clin Oncol 1999;17:2439-45.
19. Nio Y, Tamura K, Tsubono M, Kawabata K, Masai Y, Hayashi H, et al. Anticancer chemosensitivity changes between the original and recurrent tumors after successful chemotherapy selected according to the sensitivity assay. Ann Surg 1995;221:89-99.
20. Metzger R, Danenberg K, Leichman CG, Salonga D, Schwartz EL, Wadler S, et al. High basal level gene expression of thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor) in colorectal tumors is associated with nonresponse to 5-fluorouracil. Clin Cancer Res 1998;4:2371-6.
21. Lenz HJ, Hayashi K, Salonga D, Danenberg KD, Danenberg PV, Metzger R, et al. p53 point mutations and thymidylate synthase messenger RNA levels in disseminated colorectal cancer: an analysis of response and survival. Clin Cancer Res 1998;4:1243-50.
22. Elsaleh H, Powell B, Soontrapornchai P, Joseph D, Goria F, Spry N, et al. p53 gene mutation, microsatellite instability and adjuvant chemotherapy: impact on survival of 388 patients with Dukes' C colon carcinoma. Oncology 2000;58: 52-9.
23. Ichikawa W, Uetake H, Shirota Y, Yamada H, Nishi N, Nihei Z, et al. Combination of dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase gene expressions in primary tumors as predictive parameters for the efficacy of fluoropyrimidine-based chemotherapy for metastatic colorectal cancer. Clin Cancer Res 2003;9:786-91.
24. Kornmann M, Schwabe W, Sander S, Kron M, Strater J, Polat S, et al. Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expression levels: predictors for survival in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. Clin Cancer Res 2003;9:4116-24.
25. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. Nat Rev Cancer 2003; 3:330-8.
26. Yoshinare K, Kubota T, Watanabe M, Wada N, Nishibori H, Hasegawa H, et al. Gene expression in colorectal cancer and in vitro chemosensitivity to 5-fluorouracil: a study of 88 surgical specimens. Cancer Sci 2003;94:633-8.
27. Gonzalez-Garcia I, Moreno V, Navarro M, Marti-Rague J, Marcuello E, Benasco C, et al. Standardized approach for microsatellite instability detection in colorectal carcinomas. J Natl Cancer Inst 2000;92:544-9.
28. 김남규, 김호근, 박재균, 이강영, 손승국, 민진식. DNA 현미부수체 불안전성 특성을 가진 산발성 대장암의 임상병리학적 특징. 대한대장항문학회지 2003;19:13-9.
29. Liang JT, Huang KC, Lai HS, Lee PH, Cheng YM, Hsu HC, et al. High-frequency MSI predicts better chemosensitivity to high-dose 5-fluorouracil plus leucovorin chemotherapy for stage IV sporadic colorectal cancer after palliative bowel resection. Int J Cancer 2002;101:519-25.
30. Pocard M, Bras-Goncalves R, Hamelin R, Northover J, Poupon MF. Responce to 5-fluorouracil of orthotopically xenograffed human colon cancers with a microsatellite instability influence of p53 status. Anticancer Res 1999;20(1A):85-90.
31. 박재갑 편저. 대장항문학. 제2판. 서울: 일조각; 2000.

편집인의 글

현재 시행되고 있는 항암 화학요법은 대장암을 하나의 범주로 묶어 이에 해당하는 모든 환자들에게 획일적인 약제들을 투여하는 것이다. 그 결과 재발의 고위험군이라 할 수 있는 3기 대장암에 대해서 항암 요법은 약 10～15% 정도의 생존율 향상을 초래할 뿐이며 30% 내외의 환자들은 항암 화학요법에도 불구하고 궁극적으로 국소 재발이나 원격전이를 경험하게 되는 것이다. 재발에 미치는 요인이 비단 항암제의 투여방법이나 약제의 선택만으로 결정되는 것이 아니고 많은 변수가 있는 것이 사실이지만 항암 화학요법의 효과를 극대화할 필요성은 이미 오래 전부터 제시되어 온 사항이다. 따라서 향후 항암 화학요법의 방향은 환자 개개인의 특성에 맞춰 약재를 개별화하는 '맞춤치료(tailored therapy)'로 전환될 전망이다. 맞춤 치료가 이루어지기 위해서는 첫째로 개개의 암종이 가지는 항암제 감수성검사가 이루어져야 할 것이며 둘째로는 환자 개개인이 가지는 약물대사에 관여하는 여러 가지 효소 유전자의 변이(polymorphism) 여부가 중요한 인자가 된다. 5-FU가 치료의 근간이 되는 대장암에서는 무엇보다도 5-FU의 대사과정에 관여하는 효소들, 즉 thymidylate synthase, MTHFR, DPD과 같은 물질들의 활성도에 따라서 약물의 작용이 결정되기 때문에 이 효소들을 encoding 하는 유전자들의 변이여부가 중요하다. 최근 연구들에 의하면 이런 유전자들의 변이는 약물 반응에 미치는 영향 외에도 대장암의 독립적인 예후인자로서도 의의를 가지는 것으로 보고되고

있다.[1] 뿐만 아니라, 발암과정에 관여하는 유전자들 특히 암 억제 유전자인 p53 유전자의 변이나 MSI 여부도 5-FU의 작용에 영향을 미친다는 연구결과들이 많이 보고되고 있다. 본 연구는, 비록 음성 결과가 도출되기는 하였으나, 5-FU의 약물 작용에 관여하는 것으로 알려진 두가지 유전자들의 변이를 측정하고 이들 간의 상관성 여부를 분석한 논문이며 이런 점에서 향후 나아가야 할 방향을 제시한 연구로서 중요한 의의를 가진다고 생각한다. 그러나 저자들이나 독자들이 간과하지 말아야 할 점은 아직 이와 같은 연구들이 실험 조건이나 대상환자들의 선택에 따라 상이하거나 경우에 따라서는 정반대의 결과들이 보고되고 있다는 것이며[2,3] 따라서 결과를 해석함에도 신중을 기해야 할 것이다. 이론에서 실제 응용에 이르기까지 수많은 산을 넘어야하듯 아직 이 분야 역시 넘어야할 산이 많으며 앞으로 좀 더 많은 연구들이 진행되어 항암제에 대한 한국인에서의 특징적인 유전자 변이 형태의 결과들이 보고되기를 기대해 본다.

아주의대 외과학교실

서 광 욱

REFERENCES

1. Suh KW, Kim JH, Kim YB, Kim J, Jeong S. Thymidylate synthase gene polymorphism as a prognostic factor for colon cancer. J Gastrointest Surg 2005;9:336-42.
2. Rubic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. N Engl J Med 2003; 349:247-57.
3. Hemminki A, Mecklin JP, Jarvinen H, Aaltonen LA, Joensuu H. Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy [comment]. Gastroenterology 2000;119:921-8.