Tissue Microarray를 이용한 원발 신장암 조직과 전이 조직 간의 조직생물학적 표지자(Tissue-Based Biomarker)발현의 상관성에 관한 연구

국립암센터 전립선암센터 ¹비뇨기과, ²병리과, ³국립암센터 바이오메트릭연구과

김성한¹ · 박원서² · 박은영³ · 박보람³ · 주정남³ · 정재영¹ · 서호경¹ · 이강현¹ · 정진수¹

The Correlation of Tissue-Based Biomarkers in Primary and Metastatic Renal Cell Carcinoma Lesions: A Tissue Microarray Study

Sung Han Kim¹, Weon Seo Park², Eun Young Park³, Boram Park³, Jungnam Joo³,
Jae Young Joung¹, Ho Kyung Seo¹, Kang Hyun Lee¹, Jinsoo Chung¹

Departments of ¹Urology and ²Pathology, Center for Prostate Cancer; ³Biometric Research Branch, Division of Cancer Epidemiology and Prevention, Research Institute and Hospital of National Cancer Center, Goyang, Korea

Purpose: The study was aimed to determine the correlations of tissue-based biomarker expressions between primary and metastatic specimens of renal cell carcinoma and with several well-known prognostic clinicopathological parameters.

Materials and Methods: The immunohistochemistry (IHC) was used to determine the expression levels of 9 tissue-based markers calculated in H-score expressed by percentage of expression multiplied by the intensity score (0, 1, 2, and 3 points). Using 17 patients' 38 specimens paired with primary renal lesion and its metastatic lesions collected between 2004 and 2015, Tissue microarray with IHC was performed with BAP1, PBRM1, pS6, PTEN, TGase2, PD-L1, CA9, PSMA, and Ki-67 on formalin-fixed paraffin-embedded sections. Pearson correlation and accuracy test were performed to analyze the correlation between primary and metastatic tissues.

Results: The 17 patients' mean age was 56.9 years old, mean tumor size was 7.9 cm, and the male to female ratio was 13:4 (76.5%:23.5%), respectively. Three patients had 2, 3, and 3 metastatic tissues, and the rest of 14 patients had only one metastatic tissue. The H-score (PSMA and Ki67) and intensity score (pS6 and PSMA) showed that some differential significant markers were identified which had statistical correlations of expression levels between primary and metastatic lesions among 9 markers. However, no real correlation of PSMA, Ki67, and pS6 markers were found their expressions of between primary and metastatic tissues because of their skewed expressions.

Conclusions: Tissue markers failed to correlate their expression levels in primary lesions with those of metastatic lesions. (Korean J Urol Oncol 2016;14:152-158)

Key Words: Renal cell carcinoma · Metastasis · Tissue microarray · Biomarker · Immunohistochemistry

Received October 15, 2016, Revised December 8, 2016, Accepted December 16, 2016

Corresponding Author: Jinsoo Chung

Department of Urology, Center for Prostate Cancer, National Cancer Center, 323 Ilsan-ro, Ilsandong-gu, Goyang 10408, Korea

E-mail: cjs5225@ncc.re.kr, Tel: +82-31-920-2456, Fax: +82-31-920-2474

· This study was supported by the Korean National Cancer Center Grants (1510650-1).

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

2016 © Copyright The Korean Urological Oncology Society and The Korean Prostate Society. All Rights Reserved.

서론

신장암(renal cell carcinoma)은 미국 등 서구에서 전체 암의 약 3%, 국내에서는 약 1.8% 정도를 차지하며 매년 그 발생률이 2-3%씩 증가하고 있다.^{1,2} 신장암은 진단 당시에 이미 약 25-30% 정도가 타 장기로 전이가 발생한 상태로 발견되는 것으로 보고되고 있다. 국소 신장암의 경우에도 완치가 가능한 수술적 치료에도 불구하고 추적 관찰 기간 중 약 3-7%의 환자들에서 재발이 일어나고, 약 20-40%의 환자들에서 전이가 발견되는 것으로 보고되고 있다.³ 진행성 신장암의 경우에는 기존의 항암, 방사선, 면역 치료에 10-15%정도만의 치료 반응 효과를 보여 예후가 불량하다.⁴ 이는 신장암이 단순한 하나의 세포로 기원된 암이 아니라 그 기원세포, 유전자 및 염색체 변화가 다양한 여러 조직형으로 구성된 암이고, 각 조직형에 따라서 그 임상 양상 및 치료에 대한 반응이 각기 다르기 때문에 같은 병기 내에서도 다양한 임상 양상을 보여, 전체적으로 사망률이 20-40%에 달하는 비뇨기종양 중 가장 치명적인 암으로 알려져 있다.^{3,5}

지금까지 알려진 신장암의 재발 및 예후 인자들로 TNM 병기, Fuhrman nuclear grade, 조직형(histologic subtype), 림프혈관 침범(lymphovascular invasion) 유무, 육종양 분화(sarcomatoid differentiation) 존재 등의 임상병리학적 인자들이 유일하며, 아직까지 예후 예측 인자로 확립된 분자생물학적 조직 인자(biomolecular tissue marker)가 없는 실정 이어서 이 분야에 추가적인 연구들이 절실히 필요한 상황이다.⁶

최근 들어 유전자 서열(gene sequencing) 연구를 비롯한 병태생리에 대한 연구들이 활발히 진행되면서 다양한 표적 치료제들이 개발되어 여러 암들 중 신장암은 빠르게 변화하고 있는 암이다.^{5,7} 하지만 전이 신장암은 비록 과거 면역 치료 시대에 비해 최근의 표준 치료로 확립된 표적치료 시대에는 예후가 많이 향상되었지만, 아직까지도 치료 예측 인자, 분자생물학적 예후 예측 인자(predictive marker) 및 유전자 변이 인자에 대해서는 잘 모르고 있다.⁷

von Hippel-Lindau (VHL) 유전자는 신장암의 75-80%를 차지하는 투명세포형 (clear cell type)의 80-90% 이상에서 비활성화가 발견되며, 신장암 병인에 결정적인 역할을 한다고 알려져 있다.^{7,8} 다양한 분자생물학적 그리고 유전체 연구들을 통해 투명세포형 신장암 발생에 있어 VHL-HIF-VEGF pathway의 중요성도 추가로 알게 되었다.⁸ 이 기전에 작용하는 tyrosine kinase inhibitors (TKI) 약제들의 개발은 진행성 신장암 환자의 치료 반응을 및 예후를 향상

시켰다.⁷ 또 다른 중요한 신장암의 병태생리 기전인 PI3K/Akt/mTOR pathway을 표적으로 하는 mTOR Inhibitors 약제들도 등장하여 진행성 신장암 환자의 치료 반응을 및 예후를 향상시켰다.⁴

이에 이번 연구는 신장암의 여러 분자생물학적 그리고 유전체 연구들을 통해 알게 된 BAP1, PBRM1, pS6, PTEN, TGase2, PD-L1, CA9, PSMA, Ki67 등의 9개의 예후 및 치료 반응 조직 표지자(tissue-based biomarker)들의 임상적 의미를 알아보려고 하였다. 이에 전이성 신장암 동일 환자의 원발 신장암 조직과 전이 조직에 대한 조직 미세배열(tissue microarray, TMA)과 면역조직염색법(immunohistochemistry, IHC)을 이용한 원발 및 전이 조직 내 표지자들의 발현 상관 관계를 알아보았다.

대상 및 방법

1. 환자군

1992년부터 2013년까지 전향적으로 저장된 신장암 데이터베이스에서 신장암으로 신장수술(근지적 신적출술, 부분 신절제술 또는 종양 감축 신절제술)을 시행 받은 환자(351개의 원발 신장암 조직)와 전이 병소 절제술 또는 전이 병소 생검으로 전이 조직이 확보된 환자(287개의 전이 조직)를 추출하였다. 이들 중 임상병리 정보가 없거나 생존과 관련한 추적 관찰이 완료되지 않은 환자들을 제외한 후 원발 조직과 전이 조직이 모두 확보된 17명의 17개 원발 조직과 21개의 전이 조직(32개 전이 조직들 중 TMA 제작이 가능했던)을 최종적으로 본 연구에 이용하였다. 전이 조직이 2개 이상인 환자들은 총 3명이었고 이들의 전이 조직들은 간, 폐, 뼈, 임파선, 기타 장기 등이 전이 병소 절제술을 통해 확보된 조직이었다.

총 9개(BAP1, PBRM1, pS6, PTEN, TGase2, PD-L1, CA9, PSMA, Ki67) 표지자들이 본 연구의 조직 표지자로 선택되었다. 이들은 mTOR pathway 관련 인자(pS6, PTEN)와 VHL-HIF-VEGF pathway 관련 인자(CA-9), 신장암 전이에 중요한 신생혈관 형성, 증식, 치료 저항 및 진행 관련 인자(PSMA, Ki67, TGase-2, PD-L1), 그리고 투명세포형 신장암에서 새롭게 발견된 유전적 변이 예후 인자들(BAP1, PBRM1)이다.^{6,7,9,10}

모든 조직과 각 환자들의 정보는 후향적으로 분석하였고, 조직들에 대한 병리학적 판단과 IHC 결과의 판독은 15년 이상 경력의 비뇨기종양 전문 병리학자 1명이 환자 및 조직에 대한 정보 없이 무기명의 암맹 상태로 비뇨기종양 전문의 1명과 함께 판독하였다. 조직들은 World Health Organization/International Society of Urological Pathology con-

sensus conference¹¹ 기준에 따라 판독하였고, 모든 환자들의 정보는 본 기관의 의생명연구심의위원회(Institutional Review Board of the Research Institute and Hospital National Cancer Center, IRB No. NCC 2015-0219)의 절차 기준에 따라 환자들의 동의 면제에 관한 허락을 받은 후 연구를 진행하였다.

2. 조직 미세배열 제작

면역조직화학염색(immunohistochemical staining, IHC)과 조직 미세배열(TMA)에 관해서는 2015년 본 기관에서 발표한 전립선암 TMA 연구의 방법론처럼 제작 및 염색 분석을 진행하였다.^{12,13} 보관된 포르말린 고정 파라핀 포매 신장암 조직들의 hematoxylin and eosin 염색 슬라이드를 재검하여 병리전문의가 종양 부위를 찾고 TMA를 할 곳 두 군데를 표시하였다. TMA는 대표적인 종양 부위와 정상 부위 세 쌍으로 찾아 해당 부위의 파라핀 블록을 2 mm 직경의 코어를 얻어 recipient 블록에 옮겨 심는 방법으로 신장암 TMA를 만들었다.¹⁴ 종양 내의 다른 Fuhrman nuclear grade를 보이는 부분이 있다면, 두 개의 코어는 서로 다른 위치에서 얻어 TMA를 만들었다. TMA 블록을 microtome으로 3-5 μ m 두께로 박절한 후 주름을 펴주고 슬라이드에 일정 방향으로 부착시켜 건조시킨 후 각각 IHC를 시행하고 관찰하였다.

3. 면역조직화학 염색

9개의 조직생물학적 표지자들이 갖고 있는 조건을 충족시켜 Ventana automatic immunostainer (Ventana, Benchmark, AZ, USA)을 이용하여 염색을 진행하였다. 각 표지자들은 그들의 특정 조건의 용액을 이용하여 deparaffinization, heat-induced antigen retrieval을 거쳤으며 그 조건들은 부록(Supplementary Table 1)에 정리하였다. 표지자들의 조직 내 발현 판독은 TMA를 만들어 환자 번호를 삭제한 후에 무기명 연구 번호로 바꿔 병리 판독의 1명과 비뇨기 종양 전문의 1명이 각 슬라이드를 조직 내 발현 정도에 따른 반정량적(semiquantitatively) 방법으로 판독하였다. 발현 강도(intensity score)는 음성일 때 0점, 약할 때 1점, 중등도 때 2점, 강할 때 3점으로 점수를 매겼다. 각각의 염색강도를 보이는 세포의 비율을 동시에 관찰한 후, 양성 세포의 발현 비율 점수(0-100%)와 발현 강도(0, 1, 2, 3)의 곱의 합(H-score, 0-300점)으로 판독하였다.^{8,15-18} 발현 강도가 동일한 경우 BAP1 loss, PTEN loss는 가장 작은 값을, 나머지 표지자들의 경우 가장 큰 값을 대표값으로 분석에 사용하였다.

4. 통계 분석

IHC를 통한 H-score와 발현강도를 모두 사용하여 9개 표지자들의 원발 조직과 전이 조직의 발현 상관성을 알아보

았다. H-score를 사용하여 피어슨 상관계수(Pearson correlation coefficient)를 계산하였고, 동일인의 원발과 전이 조직에서의 표지자들의 발현 상관성을 보는 정확도 검사(accuracy test)로 두 조직 간 발현 일치율을 계산하였다. 여기서, 일치율은 2*2 contingency table의 전체 중 대각선의 비율(proportion)로 원발과 전이 조직이 발현 강도에서 모두 positive (2 또는 3점)이거나 negative (0 또는 1점)인 비율을 의미하며 일치율이 0.9 이상, 0.8 이상에 대한 가설검정을 수행하였다. 모든 분석은 의료 전문 통계학자들에 의해 시행되었고, SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 사용하여 p값이 0.05 미만일 때 통계학적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

본 연구의 참여 환자들의 평균 연령은 56.9 $\pm$ 10.5세였고, 남녀 성비는 13:4 (76.5%:23.5%), 원발 신장암 조직 내 종양 크기는 평균 7.9 $\pm$ 3.2 cm였다(Table 1). 70.6%의 환자들이 T3-4 or N+ stage 환자들이었고, Fuhrman nuclear grade는 56.2%의 환자가 high grade인 grade 3/4였다. 그 이외의 예후 인자로 알려진 병리 소견으로는 sarcomatoid differentiation 이 11.8%, lymphovascular invasion이 23.5%, capsular invasion 이 11.8%로 관찰되었다.

본 연구에 사용된 17개의 matched pair인 원발-전이 조직의 9개 표지자에 대한 H-score와 발현 강도 유무(음성 대 양성)에 대해 판독하였고 이를 Table 2에 각각 기술하였다. H-score에서, pS6 (중간값, 0점), PSMA (0점), Ki67 (1점)은 거의 발현 점수가 관찰되지 않았다. 발현 강도 정도를 원발과 전이 조직에서 비교했을 때, 발현율이 비슷하거나 전이 조직에서 강한 발현을 보이는 것은 BAP1 loss (전이 47.1% 대 원발 41.2%), PBRM1 (29.4% 대 23.5%), pS6 (5.9% 대 0%), PTEN loss (47.1% vs. 41.2%), TGase2 (70.6% vs. 70.6%), PD-L1 (35.3% vs. 17.6%), CA9 (94.1% vs. 88.2%)이었다. 원발 조직의 발현 강도가 높은 것은 PSMA (전이 0% vs. 원발 5.9%)와 Ki67 (58.8% vs. 88.2%)뿐이었다(Table 2).

원발 및 전이 조직의 발현 상관성 분석에서 연속 변수인 H-score를 이용했을 때는 PSMA (상관계수=0.998)와 Ki67 (0.968) 표지자만이 두 조직들 간에 높은 상관성을 보였고($p < 0.05$), 발현 강도 유무로 보았을 때는 pS6 (일치도=0.94), PSMA (0.94) 표지자가 높은 일치율(accuracy)을 보였다(Table 3). 하지만 각 마커들이 대부분 발현이 되지 않았고 일치율에 대한 가설 검정 결과 유의하지 않으므로 원발 및 전이 조직 간 3개의 표지자들이 발현 유사성을 보인다고 할 수 없다.

고 찰

현재까지 알려진 신장암의 다양한 임상병리학적 예후 인

Table 1. Baseline characteristics

Variable	Value
Age (y)	56.88±10.46
Body mass index (kg/m ²)	24.80±3.36
Tumor size (cm)	79.00±30.20
Sex, male:female	13:4 (76.5:23.5)
Diabetes mellitus	4 (23.5)
Hypertension (miss=1)	3 (17.6)
Smoke	
Smoker	4 (23.5)
Ex-smoker	1 (5.9)
No-smoker	12 (70.6)
ASA physical status	
I:II+III:unknown	5:11:1 (29.4:64.7:5.9)
Pathologic stage	
T1-2:T3-4 or N+	5:12 (29.4:70.6)
Fuhrman grade	
1+2:3+4:unknown	7:9:1 (41.2:52.9:5.9)
Sarcomatoid differentiation	2 (11.8)
Necrosis	1 (5.9)
Lymphovascular invasion	4 (23.5)
Capsular invasion	2 (11.8)
Site of metastasis	32
Lung	10 (31.2)
Lymph node	7 (21.9)
Bone	3 (9.4)
Liver	4 (12.5)
Others sites*	8 (25.0)

Values are presented as mean±standard deviation or number (%).

ASA: American Society of Anesthesiologists.

*Brain, muscle, skin, small intestine, pancreas, stomach, uterus.

자들은 환자의 예후 예측에 많은 도움을 주고 있으나, 예후 예측의 정확도에 있어서는 한계를 보여주고 있다.¹⁹ 이는 신장암의 발생 및 진행이 단순히 단일 암의 단일 clone 기원 세포에서 기인한 것이 아니라 여러 세포들의 유전자 및 염색체의 다양한 변화로 일어나기 때문으로, 심지어 동일 환자의 신장암에서도 여러 조직형들이 관찰되고 다양한 종양의 변화가 일어나 다양한 치료 반응 및 예후가 보이고 있다.^{4,7,19}

원발 신장암과 전이 신장암의 기존 연구들에서도 알 수 있듯이 신장암의 다양성은 유전자 서열 분석, 조직 내 발현 형태 구조 연구 등에서 이미 밝혀져 있다.^{19,20} 기존 연구들처럼 단순히 원발암 조직의 이해만으로는 전이 신장암의 예후를 정확히 예측하는 데 한계를 보일 것으로 생각되며, 전이 조직에 대한 새로운 형태의 이해 연구가 필요할 것으로 본다.^{4,7,19} 이런 면에서 신장암의 IHC를 이용한 TMA 연구는 수 십 년 동안 질병의 분자병리 기전을 이해하고 예후 인자를 병리학적 그리고 형태학적 관점에서 규명할 수 있는 좋은 도구로, 신장암 연구에 많이 이용되고 있다. 특히 신장암처럼 다양한 분화 형태와 다양한 임상 양상과 예후를 보이는 암에 대한 연구에서 TMA를 이용한 IHC 연구는 암의 다양성을 접근해 가는 훌륭한 방법론으로 볼 수 있겠다.

이번 연구는 신장암의 발생기전으로 잘 알려진 대표적인 9개의 조직 표지자들에 대한 원발암 조직과 전이암 조직을 이용한 분자생물학적 표지자들의 발현상관성을 알아보았다. 각 표지자들에 대한 기존의 연구 결과들을 보면, BAP1 loss나 PBRM1 loss는 새로이 발견된 투명세포형 신장암의 불량 예후 유전자들이다.^{6,21} BAP1 loss보다는 PBRM1 loss가 예후가 좀 더 좋고, BAP1 loss와 PBRM1 loss 모두가 있는 경우는 가장 예후가 나쁘다고 알려져 있다. BAP1 loss의 예후가 나쁜 이유는 pS6와 PTEN loss처럼 mTOR pathway와

Table 2. Summary of H-score and intensity score for 9 IHC markers

IHC marker	Primary lesion		Metastatic lesion	
	H-score, median (range)	Intensity, n (%)	H-score, median (range)	Intensity, n (%)
BAP1 loss	195 (6-285)	7 (41.2)	90 (3-285)	8 (47.1)
PBRM1	6 (0-171)	4 (23.5)	9 (0-285)	5 (29.4)
pS6	0 (0-6)	0 (0)	0 (0-270)	1 (5.9)
PTEN loss	90 (0-285)	7 (41.2)	90 (0-285)	8 (47.1)
TGase2	90 (3-270)	12 (70.6)	225 (6-270)	12 (70.6)
PD-L1	0 (0-90)	34 (17.6)	6 (3-285)	6 (35.3)
CA9	36 (0-147)	15 (88.2)	51 (18-90)	16 (94.1)
PSMA	0 (0-90)	1 (5.9)	0 (0-9)	0 (0)
Ki67	3 (0-120)	15 (88.2)	3 (0-30)	10 (58.8)

IHC: immunohistochemistry.

Table 3. Correlation analysis between primary and metastatic lesions

IHC marker	H-score		Intensity	
	Correlation	Accuracy (p) 95% CI	p-value ^{a)}	p-value ^{b)}
BAP1 loss	0.081	0.47 (0.23-0.72)	>0.999	0.997
PBRM1	0.286	0.82 (0.57-0.96)	0.762	0.549
pS6	-0.127	0.94 (0.71-1.00)	0.482	0.118
PTEN loss	0.558	0.71 (0.44-0.90)	0.978	0.758
TGase2	0.235	0.53 (0.28-0.77)	>0.999	0.989
PDL1	-0.144	0.59 (0.33-0.82)	0.999	0.962
CA9	0.041	0.82 (0.57-0.96)	0.762	0.549
PSMA	0.998	0.94 (0.71-1.00)	0.482	0.118
Ki67	0.968	0.59 (0.33-0.82)	0.999	0.962

IHC: immunohistochemistry, CI: confidence interval.

^{a)}p-value for hypothesis test under, $H_1: p > 0.9$. ^{b)}p-value for hypothesis test under, $H_1: p > 0.8$.

PBRM1 loss: correlation, 0.483 accuracy, 0.88 (0.64-0.99), ^{a)}p-value: 0.482, ^{b)}p-value: 0.310.

간접적으로 연관되어서 일 것이라고 추정되고 있다.^{22,23} CA9은 VHL-HIF-VEGF pathway와도 관련이 있지만 이전에 투명 세포형 신장암에서 좋은 예후 인자로 알려진 표지자이다.^{7,15,16,21,24} TGase-2, PD-L1은 새롭게 알려진 불량 예후 인자들로 최근 TKI 제제들에 대한 예후와 관련성이 대두된 인자로 이들의 발현 시 치료 반응이나 예후가 불량한 것으로 알려져 있다.^{16,23,24} 그리고 PSMA는 신생혈관 형성과 증식에 관여하는 것으로 알려진 유전자이고, Ki67는 세포 증식과 관련된 인자로 알려져 있다.^{9,10}

반정량법인 H-score로 보았을 때는 PSMA (coefficient=0.998)와 Ki67 (0.968) 표지자만, 정성적인 발현 강도 유무(intensity)로 보았을 때는 pS6 (accuracy=0.94), PSMA (0.94) 표지자만이 원발암 조직과 전이암 조직에서 높은 발현 상관성을 보였다(Table 2). 하지만, 각 표지자들의 원발암과 전이암 조직의 발현 분포를 도식화해 보면 PSMA, Ki67, pS6 표지자들이 대부분 발현이 되지 않아 상관계수와 일치율이 높게 나온 것을 확인하였다. 그러므로, 실질적으로 이들 표지자들은 모두 원발암과 전이암 조직에서 정량적으로나 정성적으로 유의한 발현 상관성을 보인다고 할 수 없었다. 즉 이번 연구 결과를 토대로 신장암의 원발암 조직과 전이 조직에서 다양한 다른 형태로 분자생물학적인 변화가 일어난다는 사실을 각각의 표지자들의 발현을 통해 알 수 있었다.

Lee 등²⁵이 2013년에 발표한 전이 신장암의 조직 다양성에 대한 IHC 연구에서 원발암 조직과 전이 조직과의 상관성은 이번 연구처럼 유의하지 않았다. 이들은 조직형만을 보았을 때, 원발 투명세포형 신장암의 전이 조직에서는 24.4%가 비투명세포형을 가지고 있고, 이런 전이 신장암 환자가 전체의 52.9%를 차지한다고 보고하였다. 또 다른 연구로 원발암과 전이 조직의 상관성 연구에서는 혈관의 분포

도를 비교해 보았다. 동일 면적의 조직에서 미세 혈관이 차지하는 전체 면적이 원발 종양이 전이 종양보다 크다고 보고하였다.²⁶ 이뿐만 아니라 면역 세포들의 분포도,²⁷ 유전자와 단백질 분석에서도 원발암 조직과 전이 조직에서는 뚜렷한 차이를 존재한다는 연구들도 있다.¹⁹ 하지만, 이와 다르게 차이가 없다고 발표한 연구자들도 있다.²⁸

기존 연구들에 따르면 전이 조직이 원발암 조직보다 질병 진행과 관련된 표지자들이 상승되어 있다고 하였다.^{7,26,28} Schultz 등²⁹의 연구에서도 pS6 표지자가 원발 조직보다 전이 조직에서 발현이 높다고 보고하였고, 이는 질병 특이 생존률(disease-specific survival)과도 유의한 연관성이 있다고 발표하였다. Jilaveanu 등²⁴도 PD-L1 표지자가 원발 조직보다 전이 조직에서 상승되어 있다고 하였다. 이번 연구에서도 pS6 표지자가 5.9%로 0%인 원발암 조직보다 높게 발현되고 있고, 전이암 조직의 PD-L1 표지자가 35.3%로 원발암 조직보다 2배 정도 높게 발현된 것을 볼 때 기존 연구들의 소견과 유사했다. 나아가 Liontos 등³⁰의 전이 신장암 IHC 소견에서 PTEN loss가 50% 발현되어 관찰된다고 보고하였고 이번 연구에서도 유사한 47.1%가 전이 조직에서 발현되는 것을 볼 때, 이번 연구의 결과가 타 연구의 결과와 큰 차이가 없음을 알 수 있었다.

하지만 기타 연구들이 한정된 생물학적 표지자들을 가진 IHC 연구인 점을 고려했을 때, 본 연구는 동일인에서 신장암의 원발암 조직이 전이를 일으킬 때 발생할 수 있는 암 발생기전과 전이 시 필요한 신생혈관 형성, 증식, 진행 기전 등과 관련한 9가지 분자생물학적 조직 표지자들을 포괄적으로 사용하여 연구를 시행했다는 점에서 유일한 논문이며 한국에서 보고된 동일 환자들에서의 첫 신장암의 원발 조직과 전이 조직의 표지자 연구라 할 수 있다. 불량 예후를

보인다고 알려진 BAP1 loss, 논란이 있는 PBRM1 loss, 불량 예후를 보이는 PTEN loss와 pS6 발현, 불량 예후를 보이는 Ki67, PD-L1, TGase2 발현, 좋은 예후를 보이는 CA9 발현, 현재까지 모르고 있는 PSMA 발현 등에 대한 정보에 대한 최초의 한국인 비교 연구라 하겠다.

이번 연구는 원발 및 전이 신장암에서 종양의 이형성(tumor heterogeneity)과 분자생물학적 다양성을 동일 환자들에서 보여주었다. 원발암 조직이나 전이암 조직에 대한 소견(특히 생검조직에 대한 검사)만으로 전체 종양에 대한 예후를 예측하는 데 한계가 있음을 기존 연구들처럼 보여주었다.¹⁹ 향후 더 많은 환자들에 대한 대규모 연구가 이루어진다면 원발암 조직 또는 전이 조직 중 어느 곳의 분자생물학적 정보가 환자 예후 및 치료 반응 예측에 더 중요한지에 대한 연구도 시행해 볼 가치가 있을 것으로 본다.

이번 연구는 비록 전향적으로 조직들을 모았지만 분석에 있어서는 후향적으로 이뤄진 점과 적은 수의 환자와 조직들을 가지고 분석되었다는 한계점이 존재한다. 또한 IHC 과정상에 발생할 수 있는 기술적 오류로 인한 조직 내 발현 차이 또한 본 연구가 갖고 있는 한계점이다. 이런 한계를 극복하기 위해 추후 연구에서는 보다 많은 환자와 조직으로, 좀 더 객관적인 관독 및 분석을 할 수 있는 방법의 개발 및 적용이 필요로 할 것으로 보인다. 그리고 분자생물학적, 병리학적 기전의 특성에 따른 해당 표적 표지자들이 다양한 영향 요인들에 의해 결과 해석에 영향을 받을 수 있으므로, 추후 추가적인 각 표적 표지자들의 예후 관련 연구에서는 충분한 수의 대규모 환자군 확보 및 기타 연구 결과들을 이용해야 한계점을 극복할 수 있을 것이다.

결 론

이번 연구는 9가지 조직생물학적 표지자(BAP1, PBRM1, pS6, PTEN, TGase2, PD-L1, CA9, PSMA, Ki67)들에 대한 원발 신장암 조직과 전이 조직 간의 발현의 상관성을 보았을 때, 일부 표지자들이 높은 발현 상관성을 보이긴 하였지만 대부분의 표지자들이 원발 조직과 전이 조직 간에 유의한 발현 상관성을 보이지 않았다. 결국 신장암에 대한(특히 원발 및 전이 조직에 대한) 다양성 연구에 향후 더 많은 수의 환자 조직들로 이뤄진 대규모 연구가 필요할 것으로 보인다.

이해관계(Conflict of Interest)

저자들은 이 논문과 관련하여 이해관계의 충돌이 없음을 명시합니다.

부 록

Supplementary Table은 온라인(<https://doi.org/10.22465/kjuo.2016.14.3.152>)을 접속하여 볼 수 있습니다.

REFERENCES

1. Jung KW, Won YJ, Oh CM, Kong HJ, Cho H, Lee JK, et al. Prediction of cancer incidence and mortality in Korea, 2016. *Cancer Res Treat* 2016;48:451-7
2. Znaor A, Lortet-Tieulent J, Laversanne M, Jemal A, Bray F. International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality. *Eur Urol* 2015;67:519-30
3. Motzer RJ. New perspectives on the treatment of metastatic renal cell carcinoma: an introduction and historical overview. *Oncologist* 2011;16 Suppl 2:1-3
4. Jonasch E, Gao J, Rathmell WK. Renal cell carcinoma. *BMJ* 2014;349:g4797
5. Motzer RJ, Escudier B, Choueiri TK. Treatment of advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2016;374:889-90
6. Brugarolas J. Molecular genetics of clear-cell renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2014;32:1968-76
7. Skolarikos AA, Papatouris AG, Alivizatos G, Deliveliotis C. Molecular pathogenesis of renal cancer. *Am J Nephrol* 2006; 26:218-31
8. Lontos M, Trigka EA, Korkolopoulou P, Tzannis K, Lainakis G, Koutsoukos K, et al. Expression and prognostic significance of VEGF and mTOR pathway proteins in metastatic renal cell carcinoma patients: a prognostic immunohistochemical profile for kidney cancer patients. *World J Urol* 2016 Jul 9 [Epub]. <https://doi.org/10.1007/s00345-016-1890-7>
9. Laird A, Harrison DJ, Stewart GD. The development of prognostic and predictive biomarkers in renal cell cancer are not one and the same thing. *Eur Urol* 2015;67:21-2
10. Stewart GD, Harrison DJ, Berney DM, Powles T. The molecular biology of renal cancer: another piece of the puzzle. *Eur Urol* 2014;66:85-6
11. Moch H. The WHO/ISUP grading system for renal carcinoma. *Pathologe* 2016;37:355-60
12. Kim SH, Kim SH, Joung JY, Lee GK, Hong EK, Kang KM, et al. Overexpression of ERG and wild-type PTEN are associated with favorable clinical prognosis and low biochemical recurrence in prostate cancer. *PLoS One* 2015;10:e0122498
13. Park WS, Ryu J, Cho KH, Choi MK, Moon SH, Yun T, et al. Human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinomas in Korea: use of G1 cycle markers as new prognosticators. *Head Neck* 2012;34:1408-17
14. Vogel UF, Bueltmann BD. Simple, inexpensive, and precise paraffin tissue microarrays constructed with a conventional microcompound table and a drill grinder. *Am J Clin Pathol*

- 2006;126:342-8
15. Argani P, Hicks J, De Marzo AM, Albadine R, Illei PB, Ladanyi M, et al. Xp11 translocation renal cell carcinoma (RCC): extended immunohistochemical profile emphasizing novel RCC markers. *Am J Surg Pathol* 2010;34:1295-303
16. Choueiri TK, Figueroa DJ, Fay AP, Signoretti S, Liu Y, Gagnon R, et al. Correlation of PD-L1 tumor expression and treatment outcomes in patients with renal cell carcinoma receiving sunitinib or pazopanib: results from COMPARZ, a randomized controlled trial. *Clin Cancer Res* 2015;21:1071-7
17. Ma LJ, Lee SW, Lin LC, Chen TJ, Chang IW, Hsu HP, et al. Fibronectin overexpression is associated with latent membrane protein 1 expression and has independent prognostic value for nasopharyngeal carcinoma. *Tumour Biol* 2014;35:1703-12
18. Minardi D, Lucarini G, Santoni M, Mazzucchelli R, Burattini L, Pistelli M, et al. VEGF expression and response to sunitinib in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 2013;33:5017-22
19. Semeniuk-Wojtaś A, Stec R, Szczylik C. Are primary renal cell carcinoma and metastases of renal cell carcinoma the same cancer? *Urol Oncol* 2016;34:215-20
20. Tan PH, Cheng L, Rioux-Leclercq N, Merino MJ, Netto G, Reuter VE, et al. Renal tumors: diagnostic and prognostic biomarkers. *Am J Surg Pathol* 2013;37:1518-31
21. Kapur P, Peña-Llopis S, Christie A, Zhrebker L, Pavía-Jiménez A, Rathmell WK, et al. Effects on survival of BAP1 and PBRM1 mutations in sporadic clear-cell renal-cell carcinoma: a retrospective analysis with independent validation. *Lancet Oncol* 2013;14:159-67
22. Sharpe K, Stewart GD, Mackay A, Van Neste C, Roife C, Berney D, et al. The effect of VEGF-targeted therapy on biomarker expression in sequential tissue from patients with metastatic clear cell renal cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19:6924-34
23. Bellmunt J, Teh BT, Tortora G, Rosenberg JE. Molecular targets on the horizon for kidney and urothelial cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10:557-70
24. Jilaveanu LB, Shuch B, Zito CR, Parisi F, Barr M, Kluger Y, et al. PD-L1 expression in clear cell renal cell carcinoma: an analysis of nephrectomy and sites of metastases. *J Cancer* 2014;5:166-72
25. Lee C, Park JW, Suh JH, Nam KH, Moon KC. Histologic variations and immunohistochemical features of metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Korean J Pathol* 2013;47:426-32
26. Aziz SA, Sznol J, Adeniran A, Colberg JW, Camp RL, Kluger HM. Vascularity of primary and metastatic renal cell carcinoma specimens. *J Transl Med* 2013;11:15
27. Remark R, Alifano M, Cremer I, Lupo A, Dieu-Nosjean MC, Riquet M, et al. Characteristics and clinical impacts of the immune environments in colorectal and renal cell carcinoma lung metastases: influence of tumor origin. *Clin Cancer Res* 2013;19:4079-91
28. Zhang JP, Yuan HX, Kong WT, Liu Y, Lin ZM, Wangs WP, et al. Increased expression of Chitinase 3-like 1 and microvessel density predicts metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Tumour Biol* 2014;35:12131-7
29. Schultz L, Chaux A, Albadine R, Hicks J, Kim JJ, De Marzo AM, et al. Immunoexpression status and prognostic value of mTOR and hypoxia-induced pathway members in primary and metastatic clear cell renal cell carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2011;35:1549-56
30. Lontos M, Trigka EA, Korkolopoulou P, Tzannis K, Lainakis G, Koutsoukos K, et al. Expression and prognostic significance of VEGF and mTOR pathway proteins in metastatic renal cell carcinoma patients: a prognostic immunohistochemical profile for kidney cancer patients. *World J Urol* 2016 Jul 9 [Epub]. <https://doi.org/doi:10.1007/s00345-016-1890-7>

김성한 외 : 원발 신장암 및 전이암 조직 간 조직생물학적 표지자 발현의 상관성

대한비뇨기종양학술지 : 제 14 권 제 3 호 2016

Supplementary Table 1. Primary antibodies used in this study

Antibody	Clone	Company	Dilution	Retrieval
BAP1	C-4	Santa Cruz	20	EXT
PBRM1	poly	Bethyl Lab	2,000	MILD
pS6	Ser235/236	Cell Signaling Technology	800	MILD
PTEN	Y184	Gene Tex	100	MILD
TGase-2	CUB7402	Abcam	400	MILD
PD-L1	130021	R&D	200	MILD
pVHL	Ig32	BD Biosciences	400	MILD
HIF-1 α	ESEE122	Abcam	3,000	CC1
HIF-2 α	EP190b	Abcam	100	EXT
VEGFR 1	Flt-1/EWC	Abcam	50	MILD
VEGFR 2	A-3	Santa Cruz Biotechnology	20	MILD
VEGFR 3	54703	R&D	400	CC1
PDGFR- α	C-20	Santa Cruz	100	MILD
PDGFR- β	P-20	Santa Cruz Biotechnology	500	MILD
CA-9	poly	NOVUS	200	MILD
Ki-67	JC/70A	DAKO	100	MILD
PSMA	QBEnd10	Novocastra	500	MILD
CD31	1D6	Novocastra	100	MILD
CD34	MIB-1	DAKO	200	STD

Retrieval: pH 8.0 ethylenediaminetetraacetic acid buffer: CC1 - for 8 minutes, Mild - for 30 minutes, STD- for 60 minutes, and EXT -for 90 minutes.