근육침윤방광암의 새로운 바이오마커와 치료 타겟에 대한 고찰

¹경북대학교 의과대학 비뇨기과학교실, ²경북대학교 국제재생의학연구소

하윤석^{1,2}

Developing Biomarkers and New Therapeutic Targets in Muscle Invasive Bladder Cancer

Yun-Sok Ha^{1,2}

¹Department of Urology, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu, Korea

²Joint Institute for Regenerative Medicine, Kyungpook National University, Daegu, Korea

Muscle-invasive bladder cancer (MIBC) is classified into a heterogeneous life-threatening epithelial tumor with a high rate of metastasis and a dismal survival rate. Dissimilarity in genetic or epigenetic environment of MIBC causes considerable uncertainty in cancer aggressiveness, progression, and response rates, representing this cancer especially tough to manage. Several definite cases consist of point mutations in genes encoding receptor tyrosine or cytosolic kinases and alterations in epigenetics machinery, including both methylated genes and respective effector enzymes. Considering the highly aggressive and invasive character of MIBC, various attempts have been made to accurately detect and treat the disease using radical cystectomy alone or in combination with adjuvant chemo- and/or radiotherapy including neo-adjuvant chemotherapy. Nowadays advances in the field of immunotherapy with the introduction of checkpoint inhibitors have led to paradigm shifts in the treatment of MIBC. In current review, several published biological markers were introduced from diverse experimental techniques including gene expression profiling, mutations, single nucleotide polymorphisms, and epigenetic alterations. Moreover, the clinical evidence of new therapeutic targets with focus on checkpoint inhibitor in MIBC was summarized. These markers may be the excellent tools to predict MIBC prognosis and drug-responsiveness in the near future. (Korean J Urol Oncol 2020;18:1-10)

Key Words: Urinary bladder neoplasms • Biomarker • Therapeutic target

Received November 21, 2019, Revised December 17, 2019,
Accepted December 23, 2019

Corresponding Author: Yun-Sok Ha

Department of Urology, Kyungpook National University Hospital,
School of Medicine, Kyungpook National University, 680
Gukchaebosang-ro, Jung-gu, Daegu 41944, Korea
E-mail: yunsokha@knu.ac.kr

Tel: +82-53-200-5843, Fax: +82-53-421-9618

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3732-9814>

• This research was supported by the Basic Science Research
Program through the National Research Foundation of Korea
(NRF) & funded by the Korean government (MSIT) (2019
R1H1A1079839).

서론

근육침윤방광암(T2-4)은 예후가 좋지 않으며, 근치적 수술, 방사선 요법 및 화학 요법을 사용한 여러 경로의 치료 방식을 요한다. 근치적 방광절제술은 1960년대 이후 영상학적으로 전이의 징후가 없는 환자의 표준 치료법으로 정착되었다.¹ Cisplatin을 기반으로 한 신보조항암화학치료는 10년 전체 생존율을 30%에서 36%로 상승된다고 보고된 후 근육침윤방광암 환자의 치료로 사용되고 있다.² 육안적으로 완

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.

2020 © Copyright The Korean Urological Oncology Society and The Korean Prostate Society. All Rights Reserved.

벽한 경요도방광종양 절제가 가능한 임상적 T2 근육침윤방광암 환자의 경우, 항암방사선 요법을 병용하는 방광 보존 치료는 일부 환자에서 근치적 방광절제술을 대체할 수 있다.³ 이러한 치료에도 불구하고, 근육침윤방광암 환자의 약 절반에서 전이가 발생하며 3년 이내에 대부분 사망한다.⁴ 최근에, 신보조항암화학치료는 근육침윤방광암 환자의 전체 생존율을 개선시키는 것으로 보고되었으나, cisplatin 기반 치료 후 내성을 예측하는 바이오마커를 선별하고 기전을 이해하는 것이 중요하고 시급한 과제이다. 종양의 병리학 병기 또는 조직학 등급과 국소림프절 병기와 같은 기존의 임상적 변수들은 예후를 예측하기에 충분하지 않다고 보고된다.⁵ 또한 환자와 치료자가 항암방사선 요법을 동반한 경요도방광종양절제술이나 부분 방광절제술과 같은 방광 보존 치료를 선택하고 치료 반응을 예측할 수 있는 바이오마커를 갖는 것은 매우 유용하다.

현재 사용하는 병리학적 예후 인자들의 불안정성은 분자생물학 기반 바이오마커의 임상 적용을 요하나,⁶ 그러나 지금까지 이 주제를 다루는 연구와 실제 임상 진료 영역에 도입은 전무하다. 현재 근육침윤방광암의 치료법을 개선하고 맞춤형 진료의 적용이 필요하지만, 이 질환의 예후를 예측하거나 적절한 치료법을 선택하기 위해 임상에 적용할 수 있는 바이오마커 또는 패널은 없다.⁷

비근육침윤방광암과 근육침윤성방광암의 가장 두드러진 차이점 중 하나는 TP53 유전자 비활성화의 상대적 빈도와

게놈 불안정성(genomic instability)의 상대적인 수준이다. 전반적으로, TP53 돌연변이는 근육침윤방광암에서는 약 50%에서 관찰되지만, 비근육침윤방광암에서는 20%의 낮은 빈도를 보였다.⁸ 최근 연구들은 근육침윤방광암을 basal type 과 luminal type 두 가지 주요 분자적 아형으로 분류한다.⁹⁻¹¹ 항암화학요법에 잘 반응하는 basal 그룹은 육종양암종(sarcomatoid)의 특징을 가지며 epidermal growth factor receptor 3 (EGFR3)가 과발현된다. 항암화학요법에 내성을 나타내는 luminal 유형은 fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) 및 epidermal growth factor receptors (ERBB2 and ERBB3)이 과발현된다. 2014년, Cancer Genome Atlas (TCGA) 프로젝트는 131명의 근육침윤방광암 환자의 통합 게놈 분석(integrated genomic analysis)에 대해 보고했으며, 방광암의 상당 부분에서 이전에 보고되지 않은 유전자 돌연변이를 밝혔다.¹² 프로파일링 연구는 예후를 예측하고 적극적인 치료로 혜택을 볼 수 있는 환자를 식별하는데 사용할 수 있는 검증된 바이오마커 패널을 제시하였다.¹³

이 연구에서는 돌연변이, 단일유전자변이(single nucleotide polymorphism, SNP), 후성학적 변화(epigenetic alteration), 유전자발현 프로파일링(gene expression profiling) 결과 및 차세대 염기서열 분석(next generation sequencing, NGS)에서 도출된 다양한 바이오마커와 새로운 치료 타겟에 대하여 정리하였다(Figs. 1, 2).

Fig. 1. Representative biomarkers in muscle invasive bladder cancer. GSTM1: glutathione S-transferase mu 1, NOTCH: neurogenic locus notch homolog protein, FBXW7: F-box and WD repeat domain containing 7, RB1: RB transcriptional corepressor 1, NFE2L2: nuclear factor, erythroid 2 like 2, GSTT1: glutathione S-transferase theta 1, hOGG1: 8-oxoguanine DNA glycosylase, ERCC2: excision repair cross-complementing group 2, MLL2: mixed-lineage leukemia 2, KDM6A: lysine demethylase 6A, RUNX3: RUNX family transcription factor 3, IL: interleukin, FAM70B: transmembrane protein 255B, EGFR: epidermal growth factor receptor, C-MET: c-mesenchymal-epithelial transition factor, USP18: ubiquitin-specific protease 18, DGCR2: DiGeorge syndrome critical region gene 2, NR1H3: nuclear receptor subfamily 1 group H member 3.

Fig. 2. Novel treatment target of muscle invasive cancer (MIBC). CPT1A: carnitine palmitoyltransferase 1A, PTEN: phosphatase and tensin homolog, mTOR: mechanistic target of rapamycin kinase, TSC1: TSC complex subunit 1, AMPK: monophosphate-activated protein kinase, PD-1: programmed cell death protein 1, PD-L1: programmed cell death protein 1 ligand.

유전자 이상(Genetic Abnormalities)

특정 개인에서 방광암이 발생하고 예후가 좋지 않은 근육 침윤방광암으로 진행되는 정확한 원인은 알려져 있지 않지만, 방광암 발생의 위험 인자로서 발암유전자(oncogene)와 종양억제유전자(tumor suppressor gene)의 유전적 이상 및 후성학적 변화, 특정 대립 유전자에 대한 이형 접합성 상실(loss of heterozygosity for specific alleles, LOH), 유전자 다형성(genetic polymorphism) 등이 있다.¹⁴ Glutathione S-transferase mu (GSTM1) 및 theta (GSTT1)에서의 유전자 다형성이 여러 종양에 미치는 영향은 이들 단백질들이 암 발생과 연관되는 물질들의 해독에 도움을 줄 수 있으므로 특별한 관심을 받고 있다.¹⁵ 최근 연구 결과에 따르면 GSTM1 SNP이 없는 환자에서 근육침윤방광암 발생위험이 더 많은 것을 확인하였다.¹⁶ 또한 동형 접합 GSTT1 결실(homozygous GSTT1 deletion)이 질환의 진행 및 암특이사망율과 밀접한 관련이 있음을 발견하였다.

DNA 손상 복구 메커니즘은 유전자 돌연변이의 원천이며 암발생에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다.¹⁷ DNA 손상복구 단백질이 암호화된 유전자 돌연변이가 비활성화되는 것은 비교적 일반적으로 근침윤방광암에서 관찰된다.^{12,18} ERCC2 돌연변이 유전자의 비활성화가 가장 흔하게 관찰되며,¹⁹ 이는 cisplatin 기반 신보조항암화학치료에 대한 감수성과 관련이 있다.²⁰ 몇몇 다른 단백질에서 발생한 돌연변이 또한 항암화학요법의 치료 반응과 관련이 있다.²¹

Human 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (hOGG1)은 DNA 손상의 인식 및 복구에 관여한다.²² 오늘날, 연구자들은 peptide nucleic acid-mediated, real-time polymerase chain reaction clamping을 이용한 새로운 접근법을 사용하

여 hOGG1 유전자형의 가치를 근육침윤방광암의 예후 지표로서 확인하였다.^{23,24} hOGG1 유전자형이 근육침윤방광암의 예후 판정에 유용하다는 것을 발견하였고,²³ 구체적으로 Cys326Cys 유전자형은 근육침윤방광암 환자에서 진행 및 암특이생존율과 유의한 관련이 있었다. 다변량 Cox 회귀분석에서 Cys326Cys 유형은 Ser326Ser을 가진 그룹보다 질환의 진행과 생존에 이득이 있음이 밝혀졌다(hazard ratio [HR], 0.284 및 0.305). 또다른 연구에서는 혈액의 genomic DNA가 아닌 근육침윤방광암 조직을 사용하여 hOGG1 유전자형을 조사하였다.²⁴ Cys326Cys 유전자형을 가진 환자에서 무진행생존율에 이점이 있음이 밝혀졌다. 우타르 프라테시에서 시행된 연구에서 Cys326Cys 유형은 방광암 발생과 종양 재발의 위험을 증가시킨다고 보고된다.²⁵ 스웨덴 인구 집단에서 시행된 연구는 hOGG1 변형 대립 유전자와 방사선 치료 후 사망 위험 사이에 역의 상관관계가 있음을 시사했다.²⁶

Lipid phosphatase phosphatase and tensin homolog (PTEN)을 포함한 phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt and the mammalian target of rapamycin (mTOR) 경로의 다양한 음성 조절 인자에서 AKT의 증폭(amplication) 또는 비활성화 돌연변이가 약 75%의 근육침윤방광암에서 관찰된다.^{19,27} 요로상피의 후반기 분화에 관련된 전사(transcription) 인자의 돌연변이 또는 증폭이 근육침윤방광암에서 발견된다.¹⁹ NOTCH 신호 경로는 증식, 분화 및 세포사멸 과정에 영향을 미침으로써 인접 세포 간의 상호작용을 통해 암 발생과 연관이 있다. NOTCH1 및 NOTCH2의 비활성화 돌연변이는 근육침윤방광암에서도 보고되며,²⁸ 마우스 모델에서의 전임상 연구는 이들이 epithelial-to-mesenchymal transition를 촉진함으로써 종양 진행을 일으킨다고 제안했다.²⁹ NOTCH 경로의 비활성화가 방광암 발생의 원동력임을 보여주는 연구이다. 마지막으로, ubiquitin ligase 및 NOTCH 경로 조절에 관여하는 FBXW7의 돌연변이는 근육침윤방광암에서 약 7% 발생하였다.¹⁹ Basal/SCC 유사 근육침윤방광암은 종종 basal 유사 유방암과 특성을 공유하는 RB1 돌연변이를 가진다.³⁰ Basal/SCC 유사 근육침윤방광암에서는 또한 폐 또는 두정부 편평암(squamous cancer)에서 확인된 NFE2L2 돌연변이가 많이 관찰된다.³¹

후성학적 마커(Epigenetic Markers)

DNA 메틸화(methylation), 히스톤 변형(histone modification) 및 microRNA를 포함한 후성학적 변화에 대한 최근 동향은 암의 검출과 치료 및 예방을 위한 새로운 패러다임을 제공했다.³² 새로 획득한 형질의 유전성은 암의 클론

확장(clonal expansion)의 특징이다. 유전자 발현 수준에 기초한 정보의 대물림은 유전자와는 반대로 후성유전학(epigenetics)으로 알려져 있으며, 이는 유전자 서열에 기반하여 유전된 정보를 말한다.³³ CpG island에서 메틸화 사이토신(cytosine) 잔기의 밀도와 국소 전사 불활성 사이의 직접적인 관계는 이미 알려져 있다.³⁴ 메틸화된 DNA에 결합된 특정 단백질은 전사 보조억제인자(corepressor) 및 히스톤 탈아세틸화 효소(histone deacetylase)를 함유하는 복합체를 동원한다.³⁵ SET family histone H3 lysine 4 (H3K4) methyltransferase MLL2에서 불활성화된 돌연변이는 근육침윤방광암에서 더 흔하였고(19%), KDM6A 및 MLL2에서의 돌연변이는 상호 배타적이었다.¹⁹

RUNX3는 여러 종양에서 그의 프로모터 영역에 있는 CpG island의 과메틸화에 의해 발현이 감소되거나 없어지는 종양억제유전자이다.³⁶ 주로 결실 및 돌연변이에 의해 불활성화되는 p53과 같은 많은 종양억제유전자와는 달리, RUNX3는 주로 후성학적 침묵(epigenetic silencing)에 의해 불활성화된다는 점에서 독특하다.³⁷ RUNX3 비활성화는 방광 종양 발생, 재발 및 진행에 크게 영향을 미친다.^{38,39} 추가 연구에서 근육침윤방광암 환자에서 RUNX3 메틸화와 예후 사이의 상관 관계 또한 밝혀졌다.⁴⁰ 근육침윤방광암 환자에서, 국소림프절 전이 및 전체 생존율은 RUNX3 메틸화와 유의한 관련을 보였다. 또한, RUNX3 메틸화는 전체 생존율을 예측할 수 있는 예후인자로 밝혀졌다. 이러한 경향은 수술 유형(근치적 방광절제술 유무)과 같은 다양한 치료 방식 및 화학 요법의 수행 여부에 따른 하위 그룹 분석에서도 나타난다. 근치적 방광절제술 또는 cisplatin 기반 항암화학치료를 받은 환자에서, RUNX3 메틸화는 전체 생존율과 유의한 상관 관계가 있었다. 종합하면, RUNX3 메틸화는 근육침윤방광암의 예후를 결정하는 유망한 바이오마커이다.

마이크로 RNA (microRNA, miRNA)는 약 23개의 뉴클레오타이드로 구성된 작은 비암호 RNA 분자로, 식물, 동물, 바이러스 등에서 내인적으로 발견된다. miRNA는 RNA를 분해하거나 번역(translation)을 억제함으로써 작용하며, 암 병원(cancer pathogen)에 관여한다. 현재, 암 환자에서 miRNA를 기반으로 한 치료법이 연구되고 있다. 변화된 miRNA 발현 패턴은 암에서 조기 검출 및 치료 반응 모니터링을 위한 신규 바이오마커로서 사용될 수 있다.⁴¹ 방광암의 발생, 진행 및 전이에 miRNA의 역할은 광범위하게 연구되고 있다. TCGA의 공개된 데이터 세트를 사용한 최근 데이터는 15개의 miRNA로 이루어진 signature가 이전에 확인된 “cluster IV/immune undifferentiated/claudin-low” 및 “cluster II/luminal immune” subtypes 해당하는 stromally infiltrated basal 및 luminal 타입의 근육침윤방광암을 식별할 수 있는

것을 보여 주었다.⁴² 이 연구의 저자들은 근육침윤방광암을 basal 및 luminal 타입으로 정확하게 분류하였고, 63개의 miRNA로 이루어진 signature를 통해 basal 타입으로 분류된 종양을 가진 환자가 전체 생존 기간이 짧다는 것을 확인했다. 이러한 관점에서, miRNA가 근육침윤성방광암의 하위분류에서 관찰되는 유전자 발현 패턴을 조절하는 경향을 보이므로 이와 관련된 miRNA는 바이오마커 및 치료 타겟으로 사용될 가능성이 있다. miR-145를 측정함으로써 근육침윤성방광암 환자와 대조군을 구별할 수 있다고 보고된다(민감도 84.1% 및 특이도 61.1%; area under the curve, 0.790).⁴³ 3개의 miRNA signature (miR-9, miR-182 및 miR-200b)는 근육침윤방광암의 공격적 임상특징과 관련이 있으며 환자의 무재발생존기간과 전체 생존율과 관련이 있는 것으로 밝혀졌다.⁴⁴ 또 다른 3개의 miRNA (miR-200c, miR-141 및 miR-30b) 패턴은 조직검사 시 병리학적 평가가 잘못된 근육침범방광암을 식별할 수 있었다.⁴⁵

유전자 발현 프로파일링(Gene Expression Profiling)

이전의 연구는 근육침윤방광암에서 많은 유전자 변형을 확인했지만, 최근의 게놈 전체 연구(genome-wide study)는 보다 포괄적인 견해를 제공한다.¹⁹ 더욱이, 최근의 몇몇 연구는 고등급(high grade) 또는 근육침윤방광암의 포괄적인 유전자 발현 프로파일링 분석을 수행하였고, unsupervised hierarchical clustering을 사용하여 발현 양상에 따른 서브타입을 정의하였다.^{9,10,12,46,47} 이러한 분석 결과는 완전히 일관되지 않지만 여러 연구들 사이에는 상당한 유사점이 발견된다. 초창기, 근육침윤방광암을 다음과 같이 5가지 아형으로 분류하였다: Urobasal A와 B, genomically unstable, squamous cell carcinoma-like (SCC-like) 및 infiltrated type. 이후 연구에서 새롭게 제시된 유형 중 “basal”로 명명된 아형은 다른 모든 연구에서도 확인되었으며, basal 또는 stem cell 표현형을 나타내는 HES2 및 MYC뿐만 아니라 KRT5, KRT14 및 KRT6A/B/C의 발현이 특징적이며, SCC-like 유형과 유사하다.⁹ 3개의 후속 연구는 유방암 luminal 서브타입과 유사함으로 인해 명명된 “luminal” 발현 서브타입을 제시하였으며, 이 그룹에서는 FGFR3, uroplakin 유전자, KRT20 및 전사 인자 PPARG, GATA3, FOXA1 및 RXRAD의 과발현이 관찰된다. luminal 서브타입은 Urobasal A 유형과 유사성을 보였다. p53-like 서브타입 또한 한 연구에서 제시되었다. 예후 정보가 이용 가능한 이러한 모든 분석은 basal 아형이 더 나쁜 예후와 관련이 있고, luminal 아형이 더 좋은 예후와 관련되어 있음을 보여주었다. 최근 한국인 데이터를 이용하여 발표한 근육침윤방광암 유전자 발현 연

구를 아래와 같이 정리하였다.

High-throughput microarray 기술은 수십만 개의 유전자의 RNA 발현 수준을 조사할 수 있으며, 사람에게서 발생하는 종양의 분자적 프로세스에 대한 이해를 돕는데 일조한다.⁴⁸ 한 연구팀에 의해 근육침윤방광암 환자에서 유전자 발현 프로파일링을 조사하고, Gene Expression Omnibus (GEO) [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/(GSE13507)]에 전체 마이크로어레이(microarray) 데이터 세트를 업로드 하였다.⁴⁹ 첫 번째 연구에서, 마이크로어레이 데이터 분석을 통해 결정된 유전자 발현 패턴은 질병 진행과 관련된 1,320 개의 유전자를 제시하였다. 이 1,320개의 유전자의 유전자 네트워크 분석은 IL1B, S100A8, S100A9 및 EGFR이 근육침윤방광암 진행의 중요한 매개자임을 시사하였다.⁴⁹ 이 4 가지 유전자 signature는 근육침윤방광암 진행의 독립적 예측 인자였다. 다음으로, 이 연구자들은 여러 개의 개별 유전자를 검증했다. FAM70B의 발현 수준은 질병 진행 및 근육침윤방광암 환자의 암특이 생존율을 예측하는 데 유용한 바이오마커로 권장될 수 있다고 보고하였다.⁵⁰ 또한, 항암화학요법을 받은 그룹에서, FAM70B 발현은 무진행 생존율과 관련이 있었다.

마이크로어레이 데이터 세트로부터의 결과에 기초하여, 면역-반응성 유전자 발현 패턴(immune-responsive gene expression)을 정상 및 근육침윤방광암 샘플 사이에서 비교한 연구도 발표되었다.⁵¹ Interleukin (IL)-5, IL-20 및 IL-28A를 포함한 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokines)의 발현은 근육침윤방광암과 관련이 있었다. IL-5, IL-20 및 IL-28A의 전령RNA (messenger RNA, mRNA) 발현 수준은 건강한 개인보다 근육침윤방광암 환자에서 일반적으로 더 높았으며, 이는 IL-5, IL-20 및 IL-28A의 발현이 근육침윤방광암 발생에 유의하게 관련됨을 시사한다.

항암화학치료의 반응성에 대하여, 2종의 유전자(S100A9 및 EGFR)의 발현 signature는 전신 항암화학요법 후 국소 재발 또는 전이가 발생한 근육침윤방광암환자에서 질환 진행 및 암특이 생존율을 예측하는 것으로 입증되었다.⁵² Receiver operating characteristic curve 분석에 기초하여, 질병 진행에 대한 컷오프 값이 결정하였으며, 예후가 좋은 signature 그룹의 환자는 예후가 좋지 않은 signature 그룹의 환자보다 진행 및 암특이 생존 시간이 상당히 길었다(각각, $p < 0.001$, $p = 0.042$). 다변량 Cox 회귀 분석에서 유전자 signature는 질병 진행에 영향을 미치는 독립적 예측 인자였다(HR, 4.726; 95% confidence interval [CI], 1.623-13.763, $p = 0.004$). 면역 조직 화학 분석에서, S100A9 및 EGFR 양성은 항암화학요법 후 질환 진행과 관련이 있었다. S100A9/EGFR의 단백질 발현은 S100A9/EGFR의 유전자 발현과 완

만한 양의 상관 관계를 나타냈다($r = 0.395$, $p = 0.014$ 및 $r = 0.453$, $p = 0.004$). 종합하면, S100A9 및 EGFR의 발현은 항암화학치료에 대한 저항성과 밀접한 관련이 있으며, S100A9 및 EGFR의 억제 방광 종양 세포를 cisplatin 기반 항암화학요법의 민감성을 높일 수 있다.

같은 그룹의 또 다른 연구는 악성도 높은 유방암 환자를 식별하는데 사용한 c-MET 네트워크 유전자(c-MET network genes)의 발현을 조사하였다.⁵³ 이 연구에서, c-MET의 과발현은 근육침윤방광암 환자에서 좋지 않은 생존율, 특히 전체 생존율과 유의하게 관련되었다. 이것은 c-MET 발현을 억제하는 것이 방광암의 진행을 예방하고 환자 생존을 개선시키는 데 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다. 근육침윤방광암 환자에서 예후 예측을 위한 새로운 바이오마커 조합 또한 이 연구 그룹에서 발견하였다.⁵⁴ 근육침윤방광암 환자 62 명을 최초 코호트로 선택하고 다른 118 근육침윤방광암 환자를 검증 코호트로 선택하였다. USP18과 DGCR2의 유전자 발현을 측정하고, 유전자 signature와 생존율 사이의 연관성을 분석하였다. USP18 및 DGCR2는 암특이적 사망율과 유의한 상관 관계가 있었다(각각 $p = 0.020$, $p = 0.007$). 다변량 Cox 회귀 분석에서, USP18 및 DGCR2 mRNA 발현은 암특이적 사망에 대한 유의한 위험 인자였다(HR, 2.106; 95% CI, 1.043-4.254, $p = 0.038$). 따라서, USP18 및 DGCR2 발현의 조합은 근육침윤방광암에서 암특이적 생존에 대한 신뢰할 수 있는 예후 마커인 것으로 보인다.

핵 수용체(nuclear receptor, NR)는 최근의 연구에 따르면 유전자 발현 조작을 통해 많은 세포 기능을 조절하고 다양한 종류의 암에서 종양 형성, 증식, 진행 및 예후에 중요한 역할을하는 전사 인자의 한 종류로 알려져 있다. Wu 등⁵⁵은 근육침윤방광암에서 NR의 예후 예측 능력을 분석하고, 낮은 NR1H3 발현 수준이 좋지 않은 전체 생존율의 독립적인 예후 인자이며, 또한 근육침윤방광암 환자에서 짧은 무재발 생존율을 보고하였다. 그들은 TCGA 코호트로부터 완전한 임상 병리학적 및 RNASeq 데이터를 갖는 총 308 MIBC 환자를 수집하였고, “TCGA filtrating and local database validating” 모델은 예후 예측을 위한 바이오마커를 선별하고, 근육침윤방광암의 특정 유전자 기능을 이해하는 데 새로운 시각을 제시 할 수 있다고 밝혔다.

치료 타겟(Therapeutic Targets)

근육침윤방광암에서, PTEN 손실은 증가된 mTOR활성과 상관 관계가 있는 것으로 보이며, 이는 PTEN이 방광암에서 downstream signaling에 직접적인 영향을 미친다는 것을 시사한다.^{56,57} 근육침윤방광암의 39%는 LOH 또는 PTEN lo-

cus의 동형 접합 결실(homozygous deletion)을 나타내고, 때때로 PTEN 코딩 영역에서 돌연변이가 발생한다.⁵⁸ 또한, p53 기능의 손실은 mTOR 신호 전달 경로의 활성화를 촉진하기 위해 PTEN 손실과 상승 작용을 하는 것으로 보인다.⁵⁶ 마지막으로, TSC1의 LOH는 방광암의 약 50%에서 보고된다.⁵⁹ 종합하면, mTOR 경로의 upstream 성분의 deregulation은 방광암을 발생시킬 수 있으며, 이는 mTOR 신호가 이러한 유형의 암에서 상승될 수 있음을 시사한다.

이전에 발표된 마이크로어레이 데이터를 사용하여 지방산 산화(fatty acid oxidation) 관련 효소의 유전자 발현 수준을 분석하였을 때, 방광암 조직은 정상 방광 점막보다 carnitine palmitoyl transferase 1A (CPT1A)의 유의미한 과발현을 나타냈다.¹⁴ CPT는 카르니틴을 사용하여 산화를 위해 지방산을 미토콘드리아로 옮기는 주요 효소이다. 특히, CPT 발현양은 비근육침윤방광암보다 근육침윤방광암에서 더 높았다. 따라서, CPT1A는 방광암의 공격적인 성격과 관련될 수 있다. 여러 연구자들이 항암제로 CPT 억제제를 개발하려고 시도 중이다.^{60,61}

AMP-activated protein kinase (AMPK) 활성화는 암에서 두 가지 상반되는 기능을 발휘한다.⁶² AMPK 활성화(결과적으로 TORC1 억제)는 합리적인 항암치료 전략으로 간주되지만,⁶³ AMPK는 실제로 종양 세포에서 복잡한 효과를 발휘할 수 있다. 미토콘드리아 대사를 억제하는 항당뇨병 약물 메트포르민(metformin)은 AMPK-의존적 및 AMPK-비의존적 방식으로 mTORC1을 억제한다.⁶⁴ 선택적 AMPK 억제제인 Compound C는 AMPK α 서브 유닛에 결합하고 ATP-competitive inhibitor로서 작용한다.⁶⁵ 그러나, 여러 연구에서 compound C가 bone morphogenetic protein receptor 뿐만 아니라 많은 다른 kinase를 억제할 수 있으며, 이러한 무차별성으로 인해 AMPK 억제에 의해 그 효과가 매개되는지 여부에 대한 의문이 제기된다.⁶⁶ 진행된 clear-cell renal cell carcinoma에 대해 임상적으로 사용되는 다중 tyrosine kinase inhibitor인 sunitinib은 AMPK α 서브 유닛에 결합함으로써 AMPK를 직접 억제할 수 있다.⁶⁷ Yoon 등⁶⁸은 사람 방광암 세포주에 대한 sunitinib의 항 종양 효과 및 관련된 분자 메커니즘을 탐구하였다. 그들은 방광암 세포에서 sunitinib과 전통적인 항암 약물인 cisplatin과 gemcitabine 사이의 상승적 항종양 효과를 보고했다. Sunitinib의 주요 항종양 메커니즘은 암세포에 의해 발현된 tyrosine kinase를 억제함으로써 혈관 형성의 억제 및 종양 apoptosis의 유도이다. Yoon 등⁶⁸의 연구에서 sunitinib는 다양한 분화 상태의 사람 방광암 세포주에 대해 용량 및 시간 의존적 항종양 활성을 나타냈다. Sunitinib의 감수성 프로파일은 cisplatin 및 gemcitabine에서 확인된 프로파일과 상이하여 sunitinib과

cisplatin/gemcitabine 사이에 교차 민감성 또는 저항이 존재하지 않음을 시사한다. 또한, sunitinib 및 gemcitabine을 사용한 병용 치료는 항종양 활성을 위한 단일 제제를 사용한 치료보다 우수한 효과를 나타냈다. 이러한 결과는 sunitinib 기반의 단일 표적 요법 또는 종래의 세포 독성 화학 요법 약물과의 병용 요법의 임상 적용이 진행된 근육침윤방광암 치료에 가능하다는 것을 시사한다. 진행된 근육침윤방광암 환자의 예후가 매우 열악하다는 것을 고려하면, sunitinib 기반 신규 치료 요법의 개발은 임상적으로 큰 의미를 가질 수 있다.

방광암 샘플의 유전자 분석 프로파일링은 종양 생물학(tumor biology)에 대한 이해를 높이고 programmed death (PD-1) 및 그의 ligand인 programmed cell death ligand 1 (PD-L1)과 같은 여러 치료 타겟을 제공하였다.⁶⁹ PD-1 경로는 T-세포 활성화를 음성적으로 조절하고 항종양 숙주 면역(antitumor host immunity)을 조절하는데 중요한 역할을 한다. PD-1 또는 PD-L1에 대한 단일 클론 항체(monoclonal antibody)는 몇몇 종양 유형에서 생물학적 활성을 나타내며, 예비 데이터는 PD-L1 발현과 항암 반응 사이의 관계를 제시했다. PD-1-PD-L1 축(PD-1-PD-L1 axis)을 표적으로 하는 면역 체크 포인트 억제제(immune checkpoint inhibitor)는 전이성 질환을 가진 환자들을 대상으로 한 임상 시험에서 지속성 있는 객관적인 반응을 달성하였다. PD-1 및 PD-L1 체크 포인트 억제제는 근육침윤방광암이 진행된 환자에서 활성을 갖지만, 강력하게 예후를 예측하는 바이오마커로서의 기능으로서의 연구는 부족한 실정이다. 예후 마커로서, 종양 세포 PD-L1 양성은 근육침윤방광암의 경우보다 고등급 T1 방광 종양에서 유의하게 낮았다($p < 0.001$).⁷⁰ Anantharaman 등⁷¹은 근육침윤방광암 환자에서 면역 체크 포인트 억제제 요법의 반응을 확인하기 위해 circulating tumor cell을 분석하였다. 현재의 추세가 계속되면 면역 요법이 근육침윤방광암 치료의 환경을 변화시켜 질환을 가진 환자의 생존 결과를 향상시킬 수 있다.

현재 국내에서도 진행된 근육침윤방광암에서 cisplatin 항암화학치료에 반응이 없거나 항암치료를 대체할 수 있는 면역 체크 포인트 억제제가 승인받아 사용되고 있다. Atezolizumab은 PD-L1에 선택적으로 결합하고 PD-1 및 B7-1과의 상호 작용을 방지하는 engineered humanized monoclonal immunoglobulin G1 항체이다.⁷² 이 항체는 정맥 내로 투여되며 종양 진행의 증거가 없는 한 3주마다 투여할 수 있다. Pembrolizumab은 PD-L1 및 PD-L2 ligand 두 개의 신호 전달을 차단하는 humanized monoclonal IgG4 PD1 항체이다.⁷³ 이 약제 또한 3주마다 투여되며, 다른 세포 독성 항암화학제와 병용 투여하는 임상 시험의 결과도 보고되고 있다.

결론 및 향후 전망

근육침윤방광암 환자에서 치료 반응과 예후를 예측하려는 노력은 아직까지 진행 중이다. 아직까지 임상에서 사용될 수 있는 바이오마커는 확립되지 않았다. 하지만, NGS 기술을 사용한 molecular clustering 등이 소개되면서 전통적인 진단 및 치료 전략의 패러다임이 바뀌고 있다. 특히 면역 체크 포인트 억제제가 진행성 근육침윤방광암 치료에 도입되면서 생존율뿐 아니라 삶의 질 향상까지 기대할 수 있게 되었다. 최소한의 독성과 최대한의 효과를 낼 수 있는 치료제 개발에 노력을 아끼지 말아야 하며, 특히 한국인 특성에 맞는 바이오마커 발굴을 위해 국내 근육침윤방광암 조직을 이용한 분자학적 대규모 연구가 시급하다.

이해관계(Conflict of Interest)

저자들은 이 논문과 관련하여 이해관계의 충돌이 없음을 명시합니다.

REFERENCES

1. Stenzl A, Cowan NC, De Santis M, Kuczyk MA, Merseburger AS, Ribal MJ, et al. Treatment of muscle-invasive and metastatic bladder cancer: update of the EAU guidelines. *Eur Urol* 2011;59:1009-18.
2. International Collaboration of Trialists; Medical Research Council Advanced Bladder Cancer Working Party (now the National Cancer Research Institute Bladder Cancer Clinical Studies Group); European Organisation for Research and Treatment of Cancer Genito-Urinary Tract Cancer Group; Australian Bladder Cancer Study Group; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group; Finnbladder, et al. International phase III trial assessing neoadjuvant cisplatin, methotrexate, and vinblastine chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer: long-term results of the BA06 30894 trial. *J Clin Oncol* 2011;29:2171-7.
3. James ND, Hussain SA, Hall E, Jenkins P, Tremlett J, Rawlings C, et al. Radiotherapy with or without chemotherapy in muscle-invasive bladder cancer. *N Engl J Med* 2012;366:1477-88.
4. Kaufman DS, Shipley WU, Feldman AS. Bladder cancer. *Lancet* 2009;374:239-49.
5. Murphy WM, Takezawa K, Maruniak NA. Interobserver discrepancy using the 1998 World Health Organization/International Society of Urologic Pathology classification of urothelial neoplasms: practical choices for patient care. *J Urol* 2002;168:968-72.
6. van Rhijn BW, Catto JW, Goebell PJ, Knüchel R, Shariat SF, van der Poel HG, et al. Molecular markers for urothelial bladder cancer prognosis: toward implementation in clinical practice. *Urol Oncol* 2014;32:1078-87.
7. Amin MB, Trpkov K, Lopez-Beltran A, Grignon D; Members of the ISUP Immunohistochemistry in Diagnostic Urologic Pathology Group. Best practices recommendations in the application of immunohistochemistry in the bladder lesions: report from the International Society of Urologic Pathology consensus conference. *Am J Surg Pathol* 2014;38:e20-34.
8. Lindgren D, Frigyesi A, Gudjonsson S, Sjödaahl G, Hallden C, Chebil G, et al. Combined gene expression and genomic profiling define two intrinsic molecular subtypes of urothelial carcinoma and gene signatures for molecular grading and outcome. *Cancer Res* 2010;70:3463-72.
9. Sjödaahl G, Lauss M, Lövgren K, Chebil G, Gudjonsson S, Veerla S, et al. A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2012;18:3377-86.
10. Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack ER, Hoffman-Censits J, et al. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell* 2014;25:152-65.
11. Choi W, Czerniak B, Ochoa A, Su X, Siefker-Radtke A, Dinney C, et al. Intrinsic basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Nat Rev Urol* 2014;11:400-10.
12. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* 2014;507:315-22.
13. Mitra AP, Lerner SP. Potential role for targeted therapy in muscle-invasive bladder cancer: lessons from the cancer genome atlas and beyond. *Urol Clin North Am* 2015;42:201-15.
14. Kim WJ, Kim EJ, Kim SK, Kim YJ, Ha YS, Jeong P, et al. Predictive value of progression-related gene classifier in primary non-muscle invasive bladder cancer. *Mol Cancer* 2010;9:3.
15. Rebbeck TR. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:733-43.
16. Kang HW, Song PH, Ha YS, Kim WT, Kim YJ, Yun SJ, et al. Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms: susceptibility and outcomes in muscle invasive bladder cancer patients. *Eur J Cancer* 2013;49:3010-9.
17. Kim EJ, Jeong P, Quan C, Kim J, Bae SC, Yoon SJ, et al. Genotypes of TNF-alpha, VEGF, hOGG1, GSTM1, and GSTT1: useful determinants for clinical outcome of bladder cancer. *Urology* 2005;65:70-5.

18. Balbás-Martínez C, Sagrera A, Carrillo-de-Santa-Pau E, Earl J, Márquez M, Vazquez M, et al. Recurrent inactivation of STAG2 in bladder cancer is not associated with aneuploidy. *Nat Genet* 2013;45:1464-9.
19. Kim J, Akbani R, Creighton CJ, Lerner SP, Weinstein JN, Getz G, et al. Invasive bladder cancer: genomic insights and therapeutic promise. *Clin Cancer Res* 2015;21:4514-24.
20. Van Allen EM, Mouw KW, Kim P, Iyer G, Wagle N, Al-Ahmadie H, et al. Somatic ERCC2 mutations correlate with cisplatin sensitivity in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Cancer Discov* 2014;4:1140-53.
21. Plimack ER, Dunbrack RL, Brennan TA, Andrade MD, Zhou Y, Serebriiskii IG, et al. Defects in DNA repair genes predict response to neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2015;68:959-67.
22. Lee YS, Lee HS, Park MK, Hwang ES, Park EM, Kasai H, et al. Identification of 8-hydroxyguanine glycosylase activity in mammalian tissues using 8-hydroxyguanine specific monoclonal antibody. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;196:1545-51.
23. Kim EJ, Yan C, Ha YS, Jeong P, Yi Kim I, Moon SK, et al. Analysis of hOGG1 genotype as a prognostic marker for muscle invasive bladder cancer: a novel approach using peptide nucleic acid-mediated, real-time PCR clamping. *Urol Oncol* 2012;30:673-9.
24. Ha YS, Yan C, Kim IY, Yun SJ, Moon SK, Kim WJ. Tissue hOGG1 genotype predicts bladder cancer prognosis: a novel approach using a peptide nucleic acid clamping method. *Ann Surg Oncol* 2011;18:1775-81.
25. Gangwar R, Ahirwar D, Mandhani A, Mittal RD. Do DNA repair genes OGG1, XRCC3 and XRCC7 have an impact on susceptibility to bladder cancer in the North Indian population? *Mutat Res* 2009;680:56-63.
26. Sanyal S, De Verdier PJ, Steineck G, Larsson P, Onelöv E, Hemminki K, et al. Polymorphisms in XPD, XPC and the risk of death in patients with urinary bladder neoplasms. *Acta Oncol* 2007;46:31-41.
27. Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer* 2015;15:25-41.
28. Rampias T, Vgenopoulou P, Avgeris M, Polyzos A, Stravodimos K, Valavanis C, et al. A new tumor suppressor role for the Notch pathway in bladder cancer. *Nat Med* 2014;20:1199-205.
29. Maraver A, Fernandez-Marcos PJ, Cash TP, Mendez-Pertuz M, Dueñas M, Maietta P, et al. NOTCH pathway inactivation promotes bladder cancer progression. *J Clin Invest* 2015;125:824-30.
30. Ellis MJ, Perou CM. The genomic landscape of breast cancer as a therapeutic roadmap. *Cancer Discov* 2013;3:27-34.
31. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* 2015;517:576-82.
32. Kim YJ, Kim WJ. Can we use methylation markers as diagnostic and prognostic indicators for bladder cancer? *Investig Clin Urol* 2016;57 Suppl 1:S77-88.
33. Kim WJ, Quan C. Genetic and epigenetic aspects of bladder cancer. *J Cell Biochem* 2005;95:24-33.
34. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999;21:163-7.
35. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 2001;10:687-92.
36. Kim WJ, Kim YJ. Epigenetic markers for bladder cancer in urine. *Transl Oncogenomics* 2007;2:35-42.
37. Bae SC, Lee YH. Phosphorylation, acetylation and ubiquitination: the molecular basis of RUNX regulation. *Gene* 2006;366:58-66.
38. Kim WJ, Kim EJ, Jeong P, Quan C, Kim J, Li QL, et al. RUNX3 inactivation by point mutations and aberrant DNA methylation in bladder tumors. *Cancer Res* 2005;65:9347-54.
39. Kim EJ, Kim YJ, Jeong P, Ha YS, Bae SC, Kim WJ. Methylation of the RUNX3 promoter as a potential prognostic marker for bladder tumor. *J Urol* 2008;180:1141-5.
40. Jeong P, Ha YS, Kim JS, Cho IC, Kim WT, Kim YJ, et al. Runt-related transcription factor 3 methylation as a possible prognosticator in muscle-invasive bladder cancer. *Cancer Biomark* 2011;10:205-11.
41. Nana-Sinkam SP, Croce CM. Clinical applications for microRNAs in cancer. *Clin Pharmacol Ther* 2013;93:98-104.
42. Ochoa AE, Choi W, Su X, Siefker-Radtke A, Czerniak B, Dinney C, et al. Specific micro-RNA expression patterns distinguish the basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Oncotarget* 2016;7:80164-74.
43. Yun SJ, Jeong P, Kim WT, Kim TH, Lee YS, Song PH, et al. Cell-free microRNAs in urine as diagnostic and prognostic biomarkers of bladder cancer. *Int J Oncol* 2012;41:1871-8.
44. Pignot G, Cizeron-Clairac G, Vacher S, Susini A, Tozlu S, Vieillefond A, et al. microRNA expression profile in a large series of bladder tumors: identification of a 3-miRNA signature associated with aggressiveness of muscle-invasive bladder cancer. *Int J Cancer* 2013;132:2479-91.
45. Wszolek MF, Rieger-Christ KM, Kenney PA, Gould JJ, Silva Neto B, Lavoie AK, et al. A MicroRNA expression profile defining the invasive bladder tumor phenotype. *Urol Oncol* 2011;29:794-801.
46. Volkmer JP, Sahoo D, Chin RK, Ho PL, Tang C, Kurtova

- AV, et al. Three differentiation states risk-stratify bladder cancer into distinct subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:2078-83.
47. Damrauer JS, Hoadley KA, Chism DD, Fan C, Tiganelli CJ, Wobker SE, et al. Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:3110-5.
48. Quackenbush J. Microarray analysis and tumor classification. *N Engl J Med* 2006;354:2463-72.
49. Kim WJ, Kim SK, Jeong P, Yun SJ, Cho IC, Kim IY, et al. A four-gene signature predicts disease progression in muscle invasive bladder cancer. *Mol Med* 2011;17:478-85.
50. Kang HW, Yoon HY, Ha YS, Kim WT, Kim YJ, Yun SJ, et al. FAM70B as a novel prognostic marker for cancer progression and cancer-specific death in muscle-invasive bladder cancer. *Korean J Urol* 2012;53:598-606.
51. Lee SJ, Lee EJ, Kim SK, Jeong P, Cho YH, Yun SJ, et al. Identification of pro-inflammatory cytokines associated with muscle invasive bladder cancer; the roles of IL-5, IL-20, and IL-28A. *PLoS One* 2012;7:e40267.
52. Kim WT, Kim J, Yan C, Jeong P, Choi SY, Lee OJ, et al. S100A9 and EGFR gene signatures predict disease progression in muscle invasive bladder cancer patients after chemotherapy. *Ann Oncol* 2014;25:974-9.
53. Kim YW, Yun SJ, Jeong P, Kim SK, Kim SY, Yan C, et al. The c-MET network as novel prognostic marker for predicting bladder cancer patients with an increased risk of developing aggressive disease. *PLoS One* 2015;10:e0134552.
54. Kim YH, Kim WT, Jeong P, Ha YS, Kang HW, Yun SJ, et al. Novel combination markers for predicting survival in patients with muscle invasive bladder cancer: USP18 and DGCR2. *J Korean Med Sci* 2014;29:351-6.
55. Wu J, Wan F, Sheng H, Shi G, Shen Y, Lin G, et al. NR1H3 expression is a prognostic factor of overall survival for patients with muscle-invasive bladder cancer. *J Cancer* 2017;8:852-60.
56. Puzio-Kuter AM, Castillo-Martin M, Kinkade CW, Wang X, Shen TH, Matos T, et al. Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer. *Genes Dev* 2009;23:675-80.
57. Qian CN, Furge KA, Knol J, Huang D, Chen J, Dykema KJ, et al. Activation of the PI3K/AKT pathway induces urothelial carcinoma of the renal pelvis: identification in human tumors and confirmation in animal models. *Cancer Res* 2009;69:8256-64.
58. Cappellen D, Gil Diez de Medina S, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 10q in muscle-invasive transitional cell carcinomas of the bladder. *Oncogene* 1997;14:3059-66.
59. Pymar LS, Platt FM, Askham JM, Morrison EE, Knowles MA. Bladder tumour-derived somatic TSC1 missense mutations cause loss of function via distinct mechanisms. *Hum Mol Genet* 2008;17:2006-17.
60. Samudio I, Harmancey R, Fiegl M, Kantarjian H, Konopleva M, Korchin B, et al. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J Clin Invest* 2010;120:142-56.
61. Bebernitz GR, Schuster HF. The impact of fatty acid oxidation on energy utilization: targets and therapy. *Curr Pharm Des* 2002;8:1199-227.
62. Kim WJ. Is 5'-AMP-activated protein kinase both jekyll and hyde in bladder cancer? *Int Neurourol J* 2015;19:55-66.
63. Kim I, He YY. Targeting the AMP-activated protein kinase for cancer prevention and therapy. *Front Oncol* 2013;3:175.
64. Ben Sahra I, Regazzetti C, Robert G, Laurent K, Le Marchand-Brustel Y, Auberger P, et al. Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1. *Cancer Res* 2011;71:4366-72.
65. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 2001;108:1167-74.
66. Sinnott SE, Brenman JE. Past strategies and future directions for identifying AMP-activated protein kinase (AMPK) modulators. *Pharmacol Ther* 2014;143:111-8.
67. Laderoute KR, Calaoagan JM, Madrid PB, Klon AE, Ehrlich PJ. SU11248 (sunitinib) directly inhibits the activity of mammalian 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK). *Cancer Biol Ther* 2010;10:68-76.
68. Yoon CY, Lee JS, Kim BS, Jeong SJ, Hong SK, Byun SS, et al. Sunitinib malate synergistically potentiates anti-tumor effect of gemcitabine in human bladder cancer cells. *Korean J Urol* 2011;52:55-63.
69. Mukherji D, Jabbour MN, Saroufim M, Temraz S, Nasr R, Charafeddine M, et al. Programmed death-ligand 1 expression in muscle-invasive bladder cancer cystectomy specimens and lymph node metastasis: a reliable treatment selection biomarker? *Clin Genitourin Cancer* 2016;14:183-7.
70. Wankowicz SAM, Werner L, Orsola A, Novak J, Bowden M, Choueiri TK, et al. Differential expression of PD-L1 in high grade T1 vs muscle invasive bladder carcinoma and its prognostic implications. *J Urol* 2017;198:817-23.
71. Anantharaman A, Friedlander T, Lu D, Krupa R, Premasekharan G, Hough J, et al. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) characterization of circulating tumor cells (CTCs) in muscle invasive and metastatic bladder cancer patients. *BMC Cancer* 2016;16:744.
72. Patel R, Bock M, Polotti CF, Elsamra S. Pharmacokinetic drug evaluation of atezolizumab for the treatment of locally advanced or metastatic urothelial carcinoma. *Expert*

- Opin Drug Metab Toxicol 2017;13:225-32.
73. Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, Fradet Y, Lee JL, Fong L, et al. Pembrolizumab as second-line therapy for advanced urothelial carcinoma. N Engl J Med 2017;376:1015-26.