방광암의 요 생물지표에 대한 고찰

국립암센터, 비뇨암센터, 비뇨의학과

김성한 · 이형호 · 서호경

Urinary Biomarker in Bladder Cancer at Present Time

Sung Han Kim, Hyung Ho Lee, Ho Kyung Seo

Department of Urology, Urological Cancer Center, Research Institute and Hospital of National Cancer Center, Goyang, Korea

Current standard diagnostic modality of bladder cancer is cystoscopy with/without urine cytology from patient's voided urine. Considering several cystoscopic disadvantages such as symptomatic invasiveness and operator-dependency, urinary cytology is an asymptomatic, noninvasive tool to detect exfoliated tumor cell in the urine samples. Various targeting molecules have been suggested to detect cancer cells in the urine beside the present urine cytology which has a limited diagnostic power of detection cancer cells. To augment the accuracy of diagnostic power, various supplementary urine biomarkers have been approved and under investigation in these days with different mechanisms and different targets. In this review article, we are going to discuss some urinary biomarkers approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) and other non-FDA approved potential urinary markers in bladder cancer. (Korean J Urol Oncol 2020;18:183-193)

Key Words: Urinary bladder neoplasms · Urine · Marker · Sensitivity · Specificity

서론

방광암은 국제 방광암 통계에 따르면 남녀를 통틀어 표준 연령발생률에서 6위(백만 명당 남성은 9.6, 여성은 2.4의 발생률)를 차지하고 있는 암으로,¹ 한국은 2012년 전체 남성 암 발생률에서는 9위(2.5%), 2016년에는 8위(2.9%)로 증가하고 있는 암이다(“통계로 본 암 현황”, 보건복지부 국립암

센터, 2015년과 2019년 발행). 방광암은 요가 모여 배출되는 방광이라는 장기에 생긴 암으로 혈뇨나 방광자극 증상 등의 방광암 의심 증상이 있을 경우 요 검체를 진단에 이용한다. 나아가 암 치료 후 재발의 위험이 높은 방광암 환자들의 치료 후 추적검사 목적에도 요 검체를 이용하는 암이다.

방광암의 진단 및 추적검사에 표준검사법인 방광경은 민감도와 특이도에서 각각 62%-84%와 43%-98%을 보이는 검사법이다.² 하지만 방광경의 시술자 의존성과 검사의 침습성으로 인한 검사 후 혈뇨, 통증, 요로 감염 발생 등의 합병증 발생은 방광암 진단법의 보완해야 할 단점으로 꼽히고 있다. 또한 작은 크기의 방광암이나 상피내암(carcinoma *in situ*, CIS) 같은 경우와 종양의 위치에 따라 방광경의 위음성률은 높아진다고 알려져 있다. 이런 방광경검사의 단점을 보완하기 위해 방광암의 요 내 종양 세포 탈락을 관찰하는 요 세포검사(urine cytology)와 방광암항원 검사(NMP22)법이 방광경과 함께 방광암 감별진단법으로 국내 보험급여 기

Received October 5, 2020, Revised November 11, 2020,
Accepted November 13, 2020

Corresponding Author: Ho Kyung Seo

Department of Urology, Urological Cancer Center, Research Institute and Hospital of National Cancer Center, 323 Ilsan-ro, Ilsandong-gu, Goyang 10408, Korea
E-mail: seohk@ncc.re.kr

Tel: +82-31-920-1706, Fax: +82-31-920-2799

ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2601-1093

· This article is financially supported by the National Cancer Center Fund (NCC 1810240-2).

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.

Table 1. Urinary markers for bladder cancer approved by the Korean Insurance and its applicable criteria

원내수가코드	수가명	급여기준
L65013	액상세포검사-체액 세포병리검사	<p>**고시 제2018-39호(행위) 나562나(2) 세포병리검사-액상세포검사-체액 세포병리검사의 급여 기준은 다음과 같이 함.</p> <p>- 다 음 -</p> <p>가. 흉강삼출액, 복강삼출액, 뇌척수액 검사의 모든 경우나. 뇨 및 객담검사는 아래와 같은 경우</p> <p>1) 일반 요검사 또는 객담검사서 비정형세포가 관찰되어 추가적인 검사 또는 추적 관찰이 필요한 경우</p> <p>2) 다른 임상검사(흉부 X선, 기관지 내시경, 방광경 검사)에서 폐암 또는 방광암이 의심되어 검사하는 경우</p> <p>3) 현미경적 혈뇨 이상의 요검사 이상이 있는 경우</p> <p>4) 방광암 또는 폐암 치료 후 재발 여부를 평가하는 경우</p> <p>5) 기타 장기로 암의 전이가 의심되어 평가하는 경우(2018.3.7. 시행)</p>
L3931	방광암항원 검사 [NMP22]	<p>**고시 제2019-255호(행위) 누372, 누421, 누422, 누428-누432, 누434-누441, 누447 및 누448을 종양검사로 시행하는 경우 급여 기준은 다음과 같이 함.</p> <p>- 다 음 -</p> <p>가. 악성종양이 원발장기에 있는 경우: 최대 2종 인정. 다만, 간내에서 발생한 원발성 암종의 감별이 임상적으로 어려운 경우에는 최대 4종 인정</p> <p>나. 악성종양이 원발장기와 속발(전이)장기에 있거나 악성종양이 의심되는 경우: 원발장기 2종을 포함하여 최대 3종 인정</p> <p>다. 원발장기가 확인이 안 된 상태에서 암이 의심되어 실시하는 경우: 장기별로 1종씩 인정하되, 최대 3종까지 인정. 다만, 난소암이 의심되는 경우에는 치료 전 검사 1회에 한하여 최대 5종까지 인정함</p> <p>라. 종양검사 중 ‘누437 인간부고환 단백질4 [정밀면역검사]’는 「선별급여 지정 및 실시 등에 관한 기준」에 따라 본인부담률을 80%로 적용함(시행일: 2020.1.1. 시행)</p>

준으로 인정되고 있다(Table 1).

요 세포검사의 장점은 비침습적이고 쉽게 언제 어디서라도 검체 확보가 가능하여 저렴한 경제적 비용을 꼽을 수 있다. 단점은 요에 존재하는 정상 탈락 세포 및 여러 효소 등의 물질의 영향으로 인한 변성이 있다. 무엇보다 암세포의 탈락이 일어나야만 진단이 가능하므로 암세포의 탈락이 많이 동반되지 않는 저위험도의 방광암에서는 검사의 민감도가 낮다는 단점이 있다. 이런 요 세포검사의 진단적 한계를 극복하기 위해 많은 연구들이 요 검체를 이용한 검사법을 개발하고 임상 적용하고 있지만 아직까지는 방광경 및 요 세포검사를 대체하고 있지는 못하다. 그러므로 본문에서는 현존하는 방광암의 진단 및 추적 관찰 목적으로 사용되도록 개발된 다양한 요를 이용한 요 생물지표를 알아보고, 그 중에 임상에서 사용되고 있는 방광암의 여러 요검체 검사법에 대해 집중적으로 알아보고자 한다. 나아가 최근 연구가 되고 있는 여러 기전의 요검체 방법에 대해서도 소개하는 시간을 가져 보도록 하겠다.

현재 FDA에서 허가된 방광암 요 검사법들(Table 2)

1. 요 세포(urine cytology)검사

요 세포검사법은 현재 임상에서 가장 많이 사용되고 있는 진단 및 추적 관찰 검사법으로 환자의 요 검체에서 방광암 탈락 세포들을 찾아내어 염색하여 눈으로 확인하는 검사법이다. 민감도와 특이도는 각각 최대 48%와 86% 정도로 알려져 있으며,³⁻⁷ 검사의 용도는 일차 방광암 진단 목적과 방광암 치료 후 추적 관찰 동안 방광 내 재발 유무를 판단하는 선별검사 목적이다. 특히 high-grade 방광암이나 상피내암(CIS)에 대해 방광 내 주입치료 이후에는 민감도와 특이도는 각각 38%-90%와 98%-100%로 유지된다.^{4,6,7} 하지만 low grade 방광암의 경우는 검사 민감도가 4%-31%로 낮으며, 염증성방광질환이나 비특이적 방광암 세포가 나온 경우, 그리고 다른 암에 대해 항암치료력이 있는 환자들의 요 검체의 경우에는 위양성률이 12%까지 상승하는 단점을 가지고 있다.^{4,5}

2. BTA stat 검사법과 BTA TRAK 검사법

Bladder Tumor Antigen (BTA) 검사법은 면역크로마토그래피 (immunochromatographic) 방법을 이용하여 방광암 성장과 면역 회피에 관여하는 보체(complement factor) H와 그 연관 단백질을 측정하여,⁸ 방광암 환자들의 추적 관찰 목적에 사용되는 검사법이다.² BTA stat 검사의 민감도와 특이도는 각각 57%~83%와 60%~92% 정도로 보고되며, BTA TRAK 검사법(Polymedco Inc., Cortlandt, NY, USA)의 경우는 각각 73%~77%와 45%~81%로 보고되고 있다.^{3,9,10}

BTA stat 검사법은 요 세포검사법보다 민감도에 있어서 는 월등하지만, 특이도에서는 요 세포검사법이 더 우수하

다.¹¹ BTA TRAK 검사법의 경우도 민감도 면에서는 high-grade와 low-grade (Ta 와 T1병기) 방광암에서 요 세포검사법보다는 우월하다고 보고되지만, 특이도면에서는 요 세포 검사법보다 떨어지며 양성 방광질환에 대한 높은 위양성률을 보고하여, 이 검사법들이 요 세포검사법을 대체하지는 못하는 것으로 보고된다.^{10,12-16}

3. NMP22 kit와 NMP22 BladderChek 검사법

NMP22 kit와 NMP22 BladderChek 검사법(Matritech, Inc., Alere, Germany)은 요 상피세포가 사멸할 때 요로 분비하는 NMP22 단백질이 방광암세포에서 월등히 높다는 점을 착안하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Table 2. FDA approved urinary marker for the bladder cancer

Test name	Assay	Detecting target methods	Targets	Materials	Objective	Sensitivity	Specificity	Reference	Company
Urine cytology	Morphologic Giemsa H&E staining	Microscopic confirmation	Atypical Tumor cells	Exfoliated tumor cells	Diagnostic and surveillance	Overall 48%; 38%~90% (HG); 4%~31% (LG)	Overall 86%; 83%~100%	3-5	
BTA stat	Sandwich ELISA	Complement and its related protein	complement factor H and its protein	Exfoliated tumor cells	Diagnostic and surveillance	Overall 70%; 57%~83%	Overall 75%; 60%~92%	2, 3 8, 9, 16	Polymedco Inc., Cortlandt, NY, USA
BTA TRACK	Sandwich immunoassay	Complement and its related protein	complement factor H and its protein	Exfoliated tumor cells	Diagnostic and surveillance	Overall 70%; 54%~75%	Overall 75%; 64%~82%	3, 8, 16	Polymedco Inc., Cortlandt, NY, USA
NMP22	ELISA	Nuclear mitosis	NMP22 protein	Exfoliated tumor cells	Surveillance	Overall 40%; 47%~100%	Overall 99%; 70%~83%	3, 16, 30	Matritech, Inc., Alere Germany
NMP22 Bladder Chek	Point of care ELISA	Nuclear mitosis	NMP22 protein	Exfoliated tumor cells	Diagnostic and Surveillance	Overall 40%; 62%~75%	Overall 99%; 70%~83%	3, 16, 30	Matritech, Inc., Alere Germany
ImmunoCyt/uCyt	Immunochromatography	Monoclonal Ab. directed immunofluorescent cytology	LDQ10 and M344 mucins from CEA	Exfoliated tumor cells	Surveillance	Overall 85%; 78%~100%	Overall 83%; 69%~87%	3, 16, 27	Scimedx Inc., Dover, NJ USA
UroVysion	Fluorescent <i>in situ</i> hybridization		Aneuploidy of Chr.3,7,17, 9p21 and loss of p16	Exfoliated tumor cells	Diagnostic and surveillance	Overall 72%; 65%~84%	Overall 83%; 78%~92%	3, 30, 37	Vysis, Abbott Molecular Inc., Chicago, IL, USA

FDA: U.S. Food and Drug Administration, HG: high grade, LG: low grade, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, Ab.: antibody, BTA: bladder tumor antigen, CEA: carcinoembryonic antigen.

방법을 이용하여 NMP22 단백질을 측정하는 검사법이다.¹⁷⁻¹⁹ 민감도와 특이도는 NMP22 kit 검사법이 추적 관찰 시 52%-59%와 87%-89%를 보인다고 알려져 있으며, NMP22 BladderChek 검사법은 진단 목적으로 민감도 62%-75%와 특이도 70%-83%를 보고하고 있다.¹⁹⁻²² 이 검사들의 장점은 미세혈뇨에서 요 세포검사법보다 진단 민감도는 더 높고,^{17,18,23} low-grade와 high-grade, 낮은 병기의 방광암에서 진단률이 높다는 점이다.²⁴ 하지만 요세포법보다 낮은 특이도와¹⁷ 양성 방광질환에서의 높은 위양성률은 단점으로 꼽힌다.^{15,25}

4. ImmunoCyt/uCyt+ assay 검사법

uCyt+ assay 검사법(Scimedx Inc., Denville, NJ, USA)은 단일클론 항체(monoclonal antibodies)에 형광물질을 붙이는 면역염색방법을 이용하여 carcinoembryonic antigen 두 개의 방광암 관련 LDQ10 과 M344 mucins을 측정하는 검사법이다.²⁶⁻³⁵ 치료 후 추적 관찰에 적합한 이 검사법은 민감도 67%-100%, 특이도 62%-84%를 가진다. 장점으로는 요 세포검사법과 함께 사용되면 향상된 진단 정확도를 보여 치료 후 불필요한 방광경검사를 줄일 수 있는 검사법으로 알려져 있다.^{22,28,36} 또한 방광암 grade가 높아질수록 민감도가 동반 상승한다는 점이다.²⁹⁻³³ 단점으로는 요 세포검사법 보다는 특이도가 낮으며, 양성 방광질환에 높은 위양성률을 보이고, 혈뇨 환자들에게는 더욱 위양성률이(-67%) 높다는

점이다.³⁴ 나아가 이 검사법은 독립된 검사 공간과 판독자의 판독 경험이 진단 정확도에 영향을 미친다고 알려져 있다.^{27,35,36}

5. UroVysion 검사법

UroVysion 검사법(Vysis, Abott Molecular Inc., Chicago, IL, USA)은 형광동소보합법(fluorescence *in situ* hybridization, FISH assay)을 이용하여 여러 개어 암 관련 염색체 복제수 변이(copy numbers)를 찾아내는 검사법이다. 복제수 변이로는 염색체 3번, 7번, 17번, 9p21번의 이수성(aneuploidy)을 표적으로 하며 P16 종양억제유전자(loss of tumor-suppressor gene) 단백질의 손실도 측정한다.³⁵⁻³⁷ 민감도는 57.1%-84%와 특이도는 78%-92%로 요 세포검사법보다 좋으며, 방광암 low-grade에서도 정확도가 좋다.^{28,35,36,38,39} 또한 불확실한 방광경 소견 방광암이나 비정형세포가 요 세포검사법에 보이는 고위험 방광암에서 진단율이 좋다는 장점이 있다.^{28,36,40} 특히, 방광 내 Bacillus Calmette-Guerin (BCG) 주입 치료 후 추적 관찰 목적에서 치료 실패 환자의 재발 유무를 판단하고,⁴¹⁻⁴⁴ 비근육침범방광암(nonmuscle invasive bladder cancer, NMIBC)에서 방광경이 음성 소견이나 요 세포검사서 의심 소견을 보일 때, UroVysion은 재발 진단에 유리한 장점을 가진다.⁴⁵ 단점으로는 독립된 검사 시설 공간과 오랜 검체 준비 시간 그리고 판독 경험이 진단율에 영향을 미친다는 점이다.^{35,37,46}

Table 3. Available commercial kits performance and characteristics

Characteristic	Technology	Type of biomarker	Purpose	Sensitivity (%) / specificity (%)	Reference
CxBladder	RT-qPCR	mRNA	Diagnostic	82/85	59
XpertDetection	RT-qPCR	mRNA	Diagnostic	76/85	62
Uromonitor	Real-time PCR	Tumor cell DNA	Surveillance	74/93	54
Epheck	Real-time PCR	methyDNA	Surveillance	68/88	63
UroSEEK	Massive parallel sequencing-based assay	Tumor cell DNA	Diagnostic / surveillance	95/93	55
UBC rapid and UBC ELISA	Sandwich ELISA	CK8 and 18	Diagnostic	50-59/82-86	53
CYFRA 21-1	Electrochemiluminescent immunoassay	CK19	Diagnostic	70-90/73-86	72
BLCA 4	Sandwich ELISA	NMP	Diagnostic	93/97	73
Survivin	ELISA Bio-dot assay	Inhibitor of apoptosis genes	Diagnostic	64/93	75
AssureMDx	Mutation analysis	Mutation: FGFR3/TERT/HRAS, Methylation: OTX1/ONECUT2/TWIST	Diagnostic	93-97/83-86	66
TaqMan Arrays	PCR	12+2 gene-set panel	Diagnostic	98/99	69-71

RT-qPCR: real time quantitative polymerase chain reaction, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay.

FDA 허가 준비 중이나 상업적으로 유통 중인 요검사법(Table 3)

1. ADXBLADDER 검사법

ADXBLADDER 검사법(Arquer Diagnostics LTD, South-lands, UK)은 ELISA 방식을 사용하여 혈뇨 환자에서 암세포 DNA 복제가 활발히 일어날 때 나오는 mini-chromosome maintenance protein 5 단백질을 측정하는 검사법이다.^{38,39,47,48} 민감도와 특이도는 각각 약 76%와 69%로 보고되며, 고위험 방광암이나 근침윤방광암(muscle invasive bladder cancer)에서는 그 민감도는 95%~97%까지 상승한다. 음성예측률(negative predictive value, NPV)은 전체적으로는 97.1%이고 고위험 방광암에서는 99.7%까지 보고한다.⁴⁹ 나아가 이 검사법은 양성 방광질환에 영향을 받지 않아 요 세포검사법의 방광암 일차 진단의 대체 검사법으로 주목받고 있다.

2. UBC Rapid test and UBC ELISA kit 검사법

UBC Rapid 검사법은 point-of-care ELISA의 면역크로마토그래피(immunochromatographic) 방법으로 방광암 세포의 침윤 시 분비되는 방광암 항원인 cytokeratin 8과 18의 용해성 부분 물질을 측정한다. 그러므로 high-grade NMIBC의 진단과 추적 관찰에 좋고, 민감도 50%~75%와 특이도 82%~93.8%를 가진다.^{46,50-52} 방광경검사가 어려운 high-grade 방광암에 매우 높은 민감도와 특이도를 보이며, 검사 방법이나 판독 방법이 어렵지 않다는 장점을 가진다.⁵³

3. Uromonitor와 Uromonitor-V2 검사법

Uromonitor 검사법(U-Monitor, Porto, Portugal)은 real-time polymerase chain reaction (PCR)로 탈락 방광암 세포의 DNA 중 TERTp와 FGFR3 변이를 측정한다. Uromonitor 검사법은 전반적인 민감도와 특이도는 73.5%와 73.2%를 가지며 방광경과 함께 사용 시, 민감도 100%, 특이도 88.6%로 방광경과 요 세포검사법 조합의 민감도 86.7%보다 우수하다.⁵⁴ Uromonitor-V2 검사법은 NMIBC의 추적검사 목적으로 사용되며, 민감도 100%, 특이도 83.3%, 양성 예측률 66.7% (positive predictive value), 음성 예측률 100% (NPV)를 가진다.⁵⁴ 이 검사법들은 양성 방광질환에도 영향을 받지 않으며, 치료 후 재발에 대한 추적 관찰에서 방광경과 비교하면 병기나 grade별로 검사 정확도가 비슷하여, 치료 후 방광경이 힘든 환자들의 대체 검사법으로 사용될 수 있다는 장점이 있다.

4. UroSEEK 검사법

UroSEEK 검사법은 TERT, FGFR3, PIK3CA, TP53, HRAS, KRAS, ERBB2, CDKN2A, MET, MLL, VHL의 변이를 측정하는 검사법으로 요 세포검사법보다 진단(95% vs. 43%) 목적과 추적 관찰(71% vs. 25%) 목적에서 더 민감하다.^{55,56} 특히, 신규 방광암 환자의 진단에 있어 비정상 요 세포검사 결과나 고위험 환자들에 진단 목적으로 사용되며, 추적관찰 목적에서는 민감도 74%~96%, 특이도 72%~88%, 음성 예측률(NPV) 53%~99%를 가진다고 알려져 있다.⁵⁶ 이 검사법의 단점은 차세대 염기서열분석(next-generation sequencing, NGS) 기술의 한계인 낮은 민감도로 그 전에 방광암으로 진단받았거나 상부요로 암의 병력이 있는 경우는 진단 정확도가 떨어진다는 점이다.²⁴

5. CxBladder assay와 CxBladderTriage 검사법

CxBladder assay 검사법(Pacific Edge Ltd., Dunedin, New Zealand)은 5개의 IGFBP5, HOXA13, MDK, CDK1, CXCR2 mRNA의 panel을 만들어 사용하는 검사법 기반의 전사체 패널검사법(transcriptomic panel assay)으로 방광암 대비 정상 대조군을 비교하여, 위양성률을 낮추고 민감도를 82%로 끌어올린 검사법이다.⁵⁷ CxBladderTriage 검사법은 임상데이터를 보정하여 사용할 수 있다는 점에 개인 맞춤형 검사법으로 불리며, 육안적 혈뇨 환자 같은 고위험 방광암 환자의 암 진단율은 100%로 알려져 있는 검사법이다.⁵⁸ 요 세포검사법과 비교하면 low-grade 방광암에서도 민감도는 93%로 병기(68%, pTa)와 grade에 민감도가 영향을 받지 않으며, 특이도가 85%로 보고되었다. Low-grade 암의 민감도는 86%, high-grade 방광암에서는 민감도는 95%, 음성예측률(NPV) 97%, 위음성예측률 1.5%를 가진다고 보고하였다.^{57,59} 그러므로 NMIBC 환자의 방광경 대체 검사법으로 주목받고 있고,⁶⁰ 현존하는 U.S. Food and Drug Administration (FDA) 승인된 검사들과 비교할 때 민감도와 위양성률은 Cxbladder Monitor (91%, 96%) 검사법이 요 세포검사법 (22%, 87%), NMP22 BC 검사법(26%, 87%), NMP22 BladderChek 검사법(11%, 86%)들보다 우수하다고 알려져 있다.⁴⁰

6. The XPERT BC Monitor 검사법

XPERT BC Monitor 검사법(Cephaid, Sunnyvale, CA, USA)은 ABL1, CRH, IGF2, UPK1B, ANXA10의 5개 mRNA를 이용한 전사체 패널검사법(transcriptomic panel assay)으로 전반적인 민감도는 73%로 요 세포검사법보다 우수하지만 특이도는 90%~91%로 요 세포검사법과 유의한

차이가 없다고 알려져 있다.^{61,62} 이 검사법의 장점은 요 세포검사법보다 더 높은 민감도(84% vs. 33%)와 음성예측률(93% vs. 76%)을 가지며, low-grade (77%)와 pTa 병기(82%)에서 민감도는 더 높아진다(요 세포검사법, 13% low grade, 21% pTa).⁶¹

7. Bladder EpiCheck 검사법

Bladder EpiCheck 검사법(Palex Medical SA, Barcelona, Spain)은 후성유전 DNA 메틸화(an epigenetic DNA methylation assay)방법으로 15개의 변이 DNA 메틸화(methylation)들을 표적으로 NMIBC의 재발을 측정하는데 사용된다.⁶² 이 검사법은 EpiScore라는 알고리즘 방식의 판독법을 이용하여, 민감도 68.2%, 특이도 88.0%, 음성예측률 95.1%를 보고하고 있다. 요 세포검사법과 비교하면 EpiCheck 검사법은 높은 민감도(62.3%-68.2% vs. 33.3%)와 낮은 특이도(86.3%-88% vs. 98.6%)를 보이며, high-grade 방광암에서 특히 민감도가 높고, 음성예측률도 82.9%를 보인다는 점이다.⁶³ 나아가 염증이나 상부요로에 영향을 받지 않는다. 하지만 검사 진행에 있어 높은 비용과 기술력이 필요하다는 단점을 가지고 있다.^{62,63}

8. BC UroMark 검사법

BC UroMark 검사법(UCL Cancer Institute, London, UK)은 염기서열을 고속으로 분석(high throughput sequencing)하는 NGS 기법의 150 CpG loci 생물지표 패널을 통한 bisulfite 표적의 후성유전학 DNA 메틸화(epigenetic DNA methylation) 측정법이다. 진단 목적에서 98%의 민감도와, 97% 특이도, 97% 음성예측률을 보고하고 있다.^{64,65}

9. AssureMDx 검사법

AssureMDx 검사법(MDx Health, Irvine, CA, USA)은 차세대 PCR 서열분석법을 이용한 체성 DNA메틸화(somatic DNA methylation) 측정법이다. OTX1, ONECUT2, TWIST1 패널이나 FGFR3, TERT, HRAS패널의 변이량을 이용하여, 혈뇨 고위험 환자에서 93%-97%의 민감도와, 83%-86%의 특이도, 99%의 음성예측률을 보고하고 있다.^{66,67} 진단 목적의 low-grade 방광암의 경우는 민감도 81%를 보고하며, 추적 관찰에서는 민감도 57%-59%를 보고한다. High-grade 방광암의 경우는 진단에서 94%의 민감도, 추적 관찰에서는 72%-77%를 보고한다.⁶⁴ 이 검사를 이용하면 77%의 불필요한 진단 목적의 방광경을 줄일 수 있을 것으로 본다.^{66,68}

10. TaqMan® Arrays 검사법

TaqMan® Arrays 검사법(Thermo Fisher Scientific, Waltham,

MA, USA)은 real time quantitative PCR를 이용하여 요에서 12+2 유전자 패널을 이용하여 일반 대조군 대비 방광암 진단 목적의 민감도 98%와 특이도 99%를 가지는 검사법이다. 전반적인 민감도는 81.5%, 특이도는 91.3%로 요 세포검사법과 비슷하다.⁶⁹⁻⁷¹

연구중인 요 생물지표

방광암의 다양한 암 생성과 진행기전과 관련한 여러 표적들을 가지고 요검체를 이용한 표적 생물지표들을 연구하고 있다.

Cytokeratin-19 (CYFRA 21-1)의 proteolytic region은 혈액뿐만 아니라 인간의 체액에서 발견되는 용해성 물질로 몇몇 암 중에서 비특이적 종양 표지자로 주목받고 있으며, 방광암에서는 진단, 예후, 추적관찰, 재발과 관련성이 있다고 알려져 있다.⁷²

NMP 조절인자들(transcription factor family)의 하나인 BLCA-4는 아직 임상 연구로는 확인(validation)된 것은 아니지만, 방광암의 초기 병기에 발견되는 물질로 방광 양성 질환에서는 높은 양으로는 관측이 안 되는 특징을 가진다.⁵² 민감도 93%에 특이도 97%를 보였다.⁷³

항사멸(anti-apoptotic) 단백질인 sFAS는 암세포를 보호하는 역할을 하며, 요 검체 연구에서 방광암의 grade, T1이상의 병기, 높은 NMP22 수치, 요 세포검사 양성에서 방광암 진단에 있어 유의한 상관성을 보였다.⁷⁴ 또 다른 암세포 염색체의 보호작용을 하는 생물지표로는 telomerase가 있다. 요의 telomerase 양은 NMIBC 재발과 연관이 되어있으며 grade와 병기와 상관성이 있다고 알려져 있다. 또한 anti-apoptotic inhibitor의 단백질 한종류인 surviving 측정 assay방법도 민감도 64%, 특이도 93%를 요검체에서 찾을 수 있는 표지자이다.⁷⁵

세포 부착과 증식에 관여하는 hyaluronic acid (HA)는 암전이 시 hyaluronidase enzyme (HAase) 효소를 통해 분해되어 세포 이동과 증식을 용이하게 하는 특징을 보여 NMIBC 진단의 생물지표로 고려되고 있다.⁷⁶

이 외에 cytokines과 chemokines 중 방광암 관련 생물지표들로는 GM-CSF, IFN-alpha, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, survivin, TNF-alpha, TRAIL들도 알려져 있다. 이들은 요에서 관찰되며 방광 내 BCG 주입술의 치료 반응지표로 주목을 받고 있다.^{34,39} PDL-1과 CTLA-4도 면역치료의 치료반응 표적 생물지표로 방광암 환자들의 요에서 측정된다.

방광암의 기전인 PI3K-AKT 기전과 관련 있는 IGF2는 세포막에 존재하는 당단백수용체(glycoprotein receptor)로 고

환과 자궁 및 방광암에서 발견되는 melanoma-associated antigen 3의 조합이 방광암진단 생물지표로 연구되고 있다.^{71,77-80}

서열 분석 방법의 기술 발전으로 분자 유전체 발달을 이용한 요 내 여러 생물지표들도 연구되고 있다.^{14,24} 대표적으로 방광암의 유전변이와 융합(fusion) 단백질을 표적으로 하는 FGFR3-TACC3 fusion protein,^{6,81} mitogen-activated protein kinase (MAPK) 기전 관련 BRAF, MAP2K1, MAP2K2 들, the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway 기전의 PIK3CA 표적들,^{2,28,82} the receptor tyrosine kinase-RAS pathway (39% of metastatic tumors)의 FGFR3 (14%)과 ERBB3 (13%) 등이 있다.

요 내 DNA-메틸화 유전체를 이용하여 다양한 유전자들의 조합 형태의 요 생물지표들도 연구되고 있으며,⁸³ 그 중에 *SOX1*, *TIP2*, *MYOID*, *HOXA9_1*, *HOXA9_2*, *VAMP8*, *CASP8*, *SPPI*, *IFNG*, *CAPG*, *HLADPA1*, *RIPK3* 유전자들의 조합을 이용한 요검체 연구는 방광암 진단의 민감도와 특이도에서 100%를 보여주었다.⁸⁴

cfDNA, long-noncoding RNA (lncRNA), miRNA도 요검체에서 측정할 수 있는 표적 생물지표들이다.^{85,86} 세포바깥소포체(extracellular vesicles)도 요의 주요 표적 생물지표로 단백질, DNA, mRNA 분야와 함께 연구되고 있다.⁸⁷ 국내 연구진들의 연구 결과를 보면, 요검체 내 cell-free microRNA를 이용한 방광암 감별 진단 연구에서는 326개의 방광암의 요 검체와 혈뇨를 보인 217개의 비방광암 요 검체를 비교했을 때 miR-6124와 miR-4511를 표적으로 이들의 비율(miR-6124/miR4511 ratio)이 민감도 90% 이상의 방광암 감별 진단율을 보여 침습적인 방광경을 대체할 비침습적 요검체 방광암 감별법을 제시하였다.⁸⁸ 이외에도 단백질체(proteomics) 연구와 대사체(metabolomics)연구를 이용한 요검체 내 방광암 표지자 연구도 활발히 진행되고 있다.⁸⁹ 대사체 연구로는 tricarboxylic acid cycle의 방광암의 당분해 대사체들(glycolysis-related metabolites)과 fructose의 감소, lactate 증가를 바탕으로 요 내 증가된 acylcarnitines, decanoylcarnitine, decenoylcarnitine, hydroxynonanoylcarnitine, hydroxybutyrylcarnitine를 측정하는 연구도 진행되고 있다.⁹⁰

결론 및 향후 전망

이번 시간에 다른 요 검체를 이용한 검사법들은 FDA에서 허용한 것들과 아직 허용되지는 않고 있지만 상용화 가능성이 큰 검사법들을 소개하였다. 나아가 연구 차원에서 주목받고 있는 요 검체 내 물질들도 알아보았다. 아직까지 방광암 가이드라인에서는 방광경을 대체하는 요검사법을

추천하고 있지는 않지만, 이는 이렇게 다양한 기전과 표적을 가진 여러 요 검체들에 대해 전향적인 대규모 비교 연구가 부족한 결과라고 생각한다. 하지만 이번 시간에 보았듯이 많은 검사법들이 진단 및 추적 관찰 목적에서 긍정적인 방광암 연구 결과들을 보여주고 있어 가까운 미래에는 방광경을 대체하거나 추가적인 보조적인 검사법들을 통한 불필요한 방광경을 줄이는 방향으로 방광암 가이드라인들이 바뀔 것으로 본다. 분자, 유전체 등의 최신 떠오르고 있는 다양한 요검사법들은 미래의 개개인의 맞춤형 의학에 맞는 요 검사법으로 자리 매김을 할 수도 있을 것이다.

이해관계(Conflict of Interest)

저자들은 이 논문과 관련하여 이해관계의 충돌이 없음을 명시합니다.

REFERENCES

1. Babjuk M, Böhle A, Burger M, Capoun O, Cohen D, Compérat EM, et al. EAU Guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2016. *Eur Urol* 2017;71:447-61.
2. Kamat AM, Dickstein RJ, Messetti F, Anderson R, Pretzsch SM, Gonzalez GN, et al. Use of fluorescence in situ hybridization to predict response to bacillus Calmette-Guerin therapy for bladder cancer: results of a prospective trial. *J Urol* 2012;187:862-7.
3. Tabayoyong W, Kamat AM. Current use and promise of urinary markers for urothelial cancer. *Curr Urol Rep* 2018; 19:96.
4. Lotan Y, Roehrborn CG. Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses. *Urology* 2003;61:109-18; discussion 118.
5. Blick CG, Nazir SA, Mallett S, Turney BW, Onwu NN, Roberts IS, et al. Evaluation of diagnostic strategies for bladder cancer using computed tomography (CT) urography, flexible cystoscopy and voided urine cytology: results for 778 patients from a hospital haematuria clinic. *BJU Int* 2012;110:84-94.
6. Leiblich A. Recent developments in the search for urinary biomarkers in bladder cancer. *Curr Urol Rep* 2017;18:100.
7. Yafi FA, Brimo F, Steinberg J, Aprikian AG, Tanguay S, Kassouf W. Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urol Oncol* 2015;33:66.e25-31.
8. Kamat AM, Dickstein RJ, Messetti F, Anderson R, Pretzsch SM, Gonzalez GN, et al. Use of fluorescence in situ hybridization to predict response to bacillus Calmette-Guerin

- therapy for bladder cancer: results of a prospective trial. *J Urol* 2012;187:862-7.
9. Glas AS, Roos D, Deutekom M, Zwinderman AH, Bossuyt PM, Kurth KH. Tumor markers in the diagnosis of primary bladder cancer. A systematic review. *J Urol* 2003;169:1975-82.
10. Duquesne I, Weisbach L, Aziz A, Kluth LA, Xylinas E, Young academic urologist urothelial carcinoma group of the European Association of Urology. The contemporary role and impact of urine-based biomarkers in bladder cancer. *Transl Androl Urol* 2017;6:1031-42.
11. Gutiérrez Baños JL, del Henar Rebollo Rodrigo M, Antolín Juárez FM, García BM. Usefulness of the BTA STAT test for the diagnosis of bladder cancer. *Urology* 2001;4:685-9.
12. Thomas L, Leyh H, Marberger M, Bombardieri E, Bassi P, Pagano F, et al. Multicenter trial of the quantitative BTA TRAK assay in the detection of bladder cancer. *Clin Chem* 1999;45:472-7.
13. Lokeshwar VB, Soloway MS. Current bladder tumor tests: does their projected utility fulfill clinical necessity? *J Urol* 2001;165:1067-77.
14. Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB, Murphy WM, Hautmann SH, Hemstreet 3rd GP, et al. Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology* 2005;66:35-63.
15. Sharma S, Zippe CD, Pandrangi L, Nelson D, Agarwal A. Exclusion criteria enhance the specificity and positive predictive value of NMP22 and BTA stat. *J Urol* 1999;162:53-7.
16. Batista R, Vinagre N, Meireles S, Vinagre J, Prazeres H, Leão R, et al. Biomarkers for bladder cancer diagnosis and surveillance: a comprehensive review. *Diagnostics (Basel)* 2020;10:39.
17. Dogan C, Pelit ES, Yildirim A, Zemheri IE, Çanakcı C, Başok EK, et al. The value of the NMP22 test for superficial bladder cancer diagnosis and follow-up. *Turk J Urol* 2013;39:137-42.
18. Moonen PM, Kiemeny LA, Witjes JA. Urinary NMP22 BladderChek test in the diagnosis of superficial bladder cancer. *Eur Urol* 2005;48:951-6.
19. Landman J, Chang Y, Kavalier E, Droller MJ, Liu BC. Sensitivity and specificity of NMP-22, telomerase, and BTA in the detection of human bladder cancer. *Urology* 1998;52:398-402.
20. Schiess R, Wollscheid B, Aebersold R. Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery. *Mol Oncol* 2009;3:33-44.
21. Chakraborty A, Dasari S, Long W, Mohan C. Urine protein biomarkers for the detection, surveillance, and treatment response prediction of bladder cancer. *Am J Cancer Res* 2019;9:1104-111.
22. Chou R, Gore JL, Buckley D, Fu R, Gustafson K, Griffin JC, et al. Urinary biomarkers for diagnosis of bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2015;163:922-31.
23. Liang Q, Zhang G, Li W, Wang J, Sheng S. Comparison of the diagnostic performance of fluorescence in situ hybridization (FISH), nuclear matrix protein 22 (NMP22), and their combination model in bladder carcinoma detection: a systematic review and meta-analysis. *Onco Targets Ther* 2018;12:349-58.
24. Todenhoefer T, Hennenlotter J, Aufderklamm S, Kühs U, Gakis G, Germann M, et al. Individual risk assessment in bladder cancer patients based on a multi-marker panel. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013;139:49-56.
25. Shariat SF, Marberger MJ, Lotan Y, Sanchez-Carbayo M, Zippe C, Lüdecke G, et al. Variability in the performance of nuclear matrix protein 22 for the detection of bladder cancer. *J Urol* 2006;176:919-26.
26. Mian C, Pycha A, Wiener H, Haitel A, Lodde M, Marberger M. Immunocyt: a new tool for detecting transitional cell cancer of the urinary tract. *J Urol* 1999;161:1486-9.
27. Olsson H, Zackrisson B. ImmunoCyt a useful method in the follow-up protocol for patients with urinary bladder carcinoma. *Scand J Urol Nephrol* 2001;35:280-2.
28. He H, Han C, Hao L, Zang G. ImmunoCyt test compared to cytology in the diagnosis of bladder cancer: a meta-analysis. *Oncol Lett* 2016;12:83-8.
29. Comploj E, Mian C, Ambrosini-Spaltro A, Dechet C, Palermo S, Trenti E, et al. uCyt+/ImmunoCyt and cytology in the detection of urothelial carcinoma: an update on 7422 analyses. *Cancer Cytopathol* 2013;121:392-7.
30. Vriesema JL, Atsma F, Kiemeny LA, Peelen WP, Witjes JA, Schalken JA. Diagnostic efficacy of the ImmunoCyt test to detect superficial bladder cancer recurrence. *Urology* 2001;58:367-71.
31. Pfister C, Chautard D, Devonec M, Perrin P, Chopin D, Rischmann P, et al. Immunocyt test improves the diagnostic accuracy of urine cytology: results of a French multicenter study. *J Urol* 2003;169:921-4.
32. Shariat SF, Marberger MJ, Lotan Y, Sanchez-Carbayo M, Zippe C, Lüdecke G, et al. Variability in the performance of nuclear matrix protein 22 for the detection of bladder cancer. *J Urol* 2006;176:919-26.
33. Mian C, Maier K, Comploj E, Lodde M, Berner L, Lusuadi L, et al. uCyt+/ImmunoCyt in the detection of recurrent urothelial carcinoma: an update on 1991 analyses. *Cancer* 2006;108:60-5.
34. Mowatt G, Zhu S, Kilonzo M, Boachie C, Fraser C, Griffiths TR, et al. Systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of photodynamic diagnosis and urine biomarkers (FISH, ImmunoCyt, NMP22) and

- cytology for the detection and follow-up of bladder cancer. *Health Technol Assess* 2010;14:1-331.
35. Xylinas E, Kluth LA, Rieken M, Karakiewicz PI, Lotan Y, Shariat SF. Urine markers for detection and surveillance of bladder cancer. *Urol Oncol* 2014;32:222-9.
36. Schmitz-Draeger C, Bonberg N, Pesch B, Todenhöfer T, Sahin S, Behrens T, et al. Replacing cystoscopy by urine markers in the follow-up of patients with low-risk non-muscle-invasive bladder cancer? An International Bladder Cancer Network project. *Urol Oncol* 2016;34:452-9.
37. Sokolova IA, Halling KC, Jenkins RB, Burkhardt HM, Meyer RG, Seelig SA, et al. The development of a multi-target, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Mol Diagn* 2000;2:116-23.
38. Mukhtar S, Perry MJ. Future prospects for bladder cancer biomarkers. *BJU Int* 2011;108:1541-3.
39. Stoeber K, Halsall I, Freeman A, Swinn R, Doble A, Morris L, et al. Immunoassay for urothelial cancers that detects DNA replication protein Mcm5 in urine. *Lancet* 1999;354:1524-5.
40. Lotan Y, O'Sullivan P, Raman JD, Shariat SF, Kavalieris L, Frampton C, et al. Clinical comparison of noninvasive urine tests for ruling out recurrent urothelial carcinoma. *Urol Oncol* 2017;35:531.e15-531.e22.
41. Kipp BR, Karnes RJ, Brankley SM, Harwood AR, Pankratz VS, Sebo TJ, et al. Monitoring intravesical therapy for superficial bladder cancer using fluorescence in situ hybridization. *J Urol* 2005;173:401-4.
42. Savic S, Zlobec I, Thalmann GN, MSchmauss M, Lehmann K, Mattarelli G, et al. The prognostic value of cytology and fluorescence in situ hybridization in the follow-up of nonmuscle-invasive bladder cancer after intravesical Bacillus Calmette-Guerin therapy. *Int J Cancer* 2009;124:2899-904.
43. Lodde M, Mian C, Mayr R, Comploj E, Trenti E, Melotti R, et al. Recurrence and progression in patients with non-muscle invasive bladder cancer: prognostic models including multicolor fluorescence in situ hybridization molecular grading. *Int J Urol* 2014;21:974.
44. Chang SS, Boorijan SA, Chou R, Clark PE, Daneshmand S, Konety BR, et al. Diagnosis and treatment of non-muscle invasive bladder cancer: AUA/SUO guideline. *J Urol* 2016;196:1021-9.
45. Schmitz-Draeger BJ, Droller M, Lokeshwar VB, Lotan Y, Hudson MA, van Rhijn BW, et al. Molecular markers for bladder cancer screening, early diagnosis, and surveillance: the WHO/ICUD consensus. *Urol Int* 2015;94:1-24.
46. Hajdinjak T. UroVysion FISH test for detecting urothelial cancers: meta-analysis of diagnostic accuracy and comparison with urinary cytology testing. *Urol Oncol* 2008;26:646-51.
47. Fenner A. ADXBLADDER test better than cytology for NMIBC follow-up monitoring. *Nat Rev Urol* 2020;17:486.
48. Roupret M, Gontero P, McCracken SR, Dudderidge T, Stockley J, Kennedy A, et al. Diagnostic accuracy of MCM5 for the detection of recurrence in nonmuscle invasive bladder cancer followup: a Blinded, Prospective Cohort, Multicenter European Study. *J Urol* 2020;204:685-90.
49. Dudderidge T, Nabi G, Mom J, Umez-Eronini N, Hrouda D, Cresswell J, et al. A novel non-invasive aid for bladder cancer diagnosis: a prospective, multi-centre study to evaluate the ADXBLADDER test. *Eur Urol Suppl* 2018;17:e1424.
50. Maas M, Bedke J, Stenzl A, Todenhöfer T. Can urinary biomarkers replace cystoscopy? *World J Urol* 2019;37:1741-9.
51. Lotan Y, Elias K, Svatek RS, Bagrodia A, Nuss G, Moran B, et al. Bladder cancer screening in a high risk asymptomatic population using a point of care urine based protein tumor marker. *J Urol* 2009;182:52-7.
52. Urquidi V, Kim J, Chang M, Dai Y, Rosser CJ, Goodison S. CCL18 in a multiplex urine-based assay for the detection of bladder cancer. *PLoS One* 2012;7:e37797.
53. Schmitz-Draeger BJ, Droller M, Lokeshwar VB, Lotan Y, Hudson MA, van Rhijn BW, et al. Molecular markers for bladder cancer screening, early diagnosis, and surveillance: the WHO/ICUD consensus. *Urol Int* 2015;94:1-24.
54. Batista R, Vinagre J, Prazeres H, Sampaio C, Peralta P, Conceição P, et al. Validation of a novel, sensitive, and specific urine-based test for recurrence surveillance of patients with non-muscle-invasive bladder cancer in a comprehensive multicenter study. *Front Genet* 2019; 10:1237.
55. Springer SU, Chen CH, Rodriguez Pena MD, Li L, Douville C, Wang Y, et al. Non-invasive detection of urothelial cancer through the analysis of driver gene mutations and aneuploidy. *Elife* 2018;7:e32143.
56. Rodriguez Pena MD, Springer SU, Taheri D, Li L, Tregnago AC, Eich ML, et al. Performance of novel non-invasive urine assay UroSEEK in cohorts of equivocal urine cytology. *Virchows Arch* 2020;476:423-9.
57. Kavalieris L, O'Sullivan P, Frampton C, Guilford P, Darling D, Jacobson E, et al. Performance characteristics of a multigene urine biomarker test for monitoring for recurrent urothelial carcinoma in a multicenter study. *J Urol* 2017;197:1419-26.
58. Kavalieris L, O'Sullivan PJ, Suttie JM, Pownall BK, Gilling PJ, Chemasle C, et al. A segregation index combining phenotypic (clinical characteristics) and genotypic (gene expression) biomarkers from a urine sample to triage out patients presenting with hematuria who have a low probability of urothelial carcinoma. *BMC Urol* 2015;15:

- 23.
59. O'Sullivan P, Sharples K, Dalphin M, Davidson P, Gilling P, Cambridge L, et al. A multigene urine test for the detection and stratification of bladder cancer in patients presenting with hematuria. *J Urol* 2012;188:741-7.
60. Brems-Eskildsen AS, Zieger K, Toldbod H, Holcomb C, Higuchi R, Mansilla F, et al. Prediction and diagnosis of bladder cancer recurrence based on urinary content of hTERT, SENP1, PPP1CA, and MCM5 transcripts. *BMC Cancer* 2010;10:646.
61. Pichler R, Fritz J, Tulchiner G, Klinglmair G, Soleiman A, Horninger W, et al. Increased accuracy of a novel mRNA-based urine test for bladder cancer surveillance. *BJU Int* 2018;121:29-37.
62. Van Valenberg FJP, Bridge JA, Mayne D, Beqaj S, Sexton WJ, Lotan Y, et al. Validation of a mRNA-based urine test for bladder cancer detection in patients with hematuria. *Eur Urol Suppl* 2017;16:e190-1.
63. Witjes JA, Morote J, Cornel EB, Klinglmair G, Soleiman A, Horninger W, et al. Performance of the bladder EpiCheck methylation test for patients under surveillance for non-muscle-invasive bladder cancer: results of a multicenter, prospective, blinded clinical trial. *Eur Urol Oncol* 2018;1:307-13.
64. Trenti E, D'Elia C, Mian C, Hanspeter E, Pycha A, Kafka M, et al. Diagnostic predictive value of the Bladder EpiCheck test in the follow-up of patients with non-muscle-invasive bladder cancer. *Cancer Cytopathol* 2019;127:465-9.
65. Feber A, Dhami P, Dong L, de Winter P, Tan WS, Martínez-Fernández M, et al. UroMark-a urinary biomarker assay for the detection of bladder cancer. *Clin Epigenetics* 2017;9:8.
66. van Kessel KE, Van Neste L, Lurkin I, Zwarthoff EC, Van Criekinge W. Evaluation of an epigenetic profile for the detection of bladder cancer in patients with hematuria. *J Urol* 2016;195:601-7.
67. Beukers W, van der Keur KA, Kandimalla R, Vergouwe Y, Steyerberg EW, Boormans JL, et al. FGFR3, TERT and OTX1 as a urinary biomarker combination for surveillance of patients with bladder cancer in a large prospective multicenter study. *J Urol* 2017;197:1410-8.
68. van Kessel KEM, Beukers W, Lurkin I, Ziel-van der Made A, van der Keur KA, Boormans JL, et al. Validation of a DNA methylation-mutation urine assay to select patients with hematuria for cystoscopy. *J Urol* 2017;197:590-5.
69. Ribal MJ, Mengual L, Lozano JJ, Ingelmo-Torres M, Palou J, Rodríguez-Faba O, et al. Gene expression test for the non-invasive diagnosis of bladder cancer: a prospective, blinded, international and multicenter validation study. *Eur J Cancer* 2016;54:131-8.
70. Mengual L, Burset M, Ribal MJ, Ars E, Marin-Aguilera M, Fernandez M, et al. Gene expression signature in urine for diagnosing and assessing aggressiveness of bladder urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2010;16:2624-33.
71. Mengual L, Ribal MJ, Lozano JJ, Ingelmo-Torres M, Burset M, Fernandez PL, et al. Validation study of a non-invasive urine test for diagnosis and prognosis assessment of bladder cancer: evidence for improved models. *J Urol* 2014;191:261-9.
72. Huang YL, Chen J, Yan W, Zang D, Qin Q, Deng AM. Diagnostic accuracy of cytokeratin-19 fragment (CYFRA 21-1) for bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Tumour Biol* 2015;36:3137-45.
73. Cai Q, Wu Y, Guo Z, Gong R, Tang Y, Yang K, et al. Urine BLCA-4 exerts potential role in detecting patients with bladder cancers: a pooled analysis of individual studies. *Oncotarget* 2015;6:37500-10.
74. Svatek RS, Herman MP, Lotan Y, Casella R, Hsieh J, Sagalowsky AI, et al. Soluble Fas--a promising novel urinary marker for the detection of recurrent superficial bladder cancer. *Cancer* 2006;106:1701-7.
75. Shariat SF, Casella R, Khoddami SM, Hernandez G, Sulser T, Gasser TC, et al. Urine detection of survivin is a sensitive marker for the noninvasive diagnosis of bladder cancer. *J Urol* 2004;171(2 Pt 1):626-30.
76. Sanchez-Carbayo M, Urrutia M, Romani R, Herrero M, Gonzalez de Buitrago JM, Navajo JA, et al. Serial urinary IL-2, IL-6, IL-8, TNFalpha, UBC, CYFRA 21-1 and NMP22 during follow-up of patients with bladder cancer receiving intravesical BCG. *Anticancer Res* 2001;21:3041-7.
77. Yang SS, Calarco PG, Wivej NA. Biochemical properties and replication of murine intracisternal A particles during early embryogenesis. *Eur J Cancer* 1975;11:131-8.
78. Knowles MA, Platt FM, Ross RL, Yu W, Zhang H, Lin TY, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway activation in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009;28:305-16.
79. Dyrskjot L, Zieger K, Kissow Lildal T, Reinert T, Gruselle O, Coche T, et al. Expression of MAGE-A3, NY-ESO-1, LAGE-1 and PRAME in urothelial carcinoma. *Br J Cancer* 2012;107:116-22.
80. De Plaen E, Traversari C, Gaforio JJ, Gaforio JJ, Szikora JP, De Smet C, et al. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 1994;40:360-9.
81. Witjes JA, Lebrecht T, Comperat EM, Cowan NC, De Santis M, Bruins HM, et al. Updated 2016 EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer. *Eur Urol* 2017;71:462-75.
82. van der Aa MNM, Steyerberg EW, Bangma C, van Rhijn BWG, Zwarthoff EC, van der Kwast TH. Cystoscopy revisited as the gold standard for detecting bladder cancer

- recurrence: diagnostic review bias in the randomized, prospective CEFUB trial. *J Urol* 2010;183:76-80.
83. Larsen LK, Lind GE, Guldberg P, Dahl C. DNA-methylation-based detection of urological cancer in urine:overview of biomarkers and considerations on biomarker design, source of DNA, and detection technologies. *Int J Mol Sci* 2019;20:11.
84. Wang Y, Yu Y, Ye R, Zhang D, Li Q, An D, et al. An epigenetic biomarker combination of PCDH17 and POU4F2 detects bladder cancer accurately by methylation analyses of urine sediment DNA in Han Chinese. *Oncotarget* 2016;7:2754-64.
85. Todenhoefer T, Struss WJ, Seiler R, Wyatt AW, Black PC. Todenhöfer T, et al. Liquid biopsy-analysis of circulating tumor DNA (ctDNA) in bladder cancer. *Bladder Cancer* 2018;4:19-29.
86. Birkenkamp-Demtroeder K, Christensen E, Nordentoft I, Knudsen M, Taber A, Høyer S, et al. Monitoring treatment response and metastatic relapse in advanced bladder cancer by liquid biopsy analysis. *Eur Urol* 2018;73:535-40.
87. Liu YR, Ortiz-Bonilla CJ, Lee YF. Extracellular vesicles in bladder cancer: biomarkers and beyond. *Int J Mol Sci* 2018;19:2822.
88. Piao X, Jeong P, Kim Y, Byun YJ, Xu Y, Kang HW, et al. Urinary cell-free microRNA biomarker could discriminate bladder cancer from benign hematuria. *Int J Cancer* 2019;144:380-8.
89. Kim J, Kim WT, Kim WJ. Advances in urinary biomarker discovery in urological research. *Investig Clin Urol* 2020;61(Suppl 1):S8-22.
90. Liu X, Cheng X, Liu X, He L, Zhang W, Wang Y, et al. Investigation of the urinary metabolic variations and the application in bladder cancer biomarker discovery. *Int J Cancer* 2018;143:408-18.