REVIEW ARTICLE

전립선암 종양 이질성 규명을 위한 차세대 염기서열 분석의 유용성

정제균¹, 박주영¹, 양소윤¹, 정정윤²

¹삼성서울병원 삼성유전체연구소, ²삼성서울병원 건강의학센터

Utility of Next-Generation Sequencing for Deciphering Intratumor Heterogeneity in Prostate Cancer

Je-Gun Joung¹, Joo-Young Park¹, So-Yun Yang¹, Jeongyun Jeong²

¹Samsung Genome Institute, Samsung Medical Center, Seoul, Korea

²Center for Health Promotion, Samsung Medical Center, Seoul, Korea

Prostate cancer has long been considered a disease with a heterogeneous phenotype. The intratumor heterogeneity (ITH) may affect diverse phenotypes such as treatment response, drug resistance, and overall clinical outcomes. Despite technical advances over the past decade, we have an incomplete understanding of the extent and effects of ITH in prostate cancer progression. We present here a comprehensive review of the various studies dealing with ITH in prostate cancer. We discuss the advanced next-generation sequencing analyses including single cell sequencing and circulating cell-free DNA sequencing that have the impact of heterogeneity on clinical decision making.

Key Words: Prostate cancer, Intratumor heterogeneity, Next-generation sequencing, Clonality, Genomic marker

Received February 10, 2021

Revised March 16, 2021

Accepted March 24, 2021

Corresponding author:

Jeongyun Jeong

Email: jjyuro@hanmail.net

<https://orcid.org/0000-0003-2390-0581>

The study was supported in part by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (NRF-2017R1D1A1B03034779).

서론

최근에 많은 악성 종양에서 일반적인 현상으로 나타난 것과 마찬가지로 전립선암에서도 종양 이질성 (intratumor heterogeneity)이 다양하게 관찰되고 있다.^{1,2} 종양 이질성은 같은 환자 내의 종양에서도 각 부위에 따라 각각의 종양세포 군집별로 상이한 유전형 또는 표현형을 가질 수 있다는 것이다. 이러한 종양 이질성은 환자의 약물 반응성, 치료 저항성, 그리고 전반적인 치료 성적 등에 영향을 미칠 수 있다.^{3,4} 이러한 종양 이질성 정도를 알기 위해서 종양 내에 어떠한 종양 세포군

(subclone)들이 존재하는지 파악하는 것이 매우 중요하다. 왜냐하면 여러 종양 부위가 어떠한 구성을 가지느냐에 따라 종양의 형성 및 진행 패턴에 영향을 받을 수 있기 때문이다. 현재 종양 이질성이 악성 종양의 치료에 미치는 영향의 중요성이 점점 중요하게 부각됨에 따라서 전세계적으로 종양 이질성 연구가 활발하게 진행되고 있다.

전립선암에 대한 대표적인 검사방법으로 전립선특이항원(prostate-specific antigen, PSA) 수치가 임상적으로 유용하지만, PSA 수치 상승 또는 하강의 정도가 항상 전립선암의 진행 방향을 대변하지 못한다는 한계를 보이고 있다. 또한, 대부분의 전립선암 세포들이 남성호르몬

의 영향을 받아서 증식되기 때문에 호르몬 치료가 효과적이지만, 일부 환자들은 이러한 치료에 불응하고 있다. 이러한 호르몬 치료 불응성의 원인과 종양 이질성으로 인한 유전적 변화의 관련성에 대해서는 아직 연구가 미흡한 실정이다. 최근에 이르러서 차세대 염기서열 분석 등의 진일보한 유전체 분석 기술들에 의하여 환자들 간의 종양의 특성이 상당히 다양할 뿐만 아니라 환자 내에서도 유전체 상에 종양의 이질성이 높게 나타날 수 있음이 제시되었다.⁵ 이러한 연구들은 종양 이질성으로 인하여 한 환자 내에서도 한 군데의 생검으로는 전체 종양의 특성을 대표하지 못할 것이라는 점을 명확하게 뒷받침하고 있다. 저자들은 이 종설을 통하여 종양 이질성에 대한 개념과 차세대 염기서열 분석으로 종양 이질성을 연구하는 최신의 유전체 분석 방법들에 대해서 살펴보고자 한다.

전립선암의 종양 이질성 (Intratumor Heterogeneity)

종양 이질성은 종양 내에 있는 세포들의 유전형 및 표현형에 대한 정보가 위치에 따라 다르게 관측된다는 개념이다. 최근 암에 대한 연구는 이러한 개념에 초점을 맞추어 개별 암세포의 행동 패턴을 관측할 수 있는 수준까지 발전하였다. 전립선암의 경우에는 원발 종양과 전이 종양

간의 비교, 서로 다른 종양 간의 비교, 그리고 종양 내에서의 이질성에 대한 측면에서 활발히 연구가 진행되고 있다. 먼저 종양의 진행 과정에 있어서 종양 이질성을 설명하는 다양한 모델에 대해서 살펴보고자 한다.

1. 종양 내 이질성 모델(Intratumor Heterogeneity Models)

지금까지 제시된 종양내 이질성 모델은 크게 종양 줄기세포 모델(cancer stem cell model), 클론 진화 모델(clonal evolution model), 그리고 단속 진화 모델(punctuated evolution model)이 있다. 이와 관련한 각각의 종양 내 이질성 모델에 대한 개념도가 Fig. 1에 보여지고 있다.¹ 종양 줄기세포 모델은 다양한 종류의 종양 줄기세포들로부터 암이 시작되고 유지된다는 모델이다.⁶ 클론 진화모델은 암 진화 혹은 다윈의 자연선택설을 따르는 모델로 크게 선형 진화(linear evolutionary), 중심과 가지(trunk branch), 꼬인 강(braided river), 그 외에 중립 돌연변이 진화(neutral evolution)의 4가지로 나뉜다.⁷ 선형 진화 모델은 하나의 선구 세포가 유전적 다양성을 얻으면서 암을 유발한다고 주장하는 모델이다. 중심과 가지 모델은 초기에 존재했던 여러 개의 하위 그룹(subclone)이 독립적으로 변이를 겪으면서 각

Fig. 1. Conceptual diagram of models that explain tumor heterogeneity in tumor progression.

각의 종양 병소(tumor foci)가 발전함을 의미한다.⁸ 꼬인 강 모델은 강을 모델로 가져와 강의 큰 줄기는 중심 변이(trunk mutation), 강의 자갈한 줄기들은 이질 변이(heterogeneous mutation)로 표현하며, 주요 변이(driver mutation)가 되거나 다른 변이들과 합쳐져 종양 대사 회로(tumor pathway)에 주요한 영향을 줄 가능성을 가지고 있다고 설명한다.⁹ 마지막으로 중립 돌연변이 진화 모델은 가장 최초의 주요 변이는 모든 암 세포에 존재할 것이고, 비교적 최근에 발생한 변이는 하위 그룹에만 존재함을 말하며, 이를 이용해 변이를 추적한다면 암의 원인을 찾을 수 있다는 것이다. 마지막으로 단속 진화 모델은 차세대 염기서열 분석으로 암 성장을 촉진하는 치명적인 유전적 이상을 찾으면서 고안된 모델로 이러한 변이들이 암의 성장에 있어서 중요한 변화를 일으킴을 말하고 있다.^{8,10}

2. 전립선암에서 종양 이질성

종양 이질성을 연구하는 것은 예후 예측 인자와 관련된 마커(marker)와 질병의 위험도를 측정하는 방법을 찾는 데에 있어서 중요한 실마리를 이끌어 낼 수 있다. 현재 전립선암 진단 기술은 결정적인 데이터 부족과 불필요한 생체 검사(biopsy)를 수행한다는 점들로 인해서 아직은 연구가 미흡하다고 여겨진다. 이를 개선하기 위해서는 종양 내 이질성을 설명해줄 수 있는 마커(marker)를 식별하는 것이 우선적으로 선행되어야 한다. 지금까지 전립선암 마커 발굴에 대한 다양한 실험들이 수행되어 왔다. 예를 들어, Qu 등¹¹은 3가지 마커 [TMPRSS2/ERG 재정렬, PTEN 손실, 안드로젠 수용체(androgen receptor, AR) 증폭]를 보고하였고, Jones 등¹²은 암화를 촉진하는 효과 마커인 MIC-1과 PDGF-A를 발굴하였다. 더불어 주변환경과 종양 이질성의 관계를 살펴보기 위해서 Lalonde 등¹³은 복제수 변이(copy number variant) 및 저산소증과 연관된 4가지 예후 지표를 발견하였다.

3. 전립선암에서 다발성(Multifocality)

전립선암은 서로 다른 글리슨 점수(Gleason grade)를 가지는 개별적인 병소로 존재하는 경향이 있다.^{14,15} 전립선암은 대부분 다초점 질병(multifocal disease)으로 단초점 전립선암(unifocal disease)보다 위험성이 높

고 재발률도 높다고 알려져 있다.¹⁶ 조직학적으로 이질성을 보이는 것은 밝혀졌으나 이러한 다초점적 경향을 보이는 이유에 대해서는 아직까지 명확하게 알려지지 않았다. Ruijter 등¹⁷과 Arora 등¹⁸은 대부분의 전립선암은 여러 부분에서 시작이 되고, 그 안에서도 위치마다 Gleason grade가 다르다는 것을 보고하였다. 암의 이질성과 다초점성은 환자들에게 적절한 처방을 하는 것을 어렵게 한다. Boutros 등¹⁹은 최초로 전립선암의 전장유전체(whole genome) 수준에서 공간에 따른 이질성과 다초점성을 관찰하여 암을 9개 부분으로 나누었고, 변이 분석 결과 각 부분마다 특정 변이가 일어나는 양상이 다르다고 보고하였다. 이를 통해서 특정 변이를 대상으로 하던 기존의 치료방법이 효과적일 수 없음이 밝혀졌다. The Cancer Genome Atlas 프로젝트의 연구에서는 전립선 1차 종양에 대해서 포괄적인 분자 분석을 진행하여 유전적, 후생유전적, 전사체적 특징을 기준으로 이분화하여 전립선암을 일으키는 특징적인 유전자융합(gene fusion)과 변이에 대한 7개의 하위 타입들을 밝혀냈다.²⁰

전립선암의 다초점성의 기원을 설명하는 두 가지 반대되는 가설이 있다. 첫 번째는 단일클론 기원 가설(monoclonal origin)로 서로 다른 세포들은 하나의 세포에서 시간에 따라 유전적, 후생유전적 변이를 획득하며 생겨난다는 가설로 모든 세포들은 하나의 세포에서 나와 연결되어 있음을 시사한다. 두 번째 가설은 Slaughter 등²¹이 제시한 암장 효과(cancer field effect)로 암이 다클론 기원(polyclonal origin)을 가지고, 정상적인 조직에서 독립적으로 변이가 생겨서 여러 개의 특이한 병소를 초래한다고 설명한다. Lindberg 등¹⁵은 엑솜 시퀀싱(exom sequencing)을 통해서 각각의 병소가 독립적인 기원을 가짐을 밝혔고, Kobayashi 등²²과 Andreou와 Cheng²³은 서열 결실을 기반으로 병소들이 독립적임을 밝혔다. 전립선암은 환자에 따라 그 기원이 한 개 또는 여러 개일 수 있다. 따라서 암종이 단일클론 기원인지 혹은 다클론 기원인지에 따라서 특정 치료 방법이 효과적일 수 있으므로 개개의 환자 별로 효과적인 처방과 치료를 위해서는 다초점성에 대해서 이해하는 것이 중요하다.

4. 암 전이와 종양 이질성

암의 진행을 제대로 이해하기 위해서는 원발 종양과 전이 종양 사이의 진화적 관계를 아는 것이 중요하다. 원발

종양과 전이 종양의 종양 이질성에 대한 두 가지 모델이 제시되었다. 첫 번째 모델은 유전적 변이가 무작위적으로 일어난다는 모델로 종양 이질성에 대한 수학적 모델링과 array CGH 분석을 통해서 서로 동떨어진 전이 부분이 연관된 클론에 포함되는 것으로 뒷받침되었다.^{24,25} 두 번째 모델은 유전적 변이가 선택적으로 일어나 특정한 패턴을 가지게 된다는 관점으로 초기 종양과 림프절 전이 종양 간의 전장유전체 분석, 멀리 떨어진 종양 간의 DNA methylation 분석 등으로 뒷받침되었다.^{26,27}

원발 종양과 전이 종양의 이질성을 이해하는 것은 효과적인 치료법을 개발하는 데에도 매우 중요하다. 예를 들어, 원발과 전이 종양이 서로 같은 암 세포일지라도 돌연변이들이 서로 상이할 수 있기 때문에 전이성 종양 특성에 맞게 개발된 표적 요법으로 환자를 치료한다면 치료 효과를 높일 수 있을 것이다. 한 개인에서 생겨난 전이 종양들은 다양성이 비교적 작기 때문에 하나의 전이 종양으로 다른 전이 종양들의 변이를 예측하는 것이 합리적일 수 있어서 비슷한 환자들에게 효과적인 치료법을 선택하는 데에 유용할 것이다. 그렇지만, 전이 위치에 따라서 유전적 및 표현적인 종양의 특성이 미세하게 다를 수 있기 때문에 엑솜 시퀀싱 등을 통해서 정밀하게 조사할 필요가 있다. 하나의 암에 대해서 이질성이 존재한다는 것은 생검마다 지나는 변이와 클론이 다르고, 변이의 일반성 또한 다르다는 것을 의미한다. 따라서, 환자 상태에 대한 객관적인 판단을 내릴 때에 이를 고려해야 한다. 또한 기존에 있던, 혹은 진화한 하위 클론이 환경의 변화나 암의 재발을 유도하는 환경 아래에서 주된 클론으로 변할 가능성을 가지고 있으므로 약물의 내성 발달 연구를 할 때에도 중요하게 작용하므로 이를 고려해야 한다.

다지역 종양시퀀싱 (Multiregion Tumor Sequencing)

1. 차세대 염기서열 분석(Next Generation Sequencing)

차세대 염기서열 분석기술(next generation sequencing)은 클론증폭(clonal amplification), 대량병렬(massively parallel), 새로운 염기서열결정법(cyclic sequencing)을 이용하여 적은 양의 샘플로도 서열 분석을 가능하게 하기 때문에 게놈(genome) 및 전사체

(transcriptome) 연구에 있어서 큰 혁신을 가져왔다.²⁸ 이를 이용한 RNA 시퀀싱(RNA sequencing) 분석으로 RNA 대체 이어맞추기(alternative RNA splicing), 유전자의 발현량(gene expression), 유전자 융합(gene fusion) 등의 정보를 얻을 수 있고, 질병에 대한 바이오마커 발굴과 분자 표적 발굴에 활용할 수 있다.²⁹ 차세대 염기서열 분석기술을 통하여 종양의 게놈을 분석할 경우, 게놈의 변이 정보 및 잠재적으로 작동할 게놈 신호 전달 경로(signaling pathway)를 알아낼 뿐만 아니라, 돌연변이 프로파일을 이용해 분자 표적 치료와 관련된 바이오마커를 개발할 수 있다.³⁰ 종양들 사이에 유전체 프로파일의 이질성 정도를 알기 위해서는 다지역 시퀀싱(multiregional sequencing)으로 분석이 가능하며, 또한 단일세포 염기서열 분석을 통해서 각 세포 수준에서 유전자 발현 프로파일의 비교가 가능하다. 이와 더불어, 순환성 세포유리 DNA 시퀀싱(circulating cell-free DNA sequencing) 분석으로 종양 환자의 원발암뿐만 아니라 전이암 조직에서 말초혈액 속으로 흘러 들어간 사망 또는 괴사한 종양 세포의 유리 DNA를 분석하여 서로 간의 이질성을 파악해 볼 수 있다. 이러한 세 가지 시퀀싱 방법들이 Fig. 2에 제시되어 있다.

2. 다지역시퀀싱(Multiregional Sequencing)

차세대 염기서열 분석기술이 발전함에 따라, 전립선암의 여러 부위들에 대한 샘플을 이용해 전장 엑솜 시퀀싱(whole exome sequencing) 혹은 전장 유전체 시퀀싱(whole genome sequencing) 분석으로 클론과 하위 클론의 이질성에 대한 연구가 수행되고 있다. 이러한 연구를 통해 종양 병소들이 주요 유전자 변이를 공유하지 않고, 각 클론들이 독립적으로 진화됨을 밝히는 정확한 증거를 발견하면서 1차 종양이 다클론적 성향을 가지는 것이 밝혀졌다.³¹ 시퀀싱 분석을 통해서 대립유전자 빈도(variant allele frequency)에 따른 변이 군집화를 통해 세포 하위 클론의 존재를 알 수 있고, 이는 종양 위치 간의 시간에 따른 하위 클론 진화에 대한 이해가 가능하다.^{32,33} 이와 더불어 종양의 여러 부위에서 발견되는 트렁크 변이들(truncal mutation)과 특정 부위에서만 발견되는 특정 변이(unique mutation)들의 계통수(phylogenetic tree) 또한 새롭게 정의가 될 수 있다.³⁴ 이러한 분석은 암 진화의 기원과 시기에 대한 이해를 제공할 뿐 만 아니라

Fig. 2. Sequencing methods for heterogeneity analysis. FACS: fluorescence-activated cell sorting.

임상적 증상(clinical manifestation)과 진단이 있기 전에 초기의 주요 유전자 변화가 일어날 수 있다는 것을 시사한다. 그 동안 염기 서열 분석 기술로 다양한 정보를 얻을 수 있었지만, 아직까지 서열 분석 정밀성과 알고리즘의 민감도는 편향된 분석 결과를 낼 가능성이 높아서 이에 대한 지속적인 발전이 필요하다.

단일세포 염기서열 분석 (Single Cell Sequencing Analysis)

단일세포 염기서열 분석은 하나의 세포로부터 DNA 또는 RNA를 추출하여 증폭하고 염기서열을 파악함으로써 세포의 특징을 분석하는 기술이다.³⁵ 즉, 동일한 세포로부터 유래된 세포들 사이에서도 환경에 따라 여러 가지 특성에 차이를 보이는 개별 세포의 유전자 발현 프로파일을 분석하는 방법을 일컫는다. 이러한 분석 기술을 통해서 한 조직 내에 존재하는 다양한 세포들을 동시에 분석하는 것이 기술적으로 가능해지면서 종양 이질성 연구를 포함한 다양한 분야에 응용이 되고 있다.³⁶ 전립선암의 종양 이질성을 규명하는 측면에서도 그 유용성이 클 것으로 전

망되고 있지만 아직까지 연구 성과가 미흡한 실정으로 향후 활발한 연구가 기대되는 분야이다.

최근에 진행된 연구에서는 전립선암 진단에 단핵 시퀀싱(single-nucleus sequencing)을 적용하기 위한 시범 연구가 이루어졌다. 이 연구에서 얻은 단일세포 유전 정보의 특징은 조직 병리학적인 측정치와 비교 평가되었다.³⁷ 한 가지의 동일한 성질을 지닌 세포들이 증식하는 현상을 설명하는 클로넬리티(clonality)는 생체검사 샘플과 근치적전립선절제술(radical prostatectomy) 샘플에서 나타난 글리슨 점수와 상당히 유의미하게 연관되어 있었다. 여기서 클로넬리티는 하나 또는 적은 수의 클론(oligoclone) 혹은 여러 개의 클론들(polyclone)로부터 유도되는 종양 세포들의 상태를 말한다. 또한, 클론 이질성(clonal heterogeneity), 클론 세포들 중에서 생검 시에 코어에 해당되는 비율을 의미하는 클론 세포를 포함하는 코어의 비율, 클론으로 판단되는 세포의 비율과 같은 유전적 특성을 지닌 세포들이 증식되는 현상을 나타내는 클론 확산은 조직병리학적 결과와 연관하여 고려될 수 있다는 가능성을 제시했다. 계놈상의 클로넬리티와 연관된 유전적 변이는 생체검사 샘플에서 글리슨 점수와 상당히

밀접하게 관련이 있기 때문에 외과적 수술조직 샘플에 기초한 암의 평가를 개선했다는 점에서 의의가 있고, 이러한 결과는 전립선암 진단을 위한 단일세포 기반의 유전체학의 유용성을 보여주는 것으로써 전립선암 치료방법의 결정에 도움이 될 수 있을 것으로 기대한다.

순환성 세포유리 DNA 분석 (Circulating Cell-Free DNA Sequencing Analysis)

Low-pass 전장유전체 시퀀싱 및 타겟 심층 시퀀싱(target deep sequencing)은 전이성 전립선암 환자에서 순환성 종양 DNA (circulating tumour DNA)를 검출할 수 있지만 국소 전립선암 환자에서는 검출되지 않으므로 초기 전립선암에서 이 분석 방법의 활용은 제한적일 수 있다.³⁸ 최근에는 세포유리 DNA (cell-free DNA, cfDNA) 연구를 통해서 건강한 세포와 종양 세포 사이의 뉴클레오솜 발자취(nucleosome footprint) 차이를 볼 수 있기 때문에 cfDNA를 암의 조기 발견을 위해서 사용할 수 있는 가능성이 커지고 있다.^{39,40} 전이성 종양과 혈장에 대한 DNA 시퀀싱 연구에서 cfDNA와 조직에서 검출된 변이는 높은 중첩을 보이며, cfDNA가 종양 물질의 대리 발생원이라는 것을 입증하기도 하였다.^{41,42} 따라서, 한 환자에 존재하는 다양한 종양 클론이 혈액 순환에 나타나므로, cfDNA의 연쇄 수집은 암 진행과 새로운 치료 저항 메커니즘의 배후에 있는 생물학적인 기전을 연구하기 위한 도구로 사용될 수 있을 것이다.^{39,40}

결론 및 향후 전망

전립선암의 종양 이질성에 대한 이해는 종양의 진행을 이해하는 것과 더불어 전립선암 치료 과정을 전반적으로 이해하고 치료 방침을 결정하는데 있어서 매우 중요하다. 다양한 서브 클론들에 포함된 이질적인 돌연변이들로 인해서 주요변이들을 놓치지 않고 적절한 표적치료를 하기 위해서는 다지역 종양 시퀀싱에 의한 변이 검출이 진단에 포함될 필요가 있다. 현재의 차세대 유전체 분석기술은 임상 검사에 적용될 만큼 그 수준이 높은 단계로 발전했지만 종양 이질성의 복잡성을 해결하는 데는 여전히 부족하다. 최근 단일세포 분석기술 및 순환성 세포유리 DNA 분석 등의 진보된 분석기술의 도입으로 고해상도와 정확

성을 가지고 이러한 문제를 일부 해결할 것으로 전망된다. 향후에 전립선암에서 나타나는 종양 이질성을 체계적으로 이해하고 특성화한다면 환자를 위한 치료의 표준을 향상시킬 수 있는 가능성을 가질 수 있다. 종양 이질성은 진단에서부터 치료의 우선 순위에 이르기까지 실제 임상에 있어서 중요한 의사 결정과 밀접하게 관련되어 있다. 따라서 전립선암에서 종양 이질성 문제를 고려한 개인 맞춤형 정밀의학의 접근법을 통해서 환자의 진단과 치료에 획기적인 발전을 가져올 수 있을 것으로 기대한다.

이해관계(CONFLICT OF INTEREST)

저자들은 이 논문과 관련하여 이해관계의 충돌이 없음을 명시합니다.

REFERENCES

1. Yadav SS, Stockert JA, Hackert V, Yadav KK, Tewari AK. Intratumor heterogeneity in prostate cancer. *Urol Oncol* 2018;36:349-60.
2. Tolkach Y, Kristiansen G. The heterogeneity of prostate cancer: a practical approach. *Pathobiology* 2018;85:108-16.
3. Jamal-Hanjani M, Quezada SA, Larkin J, Swanton C. Translational implications of tumor heterogeneity. *Clin Cancer Res* 2015;21:1258-66.
4. Jamal-Hanjani M, Wilson GA, McGranahan N, Birkbak NJ, Watkins TBK, Veeriah S, et al. Tracking the evolution of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2017;376:2109-21.
5. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366:883-92.
6. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* 2014;14:275-91.
7. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194:23-8.
8. Elena SF, Cooper VS, Lenski RE. Punctuated evolution caused by selection of rare beneficial mutations. *Science* 1996;272:1802-4.

9. Voss MH, Hakimi AA, Pham CG, Brannon AR, Chen YB, Cunha LF, et al. Tumor genetic analyses of patients with metastatic renal cell carcinoma and extended benefit from mTOR inhibitor therapy. *Clin Cancer Res* 2014;20:1955-64.
10. Campbell PJ, Yachida S, Mudie LJ, Stephens PJ, Pleasance ED, Stebbings LA, et al. The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature* 2010;467:1109-13.
11. Qu X, Randhawa G, Friedman C, Kurland BF, Glaskova L, Coleman I, et al. A three-marker FISH panel detects more genetic aberrations of AR, PTEN and TMPRSS2/ERG in castration-resistant or metastatic prostate cancers than in primary prostate tumors. *PLoS One* 2013;8:e74671.
12. Jones AC, Antillon KS, Jenkins SM, Janos SN, Overton HN, Shoshan DS, et al. Prostate field cancerization: deregulated expression of macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC-1) and platelet derived growth factor A (PDGF-A) in tumor adjacent tissue. *PLoS One* 2015;10:e0119314.
13. Lalonde E, Ishkanian AS, Sykes J, Fraser M, Ross-Adams H, Erho N, et al. Tumour genomic and microenvironmental heterogeneity for integrated prediction of 5-year biochemical recurrence of prostate cancer: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol* 2014;15:1521-32.
14. Boyd LK, Mao K, Xue L, Lin D, Chaplin T, Kudahetti SC, et al. High-resolution genome-wide copy-number analysis suggests a monoclonal origin of multifocal prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2012;51:579-89.
15. Lindberg J, Klevebring D, Liu W, Neiman M, Xu J, Wiklund P, et al. Exome sequencing of prostate cancer supports the hypothesis of independent tumour origins. *Eur Urol* 2013;63:347-53.
16. Djavan B, Susani M, Bursa B, Basharkhah A, Simak R, Marberger M. Predictability and significance of multifocal prostate cancer in the radical prostatectomy specimen. *Tech Urol* 1999;5:139-42.
17. Ruijter ET, van de Kaa CA, Schalken JA, Debruyne FM, Ruiter DJ. Histological grade heterogeneity in multifocal prostate cancer. Biological and clinical implications. *J Pathol* 1996;180:295-9.
18. Arora R, Koch MO, Eble JN, Ulbright TM, Li L, Cheng L. Heterogeneity of Gleason grade in multifocal adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 2004;100:2362-6.
19. Boutros PC, Fraser M, Harding NJ, de Borja R, Trudel D, Lalonde EL, et al. Spatial genomic heterogeneity within localized, multifocal prostate cancer. *Nat Genet* 2015;47:736-45.
20. Abeshouse A, Ahn J, Akbani R, Ally A, Amin S, Andry CD, et al. The molecular taxonomy of primary prostate cancer. *Cell* 2015;163:1011-25.
21. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953;6:963-8.
22. Kobayashi M, Ishida H, Shindo T, Niwa SI, Kino M, Kawamura K, et al. Molecular analysis of multifocal prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Prostate* 2008;68:1715-24.
23. Andreou M, Cheng L. Multifocal prostate cancer: biologic, prognostic, and therapeutic implications. *Hum Pathol* 2010;41:781-93.
24. Weier C, Haffner MC, Mosbrugger T, Esopi DM, Hicks J, Zheng Q, et al. Nucleotide resolution analysis of TMPRSS2 and ERG rearrangements in prostate cancer. *J Pathol* 2013;230:174-83.
25. Liu W, Laitinen S, Khan S, Vihinen M, Kowalski J, Yu G, et al. Copy number analysis indicates monoclonal origin of lethal metastatic prostate cancer. *Nat Med* 2009;15:559-65.
26. Durrett R, Foo J, Leder K, Mayberry J, Michor F. Intratumor heterogeneity in evolutionary models of tumor progression. *Genetics* 2011;188:461-77.
27. Robbins CM, Tembe WA, Baker A, Sinari S, Moses TY, Beckstrom-Sternberg S, et al. Copy number and targeted mutational analysis reveals novel somatic events in metastatic prostate tumors. *Genome Res* 2011;21:47-55.

28. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyzyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet* 2014;30:418-26.
29. Maher CA, Kumar-Sinha C, Cao X, Kalyana-Sundaram S, Han B, Jing X, et al. Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer. *Nature* 2009;458:97-101.
30. Ikeda S, Elkin SK, Tomson BN, Carter JL, Kurzrock R. Next-generation sequencing of prostate cancer: genomic and pathway alterations, potential actionability patterns, and relative rate of use of clinical-grade testing. *Cancer Biol Ther* 2019;20:219-26.
31. Cooper CS, Eeles R, Wedge DC, Van Loo P, Gundem G, Alexandrov LB, et al. Analysis of the genetic phylogeny of multifocal prostate cancer identifies multiple independent clonal expansions in neoplastic and morphologically normal prostate tissue. *Nat Genet* 2015;47:367-72.
32. Gundem G, Van Loo P, Kremeyer B, Alexandrov LB, Tubio JMC, Papaemmanuil E, et al. The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature* 2015;520:353-7.
33. Baca SC, Prandi D, Lawrence MS, Mosquera JM, Romanell A, Drier Y, et al. Punctuated evolution of prostate cancer genomes. *Cell* 2013;153:666-77.
34. Turajlic S, Swanton C. Metastasis as an evolutionary process. *Science* 2016;352:169-75.
35. Wen L, Tang F. Boosting the power of single-cell analysis. *Nat Biotechnol* 2018;36:408-9.
36. Levitin HM, Yuan J, Sims PA. Single-cell transcriptomic analysis of tumor heterogeneity. *Trends Cancer* 2018;4:264-8.
37. Alexander J, Kendall J, McIndoo J, Rodgers L, Aboukhalil R, Stepansky LD, et al. Utility of single-cell genomics in diagnostic evaluation of prostate cancer. *Cancer Res* 2018;78:348-58.
38. Hennigan ST, Trostel SY, Terrigino NT, Voznesensky OS, Schaefer RJ, Whitlock NC, et al. Low abundance of circulating tumor DNA in localized prostate cancer. *JCO Precis Oncol* 2019;3:PO.19.00176.
39. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin. *Cell* 2016;164:57-68.
40. Ulz P, Perakis S, Zhou Q, Moser T, Belic J, Lazzeri I, et al. Inference of transcription factor binding from cell-free DNA enables tumor subtype prediction and early detection. *Nat Commun* 2019;10:4666.
41. Frenel JS, Carreira S, Goodall J, Roda D, Perez-Lopez R, Tunariu N, et al. Serial next-generation sequencing of circulating cell-free DNA evaluating tumor clone response to molecularly targeted drug administration. *Clin Cancer Res* 2015;21:4586-96.
42. Wyatt AW, Annala M, Aggarwal R, Beja K, Feng F, Youngren J, et al. Concordance of circulating tumor DNA and matched metastatic tissue biopsy in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2017;109:djx118.