대장암에서의 “Omics” 연구 - 단백체학 연구를 중심으로

한림대학교 의과대학 내과학교실

석 기 태

An “Omics” Based Survey of Human Colon Cancer (Proteomics)

Ki Tae Suk, M.D.

Department of Internal Medicine, Hallym University College of Medicine, Chuncheon, Korea

요 약

지난 20년간 대장암의 분자생물학적 기전에 관한 많은 연구가 진행되었음에도 불구하고 대장암의 진단과 예후, 예방, 치료, 병기결정에 맞는 신뢰성과 재현성이 있는 생물학적인 표지자는 부족한 실정이다. 현재까지 대장암의 진단과 치료는 기술적인 병기결정 체계와 형태학적 또는 조직학적인 소견에 의존되어 왔다. 그러나 질병을 연구하는데 있어 위와 같은 접근이나 한 가지 원인에 의한 발생한다는 단순한 접근은 복잡한 여러 인자가 관여한 암과 같은 질환의 이해에 많은 제약이 있다.

이러한 복잡한 기전을 연구하는 생물학적 분야로 전사체학, 단백체학, 대사체학, 그리고 유전체학이 있다. 비록 이러한 “omics”의 연구에서의 결과가 “Desire state”와는 거리가 있지만, 이 분야에서 지난 10년 동안 기술적인 면에서 굉장한 진보를 이루었다. 현재까지의 “omics”를 이용한 대장암 연구 결과는 대장암의 진단과 예후에 일관된 생물학적 표지자를 밝혀내는데 미흡하지만, 대장암의 여러 분야의 이해에 도움을 주었다. 예를 들면 대장암의 서로 다른 병기에서 게놈, 전사, 단백질의 연구는 염색체의 평균 유전자 표현 수준과 연관되는 염색체 이수성을 발견하게 해 주었고, 이러한 염색체 변이/DNA복사 변화와 관련되는 유전자의 발현은 대장암에서만 한정되는 것이 아니라, 다

른 고형암과 심지어는 효모에서도 발견되었다. 결국 이러한 연구는 대장암에서 새로운 후보 유전자(PLCG1 on20q, DBC1 on 8q21, NDGR1 on 8p24)를 발견하도록 해 주었다.

이 중 단백체학은 단백질의 성질을 발현, 중개연구 후 적용, 다른 단백질과의 결합에 초점을 두어 연구함으로써 세포 내 변형과정과 네트워크 형성을 질병의 진행 과정과 연계시켜 총괄적으로 이해할 수 있는 분야이다. 방법적으로 단백체학은 살아있는 시스템에서 단백질의 분석과 분리하는 방법 중 가장 효율적이라는데 기초를 두고 있다.

이러한 발전과 연구들에도 불구하고, 이 분야에는 자료수집, 해석, 진행과정의 분석, 발생 모델의 개발과 같은 수많은 rate-limiting step이 있다. 이러한 난관들은 현재의 기술과 전략들에 의해 빠르게 극복되고 있으며, 최근의 생물학에서의 암 관련 연구의 진보에 대한 EU-USA joint workshop에서, 연구 성공을 위해서 다음 분야의 향후 연구 의지를 발표하였다.¹

“Cell-context specific molecular interaction maps in cancer (cancer interactomes, widely available experimental platforms for rapid biochemical validation, cellular network based contexts for the integration of orthogonal data modalities including gene expression, SNPs, gene copy number, epigenetic data, etc., information on pathway synergy for therapeutic intervention,

접수 : 2011년 4월 12일 수정 : 2011년 4월 13일

승인 : 2011년 4월 16일

• 연락처 : 석기태, 강원도 춘천시 교동 (220-704)
한림대학교 의과대학 내과학교실
Tel: 033) 240-5826, Fax: 033) 241-8064
E-mail: ktsuk@hallym.ac.kr

Received April 12, 2011. Revised April 13, 2011.

Accepted April 16, 2011.

• Correspondence to : Ki Tae Suk, M.D., Department of Internal Medicine, Hallym University College of Medicine, Kyodong, Chuncheon 220-704, Korea
Tel: +82-33-240-5826, Fax: +82-33-241-8064
E-mail: ktsuk@hallym.ac.kr

Fig. 1. Serial methods of proteomics.

assembly and validation of cell-context specific molecular interaction maps for cancer cells (genes, proteins, miRNA, lipids, metabolites, etc.)”

추후 “omics”를 이용하여 개인의 암세포에서 복잡한 발생 과정을 시각화하고 특별화된 개인적인 치료가 비기능적인 암 발생 과정을 교정하도록 하여 향후 미래에 적용될 개별화된 치료에서 혁명을 일으킬 것으로 판단된다.

해설

1. 단백질학이란 무엇인가?

단백질학은 살아있는 개체의 단백질 발현의 지도화, 시각화, 정량화와 연관된 과학과 기술로 정의할 수 있다. 단백질학은 최근까지 이차원적인 폴리아크릴아마이드의 형태로 알고 있었으며² 민감한 분석 기술이 부족하였다. 질량분석법(mass spectrometry, MS) 근간의 단백질학은 1990년대 중반 이후 펩타이드를 이온화하는 기술의 발견 이후 획기적으로 발전되었다.³ *E. coli* 계놈에서 인간 계놈까지 모든 계놈에 응용할 수 있으며, 액체 크로마토그래피(lipid chromatography, LC)처럼 빠르고 동시에 조사할 수 있는 질량

Fig. 2. Steps of proteomics.

분석기의 이용으로 단백질학이 빠른 발전을 이루었다.

2. 단백질체학의 방법 및 기술

단백체학은 다음과 같은 조직준비, LC-MS분석, 그리고 단백질 정보 획득으로 세가지 과정에 의하여 진행된다(Fig. 1, 2).

3. 대장암에서의 단백질체학

인간 대장암에서의 단백질체학 연구는 유전학과 전사 분석학에 비하여 제한적이다. 현재까지 알려진 단백질체학과 대장암과의 연구는 혈청을 이용하였고, 비침습적으로 정상인과 여러 단계의 대장암 환자를 구별해 내기 위한 생물학적 표지자를 찾기 위하여 진행되었다. CEA의 조기대장암 진단 민감도가 30-40%인 것을 감안하면 새로운 생물학적 표지자를 찾는 노력은

중요하다.⁴ 단백질 분석은 혈액을 이용하여 비 침습적이고 민감도와 특이도가 높으며 가격이 저렴하여 의료종사자와 환자, 양측에 있어 매력적이고 합리적이다. 완벽하진 않지만 대장암의 단백질체학을 통한 종양 표지자 연구에 있어 이미 상당한 진전이 있음을 아래를 통해 알 수 있다(Table 1). 흥미롭게도 서로 다른 단백질을 이용하여 서로 다른 환자의 혈액을 분석했지만 여러 연구에 걸쳐 공통된 생물학적 표지자가 발견되었다. 따라서 대장암의 진단과 예후 판정에 있어 단백질체학의 미래는 매우 기대된다.

대장암 환자(62명)와 정상대조군(31명)의 혈액의 분석에서 보체계의 세 가지 단백질(C3-a-des-arg, α1-antitrypsin 그리고 transferrin)이 감별되었다.⁵ 이 때 사용된 SELDI 칩은 Cu²⁺ loaded IMAC30 배열이었고, 인공신경네트워크는 종양성인지 비종양성인지 감별하는데 사용되었다. 이 연구에서 인공신경네트워크를

Table 1. Summary of Proteomics Studies for Classification of Human Colorectal Cancer

Ref	Technique	Comparison	Classification	Biomarker
5	SELDI arrays (IMAC30), LC-MS/MSnetworks	Sera: 62 CRC vs. 31 normal	Successful separation of CRC vs. normal 95% Sen and 91% Spe	C3a-des-arg, α1-antitrypsin, transferrin
6	SELDI arrays (IMAC3 and WCX2), QTOF-MS/MS	Sera: CRA vs. CRC vs. normals	C3a-des-arg predicted CRC with 96.8% Sen and 96.2% Spe C3a-des-arg predicted CRA in 86.1% of 36 CRA patients while only 5.6% were false-negative	C3a-des-arg
7	IMAC30 and NP20 SELDI arrays for sera and tissue screens, respectively, MALDI-TOF	Sera: 125 CRC vs. 100 normals Tissue: paired adjacent normals and tumors from same patient (n=40)	HNP 1-3 were markedly up in both sera and tissue from CRC relative to normals No Sen and Spe data reported	Defensin family: human neutrophil peptides aka alpha-defensins 1-3
9	SELDI hydrophobic (H4 arrays), neural networks, support vector machine	Sera: 55 CRC, 35 CRA, and 92 normals	CRA vs. CRC: Sen was 89%, Spe was 83% (moderate) CRC vs. normal: Sen was 89%, Spewas 92% (high)	No robust biomarker
8	SAX2 and WCX2 SELDI arrays.	CRC (39) vs. adjacent normals (40)	Elevated HNP 1-3 ELISA-based evaluation of HNP1-3 in sera yielded Sen of 100% and Spe of 69%	HNP1-3 (similar to Albrethsen)
10	MALDI-TOF, ELISA	Secretomes of 21 cancer cell lines yielded CRMP-2 This was used in 169 CRC vs. normals from 201 CRC and 201 normals	CRC vs. normals: a combination of CEA and CRMP-2 could yield Sen of 76.8% and Spe of 95.1%	Collapsin response mediator protein-2, CRMP-2; CEA
11	MALDI-TOF	Microdissected adenomas (24), CRC (71), 55 normals	Greater heterogeneity in CRC when compared to adenomas highlighting commonality of mechanisms in adenomas vs. carcinomas.	No biomarker reported

CRC, colorectal cancer; CRA, colorectal adenoma; Sen, sensitivity; Spe, specificity; n, number.

이용한 종양성 진단의 민감도와 특이도는 95%와 91%였으나 병기에 따른 분류는 보고되지 않았다. Habermann 등⁶이 진행한 다른 연구에서 건강한 정상군(32명)과 비교하여 보았을 때 선종과 선암이 있는 환자군(58명)의 혈청에서 C3a-des-arg라는 생체표지자가 증가되어 있었다. 또한 다른 59명의 대장암 환자에서 C3a-des-arg는 대장암의 예전에 96.8%의 민감도와 96.2%의 특이도를 보였다. 흥미롭게도 36명의 선종군에서 뽑은 혈액의 86.1%에서 이 단백질이 상승되어 있었고, 위음성율은 5.6%에 불과하였다. 대장암환자와 정상 대조군의 혈액, 대장암 조직, 대장암 근처 조직을 찍어서 검사한 결과에서도 특정 생물학적 표지자를 발견하였다.^{7,8} 이것은 defensin family에 속한 물질로써 alpha-defensins 1-3이라고도 알려진 Human Neutrophil Peptide (HNP 1-3)이다. 민감도와 특이도는 보고되지 않았지만, 대장암 환자의 혈청과 조직 샘플에서 HNP 1-3은 매우 상승되어 있었다. 또한 HNP 1-3 농도는 미세 절제된 암 조직과 근접한 정상 조직과 비교하였을 때 상승되어 있었다.

다른 연구에서는 55명의 대장암, 35명의 대장 선종, 그리고 92명의 정상인의 혈청을 SELDI hydrophobic surface (H4) chip을 사용하여 인공신경네트워크의 생체 정보를 대장암과 정상군을 구분하는데 사용하였다. 대장암과 대장 선종의 구분에는 support vector machine algorithm이 사용되었고 특이도와 민감도는 83%와 89%이었다. 그러나 대장암과 정상에서의 특이도와 민감도는 92%와 89%였다. 이 연구에서 잠재적인 생물학적 표지자 단백질이나 병기에 특이한 차이는 발표되지 않았다.⁹

Wu 등¹⁰의 연구에서, 21개의 다양한 조직 기원의 암세포의 secretome이 생물학적 표지자 연구에 처음으로 사용되었다. Secretome 분석을 통하여 21개의 암세포 중 두 개의 대장암 기원 세포에서 collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2)를 발견하였다. 항 CRMP-2항체를 이용한 면역조직화학 염색에서, 초기 단계(68.7%)의 염색이 후기 단계(II48.8%)와 비교하였을 때 확연히 증가하였다. CRMP-2는 169쌍의 대장암과 정상의 생물학적 표지자 비교에 선택되었다. 이 연구에서 저자는 CEA와 CRMP-2의 복합적인 분석을 통하여 대장암군과 정상군에서 의미있는 민감도 76.8%, 특이도 95.1%를 얻을 수 있었다.

Li 등¹¹의 연구는 24개의 선종, 71개의 대장암, 그리고 55개의 정상 미세절제조직으로 단백질 분석하였고 선암과 선종의 비교에서 이질성을 보였다. 이는 빈번한 APC유전자의 비활성화 변이가 선종 형성 이전에

관여하기 때문으로 추측된다.

단백체학의 단점은 여러 연구실에서 동일한 시료를 갖고 단백질 분석을 할 때, 재현 가능성이 높지 않다는 것이다. 예를 들어, 최근에 시행된 연구 중에서 20종류의 매우 순수한 단백질을 20개의 연구실에 분석을 맡겼는데, 그 중 7개의 연구소에서만 20개의 단백질을 모두 맞출 수 있었다. 하지만, 몇 번의 피드백과 재분석 이후, 모든 연구소에서 20개의 단백질을 모두 맞출 수 있었다. 이 결과를 보면 연구실에서의 수행 실력이 재현성을 낮출 수 있는 인자로 생각된다. 왜냐하면 정확한 분석을 위해서는 어느 수준의 지도가 필요하기 때문이다. 이 때문에 우리는 20개 이상의 대장암 시료를 갖고 분석한 연구만을 언급하였다. 이유는 많은 자료가 바탕이 되어야 통계학적으로 유의한 결과를 얻을 수 있고, 단백질체학의 낮은 재현성이라는 비판에 반박할 수 있기 때문이다. 그리고 생물학적 표지자를 이용한 암 발견, 치료, 예후 분야에서 밝혀진 단점으로는 조직 시료에서의 높은 단백질 농도-예를 들면 혈청에서 알부민, 또는 타액에서의 아밀라아제- 때문에 낮은 농도로 있는 단백질 신호를 간과할 수 있다는 것이다. 그리고 적절한 시료의 선택에서의 어려움이 있다. 마지막으로 단백질 용해의 어려움에 기인한 막 단백질의 분석의 어려움이나 장애가 있다.

이와 같이 대장암 분야에서 단백질체학을 사용하는 접근 방법으로 생물학적 표지자를 통해 진단과 예측을 한다는 측면에서 의미 있는 결과를 얻어내었다. 그러나, 예비적 자료이고 생물학적 표지자는 정확한 진단, 예후, 병기 결정을 하기에는 아직 부족한 점이 많다. 향후 단백질체학 중심 연구가 많아짐에 따라, 미래에는 단백질체학을 이용한 생물학적 표지자를 개발하여 대장암의 진단과 치료에 이용할 수 있을 것을 기대한다.

REFERENCES

1. Aebersold R, Auffray C, Baney E, et al. Report on EU-USA workshop: how systems biology can advance cancer research (27 October 2008). *Mol Oncol* 2009;3:9-17.
2. O'Farrell PZ, Goodman HM, O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 1977;12:1133-1141.
3. Cho A, Normile D. Nobel Prize in Chemistry. Mastering macromolecules. *Science* 2002;298:527-528.
4. Fletcher RH. Carcinoembryonic antigen. *Ann Intern Med* 1986;104:66-73.
5. Ward DG, Suggett N, Cheng Y, et al. Identification of serum biomarkers for colon cancer by proteomic analysis. *Br J Cancer*

- 2006;94:1898-1905.
6. Habermann JK, Roblick UJ, Luke BT, et al. Increased serum levels of complement C3a anaphylatoxin indicate the presence of colorectal tumors. *Gastroenterology* 2006;131:1020-1029.
 7. Albrethsen J, Bøgebo R, Gammeltoft S, Olsen J, Winther B, Raskov H. Upregulated expression of human neutrophil peptides 1, 2 and 3 (HNP 1-3) in colon cancer serum and tumours: a biomarker study. *BMC Cancer* 2005;5:8.
 8. Melle C, Ernst G, Schimmel B, et al. Discovery and identification of alpha-defensins as low abundant, tumor-derived serum markers in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2005;129:66-73.
 9. Yu JK, Chen YD, Zheng S. An integrated approach to the detection of colorectal cancer utilizing proteomics and bioinformatics. *World J Gastroenterol* 2004;10:3127-3131.
 10. Wu CC, Chen HC, Chen SJ, et al. Identification of collapsin response mediator protein-2 as a potential marker of colorectal carcinoma by comparative analysis of cancer cell secretomes. *Proteomics* 2008;8:316-332.
 11. Li JQ, Xu BJ, Shakhtour B, et al. Variability of in situ proteomic profiling and implications for study design in colorectal tumors. *Int J Oncol* 2007;31:103-111.
-