

소변 miRNA를 이용한 전립선암 진단법

김원재*

UROTECH

*Corresponding author: wjkim@chungbuk.ac.kr

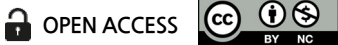
1. 서론

최근 들어 중년 이후의 남성들 사이에 전립선암에 대한 관심이 매우 빠르게 증가하고 있다. 그 이유는 전립선암은 여성의 유방암처럼 남자에서 매우 흔하며, 서양의 경우는 남성암 중 가장 흔하게 발생한다. 동양에서도 우리나라의 경우 5위, 일본의 경우 3위로 높은 빈도의 암이다. 전립선암은 고령에서 주로 발생하는 종양으로 최근 초고령화 사회로 빠르게 진입한다는 점을 고려할 때 수년 내에 3대 남성 종양으로 진입이 확실시되고 있다.

전립선암은 주로 혈청 전립선특이항원(prostate specific antigen [PSA])이 정상치보다 증가되어 있을 때 조직검사를 통해 진단을 내리게 된다. PSA는 우수한 종양마커이지만 전립선 조직에 대한 항원이지 전립선암세포 특이 항원이 아니어서, 심한 전립선비대증, 전립선염 및 전립선 결석과 같은 암이 아닌 질환에서도 PSA가 증가한다. PSA가 통상 3-4 ng/ml 이상이면 전립선암을 의심하게 된다. 그러나 PSA는 특이성이 부족하기 때문에 음성 생검 비율이 매우 높다 [1]. 즉 불필요한 생검이 70-85%에서 이루어지고 있는 것이 현실이다. 많은 남성들이 혈청 PSA 수치가 높지만 전립선 생검에서 음성 소견을 보이며 전립선암에 대한 정확한 진단 검사가 부족하다는 점 [2] 때문에 경직장 초음파 검사, CT, MRI 등의 많은 추가적인 검사를 생검과 함께 혹은 전후에 시행하게 된다.

PSA의 한계를 극복하기 위해 여러 바이오마커가 제안되었지만, 이들 중 대부분은 재현성이 떨어지고, 고비용, 복잡한 검출 방법 등으로 임상에서 사용하는데 많은 제한이 따른다 [3]. 따라서 간편하고, 일정하며, 신뢰성 있는 검출 방법과 우수한 재현성을 갖춘 전립선암의 새로운 진단 바이오마커를 찾는 것이 매우 중요하다. 최근 들어 전립선암을 포함한 많은 고형 종양의 진단에 비침습적인 “액체 생검”의 필요성과 중요성이 증가하고 있다 [4,5]. 특히 소변은 간편하고 비침습적으로 얻을 수 있어 전립선암의 진단 바이오마커 연구에 가장 좋은 소재로 여겨지기 시작하였다.

종양 유래 괴사 또는 세포사멸로부터 유래한 순환성 cell-free DNA와 순환성 RNA (microRNAs [miRNAs], 긴 비암호화 RNA (lncRNA), 메신저 RNA) 등이 전립샘관을 통해 요도로 방출된다. 따라서 소변에서 이들을 찾고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다 [6-8]. 소변 기반 액체 생검은 전립선암의 이질성을 포착할 수 있기 때문에 혈액을 통하여 마커를 찾는 방법에 비하면 훨씬 많은 장점이 있다 [9]. 액체 생검의 여러가지 장점에도 불구하고 낮은 특이도와 민감도, 표준화 부족,



The Association of Korean Urologist
3(4):132-137, 2022
URL: www.urodigest.com

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.

Copyright © 2022 by The Association of Korean Urologist. All Rights Reserved.

낮은 재현성 등으로 인하여 임상 적용에는 많은 어려움이 있다 [10]. 상대적 정량화(relative quantification)를 통하여 전립선암의 진단 마커를 찾기 위해 가장 일반적으로 사용되는 방법이 real-time PCR (RT-PCR)이지만, 소변에는 신뢰할 수 있는 내인성 참조 miRNA가 없기 때문에 실용화가 어려웠으며, 이를 극복하고자 다양한 표준화법들이 소개되어 왔다. 그러나 이들 방법 역시 신뢰도가 상당히 떨어진다 [11]. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 여러 유전자의 발현 패턴을 동시에 측정하는 비율 분석법을 본 저자는 개발하였다. 이 전략은 내인성 참조 miRNA를 필요로 하지 않기 때문에 비율 분석은 RT-PCR 데이터의 정확도를 향상시키는 신뢰할 수 있는 방법이다.

선행 연구를 통하여 우리는 소변을 이용한 miRNA array를 수행하여 전립선암과 전립선비대증 사이에서 다르게 발현되는 miRNA를 선택할 수 있었다 [12-14]. 수많은 반복 실험을 통하여 2개의 후보 miRNA (miR-H9 및 miR-3659)를 소변에서 선택하였다 [12,13]. 선택된 miR-H9 / miR-3659 의 상대값은 상당히 재현성이 높으며 안정적으로 산출되었다. 따라서 이를 이용하여 얻은 결과가 전립선암의 진단에 얼마나 도움이 되는지를 소개하고자 한다.

2. 재료 및 방법

본 연구는 헬싱키 선언에 설명된 관련 법률과 규정, 우수한 임상 관행 및 윤리적 원칙을 준수하였으며, 연구계획서는 충북대학교 윤리위원회의 승인을 받은 후 시행하였다. 전립선비대증 및 전립선암 환자의 소변 시료는 국립 인체자원은행으로부터 분양 받았다. 생검을 받는 환자의 경우 시술 직전에 소변 샘플을 채취하였다. 혈청 PSA 농도는 3-10 ng/ml로 “PSA gray zone”으로 정의하였다.

소변 시료는 Genolution 소변 miRNA 정제 키트(Genolution Pharmacies Inc., Seoul)를 사용하여 miRNA를 정제하였다. 분리된 miRNA의 농도는 Quant-IT RiboGreen RNA Reagent and Kit (Invitrogen)를 사용하여 측정하였으며 cDNA는 제조사의 프로토콜에 따라 Mir-XTM miRNA First Strand cDNA Synthesis Kit (Clontech, TAKARA Bio Inc., Otsu, Japan)를 사용하여 합성하였다.

500례 이상의 소변 시료를 통한 선행 연구에서 전립선비대증과 비교하여 전립선암에서 상향 발현되는 miR-H9 및 하향 발현되는 miR-3659를 찾아서 진단 마커로 선택하였으며 이들을 대상 miRNA로 설정한 RT-PCR 방법을 통하여 정량화를 시행하였다.

miRNA의 발현 비율은 상향 발현된 miRNA (miR-H9)를 분자로 사용하고, 하향 발현된 miRNA (miR-3659)를 분모로 사용하여 계산하였다 [그림 1].

수신자 조작 특성(receiver operating characteristic [ROC]) 곡선을 그리고 곡선 아래의 면적(area under curve [AUC])을 계산하여 PSA 및 이들 miRNA 발현 비율의 진단 성능을 평가하였다.

$$\text{Ratio of miRNAs} = \frac{\frac{\text{Up-regulated miRNA}}{\text{Housekeeping-gene}}}{\frac{\text{Down-regulated miRNA}}{\text{Housekeeping-gene}}} = \frac{\text{Up-regulated miRNA}}{\text{Down-regulated miRNA}}$$

그림 1. miRNA의 발현 비율 모식도. 현재 소변 샘플에는 신뢰할 수 있는 표준 miRNA가 없다. 발현 비율 분석은 소변의 표준 miRNA를 기반으로 한 정규화가 필요하지 않다.

3. 결과

miR-H9 / miR-3659의 발현 비율은 전립선비대증군(중앙값, 13.45; IQR, 11.44-14.93)보다 전립선암군(중앙값, 17.27; IQR, 14.52-19.97)에서 유의하게 더 높았다($p < 0.001$) [그림 2A]. 기준 PSA 값으로 환자를 분류한 후, PSA gray zone (3-10 ng/ml) 내 환자[그림 2C]와 PSA>10 ng/ml 환자[그림 2D]의 전립선암군과 전립선비대증군 사이에 miR-H9 / miR-3659 발현 비율은 유의미한 차이가 있었다(둘 다 $p < 0.05$). 그러나 PSA가 3ng/ml 미만인 환자에서는 유의한 차이가 없었다 [그림 2B]. 다변량 로지스틱 회귀분석에서 miRNA의 발현 비율이 전립선암의 진단과 유의하게 관련이 있는 것으로 나타났다(odds ratios 1.479, 95% 신뢰 구간[CI] 1.256-1.740, $p < 0.001$, [표 1]).

miR-H9 / miR-3659 발현 비율의 AUC는 0.803 (95% CI, 0.725-0.881) ($p < 0.001$)으로 PSA (AUC, 0.857; 95% CI, 0.790-0.925) ($p < 0.001$)와 유사하였다 [그림 3A]. ROC 곡선상 miR-H9 / miR-3659의 발현 비율과 PSA 값 사이에 유의미한 차이를 보이지 않았다($p = 0.287$). 하위 그룹 분석 결과, PSA gray zone내의 환자에서 miR-H9 / miR-3659 비율의 AUC가 PSA 검사의 AUC보다 유의하게 더 높은 것으로 나타났다(ROC 곡선 비교, $p = 0.034$) [그림 3B].

병리학적 특징과 관련하여, 전립선전적출술을 시행 받은 환자에서 miR-H9 / miR-3659의 발현 비율과 병기 및 Gleason score 사이에는 유의미한 연관성이 없었다.

2022년 현재 소변을 이용한 miR-H9 / miR-3659 검사법은 유로테크(<https://www.uro-tech.co.kr>)에서 생산 (mirCaP test)하여 전립선암 유전자 검진서비스를 시행 중이며, 전립선암 진단을 위한 탐색 및 확진 임상은 다기관연구를 통하여 진행 중에 있다.

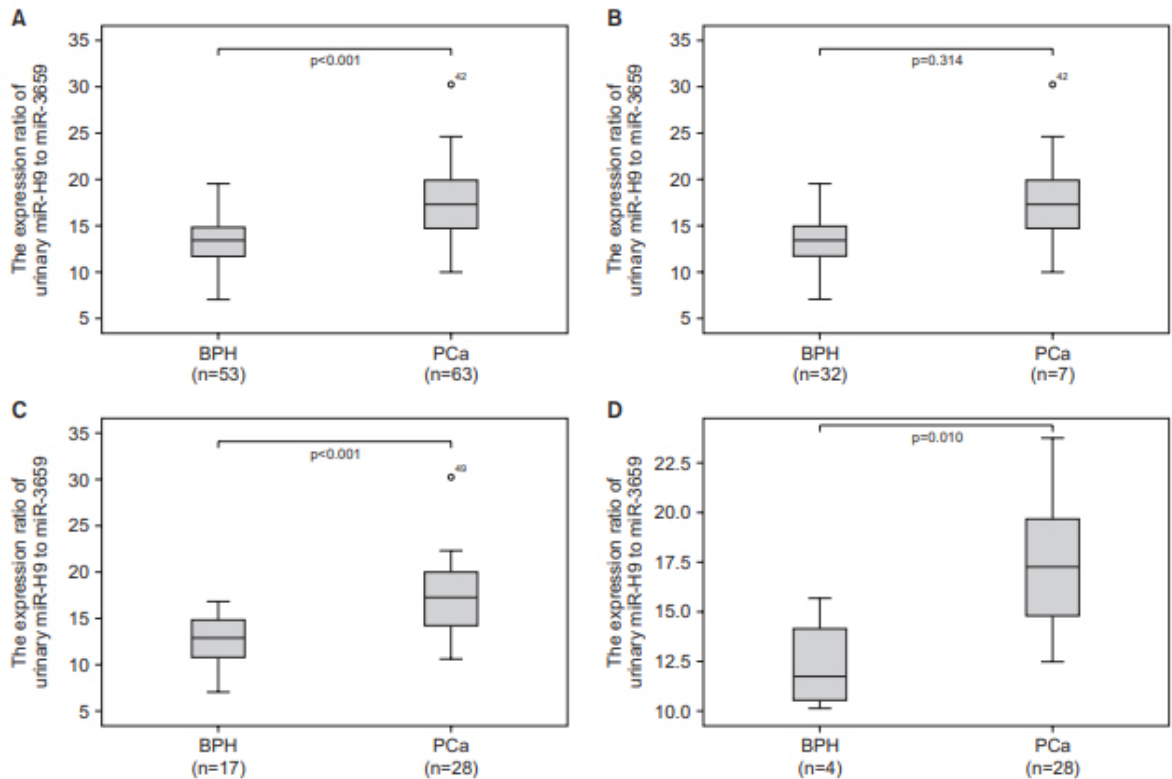


그림 2. (A) 전체 코호트에서, (B) PSA <3 ng/ml에서, (C) PSA gray zone (3-10 ng/ml) 내의 환자에서, (D) PSA > 10 ng/ml에서 miR-H9 / miR-3659의 발현 비율. miRNA: microRNA, BPH: 전립선비대증, PCa: 전립선암, PSA: prostate specific antigen. p-value는 Mann-Whitney에 의해 결정되었다.

표 1. 전립선암 위험도에 대한 다변량 로지스틱 회귀 분석

| Variable | Odds ratio (95% confidence interval) | p-value |
|--|---|---------|
| Age at diagnosis (continuous) | 0.952 (0.894-1.013) | 0.121 |
| Prostate size (continuous) | 1.001 (0.969-1.034) | 0.941 |
| Urinary miRNAs expression ratio (continuous) | 1.479 (1.256-1.740) | <0.001 |

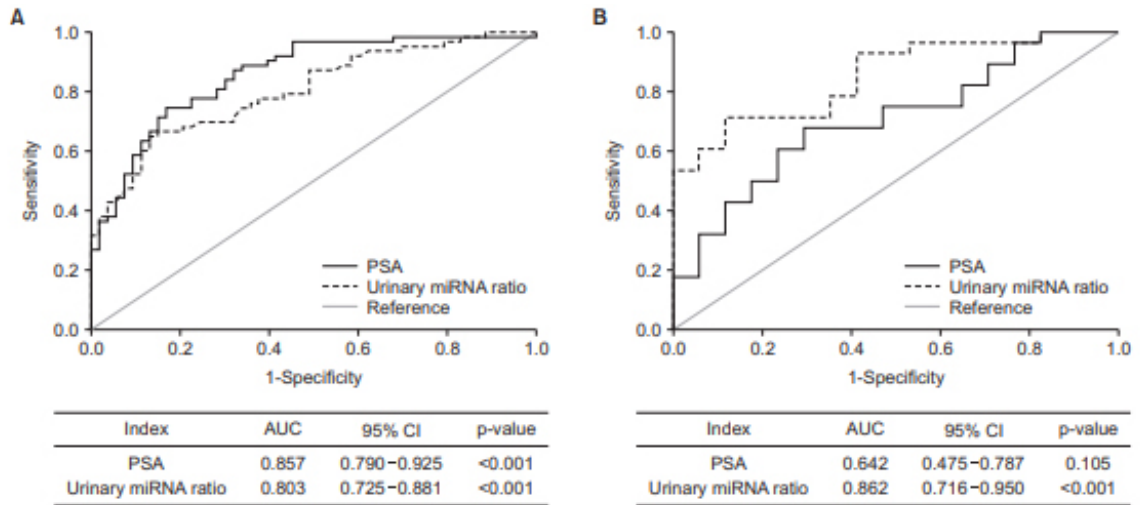


그림 3. (A) 전체 코호트 및 (B) PSA gray zone (3-10 ng/ml) 내 환자에 대한 전립선비대증과 전립선암을 구별하기 위한 수신자 조작 특성 곡선.

4. 고찰

miR-H9 / miR-3659 비율은 전립선암과 전립선비대증을 구별하기 위한 PSA 검사와 유사한 진단력을 가지며 특히 gray zone인 PSA 3-10 ng/ml 에서 우수한 진단 정확도를 보였다. 이러한 결과는 초기 전립선암의 조기 진단에 매우 도움이 될 것으로 여겨지며 PSA 10 ng/ml 이하에서 생검상 음성인 경우 PSA와 함께 소변 miR-H9 / miR-3659를 추적 관찰 시 측정함으로써 불필요한 반복적인 생검 횟수를 획기적으로 줄일 수 있을 것이다.

액체 생검법은 암 진단 및 예후 바이오마커를 조사하는데 비침습적 방법이란 점 때문에 많은 관심을 받고 있다 [15]. 암은 순환종양세포(circulating tumor cell), cell-free DNA, 단백질, 대사산물, 세포외 소포(extracellular vesicle), cell-free RNA 등을 혈액, 소변, 타액, 뇌척수액, 흉수액 등으로 배출하기 때문에 이를 이용하는 비침습적인 진단법들은 최근 들어 많이 연구되고 있다 [16]. 특히, 소변은 비뇨기암과 관련된 마커를 조사하는 데는 가장 좋은 시료로 사료된다 [8]. 혈액에는 정상과 비정상적인 물질이 섞여있어서 비뇨기암에 특화된 마커를 찾기가 어려우나 비뇨기암 자체가 소변과 직접 접촉을 하며 신장에서는 정상 물질들을 걸러내기 때문에 소변은 비뇨기종양에 좀 더 특화된 종양 유래 물질의 풍부한 공급원임을 알 수 있다 [17].

RNA는 매우 불안정한 분자이지만, miRNA는 혈장 및 혈청에서 안정적이며 RNase 활성에 내성이 있을 뿐만 아니라 극한의 pH 및 다중 동결-해동 주기에 잘 분해되지 않는다 [18]. 더욱이 세포외(extracellular) miRNA는 미세 소포(microvesicle) 내에 들어있기 때문에 RNase에 의한 분해에서 더욱더 보호된다 [19,20]. 인체 시료를 통한 이상적인 진단법은 단순하며, 재현성이 있으며, 안정성이 보장되어야 한다. 이런 관점에서 miRNA는 가장 이상적인 후보 마커라고 여겨진다. 최근 Mall 등[21]은 다양한 보관 조건하에서 miRNA의 안정성을 조사하였다. 상온에서 5일간 보관하고 10번의 동결-해동 주기 이후에도 정량적 분석을 위한 충분한 miRNA가 안정적으로 추출됨을 확인하였다.

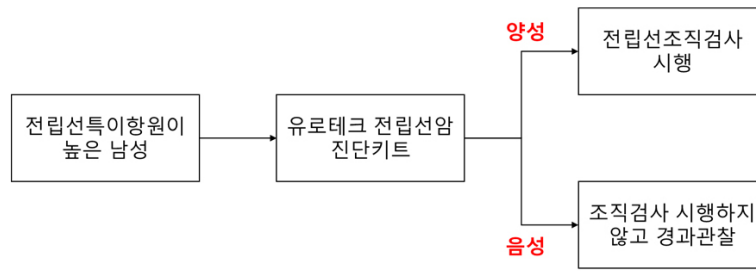


그림 4. 유로테크가 개발한 전립선암 진단키트의 사용

마커로서 miRNA를 이용하려면 표적 유전자와 비교하기 위한 적절한 참조 miRNA (reference miRNA)가 필요하다 [11]. 혈청 miRNA 발현은 농도로 나타낼 수도 있고, 일반적으로 글리세르알데하이드 3-인산 탈수소효소(GAPDH), 베타글로빈, U6 및 베타액틴과 같은 내인성 유전자의 발현을 사용하여 정규화 할 수 있다 [22]. 그러나 소변에서 miRNA 발현은 수분 섭취, 탈수 상태 및 신기능의 이상 등으로 위양성 혹은 위음성이 나올 수 있기 때문에 절대적인 발현 양의 측정만으로는 진단에 활용할 수가 없다 [23]. 소변에서 miRNA 발현을 정규화하기 위하여 농도 기반 정량화 방법이 사용되었지만, 총 RNA 농도를 사용하는 정규화는 비용이 많이 들고 시간이 많이 걸리는 과정이다. 본 연구에서는 내부통제가 필요 없는 두 miRNA의 발현 비율을 계산하였다. 이전에 우리 연구자들이 cell-free DNA와 miRNA를 분석하기 위해 유사한 접근 방식을 사용한 경험이 있다 [13,24,25].

miRNA의 비율 분석은 우수한 재현성을 보여주는 비교적 간단한 방법이기 때문에 임상에 적용될 수 있다. 이 연구에서, 우리는 새로운 miRNA의 발현 비율에 대한 진단 정확도가 PSA의 진단 정확도와 비슷하다는 것을 보여주었다. 그러나 소변을 사용한다는 점에서 PSA보다 훨씬 비침습적이며 피험자에게 편안함을 제공할 것이다. 또한 PSA gray zone 내 환자에서 비뇨기 miRNA 발현 비의 진단 성능은 PSA보다 매우 우수하였다.

특히 PSA와 miR-H9 / miR-3659 측정 키트인 유로테크에서 GMP 시설을 통하여 제작한 진단키트(mirCaP test)를 같이 사용할 때 PSA 3ng/ml 이상이며 전립선암이 아닌 환자를 85%에서 선별할 수 있기 때문에 불필요한 조직검사를 획기적으로 감소시킬 수 있다. 따라서 환자에게 상당한 고통과 부작용을 줄 수 있는 전립선 조직검사를 최소화하여 중앙 진단에 획기적인 변화를 가져올 수 있을 것으로 기대한다. 뿐만 아니라 PSA는 상승되어 있으나 조직검사에서 음성으로 나온 경우 재생검 유무를 결정하는데 많은 도움을 줄 것으로 기대한다. 또한 조직검사의 음성 예측률이 80% 이상이기 때문에 이를 이용한다면 많은 환자들에서 고통스러운 재생검 횟수를 최소화할 수 있을 것이다 [그림 4].

5. 결론

miR-H9 / miR-3659 발현 비율은 특히 PSA gray zone 내의 환자에서 전립선암 진단을 위한 비침습적 바이오마커가 될 수 있다. miR-H9 / miR-3659 검사법은 비교적 간단한 방법으로 재현성이 양호하며 내부 대조군으로 보정이 필요하지 않다. 특히, 이미 조직검사를 시행하여 음성으로 판정 받은 환자가 PSA가 정상치로 떨어지지 않거나 계속 증가하는 경우 조직검사의 재시행 여부를 결정하는데 많은 도움이 될 것으로 사료된다.

References

1. Parker C et al., Prostate cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, Ann Oncol, 2020

2. Salido-Guadarrama AI et al., Urinary microRNA-based signature improves accuracy of detection of clinically relevant prostate cancer within the prostate-specific antigen grey zone, *Mol Med Rep*, 2016
3. Filella X et al., Emerging biomarkers in the diagnosis of prostate cancer, *Pharmgenomics Pers Med*, 2018
4. Martins I et al., Liquid Biopsies: Applications for Cancer Diagnosis and Monitoring, *Genes (Basel)*, 2021
5. Alix-Panabieres C et al., Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. *Cancer Discov*, 2021
6. Yun SJ et al., Cell-free microRNAs in urine as diagnostic and prognostic biomarkers of bladder cancer, *Int J Oncol*, 2012
7. Di Meo A et al., Liquid biopsy: a step forward towards precision medicine in urologic malignancies, *Mol Cancer*, 2017
8. Oshi M et al., Urine as a Source of Liquid Biopsy for Cancer, *Cancers*, 2021
9. De Rubis G et al., Liquid Biopsies in Cancer Diagnosis, Monitoring, and Prognosis, *Trends Pharmacol Sci*, 2019
10. Arechederra M et al., Liquid biopsy for cancer management: a revolutionary but still limited new tool for precision medicine, *Advances in Laboratory Medicine / Avances en Medicina de Laboratorio*, 2020
11. Lodewijk I et al., Liquid Biopsy Biomarkers in Bladder Cancer: A Current Need for Patient Diagnosis and Monitoring, *Int J Mol Sci*, 2018
12. Yun SJ et al., Urinary MicroRNAs of Prostate Cancer: Virus-Encoded hsv1-miRH18 and hsv2-miR-H9-5p Could Be Valuable Diagnostic Markers, *Int Neurourol J*, 2015
13. Byun YJ et al., Urinary microRNA-1913 to microRNA-3659 expression ratio as a non-invasive diagnostic biomarker for prostate cancer, *Investig Clin Urol*, 2021
14. Yun SJ et al., Increased Expression of Herpes Virus-Encoded hsv1-miR-H18 and hsv2-miR-H9-5p in Cancer-Containing Prostate Tissue Compared to That in Benign Prostate Hyperplasia Tissue, *Int Neurourol J*, 2016.
15. Pantel K et al., Liquid biopsy: Potential and challenges, *Mol Oncol*, 2016
16. Szilagyi M et al., Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main Characteristics and Clinical Application, *Int J Mol Sci*, 2020
17. Satyal U et al., Urine Biopsy-Liquid Gold for Molecular Detection and Surveillance of Bladder Cancer, *Front Oncol*, 2019
18. Glinge C et al., Stability of Circulating Blood-Based MicroRNAs - Pre-Analytic Methodological Considerations, *PLoS One*, 2017
19. Hessvik N et al., Exosomal miRNAs as Biomarkers for Prostate Cancer, *Frontiers in Genetics*, 2013
20. Zhou BT et al., Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis, *Signal Transduct Tar*, 2020
21. Mall C et al., Stability of miRNA in human urine supports its biomarker potential, *Biomark Med*, 2013
22. Duan ZY et al., U6 can be used as a housekeeping gene for urinary sediment miRNA studies of IgA nephropathy, *Sci Rep-Uk*, 2018
23. Filella X et al., miRNAs as novel biomarkers in the management of prostate cancer, *Clin Chem Lab Med*, 2017
24. Xu YJ et al., Urinary Cell-Free DNA IQGAP3/BMP4 Ratio as a Prognostic Marker for Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer, *Clin Genitourin Canc*, 2019
25. Xu Y et al., Diagnostic value of combined IQGAP3/BMP4 and IQGAP3/FAM107A expression ratios in urinary cell-free DNA for discriminating bladder cancer from hematuria, *Urol Oncol*, 2019