



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0112535
(43) 공개일자 2020년10월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) C12Q 1/6806 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2018.05)
C12Q 1/6806 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2019-0033176
(22) 출원일자 2019년03월22일
심사청구일자 2019년03월22일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
홍승모
서울특별시 강남구 역삼로 314, 304동 601호(개나리푸르지오아파트)
김성주
서울특별시 서초구 신반포로 270, 130동 101호(반포동, 반포자이아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

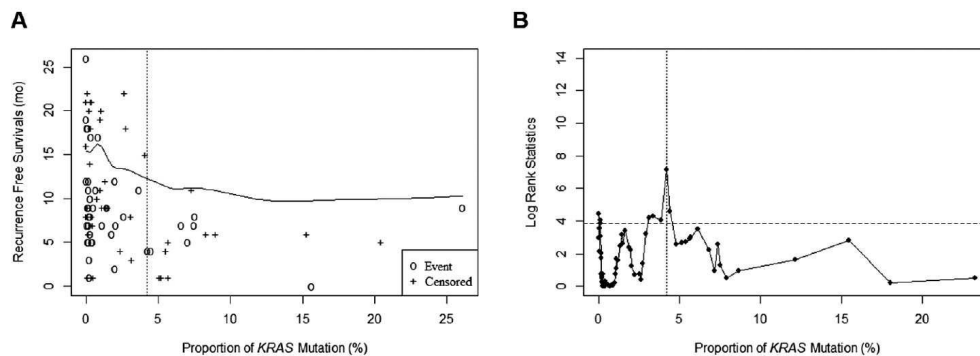
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 외과적 절제술을 받은 췌장암 환자의 재발 예측방법

(57) 요약

본 발명은 췌장암 환자의 예후 예측방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 췌장암 환자로부터 분리된 췌장 상장간 막동맥 절제연 또는 방사형 절제연에서 KRAS 유전자 돌연변이 상태를 극초민감 디지털 PCR로 확인하고, 돌연변이 비율의 함을 이용하여 분자적 평가 기준을 성립함으로써 췌장암 환자의 예후를 보다 정확하게 예측할 수 있는 방법을 제공한다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/118 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

(72) 발명자

조형준

서울특별시 서초구 강남대로61길 23, 1303호(서초
동, 현대성우주상복합아파트)

김미주

서울특별시 송파구 가락로19길 12, 304호(송파동,
석촌역 송파 한양 LEEPS)

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 췌장암 환자로부터 분리된 생물학적 시료를 채취하는 단계;
- (b) 채취된 생물학적 시료로부터 DNA를 추출하는 단계;
- (c) PCR을 수행하여 코돈 12 및 13에서 KRAS 돌연변이를 검출하는 단계;
- (d) KRAS 유전자 돌연변이 비율의 합을 계산하는 단계; 및
- (e) KRAS 유전자 돌연변이 비율의 합이 컷오프 값 이상인 경우 환자를 분자적 절제연 양성으로 정의하고, 컷오프 값 미만인 경우 환자를 분자적 절제연 음성으로 정의하는 단계;를 포함하는 췌장암 환자의 재발 예측 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 생물학적 시료는 외과 절제술을 받은 췌장암 환자로부터 수득된 췌장 상장간막동맥 절제연 또는 방사형 절제연인 것인 췌장암 환자의 재발 예측 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 세포는 면봉채취법을 이용하여 채취되는 것인 췌장암 환자의 재발 예측 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (c) 단계의 PCR은 디지털 PCR인 것인 췌장암 환자의 재발 예측 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 (c) 단계의 KRAS 돌연변이는 G12D, G12V, G13D, G12R, G12C, G12S 및 G12A로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것인 췌장암 환자의 재발 예측 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 (e) 단계에서 컷오프 값은 4.19%인 것인 췌장암 환자의 재발 예측 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 (e) 단계에서 분자적 절제연 양성으로 정의된 환자는 무재발생존이 7개월 미만인 것인 췌장암 환자의 재발 예측 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 (e) 단계에서 분자적 절제연 음성으로 정의된 환자는 무재발생존이 12개월 이상인 것인 췌장암 환자의 재발 예측 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 췌장암 환자는 화학요법 또는 방사선요법을 받지 않은 환자인 것인 췌장암 환자의 재발 예측 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, (f) 상기 췌장암 환자로부터 수득된 췌장 상장간막동맥 절제연 또는 방사형 절제연의 병리학적 상태를 확인하는 단계를 추가로 포함하는 췌장암 환자의 재발 예측 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 병리학적 절제연 양성 또는 분자적 절제연 양성이거나 병리학적 절제연과 분자적 절제연이 모두 양성인 환자는 병리학적 절제연 및 분자적 절제연이 모두 음성인 환자보다 짧은 무재발생존을 나타내는 췌장암 환자의 재발 예측 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 종양의 분화도, 종양 크기, T 카테고리, 림프혈관 침윤, 신경주위 침윤 및 림프절 전이로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 임상병리학적 요인을 추가로 확인하는 것을 포함하는 췌장암 환자의 재발 예측 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 외과적 절제술을 받은 췌장암 환자의 수술 후의 재발 예측방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 췌장암 환자로부터 수술 후 분리된 췌장 상장간막동맥 절제연 또는 방사형 절제연에서 KRAS 유전자의 돌연변이 상태를 극초민감 디지털 PCR법으로 확인하고, 돌연변이 비율의 함을 이용하여 분자적 평가 기준을 성립함으로써 외과수술을 받은 췌장암 환자의 재발의 위험도를 보다 정확하게 예측할 수 있는 방법을 제공한다.

배경 기술

[0002] 췌장암은 예후가 불량한 치명적인 질환으로, 외과적 치료 절제술 이후 장기(10년 이상) 생존율은 3.9%에 불과하다. 매년 173,800명의 남성과 156,600명의 여성이 췌장암으로 사망하며, 전 세계적으로 남녀 모두에서 암으로 사망하는 7번째 주요 원인이다. 비록 췌장암은 현재 미국에서 암 사항의 4번째 주요 원인이지만, 2030년에는 2번째 주요 원인이 될 것이다. 대한민국의 경우, 췌장암은 남성에서 5번째로 흔한 암(5.6%)이고, 여성에서는 6번째로 흔한 암(7.8%)이며, 5년 생존율이 10.1%이다. 수술 기법의 향상과 새로운 치료법의 개발에도 불구하고, 대한민국에서 췌장암의 5년 생존율은 지난 20년 동안 약 0.7%만 향상되었다. 외과적 절제술만이 췌장암을 치료하는 유일한 방법이지만, 환자의 10-15%만이 진단 당시 외과적 절제술이 가능하다. 또한, 외과 절제술을 받은 거의 모든 환자는 전신(>70%) 또는 국소적(<20%) 재발이 진행된 이후 결국 사망하게 된다.

[0003] 수술 후 분리된 췌장에서 수술 절제연 상태는, 증가된 종양 크기, 등급, 및 T 및 N 카테고리과 함께 췌장암의 외과적 절제술 후 재발에 영향을 미치는 중요한 요인 중 하나이다 (Panizza A, Hosokawa P, Henderson W, et al. Characteristics of 10-year survivors of pancreatic ductal adenocarcinoma. *JAMA Surg.* 2015;150:701-710; Zhang Y, Frampton AE, Kyriakides C, et al. Loco-recurrence after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas: predictors and implications for adjuvant chemoradiotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012;138:1063-1071). 그러나, 절제연에 암세포가 없는 완전절제로 판정을 받은 경우에도 국소적 재발과 원격 재발이 발생할 수 있다 (Zhang Y, Frampton AE, Kyriakides C, et al. Loco-recurrence after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas: predictors and implications for adjuvant chemoradiotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012;138:1063-1071). 따라서, 절제연 상태를 보다 정확하게 평가하기 위한 새로운 진단 방법이 요구된다.

[0004] 유문보존췌십이지장절제술 표본은 췌장 경부, 총담관, 십이지장, 공장, 방사형 절제연(margins)을 포함하는 여러 가지 절제연을 포함한다. 외과적 절제술 후의 국소적 재발은 방사형 절제연에서 가장 흔히 발생하지만, 이를 평가하는 것은 매우 어렵다. 방사형 절제연과 달리, 췌장 경부와 총담관 절제연은 동결 절편 평가로 외과적 절제술 동안 완전 절제를 위한 절제연을 달성하기 위해 평가될 수 있다. 방사형 절제연은 또한 후복막, 갈고리(uncinate), 또는 상장간막동맥 및 상장간막정맥 절제연으로도 알려져 있다. 상장간막정맥고랑과 상장간막동맥 절제연은 방사형 절제연을 이루는 두 가지 요소이며, 불완전 절제가 발생하는 가장 흔한 부위이다. 암세포가 방사형 절제연으로부터 1mm 이내로 침윤하는 경우, 방사형 절제연에 암세포가 있는 것으로 간주된다 (Schlitter AM, Esposito I. Definition of microscopic tumor clearance (r0) in pancreatic cancer resections. *Cancers (Basel).* 2010;2:2001-2010; Campbell F, Smith RA, Whelan P, et al. Classification of R1 resections for pancreatic cancer: the prognostic relevance of tumour involvement within 1 mm of a resection margin. *Histopathology.* 2009;55:277-283). 방사형 절제연에서 암세포가 관찰이 될 경우 췌장 절제술을 받은 췌장암 환자의 예후는 나쁘다 (Sabater L, del Carmen Gomez-Mateo M, Lopez-Sebastian J, et al. Prognostic implications of the standardized study of resection margins in pancreatic cancers. *Cirugia*

Espanola. 2014;92:532-538).

[0005] 현재 방사형 절제연을 평가하기 위해 사용되는 병리학적 방법은 표본의 절제연에서 가장 대표적인 절편을 선택 하여 현미경으로 검경하여, 절제연에서의 암세포의 유무를 판단한다. 하지만, 절제연 전체에 대한 평가는 거의 불가능하다. 따라서, 현재 통용되는 병리학적 검사법에 의한 절제연의 평가가 저평가될 가능성이 매우 높다. 통 상적인 육안검사에 의한 방사형 절제연의 저평가 가능성을 최소화하기 위해, 1) 염색된(inked) 방사형 절제연을 모두 포르말린으로 고정, 파라핀으로 포매한 다음 염색슬라이드를 만든 후 현미경을 이용한 방법과 2) 전체 췌 장에 대한 포르말린 고정, 파라핀 포매한 후 염색슬라이드를 만든 후 현미경을 검경 후 절제연에 대한 맵핑 등 의 방법이 제안되어 왔다. 그러나 이러한 방법은 노동 집약적이며 많은 시간을 필요로 한다.

[0006] KRAS 유전자는 CDKN2A/p16, SMAD4/DPC4 및 TP53 등의 유전자와 함께 췌관선암(pancreatic ductal adenocarcinoma, 다른 말로 췌장암이라 부름)에서 가장 흔하게 돌연변이되는 유전자 중 하나이다. KRAS 유전자의 돌연변이는 방사형 절제연을 포함하는 비종양성 췌장주변 연조직에서 관찰되지 않는다. 이에, 본 발명에서 방사형 절제연의 KRAS 유전자 돌연변이의 상태를 극초민감도의 드롭렛 디지털 PCR(ddPCR)로 조사하였고, KRAS 유전자 돌연변이를 이용한 분자적 절제연 평가의 유용성을 통상적인 조직학적 현미경 검경에 의한 평가 방법의 유용성 및 외과적 절제술을 받은 췌장암 환자에서 무재발생존을 포함한 임상병리학적 요소와의 연관성과 비교하 였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 췌장암 환자로부터 외과적 절제술을 받은 후 분리된 췌장의 상장간막동맥 절제연 또는 방사형 절제연에서 KRAS 유전자의 돌연변이 상태를 극초민감도의 디지털 PCR법으로 확인한 후, KRAS 유전자 돌연변이 비율을 이용하여 췌장암 환자의 재발의 위험도를 예측하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상술한 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 췌장암 환자의 재발 예측방법을 제공한다:
- [0009] (a) 췌장암 환자로부터 분리된 생물학적 시료를 채취하는 단계;
- [0010] (b) 채취된 생물학적 시료로부터 DNA를 추출하는 단계;
- [0011] (c) PCR을 수행하여 코돈 12 및 13에서 KRAS 유전자 돌연변이를 검출하는 단계;
- [0012] (d) 검출된 KRAS 유전자 돌연변이 비율의 합을 계산하는 단계; 및
- [0013] (e) KRAS 유전자 돌연변이 비율의 합이 컷오프 값 이상인 경우 환자를 분자적 절제연 양성으로 정의하고, 컷오프 값 미만인 경우 환자를 분자적 절제연 음성으로 정의하는 단계.
- [0014] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 (a) 단계의 생물학적 시료는 외과 절제술을 받은 췌장암 환자로부터 수득된 췌장 상장간막동맥 절제연 또는 방사형 절제연일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 (a) 단계의 세포는 면봉채취법을 이용하여 채취될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 (c) 단계의 PCR은 디지털 PCR일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 (c) 단계의 KRAS 유전자의 돌연변이는 G12D, G12V, G13D, G12R, G12C, G12S 및 G12A로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 (e) 단계에서 컷오프 값은 4.19%일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 (e) 단계에서 분자적 절제연 양성으로 정의된 환자는 무 재발생존이 7개월 미만일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 (e) 단계에서 분자적 절제연 음성으로 정의된 환자는 무 재발생존이 12개월 이상일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 췌장암 환자는 화학요법 또는 방사선요법을 받지 않은 환자 이거나, 화학요법 및 방사선요법을 모두 받지 않은 환자일 수 있다.

[0022] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, (f) 상기 췌장암 환자로부터 수득된 췌장 상장간막동맥 절제연 또는 방사형 절제연의 병리학적 상태를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 병리학적 절제연 양성 또는 분자적 절제연 양성이거나 병리학적 절제연과 분자적 절제연이 모두 양성인 환자는 병리학적 절제연 및 분자적 절제연이 모두 음성인 환자보다 짧은 무재발생존을 나타낼 수 있다.

[0024] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 방법은 종양의 분화도, 종양 크기, T 카테고리, 림프혈관 침윤, 신경주위 침윤 및 림프절 전이로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 임상병리학적 요인을 추가로 확인할 수 있다.

발명의 효과

[0025] 본 발명에 따른 췌장암 환자의 재발 예측방법은 KRAS 유전자 돌연변이 비율의 합에 대한 컷오프를 선택하고 이를 분자적 평가의 양성 기준으로 설정하여 도출된 분자적 재발 예측방법으로서, 기존의 병리학적 평가 방법에 비해 현저하게 높은 재발 예측 정확성을 나타낸다. 또한, 췌장암 환자의 외과적 수술로 수득된 췌장 상장간막동맥 절제연 또는 방사형 절제연을 시료로 이용한다는 점에서 시료 채취에 따른 환자의 추가적인 부담이 없다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 췌장암 환자의 방사형 절제연에서 면봉채취법을 이용한 세포 채취과정을 보여주는 사진이다.

도 2는 정상 췌장 (왼쪽 컬럼) 및 표본 #86(오른쪽 컬럼)에서 드롭렛 디지털 PCR을 이용한 KRAS 유전자 돌연변이의 대표적인 이미지를 나타낸 것으로, 정상 췌장은 야생형 KRAS 유전자인 반면, 표본 #86은 4.9%의 KRAS 유전자 돌연변이 중 하나인 G12D를 나타낸다.

도 3은 주형이 없는 대조군 (왼쪽 컬럼), 정상 췌장(중간 컬럼) 및 표본 #59 (오른쪽 컬럼)에서 드롭렛 디지털 PCR을 이용한 KRAS 변이 대립유전자 빈도의 대표적 이미지를 나타낸 것으로, 정상 췌장은 모든 KRAS 유전자가 야생형인 반면, 표본 #59는 3가지 종류의 KRAS 유전자 돌연변이(G12S, G12D 및 G13D)를 포함한다. 이들 돌연변이는 순서대로 각각 0.1%, 8.6% 및 17.6%이다. 따라서, KRAS 유전자 돌연변이의 합계 비율은 정상 췌장에서 0%, 표본 #59에서 26.5%로 계산된다.

도 4는 유문보존췌십이지장절제 표본의 방사형 절제연에서 KRAS 유전자 돌연변이의 합계를 그래프로 나타낸 것이다. 표본의 방사형 절제연 평균 KRAS 유전자 돌연변이는 2.71%(SD, 4.59%; 범위, 0-26.12%)이다. 그래프 아래 검정색 블록은 병리학적 절제연 양성 케이스를 나타내고, 회색 블록은 병리학적 절제연 음성 케이스를 나타낸다. 병리학적 및 분자적 절제연은 서로 연관성을 보이지 않았다.

도 5는 정상 췌장을 이용한 G12D 돌연변이 한계값에 대한 KRAS 유전자 돌연변이 한계값을 결정한 것을 나타낸 것이다. 드롭렛 디지털 PCR에 의한 KRAS G12D 돌연변이 한계값은 0.16% (3개의 독립적인 정상 췌장 케이스에서 돌연변이 비율의 평균+3SD)이다.

도 6A는 KRAS 유전자 돌연변이 비율에 대한 무재발생존의 산점도를 나타낸 것으로, 국소적 회귀분석 평가는 KRAS 유전자 돌연변이의 비율에 대한 무재발생존의 산점도에 중첩된다. 검열된(censored) 케이스는 'o'로 표시되고, 사건은 '+'로 표시된다. 생존율은 4.19%의 KRAS 유전자 돌연변이 비율에서 감소되었다. 도 6B는 모든 케이스에 대한 KRAS 유전자 돌연변이 비율의 컷오프 포인트에 대한 로그 순위 통계를 나타낸 것으로, 3.84 로그 순위 통계보다 큰 분할(점선 위)은 0.05 미만의 P 값에 해당한다. 7 종류의 KRAS 유전자 돌연변이 비율의 합계에 따라 4.19%로 생성된 분할은 가장 큰 로그 순위 통계를 나타내고, 이는 가장 낮은 P 값을 나타낸다.

도 7A는 분자적 절제연 상태를 기초로 한 카플란-마이어 분석을 나타낸 것으로, 양성 분자적 절제연을 갖는 환자 (평균, 7개월)가 음성 분자적 절제연을 갖는 환자 (12개월, 로그 순위 테스트, $P=0.008$)보다 통계적으로 유의한 더 짧은 무재발생존을 나타냄을 보여준다. 도 7B는 병리학적 절제연 상태를 기초로 한 카플란-마이어 분석을 나타낸 것으로, 양성 병리학적 절제연을 갖는 환자 (9개월)는 음성 병리학적 절제연을 갖는 환자(17개월; $P=0.08$)와 통계적으로 무재발생존의 차이를 나타내지 않았음을 보여준다.

도 8은 화학요법 또는 방사선요법 상태의 서브그룹에서 분자적 절제연 상태를 기초로 한 카플란-마이어 생존 분석을 나타낸 것으로, 도 8A는 화학요법을 받지 않은 서브그룹에서, 양성 분자적 절제연 (평균, 7개월)을 갖는 환자는 음성 분자적 절제연 (14개월, 로그 순위 테스트, $P<0.001$)을 갖는 환자보다 유의적으로 더 짧은 무재발

생존을 나타냄을 보여준다. 도 8B는 분자적 절제연 상태를 기초로 하여, 화학요법을 받은 환자에서 무재발생존에 차이가 관찰되지 않았음을 보여준다 (양성 분자적 절단면, 10개월; 음성 분자적 절단면, 15개월; $P=0.392$). 도 8C는 방사선요법을 받지 않은 서브그룹에서, 양성 분자적 절제연 (7개월)을 갖는 환자가 음성 분자적 절제연을 갖는 환자 (15개월, $P<0.001$)보다 유의적으로 더 짧은 무재발생존을 나타냄을 보여준다. 도 8D는 분자적 절단면 상태를 기초로, 방사선요법을 받은 환자에서 무재발생존에 차이가 관찰되지 않았음을 보여준다 (양성 분자적 절단면, 8개월; 음성 분자적 절단면, 14개월; $P=0.983$).

도 9는 화학요법 또는 방사선요법 상태의 서브그룹에서 병리학적 절제연 상태를 기초로, 카플란-마이어 생존 분석을 나타낸 것으로, 도 9A는 화학요법을 받지 않은 서브그룹에서 무재발생존에 차이가 관찰되지 않았음을 보여준다 (평균 생존: 양성 병리학적 절단면, 12개월; 음성 병리학적 절단면, 13개월; 로그 순위 테스트, $P=0.898$). 도 9B는 화학요법을 받은 서브그룹에서 무재발생존에 차이가 관찰되지 않았음을 보여준다 (양성 병리학적 절단면, 12개월; 음성 병리학적 절단면, 17개월; $P=0.129$). 도 9C는 방사선요법을 받지 않은 서브그룹에서 무재발생존에 차이가 관찰되지 않았음을 보여준다 (양성 병리학적 절단면, 11개월; 음성 병리학적 절단면, 15개월; $P=0.216$). 도 9D는 방사선요법을 받은 서브그룹에서 무재발생존에 차이가 관찰되지 않았음을 보여준다 (양성 병리학적 절단면, 12개월; 음성 병리학적 절단면, 17개월; $P=0.220$).

도 10은 병리학적 및 분자적 혼합 절제연 상태를 기초로 한 카플란-마이어 생존 분석을 나타낸 것으로, 양성 혼합 절제연을 갖는 환자 (분자적 또는 병리학적 절제연 양성; 평균, 9개월)가 음성 혼합 절제연을 갖는 환자 (분자적 및 병리학적 절제연 둘다 음성; 18개월, 로그 순위 테스트, $P=0.002$)보다 유의적으로 더 짧은 무재발생존을 나타냄을 보여준다.

도 11은 화학요법 또는 방사선요법 상태의 서브그룹에서 병리학적 분자적 혼합 절제연 상태를 기초로 한 카플란-마이어 생존 분석을 나타낸 것으로, 도 11A는 병리학적 및 분자적 혼합 절제연 상태를 기초로 화학요법을 받지 않은 환자에서 무재발생존에 차이가 관찰되지 않았음을 보여준다 (양성 혼합 절단면, 11개월; 음성 혼합 절단면, 13개월; $P=0.145$). 도 11B는 화학요법을 받은 서브그룹에서, 양성의 병리학적 및 분자적 혼합 절제연을 갖는 환자 (병리학적 또는 분자적 절제연 양성 케이스, 평균 12개월)가 음성의 병리학적 및 분자적 혼합 절제연을 갖는 환자 (병리학적 및 분자적 절제연 모두 음성 케이스, 17개월, 로그 순위 테스트, $P=0.037$) 보다 더 짧은 무재발생존을 나타냄을 보여준다. 도 11C는 방사선요법을 받지 않은 서브그룹에서, 양성의 병리학적 및 분자적 혼합 절제연을 갖는 환자 (병리학적 또는 분자적 절제연 양성 케이스, 10개월)가 음성의 병리학적 및 분자적 혼합 절제연을 갖는 환자 (병리학적 및 분자적 절제연 둘다 음성 케이스, 18개월, $P=0.017$) 보다 유의적으로 더 짧은 무재발생존을 나타냄을 보여준다. 도 11D는 병리학적 및 분자적 혼합 절제연 상태를 기초로 방사선요법을 받은 환자에서 무재발생존에 차이가 관찰되지 않았음을 보여준다 (양성 혼합 절단면, 12개월; 음성 혼합 절단면, 17개월; $P=0.169$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 상술한 바와 같이, 절제연 상태는, 증가된 종양 크기, 등급, 및 T 및 N 카테고리과 함께 채장암의 외과적 절제술 후 재발에 영향을 미치는 중요한 요인 중 하나이지만, 완전절제수술을 받은 경우에도 국소적 재발 및 원격 재발이 발생할 수 있어 절제연 상태를 보다 정확하게 평가하기 위한 새로운 진단 방법이 요구된다. 한편, KRAS 유전자는 CDKN2A/p16, SMAD4/DPC4 및 TP53과 함께 채관선암에서 가장 흔하게 변이되는 유전자 중 하나로, 방사형 절제연을 포함하는 비종양성 채장주변 연조직에서 관찰되지 않는다.
- [0028] 이에, 본 발명자들은 외과적 절제술을 받은 채장암 환자의 방사형 절제연의 KRAS 유전자 돌연변이의 상태를 극초민감도의 디지털 PCR법으로 확인하고, KRAS 유전자 돌연변이 비율의 합을 이용하여 채장암 환자의 재발 위험도를 보다 정확하게 예측할 수 있는 분자적 평가 기준을 확립함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0029] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0030] 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 외과적 절제술을 받은 채장암 환자의 재발 예측방법에 관한 것이다:
- [0031] (a) 채장암 환자로부터 분리된 생물학적 시료를 채취하는 단계;
- [0032] (b) 채취된 생물학적 시료로부터 DNA를 추출하는 단계;
- [0033] (c) PCR을 수행하여 코돈 12 및 13에서 KRAS 돌연변이를 검출하는 단계;
- [0034] (d) KRAS 돌연변이 비율의 합을 계산하는 단계; 및

- [0035] (e) KRAS 돌연변이 비율의 합이 컷오프 값 이상인 경우 환자를 분자적 절제연 양성으로 정의하고, 컷오프 값 미만인 경우 환자를 분자적 절제연 음성으로 정의하는 단계.
- [0036] 본 발명에 따른 췌장암 환자의 재발 예측방법에 있어서, 췌장암은 췌장에서 발악하는 여러 종류의 악성종양 중에서 췌관선암종과 점액성 낭성 종양 또는 췌관 내 유두상 종양에서 발생하는 췌관선암종을 이른다.
- [0037] 본 발명에 따른 췌장암 환자의 재발 예측방법에 있어서, 상기 (a) 단계의 생물학적 시료는 핵산을 함유하는, 환자로부터 유래하는 임의의 생물학적 시료일 수 있다. 바람직하게는 외과 절제술을 받은 췌장암 환자로부터 적출된 췌장 조직, 특히 췌장 상장간막동맥 절제연 또는 방사형 절제연일 수 있고, 도 1에 나타난 바와 같이 상기 절제연을 면봉으로 문질러 세포를 채취할 수 있다.
- [0038] 본 발명에 따른 췌장암 환자의 재발 예측방법에 있어서, (b) 채취된 세포로부터 DNA를 추출하는 단계는 당해 기술분야에 사용되는 통상적인 DNA 추출방법을 사용할 수 있다.
- [0039] 본 발명에 따른 췌장암 환자의 재발 예측방법에 있어서, (c) PCR을 수행하여 코돈 12 및 13에서 KRAS 유전자 돌연변이를 검출하는 단계는 극초민감도의 디지털 PCR (Digital polymerase chain reaction, dPCR), 특히 드롭렛 디지털 PCR(droplet digital polymerase chain reaction, ddPCR)을 이용하여 수행될 수 있다.
- [0040] 상기 용어 “디지털 PCR” 이란, 핵산을 탐지하고 정량하는 새로운 접근법으로서 기존 qPCR에 비해 정확한 정량 분석과 표적 핵산 분자의 고감도 탐지가 가능하다. 기존의 qPCR의 결과 분석 방식이 아날로그 방식인 점에 반해, 결과 신호가 "0" 또는 "1"의 값을 가져 분석 방식이 디지털 방식인 디지털 PCR 방법은 대용량 시료의 분석, 한번에 다양한 시료의 검사 그리고 다양한 검사 항목을 한번에 수행할 수 있는 장점이 있다. 디지털 PCR (digital PCR) 기술은 DNA 시료를 표준 곡선이 필요 없는 단일 분자 계수법을 적용하여 절대정량이 가능한 기술로서, 하나의 웰 당 하나의 액적(droplet)에 대한 PCR 반응으로 보다 정확한 절대 정량을 수행할 수 있는 장점이 있다.
- [0041] 본 발명에 따른 췌장암 환자의 재발 예측방법에 있어서, 상기 (c) 단계의 KRAS 유전자 돌연변이는 G12D, G12V, G13D, G12R, G12C, G12S 및 G12A로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 재발 예측의 정확도를 향상시키기 위해 7종 모두를 포함할 수 있다.
- [0042] 본 발명자들은 실시예 2에 기재된 바와 같이 81명의 췌장암 환자의 각각의 방사형 절제연에서 상기 7종의 KRAS 유전자 돌연변이 비율의 합을 계산하였고, 이들의 평균값이 2.71%임을 확인하였으며, 실시예 3에 기재된 바와 같이 검출 한계 보정 후, 실시예 4에 기재된 바와 같이 KRAS 유전자 돌연변이 비율에 따른 환자의 무재발생존을 구별하기 위한 컷오프 포인트를 4.19%로 선택하였다.
- [0043] 구체적으로, 본 발명에 따른 췌장암 환자의 재발 예측방법에 있어서, (d) 단계의 KRAS 유전자 돌연변이 비율의 합의 채택은 다음의 단계를 통하여 도출되었다:
- [0044] (1단계) 드롭렛 디지털 PCR에서 발생할 수 있는 DNA가 없는 환경에서의 KRAS 유전자 돌연변이 긍정오류값 (false positive) 보정;
- [0045] (2단계) 극초민감도의 디지털 PCR을 이용했을 때 정상조직에서 발현되는 KRAS 유전자 돌연변이 비율에 근거한 보정;
- [0046] (3단계) 방사형 절제연에서 보정된 7종의 KRAS 유전자 돌연변이 비율 값 중 최대값을 채택하였을 경우와 각 7종의 돌연변이 비율의 합을 채택하였을 경우로 나누어 무재발생존분석 비교;
- [0047] (4단계) 7종의 KRAS 유전자 돌연변이 비율의 합($P=0.008$)이 최대값의 돌연변이 비율값 보다 유의한 차이를 보임.
- [0048] 본 발명에 따른 췌장암 환자의 재발 예측방법에 있어서, "재발"은 췌장암이 췌장절제 수술 이후 특정 기간 동안 관찰되지 않다가, 원발병소인 췌장이나 신체의 다른 부위에서 다시 발생하는 것을 포함한다.
- [0049] 본 발명에 따른 췌장암 환자의 재발 예측방법에 있어서, (e) 단계의 컷오프 값은 4.19%이며, 이를 기준으로 하여 분자적 절제연 양성으로 정의된 환자는 분자적 절제연 음성으로 정의된 환자보다 더 짧은 무재발생존을 나타낸다.
- [0050] 보다 구체적으로, KRAS 유전자 돌연변이 비율의 합이 4.19% 이상인 분자적 절제연 양성 환자는 무재발생존이 7개월 미만이고, KRAS 유전자 돌연변이 비율의 합이 4.19% 미만인 분자적 절제연 음성 환자는 무재발생존이 12개월

월 이상일 수 있다.

- [0051] 본 발명에 따른 췌장암 환자의 재발 예측방법에 있어서, 상기 췌장암 환자는 외과적 절제술을 받은 모든 환자를 포함할 수 있고, 바람직하게는 췌장암의 외과적 절제술 이후 화학요법 또는 방사선요법을 받지 않은 환자이거나, 화학요법 및 방사선요법을 모두 받지 않은 환자일 수 있다.
- [0052] 도 7A에 나타난 바와 같이, 양성 분자적 절제연을 갖는 환자 (평균, 7개월)는 음성 분자적 절제연을 갖는 환자 (12개월, 로그 순위 테스트, $P=0.008$)보다 유의적으로 더 짧은 무재발생존을 나타냄을 확인하였고, 도 8A에 나타난 바와 같이, 췌장절제술 이후 화학요법을 받지 않은 환자의 경우 양성 분자적 절제연 (평균, 7개월)을 갖는 환자는 음성 분자적 절제연 (14개월, 로그 순위 테스트, $P<0.001$)을 갖는 환자보다 유의적으로 더 짧은 무재발생존을 나타냄을 확인하였으며, 도 8C에 나타난 바와 같이 방사선요법을 받지 않은 환자의 경우 양성 분자적 절제연 (7개월)을 갖는 환자가 음성 분자적 절제연을 갖는 환자 (15개월, $P<0.001$)보다 유의적으로 더 짧은 무재발생존을 나타냄을 확인하였다.
- [0053] 따라서, 본 발명에 따른 췌장암 환자의 재발 예측방법은 분자적 평가 방법으로서 기존의 병리학적 평가 방법에 비해 현저하게 높은 재발 예측 정확성을 나타내며, 외과적 절제술을 받은 췌장암 환자의 재발 예측에 단독으로 적용함으로써 환자의 재발 위험도에 대한 정보를 정확하게 예측할 수 있다.
- [0054] 본 발명에 따른 췌장암 환자의 재발 예측방법은 (f) 상기 췌장암 환자로부터 수득된 췌장 상장간막동맥 절제연 또는 방사형 절제연의 병리학적 상태를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0055] 상기 (f) 단계는 방사형 절제연의 상태가 병리학적으로 음성인지 또는 양성인지를 확인하는 것으로, 병리학적 절제연 음성은 현미경 검경에서 절제연으로부터 1mm 이내의 거리에서 종양세포가 관찰되지 않는 상태를 의미할 수 있고, 병리학적 절제연 양성은 절제연으로부터 1mm 이내의 거리에서 종양세포가 관찰이 되는 상태를 의미할 수 있다.
- [0056] 본 발명에 따른 췌장암 환자의 재발 예측방법은 병리학적 절제연 상태와 분자적 절제연 상태를 모두 고려한 병리학적 및 분자적 혼합 절제연 평가방법으로 적용될 수 있으며, 도 10에 나타나 바와 같이, 병리학적 및 분자적 절제연 상태 중 하나 이상이 양성인 환자는 병리학적 및 분자적 절제연 상태가 모두 음성인 환자보다 유의적으로 더 짧은 무재발생존을 나타냄을 확인하였다.
- [0057] 화학요법 또는 방사선요법 상태에 따른 재발 예측의 경우, 도 11B에 나타난 바와 같이 수술 후 화학요법을 받은 환자에서 병리학적 및 분자적 절제연 상태 중 하나 이상이 양성인 환자는 병리학적 및 분자적 절제연 상태가 모두 음성인 환자보다 더 짧은 무재발생존을 나타냄을 확인하였고, 도 11C에 나타난 바와 같이 방사선요법을 받지 않은 환자에서 병리학적 및 분자적 절제연 상태 중 하나 이상이 양성인 환자는 병리학적 및 분자적 절제연 상태가 모두 음성인 환자보다 더 짧은 무재발생존을 나타냄을 확인하였다.
- [0058] 따라서, 본 발명에 따른 췌장암 환자의 재발 예측방법은 분자적 평가 방법으로서 기존의 병리학적 평가 방법과 함께 적용함으로써 환자에 대한 재발 위험도를 정확하게 예측할 수 있다.
- [0059] 이외에도, 종양의 분화도, 종양 크기, T 카테고리, 림프혈관 침윤, 신경주위 침윤 및 림프절 전이로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 임상병리학적 요인, 바람직하게는 종양의 분화도, T 카테고리(예를 들어, 제8판에 따른 T 카테고리), 림프절 전이 상태를 확인하여 췌장암 환자의 재발 위험도를 예측할 수 있다.
- [0060] 이전 연구들에서, 췌장암의 불완전 절제율은 17-85%로 다양했다(Ethun CG, Kooby DA. The importance of surgical margins in pancreatic cancer. *J Surg Oncol*. 2016;113:283-288). 불완전 절제율이 넓은 변이를 보이는 이유는 절제연 양성에 대한 다양한 정의에 기인할 수도 있다. 일부 그룹은 암세포가 정확하게 절제연에 존재하는 경우(절제연으로부터 0 mm 떨어짐)를 절제연을 양성인 것으로 간주하지만, 다른 그룹은 절제연의 1 mm 이내에 암세포가 존재하는 경우 절제연을 양성인 것으로 간주한다. 일부 이전 연구들은 양성 절제연 상태가 더 불량한 환자 생존 결과와 관련이 있다고 보고한 반면(Verbeke C, Leitch D, Menon K, et al. Redefining the R1 resection in pancreatic cancer. *Br J Surg*. 2006;93:1232-1237; Raut CP, Tseng JF, Sun CC, et al. Impact of resection status on pattern of failure and survival after pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma. *Ann Surg*. 2007;246:52-60; Chang DK, Johns AL, Merrett ND, et al. Margin clearance and outcome in resected pancreatic cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27:2855-2862; Gnerlich JL, Luka SR, Deshpande AD, et al. Microscopic margins and patterns of treatment failure in resected pancreatic adenocarcinoma. *Arch Surg*. 2012;147:753-760; Jamieson NB, Foulis AK, Oien KA, et al. Positive mobilization margins alone do not influence survival following pancreatico-duodenectomy for

pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg.* 2010;251:1003-1010; Sergeant G, Ectors N, Van Steenberg W, et al. Patterns of recurrence after curative resection of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Eur J Surg Oncol.* 2009;35:600-604), 다른 연구들에서는 이러한 상태에 따른 무재발생존의 차이에 유의성이 없음을 보고한 바 있다(Esposito I, Kleeff J, Bergmann F, et al. Most pancreatic cancer resections are R1 resections. *Ann Surg Oncol.* 2008;15:1651-1660; Westgaard A, Tafjord S, Farstad IN, et al. Resectable adenocarcinomas in the pancreatic head: the retroperitoneal resection margin is an independent prognostic factor. *BMC Cancer.* 2008;8:5; Sugiura T, Uesaka K, Mihara K, et al. Margin status, recurrence pattern, and prognosis after resection of pancreatic cancer. *Surgery.* 2013;154:1078-1086). 이러한 불일치된 결과는 절제연의 불완전한 병리학적 평가로 인한 것일 수 있으며, 이는 절제연 상태와 재발 및 생존 기간의 관계에 대해 일관성 없는 결과를 초래할 수 있다. 잔여 질환의 국소적 재발에 대한 타당한 설명은 절제연 상태와 관계없이 암세포가 신경주위부를 침윤하거나 림프혈관 침윤에 의하여 외과적 절제술을 받은 부위를 지나 퍼졌기 때문이라고 할 수 있다.

[0061]

2 가지의 체장암을 대상으로 한 연구를 포함하여(표 1), 다양한 종양의 외과적 절제연 상태를 평가하기 위해 다양한 분자적 기술이 사용되어 왔다(33-40)(Kim J, Reber HA, Dry SM, et al. Unfavourable prognosis associated with K-ras gene mutation in pancreatic cancer surgical margins. *Gut.* 2006;55:1598-1605; Ohigashi H, Ishikawa O, Sasaki Y, et al. K-ras point mutation in the nerve plexuses around the superior mesenteric artery in resectable adenocarcinoma of the pancreatic head: distribution pattern and related factors. *Arch Surg.* 2000;135:1450-1455; Okulczyk B, Kovalchuk O, Piotrowski Z, et al. Clinical usefulness of K-RAS mutation detection in colorectal cancer and in surgical margins of the colon. *Rocz Akad Med Białymst.* 2004;49 Suppl 1:52-4; Holdhoff M, Schmidt K, Diehl F, et al. Detection of tumor DNA at the margins of colorectal cancer liver metastasis. *Clin Cancer Res.* 2011;17:3551-3557; Kokudo N, Miki Y, Sugai S, et al. Genetic and histological assessment of surgical margins in resected liver metastases from colorectal carcinoma: minimum surgical margins for successful resection. *Arch Surg.* 2002;137:833-840; Vatan O, Bilaloglu R, Tunca B, et al. Low frequency of p53 and k-ras codon 12 mutations in non-small cell lung carcinoma (NSCLC) tumors and surgical margins. *Tumori.* 2007;93:473; Jassem J, Jassem E, Jakobkiewicz-Banecka J, et al. P53 and K-ras mutations are frequent events in microscopically negative surgical margins from patients with non-small cell lung carcinoma. *Cancer.* 2004;100:1951-1960; Masasyesva BG, Tong BC, Brock MV, et al. Molecular margin analysis predicts local recurrence after sublobar resection of lung cancer. *Int J Cancer.* 2005;113:1022-1025). Kim과 그의 동료들은 70 케이스의 완전 절제술에서 정량적 실시간 PCR로 체장 횡단면 또는 복막의 외과적 절제연의 KRAS 유전자 돌연변이 분석을 수행하였다(Kim J, Reber HA, Dry SM, et al. Unfavourable prognosis associated with K-ras gene mutation in pancreatic cancer surgical margins. *Gut.* 2006;55:1598-1605). 그들은 절제연에서 KRAS 유전자의 돌연변이를 갖는 환자와 야생형 KRAS를 갖는 환자 사이에서 통계적으로 유의한 전체 생존율의 차이를 관찰하였다(평균 생존, 15 및 55개월). 본 발명은 기존 연구들과 몇 가지 차이를 갖는다. 첫 번째로, 기존 연구들은 불완전 절제술의 경우를 제외하였으나, 본 발명에서는 불완전 절제술을 받은 증례도 포함시켰다. 두 번째로, 기존 연구는 횡단면 또는 복막 절제연을 평가한 반면, 본 발명에서는 횡단면 절제연을 대상에서 제외하여, 암세포 대신 체장상피내종양(PanIN)에서 검출될 수 있는 KRAS 유전자 돌연변이에 의한 위양성의 가능성을 차단하였다. Ohigashi 등은 상장간막동맥 조직 주위의 암 침윤 상태를 결정하기 위한 통상적인 조직학적 평가 방법과 KRAS 유전자 돌연변이 검정을 비교하였고, KRAS 유전자 돌연변이 검정이 상장간막동맥 조직 주위의 암 침윤을 보다 민감하게 검출하였다(Ohigashi H, Ishikawa O, Sasaki Y, et al. K-ras point mutation in the nerve plexuses around the superior mesenteric artery in resectable adenocarcinoma of the pancreatic head: distribution pattern and related factors. *Arch Surg.* 2000;135:1450-1455). 다른 연구에서 외과적 절제연에 대한 최적의 간격을 결정하기 위해 간으로 전이된 대장암의 간질 절제연에서 KRAS 유전자 돌연변이를 검출하였다(Holdhoff M, Schmidt K, Diehl F, et al. Detection of tumor DNA at the margins of colorectal cancer liver metastasis. *Clin Cancer Res.* 2011;17:3551-3557; Kokudo N, Miki Y, Sugai S, et al. Genetic and histological assessment of surgical margins in resected liver metastases from colorectal carcinoma: minimum surgical margins for successful resection. *Arch Surg.* 2002;137:833-840). Masasyesva 등은 형광 캡 리가아제 PCR로 폐 부분 절제 표본의 외과적 절제연에서 KRAS 유전자 코돈 12를 평가하였고, 폐 절제연에서 KRAS 유전자 돌연변이를 갖는 환자가 야생형 KRAS를 갖는 환자보다 더 빈번한 재발을 보이는 경향이 있음을 확인하였다(Masasyesva BG, Tong BC, Brock MV, et al. Molecular margin analysis predicts local recurrence

after sublobar resection of lung cancer. *Int J Cancer*. 2005;113:1022-1025). 본 발명에서는 최초로 먼봉채 취법을 이용하여 수집한 세포로 외과적 절제술을 받은 췌장암 환자의 유문보존췌십이지장절제 조직의 방사형 절제연을 평가하였다.

표 1

췌장 및 다른 기관에서 분자적 기술을 이용한 절제연 평가 요약

저자(연도)	기관	검출 방법	돌연변이 빈도	테스트 유전자	참조번호
Kim et al (2006)	췌장	정량적 실시간 PCR	37/70 (53%)	KRAS	[33]
Ohigashi et al (2000)	췌장 (peri-SMA 조직)	돌연변이 대립유전자-특이적 PCR	9/24 (37.5%)	KRAS	[34]
Okulczyk et al (1995)	대장	PCR-RFLP 기술	1/27 (4%)	KRAS	[35]
Holdhoff et al (2011)	간	BEAMing	12/88 (14%)	APC, KRAS, PIK3CA, TP53	[36]
Kokudo et al (2002)	간	돌연변이 대립유전자-특이적 증폭 PCR	4/199 (2%)	KRAS, TP53	[37]
Vatan et al (2007)	폐	돌연변이 유발 PCR-제한 단편 길이 다형성	2/34 (6%)	KRAS, TP53	[38]
Jassem et al (2004)	폐	생어 염기서열 분석	22/118 (19%)	KRAS, TP53	[39]
Masasyesva et al (2005)	폐	형광 겔 리가아제 PCR	13/44 (30%)	KRAS	[40]

생어 염기서열분석, 피로시퀀싱(pyrosequencing), 용융곡선분석 및 드롭렛 PCR을 비롯하여, KRAS 유전자 돌연변이를 검출하기 위한 여러 가지 방법이 있다. 생어 염기서열분석의 검출 한계는 15-20%이고, 피로시퀀싱은 5%, 용융곡선분석은 10%이다 (Tsiatis AC, Norris-Kirby A, Rich RG, et al. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *J Mol Diagn* 2010;12:425-432). FID 드롭렛 디지털 PCR은 KRAS 유전자 돌연변이를 검출하기 위한 가장 민감한 방법으로, 10,000 개의 세포 중 1개의 세포에서 발생하는 돌연변이를 검출할 수 있다 (Huggett JF, Cowen S, Foy CA. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clin Chem*. 2015;61:79-88; Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Pro Nat Acad Sci USA*. 1999;96:9236-9241). 이 방법은 폐암 (Guibert N, Pradines A, Farella M, et al. Monitoring KRAS mutations in circulating DNA and tumor cells using digital droplet PCR during treatment of KRAS-mutated lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*. 2016;100:1-4), 대장암 (Olmedillas Lopez S, Garcia-Olmo DC, Garcia-Arranz M, et al. KRAS G12V Mutation Detection by Droplet Digital PCR in Circulating Cell-Free DNA of Colorectal Cancer Patients. *Int J Mol Sci*. 2016;17:484) 및 췌장암 (Cheng H, Liu C, Jiang J, et al. Analysis of ctDNA to predict prognosis and monitor treatment responses in metastatic pancreatic cancer patients. *Int J Cancer*. 2017;140:2344-2350) 환자로부터 순환하는 종양 DNA에서의 KRAS 유전자 돌연변이와 같은 극히 드문 돌연변이를 검출하고 정확하게 정량하는데 널리 사용되고 있다. 높은 민감도로 인해, 위양성 결과의 가능성이 증가된다. 본 발명에서는, 돌연변이 KRAS의 정도는 76 케이스(94%)에서 유문보존췌십이지장절제술 표본의 방사형 절제연에서 검출되었다. 췌장암 환자의 외과 절제술 후 높은 재발률은 본 발명에서 방사형 절제연에 돌연변이 KRAS의 다양한 정도에 따르며, 대부분의 외과적 절제술을 받은 췌장암 환자는 재발의 가능성이 있음을 시사한다. 따라서, 위양성 세포의 가능성을 줄이기 위해 돌연변이 KRAS에 대한 컷오프를 설정하는 것이 중요하다 (Hunter ME, Dorazio RM, Butterfield JS, et al. Detection limits of quantitative and digital PCR assays and their influence in presence-absence surveys of environmental DNA. *Mol Ecol Resour*. 2017;17:221-229; Milbury CA, Zhong Q, Lin J, et al. Determining lower limits of detection of digital PCR assays for cancer-related gene mutations. *Biomol Detect Quantif*. 2014;1:8-22). 평균값 (Zonta E, Garlan F, Picuchet N, et al. Multiplex Detection of Rare Mutations by Picoliter Droplet Based Digital PCR: Sensitivity and Specificity Considerations. *PLoS One*. 2016;11:e0159094) 또는 정상 조직과 같은 3개

이상의 야생형 샘플 또는 주형이 없는 3개 이상의 대조군으로 평균+3SD 값을 이용하여 돌연변이 한계값을 결정하는 다양한 방법이 있다 (Denis JA, Patroni A, Guillerme E, et al. Droplet digital PCR of circulating tumor cells from colorectal cancer patients can predict KRAS mutations before surgery. *Mol Oncol.* 2016;10:1221-31). 본 발명에서, 3개의 독립적인 정상 채장 실질 조직과 주형이 없는 대조군의 평균+3SD 값은 7개의 KRAS 유전자 돌연변이 한계값 각각에 대한 위양성 비율을 감소시키기 위해 사용하였다.

[0064] 극초민감도의 드롭렛 디지털 PCR을 이용하여, 4.19%의 KRAS 유전자 돌연변이 비율 컷오프를 갖는 분자적 절제연 상태를 바탕으로, 외과적 절제술을 받은 채장암 환자를 구별할 수 있다. 전체 그룹을 테스트했는지 또는 서브그룹을 테스트했는지에 관계없이 분자적 절제연이 양성인 환자는 절제연이 음성인 환자보다 통계적으로 유의하게 더 나쁜 무재발생존을 나타냈다. 분자적 절제연 상태는, 특히 수술을 받은 환자가 추가적인 화학요법 또는 방사선 요법을 받지 않은 경우 무재발생존을 구별할 수 있다. 대조적으로, 병리학적 절제연 상태는, 환자가 화학요법을 받았는지 또는 방사선요법을 받았는지에 관계없이 무재발생존율의 차이를 보이지 않았다.

[0065] 종양 분화, pT 카테고리 및 림프절 전이외에도, 분자적 절제연 상태는 외과 절제술을 받은 채장암 환자에서 무재발생존에 대한 재발 예측 인자로 사용될 수 있다. 따라서, 방사형 절제연의 KRAS 유전자의 돌연변이 분석은, 특히 수술 후 추가적인 화학요법 또는 방사선 요법을 받지 않은 환자에서 통상적인 병리학적 방사형 절제연 평가와 함께 또는 단독으로 사용하여 외과 절제술을 받은 채장암 환자에게 대한 추가적인 재발 위험도에 대한 정보를 제공할 수 있다.

[0066] 본 발명자들은 분자적 절제연 평가가 현재 병리학적 현미경 검정법을 이용한 방사형 절제연의 평가보다 민감할 것으로 예상하였다. 그러나, 병리학적 및 분자적 방사형 절제연 상태 사이에서 연관성은 관찰되지 않았다. 26명의 환자는 병리학적 절제연 양성이지만, 분자적 절제연 음성이었다. 이러한 위음성 케이스는 방사형 절제연의 부적절한 마찰(rubbing)과 같은 샘플링의 오류로 설명될 수 있다. 4개의 장액성 낭포 신생물과 4개의 신경내분비 종양을 포함하는 8개의 테스트된 비선암종 케이스 모두에서 KRAS 유전자의 돌연변이가 검출되지 않았기 때문에, 드롭렛 디지털 PCR로부터의 위양성 판단의 가능성은 더 낮았다 (데이터 미도시).

[0067] 병리학적 절제연 자체가 외과적 절제술을 받은 환자의 무재발생존을 완벽하게 구분하지 못했기 때문에, 방사형 및 병리학적 절제연 상태와 추가적으로 분석된 다른 임상병리학적 인자 및 무재발생존과의 상관관계를 조합하였다. 본 발명에서는 혼합 절제연 양성인 증례가 혼합 절제연 음성인 증례 보다 더 짧은 무재발생존을 나타냄을 확인하였다. 이러한 접근법은 다변량 분석으로 입증한 바와 같이 독립적인 악화된 예후 인자로 사용될 수 있다.

[0068] 요약하면, 본 발명자들은 외과 절제술을 받은 채장암 환자의 방사형 절제연에서 KRAS 유전자 돌연변이의 상태를 극초민감도 드롭렛 디지털 PCR로 평가하였고, 단변량 및 다변량 분석 모두에서, 양성 병리학적 및 분자적 혼합 절제연이 특히 수술 이후 추가적인 화학요법 또는 방사선요법을 받지 않은 환자에서 통계적으로 유의하게 더 짧은 무재발생존율을 보이는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로, KRAS 유전자 돌연변이 분석을 이용한 분자적 절제연 상태의 평가를 드롭렛 디지털 PCR 단독 또는 통상적인 병리학적 절제연 평가와 병용하면 외과 절제술을 받은 채장암 환자의 재발 가능성에 대해 추가의 정보를 제공할 수 있다.

[0069] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예 1

[0070] 1-1. 표본 수집

[0071] 생명윤리위원회(institutional review board)의 승인(2016-0550)을 받은 후, 2016년부터 2017년까지 서울 아산 병원 외과의 채장암(채관선암) 환자로부터 외과적으로 절제된 유문보존채십이지장 표본 81개를 수집하였다. 신 보조 화학방사선요법(neoadjuvant chemoradiation therapy)의 경우, 본 발명에 포함되지 않았다. 절제된 표본의 방사형 절제연에 대한 세심한 육안검사는 병리학과 육안검사실에서 수행되었다.

[0072] 연구 집단의 임상병리학적 특성을 표 2에 요약하였다. 평균 환자 나이는 62.2세(표준 편차 [SD], 9.3)였고, 남성 대 여성의 비율은 1.7이었다. 평균 종양 크기는 3.7(SD, 2.3)cm였다. 대부분의 경우 중등도 분화도(29 증례, 73%)로 분류되었고, 림프혈관 침윤(56 증례, 69%) 및 신경주변부 침윤(72 증례, 89%)을 나타냈다. 대부분의 종양은 AJCC TNM 암병기 시스템의 제8판에 따른 T2 카테고리였다. 통상적인 병리학적 절제연 평가에 의해, 35명의 환자 (43%)의 방사형 절제연에서 불완전 절제(종양세포의 관찰)를 나타냈다. 50명의 환자는 수술 후 추가적인

화학요법을 받았고 14명의 환자는 수술 후 추가적인 방사선 요법을 받았다. 13명의 환자는 화학요법과 방사선 요법을 모두 받았다.

표 2

연구 환자의 임상병리학적 특성

특성	N (%)
나이, y	
≤60	38 (47)
>60	43 (53)
성별	
남성	51 (63)
여성	30 (37)
분화도	
저도	10 (12)
중등도	29 (73)
고도	12 (15)
크기	
≤2 cm	7 (9)
>2 cm	74 (91)
림프혈관 침윤	
없음	25 (31)
있음	56 (69)
신경주변부 침윤	
없음	9 (11)
있음	72 (89)
병리학적 방사형 절제연	
음성	46 (57)
양성	35 (43)
T 카테고리	
T1	8 (10)
T2	51 (63)
T3	21 (26)
T4	1 (1)
림프절 전이	
있음	22 (27)
없음	59 (73)

상장간막동맥 및 상장간막정맥 굴곡 절제연 영역을 포함하는 방사형 절제연을 와트만 FTA 면봉(GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK)으로 문지른 후, 70% 에탄올이 들어있는 튜브에 넣고 흔들어 면봉에 붙어 있는 세포를 에탄올이 들어있는 튜브에 수집되도록 하였다.

1-2. DNA 추출

절제연에서 채취한 세포가 들어있는 70% 에탄올을 원심분리(13,000 rpm, 5분)를 통하여 세포만 수거하고 이를 1 × PBS로 3회 세척하였다. 단백분해효소 K에 12시간 이상 반응시킨 후 QIAamp DNA Micro kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 유전체 DNA를 추출하였다. DNA 품질은 Nanodrop2000 (Thermo Scientific, Wilmington, Del.)을 사용하여 260/280 흡광도 비율을 측정함으로써 평가되었다.

실시예 2

방사형 절제연에서의 KRAS 유전자 돌연변이의 검출

드롭렛 디지털 PCR을 수행하여 코돈 12 및 13에서 7개의 상이한 KRAS 유전자 돌연변이 (G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V 및 G13D)를 검출하였다. DNA 드롭렛을 생성하기 위해, 5ng DNA, HEX(야생형; Bio-Rad, Hercules, Calif.) 또는 FAM(돌연변이; Bio-Rad)으로 형광 표지된 20X KRAS 프로브, 2X 드롭렛 디지털 PCR 수

퍼믹스 버퍼와 DG 오일을 드롭렛 생성기(Bio-Rad)에 로딩하였다. 생성된 DNA 드롭렛을 95 °C에서 10분 동안 반응시킨 후, 드롭렛 안에 들어있는 DNA에서 KRAS 표적 영역을 94°C, 30초; 55°C, 1분으로 40 사이클로 증폭하였다. 모든 PCR 단계에서, C-1000 열순환기(Bio-Rad)를 이용한 온도 상승율(ramp increment)은 2.5°C/s로 일정하게 유지시켰다. 드롭렛 안의 돌연변이 또는 야생형 KRAS 양은 QX 드롭렛 판독기 (Bio-Rad)를 통하여 프로브의 형광 강도로서 검출되었다. 드롭렛 디지털 PCR 데이터는 QuantaSoft v.1.6.6 (Bio-Rad)로 분석하였다.

[0079] 본 실시예에서 사용된 KRAS 유전자 돌연변이 프로브와 KRAS 야생형 프로브(Bio-Rad)는 다음과 같다:

[0080] - KRAS 유전자 돌연변이 프로브(Bio-Rad):

[0081] c.35G>T (MT for G12V; cat no. dHsaCP2500592), c.35G>A (MT for G12D; cat no. dHsaCP2500596), c.35G>C (MT for G12A; cat no. dHsaCP2500586), c.34G>A (MT for G12S; cat no. dHsaCP2500588), c.34G>C (MT for G12R; cat no. dHsaCP2500590), c.34G>T (MT for G12C; cat no. dHsaCP2500584), c.38G>A (MT for G13D; cat no. dHsaCP2500598).

[0082] - KRAS 야생형 프로브(Bio-Rad):

[0083] c.35G>T (WT for G12V; cat no. dHsaCP2500593), c.35G>A (WT for G12D; cat no. dHsaCP2000002), c.35G>C (WT for G12A; cat no. dHsaCP2000004), c.34G>A (WT for G12S; cat no. dHsaCP2000012), c.34G>C (WT for G12R; cat no. dHsaCP2000010), c.34G>T (WT for G12C; cat no. dHsaCP2000008), c.38G>A (WT for G13D; cat no. dHsaCP2000014).

[0084] 드롭렛 디지털 PCR에 의한 KRAS 유전자 돌연변이 결과는 도 2 및 도 3에 나타난 바와 같다. G12V 및 G12D KRAS 유전자 돌연변이는 81명의 환자에서 빈번하게 발생하였다. 종류별 KRAS 유전자 돌연변이 빈도는 다음과 같다: G12V는 59% (48 케이스), G12D는 49% (40 케이스), G12S는 44% (36 케이스), G12C는 30% (24 케이스), G12R은 25% (20 케이스), G13D는 14% (11 케이스), G12A는 10% (8 케이스). 2개 이상의 KRAS 유전자 돌연변이는 61 케이스, 단일 KRAS 유전자 돌연변이는 15 케이스, 그리고 나머지 5 케이스는 야생형 KRAS를 나타냈다. G12D는 가장 높은 돌연변이 비율을 나타냈다. 방사형 절제연에서 가장 높은 비율에서 가장 낮은 비율의 KRAS 유전자 돌연변이(평균 돌연변이 비율, SD, %)는 순서대로 다음과 같다: G12D (1.76, 3.66), G12V (0.27, 0.71), G13D (0.23, 1.97), G12R (0.18, 0.53), G12C (0.18, 0.51), G12S (0.09, 0.40) 및 G12A (0.01, 0.07).

[0085] 절제연에 대한 7개의 KRAS 유전자 돌연변이 비율의 합계를 방사형 절제연의 KRAS 유전자 돌연변이의 결정값으로 계산하였다. KRAS 유전자 돌연변이의 결정값 평균은 2.71% (SD, 4.59)였고, 0 내지 26.12%의 범위였다 (도 4).

실시예 3

[0086] 검출한계 평가

[0087] 위양성 ‘돌연변이’ 또는 ‘야생형’ 드롭렛의 비율을 7개의 KRAS 유전자 돌연변이에 대해 주형이 없는 3개의 대조군을 이용하여 평가하였다. 데이터에 대한 오류 반영의 비율을 최소화하기 위해, 가장 높은 위양성 값을 제외함으로써 방사형 절제연과 정상 채장 샘플의 형광 강도 값을 수정했다. 그 다음, 3개의 독립적인 정상 채장 샘플(야생형 대조군)의 KRAS 유전자 돌연변이 비율을, KRAS 유전자 돌연변이 비율의 ‘평균 + 3SD’ 로 돌연변이 한계치를 정의하여 계산하였다. 도 5에 나타난 바와 같이 돌연변이 한계치는 G12D에 대해 0.16%였고, 나머지 6개의 KRAS 유전자 돌연변이에 대해서는 0%였다.

실시예 4

[0088] KRAS 유전자 돌연변이에 대한 컷오프 포인트(cutoff point) 평가

[0089] 방사형 절제연에서 KRAS 유전자 돌연변이 비율에 따른 환자의 무재발생존을 구별하기 위한 컷오프 포인트를 결정하기 위해, 환자의 생존율 데이터를 분류하고 방사형 절제연에서 7개의 KRAS 유전자 돌연변이 비율 합계에 따라 비교하였다. 상당한 생존율 차이가 관찰될 때까지 로그 순위 테스트(log-rank test)를 이용하여 n의 KRAS 유전자 돌연변이 합을 갖는 경우와 n+1 또는 그 이상을 갖는 경우를 비교하였다.

[0090] 구체적으로, 컷오프 포인트를 결정하기 위해, 환자의 무재발생존 시간을 7개의 KRAS 유전자 돌연변이의 합계 비율에 대해 플롯팅하였다(도 6A). 환자 생존율은 4.19%의 KRAS 유전자 돌연변이 비율에서 급격하게 감소했다. KRAS 유전자 돌연변이 비율을 바탕으로 한 예후 그룹을 호가인하기 위해, 컷오프 포인트를 재귀분할(recursive partitioning)을 이용하여 수득하였다. 로그 순위 통계가 3.84보다 큰 분할은 0.05 미만의 P값에 해당한다. 도

6B는 합계 KRAS 유전자 돌연변이 비율에 대한 모든 가능한 컷오프 포인트 로그 순위 통계를 보여준다. 4.19% KRAS 유전자 돌연변이 비율에서 그리고 이에 근접한 분할(4.19% 미만의 분할 그리고 4.19% 이상의 분할)은 가장 큰 로그 순위 통계를 생성하였고, 따라서 가장 작은 P값을 나타냈다($P < 0.001$). 따라서, 4.19%를 컷오프 포인트로 선택하였다. 유사한 통계 강도의 P값을 갖는 다른 컷오프 포인트는 없었다.

컷오프 (4.19%) 이상의 합계 KRAS 유전자 돌연변이 비율을 갖는 환자를 분자적 절제연 양성으로 정의하였고, 컷오프 포인트 미만을 갖는 환자를 분자적 절제연 음성으로 정의하였다.

실시예 5

5-1. 분자적 및 병리학적 절제연과 다른 임상병리학적 요인들의 연관성

병리학적 또는 분자적 절제연과 임상병리학적 요인 사이의 연관성은 표 3에 요약하였다. 양성 병리학적 방사형 절제연은 림프혈관 침윤 ($P=0.02$) 및 신경주변부 침윤($P=0.02$) 침윤과 연관이 있었다. 그러나, 양성 분자적 방사형 절제연은 임상병리학적 요인과 연관이 없었다.

표 3

병리학적, 분자적 및 혼합 절제연과 다른 임상병리학적 요인 사이의 연관성

특성	병리학적 절제연		P	분자적 절제연		P	혼합 절제연		P
	음성 (%)	양성 (%)		음성 (%)	양성 (%)		음성 (%)	양성 (%)	
성별			0.26			0.85			0.35
여성	14 (47)	16 (53)		23 (77)	7 (23)		10 (33)	20 (67)	
남성	29 (57)	22 (43)		40 (78)	11 (21)		23 (45)	28 (55)	
나이, y			0.54			0.15			0.66
≤60	21 (54)	18 (46)		33 (85)	6 (15)		17 (44)	22 (56)	
>60	22 (52)	20 (48)		30 (71)	12 (29)		16 (38)	26 (62)	
분화도			0.19			0.91			0.38
저도	9 (90)	1 (10)		8 (80)	2 (20)		7 (70)	3 (30)	
중등도	27 (45)	33 (55)		46 (77)	14 (23)		21 (35)	39 (65)	
고도	7 (64)	4 (36)		9 (81)	2 (18)		5 (45)	6 (55)	
종양 크기			0.57			0.28			1
≤2 cm	4 (50)	4 (50)		5 (63)	3 (37)		3 (38)	5 (62)	
>2 cm	39 (53)	34 (47)		58 (79)	15 (21)		30 (41)	43 (59)	
T 카테고리			0.28			0.51			0.45
T1-T2	33 (56)	26 (44)		47 (80)	12 (20)		26 (44)	33 (56)	
T3-T4	10 (45)	12 (55)		16 (73)	6 (27)		7 (32)	15 (68)	
림프혈관 침윤			0.02			0.08			0.22
없음	18 (72)	7 (28)		16 (64)	9 (36)		13 (52)	12 (48)	
있음	25 (45)	31 (55)		47 (84)	9 (16)		20 (36)	36 (64)	
신경주변부 침윤			0.02			0.19			0.48
없음	8 (89)	1 (11)		5 (56)	4 (44)		5 (56)	4 (44)	
있음	35 (49)	37 (51)		58 (81)	14 (19)		28 (39)	44 (61)	
림프절 전이			0.08			0.07			0.32
없음	15 (68)	7 (32)		14 (64)	8 (36)		11 (50)	11 (50)	
있음	28 (47)	31 (53)		49 (83)	10 (17)		22 (37)	37 (63)	

굵은 글자는 $P < 0.05$ 를 나타낸다.

5-2. 분자적 및 병리학적 절제연에 기초한 무재발생존

음성 분자적 절제연을 갖는 환자에서 평균 무재발생존기간은 12개월인 반면, 양성 분자적 절제연을 갖는 환자에서 평균 무재발생존기간은 7개월이었다 (도 7A, 로그 순위 테스트, $P=0.008$). 대조적으로, 병리학적 절제연 양성성은 통계적 유의성을 나타내지 않았다 (도 7B, 평균 생존: 병리학적 절제연, 17개월; 로그 순위 테스트,

P=0.08).

[0098] 5-3. 화학요법 또는 방사선 요법 상태의 서브그룹에서 분자적 절제연을 기초로 한 무재발생존

[0099] 본 발명자들은 화학요법 및/또는 방사선 요법에 따른 추가의 서브그룹 분석을 수행하였다. 50명의 환자가 수술 후 추가적인 화학요법을 받았고, 14명의 환자가 수술 후 추가적인 방사선 요법을 받았으며, 13명의 환자는 추가적인 화학요법과 방사선 요법을 동시에 받았다. 먼저, 추가적인 화학요법을 받지 않은 서브그룹에서, 양성 분자적 절제연을 갖는 환자(평균, 7개월)는 음성 분자적 절제연을 갖는 환자(14개월, 로그 순위 테스트, $P<0.001$, 도 8A)보다 유의적으로 더 짧은 무재발생존을 나타냈다. 그러나, 추가적인 화학요법을 받은 환자에서의 분자적 절제연 상태에 대한 환자의 무재발생존율의 차이는 없었다 (양성 분자 절제연, 10개월; 음성 분자적 절제연, 15개월; $P=0.392$, 도 8B). 둘째로, 수술 후 추가적인 방사선 요법을 받지 않은 서브그룹에서, 양성 분자적 절제연을 갖는 환자(7개월)는 음성 분자적 절제연을 갖는 환자(15개월, $P<0.001$, 도 8C)보다 유의적으로 더 짧은 무재발생존을 나타냈다. 그러나, 추가적인 방사선 요법을 받은 환자에서 분자적 절제연 상태에 대한 무재발생존율의 차이는 없었다 (양성 분자적 절제연, 8개월; 음성 분자적 절제연, 14개월; $P=0.983$, 도 8D).

[0100] 5-4. 화학요법 또는 방사선 요법 상태의 서브그룹에서 병리학적 절제연에 기초한 무재발생존

[0101] 수술 후 추가적인 화학요법을 받은 환자에서 병리학적 절제연 상태에 대한 무재발생존율의 차이는 없었다 (화학요법을 받지 않은 서브그룹, 양성 병리학적 절제연의 평균 생존율, 12개월; 음성 병리학적 절제연, 13개월; 로그 순위 테스트, $P=0.898$, 도 9A; 화학요법을 받은 서브그룹, 양성 병리학적 절제연, 12개월; 음성 병리학적 절제연, 17개월; $P=0.129$, 도 9B). 또한, 수술 후 추가적인 방사선 요법을 받은 환자에서도 병리학적 절제연 상태에 대한 무재발생존율의 차이는 없었다 (방사선 요법을 받지 않은 서브그룹, 양성 병리학적 절제연, 11개월; 음성 병리학적 절제연, 15개월; $P=0.216$, 도 9C; 방사선 요법을 받은 서브그룹, 양성 병리학적 절제연, 12개월; 음성 병리학적 절제연, 17개월; $P=0.220$, 도 9D).

[0102] 5-5. 다른 임상병리학적 요인의 단변량 분석

[0103] 분자적 절제연 상태 이외에도, 종양의 분화도($P=0.01$)는 단변량 분석에서 더 나쁜 결과와 관련이 있었다. 그러나, 다른 임상병리학적 요인은 생존과 유의적인 연관성을 보이지 않았다. 제8판에 따른 T 카테고리($P=0.09$), 림프절 전이($P=0.06$) 및 병리학적 방사형 절제연 상태 ($P=0.08$)는 더 나쁜 무재발생존 경향을 나타냈다(표 4).

표 4

관선암 환자의 단변량 및 다변량 분석

특성	단변량 분석		다변량 분석	
	평균 생존(mo)	P	HR (95% CI)	P
성별		0.40		
여성	17			
남성	12			
나이, y		0.79		
≤ 60	12			
>60	12			
분화도		0.01		0.01
저도	22		1 (-)	
중등도	11		4.56 (1.05-20.1)	
고도	9		8.15 (1.64-40.5)	
종양 크기		0.31		
≤ 2 cm	18			
>2 cm	11			
T 카테고리		0.09		0.03
1 및 2	12		1 (-)	
3 및 4	8		2.22 (1.06-4.64)	
림프혈관 침윤		0.11		
없음	18			
있음	11			
신경주위 침윤		0.61		
없음	17			
있음	11			
병리학적 방사형 절제연		0.08		
음성	17			
양성	9			
림프절 전이		0.06		0.03
없음	26		1 (-)	
있음	11		2.76 (1.1-6.92)	
분자적 방사형 절제연		0.008		0.02
음성	12		1 (-)	
양성	7		2.68 (1.16-6.2)	

[0104]

[0105] 굵은 글자는 P<0.05, HR은 위험비(Hazard Ratio), CI는 신뢰구간을 나타낸다.

[0106] 5-6. 예후에 대한 다변량 분석

[0107] 다변량 분석으로, 고도의 분화도(P=0.01), 더 높은 T 카테고리(P=0.03), 림프절 전이(P=0.03) 및 분자적 방사형 절제연 양성(P=0.02)을 갖는 종양은 외과적 절제술을 받은 췌장암 환자에 대해 더 나쁜 무재발생존을 나타냈다 (표 4).

[0108] 5-7. 혼합 병리학적 및 분자적 절제연 상태

[0109] 임상병리학적 요소를 혼합 병리학적 및 분자적 절제연 상태와 함께 평가하였다. 혼합 절제연 양성 케이스 (병리학적 또는 분자적 절제연-양성 케이스)는 임의의 다른 임상병리학적 요소와 관련이 없었다 (표 3). 그러나, 양성 혼합 절제연 (병리학적 또는 분자적 절제연 양성 케이스)을 갖는 환자는 음성 혼합 절제연 (18개월, P=0.002; 도 10)을 갖는 환자보다 유의적으로 더 짧은 무재발생존 (평균, 9개월)을 나타냈다.

[0110] 5-8. 화학요법 또는 방사선 요법 상태의 서브그룹에서 병리학적 및 분자적 혼합 절제연 상태에 기초한 무재발생존

[0111] 수술 후 추가적인 화학요법 또는 방사선 요법의 유무에 따른 서브그룹 분석을 수행했다. 수술 후 추가적인 화학

요법을 받지 않은 환자에서 혼합 절제연 상태에 따른 평균 무재발생존율의 차이는 없었다 (양성 혼합 절제연의 평균 생존, 11개월; 음성 혼합 절제연, 13개월; 로그 순위 테스트, $P=0.145$, 도 11A). 수술 후 추가적인 화학요법을 받은 서브그룹에서, 양성의 병리학적 및 분자적 혼합 절제연을 갖는 환자 (병리학적 또는 분자적 절제연-양성 케이스, 12개월)는 음성의 병리학적 및 분자적 혼합 절제연을 갖는 환자 (병리학적 및 분자적 절제연 모두 음성 케이스, 17개월, $P=0.037$, 도 11B)보다 통계적으로 유의하게 더 짧은 무재발생존율을 나타냈다.

[0112] 수술 후 추가적인 방사선 요법을 받지 않은 서브그룹에서, 양성의 병리학적 및 분자적 혼합 절제연을 갖는 환자 (병리학적 또는 분자적 절제연 양성 케이스, 10개월)는 음성의 병리학적 및 분자적 혼합 절제연을 갖는 환자 (병리학적 및 분자적 절제연 모두 음성 케이스, 18개월, $P=0.017$, 도 11C) 보다 통계적으로 유의적하게 더 짧은 무재발생존율을 나타냈다. 그러나, 수술 후 추가적인 방사선 요법을 받은 환자에서 혼합 절제연 상태에 기초한 (양성 혼합 절제연, 12개월; 음성 혼합 절제연, 17개월; $P=0.169$, 도 11D), 평균 무재발생존의 차이는 없었다.

[0113] 5-9. 병리학적 및 분자적 혼합 절제연 상태를 이용한 단변량 및 다변량 분석

[0114] 양성의 병리학적 및 분자적 혼합 절제연 (병리학적 또는 분자적 절제연-양성 케이스)이외에도, 고도의 종양 분화도 ($P=0.01$)는 단변량 분석에서 불량한 무재발생존과 관련이 있었다. 그러나, 다른 요소들은 유의적인 생존 차이를 보이지 않았다. 제8판 ($P=0.09$) 및 림프절 전이 ($P=0.06$)에 따른 T 카테고리 절제연 생존 차이를 나타냈다 (표 5). 다변량 분석으로, 고도의 분화도를 갖는 종양 ($P=0.03$), 더 높은 T 카테고리의 종양 ($P=0.05$) 및 양성의 병리학적 및 분자적 혼합 절제연을 갖는 종양 ($P=0.03$)은 외과적 절제술을 받은 직장암 환자에 대해 독립적인 더 나쁜 예후를 보이는 인자였다 (표 5).

표 5

혼합 병리학적 및 분자적 방사형 절제연 상태를 포함하는
단변량 및 다변량 분석

특성	단변량 분석		다변량 분석	
	평균 생존 (mo)	P	HR (95% CI)	P
성별		0.4		
여성	17			
남성	12			
나이, y		0.79		
≤ 60	12			
>60	12			
분화도		0.01		0.03
저도	22		1 (-)	
중등도	11		3.75 (0.85-16.6)	
고도	9		6.86 (1.37-34.3)	
종양 크기		0.31		
≤ 2 cm	18			
>2 cm	11			
T 카테고리		0.09		0.05
1 및 2	12		1 (-)	
3 및 4	8		2.1 (0.99-4.48)	
림프혈관 침윤		0.11		
없음	18			
있음	11			
신경주위 침윤		0.61		
없음	17			
있음	11			
림프절 전이		0.06		0.1
없음	26		1 (-)	
있음	11		2.19 (0.85-5.63)	
혼합 절제연 상태		0.002		0.03
음성*	18		1 (-)	
양성*	9		2.21 (1.08-4.5)	2.21

[0115]

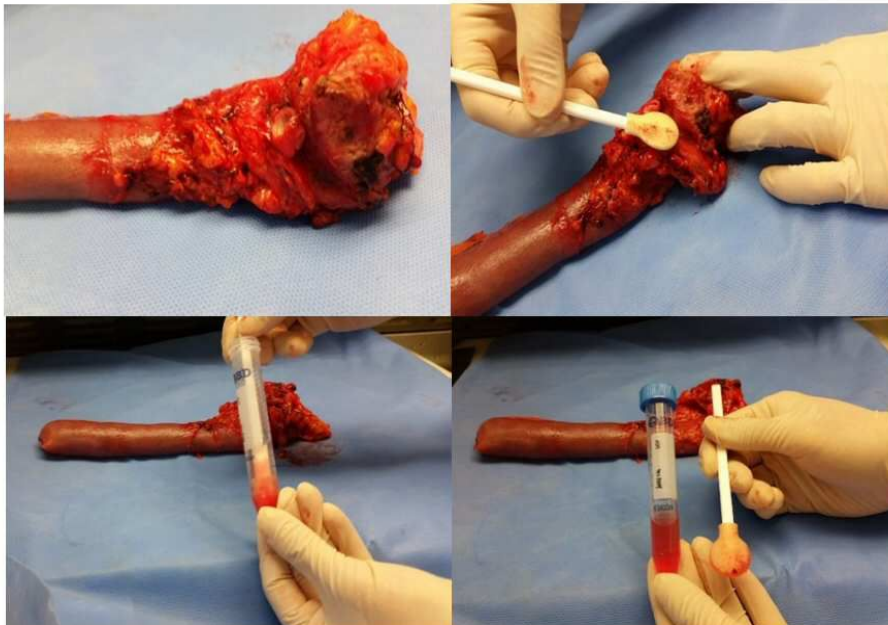
[0116] 굵은 글자는 $P < 0.05$, HR은 위험비(Hazard Ratio), CI는 신뢰구간, 음성*은 병리학적 및 분자적 절제연 모두 음성, 양성*은 병리학적 또는 분자적 절제연 양성을 나타낸다.

[0117] 통계분석

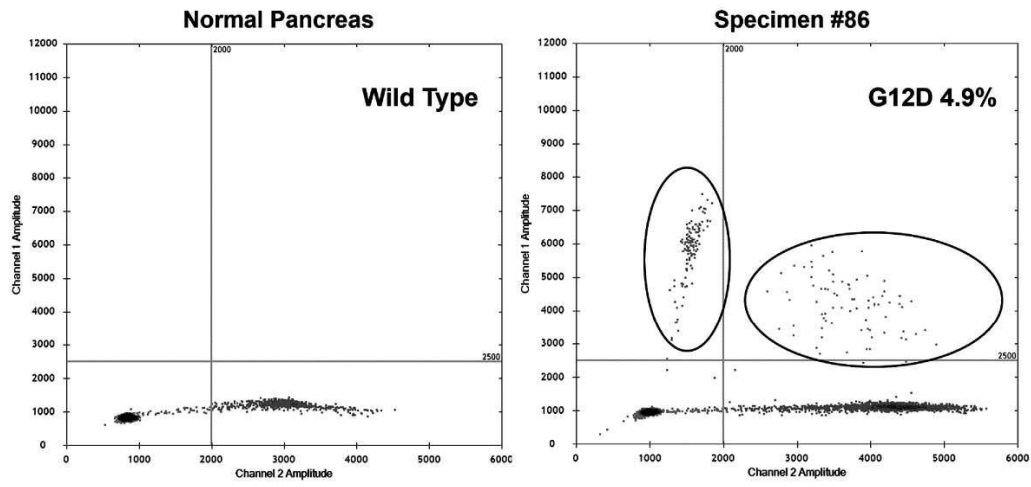
[0118] 절제연 상태를 환자의 성별, 나이, 종양 크기, 분화도, T 카테고리, 림프절 상태, 신경주변부 침윤 및 림프관 전이 및 화학요법 또는 방사선 요법과 같은 임상병리학적 변수와 통계학적으로 비교하였다. 통계분석은 SPSS 통계 20 (IBM, Armonk, N.Y.) 및 R 버전 3.3.1(<http://www.r-project.org>)을 이용하여 수행하였다. 명목형 변수 (categorical variables) 사이의 연관성 분석은 피어슨의 χ^2 테스트(Pearson's χ^2 test)로 수행하였다. 생존율은 카플란-마이어 방법 (Kaplan-Meier method)로 계산하였고, 통계적 유의성은 로그 순위 테스트와 콕스 비례 위험 회귀 모델로 조사하였다. $P < 0.05$ 는 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

도면

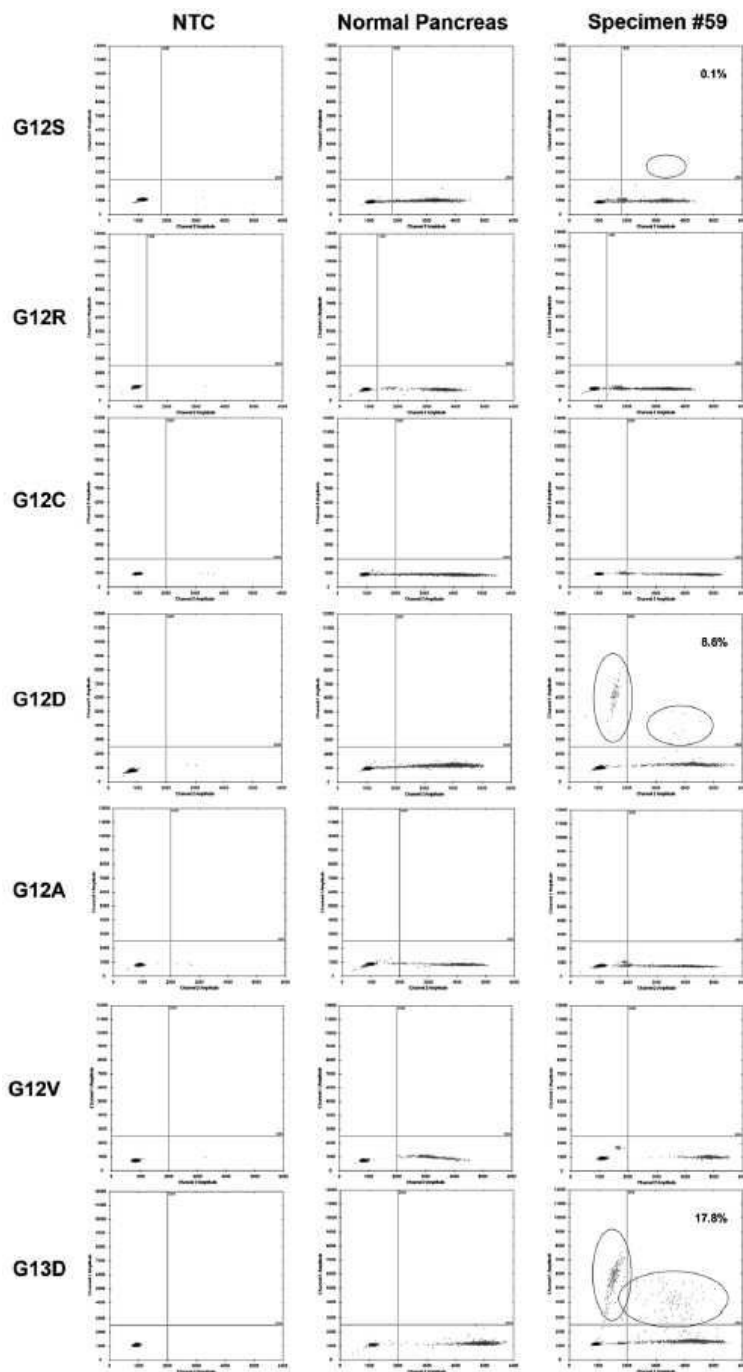
도면1



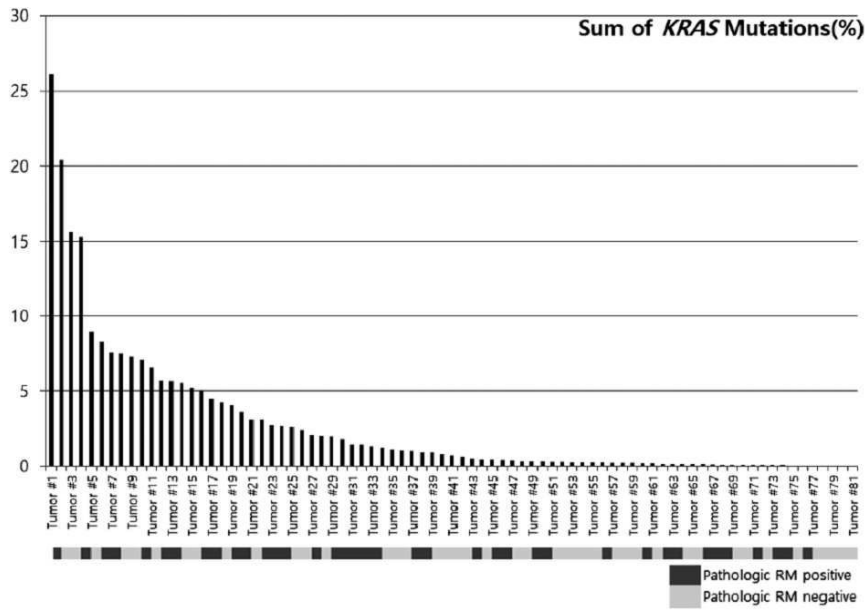
도면2



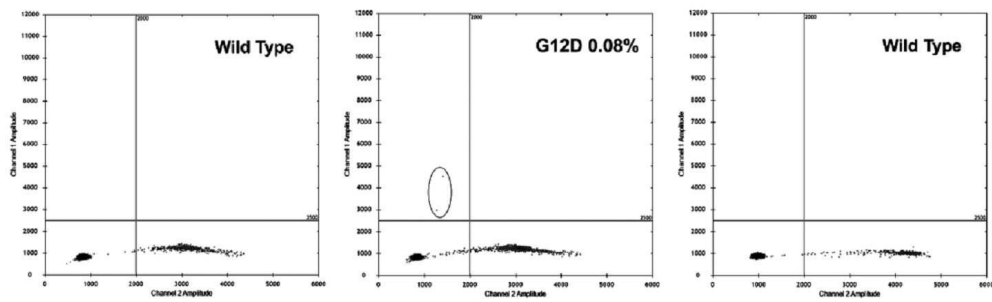
도면3



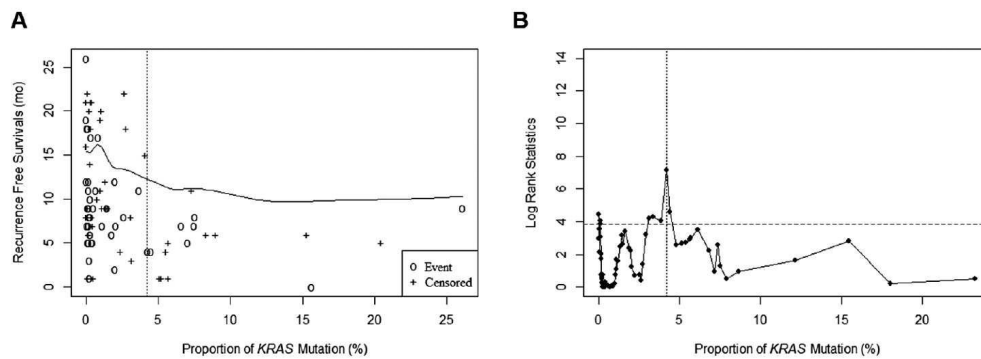
도면4



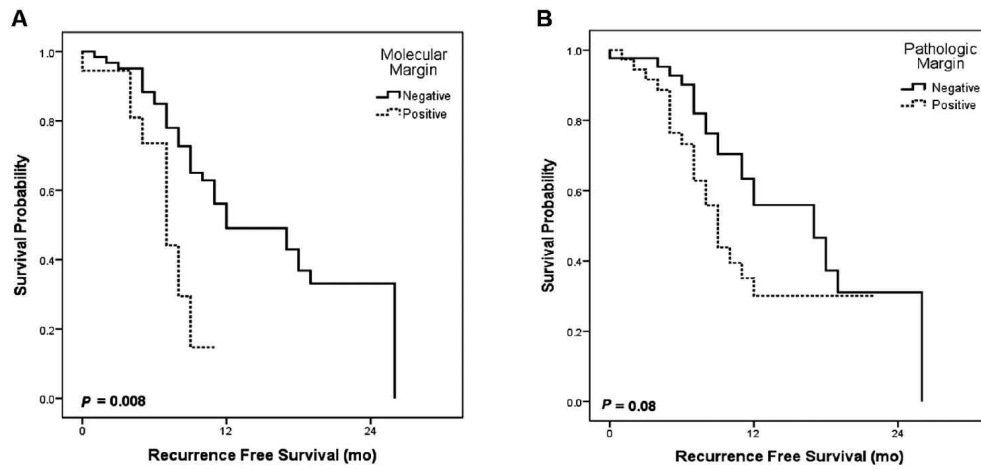
도면5



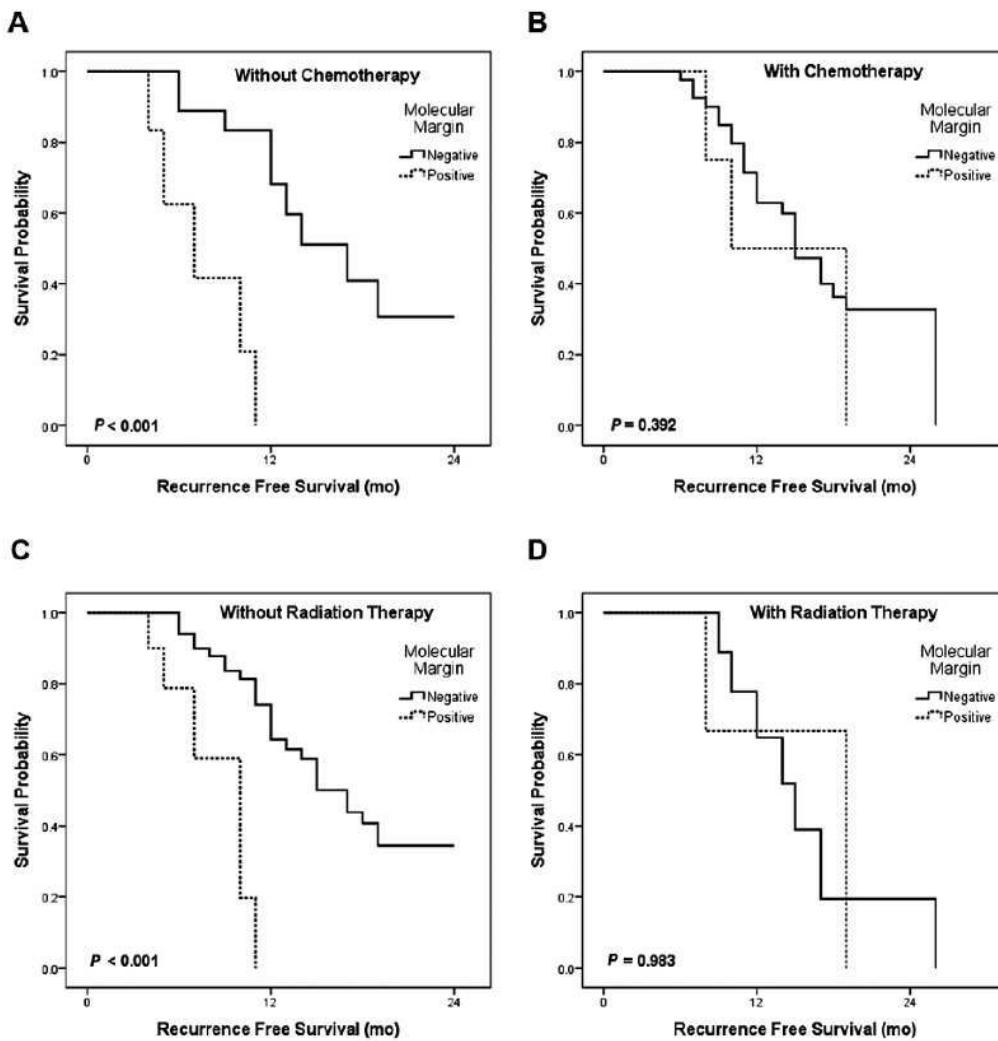
도면6



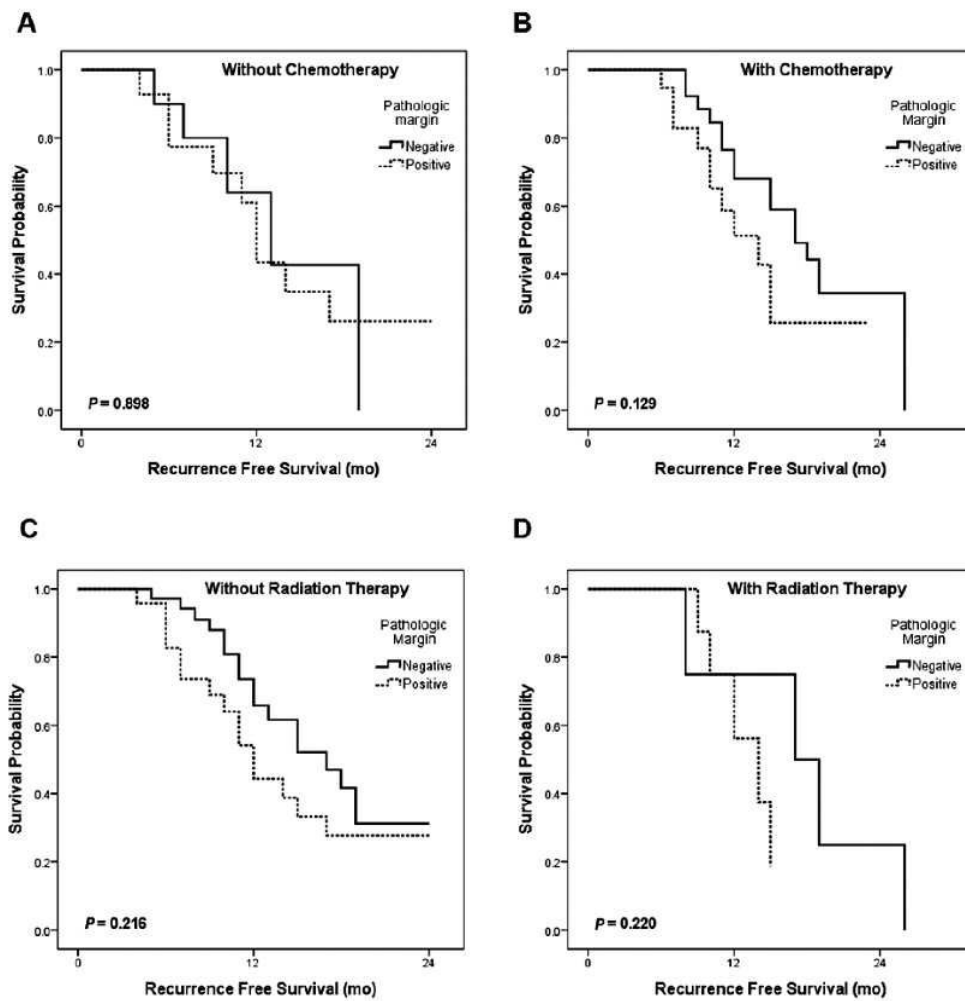
도면7



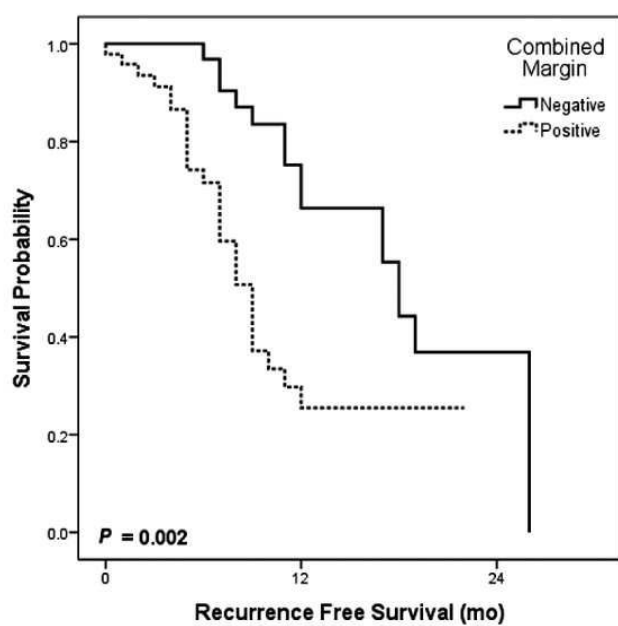
도면8



도면9



도면10



도면11

