

EGFR 돌연변이 검출에 있어 PNA-Mediated Real-Time PCR Clamping과 직접 염기서열 분석법의 비교 분석

건국대학교 의학전문대학원 ¹내과학교실, ²병리학교실, 영남대학교 의과대학 ³내과학교실, ⁴병리학교실, 충남대학교 의과대학 ⁵내과학교실, ⁶병리학교실

김희정¹, 김완섭², 신경철³, 이관호³, 김미진⁴, 이정은⁵, 송규상⁶, 김선영⁵, 이계영¹

Comparative Analysis of Peptide Nucleic Acid (PNA)-Mediated Real-Time PCR Clamping and DNA Direct Sequencing for EGFR Mutation Detection

Hee Joung Kim, M.D.¹, Wan Seop Kim, M.D.², Kyeong-Cheol Shin, M.D.³, Gwan Ho Lee, M.D.³, Mi-Jin Kim, M.D.⁴, Jeong Eun Lee, M.D.⁵, Kyu Sang Song, M.D.⁶, Sun Young Kim, M.D.⁵, Kye Young Lee, M.D., Ph.D.¹

Departments of ¹Internal Medicine, ²Pathology, Konkuk University School of Medicine, Seoul, Departments of ³Internal Medicine, ⁴Pathology, Yeungnam University College of Medicine, Daegu, Departments of ⁵Internal Medicine, ⁶Pathology, Chungnam National University College of Medicine, Daejeon, Korea

Background: Although the gold standard method for research trials on epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations has been direct sequencing, this approach has the limitations of low sensitivity and of being time-consuming. Peptide nucleic acid (PNA)-mediated polymerase chain reaction (PCR) clamping is known to be a more sensitive detection tool. The aim of this study was to compare the detection rate of *EGFR* mutation and EGFR-tyrosine kinase inhibitor (TKI) responsiveness according to *EGFR* mutation status using both methodologies.

Methods: Clinical specimens from 112 NSCLC patients were analyzed for *EGFR* mutations in exons 18, 19, 20, and 21. All clinical data and tumor specimens were obtained from 3 university hospitals in Korea. After genomic DNA was extracted from paraffin-embedded tissue specimens, both PNA-mediated PCR clamping and direct-sequencing were performed. The results and clinical response to *EGFR*-TKIs were compared.

Results: Sequencing revealed a total of 35 (22.9%) mutations: 8 missense mutations in exon 21 and 26 deletion mutations in exon 19. PNA-mediated PCR clamping showed the presence of genomic alterations in 45 (28.3%) samples, including the 32 identified by sequencing plus 13 additional samples (6 in exon 19 and 7 in exon 21).

Conclusion: PNA-mediated PCR clamping is simple and rapid, as well as a more sensitive method for screening of genomic alterations in *EGFR* gene compared to direct sequencing. This data suggests that PNA-mediated PCR clamping should be implemented as a useful screening tool for detection of *EGFR* mutations in clinical setting.

Key Words: Peptide Nucleic Acids; Molecular Sequencing Data; Receptor, Epidermal Growth Factor; Epidermal Growth Factor

서론

Address for correspondence: Kye Young Lee, M.D., Ph.D.
Department of Internal Medicine, Konkuk University School of Medicine, 4-12, Hwayang-dong, Gwangjin-gu, Seoul 143-729, Korea
Phone: 82-2-2030-7521, Fax: 82-2-2030-7748
E-mail: kyleemd@kuh.ac.kr

Received: Dec. 11, 2010

Accepted: Jan. 14, 2011

폐암은 예후가 좋지 않아서 수술이 불가능한 진행성 비소세포암의 경우 표준 치료인 platinum 제제를 기본으로 한 항암화학요법을 받더라도 중앙 생존기간이 8개월에 불과한 것으로 알려져 있다¹. 비소세포암에서 표피성장인자 수용체(Epidermal growth factor receptor, EGFR)가 혼

히 과발현되거나 비정상적으로 활성화되는 점을 근거로 하여 EGFR를 표적으로 하는 새로운 치료방법이 제시되었고², 2004년 처음으로 EGFR tyrosine kinase 부위에 돌연변이가 보고^{3,5}된 이래로 EGFR tyrosine kinase 저해제를 이용한 수많은 연구가 진행되고 있고 감수성 돌연변이를 가지고 있는 특정 환자군에서는 중앙 생존기간이 최대 30개월까지 보고되고 있다^{6,7}.

이와 같이 EGFR tyrosine kinase 저해제에 대한 반응 및 예후를 예측하는데 가장 중요한 EGFR 돌연변이를 찾아내기 위해서는 직접 염기서열 분석법이 표준방법으로 사용되었으나 민감도가 낮고 단계가 복잡하며 분석시간이 오래 걸려서 일상적으로 사용하기 어려운 점이 있다. 또한 수술을 통해 적출된 조직이나 대부분 암세포로 구성된 조직검체에서는 비교적 EGFR 돌연변이를 검사하기 쉬운 편이지만 실제 임상에서는 매우 작은 조직 또는 세포진 검사만으로 진단과 돌연변이 검사를 동시에 시행해야 하므로 높은 민감도와 함께 정확성을 유지하면서 작은 검체로도 돌연변이를 빨리 찾아낼 수 있는 새로운 검사법이 필요하게 되었다⁸.

Scorpions ARMS (amplified refractory mutation system)⁶, dHPLC (denaturing high performance liquid chromatography)^{9,10}, SMarT Amplification Process (SMAP)¹¹와 같은 많은 다양한 방법들이 돌연변이 검사목적으로 연구되고 있으나 아직 표준화되지는 않은 실정이다. 이러한 새로운 방법 중에서 peptide nucleic acid (PNA)를 매개로 유전자증폭을 시행하여 돌연변이 유무를 찾아내는 민감도가 매우 높고 간편한 방법이 개발되어 최근 일본을 중심으로 널리 사용되고 있다^{7,12,13}. PNA는 인공 DNA로서 DNA의 인산-리보스당의 골격이 펩타이드와 비슷한 아미드 골격으로 치환된 구조를 가지고 있어서 DNA나 RNA에 대한 결합력과 안정성이 매우 높은 특성을 가지면서 DNA와 마찬가지로 특정 염기서열에 대한 상보적인 결합을 할 수 있기 때문에 다양한 생물학적 진단과 치료분야에 활용되고 있는 물질이다¹⁴. 저자들은 이번 연구에 앞서 PNA를 이용한 RT PCR clamping 방법으로 EGFR 돌연변이 분석을 시행한 결과, 검사를 시행한 71예 중에서 33예 (46.5%)에서 변이형을 확인하였고 선암, 여성, 비흡연자에서 그 빈도가 더 높았으며 EGFR-tyrosine kinase 저해제에 대한 반응과 높은 관련성이 있는 것을 확인하였다¹⁵. 이에 이번 연구에서는 비소세포폐암환자의 종양조직에서 추출한 DNA로 PNA-mediated Real-Time (RT) PCR Clamping과 직접 염기서열 분석법으로 각각 EGFR 돌연

변이 검사를 시행한 후 그 결과를 비교 분석하여 국내에서 PNA clamp를 이용한 EGFR 돌연변이분석 검사의 임상적용 및 직접 염기서열 분석법 대체가능성을 평가하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

2001년 8월부터 2009년 9월까지 건국대학교병원, 영남대학교병원, 충남대학교병원에서 비소세포폐암으로 진단받은 후 EGFR tyrosine kinase 저해제를 복용한 환자를 대상으로 후향적 연구를 시행하였다. 환자들은 모두 각 병원에서 조직검사를 통해 비소세포폐암을 진단받은 후 임상경과 중 한 번 이상 EGFR tyrosine kinase 저해제를 복용하였으며 의무기록 및 방사선 소견에 근거하여 표적 치료제투약 후 질병진행 여부를 평가하였다. 진단 재확인 및 돌연변이 검사를 위해 파라핀 포매 조직 1~5장을 수집하였고 진단이 불명확하거나 DNA가 충분하지 않은 경우에는 검사에서 제외하였다. 대상 환자의 조직을 수집하는 것에 있어서는 각 병원의 임상연구심의위원회 심의를 통과하였다.

2. DNA 분리

병리의사가 현미경으로 관찰하여 파라핀 포매 조직 및 세포 슬라이드에서 종양세포가 최소 50% 이상 포함되도록 영역을 표기한 후 커버글라스를 제거하고 암세포만을 채취하였다. 10% Resin이 들어있는 DNA extraction buffer (50 mM Tris-cl pH 8.5, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.5% Tween 20) 50~100 μ L에 채취한 암세포만 분리하여 넣고 200 μ g/mL Proteinase K와 혼합한 후 56°C에서 최소 1시간 이상 처리하였다. 100°C에서 10분 동안 가열한 후 12,000 rpm에서 10~15분 동안 원심분리하고 상층액만 채취하여 PCR 반응에 사용하였다¹⁶.

3. PNA-mediated RT PCR Clamping

추출된 DNA에서 PNA ClampTM EGFR mutation detection kit (PANAGENE, Daejeon, Korea)를 사용하여 검출하였다. Real time PCR 기기는 CFX 384 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하였으며 94°C에서 5분간 유지한 후에 94°C에서 30초, 70°C에서 20초, 63°C에서 30초를 40회 반복하였다. PNA ClampTM EGFR mutation detection kit에서 검출 가능한 돌연변이로는 Exon 19 결실

과 Exon 21 L858R 점돌연변이를 기본으로 하여 Exon 18 부터 21에 이르기까지 EGFR-tyrosine kinase 저해제에 대한 억제 반응성과 관련하여 감수성 또는 저항성과 같은 임상적인 의미를 가지면서 흔히 발견되는 29가지 돌연변이를 포함하였다.

4. 직접 염기서열 분석법

Exon 18에 대해서는 E18-SF, 5'-AGGTGACCCITGTC-TCTGTG-3', E18-SR, and 5'-CCTGTGCCAGGGACCTT-AC-3', Exon 19에 대해서는 E19-SF, 5'-CATGTGGCACC-ATCTCACA-3', E19-SR와 5'-CCCACACAGCAAAGCAG-AA-3', Exon 20에 대해서는 E20-B-F, 5'-ATCGCATTGAT-GCGTCTTC-3', E20-B-R와 5'-GTCTTTGTGTTCCTCGGA-CAT-3', Exon 21에 대해서는 E21-B-F, 5'-CCTCACAGC-AGGGTCTTCTC-3', E21-B-R와 5'-GGAAAATGCTGGCT-GACCTA-3'와 같은 primer를 이용하여 PCR을 시행하였다. 그 결과물을 PCR clean-up kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany)를 통해 정제한 후 Big Dye Terminator kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 ABI Prism 3100 station (Applied Biosystems)으로 순방향과 역방향의 염기서열을 2회 분석하여 판정하였다.

5. 돌연변이 결과 비교

각 검사법에 따른 돌연변이 검출 빈도를 Exon 종류에 따라 구분하여 증례수(백분율)로 나타냈고 검사방법에 따라 다른 결과를 보인 환자에 한해 개별적으로 기술하였다. 각 검사법에 따른 돌연변이 결과의 일치도는 교차분석으로 kappa 값을 확인하였고, EGFR tyrosine kinase 저해제

에 대한 반응을 비교하여 돌연변이 검사를 통한 억제반응 예측율을 비교하였다.

결 과

1. 환자 특성

3개 대학병원에서 수집된 112명의 비소세포폐암환자 중에서 돌연변이 분석이 불가능한 5명은 분석에서 제외하였다. 대상 환자의 연령은 평균 62.2 ± 10.1 세(39~86세) 남녀비는 53 : 54 (49.5% : 50.5%), 흡연력은 비흡연자 64명(61.0%), 과거흡연자 13명(12.4%), 현재흡연자 27명(25.7%)이었다. 조직형으로는 선암이 91명(85.0%)으로 대다수를 차지하고 있었으며 그 다음으로 평편상피암 15

Table 1. Demographic characteristics of subjects

Characteristics	No. (%)
Age, yr	62.2 ± 10.1 (63, 39~86)*
Sex	
Male	53 (49.5%)
Female	54 (50.5%)
Smoking status	
Never smoker	64 (61.0%)
Ex-smoker	13 (12.4%)
Current smoker	27 (25.7%)
Pathology	
Adenocarcinoma	91 (85.0%)
Squamous cell carcinoma	15 (14.0%)
Large cell carcinoma	1 (0.9%)

SD: standard deviation.

*Average \pm SD (median, range).

Table 2. EGFR mutation detected by PNA-mediated Real-Time PCR Clamping and DNA direct sequencing

	PNA-mediated RT PCR clamping (n=107)	DNA direct sequencing (n=107)
Mutant type	47 (43.9%)	38 (35.5%)
Exon19 del	26 (55.3%)	23 (60.5%)
Exon21 L858R or L861Q	16 (34.0%)	12 (31.6%)
Exon20 S768I or ins9	1 (2.1%)	1 (2.6%)
Exon20 2321_2322 ins6	0 (0.0%)	1 (2.6%)
Exon 20 2364 C >T, L788L	0 (0.0%)	1 (2.6%)
Exon 19 del+Exon 21 L858R/L861Q	1 (2.1%)	0 (0.0%)
Exon19 del+Exon 20 T790M	3 (6.4%)	0 (0.0%)
Indeterminate	2 (1.9%)	5 (4.7%)
Wild type	58 (54.2%)	64 (59.8%)

Values are presented as number (%).

EGFR: epidermal growth factor receptor; PNA: peptide nucleic acid; PCR: polymerase chain reaction.

명(14.0%), 대세포암 1명(0.9%)으로 나타났다(Table 1).

2. PNA-Mediated RT PCR Clamping과 DNA 직접 염기서열 분석법에 따른 EGFR 돌연변이 결과

107예의 비소세포폐암 환자에서 PNA-mediated RT PCR clamping 방법으로 EGFR 돌연변이 분석을 시행한 결과 47예(43.9%)에서 돌연변이형, 58예(54.2%)에서 야생형으로 나타났고, DNA 직접 염기서열 분석법을 이용하여 유전자형을 분석하였을 때는 돌연변이형과 야생형이 각각 38예(35.5%), 64예(59.8%)에서 확인되었다(Table 2). 변이형 중에서 세부적인 종류를 살펴보면, 두 가지 방법에서 모두 Exon 19 결실이 절반 이상을 차지할 정도로 가장 비중이 높았고 다음으로는 Exon 21 L858R 점돌연변이가 전체 변이형 중에서 1/3 넘게 차지하는 것으로 나타났다. PNA-mediated RT PCR clamping으로 분석하였을 때 4예(8.5%)에서 두 가지 돌연변이가 함께 검출되었는데 Exon 19 결실과 함께 3예(6.4%)에서는 Exon 21 L858R 점돌연변이가 동반되었고, 1예(2.1%)에서는 Exon 21 T790M 돌연변이가 함께 확인되어 결과적으로 Exon 19 결실을 포함하는 돌연변이가 31예(63.8%)로 전체 돌연변이형 중에서 2/3 가량에 미치는 것으로 나타났다. 이외에 1예

(2.1%)에서 Exon 20의 9 삽입이 두 가지 방법으로 모두 확인되었다.

3. PNA-Mediated RT PCR Clamping과 DNA 직접 염기서열 분석법에 따른 EGFR 돌연변이 일치도 비교

두 가지 돌연변이 분석방법을 통한 결과가 서로 얼마나 일치하는지 비교해 본 결과 돌연변이형의 70.2% (33예)와 야생형의 88.3% (53예)에서 동일한 결과를 보였다. 전체 환자 중에서는 80.4%에서 같은 결과를 보여 일치도가 높은 것으로 확인되었다(Table 3). 검사결과가 다르게 확인된 21예(19.6%)를 PNA-mediated RT PCR clamping 결과에 따라 나누어 보면 DNA 직접 염기서열 분석법에 비해 PNA를 이용한 방법으로 돌연변이형을 더 많이 찾아낸 경우가 14예(13.1%)를 차지했다. 세부 종류를 살펴보면 Exon 19 결실이 6예, Exon 21 L858R 점돌연변이가 4예였고, 두 가지 돌연변이가 함께 나타난 경우가 3예로 나타났다. 이와 반대로 PNA-mediated RT PCR clamping의 프로브 목록에 들어있지 않아 야생형으로 나왔으나 직접 염기서열 분석법으로 돌연변이를 찾아낸 것이 2예(1.9%)였고 이 중 하나(Exon 20 2364 C>T, L788L)는 점돌연변이는 있지만 아미노산의 변화가 없어서 억제 반응

Table 3. Comparison of EGFR mutation results using PNA-mediated RT PCR Clamping and DNA direct sequencing

		PNA-mediated PCR clamping	DNA direct sequencing	Total	Kappa (p-value)
Concordant cases (n=86, 80.4%)	Mutant type	Exon19 del		20	0.799 (<0.001)
		Exon21 L858R or L861Q		12	
		S768I or Exon20 ins9		1	
	Wild type	—	53	53 (49.5%)	
Discordant cases (n=21, 19.6%)	Mutant type	Exon 19 del	Wild	5	14 (13.1%)
		Exon 19 del	Indeterminate	1	
		Exon 21 L858R or L861Q	Wild	4	
		Exon 19 del+Exon 20 L858R/L861Q	Exon 19 del	2	
		Exon 19 del+Exon 20 L858R/L861Q	Indeterminate	1	
		Exon19 del+T790M	Exon 19 del	1	
		Wild type	Wild	Indeterminate	
	Wild		Exon20 2321_2322 ins6	1	
	Wild		Exon 20 2364 C>T, L788L	1	
	Indeterminate		Wild	2	
	Total				107

EGFR: epidermal growth factor receptor; PNA: peptide nucleic acid; PCR: polymerase chain reaction.

Table 4. Clinical response according to EGFR mutation status

		Clinical response to EGFR TKIs				Total
		CR	PR	SD	PD	
PNA-mediated RT PCR clamping (n=105)	Mutant	2 (4.3%)	22 (46.8%)	19 (40.4%)	4 (8.5%)	47 (44.8%)
	Wild	0 (0.0%)	7 (12.1%)	20 (34.5%)	31 (53.4%)	58 (55.2%)
DNA direct sequencing (n=102)	Mutant	2 (5.3%)	18 (47.4%)	12 (31.6%)	6 (15.8%)	38 (37.3%)
	Wild	0 (0.0%)	11 (17.7%)	24 (38.7%)	29 (46.8%)	64 (62.7%)

Values are presented as number (%).

EGFR: epidermal growth factor receptor; PNA: peptide nucleic acid.

성에 영향을 줄 수 없었다. 나머지 1에 또한 발생빈도가 극히 낮고 임상적인 의미가 없는 돌연변이였다.

4. PNA-mediated RT PCR Clamping과 DNA 직접 염기서열 분석법에 따른 돌연변이 유무와 EGFR-tyrosine kinase 저해제에 대한 약제 반응성

두 가지 검사법을 통해 EGFR 돌연변이를 확인한 환자에서는 EGFR tyrosine kinase 저해제에 대한 반응이 현저하게 좋은 것으로 나타났는데, PNA-mediated RT PCR clamping과 직접 염기서열 분석법을 통해 변이형으로 확인된 환자의 91.5%와 84.2%에서 질병이 조절(disease control rate, DCR)되는 양상을 보였다(Table 4). 야생형을 보인 환자에서도 절반에 가까운 환자에서는 약제에 대해 좋은 반응을 보였으나 검사법에 따른 약제 반응성의 뚜렷한 차이는 없었다.

고 찰

이번 연구에서는 PNA-mediated RT PCR clamping으로 시행한 EGFR 돌연변이 검사가 DNA 직접 염기서열 분석법을 이용하여 얻은 결과에 비해 돌연변이형 검출률이 더욱 높았으며 검사방법과 무관하게 돌연변이가 확인된 환자들은 대다수에서 EGFR tyrosine kinase 저해제에 좋은 반응을 보이는 것을 확인하였다. EGFR tyrosine kinase 부위의 돌연변이는 EGFR tyrosine kinase 저해제 사용에 있어서 가장 강력한 반응예측 인자로서 각 환자에서는 가장 적합한 치료를 선택하는 기준이 될 수 있다는 데 임상적 의의가 있다¹⁷. 특히 선암에서는 변이형 환자에 한해 1차 치료제로 EGFR tyrosine kinase를 투약하였을 때 그 효과가 더 우월한 것으로 보고되고 있고^{6,18,19}, 곧 국내에서도 이러한 흐름에 맞춰 돌연변이를 동반한 진행성 비소

세포폐암환자에서 1차 치료로 표적치료제가 도입될 예정으로 있어 각 환자의 EGFR 돌연변이 유무를 확인하기 위한 정확하고 빠른 표준화된 검사법의 도입이 필수적이다.

PNA-DNA 결합체가 DNA-DNA 결합체에 비해 높은 온도에서 안정성이 높고, PNA 올리고머가 해당 DNA의 단일염기 불일치까지 식별해 낼 수 있으며 DNA 중합효소에는 반응하지 않는다는 PNA 프로브의 특징을 이용해서 PNA-mediated RT PCR clamping이 EGFR 돌연변이 검출용으로 개발되어 연구목적으로 사용 중이다^{12,13,15,20}. 야생형과 돌연변이형 폐암 세포주를 이용하여 민감도와 특이도를 분석한 연구에 따르면 야생형 유전자에 변이형 유전자가 1%만 포함되어 있어도 검출해 낼 수 있는 것으로 확인하였다²⁰. 실제 비소세포폐암환자의 종양조직 및 세포를 이용하여 검사를 시행해 보았을 때 검체종류에 상관없이 변이형을 선별해낼 수 있었고, 변이형으로 확인된 환자들은 야생형 환자들에 비해 EGFR tyrosine kinase 저해제에 훨씬 우월한 반응을 보인 것으로 나타났다¹⁵. 특히, RT PCR을 시행하는 데 소요되는 시간이 약 2시간에 불과해서 임상에서 조직형을 확인한 후 환자의 치료방침을 결정하는 데 큰 도움이 될 것으로 예상된다.

직접 염기서열 분석법으로 변이형을 확인했던 38예 중 2예에서 PNA-mediated RT PCR clamping으로 돌연변이를 찾을 수 없었으나 변이형 중에서 발현빈도가 극히 드문 경우였고, EGFR tyrosine kinase 저해제에 대한 약제반응성과도 관련성이 없어 임상적 의미는 매우 낮다고 하겠다. 지금까지 알려진 돌연변이의 종류로는 Exon 19 결실과 Exon 21 L858R 점돌연변이가 비슷한 정도로 발생하여 전체 변이형의 90%를 차지하고 나머지 Exon 18과 20의 변이가 10%를 차지하는 것으로 보고되었다. 그 중에서 T790M 점돌연변이를 포함한 약제 저항성 돌연변이가 Exon 20에서 약 5% 정도로 알려져 있다²¹. 이번 연구에서

는 Exon 19 결실이 Exon 21 L858R 점돌연변이 보다 2배 정도 많은 빈도로 관찰되었으나 이 두 가지 돌연변이가 역시 전체 변이형의 90% 이상을 차지하였고, 직접 염기서열 분석법에서 추가로 확인된 Exon 20의 돌연변이는 임상적 의미를 찾기 어려웠다. 1예에서 PNA-mediated PCR clamping으로 약제 저항성 돌연변이로 알려져 있는 Exon 20 T790M과 Exon 19 결실이 함께 있는 것을 확인하였는데 약제 반응기간이 짧을 것이라는 예측과는 달리 무진행 생존기간이 22개월이었으며, 약제 저항성으로 알려진 S768I 점돌연변이가 두 가지 방법으로 모두 확인된 환자 또한 무진행 생존기간이 7개월로 나타나 약제 저항성 돌연변이와 임상경과가 정확히 일치하지 않았지만 각 1예에 불과하여 추가적인 검토가 필요할 것으로 보인다.

이번 연구결과와 같이 PNA-mediated RT PCR clamping의 돌연변이 검출률이 높은 원인을 종양조직의 이질성으로 생각해 볼 수 있는데, Sakurada 등²²은 수술적으로 절제한 비소세포폐암환자에서 신선동결절편과 파라핀 포매 조직 중 2~3 부위가 서로 다른 유전자형을 나타내는 것을 확인하여 종양조직 내 이질성이 존재한다고 보고하였다. 직접 염기서열 분석법이 변이형 유전자가 최소 25% 이상 존재할 때 돌연변이를 검출한다고 알려져 있으므로 변이형 세포와 야생형 세포의 구성 비율에 따라 검사방법의 예민도에 의해 그 결과가 달라질 수 있음을 의미하고, 이러한 이론을 바탕으로 최근에는 변이형 세포의 분율을 정량화하려는 연구도 진행되고 있다²³. 종양 내 이질성이 임상적으로 중요한 점은 소량의 변이형이라도 선별해 내는 것이 환자의 치료방침 결정과 예후에 어떤 영향을 미칠 것인가 하는 것인데, 이번 연구에서 확인한 바로는 PNA-mediated RT PCR clamping으로 돌연변이가 검출된 환자에서도 EGFR-tyrosine kinase 저해제에 비교적 좋은 반응을 보여서 변이형이 소량이라도 존재한다면 전반적으로 좋은 임상경과를 예측할 수 있겠지만 더 많은 수의 PNA-mediated RT PCR clamping 단독 돌연변이 양성환자를 대상으로 약제 반응성 및 무진행 생존기간과의 관련성 등을 추가적으로 연구해 볼 필요가 있다. 또한 진행성 폐암 환자에서는 진단 당시에 다양한 방법의 조직검사를 시행 하더라도 얻을 수 있는 조직이나 종양세포의 양에 한계가 있으므로 세포진 검사에서 얻은 소량의 DNA만으로도 돌연변이 검출이 가능한 PNA-mediated RT PCR clamping이 유용하게 사용될 수 있다.

결론적으로 이번 연구를 통하여 검사단계가 간단해서 결과를 빠르게 얻을 수 있으면서 예민한 검사법인 PNA-

mediated RT PCR clamping을 이용함으로써 임상진료에서 각 환자의 치료방향을 결정하고 예후를 예측하는 데 중요한 EGFR 돌연변이를 선별하는 데 도움을 얻을 수 있을 것으로 기대한다.

감사의 글

This study was supported by a grant from Korean Association for the Study of Lung Cancer (KASLC-1002).

참 고 문 헌

- Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002;346:92-8.
- Giardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2001;7:2958-70.
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129-39.
- Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497-500.
- Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:13306-11.
- Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361:947-57.
- Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010;11:121-8.
- Eberhard DA, Giaccone G, Johnson BE; Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group. Biomarkers of response to epidermal growth factor receptor inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group: standardization for use in the clinical trial setting. *J Clin*

- Oncol 2008;26:983-94.
9. Jänne PA, Borras AM, Kuang Y, Rogers AM, Joshi VA, Liyanage H, et al. A rapid and sensitive enzymatic method for epidermal growth factor receptor mutation screening. *Clin Cancer Res* 2006;12:751-8.
10. Chin TM, Anuar D, Soo R, Salto-Tellez M, Li WQ, Ahmad B, et al. Detection of epidermal growth factor receptor variations by partially denaturing HPLC. *Clin Chem* 2007;53:62-70.
11. Hoshi K, Takakura H, Mitani Y, Tatsumi K, Momiyama N, Ichikawa Y, et al. Rapid detection of epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer by the SMart-Amplification Process. *Clin Cancer Res* 2007;13:4974-83.
12. Nagai Y, Miyazawa H, Huqun, Tanaka T, Udagawa K, Kato M, et al. Genetic heterogeneity of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cell lines revealed by a rapid and sensitive detection system, the peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR clamp. *Cancer Res* 2005;65:7276-82.
13. Tanaka T, Nagai Y, Miyazawa H, Koyama N, Matsuoka S, Sutani A, et al. Reliability of the peptide nucleic acid-locked nucleic acid polymerase chain reaction clamp-based test for epidermal growth factor receptor mutations integrated into the clinical practice for non-small cell lung cancers. *Cancer Sci* 2007;98:246-52.
14. Nielsen PE, Egholm M. An introduction to peptide nucleic acid. *Curr Issues Mol Biol* 1999;1:89-104.
15. Lee KY, Kim HJ, Kim SJ, Yoo GH, Kim WD, Oh SY, et al. PNA-mediated PCR clamping for the detection of EGFR mutations in non-small cell lung cancer. *Tuberc Respir Dis* 2010;69:271-8.
16. Hwang TS. Molecular biologic techniques in cytopathologic diagnosis. *Korean J Pathol* 2009;43:387-92.
17. Dahabreh IJ, Linardou H, Siannis F, Kosmidis P, Bafaloukos D, Murray S. Somatic EGFR mutation and gene copy gain as predictive biomarkers for response to tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:291-303.
18. Neal JW, Sequist LV. Targeted therapies: optimal first-line therapy for NSCLC with EGFR mutations. *Nat Rev Clin Oncol* 2010;7:71-2.
19. Rosell R, Viteri S, Molina MA, Benlloch S, Taron M. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as first-line treatment in advanced nonsmall-cell lung cancer. *Curr Opin Oncol* 2010;22:112-20.
20. Choi J, Cho M, Oh M, Kim H, Kil MS, Park H. PNA-mediated real-time PCR clamping for detection of EGFR mutations. *Bull Korean Chem Soc* 2010;31:3525-9.
21. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7:169-81.
22. Sakurada A, Lara-Guerra H, Liu N, Shepherd FA, Tsao MS. Tissue heterogeneity of EGFR mutation in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2008;3:527-9.
23. Wang J, Ramakrishnan R, Tang Z, Fan W, Kluge A, Dowlati A, et al. Quantifying EGFR alterations in the lung cancer genome with nanofluidic digital PCR arrays. *Clin Chem* 2010;56:623-32.