

항암제 반응성 검사 : 개요, 방법론 및 ATP-CRA를 활용한 임상연구 결과

최성호^{1*}, 김봉석²

¹주이수애플지스, ²서울 보훈병원

* To whom correspondence should be addressed. E-mail : shchoi2@isu.co.kr

목 차

- I . 요약
- II . 서론
- III . 방법론 및 미래 활용분야
- IV . 의학적 검사방법으로서의 항암제 반응성 검사요건
- V . ATP-CRA의 임상 시험 결과
- VI . 결론
- VII . 참고문헌

I. 요약

암은 1980년대 중반부터 한국인의 사망원인 1위를 차지하고 있으며 해마다 16 만 명 이상의 새로운 암 환자가 발생하고 있다. 항암 화학 치료는 수술만으로도 완치가 가능한 일부 조기 암의 경우를 제외하고 상당수의 암 환자들에게 매우 중요한 치료 수단이다. 항암제 반응성 검사란 항암 화학 치료를 받을 예정인 암 환자에게 가장 이상적인 항암제 혹은 효과가 없을 것으로 예측되는 항암제를 사전에 선별하여 이를 바탕으로 개인 맞춤 치료 (individualized therapy)를 실현하기 위해 개발된 검사 방법이다. 본 글에서는 항암제 반응성 검사의 개요와 종류를 정리해보고 의학적 검사 방법으로서 갖추어야 할 항암제 반응성 검사의 요건을 최근 개발된 ATP-CRA (Adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay)를 중심으로 살펴본 뒤 이 방법의 임상적 유용성을 가늠할 수 있는 몇 가지 연구 결과에 대해 논의하고자 한다.

II. 서론

근래 여러 가지 항암제들이 지속적으로 개발되고 임상에 적용되면서 항암 화학 요법의 치료 효과가 높아지고 있으나, 아직도 여러 가지 암 중에서 치료에 대한 반응율이 충분하지 않아서 상당수의 환자는 독성이 매우 강한 항암제에 노출됨에도 불구하고 증상의 완화나 수명 연장 효과는 낮은 실정이다. 이 같은 현상을 개선하기 위해서는 보다 우수한 항암제 개발과 표준 치료법에 대한 연구뿐만 아니라 개별 암 환자가 잘 반응 할 것으로 기대되는 항암제들을 보다 정확히 선정하거나 또는 투약 효과를 기대 할 수 없는 항암제들을 배제 할 수 있는 검사 방법의 적용이 요구 되고 있다. 최근에는 유전자의 발현 양상이나 유전적 변이를 검사하여 항암 화학 요법의 효과를 사전에 예측하려는 다양한 시도와 성공적인 사례들이 보고 되고 있으나 알려진 소수의 유전자에 대한 검사 결과만으로 인체와 종양 조직이 항암 화학 치료에 보이는 복잡한 현상을 충분히 설명하는 수준에는 도달하지 못하고 있다.

항암제 반응성 검사란 항암 화학 치료를 받을 예정인 암 환자로부터 암 조직을 채취한 뒤 배양하면서 여러 종류의 항암제를 처리한 시료와 처리하지 않은 시료 사이에서 암 세포의 사멸 혹은 증식 억제를 비교하여 가장 이상적인 항암제를 찾아내거나 효과가 없을 것으로 예측되는 항암제를 선별하여 이를 바탕으로 개인 맞춤 치료 (individualized therapy)을 실현하기 위해 개발된 검사 방법이며 1970년대 후반부터 개념 도입이 이루어졌다¹. 초기의 항암제 반응성 검사는 다량의 암 조직이 필요하고 검사 성공율이 매우 낮은 뿐만 아니라 (60% 미만) 검사 결과를 확인하는데 걸리는 기간이 2~3주 소요되어 일상적인 환자 진료에 사용하기 어려운 측면이 있었으나 최근에는 발전된 세포 배양과 분석 기술을 바탕으로 소량의 암 조직만으로도 빠르고 정확한 결과 제공이 가능한 방법들이 개발 되었다. 이에 따라 개별 환자에서 분리된 암 세포를 이용하여 해당 환자에게 적용 가능한 여러 가지 항암제들의 감수성과 저항성을

화학 치료 시행 이전에 미리 예측하고 치료 방침에 참고할 수 있는 whole cell profiling이 가능하게 되었으며 이 같은 기술을 암 환자 진료에 적용하는 것이 바람직하다는 다양한 증거들이 축적 되고 있다 (Table 1).

본 글에서는 항암제 반응성 검사의 개념과 종류를 정리하고 의학적 검사 방법으로서 갖추어야 할 항암제 반응성 검사의 요건을 최근 본 저자들에 의해 개발된 ATP-CRA (adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay)를 중심으로 살펴본 뒤 이 방법의 임상적 유용성을 가늠할 수 있는 몇 가지 연구 결과에 대해 논의하고자 한다^a.

III. 방법론 및 미래 활용 분야

항암제 반응성 검사란 *in vitro* 또는 *in vivo* 에서 항암제에 노출된 환자의 암 세포가 사멸하거나 증식이 억제되는 정도를 측정하는 일체의 검사 방법을 의미한다 (Table. 2). 항암제 반응성 검사는 크게 *in vitro* 및 *in vivo* 검사 방법으로 분류 할 수 있는데, sub renal capsule assay는 환자의 암 조직을 적출하여 작은 크기로 자른 뒤 mouse의 sub renal capsule에 삽입하고 항암제를 투여하여 이식된 종양의 크기 변화를 측정하는 방법이며 항암제 반응성 검사 중에서 유일한 *in vivo* 검사 방법이지만 mouse에 투여하는 항암제의 용량과 주기를 사람에게 적절히 변환하여 적용 하는 것이 어려우며 숙련된 시술자가 필요하고 여러 종류의 항암제를 검사할 경우 비용 대비 효율적이지 못하다는 단점이 있다.

이외의 *in vitro* 항암제 반응성 검사들은 대부분 다음과 같은 네 가지 실험 단계를 갖는다. (1) 암 조직으로부터 세포의 분리, (2) 항암제 처리와 배양, (3) 세포 사멸(또는 증식 억제)의 측정, (4) 실험 결과의 해석. 이러한 과정들에서 고려해야 할 사항은 다음과 같다. 환자의 암 조직으로부터 충분한 양의 살아있는 암 세포를 분리 할 수 있어야 한다. 특히 암 치료 목적으로 시행하는 수술에 의해 암 조직을 얻을 수 없는 환자들의 경우에는 생검 (biopsy)으로 채취되는 매우 적은 양의 암 조직으로도 검사 시행이 가능해야 한다. 아울러, 조직에 존재하는 정상 세포들이 항암 효과 측정에 미칠 수 있는 영향을 배제 할 수 있어야 하며, 인체에 존재하는 상재균에 의한 미생물 오염을 예방할 수 있어야 하고, 마지막으로 *in vitro* 검사 결과를 통해서 항암제 투약 후 환자의 반응을 정확히 예측 할 수 있는 분석 체계를 개발 하여야 한다.

환자의 암 조직으로부터 세포를 분리하는 데에는 trypsin, collagenase, elastase, hyaluronidase, pronase, dispase 등의 세포 외 기질 (extra cellular matrix)을 분해하는 효소들이 흔히 사용되고 용해된 세포에서 유래한 DNA 때문에 생기는 점성을 없애기 위해 DNase를 추가하기도 하는데 각 검사 방법 마다 서로 다른 다양한 효소들이 사용되고 있으며 암 조직으로부터 사용 가능한 세포를 얼마나 많이 분리해 낼 수 있는가에 따라 검사를 위해 많은 양의 암 조직이 필요한지 또는 적은 양의 암 조직만으로도 검사가 가능한 지 여부가 결정된다.

^a Presented in part at the 3rd annual symposium of the Korean Society of Gastrointestinal Cancer, Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital, Seoul, March 10, 2007.

이 밖에도 세포 생존을 측정에 가장 널리 사용되는 MTT (methyl thiazolyl-diphenyl tetrazolium bromide) assay 보다 적은 수의 세포를 사용해도 되는 민감한 측정 방법을 활용하는 것이 적은 양의 암 조직으로 검사를 진행하는데 있어 유리하다.

대부분의 항암제 반응성 검사들은 암 조직에 혼입된 정상 세포를 배제하거나 억제하기 위해 부유 배양 (suspension culture), 무혈청배지 (serum free medium), ficoll gradient centrifugation, immunomagnetic separation 등을 이용한다. 이와는 대조적으로 정상 세포를 인위적으로 제거하지 않는 방법도 알려져 있다. histoculture drug response assay (HDRA)는 미세 암 조직 절편을 collagen sponge 위에서 배양하고 세포의 사멸 정도를 생존한 세포의 효소 활성으로 측정하는 검사 방법이며 3 차원 (three dimensional) 배양이 가능하기 때문에 정상 세포가 존재하는 상태에서 생체 내와 유사한 환경으로 암 세포를 배양 할 수 있다는 장점이 있다. 그러나 세포의 효소 활성을 이용하여 항암제에 의한 세포 사멸 정도를 측정할 때, 종양 조직 내에 섞여있는 정상 세포의 효소 활성과 암 세포의 효소 활성이 구분되지 않고, 개별 항암제의 효과를 측정하기 위해 사용된 각각의 암 조직 미세 절편에서 암 세포의 비율과 숫자가 고르게 분포하지 않게 되기 때문에, 항암제가 암 세포에 미치는 효과를 정확히 측정하지 못한다는 단점이 있다.

인체 상재 균에 의한 미생물 오염을 예방하기 위해서는 세포 배양에 일반적으로 사용하는 penicillin, streptomycin 이외에 mycoplasma를 포함해서 광범위한 세균 억제 효과를 갖는 gentamycin (50 μ g/ml)과 진균을 억제하는 amphotericin B (2.5 μ g/ml)을 추가하는 것이 많은 도움이 된다. 특히 대장암, 직장암과 같이 미생물 오염 빈도가 높은 조직에서는 70% 에탄올을 이용한 전 처리와 대장 및 직장 조직에 존재하는 상재 균을 억제할 수 있는 항생제 추가 사용이 필요하다.

in vitro 실험 결과가 개별 암 환자의 투약 후 반응을 예측 할 수 있는 유용한 자료가 되기 위해서는 환자의 반응과 실험 결과를 후향적 (retrospective)으로 비교하여 확립한 분석 체계가 필요한데, 대부분의 항암제 반응성 검사들은 종양의 크기 변화와 같은 환자의 투약 후 반응을 Receiver operating characteristic (ROC) 분석법을 이용하여 세포 사멸률 (또는 증식 억제율), IC_{50} , chemosensitivity index, 항암제 반응성 database에서 해당 환자의 상대적 분포 위치 (mean \pm standard deviation)등의 *in vitro* data와 비교한다. 이러한 과정을 거치게 되면 효과가 있을 것으로 예측되는 항암제 또는 효과가 없을 것으로 예측되는 항암제를 구별할 수 있는 항암 효과 판정 기준 (cut off)을 수립할 수 있으며 이를 반복 적용하는 과정을 통해 정확성을 검증하거나 개선하고 있다.

항암제 반응성 검사는 어떤 분석 방법을 이용하여 세포 사멸 혹은 증식 억제를 측정하는가에 따라서 (1) clonogenic methods (human tumor cloning assay; HTCA, capillary cloning assay; CCS), (2) dye exclusion method (differential staining cytotoxicity; DiSC), (3) radioactive precursors incorporation methods (tritiated thymidine incorporation 혹은 extreme drug

resistant; EDR), (4) metabolic methods (methyl thiazolyl-diphenyl tetrazolium bromide; MTT assay, adenosine triphosphate; ATP assay) 등으로 나눌 수 있다. 이러한 방법들 중에서 EDR assay는 암 세포 증식에 영향을 주지 못하는 저항성 항암제를 식별하는 것을 표방하므로 최근에는 항암제 감수성 검사 및 저항성 검사 (chemotherapy sensitivity and resistance assay; CSRAs)라는 용어가 사용되고 있다.² 그러나 근래에 개발되어서 초기의 기술적 한계를 극복한 항암제 감수성 검사 및 항암제 저항성 검사들은 서로 유사한 specificity와 negative predictive value를 갖고 있는 것으로 보고되고 있다 (Table 3).

한편, 처리한 항암제에 대한 암 세포의 반응을 어떤 관점에서 측정하는가에 따라 항암제 반응성 검사를 growth inhibition assays (HTCA, CCS, EDR) 또는 cell death assays (DiSC, MTT, ATP)로 분류하기도 하는데 이 같은 분류법은 세포 사멸 현상의 측정이 항암제에 의해 유도되는 암 세포의 apoptosis 현상을 가장 적절하게 대변하는 생물학적 측정 방법이므로 1970년대부터 항암제 반응성 검사에서 측정해오던 growth inhibition 보다 바람직하다는 관점에서 기인한다³.

항암제 반응성 검사 중 가장 처음 개발된 HTCA는 암 조직에 세포 외 기질 분해 효소를 처리하여 세포를 분리하고 항암제를 처리하거나 처리하지 않은 상태로 배양하여 생기는 집락 숫자를 계수하여 항암 효과를 판별하는데, 항암제 미처리 군 보다 집락 숫자가 많거나 같으면 효과가 적은 항암제이고, 반대이면 효과가 좋은 항암제로 판단한다. CCS는 암 세포를 배양 용기에 배양하지 않고 glass capillary에 배양하는 점 이외에는 HTCA와 동일하다. HTCA 및 CCS는 많은 양의 검체가 필요하고 체외에서 증식하지 않는 암 세포는 검사 할 수 없어 검사 성공률이 낮고 집락이 형성되어야 결과 확인이 가능하므로 검사에 비교적 오랜 시간 (14~21일)이 소요되는 것이 단점이다.

EDR은 분리한 암 세포에 항암제 및 방사성 동위 원소 (³H-thymidine 등)를 첨가하여 배양한다. 증식이 활발한 암 세포는 핵산을 합성할 때에 이를 사용하므로 세포에 방사성 동위 원소가 표지되며 항암제 미처리 군 보다 방사능 수치가 높거나 같으면 효과가 적은 항암제, 반대이면 효과가 좋은 항암제로 판단한다. EDR은 HTCA, CCS 보다 종양 증식 현상을 빨리 관찰 할 수 있으나 방사성 동위 원소를 사용해야 하고 일시적으로 증식을 중단한 암 세포 (Temporarily non-proliferating clonogenic cancer cell)가 검사 결과에 반영되지 않는다는 growth inhibition assay의 공통적인 단점을 지니고 있다.

DiSC는 분리된 암 세포에 항암제를 처리하거나 처리하지 않은 상태로 배양한 뒤, 시료를 Hematoxylin & Eosin (HE) 염색하고 병리학 전문가 또는 혈액학 전문가가 현미경 시야에서 살아있는 암 세포와 죽은 암 세포를 감별 계수한다. 항암제 미처리 대조군의 세포 생존 상태를 비교하여 살아있는 암 세포 숫자가 많으면 효과가 낮은 항암제, 반대일수록 효과가 좋은 항암제로 판단한다. 이 방법은 암 조직에 섞여있는 정상 세포의 영향을 효과적으로 배제할 수 있는 방법일 뿐만 아니라 많은 양의 검체가 필요하지 않고 암 세포의 활발한 증식 여부에 상관없이 적용이 가능한 것이 장점이다. 그러나 육안적인 형태 분석이므로 결과 판독에 대한 많은 경험과 전문성이 결여될 경우 검사의

재현성과 정확성이 낮아질 수 있고, 검사에 수반되는 인력 소요가 많으며 혈액 암에서는 연구 결과가 많으나 고형암에서는 적용 사례가 많지 않다는 점이 단점이다.

잘 알려져 있는 바와 같이 MTT assay는 세포에 존재하는 succinate dehydrogenase 효소 활성을 이용하여 무색의 화합물 (methyl thiazolyl tetrazolium bromide)을 발색시켜 항암 효과를 비교한다. 발색이 많이 될수록 효소 활성이 높다는 뜻이며 살아있는 세포가 많다는 뜻이기 때문에 발색이 많이 될수록 효과가 떨어지는 항암제, 반대이면 효과가 좋은 항암제로 판단한다. 이 방법은 검사에 필요한 비용이 저렴하고 비교적 쉽고 빠르며 반자동화가 가능하여 많은 양의 검체를 검사하는데 용이한 점이 장점이다. 반면, 이 검사법은 정상 세포가 제거되지 않을 경우 암 세포와 정상 세포의 효소 활성이 구분되지 않고, 세포 성장의 지수기에 해당하는 세포 농도를 접종해야 세포 농도 및 흡광도 사이에 높은 상관 관계를 얻을 수 있어서 가용한 암 세포 수가 가변적인 환자의 검체에 사용하는데 제한적이며, 세포가 사멸한 뒤에도 상당 기간 효소 활성이 유지되어 세포 생존 여부 측정이 민감하지 못한 점이 단점이다.

ATP assay는 모든 살아있는 세포의 기초 에너지 자원이 ATP이며 세포가 죽는 경우에는 이 같은 ATP가 빠르게 소실된다는 점을 이용한다. 세포의 ATP 양은 luciferase-luciferin 시약을 이용한 ATP bioluminescence로 측정이 가능한데 생성되는 빛의 강도는 ATP 농도와 비례하게 된다. 항암제를 처리한 후 세포가 사멸하면 항암제를 처리하지 않은 대조군과 비교해서 ATP 양이 감소하게 되며 ATP가 감소하는 양이 큰 항암제일수록 암 세포에 좀더 큰 항암 효과를 보인다고 판단 할 수 있다. 이 같은 방법은 약 50개 세포에서 유래한 소량의 ATP의 양도 측정 할 수 있을 정도로 민감한 것으로 알려져 있다⁴.

이같이 항암제 반응성 검사의 명칭이 다양하고 개별 연구자마다 고유의 명칭을 사용함에 따라 해당 분야의 연구 현황 파악이 어려울 뿐만 아니라 개별 연구 성과들이 결집되어 항암제 반응성 검사 분야의 활용을 확대하는데 장애가 된다는 판단에 따라서 최근에는 세계 각국에서 항암제 반응성 검사를 연구하는 연구자들이 “암 환자에서 유래한 살아있는 암 세포에서 항암 화학 치료의 효과를 판별하는 모든 검사 방법”을 individualized tumor response testing (ITRT)라는 용어로 통일하여 사용하는데 합의하였다⁵.

항암 신약 개발에는 긴 시간과 막대한 비용이 필요하므로 약물 개발 과정의 일정한 시점마다 개발 지속 여부를 판단하는 과정을 통해서 비용은 절감하면서 개발 가능성을 극대화하는 것이 일반적인 추세이다. 근래에는 신약 개발의 비임상/임상 전환기에 다양한 암 종에서의 항암 효과 검색, 이미 판매중인 표준 치료제 대비 항암 효과 관찰, 표준 치료제와의 교차 내성 검토, 새로운 병합 요법 (regimen) 개발 등을 항암제 반응성 검사를 통해 수행함으로써 효과적인 의사 결정 수단을 제공할 수 있음이 보고되고 있기 때문에^{6,7,8} 항암제 반응성 검사의 새로운 활용 분야로 기대되고 있다.

IV. 의학적 검사방법으로서의 항암제 반응성 검사 요건

항암제 반응성 검사가 의학적 검사 방법으로서 적합한가에 관해서는 다음과 같은 여러 가지 사항들이 고려되어야 한다⁹. (1) 종양 조직 내에 섞여있는 정상 세포에 대한 영향을 배제하고 암 세포에 선택적인 검사 결과를 제공할 수 있는가? (2) 검사 성공률이 의학적 검사 방법으로서 받아들일 수 있을 만큼 높은가? (80% 이상) (3) 검사 결과가 화학 치료 후 반응을 및 생존률과 연관이 있는가? (4) 검사를 모든 종류의 histological type과 여러 유형의 검체에서 수행할 수 있는가? (5) 검사에 소요되는 기간이 임상적인 요구를 충족하는가? (6) cost effectiveness가 있는가?

인체 암 조직에는 여러 가지 다양한 정상 세포가 함께 존재하며 이 같은 정상 세포는 항암제 반응성 검사 결과에 영향을 미칠 수 있는 것으로 알려져 있다^{10,11}. ATP-CRA는 조직에서 세포를 분리한 직후에 Ficoll gradient centrifugation 및 anti-CD45 antibody conjugated magnetic beads를 이용한 immunomagnetic separation을 이용하여 면역 세포들을 제거하며¹², ultra low attachment plate를 이용한 부유 배양 방법으로 섬유아 세포 등의 정상 세포 증식을 억제하면서 항암제 반응성 검사를 시행함으로써 암 세포에 선택적인 실험 결과를 도출한다¹³.

ATP-CRA의 검사 성공률은 비소세포 폐암¹³에서는 90.6 %, 위 암¹⁴에서는 97%, 수술 후 채취된 유방 암¹⁵ 조직의 경우는 92.6 %, tru-cut biopsy로 채취한 유방암¹⁶ 조직에서는 93 %, 대장암과 같이 미생물 오염으로 인해 배양이 어려운 암 종에서는 85.5 % ~92.3% 이다^{17,18}. 특히 기관지경으로 채취되는 매우 적은 양의 검체로도 88.9% (40/45)의 검사 성공률을 나타냈으며 평균 6.2 ± 1.3 개의 항암제를 검사 할 수 있었다¹³.

ATP-CRA는 검체로부터 정상 세포를 제거하고 부유 배양 방법을 사용하므로 수술, 위 내시경, 기관지경, NAB로 채취된 고형암 조직뿐만 아니라 malignant effusion, 말초혈액(혈액암)등의 액상 검체에서도 검사 시행이 가능하다. 고형암의 경우 ATP-CRA에서 사용하는 세포 분리 방법을 통하여 한국인에게 빈번하게 발생하는 5대 암 종으로부터 얻을 수 있는 암 세포의 평균 숫자는 다음과 같다¹². 위암 (50,649 cells/mg), 폐암 (98,100 cells/mg), 간암 (48,958 cells/mg), 대장 및 직장암(32,135 cells/mg), 유방암 (15,663 cells/mg). 이렇게 분리된 세포의 평균 viability가 92%를 상회하는데, 이는 8개에서 12개 정도의 항암제를 검사하기에 충분한 양이다.

ATP-CRA의 검사소요 기간은 검체 인수 후 7일 이내이며 이 밖에도 검사의 재현성($94 \pm 3.8\%$)과 실험 오차 수준 (intra assay mean coefficient of variation; CV) $10.5 \pm 4.6\%$, 7.3% , 5.7% 등의 검사 수행 능력에 관한 자료가 보고되었다^{13,17,18,19}.

V. ATP-CRA의 임상 시험 결과

ATP-CRA는 비소세포 폐암, 유방암, 난소암, 대장암, 위암에서 연구되어, 환자에게 도움을 줄 수 있음을 입증하는 연구 결과들이 발표되었다 (Table 4). 43명의 환자를 등록하여 검사 결과에 상관 없이 표준 치료제를 이용하여 신 보강

항암 화학 치료를 시행하고 비교가 가능한 20명에서 환자의 임상 반응과 검사 결과를 분석했던 유방암 연구에서¹⁶ 항암 화학 치료에 좋은 반응을 보였던 환자들은 반응하지 않은 환자와 비교해서 항암 화학 치료 전 시행한 ATP-CRA 결과에서 높은 *in vitro* 세포 사멸 현상이 관찰 되었다 ($P < 0.05$).

29명의 난소암 환자를 대상으로 수술 후 채취한 조직을 이용하여 ATP-CRA 검사를 시행한 뒤 표준 항암 화학 요법을 시행한 연구 결과에서는¹⁹ 종양 표지자인 CA-125와 수술 후 잔류 종양 조직의 크기가 감소하는 정도와 투약된 항암제의 효과 여부를 판별한 ATP-CRA 결과가 높은 상관 관계를 보였다 ($P=0.046$).

진행성 비소세포 폐암 환자들을 대상으로 기관지경으로 채취된 암 조직을 이용하여 ATP-CRA 검사를 시행하고 검사 결과에 따라 개별 환자에게 가장 적합한 항암제를 투약한 환자 군과, 일반 표준 항암제가 투약되었던 환자들로 나누어 종양의 크기가 줄어드는 정도와 생존 기간을 분석한 결과, 검사를 통해 개인별 맞춤 항암제를 투여한 환자군이 평균 21.8 개월 생존했고 일반 표준 항암제를 투여한 환자군은 평균 9.7 개월을 생존하여 ($P=0.025$) ATP-CRA 결과를 치료에 활용하는 것이 바람직함이 입증 되었다²⁰.

대장 및 직장암에서 ATP-CRA가 시행된 181개의 사례 중에서 원격 전이된 병소가 있어 항암 화학 치료 후 종양의 크기 축소 여부를 단기간에 관찰 할 수 있었던 Duke's stage D 환자 26명을 분석한 결과, 검사 결과를 반영하여 개인 맞춤 치료가 시행된 환자군의 치료 후 반응율 (disease control rate; 종양의 크기가 50% 이상 줄어들거나 또는 종양의 크기가 증가하지 않은 환자들의 비율)은 85%로서 표준 항암 화학 치료가 일률적으로 시행된 환자 군의 50%에 비해 높았으나 대상 환자 수가 많지 않아 통계적인 유의성은 없었다¹⁸.

이 밖에도 결장에서 발생한 종양이 원위부 요관으로 침범되었고 다발성 간전이 및 다발성 복막 전이 소견을 보이던 환자가 ATP-CRA 검사를 통해서 가장 효과 있을 것으로 예측되는 항암제를 투약 받은 후 완전 관해를 보인 사례가 보고된바 있다²¹.

절제가 불가능한 위암 환자를 대상으로 ATP-CRA를 시행하고 검사 결과 가장 효과가 좋은 두 가지 항암제를 병합 투약하고 치료 성과를 관찰하는 전향적 연구를 시행한 결과에 따르면 전체 대상 환자의 반응율은 29.2% 이었으며 완전 관해 된 사례가 2건 있었다 (관해 판정 후 38 및 50 개월 현재 재발 징후 없이 생존중임). 1년 및 2년 생존율은 각각 18.5%, 13.9% 이었으며 1년 및 2년까지 재발하지 않은 경우가 두 경우 모두 10.6% 이었다. 개인 맞춤 항암 요법이 시행된 모든 환자에서 한 건의 grade 3 백혈구 감소증 보고를 제외하고 또 다른 심각한 약물 부작용 보고는 없었다. 이 같은 결과는 유사한 환자들을 대상으로 시행된 표준 항암 화학 요법 임상 시험에서 거둔 치료 성적들과 비교 시 동등하거나 우수한 결과이다²².

임상 연구 결과가 발표된 유방암, 난소암, 비소세포 폐암, 대장 및 직장암, 위암 등 대상 암 중 전체의 diagnostic accuracy는 68.8 %에서 90% 사이에 분포 하였으며 평균 83.5 %였다. 대부분의 경우에서 검사의 sensitivity보다는 specificity가 높고 positive predictive value보다는 negative predictive

value가 높은 결과로 보고 되었다. 이 같은 결과는 ATP-CRA가 항암제 감수성 보다는 항암제 저항성을 더 잘 예측 할 수 있음을 시사하는 결과이다. 악성 종양은 동일인의 종양 내에서도 매우 다른 이질성을 가질 수 있는 것으로 알려져 있기 때문에²³, 검사를 위해서 암 조직을 채취한 특정 시기 혹은 종양 조직 중 특정 부위에서의 항암제 감수성은 종양 전체의 항암제 감수성을 대표하는데 한계가 있는 반면에 한번 검출된 항암제 저항성은 종양 채취 시기에 구애 받지 않고 전체 종양의 항암제 저항성을 보다 잘 대변 할 수 있는 점을 고려하여 저항성을 보이는 약제를 배제하는 노력이 필요하다고 판단된다.

VI. 결론

이상에서 살펴본 바와 같이 ATP-CRA는 기존의 항암제 반응성 검사와는 달리 검사 성공률이 높고 결과를 확인하는데 필요한 시간이 짧을 뿐만 아니라 실험 방법을 표준화함으로써 검사의 재현성이 높으며 실험 오차 수준이 낮다. 이 밖에도 기관지경, 위내시경, NAB등으로 채취된 소량의 검체만으로도 실험 결과 도출이 가능하기 때문에, 임상에서 환자를 진료할 때 대면하는 다양한 상황에서 항암제 반응성 검사 시행을 위한 기반을 제공할 수 있다. 그 간에 보고된 ATP-CRA의 *in vitro* & *in vivo* correlation을 고려하면 ATP-CRA는 항암제 감수성뿐만 아니라 항암제 저항성 예측 역시 높은 수준의 정확성을 갖는 것으로 판단되며 ATP-CRA guided therapy를 활용할 때에 환자 치료에 보다 좋은 성과를 거둘 가능성이 있음이 확인되었다.

VII. 참고문헌

1. Salmon SE, Hamburger AW, Soehnen B, Durie BG, Alberts DS, Moon TE. Quantitation of differential sensitivity of human-tumor stem cells to anticancer drugs. N Engl J Med.1978. 298(24): 1321-1327.
2. Schrag D, Garewal HS, Burstein HJ, Samson DJ, Von Hoff DD, Somerfield MR. American society of clinical oncology technology assessment: chemotherapy sensitivity and resistance assays. J Clin Oncol. 2004. 22(17): 3631-3638.
3. Nagourney R. Chemosensitivity and resistance assays: a systematic review? J Clin Oncol. 2005. 23(15): 3640-3641
4. Moyer JD, Henderson JF. Ultrasensitive assay for ribonucleotide triphosphates in 50-1000 cells. Biochem Pharmacol. 1983. 32:3831-3834.
5. Bosanquet AG, Kaspers GJ, Larsson R, Nagourney RA, Nygren P, Pieters, R,

Staib P, Tidefelt U, Zwaan CM, Weisenthal LM. Individualized tumor response (ITR) profiling for drug selection in tailored therapy: meta-analysis of 1929 cases of leukemia and lymphoma. *Blood* 2007; 110; Abstract #3471.

6. Cree IA, Kurbacher CM. ATP-based tumor chemosensitivity testing: assisting new agent development. *Anticancer Drugs*. 1999. 10(5):431-435.

7. Di Nicolantonio F, Knight LA, Di Palma S, Sharma S, Whitehouse PA, Mercer SJ, Charlton PA, Norris D, Cree IA. Ex vivo characterization of XR11576 (MLN576) against ovarian cancer and other solid tumors. *Anticancer Drugs*. 2004. 15(9):849-860.

8. Raymond E, Lawrence R, Izbicka E, Faivre S, Von Hoff DD. Activity of oxaliplatin against human tumor colony-forming unit. *Clin Cancer Res*. 1998. 4(4):1021-1029.

9. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer principles & practice of oncology*. 2001. pp 302-304. Lippincott Williams & Wilkins. PA, USA.

10. Maehara Y, Kusumoto H, Kusumoto T, Anai H, Sugimachi K. Tumor tissue is more sensitive to mitomycin C, carboquone, and aclacinomycin A than is adjacent normal tissue in vitro. *J Surg Oncol*. 1989. 40(1): 4-7.

11. Yamaue H, Tanimura H, Tsunoda T, Tani M, Iwahashi M, Noguchi K, Tamai M, Hotta T, Arii K. Chemosensitivity testing with highly purified fresh human tumor cells with the MTT colorimetric assay. *Eur J Cancer*. 1991. 27: 1258-1263.

12. Choi SH. 2007. Patent (ROK) 10-0721927.

13. Kang SM, Park MS, Chang J, Kim SK, Kim H, Shin DH, Chung KY, Kim DJ, Sohn JH, Choi SH, Kim J, Yoon EJ, Kim JH. A feasibility study of Adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay (ATP-CRA) as a chemosensitivity test for lung cancer. *Cancer Res Treat*. 2005.37:223-227.

14. Lee JH. The Results of the ATP Based Chemotherapy Response Assay in Gastric Cancer Tissues. J Korean Gastric Cancer Assoc. 2007. 7(3): 160-166.
15. Woo SU, Bae JW, Kim HG, Choi SH, Kang DH, Lee JB, Koo BW. The Journal of International Medical Research. 2007. 35: 753-761.
16. Kim HA, Yom CK, Moon BI, Choe KJ, Sung SH, Han WS, Choi HY, Kim HK, Park HK, Choi SH, Yoon EJ, Oh SY. The use of an in vitro adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay to predict chemotherapeutic response in breast cancer. The Breast.2008.17:19-26.
17. Huh JW, Park YA, Sohn SK, Choi SH. In-vitro Chemosensitivity Test for Colorectal Cancer using an Adenosine-triphosphate-based Chemotherapy Response Assay (ATP-CRA) J Korean Soc C oloproctol. 2007. 23:172-179.
18. Park CS, Choi SH, Kim HD. Preliminary study of the clinical features of the chemosensitivity test in colorectal cancer. J Korean Soc Coloproctol. 2007. 23:358-364.
19. Han SS, Choi SH, Lee YK, Kim JW, Park NH, Song YS, Lee HP, Kang SB. Predictive value of Individualized tumor response testing by ATP-based chemotherapy response assay in ovarian cancer. Cancer Investigation. 2008. 26:426-430.
20. Moon YW, Choi SH, Kim YT, Sohn JH, Chang J, Kim SK, Park MS, Chung KY, Lee HJ, Kim JH. Adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay (ATP-CRA)-guided platinum-based two-drug chemotherapy in unresectable non-small cell lung cancer. Cancer.2007.109:1829-1835.
21. Huh JW, Park YA, Jung EJ, Lee KY, Kwon JE, Sohn SK. Complete remission of unresectable colon cancer after preoperative chemotherapy selected by adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay. J Korea Med Sci. 2008. 23:916-919.
22. Park JY, Kim YS, Bang S, Hyung WJ, Noh SH, Choi SH, Song SY. ATP-based chemotherapy response assay in patient with unresectable gastric cancer.

Oncology. 2007. 73: 439-440.

23. Sirachy J. An approach to the problem of heterogeneity of human tumor cell populations. Br J Cancer. 1979. 39(5): 570-577.

24. Loizzi V, Chan JK, Osann K, Cappuccini F, DiSaia PJ, Berman ML. Survival outcomes in patients with recurrent ovarian cancer who were treated with chemoresistance assay-guided chemotherapy. Am J Obstet Gynecol. 2003. 189(5):1301-1307.

25. Kurbacher CM, Cree IA, Bruckner HW, Brenne U, Kurbacher JA, Müller K, Ackermann T, Gilster TJ, Wilhelm LM, Engel H, Mallmann PK, Andreotti PE. Use of an ex vivo ATP luminescence assay to direct chemotherapy for recurrent ovarian cancer. Anticancer Drugs. 1998. 9(1):51-57.

26. Xu JM, Song ST, Tang ZM, Jiang ZF, Liu XQ, Zhou L, Zhang J, Liu XW. Predictive chemotherapy of advanced breast cancer directed by MTT assay in vitro. Breast Cancer Res Treat. 1999. 53(1):77-85.

27. Kawamura M, Gika M, Abiko T, Inoue Y, Oyama T, Izumi Y, Kobayashi H, Kobayashi K. Clinical evaluation of chemosensitivity testing for patients with unresectable non-small cell lung cancer (NSCLC) using collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test (CD-DST). Cancer Chemother Pharmacol. 2007. 59(4):507-513.

28. Cortazar P, Gazdar AF, Woods E, Russell E, Steinberg SM, Williams J, Ihde DC, Johnson BE. Survival of patients with limited-stage small cell lung cancer treated with individualized chemotherapy selected by in vitro drug sensitivity testing. Clin Cancer Res. 1997. 3(5):741-747.

29. Iwahashi M, Nakamori M, Nakamura M, Noguchi K, Ueda K, Nakatani Y, Ojima T, Ishida K, Naka T, Yamaue H. Individualized adjuvant chemotherapy guided by chemosensitivity test sequential to extended surgery for advanced gastric cancer. Anticancer Res. 2005 25(5):3453-3459.

30. Nakamura R, Saikawa Y, Kubota T, Kumagai A, Kiyota T, Ohashi M, Yoshida M, Otani Y, Kumai K, Kitajima M. Role of the MTT chemosensitivity test in the prognosis of gastric cancer patients after postoperative adjuvant chemotherapy. *Anticancer Res.* 2006. 26(2B):1433-1437.
31. Tilgen U, Reinhold U. Recent results in cancer research; chemosensitivity testing in oncology. 2003. pp 3-62. Springer-Verlag. Heidelberg, Germany
32. Blumenthal RD. Method in molecular medicine; chemosensitivity volume1 in vitro assays. 2005. pp 3-225. Humana Press. NJ, USA
33. Kim BS, Ahn YM, Kim J, Yoon EJ, Choi SH. Clinical utility of adenosine triphosphate-based chemosensitivity response assay (ATP-CRA) in non-small cell lung cancer: preliminary study. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2004.22: 7259.

Key Words: adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay (ATP-CRA), Individualized tumor response testing (ITRT), Chemosensitivity test, Chemotherapy, Cancer

Disclaimer: "BioWave" is not political. The views and opinions expressed by its writers do not necessarily reflect those of the Biological Research Information Center(BRIC). © Copyright 2010, the Biological Research Information Center(BRIC), Pohang 790-784, Korea.

본 글의 저작권은 "생물학연구정보센터 BioWave"에 있습니다.

일부 내용 인용 시 "생물학연구정보센터 BioWave (<http://bric.postech.ac.kr/biowave>) Vol. 12 No. 9"으로 정보 출처를 밝혀야 합니다.

전체 내용에 대한 인용 시 생물학연구정보센터의 사전 허락

([mail: biowave@bric.postech.ac.kr](mailto:biowave@bric.postech.ac.kr) Tel: 054-279-8196~8)을 받으신 후 전제가 가능합니다.

(단. 원 저작자의 경우는 정보 출처만 밝히시면 됩니다.)

Table 1. Treatment outcomes of chemosensitivity-test guided therapy

Cancer	Number of patients	Group	Treatment outcomes			
			Response rate	Median OS	1-year OS	5-year OS
			(%)	(Months)	(%)	(%)
Recurrent ovarian Cancer ²⁴	31	TEST	65*	38**	90**	
	31	STD	35	21	70	
Recurrent ovarian Cancer ²⁵	25	TEST	64	22.3		
	30	STD	37	17.3		
Advanced breast Cancer ²⁶	73	TEST	76.7*	19.2	74.0	20.5
	73	STD	43.8	17.7	67.1	12.3
NSCLC ²⁷	22	TEST	72.7***	15		
	11	STD	0	4.5		
Untreated SCLC ²⁸	8	TEST	100	38.5*		
	44	STD	100	19		
Advanced gastric Cancer ²⁹	32	TEST				56.3*
	32	STD				28.1
Advanced gastric Cancer ³⁰	38	TEST				>50*
	20	STD				<35

Abbreviations: OS, Overall Survival; Test, Chemosensitivity-guided therapy; STD, Standard therapy; NSCLC, non-small cell lung cancer; SCLC, small cell lung cancer. P values: * <0.05, ** <0.005, *** <0.0005

Table 2. Overview of the most frequently used chemosensitivity tests

Category	Assay	End-point	Comment	
in vivo	SRCA	Tumor size	Mouse xenograft	
in vitro	Cell death assay	DiSC	Light microscopic reading of nonviable cells	Dye exclusion method
		MTT	Formazan formation catalyzed by succinate dehydrogenase	Metabolic method
		ATP	ATP content in cultured cells	Metabolic method
	Growth inhibition assay	HTCA	Colony formation and count	Clonogenic method
		CCS	Colony formation and count	Clonogenic method
		EDR	³ H-thymidine incorporation	Radioactive precursor incorporation
Miscellaneous	HDRA	Formazan formation catalyzed by succinate dehydrogenase	Metabolic method	

Abbreviations: SRCA, subrenal capsule assay; DiSC, differential staining cytotoxicity; MTT, methyl thiazolyl-diphenyl tetrazolium bromide; ATP, adenosine triphosphate; HTCA, human tumor cloning assay; CCS, capillary cloning assay; EDR, extreme drug resistance; HDRA, histoculture drug response assay (reviewed in Schrag et al., 2004; Tilgen and Reinhold, 2003; Blumenthal, 2005)^{2,31,32}.

Table3. Correlation of in vitro test results with patient response

Assay	Total	Number of cases				Percentage (%)			
		True positive	True negative	False positive	False negative	PPV	NPV	Sens	Spec
HTCA	2300	512	1427	226	135	69	91	79	86
EDR	171	90	40	21	20	81	67	82	66
MTT	326	187	74	37	28	83	73	87	67
DiSC	510	247	175	72	16	77	92	94	71
ATP	129	74	37	6	12	93	76	86	86

Modified from table 17-4 in DeVita et al., 2001⁹. Abbreviations: PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; Sens, sensitivity; Spec, specificity; HTCA, human tumor cloning assay; EDR, extreme drug resistance; MTT, methyl thiazolyl-diphenyl tetrazolium bromide; DiSC, differential staining cytotoxicity; ATP, adenosine triphosphate; True positive = patients who are found to be sensitive by in vitro methods and respond to therapy. True negative = patients who are found to be resistant by in vitro methods and do not respond to therapy. False positive = patients who are found to be sensitive by in vitro methods but are clinically resistant. False negative = patients who are found to be resistant in vitro methods but respond clinically. sensitivity = true positive/(true positive+ false negative). specificity = true negative/(false positive + true negative), positive predictive value = true positive/(true positive + false positive), negative predictive value = true negative/(false negative + true negative).

Table 4. Predictive values and treatment outcomes obtained with ATP-CRA

Cancer	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Negative predictive value (%)	Positive predictive value (%)	Diagnostic accuracy (%)	Summary of main findings
Breast cancer ¹⁶	78.6	100	100	66.7	85	Diagnostic accuracy achieved by immunohistochemical method using estrogen or progesterone receptor was lower than that achieved using ATP-CRA.
Ovarian cancer ¹⁹	94.1	66.7	94.1	66.7	90	In patients found to be “chemosensitive” by the ATP-CRA, there was a significant (P<0.001) decrease between the mean pre-chemotherapeutic CA-125 level after operation and mean post-chemotherapeutic CA-125 level. In patients found to be “chemoresistant” by ATP-CRA, this significant difference was not noted.
Non small cell lung cancer ³³	83.3	100	100	80	90	Very small amounts of tissue, such as bronchoscopic biopsy specimens, are feasible for ATP-CRA.
Non small cell lung cancer ²⁰			78.6	61.1	68.8	The group found to be “chemosensitive” by ATP-CRA showed better clinical response (P = 0.036), longer progression-free survival (P = 0.060), and longer overall survival (P = 0.025) than that found to be “chemoresistant”.
Colorectal Cancer ¹⁸						The effect of treatment was better in the test-guided therapy group than the standard therapy group (Disease control rate, 50% in the standard therapy group vs. 85% in the test-guided group. P > 0.05).
Advanced stomach cancer ²²						In the test-guided therapy group, the median overall survival was 6.3 months. The 1- and 2-year survival rates were 18.5 % and 13.9%, respectively. The median time to tumor progression was 3.2 months. The 1- and 2-year progression-free survival rates were 10.6%. Two cases of complete remission were found.
Colon cancer ²¹						Complete remission was observed in the colon cancer patient with multiple metastases after preoperative chemotherapy selected by ATP-CRA was administered