

2009년 2월
박사학위논문

전이성 대장암에서
K-ras 돌연변이

조선대학교 대학원

의학과

강 지 은

전이성 대장암에서
K-ras 돌연변이

K-ras Gene Mutations in the metastatic ColoRectal
Cancer

2009년 2월 25일

조선대학교 대학원
의학과
강 지 은

전이성 대장암에서
K-ras 돌연변이

지도교수 박 치 영

이 논문을 의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2008년 10월

조선대학교 대학원

의학과

강 지 은

강지은의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 정 춘 해 印

위원 조선대학교 교수 홍 순 표 印

위원 조선대학교 부교수 김 현 리 印

위원 조선대학교 조교수 김 동 민 印

위원 조선대학교 조교수 박 치 영 印

2008년 12월

조선대학교 대학원

목 차

표목차	ii
도목차	iii
ABSTRACT	iv
I. 서론	1
II. 대상 및 방법	3
1. 대상	3
2. 반응기준	3
3. DNA추출및 K-ras 돌연변이 검사.....	4
4. 통계학적 분석.....	5
III. 결과	6
1. 대상자의 임상적 특성	6
2. Cetuximab치료군	6
3. K-ras mutation유무와 생존기간과의 관계.....	7
IV. 고찰	8
V. 요약 및 결론	13
참고문헌	14

표 목 차

Table 1. RECIST criteria.....	19
Table 2. Clinical characteristics of the patients (N=20).....	20
Table 3. Comparison of clinical characteristics and response to chemotherapy according to k-ras mutation.....	22
Table 4. Clinical characteristics of the patients receiving cetuximab (N=20).....	23

도 목 차

Figure 1. Ras upstream & downstream signaling.....	24
Figure 2. A representative sequencing for conon 12 of k-ras gene using DNA from a metastatic colon cancer patient.....	25
Figure 3. Effect of cetuximab on overall survival in patients with wild k-ras(N=14).....	26
Figure 4. Effect of k-ras on overall survival.....	27

ABSTRACT

K-ras Gene Mutations in the metastatic ColoRectal Cancer

Kang, Ji-Eun

Advisor : Prof. Park, Chi-young, M.D.

Department of Medicine,

Graduate School of Chosun University

Purpose: The anti-epidermal growth factor receptor cetuximab has been proven to be efficient in metastatic colorectal cancer(mCRC). This study was aimed to evaluate the prevalence and prognostic implication of k-ras mutation in 20 mCRC treated with/without cetuximab, in Korea.

Methods: Patients with mCRC treated with/without cetuximab with available archival tissue specimens were included. K-ras mutation was analyzed using polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism(PCR-SSCP) and several clinical variables, including response rate of chemotherapy were obtained.

Results: K-ras mutation was detected in 6 of 20 patients (30%). Response rates to cytotoxic chemotherapy were 42.9 % and 16.7 % for the wild and mutant k-ras(p value 0.277). Response rate to cetuximab treatment among patients with wild type k-ras tumors was 20%.

Conclusion: In korea, prevalence of k-ras mutation in mCRC was similar, but response rate to cetuximab treatment among wild k-ras patients was relatively low.

Keywords : colorectal, k-ras, cetuximab

1. 서론

대장암은 서구에서는 흔히 발생하는 악성 종양의 하나로 암 관련 사인의 2, 3번째를 차지하고 있으며 국내에서도 대장암의 발생빈도가 급격히 증가하여, 2002년 국내 암 발생의 11.2%를 차지하고 있다(한국중앙암등록사업 2002보고서; Shin, 2002). 또한 암으로 인한 사망 빈도에서도 폐암, 위암, 간암에 이어 4번째를 차지하고 있다. 대장암의 약 30%에서는 진단시 전이 병변을 가지고 있으며, 근치적 절제술을 시행받은 환자의 약 25~30%에서도 결국 재발하게 된다.

전이성 대장암에서 과거 40년간 사용되어 오던 5-Fluorouracil과 1996년 이후 oxaliplatin 및 irinotecan의 약제가 도입되면서 반응률은 물론 중앙 생존기간이 20개월 정도로 연장되었다(Goldberg, 2004; Saltz 2002). 최근 분자 및 세포 생물학적 발달로 암발생에 관여하는 여러물질들이 발견되었고 이로 인해 표적치료가 가능하게 되었다. 대장암 치료에서 epidermal growth factor receptor(EGFR) 및 vascular endothelial growth factor(VEGF)를 표적으로 하는 cetuximab(Erbitux®), bevacizumab(Avastin®)등이 사용가능하게 되면서 치료성적의 향상을 보이고 있다(Khorana, 2003; Cunningham, 2004; Kabbinavar, 2003). 그러나 이러한 표적치료제들의 사용으로 인한 경제적 부담이 증가하게 되어 이들 치료에 따른 효과적인 환자군의 선별을 위한 예측 인자에 대한 필요성이 대두되게 되었다. EGFR 표적항체인 cetuximab의 치료에 대한 EGFR의 영향에 관한 연구에서 EGFR에 대한 면역조직학적 염색유무, 염색 정도와 치료 효과와는 무관하다고 하였으며, 치료중 피부 발진을 보인 환자군에서 그렇지 않은 환자군에 비해서 효과가 있다고 보고하였다(Cunningham, 2004; Saltz, 2004). 그러나 치료전에 cetuximab의 효과를 예측할수 있는 인자는 없었다. 최근 k-ras mutation을 가진 비소세포

폐암에서 EGFR에 대한 tyrosine kinase 억제제의 효과가 없었다는 것이 보고되면서(Van Zandwijk, 2007; Massarelli, 2007; Pao, 2005) 전이성 대장암에서 k-ras mutation유무에 따른 cetuximab의 치료효과에 대한 연구가 활발하게 진행되게 되었다. 최근 외국보고들에 따르면 k-ras mutation이 없는 환자에서 cetuximab이 효과적이라는 보고가 나오고 있으나(Christos, 2008; Lievre, 2008) 국내에서는 대장암에서 k-ras mutation의 정도와 k-ras mutation유무에 따른 cetuximab의 효과에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구는 전이성 대장암으로 진단된 한국인에서 k-ras mutation의 유무, k-ras mutation 유무에 따른 cetuximab의 효과를 평가하고자 하였다.

II. 대상 및 방법

1. 대상

2007년 1월부터 2008년 6월까지 조선대학교 병원에서 전이성 대장암으로 항암치료를 3주기이상 받고 반응평가가 가능했던 환자중 k-ras mutation검사를 시행한 20명을 대상으로 하였다. 대상 환자의 성별, 연령, 진단시 CEA치, 항암치료종류 및 반응은 후향적으로 환자의 병록지를 검토하여 확인하였다.

2. 반응기준 (table 1)

항암치료에 대한 반응평가는 항암화학요법 치료 시작후 매 2~3주기마다 평가하였으며, RECIST(response evaluation criteria in solid tumors)를 기준으로 완전관해, 부분관해, 병의 진행, 병의 안정 상태로 하였다.

완전관해(Complete Response, CR): 종양에 대한 임상적 그리고 방사선학적 모든 증거가 소실되고 4주 이상 지속

부분관해(Partial Response, PR): 대상병변 최대직경의 합이 적어도 치료 전 최대직경의 합보다 30%가 감소되고 4주 이상 지속

정지성 병변(Stable Disease, SD): 병변이 부분관해에 해당되게 충분히 감소된 것도 아니고, 병의 진행에 해당되게 충분히 증가한 경우도 아닌 불변인 상태.

병의 진행(Progressive Disease, PD): 병변의 최대직경 합이 최소 20% 증가되었거나 하나 또는 그 이상의 새로운 병변이 나타난 경우.

3. DNA추출 및 K-ras 돌연변이 검사(figure 1, 2)

K-ras 돌연변이 여부는 PCR-SSCP(polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism) 방법으로 조사하였다(Oh, 2001). 포르말린 고정과 파라핀 포매조직을 5 μ m 두께의 절편으로 만들어 파라핀을 제거하기 위해 크실렌 1ml를 가하였다. 이후 60°C에서 10분간 둔 후 15,000 rpm으로 10분간 원심분리하는 과정을 2번 반복한 후 100% 에탄올 1ml로 크실렌을 제거하였다. 15,000 rpm으로 10분간 원심분리하며 다시 이 과정을 2-3회 반복한 다음 pellet을 건조하였다.

DNA추출은 High pure PCR template preparation kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 eppendorf tube의 건조된 조직에 boiling resin 150 μ l를 넣고 proteinase K 5 μ l를 넣은 후 56°C에서 1시간 동안 반응하였다. 이 tube를 95°C에서 10분간 반응한 후 얼음에 10분간 두고, 다시 10분간 95°C에 반응시킨 다음, 15,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 상층액 2 μ l를 PCR에 사용하였다. 추출한 DNA 200 ng, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 10 pmole primers, 2.5 U Taq polymerase 및 증류수를 가하여 PCR 혼합액이 25 μ l가되게 한 후, PCR thermal cycler (Perkin Elmer 2400, U.S.A.)을 사용하여 K-ras codon 12에 대한 유전자 증폭을 시행하였다. 사용한 primer의 염기서열은 아래와 같다.

K-ras codon 12: 5、-G ACTGAATATAAACTTGTGG-3、

5、-C TATTGTTGGATCATATTTCG-3、

PCR조건은 처음 94°C에서 5분간 변성시킨 후 94°C에서 1분간 변성, 55°C에서 2분간 annealing, 72°C에서 7분간 extension하였다. PCR반응의 적절성을 평가하기 위하여 20 ug ethidium bromide가 함유된 1.2% 아가로즈겔에 PCR 산물 3 L와 loading dye를 섞어 loading 한 후, 100 V에서 20분간 전기영동을 시키고 UV transilluminator로 100-200 bp 사이에 나타나는 band를 확인한 다음 polaroid 사진기로 촬영하였다. DNA marker로 100 bp ladder 5 L를 loading dye와 섞어 사용하였다. 5 μ l의 PCR 산물과 증류수에 denaturing solution (95% formamide, 0.05% bromophenol blue) 5 μ l를 넣고 끓는 물에서 3분간 방치한 후 급히 얼음에 식히고, 12.5% polyacrylamide gel에 load하고 150 V로 6시간 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 후 gel을 10% 에탄올에 10분간 담가 둔 후 1% nitric acid에 3분간 담그고, 0.012 μ m silver nitrate 용액에 30분간 담가 증류수로 씻어준 후 0.28 μ m sodium carbonate, 0.019% formaldehyde 용액으로 발색시켰다. DNA 띠가 적절하게 염색되면 10% 아세트산으로 3분간 고정한 후 증류수로 씻고 셀로판으로 겔을 말려서 보관하였다.

4. 통계학적 분석

통계학적 처리는 SPSS version 10.0 (SPSS Inc., Chicago, U.S.A.) 통계 프로그램을 이용하여 각 지표에 따라 Fisher's exact test, Kaplan-Meier method, log-rank test를 사용하였고, p값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 의미가 있는 것으로 판정하였다.

III. 결과

1. 대상자의 임상적 특성(table 2, 3)

전체 대상자 20명중 남자 12예, 여자 8예였고, 연령은 48세에서 81세까지로 평균 나이는 62.8세였다. K-ras 돌연변이는 6예(30%)에서 관찰되었으며, 평균 연령은 62.7세(범위, 50-72세)였고, 남자 4예, 여자 2예였으며 진단당시의 평균 CEA치는 54.8 ng/mL(범위, 14.6-84.7 ng/mL)였다. 정상 k-ras군의 평균연령은 62.9세(범위, 48-81세)였고, 남자 8예, 여자 6예였으며 진단당시의 평균 CEA치는 63.7 ng/mL(1.7~440 ng/mL)였다. 정상 k-ras군과 돌연변이 군간 성별, 연령, 진단시 CEA치와 같은 임상적인 특징에는 유의한 차이가 없었다. 정상 k-ras군과 돌연변이군간에 항암치료에 대한 반응은 정상 k-ras군에서 42.9%로 돌연변이 k-ras군의 16.7%에 비해서 높았으나 통계학적 유의성은 없었다(p value 0.277).

2. Cetuximab치료군(table 4)

전체 대상자 20명 중 6명만이 cetuximab치료를 받았으며, k-ras 돌연변이가 있었던 1례와 정상 k-ras를 가진 5례였다. cetuximab에 부분 반응 이상을 보인 경우는 단 1예였으며, 정상 k-ras를 가진 환자였다. 2례에서는 정지성 병변을 보였고, 2례에서 병의 진행을 보였다. 병의 진행을 보인 2례중 1례는 정상 k-ras를 보인 환자였으며, 치료하는 동안에 grade 2의 피부발진이 발생되었다. 정상 k-ras를 가진 5례중 1례만 부분 반응을 보여 정상 k-ras군에서 cetuximab의 반응율은 20%였다.

3. K-ras mutation 유무와 생존기간과의 관계 (figure 3, 4)

정상과 돌연변이 k-ras군의 평균생존기간은 각각 18.4개월과 7.4개월로 정상 k-ras군에서 생존기간이 길었으나 p value는 0.384로 통계학적인 유의성은 없었다. 또한 정상 k-ras를 보인 군에서 cetuximab 치료의 유무에 따른 생존기간 분석에서도 cetuximab을 사용한 군에서 생존기간의 연장이 관찰되긴했지만 (56.0개월 vs 12.9개월) p value가 0.259로 통계학적 유의성은 없었다.

IV. 고찰

대장암은 우리나라에서 암발생 4위를 차지하는 암으로 한국인암 등록사업이 처음 시작된 1980~1982년에는 전체 암의 5.8%를 차지하던 것이 2000년에는 전체 암의 10.3%를 차지하게 되어 점차 증가하고 있다(한국중앙암등록사업 2002보고서; Shin, 2002). 경제발전에 따라 식생활이 서구화되면서 대장암의 발생빈도는 계속 증가할 것으로 예상되고, 또한 암으로 인한 사망 빈도에서도 폐암, 위암, 간암에 이어 4번째를 차지하고 있다.

대장암의 주된 치료는 근치적 수술이나, 대장암의 약 30%에서는 진단시 전이 병변을 가지고 있으며, 근치적 절제술을 시행받은 환자의 약 25~30%에서도 결국 재발하게 된다(Bohm, 1993; Ragnhammar, 2001). 전이성 대장암의 주된 치료는 항암화학요법이다. 지난 40년간 대장암에 대한 항암화학요법은 5-FU의 적절한 투여방법에 따른 연구였으나 oxaliplatin과 irinotecan 등의 약제가 등장하면서 5-FU와 병용투여를 통해 생존기간의 증가를 가져왔다(Goldberg, 2004; Saltz, 2002, De Gramont, 2000). 최근에는 표적치료의 분야에서 epidermal growth factor receptor(EGFR) 및 vascular endothelial growth factor(VEGF)등에 대한 단일클론 항체가 개발되어 치료면에서 좀더 효과를 얻을수 있게 되었다(Saltz, 2004; Khorana, 2003; Cunningham, 2004; Kabbinavar, 2003). 그러나 새로운 고가의 표적치료제들이 개발되면서 어떤 특성을 지닌 환자군에서 효과적이겠는가 하는 예측인자에 대한 연구가 필요하게 되었다(Tappenden, 2007).

EGFR은 ErbB계열에 속하는 tyrosine kinase 수용체로 대장암을 비롯한 여러 악성종양에서 발현되고 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 대장암의 경우 그 발현율은 25~77%에 달한다(Carpenter, 1990; Salomon,

1995; Gullick, 1991). 이러한 EGFR의 발현은 대장암의 빠른 진행, 전이, 항암치료에 대한 저항성 등 불량한 예후와 관련이 있는 것으로 알려지고 있다(Goldstein, 1996). EGFR에 대한 단클론항체인 cetuximab은 EGFR과 결합하는 murine 단클론항체로서 EGFR의 ligand와 경쟁적으로 작용하여 EGFR의 차단 혹은 발현을 저하시켜서 암의 성장을 억제하고 환자의 예후를 향상시키는 것으로 알려져 있다. 특정한 표적에 대한 약물이 효과를 보이려면 환자의 종양에 해당 표적이 존재해야 하는 것은 당연하다. 그러나 여러 연구자들에 의해 면역조직화학적 방법으로 측정된 EGFR 발현의 정도가 EGFR 억제제의 치료에 대한 반응이나 생존기간의 향상과의 관련성을 관찰한 연구에서 통계학적인 유의성이 없었다고 보고하였다(Saltz, 2004; Zhang, 2006; Chung, 2005; Hebber, 2006).

최근 여러 연구자들에 의해 k-ras mutation을 동반한 비소세포폐암에서 EGFR표적치료제, 특히 gefitinib(Iressa®)이나 erotinib(Tarceva®)과 같은 tyrosine kinase inhibitor의 효과가 없다는 것이 보고되었으며(Pao, 2005; Massarelli, 2007; van Zandwijk, 2007), 이에 따라 대장암에서도 cetuximab에 대한 치료효과와 k-ras mutation동반 유무에 따른 연구들이 진행되게 되었다. Vogelstein과 Fearon 등(Vogelstein, 1988; Fearon, 1990)이 DNA의 분자적 변화에 근거한 carcinogenesis 모델을 발표한 이후 많은 연구들이 진행되어 현재는 정상 대장 상피세포에서 용종이 생기고 이것이 진행하여 대장 직장암이 되는 과정에서 생기는 유전적 이상이 계속 축적되어 대장 직장암이 되는 것으로 이해 되고 있다. 이러한 과정에 작용하는 암유전자중에 하나가 ras유전자이다. Ras유전자는 H, K 그리고 N-ras로 구분되며 모두 188개의 아미노산으로 구성된 21kD의 p21 guanine binding protein을 coding한다(Lowy, 1993; Friday, 2005; Adjei, 2001; Campbell, 2004). 특히 염색체 12번 장완에 위치한 k-ras 유전자의 돌연변이가 소화기계 선암에서 주로 발견되고 있다. 이 p21-ras 단백질은 세

포막의 내부에 위치해 있으면서 guanine diphosphate(GDP)와 결합하여 불활성 상태로 존재한다. 그러나 epidermal growth factor receptor(EGFR)와 Erb B2의 heterodimer로 이루어진 수용체에 tumor growth factor alpha(TGF- α)가 결합하게 되면 p21-ras에 GDP대신 guanine triphosphate(GTP)가 결합하면서 p21-ras 단백질이 활성화되어 tyrosine kinase기능을 발휘하여 다른 단백질들을 인산화시켜서 결국 세포핵까지 신호를 전달하게 된다. 활성화 된 p21-ras 단백질은 GTPase 활성화단백질(GTPase activating proteins, GAP)에 의하여 GTP에서 GDP 결합형태로 되면서 다시 불활성화된다. Ras 암유전자의 경우 ras 암유전자의 종산물인 p21-ras 단백질이 과발현되어 성장 신호를 세포내로 필요이상 전달함으로써 암의 발생에 관여될 수도 있으나, 주로 ras 유전자의 돌연변이에 의하여 ras 단백질이 불활성화 되지 않음으로써 세포 내로 성장 신호를 필요 이상 과전달하여서 일어난다. 대표적으로 k-ras 유전자의 codon 12, 13 그리고 61에 돌연변이가 잘 발생하는 것으로 알려져 있으며, codon 12에 돌연변이가 가장 흔하다(Breivik, 1994; Brink, 2003; Donovan, 2002). Akagi 등(Akagi, 2007)에 의해서 최근 codon 19에 돌연변이가 보고되기도 하였다. K-ras 유전자의 돌연변이 중 가장 흔히 발견되는 형은 정상적인 GGT(glycine)에서 GAT(aspartic acid), TGT(cystine)또는 GTT(valine)로 치환되는 것인데 GTT변이가 대장암에서 흔하게 발견된다(Lechner, 2000).

Lievre 등(Lievre, 2008)은 전이성 대장암에서 k-ras mutation은 27%에서 관찰되었고, k-ras mutation이 있었던 24명에서 cetuximab은 전혀 효과가 없었으며, k-ras mutation이 없었던 65명중에서는 26명(40%)이 반응을 보였다고 보고하였다. 본 연구에서 k-ras mutation은 30%에서 관찰되어 외국 보고와 비슷하였으나, 정상 k-ras 환자에서 cetuximab의 반응률은 20%로 외국의 보고보다는 낮게 관찰되었다. Christose 등(Christose, 2008)은 전이성 대장암에서 k-ras mutation 유무가 cetuximab

치료에 대한 반응과 관련이 있다고 보고하였으며, k-ras mutation이 있는 환자에서는 cetuximab을 사용하는 것과 그렇지 않은 군간에 생존기간에 유의한 차이가 없었다고 보고하였다. 또한 cetuximab으로 치료하지 않은 경우에 있어서는 k-ras mutation유무자체가 생존기간에 유의한 차이가 없다고 보고하였다.

Cetuximab을 사용할 때 나타날 수 있는 부작용은 가장 흔한 것이 전신쇠약(18%), 고열(16%), 구역(16%) 그리고 여드름 양상의 피부발진(15%)등이 있다(Cunningham, 2004). 최근 몇몇 연구자들에 의해서 cetuximab을 사용후에 피부발진을 보인 환자군에서 29%의 높은 반응률을 보여 피부발진이 없었던 환자군의 3%와 뚜렷한 대조를 보였다(Cunningham, 2004; Saltz, 2004). 그러나 Lievre 등(Lievre, 2008)에 의한 다변량분석에서는 k-ras mutation여부만 생존기간과 유의성이 있었고, 피부발진은 없었다고 보고하였다. 본 연구에서 총 6명의 환자에서 cetuximab을 사용하였으나 치료 반응률과 관련성이 있는 것으로 알려진 피부발진은 단 1예에서만 발생이 되었고, 정상 k-ras를 보인 환자였으나, 3주기후 반응평가를 했을때 진행을 보였다. 본 연구의 경우로는 피부발진과 k-ras mutation유무와의 관련성등을 평가하기는 어렵겠지만, 앞으로 cetuximab의 치료효과를 예측할수 있는 인자로 인정되고 있는 피부발진과 k-ras mutation유무와의 관련성에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구의 제한점은 경제적 부담으로 인한 cetuximab을 투여받은 환자가 적다는 것과, 전이성 대장암에서 5-FU, oxaliplatin, irinotecan등의 세가지 약제를 병합해서 치료할 경우 평균생존기간이 20개월을 넘는 것을 고려할 때 관찰기간이 짧다는 것이다.

그렇다 하더라도 정상 k-ras를 보인 군에서 cetuximab의 치료효과가 20%정도로 낮은 것을 고려하여 외국의 보고와 비교연구가 필요함을

보여주었고, 정상 k-ras에서 cetuximab의 치료후 grade 2의 피부발진이 발생하였음에도 병의 진행이 관찰된 것등을 고려할 때 k-ras mutation이 외에 표적치료제에 대한 반응을 예측할수 있는 인자들에 대한 연구가 필요함을 보여준다고 할 수 있다.

VI. 요약 및 결론

2007년 1월부터 2008년 6월까지 조선대학교 병원에서 전이성 대장암으로 항암치료를 3주기이상 받고 반응평가가 가능했던 환자중 k-ras mutation검사를 시행한 20명을 대상으로 하였다. 한국인 전이성 대장암에서 k-ras mutation 발현율과 함께 k-ras mutation 유무에 따른 EGFR 표적항체인 cetuximab의 치료효과를 보고자 하였다. K-ras codon 12의 변이 여부는 PCR-SSCP(polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism) 방법으로 조사하였다.

연구결과 k-ras mutation의 발현율은 30%(6/20) 였으며, 정상 k-ras군과 돌연변이군간에 성별, 연령, 진단시 CEA치뿐만 아니라 항암 치료에 반응률에 유의한 차이는 없었다. 총 6명에서 cetuximab치료를 받았으며, 정상 k-ras군에서 cetuximab 치료에 따른 반응율은 20%(1/5)였다. K-ras mutation의 유무와 생존기간간의 비교에서는 통계학적인 유의성이 없었으며, 정상 k-ras군에서 cetuximab치료의 유무에 따른 생존기간 분석에도 통계학적 유의성이 없었다.

결론적으로, 한국인에서 정상 k-ras군에서 cetuximab의 치료효과는 외국에 비해서 다소 낮았다. 우리나라에서 향후 더 많은 환자를 대상으로 하는 연구가 필요할 것으로 생각되며, 흔하게 발생하는 k-ras 돌연변이외에도 검사가 필요할 것으로 생각된다.

V. 참고문헌

- Adjei AA: Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 93:1062-74, 2001
- Brevik J, Meling GI, Spurkland A: K-ras mutation in colorectal cancer: relations to patient age, sex and tumour location. *Br. J. Cancer* 69:367-71, 1994
- Brink M, de Goeij AF, Weijenberg MP, Roemen GM, Lentjes MH: K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis* 24:703-10, 2003
- Bohm B, Schwenk W, Hucke HP, Stock W: Does methodic long-term follow-up affect survival after curative resection of colorectal carcinoma? *Dis Colon Rectum* 36:280-6, 1993
- Campbell PM, Der CJ: Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol.* 14:105-14, 2004
- Carpenter G, Cohen S: Epidermal growth factor. *J Biol Chem* 265:18-26, 2001
- Christos SK, Shirin KF, Derer JJ: K-ras Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 359:1757-65, 2008
- Chung KY, Shia J, Kemeny NE: Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 23:1803-0, 2005
- Cunningham D, Humblet Y, Siena S: Cetuximab monotherapy and

- cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351:337-45, 2004
- de Gramont A, Figer A, Seymour M: Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 18:2938-47, 2000
- Donovan S, Shannon KM, Bollag G: GTPase activating proteins: critical regulators of intracellular signaling. *Biochim, Biophys. Acta* 1602:23-45, 2002
- Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model of colorectal carcinogenesis. *Cell* 1990; 61: 759-67, 1990
- Friday BB, Adjei AA: K-ras as a target for cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1756: 127-44, 2005
- Goldberg RM, Gill S: Recent phase III trials of fluorouracil, irinotecan, and oxaliplatin as chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 54 Suppl 1: S57-64, 2004
- Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K: Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1:1311-8, 1996
- Gullick WJ: Prevalence of aberrant expression of the epidermal growth factor receptor in Human cancers. *Br Med Bull* 47:87-98, 1991
- Hebbar M, Wacrenier A, Desauw C: Lack of usefulness of epidermal growth factor receptor expression determination for cetuximab therapy in patients with colorectal cancer. *Anticancer Drugs* 17:855-7, 2006
- Kabbinavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L: Phase II, randomized trial

- comparing bevacizumab plus fluorouracil(FU)/leucovorin(LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 21:60-6, 2003
- Khorana AA, Ryan CK, Eberly S: EGFR expression and survival in stage II, III and IV colon cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 21:a1272, 2003
- Lechner JF, Fugaro JM: Ras and ErbB2. In: Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH. *Lung Cancer Principles and Practice*. 2nd Ed. Lippincott Williams & Wilkins 2000 Philadelphia. PA 0000;89-97
- Lievre A, Bachet JB, Boige V: KRAS Mutations As an Independent Prognostic Factor in Patients With Advanced Colorectal Cancer Treated With Cetuximab. *J Clin Oncol* 26:374-9, 2008
- Lowy DR, Willumse BM: Function and regulation of ras. *Annu. Rev. Biochem.* 62:851-91, 1993
- Massarelli E, Varella-Garcia M, Tang X: KRAS mutation is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 13:2890-6, 2007
- Oh HE, Cho SJ, Won NH, Lee DL Kim IS, Yeom BW. K-ras gene mutations and expression of K-ras, p16, cyclin D1 and p53 in synchronous lesions of the colon adenoma-carcinoma sequences. *Korean J Pathol.* 35:291-8, 2001
- Pao W, Wang TY, Riely GJ: KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med* 2:e17, 2005
- Ragnhammar P, Hafström L, Nygren P, Glimelius B; SBU-group.

- Swedish Council of Technology Assessment in Health Care: A systematic overview of chemotherapy effects in colorectal cancer. *Acta Oncol.* 40: 282-308, 2001
- Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F: Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19:183-232, 1995
- Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ: Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 22:1201-8, 2004
- Shin HR, Ahn YO, Bae JM, Shin MH: Cancer incidence in Korea. *Cancer Res Treat* 34:405-8, 2002
- Tappenden P, Jones R, Paisley S, Carroll C: Systematic review and economic evaluation of bevacizumab and cetuximab for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Health Technol Assess.* 11:1-128, 2007
- Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L: New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst.* 92:205-16, 2000
- van Zandwijk N, Mathy A, Boerrigter L: EGFR and KRAS mutations as criteria for treatment with tyrosine kinase inhibitors: retro-and prospective observations in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 18:99-103, 2007
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR: Genetic alterations during

colorectal tumor development. *N Engl J Med* 319: 525-32, 1988

Zhang W, Gordon M, Press OA: Cyclin D1 and epidermal growth factor polymorphisms associated with survival in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *Pharmacogenet Genomics* 16: 475-83, 2006

Table 1. RECIST Criteria(Therasse, 2000)

Method	Sum of longest diameters(uni-dimensional)
No. of lesion	Target lesion: maximum 5 per organ, 10 in total
Objective response	
Complete response(CR)	Disappearance of all known disease, confirmed at 4 wks
Partial response(PR)	$\geq 30\%$ decrease, confirmed at 4 wks
Stable disease(SD)	Neither PR nor PD criteria met
Progressive disease(PD)	$\geq 20\%$ increase, no CR, PR, or SD documented before increased disease, new lesion(s)

RECIST: response evaluation criteria in solid tumors

Table 2. Clinical characteristics of the patients (N=20)

	나이	성별	CEA	1차치료	반응	2차치료	반응	3차치료	반응	4차치료	반응	k-ras	LIVE	
No 1	74	M	34.8	FOLFOX	SD	FOLFIRI	PD	IR+CE	PD			0	13	LIVE
No 2	54	M	79.3	FOLFOX+AV	PR	FOLFIRI	SD	XE				0	19	1LIVE
No 3	56	F	83.9	FOLFOX+AV	PD	FOLFIRI	PD					1	3	DEAD
No 4	49	F	73.4	FOLFOX	PD	FOLFIRI	SD	XE				0	7	LIVE
No 5	70	M	6.4	FORFOX	SD	FOLFIRI						0	15	LIVE
No 6	50	F	64.7	FOLFOX+AV	SD	XE	SD					1	10	DEAD
No 7	48	F	440	CE	SD	FOLFOX	PD	XE	SD	FOLFIRI	SD	0	70	DEAD
No 8	70	F	215	FOLFOX	SD	FOLFIRI	SD	XE	PD			0	8	DEAD
No 9	48	M	18.8	FOLFOX	PR	FOLFIRI	SD	CE	PR			0	19	LIVE
No 10	72	M	56.7	FOLFIRI	ND							1	8	DEAD
No 11	66	M	24.1	FOLFOX	SD	FORFIRI	SD	CE	PD			1	6	LIVE
No 12	81	M	4.1	FOLFOX	PR							0	6	LIVE
No 13	63	M	84.7	FOLFOX	SD							1	6	LIVE
No 14	71	M	2.5	FOLFOX	SD							0	6	LIVE
No 15	52	M	1.7	FOLFOX	PD	FOLFIRI	ND					0	6	DEAD

No 16	69	M	14.6	FOLFOX	PR					1	5	LIVE
No 17	72	F	5.2	FOLFOX	ND					0	5	DEAD
No 18	61	F	4	FOLFOX	SD					0	4	LIVE
No 19	66	F	1.8	FOLFOX	PR	FOLFIRI	PR	CE		0	14	LIVE
No 20	64	M	5.2	FOLFOX	PR	FOLFIRI	SD	CE	SD	0	14	DEAD

FOLFOX: 5-FU+Leucovorin+Oxaliplatin, FOLFIRI: 5-FU+Leucovorin+Irinotecan,

IR+CE: Irinotecan+Cetuximab, XE: Capecitabine(Xeloda[®]),

SD: Stable Disease, PR: Partial Response, PD: Progressive Disease

Table 3. Comparison of clinical characteristics and response of chemotherapy according to k-ras mutation

	K-ras wild (14)	K-ras mutation (6)	P value
Sex(M/F)	8/6	4/2	0.545
Age(yr)	62.9(48-81)	62.7(50-72)	0.967
CEA(ng/mL)	63.7(1.7-440)	54.8(14.6-84.7)	0.802
Response			0.277
CR+PR	6(42.9%)	1(16.7%)	
SD+PD	8(57.1%)	5(83.3%)	

Table 4. Clinical characteristics of the patients receiving cetuximab(N=6)

	나이	성별	CEA	1st치료	반응	2nd치료	반응	3rd치료	반응	4th치료	반응	k-ras	생존기간	
No 1	74	M	34.8	FOLFOX	SD	FOLFIRI	PD	IR+CE	PD			0	13	LIVE
No 7	48	F	440	CE	SD	FOLFOX	PD	XE	SD	FOLFIRI	SD	0	70	DEAD
No 9	48	M	18.8	FOLFOX	PR	FOLFIRI	SD	CE	PR			0	19	LIVE
No 11	66	M	24.1	FOLFOX	SD	FOLFIRI	SD	CE	PD			1	6	LIVE
No 19	66	F	1.8	FOLFOX	PR	FOLFIRI	PR	CE				0	14	LIVE
No 20	64	M	5.2	FOLFOX	PR	FOLFIRI	SD	CE	SD			0	14	DEAD

FOLFOX: 5-FU+Leucovorin+Oxaliplatin, FOLFIRI: 5-FU+Leucovorin+Irinotecan,

IR+CE: Irinotecan+Cetuximab, XE: Capecitabine(Xeloda[®]),

SD: Stable Disease, PR: Partial Response, PD: Progressive Disease

**Figure 1. Ras upstream & downstream signaling
(Campbell, 2004)**

RTKs: Receptor tyrosine kinases, GDP: guanine diphosphate, GTP: guanine triphosphate, GAP: GTPase activating proteins, GEFs: guanine exchange factors.

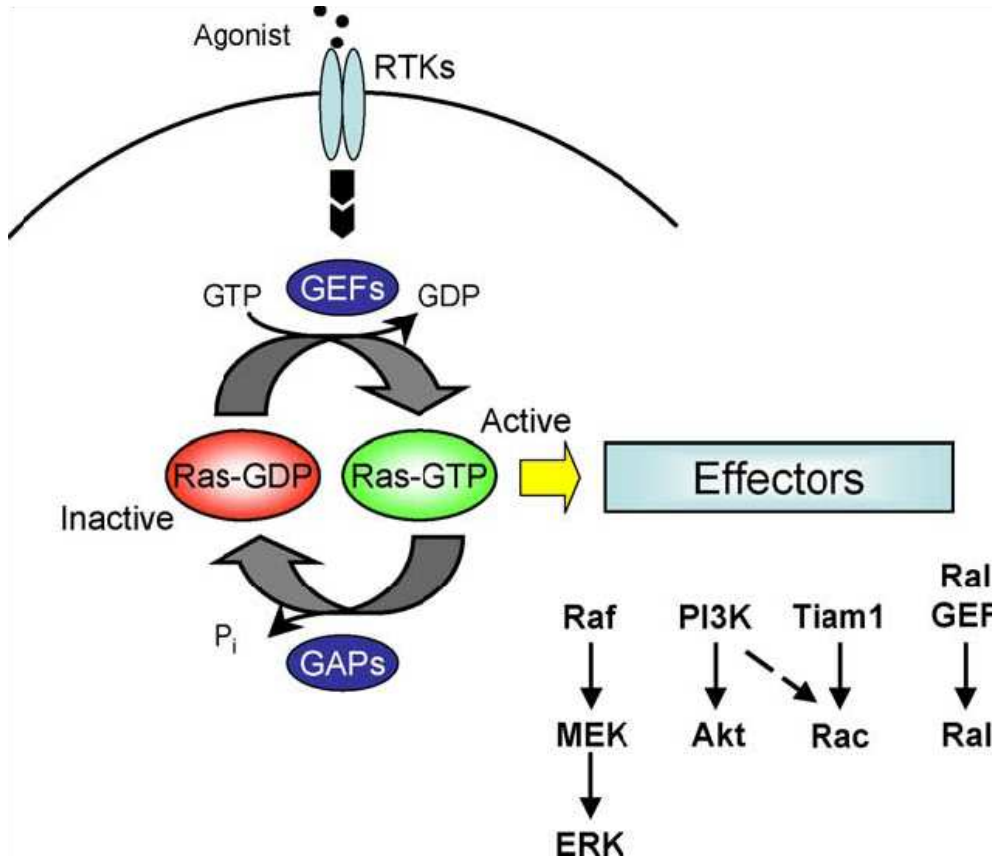
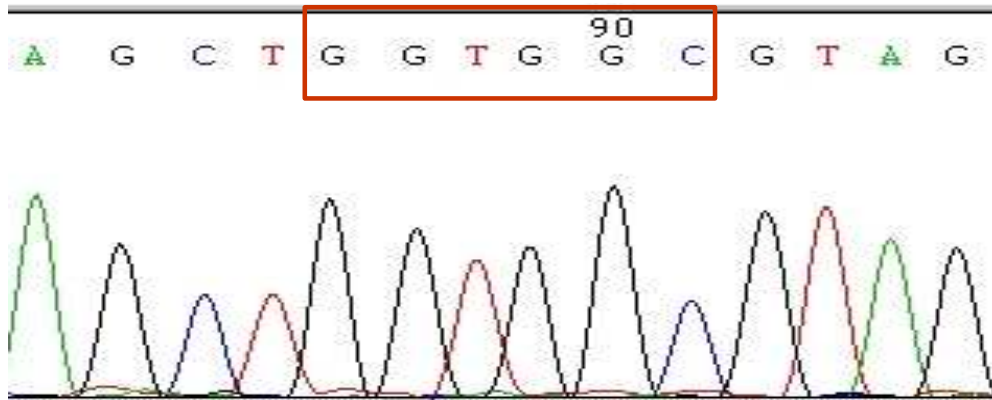


Figure 2. A representative sequencing for codon 12 of k-ras gene using DNA from a metastatic colon cancer patient.

A. wild K-ras



B. mutant K-ras

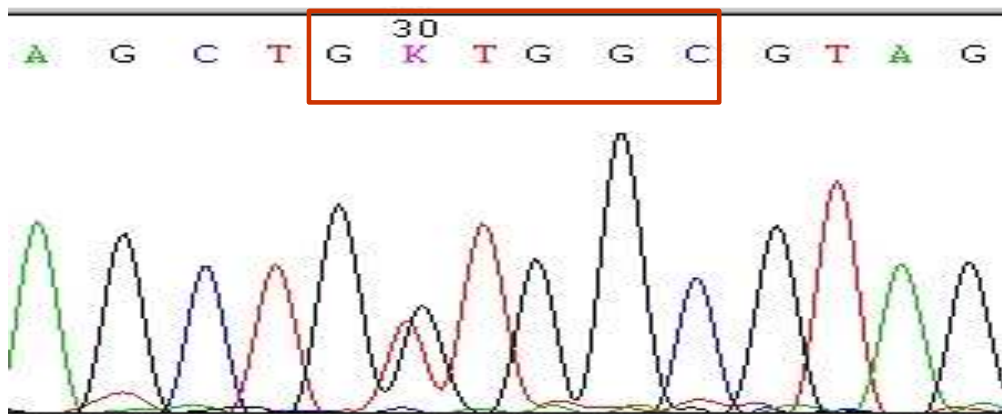


Figure 3. Effect of cetuximab on overall survival in patients with wild k-ras(N=12)

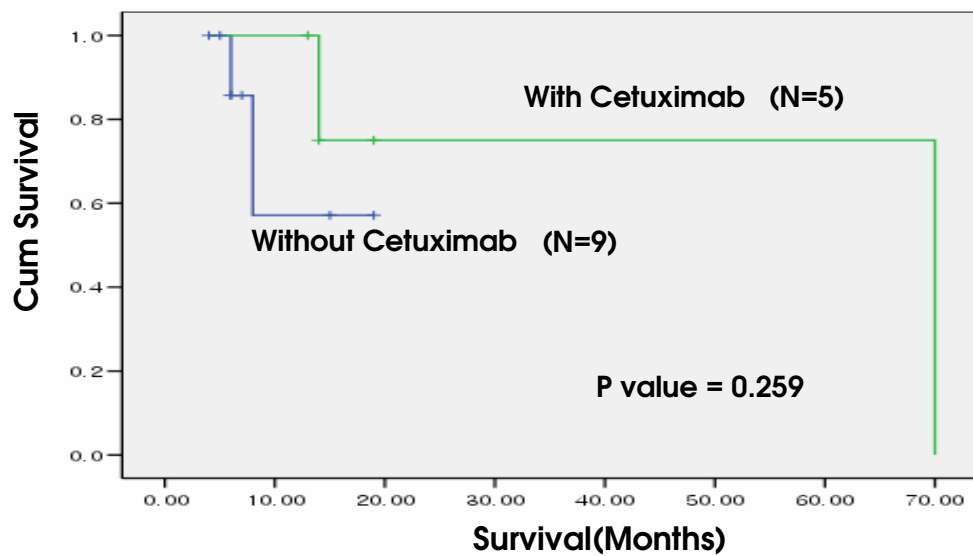


Figure 4. Effect of K-ras on overall survival (N=12)

