

연구제목 (국문) : 구강암의 발생 및 예후에 영향을 주는 바이오마커 발굴

Title(영문) : Discovery of biomarkers in the development and prognosis of oral cancer

Protocol Number : (version 4.1, Date 2022-04-15)

Principal investigator : 암역학연구과 김미경

Co-investigator : 희귀난치암연구과 최성원
특수암센터 구강종양클리닉 박주용
구강악안면외과 오현준

IRB Number :

Approved Date :

Revised Date :

NATIONAL CANCER CENTER
323 Ilsan-ro, Ilsandong-gu, Goyang-si
Gyeonggi-do, 410-769, Republic of Korea
TEL ;+82-31-920-0000
FAX ;+82-31-920-0000

계획서 요약

연구제목	구강암의 발생 및 예후에 영향을 주는 바이오마커 발굴
	Discovery of biomarkers in the development and prognosis of oral cancer
책임연구자 : 김미경	
공동연구자 : 최성원, 박주용, 오현준	
연구목적 : 구강암의 발생 및 예후에 미치는 바이오마커 발굴	
<p>1. 1차목적</p> <p>－ 타액 및 혈액을 이용하여 구강암의 발생에 관련된 바이오마커 발굴</p> <p>－ 역학적 위험요인 분석결과와 metagenomic 그리고 대사체 분석결과를 연계하여 생물정보학적 기법을 통해 구강암의 발생에 미치는 영향 규명</p> <p>2. 2차목적</p> <p>－ 타액 및 혈액을 이용하여 구강암의 예후에 관련된 바이오마커 발굴</p> <p>－ 역학적 위험요인 분석결과와 metagenomic 그리고 대사체 분석결과를 연계하여 생물정보학적 기법을 통해 구강암의 예후에 미치는 영향 규명</p>	
<p>연구배경 : 1) 우리나라에서 구강암 발생률의 현저한 증가 2) 구강암 위험요인에 관한 연구가 미흡 3) 특히 구강암 환자에 대한 우리나라 연구가 시급히 필요함 4) 최근 메타제노믹스와 메타볼로믹스를 이용한 여러 가지 질환에서 연구가 활발히 이루어지고 있음 5) 구강암 발생 연구 부족 6) 본 연구진은 구강암의 역학연구 경험과 metagenomics, 대사체 분석 연구 경험을 바탕으로 본 연구를 수행하고자 함</p>	
<p>선행연구 결과: <input type="checkbox"/> 무 <input checked="" type="checkbox"/> 유</p> <p>1. Apelin/APJ signaling의구강암에서 비만 및 tumor angiogenesis 관련의 역할 규명 및 이를 이용한 치료법탐색 (IRB No. NCCNCS-09219)</p> <p>2. Cervical microbiome과 대사체 분석을 통해 CIN 및 자궁경부암의 암화과정에서의 host-microbe 상호작용을 규명하였음 (IRB No. 2016-0135-0008)</p>	
<p>연구설계 개요 :</p> <p>－ 연구디자인: 전향적 코호트 연구</p> <p>－ 피험자 연구 참여 기간: 2018년 IRB 승인일로부터 2028년까지 10년 동안 참여</p> <p>－ 총 연구예정 기간: 10년</p>	
<p>자료수집항목 및 임상검사항목 :</p> <p>1) 역학적(생활습관) 특성 연구</p> <p>2) 신체계측</p> <p>3) 식품섭취 조사</p> <p>4) 임상적 양상 및 임상 경과 조사</p> <p>5) 대사체 분석</p> <p>6) 생존율 분석</p>	
<p>연구 참여조건 : <input checked="" type="checkbox"/> 입원환자 <input checked="" type="checkbox"/> 외래환자 <input type="checkbox"/> 지역주민 <input type="checkbox"/> 기타</p> <p>Inclusion Criteria : 2018년 IRB 승인일 이후부터 2024년까지 국립암센터 구강종양클리닉에 내원한 편</p>	

<p>평상피세포암종 환자와 검진센터 및 외래에 내원한 암이 없는 건강인.</p> <p>Exclusion Criteria : 만 19세 미만의 미성년자</p> <p>-원인별 중도탈락자: 사망자(질병 또는 다른원인), 동의 철회자(동의철회 일자 기준으로 명시함, f/u 진행 중단)</p>
<p>연구방법 :1) 역학적(생활습관) 특성 연구 2) 신체계측 3) 식품섭취 조사 4) 임상적 양상 및 임상 경과 조사 5) 대사체 분석 6) Network 분석 7) 생존율 분석 8) Bioinformatics 분석</p>
<p>중재 방법 : 해당 없음</p>
<p>평가 기준 :</p> <p>1) 숙주의 역학적 환경요인(생활습관) 요인: 인구학적 요인, 생식력, 흡연 및 음주력, 사회경제적 요인, 질병 과거력, 가족력 등 위험요인들의 로지스틱 분석을 통해 위험도 분석</p> <p>2) 구강암 발생 및 예후와 관련되는 대사체 발굴</p> <p>3) 환자의 역학적 특성과 대사체와의 상호작용 규명</p>
<p>연구대상자(또는 사례) 수: 본 연구는 환자-대조군 연구로 진행될 예정이며 국립암센터 구강종양클리닉에서 편평상피세포암종 환자를 등록하고, 검진센터 및 외래에서 정상 대조군을 등록할 예정임. 2018년 IRB 승인일 이후부터 2024년까지 6년 동안 편평상피세포암종 환자 대략 300명 정도 모집될 것으로 예상함. 그에 대응되는 대조군은 검진센터 및 외래에서 암이 없는 건강인으로 대표성을 위해 환자 수의 2배수 모집할 예정으로 대략 600명 정도 될 것이라고 예상함.</p>
<p>통계적 고려 :</p> <p>- 연구대상자의 환경요인(생활습관 등) 및 대사체와 구강암 발생 및 예후의 연관성 분석</p> <p>- 영양 요인, 인구 사회학적 특성, 흡연, 음주, 질병 과거력 및 암 가족력 여부 그리고 대사체에 대한 다변수 분석은 Kruskal-Walis 및 chi-square 검정을 수행</p> <p>- 연구대상자의 환경요인(생활습관 등), 대사체와 구강암 발생 및 예후의 관련성은 logistic 또는 Cox proportional hazard model을 이용하여 relative risk 및 95% 신뢰구간을 산출</p>
<p>인체 유래물(검체) 연구</p> <p>■인체 유래물 연구 목적 : oral swab과 plasma를 이용한 바이오마커 발굴</p> <p>■인체 유래물 수집 및 보관 여부 : <input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니요</p> <p>■수집 및 보관되는 인체 유래물 종류 :</p> <p>환자군: 타액, oral swab, 혈액, 조직(원발 혹은 전이병소 조직) 채취/ 대조군:타액, oral swab, 혈액 <타액></p> <p>- 국립암센터 내원한 편평상피세포암종 환자와 암이 없는 건강인 중 연구 참여에 동의한 경우 연구 등록 당일 1회 채취함. 외래를 방문하는 날짜에(환자의 통상적인 검진 일정에 해당하는 3개월, 6개월, 9개월, 1년,1년6개월, 2년 되는 시점) 1회씩 추가 채취가 시행되며, 총 연구 기간 10년(대상자 모집 기간 6년, 추적관찰 기간 4년) 동안 예후 여부에 따라 채취하는 검체의 총량은 개인별로 상이함. 채득 시 1시간 이상 음식, 음료를 섭취하지 않거나 구강 양치를 하지 않도록 주의시키며 비자극 타액을 약 5ml를 채취함. 타액은 소독 처리된 15ml conical tube에 받음.</p>

<p>- 타액을 받기 전의 tube 질량을 0.01g까지 측정하고, 타액 받은 후의 질량도 0.01g까지 측정하여 그 차이로 타액의 양을 구하며, 타이머로 타액을 채득한 시간을 측정하여 나누어 타액 분비율 (ml/min)을 계산함.</p> <p>- 채득한 타액은 바로 저온에 보관하며 연구실로 가급적 빨리 이송하여 적정용량으로 분주되어 deep freezer에 -80℃에서 보관함.</p> <p><oral swab></p> <p>-국립암센터 구강종양클리닉에 내원한 편평상피세포암종 환자와 암이 없는 건강인 중에서 연구 참여에 동의한 경우 연구 등록 당일 Copan eSwab 480CE를 이용하여 1회(bucal site 2곳) 채취함. 외래를 방문하는 날짜에(환자의 통상적인 검진 일정에 해당하는 3개월, 6개월, 9개월, 1년, 1년 6개월, 2년 되는 시점) 1회씩 추가 채취가 시행되며, 총 연구 기간 10년(대상자 모집 기간 6년, 추적관찰 기간 4년) 동안 예후 여부에 따라 채취하는 검체의 총량은 개인별로 상이함.</p> <p>- 채득한 검체는 가급적 빨리 이송하여 적정용량으로 분주되어 deep freezer에 -80℃에서 보관함.</p> <p><혈액></p> <p>-국립암센터를 내원한 편평상피세포암종 환자와 암이 없는 건강인 중에서 연구 참여에 동의한 경우 혈액을 채취함. 혈액은 구강과 관련된 수술(또는 치료) 전(또는 당일)과 후로 1회씩(총 2회) 채취함. 구강과 관련된 수술(또는 치료) 받지 않는 경우에는 혈액을 1회(총 1회) 채취함. 일반적으로 진료(수술, 검사 등) 목적으로 채혈 시 연구용 혈액을 추가 채취하지만, 진료 목적으로 채혈하지 않을 시 연구용 혈액을 별도 채취함. 연구에 사용할 혈액 8ml를 EDTA tube에 받음.</p> <p>- 혈액은 가급적 채득 직후 냉동 보관하는 것을 원칙으로 함. 혈액은 조성대로 원심 분리하여 연구실의 deep freezer에 -80℃에서 저장함.</p> <p><조직></p> <p>-국립암센터를 내원한 편평상피세포암종 환자 중에서 연구 참여에 동의한 경우 수술 시 원발 혹은 전이 병소 조직 약 200mg을 채취함. 채취한 샘플은 적정량 분주하여 연구실 냉동고에 -80도 이하에서 보관</p> <p>■유전 정보 사용 여부 : <input checked="" type="checkbox"/> 미사용 <input type="checkbox"/> 사용</p> <p>■보관 및 관리방안 : 채취된 검체는 보관 용기에 담겨 연구실로 이동되며, 타액과 oral swab은 적정용량으로 분주 되어 보관되며, 혈액은 조성분대로 원심 분리된 후, 분주 되어 보관됨. 모두 deep freezer (-80℃)에 보관할 것이며, deep freezer 위치 및 샘플 보관 위치를 문서로 작성 (샘플박스과일이 따로 있음)하여 관리. 수집된 조직 검체는 피험자의 이니셜과 배정된 식별 번호만 기재되어 분석, 관리, 보관될 것임. 검체 관리 및 분석자는 라벨링된 정보 이외에 다른 연구 정보에 접근이 불가능하며, 검체 분석결과에는 등록된 연구자에게만 열람이 허용될 것임. 연구대상자가 동의 철회 시 본 연구의 목적으로 얻어진 검체는 폐기될 것임.</p> <p>■보존 기간 : 피험자가 동의한 보존 기간까지 보관 후 즉시 폐기</p> <p>■폐기 시점 : 피험자가 동의한 보존 기간까지 보관 후 즉시 폐기. 연구가 비정상적으로 종료(중단)될 경우 폐기하지 않음. 동의 철회 시 「폐기물관리법」 제13조에 따른 기준 및 방법에 따라 폐기함.</p> <p>■인체 유래물 연구동의서 취득:</p> <p>■ 새로 취득 (환자-대조군 연구의 경우)</p>
--

<p>동의면제 신청(☐기 취득된 동의서의 포괄 동의서 확인 ☐기 취득된 동의서 무)</p> <p>수집된 자료의 2차 사용 계획 여부: 있음. 본 연구와 유사한 연구 또는 포괄적 연구 목적으로 검체를 제공하는 것에 동의한 대상자의 자료의 2차 사용.</p> <p><input type="checkbox"/> 해당 없음</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 개인식별정보를 포함한 개인정보 사용</p> <p><input type="checkbox"/> 개인식별정보를 제외한 개인정보 사용</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 검체 사용</p>
<p>피험자 안전 보호에 대한 대책(모니터링 계획)</p> <p>■ 안전성 데이터를 모니터링 방법(예측 부작용 monitoring 방법): 임상시험 연구 아님(해당 사항 없음)</p> <p>■ 연구 수행을 모니터링하고 점검하는 방법 제시: 연구담당자는 한 달에 한번씩 수집된 자료를 점검하고 계획서대로 잘 수행되고 있는지 모니터링하고 정기연구회의 시간에 보고함.</p>
<p>윤리적 고려 사항 :</p> <p>■ 취약한 피험자의 보호 방안 : <input checked="" type="checkbox"/> 해당 없음</p> <p>■ 개인식별정보 사용 여부 : <input type="checkbox"/> 미사용 <input checked="" type="checkbox"/> 사용</p> <p>■ 개인식별정보를 포함한 개인정보 이용 방안</p> <p>1) 수집하는 개인식별정보 종류-환자등록번호, 성명, 전화번호, 주소, 수집하는 개인정보 종류- 성별, 나이, 혈액형, BMI, 진단명, 수술력, 병력, 치료력, 과거력, 가족력, 재발, 사망일</p> <p>2) 개인 (식별) 정보를 수집하는 목적: 임상 결과수집 및 식품영양 조사 결과지 송부</p> <p>3) 정보 보유기간: 수집한 자료는 연구종료 후 10년간 보관 후 폐기.</p> <p>4) 정보 폐기방법: 출력문서인 경우 문서파쇄기를 통한 폐기, 전산파일의 경우 복구 불가능한 상태로 파일 삭제.</p> <p>5) 정보 2차사용 여부: 본 연구를 위하여 사용하는 목적 이외에 대상자가 2차적 사용을 동의한 경우는 본 연구와 유사한 연구 또는 포괄적 연구 목적으로 사용을 하나 2차적 사용에 동의하지 않으면 다른 목적으로 활용하지 않을 것임. 피험자가 원하는 기간까지 보관 후 즉시 폐기를 원칙으로 하고 검체 관리 및 분석자는 라벨링된 정보 이외에 다른 연구 정보에 접근이 불능하며, 검체 분석결과는 등록된 연구자에게만 열람이 허용될 것임. 채취된 검체가 2차 사용될 경우, 수집된 개인 (식별) 정보도 이용. 연구파일에 접근할 수 있는 권한은 일부 연구원(암역학연구과 김미경, 우윤정, 박진희)으로 제한. 연구대상자 동의 철회 또는 중도 탈락시에는 기존 수집된 개인식별정보와 아직 사용하지 않은 검체는 피험자가 동의한 보존기간까지 보관 후 즉시 폐기할 것이며, 동의철회 전까지 수집된 인체유래물등과 기록 및 정보는 사용.</p> <p>6) 본 연구에 사용되는 자료는 2018년 IRB 승인일 이후 국립암센터에 내원하여 검사를 받고, 자료 제공에 동의를 한 대상자 정보 및 보관된 시료를 이용하여 이루어짐. 본 연구결과는 환자에게 전혀 영향을 주지 않으며, 어떤 임상적 중재도 이루어지지 않으므로 일반적으로 임상연구에서 발생할 수 있는 윤리적 측면이 문제가 되지 않을 것으로 판단됨. 또한, 본 연구의 모든 자료는 엄격하게 연구대상자의 비밀이 유지되어 보호를 받게 되며, 본 연구의 분석을 위해 제공되는 설문과 검사의 결과는 연구 목적 외에는 다른 용도로 사용하지 않으며, 절대 비밀이 보장될 수 있도록 조치하고자 함.</p>

<p>■ 피험자의 보호(비밀보장) 방안 :</p> <p>1) 개인식별정보를 최대한 신속하게 제거할 수 있도록 자체연구번호를 만들어 관리할 계획.</p> <p>2) 개인식별정보와 연구번호를 대조할 수 있는 원본은 따로 보관하고, 그 이후의 작업 파일들은 연구번호로만 인식할 수 있도록 함.</p> <p>3) 개인식별정보가 기재된 서류는 잠금장치가 내장된 서류함에 보관되며, 개인식별 정보가 기재된 전자파일은 암호화되어 관리함.</p> <p>4) 암호화된 파일에 접근할 수 있는 사람은 본 연구에 직접 관련된 연구자들로 제한하여 엄격히 관리할 것임.</p> <p>■ 피해보상방안 : 해당 없음</p> <p>■ 피험자에 대한 지원 사항 : <input checked="" type="checkbox"/> 없음 <input type="checkbox"/> 있음</p> <p>■ 피험자가 연구 참여 시 발생하는 추가 비용 : <input checked="" type="checkbox"/> 없음 <input type="checkbox"/> 있음</p> <p>■ 동의서 등의 서류 및 데이터 관리 방안:</p> <p>1) 연구를 위해 수집된 동의서 등의 서류 및 데이터 정보는 잠금장치가 있는 연구실에 비밀번호가 걸린 파일로 보관함을 명시.</p> <p>2) 연구파일에 접근할 수 있는 권한은 일부 연구원(암역학연구과 김미경, 우윤정, 박진희)으로 제한.</p> <p>3) 수집된 개인정보는 연구 종료 후 10년간 연구 관계자의 담당하에 보유될 예정이며, 보유 기간 동안은 잠금장치로 엄격히 관리될 것임.</p> <p>4) 보유 기간 이후 전산 기록은 파일 삭제로, 서류에 기록된 개인정보는 서류 폐기 기계를 이용하여 삭제될 것임.</p> <p>5) 개인식별 정보가 기재된 서류는 잠금장치가 내장된 서류함에 보관되며, 개인식별 정보가 기재된 전자파일은 암호화되어 관리함. 암호화된 파일에 접근할 수 있는 사람은 본 연구에 직접 관련된 연구자들로 제한하여 엄격히 관리할 것임.</p>

1. 연구배경

1) 우리나라에서 구강암 발생률의 현저한 증가

■ 우리나라 2002년 중앙암등록본부 보고에 의하면 전체 99,025건의 암 환자가 등록되었는데 이중 구강암 환자는 약 800건으로 전체 암의 약 1%에 조금 못 미치는 빈도로 인구 10만 명 당 약 1.6명 정도를 차지. 남자는 전체 구강암의 68%로 여자보다 약 2배 정도 많이 발생. 연령별로는 60대가 약 34%로 가장 많은 비율을 차지하였으며 50대 이후부터 60, 70대에 구강암으로 진단받은 사람이 약 70% 이상을 차지함. 발생 부위별로는 혀에 발생하는 설암이 가장 많아 전체 구강암의 1/3 정도를 차지. 최근 10년간의 발생률과 사망 건수를 보면 계속 증가하는 추세에 있음.

■ 미국의 경우는 구강암이 전체 암의 약 6%를 차지하며 남자와 여자의 비율은 2:1로 우리나라와 비슷함. 매년 약 30,000명 정도의 구강암 환자가 발생하고 8,000명 정도가 구강암으로 사망하는 것으로 보고됨. 인도는 전체 암의 약 50%가 구강암으로 구강암 발생 빈도가 가장 높은 나라이며 프랑스도 남성에서 발생하는 암중에 구강암이 3위를 차지하여 높은 구강암 발생빈도를 보임.



■ 인체 암의 90% 이상은 편평세포암종으로 암으로 인한 사망률은 매년 증가추세에 있으며, 암의 진행 정도가 심한 후 진단받는 경우가 많아 치료 예후가 좋지 못하여 이로 인해 사망률이 매우 높은 편임 (Jemal et al. 2011; Krishna Rao et al. 2013). 따라서 치료 예후를 높이고 치료비 절감을 위해 암 발생을 조기 진단할 혈액 및 타액 바이오마커(biomarker) 발굴은 매우 절실함. 타액은 전신건강상태를 반영하는 다양한 바이오마커를 가지고 있으며 비침습적이고 채득이 용이해 최근 다양한 영역에서 연구되고 있음 (Liu and Duan 2012).

2) 구강암 위험요인에 관한 연구가 필요

■ 구강암의 정확한 원인은 아직 명확하게 알려져 있지 않음. 일반적으로 알려진 구강암의 위험요인으로 흡연, 음주, 바이러스, 방사선이나 자외선, 식습관과 영양결핍, 유전적 감수성 등이 거론되고 있음.

■ 흡연은 구강암이나 호흡 기암의 발생에 절대적인 영향을 주는 것으로 알려져 있음. 담배가 포함하고 있는 다수의 발암 관련 물질이 관련이 있는 것으로 연구되고 있는데, 미국암협회의 조사에 의하면, 흡연자의 경우 비흡연자에 비하여 구강암에 걸릴 위험성이 2배 이상 된다고 함. 한 미국 대학의 연구에 의하면 구강암 환자의 약 72%가 흡연자였으며 흡연자 중 약 60%가 하루에 한 갑 이상의 담배를 피운 것

으로 조사되었음. 특히 썩는 담배가 주된 기호품인 인도나 동남아시아 지방에서 불 점막에 암이 잘 발생하는 것으로 알려져 있음.

■ 음주의 경우는 음주습관 자체가 구강암과 관련이 있는지는 아직 밝혀진 것이 없지만 흡연과 음주를 동시에 시행할 경우 상승효과가 나타나 흡연과 음주를 과도하게 하는 사람의 경우 구강암이 발생할 확률이 약 30배 이상 높아지는 것으로 보고되고 있음.

■ 담배와 술 이외에도 최근 바이러스도 구강암의 위험요인으로 생각됨. 특히 자궁경부암의 원인으로 알려진 인유두종바이러스가 구강암과 관련이 있는지에 대한 연구가 많이 진행되었는데 현재까지 구강암과의 연관성은 아직 잘 파악되지 않고 있지만, 구강 편평상피세포암의 약 15~50%에서 인유두종바이러스가 발견됨.

■ 방사선이나 자외선 등은 염색체 변이를 유발할 수 있어 구강암의 원인이 될 수 있다고 알려져 있으며 한 역학조사 보고에 따르면 야외에서의 활동이 많은 사람들에게 구순암의 발생 빈도가 높다고 함.

■ 동물실험에서 비타민 결핍과 암 발생 사이에 상관관계가 있는 것으로 알려져 있는데 사람에서도 비타민이나 철의 결핍, 아연, 구리 등의 dietary factor의 결핍도 구강암 발생과 연관성이 있는 것으로 알려져 있음.

3) 구강암 예후에 대한 현재의 문제점

■ 구강암의 환자의 치료성적은 5년 생존율이 50~60%로 최근까지 달라지지 않고 있음. 치료방법은 수술적 치료와 부가적인 방사선 및 항암치료가 일반적인 치료방법임. 치료방법의 결정과 재발 전신 전이를 포함한 예후예측은 기존 병기 설정에 따라 치료 선택과, 치료반응을 예측하지만 치료한 환자의 예후는 환자마다 매우 다양하여 단순히 AJCC 병기만으로 예후를 예측 하는 것은 한계가 있음. 따라서 구강암 환자의 맞춤형치료와 예후예측을 위하여서는 새로운 biomarker 발굴이 시급히 필요한 실정임.

■ 암치료기술 발전에도 불구하고 구강암 환자의 생존율이 답보상태인 것은 여전히 재발률이 높기 때문으로 생각됨. 재발환자의 치료성적을 높이기 위하여서는 조기발견이 매우 중요함. 이러한 재발의 진단은 임상적 관찰과 영상에 의하여 이루어지지만 치료한 환자의 영상은 해부학적 변형으로 인하여 specificity가 낮다는 문제가 있음. 이러한 재발 암의 조기발견으로 완치율을 높이려면 새로운 biomarker 발굴이 절실함. 최근 liquid biopsy를 통한 암 진단 연구가 활발하게 진행되고 있지만, 구강암에서도 이러한 liquid biopsy 진단이 필요함에도 현재까지 연구가 미미함. 구강암 환자의 혈액과 타액을 분석하여 환자의 치료반응 예후 및 재발 예측을 할 수 있다면 이에 따른 환자의 맞춤형치료가 가능할 것으로 생각됨.

4) 구강암 환자에 대한 우리나라 자료가 시급히 필요함

■ 우리나라에서 구강암 발생 증가의 구체적인 원인을 규명하는 연구는 다른 암종에 비교해 매우 미약함. 흡연이나 음주와 같이 구강암의 일반적인 원인에 노출되지 않은 사람들(특히 여성들)에서도 구강암 발생이 나타나고 있기 때문에 이들 집단에서의 원인인자를 규명하는 연구는 매우 필요하다고 생각됨. 일반적으로 우리나라 여성들의 고지방, 고칼로리식이, 비만과 같은 서구화되고 있는 식생활습관 변화, 사회활동 참여의 증가로 인한 늦은 결혼, 저출산, 모유 수유 감소와 같은 사회적 양상 변화, 초경 연령이 빨라지는 생식인자의 변화 등의 요인들이 최근 크게 증가하고 있는 암 발생과 관련이 있을 것으로 생각되지만 구강암에서도 특이적으로 작용할지에 대해서는 아직 증거가 미약함.

■ 유럽에서 현재 진행 중인 대규모 암 코호트 연구인 EPIC (European Prospective Investigations into Cancer) study는 1990년부터 유럽 9개국, 22개 협력기관에서 50여만 명의 중년 남녀를 대상으로 암에 대한 광범위한 조사/분석을 수행하고 있으며 이를 통해 암 발생 관련 위험요인을 규명해가고 있음. 미국과 일본에서도 수많은 역학연구를 통해 구강암의 원인 인자에 대한 연구를 하고 있음. 그러나 지금까지 암에 대한 다양한 역학연구 결과들을 보면 많은 연구에서 대륙간, 국가간 차이를 보이고 있음. 이는 각 나라의 환경요인과 유전적 요인들이 다르고, 이로 인해 암 발생에 대한 영향이 달라질 것으로 생각됨. 따라서 외국, 특히 서양의 연구결과를 우리나라에 그대로 적용하는 데에는 절대적인 제한점이 있고 구강암 발생률 증가가 급속히 일어나고 있는 현실점에서 우리나라 고유의 자료가 매우 시급히 제공되어야 함.

5) 메타볼로믹스를 이용한 구강암 발생 관련성 연구

■ 메타볼로믹스는 다양한 유전, 생리/병리 또는 환경 등의 조건에서 변화되어 나타나는 생체 내 저분자량 대사체군의 구성과 농도를 분석하고 해석함으로써 생명현상의 변화와 원인을 규명해 나가는 연구 분야임.

■ 대사체군이란 세포, 조직 또는 생체 내에 존재하는 저분자량의 대사체 산물의 집단을 말하며, 생체내 대사체군 분석을 통하여 질환 관련 표지 대사체를 발굴함으로써 진단법을 개발하고, 그 기능을 규명함으로써 병인 기전을 이해하는데 매우 중요함.

■ 일반적으로 대사체는 표현형을 가장 잘 나타내는 정량할 수 있는 소분자로서, 완전한 대사체의 프로파일은 그 자체로서 또는 유전자의 표현과 연관된 지식의 데이터와 조합된 표현형 발현에 관한 생리학적 기초로서 상당한 정보를 제공함.

■ 인체 공생 미생물은 복잡한 탄수화물이나 섬유소의 분해, 흡수뿐만 아니라, 짧은 사슬 지방산(acetate, propionate, butyrate)을 비롯한 여러 대사체의 분비, 조절, 변화에 관여하기 때문에 다양한 질

환에서 공생 미생물의 구성에 따른 대사체군의 구성과 농도 차이를 비교하고, 공생 미생물 유래 대사체의 역할 규명을 위한 연구가 진행되고 있음.

■ 비만과 관련한 장내 미생물의 구성 변화는 혈액 내 대사체의 변화와 관련이 있음. 정상과 비만 사이에서 Bacteroides thetaiotaomicron 조성에 차이를 확인하였고 이와 관련하여 glutamate 대사체의 혈액 내 농도가 상관관계에 있음을 제시함. (Nat. Med, 2017)

■ 장내 미생물의 다양성은 여러 질병과 연관 있을 뿐 아니라 대사체 농도와도 관련이 있으며, 여러 대사체 중에서 Hippurate 대사체는 대사증후군에서의 장내 미생물의 다양성을 확인할 수 있는 마커로 활용가능함이 확인됨. (Sci Rep, 2017)

6) 대사체 분석기술 및 질환 관련 대사체학 연구 동향

■ 2000년 이후로 통합 대사체 연구 논문의 수가 급속히 증가하였음. 이를 통해 대사체 기반 연구의 국제적 발전이 매우 급속히 이루어짐을 알 수 있음. 올해인 2018년에도 2017년 이상의 논문이 출판될 것으로 사료되며, 통합 대사체 연구 기반 바이오마커 및 대사 시그니처 발굴 기술의 중요성이 세계적으로 대두되고 있다는 것을 알 수 있음.

■ 인체의 질환을 대상으로, 대사체 분석과 기능연구를 접목시킨 연구는 타 분야에 비하여 아직 초기 단계임. 그러나 대사체학 연구 기반이 인체의 질환에 응용되는 속도가 매우 빠르고, 각종 질환에 대한 대사체학적 접근이 매우 다양하게 수행되고 있으며, 이는 더욱 가속화될 것임.

■ 과거의 경우 대사와 관련한 질환들은 특정 효소측정법에 의하여 진단되었지만, 오랜 소요시간, 민감도 등의 문제로 새로운 질병 진단기법의 개발이 요구되어 왔음. 대부분의 질환 관련 대사체학 연구가 동물 질환 모델을 이용하였으나, 최근 국외에서는 다수의 환자군을 대상으로 활성화되고 있음. 그러나 국내 질환연구의 경우 국외 연구들보다 환자군 규모가 작고 특정 질환만을 대상으로 진행되는 실정임.

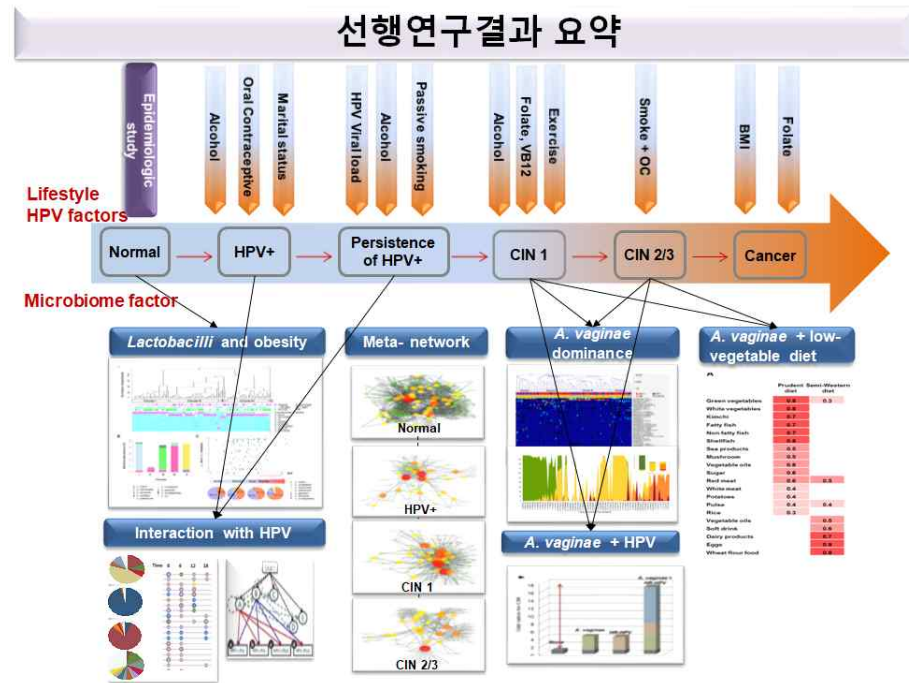
■ 현재는 NMR(Nuclear Magnetic Resonance), UPLC-QTOF, GC-TOF 등 분석기기의 뛰어난 감도로 활용도 높은 질병 진단기술들이 개발되고 있음. 그 예로, 당뇨병 환자에서 케톤체 및 당의 혈중 농도 상승과 지질단백의 조성 변화를 측정하여 당뇨병 환자의 치료 및 예후를 진단하는 연구가 진행되었음.

■ 최근 암 조기진단기술 수요증가로 대사체학을 이용한 암 질환 관련 다양한 연구가 진행되었고, 그 예로 NMR을 이용한 뇌종양환자에서의 과인산 추출물 대사체 분석 등이 보고됨. 특히 대사체는 생체의 표현형에 가장 가까운 대사물질로 미생물의 변화에 민감하게 변화하므로 대사체와 미생물의 융합 연구는 질환의 기전을 규명하는데 유용한 정보를 제공할 것임. 대사체 분석은 동맥경화, 암 또는 당뇨 같은 만성질환에서 복잡한 질병(complex disorders)들을 일으키는 병인을 밝혀내는데 용이하며, 이러한 연구들을

통해서 대사체들이 질병 발병, 세포 신호 및 생리적인 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀지고 있음. 신속성과 용이성을 겸비한 대사체 생체지표는 질병에 따라 변화하는 대사체 동정 및 대사 기전의 해석을 가능케 하며, 대사체를 기반으로 다른 유전체, 단백체 등 다양한 생물학적 정보를 종합함으로써 미생물 군집 내의 생물학적인 기능 및 질환과의 연관관계를 밝혀내는데 핵심적인 역할을 할 것임.

7) 본 연구진의 선행연구

■ 본 연구진들은 대장암, 자궁경부암(자궁내막암, 난소암) 등에 대한 다양한 역학적 연구방법(환자-대조군 연구, 코호트 연구)들을 통해 metagenome 및 대사체 연구를 수행해 오고 있음.



8) 본 과제의 창의성

■ 구강암 역학연구는 현재 우리나라에서 거의 없는 실정이며, 특히 비만이 일반적인 암의 발생원인으로 여러 연구에서 명확한 증거들이 나오고 있음에도 불구하고 구강암에 관해서는 연구결과도 세계적으로 부족하고 현재까지의 일부 결과들도 일치하고 있지 않음.

■ 최근 우리나라에서 비만 유병률이 급격하게 증가하고 있고 또한 이 분야 연구 결과가 매우 부족한 상황에서 구강암 환자들의 발병의 원인적 특성과 발생 인자를 밝히기 위한 다양한 역학적 요인들과 유전

적 요인에 의한 영향을 밝히기 위한 SNPs 연구를 통해 이러한 원인적 관련성을 밝히고자 하는 본 연구는 매우 독창적이라 할 수 있고, 우리 나라와 같이 비만 유병률이 급격하게 증가하고 있는 시점에서 더욱 연구 가치가 높다고 판단됨.

9) 연구의 필요성

■ 구강암은 우리나라에서 전체 암종에서 차지하는 비율은 적지만, 최근 증가하는 추세에 있고, 발병 위험요인 인자에 대한 연구가 매우 부족함.

■ 구강암의 발생은 유전적 요인과 여러 가지 환경적 요인과의 매우 밀접한 상호관련성에 의해 발생하고 진행되는 것으로 보임. 또한 우리나라에서 구강암 환자들은 서구 및 유럽과는 뚜렷이 구별되는 발생 양상을 가지고 있고 특히 환경적인 요인이나 위험요인에 있어서도 외국과는 다른 양상을 보임. 또한 이미 잘 알려져 있듯이 우리나라에서 구강암 발생률의 급격한 증가는 서구화에 따른 환경적인 변화도 큰 영향을 주었을 것으로 보이므로 우리나라에서 매우 특이적인 양상을 보이는 구강암의 원인을 규명하는 연구는 매우 중요하고 암의 1차 예방 및 3차 예방에서 매우 중요한 과학적 자료가 될 수 있을 것으로 생각됨.

■ 각 나라의 유전적 배경이 다르고 암화과정에 영향을 주는 환경적 요인 또한 매우 다를 수 있으므로서 양의 연구 결과를 우리나라에 그대로 적용하는 데에는 절대적인 제한점이 있음. 특히 암 발생률 및 사망률의 증가가 급속히 일어나고 있는 현 시점에서 우리나라 고유의 자료가 매우 시급히 제공되어야 할 것으로 판단됨. 더욱이 우리나라에서는 이에 대한 체계적인 연구 결과가 부족한 실정으므로 분자역학적 연구를 통한 체계적인 연구접근이 이루어져야 함.

■ 구강악안면부위의 편평상피세포암종은 그 예후가 매우 불량하여 조기 진단 및 치료가 중요함. 근래에 종양세포의 유전자발현 양상을 분석하여 조기진단에 유용한 표지자를 찾는 연구가 많이 진행되고 있음. 본 연구의 목표는 구강암 환자에서 유효한 바이오마커를 혈액과 타액을 통해서 발굴하고자 함.

2. 연구목적

구강암의 발생 및 예후에 미치는 바이오마커 발굴

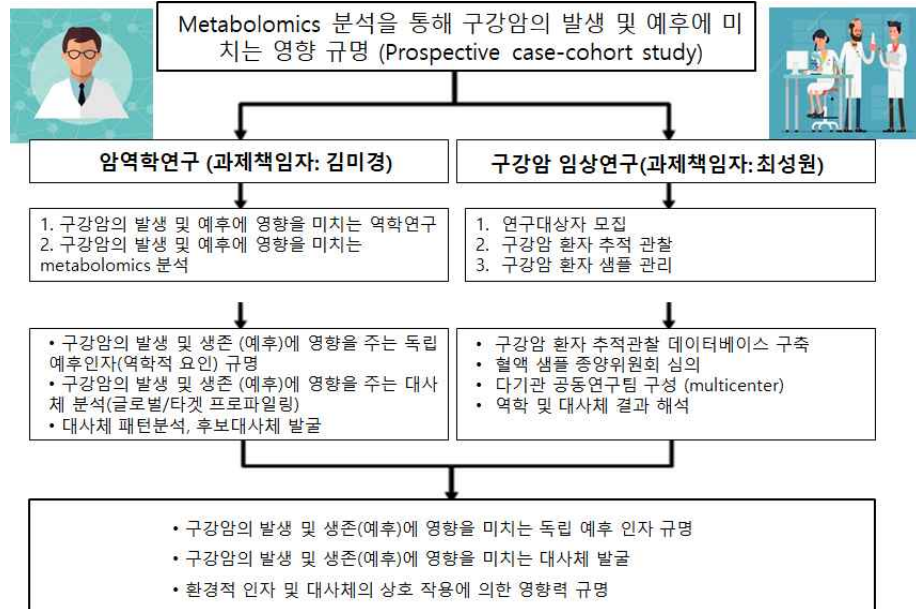
1) 1차목적

- 타액 및 혈액을 이용하여 구강암의 발생에 관련된 바이오마커 발굴
- 역학적 위험요인 분석결과와 metagenomic 그리고 대사체 분석결과를 연계하여 생물정보학적 기법을 통해 구강암의 발생에 미치는 영향 규명

2) 2차목적

- 타액 및 혈액을 이용하여 구강암의 예후에 관련된 바이오마커 발굴
- 역학적 위험요인 분석결과와 metagenomic 그리고 대사체 분석결과를 연계하여 생물정보학적 기법을 통해 구강암의 예후에 미치는 영향 규명

3. Study Design, 연구디자인



4. 연구대상자

본 연구는 환자-대조군 연구로 진행될 예정이며 본원 구강암센터에서 환자를 등록하고 검진센터 및 외래에서 정상 대조군을 등록할 예정이다. 2018년 IRB 승인일 이후부터 2024년까지 6년 동안 편평상피세포암종환자 대략 300명 정도 모집될 것으로 예상. 그에 대응되는 대조군은 검진센터 및 외래에서 암이 없는 건강인으로 대표성을 위해 환자 수의 2배수 모집할 예정이며 대략 600명 정도 될 것이라고 예상함.

- 환자군: 2018년 IRB 승인일 이후부터 2024년까지 국립암센터 구강종양클리닉에 내원한 편평상피세포암종 환자 중에서 연구에 동의한 대상자.(만 19세 미만의 미성년자 제외/ 중도탈락자:사망자(질병 또는 다른원인), 동의 철회자(동의철회 일자 기준으로 명시함, f/u 진행 중단))

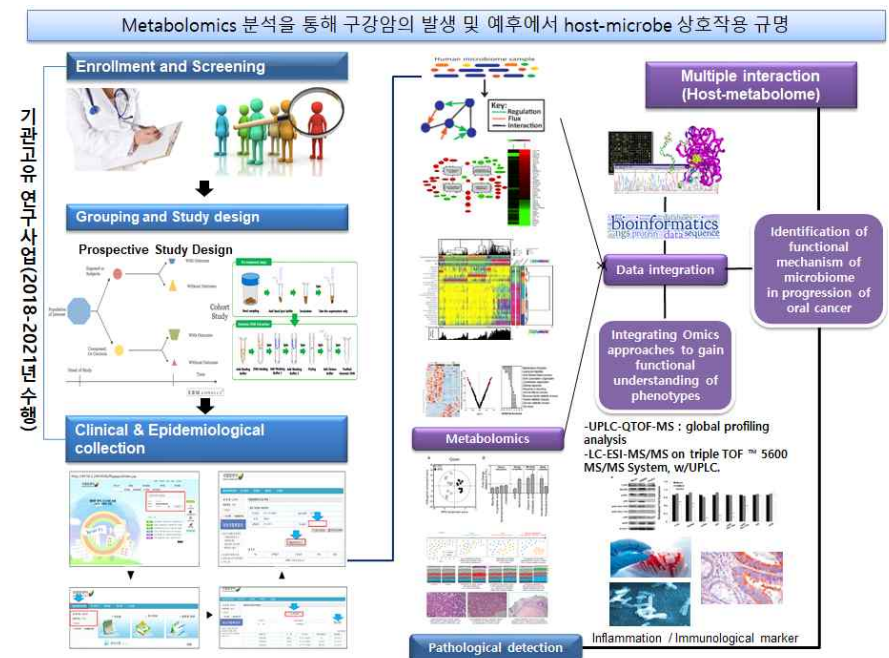
- 대조군: 2018년 IRB 승인일 이후부터 2024년까지 국립암센터 검진센터 및 외래에 방문한 암이 없는 건강인 중에서 연구에 동의한 대상자. 환자군과의 비교성을 높이기 위하여 환자군의 특성(성별, 연령, 모집시기 등)을 고려하여 환자 수의 2배수로 추출할 예정.(만 19세 미만의 미성년자 제외)

- 연구는 어디까지나 연구대상자의 자발적인 의사에 의하여 참여를 결정하며 연구에 참여한 후에 언제라도 참여 취소를 할 수 있음. 동의 철회 또는 중도 탈락 시에는 기존 수집된 개인정보와 아직 사용하지 않은 검체는 폐기되며, 이후에는 어떠한 자료도 추가로 수집하지 않음.

- 의생명연구심의위원회 심의

본 연구의 환자 모집 방법, 조사 내용, 연구 참여자의 권익 등 연구 전반에 관한 윤리적 검토를 받음. 고지된 동의서 문구에 대한 심의를 받음.

5. Study diagram 연구흐름도



6. Patient Recruitment & Registration 연구 참여자 모집

- 2018년 IRB 승인일부터 2024년까지 국립암센터 구강종양클리닉에 내원한 편평상피세포암종 환자 중에서 연구 참여에 동의한 대상자. 2018년 IRB 승인일 부터 2024년까지 국립암센터 검진센터 및 외래에 방문한 암이 없는 건강인 중에서 연구 참여에 동의한 대상자. 암이 없는 건강한 사람은 환자군과 성별이 같고, 연령, 모집 시기 등이 유사한 대상자로 모집.
- 2018년 IRB 승인일 이후로부터 2024년까지 등재될 연구대상자를 본연구기간 10년 동안 구강종양클리닉 외래에서 추적 관찰함.

7. Study Assessment 연구 평가 및 Efficacy 효과평가

1) 숙주의 역학적 환경요인(생활습관) 요인

- 인구학적 요인, 생식력, 흡연 및 음주력, 사회경제적 요인, 질병 과거력, 가족력 등 위험요인들의 COX, logistic 분석을 통한 위험도 분석
- 영양요인(24시간 식사 기록지 및 식품섭취빈도 조사지를 통한 영양 및 식품 요인) COX, logistic 분석을 통한 위험도 분석

2) 대사체 분석

- 다변량 분석을 위하여 SIMCA-P+ software version 12.0 (Umetrics, Sweden)을 사용. PCA (principal components analysis)를 통하여 그룹 간의 패턴 및 이상치를 확인하고, PLS-DA(partial least squares discriminant analysis)를 통하여 유의한 대사체를 찾아냄.

3) Metagenomics 분석

-구강 내 공생 미생물의 Metagenomic 분석

Metagenome shotgun은, DNA 전체를 염기서열 단편으로 무작위로 확보한 후 이를 조립하는 유전체 분석 방법. 이 기술을 활용하면 군집 내에 존재하는 전체 미생물들의 유전체 정보를 확인 가능. (Human genome이 아닌 bacteria genome을 분석)

특정 마커 유전자(16S rRNA/ ITS)에 대한 NGS 시퀀싱 기술이 주로 생물체의 군집 다양성을 분석하기 위한 용도에 쓰인다면, shotgun sequencing 기법은 시료 내에 존재하는 수많은 유전자의 다양성과 더불어 전체 유전자들의 기능과 상호작용을 파악할 수 있는 방법.

-Metagenomic 분석 전략

Marker gene, binning, assembly 분석들이 미생물 군집의 taxonomic 또는 phylogenetic 다양성에 대한 결과를 제공하고 새로운 미생물 혹은 유전자들을 발견할 수 있음.

Metagenomes은 gene prediction과 functional annotation이 가능하고, 미생물 군집과 연관된 생물학적인 기능들을 특성화하고 새로운 유전자들을 발견하는데 이용 가능함.

미생물군 간의 유사성을 정량화하고, 군집 다양성 범위가 다른 역학 요인들에 의해 변화되는지를 결정

-Metagenome functional annotation 작업

Metagenome은 각각의 reads를 gene prediction과 functional annotation에 적용하여 annotate를 할 수 있음. Gene prediction에서 여러 알고리즘이 metagenome read에 단백질을 암호화 하는 subsequences를 조사하기 위해 사용됨. 예측된 단백질들의 기능이 예측되며, 데이터베이스를 이용하여 단백질 패밀리/웹타이드 기능도 알 수 있음. 모든 reads에 대하여 이러한 분석을 적용하면 군집의 기능적 다양성에 대한 프로파일 작성됨.

-KEGG pathway map과 pathway 분석

대조군이나 실험군에서 유전자들의 enrichment가 있는 부분을 KEGG pathway에 색과 증감률로 표시하여, 관련된 pathway 뿐만 아니라 생물학적인 관계를 파악 가능함

4) Network 분석

- 질환에 대한 수많은 연구결과와 문헌정보들이 빅데이터의 형태로 보고되고 있기 때문에, 이들의 정보들을 통합하여 새로운 의미를 도출하는 것이 반드시 필요함. 이러한 작업을 위해서는 생물학적 패스웨이 네트워크(biological pathway network)의 거시적인 관점에서 정보 분석이 필요.

- 질환에 대한 수많은 연구결과와 문헌정보들이 빅데이터의 형태로 보고되고 있기 때문에, 이들의 정보들을 통합하여 새로운 의미를 도출하는 것이 반드시 필요함. 이러한 작업을 위해서는 생물학적 패스웨이 네트워크(biological pathway network)의 거시적인 관점에서 정보 분석이 필요.

- 상호작용은 nodes (유전자 또는 단백질)와 edges (간접적 네트워크)나 arcs (직접적인 네트워크)로 표현되며, 네트워크의 위상 (topology)은 네트워크의 구조와 형성을 이해하는 중요한 역할을 함. 위상적인 특징을 알기 위해서 주로 사용되는 용어는 degree (한 꼭지점에 연결된 수), clustering coefficient (꼭지점 사이에 연결된 수), shortest path length (두 꼭지점 사이의 거리), betweenness (꼭지점들의 모든 쌍 사이에 가장 짧은 거리 부분)임. Hub에 해당하는 nodes는 생물학적 시스템을 이해하는데 매우 중요한 요소임.

- 다양한 실험 결과를 통합한 네트워크는 상호작용의 정확성을 향상시키고, 합성된 모티프의 정체를 밝히고, 기능을 예측하는데 도움을 줌. 특히 네트워크 구조 파괴는 인체 질병과 연관성이 있을 것으로 기대함. 한 가지 구성요소의 손실은 전체 네트워크 구조에 영향을 미치지 않는데, 이것은 우리 몸의 면역 세포 반응과 유사. 다중 구성요소의 손실 (multiple-mutation)은 네트워크 위상 파괴를 유도하는데, 이는 여러 암에서 발생하는 네트워크 구조와 같음.

5) 연구 활용 계획

- 구강암과 관련이 있는 구강박테리아(pathobionts)가 규명이 되면 구강암 병인에 대한 과학적인 진보를 이룰 수 있고 이를 바탕으로 새로운 예방 전략이 가능.

- 쉽게 접근이 가능하고 비침윤적인 방법으로 고위험군을 찾아내고 침윤성암으로의 이행을 예방할 수 있음.

- Targeted prophylactic therapy를 개발하여 비교적 저렴하고 안전한 방법으로 구강암을 손쉽게 예방

할 수 있는 매우 경제적이고, 효과적인 방법이 될 것임.

- 향후 Multicenter Study할 경우 연구자료 제공 가능.

8. Study method 연구 방법

1) 역학적(생활습관) 특성 연구

인구학적 요인, 생식력, 흡연 및 음주력, 사회경제적 요인, 질병 과거력, 가족력, 영양요인(24시간 식사 기록지 및 식품섭취빈도조사지를 통한 영양 및 식품요인) 등 위험요인들의 로지스틱 분석을 통해 구강암의 발생에 대한 위험도 분석

2) 임상적 양상 및 임상경과 조사

- 수술받은 구강암 환자 자료를 취합함. 임상양상 및 임상경과 조사(연도별 환자 수, 환자 분포 %, 생존율, 병기별 생존율, 임파선전이 %), 병기, 조직분화도 등급의 차이, 혈관림프관침윤 차이, 폐경 여부, 치료 방법 등 조사.

3) 대사체 분석

(1) 시료의 전처리: 연구대상자의 serum 샘플은 -80°C 에서 분석을 할 때까지 보관. MS 분석을 위해 polar 대사체와 지질 대사체 추출을 위하여 water, methanol, chloroform을 넣고 추출. 상층액과 하층액을 분리하여, 상층액은 speed-vac으로 날리고 하층액은 N_2 가스로 dry. Dry된 시료를 재용해하여 MS 분석에 이용. NMR분석 시에는 대사체 추출 과정 없이 원심분리 후 buffer를 첨가하여 이용.

(2) LC/MS 및 NMR분석: MS 분석은 Ultra Performance Liquid Chromatography와 결합한 MS/MS system 이용하여 대사체를 측정. LC에서는 Zic HILIC column ($3.5\mu\text{m}$, 200\AA , $2.1 \times 100\text{mm}$)을 사용하며, 용매 A는 95:5비율의 acetonitrile과 water에 10mM의 ammonium acetate, 0.1% formic acid를 넣어 사용하고, 용매 B는 50:50 비율의 acetonitrile과 water에 10mM ammonium acetate, 0.1% formic acid를 넣어사용. flow rate는 0.4ml/min으로 하여 총 15분 동안 분리. NMR 분석은 800Hz NMR spectroscopy에서 CPMG sequence 또는 NOESY presat sequence 각각을 이용하여 세포 및 플라즈마 분석.

(3) Data processing and identification

- MS 분석의 경우, 측정된 data (retention time, m/z, ion intensity 등)를 얻기 위하여 Markerview software (AB Sciex, Concnrd, Canada)를 사용. processing된 data는 단백질 양으로 normalization을 하여 사용. 세포 및 플라즈마의 polar 대사체의 identification을 위하여 MS/MS를 수행하며, online database인 lipidmap (www.lipidmaps.org), human 대사체 (www.hmdb.ca), metlin(metlin.scripps.edu)와 표준 물질을 통하여 MS/MS 패턴 및 retention time을 확인.

- NMR 분석의 경우, 획득한 spectrum을 Chenomx software에서 binning한 뒤, MATLAB software를 통해 align하는 data processing. 그리고 Chenomx software의 library를 이용하여 identification.

(4) Network 분석

- 질환에 대한 수많은 연구결과와 문헌정보들이 빅데이터의 형태로 보고되고 있기 때문에, 이들의 정보들을 통합하여 새로운 의미를 도출하는 것이 반드시 필요함. 이러한 작업을 위해서는 생물학적 패스웨이 네트워크(biological pathway network)의 거시적인 관점에서 정보 분석이 필요.

- 상호작용은 nodes (유전자 또는 단백질)와 edges (간접적 네트워크)나 arcs (직접적인 네트워크)로 표현되며, 네트워크의 위상 (topology)은 네트워크의 구조와 형성을 이해하는 중요한 역할을 함. 위상적인 특징을 알기 위해서 주로 사용되는 용어는 degree (한 꼭지점에 연결된 수), clustering coefficient (꼭지점 사이에 연결된 수), shortest path length (두 꼭지점 사이의 거리), betweenness (꼭지점들의 모든 쌍 사이에 가장 짧은 거리 부분)임. Hub에 해당하는 nodes는 생물학적 시스템을 이해하는데 매우 중요한 요소임.

- 다양한 실험 결과를 통합한 네트워크는 상호작용의 정확성을 향상시키고, 합성된 모티프의 정체를 밝히고, 기능을 예측하는데 도움을 줌. 특히 네트워크 구조 파괴는 인체 질병과 연관성이 있을 것으로 기대함. 한 가지 구성요소의 손실은 전체 네트워크 구조에 영향을 미치지 않는데, 이것은 우리 몸의 면역 세포 반응과 유사. 다중 구성요소의 손실 (multiple-mutation)은 네트워크 위상 파괴를 유도하는데, 이는 여러 암에서 발생하는 네트워크 구조와 같음.

(5) 통계분석

- 다변량 분석을 위하여 SIMCA-P+ software version 12.0 (Umetrics, Sweden)을 사용. PCA(principal components analysis)를 통하여 그룹 간의 패턴 및 이상치를 확인하고, PLS-DA(partial least squares discriminant analysis)를 통하여 유의적인 대사체를 찾아냄.

- 병기는 AJCC 5th Stage Classification을 사용하고, 병기별 생존율을 제외한 모든 생존율 분석은 침윤성 구강암 자료를 대상으로 함. 통계분석은 SAS 9.4를 사용하여 생존율을 산출하고, 상대 생존율은 Brenner등의 방법을 이용함. 각각의 변수들(병기, 성별, 연령, 수술방법, 림프절 전이, 병리조직학적 분류)에 대한 생존율 비교는 95% confidence interval을 사용함.

- 연구대상자의 환경요인(생활습관 등) 및 대사체와 구강암 발생 및 예후와의 연관성분석

- 영양요인, 인구사회학적 특성, 흡연, 음주, 질병 과거력 및 암 가족력 여부 그리고 대사체에 대한 단변수 분석은 chi-square test 또는 Fisher's exact test와 Kruskal-Wallis test를 수행.

- 연구대상자의 환경요인 (생활습관 등) 및 대사체와 구강암 발생과의 관련성을 파악하기 위하여 logistic regression을 수행할 예정이며, 구강암 코호트를 대상으로는 예후와 관련성이 있는 인자를 파악하기 위해 Kaplan-Meier curve 및 log-rank test를 수행할 예정.

- 예후에 유의미한 위험 인자를 찾기 위해 Cox regression을 수행할 예정.

9. 추진 일정

년 월 일	연구수행내용	비고
2018.승인일 ~2028년	대상자 모집 및 추적관찰 역학 자료와 생체시료 수집	
2018.승인일 ~2021년	관련 문헌 고찰 및 실험 진행	
2020년~2028년	Metagenomics 분석	
2020년~2028년	대사체 분석, global profiling 분석	
2021년~2028년	대사체 분석, taarget profiling 분석	
2018.승인일 ~2028년	진료기록자료 검토(임상자료 수집)	
2021년~2028년	Bioinformatic 분석	
2021년~2028년	역학적 위험요인과 대사체 분석 결과를 통합하여 Bioinformatics 분 석	
2021년~2028년	역학적 위험요인과 대사체 결과들의 Network 분석을 통해 구강암 발생에 대한 영향력 해석	
2021년~2028년	공생미생물 군집 분석, 각 종 내에서의 미생물 구조, 높게 발현되는 단백질 도메인 분석, 특정 유전자에 상응하는 단백질 도메인, 단백질 대사경로를 분석	
2021년~2028년	대사체 메커니즘 규명분석	
2021년~2028년	통계학적 분석, 논문 작성	

10. Interim analysis 중간분석 (해당사항 없음)

11. Safety 안정성

■ 본 연구에 사용되는 자료는 2018년 IRB 승인일 이후부터 2024년까지 국립암센터 구강종양클리닉에 내원한 편평상피세포암종 환자와 검진센터 및 외래에 내원한 암이 없는 건강인을 대상으로 자료 제공에 동의한 대상자 정보 및 보관된 시료를 이용하여 이루어짐. 본 연구결과는 환자에게 전혀 영향을 주지 않으며, 어떤 임상적 중재도 이루어지지 않음.

12. 인체 유래물 (검체) 수집

1) 수집 및 보관되는 인체 유래물 종류:

인체 유래물(검체) 연구

- 인체 유래물 연구 목적 : oral swab과 plasma를 이용한 바이오마커 발굴
- 인체 유래물 수집 및 보관 여부 : ☒ 예 ☐ 아니요
- 수집 및 보관되는 인체 유래물 종류 :

환자군 -타액, oral swab, 혈액, 조직/대조군-타액, oral swab, 혈액,
<타액>

- 국립암센터 내원한 편평상피세포암종 환자와 암이 없는 건강인 중 연구 참여에 동의한 경우 연구 등록 당일 1회 채취함. 외래를 방문하는 날짜에(환자의 통상적인 검진 일정에 해당하는 3개월, 6개월, 9개월, 1년, 1년 6개월, 2년 되는 시점) 1회씩 추가 채취가 시행되며, 총 연구 기간 10년(대상자 모집 기간 6년, 추적관찰 기간 4년) 동안 예후 여부에 따라 채취하는 검체의 총량은 개인별로 상이함. 채득 시 1시간 이상 음식, 음료를 섭취하지 않거나 구강 양치를 하지 않도록 주의시키며 비자극 타액을 약 5ml를 채취함. 타액은 소독 처리된 15ml conical tube에 받음.

- 타액을 받기 전의 tube 질량을 0.01g까지 측정하고, 타액 받은 후의 질량도 0.01g까지 측정하여 그 차이로 타액의 양을 구하며, 타이머로 타액을 채득한 시간을 측정하여 나누어 타액 분비율 (ml/min)을 계산함.

- 채득한 타액은 바로 저온에 보관하며 연구실로 가급적 빨리 이송하여 적정용량으로 분주되어 deep freezer에 -80℃에서 보관함.

<oral swab>

-국립암센터 구강종양클리닉에 내원한 편평상피세포암종 환자와 암이 없는 건강인 중에서 연구 참여에 동의한 경우 연구 등록 당일 Copan eSwab 480CE를 이용하여 1회(buccal site 2곳) 채취함. 외래를 방문하는 날짜에(환자의 통상적인 검진 일정에 해당하는 3개월, 6개월, 9개월, 1년, 1년6개월, 2년 되는 시점) 1회씩 추가 채취가 시행되며, 총 연구 기간 10년(대상자 모집 기간 6년, 추적관찰 기간 4년) 동안 예후 여부에 따라 채취하는 검체의 총량은 개인별로 상이함.

- 채득한 검체는 가급적 빨리 이송하여 적정용량으로 분주되어 deep freezer에 -80℃에서 보관함.

<혈액>

-국립암센터를 내원한 편평상피세포암종 환자와 암이 없는 건강인 중에서 연구 참여에 동의한 경우 혈액을 채취함. 혈액은 구강과 관련된 수술(또는 치료) 전(또는 당일)과 후로 1회씩(총 2회) 채취함. 구강과 관련된 수술(또는 치료) 받지 않는 경우에는 혈액을 1회(총 1회) 채취함. 일반적으로 진료(수술, 검사 등) 목적으로 채혈 시 연구용 혈액을 추가 채취하지만, 진료 목적으로 채혈하지 않을 시 연구용 혈액을 별도 채취함. 연구에 사용할 혈액 8ml를 EDTA tube에 받음.

- 혈액은 가급적 채득 직후 냉동 보관하는 것을 원칙으로 함. 혈액은 조성대로 원심 분리하여 연구실의 deep freezer에 -80℃에서 저장함.

<조직>

-국립암센터를 내원한 편평상피세포암종 환자와 중에서 연구 참여에 동의한 경우 수술 시 원발 혹은

전이병소 조직 약 200mg을 채취함. 채취한 샘플은 적정량 분주하여 연구실 냉동고에 -80도 이하에서 보관

<시료 관리>

- 타액과 혈액의 각 시료에는 대상자의 ID 및 시료번호를 부여하되 동일 대상자에서 타액과 혈액의 시료번호는 동일함.
- 시료는 별도의 엑셀 파일로 채득날짜, 채득량, 채득시간, 운송시간을 기록하여 관리함.

<시료 전처리>

- 타액의 경우 4℃에서3000rpm으로 15분간 원심분리 후 상청액을 분주하여 사용함.
- 혈액의 경우 4℃에서3000rpm으로 15분간 원심분리하여 목적에 따라 plasma 또는 buffy coat를 사용
- 1.5ml eppendorf tube에 분주하여 필요한 만큼 실험에 사용하고 나머지는 -80℃에 냉동보관하여 추후 실험에 사용함. (Yoshizawa and Wong 2013)

<환자 추적 조사>

- 결과 변수로서 환자의 예후를 사용하기 위하여 추적조사를 시행하며, 환자의 통상적인 검진 일정에 해당하는 3개월, 6개월, 9개월, 1년, 1년 6개월, 2년이 되는 시점의 진료 기록 자료를 진료기록부 검토를 통해서 하고 혈액 및 타액을 채취함.
- 결과 변수는 중례 기록지에 기록된 것 같이 재발 여부, 전이 여부에 관련된 사항임.
- 환자 추적조사를 위하여 필요할 경우 IRB를 연장 신청함.

2) 유전 정보 사용 여부: 사용하지 않음

13. Ethical Considerations 윤리적 고려

■ 2018년 IRB 승인일 이후부터 2024년까지 국립암센터 내원한 편평상피세포암종 환자 및 암이 없는 건강한 사람을 대상으로 자료 제공에 동의한 대상자 정보 및 보관된 시료를 이용하여 이루어짐. 본 연구 결과는 환자에게 전혀 영향을 주지 않으며, 어떤 임상적 증세도 이루어지지 않으므로 일반적으로 임상연구에서 발생할 수 있는 윤리적인 측면이 크게 문제가 되지 않으리라고 판단됨.

■ 본 연구의 모든 자료는 엄격하게 연구대상자의 비밀이 유지되어 보호를 받게 되며, 본 연구의 분석을 위해 제공되는 설문과 검사의 결과는 본 연구의 목적 외에는 이용되지 않으며, 절대 비밀이 보장될 수 있도록 조치하고자 함.

■ 취약한 피험자의 보호 방안 : ☒ 해당 없음

■ 개인식별정보 사용 여부 : ☐ 미사용 ☒ 사용

■ 개인식별정보를 포함한 개인정보 이용 방안

1) 수집하는 개인식별정보 종류-환자등록번호, 성명, 전화번호, 주소, 수집하는 개인정보 종류- 성별,

나이, 혈액형, BMI, 진단명, 수술력, 병력, 치료력, 과거력, 가족력, 재발, 사망일

2) 개인 (식별) 정보를 수집하는 목적: 임상 결과수집 및 식품영양 조사 결과지 송부

3) 정보 보유기간: 수집한 자료는 연구종료 후 10년간 보관 후 폐기.

4) 정보 폐기방법: 출력문서인 경우 문서파쇄기를 통한 폐기, 전산파일의 경우 복구 불구한 상태로 파일 삭제.

5) 정보 2차사용 여부: 본 연구를 위하여 사용하는 목적 이외에 대상자가 2차적 사용을 동의한 경우는 본 연구와 유사한 연구 또는 포괄적 연구 목적으로 사용을 하나 2차적 사용에 동의하지 않으면 다른 목적으로 활용하지 않을 것임. 피험자가 원하는 기간까지 보관 후 즉시 폐기를 원칙으로 하고 검체 관리 및 분석자는 라벨링된 정보 이외에 다른 연구 정보에 접근할 수 없으며, 검체 분석결과는 등록된 연구자에게만 열람이 허용될 것임. 채취된 검체가 2차 사용될 경우, 수집된 개인 (식별) 정보도 이용. 연구 파일에 접근할 수 있는 권한은 일부 연구원(암역학연구과 김미경, 우윤정, 박진희)으로 제한. 연구대상자 동의 철회 또는 중도 탈락시에는 기존 수집된 개인식별정보와 아직 사용하지 않은 검체는 피험자가 동의한 보존기간까지 보관 후 즉시 폐기할 것이며, 동의철회 전까지 수집된 인체유래물등과 기록 및 정보는 사용.

6) 본 연구에 사용되는 자료는 2018년 IRB 승인일 이후 국립암센터에 내원하여 검사를 받고, 자료 제공에 동의한 대상자 정보 및 보관된 시료를 이용하여 이루어짐. 본 연구결과는 환자에게 전혀 영향을 주지 않으며, 어떤 임상적 증세도 이루어지지 않으므로 일반적으로 임상연구에서 발생할 수 있는 윤리적인 측면이 문제가 되지 않으리라고 판단됨. 또한, 본 연구의 모든 자료는 엄격하게 연구대상자의 비밀이 유지되어 보호를 받게 되며, 본 연구의 분석을 위해 제공되는 설문과 검사의 결과는 연구 목적 외에는 다른 용도로 사용하지 않으며, 절대 비밀이 보장될 수 있도록 조치하고자 함.

■ 피험자의 보호(비밀보장) 방안 :

1) 개인식별정보를 최대한 신속하게 제거할 수 있도록 자체연구번호를 만들어 관리할 계획.

2) 개인식별정보와 연구번호를 대조할 수 있는 원본은 따로 보관하고, 그 이후의 작업 파일들은 연구번호로만 인식할 수 있도록 함.

3) 개인식별정보가 기재된 서류는 잠금장치가 내장된 서류함에 보관되며, 개인식별정보가 기재된 전자파일은 암호화되어 관리함.

4) 암호화된 파일에 접근할 수 있는 사람은 본 연구에 직접 관련된 연구자들로 제한하여 엄격히 관리할 것임.

■ 피해보상방안 : 해당 없음

■ 피험자에 대한 지원 사항 : ☒ 없음 ☐ 있음

■ 피험자가 연구 참여 시 발생하는 추가 비용 : ☒ 없음 ☐ 있음

■ 동의서 등의 서류 및 데이터 관리 방안:

1) 연구를 위해 수집된 동의서 등의 서류 및 데이터 정보는 잠금장치가 있는 연구실에 비밀번호가 걸린 파일로 보관함을 명시.

2) 연구 파일에 접근할 수 있는 권한은 일부 연구원(암역학연구과 김미경, 우윤정, 박진희)으로 제한.

3) 수집된 개인정보는 연구종료 후 10년간 연구 관계자의 담당 하에 보유될 예정이며, 보유기간 동안은

잠금 장치로 엄격히 관리될 것임.

4) 보유 기간 이후 전산 기록은 파일 삭제로, 서류에 기록된 개인정보는 서류 폐기 기계를 이용하여 삭제

14. References 참고문헌

Thomas G, Hashibe M, Jacob BJ, et al. Risk factors for multiple oral premalignant lesions. *Int J Cancer* 2003;107:285-91.

Thomas G, Hashibe M, Jacob BJ, et al. Risk factors for multiple oral premalignant lesions. *Int J Cancer* 2003;107:285-91.

Shiboski CH, Shiboski SC, Silverman S Jr. Trends in oral cancer rates in the United States, 1973-1996. *Community Dent Oral Epidemiol* 2000;28:249-56.

Mignogna MD, Fedele S, Lo Russo L. The world cancer report and the burden of oral cancer. *Eur J Cancer Prev* 2004;13:139-42.

Znaor A, Brennan P, Gajalakshmi V, et al. Independent and combined effects of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking on the risk of oral, pharyngeal and esophageal cancers in Indian men. *Int J Cancer* 2003;105:681-6.

IARC. World Cancer Report. Lyon: IARC Press; 2003.

Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988;48:3282-7.

Balaram P, Sridhar H, Rajkumar T, et al. Oral cancer in southern India: the influence of smoking, drinking, paanchewing and oral hygiene. *Int J Cancer* 2002;98:440-5.

Anaya-Saavedra G, Ramirez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, et al. High association of human papillomavirus infection with oral cancer: a case-control study. *Arch Med Res* 2008;39:189-97.

Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol* 2008;26:612-9.

Liu R, et al. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. *Nat Med*. 2017;23(7):859-868. doi: 10.1038/nm.4358.

Pallister T, Jackson MA, Martin TC, Zierer J, Jennings A, Mohny RP, MacGregor A, Steves CJ, Cassidy A, Spector TD, Menni C. Hippurate as a metabolomic marker of gut microbiome diversity: Modulation by diet and relationship to metabolic syndrome. *Sci. Rep.* 2017;7(1):13670. doi: 10.1038/s41598-017-13722-4.