creative commons

COMMONS DEED

저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:48009-200000002573

이학석사 학위논문

광범위 큰 B 세포 림프종에서 면역형광다중염색법을 이용한 MYC 단백 발현의 정량적 분석과 예후 분석 및 임상 판독 기준 제시

Analysis of prognosis by quantitative analysis of MYC protein expression using multiplexed immunofluorescence in diffuse large B-cell lymphoma.

울 산 대 학 교 대 학 원

의 학 과

이 윤 경

광범위 큰 B 세포 림프종에서 면역형광다중염색법을 이용한 MYC 단백 발현의 정량적 분석과 예후 분석 및 임상 판독 기준 제시

지도교수 박 찬 식

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2018 년 02 월

울산대학교대학원
의 학 과
이 윤 경

이윤경의 이학석사학위 논문을 인준함

심사위원 이 무 송 인

심사위원 홍 정 용 인

심사위원 박 찬 식 인

울 산 대 학 교 대 학 원

2018 년 02 월

국문요약

연구배경: 광범위 큰 B 세포 림프종 (Diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) 은 비호지킨 림프종에서 약 40% 를 차지하는 흔한 질병이다. DLBCL 의 완치율은 표준 항암치료 (R-CHOP; rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone) 로 인해 과거에 비해 향상 되었으나, 여전히 약 40%의 환자는 치료에 반응하지 않고 결국 사망한다. 이러한 환자를 예측 및 정의하고, 새로운 치료법을 개발하기 위한 선행 연구에서 MYC 단백의 발현과 DLBCL 의 나쁜 예후와의 관련성이 다수 보고 되었다. 그러나 선행연구에서 사용된 면역화학조직염색 (IHC, immunohistochemistry)은 MYC 발현강도의 다양성으로 인해 그 염색상이 다양하다. 이러한 이유로 cut-off value 에 대한 판독자 간 불일치로 인해 진단에 적용하는데 어려움이 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 발현의 강도를 객관적으로 수치화 할 수 있는 실험 기법과 과학적 근거를 갖는 정량적 분석이 요구 되고 있다. 본 연구는 다중형광염색법을 통한 정량적 이미지 분석 및 임상지표를 종합한 통계 분석을 통해 DLBCL 예후 예측에서의 MYC 단백발현 cut-off value 를 도출 하였다.

재료 및 방법: 2007~2012 년 사이, 서울아산병원에서 진단받은 DLBCL 환자의 파라핀 조직을 대상으로 하였다. 이 중, R-CHOP 이외의 치료를 받은 환자와 원발성 중추신경계 DLBCL 환자, TMA (tissue microarray) 를 제작 할 수 없는 작은 양의 조직을 제외한 192 예로 TMA 를 제작하였다. TMA 면역염색은 항체 마다 파장이 각각 다른 형광물질로 표지 하여, 형광 발현 강도를 정량적으로 측정할 수 있는 Opal 다중형광염색법을 이용하였다. 사용된 항체로는 종양 세포에서 MYC 단백의 발현을 확인하기 위해 CD20 와 MYC 으로 염색하였다. 또한 비 종양 세포인 T 세포를 제외하고 분석 할 수 있도록 CD3 염색을 시행하였다. 염색이 완료된 슬라이드는 Vectra slide scanner (PerkinElmer, Waltham, MA) 가 20 nm 간격으로 촬영한 각 파장 별 이미지를 취합했다. 이미지 분석 프로그램인 inForm™ Tissue Finder™ image analysis software (PerkinElmer, Waltham, MA) 로 정량 된 데이터를 얻었다. MYC 의 발현 강도는 차수로 나열하여, 사분위 수로 나누었다 (0+, 1+, 2+, 3+). MYC 단백 발현 강도와 양성 세포 비율에 따른 환자 집단 간 생존 분석을 시행하여 cut-off value 를 도출했다. 도출 된 cut-off value 를 내부 비교하여 신뢰성을 재확인 했다.

결과: 여러 cut-off value 를 비교 분석 한 결과, MYC 단백발현의 강도가 3+ 이상이며 양성세포비율이 60% 이상인 환자 집단의 생존이 통계적으로 유의하게 나쁜 전체생존율 (overall survival, OS) 을 보였다 ($p = 0.04$). 무합병증 생존율 (Event-free survival, EFS) 에서는 유의하지 않았으나 예후가 나쁜 경향을 보였다 ($P= 0.091$). 콕스 회귀 분석으로 위험비를 구해보았다. 그 결과, MYC 단백발현의 강도가 3+ 이상이며 양성세포비율이 60% 이상인 환자 집단의 OS 가 유의하게 위험율이 2.4 배 였으며, EFS 에서도 같은 집단이 유의하게 위험율 2 배 였다 (OS, $p = 0.014$; EFS, $p = 0.032$). MYC 단백 발현의 강도가 3+ 이상이며 양성 세포 60% 이상을 cut-off value 로 설정한 후, internal validation 을 시행하였다. 그 결과, 제시한 cut-off value 가 나쁜 예후를 예측 할 수 있는 최선이라는 결과가 재확인 되었다 ($p < 0.05$).

결론: 본 연구 결과, MYC 단백발현의 강도가 3+ 이상 이며 양성세포비율이 60% 이상인 경우 DLBCL 의 예후를 가장 잘 예측 할 수 있었다. 이 결과를 기반으로 형광면역염색법의 정량적 분석을 통한 DLBCL 에서의 MYC 단백과 예후 간의 관계를 예측 하는 것을 하나의 cut-off value 로 제시할 수 있다. 종양 세포에서 MYC 의 과발현에 대해서 아직 많이 알려진 바가 없기 때문에 DLBCL 에서 과발현 되고 있는 MYC 의 병태생리를 연구하여 치료법에 반응하지 않는 환자군을 예측하고 그에 알맞은 치료법을 제시하는 기저 연구가 될 수 있다. 또한 AI 를 이용한 새로운 진단 기법을 개발하는데 기반이 될 것 이다.

차 례

요약 ····· i
그림목차 ····· iv
서론 ····· 1
재료 및 방법 ····· 4
1. 대상 환자 모집과 tissue microarray (TMA) block 제작 ····· 4
2. Opal 다중 형광면역염색 ····· 7
3. Image 획득 ····· 11
4. Image 정량분석 ····· 16
5. 집단 분류 방법 ····· 22
6. 통계 분석 ····· 26
결과 ····· 27
1. 환자의 특징 별 통계 ····· 27
2. Opal 다중면역형광염색의 분석 ····· 27
3. MYC 단백 발현 강도와 양성 세포 비율의 세분화의 통계적 분석 ····· 30
4. 내부 data 로 도출 된 cut-off value 검증 ····· 45
5. COO 가 확인 된 환자군에 대한 cut-off value 검증 ····· 49
결론 ····· 51
참고 문헌 ····· 52
Abstract ····· 57

그림목차

표 1. 대상 DLBCL 환자들의 특징 및 분류 ····· 5
표 2. 사용 된 항체의 정보 ····· 9
표 3. Opal 형광 분자의 파장 ····· 15
표 4. 분위수로 나눈 각 집단의 MYC 단백 발현 강도의 범위와 중간값 ····· 23
표 5. MYC 단백 발현 강도와 양성 세포 비율이 세분화 된 각 집단의 기준 ····· 25
표 6. MYC 1+ 의 OS 에 대한 콕스 회귀분석 결과 ····· 33
표 7. MYC 1+ 의 EFS 에 대한 콕스 회귀분석 결과 ····· 34
표 8. MYC 2+ 의 OS 에 대한 콕스 회귀분석 결과 ····· 38
표 9. MYC 2+ 의 EFS 에 대한 콕스 회귀분석 결과 ····· 39
표 10. MYC 3+ 의 OS 에 대한 콕스 회귀분석 결과 ····· 43
표 11. MYC 3+ 의 EFS 에 대한 콕스 회귀분석 결과 ····· 44
표 12. 도출 된 cut-off value 에 대한 internal validation 콕스 회귀분석 결과 ····· 48
표 13. COO 가 확인된 180 명의 환자에 대한 도출 된 cut-off value, COO, IPI 의 단변량 분석의 결과 ····· 50
그림 1. DLBCL 조직에서의 MYC 면역화학조직염색의 이미지 ····· 3
그림 2. Microwave treatment 를 이용한 tyramide 증폭 시스템 ····· 6
그림 3. Opal 다중 면역 형광 염색 방법 ····· 10
그림 4. Opal 형광 파장에 대해 구성된 라이브러리 ····· 12
그림 5. 스캔 된 TMA slide 전체 이미지 ····· 13
그림 6. 항체 별 표지 된 형광 ····· 14
그림 7. 핵 segmentation 이미지 ····· 17
그림 8. 세포막 segmentation 이미지 ····· 18
그림 9. 세포질 segmentation 이미지 ····· 19
그림 10. CD20, CD3 phenotyping ····· 20
그림 11. inform 소프트웨어 분석의 흐름 ····· 21
그림 12. MYC 단백 발현 강도에 따른 사분위수 분포 그래프 ····· 24
그림 13. 면역형광 염색이 된 B 세포와 T 세포와 MYC 단백의 이미지 ····· 28
그림 14. DLBCL 세포에서 MYC 단백의 발현 ····· 29

그림 15. MYC 단백 발현 강도가 1+ 이상일 때 양성 세포 비율 세분화를 이용한 OS 의 카플란-마이어 곡선 ····· 31
그림 16. MYC 단백 발현 강도가 1+ 이상일 때 양성 세포 비율 세분화를 이용한 EFS 의 카플란-마이어 곡선 ····· 32
그림 17. MYC 단백 발현 강도가 2+ 이상일 때 양성 세포 비율 세분화를 이용한 OS 의 카플란-마이어 곡선 ····· 36
그림 18. MYC 단백 발현 강도가 2+ 이상일 때 양성 세포 비율 세분화를 이용한 EFS 의 카플란-마이어 곡선 ····· 37
그림 19. MYC 단백 발현 강도가 3+ 이상일 때 양성 세포 비율 세분화를 이용한 OS 의 카플란-마이어 곡선 ····· 41
그림 20. MYC 단백 발현 강도가 3+ 이상일 때 양성 세포 비율 세분화를 이용한 EFS 의 카플란-마이어 곡선 ····· 42
그림 21. 내부 데이터로 도출 된 cut-off value 로 OS 의 카플란-마이어 곡선 ····· 46
그림 22. 내부 데이터로 도출 된 cut-off value 로 EFS 의 카플란-마이어 곡선 ····· 47

서론

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) 는 B 세포 림프종의 한 종류이다. 국내 10 대 암 중 하나인 비 호지킨 림포마에서도 가장 흔한 질병 이며, 새롭게 진단되는 림포마 의 전체에서 30-40%를 차지한다. 생물학적 및 임상적으로 이질적인 특성으로 인해 2008 년 세계보건기구 (WHO) 에서 달리 명시되지 않는 악성 림프종은 DLBCL 로 분류되었다[1-3]. 유전자 발현 프로파일링 (GEF, Gene-expression profiling) 을 통해 2 개의 아형으로 분류할 수 있다. 전체의 45 – 50%는 germinal center B (GCB) 세포 형이며 나머지는 activated B (ABC) 세포 형으로 나뉜다[4, 5]. 아형 분류는 종양의 기원이 된 모세포를 조사하여 개별화 된 치료를 가능하게 했다[6]. 기존 치료는 세포독성 항암제 조합인 CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone) 으로 시행하였다[7]. 최근, CHOP 요법 에 표적 항암제인 rituximab 을 병행함으로써 보다 높은 전체 생존율 예후를 보이게 되어 완치율은 약 60 % 정도가 되었다[8-10]. 그러나 여전히 R-CHOP 치료에 반응하지 않고, DLBCL 로 인해 사망에 이르는 환자가 약 40% 이다[10].

이후 이러한 환자군을 정의하고자 예후를 예측하기 위한 표지인자 규명을 위한 연구가 활발히 진행되어 다양한 관련 인자들이 밝혀졌다.

최근 많은 연구에 따르면 R-CHOP 치료에 반응하지 않고 나쁜 예후를 보이는 환자군이 MYC 과 관련이 있다고 발표 되었다[10]. MYC 은 강력한 oncogene 이자 oncoprotein 으로 알려져 있다[11-13]. 정상 세포에서 MYC 은 세포의 생장에 중요한 역할을 하는데, 세포 주기, 성장, 분열, 분화, 자멸사 등에 관여하며, 성장 인자를 자극하여 세포를 증식시킨다. 그러나 MYC 의 돌연변이로 인한 조절 불능 상태는 성장과 자멸사를 조절하지 못하게 되고, 세포를 불멸화하게 만든다. 또한 면역계의 감시에서 벗어나 공격 받지 않게 하여 암을 형성하게 되는 요인이 된다. 실제로 대부분의 DLBCL case 에서 MYC 단백의 비정상적 발현이 관찰되어왔다[14, 15]. 그러나 아직까지 종양세포에서 MYC 단백의 자세한 역할은 명확히 알려진 바가 없다.

선행 연구들은 MYC 단백의 발현과 질병의 관련성을 검증하기 위해 면역화학조직염색 기법을 적용하고 있기 때문에 이미지 분석에 대한 연구자들의 관심이 높다[16, 17]. 소프트웨어를 이용한 공인된 cut-off value 를 제시하려는 다수의 시도가 있었지만, heterogeneous 한 MYC 단백의 특성 탓에 면역 화학 조직 염색에서의 MYC 발현 강도 편차가 매우 크다 (그림 1). MYC 발현의 강도가 일관되지 않기 때문에 양성세포를 판독하고 그 비율을 정하는데 어려움이 있다[18]. 이러한 이유로 현재 공인된 cut-off value

가 존재하지 않는다. 연구자들 마다 설정한 ct-off value 가 다르다[19, 20]. 따라서 면역 화학 조직 염색법만을 진단기준으로서 임상에 적용하기는 어려운 실정이다[21].

본 연구에서는 이러한 문제점을 극복하기 위하여 Opal 면역형광염색법을 적용하였다. 이는 면역화학조직염색법을 기반으로 하여 형광으로 검출하는 실험법이다. 면역화학 조직염색 보다 dynamic range 가 넓기 때문에 강도를 측정하기에 알맞은 실험이다. 이 기법을 이용하여 발현의 강도 및 발현 위치에 대한 정보를 정량적으로 얻을 수 있다[22]. 총 192 예의 DLBCL tissue microarray 내 종양세포 내의 MYC 의 발현 정도를 Opal 면역형광염색을 통해 정량 분석하였다. 분석 된 데이터를 이용하여 ROC (receiver operating characteristic) curve, H-scoring (histo-scoring) , MYC 단백의 발현 강도 및 양성 세포 비율을 세분화한 분석 등으로 cut-off value 를 도출하였다[23-26]. 본 연구에서 활용된 각 기법은 분석된 결과와 임상적 예후와의 상관 관계를 평가 했으며, 그 중 가장 우수했던 cut-off value 의 도출 된 강도와 비율을 세분화 한 분석에 대해 논하려 한다.

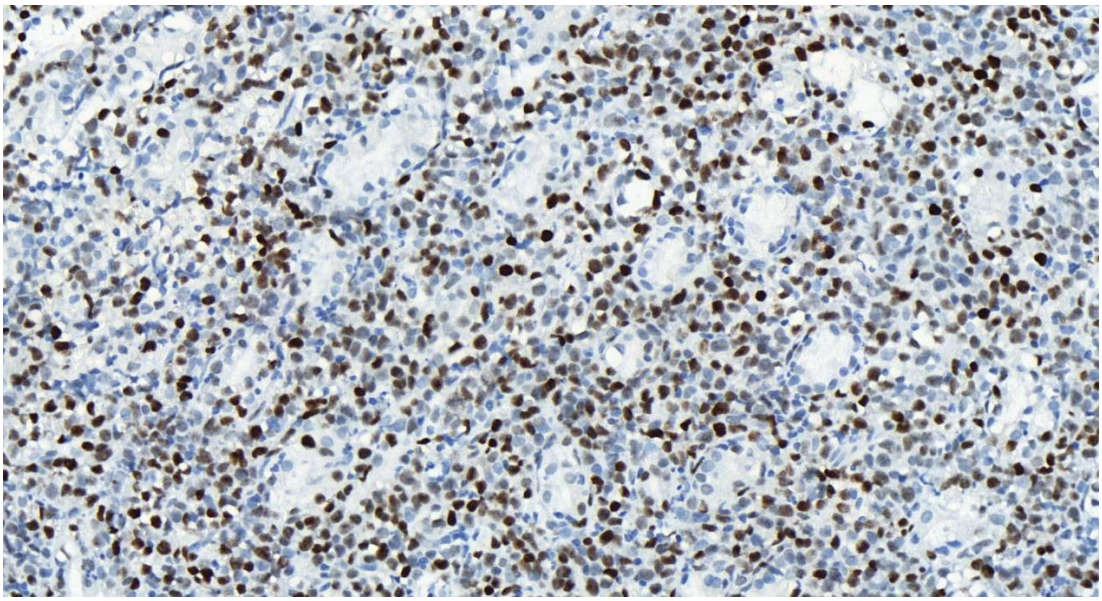

그림 1. DLBCL 조직에서의 MYC 면역화학조직염색의 이미지

재료 및 방법

1. 대상 환자 모집과 tissue microarray (TMA) 제작

2007 년부터 2012 년 사이에 서울아산병원 종양내과에서 DLBCL 을 진단받은 환자를 대상으로 했다. 그 중 원발성 중추신경계 DLBCL 환자와 R-CHOP 이외의 치료를 받은 환자를 제외한 검체의 hematoxylin 과 eosin 염색 슬라이드를 검토하여 적절한 양의 종양이 존재하는지 확인했다. 확인이 된 192 명의 파라핀 조직 블록에서 환자 1 인 당 직경 1mm 의 시료를 3 개 채취하여 TMA 주형 블록에 삽입하여 TMA 를 완성했다[27, 28]. 대상 환자에 대한 임상 정보는 병원 기록에서 성별, 나이, 치료 방법(treatment regimens), Ann Arbor stage, LDH (lactate dehydrogenase) level, COO (cell of origin), CNS relapse 와 국제예후지수(IPI, international prognosis score) 를 입수했다. 환자 추적 기간은 2007 년 1 월부터 2016 년 10 월까지였다. 본 연구는 서울아산병원의 임상시험심사위원회의 승인 (2015-0720) 을 받았다.

표 1. 대상 DLBCL 환자들의 특징 및 분류

	All Patients (n = 192)	
Characteristic	No.	%
Median age, years [range]	58 [20 – 82]	
Age >60y	93	48.4
R-CHOP therapy	192	100
Gender		
Male	104	54.2
Female	88	45.8
Survival		
<5-y OS	107	55.7
<5-y EFS	114	59.4
Stage III-IV	116	60.4
Elevated LDH (> 250 IU/L)	91	47.4
IPI score of 3-5	76	39.6
CNS relapse	14	7.3
Cell of origin (COO)		
No identified	12	6.3
GCB	53	32.7
Non-GCB	127	67.3

Abbreviations: OS, overall survival; EFS, event-free survival; LDH, lactate dehydrogenase; IPI, international prognostic index; CNS, central nervous system; GCB, germinal center B-cell

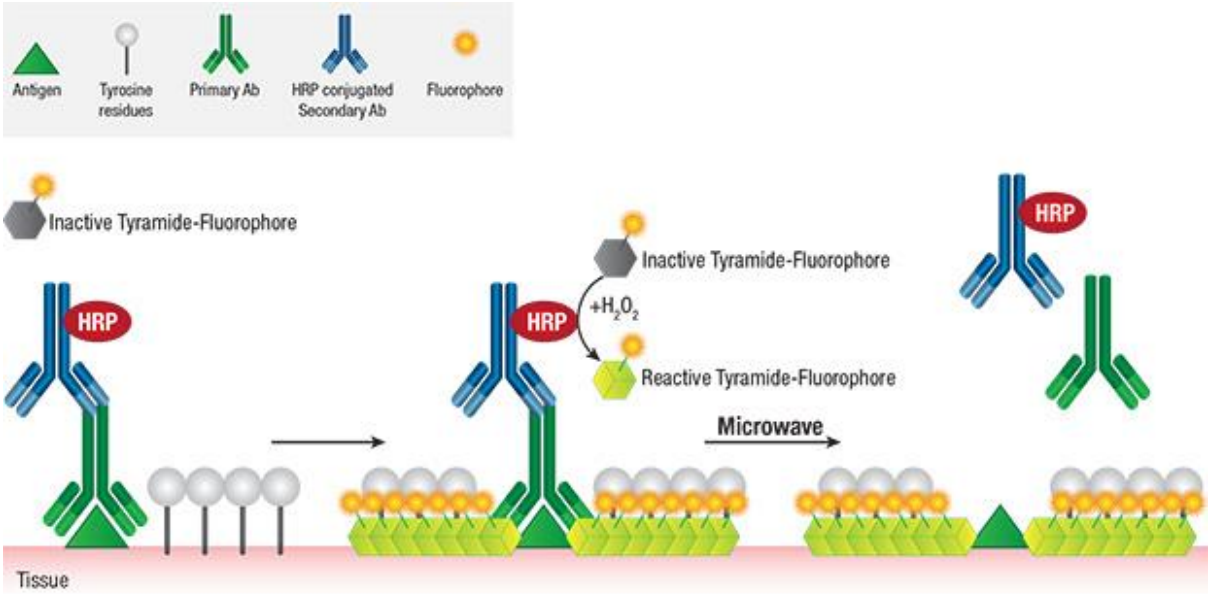

그림 2. Microwave treatment 를 이용한 tyramide 증폭 시스템

(This illustration is adaptive from Cell signaling tech.)

2. Opal 다중 형광 면역 염색

Opal 다중 형광 면역 염색은 형광을 이용하여 조직에서 표적 항원 단백을 검출하는 실험법이다. 이는 면역화학조직염색보다 dynamic range 가 넓어서 다양한 강도를 측정하기에 알맞은 실험법이다[29, 30]. 형광분자는 자외선이나 가시광선을 흡수하게 되면 전자가 들뜬 상태가 되었다가 다시 원상태로 돌아갈 때 빛 에너지가 방출이 되는 성질이 있다. 형광분자는 각각의 특성에 따라 특정 파장의 빛을 흡수하여 독특한 파장의 빛을 방출하게 된다. Opal 다중형광면역염색은 이러한 성질을 이용하여 다른 파장대로 최대 7 개의 형광물질을 표지 할 수 있다.

Opal 다중 형광 면역 염색을 시행하기 이전에 항체 최적화 농도를 정하고, 각 항체 별 형광 파장을 정한다[22]. 전체적인 실험 방법은 면역 화학 조직 염색과 동일하다[31]. TMA 4um 두께로 박절한 section 으로 Opal 다중형광 면역 염색을 시행했다. 파라핀을 제거하기 위해 65°c 온열기에서 파라핀을 녹여준 후 xylene 에 30 분 간 담그어 조직의 빈 공간 사이에 포매 되어 있는 파라핀을 제거했다. 이후, 에탄올을 이용해 수세 과정을 거쳤다. 4% 파라포름알데히드로 조직을 재고정했다. 알데히드 고정으로 생성된 cross-link 를 제거하여 항원의 결정기를 복구시키기 위해 P.H. 6.0 의 구연산염 용액에 슬라이드를 담그어 MWT (microwave treatment) 를 시행했다. 항원 결정기가 복구된 슬라이드는 실온에서 열기를 식혀준 후, 인산화완충용액 (Phosphate buffered saline, PBS) 에 BSA (bovine serum albumin) 를 1%로 희석한 단백질 비특이 억제 용액으로 조직을 실온에서 10 분 반응 시켰다. 이 과정으로 비특이적인 항원 - 항체 간 결합이 억제된다. 비특이 억제가 완료 된 슬라이드에 적정 농도로 희석이 된 1 차 항체 150ul 로 실온에서 1 시간 반응했다. 0.1% 의 계면활성제 (tween 20) 를 TBS (tris-buffered saline) 용액에 희석하여 1 차 항체 반응이 끝난 슬라이드를 3 분 간격으로 2 회 담그어 세척했다. 세척이 끝난 슬라이드는 HRP (horseradish peroxidase) 가 공액 되어 있는 2 차 항체로 실온에서 1 시간 반응시켰다. 이 때, 2 차 항체는 1 차 항체의 숙주와 같은 종에서 면역 반응을 통해 얻은 것을 사용한다. 반응이 끝난 슬라이드는 이전과 같은 방법으로 세척했다. Opal 7-color Manual IHC manual kit (cat. NEL811001KT, PerkinElmer, Waltham, MA) 에 포함되어 있는 TSA (tyramide signal amplification) buffer 에 형광물질을 1:50 으로 희석하여 슬라이드 당 150ul 로 습윤하고 어두운 염색상자에 넣고 실온에서 10 분 반응했다. 반응이 완료 된 슬라이드는 TBS-T 용액에 10 분간 담그어 세척했다. 1 차 항체와 2 항체를

제거하고 tyramide 와 형광 물질만 남기기 위해 MWT 를 시행했다. TSA 는 tyramide 가 HRP 효소의 작용을 받아서 activation 된 후에 바로 주변의 생체 분자에 공유결합을 하는 현상을 말한다[32]. MWT 를 통해 비특이적으로 반응 되어있는 항원 – 항체, 항체 – 항체 간의 결합이 사라지게 되고, 공유결합인 tyramide 와 형광이 남게 되어 host 에 상관없이 최대 여섯 가지의 항체를 표지 할 수 있다 (그림 2.). 따라서 1 차 항체의 숙주에 따라 2 차 항체 선택의 폭이 좁았던 점과 항체와 형광이 세척과정에서 사라지게 되는 점이 개선된다. 마지막으로 DAPI 를 이용하여 핵에 counter staining 을 한 후, 형광 염색 전용 봉입제를 이용해 커버 슬라이드를 덮어 완성한다 (그림 3.).

본 연구에서는 DLBCL 세포에서 MYC 이 발현되는 강도를 정량화하기 위해 1 차 항체로는 CD20, MYC 을 사용했으며, 비 종양세포인 T 세포를 제외하고 분석하기 위해 CD3 를 표지 했다 (표 2.).

표 2. 사용 된 항체의 정보

Name	Cat. no	Target	Location	Clone	Concentrate	Fluorophore
Anti-CD20	M0755	B-cell	Membrane	L26	1:1,000	Opal 520
Anti-CD3	A0452	T-cell	Cytoplasm, Membrane	F7.2.38	1:50	Opal 620
Anti-MYC	ab32072	MYC	Nucleus	Y69	1:500	Opal 690

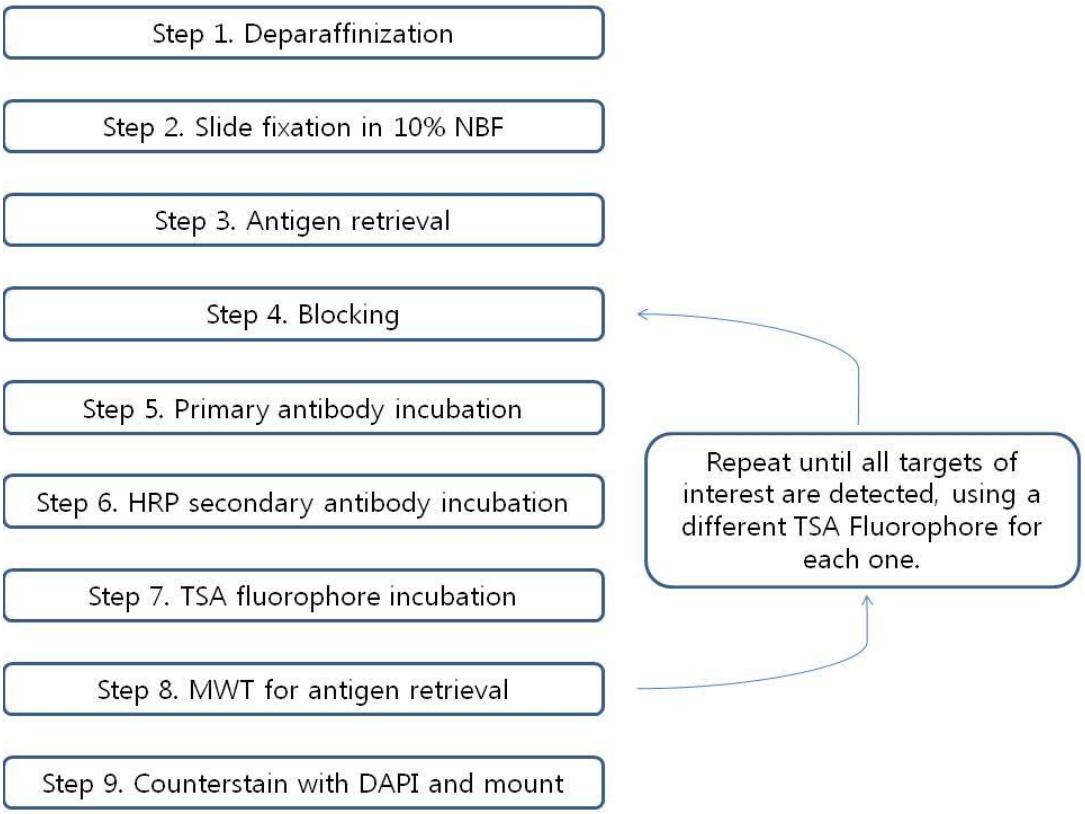

그림 3. Opal 다중 면역 형광 염색 방법[22)]

Abbreviations: NBF, neutral-buffered formalin; HRP, horseradish peroxidase

3. Image 획득

Vectra slide scanner (PerkinElmer, Waltham, MA) 는 파장의 범위가 420 nm 에서 720 nm 이며, 촬영 간격은 20 nm 이다. 그러므로 동일한 조직에 다양한 항체와 형광이 표지 되어 있어도 형광 파장을 분리하여 촬영 할 수 있다. 이미지를 각 파장 별로 획득 한 후, 취합하여 하나의 이미지로 만든다.

Vectra 3.0 software packages (PerkinElmer, Waltham, MA) 은 4 가지 (DAPI, OPAL 520, OPAL 620, OPAL 690) 의 형광으로 표지 된 슬라이드의 형광 스펙트럼 파장이 안정적으로 혼합되지 않고 정량화 되어야 한다. 따라서 각 파장의 예와 형광 물질이 표지 되지 않은 조직의 자가형광파장이 다중 파장 라이브러리에 등록이 되어야 한다. 이러한 이유로 표적 정량의 기준을 형성하기 위해 형광 파장 라이브러리를 생성한다 (그림 4.). 양성대조군인 정상 조직 (예. 인간 정상 편도 조직) 을 준비한다. 염색 되지 않은 슬라이드와 패널 중 가장 풍부한 항체 (예. CD20) 를 이용하여 개별적으로 염색이 된 각 슬라이드로 다중 파장 분석에 필요한 형광 파장 라이브러리를 확립했다. 각각의 형광으로 염색이 된 슬라이드로 구성 된 멀티 스펙트럼 라이브러리와 염색되지 않은 슬라이드는 표적 정량의 기준을 형성한다. 형광 분자의 파장은 표 3. 에 요약했다.

Vectra 로 슬라이드 전체를 저배율로 촬영하여 파장 별로 고배율 촬영 할 부분을 표시 (annotation) 해주고 고배율로 촬영한다 (그림 5.).

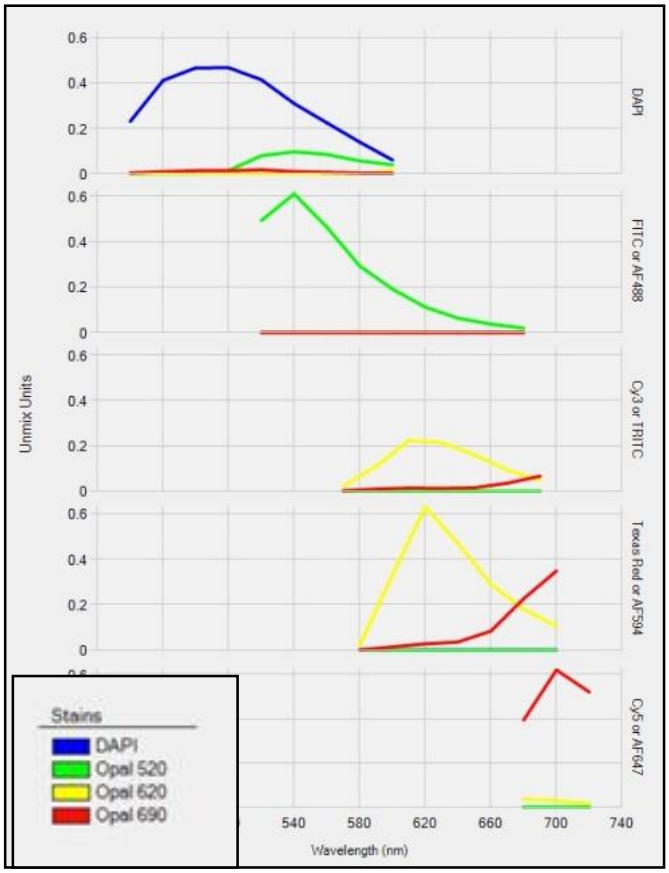

그림 4. Opal 형광 파장에 대해 구성된 라이브러리 [33].

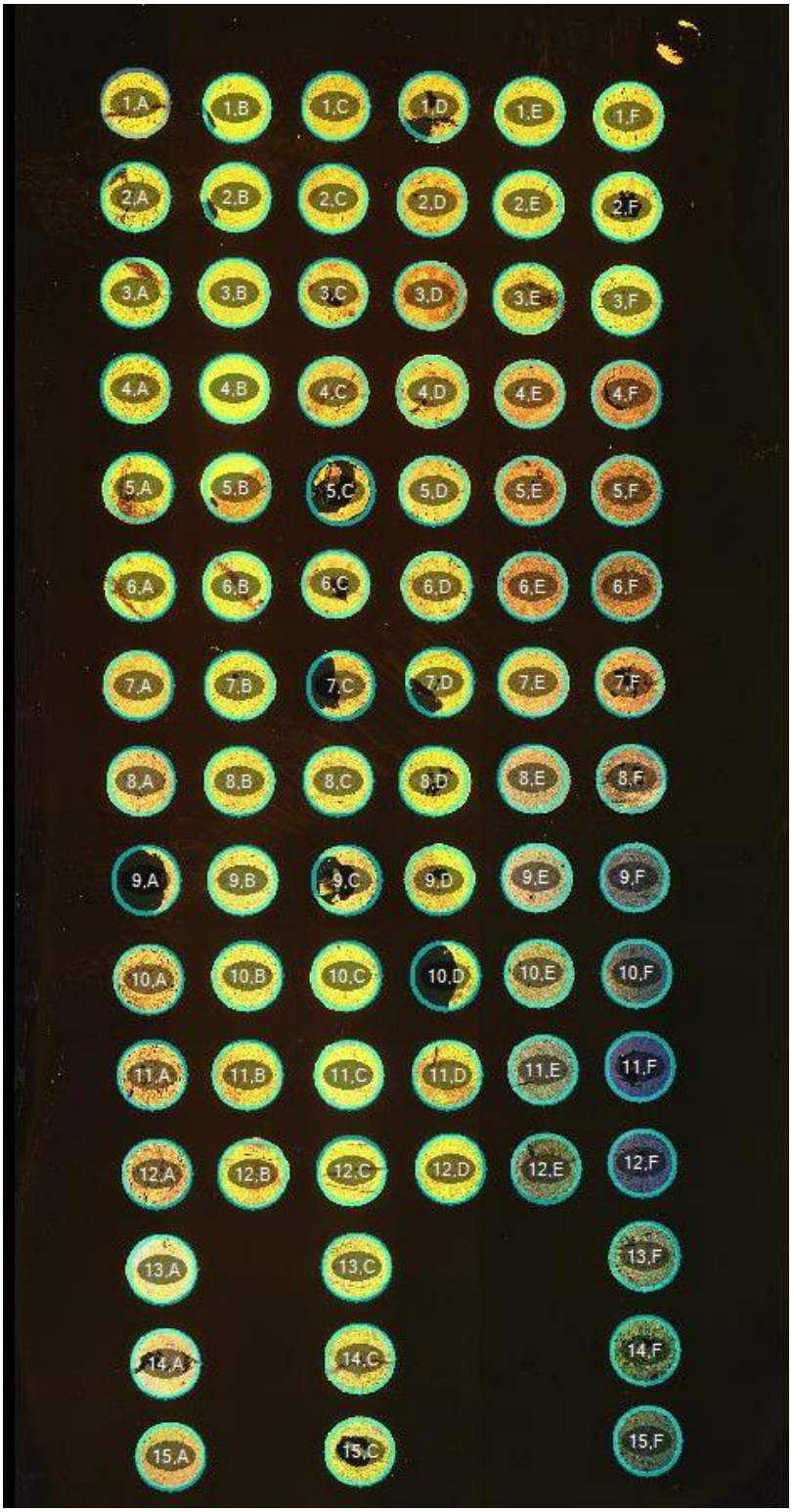

그림 5. 스캔 된 TMA slide 전체 이미지

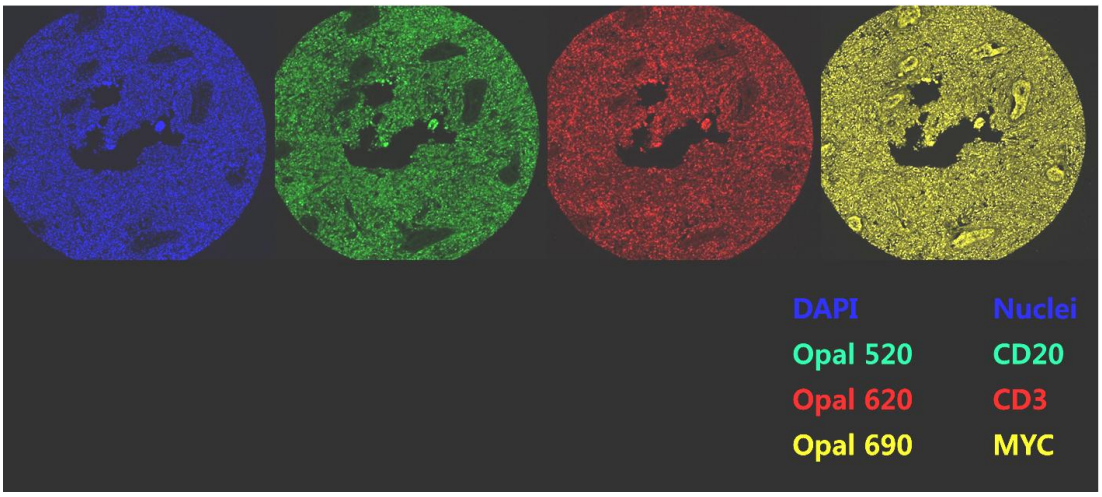

그림 6. 항체 별 표지 된 형광

표 3. Opal 형광 분자의 파장

	Wavelength	
Opal fluorephores	Excitation	Emission
Opal 520	494nm	525nm
Opal 620	588nm	616nm
Opal 690	676nm	694nm
Spectral DAPI	358nm	461nm

.

4. Image 정량 분석

추출 된 이미지를 분석 프로그램인 inForm® Tissue Finder™ image analysis software (PerkinElmer, Waltham, MA) 를 이용 하여 정량화 했다 (그림 6.). 정량화 이전에 소프트웨어를 트레이닝 하는 과정을 거쳐야 한다. 먼저 세포의 핵, 세포질, 세포막에 대한 위치와 크기 정보를 지정한다 (그림 7 - 9). 세포의 형태에 대한 소프트웨어 트레이닝 후, CD20 과 CD3 로 표현형을 지정하여 알고리즘을 생성한다 (그림 10.). 생성된 알고리즘으로 모든 이미지 파일에 대한 세포 구획의 위치, 위치 마다 발현 되는 형광의 강도 등에 대한 정량적 정보를 얻었다 (그림 11.).

.

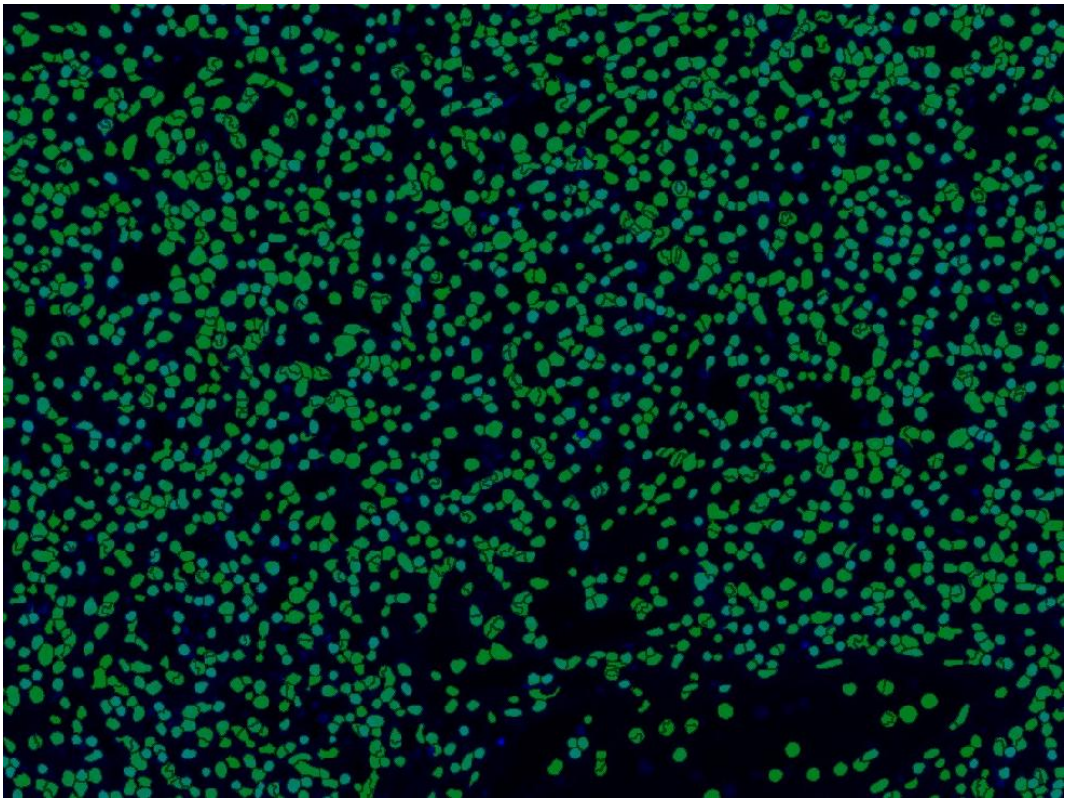

그림 7. 핵 segmentation 이미지

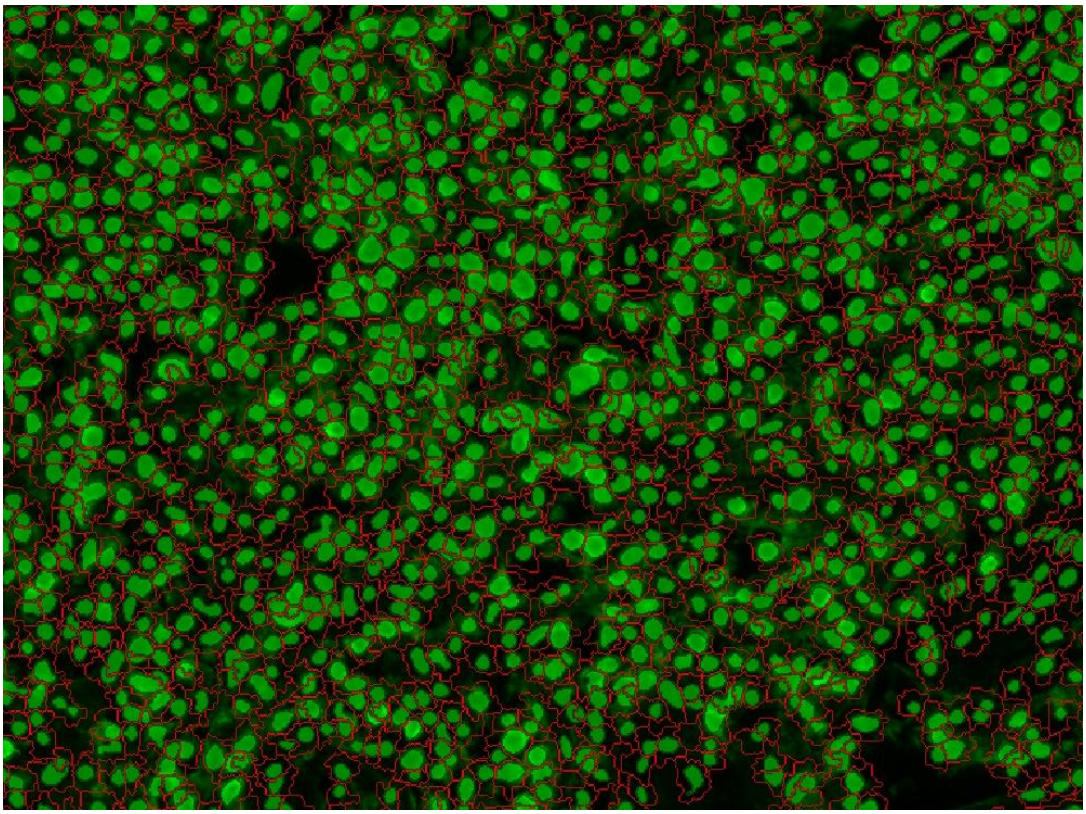

그림 8. 세포막 segmentation 이미지

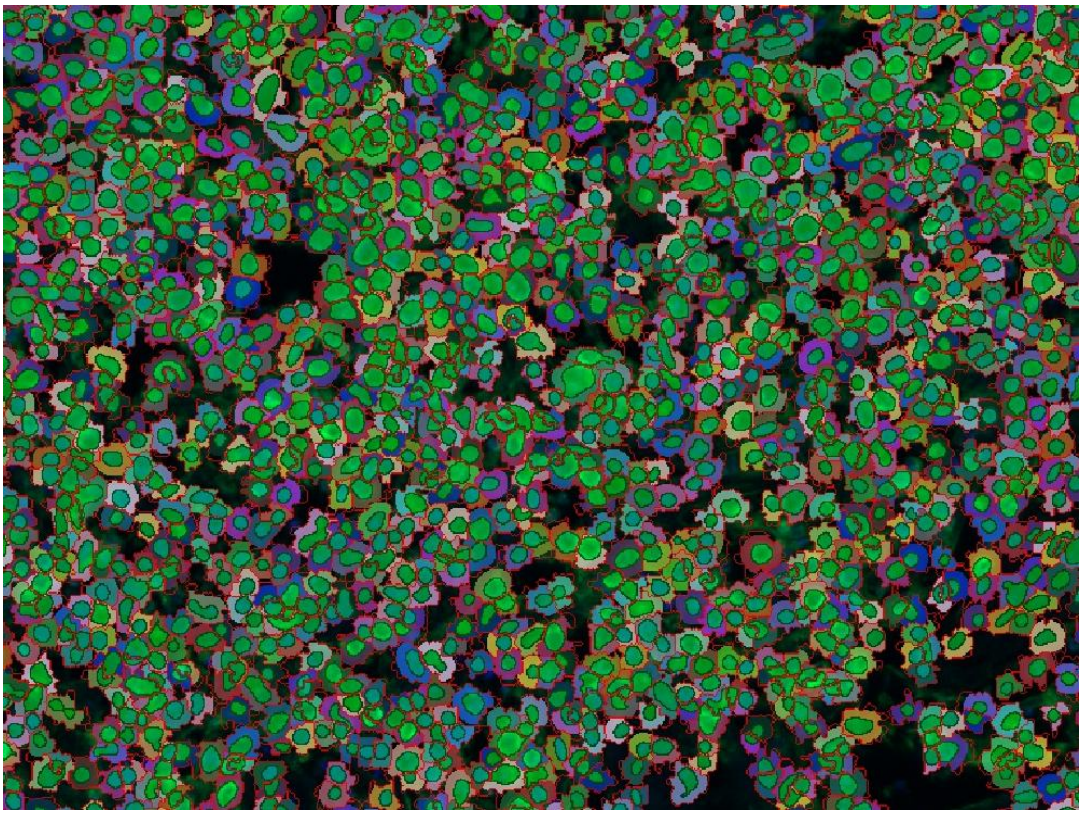

그림 9. 세포질 segmentation 이미지

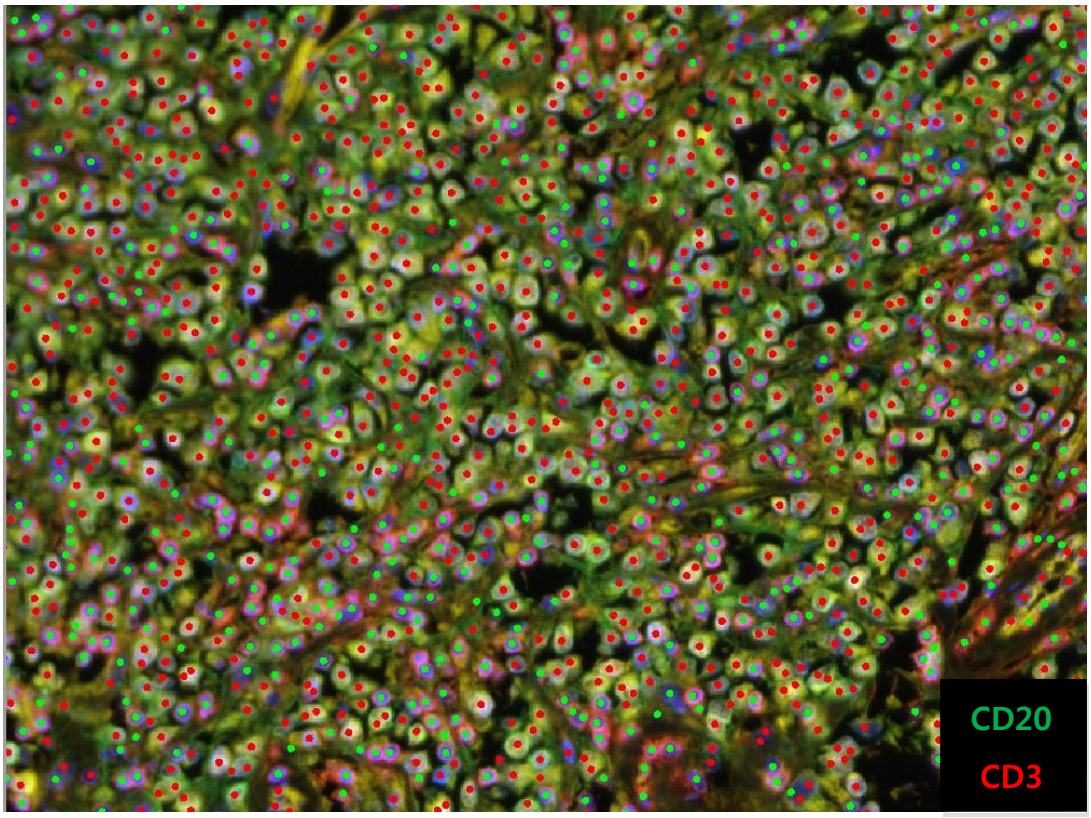

그림 10. CD20, CD3 phenotyping

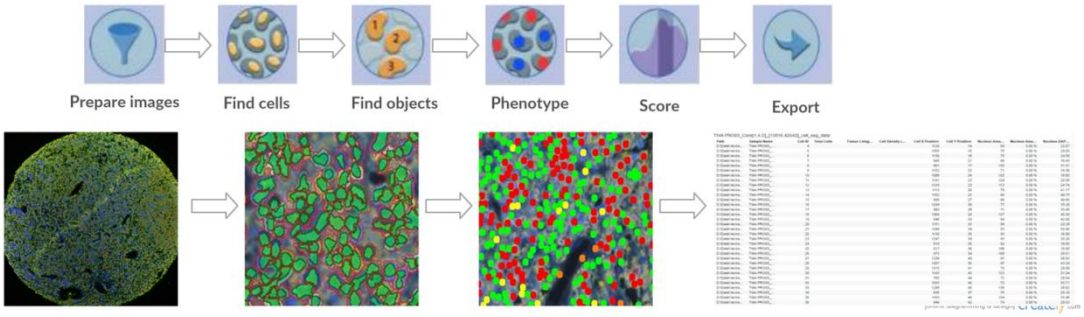

그림 11. inForm 소프트웨어 분석의 흐름[33)]

5. 집단 분류 방법

정량화 된 DLBCL 종양 세포에서 MYC 의 발현 강도를 오름차순으로 나열한 후, 분위수로 4 개의 집단으로 나누었다 (그림 12.). 각각의 강도에 따라 분류 된 집단의 특징은 표 4. 에 요약되어 있다. 분석에 앞서 MYC 단백 발현 강도와 양성 세포 비율의 세분화한 cut-off value 를 이용하여 9 개의 집단으로 나누어 OS 와 EFS 를 분석했다 (표 5.).

표 4. 분위수로 나눈 각 집단의 MYC 단백 발현 강도의 범위와 중간 값

MYC expression intensity	Range	Median
0	4 – 23.6	19
1+	23.7 – 29.4	27.9
2+	29.4 – 35.9	35
3+	35.9 – 102.4	51.2

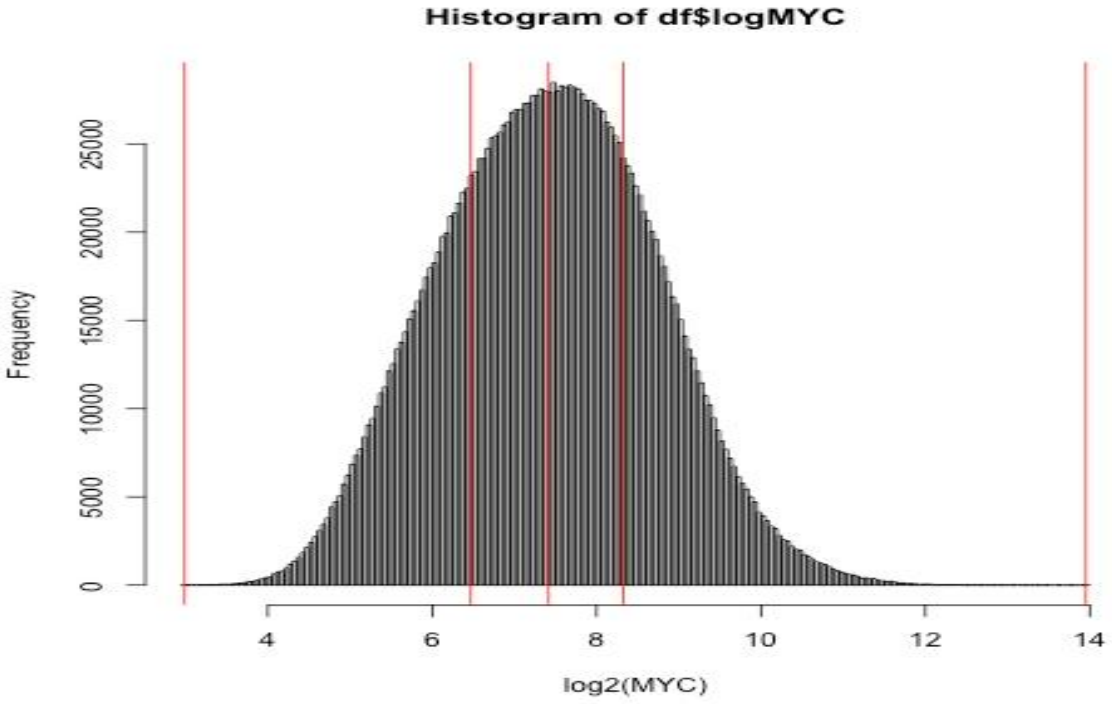

그림 12. MYC 단백 발현 강도에 따른 사분위수 분포 그래프

표 5. MYC 단백 발현 강도와 양성 세포 비율이 세분화 된 각 집단의 기준

MYC expression	
Intensity	Proportion(%)
1+	0 - 30
	30 - 60
	60 -
2+	0 - 30
	30 - 60
	60 -
3+	0 - 30
	30 - 60
	60 -

6. 통계 분석

사용된 통계 기법으로는 카플란-마이어 생존곡선법과 콕스 회귀분석을 사용했다. 카플란-마이어 생존곡선으로 누적 생존을 시각화 하여 추정했다[34]. 카플란-마이어의 유의성은 로그 순위 법으로 검정했다. 콕스 회귀분석으로는 각 집단의 위험비를 계산하여 생존 분석을 했다[35-37]. 도출 된 결과를 비교하여 가장 적합한 cut-off value 를 구하고자 했다. *P*-value 는 0.05 미만을 통계적으로 유의하게 보았다[38].

통계 프로그램으로는 R version 3.2.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) 을 사용했다.

결과

1. 환자의 특징 별 통계

환자들의 임상 정보는 표 1. 에 요약하였다. 192 명의 환자 중 남성 환자는 104 명 (54.2%) 이며 여성 환자는 88 명 (45.8%) 이다. 평균 나이는 58 세 (범위, 20-82 세) 이고, 60 세 이상의 환자는 93 명 (48.4%) 이다. GCB 아형의 환자는 53 명 (32.7%) 이며, non-GCB 아형의 환자는 127 명 (67.3%) 이다. 116 명 (60.4%) 의 환자가 병기 3-4 기에 속했다. 그리고 76 명 (39.6%) 의 환자는 IPI 점수 3-5 에 속했다. 91 명 (47.4%) 의 환자는 LDH 가 250 IU/L 이상이고, CNS (central nervous system) relapse 환자는 14 (7.3%) 명 이다. 5 년 미만의 전체 생존율은 55.7%, 5 년 미만의 무합병증 생존율은 59.4% 이다.

2. Opal 다중 면역 형광 염색의 분석

Opal 다중 면역 형광 염색은 192 개의 조직 샘플 TMA 블록에 시행했다. DLBCL 세포에서 MYC 단백의 발현을 확인하기 위해 CD20 과 MYC 을 표지하고, 비종양세포인 T 세포를 제외하기 윟 CD3 를표지했다. 각 단백의 발현은 이미지로 확인했다 (그림 13.). 파장 별 이미지를 겹쳐서 CD20 과 MYC 이 동시에 발현되는 종양 세포를 분석 했다 (그림 14.). 이 때 DAPI 와 MYC 이 같은 위치에서 발현되므로 DAPI 로 핵의 위치를 파악한 후, MYC 을 중점으로 분석을 했다[39].

DLBCL 세포에서 발현되는 MYC 의 강도를 사분위수로 나누어 4 개의 집단화 했다. 가장 발현의 강도가 약한 0+ 의 중간값은 19 (4 – 23.7) 이다. 1+ 의 중간값은 27.9 (23.6 – 29.4) 였으며, 2+ 의 중간값은 35 (29.4 – 35.9) 였고, 발현의 강도가 가장 강한 3+ 의 중간값은 51.2 (35.9 – 102.4) 이다 (표 4.).

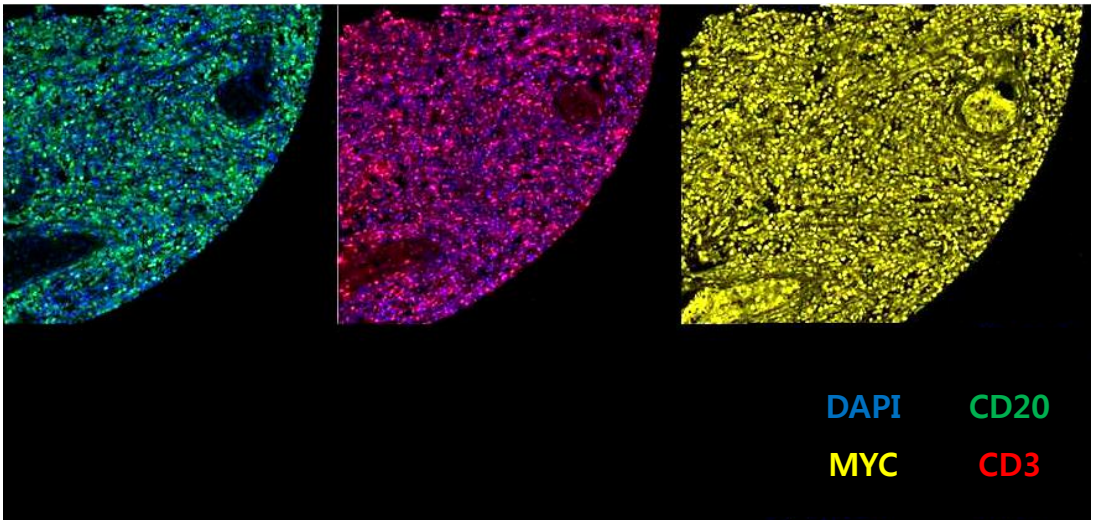

그림 13. 면역형광 염색이 된 B 세포와 T 세포와 MYC 단백의 이미지

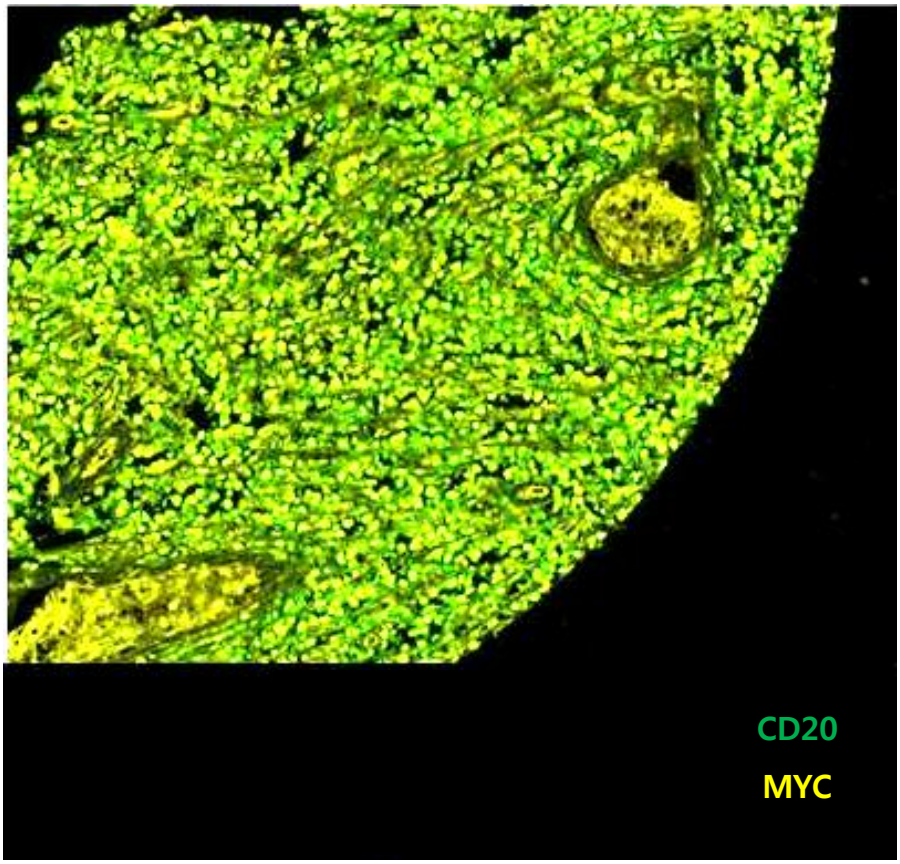

그림 14. DLBCL 세포에서 MYC 단백의 발현

3. MYC 단백 발현 강도와 양성 세포 비율의 세분화의 통계적 분석

강도 0+을 제외한 1+, 2+, 3+ 에 대해 양성 세포 비율을 세분화한 집단에 대해 분석했다 (표 5.). 강도 1 에 대한 3 개의 집단 중 myc1.group3 의 OS 가 카플란-마이어 곡선의 결과, 유의하지 않게 예후가 나쁜 경향을 보였다 (OS, $p = 0.41$; 그림 15.). EFS 역시 OS 와 같이 유의하지 않게 예후가 나쁜 경향을 보였다 (EFS, $p = 0.7$; 그림 16.). OS 에 대한 콕스 회귀 분석의 결과, myc1.group3 가 가장 예후가 나쁜 경향이 있었으나, 통계적으로 유의하지 않았다 (HR, 1.39, 95% CI, 0.05 – 3.9, $p = 0.529$; 표 6.). EFS 에 대한 콕스 회귀 분석 결과 역시 myc1.group3 가 예후가 나쁜 경향이 있었으나 통계적으로 유의하지 않았다 (HR, 1.20, 95% CI, 0.52 – 2.8, $p = 0.667$; 표 7.).

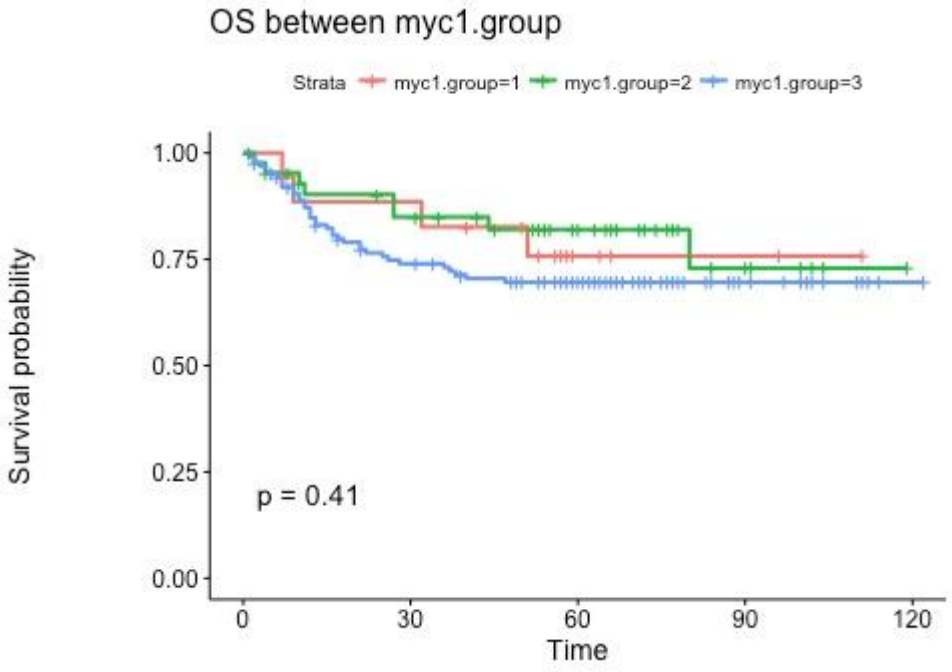

그림 15. MYC 단백 발현 강도가 1+ 이상일 때 양성 세포 비율 세분화를 이용한 OS 의 카플란-마이어 곡선

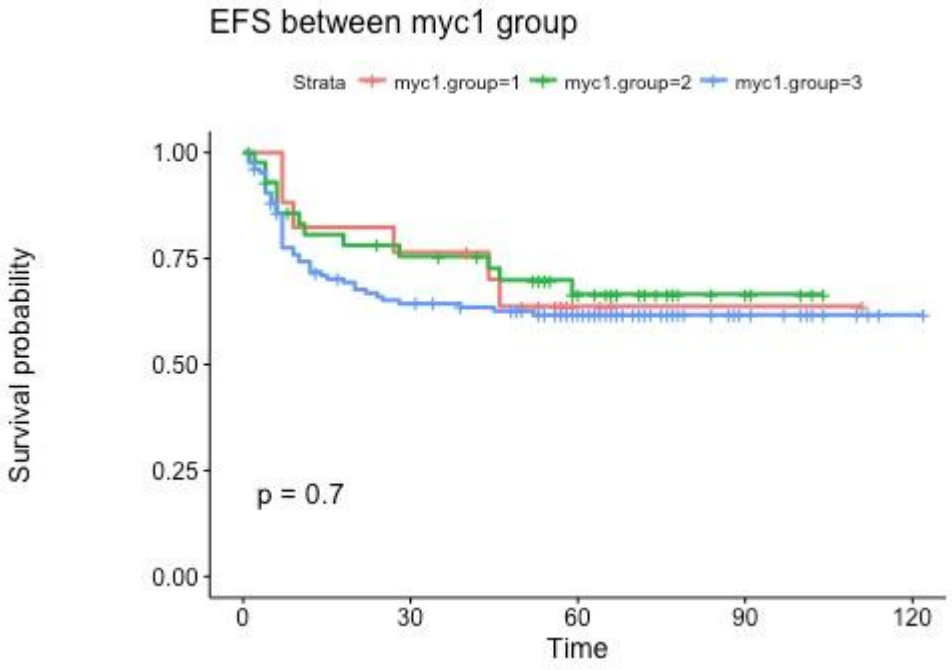

그림 16. MYC 단백 발현 강도가 1+ 이상일 때 양성 세포 비율 세분화를 이용한 EFS 의 카플란-마이어 곡선

표 6. MYC 1+ 의 OS 에 대한 콕스 회귀분석 결과

Variable	OS		
	HR	95% CI	*P*
myc1.group1		Reference	
myc1.group2	0.86	0.26 – 2.9	0.805
myc1.group3	1.39	0.50 – 3.9	0.529

표 7. MYC 1+ 의 EFS 에 대한 콕스 회귀분석 결과

Variable	EFS		
	HR	95% CI	*P*
myc1.group1		Reference	
myc1.group2	0.94	0.36 – 2.5	0.895
myc1.group3	1.20	0.52 – 2.8	0.667

강도 2 를 양성 세포 비율로 세분화 한 3 개 집단에 대한 카플란-마이어 법 분석 결과는 다음과 같다. myc2 의 OS 분석은 유의하지 않았으며 비례가정에 위배되었다. (OS, p = 0.12; 그림 17.). EFS 역시 유의하지 않았으며 비례가정에 위배되었다 (EFS, p = 0.2; 그림 28.). myc2+ 에 대해 콕스 회귀 분석을 진행했다. 그 결과, myc2.group3 의 OS 가 다른 집단에 비해 유의하지 않게 예후가 나쁜 경향을 보였다 (HR, 1.39, 95% CI, 0.50 – 3.9, p = 0.529; 표 8.). EFS 역시 유의하지 않게 예후가 나쁜 경향을 보였다 (HR, 1.6, 95% CI, 0.92 – 2.8, p = 0.086; 표 9.).

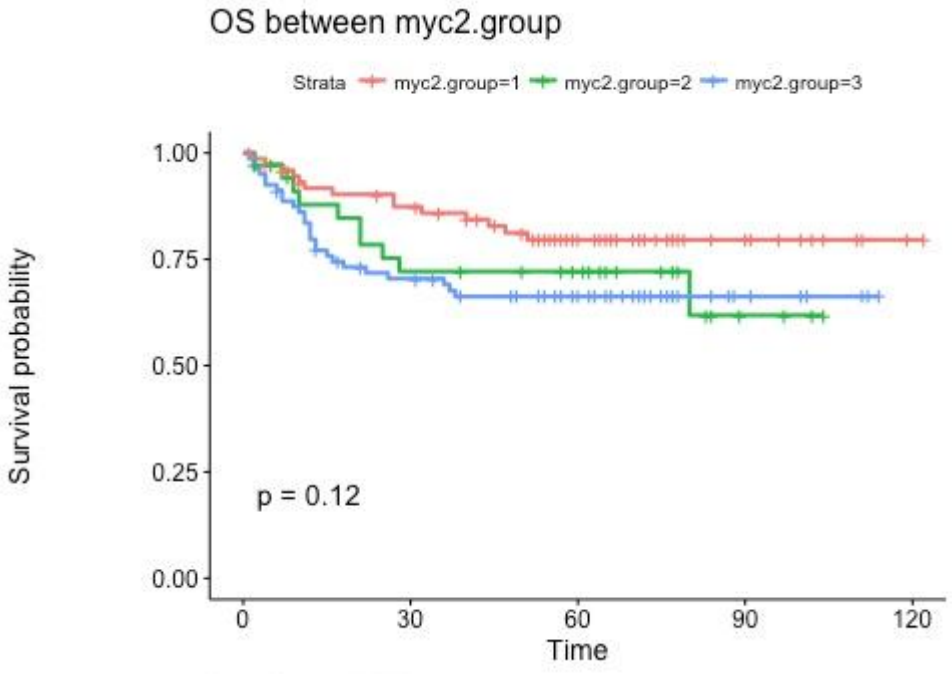

그림 17. MYC 단백 발현 강도가 2+ 이상일 때 양성 세포 비율 세분화를 이용한 OS 의 카플란-마이어 곡선

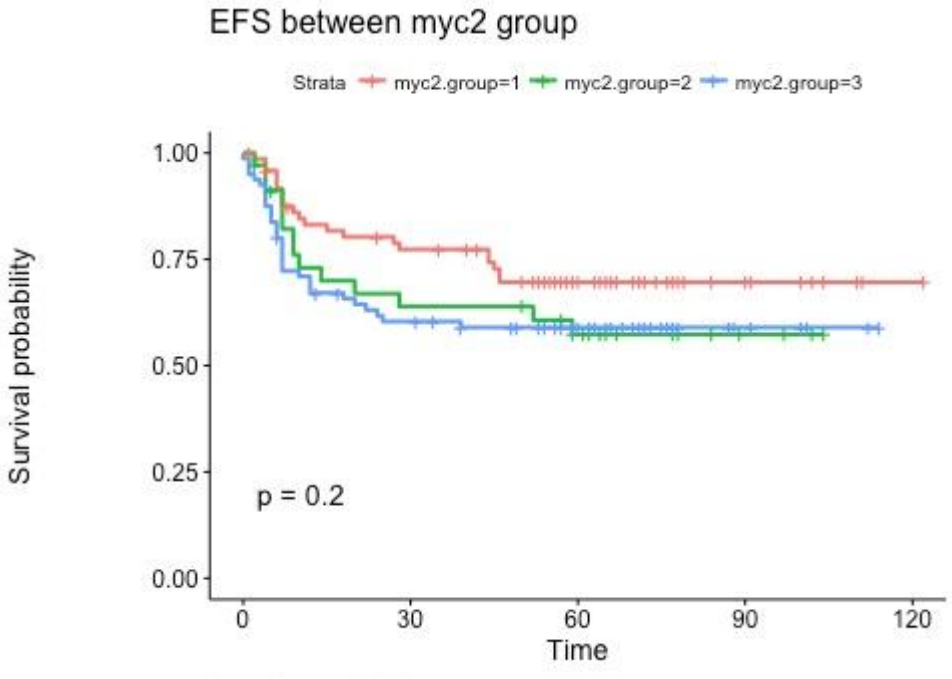

그림 18. MYC 단백 발현 강도가 2+ 이상일 때 양성 세포 비율 세분화를 이용한 EFS 의 카플란-마이어 곡선

표 8. MYC 2+ 의 OS 에 대한 콕스 회귀분석 결과

Variable	OS		
	HR	95% CI	*P*
myc2.group1		Reference	
myc2.group2	1.7	0.73 – 3.7	0.225
myc2.group3	2.0	1.02 – 3.8	0.042 *

표 9. MYC 2+ 의 EFS 에 대한 콕스 회귀분석 결과

Variable	EFS		
	HR	95% CI	*P*
myc2.group1		Reference	
myc2.group2	1.5	0.77 – 3.0	0.224
myc2.group3	1.6	0.93 – 2.8	0.086

강도 3 에 속하는 3 개의 집단에 대한 카플란-마이어 분석 결과는 다음과 같다. OS 는 myc3.group3 이 다른 집단에 비해 예후가 나쁜 경향을 보였으며, 통계적으로 유의했다 (OS, $p = 0.04$; 그림 19.). EFS 는 통계적으로 유의하지 않게 예후가 나쁜 경향을 보였다 (EFS, $p = 0.091$; 그림 20.). OS 의 콕스 회귀 분석 결과, myc3.group3 가 유의하게 예후가 나쁨을 보였다 (HR, 2.4, 95% CI, 1.20 – 4.9, $p = 0.014$; 표 10.). EFS 의 콕스 회귀 분석 결과도 myc3.group3 유의하게 예후가 나쁜 경향을 보였다 (HR, 2.0, 95% CI, 1.06 – 3.7, $p = 0.032$; 표 11.).

이로써 myc3.group3 집단의 cut-off value 가 예후를 가장 잘 예측 할 수 있다는 결과가 도출됐다.

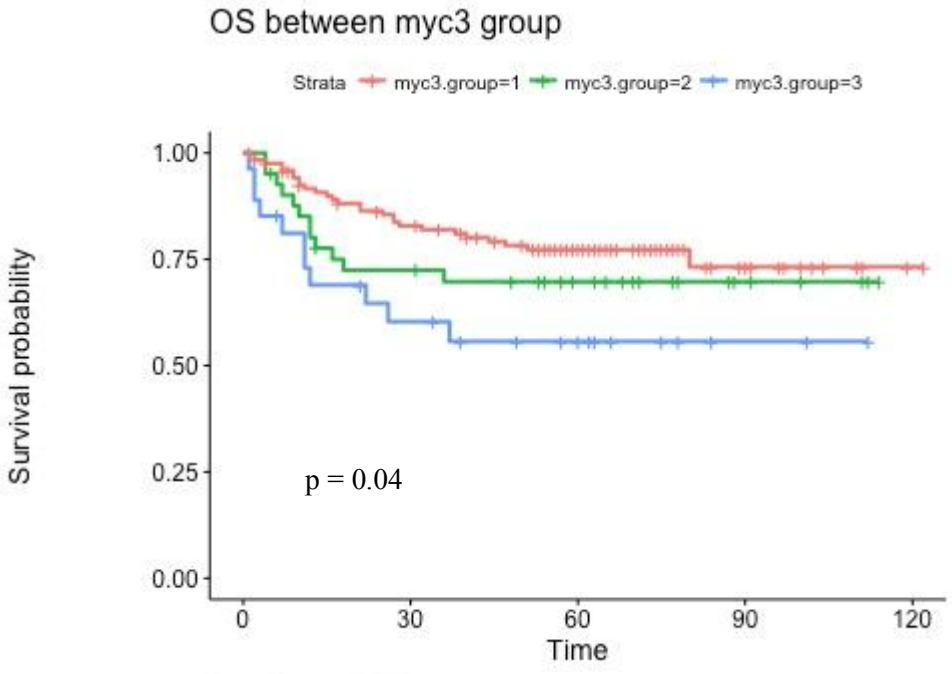

그림 19. MYC 단백 발현 강도가 3+ 이상일 때 양성 세포 비율 세분화를 이용한 OS 의 카플란-마이어 곡선

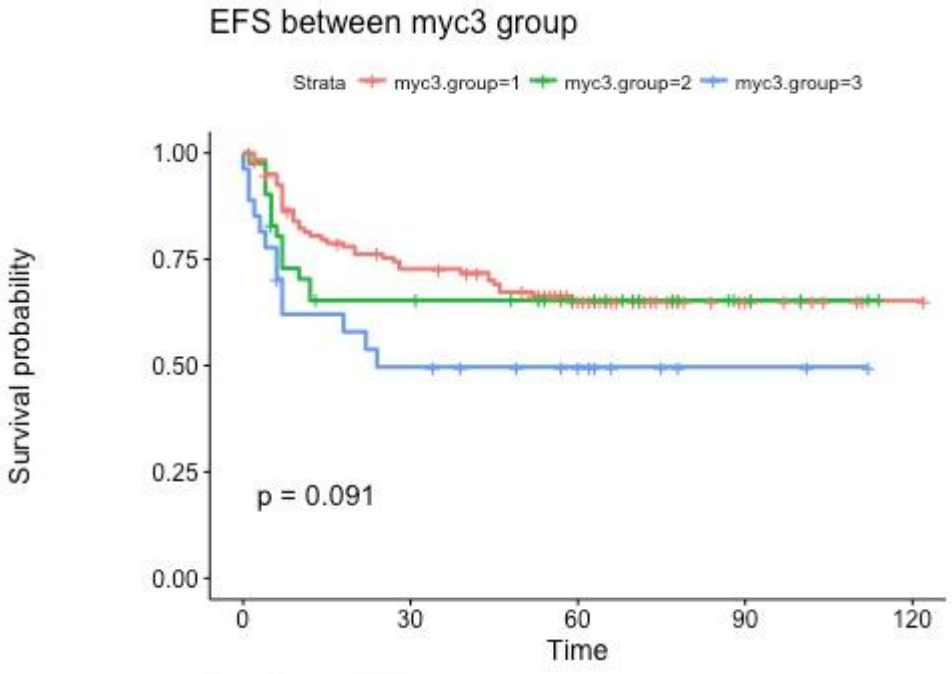

그림 20. MYC 단백 발현 강도가 3+ 이상일 때 양성 세포 비율 세분화를 이용한 EFS 의 카플란-마이어 곡선

표 10. MYC 3+ 의 OS 에 대한 콕스 회귀분석 결과

Variable	OS		
	HR	95% CI	*P*
myc3.group1		Reference	
myc3.group2	1.4	0.73 – 2.8	0.3
myc3.group3	2.4	1.20 – 4.9	0.014 *

표 11. MYC 3+ 의 EFS 에 대한 콕스 회귀분석 결과

Variable	EFS		
	HR	95% CI	*P*
myc3.group1		Reference	
myc3.group2	1.2	0.63 – 2.1	0.642
myc3.group3	2.0	1.06 – 3.7	0.032 *

4. 내부 data 로 도출 된 cut-off value 검증

앞서 도출 된 myc3.group3 의 cut-off value 를 내부 비교를 통해 재검정해보았다.

전체 192 명의 환자를 MYC 발현 강도 3+ 이상 이며, 양성 세포 비율이 60% 이상의 cut-off value 를 이용해 음성군 (myc3.regroup = 1) 과 양성군 (myc3.regroup = 2)으로 이원화 했다.

OS 를 카플란-마이어 생존 곡선으로 분석한 결과는 통계적으로 유의하게 양성군이 음성군에 비해 예후가 나쁜 경향을 보였다 (OS, $p = 0.019$; 그림 21.). EFS 의 카플란-마이어 곡선 분석 역시 OS 와 비슷하게 예후가 나쁜 경향을 보였다 (EFS, $p = 0.032$; 그림 22.). OS 에 대한 콕스 회귀 분석 결과, 양성군이 예후가 나쁜 경향을 보였다 (HR, 2.2, 95% CI, 1.1 – 4.3, $p = 0.022$; 표 12.).

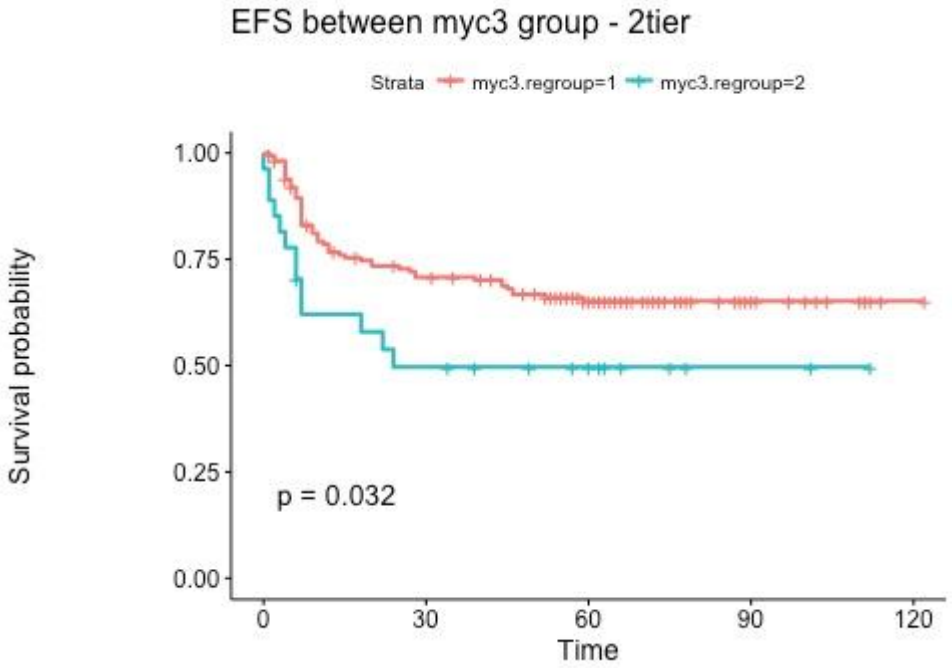

그림 21. 도출 된 cut-off value 로 내부 데이터에 대한 OS 의 카플란-마이어 곡선

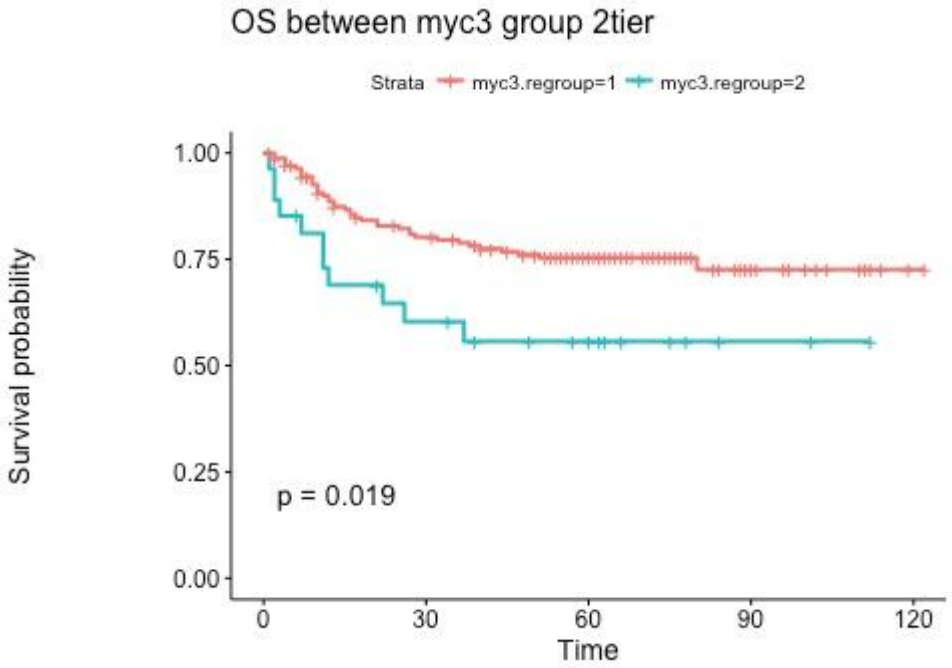

그림 22. 도출 된 cut-off value 로 내부 데이터에 대한 EFS 의 카플란-마이어 곡선

표 12. 도출 된 cut-off value 에 대한 internal validation 콕스 회귀분석 결과

Variable	OS		
	HR	95% CI	*P*
myc3.regroup1		Reference	
myc3.regroup2	2.2	1.1 – 4.3	0.022 *

5. COO 가 확인 된 환자군에 대한 cut-off value 재검증

예후를 예측하는데 영향을 미칠 것으로 알려져 있는 COO 와 IPI, 도출 된 cut-off value 를 비교 분석 했다. 비교분석을 위해 COO 가 확인 되지 않은 환자를 제외 한 180 명을 대상으로 했다.[40].

앞서 도출 된 cut-off value 에 따라 음성군과 양성군으로 이분화 했다. 이를 콕스 회귀 분석 결과가 앞선 결과와 같이 양성군이 유의하게 예후가 나쁨을 보였다 (HR, 2.1, 95% CI, 1.06 – 4.2, $p = 0.033$.) .

COO 는 양성군이 음성군에 비해 유의하지 않게 예후가 나쁜 경향을 보였다 (HR, 1.3, 95% CI, 0.65 – 2.7, $p = 0.443$).

IPI 지수 3 미만인 모집을 음성군, 3 이상인 모집을 양성군으로 나누어 분석했다. 그 결과 음성군에 비해 양성군이 양성군이 유의하게 예후가 나쁨을 보였다 (HR, 2.7, 95% CI, 1.47 – 5.0, $p = 0.001$).

그 결과, COO 로 예측한 결과 보다 MYC 단백의 발현의 강도와 비율이 예측에 적합하다는 결과를 도출 할 수 있었다.

이로써 Opal 다중 면역 형광 염색으로 정량화 하여 cut-off value 를 강도 3+ 이상, 양성 세포 비율 60% 이상으로 하는 것이 판독 기준으로 제시 가능하다는 결론을 내렸다 (표 13.).

표 13. COO 가 확인된 180 명의 환자에 대한 도출 된 cut-off value, COO, IPI 의 단변량 분석의 결과

	OS		
Variable	HR	95% CI	*P*
myc3.group1		Reference	
myc3.group2	2.1	1.06 – 4.2	0.033 *
COO 1		Reference	
COO 2	1.3	0.65 – 2.7	0.443
IPI 1		Reference	
IPI 2	2.7	1.47 – 5.0	0.001 **

결론

본 연구는 MYC 단백 발현 강도를 객관적으로 정량함 으로써 R-CHOP 요법에 반응하지 않는 나쁜 예후의 DLBCL 환자군을 예측하는데 의미가 있다.

MYC 단백발현의 강도가 3+ 이상이며 양성세포비율이 60% 의 cut-off value 가 연구결과 가장 명확한 예후를 예측할 수 있었다.

비록 현재까지 MYC 의 병태생리에 대해 폭 넓게 연구되어있지 않지만, 본 연구결과를 기반으로 MYC 의 생물학적 역할에 대해 규명하여 R-CHOP 에 반응하지 않는 DLBCL 환자군을 예측하는 중요한 표지 인자로서 활용될 수 있으며 또한 적절한 치료법을 제시하는데 기여할 수 있을 것 이다.

현재 임상진단기법으로 널리 활용되고 있는 면역화학염색 기법에도 도출된 cut-off value 가 적용 가능하다면 병리의사의 진단의 보조적 도구로 유용하게 사용 될 것 이다.

또한 이 연구는 AI 를 이용한 새로운 진단 기술을 개발하는데 기저 연구가 될 것 으로 사료된다.

참고 문헌

1. Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, et al. MYC gene rearrangements are associated wi th a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemoth erapy. Blood. 2009;114: 3533-3537.

2. Zhang J, Grubor V, Love CL, et al. Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphom a. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110: 1398-1403.

3. Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the conte xt of clinical and biologic heterogeneity. Blood. 2015;125: 22-32.

4. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. Nat Genet. 2011;43: 830-837.

5. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature. 2000;403: 503-511.

6. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. N Engl J Med. 2002;346: 1937-1947.

7. Fisher RI, Gaynor ER, Dahlberg S, et al. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. N Engl J M ed. 1993;328: 1002-1006.

8. Barrans S, Crouch S, Smith A, et al. Rearrangement of MYC is associated with poor progn osis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. J Clin On col. 2010;28: 3360-3365.

9. Fu K, Weisenburger DD, Choi WW, et al. Addition of rituximab to standard chemotherapy

improves the survival of both the germinal center B-cell-like and non-germinal center B-cell -like subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. J Clin Oncol. 2008;26: 4587-4594.

10. Valera A, Lopez-Guillermo A, Cardesa-Salzmann T, et al. MYC protein expression and g enetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treat ed with immunochemotherapy. Haematologica. 2013;98: 1554-1562.

11. Chen H, Liu J, Zhao CQ, Diwan BA, Merrick BA, Waalkes MP. Association of c-myc ov erexpression and hyperproliferation with arsenite-induced malignant transformation. Toxicol Appl Pharmacol. 2001;175: 260-268.

12. Dang CV. MYC on the path to cancer. Cell. 2012;149: 22-35.

13. Tansey WP. Mammalian MYC Proteins and Cancer. New Journal of Science. 2014;2014: 27.

14. Cai Q, Medeiros LJ, Xu X, Young KH. MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: biolo gy, entity, differential diagnosis and clinical management. Oncotarget. 2015;6: 38591-38616.

15. Dang CV. MYC, metabolism, cell growth, and tumorigenesis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2013;3.

16. Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC Profiler: an open source plugin for the q uantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tiss ue samples. PLoS One. 2014;9: e96801.

17. Tsuyama N, Sakata S, Baba S, et al. BCL2 expression in DLBCL: reappraisal of immuno histochemistry with new criteria for therapeutic biomarker evaluation. Blood. 2017;130: 489 -500.

18. Kluk MJ, Chapuy B, Sinha P, et al. Immunohistochemical detection of MYC-driven diffu

se large B-cell lymphomas. PLoS One. 2012;7: e33813.

19. Green TM, Young KH, Visco C, et al. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab p lus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. J Clin Oncol. 2012;30: 346 0-3467.

20. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in d iffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vi ncristine, and prednisone. J Clin Oncol. 2012;30: 3452-3459.

21. Mahmoud AZ, George TI, Czuchlewski DR, et al. Scoring of MYC protein expression in diffuse large B-cell lymphomas: concordance rate among hematopathologists. Mod Pathol. 2 015;28: 545-551.

22. Stack EC, Wang C, Roman KA, Hoyt CC. Multiplexed immunohistochemistry, imaging, and quantitation: a review, with an assessment of Tyramide signal amplification, multispectra l imaging and multiplex analysis. Methods. 2014;70: 46-58.

23. Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, et al. Cutoff Finder: a comprehensive and straightforw ard Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. PLoS One. 2012;7: e5186 2.

24. Heagerty PJ, Zheng Y. Survival model predictive accuracy and ROC curves. Biometrics. 2005;61: 92-105.

25. Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD. Principles and practical application of the receiver-ope rating characteristic analysis for diagnostic tests. Prev Vet Med. 2000;45: 23-41.

26. Habibzadeh F, Habibzadeh P, Yadollahie M. On determining the most appropriate test cut

-off value: the case of tests with continuous results. Biochem Med (Zagreb). 2016;26: 297-307.

27. Jawhar NM. Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. Ann Saudi Med. 2009;29: 123-127.

28. Kampf C, Olsson I, Ryberg U, Sjostedt E, Ponten F. Production of tissue microarrays, immunohistochemistry staining and digitalization within the human protein atlas. J Vis Exp. 2012.

29. Lian L, Deng Y, Xie W, et al. High-dynamic-range fluorescence molecular tomography for imaging of fluorescent targets with large concentration differences. Opt Express. 2016;24: 19920-19933.

30. Mitchell TJ, Saunter CD, O'Nions W, Girkin JM, Love GD. Quantitative high dynamic range beam profiling for fluorescence microscopy. Rev Sci Instrum. 2014;85: 103713.

31. Matos LL, Trufelli DC, de Matos MG, da Silva Pinhal MA. Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. Biomark Insights. 2010;5: 9-20.

32. McNicol AM, Richmond JA. Optimizing immunohistochemistry: antigen retrieval and signal amplification. Histopathology. 1998;32: 97-103.

33. 노진. 광범위 큰 B 세포 림프종에서 MYC 과 BCL2 단백의 이중 면역조직화학 염색법을 이용한 double expressor 림프종 진단의 유용성에 관한 연구. 울산: 울산대학교 일반대학원, 2017.

34. Stel VS, Dekker FW, Tripepi G, Zoccali C, Jager KJ. Survival analysis I: the Kaplan-Meier method. Nephron Clin Pract. 2011;119: c83-88.

35. George B, Seals S, Aban I. Survival analysis and regression models. J Nucl Cardiol. 201

4;21: 686-694.

36. Benitez-Parejo N, Rodriguez del Aguila MM, Perez-Vicente S. Survival analysis and Co x regression. Allergol Immunopathol (Madr). 2011;39: 362-373.

37. Delgado J, Pereira A, Villamor N, Lopez-Guillermo A, Rozman C. Survival analysis in h ematologic malignancies: recommendations for clinicians. Haematologica. 2014;99: 1410-14 20.

38. Kardaun O. Statistical survival analysis of male larynx-cancer patients - a case study. Stat istica Neerlandica. 1983;37: 103-125.

39. Kato GJ, Dang CV. Function of the c-Myc oncoprotein. FASEB J. 1992;6: 3065-3072.

40. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classificati on of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. Bl ood. 2004;103: 275-282.

ABSTRACT

Introduction: A large B-cell lymphoma (DLBCL) is a common disease that accounts for approximately 40% of non-Hodgkin's lymphomas. DLBCL has improved compared to the past due to standard chemotherapy (r-CHOP; rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone), but about 40% of patients still do not respond to treatment and eventually die. Previous studies to predict and define these patients and to develop new therapies have reported a number of associations between the expression of MYC protein and the poor prognosis of DLBCL. However, immunohistochemistry (IHC) used in previous studies has a variety of staining due to the diversity of MYC expression intensity. For this reason, it is difficult to apply it to the diagnosis due to the inconsistency between the readers and the cut-off value. In order to overcome these problems, it is required to carry out quantitative analysis with an experimental technique and scientific basis that can objectively quantify the intensity of expression. In this study, MYC protein expression cut-off value was derived from DLBCL prognosis prediction by quantitative image analysis using multiplexed immunofluorescence staining and statistical analysis combined with clinical indicators.

Methods: Between 2007 and 2012, paraffin tissues of DLBCL patients diagnosed at Asan Medical Center in Seoul were studied. Of these, TMAs were made in 192 patients except for patients who received treatment other than R-CHOP, DLBCL patients with primary central nervous system, and small amounts of tissue that could not be used for TMA (tissue microarray). TMA immunohistochemistry was performed by using Opal multiphoton staining method, in which each antibody was labeled with a different fluorescent material and quantitatively measured the fluorescence intensity. The antibody used was stained with CD20 and MYC to confirm the expression of MYC protein in tumor cells. In addition, CD3 staining was performed for analysis except T cell, which is a non-tumor cell. The stained slides were collected by a Vectra slide scanner (PerkinElmer, Waltham, Mass.) At 20 nm intervals. Quantified data was obtained with inForm ™ Tissue Finder ™ image analysis software (PerkinElmer, Waltham, Mass.). The expression intensity of MYC was divided by the number of quartiles (0+, 1+, 2+, 3+). The cut-off value was calculated by performing survival analysis between patient groups according to MYC protein expression intensity and positive cell ratio. The resulting cut-off value was internally compared to confirm the

reliability.

Results: Comparison of multiple cut-off values showed that overall survival (OS) was statistically significantly worse in patients with MYC protein expression> 3+ and positive cell ratio> 60% ($p < = 0.04$). There was no significant difference in event-free survival (EFS), but the prognosis was poor ($p = 0.091$). Cox regression analysis was used to determine the HR (hazard ratio). As a result, the OS of the patients with the intensity of MYC protein expression of 3+ and the percentage of positive cells of 60% or more was significantly higher than that of the control group (HR, 2.4, $p = 0.032$). The intensity of MYC protein expression was over 3+, and more than 60% of positive cells were set as cut-off value and internal validation was performed. As a result, we conclude that the proposed cut-off value is the best predictor of poor prognosis ($p <0.05$).

Conclusions: In this study, the prognosis of DLBCL was best predicted when the intensity of MYC protein expression was over 3+ and the proportion of positive cells was more than 60%. Based on these results, quantitative analysis of fluorescence immunohistochemistry can be used to predict the relationship between MYC protein and prognosis in DLBCL as a cut-off value. Since the overexpression of MYC in tumor cells has not been well known, it may be a baseline study to study the pathophysiology of MYC overexpressed in DLBCL, to predict patients who do not respond to the treatment and to suggest appropriate treatment methods. It will also be a basis for developing new diagnostic techniques using AI.

Key words: Diffuse large B-cell lymphoma, MYC, Opal multiplexed immunofluorescence, cut-off value, quantitative analysis