



REVIEW ARTICLE

전이성 신장세포암 조기 진단을 위한 액체 생검 기술의 최신 동향

서정윤¹, 맹세정², 김미리내², 강수정², 최영욱², 장인호²

¹중앙대학교 의과대학 의학부, ²중앙대학교 의과대학 비뇨의학교실

Current Trends in Liquid Biopsy Technology for Early Diagnosis of Metastatic Renal Cell Carcinoma

Jeong Yoon Suh¹, Se Jung Maeng², Mirinae Kim², Su Jeong Kang², Young Wook Choi², In Ho Chang²

¹Department of Medicine, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

²Department of Urology, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) is a disease with a wide variety of clinical progressions such as the rate of disease progression or the degree of metastasis. About 30% of ccRCC patients suffer from metastatic diseases, and about 30% develop metastasis after diagnosis. In the case of metastatic RCC, early prediction of the disease is important because of the poor prognosis, but ccRCC-specific molecular markers for clinical use are not available yet. As an alternative, liquid biopsy, which can find molecules released from tumor tissues in circulating blood and obtain information on metastatic dissemination and recurrence of ccRCC, is emerging. In this article, we will introduce molecules such as cell free DNA, cell free RNA, protein, and exosomes available as circulating biomarkers for liquid biopsy. We will also introduce some promising technologies that can compensate for the limitations of liquid biopsy.

Received August 9, 2022
Revised October 2, 2022
Accepted October 4, 2022

Corresponding author:
In Ho Chang
Email: caucih@cau.ac.kr
<https://orcid.org/0000-0003-0240-1310>

Key Words: Liquid biopsy, Prognostic markers, Renal cell carcinoma, Tumor biomarker

서 론

신장암은 전 세계적으로 일곱 번째로 흔한 암이며, 매년 약 100,000명에 이르는 사람들을 죽음에 이르게 하는 암이다. 투명신세포암(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)은 신세포암(renal cell carcinoma, RCC)의 가장 일반적인 하위 유형으로, 현재 신세포암 환자의 약 75%를 차지한다.¹ ccRCC의 발생에 있어서 가장 획기적인 발견은 *VHL* 종양 억제 유전자가 암호화되어 있는 3번 염색체의 단완(3p)의 결실로 종종 5번 염색체의 장완(5q)이 결합하는 전좌와 동시에 발생하고 이때 소수의 종양 개시 세포가 생성된다는 점이다.² 따라서 *VHL* 유전자의 불활성화는 임상적으로 공격적인 ccRCC의 발생을 예고하게 된다.² 또한 유전적으로 ccRCC는 높은 종양 내 이질성

을 특징으로 가지고 있는데, ccRCC에서 발견되는 체세포 돌연변이는 후생적 조절유전자(epigenetic regulator)인 *PBRM1*, *SETD2*, *BAP1*에서 발생하는데 이들은 모두 3p 염색체에 위치해 있으며, *VHL*과 마찬가지로 불활성화 되기 쉽다.³⁻⁵ 이런 유전적 변화는 RNA와 단백질 수준으로 반영되어 HIF 경로의 활성화와 이에 대응하는 혈관생성 관련 mRNA 발현 증가, 허혈성 신호전달 등이 발생한다.⁶ 결국 이러한 변화는 ccRCC의 진행과 연관성이 있는 것으로 알려져 있다.⁷ ccRCC 환자는 진단 당시 거의 30%의 ccRCC 환자가 이미 전이성 질환을 앓고 있고 다른 30%는 질병의 진행 과정에서 추후 전이가 발생한다.¹ 전이성 RCC (metastatic RCC, mRCC)는 전체 생존 기간이 6개월 미만에서 5년 이상까지 가변적인 스펙트럼을 가지며, 그 예후는 아직 좋지 않다.⁸ 따라서 재발을 조기에 예측할



수 있도록 해주는 방법이 ccRCC 환자의 치료에 필수적이거나 아직까지 이 임상 용도로 사용이 가능한 특정 분자 표지자는 없다.⁹

액체 생검은 혈액이나 소변 같은 생체의 액체 속 암 표지를 결정하기 위한 최소 침습적이고 신속하며 비용 효율적인 도구로서 떠오르고 있다.^{10,11} “Circulome”은 종양 조직을 포함한 모든 조직으로부터 순환 혈액으로 방출되는 분자를 지칭하는 용어로서, 앞서 말한 잠재적 생체표지의 근원이다. 액체 생검은 순환 종양 세포(circulating tumor cells), 순환 종양 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA), 순환 종양 RNA (circulating tumor RNA, ctRNA), 분비 단백질, 세포 외 소포, 대사물, 종양 혈소판 등의 형태로 종양 특이적인 정보를 포함할 수 있으며, 현재 비소세포암, 전립선암, 직장암 등의 진단을 위한 동반 도구로 ctDNA를 검출하는 소수의 비침습적 혈액검사가 사용되고 있다. 또한 비소세포암 환자에서 오시머티닙 (osimertinib)을 투여하여 치료할 수 있는 표피성장인자 수용(epidermal growth factor receptor)의 활성 돌연변이를 검출하는 등의 치료 결정을 위한 근거로 주로 사용된다.¹² 현재 신장암에서는 주로 mRCC 환자를 대상으로 연구가 진행되고 있으며, ctDNA, ctRNA, 단백질 그리

고 엑소좀 등에서 예후와 관련성이 있는 추정 표지자에 대한 연구가 활발히 시도되고 있다. 이 종설에서는 전이성 ccRCC 환자의 질병 재발을 식별할 수 있는 순환 바이오마커의 식별에 대한 최신 지견과 임상적 효용성을 가지는 예측 도구로써 사용하는데 액체 생검 분석의 현재 한계점 및 이를 극복할 수 있는 유망한 기술을 소개하고자 한다.

순환 종양 DNA (ctDNA)

ccRCC의 신혈관 신생의 특징은 DNA와 같은 종양 물질이 혈액 순환에 투입되어 조직 생검을 하지 않고도 종양 계놈의 프로파일을 얻을 수 있는 가능성이 높음을 기대할 수 있으며, 공공 데이터베이스에서 검색 용어 “신장세포암종”과 “순환 종양 DNA”를 사용하여 이러한 가능성들을 조사한 여러 연구를 정리하였다(Table 1). 초기 연구에서는 mRCC로의 진행을 예측하고 추적하기 위한 도구로 세포 유리 DNA (cell free DNA, cfDNA) 농축물과 단편을 이용하였으며, cfDNA 농도는 진행성 또는 전이성 ccRCC 환자들이 건강한 개인이나 국소 종양 환자에 비해 유의미하게 높았다(Table 1). Wan 등¹³은 국소보다 전이성 ccRCC에서 평균 혈장 cfDNA 수치가 유의미하게 높음

Table 1. Circulating tumor DNA

No. of patient samples	Evaluation method	No. of patient samples
Serum of 36 ccRCC patients and 42 healthy controls ²⁰	qPCR	Serum of 36 ccRCC patients and 42 healthy controls
Serum of 35 RCC patients (29 ccRCC patients) and 54 healthy controls ²¹	qPCR	Serum of 35 RCC patients (29 ccRCC patients) and 54 healthy controls
Plasma of 92 ccRCC patients, 44 healthy controls ²²	qPCR	Plasma of 92 ccRCC patients, 44 healthy controls
Plasma of 5 mRCC patients ²³	NGS	Plasma of 5 mRCC patients
Plasma of healthy individuals (n=40), non-metastatic (n=145), and metastatic (n=84) ccRCC patients ²⁴	qPCR	Plasma of healthy individuals (n=40), non-metastatic (n=145), and metastatic (n=84) ccRCC patients
Plasma and serum samples of 9 ccRCC patients ²⁵	NGS	Plasma and serum samples of 9 ccRCC patients
Plasma from 34 RCC patients (26 ccRCC patients) ²⁶	NGS-Gaurdant360 panel	Plasma from 34 RCC patients (26 ccRCC patients)
Plasma from 220 mRCC patients ²⁷	NGS-Gaurdant360 panel	Plasma from 220 mRCC patients
Plasma from 92 ccRCC patients and 41 healthy controls ²⁸	qPCR	Plasma from 92 ccRCC patients and 41 healthy controls
MonRec study (43 metastatic RCC patients treated with multiple systemic therapies and longitudinal follow-up) and 90 patients from DIAMOND study (samples taken either prior to surgery or during progressive disease) ²⁹	Whole genome/exome sequencing	MonRec study (43 metastatic RCC patients treated with multiple systemic therapies and longitudinal follow-up) and 90 patients from DIAMOND study (samples taken either prior to surgery or during progressive disease)
Plasma of 53 ccRCC patients ³⁰	NGS - RCC-specific gene panel (48 genes)	Plasma of 53 ccRCC patients
Plasma from 55 mRCC patients ³¹	NGS - Roche SeqCap EZ Human Oncology Panel	Plasma from 55 mRCC patients

RCC: renal cell carcinoma, ccRCC: clear cell RCC, qPCR: quantitative real-time polymerase chain reaction, mRCC: metastatic RCC, NGS: next-generation sequencing.

을 보고하였는데, 이는 평균 혈장 cfDNA 수치가 ccRCC의 진행을 반영할 수 있다는 것을 나타낸다. 그러나 변이에 대한 특이성과 민감도가 높지 않아서 순환 바이오마커로서 cfDNA 농도의 임상적 유용성을 명확히 하기 위해 추가적인 연구가 필요하다.

cfDNA 단편에 대한 연구는 RCC 환자의 진단 및 예후 마커로도 연구되었다.^{14,15} *ACTB*, *GAPDH*, *APP*와 같은 유전자로부터 얻은 마커 DNA 조각이나 핵산 조각인 Alu, 그리고 미토콘드리아 DNA 조각인 Mito-1과 Mito-2를 사용하여 이러한 분석을 진행했다.¹⁶⁻¹⁸ Lu 등¹⁸은 아밀로이드 베타(A4) 전구 단백질(*APP*) 유전자의 cfDNA 조각과 ccRCC 환자에서 무재발 및 OS에 대한 예후 인자의 연관성을 보여주었고, 이러한 cfDNA 농도의 비율을 바탕으로 계산된 cfDNA 보전 지수는 대조군에서 mRCC 환자에 대해 감소함을 보고하였다. 마찬가지로 미토콘드리아 조각과 Alu 요소들은 RCC 환자들에서 단편화 증가와 낮은 cfDNA 보전성을 보였다. 하지만 *ACTB*와 *GAPDH*를 마커로 사용하여 DNA 보전성을 분석할 때 cfDNA 단편은 RCC 환자들에게서 대조군에 비해 더 증가한 것을 확인할 수 있었다.^{16,17} 이러한 결과의 차이는 cfDNA 단편이 가치 있는 바이오마커가 될 수 있다는 것이 입증되었지만, 임상적 사용을 위하여서는 추가적인 연구가 필요하다는 것을 의미한다.¹⁸

ctDNA가 모든 단계의 RCC 환자들에게서 확인되었지만 종양 크기에 따라 검출 확률이 증가하였고, 이는 액체 생검에서 질병의 진행된 단계가 더 잘 반영될 수 있음을 보여준다.¹⁹ 그러나 많은 연구에서 보고된 바에 따르면, 다른 암환자들과 비교하여 RCC 환자들의 ctDNA의 검출율은 낮아 ccRCC-특이적 ctDNA가 약 30%~50% 환자에서만 검출됨이 보고되고 있다.¹⁹⁻²³ 최근 연구에서 Roche SeqCap EZ human oncology panel을 이용하여 55명의 mRCC 환자들 혈장 cfDNA에 있는 981개 암 관련 유전자의 암호화 영역을 분석하였을 때, 환자의 1/3에서, 둘 이상의 확립된 RCC 유전자의 체세포 돌연변이와 같은 RCC 유래 ctDNA의 증거를 발견할 수 있을 뿐이다.²³

요약하면, 많은 연구들이 현재 이용 가능한 프로파일링 기술을 이용하여 오직 30%~50%의 환자들만 ccRCC 특이적 ctDNA의 특성감별로 혜택을 받은 것을 보여줌으로써, RCC가 ctDNA가 적은 악성종양임을 나타냈다.¹⁹⁻²³ 이러한 단점에도 불구하고, ctDNA는 더 큰 종양을 가진 환자의 혈장에서 더 자주 검출되었고, 따라서 적어도 일부 질

병이 진행된 환자들에서 주기적 검사를 통하여 질병의 경과를 추적 관찰할 수 있었다. 비록 ctDNA 분석이 현재로서는 직접적인 추적 관찰을 가능하게 하지 않는 것처럼 보이지만, 새로운 기술은 미래에 이러한 상황을 크게 개선할 수 있을 것이다.

단백질과 발암대사체

액체 생검은 혈액으로의 ccRCC 유출과 같은 변화를 반영하는 단백질 지형을 추가적으로 조사하는데 도움이 될 수 있다. 단백질이 풍부한 혈액은 질병 관련 표지를 탐색하기 위한 매력적인 매체이지만, 풍부한 혈장 단백질과 다른 수용성 인자들 가운데 종양 특이적 단백질을 찾아내는 것은 기술적으로 어려운 일이다. “신장세포암종”, “액체 생검 또는 혈장”, “단백질 또는 단백질체”와 같은 키워드 검색으로 찾아낸 연구들 중 다수는 대조군과 다르게 RCC의 혈장 또는 혈청에 차별적으로 풍부한 단백질을 찾기 위해 다른 실험적 접근법을 사용했다(Table 2).

이러한 맥락에서 역사적으로 가장 광범위하게 연구된 단백질 중 하나는 신장손상분자1 (kidney injury molecule 1, KIM1)이며 KIM1 수치는 RCC 환자에서 크게 증가한 것으로 나타났다.²⁴ 실제로 고등급 ccRCC에서 KIM1의 수치가 7배 가까이 증가했으며, mRCC 환자들의 혈장에서 KIM1 수치가 특히 높게 나타났다.^{25,26} 몇몇 신장 질환에서 KIM1이 다소 광범위하게 발현됐음에도 불구하고,²⁷ 순환 과정에 포함된 KIM1은 초기단계 종양 검출에 83%의 특이성을 보였으며, 말기단계 종양에서는 특이성이 97%로 증가했다.²⁵ 이를 통해 KIM1은 유망 바이오마커로 자리매김하고 있지만, 향후 연구들은 KIM1의 ccRCC 특이적 순환 단백질로서의 임상 효용성을 검증할 필요가 있다.

ccRCC 종양발생에 *VHL* 돌연변이가 관여함을 인정할 때, 저산소증 하위경로 단백질에 대한 연구가 진행되고 있다. 예를 들어 저산소증 유도 단백질인 HIF2는 ELISA 기반 연구에서 RCC 환자의 혈장에서 약 3배 증가하였으며, 신장절제술 이후 그 수치가 급격히 감소하였다.²⁸ 또한 *VHL*-HIF 경로의 가장 두드러진 표적 중 하나인 CAIX는, 대조군과 비교하여 ccRCC 환자의 혈장 내 단백질 농도와 활성도가 증가하는 것을 보여주면서 잠재적 바이오마커로 떠올랐다.²⁹ 마찬가지로 높은 IMP3 수치는 RCC 환자들에게서 관찰되었으며, 원격전이의 발생과 상관관계가 있다.³⁰

Table 2. Protein and oncometabolites

No. of patient samples	Evaluation method	No. of patient samples
Serum of 15 RCC patients, 15 patients with other urological malignancies and 6 healthy controls ³⁵	SELDI-TOF MS/MS	Serum of 15 RCC patients, 15 patients with other urological malignancies and 6 healthy controls
Urine of 42 RCC patients ³⁶	Western blot and ELISA	Urine of 42 RCC patients
Serum from 40 RCC samples, 44 healthy controls and 5 patients with pyelonephritis ³⁷	SELDI-TOF MS/MS	Serum from 40 RCC samples, 44 healthy controls and 5 patients with pyelonephritis
Plasma of 32 RCC patients, 20 healthy controls and 10 chronic glomerulonephritis patients ³⁸	ELISA	Plasma of 32 RCC patients, 20 healthy controls and 10 chronic glomerulonephritis patients
Serum of 20 RCC patients and 20 healthy controls ³⁹	2D gel electrophoresis, MALDI-TOF MS/MS	Serum of 20 RCC patients and 20 healthy controls
Plasma samples from 68 RCC patients and 39 healthy controls ⁴⁰	ELISA	Plasma samples from 68 RCC patients and 39 healthy controls
Serum of 84 RCC patients and 52 healthy controls ⁴¹	ELISA	Serum of 84 RCC patients and 52 healthy controls
Serum of 54 RCC patients and 36 normal individuals; urine of 21 RCC patients and 9 normal individuals ⁴²	LC-MS/MS, western blotting	Serum of 54 RCC patients and 36 normal individuals; urine of 21 RCC patients and 9 normal individuals
Serum of 54 ccRCC patients and 17 healthy controls ⁴³	ELISA	Serum of 54 ccRCC patients and 17 healthy controls
Serum of 40 RCC patients, 10 healthy controls and 20 patients with other urological malignancies ⁴⁴	Western blot, ELISA and iTRAQ-labelled MS/MS	Serum of 40 RCC patients, 10 healthy controls and 20 patients with other urological malignancies
Plasma of 8 ccRCC patients, 8 BRT and 8 controls ⁴⁵	Western blot, ELISA and enzyme activity assay	Plasma of 8 ccRCC patients, 8 BRT and 8 controls
Serum samples from 5 ccRCC patients and 5 healthy controls ⁴⁶	UPLC-MS/MS	Serum samples from 5 ccRCC patients and 5 healthy controls
Plasma of 99 ccRCC patients, 14 BRT and 29 healthy controls ⁴⁷	ELISA	Plasma of 99 ccRCC patients, 14 BRT and 29 healthy controls
Plasma of 98 RCC patients and 20 healthy controls ⁴⁸	ELISA	Plasma of 98 RCC patients and 20 healthy controls
Plasma from 190 RCC patients and 190 healthy controls ⁴⁹	ELISA	Plasma from 190 RCC patients and 190 healthy controls
Plasma samples from 182 ccRCC patients ⁵⁰	Multiplex Luminex assay	Plasma samples from 182 ccRCC patients
Urine samples from 39 RCC patients, 22 BRTs and 68 healthy controls ⁵¹	LC-M/MS	Urine samples from 39 RCC patients, 22 BRTs and 68 healthy controls

RCC: renal cell carcinoma, SELDI: surface-enhanced laser desorption/ionization, TOF: time of flight, MS: mass spectrometry, ELISA: enzyme linked immunosorbent assay, BRT: benign renal tumors, ccRCC: clear cell RCC.

또한 ccRCC 환자의 혈청에서 높은 수준의 수용성 CD27 이 검출되었으며, 시험관 내 분석 결과 이는 HIF-표적 유전자인 *CD70*의 높은 발현 수준에 의해 유발된 것으로 나타났다.³¹ 또한 VHL-HIF 경로를 넘어서, TNF 관련 세포자멸사 유도 리간드(TRAIL)는 RCC 환자의 혈청에서 2배 감소하는 것이 확인되고 정맥 침범 및 전이에 대한 높은 예측이 가능하며, 잠재적 바이오마커로 보고되었다.³²

초기의 희망적인 결과에도 불구하고, 이러한 순환 단백질 마커들 중 임상에서 사용이 승인된 것은 아직 없으나, 액체 바이오마커 후보의 탐색을 보조하는 ccRCC 특이적 단백질의 보다 깊은 특성화를 제공하기 위해 대규모 단백질체학 기술들이 활용되고 있다. 이전의 연구는 SELDI-TOF를 이용하고 3,900–5,900 Da 범위의 질량을 가진 5개 단백질에 기초한 패턴 분석을 적용하여 RCC 환자를 비RCC 및 건강한 대조군과 구별할 수 있었다.³³ 인자 XIIIb,

보체 C3, 미사토 상동체 1, 헤모팩신, 알파-1-B-당단백질³⁴ 그리고 HSC71³⁵을 포함하는 개별 단백질들의 RCC 특이적 수용성 바이오마커로서의 효용에 대한 다양한 증거를 제공했다. 또한 MALDI-TOF를 이용하여 RNA 결합 단백질 6 (RBP6), 튜블린 베타 사슬(TUBB), 그리고 징크 핑거 단백질 3 (ZFP3)이 수술 이후 감소하는 것으로 확인되었다.³⁶ 종합하면, 이러한 연구 결과는 혈장 단백질체가 신장암의 추적에 대한 바이오마커로 사용이 가능함을 암시한다.

ctDNA에서 사용된 것과 마찬가지로, 액체 생검 단백질 프로파일을 1차 RCC와 연결하면 바이오마커 후보의 탐색에 중요한 보완 데이터를 제공할 수 있다. White 등³⁷은 liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS)/MS 분석을 이용해 정상 신장 조직과 비교하여 ccRCC에서 차별적으로 발현되는 단백질들을 연구하여 열충격 단백질 베타-1 (HSPB1/Hsp27)이 유용한 비침습

적 마커임을 보고하였다. Hsp27은 ccRCC 환자의 혈청과 소변에서 상승한 것 외에도 고등급(등급 3-4) 종양과도 연관성이 있었다.

마지막으로, 현재 면역관문억제제가 신장암의 치료에 사용되고 있는 상황에서 면역관문 관련단백질들에 대한 평가가 진단 혹은 예후에서의 잠재력 이외에도 면역요법에서의 반응을 예측하는데 추가적인 이점을 제공할 수 있다. SLAG3, sPD-L2, sBTLA, 그리고 sTIM3와 같은 인자들은 ccRCC 환자에서 더 높은 농도로 관찰되었으며, 환자의 생존, 사망 위험 및 질병의 재발과 유의미한 상관관계가 있었다.³⁸ 이러한 단백질들은 몇몇 다른 암 유형에서 이미 면역 요법 예측을 위한 바이오마커로 개발되었다.³⁹ 단백질체 외에도 아미노산 대사나 호르몬 합성, 류신을 포함한 지질 운반 등의 대사 과정에서 비롯된 다른 발암 대사체들, N-락토일-류신, N-아세틸-페닐알라닌, 하이드록실프로필-발린, 코르톨론 그리고 테스토스테론이 RCC 환자에서 잠재적 액체 바이오마커로 연구되고 있다.^{40,41}

요약하면, 여러 연구들이 이미 RCC 특이적 대사산물과 특정 단백질에 대하여 연구를 수행하였으나, 이들 중 대다수가 RCC 진단에서 특이적인 이상 발현 패턴을 기술하기 위해 건강한 대조군과 비교하여 환자의 샘플만을 조사하였으므로 추가적인 연구가 필요한 상황이다. 또한 임상 코호트에서의 검증 부족으로 인해 ccRCC 모니터링을 위한 마커 패널을 정의하는데 어려움이 있어 이를 극복하기 위

한 새로운 질량 분석법과 다중 마커 기반 접근법이 연구되고 있다.

순환 RNA와 엑소좀

세포 유리 RNA는 엑소좀과 같은 세포 외 소포를 통한 세포로부터의 활발한 방출을 통해 혈액으로 들어가거나 단백질과 결합한다.⁴²⁻⁴⁴ mRNA와 같은 coding RNA나 microRNA (miRNA), long noncoding RNA (lncRNA) 같은 noncoding RNA는 잠재적인 액체 생검 바이오마커로서 연구되고 있다. “신장세포암종”, “순환 RNA/mRNA/miRNA/lncRNA”와 같은 검색 용어로 연구들을 검색하였고, 상대적으로 새로운 lncRNA와 짧은 반감기를 가진 mRNA 때문에 miRNA가 주로 연구되고 있다(Table 3).

대표적인 사례 중 하나가 VHL/HIF 경로에 의해 조절된다고 알려져 있고, ccRCC의 새로운 표지자로 떠오르고 있는 miR-210이다.⁴⁵ ccRCC 환자의 혈청에서 순환 miR-210의 증가된 수치가 보고되었으며, 신장 절제술 후 추적 검사에서 재발이 없는 환자 소변에서의 수치는 감소한 것이 확인되었다.^{46,47} ccRCC 조직에 대한 연구에서 miR-215를 포함한 65개의 miRNA가 mRCC 환자와 국소 ccRCC 환자 간에 차이가 있음을 보고하였다.⁴⁸ MRCC 예측에 연구되고 있는 순환 miRNA는 miR-122-5p, miR-206 miR-221인데 특히 miR-221은 생존율과 유의한 상

Table 3. Circulating RNA and exosome

No. of patient samples	Evaluation method	No. of patient samples
Circulating RNA		
Serum of 68 ccRCC patients and 42 healthy controls ⁵⁸	qPCR	Serum of 68 ccRCC patients and 42 healthy controls
Plasma of 77 RCC patients ⁵⁹	qPCR	Plasma of 77 RCC patients
Serum of 71 ccRCC patients, 8 BRT, 62 healthy controls ⁶⁰	qPCR	Serum of 71 ccRCC patients, 8 BRT, 62 healthy controls
Urine of 75 ccRCC and 45 healthy controls ⁶¹	qPCR	Urine of 75 ccRCC and 45 healthy controls
Urine of 38 ccRCC patients ⁶²	qPCR	Urine of 38 ccRCC patients
Serum of 86 ccRCC, 55 BRT, 28 controls ⁶³		Serum of 86 ccRCC, 55 BRT, 28 controls
Serum of 10 ccRCC patients, 10 healthy controls ⁶⁴	qPCR	Serum of 10 ccRCC patients, 10 healthy controls
Plasma from 10 mRCC and 6 ccRCC patients, 7 healthy controls ⁶⁵	qPCR	Plasma from 10 mRCC and 6 ccRCC patients, 7 healthy controls
Exosomes		
Urine of 29 RCC patients and 23 healthy controls ⁶⁶	LC-MS/MS	Urine of 29 RCC patients and 23 healthy controls
109 ccRCC patients, 24 BRT and 33 healthy controls ⁶⁷	qPCR	109 ccRCC patients, 24 BRT and 33 healthy controls
Plasma of 71 RCC patients ⁶⁸	qPCR	Plasma of 71 RCC patients
109 RCC patients ⁶⁹	qPCR	109 RCC patients
Serum of 19 ccRCC patients and 10 healthy controls ⁷⁰	LC/MS, Western blotting	Serum of 19 ccRCC patients and 10 healthy controls
82 ccRCC patients, 80 healthy controls ⁷¹	qPCR	82 ccRCC patients, 80 healthy controls

RCC: renal cell carcinoma, ccRCC: clear cell RCC, qPCR: quantitative real-time polymerase chain reaction, BRT: benign renal tumors, LC: liquid chromatography, MS: mass spectrometry.

관관계가 있음이 확인되었다.^{49,50} 또한 혈청 miR-508-3p와 miR-885-5p의 조합으로 ccRCC 환자를 구별해낼 수 있으며, 이들 miRNA는 이노시톨 포스페이트 대사를 증진시키고 ccRCC 종양 발생과 연관된 Hippo 및 Wnt 신호 전달 경로에 관여한다.⁵¹

mRNA는 유전적 변화를 단백질 수준으로 증계하는 중요한 매개체이고, 따라서 종양에서의 돌연변이와 조절 변화를 반영할 수 있다. 하지만 환자 혈액 내 종양 특이적 mRNA 검출의 기술적 어려움은 질병 모니터링 바이오마커로서의 제한점이었다. 최근 새로운 염기서열 분석 기술은 순환 mRNA의 제한점을 극복하는데 사용되었으며, 결과적으로 ccRCC 환자의 혈액에서 CDK18과 CCND1의 발현이 감소하는 것이 밝혀졌다(Table 2).⁵² 또한 짧은 noncoding RNA 분야의 새로운 주자 중 하나인 순환 lncRNA도 RCC 특이적 바이오마커로서의 가능성을 보여주었는데, 5개의 대표적인 lncRNA (lncRNA-LET, PVT1, PANDAR, PTENP1 그리고 linc00963)는 종양 단계 분류와 무관하게 67%의 민감도에서 91%의 특이성으로 RCC 표본을 대조군과 구별할 수 있었다.⁵³ 대조군 및 ccRCC 1기 환자들로 제한했을 때 민감도가 76%로 증가하는 것이 관찰되었고, 이는 암이 국소적으로 진행된 환자에서도 양호한 식별력을 나타낸다는 것을 의미한다.⁵⁴

엑소솜은 신호 전달 분자를 운반하여 세포의 소통에 역할을 하는 나노 크기의 분비성 막결합 소낭이다. 운반되는 가장 빈번한 분자 중 하나는 miRNA이고, DNA, 단백질, 그리고 다른 종류의 RNA를 포함한 몇몇 다른 분자들도 엑소솜에 의해 운반된다.⁵⁵ 혈액보다 소변에서 훨씬 더 많이 연구된 이 엑소솜은 ccRCC와 mRCC를 구별하고 식별할 수 있는 분자들을 포함하고 있는 것으로 관찰되었다. 순환 miR-210과 비슷하게, 엑소솜 miR-210은 ccRCC 환자의 혈청에서 증가하였고, 62%의 특이도로 ccRCC 환자와 대조군을 구별할 수 있었다.⁵⁶ miR-210의 순환 수준이 세포 유리 분석 물질 중 관련 바이오마커로서, 그리고 엑소솜의 분자로서 설명되고 있음을 고려하면, 임상에서 액체 바이오마커로서의 진단 및 예후 잠재력을 평가하기 위한 추가 연구를 수행 중인 가장 유망한 분자 중 하나이다. Table 2에 열거된 것과 같이 몇몇 다른 엑소솜 miRNA나 이들의 조합 또한 RCC 환자를 대조군과 구별할 수 있었고 ccRCC의 잠재적 바이오마커로서 엑소솜의 분자를 이용하자는 가설을 뒷받침했다.^{57,58} 또한 엑소솜을 통해 전달되는 비암호화 전사 IncARSR (sunitinib 저항성 RCC에

서 활성화된다)은 RCC 환자의 혈청에서 증가된 수치를 보였으며, 종양 절제 후 감소되었다가 종양 재발 시 다시 증가하여 비침습성 질병 모니터링 후보가 되었다.⁵⁹ 소수의 연구에서는 대조군과 종양 환자 사이의 엑소솜 단백질의 수치적 차이에 대한 초기 통찰을 이용하여 엑소솜 단백질 마커의 가능성에 대해 조사했다.^{60,61} LC/MS에 의한 종합적인 단백질 분석 결과, 아즈로시딘1 (AZU1)이 종양 유래 엑소솜에 상당히 농축되어 있었으며, 이는 전이성 전파를 촉진하는 기능적 역할까지 할 수 있다는 것이 밝혀졌다.⁶¹

초기 보고에도 불구하고, lncRNA, 엑소솜 miRNA 또는 단백질은 전이성 질병의 잠재적 바이오마커로서 가능성은 높지 않은데 그 이유는 대량의 표본 부피와 복잡하고 비싼 처리 방식 때문이며, 현재의 접근방식을 개선하고 임상 환경에서의 RNA 또는 엑소솜 기반 암 검출을 추가 조사 및 번역할 수 있는 기반을 마련하기 위한 기술적 진보가 필요하다.

액체 생검의 미래

분명히 액체 생검 분석의 분야는 빠르게 진화하고 있고, 폐, 유방 및 대장암과 같은 암 진행을 예측하는데 상당한 가능성을 보여주었다.⁶²⁻⁶⁴ 그러나 현재 ccRCC를 비롯하여 많은 진행성 암에서 순환 분자 대다수의 임상적 효용에 대한 증거가 아직 불충분하다.⁶⁵ 또한 고려해야 할 가장 중요한 측면 중 하나는, 잠재적 액체 바이오마커가 임상적 효용이 있는 특이적이고 민감도가 높은 비침습적 마커로 간주되기 위해서는 해당 바이오마커가 더 큰 환자 코호트에서 검증하여야 한다는 점이다.

임상적으로 적용 가능한 액체 생검 분석 플랫폼을 개발하는데 있어서 장애 중 하나는 ctDNA의 양이 적어서 mRCC를 진단하고 추적하는데 조직생검을 대체하기 어렵다는 점이다.^{19-23,66} 그럼에도 불구하고, RCC 세포에서 유래한 돌연변이 조각이 환자의 혈장에서 확인되었고, 돌연변이는 일차 종양의 돌연변이를 반영하였다.²³ 따라서 검출법에서 추가적인 개선이 이루어진다면 ccRCC 환자의 추적 검사에서 액체 생검의 가능성이 있음을 보여준다. 다른 장애로 CHIP을 이용한 검사에서 문제가 되는 RCC가 아닌 체세포에서 유래 돌연변이로 인한 혈장과 조직 RCC 샘플 간의 불일치이다.^{23,66} 보관 종양 조직에서 돌연변이를 검사 후에 이를 보정하는 방법이 mRCC에서 ctDNA 검출의 민감도를 높이기 위해 시도되고 있는 방법

이다.^{19,21,66}

후생유전학적 규제는, 특히 염색질 리모델러가 가장 빈번하게 변경되는 요소 중 하나이기 때문에, ccRCC 특이적 패턴을 탐구할 수 있는 폭넓은 방법을 제시한다. 세포 유리 메틸화 DNA 면역침전 시퀀싱(cfMeDIP Seq)은 종양 세포가 이상 DNA 메틸화를 획득한다는 원리를 바탕으로 mRCC 환자 검출의 민감도를 현저하게 개선할 수 있었다. 세포 유리 메틸염의 가장 차별적으로 메틸화된 영역에 대한 평가 또한 ccRCC와 대조군 샘플을 구별할 수 있었다.⁶⁷ 혈액 cfDNA는 파편화된 염색질에서 유래하기 때문에 종종 히스톤과 연관되어 남는데, 히스톤은 자신이 유래한 세포의 후생유전학적 지형에 대한 증거를 포함할 수 있다.^{68,69} 따라서 순환하는 세포 유리 뉴클레오솜은 종종 *SETD2*, *PBRM1* 또는 *BAP1*에서의 변화에 의해 시작되는 발현 프로그램에서의 mRCC 특이적 변화를 관찰하기 위한 대상이 될 수 있다. 세포 유리 뉴클레오솜(cfChIP-seq)의 염색질 면역침강 시퀀싱은 위장관 암에서의 유전자 활성 및 전사 변화뿐만 아니라 근원세포 발현의 표지 또한 식별할 수 있는 것으로 나타났다.⁶⁸ 이를 ccRCC에 대입하여 추정한다면, 액체 생검 분석에서 질병의 상태에 대한 세부적인 정보를 제공할 수 있다.

새로운 단백질체학 기술은 순환 바이오마커의 개발에 역할을 할 것이다. ccRCC 특이적 펩타이드의 획득을 돕기 위해서, 매우 풍부한 단백질을 제거하거나 특정 단백질을 더 풍부하게 하기 위한 사전 분류를 사용할 수 있다. 또한 미세유체 LC-MS/MS 기술이나 포획 이온 이동도 분광 분석(trapped ion mobility spectrometry)과 같은 새로운 MS-기반 단백질학적 접근방식은 바이오마커 발견을 위하여 시도되고 있다.^{70,71} 이러한 기술들이 높은 처리량과 결합한다면 액체 생검에서 mRCC 특이적 단백질을 식별하는데 도움이 될 것이다.

순환 RNA는 새로 발견된 짧은 noncoding RNA의 한 종류로, 최근 신장 질환의 잠재적 바이오마커로 밝혀졌다. 일차 조직 수집을 활용한 연구에서는 ccRCC를 식별할 수 있고^{72,73} 종양 등급과도 상관관계가 있는⁷⁴ 이러한 순환 RNA의 여러 조합을 식별했다. 중요한 것은 순환 RNA는 이미 특발성 막성신증 환자의 소변과 혈장에서 엑소솜의 분자로 발견되어⁷⁵ 이 분자들이 신장암의 지표로도 연구될 수 있다는 가능성이 제기되었다. 엑소솜은 세포 간 의사소통에 도움을 주기 때문에 질병의 진행과 전파를 추적하는 유용한 매개체로서의 높은 잠재력을 보여준다. 작은 크기

와 낮은 밀도 때문에 혈장이나 소변으로부터의 추출 및 정량화는 제한점으로 남아 있다.⁷⁶ 혈장에서 세포외 소포 격리(EV트랩)를 위한 새로운 화학적 친화력 기반 포획법이 개발되었는데, 이 방법에서 초원심분리 대비 포획량이 7배 증가한 것이 확인되었기 때문에 이 문제를 개선시킬 가능성이 있다. 개념 증명 연구에서 RCC 혈장 샘플의 인단백질 분석으로부터 5명의 RCC 환자를 5명의 건강한 대조군으로부터 구별할 수 있는 여러 단백질을 밝혀내었는데,⁷⁷ 이는 EV트랩이 질병 모니터링을 위한 추가적인 마커를 개발하는데 이용될 수 있음을 나타낸다.

또한 종양 상태와 예후에 대한 최선의 정의가 *circulome*의 다양한 보완 성분에 대한 동시 연구로부터 내려질 것이 점점 분명해지고 있고, 따라서 질병 감시를 위한 신뢰할 수 있는 바이오마커를 개발하는데 멀티마커 기반 접근법이 유용한 것으로 입증될 것이다.⁷⁸ 이 리뷰에서 설명한 몇몇 분자의 지시적인 잠재력을 함께 활용하는 것이 ccRCC 액체 생검 프로파일링에서 예후적 효용을 달성하는데 사실상 핵심이 될 수 있다.

결론

액체 생검 분석은 *circulome*을 통해 다양한 보완 정보를 제공하고 임상 종양학의 획기적인 발전을 가져올 수 있는 잠재력을 가지고 있다. 기존의 조직 생검과는 달리, 액체 생검은 ccRCC에 대해 기술된 분자적 이질성에 대해 더 많이 포착하고 전이적 틈새로 전파된 공격적인 클론에 대한 정보를 제공할 수 있을 것이다. 이러한 잠재력이 실현되기까지는 아직 많은 장애물들이 남아있지만, 기술 발전의 빠른 속도를 감안하면 액체 생검의 유용성, 그 중 특히 ccRCC 환자의 전이 진행을 모니터링하는데 있어서의 유용성에 기대해볼 수 있다.

NOTES

• Conflicts of Interest: 저자들은 이 논문과 관련하여 이해관계의 충돌이 없음을 명시합니다.

• Funding: 없음.

• ORCID

Jeong Yoon Suh: <https://orcid.org/0000-0002-1468-0057>

Se Jung Maeng: <https://orcid.org/0000-0002-0730-0300>

Mirinae Kim: <https://orcid.org/0000-0003-4199-8105>

Su Jeong Kang: <https://orcid.org/0000-0003-4324-8252>

Young Wook Choi: <https://orcid.org/0000-0001-6659-3855>

In Ho Chang: <https://orcid.org/0000-0003-0240-1310>

REFERENCES

1. Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger M, et al. Renal cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2017;3:17009.
2. Mitchell TJ, Turajlic S, Rowan A, Nicol D, Farmery JHR, O'Brien T, et al. Timing the landmark events in the evolution of clear cell renal cell cancer: TRACERx Renal. *Cell* 2018;173:611-23.e17.
3. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366:883-92.
4. Bolck HA, Corrà C, Kahraman A, von Teichman A, Toussaint NC, Kuipers J, et al. Tracing clonal dynamics reveals that two- and three-dimensional patient-derived cell models capture tumor heterogeneity of clear cell renal cell carcinoma. *Eur Urol Focus* 2021;7:152-62.
5. Bihl S, Ohashi R, Moore AL, Rüschoff JH, Beisel C, Hermanns T, et al. Expression and mutation patterns of PBRM1, BAP1 and SETD2 mirror specific evolutionary subtypes in clear cell renal cell carcinoma. *Neoplasia* 2019;21:247-56.
6. Beuselinck B, Verbiest A, Couchy G, Job S, de Reynies A, Meiller C, et al. Pro-angiogenic gene expression is associated with better outcome on sunitinib in metastatic clear-cell renal cell carcinoma. *Acta Oncol* 2018;57:498-508.
7. Creighton CJ, Morgan M, Gunaratne PH, Wheeler DA, Gibbs RA, Gordon Robertson A, et al. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 2013;499:43-9.
8. Assi HI, Patenaude F, Toumishey E, Ross L, Abdelsalam M, Reiman T. A simple prognostic model for overall survival in metastatic renal cell carcinoma. *Can Urol Assoc J* 2016;10:113-9.
9. Escudier B, Porta C, Schmidinger M, Rioux-Leclercq N, Bex A, Khoo V, et al. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol* 2019;30:706-20.
10. Kwapisz D. The first liquid biopsy test approved. Is it a new era of mutation testing for non-small cell lung cancer? *Ann Transl Med* 2017;5:46.
11. Mattox AK, Bettegowda C, Zhou S, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Applications of liquid biopsies for cancer. *Sci Transl Med* 2019;11:eaay1984.
12. Rijavec E, Coco S, Genova C, Rossi G, Longo L, Grossi F. Liquid biopsy in non-small cell lung cancer: highlights and challenges. *Cancers (Basel)* 2019;12:17.
13. Wan J, Zhu L, Jiang Z, Cheng K. Monitoring of plasma cell-free DNA in predicting postoperative recurrence of clear cell renal cell carcinoma. *Urol Int* 2013;91:273-8.
14. Yamamoto Y, Uemura M, Nakano K, Hayashi Y, Wang C, Ishizuya Y, et al. Increased level and fragmentation of plasma circulating cell-free DNA are diagnostic and prognostic markers for renal cell carcinoma. *Oncotarget* 2018;9:20467-75.
15. Yamamoto Y, Uemura M, Fujita M, Maejima K, Koh Y, Matsushita M, et al. Clinical significance of the mutational landscape and fragmentation of circulating tumor DNA in renal cell carcinoma. *Cancer Sci* 2019;110:617-28.
16. Hauser S, Zahalka T, Ellinger J, Fechner G, Heukamp LC, VON Ruecker A, et al. Cell-free circulating DNA: diagnostic value in patients with renal cell cancer. *Anticancer Res* 2010;30:2785-9.
17. Gang F, Guorong L, An Z, Anne GP, Christian G, Jacques T. Prediction of clear cell renal cell carcinoma by integrity of cell-free DNA in serum. *Urology* 2010;75:262-5.
18. Lu H, Busch J, Jung M, Rabenhorst S, Ralla B, Kilic E, et al. Diagnostic and prognostic potential of circulating cell-free genomic and mitochondrial

- DNA fragments in clear cell renal cell carcinoma patients. *Clin Chim Acta* 2016;452:109-19.
19. Smith CG, Moser T, Mouliere F, Field-Rayner J, Eldridge M, Riediger AL, et al. Comprehensive characterization of cell-free tumor DNA in plasma and urine of patients with renal tumors. *Genome Med* 2020;12:23.
 20. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014;6:224ra24.
 21. Corrò C, Hejhal T, Poyet C, Sulser T, Hermanns T, Winder T, et al. Detecting circulating tumor DNA in renal cancer: an open challenge. *Exp Mol Pathol* 2017;102:255-61.
 22. Maia MC, Bergerot PG, Dizman N, Hsu J, Jones J, Lanman RB, et al. Association of circulating tumor DNA (ctDNA) detection in metastatic renal cell carcinoma (mRCC) with tumor burden. *Kidney Cancer* 2017;1:65-70.
 23. Bacon JW, Annala M, Soleimani M, Lavoie JM, So A, Gleave ME, et al. Plasma circulating tumor DNA and clonal hematopoiesis in metastatic renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 2020;18:322-31.e2.
 24. Han WK, Alinani A, Wu CL, Michaelson D, Loda M, McGovern FJ, et al. Human kidney injury molecule-1 is a tissue and urinary tumor marker of renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1126-34.
 25. Kushlinskii NE, Gershtein ES, Naberezhnov DS, Taipov MA, Bezhanova SD, Pushkar DY, et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1) in blood plasma of patients with clear-cell carcinoma. *Bull Exp Biol Med* 2019;167:388-92.
 26. Scelo G, Muller DC, Riboli E, Johansson M, Cross AJ, Vineis P, et al. KIM-1 as a blood-based marker for early detection of kidney cancer: a prospective nested case-control study. *Clin Cancer Res* 2018;24:5594-601.
 27. Song J, Yu J, Prayogo GW, Cao W, Wu Y, Jia Z, et al. Understanding kidney injury molecule 1: a novel immune factor in kidney pathophysiology. *Am J Transl Res* 2019;11:1219-29.
 28. Togashi A, Katagiri T, Ashida S, Fujioka T, Maruyama O, Wakumoto Y, et al. Hypoxia-inducible protein 2 (HIG2), a novel diagnostic marker for renal cell carcinoma and potential target for molecular therapy. *Cancer Res* 2005;65:4817-26.
 29. Lucarini L, Magnelli L, Schiavone N, Crisci A, Innocenti A, Puccetti L, et al. Plasmatic carbonic anhydrase IX as a diagnostic marker for clear cell renal cell carcinoma. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2018;33:234-40.
 30. Tschirdewahn S, Panic A, Püllen L, Harke NN, Hadaschik B, Riesz P, et al. Circulating and tissue IMP3 levels are correlated with poor survival in renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 2019;145:531-9.
 31. Ruf M, Mittmann C, Nowicka AM, Hartmann A, Hermanns T, Poyet C, et al. pVHL/HIF-regulated CD70 expression is associated with infiltration of CD27+ lymphocytes and increased serum levels of soluble CD27 in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2015;21:889-98.
 32. Toiyama D, Takaha N, Shinnoh M, Ueda T, Kimura Y, Nakamura T, et al. Significance of serum tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand as a prognostic biomarker for renal cell carcinoma. *Mol Clin Oncol* 2013;1:69-74.
 33. Won Y, Song HJ, Kang TW, Kim JJ, Han BD, Lee SW. Pattern analysis of serum proteome distinguishes renal cell carcinoma from other urologic diseases and healthy persons. *Proteomics* 2003;3:2310-6.
 34. Xu G, Hou CR, Jiang HW, Xiang CQ, Shi N, Yuan HC, et al. Serum protein profiling to identify biomarkers for small renal cell carcinoma. *Indian J Biochem Biophys* 2010;47:211-8.
 35. Zhang Y, Cai Y, Yu H, Li H. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis identified HSC71 as a novel serum biomarker for renal cell carcinoma. *Biomed Res Int* 2015;2015:802153.

36. Yang J, Yang J, Gao Y, Zhao L, Liu L, Qin Y, et al. Identification of potential serum proteomic biomarkers for clear cell renal cell carcinoma. *PLoS One* 2014;9:e111364.
37. White NM, Masui O, Desouza LV, Krakovska O, Metias S, Romaschin AD, et al. Quantitative proteomic analysis reveals potential diagnostic markers and pathways involved in pathogenesis of renal cell carcinoma. *Oncotarget* 2014;5:506-18.
38. Wang Q, Zhang J, Tu H, Liang D, Chang DW, Ye Y, et al. Soluble immune checkpoint-related proteins as predictors of tumor recurrence, survival, and T cell phenotypes in clear cell renal cell carcinoma patients. *J Immunother Cancer* 2019;7:334.
39. Nixon AB, Schalper KA, Jacobs I, Potluri S, Wang IM, Fleener C. Peripheral immune-based biomarkers in cancer immunotherapy: can we realize their predictive potential? *J Immunother Cancer* 2019;7:325.
40. Knott ME, Manzi M, Zabalegui N, Salazar MO, Puricelli LI, Monge ME. Metabolic footprinting of a clear cell renal cell carcinoma in vitro model for human kidney cancer detection. *J Proteome Res* 2018;17:3877-88.
41. Zhang M, Liu X, Liu X, Li H, Sun W, Zhang Y. A pilot investigation of a urinary metabolic biomarker discovery in renal cell carcinoma. *Int Urol Nephrol* 2020;52:437-46.
42. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:5003-8.
43. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature Cell Biology* 2011;13:423-33.
44. Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2010;38:7248-59.
45. Zhao A, Li G, Péoc'h M, Genin C, Gigante M. Serum miR-210 as a novel biomarker for molecular diagnosis of clear cell renal cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2013;94:115-20.
46. Li G, Zhao A, Péoch M, Cottier M, Mottet N. Detection of urinary cell-free miR-210 as a potential tool of liquid biopsy for clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2017;35:294-9.
47. Petrozza V, Pastore AL, Palleschi G, Tito C, Porta N, Ricci S, et al. Secreted miR-210-3p as non-invasive biomarker in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* 2017;8:69551-8.
48. White NM, Khella HW, Grigull J, Adzovic S, Youssef YM, Honey RJ, et al. miRNA profiling in metastatic renal cell carcinoma reveals a tumour-suppressor effect for miR-215. *Br J Cancer* 2011;105:1741-9.
49. Heinemann FG, Tolkach Y, Deng M, Schmidt D, Perner S, Kristiansen G, et al. Serum miR-122-5p and miR-206 expression: non-invasive prognostic biomarkers for renal cell carcinoma. *Clin Epigenetics* 2018;10:11.
50. Teixeira AL, Ferreira M, Silva J, Gomes M, Dias F, Santos JI, et al. Higher circulating expression levels of miR-221 associated with poor overall survival in renal cell carcinoma patients. *Tumour Biol* 2014;35:4057-66.
51. Liu S, Deng X, Zhang J. Identification of dysregulated serum miR-508-3p and miR-885-5p as potential diagnostic biomarkers of clear cell renal carcinoma. *Mol Med Rep* 2019;20:5075-83.
52. Simonovic S, Hinze C, Schmidt-Ott KM, Busch J, Jung M, Jung K, et al. Limited utility of qPCR-based detection of tumor-specific circulating mRNAs in whole blood from clear cell renal cell carcinoma patients. *BMC Urol* 2020;20:7.
53. Hsiao KY, Sun HS, Tsai SJ. Circular RNA - New member of noncoding RNA with novel functions. *Exp Biol Med (Maywood)* 2017;242:1136-41.
54. Wu Y, Wang YQ, Weng WW, Zhang QY, Yang XQ, Gan HL, et al. A serum-circulating long noncoding

- RNA signature can discriminate between patients with clear cell renal cell carcinoma and healthy controls. *Oncogenesis* 2016;5:e192.
55. Miranda KC, Bond DT, Levin JZ, Adiconis X, Sivachenko A, Russ C, et al. Massively parallel sequencing of human urinary exosome/microvesicle RNA reveals a predominance of non-coding RNA. *PLoS One* 2014;9:e96094.
 56. Zhang W, Ni M, Su Y, Wang H, Zhu S, Zhao A, et al. MicroRNAs in serum exosomes as potential biomarkers in clear-cell renal cell carcinoma. *Eur Urol Focus* 2018;4:412-9.
 57. Butz H, Nofech-Mozes R, Ding Q, Khella HWZ, Szabó PM, Jewett M, et al. Exosomal MicroRNAs are diagnostic biomarkers and can mediate cell-cell communication in renal cell carcinoma. *Eur Urol Focus* 2016;2:210-8.
 58. Du M, Giridhar KV, Tian Y, Tschannen MR, Zhu J, Huang CC, et al. Plasma exosomal miRNAs-based prognosis in metastatic kidney cancer. *Oncotarget* 2017;8:63703-14.
 59. Qu L, Ding J, Chen C, Wu ZJ, Liu B, Gao Y, et al. Exosome-transmitted lncARSR promotes sunitinib resistance in renal cancer by acting as a competing endogenous RNA. *Cancer Cell* 2016;29:653-68.
 60. Raimondo F, Morosi L, Corbetta S, Chinello C, Brambilla P, Della Mina P, et al. Differential protein profiling of renal cell carcinoma urinary exosomes. *Mol Biosyst* 2013;9:1220-33.
 61. Jingushi K, Uemura M, Ohnishi N, Nakata W, Fujita K, Naito T, et al. Extracellular vesicles isolated from human renal cell carcinoma tissues disrupt vascular endothelial cell morphology via azurocidin. *Int J Cancer* 2018;142:607-17.
 62. Alimirzaie S, Bagherzadeh M, Akbari MR. Liquid biopsy in breast cancer: a comprehensive review. *Clin Genet* 2019;95:643-60.
 63. Norcic G. Liquid biopsy in colorectal cancer-current status and potential clinical applications. *Micromachines (Basel)* 2018;9:300.
 64. Santarpia M, Liguori A, D'Aveni A, Karachaliou N, Gonzalez-Cao M, Daffinà MG, et al. Liquid biopsy for lung cancer early detection. *J Thorac Dis* 2018;10(Suppl 7):S882-97.
 65. Merker JD, Oxnard GR, Compton C, Diehn M, Hurley P, Lazar AJ, et al. Circulating tumor DNA analysis in patients with cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *J Clin Oncol* 2018;36:1631-41.
 66. Lasseter K, Nassar AH, Hamieh L, Berchuck JE, Nuzzo PV, Korthauer K, et al. Plasma cell-free DNA variant analysis compared with methylated DNA analysis in renal cell carcinoma. *Genet Med* 2020;22:1366-73.
 67. Nuzzo PV, Berchuck JE, Korthauer K, Spisak S, Nassar AH, Abou Alaiwi S, et al. Detection of renal cell carcinoma using plasma and urine cell-free DNA methylomes. *Nat Med* 2020;26:1041-3.
 68. Sadeh R, Sharkia I, Fialkoff G, Rahat A, Gutin J, Chappleboim A, et al. ChIP-seq of plasma cell-free nucleosomes identifies gene expression programs of the cells of origin. *Nat Biotechnol* 2021;39:586-98.
 69. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin. *Cell* 2016;164:57-68.
 70. Bache N, Geyer PE, Bekker-Jensen DB, Hoerning O, Falkenby L, Treit PV, et al. A novel LC system embeds analytes in pre-formed gradients for rapid, ultra-robust proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2018;17:2284-96.
 71. Bruderer R, Muntel J, Müller S, Bernhardt OM, Gandhi T, Cominetti O, et al. Analysis of 1508 plasma samples by capillary-flow data-independent acquisition profiles proteomics of weight loss and maintenance. *Mol Cell Proteomics* 2019;18:1242-54.
 72. Franz A, Ralla B, Weickmann S, Jung M, Rochow H, Stephan C, et al. Circular RNAs in clear cell renal cell carcinoma: their microarray-based identification, analytical validation, and potential use in a

- clinico-genomic model to improve prognostic accuracy. *Cancers (Basel)* 2019;11:1473.
73. Wang K, Sun Y, Tao W, Fei X, Chang C. Androgen receptor (AR) promotes clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) migration and invasion via altering the circHIAT1/miR-195-5p/29a-3p/29c-3p/CDC42 signals. *Cancer Lett* 2017;394:1-12.
 74. Zviran A, Schulman RC, Shah M, Hill STK, Deochand S, Khamnei CC, et al. Genome-wide cell-free DNA mutational integration enables ultra-sensitive cancer monitoring. *Nat Med* 2020;26:1114-24.
 75. Ma H, Xu Y, Zhang R, Guo B, Zhang S, Zhang X. Differential expression study of circular RNAs in exosomes from serum and urine in patients with idiopathic membranous nephropathy. *Arch Med Sci* 2019;15:738-53.
 76. Stranska R, Gysbrechts L, Wouters J, Vermeersch P, Bloch K, Dierickx D, et al. Comparison of membrane affinity-based method with size-exclusion chromatography for isolation of exosome-like vesicles from human plasma. *J Transl Med* 2018;16:1.
 77. Iliuk A, Wu X, Li L, Sun J, Hadisurya M, Boris RS, et al. Plasma-derived extracellular vesicle phosphoproteomics through chemical affinity purification. *J Proteome Res* 2020;19:2563-74.
 78. Qiu J, Xu J, Zhang K, Gu W, Nie L, Wang G, et al. Refining cancer management using integrated liquid biopsy. *Theranostics* 2020;10:2374-84.