

<붙임 4>

기관고유연구사업 최종보고서									
연구분야(코드)	I-3	과제번호	1410050			지원 프로그램	창의 협동연구		
과제성격(기초,응용,개발)	응용	실용화 대상여부	실용화	공개가능여부 (공개,비공개)			공개		
연구과제명	(국문)암진단을 위한 분자적 방법의 개발과 암환자에 적용: 유전자 증폭, DNA 메틸화, 염색체 전위를 중심으로 II 예비연구 (영문)Development and application of molecular diagnostic methods for gene amplification, DNA methylation and chromosomal translocation II, a preliminary study								
과제책임자	소 속	분자종양학연구과		직 위	책임연구원				
	성 명	홍경만		전 공	생화학				
세부과제	구분	세부과제명			세부과제책임자				
		성명	소속(직위)	전 공					
	1	재배열서열 분석을 통한 위암환자의 모니터링 예비연구			홍경만	분자종양학 (책임)	생화학		
	2	돌연변이와 카피수 분석을 통한 위암 환자의 분자적 진단 예비연구			김영우	위암연구과 (책임)	외과학		
3									
총 연구기간	2014년 1월~ 2014년 12월(총 1년)			참여연구원수 (단위: 명, MY)		8			
연구기간 및 연구비 (단위:천원)	구분	연구기간	계	국립 암센터	기업부담금				
	계	2014.1~2014.12		190,000	소계	현금	현물		
	제1차	2014.1~2014.12		190,000					
	제2차	~							
	제3차	~							
참여기업	명칭		전화		FAX				
기관고유연구사업관리규칙에 따라 본 연구개발사업을 성실히 수행하였으며 아래와 같이 최종보고서를 제출합니다.									
2014년 10 월 30 일  과제책임자      홍 경 만 (서명)									
국립 암 센터 원 장    귀 하									
(첨부서류)									

# 목 차

## < 요약 문 >

(한글)

(영문)

1. 연구의 최종목표
2. 연구의 내용 및 결과
3. 연구결과 고찰 및 결론
4. 연구성과 및 목표달성도
5. 연구결과의 활용계획
6. 참고문헌
7. 첨부서류

※ 여러개의 세부과제로 과제가 구성된 경우 위 목차와 동일하게 세부과제별로 작성함

(I. 총괄과제, II. 제1세부과제, III. 제2세부과제.....)

## < 요약 문 >

<p>연구목표 (200자 이내)</p>	<p>&lt;최종목표&gt;</p> <p>유전자증폭, DNA methylation, translocation 등은 돌연변이와 함께 암세포의 주요한 변화들이다. 그러나 임상에서 이들에 대한 정보의 사용은 전통적인 분자적 방법보다는 면역조직화학염색이나 FISH와 같이 병리학적인 방법과 결합하여 임상에 사용되고 있다. 본 연구에서는 분자적 변화들을 검출할 수 있으면서 automation이 가능하고 결과의 분석이 용이한 장점을 가지고 있는 분자적 진단방법을 개발하고 암환자의 예후 표지자 혹은 치료대상자를 고르는데 predictive marker로서의 가능성에 대해 연구하고자 한다. 본 예비연구는 임상적용을 위하여 위암 동결조직에서 재배열 서열을 분석하는 방법을 확립할 것을 목표로 하여 1 년 계획으로 시행할 예정이다.</p> <p>&lt;당해연도목표&gt;</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 위암조직에서 재배열 서열정보 분석방법의 확립</li> <li>2. 위암조직의 돌연변이 분석 방법 확립</li> <li>3. 유전자 카피수 변화에 따른 위암조직의 분류를 위한 분자적 검출방법의 확립</li> <li>4. 위암 파라핀 조직에서 CKAP2발현의 의의</li> </ol>
<p>연구내용 및 방법 (500자 이내)</p>	<p><b>1. 위암조직에서 재배열 서열정보 분석방법의 확립:</b></p> <p>대상 위암환자의 동결위암조직에서 재배열 서열을 분석하고, 수술후 지속적으로 환자 plasma시료에서 종양유래 cfDNA를 분석할 계획임. 본 예비계획에서는 위암 동결조직에서 재배열 서열을 분석하는 방법을 확립하고자 하는 것이 일차목표임. 이를 위하여 1) 이미 선행연구에서 위암환자 중 재발한 시점까지 serial하게 암환자의 plasma시료를 모아두었기 때문에 이를 이용한 retrospective 연구를 계획하였고 (총 20 case의 동결 위암조직은 조직은행에서 분양받음), 2) 수술하는 3기 위암환자에서 동결조직을 모으고, 이 환자들에서 수술전과 수술후 매달마다 plasma시료를 모아 보관하고 있음 (총 50명을 계획하였음).</p> <p>이중 이미 serial plasma sample이 있는 재발위암 10 case의 조직에 대해 재배열 서열정보를 분석하고자 하였음. 동결 위암조직의 H&amp;E staining후 암세포 proportion확인하였으나, 대부분 50%가 되지 않아서 microdissection을 하여 연구를 진행하기로 계획을 수정하였음. microdissection으로 얻을 수 있는 DNA의 양이 제한되어 원래 계획하였던 TNGS-CNB방법으로 분석하지 못하고 (3.5 ug 정도가 소요), whole genome NGS 방법으로 진행하기로 하였음 (100 ng이 소요). 이 방법은 연구비가 많이 들고, 분석에 많은 시간이 소요된다는 단점이 있는 반면, 돌연변이와 카피수를 한꺼번에 분석할 수 있어서 원래 계획했던 돌연변이와 카피수분석도 이 방법으로 대체하기로 하였으며, 10 case와 paired 정상 위조직에서 모두 whole genome NGS를 시행하였음. 많은 case들에서 translocation과 inversion들을 확인할 수 있었는데, 현재 종양과 정상조직 DNA를 이용하여 재배열 서열의 특이성을 증명하는 연구를 진행하고 있음.</p> <p>대장암에서 재배열 서열을 분석하기 위하여 TNGS-CNB방법을 사용한 결과는 논문으로 출간함으로써 이 방법이 recurrent rearranged site들이 밝혀진 암에서</p>

	<p>유용할 수 있다는 것을 보였음.</p> <p><b>2. 유전자 카피수 변화에 따른 위암의 분류:</b> 최근 위암에서 흔히 카피수가 증가되어 있는 유전자들이 있으며, 이들을 중심으로 위암을 분류할 수 있다는 논문이 출간되었다. 이 보고에서 FGFR2, HER2, EGFR, MET 등 PTK와 KRAS의 카피수 증가를 보인 위암의 생존율이 그렇지 않은 군에 비해 유의하게 나뉘었으며, 이들을 표적으로 하는 항암제를 사용하면 위암의 생존율이 개선될 수 있다고 발표되었다.</p> <p>따라서 본 연구에서는 1단계 연구에서 확립된 mrcPCR방법으로 위암에서의 다섯가지 유전자의 카피수를 측정하고, 위암환자의 생존율이 관련이 이들 유전자 카피수와 있는지와 표적항암제 사용이 생존율을 높일 수 있는지에 대해 연구하고자 하였으며, 23가지 유전자의 카피수를 측정하는 방법을 확립하였으며, 현재 위암에서의 카피수 측정 연구를 진행하고 있음.</p> <p><b>3. 위암 파라핀조직에서의 CKAP2 발현연구:</b> 본 연구자들은 CKAP2가 암의 성장을 측정하는 표지자가 될 수 있다는 것을 최근 보고하였는데, 위암에서는 어떠한 임상적의의가 있는지에 관해 약 400예의 파라핀 조직을 이용하여 조직면역화학염색을 통하여 일부 남자 위암의 일부 환자들에서 생존과 유의한 관련성이 있다는 것을 확인하였음. 유방암에서 생존과의 관련성에 관한 논문을 본 연구비를 사사하여 발간하였음.</p>																				
<p>연구개발에 따른 기대성과</p>	<p>&lt;정량적 성과<sup>1)</sup>&gt;</p> <table border="1" data-bbox="491 1093 1428 1232"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>달성치/목표치<sup>1)</sup></th> <th>달성도(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SCI 논문 편수</td> <td>17/2</td> <td>850</td> </tr> <tr> <td>IF 합</td> <td>67.2/8</td> <td>840%</td> </tr> <tr> <td>기타 성과</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>1) 총연구기간 내 목표연구성과로 기 제출한 값</p> <p>&lt;정성적 성과&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- mrcPCR을 이용한 HER카피수 측정에 대한 국내특허 등록 1건</li> <li>- CKAP2의 면역화학염색을 이용한 예후에 관한 미국특허 등록결정 1건</li> </ul>	구분	달성치/목표치 <sup>1)</sup>	달성도(%)	SCI 논문 편수	17/2	850	IF 합	67.2/8	840%	기타 성과										
구분	달성치/목표치 <sup>1)</sup>	달성도(%)																			
SCI 논문 편수	17/2	850																			
IF 합	67.2/8	840%																			
기타 성과																					
<p>색인어</p>	<table border="1"> <tr> <td rowspan="3">국문</td> <td>위암</td> <td>전위</td> <td>돌연변이</td> </tr> <tr> <td>카피수변화</td> <td>cell-free DNA</td> <td>재배열 서열</td> </tr> <tr> <td>분자적 진단</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td rowspan="3">영문</td> <td>gastric cancer</td> <td>translocation</td> <td>mutation</td> </tr> <tr> <td>copy number change</td> <td>cell-free DNA</td> <td>rearranged sequence</td> </tr> <tr> <td>molecular diagnosis</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	국문	위암	전위	돌연변이	카피수변화	cell-free DNA	재배열 서열	분자적 진단			영문	gastric cancer	translocation	mutation	copy number change	cell-free DNA	rearranged sequence	molecular diagnosis		
국문	위암		전위	돌연변이																	
	카피수변화		cell-free DNA	재배열 서열																	
	분자적 진단																				
영문	gastric cancer	translocation	mutation																		
	copy number change	cell-free DNA	rearranged sequence																		
	molecular diagnosis																				

※ 요약문의 총분량은 2page 이내로 제한함

## Project Summary

<b>Title of Project</b>	Development and application of molecular diagnostic methods for gene amplification, DNA methylation and chromosomal translocation II, a preliminary study
<b>Key Words</b>	gastric cancer, translocation, mutation, copy number change, cell-free DNA, rearranged sequence, molecular diagnosis
<b>Project Leader</b>	Kyeong-Man Hong
<b>Associated Company</b>	

**Final Goal:** Amplifications, DNA methylations, translocations, and mutations are most important major changes in cancer. But molecular methods including PCR has not been used for the clinical application of the information on those molecular changes, and immunohistochemical staining or FISH have been used instead. The final goal of the present study is to develop molecular methods which can detect molecular changes in cancer and be automated, and ultimately to develop useful molecular markers for prognosis or theragnosis. The present 1-year preliminary study is about the method establishment for the future clinical application.

**The goals for the present-year study:**

- 1) to establish the method to analyze rearranged sequences in gastric cancer
- 2) to establish the method to analyze mutation detection method in gastric cancer
- 3) to establish the method to classify gastric cancer molecularly
- 4) to analyze the clinical implication of CKAP2 in gastric cancer

**Methods and Results of the present-year study**

1. To establish the method to analyzed rearranged sequences in gastric cancer. Gastric cancer tissues and serial plasma samples were collected. 1) A prospective with the prospective collection of gastric cancer tissues and serial plasma samples and 2) a retrospective study employing gastric cancer samples in NCC tumor bank in which serially collected plasma samples are available were planned and approved by IRB. Currently about 20 recurrent gastric cancer samples with serially collected plasma samples are available, and prospective collection of 50 gastric cancer tissues and plasma samples is in progress.

Among these samples, 10 recurrent cases in which serial plasma samples are available were analyzed. When H&E slides were reviewed, most cases did not contain enough cancer cell proportion in tumor tissues, and microdissection was made for all 10 cases. However, the total prepared DNA amount was not enough for all TNGS-CNB method which is originally planned to use. Therefore we changed the plan, and whole genome NGS method was employed. This whole genome NGS has disadvantages such as high cost and long analysis time, but has advantages such as necessity of relatively small DNA samples and obtaining other molecular information including mutations and copy number changes. We performed whole genome NGS analysis over 10 recurrent cases along with paired normal samples.

The analysis result of TNGS-CNB (targeted NGS for copy number breakpoints) for the analysis of rearrangements in colon cancer was published, and the feasibility of this method in cancers with recurrent rearrangement sites is suggested.

2. Classification of gastric cancer with copy number changes. Several genes with increased copy number have recently been published, and the clinical classification of gastric cancer with copy numbers is suggested. In this report, the cases with FGF2, HER2, EGFR, MET, or KRAS copy gain showed worse survival, and they suggested that specific target agents for the amplified genes can help to improve the patient's survival. In this project, we are plan to classify gastric cancer molecularly by establishing mrcPCR method and testing 24 gene copy status in gastric cancer tissues. Currently, mrcPCR methods for 24 gene copy number have been established, and are employed for gastric cancer tissues.

3. CKAP2 expression in gastric cancer tissues. We recently showed that CKAP2 can be a marker for cancer cell growth, and the clinical importance of proliferation by measuring CKAP2 expression was tested in gastric cancer. We performed IHC study on about 400 cases, and found the correlation with survival in a subgroup of male gastric cancer cases. We also reported the correlation of CKAP2 expression with breast cancer survival with the help of this fund.

※ 연구목표, 연구방법, 연구성과를 영문으로 요약하여 2쪽이내의 분량으로 작성

## 1. 연구의 최종목표

○ 당초 연구계획을 참고하기 위한 자료임. 선정당시 「과제계획서」와 전년도 제출하였던 「연구차실적·계획서」상의 내용과 동일하게 작성해야 함. 연구사업의 목적, 범위 등에 대해 기술 유전자증폭, DNA methylation, translocation 등은 돌연변이와 함께 암세포의 주요한 변화들이다. 그러나 임상에서 이들에 대한 정보의 사용은 전통적인 분자적 방법보다는 면역조직화학염색이나 FISH와 같이 병리학적인 방법과 결합하여 임상에 사용되고 있다. 본 연구에서는 분자적 변화들을 검출할 수 있으면서 automation이 가능하고 결과의 분석이 용이한 장점을 가지고 있는 분자적 진단방법을 개발하고 암환자의 예후 표지자 혹은 치료대상자를 고르는데 predictive marker로서의 가능성에 대해 연구하고자 한다. 본 예비연구는 임상적용을 위하여 위암 동결조직에서 재배열 서열을 분석하는 방법을 확립할 것을 목표로 하여 1년 계획으로 시행할 예정임.

### 1. 염색체전위 분석을 통한 위암환자의 모니터링 예비연구

- 환자는 동결위암조직이 조직은행에 보관하고 있거나, 수술이나 biopsy 예정인 위암 환자 50명. 환자의 stage는 3.
- 환자의 혈액은 20 ml씩 3개월 간격으로 채혈하여 cfDNA를 추출하여 사용한다.
- 위암조직에서의 염색체 전위분석은 TNGS-CNB방법을 사용한다.

### 2. 돌연변이 분석을 통한 위암환자의 모니터링 예비연구

- 염색체 전위를 통한 연구와 연구대상자가 동일하며, 채취한 시료를 같이 사용
- 위암조직의 돌연변이 분석은 Haloplex technology를 이용할 계획.

### 3. 카피수 변화를 중심으로 분자적 변화에 따른 위암의 분류 예비연구

- 대상환자는 stage 2 이상인 위암환자로 환자동결 암조직이 조직은행에 보관 중인 환자.
- 위암조직 DNA의 추출은 먼저 H&E염색으로 위암세포의 proportion이 50%이상인 경우에 한해 시행.
- 23개 유전자의 카피수 분석은 1단계 연구에서 확립한 mrcPCR방법을 이용하여 분석방법확립.
- 돌연변이 분석은 Haloplex technology를 사용하여 분석방법확립.

### 4. CKAP2 조직면역화학염색

- 위암의 파라핀조직 100예에 대하여 CKAP2조직면역화학염색을 시행하고 위암의 성장에 대한 임상적 의의를 연구하고자 함.

## 2. 연구의 내용 및 결과

○ 연구의 이론적, 실험적 연구 방법, 연구 내용 및 결과를 객관적으로 기술

## 1) mrcPCR 방법을 이용한 유전자 증폭의 측정

◎ 카피수변화는 암세포의 주요한 변화 중 하나이다. 그런데 카피수변화를 측정하는 PCR방법을 응용한 분자적 방법이 임상적용에 제한이 있었는데, 이는 PCR 방법을 응용한 분자적 방법으로 측정된 결과의 신뢰성이 다른 방법에 비해 떨어지기 때문이다. 이러한 단점을 극복하고자 다른 연구자들이 competitor를 시료와 인위적으로 섞어서 사용하는 rcPCR (real competitive PCR) 이라는 방법이 도입되었으나, 시료와 competitor를 정확하게 섞어 주어야하는 단점으로 인해 임상에 적용하기 어려웠다. 본 연구자들은 기존의 rcPCR방법을 변형하고 procedure를 개량하여 mrcPCR (modified real competitive PCR)이라는 방법을 고안하였고, 이 결과를 2013년 논문으로 출간하였다.

◎ 그림 1은 mrcPCR 방법의 원리이다. 그리고 이 방법을 이용하여 HER2의 카피수를 측정하기 위하여 mrcPCR방법을 확립하였고, 17q 염색체에 있는 HER2유전자의 두 서열을 선택하여 카피수를 측정하도록 고안하였고, 상대적인 카피수의 기준으로 사용하기 위하여 17q 염색체 상에서 ALDOC유전자와 G6PC3유전자 등 두개의 유전자 서열을 선택하였다 (그림 2).

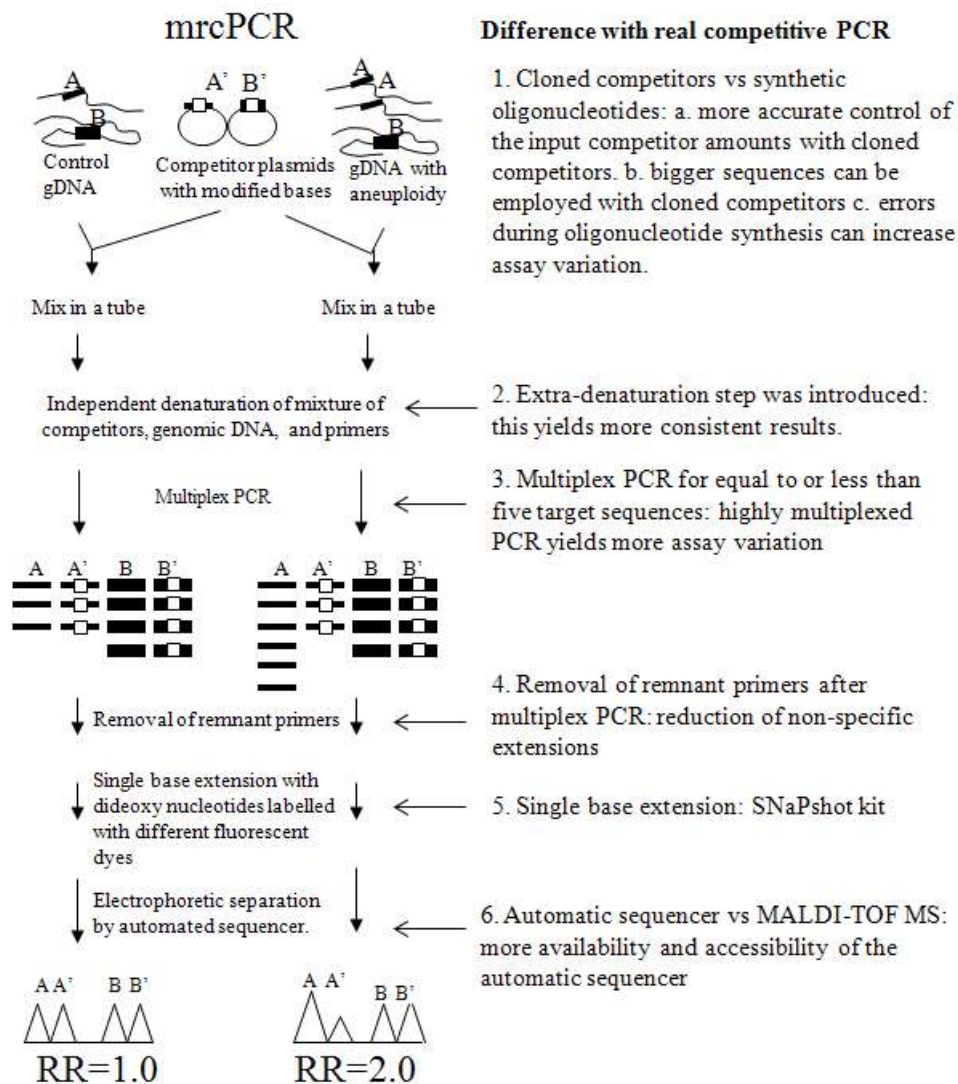




그림 1. 두 종류의 시료 DNA 서열과 두 가지 인위적 SNP 서열의 혼합물로부터 두 가지 표적 유전자 (A, A' 과 B, B')를 증폭하고 동시 증폭된 인위적 SNP 서열을 근거로 두 표적 유전자의 상대적인 양을 분석하는 과정을 예시한 Co-aSNP 방법의 개략도. 실험과정은 보통 표준시료와 검체 시료를 동시에 진행한다. 표준시료 DNA (왼편)와 검체시료 (오른편)에 두 가지 이상의 인위적 SNP 서열을 각각 혼합한 후 실험을 다른 튜브에서 동시에 진행한다. 오른쪽의 검체시료의 경우 특정유전자가 증폭되어 있으면 상대적으로 지놈 DNA에서 증폭된 A의 생산물 양이 인위적 SNP 서열에서 증폭된 A'의 양에 비해 많은 양이 증폭하게 된다. 이 상대적인 양을 artificial SNP site 를 검출할 수 있도록 고안한 single base extension방법으로 측정하게되면 그림의 아래쪽에 나와 있는 것과 같이 상대적인 신호의 크기를 알수 있게되어 이로부터 (A/A')/(B/B')의 값을 구하면 표준시료에 비해 변화된 만큼의 값을 얻게되어, 어느정도 변했는지 변화정도를 정량적으로 알 수 있게 된다.

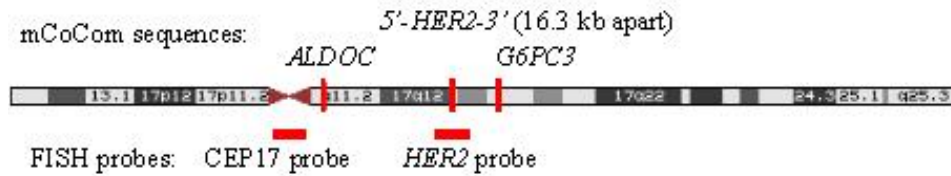
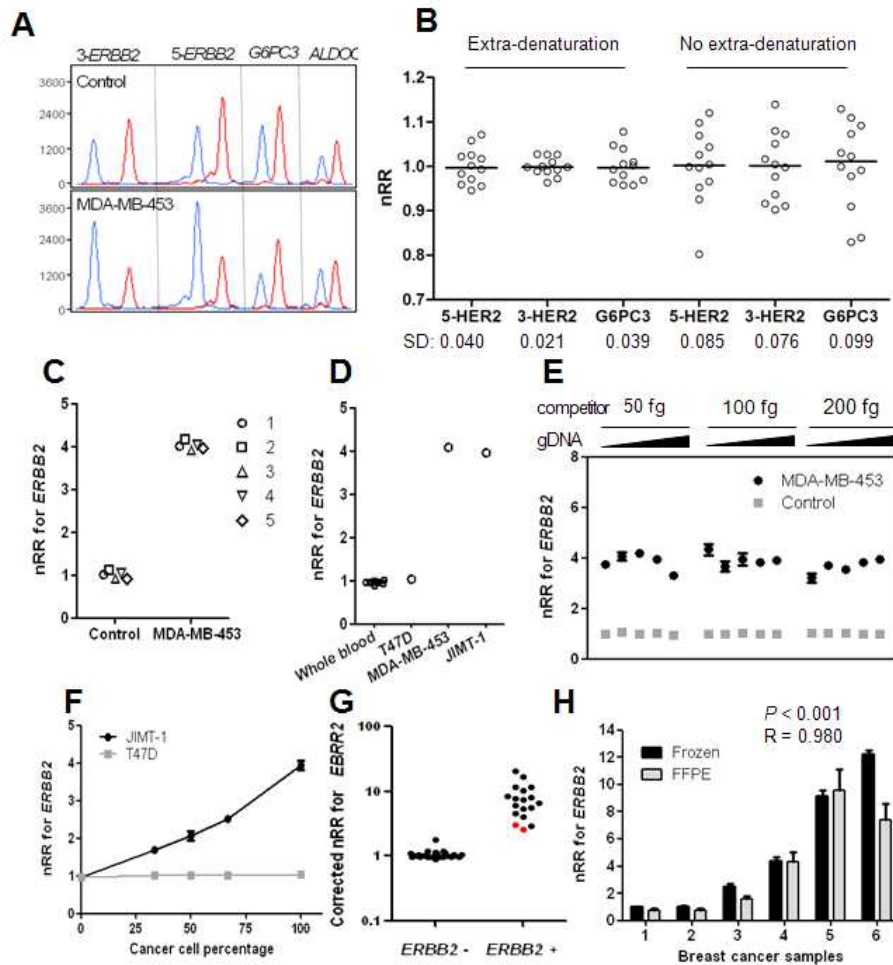


그림 2. HER2 증폭을 측정하기 위해 mrcPCR에 사용한 4가지 서열의 위치. ALDOC유전자는 HER2에 비해 centromere쪽에 위치하고 있고, G6PC3는 telomere 쪽에 위치한다. 그러나 HER2로부터의 상대적인 거리는 G6PC3가 가깝다. HER2유전자 내에서 두 가지 서로 다른 서열의 증폭을 측정하도록 고안하였다. 5HER2는 ALDOC쪽에 위치한 서열이고, 3HER2는 G6PC3쪽에 위치한 서열이다. FISH probe로 사용하는 CEP17과 HER2 probe의 위치도 표시하였다.

© 이렇게 고안한 방법을 사용하여 실제 카피수를 측정하여 그림 3과 같이 이 방법의 유용성을 증명하였다. 이 방법을 사용하는 과정에서 extradenaturation procedure를 사용하는데, 이는 PCR과정 바로 이전에 genomic DNA의 full denaturation하는 것이 카피수를 측정하는데 중요하다는 결과를 그림 3B와 같이 알 수 있었다. 그리고 그림 3C와 3D에서와 같이 독립적으로 반복실험하여도 같은 결과를 얻을 수 있었다. 또한 3E에서와 같이 서로 다른 양의 competitor를 서로 다른 양의 genomic DNA와 섞어 실험을 하여도 동일한 결과를 얻을 수 있으며, 그림 3G에서와 같이 IHC와 FISH를 병용한 현재의 standard method의 결과와도 일치한다는 것을 알 수 있었다. 실제 이러한 방법은 동결유방암조직 뿐 아니라 파라핀 조직 DNA에도 적용할 가능성이 있음을 그림 3H와 같이 알 수 있어서 임상적 응용 가능성이 있다고 하겠다. 이상과 같은 결과로 특허를 출원하였는데, 올해 대한민국 특허로 등록할 수 있었다.

그림 3. Measurement of ERBB2 gene copy number by mrcPCR. (A) Representative results for measurement of ERBB2 copy number by mrcPCR using two ERBB2 sequences (5-ERBB2 and 3-ERBB2) and two reference sequences (ALDOC and G6PC3). Eight peaks



originated from either genomic DNA (blue) or the competitor (red). (B) mrcPCR assay variation depending on extra-denaturation procedure. Standard deviation (SD) values for the nRRs are shown. (C) Reproducibility of mrcPCR by five independent assays. (D) ERBB2 copy number by mrcPCR in control and cancer cell samples. The y-axis shows the mean nRR values of 5-ERBB2 and 3-ERBB2. (E) mrcPCR results using various amounts of input genomic DNA (blue, 2.5, 5, 10, 20, or 40 ng) and competitors (red, 6.25, 12.5, or 25 fg based on ALDOC competitor). The y-axis shows the mean nRR values of 5-ERBB2 and 3-ERBB2. (F) Detection of ERBB2 amplification in serially-diluted DNA of JIMT-1 or T47D cells. The y-axis shows the mean nRR values of 5-ERBB2 and 3-ERBB2. The assay was performed in duplicate. (G) Comparison of mrcPCR results with those from standard methods of immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH). Y axis: corrected nRR for ERBB2 copy based on cancer cell percentage as described in Materials and Methods. The red spots are the samples that contained only about 30% tumor cells. (H) Comparison of mrcPCR results between fresh-frozen (black) and formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE, gray) cancer tissues ( $P < 0.001$ ,  $R = 0.980$ , by Pearson correlation test after logarithmic transformation). The assay was performed in triplicate.

## 2) 카피수 분석을 위한 competitive SNP (cSNP) microarray 방법

본 연구자들은 mrcPCR의 원리를 microarray 방법에 적용하고자 competitive SNP (cSNP) microarray 방법을 고안하여 그 가능성을 측정하였다.

◎ 그림 4는 cSNP microarray의 원리를 설명하는 그림으로, 이때 competitor로는 H-mole세포의 DNA를 사용하였는데, H-mole세포는 모든 SNP가 homozygous allele로 구성되어있다. normal DNA혹은 cancer DNA와 혼합하여 SNP microarray를 시행하고, 결과를 분석하는데, alter homozygote SNP들 만은 선별하여 분석한다. 이때, alter homozygote SNP들은 normal DNA도 homozygote이면서 H-mole의 염기와는 다른 염기로 구성된 SNP들을 말한다.

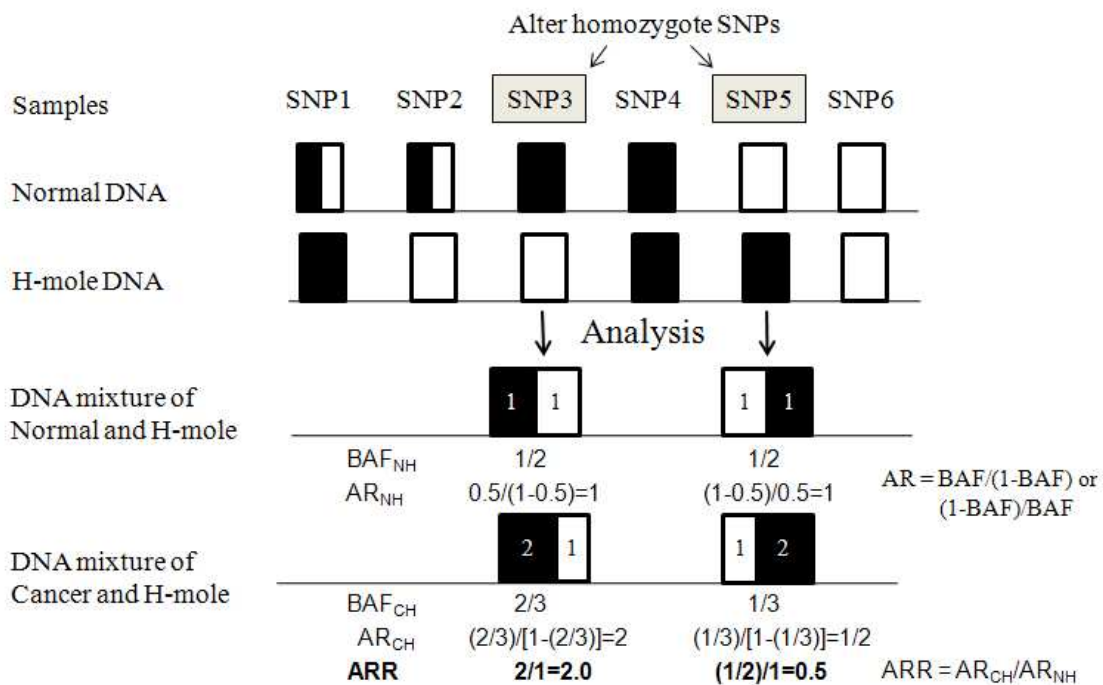


그림 4. Schematic procedure for competitive SNP microarray. First, alter homozygous alleles were selected (SNP3 and SNP5). From B allele frequency (BAF) values, allelic ratio (AR) was determined for mixture samples of 1) normal and H-mole DNAs, and 2) cancer and H-mole DNAs. B allele is automatically designated by Genome Studio software (Illumina) and is marked in black box. From AR values from two mixture samples, ARR was obtained. The formulas for AR and ARR were shown.

◎ 이전의 rcPCR방법은 competitor와 시료를 정확하게 50:50으로 섞어서 실험을 진행해야한다는 단점이 있었다. 이러한 문제점 때문에 이를 임상에 응용하기 어려웠다. mrcPCR 방법에서는 이러한 단점이 개선되도록 고안하여 사용하였다. 그런데 서로 다른 competitor와 시료의 비율을 사용하여도 시료의 카

피수를 정확히 예측할 수 있다는 이론적인 근거가 이러한 방법이 cSNP microarray에서도 필요하였다. 따라서 이러한 비율에 따라 여러 가지 식을 사용하여 Table 1과 같이 분석하였는데, nARR 값을 사용하는 경우 어떠한 경우라도 시료의 카피수를 바르게 계산해 낼 수 있다는 것을 확인하고 이 수식을 사용하여 시료에서의 카피수를 계산할 수 있었다. 이와 같은 내용의 새로운 방식의 SNP microarray를 이용한 카피수 분석방법에 대하여 특허를 신청하였고 국내외 특허를 등록하였고, 아직 몇 나라에서는 특허심사가 진행중에 있다.

Table 1. 서로 다른 비율로 cancer 혹은 normal DNA를 H-mole DNA와 혼합하였을 때 cancer에서의 카피수 변화를 계산하는 방법.

N-H mix ratio	C-H mix ratio	Copy Number	Cancer genotype	Normal genotype	H-mole genotype	N-H mix genotype	C-H mix genotype	$BAF_H^N$	$AR_{NH}$	$BAF_{CH}$	$AR_{CH}$	ARR	nARR
2:2 or 1:1	2:2 or 1:1	4	BBBB	BB	AA	AABB	AABBBB	2/4	2/2	4/6	<b>4/2 (2.00)</b>	<b>2.00</b>	<b>2.00</b>
		3	BBB	BB	AA	AABB	AABBB	2/4	2/2	3/5	<b>3/2 (1.50)</b>	<b>1.50</b>	<b>1.50</b>
		2	BB	BB	AA	AABB	AABB	2/4	2/2	2/2	<b>2/2 (1.00)</b>	<u>1.00</u>	<b>1.00</b>
		1	B	BB	AA	AABB	AAB	2/4	2/2	1/2	<b>1/2 (0.50)</b>	<b>0.50</b>	<b>0.50</b>
		0		BB	AA	AABB	AA	2/4	2/2	0/2	<b>0/2 (0.00)</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
2:3	2:3	4	BBBB	BB	AA	AAABB	AAABBBB	2/5	2/3	4/3	4/3	<b>2.00</b>	<b>2.00</b>
		3	BBB	BB	AA	AAABB	AAABBB	2/5	2/3	3/3	3/3	<b>1.50</b>	<b>1.50</b>
		2	BB	BB	AA	AAABB	AAABB	2/5	2/3	2/3	2/3	<u>1.00</u>	<b>1.00</b>
		1	B	BB	AA	AAABB	AAAB	2/5	2/3	1/3	1/3	<b>0.50</b>	<b>0.50</b>
		0		BB	AA	AAABB	AAA	2/5	2/3	0/3	0/3	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
3:2	2:3	4	BBBB	BB	AA	AABBB	AAABBBB	3/5	3/2	4/3	4/3	0.89	<b>2.00</b>
		3	BBB	BB	AA	AABBB	AAABBB	3/5	3/2	3/3	3/3	0.67	<b>1.50</b>
		2	BB	BB	AA	AABBB	AAABB	3/5	3/2	2/3	2/3	<u>0.44</u>	<b>1.00</b>
		1	B	BB	AA	AABBB	AAAB	3/5	3/2	1/3	1/3	0.22	<b>0.50</b>
		0		BB	AA	AABBB	AAA	3/5	3/2	0/3	0/3	0.00	<b>0.00</b>

In the table example, the allele B is the B allele, and the values for various parameters are the expected values.

N-H mixture or N-H mix, the mixture of normal and H-mole DNAs; C-H mixture or C-H mix, the mixture of cancer and H-mole DNAs; N-H mix ratio, the ratio of normal and H-mole DNA amounts in the N-H mixture; C-H mix ratio, the ratio of cancer and H-mole DNA amounts in the C-H mixture; Copy Number, the copy number in cancer; Cancer Genotype, the genotype in cancer sample DNA; Normal genotype, the genotype in normal sample DNA; N-H mix genotype, the genotype in then-H mixture; C-H mix genotype, the genotype in the C-H mixture;  $BAF_{NH}$ , the ratio of B allele and total allele amounts (or B allele frequency) in the N-H mixture;  $AR_{NH}$ , the ratio of B allele and A allele amounts (or allelic ratio) in the N-H mixture;  $BAF_{CH}$ , the ratio of B allele and total allele amounts (or B allele frequency) in the C-H mixture;  $AR_{CH}$ , the ratio of B allele and A allele amounts (or allelic ratio) in the C-H mixture; ARR, the ratio of  $AR_{CH}$  and  $AR_{NH}$ , or the AR ratio; nARR, the ARR values which are divided by the median ARR value, or normalized ARR.

In the table example, the ARR value from copy number 2 (underlined) was used as a median value

© 위 Table 1과 같은 수식을 사용하여 cSNP microarray의 결과를 분석하였는데, 지금까지 흔히 사용하고 있는 SNP microarray의 방법인 LogR ratio에 의한 결과 (그림 5A)에 비하여, cSNP microarray 방법으로 copy number status를 분석하면 그림 5B에서와 같이 카피수의 변화 양상을 훨씬 뚜렷하게 알 수 있었다. 특히 copy number breakpoint (CNB), 즉 카피수가 변화되어 있는 부위에 대한 정보를 정확하게 얻을 수 있는 장점이 있다. 특히 이 CNB는 반드시 하나 이상의 rearranged sequence를 포함하고 있어서, 암 특이 분자적 변화를 이용한 임상연구에 응용할 수 있을 것으로 생각하였다.

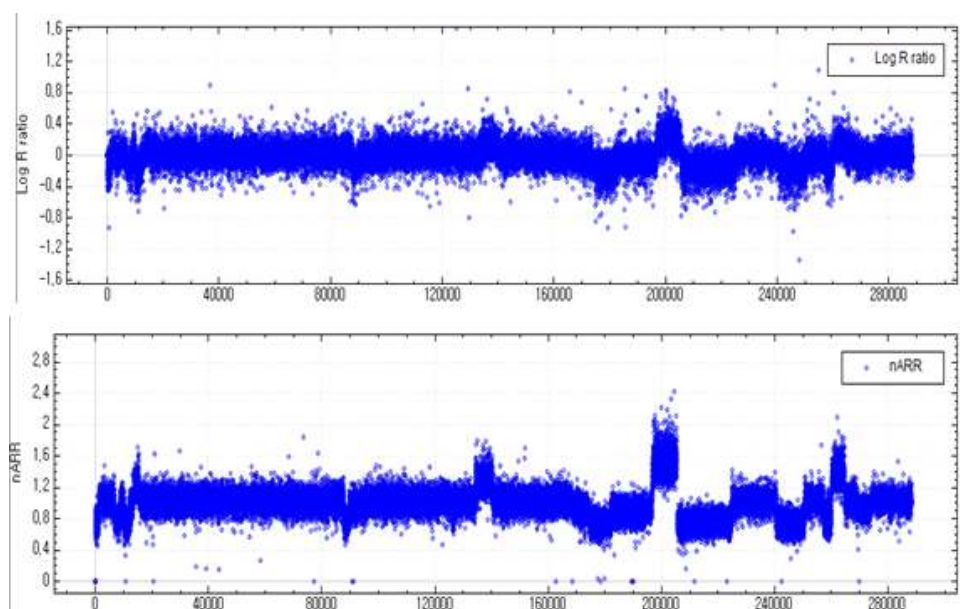


그림 5. A representative results of from Log R ratio, nARCH, and nARR in a colon cancer sample. Log R ratio was obtained from Genome Studio software; nARR was calculated employing DNAs from a cancer tissue, the corresponding normal tissue, and H-mole with cSNP software.

### 3) 암조직에서 재배열 서열 정보를 얻기 위한 TNGS-CNB 방법의 확립

© 2010년 Science translational medicine에 whole genome NGS로 암에서의 rearrangement를 분석하고 이 정보를 이용하여 cancer specific PCR을 고안하여 환자의 혈액 내에 있는 cell free DNA에서 암유래 cell free DNA를 monitoring함으로써 암의 재발을 모니터링 하겠다는 idea가 발표되었다 (그림 6, Larray et al., 2010). 그러나 이러한 방법의 임상적용이 가능한지 혹은 효율성은 어떠한 지에 대한 임상시험 결과는 없었다. 본 연구자들은 이와 같은 연구가 본격적으로 이루어지지 않는 이유 중 하나로 whole genome NGS의 비용이 너무 높고, 또한 결과 분석에 많은 시간이 소요되며, bioinformatics로 분석된 결과의 신뢰도에 문제가 있을 수 있다고 생각하였다. 본 연구자들은 cfDNA에서의 rearranged sequence를 이용한 암재발 모니터링이 임상에 유용할 수 있다는 것을 좀 더 연구하기 위하여, 우선 암조직에서 쉽게 rearranged sequence를 알아낼 수 있는 방



법으로 whole genome NGS이외의 방법을 생각하였다. 그런데 cSNP microarray의 CNB에 rearranged sequence가 반드시 하나 이상 존재할 것이므로, 이 부위를 포함하도록 하여 probe를 design하고 cancer DNA에서 이들을 포함하는 서열을 capture한다면 rearranged sequence들에 대한 정보를 얻을 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 따라서 이를 TNGS-CNB (targeted next generation sequencing for copy number breakpoints)라고 명명하였는데, 그 procedure는 그림 7과 같다. 이 방법을 이용하여 colon cancer case를 대상으로 먼저 시행하였다.

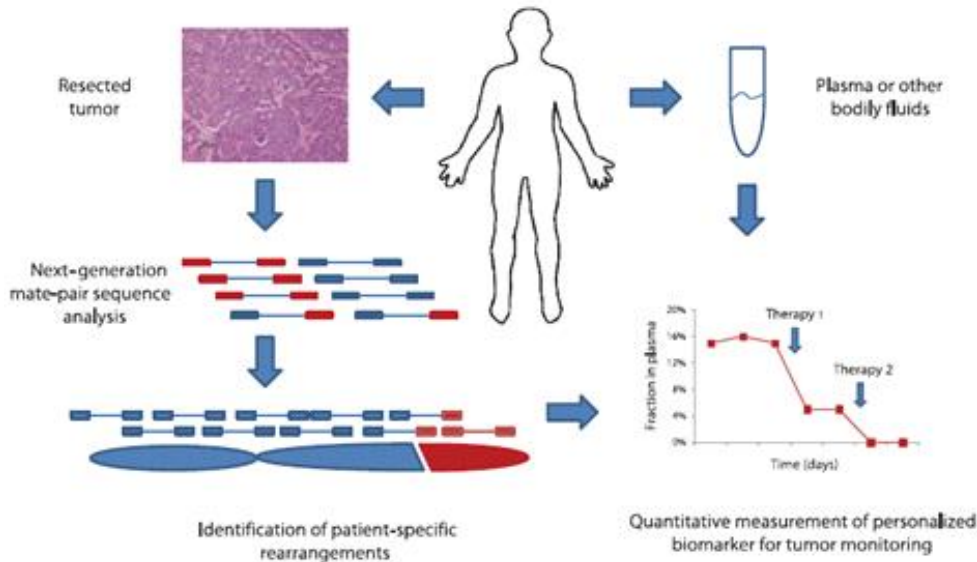


그림 6. Whole genome next generation sequencing을 이용한 환자 재발의 모니터링. 환자 암조직 DNA를 이용하여 whole genome NGS를 시행하고 이로부터 rearranged sequence 정보를 획득하여 환자 혈액내 cfDNA 중 암유래 cell free DNA를 특이적으로 측정함으로써 환자의 재발을 예측할 수 있다는 내용의 논문이 2010년 발표되었다.

#### 4) 대장암에서 TNGS-CNB를 이용한 rearranged sequence 정보 획득

© cSNP microarray방법으로 분석한 결과와 기존의 LogR ratio를 이용한 결과를 비교해 보면 그림 5에서 설명한 바와 같이 전체적으로 훨씬 좋은 copy number status를 예측할 수 있어서 이 방법을 이용하여 9개 시료에서 91개의 copy number breakpoint들을 예측하였고, 이들을 포함한 region을 capture할 수 있도록 capture probe들을 design하고 이 targeted probe와 시료 DNA를 hybridize시켜서 probe와 결합하는 서열을 모두 capture하였다. 이렇게 capture한 서열을 next generation sequencing방법으로 분석하여 모두 23개의 candidate rearranged sequence 정보를 얻었는데, 이들에 대해 모두 PCR방법을 확립하였고, tumor와 normal 조직을 이용하여 암특이성을 확인한 바, 19개의 rearranged site가 암조직에 특이하다는 것을 확인하였다. 이상과 같은 실험의 진행은 그림 7과 같다.

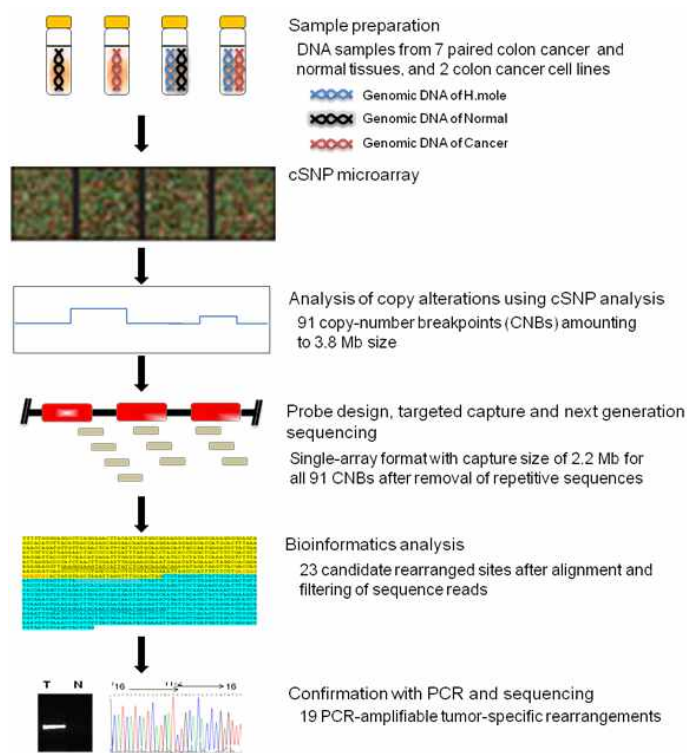


그림 7. TNGS-CNB scheme. Out of 91 copy-number breakpoints deduced using a novel competitive SNP microarray technology, 19 PCR-amplifiable rearrangements were identified from seven paired primary colon cancer and normal tissues and two colon cancer cells by capture and next-generation sequencing of those copy-number breakpoints.

◎ 특히 23개 candidate rearranged sequence들에 대한 암특이성을 PCR로 확인하였는데 모두 19개의 PCR-amplifiable tumor-specific rearrangement에 대해 암특이성을 확인할 수 있었다 (그림 9)

◎ cSNP microarray결과와 LogR ratio의 결과를 비교해 보면 그림 10과 같다. 그림에서 확인할 수 있듯이 cSNP microarray를 이용하는 경우 copy number breakpoint들을 훨씬 쉽게 알아낼 수 있다는 것을 확인할 수 있다.

◎ 모든 19개 PCR-amplifiable tumor-specific rearrangement 부위를 암 DNA에서 증폭하고 이에 대한 염기서열을 분석하여 정확한 rearranged sequence 정보를 다시 한번 확인할 수 있었는데, 그림 11에 그 결과를 나타내었다.

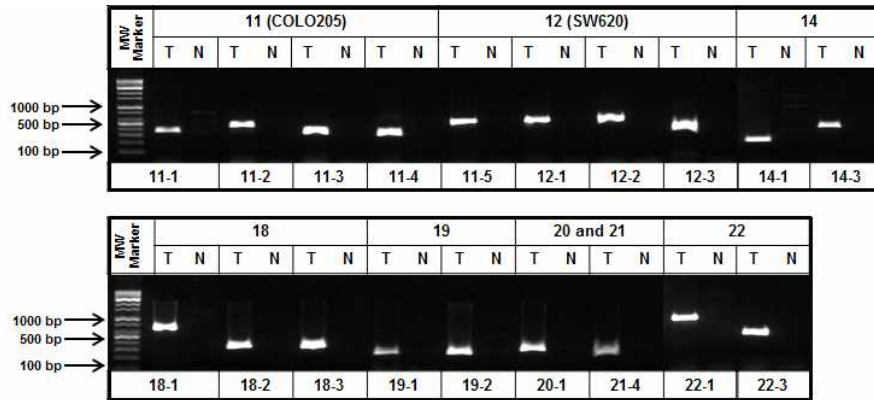


그림 9. Candidate rearranged site들의 암특이성 확인. 23개 candidate rearranged site에 대해 모두 PCR 방법을 확립하고 암조직과 정상조직 DNA를 이용하여 PCR방법으로 암조직 특이성을 확인하였는데, 모두 19개의 rearranged sequence를 확인할 수 있었다.

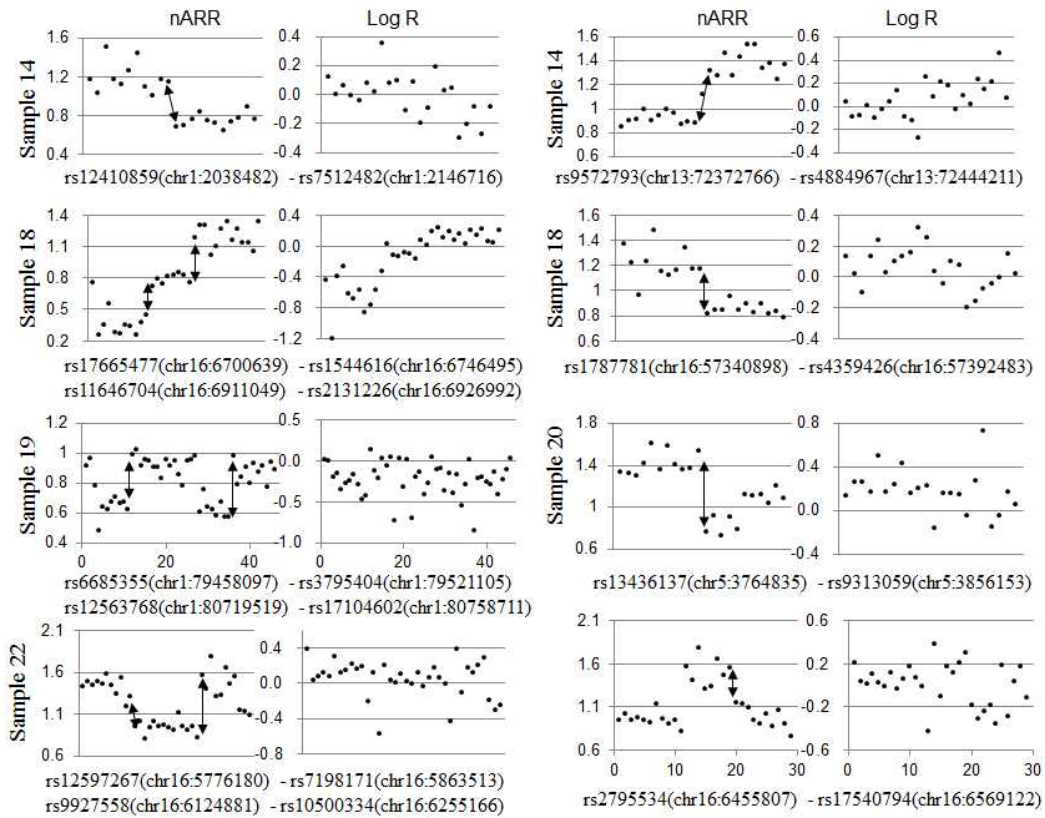


그림 10. rearrangement가 확인된 부위들에서의 cSNP microarray분석결과와 LogR ratio의 분석결과 비교. 화살표로 표시된 부위가 copy number breakpoint가 있는 부위이며, 모든 경우에서 암특이 rearrangement가 확인되었다. cSNP microarray분석결과 (nARR)에서는 breakpoint들이 분명히 존재한다는 것을 알 수 있으나, LogR ratio를 이용하는 경우 breakpoint들을 확인하기 어려운 경우가 대부분이라는 것을 알 수 있다.



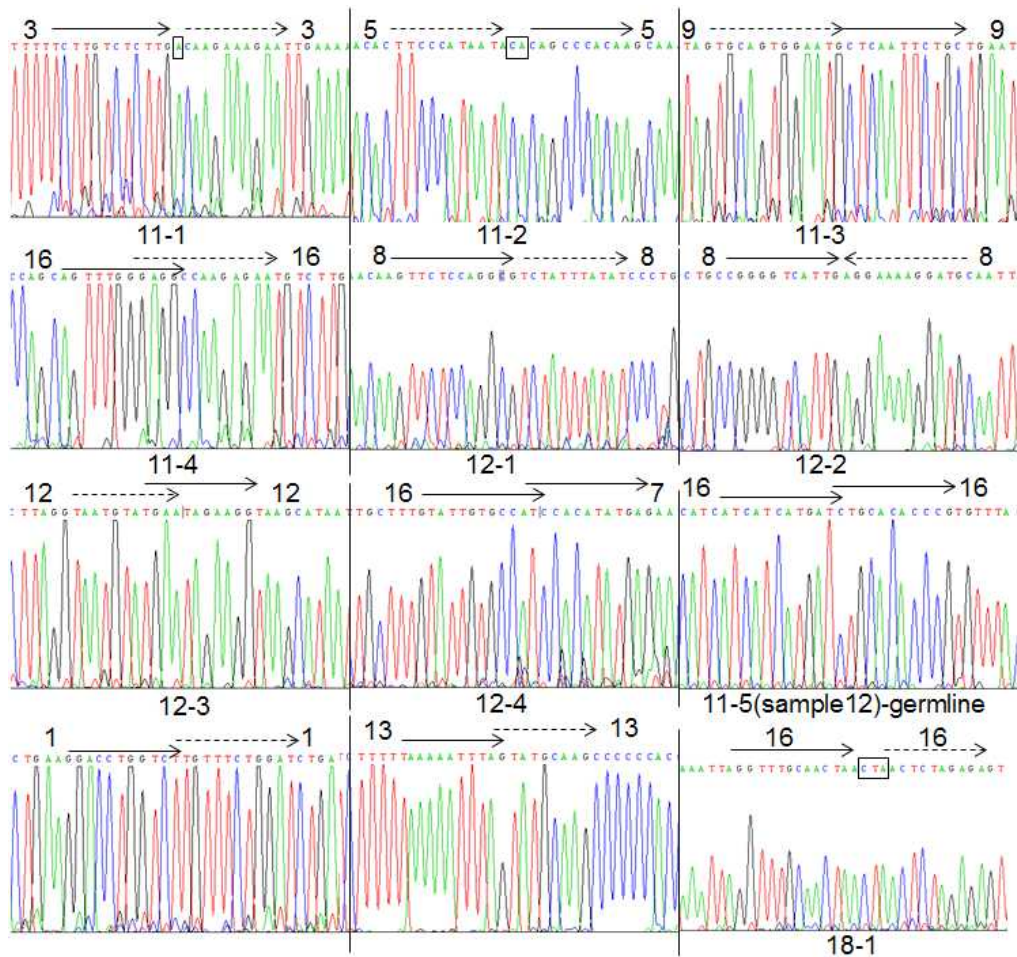


그림 11. 암특이 재배열서열의 염기서열 결정결과. 19개 암특이 재배열 서열에서 염기서열을 결정 하였으며, 모든 19개 PCR product에서 재배열된 서열을 확인할 수 있었다. 그림에서 화살표 옆의 수는 서열이 존재하는 염색체 number 나타내며, 염색체는 동일 염색체에서 재배열이 일어나거나 서로 다른 염색체에서 재배열이 일어났다는 것을 알 수 있다. 시료 11-5의 경우는 암조직 뿐 아니라 정상조직에서도 PCR product를 얻을 수 있었고, 이는 정상적으로 존재하는 재배열 혹은 variant라는 것을 알 수 있다.

© 이상과 같은 재배열의 결과를 모두 종합하여 정리하면 표 2와 같다. 그리고 이상과 같은 결과는 올해 PLoS ONE에 논문으로 출간하였다.

표 2. TNGS-CNB방법으로 확인된 재배열된 서열들.

Sample	ID	Copy-number breakpoint region		TNGS				Predicted cDNA	Amplified in tumor	Amplified in normal
		Chr. <sup>1</sup>	Position (in nucleotides)	Read end 1		Read end 2				
				Chr. <sup>1</sup>	Position	Chr. <sup>1</sup>	Position			
C1	C1-1	1	32620989-32670780	1	Intergenic DNA	1	C1orf86 intron	Exon 1-7 deletion of C1orf86	Y	
	C1-2	13	72372766-72444211	13	DACH1 intron	13	DACH1 intron	Partial exon 1 and exon 2-3 deletion of DACH1	Y	
C2	C2-1	16	6700639-6746495	16	RBFOX1 intron	16	RBFOX1 intron	Exon 3 deletion of RBFOX1	Y	
	C2-2	16	6911049-6926992	16	RBFOX1 intron	16	RBFOX1 intron	Exon 3 deletion of RBFOX1	Y	
C3	C3-1	1	79458097-79521105	1	Intergenic DNA	1	Intergenic DNA		Y	
	C3-2	1	80719519-80758711	1	Intergenic DNA	2	ANXA4 intron	Exon 2-13 deletion of ANXA4	Y	
C4	C4-1	5	3764835-3856153	5	Intergenic DNA	5	Intergenic DNA		Y	
	C4-2	7	54247350-54264207	7	Intergenic DNA	7	FKBP9L intron		Y	Y <sup>2</sup>
C5	C5-1	8	38120026-38193268	8	WHSC1L1 intron	17	Intergenic DNA	Exon 1-12 deletion of WHSC1L1	Y	
	C5-2	16	5776180-5863513	16	Intergenic DNA	16	RBFOX1 intron	Exon 1 deletion of RBFOX1	Y	
C6	C6-2			16	RBFOX1 intron	16	RBFOX1 intron		N	
	C6-3	16 <sup>3</sup>	6455807-6569122	16	RBFOX1 intron	16	RBFOX1 intron	Exon 3 deletion of RBFOX1	Y	
C7 <sup>4</sup>	C7-1	3	60448421-60459041	3	FHIT intron	3	FHIT intron	Exon 5 deletion of FHIT	Y	
	C7-2	5	27040172-27058600	5	Intergenic DNA	5	Intergenic DNA		Y	
	C7-3	9	121112114-121136985	9	Intergenic DNA	9	ASTN2 intron	Exon 4-22 deletion of ASTN2	Y	
	C7-4	16	83284155-83293878	16	CDH13 intron	16	CDH13 intron	Exon 3-5 deletion of CDH13	Y	
C8 <sup>4</sup>	C8-1	16	6700639-6746495	16	RBFOX1 intron	16	RBFOX1 intron	No deletion of RBFOX1	Y	
	C8-2	8	128601683-128606353	8	Intergenic DNA	8	Intergenic DNA		Y	
	C8-3	8	129746645-129857169	8	Intergenic DNA	8	Intergenic DNA		Y	
	C8-4	12	27552182-27572094	12	ARNTL2 intron	12	Intergenic DNA	Exon 15-17 deletion of ARNTL2	Y	
	C8-5	16	82855099-82866517	16	CDH13 intron	7	Intergenic DNA		Y	Y <sup>2</sup>
	C8-6	22	31618708-31645509	22	LIMK2 intron	22	PRR14L intron		N	

<sup>1</sup>Chromosome number

<sup>2</sup>Two rearrangements were amplified also in normal samples, indicating that these are constitutive genomic rearrangements.

<sup>3</sup>Two candidate rearrangements were analyzed by next-generation sequencing in the same region as sample C6, but only one was amplified by PCR.

<sup>4</sup>Samples C7 and C8 are the COLO205 and SW620 cancer cell lines, respectively.

ID, identification number

## 5) 위암에서의 재배열 분석

◎ 위암의 재발을 환자 혈액 내 암유래 cfDNA를 모니터링함으로써 환자 재발을 예측하는 individualized medicine에 관한 연구를 진행하기 위하여 위암 동결조직과 수술전과 재발할 때까지의 혈액에서 plasma를 분리하여 시료를 모아야 한다. 이를 위하여 prospective로 제 3기 위암환자들을 대상으로 하는 연구의 IRB 계획서를 작성하여 승인받았다. 또한 승인된 IRB 계획서를 기반으로 위암환자의 동결조직과 수술전과 수술후 plasma를 매달 지속적으로 수집하고 있다.

◎ 위암 연구과에서 cfDNA의 임상적의의에 대해 연구하고자 이미 100여명의 환자들에서 수술전과 수술 후 매달 plasma를 분리하여 보관하고 있었다. 이들 중 20여명의 환자에서 재발할 때까지 plasma가 보관되어 있는 것을 확인하고, 이들 시료를 이용하고자 위 IRB계획서에 동시에 사용승인을 신청하였고, 승인된 IRB 계획서를 기반으로 국립암센터 중앙은행에 동결 위암조직을 신청하여 분양받았다.

◎ 위암에서의 재배열 분석을 위하여 동결위암조직에서 DNA를 분리하여야 한다. 이 과정에서 분

자적 분석의 신뢰성을 높이기 위하여 동결위암조직에서의 위암세포 percentage를 결정하는 것이 중요하다. 보통 TCGA에서는 위암세포의 percentage를 60%이상으로 정하고 있다. 따라서 위암조직에서 위암세포의 proportion을 결정하기 위하여 H&E 염색을 시행하여 관찰하였는데, 일부 조직을 제외하고 대부분의 조직에서 위암세포의 percentage가 50%에 훨씬 미치지 못하였고, 몇 조직은 5% 이하였다. 이 조직들을 macrodissection을 시행한다고 하여도 60%이상의 위암세포 percentage를 얻는 것은 일부 조직에서만 가능할 것으로 판단하였다.

◎ 위암에서의 tumor percentage에 관한 문제는 실험 design할 때 어느정도의 문제가 있을 것으로 예상은 했지만, 우리가 전혀 고려하지 못했던 문제였다. 이와 같은 문제를 해결하고자 microdissection을 시행하였다. 여러 가지 microdissector들을 사용하여 시행하였는데, 그 중 하나가 microdissection시 암세포를 분명하게 구별할 수 있었으며, microdissection으로 암세포를 순수하게 분리할 수 있었다. 그림 12는 microdissection을 시행한 한 예로, inflammation이 많고 군데 군데 암세포들이 모여 있어서 macrodissection으로는 암세포의 percentage를 높일 수 없는데, microdissection으로 이 문제를 해결할 수 있었다.

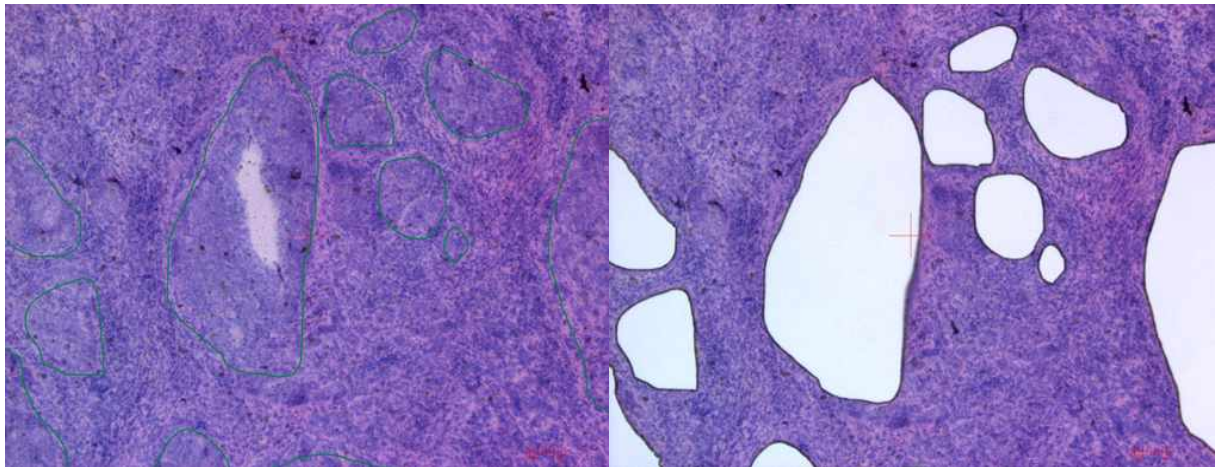


그림 12. 위암조직에서의 microdissection. 왼쪽 그림은 microdissection하기 이전의 위암조직이고, 녹색으로 표시된 부분이 암세포가 모여있는 부분이다. 이부분만을 microdissection하여 tube에 모았다. 오른쪽 그림은 microdissection한 암세포들이 떨어져 나가고 나머지 inflammation과 정상조직 부분이 남아 있음을 보여주고 있다.

◎ 이와 같이 microdissection을 시행하는데, 암세포 여부를 판단하기 위하여 H&E염색을 시행하였다. 따라서 이렇게 H&E염색과 microdissection 과정을 거쳐서 얻은 DNA의 quality에 변화가 없는지를 check하기 위하여 microdissection한 조각들에서 DNA를 분리하고 전기영동을 시행하여 DNA fragment size를 확인하였는데, 냉동 위암조직에서 microtome으로 얇게 조직을 자른 후 곧바로 분리한 DNA와 비교하여 1% agarose gel electrophoresis에서 별 차이가 없다는 것을 확인하였다 (그림 13). 따라서 microdissection으로 얻은 DNA를 암조직에서의 재배열을 분석하는데 이용할 수 있다고 판단하였다.

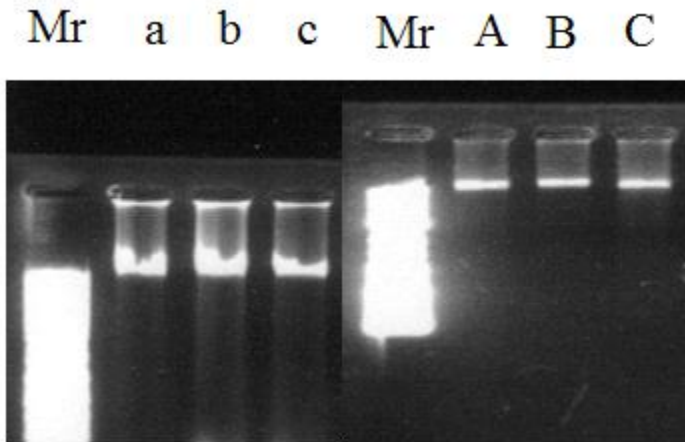


그림 13. 위암 조직의 microdissection 후 DNA quality 점검. 동결조직을 microtome으로 얇게 잘라서 분리한 DNA (A, B, C)와 H&E염색 후 microdissection을 통하여 분리한 DNA (a, b, c)의 quality를 1% agarose gel electrophoresis를 하여 확인하였다. Mr, 100 bp ladder DNA marker.

◎ 그런데 위암조직의 microdissection을 통하여 얻은 DNA양이 원래 계획이었던 TNGS-CNB방법을 사용하기에는 너무 부족하였다. 이를 위해서는 조직은행에서 얻은 동결조직보다 훨씬 많은 양의 조직이 필요한 경우가 많았고, microdissection을 훨씬 많은 section에서 시행해야만 하였다. 따라서 TNGS-CNB보다는 whole genome NGS로 분석하는 것이 현실적이라고 판단하였다. Whole genome NGS로 분석하면 비용은 많이 소모되고 bioinformatics분석 시간이 많이 소요된다는 단점이 있지만, copy number 변화와 mutation에 대한 정보를 한꺼번에 얻을 수 있다는 장점이 있다. 이와 같은 판단에 따라 whole genome NGS를 하는 쪽으로 결정하고 microdissection한 10 case의 위암시료와 대응되는 정상 위조직 10개, 총 20개의 시료에 대해 whole genome NGS를 분석하였다.

◎ Bioinformatics 분석결과를 정리하였는데, 같이 분석한 normal에 비교하여 cancer에 변화되어 있는 분자적 변이들을 정리하면 표 3과 같다.

◎ 정상과 암세포의 비교를 통하여 분자적변화들을 추정된 자료로부터 rearranged sequence를 찾는 것이 목표인데, 우선 translocation과 inversion이라고 표시된 부분들에서 rearranged sequence를 찾을 수 있을 것으로 예상된다. 따라서 이 부위에서 rearranged sequence가 어떻게 되어 있는지를 sequencing data를 직접 보면서 확인하는 작업을 하고 있다. 이 작업으로부터 한 시료당 5개의 rearranged sequence들을 선별하고, 이 부위에 대한 암조직 특이성을 증명하고자 PCR primer들을 design하고 PCR을 시행할 계획이다.



표 3. 위암조직의 whole genome NGS를 분석하여 얻은 암세포에서의 분자적 변화

Order no.	Sample ID	SNPs	Small insertions	Small deletions	Copy number gains	Copy number losses	Duplications	Insertions	Deletions	Inversions	Translocations
1408AHX-0001	N1_C1	11,685	277	246	128	4	27	2	72	60	96
1408AHX-0001	N2_C2	3,399	1	5	52	4	6	-	37	3	-
1408AHX-0001	N3_C3	14,816	242	271	72	8	39	3	234	8	-
1408AHX-0001	N4_C4	17,723	350	567	354	21	169	2	136	79	94
1408AHX-0001	N5_C5	6,398	116	123	34	5	2	1	36	-	4
1408AHX-0001	N6_C6	14,819	328	256	100	4	25	2	58	38	6
1408AHX-0001	N7_C7	109,027	11,162	49,614	6	14	10	4	64	1	10
1408AHX-0001	N8_C8	9,212	177	215	156	26	62	2	633	31	16
1408AHX-0001	N9_C9	2,792	48	70	13	21	13	-	44	27	16
1408AHX-0001	N10_C10	836,066	15,820	22,001	142	5	108	158	665	57	62

#### 6) 카피수에 따른 위암 분류를 위한 카피수 분석방법의 확립

◎ 카피수의 증가는 증가된 유전자 억제제 민감성과 관련이 있다는 보고들이 있다. 최근 위암에서 억제 표적 유전자 5가지가 증폭되어 있다는 것이 보고되었는데, 이는 위암에서 copy number status를 측정하면 위암을 항암제 민감성을 판단하는 근거가 된다는 의미에서 임상적으로 중요한 의의를 갖고 있다고 하겠다. 본 연구에서도 유전자의 카피수변화에 따른 위암의 분류가 가능한 지 여부를 확인하기 위하여, 최근 암의 주요 표적이 되는 유전자 24개에 대해 카피수 변화 측정할 수 있는 mrcPCR 방법을 확립하였고, NCI-60 세포주에서 측정하여 그 결과가 다른 QPCR 혹은 microarray에서의 결과와 유사하다는 것을 확인하였다 (그림 14).

◎ 표 4에 표적 유전자 24개의 list와 항암제 개발현황에 대해 정리하였다. 이들 중에는 현재 임상에 사용되는 항암제도 있지만 현재 개발중이거나 임상에 들어가 있는 항암제들이 포함되어 있다. 향후 이들 24개 표적유전자에 대한 표적항암제가 훨씬 더 많이 개발될 예정이고, 이들의 사용에 있어서 표적유전자의 증폭상태를 측정하는 것은 환자의 항암제 민감성에 대한 지표가 될 수 있으므로 위암환자의 치료에 도움이 될 것으로 기대할 수 있다.

표 4. 항암표적유전자 24개와 현재 사용 중이거나 개발단계의 항암제 list

Gene	Chromosomal location	Drug	Ref
RAF1	3p25	*PLX4720 <sup>c</sup> , AZ628 <sup>c</sup> , SB590885 <sup>c</sup>	1, 2
PIK3CA	3q26.32	NVP-BEZ235 <sup>b</sup> , GDC0941 <sup>b</sup>	1
KIT	4q11-q12	Sorafenib <sup>a</sup> , Sunitinib <sup>a</sup>	1
KDR	4q11-q12	Sorafenib <sup>a</sup> , Sunitinib <sup>a</sup>	1
PDGFRA	4q11-q13	Imatinib <sup>a</sup> , *Sorafenib <sup>a</sup>	1
hTERT	5p15.33	BIBR1532 <sup>c</sup>	3
PDGFRB	5q31-q32	Sorafenib <sup>a</sup> , Sunitinib <sup>a</sup>	1
EGFR	7p12	*Gefitinib <sup>a</sup> , Erlotinib <sup>a</sup>	1
ABCB1	7q21.12	*CP100356 <sup>c</sup>	4
MET	7q31.2	*PHA-665752 <sup>c</sup> , PF-02341066 <sup>b</sup>	1
FGFR1	8p11.2-p11.1	*PD-173074 <sup>c</sup>	1
PTK2	8q24.3	*FAK Inhibitor 14 <sup>c</sup> , PF-00562271 <sup>b</sup> , PF-00562271 <sup>b</sup> , PF-04554878 <sup>b</sup> , GSK2256098 <sup>b</sup>	1, 5-8
MYC	8q24.12-q24.13	c-Myc Inhibitor I, *c-Myc Inhibitor II	9, 10
ERBB3	12q13.2	AV-203 <sup>c</sup>	11
Akt1	14q32.33	MK-2206 <sup>b</sup> , A-443654 <sup>c</sup> , AKT inhibitor VIII <sup>b</sup>	1
MAP2K1	15q22.1-q22.33	PD-0325901 <sup>b</sup> , RDEA119 <sup>b</sup> , CI-1040 <sup>b</sup> , AZD6244 <sup>b</sup>	1
IGF1R	15q26.3	BMS-536924 <sup>c</sup> , BMS-754807 <sup>b</sup> , *Podophyllotoxin <sup>c</sup>	1, 12
MRP1	16p13.11	Reversan <sup>c</sup>	13
AURKB	17p13.1	ZM-447439 <sup>c</sup>	1
ERBB2	17q11.2-q12	Lapatinib <sup>a</sup> , TAK165 <sup>c</sup> , ERBB2 inhibitor II <sup>c</sup> , *AG825 <sup>c</sup>	1,
TOP2A	17q21.2	Doxorubicin <sup>d</sup> , Etoposide <sup>d</sup>	1,
MAP2K2	19p13.3	*PD-0325901 <sup>b</sup> , RDEA119 <sup>b</sup> , CI-1040 <sup>b</sup> , AZD6244 <sup>b</sup>	1
AURKA	20q13.2-q13.3	VX-680 <sup>b</sup>	1
TP63**	3q28		14

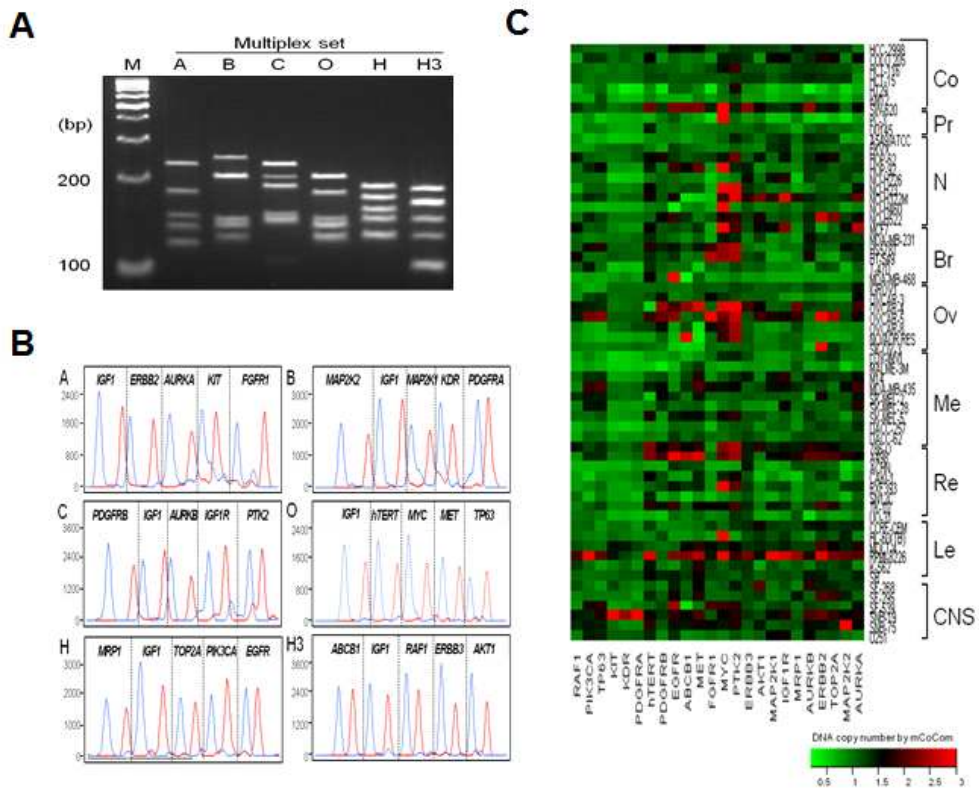


그림 14. 24개 유전자에 대한 mrcPCR방법의 확립과 60개 세포주에서 유전자 카피수를 측정 한 결



과. A. mrcPCR을 위한 24개 유전자의 multiplex PCR결과. A-H3까지 총 6 set의 PCR로 24개 유전자의 카피수 측정. B. mrcPCR과정에서 single base extension후 결과. C. 결과를 분석하여 유전자의 카피수를 색으로 표시한 그림.

### 7) CKAP2 조직면역화학염색을 통한 CKAP2 위암조직 발현과 생존과의 상관관계

◎ 본 연구는 제1 세부과제에서 진행하기로 하였는데, 제 1세부과제에서 계획했던 100개의 조직 대신 400개 이상의 위암조직에 대한 조직면역화학염색으로 확대하여 제 2세부과제에서 진행하기로 하였으며, 이에 필요한 IRB 계획서를 작성하여 국립암센터 IRB의 승인을 받았다.

◎ 약 500개의 조직으로 제작한 tissue microarray에서 CKAP2 항체를 이용하여 IHC염색을 시행하였다. 그림 15와 같은 결과를 얻을 수 있다. 이러한 결과에서 CKAP2 양성인 세포의 수가 위암환자의 생존과 관련성이 있는 지 여부를 분석하였다.

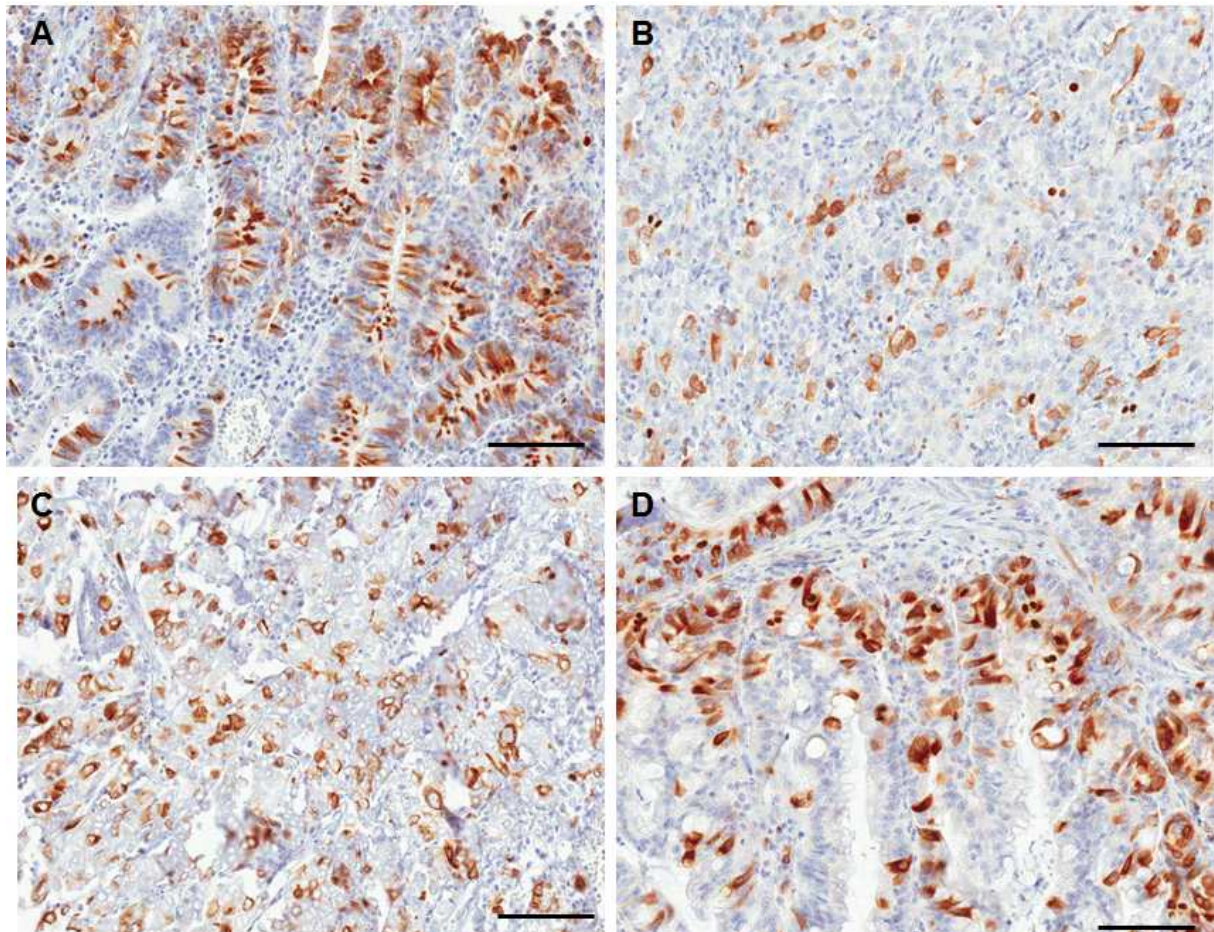


그림 15. CKAP2 immunohistochemical staining of gastric cancer tissues. The chromatin CKAP2-positive cell numbers were clearly shown among the various gastric cancer types: well differentiated adenocarcinoma (A, intestinal type), poorly differentiated adenocarcinoma (B, diffuse type), signet-ring cell carcinoma (C, diffuse type), and mucinous adenocarcinoma (D, mixed type). Each bar represents

100  $\mu$ m.

© CKAP2의 IHC를 분석하여 나온 CPCC (CKAP2 positive cell count)를 분석하였다. 60%이상의 암이 있는 TMA core 437예에 대하여 임상적인 특징과의 관련성을 조사하였는데, 그 결과는 표 5와 같았다.

표 5. Correlation between CPCC and clinicopathologic characteristics of 437 gastric cancer patients.

Variable <sup>⊖</sup>	Group <sup>⊖</sup>	N <sup>⊖</sup>	median CPCC <sup>⊖</sup> (quartile range) <sup>⊖</sup>	P <sup>†</sup> <sup>⊖</sup>
Gender <sup>⊖</sup>	Male <sup>⊖</sup>	301 <sup>⊖</sup>	12 (6, 21) <sup>⊖</sup>	<sup>⊖</sup>
	Female <sup>⊖</sup>	136 <sup>⊖</sup>	8 (2, 17) <sup>⊖</sup>	<b>0.002</b> <sup>⊖</sup>
Age <sup>⊖</sup>	<50 <sup>⊖</sup>	119 <sup>⊖</sup>	8 (2, 17) <sup>⊖</sup>	<sup>⊖</sup>
	50-59 <sup>⊖</sup>	123 <sup>⊖</sup>	13 (5.5, 20) <sup>⊖</sup>	<b>0.003</b> <sup>⊖</sup>
	60-69 <sup>⊖</sup>	146 <sup>⊖</sup>	11 (5, 20.8) <sup>⊖</sup>	<b>0.009</b> <sup>⊖</sup>
	≥70 <sup>⊖</sup>	49 <sup>⊖</sup>	11 (5, 23) <sup>⊖</sup>	<b>0.011</b> <sup>⊖</sup>
Histologic Type <sup>⊖</sup> (WHO) <sup>††</sup> <sup>⊖</sup>	WD or MD <sup>⊖</sup>	166 <sup>⊖</sup>	13 (6, 21.8) <sup>⊖</sup>	<sup>⊖</sup>
	PD <sup>⊖</sup>	178 <sup>⊖</sup>	10 (4, 18.8) <sup>⊖</sup>	0.071 <sup>⊖</sup>
	SRC <sup>⊖</sup>	68 <sup>⊖</sup>	5.5 (2, 12) <sup>⊖</sup>	<b>&lt; 0.001</b> <sup>⊖</sup>
	Others <sup>⊖</sup>	25 <sup>⊖</sup>	18 (6.75, 44.75) <sup>⊖</sup>	0.068 <sup>⊖</sup>
Lauren <sup>⊖</sup> Classification <sup>†††</sup> <sup>⊖</sup>	Intestinal <sup>⊖</sup>	207 <sup>⊖</sup>	12 (6, 21) <sup>⊖</sup>	<sup>⊖</sup>
	Diffuse <sup>⊖</sup>	151 <sup>⊖</sup>	6 (2, 14.8) <sup>⊖</sup>	<b>&lt; 0.001</b> <sup>⊖</sup>
	Mixed <sup>⊖</sup>	36 <sup>⊖</sup>	10 (5, 19.8) <sup>⊖</sup>	0.343 <sup>⊖</sup>
	Unknown <sup>⊖</sup>	43 <sup>⊖</sup>	14.5 (9.3, 32.5) <sup>⊖</sup>	<b>0.010</b> <sup>⊖</sup>
Depth of Invasion <sup>‡</sup> <sup>⊖</sup>	T1 <sup>⊖</sup>	183 <sup>⊖</sup>	9 (3.5, 17) <sup>⊖</sup>	<sup>⊖</sup>
	T2 <sup>⊖</sup>	44 <sup>⊖</sup>	15 (4, 28) <sup>⊖</sup>	<b>0.035</b> <sup>⊖</sup>
	T3 <sup>⊖</sup>	83 <sup>⊖</sup>	11 (5, 18) <sup>⊖</sup>	0.200 <sup>⊖</sup>
	T4 <sup>⊖</sup>	127 <sup>⊖</sup>	12 (6, 22) <sup>⊖</sup>	<b>0.038</b> <sup>⊖</sup>
LN Metastasis <sup>‡</sup> <sup>⊖</sup>	N0 <sup>⊖</sup>	219 <sup>⊖</sup>	10 (4, 18.5) <sup>⊖</sup>	<sup>⊖</sup>
	N1 <sup>⊖</sup>	50 <sup>⊖</sup>	12.5 (6, 22) <sup>⊖</sup>	0.351 <sup>⊖</sup>
	N2 <sup>⊖</sup>	58 <sup>⊖</sup>	11 (5, 17) <sup>⊖</sup>	0.586 <sup>⊖</sup>
	N3 <sup>⊖</sup>	110 <sup>⊖</sup>	11 (5, 23.5) <sup>⊖</sup>	0.340 <sup>⊖</sup>
Metastasis <sup>⊖</sup>	No <sup>⊖</sup>	411 <sup>⊖</sup>	11 (4, 20) <sup>⊖</sup>	<sup>⊖</sup>
	Yes <sup>⊖</sup>	26 <sup>⊖</sup>	8.5 (6, 14.5) <sup>⊖</sup>	0.840 <sup>⊖</sup>
Tumor Location <sup>‡‡</sup> <sup>⊖</sup>	Middle <sup>⊖</sup>	81 <sup>⊖</sup>	8 (4, 17) <sup>⊖</sup>	<sup>⊖</sup>
	Upper <sup>⊖</sup>	53 <sup>⊖</sup>	9 (2, 16) <sup>⊖</sup>	0.624 <sup>⊖</sup>
	Lower <sup>⊖</sup>	263 <sup>⊖</sup>	11 (5, 21) <sup>⊖</sup>	0.050 <sup>⊖</sup>
	Overlapping <sup>⊖</sup>	40 <sup>⊖</sup>	13 (4.8, 22) <sup>⊖</sup>	0.153 <sup>⊖</sup>
Tumor Size <sup>⊖</sup>	1 (< 3.0 cm) <sup>⊖</sup>	99 <sup>⊖</sup>	10 (3, 18) <sup>⊖</sup>	<sup>⊖</sup>
	2 (3.0 <, ≤ 5.0 cm) <sup>⊖</sup>	144 <sup>⊖</sup>	10 (5, 8) <sup>⊖</sup>	0.473 <sup>⊖</sup>
	3 (5.0 <, ≤ 7.0 cm) <sup>⊖</sup>	90 <sup>⊖</sup>	13 (5, 21) <sup>⊖</sup>	0.142 <sup>⊖</sup>
	4 (> 7.0 cm) <sup>⊖</sup>	109 <sup>⊖</sup>	11 (5, 24) <sup>⊖</sup>	0.109 <sup>⊖</sup>
Adjuvant Chemotherapy <sup>⊖</sup>	No <sup>⊖</sup>	207 <sup>⊖</sup>	10 (4, 18) <sup>⊖</sup>	<sup>⊖</sup>
	Yes <sup>⊖</sup>	230 <sup>⊖</sup>	11.5 (5, 22) <sup>⊖</sup>	0.065 <sup>⊖</sup>

© 분석한 환자들에서 CPCC와 생존과의 관련성을 분석하였는데, 전체 위암환자에서는 그림 16A와 같이 CPCC와의 관련성이 없었는데, 남자 환자 중 T1과 T2 stage의 암에서 생존과 유의성을 보였다. 그러나 다른 환자들에서는 유의성을 보이지 않았다. 현재 이들에 대한 multivariate analysis 등 나머지 분석을 계속하고 있다.



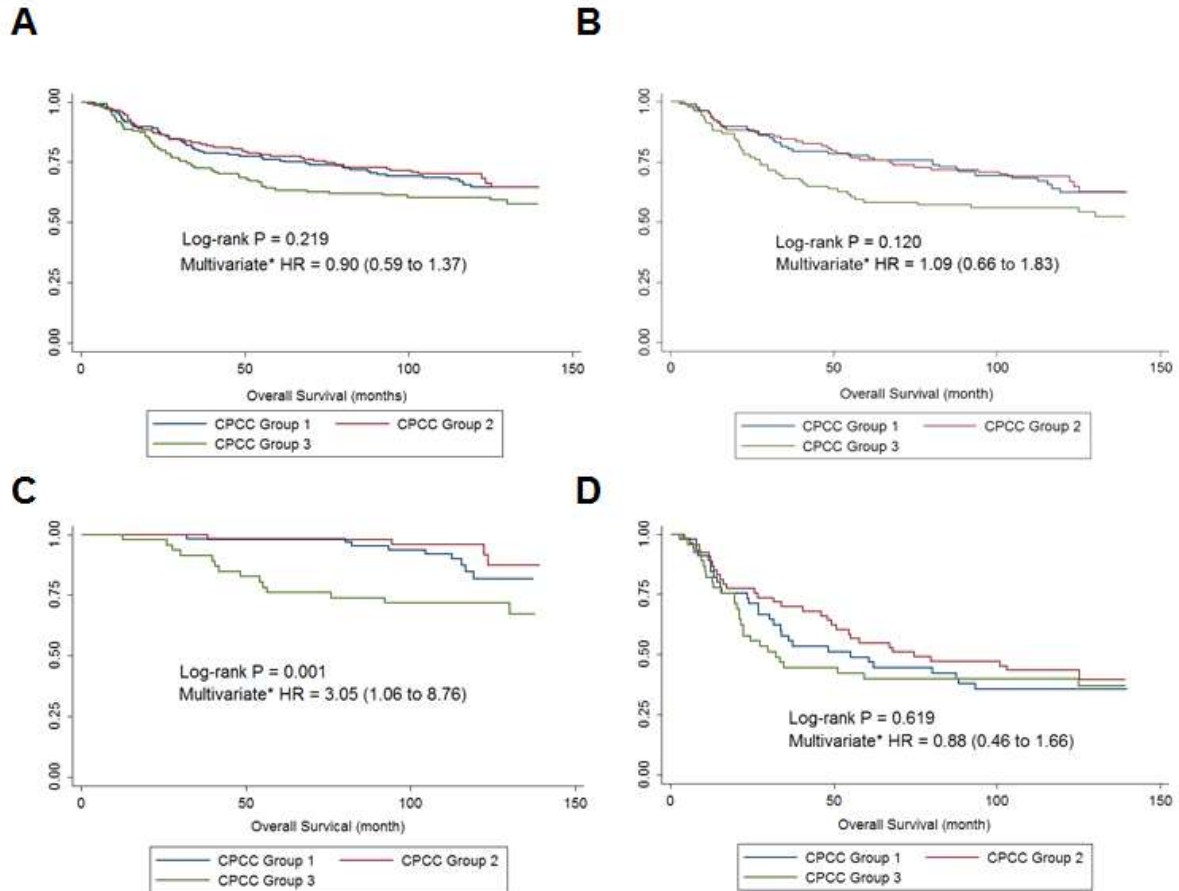


그림 16. Correlation of CPCC with OS. A Kaplan–Meier plots of the CPCCs for the total (A), male (B), T1 or T2 male (C), and T3 or T4 male (D) of gastric cancer cases are shown. The  $P$  values were determined by log–rank test. The HRs and 95% CIs of CPCC group 3 compared with CPCC group 1 by multivariate analyses are shown. CPCC, chromatin CKAP2–positive cell count; X–axis, OS in months; Y–axis, survival probability.

© 이상과 같은 결과는 적어도 일부의 위암환자에서는 암세포 성장속도가 예후와 관련이 있을 수 있어서 이미 유방암에서 진행되어 잘 알려져 있는 암세포 성장속도에 따른 항암제 민감성에 대한 연구들이 필요할 것이라는 것을 시사하는 결과라 할 수 있다.

### 3. 연구결과 고찰 및 결론

- 국내·외 관련분야의 기술개발 현황과 연구결과가 국내·외 기술개발 분야에서 차지하는 위치 등을 기술
- 연구결과 해석 및 다른 결과와의 비교분석 등에 대해 고찰하고 결론을 서술함

#### 1. TNGS-CNB와 whole genome NGS방법을 이용한 암조직에서의 재배열 분석방법의 확립

◎ TNGS-CNB는 copy number를 cSNP microarray 방법으로 분석하고, 이로부터 copy number breakpoint 정보를 얻은 다음, 이들 부위를 capture하는 array를 제작하여 targeted NGS를 시행하는 과정을 거친다. 초기 copy number breakpoint 정보를 얼마나 정확하게 얻을 수 있는지가 이 방법의 가장 중요한 과정이라고 할 수 있는데, 이 과정에서 본 연구자들이 새로이 개발한 cSNP microarray를 이용함으로써 정확한 CNB들의 정보를 알 수 있었고, 이로부터 암조직의 재조합 서열을 알아낼 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 TNGS-CNB 방법은 특히 재조합서열이 비교적 빈번하게 일어나는 부위의 정보를 알 수 있다면 미리 capture array를 제작하여 이들 부위만 targeted NGS를 시행한다면 재조합 서열정보를 빠르고 간편하게 얻을 수 있는 방법이라 할 수 있다.

◎ 본 예비연구에서는 위암에서 이와 같은 방법으로 재배열 서열분석을 하고자 하였는데, 위암조직에 inflammatory cell의 침윤이나 정상조직과 혼재해 있어서 단순한 macrodissection만으로는 암세포를 순수하게 분리하는 과정이 불가능하다는 것을 알고, laser microdissection을 시행하게 되었다. 암세포를 laser microdissection의 과정을 거쳐서 분리하게 되면 암조직에서 DNA를 얻는 속도가 현저히 늦어져서 결국 시간내에 얻을 수 있는 DNA의 양이 제한적일 수 밖에 없었다. 따라서 분석하는데 비교적 적은양의 DNA를 필요로하는 whole genome NGS방법을 사용하게 되었다. 비록 본 예비연구에서 TNGS-CNB 방법을 사용하지 못하였지만, targeted NGS 기술이 더 발달하면 적은양의 DNA로도 효과적으로 결과를 얻을 수 있는 방법들이 개발될 것으로 여겨진다. 하지만 현재는 많은 연구비가 whole genome NGS로 집중되어 targeted NGS에 대한 시장의 필요성이 커지지 않는다면 기술개발이 더딜 가능성이 있다고 하겠다.

◎ 따라서 현재 위암조직에서의 재배열 서열 정보를 알아내는 방법은 laser microdissection을 통해서 진행해야하는 단점 때문에, whole genome NGS 방법을 이용하는 것이 현실적인 대안이라고 할 수 있다. 또한 copy number breakpoint들 만으로 알 수 없는 copy number neutral translocation과 inversion과 같은 정보들이 같이 있어서, TNGS-CNB에서 얻을 수 없는 재배열 서열을 얻을 수 있는 장점도 있었다. 그러나 whole genome NGS의 결과에서 곧바로 재배열 서열을 정확히 알 수 없는 단점이 있어서, 이 재배열 부위를 PCR로 확인하고 염기서열을 결정하는 과정이 더 필요하다.

#### 2. 위암조직에서의 돌연변이 분석방법의 확립

◎ 재조합 이외에도 돌연변이를 이용해서 암유래 cfDNA를 모니터링할 수 있다는 proof of concept논문이 발표된 바 있다. 따라서 본 연구에서 이 두가지 모두를 이용하여 암유래 cfDNA의 모니터링을 시도하고자 하였으며, 제 2세부과제에서 이 연구를 하기로 계획하였다.

◎ 그런데 재배열 서열분석 방법으로 whole genome NGS를 사용하게 됨에 따라서 돌연변이를 다른 방법으로 확인하지 않아도 그 정보를 곧바로 얻을 수 있기 때문에 whole genome NGS 방법에서 나온 결

과를 이용하기로 하였다. 또한 whole genome NGS를 분석하는데, 암조직과 동시에 정상 위조직의 DNA도 한꺼번에 분석해야 하는 등의 문제로 비용이 훨씬 더 많이 소요되어 따라 돌연변이만을 분석하는 방법을 이용하지 못한 이유도 있었다.

◎ 그러나 이미 잘 알고 있듯이 whole genome NGS 방법은 돌연변이를 분석할 수 있는 좋은 방법이며 본 예비연구에서도 많은 돌연변이들을 확인할 수 있었다.

### 3. 카피수에 따른 위암분류를 위해 mrcPCR방법의 확립

◎ 이전의 1단계 연구에서 카피수변화를 민감하게 측정할 수 있는 방법으로 mrcPCR방법을 확립하였는데, 이 방법을 NCI-60 cell line에도 적용하여 이 방법의 유용성을 증명한 바 있다. 현재 이 방법을 위암조직에서 얻은 DNA를 이용하여 24개 유전자의 카피수를 측정하는 연구가 진행중에 있다. 이 mrcPCR방법은 간단하고 적은 비용으로 automatic sequencer가 있는 실험실이면 어디에서든지 쉽게 사용할 수 있다는 장점이 있어서, 임상에 적용하기에 좋은 방법이 될 것으로 기대하고 있다.

### 4. 위암에서 CKAP2 발현과 생존과의 관련성 분석

◎ 위암에서 CKAP2 발현의 조건을 확립하고 100개 위암 시료에서 발현에 대한 연구를 계획하였는데, 연구를 진행하는 동안 위암 조직의 수를 500개 정도에서 검증하는 것으로 계획을 수정하였다. 따라서 제 2 세부연구에서 연구를 진행하여, 현재 CKAP2 발현에 대한 예비결과가 나와서 분석을 시행하였는데, 남자 T1과 T2환자에서 생존과 유의한 상관관계가 있다는 것을 확인하였다. 그동안 위암에서 proliferation activity와 예후와의 상관관계에 대해서는 서로 다른 결론이 나와서 혼란스러웠는데, 전체 위암환자군에서는 유의한 차이가 없었고, 일부 위암환자에서만 유의한 상관관계가 있어서 이러한 혼란이 있었을 것으로 추정할 수 있다. 이러한 결과는 남자 T1과 T2환자에서는 CKAP2발현이 높은 혹은 proliferation activity가 높은 환자의 경우 예후가 나쁘다는 것을 의미하며, 이러한 환자들에서 수술 후 chemotherapy를 시행한다면 생존율을 높일 수 있는 가능성이 있어서, 향후 임상적인 연구를 촉발할 수 있다는 의의가 있다고 하겠다.

## 4. 연구성과 및 목표달성도

### (1) 연구성과

- 과제시작시점부터 과제종료시점까지의 연구성과(학술지 게재, 학회발표, 학위논문, 산업재산권 출원·등록, 워크숍 또는 심포지움 개최, 전시회 참가, 임상응용, 기술성과 이전, 벤처 창업 등의 실적)를 기재하되, 본 과제와 관련성이 있는 성과에 한하여 기재
- ※ 논문, 특허성과는 과제 시작시점 이후 게재 신청 또는 출원된 실적만 기재.
- 다만, 후속과제의 경우는 예외

### 가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자	저널명(IF.)	Year;	구분 <sup>2)</sup>	지원과제번호 <sup>3)</sup>
-----	----	----------	-------	------------------	----------------------

	(저자구분)		Vol(No):Page		
Targeted next-generation sequencing at copy-number breakpoints for personalized analysis of rearranged ends in solid tumors	홍경만 (교신)	PLoS One (3.534)	2014; 9(6):e100089~e100089	국외 SCIE	1110130
Chromatin CKAP2, a New Proliferation Marker, as Independent Prognostic Indicator in Breast Cancer:	홍경만 (교신)	PLoS One (3.534)	2014; 9(6):e98160~e98160	국외 SCIE	1410050
Association of Polymorphisms and Haplotypes in the Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor (IGF1R) Gene with the Risk of Breast Cancer in Korean Women	홍경만 (공동)	PLoS One (3.534)	2014; 9(1):e84532~e84532	국외 SCIE	없음
Down-regulation of lipid raft-associated onco-proteins via cholesterol-dependent lipid raft internalization in docosahexaenoic acid-induced apoptosis	홍경만 (교신)	Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids. (4.495)	2014; 1841(1):190~203 (4.495)	국외 SCI	없음

논문명	저자 (저자구분)	저널명(I.F.)	Year; Vol(No):Page	구분 <sup>2)</sup>	지원과제번호 <sup>3)</sup>
Characteristics of gastric cancer according to Helicobacter pylori infection status	김영우	J Gastroenterol Hepatol.(3.627)	2014;29(9):1671~1677	국외 SCI	
Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ upregulates galectin-9 and predicts prognosis in intestinal-type gastric cancer	김영우	Int J Cancer (3.534)	2014;Online published	국외 SCI	
Unique patterns and proper management of postgastrectomy bleeding in patients with gastric cancer	김영우	Surgery (3.105)	2014;155(6):1023~1029	국외 SCI	
The association between Helicobacter pylori status and incidence of metachronous gastric cancer after endoscopic resection of early gastric cancer	김영우	Helicobacter. (2.993)	2014; 19(3):194~201	국외 SCI	
The association of self-leadership, health behaviors, and posttraumatic growth with health-related quality of life in patients with cancer	김영우	PSYCHO-ONCOLOGY (4.044)	2014;3582:3582~3582	국외 SCIE	
4-1BB-based isolation and expansion of CD8 <sup>+</sup> T cells specific for self-tumor and non-self-tumor antigens for adoptive T-cell therapy	김영우	Journal of Immunotherapy (3.354)	2014;37:225~236	국외 SCI	
Health-Related Quality of Life After Robot-Assisted Distal Gastrectomy in Early Gastric Cancer	김영우	World Journal of Surgery (2.348)	2014;38(5):1112~1120	국외 SCI	
Genomic profile analysis of diffuse-type gastric cancers	김영우	Genome Biology(10.465)	2014;15(4):R55~R55	국외 SCI	
Long-term metformin use reduces gastric cancer risk in type 2 diabetics without insulin treatment: a nationwide cohort study	김영우	Alimentary Pharmacology and Therapeutics(5.	2014;39(8):854~863	국외 SCI	

		478)			
A Body Shape Index Has a Good Correlation with Postoperative Complications in Gastric Cancer Surgery	김영우	Annals of Surgical Oncology(3,943)	2014;21(4):1115~1122	국외 SCI	
Intravenous iron supplementation may be superior to observation in acute isovolemic anemia after gastrectomy for cancer	김영우	World journal of gastroenterology (2,433)	2014;20(7):1852~1857	국외 SCIE	
Suicide ideation in stomach cancer survivors and possible risk factors	김영우	Supportive care in cancer (2,495)	2014;22(2):331~337	국외 SCI	
Clinical significance of intraperitoneal air on computed tomography scan after endoscopic submucosal dissection in patients with gastric neoplasms	김영우	Surgical Endoscopy(3,313)	2014;28(1):307~313	국외 SCI	

- 1) 저자구분 : 교신, 제1, 공동
- 2) 구분 : 국내, 국내 SCI, 국내 SCIE, 국외, 국외SCI, 국외SCIE 등
- 3) 지원과제번호(Acknowledgement)
  - 과제번호를 연차 표시(-1, -2, -3 등)를 생략하고 7자리로 기재하고, 과제와 관련성은 있으나 불가피하게 Acknowledgement가 누락된 경우에는 '없음'으로 기재

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 <sup>1)</sup>	지원과제번호

- 1) 지역 : 국내, 국외

다. 산업재산권

구분 <sup>1)</sup>	특허명	출원인	출원/등록국	출원/등록번호
발명특허	HER 2 양성 개체 진단 방법 및 HER 2 양성 개체 진단용 키트	홍경만 외 1인	등록/대한민국	1448175 (등록번호) 등록일: 2014.09.30
발명특허	Composition for Cancer Prognosis Prediction Comprising Anti-TMAP/CKAP2 Antibodies	홍경만 외 4인	등록결정/미국	13/577,126

- 1) 구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저서

저서명	저자	발행기관(발행국, 도시)	쪽수	Chapter 제목, 쪽수 (공저일 경우)

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용


바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

- 사업목표에 대한 달성내용 및 관련분야 기술발전예의 공헌도 등을 기술
- 달성도(%)는 연차별목표대비 당해연도 달성도 및 최종목표대비 당해연도까지의 누적 달성도를 반드시 기입

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
Automation이 가능하고 결과의 분석이 용이한 장점을 가지고 있는 분자적 진단방법을 개발하고 암환자의 예후 표지자 혹은 치료대상자를 고르는데 predictive marker로서의 가능성에 대해 연구하고자 한다. 본 예비연구는 임상적 용을 위한 방법의 확립을 위해 1년 계획으로 시행할 예정이다.	1차년도	위암동결조직의 H&E 염색 및 암세포 50%이상조직의 DNA 및 RNA추출	위암조직에서 DNA를 추출. macrodissection을 계획하였으나, laser microdissection을 확립하고 이 방법으로 시행함.	90	90
		위암조직 10개에서 TNGS-CNB를 시행하고, rearranged sequence분석	10 개 위암조직과 정상조직의 whole genome NGS를 실시하여 재배열 서열을 분석.		
		위암조직 10개에서 Haloplex technology로 돌연변이 분석	10 개 위암조직과 정상조직의 whole genome NGS를 실시하여 돌연변이를 분석.		
		위암조직에서 23개 유전자의 카피수 분석	24개 유전자의 카피수 분석방법을 확립하였으며, 위암조직에서 진행중임.		
		CKAP2 조직면역화학염색	약 500개 위암조직의 CKAP2 염색 완료		
	2차년도				
	3차년도				

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가

## 5. 연구결과의 활용계획

### (1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

- 연구종료 2년후까지 연구사업 결과로 발생할 것으로 예상되는 성과, 즉 학술지 게재, 산업재산권 등을 단계별로 다음의 양식에 의거하여 작성함. 학술지 게재는 게재 예상 학술지 명과 Impact Factor 등을 기재함
  - 연구사업의 내용이 논문이나 산업재산권과 연결되기 힘든 과제의 경우, 자유 형식으로 예상연구성과 및 활용정도를 기재하되 최대한 계량화할 것
- 예) DB 몇 건 구축완료. OOO 시스템 구축 및 OO사업 완료

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재		게재 예상 전문학술지명, SCI급 학술지인 경우 Impact Factor 기록
산업재산권 등록		특허 등록 예상 국가, 예상 특허명 등
기 타		

### (2) 연구성과의 활용계획

- 연구성과물의 활용분야 및 활용방법, 활용범위 등을 구체적(특히 시간적 구체성, 예를 들어 몇 년 안에 치료기술 실용화 등)으로 기술하되, 참여기업이 포함되어 있는 과제의 경우 기업과 연계한 활용방안에 대해서도 기술함
- 추가 후속연구의 필요성에 대해서도 간략하게 기술함

## 6. 참고문헌

- 보고서 작성시 인용된 모든 참고문헌을 열거

Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Hill J, Lehle M, Ruschhoff J, Kang YK; ToGA Trial Investigators. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2010 Aug 28;376(9742):687-97. Epub 2010 Aug 19.

Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, Carnaghi C, Bajetta E, Luppi G, Sobrero A, Barone C, Cascinu S, Colucci G, Cortesi E, Nichelatti M, Gambacorta M, Siena S. Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. *J Clin Oncol*. 2007 Aug 1;25(22):3238-45.

Smolen GA, Sordella R, Muir B, Mohapatra G, Barmettler A, Archibald H, Kim WJ, Okimoto RA, Bell DW, Sgroi DC, Christensen JG, Settleman J, Haber DA: Amplification of MET may

identify a subset of cancers with extreme sensitivity to the selective tyrosine kinase inhibitor PHA-665752. Proc Natl Acad Sci U S A 2006, 103 (7):2316-2321

Nakamura K, Yashiro M, Matsuoka T, Tendo M, Shimizu T, Miwa A, Hirakawa K: A novel molecular targeting compound as K-samII/FGF-R2 phosphorylation inhibitor, Ki23057, for Scirrhus gastric cancer. Gastroenterology 2006, 131 (5):1530-1541

Kim HK, Hwang HL, Park SY, Lee KM, Park WC, et al. (2013) Simple and versatile molecular method of copy-number measurement using cloned competitors. PLoS One, 8(7):e69414

Hollox EJ, Detering JC, Dehnugara T (2009) An integrated approach for measuring copy number variation at the FCGR3 (CD16) locus. Hum Mutat 30: 477-484.

## 7. 첨부서류

○ 본 연구의 성과로 논문, 저서, 산업재산권, 정책정책 기여 등이 있을 경우 관련 증빙자료를 첨부토록 함





# Targeted Next-Generation Sequencing at Copy-Number Breakpoints for Personalized Analysis of Rearranged Ends in Solid Tumors

Hyun-Kyoung Kim<sup>1,2,3</sup>, Won Cheol Park<sup>3,4</sup>, Kwang Man Lee<sup>3</sup>, Hai-Li Hwang<sup>1</sup>, Seong-Yeol Park<sup>1</sup>, Sungbin Sorn<sup>1</sup>, Vishal Chandra<sup>1</sup>, Kwang Gi Kim<sup>1</sup>, Woong-Bae Yoon<sup>1</sup>, Joon Seol Bae<sup>4</sup>, Hyoung Doo Shin<sup>5,6</sup>, Jong-Yeon Shin<sup>7</sup>, Ju-Young Seoh<sup>2</sup>, Jong-Il Kim<sup>7,8,9</sup>, Kyeong-Man Hong<sup>1\*</sup>

**1** Research Institute, National Cancer Center, Ilsandong-gu, Goyang, Korea, **2** Department of Microbiology, Ewha Womans University School of Medicine, Seoul, Korea, **3** Department of Surgery, Wonkwang University School of Medicine, Iksan, Korea, **4** Laboratory of Translational Genomics, Samsung Genome Institute, Samsung Medical Center, Seoul, Korea, **5** Department of Life Science, Sogang University, Seoul, Korea, **6** Department of Genetic Epidemiology, SNP Genetics, Inc., Seoul, Korea, **7** Genomic Medicine Institute, Medical Research Center, Seoul National University, Seoul, Korea, **8** Department of Biomedical Sciences, Seoul National University Graduate School, Seoul, Korea, **9** Department of Biochemistry and Molecular Biology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

## Abstract

**Background:** The concept of the utilization of rearranged ends for development of personalized biomarkers has attracted much attention owing to its clinical applicability. Although targeted next-generation sequencing (NGS) for recurrent rearrangements has been successful in hematologic malignancies, its application to solid tumors is problematic due to the paucity of recurrent translocations. However, copy-number breakpoints (CNBs), which are abundant in solid tumors, can be utilized for identification of rearranged ends.

**Method:** As a proof of concept, we performed targeted next-generation sequencing at copy-number breakpoints (TNGS-CNB) in nine colon cancer cases including seven primary cancers and two cell lines, COLO205 and SW620. For deduction of CNBs, we developed a novel competitive single-nucleotide polymorphism (cSNP) microarray method entailing CNB-region refinement by competitor DNA.

**Result:** Using TNGS-CNB, 19 specific rearrangements out of 91 CNBs (20.9%) were identified, and two polymerase chain reaction (PCR)-amplifiable rearrangements were obtained in six cases (66.7%). And significantly, TNGS-CNB, with its high positive identification rate (82.6%) of PCR-amplifiable rearrangements at candidate sites (19/23), just from filtering of aligned sequences, requires little effort for validation.

**Conclusion:** Our results indicate that TNGS-CNB, with its utility for identification of rearrangements in solid tumors, can be successfully applied in the clinical laboratory for cancer-relapse and therapy-response monitoring.

**Citation:** Kim H-K, Park WC, Lee KM, Hwang H-L, Park S-Y, et al. (2014) Targeted Next-Generation Sequencing at Copy-Number Breakpoints for Personalized Analysis of Rearranged Ends in Solid Tumors. PLoS ONE 9(6): e100089. doi:10.1371/journal.pone.0100089

**Editor:** Zhuang Zuo, UT MD Anderson Cancer Center, United States of America

**Received:** March 16, 2014; **Accepted:** May 20, 2014; **Published:** June 17, 2014

**Copyright:** © 2014 Kim et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability:** The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All data are included within the manuscript.

**Funding:** This work was supported by a grant to K.-M.H. from the Basic Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF), funded by the Ministry of Education, Science and Technology (1031020), and by a grant to K.-M.H. from the National Cancer Center through the Korean Ministry of Health and Welfare (1110130). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The presence of an author employed by a commercial company, SNP Genetics, does not alter the authors' adherence to all of PLOS ONE's policies on sharing data and materials.

\* Email: kmhong@ncc.re.kr

† These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Tumor-specific, widespread rearrangement of DNA is a universal feature of cancer. Because rearrangement is not present in normal cells, it can be a useful means of monitoring cancer relapse and response to therapy [1,2,3]. Initially, the recurrent rearrangements including *BCR-ABI*, *AML1-ETO*, *TEL-AML1*, and *TML-RARA* were used with conventional technologies such as reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) to monitor minimal residual tumors and classify hematologic

malignancies [1,4,5]. Their clinical implications, in the context of hematologic malignancies, subsequently has been confirmed by several studies [6,7,8,9]. Recurrent rearrangements, however, are rare in solid tumors, and in most cases, information on rearranged sequences is not available.

Recently, whole-genome next-generation sequencing (NGS) has been employed to obtain information on rearranged sequences, and its clinical application in cancer has been successfully demonstrated [10,11]. Although the acquisition of NGS data by now is relatively straightforward, its analysis can be extremely



# Chromatin CKAP2, a New Proliferation Marker, as Independent Prognostic Indicator in Breast Cancer

Han-Seong Kim<sup>1,2</sup>, Jae-Soo Koh<sup>2,3</sup>, Yong-Bock Choi<sup>3</sup>, Jungsil Ro<sup>3</sup>, Hyun-Kyoung Kim<sup>3</sup>, Mi-Kyung Kim<sup>3</sup>, Byung-Ho Nam<sup>3</sup>, Kyung-Tae Kim<sup>3</sup>, Vishal Chandra<sup>3</sup>, Hye-Sil Seol<sup>2</sup>, Woo-Chul Noh<sup>4</sup>, Eun-Kyu Kim<sup>4</sup>, Joobae Park<sup>5</sup>, Chang-Dae Bae<sup>5\*</sup>, Kyeong-Man Hong<sup>3\*</sup>

**1** Department of Pathology, Inje University Ilsan Paik Hospital, Ilsanseo-gu, Goyang, Korea, **2** Department of Pathology, Korea Cancer Center Hospital, Nowon-gu, Seoul, Korea, **3** Research Institute, National Cancer Center, Ilsandong-gu, Goyang, Korea, **4** Department of Surgery, Breast Cancer Center, Korea Cancer Center Hospital, Nowon-gu, Seoul, Korea, **5** Department of Molecular Cell Biology, Sungkyunkwan University School of Medicine, and Samsung Biomedical Research Institute, Suwon, Korea

## Abstract

**Background:** The level of proliferation activity is a strong prognostic or predictive indicator in breast cancer, but its optimal measurement is still in debate, necessitating new proliferation markers. In the present study, the prognostic significance of the CKAP2-positive cell count (CPCC), a new proliferation marker, was evaluated, and the results were compared with those for the mitotic activity index (MAI).

**Methods:** This study included 375 early-stage breast cancer samples collected from two institutions between 2000 and 2006. Immunohistochemical staining was performed using a CKAP2 monoclonal antibody. Cox proportional hazard regression models were fitted to determine the association between the CPCC and relapse-free survival (RFS) amongst three groups formed on the basis of the CPCC or MAI value: groups 2 and 3 showing the middle and highest values, respectively, and group 1 the lowest.

**Results:** After adjustment for age, T stage, N stage, HER2 status, estrogen receptor status, progesterone receptor status, institution, and year of surgical resection, the CPCC was associated with a significantly worse RFS [hazard ratio (HR) = 4.10 (95% CI: 1.64–10.29) for group 2; HR = 4.35 (95% CI: 2.04–10.35) for group 3]. Moreover, its prognostic significance was similar to or higher than that based on the MAI (HR = 2.05 (95% CI: 0.94–4.65) for group 2; HR = 2.35 (95% CI: 1.09–5.10) for group 3). In subgroup analyses, the CPCC showed a prognostic significance in the luminal A and triple-negative subgroups, but not in the HER2-positive subgroup.

**Conclusions:** Chromatin CKAP2 is an independent prognostic marker for RFS in early-stage breast cancer, and could potentially replace the MAI in clinical evaluation of proliferation activity. Additionally, our study results suggest that the prognostic significance of proliferation activity differs among the various subgroups of breast cancer.

**Citation:** Kim H-S, Koh J-S, Choi Y-B, Ro J, Kim H-K, et al. (2014) Chromatin CKAP2, a New Proliferation Marker, as Independent Prognostic Indicator in Breast Cancer. PLoS ONE 9(6): e98160. doi:10.1371/journal.pone.0098160

**Editor:** Syed A. Aziz, Health Canada and University of Ottawa, Canada

**Received:** January 20, 2014; **Accepted:** April 29, 2014; **Published:** June 2, 2014

**Copyright:** © 2014 Kim et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by a research grant to K.M.H. from the National Cancer Center, Korea (1410050); by a grant to C.-D.B. from the Samsung Biomedical Research Institute, Korea (B801022), and by a grant to J.R. from the National Research Foundation, Korea (1230950). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: kmhong@mcc.re.kr (KMH); cdbae@sikku.edu (CDB)

† These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Proliferation activity has been recognized as one of the most reliable breast cancer prognosticators [1,2,3]. Moreover, it has been identified as a reliable predictive marker for anti-cancer therapy, with higher proliferation activity correlating with stronger response to chemotherapy [4,5]. So, in addition to classical mitotic counting, a number of markers, including Ki-67, cyclin D, cyclin E, p27, p21, thymidine kinase, topoisomerase II $\alpha$ , and phosphohistone H3, have been used to measure proliferation activity [6,7]. However, debate continues over which proliferation marker is the most reliable for clinical application. For example, whereas the mitotic activity index (MAI) has been the most reliable breast

cancer prognosticator [1,2], the clinical application data on Ki-67 has been inconclusive [8,9]. On the contrary, as a predictive marker in breast cancer, Ki-67 has been the most widely evaluated, showing its clinical applicability, especially in triple-negative (TN) breast cancer [5,10,11]. Clearly, further prognostic and predictive evaluations of the currently available markers are necessary, and development of new proliferation markers, in turn, could facilitate the clinical application of proliferation activity to breast cancer.

Cytoskeleton-associated protein 2 (CKAP2) [or tumor-associated microtubule-associated protein/cytoskeleton-associated protein 2 (TMAP/CKAP2)] is a microtubule-associated protein that plays key roles in the regulation of microtubule assembly and



## ORIGINAL ARTICLE

**Cancer cells promote survival through depletion of the von Hippel–Lindau tumor suppressor by protein crosslinking**D-S Kim<sup>1</sup>, Y-B Choi<sup>1</sup>, B-G Han<sup>1</sup>, S-Y Park<sup>1</sup>, Y Jeon<sup>2</sup>, D-H Kim<sup>1</sup>, E-R Ahn<sup>1</sup>, J-E Shin<sup>1</sup>, BI Lee<sup>1</sup>, H Lee<sup>2</sup>, K-M Hong<sup>1</sup> and S-Y Kim<sup>1</sup><sup>1</sup>Cancer Cell and Molecular Biology Branch, Division of Cancer Biology, Research Institute, Goyang, Korea and <sup>2</sup>Cancer Resources Branch, Division of Cancer Biology, Research Institute, Goyang, Korea

Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-mediated signaling is associated with different tumors including renal cell carcinoma. NF- $\kappa$ B- and IGF-1-mediated signaling is found to be inhibited in the presence of wild-type von Hippel–Lindau (VHL) tumor suppressor gene. Therefore, negative regulator of VHL may be a good target for regulating NF- $\kappa$ B and IGF-1R. In this study, we found that VHL, a tumor suppressor protein that downregulates the NF- $\kappa$ B activity and the stability of IGF-1R was depleted by TGase 2 through polymerization via crosslinking and proteasomal degradation in kidney, breast and ovary cancer cell lines. We also found that TGase 2 knockdown promotes hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) degradation, and thereby decrease HIF-1 $\alpha$  transcriptional activity. Importantly, VHL expression was decreased *in vivo* in TGase-2-transgenic mice, and this was associated with increased NF- $\kappa$ B activity and the levels of expression of IGF-1R, HIF-1 $\alpha$  and erythropoietin in kidney tissue. These results suggest a novel mechanism of regulation of the VHL tumor suppressor by TGase 2 that appears to be independent of the known cancer regulatory mechanisms.

*Oncogene* (2011) 30, 4780–4790; doi:10.1038/onc.2011.183; published online 30 May 2011

**Keywords:** transglutaminase 2; NF- $\kappa$ B; von Hippel–Lindau; IGF-1R; HIF-1 $\alpha$ ; EPO

**Introduction**

TGase 2 (EC2.1.2.13) is a crosslinking enzyme that has been implicated in numerous cellular pathways, including cancer cell proliferation, migration, angiogenesis, epithelial mesenchymal transition and drug resistance (Verma and Mehta, 2007; Iismaa *et al.*, 2009; Shao *et al.*, 2009; Seo *et al.*, 2010). A series of studies have shown that the induction of TGase 2 contributes to constitutive nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) activation via polymeriza-

tion of the inhibitor of NF- $\kappa$ B (Lee *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006), and that this is one of the mechanisms of drug resistance in cancer cells (Mehta *et al.*, 2004; Herman *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006, 2008, 2009; Park *et al.*, 2006; Gangadharan *et al.*, 2009). Increased TGase 2 expression correlates with increased NF- $\kappa$ B activity in breast cancer tissue (Park *et al.*, 2009). Amplification of NF- $\kappa$ B-mediated signaling activity by TGase 2 appears to be mediated by the depletion of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , a known inhibitor of NF- $\kappa$ B (Maiuri *et al.*, 2008). Either case of TGase-2-mediated downregulation of inhibitor of NF- $\kappa$ B or peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  presents reducing suppressor of inflammatory transcription factors. We have proposed that TGase-2-mediated protein–protein crosslinking serves as a unique mechanism of secondary signaling through post-translational modification (Seo *et al.*, 2010).

The von Hippel–Lindau (VHL) tumor suppressor protein, as part of a ubiquitin-ligase complex, is well known to downregulate insulin-like growth factor-1 (IGF-1R; Yuen *et al.*, 2007). In renal cell carcinoma cells, VHL also downregulates NF- $\kappa$ B activity by suppressing NF- $\kappa$ B target anti-apoptotic genes such as FLICE inhibitory protein (c-FLIP), survivin, inhibitor of apoptosis-1 (IAP-1) and c-IAP-2, which sensitizes cells to tumor necrosis factor-induced cytotoxicity (Qi and Ohh, 2003). Importantly, VHL has been shown to downregulate the hypoxia-inducible factor (HIF) by targeting HIF-1 $\alpha$  subunit for polyubiquitinylation and proteasomal degradation, resulting in inhibit diverse growth factor involved in renal cyst formation and angiogenesis, such as transforming growth factor- $\alpha$ , vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth-factor B chain and IGF-1 (Kaelin, 2002; Carroll and Ashcroft, 2006). Although the mechanism of inhibition of NF- $\kappa$ B and IGF-1R by VHL are well documented, it is not fully understood how the loss of VHL induces the activation of NF- $\kappa$ B and the level of expression of IGF-1R. Also, in contrast to the regulation of VHL by deletion, mutation or promoter methylation of the *VHL* gene, which have been described (Curtis and Goggins, 2005; Tischoff and Tannapfel, 2008; Cowey and Rathmell, 2009), the mechanisms of regulation of VHL at the protein level have yet to be elucidated. In this study, we

Correspondence: Dr S-Y Kim, Cancer Cell and Molecular Biology Branch, National Cancer Center, 323 Ilsan-ro, Ilsandong-gu, Goyang, Kyunggi-do 410-769, Korea.  
E-mail: kimsooyoul@gmail.com

Received 12 December 2010; revised 16 March 2011; accepted 13 April 2011; published online 30 May 2011



Australian Government

IP Australia

LETTERS PATENT

# STANDARD PATENT

2009224170

I, Fatima Beattie, the Commissioner of Patents, grant a Standard Patent with the following particulars:

**Name and Address of Patentee(s):**

National Cancer Center  
809, Madu 1-dong Ilsandong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do, 410-769, Republic of Korea

**Name of Actual Inventor(s):**

Hong, Kyeong Man.

**Title of Invention:**

Method for measuring chromosome, gene or specific nucleotide sequence copy numbers using SNP array

**Term of Letters Patent:**

Twenty years from 5 March 2009

**Priority Details :**

<i>Number</i>	<i>Date</i>	<i>Filed with</i>
10-2008-0022500	11 March 2008	KR



Dated this 12<sup>th</sup> day of July 2012

Fatima Beattie  
Commissioner of Patents

PATENTS ACT 1990





# 특 허 증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-1283629 호 (PATENT NUMBER)	출원번호 (APPLICATION NUMBER)	제 2010-0138285 호
	출원일 (FILING DATE:YY/MM/DD)	2010년 12월 29일
	등록일 (REGISTRATION DATE:YY/MM/DD)	2013년 07월 02일

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)

C D 3 Z 유전자의 메틸화 수준을 측정하는 체계를 포함하는 자가면역질환 진단용 조성물 및 이를 이용한 자가면역질환 진단방법

특허권자 (PATENTEE)

등록사항란에 기재

발명자 (INVENTOR)

등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.

(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2013년 07월 02일



특 허 청 장 김 영

COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE



연차등록료 납부일은 실정등록일 이후 4년차부터 매년 07월 02일까지이며 등록원부로 권리관계를 확인바랍니다.





# 특 허 증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-1448175 호 (PATENT NUMBER)	출원번호 (APPLICATION NUMBER)	제 2011-0011644 호
	출원일 (FILING DATE:YY/MM/DD)	2011년 02월 09일
	등록일 (REGISTRATION DATE:YY/MM/DD)	2014년 09월 30일

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)  
HER2 양성 개체 진단 방법 및 HER2 양성 개체 진단용 키트

특허권자 (PATENTEE)  
국립암센터(116433-0\*\*\*\*\*)  
경기도 고양시 일산동구 일산로 323 (마두동)

발명자 (INVENTOR)  
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록 되었음을 증명합니다.

(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2014년 09월 30일



특 허 청 장 김 영 민  
COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE



연차등록료는 2017년부터 매년 09월 30일까지 납부하여야 하며, 등록원부로 권리관계를 확인바랍니다.

## II. 제 1 세부과제

- 세부과제별로 별도로 작성함
- 각 세부과제의 계획서의 표지는 색지로 작성하여 쉽게 구분될 수 있도록 함.  
표지에는 다음과 같은 사항을 반드시 기재함.

**세부과제명** : 재배열서열 분석을 통한 위암환자의 모니터링 예비연구

**세부과제책임자(성명/소속)** : 홍경만/분자종양학연구과



(1) 최종목표 : 위암에서 카피수 breakpoint로부터 재배열 서열 정보를 이용하여 환자 cfDNA에서 모니터링 가능성에 대한 예비 연구.

1) 위암환자 10명에서 카피수 breakpoint를 결정하고, targeted next generation sequencing방법으로 재배열 서열 정보를 획득하는 방법의 확립

2) 제2 세포과제와 공동으로 진행할 위암의 카피수와 돌연변이에 따른 분류를 위해 위암조직에서 암세포가 50%이상 모여있는 부위를 H&E염색으로 확인하고, 이로부터 DNA와 RNA 추출.

3) 위암조직에서 CKAP2 조직면역화학염색

## 2. 연구의 내용 및 결과

○ 연구의 이론적, 실험적 연구 방법, 연구 내용 및 결과를 객관적으로 기술

### 1) 카피수 분석을 위한 competitive SNP (cSNP) microarray 방법

◎ copy number breakpoint를 알아내기 위하여 SNP microarray를 이용하여 카피수를 측정하였는데, 카피수 차이를 분명하게 나타내지 못하는 단점이 있었다. 선행연구에서 개발한 방법은 H-mole세포의 DNA를 competitor로 사용함으로써 SNP microarray를 이용한 카피수 측정에 좀 더 많은 차이가 날 수 있다는 것을 알게 되었고 이를 이용하여 copy number breakpoint부위가 있는 지 여부를 좀 더 정확히 알 수 있었고, 그 부위의 region을 훨씬 좁힐 수 있었다. 이 방법을 competitive SNP (cSNP) microarray로 명명하였다.

◎ 그림 1은 cSNP microarray의 원리를 설명하는 그림으로, 이때 competitor로는 H-mole세포의 DNA를 사용하였는데, H-mole세포는 모든 SNP가 homozygous allele로 구성되어있다. normal DNA혹은 cancer DNA와 혼합하여 SNP microarray를 시행하고, 결과를 분석하는데, alter homozygote SNP들 만은 선발하여 분석한다. 이때, alter homozygote SNP들은 normal DNA도 homozygote이면서 H-mole의 염기와는 다른 염기로 구성된 SNP들을 말한다..

◎ 이 cSNP microarray를 시행할 때 competitor와 시료를 50:50으로 섞어서 진행하지만 실험의 오류로 이렇게 정확한 비율로 진행되지 않는 경우가 대부분일 것이다. 이를 고려하지 않고 카피수를 계산한다면 전혀 다른 결과가 나올 수 있다. 이러한 문제점 때문에 cSNP microarray에서 비율을 서로 다르게 섞어서 실험을 진행하여도 카피수가 동일하게 계산하도록 하는 algorithm이 필요하였다. 따라서 이러한 비율에 따라 여러 가지 식을 사용하여 표3과 같이 분석하였는데, nARR 값을 사용하는 경우 어떠한 경우라도 시료의 카피수를 바르게 계산해 낼 수 있다는 것을 확인하고 이 수식을 사용하여 시료에서의 카피수를 계산할 수 있었다. 이와 같은 내용의 새로운 방식의 SNP microarray를 이용한 카피수 분석방법에 대하여 특허를 신청하였고 국내외 특허를 등록하였고, 아직 몇 나라에서는 특허심사가 진행중에 있다.

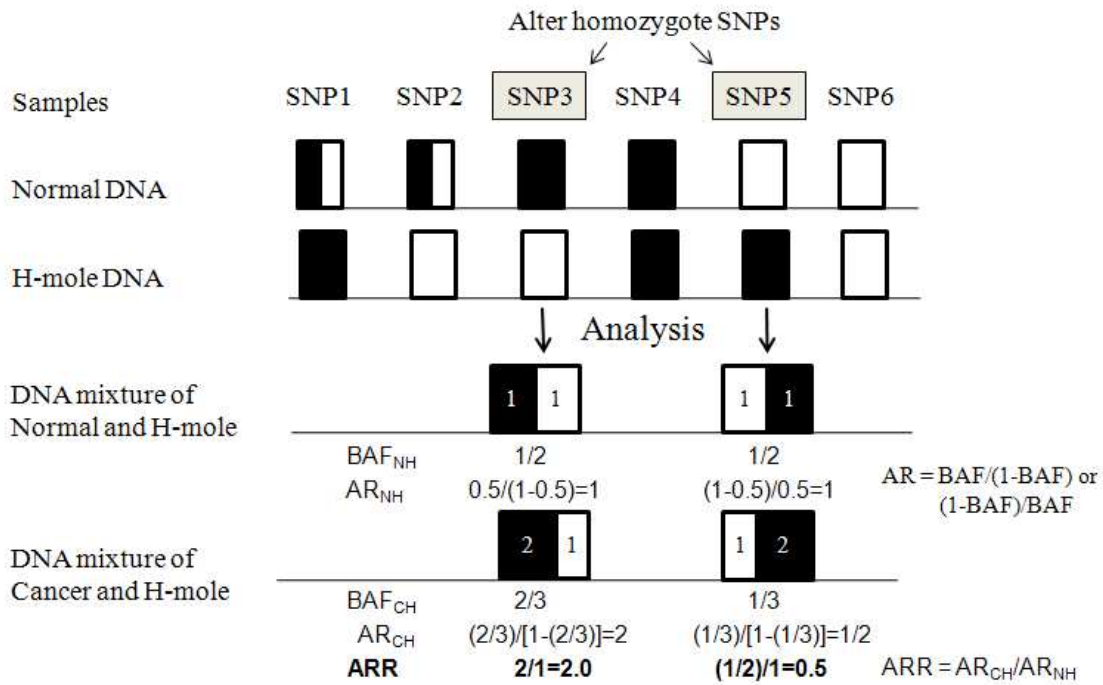


그림 1. Schematic procedure for competitive SNP microarray. First, alter homozygous alleles were selected (SNP3 and SNP5). From B allele frequency (BAF) values, allelic ratio (AR) was determined for mixture samples of 1) normal and H-mole DNAs, and 2) cancer and H-mole DNAs. B allele is automatically designated by Genome Studio software (Illumina) and is marked in black box. From AR values from two mixture samples, ARR was obtained. The formulas for AR and ARR were shown.

표 1. 서로 다른 비율로 cancer 혹은 normal DNA를 H-mole DNA와 혼합하였을 때 cancer에서의 카피 수 변화를 계산하는 방법.

N-H mix ratio	C-H mix ratio	Copy Number	Cancer genotype	Normal genotype	H-mole genotype	N-H mix genotype	C-H mix genotype	BAF <sub>NH</sub>	AR <sub>NH</sub>	BAF <sub>CH</sub>	AR <sub>CH</sub>	ARR	nARR
2:2 or 1:1	2:2 or 1:1	4	BBBB	BB	AA	AABB	AABBBB	2/4	2/2	4/6	4/2 (2.00)	2.00	2.00
		3	BBB	BB	AA	AABB	AABBB	2/4	2/2	3/5	3/2 (1.50)	1.50	1.50
		2	BB	BB	AA	AABB	AABB	2/4	2/2	2/2	2/2 (1.00)	1.00	1.00
		1	B	BB	AA	AABB	AAB	2/4	2/2	1/2	1/2 (0.50)	0.50	0.50
		0		BB	AA	AABB	AA	2/4	2/2	0/2	0/2 (0.00)	0.00	0.00
2:3	2:3	4	BBBB	BB	AA	AAABB	AAABBBB	2/5	2/3	4/3	4/3	2.00	2.00
		3	BBB	BB	AA	AAABB	AAABBB	2/5	2/3	3/3	3/3	1.50	1.50
		2	BB	BB	AA	AAABB	AAABB	2/5	2/3	2/3	2/3	1.00	1.00
		1	B	BB	AA	AAABB	AAAB	2/5	2/3	1/3	1/3	0.50	0.50
		0		BB	AA	AAABB	AAA	2/5	2/3	0/3	0/3	0.00	0.00
3:2	2:3	4	BBBB	BB	AA	AABBB	AAABBBB	3/5	3/2	4/3	4/3	0.89	2.00
		3	BBB	BB	AA	AABBB	AAABBB	3/5	3/2	3/3	3/3	0.67	1.50
		2	BB	BB	AA	AABBB	AAABB	3/5	3/2	2/3	2/3	0.44	1.00
		1	B	BB	AA	AABBB	AAAB	3/5	3/2	1/3	1/3	0.22	0.50
		0		BB	AA	AABBB	AAA	3/5	3/2	0/3	0/3	0.00	0.00

In the table example, the allele B is the B allele, and the values for various parameters are the expected values.

N-H mixture or N-H mix, the mixture of normal and H-mole DNAs; C-H mixture or C-H mix, the mixture of cancer and H-mole DNAs; N-H mix ratio, the ratio of normal and H-mole DNA amounts in the N-H mixture; C-H mix ratio, the ratio of cancer and H-mole DNA amounts in the C-H mixture; Copy Number, the copy number in cancer; Cancer Genotype, the genotype in cancer sample DNA; Normal genotype, the genotype in normal sample DNA; N-H mix genotype, the genotype in then-H mixture; C-H mix genotype, the genotype in the C-H mixture;  $BAF_{NH}$ , the ratio of B allele and total allele amounts (or B allele frequency) in the N-H mixture;  $AR_{NH}$ , the ratio of B allele and A allele amounts (or allelic ratio) in the N-H mixture;  $BAF_{CH}$ , the ratio of B allele and total allele amounts (or B allele frequency) in the C-H mixture;  $AR_{CH}$ , the ratio of B allele and A allele amounts (or allelic ratio) in the C-H mixture; ARR, the ratio of  $AR_{CH}$  and  $AR_{NH}$ , or the AR ratio; nARR, the ARR values which are divided by the median ARR value, or normalized ARR.

In the table example, the ARR value from copy number 2 (underlined) was used as a median value

© 위 표 1과 같은 수식을 사용하여 cSNP microarray의 결과를 분석하였는데, 지금까지 흔히 사용하고 있는 SNP microarray의 방법인 LogR ratio에 의한 결과 (그림 2A)에 비하여, cSNP microarray 방법으로 copy number status를 분석하면 그림 2B에서와 같이 카피수의 변화 양상을 훨씬 뚜렷하게 알 수 있었다. 특히 copy number breakpoint (CNB), 즉 카피수가 변화되어 있는 부위에 대한 정보를 정확하게 얻을 수 있는 장점이 있다. 특히 이 CNB는 반드시 하나 이상의 rearranged sequence를 포함하고 있어서, 암 특이 분자적 변화를 이용한 임상연구에 응용할 수 있을 것으로 생각하였다.

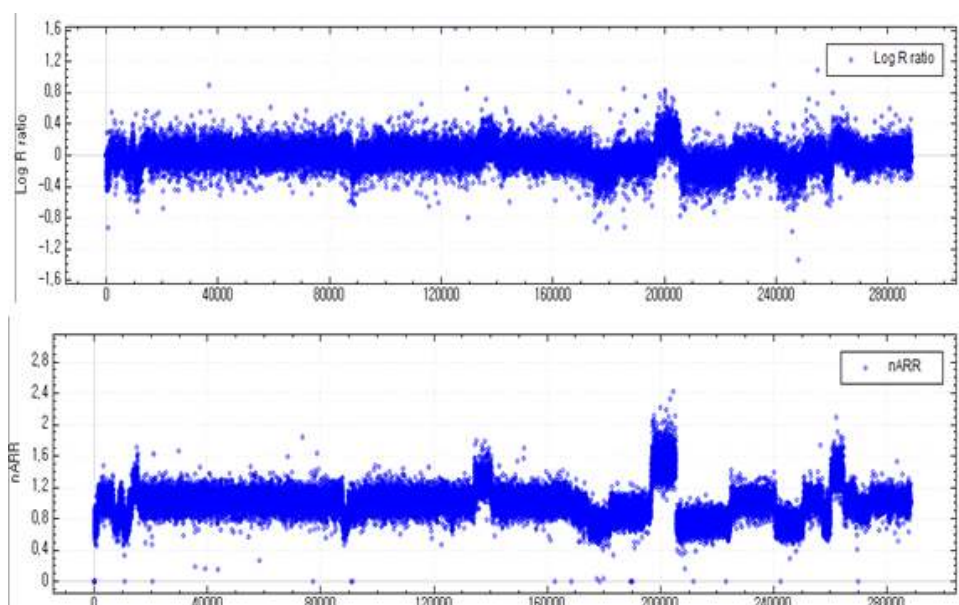


그림 2. A representative results of from Log R ratio, nARCH, and nARR in a colon cancer sample. Log R ratio was obtained from Genome Studio software; nARR was calculated employing DNAs from a cancer tissue, the corresponding normal tissue, and H-mole with cSNP software.

### 3) 암조직에서 재배열 서열 정보를 얻기위한 TNGS-CNB 방법의 확립

© 2010년 Science translational medicine에 whole genome NGS로 암에서의 rearrangement를 분석하고 이 정보를 이용하여 cancer specific PCR을 고안하여 환자의 혈액 내에 있는 cell free DNA에서 암유래 cell free DNA를 monitoring함으로써 암의 재발을 모니터링 하겠다는 idea가 발표되었다 (그림 3, Larray et al., 2010). 그러나 이러한 방법의 임상적용이 가능한지 혹은 효율성은 어떠한 지에 대한 임상시험 결과는 없었다. 본 연구자들은 이와 같은 연구가 본격적으로 이루어지지 않는 이유 중 하나로 whole genome NGS의 비용이 너무 높고, 또한 결과 분석에 많은 시간이 소요되며, bioinformatics로 분석된 결과의 신뢰도에 문제가 있을 수 있다고 생각하였다. 본 연구자들은 cfDNA에서의 rearranged sequence를 이용한 암재발 모니터링이 임상에 유용할 수 있다는 것을 좀 더 연구하기 위하여, 우선 암조직에서 쉽게 rearranged sequence를 알아낼 수 있는 방법으로 whole genome NGS이외의 방법을 생각하였다. 그런데 cSNP microarray의 CNB에 rearranged sequence가 반드시 하나 이상 존재할 것이므로, 이 부위를 포함하도록 하여 probe를 design하고 cancer DNA에서 이들을 포함하는 서열을 capture한다면 rearranged sequence들에 대한 정보를 얻을 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 따라서 이를 TNGS-CNB (targeted next generation sequencing for copy number breakpoints)라고 명명하였는데, 그 procedure는 그림 4와 같다. 이 방법을 이용하여 colon cancer case를 대상으로 먼저 시행하였다.

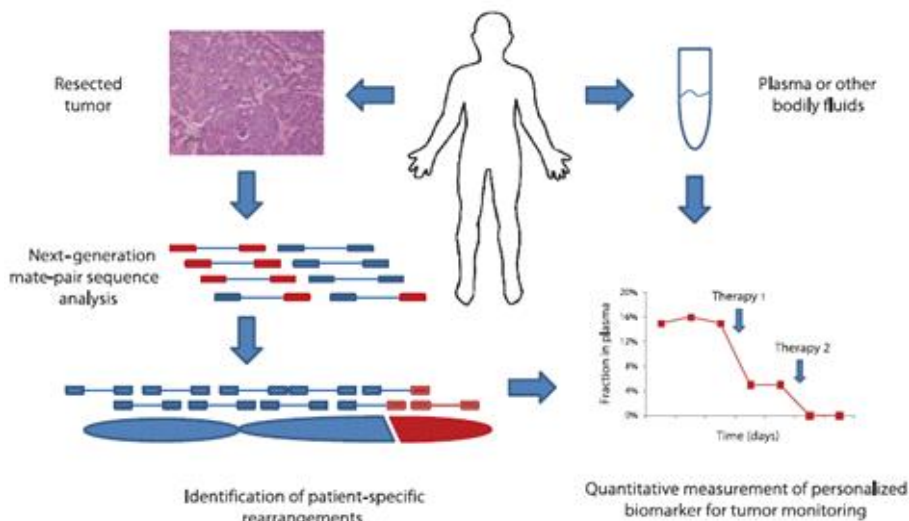


그림 3. Whole genome next generation sequencing을 이용한 환자 재발의 모니터링. 환자 암조직

DNA를 이용하여 whole genome NGS를 시행하고 이로부터 rearranged sequence 정보를 획득하여 환자 혈액내 cfDNA 중 암유래 cell free DNA를 특이적으로 측정함으로써 환자의 재발을 예측할 수 있다는 내용의 논문이 2010년 발표되었다.

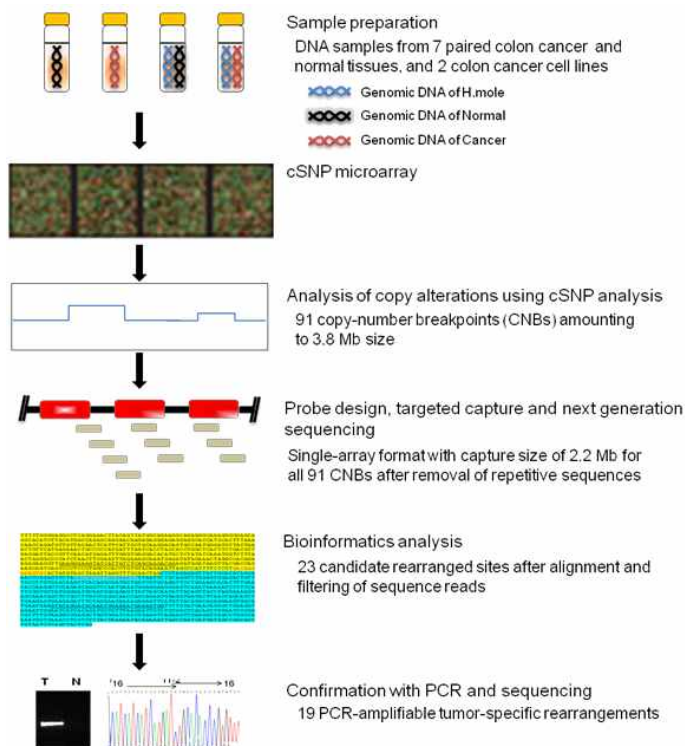


그림 4. TNGS-CNB scheme. Out of 91 copy-number breakpoints deduced using a novel competitive SNP microarray technology, 19 PCR-amplifiable rearrangements were identified from seven paired primary colon cancer and normal tissues and two colon cancer cells by capture and next-generation sequencing of those copy-number breakpoints.

#### 4) 대장암에서 TNGS-CNB를 이용한 rearranged sequence 정보 획득

© cSNP microarray방법으로 분석한 결과와 기존의 LogR ratio를 이용한 결과를 비교해 보면 그림 5에서 설명한 바와 같이 전체적으로 훨씬 좋은 copy number status를 예측할 수 있어서 이 방법을 이용하여 9개 시료에서 91개의 copy number breakpoint들을 예측하였고, 이들을 포함한 region을 capture할 수 있도록 capture probe들을 design하고 이 targeted probe와 시료 DNA를 hybridize시켜서 probe와 결합하는 서열을 모두 capture하였다. 이렇게 capture한 서열을 next generation sequencing방법으로 분석하여 모두 23개의 candidate rearranged sequence 정보를 얻었는데, 이들에 대해 모두 PCR방법을 확립하였고, tumor와 normal 조직을 이용하여 암특이성을 확인한 바, 19개의 rearranged site가 암조직에 특이하다는 것을 확인하였다. 이상과 같은 실험의 진행은 그림 5와 같다.

◎ 특히 23개 candidate rearranged sequence들에 대한 암특이성을 PCR로 확인하였는데 모두 19개의 PCR-amplifiable tumor-specific rearrangement에 대해 암특이성을 확인할 수 있었다 (그림 5)

◎ cSNP microarray결과와 LogR ratio의 결과를 비교해 보면 그림 6과 같다. 그림에서 확인할 수 있듯이 cSNP microarray를 이용하는 경우 copy number breakpoint들을 훨씬 쉽게 알아낼 수 있다는 것을 확인할 수 있다.

◎ 모든 19개 PCR-amplifiable tumor-specific rearrangement 부위를 암 DNA에서 증폭하고 이에 대한 염기서열을 분석하여 정확한 rearranged sequence 정보를 다시 한번 확인할 수 있었는데, 그림 7에 그 결과를 나타내었다.

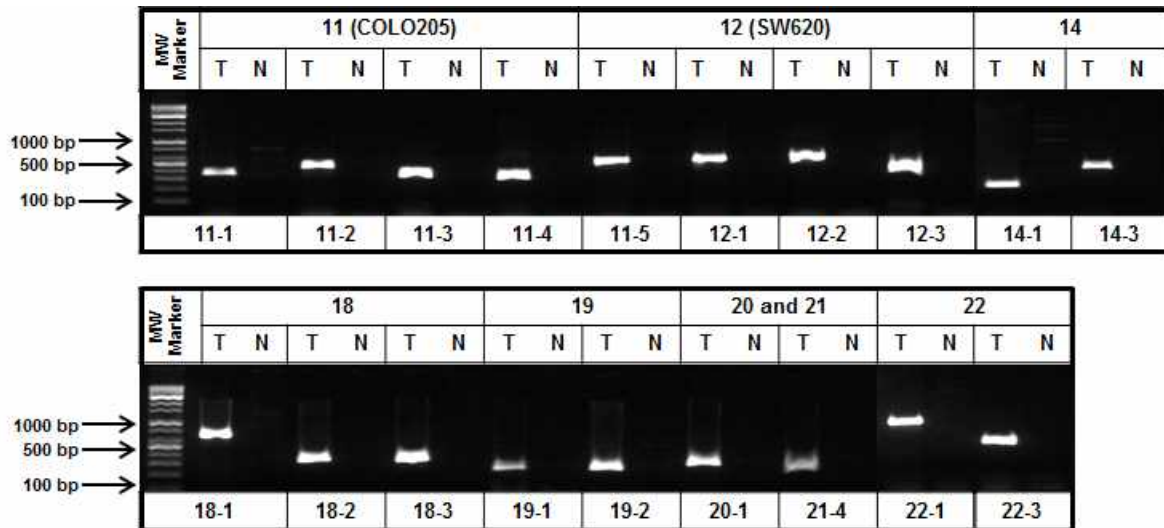


그림 5. Candidate rearranged site들의 암특이성 확인. 23개 candidate rearranged site에 대해 모두 PCR 방법을 확립하고 암조직과 정상조직 DNA를 이용하여 PCR방법으로 암조직 특이성을 확인하였는데, 모두 19개의 rearranged sequence를 확인할 수 있었다.



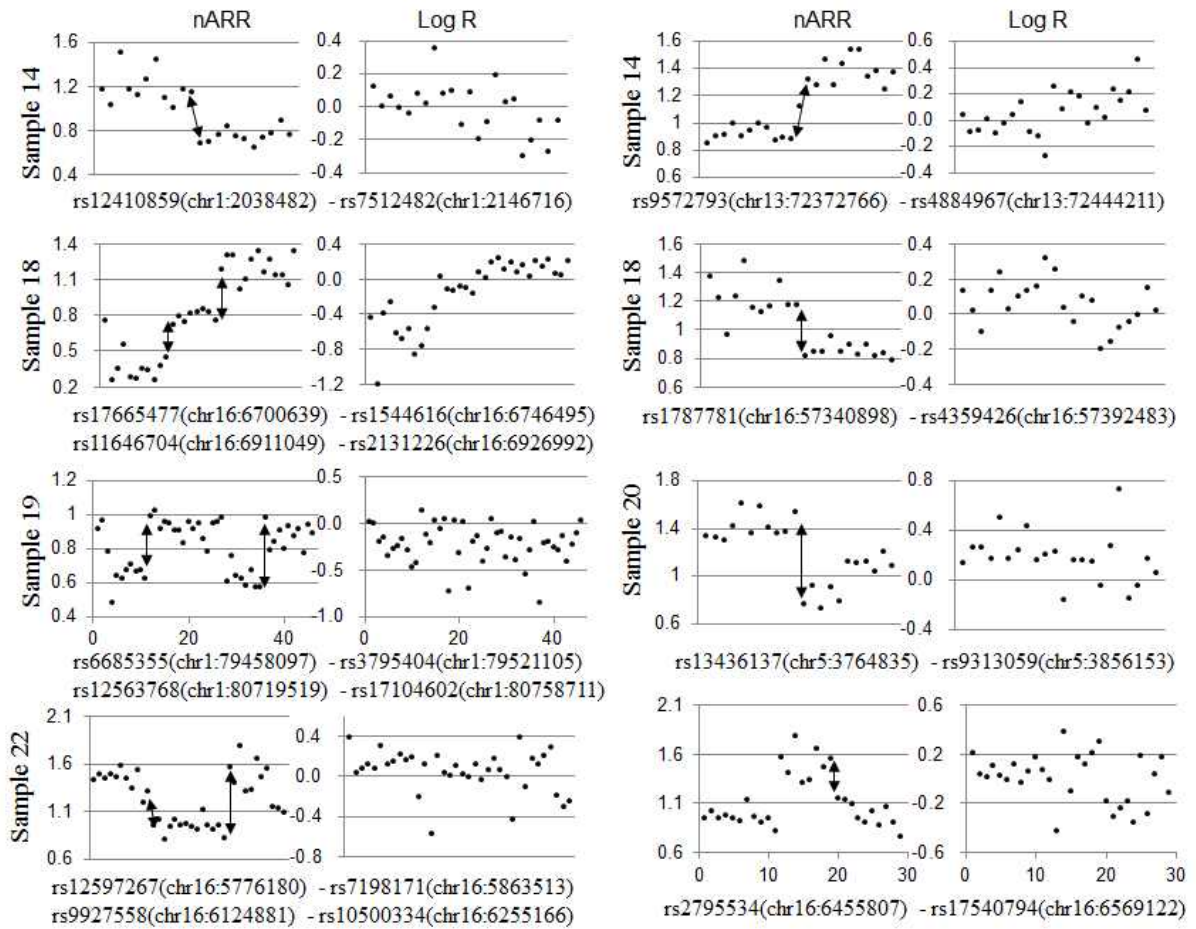


그림 6. rearrangement가 확인된 부위들에서의 cSNP microarray분석결과와 LogR ratio의 분석결과 비교. 화살표로 표시된 부위가 copy number breakpoint가 있는 부위이며, 모든 경우에서 암특이 rearrangement가 확인되었다. cSNP microarray분석결과 (nARR)에서는 breakpoint들이 분명히 존재한다는 것을 알 수 있으나, LogR ratio를 이용하는 경우 breakpoint들을 확인하기 어려운 경우가 대부분이라는 것을 알 수 있다.

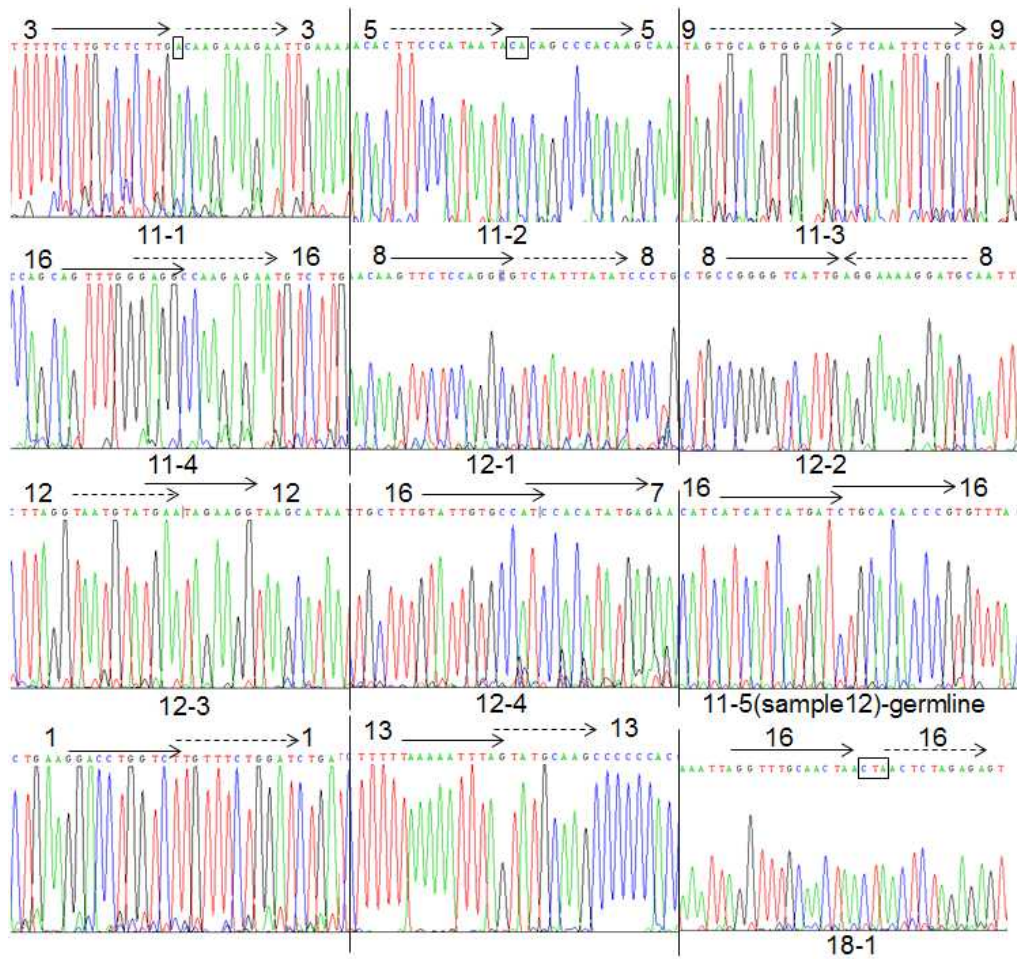


그림 7. 암특이 재배열서열의 염기서열 결정결과. 19개 암특이 재배열 서열에서 염기서열을 결정 하였으며, 모든 19개 PCR product에서 재배열된 서열을 확인할 수 있었다. 그림에서 화살표 옆의 수는 서열이 존재하는 염색체 number 나타내며, 염색체는 동일 염색체에서 재배열이 일어나거나 서로 다른 염색체에서 재배열이 일어났다는 것을 알 수 있다. 시료 11-5의 경우는 암조직 뿐 아니라 정상조직에서도 PCR product를 얻을 수 있었고, 이는 정상적으로 존재하는 재배열 혹은 variant라는 것을 알 수 있다.

© 이상과 같은 재배열의 결과를 모두 종합하여 정리하면 표 2와 같다. 그리고 이상과 같은 결과는 올해 PLoS ONE에 논문으로 출간하였다.



표 2. TNGS-CNB방법으로 확인된 재배열된 서열들.

Sample	ID	Copy-number breakpoint region		TNGS				Predicted cDNA	Amplified in tumor	Amplified in normal
		Chr. <sup>1</sup>	Position (in nucleotides)	Read end 1		Read end 2				
				Chr. <sup>1</sup>	Position	Chr. <sup>1</sup>	Position			
C1	C1-1	1	32620989-32670780	1	Intergenic DNA	1	C1orf86 intron	Exon 1-7 deletion of C1orf86	Y	
	C1-2	13	72372766-72444211	13	DACH1 intron	13	DACH1 intron	Partial exon 1 and exon 2-3 deletion of DACH1	Y	
C2	C2-1	16	6700639-6746495	16	RBFOX1 intron	16	RBFOX1 intron	Exon 3 deletion of RBFOX1	Y	
	C2-2	16	6911049-6926992	16	RBFOX1 intron	16	RBFOX1 intron	Exon 3 deletion of RBFOX1	Y	
C3	C3-1	1	79458097-79521105	1	Intergenic DNA	1	Intergenic DNA		Y	
	C3-2	1	80719519-80758711	1	Intergenic DNA	2	ANXA4 intron	Exon 2-13 deletion of ANXA4	Y	
C4	C4-1	5	3764835-3856153	5	Intergenic DNA	5	Intergenic DNA		Y	
	C4-2	7	54247350-54264207	7	Intergenic DNA	7	FKBP9L intron		Y	Y <sup>2</sup>
C5	C5-1	8	38120026-38193268	8	WHSC1L1 intron	17	Intergenic DNA	Exon 1-12 deletion of WHSC1L1	Y	
	C5-2	16	5776180-5863513	16	Intergenic DNA	16	RBFOX1 intron	Exon 1 deletion of RBFOX1	Y	
C6	C6-2			16	RBFOX1 intron	16	RBFOX1 intron		N	
	C6-3	16 <sup>3</sup>	6455807-6569122	16	RBFOX1 intron	16	RBFOX1 intron	Exon 3 deletion of RBFOX1	Y	
C7 <sup>4</sup>	C7-1	3	60448421-60459041	3	FHIT intron	3	FHIT intron	Exon 5 deletion of FHIT	Y	
	C7-2	5	27040172-27058600	5	Intergenic DNA	5	Intergenic DNA		Y	
	C7-3	9	121112114-121136985	9	Intergenic DNA	9	ASTN2 intron	Exon 4-22 deletion of ASTN2	Y	
	C7-4	16	83284155-83293878	16	CDH13 intron	16	CDH13 intron	Exon 3-5 deletion of CDH13	Y	
C8 <sup>4</sup>	C8-1	16	6700639-6746495	16	RBFOX1 intron	16	RBFOX1 intron	No deletion of RBFOX1	Y	
	C8-2	8	128601683-128606353	8	Intergenic DNA	8	Intergenic DNA		Y	
	C8-3	8	129746645-129857169	8	Intergenic DNA	8	Intergenic DNA		Y	
	C8-4	12	27552182-27572094	12	ARNTL2 intron	12	Intergenic DNA	Exon 15-17 deletion of ARNTL2	Y	
	C8-5	16	82855099-82866517	16	CDH13 intron	7	Intergenic DNA		Y	Y <sup>2</sup>
	C8-6	22	31618708-31645509	22	LIMK2 intron	22	PRR14L intron		N	

<sup>1</sup>Chromosome number

<sup>2</sup>Two rearrangements were amplified also in normal samples, indicating that these are constitutive genomic rearrangements.

<sup>3</sup>Two candidate rearrangements were analyzed by next-generation sequencing in the same region as sample C6, but only one was amplified by PCR.

<sup>4</sup>Samples C7 and C8 are the COLO205 and SW620 cancer cell lines, respectively.

ID, identification number

#### 4) 위암조직에서 재배열 서열 정보 획득 방법의 확립

◎ 위암에서의 재배열 서열 정보를 TNGS-CNB방법으로 분석하는 연구를 계획하였는데, H&E염색에서 위암 조직에서 tumor percentage가 너무 낮아서 macrodissection으로 해결할 수 없어서 laser microdissection방법을 확립하였는데, 이로부터 얻을 수 있는 DNA의 양이 제한되어서 약 5 ug의 DNA가 있어야 하는 TNGS-CNB방법을 사용할 수 없었는데, whole genome NGS 방법의 경우는 약 100 ng의 DNA만 있어도 연구를 진행할 수 있어서 방법을 변경하였다.

◎ 이 연구에 필요한 IRB 승인을 모두 획득하고, 국립암센터 종양은행에서 조직을 분양받은 후 laser microdissection을 통하여 얻은 위암조직 DNA를 이용하여 whole genome NGS를 시행하였다. 이때 암조직 DNA이외에 정상 위조직에서 얻은 DNA도 함께 분석하였고, 정상 DNA에 비하여 달라져 있는 분자적 변화들을 bioinformatics기법으로 분석하였다.

◎ 표 3은 전체 10 case에 대한 whole genome NGS로부터 분석한 분자적 변화에 대한 결과이다. 모두 10 case 중 8 case에서 translocation을 확인할 수 있었는데, inversion을 포함하여 insertion

이나 duplication과 같은 서열들도 재배열 서열이 존재하므로 위암에서의 암특이 cfDNA를 확인하는데 이용할 수 있을 가능성이 있다. 현재 translocation부위에 대해 몇 개의 paired end read들이 translocation으로 분석되었는지에 대해 분석하고 있는 중이다. 이들의 결과가 reliable하다면 각 case당 5개정도까지의 재배열 서열을 PCR로 확인하고 재배열 서열의 염기서열을 결정할 예정이다. 염기서열에 대한 정보가 모두 확인되면, cfDNA에서 재배열 서열을 확인하기 위하여 각각의 재배열 서열 특이 quantitative PCR 방법을 확립할 예정이다. 일반적으로 cfDNA의 경우 fragment size가 작아서 약 100 bp정도의 PCR fragment가 생기도록 PCR primer를 design할 계획이다. 이들의 암 특이성을 암과 정상조직 DNA를 이용하여 확인한 다음, cfDNA에서 양을 측정할 계획이다.

표 3. 위암조직의 whole genome NGS를 분석하여 얻은 암세포에서의 분자적 변화

Order no .	Sample ID	SNPs	Small insertions	Small deletions	Copy number gains	Copy number losses	Duplications	Insertions	Deletions	Inversions	Translocations
1408AHX-0001	N1_C1	11,685	277	246	128	4	27	2	72	60	96
1408AHX-0001	N2_C2	3,399	1	5	52	4	6	-	37	3	-
1408AHX-0001	N3_C3	14,816	242	271	72	8	39	3	234	8	-
1408AHX-0001	N4_C4	17,723	350	567	354	21	169	2	136	79	94
1408AHX-0001	N5_C5	6,398	116	123	34	5	2	1	36	-	4
1408AHX-0001	N6_C6	14,819	328	256	100	4	25	2	58	38	6
1408AHX-0001	N7_C7	109,027	11,162	49,614	6	14	10	4	64	1	10
1408AHX-0001	N8_C8	9,212	177	215	156	26	62	2	633	31	16
1408AHX-0001	N9_C9	2,792	48	70	13	21	13	-	44	27	16
1408AHX-0001	N10_C10	836,066	15,820	22,001	142	5	108	158	665	57	62

### 3. 연구결과 고찰 및 결론

- 국내·외 관련분야의 기술개발 현황과 연구결과가 국내·외 기술개발 분야에서 차지하는 위치 등을 기술
- 연구결과 해석 및 다른 결과와의 비교분석 등에 대해 고찰하고 결론을 서술함

◎ TNGS-CNB는 copy number를 cSNP microarray 방법으로 분석하고, 이로부터 copy number breakpoint 정보를 얻은 다음, 이들 부위를 capture하는 array를 제작하여 targeted NGS를 시행하는 과정을 거친다. 초기 copy number breakpoint 정보를 얼마나 정확하게 얻을 수 있는지가 이 방법의 가장 중요한 과정이라고 할 수 있는데, 이 과정에서 본 연구자들이 새로이 개발한 cSNP microarray를 이용함으로써 정확한 CNB들의 정보를 알 수 있었고, 이로부터 암 조직의 재조합 서열을 알아낼 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 TNGS-CNB 방법은 특히 재조합서열이 비교적 빈번하게 일어나는 부위의 정보를 알 수 있다면 미리 capture array를 제작하여 이들 부위만 targeted NGS를 시행한다면 재조합 서열정보를 빠르고 간편

하게 얻을 수 있는 방법이라 할 수 있다.

◎ 본 예비연구에서는 위암에서 이와 같은 방법으로 재배열 서열분석을 하고자 하였는데, 위암조직에 inflammatory cell의 침윤이나 정상조직과 혼재해 있어서 단순한 macrodissection만으로는 암세포를 순수하게 분리하는 과정이 불가능하다는 것을 알고, laser microdissection을 시행하게 되었다. 암세포를 laser microdissection의 과정을 거쳐서 분리하게되면 암조직에서 DNA를 얻는 속도가 현저히 늦어져서 결국 시간내에 얻을 수 있는 DNA의 양이 제한적일 수 밖에 없었다. 따라서 분석하는데 비교적 적은양의 DNA를 필요로하는 whole genome NGS방법을 사용하게 되었다. 비록 본 예비연구에서 TNGS-CNB 방법을 사용하지 못하였지만, targeted NGS 기술이 더 발달하면 적은양의 DNA로도 효과적으로 결과를 얻을 수 있는 방법들이 개발될 것으로 여겨진다. 하지만 현재는 많은 연구비가 whole genome NGS로 집중되어 targeted NGS에 대한 시장의 필요성이 커지지 않는다면 기술개발이 더딜 가능성이 있다고 하겠다.

◎ 따라서 현재 위암조직에서의 재배열 서열 정보를 알아내는 방법은 laser microdissection을 통해서 진행해야하는 단점 때문에, whole genome NGS 방법을 이용하는 것이 현실적인 대안이라고 할 수 있다. 또한 copy number breakpoint들 만으로 알 수 없는 copy number neutral translocation과 inversion과 같은 정보들이 같이 있어서, TNGS-CNB에서 얻을 수 없는 재배열 서열을 얻을 수 있는 장점도 있었다. 그러나 whole genome NGS의 결과에서 곧바로 재배열 서열을 정확히 알 수 없는 단점이 있어서, 이 재배열 부위를 PCR로 확인하고 염기서열을 결정하는 과정이 더 필요하다.

#### 4. 연구성과 및 목표달성도

##### (1) 연구성과

○ 과제시작시점부터 과제종료시점까지의 연구성과(학술지 게재, 학회발표, 학위논문, 산업재산권 출원·등록, 워크숍 또는 심포지움 개최, 전시회 참가, 임상응용, 기술성과 이전, 벤처 창업 등의 실적)를 기재하되, 본 과제와 관련성이 있는 성과에 한하여 기재 ※ 논문, 특허성과는 과제 시작시점 이후 게재 신청 또는 출원된 실적만 기재. 다만, 후속과제의 경우는 예외
---

##### 가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분)	저널명(IF.)	Year; Vol(No):Page	구분 <sup>2)</sup>	지원과제번호 <sup>3)</sup>
Targeted next-generation sequencing at copy-number breakpoints for personalized analysis of rearranged ends in solid tumors	홍경만 (교신)	PLoS One (3.534)	2014; 9(6):e100089~e100089	국외 SCIE	1110130
Chromatin CKAP2, a New Proliferation Marker, as Independent Prognostic Indicator in Breast Cancer:	홍경만 (교신)	PLoS One (3.534)	2014; 9(6):e98160~e98160	국외 SCIE	1410050

Association of Polymorphisms and Haplotypes in the Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor (IGF1R) Gene with the Risk of Breast Cancer in Korean Women	홍경만 (공동)	PLoS One (3.534)	2014; 9(1):e84532~e84532	국외 SCIE	없음
Down-regulation of lipid raft-associated onco-proteins via cholesterol-dependent lipid raft internalization in docosahexaenoic acid-induced apoptosis	홍경만 (교신)	Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids. (4.495)	2014; 1841(1):190~203 (4.495)	국외 SCI	없음

- 1) 저자구분 : 교신, 제1, 공동
- 2) 구분 : 국내, 국내 SCI, 국내 SCIE, 국외, 국외SCI, 국외SCIE 등
- 3) 지원과제번호(Acknowledgement)
  - 과제번호를 연차 표시(-1, -2, -3 등)를 생략하고 7자리로 기재하고, 과제와 관련성은 있으나 불가피하게 Acknowledgement가 누락된 경우에는 '없음'으로 기재

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 <sup>1)</sup>	지원과제번호

- 1) 지역 : 국내, 국외

다. 산업재산권

구분 <sup>1)</sup>	특허명	출원인	출원/등록국	출원/등록번호
발명특허	HER 2 양성 개체 진단 방법 및 HER 2 양성 개체 진단용 키트	홍경만 외 1인	등록/대한민국	1448175 (등록번호) 등록일: 2014.09.30
발명특허	Composition for Cancer Prognosis Prediction Comprising Anti-TMAP/CKAP2 Antibodies	홍경만 외 4인	등록결정/미국	13/577,126

- 1) 구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저서

저서명	저자	발행기관(발행국, 도시)	쪽수	Chapter 제목, 쪽수 (공저일 경우)

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

- 사업목표에 대한 달성내용 및 관련분야 기술발전예의 공헌도 등을 기술
- 달성도(%)는 연차별목표대비 당해연도 달성도 및 최종목표대비 당해연도까지의 누적 달성도를 반드시 기입

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
본 예비연구는 임상 적용을 위한 방법의 확립을 위해 1년 계획으로 시행할 예정이다.	1차년도	위암동결조직의 H&E 염색 및 암세포 50%이상조직의 DNA 및 RNA추출	위암조직에서 DNA를 추출. macrodissection을 계획하였으나, laser microdissection을 확립하고 이 방법으로 시행함.	90	90
		위암조직 10개에서 TNGS-CNB를 시행하고, rearranged sequence분석	10 개 위암조직과 정상조직의 whole genome NGS를 실시하여 재배열 서열을 분석.		
		위암조직 10개에서 Haloplex technology로 돌연변이 분석	10 개 위암조직과 정상조직의 whole genome NGS를 실시하여 돌연변이를 분석.		
		위암조직에서 23개 유전자의 카피수 분석	24개 유전자의 카피수 분석방법을 확립함		
	CKAP2 조직면역화학염색	500개 위암조직의 CKAP2 염색완료			
2차년도					
3차년도					

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
원래 3년 계획이었으나 방법의 확립을 위해 1년 예비연구를 진행하였음	위암에서 성공적으로 재배열 서열을 분석할 수 있었음
위암의 분자적 분석을 위한 조직 확보	IRB계획서 승인받고, 종양조직을 분양받아서, 위암의 조직과 함께 plasma가 있는 재발 위암 20 case를 확보하였으며, prospective design으로 50case의 위암에 대해 조직과 plasma를 모으고 있음.
위암의 분류를 위한 조직 확보	위암의 분자적 분류를 위하여 300case의 위암을 대상으로 하는 IRB 계획서를 제출하여 승인받았고, 중앙은행으로부터

	터 분량을 승인받았음.
위암에서의 분자적 분석	원래 계획했던 방법이 DNA 양이 많이 필요하였는데, laser microdissection의 필요성으로 인해 많은 양의 DNA를 얻을 수 없는 한계 때문에 whole genome NGS방법으로 전환하였는데, 카피수와 돌연변이에 대한 모든 결과를 한꺼번에 얻을 수 있었음.

## 5. 연구결과의 활용계획

### (1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

- 연구종료 2년후까지 연구사업 결과로 발생할 것으로 예상되는 성과, 즉 학술지 게재, 산업재산권 등을 단계별로 다음의 양식에 의거하여 작성함. 학술지 게재는 게재 예상 학술지 명과 Impact Factor 등을 기재함
  - 연구사업의 내용이 논문이나 산업재산권과 연결되기 힘든 과제의 경우, 자유 형식으로 예상연구성과 및 활용정도를 기재하되 최대한 계량화할 것
- 예) DB 몇 건 구축완료. OOO 시스템 구축 및 OO사업 완료

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재		게재 예상 전문학술지명, SCI급 학술지인 경우 Impact Factor 기록
산업재산권 등록		특허 등록 예상 국가, 예상 특허명 등
기 타		

### (2) 연구성과의 활용계획

- 연구성과물의 활용분야 및 활용방법, 활용범위 등을 구체적(특히 시간적 구체성, 예를 들어 몇 년 안에 치료기술 실용화 등)으로 기술하되, 참여기업이 포함되어 있는 과제의 경우 기업과 연계한 활용방안에 대해서도 기술함
- 추가 후속연구의 필요성에 대해서도 간략하게 기술함

◎ TNGS-CNB 방법으로 고형암에서 재배열 서열을 효과적으로 알아낼 수 있다는 것을 예비실험 결과 알 수 있었다. 향후 고형암환자 혈액내 cfDNA에서 암세포 유래 cfDNA를 재배열서열을 이용하여 모니터링 할 수 있다는 결과가 나온다면, 암환자의 재발이나 항암제치료에 이 방법이 응용될 가능성이 아주 크다고 하겠다.

◎ 선행연구에서 TNGS-CNB 방법으로 분석한 후 재배열된 서열의 유전자를 분석한 결과, 암억제유전자로 알려져 있는 유전자들의 intragenic exonal deletion이 대부분 발견된다는 것을 알 수

있었으며, 그 이외에도 알려지지 않은 유전자들의 intragenic deletion을 발견할 수 있었다. 이러한 결과는 새로운 돌연변이들을 TNGS-CNB 방법으로 발견해 낼 수 있다는 것을 의미한다. 따라서 TNGS-CNB 방법으로 분석한 재배열서열 부위의 유전자의 기능을 밝히는 데에도 기여를 할 수 있을 것으로 보인다.

◎ 본 예비연구는 본 연구를 위한 방법의 확립에 대한 연구로, laser microdissection과 whole genome NGS 및 이를 분석하는 전 과정에 대한 방법을 확립하였고, 또한 예비연구에서 본 연구에 필요한 암조직과 plasma시료를 확보함으로써 다음 단계 연구를 시작할 수 있는 준비가 되었다고 할 수 있다.

## 6. 참고문헌

○ 보고서 작성시 인용된 모든 참고문헌을 열거

Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Hill J, Lehle M, Ruschhoff J, Kang YK; ToGA Trial Investigators. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2010 Aug 28;376(9742):687-97. Epub 2010 Aug 19.

Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, Carnaghi C, Bajetta E, Luppi G, Sobrero A, Barone C, Cascinu S, Colucci G, Cortesi E, Nichelatti M, Gambacorta M, Siena S. Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. *J Clin Oncol*. 2007 Aug 1;25(22):3238-45.

Smolen GA, Sordella R, Muir B, Mohapatra G, Barmettler A, Archibald H, Kim WJ, Okimoto RA, Bell DW, Sgroi DC, Christensen JG, Settleman J, Haber DA: Amplification of MET may identify a subset of cancers with extreme sensitivity to the selective tyrosine kinase inhibitor PHA-665752. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103 (7):2316-2321

Nakamura K, Yashiro M, Matsuoka T, Tendo M, Shimizu T, Miwa A, Hirakawa K: A novel molecular targeting compound as K-samII/FGF-R2 phosphorylation inhibitor, Ki23057, for Scirrhus gastric cancer. *Gastroenterology* 2006, 131 (5):1530-1541

Kim HK, Hwang HL, Park SY, Lee KM, Park WC, et al. (2013) Simple and versatile molecular method of copy-number measurement using cloned competitors. *PLoS One*, 8(7):e69414

Hollox EJ, Detering JC, Dehnugara T (2009) An integrated approach for measuring copy

number variation at the FCGR3 (CD16) locus. Hum Mutat 30: 477-484.

## 7. 첨부서류

- 본 연구의 성과로 논문, 저서, 산업재산권, 정책정책 기여 등이 있을 경우 관련 증빙자료를 첨부토록 함



## II. 제 2 세부과제

- 세부과제별로 별도로 작성함
- 각 세부과제의 계획서의 표지는 색지로 작성하여 쉽게 구분될 수 있도록 함.  
표지에는 다음과 같은 사항을 반드시 기재함.

**세부과제명** : 돌연변이와 카피수 분석을 통한 위암 환자의 분자적 진단 예비연구

**세부과제책임자(성명/소속)** : 김영우/위암연구과

(1) 최종목표 : 위암에서 돌연변이 정보를 이용하여 위암환자 cfDNA에서 모니터링 가능성과 위암분류에 대한 예비연구.

구체적으로 1) 위암환자 10명에서 haloplex technology 등의 기술을 이용하여 돌연변이 정보를 얻는 방법의 확립.

2) 위암조직 10개에서 23개 유전자의 카피수를 분석하고, 40가지 돌연변이 정보를 분석하는 방법의 확립.

## 2. 연구의 내용 및 결과

○ 연구의 이론적, 실험적 연구 방법, 연구 내용 및 결과를 객관적으로 기술

### 1) 위암의 재발과 분류를 위한 돌연변이 분석

◎ 고행암에서 재조합서열을 이용하여 암유래 cfDNA를 민감하게 측정할 수 있다는 proof of concept 논문이 Science Translational Medicine에 보고되었다는 것은 이미 기술하였다 (Leary et al., 2010). 그러나 실제 이러한 proof of concept을 실제 임상에 적용하기 위해서는 다양한 시도가 필요하다. 그래서 본 연구는 이러한 새로운 개념의 분자적 변화의 임상적용을 시도하고자 위암조직에서 재배열 서열을 분석하고 재발까지의 plasma 시료를 모아서 암유래 cfDNA의 level을 재배열 서열을 이용하여 측정하고자 계획하였다. 이를 위해서는 위암 동결조직과 수술전 후의 plasma 시료를 주기적으로 모아야 하는데, prospective study를 고안해야만 하였다.

◎ 그런데 연구를 진행하던 중, 이미 plasma시료를 수술전 후에 주기적으로 모아둔 시료가 있다는 것을 발견하고, 이들 중 재발암이 있는지를 확인하였는데, 20여 case의 위암case를 발견하였다. 따라서 우선 이들에 대해 retrospective study를 design하였으며, 지속적으로 50여 case의 위암조직과 serial plasma 시료를 수집하고 있다. 이를 위해 이미 국립암센터 IRB의 승인을 받았고, 국립암센터 중앙은행에 동결 위암조직을 신청하여 분양받아서 연구를 진행하고 있는 상황이다.

◎ 다음은 위와 같은 연구를 위하여 IRB 계획서를 작성한 내용 중 연구의 선정기준과 시료에 관한 내용이다.

#### 1) 염색체전위 분석을 통한 위암환자의 모니터링 연구

선정기준:

- A. Prospective study
- 1) 위암 병기 IIIb-IIIc 환자로 완치수술을 받을 환자
  - 2) 나이 60세 이하 환자
  - 3) 종양크기 3cm이상이면서 연구동의서에 동의한 환자

- B. Retrospective study
- 1) 재발한 위암환자로 이전연구에서 수술전후 혈액이 보관된 환자

2) 종양은행에 동결조직이 보관되어 있는 환자.

제외기준: Prospective study의 경우 적출한 종양 중 0.5 x 0.5 cm의 종양조직을 병리학에서 전달 받고, 이를 동결하여 돌연변이와 재배열 분석에 사용. 혈액은 수술전 20 cc, 수술 후 매 3개월마다 10cc 씩 채혈.

- cfDNA를 사용하게 될 환자에게 매 3개월마다, 혈액 약 20 ml를 채취하게 되며, 대상 환자에게 동의서를 받아서 연구.
- 각 재배열 서열에 특이한 realtime PCR방법을 확립하고, 이 방법으로 serial하게 모은 혈액 cfDNA에서 암세포 유래 cfDNA의 양을 측정.
- 환자의 재발과 항암제 치료효과 등에 대한 정보를 모아서 관련성을 분석.

2) 카피수와 돌연변이 분석을 통한 위암의 분자적 분류 연구

Inclusion criteria

1) 위암 병기 II-III 환자로 근치수술을 받는 환자

2) 동결위암조직이 보관중인 환자

- 위암조직의 돌연변이 분석은 Haloplex technology를 이용할 계획.
- 24개 유전자의 카피수 분석은 1단계 연구에서 확립한 mrcPCR방법을 이용.
- 각 돌연변이에 대한 특이 PCR방법을 확립하고, cfDNA에서 암유래 cfDNA의 양을 돌연변이를 이용하여 측정.
- 환자의 재발과 항암제 치료효과 등에 대한 정보를 모아서 관련성을 분석.

◎ 이상과 같은 inclusion criteria에 의하여 retrospective 연구의 경우, 국립암센터 종양은행에서 재발이 있는 암환자의 위암조직을 분양받아 연구를 진행하였다.

◎ 또한 prospective study를 위하여 위암수술 예정인 환자의 혈액에서 plasma를 모으고, 수술일 위암조직을 수집하고 있으며, 수술후와 매 3개월 마다 환자 혈액에서 plasma를 모아서 보관하고 있다. 현재 이를 위하여 약 15명의 환자 암조직을 수집하였고, 이 환자들의 plasma를 지속적으로 모으고 있다.

◎ 위암에서의 재배열 분석을 위하여 동결위암조직에서 DNA를 분리하여야 한다. 이 과정에서 분자적 분석의 신뢰성을 높이기 위하여 동결위암조직에서의 위암세포 percentage를 결정하는 것이 중요하다. 보통 TCGA에서는 위암세포의 percentage를 60%이상으로 정하고 있다. 따라서 위암조직에서 위암세포의 proportion을 결정하기 위하여 H&E 염색을 시행하여 관찰하였는데, 일부 조직을 제외하고 대부분의 조직에서 위암세포의 percentage가 50%에 훨씬 미치지 못하였고, 몇 조직은 5% 이하였다. 이 조직들을 macrodissection을 시행한다고 하여도 60%이상의 위암세포 percentage를 얻는 것은 일부 조직에서만 가능할 것으로 판단하였다.

◎ 위암에서의 tumor percentage에 관한 문제는 실험 design할 때 어느 정도의 문제가 있을 것으로 예상은 했지만, macrodissection으로 해결할 수 있을 것으로 예상했다. 그러나 대부분의 위암조직에서 tumor percentage에 대한 문제를 이 방법으로 해결할 수 없다는 것을 알게 되었다. 이와

같은 문제를 해결하고자 laser microdissection을 시행하였다. 여러 가지 microdissector들을 사용하여 시행하였는데, 그 중 하나가 microdissection시 암세포를 분명하게 구별할 수 있었으며, microdissection으로 암세포를 순수하게 분리할 수 있었다. 그림 1은 microdissection을 시행한 한 예로, 암세포 주위에 inflammation이 많고 그 중간중간에 암세포들이 모여 있어서 macrodissection으로는 암세포의 percentage를 높일 수 없었지만, laser microdissection으로서 문제를 해결할 수 있었다.

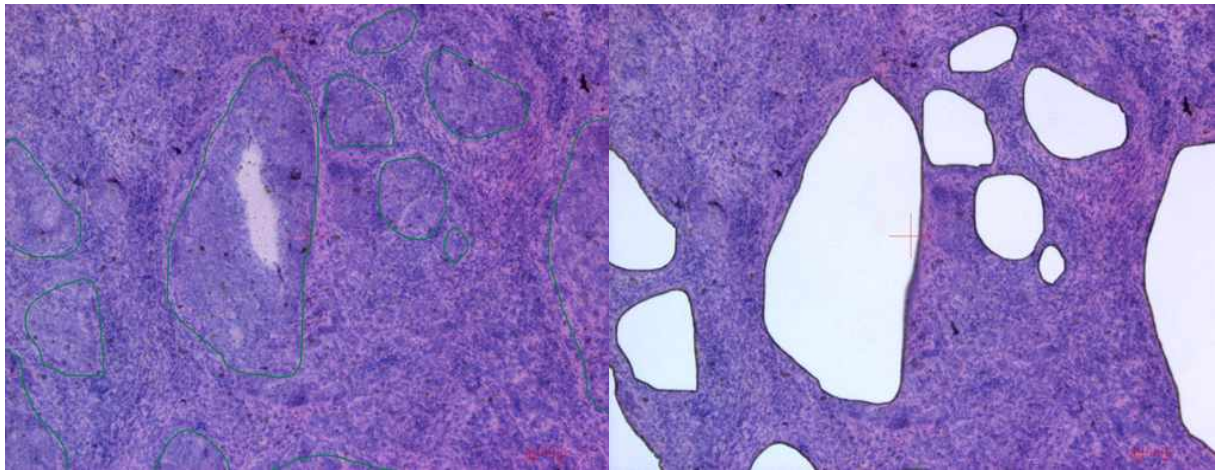


그림 1. 위암조직에서의 microdissection. 왼쪽 그림은 microdissection하기 이전의 위암조직이고, 녹색으로 표시된 부분이 암세포가 모여있는 부분이다. 이부분만을 microdissection하여 tube에 모았다. 오른쪽 그림은 microdissection한 암세포들이 떨어져 나가고 나머지 inflammation과 정상조직 부분이 남아 있음을 보여주고 있다.

© 이와 같이 microdissection을 시행하는데, 암세포 여부를 판단하기 위하여 H&E염색을 시행하였다. 그런데 이렇게 H&E염색과 microdissection 과정을 거쳐서 얻은 DNA의 quality에 변화가 올 수 있어서, 이를 check하기 위해 microdissection한 조각들에서 DNA를 분리하고 전기영동을 시행하여 DNA fragment size를 확인하였다. 이 결과에서 냉동 위암조직에서 microtome으로 얇게 조직을 자른 후 곧바로 분리한 DNA와 비교하여 1% agarose gel electrophoresis에서 별 차이가 없다는 것을 확인하였다 (그림 2). 따라서 microdissection으로 얻은 DNA를 암조직에서의 재배열을 분석하는데 이용할 수 있다고 판단하였다. 이와 같은 laser microdissection을 위한 조건을 확립하고, DNA quality를 확인하는 과정을 거치면서 연구의 진행이 예상했던 것보다 훨씬 늦어지게 되었다. 이 과정에서 H&E염색후 얼마간 slide 조직을 보관하여도 DNA에 문제가 없는지 등의 연구를 진행하였으며, 우리의 결과에 의하면 동결조직의 H&E염색후 약 2주일까지는 DNA의 크기에 커다란 변화가 없다는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 한 조직에서 나온 여러 slide를 한꺼번에 preparation한 후 염색하고 1주일 정도 내에 microdissection을 하고 DNA를 보관한다면 whole genome NGS를 하는데 문제가 없다는 것을 의미한다. 실험의 진행에서 한 slide를 제작하고 곧바로 microdissection을 시행한 후 DNA를 preparation하고 같은 시료에서 다시 cryosection을 통해

slide를 제작한 후 다시 microdissection을 함으로써 오는 시간적인 문제와 slide를 그때그때 제작하면서 오는 시료의 loss에 대한 중요한 문제점들을 해결해 주었다는 점에서 중요한 정보를 제공해 주었다.

◎ 그런데 위암조직의 microdissection을 통하여 얻은 DNA양이 원래 계획이었던 TNGS-CNB방법을 사용하기에는 너무 부족하였다. 이를 위해서는 조직은행에서 얻은 동결조직보다 훨씬 많은 양의 조직이 필요한 경우가 많았고, microdissection을 훨씬 많은 section에서 시행해야만 하였다. 따라서 TNGS-CNB 방법 대신에, 시료의 양이 훨씬 적게 필요로 하는 whole genome NGS 방법을 사용하기로 하였다. Whole genome NGS로 분석하면 비용은 많이 소모되고 bioinformatics분석 시간이 많이 소요된다는 단점이 있지만, copy number 변화와 mutation에 대한 정보를 한꺼번에 얻을 수 있다는 장점이 있다. 이와 같은 판단에 따라 whole genome NGS를 하는 쪽으로 결정하고 microdissection한 10 case의 위암시료와 대응되는 정상 위조직 10개, 총 20개의 시료에 대해 whole genome NGS를 분석하였다.

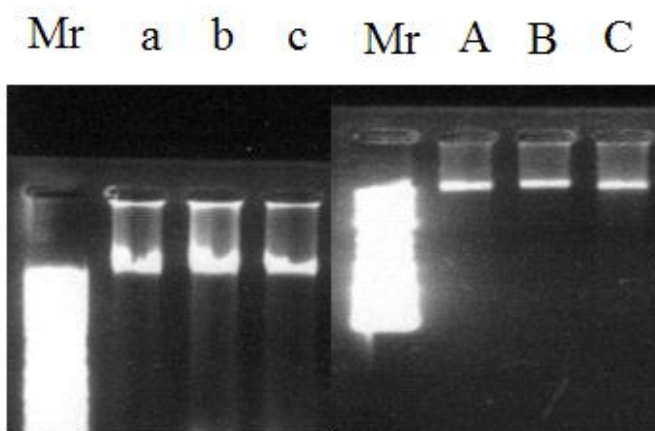


그림 2. 위암 조직의 microdissection 후 DNA quality 점검. 동결조직을 microtome으로 얇게 잘라서 분리한 DNA (A, B, C)와 H&E염색 후 microdissection을 통하여 분리한 DNA (a, b, c)의 quality를 1% agarose gel electrophoresis를 하여 확인하였다. Mr, 100 bp ladder DNA marker.

◎ Whole genome NGS에서 mutation에 대한 결과가 같이 나오므로, 40개 유전자에 대한 돌연변이를 다른 방법으로 분석하고자 한 계획을 수정하여 whole genome NGS에서 나온 결과를 이용하기로 하였다. 따라서 원래 haloplex 방법으로 돌연변이에 대한 정보를 얻는 연구계획을 취소하였다. 이러한 배경에는 whole genome NGS로 방법을 선회하면서 연구비가 예상외로 많이 소요되어 haloplex 방법을 따로 확립할 수 있는 연구비가 없었기 때문이기도 하다.

◎ Laser microdissection을 통해 preparation한 DNA에 대해 paired normal 위조직 DNA와 함께 whole genome NGS를 시행하였다. 정상위조직 DNA와 비교하여 위암조직 DNA의 변화를 bioinformatics 방법으로 분석하였는데, 표 1과 같은 결과를 얻었다. 거의 모든 case에서 예상보다 많은 돌연변이와 small insertion과 deletion을 확인할 수 있었는데, 이 이유가 laser

microdissection을 통해 암세포만 따로 분리하여 분석한 것이 원인인지 아니면 여기에 include된 case들이 hypermutated type들이 enrich된 것인지 더 분석을 통하여 규명해야 할 것이다. 그런데, 우선 translocation부위들을 확인해 본 결과 대부분의 translocation site들이 reliable하게 여러개의 read pair에서 같은 translocation을 보이는 것으로 보아 시료의 문제나 분석상의 문제로 여겨지지는 않아서, 새로운 결과가 될 수 있기를 기대하고 있다.

표 1. 위암조직의 whole genome NGS를 분석하여 얻은 암세포에서의 분자적 변화

Order no.	Sample ID	SNPs	Small insertions	Small deletions	Copy number gains	Copy number losses	Duplications	Insertions	Deletions	Inversions	Translocations
1408AHX-0001	N1_C1	11,685	277	246	128	4	27	2	72	60	96
1408AHX-0001	N2_C2	3,399	1	5	52	4	6	-	37	3	-
1408AHX-0001	N3_C3	14,816	242	271	72	8	39	3	234	8	-
1408AHX-0001	N4_C4	17,723	350	567	354	21	169	2	136	79	94
1408AHX-0001	N5_C5	6,398	116	123	34	5	2	1	36	-	4
1408AHX-0001	N6_C6	14,819	328	256	100	4	25	2	58	38	6
1408AHX-0001	N7_C7	109,027	11,162	49,614	6	14	10	4	64	1	10
1408AHX-0001	N8_C8	9,212	177	215	156	26	62	2	633	31	16
1408AHX-0001	N9_C9	2,792	48	70	13	21	13	-	44	27	16
1408AHX-0001	N10_C10	836,066	15,820	22,001	142	5	108	158	665	57	62

## 2) 위암의 분류를 위한 24가지 유전자의 카피수 측정 방법의 확립

◎ 카피수변화는 암세포의 주요한 변화 중 하나이다. 그런데 카피수변화를 측정하는 PCR방법을 응용한 분자적 방법이 임상적용에 제한이 있었는데, 이는 PCR 방법을 응용한 분자적 방법으로 측정된 결과의 신뢰성이 다른 방법에 비해 떨어지기 때문이다. 이러한 단점을 극복하고자 다른 연구자들이 competitor를 시료와 인위적으로 섞어서 사용하는 rcPCR (real competitive PCR) 이라는 방법이 도입되었으나, 시료와 competitor를 정확하게 섞어 주어야하는 단점으로 인해 임상에 적용하기 어려웠다. 본 연구자들은 기존의 rcPCR방법을 변형하고 procedure를 개량하여 mrcPCR (modified real competitive PCR)이라는 방법을 고안하였다.

◎ 그림 3은 mrcPCR 방법의 원리이다. 그리고 이 방법을 이용하여 HER2의 카피수를 측정하기 위하여 mrcPCR방법을 확립하였고, 17q 염색체에 있는 HER2유전자의 두 서열을 선택하여 카피수를 측정하도록 고안하였고, 상대적인 카피수의 기준으로 사용하기 위하여 17q 염색체 상에서 ALDOC유전자와 G6PC3유전자 등 두개의 유전자 서열을 선택하였다 (그림 4).



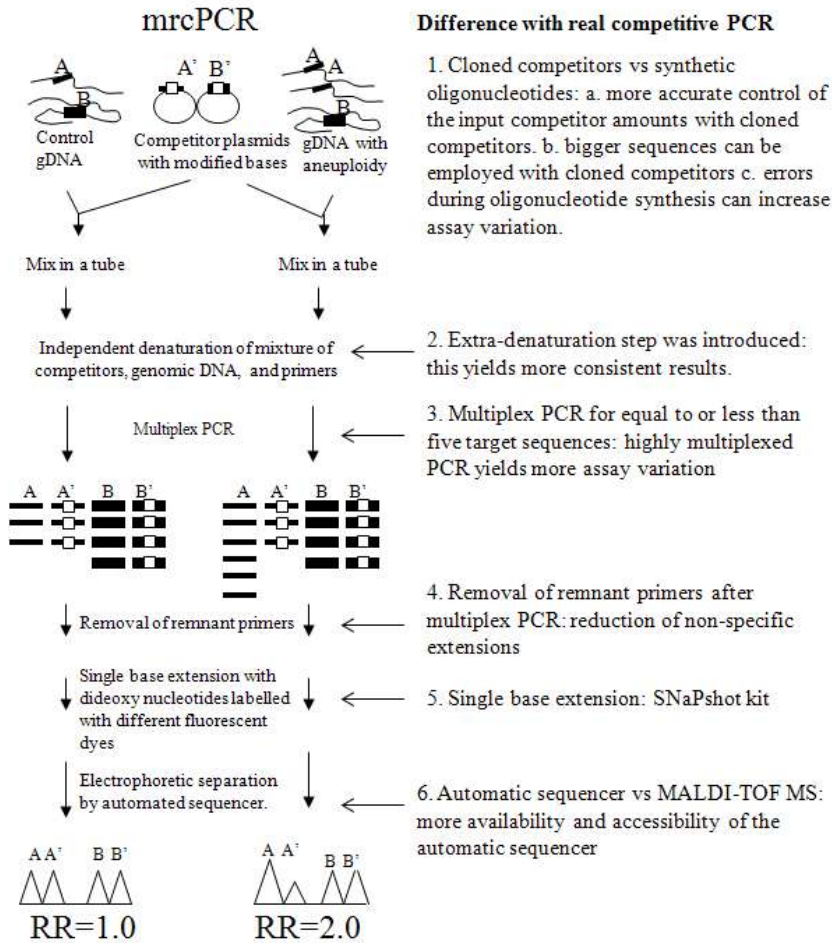


그림 3. mrcPCR의 원리. 시료에 competitor를 일정양 혼합하여 multiplex PCR을 시행한다. 이때 사용하는 competitor로 지놈 DNA에 있는 유전자의 fragment가 클로닝되어 있는 vector를 사용하고, 이 vector내 유전자 fragment 중 하나는 자연계에서 보고되지 않은 SNP를 도입하여 사용한다. 시료와 competitor 혼합물을 사용하여 multiplex PCR을 시행하면, 시료의 유전자와 competitor의 유전자가 경쟁적으로 증폭되는데, 그 상대적인 양은 reference 유전자의 상대적인 양에 비해 항상 일정하게 된다. 따라서 control 시료에서 target 유전자와 reference 유전자 사이에 genomic DNA와 competitor에서 유래되는 RR을 1.0으로 normalize하면 target 유전자의 카피수가 증가되어 있는 경우 RR은 증가하고, target 유전자의 카피수가 감소하면 RR은 감소하게 된다. 오른쪽 그림은 HER2 유전자의 카피수를 세포주에서 측정한 결과이다.

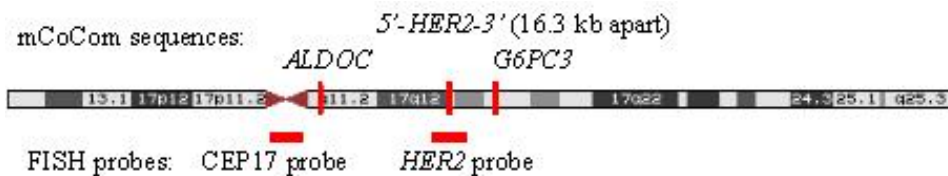


그림 4. HER2 증폭을 측정하기 위해 mrcPCR에 사용한 4가지 서열의 위치. ALDOC 유전자는 HER2에 비해 centromere 쪽에 위치하고 있고, G6PC3는 telomere 쪽에 위치한다. 그러나 HER2로부터의 상대적인 거리는 G6PC3가 가깝다. HER2 유전자 내에서 두 가지 서로 다른 서열의 증폭을

측정하도록 고안하였다. 5HER2는 ALDOC쪽에 위치한 서열이고, 3HER2는 G6PC3쪽에 위치한 서열이다. FISH probe로 사용하는 CEP17과 HER2 probe의 위치도 표시하였다.

◎ 이렇게 고안한 방법을 사용하여 실제 카피수를 측정하여 그림 5와 같이 이 방법의 유용성을 증명하였다. 이 방법을 사용하는 과정에서 extradenaturation procedure를 사용하는데, 이는 PCR과정 바로 이전에 genomic DNA의 full denaturation하는 것이 카피수를 측정하는데 중요하다는 결과를 그림 5B와 같이 알 수 있었다. 그리고 그림 5C와 5D에서와 같이 독립적으로 반복실험하여도 같은 결과를 얻을 수 있었다. 또한 5E에서와 같이 서로 다른 양의 competitor를 서로 다른 양의 genomic DNA와 섞어 실험을 하여도 동일한 결과를 얻을 수 있으며, 그림 5G에서와 같이 IHC와 FISH를 병용한 현재의 standard method의 결과와도 일치한다는 것을 알 수 있었다. 실제 이러한 방법은 동결유방암조직 뿐 아니라 파라핀 조직 DNA에도 적용할 가능성이 있음을 그림 3H와 같이 알 수 있어서 임상적 응용 가능성이 있다고 하겠다. 이상과 같은 결과로 특허를 출원하였는데, 올해 대한민국 특허로 등록할 수 있었다.

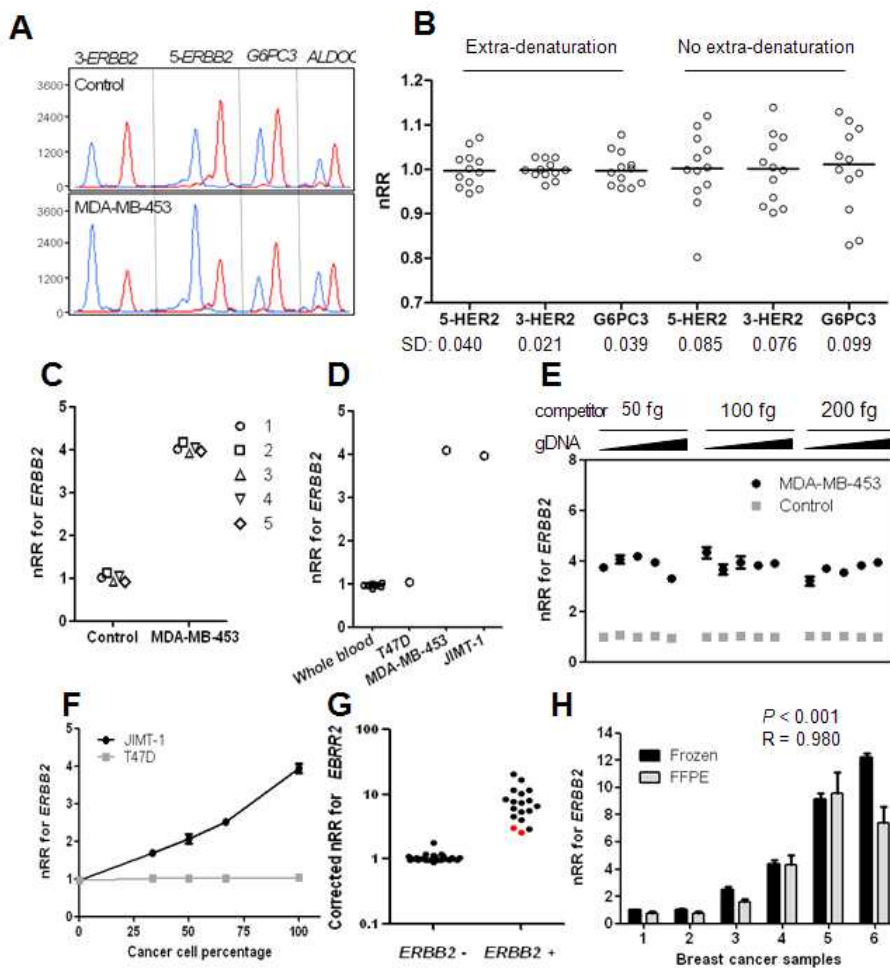


그림 5. Measurement of ERBB2 gene copy number by mrcPCR. (A) Representative results for measurement of ERBB2 copy number by mrcPCR using two ERBB2 sequences (5-ERBB2 and 3-ERBB2) and two reference sequences (ALDOC and G6PC3). Eight peaks originated from either genomic DNA (blue) or the competitor (red). (B) mrcPCR assay variation depending on

extra-denaturation procedure. Standard deviation (SD) values for the nRRs are shown. (C) Reproducibility of mrcPCR by five independent assays. (D) ERBB2 copy number by mrcPCR in control and cancer cell samples. The y-axis shows the mean nRR values of 5-ERBB2 and 3-ERBB2. (E) mrcPCR results using various amounts of input genomic DNA (blue, 2.5, 5, 10, 20, or 40 ng) and competitors (red, 6.25, 12.5, or 25 fg based on ALDOC competitor). The y-axis shows the mean nRR values of 5-ERBB2 and 3-ERBB2. (F) Detection of ERBB2 amplification in serially-diluted DNA of JIMT-1 or T47D cells. The y-axis shows the mean nRR values of 5-ERBB2 and 3-ERBB2. The assay was performed in duplicate. (G) Comparison of mrcPCR results with those from standard methods of immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH). Y axis: corrected nRR for ERBB2 copy based on cancer cell percentage as described in Materials and Methods. The red spots are the samples that contained only about 30% tumor cells. (H) Comparison of mrcPCR results between fresh-frozen (black) and formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE, gray) cancer tissues ( $P < 0.001$ ,  $R = 0.980$ , by Pearson correlation test after logarithmic transformation). The assay was performed in triplicate.

© 현재 이러한 카피수 측정방법을 24개 유전자에 대해 모두 확립하였고 (그림 6), 이 방법을 활용하여 위암조직에서 카피수 변화를 측정하고 있다.

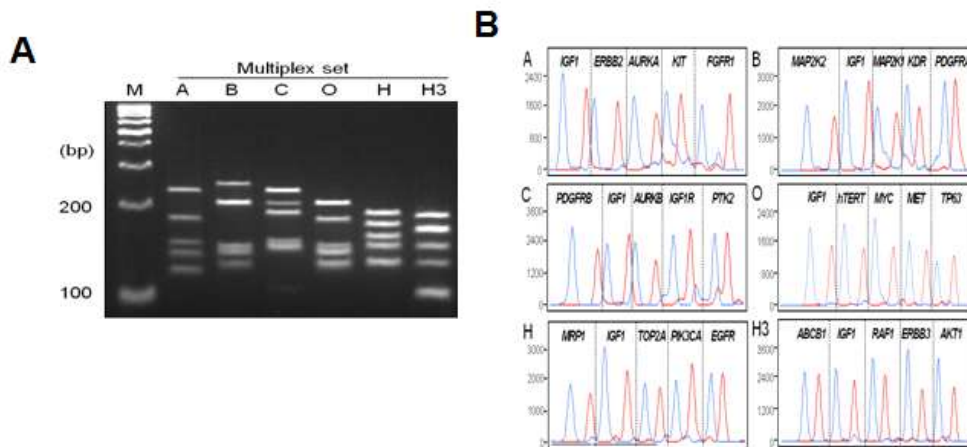


그림 6. 24가지 유전자에 대한 mrcPCR방법 예시. 각각의 target 유전자를 control 유전자 (IGF1을 사용)의 서열과 함께 multiplex PCR을 시행하고 (A), single base extension을 시행하면 (B) 지놈 DNA와 competitor에서 유래된 서열의 상대적인 양을 측정할 수 있다. 상대적인 양을 측정하는데, electrophoregram (B)에서 각각 유전자 peak height 값의 상대적인 양을 이용한다.

### 3) 위암 파라핀 조직에서 CKAP2발현의 의의

© 본 연구는 제1 세부과제에서 진행하기로 하였는데, 제 1세부과제에서 계획했던 100개의 조직 대신



400개 이상의 위암조직에 대한 조직면역화학염색으로 확대하여 제 2세부과제에서 진행하기로 하였으며, 이에 필요한 IRB 계획서를 작성하여 국립암센터 IRB의 승인을 받았다.

◎ 약 500개의 조직으로 제작한 tissue microarray에서 CKAP2 항체를 이용하여 IHC염색을 시행하였다. 그림 7과 같은 결과를 얻을 수 있다. 이러한 결과에서 CKAP2 양성인 세포의 수가 위암환자의 생존과 관련성이 있는 지 여부를 분석하였다.

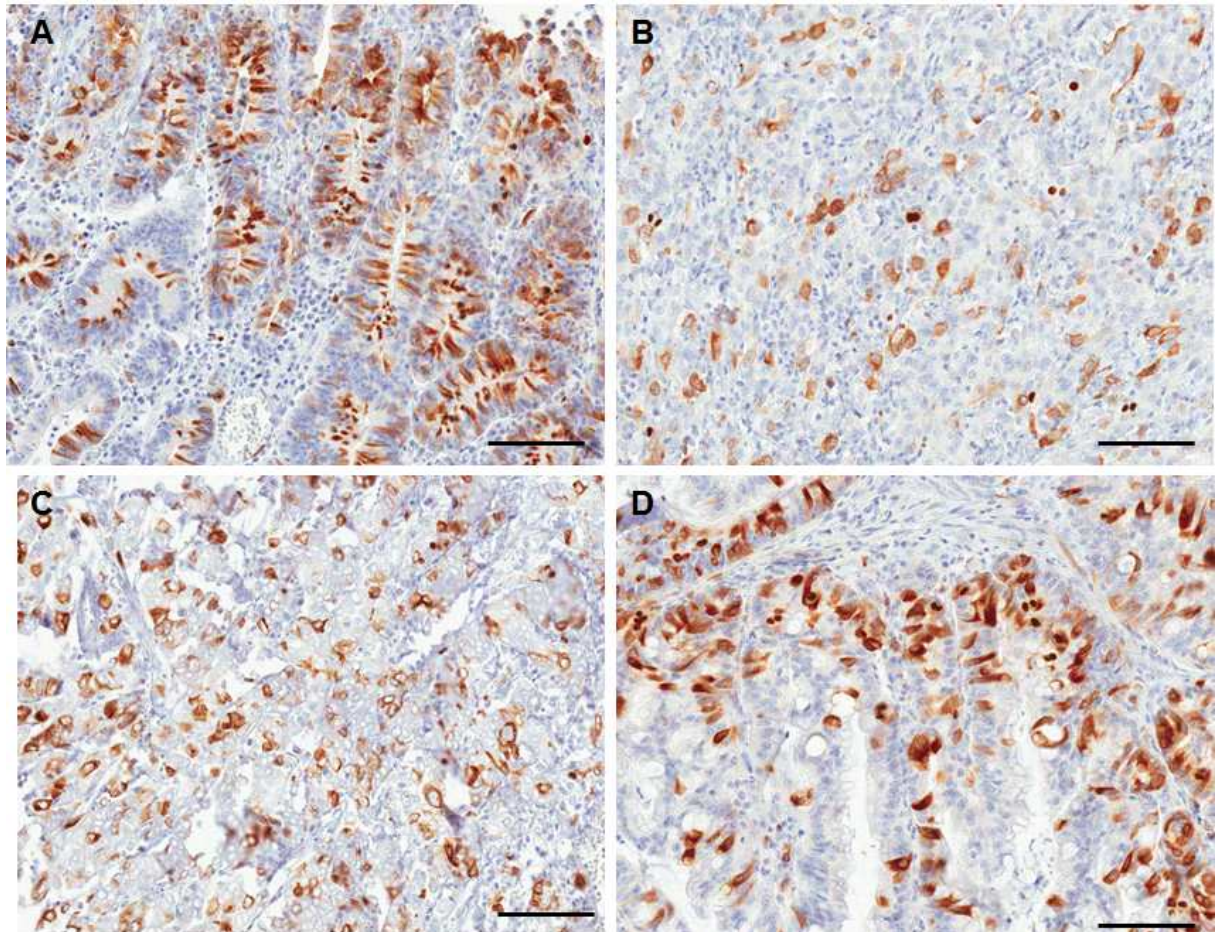


그림 7. CKAP2 immunohistochemical staining of gastric cancer tissues. The chromatin CKAP2-positive cell numbers were clearly shown among the various gastric cancer types: well differentiated adenocarcinoma (A, intestinal type), poorly differentiated adenocarcinoma (B, diffuse type), signet-ring cell carcinoma (C, diffuse type), and mucinous adenocarcinoma (D, mixed type). Each bar represents 100  $\mu$ m.

◎ CKAP2의 IHC를 분석하여 나온 CPCC (CKAP2 positive cell count)를 분석하였다. 60%이상의 암이 있는 TMA core 437예에 대하여 임상적인 특징과의 관련성을 조사하였는데, 그 결과는 표 1과 같았다.

표 1. Correlation between CPCC and clinicopathologic characteristics of 437 gastric cancer patients.

Variable <sup>⊃</sup>	Group <sup>⊃</sup>	N <sup>⊃</sup>	median CPCC <sup>⊃</sup> (quartile range) <sup>⊃</sup>	P <sup>†</sup> <sup>⊃</sup>
Gender <sup>⊃</sup>	Male <sup>⊃</sup>	301 <sup>⊃</sup>	12 (6, 21) <sup>⊃</sup>	<sup>⊃</sup>
	Female <sup>⊃</sup>	136 <sup>⊃</sup>	8 (2, 17) <sup>⊃</sup>	<b>0.002</b> <sup>⊃</sup>
Age <sup>⊃</sup>	<50 <sup>⊃</sup>	119 <sup>⊃</sup>	8 (2, 17) <sup>⊃</sup>	<sup>⊃</sup>
	50-59 <sup>⊃</sup>	123 <sup>⊃</sup>	13 (5.5, 20) <sup>⊃</sup>	<b>0.003</b> <sup>⊃</sup>
	60-69 <sup>⊃</sup>	146 <sup>⊃</sup>	11 (5, 20.8) <sup>⊃</sup>	<b>0.009</b> <sup>⊃</sup>
	≥70 <sup>⊃</sup>	49 <sup>⊃</sup>	11 (5, 23) <sup>⊃</sup>	<b>0.011</b> <sup>⊃</sup>
Histologic Type <sup>⊃</sup> (WHO) <sup>††</sup> <sup>⊃</sup>	WD or MD <sup>⊃</sup>	166 <sup>⊃</sup>	13 (6, 21.8) <sup>⊃</sup>	<sup>⊃</sup>
	PD <sup>⊃</sup>	178 <sup>⊃</sup>	10 (4, 18.8) <sup>⊃</sup>	0.071 <sup>⊃</sup>
	SRC <sup>⊃</sup>	68 <sup>⊃</sup>	5.5 (2, 12) <sup>⊃</sup>	<b>&lt; 0.001</b> <sup>⊃</sup>
	Others <sup>⊃</sup>	25 <sup>⊃</sup>	18 (6.75, 44.75) <sup>⊃</sup>	0.068 <sup>⊃</sup>
Lauren <sup>⊃</sup> Classification <sup>†††</sup> <sup>⊃</sup>	Intestinal <sup>⊃</sup>	207 <sup>⊃</sup>	12 (6, 21) <sup>⊃</sup>	<sup>⊃</sup>
	Diffuse <sup>⊃</sup>	151 <sup>⊃</sup>	6 (2, 14.8) <sup>⊃</sup>	<b>&lt; 0.001</b> <sup>⊃</sup>
	Mixed <sup>⊃</sup>	36 <sup>⊃</sup>	10 (5, 19.8) <sup>⊃</sup>	0.343 <sup>⊃</sup>
	Unknown <sup>⊃</sup>	43 <sup>⊃</sup>	14.5 (9.3, 32.5) <sup>⊃</sup>	<b>0.010</b> <sup>⊃</sup>
Depth of Invasion <sup>‡</sup> <sup>⊃</sup>	T1 <sup>⊃</sup>	183 <sup>⊃</sup>	9 (3.5, 17) <sup>⊃</sup>	<sup>⊃</sup>
	T2 <sup>⊃</sup>	44 <sup>⊃</sup>	15 (4, 28) <sup>⊃</sup>	<b>0.035</b> <sup>⊃</sup>
	T3 <sup>⊃</sup>	83 <sup>⊃</sup>	11 (5, 18) <sup>⊃</sup>	0.200 <sup>⊃</sup>
	T4 <sup>⊃</sup>	127 <sup>⊃</sup>	12 (6, 22) <sup>⊃</sup>	<b>0.038</b> <sup>⊃</sup>
LN Metastasis <sup>‡</sup> <sup>⊃</sup>	N0 <sup>⊃</sup>	219 <sup>⊃</sup>	10 (4, 18.5) <sup>⊃</sup>	<sup>⊃</sup>
	N1 <sup>⊃</sup>	50 <sup>⊃</sup>	12.5 (6, 22) <sup>⊃</sup>	0.351 <sup>⊃</sup>
	N2 <sup>⊃</sup>	58 <sup>⊃</sup>	11 (5, 17) <sup>⊃</sup>	0.586 <sup>⊃</sup>
	N3 <sup>⊃</sup>	110 <sup>⊃</sup>	11 (5, 23.5) <sup>⊃</sup>	0.340 <sup>⊃</sup>
Metastasis <sup>⊃</sup>	No <sup>⊃</sup>	411 <sup>⊃</sup>	11 (4, 20) <sup>⊃</sup>	<sup>⊃</sup>
	Yes <sup>⊃</sup>	26 <sup>⊃</sup>	8.5 (6, 14.5) <sup>⊃</sup>	0.840 <sup>⊃</sup>
Tumor Location <sup>‡‡</sup> <sup>⊃</sup>	Middle <sup>⊃</sup>	81 <sup>⊃</sup>	8 (4, 17) <sup>⊃</sup>	<sup>⊃</sup>
	Upper <sup>⊃</sup>	53 <sup>⊃</sup>	9 (2, 16) <sup>⊃</sup>	0.624 <sup>⊃</sup>
	Lower <sup>⊃</sup>	263 <sup>⊃</sup>	11 (5, 21) <sup>⊃</sup>	0.050 <sup>⊃</sup>
	Overlapping <sup>⊃</sup>	40 <sup>⊃</sup>	13 (4.8, 22) <sup>⊃</sup>	0.153 <sup>⊃</sup>
Tumor Size <sup>⊃</sup>	1 (≤ 3.0 cm) <sup>⊃</sup>	99 <sup>⊃</sup>	10 (3, 18) <sup>⊃</sup>	<sup>⊃</sup>
	2 (3.0 <, ≤ 5.0 cm) <sup>⊃</sup>	144 <sup>⊃</sup>	10 (5, 8) <sup>⊃</sup>	0.473 <sup>⊃</sup>
	3 (5.0 <, ≤ 7.0 cm) <sup>⊃</sup>	90 <sup>⊃</sup>	13 (5, 21) <sup>⊃</sup>	0.142 <sup>⊃</sup>
	4 (> 7.0 cm) <sup>⊃</sup>	109 <sup>⊃</sup>	11 (5, 24) <sup>⊃</sup>	0.109 <sup>⊃</sup>
Adjuvant Chemotherapy <sup>⊃</sup>	No <sup>⊃</sup>	207 <sup>⊃</sup>	10 (4, 18) <sup>⊃</sup>	<sup>⊃</sup>
	Yes <sup>⊃</sup>	230 <sup>⊃</sup>	11.5 (5, 22) <sup>⊃</sup>	0.065 <sup>⊃</sup>

© 분석한 환자들에서 CPCC와 생존과의 관련성을 분석하였는데, 전체 위암환자에서는 그림 8A와 같이 CPCC와의 관련성이 없었는데, 남자 환자 중 T1과 T2 stage의 암에서 생존과 유의성을 보였다 (그림 8C). 그러나 다른 환자들에서는 유의성을 보이지 않았다. 현재 이들에 대한 multivariate analysis 등 나머지 분석을 계속하고 있다.



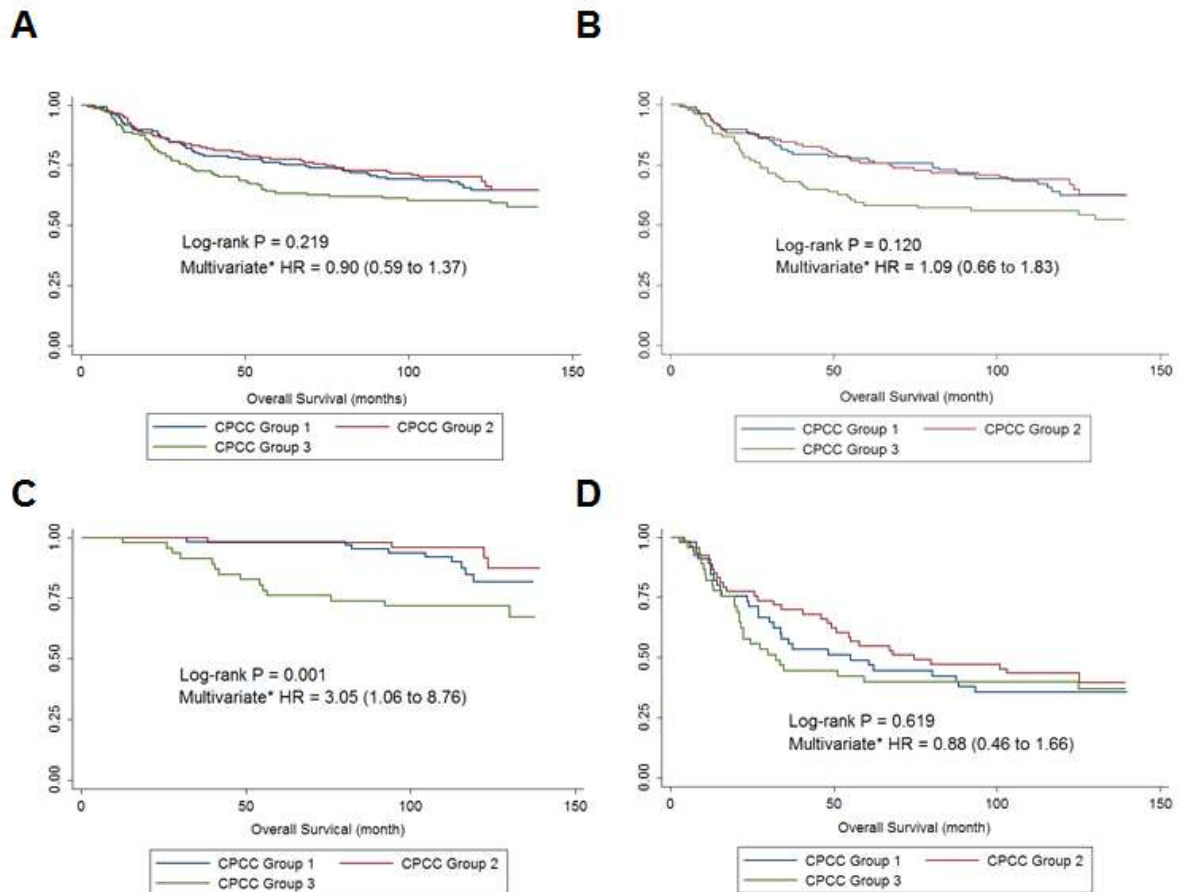


그림 8. Correlation of CPCC with OS. A Kaplan–Meier plots of the CPCCs for the total (A), male (B), T1 or T2 male (C), and T3 or T4 male (D) of gastric cancer cases are shown. The *P* values were determined by log–rank test. The HRs and 95% CIs of CPCC group 3 compared with CPCC group 1 by multivariate analyses are shown. CPCC, chromatin CKAP2–positive cell count; X–axis, OS in months; Y–axis, survival probability.

◎ 이상과 같은 결과는 적어도 일부의 위암환자에서는 암세포 성장속도가 예후와 관련이 있을 수 있어서 이미 유방암에서 진행되어 잘 알려져 있는 암세포 성장속도에 따른 항암제 민감성에 대한 연구들이 필요할 것이라는 것을 시사하는 결과라 할 수 있다.

### 3. 연구결과 고찰 및 결론

- 국내·외 관련분야의 기술개발 현황과 연구결과가 국내·외 기술개발 분야에서 차지하는 위치 등을 기술
- 연구결과 해석 및 다른 결과와의 비교분석 등에 대해 고찰하고 결론을 서술함

#### 1. 위암조직에서의 돌연변이 분석방법의 확립

◎ 재조합 이외에도 돌연변이를 이용해서 암유래 cfDNA를 모니터링할 수 있다는 proof of concept논문

이 발표된 바 있다. 따라서 본 연구에서 이 두가지 모두를 이용하여 암유래 cfDNA의 모니터링을 시도하고자 하였으며, 제 2세부과제에서 이 연구를 하기로 계획하였다.

◎ 그런데 재배열 서열분석 방법으로 whole genome NGS를 사용하게 됨에 따라서 돌연변이를 다른 방법으로 확인하지 않아도 그 정보를 곧바로 얻을 수 있기 때문에 whole genome NGS 방법에서 나온 결과를 이용하기로 하였다. 또한 whole genome NGS를 분석하는데, 암조직과 동시에 정상 위조직의 DNA도 한꺼번에 분석해야 하는 등의 문제로 비용이 훨씬 더 많이 소요되어 따라 돌연변이만을 분석하는 방법을 이용하지 못한 이유도 있었다.

◎ 그러나 이미 잘 알고 있듯이 whole genome NGS 방법은 돌연변이를 분석할 수 있는 좋은 방법이며 본 예비연구에서도 많은 돌연변이들을 확인할 수 있었다.

## 2. 카피수에 따른 위암분류를 위해 mrcPCR방법의 확립

◎ 이전의 1단계 연구에서 카피수변화를 민감하게 측정할 수 있는 방법으로 mrcPCR방법을 확립하였는데, 이 방법을 NCI-60 cell line에도 적용하여 이 방법의 유용성을 증명한 바 있다. 현재 이 방법을 위암조직에서 얻은 DNA를 이용하여 24개 유전자의 카피수를 측정하는 연구가 진행중에 있다. 이 mrcPCR방법은 간단하고 적은 비용으로 automatic sequencer가 있는 실험실이면 어디에서든지 쉽게 사용할 수 있다는 장점이 있어서, 임상에 적용하기에 좋은 방법이 될 것으로 기대하고 있다.

## 3. 위암에서 CKAP2 발현과 생존과의 관련성 분석

◎ 위암에서 CKAP2 발현의 조건을 확립하고 100개 위암 시료에서 발현에 대한 연구를 계획하였는데, 연구를 진행하는 동안 위암 조직의 수를 500개 정도에서 검증하는 것으로 계획을 수정하였다. 따라서 제 2 세부연구에서 연구를 진행하여, 현재 CKAP2 발현에 대한 예비결과가 나와서 분석을 시행하였는데, 남자 T1과 T2환자에서 생존과 유의한 상관관계가 있다는 것을 확인하였다. 그동안 위암에서 proliferation activity와 예후와의 상관관계에 대해서는 서로 다른 결론이 나와서 혼란스러웠는데, 전체 위암환자군에서는 유의한 차이가 없었고, 일부 위암환자에서만 유의한 상관관계가 있어서 이러한 혼란이 있었을 것으로 추정할 수 있다. 이러한 결과는 남자 T1과 T2환자에서는 CKAP2발현이 높은 혹은 proliferation activity가 높은 환자의 경우 예후가 나쁘다는 것을 의미하며, 이러한 환자들에서 수술 후 chemotherapy를 시행한다면 생존율을 높일 수 있는 가능성이 있어서, 향후 임상적인 연구를 촉발할 수 있다는 의의가 있다고 하겠다.

## 4. 연구성과 및 목표달성도

### (1) 연구성과

○ 과제시작시점부터 과제종료시점까지의 연구성과(학술지 게재, 학회발표, 학위논문, 산업재산권 출원·등록, 워크숍 또는 심포지움 개최, 전시회 참가, 임상응용, 기술성과 이전, 벤처 창업 등의 실적)를 기재하되, 본 과제와 관련성이 있는 성과에 한하여 기재  
 ※ 논문, 특허성과는 과제 시작시점 이후 게재 신청 또는 출원된 실적만 기재.  
 다만, 후속과제의 경우는 예외

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분)	저널명(IF.)	Year; Vol(No):Page	구분 <sup>2)</sup>	지원과제번호 <sup>3)</sup>
Characteristics of gastric cancer according to Helicobacter pylori infection status	김영우	J Gastroenterol Hepatol.(3.627)	2014:29(9):1671~1677	국외 SCI	
Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ upregulates galectin-9 and predicts prognosis in intestinal-type gastric cancer	김영우	Int J Cancer (3.534)	2014:Online published	국외 SCI	
Unique patterns and proper management of postgastrectomy bleeding in patients with gastric cancer	김영우	Surgery (3.105)	2014:155(6):1023~1029	국외 SCI	
The association between Helicobacter pylori status and incidence of metachronous gastric cancer after endoscopic resection of early gastric cancer	김영우	Helicobacter. (2.993)	2014; 19(3):194~201	국외 SCI	
The association of self-leadership, health behaviors, and posttraumatic growth with health-related quality of life in patients with cancer	김영우	PSYCHO-ONCOLOGY (4.044)	2014:3582:3582~3582	국외 SCIE	
4-1BB-based isolation and expansion of CD8 <sup>+</sup> T cells specific for self-tumor and non-self-tumor antigens for adoptive T-cell therapy	김영우	Journal of Immunotherapy (3.354)	2014:37:225~236	국외 SCI	
Health-Related Quality of Life After Robot-Assisted Distal Gastrectomy in Early Gastric Cancer	김영우	World Journal of Surgery (2.348)	2014:38(5):1112~1120	국외 SCI	
Genomic profile analysis of diffuse-type gastric cancers	김영우	Genome Biology(10.465)	2014:15(4):R55~R55	국외 SCI	
Long-term metformin use reduces gastric cancer risk in type 2 diabetics without insulin treatment: a nationwide cohort study	김영우	Alimentary Pharmacology and Therapeutics(5.478)	2014:39(8):854~863	국외 SCI	
A Body Shape Index Has a Good Correlation with Postoperative Complications in Gastric Cancer Surgery	김영우	Annals of Surgical Oncology(3.943)	2014:21(4):1115~1122	국외 SCI	
Intravenous iron supplementation may be superior to observation in acute isovolemic anemia after gastrectomy for cancer	김영우	World journal of gastroenterology (2.433)	2014:20(7):1852~1857	국외 SCIE	
Suicide ideation in stomach cancer survivors and possible risk factors	김영우	Supportive care in cancer	2014:22(2):331~337	국외 SCI	

		(2.495)			
Clinical significance of intraperitoneal air on computed tomography scan after endoscopic submucosal dissection in patients with gastric neoplasms	김영우	Surgical Endoscopy(3.313)	2014;28(1):307~313	국외 SCI	

- 1) 저자구분 : 교신, 제1, 공동
- 2) 구분 : 국내, 국내 SCI, 국내 SCIE, 국외, 국외SCI, 국외SCIE 등
- 3) 지원과제번호(Acknowledgement)
  - 과제번호를 연차 표시(-1, -2, -3 등)를 생략하고 7자리로 기재하고, 과제와 관련성은 있으나 불가피하게 Acknowledgement가 누락된 경우에는 '없음'으로 기재

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 <sup>1)</sup>	지원과제번호

- 1) 지역 : 국내, 국외

다. 산업재산권

구분 <sup>1)</sup>	특허명	출원인	출원/등록국	출원/등록번호

- 1) 구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저서

저서명	저자	발행기관(발행국, 도시)	쪽수	Chapter 제목, 쪽수 (공저일 경우)

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

○ 사업목표에 대한 달성내용 및 관련분야 기술발전예의 공헌도 등을 기술

○ 달성도(%)는 연차별목표대비 당해연도 달성도 및 최종목표대비 당해연도까지의 누적 달성도를 반드시 기입

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
위암에서 돌연변이 정보를 이용하여 위암환자 cfDNA에서 모니터링 가능성과 위암분류에 대한 예비연구	1차년도	위암조직 10개에서 haloplex방법으로 돌연변이 분석의 확립	위암조직 10개에서 whole genome NGS방법으로 돌연분석법 확립	90	90
		위암조직 10개에서 24개 유전자 카피수 분석 방법의 확립			
	2차년도				
	3차년도				

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
위암조직의 암 percentage가 낮아서 분석방법을 whole genome NGS방법을 사용함	방법을 바꾸었지만 10개의 위암조직에서 돌연변이에 대한 분석방법을 확립함

## 5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

- 연구종료 2년후까지 연구사업 결과로 발생할 것으로 예상되는 성과, 즉 학술지 게재, 산업재산권 등을 단계별로 다음의 양식에 의거하여 작성함. 학술지 게재는 게재 예상 학술지 명과 Impact Factor 등을 기재함
  - 연구사업의 내용이 논문이나 산업재산권과 연결되기 힘든 과제의 경우, 자유 형식으로 예상연구성과 및 활용정도를 기재하되 최대한 계량화할 것
- 예) DB 몇 건 구축완료. OOO 시스템 구축 및 OO사업 완료

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재		게재 예상 전문학술지명, SCI급 학술지인 경우 Impact Factor 기록
산업재산권 등록		특허 등록 예상 국가, 예상 특허명 등
기 타		

## (2) 연구성과의 활용계획

- 연구성과물의 활용분야 및 활용방법, 활용범위 등을 구체적(특히 시간적 구체성, 예를 들어 몇 년 안에 치료기술 실용화 등)으로 기술하되, 참여기업이 포함되어 있는 과제의 경우 기업과 연계한 활용방안에 대해서도 기술함
- 추가 후속연구의 필요성에 대해서도 간략하게 기술함

◎ 본 예비연구는 본 연구를 위한 방법의 확립에 대한 연구로, laser microdissection과 whole genome NGS 및 이를 분석하는 전 과정에 대한 방법을 확립하였고, 또한 예비연구에서 본 연구에 필요한 암조직과 plasma시료를 확보함으로써 다음 단계 연구를 시작할 수 있는 준비가 되었다고 할 수 있다.

◎ CKAP2에 대한 항체를 사용하여 조직면역화학염색을 하여 CKAP2가 훌륭한 proliferation marker가 될 수 있음을 확인하였고, 유방암조직을 이용한 연구에서 기존에 알려진 proliferation marker인 Ki-67이나 mitotic count보다 유방암 예후판정에서 더 좋은 결과를 얻었다. 이에 대한 validation study가 끝나면 CKAP2를 임상에 적용할 수 있는 근거가 생기고, 이를 임상에 사용하여 환자의 치료제 선택에 유용한 marker가 될 수 있을 것으로 기대한다.

## 6. 참고문헌

- 보고서 작성시 인용된 모든 참고문헌을 열거

Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Hill J, Lehle M, Ruschhoff J, Kang YK; ToGA Trial Investigators. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. Lancet. 2010 Aug 28;376(9742):687-97. Epub 2010 Aug 19.

Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, Carnaghi C, Bajetta E, Luppi G, Sobrero A, Barone C, Cascinu S, Colucci G, Cortesi E, Nichelatti M, Gambacorta M, Siena S. Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. J Clin Oncol. 2007 Aug 1;25(22):3238-45.

Smolen GA, Sordella R, Muir B, Mohapatra G, Barmettler A, Archibald H, Kim WJ, Okimoto RA, Bell DW, Sgroi DC, Christensen JG, Settleman J, Haber DA: Amplification of MET may



identify a subset of cancers with extreme sensitivity to the selective tyrosine kinase inhibitor PHA-665752. Proc Natl Acad Sci U S A 2006, 103 (7):2316-2321

Nakamura K, Yashiro M, Matsuoka T, Tendo M, Shimizu T, Miwa A, Hirakawa K: A novel molecular targeting compound as K-samII/FGF-R2 phosphorylation inhibitor, Ki23057, for Scirrhus gastric cancer. Gastroenterology 2006, 131 (5):1530-1541

Kim HK, Hwang HL, Park SY, Lee KM, Park WC, et al. (2013) Simple and versatile molecular method of copy-number measurement using cloned competitors. PLoS One, 8(7):e69414

Hollox EJ, Detering JC, Dehnugara T (2009) An integrated approach for measuring copy number variation at the FCGR3 (CD16) locus. Hum Mutat 30: 477-484.

## 7. 첨부서류

○ 본 연구의 성과로 논문, 저서, 산업재산권, 정책정책 기여 등이 있을 경우 관련 증빙자료를 첨부토록 함