<붙임 4>

기관고유연구사업 결과 보고

결재	과제책임자	과 장	부 장

※ 협조 :

- 사업단 소속 연구직의 경우 국가암관리사업단장
- 연구(의사직), 의사직, 의학물리학직의 경우 소속 센터장

본인이 수행한 2008~2010년도 기관고유연구사업 과제 연구결과를 붙임과 같이 보고합니다.

과제명	비소세포 폐암 환자의 생존과 관련된 CNV 분자적 표지자 개발
과제책임자 (소속, 성명)	분자종양학 연구과 홍 경 만
총연구비	400,000천원 (2008년: 130,000 , 2009년: 130,000 , 2010년: 140,000)
총연구기간	2008년 1월 1일 ~ 2010년 12월 31일

붙임 : 기관고유연구사업 최종보고서 1부

2010 년 12 월 31일

과제책임자 홍 경 만

기관고유연구사업 최종보고서

편집순서 1 : 겉표지 (앞면)

(과제번호 : 0810240)

비소세포 폐암 환자의 생존과 관련된 CNV 분자적 표지자 개발

Development of CNV molecular markers related to the patient's survival in nonsmall cell lung cancer

과제책임자 : 홍 경 만

국 립 암 센 터

편집순서 1 : 겉표지 (측면, 뒷면)

(뒷면)

(측 면)

↑
5cm
↓

비소세포 폐암 환자의 생존과 관련된 CNV 분자적 표지자 개발

1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구사업 최종보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다.

(14 pont, 고딕체)

국립암센터

↑
6cm↓

↑
3cm
↓

편집순서 2 : 제출문

제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 " 비소세포 폐암 환자의 생존과 관련된 CNV 분자적 표지자 개발 " 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2010. 12.

국 립 암 센 터

과 제 책 임 자 : 홍 경 만
연 구 원 : 김 현 경
〃 : 최 용 복
〃 : 박 성 열
〃 : 황 혜 리
〃 : 신 정 은

편집순서 3 : 목차

목 차

< 요 약 문 >

(한글) 1

(영문) 3

1. 연구의 최종목표 4
2. 연구의 내용 및 결과 4
3. 연구결과 고찰 및 결론 21
4. 연구성과 및 목표달성도 27
5. 연구결과의 활용계획 29
6. 참고문헌 30
7. 첨부서류 38

편집순서 4 : 요약문 (한글)

< 요 약 문 >

<table>
<tr><td colspan="2">연구분야(코드)</td><td colspan="2"></td><td>과제번호</td><td colspan="2">0810240</td></tr>
<tr><td colspan="2">과 제 명</td><td colspan="5">비소세포 폐암 환자의 생존과 관련된 CNV 분자적 표지자 개발</td></tr>
<tr><td colspan="2" rowspan="4">연구기간/연구비 (천원)</td><td>합계</td><td colspan="3">2008년 1월 1일 ~ 2010년 12월 31일</td><td>400,000</td></tr>
<tr><td>1차년도</td><td colspan="3">2008년 1월 1일 ~ 2008년 12월 31일</td><td>130,000</td></tr>
<tr><td>2차년도</td><td colspan="3">2009년 1월 1일 ~ 2009년 12월 31일</td><td>130,000</td></tr>
<tr><td>3차년도</td><td colspan="3">2010년 1월 1일 ~ 2010년 12월 31일</td><td>140,000</td></tr>
<tr><td colspan="2" rowspan="2">과제책임자</td><td>성 명</td><td>홍 경 만</td><td>주민등록번호</td><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td>전화번호</td><td>010-3321-9734</td><td>전 자 우 편</td><td colspan="2">kmhong@ncc.re.kr</td></tr>
<tr><td rowspan="2">색인단어</td><td>국문</td><td colspan="5">비소세포폐암, 카피수변화, 분자적표지자</td></tr>
<tr><td>영문</td><td colspan="5">non-small cell lung cancer, copy number variation, molecular target</td></tr>
</table>

◆ 연구목표

<최종목표> 비소세포폐암환자의 생존과 관련이 있는 CNV (copy number variation)과 관련된 분자적 표지자를 개발

<당해년도 목표>

1. Co-aSNP방법을 활용하여 NCI-60 cell line에서 24개 유전자의 카피수 결정
2. Co-aSNP방법을 활용하여 비소세포폐암, 위암, 대장암에서 24개 유전자의 카피수를 결정하고 환자의 생존율, 항암제 반응과의 관련성에 관해 연구.
3. 암조직에서 HER2 증폭검사방법과 조직면역검사 및 FISH (fluorescence in situ hybridization)방법을 비교분석.
4. 단클론항체의 제작과 조직면역화학염색을 통한 진단시약개발연구

◆ 연구내용 및 방법

- Co-aSNP방법을 NCI-60 cell line에 적용하기에 앞서 유방암의 HER2증폭 여부를 확인하는 방법을 확립하면서 민감도와 반복검사의 정확도 그리고 방법상의 문제점 들을 파악하기 위하여 일련의 실험을 진행하였음.

1) 먼저 작년에 확립된 HER2증폭 Co-aSNP방법은 측정하고자 하는 HER2이외에 대조 유전자로서 IGF1과 HK1유전자를 사용하였는데, 현재 HER2검사에 사용하고 있는 FISH에서의 대조유전자는 17번 염색체의 centromere probe를 사용하고 있어서, 이에 맞추어 유전자 선택을 다시 조정하여 HER2검사 set를 다시 만들었음. 이를 위하여 17번 염색체의 ALDOC과 G6PC3를 선택하였고, HER2 유전자의 5‘ 위치에 존재하는 서열을 하나 더 추가하여 4가지 서열을 비교하는 검사 set를 구성하였음. 검사 set를 구성하기 위하여 각각 서열에 대한 aSNP 서열을 다시 클로닝하고 site directed mutagenesis방법으로 인위적인 돌연변이를 도입한 후 Co-aSNP방법을 확립하였음. 이 방법의 정확도와 reproducibility를 다시 확인하였는데, 작년에 사용했던 set와 거의 유사한 결과를 얻었음 (SD은 약0.04).
2) 우선 HER2가 증폭되었다고 알려진 유방암세포주들에서 이 방법을 이용하여 증폭여부를 확인하였는데, 보고된 결과와 유사한 결과를 얻었음. 특히 세포주들 중 대조유전자로 사용한 ALDOC과 G6PC3의 카피수에 변화가 동시에 일어나 있다는 것을 확인할 수 있었는데, 시료의 증폭여부를 판단하는데 판정이 달라질 수 있다는 것을 예상할 수 있음.
3) 또한 이 방법의 문제점을 파악하고자 서로다른 농도의 gDNA와 서로다른 농도의 aSNP서열의 mixture를 사용하여 정상적인 시료와 HER2가 증폭되어 있는 세포주를 대상으로 assay를 하였는데 그 결과 또한 reproducible하다는 것을 확인하였음. 그러나 정밀한 검사를 위해서 이들의 농도를 fix할 필요성이 있다는 것을 확인하였음. 그러나 이전에 보고되었던 realtime PCR방법에 비해서는 민감도와 재현도 (SD은 약0.10)에 있어서 장점이 있을 것으로 판단할 수 있었으며, FISH등의 방법에 비해 신속한 결과를 얻을 수 있고 결과를 해석하는데도 비교적 쉬워서 automation이 가능할 것으로 판단할 수 있었음.

4) 이렇게 확립된 새로운 HER2측정용 Co-aSNP방법을 50여개의 동결 유방암조직을 대상으로 검사를 시행하였음. Co-aSNP방법은 HER2가 증폭된 시료와 그렇지 않은 시료를 확실히 구별할 수 있었으며, HER2의 증폭이 비교적 적게 일어난 borderline 증폭 시료도 다수 포함되어 있다는 것을 확인할 수 있었음. 현재 유방암 파라핀 조직을 확보하여 조직면역화학염색과 FISH를 시행하여 서로 다른 방법들 간의 일치도에 대해 비교하는 연구를 진행하고 있음. HER2의 증폭측정 방법에 대해 국내 특허 출원을 하였으며, 내년초 PCT출원을 준비하고 있음. 또한 조직면역화학염색과 FISH결과를 비교한 후 Clinical Chemistry에 투고할 예정으로 논문을 준비하고 있음.

- 작년에 HER2를 제외한 24개 유전자의 Co-aSNP방법의 일부를 확립하고 일부 세포주에 적용하여 결과보고를 하였는데, 이를 NCI-60 세포주 모두에 적용하여 각 세포주마다 24개 유전자의 카피수 변화 상황과 NCI homepage에 나와있는 각 세포주마다의 항암제 내성과의 관련성을 비교분석하여 항암제 내성과 특정 유전자 카피수 변화와의 관련성에 대해서도 연구를 진행하고 있음. 올해 HER2 검출용 assay방법을 확립하고 이를 적용하기 위한 연구에 집중하면서 24개 유전자의 적용에 관한 연구에 집중할 수 있는 시간이 없었으나, HER2 증폭 측정방법을 확립하면서 Co-aSNP방법의 장점을 확인할 수 있어서 이를 적용하여 향후 좋은 결과를 얻을 수 있을 것이라는 것을 확인할 수 있었음.
- 본 연구과제로 단클론항체를 만들고 이를 이용하여 암진단 혹은 예후진단 표지자를 발굴하는 연구를 같이 진행하고 있는데, 작년에 사람 CKAP2의 항체를 만들어 조직면역화학염색을 시행한 결과 mitotic phase의 세포 염색체에 특이하게 염색된다는 것을 확인하여 암의 예후예측 표지자로서의 가능성을 제시한 바 있다. 올해에는 이를 확인하고자 유방암조직에서 조직면역화학염색을 시행하였는데 다음과 같은 결과를 얻었음

1) CKAP2의 조직면역화학염색에서 위와 대장의 crypt cell, lymphoid follicle, 그리고 cervix의 epithelial cell layer와 같이 mitosis가 활발한 정상적인 부위에서 발현이 높다는 것을 확인하였고, 30개의 유방암 조직을 이용한 연구에서 CKAP2의 염색체 염색된 세포의 수가 mitotic figure count와 비례한다는 것을 확인하였음 (rho =0.743 and P <0.001 by Spearman correlation test).
2) 또한 환자의 clinicopathologic factor들과 association을 비교한 결과 histologic grade, nuclear grade, T stage, N stage, ER status, PR status등과 유의한 correlation을 보여 임상적인 예후와 관련이 있을 것이라는 것을 알게되었으며 이러한 사실은 univariate analysis에서 overall survival (P=0.003 or <0.001 depending on the level of CPC percentage) 혹은 DFS과 유의한 관련성을 보여 확인되었다.
3) CKAP2의 염색체 염색된 세포의 percentage (CPC percentage)가 nuclear grade, T stage, N stage, age, HER2 status 등을 고려한 multivariate analysis에서 환자의 overall survival과의 유의한 관련성을 확인하여 CKAP2가 independent prognostic factor라는 것을 확인하였음 (P=0.010) 더구나 hazard ratio가 17.8 (95% CI, 11.98 - 159.53)로 같은 환자군의 mitotic count가 약 3.9라는 것을 감안하였을 때, 예후 예측에 훨씬 강력한 tool로 사용될 수 있다는 것을 의미한다. 이러한 결과를 국내 특허출원 하였으며, 현재 PCT 출원을 준비하고 있음. 또한 Journal of Clinical Oncology에 투고하기 위하여 논문을 준비하고 있음.

◆ 연구성과

-정량적 성과:

구분	달성치/목표치[1]	달성도(%)
SCI 논문 편수	5/8	62.5%
IF 합	2.3+2.3+5.8+2.2+3.5/30	53.7%
기타 성과	특허출원 3건, 등록 2건/특허출원 3건	167%

1) 총연구기간내 목표 연구성과로 기 제출한 값

-정성적 성과

· HER2진단을 위한 새로운 방법을 고안하여 특허를 출원하고 논문을 준비하고 있음

· 새로운 유방암 예측 표지자를 개발하여 특허를 출원하였음.

· 정량적 성과 이외에 주요 결과를 아직 논문으로 출간하지 못하였으나, 기타성과에 제시한 바와 같이 본 연구로부터 4건의 특허출원하였으며 Nature genetics, Journal of Clinical Oncology, Clinical Chemistry, Gastroenterology등에 게재하기 위하여 4개의 논문을 준비하고 있음.

◆ 참여연구원 (최종연도 참여인원)	성 명	김현경, 최용복, 박성열, 황혜리
	주민등록번호	

※ 요약문의 총분량은 2page 이내로 제한함

편집순서 5 : 요약문 (영문)

Project Summary

Title of Project	Development of CNV molecular markers related to the patient's survival in nonsmall cell lung cancer
Key Words	non-small cell lung cancer, copy number variation, molecular target
Project Leader	Kyeong-Man Hong
Associated Company	

Objective: Development of molecular targets related to survival of non-small cell lung cancer
Method:
1) Detection of gene amplification in cancer: For the evaluation of gene amplification status, co-amplification of artificial SNP sequences (Co-aSNP), a modified version of competitive PCR, was used. In the assay, two genes in chromosome 17q were used as control genes, and two different sequences of HER2 were included for the evaluation of HER2 status.
2) Detection of methylation level changes in disease: Methylation sigle base extension method was used for the evaluation of methylationn level changes in autoimmune disease.
3) Development of proliferation marker for the prediction of breast cancer prognosis: Immunohistochemical study was performed on 110 early stage breast cancer. The correlation between mitotic figure count and CKAP2 chromosomal positive cells was also analyzed.
Result:
1) Co-aSNP method showed high sensitivity and reproducibility (SD~0.04), detecting the amplification status of MDA-MB-453 even in 4 fold dilution with normal 2n DNA. In addition, this multiplex method found a frequent unexpected co-amplifications of control genes located in 17q, raising an issue of necessitating the usage of two or more control genes in 17q. Using breast cancer cell lines and 40 breast cancer tissues, reliability of mCoCom method on HER2 evaluation was tested. Also Co-aSNP method for the amplification of two dozen genes was set up in this study.
2) quantitative measurements of methylated promoters in whole blood DNAs, a significantly increased gene A promoter methylation in SLE patients was found ($P < 0.0001$ with $OR = 29.8$). The level of methylation was significantly higher in active SLE patients than in inactive cases ($p=0.0075$). In patients with rheumatoid arthritis or progressive systemic sclerosis, increased gene A promoter methylation was also observed, suggesting increased CD3Z methylation is a common phenomenon in autoimmune disease. In addition to A, increased promoter methylations of two other genes were also found.
3) CKAP2 chromosomal staining was closely correlated with the number of mitotic figure in breast cancer tissues ($p<0.001$). The percentage of chromosomal positive cells per cancer cells was significantly correlated with N stage, T stage, histologic grade and nuclear grade. In a multivariate analysis, the negative association with overall survival persisted, with a hazard ratio of 17.8 ($p=0.010$).

Publication: 5 SCI papers and a non-SCI paper, 4 papers under preparation
Patent: 2 patent registrations, 3 patent applications

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

편집순서 6 : 연구결과

1. 연구의 최종목표

○ 당초 연구계획을 참고하기 위한 자료임. 선정당시 「과제계획서」와 전년도 제출하였던 「연차실적・계획서」상의 내용과 동일하게 작성해야 함. 연구사업의 목적, 범위 등에 대해 기술

최종목표: 비소세포폐암환자의 생존과 관련이 있는 CNV (copy number variation)과 관련된 분자적 표지자 개발

2. 연구의 내용 및 결과

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

◎ 암에서의 주요 분자적 변화는 점 돌연변이, 결실, 증폭 그리고 DNA methylation의 변화등을 들 수 있는데 점돌연변이와 DNA methylation을 검출할 수 있는 방법은 다양한 방법들이 소개되고 있다. 그러나 증폭과 결실을 reliable하게 검출하여 임상환자 시료에 응용되고 있는 방법은 FISH등 조직학적인 방법이 포함된 방법에 국한되어 이용하고 있다. 최근 realtime PCR을 포함한 분자적인 방법을 유전자의 증폭과 결실을 측정하는데 이용하고자 하였으나 널리 사용되고 있지 못하다. 그러나 분자적 검사의 장점인 검사시간이 빠르고 비용이 비교적 저렴하며 automation이 가능하다는 점 때문에 현재도 여러 가지 분자적 방법들이 시도되고 있다.

◎ 암에서의 흔히 발견되는 유전자 증폭과 aneuploidy가 임상에서 적용되는 예 중 가장 대표적인 것이 유방암에서의 HER2 증폭 측정이며, 최근에는 위암에서도 HER2가 증폭된 암의 치료에 Trastuzumab을 포함하는 치료가 생존연장에 도움이 된다는 보고도 있었다 (Bang et al., 2010). HER2 이외에도 유전자의 증폭을 확인하여 환자의 치료에 이용할 수 있다는 논문들이 최근 많이 보고되고 있는데, 대장암에서 pantitumumab으로 치료하는 환자의 clinical outcome이 EGFR의 증폭과 관련이 있다는 논문 (Sartore-Bianchi et a., 2007), MET 유전자 증폭은 tyrosine kinase inhibitor인 PHA-665752의 민감도를 결정하는 중요한 수단이 된다는 논문 (Smolen et al., 2006), 위암에서 FGFR2의 phosphorylation inhibitor인 Ki23057의 민감도를 결정하는데 FGFR2유전자의 증폭의 여부를 측정하는 것이 중요하다는 논문 (Nakamura et al., 2006) 등이 보고되었는데, 이들을 포함하는 수많은 논문들에서 유전자 증폭이 치료제의 선택에 중요할 수 있다는 것을 시사하고 있다.

◎ 본 연구에서 유전자 증폭을 측정하는 새로운 분자적 방법의 하나로 Co-amplification of artificial SNP (Co-aSNP)라는 방법을 고안하고 (그림 1), 이와 관련하여 2008년 국내특허를 취득하였다. 특허 등록 이후 이 방법의 원리가 비슷한 PNAS와 Nature등에 competitive PCR방법이 소개된 바가 있다는 사실을 확인하였는데 (Gilliland et al., 1990; Siebert et al., 1992), 이전의 방법들로 소개된 competitive PCR방법들은 환자의 시료 DNA를 정확하게 측정하고 serial dilution한 여러개의 competitor로 여러개의 실험set를 준비해야 증폭여부를 측정할 수 있어서 임상적용에 어려움이 있었으며 (Sestini et al., 1994), 비교적 최근에 보고된 competitive PCR의 변형된 방법인

competitive PCR using fluorescent melting curve analysis 방법 또한 같은 문제점을 가지고 있다 (Lyon et al., 2001).

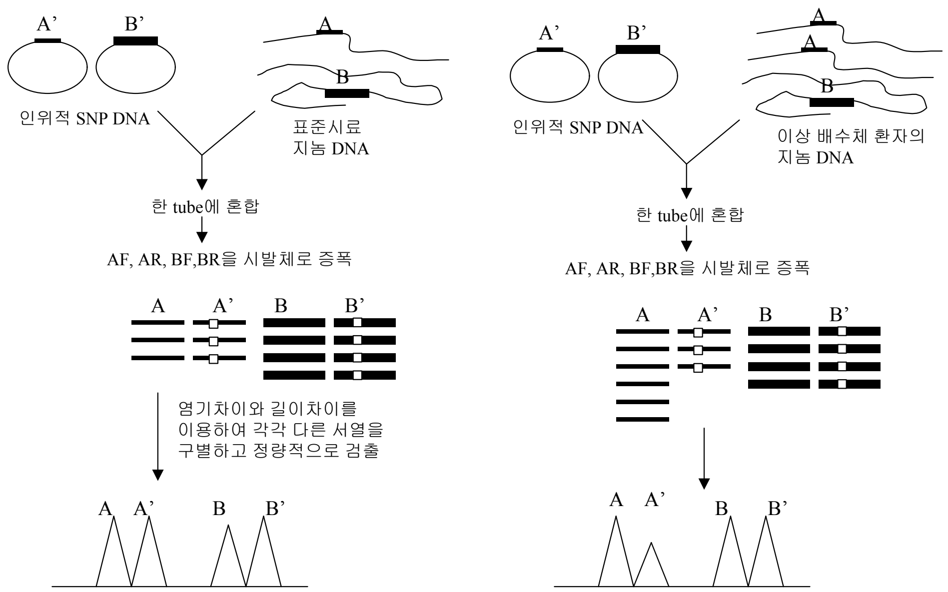


그림 1. 두 종류의 시료 DNA 서열과 두 가지 인위적 SNP 서열의 혼합물로부터 두 가지 표적 유전자 (A, A′ 과 B, B′)를 증폭하고 동시 증폭된 인위적 SNP 서열을 근거로 두 표적 유전자의 상대적인 양을 분석하는 과정을 예시한 Co-aSNP 방법의 개략도. 실험과정은 보통 표준시료와 검체시료를 동시에 진행한다. 표준시료 DNA (왼편)와 검체시료 (오른편)에 두 가지 이상의 인위적 SNP 서열을 각각 혼합한 후 실험을 다른 튜브에서 동시에 진행한다. 오른편의 검체시료의 경우 특정유전자가 증폭되어 있으면 상대적으로 지놈 DNA에서 증폭된 A의 생산물 양이 인위적 SNP 서열에서 증폭된 A′의 양에 비해 많은 양이 증폭하게 된다. 이 상대적인 양을 artificial SNP site를 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.

◎ 본 연구자의 Co-aSNP방법은 이러한 competitive PCR의 단점들을 없애면서 민감도를 그대로 유지하고, 또한 한꺼번에 여러개의 유전자 증폭을 측정할 수 있는 새로운 방법이라는 것을 확인할 수 있었다. Co-aSNP 방법을 응용하여 HER2증폭을 측정하기위하여 17q 염색체에 있는 HER2유전자의 두 서열을 선택하여 design 하였고 (하나는 5HER2, 다른 하나는 3HER2로 명명하였고, 이들간의 거리는 16.3 kb정도 떨어져 있음), 상대적인 카피수의 기준으로 사용하기 위하여 17q 염색체 상에서 두개의 유전자 서열을 선택하였다. HER2보다 centromere 쪽에 위치한 ALDOC유전자와 17q의 telomere쪽에 위치하는 G6PC3유전자를 기준 유전자로 선택하였다. 이들의 염색체간 상대적인 거리와 서로의 위치는 그림 2와 같다. FISH의 probe로 사용하는 CEP17의 위치와 HER2 probe의위치도 같이 표시하였다.

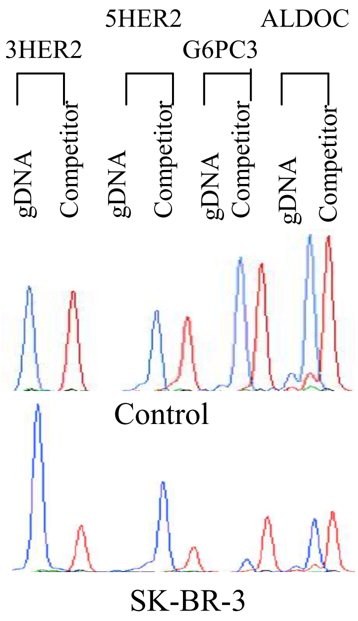
그림 2. HER2증폭 Co-aSNP 에 사용한 4가지 서열의 위치. ALDOC유전자는 HER2에 비해 centromere쪽에 위치하고 있고, G6PC3는 telomere 쪽에 위치한다. 그러나 HER2로 부터의 상대적인 거리는 G6PC3가 가깝다. HER2유전자 내에서 두 가지 서로 다른 서열의 증폭을 측정하도록 고안하였다. 5HER2는 ALDOC쪽에 위치한 서열이고, 3HER2는 G6PC3쪽에 위치한 서열이다. FISH probe로 사용하는 CEP17과 HER2 probe의 위치도 표시하였다.

◎ 이렇게 Co-aSNP 방법을 응용한 HER2 증폭 측정방법으로 세포주에서 측정한 예를 그림 3에서 나타내었다. SK-BR-3는 HER2가 증폭되어 있는 세포주이고, Control로 사용한 시료는 정상인 혈액세포에서 분리한 DNA로 실험한 결과이다. 그림에서 SK-BR-3의 결과는 HER2 유전자들의 경우 (5HER2와 3HER2) competitor에서 나온 신호에 비해 상대적으로 gDNA에서 나온 신호가 훨씬 강하다는 것을 알 수 있다. 그런데 대조 유전자로 사용한 ALDOC과 G6PC3에서도 많은 변화가 있어서 계속해서 이들의 상대적인 변화를 분석하였다. Competitor와 gDNA에서 오는 신호의 상대적인 양들과 서로 다른 4가지 서열로부터 나온 신호들을 비교하고, G6PC3로부터 오는 신호의 양을 1로 만든 다음 계산하면 그림의 오른쪽 위의 표에서와 같이 SK-BR-3에서의 상대적인 유전자 증폭은 HER2에서 증폭이 심하게 일어나 있고, 대조 유전자로 사용한 ALDOC에서도 증폭이 일부 같이 일어나있다는 것을 알 수 있다.

◎ 이상과 같은 Co-aSNP 의 연구 결과는 HER2측정을 위해 사용했던 Realtime PCR의 결과가 정확하지 않을 수 있다는 것을 유추해 볼 수 있다. Realtime PCR의 대조유전자로 centromere에 가까운 ALDOC과 같은 유전자를 사용하는 경우 HER2와 동시에 증폭이 일어나 있어서 실제보다 훨씬 적게 증폭이 일어나 있는 것처럼 판별할 수 있게되어 false negative결과가 나올 수도 있다. 실제 유방암조직을 이용한 실험결과에서도 SK-BR-3와 같이 대조유전자가 HER2와 동시에 증폭되어 있는 경우를 많이 발견하였으며, 이는 어느 한 유전자를 대조 유전자로 사용하는 경우 false negative결과를 가져올 수 있다는 것을 의미한다고 하겠다.

◎ HER2 증폭 측정을 위한 Co-aSNP 방법의 정확성을 측정하기 위하여 12명의 정상인 blood DNA를 사용하여 실험을 반복하였다 (그림 4). 이때 증폭되어 있는 양성대조군으로 JIMT 유방암 세포주를 사용하였다. JIMT유방암세포주는 FISH로 측정한 이전의 연구에서 HER2 카피수가 6-10 copy정도라는 것이 보고되었는데, Co-aSNP에서의 결과와 거의 일치하였다. 이 실험에서

Co-aSNP 방법의 정확도를 측정할 수 있었는데 그림의 오른편에 표시한 바와 같이 Standard deviation (STDEV) 값이 0.04이하라는 것을 알 수 있다. 오른쪽 위는 normalize하기 전 값이고, 오른쪽 아래는 각 유전자의 average copy수를 1로 normalize한 후의 값이다. 기존에 realtime PCR 방법으로 측정하였을 때 STDEV값이 0.1-0.2정도라는 것을 감안한다면 STDEV이 적어도 1/3로 줄어들었다는 것을 의미하고, 이는 실험으로 인한 오류가 적어도 1/100정도로 감소한다는 것을 의미한다. 따라서 Co-aSNP 방법은 realtime PCR방법에 비해 훨씬 정확할 수 있다는 것을 보여주는 결과라고 할 수 있다.

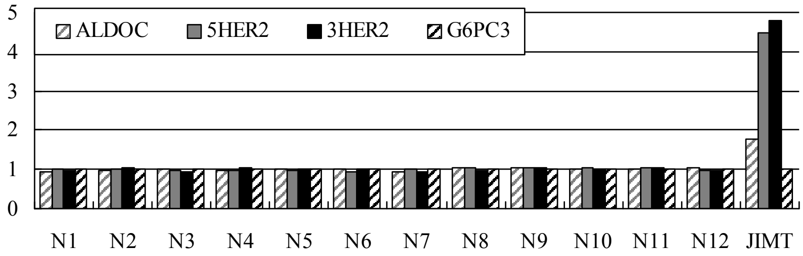


	ALDOC	5HER2	3HER2	G6PC3
Control	0.963	1.034	0.998	1
SK-BR-3	3.512	13.925	14.185	1

	3HER2	5HER2	G6PC3	ALDOC
gDNA	842	652	1069	1249
Competitor	804	601	1019	1236
Ratio	1.05	1.08	1.05	1.01

	3HER2	5HER2	G6PC3	ALDOC
gDNA	4888	2632	409	1562
Competitor	1380	757	1638	1781
Ratio	3.54	3.48	0.25	0.88

그림 3. Co-aSNP 방법으로 유방암 세포주에서 HER2 증폭상태를 측정한 예.



	ALDOC	5HER2	3HER2	G6PC3
Average	0.999	0.941	0.987	1
STDEV	0.035	0.037	0.038	0

	ALDOC	5HER2	3HER2	G6PC3
Average	1	1	1	1
STDEV	0.035	0.039	0.038	0

그림 4. 사람의 혈액세포 DNA와 대조 DNA로 사용한 JIMT유방암 세포주에서 mCoCom방법을 이용한 HER2 증폭측정. mCoCom방법으로 측정한 정상인 DNA에서의 각 유전자 copy number는 거의 1.0에 가깝다는 것을 알 수 있고, STEDV값이 0.04이하로 기존의 realtime PCR방법에 비해 1/3로 줄어들어 정확도가 훨씬 증가했다는 것을 알 수 있다.

◎ HER2 증폭 Co-aSNP 방법을 이용하여 여러 유방암세포주에서 HER2의 증폭상황을 측정하였

는데, 그림 5과 같은 결과를 보였다. HER2증폭이 보고되지 않은 T47D에서는 HER2유전자의 증폭이 없었으나 이미 HER2유전자의 증폭이 잘 알려진 나머지 세가지 세포주의 경우에는 증폭을 발견할 수 있었는데, HER2의 카피수는 세포주마다 상이하다는 것을 알 수 있다. 또한 대조 유전자로 사용한 ALDOC이나 G6PC3 유전자의 증폭을 HER2가 증폭된 모든 세포주에서 확인할 수 있어서 다시 한번 하나의 유전자를 대조유전자로 사용하는 경우 잘못된 해석을 할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 또한 SK-BR-3의 경우 HER2의 5′ 서열에 해당하는 부위만 증폭되어 있다는 것을 발견하였는데, 이러한 유전자의 부분적인 증폭이 유전자의 발현에 어떠한 영향이 있는지 RT-PCR로 확인하고 있는 중이다.

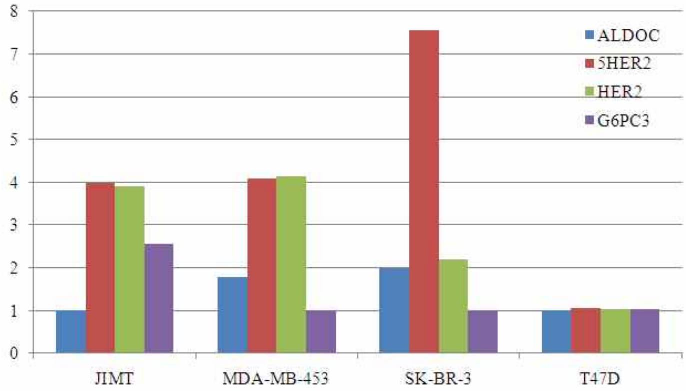


그림 5. 유방암세포주에서 Co-aSNP 방법을 이용한 HER2 증폭상태.

◎ 이러한 Co-aSNP 방법은 기본적으로 과거에 보고된 competitive PCR과 유사한 원리를 사용하고 있는데, competitive PCR의 경우에는 DNA의 농도를 정확하게 측정해야하고, 또한 competitor의 농도를 몇 가지 사용하는 assay를 동시에 진행해야하는 불편한 점이 있었다. 이러한 기존의 competitive PCR방법의 단점이 해결되었는지 확인하기 위하여 시료의 양을 다르게 사용하는 경우 실험의 결과에 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보는 실험을 진행하였다. 그림 6에서와 같이 보통 사용하는 DNA양 (10 ng)의 1/4 - 4배 정도의 DNA를 사용하여도 Co-aSNP 방법을 사용한 실험결과에 차이가 별로 없으며, 또한 aSNP sequence mixture의 농도를 변화시켜도 실험결과에는 차이가 별로 없다는 것을 알 수 있었는데, 이러한 결과는 기존의 competitive PCR이 가지고 있었던 커다란 단점을 해결했다는 것을 의미하는 것이다.

◎ Co-aSNP 방법이 reproducible한 지 여부를 확인하기 위하여 세가지 세포주의 DNA를 사용하여 다섯 번 독립적으로 실험을 반복하여 결과를 비교하였다. 그림 7에서와 같이 모든 실험결과가 다섯 번의 독립된 실험에서 거의 일치하다는 것을 알 수 있다. 이는 PCR machine과 gDNA/competitor의 상대적인 양 측정의 오차한계 내에서는 Co-aSNP 방법이 아주 일정한 결과를 가져온다는 것을 나타낸다. 본 실험을 위해 HER2 이외에도 20여가지 유전자의 증폭을 측정할 수 있는 Co-aSNP방법을 확립하였는데, 이 중 일부의 결과이다.

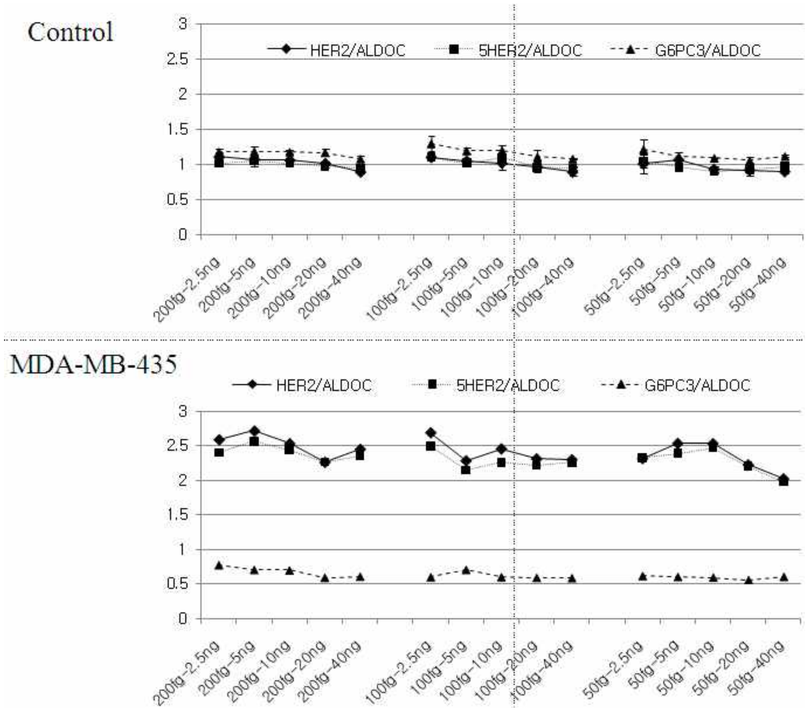


그림 6. 서로 다른 양의 시료 DNA와 aSNP sequence mixture를 사용한 경우의 Co-aSNP 실험 결과. 기존의 competitive PCR방법에서DNA양을 정확하게 측정하여야 올바른 결과를 얻을 수 있었는데, Co-aSNP 의 경우에는 DNA의 양의 측정이 잘못되어도 결과에는 커다른 변화가 없다는 것을 알 수 있다.

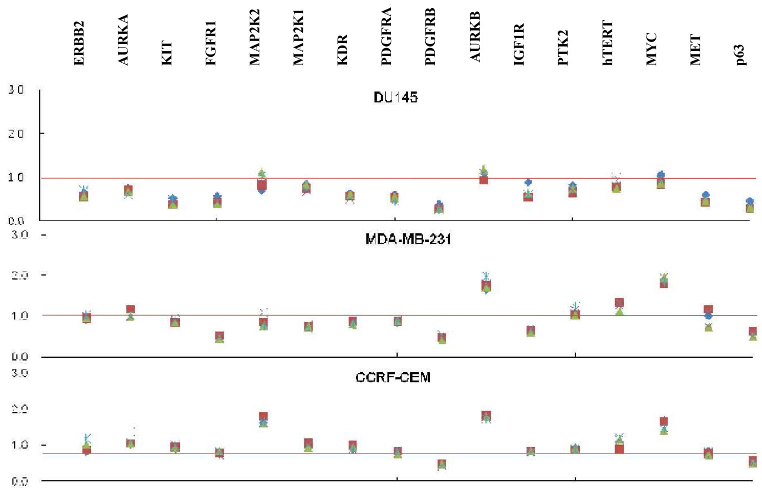


그림 7. 세가지 세포주에서 Co-aSNP 방법으로 16가지 유전자의 증폭을 다섯 번 독립적으로 반복하여 실험한 결과. 이 실험결과는 PCR machine의 증폭시 발생할 수 있는 error와 gDNA/competitor의 상대적인 양 측정의 오차한계 내에서는 Co-aSNP 방법이 아주 일정한 결과를 가져온다는 것을 나타낸다.

◎ HER2측정 Co-aSNP 방법을 실제 동결유방암조직에서 얻은 DNA를 사용하여 실험을 진행하여 그림 8과 같은 결과를 얻을 수 있었다. 총 46예의 유방암조직중에서 11예에서는 HER2의 카피수가 5배 이상 (10n 이상)으로 증폭되어 있었으며, 또 다른 5예에서 적어도 4n이상으로 증폭되어 있다는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 Co-aSNP 방법이 실제 동결암조직에서도 유용하게 사용될 수 있다는 것을 의미하는 결과라고 하겠다.

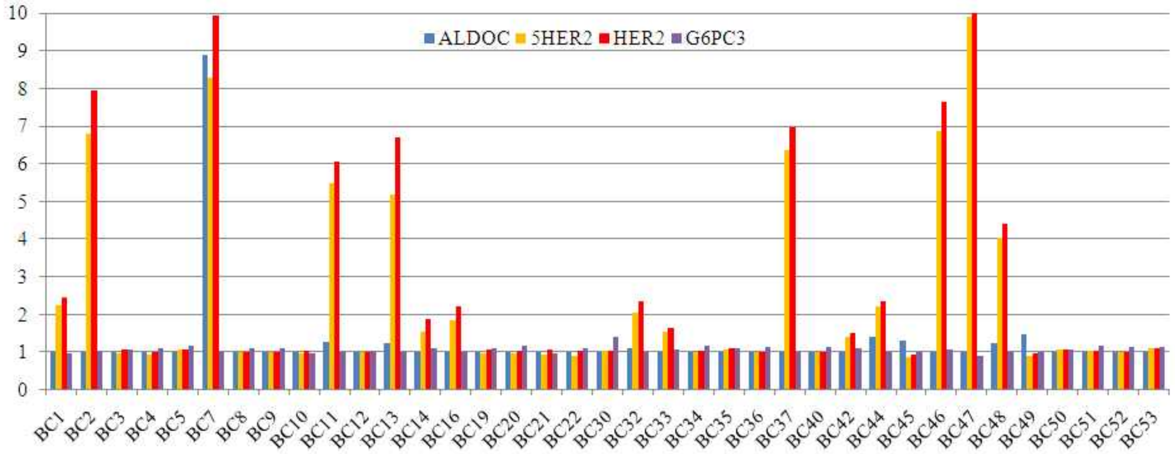


그림 8. 유방암조직에서의 Co-aSNP 방법을 이용한 HER2증폭상태의 결과.

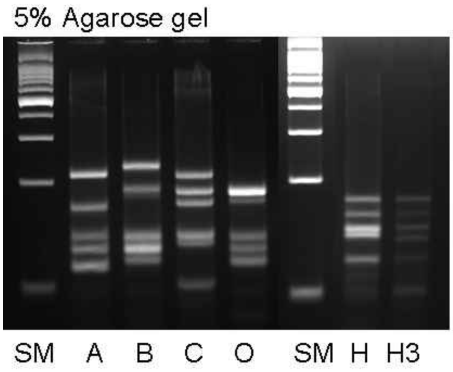
◎ 현재 이상과 같은 결과를 종합하여 특허를 출원한 상태에 있으며 내년 초 PCT 출원을 준비하고 있다. 또한 Clinical Chemistry에 논문을 준비하고 있다. 이상과 같은 결과는 Co-aSNP방법이 reliable하게 환자의 치료제 선택에 사용될 수 있으며, 이를 multiplex로 하여 사용하는 경우 FISH 등의 방법이 할 수 없는 치료제 선택의 폭을 미리 결정할 수 있다는 측면에서 암환자의 치료에 커다란 전기를 마련할 수 있다는 점에서 커다란 의의가 있다고 할 수 있다. 또한 CNV이 암환자의 gDNA내에 존재하며 이러한 변이가 암의발생과 관련이 있을 것으로 예상하고 있는데, 이에 대한 연구를 촉진시킬 수 있는 중요한 방법을 제공할 수 있다는데 또한 의의가 있다 하겠다.

◎ HER2 이외의 유전자들에 대해서도 증폭을 측정하기 위하여 Co-aSNP 방법을 확립하였다. 확립된 Co-aSNP 방법의 대상 유전자들을 표 2에 표시하였다. 대부분의 유전자들은 현재 targeted therapy를 위한 항암제가 개발 중에 있거나 개발된 표적 유전자들이다.

◎ 이 Co-aSNP 방법을 setup하기 위하여 각각의 유전자와 control유전자인 IGF1으로 구성된 multiplex PCR들을 setup하였고, 각각의 PCR product산물의 양이 일정하도록 실험조건을 조정하였고 (그림 9 왼편), 이들의 PCR product를 정제하고 다시 single base extension을 사용하여 지놈 DNA에서 나온 신호 (blue)와 artificial SNP 서열에서 나온 신호 (red)의 값의 비율을 구하고 (그림 9 오른편), 정상적인 2n 상태의 DNA에서온 signal을 1로 만들어 상대적인 값을 구하였다.

표 2. Co-aSNP방법으로 setup한 유전자들의 list.

Gene	Chromosomal location	targeted therapy
RAF1	3p25	BAY 43-9006
PDGFRA	4q11-13	Imatinib
KIT	4q11-12	MLN518, SU5416
KDR	4q11-12	SU5416, IMC-2C6
PDGFRB	5q31-32	SU6668
EGFR	7p12	Gefitinib, Erlotinib, Erbitux, Matusumab
MET	7q31	SU11274, 5D5-Fab
FGFR1	8p11.2-11.1	PKC412
PTK2	8q24-qter	Geldanamycin
MAP2K1	15q22.1-22.33	CL-1040
IGF1R	15q26.3	AG1024
PLK1	16q12.1	ON01910
AURKB	17q13.1	Hesperadin
ERBB2	17q11.2-12	HKI-272, TAK165, Trastuzumab, Pertuzumab
MAP2K2	19p13.3	CI-1040
AURKA	20q13.2-q13.3	VX-680
Genes related to lung cancer survival		
MDR1 *MDM2* *c-Myc* *skp2* *p63*		
Genes altered frequently		
APC *BLK* *TP53* *DCC*		



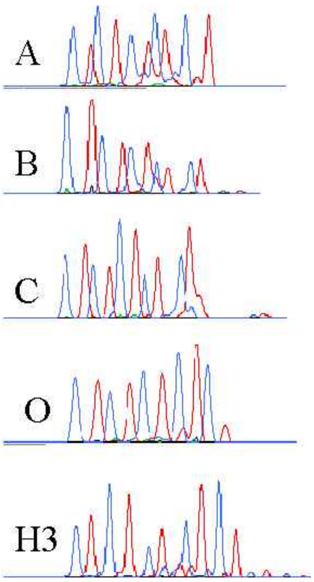


그림 9. 24가지 유전자에 대한 Co-aSNP의 예시. 왼편은 6가지 multiplex PCR을 시행한 예시이고, 이러한 PCR 산물을 정제한 다음, single base extension을 시행하면 오른편과 같은 pherogram을 얻을 수 있다. 각각의 peak에 대한 intensity값을 IGF1과 비교하여 상대적인 ratio를 구한다.

◎ 각각의 multiplex PCR product에 single base extension을 시행한 후 결과를 보면 그림 10과 같은 결과를 얻을 수 있다. 각각의 multiplex PCR로부터 나온 single base extension의 peak signal로부터 각각의 ratio를 얻으면 그림 11과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

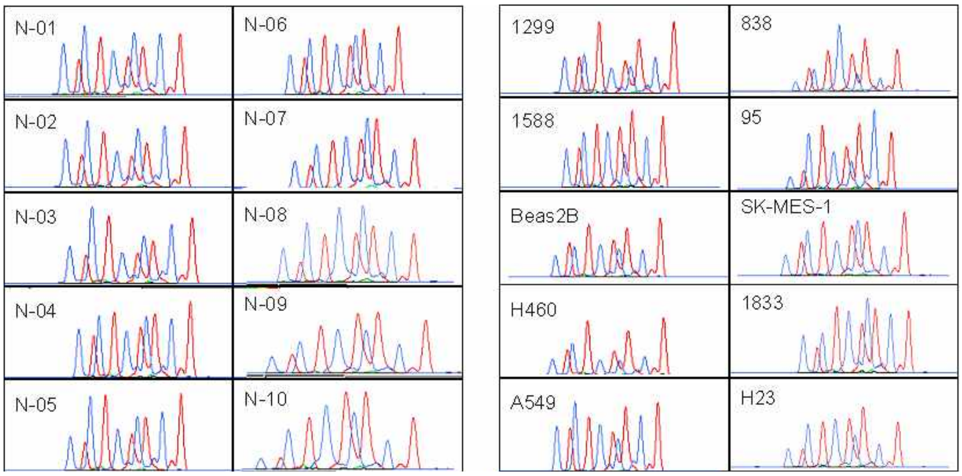
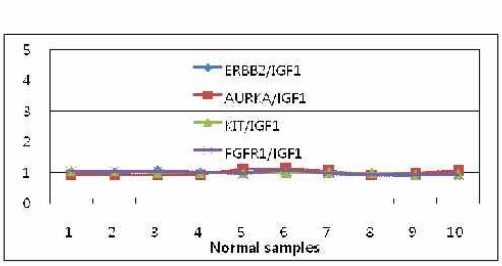


그림 10. Series A (multiplex PCR A)로부터 single base extension 실험후 얻은 결과의 예시. N으로 시작된 결과는 여러 가지 2n상태의 DNA에서 얻은 결과이고, 오른편은 암세포주에서 얻은 결과임. 이 결과에서 나온 각각의 신호값의 비율을 구하여 2n 상태의 DNA에서 얻은 값을 1로 normalize하여 최종적으로 각 세포주 혹은 암조직에서의 카피수를 결정한다.



	ERBB2/IGF1	AURKA/IGF1	KIT/IGF1	FGFR1/IGF1
normal ave.	1	1	1	1
NCI-H1299	0.670	0.938	0.588	0.780
HCC-1588	1.093	1.103	0.513	1.100
Bease2B	1.128	1.657	1.083	1.119
H460	1.142	1.206	0.632	0.801
A549	1.474	1.345	0.592	1.186
H838	1.581	5.145	0.929	1.143
HCC-95	1.598	1.538	0.748	3.210
SK-MES-1	1.648	1.339	1.980	1.115
H1833	0.492	0.996	0.926	0.960
NCI-H23	1.114	1.114	0.599	0.734

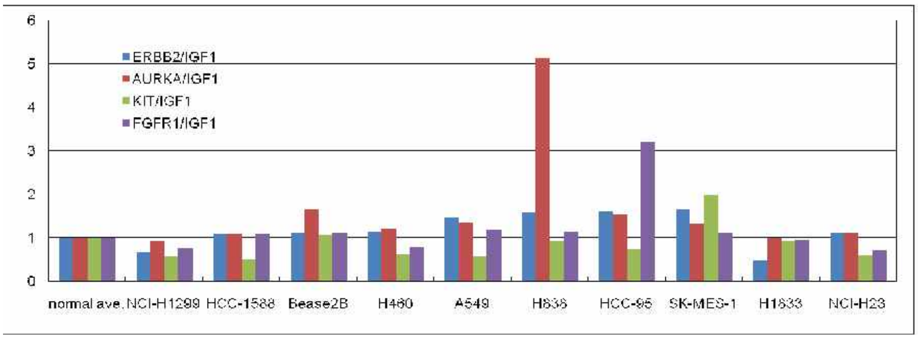


그림 11. Series A를 위한 multiplex PCR product로부터 single base extension을 시행하여 나온 데이터를 normal DNA를 1로 normalize한 후 각 cell line마다 유전자 카피수를 계산한 결과.

◎ Normal DNA로부터 나온 결과를 1로 normalize한 후 24개 모든 유전자에 대해 유전자 카피수

를 결정하면 그림 12에서와 같이 각 유전자마다 각 cell line에서의 카피수를 비교한 결과가 나오게 된다. 현재 대부분의 NCI-60 cell line에서 진행하였으며 각종 항암제에 대한 민감성과 비교하여 특허와 논문을 작성할 예정이다.

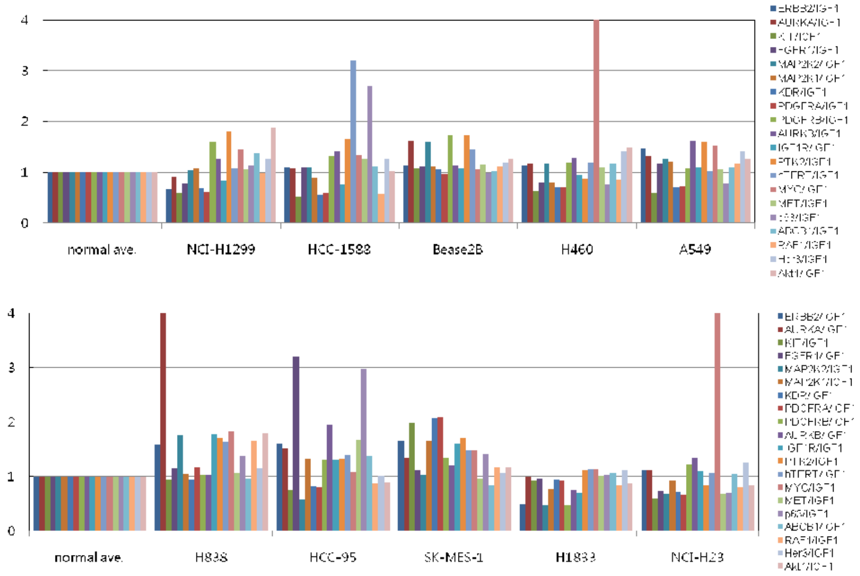


그림 12. 각 cell line에서의 24개 유전자의 copy수 측정 결과.

◎ 또한 본 연구에서 분자적 진단방법과 관련된 대상으로 DNA promoter CpG island methylation에 대한 연구도 동시에 계획하고 진행하였다. Promoter methylation이 있는 유전자들 중 일부는 암환자의 생존과 관련이 있다고 알려져 있는 유전자들이 보고되어 있다. 이들에 대한 MSBE method를 setup하고 암환자의 생존과의 관련성을 연구하고자 한다. 암환자에서 생존과 관련이 있다고 알려져 있는 유전자들의 promoter methylation은 MGMT (Brabender et al., 2003), RASSF1A (Tomizawa et al., 1999), FHIT (Maruyama et al., 2004), p16 (Wang et al., 2004), DAPK (Lu et al., 2004) 등이 있다.

◎ 프로모터 메틸화는 암에서 가장 흔한 변화 중 하나로 이를 진단하는 방법으로는 MSP방법이 가장 많이 사용하는 방법이다. 그런데 MSP방법은 시간과 비용면에서 장점을 가지고 있지만 결과 해석에 객관성이 부족한 경우가 많았으며 methylation의 변화가 quantitive change가 많다는 사실을 감안했을때 정량분석이 가능한 방법이 실제 임상적용에 응용될 가능성이 크다고 할 수 있다.

◎ 본 연구자는 DNA promoter CpG island methylation을 측정할 수 있는 정량적이고 간단한 MSBE 방법을 보고한 바 있다 (그림 13, Hong et al., 2005). 이 방법은 한번에 여러 CpG site를 측정할 수 있으며, 결과가 peak의 ratio로 나오기 때문에 cutoff를 정하여 좀더 객관적으로 positive 혹은 negative여부를 판별할 수 있는 장점이 있다.

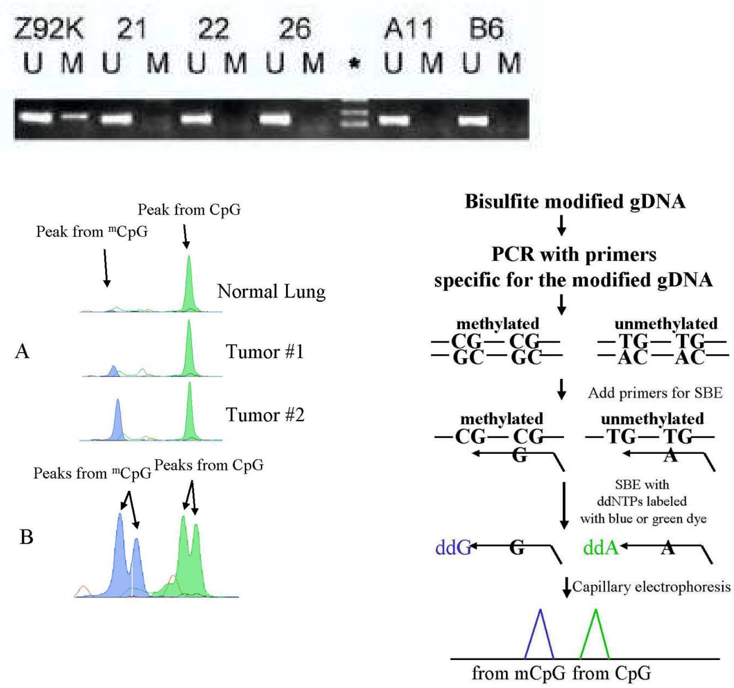


그림 13. Semiautomatic measurement of promoter methylation. 위 그림은 전통적으로 사용하고 있는 MSP (methylation specific PCR) 방법으로 promoter methylation을 측정하는 방법. 아래 왼쪽은 MSBE (methylation single base extension)방법으로 측정한 p16 promoter methylation 측정 방법. 아래 오른쪽은 그 원리를 설명한 그림.

◎ 본 연구에서는 이러한 Methylation level을 정량적으로 측정하는 방법을 응용하여 10여 가지 유전자를 대상으로 확립하였으나 (그림 14), 암질환을 대상으로 한 연구는 진행하지 못하였다.

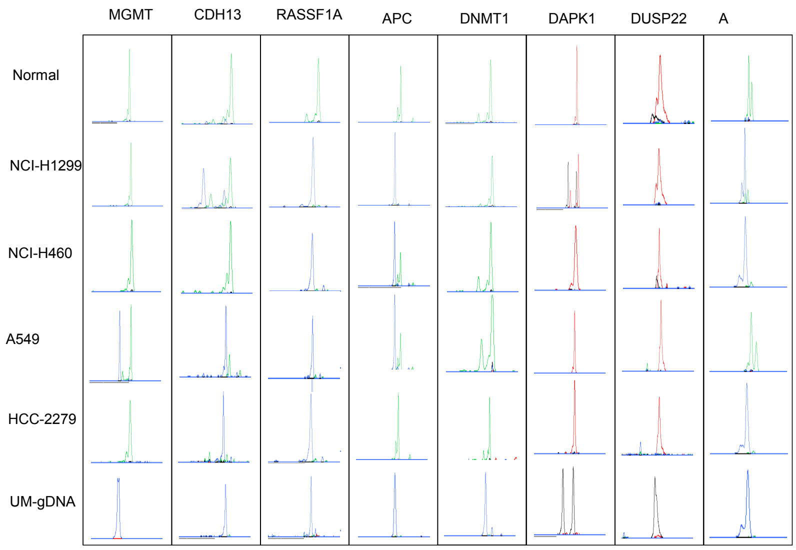


그림 14. Methylation single base extension (MSBE)방법으로 10가지 유전자의 promoter methylation,여부를 확인하는 assay를 확립함.

◎ 그러나 SLE라고 하는 자가면역질환에 MSBE방법을 적용하여 자가면역질환의 발생이 epigenetic한 변화와 관련이 있음을 발견하였다. 이러한 결과는 SLE등을 포함한 자가면역질환의 발생이 유전적변화 즉 SNP와의 관련성이 NEJM, Nature Genetics두편, PLoS Genetics2편을 포함하여 최근 2-3년 동안 많이 보고되었는데 (Hom et al., 2008; Graham et al., 2008; Han et al., 2009; Yang et al., 2010; Barcellos et al., 2010), 이들에서 보고된 SNP와 SLE의 연관성을 알아볼 수 있는 지표인 OR는 1.3-2.3정도였다. SLE를 가진 일란성 쌍둥이에서도 SLE의 발생이 일치하지 않는 쌍을 대상으로한 연구에서 DNA methylation level이 저하되어 있다는 최근의 연구 또한 SLE가 epigenetic한 변화와 관련이 있을 것이라는 최근의 가설과 부합하는 결과이다 (Javierre et al., 2010). 이러한 최근의 결과이외에도 SLE가 epigenetic한 변화와 관련이 있을 것이라는 증거는 많이 보고되고 있었는데, 5-azacytidine, procainamide, hydralazine과 같은 demethylating agent를 사용한 사람들에서 lupus like symptom이 나타난다는 것 등이 그 증거로 들 수 있다.

◎ 이러한 epigenetic change는 그동안 유전적인 변화로는 설명할 수 없었던, age dependency, quantitative nature를 포함하여 환경적인 요인에 의해 영향을 받아 발생할 수 있다는 기전을 제공해주는 장점이 있어서 많은 주목을 받고 있다.

◎ 관련된 연구결과를 구체적으로 보면 세가지 유전자의 프로모터 methylation level이 정상에 비하여 SLE와 류마티스관절염 (RA), 그리고 전신경화증 (SSC)환자에서 유의하게 차이가 있었으며 대조 질환으로 사용한 유방암환자 (BC)에서는 유의한 차이가 없었다 (그림 15).

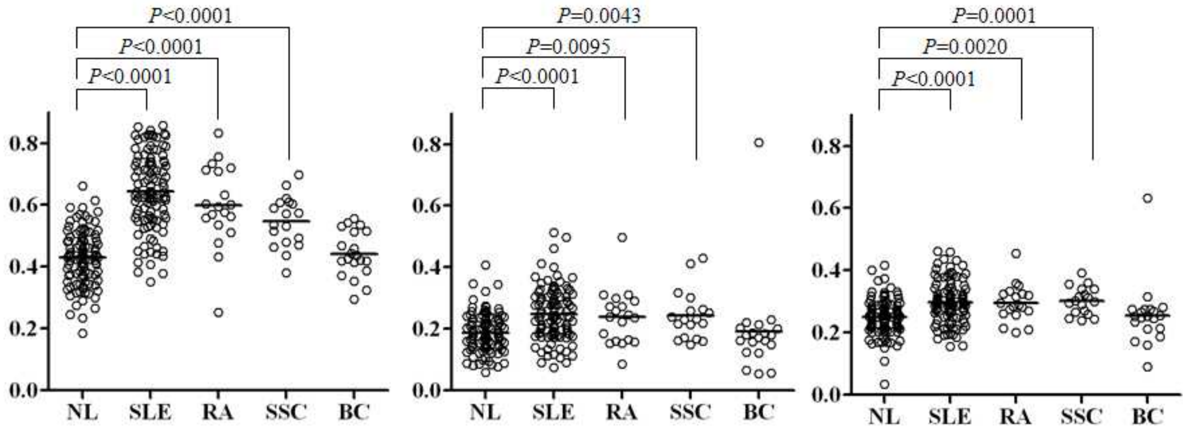


그림 15. Quantitative changes in the levels of promoter CpG island methylation of promoters for A) B)and C. Patients with SLE (SLE) showed significantly higher level of promoter CpG island methylation in three different gene promoters (p<0.0001 by Mann Whitney test for all methylation marker genes) than normal healthy controls (NL). Patients with RA (RA) or SSC (SSC) also showed significantly higher level of methylation. As a disease control, breast cancer was also included (BC). Y axis is the signal ratio of methylated peak to the sum of methylated and un-methylated peaks.

◎ 또한 active와 inactive SLE환자에서 A, B, C등 세가지 유전자 promoter methylation을 측정하

였을 때, A와 C 유전자의 promoter methylation이 active SLE환자에서 유의하게 증가되어 있다는 것을 확인할 수 있었다 (그림 16). 또한 blood cell을 분획한 후 subpopulation에서도 이러한 promoter methylation의 증가를 관찰할 수 있었는데 이는 질환과 관련된 특정 유전자의 methylation이 T cell에 국한되어 변화하지 않고 전반적인 blood 세포에 일어난다는 것을 확인할 수 있었다 (그림 16). (참고로 아직 특허를 진행하고 있어서 유전자의 이름을 밝힐 수 없었고, A, B, C라는 유전자로 표기하였음)

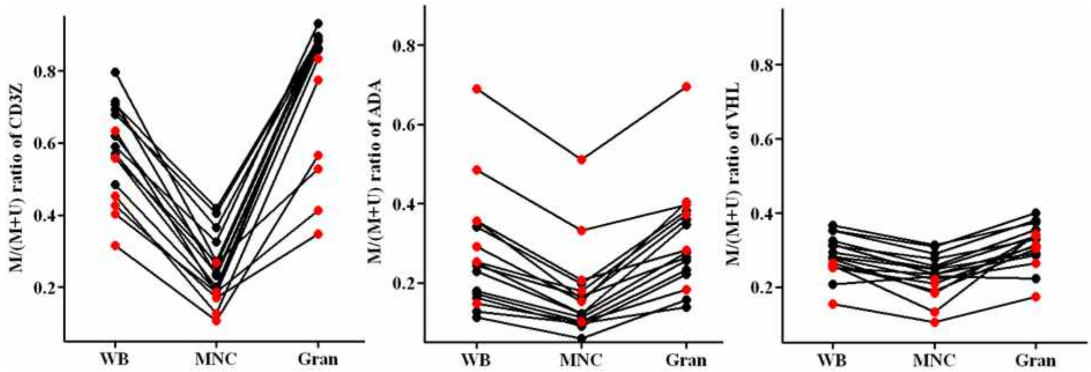


그림 16. Promoter methylation status in subpopulationsof blood cells from 10 active and 6 inactive SLE patients. The level of promoter methylation levels of whole blood (WB), mono-nuclear cell (MNC), or granulocyte of inactive (red head) and active (black head) SLE patients were measured by MSBE methods. Whole blood DNA methylation level of B and C were significantly correlated with those of MNC or granulocyte fractions (p<0.001 by Spearman test). Gene A promoter methylation level in MNC or granulocyte were significantly correlated with that from WB (p=0.001 for MNC, p=0.003 for granulocyte by Spearman test). The levels of gene A methylation in WB, MNC and granulocyte from active SLE patients were significantly higher than those from inactive SLE patients (p=0.0075 for WB, p=0.0047 for MNC, p=0.0002 for granulocyte by Mann Whitney test). The levels of gene C methylation in WB and MNC from active SLE patients were significantly higher than those from inactive SLE patients (p=0.0225 for WB, p=0.0002 for MNC by Mann Whitney test). However the level of methylation in granulocyte from active SLE patients was not significantly higher than that from inactive patients (p=0.3132). The levels of gene B methylation in MNC from active patients were significantly lower than those from inactive patients (p=0.042). In WB or granulocyte, the level of gene B methylation from active patients was lower than those from inactive patients though not statistically significant (p=0.0559 by Mann Whitney test).

◎ SLE와 관련된 보고된 특정유전자의 DNA methylation의 변화는 SLE환자의 T 세포에서 몇가지 SLE-associated hypo-methylated gene들이 발견되어 보고되었다 (Deng et al., 2001 Richardson et al., 1992 Kaplan et al., 2004; Lu et al., 2002). 그러나 SLE를 포함한 자가면역질환이나 기타 환경에 영향을 받은 multi-factorial disease들 중 지금까지 보고된 DNA methylation은 대부분 hypomethylation과 관련된 보고였으며, 어느 것도 case-control study의 결과로 odds ratio 혹은 relative risk가 어느정도 인지를 보고한 결과는 없었다. 이러한 결과의 부재로 인해 아직까지 epigenetic change가 어느정도 질환의 발생 혹은 progression에 영향을 주는 지에 대해 확인할 수 없었다는 단점이 있었다.

◎ 본 연구의 진행과정에서 SLE, 류마티스관절염, 전신경화증 등과 같은 자가면역질환 환자의 혈액 DNA에서 유의하게 methylation정도가 변화되어 있는 세가지 유전자를 발견하였고, 특히 그 중 하나의 유전자는 methylation level을 0.6정도에서 cutoff 값으로 정하는 경우 정상인의 2%미만에서 증가되어 있으나 약 65%의 SLE환자에서 증가되어 있는 등 SLE와 관련성이 아주 높게 나왔으며, 이러한 결과는 SLE를 포함한 자가면역질환의 진단에 응용될 수 있다는 것을 시사하는 것이다. 특히 정상인과 SLE환자의 methylation level을 median값을 cutoff로 한 SLE이환에 대한 odds ratio를 구하면 29.8이라는 것을 알게되었는데 이는 SNP가 SLE 위험도에 대한 odds ratio가 1.3-2.3정도라는 것을 감안한다면 epigenetic change가 자가면역질환의 발생 혹은 progression에 얼마나 중요한 영향을 미치는 지를 확인할 수 있다고 하겠다. 이러한 결과는 본연구에서 진행하고 있는 연구비를 주요 연구비로 사용하여 나온 결과로서, 본 연구비를 reference로 하여 관련 내용을 요약하여 특허와 논문을 준비하고 있다. 이 결과는 비록 암에 대한 직접적인 연구는 아니지만 암연구에 사용하는 방법을 또 다른 질병에 응용함으로써 전혀 새로운 질병에 대한 insight를 가지게 할 수 있는 계기가 되었다는데 의의가 있다 하겠다.

◎ 또한 본 연구의 계획에 포함되어 있으며 본 연구의 연구비를 사용하여, 국립암센터 혹은 대학의 연구원들과 공동연구를 진행하여 단클론항체를 생산하고 특성연구를 진행하고 있다. 그 중 성균관대학교와의 공동연구로 CKAP2에 대한 단클론항체를 생산하고, 사람의 유방암조직에서 조직면역화학염색을 시행함으로써 유방암의 예후 예측 표지자로 사용될 수 있다는 것을 발견하게되었다. 현재까지 CKAP2의 발현과 암의 예후와 관련되어 보고된 바가 없으며, 특허 또한 진행된 바가 없다. 본 연구에서 CKAP2항체에 대한 염색체 염색된 세포의 수가 mitotic count와 비례하다는 것을 보였고, 110명의 유방암 환자에서 분석하여 환자의 overall survival 및 disease-free survival과 관련되어 있다는 것을 확인함으로써 CKAP2가 proliferation marker로 사용될 수 있고, 또한 independent prognostic marker라는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 본 연구의 연구비를 주요 연구비로 사용하여 진행하였고, 그 결과에 대해서도 본 연구비를 reference로 하여 특허를 신청한 상태에 있고 논문을 준비하고 있다.

◎ 구체적인 결과를 보면, 사람의 정상적인 조직의 파라핀 section을 이용한 CKAP2 조직면역화학염색에서 CKAP2의 발현이 그림 17에서와 같이 세포의 증식이 활발하게 일어나는 부위에서 높다는 것을 확인할 수 있었다.

◎ 유방암조직에서의 조직면역화학염색에서 그림 18A와 같이 H&E염색상 mitosis를 구별하기 힘든 경우에도 그림 18B와 같이 CKAP2의 염색체 염색 양성인 세포의 수를 쉽게 알 수 있다. CKAP2의 염색은 세포질에서도 양성인 세포가 있는데 이러한 세포는 G2 phase에 있는 것으로 생각되며 본 연구 결과에서는 염색체에 양성인 세포의 수를 기준으로 평가하였다. 구체적인 세포의 CKAP2발현 상황을 살펴보면 그림 18D에서와 같이 대부분의 interphase세포나 apoptotic cell은 CKAP2가 발현되지 않았으며, metaphase가 지난 시기부터 cytokinesis가 끝나고 지난 시기까지 염색체에 CKAP2가 발현되는 것을 관찰할 수 있었다.

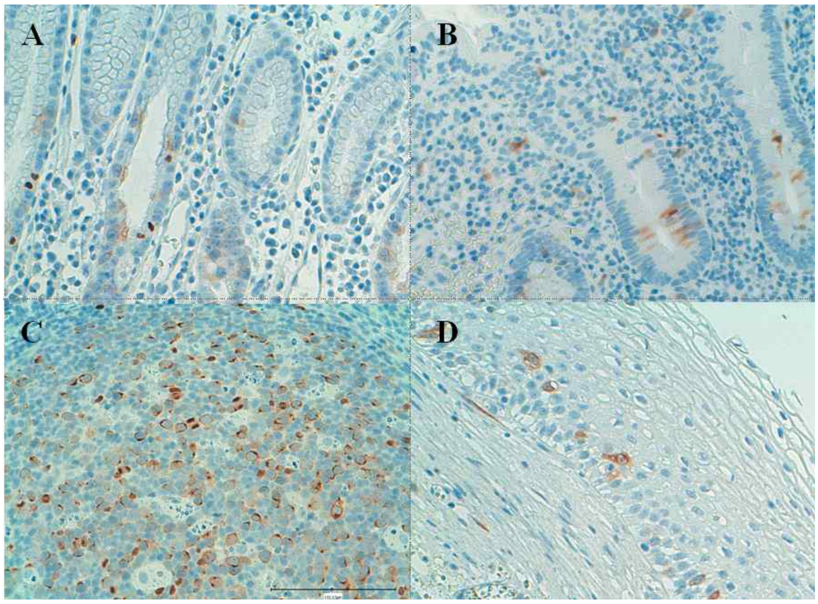


그림 17. Expression of CKAP2 in proliferating cells of different human tissues. CKAP2 expression was shown in proliferating gastric crypt cells (A), small intestinal crypts (B), lymphoid follicle (C), and the basal layer of the uterine cervix (D). Images were taken under x400 magnification.

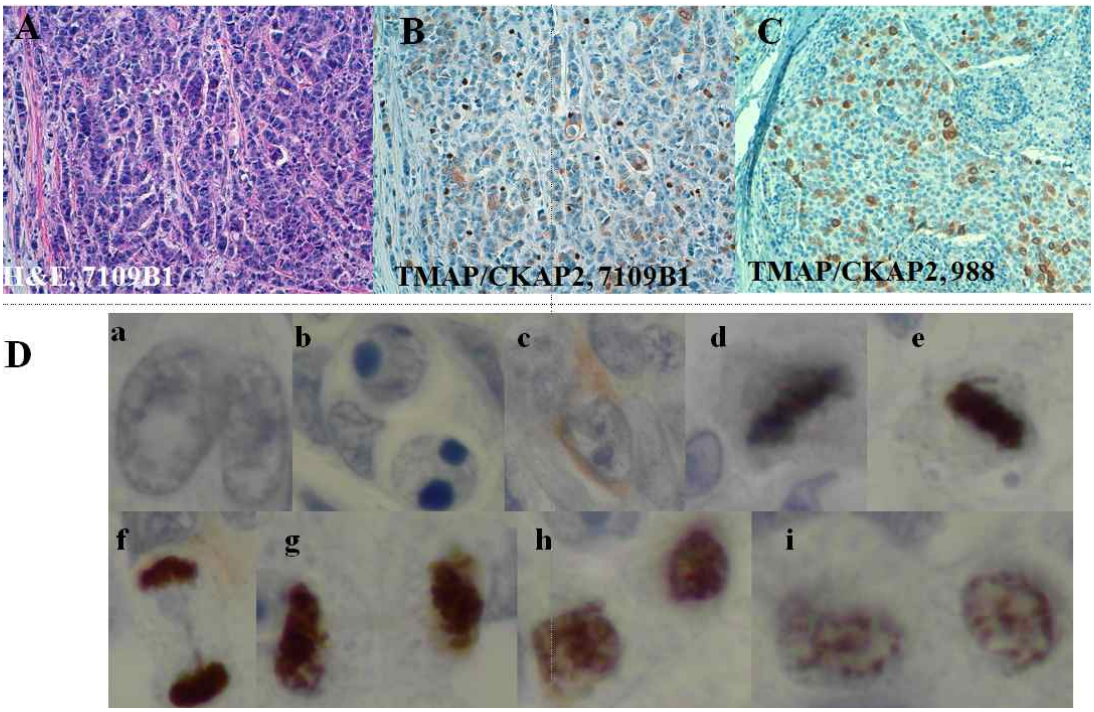


그림 18. Immunohistochemical (IHC) staining of CKAP2 in breast cancer tissues. A. In breast cancer tissues of pleomorphic cellular morphology and showing poor cell-to-cell distinction, the measurement of the mitotic count on H&E slides was difficult. B. When the same tissue was stained with CKAP2 antibody, positive cells were easily identifiable. C. In some tissues, cytoplasmic staining was more

apparent. All images were taken under x200 magnification.D. CKAP2 was localized cytoplasm or chromosome depending on the phase status of cell cycle. a and c: interphase, b: apoptotic cell d: metaphase, e: post-metaphase, f: anaphase to telophase, g: cytokinetic phase, h-I: post-cytokinetic phase.

◎ CKAP2가 proliferation marker로서 사용될 수 있는지를 알아보기 위하여 CKAP2 염색체 염색의 수와 mitotic figure count와의 상관관계를 30개 정도의 유방암조직에서 비교분석하였는데 그림 19에 보는 바와 같이 상관관계가 아주 높다는 것을 알 수 있었다 (ρ=0.743, p<0.001). 이러한 결과는 CKAP2가 유효한 proliferation marker라는 것을 의미하는 것이라 하겠다.

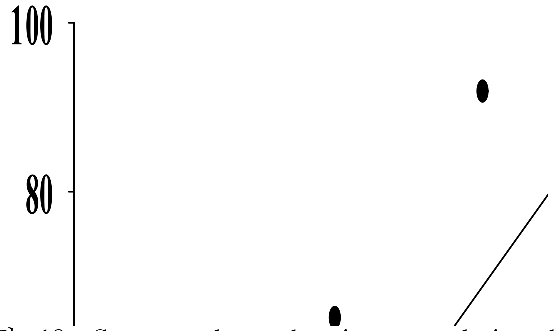


그림 19. Scatter plots showing correlation between mitotic figure (MF) and chromosomal CKAP2-positive cell counts. When the MF counts on H&E staining were compared with the CKAP2-positive cell counts for 30 samples of primary breast cancer tissue, the correlation was significant (ρ=0.743). x-axis: MF count on H&E staining. y-axis: chromosomal staining cell count on CKAP2 IHC staining.

◎ CKAP2가 proliferation marker이고 H&E염색에서 mitotic count를 세기 어려운 경우에도 proliferation정도를 잘 알 수 있다면 좋은 유방암 예후예측 표지자로서 사용될 수 있는 지를 알아보기 위하여 초기 유방암 환자 (carcinoma *in situ*환자를 제외하고 유방암으로 조직검사에서 확인된 환자 중 완치를 위해 유방암 절제 수술한 환자) 110명의 조직을 이용하여 조직면역화학염색을 시행하고 여러 가지 clinicpathologic factor들 그리고 overall survival과의 연관성을 비교분석하였는데, CKAP2의 염색체 염색 양성인 세포의 percentage (CPC percentage)는 histologic grade, nuclear grade, T stage, N stage, ER status, PR status 등 기존에 survival과 연관성이 크다고 알려진 factor들과 유의한 관련성을 보였다 (모두 P<0.01). 그리고 CPC percentage에 따라 세가지 group으로 나누어 Kaplan-Meier plot을 하였는데 (그림 20) 유방암 환자의 overall survival과 유의한 상관관계를 보였다 (group II와 group III모두 CPC percentage 가 가장 낮은 group I에 비해 유의하게 overall survival이 낮았으며 유의 수준은 모두 0.001이하였다).

◎ CKAP2 발현이 independent prognostic factor 인지 여부를 확인하기 위하여 overall survival과 association에서 0.1이하의 유의성을 보이는 factor들인 age, T stage, N stage, HER2 status, nuclear grade를 고려한 multivariate analysis에서 CKAP2 CPC percentage와 overall survival과의 상관관계를 분석하였는데, 가장 낮은 CPC percentage를 가진 group I에 비해 중간정도의 CPC percentage를 가진 group II (HR=12.492, *P* =0.028)와 가장 높은 CPC percentage를 보인 group

III (HR=24.594, *P* =0.005)에서 유의한 상관관계를 보였다. Group II와 Group III를 합하여 group I과 비교하여도 역시 유의한 상관관계를 보였으며 (p=0.010), HR도 17.8이었다. Mitotic count를 기준으로 두 group으로 나눈 후 mitotic count가 높은 군이 낮은 군에 비해 유의하게 overall survival이 나빴지만, HR는 3.9정도로 CKAP2에 비해서는 낮았다. 이러한 결과는 CKAP2가 단순히 mitotic count의 surrogate marker로서 뿐 아니라, 초기 유방암환자의 예후예측에 있어서 mitotic count보다 유용할 수 있다는 것을 의미하는 것이다.

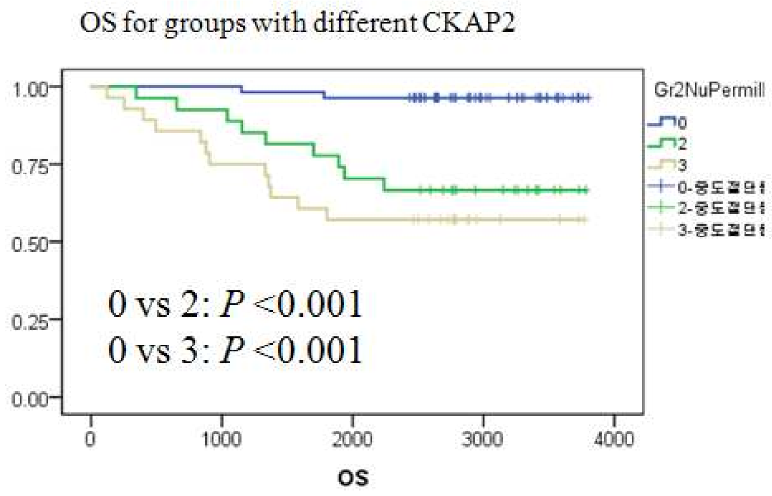


그림 20. Kaplan-Meier plots of OS ccording to groups with different chromosome percentage of CKAP2-positive cells. x-axis is survival (disease-free or overall) months after surgery, and y-axis is survival probability. Statistically significant differences of OS or DFS were marked (*).

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

I. 암조직에서의 카피수 변화의 측정방법의 개발 및 적용

◎ 암에서의 주요 분자적 변화는 점 돌연변이, 결실, 증폭 그리고 DNA methylation의 변화등을 들 수 있다. 이 중 점돌연변이와 DNA methylation을 검출할 수 있는 방법은 dideoxy determinator sequencing, pyrosequencing을 포함한 다양한 방법들이 소개되고 있다. 그러나 증폭과 결실을 reliable하게 검출하여 임상환자 시료에 응용되고 있는 방법은 FISH등 조직학적인 방법이 포함된 방법에 국한되어 이용하고 있다. FISH 방법이 확립하기 힘들고, 전문적인 판독이 필요하고 검사시간과 비용이 많이 소모되어 분자적인 방법을 이용한 검출방법이 많이 시도되었다. 그 중에서 realtime PCR 방법은 실제 Roche에서 kit로 제작되어 실험실에서 널리 사용되다가 미국 FDA의 승인을 획득하지 못하여 더 이상 사용되지 않고 있다. 검사시간이 빠르고 비용이 비교적 저렴하며 automation이 가능하다는 장점 때문에 그 이후에도 Roche방법을 변형한 여러 가지 분자적 방법들이 시도되었다. 그러나 현재 FISH를 대체하거나 적어도 보조적인 방법으로 사용할 수 있는 공인된 분자적인 방법이 없는 실정이다.

◎ 암에서의 흔히 발견되는 유전자 증폭과 aneuploidy가 임상에서 적용되는 예 중 가장 대표적인 것이 유방암에서의 HER2 증폭 측정방법이다. 유방암에서 HER2의 증폭여부는 치료의 방향을 결정하는데 중요한 진단수단이 되어서 모든 유방암환자에서 HER2검사가 ER PR등의 검사와 함께 기본 검사 중 하나로 되어 있다는 것은 주지의 사실이다. 이러한 유전자증폭의 검사에 FISH가 도입되면서 이러한 유전자 증폭이 환자의 치료를 결정하는데 사용될 수 있다는 것은 최근에 많은 논문들에서 보고되고 있다. 최근에는 방영주교수등의 Lancet논문에서 위암에서도 HER2가 증폭된 암의 치료에 Trastuzumab을 포함하는 치료가 생존연장에 도움이 된다는 보고로 위암에서도 HER2 증폭검사가 중요한 검사방법이 되고 있다 (Bang et al., 2010).

◎ HER2 이외에도 유전자의 증폭을 확인하여 환자의 치료에 이용할 수 있다는 논문들이 최근 많이 보고되고 있는데, 그림 1에서 보는 바와 같이 대장암에서 pantitumumab으로 치료하는 환자의 clinical outcome이 EGFR의 증폭과 관련이 있다는 논문이 2007년 JCO에 보고되었고 (Sartore-Bianchi et a., 2007), MET 유전자 증폭은 tyrosine kinase inhibitor인 PHA-665752의 민감도를 결정하는 중요한 수단이 된다는 것이 2006년 PNAS에 보고되었으며 (Smolen et al., 2006), 위암에서 FGFR2의 phosphorylation inhibitor인 Ki23057의 민감도를 결정하는데 FGFR2유전자의 증폭의 여부를 측정하는 것이 중요하다는 논문이 2006년 gastroenterology에 보고되는 등 (Nakamura et al., 2006), 이들을 포함하는 수많은 논문들에서 유전자 증폭이 치료제의 선택에 중요할 수 있다는 것을 시사하고 있다.

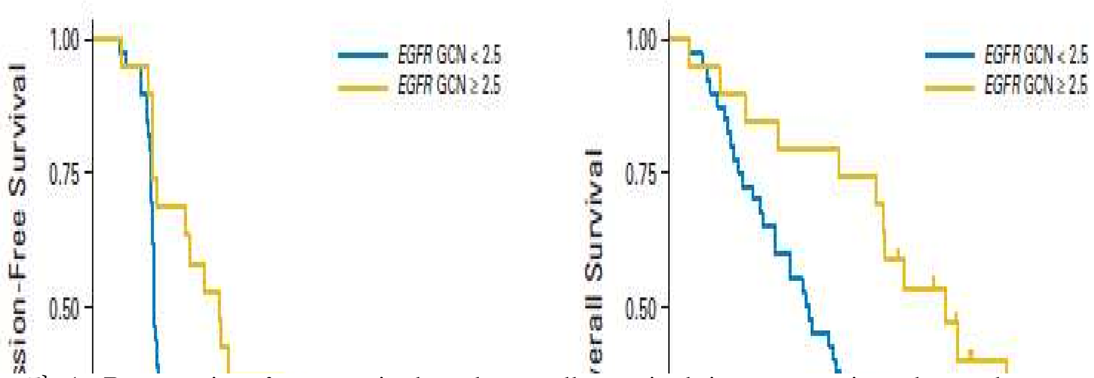


그림 1. Progression-free survival and overall survival in metastatic colorectal cancer patients treated with panitumumab according to the proposed cutoff values of EGFR gene copy number/nucleus as evaluated by fluorescence in situ hybridization in individual tumor specimens.

◎ 현재 이들 유전자의 증폭을 검사하는 gold standard로 FISH (fluorescence in situ hybridization)방법을 사용하고 있다. 그림 2는 HER2의 증폭을 검사하기 위한 FISH 방법을 예로 들었다. 이 방법은 디파라핀화한 유방암 조직 slide에서 유전자의 증폭여부를 측정하는 방법으로 대개 표적 probe이외에 control로 사용하는 probe를 동시에 측정한다. 그러나 이를 위한 특별한 기술과 fluorescence microscopy와 같은 장비가 필요하다는 약점이 있으며, FISH의 결과는 시간이 지나면 약해져서 결과를 장기간 보관하지 못한다는 단점이 있다. 그러나 Herceptin의 유방암 치료 효과와 가장 연관성이 크다고 알려져 있어서 HER2 증폭여부를 검사하는 gold standard로 알려져 있다.

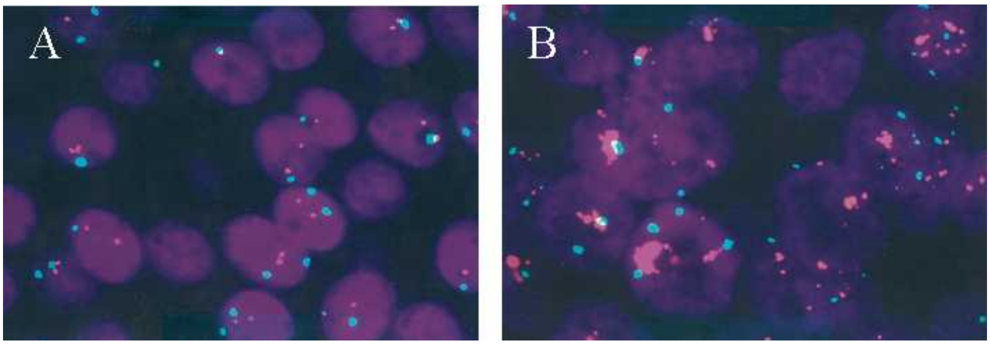


그림 2. HER2 증폭 검사를 위한 FISH 측정 방법. HER2에서 오는 신호 (red)와 17번 염색체의 centromere쪽에서 오는 신호 (blue)를 각각 count하면 A 와 같이 정상적으로 같은 ratio로 나오는데, HER2가 증폭되어 있는 경우 B와 같이 HER2에서 오는 신호가 증폭되어 있거나 수가 늘어나 있다.

◎ 유방암에서는 FISH방법이 정확하다는 장점이 있으나, 검사가격이 비싸다는 단점 때문에 모든 환자에서 우선적으로 사용하지 않고 조직면역화학염색을 먼저 시행하고 결과가 불명확한 경우에

한해 FISH를 검사하는 것이 일반적인 검사진행이다. 이 조직면역화학염색법은 파라핀 블락을 5 μm로 얇게 잘라서 항체를 이용하여 단백질의 발현양상을 semi-quantitative하게 검사하는 방법으로 비교적 많은 병리 실험실에서 쉽게 시행할 수 있으며 상대적으로 가격이 저렴하다는 장점이 있다. 또한 염색한 결과를 오랬동안 보관이 가능하다는 장점을 가지고 있고 암세포의 모양이 그대로 보존되어 판독이 용이하다는 커다란 장점이 있어서 현재 가장 많이 사용하고 있는 검사방법이다. 그러나 시료보관 조건, 고정액의 종류, 고정시간의 변화, 항체의 종류에 따른 변화와 같이 염색결과에 영향을 미치는 많은 변수들이 있으며, 중등도 염색이 되는 경우 결과 판정이 모호한 경우가 많다는 단점이 있다. 최근 이러한 변화를 줄이기 위해 HER2 과발현 검사를 위해 조직면역화학염색법이 kit로 개발되어 보급되고 있으나, 조직면역화학염색 결과 2+인 유방암조직의 경우 또다시 FISH로 검사하는 것이 표준으로 되어있다.

◎ 그런데 시간이 오래걸리고 검사비용이 많이 든다는 단점을 가지고 있는 FISH등의 방법이 유전자 증폭의 표준검사로 사용하는 가장 큰 이유는 이를 대체할 만한 간편한 분자적 진단방법이 없다는 점이다. 실제 이러한 가능성을 연구한 연구결과들이 많이 있었다. 그 중에서 realtime PCR 방법으로 검사하는 Roche의 HER2 증폭 진단 kit는 많은 연구들에서 유용성을 보고하였으나, 미국 FDA승인을 획득하지 못하면서 분자적 방법을 유전자 증폭의 진단에 사용하는 것은 불가능하다는 것이 일반적인 상식으로 되어 있다. 그러나 분자적 방법이 automation이 가능하고 결과를 해석하기 용이하다는 장점이 있어서 유전자 증폭의 표준 진단법으로 사용할 수 있는 새로운 방법의 개발에 많은 노력을 하고 있다. 이는 많은 표적유전자 증폭여부를 진단하는 것이 대상환자를 선택하는데 중요한 요소인 상황에서, 새로 개발되는 표적치료제의 빠른 임상적용과 환자의 치료 비용감소를 위해서도 새로운 분자적 방법을 개발하는 것이 절실한 상황이다.

◎ 이러한 상황에서 최근 Gastroenterology잡지에 QMPSF (quantitative multiplex polymerase chain reaction of short fluorescent fragments)방법이 소개되었는데 (Killian et al., 2007), 이 방법은 fluorescent이 표지된 primer를 사용하여 유전자를 multiplex로 증폭하여 그 상대적인 signal intensity를 비교함으로써 양의 변화를 측정할 수 있는 방법이다. 이 방법은 비교적 여러개의 유전자 증폭상황을 빠르게 분자적인 방법으로 측정할 수 있다는 장점을 가지고 있는데, 아직까지 임상적용의 예와 민감도와 reproducibility등에 대한 자세한 연구결과가 보고되지 않고 있으며 원리상으로도 multiplex PCR의 민감도를 약간 증가시켰다는 것 이외에는 특징적인 내용이 없었다.

◎ 본 연구에서 유전자 증폭을 측정하는 새로운 분자적 방법의 하나로 Co-amplification of artificial SNP (Co-aSNP)라는 방법을 개발하였고, 이와 관련하여 2008년 국내특허를 취득하였다. 이 방법의 원리가 비슷한 PNAS와 Nature등에 competitive PCR방법이 소개된 바가 있는데 (그림 3, Gilliland et al., 1990; Siebert et al., 1992), 이전의 방법들로 소개된 competitive PCR방법들은 환자의 시료 DNA를 정확하게 측정하고 serial dilution한 여러개의 competitor로 여러개의 실험set를 준비해야 증폭여부를 측정할 수 있어서 임상적용에 어려움이 있었으며 (Sestini et al., 1994), 비교적 최근에 보고된 competitive PCR의 변형된 방법인 competitive PCR using fluorescent melting curve analysis 방법 또한 같은 문제점을 가지고 있다 (Lyon et al., 2001).

◎ 본 연구자는 이러한 competitive PCR의 단점들을 없애면서 민감도를 그대로 유지하고, 또한 한꺼번에 여러개의 유전자 증폭을 측정할 수 있는 새로운 방법을 고안하였다. 그리고 선행연구에

서 HER2를 측정할 수 있도록 17q 염색체에 두개의 control 유전자를 선택하고 두 군데의 HER2 유전자 서열을 한꺼번에 검사하도록 새로운 방법을 고안하여, HER2가 증폭되어 있다고 알려진 유방암세포주들에서 증폭정도를 측정하였는데 이미 알려진 결과와 유사한 결과가 나왔으며, 정상적인 blood DNA에서의 각 서열의 copy 수에 대한 결과가 매우 reproducible하게 나왔다. 특히 두 개의 서로 다른 17q에 위치하는 control 유전자를 사용함으로써 기존의 realtime PCR방법으로 분석할 수 없었던 case들을 분석할 수 있는 장점이 있음을 알 수 있었다. 또한 본연구에서 이러한 새로운 유전자증폭 검출을 위한 분자적 진단방법을 24개 정도의 예후와 관련이 있거나 암치료제의 표적이 되는 유전자에 대해 확립하였다.

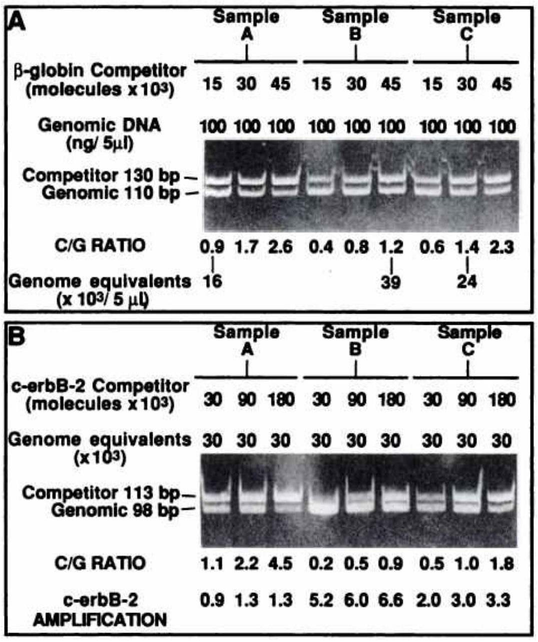


그림 3. Measurement of c-erbB-2 amplification by competitive PCR. (A) Genomic DNA extracted from three breast tumor samples was coamplified with various amounrs of b-globin competitor DNA. (B) c-erbB-2 amplification was quantified by coamplification of exactly 30 x 10^3 genomic equavalents with various amounts of corresponding competitor DNA. Then degree of c-erbB-2 amplification was calculated from the C/G ratio.

◎ 이러한 새로운 분자적 방법의 개발은 최근 유전자 증폭이 항암제 선택의 중요한 기준이 된다는 여러 보고들을 고려한다면 앞으로의 응용가능성은 아주 크다고 할 수 있다. 현재까지 유전자증폭을 검출하는 방법이 FISH와 조직면역화학염색방법에 국한되고 있고 최근 chromogen을 이용한 CISH등의 방법을 사용하는 시도가 늘었기는 했지만 여러 가지 유전자의 증폭상황을 한꺼번에 민감하게 측정하기에는 시간과 비용이 많이 소요되어 본 연구에서 개발한 Co-aSNP방법이 그 대안으로 사용될 가능성이 크다고 하겠다. 더구나 민감도에 있어서 기존의 realtime PCR방법에 비해 100배 정도 정확하고, 좀 더 연구를 진행해야 결과가 나오겠지만 FISH에 비해서도 많은 차이가 나지 않을 정도로 좋은 결과를 보이는 점 등을 고려한다면, automation등의 방법적인 개발과정이 더해진다면 암의 진단분야에 커다란 공헌을 할 수 있는 방법이 될 것으로 기대하고 있다. 본 연구 결과는 현재 특허출원하였으며, FISH와 조직면역화학염색 결과를 비교하여 논문으로 출간할 예정

이다. 향후 유방암 혹은 위암조직을 대상으로 prospective study를 하여 HER2증폭의 standard test method로 사용될 수 있는 지 등의 연구를 진행한다면 일반 병원에서도 암진단 분야에 비용과 시간 면에서 획기적인 개선을 기대할 수 있다. 또한 여러 유전자 증폭에 대한 동시검사가 가능하여 항암제선택에 중요한 지표를 제공해 줄 것으로 기대하고 있다.

II. DNA methylation level 측정방법의 개발과 질환에의 응용

◎ DNA promoter methylation은 암의 대표적 분자적변화 중 하나이다. 그런데 과거 사용하던 MSP 방법은 정량적이지 못하여 판독하는데 많은 bias가 존재하였다. 그러한 단점을 보완하고자 본 연구자는 DNA promoter CpG island methylation을 측정할 수 있는 정량적이고 간단한 MSBE 방법을 보고한 바 있다 (Hong et al., 2005). 이 방법은 한번에 여러 CpG site를 측정할 수 있으며, 결과가 peak의 ratio로 나오기 때문에 cutoff를 정하여 좀더 객관적으로 positive 혹은 negative 여부를 판별할 수 있는 장점이 있다.

◎ 그러나 본 연구를 진행하면서 암조직에서의 정량적인 변화를 측정하는 연구를 진행하기에 앞서, SLE (전신홍반루푸스, systemic lupus erythematosus)라고 하는 자가면역질환에 이 방법을 적용하였는데, 자가면역질환의 발생이 epigenetic한 변화와 관련이 있음을 발견하였고 이에 따라서 이와 관련된 연구를 본 연구의 연구비로 진행하게 되었다.

◎ SLE 등을 포함한 자가면역질환의 발생이 유전적변화 즉 SNP와의 관련성이 NEJM, Nature Genetics두편, PLoS Genetics2편을 포함하여 최근 2-3년 동안 많이 보고되었는데 (Hom et al., 2008; Graham et al., 2008; Han et al., 2009; Yang et al., 2010; Barcellos et al., 2010), 이들에서 보고된 SNP와 SLE의 연관성을 알아볼 수 있는 지표인 OR는 1.3-2.3정도였다. 그런데 본 연구에서 발견한 A 유전자의 DNA methylation 변화에 의한 OR는 약 30정도라는 것을 확인함으로써 epigenetic change가 어느정도 SLE발생 혹은 progression과 관련이 있을 지에 대한 명확한 증거를 제시할 수 있었다.

◎ 이러한 결과는 SLE를 가진 일란성 쌍둥이에서도 SLE의 발생이 일치하지 않는 쌍을 대상으로 한 연구에서 DNA methylation level이 저하되어 있다는 최근의 연구 또한 SLE가 epigenetic한 변화와 관련이 있을 것이라는 최근의 가설과 부합하는 결과이다 (Javierre et al., 2010). 이러한 최근의 결과이외에도 SLE가 epigenetic한 변화와 관련이 있을 것이라는 증거는 많이 보고되고 있었는데, 5-azacytidine, procainamide, hydralazine과 같은 demethylating agent를 사용한 사람들에서 lupus like symptom이 나타난다는 것 등을 그 증거로 들 수 있다.

◎ 이러한 epigenetic change는 그동안 유전적인 변화로는 설명할 수 없었던, age dependency, quantitative nature를 포함하여 환경적인 요인에 의해 영향을 받아 발생할 수 있다는 기전을 제공해 주는 장점이 있어서 많은 주목을 받고 있다.

◎ 이러한 DNA methylation을 포함한 epigenetic change와 질환과의 관련성에 대해서는 그동안 많은 논문들을 통하여 논의되었고 증거도 제시되었지만, 본 연구에서처럼 환자군과 대조군을 비교하여 OR를 제시한 적은 없었다. 그리고 epigenetic factor가 기존의 알려진 유전적인 요인에 비해

어느 정도의 비중으로 관련이 있는 지에 대해서도 명확히 제시된 바가 없었다. 따라서 본 연구는 자가면역질환 뿐 아니라 환경에 영향을 받은 많은 multifactorial disease의 발생과 progression을 설명하는 하나의 mechanism을 설명할 수 있는 model system을 제공했다는 측면에서 커다란 의의가 있다고 할 수 있다. 뿐만 아니라 A 유전자의 경우에는 cutoff value를 0.6으로 하였을 때 정상인의 2% 이하만 양성이고 SLE환자의 약 65%에서 양성을 보였으며, 비활성상태의 환자와 활성상태의 환자사이에 methylation level이 현저하게 달라서 진단적인 가치도 클 것으로 기대하고 있다. 이에 대한 결과를 정리하여 특허출원을 진행하고 있으며, 아직 출원이 완료되지 않아서 유전자의 이름을 A, B, C와 같이 표기하였다. 또한 결과에는 제시하지 않았으나 methylation에 의한 단백질의 변화까지 확인하였으며, 논문을 작성이 완료되어 Nature Genetic에 투고를 준비하고 있다. 이 결과는 본 연구의 연구비를 주요 연구비로 사용하여 진행하였고, 그 결과에 대해서도 본 연구비를 reference로 하여 특허와 논문을 진행하고 있다.

III. 조기 유방암 환자 예후예측표지자로서의 CKAP2 발현

◎ 단클론항체의 생산에 대한 연구계획은 본 연구의 계획에 포함되어 있었으며, 본 연구의 연구비를 사용하여, 국립암센터 혹은 대학의 연구원들과 공동연구를 진행하여 단클론항체를 생산하고 특성연구를 진행하고 있었다. 그 중 성균관대학교와의 공동연구로 CKAP2에 대한 단클론항체를 생산하고, 사람의 유방암조직에서 조직면역화학염색을 시행함으로써 CKAP2가 proliferation marker이고, 유방암의 예후 예측 표지자로 사용될 수 있다는 것을 발견하게 되었다.

◎ 현재까지 잘 알려진 proliferation marker로는 Ki-67, cyclin D, cyclin E, p27, p21, thymidine kinase, and topoisomerase IIalpha 등이 알려져 있으나 어느것도 유방암에서 independent prognostic marker로 임상에 사용하고 있지 않다. 다만 H&E염색으로 mitotic figure를 세어 세포의 모양 등을 포함한 mitotic index라는 병리학적 criteria를 만들어 예후를 예측하는데 사용하고 있다. 따라서 proliferation과 관련하여 mitotic figure count가 현재의 가장 확실한 예후 예측 인자로 알려져 있다. 그런데 본 연구에서 CKAP2가 mitotic figure count와 비례관계에 있으며 ($p<0.001$), 또한 환자의 나이, T stage, N stage, nuclear grade, HER2 status등을 고려한 multivariate analysis에서 overall survival과 유의한 association ($P=0.010$)을 보인다는 것을 발견하였다. 더구나 multivariate analysis에서 hazard ratio가 17.8이 나왔는데, 같은 환자군을 대상으로 한 mitotic count의 hazard ratio가 약 3.9정도라는 것을 감안한다면 mitotic count보다 훨씬 더 좋은 유방암의 예후예측 표지자로 사용될 수 있다는 것을 의미한다. 이러한 유방암에서의 결과는 melanoma, sarcoma, mantle cell lymphoma, colorectal cancer와 같이 proliferation이 주요한 prognostic marker로 사용될 수 있는 암에서 CKAP2가 예후예측 표지자로서 사용될 수 있다는 것을 의미하는 것으로 이에 대한 후속 연구도 필요한 상황이다.

◎ 현재까지 CKAP2의 발현과 암의 예후와 관련되어 보고된 바가 없으며, 특허 또한 진행된 바가 없다. 이 결과는 본 연구의 연구비를 주요 연구비로 사용하여 진행하였고, 그 결과에 대해서도 본 연구비를 reference로 하여 특허를 신청한 상태에 있고 논문을 준비하고 있다.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

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

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분[1])	저널명(I.F.)	Year; Vol(No):Page	구분[2]	지원과제번호[3]
Transient phosphorylation of tumor associated microtubule associated protin (TMAP)/cytoskeleton associated protein 2 (CKAP2) at Thr-596 during early phases of mitosis	홍경욱, 최용복, 이정화, 김현준, 권혜림, 성연선, 김홍태, 박주배, 배창대, 홍경만 (교신)	Exp Mol Med (2.3)	2008; 40(4):377-386	국내 SCI	0810240
Predisposition of genetic disease by modestly decreased expression of GCH1 mutant allele	김요식, 최용복, 이정화, 양세훈, 조지현, 신창호, 이상도, 백문기, 홍경만 (교신)	Exp Mol Med (2.3)	2008; 40(3):271-275	국내 SCI	0810240
원발성 폐암에서 LKB1 단백질 발현 소실에 따른 임상양상 및 조직병리할적 특성	황기은, 조향정,,, 홍경만,,,양세훈, 정은택 (공동)	Tuberculosis and Respiratory disease	2008; 64(5): 362-368	국내	없음
Transglutaminase 2 as a cisplatin resistance marker in non-small cell lung cancer.	Park KS, Kim HK, Lee JH, Choi YB, Park SY, Yang SH, Kim SY, Hong KM.(교신)	Journal of Cancer Res and Clinical Oncology (2.2)	2010 ; 136(4): 493-502.	국외 SCI	0810240
Cdk1-cyclin B1-mediated phosphorylation of tumor-associated microtubule-associated protein/cytoskeleton-associated protein 2 in mitosis.	Hong KU, Kim HJ, Kim HS, Seong YS, Hong KM, Bae CD, Park J.(공동)	J Biol Chem (5.808)	2009; 284(24):16501-12	국외 SCI	없음
Dose dependent inhibition of GVHD with mesenchymal stem cells in mice	Ju SY, Choi KA, Jung YJ, Kim HS, Park SY, Choi YB, Hong KM, Woo SY, Seoh JY, Cho SJ, Ryu KH (공동)	Cytotherapy (3.471)	2010; 12(3): 361-70.	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[1]	지원과제번호

1) 지역 : 국내, 국외

다. 산업재산권

구분[1]	특허명	주출원인	출원국	출원번호
발명특허	인위적 에스엠피서열의 동시증폭을 이용한 염색체, 유전자 혹은 특정 뉴클레오티드 서열의 카피수 측정방법	홍경만	대한민국	2005-0066736 (등록)
발명특허	TMAP/CKAP2에 특이적인 단일클론 항체	홍경만	대한민국	2008-0024453 (등록)
발명특허	SNP 어레이를 이용한 염색체, 유전자, 혹은 특정 뉴클레오티드 서열의 카피수 측정방법	홍경만	대한민국, 미국, 일본, 중국, 캐나다, 유럽, 호주	10-2008-0022500 (출원)
발명특허	HER2 양성개체 진단방법 및 HER2 카피수 측정방법	홍경만	대한민국	10-2010-0012112 (출원)
발명특허	항-TMAP/CKAP2 항체를 포함하는 암의 예후 진단용 조성물	홍경만	대한민국	10-2010-0011126 (출원)
발명특허	SNA methylation 변화를 이용한 SLE를 포함한 자가면역질환의 진단방법	홍경만, 송영욱	대한민국	출원준비중

1) 구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

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

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
비소세포폐암환자의 생존과 관련이 있는 CNV (copy number variation)과 관련된 분자적 표	1차년도	암조직에서 LCM 시행 및 및 GS-CNV방법을 이용한 assay	비소세포폐암환자의 clinical data 정리 및 암조직을 병리적으로 분석하고, DNA와 RNA를 분리	100	33
		CNV방법의 확립	20가지 kinase 및 생존과 관련이 있는 암관련 유전자에		

지자 개발			대해 CNV를 검출할 수 있는 assay 확립		
	2차년도	CNV방법의 확립	암조직을 이용한 HER2증폭의 분자적진단방법 적용방법 확립	100	66
		정량적인 DNA methylation 방법의 확립	10가지 유전자에 대한 quantitative promoter DNA methylation 측정방법 확립		
	3차년도	유방암조직에서 HER2 증폭 검사방법의 확립 및 실험조건 확립	유방암세포주와 40여개 유방암조직에서 HER2증폭 검사. SD등 실험조건 확립	100	100
		Co-aSNP방법을 활용하여 cell line에서 24개 유전자의 카피수 결정	NCI-60 cell line에서 유전자의 카피수 결정		
		단클론항체의 제작과 조직면역화학염색을 통한 진단시약개발연구	CKAP2의 조직면역화학염색을 통한 예후예측 표지자 개발		

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
유전자 증폭 측정을 위한 새로운 분자적 방법이 Co-aSNP방법의 확립 및 실험조건 확립	민감성과 재현성이 뛰어나고 automation이 가능하다는 장점이 있어서 암진단분야에서의 활용가능성이 크고 항암제 선택의 지표를 제공해줄 수 있음
Methylation level의 측정방법의 질환에서의 응용	methylation측정을 암을 대상으로 하지는 않았지만, SLE라는 자가면역질환을 대상으로 새로운 epigenetic marker를 개발하였고, 아직까지 유전적인 원인으로만 설명할 수 없었던 많은 multifactorial disease들의 발생원인을 설명할 수 있는 model을 제시하였다는 점에서 의의가 크다고 할 수 있음
단클론항체의 제작과 암진단에의 응용	CKAP2항체를 개발하고 유방암에서의 overall survival과의 유의한 연관성을 밝힘으로써 새로운 암예후예측 표지자를 개발하였고, 임상에 적용할 가능성이 크다고 할 수 있음

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	4	Nature Genetics (23), Journal of Clinical Oncology (15), Clinical Chemistry (6), Gastroenterology (15) 등의 잡지에 투고위해 논문작성중임
산업재산권 등록	4	출원중이거나 출원예정인 특허 4건에 대해 PCT 및 해외 5개국 특허를 진행예정에 있음
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

Amadori D, Nanni O, Marangolo M, et al: Disease-free survival advantage of adjuvant cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in patients with node-negative, rapidly proliferating breast cancer: a randomized multicenter study. J Clin Oncol 18:3125-3134, 2000

Baak JP et al: Prospective multicenter validation of the independent prognostic value of the mitotic activity index in lymph node-negative breast cancer patients younger than 55 years. J Clin Oncol 23:5993-6001, 2005

Baak JP, Gudlaugsson E, Skaland I, et al: Proliferation is the strongest prognosticator in node-negative breast cancer: significance, error sources, alternatives and comparison with molecular prognostic markers. Breast Cancer Res Treat 115:241-254, 2009

Bae CD, Sung YS, Jeon SM, et al: Up-regulation of cytoskeletal-associated protein 2 in primary human gastric adenocarcinomas. J Cancer Res Clin Oncol 129:621-630, 2003

Baniyash M. TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. Nat Rev Immunol. 2004 Sep;4(9):675-87.

Bang YJ et al., 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.

Barcellos LF et al., High-density SNP screening of the major histocompatibility complex in systemic lupus erythematosus demonstrates strong evidence for independent susceptibility regions. PLoS Genet. 2009 Oct;5(10):e1000696. Epub 2009 Oct 23.

Bieche I et al.,. Novel approach to quantitative polymerase chain reaction using real-time detection: application to the detection of gene amplification in breast cancer. Int J Cancer 1998;78:6616.

Bjornsson, H. T., M. D. Fallin, and A. P. Feinberg. 2004. An integrated epigenetic and genetic approach to common human disease. Trends Genet. 20: 350-358.

Bossard C, Jarry A, Colombeix C, et al: Phosphohistone H3 labelling for histoprognostic grading of breast adenocarcinomas and computer-assisted determination of mitotic index. J Clin Pathol 59:706-710, 2006

Boyages J et al: Use of the St Gallen classification for patients with node-negative breast cancer may lead to overuse of adjuvant chemotherapy. Br J Surg 89:789-796, 2002

Brabender J et al., (2003) Quantitative O(6)-methylguanine DNA methyltransferase methylation analysis in curatively resected non-small cell lung cancer: associations with clinical outcome. Clin Cancer Res 9(1):223-7.

Chibon F et al: Validated prediction of clinical outcome in sarcomas and multiple types of cancer on the basis of a gene expression signature related to genome complexity. Nat Med 16:781-787, 2010

Cornacchia, E., J. Golbus, J. Maybaum, J. Strahler, S. Hanash, and B. Richardson. 1988. Hydralazine and procainamide inhibit T cell DNA methylation and induce autoreactivity. J. Immunol. 140: 2197-2200.

Deng C, Kaplan MJ, Yang J, Ray D, Zhang Z, McCune WJ, Hanash SM, Richardson BC. 2001. Decreased Ras-mitogen-activated protein kinase signaling may cause DNA hypomethylation in T lymphocytes from lupus patients. Arthritis Rheum 44: 397-407.

Egger, G., G. Liang, and P. A. Jones. 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature 429: 457-463.

Fisher, A. G. 2002. Cellular identity and lineage choice. Nat. Rev. Immunol. 2: 977-982.

Fraga MF et al., Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jul 26;102(30):10604-9. Epub 2005 Jul 11.

Fukasawa M et al., (2006) Microarray analysis of promoter methylation in lung cancers. J Hum Genet. 51(4):368-74.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, et al: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J Immunol 133:1710-1715, 1984

Gilliland G et al.,. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Apr;87(7):2725-9.

Gimotty PA et al: Biologic and prognostic significance of dermal Ki67 expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma. J Clin Oncol 23:8048-8056, 2005

Gorman CL, Russell AI, Zhang Z, Cunninghame Graham D, Cope AP, Vyse TJ. Polymorphisms in the CD3Z gene influence TCRzeta expression in systemic lupus erythematosus patients and healthy controls. J Immunol. 2008 Jan 15;180(2):1060-70.

Graham RR et al., Genetic variants near TNFAIP3 on 6q23 are associated with systemic lupus erythematosus. Nat Genet. 2008 Sep;40(9):1059-61.

Gruber IV, El Yousfi S, D?rr-St?rzer S, Wallwiener D, Solomayer EF, Fehm T. Down-regulation of CD28, TCR-zeta (zeta) and up-regulation of FAS in peripheral cytotoxic T-cells of primary breast cancer patients. Anticancer Res. 2008 Mar-Apr;28(2A):779-84.

Han JW et al., Genome-wide association study in a Chinese Han population identifies nine new susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. Nat Genet. 2009 Nov;41(11):1234-7. Epub 2009 Oct 18.

Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al: American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. J Clin Oncol 25:5287-5312, 2007

Hewagama A, Richardson B. The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. J Autoimmun. 2009 Aug;33(1):3-11.

Hom G et al., Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. N Engl J Med. 2008 Feb 28;358(9):900-9. Epub 2008 Jan 20.

Hong KM, Yang SH, Guo M, Herman JG, Jen J. Semiautomatic detection of DNA methylation at CpG islands. Biotechniques. 2005 Mar;38(3):354, 356, 358.

Hong KU, Park YS, Seong YS, et al: Functional importance of the anaphase-promoting complex-Cdh1-mediated degradation of TMAP/CKAP2 in regulation of spindle function and cytokinesis. Mol Cell Biol 27:3667-3681, 2007

Hong KU, Kim HJ, Bae CD, et al: Characterization of mitosis-specific phosphorylation of tumor-associated microtubule-associated protein. Exp Mol Med 41:832-840, 2009

Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, et al: The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. Science 283:83-87, 1999

Javierre BM et al., Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. Genome Res. 2010 Feb;20(2):170-9.

Jin Y, Murakumo Y, Ueno K, et al: Identification of a mouse cytoskeleton-associated protein, CKAP2, with microtubule-stabilizing properties. Cancer Sci 95:815-821, 2004

Jordan MA, Wilson L: Microtubules as a target for anticancer drugs. Nat Rev Cancer 4:253-265, 2004

Kaminsky ZA, Assadzadeh A, Flanagan J, Petronis A. Single nucleotide extension technology for quantitative site-specific evaluation of metC/C in GC-rich regions. Nucleic Acids Res. 2005 Jun 15;33(10):e95.

Kaplan, M. J., Q. Lu, A. Wu, J. Attwood, and B. Richardson. 2004. Demethylation of promoter regulatory elements contributes to perforin overexpression in CD4+ lupus T cells. J. Immunol. 172: 3652-3661.

Karouzakis E, Gay RE, Michel BA, Gay S, Neidhart M. DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Arthritis Rheum. 2009 Dec;60(12):3613-22.

Kavallaris M: Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. Nat Rev Cancer 10:194-204, 2010

Konecny G et al: Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor positive primary breast cancer. J Natl Cancer Inst 95:142-153, 2003

Konecny GE et al: Her-2/neu gene amplification and response to paclitaxel in patients with metastatic breast cancer. J Natl Cancer Inst 96:1141-1151, 2004

Lehmann U et al.. Detection of gene amplification in archival breast cancer specimens by laser-assisted microdissection and quantitative real-time polymerase chain reaction. Am J Pathol 2000;156:185564.

Liossis SN, Ding XZ, Dennis GJ, Tsokos GC. Altered pattern of TCR/CD3-mediated protein-tyrosyl phosphorylation in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Deficient expression of the T cell receptor zeta chain. J Clin Invest. 1998 Apr 1;101(7):1448-57.

Lu C et al., (2004) Prognostic factors in resected stage I non-small-cell lung cancer: a multivariate analysis of six molecular markers. J Clin Oncol. 22(22):4575-83.

Lu, Q., M. Kaplan, D. Ray, D. Ray, S. Zacharek, D. Gutsch, and B. Richardson. 2002. Demethylation of ITGAL (CD11a) regulatory sequences in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 46: 1282-1291.

Lyon E et al., Quantification of HER2/neu gene amplification by competitive pcr using fluorescent melting curve analysis. Clin Chem. 2001 May;47(5):844-51.

Maouche-Chretien L, Deleu N, Badoual C, et al: Identification of a novel cDNA, encoding a cytoskeletal associated protein, differentially expressed in diffuse large B cell lymphomas. Oncogene 17:1245-1251, 1998

Maruyama R et al., (2006) Microarray analysis of promoter methylation in lung cancers. J Hum Genet. 51(4):368-74.Sugio K, Yoshino I, Maehara Y, Gazdar AF. (2004) Hypermethylation of FHIT as a prognostic marker in nonsmall cell lung carcinoma. Cancer. 100(7):1472-7.

Merkelbach-Bruse S et al.,. Current diagnostic methods of HER-2/neu detection in breast cancer with special regard to real-time PCR. Am J Surg Pathol. 2003 Dec;27(12):1565-70.

Okuyama N et al. Quantification of c-erbB-2 gene amplification in breast cancer tissue by competitive PCR. Tumor Biol 1999;20:15361.

Paik S et al.,. Real-world performance of HER2 testing--National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. J Natl Cancer Inst. 2002 Jun 5;94(11):852-4.

Press MF, Bernstein L, Thomas PA, et al: HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: Poor prognosis in node-negative breast carcinomas. J Clin Oncol 15: 2894-2904, 1997

Press M et al: Her-2/neu expression in node-negative breast cancer: Direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. Cancer Res 53:4960-4970, 1993

Pritchard KI et al: HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. N Engl J Med 354:2103-2111, 2006

Prokunina L et al.,A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. Nat Genet. 2002 Dec;32(4):666-9. Epub 2002 Oct 28.

Quddus, J., K. J. Johnson, J. Gavalchin, E. P. Amento, C. E. Chrisp, R. L. Yung, and B. C. Richardson. 1993. Treating activated CD4 T cells with either of two distinct DNA methyltransferase inhibitors, 5-azacytidine or procainamide, is sufficient to cause a lupus-like disease in syngeneic mice. J. Clin. Invest. 92: 38-53.

Rauch T et al., (2006) MIRA-assisted microarray analysis, a new technology for the determination of DNA methylation patterns, identifies frequent methylation of homeodomain-containing genes in lung cancer cells. Cancer Res. 66(16):7939-47.

Revillion F et al., Quantification of c-erbB-2 gene expression in breast cancer by competitive RT-PCR. Clin Chem 1997;43:211420.ol 24:4056- 4058, 2006

Richardson B et al., 1990. Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 33: 1665-1673.

Richardson, B. C. et al., 1992. Phenotypic and functional similarities between 5-azacytidine-treated T cells and a T cell subset in patients with active systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 35: 647-662.

Roche PC et al., Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831. J Natl Cancer Inst. 2002 Jun 5;94(11):855-7

Schlemmer BO et al., Quantitative PCR--new diagnostic tool for quantifying specific mRNA and DNA molecules: HER2/neu DNA quantification with LightCycler real-time PCR in comparison with immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. Scand J Clin Lab Invest. 2004;64(5):511-22.

Sestini R et al.,. Measuring c-erbB-2 oncogene amplification in fresh and paraffin-embedded tumors by competitive polymerase chain reaction. Clin Chem. 1994 Apr;40(4):630-6.

Siebert PD and Larrick JW. Competitive PCR. Nature. 1992 Oct 8;359(6395):557-8.

Sigurdsson H et al: Indicators of prognosis in node-negative breast cancer. N Engl J Med 322:1045-1053, 1990

Skaland I, Janssen EA, Gudlaugsson E, et al: Validating the prognostic value of proliferation measured by Phosphohistone H3 (PPH3) in invasive lymph node-negative breast cancer patients less than 71 years of age. Breast Cancer Res Treat 114:39-45, 2009

Slamon DJ et al: Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 235:177-182, 1987

Slamon DJ et al: Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. N Engl J Med 344:783-792, 2001

Taylor DD, Bender DP, Gerel-Taylor C, Stanson J, Whiteside TL. Modulation of TcR/CD3-zeta chain expression by a circulating factor derived from ovarian cancer patients. Br J Cancer. 2001 Jun 15;84(12):1624-9.

Tomizawa Y et al., (1999) Prognostic significance of allelic imbalances on chromosome 9p in stage I non-small cell lung carcinoma. Clin Cancer Res. 5(5):1139-46.

Valera V, Yokoyama N, Walter B, et al: Clinical significance of Ki-67 proliferation index in disease progression and prognosis of patients with resected colorectal carcinoma. Br J Surg 92:1002-1007, 2005

Velders GA, Kluin-Nelemans JC, De Boer CJ, et al: Mantle-cell lymphoma: a population-based clinical study. J Clin Oncol 14:1269-1274, 1996

Walczak CE, Shaw SL: A MAP for bundling microtubules. Cell 142:364-367, 2010

Wang J et al., (2004) Value of p16INK4a and RASSF1A promoter hypermethylation in prognosis of patients with resectable non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 10:6119-25.

Whitfield ML, Sherlock G, Saldanha AJ, et al: Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. Mol Biol Cell 13:1977-2000, 2002

Willett CG, Warland G, Hagan MP, et al: Tumor proliferation in rectal cancer following preoperative irradiation. J Clin Oncol 13:1417-1424, 1995

Yamauchi H et al.,: When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. J Clin Oncol 19:2334-2356, 2001

Yang W et al., Asian Lupus Genetics Consortium. Genome-wide association study in Asian populations identifies variants in ETS1 and WDFY4 associated with systemic lupus erythematosus. PLoS Genet. 2010 Feb 12;6(2):e1000841.

7. 첨부서류

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

EXPERIMENTAL and MOLECULAR MEDICINE, Vol. 40, No. 4, 377-386, August 2008

Transient phosphorylation of tumor associated microtubule associated protein (TMAP)/cytoskeleton associated protein 2 (CKAP2) at Thr-596 during early phases of mitosis

Kyung Uk Hong[1], Yong-Bock Choi[2], Jung-Hwa Lee[2], Hyun-Jun Kim[1], Hye-Rim Kwon[1], Yeon-Sun Seong[3], Heung Tae Kim[2], Joobae Park[1], Chang-Dae Bae[1,4] and Kyeong-Man Hong[2,4]

[1]Department of Molecular Cell Biology and
Samsung Biomedical Research Institute
Sungkyunkwan University School of Medicine
Suwon 440-769, Korea
[2]Research Institute
National Cancer Center
Goyang 410-769, Korea
[3]Department of Biochemistry
College of Medicine, Dankook University
ChunAn 330-714, Korea
[4]Corresponding authors: Tel, 82-31-920-2261; Fax, 82-31-920-2006;
E-mail, kmhong@ncc.re.kr (K.M. Hong); Tel, 82-31-299-6130;
Fax, 82-31-299-6149; E-mail, cdbae@med.skku.ac.kr (C.D. Bae)
DOI 10.3858/emm.2008.40.4.377

Accepted 7 April 2008

Abbreviations: CKAP2, cytoskeleton associated protein 2; TMAP, tumor associated microtubule associated protein

Abstract

Tumor associated microtubule associated protein (TMAP), also known as cytoskeleton associated protein 2 (CKAP2) is a mitotic spindle-associated protein whose expression is cell cycle-regulated and also frequently deregulated in cancer cells. Two monoclonal antibodies (mAbs) against TMAP/CKAP2 were produced: B-1-13 and D-12-3. Interestingly, the reactivity of mAb D-12-3 to TMAP/CKAP2 was markedly decreased specifically in mitotic cell lysate. The epitope mapping study showed that mAb D-12-3 recognizes the amino acid sequence between 569 and 625 and that phosphorylation at T596 completely abolishes the reactivity of the antibody, suggesting that the differential reactivity originates from the phosphorylation status at T596. Immunofluorescence staining showed that mAb D-12-3 fails to detect TMAP/CKAP2 in mitotic cells between prophase and metaphase, but the staining becomes evident again in anaphase, suggesting that phosphorylation at T596 occurs transiently during early phases of mitosis. These results suggest that the cellular functions of TMAP/CKAP2 might be regulated by timely phosphorylation and dephosphorylation during the course of mitosis.

Keywords: antibodies, monoclonal; cell cycle; CKAP2 protein, human; fluorescent antibody technique, direct; phosphorylation

Introduction

Tumor associated microtubule associated protein (TMAP), also known as cytoskeleton associated protein 2 (CKAP2) is frequently upregulated in various malignancies, including gastric adenocarcinoma, diffuse B-cell lymphoma and cutaneous T-cell lymphoma (Maouche-Chretien *et al.*, 1998; Eichmuller *et al.*, 2001; Bae *et al.*, 2003), and also detected in various cancer cell lines (Bae *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2004). Knockdown of TMAP/CKAP2 reduces cell proliferation, whereas constitutive overexpression at a moderate level enhances proliferation of human foreskin fibroblasts (HFFs) and NIH 3T3 cells (Jeon *et al.*, 2006), indicating that TMAP/CKAP2 is essential for normal cell growth. However, the exact cellular functions of TMAP/CKAP2 remain unknown. TMAP/CKAP2 is primarily localized to microtubules and centrosomes during interphase and to mitotic spindles and spindle poles during mitosis (Maouche-Chretien *et al.*, 1998; Bae *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2007). During late stages of mitosis, however, TMAP/CKAP2 localizes near the chromatin region and to the midbody microtubules (Hong *et al.*, 2007).

While the level of TMAP/CKAP2 expression is low or undetectable in growth-arrested primary HFFs and NIH 3T3 cells, its expression starts to incline as cells enter the cell cycle and peaks at G_2/M phases (Jeon *et al.*, 2006). Moreover, its cell cycle-dependent expression pattern coincides with those of various known mitotic regulators (Iyer *et al.*, 1999; Whitfield *et al.*, 2002), which suggests a possibility that the cellular functions of TMAP/CKAP2 may pertain to mitotic processes. In support of this, recent reports have shown that TMAP/CKAP2 has microtubule-stabilizing properties and may contribute

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 284, NO. 24, pp. 16501–16512, June 12, 2009
© 2009 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in the U.S.A.

Cdk1-Cyclin B1-mediated Phosphorylation of Tumor-associated Microtubule-associated Protein/Cytoskeleton-associated Protein 2 in Mitosis*

Received for publication, January 13, 2009, and in revised form, March 19, 2009 Published, JBC Papers in Press, April 15, 2009, DOI 10.1074/jbc.M900257200

Kyung Uk Hong[‡], **Hyun-Jun Kim**[‡], **Hyo-Sil Kim**[‡], **Yeon-Sun Seong**[§], **Kyeong-Man Hong**[¶], **Chang-Dae Bae**[‡1], **and Joobae Park**[‡2]

From the [‡]*Department of Molecular Cell Biology and Samsung Biomedical Research Institute, Sungkyunkwan University School of Medicine, 300 Chunchundong, Jangangu, Suwon 440-769, the* [§]*Department of Biochemistry, Dankook University College of Medicine, San 29, Ansuh-dong, Cheonan, Chungnam 330-714, and the* [¶]*Research Institute, National Cancer Center, Ilsandong-gu, Goyang-si 410-769, Korea*

During mitosis, establishment of structurally and functionally sound bipolar spindles is necessary for maintaining the fidelity of chromosome segregation. Tumor-associated microtubule-associated protein (TMAP), also known as cytoskeleton-associated protein 2 (CKAP2), is a mitotic spindle-associated protein whose level is frequently up-regulated in various malignancies. Previous reports have suggested that TMAP is a potential regulator of mitotic spindle assembly and dynamics and that it is required for chromosome segregation to occur properly. So far, there have been no reports on how its mitosis-related functions are regulated. Here, we report that TMAP is hyper-phosphorylated at the C terminus specifically during mitosis. At least four different residues (Thr-578, Thr-596, Thr-622, and Ser-627) were responsible for the mitosis-specific phosphorylation of TMAP. Among these, Thr-622 was specifically phosphorylated by Cdk1-cyclin B1 both *in vitro* and *in vivo*. Interestingly, compared with the wild type, a phosphorylation-deficient mutant form of TMAP, in which Thr-622 had been replaced with an alanine (T622A), induced a significant increase in the frequency of metaphase cells with abnormal bipolar spindles, which often displayed disorganized, asymmetrical, or narrow and elongated morphologies. Formation of these abnormal bipolar spindles subsequently resulted in misalignment of metaphase chromosomes and ultimately caused a delay in the entry into anaphase. Moreover, such defects resulting from the T622A mutation were associated with a decrease in the rate of protein turnover at spindle microtubules. These findings suggest that Cdk1-cyclin B1-mediated phosphorylation of TMAP is important for and contributes to proper regulation of microtubule dynamics and establishment of functional bipolar spindles during mitosis.

* This work was supported by the National R&D Program for Cancer Control, Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea (Grant 0720370).

[1] To whom correspondence may be addressed: Dept. of Molecular Cell Biology, Sungkyunkwan University, School of Medicine, 300 Chunchundong, Jangangu, Suwon 440-746, Republic of Korea. Tel.: 82-31-299-6133; Fax: 82-31-299-6143; E-mail: cdbae@med.skku.ac.kr.

[2] To whom correspondence may be addressed: Dept. of Molecular Cell Biology, Sungkyunkwan University, School of Medicine, 300 Chunchundong, Jangangu, Suwon 440-746, Republic of Korea. Tel.: 82-31-299-6130; Fax: 82-31-299-6149; E-mail: jbpark@med.skku.ac.kr.

Tumor-associated microtubule-associated protein (TMAP),[3] also known as cytoskeleton-associated protein 2 (CKAP2), LB-1, and se20-10, is frequently up-regulated in various malignancies, including gastric adenocarcinoma, diffuse B-cell lymphoma, and cutaneous T-cell lymphoma (1–3), and detected in various cancer cell lines (1, 4). Knockdown of TMAP significantly reduces the rate of cell growth (5, 6), indicating that it is essential for normal cell growth. However, the cellular functions of TMAP remain largely unknown. Recent findings indicate that TMAP plays an essential role in mitosis. Expression of TMAP changes in a cell cycle-dependent manner; its expression is relatively low during G_1, starts to incline during G_1/S transition, and peaks at G_2/M phases of the cell cycle (5, 7). TMAP primarily localizes at mitotic spindle and spindle poles during mitosis (1, 4, 8, 9). During late stages of mitosis, however, TMAP localizes near the chromatin region and to the midbody microtubules (8). TMAP has microtubule-stabilizing properties (4, 8, 9), and its overexpression induces mitotic spindle defects, including monopolar spindle formation, and arrests cells at mitosis as a result (8). Similar to other mitotic regulators, TMAP is a substrate of the anaphase-promoting complex (8). TMAP is degraded during mitotic exit by the anaphase-promoting complex-Cdh1 in a KEN box-dependent manner. Results of the experiments using a nondegradable mutant of TMAP suggested that proper regulation of the TMAP protein level is functionally important for establishment of bipolar spindles and completion of cytokinesis. Recently, we also have shown that siRNA-mediated depletion of TMAP in mammalian cells results in chromosome missegregation, characterized by chromatin bridge formation and malformation of interphase nuclei, and such phenotype was associated with a reduction in the spindle assembly checkpoint activity (6). These findings suggest that TMAP is a potential regulator of mitotic spindle function and dynamics and that proper regulation of its protein level and functions is necessary for establishment of bipolar spindles as well as for maintaining the fidelity of the chromosome segregation process.

[3] The abbreviations used are: TMAP, tumor-associated microtubule-associated protein; CKAP2, cytoskeleton-associated protein 2; Cdk1, cyclin-dependent kinase 1; GST, glutathione S-transferase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; GSK-3β, glycogen synthase kinase 3β; WT, wildtype; KD, kinase-dead; FRAP, fluorescence recovery after photobleaching.

J Cancer Res Clin Oncol
DOI 10.1007/s00432-009-0681-6

ORIGINAL PAPER

Transglutaminase 2 as a cisplatin resistance marker in non-small cell lung cancer

Kang-Seo Park · Hyun-Kyoung Kim · Jung-Hwa Lee · Yong-Bock Choi · Seong-Yeol Park · Sei-Hoon Yang · Soo-Youl Kim · Kyeong-Man Hong

Received: 28 May 2009 / Accepted: 2 September 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract
Purpose Recently, it was reported that expression of transglutaminase 2 plays an important role in doxorubicin/cisplatin resistance in breast and ovarian cancer. The aims of this study were to verify the role of transglutaminase 2 in cisplatin response in non-small cell lung cancer (NSCLC) and to study if transglutaminase 2 gene (*TGM2*) methylation can be a molecular marker for good response to cisplatin.
Methods *TGM2* promoter methylation was analyzed by sodium bisulfite sequencing. Cisplatin sensitivity was analyzed by treatment of cisplatin in NSCLC cell lines with/without *TGM2* or *TGM2* siRNA transfection.
Results In one-third of NSCLC cell lines, TGase 2 gene (*TGM2*) was silenced by promoter methylation. The *TGM2* promoter-methylated cell lines (HCC-95 and HCC-1588) showed relatively higher sensitivity to cisplatin than the *TGM2*-expressing cell lines (NCI-H1299 and HCC-1195). Down-regulation and over-expression of *TGM2* in those NSCLC cells also suggested a positive correlation of cisplatin sensitivity and *TGM2* inhibition. With doxorubicin, the relationship was quite similar.
Conclusions We showed that good responders of cisplatin in NSCLC could be identified by the promoter methylation of *TGM2* and that TGase 2 inhibition appears to be an effective cisplatin-sensitizing modality in NSCLC.

K.-S. Park · H.-K. Kim · J.-H. Lee · Y.-B. Choi · S.-Y. Park · S.-Y. Kim (✉) · K.-M. Hong (✉)
Research Institute, National Cancer Center,
111 Jungbalsan-ro, Ilsandong-gu, Goyang 410-769, Korea
e-mail: kimsooyoul@gmail.com

K.-M. Hong
e-mail: kmhong@ncc.re.kr

K.-S. Park
Department of Biomedical Science, Graduate School,
Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

H.-K. Kim
Department of Microbiology, Ewha Womans University
School of Medicine, Seoul 158-710, Korea

S.-Y. Park
Department of Molecular Cell Biology,
Sungkyunkwan University School of Medicine,
Suwon 440-769, Korea

S.-H. Yang
Department of Internal Medicine,
Wonkwang University College of Medicine,
Iksan 570-749, Korea

Keywords Transglutaminase 2 · Cisplatin resistance · Non-small cell lung cancer · Promoter methylation

Abbreviations

TGase	Transglutaminase
NSCLC	Non-small cell lung cancer
I-κBα	Inhibitor of kappa B α
NF-κB	Nuclear factor-kappa B

Introduction

Lung cancer is the leading cause of cancer-related death, representing about 29% of all such cases (American Cancer Society 2007). About 85% of lung cancer cases are non-small cell lung cancer (NSCLC). Surgical resection is the mainstay of therapy for early-stage NSCLC. However, most of the patients are detected with advanced stages and are offered cisplatin-based chemotherapy. Cisplatin has

Published online: 18 September 2009

EXPERIMENTAL and MOLECULAR MEDICINE, Vol. 40, No. 3, 271-275, June 2008
DOI 10.3858/emm.2008.40.3.271

Predisposition of genetic disease by modestly decreased expression of *GCH1* mutant allele

Yo-Sik Kim[2], Yong-Bock Choi[1], Jeong-Hwa Lee[1], Sei-Hoon Yang[3], Ji-Hyun Cho[4], Chang-Ho Shin[5], Sang-Do Lee[6], Moon-Kee Paik[6] and Kyeong-Man Hong[1,7]

[1]Research Institute
National Cancer Center
Goyang 410-769, Korea
[2]Department of Neurology
[3]Department of Internal Medicine
[4]Department of Clinical Pathology
[6]Department of Biochemistry
Wonkwang University College of Medicine
Iksan 570-749, Korea
[5]Department of Medical Informatics
Hyechon College
Daejeon 302-715, Korea
[7]Corresponding author: Tel, 82-31-920-2261;
Fax, 82-31-920-2006; E-mail, kmhong@ncc.re.kr

Accepted 5 March 2008

Abbreviations: DRD, dopa responsive dystonia; SNP, single nucleotide polymorphism

Abstract

Recently it was shown that single nucleotide polymorphisms (SNPs) can explain individual variation because of the small changes of the gene expression level and that the 50% decreased expression of an allele might even lead to predisposition to cancer. In this study, we found that a decreased expression of an allele might cause predisposition to genetic disease. Dopa responsive dystonia (DRD) is a dominant disease caused by mutations in *GCH1* gene. The sequence analysis of the *GCH1* in a patient with typical DRD symptoms revealed two novel missense mutations instead of a single dominant mutation. Family members with either of the mutations did not have any symptoms of DRD. The expression level of a R198W mutant allele decreased to about 50%, suggesting that modestly decreased expression caused by an SNP should lead to predisposition of a genetic disease in susceptible individuals.

Keywords: dystonic disorders; germ-line mutation; point mutation; polymorphism, single nucleotide

Introduction

Dopa-responsive dystonia (DRD) (OMIM 128230) is an autosomal dominant disorder characterized by a fluctuating dystonia which develops during childhood with postural dystonia of lower limbs that is aggravated toward evening and alleviated after sleep. This disorder shows dramatic and sustained responses to low doses of levodopa therapy. DRD gene has been mapped to chromosome 14q21-22, where a lot of mutations in the guanosine 5'-triphosphate cyclohydrolase I gene (*GCH1*) (OMIM 600225) have been discovered in sporadic and familial cases. This gene contains 6 exons coding for the rate-limiting enzyme for the biosynthesis of tetrahydrobiopterin (BH_4) (Figure 1). BH_4 is the cofactor of phenylalanine hydroxylase, tyrosine hydroxylase, tryptophan hydroxylase and NOS. The latter three are involved in the production of dopamine, serotonin and nitric oxide, respectively.

When both *GCH1* was deficient (OMIM 605407), the patients usually presents with neonatal hyperphenylalaninemia and encephalopathy with severe mental retardation, seizures, abnormal muscle tone and movements (Blau *et al*., 1995; Ichinose *et al*., 1995; Furukawa *et al*., 1998; Nardocci *et al*., 2003). However, a patient with homozygous recessive mutation of *GCH1* was reported to have mild symptoms of typical DRD study (Hwu *et al*., 1999), suggesting more complex interplay of *GCH1* muta-

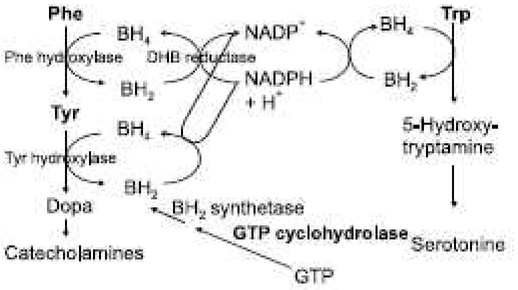


Figure 1. Metabolism of BH_4. GTP is used for the synthesis of BH_4. In the process of the synthesis of BH_4, GTP cyclohydrolase is the first and the rate-limiting step enzyme. DHB or BH_2, dihydrobiopterin; BH_4, tetrahydrobiopterin.

관 인 생 략

출 원 번 호 통 지 서

출 원 일 자	2010.02.05
특 기 사 항	심사청구(무) 공개신청(무)
출 원 번 호	10-2010-0011126 (접수번호 1-1-2010-0081320-65)
출원인 명칭	국립암센터(1-2000-036786-6) 외 2명
대리인 성명	손민(9-1999-000420-6)
발명자 성명	홍경만 배창대 박주배 신창호 최용복
발명의 명칭	항-TMAP/CKAP2 항체를 포함하는 암의 예후 진단용 조성물

특 허 청 장

1. **출원번호통지서** 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니 출원번호통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
2.
   2-가. 특허 및 실용신안 출원은 **심사청구 후 평균 16개월**에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 **출원 후 평균 10개월**에 1차 심사처리가 이루어집니다.
   2-나. 특허 및 실용신안은 **특허路 홈페이지**(http://www.patent.go.kr)의 "고객지원서비스-민원처리과정 통지 서비스" 코너에서 1차 심사결과통지 예고서비스를 신청하시면, 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다
   2-다. 상표 및 디자인은 **특허청 홈페이지(공지사항)**에 **류별 1차 심사결과통지 예정시기**를 매월 게시하고 있으며, **특허정보검색서비스 시스템**(http://www.kipris.or.kr)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, SMS 또는 E-mail 서비스로 제공해 드립니다.
   ※ 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라 질 수 있습니다.
   2-라. 1차 심사결과통지시(심사관이 특허결정의 등본을 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 빠른 때)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다.
   특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리됨을 알려드립니다.
3. **우선심사** 특허(실용신안등록)출원 또는 디자인등록출원, 상표등록출원에 대해 조기에 심사를 원하시면 "우선심사제도"를 이용하실 수 있습니다
4. **주소 등 변경신고** 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
5. **산업재산권 표시, 광고요령** 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.
   예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
6. **미성년자** 미성년자인 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 직접 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
7. **문의처** 기타 문의사항이 있으시면 특허고객 콜센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.
8. **특허청 주소** 302-701 대전광역시 서구 선사로 139 정부대전청사 4동
   특허청 서울사무소 주소 135-911 서울특별시 강남구 역삼동 647-9 한국지식센터
   FAX) 대전 : 042-472-7140, 서울 : 02-566-8454

관 인 생 략

출 원 번 호 통 지 서

출 원 일 자 2010.02.09

특 기 사 항 심사청구(무) 공개신청(무)

출 원 번 호 10-2010-0012112 (접수번호 1-1-2010-0088255-03)

출원인 명칭 국립암센터(1-2000-036786-6)

대리인 성명 손민(9-1999-000420-6)

발명자 성명 홍경만 김현경

발명의 명칭 H E R 2 양성 개체 진단 방법 및 H E R 2 카피수 측정 방법

특 허 청 장

1. **출원번호통지서** 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니 출원번호통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
2.
   2-가. 특허 및 실용신안 출원은 **심사청구 후 평균 16개월**에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 **출원 후 평균 10개월**에 1차 심사처리가 이루어집니다.
   2-나. 특허 및 실용신안은 **특허路 홈페이지**(http://www.patent.go.kr)의 "고객지원서비스-민원처리과정 통지 서비스" 코너에서 1차 심사결과통지 예고서비스를 신청하시면, 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다
   2-다. 상표 및 디자인은 **특허청 홈페이지(공지사항)에 류별 1차 심사결과통지 예정시기**를 매월 게시하고 있으며, **특허정보검색서비스 시스템**(http://www.kipris.or.kr)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, SMS 또는 E-mail 서비스로 제공해 드립니다.
   ※ 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라 질 수 있습니다.
   2-라. 1차 심사결과통지시(심사관이 특허결정의 등본을 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 빠른 때)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다.
   특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리됨을 알려드립니다.
3. **우선심사** 특허(실용신안등록)출원 또는 디자인등록출원, 상표등록출원에 대해 조기에 심사를 원하시면 "우선심사제도"를 이용하실 수 있습니다
4. **주소 등 변경신고** 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
5. **산업재산권 표시, 광고요령** 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.
   예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
6. **미성년자** 미성년자인 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 직접 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
7. **문의처** 기타 문의사항이 있으시면 특허고객 콜센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.
8. **특허청 주소** 302-701 대전광역시 서구 선사로 139 정부대전청사 4동
   특허청 서울사무소 주소 135-911 서울특별시 강남구 역삼동 647-9 한국지식센터
   FAX) 대전 : 042-472-7140, 서울 : 02-566-8454

특 허 증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-0959020 호
(PATENT NUMBER)

출원번호 (APPLICATION NUMBER) 제 2008-0024453 호

출 원 일 (FILING DATE:YY/MM/DD) 2008년 03월 17일

등 록 일 (REGISTRATION DATE:YY/MM/DD) 2010년 05월 12일

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)

TMAP/CKAP2에 특이적인 단일클론항체

특허권자 (PATENTEE)

등록사항란에 기재

발명자 (INVENTOR)

등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 의하여 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.

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

2010년 05월 12일

특 허 청

COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

919990004206101110100000190000000

특허출원서

【출원구분】 특허출원

【출원인】

【명칭】 국립암센터

【출원인코드】 1-2000-036786-6

【대리인】

【성명】 손민

【대리인코드】 9-1999-000420-6

【포괄위임등록번호】 2005-068620-5

【발명의 국문명칭】 S N P 어레이를 이용한 염색체,유전자, 혹은 특정 뉴클레오티드 서열의 카피 수 측정방법

【발명의 영문명칭】 Method for measuring the chromosome, gene or nucleotidesequence copy number using SNP array

【발명자】

【성명의 국문표기】 홍경만

【성명의 영문표기】 HONG, Kyeong Man

【주민등록번호】 650209-1565717

【우편번호】 411-320

【주소】 경기 고양시 일산서구 탄현동 130 쌍용아파트 101동 501호

【국적】 KR

위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

대리인 손민 (인)

【수수료】

【기본출원료】	0	면	38,000	원
【가산출원료】	28	면	0	원

특 허 증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-0808312 호

(PATENT NUMBER)

출원번호 (APPLICATION NUMBER)	제 2005-0066736 호
출 원 일 (FILING DATE:YY/MM/DD)	2005년 07월 22일
등 록 일 (REGISTRATION DATE:YY/MM/DD)	2008년 02월 21일

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)

인위적 에스엔피 서열의 동시증폭을 이용한 염색체,유전자, 혹은 특정 뉴클레오티드 서열의 카피 수 측정방법

특허권자 (PATENTEE)

등록사항란에 기재

발명자 (INVENTOR)

등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 의하여 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.

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

2008년 02월 21일

특 허 청 장

COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE