

최종보고서

[기관고유연구사업]

과제고유번호	1510700-1	연구분야 (코드)	1-3	지원 프로그램	창의 모험연구	공개가능여부 (공개, 비공개)	공개
연구사업명	국립암센터 기관고유연구사업						
연구과제명	비종양성 위점막조직의 유형별 차이를 바탕으로 한 위암분류법 가능성 확인						
과제책임자	성명	국명철	소속	위암센터	직위	의사	
세부과제	구분	과제명			과제책임자		
	(1세부)	해당없음			성명	소속(직위)	전공
	(2세부)						
	(3세부)						
총연구기간	2015년 3월~ 2015년 12월 (총 10개월)		해당단계 참여 연구원 수	총: 13명 내부: 11명 외부: 2명	해당단계 연구개발비	연구비: 천원 민간: 천원 계: 천원	
			총연구기간 참여 연구원 수	총: 13명 내부: 11명 외부: 2명	총연구개발비	연구비: 천원 민간: 천원 계: 천원	
연구기간 및 연구비 (단위: 천원)	구분	연구기간	계	국립암센터	기업부담금		
	계	2015.03.01.~2015.12.31	30,000	30,000	소계	현금	현물
	제1차	2015.03.01.~2015.12.31	30,000	30,000			
	제2차	~					
	제3차	~					
참여기업	참여기업명 :						
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:			
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:			

요약

- 배경: 현재 사용되고 있는 위암분류법은 위암의 다양성과 위암발생기전을 반영하고 있지 못함. 위암 발생의 배경이 되는 비종양성 위암점막의 유전자발현양상을 분석하여 이를 기반으로 한 위암분류법의 고안 가능성을 알아보고자 연구를 기획하였음.

- 목적: 비종양성 위점막조직 유형별 유전자 발현양상 차이를 위암분류에 사용할 수 있는 가능성 확인.

- 시행연구내용:

- 1) 대표적인 4가지 유형 총 32증례의 신선동결조직에 대해 cDNA mircoarry 시행함.
- 2) cDNA microarray 를 분석하여 비종양성점막의 4그룹에 대해 특징적인 표지자를 선정할 예정임.
- 3) set 1 194례 및 set 2 399례를 tissue microarray(TMA) 블록 제작함. 선정된 표지자에 대해 면역염색시행하여 종양에서의 발현을 확인하고 종양을 분류할 예정임.
- 4) TMA면역염색결과로 분류한 종양유형과 수집된 임상병리학적 특성의 연관성을 분석하여 임상적의의를 판정할 예정임.

- 연구수행지연:

비종양성점막의 유형별로 발생빈도가 달라서 특정유형이 수집되는데 시간이 오래 소요되어 유전자발현분석이 지연되었음. 이에 따라 과제 수행이 전체적으로 지연됨. 현재 발현분석단계 완료되었고 후속 단계 실험진행 중임.

- 연구개발성과

1) 후속연구증례 확보: 재사용 74증례 및 신규 수집된 93증례 등 총 167증례의 비종양성점막 신선동결조직 수집.

2) TMA cohort 제작: 593례의 위암조직에 대한 임상병리학적 특성 수집 및 TMA제작.

- 활용방안

후속연구로 위암의 다양한 발생기전을 반영하는 새로운 위암분류법을 개발하고 기존의 위암분류법의 문제점을 극복하여 예후인자물질 및 치료표적물질의 비재현성을 해소할 것을 기대함.

2015 년 11 월 4 일

과제책임자 : 국 명철 (인)

국립 암 센터 원장 귀하

< 국문 요약문 >

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>1. 연구목적: 비종양성 위점막조직 유형별 유전자 발현양상 차이를 위암분류에 사용할 수 있는 가능성 확인. ○ 비종양성 위점막조직 유형별 유전자 발현양상 분석 ○ 발현차이를 보이는 대표적인 유전자들의 발현을 위암조직에서 확인 ○ 발현차이와 임상적특성간의 관련성 분석</p> <p>2.연구내용: 1) 비종양성 위점막조직 유형별 대표증례에서 유전자발현양상분석: 대표적인 4가지 유형 총 32증례의 신선동결조직에 대해 cDNA mircoarry 시행함. 2) Analysis of RNA expression data and stratification: cDNA microarray를 분석하여 비종양성점막의 4그룹에 대해 특징적인 표지자를 선정할 예정임. 3) 위암증례 TMA제작 및 면역조직화학염색: 수술조직 194례 set 및 2005년 절제된 399례 set를 tissue microarray(TMA) 블록 제작함. cDNA microarray 결과 분석후 선정된 표지자에 대해 면역염색시행하여 종양에서의 발현을 확인하고 종양을 분류할 예정임. 4) Clinicopathologic significance: TMA면역염색결과로 분류한 종양유형과 수집된 임상병리학적 특성의 연관성을 분석하여 임상적의의를 판정할 예정임.</p>																
<p>연구개발성과</p>	<p><정량적 성과¹⁾></p> <table border="1" data-bbox="464 1010 1401 1146"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>달성치/목표치¹⁾</th> <th>달성도(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SCI 논문 편수</td> <td>0/1</td> <td></td> </tr> <tr> <td>IF 합</td> <td>0/4</td> <td></td> </tr> <tr> <td>기타 성과</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p><정성적 성과> ○ 연구개발성과 1) 후속연구증례 확보: 재사용 74증례 및 신규 수집된 93증례 등 총 167증례의 비종양성점막 신선동결조직 수집. 2) TMA cohort 제작: 593례의 위암조직에 대한 임상병리학적 특성 수집 및 TMA 제작.</p>					구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)	SCI 논문 편수	0/1		IF 합	0/4		기타 성과		
구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)															
SCI 논문 편수	0/1																
IF 합	0/4																
기타 성과																	
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>후속연구로 위암의 다양한 발생기전을 반영하는 새로운 위암분류법을 개발하고 기존의 위암분류법의 문제점을 극복하여 예후인자물질 및 치료표적물질의 비재현성을 해소할 것을 기대함.</p>																
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>위암</p>	<p>분류</p>	<p>암발생기전</p>	<p>배경점막</p>	<p>파라핀조직</p>												

< 영문 요약문 >

< SUMMARY >

<p>Purpose& Contents</p>	<p>1. Purpose: Evaluation of the possibility of new gastric cancer classification based on the differences in background non-neoplastic mucosa ○ Gene expression analysis of representative cases of non-neoplastic mucosa. ○ Verification of the expression pattern in gastric cancers for the markers selected from non-neoplastic mucosa. ○ Analyzing the relationship to clinicopathological features. 2. Contents: 1) Analysis of RNA expression in various non-neoplastic mucosa: cDNA microarray for 32 cases from 4 types of non-neoplastic mucosa. 2) Analysis of RNA expression data and stratification: Planned: determination of specific markers for 4 types will be done. 3) TMA and immunohistochemistry: 194 EGC cases (set 1) and 399 AGC and EGC cases (set 2) were made to TMA blocks. Confirmation of markers for 4 types and sorting of cancers will be done. 4) Analyzing the clinicopathological significance</p>				
<p>Results</p>	<p><Quantitative results> SCI paper: 0/1 <Qualitative results> 1) Collection of samples for further study: Fresh frozen tissues of non-neoplastic mucosa for 167 cases. 2) TMA cohort: 593 cases of gastric cancers were completed to making TMA block and clinicopathological data collection.</p>				
<p>Expected Contribution</p>	<p>Application to further study for new classification system of gastric cancer based on carcinogenic process which can solve the problems of present classifications and facilitate the discovery of prognostic factor or treatment target.</p>				
<p>Keywords</p>	<p>gastric cancer</p>	<p>classification</p>	<p>carcinogenesis</p>	<p>background mucosa</p>	<p>paraffin embedded tissue</p>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	6
2. 국내외 기술개발 현황	6
3. 연구수행 내용 및 결과	8
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	9
5. 연구결과의 활용계획 등	9
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	9
7. 연구개발과제의 대표적 연구실적	10
8. 참여연구원 현황	11
9. 기타사항	11
10. 참고문헌	12

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

○ 비종양성 위점막조직 유형별 유전자 발현양상 차이를 위암분류에 사용할 수 있는 가능성 확인.

1-2. 연구개발의 필요성

○ 현재 널리 사용되는 Lauren classification은 위암의 다양한 유전자이상을 반영하지 못한다.

○ Lauren classification의 두가지 유형내에는 서로 다른 여러 종류의 위암이 혼재되어있다.

○ 기존의 위암분류법에 따른 유형들은 예후관련인자 연구시 일관된 소견을 보이지 못하고 있다.

○ 최근 진행된 위암의 분자학적 이상에 대한 연구는 발암과정과 관련된 분석이 아니며 유전자 이상이 축적된 최종 결과만을 반영하고 있다.

○ 종양배경의 비종양점막에 대한 유전자이상분석은 종양발생과정에 따른 위암분류법고안을 가능케 할 것이다.

1-3. 연구개발 범위

○ 비종양성 위점막조직 유형별 유전자 발현양상 분석

○ 발현차이를 보이는 대표적인 유전자들의 발현을 위암조직에서 확인

○ 발현차이와 임상적특성간의 관련성 분석

2. 국내외 기술개발 현황

1) 현재 가장 널리 사용되고 있는 위암분류법인 Lauren 분류법은 위암을 형태학적 특징에 따라 intestinal type과 diffuse type으로 분류하며 이 두가지 유형의 설정은 단순히 형태학적 특징만을 고려한 것이 아니라 배경 위점막상피와의 관련성을 기반으로 한 것이다. Intestinal metaplasia가 진행된 증례에서는 colon cancer를 닮은 intestinal type cancer가 주로 발생하며 intestinal metaplasia가 없는 증례에서는 위의 특징적인 종양인 diffuse type cancer가 발생하는 관찰결과를 바탕으로 한 것이다. 따라서 Lauren 분류법은 본 연구의 주제와 같이 주변 위점막의 종류에 따른 gastric cancer의 발생차이를 반영한 모델이라고 할 수 있다. 그러나, Lauren 분류법은 두 가지 유형으로의 분류가 다양한 위암을 분류하기에는 너무 불완전하여 다음과 같은 많은 문제점들을 보이고 있다.

○ Diffuse type으로 분류되는 종양들 중 처음부터 별도의 diffuse type 형태의 종양으로 발생한 것들과 intestinal type의 종양들이 분화가 나빠지면서 diffuse type의 infiltrative pattern을 보이게 된 것들이 구별되지 못한다. 실제로 유전자발현양상에 따른 hierarchical clustering을 시행하여 얻은 분자학적 분류가 형태학적 분류와 상당한 불일치를 보이는 것이 관찰된다¹⁾.

○ 형태학적으로 intestinal type이나 diffuse type으로 분류되기 어려운 증례가 10-20% 정도 존재한다. 처음 단계부터 intestinal type과 diffuse type component가 동반되어 나타나는 종양도 흔히 관찰된다. 이러한 소위 mixed type의 경우 intestinal type이나 diffuse type과는 또 다른 methylation pattern을 보여서 별도의 유형으로 분리되어야 할 가능성이 제기되고 있다²⁾.

○ Intestinal type 또는 diffuse type으로 분류된 증례들에 대해서 실제로는 추가적인 분류가 필요하다고 생각되어지고 있다. Signet ring cell carcinoma와 poorly differentiated tubular adenocarcinoma는 diffuse type으로 함께 분류되지만 다른 기전의 종양으로 생각되어지고 있다³⁾⁴⁾. Intestinal type으로 분류되는 종양들 중에는 대장암처럼 잘 발달된 gland 구조를 보이는 것도 있으나 일부 종양은 그 구조가 대장암과는 달리 복잡하게 교차되어있는 소견을 보이며 형태학적으로 큰 차이를 보인다. Intestinal type의 종양 중 일부는 microsatellite instability(MSI)를 보이며 대장암에서의 경우와는 달리 유전성배경에 의한 발생이 아니고 hypermethylation에 의한 개별적인 발생으로 알려져있

다. 이러한 종양은 종양발생과정이나 예후가 달라서 별도의 유형으로 분류되어야 할 필요가 있다. 이러한 다양한 유형의 종양이 모두 intestinal type으로 묶여있다.

이러한 문제점들로 인해 Lauren 분류법은 현재 알려지고 있는 분자학적 소견들과 연결되어 사용하기에 적합하지 않은 실정이다.

2) 분화양상에 따라 위암종을 분류하는 방법으로 mucin type에 따라 종양을 분류하는 phenotype classification으로 시행된 바가 있다. 여기서는 암세포에서 생산되는 mucin이 정상 gastric mucin과 intestinal mucin 어느 것인지에 따라 위암을 gastric, intestinal, mixed type으로 나누었다. 이러한 분류법은 표현형 분화에 따라 종양을 분류하고 이를 발암과정의 화생이나 전암성 병변의 표현형과 관련 지어서 발암기전과의 연관성을 반영하고자 한 것이나 실제로 이러한 전암성 병변과의 관련성은 아직 밝혀지고 있지 않다. 또한, 일부 표현형이 침습도나 예후와 관련성이 있는 것으로 보고되고 있으나 대부분 기존의 조직학적 침습 소견이나 TNM 병기 등과 함께 분석되었을 때는 아직 그 근거가 충분치 못하다 (Tajima 2006). 이러한 분류법은 임상병리학적 특성과 일관된 유의성을 찾기 어려웠고 또한 일부 보고에서는 종양의 성장에 따라 phenotype이 변화될 가능성을 보였다. 따라서 최종분화단계의 표현형보다는 기본적인 세포기능이나 분화과정을 결정짓는 물질들의 발현양상변화를 이용할 필요가 있다.

3) 최근 대표적인 signal transduction pathway이상에 따라 대량의 위암종류의 분류를 시도한 논문들이 보고되었다⁵⁾. 기존의 분류법이 조직학적 소견이나 phenotype 등 종양세포의 분화결과에 관련되어 있는데 반하여 이러한 pathway-based classification은 발암기전과의 연관성을 반영하고 있다. 그러나, 이러한 분류는 driver가 아닌 bystander들에 의해 교란될 가능성을 염두에 두고 이를 배제하기 위한 노력이 필요하다. 종양세포의 종류에 따라 pathway network background가 다르기 때문에 동일한 pathway abnormality라 하더라도 종양세포내에서의 실제 중요성은 큰 차이를 보일 수 있다⁶⁾⁷⁾. 주변배경점막이나 작은 크기의 위암에서 나타나는 pathway abnormality는 위암이 발생된 초기단계의 이상소견을 반영할 것으로 생각되므로 이러한 오류를 배제할 수 있는 좋은 방법이 될 것이다.

4) 위점막상피의 분류에 있어서 각 상피별로 특유의 stem cell을 이용하여 분류하는 것이 가장 이상적이겠으나 아직 위점막의 stem cell의 nature는 잘 밝혀져있지 않다. 단, 이전의 동물실험 및 인체조직에서의 증식성세포의 분포를 참고로 isthmus에 위치하고 있다고 추정하고 있다⁸⁾. intestinal metaplasia에서는 이러한 증식성세포의 분포가 변화되어 intestinal epithelium처럼 base에 위치한다. 이러한 증식구역의 차이와 세포분화의 차이를 볼 때 gastric epithelium과 intestinal metaplasia는 서로 다른 성질의 stem cell에 의해 형성될 것으로 추정할 수 있다. Intestinal metaplasia가 위점막상피의 intrinsic stem cell이 아닌 extrinsic stem cell에서 유래된다는 연구가 보고된 바 있으며 만성위염의 동물실험모델에서 bone-marrow origin stem cell이 위점막에 recruitment 이 세포에서 intestinal metaplasia 전체세포가 유래됨을 보였다⁹⁾. 그러나, 아직 인체조직에서의 확인은 이루어지고 있지 않고 또한 무엇보다 gastric mucosa의 intrinsic stem cell이 아직 발견되지 않아서 비교연구가 어려운 상황이다. 위점막상피의 stem cell로는 최근 Lgr5+ cell이 제기되고 있으며 위암조직에서는 CD44v8-10(+) cell¹⁰⁾, ALDH1(+) cell¹¹⁾ 등이 cancer-initiating cell로 보고되고 있다. Stem cell에서는 분화된 세포에 비해 특징적으로 활성화되어있는 pathway들이 보고되어있고 대표적인 것은 hedgehog, WNT, FGFR, Notch, BMP pathway등이 보고되어있다.

3. 연구수행 내용 및 결과

3-1. 연구내용 및 결과

1) 비종양성 위점막조직 수집:

기존연구과제검체중 2차사용동의된 74개 샘플 및 전향적으로 수집된 147개 샘플 등 총 221개 샘플의

비종양성점막 신선동결조직 수집됨.

[표 1. 전향적수집된 비종양성 점막조직의 형태학적 분류]

Location	Control (normal)	Intestinal metaplasia, complete	Intestinal metaplasia, incomplete	Nonmetaplastic atrophy	Pseudopyloric metaplasia
Body	83	10	0	0	12
Antrum	9	12	2	7	해당없음
Tranzitional zone	2	10	0	0	해당없음

2) RNA expression analysis 대상 증례선정:

- 신선동결조직이 채취된 부위의 바로 옆에서 파라핀블록을 제작하여 점막조직의 부위와 형태학적 소견을 기술함. 다음 4가지 그룹에 대해 증례를 선정함: antrum 부위점막이면서 metaplasia와 atrophy가 없는 경우(ATctrl), antrum부위 점막이면서 complete type intestinal metaplasia가 3+이상인 경우(ATIM), body 부위점막이면서 metaplasia와 atrophy가 없는 경우(BDctrl), body 부위 점막이면서 complete type intestinal metaplasia가 3+이상인 경우(BDIM). 각 그룹당 8개 샘플을 선정함. 각 샘플은 파라핀블록에서 형태학적 소견을 관찰하였을 때 위의 그룹에 해당하면서 세포성분중 상피세포의 비율이 60%이상, 염증세포침윤정도는 Sydney grading system 분류로 1+~2+ 인 조건으로 일치시켜서 선정하였다.

[표 2. Samples for cDNA microarray]

Test No.	Study Case No.	Group
NL001	C445_012	ATIM
NL002	C445_022	FDIM
NL003	C445_089	FDctrl
NL004	C445_092	ATIM
NL005	C445_100	ATctrl
NL006	C445_102	ATctrl
NL007	C445_028	ATIM
NL008	C445_116	FDIM
NL009	C445_120	ATctrl
NL010	C445_124	ATctrl
NL011	C445_125	FDctrl
NL012	C445_137	FDIM
NL013	C445_165	ATIM
NL014	G15-046	FDctrl
NL015	101-0033	ATIM
NL016	101-0038	FDIM
NL017	NCC_P_020	FDIM
NL018	NCC_P_024	FDIM
NL019	101-0048	ATIM

NL020	C445_087	ATIM
NL021	G15-044	FDctrl
NL022	G15-012	ATctrl
NL023	G15-018	FDctrl
NL024	G15-029	ATctrl
NL025	G15-030	FDctrl
NL026	G15-031	ATctrl
NL027	G15-039	FDctrl
NL028	G15-045	FDctrl
NL029	G15-048	FDIM
NL030	G15-050	ATIM
NL031	G15-050	FDIM
NL032	G15-052	ATctrl

- RNA expression level에 대한 control tissues를 다음과 같이 사용하였다.

○ Control 1: normal mucosa mixture

각 그룹별 대표샘플 1개를 선정하여 RNA extract 동량을 혼합하여 mixture 만듦. 이를 normal mixture control로 사용함.

○ Control 2: tumor tissue mixture

종양의 조직학적 분류시 각각의 분류에서 대표적인 종양 총 6증례를 선정하여 RNA extract 동량을 혼합하여 mixture 만듦. 이를 tumor mixture control로 사용함.

○ Control 3: connective tissue control

조기위암증례 수술 당시 종양과 상관없는 부위의 위조직 장막면측에서 채취한 위근육층의 조직을 사용함.

○ Control 4: Inflammatory cell control

조기위암증례 수술 당시 종양과 상관없는 부위의 위주변 림프절종 크기가 매우 작고 종양전이가 의심되지 않는 림프절 조직을 사용함.

3) Analysis of RNA expression using cDNA microarray:

QIAGEN RNeasy mini kit(cat. no. 74104)를 이용하여 RNA extraction을 시행하였음. 각 샘플의 시료는 Nanodrop을 이용한 정량분석과 Agilent Technologies RNA 6000 nano kit(cat. no. 5067-1511) 및 gel electrophoresis 를 이용한 정성분석을 시행하였다. 각 샘플은 200ng/ul 농도로 맞추어 chip analysis에 사용하였다. cDNA microarray는 Illumina HumanHT-12 v4 Expression BeadChip Kit (cat. no. BD-103-0204)을 이용하였다.

4) Analysis of RNA expression data and stratification:

(1) 4개 그룹에서 검출된 유전자 중 다음과 같은 과정을 통해 분석대상을 선별하였다.

- control1(normal mixture)의 발현수준과 유의한 차이 없는 유전자는 대상에서 제외함.
- control2(tumor mixture)에서 발현이 검출되지 않거나 현저히 낮은 수준인 유전자는 제외함.
- control3(connective tissue)의 발현수준과 유의한 차이 없는 유전자는 대상에서 제외함.
- control4(inflammatory cell)의 발현수준과 유의한 차이 없는 유전자는 대상에서 제외함.

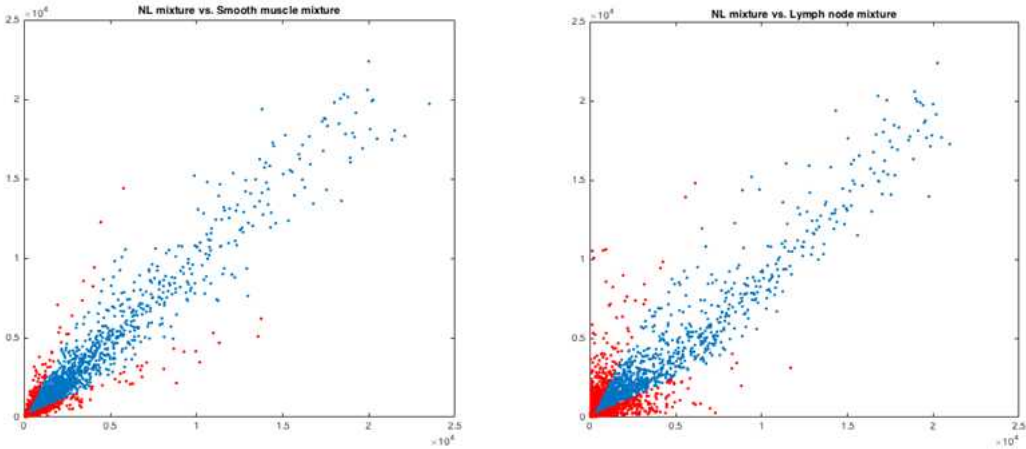


그림1. connective tissue 또는 inflammatory cell에서 발현되는 유전자와의 중복을 제거하기 위해 control 샘플과 비교하여 유의한 차이를 보이는 유전자들로 분석대상을 선별함.

(2) 두 그룹간 비교 분석: Location (antrum vs body), IM (normal vs IM) 시행하였음.

- ATctrl vs ATIM: 24개 유전자가 유의한 차이를 보임.
- FDctrl vs FDIM: 109개 유전자가 유의한 차이를 보임.
- ATctrl vs FDctrl: 6개 유전자가 유의한 차이를 보임.
- ATIM vs FDIM: 63개 유전자가 유의한 차이를 보임.

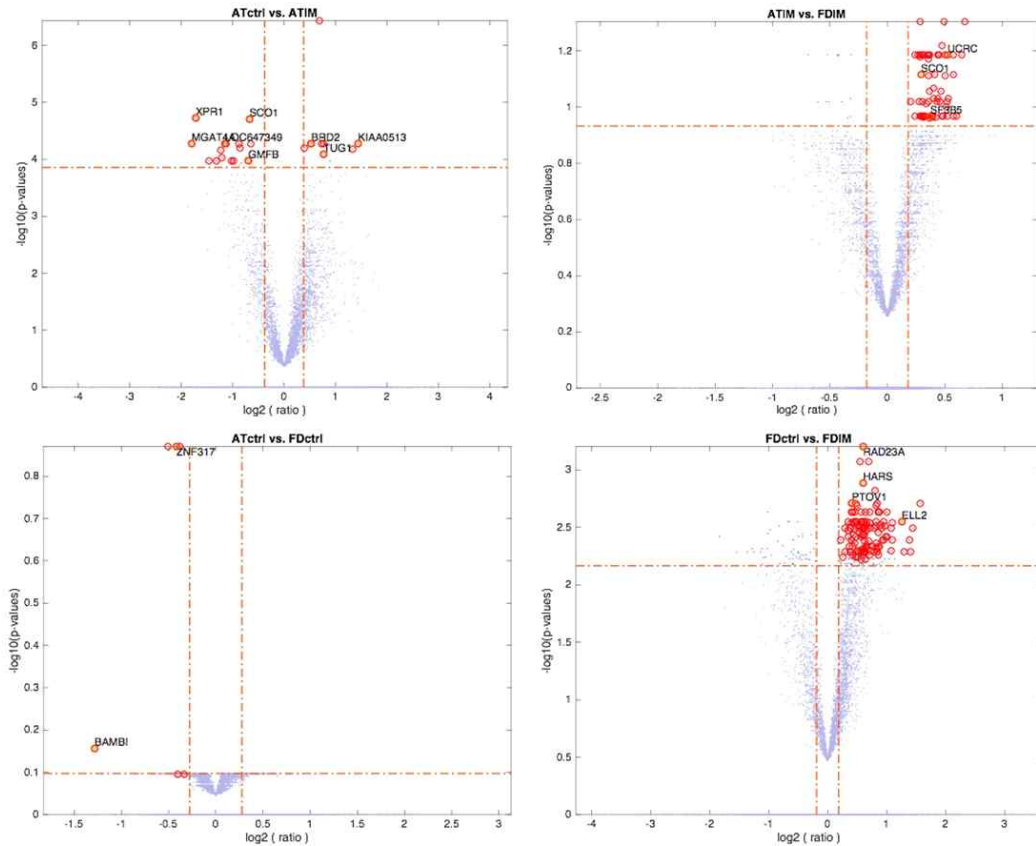


그림2. Location 과 IM여부에 따른 비교 분석.

(3) 각 그룹별 고유한 표지자 선별

○ 4개 그룹에 따라 유전자 clustering 양상을 분석하였음.

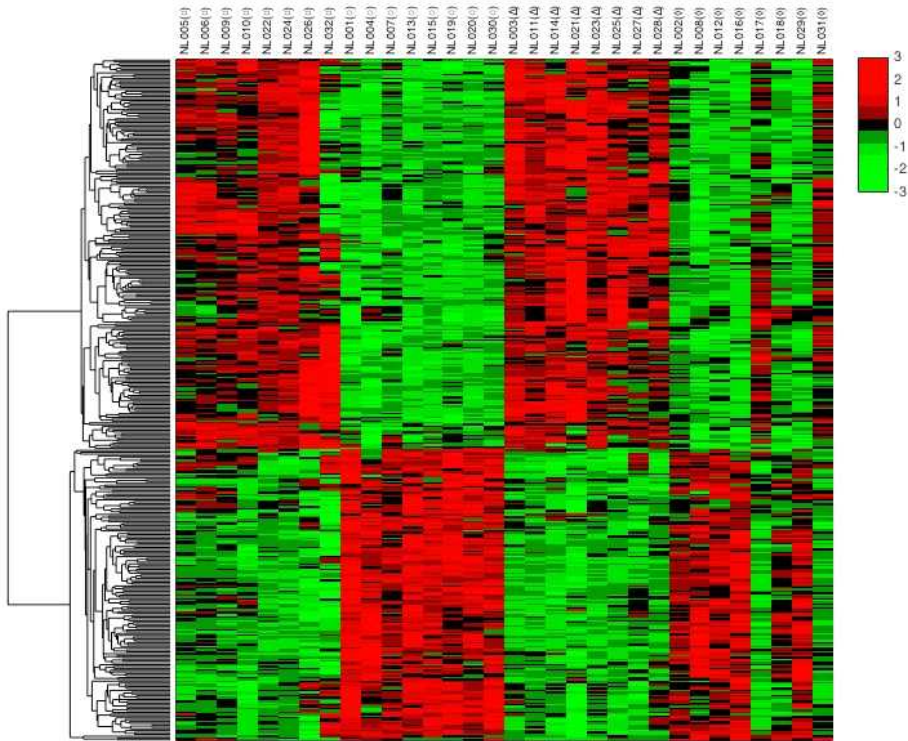


그림3. 그룹별 유전자 clustering analysis

이 분석에서는 normal vs intestinal metaplasia 에 따라 유전자들의 clustering이 관찰되었고 IM여부에 대한 감별표지자들을 선정할 수 있었음. 그러나 한 그룹에 특정한 양상으로 clustering되는 유전자그룹은 관찰되지 않아서 그룹특이적표지자는 선정할 수 없었음.

○ 특정 점막유형에서 발현차이를 보이는 유전자 분석

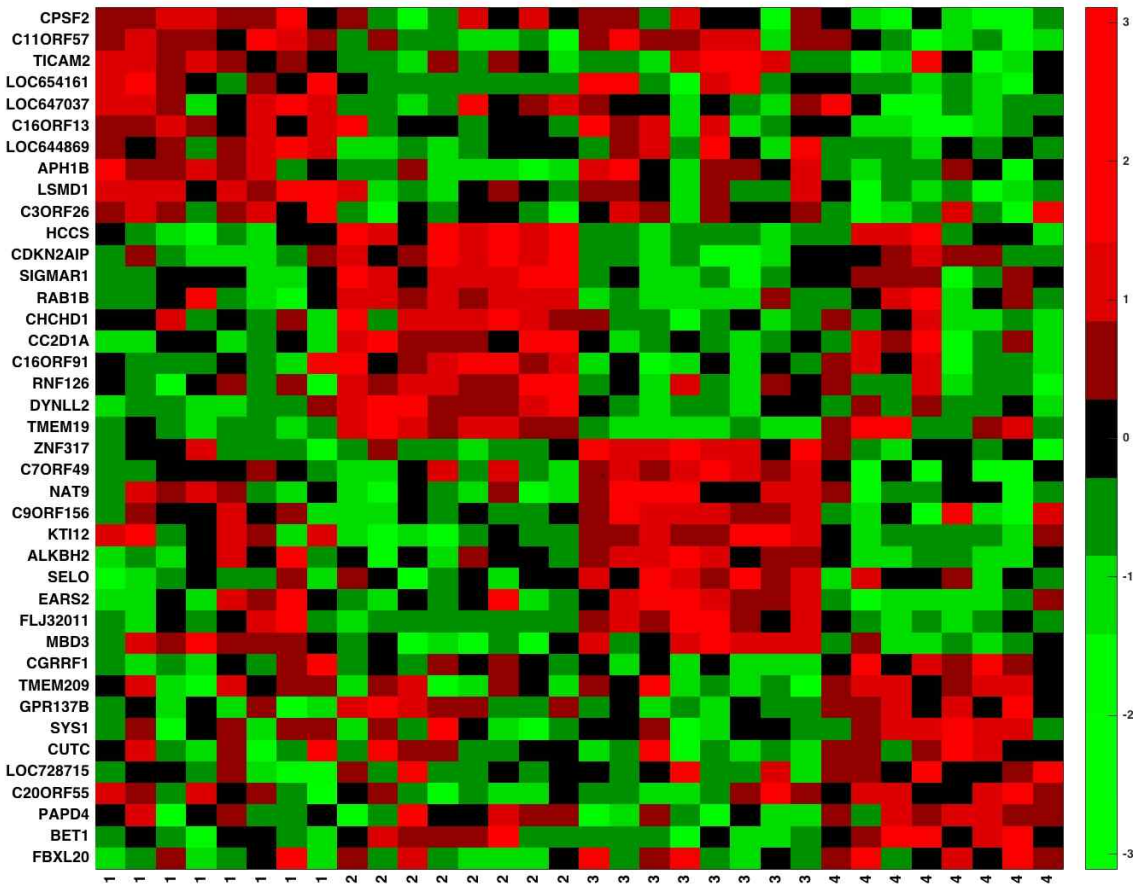


그림4. 특정 점막유형의 발현차이 분석.

다른 3개의 그룹에 비해 특정 점막유형에서 발현양상에 차이를 보이는(p-value<0.05) 유전자를 분석하였고 그중 각 그룹별로 fold change가 가장 큰 상위 10개의 유전자를 선정하였음.

5) 점막유형별 특이표지자 후보 선정

cDNA microarray 분석 결과를 바탕으로 다음과 같은 기준으로 표지자 후보를 선별하였음: 두 그룹간 비교분석시 여러 분석조합에서 일정하게 특정그룹에서 유의한 소견을 보인 유전자; 특정 점막유형에 유의한 발현차이를 보인 유전자 중 상위 10개 유전자; 두 그룹간 비교분석과 특정 점막유형의 발현분석에서 공통되게 선정되는 유전자. 이상의 기준으로 특이표지자 후보 유전자들을 선정하였음.

[Antrum normal]

Gene	ENTREZ_ID	Chromosome
APH1B	83464	15q22.2b
C11ORF57	55216	11q23.1c
C16ORF13	84326	16p13.3f
C3ORF26	84319	3q12.1c
CPSF2	53981	14q32.12b
LOC644869	644869	
LOC647037	647037	15q25.2a
LOC654161	654161	

LSMD1	84316	17p13.1d
TICAM2	353376	5q22.3b

[Body normal]

Gene	ENTREZ_ID	Chromosome
ALKBH2	121642	12q24.11a
C7ORF49	78996	7q33b
C9ORF156	51531	9q22.33b
EARS2	124454	16p12.1c
FLJ32011	148930	1p33d
KTI12	112970	1p32.3e
MAGMAS	51025	16p13.3b
MBD3	53615	19p13.3h
NAT9	26151	17q25.1b
SELO	83642	22q13.33b
ZNF317	57693	19p13.2d

[Antrum IM]

Gene	ENTREZ_ID	Chromosome
C16ORF91	283951	16p13.3e
CC2D1A	54862	19p13.12c
CDKN2AIP	55602	4q35.1c
CHCHD1	118487	10q22.2a
DYNLL2	140735	17q22d
HCCS	3052	Xp22.2
RAB1B	81876	11q13.1e
RNF126	55658	19p13.3j
SCO1	6341	17p13.1a
SIGMAR1	10280	9p13.3c
TMEM19	55266	12q21.1a

[Body IM]

Gene	ENTREZ_ID	Chromosome
BET1	10282	7q21.3a
C20ORF55	83541	20p13f
CGRRF1	10668	14q22.2b
CUTC	51076	10q24.2c
FBXL20	84961	17q12c
GPR137B	7107	1q42.3d
LOC728715	728715	12p13.31a
PAPD4	167153	5q14.1d
SYS1	90196	20q13.12b
TMEM209	84928	7q32.2b

6) 특이표지자 후보의 검증을 위한 위암증례 수집

이전 연구에서 신선동결조직이 채취된 수술조직 194례 및 2005년 수술 및 내시경으로 절제된 399례를 대상으로 HE슬라이드 리뷰 시행하고 임상 및 병리소견 수집하여 기록함. 증례별로 대표적인 부위를 선정하여 tissue microarray(TMA) 블록 제작을 제작하였음. 총 593례 증례의 조직 및 임상데이터 수집이 완료됨.

7) Assessment of clinicopathologic significance and design of classification:

cDNA microarray 결과 분석후 선정된 표지자 후보에 대해 면역염색시행하여 비종양성점막 및 종양에서의 발현을 확인하고 특이표지자로서의 적합 유무를 판정할 예정임. TMA면역염색결과로 분류한 종양유형과 수집된 임상병리학적 특성의 연관성을 분석할 예정임.

3-2. 연구개발성과

- 1) 신선동결조직 수집: 재사용 74 샘플 및 전향적으로 수집된 147개 샘플 등 총 221개 샘플의 비종양성점막 신선동결조직 수집됨.
- 2) TMA cohort 제작: 593례의 위암조직에 대한 임상병리학적 특성 수집 및 TMA제작.
- 3) 점막유형별 특이표지자 후보 유전자 42개를 선별함.

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

4-1. 목표달성도

세부연구목표	가중치(%)	평가의 착안점 및 척도	달성도
비종양성 위점막조직 유형별 유전자 발현양상 분석	60	해당 검체에 대한 유전자발현실험 및 데이터 분석 완료.	100%
발현차이를 보이는 대표적인 유전자들의 발현을 위암조직에서 확인	20	위암조직의 tissue microarray에 대한 면역염색 분석 완료.	50%
발현차이와 임상적특성간의 관련성 분석	20	발현차이에 따른 임상적 특성 차이 분석 완료.	0%

- 비종양성점막의 유형별로 발생빈도가 달라서 특정유형이 수집되는데 시간이 오래 소요되어 유전자발현분석이 지연되었음. 이에 따라 과제 수행이 전체적으로 지연됨. 현재 유전자발현분석단계 완료되어 점막유형별 특이표지자 후보 유전자 선정을 완료하였음. 후속단계로 시행할 위암조직의 TMA제작을 완료하였으며 후보물질의 발현확인 및 특이표지자 적합여부를 판정하기 위한 면역조직화학염색실험을 진행할 예정임.

4-2. 관련분야 기여도

○ 비종양성 위점막이 부위와 위염에 따른 변화양상에 따라 특징적인 유전자발현양상을 보이는 것을 확인하였음. 이에 따라 기존의 근위성위암과 원위성위암의 차이, 장형위암과 미만형위암의 차이를 위암발생단계와 관련된 유전자발현차이에 근거하여 분석할 수 있는 근거가 마련되었음. 또한 이러한 차이를 바탕으로 위암을 분류할 수 있는 기준에 대한 새로운 연구의 근거가 마련되었음.

○ 후속연구에 사용될 증례 확보

- 221증례의 비종양성점막 신선동결조직 수집.
- TMA cohort 제작: 593례의 위암조직에 대한 임상병리학적 특성 수집 및 TMA제작.

5. 연구결과의 활용계획

○ 새로운 위암분류법을 고안하는 후속 연구에 활용: 기존의 Lauren classification의 불완전성을 극복하고 위암의 다양한 발생기전을 반영하는 새로운 위암분류법을 개발할 수 있는 가능성을 확인 할 수 있음. 후속 연구시 기존의 위암분류법이 가지고 있는 문제점들인 위암발생환자의 역학적 특성의 미반영, 조직학적 진단의 불일치성, 동일유형내에 다양한 조직-분자학적 소견의 혼재, 임상적 의의의 부재 등을 해소하고 예후인자물질 및 치료표적물질 개발시 문제되는 표지자의 임상적의의 비재현성이 이러한 분류법에 따른 대상증례의 선별과정을 거치면 크게 해소될 수 있을 것으로 기대함.

○ 위조직은 다른 장기와 달리 비종양성점막도 위치와 위염의 양상에 따라 특징적인 유전자발현양상이 있음을 보였음. 이는 위암에서의 유전자발현연구시 비종양성점막을 대조군으로 선정하는 연구들에서 사용된 조직들이 일정하지 않고 다양한 유형의 점막이 사용되었으므로 이로 인한 오류가 생겼을 가능성을 시사함. 향후 위암연구시 비종양성점막을 일정한 유형으로 선택하여 채취할 수 있도록 하는 주의가 필요함을 제시하였음.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

○ 해당없음.

7. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1		없음					yyyy.mm.dd		
2							yyyy.mm.dd		
3							yyyy.mm.dd		
4							yyyy.mm.dd		
5							yyyy.mm.dd		

<별첨작성 양식>

[별첨]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	1510700-1		
사업구분	기관고유연구사업				
연구분야	I-3		과제구분	단위	
사업명	기관고유연구사업			주관	
총괄과제	비중양성 위점막조직의 유형별 차이를 바탕으로 한 위암분류법 가능성 확인		총괄책임자	국명철	
과제명	비중양성 위점막조직의 유형별 차이를 바탕으로 한 위암분류법 가능성 확인		과제유형	응용	
연구기관	국립암센터		연구책임자	국명철	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	연구비	민간	계
	1차년도	2015.03.01.~2015.12.31	3,000만원	없음	3,000만원
	2차년도				
	3차년도				
	계	2015.03.01.~2015.12.31	3,000만원	없음	3,000만원
참여기업					
상대국			상대국연구기관		

2. 평가일 : 2016.03.11.

3. 평가자(과제책임자) :

소속	직위	성명
국립암센터	선임연구원	국명철

4. 평가자(과제책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	국명철
----	-----

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

- 기존의 위암에서의 유전자분석 연구들과는 달리 비종양성점막조직에서의 유전자발현양상 차이를 분석하였음. 이는 다른 연구에서 시도되지 않은 고유한 독창적 연구결과임. 후속연구에서 비종양성점막 유형의 표지자의 위암조직 발현 및 이를 이용한 분류법을 연구할 근거를 마련하였음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (우수)

- 기존의 Lauren classification의 불완전성을 극복하고 위암의 다양한 발생기전을 반영하는 새로운 위암분류법을 개발할 수 있는 가능성을 확인 할 수 있음.
- 위조직에서 비종양성점막이 동일하지 않고 각 유형에 따라 특이한 유전자발현을 보임을 밝혔음. 이에 따라 기존의 연구에서 위암에 대해 대조군으로 사용했던 비종양성점막의 유전자발현이 균일하지 않았으며 이로 인한 오류가 있었을 가능성을 제시하여 위암연구시 대조군조직 채취에 대한 새로운 의견을 제시하였음.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (우수)

- 기존에 사용되고 있는 위암분류법인 Lauren classification을 개선하여 크게 보완할 수 있을 것으로 기대함.
- 비종양성점막은 신선조직이 거의 확보되어있지 않은 연구대상이나 본 연구를 통해 후속연구에서 종양분류법에 대한 연구를 시행할 검체들을 확보하여 연구진행이 수월할 것으로 예상됨.(221증례의 비종양성점막 신선동결조직 수집, 593례의 위암조직에 대한 임상병리학적 특성 수집 및 TMA제작.)

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (우수)

- 1차 목표로 하였던 비종양성점막의 유형별 유전자발현차이를 증명하였으며 특이표지자 후보를 선정 하였음.
- 조직수집의 지연으로 최종목표인 위암조직에서의 발현 및 임상소견과의 관련성 분석은 연구기간 중 완료하지 못하였으나 이에 사용될 조직과 데이터를 모두 확보하였음. 후속연구가 이루어질 경우 원활하게 목표를 달성할 수 있을 것으로 기대함.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (미흡)

본 연구를 통한 논문 작성은 아직 이루어지지 못하였음. 그러나 본 연구 자체가 비종양성점막의 발현 표지자를 확인할 수 있는 지에 대한 선행연구로 소규모의 연구비내에서 기획된 것이므로 향후 연구에서의 성과를 기대함.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체 평가
비종양성 위점막조직 유형별 유전자 발현양상 분석	60	100%	
발현차이를 보이는 대표적인 유전자들의 발현을 위암조직에서 확인	20	50%	
발현차이와 임상적특성간의 관련성 분석	20	0%	
합계	100점	70%	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

기존의 위암에서의 유전자분석 연구들과는 달리 비종양성점막조직에서의 유전자발현양상 차이를 분석한 독창성 있는 연구로 위조직은 다른 장기와 달리 비종양성점막도 위치와 위염의 양상에 따라 특징적인 유전자발현양상이 있음을 확인하였고 1차 목표로 하였던 비종양성점막의 유형별 유전자발현차이를 증명하였으며 특이표지자 후보를 선정하는데 성공하였음. 이에 따라 후속연구에서 비종양성점막유형의 표지자의 위암조직 발현 및 이를 이용한 분류법을 연구할 근거를 마련하였음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구는 비종양성점막의 발현표지자를 위암분류에 활용할 수 있을지 가능성을 확인하기 위해 계획된 선행연구이므로 본 연구에서의 논문 등 성과보다는 본 연구결과로 인해 위암분류 연구를 새로운 관점에서 시행할 수 있는 근거가 마련되었다는 점을 고려하여야 함. 선행연구로 소규모의 연구비내에서 기획된 것이므로 향후 연구에서의 성과를 기대함.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구결과를 바탕으로 한 후속연구의 시행을 기대함.

IV. 보안성 검토

o 해당 없음.

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

10. 참고문헌

- 1) Tan IB, Ivanova T, Lim KH, Ong CW, Deng N, Lee J, Tan SH, Wu J, Lee MH, Ooi CH, Rha SY, Wong WK, Boussioutas A, Yeoh KG, So J, Yong WP, Tsuburaya A, Grabsch H, Toh HC, Rozen S, Cheong JH, Noh SH, Wan WK, Ajani JA, Lee JS, Tellez MS, Tan P. Intrinsic subtypes of gastric cancer, based on gene expression pattern, predict survival and respond differently to chemotherapy. *Gastroenterology*. 2011 Aug;141(2):476-85.
- 2) Chong Y et al. DNA methylation status of a distinctively different subset of genes is associated with each histologic Lauren classification subtype in early gastric carcinogenesis. *Oncol Rep* 2014;31(6):2535-44.
- 3) Yang M, Kim HS, Cho MY. Different methylation profiles between intestinal and diffuse sporadic carcinogenesis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2014;38(5):613-20.
- 4) Oue N et al. Distinct promoter hypermethylation of p16INK4a, CDH1, and RAR-beta in intestinal, diffuse-adherent, and diffuse-scattered type gastric carcinomas. *J Pathol* 2002;198(1):55-9.
- 5) Ooi CH, Ivanova T, Wu J, Lee M, Tan IB, Tao J, Ward L, Koo JH, Gopalakrishnan V, Zhu Y, Cheng LL, Lee J, Rha SY, Chung HC, Ganesan K, So J, Soo KC, Lim D, Chan WH, Wong WK, Bowtell D, Yeoh KG, Grabsch H, Boussioutas A, Tan P. Oncogenic pathway combinations predict clinical prognosis in gastric cancer. *PLoS Genet*. 2009 Oct;5(10):e100067. Epub 2009 Oct 2.
- 6) Roviello F et al. p53 accumulation is a prognostic factor in intestinal-type gastric carcinoma but not in the diffuse type. *Ann Surg Oncol*. 1999;6(8):739-45.
- 7) Lu SH et al. Expression and prognostic significance of gastric-specific annexin A10 in diffuse- and intestinal-type gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26(1):90-7.
- 8) Mills JC, Shivdasani RA. Gastric epithelial stem cells. *Gastroenterology*. 2011 Feb;140(2):412-24.
- 9) Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, Cai X, Fox JG, Goldenring JR, Wang TC. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science*. 2004 Nov 26;306(5701):1568-71.
- 10) Lau WM, Teng E, Chong HS, Lopez KA, Tay AY, Salto-Tellez M, Shabbir A, So JB, Chan SL. CD44v8-10 is a cancer-specific marker for gastric cancer stem cells. *Cancer Res*. 2014 May 1;74(9):2630-41.
- 11) Wakamatsu Y, Sakamoto N, Oo HZ, Naito Y, Uraoka N, Anami K, Sentani K, Oue N, Yasui W. Expression of cancer stem cell markers ALDH1, CD44 and CD133 in primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer. *Pathol Int*. 2012 Feb;62(2):112-9.