

기관고유연구사업 최종보고서

편집순서 1 : 겉표지 (앞면)

(과제번호 : 0910507)

연구과제명 (국문)

위암의 항암제 감수성 예측, 진단표지자 및 동물 모델 연구

연구과제명 (영문)

Prediction of chemosensitivity, diagnostic markers, and
genetically-engineered models for gastric cancer

과제책임자 : 김 학 균

국립암센터

편집순서 1 : 겉표지 (측면, 뒷면)

(뒷면)

(측면)

↑
5cm
↓
위암의
항암제
감수성
예측,
진단표
지자 및
동물
모델
연구

1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구사업 최종보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다.

(14 pont, 고딕체)

국립
암
센터

↑
6cm
↓

↑
3cm
↓

편집순서 2 : 제출문

제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “위암의 항암제 감수성 예측, 진단 표지자 및 동물 모델 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2012. 02. 10

국립암센터

과제책임자 : 김학균

” :

” :

제1세부과제명(과제책임자) :

제2세부과제명(과제책임자) :

- .
- .
- .

참여기업명 :

편집순서 3 : 목차

목 차

< 요약 문 >

(한글)

(영문)

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

※ 여러개의 세부과제로 과제가 구성된 경우 위 목차와 동일하게 세부과제별로 작성함
 (I. 총괄과제, II. 제1세부과제, III. 제2세부과제.....)

편집순서 4 : 요약문 (한글)

< 요약문 >

연구분야(코드)	I-3		과제번호	0910570
과제명	위암의 항암제 감수성 예측, 진단표지자 및 동물 모델 연구			
연구기간/연구비 (천원)	합계	2009년 3월 1일 ~ 2011년 12월 31일		510,000
	1차년도	2009년 3월 1일 ~ 2009년 12월 31일		170,000
	2차년도	2010년 1월 1일 ~ 2010년 12월 31일		170,000
	3차년도	2011년 1월 1일 ~ 2011년 12월 31일		170,000
과제책임자	성명	김학균	소속	분자종양학연구과
	전화번호	2238	전자우편	hkim@ncc.re.kr
색인단어	국문	항암제 감수성 예측 유전체		
	영문	Chemosensitivity prediction genomics		
<p>◆ 연구목표 <최종목표> 항암제 감수성 예측 및 진단 표지자를 탐색하고 유전자변형 마우스모델을 확립함</p>				
<p>◆ 연구내용 및 방법</p> <p>-동일한 항암화학요법 (5-FU/cisplatin) 을 시행 받은 환자의 치료 전 및 치료 후 내시경 검체에서 분리한 RNA/DNA 를 이용하여 comparative genomic hybridization (aCGH) 데이터 및 microRNA chip 데이터를 얻어서 이를 임상 정보 (항암제 내성) 와 연관시켜 발암 관련 및 항암제 내성 관련 mRNA, miRNA, 및 염색체 이상의 종합적인 분자 정보를 얻고 이를 항암제 내성 기전 연구에 응용하고자 하는 것임. 연구 결과 EGFR, FGFR, MYC 의 linear combination 인 3-gene predictive index 를 동일한 항암요법 (cisplatin / fluorouracil) 을 시행받은 별도의 validation set 환자 (27 명) 샘플에서 test 한 결과, 통계적으로 유의한 predictive power 를 확인할 수 있었습. 한편 이차내성 signature 를 기반으로 한 65-gene signature 도 환자의 치료반응을 예측할 수 있었습. 그리고 환자의 치료반응을 예측할 수 있는 58-microRNA signature 를 동정할 수 있었습.</p> <p>그리고 위암의 진단 및 치료표적분자 후보물질로 SOCS6, ADRM1 의 기능적 분석을 수행하였습.</p> <p>E-cadherin; Smad4; p53 triple knockout (Villin-cre; Cdh1^{F/wt};Smad4^{F/F};p53^{F/F})의 연구를 통해 위암의 syngeneic 동물 (cell line) 모델을 확립하고 이를 characterize 하고 있음.</p>				

<p>◆ 연구성과</p> <p>-정량적 성과</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>달성치/목표치¹⁾</th> <th>달성도(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SCI 논문 편수</td> <td>8/9</td> <td>89</td> </tr> <tr> <td>IF 합</td> <td>25/30</td> <td>83</td> </tr> <tr> <td>기타 성과</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>1) 총연구기간내 목표 연구성과로 기 제출한 값</p> <p>-정성적 성과 유전자변형 동종(syngeneic) 마우스 위암 모델 확립</p>			구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)	SCI 논문 편수	8/9	89	IF 합	25/30	83	기타 성과		
구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)												
SCI 논문 편수	8/9	89												
IF 합	25/30	83												
기타 성과														
<p>◆ 참여연구원 (최종연도 참여인원)</p>	성명	김학균,												

* 요약문의 총분량은 2page 이내로 제한함

Project Summary

Title of Project	Prediction of chemosensitivity, diagnostic markers, and genetically-engineered models for gastric cancer
Key Words	Chemosensitivity prediction genomics
Project Leader	Hark Kyun Kim
Associated Company	
<p>The goal of this project is prediction of chemosensitivity, finding diagnostic markers and establishing genetically-engineered models for gastric cancer</p> <p>RNA was isolated from frozen tissue samples of gastric cancer biopsies from 20 patients using both histologic macrodissection and LCM techniques. RNA from LCM was subject to an additional round of T7 RNA amplification. Expression profiling was performed using Affymetrix HG-U133A arrays. Genes identified in the expression signatures from each tissue processing method were compared to the set of genes contained within chromosomal regions found to harbor copy number aberrations in the tumor samples by array CGH and to proteins previously identified as being overexpressed in gastric cancer.</p> <p>The tumor sampling technique biases the microarray results. LCM may be a more sensitive collection and processing method for the identification of potential tumor suppressor gene candidates in gastric cancer using expression profiling.</p>	

To identify transcriptional profiles predictive of the clinical benefit of cisplatin and fluorouracil (CF) chemotherapy to gastric cancer patients, endoscopic biopsy samples from 96 CF-treated metastatic gastric cancer patients were prospectively collected before therapy and analyzed using high-throughput transcriptional profiling and array comparative genomic hybridization. Transcriptional profiling identified 917 genes that are correlated with poor patient survival after CF at $P < 0.05$ (poor prognosis signature), in which protein synthesis and DNA replication/recombination/repair functional categories are enriched. A survival risk predictor was then constructed using genes, which are included in the poor prognosis signature and are contained within identified genomic amplicons. The combined expression of three genes—MYC, EGFR and FGFR2—was an independent predictor for overall survival of 27 CF-treated patients in the validation set (adjusted $P = 0.017$), and also for survival of 40 chemotherapy-treated gastric cancer patients in a published data set (adjusted $P = 0.026$). Thus, combined expression of MYC, EGFR and FGFR2 is predictive of poor survival in CF-treated metastatic gastric cancer patients.

Additionally, we found candidates for diagnostic molecular marker ADRM1 and SOCS6 and performed the functional analysis.

We established the syngenic mouse and cell line model for gastric cancer using E-cadherin; Smad4; p53 triple knockout (Villin-cre; Cdh1^{F/wt}; Smad4^{F/F}; p53^{F/F}) mouse

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

편집순서 6 : 연구결과

1. 연구의 최종목표

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

항암제 감수성 예측 및 진단 표지자를 탐색하고 유전자변형 마우스모델을 확립함

-상기 목표를 위한 항암제 예측 도구 적합화 및 표지자 탐색

-유전자 변형 위암 마우스모델 확립

2. 연구의 내용 및 결과

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

Part I. 항암제 감수성의 임상적 예측모델 확립 및 분자적 기전 연구

이 project 에서 목적하는 바는, 동일한 항암화학요법 (5-FU/cisplatin) 을 시행 받은 환자의 치료 전 및 치료 후 내시경 검체에서 분리한 RNA/DNA 를 이용하여 comparative genomic hybridization (aCGH) 데이터 및 microRNA chip 데이터를 얻어서 이를 임상 정보 (항암제 내성) 와 연관시켜 발암 관련 및 항암제 내성 관련 mRNA, miRNA, 및 염색체 이상의 종합적인 분자 정보를 얻고 이를 항암제 내성 기전 연구에 응용하고자 하는 것이었임.

Ia. 항암제 감수성 유전체 예측 3-gene signature

EGFR, FGFR, MYC 의 linear combination 인 3-gene predictive index 를 동일한 항암요법 (cisplatin / fluorouracil) 을 시행받은 별도의 validation set 환자 (27 명) 샘플에서 test 한 결과, 통계적으로 유의한 predictive power 를 확인할 수 있었음 (adjusted $P=0.015$; hazard ratio, 1.01; 95% CI, 1.00-1.01).

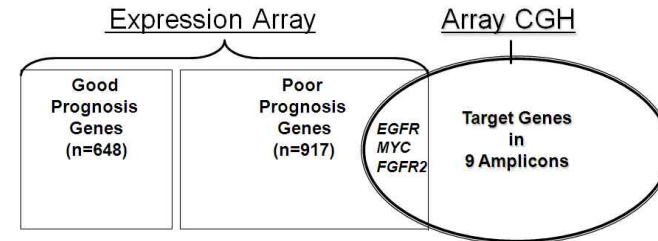


Figure 1. Three genes -EGFR, FGFR2, and MYC-overlap between genes whose array expression levels correlated with survival times(96 training set patients, $P<0.05$) and gene copy number changes determined by array CGH(tumor/normal \log_2 ratio >2 for ≥ 5 consecutive probes).

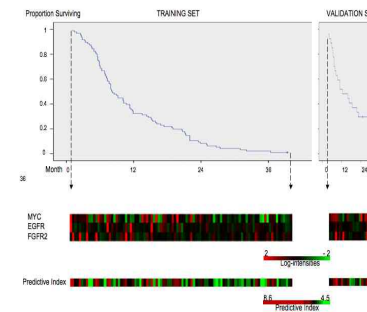


Figure 2. Affymetrix array expression levels of MYC, EGFR, and FGFR2 in 96 training set samples(left) and 27 validation set samples(right), shown with Kaplan-Meier plots for overall survival. Samples are ordered by the increasing survival period of patient from left to right, for the training and validation sets, respectively. A 3-gene predictive index for each patient based upon the 3-gene predictor is indicated below.

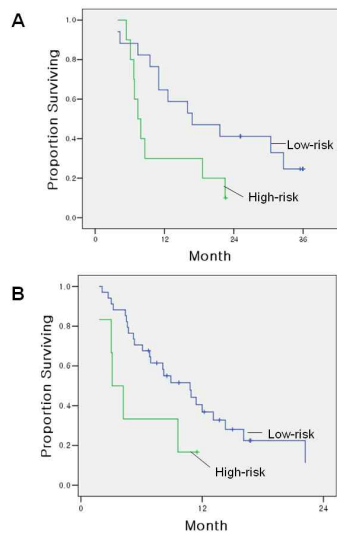


Figure 3. (A) Kaplan–Meier survival curves for the 2 risk groups of the validation cohort predicted by 3–gene predictor. Patients at a high risk (predictive index percentile $\geq 67\%$; $n = 10$) had significantly shorter median survival than patients at a low risk ($n = 17$) (7.4 vs. 16.8 months; Log–rank $P=0.047$). Green and blue lines represent overall survival curves for the predicted high– and low–risk groups, respectively. (B) Kaplan–Meier survival curves for the 2 risk groups of the published microarray dataset from 40 metastatic gastric cancer patients treated with either fluorouracil–based regimens or cisplatin/irinotecan combination chemotherapy regimen. Patients at a high risk (predictive index percentile $\geq 67\%$; $n = 6$) had shorter median survival than patients at a low risk ($n = 34$), at a borderline significance (3.1 vs. 10.8 months; Log–rank $P=0.056$). Green and blue lines represent overall survival curves for the predicted high– and low–risk groups, respectively.

Table 1. Cox regression analyses of the 3-gene predictive index percentile, as a continuous variable, for 27 patients in the validation set ¹

	Overall survival		Time to progression	
	<i>P</i>	HR ¹ (95% CI) ²	<i>P</i>	HR (95% CI)
<i>Univariate</i> ³				
3-gene predictive index percentile ³	0.050	1.015 ⁴ (1.000-1.030)	0.026	1.017 (1.002-1.031) ⁴
<i>Multivariate</i> ⁴				
3-gene predictive index percentile	0.017	1.023 (1.004-1.042)	0.014	1.023 (1.005-1.043)
Age ≥ 70 years ⁵	0.027	7.614 (1.257-46.130)	0.144	3.605 (0.646-20.112) ⁶
Poor performance status (ECOG PS ⁶ 2 or 3)	0.346	2.130 (0.442-10.258)	0.074	4.829 (0.861-27.086) ⁶
Second-line chemotherapy	0.041	4.231 (1.064-16.831)	0.011	5.992 (1.502-23.902) ⁶
Diffuse histological type	0.773	1.164 (0.415-3.263)	0.280	1.774 (0.626-5.025) ⁶

¹Hazard ratio⁴

²Confidence interval⁴

³Computed based on weighted average of log intensities of the 3 genes (*EGFR*, *FGFR2*, and *MYC*) obtained using a proportional hazards regression on the first 2 principal components of the log signal intensities of those 3 genes.⁴

⁴Adjusted hazard ratio for each percentile increase in 3-gene predictive index percentile. For example, a predictive index percentile of 100 (the highest predictive index) is associated with a hazard ratio of 4.4 ($=1.015^{100}$), compared with a predictive index percentile of 0 (the lowest predictive index). The median predictive index (50%) is associated with hazard ratios of 2.1 ($=1.015^{50}$), compared with the lowest predictive index.⁴

⁵For patients aged ≥ 70 years, the treatment schedule for fluorouracil could be shortened at the discretion of the oncologist to 3 instead of 5 days.⁴

⁶Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status⁴

Table 2. Cox regression analyses of the 3-gene predictive index percentile, as a continuous variable, for published DNA microarray data from 40 metastatic gastric cancer patients treated with either fluorouracil-based chemotherapy or cisplatin/irinotecan combination chemotherapy ¹

	Overall survival ¹	
	<i>P</i>	HR ¹ (95% CI) ² ⁴
<i>Univariate</i> ³		
3-gene predictive index percentile	0.047	1.014 (1.000-1.027)
<i>Multivariate</i> ⁴		
3-gene predictive index percentile	0.026	1.017 ³ (1.002-1.032) ⁴
Performance status ≥ 1	0.028	3.008 (1.129-8.016) ⁴
Age ⁴	0.766	0.995 (0.961-1.030) ⁴
Male	0.538	1.359 (0.512-3.605) ⁴
FU-based chemotherapy regimen ⁵	0.744	0.854 (0.332-2.199) ⁴

¹Hazard ratio⁴

²Confidence interval⁴

³Adjusted hazard ratio for each percentile increase in 3-gene predictive index percentile. For example, a predictive index percentile of 100 (the highest predictive index) is associated with a hazard ratio of 5.4 ($=1.017^{100}$), compared with a predictive index percentile of 0 (the lowest predictive index).⁴

⁴as a continuous variable⁴

⁵as compared to the irinotecan/cisplatin combination chemotherapy regimen⁴

Table 3. Regression analyses of the 3-gene predictive index for radiographic response of 150 patients with measurable disease, including patients represented by the published dataset ^{1,2}

	Radiographic response ¹			Overall survival ²	
	SS ²	F	P ³	P	HR ⁴ (95% CI) ⁵
<i>Univariate</i> ⁶					
3-gene predictive index ⁶	1.169	5.63	0.019	0.046	1.270 ⁷ (1.004-1.607) ⁴
<i>Multivariate</i> ⁶					
3-gene predictive index	1.081	5.14	0.025	0.030	1.298 (1.026-1.643) ⁴
Age ≥ 70 years	0.004	0.02	0.888	0.187	1.503 (0.821-2.754) ⁴
Poor performance status (ECOG PS ⁸ 2 or 3)	0.018	0.08	0.773	0.050	1.920 (1.000-3.685) ⁴

¹Clinical benefit (partial response and stable disease according to the WHO criteria) versus no clinical benefit (progressive disease)¹

²Sum of squares (type III)¹

³P>F based on the general linear model¹

⁴Hazard ratio¹

⁵Confidence interval¹

⁶Computed based on weighted average of log intensities of the 3 genes (*EGFR*, *FGFR2*, and *MYC*) obtained using a proportional hazards regression on the first 2 principal components of the log signal intensities of those 3 genes.¹

⁷Hazard ratio for each unit (*i.e.*, 1.0) increase in 3-gene predictive index, which ranges from -0.766 to 3.327 (*i.e.*, the highest predictive index (3.327) is associated with a hazard ratio of 2.7 (=1.27^{3.327}), compared with the lowest predictive index (-0.766)).¹

⁸Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status¹

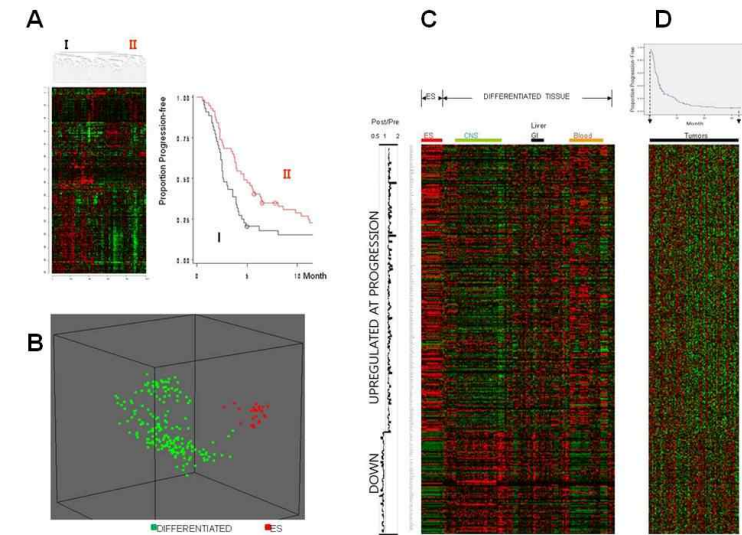


Figure 4. (A) Hierarchical clustering of 101 pretreatment patient samples using the “ES set without proliferation genes signature”. Kaplan–Meier plots for time to progression (TTP) of patients in each cluster generated are shown on the right side. Patients in high risk cluster (I) (n=44, high expression of “ES set without proliferation genes”) had a significantly shorter TTP than patients in the low risk cluster (II) (n=57, low expression) (2.6 vs.4.7months; Log–rank P value=0.014). (B) Principal component analysis plot using a published U133A microarray meta–analysis dataset¹⁴containing 24 human ES cell samples(*shown in red*) and 193 various fetal and adult differentiated tissue samples(*shown in green*) using the 633–gene acquired resistance signature (feature selection P<0.01). Each sphere represents a single sample. Samples whose expression profiles of 633 genes are similar are shown close together. (C) Expression of the 633–gene acquired resistance signature using the same published meta–analysis microarray data¹⁴asin(B). Heatmap generated using a log₂–pseudocolorimagerwithgene centering. Genes up–regulated in the chemoresistant state of our study patients (post/pre>1) show coordinated overexpression in ES cells(*left*),while genesdownregulatedinthechemoresistantstate(post/pre<1)showcoordinated overexpressionindifferentiatedtissuesamples(*right*).

앞서 발견한 어떤 predictor 보다도 ES cell signature without proliferation signature 가 TTP 와 긴밀한 관계를 보였기 때문에, stem cell 의 regulatory circuit 을 규명하는 것이 항암제 내성 극복에서 가장 중요한 과제임을 알게됨. 따라서 위암의 mouse model 을 만들어 stem cell

특히 위의 Fig 3B에서 보는 바와 같이, 별도의 40 명의 일본인 환자에서도 통계적으로 유의한 생존기간 예측이 가능하였습.

Ib. 항암제 내성에 관여하는 tumor initiation clone 동정:

72–gene signature

본 연구자들은 이차내성이 발생한 환자 중 연구의 목적에 동의하여 IRB–approved informed consent 에 서명한 일부의 환자 (n=22) 로 부터 이차내성 발생시의 임상검체를 채취할 수 있었습. 이 환자들은 모두 치료에 잘 반응하였던 환자들이기 때문에, 치료 전후의 expression profile 을 비교하여 이차내성의 signature 를 정의할 수 있었습. P<0.01에서 이차내성이 발생한 시점 (chemoresistant clones) 과 치료 전 (chemosensitive clones) 에서 유의한 차이를 보이는 633 개의 유전자를 분석하였을 때, embryonic stem signature 와 유사한 profile 이 보이는 것을 관찰한 바 있습. Embryonic stem cell signature 도 아래 Fig 4A 와 같이 101 명의 치료반응 (time to progression) 을 예측할 수 있었으며, 한편 본 연구자가 define 한 이차내성 signature 가 differentiated tissue 와 embryonic stem cell 을 뚜렷히 구분할 수 있었고 (Fig 4B and Fig 4C) 역시 101 명의 치료반응 (time to progression) 을 예측할 수 있었습 (Fig 4D).

population 을 규명하는 것으로 연구를 계속하게 되었습.

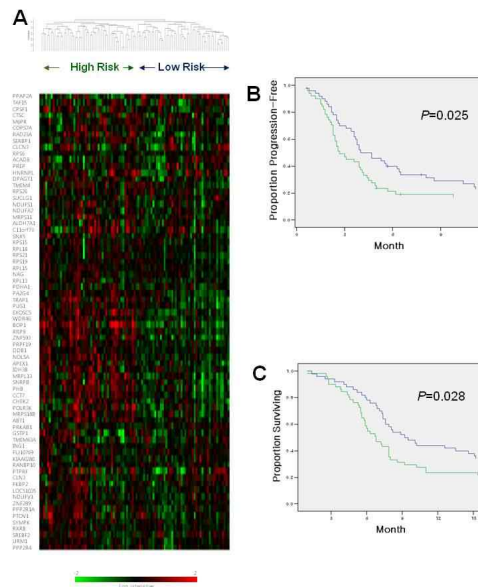


Figure 5. (A) Hierarchical clustering of the 101 gastric cancer samples using the 72 genes that are upregulated at chemoresistant state ($P < 0.01$) and belong to “EScell-related gene sets”. (B) Patients in high risk cluster according to (A) ($n=51$, high expression of 72 genes) had a significantly shorter time to progression (TTP) than patients in low risk cluster ($n=50$, low expression) (2.7 vs.4.0 months; $P=0.025$). (C) Patients in high risk cluster according to (A) ($n=51$, high expression of 72 genes) had a significantly shorter survival than patients in low risk cluster ($n=50$, low expression) (6.8 vs.9.2months; $P=0.028$).

1c. 항암제 감수성 예측 58-microRNA signature

지금까지는 mRNA expression 을 이용한 chemotherapy response predictor 개발에 관한 성과를 기술하였으며 이제부터는 microRNA expression 을 이용한 성과를 기술하려고 함.

지난 연도에 42 명의 위암환자에 대해 pilot test 로 시행하였던 microarray microRNA study 를 expand 하여 총 90 명 환자의 치료전 내시경 생검 동결검체에 대한 microRNA microarray

Table 4. Multivariable Cox Regression Analyses of the 72-gene Predictive Index in 101 Separate (Non-rebiopsied) Gastric Cancer Patients^{a,b}

	Time to progression		Overall survival ^{c,d}	
	P	HR1 (95% CI2)	P	HR (95% CI)
72-gene predictive index	0.011	1.005 (1.001-1.009)	0.034	1.004 (1.000-1.008)
Poor performance status (ECOG PS5 2 or 3)	0.048	2.305 (1.009-5.266)	0.049	2.240 (1.005-4.992)
Age	0.268	0.9877 (0.965-1.010)	0.953	0.999 (0.976-1.023)
Female	0.100	1.566 (0.917-2.675)	0.156	1.462 (0.865-2.469)

analysis 를 시행하였으며 이에 덧붙여 8 명의 환자에 대해 acquired resistance 발생 시점에서 채취한 검체에 대해 microRNA microarray analysis 를 시행하였습.

즉 8 명의 환자는 치료 전과 치료 후 두 번의 시점에서 내시경 생검 조직이 채취된 경우이며, 따라서 이런 점을 고려하여 이 8 명의 환자를 validation set 으로 설정하고, 이 8 명의 환자를 제외한 82 명의 환자의 치료전 검체를 training set 으로 하여 predictive model 을 생성하였습.

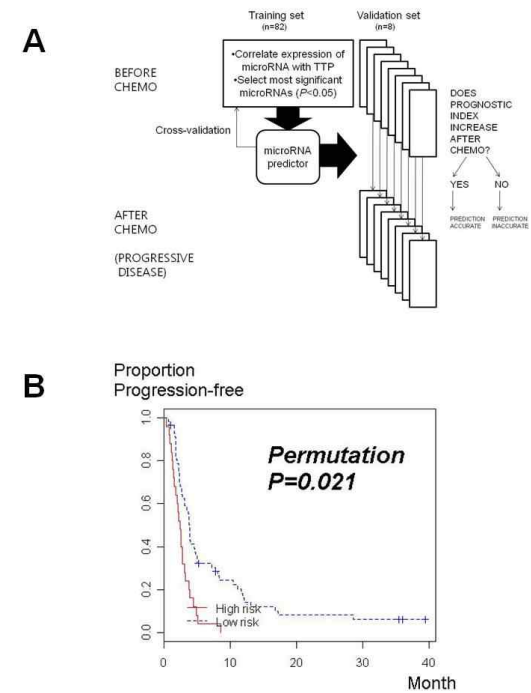


Fig 6. (A) Study scheme to identify and test miRNAs predictive of resistance to CF. (B)

Kaplan–Meier curves for the time to progression (TTP) of 2 risk groups stratified according to the expression of 58 miRNAs correlated with TTP at a feature selection $P < 0.05$. The association of miRNA expression data to TTP was statistically significant (permutation P value for log–rank statistics of cross–validated Kaplan–Meier curves = 0.021).

그 결과 위 Fig 6B 에서 보는 바와 같이 82 명의 환자에서 leave–one–cross validation 결과 misclassification rate 에 대한 permutation p value 가 0.05 이하로 robust 한 classifier 를 도출할 수 있었습.

이 classifier 를 8 명의 pretreatment 검체에 적용하여 microRNA signature 의 chemoresponse 에 대한 predictive power 를 검증한 결과 아래 제시한 Table 5 과 같이 100% 의 classification accuracy 를 보여 주었습. Overtraining 의 가능성을 배제하기 위하여 feature selection P value 를 변경하여 보아도 같은 결과를 확인할 수 있었습.

Table 5. Prediction for chemoresistance in the proof-of-principle test set.

Sample ID	Feature selection $P < 0.05$			Feature selection $P < 0.01$		
	Predictive Index Percentile ¹	Prediction for Pretreatment Sample ²	Overall Prediction ³	Predictive Index Percentile	Prediction for Pretreatment Sample	Overall Prediction
1 pre	39%	low	incorrect	35%	low	incorrect
1 post	22%			24%		
2 pre	48%	low	correct	49%	low	correct
2 post	79%			77%		
3 pre	55%	low	correct	46%	low	correct
3 post	73%			77%		
4 pre	13%	low	correct	24%	low	correct
4 post	72%			73%		
5 pre	31%	low	correct	33%	low	correct
5 post	48%			46%		
6 pre	13%	low	correct	27%	low	correct
6 post	16%			66%		
7 pre	7%	low	correct	12%	low	correct
7 post	66%			57%		
8 pre	52%	low	incorrect	50%	low	incorrect
8 post	17%			24%		

¹The predictive index was computed for each sample by this supervised principal component method, where a high value of the predictive index corresponds to a rapid progression after chemotherapy (*i.e.*, short TTP). If the predictive index of a sample in the test set corresponded to the median predictive index of the training set, the sample was assigned a 50% predictive index.

²The risk was predicted low, if predictive index percentile of the pretreatment sample was less than 67%.

³The prediction was considered correct if post-treatment samples were assigned a higher predictive index than pre-treatment samples.

그 다음으로는 이 predictor 를 치료 후 검체에 적용하였으며 치료 후 검체가 acquired chemoresistant state 에 collect 한 것이기 때문에 resistance profile 을 보일 것으로 예측하였는

데, 예상대로 6/8 (75%) 의 검체에서 chemoresistant profile 을 보이고 있었습. 따라서 82 명의 검체에서 확인한 chemoresistance microRNA signature 가 chemotherapy response 를 예측할 수 있는 predictor 로서의 가능성을 가지고 있음을 확인하였습.

**Part II. 위암 신규 진단 표지자 및 novel molecular target 동정:
Identification of novel therapeutic targets in chr20q**

20 명의 위암 환자에서 얻은 array CGH 결과 상, 여러 환자에서 amplify 되어 있으면서도 뚜렷한 oncogene 이 없는 locus 로 chr20q 를 찾을 수 있었습.

우리는 그 중 MYBL2 와 ADRM1 두 gene 에 focus 하였습.

Independent validation 을 위해서 위암 세포주 9 종으로부터 genomic DNA 를 분리한 다음, real time quantitative PCR 을 시행하여 cell line 에서의 copy number 변화를 확인하였습. 이 두 locus 는 특히 SNU-216 에서 copy number gain 을 보여 주었습.

Table 6. regions of amplification in 63 gastric cancer of 4th stage

a			b		
Rank	CytoBand	n=33	Rank	CytoBand	P-value
1	17q21.2	n=5	1	16p12.3	2.07E-14
2	16p12.3	n=4	2	11p14.1	1.17E-10
3	20q13.33	n=3	3	8q21.11 - q21.12	5.28E-10
4	10q26.13	n=3	4	7q31.31	5.86E-10
5	8q24.3	n=3	5	2p25.2 - p25.1	1.44E-08
6	18q11.2	n=2	6	13q21.1 - q22.2	3.98E-08
7	17q21.31	n=2	7	1p36.12	6.58E-08
8	17q12	n=2	8	10q26.13	1.88E-07
9	16q24.3	n=2	9	9q31.1	2.15E-07
10	16p13.3	n=2	10	16q24.3	2.17E-07
11	11p15.1	n=2	11	17q22	2.65E-07
12	9q34.13	n=2	12	19p13.3	2.84E-07
13	9p13.3	n=2	13	8q12.1 - q24.3	1.24E-06
14	8p21.3	n=2	14	8q21.11 - q24.3	1.43E-06
15	7p13	n=2	15	8q24.13 - q24.21	2.10E-06
16	5q33.1	n=2	16	8p23.1	3.36E-06
17	3q13.11	n=2	17	20q11.21 - q13.33	3.55E-06
18	2q37.3	n=2	18	20p13 - p11.21	3.79E-06
			19	8q24.3	4.66E-06
			20	20q11.22 - q13.33	4.69E-06

* Locus highlighted in red is involved in *ADRM1* gene.

33명의 4기 위암 환자의 조직을 CGH array를 통해 분석한 결과, a)3명의 환자가 *ADRM1*을 포함하고 있는 locus에서 amplification 되었으며, p-value 순에서도 높은 순위에 *ADRM1*이 이를 통해 *ADRM1*이라는 유전자를 선택해 study를 진행하였음. (Table1.)

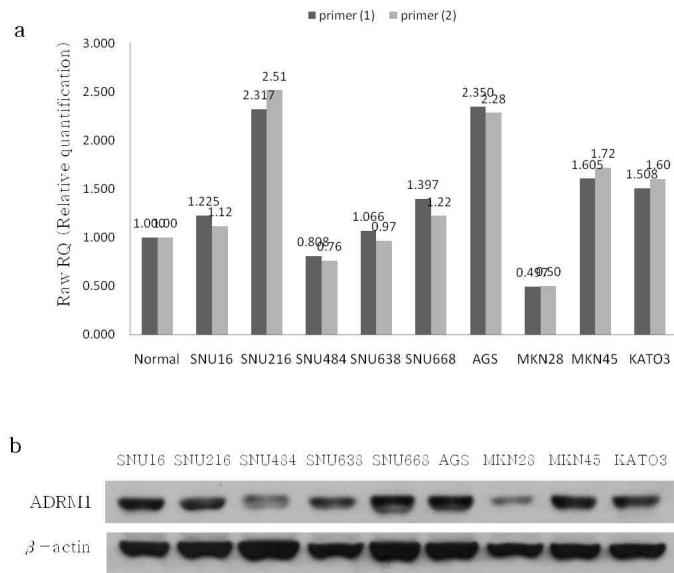


Figure 10. Copy numbers of *ADRM1* gene and endogenous protein levels of *ADRM1* in 9 gastric cancer cell lines. (a) After cancer cells and normal blood cells (for normal control) were harvested and their genomic DNAs were purified using DNeasy blood & tissue kit (QIAGEN, Hilden, Germany), quantitative PCR was performed to amplify *ADRM1* gene with 2 independent primer sets. Copy numbers of *ADRM1* gene were normalized to that of LINE1. This data shows that copy numbers of *ADRM1* gene in SNU-216, AGS, MKN45 and KATOIII cells were amplified when compared to female normal control. (b) To verify endogenous protein levels of *ADRM1* in those cells, Western blot analysis was performed. The amounts of *ADRM1* protein correlated with those of its genomic DNA with the exception of SNU-216.

Gastric cancer cell line에서도 copy number가 올라가 있는지 확인하기 위해 정상군의 blood에서 추출한 genomic DNA와 9개의 cell line의 genomic DNA로 realtime PCR을 수행하였음. SNU-216과 AGS에서 2배 정도 copy number가 올라가 있었음. 그 중에서 SNU-216과 data는 없지만 SNU-601을 가지고 실험을 진행하였음. (Figure 10)

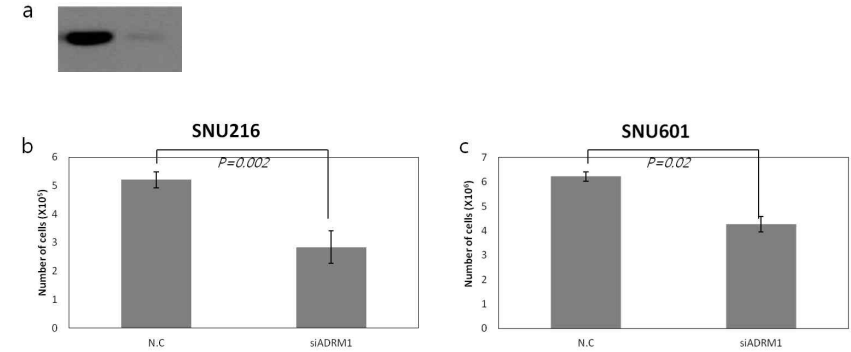


Figure 11. knock-down of *ADRM1* suppresses cell growth in 2 gastric cancer cells. cells were seeded onto 60 mm tissue culture dishes. After 24 hours, the cells were transfected with 20 nM negative control and *ADRM1*-targeting small interfering RNAs (siRNA) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, CA, U.S.A). The cells were transfected every 3 days for 9 days. After 9 days, the cells were counted with Contess automated cell counter (Invitrogen, CA, U.S.A). (a) Result of Western blot analysis with protein samples which were prepared from the counted cells shows *ADRM1* siRNA significantly knock-downed protein level of *ADRM1*.(b,c) The knock-down of *ADRM1* reduced cell growth rate by 40 percent. Data were mean \pm standard error (SE) . $P=0.024$ when compared to control cells with Student's *t*-test.

ADRM1 siRNA가 제대로 knock down이 되는지 확인하기 위해 SNU 601에서 western blot을 수행하였으며, cell proliferation에 차이가 나는지 보기 위해 *ADRM1* siRNA를 9일 동안 3일 마다 transfection하여 counting하였고 negative control siRNA에 비해 (a) SNU-216에서는 56%정도 떨어졌으며, (b)SNU-601에서는 32%정도 떨어졌음. (Figure 11)

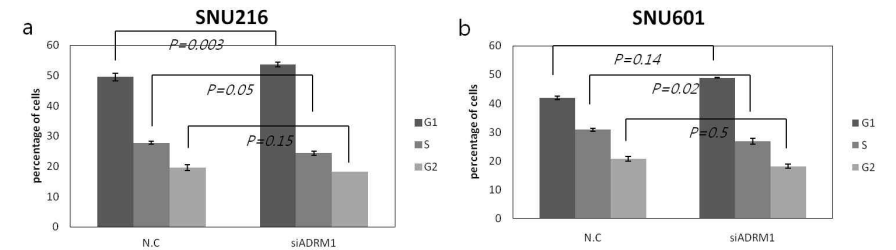


Figure 12. Knock-down of ADRM1 increases G1 and decreases S phases in cell cycle of 2 gastric cancer cell lines. SNU-216, SNU-601 cells were transfected with 20 nM negative control and ADRM1 siRNAs. After 48 hours, cell cycle analysis was performed by Flow Cytometry. Knock-down of ADRM1 suppressed G1/S transition. Data were mean \pm SE from three independent experiments.

이 2 cell line의 proliferation이 차이나 나는 이유를 알아보기 위해 cell cycle analysis를 수행하였으며 G1/S기 억제에 일어남.(Figure 12)

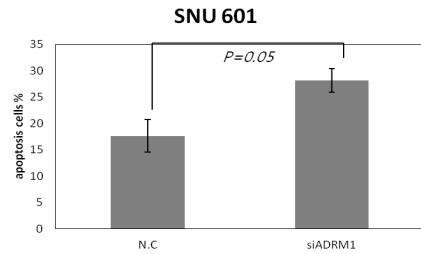


Figure 13. Knock-down of ADRM1 induces apoptosis by staurosporine (0.2 μ M) treatment. SNU-601 cells were transfected with 20 nM negative control and ADRM1 siRNAs for 24 hours. After 24 hours staurosporine μ M treatment, apoptotic cells were detected with Annexin V-FITC/PI doubling staining. Data were mean \pm SE from three independent experiments.

Staurosporine을 처리하였을 때 ADRM1 siRNA를 transfection시킨 SNU-601에서 apoptosis가 유도되었음. (Figure 13)

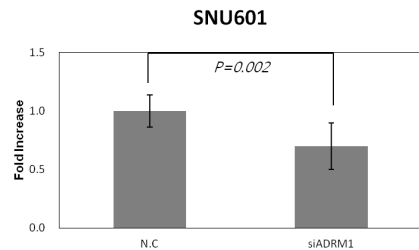


Figure 14. Knock-down of ADRM1 significant inhibited of SNU-601 cell invasion. SNU-601 cells were transfected with 20 nM negative control and ADRM1 siRNAs. After 72 hours, invasion of siRNA transfected cells were assayed by transwell system. Cells were resuspended at a density of 1×10^6 cells/ml and were added in transwell(Corning,U.S.A). After incubation for 12 hours, lower chamber of transwell was stained and cells were counted under a light microscope. Data were mean \pm SE from three independent experiments.

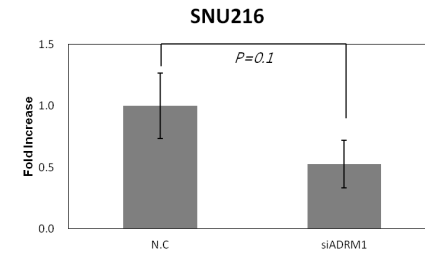


Figure 15. Knock-down of ADRM1 led to significant suppression of SNU-216 cell migration. SNU-216 cells were transfected with 20 nM negative control and ADRM1 siRNAs. After 72 hours, migration of siRNA transfected cells were assayed by chemotaxis system. Cells were resuspended at a density of 5×10^5 cells/ml and were added on membrane of 96 well chemotaxis plate(Neuroprobe,U.S.A). After incubation for 12hours, membrane was stained and cells were counted under a light microscope. Data were mean \pm SE from three independent experiments.

ADRM1 siRNA를 transfection시킨 gastric cancer cell line의 invasion과 migration능력을 알아보기 위해 실험을 수행하였으며 negative control siRNA에 비해 SNU-601에서는 30%정도 올라갔으며 (Figure 14), SNU-216에서는 50%정도 올라갔음 (Figure 15)

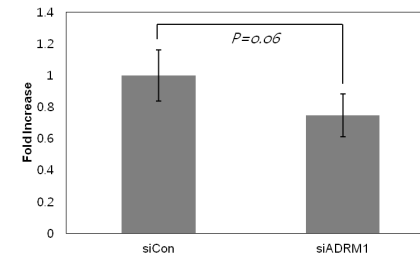


Figure 16. Knock-down of ADRM1 reduced Myc signaling.

ADRM1 siRNA를 transfection시켰을 때 myc signaling에 변화가 있는지 보기 위해 293 FT cell에 myc transcriptional luciferase reporter vector를 함께 transfection시켜 luciferase assay를 수행하였으며, negative control siRNA에 비해 26%정도 감소함. (Figure 16)

Part III. Smad4, E-cadherin, p53 의 knockout mice 를 이용한 위암 동물 모델 확립

이 project 는 크게 세 가지 목적으로 진행되었습

1. 위장관 암의 발암기전에서 E-cadherin, Smad4 의 역할을 밝히고자 함
2. 현재 국제적으로 유용한 모델이 존재하지 않는 위암의 GEM 모델을 만들어 항암제 개발을 촉진하고자 함
3. 위암의 tumor initiating cell 을 characterize 하고자 함.

E-Cadherin 은 diffuse type gastric cancer 의 75% 이상에서 deletion, methylation 등으로 functional loss 가 관찰되고 있어 역학적으로 위암의 발암기전에 매우 중요할 것으로 생각되고 있는 분자이며, SMAD4 는 위암의 발암기전에 중요한 것으로 알려진 TGF-beta signaling pathway 의 핵심적인 mediator 이고 그 자체 단독으로도 knockout 시 18 개월 쯤 mouse 에서 tumor 가 생기는 것이 알려져 있어 이들의 compound knockout mutant 로 위암의 GEM model 을 만들고자 한 것임.

위암의 GEM 모델을 만들기 위해 먼저 본 연구자는 villin Cre; ROSA26R-LacZ model 로 villin promoter 가 소장/대장 뿐 아니라 위점막에서도 active 한 것을 관찰한 선행 연구결과에 의거, 연구계획서에 기술한 대로 E-cadherin, Smad4, p53 의 compound knockout mice 를 Villin-cre 와 cross 하여 Villin-cre; Cdh1^{F/wt};Smad4^{F/F};p53^{F/F} 의 triple (E-cadherin, Smad4, p53) compound knockout 를 생성하여 종양 발생 여부를 모니터 하였습. 이 mouse 를 아래 Fig 18 에서 제시한 대로 double (Smad4;p53 와 E-cadherin; p53) knockout 및 p53 single knockout 의 phenotype 과 비교 관찰하였습.

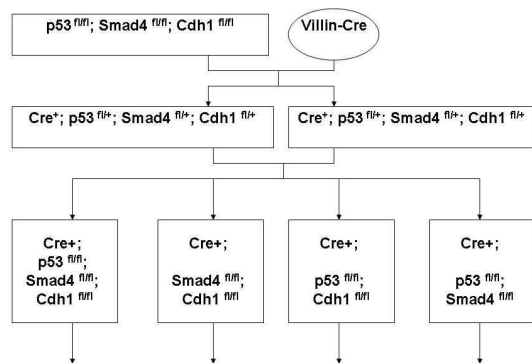


Figure 18. Breeding scheme to establish GEM model for gastric cancer

Villin cre+ 인 pup 의 경우, Cdh^{F/F}의 genotype 이 태어나지 않았고 모든 Villin-Cre + mouse

는 Cdh^{F/wt}이거나 Cdh^{wt/wt}습. 이로 볼 때 E-cadherin 이 위장관 development 에 필수적임을 알 수 있었습. 따라서 triple knockout 은, Cdh^{F/wt}의 genotype 을 가진 pup 을 관찰하였습. 위장관암의 발생을 monitor 하여 Stress sign (poor oral intake, vomiting, change in skin/hair/posture) 을 보이는 mouse 를 sacrifice 하였습. E-cadherin; Smad4; p53 triple knockout (Villin-cre; Cdh1^{F/wt};Smad4^{F/F};p53^{F/F})에서 Tumor 는 duodenum 과 colon 에서 주로 관찰되었으며 liver, peritoneum, lung 등의 metastasis 소견은 관찰되지 않았습. 병리소견상 모두 adenocarcinoma 의 소견을 보였습.

Triple (Villin-cre; Cdh1^{F/wt};Smad4^{F/F};p53^{F/F})과 double knockout mouse (Villin-cre; Smad4^{F/F};p53^{F/F})사이에 유의한 생존률의 차이가 관찰되었습 (Log-rank $P=0.042$)(Fig19). 이 생존률의 차이는 tumor penetrance 의 차이가 반영된 것으로, double knockout mouse 의 tumor penetrance 가 71% 였던 것에 비해 triple knockout 에서는 100% mice 에서 intestinal tumor 가 생겼습. P53 single knockout 의 경우 아직 tumor 가 document 된 mouse 는 없었으며, double knockout mouse 에 비해 생존기간이 유의하게 길었습(Log-rank $P<0.001$)

상기 데이터로 볼 때 Smad4 와 E-cadherin 이 synergistic 하게 intestinal carcinogenesis 에 causative role 을 하고 있고, E-cadherin 의 경우 single allele loss 만으로도 intestinal carcinogenesis 에 영향을 줌을 알 수 있습.

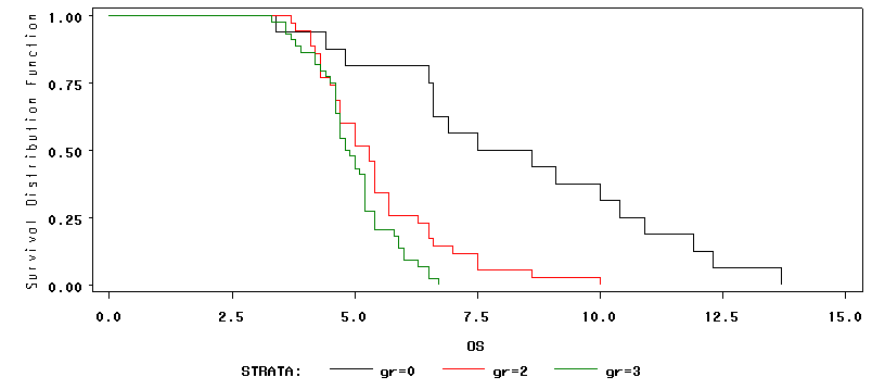


Fig 19. Kaplan-Meier survival plot of triple knockout (Villin-cre; Cdh1^{F/wt}; Smad4^{F/F}; p53^{F/F}, shown in green), as compared with double(Villin-cre; Smad4^{F/F}; p53^{F/F}, shown in red), or p53 single knockouts(shown in black).

현재까지 intestine 에서 먼저 tumor 가 생겨 위암의 tumor 발생을 관찰할 수 없었기 때문에 상기 molecular alteration 의 위암에서의 역할을 알기 위하여 Helicobacter felis 를 infect 시키는 실험조건을 확립하였습.

한편 *Helicobacter* 를 처리하지 않고 monitor 중인 Villin-cre; Cdh1^{F/wt};Smad4^{F/F};p53^{F/F} mouse 중에서도 한 마리에서 6 Mo 쯤 위암이 발생하였음. 이 위암은 human diffuse type adenocarcinoma 와 아주 유사한 조직학적 양상을 보이는 adenocarcinoma이었음 (Figure 20).

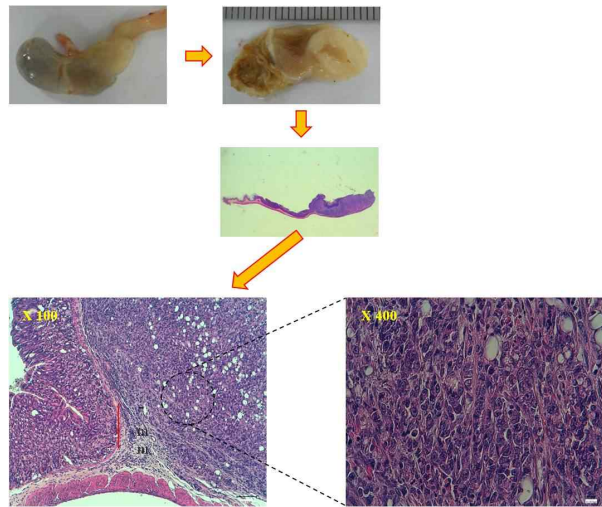


Figure 20. Generation of mouse gastric cancer from vSCP mouse and its histological feature.

이후 우리 마우스 모델의 발암기전 연구를 분자유전학적 수준에서 수행하기 위하여, 이 위암 조직을 이용하여 Primary culture 로 서로 다른 2 개의 clonal cell line 들 (w1900N-1와 w1900N-2) 을 확립하였음 (Figure 21).

이 cell 들의 분자적 특징을 Western blotting 으로 확인한 결과, control cell (ImSt; immortalized non-cancerous mouse gastric cell line) 에 비해서 Erk와 Stat3 signal이 강하게 활성화되어 있었으나 (K-RAS의 mutation analysis 결과, K-RAS의 mutation의 관찰되지 않았음) 반면 Akt signal의 활성화는 관찰되지 않았으며, 특히 w1900N-1 cell 의 경우에는 Pten과 P18 protein의 loss가 확인되었음 (Figure 22). 또한 이 cell 들을 이용하여 expression microarray를 수행 후 signal pathway를 분석(Ingenuity analysis database를 이용)한 결과, w1900N cell 들에서 NF-κB, Erk, Akt signal이 control cell 에 비해 활성화되어 있음을 확인함 (Figure 23). 이러한 분자적 특징은 사람의 많은 위암에서 흔히 관찰됨.

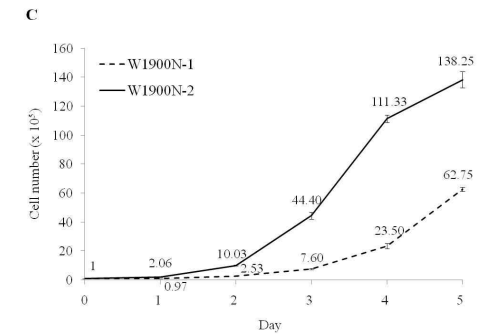
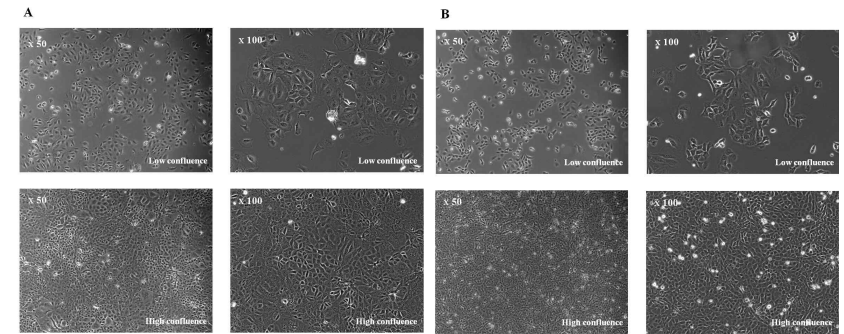


Figure 21. Cellular morphology and growth characteristic of W1900N-1 and -2 cells. (A and B) Morphological examination of non-confluent and confluent W1900N-1(A) and -2cells(B), which originated from the same mouse W1900N primary gastric tumor, by phase contrast microscopy(at 50x and 100x magnification) at passage 14 and 20, respectively. W1900N cells exhibited a spindle shaped epithelial morphology, although W1900N-1 cells were more prone to tightly anchored round-shaped colony formation. (C) Growth curve of W1900N-1 and -2 cells *in-vitro*. 100000 cells were plated on to 100mm tissue culture dishes. Cells were trypsinised and counted every 24h for 5 days by using Countess automated cell counter(Invitrogen, CA,U.S.A). The results shown are for an experiment representative of three independent assays. Results are shown as mean +/- standard error(SE). Doubling time of W1900N-1 and -2 cells were 13.82 hand 15.76h ,respectively, according to the following formula: $TD = T_x \log_{10}2 / \log_{10}(N/N_0)$ (TD: doublingtime, T: time interval, N: end-point cell number, N_0 :initial cell number). Time periods from Day 3 to Day 5 and from Day 2 to Day 4 were applied to T_{in} W1900N-1 and-2 cells, respectively.

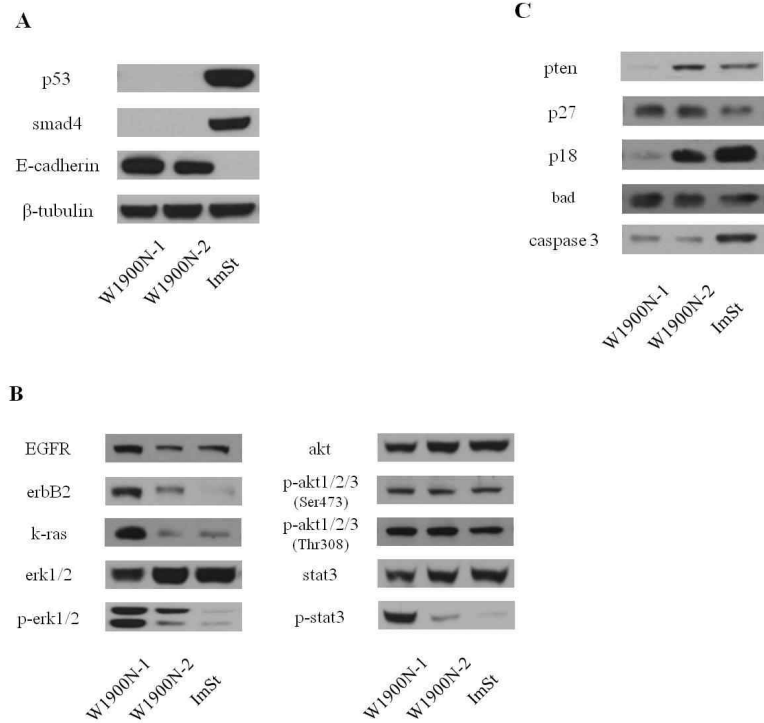
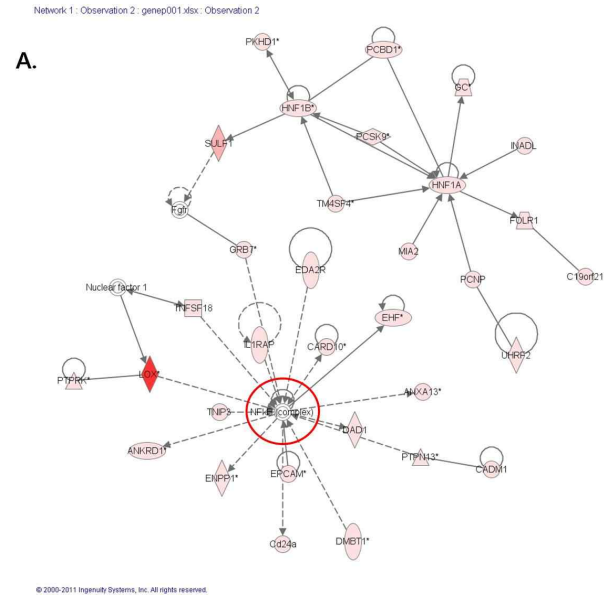


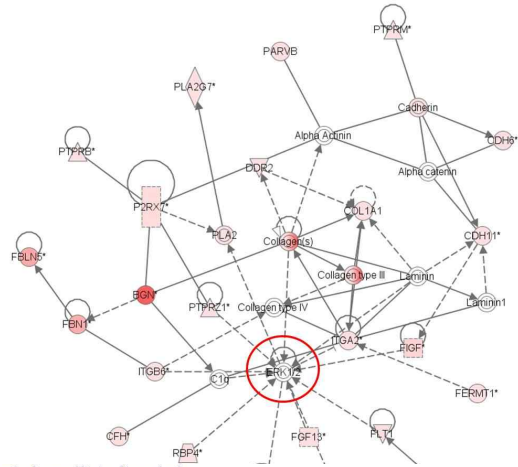
Figure 22. Confirmation of knock-out of *Tp53* and *Smad4* genes and molecular characterization of cellular state in W1900N cells by Western blot analysis.

1.5×10^5 W1900N and ImSt(Immortalized mouse stomach epithelium cells, kindly provided by R.H. White head at the Ludwig Institute for Cancer Research LTD.) cells were seeded onto 100mm tissue culture dishes. After 2 days with a normal growth condition(at 37°C and 5% CO_2 with 10% FBS-containing RPMI), W1900N cells were harvested for Western blot analysis. In ImSt cells, to inactivate SV40 T antigen, the cells were incubated at 39°C and 5% CO_2 for 36hours with serum-free RPMI(non-permissive condition), and then were transferred to the same normal growth condition(above mentioned). After 2 days, the ImSt cells were collected for the analysis. (A)Proteins of p53 and smad4 were not detected in both types of W1900N cells. Unexpectedly E-cadherin was silenced in normal control cells(ImSt). (B)erbB2 and k-ras oncoproteins were significantly overexpressed, and erk and stat3 oncoproteins were highly activated in W1900N-1 cells. K-ras mutation was not observed in W1900N cells by sequencing analysis with complementary DNA(data not shown). (C)Loss of tumor suppressor or pro-apoptotic proteins of pten, p18 and caspase-3 was detected in W1900N-1 cells.



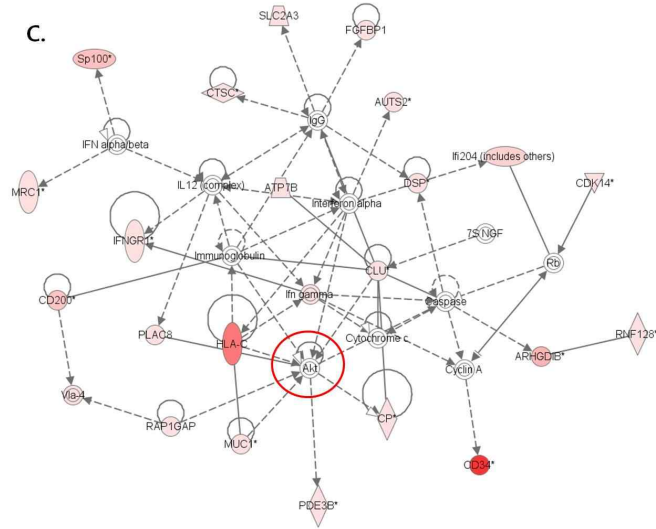
Network 3 : Observation 2 : gene001.xlsx : Observation 2

B.



Network 4 : Observation 2 : gene001.xlsx : Observation 2

C.



© 2000-2011 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Figure 23. Hyperactivated signal pathways in w1900N cells compared to control immortalized non-cancerous mouse gastric cell (ImSt) through expression microarray and Ingenuity analysis. (A) NF- κ B, (B) Erk, and (C) Akt signal pathway

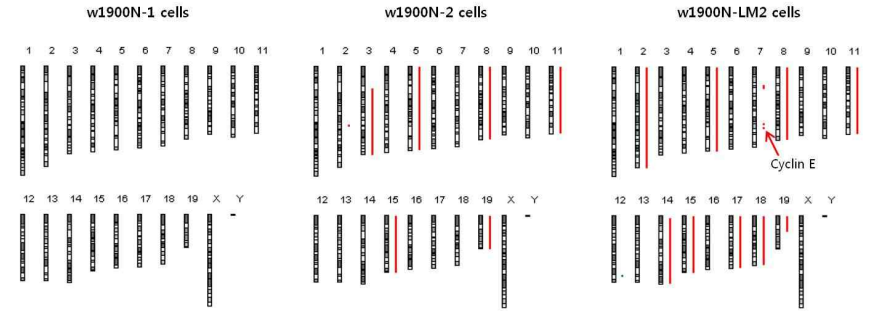


Figure 24. Genomic alteration status in w1900N cells through CGH microarray analysis.

한편으로 w1900N cell 을 SCID mouse 에 implantation 한 후, 폐로 전이된 tumor (LM1; Lung Metastasis 1 passage) 를 확립함. 이 tumor 조직을 다시 SCID mouse 에 implantation 하여 폐로 전이된 2차 tumor를 확립한 후, 이 tumor로부터 cell line 을 확립하여 w1900N-LM2로 명명함.

이렇게 확립된 세 개의 cell line의 genomic DNA를 추출하여 CGH microarray를 수행하여 genomic alteration (copy number change) 를 확인함. 놀랍게도 w1900N-1 cell 의 경우에는 genomic alteration 이 관찰되지 않았으나, w1900N-2 와 LM2 cell 에서는 global/focal genomic alteration이 관찰됨 (Figure 24).따라서 w1900N-2 와 LM2 cell 들은 w1900N-1 cancer cell clone에서 유래된 2차 cancer cell clone임을 추정해 볼 수 있음.

모든 세 cell line 들은 SCID mouse에서 종양발생능력 (tumorigenicity) 을 가지고 있으며, 특히 w1900N-LM2 cell 은 나머지 두 cell 들과는 달리 SCID 에서 폐로 전이가 잘 됨을 확인하였음 (Figure 25).이러한 특성으로 LM2 cell 은 향후 전이성 위암 마우스모델 확립 후 cancer drug의 효과를 검증하는 전임상 연구에 활용할 수 있으리라 판단

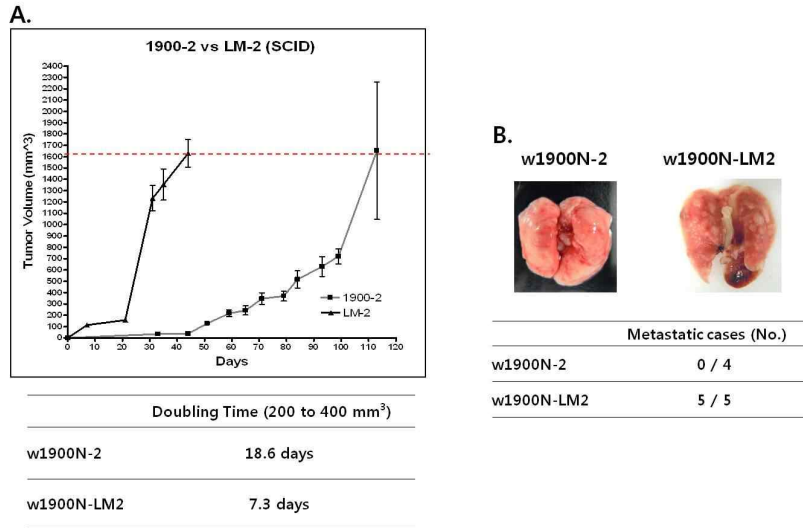


Figure 25. In-vivo growth and metastasis characteristics of w1900N cells in SCID mice.

현재까지 (human) cancer cell 을 mouse 에 implantation 하여 tumor 모델을 확립하기 위해서는 nude mouse 나 SCID mouse 와 같은 면역부전 (immune-compromised) mouse 를 거의 이용하고 있는데, 이는 tumor cell의 이종이식이 매우 어렵기 때문이다. 하지만 종양발생과 치료연구에 있어서 면역학적 현상이 점차 중요한 이슈로 대두됨에 따라 면역능력을 가진 (immune-competent) mouse tumor model 확립의 중요성이 증대되고 있는 실정임. Mouse 유래의 cancer는 mouse 에 implantation (동종이식)이 비교적 양호하기에 immune-competent (syngenic) mouse tumor model의 확립에 적용이 가능하리라 판단되어 관련 연구를 진행하였음. w1900N-1과 LM2 cell 을 syngenic mouse 에 implantation 한 결과, 예상대로 tumor 가 잘 형성됨을 확인할 수 있었음 (Figure 26).

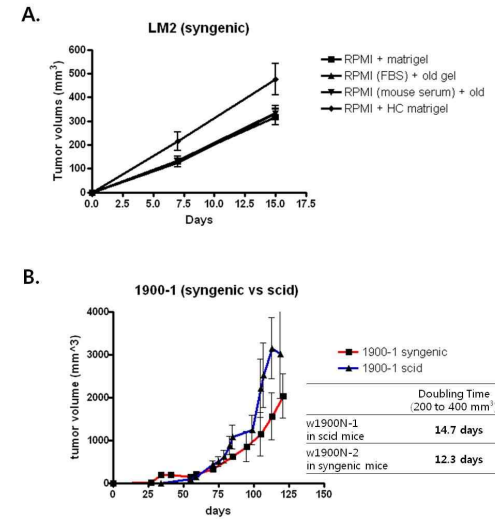


Figure 26. In-vivo growth characteristic of w1900N-1 and -LM2 cells in syngenic immune-competent mice.

이렇게 확립된 immune-competent gastric cancer mouse model을 종양의 면역학적 치료연구에 적용하여 그 의의를 검증하기 위해서 agonistic anti-4-1BB (CD137) antibody 를 우리의 마우스 모델에 처리함. Anti-4-1BB antibody 가 T cell이 정상적으로 기능하는 우리의 immune-competent mouse에서 tumor 발생억제 효과가 있음을 확인할 수 있었음 (Figure 27).

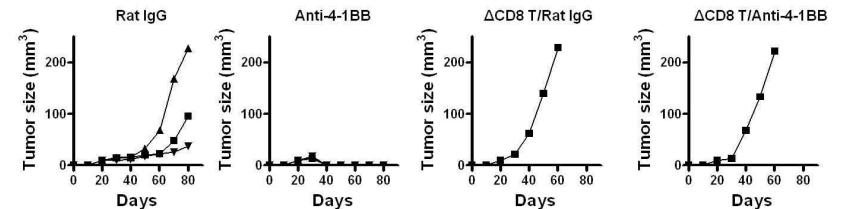


Figure 27. Immunological anti-cancer therapeutic application of w1900N cells with 4-1BB antibody in immune-competent syngenic mice.

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

-아직까지 항암제 치료에 대한 반응 예측을 가능하게 하는 지표가 발견되지 못했기 때문에, 현재는 무작위 적으로 항암제를 투여하고 반응을 기다릴 수 밖에 없는 상황인 반면 항암제는 독성이 매우 심한 약물들이므로, 유전체 예측모델을 사용해서 항암제가 반응하지 않을 것으로 예상되는 환자에서 해당 항암제를 사용하지 않고 다른 치료를 시행하는 것은 환자의 복지 및 국가 의료비 절감 차원에서 매우 중요함. 또한 국소진행암의 경우 항암제 반응 여부를 예측할 수 있다면 수술 이전에 항암제 치료를 통해 더 좋은 치료성적을 기대할 수 있겠음. 따라서 종합적으로 암환자의 진료에 있어서 항암제 감수성 예측인자 개발은 매우 큰 임상적 중요성을 가지고 있음.

-genome-wide 한 종양특이적 분자적 특성 분석은, 새로운 치료제 개발 및 조기진단 표지자 개발을 위해 응용될 수 있고, 국내 호발암을 대상으로 연구 중인 개개인의 암연구자가 연구데이터의 임상적 의미를 추가하거나 새로운 분자적 가설을 세울 수 있는 자료로 활용될 수 있음

-유전자변형마우스모델은 인체 임상검체를 이용하는 것에 비해 cancer stem cell population 을 동정하는데 있어서, 종양의 성장 및 전이의 수월성으로 인해 많은 잇점을 가지고 있음.

-한편 본 연구는 기 확보된 마우스모델에서 동정될 위암 stem cell signature 를 validate 할 수 있는 환자 data 를 함께 가지고 있기 때문에 실제 치료에 연결할 수 있는 중요한 고리를 확보하고 있음. 따라서 본 연구결과로 도출되는 항암제 내성 예측 모델은 임상적인 적용가능성이 어느 연구보다도 높다고 할 수 있겠음

-Cisplatin/fluorouracil 항암제 감수성 예측 모델을 실용화하는 방법론을 개발/검증하면, 종양환자의 임상치료를 현재의 무작위적 항암제 치료에서 유전적 정보에 근거하여 환자에게 맞는 항암제를 선택하는 개인화된 의료로 업그레이드시키게 됨. 다음과 같은 매우 중요한 활용이 예상됨

1. 불필요한 항암제 독성 노출 최소화
2. 항암제 효과 증대

특히 말기암환자는 치료를 받지 않는 경우 평균 수명이 3-5 개월에 불과하므로 1 차 치료 실패시 2 차 치료의 기회가 주어지지 않는 경우가 많음. 따라서 높은 효과가 예상되는 항암요법을 1 차 치료로 선택할 수 있는 것은 말할 수 없이 중요한 활용임.

3. 위암 진료의 새로운 가이드라인 제시

위암에서 항암화학요법의 적용을 보다 적절히 시행할 수 있음

4. 의료비 절감

필요한 경우에 필요한 항암제를 처방함으로써 인해 국가적으로 의료비 절감이 예상됨

-위암 줄기세포의 동정 및 항암제 내성과의 관련성 연구 결과는, 위암의 항암제 내성을 극복하는 target 을 명확히 함으로써 위암의 치료효과를 높이는 치료제 개발에 중요한 단서를 제공할 것이 예상됨

-종양 조직에서 확인된 진단 표지자가 혈청, 복수, 흉수, CSF 에서 검증되고 assay 법이 개발되면 다음과 같은 임상적 활용이 기대됨

1. 악성세포가 관찰되지 않는 위암의 전이

위암의 원격전이 중 많은 경우는 복수, 흉수, CSF 에서의 악성세포 존재 유무로 진단함. 그런데 >50% 에서 악성세포가 보이지 않으며 이 경우 현재 위암에 특이적인 진단표지자가 존재하지 않음으로 인해서 임상진료에 상당한 애로가 있는 현실임. 따라서 새로운 진단표지자가 동정/검증되면 위암의 전이 확인에 매우 유용함

2. 재발의 조기 진단

현재 재발의 진단은 CT 등 imaging 에 의존하고 있으나 간암 (AFP) 이나 난소암 (CA125)의 경우처럼 민감도/특이도가 높은 표지자를 위암에서도 찾을 수 있다면 비용 효과 면에서 매우 유용할 것임

3. 항암화학요법 평가

마찬가지로 CT 등 imaging 에 의존하는 현재의 임상행태에 중요한 진전을 가져올 것임.

-genome-wide 한 종양특이적 분자적 특성 분석은 임상정보와 함께 website 를 통해 전국의 암연구자가 공유하는 데이터로 활용할 수 있음. 국내의 많은 암연구자가 위암연구에 집중하고 있는 현실을 생각할 때, 본 연구를 통해 생성 분석되는 위암 유전체 데이터는 국내 암연구자에게 실제적인 도움이 될 것으로 기대됨.

-위선암의 유전자 재조합 마우스 모델은 국내 뿐 아니라 국제적으로도 독창적인 것으로, 위암의 발암 및 전이에 영향을 미칠 것으로 예상하는 분자 및 물질을 연구 개발하는 국내 많은 연구자의 연구에 매우 유용한 resource 로 활용될 것임

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 시작시점 이후 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⁾
Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry reveals decreased calyculin expression in small cell lung cancer	김학균 (교신)	Pathol Int (1.5)	2012 Jan;62(1):28-35	국외 SCI	0910570
Lipid profiles for intrahepatic cholangiocarcinoma identified using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry	김학균 (교신)	Clin Chim Acta (2.5)	2011 Oct 9;412(21-22):1978-82	국외 SCI	0910570
MicroRNA signature associated with outcome of gastric cancer patients following chemotherapy	김학균 (공동 제1)	BMC Med Genomics (3.7)	In press	국외 SCI	0910570
Protein and lipid MALDI profiles classify breast cancers according to the intrinsic subtype.	김학균 (교신)	BMC Cancer (3.2).	2011 Oct 27;11(1):465	국외 SCI	0910570
Distinctions in gastric cancer gene expression signatures derived from laser capture microdissection versus histologic macrodissection	김학균 (제1)	BMC Med Genomics (3.7)	2011 Jun 2;4:48.	국외 SCI	0910570
A Gene Expression Signature of Acquired Chemoresistance to Cisplatin and Fluorouracil Combination Chemotherapy in Gastric Cancer Patients	김학균 (제1)	PLOS ONE (4.4)	2011 Feb 18;6(2):e16694.	국외 SCI	0910570
Three-gene Predictor of Clinical Outcome for Gastric Cancer Patients Treated with Chemotherapy	김학균 (제1)	Pharmacogenomics Journal (4.4)	2010 Dec 21. [Epub ahead of print]	국외 SCI	0910570
Combined expression of miR-122a, miR-1, and miR-200b can differentiate degraded RNA samples from liver, pancreas, and stomach.	김학균 (교신)	Pathol Int (1.5)	2011 Feb;61(2):67-72	국외 SCI	0910570

- 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	출원인	출원국	출원번호

1) 구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저 서

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

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

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

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
위암에 있어서 항암제 감수성 예측 및 진단 표지자를 탐색하고 유전자변형 마우스모델을 확립함	1차년도 2차년도 3차년도	항암제 감수성 predictor 개발	3-gene signature의 external validation set에서 통계적으로 유의한 예측력을 입증하였음		100
		새로운 표적치료의 후보물질 개발을 위한 중앙 특이 유전자 발굴 및 진단 표지자 탐색	ArrayCGH/microRNA를 통해서 후보물질 탐색을 성공적으로 수행중임		90
		유전자 변형 위암 마우스 모델 확립	위암에 adenocarcinoma primary cultured cell/ syngenic mouse model(xenograft) 확립		90

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
Array CGH, miRNA microarray 상 발견된 중앙특이분자의 작용기전 연구	위암의 유전체분석을 성공적으로 수행
Smad4, E-cadherin, p53 가 위 상피세포에서 선택적으로 결손된 유전자변형 마우스 phenotype 분석 위암의 tumor initiating clone 및 항암제 내성 expression signature 동정 및 functional validation	위암에 adenocarcinoma primary cultured cell/ syngenic mouse model(xenograft) 확립

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 과제인 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	3	
산업재산권 등록	1	GEM위암세포주확립
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

-유전자변형마우스모델은 인체 임상검체를 이용하는 것에 비해 cancer stem cell population 을 동정하는데 있어서, 중앙의 성장 및 전이의 수월성으로 인해 많은 잇점을 가지고 있으므로 scientific community 에 중요한 resource 가 됨

활용방안

1. Germline E-cadherin mutation 및 sporadic diffuse type gastric cancer 의 novel therapeutic target candidate 발굴에 활용
 2. 전이 억제제 개발을 위한 target 발굴에 활용
 3. 마우스 모델
- 위선암의 유전자 재조합 마우스 모델은 국내 뿐 아니라 국제적으로도 독창적인 것으로, 위암의 발암 및 전이에 영향을 미칠 것으로 예상하는 분자 및 물질을 연구 개발하는 국내 많은 연구자의 연구에 매우 유용한 resource 로 활용될 것임

6. 참고문헌

- 보고서 작성시 인용된 모든 참고문헌을 열거

7. 첨부서류

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

