

기관고유연구사업 최종보고서

(과제번호 : 1110260)

MicroRNA 발현 양상 분석을 통한 암의 진단과 치료 예측 및
예후인자의 발견

Expression of microRNA in cancer as predictive and
prognostic markers for diagnosis and treatment

과제책임자 : 이 현 성

국립암센터

(뒷면)

(측면)

↑
5cm
↓

MicroRNA
발현 양상
분석을
통한
암의
진단과
치료 예측
및
예후인자
의 발견

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

↑
6cm
↓

국립
암
센터

↑
3cm
↓

제 출 문

목 차

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “MicroRNA 발현 양상 분석을 통한 암의 진단과 치료 예측 및 예후인자의 발견” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2012. 11 . 07

국립암센터

과 제 책 임 자 : 이 현 성

연 구 원 : 박 인 혜

” : 이 건 국

” : 김 학 균

” : 장 희 진

제1세부과제명(과제책임자) : 이 현 성

제2세부과제명(과제책임자) : 박 인 혜

< 요약 문 >

(한글) ----- 1

(영문) ----- 3

1. 연구의 최종목표 ----- 5

2. 연구의 내용 및 결과 ----- 5

3. 연구결과 고찰 및 결론 ----- 6

4. 연구성과 및 목표달성도 ----- 7

5. 연구결과의 활용계획 ----- 10

< 요약 문 >

연구분야(코드)	과제번호			1110260
과제명	MicroRNA 발현 양상 분석을 통한 암의 진단과 치료 예측 및 예후인자의 발견			
연구기간/연구비 (천원)	합계	2011년01월01일 ~ 2012년12월31일	180,000	
	1차년도	2011년01월01일 ~ 2011년12월31일	80,000	
	2차년도	2012년01월01일 ~ 2012년12월31일	100,000	
	3차년도	년 월 일 ~ 년 월 일		
과제책임자	성명	이현성		
	소속	폐암연구과		
색인단어	국문	암, microRNA, 진단, 치료, 예측인자, 예후인자		
	영문	cancer, microRNA, diagnosis, treatment, predictive factor, prognostic factor		
◆ 연구목표 <최종목표> microRNA (miRNA) 발현 양상 분석을 통한 암의 진단과 치료 예측 및 예후인자의 발견 <당해년도 목표> 유방암과 식도암에서 혈액 또는 조직을 이용한 miRNA array				
◆ 연구내용 및 방법 - 최근 miRNA 의 발현이 여러 암에서의 발병과 경과에 미치는 영향에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있음. miRNA는 18-24개의 뉴클레오타이드로 구성된 작은 단일가닥 RNA로서, 직접 단백질을 coding 하지는 않지만, 상보적인 mRNA의 translation을 억제하고 degradation을 유도함으로써 해당 유전자의 발현을 조절하는 기능을 담당함. - 종양에서 miRNA는 종양억제 유전자의 기능 저해, oncogene의 발현 증가, 세포 주기 및 사멸 조절 등 다양한 기전을 통하여 종양을 발생하는 쪽으로 작용할 수 있고(예: miR-17-92) 반대로 oncogene을 억제하는 종양억제 효과를 나타내기도 함(예: let-7). - 국립암센터에서 2001년부터 2009년까지 식도 편평상피 세포암으로 수술을 시행 받은 환자의 수술검체에서 종양은행에 보편적인 cancerous 및 adjacent noncancerous tissue 108례 중 training 및 validation set으로 분류하여 분석하고자 함. 단, 이 환자들은 수술 외의 다른 치료는 시행 받지 않은 편평상피 세포암으로 국한함. - 무작위로 54명을 Training cohort 로, 나머지 54명을 test cohort 로 분류				

- Training cohort에서 recurrence를 end-point 로 하여 예후에 영향을 주는 miRNA signature 발굴 - 찾아진 recurrence 관련 miRNA signature를 test cohort에서 검증. - 또한, Pilot study 로 본원의 건강검진 센터를 내원한 건강한 5명과 유방암환자 (호르몬 수용체 양성, HER2 수용체 음성) 11명을 대상으로 혈액을 채취하여 시행한 miRNA microarray 를 분석해 보았을 때 정상과 대별되는 miRNA expression pattern 을 볼 수 있었으며 대상군의 blood에서 qRT-PCR 로 candidated miRNA (mir 1280, mir 720) 를 정량적으로 측정해 보았을 때도 정상인과 유방암 환자에서 의미있는 차이를 볼 수 있었음 - 두 miRNA 의 발현을 여러 종류의 cell lines 과 정상유방조직 및 유방암 조직에서 확인. - 유방암이 없는 건강한과 조기 유방암 환자, 전이성 유방암 환자의 혈액에서 miRNA 의 level 을 확인 - 조기 유방암 환자와 전이성 유방암 환자에서 일차 치료 후의 임상적인 반응과 혈액 내에서의 miRNA level 의 변화를 연관하여 분석. - 해당 miRNA 의 세포 내 역할을 anti-Mir 를 이용해 형태적 변화 및 연관된 gene expression 의 변화를 확인함.			
◆ 연구성과 - 정량적 성과			
	구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)
	SCI 논문 편수	4/3	133%
	IF 합	10.888/15	72.6%
	기타 성과		
1) 총연구기간내 목표 연구성과로 기 제출한 값 - 정성적 성과 · 식도편평세포암에서 수술 후 재발을 예측하는 miRNA signature를 찾음. · 이 signature 중 가장 영향력 있는 miRNA는 miR-886 및 mir-1269 2개의 miRNA 들의 조합으로도 재발을 충분히 예측. · mir-886은 miRNA가 아닌 100 base pair의 vault RNA 로 분류되어 있어, small non-coding RNA의 예후인자로의 재발견 · 혈액 내에서 정상인과 구별되는 유방암 환자에서 특이적인 miRNA 의 패턴을 확인함. · 특정 miRNA 가 종양의 양적인 증가와 같이 혈액 내에서의 level 도 증가되는 것을 확인함.			
◆ 참여연구원 (최종연도 참여인원)	성명	이현성, 김학균, 장희진, 이건국, 노정실, 이근석, 강주현	

* 요약문의 총분량은 2page 이내로 제한함

Project Summary

Title of Project	Expression of microRNA in cancer as predictive and prognostic markers for diagnosis and treatment
Key Words	cancer, microRNA, diagnosis, treatment, predictive factor, prognostic factor
Project Leader	Hyun-Sung Lee
Associated Company	None
Objectives	
<ul style="list-style-type: none"> - MicroRNAs (MiRNA) are non-coding RNA species that have a crucial role in growth, development, and cell death and differentiation. - To evaluate the correlation between miRNA microarrays from tissues or blood and clinical results or cancer recurrence in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and breast cancer 	
Methods	
<ul style="list-style-type: none"> - Microarray-based miRNA expression data from cancerous and adjacent noncancerous tissue pairs from 108 ESCC patients who underwent curative esophageal surgery without peri-operative chemo- or radio-therapy. - This cohort was randomly divided into discovery set and test set. - From the discovery set, miRNA signature to predict the tumor recurrence was found. - MiRNA signature was internally validated in test set. - miRNA expression array using blood samples of patients with breast cancer and those of healthy controls - check the blood levels of candidate miRNA using quantitative RT-PCR methods in large patient cohort. - mir-1280 gene cloning and transfection to MCF-7 cell line - MTT assay 	

Results
<ul style="list-style-type: none"> - In ESCC, 30 miRNA signature was found to predict the recurrence. - Among them, most potent miRNAs were mir-886 and mir-1269 to predict the recurrence. - These two miRNA signature predicted the recurrence in the discovery cohort ($p=0.006$). - Also, two miRNA signature was validated in the test cohort ($p=0.03$). - Mir-886 is not miRNA. Currently, the nomenclature of this RNA is vault RNA 2-1 (VTRNA2-1). - In breast cancer patients, profiles of circulating miRNAs were significantly different compared with those of controls - Of those, the levels of circulating mir-1280 and mir-720 were significantly elevated in blood of breast cancer patients. In addition, those levels showed a positive correlation with overall tumor burdens in each patients. - The mir-1280 and mir-720 were detected in breast cancer tissue, however they were not found in normal mammary tissue.
Conclusion
<ul style="list-style-type: none"> - VTRNA2-1 and miR-1269 signature predicts the recurrence in completely resected esophageal squamous cell carcinoma. - This signature should be externally validated. - In breast cancer, circulating microNAs, mir-1280 and mir-720, could be used as a potential biomarker of breast cancer. - Their functions should be addressed in a further study.

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

1. 연구의 최종목표

(1) 최종목표 : microRNA (miRNA) 발현 양상 분석을 통한 암의 진단과 치료 예측 및 예후인자의 발견

(2) 목표

1) 식도암

- 암재발 예측 miRNA signature의 발굴

2) 유방암

- 유방암 환자의 혈액 내에서 miRNA 의 expression profile 을 봄으로서 조직에서의 miRNA profile 과 비교하며, 또 정상과 구별되는 유방암 특이적인 miRNA 를 발굴

- 이후 치료 경과에 따른 miRNA 의 변화를 추적하여 marker로서의 유용성을 평가

2. 연구의 내용 및 결과

(1) 식도암

- 식도암과 정상식도의 비교를 통한 후보 miRNA 발굴; 108개의 식도암 조직 및 108개의 암주위 정상조직의 miRNA array

- 국립암센터에서 2001년부터 2009년까지 식도 편평상피 세포암으로 수술을 시행 받은 환자의 surgical specimen에서 분리되어 보관중인 cancerous 및 adjacent noncancerous tissue 108례 중 training 및 validation set으로 분류하여 분석하고자 함. 단, 이 환자들은 수술 외의 다른 치료는 시행 받지 않은 편평상피 세포암으로 국한함.

- 식도암 환자로부터 수술적으로 절제된 원발암 병소조직과 matched normal tissue 의 frozen tissue 를 section 하여 reference slide 를 H/E stain 시행. Reference slide 상 80% 이상의 중앙 세포를 포함하고 있는 부위를 manual dissection 해 냄. Tumor-rich area 에 해당하는 block 을 liquid nitrogen 하에서 crush 하고 homogenize 하여 Trizol reagent 로 total RNA isolation 시행 할 것임.

- miRNA expression level은 Affymetrix GeneChip® miRNA 2.0 Array를 이용하여 측정함.

- 무작위로 54명을 Training cohort 로, 나머지 54명을 test cohort 로 분류

- Training cohort에서 recurrence를 end-point 로 하여 survival 에 영향을 주는 30 miRNAs signature 발굴

- miRNA signature 중 expression 이 확연히 드러나는 2개의 miRNA (miR-886, miR-1269) selection

하여 재발 예측하여도 재발 예측 가능 하였고, 이들의 조합은 더욱더 의미 있음 ($p=0.006$).

- miR-886; high expression 일수록 good prognosis

- miR-1269; high expression 일수록 poor prognosis

- 찾아진 recurrence 관련 miRNA signature를 test cohort에서 validation 함.

- 세부과제에서 상세 기술.

(2) 유방암

- Pilot study 로 본원의 건강검진 센터를 내원한 건강인 5명과 유방암환자 (호르몬 수용체 양성, HER2 수용체 음성) 11명을 대상으로 혈액을 채취하여 시행한 microRNA microarray 를 분석해 보았을 때 Figure 1과 같이 정상과 대별되는 microRNA expression pattern 을 볼 수 있었으며 대상군의 blood에서 qRT-PCR 로 candidate microRNA 를 정량적으로 측정해 보았을 때도 정상인과 유방암 환자에서 의미있는 차이를 볼 수 있었음.

- 이 결과를 바탕으로 건강인 40명과 진단 당시의 조기유방암 환자 (N=187), 치료 전 전이성 유방암 환자 (N=37) 을 대상으로 혈액 내에서 mir-1280 과 mir-720 의 level 을 qRT-PCR 로 측정하여 비교하였음.

- mir-1280, mir-720 을 정상 유선 조직과 유방암 조직에서 발현 정도를 비교함. 비교 결과 정상 조직에서는 두 microRNA 가 거의 검출 되지 않은 반면 중앙 조직에서는 상대적으로 많이 발현됨을 확인하였음.

- 세부과제에서 상세 기술

3. 연구결과 고찰 및 결론

(1) 식도암

- 식도편평세포암에서 수술 후 재발을 예측하는 miRNA signature를 찾을 수 있었고, 이 중 가장 영향력 있는 miRNA는 miR-886 및 miR-1269 이었음.

- 이 2개의 miRNA 들의 조합으로도 재발을 충분히 예측.

- Internal validation 이 되었지만 external validation을 통한 증명이 필요함.

- miR-886 은, 현재는 dicer에 의해 20mer로 분리되지 않고 polIII와 관련이 없어 miRNA가 아닌 vault RNA 2-1 (VTRNA2-1)로 분류됨.

- 이 VTRNA2-1가 smoking 등에 fragile한 chromosome 5q31.1에 위치하며 여기에는 많은 tumor

suppressor gene이 모여있음. VTRNA2-1은 TGFBI(Transforming growth factor-beta induced) gene 과 Smad5 사이에 위치.

- VTRNA2-1이 high expression 이 good prognosis.
- mir-1269는 TargetScan에 의한 target prediction 시 FOXO1 gene 이 1순위로 예측됨.

(2) 유방암

- 본 연구는 혈중 유방암 특이적인 microRNA 를 가정하고 탐색적인 연구로 시작하였음. 정상인과 차이를 보인 microRNA 로 mir-1280 과 mir-720 를 확인하였음. 많은 수의 환자와 정상인에서 quantitative RT-PCR 의 방법으로 mir-1280 과 mir-720 의 혈중 level 에 있어 차이가 있다는 것을 확인하였으며 특히 종양이 양적으로 더 많이 증가되었을 때 각각의 microRNA 의 혈중 level 도 증가되는 것을 확인할 수 있었음.
- 또 전이성 유방암의 경우 치료 전과 치료 후에 mir-1280 과 mir-720 의 혈중 농도가 달라지는 것을 보아 치료의 반응 정도 및 향후 치료 반응 정도를 예측할 수 있는 생체 지표로 사용할 수 있을 가능성을 볼 수 있었음.
- 하지만 이런 microRNA 의 기능을 연구하기 위해 해당 microRNA 의 origin 및 세포 내 biogenesis 을 찾아 보던 중 해당 microRNA 가 특정 tRNA 의 일부일 가능성을 발견하게 됨.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 ¹⁾)	저널명(IF.)	Year; Vol(No):Page	구분 ²⁾	지원과제번호 ³⁾
The prognostic impact of microRNA sequence polymorphisms on the recurrence of patients with completely resected non-small cell lung cancer.	이현성 (교신)	Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery (3.406)	2012 Oct;144(4):794-807	국외 SCI	1110260
Patterns of Lymph Node Metastasis and Survival for Upper Esophageal Squamous	이현성 (제1)	The Annals of Thoracic	2011;92:1091-10	국외 SCI	없음

Cell Carcinoma		Surgery (3.741)	97		
Free jejunal graft for esophageal reconstruction using end-to-side vascular anastomosis and extended pharyngo-jejunostomy	이현성 (제1)	The Annals of Thoracic Surgery (3.741)	2012;93:1850-4.	국외 SCI	없음
Efficacy of intraoperative, single-bolus corticosteroid administration to prevent postoperative acute respiratory failure after oesophageal cancer surgery.	이현성 (교신)	Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery	2012 Oct;15(4):639-43.	국외	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
Circulating microRNAs as specific biomarkers for breast cancer.	In Hae Park, et al	AACR 2012	국외	1110260

1) 지역 : 국내, 국외

다. 산업재산권

구분 ¹⁾	특허명	출원인	출원국	출원번호

1) 구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저서

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

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
microRNA 발현 양상 분석을 통한 암의 진단과 치료 예측 및 예후인자의 발견	1차년도	종양은행을 통한 후보 miRNA 의 검증 및 예측 또는 예후인자로서의 역할 검증	종양은행의 식도암조직을 이용한 miRNA microarray 시행.	1	100
		유방암 조직과 혈액에서 microRNA expression array 를 통해 microRNA profile model 확립			
	2차년도	정상식도의 비교를 통한 후보 miRNA 발굴	후보 miRNA 찾고 validation.	2	75
		치료의 predictive marker 로서의 microRNA 발굴	전이성 유방암 환자에서 치료 전후의 혈액을 채취하여 microRNA expression 차이를 봄		
	3차년도				

평가의 착안점	자 체 평 가
식도암의 종양은행을 통한 후보 miRNA 의 검증 및 환자의 암재발과 생존분석을 통한 예측/예후인자 발굴	식도암수술 후 재발 예측하는 miRNA signature를 찾았고 validation 시행함. external validation 필요함.
정상인의 혈액과 유방암 환자의 혈액에서 차이를 보이는 microRNA 를 찾고 이를 RT-PCR 로 확인함.	discovery patients cohort에서 candidated microRNA 를 blood 내에서 qRT-PCR 로 검증을 하고 이후 validation patient cohort에서 확인함.
치료의 predictive marker 로서의 microRNA 발굴하고 그 기능을 세포주에서 확인함.	전이성 유방암 환자에서 치료 전후의 혈액을 채취하여 microRNA expression 차이를 봄. 세포 주에서 anti-mir 를 이용하여 cell 의 phenotype 변화를 관찰하였으나 특정 기능을 확인하지 못함.

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	2	Clinical Cancer Research (IF=7.742)
산업재산권 등록		특허 등록 예상 국가, 예상 특허명 등
기 타		

(2) 연구성과의 활용계획

- 본 연구결과 도출된 small non-coding RNA(VTRNA2-1, mir-1269, mir-1280, mir-720) 의 역할에 대해서 향후 biogenesis 과정에 대한 연구를 포함하여 cancer cell 과 미세환경과의 상호작용의 측면에서 그 기능에 대한 연구를 진행할 계획임.
- 향후 3년내에, 이들의 기능에서 유력후보물질들을 in vitro 실험을 통하여 밝히고, animal model 까지 확장적용.
- 또한 타장기 암종에 대한 이 microRNA 적용가능성 고찰.

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

목 차

I. 제1세부과제

세부과제명: 식도암의 microRNA 분석을 통한 예후인자 발견 및
 중앙표지자 발굴

세부과제책임자(성명/소속) : 이현성 (폐암연구과)

< 요약 문 >

(한글) ----- 13

(영문) ----- 15

1. 연구의 최종목표 -----17

2. 연구의 내용 및 결과 -----17

3. 연구결과 고찰 및 결론 -----23

4. 연구성과 및 목표달성도 -----28

5. 연구결과의 활용계획 -----30

6. 참고문헌 -----31

7. 첨부서류 -----33

<요 약 문>

연구분야(코드)				과제번호	1110260
과제명	식도암의 microRNA 분석을 통한 예후인자 발견 및 중앙 표지자 발굴				
연구기간/연구비 (천원)	합계	2011년 01월01일 ~ 2012년12월31일	120,000		
	1차년도	2011년 01월01일 ~ 2011년 12월31일	50,000		
	2차년도	2012년 01월01일 ~ 2012년 12월31일	70,000		
	3차년도	년 월 일 ~ 년 월 일	-		
과제책임자	성명	이현성			
	소속	폐암연구과			
색인단어	국문	식도암, microRNA, 예후인자			
	영문	esophageal cancer, microRNA, prognostic factor			
<p>◆ 연구목표 <최종목표> 식도암의 microRNA 발현 양상 분석을 통한 기능성 연구 및 예후인자 발견</p> <p><당해연도목표> 식도암 조직에서 microRNA microarray 및 후보 microRNA signature 발굴</p>					
<p>◆ 연구내용 및 방법</p> <p>- 최근 microRNA(miRNA)의 발현이 여러 암에서의 발병과 경과에 미치는 영향에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있음. miRNA는 18-24개의 뉴클레오타이드로 구성된 작은 단일가닥 RNA로서, 직접 단백질을 coding 하지는 않지만, 상보적인 mRNA의 translation을 억제하고 degradation을 유도함으로써 해당 유전자의 발현을 조절하는 기능을 담당함.</p> <p>- 식도암은 전세계적으로 발병하는 질환으로, 6위의 암사망율을 차지하는 질환이나, 조직 소견에 따른 유병율은 지역적 편차가 매우 큼. 식도암은 크게 편평세포암과 선암으로 분류되는데, 편평세포암은 동아시아에서 호발하는 것으로 알려져 있는 반면, 서구에서는 선암이 대다수를 차지함. 식도암의 경우 해부학적으로 장막이 없는 특징을 가지고 있어 주위 조직으로의 직접적인 침범이 쉽고, 주위 조직을 침범한 경우 심장 또는 기관지 등 수술적 절제가 불가능한 경우가 많으며, 절막하층의 잘 발달된 림프관은 초기에도 주위 림프관으로의 전이가 쉽게 일어나는 통로 역할을 하여, 이미 병기가 진행된 상태에서 발견되는 경우가 많음. 최근 수술과 더불어 항암약물치료나 방사선치료 등이 식도암의 예후를 향상시키고 있으나, 여전히 식도암 5년 생존률이 전체적으로는 10-20% 내외에 머무르고 있으며, 광범위 수술을 하는 일본의 경우 몇몇 기관에서 5년 생존률을 40% 내외로 보고하고 있음. 식도의 편평세포암의 경우 현재까지 여러 발암유전자 및 이와 관련된 단백질들에 대한 연구가 이루어져 오고 있으나, 분자표지자에 대한 연구는 아직 시작단계에 불과함.</p>					

<p>- 식도암의 경우 지역적으로 조직학적 특성이 극명히 구분되어 나타나는데, 서구에서는 Barrett 식도도 인한 선암의 경우가 많으나 아시아권에서는 편평세포상피암이 주된 병리학적 소견임.</p> <p>- 국립암센터에서 2001년부터 2009년까지 식도 편평상피 세포암으로 수술을 시행 받은 환자의 수술검체에서 중앙은행에 보관중인 cancerous 및 adjacent noncancerous tissue 108례 중 training 및 test set으로 분류하여 분석하고자 함.</p> <p>- 단, 환자 코호트의 균질성을 위해 수술 외의 다른 치료는 시행 받지 않은 편평상피세포암으로 국한함.</p> <p>- 무작위로 54명을 Training cohort 로, 나머지 54명을 test cohort 로 분류</p> <p>- Training cohort에서 recurrence를 end-point 로 하여 예후에 영향을 주는 miRNA signature 발굴</p> <p>- 찾아진 recurrence 관련 miRNA signature를 test cohort에서 검증.</p>														
<p>◆ 연구성과</p> <p>- 정량적 성과</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>달성치/목표치¹⁾</th> <th>달성도(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SCI 논문 편수</td> <td>4/2</td> <td>200%</td> </tr> <tr> <td>IF 합</td> <td>10.888/10</td> <td>108.88%</td> </tr> <tr> <td>기타 성과</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>1) 총연구기간내 목표 연구성과로 기 제출한 값</p>			구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)	SCI 논문 편수	4/2	200%	IF 합	10.888/10	108.88%	기타 성과		
구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)												
SCI 논문 편수	4/2	200%												
IF 합	10.888/10	108.88%												
기타 성과														
<p>- 정성적 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> 식도편평세포암에서 수술 후 재발을 예측하는 microRNA signature를 찾음. 이 signature 중 가장 영향력 있는 miRNA는 miR-886 및 mir-1269 2개의 miRNA 들의 조합으로도 재발을 충분히 예측. mir-886은 microRNA가 아닌 100 base pair의 vault RNA 로 분류되어 있어, small non-coding RNA의 예후인자로의 재발견 														
<p>◆ 참여연구원 (최종연도 참여인원)</p>	<p>성명</p>	<p>조재일, 이현성, 김학균, 장희진, 이건국</p>												

Project Summary

Title of Project	Expression of microRNA in esophageal squamous cell carcinoma as predictive and prognostic markers for diagnosis and treatment
Key Words	esophageal cancer, microRNA, diagnosis, treatment, predictive factor, prognostic factor
Project Leader	Hyun-Sung Lee
Associated Company	None
Objectives	
<ul style="list-style-type: none"> - MicroRNAs are non-coding RNA species that have a crucial role in growth, development, and cell death and differentiation. - To evaluate the correlation between miRNA microarrays from tissues and clinical results or cancer recurrence in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) 	
Methods	
<ul style="list-style-type: none"> - Microarray-based miRNA expression data from cancerous and adjacent noncancerous tissue pairs from 108 ESCC patients who underwent curative esophageal surgery without peri-operative chemo- or radio-therapy. - This cohort was randomly divided into discovery set and test set. - From the discovery set, miRNA signature to predict the tumor recurrence was found. - MiRNA signature was internally validated in test set. 	
Results	
<ul style="list-style-type: none"> - In ESCC, 30 miRNA signature was found to predict the recurrence. - Among them, most potent miRNAs were mir-886 and mir-1269 to predict the recurrence. - These two miRNA signature predicted the recurrence in the discovery cohort ($p=0.006$). - Also, two miRNA signature was validated in the test cohort ($p=0.03$). - Mir-886 is not microRNA. Currently, the nomenclature of this RNA is vault RNA 2-1 (VTRNA2-1). 	

Conclusion

- VTRNA2-1 and miR-1269 signature predicts the recurrence in completely resected esophageal squamous cell carcinoma.
- This signature should be externally validated.
- Their functions should be addressed in a further study.

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

1. 연구의 최종목표

(1) 최종목표 : 식도암의 microRNA 발현 양상 분석을 통한 기능성 연구 및 예후인자 발견

- 식도암 및 암 주위 정상조직의 miRNA microarray를 통한 발현 양상의 분석 및 암주위 정상 조직에 비해 식도암에서 통계적으로 유의하게 그 발현이 증가 또는 감소되어 있는 miRNA의 발견.
- 발견된 miRNA 와 환자의 생존자료와의 관계를 분석하여 환자의 예후와 관계된 miRNA의 발견.

2. 연구의 내용 및 결과

(1) 연구내용

1) Cohorts and clinicopathologic data

- 국립암센터에서 2001년부터 2009년까지 식도 편평상피 세포암으로 수술을 시행 받은 환자의 수술조직으로 종양은행에 보관중인 cancerous 및 adjacent noncancerous tissue 108쌍을 training 및 validation set으로 분류하여 분석하고자 함.
- 단, 코호트의 균질성을 위하여 이 환자들은 수술 외의 다른 치료는 시행 받지 않은 편평상피 세포암으로 국한함.
- 종양은행에서 얻은 tissue의 환자정보는 성별, 연령, 조직조건, 흡연력, 음주력, 병리학적 병기, 재발 또는 생존 여부 등을 포함함.

2) RNA isolation

- 식도암 환자로부터 수술적으로 절제된 원발암 병소조직과 matched normal tissue 의 frozen tissue 를 section 하여 reference slide 를 H/E stain 시행. Reference slide 상 80% 이상의 종양 세포를 포함하고 있는 부위를 manual dissection 해 냄. Tumor-rich area 에 해당하는 block 을 liquid nitrogen 하에서 crush 하고 homogenize 하여 Trizol reagent 로 total RNA isolation 시행.

3) miRNA expression microarray

- 전술한 방법대로 isolation 한 total RNA 0.5µg 을 이용하여 commercial miRNA microarray로 expression profile 을 얻음. miRNA expression level은 Affymetrix GeneChip® miRNA 2.0 Array 를 이용하여 측정함.
- Affymetrix GeneChip® miRNA 2.0 Array는 total probe set이 15,644개임. human mature miRNA 1,105개, human precursor miRNA 1,105개, human snoRNA and scaRNA 2,334개 있고 그 외 mouse와 rat miRNA를 포함함.

- 여기서 human mature RNA와 pre-miRNA 2,210 개만 분석.

4) 분석

- 무작위로 54명을 Training cohort 로, 나머지 54명을 test cohort 로 분류
- Training cohort에서 recurrence를 end-point 로 하여 예후에 영향을 주는 miRNA signature 발굴
- 찾아진 recurrence 관련 miRNA signature를 test cohort에서 validation

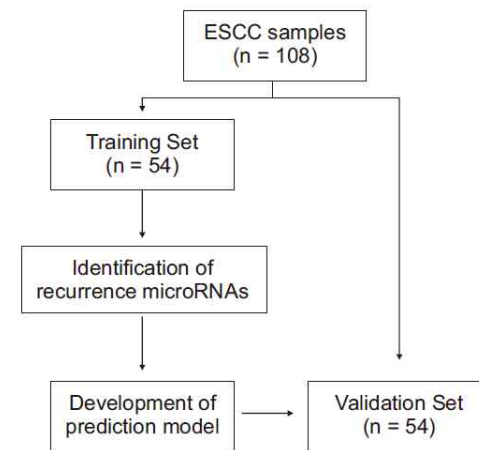


Figure 1. Schematic diagram

(2) 연구결과

1) 식도암 종양조직과 이웃한 정상조직간의 miRNA expression 차이

- 종양과 정상조직간의 microRNA 차이가 확연히 있음을 보여줌.
- 식도암에서 108 쌍의 종양과 주위정상조직에서 miRNA expression data Hierarchical clustering 시행함.
- 중위값과 비교하여 적어도 20조직 이상에서 2배이상 차이 나는 miRNAs expression을 hierarchical clustering analysis 하여 686 miRNA features 나옴.

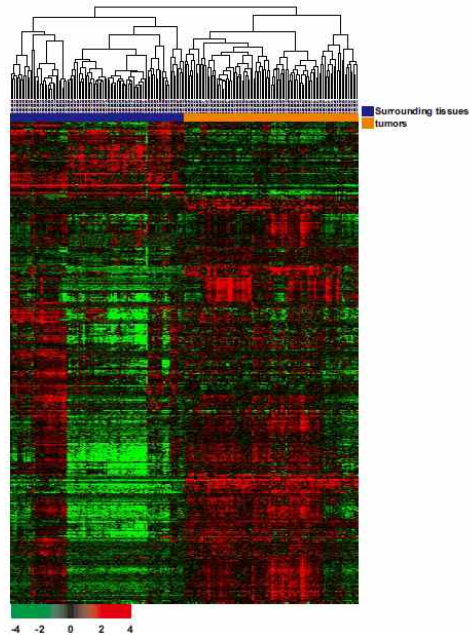


Figure 2. Hierarchical clustering analysis of microRNA expression data from patients with esophageal squamous cell carcinoma

The data are presented in matrix format in which rows represent individual gene and columns represent each tissue. Each cell in the matrix represents the expression level of a gene feature in an individual tissue. The red and green color in cells reflect relative high and low expression levels respectively as indicated in the scale bar (log2 transformed scale).

2) Training cohort 분석

- 54명의 training set에서 30개의 recurrence-associated miRNA expression signature 발굴.
- 이 miRNA signature는 recurrence free survival 이 의미있게 차이($p < 0.05$).

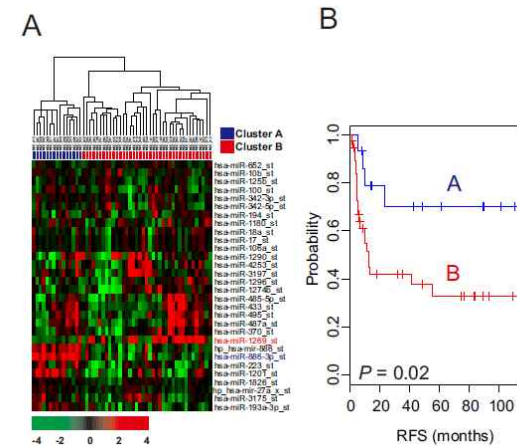


Figure 3. Hierarchical clustering analysis of recurrence-associated miRNA signature and recurrence-free survival according to the miRNA signature.

- 이 30 miRNAs signature 중 expression 이 확연히 드러나는 2개의 miRNA (hsa-miR-886-3p, has-miR-1269) selection하여 재발 예측하여도 재발 예측 가능 하였고, 이들의 조합은 더욱더 의미 있음 ($p=0.006$).
- miR-886; high expression 일수록 good prognosis
- miR-1269; high expression 일수록 poor prognosis
- mir-886은 mature form 뿐만이 아니라 precursor mir-886도 같은 expression을 보임.

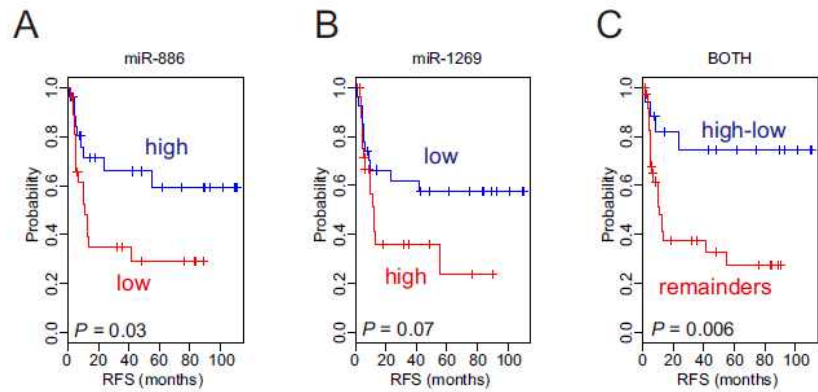


Figure 4. Kaplan-Meier plots of patients with ESCC stratified according to expression of miR-886 and miR-1269.

Expression of two miRNA genes is sufficient to identify high risk patients of recurrence in training set.

3) Test cohort 분석

- test cohort에서 각각의 두 miRNA 에 의한 재발예측 경향을 보이고 두 miRNA 조합시 통계학적으로 의미 있음 ($p=0.03$).

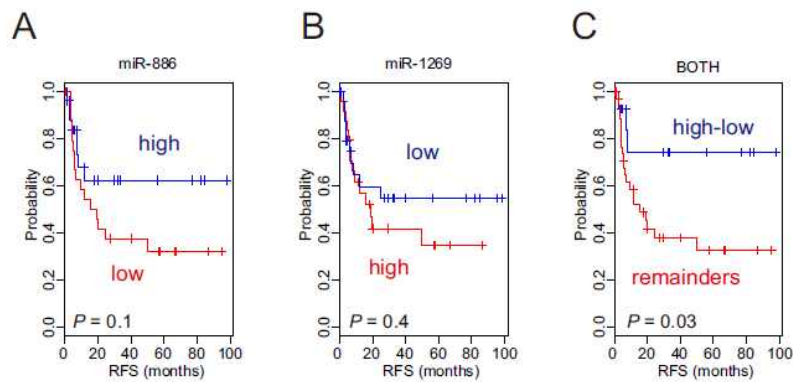


Figure 5. Validation of two-miRNA gene predictor in test set.

Kaplan-Meier plots of patients with ESCC stratified according to expression of miR-886 (A),

miR-1269 (B), or both (C). The + symbols in panel indicate censored data.

4) 모든 108명 환자를 대상으로 병기별 분석 및 다변량 분석

- 병기가 가장 강력한 재발예측인자.
- miR-886/miR-1269 combination 에 의한 예측도 stage 별로 의미 있음. stage III에서 더욱 의미.
- 국소재발 및 원격전이 모두 영향.
- 전체 생존율(overall survival) 또한 miR-886/miR-1269 combination 에 의한 예측 가능

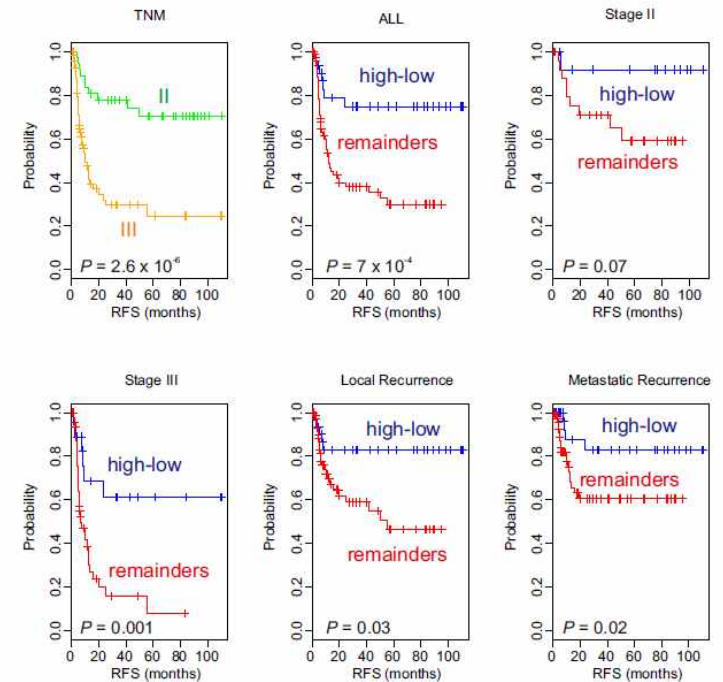


Figure 6. K-M plots with all patients (n=108)

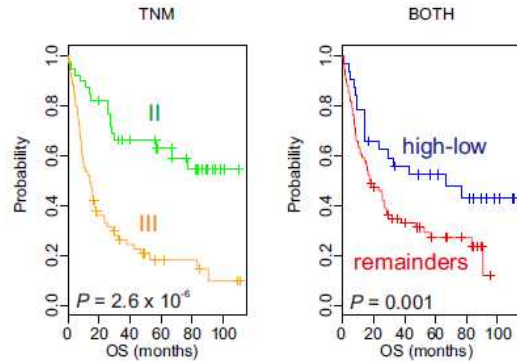


Figure 7. Significant association of two subgroups with overall survival

- Cox regression analysis에 의한 다변량 분석결과에서도 TNM staging과 더불어 재발과 생존율을 예측하는 의미있는 인자임.

Table 1. Multivariate analysis according to recurrence-free survival and overall survival

Variables	Recurrence-free survival			Overall Survival		
	p-value	Odds ratio	95% CI	p-value	Odds ratio	95% CI
TNM	<0.001	4.537	2.221-9.268	<0.001	3.69	2.089-6.52
High mir-886/ Low mir-1269	0.001	0.252	0.112-0.564	0.017	0.51	0.294-0.886

3. 연구결과 고찰 및 결론

- 식도편평세포암에서 종양과 중앙주위정상조직의 확연히 드러나는 expression pattern을 확인함.
 - 수술 후 재발을 예측하는 microRNA signature를 찾을 수 있었고, 이 중 가장 영향력 있는 miRNA는 miR-886 및 mir-1269 이었음.
 - 이 2개의 miRNA 들의 조합으로도 재발을 충분히 예측할 수 있음을 training set 및 test set을 통하여 확인함. 하지만, external validation을 통한 재증명이 필요하여, 현재 삼성서울병원과 전남대 화순병원으로부터 얻은 FFPE(Formalin Fixed Paraffin Embedded) tissue에서 두 RNA qRT-PCR 후 임상자료와 correlation 하여 재검증 시행중임.

1) microRNA-886

- miR-886 은 chromosome 5q31.1에 위치함.

- 현재는 small non-coding RNA 인 vault RNA 2-1 (VTRNA2-1)로 분류됨.

- vault RNA 는 vault complex의 하나로 major vault protein에 붙는 RNA로 알려짐. vault RNA 1-1, 1-2, 1-3이 있음. 하지만 vault RNA 2-1은 major vault protein에 붙는다는 증거는 없고 단지 100 base pair에 sequencing 이 vault RNA 1 series 와 유사하여 명명됨. 최근 Lee YS et al. 에 의해서는 microRNA 도, vault RNA도 아닌 것으로 증명되어 non-coding RNA 886 (nc886)으로 명명되기도 함.

- 이 VTRNA2-1은 TGFBI(Transforming growth factor-beta induced) gene 과 Smad5 사이에 위치.

- 식도편평세포암에서 5q31.1염색체에 LOH(loss of heterozygosity) 57%에서 보이며 가장 흔한 deletion site는 tumor suppressor gene인 Interferon Regulatory Factors 1 (IRF-1)gene locus 임이 보고됨.(Ogasawara S, et al. Gastroenterology 1996)

- 본 연구에서는 high expression 이 good prognosis 이므로 tumor suppressor 역할을 할 것으로 예상됨. cancer 시 chromosomal damage 등에 의해 VTRNA2-1의 감소가 일어나지만 VTRNA2-1이 유지되는 환자와 고갈되어있는 환자의 cancer course가 다를 것으로 예측. 완전히 depletion 된 환자에서는 매우 불량한 예후가 예상됨.

- Affymetrix array 에는 mature miRNA 뿐만 아니라 pre-mir-886도 probe 심어져 있어 그 expression을 비교함. has-miR-886-3p, hsa-miR-886-5p, pre-mir-886 expression 이 매우 상관관계가 높음. 또한 array data normalization 후 대부분의 precursor miRNA의 expression 은 1.5, mature RNA 는 2-3으로 expression 되는 것과 비교하여, mir-886은 mature 및 precursor form이 6-12 로 매우 abundant expression 함을 보임. 이는 array probe에 심어진 primer가 모두 같은 RNA에 붙음을 시사함. 즉 mature and precursor mir-886 probe가 100bp의 VTRNA2-1에 반응을 예측할 수 있음.

Pre-mir-886 vs mature miR-886

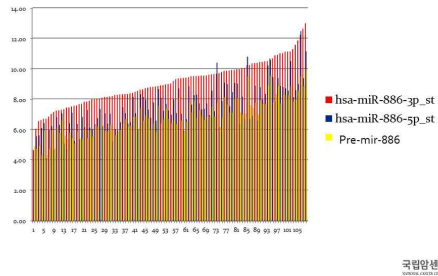


Figure 8. Correlation of expression between miR-886 and pre-mir-886.

- 이에 VTRNA2-1의 존재를 확인하기 위해 본 연구의 식도암 조직에서 추출한 RNA로 Northern blot 을 시행함. hsa-miR-886-3p를 primer로 하여 Northern blot (³²P isotope 이용) 시행한 결과 20 bp에는 band 보이지 않고 101 bp에서 band 보임.

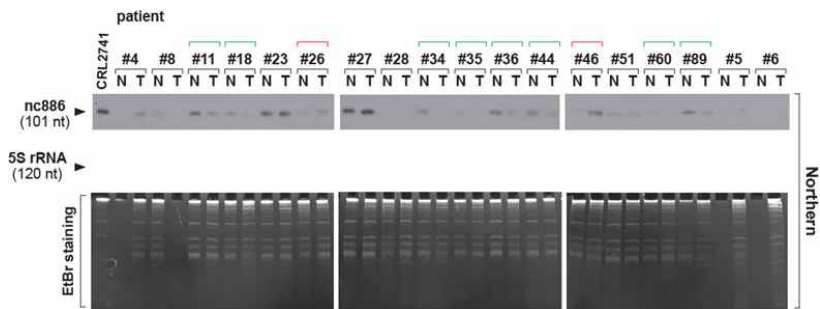


Figure 9. Northern blot in esophageal squamous cell carcinoma samples

- Control(제일 왼쪽)로 VTRNA2-1 high expression 되는 CRL2741 cell line (normal bronchial epithelial cell)로 삼음. 18 sample에서 시행한 결과 8 sample에서는 normal에서 tumor 보다 expression 이 높았고, 2개에서만 tumor에서 expression 이 높고 8개는 RNA 양이 충분하지 않아 판정 불가함.

- array 결과, Northern blot 결과, has-miR-886-3p와 has-miR-886-5p를 primer 로 시행한 qRT-PCR 모두 결과가 일치하는 소견을 보임.

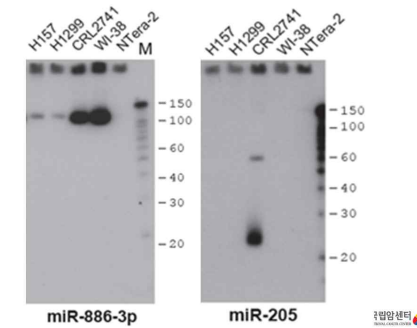


Figure10. Comparison of expression in diverse cell lines between miR-886 and other microRNA in Northern blot (Permission from Yong-Sun Lee.,RNA. 2011).

- 식도암 세포주에서도 VTRNA2-1(nc886) expression 확인함. HET-1A, BE-3, OE-33, SK-4에서는 high expression 을 보였고, TE-1, TE-8, TE-12 에서는 감소된 expression 을 보였으며 TT는 no expression. TT cell line 은 esophageal cancer 의 radiotherapy 후 bone metastasis 한 곳에서 origin 한 cell line 으로 매우 aggressive 한 cell line 임.

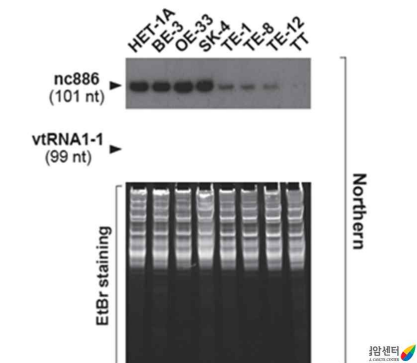


Figure 11. Results of Northern blot in esophageal cancer cell lines.

HET-1(normal esophageal epithelial cell); BE-3(Barrett's esophagus); OE-33(esophageal dysplasia); SK-4(esophageal adenocarcinoma); TE-1, TE-8, TE-12, TT(esophageal squamous cell carcinoma)

- TargetScan 등의 microRNA target prediction site에서 mir-886은 vault RNA로 분류되어 제외됨. target prediction 위해 NCI 60 cell line에서 시행된 microRNA array 중 mir-886 과 mRNA array correlation data 있어 의미 있는 gene selection 함.

NAME	GENE	GENE_NAME	Estimates	Pvalue
GRK6	2870G	protein-coupled receptor kinase 6	-0.444	0.00049
GTF2A1	2957	general transcription factor IIA, 1, 19/37kDa*	-0.433	0.00069
STK19	8859	serine/threonine kinase 19	-0.409	0.00143
EHMT2	10919	euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2	-0.402	0.00178
TGIF2	60436	TGFβ-induced factor/homeobox 2	-0.401	0.00181
REST	5978	RE1-silencing transcription factor	-0.396	0.00207
NFKBIL1	4795	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1	-0.383	0.003
KBKB	3551	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta*	-0.374	0.00381
MYST4	23522	MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 4	-0.369	0.00436
RAB33B	83452	RAB33B, member RAS oncogene family	-0.367	0.00457
ARHGAP18	23370	ho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 18	-0.365	0.00488
GLS	2744	glutaminase	0.369	0.00436
LMK1	3984	LIM domain kinase 1	0.37	0.00422
ROR1	4919	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1	0.382	0.00309
MAOB	4129	monoamine oxidase B	0.383	0.00297
HOXB9	3219	homeobox B9	0.388	0.00259
C3F1	1435	colony stimulating factor 1 (macrophage)	0.398	0.00197
STAT4	6775	signal transducer and activator of transcription 4	0.41	0.00138
TGFA	7039	transforming growth factor, alpha*	0.427	0.00082
TLR6	10333	toll-like receptor 6	0.435	0.00064
DGKG	1608	diacylglycerol kinase, gamma 90kDa	0.44	0.00055

Table 2. Correlation between has-mir-886-3p and mRNA from NCI-60 cell lines (GEO)

- 최근 VTRNA2-1의 allelic methylation 이 AML의 outcome 을 예측한다는 보고도 있음. 즉 VTRNA2-1에 allelic methylation 이 없는 환자가 monoallelic or biallelic methylation 있는 환자에 비해 예후가 좋음이 보고됨. 이는 본 연구의 임상결과와 같이 VTRNA2-1이 tumor suppressor 역할을 하고 있음을 시사함.

- 여러 보고에서 PKR(RNA-dependent protein kinase)의 phosphorylation 에 관여한다는 보고도 있음.

- VTRNA2-1의 site가 TGFBI 와 Smad 5 사이에 있고 prediction table에서 negative correlation 하는 gene중 TGIF2 (TGF-beta-induced factor homeobox 2) 있어 TGF beta pathway에 관여할 가능성 있음. 하지만 cell line에서 over-expression 또는 knock down 시킨 후 mRNA array 시행하여 변화된 mRNA expression으로 정확한 target gene을 찾아야 함.

- 또한 VTRNA2-1의 upstream의 조절에 대한 연구도 요함.

2) microRNA-1269

- human intestinal epithela cell에서 growth에 관여하는 microRNA도 보고됨. antisense mature

miR-1269에 growth rate과 세포의 trans-epithelial resistance가 감소함.

- TargetScan에 의한면 FOXO1(forkhead box O1)이 ranking 1위인 target 임.

- mimic 이나 anti-Mir 로 esophageal cancer cell level에서의 검증이 필요함.

Human | miR-1269 [Go to TargetScanHuman 6.0 for updated predictions](#)
 77 conserved targets, with a total of 80 conserved sites and 14 poorly conserved sites.
 Table sorted by total context score
 Genes with only poorly conserved sites are not shown [\[View top predicted targets, irrespective of site conservation\]](#)

Target gene	Gene name	Conserved sites			Poorly conserved sites		
		total	8mer	7mer-1A	total	8mer	7mer-1A
FOXO1	forkhead box O1	1	1	0	2	1	1
PPP1R2	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2	1	1	0	0	0	0
CENTG2	centaurin, gamma 2	1	1	0	0	0	0
YTHDC1	YTH domain containing 1	1	1	0	0	0	0
BHLHB5	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 5	1	1	0	0	0	0
USP9X	ubiquitin specific peptidase 9, X-linked	1	1	0	0	0	0
ZNF280C	zinc finger protein 280C	1	1	0	0	1	0
CHP	calcium binding protein P22	2	2	0	0	0	0
CCDC58	coiled-coil domain containing 58	1	1	0	0	0	0
VPS13B	vacuolar protein sorting 13 homolog B (yeast)	1	0	1	0	1	0
DAZ3	deleted in azoospermia 3	1	1	0	0	0	0
DAZ4	deleted in azoospermia 4	1	1	0	0	0	0
DAZ2	deleted in azoospermia 2	1	1	0	0	0	0
DAZ1	deleted in azoospermia 1	1	1	0	0	0	0
DAZL	deleted in azoospermia-like	1	1	0	0	0	0

Table 3. Target prediction of mature miR-1269 from TargetScan.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 ¹⁾)	저널명(IF.)	Year: Vol(No):Page	구분 ²⁾	지원과제번호 ³⁾
The prognostic impact of microRNA sequence polymorphisms on the recurrence of patients with completely resected non-small cell lung cancer.	이현성 (교신)	Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery (3.406)	2012 Oct;144(4):794-807	국외 SCI	1110260
Patterns of Lymph Node Metastasis and Survival for Upper Esophageal Squamous Cell Carcinoma	이현성 (제1)	The Annals of Thoracic Surgery (3.741)	2011;92:1091-1097	국외 SCI	없음
Free jejunal graft for esophageal reconstruction using end-to-side vascular anastomosis and extended pharyngo-jejunostomy	이현성 (제1)	The Annals of Thoracic Surgery (3.741)	2012;93:1850-1854	국외 SCI	없음

Efficacy of intraoperative, single-bolus corticosteroid administration to prevent postoperative acute respiratory failure after oesophageal cancer surgery.	이현성 (교신)	Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery	2012 Oct;15(4):639-43.	국외	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	출원인	출원국	출원번호

1) 구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저서

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

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
	연차	최종		연차	최종
microRNA 발현 양상 분석을 통한 암의 진단과 치료 예측 및 예후인자의 발견	1차년도	종양은행의 식도암조직을 이용한 miRNA microarray 시행	종양은행의 식도암조직을 이용한 miRNA microarray 시행.	1	100
	2차년도	종양은행의 식도암조직을 이용한 miRNA microarray 시행 식도암과 정상식도의 비교를 통한 후보 miRNA 발굴	종양은행의 식도암조직을 이용한 miRNA microarray 시행 후보 miRNA 찾고 validation	2	100
	3차년도				

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자체평가
식도암 조직 및 암주위 정상조직의 miRNA array	miRNA array 시행 후 결과.
식도암의 종양은행을 통한 후보 miRNA 의 검증 및 환자의 암재발과 생존분석을 통한 예측/예후인자 발굴	식도암수술 후 재발 예측하는 miRNA signature를 찾았고 validation 시행함. external validation 필요함.

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	1	Clinical Cancer Research (IF=7.742)
산업재산권 등록		
기 타		

(2) 연구성과의 활용계획

- 본 연구결과 도출된 small non-coding RNA(VTRNA2-1, mir-1269) 의 역할에 대해서 향후 biogenesis 과정에 대한 연구를 포함하여 cancer cell 과 미세환경과의 상호작용의 측면에서 그 기능에 대한 연구를 진행할 계획임.
- 향후 3년 내에, 이들의 기능에서 유력후보물질을 in vitro 실험을 통하여 밝히고, animal model 까지 확장적용.
- 또한 폐암 및 악성종괴종같은 squamous cell carcinoma 와 유사한 타장기 암종에 대한 상기 microRNA 적용가능성 고찰.

6. 참고문헌

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58:71-96.
3. Daly JM, Fry WA, Little AG, et al. Esophageal cancer: results of an American College of Surgeons Patient Care Evaluation study. *J Am Coll Surg* 2000;190:562-72, discussion 72-3.
4. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009;136:642-55.
5. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev* 2009;28:369-378.
6. Feber A, Xi L, Luketich JD, et al. MicroRNA expression profiles of esophageal cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;135:255-60.
7. Guo Y, Chen Z, Zhang L, et al. Distinctive microRNA profiles relating to patient survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2008;68:26-33.
8. Watson DI, Wijnhoven BP, Michael MZ, Mayne GC, Hussey DJ. Hp24 microRNA

expression profiles in Barrett's oesophagus. *ANZ J Surg* 2007;77 Suppl 1:A45.

9. Yang H, Gu J, Wang KK, et al. MicroRNA expression signatures in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2009;15:5744-52.
10. Ye Y, Wang KK, Gu J, et al. Genetic variations in microRNA-related genes are novel susceptibility loci for esophageal cancer risk. *Cancer Prev Res* 2008;1:460-9.
11. Mathe EA, Nguyen GH, Bowmn ED, et al. MicroRNA expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus: associations with survival. *Clin Cancer Res* 2009;15:6192-200.
12. Nguyen GH, Schetter AJ, Chou DB, et al. Inflammatory and microRNA gene expression as prognostic classifiers of Barrett's associated esophageal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2010;Oct, Epub ahead of print.
13. Ogawa R, Ishiguro H, Kuwabara Y, et al. Expression profiling of microRNAs in juman esophageal squamous cell carcinoma using RT-PCR. *Med Mol Morphol* 2009;42:102-9.
14. Lee KH, Goan YG, Hsiao M, et al. MicroRNA-373 (miR-373) post-transcriptionally regulates large tumor suppressor, homolog 2 (LATS2), and stimulates proliferation in human esophageal cancer. *Exp Cell Res* 2009;315:2529-38.
15. Irizarry R, Hobbs B, Collin F, et al. exploration, normalization , and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003;4:249-64.
16. Agilent Technologies: Agilent Feature Extraction Reference Guide. 2008.
17. Lopez-Romero P, Gonzalez MA, Callejas S, et al. Processing of Agilent microRNA array data. *BMC Research Notes* 2010;3:18-23.
18. Wang H, Ach RA, Curry B. Direct and sensitive microRNA profiling from low-input total RNA. *RNA* 2007;13:151-9.
19. Hua YJ, Tu K, Tang ZY, et al. Comparison of normalization methods with microRNA microarray. *Genomics* 2008;92:122-8.
20. Pradervand S, Weber J, Thomas J, et al. Impact of normalization on miRNA microarray expression profiling. *RNA* 2009;15:493-501.
21. Stadler PF, Chen JJ, Hackermüller J, Hoffmann S, Horn F, Khaitovich P, Kretzschmar AK, Mosig A, Prohaska SJ, Qi X, Schutt K, Ullmann K. Evolution of vault RNAs. *Mol Biol Evol*. 2009 Sep;26(9):1975-91
22. Ogasawara S, Tamura G, Maesawa C, Suzuki Y, Ishida K, Satoh N, Uesugi N, Saito K, Satodate R. Common deleted region on the long arm of chromosome 5 in esophageal

carcinoma.Gastroenterology. 1996 Jan;110(1):52-7.

23. Jeon SH, Lee K, Lee KS, Kunkeaw N, Johnson BH, Holthauzen LM, Gong B, Leelayuwat C, Lee YS.Characterization of the direct physical interaction of nc886, a cellular non-coding RNA, and PKR.FEBS Lett. 2012 Sep 21;586(19):3477-84.

24. Kunkeaw N, Jeon SH, Lee K, Johnson BH, Tanasanvimon S, Javle M, Pairojkul C, Chamgramol Y, Wongfieng W, Gong B, Leelayuwat C, Lee YS.Cell death/proliferation roles for nc886, a non-coding RNA, in the protein kinase R pathway in cholangiocarcinoma.Oncogene. 2012 Aug 27. doi: 10.1038/onc.2012.382. [Epub ahead of print]

25. Lee K, Kunkeaw N, Jeon SH, Lee I, Johnson BH, Kang GY, Bang JY, Park HS, Leelayuwat C, Lee YS. Precursor miR-886, a novel noncoding RNA repressed in cancer, associates with PKR and modulates its activity.RNA. 2011 Jun;17(6):1076-89.

26. Treppendahl MB, Qiu X, Sogaard A, Yang X, Nandrup-Bus C, Hother C, Andersen MK, Kjeldsen L, Möllgaard L, Hellström-Lindberg E, Jendholm J, Porse BT, Jones PA, Liang G, Grønbæk K.Allelic methylation levels of the noncoding VTRNA2-1 located on chromosome 5q31.1 predict outcome in AML.Blood. 2012 Jan 5;119(1):206-16.

27. Dalmaso G, Nguyen HT, Yan Y, Laroui H, Srinivasan S, Sitaraman SV, Merlin D.MicroRNAs determine human intestinal epithelial cell fateDifferentiation. 2010 Sep-Oct;80(2-3):147-54

7. 첨부서류

논문4편.

II. 제2세부과제

세부과제명 : 유방암의 진단과 치료경과 예측을 위한 혈액 내 microRNA 연구
 세부과제책임자(성명/소속) : 박인혜/ 유방내분비연구과

목 차

< 요약 문 >

(한글)유방암의 진단과 치료경과 예측을 위한 혈액 내 microRNA 연구

(영문)A study of circulating microRNA in breast cancer

1. 연구의 최종목표-----39

2. 연구의 내용 및 결과-----39

3. 연구결과 고찰 및 결론-----46

4. 연구성과 및 목표달성도-----47

5. 연구결과의 활용계획-----48

6. 참고문헌-----49

7. 첨부서류-----49

< 요약 문 >

연구분야(코드)			과제번호	
과제명	유방암의 진단과 치료경과 예측을 위한 혈액 내 microRNA 연구			
연구기간/연구비 (천원)	합계	2011년 01월01일 ~ 2012년12월31일	60,000	
	1차년도	2011년 01월01일 ~ 2011년 12월31일	30,000	
	2차년도	2012년 01월01일 ~ 2012년 12월31일	30,000	
	3차년도	년 월 일 ~ 년 월 일	-	
과제책임자	성명	박인혜		
	소속	유방내분비연구과		
책임단어	국문	유방암, 혈액, microRNA		
	영문	breast cancer, blood, microRNA		
<p>◆ 연구목표</p> <p><최종목표> 본 연구는 유방암 환자의 혈액 내에서 유방암에 특이적이며 치료 (수술, 항호르몬 치료, 항암치료)의 반응과 연관된 microRNA 을 발굴하고 그것의 세포 내 기능을 밝히는 것이 목표임.</p> <p><당해년도 목표> 유방암 치료에 따른 치료 반응을 예측할 수 있는 marker 로서의 혈액 내 microRNA 를 발굴하고 그 기능을 세포주를 통해 확인함.</p>				
<p>◆ 연구내용 및 방법</p> <p>-Cancer 에 있어서 microRNA 의 역할은 invasion, metastasis, angiogenesis 등과 연관이 있는 것으로 알려져 있으며 이런 cancer associated microRNA 의 발현 정도로 진단 및 clinical outcome 을 예측할 수 있다는 연구 보고도 있음. 조직내에서의 microRNA 발현과 기능에 대해서는 많은 연구가 이루어지고 있으나 그것이 직접적으로 진단과 치료 반응의 예측할 수 있는 marker 로서 이용되는 것에는 한계가 있음. 이런 microRNA 를 혈액내에서 안정적으로 측정 가능하고 그것이 진단과 치료반응과 연관성을 가진다면 좋은 tumor marker 로서 쓰일 수 있을 것으로 예상됨.</p> <p>- Pilot study 로 본원의 건강검진 센터를 내원한 건강인 5명과 유방암환자 (호르몬 수용체 양성, HER2 수용체 음성) 11명을 대상으로 혈액을 채취하여 시행한 microRNA microarray 를 분석해 보았을 때 정상과 대별되는 microRNA expression pattern 을 볼 수 있었으며 대상군의 blood에서 qRT-PCR 로 candated microRNA (mir 1280, mir 720) 를 정량적으로 측정해 보았을 때도 정상인과 유방암 환자에서 의미있는 차이를 볼 수 있었음</p>				

Project Summary

Title of Project	A study of circulating microRNA in breast cancer
Key Words	Breast cancer, blood, microRNA
Project Leader	In Hae Park.
Associated Company	None
<p>0 Objectives</p> <ul style="list-style-type: none"> - To investigate specific circulating microRNAs for breast cancer - Searching for clinical meanings of circulating microRNAs in breast cancer <p>0 Methods</p> <ul style="list-style-type: none"> - microRNA expression array using blood samples of patients with breast cancer and those of healthy controls - check the blood levels of candidate microRNA using quantitative RT-PCR methods in large patient cohort. - mir-1280 gene cloning and transfection to MCF-7 cell line - MTT assay <p>0 Results</p> <ul style="list-style-type: none"> - In breast cancer patients, profiles of circulating microRNAs were significantly different compared with those of controls - Of those, the levels of circulating mir-1280 and mir-720 were significantly elevated in blood of breast cancer patients. In addition, those levels showed a positive correlation with overall tumor burdens in each patients. - The mir-1280 and mir-720 were detected in breast cancer tissue, however they were not found in normal mammary tissue. <p>0 Those circulating microRNA could be used as a potential biomarker of breast cancer. Their functions should be addressed in a further study.</p>	

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

- 두 microRNA 의 발현을 여러 종류의 cell lines 과 정상유방조직 및 유방암 조직에서 확인.
 - 유방암이 없는 건강인과 조기 유방암 환자, 전이성 유방암 환자의 혈액에서 microRNA 의 level 을 확인
 - 조기 유방암 환자와 전이성 유방암 환자에서 일차 치료 후의 임상적인 반응과 혈액 내에서의 microRNA level 의 변화를 연관하여 분석.
 - 해당 microRNA 의 세포 내 역할을 anti-Mir 를 이용해 형태적 변화 및 연관된 gene expression 의 변화를 확인함.

◆ 연구성과

-정량적 성과

구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)
SCI 논문 편수	0/1	0%
IF 합		
기타 성과	AACR 2012 국외 학술대회에서 발표	

1) 총연구기간내 목표 연구성과로 기 제출한 값

-정성적 성과

- 혈액내에서 정상인과 구별되는 유방암 환자에서 특이적인 microRNA 의 패턴을 확인함.
- 특정 microRNA 가 종양의 양적인 증가와 같이 혈액 내에서의 level 도 증가되는 것을 확인함.

◆ 참여연구원 (최종연도 참여인원)	성 명	노정실, 이근석, 강주현

※ 요약문의 총분량은 2page 이내로 제한함

1. 연구의 최종목표

본 연구에서는 유방암 환자의 혈액 내에서 microRNA 의 expression profile 을 봄으로서 조직에서의 microRNA profile 과 비교하며 (기존의 연구 결과를 이용) 또 정상과 구별되는 유방암 특이적인 microRNA 를 발굴하는 것이 목표임. 그리고 유방암 치료 (항호르몬제, anti-HER2 therapy) 에 따른 치료 반응을 예측할 수 있는 marker 로서의 혈액내 microRNA 를 발굴하는 것이 목표임.

2. 연구의 내용 및 결과

혈액 내 microRNA 의 기원은 아직 정확히 밝혀지지 않았으나 종양 조직에서 높게 발현된 microRNA 가 혈액 내에서 발견되는 경우에는 그 기원이 종양 조직일 가능성이 클 것으로 보이며 따라서 종양에 특이적인 혈액 내 microRNA 이 발견될 경우에 종양 특이적인 tumor marker 로서 역할을 할 수 있을 것으로 예상된다.

Pilot study 로 본원의 건강검진 센터를 내원한 건강한 5명과 유방암환자 (호르몬 수용체 양성, HER2 수용체 음성) 11명을 대상으로 혈액을 채취하여 시행한 microRNA microarray 를 분석해보았을 때 Figure 1과 같이 정상과 대별되는 microRNA expression pattern 을 볼 수 있었으며 대상군의 blood에서 aRT-PCR 로 candidate microRNA 를 정량적으로 측정해 보았을 때도 정상인과 유방암 환자에서 의미있는 차이를 볼 수 있었음 (Table 1)

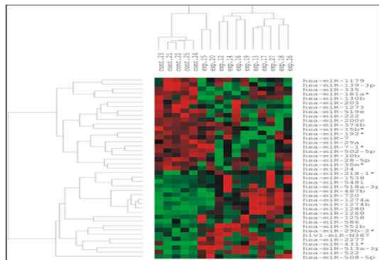


Figure 1. Unsupervised hierarchical clustering over 910 miRNAs. Heatmap colors represent relative miRNA expression as indicated. First five columns indicated normal blood samples and followings meant 11 breast cancer with ER+/HER2-

<Table 1> Candidate miRNAs from the results of current microarray expression profiles and those from previous data

Target miRNA	Breast cancer	Control	Fold change	P-value
has-miR-1280	48.6	15.3	3.17	0.0026
has-miR-1260	224.8	93.6	2.40	0.0062
has-miR-720	479.4	211.5	2.27	0.019
has-miR-21	401.0	772.1	0.52	0.135
has-let-7a	0.98	3.49	0.28	0.105
has-miR-195*	Not detected			

- 이 결과를 바탕으로 건강한 40명과 진단 당시의 조기유방암 환자 (N=187), 치료 전 전이성 유

방암 환자 (N=37) 을 대상으로 혈액 내에서 mir-1280 과 mir-720 의 level 을 qRT-PCR 로 측정하여 비교하였음 (Figure 2)

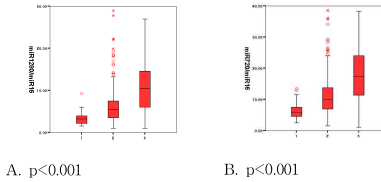


Figure 2. Relative expression levels of *miR-1280* (A) and *miR-720* (B) in preoperative EBC (N=187), pre-chemotherapy MBC (N= 37), and control (N=40). Bonferroni test was done to correct multiple test. 1. control; 2. early breast cancer (EBC); 3. metastatic breast cancer (MBC)

- mir-1280, mir-720 을 정상 유선 조직과 유방암 조직에서 발현 정도를 비교함. 비교 결과 정상 조직에서는 두 microRNA 가 거의 검출 되지 않은 반면 종양 조직에서는 상대적으로 많이 발현됨을 확인하였음 (Figure 3).

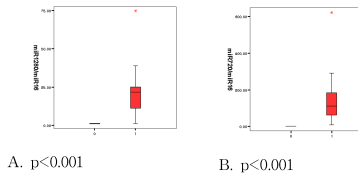


Figure 3. miR-1280 and miR-720 showed higher expression in primary breast cancer tissue than normal breast tissues.

- 치료에 따른 혈중 microRNA 의 level 변화 (N=56)

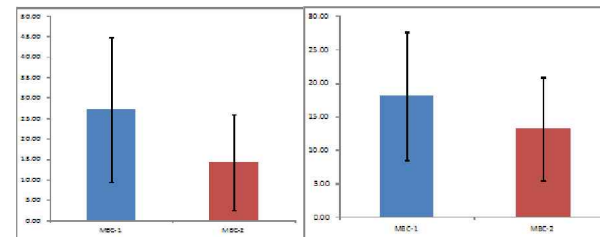


Figure 4. Decreased blood levels of miR-1280 and miR-720 in MBC patients. A) miR-1280, B) miR-720. MBC-1: pre-treated patients; MBC-2: post-treated patients (at least 2-3 months after treatment).

치료 후 CT/MRI 로 평가된 결과와 mir-1280, mir-720 의 혈중 level 과의 상관성에 대해 향후 분석할 계획임.

- mir-1280/mir-720 의 세포내 기능 분석

mir-1280 과 mir-720 의 기능에 대해서 database (DAVID, miRBase, TargetScan, Ingenuity systems pathway analysis) 를 이용하여 prediction 하였을 때 Table 2 와 같은 결과가 나왔음.

Table 2. Candidate targets of mir-1280 and mir-720 predicted based on various database.

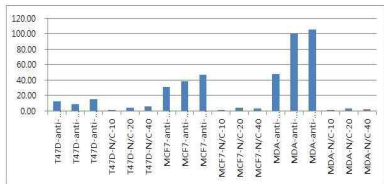
mir-720				
Category	Function	Function Annotation	p-value	Molecules
Cellular Movement	invasion	invasion of cells	3.20E-04	ADM, docetaxel, EPHB6, JAM3, LEP, MCAM, SDC4, SEPT9, SH3GLB2, SST
Cellular Movement	invasion	invasion of tumor cell lines	6.78E-04	ADM, EPHB6, JAM3, LEP, SDC4, SEPT9, SH3GLB2, SST
Cellular Movement	migration	migration of cells	3.29E-04	ADM, docetaxel, EGLN3, EPHB6, FBLN1, ITGAL, JAM3, LEP, MCAM, MNX1, NKX2-3, SDC4, SEPT9, SH3GLB2, SPATA13, SST, STARD13, TNFRSF1B, WNT5B
Cellular Movement	migration	migration of cancer cells	7.60E-04	ADM, EPHB6, FBLN1, ITGAL, JAM3, LEP, SDC4, SEPT9, SH3GLB2, SST, STARD13
Gene Expression	transcription	transcription of DNA	1.32E-03	ACVR1B, BPTF, DNMT3A, docetaxel, DR1, DVL1, FOXG1, GMEB2, LEP, MN1, MNX1, NANOG, NFATC2IP, NKX2-3, POU2F2, SCN2F, SEPT9, SIM2, SST, TNFRSF1B, ZNF292
Cell Cycle	mitosis	mitosis	5.40E-04	ADM, docetaxel, FOXG1, INCENP, ITGAL, LEP, ORC6, SEP19
Cell Cycle	cell cycle progression	re-entry into cell cycle progression of lung cell lines	9.85E-03	FOXG1
Cell Cycle	cell cycle progression	entry into cell cycle progression	1.28E-02	LEP, SST
Cell Death	cell death	cell death of malignant tumor	1.25E-03	docetaxel, TNFRSF1B
Cellular Development	differentiation	differentiation	8.80E-04	ACVR1B, ADM, EGLN3, FEZ1, FOXG1, GJA3, INSG1, ITGAL, JAM3, LEP, MN1, MNX1, NANOG, NKX2-3, POU2F2, SCN4B, TNFRSF1B, WNT5B
Cancer	transformation	transformation	3.41E-03	ADM, DVL1, FOXG1, INCENP, MN1, SEPT9, STARD13

mir-1280				
Category	Function	Function Annotation	p-value	Molecules
Gene Expression	transcription	transcription	2.49E-05	AEBP2, ATF6B, CBX7, CD86, CD9, CHRM1, CSRNP2, CTNND1, DNMT3A, docetaxel, DTXL, DYRK1A, EP300, ET1S1, FOXM1, FOXO4, GDF6, HDAC4, HSPK2, IER3, INHBB, JAG2, KLF2, LHX6, NCOR2, NDC2L, PABPN1, PIPHR8, RALBP1, SEC61A1, SFRP1, SLA2, SRC, TARDBP, TRIM26, UBT1, WNK1, ZFYVE9, ZNF2
Cell Cycle	cell division	proceed cell division process of tumor cell lines	7.03E-05	ACRBP, AGK, CDC25A, CTNND1, docetaxel, EP300, EPB41L1, ET1S1, FOXM1, HDAC4, IER3, LRG1, SRC, SULF1
Cell Cycle	cell cycle progression	cell cycle progression	5.65E-06	ACRBP, CBX7, CDC25A, CDK19, C-SNRC2, docetaxel, EP300, ET1S1, PGP9, FOXM1, FOXO4, HDAC4, HPK2, IER3, LRG1, NCOR2, oxaliplatin, RNU1, SRC, SULF1, TRIM26
Cell Cycle	mitosis	mitosis of tumor cell lines	2.27E-04	ACRBP, CDC25A, docetaxel, FOXM1, HDAC4
Cellular Growth and Proliferation	proliferation	proliferation of cells	1.63E-06	ACRBP, AGK, CD86, CD9, CDC25A, CDK19, CHRM1, CLEC10A, CSMK2B, CTNND1, docetaxel, DYRK1A, EIF3A, EP300, ET1S1, FGF9, FLT3, FOXM1, FOXO4, HDAC4, HPK2, IER3, JAG2, KLF2, LHX6, LRG1, NCOR2, oxaliplatin, PDXK, PIP4K2B, PIPHR8, RALBP1, RASIP1, RRM3, RNF41, SFRP1, SRC, TARDBP, TRIM26, WNK1
Cellular Growth and Proliferation	proliferation	proliferation of tumor cell lines	4.42E-04	ACRBP, AGK, CDC25A, C-SNRC2, CTNND1, docetaxel, EIF3A, EP300, FOXM1, HPK2, IER3, KLF2, NCOR2, oxaliplatin, PIP4K2B, RNF41, SRC
Cellular Growth and Proliferation	proliferation	proliferation of breast cancer cell lines	2.08E-03	EIF3A, FOXM1, IER3, NCOR2, PIP4K2B, RNF41, SRC
Cellular Growth and Proliferation	growth	growth of tumor cell lines	3.78E-03	ARL11, CBX7, docetaxel, EP300, ET1S1, FOXM1, HDAC4, HPK2, IER3, KLF2, oxaliplatin, PIP4K2B, SFRP1, SRC
Cancer	tumorigenesis	tumorigenesis	2.22E-04	ARL11, CBX7, CD86, CD9, CDC25A, CDK19, CHRM1, CLEC10A, COL4A3, C-SNRC2, CTNND1, DLG2, docetaxel, EP300, EIF3A, EP300, ET1S1, FGF9, FLT3, FOXM1, FOXO4, GSK, GFAP, GIT1, HDAC4, HPK2, IER3, INHBB, JAG2, KLF2, KLF9, KLF2, LPAR6, LRG1, MGA, MYK, NCOR2, oxaliplatin, PDE8A, RALBP1, SCD, SFRP1, SLC6A3, SRC, SULF1, WNK1, ZNF2
Cellular Movement	invasion	invasion of tumor cell lines	1.79E-04	AJAP1, CD9, CTNND1, ET1S1, FOXM1, HPK2, INHBB, PDXL, SFRP1, SRC, SULF1
Cellular Movement	migration	migration of cancer cells	9.47E-05	AGK, AJAP1, CD9, CTNND1, ET1S1, FOXM1, GIT1, HPK2, INHBB, JAG2, LRG1, PDXL, RNF41, SFRP1, SRC, SULF1

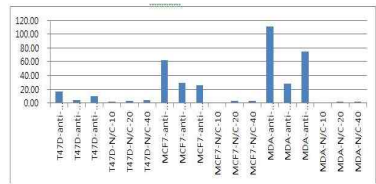
- anti-mir 를 이용한 microRNA function 연구

T47D, MCF-7, MDA-MB-231 cell lines에 anti-mir 를 transfection 시킨 후 transfection 된 cell 에서 mir-1280 과 mir-720 의 level 을 qRT-PCR 로 확인함. 결과 negative control 에 비해 transfection 된 cell에서 microRNA 의 level 이 더 높게 나옴 (Figure 5).

동시에 MCF-7 cell line에서 anti-mir1280 과 anti-mir720 을 transfection 시킨 후 0h, 36h, 72h 동안 incubation 한 뒤 cell viability 를 MTT assay 로 비교, 측정하였음 (Figure 6). 결과 anti-mir 를 넣은 cell 과 control 간의 cell viability 에 있어 차이가 없었음.

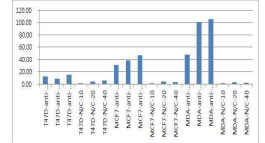


A) anti-mir-1280

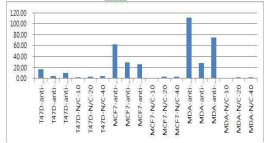


B) anti-mir-720

Figure 5. The levels of mir-1280 and mir-720 in each cell lines transfected with anti-mir-1280 and anti-mir-720 respectively.

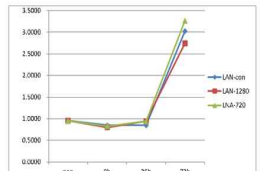


A) anti-mir 1280

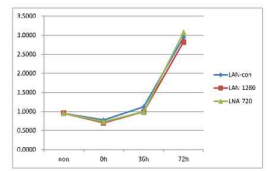


B) anti-mir 720

Figure 6. MTT assay with two different anti-mir concentrations.



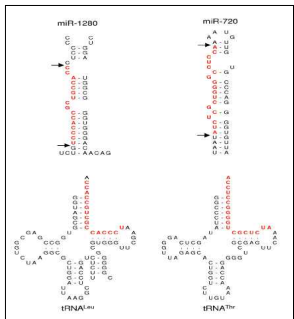
A) anti-mir 5nM



B) anti-mir 10nM

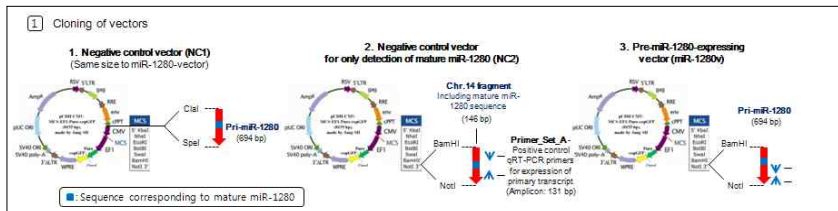
- mir-1280, mir-720 의 기원 연구

mir-1280 과 mir-720 의 function 을 더 연구하기 위해 mir-1280 과 mir-720 의 기원을 찾던 중 각 microRNA 가 특정 tRNA 의 sequence 의 일부와 일치함을 알게 됨. (Nick Schopman et al, RNA Biology 7(5); 573-576, 2010)

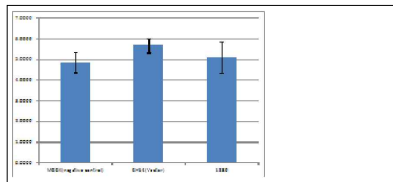


따라서 본 연구에서 검출된 혈액 내 mir-1280 과 mir-720 은 tRNA^{Leu} 와 tRNA^{Thr} 의 RNA fragment (tRF) 일 가능성을 고려할 수 있음.

우선 mir-1280 과 tRNA^{Leu} 과의 연관성을 간접적으로 파악하기 위해 mir-1280 gene 을 cloning 하여 특정 cell (293FT) 에 transfection 시킨 후 발현정도를 확인함. 이 실험의 mir-1280 gene 을 cell 내로 transfection 시킨 후 mature mir-1280 이 cell 내에서 검출이 되는 지 확인하기 위해 시행함.



각각의 transfected cell에서 mir-1280의 level을 측정하였을 때 negative control에 비해 mir-1280 containing vector를 삽입한 cell에서 mir-1280의 level이 더 증가되지 않았음.



실제로 유방암 조직과 정상 유방조직 및 유방암 환자의 혈액 내에서의 tRNA^{Leu} level과 mir-1280의 level 사이에 양의 상관성이 보여 tRNA^{Leu}의 biogenesis 과정에서 mir-1280이 만들어졌을 가능성을 더욱 시사한다고 할 수 있겠음.

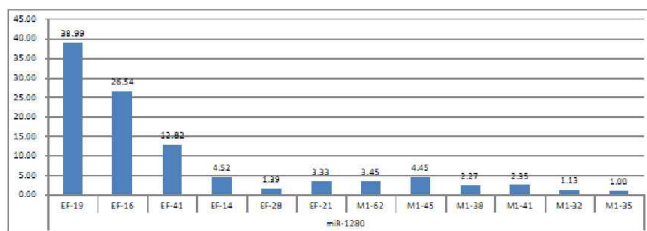
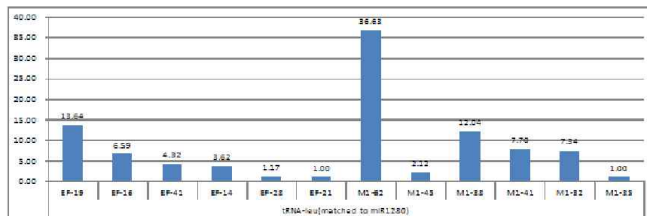


Figure 6. Comparison between the levels of tRNA-leu and mir-1280 in tumor tissue and blood samples.

EF- breast cancer tissue; MI- blood of breast cancer patients.

<<< 실험방법 >>>

RNA extraction

: using the Trizol LS reagent (Invitrogen Life Science, Carlsbad, CA, USA) together with miRNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)

1. Sample 250ulX2으로 분주
2. Sample 250ul에 Trizol LS 750ul add. Several time pipetting & vortexing RT에서 5min incubate.
3. Chloroform 200ul add. Vigorously hand shaking & vortexing RT에서 15min incubate.
4. 4°C 10000rpm 15min centrifuge
5. Transfer aqueous phase to new tube, sample의 1.5배의 100% ethanol add. Pipetting up & down
6. 700ul sample을 RNeasy Mini column에 넣고, RT 10000rpm 15sec centrifuge Discard flow-through
7. 남은 sample도 step 6 repeat
8. Add 350ul RWT buffer to column, RT 10000rpm 15sec centrifuge Discard flow-through
9. Add 10ul DNase I + 70ul RDD buffer, gently mix(inverting 정도만)
10. Column에 직접 DNase I mix 80ul add, RT 15min incubate
11. Add 350ul RWT buffer to column, RT 10000rpm 15sec centrifuge Discard flow-through
12. Add 500ul RPE buffer to column, RT 10000rpm 15sec centrifuge Discard flow-through
13. Add 500ul RPE buffer to column, RT 10000rpm 2min centrifuge Column dry.
14. Column을 new 2ml tube로 옮긴 후 full speed 1min centrifuge
15. Column을 new 1.5ml tube로 옮긴 후 30ul RNase free water를 넣고 RT, 10000rpm 1min centrifuge ,RNA elution

Reverse transcription

: using the Taqman miRNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Cheshire, UK)

component	volume
100mM dNTP	0.075ul
10X RT buffer	0.75ul
RNase Inhibitor(20U/ul)	0.095ul
RTase(50U/ul)	0.5ul
Nuclease-free water	2.58ul
5X RT primer	1.5ul
RNA	2ul(10ng)
total	7.5ul

On Ice 5min incubation

↓

16°C 30min

42°C 30min

85°C 5min

4°C forever

Quantitative PCR(qPCR)

: using the Taqman universal Master Mix(Applied Biosystems, Cheshire, UK)

: Roche Light Cycler 480 real-time PCR instrument (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany)

component	volume
Taqman miRNA assay 20X (probe)	0.5ul
Taqman 2X universal PCR master mix	5ul
Nuclease-free water	2.5ul
RT product	2ul
total	10ul

**각 sample은 duplicate로 시행할 것.

**NTC는 RT product 대신 DW.

**

95°C 10min

(95°C 15sec

60°C 1min)-----45cycles

** relative expression levels of each miRNA were calculated using the comparative threshold cycle (Ct) method as normalized control (miR-16) such a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Transfection

1. Cell line 6well에 3.5×10^4 개로 seeding

2. EP tube에 opti-mem 120ul+ Anti-miR 10^{-40} nM mix

EP tube에 opti-mem 120ul+ LF2000 1~3ul mix

: Anti-miR의 농도는 최종 volume에 맞추고 cell 종류나 상태에 따라 조절

5min incubate후에 두 tube를 mix 20min incubate

3. 1)의 plate에서 기존의 growth media를 제거 하고 opti-mem 1ml씩 분주

4. 2)의 mixture를 분주

5. 6h, 37°C, 5% co2에서 incubate.

6. Tranfection reagent를 제거하고 기존의 growth media로 change.

7. 3days 37°C, 5% co2에서 incubate.

MTT assay

1. 12well plate에 cell line을 2×10^4 개로 seeding(quadruplicate)

2. 24h incubation후 Drug 처리

3. MTT Mixture 500ul growth media + 100ul MTT soln.(5mg/ml in PBS)

→ 600ul/well씩 분주하여 1h 37°C에서 incubation

4. MTT mixture는 suckout하고 500ul/well DMSO add.

5. 빛차단하여 10min shaking.

6. 12well의 well 하나를 96well의 well 세개로 100ul/well로 분주

7. ELISA reader로 570nm 흡광도 측정

3. 연구결과 고찰 및 결론

Circulating microRNA 가 cancer 를 detection 할 수 있는 marker 가 될 수 있다는 것은 Patrick 등에 의해 최근에 밝혀진 바 있음 (Patrick SM et al, 2008, PNAS). 이 연구에서 cancer에서 microRNA 의 발현 pattern 이 조직 특이적이며 formalin-fixed tissue 에서도 stability 가 높게 유지되는 기존의 data 를 근거로 TaqMan qRT-PCR 의 방법을 통해 blood based microRNA 를 detection 하였음. 이 연구 결과 human plasma에서 endogenous microRNA 가 안정적으로 유지되는 것을 확인하였으며 또한 prostate cancer 환자에서 tissue based microRNA array 를 통해 알려진 tumor-derived microRNA 를 혈액 내에서도 detection 할 수 있었음.

그 외 Wong TS (2008, Clin Cancer Res)는 human squamous cell cancer(SCC) of tongue에서 circulating miR-184 가 oncogenic marker 로 쓰일 수 있음을 functional study 를 통해 밝힌 바 있음. miR-184 가 SCC 환자의 blood 내에서 정상에 비해 약 60배 가량 증가되어 있으며 SCC cell line에서 miR-184 inhibitor 를 처리했을 때 cancer cell 의 proliferation 이 현저히 감소되는 것을 볼 수 있었음. 그리고 23명의 SCC 환자에서 수술 전과 후의 blood 내 miR-184 의 level 을 보았을 때 치료를 통해서 miR-184의 level 이 감소되는 것을 보였음.

본 연구는 혈중 유방암 특이적인 microRNA 를 가정하고 탐색적인 연구로 시작하였음. 정상인과 차이를 보인 microRNA 로 mir-1280 과 mir-720 를 확인하였음. 많은 수의 환자화 정상인에서 quantitative RT-PCR 의 방법으로 mir-1280 과 mir-720 의 혈중 level 에 있어 차이가 있다는 것을 확인하였으며 특히 종양이 양적으로 더 많이 증가되었을 때 각각의 microRNA 의 혈중 level 도 증가되는 것을 확인할 수 있었음.

또 전이성 유방암의 경우 치료 전과 치료 후에 mir-1280 과 mir-720 의 혈중 농도가 달라지는 것을 보아 치료의 반응 정도 및 향후 치료 반응 정도를 예측할 수 있는 생체 지표로 사용할 수 있을 가능성을 볼 수 있었음.

하지만 이런 microRNA 의 기능을 연구하기 위해 해당 microRNA 의 origin 및 세포 내 biogenesis 을 찾아 보던 중 해당 microRNA 가 특정 tRNA 의 일부일 가능성을 발견하게 됨. 이런 tRNA derived microRNA 는 microRNA 의 새로운 종으로 분류되기도 하고 (Yong Sun Lee et al, Genes Dev 23:2639-2649, 2009) 또는 microRNA 의 biogenesis 과정 중 비특이적인 과정에 의해 만들어 지는 것으로 설명하기도 함 (Jr-Shiuan Yang and Eric Lai, Molecular cell 43:892-903, 2011). 이런 tRNA derived fragment miRNA 또는 tRNA 자체가 cancer cell 내에서는 증가될 수 있고 그 역할도 단순히 biogenesis 과정에서 나오는 부산물이 아니라 oncogenesis 에 적극적으로 역할을 할 수 있을 가능성에 대해 연구 발표된 결과들이

있음 (Yong Sun Lee et al, Genes Dev 23:2639-2649, 2009, Anton Berns, Cell 133: 29-30, 2008).

본 연구에서 탐색하고자 했던 mir-1280 과 mir-720 은 정상 유선 조직에서는 거의 검출되지 않았으나 종양 조직과 유방암 환자의 혈액 내에서는 높은 level 로 검출이 되었으며 특히 tumor burden 에 따른 차이를 보였음. 따라서 본 연구 결과를 통해 도출할 수 있는 가설로는 cancer cell에서 특정 tRNA 가 많이 만들어 지거나 또는 특정 tRNA 의 세포 내 processing 과정에서 해당 microRNA 의 생성이 많은 방향으로 biogenesis 가 진행될 가능성을 생각할 수 있겠음.

mir-1280 과 mir-720 의 세포 내 기능을 탐색하기 위해 anti-mir 를 사용하였으나 각 anti-mir 를 transfection 시킨 세포에서 cell 의 성장과 사멸에 변화를 볼 수 없었음. 특히 anti-mir 를 넣은 세포에서 각 microRNA 의 level 이 낮아지지 않았으며 이것이 기능적인 변화를 관찰하는데 영향을 주었을 가능성도 있음. MCF-7 이나 T47D, MDA-MB-231 같은 유방암 세포주에서는 기대와 달리 종양 조직만큼 높은 microRNA 의 발현을 볼 수 없었으며 이것 역시 anti-mir 에 의한 변화를 관찰할 수 없었던 이유가 될 수도 있을 것으로 생각됨.

mir-1280 과 mir-720 은 각각 염기 서열로 보았을 때 leucin 과 tryptophan 아미노산의 tRNA 과 유사한 것으로 생각됨. Leucin 과 tryptophan 은 대표적으로 인체 내에서 합성되지 않는 필수 아미노산으로 알려져 있음. 따라서 cell line에서 그 양이 종양 조직에 비해 적은 이유가 in vitro 상태와 in vivo 상태와의 차이, 즉 주변 미세환경에 의해 달라질 수 있을 가능성을 고려할 수 있겠음. 이런 미세환경을 포함한 조건에서 각 microRNA 의 기능을 탐색할 필요가 있을 것으로 생각됨.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청 : 준비 중임.

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	지자	학술대회명	지역 ¹⁾	지원과제번호
Circulating microRNAs as specific biomarkers for breast cancer.	In Hae Park, et al	AACR 2012	국외	

1) 지역 : 국내, 국외

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표	달성내용	달성도(%)
			연차

유방암 환자의 혈액 내에서 유방암에 특이적이며 치료 (수술, 항호르몬 치료, 항암치료)의 반응과 연관된 microRNA 을 발굴하고 그것의 세포 내 기능을 밝히는 것이 목표임.	1차년도	유방암 조직과 혈액에서 microRNA expression array 를 통해 microRNA profile model 확립	blood 에서의 microRNA array data 를 통해 유방암과 관련된 microRNA 을 찾음.	1	100%
	2차년도	candidate microRNA 를 blood sample에서 검증	discovery patients cohort에서 candidate microRNA 를 blood 내에서 qRT-PCR 로 검증을 하고 이후 validation patient cohort에서 확인함.		
	3차년도	치료의 predictive marker 로서의 microRNA 의 기능을 탐색함.	전이성 유방암 환자에서 치료 전후의 혈액을 채취하여 microRNA expression 차이를 봄 유방암 세포주를 이용하여 microRNA의 기능을 탐색함.	2	50%

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
정상인의 혈액과 유방암 환자의 혈액에서 차이를 보이는 microRNA 를 찾고 이를 RT-PCR 로 확인함.	discovery patients cohort에서 candidate microRNA 를 blood 내에서 qRT-PCR 로 검증을 하고 이후 validation patient cohort에서 확인함.
치료의 predictive marker 로서의 microRNA 발굴하고 그 기능을 세포주에서 확인함.	전이성 유방암 환자에서 치료 전후의 혈액을 채취하여 microRNA expression 차이를 봄. 세포 주에서 anti-mir 를 이용하여 cell 의 phenotype 변화를 관찰하였으나 특정 기능을 확인하지 못함.

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	1	IF 3.0
산업재산권 등록		
기 타		

(2) 연구성과의 활용계획

현재 tRNA와 tRNA synthatase 에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있으며 이것에 대한 cancer cell 내에서의 역할에 대해서도 일부 밝혀진 바가 있음.

본 연구 결과 도출된 mir-1280 과 mir-720 의 역할에 대해서는 향후 biogenesis 과정에 대한 연구를 포함하여 cancer cell 과 미세환경과의 상호작용의 측면에서 그 기능에 대한 연구를 진행할 계획임.

6. 참고문헌

1. Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med* 2009; 60: 167-179.
2. Visone R, Croce CM. MiRNAs and cancer. *Am J Pathol* 2009; 174: 1131-1138.
3. Lowery AJ, Miller N, McNeill RE, Kerin MJ. MicroRNAs as prognostic indicators and therapeutic targets: potential effect on breast cancer management. *Clin Cancer Res* 2008; 14:360-365.
4. Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* 2008; 299: 425-436.
5. Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N et al. A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell* 2009; 137: 1032-1046.
6. Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 2008; 451: 147-152.
7. Lowery AJ, Miller N, Devaney A et al. MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2009; 11: R27.
8. Shimono Y, Zabala M, Cho RW et al. Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell* 2009; 138: 592-603.
9. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 10513-10518.
10. Wong TS, Liu XB, Wong BY et al. Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 2588-2592.
11. Heneghan HM, Miller N, Newell J et al. Systemic miRNA levels as novel breast cancer biomarkers. proceeding SABCS 2009 abstract #32.
12. Lee YS, Shibata Y, Malhotra A et al, A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Genes Dev* 2009; 23:2639-2649.
13. Yang S and Lai E. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Molecular Cell* 2011;43:892-903.
14. Anton Berns. A tRNA with oncogenic capacity. *Cell* 2008; 133:29-30.

7. 첨부서류

AACR 2012 abstract 첨부함.