

F
G
0
9
/
1
1
/
0
6

FG09-11-06

인간유전체기능연구
Functional Analysis of Human Genome

**Array-CGH 시스템을 이용한 진단/예후 지표 및
환자 맞춤 치료법 개발**

**Develop diagnostic/prognostic marker system for HCC
by using array-CGH**

가톨릭대학교

교육과학기술부

Array-
CGH
시
스
템
을

이
용
한

진
단
/
예
후
지
표

및

환
자

맞
춤
치
료
법

개
발

교
육
과
학
기
술
부

제 출 문

교육과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “ Array-CGH 시스템을 이용한 진단/예후 지표 및 환자 맞춤 치료법 개발 ”과제의 보고서로 제출합니다.

2010. 05. 21

주관연구기관명 : 가톨릭대학교 (성의)

주관연구책임자 : 정 연 준
연 구 원 : 최 종 영
" : 배 시 현
" : 이 석 형
" : 임 선 희
" : 강 현 미
" : 김 태 민
" : 허 혜 진
" : 김 지 홍
" : 서 해 동
" : 김 미 영
" : 민 애 령
" : 정 승 현
" : 정 용 복
" : 최 혜 선
" : 홍 승 현
" : Jiang Yuzhu
" : 신 승 훈

보고서 초록

과제관리번호	FG09-11-06	해당단계 연구기간	'06.09.01-'10.03.31	단계 구분	3 / 3
3 연구사업명	중 사업명	21C 프론티어연구개발사업			
	세부사업명	인간유전체기능연구사업			
연구과제명	중 과제명				
	세부(단위)과제명	Array-CGH 시스템을 이용한 진단/예후 지표 및 환자 맞춤 치료법 개발			
연구책임자	정연준	해당단계 참여연구원수	총 : 18 명 내부 : 8 명 외부 : 10 명	해당단계 연구비	정부: 550,000 천원 기업: 천원 계: 550,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	가톨릭대학교(성의) 미생물학교실		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서 면수
					53
<p>연구 목적</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 전장 유전체 분석기술인 array-CGH를 이용하여 DNA, RNA, protein이라는 생명체의 3대 축 중 RNA, proteomics 수준에서 발굴해온 간암 바이오마커와 보완적으로 DNA copy number 변이마커를 발굴하여 간암 예후예측의 실효성을 높임 ● 임상친화성 간암예후예측용/치료효과 예측용 DNA칩 또는 검사키트 개발 ● 임상적용을 지원하는 분석 시스템 개발 <p>연구 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 한국인 간암에서 공통적으로 변하는 common alteration region (CAR) 발굴 (특허출원: 한국, 미국) -32종의 CAR 및 43종의 high level copy number alteration 마커 발굴 -CAR 중 Gain of 1q21.1-q32.1 (64.5%), 1q32.1-q44 (59.2%), 8q11.21-q24.3 (48.7%), Loss of 17p13.3-p12 (51.3%)은 한국인 간암의 45%이상에서 매우 빈번하게 발견되었으며 MYC, EIF3S3 유전자 위치하는 8q11.1-8q24.3의 amplification은 76례의 간암 중 10례에서 공통적으로 발견되었음. ● Genomic qPCR기반 간암 예후예측 검사 kit 개발 (특허출원: 한국) - 발굴한 CAR 마커 중 간암의 예후를 가장 정확히 나타내는 조합을 룰 마이닝을 이용하여 발굴하였고 이를 바탕으로 간암 간암 예후예측 검사 kit을 설계하였음. ● 간암 예후예측용 DNA 어레이 시스템 개발 -발굴한 CAR 마커 및 예후/임상 연관성 결과를 바탕으로 6093 probe를 디자인하고 이를 바탕으로 간암 예후예측용 DNA 어레이 시스템을 개발하였음 (http://ircgp.com/cnv_RND1.html). ● 간암 CAR에 속한 유전자들의 기능 연구 및 치료적용 가능성 확보 -TPM3, KIF14 유전자의 간암 발암기전을 규명하였으며 이 유전자의 과발현 경로 차단시 간암성장이 지연됨을 확인하였음. ● 간암 염색체 변이 분석 및 간암 예후예측 검사kit을 지원하는 소프트웨어 개발 -Gene Set Enrichment Analysis for Genomic Alterations (GEAR: http://www.systemsbioogy.co.kr/GEAR/) - CGHscape, http://www.ircgp.com/software/CGHscape 					
색인어 (각 5개 이상)	한글	간암, 어레이-비교유전자보합법, 공통 염색체변이구역, 암유전자, 맞춤의학			
	영어	Hepatoma, array-CGH, common alteration region (CAR), cancer related gene, Personalized medicine			

요 약 문

I. 제 목

Array-CGH 시스템을 이용한 진단/예후 지표 및 환자 맞춤 치료법 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

연구개발의 목적

- 전장 유전체 분석기술인 array-CGH를 이용하여 DNA, RNA, protein이라는 생명체의 3대 축 중RNA, proteomics 수준에서 발굴해온 간암 바이오마커와 보완적으로 DNA copy number 변이마커를 발굴하여 간암 예후예측의 실효성을 높임
- 임상친화성 간암예후예측용/치료효과 예측용 DNA칩 또는 검사키트 개발
- 임상적용을 지원하는 분석 시스템 개발

연구개발의 필요성

간암을 포함한 소화기계 암은 우리나라를 포함한 아시아지역에서 특히 흔하며 다른 종류의 암에 비해서 높은 발병률 및 치사율을 가지기 때문에 이에 대응할 수 있는 보다 발전되고 임상친화적인 진단 및 치료기술 개발이 절실한 실정임. 이를 위해서는 기존의 유전자발현, 후성유전체, 단백질체 분석 외에 전장 염색체변이 분석 자료도 필요하며 이들이 통합적으로 해석될 때 간암의 맞춤치료 실현이 촉진될 수 있음.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- Array-CGH를 이용한 한국인 간암 (정상-암조직)에 대한 전장 염색체 변이 분석
- 한국인 간암에서 공통적으로 나타나는 염색체 변이 구역 (CAR) 분석 및 발굴
- Genomic qPCR, Real-time qRT-PCR등을 이용한 CAR 검증
- 간암 예후예측용 genomic qPCR 검사 kit 개발 및 마이크로어레이 칩 개발
- 간암 예후예측/임상연관성 분석을 지원하는 소프트웨어 개발

IV. 연구개발결과

- 한국인 간암에서 공통적으로 변하는 common alteration region (CAR) 발굴 (특허출원: 한국,미국)

-32종의 CAR 및 43종의 high level copy number alteration 마커 발굴

-CAR 중 Gain of 1q21.1-q32.1 (64.5%), 1q32.1-q44 (59.2%), 8q11.21-q24.3 (48.7%), Loss of 17p13.3-p12 (51.3%)은 한국인 간암의 45%이상에서 매우 빈번하게 발견되었으며 MYC, EIF3S3 유전자가 위치하는 8q11.1-8q24.3의 amplification은 76례의 간암 중 10례에서 공통적으로 발견되었음.

- Genomic qPCR기반 간암 예후예측 검사 kit 개발 (특허출원: 한국)

- 발굴한 CAR 마커 중 간암의 예후를 가장 정확히 나타내는 조합을 룰 마이닝을 이용하여 발굴하였고 이를 바탕으로 간암 예후예측 검사 kit을 설계하였음.

- 간암 예후예측용 DNA 어레이 시스템 개발
 - 발굴한 CAR 마커 및 예후/임상 연관성 결과를 바탕으로 6093 probe를 디자인하고 이를 바탕으로 간암 예후예측용 DNA 어레이 시스템을 개발하였음 (http://ircgp.com/cnv_RND1.html).
- 간암 CAR에 속한 유전자들의 기능 연구 및 치료적용 가능성 확보
 - TPM3, KIF14 유전자의 간암 발암기전을 규명하였으며 이 유전자의 과발현 경로 차단 시 간암성장이 지연됨을 확인하였음.
- 간암 염색체 변이 분석 및 간암 예후예측 검사kit을 지원하는 소프트웨어 개발
 - Gene Set Enrichment Analysis for Genomic Alterations (GEAR: <http://www.systemsbiology.co.kr/GEAR/>)
 - CGHscape, <http://www.ircgp.com/software/CGHscape>

V. 연구개발결과의 활용계획

- 개발한 임상친화성 간암예후예측용 유전자 검사법의 임상적용
 - :본 연구를 통해 1)간암 예후예측용 genomic qPCR kit개발과 2)간암 올리고어레이 칩 개발을 이루었음. 향후 개발한 검사법을 임상에 적용하여 효능검증을 거친 뒤 궁극적으로는 임상에서 사용할 수 있는 시스템으로 발전시킴
- 간암 CAR에 속한 유전자들의 기능 연구 및 진단/치료적용 가능성연구
 - :본 연구를 통해 간암 발암에 기여정도가 큰 유전자로 판단되는 KIF14와 TPM3 유전자의 기능연구를 실시하였음. 이들이 간암의 침윤성 및 성장에 기여함을 입증하였기에 향후 이들의 경로를 차단하는 치료제 개발로 활용될 수 있을 것으로 예상함.

S U M M A R Y

I. Title

Develop diagnostic/prognostic marker system for HCC by using array-CGH

II. Background and Purpose

Purpose

- Most of the biomarkers of hepatoma have been studied using gene expression profiling, epigenomics, or proteomics approach. To get more reliable and comprehensive prognosis prediction method for hepatoma, we planed to perform genome-wide DNA copy number alteration analysis using array-CGH technology for merging diverse data.
- Develop clinic-oriented prognosis/treatment responsiveness prediction kit
- Develop the analysis software or algorithm for clinical application of the prediction system

Background

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the third most common cause of cancer mortality worldwide, and liver cirrhosis is the most important predisposing factor for it. Therefore, developing reliable and clinic-oriented diagnostic/prognostic method is still very important to control HCC. Comprehensive understanding of HCC by merging transcriptome, epigenome, proteome and genome analysis data is crucial for future personalized medicine.

III. Approaches

- Analysis the whole-genome copy number alterations using array-CGH for Korean HCC cases (normal-tumor pair)
- Define the common alteration regions (CARs) in the HCCs
- Validation of the CARs by using genomic qPCR and real-time qRT-PCR
- Develop genomic qPCR kit and diagnostic array-chip for HCC
- Develop softwares to support prediction of HCC prognosis in the clinical field

IV. Result

- Define common alteration regions (CAR) in HCC (Patent: Korean, USA)
 - Mining 32 CARs and 43 high level copy number alterations
 - Commonly appeared CARs (> 45%): Gain of 1q21.1-q32.1 (64.5%), 1q32.1-q44 (59.2%), 8q11.21-q24.3 (48.7%), Loss of 17p13.3-p12 (51.3%)
 - Most common amplification: 8q11.1-8q24.3 amplification where MYC and EIF3S3 genes are located.

- Develop Genomic qPCR based HCC prognosis prediction kit (Patent: Korea)
- Develop DNA array system for HCC prognosis prediction
- Functional analysis of the putative cancer related genes located in the significant CARs

-Explored the biological role of TPM3 and KIF14 overexpression in HCC by using siRNA knockdown. TPM3 was found to be related with HCC invasion and metastasis through activating epithelial to mesenchymal transition pathway and KIF14 was found to be associated with tumor cell growth through inactivation of negative regulator of cell cycle progression.

- Develop softwares to support prediction of HCC prognosis in the clinical field
- Gene Set Enrichment Analysis for Genomic Alterations (GEAR: <http://www.systemsbiology.co.kr/GEAR/>)
- CGHscape: (<http://www.ircgp.com/software/CGHscape>)

V. Application

- Clinical application of the HCC prognosis prediction methods

:We developed two types of HCC prognosis prediction methods: 1)Genomic qPCR based HCC prognosis prediction kit 2)DNA array system for HCC prognosis prediction. After further clinical validation, these systems can be applied for HCC patient care. Especially, genomic qPCR kit will be more suitable for clinical application in terms of the simplicity of procedure and interpretation.

- Functional analysis of the putative cancer related genes located in the significant CARs

:As described above, overexpression of KIF14 and TPM3 genes can be potential diagnostic and therapeutic targets for inhibiting tumor cell growth and invasiveness.

C O N T E N T S

(영 문 목 차)

Chapter 1. General background (page 9-11)

Chapter 2. Technical background (page 12-14)

Chapter 3. Approaches and Results (page 15-38)

Chapter 4. Achievement (page 39-42)

Chapter 5. Applications (43-44)

Chapter 6. Related Informations (45)

Chapter 7. References (45)

목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요 (page 9-11)
- 제 2 장 국내외 기술개발 현황 (page 12-14)
- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 (page 15-38)
- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 (page 39-42)
- 제 5 장 연구개발결과의 활용계획 (43-44)
- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 (45)
- 제 7 장 참고문헌 (45)

제 1 장 연구개발과제의 개요

가 연구개발의 목적

- 염색체 변이를 고해상도로 분석할 수 있는 기술인 array-CGH를 이용하여 DNA, RNA, protein이라는 생명체의 3대 축 중 지금까지 RNA, proteomics 수준에서 발굴해온 간암 바이오마커와 차별적으로 보완적인 DNA copy number 염색체 변이마커를 발굴 하여 간암 예후예측의 실효성을 높임
- 임상친화성 간암예후예측용/치료효과 예측용 DNA칩 또는 검사키트 개발
- 후보 바이오마커에 대해 생물학적 효능검증을 실시하여 진단적 측면의 예후예측 뿐 아니라 치료제 개발의 가능성을 개척함
- 임상적용을 지원하는 분석 시스템 개발

나. 연구개발의 필요성

○ 기술적 측면

간암을 포함한 소화기계 암은 우리나라를 포함한 아시아지역에서 특히 흔하며 다른 종류의 암에 비해서 높은 발병율 및 치사율을 가지기 때문에 이에 대응할 수 있는 보다 발전된 진단 및 치료기술을 개발이 절실한 실정이다. 기존의 조기 진단기술을 대치·보완할 수 있는 새로운 바이오마커의 개발은 위암 및 간암의 조기진단율을 높이고 결과적으로 이러한 질환의 조기적출을 통한 생존율의 향상을 꾀함으로써 종양치료와 관련한 경제학적 비용의 절감을 유발할 수 있다. 또한 생물학적으로 의의가 있는 바이오마커의 경우 단순히 질환의 조기진단뿐 아니라 치료전략마련·예후판정 등에 다양하게 활용될 수 있는 장점이 있다. 즉, 특정 바이오마커의 유무 혹은 발현양상에 따라 위암·간암샘플간의 분자분류molecular taxonomy가 가능한데 이렇게 구분된 환자군은 각각 특정치료에 반응여부가 다르거나 예후가 다를 수 있기에 환자의 조기진단, 치료전략수립, 예후예측 등의 암환자전반의 토달 케어가 가능하다.

간암(Hepatocellular carcinoma; HCC)은 전 세계적으로 가장 흔한 종양들 중 하나이고, 암과 관련된 전체 사망이 세 번째로 높은 악성 질환이다. 간암의 발병기전 및 악성화 기전이 연구되어 p53 암억제 유전자의 변이, Wnt 시그널, EGFR 변이 등이 관여됨을 알게 되었으나, 간암 발병율은 여전히 증가하고 있고, 초기 단계에서 손상 부위를 완전히 절제하는 것이 치료에 있어서 유일한 희망이어서, 보다 효과적인 진단 및 치료법 개발의 중요성은 여전하다. 특히 간암은 알콜이나 B형 간염바이러스 등이 원인이 되는 경우가 많은데 다른 소화기계 암보다 조기진단이 매우 힘들며 상당히 진행된 상태에서 발견되는 경우가 많기 때문에 예후가 지극히 불량해 진단 후 평균수명이 1년을 넘지 못하는 실정이다. 위암과 간암의 경우 각각 내시경 및 초음파기기를 활용한 조기 진단술이 이용되며 그 효용성이 어느 정도 인정되고 있으나 전술한바와 같이 위암·간암의 발생빈도와 치사율이 상대적으로 매우 높기 때문에 기존의 조기 진단술을 대치·보완할 수 있는 기술의 개발이 절실한 상황이다. 예를 들어 만성B형간염환자 등 고위험군에 대한 지속적인 추적, 고연령군등에 대

한 초음파검사가 간암의 조기 진단법으로 이용되고 있으나 간암의 전구병변인 dysplastic nodule이 발견될 때는 이미 발암과정이 충분히 진행된 상태이고 나머지경우의 대부분은 이미 진단당시 완전적출이 불가능하여 고식적인 TACE시술 등에 의존하게 된다. 간암의 대표적인 바이오마커로 AFP(alpha-fetoprotein)라는 물질이 알려져 있으며 간암의 초기 스크리닝, 재발·전이여부판정 등에 이용되고 있으나 민감도자체가 그리 높지 못하며(60%) 이러한 AFP의 유의한 혈중농도증가를 보이는 경우는 이미 발견되지 않은 간암이 상당 수준 진행된 경우가 많아 임상적 의의가 그리 높지 못한 실정이다. 따라서 특정치료법에 예후가 좋은 환자와 좋지 않는 환자를 구분할 수 있는 고효율의 혈청학적인 표지자를 개발할 필요성은 절실하다. 따라서 다양한 방식으로 표지자를 발굴하고 이를 임상정보와 최대한 결합하는 노력이 중요하다는 공감대가 형성되고 있고 본 과제에서도 이러한 방향의 연구를 지향하였다. 기능유전체 정보와 임상정보를 통합하여 임상에 적용 하므로써 맞춤형의학을 발전시킬 수 있다는 개념은 아래 그림에 정리되어있다 (그림).

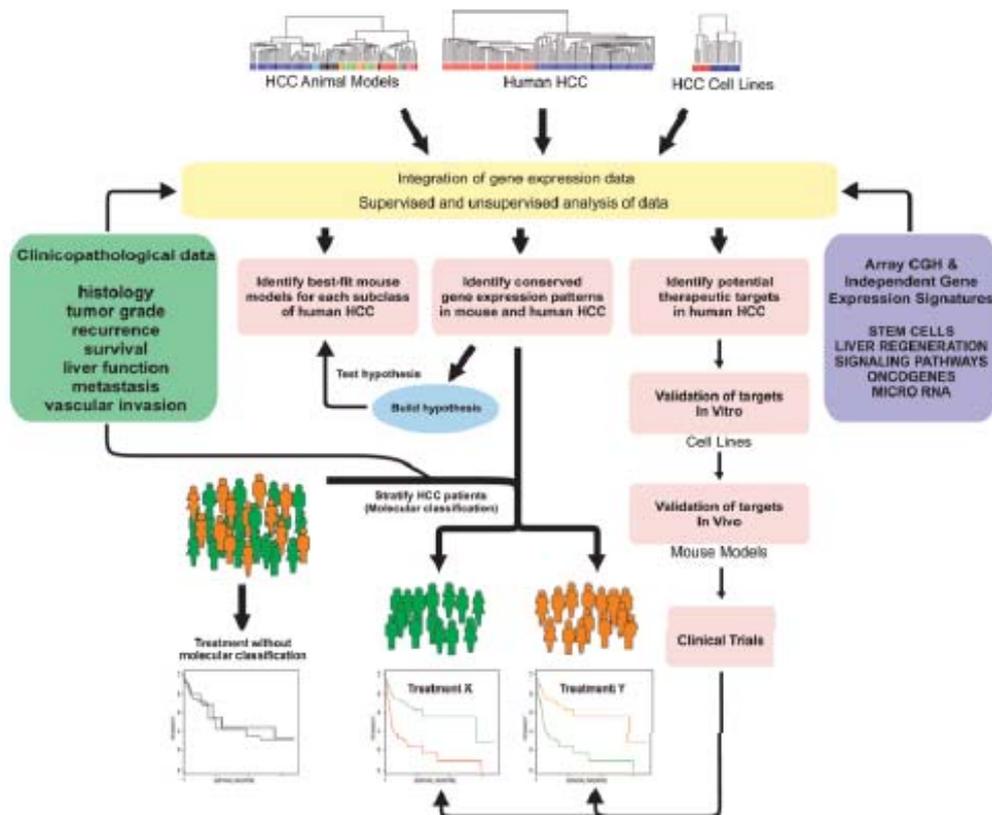


그림. A framework for the application of integrative functional genomics and its clinical implication (Ref 1. Hepatology. 2006 43:S145-50)

근래에 마이크로어레이 기술과 비교 유전자보합 (comparative genomic hybridization; CGH) 기술이 융합된 어레이-CGH를 이용하여 암에서 발생한 염색체 복제수 변이 (copy number alteration, CNA)를 높은 해상도로 찾을 수 있게 되었다. 그러나 어레이-CGH를 기반으로 한 기술이 그대로 임상에 적용되는데 몇 가지 어려움이 있는데 첫째는 마이크로어레이 분석과정이 정밀하며 특수 장비가 필요하여 환자를 진료하는 일선 의료기관의 검사실에서 시행하기 어려운 단점이 있다. 둘째는 많은 CNA 들이 발굴되었는데 이 마커들이 개별적으로는 임상에서 적용되기에 충분한 예측력을 가지지 못한다는 어려움이 있다.

○ 경제·산업적 측면

간암은 한국 뿐 아니라 전 세계적으로 중요한 신생물 질환으로 매년 약 50만명이 간암에 의해 사망하고 있다. 이렇게 사회적으로 중요한 질환이지만 현 기술수준으로는 세계 어느 나라도 치료 제개발만으로 종양을 제어할 수 없음을 자명하다. 지속적 치료제 개발이 중요하지만 조기진단법의 개발 및 개선에 의한 완치율과 생존율 증가가 보다 현실적인 대안일 것이다. 조기진단 이전에 종양 발생 자체를 예측할 수 있는 바이오마커 발굴도 이루어지고 있지만 현재로서는 가능성이 희박하므로 특히 조기진단에 의한 치료효율 향상과 치료 전 예후예측에 의한 효율적 치료가 가장 가능성 있는 방안이라 하겠다. 앞에서 언급한대로 한국에서 종양에 의한 사회적 손실액 연간 약 15조 5천 억원 정도로 추산되고 있으며 이로 인한 가족 구성원의 보이지 않는 고통은 가족 해체로 까지 이어지는 것이 현실이다. 국가의 R&D 투자는 대다수 국민들도 잘 알고 있기에 BT분야의 실용적 연구 결실에 대한 암환자 및 일반 국민들의 기대와 희망은 대단히 클 것이다. 위암/간암 고효율 진단기술의 완성은 신약개발과 같이 긴 시간을 요하지는 않기에 BT 분야의 연구사업 성과를 기대하는 국민적 기대에 조속히 부응하는 측면에서도 적절한 분야일 것이다.

○ 연구개발의 범위

본 연구에서는 고해상도 array-CGH를 이용하여 간암의 예후 및 특성과 연관된 염색체변이 마커를 발굴하고 이를 바탕으로 임상적용의 장벽을 낮추는 임상 친화적 간암예후예측 검사 kit을 개발하고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 간암의 염색체 변이 연구

○ 염색체이상은 HCC 에서 빈번하게 탐지되는데 comparative genomic hybridization(CGH)과 loss of heterozygosity analyses를 통한 분자세포유전적 기술은 genomic level에서 HCC의 유용한 변화양상의 정보를 제공해 왔다. 염색체의 gain과 loss의 mapping 은 oncogene과 tumor suppress 유전자의 증명에서 각각 빈번한 결과를 가져왔다. 염색체이상 가운데, 1q, 8q, 20q의 gain 과 4q, 8p, 13q, 16q, 17p의 loss는 빈번히 보고되어 왔지만, 반드시 임상 및 예후 연관성은 아니었다. Saelee 등은 태국HCC 환자에서 염색체 5q34, 6p25.2, 8q12.1에서 DNA 변형을 관찰했으며, HCC에서 저조한 생존율과 관련된 염색체 5q34의 allelic loss를 발견했는데, 이는 이 염색체 구역이 HCC 발달의 역할을 하며 HCC의 예후 마커로 사용될 수 있음을 가리킨다. 이는 HCC에서 TOX내의 유전적 변형의 첫 보고이다. 염색체 8q12.1에 위치한 TOX가 간암발생 또는 다른 cancer에서 연관성이 기존에 없더라도, cancer에서 이 유전자는 주목할 만하다. 아래그림은 CGH기술을 이용하여 발굴되어온 간암의 염색체변이 및 이 변이 구역에 위치하는 암 관련 유전자들을 정리하였다 (그림) (Ref 2 Hepatology 29 (4): 1208).

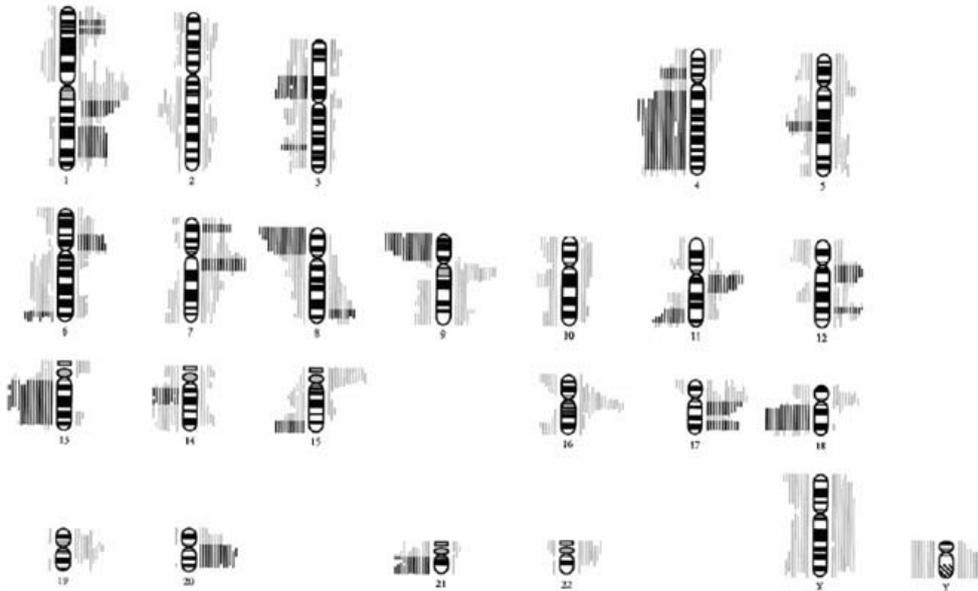


TABLE 2. Chromosomal Localization of Genomic Imbalances in HCC and Proto-oncogene and Tumor Suppressor Genes

Regions With DNA Copy-Number Gains	Proto-oncogene	Regions With DNA Copy-Number Losses	Tumor Suppressor Genes
1p34.3-35	LCK, MYCL1	3p12-14	FHIT, NRC-1, RCA1, PTPRG
1p33-34.1	MPL	3q25	—
1q21-23	SKY	4p12-14	—
1q31-32	ELK4	4q13-34	SMAD1, FAT, AREG
6p11-12	KRAS1P	5q21	MCC, APC
7p2.1	RALA	6q25-26	MAS1, M6P/IGF2R, ST8
7q11.2	—	8p11.2-23	EIF4, EBF1, PRLTS
8q24.1-24.2	MYC	9p12-24	CDKN2B(p15), CDKN2A(p16)
11q11-13	INT2, BCL1, SEA, STF1	11q23-24.1	—
12q11-13	GLI, INT1, RAB5B	13q12-33	RB, BRCA2, FLT1
12q23	ELK3	14q12-13	—
17q11.2-21	ERBB2	15q25-26	—
17q23-24	ERBAL2	18q11.2-22.2	SMAD2, SMAD4, DCC
20p11.1-q13.2	SRC, MYB12	21q22	—

(Hepatology 29 (4): 1208)

○ 본 연구진은 whole-genome array-CGH를 이용하여 HCC 에서 빈번히 변화된 염색체구역을 정의했으며, gene set enrichment analysis 를 통해 기능적 연관성을 조사했다. 그 결과 간암의 병기, invasiveness등과 연관된 새로운 copy number alteration을 발굴 하였으며 (*Int J Cancer* 2008) 후속 연구를 통해 한국인 간암에서 발굴된 copy number alteration 및 이 구역에 포함된 유전자들이 간암발생에 기여하는 기전을 증명하여왔다 (*BMC Cancer* 2010) (Ref 3,4). 또한 Array-CGH를 임상연구에 적용시키는 기술을 발전시켜왔는데 예를 들면 copy number 분석 결과를 기능적으로 해석하는 tool개발, 다양한 임상시료에서 array-CGH 분석의 최적화 실험조건 제시, 고해상도 array-CGH 기법 및 DNA copy number와 RNA expression의 통합 분석기술 개발 등을 지속적으로 발표해왔다 (*Bioinformatics* 2008; *BMC Bioinformatics* 2007; *Molecular & Cellular Toxicology* 2008; *Exp Mol Med* 2009) (Ref 5-8). 이와 관련하여 최근 본 연구진은 간암의 바이오 마커발굴을 임상에 연결시키는 리뷰 논문을 발표한 바 있다 (*Cancers* 2010) (Ref 9). 아래그림은 30K 올리고어레이를 이용하여 whole-genome 염색체변이와 유전자발현변화를 동시에 분석하는 기술을 개발하여 적용한 예를 보여주고 있다 (그림).

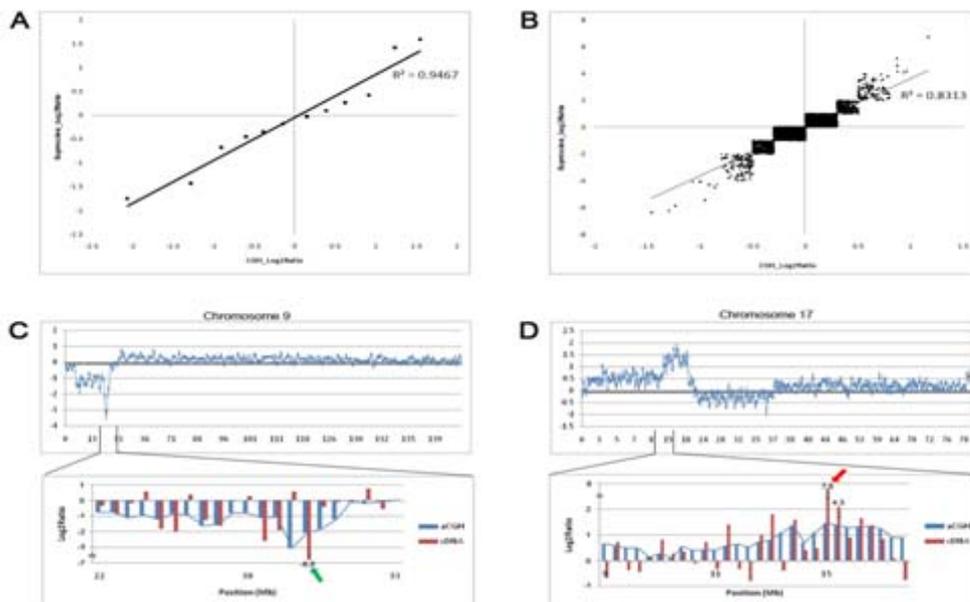


그림. Integrated analysis of copy number and expression profiles. (A) Correlation analysis of array-CGH and expression profiling. X axis represents the array-CGH signal intensity ratio (tumor/normal) in log₂ ratio and Y axis represents the expression signal intensity ratio (tumor/normal) in log₂ ratio. R-square value of the CGH and expression ratio was 0.92. (B) Example of the correlations at amplified region (17p12-p11.2). Black arrow represents the highest value of expression signal intensity ratio. (C) Example of the correlations at deleted region (9p22.1-p21.2). Black arrow represents the lowest value of expression signal intensity ratio. X axis represents the chromosomal position in Mb scale and Y axis represents the intensity ratio in log₂ ratio. (*EMM* 2009)

○ 이상을 종합하면, 전 세계적으로 간암에 대한 array-CGH 염색체 연구가 많지 않았음을 감안할 때 본연구진의 연구 역량은 선진국과 대등하다고 판단된다. 한국이 사회 문화적인 이유로 여전

히 간염 및 간암의 높은 유병율을 보이고 있음을 감안할 때 본 연구는 그간 축적해온 유전체 분석 기술을 간암에 적용하는 연구가 발전하는 계기를 제공했다고 판단된다.

2. 혈청 DNA 마커

- 일부 암에서는 DNA를 포함하는 세포물질을 혈액으로 분비하는데, 이는 암을 탐지하는 잠재 바이오마커가 되는 것으로 알려져 있다. Methylation 관련 후생유전학적 측면에서는 HCC에서 주로 세포성장을 제어하는 측면에 연관되어 있다. 이런 유전자 가운데, cyclin-dependent kinase inhibitors, p15/p16 및 RASSF1A의 메틸화된 염기서열은 암 진단시점의 혈청샘플에 존재하는 것으로 보고되었다. Zhang 등은 HCC환자의 혈청샘플에서 p16, p15 그리고 RASSF1A의 메틸화된 allele이 각각 44%, 24%, 70% 존재함을 알았고, 이런 메틸화된 allele은 cancer의 임상적 진단 1-9년 전에 탐지할 수 있음을 보고 했다. 이와 대조적으로, p16, p15 및 RASSF1A 유전자의 정상 DNA 샘플에서는 각각 4%, 0%, 6%의 메틸화 allele를 확인했다. 혈청 샘플에서 메틸화 allele의 탐지 이후 cancer의 임상진단 평균시기는 p16은 4.3년, p15은 3.4년 그리고 RASSF1A은 4.4년이였다. 장기간의 간암발생 동안 에 유전과 후생유전 상황의 연계성 등으로, 이러한 유전자는 HCC나 전암단계 병반의 조기 탐지를 위한 잠재적인 후생유전적 바이오마커 일 수 있다. 본 연구진도 혈청 DNA 분석 및 변이 분석의 기반을 마련하였으며 이는 발굴된 간암 마커를 비 침습적으로 임상에 적용하는데 많이 활용될 것으로 예상된다.

3. siRNA를 이용한 간암발암유전자의 발현억제연구

- siRNA는 간암후보유전자들의 기능연구 뿐 아니라 치료법 개발로 연결될 수 있어 근래에 많은 연구가 이루어지고 있다. 본 연구진은 array-CGH로 발굴한 새로운 간암유전자 후보들의 기능을 이해하고 이를 바탕으로 치료에 적용할 수 있는 가능성을 확보하기위해 후보 유전자들의 knockdown 연구를 활발히 하여왔다 (*BMC Cancer* 2010등). 유전자 knockdown 자체는 한국의 수준이 세계 수준과 대등하지만 치료적용을 위한 유전자 전달기술은 아직 세계수준에 많이 미흡한 분야이다.

4. RNA expression

- 다른 암 연구와 마찬가지로 간암연구에서도 RNA expression profiling을 통한 간암마커 발굴이 가장 활발하게 이루어졌다. 이 분야는 한국과 세계의 기술 격차가 거의 존재하지 않으나 결과적으로 MammaPrint와 같은 제품으로 이어지지 못한데 이는 역설적으로 간암의 비침습적 검사가 더 필요할 수 있음을 시사한다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

가. 한국인 간암에서 공통적으로 변하는 common alteration region (CAR) 발굴

○ 간암의 예후 예측을 위해 총 76례의 간암에 대해 1Mb 해상도의 BAC array를 이용하여 array-CGH분석을 실시하였고 whole-genome copy number alteration (CNA) 프로파일을 분석하였다. 아래 그림에서는 BAC array로 CNA를 발굴한 예와 76례 간암의 CNA 프로파일 및 frequency map을 보여주고 있다.

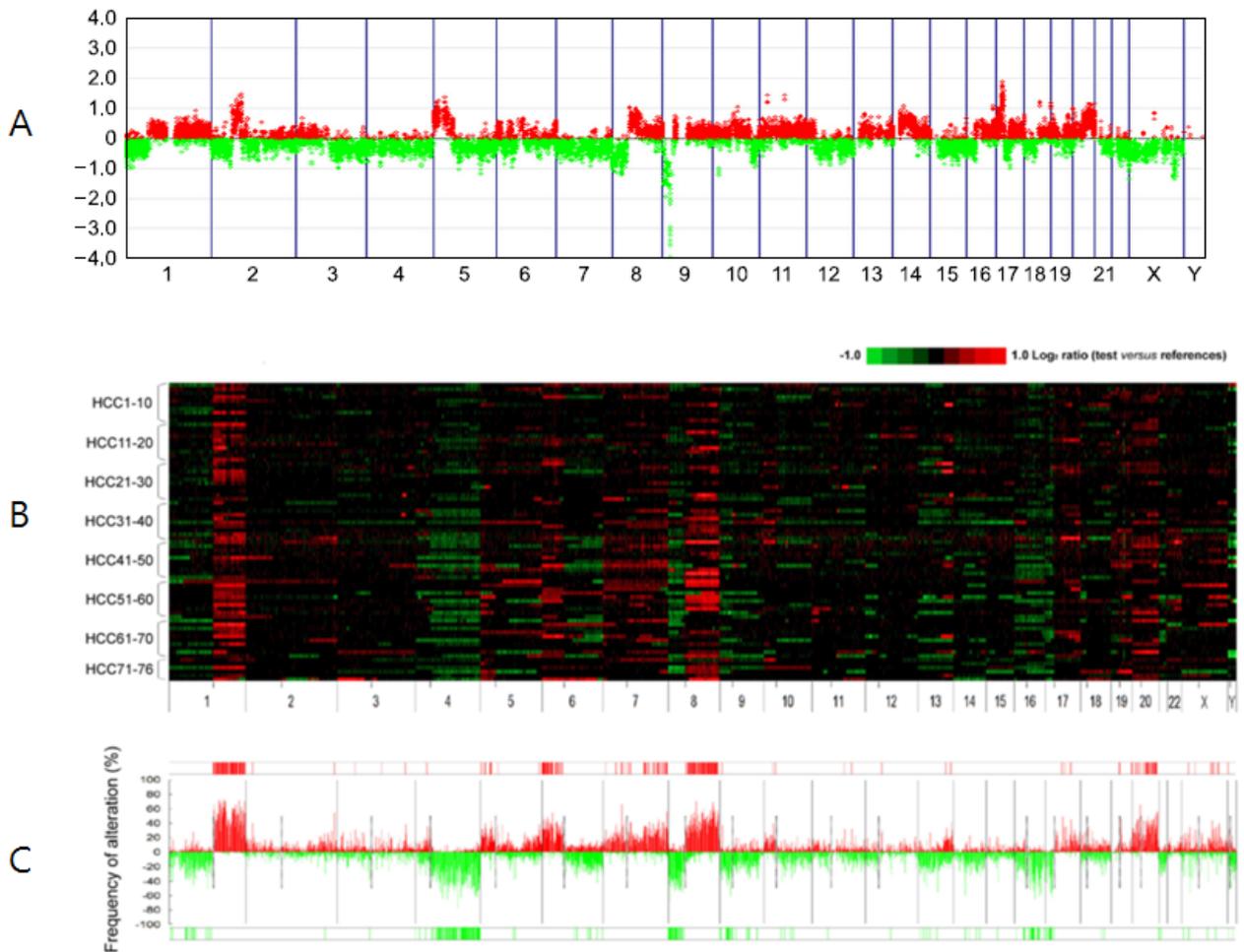


그림. A) 간암에서 나타나는 CNA의 예 B) 76례 간암의 CNA 프로파일. 붉은색: copy number gain, 초록색: copy number loss C)간암 CNA의 frequency map.

○ 그 결과 공통적으로 염색체 변이를 보이는 commonly altered region (CAR) 32종을 발굴하였다 (25% 이상 공통적으로 나타나는 CAR기준). 이 중 copy number gain - CAR이 14종, copy number loss-CAR이 18종이었다. CAR의 발굴 과정은 아래 그림과 같으며 발굴된 CAR의 자세한 사항은 아래의 표1과 같다.

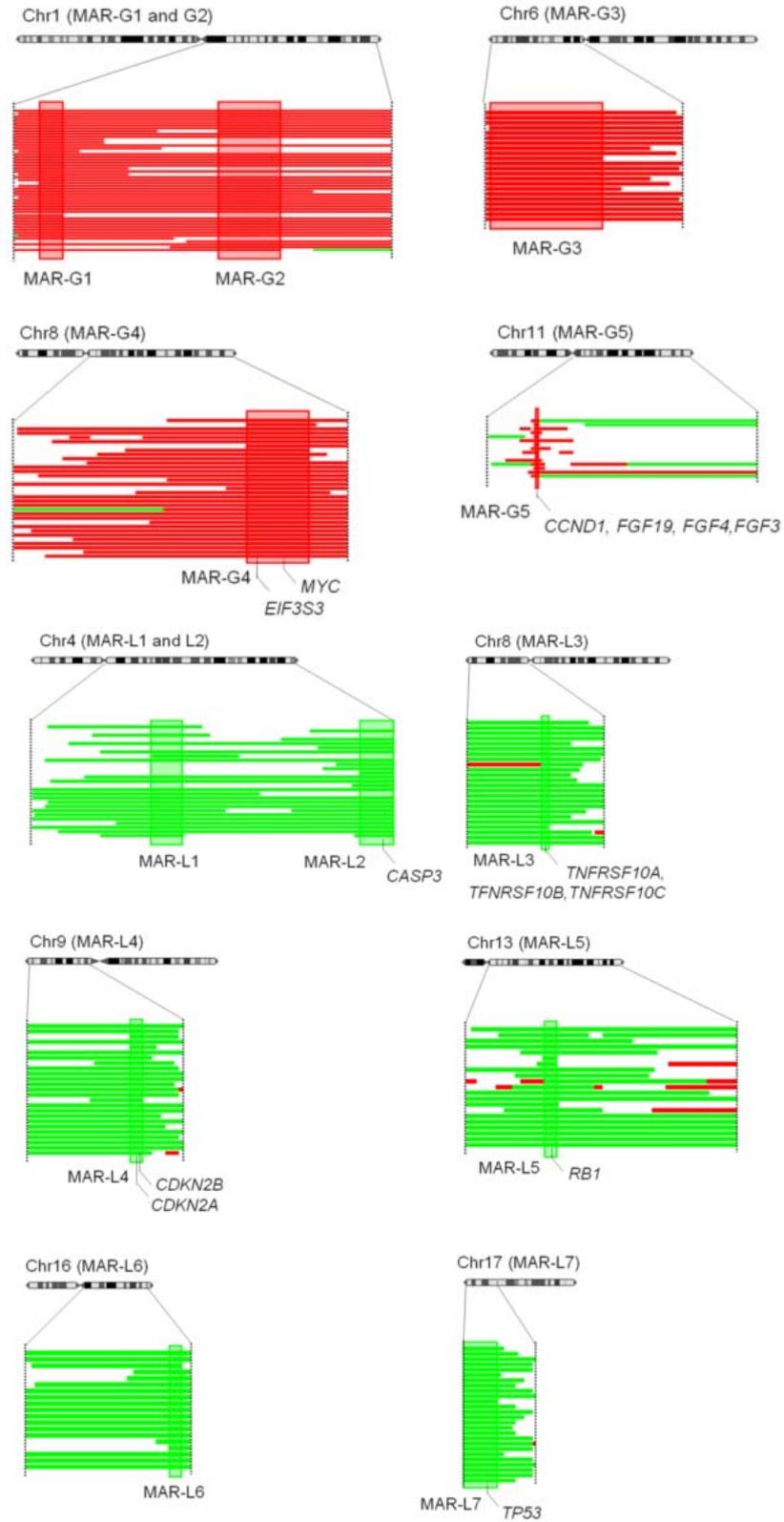


그림. CAR define 과정

TABLE 1 - GENERAL CHARACTERISTICS OF RECURRENTLY ALTERED REGIONS

RAE	Core	Chromosome	Mapposition ¹	Size (Mb)	Cytoband	Number of cases	Cancer-related genes
G1	RP11-326G21-RP5-936P19	1	142391262-183515789	41	1q21.1-1q32.1	49	<i>PDZK1, MCL1, ARNT, AFIQ, TPM3, ADAR, RPS27, HAX1, PYGO2, CKS1B, ADAM15, MUC1, HDGF, CCT3, PRCC, IFI16, ABM2, USF1, SELP, SELE, LAMC2, TPR, PTGS2, KIF14, ELF3, MDM4, ATF3, TGFB2, WNT3A, AKT3</i>
G2	RP11-572A16-RP11-438H8	1	198883756-244440465	46	1q32.1-1q44	45	<i>AMACR</i>
G3	RP11-46C20-CTD-2291F22	5	27487154-35513594	8	5p14.1-5p13.2	19	<i>FGF18</i>
G4	CTB-55A14-CTB-73D21	5	167592449-174643724	7	5q34.5q35.2	16	<i>DEK, ID4, E2F3, PRL, MICA, MICB, HMGAI, NOTCH4, MAPK14, PIM1, TFEB, CCND3, VEGF</i>
G5	RP1-136B1-RP11-524H19	6	2316508-54856430	52	6p25.2-6p12.1	23	<i>EGFR</i>
G6	RP5-1091E12-RP11-339F13	7	54851795-55154846	1	7p11.2	16	<i>HGF, DMTF1, ABCB1</i>
G7	RP5-1057M1-RP11-212B1	7	7934584-86861115	7	7q21.11	20	<i>EPO, EP HB4, PIK3CG, CAV1&2, MET, WNT2</i>
G8	RP5-1059M17-RP11-420H19	7	100783053-124638919	24	7q22.1-7q31.33	22	<i>PRKDC, MCM4, SNAI2, LYN, MOS, FLAG1, COPP5, TPDS2, E2F5, MMP16, NBS1, EIF3S3, MYC, KCN9, PTK2, EIF2C2, CCNE2</i>
G9	RP11-167E7-RP11-65A5	8	48736257-141551817	94	8q11.21-8q24.3	37	<i>MAP3K8, NRP1, FGF14, ERCC5</i>
G10	RP11-472N13-RP11-505N10	10	31849328-33818450	2	10p11.22	15	<i>HLF, MPO, PPM1D, BCAS3, TBX2</i>
G11	RP11-95C14-RP11-265C7	13	91284427-112901415	21	13q31.3-13q34	16	<i>CCNE1</i>
G12	RP11-515O17-RP11-332H18	17	50654233-56847074	6	17q22-17q23.2	16	<i>CDC25B, JAG1, SSTR4, BCL2L1, PLAGL2, DNMT3B, E2F1, MMP24, SRC, TOP1, MYBL2, MMP9, NCOA3, PTPN1, ZNF217, STK6, BMP7</i>
G13	CTD-2043116-CTC-416D1	19	33293135-36979856	3	19q12	19	<i>CHD5, ICMT, CAMTA1</i>
G14	RP5-852M4-RP4-563E14	20	327036.61041280	61	20p13-20q13.33	26	<i>PRDM2, RIZ, CASP9</i>
L1	RP1-37J18-RP11-338N10	1	4487199-7719107	3.3	1p36.32-1p36.23	18	<i>RADS4L, FAF1, S/TJL, CDKN2C, TTC4, JUN, ARH1</i>
L2	RP11-285P3-RP4-566M15	1	14486429-15354152	0.9	1p36.21	24	<i>BCL10, CLCA2, LMO4, GTF2B, TGFBR3, GF11, EVI5</i>
L3	RP11-839-RP11-412F21	1	46823997-69303906	23	1p33-1p31.2	17	<i>CASP3, FAT</i>
L4	RP11-118B23-RP5-1108M17	1	84667459-103923047	19	1p22.3-1p21.1	16	<i>CCNC, GRIK2</i>
L5	RP11-213L8-RP11-533E4	4	172094998-190118103	18	4q33-4q35.2	34	<i>CRSP3, PLAGL1, SASH1, LATS1, IGF2R, UNC93A, MLLT4</i>
L6	RP11-273N12-RP11-347H8	6	99385861-102294657	3	6q16.2-6q16.3	17	<i>CSMD1, DEFB1, NAT1, NAT2, PSD3, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10C, RHOB TB2</i>
L7	RP11-84N20-RP3-470B24	6	125389372-168197568	43	6q22.31-6q27	16	<i>SMARCA2, MTAP, CDKN2B, CDKN2A, RECK, PAX5</i>
L8	RP11-336N16-RP11-75P13	8	2898583-34455078	31	8p23.2-8p12	34	<i>GAS1, DAPK1</i>
L9	RP11-48M17-RP11-48L13	9	2136329-29639069	27	9p24.2-9p21.1	26	<i>TGFBF1</i>
L10	RP11-276H19-RP11-65B23	9	86827119-87654534	1	9q21.33	15	<i>CASP7</i>
L11	RP11-92C4-RP11-31J20	9	98644250-104754734	6	9q22.33-9q31.1	16	<i>BRCA2, CCNA1, RB1, RFP2, DLEU1, DLEU2, DDX26</i>
L12	RP11-381K7-RP11-338L11	10	112963138-116971219	4	10q25.2-10q25.3	15	<i>BCL11B</i>
L13	RP11-153M24-RP11-359P14	13	27414161-59888914	32	13q12.2-13q12.1	19	<i>SOCS1, ERCC4</i>
L14	RP11-353N19-RP11-68I8	14	91389738-99247779	8	14q32.12-14q32.2	15	<i>CDH1, CDH3, BCAR1, WWOX, CDH13, WFDC1</i>
L15	RP11-114I12-RP11-142A12	16	6846342-26727359	20	16p13.2-16p12.1	18	<i>TP53</i>
L16	RP11-325K4-RP11-514D23	16	55369591-84922042	29	16q1.3-16q24.1	28	<i>ADAMTS1</i>
L17	RP11-135N5-RP11-219A15	17	2312021-16718826	14	17p13.3-17p12	39	
L18	RP1-270M7-RP5-1031P17	21	15134621-39788380	14	21q11.2-21q22.2	15	

¹The mapping position refers to the UCSC genome browser (<http://genome.ucsc.edu/>; May 2004 freeze).

표1. 한국인 간암에서 발굴한 32종 CAR의 상세 자료

- 특히 이 중 1q21.1-q32.1 (64.5%), 1q32.1-q44 (59.2%), 8q11.21-q24.3 (48.7%), loss in 17p13.3-p12 (51.3%)은 한국인 간암의 45% 이상에서 매우 빈번하게 발견되었다. 이들은 간암의 조기진단 및 비 침습성 검사법 개발의 마커로 활용될 수 있다.
- CAR에는 MYC, FGF, EGFR, CCND3와 같은 잘 알려진 oncogene들이 common gained region에 위치하며 TP53, RB1, CDKN2A, CDKN2B와 같은 잘 알려진 tumor suppressor gene 들이 copy number deleted region에 포함되어있는 것으로 볼 때 DNA copy number의 변화가 간암 발생에 중요하게 기여함을 확인하였으며 이들이 간암 유전자변이 마커로 활용될 수 있다는 가능성도 확인하였다.
- 이러한 잘 알려진 암관련 유전자 외에 CAR에는 TPM3, RPS27, HAX1, PYGO2, CKS1B, ADAM15, CCT3, PRCC, KIF14, ELF3, TGFB2, AKT3와 같은 potential cancer related gene들이 다수 포함되었다. 이들은 지금까지 간암에서 알려지지 않은 새로운 마커일 가능성이 있기에 후속 연구에서 기능연구를 통해 5종의 유전자의 기능을 확인하고 검사법 kit에 포함시켰다.
- 간암 예후 예측을 위한 검사법 개발을 위해 32종의 CAR과 예후와의 연관성을 분석한 결과 7종의 CAR이 간암의 예후와 유의한 연관성을 나타내었다 (아래그림). 예후 연관성 외에 CAR들은 간암의 grade, stage, mincoinvasiveness, onset time등 다양한 임상양상과의 연관성을 나타내었다 (표2). 따라서 이들 마커는 간암의 임상양상/예후예측용 칩 설계의 마커로 포함시켰다.

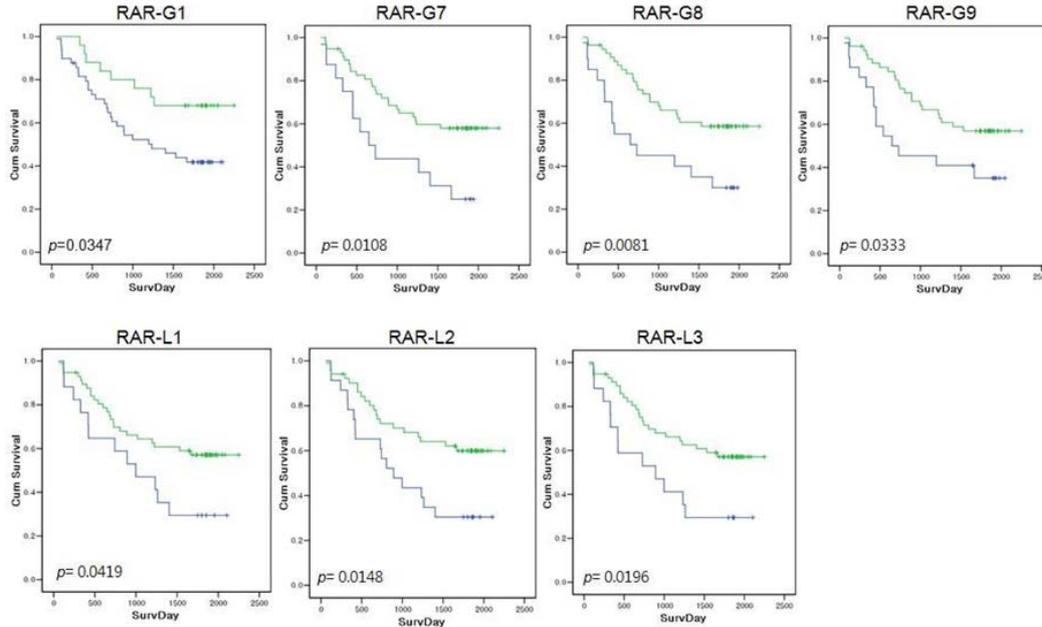


그림. 간암의 예후와 유의하게 연관된 CAR. 이중 G7, L1-3은 독립적인 재현성 분석군에서도 일치되게 불량한 예후를 보였다.

TABLE II – SIGNIFICANT ASSOCIATIONS BETWEEN RARs AND CLINICAL FEATURES

		Early onset (<50)	Late onset (≥50)	Total	p value
RAR-L11	-	23	37	60	0.046
	+	11	5	16	
RAR-L16	-	23	37	60	0.046
	+	11	5	16	
		Female	Male	Total	p value
RAR-G5	-	11	42	53	0.028
	+	0	23	23	
RAR-G8	-	11	43	54	0.028
	+	0	22	22	
		Low grade (1, 2)	High grade (3, 4)	Total	p value
RAR-L5	-	30	12	42	0.020
	+	15	19	34	
RAR-L9	-	36	14	42	0.003
	+	9	17	26	
RAR-L10	-	42	19	51	0.001
	+	3	12	15	
RAR-L11	-	40	20	60	0.020
	+	5	11	16	
RAR-L13	-	38	19	57	0.031
	+	7	12	19	
		Stage (I, II)	Stage (III, IV)	Total	p value
RAR-L4	-	34	26	60	0.047
	+	4	12	16	
		Size (<3.5 cm)	Size (≥3.5 cm)	Total	p value
RAR-G4	-	35	25	60	0.024
	+	4	12	16	
		MVI (-)	MVI (+)	Total	p value
RAR-G9	-	27	12	39	0.005
	+	13	24	37	
RAR-G12	-	36	24	60	0.022
	+	4	12	16	
RAR-G13	-	25	32	57	0.009
	+	15	4	19	
		PVI (-)	PVI (+)	Total	p value
RAR-G13	-	43	14	57	0.016
	+	19	0	19	
RAR-L7	-	46	14	60	0.033
	+	16	0	16	

○ 32종의 CAR외에 43종의 high level copy number change도 발굴하였다. 이 중 33종은 amplification이고 10종은 homozygous deletion이었다. 자세한 리스트는 아래 표3과 같다. 이 중 MYC, EIF3S3 유전자가 위치하는 8q11.1-8q24.3의 amplification은 76례의 간암 중 10례에서 공통적으로 발견되었다. 이는 MYC과 EIF3S3 유전자의 amplification에 의한 과발현이 간암 발생 및 진행의 중요 요소임을 보여준다. CCND1, FGF4, FGF3, ORAOV1 유전자가 위치하는 11q13.2-13.3 의 증폭도 5례에서 공히 발견되었다.

Table 3. High-level copy number changes in 76 HCCs.

	Probe	Chromosome	Map position*	RAK*	Cytoband	Number of cases	Cancer-related genes
Amp1	RP4-706A17- RP11-333N14	1	143352667- 144380209	G1	1q21.1	1	<i>PDXK1</i>
Amp2	RP11-422P24- RP11-307C12	1	130704923- 131839277	G1	1q22	1	<i>TPM3, ADAR, RPS27, NAX1, PFGO2, CCK2B, ADAM15</i>
Amp3	RP11-95F1- RP11-172I6	1	132090105- 132897176	G1	1q22	1	<i>HMGF, CCK2, PRCC, NTF1, ETV3</i>
Amp4	RP11-190A12	1	136557891- 136696735	G1	1q23.2	1	<i>CRP</i>
Amp5	RP11-430G6- RP11-71D4	1	139688695- 179511167	G1	1q23.3-1q25.3	2	<i>SELE, SELL, SELP, LAMC2</i>
Amp6	RP11-103M21- RP11-336D15	1	183908427- 185875252	G1	1q31.1	1	<i>TPR, PFGS2</i>
Amp7	RP11-445K1- RP11-359A17	1	186717333- 236040528	G2	1q31.1-1q43	4	<i>KIF14, ELFB1, TGFBI</i>
Amp8	RP11-80B9- RP11-433E8	1	237216929- 244440465	G2	1q43-1q44	4	<i>AKT3</i>
Amp9	RP11-105K13- RP11-334L22	3	9236205- 23404803-		3p25.3	1	<i>CAV3, OATR</i>
Amp10	RP11-89F13- RP11-15L17	3	24311473- 32590143-		3p24.3	1	
Amp11	RP11-134C18	3	36744654-		3p22.3	1	
Amp12	RP11-447A21- RP11-966M1	3	52396261- 52839811-		3p21.1	1	
Amp13	RP11-154D3- RP11-204J18	3	62016733- 62347194-		3p14.2	1	
Amp14	RP11-362K14- RP11-44A1	3	173181079- 173855790-		3q26.2-3q26.31	2	<i>SKL, PLO1, ECT1</i>
Amp15	RP11-494P23- RP11-421A17	5	67322896- 67677101-		5q13.1	1	<i>PIK3R1, CCNB</i>
Amp16	RP11-175A4- RP11-468B3	6	33467377- 34013143-	G5	6p21.32	1	<i>HMGAI</i>
Amp17	RP11-431A14- RP11-472M19	6	36731256- 56905292-	G5	6p21.31-6p12.1	2	<i>PIM1, TP53, CCND3, VEGF</i>
Amp18	RP11-537H13- RP11-32B1	6	134784496- 135663804-		6q23.2	1	<i>MTB</i>
Amp19	RP11-44M6	7	99680294- 99845417-		7q22.1	1	<i>EPO</i>
Amp20	RP11-905M6	7	110673548- 110781794-	G8	7q31.1	1	
Amp21	RP11-350F16- RP11-349C2	8	47816604- 145778719-	G9	8q11.1-8q24.3	10	<i>PRKDC, MCM4, SNAI2, LIN, MOS, PLAG1, COP2, TP53, E2F3, MDM16, NBS1, EIF3E, MYC, CCND3, PTK2, EIF3C3</i>
Amp22	RP11-543E8- RP11-422N19	9	71314533- 76253331-		9q21.13	1	<i>ANKK1</i>
Amp23	RP11-345K20- RP11-399K21	10	74746892- 76882563-		10q22.2	1	<i>ANKK1, PLAU, PDAC1</i>
Amp24	RP11-83M6- RP11-316D7	11	32978034- 33595628-		11p13	1	
Amp25	RP11-569N5-	11	68186960-		11q13.2	5	<i>ORAOV1, FGF4, FGF3, CCND1</i>
Amp26	RP11-533H13- RP11-236L3	11	91893710- 93189097-		11q21	1	
Amp27	RP11-437F6- RP11-707G18	12	23609734- 23447853-		12p12.1	1	<i>ERAS2</i>
Amp28	RP11-376H13- RP11-265C7	13	84781263- 112901415-	G11	13q31.1-13q34	4	<i>POF14, TFDPI, CUL2A, GASS, CDC16, ERBB2, GRB7, CSF3, TOP2A, CDK7, BRCA1, ETV4, GRN, COL1A1, CACNA1G, HLF, MPO, TRX7, RAGE, AXIN2, PRKCA, SON7, GRB2, TIMP2, RAC1</i>
Amp29	RP11-390P24- RP11-567O16	17	34803850- 78374826-	G12	17q12-17q25.3	4	
Amp30	CTD-3149D2- CTC-451A6	19	17561412- 22729110-		19p13.11-19p12	2	<i>JUND, JAK3, EDO4</i>
Amp31	CTD-2037D4- CTC-416D1	19	34936729- 36979856-	G13	19q12	2	<i>CCNE1</i>
Amp32	RP4-633O20- RP4-363E14	20	34762707- 61041280-	G14	20q11.23- 20q13.33	1	<i>SRC, TOP1, MYBL2, MMP9, NCOA3, PTPN1, INF217, STR3, BMP7</i>
Amp33	CTA-390B3- RPS-383M5	22	36114798- 42644660-		22q13.1- 22q13.2	1	<i>PDOFR, EP300, SIK</i>
HD1	RP11-1043L3- RP11-427B20	1	87387994- 88674564-	L4	1p22.2	1	<i>GTF2B</i>
HD2	RP11-351J23- RPS-470B24	6	167866346- 168197568-	L7	6q27	1	<i>LINC004, MLLT4</i>
HD3	RP11-336N16- RP11-43M12	8	2898583- 4066807-	L8	8p23.2	1	<i>CEMD1</i>
HD4	RPS-991O23- RP11-211C9	8	5326019- 8677720-	L8	8p23.2	1	<i>DEFB1</i>
HD5	RP11-809L3- RP11-161I2	8	18249257- 18644382-	L8	8p22	1	<i>NAT1, NAT2, PSD3</i>
HD6	RP11-113D19- RP11-488C2	9	20996400- 23069411-	L9	9p21.3	2	<i>CCND3B, CCND3A</i>
HD7	RP11-39H1- RP11-43N23	12	12770043- 13592296-		12p13.1	1	<i>CDKN3</i>
HD8	RP11-174I10	13	47897821- 47960646-	L13	13q14.2	1	<i>RS1</i>
HD9	RP11-327P2	13	51243101- 51412203-	L13	13q14.3	1	<i>DDX26</i>
HD10	RP11-424E21- RP11-100M1	13	65400726- 66421703-		13q21.32	1	

나. 한국인 간암 CAR 마커의 기술권 확보

- 향후 한국형 간암 검사kit 개발을 위한 원천기술을 확보하고자 한국인 간암에서 CAR을 발굴하는 과정과 CAR 자료에 대해 한국과 미국에 특허출원을 실시하였다 (비교유전자 보합법을 이용한 간암 예후 진단방법 및 진단키트 대한민국 출원번호 10-2008-0004627; Diagnostic Methods and Kits for Hepato Cellular Carcinoma Using Comparative Genomic Hybridization 미국 PU-090004US).

다. Genomic qPCR기반 간암 예후예측 검사 kit 개발

- 한국인 간암의 염색체변이 마커에 대한 원천 기술권을 확보하였으며 이 기술은 마이크로어레이 검사법 개발에는 반드시 필요한 단계이다. 하지만 마이크로어레이 검사 시스템을 임상에 적용하기에는 기술적으로 어렵고 연구가 아닌 검사 현장에서 재현성이 담보되지 않는 단점이 있기에 이를 보완하기 위해서 발굴한 간암 CAR을 바탕으로 간암 DNA 칩 개발과 아울러 genomic qPCR을 이용하는 간편한 간암 예후예측 검사 kit 개발을 시도하였다.
- Kit 개발을 위해 연관성 규칙 룰 마이닝, Elastic net과 MDR 분석을 통한 CAR 상호간의 작용분석을 통해 간암의 예후에 가장 중요 역할을 하는 CAR의 조합을 발굴하였다. 룰 마이닝 기법을 적용한 배경은 개별적 CAR 마커로는 충분한 예후 예측력을 확보하기 어려운 반면 가장 적절한 연관성을 가지는 CAR의 조합을 발굴하면 예후예측의 신뢰도를 향상시킬 수 있기 때문이다. 룰 마이닝 분석과정은 아래와 같다.

- ◆ 연관성 규칙 마이닝은 데이터속의 흥미로운 패턴들을 찾기 위해 정보 이득 (information gain)의 개념을 도입한 것임. 이는 빈도가 높게 나타나는 아이템 보다는 정보 면에서 가장 큰 이득을 주는 아이템들로 규칙을 만들어 가는 것임. 정보 모델 (information model) 은 다음과 같이 정의 될 수 있음. 고유의 이벤트들로 이루어진 set, E 가 있다고 할 때, 그 set 내에서 하나의 이벤트 e_i 가 포함하고 있는 정보의 양은 다음과 같음.

$$E = \{e_1, e_2, \dots\}$$
$$I(e_i) = -\log_{|E|} \text{Prob}(e_i)$$

- ◆ 여기서, $|E|$ 와 $\text{Prob}(e_i)$ 는 각각 이벤트의 수 와 하나의 이벤트 e_i 가 일어날 확률을 의미함. m 개의 이벤트로 구성된 하나의 패턴 P 가 있다고 하면, 그 패턴은 다음과 같은 확률로 나타날 수 있음.

$$P = (p_1, p_2, \dots, p_m)$$
$$\text{Prob}(P) = \text{Prob}(p_1) \times \text{Prob}(p_2) \times \dots \times \text{Prob}(p_m)$$

- ◆ 또한 이 패턴에 포함된 정보의 양은 다음과 같음.

$$I(P) = -\log_{|E|} \text{Prob}(P) = I(p_1) + I(p_2) + \dots + I(p_m)$$

- ◆ 임의의 데이터베이스에서 하나의 패턴이 같은 정보이득은 아래와 같이 정의 됨.

$$G(P) = I(P) \times (\text{Support}(P) - 1)$$

- ◆ 여기서 $\text{Support}(P)$ 란 특정 패턴이 나타나는 빈도를 말함.

○ 룰 마이닝 결과 불량한 예후의 간암과 우량한 예후의 간암에 연관된 6 종의 염색체 변이 마커 조합의 규칙을 발견하였다. 표 4에서는 우량 예후 및 불량 예후 마커 조합을 보여주고 있다.

불량 예후와 관련된 규칙들	사망 빈도 (이벤트/총수)	생존빈도 (이벤트/총수)
(1) L2 = {1}, L4 = {0} --> 사망 (0.91)	10/38	1/38
(2) G14 = {1}, L3 = {1} --> 사망 (0.89)	8/38	0/38
(3) G4 = {1}, G6 = {1} --> 사망 (0.86)	6/38	0/38
우량 예후와 관련된 규칙들	사망 빈도	생존빈도
(1) L7 = {0}, L18 = {1} --> 생존 (0.89)	1/38	7/38
(2) G6 = {0}, L14 = {1} --> 생존 (0.88)	2/38	11/38
(3) G13 = {1}, L10 = {1} --> 생존 (0.83)	0/38	5/38

표4. 간암의 예후를 대표하는 염색체 변이마커의 조합. L 과 G는 위 표1의 CAR의 ID를 의미함.

○ 3 종의 불량 예후 조합 중 G14-L3 double positive가 그렇지 않은 경우에 비해 가장 뚜렷한 예측력이 있었기에 G14-L3을 kit 개발의 1단계 후보로 선정하였다. 아래그림은 G14 single +, L3 single + 는 예후와 유의한 상관성을 보이지 못한 반면 G14-L3 double +는 매우 유의한 상관관계를 보임을 보여주고 있다.

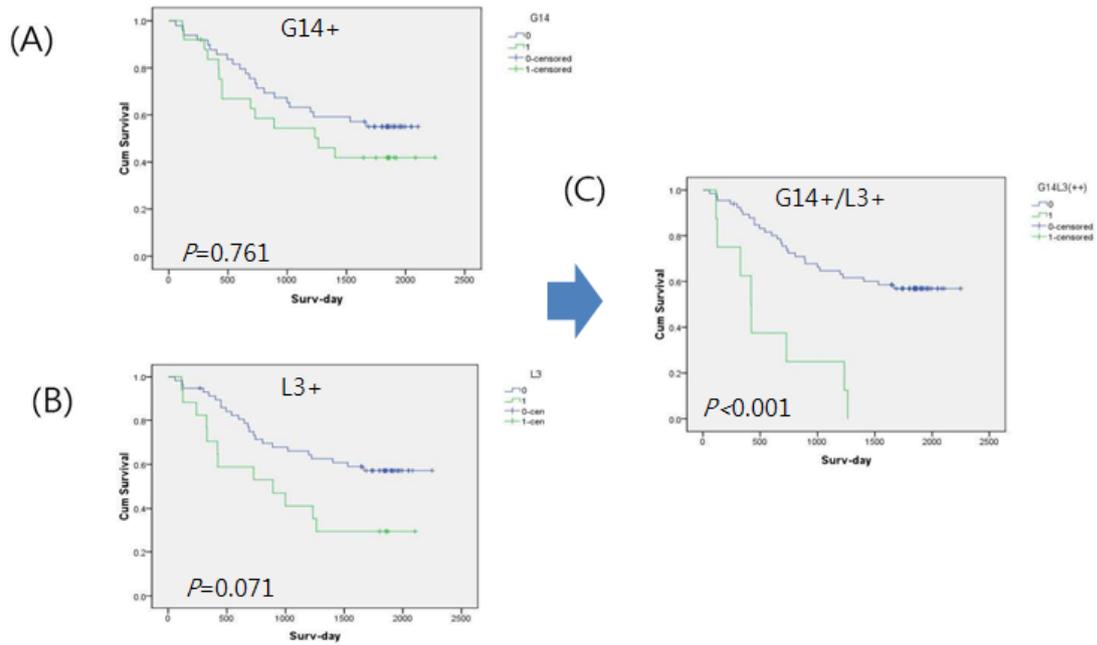


그림. G14-L3 변이 마커의 조합을 갖는 경우 마커 각각에 비해 불량한 예후를 예측하는 유의성이 높아짐.

○ BAC array-CGH분석에 적용한 간암과 별도로 50례의 independent replication set을 준비하여 G14-L3 genomic qPCR 결과의 예후예측 효능을 검증하였다. 그 결과 Array-CGH 분석을 기반으로 룰 마이닝에 의해 발굴된 결과와 일치되게 G14-L3 double +가 그 외의 간암에 비해 불량한 예후를 나타내었다. 다만 replication 분석의 대상자 수가 충분치 못하여 현재는 통계적 유의성이 충분치 못하다. 아래 표는 간암 qPCR 검사kit 개발을 위해 설계한 프로브를 보여주고 있다.

유전자	크기 (bp)	전방향 서열	역방향서열
<i>TTC4</i> (chr1)	188	<i>CTTGCCCAAAGCAGGTTCTTTCCA</i> (서열번호 1)	<i>TCAGCTTGTCTGCTTTAGCCCTCA</i> (서열번호 2)
<i>ZNF217</i> (chr20)	120	<i>CCACAAACACTCATGTGGGCGAAA</i> (서열번호 3)	<i>TTCTCCTGATGCACGTGAGACACA</i> (서열번호 4)

표5. 간암 qPCR 검사kit용 primer

라. 간암 예후예측용 qPCR 검사법의 기술권 확보

○ 룰 마이닝에 의해 간암 예후 예측을 가장 정확히 대표하는 마커의 조합을 발굴하고 이를 바탕으로 고안된 qPCR 검사 kit을 고안한 BAC array-CGH분석에 적용한 간암과 별도의 independent replication set을 준비하여 G14-L3 genomic qPCR 결과의 예후예측

효능을 검증하였다. 그 결과 Array-CGH 분석을 기반으로 를 마닝에 의해 발굴된 결과와 일치되게 G14-L3 double +가 그 외의 간암에 비해 불량한 예후를 나타내었다. (게놈릭 정량 PCR을 이용한 간암 예측 방법 및 예측 키트. 대한민국 출원번호: 10-2010-0015217)

마. 간암 예후예측용 올리고어레이 개발

○ 아래 그림과 같이 발굴한 32 region의 CAR을 중심으로 100 kb 해상도의 간암 oligoarray 프로브를 설계하였다. Probe설계는 미국 Phalanx사와 협력하여 총 6093 probe가 설계되었다. Probe의 자세한 정보는 가톨릭인간유전체다형성연구소 웹 페이지에 기록되어 있다 (http://ircgp.com/cnv_RND1.html).

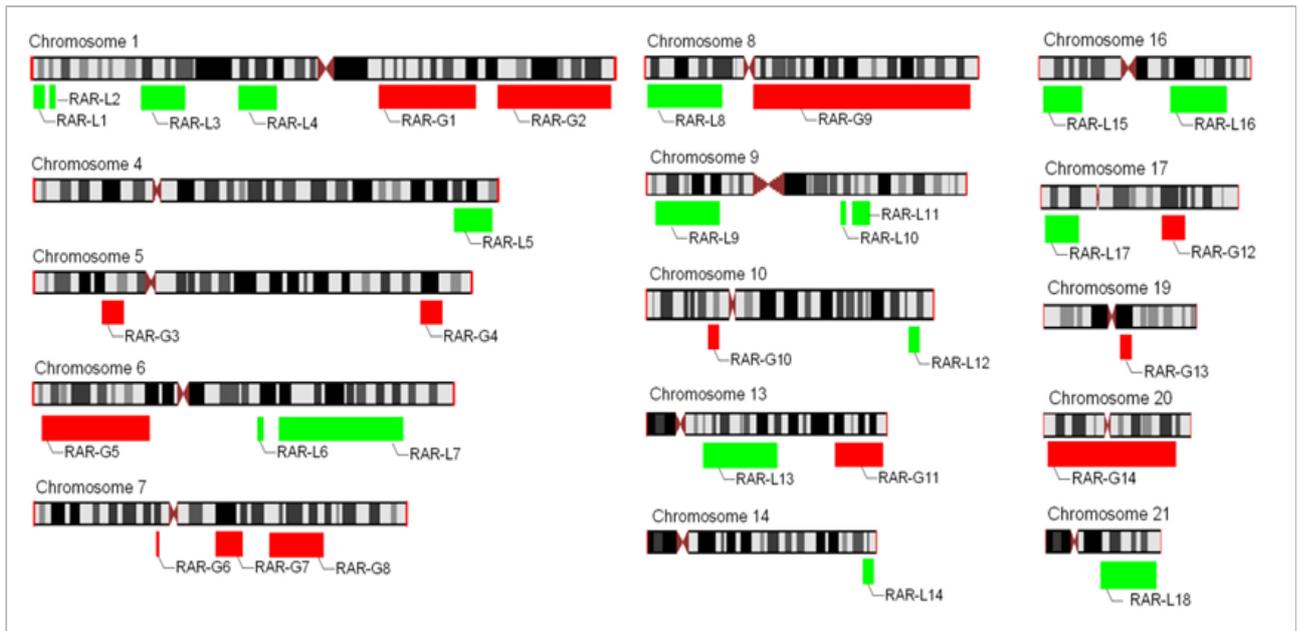
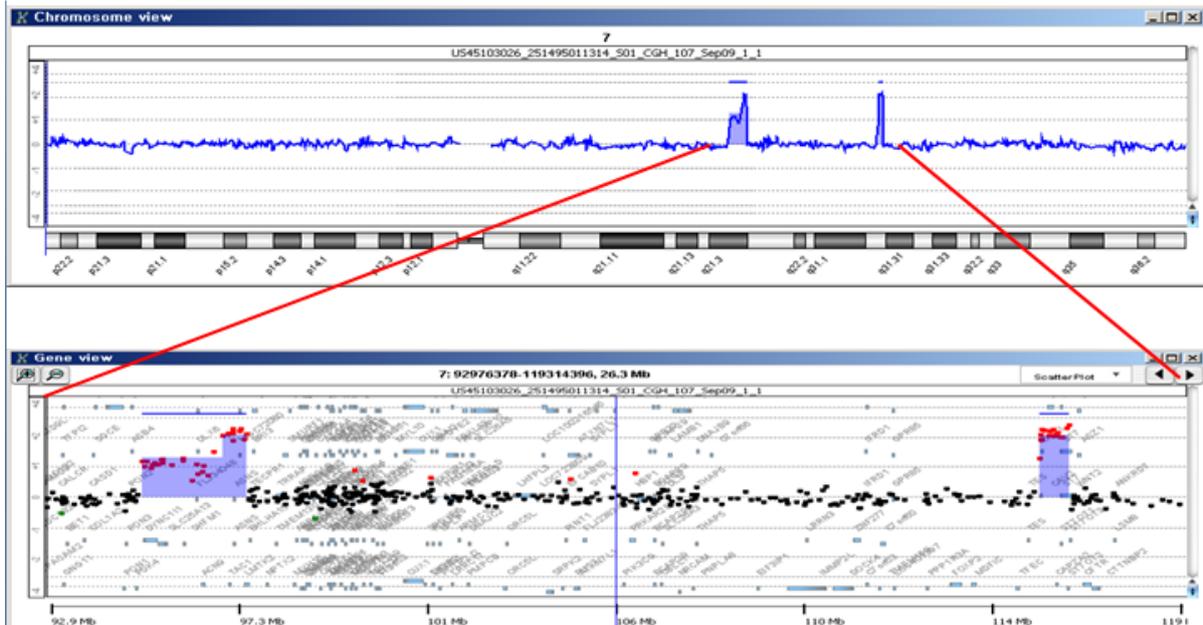


그림. 32 구역의 간암 CAR

○ 이 32 region을 포함하여 총 44K의 custom 올리고어레이를 제작하고 (Agilent 사, UAS) 이 간암 어레이의 효능을 30례의 조기 간암에서 검사하였다. 아래 그림은 44K custom 간암 어레이 분석 결과의 한 예를 보여주고 있다.



- 간암 custom array로 독립적인 23례 간암의 분석 결과 총 57 region의 CAR이 발굴되었으며 BAC array로 검출된 CAR 중 28 region이 올리고어레이에서도 일치하였다. 76례의 간암에서 생존과 유의하게 연관된 7 CAR region 중 CAR-G7, RAR-L1, L2, L3만이 custom 올리고어레이 에서도 일관되게 나타났으나 분석 대상자 수가 충분치 않아 통계적 유의성은 없었다.
- 간암에서 BAC array-CGH를 이용하여 발굴한 32종의 CAR을 바탕으로 두 가지 방향 (1. 간암 올리고어레이 칩 개발; 2. Genomic qPCR간암을 이용한 간암 예후예측 검사 kit)의 개발결과를 비교해볼 때 단위 임상기관에서의 수월성과 재현성, 검사 비용의 적정성 등을 고려할 때 DNA 칩 보다는 간암 예후를 적절히 대표하는 염색체 변이 마커들의 조합을 찾고 이를 바탕으로 qPCR 개발한 qPCR이 임상적용에 더 적합하다고 판단된다. 향후 현 기술 및 특허 기반을 바탕으로 더 많은 간암에 대해 genomic qPCR 간암검사 kit의 효능 검증이 이루어지면 임상연구에 들어갈 수 있으리라 예상된다.

바. 간암 CAR에 속한 유전자들의 기능 연구 및 치료적용 가능성

- copy number gain CAR (G1)은 1q21.1-32.1에 위치하며 이 염색체 구역에는 간암과 관련되었을 것으로 추정되는 관련 유전자들이 포함되어 있다 (표 6). G1은 특히 CAR의 빈도도 매우 높기에 이 구역에 속한 유전자들의 기능을 siRNA knockdown 기술을 이용하여 조사하였다.

RAR	Clone	Chromosome	Map position ^a	Size (Mb)	Cytoband	Number of cases	Cancer-related genes
G1	RP11-326G21- RP5-936P19	1	142391262- 183515789	41	1q21.1-1q32.1	49	<i>PDZK1, MCL1, ARNT, AF1Q, TPM3, ADAR, RPS27, HAX1, PYGO2, CKS1B, ADAM15, MUC1, HDGF, CCT3, PRCC, IFI16, AIM2, USF1, SELP, SELE, LAMC2, TPR, PTGS2,</i>
G2	RP11-572A16- RP11-438H8	1	198883756- 244440465	46	1q32.1-1q44	45	<i>KIF14, ELF3, ATF3, TGFB2, WNT3A, AKT3</i>
G3	RP11-46C20- CTD-2291F22	5	27487154- 35513594	8	5p14.1-5p13.2	19	<i>AMACR</i>
G4	CTB-55A14- CTB-73D21	5	167592449- 174643724	7	5q34-5q35.2	16	<i>FGF18</i>
G5	RP1-136B1- RP11-524H19	6	2316508- 54856430	52	6p25.2-6p12.1	23	<i>DEK, ID4, E2F3, PRL, MICA, MICB, HMGAI, NOTCH4, MAPK14, PIMI, TFEB, CCND3, VEGF</i>
G6	RP5-1091E12- RP11-339F13	7	54851795- 55154846	1	7p11.2	16	<i>EGFR</i>
G7	RP5-1057M1- RP11-212B1	7	79345845- 86861115	7	7q21.11	20	<i>HGF, DMTF1, ABCB1</i>
G8	RP5-1059M17- RP11-420H19	7	100783053- 124638919	24	7q22.1-7q31.33	22	<i>EPO, EPHB4, PIK3CG, CAV1&2, MET, WNT2</i>
G9	RP11-167E7- RP11-65A5	8	48736257- 141551817	94	8q11.21-8q24.3	37	<i>PRKDC, MCM4, SNAI2, LYN, MOS, PLAG1, COPS5, TPD52, E2F5, MMP16, NBS1, EIF3S3, MYC, KCNK9, PTK2, EIF2C2, CCNE2</i>
G10	RP11-472N13- RP11-505N10	10	31849328- 33818450	2	10p11.22	15	<i>MAP3K8, NRP1,</i>
G11	RP11-95C14- RP11-265C7	13	91284427- 112901415	21	13q31.3-13q34	16	<i>FGF14, ERCC5,</i>
G12	RP11-515O17- RP11-332H18	17	50654233- 56847074	6	17q22-17q23.2	16	<i>HLF, MPO, PPM1D, BCAS3, TBX2</i>
G13	CTD-2043I16- CTC-416D1	19	33293135- 36979856	3	19q12	19	<i>CCNE1</i>
G14	RP5-852M4- RP4-563E14	20	327036- 61041280	61	20p13-20q13.33	26	<i>CDC25B, JAG1, SSTR4, BCL2L1, PLAGL2, DNMT3B, E2F1, MMP24, SRC, TOP1, MYBL2, MMP9, NCOA3, PTPN1, ZNF217, STK6, BMP7</i>

표6. Copy number gain CAR에 위치한 암관련 유전자 리스트.

1) KIF14

○ KIF14는 Kinesin family의 하나로 chromosome segregation에 관여하여 세포 분열의 조절에 영향을 미친다. KIF14의 과 발현은 유방암, 폐암 등 여러 종양에서 보고되고 있으며 KIF14가 위치한 1q31-32 구역은 간암에서 amplification이 빈번히 관찰되어왔으나 KIF14가 간암의 발생, 진행, 예후에 어떻게 기여하는지 기능적 연구는 전혀 없는 실정이다. 이에 본 연구를 통해 KIF14 발현을 억제하여 간암에 기여하는 기능을 분석하였다.

○ KIF14는 한국인 간암에서 과발현이 빈번히 나타나고 있다.

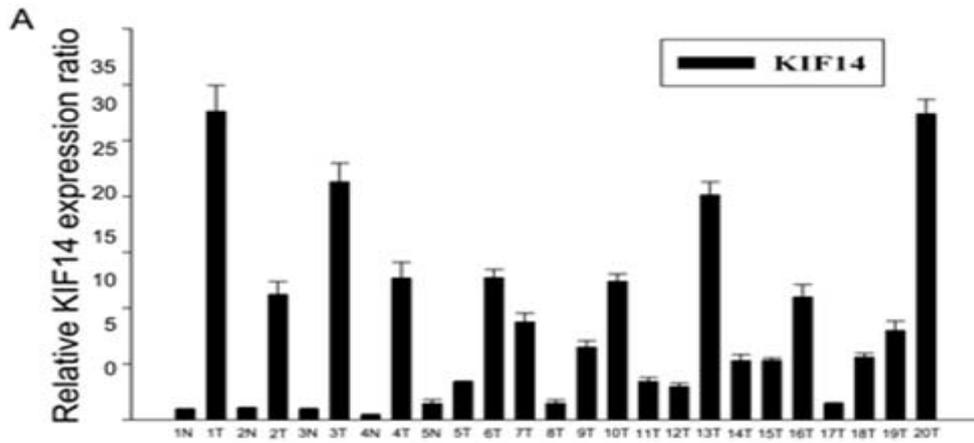


그림. 한국인 간암에서 KIF14의 발현 양상. T: 간암; N: 정상간조직

○ KIF14 과 발현을 억제하면 간암세포 성장이 현저히 억제된다.

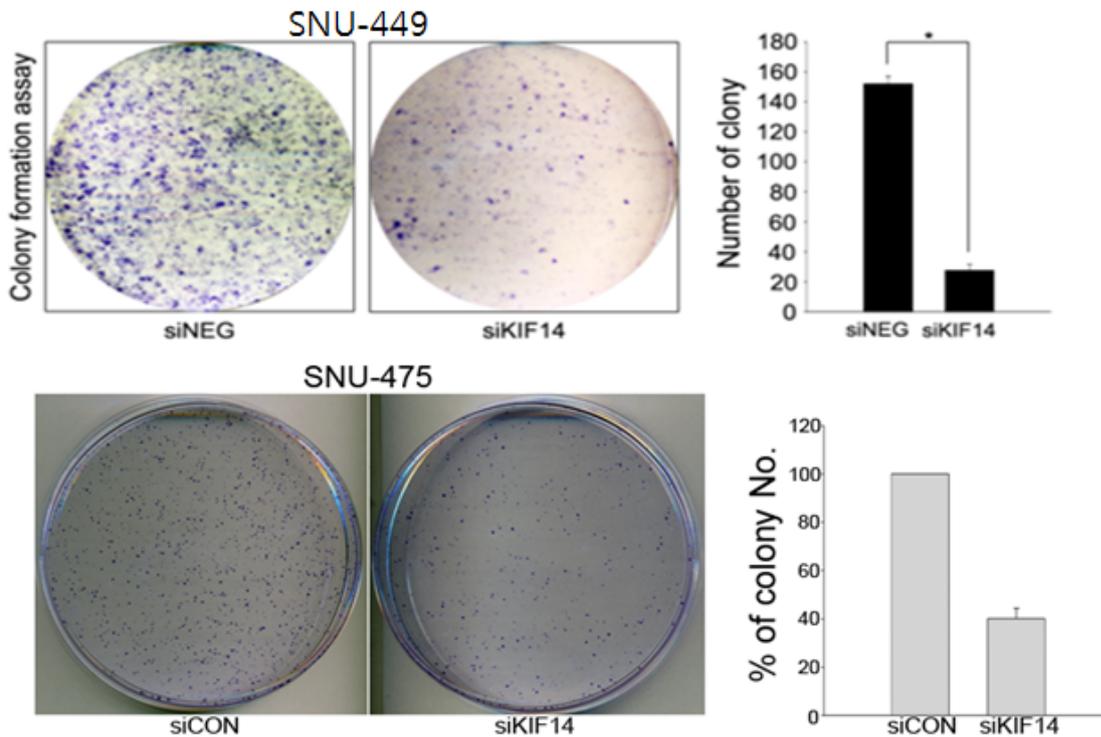


그림. 간암세포주 (SNU-475, hepG2)에서 KIF14 발현 억제시 colony formation이 현저히 감소

○ KIF14 발현 억제에 의한 간암세포 성장억제는 G1 arrest를 통해 나타난다.

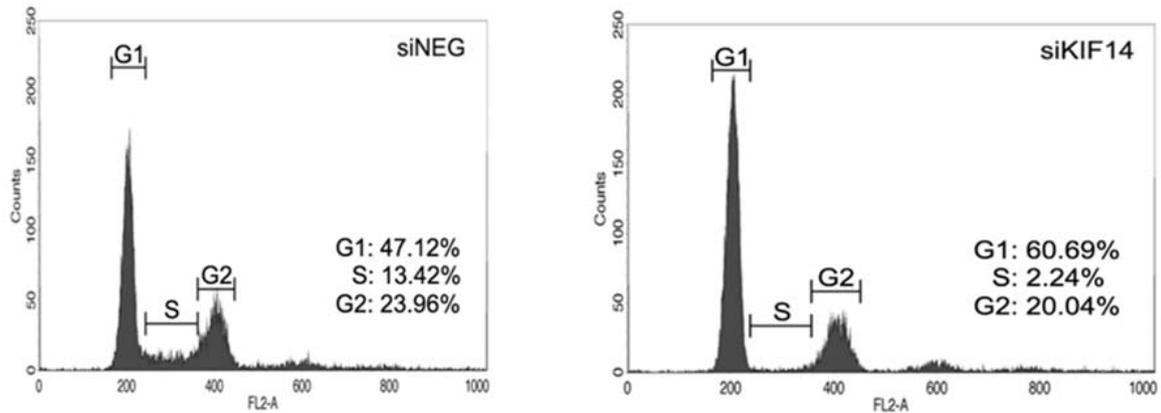


그림. Flow cytometry analysis of the effect of siKIF14 on cell cycle progression. Cells were subjected to treatment with siNEG or siKIF14 after 72 hours of incubation they were fixed, stained with propidium iodide and subjected to flow cytometry analysis.

○ G1 arrest의 기전은 KIF14 억제에 의해 p27 level이 증가하고 cyclin B1, D1, E1 level이 감소하기 때문이다.

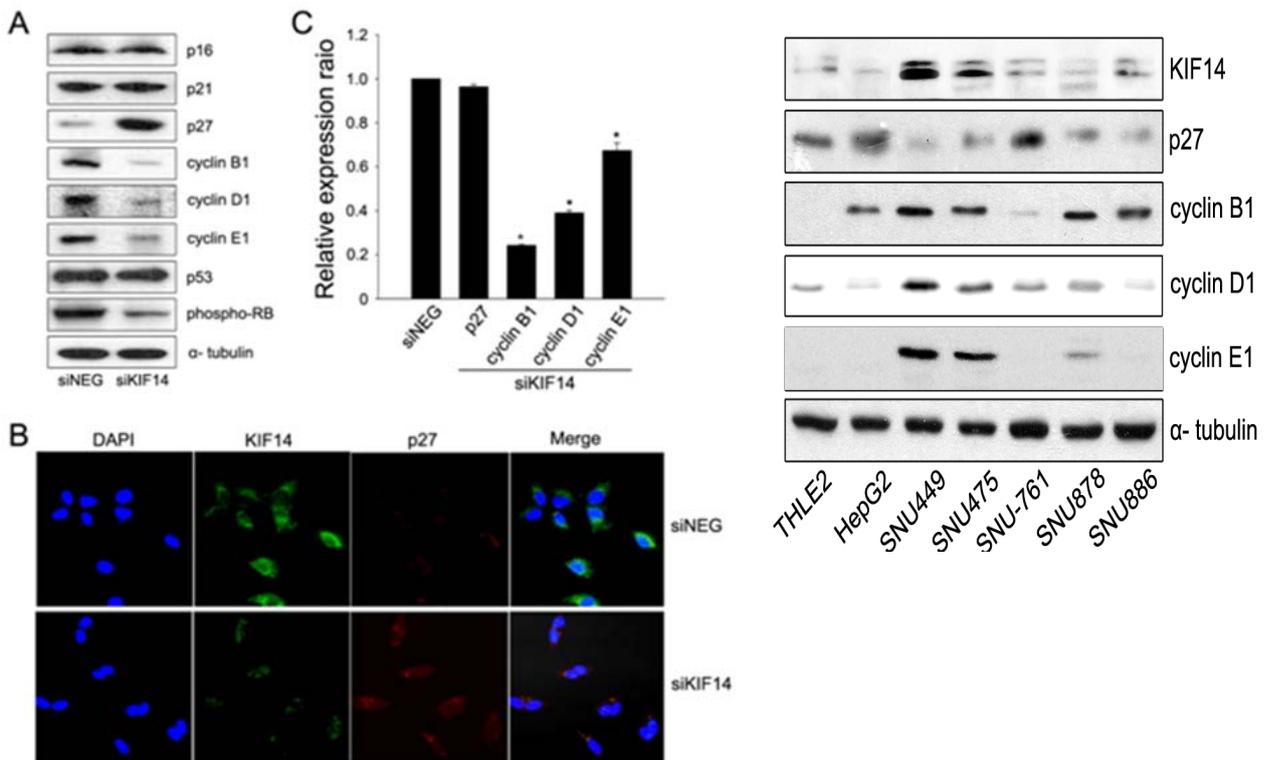


그림. Expression of Cyclin and CDK inhibitors associated with KIF14 silencing. Western blot analysis (A) were performed in the indicated time after 72 hours incubation with siNEG or siKIF14. Double immunofluorescence staining (B) and RT-PCR assay(C).

○ KIF14 발현 억제에 의한 세포 분열 억제는 binucleated cell의 증가로 나타난다.

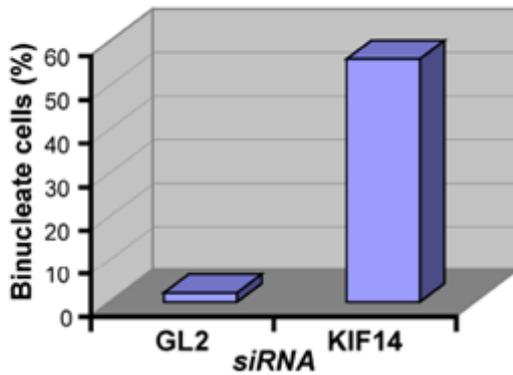
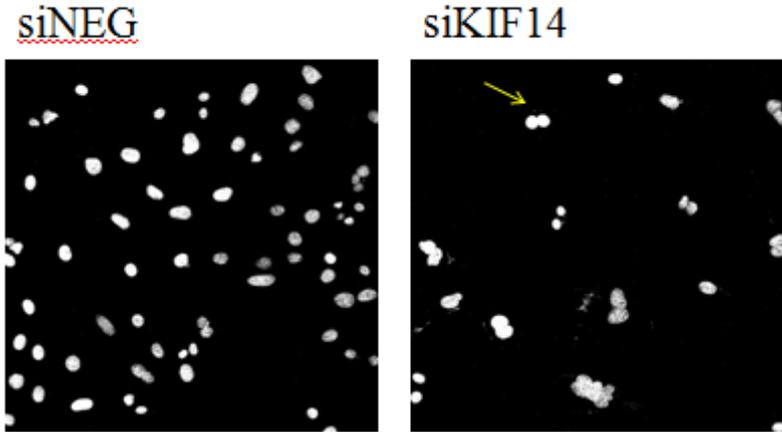


그림. KIF14 억제에 의해 binucleated cell이 약 55%로 급격히 증가함

○ P27 level 증가의 기전은 KIF14 억제에 따라 p27의 ubiquitination이 억제되기 때문이다. KIF14 억제의 효과는 proteasome inhibitor인 MG132 처라 효과와 동일한 효과를 나타내었으며 translation 억제제 처리시 ubiquitination이 억제효과가 사라졌다. 이러한 증거들은 KIF14의 과 발현이 p27의 ubiquitination을 촉진하여 세포의 주기조절을 파괴함으로써 간암이 발생/진행함을 보여준다. 아래그림은 이 과정의 결과를 요약한 것이다.

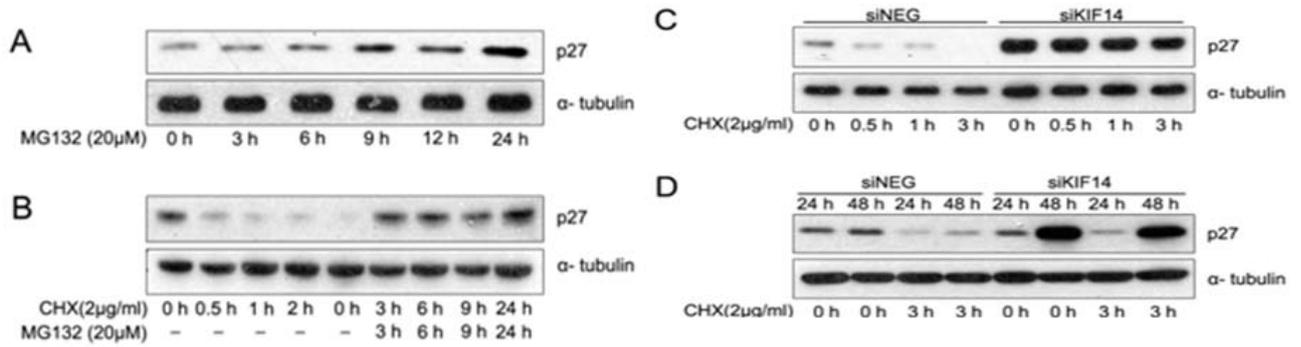


그림. KIF14 siRNA transfection plays like a proteasome inhibitor in SNU-449. (A) Intracellular p27 level was elevated by proteasome inhibitor MG132. 20 μ M MG132 was treated onto SNU-449 and p27 expression level was analyzed at 3, 6, 9, 12 and 24 h after treatment. (B) Examined whether MG132 block the decrement of p27 by treatment of translation inhibitor, CHX. (C) Effect of KIF14 siRNA on the expression of p27 by treatment of CHX. 72 hours after transfection with KIF14 siRNA, SNU-449 cells were treated with 2ug/ml CHX for 0h, 0.5h, 1h and 3h. (D) Time-dependent effect of KIF14 siRNA on p27 expression. p27 levels were measured with protein from CHX-treated (0h and 3h) cells.

○ 이를 바탕으로 KIF14가 간암에 기여하는 경로를 요약하면 아래와 같다.

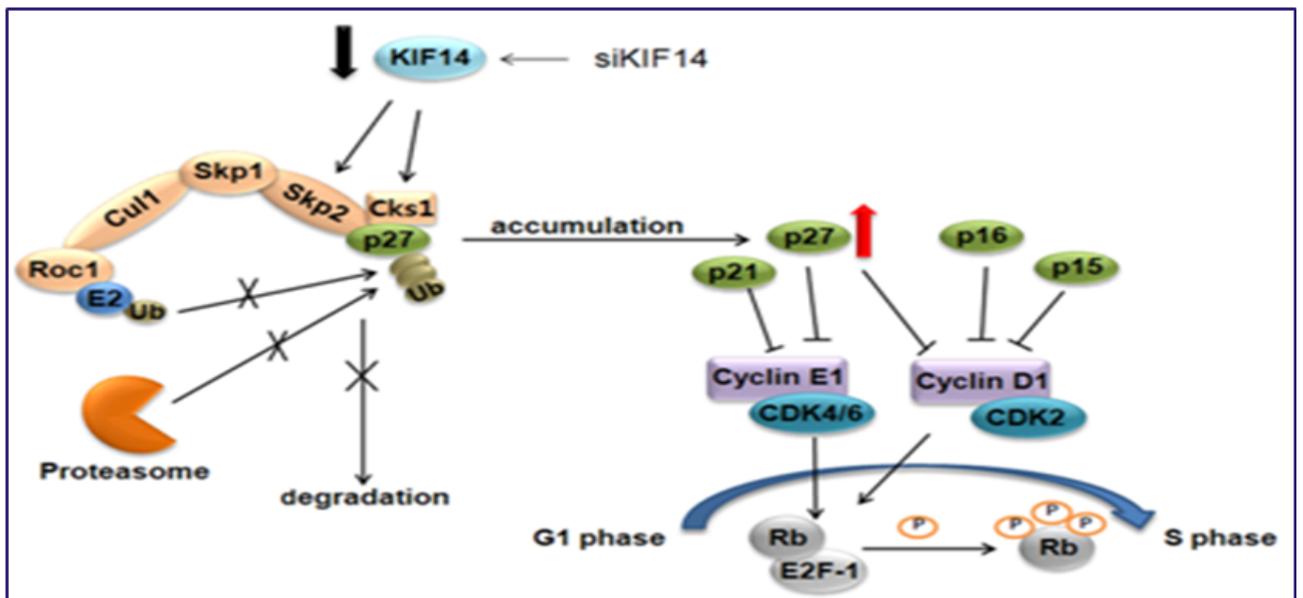


그림. KIF14의 간암 발암과정

○ 향후 KIF14의 pathway를 차단하는 물질 개발을 통해 간암세포 성장을 억제하는 약 개발의 후보 물질로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

2) TPM3

○ TPM3는 또한 1q21-32 CAR구역에 속하는 유전자로 tropomyosin family member 중 하나이다. TPM3의 과 발현은 간암의 침윤 및 전이에 기여할 것으로 예상하고 있다. 그러나 TPM3가 실제 간암의 특성에 어떻게 기여하는지 기능적 연구가 시행된 바 없다. 따라서 본 연구를 통해 TPM3의 기능을 파악하고 간암의 전이를 억제하는 약제 개발에 활용하고자 연구를 실시하였다.

○ TPM3 발현 억제결과 간암세포의 migration과 invasiveness가 현저히 감소하였다.

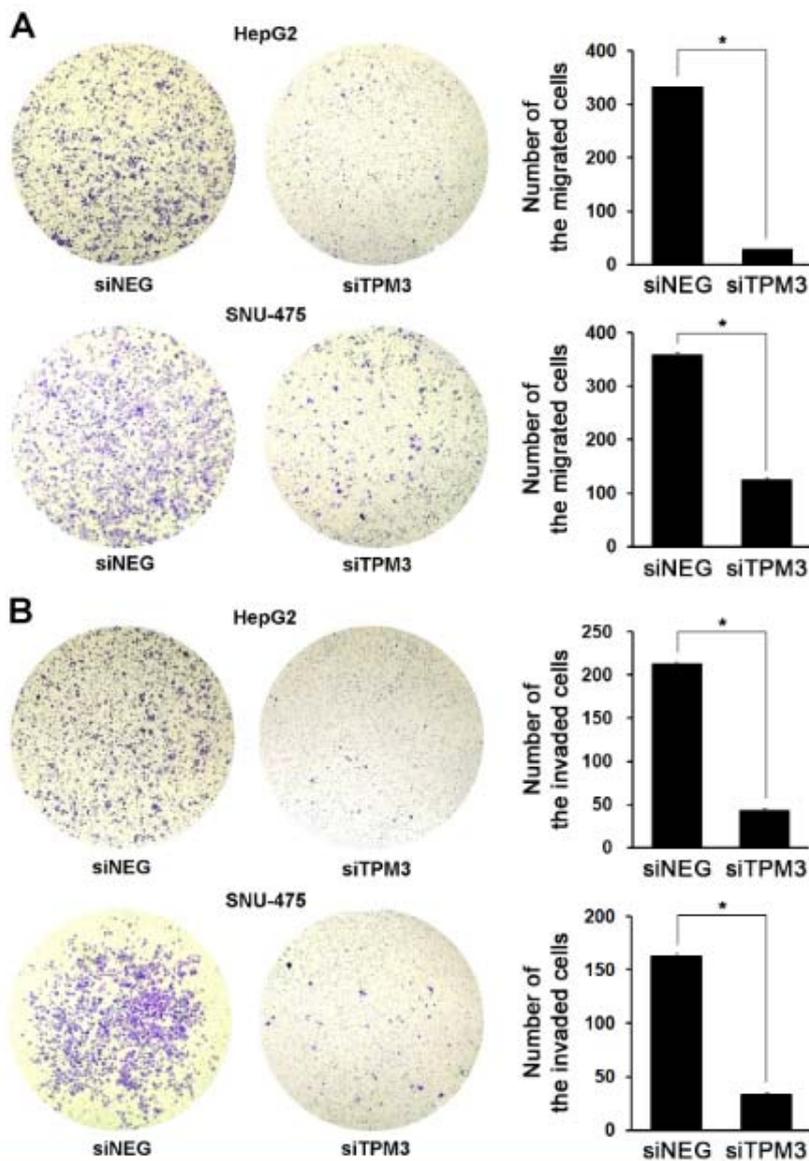


그림. 간암에서 TPM3 발현억제 후 migration (A)과 invasion (B)의 감소

○ TPM3 발현 억제결과 Snail 발현이 감소하고 E-cadherin 발현이 증가되어있다. 이는

TPM3 발현억제에 의해 간암의 침습성이 억제되는 기전을 설명할 수 있는 증거로 보여진다.

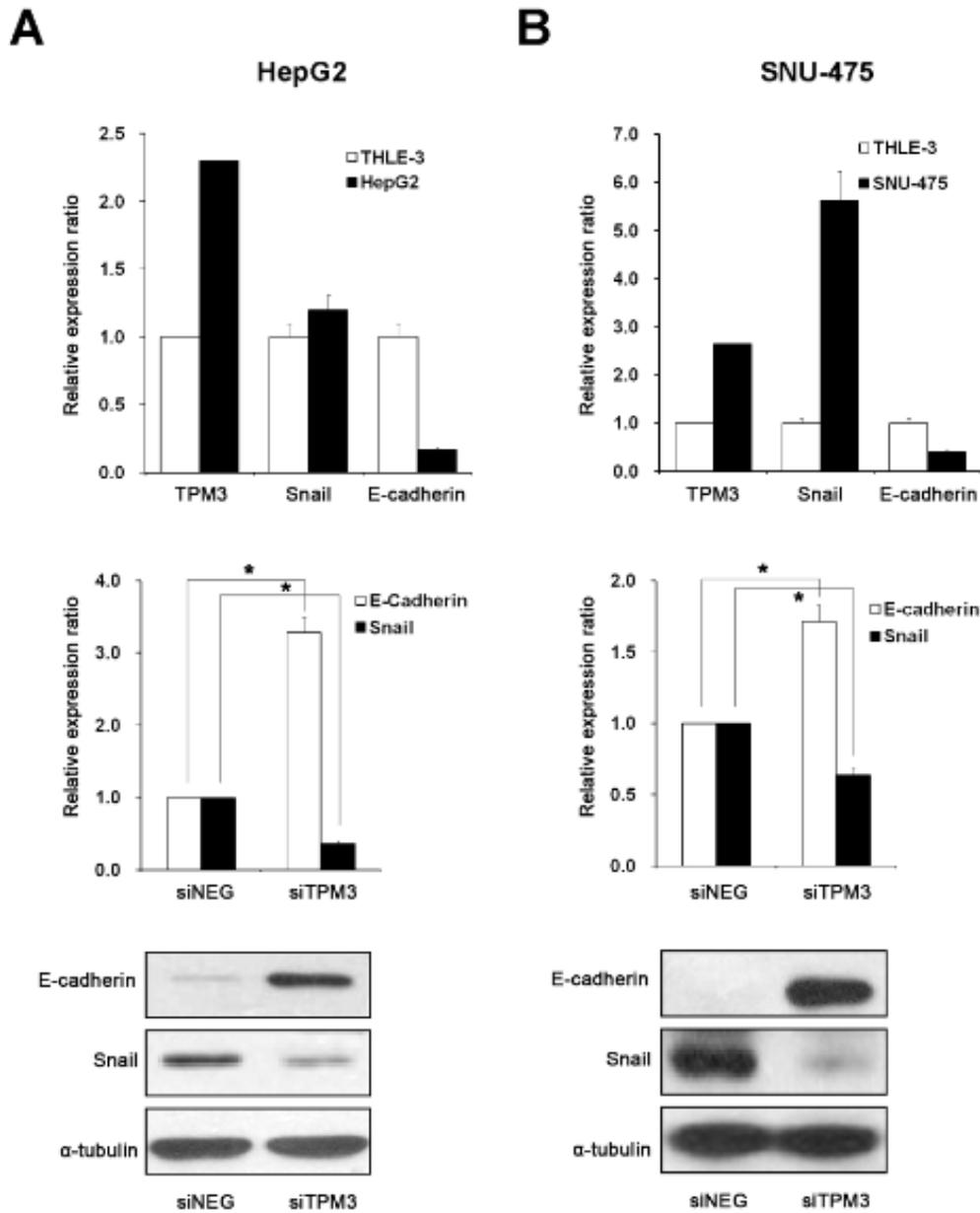


그림. E-cadherin and Snail expression changes after TPM3 knockdown in HepG2 (A) and SNU-475(B).

○ TPM3 억제 후 침습성이 감소한 간암세포는 다른 침습성 관련 molecule의 발현에도 변화를 보였다. 특히 vimentin과 fibronectin의 발현은 TPM3 knockdown 후 현저하게 발현이 감소되었다.

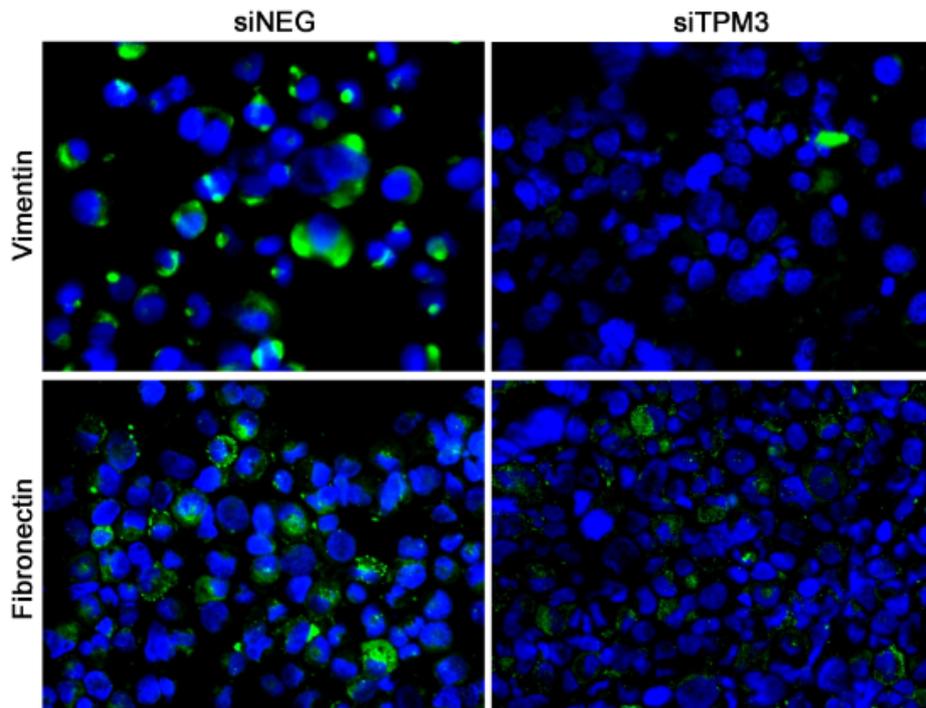


그림. Expression profiles of vimentin and fibronectin after TPM3 knockdown in SNU-475. Vimentin (upper) and fibronectin (lower) expression patterns were compared between siTPM3 and siNEG transfected SNU-475 by immunofluorescence staining (green for vimentin and fibronectin stain; blue for nuclear DAPI stain).

○ TPM3 억제 후 침습성 감소 외에 간암의 성장도 억제되었다.

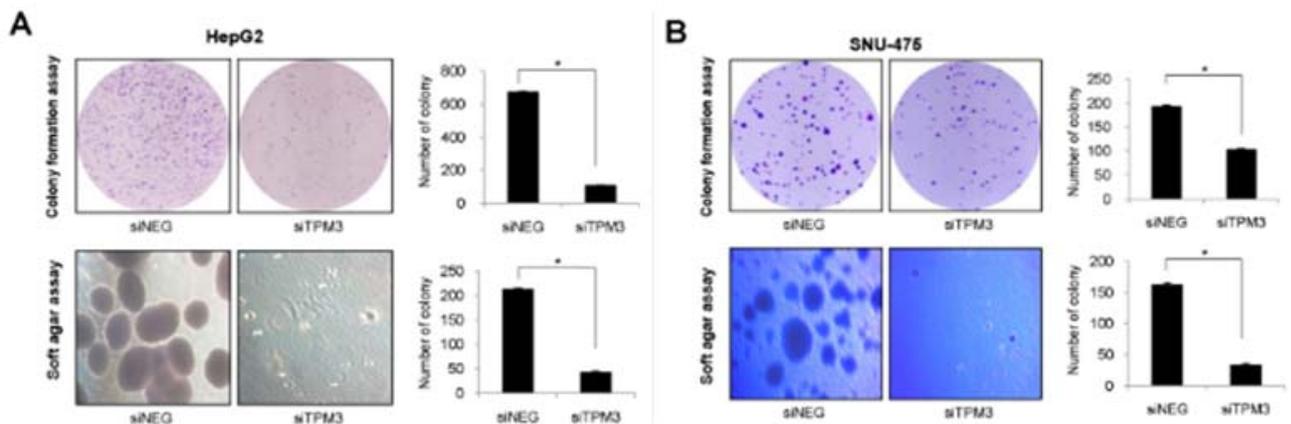


그림. Inhibited HepG2 (A) and SNU-475 (B) tumor cell growth in TPM3 knockdown HCC cell lines.

○ 이러한 결과를 바탕으로 TPM3 과발현이 간암에 미치는 영향을 아래와 같이 정리하였다.

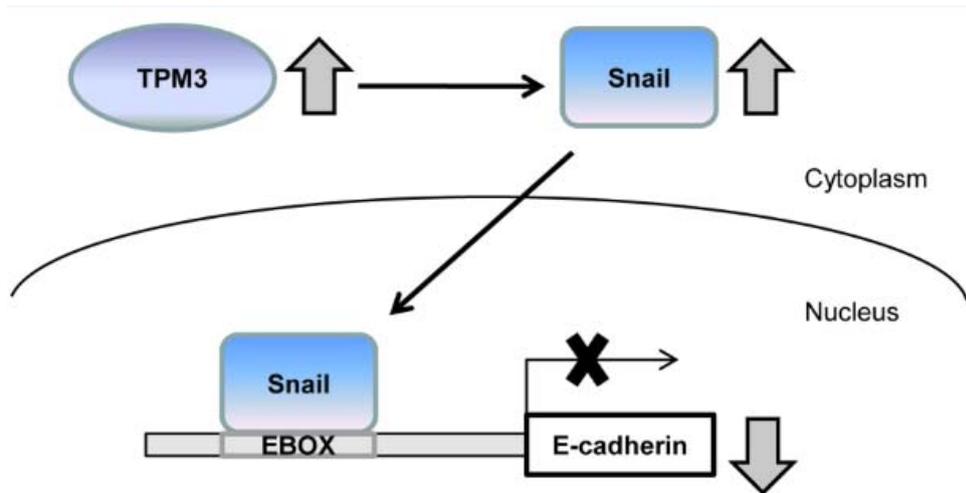


그림. Schematic diagram of the hypothetical molecular pathway of TPM3 overexpression contributing to migration/invasion by activating EMT pathway.

- 이 결과는 간암의 침습성을 예측하는 마커로 활용될 뿐 아니라 전이를 막는 약제 개발에도 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

3) CCT3, CKS1B, PRCC, CCNE2, E5F5

- 1q21-32 CAR-gain에 위치하는 암 관련 유전자 중 CCT3, CKS1B, PRCC, CCNE2, E5F5 유전자들에 대해서 기능 연구를 실시하였다. 이 중 PRCC, CKS1B는 간암의 성장 및 침습성에 기여하는 것이 확인 되었으나 나머지 유전자는 미치는 영향이 크지 않았다.
- 기능 연구로 확인된 molecule을 바탕으로 간암 전이 예측 검사 kit와 전이 및 성장 억제 신약 개발로 연구를 이어갈 계획이다.

사. 간암 염색체 변이 분석 및 간암 예후예측 검사kit을 지원하는 소프트웨어 개발

1) 염색체 변이를 기능적으로 해석하는 알고리즘 개발

- Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)를 바탕으로 CAR 구역에 속한 유전자의 기능적 ontology를 자동 분석하는 소프트웨어를 개발하였다 (*Bioinformatics* 2008, 24, 420): 아래 그림. 이 연구를 통해 copy number 변화를 간편하게 기능적으로 해석할 수 있게 되었으며 기능적 부분도 가장 빈번한 염색체 변화의 기능, 개인에서 일어나는 염색체 변화의 생물학적 기능 및 의미, 예후 및 표현형과 연관된 염색체 변화의 기능적 해석이 가능하게 되었다.

○ 간암의 예후 및 임상양상과 연관된 copy number alteration의 ontology는 아래의 표들과 같다.

표 7. Survival-related signatures in HCC

Class	Type	Pathway	Size	Identifier	FDR		
Poor	Gain	homophilic cell adhesion	100	7156	<0.0001		
		cell adhesion	416	7155	<0.0001		
		Calcium-dependent cell-cell adhesion	16	16339	<0.0001		
		Calcium ion binding	692	5509	<0.0001		
		synaptogenesis	17	7416	<0.0001		
		synaptic transmission	143	7268	<0.0001		
		Nervous system development	242	7399	<0.0001		
		interleukin-1 receptor activity	7	4908	<0.0001		
		membrane alanyl aminopeptidase activity	13	4179	0.0007		
		Gamma-aminobutyric acid signaling pathway	10	7214	0.0124		
		aminopeptidase activity	28	4177	0.0156		
		GABA-A receptor activity	16	4890	0.0463		
		Loss	oxygen transporter activity	oxygen transport	12	5344	0.0035
				oxygen transport	13	15671	0.0035
oxygen binding	27			19825	0.0035		
Vitamin A metabolism	5			6776	0.0037		
Good	Gain	N-formyl peptide receptor activity	6	4982	0.0166		
		Loss	hematopoietin/interferon-class cytokine receptor binding	23	5126	<0.0001	
			response to virus	62	9615	<0.0001	
			interferon-alpha/beta receptor binding	11	5132	<0.0001	
			Defense response	111	6952	<0.0001	
			sugar binding	131	5529	<0.0001	
			cytokine activity	174	5125	<0.0001	
			taste receptor activity	13	8527	<0.0001	
			Sensory perception of taste	14	50909	0.0001	
			antimicrobial humoral response	75	19735	0.0009	
			cell surface receptor linked signal transduction	157	7166	0.0009	

Phenotype-related signatures related to two classes (good - more than 5 years after diagnosis vs poor-death within 5 years).

Table 8. Phenotype-related signature for six different clinicopathological parameters

Clinicopathological parameter	Class	Type	Annotated function	Size	FDR
Age	Old-onset (≥ 50 yrs)	Gain	structural molecule activity	355	0.0004752
			oxygen transporter activity	15	0.004796
			oxygen transport	16	0.004796
	Young-onset (< 50 yrs)	Loss	C-C chemokine receptor activity	16	0.0005283
			chemotaxis	110	0.0011682
			chemokine receptor activity	18	0.009196
Stage	Early-disease (stage I and II)	Gain	MHC class II receptor activity	17	9.57E-08
			immune response	438	9.57E-08
			antigen presentation, exogenous antigen	16	1.553E-06
			antigen processing, exogenous antigen via MHC class II	17	2.02E-06
			antigen presentation	22	0.0234168
			MHC class I receptor activity	24	0.0236337
	Late-disease (stage III and IV)	Gain	interleukin-1 receptor binding	11	1.024E-10
			homophilic cell adhesion	116	1.742E-10
			calcium-dependent cell-cell adhesion	18	6.468E-10
			interleukin-1 receptor antagonist activity	8	3.63E-09
			synaptogenesis	19	4.198E-08
			cell adhesion	509	0.0001032
			nervous system development	283	0.0006242
			synaptic transmission	177	0.006336
			calcium ion binding	824	0.0254835
development	695	0.0362131			
Histological grade	Well-differentiated	Gain	nucleosome assembly	84	1.222E-28
			chromosome organization and biogenesis	86	6.666E-27
			DNA packaging	17	4.752E-07
			antigen presentation, exogenous antigen	16	5.577E-05
			MHC class II receptor activity	17	0.0000638
			antigen processing, exogenous antigen via MHC class II	17	0.0000638
			phosphoinositide-mediated signaling	23	8.316E-05
			establishment and/or maintenance of chromatin architecture	29	0.0002442
			Glutathione metabolism	31	0.0062333
			sensory perception of taste	17	0.0260887
	Poorly-differentiated	Loss	membrane aanyl aminopeptidase activity	15	0.0058608
			aminopeptidase activity	33	0.013794
			alcohol dehydrogenase activity	9	1.505E-05
			ethanol oxidation	5	1.505E-05
			methylnaphthalene degradation	6	5.852E-05
			antigen presentation, exogenous antigen	16	0.0003181
			MHC class II receptor activity	17	0.0003608
			antigen processing, exogenous antigen via MHC class II	17	0.0003608
			bile acid biosynthesis	27	0.0006015
			Glycolysis / Gluconeogenesis	52	0.010791
ATPase activity	103	0.0165754			
carrier activity	14	0.0285025			

3) Array-CGH 데이터 분석지원 소프트웨어 개발

- Oligoarray-CGH 분석 소프트웨어 개발을 완료하여 사용자의 편의성을 높이고 병원 실험실에서도 누구나 분석 가능한 소프트웨어를 개발하였다 (소프트웨어 명 CGHscape, <http://www.irgcp.com/software/CGHscape>)
- CGHscape에는 whole-genome profiling, Individual chromosome profiling, log2 scale 조절, Moving average, Chromosome idiogram 기능 등 다양한 분석기능을 탑재하였으며 Web 분석과 내려받기를 통한 standalone 소프트웨어로서의 기능을 모두 지원한다. 아래그림은 CGHscape의 메인 페이지들을 보여주고 있다.

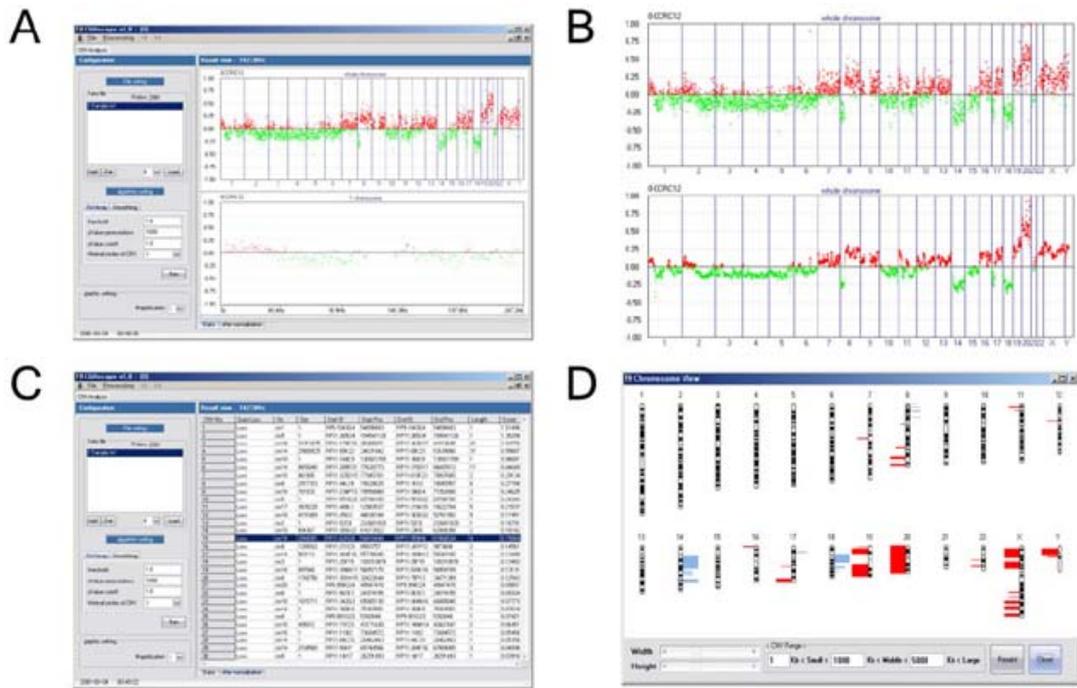


Fig. 1. Screenshots of CGHscope. (A) The main frame of CGHscope for data uploading and visualization is shown. The data uploading and the parameter setting of the subsequent analyses can be done with graphic user interface. The genome-wide \log_2 ratio plots are shown in order of $1p_{ter}$ to Yq_{ter} for all chromosomes demonstrating the chromosomal gains and losses in red and green, respectively. The selected chromosome can be further shown as individual chromosomal plot (below). (B) \log_2 ratio can be processed for Gaussian smoothing to reduce the noise level. Above (before Gaussian smoothing) and below (after) \log_2 plots clearly shows the benefits of data smoothing. (C) The CNAs identified using SW-ARRAY algorithm can be listed in table formats. The list can be exported into tab-delimited plain text or Microsoft Excel format. (D) The genome-wide distribution of identified CNAs is illustrated with respect to individual chromosomes. Left (red) and right (green) bars indicate the relative genomic gains and losses, respectively and the length of bars indicate the length of CNAs.

그림. CGHscope (Jeong et al 2008 6:126-129)

야. 연구 성과 (자료첨부)

1) 논문게재

계재 연월일	논문명	저자명			학술지명 ('08 IF)	권(호), 쪽	국내외	SCI	*사업단 기여도(%)
		주저자	교신저자	공동저자					
2008. 12. 15	Clinical implication of recurrent copy number alterations in hepatocellular carcinoma and putative oncogenes in recurrent gains on 1q.	김태민, 임선희	정연준	신승훈 et al	Int J Cancer (IF 4.555)	123 (12) 2808-2815	국외	SCI	100%
2008. 02	GEAR: genomic enrichment analysis of regional DNA copy number changes	김태민, 임선희	정연준	정유채 et al	Bioinformatics (IF 5.039)	24(3) 420-421	국외	SCI	60%
2008.	Comparison of Non-amplified and Amplified DNA Preparation Methods for Array-comparative Gnostic Hybridization Analysis	주홍진, 정승현	정연준	임선희 et al	Molecular & Cellular Toxicology (IF 0.759)	4(3):246-252	국내	SCIE	100%
2007. 11	Inferring biological functions and associated transcriptional regulators using gene set expression coherence analysis.	김태민	정명호	정연준	BMC Bioinformatics (IF 3.617)	8 453	국외	SCI	70%
2010. 04.01	Tropomyosin3 overexpression and a potential link to epithelial-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma.	최혜선	정연준	임선희 et al	BMC Cancer (IF 3.08)	10 122	국외	SCI	90%
2010. 05.07	An Overview of Biomarkers and Molecular Signatures in HCC	임선희	정연준		Cancers	2 809-823	국외	비SCI	80%
2008. 12	CGHscape: A Software Framework for the Detection and Visualization of Copy Number Alterations	정용복	정연준	김태민	Genomics & Informatics	6(3) 126-129	국내	비SCI	100%

2) 특허 성과

출원된 특허					*사업단 기여도 (%)	등록된 특허					*사업단 기여도 (%)
출원 연월일	특허명	발명인 / 출원인	출원 국	출원 번호		등록 연월일	특허명	발명인 / 등록인	등록 국	등록 번호	
2008. 01.15	비교유전자보합법을 이용한 간암 예후 진단방법 및 진단키트	정연준/가톨릭대학교 산학협력단	한국	10-2008-0004627	100%						
2009. 1. 14	Diagnostic Methods and Kits for Hepato Cellular Carcinoma Using Comparative Genomic Hybridization	정연준/가톨릭대학교 산학협력단	미국	PU-09004US	100%						
2010. 2.	게노믹 정량 PCR를 이용한 간암 예측 방법 및 예측 키트	정연준/가톨릭대학교 산학협력단	한국	10-2010-0015217	100%						

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

가. 연구개발의 최종목표

- 유전체 변이를 고해상도로 발굴할 수 있는 기술인 array-CGH를 이용하여 위암 및 간암 후보 유전체변이 발굴 및 기능성 바이오마커 데이터베이스 구축
- 최종 후보 유전체 바이오마커를 이용한 임상친화성 간암예후예측용/치료효과 예측용 array-CGH칩 개발
- 다수의 임상적용 및 전향 분석을 통한 실용화/사업화 기술 완성

나. 연차별 연구개발 목표 및 내용

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> ◦임상조직 및 세포주 확보, array CGH 분석 통한 analysis 통한 유전체 변이 분석 ◦유의한 빈도 이상으로 나타나는 genomic alterations/individual 유전체 변이를 규명하는 알고리즘 개발, 데이터베이스화 	<ul style="list-style-type: none"> -간암 세포주, 조직 수집 -array-CGH로 whole-genome copy number 분석 --반복 염색체 변화 분석 -Minimal alteration region(MAR) 설정 -후보 유전자에 대해 realtime qRT-PCR로 유전자 변이 후보 선정
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> ◦발굴된 공통 유전체 변이(RAR)에 위치하는 유전자를 선별하여 유전자 발현 분석 ◦등의 생물학적 규명을 통해 5종 내외의 최종 후보 유전체 변이군 선정 ◦원자력병원 데이터와 비교 분석을 통하여 간암 진단/예후 예측용 염색체 칩 후보 마커로서의 가능성 확인 	<ul style="list-style-type: none"> -RAR defining 알고리즘 개발, 활용 -바이오칩 개발에 유의한 RAR 발굴: 1차년도보다 증가된 간암 조직에서 RAR 발굴 -RAR 마커 기반 간암 예후 및 임상 연관성 연구 -발굴된 염색체 이상 구역에 포함된 유전자들의 발현 분석 -각 대상 유전자의 간암 발생 관련 기능 분석 실시
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> ◦간암 예후 예측용 염색체 마커 올리고어레이 칩 설계 및 시제품 제작 ◦제작한 간암 올리고어레이에 대한 소규모 효능 연구 ◦간암 바이오마커 후보 유전자에 대한 생물학적 기능 분석 	<ul style="list-style-type: none"> -발굴한 RAR을 중심으로 100K 해상도의 올리고어레이 칩 설계 -간암 예후 예측 올리고어레이 칩 제작 -올리고어레이 기반 array-CGH 분석 실험 조건 확립 -20개의 간암 조직을 올리고어레이에 적용 및 효능 분석 -올리고어레이 분석 array-CGH 분석용 소프트웨어 제작 -후보 유전자 2종에 대한 SiRNA 처리 및 in vitro transformation 분석 실시
4차년도	<ul style="list-style-type: none"> ◦간암 진단/예후 예측용 올리고칩 최종 설계 및 실용화 준비 ◦간암 진단/예후 예측용 유전자 검사 키트 개발 	<ul style="list-style-type: none"> -발굴된 염색체 변이 마커 probe set을 100kb 해상도로 최종 설계 -간암 올리고칩 실용화를 위한 최적 프로토콜 확립 및 제공 -간암 올리고칩을 지원하는 분석 소프트웨어 확립 및 제공 -3종의 최적 마커를 이용한 간암 검사/예후 예측 신속 유전자 검사 키트 (genomic qPCR 기반) 개발 -미래의 간암 유전자 치료제 개발을 위하여 KIF14 기능 억제 물질 탐색

다. 계획대비 달성도

번호	세부연구목표	달성내용	달성도(%)
1	Array-CGH를 이용하여 간암에서 공통적으로 나타나는 염색체 변이 (common alteration region: CAR) 발굴	-한국인 간암 76례에 대해 array-CGH whole-genome 염색체 변이 분석을 통해 총 32종의 CAR 발굴 -발굴한 CAR의 분자 생물학적 검증 및 database로 구축하여 타 연구자에게 공개 (http://www.systemsbiology.co.kr/micro/CGH/hepato.htm) -한국인 간암 CAR 발굴 내용을 논문발표 (Int J Cancer 2008 123(12):2808-2815) -한국인 간암 CAR 자료의 특허 출원 (대한민국 출원번호 10-2008-0004627; 미국 출원번호PU-090004US) -Array-CGH 분석기술을 확립하고 논문 발표 (Molecular & Cellular Toxicology 4:246-252)	100%
2	도출한 후보 유전체 바이오마커를 이용한 임상친화성 간암예후 예측용 유전자 검사법 개발	-연관성 규칙 마이닝을 적용하여 발굴한 32종의 CAR에서 간암 예후를 가장 정확히 반영하는 조합 발굴 -이 조합에 대해 예후예측용 genomic qPCR 검사 kit 개발 -별도의 간암군에 대해 개발한 검사kit의 예후예측 효능 임상 확인 -32 CAR을 중심으로 whole genome 분석이 가능한 44K custom 올리고어레이 설계 및 제작 -제작한 간암 올리고 어레이에 대해 임상 효능 확인 -검사kit에 대한 특허 출원 (대한민국 출원번호: 10-2010-0015217)	100%
3	간암 CAR에 속한 유전자들의 기능 연구 및 진단/치료적용 가능성연구	-간암에서 공통적으로 copy number gain을 보인 총 7 종의 CAR 유전자에 대해 간암 기여 경로 연구실시 -KIF14의 간암 발암기전 규명 -TPM3의 간암 발암기전 규명 -CCT3, CKS1B, PRCC, CCNE2, E5F5 의 간암 발암기전 규명	100%

번호	세부연구목표	달성내용	달성도(%)
4	간암 염색체 변이 분석 및 간암 예후예측 검사kit을 지원하는 소프트웨어 개발	- 염색체 변이를 기능적으로 분석할 수 있는 genomic enrichment analysis of regional DNA copy number changes 시스템 개발 (Bioinformatics 2008; BMC (Bioinformatics 2007) - Array-CGH 분석 전과정의 지원 및 visualization 시스템 개발 (Genomics & Informatics 2008)	100%
5	개발한 검사법의 실용화/사업화 기술 연구	- 개발한 검사법의 임상 연구실시 및 특허출원 (한국 2건 미국 1건) -간암 유전체 연구의 임상적응에 관한 리뷰논문 발표 (Cancers 2010)	100%

라. 제시된 연구목표중 중요도 순으로 목표(4-5개 정도)를 추출하고 가중치를 부여

번호	세부연구목표	가중치
1	Array-CGH를 이용하여 간암에서 공통적으로 나타나는 염색체 변이 (common alteration region: CAR) 발굴	40%
2	간암 염색체 변이 분석 및 간암 예후예측 검사kit을 지원하는 소프트웨어 개발	30%
3	도출한 후보 유전체 바이오마커를 이용한 임상친화성 간암예후예측용 유전자 검사법 개발	20%
4	간암 CAR에 속한 유전자들의 기능 연구 및 진단/치료적용 가능성연구	10%
계		총 100%

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. Array-CGH를 이용하여 간암에서 공통적으로 나타나는 염색체 변이 (common alteration region: CAR) 발굴 및 도출한 후보 유전체 바이오마커를 이용한 임상친화성 간암예후예측용 유전자 검사법 개발

○ 간암에서 발굴한 CAR data를 이용하여 임상친화적인 간암 예후예측용 genomic qPCR kit개발과 고밀도 (44K) 간암 올리고어레이 칩 개발이 이루어 졌다.

○ 간암 예후예측용 genomic qPCR kit의 경우 연관성 룰 마이닝 기법을 적용하여 효율적으로 최적의 예후예측 마커를 확인하고 병원 검사실에서 실시할 수 있는 PCR기반의 검사법으로 개발하였으므로 임상적용성 및 신의료기술 지정 가능성이 매우 높다고 판단된다. 그러나 근래에 간암치료를 수술보다 내과적으로 대부분 치료하기에 간암조직 임상시료 수집이 어려워 충분한 수의 검증이 이루어지지 못했다. 향후 연구에서 다기관 협력연구를 통해 충분한 수의 간암 시료를 확보하여 개발한 간암 예후예측용 genomic qPCR kit의 효능을 검증할 예정이다. 효능 검증에서 신뢰성과 임상적용성이 확인되면 가톨릭의대 서울성모병원 간암센터와 협력하여 '전향적'으로 실제 외래 환자에 적용할 계획이며 이 자료를 바탕으로 궁극적으로는 국가 '신의료기술'에 등재시켜 모든 단위병원에서 의료보험 하에 실시되도록 하고자 한다.

○ Genomic qPCR kit의 taregt 유전자는 2-4개로서 qPCR 이외에 Immunohistochemistry (IHC) kit으로 개발하면 DNA보다 더 정확한 진단이 가능할 수 있다. 따라서 추가연구에서는 간암의 Tissue array를 준비하여 예후예측 qPCR kit과 동일한 유전자의 조합에 대해 Tissue array-IHC를 실시하여 병원 병리과에서 바로 사용가능한 kit로 발전시키고자 한다.

○ 현재까지 개발한 간암 예후예측용 올리고어레이는 32 region의 CAR을 포함하고 전체 염색체를 약 100kb backbone으로 커버하는 어레이이다. 현재 간암 시료의 제한으로 인해 23례에 대한 검증을 마쳤는데 이 자료만으로 이 칩의 효용성을 판단하기 이르다. 따라서 추가적인 검증 연구가 필요하다고 판단된다.

2. 간암 CAR에 속한 유전자들의 기능 연구 및 진단/치료적용 가능성연구

○ 본 연구를 통해 간암 발암에 기여정도가 큰 유전자로 판단되는 후보는 KIF14와 TPM3 유전자이다. TPM3유전자를 억제한 경우 간암세포의 전이/침습성이 크게 저하되는 것으로 보아 TPM3 pathway를 직접 차단하거나 TPM3-Snail interaction을 저해하는 chemical을 개발하여 TAC 치료에 보조 항암제로 사용하면 간암의 전이를 낮추는 효과가 있을 것으로 예상된다.

○ 본 연구 결과로 볼 때 KIF14는 간암의 uncontrolled growth에 크게 기여하는 것으로

판단되며 KIF14의 pathway, 특히 p27의 ubiquitination을 저해하는 기전을 보다 명확히 알게 되면 이 기전을 저해하는 chemical 개발로 이어질 수 있을 것으로 기대된다.

3. 간암 예후예측 qPCR/IHC 검사법

- 이 검사법은 신약개발과 같은 임상시험 단계를 거치지 않아도 되므로 특허로 확인된 효능을 확대검증하면 식약청 허가와 신의료기술 선정 심사에 들어갈 수 있다. 따라서 연간 10000건 이상의 검사가 가능한 산업화 아이템으로 발전이 가능하며 현재 진행 중인 미국 특허가 완료되면 국외 시장진출도 가능하리라 예상한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

1. Thorgeirsson SS, Lee J-S, and Grisham SW. Functional Genomics of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 2006;43:S145-S150.
2. Zimonjic DB, Keck CL, Thorgeirsson SS, Popescu NC. Novel recurrent genetic imbalances in human hepatocellular carcinoma cell lines identified by comparative genomic hybridization. *Hepatology* 1999 29(4):1208-14.
3. Kim TM, Yim SH, Shin SH, Xu HD, Jung YC, Park CK, Choi JY, Park WS, Kwon MS, Fiegler H, Carter NP, Rhyu MG, Chung YJ. Clinical implication of recurrent copy number alterations in hepatocellular carcinoma and putative oncogenes in recurrent gains on 1q. *Int J Cancer*. 2008 123(12):2808-15.
4. Choi HS, Yim SH, Xu HD, Jung SH, Shin SH, Hu HJ, Jung CK, Choi JY, Chung YJ. Tropomyosin3 overexpression and a potential link to epithelial-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. 2010 10:122.
5. Kim TM, Jung YC, Rhyu MG, Jung MH, Chung YJ. GEAR: genomic enrichment analysis of regional DNA copy number changes. *Bioinformatics*. 2008 24(3):420-1.
6. Kim TM, Chung YJ, Rhyu MG, Jung MH. Inferring biological functions and associated transcriptional regulators using gene set expression coherence analysis. *BMC Bioinformatics*. 2007 8:453.
7. Joo HJ, Jung SH, Yim SH, Kim TM, Xu HD, Shin SH, Kim MY, Kang HM, Chung YJ. Comparison of Non-amplified and Amplified DNA Preparation Methods for Array-comparative Gnostic Hybridization Analysis. *Molecular & Cellular Toxicology* 2008 4(3):246-252.
8. Jung SH, Shin SH, Yim SH, Choi HS, Lee SH, Chung YJ. Integrated analysis of copy number alteration and RNA expression profiles of cancer using a high-resolution whole-genome oligonucleotide array. *Exp Mol Med*. 2009 41(7):462-70.
9. Yim SH, Chung YJ. An Overview of Biomarkers and Molecular Signatures in HCC. *Cancers* 2010 2:809-823.

Clinical implication of recurrent copy number alterations in hepatocellular carcinoma and putative oncogenes in recurrent gains on 1q

Tae-Min Kim¹, Seon-Hee Yim², Seung-Hun Shin^{1,2}, Hai-Dong Xu^{1,2}, Yu-Chae Jung¹, Cheol-Keun Park³, Jong-Young Choi⁴, Won-Sang Park⁵, Mi-Seon Kwon⁶, Heike Fiegler⁷, Nigel P. Carter⁷, Mun-Gan Rhy¹ and Yeun-Jun Chung^{1,2*}

¹Department of Microbiology, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

²Integrated Research Center for Genome Polymorphism, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

³Department of Pathology, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University of Medicine, Seoul, Korea

⁴Department of Internal Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

⁵Department of Pathology, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

⁶Department of Pathology, College of Medicine, Dankook University Hospital, Cheonan, Korea

⁷The Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, United Kingdom

To elucidate the pathogenesis of hepatocellular carcinoma (HCC) and develop useful prognosis predictors, it is necessary to identify biologically relevant genomic alterations in HCC. In our study, we defined recurrently altered regions (RARs) common to many cases of HCCs, which may contain tumor-related genes, using whole-genome array-CGH and explored their associations with the clinicopathologic features. Gene set enrichment analysis was performed to investigate functional implication of RARs. On an average, 23.1% of the total probes were altered per case. Mean numbers of altered probes are significantly higher in high-grade, bigger and microvascular invasion (MVI) positive tumors. In total, 32 RARs (14 gains and 18 losses) were defined and 4 most frequent RARs are gains in 1q21.1-q32.1 (64.5%), 1q32.1-q44 (59.2%), 8q11.21-q24.3 (48.7%) and a loss in 17p13.3-p12 (51.3%). Through focusing on RARs, we identified genes and functional pathways likely to be involved in hepatocarcinogenesis. Among genes in the recurrently gained regions on 1q, expression of *KIF14* and *TPM3* was significantly increased, suggesting their oncogenic potential in HCC. Some RARs showed the significant associations with the clinical features. Especially, the recurrent loss in 9p24.2-p21.1 and gain in 8q11.21-q24.3 are associated with the high tumor grade and MVI, respectively. Functional analysis showed that cytokine receptor binding and defense response to virus pathways are significantly enriched in high grade-related RARs. Taken together, our results and the strategy of analysis will help to elucidate pathogenesis of HCC and to develop biomarkers for predicting behaviors of HCC.

© 2008 Wiley-Liss, Inc.

Key words: hepatocellular carcinoma; recurrently altered regions; array comparative genomic hybridization; *KIF14*; *TPM3*

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common human malignancies and responsible for ~5% of all cancer-related deaths in the world.¹ Given that the overall HCC incidence is still rising and prognosis of the disease remains poor, it is important to develop effective diagnostic and therapeutic modalities based on sound biological insights into hepatocarcinogenesis.^{2,3}

The copy number alterations observed in human solid tumors are known to contribute to the tumorigenesis by affecting the activities of cancer-related genes in the altered chromosomal regions.⁴ Thus, genome-wide mapping of copy number alterations in cancer can facilitate the identification of cancer-related genes, which will improve the understanding of tumorigenesis. Using conventional cytogenetic tools such as comparative genomic hybridization (CGH), copy number gains on 1q, 8q and 20q, along with losses on 1p, 4q, 8p, 13q, 16q and 17p have been previously identified in HCC.^{5–7} However, the resolution of conventional cytogenetic analysis is insufficient to precisely identify submicroscopic changes. Recently introduced array-CGH, the combination of conventional CGH and microarray technology, enabled high-resolution screening of genome-wide copy number alterations containing potential cancer-related genes.^{8,9} Through array-CGH analysis, novel oncogenes such as *JAB1* or differentiation-specific

regions have been identified in HCC.^{5,10} Also etiology-dependent copy number alterations and genes relevant to hepatocarcinogenesis were suggested in HCC.¹¹ But, it is still difficult to identify the biologically relevant changes and their functional significance in a systematic manner due to the extensive and complex nature of chromosomal alterations.

We hypothesized that recurrent copy number changes common to many HCC cases may contain essential genes for hepatocarcinogenesis. Using this strategy, recurrently altered regions (RARs) were defined in 76 primary HCCs using whole-genome array CGH analysis, and the associations between RARs and clinicopathologic features were examined. Also, we functionally categorized the genes located in the RARs.

Material and methods

Study materials

Frozen tissues (tumor and adjacent normal tissue pairs) were obtained from 76 primary HCC patients (65 males and 11 females) who underwent surgical resection. This study was performed under the approval of the Institutional Review Board of the Catholic University Medical College of Korea. Tumor stage was determined according to the standard tumor-node-metastasis classification of AJCC guidelines (6th edition). Clinicopathologic information about the 76 cases is available in Supporting Table 1. Ten-micrometer-thick frozen sections were prepared, and tumor cell-rich areas (tumor cells comprise more than 80–90% of the selected area) without tumor cell necrosis were microdissected, from which genomic DNA was extracted as described previously.^{12,13} Normal human genomic DNA was purchased from Promega (Madison, WI) and used as sex-matched reference DNA for array-CGH.

Array comparative genomic hybridization

A large insert clone array covering the entire human genome at 1 Mb resolution was used for profiling genomic alterations.¹⁴ Array-CGH was performed as described elsewhere using MAUI hybridization station (BioMicro Systems, Salt Lake city, UT).^{12,13} Data processing, normalization and realigning of raw array-CGH data were performed using web-based array-CGH analysis software ArrayCyGHt (<http://genomics.catholic.ac.kr/arrayCGH/>).¹⁵

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: Ministry of Science and Technology in Korea (21C Frontier Functional Human Genome Project); Grant number: FG06-12-01.

The first two authors contributed equally to this work.

*Correspondence to: 505, Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-701, Korea. Fax: +82-2-596-8969. E-mail: yejun@catholic.ac.kr

Received 6 January 2008; Accepted after revision 16 July 2008

DOI 10.1002/ijc.23901

Published online 19 September 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

Genome analysis

GEAR: genomic enrichment analysis of regional DNA copy number changes

Tae-Min Kim^{1,3}, Yu-Chae Jung¹, Mun-Gan Rhyu¹, Myeong Ho Jung^{3,4} and Yeun-Jun Chung^{1,2,*}

¹Department of Microbiology, ²Integrated Research Center for Genomic Polymorphism, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul 137-701, ³Division of Metabolic Diseases, Center for Biomedical Science, National Institute of Health, Seoul and ⁴School of Oriental Medicine, Pusan National University, Busan, Korea

Received on March 22, 2007; revised on November 3, 2007; accepted on November 20, 2007

Advance Access publication November 23, 2007

Associate Editor: Dmitriy Frishman

ABSTRACT

Summary: We developed an algorithm named GEAR (genomic enrichment analysis of regional DNA copy number changes) for functional interpretation of genome-wide DNA copy number changes identified by array-based comparative genomic hybridization. GEAR selects two types of chromosomal alterations with potential biological relevance, i.e. recurrent and phenotype-specific alterations. Then it performs functional enrichment analysis using *a priori* selected functional gene sets to identify primary and clinical genomic signatures. The genomic signatures identified by GEAR represent functionally coordinated genomic changes, which can provide clues on the underlying molecular mechanisms related to the phenotypes of interest. GEAR can help the identification of key molecular functions that are activated or repressed in the tumor genomes leading to the improved understanding on the tumor biology.

Availability: GEAR software is available with online manual in the website, <http://www.systemsbio.org.co.kr/GEAR/>.

Contact: yejun@catholic.ac.kr

1 BACKGROUND

Recently developed array-based comparative genomic hybridization (array-CGH) is one of the most advanced genome-wide screening technologies of chromosomal alterations (Albertson and Pinkel, 2003). In spite of the promising potential, the complex and prevalent nature of chromosomal alterations often makes it difficult to identify biologically relevant changes and to draw a functional interpretation. Although there have been relative successes to search master genes from local chromosomal alterations, it is highly challenging to develop a more integrative and function-oriented analytic method for high-throughput data sets (Rhodes and Chinnaiyan, 2005). From this perspective, one promising method is functional enrichment or pathway analysis using *a priori* selected functional gene sets, by which the large-scale gene expression profiles are interpreted as function-related coordinated expression changes (Curtis *et al.*, 2005). Theoretically, this analytical method could

be applied to other types of high-throughput data such as genome-wide DNA copy number alterations of array-CGH. Therefore, we developed a novel algorithm, GEAR (genomic enrichment analysis of regional DNA copy number changes), that selects biologically relevant copy number changes and performs gene functional enrichment analysis using predefined functional gene sets.

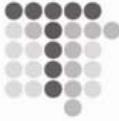
2 DESCRIPTION

The GEAR algorithm can be applied to both large insert clone array and oligo-array based whole-genome copy number data. GEAR defines two types of chromosomal alterations; one is a recurrent alteration shared by a significant number of samples and the other one is a phenotype-specific alteration that occurs more often in a certain phenotypic subclass. Then, GEAR measures the significance for the enrichment of the functional gene sets in those two types of alterations. The significantly enriched gene sets, in recurrent and phenotype-specific alterations are termed primary- and clinical-genomic signatures, respectively. The major functions of GEAR algorithm are implemented in VB.NET program running on Microsoft Windows machine with user-friendly graphic interface. The major steps of the GEAR algorithm are as follows;

- Determination of significantly recurrent chromosomal alterations.
- Determination of phenotype-specific chromosomal alterations.
- Mapping genes on respective probes or genomic regions.
- Enrichment analysis using functionally-annotated gene sets.
- Identification of primary and clinical genomic signatures.

(1) The recurrent chromosomal alterations are determined by two distinct methods; one is based on the alteration profile of individual probes and the other based on SW-ARRAY algorithm. In individual probe-based method, GEAR first determines chromosomal gains or losses for each probe using user-defined cutoff values.

*To whom correspondence should be addressed.



Comparison of Non-amplified and Amplified DNA Preparation Methods for Array-comparative Genomic Hybridization Analysis

Hong-Jin Joo^{1,*}, Seung-Hyun Jung^{1,2,*},
Seon-Hee Yim², Tae-Min Kim¹, Hai-Dong Xu^{1,2},
Seung-Hun Shin^{1,2}, Mi-Young Kim^{1,2},
Hyun-Mi Kang¹ & Yeun-Jun Chung^{1,2}

¹Department of Microbiology, The Catholic University of Korea, Seoul 137-701, Korea

²Integrated Research Center for Genome Polymorphism, The Catholic University of Korea, Seoul 137-701, Korea
Correspondence and requests for materials should be addressed to Y. J. Chung (yejun@catholic.ac.kr)

*Hong-Jin Joo and Seung-Hyun Jung contributed equally to this work.

Accepted 16 June 2008

Abstract

Tumor tissue is usually contaminated by normal tissue components, which reduces the sensitivity of analysis for exploring genetic alterations. Although microdissection has been adopted to minimize the contamination of tumor DNA with normal cell components, there is a concern over the amount of microdissected DNA not enough to be applied to array-CGH reaction. To amplify the extracted DNA, several whole genome amplification (WGA) methods have been developed, but objective comparison of the array-CGH outputs using different types of WGA methods is still scarce. In this study, we compared the performance of non-amplified microdissected DNA and DNA amplified in 2 WGA methods such as degenerative oligonucleotide primed (DOP)-PCR, and multiple strand displacement amplification (MDA) using Phi 29 DNA polymerase. Genomic DNA was also used to make a comparison. We applied those 4 DNAs to whole genome BAC array to compare the false positive detection rate (FPDR) and sensitivity in detecting copy number alterations under the same hybridization condition. As a result microdissected DNA method showed the lowest FPDR and the highest sensitivity. Among WGA methods, DOP-PCR amplified DNA showed better sensitivity but similar

FPDR to MDA-amplified method. These results demonstrate the advantage and applicability of microdissection for array-CGH analysis, and provide useful information for choosing amplification methods to study copy number alterations, especially based on precancerous and microscopically invaded lesions.

Keywords: Array-CGH (Comparative Genomic Hybridization), Microdissection, DOP-PCR (Degenerated Oligonucleotide-Primed PCR), Phi 29 DNA polymerase

Microarray-based comparative genomic hybridization (array-CGH) enables higher-resolution copy number analysis across the whole chromosome by single hybridization^{1,2}. The resolution of array-CGH has been rapidly improved and tiling arrays are available now. This enormous technical advance has contributed to delineating clinically significant, minimally altered regions (MAR) especially in various cancers, which potentially include novel cancer-related genes^{1,3,4}. Array-CGH is a powerful tool also for toxicogenomics studies, such as studying the lesions induced by carcinogens⁵.

Precise identification of the genetic alterations in premalignant as well as microscopically invaded lesions has been one of the key issues of cancer research. Tumor tissue is invariably contaminated by stromal cell or normal connective tissue components, which reduces the sensitivity of array-CGH analysis for exploring genetic alterations when using genomic DNA extracted from a tumor tissue⁶. It means copy number changes, especially low-level changes, might not be readily detectable if surrounding normal cells are not removed. Johnson *et al* suggested that at least 70% of test material should contain tumor DNA for reliable array-CGH analysis⁷.

Microdissection has been adopted as a powerful tool to minimize the contamination of tumor DNA with normal cell components, which increases sensitivity and specificity⁶⁻⁸. However, the amount of DNA extracted from microdissected tissue is often not enough to be applied to array-CGH reaction. To amplify the amount of extracted DNA, several whole genome

Methodology article

Open Access

Inferring biological functions and associated transcriptional regulators using gene set expression coherence analysis

Tae-Min Kim^{1,2}, Yeun-Jun Chung^{2,3}, Mun-Gan Rhyu² and Myeong Ho Jung*^{1,4}

Address: ¹Division of Metabolic Disease, Center for Biomedical Science, National Institute of Health, Nokbun-dong 5, Eunpyung-gu, Seoul, Republic of Korea, ²Department of Microbiology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Republic of Korea, ³Integrated Research Center for Genome Polymorphism, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Republic of Korea and ⁴School of Oriental Medicine, Pusan National University, Busan, Republic of Korea

Email: Tae-Min Kim - tmkim@catholic.ac.kr; Yeun-Jun Chung - yejun@catholic.ac.kr; Mun-Gan Rhyu - rhyumung@catholic.ac.kr; Myeong Ho Jung* - jung0603@pusan.ac.kr

* Corresponding author

Published: 17 November 2007

Received: 9 May 2007

BMC Bioinformatics 2007, 8:453 doi:10.1186/1471-2105-8-453

Accepted: 17 November 2007

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/8/453>

© 2007 Kim et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Gene clustering has been widely used to group genes with similar expression pattern in microarray data analysis. Subsequent enrichment analysis using predefined gene sets can provide clues on which functional themes or regulatory sequence motifs are associated with individual gene clusters. In spite of the potential utility, gene clustering and enrichment analysis have been used in separate platforms, thus, the development of integrative algorithm linking both methods is highly challenging.

Results: In this study, we propose an algorithm for discovery of molecular functions and elucidation of transcriptional logics using two kinds of gene information, functional and regulatory motif gene sets. The algorithm, termed gene set expression coherence analysis first selects functional gene sets with significantly high expression coherences. Those candidate gene sets are further processed into a number of functionally related themes or functional clusters according to the expression similarities. Each functional cluster is then, investigated for the enrichment of transcriptional regulatory motifs using modified gene set enrichment analysis and regulatory motif gene sets. The method was tested for two publicly available expression profiles representing murine myogenesis and erythropoiesis. For respective profiles, our algorithm identified myocyte- and erythrocyte-related molecular functions, along with the putative transcriptional regulators for the corresponding molecular functions.

Conclusion: As an integrative and comprehensive method for the analysis of large-scaled gene expression profiles, our method is able to generate a set of testable hypotheses: the transcriptional regulator X regulates function Y under cellular condition Z. GSECA algorithm is implemented into freely available software package.

Background

Advanced high-throughput microarray technologies have

facilitated the investigation of gene expression in a genome-wide manner [1,2]. Because of the complex

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Tropomyosin3 overexpression and a potential link to epithelial-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma

Hye-Sun Choi^{1,2}, Seon-Hee Yim², Hai-Dong Xu^{1,2}, Seung-Hyun Jung^{1,2}, Seung-Hun Shin^{1,2}, Hae-Jin Hu^{1,2}, Chan-Kwon Jung³, Jong Young Choi⁴, Yeun-Jun Chung^{1,2*}

Abstract

Background: Since hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the leading causes of cancer death worldwide, it is still important to understand hepatocarcinogenesis mechanisms and identify effective markers for tumor progression to improve prognosis. Amplification and overexpression of Tropomyosin3 (*TPM3*) are frequently observed in HCC, but its biological meanings have not been properly defined. In this study, we aimed to elucidate the roles of *TPM3* and related molecular mechanisms.

Methods: *TPM3*-siRNA was transfected into 2 HCC cell lines, HepG2 and SNU-475, which had shown overexpression of *TPM3*. Knockdown of *TPM3* was verified by real-time qRT-PCR and western blotting targeting *TPM3*. Migration and invasion potentials were examined using transwell membrane assays. Cell growth capacity was examined by colony formation and soft agar assays.

Results: Silencing *TPM3* resulted in significant suppression of migration and invasion capacities in both HCC cell lines. To elucidate the mechanisms behind suppressed migration and invasiveness, we examined expression levels of Snail and E-cadherin known to be related to epithelial-mesenchymal transition (EMT) after *TPM3* knockdown. In the *TPM3* knockdown cells, E-cadherin expression was significantly upregulated and Snail downregulated compared with negative control. *TPM3* knockdown also inhibited colony formation and anchorage independent growth of HCC cells.

Conclusions: Based on our findings, we formulate a hypothesis that overexpression of *TPM3* activates Snail mediated EMT, which will repress E-cadherin expression and that it confers migration or invasion potentials to HCC cells during hepatocarcinogenesis. To our knowledge, this is the first evidence that *TPM3* gets involved in migration and invasion of HCCs by modifying EMT pathway.

Background

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common human malignancies and the third leading cause of cancer-related death in the world [1]. A number of studies have been suggesting the molecular mechanisms involved in hepatocarcinogenesis such as MAPK, EGFR, p53, Wnt, TGF- β , Ras and Rb pathways [2-5]. However, given that prognosis of the disease remains poor, it is still important to understand hepatocarcinogenesis mechanisms and to identify effective

markers for early diagnosis and accurate prognostication which reflect biological phenomena well.

In our recent study which reported the chromosomal alterations in HCC by genome-wide array-CGH analysis, we found that a 1q21.3 locus was recurrently amplified and that a Tropomyosin 3 (*TPM3*) gene located in this region was coherently overexpressed in primary HCC [6]. This evidence suggests that overexpression of *TPM3* may play a role in HCC tumorigenesis. *TPM3* is an actin-binding protein present in skeletal and smooth muscle and some non-muscular tissues. In skeletal muscle, *TPM3* mediates a myosin-actin response to calcium ions and takes part in the stabilization of cytoskeletal

* Correspondence: yejun@catholic.ac.kr

¹Department of Microbiology, School of Medicine, The Catholic University of Korea, 505 Banpo-dong, Socho-gu, Seoul 137-701, Korea



© 2010 Choi et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Review

An Overview of Biomarkers and Molecular Signatures in HCC

Seon-Hee Yim ¹ and Yeun-Jun Chung ^{1,2,*}

¹ Integrated Research Center for Genome Polymorphism, The Catholic University of Korea School of Medicine, 505 Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-701, Korea; E-Mail: lyra@catholic.ac.kr (S.Y.)

² Department of Microbiology, The Catholic University of Korea School of Medicine, 505 Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-701, Korea

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: yejun@catholic.ac.kr; Tel.: +82-2-2258-7343; Fax: +82-596-8969.

Received: 19 March 2010; in revised form: 30 April 2010 / Accepted: 7 May 2010 /

Published: 7 May 2010

Abstract: Hepatocellular carcinoma (HCC) is the third most common cause of cancer mortality worldwide. Although most HCCs seem to originate from the accumulation of genetic abnormalities induced by various risk factors, underlying mechanisms of hepatocarcinogenesis remain unclear. Long-term survival of HCC patients is also poor, partly due to HCC recurrence. Although serum alpha-fetoprotein (AFP) level is a useful marker for the detection and monitoring of HCC, AFP levels may remain normal in the patients even with advanced HCC. To identify useful biomarkers for HCC, many studies have been conducted on molecular events such as genetic and epigenetic alterations, and gene expression. This review summarizes recent studies of potential molecular markers for diagnosis and monitoring metastasis or recurrence of HCC.

Keywords: hepatocellular carcinoma; biomarker; molecular classification

1. Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the third most common cause of cancer mortality worldwide, and liver cirrhosis is the most important predisposing factor for it [1]. Hepatitis B and C viral infection is the most common underlying cause of chronic liver disease leading to liver cirrhosis, and aflatoxin B1 and alcohol are also well-known risk factors. Although most HCCs seem to be originated from the

CGHscape: A Software Framework for the Detection and Visualization of Copy Number Alterations

Yong-Bok Jeong^{1,2}, Tae-Min Kim^{1,2} and Yeun-Jun Chung^{1,2*}

¹Integrated Research Center for Genome Polymorphism, ²Department of Microbiology, The Catholic University of Korea College of Medicine, Seoul 137-701, Korea

Abstract

The robust identification and comprehensive profiling of copy number alterations (CNAs) is highly challenging. The amount of data obtained from high-throughput technologies such as array-based comparative genomic hybridization is often too large and it is required to develop a comprehensive and versatile tool for the detection and visualization of CNAs in a genome-wide scale. With this respect, we introduce a software framework, CGHscape that was originally developed to explore the CNAs for the study of copy number variation (CNV) or tumor biology. As a standalone program, CGHscape can be easily installed and run in Microsoft Windows platform. With a user-friendly interface, CGHscape provides a method for data smoothing to cope with the intrinsic noise of array data and CNA detection based on SW-ARRAY algorithm. The analysis results can be demonstrated as \log_2 plots for individual chromosomes or genomic distribution of identified CNAs. With extended applicability, CGHscape can be used for the initial screening and visualization of CNAs facilitating the cataloguing and characterizing chromosomal alterations of a cohort of samples.

Availability: CGHscape installation package with online manual is freely available in our website, <http://www.irccp.com/software/CGHscape>.

Keywords: array-CGH, copy number alteration (CNA), copy number variation (CNV)

Introduction

The advancement of high-throughput technologies such as microarray-based platforms has opened unprece-

ded challenges in a biological field. In case of genomic analysis, array-based comparative genomic hybridization (array-CGH) has enabled the detection of copy number alterations (CNAs) in a high resolution and has been used for the analysis of cancer or congenital disorders (Pinkel *et al.*, 2005; Yim *et al.*, 2004). It has also facilitated the discovery of large-scaled structural variations including copy number variation (CNV) that comprises a substantial amount of genomes in normal individuals (Freeman *et al.*, 2006). In spite of the technological advancement, the identification of CNAs is often not straightforward largely due to the intrinsic noise of array-based dataset. A number of algorithms have been proposed to detect the CNAs (Lai *et al.*, 2005), however, a majority of them require considerable experiences on handling of large-scale data or specific knowledge (i.e., R-package). In addition, the use of vendor-provided software is often limited to certain types of used array platforms limiting the general use. Thus, it is highly challenging to develop software that can be used with relative ease and those equipped with versatile methods that can be applied for common array-CGH platforms to ensure the extended compatibility.

Here, we propose a software framework designed for the identification and visual representation of CNAs using genome-wide array-CGH profiles. CNAs can be directly identified from \log_2 ratio profiles that can be obtained from array-CGH datasets with minimal modifications. Data smoothing option is also provided to cope with the noise level of data for reliable detection of CNAs. The identification of CNAs is based on SW-ARRAY algorithm that ensures fast and robust detection of chromosomal alterations. The identified CNAs are exported into Excel-compatible outputs or graphically illustrated with graphic-user interface. Relatively easy operability as well as the fast processing of overall procedures is the major advantage of our software over the conventional ones. CGHscape software package is freely available and provides the comprehensive environments for investigation of tumor genome and genomic variants.

Major Functionalities of CGHscape

(1) CGHscape was designed as a standalone program compatible in Microsoft Windows environments. Compiled codes of CGHscape can be easily installed. The interpreter- or web-based methods have the advantage

*Corresponding author: E-mail yejun@catholic.ac.kr
Tel +82-2-590-1214, Fax +82-2-596-8969
Accepted 7 September 2008

등록원부사본

관인생략 출원번호통지서

출원일자 2008.01.15
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2008-0004627 (접수번호 1-1-2008-0034488-76)
 출원인명칭 가톨릭대학교 산학협력단(2-2005-022404-1)
 대리인성명 윤여강(9-2002-000126-9)
 발명자성명 정연준

특 허 청 장

1. 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니 출원번호통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
2. 2-가. 특허 및 실용신안 출원은 심사청구 후 평균 10개월에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 출원 후 평균 6개월에 1차 심사처리가 이루어집니다.
 2-나. 특허 및 실용신안은 특허청 홈페이지(<http://www.kipo.go.kr> 이하 "홈페이지"라 함)내 "특허로(온라인전자출원)" 사이트 "나의출원등록조회"에서 1차 심사처리 1개월 전에 1차 심사결과통지 예정시기를 확인할 수 있으며, 동 사이트 코너인 "통지서비스신청"에서 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다. (단 홈페이지 회원에 한하여 통지서비스 신청 가능)
 2-다. 상표 및 디자인은 특허청 홈페이지(공지사항)에 류별 1차 심사결과통지 예정시기를 매월 게시하고 있으며, 특허정보검색서비스 시스템(<http://www.kipris.or.kr>)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, SMS 또는 E-mail 서비스로 제공해 드립니다.
 ※ 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라 질 수 있습니다.
 2-라. 1차 심사결과통지서(심사관이 특허결정의 등본을 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 빠른 때)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다.
3. 심사청구 특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리됨을 알려드립니다.
4. 우선심사 특허출원 또는 디자인등록출원에 대해 조기에 심사받기를 원하시면 우선심사제도를 이용하실 수 있습니다.
5. 주소 등 변경신고 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
6. 산업재산권 표시, 광고요령 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.
 예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
7. 미성년자 미성년자인 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 직접 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
8. 문의처 기타 문의사항이 있으시면 특허고객 콜센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.
9. 특허청 주소 302-701 대전광역시 서구 둔산동 920 정부대전청사 4동
 특허청 서울사무소 주소 135-911 서울특별시 강남구 역삼동 647-9 한국지식센터
 FAX) 대전 : 042-472-7140, 서울 : 02-566-8454

CLARK & ELBING LLP
INTELLECTUAL PROPERTY LAW

101 FEDERAL STREET
BOSTON MA 02110
PHONE 617.428.0200
FAX 617.428.7045
WWW.CLARKELBING.COM

Date: January 15, 2009

To: Yuh Gang Yoon
Zenith Patent & Law Firm
4th Floor 1627-10
Bongcheon-7-dong
Gwanak-gu, Seoul 151-818
Republic of Korea

Facsimile No.: +82-2-888-3678

From: Susan M. Michaud, Ph.D.

Re: Newly filed U.S. Patent Application
"Diagnostic Methods and Kits for Hepatocellular Carcinoma
Using Comparative Genomic Hybridization"
Your Reference: PU090004US
Our Reference: 50413/026001

Pages: 1

Message: We are writing to confirm that the above-referenced application was filed with the U.S. Patent and Trademark Office on January 14, 2009. Our reporting letter and documents as filed will follow shortly.

NOTICE: This facsimile transmission may contain confidential or privileged information intended for the addressee only. If you are not the addressee, be aware that any disclosure, copying, distribution, or use of the information is prohibited. If you have received this facsimile transmission in error, please call us at 617-428-0200 to arrange for its return at no cost to you.

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2010.02.19
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
출원번호 10-2010-0015217 (접수번호 1-1-2010-0110865-06)
출원인명칭 가톨릭대학교 산학협력단(2-2005-022404-1)
대리인성명 윤여강(9-2002-000126-9)
발명자성명 정연준
발명의명칭 게노믹 정량 PCR를 이용한 간암 예측 방법 및 예측 키트

특 허 청 장

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

주 의

1. 이 보고서는 교육과학기술부에서 시행한 특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 교육과학기술부에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.