



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년05월30일
(11) 등록번호 10-1401749
(24) 등록일자 2014년05월23일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/00 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2006-0061741
(22) 출원일자 2006년07월03일
심사청구일자 2011년04월08일
(65) 공개번호 10-2008-0003472
(43) 공개일자 2008년01월08일
(56) 선행기술조사문헌
Clin Cancer Res Vol. 11, pages 1119-1128.
Published online February 11, (2005)*
Gastroenterology, Vol. 113, pages 761-766
(1997)*
Genes, Chromosomes & Cancer, Vol. 37, pages
369-380 (2003)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
가톨릭대학교 산학협력단
서울특별시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교
성의교정내 (반포동)
- (72) 발명자
정연준
경기도 성남시 분당구 정자동로 21, 1402호 (금곡
동, 삼라마이다스빌)
- (74) 대리인
특허법인이룸

전체 청구항 수 : 총 3 항

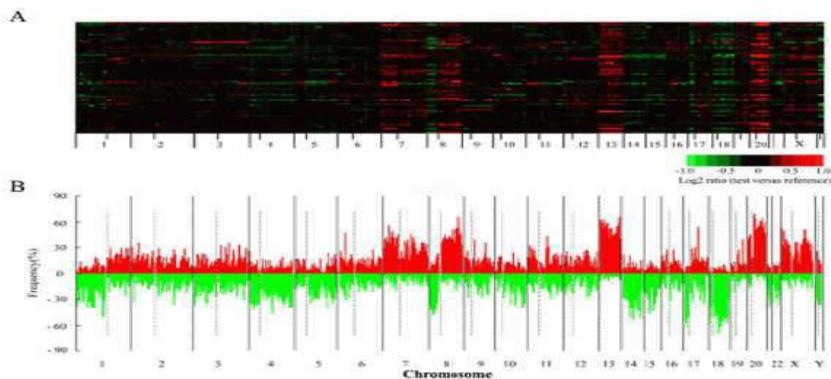
심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 대장암 진단 방법 및 진단키트

(57) 요약

본 발명은 새로운 암 진단 방법 및 진단 키트에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 (1) 염색체 상의 재현되는 계놈 변화 영역 (recurrently altered genomic region; RAR)을 관찰하고; 및/또는 (2) 상기 RAR 영역의 유전자 발현 변화를 측정하는; 과정으로 대장암 (colorectal cancer; CRC)의 예후를 판정하는 진단 방법 및 진단 키트 그리고 대장암의 진단에 사용될 수 있는 새로운 암 억제 유전자들 (tumor suppressor genes)에 관한 것이다. 본 발명의 진단 방법은 상기 RAR 영역 상에서 통계적으로 유의한 암 억제 유전자를 선택하고 그의 발현 변화를 정확히 관찰 및 측정하므로, 대장암을 포함한 각종 암 및 종양의 예후 판단 뿐만 아니라 조기 진단 등을 가능하게 한다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

대장암 진단 또는 예후 판정에 필요한 정보를 제공하기 위한 방법으로서,

- (1) 환자의 시료로부터 하기 표에서 정의된 RAR(Recurrently altered genomic region)-L1을 검출하는 단계; 및
- (2) 상기 검출된 RAR-L1에 속하는 암 억제 유전자 CAMTA1의 발현 정도를 측정하는 단계를 포함하는, 정보 제공 방법.

RAR	클론	크기 (Mb)	사이토밴드 ^a (Cytoband)	암 관련 유전자
L1	RP3-438L4-RP11-338N10	1.90	1p36.31-p36.23	CAMTA1

^a사이토 밴드는 UCSC 게놈 브라우저에 따른다(2004(NCBI35/hg17)버전).

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

하기 표에서 정의된 RAR(Recurrently altered genomic region)-L1에 속하는 유전자 CAMTA1을 암호화하는 뉴클레오티드, 이들의 cDNA 또는 이들에 상보적인 서열을 갖는 뉴클레오티드를 플레이트 위에 고착화시켜 제조된 대장암 진단용 DNA 칩.

RAR	클론	크기 (Mb)	사이토밴드 ^a (Cytoband)	암 관련 유전자
L1	RP3-438L4-RP11-338N10	1.90	1p36.31-p36.23	CAMTA1

^a사이토 밴드는 UCSC 게놈 브라우저에 따른다(2004(NCBI35/hg17)버전).

청구항 6

제5항의 DNA 칩을 포함하는 것을 특징으로 하는 대장암 진단 키트.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- [0009] 본 발명은 새로운 대장암 진단 방법 및 진단 키트에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 (1) 염색체 상의 재현되는 계놈 변화 영역 (RAR)을 관찰하고; 및/또는 (2) 상기 RAR 영역의 유전자 발현 변화를 측정하는; 과정으로 대장암 (colorectal cancer; CRC)의 예후를 판정하는 진단 방법 및 진단 키트 그리고 대장암의 진단에 사용될 수 있는 새로운 암 억제 유전자들 (tumor suppressor genes)에 관한 것이다.
- [0010] 대장암 (CRC)은 2002년에 대략 전세계적으로 100만명의 환자들 (세계 전체의 9.4%)이 발생한 것으로 추산되고 있다. 대장암은 발생율에 있어서 남성에서는 4위 여성에서는 3위를 차지한다. 또한 유병율 (prevalence)은 전세계적으로 유방암 다음으로 높고 치사율은 대략 발생율의 절반 (2002년 대략 529,000명 사망)에 이르며, 2.8백만 명의 환자들이 대장암으로 5년 이내에 진단을 받고 생존하고 있는 것으로 추산된다. 전세계적으로 대장암의 발생에 있어서 적어도 25배 정도의 다양성이 존재하고 있다. 이러한 대장암은 발병률이 선진국에서 가장 높은 반면, 아프리카 및 아시아에서 낮은 경향이 있다. 한국에서 대장암은 2004년에 암 사망 원인 중에서 4위가 되었으며, 이는 남성 및 여성 모두에서 나이를 기준으로 하는 대장암의 발병률이 세계 평균보다 더 높은 것이다. 이러한 지리적 차이는 대장암이 다인성 질환 (multifactorial disease)이기 때문에 아마도 환경 요인들 뿐만 아니라 유전적 배경에 의한 것으로 판단된다.
- [0011] 대장암의 발병화 과정에서 다양한 돌연변이들 (multiple mutations)이 측정되는 것은 잘 알려져 있다. 대장암에서 유전적 불안정성은 두 가지 주요 형태, 미세부수체 불안정성 (MIN; microsatellite instability) 및 염색체 불안정성 (CIN)로 구분되어 왔다. 대략 13%의 대장암에서 미스매치 복구가 결핍되어 미세부수체 불안정성이 유발되는 반면, 나머지 87%에서 염색체 불안정성이 유전물질의 획득과 소실을 가져오는 것으로 여겨진다. 따라서, 염색체 불안정성에 대한 연구는 잠재적인 암 유전자 (oncogenes) 및 /또는 종양 억제 유전자들을 확인하고 더 나아가 대장암의 발병 과정을 밝히도록 도와줄 수 있다.
- [0012] 이와 같은 염색체 불안정성을 연구하기 위하여, 기존의 비교 계놈 하이브리디제이션 (comparative genomic hybridization; 이하, "CGH"라고 약칭함)이 단일 실험으로부터 나온 시료에서 다중 염색체 불균형을 조사하는 데 사용되어 왔다. 그러나 기존의 CGH 방법은 현미경적 변화 이외의 미세한 변화를 정확하게 확인하기에는 그 해상도가 부족하였다. 모인 실험 증거들이 계놈 양의 변화가 암과 연관된 유전자의 발현 정도를 변화시키어 종양화를 유발하는 것을 제시하기 때문에, 높은 해상도를 가진 좀 더 상세한 분석이 필요하다. 최근 들어, 기존의 CGH 방법과 마이크로어레이 기술을 조합하여 계놈 전체 DNA 복제수의 분석을 높은 정확도로 실시할 수 있게 되었다. 어레이 CGH는 암 유전자 또는 종양 억제 유전자가 존재하는지 여부의 계놈 이상을 탐지하는 유용한 도구로 각광받고 있다. 또한, 어레이 CGH는 몇 가지 계놈 이상이 종양에서 예후 마커로 제시되었기 때문에 종양을 문자적으로 분류하는 데 사용될 수 있고 또는 치료 또는 예방을 위한 타겟 유전자를 확인하는 데 사용될 수 있다.
- [0013] 본 발명자들은 대장암에서 계놈 변화 및 그의 임상병리학적 의미를 조사하기 위하여, 59명의 대장암 환자들의 미세하게 다른 조직들로부터 추출된 계놈 DNAs를 사용하여 계놈 규모의 어레이 CGH를 수행하였다. 그 결과, 대장암과 연관된 계놈 복제수의 다양한 변화가 새로운 재현되는 변화 영역 (recurrently altered region; 이하, "RAR"이라고 약칭함)과 함께 관찰되었고, 어레이 CGH에 의해 발견되는 유전적 변화와 임상병리학적 변수들 간의 연관성을 조사할 수 있었다.
- [0014] 이에 본 발명자들은 새로운 대장암 진단법을 개발하기 위하여 노력을 계속한 결과, 대장암에서 재현되는 변화 영역 (RAR) 27개를 확인하고 이로부터 얻은 대장암과 관련된 유전자의 발현 정도를 측정하여 부정적인 예후를 나타내는 두 가지 유전자 RAR-L1 및 RAR-L20 그리고 상기 RAR-L1으로부터 종양 억제인자 (tumor suppressor)로 작용하는 CAMTA1 유전자를 분리하여 이를 이용한 대장암 진단 방법 및 진단 키트를 제공함으로써 본 발명을 성공적으로 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- [0015] 본 발명은 새로운 대장암 예후를 판정하는 진단 방법 및 진단 키트 그리고 이에 사용되는 암 억제 유전자를 제공하는 것을 목적으로 한다.

- [0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0017] (1) 염색체 상의 재현되는 게놈 변화 영역 (RAR)을 관찰하고; 및/또는
- [0018] (2) 상기 RAR 상에서 특정 유전자의 발현 변화를 측정하는; 과정으로 대장암 (CRC)의 예후를 판정하는 진단 방법을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은
- [0020] (1) 염색체 상의 재현되는 게놈 변화 영역 (RAR)을 관찰하는 도구; 및/또는 (2) 상기 RAR 상에 위치하는 특정 유전자의 발현 변화를 측정하는 도구;를 포함하는 대장암 (CRC)의 예후를 판정하는 진단 키트를 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 대장암 진단에 사용될 수 있는 암 억제 유전자를 제공한다.

발명의 구성 및 작용

- [0022] 이하, 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.
- [0023] 본 발명은
- [0024] (1) 염색체 상의 재현되는 게놈 변화 영역 (RAR)을 관찰하고; 및/또는
- [0025] (2) 상기 RAR 상에서 특정 유전자의 발현 변화를 측정하는; 과정으로 대장암 (CRC)의 예후를 판정하는 진단 방법을 제공한다.
- [0026] 상기 (1) 과정에서 재현되는 게놈 변화 영역 (RAR)은 RAR-L1 (염색체 1p36의 소실) 및 RAR-L20 (염색체 21q22의 소실) 중에서 선택된 하나 이상인 것이 바람직하다.
- [0027] 또한, 상기 (2) 과정에서 특정 유전자는 상기 RAR 상에 위치하는 암 억제 유전자인 것이 바람직하고, 상기 RAR 상에 위치하는 암 억제 유전자 *CAMTA1* 인 것은 더욱 바람직하다.
- [0028] 상기 암 억제 유전자 *CAMTA1* 는 유전자 발현이 감소될 때 대장암을 포함하는 각종 암의 부정적인 예후를 나타내고, 유전자 발현이 증가될 때 대장암을 포함하는 각종 암의 긍정적인 예후를 나타내게 된다.
- [0029] 또한, 본 발명은
- [0030] (1) 염색체 상의 재현되는 게놈 변화 영역 (RAR)을 관찰하는 도구; 및
- [0031] (2) 상기 RAR 상에 위치하는 특정 유전자의 발현 변화를 측정하는 도구; 등을 포함하는 대장암 (CRC)의 예후를 판정하는 진단 키트를 제공한다.
- [0032] 상기 (1)에서 상기 재현되는 게놈 변화 영역 (RAR)은 RAR-L1 (염색체 1p36의 소실) 및 RAR-L20 (염색체 21q22의 소실) 중에서 선택된 하나 이상인 것이 바람직하다.
- [0033] 상기 (2)에서 상기 RAR 상에 위치하는 암 억제 유전자 *CAMTA1* 의 발현 감소를 측정하는 도구인 것이 바람직하다.
- [0034] 또한, 본 발명은 대장암을 포함하여 각종 암의 진단에 사용될 수 있는 암 억제 유전자를 제공한다.
- [0035] 상기 암 억제 유전자는 *CAMTA1* 유전자를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0036] 이하, 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.
- [0037] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 실시예 1. 대장암에서 게놈 변화의 특징 조사

[0039] (1) 대장암 환자 및 세포 시료의 수집

- [0040] 본 발명에서는 1995년 및 1997년 기간 중 단국대학교 병원 (천안, 한국)에서 외과 수술을 받은 59명의 대장암 (CRC) 환자의 시료를 수집하여 강남 성모병원 연구진의 승인 하에 사용하였다. 각 환자로부터 얻은 종양 및 인근 정상 조직은 외과적으로 적출되어 냉동고에 얼려서 보관되었다. 각 조직은 크리오톰 (cryotom)을 사용하여 젤라틴이 코팅된 슬라이드 상에 준비되었다. 이 조직은 H & E 염색을 한 후에 종양 세포가 많은 영역 (60% 이

상) 및 정상세포 영역은 혈마경 하에서 선별되고 수작업으로 해부되었다. 미세 해부된 (microdissected) 조직은 세포용해 완충용액 (1% 프로테아제 K를 녹인 TE 완충용액)에 담가 50°C에서 12시간 동안 반응시키어 게놈 DNA를 추출하였다. 어레이 CGH의 대조군으로 정상조직으로부터 얻은 DNA가 사용되었다. 분리된 DNA는 DNA 분리 키트 (DNA purification kit; Solgent, 한국 대전)를 사용하여 순수 정제되고, NanoDrop ND-1000 스펙트로포토미터 (NanoDrop Technologies; 텔라웨어, 미국)를 사용하여 정량되었다. 종양의 조직병리학적 소견은 암 가이드라인에 관한 미국 학회의 표준 TNM 분류에 따라 훈련된 병리학자에 의해 이루어졌다.

[0041] (2) 어레이 비교 게놈 하이브리디제이션 및 데이터 프로세싱

생거 연구소 마이크로어레이 연구진이 만든 전체 게놈에서 1 Mb 해상도를 가지는 인간 클론 어레이를 사용하였다. DNA 라벨링, 전하이브리디제이션, 하이브리디제이션 및 후하이브리디제이션은 하기와 같이 수행하였다. 암 조직으로부터 얻은 게놈 DNA는 Cy3-dCTP로 라벨링하고, 종양조직으로부터 얻은 DNA는 Cy5-dCTP로 라벨링하였다. 오픈-웰 하이브리디제이션은 기존의 방법에 따라 수행되었다. 어레이는 GenePix 4100A 스캐너 (엑손 인스트루먼트사, 미국)를 사용하여 스캔되고, 이미지는 GenePix Pro 6.0을 사용하여 프로세싱 되었다. 어레이 CGH 데이터는 웹 상의 어레이 CGH 분석 인터페이스 *ArrayCygHt*를 사용하여 정상화 (print-tip loss normalization) 되고 재배열 되었다. 크기가 긴 삽입 클론은 Ensembl 및 UCSC 게놈 브라우저 상의 게놈 위치에 따라 맵핑 되었다. 전체적으로 2,981 BAC 클론이 처음 3,014 클론으로부터 프로세싱 되었다. 전체 클론 세트에 대한 정보는 Ensembl 인간 게놈 브라우저를 통해 얻을 수 있다.

[0043] (3) 염색체 변화에 대한 데이터 분석

각 클론에서 염색체 변화에 대한 컷-오프 값을 설정하기 위하여, 4가지의 정상 하이브리디제이션을 별도 시리즈로 수행하였다. 대조군의 하이브리디제이션 결과에 기초하여, 복제수 이상에 대한 컷-오프 값은 각 개인의 데이터에서 표준 오차의 3배 내외인 것으로 설정하였다. 영역 상의 복제수 변화는 2 이상의 BAC 클론들에 이어지는 DNA 복제수 변화로 정의하고 전체 염색체를 대상으로 하지는 않았다. 각 클론에서 높은 정도의 증폭은 강도가 로그 2의 값이 1.0 이상 또한 상동 소실에서는 그 반대로 정의하였다. 복제수 변화의 범위는 이웃 클론들 간의 절반 정도로 정하였다. RAR은 적어도 10개의 종양 시료에서 나타나는 영역 상의 복제수 변화로 정의하였다.

[0045] (4) 게놈 변화 조사

모두 59명의 대장암 환자의 임상병리학적 데이터는 하기 표 1에 나타난 바와 같다. 39명의 남자 환자들과 20명의 여자 환자들을 선별하고 수술 시 환자의 평균 연령은 58.7세 (23세부터 81세까지)인 것으로 조사되었다. 59명의 환자들 중에서, 41명의 환자들 (69.5%)은 직장암 (rectosigmoid cancer)이었고 36명의 환자들 (61.0%)은 초기 단계의 종양으로 분류 진단되었다. 실험 진행 시 23명의 환자들은 사망하였다.

표 1

연구 대상 환자들의 일반적인 특성들

Number of patients	59 (100 %)
male	39 (66.1 %)
female	20 (33.9 %)
Age group	
Male	59.2
Female	57.8
< 60	31 (52.5 %)
≥ 60	28 (47.5 %)
Stage	
Early (Stage I and II)	36 (61.0 %)
Advanced (Stage III and IV)	23 (39.0 %)
Tumor site	
Rectosigmoid	41(69.5 %)
Other sites	18(30.5 %)

[0047]

상기 59명의 대장암 환자들에서 발견되는 게놈 변화 모두는 도 1에 나타내었다. 염색체 변화의 빈도를 조사한 결과 이를 모두 무작위로 분포하는 것으로 조사되었지만, 전체 게놈을 통해 몇 가지 중요한 영역 (hot region s)은 집중되어 있었다. 59명의 환자들에서 어레이 CGH 의 신호 강도 비율 (로그2 단위)에 관한 데이터는 웹사이트로부터 다운로드 받을 수 있다.

[0049]

각 환자마다 변화된 클론은 평균적으로 전체 2,981개 클론들 중 764.8개(58개 내지 1,540개)인 것으로 측정되었다. 변화된 클론의 숫자는 남자들, 증상이 악화된 그룹 및 직장암에서 유의하게 더 높은 것으로 나타났다. 전체 염색체 중에서 가장 빈번한 변화는 13q (31/59, 52.5%), 20q (30/59, 50.8%), 20p (21/59, 35.6%), 7p (20/59, 33.9%) 및 8q (29/59, 49.2%) 상의 획득 그리고 18q (29/59, 49.2%), 18p (27/59, 45.8%) 및 17p (26/59, 44.1%) 상의 소실인 것으로 확인되었다.

[0050]

실시예 2. 복제수 변화의 확인

[0051]

본 발명은 복제수 변화를 조사하기 위하여, 다중 라이케이션 의존성 프로브 증폭 분석 (multiplex ligation-dependent probe amplification analysis; 이하, "MLPA"라고 약칭함)을 MLPA-Aneuploidy 테스트 키트 P095를 사용하여 (MRC, 네덜란드) 다음과 같이 수행하였다. 상기 250 ng의 게놈 DNA를 98°C에서 10분 동안 디네이처시키고 완충용액을 포함하는 프로브 혼합액 3 μ l를 첨가하였다. 그 다음 반응 혼합액을 95°C에서 1분 동안 가열하고 60°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 라이케이션 반응은 열에 안정한 라이케이즈 65를 사용하여 54°C에서 15분 동안 반응시켰다. 10 μ l의 반응용액은 40 μ l의 범용 프라이머가 포함된 PCR 반응 혼합액과 혼합하였다. 하나의 프라이머는 그대로 두고 나머지 프라이머만 FAM [N-(3-플루안틸)말레이미드]로 라벨링 하였다. 열 반응은 95°C에서 1분, 이어서 95°C에서 30초 동안 35회 반복하고, 60°C에서 30초 그리고 72°C에서 60초 과정으로 진행되었다. 증폭된 조각은 ABI PRISM 3730 XL DNA 분석기 (어플라이드 바이오시스템, 미국)를 사용하고 ROX-500을 크기 마커로 사용하여 분석되었다. PCR 산물의 피크 영역은 Genotyper 소프트웨어로 산정되고 데이터는 Coffalyser macro로부터 얻은 단순화된 분석법을 사용하여 분석되었다.

[0052]

[0053] 실제로 어레이 CGH 에 의해 복제수를 조사하기 위하여, 복제수 이상을 보이는 13명의 초기 대장암 환자들을 대상으로 MLPA 분석을 수행하였다. 어레이 CGH 에 의해 확인된 복제수 이상은 MLPA 결과와 대략적으로 일치하였다. 도 2 는 MLPA 확인 결과를 설명하고 있으며, 번호가 매겨진 12개의 피크는 각각 13번, 18번, 21번 및 X 염색체의 복제수 이상을 보여주는 것이다.

[0054] 실시예 3. 재현되는 변화 영역의 확인

[0055] 전체 염색체 변화와 더불어, 많은 영역 상의 복제수 변화가 관찰되었다. 이러한 재현되는 변화 영역 (recurrently altered regions) 중에서, 적어도 10 환자들에서 염색체의 재현되는 변화 영역은 RAR 인 것으로 명명하였으며, 구체적으로는 7개의 RAR 획득 (RAR-G) 및 20개의 RAR 소실 (RAR-L)이 관찰되었다. 하기 표 2 에 27개 RARs 의 맵 상 위치, 크기 및 암 관련 유전자들을 나열하여 나타내고 있다. 이들 중 5개의 RARs는 40% 이상의 환자에서 관찰되었다: RAR-G4 (28/59, 47.5%), RAR-L2 (27/59, 45.8%), RAR-L5 (25/59, 42.2%), RAR-L14 (28/59, 47.5%) 및 RAR-L17 (28/59, 47.5%).

표 2

59명의 대장암 환자들에서의 재현되는 변화 영역들

Alterations		BAC clone ID	Cytoband	Boundary (Mb)	Size (Mb)	Frequency	Putative cancer related genes
Gain	RAR-G1	RP11-440P5-RP11-373L24	2p16.1-p15	59.90-61.92	2.01	15/59	<i>BCL11A, REL</i>
	RAR-G2	RP11-163H6-RP11-484D18	1q26.2- q26.32	172.14- 178.64	6.49	12/59	<i>PLD1, ECT2</i>
	RAR-G3	RP11-196O16-RP11-486P11	7p21.1	15.35-20.32	4.97	21/59	<i>AGR2, TWIST1</i>
	RAR-G4	RP11-499D4-RP11-17E16	8q24.12- q24.21	126.22- 131.11	4.88	28/59	<i>MTC</i>
	RAR-G5	RP11-121C18-RP11-34N19	11p15.1- p14.3	20.97-23.47	2.49	11/59	
	RAR-G6	RP11-31I23-RP1-68D15	11p15	34.47-31.49	1.01	19/59	<i>CD44</i>
	RAR-G7	RP1-404F18-RP1-39AF12	Xq24-q25	117.92- 125.02	7.10	21/59	<i>BIRC4</i>
Loss	RAR-L1	RP1-485L4-RP11-33HN10	1p36.31- p36.23	6.52-8.43	1.90	15/59	<i>CAMTA1</i>
	RAR-L2	RP11-428D13-RP1-86A18	1p35-p32.3	48.50-51.17	2.66	27/59	<i>PAF1</i>
	RAR-L3	RP5-944F13-RP11-175G14	1p31.1	69.56-72.27	2.70	15/59	<i>CTH, PIGER3</i>
	RAR-L4	RP5-963M15-RP4-759M21	1p31.1	76.26-77.47	1.20	23/59	
	RAR-L5	RP11-22A3-RP11-446J8	4p15.33- p15.32	12.05-17.17	5.11	15/59	
	RAR-L6	RP11-100N21-RP11-413L23	4p12	46.67-48.32	1.65	19/59	<i>TEC</i>
	RAR-L7	RP11-67T15-RP11-347K3	4q24.1- q26.33	177.12- 189.91	12.79	10/59	<i>CLDN12, IRF2, ING2, C4BP</i>
	RAR-L8	CTD-201L22-RP11-200I3	5q14.3-q15	91.53-93.36	1.83	12/59	
	RAR-L9	RP11-591B7-CTC-279E3	5q35.3-q34	157.56- 160.75	3.41	12/59	
	RAR-L10	RP3-365E2-RP1-13D10	6p23-p22.3	13.97-17.02	3.04	19/59	
	RAR-L11	RP11-3NB22-RP11-16H11	6p23.3-p23.2	0.46-4.49	4.02	23/59	
	RAR-L12	RP11-325D15-RP11-619F23	10q22.2- q22.3	77.33-79.26	1.91	13/59	
	RAR-L13	RP11-481K7-RP11-416E5	10q25.2	112.7-114.46	1.75	12/59	<i>ACSL5</i>
	RAR-L14	RP11-164H11-RP11-76E12	14q22.13- q22.2	95.13-97.53	2.40	28/59	
	RAR-L15	RP11-555D9-RP11-103D1	15q21.1- q21.2	47.35-49.35	1.99	17/59	
	RAR-L16	RP11-231A23-RP11-34N10	15q22.2- q22.31	57.44-61.74	4.39	21/59	<i>AXIN2, ROR4</i>
	RAR-L17	RP11-401O9-RP11-219A15	17p13.1- p11.2	9.83-17.02	7.18	28/59	<i>SCOF1</i>
	RAR-L18	RP5-896L9-RP11-121A13	17p11.2	19.88-22.24	0.35	23/59	
	RAR-L19	RP1-270M7-RP1-151M24	21q11.2- q21.1	15.21-16.83	1.61	18/59	
	RAR-L20	RP11-380I3-RP5-103I17	21q22.15- q22.2	37.30-40.67	3.16	13/59	

[0056]

[0057] 상기 RARs 에는 몇 가지 암 관련된 유전자들이 포함된다. 예를 들어, *BCL11A*, *PLD1*, *ECT2*, *AGR2*, *TWIST1* 및

BIRC4 와 같은 암 유전자 (oncogenes) 뿐만 아니라 *MYC* 및 *REL*과 같은 기존의 암유전자가 상기 RAR-Gs 에 포함된다. 또한, *CAMTA1*, *FAF1*, *CTH*, *PTGER3*, *TEC*, *CLDN22*, *ING2*, *IRF2*, *ACSL5*, *ANXA2*, *RORA* 및 *SCO1*와 같은 많은 암 억제 유전자가 상기 RAR-Ls 에 위치하고 있다.

[0058] 실시예 4. 높은 복제수로의 변화

RARs 에 위치하는 암 관련된 유전자들과 함께 높은 정도의 증폭 및 상동 삭제 (homozygous deletion)를 표 3에 정리하여 나타내었다.

표 3

대장암 환자들에서 높은 복제수 변화를 나타내는 유전적 위치들

Change	BAC clone ID	Cytoband	Boundary (Mb)	Size (Mb)	Observed cases ^a	Potential cancer-related genes
Amp.	RP11-449G3-RP4-725G10	7p12.1-p11.2	53.47-56.26	2.78	CCRC93	<i>EGFR</i>
	RP4-550A13-RP11-506M12	7q22.1	97.86-99.59	1.72	CCRC29	<i>MCM7</i>
	RP11-90J7-RP11-20E23	10q22.3-q23.1	79.26-83.53	4.27	CCRC37	
	RP5-1096D14-RP11-319E16	12p13.33-p13.31	1.43-5.57	4.13	CCRC33	<i>CCND2</i> , <i>FGF6</i> , <i>FGF13</i> , <i>AKAP3</i>
	RP11-129M14-RP11-332E3	13q21.31-q22.2	64.90-75.98	11.07	CCRC59	<i>KLF5</i>
	RP11-564N10-RP11-255P5	13q33.1	100.86-102.84	1.97	CCRC72	<i>FGF14</i>
	RP11-265C7-RP11-245B11	13q34	112.49-113.85	1.35	CCRC19	<i>CUL4A</i> , <i>TFDP1</i> , <i>PPARBP</i> , <i>PPPIR1B</i> , <i>STARD3</i> , <i>TCAP</i> , <i>PNMT</i> , <i>ERBB2</i> , <i>GRB7</i> , <i>CDK6</i> , <i>RARA</i>
	RP11-390P24-RP11-84L15	17q12-q21.2	34.71-35.45	0.73	CCRC17, 81	
	RP11-13L22-RP11-28F1	18q21.33	57.72-59.73	2	CCRC80	
	RP3-324O17-RP4-633O20	20q11.21-q11.23	28.92-36.34	7.41	CCRC12, 90, 93	<i>ID1</i> , <i>BCL11A</i> , <i>HCK</i> , <i>TPX2</i> , <i>MYLK2</i> , <i>PLAGL2</i> , <i>TGIF2</i> , <i>SRC</i>
	RP5-1028D15-RP4-719C8	20q13.12-q13.33	41.66-58.31	16.64	CCRC11, 43, 72, 90, 93	<i>MYBL2</i> , <i>RAB22A</i>
HD	RP11-350K6-RP11-520K18	18q21.31-q21.33	54.78-57.70	2.91	CCRC73	<i>PMAP10X</i>
	RP11-25L3-RP11-196D4	18q21.3-q23	69.26-71.83	2.56	CCRC73	-

[0060]

증폭된 11개의 계놈 분절과 2개의 동종 삭제는 적어도 1명의 환자에서 확인되었다. 가장 높은 복제수 변화는 1명의 환자에서 관찰되었지만, 17q12, 20q11 및 20q13 상의 증폭은 2명 이상의 환자에서 관찰되었다. 상기 증폭 영역에서는 *EGFR*, *CCND2*, *ERBB2* 및 *MYBL2* 와 같은 기지의 암 유전자들이 위치하고, 또한 몇 가지 암과 연관된 유전자 높은 복제수의 변화 영역에 포함되어 있었다 (표 3 참조)

[0062] 실시예 5. 계놈 변화들 간의 상관성 조사

RARs 간의 연관성 분석이 이를 상호 발생율의 유의성을 조사하여 수행되었다. 서로 다른 염색체 영역 상의 모든 가능한 RARs 간의 쌍들 (pairs)이 고려되었다. RARs 간의 5가지 쌍들이 다중 테스트 (multiple testing)로 최적화시킨 결과 서로 유의하게 연관된 것으로 조사되었다. 구체적으로 염색체 4p15 상의 RAR-L5 는 염색체 1p33 상의 RAR-L2 및 염색체 Xq24 상의 RAR-G7 와 상호 연관되고, 염색체 17p13 상의 RAR-L17 는 염색체 4p15 상의 RAR-L5 및 염색체 14q32 상의 RAR-L14 와 상호 연관되는 것으로 나타났다. 또한 염색체 4p12 상의 RAR-L6 는 염색체 1p33 상의 RAR-L2와 상호 연관되었다.

또한, 유의하게 상호 연관된 RARs 가 기능적으로 연관된 유전자를 공유하는지 여부를 유전자 데이터베이스 (Gene Ontology; GO)를 사용하여 조사하였다. 또한 동일한 기능적 표시를 가지지만, 2개의 연관된 RARs 상에 별도로 위치하는 유전자를 선별하였다. 또한, 3개의 RAR 쌍들이 12개의 표시를 따라 기능적으로 연관된 유전자를 공유하는 것으로 확인되었다 (표 4 참조).

표 4

공통적인 RARs가 공유하는 기능적으로 연관된 유전자들

Pathway	RefSeq	Symbol	RAR-G7	RAR-L5	RAR-L11	RAR-L14
			0.6426			
		adjusted p-value		0.2079		
					0.0022	
Receptor activity	NM_00603	EDKR81				1
	NM_00674	ADORA1B			1	
	NM_00710	EDKR81				1
	NM_00775	CD38		2		
	NM_00667	PGRM1	1			
	NM_01243	TNFSF11B			1	
Regulation of transcription, DNA-dependent	NM_00119	SAPX1		2		
	NM_00677	ZBTB33	1			
	NM_01764	NEERF	1			
	NM_02063	ZNF187			1	
	NM_00787	ZNF524			1	
	NM_03498	PEPP1	1			
	NM_14480	ZNF18			1	
	NM_15104	MYOCD			1	
Transcription factor activity	NM_00119	SAPX1	1			
	NM_00647	TRIM16			1	
	NM_01053	ZNF187			1	
	NM_03498	PEPP1	1			
	NM_14480	ZNF18			1	
Sensory perception	NM_00023	EDKR81				1
	NM_00037	GRONU		2		
	NM_01613	TRPV1			1	
Signal transduction	NM_00676	ADORA1B		1		
	NM_00971	EDKR81				2
	NM_00775	CD38		2		
	NM_00304	MAP2K4			1	
	NM_00613	PGFBP1		2		
	NM_01624	RASD1			1	
Development	NM_00139	LDB1		2		
	NM_04834	EST1		1		
	NM_00674	ZNF119A	1			
ATP binding	NM_00247	MYTH3			1	
	NM_00472	MYTH8			1	
	NM_00601	MAP2K4			1	
	NM_00384	TRKL				2
	NM_00192	MYTH13			1	
	NM_00563	MYTH1			1	
	NM_01733	MYTH4			1	
	NM_01554	MYTH6			1	
Generation of precursor metabolites and energy	NM_00177	CD38		2		
	NM_04541	NDUFAL1	1			
Hydrolase activity	NM_00177	CD38		2		
	NM_00437	PGKL			1	
	NM_00434	EST1		1		
Protein amino acid phosphorylation	NM_00310	MAP2K4			1	
	NM_00134	TRKL				2
C-protein coupled receptor protein signalling pathway	NM_00613	EDKR81			2	
	NM_00676	ADORA1B		1		
	NM_00971	EDKR81			2	
	NM_01624	RASD1			1	
Transcription	NM_03498	ZNF187		1		
	NM_01243	SAPOLA			1	

[0065]

[0066] 실시예 6. 임상병리학적 변수에 따른 유전적 변화의 차별화된 분포 조사

[0067]

4가지 종류의 임상적 변수들 (연령, 단계, 성별, 종양 위치)이 미리 확인된 계놈 변화와의 상호 연관성을 조사하기 위하여 분석되었다. RAR-G7, RAR-L11, RAR-L12, RAR-L13, RAR-L16, RAR-L17 및 RAR-L18, 염색체 8q, 19p 및 X의 획득 그리고 14q, 15q, Xq 및 Y의 소실이 성별과 연관되어 있었다. RAR-G3, RAR-L1, RAR-L2, RAR-L5, RAR-L6 및 RAR-L20 그리고 염색체 1p 및 4p의 획득이 암 진행 단계와 연관되는 것으로 조사되었다. RAR-G7, RAR-L4, RAR-L9, RAR-L11 및 RAR-L12, 염색체 13q, 20p 및 20q의 획득 그리고 18p 및 18q의 소실이 직장암 부위와 연관되어 있었다.

[0068]

실시예 7. 계놈 변화에 따른 생존율 분석

[0069]

임상병리학적 변수 및 RARs의 예후 진단 가치를 평가하기 위하여 생존율 분석이 수행되었다. 암 진행 단계, RAR-L1, RAR-L4 및 RAR-L20은 낮은 생존율과 유의하게 관련되어 있었다 (도 3 참조). 특히 RAR-L1의 존재는 통계적으로 가장 높은 유의성을 가지는 것으로 관찰되었다.

[0070]

상기 분석에서 조사된 유의한 계놈 변화와 함께 연령, 성별 및 종양 진행 단계와 같은 임상적 변수들을 사용하여 2개의 RARs (RAR-L1 및 RAR-L20), 연령 및 단계가 대장암이 나쁜 예후를 보여주는 독립적인 예측인자가 될 수 있는 것을 확인시켜 주었다 (표 5 참조). 도 3은 환자 생존율과 유의하게 연관된 2개의 RARs 를 나타내고 있다.

표 5

Cox 회귀 분석 결과

Variable	Hazard ratio	95% Confidence interval		p value
		Lower	Upper	
Age	9.979	2.688	37.050	0.001
Stage	5.073	1.880	13.689	0.001
RAR-L1	8.151	2.167	30.657	0.002
RAR-L20	3.528	1.098	11.339	0.034

Variable	Hazard ratio	95% Confidence interval		p value
		Lower	Upper	
Age	6.455	2.034	20.488	0.002
Stage	7.409	2.481	22.124	0.000
Low CAMTA1	7.089	2.121	23.688	0.001

[0071]

실시예 8. 생존율과 연관된 RARs 에서 암 유전자의 발현 조사

(1) 실시간 정량적 중합효소 연쇄반응 분석

한 가닥의 cDNA 가 44쌍의 암/정상 조직 및 3가지 세포주 (RKO, HT29 및 HCT116)에서 얻은 전체 RNA로부터 M-MLV 역전사효소 (Invitrogen, 캐나다)를 사용하여 합성되었다. 본 발명의 CAMTA1 유전자의 발현 프로파일을 분석하기 위하여, 실시간 정량적 PCR 이 Mx3000P qPCR 시스템 및 MxPro 버전 3.0 소프트웨어(Stratagene, 미국)를 사용하여 수행되었다. 20 μ l의 실시간 PCR 반응 혼합액은 10 ng cDNA, 1X SYBR Green Tbr 폴리머라제 조합 (FINNZYMES, 핀란드), 05X ROX 및 20 pmole 프라이머들을 포함하도록 구성되었다. GAPDH 유전자는 각 실험 과정에서 내부 대조군으로 사용되었다. 열 반응은 95°C에서 10분, 이어서 94°C에서 10초 동안 40회 반복하고, 54°C에서 30초 그리고 72°C에서 30초 과정으로 진행되었다. 특정 부위의 증폭을 확인하기 위하여, 녹는점 분석이 55 내지 95°C에서 0.5°C/초로 수행되었다. 비교 정량은 $\Delta\Delta CT$ 방법으로 수행되었고 안 조직에서 CAMTA1 유전자의 발현이 40% 감소되면 낮은 발현이라고 보았다. 모든 실험은 2번 반복되었고 표준 오차 내 강도의 평균값이 각 환자에 대하여 측정되었다. 이 때 사용한 CAMTA1 유전자의 프라이머는 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기 서열을 각각 포함하도록 제작되었다.

(2) CAMTA1 유전자의 돌연변이 분석

CAMTA1 유전자의 체세포 돌연변이는 PCR-direct 염기서열 결정법에 따라 검색되었다. 특정한 엑손의 증폭에 대한 프라이머 세트는 약간 변형시킨 기존의 방법과 동일하게 제작되었다. 프라이머 서열에 대한 상세한 정보는 하기 표 6에 나타난 바와 같다. 모든 증폭 과정에서 Phusion High-Fidelity DNA 폴리머라제 (FINNZYMES, 핀란드)를 사용하여 수행되고, PCR 산물은 MEGA-spin 젤 추출 키트(iNtRON, 한국)를 사용하여 순수 분리되었다.

표 6

	Forward primer	Reverse primer
Exon1	CCACTAGGAAGCTTGTAGGT	CTCTTACCTCCGGCTTGT
Exon2	TTGGCAGGAATATCACAGAAGAG	TTTGCTACCCCCAGAAGGATTA
Exon3	GGAGATTTATCTATTATTTCTCA	GGACTATGTGAAGCAACCTAA
Exon4	AACAGCAAAAACCTTACCTCTC	CCAAATCAGGTAATCAATGCA
Exon5	TTTCTTCTACTTGGTACTCTGGTA	AATGACATTTGTGACCAAGG
Exon6	CCCTCTTCCAACCTGAATTCTC	CCAGAGACAGAAGAAGAATCC
Exon7	AGTCTGCTAATATCCCACATGCGC	TGGTTGATGCCAGCCTGGTTC
Exon9	CCAGCACCATGGCCTACATGC	CAGCGGCGGCAGCTTACCTCT
Exon10	AACTCTGTTCCCTCTGTCTCT	CAGGCCATCACACTCACCTTG
Exon11	CATTAAGGAGAGCTGGACATTA	ACGACCCAAGCACTGTTCTTA
Exon13	GTGGTATGCGAGAAGATGATG	CAGTGCTCAGGAAGAATGTGA
Exon14	TACCCAGTTGGGTTCATCTGGTG	ATGCCAGACTGGAAGAACAGCAAG
Exon15-1	GGTCTTGACCTCTGATTGAGA	CTCTGCTAATTTCACATGACC
Exon15-2	ATCTCGATTCGGACTCTCTAG	ATAACAGTGAETCCCTGGGT
Exon19	AAGCTGACATTTCTGGTAGTTAAC	TTTAGCCAAACCAGGATCTTC
Exon20	TTCTCTTCTCCCTTCCCGTA	AAGTCAGAGTTCTTCCCTAGGG

[0077]

그 결과 상기 RAR-11 및 RAR-20 유전자의 코딩 영역 중에서, *CAMTA1* 유전자는 신경성 종양에서 종양 억제 유전자로 제시된 바 있었다. 따라서 3개의 대장암 세포주 및 44쌍의 초기 대장암에서 이 유전자의 발현 프로파일을 실시간 정량적 PCR (real-time quantitative PCR)을 수행하여 조사하였다. 유전자 발현 수치 간의 비율 (암 대 정상)이 측정되었다. 모두 3개의 세포주 및 44개 중 26개의 대장암이 정상 조직과 비교하여 *CAMTA1* 유전자의 낮은 발현을 보여주었다 (도 4 참조). 특히 *CAMTA1* 유전자의 낮은 발현은 정상 *CAMTA1* 유전자와 비교하여 낮은 생존율과 유의하게 연관되어 있었다. Cox 회귀 분석에 의하여 연령, 성별 및 단계에 따라 최적화시킨 후에 *CAMTA1* 유전자의 낮은 발현이 독립적인 예측인자로서 낮은 생존율과 더욱 유의하게 연관되는 것을 알 수 있었다 (표 7 참조).

표 7

Cox 회귀 분석의 결과

Variable	Hazard ratio	95% Confidence interval		p value
		Lower	Upper	
Age	9.979	2.688	37.050	0.001
Stage	5.073	1.880	13.689	0.001
RAR-L1	8.151	2.167	30.657	0.002
RAR-L20	3.528	1.098	11.339	0.034

Variable	Hazard ratio	95% Confidence interval		p value
		Lower	Upper	
Age	6.455	2.034	20.488	0.002
Stage	7.409	2.481	22.124	0.000
Low <i>CAMTA1</i>	7.089	2.121	23.688	0.001

[0079]

또한, *CAMTA1* 유전자의 낮은 발현은 RAR-L1이 없는 경우 (70%, 7/10) 보다 RAR-L1 을 가진 대장암 (55.9%, 19/34)에서 더욱 빈번히 관찰되었고, 또한 발현 수준도 RAR-L1 을 가진 대장암에서 더 낮은 것으로 유의성을 없지만 확인되었다. 또한, *CAMTA1* 유전자의 낮은 발현의 기작을 조사하기 위하여, 체세포 돌연변이 (26개

대장암) 및 메틸화 정도 (38개 대장암)가 검색되었다. 1개의 미스센스 돌연변이가 초기 대장암 (CCRC71)에서 발견되어, 이로 인해 RAR-L1 이 없는 CAMTA1 유전자의 낮은 발현이 유발되는 것을 알 수 있었다 (도 4 참조). 그러나 CAMTA1 유전자의 프로모터 영역에서 과메틸화 (hypermethylation)가 관찰되지는 않았다.

발명의 효과

- [0081] 상술한 바와 같이, 본 발명은 (1) 염색체 상의 재현되는 게놈 변화 영역 (RAR)을 관찰하고; 및/또는 (2) 상기 RAR 영역의 유전자 발현 변화를 측정하는; 과정으로 대장암 (colorectal cancer; CRC)의 예후를 판정하는 진단 방법 및 진단 키트 그리고 대장암의 진단 등에 사용될 수 있는 새로운 암 억제 유전자들 (tumor suppressor genes)에 관한 것이다. 본 발명의 진단 방법은 상기 RAR 영역 상에서 통계적으로 유의한 암 억제 유전자를 선택하고 그의 발현 변화를 정확히 관찰 및 측정하므로, 대장암을 포함한 각종 암 및 종양의 예후 판단뿐만 아니라 초기 진단 등이 효과적으로 이루어지게 돋는다.
- [0082] [참고문헌]
- [0083] 1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2005;55:74-108.
- [0084] 2. National Statistical Office, Korea. Korean Statistical Information System. 2006. Available from: URL: <http://www.ncc.re.kr>.
- [0085] 3. Shin HR, Won YJ, Jung KW, Kong HJ, Yim SH, Lee JK, Noh HI, Lee JK, Park JG. Nationwide Cancer Incidence in Korea, 1999-2001; First result using the National Cancer Incidence Database. Cancer Res Treat 2006;37:in press.
- [0086] 4. Michor F, Iwasa Y, Lengauer C, Nowak MA. Dynamics of colorectal cancer. Semin Cancer Biol 2005;15:484-493.
- [0087] 5. Yim SH, Chung YJ. Current Status and Future Clinical Applications of Array based Comparative Genomic Hybridization. Genomics & Informatics 2004;2:113-120.
- [0088] 6. Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. Nat Genet 1998;20:207-211.
- [0089] 7. Fiegler H, Carr P, Douglas EJ, Burford DC, Hunt S, Scott CE, Smith J, Vetrici D, Gorman P, Tomlinson IP, Carter NP. DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. Genes Chromosomes Cancer 2003;36:361-374.
- [0090] 8. Kim TM, Yim SH, Lee JS, Kwon MS, Ryu JW, Kang HM, Fiegler H, Carter NP,
- [0091] Chung YJ. Genome-wide screening of genomic alterations and their clinicopathologic implications in non-small cell lung cancers. Clin Cancer Res 2005;11:8235-8242.
- [0092] 9. Chung YJ, Jonkers J, Kitson H, Fiegler H, Humphray S, Scott C, Hunt S, Yu Y, Nishijima I, Velds A, Holstege H, Carter N, Bradley A. A whole-genome mouse BAC microarray with 1-Mb resolution for analysis of DNA copy number changes by array comparative genomic hybridization. Genome Res 2004;14:188-196.
- [0093] 10. Kim SY, Nam SW, Lee SH, Park WS, Yoo NJ, Lee JY, Chung YJ. ArrayCyGHT: a web application for analysis and visualization of array-CGH data. Bioinformatics 2005;21:2554-2555.
- [0094] 11. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001;25: 402-408.
- [0095] 12. Henrich KO, Fischer M, Mertens D, Benner A, Wiedemeyer R, Brors B, Oberthuer A, Berthold F, Wei JS, Khan J, Schwab M, Westermann F. Reduced expression of CAMTA1 correlates with adverse outcome in neuroblastoma patients. Clin Cancer Res 2006;12:131-138.
- [0096] 13. Barbashina V, Salazar P, Holland EC, Rosenblum MK, Ladanyi M. Allelic losses at 1p36 and 19q13 in gliomas: correlation with histologic classification, definition of a 150-kb minimal deleted region on

- 1p36, and evaluation of CAMTA1 as a candidate tumor suppressor gene. *Clin Cancer Res* 2005;11:1119-1128.
- [0097] 14. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwinderman D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e57.
- [0098] 15. He QJ, Zeng WF, Sham JS, Xie D, Yang XW, Lin HL, Zhan WH, Lin F, Zeng SD, Nie D, Ma LF, Li CJ, Lu S, Guan XY. Recurrent genetic alterations in 26 colorectal carcinomas and 21 adenomas from Chinese patients. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 144:112-118.
- [0099] 16. Poeaim S, Rerkamnuaychoke B, Jesdapatarakul S, Campiranon A. Chromosome
- [0100] alterations in colorectal cancer in Thai patients. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 160:152-159.
- [0101] 17. Ried T, Knutzen R, Steinbeck R, Blegen H, Schrock E, Heselmeyer K, du Manoir S, Auer G. Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1996;15:234-245.
- [0102] 18. Nakao K, Mehta KR, Fridlyand J, Moore DH, Jain AN, Lafuente A, Wiencke JW, Terdiman JP, Waldman FM. High-resolution analysis of DNA copy number
- [0103] alterations in colorectal cancer by array-based comparative genomic hybridization. *Carcinogenesis* 2004;25:1345-1357.
- [0104] 19. Knosel T, Petersen S, Schwabe H, Schluns K, Stein U, Schlag PM, Dietel M, Petersen I. Incidence of chromosomal imbalances in advanced colorectal carcinomas and their metastases. *Virchows Arch* 2002;440:187-194.
- [0105] 20. Jones AM, Douglas EJ, Halford SE, Fiegler H, Gorman PA, Roylance RR, Carter NP, Tomlinson IP. Array-CGH analysis of microsatellite-stable, near-diploid bowel cancers and comparison with other types of colorectal carcinoma. *Oncogene* 2005;24:118-129.
- [0106] 21. Knosel T, Schluns K, Stein U, Schwabe H, Schlag PM, Dietel M, Petersen I. Genetic imbalances with impact on survival in colorectal cancer patients. *Histopathology* 2003;43:323-331.
- [0107] 22. Aragane H, Sakakura C, Nakanishi M, Yasuoka R, Fujita Y, Taniguchi H, Hagiwara A, Yamaguchi T, Abe T, Inazawa J, Yamagishi H. Chromosomal aberrations in colorectal cancers and liver metastases analyzed by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer* 2001;94:623-629.
- [0108] 23. Douglas EJ, Fiegler H, Rowan A, Halford S, Bicknell DC, Bodmer W, Tomlinson IP, Carter NP. Array comparative genomic hybridization analysis of colorectal cancer cell lines and primary carcinomas. *Cancer Res* 2004;64:4817-4825.
- [0109] 24. De Angelis PM, Clausen OP, Schjolberg A, Stokke T. Chromosomal gains and losses in primary colorectal carcinomas detected by CGH and their associations with tumour DNA ploidy, genotypes and phenotypes. *Br J Cancer* 1999;80:526-535.
- [0110] 25. Shrivarpurkar N, Maitra A, Milchgrub S, Gazdar AF. Deletions of chromosome 4 occur early during the pathogenesis of colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 2001;32:169-177.
- [0111] 26. Finch R, Moore HG, Lindor N, Jalal SM, Markowitz A, Suresh J, Offit K, Guillem JG. Familial adenomatous polyposis and mental retardation caused by a de novo chromosomal deletion at 5q15-q22: report of a case. *Dis Colon Rectum* 2005;48:2148-2152.
- [0112] 27. Flanagan JM, Healey S, Young J, Whitehall V, Trott DA, Newbold RF, Chenevix-Trench G. Mapping of a candidate colorectal cancer tumor-suppressor gene to a 900-kilobase region on the short arm of chromosome 8. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;40:247-260.
- [0113] 28. Frayling IM, Bodmer WF, Tomlinson IP. Allele loss in colorectal cancer at the Cowden

- disease/juvenile polyposis locus on 10q. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;97:64-69.
- [0114] 29. Bando T, Kato Y, Ihara Y, Yamagishi F, Tsukada K, Isobe M. Loss of heterozygosity of 14q32 in colorectal carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;111:161-165.
- [0115] 30. Park WS, Park JY, Oh RR, Yoo NJ, Lee SH, Shin MS, Lee HK, Han S, Yoon SK, Kim SY, Choi C, Kim PJ, Oh ST, Lee JY. A distinct tumor suppressor gene locus on chromosome 15q21.1 in sporadic form of colorectal cancer. *Cancer Res* 2000;60:70-73.
- [0116] 31. Risio M, Casorzo L, Chieccio L, De Rosa G, Rossini FP. Deletions of 17p are associated with transition from early to advanced colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;147:44-49.
- [0117] 32. Knosel T, Petersen S, Schwabe H, Schluns K, Stein U, Schlag PM, Dietel M, Petersen I. Incidence of chromosomal imbalances in advanced colorectal carcinomas and their metastases. *Virchows Arch* 2002;440:187-194.
- [0118] 33. Donzelli M, Bernardi R, Negri C, Prosperi E, Padovan L, Lavialle C, Brison O, Scovassi AI. Apoptosis-prone phenotype of human colon carcinoma cells with a high level amplification of the c-myc gene. *Oncogene* 1999;18:439-448.
- [0119] 34. Lakshman M, Subramaniam V, Rubenthaler U, Jothy S. CD44 promotes resistance to apoptosis in human colon cancer cells. *Exp Mol Pathol* 2004;77:18-25.
- [0120] 35. Cummins JM, Kohli M, Rago C, Kinzler KW, Vogelstein B, Bunz F. X-linked
- [0121] inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is a nonredundant modulator of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis in human cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:3006-3008.
- [0122] 36. Satterwhite E, Sonoki T, Willis TG, Harder L, Nowak R, Arriola EL, Liu H, Price HP, Gesk S, Steinemann D, Schlegelberger B, Oscier DG, Siebert R, Tucker PW, Dyer MJ. The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. *Blood* 2001;98:3413-3420.
- [0123] 37. Ahn BH, Kim SY, Kim EH, Choi KS, Kwon TK, Lee YH, Chang JS, Kim MS, Jo YH, Min DS. Transmodulation between phospholipase D and c-Src enhances cell
- [0124] proliferation. *Mol Cell Biol* 2003;23:3103-3115.
- [0125] 38. Zhang JS, Gong A, Cheville JC, Smith DI, Young CY. AGR2, an androgen-inducible secretory protein overexpressed in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;43:249-259.
- [0126] 39. Shoji Y, Takahashi M, Kitamura T, Watanabe K, Kawamori T, Maruyama T,
- [0127] Sugimoto Y, Negishi M, Narumiya S, Sugimura T, Wakabayashi K. Downregulation of prostaglandin E receptor subtype EP3 during colon cancer development. *Gut* 2004;53:1151-1158.
- [0128] 40. Bjorling-Poulsen M, Seitz G, Guerra B, Issinger OG. The pro-apoptotic FAS-associated factor 1 is specifically reduced in human gastric carcinomas. *Int J Oncol* 2003;23:1015-1023.
- [0129] 41. Dunn JR, Risk JM, Langan JE, Marlee D, Ellis A, Campbell F, Watson AJ, Field JK. Physical and transcript map of the minimally deleted region III on 17p implicated in the early development of Barrett's oesophageal adenocarcinoma. *Oncogene* 2003;22:4134-4142.
- [0130] 42. Kuo T, Fisher GA. Current status of small-molecule tyrosine kinase inhibitors targeting epidermal growth factor receptor in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2005;Suppl 2:S62-70.
- [0131] 43. Gunther K, Leier J, Henning G, Dimmler A, Weissbach R, Hohenberger W, Forster R. Prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma by expression of chemokine receptor CCR7. *Int J Cancer* 2005;116:726-733.
- [0132] 44. Aligayer H, Boyd DD, Heiss MM, Abdalla EK, Curley SA, Gallick GE. Activation of Src kinase in primary colorectal carcinoma: an indicator of poor clinical prognosis. *Cancer* 2002;94:344-351.

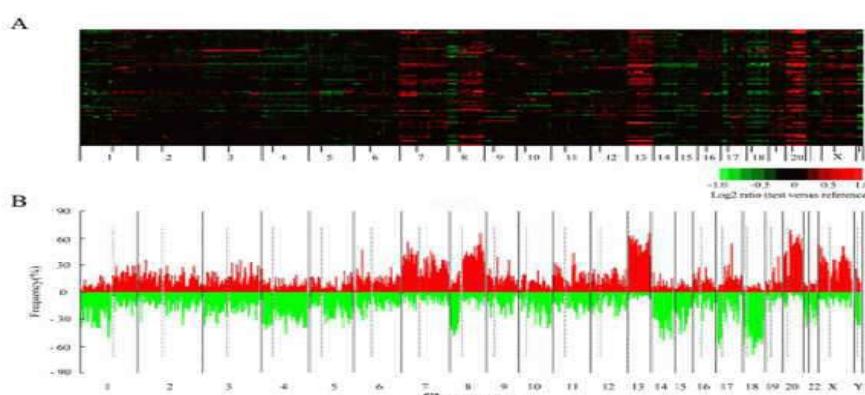
- [0133] 45. Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Mullauer F, Bock G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 2003;302:1036-1038.
- [0134] 46. Ogunbiyi OA, Goodfellow PJ, Gagliardi G, Swanson PE, Birnbaum EH, Fleshman JW, Kodner IJ, Moley JF. Prognostic value of chromosome 1p allelic loss in colon cancer. *Gastroenterology* 1997;113:761-766.
- [0135] 47. Ray R, Cabal-Manzano R, Moser AR, Waldman T, Zipper LM, Aigner A, Byers SW, Riegel AT, Wellstein A. Up-regulation of fibroblast growth factor-binding protein, by beta-catenin during colon carcinogenesis. *Cancer Res* 2003;63:8085-8089.

도면의 간단한 설명

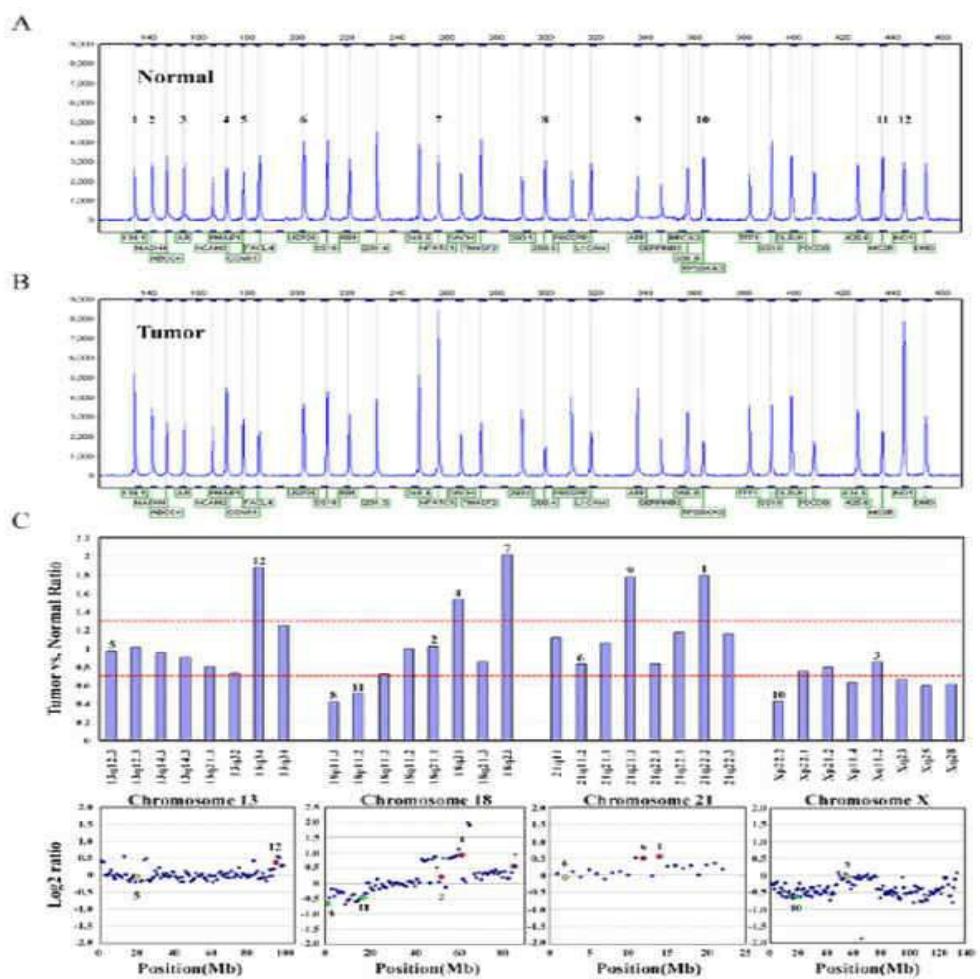
- [0001] 도 1 은 대장암 환자의 게놈을 분석한 결과이다.
A: 대장암 환자의 게놈 프로파일들; B: 염색체 상의 획득 및 소실의 빈도들
- [0003] 도 2 는 어레이 CGH 를 이용하여 복제수 프로파일을 분석한 결과이다.
- [0004] A: 정상 조직; B: CCRC80 종양 조직; C:종양 조직 대 정상 조직;
- [0005] 도 3 은 재현되는 게놈 변화 영역 (RAR)과 생존율의 상관성을 분석한 결과이다.
- [0006] A: 단계; B: 염색체 1q36 상의 RAR-L1; C: 염색체 1p31 상의 RAR-L4; D: 염색체 21q22 상의 RAR-L20
- [0007] 도 4 는 본 발명의 암 억제 유전자의 발현 프로파일을 분석한 결과이다.
- [0008] A: 종양/정상 강도의 비율; B: 카프란-메이어 생존율 곡선; C: 미스센스 돌연변이.

도면

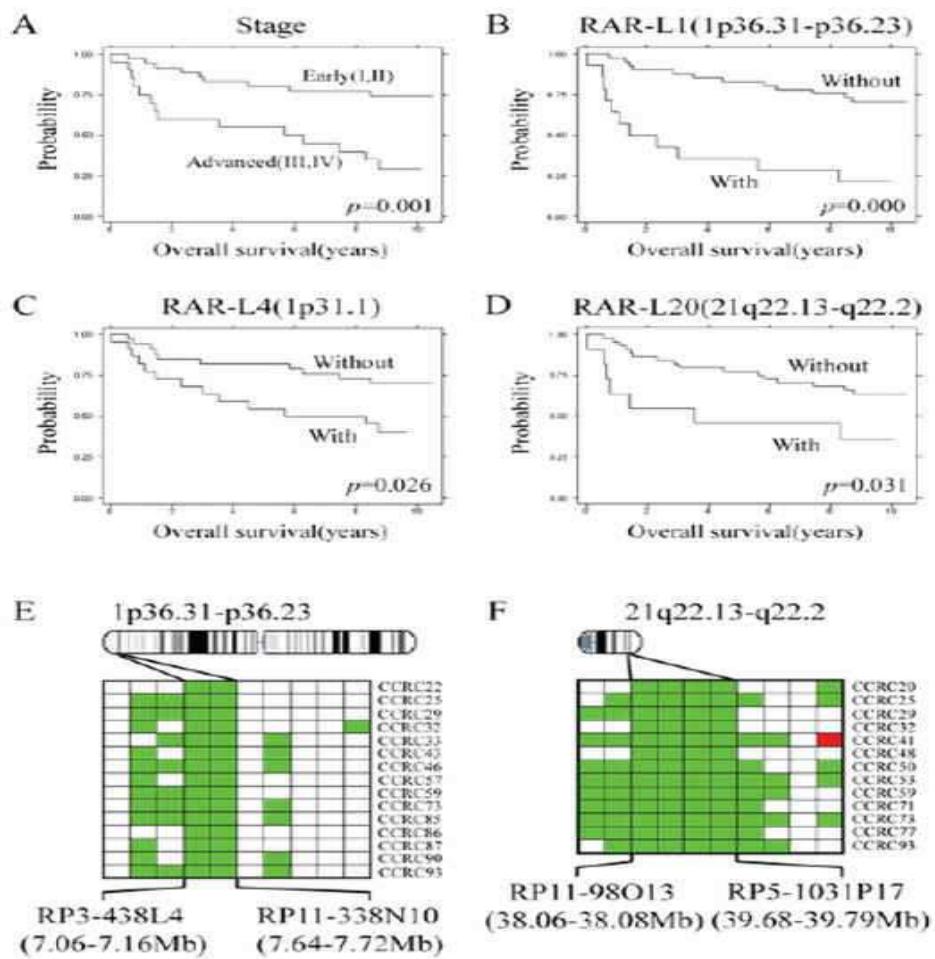
도면1



도면2



도면3



도면4

