

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2022년 1월 13일 (13.01.2022)



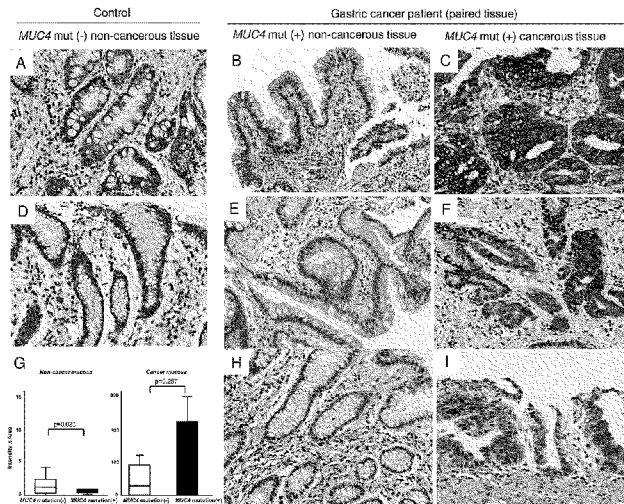
(10) 국제공개번호

WO 2022/010312 A1

- (51) 국제특허분류: *C12Q 1/6886* (2018.01) *G01N 33/574* (2006.01)
- (74) 대리인: 최우성 (CHOI, Woo-sung); 03151 서울시 종로구 종로5길 58 석탄회관빌딩 10층, Seoul (KR).
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2021/008803
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (22) 국제출원일: 2021년 7월 9일 (09.07.2021)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2020-0085614 2020년 7월 10일 (10.07.2020) KR
10-2020-0101967 2020년 8월 13일 (13.08.2020) KR
- (71) 출원인: 서울대학교병원 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) [KR/KR]; 03080 서울시 종로구 대학로 101, Seoul (KR).
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
- (72) 발명자: 김나영 (KIM, Nayoung); 13588 경기도 성남시 분당구 중앙공원로 17, 314동 1502호, Gyeonggi-do (KR).

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING MUC4 GENE MUTATION DETECTING AGENT FOR PREDICTION OR DIAGNOSIS OF GASTRIC CANCER

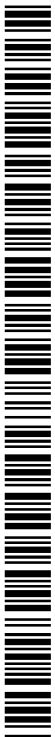
(54) 발명의 명칭: MUC4 유전자의 돌연변이 검출 재제를 포함하는 위암 예측 또는 진단용 조성물



(57) Abstract: The present invention in which a MUC4 gene is discovered as a biomarker for predicting or diagnosis gastric cancer relates to a composition and kit capable of predicting or diagnosing gastric cancer when a mutation is present on the gene and to a method for providing information therefor. The composition according to an aspect of the present invention allows the detection of a mutation at one or more loci selected from the group consisting of rs774527434, rs534579185, rs77250903, rs868067409, rs531395109, rs754808151, rs1304612772, rs774907241, rs771925912, rs745342765, rs148735556, rs11717039, and rs547775645 on MUC4 gene, thus exhibiting an excellent effect of predicting or diagnosing gastric cancer in a cost and time effective manner for multiple subjects to be tested.

(57) 요약서: 본 발명은 위암을 예측 또는 진단하기 위한 바이오마커로 MUC4 유전자를 발굴하고, 상기 유전자에 돌연변이가 있는 경우 위암을 예측 또는 진단할 수 있는 조성물, 키트 및 정보제공방법에 관한 것으로, 본 발명의 일 측면에 따른 조성물은 MUC4 유전자의 rs774527434, rs534579185, rs77250903, rs868067409, rs531395109, rs754808151, rs1304612772, rs774907241, rs771925912, rs745342765, rs148735556, rs11717039 및 rs547775645로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 영역에서 돌연변이를 검출하여 다수의 피험자를 대상으로 비용 및 시간 효율적으로 위암을 예측 또는 진단할 수 있는 우수한 효과가 있다.

[다음 쪽 계속]



WO 2022/010312 A1

MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17에 의한 선언서:

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예
외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수
하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: MUC4 유전자의 돌연변이 검출 제제를 포함하는 위암 예측 또는 진단용 조성물

기술분야

- [1] 본 명세서에는 위암을 예측 또는 진단하기 위한 바이오마커로 MUC4 유전자를 발굴하고, 상기 유전자에 돌연변이가 있는 경우 위암을 예측 또는 진단할 수 있는 조성물, 키트 및 정보제공방법이 개시된다.

배경기술

- [2] 위암(gastric cancer, GC)은 가장 흔한 암 중 하나이며 2018년에 783,000 명이 사망한 것으로 추정되는, 전 세계적으로 암 사망률의 세 번째 주요 원인이다 [Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68(6):394-424. Epub 2018/09/13. <https://doi.org/10.3322/caac.21492> PMID: 30207593]. 한국은 세계에서 위암 발병률이 가장 높다. 남성, 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 감염, 흡연, 및 빈번한 짠 음식과 아질산염(nitrite) 식이 외에도, 가족력은 위암의 잘 알려진 위험 요소이다 [Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelman H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* 1997; 40(3):297-301. Epub 1997/03/01. <https://doi.org/10.1136/gut.40.3.297> PMID: 9135515; PubMed Central PMCID: PMC1027076]. 대부분의 위암은 산발적이며, 지역 사회에서 발병하는 약 90%만이 평균 위험도를 가진다 [La Vecchia C, Negri E, Franceschi S, Gentile A. Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. *Cancer.* 1992; 70(1):50-5. Epub 1992/07/01. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19920701\)70:1<50::aid-cncr2820700109>3.0.co;2-i](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19920701)70:1<50::aid-cncr2820700109>3.0.co;2-i) PMID: 1606546][Zanghieri G, Di Gregorio C, Sacchetti C, Fante R, Sassatelli R, Cannizzo G, et al. Familial occurrence of gastric cancer in the 2-year experience of a population-based registry. *Cancer.* 1990; 66(9):2047-51. Epub 1990/11/01. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19901101\)66:9<2047::aid-cncr2820660934>3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19901101)66:9<2047::aid-cncr2820660934>3.0.co;2-g) PMID: 2224804]. 유전성 미만형 위암(hereditary diffuse gastric cancer, HDGC)를 포함하는 유전성 암 증후군은 전체 위암 사례들 중 3% 미만을 차지한다. 나머지 7%는 유전성 암 증후군을 진단받지 않은 가족력이 있는 개인에서 발견된다 [McLean MH, El-Omar EM. Genetics of gastric cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014; 11 (11):664-74. Epub 2014/08/20. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.143> PMID: 25134511].
- [3] 위암에 걸린 직계 가족 (first-degree relatives, FDRs)이 있는 개인은 위암

위험도가 2 내지 3 배 증가한다 [Choi YJ, Kim N. Gastric cancer and family history. Korean J Intern Med. 2016; 31(6):1042-53. Epub 2016/11/04.

<https://doi.org/10.3904/kjim.2016.147> PMID: 27809451; PubMed Central PMCID: PMC5094936]. 위암에 걸린 가족에서 위험도 증가는 식습관 또는 헬리코박터 파일로리 감염과 같은, 유사한 환경 요인의 공유에 부분적으로 기인한다.

그럼에도 불구하고, 위암에 걸린 가족에서 헬리코박터 파일로리 감염과 위암 발병 사이에 빈번하게 관찰된 약한 연관성은 [Choi YJ, Kim N, Jang W, Seo B, Oh S, Shin CM, et al. Familial Clustering of Gastric Cancer: A Retrospective Study Based on the Number of First-Degree Relatives. Medicine (Baltimore). 2016; 95(20): e3606. Epub 2016/05/20. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003606> PMID: 27196462; PubMed Central PMCID: PMC4902404][Sahasrabudhe R, Lott P, Bohorquez M, Toal T, Estrada AP, Suarez JJ, et al. Germline Mutations in PALB2, BRCA1, and RAD51C, Which Regulate DNA Recombination Repair, in Patients With Gastric Cancer. Gastroenterology. 2017; 152(5):983-6 e6. Epub 2016/12/28.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.12.010> PMID: 28024868; PubMed Central PMCID: PMC5367981] 가족 응집의 유전적 기초를 제시한다.

- [4] 문헌에 따르면, 위암과 관련된 몇 가지 SNP는 후보 유전자 접근법 [Ean MH, El-Omar EM. Genetics of gastric cancer. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2014; 11(11):664-74. Epub 2014/08/20. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.143> PMID: 25134511][El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. Nature. 2000; 404(6776):398-402. Epub 2000/04/04. <https://doi.org/10.1038/35006081> PMID: 10746728] 또는 게놈-전체 연관 연구(genome-wide association study, GWAS)를 통해 확인되었다 [Saeki N, Saito A, Choi IJ, Matsuo K, Ohnami S, Totsuka H, et al. A functional single nucleotide polymorphism in mucin 1, at chromosome 1q22, determines susceptibility to diffuse-type gastric cancer. Gastroenterology. 2011; 140(3):892-902. Epub 2010/11/13. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.10.058> PMID: 21070779][Study Group of Millennium Genome Project for C, Sakamoto H, Yoshimura K, Saeki N, Katai H, Shimoda T, et al. Genetic variation in PSCA is associated with susceptibility to diffuse-type gastric cancer. Nat Genet. 2008; 40(6):730-40. Epub 2008/05/20. <https://doi.org/10.1038/ng.152> PMID: 18488030]. 가장 잘 알려진 것 중 하나는 *MUC1* 과 위암의 연관성이다 [Saeki N, Sakamoto H, Yoshida T. Mucin 1 gene (*MUC1*) and gastric-cancer susceptibility. Int J Mol Sci. 2014; 15(5):7958-73. Epub 2014/05/09. <https://doi.org/10.3390/ijms15057958> PMID: 24810688; PubMed Central PMCID: PMC4057712]. *MUC1* 은 뮤신 패밀리에 속하며, 점막 상피세포의 선단 표면(apical surface)에 위치하고 외인적 손상에 대한 보호 장벽으로서 작용한다. rs4072037와 같은 *MUC1* 변이는 *MUC1* 단백질의 양과 질에 영향을 미치며

개인간 위암 감수성의 차이로 위에서 장벽 기능의 차이를 유발한다는 가설이 있다 [Saeki N, Sakamoto H, Yoshida T. Mucin 1 gene (MUC1) and gastric-cancer susceptibility. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(5):7958-73. Epub 2014/05/09.

<https://doi.org/10.3390/ijms15057958> PMID: 24810688;PubMed Central PMCID: PMC4057712].

- [5] 그러나, 이러한 SNP에 대한 연구는 특히 다른 위암 유형 및 민족성과 관련하여 일관성 없는 결과를 낳았다 [Saeki N, Saito A, Choi IJ, Matsuo K, Ohnami S, Totsuka H, et al. A functional single nucleotide polymorphism in mucin 1, at chromosome 1q22, determines susceptibility to diffuse-type gastric cancer. *Gastroenterology.* 2011; 140(3):892-902. Epub 2010/11/13. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.10.058> PMID: 21070779][El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Schoenberg JB, et al. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology.* 2003; 124(5):1193-201. Epub 2003/05/06. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(03\)00157-4](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(03)00157-4) PMID: 12730860][Kim N, Cho SI, Yim JY, Kim JM, Lee DH, Park JH, et al. The effects of genetic polymorphisms of IL-1 and TNF-A on Helicobacter pylori-induced gastroduodenal diseases in Korea. *Helicobacter.* 2006; 11 (2):105-12. Epub 2006/04/04. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2006.00384.x> PMID: 16579840][Palmer AJ, Lochhead P, Hold GL, Rabkin CS, Chow WH, Lissowska J, et al. Genetic variation in C20orf54, PLCE1 and MUC1 and the risk of upper gastrointestinal cancers in Caucasian populations. *Eur J Cancer Prev.* 2012; 21(6):541-4. Epub 2012/07/19. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e3283529b79> PMID: 22805490; PubMed Central PMCID: PMC3460062]. 더욱이, GWAS로부터 얻은 SNP의 효과 크기는 일반적으로 2.0 미만으로 작았다. 최근에, 전체-게놈 및 전체-엑손 시퀀싱(whole-genome and whole-exome sequencing, WES)을 사용하여 가족성 위암의 작은 부분을 설명하는 *PALB2*, *BRCA1*, 및 *CTNNA1*을 포함하는 신규한 위암 유전자를 확인하였다 [Sahasrabudhe R, Lott P, Bohorquez M, Toal T, Estrada AP, Suarez JJ, et al. Germline Mutations in PALB2, BRCA1, and RAD51C, Which Regulate DNA Recombination Repair, in Patients With Gastric Cancer. *Gastroenterology.* 2017; 152(5):983-6 e6. Epub 2016/12/28. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.12.010> PMID: 28024868; PubMed Central PMCID: PMC5367981][Fewings E, Larionov A, Redman J, Goldgraben MA, Scarth J, Richardson S, et al. Germline pathogenic variants in PALB2 and other cancer-predisposing genes in families with hereditary diffuse gastric cancer without CDH1 mutation: a whole-exome sequencing study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2018; 3 (7):489-98. Epub 2018/05/01. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(18\)30079-7](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(18)30079-7) PMID: 29706558; PubMed Central PMCID: PMC5992580][Majewski IJ, Kluijdt I, Cats

A, Scerri TS, de Jong D, Kluin RJ, et al. An alpha-E-catenin (CTNNA1) mutation in hereditary diffuse gastric cancer. *J Pathol.* 2013; 229(4):621-9. Epub 2012/12/05. <https://doi.org/10.1002/path.4152> PMID: 23208944]. 위암의 가족 클러스터링에 대한 이전의 대부분의 연구는 HDGC 또는 미만형 위암에 중점을 두었지만[Sahasrabudhe R, Lott P, Bohorquez M, Toal T, Estrada AP, Suarez JJ, et al. Germline Mutations in PALB2, BRCA1, and RAD51C, Which Regulate DNA Recombination Repair, in Patients With Gastric Cancer. *Gastroenterology.* 2017; 152(5):983-6 e6. Epub 2016/12/28. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.12.010> PMID: 28024868; PubMed Central PMCID: PMC5367981][Fewings E, Larionov A, Redman J, Goldgraben MA, Scarth J, Richardson S, et al. Germline pathogenic variants in PALB2 and other cancer-predisposing genes in families with hereditary diffuse gastric cancer without CDH1 mutation: a whole-exome sequencing study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2018; 3 (7):489-98. Epub 2018/05/01. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(18\)30079-7](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(18)30079-7) PMID: 29706558; PubMed Central PMCID: PMC5992580], 장형 위암의 상당 부분이 위암 가족 클러스터에서 발생한다[Choi YJ, Kim N, Jang W, Seo B, Oh S, Shin CM, et al. Familial Clustering of Gastric Cancer: A Retrospective Study Based on the Number of First-Degree Relatives. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95(20): e3606. Epub 2016/05/20. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003606> PMID: 27196462; PubMed Central PMCID: PMC4902404][Kaurah P, MacMillan A, Boyd N, Senz J, De Luca A, Chun N, et al. Founder and recurrent CDH1 mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *JAMA.* 2007; 297(21):2360-72. Epub 2007/06/05. <https://doi.org/10.1001/jama.297.21.2360> PMID: 17545690]. 또한, 장형 위암의 유병률이 높은 아시아에서는 위암에 대한 WES 연구가 드물다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명자는 위암에 걸린 가족 구성원 및 위암에 걸리지 않은 가족 구성원을 모두 모집하고 큰 효과를 가진 후보 소인 유전자로 *MUC4*를 확인하였다. 본 발명자는 사례와 대조군의 수가 큰 집단에서 정상 위 점막 및 위암 조직에서 *MUC4*의 발현 분석을 통해 추가로 검증하였다.
- [7] 따라서, 일 측면에서, 본 발명의 목적은, 위암을 예측 또는 진단하기 위한 바이오마커를 제공하는 것이다.
- [8] 다른 측면에서, 본 발명의 목적은, 위암을 예측 또는 진단하기 위한 바이오마커의 돌연변이를 제공하는 것이다.

기술적 해결방법

- [9] 일 측면에서, 본 발명은, 뮤신 4 (mucin 4, *MUC4*) 유전자의 돌연변이 검출 체제를 포함하고, 상기 돌연변이는 *MUC4* 유전자의 rs774527434, rs534579185,

rs77250903, rs868067409, rs531395109, rs754808151, rs1304612772, rs774907241, rs771925912, rs745342765, rs148735556, rs11717039 및 rs547775645로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 영역에서의 돌연변이인, 위암 예측 또는 진단용 조성물을 제공한다.

[10] 다른 측면에서, 본 발명은, 상기 조성물을 포함하는, 위암 예측 또는 진단용 키트를 제공한다.

[11] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 피험자의 샘플로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계; 상기 추출된 게놈 DNA에 뮤신 4 (mucin 4, MUC4) 유전자의 rs774527434, rs534579185, rs77250903, rs868067409, rs531395109, rs754808151, rs1304612772, rs774907241, rs771925912, rs745342765, rs148735556, rs11717039 및 rs547775645로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 영역에서의 돌연변이를 검출하는 단계;를 포함하는, 위암 예측 또는 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

발명의 효과

[12] 본 발명은 일 측면에서, 위암을 예측 또는 진단하기 위한 바이오마커로서 MUC4 유전자를 발굴하고, 정상 대조군과 달리 위암 환자의 경우 상기 MUC4 유전자의 rs774527434, rs534579185, rs77250903, rs868067409, rs531395109, rs754808151, rs1304612772, rs774907241, rs771925912, rs745342765, rs148735556, rs11717039 및 rs547775645로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 영역에서 돌연변이가 존재하고, 특히 MUC4 생식세포계열(germline) 미스센스 돌연변이(rs547775645 미스센스 돌연변이)를 갖는 피험자는 비암성 위 점막(noncancerous gastric mucosa)에서 발현이 억제되어(downregulated) MUC4의 기능 상실에 의해 위암을 유발하고, 정상 조직에 비해 암 조직에서의 MUC4의 발현이 증가함을 확인하였는바, MUC4 유전자 돌연변이 검출 제제를 포함하는 조성물은 다수의 피험자를 대상으로 비용 및 시간 효율적으로 위암을 예측 또는 진단할 수 있는 우수한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[13] 도 1은 본 발명의 일 측면에 따른 MUC4 변이를 가진 가족의 가계도이다. 도 1에서, 본 발명의 일 측면에 따라 DNA를 분석한 피험자는 "#"으로 시작하는 번호로 표시되고, 위암을 진단받은 당시의 연령은 GC 뒤의 괄호에 기재되었다. 도 1의 화살표는 발단자(proband)를 나타내며, 십자가는 사망한 피험자를 나타내고, *mut*는 유전자의 변이를 수반한 피험자를 나타낸다. 피험자 중 #34는 c.5005A>G; p.S1669G 의 또 다른 MUC4 돌연변이를 가진다. 도 1의 약어는 다음과 같다: GC, 위암(gastric cancer)(Lauren 분류로 알 수 없음); IGC, 장형 위암(intestinal-type gastric cancer); DGC, 미만형 위암(diffuse-type gastric cancer); RCC, 신장 세포암(renal cell cancer); ca, 암(cancer); TA, 세관 선종(tubule adenoma); F, 가족(family).

[14] 도 2a 내지 도 2c는 본 발명의 일 측면의 pVAAST와 연계 분석을 조합하여 얻은 위암에 대한 소인 유전자 후보들을 나타낸다. 도 2a는 검출된 소인 유전자를 나타내며, 위암 케이스 및 대조군의 대립 유전자 수에 대한 이항 가능성(binomial likelihood)에 기초한 복합 우도 비율 검정(CLRT)을 수행하였는데, 이는 유전자 드롭 방법(gene drop method)에 의해 10^6 개의 치환된 샘플로 수행한 기능 예측 가능성 비율(functional prediction likelihood)로 가중된 것이다. 도 2b는 pVAAST 수행으로부터 얻은 모든 단백질-암호화 유전자의 LOD p 값의 Manhattan 플롯을 나타내며, 도 2B에서 플롯의 각 점은 하나의 유전자에 대한 p 값을 나타내고, x 축은 염색체에 배열된 게놈의 위치를 보여준다. 도 2c는 pVAAST로부터 얻은 LOD p 값의 quantile-quantile (QQ) 플롯을 나타낸다.

[15] 도 3은 가족 No. 14의 비암성 및 암성 위 점막 조직에서의 MUC4에 대한 IHC의 대표적인 현미경 사진이다 (원래 배율 A-F, H 및 I는 X400). 도 3에서 A는 #50 (피험자 번호)의 조직이고; B 및 C는 #51의 조직; D는 #54의 조직; E 및 F는 #52의 조직; H 및 I는 #53의 조직이다. 대표적인 MUC4 변이-음성 대조군의 비암성 조직(A, D)에서 MUC4의 염색 강도(갈색)는 MUC4 변이-양성 위암 환자 (B, E 및 H)의 비암성 조직의 부재 또는 희미한 면역 반응성과 비교하여 제시된다. B, E 및 H의 한 쌍의 암 조직 (C, F 및 I)은 MUC4의 강하고 분산된 염색을 보여준다. MUC4 변이-양성 비암성 점막에서의 MUC4 면역강도는 MUC4 변이-음성에 비해 약했다(G의 왼쪽 그래프). MUC4 변이-양성 암 조직에서의 면역 강도의 경향이 증가함에도 불구하고, 통계적 유의성은 관찰되지 않았다(G의 오른쪽 그래프). G에서 흰색 막대는 MUC4 변이-음성을 나타내고 검은색 막대는 MUC4 변이-양성을 나타낸다.

[16] 도 4는 본 발명의 일 측면에 따른 유전자 *MUC4*, *MAGEC1*, 및 *RETSAT*의 LOD p 값에 대한 QQ 플롯을 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[17] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[18] 본 발명의 일 측면에서, "돌연변이(mutant)"는 해당 유전자의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열이 염기 치환, 결실, 삽입, 증폭 및 재배열된 것을 포함하고, 뉴클레오티드 변이는 참조 서열(예를 들어, 야생형 서열)에 대한 뉴클레오티드 서열의 변화(예를 들어, 1개 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 결실, 역위 또는 치환, 예컨대 단일 뉴클레오티드다형성 (SNP))를 지칭한다. 상기 용어는 또한 달리 나타내지 않는다면, 뉴클레오티드 서열의 보체에서의 상응하는 변화도 포함한다. 뉴클레오티드 변이는 체세포 돌연변이 또는 배선 다형성일 수 있으며, 본 명세서에서 돌연변이는 변이(variant)와 상호 교환되어 사용될 수 있다.

[19] 또한, 본 발명의 일 측면에서, 아미노산 변이는 참조 서열(예를 들어, 야생형 서열)에 비해 아미노산 서열의 변화 (예를 들어, 1개 이상의 아미노산의 삽입, 치환 또는 결실, 예컨대 내부 결실 또는 N- 또는 C-말단의 말단절단(truncation))를

지칭한다.

- [20] 또한, 본 발명의 일 측면에서, "위암 예측"이란 피험자에 대하여 위암이 발병할 가능성이 있는지, 위암이 발병할 가능성이 상대적으로 높은지, 위암의 원인인자가 무엇인지, 또는 위암이 이미 발병하였는지 여부를 예측 또는 진단하는 것을 의미할 수 있다. 또한, 본 발명의 일 측면에서, "위암 진단"이란 피험자에 대하여 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미하며, 본 발명의 일 측면에 따른 목적상, 진단은 위암의 발병 여부를 확인하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명의 일 측면에 따른 조성물, 키트 또는 방법은 임의의 특정 환자에 대한 위암 발병 위험도가 높은 환자로서 특별하고 적절한 관리를 통하여 발병 시기를 늦추거나 발병하지 않도록 하는데 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 일 측면에 따른 조성물, 키트 또는 방법은 위암을 조기에 진단하여 가장 적절한 치료방식을 선택함으로써 치료를 결정하기 위해 임상적으로 사용될 수 있다.
- [21] 일 측면에서, 본 발명은 뮤신 4 (mucin 4, MUC4) 유전자의 돌연변이 검출 체제를 포함하고, 상기 돌연변이는 MUC4 유전자의 rs774527434, rs534579185, rs77250903, rs868067409, rs531395109, rs754808151, rs1304612772, rs774907241, rs771925912, rs745342765, rs148735556, rs11717039 및 rs547775645로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 영역에서의 돌연변이인, 위암 예측 또는 진단용 조성물을 제공한다.
- [22] 본 발명의 일 측면에 따른 MUC4 유전자의 돌연변이는 비암성 위 점막(noncancerous gastric mucosa)에서 MUC4 유전자의 발현을 억제하는 것일 수 있다.
- [23] 또한, 본 발명의 일 측면에 따른 일 측면에 따른 MUC4 유전자의 돌연변이는 정상 위 조직에 비하여 위암 조직에서 MUC4 유전자의 발현을 증가시키는 것일 수 있다.
- [24] 본 발명의 일 실시예에 따르면, MUC4-염색된 세포는 비-암성 위 점막에서 감소하는 경향을 보였으며, 이는 MUC4 돌연변이를 가진 피험자의 정상 위 점막은 정상 MUC4 유전자를 가진 피험자에 비하여 MUC4 발현이 감소됨을 의미하고, MUC4 변이를 가진 피험자는 MUC4의 발현이 감소된 것을 나타내는데, 이를 통해 MUC4 변이가 정상 위 점막에서 MUC4 발현을 억제하여 유해한 효과를 유발함을 알 수 있다. 또한, 상기와 같은 경향은 MUC4의 c.5375G>A:p.R1792H 돌연변이를 가진 가족 구성원에서 가장 두드러졌으며(도 1의 가족 No. 14), 정상 조직에 비하여 암 조직에서 MUC4 발현이 증가하였는바, 이를 통해 암 조직에서의 MUC4의 과도한 발현은 MUC4 유전자가 종양 유전자(oncogene)로서 이중적인 역할을 함을 알 수 있었다(실시예 4 및 도 3).
- [25] 본 발명의 일 측면에 따른 MUC4 유전자의 돌연변이는 생식세포계열(germline)에서의 돌연변이일 수 있고, 구체적으로 MUC4 유전자의 엑손 영역에서의 돌연변이일 수 있으며, 보다 구체적으로 MUC4 유전자의 엑손 2 및 엑손 24로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 영역에서의

- 돌연변이일 수 있다.
- [26] 본 발명의 일 측면에 따른 MUC4 유전자의 rs547775645 영역에서의 돌연변이는 미스센스(missense) 돌연변이일 수 있다.
- [27] 본 발명의 일 측면에 따른 MUC4 유전자의 돌연변이는 NM_018406.7:c.5375C>T, NM_018406.7:c.5005T>C, NM_018406.7:c.7658G>A, NM_018406.7:c.11180G>C, NM_018406.7:c.15884G>A, NM_018406.7:c.10673G>A, NM_018406.7:c.6064G>A, NM_018406.7:c.7648G>T, NM_018406.7:c.6638C>T, NM_018406.7:c.6640G>T 및 NM_018406.7:c.3053G>C로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이일 수 있다.
- [28] 본 발명의 일 측면에서, 정상 대조군 피험자에 비하여 위암 피험자에서 MUC4 유전자 돌연변이가 특이적으로 검출됨을 규명하고, 이에 기초하여, MUC4 유전자 돌연변이를 위암 예측 또는 진단을 위한 바이오마커로 제공함을 특징으로 한다.
- [29] 본 발명의 일 측면에 따른 검출 제제는 샘플 내에서 위암의 예측 또는 진단 마커인 MUC4 유전자의 돌연변이의 존재를 검출하기 위하여 사용될 수 있는 물질을 의미할 수 있다. 상기 돌연변이에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머 쌍, 프로브, 항체, 펩타이드 및 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [30] 본 발명의 일 측면에 따른 조성물은 피험자의 샘플에 적용되는 것일 수 있고, 상기 샘플은 본 발명의 일 측면에 따른 바이오마커의 발현이 검출될 수 있는 개체로부터 얻어지는 모든 시료를 의미하며, 구체적으로, 상기 샘플은 타액(saliva), 생검(biopsy), 혈액, 피부 조직, 액체 배양물, 분변 및 소변으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않고, 본 발명의 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법으로 처리하여 준비될 수 있다.
- [31] 본 발명의 일 측면에 따른 검출 제제는 상기 돌연변이에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머 쌍, 프로브 및 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다. 즉, 핵산의 검출은 유전자를 암호화하는 핵산 분자 또는 상기 핵산 분자의 상보물에 혼성화되는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하는 증폭반응에 의해 수행될 수 있다. 예컨대, 프라이머를 이용한 핵산의 검출은 PCR과 같은 증폭 방법을 사용하여 유전자 서열을 증폭한 다음 당 분야에 공지된 방법으로 유전자의 증폭 여부를 확인함으로써 수행될 수 있다.
- [32] 본 발명의 일 측면에서 "프라이머(primer)"란 유전자의 표적 부위에 해당하는 특정 영역을 PCR을 이용하여 증폭하기 위하여 사용하는 유전자 특정 영역의 말단에 상보적으로 결합할 수 있는 서열의 염기를 갖는 폴리뉴클레오티드 또는 그 변이체를 의미한다. 상기 프라이머는 특정 영역 말단과 완전히 상보적일 것을 요구하지 않으며, 상기 말단에 혼성화되어 이중사슬 구조를 형성할 정도로

- 상보적이라면 사용될 수 있다.
- [33] 본 발명의 일 측면에서 "프로브(probe)"란 유전자의 표적 부위와 상보적으로 결합할 수 있는 서열의 염기를 갖는 폴리뉴클레오티드, 그 변이체, 또는 폴리뉴클레오티드와 이에 결합된 표지 물질을 포함하는 것을 의미한다.
- [34] 본 발명의 일 측면에서 "혼성화(hybridization)"란 2개의 단일 가닥 핵산이 상보적인 염기 서열들의 페어링(pairing)에 의하여 이합체 구조(duplex structure)를 형성하는 것을 의미한다.
- [35] 혼성화는 단일 가닥 핵산 서열 간의 상보성이 완전할 경우(perfect match) 뿐 아니라 일부 미스매치(mismatch) 염기가 존재하여도 일어날 수 있다.
- [36] 본 발명의 일 측면에 따른 검출 제제는 상기 돌연변이의 아미노산 부위에 특이적으로 결합하는 항체 및 펩타이드로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [37] 본 발명의 일 측면에 따른 MUC4 돌연변이는 p.Arg1792His, p.Ser1669Gly, p.Ala2553Val, p.Thr3727Ser, p.Thr5295Met, p.Ala3558Val, p.Leu2022Phe, p.Pro2550Thr, p.Ser2213Asn, p.Pro2214Thr 및 p.Ser1018Cys로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 변이일 수 있으며, 본 발명의 일 측면에 따른 검출 제제는 상기 돌연변이의 상기 아미노산 변이를 검출할 수 있는 제제일 수 있다.
- [38] 본 발명의 일 측면에서, 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체, 재조합 항체 및 이들의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다. 구체적으로, 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체, 재조합 항체 및 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 및 항체 분자의 기능적인 단편, 예를 들어, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv를 모두 포함하는 것일 수 있다. 항체 생산은 본 발명이 속하는 분야에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있고, 제조되어 상업적으로 판매되는 항체를 이용할 수 있다.
- [39] 본 발명의 일 측면에 따른 조성물은 상기 MUC4 유전자 돌연변이의 존재 또는 발현 여부를 측정하는 제제뿐만 아니라, 항원-항체 복합체의 형성을 정량 또는 정성적으로 측정 가능하게 하는 라벨, 면역학적 분석에 사용되는 통상적인 도구, 시약 등을 더 포함할 수 있다.
- [40] 본 발명의 일 측면에서 상기 항원-항체 복합체의 형성을 정성 또는 정량적으로 측정 가능하게 하는 라벨에는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 산화환원 분자 및 방사선 동위원소 등이 있으며, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다. 검출 라벨로 이용 가능한 효소에는 β 글루쿠로니다제, β 글루코시다제, β 갈락토시다제, 우레아제, 퍼옥시다아제, 알칼라인포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코즈옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈옥시다제와루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트카복실라제,

아스파르트이트아미노트랜스페라제, 포스페놀피루베이트데카복실라제, β라타마제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 형광물에는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈데히드, 플루오레스카민 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 리간드에는 바이오틴 유도체 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 발광물에는 아크리디늄에스테르, 루시페린, 루시퍼라아제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 미소입자에는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 산화환원 분자에는 페로센, 루테늄착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논, $K_4 W(CN)_8$, $[Os(bpy)_3]^{2+}$, $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, $[MO(CN)_8]^{4-}$ 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 방사선동위원소에는 3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re 등이 있으며 이로 제한되지 않는다.

- [41] 본 발명의 일 측면에서 상기 도구 또는 시약의 일 예로, 적합한 담체, 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 표지물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 담체는 가용성 담체, 불용성 담체가 있고, 가용성 담체의 일 예로 당 분야에서 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS가 있고, 불용성 담체의 일 예로 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스트란, 폴리사카라이드, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로오스 및 이들의 조합일 수 있다.
- [42] 본 발명의 일 측면에 따른 위암은 미만형(diffuse-type) 위암, 장형(intestinal-type) 위암 및 혼합형(mixed-type) 위암으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 위암이라면 그 유형은 제한되지 않는다. 종래 가족력과 관련이 있는 위암에 대한 바이오마커는 미만형 위암 또는 HDGC(유전성 미만형 위암, hereditary diffuse gastric cancer)에 국한되어 있었지만, 본 발명의 일 측면에 따른 조성물은 위암의 유형에 관계없이 MUC4 유전자 돌연변이 유무에 따라 위암을 예측 또는 진단할 수 있어, 보다 폭넓은 유형의 위암을 예측 또는 진단할 수 있는 우수한 효과가 있다.
- [43] 본 발명 일 측면에 따른 조성물은 위 선암종(stomach adenocarcinoma, STAD), 대장암(colorectal cancer, CRC) 및 자궁내막암(uterine corpus endometrial cancer, UCEC)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 암에 걸린 피험자에서 위암을 예측 또는 진단하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [44] 본 발명의 일 측면에 따른 피험자는 위암 가족력이 있는 피험자일 수 있거나 없는 피험자일 수 있고, 상기 위암 가족력이 있다는 것은 3 세대 이내에 현재 위암에 걸렸거나 과거에 위암에 걸렸던 가족 구성원이 2인 이상 있는 것을 의미할 수 있다.
- [45] 다른 측면에서, 본 발명의 일 측면은 상기 뮤신 4 (mucin 4, MUC4) 유전자의 돌연변이 검출 제제를 포함하는 위암 예측 또는 진단용 조성물을 포함하는 위암

- 예측 또는 진단용 키트를 제공한다. 상기 MUC4 유전자, MUC4 유전자의 돌연변이, 검출 제제, 위암, 피험자, 샘플 등에 대한 설명은 상술한 바와 같다.
- [46] 본 발명의 일 측면에 따른 키트는 설명서를 추가로 포함할 수 있다.
- [47] 본 발명의 일 측면에 따른 상기 설명서에는 상기 MUC4 유전자의 rs774527434, rs534579185, rs77250903, rs868067409, rs531395109, rs754808151, rs1304612772, rs774907241, rs771925912, rs745342765, rs148735556, rs11717039 및 rs547775645로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 영역에서 돌연변이가 존재하면 위암으로 예측 또는 진단하는 것이 기재될 수 있다.
- [48] 본 발명의 일 측면에 따른 키트는 위암 가족력이 있거나 없는 피험자에게 적용되는 것일 수 있고, 상기 위암 가족력이 있다는 것은 3 세대 이내에 현재 위암에 걸렸거나 과거에 위암에 걸렸던 가족 구성원이 2인 이상 있는 것을 의미할 수 있다.
- [49] 본 발명의 일 측면에 따른 키트는 암에 걸린 피험자에게 적용되는 것일 수 있고, 구체적으로 위 선암종(stomach adenocarcinoma, STAD), 대장암(colorectal cancer, CRC) 및 자궁내막암(uterine corpus endometrial cancer, UCEC)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 암에 걸린 피험자에게 적용되는 것일 수 있다.
- [50] 또 다른 측면에서, 본 발명은 피험자의 샘플로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계; 상기 추출된 게놈 DNA에 뮤신 4 (mucin 4, MUC4) 유전자의 rs774527434, rs534579185, rs77250903, rs868067409, rs531395109, rs754808151, rs1304612772, rs774907241, rs771925912, rs745342765, rs148735556, rs11717039 및 rs547775645로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 영역에서의 돌연변이를 검출하는 단계;를 포함하는, 위암 예측 또는 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다. 상기 MUC4 유전자, MUC4 유전자의 돌연변이, 검출 제제, 위암 등에 대한 설명은 상술한 바와 같다.
- [51] 본 발명의 일 측면에 따른 상기 돌연변이 검출 단계는 상기 MUC4 유전자의 상기 영역에서의 p.Arg1792His, p.Ser1669Gly, p.Ala2553Val, p.Thr3727Ser, p.Thr5295Met, p.Ala3558Val, p.Leu2022Phe, p.Pro2550Thr, p.Ser2213Asn, p.Pro2214Thr 및 p.Ser1018Cys로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 변이를 검출하는 단계를 포함할 수 있으며, 본 발명의 일 측면에 따른 상기 돌연변이의 상기 아미노산 변이를 검출할 수 있는 검출 제제를 이용하여 아미노산 변이를 검출하는 단계일 수 있다.
- [52] 본 발명의 일 측면에 따른 상기 돌연변이 검출 단계는 상기 MUC4 유전자의 NM_018406.7:c.5375C>T, NM_018406.7:c.5005T>C, NM_018406.7:c.7658G>A, NM_018406.7:c.11180G>C, NM_018406.7:c.15884G>A, NM_018406.7:c.10673G>A, NM_018406.7:c.6064G>A, NM_018406.7:c.7648G>T, NM_018406.7:c.6638C>T, NM_018406.7:c.6640G>T 및 NM_018406.7:c.3053G>C로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 영역의 뉴클레오티드 서열로부터 선택된 연속 뉴클레오티드 서열에 특이적인

프라이머를 반응시키는 단계; 및 상기 반응물을 증폭시키는 단계;를 포함할 수 있다.

- [53] 본 발명의 일 측면에 따른 상기 돌연변이 검출 단계는 당업계에 널리 공지되어 있는 기술을 이용하여 표적 분자 클로닝 및 서열 분석에 의해 수행될 수 있다. 예컨대, DNA 서열분석; 대립유전자-특이적 뉴클레오티드 혼입 검정 및 대립유전자-특이적 프라이머 연장 검정 (예를 들어, 대립유전자-특이적 PCR, 대립유전자-특이적 라이게이션 연쇄 반응 (LCR) 및 갭-LCR)을 비롯한 프라이머 연장 검정; 대립유전자-특이적 올리고뉴클레오티드 혼성화 검정 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드 라이게이션 검정); 절단제로부터의 보호를 이용하여 핵산 이중나선 내의 미스매치된 염기를 검출하는 절단 보호 검정; MutS 단백질 결합 분석; 변이체 및 야생형 핵산 분자의 이동성을 비교하는 전기영동 분석; 변성-구배 겔 전기영동(DGGE, 예를 들어 문헌 [Myers et al. (1985) Nature 313:495]에서와 같음); 미스매치된 염기 쌍에서의 RNase 절단의 분석; 헤테로 이중나선 DNA의 화학적 또는 효소적 절단의 분석; 질량 분광측정법 (예를 들어, MALDITOF); 유전적 비트 분석 (GBA); 5' 뉴클레아제 검정 (예를 들어, 택맨(TaqMan); 및 분자 비콘을 사용하는 검정으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 기술을 이용한 돌연변이 검출 단계를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [54] 본 발명의 일 측면에 따른 상기 MUC4 유전자의 돌연변이는 NM_018406.7:c.5375C>T, NM_018406.7:c.5005T>C, NM_018406.7:c.7658G>A, NM_018406.7:c.11180G>C, NM_018406.7:c.15884G>A, NM_018406.7:c.10673G>A, NM_018406.7:c.6064G>A, NM_018406.7:c.7648G>T, NM_018406.7:c.6638C>T, NM_018406.7:c.6640G>T 및 NM_018406.7:c.3053G>C로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이일 수 있다.
- [55] 본 발명의 일 측면에 따른 정보제공방법은 상기 MUC4 유전자의 돌연변이 검출 단계 후, 상기 MUC4 유전자의 돌연변이가 검출되면 위암인 것으로 예측하거나 진단하는 것일 수 있다.
- [56] 본 발명의 일 측면에 따른 정보제공방법은 미만형(diffuse-type) 위암, 장형(intestinal-type) 위암 및 혼합형(mixed-type) 위암으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 위암 예측 또는 진단을 위한 정보제공방법일 수 있으나, 위암이라면 그 유형은 제한되지 않는다. 종래 가족력과 관련이 있는 위암에 대한 바이오마커는 미만형 위암 또는 HDGC(유전성 미만형 위암, hereditary diffuse gastric cancer)에 국한되어 있었지만, 본 발명의 일 측면에 따른 정보제공방법은 위암의 유형에 관계없이 MUC4 유전자 돌연변이 유무에 따라 위암을 예측 또는 진단할 수 있는 정보를 제공할 수 있어, 보다 폭넓은 유형의 위암을 예측 또는 진단할 수 있는 우수한 효과가 있다.
- [57] 본 발명의 일 측면에 따른 피험자는 위암 가족력이 있거나 없는 피험자일 수

있고, 상기 위암 가족력이 있다는 것은 3 세대 이내에 현재 위암에 걸렸거나 과거에 위암에 걸렸던 가족 구성원이 2인 이상 있는 것을 의미할 수 있다.

[58] 본 발명의 일 측면에 따른 피험자는 암에 걸린 피험자일 수 있고, 구체적으로 위선암종(stomach adenocarcinoma, STAD), 대장암(colorectal cancer, CRC) 및 자궁내막암(uterine corpus endometrial cancer, UCEC)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 암에 걸린 피험자일 수 있다.

[59] 이하, 실시예를 들어 본 발명의 구성 및 효과를 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 아래 실시예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위해 예시의 목적으로만 제공된 것일 뿐 본 발명의 범주 및 범위가 그에 의해 제한되는 것은 아니다.

[60] **[실시예 1] 피험자의 특징**

[61] 신규한 위암-감수성 유전자를 식별하기 위해, 2 이상의 위암 케이스(case)가 3 세대 이내에 발생한 14가구의 가족의 19명의 위암 환자와 36명의 위암에 걸리지 않은 직계 가족들에서 전체-엑솜 시퀀싱 (whole-exome sequencing, WES)을 수행하였다. 이를 위한 피험자 등록 방법 및 등록된 피험자들의 특징은 다음과 같다.

[62] **엑솜 시퀀싱을 위한 환자 등록**

[63] 2017년 4월부터 2018년 3월까지 분당서울대학교병원의 가족 중 3세대 이내에 위암 진단을 받은 자가 2명 이상이 있는 위암 환자와 이의 직계 가족(first-degree relatives, FDRs)을 본 발명의 일 실시예에 따른 연구에 등록하였다. 비-위암 대조군(이하, 대조군)은 지난 6개월 이내에 정상적인 내시경 검사를 받은 50세 초과로 자료 정의되었다. 위암 진단을 위해, 내시경 생검(endoscopic biopsy) 또는 외과적 샘플(surgical specimen)에 의한 병리학적 진단을 기반으로 하였다.

[64] 위암의 가족력, 흡연, 음주, 식이 선호(dietary preference), 사회경제적 상태, 위장 증상 및 이전의 헬리코박터 파일로리 제균 이력은 설문지를 통해 얻었다. 김자염색(Giemsa staining) 및 항-헬리코박터 파일로리 테스트에 의한 조직학적 평가는 헬리코박터 파일로리 감염 상태를 확인하기 위해 수행되었다[Choi YJ, Kim N, Jang W, Seo B, Oh S, Shin CM, et al. Familial Clustering of Gastric Cancer: A Retrospective Study Based on the Number of First-Degree Relatives. *Medicine* (Baltimore). 2016; 95(20): e3606. Epub 2016/05/20.

<https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003606> PMID: 27196462; PubMed Central PMCID: PMC4902404.][Kim N, Cho SI, Yim JY, Kim JM, Lee DH, Park JH, et al. The effects of genetic polymorphisms of IL-1 and TNF-A on Helicobacter pylori-induced gastroduodenal diseases in Korea. *Helicobacter*. 2006; 11(2):105-12. Epub 2006/04/04. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2006.00384.x> PMID: 16579840].

[65] 피험자와 관련된 모든 절차는 기관 및 국가 연구위원회의 윤리 기준과 1964년 헬싱키 선언에 따라 수행되었다. 본 연구는 분당서울대학교병원 임상 시험 심사위원회의 승인을 받았다(B-1610-366-303). 본 연구에 참여한 모든 가족

구성원은 구체적인 사전 동의서에 서명하였다.

[66] **피험자의 특징**

[67] 총 피험자는 14가구의 독립적인 가족으로부터 55명의 피험자(19명의 위암 환자 및 36명의 비-위암 친척)가 포함되었다. 14가구의 가족 중 가계도가 도 1에 나타나 있다. 국제 위암 연계 컨소시엄 2010(International Gastric Cancer Linkage Consortium 2010) 임상 기준에 부합하는 3가구의 HDGC(유전성 미만형 위암, hereditary diffuse gastric cancer) 가족 (No. 7, 8 및 13)이 포함되었다 [Fitzgerald RC, Hardwick R, Huntsman D, Carneiro F, Guilford P, Blair V, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. J Med Genet. 2010; 47(7):436-44. Epub 2010/07/02. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.074237> PMID: 20591882; PubMed Central PMCID: PMC2991043]. 피험자의 임상 특징을 하기 표 1에 나타냈다(표 1).

[68] [표 1]

[69] 위암 환자 및 비-위암 피험자의 임상 및 인구통계학적 특징

구분	비-위암 (n=36)	위암 (n=19)	P-값 ^a
남성	12 (33.3)	12 (63.2)	0.034
연령 (세)	62.14 (9.1)	59.11 (13.8)	0.331
<i>MUC1</i> (rs4072037)			
GG	0	2 (10.5)	0.098
AG	5 (13.9)	1 (5.3)	
AG	31 (86.1)	16 (84.2)	
지방 거주	21 (58.3)	14 (73.7)	0.260
흡연	10 (27.8)	12 (63.2)	0.011
음주	22 (61.1)	14 (73.7)	0.351
과일 섭취 횟수 ≥ 3/week	26 (72.2)	16 (84.2)	0.320
<i>H. pylori</i>	27 (75.0)	11 (57.9)	0.192
B 대립유전자가 있는 혈액형	11 (30.6)	6 (31.6)	0.938
<i>MUC4</i> 변이	3 (8.3)	14 (73.7)	<0.001
암의 조직학 ^b			
장형		13 (63.2)	
미만형 ^c		4 (26.3)	
알 수 없음		2 (10.5)	
HDGC ^d		3 (15.8)	

평균(표준 편차)으로 표시되는 연령을 제외하고 대부분 값은 숫자(%)로 표시됨.
 굵은 글자는 통계적 유의성을 나타냄.
 약어는 다음과 같음: 위암(GC), gastric cancer; 유전성 미만형 위암 증후군(HDGC), hereditary gastric cancer syndrome.
^a 통계적 유의성은 카이-제곱 검정(chi-squared test) 또는 t-검정(t-test)에 의해 결정됨.
^b Lauren 분류 기준
^c 1 혼합형 포함
^d 50 세 이전에 진단된 최소 1회의 미만형 위암이 있는 위암이 2 케이스 이상 있는 가족

[71] 상기 표 1에 나타난 바와 같이 위암 진단을 받은 환자의 평균 연령은 59.0 세(범위: 31-84 세)인 반면, 위암에 걸리지 않은 친척들의 평균 연령은 62세였다. 다른 군보다 위암 군에 남성의 비율이 더 높은 경향이 있었다(위암 군 63.2% vs. 비-위암 군 33.3%, $p = 0.034$). 흡연 비율이 비-위암 군의 피험자에 비해 위암 환자에서 더 높았다 (위암 군 63.2% vs. 비-위암 군 27.8%, $p = 0.011$). 위암 환자의 약 절반은 *H. pylori*-양성이었고, 암에 걸리지 않은 친척들의 75.0%는 *H. pylori*-양성으로 이러한 비율에서 유의한 차이가 없었다. Lauren 분류에 따르면 등록된 위암 환자 중에서 3명은 미만형, 13명의 장형, 및 나머지는 혼합형으로 식별되었다. 오래 전에 위 수술이나 조직학적으로 환자를 치료한 병원에 나머지

환자들의 특정 조직학적 유형에 대한 정보를 요청했지만 이들의 유형을 식별할 수 없었다.

- [72] **[실시예 2] 위암 관련 바이오마커 발굴을 위한 피험자의 게놈 분석**
- [73] 상기 실시예 1의 피험자들을 대상으로 위암 예측 또는 진단을 위한 바이오마커 발굴을 위하여 하기와 같은 방법으로 피험자의 게놈을 분석하였다.
- [74] **DNA 분리 및 전체-엑솜 시퀀싱 (whole-exome sequencing, WES)**
- [75] 먼저, 제조사의 지시서에 따라 Qiagen DNeasy 혈액 및 조직 키트 (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 상기 실시예 1의 피험자들의 게놈 DNA를 분리하였다. WES를 수행하기 위해, 시약과 함께 Agilent SureSelect All Exon V6(Agilent Technologies, Santa Clara, CA)을 시퀀싱 라이브러리 및 캡처와 함께 사용하였다. 시퀀싱은 Illumina HiSeq 2500 플랫폼 (2x100 bp-paired end; Illumina, Inc., San Diego, CA)에서 수행되었다. 상기 실시예 1의 55명의 등록자들의 서열 데이터 세트는 유럽 Nucleotide Archive (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view>)에 수탁번호 PRJEB29071로 기탁되었다.
- [76] **변이 검출 및 주석(annotation)**
- [77] 원시 시퀀싱 판독은 Burrows-Wheeler Aligner(BWA v0.7.15) 소프트웨어를 사용하여 Human Genome Reference Assembly GRCh37/hg19에 정렬되었다[Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009; 25(14):1754-60. Epub 2009/05/20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324> PMID: 19451168; PubMed Central PMCID: PMC2705234]. SAM tools v1.3을 사용하여 BWA 정렬 파일(BWA alignment files)을 BAM files로 변환하였으며 복사본은 Picard (<https://sourceforge.net/projects/picard>, v1.96)로 표시되었다. 최상의 케이스(best case)에 따라 Genome Analysis Toolkit (GATK v3.5)을 사용하여 피험자 각각의 각 샘플에 대해 게놈 Variant Call Format(genomic Variant Call Format, gVCF) 모드에서 국소 재배치(local realignment), 염기 정확도 재보정(base quality recalibration), 및 단상형(haplotype) 호출(calling)을 수행하였다[DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet*. 2011; 43(5):491-8. Epub 2011/04/12. <https://doi.org/10.1038/ng.806> PMID: 21478889; PubMed Central PMCID: PMC3083463]. 게놈 VCF(gVCF) 파일을 조합하고 GATK와 공동 유전자형을 만들었다. 유전자 변이의 기능적 주석은 집단 빈도로 ANNOVAR을 사용하여 수행하였다. *MUC4* 유전자의 엑손 24(Exon 24) 상에서의 변이는 생거 시퀀싱(Sanger sequencing)에 의해 확인되었고 모든 변이 판독은 Integrative Genomes Viewer로 검사되었다[Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol*. 2011; 29(1):24-6. Epub 2011/01/12. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754> PMID: 21221095; PubMed Central PMCID:

PMC3346182].

[78] **연계(linkage) 및 연관(association) 분석**

- [79] 질병 감수성 유전자의 유전자좌(loci)는 상 염색체 우성 유전 모델 및 질병의 최대허용 가능한 유병율인 0.005 하에서 Pedigree Variant Annotation, Analysis, 및 Search Tool (pVAAST)과의 연계 분석 및 유전자-기반 연관성 테스트를 사용하여 확인되었다[Hu H, Roach JC, Coon H, Guthery SL, Voelkerding KV, Margraf RL, et al. A unified test of linkage analysis and rare-variant association for analysis of pedigree sequence data. Nat Biotechnol. 2014; 32(7):663-9. Epub 2014/05/20. <https://doi.org/10.1038/nbt.2895> PMID: 24837662; PubMed Central PMCID: PMC4157619]. 기능적 예측에 의해 가중된 케이스와 대조군의 대립 유전자 수에 기초한 이항 우도(binomial likelihood)에 대한 LOD (logarithm of odds) 점수 및 유전자-기초 부담-유형(burden-type) 복합 우도 비 테스트(composite likelihood ratio test, CLRT)의 p 값은 유전자-드롭 방법(gene-drop method)을 사용하여 10^6 개의 치환된 샘플로부터 계산되었다. 연계 분석에서, 각각의 가족 구조를 고려하여 본 발명자는 19명의 위암 환자에서의 변이를, 14가구의 가족 모두에서 위암이 발병하지 않은 36명의 대조군과 비교하였다. 유전자 기반의 연관성 시험에서, 본 발명자는 19명의 위암 환자의 전체 엑솜의 대립 유전자 수를 한국 국립 보건원(National Institute of Korea)의 한국 국립 바이오뱅크에서 얻은 397개의 한국 대조군의 전체 게놈의 대립 유전자 수와 비교하였다. 총 19,491 종의 유전자를 분석하였고, Bonferroni-조정된 0.05 수준은 2.57×10^{-6} 이었다. *MUC4*의 경우, 10^6 개의 치환된 샘플에서 CLRT 점수의 p 값이 1.0×10^{-6} 였기 때문에, 10^8 개의 치환된 샘플이 사용되었다.

[80] **대립 유전자 빈도 결정**

- [81] gnomAD 데이터베이스 (<http://gnomad.broadinstitute.org/>)를 사용하여 전체 및 동아시아 대조군 집단의 특정 변이의 빈도를 확인하였다.

[82] **TCGA(The Cancer Genome Atlas) 데이터 분석**

- [83] TCGA 데이터는 게놈 데이터 공통 레거시(GRCh37/hg19) 아카이브 및 게놈 데이터 공통 데이터 포털(<https://portal.gdc.cancer.gov>)의 시스템 생물학 암 게놈 클라우드 협회(Institute for Systems Biology Cancer Genomics Cloud)로부터 다운로드하였다. 유전자형 및 표현형의 데이터베이스로부터(dbGaP) 서열 정보를 수득하였다.

[84] **효과 크기 분석**

- [85] Bonferroni-조정된 0.05 유의 수준에서 모든 유의한 유전자에 대한 교차비(odds ratio, OR)는 로지스틱 회귀로 추정되었다. 가족 관계는 GMMAT로 추정되었으며[Chen H, Wang C, Conomos MP, Stilp AM, Li Z, Sofer T, et al. Control for Population Structure and Relatedness for Binary Traits in Genetic Association Studies via Logistic Mixed Models. Am J Hum Genet. 2016; 98(4):653-66. Epub 2016/03/29. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.02.012>

PMID:27018471; PubMed Central PMCID: PMC4833218], 가족 관계를 설명하는 랜덤 효과의 분산은 0으로 추정되었다. 따라서, 가족 구성원 간의 위암 상태는 독립적인 것으로 가정되었고, 표준 로지스틱 회귀 분석은 Rex Version 2.1 (<http://rexsoft.org>)을 사용하여 적용되었다. 각 유전자에 대해, 상응하는 유전자에서 하나 이상의 희귀 대립 유전자가 관찰되면 유전자 위험 점수(genetic risk scores)는 1로 코딩되고, 그렇지 않으면 0으로 코딩되었다. 성별, 연령, 흡연 상태 및 HDGC가 공변량으로 포함되어 효과를 조정하였다.

[86] 위암과 관련된 생식세포계열(germline) 엑손 변이 발견

[87] 상기 유전자 분석으로부터 수득한 WES 데이터는 표적 엑솜 영역에서 평균 깊이(mean depth)가 96배인 55명의 피험자로부터 생성된 것이다. 모든 표적 영역의 평균 97%가 최소 20배가 되었다. 위암에 대한 희귀 변이 후보를 탐색하기 위해, 연관성 시험과 결합된 연계 분석을 수행하였다. LOD p 값에 기초하여, 위암과 관련된 추정 유전자로 *MUC4*, *MAGEC1*, 및 *RETSAT*을 확인하였으며, 이를 도 2a 내지 도 2c에 나타내었다. 연계 정보, 케이스-대조군 연관성 및 기능적 변이 예측을 통합한 유전자-기반 CLRT 분석에서, *MUC4*는 게놈-전체 유의성 수준에 달했다(p 값 $\leq 9.9 \times 10^{-9}$, 및 게놈 전체 Bonferroni-조정된 0.05 유의 수준 = 2.6×10^{-6}) (도 2a). 도 2b 및 도 2c는 각각 본 연계 분석에 대한 Manhattan 및 quantile-quantile (QQ) 플롯을 보여주며, 본 통계분석이 명목상의 유의 수준을 유지함을 보여준다. 도 4는 3 종의 다른 유전자 크기 그룹의 LOD p 값에 대한 QQ 플롯을 보여주며, 상기 분석이 유전자 크기에 영향을 받지 않음을 확인하였다.

[88] MUC4 변이

[89] 상기 pVAAST를 사용하여 전체 데이터세트를 분석하였으며, *MUC4*의 14 종의 변이가 LOD 점수에 기여하는 것으로 나타났으며, 이들 중 10 종은 LOD 값이 0 초과인 것으로 최종 선택되었다. *MUC4*의 10 종의 변이는 14 가구의 독립적인 가족들 중에서 확인되었다 (표 2).

[90] [표 2]

[91] 연구된 14가구의 가족에서 연계 분석에 의해 도출한 위암과 관련된 생식세포계열 *MUC4* 변이의 특징

[92]

위치*	대립 유전자 변화		아미노산 변화 (NM_018406)	LOD	발병 케이스 (환자 IDs) ^b	집단 MAF (전체/동아시아인, %) ^c	엑손	기능 예측
	참조(Ref)	변화(Alt)						
chr3:195513076 rs774527434	C	T	p.Arg1792His	0.60	51, 52, 53	0.044/ 0.433	2	O-글리코실화 (알파 서브유닛)
chr3:195513446 rs534579185	T	C	p.Ser1669Gly	1.20	34, 2, 30	0.262/ 1.460	2	O-글리코실화 (알파 서브유닛)
chr3:195510793 rs77250903	G	A	p.Ala2553Val	1.57	11, 19, 23	0.062/ 0.028	2	O-글리코실화 (알파 서브유닛)
chr3:195507271 rs868067409	G	C	p.Thr3727Ser	0.90	51	0.017/ 0.226	2	O-글리코실화 (알파 서브유닛)
chr3:195475923 rs531395109	G	A	p.Thr5295Met	0.60	34, 37, 38, 39	0.001/ 0.011	24	N-글리코실화 (베타 서브유닛)
chr3:195507778 rs754808151	G	A	p.Ala3558Val	0.35	5	0.016/ 0.000	2	O-글리코실화 (알파 서브유닛)
chr3:195512387 rs1304612772	G	A	p.Leu2022Phe	0.30	32, 33	0.001/ 0.009	2	O-글리코실화 (알파 서브유닛)
chr3:195510803 rs774907241	G	T	p.Pro2550Thr	0.30	19	0.008/ 0.000	2	O-글리코실화 (알파 서브유닛)
chr3:195511813 rs771925912	C	T	p.Ser2213Asn	0.14	15, 16	0.001/ 0.009	2	O-글리코실화 (알파 서브유닛)
chr3:195511811 rs745342765	G	T	p.Pro2214Thr	0.04	15, 16	0.000/ 0.000	2	O-글리코실화 (알파 서브유닛)

* 참조 게놈에서의 염색체 위치, GRCh37/hg19.

^b 위암으로 진단된 개체의 ID는 굵은 글씨로 강조 표시되고 밑줄의 케이스 번호는 같은 가족에 속함^c gnomAD (v2.1) 엑솜 데이터베이스의 전체 및 동아시아 집단에서의 MAF (%)

[93]

상기 표 2에 나타난 바와 같이, *MUC4* 변이를 보유한 피험자는 케이스 #16, #37 및 #39를 제외하고 모두 위암 환자이다. *MUC4* 변이를 가진 위암 환자들은 #23를 제외하고 대부분 장형 위암이다 (도 1). 위암에 걸리지 않은 3명의 피험자 (#16, #37 및 #39)는 모두 여성이고 비흡연자였다. 2종의 변이인 c.7658C>T p.A2553V 및 c.5005A>G p.S1669G가 관련 없는 3가구의 가족에서 확인되었다. 피험자 #15, #16, #19, #34 및 #51은 각각 2종의 다른 변이를 가졌다. 동아시아 출신 집단의 변이 식별율은 대부분 전체 집단에서 관찰된 것보다 높았다 (표 2).

[94]

한편, 상기 실시예 1의 피험자 중에서 *MUC1* rs4072037 A 대립 유전자의 빈도는 90.9%로 1,124 명의 중국인 위암 환자와 비슷한 반면 [Qiu LX, Hua RX, Cheng L, He J, Wang MY, Zhou F, et al. Genetic variant rs4072037 of MUC1 and gastric cancer risk in an Eastern Chinese population. *Oncotarget*. 2016; 7(13):15930-6. Epub 2016/02/26. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7527> PMID: 26910281; PubMed Central PMCID: PMC4941287], A 및 G 대립 유전자의 빈도는 각각 아메리카 집단에서 57.9% 및 42.1%, 아프리카 집단에서 49.2% 및 50.8%였다 [Reis CA, David L, Seixas M, Burchell J, Sobrinho-Simoes M. Expression of fully and under-glycosylated forms of MUC1 mucin in gastric carcinoma. *Int J Cancer*. 1998; 79(4):402-10. Epub 1998/08/12. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19980821\)79:4<402::aid-ijc16>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19980821)79:4<402::aid-ijc16>3.0.co;2-6) PMID: 9699534]. 이러한 결과는 동아시아 집단이 *MUC1* 변이를 통해 유전적으로 취약할 수 있음을 나타낸다. 상기 분석 결과로부터 확인된 *MUC4* 변이의 대부분의 빈도는 서양 출신을 포함하는 전세계적인 집단에 비하여 동아시아 집단에서 유전적으로 더 높았다 (표 2). 또한, TCGA에서 동아시아 위암 환자에서 *MUC4*의 1종의 변이 (rs774527434)가 확인되었다. 전반적으로, 본 발명에서

추정된 *MUC4* 변이는 *MUC1* 변이와 평행한 위암 발병률의 지리적 차이에 기여할 수 있다.

- [95] 또한, 위암은 이종 병인(heterogeneous etiology)을 가지기 때문에, 위암 가족에서 개개인은 유전적 감수성 및 임상적 표현 사이에 불일치를 보일 수 있다. 상기 계층 분석 결과에서, *MUC4* 변이가 없는 5명의 위암 환자는 4 가구의 독립된 가족들 사이에서 확인되었다: #20, #28, #43, #45, 및 #46 (도 1). HDGC 기준을 충족한 미만형 위암 환자 #28은 *CDH1*에서 신규한 미스센스 돌연변이를 가졌다 (NM_001317184: exon8:c.G1057A:p.E353K). 비록 가족 #46이 HDGC 기준을 충족하였어도, *CDH1* 또는 *CTNNA1*에서 돌연변이는 발견되지 않았다 [Majewski JJ, Kluijt I, Cats A, Scerri TS, de Jong D, Kluin RJ, et al. An alpha-E-catenin (CTNNA1) mutation in hereditary diffuse gastric cancer. J Pathol. 2013; 229(4):621-9. Epub 2012/12/05. <https://doi.org/10.1002/path.4152> PMID: 23208944][Hansford S, Kaurah P, Li-Chang H, Woo M, Senz J, Pinheiro H, et al. Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: CDH1 Mutations and Beyond. JAMA Oncol. 2015; 1(1):23-32. Epub 2015/07/17. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2014.168> PMID: 26182300]. 환자 #43 및 #45는 신장 세포암 환자가 2명인 동일한 가족에 속했으며, 이는 다른 유전적 증후군의 가능성을 시사한다. 특히, *MUC4* 변이와 위암 발병은 한국인의 HDGC가 아니고 위암 대부분이 장형인 경우 강한 연관성을 가질 수 있음을 알 수 있었다.

[96] 위암 발병에서 *MUC4* 변이의 효과 크기

- [97] 표준 로지스틱 회귀 분석은 성별, 흡연 및 HDGC를 조정하여 55명의 모든 피험자에게 적용되었으며, 그 결과는 하기 표 3과 같다.

[98] [표 3]

- [99] 이항 로지스틱 회귀 분석에 의한 위암에 대한 독립적 위험 요소의 교차비(odds ratios)

구분 [reference]	log (OR)	OR	SE	95% CI of OR	Z-값	p-값
성별 [여성]	1.27	3.56	1.05	(0.46 내지 27.63)	1.21	.225
임의의 <i>MUC4</i> 변이 수반 [해당 없음]	4.1	58.08	1.06	(7.33 내지 459.97)	3.85	<.001
HDGC [해당 없음]	1.02	2.78	1.04	(0.36 내지 21.36)	0.98	.326
흡연 (현재/과거) [해당 없음]	1.17	3.22	1.00	(0.45 내지 22.80)	1.17	.241

OR, 교차비(odds, ratio); SE, 표준 오차(standard error); CI, 신뢰 구간(confidential interval);

HDGC, 유전성 미만형 위암 증후군(hereditary gastric cancer syndrome)

MUC4 변이, 흡연, 및 유전성 미만형 위암 가족력은 성별에 맞게 조정됨.

유사 결정 계수(Pseudo R²) = 0.616

굵은 글씨는 통계적 유의성을 나타냄.

- [101] 상기 표 3에 나타난 바와 같이, 임의의 *MUC4* 변이를 가지는 것은 위암 위험도 증가와 관련 있음을 알 수 있었다.

[102] [실시예 3] 큰 코호트에서의 *MUC4*와 위암의 연관성 검증

- [103] 상기 실시예 2로부터 상기 실시예 1의 피험자들을 대상으로 한 계층 분석 결과 *MUC4* 변이가 있는 피험자의 경우 위암 위험도가 증가함을 확인하였는바, 상기 *MUC4* 변이와 위암의 연관성을 보다 큰 크기의 코호트에서 하기와 같은

방법으로 검증하였다.

[104] MUC4에 위치한 변이의 게놈 전체 연관성

[105] 분당서울대학교병원 및 서울대학교 병원 헬스케어 시스템 강남 센터에서 조직학적으로 확인된 위암 환자 597명과 비-위암 환자(대조군) 9,758명으로부터 혈액 샘플을 수집하였다. 상기 샘플들은 827,783개의 변이들로 구성된 Affymetrix Axiom Korean Chip에 의해 유전자형이 지정되었다.

[106] 이 때, 하기에 해당하는 피험자는 제외되었다: 1) 게놈에 의해 추정된 성별이 임상 정보와 다른 경우, 2) 피험자의 호출 속도(call rates)가 97% 미만인 경우, 3) 이형접합 비율이 평균에서 표준 편차의 3배인 경우, 4) 다른 피험자와의 IBD(identity-by-descent) 추정치가 0.185 초과이고 이의 짝 피험자에 비하여 결측률(missing rate)이 더 높은 경우.

[107] 또한, 하기의 변이는 제외되었다: 1) 결측률(missing rate)가 3% 초과이거나 위암 환자와 대조군간에 유의미하게 다른 경우 ($p < 1 \times 10^{-5}$), 2) 마이너 대립유전자 빈도(minor allele frequency)가 5% 미만인 경우, 3) Anderson et al. 등에서 제안된대로, 하디-바인베르크 평형 정밀 시험에서의 p 값이 0.001 미만인 경우[Anderson CA, Pettersson FH, Clarke GM, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT. Data quality control in genetic case-control association studies. Nat Protoc. 2010; 5(9):1564-73. Epub 2010/11/19. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.116> PMID: 21085122; PubMed Central PMCID: PMC3025522].

[108] 그런 다음, Michigan Imputation Server를 사용하여 유형이 지정되지 않은 변이를 대치하였다(impute)[Das S, Forer L, Schonherr S, Sidore C, Locke AE, Kwong A, et al. Next-generation genotype imputation service and methods. Nat Genet. 2016; 48(10):1284-7. Epub 2016/08/30. <https://doi.org/10.1038/ng.3656> PMID: 27571263; PubMed Central PMCID: PMC5157836]. 대치(imputation) 후, MUC4에 위치한 4,224 개의 변이 및 이의 0.5 MB 인접 영역(flanking region)을 샘플 관계 매트릭스의 성별, 나이, 및 상위 10 가지의 주요 요소의 영향을 조정하여 로지스틱 회귀(logistic regression)를 사용하여 분석하였다. Bonferroni-조정된 0.05 유의 수준은 1.18×10^{-5} 이었으며, PLINK(v1.90b4.5) 및 R (v3.5.2)이 되어 과정에서 사용되었다[Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. Gigascience. 2015; 4:7. Epub 2015/02/28. <https://doi.org/10.1186/s13742-015-0047-8> PMID: 25722852; PubMed Central PMCID: PMC4342193].

[109] 큰 케이스 대조군 코호트에서 MUC4와 위암의 연관성 검증

[110] 유전성 및 산발성 위암은 위암에 대한 유전적 배경을 공유할 수 있다고 가정하면서, SNP 어레이로 유전자형화된 상기의 597명의 위암 환자 및 9,759명의 건강한 대조군으로 구성된 큰 코호트에서 MUC4의 변이가 위암과 관련이 있는지를 추가로 분석하였다. 0.5 MB의 플랭킹 영역을 포함하는 MUC4 영역 (chr3: 195,473,637-195,539,149)의 공통 SNP를 분석하였고,

Bonferroni-조정된 0.05 유의 수준은 1.18×10^{-5} 였다. *MUC4* 병변에서 2 종의 공통 변이(rs148735556 및 rs11717039)를 검출하였고(표 4), 이는 *MUC4*와 위암의 연관성을 시사하였다.

[111] [표 4]

[112] 0.5MB 플랭킹 영역을 포함하는 *MUC4* 영역 (chr3: 194,473,637-195,539,149)

[113]

CHR	SNP	BP	P	OR	L95	U95	A1	A2	MAF_A	MAF_U	MAF_DB	HWE	MISS
3	rs148735556	195052426	1.27e-07	4.343	2.519	7.487	T	A	0.0235	0.0054	0.0113	0.3515	0
3	rs11717039	195401737	1.071e-05	1.386	1.198	1.603	C	T	0.4782	0.4026	0.4534	0.07002	0

[114] *MUC4*의 엑손 2 및 엑손 24 영역에서, 25 개의 SNP가 있었고, 엑손 2에서 rs547775645 미스센스 변이가 $0.05/25 = 2 \times 10^{-3}$ 유의 수준에서 유의한 것으로 확인되었다(표 5).

[115] [표 5]

[116] *MUC4* 영역 (엑손 2 및 엑손 24)

[117]

엑손	SNP	BP	AA 변경	주석	P	OR	L95	U95	A1	A2	MAF_A	MAF_U	HWE	MISS
2	rs547775645	195515398	p.Ser1018Cys	미스센스	1.12e-03*	17.75	3.148	100.1	C	G	0.0050	0.004	1	0

* $0.05 / 25 = 2e^{-3}$

[118] *MUC4*에서 상기 언급된 10 종의 희귀 변이의 대치 품질(imputation quality)은 불량하여(INFO < 0.5), SNP 칩 분석에서 시험될 수 없었다. 그러나, 위암의 가족 응집(familial aggregation)에 대한 소인으로서 *MUC4* 미스센스 변이를 확인하였으며, 위암과 유의한 연관성을 갖는 *MUC4*에서 공통 변이가 존재함을 확인하였다.

[119] 즉, 위암의 큰 케이스 대조군 코호트에서 위암과 유의하게 연관된 *MUC4* 영역의 공통 변이를 발견하였는바, 이를 통해 *MUC4*와 위암이 연관성이 있음을 알 수 있었다.

[120] 다양한 암 유형의 환자에서 *MUC4* 생식세포계열(germline) 변이의 빈도

[121] *MUC4*는 위뿐만 아니라 결장, 식도, 소장, 자궁 및 폐와 같은 다른 조직에서도 발현되고, 폐, 유방, 췌장, 및 위의 암종을 포함하는 다양한 유형의 암종에서 비정상 *MUC4* 발현이 보고되었기 때문에[Chaturvedi P, Singh AP, Batra SK. Structure, evolution, and biology of the *MUC4* mucin. FASEB J. 2008; 22(4):966-81. Epub 2007/11/21. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9673rev> PMID: 18024835; PubMed Central PMCID: PMC2835492], 다양한 암 유형의 환자의 생식세포계열(germline) 샘플에서 *MUC4* 변이의 대립 유전자 빈도를 조사하였으며, 생식세포계열 *MUC4* 변이를 가진 환자가 다양한 유형의 암이 발생할 위험이 더 높음을 확인하였다. 또한, 상기 실시예 2의 TCGA 데이터의 혈액으로부터 얻은 생식세포계열 변이를

사용하여 *MUC4* 유전자의 10 종의 희귀 변이가 암과 관련 있는지 여부를 테스트하였으며, 위암 및 4 종의 암 유형이 *MUC4*의 3 종의 희귀 변이와 관련이 있음을 확인하였다 (표 6).

[122] [표 6]

[123] TCGA로부터 다양한 암 유형에서의 3 종의 SNP의 빈도

[124]

	STAD	CRC	UCEC	LUAD	LUSC
rs774527434	0.17%	0%	0%	0%	0%
rs534779185	0%	4%	0.56%	0%	0%
rs77250903	0%	0.13%	0%	0%	0%

STAD, 위 선암종(stomach adenocarcinoma); CRC, 대장암(colorectal cancer); UCEC, 자궁내막암(uterine corpus endometrial cancer); LUAD, 폐 선암종(lung adenocarcinoma); LUSC, 폐 편평상피세포암(lung squamous cell cancer)

[125] 상기 표 2에 나타난 가족성 위암과 연관된 *MUC4* 유전자의 10 종의 관련 변이 중에서, 295개의 위 선암종(stomach adenocarcinoma) 생식세포계열 샘플 중 한 명의 환자에서(0.17%) 이형접합 rs774527434 SNP가 확인되었고 (표 6), 이는 일반적인 집단에서보다 약 4 배 더 높은 것이다 (0.04%, 표 2). 2종의 변이인 rs534779185 및 rs77250903는 372명의 대장암(CRC) 환자에서 확인되었고, 빈도는 각각 4.0% 및 0.13%인데, 이는 일반적인 집단에서보다 더 높은 것이다 (각각 0.26% 및 0.06%, 표 2). 1종의 변이인 rs534779185는 0.56%의 빈도로 265개의 자궁내막암(uterine corpus endometrial cancer) 샘플에서 발견되었다. 408명의 폐 편평상피세포암(lung squamous cell cancer) 환자와 495명의 폐 선암종(lung adenocarcinoma) 환자에서는 *MUC4* 유전자의 10 종의 변이가 확인되지 않았다. 이를 통해 *MUC4* 변이가 위장관 또는 비뇨 생식관 암과 관련될 수 있음을 알 수 있었다.

[126] [실시예 4] 면역조직화학(immunohistochemistry, IHC) 분석을 통한 위 조직에서의 기능적 효과 확인

[127] 상기 실시예 2 및 3을 통해 *MUC4* 변이가 있는 피험자의 경우 위암 위험도가 증가함을 확인하였는바, *MUC4* 변이가 실제 위 조직에서 어떠한 기능적 효과가 있는지를 확인하기 위해, 면역조직화학(IHC) 분석을 하기와 같이 수행하였다.

[128] 비암성 위 점막 및 위암 조직의 면역조직화학 분석

[129] 내시경 생검에 동의한 15 명의 위암 환자 및 8 명의 비-위암 환자로부터 IHC를 사용하여 유문부(antral) 비암성 점막을 평가하였다. 위암 환자의 경우, 암 조직도 염색하였다. IHC에 *MUC4* 검출용 항체 (클론: 8G7) (1:100 희석, Zeta Corporation, Arcadia, CA, USA)를 사용하였다. 상기 IHC에 사용한 항체는 *MUC4α* 영역을 검출하는 것이다. 항체의 특이성은 이전 연구에 의해 입증되었다. 섹션의 전체 염색 (두께 4 μ m)은 BenchMark XT Staining 시스템 및 ultraVIEW Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA)를 통해 수행되었다. *MUC4* 발현은 과학 현미경을 사용하여 면적에 따른 강도의 곱(%)을 통해 하기와 같이 평가되고, 여기서 염색은 하기와 같이 상피선(epithelial glands)에서 관찰된다(0 내지 300): 염색 미관찰이면 0; 희미하거나/간신히 지각 가능한

부분적 염색이면 1+; 약하거나 중간 정도의 염색이면 2+; 강한 염색이면 3+. 암 조직에서는, 강하게 염색된 면적을 점수화하였다. 각 샘플은 단일 병리학자(이혜승)에 의해 맹검 방식으로 채점되었다.

[130] **MUC4 변이를 가진 피험자의 위 조직에서 MUC4 발현**

[131] 확인된 변이의 기능적 효과를 조사하기 위해 수행한 상기 위 점막에서의 MUC4 발현의 IHC 분석 결과는 다음과 같다.

[132] 먼저, MUC4 변이(rs774527434)와 완전한 공집합을 보이고 가장 많은 수의 위암 환자를 포함하는 가족 No. 14의 5명의 피험자의 대표적인 면역화학적 결과를 도 3에 나타냈다. MUC4 변이-음성인 비암성 위점막(#50, #54)(도 3A 및 도 3D)은 높은 강도를 나타낸 반면, MUC4 변이를 갖는 3명의 환자(#51, #52 및 #53)의 MUC4 변이-양성 비암성 점막의 IHC 결과는 약하거나 음성이었다(도 3B, 도 3E 및 도 3H). 대조적으로, 3명의 위암 환자(#51, #52 및 #53)의 암 조직은 높은 IHC 점수를 보여주었다(도 3C, 도 3F 및 도 3I).

[133] 일반적으로, MUC4 변이를 가진 비암성 점막은 야생형을 가진 비암성 점막보다 MUC4-양성 염색 점수가 더 낮은 것을 보여준다 (도 3G; 중앙값 [사분위수 범위]: 0 [10.0-30.0] vs. 70 [9.5-165.0], $p = 0.023$). 암 조직에서는, 야생형과 비교하여 MUC4 변이가 있는 조직에서 IHC 염색이 더 두드러지는 경향이 있다 (도 3G; 중앙값 [사분위수 범위]: (75.0 (0-240.0) vs. 30 (0-105.0), $p = 0.287$).

[134] 상기 IHC 분석 결과에 따르면, MUC4-염색된 세포는 비-암성 위 점막에서 감소하는 경향을 보였으며, 이는 MUC4 변이를 가진 피험자의 정상 위 점막은 야생형을 가진 피험자에 비하여 MUC4 발현이 감소됨을 의미한다. MUC4는 구조적으로 MUC1과 유사하고 MUC4 변이를 가진 피험자는 MUC4의 발현이 감소된 것을 나타내는데, MUC4 변이가 정상 위 점막에서 MUC4 발현을 억제하여 유해한 효과를 유발함을 알 수 있으며, 이러한 경향은 MUC4의 c.5375G>A:p.R1792H 돌연변이를 가진 가족 구성원에서 가장 두드러졌다(Family No. 14). 또한, 정상 조직에 비하여 암 조직에서 MUC4 발현이 증가하였는데, 이를 통해 암 조직에서의 MUC4의 과도한 발현은 MUC4 유전자가 종양 유전자(oncogene)로서 이중적인 역할을 함을 확인하였다.

[135] **[실시예 5] MUC4 단백질 구조 예측**

[136] 상기 실시예 2 내지 4를 통해 MUC4 변이가 위암을 예측 또는 진단하기 위한 바이오마커임을 확인하였는데, MUC4 단백질의 구조를 예측하기 위해 하기와 같이 컴퓨터 분석을 수행하였다.

[137] **MUC4 구조 컴퓨터 분석**

[138] MUC4 구조 분석을 위해 NCBI 참조 서열 데이터베이스로부터 얻은, 단백질 서열(refSeqID:NP_001191215) 및 mRNA 서열 (refSeqID:NM_018406.6)을 사용하여 모티프 검색, 및 펩티드 절단(cleavage), 글리코실화(glycosylation), 및 단백질 구조의 예측을 수행하였다[O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciufo S, Haddad D, McVeigh R, et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current

status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(D1):D733-45. Epub 2015/11/11. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189> PMID:26553804; PubMed Central PMCID: PMC4702849].

GenomeNet(<https://www.genome.jp>)의 MotifFinder 툴을 이용하여 모티프 검색을 수행하였다. 단백질 참조 서열(NP_001191215) 및 변이 서열의 MUC4 α 영역에서 PeptideCutter [Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol.* 1999; 112:531-52. Epub 1999/02/23. <https://doi.org/10.1385/1-59259-584-7:531> PMID: 10027275]를 수행하여 펩티드 절단 예측을 수행하였다. NetOGlyc [Steentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KT, et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J.* 2013; 32(10):1478-88. Epub 2013/04/16. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.79> PMID: 23584533; PubMed Central PMCID: PMC3655468] 및 NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)을 사용하여 각각 O-GalNAc (N-아세틸갈라토사민)(N-acetylgalactosamine) 및 N-GalNAc 변형의 위치를 예측하였다. MODELLER [Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen MY, et al. Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2006;Chapter 5:Unit-5 6. Epub 2008/04/23. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0506s15> PMID: 18428767; PubMed Central PMCID: PMC4186674][Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(W1):W296-W303. Epub 2018/05/23. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427> PMID: 29788355; PubMed Central PMCID: PMC6030848] 및 SWISS-MODEL의 상동성 모델링을 사용하여 단백질 구조 예측을 수행하고자 하였다.

[139] 단백질 구조 예측 결과

[140] 상기 실시예 2 내지 4에서 확인된 10 종의 MUC4 변이 중 9 종은 엑손 2에 위치하고, 이는 탠덤 반복 영역(tandem repeat region)을 포함하며[Chaturvedi P, Singh AP, Batra SK. Structure, evolution, and biology of the MUC4 mucin. *FASEB J.* 2008; 22(4):966-81. Epub 2007/11/21. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9673rev> PMID: 18024835;PubMed Central PMCID: PMC2835492], 다른 변이는 엑손 24에 존재했다. 다만, 상동성 모델링 또는 제1 (*ab initio*) 구조적 모델링은 확립된 MUC1 또는 MUC4 모델, 및 O-글리코실화-풍부 부위의 코일 구조의 부재로 인해 성공적이지 않았다.

[141] 글리코실화 예측에 따르면 [Steentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KT, et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J.* 2013; 32(10):1478-88. Epub 2013/04/16. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.79> PMID:

23584533; PubMed Central PMCID: PMC3655468][Gupta R, Brunak S. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. Pac Symp Biocomput. 2002:310-22. Epub 2002/04/04. PMID: 11928486], 엑손 2의 대부분의 MUC4 변이는 O-글리코실화 부위이거나 이와 물리적으로 가까이에 있다 (표 7).

[142] [표 7]

[143] NetOGlyc 및 NetNGlyc을 이용한 글리코실화 부위 예측

위치*	아미노산 변화	부위(site) 예측
chr3:195512387	p.L2022F	위치 (2020, 2021, [], 2023, 2024)는 O-글리코실화 부위일 것으로 예상됨
chr3:195510793	p.A2553V	위치 (2551, 2553, 2554, 2555)는 O-글리코실화 부위일 것으로 예상됨
chr3:195475923	p.T5295M	약 20개의 N-글리코실화 예측 부위 중 MUC4 β-서브유닛의 제2 및 제3 EGF 도메인 사이의 마지막 N-글리코실화 부위 (N-Xaa-ST->ML)의 근처이거나 일부
chr3:195507271	p.T3727S	위치 (3727)는 O-글리코실화 부위일 것으로 예상됨
chr3:195507778	p.A3558V	위치 (3556, [], 3559, 3560)는 O-글리코실화 부위일 것으로 예상됨
chr3:195513076	p.R1792H	위치 (1790, 1791, [])는 O-글리코실화 부위일 것으로 예상됨
chr3:195513446	p.S1669G	위치 (1668, 1669, 1670-2)는 O-글리코실화 부위일 것으로 예상됨
chr3:195510803	p.P2550T	위치 (2548, 2549, [], 2551, 2552)는 O-글리코실화 부위일 것으로 예상됨
chr3:195511811	p.P2214T	위치 (2212, 2213, [], 2215, 2216)는 O-글리코실화 부위일 것으로 예상됨
chr3:195511813	p.S2213N	위치 (2212, 2213, 2215, 2216)는 O-글리코실화 부위일 것으로 예상됨

* 참조 게놈에서의 염색체 위치, GRCh37/hg19.
[]는 가능한 O-글리코실화 부위를 나타냄

[145] 특히, p.T3727S, p.S1669G 및 p.S2213N는 O-GalNAc 변형이 있을 가능성이 더 높았다 [Steentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KT, et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. EMBO J. 2013; 32(10):1478-88. Epub 2013/04/16. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.79> PMID: 23584533; PubMed Central PMCID: PMC3655468]. 이러한 추정된 절단 부위의 G에서 A로의 단일 코돈의 변화(c.5375G>A;p.R1792H)는 단백질 분해 활성을 잠재적으로 억제할 수 있다. C에서 T로의 단일 코돈 변화(c.15884C>T)는 MUC4 β서브유닛의 제2 및 제3 표피성장인자(epidermal growth factor (EGF))-유사 도메인 사이의 잠재적 N-글리코실화 부위의 트레오닌 합성을 방해하였다.

[146] 즉, MUC4 구조에서 글리코실화의 인실리코(*in silico*) 예측으로부터 얻은 정보는 MUC4 변이에 의해 코딩화된 대부분 영역은 O-글리코실화 부위일 가능성이 있음을 나타낸다. 글리칸 마이크로-이종성(glycan micro-heterogeneity)을 갖는 O-글리코실화는 뮤신 구조 및 기능에 중요하다. 뮤신형 글리칸은 특정 리간드-수용체 상호작용에 관여하고 흡습성을 부여할 수 있고 다양한 소분자와 단백질에 결합하여, 최종적으로 단백질 구조를 안정화시킬 수 있다 [Jayaprakash NG, Surolia A. Role of glycosylation in nucleating protein folding and stability. Biochem J. 2017; 474(14):2333-47. Epub 2017/07/05. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170111> PMID: 28673927]. MUC4α 서브유닛에 수백 개의 O-글리코실화 부위가 존재하지만, 하나의 특정 부위에서의 하나의 아미노산 차이는 코딩된 변이 단백질의 기능을 변화시킬 수 있다 [van der Post S,

Thomsson KA, Hansson GC. Multiple enzyme approach for the characterization of glycan modifications on the C-terminus of the intestinal MUC2mucin. *J Proteome Res.* 2014; 13(12):6013-23. Epub 2014/11/19. <https://doi.org/10.1021/pr500874f> PMID: 25406038; PubMed Central PMCID:PMC4261943]. 상기와 같은 O-글리코실화 부위 주변의 아미노산 위치 선호 [Thanka Christlet TH, Veluraja K. Database analysis of O-glycosylation sites in proteins. *Biophys J.* 2001; 80(2):952-60. Epub 2001/02/13. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(01\)76074-2](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(01)76074-2) PMID: 11159462; PubMed Central PMCID: PMC1301293] 및 세린 또는 트레오닌에서의 변화에 기초하여 [Chaturvedi P, Singh AP, Batra SK. Structure, evolution, and biology of the MUC4 mucin. *FASEB J.* 2008; 22(4):966-81. Epub 2007/11/21. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9673rev> PMID: 18024835; PubMed Central PMCID: PMC2835492] MUC4의 글리코실화가 변경되었을 수 있다.

- [147] 한편, 종래의 연구는 *MUC4*가 위암의 발병기 동안 ErbB2 종양 단백질을 활성화시킬 수 있음을 제안하였다 [Yokoyama A, Shi BH, Kawai T, Konishi H, Andoh R, Tachikawa H, et al. Muc4 is required for activation of ErbB2 in signet ring carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 355(1):200-3. Epub 2007/02/13. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.01.133> PMID: 17292332] [Senapati S, Chaturvedi P, Sharma P, Venkatraman G, Meza JL, El-Rifai W, et al. Deregulation of MUC4 in gastric adenocarcinoma: potential pathobiological implication in poorly differentiated non-signet ring cell type gastric cancer. *Br J Cancer.* 2008; 99(6):949-56. Epub 2008/09/11. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604632> PMID: 18781152; PubMed Central PMCID: PMC253875247, 48]. 또한, 변이가 EGF-유사 도메인들 사이에서 N-글리코실화 부위의 아미노산 변화를 유발하기 때문에, 엑손 24에서의 변이, p.Thr5295Met는 ErbB2 신호 전달에 관여할 수 있다.
- [148] 분석 결과를 종합하면, *MUC4*의 추정적 제3 EGF-유사 도메인의 구조적 모델은 F5300 내지 L5362의 잔기에 걸쳐져 있으며, 이는 변이 잔기인 T5295M에 매우 가깝다. 이 부위는 모델링된 EGF-유사 도메인로부터 오직 5 개의 잔기만큼 떨어져 있기 때문에, 이 변이가 EGF-유사 도메인의 기능에 영향을 끼칠 수 있는 것으로 보인다.
- [149] [실시예 6] *MUC4* 변이와 위암의 연관성 검증
- [150] 상기 실시예 2 내지 4로부터 *MUC4* 변이가 있는 피험자의 경우 위암 위험도가 증가함을 확인하였는바, 상기 *MUC4* 변이와 위암의 연관성을 하기와 같은 방법으로 지노타이핑(genotyping) 및 면역조직화학(IHC) 분석 결과로 재검증하였다.
- [151] 먼저, 분당서울대병원의 환자 중 총 288명을 선별하고, 이 중 위 전정부(antrum)과 위암 조직의 면역조직화학(IHC) 분석이 완료된 237명의 피험자(위암 환자는 103명, 비-위암 환자(대조군)은 134명)를 선별하였다. 상기 선별된 237명의 피험자의 위 전정부(antrum)와 위암 환자인 경우에는 혈액 및

위암 조직을 수득하고, 이로부터 genomic DNA를 분리 및 추출하였다(Qiagen DNeasy blood and tissue kit(Qiagen, Hilden, Germany)).

[152] 상기 추출된 DNA를 이용하여 MUC4 rs774527434 및 rs531395109의 2종의 SNP에 대하여 지노타이핑을 진행하였다. 그 결과 MUC4 유전자의 돌연변이가 있는 피험자는 총 14명으로, 이 중 비-위암 환자는 5명, 위암 환자는 9이었다.

[153] 참고로, 지노타이핑에 사용한 프라이머와 리포터 서열은 다음과 같다.

[154] MUC4 rs774527434 SNP 측정

[155] - forward primer: CTTTCTTCAGCTTCCACAGATGAC (서열번호 1)

[156] - reverse primer: TGGATGCCGAGGAAACGT (서열번호 2)

[157] - reporter 1: ACCACCCGTCTTCCT (서열번호 3)

[158] - reporter 2: ACCACCCATCTTCCT (서열번호 4)

[159] MUC4 rs531395109 SNP 측정

[160] - forward primer: GCCATCGCATCTGAAGTAAGC (서열번호 5)

[161] - reverse primer: GGTGCTTTCTGTGTTAATCTGTGT (서열번호 6)

[162] - reporter 1: TTCAGCGTGCTCACG (서열번호 7)

[163] - reporter 2: CTTCAGCATGCTCACG (서열번호 8)

[164] PCR 반응액은 TaqMan[®] Genotyping Master Mix (Cat No. 4371353) 12.5 μ l, Genotyping Assay Mix (forward primer, reverse primer, reporter 1, reporter 2) 1.25 μ l, DNase-free water 10.25 μ l로 만들었다. 여기에 genomic DNA 1 μ l (10-50ng) 씩 첨가하여 총 25 μ l로 만들고 10분간 95°C에서 holding한 후 92°C에서 15초간 denature, 60°C에서 1분간 anneal/extend을 50회 cycling하여 ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)을 사용하여 Real-time PCR 반응을 실시하여 지노타이핑을 수행하였다.

[165] 한편, 면역조직화학 분석은 실시예 4에서와 같이 수행되었다.

[166] 즉, 색전의 전체 염색 (두께 4 μ m)은 BenchMark XT Staining 시스템 및 ultraVIEW Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA)를 통해 수행되었다. MUC1 및 MUC4 발현은 과학 현미경을 사용하여 면적에 따른 강도의 곱(%)을 통해 하기와 같이 평가되고, 여기서 염색은 하기와 같이 상피선(epithelial glands)에서 관찰된다(0 내지 300): 염색 미관찰이면 0; 희미하거나/간신히 지각 가능한 부분적 염색이면 1+; 약하거나 중간 정도의 염색이면 2+; 강한 염색이면 3+. 암 조직에서는, 강하게 염색된 면적을 점수화하였다. 각 샘플은 단일 병리학자에 의해 맹검 방식으로 채점되었다.

[167] 면역조직화학 분석에 따른 MUC4의 상기 돌연변이가 있는 경우의 발현량 결과는 하기 표 8과 같다.

[168] [표8]

MUC4 돌연변이가 있는 피험자의 분석 결과

	대조군의 위 전정부 (n=5)	위암 환자의 위 전정부 (n=9)	위암 환자의 암 조직 (n=9)	P값
MUC4 발현량	54.80 ± 53.51	26.11 ± 51.95	76.11 ± 59.99	0.187

[169] 상기 표 8에 나타난 바와 같이, MUC4 돌연변이가 있는 피험자는 위암 환자의 경우 위 전정부에서 MUC4 발현이 감소하고, 위암 조직에서 MUC4 발현이 상승하는 경향을 보임을 확인하였다.

[170] 이를 통해, 비용 및 시간적 측면에서 보다 효율적이고 간단하게 유전자 분석을 수행할 수 있는 지노타이핑을 이용하여서도 MUC4 돌연변이가 있는 경우 위암을 예측 또는 진단할 수 있음을 알 수 있었다.

[171] 종합적으로, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 정상 대조군과 달리 위암 환자의 경우 MUC4 유전자의 특정한 13 영역(rs774527434, rs534579185, rs77250903, rs868067409, rs531395109, rs754808151, rs1304612772, rs774907241, rs771925912, rs745342765, rs148735556, rs11717039 및 rs547775645) 중 하나에 돌연변이가 존재하고, 특히 MUC4 생식세포계열(germline) 미스센스 돌연변이(rs547775645 미스센스 돌연변이)를 갖는 피험자는 비암성 위 점막(noncancerous gastric mucosa)에서 발현이 억제되어(downregulated) MUC4의 기능 상실에 의해 위암을 유발하고, 정상 조직에 비해 암 조직에서의 MUC4의 발현이 증가하였는바, 이를 통해, MUC4 유전자 돌연변이 검출 제제를 이용하면 위암을 예측 또는 진단할 수 있음을 알 수 있었다.

청구범위

- [청구항 1] 뮤신 4 (mucin 4, MUC4) 유전자의 돌연변이 검출 제제를 포함하고, 상기 돌연변이는 MUC4 유전자의 rs774527434, rs534579185, rs77250903, rs868067409, rs531395109, rs754808151, rs1304612772, rs774907241, rs771925912, rs745342765, rs148735556, rs11717039 및 rs547775645로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 영역에서의 돌연변이인, 피험자에서의 위암 예측 또는 진단용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 피험자는 위암 가족력이 있는 피험자인, 위암 예측 또는 진단용 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 돌연변이는 비암성 위 점막(noncancerous gastric mucosa)에서 MUC4 유전자의 발현을 억제하는, 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 돌연변이는 정상 위 조직에 비하여 위암 조직에서 MUC4 유전자의 발현을 증가시키는, 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 rs547775645 영역에서의 돌연변이는 미스센스(missense) 돌연변이인, 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 돌연변이는 NM_018406.7:c.5375C>T, NM_018406.7:c.5005T>C, NM_018406.7:c.7658G>A, NM_018406.7:c.11180G>C, NM_018406.7:c.15884G>A, NM_018406.7:c.10673G>A, NM_018406.7:c.6064G>A, NM_018406.7:c.7648G>T, NM_018406.7:c.6638C>T, NM_018406.7:c.6640G>T 및 NM_018406.7:c.3053G>C로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이인, 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 검출 제제는 상기 돌연변이에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머 쌍, 프로브, 항체, 펩타이드 및 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인, 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 위암은 미만형(diffuse-type) 위암, 장형(intestinal-type) 위암 및 혼합형(mixed-type) 위암으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인, 조성물.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 위 선암종(stomach adenocarcinoma, STAD),

- 대장암(colorectal cancer, CRC) 및 자궁내막암(uterine corpus endometrial cancer, UCEC)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 암에 걸린 피험자에서 위암을 예측 또는 진단하는, 조성물.
- [청구항 10] 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 위암 예측 또는 진단용 키트.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 키트는 설명서를 추가로 포함하고,
상기 설명서에는 검출된 상기 MUC4 유전자의 rs774527434, rs534579185, rs77250903, rs868067409, rs531395109, rs754808151, rs1304612772, rs774907241, rs771925912, rs745342765, rs148735556, rs11717039 및 rs547775645로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 영역에서 돌연변이가 존재하면 위암으로 예측 또는 진단하는 것이 기재된, 키트.
- [청구항 12] 제10항에 있어서,
상기 키트는 위 선암종(stomach adenocarcinoma, STAD), 대장암(colorectal cancer, CRC) 및 자궁내막암(uterine corpus endometrial cancer, UCEC)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 암에 걸린 피험자에게 적용되는 것인, 키트.
- [청구항 13] 피험자의 샘플로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계;
상기 추출된 게놈 DNA에 뮤신 4 (mucin 4, MUC4) 유전자의 rs774527434, rs534579185, rs77250903, rs868067409, rs531395109, rs754808151, rs1304612772, rs774907241, rs771925912, rs745342765, rs148735556, rs11717039 및 rs547775645로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 영역에서의 돌연변이를 검출하는 단계;를 포함하는, 위암 예측 또는 진단을 위한 정보제공방법.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 피험자는 위암 가족력이 있는 피험자인, 위암 예측 또는 진단을 위한 정보제공방법.
- [청구항 15] 제13항에 있어서,
상기 돌연변이 검출 단계는 상기 영역의 뉴클레오티드 서열로부터 선택된 연속 뉴클레오티드 서열에 특이적인 프라이머를 반응시키는 단계; 및
상기 반응물을 증폭시키는 단계;를 포함하는, 정보제공방법.
- [청구항 16] 제13항에 있어서,
상기 돌연변이는 NM_018406.7:c.5375C>T, NM_018406.7:c.5005T>C, NM_018406.7:c.7658G>A, NM_018406.7:c.11180G>C, NM_018406.7:c.15884G>A, NM_018406.7:c.10673G>A, NM_018406.7:c.6064G>A, NM_018406.7:c.7648G>T, NM_018406.7:c.6638C>T, NM_018406.7:c.6640G>T 및

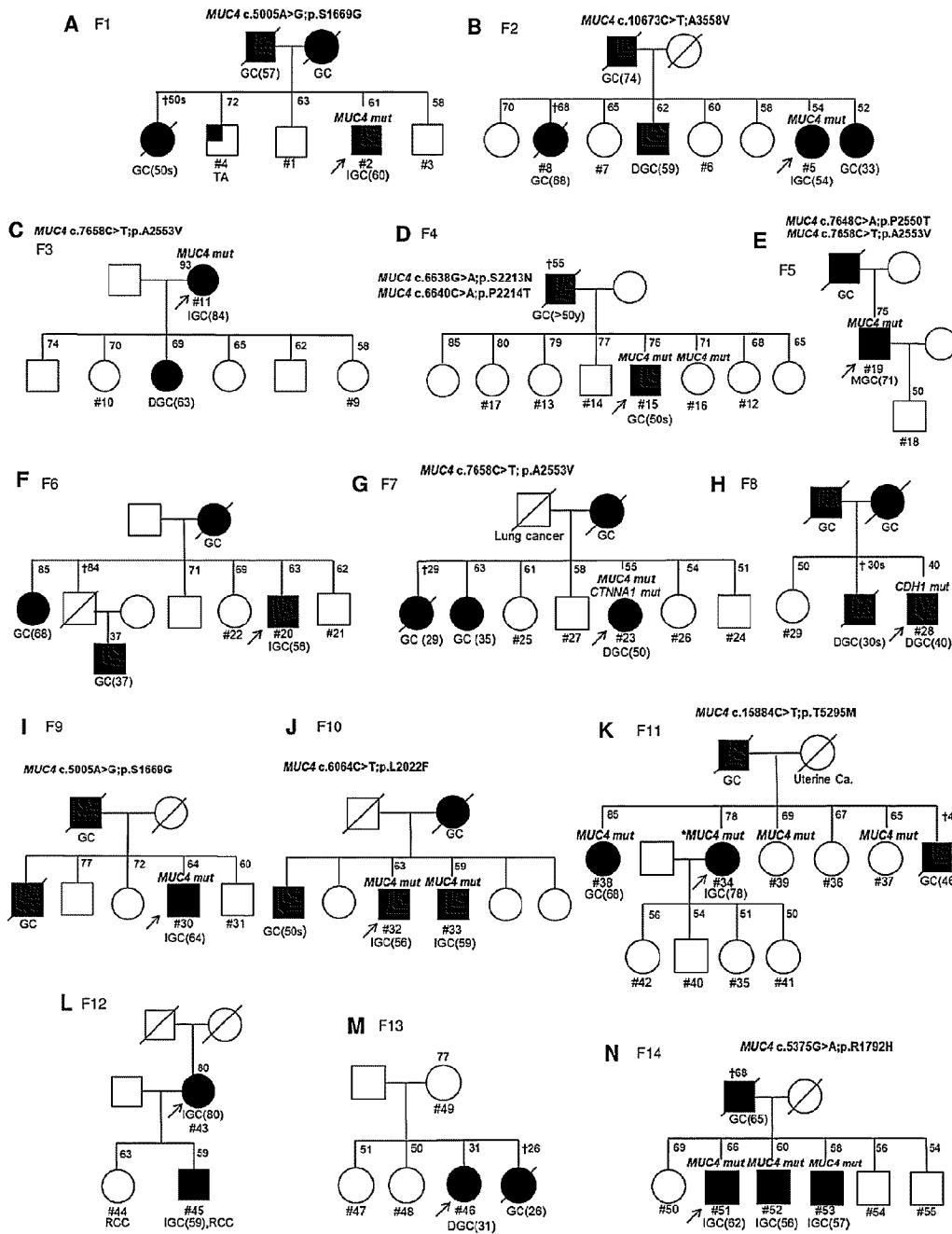
NM_018406.7:c.3053G>C로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이인, 정보제공방법.

[청구항 17]

제13항에 있어서,

상기 정보제공방법은 상기 MUC4 유전자의 돌연변이 검출 단계 후, 상기 MUC4 유전자의 돌연변이가 검출되면 위암인 것으로 예측하거나 결정하는 것인, 정보제공방법.

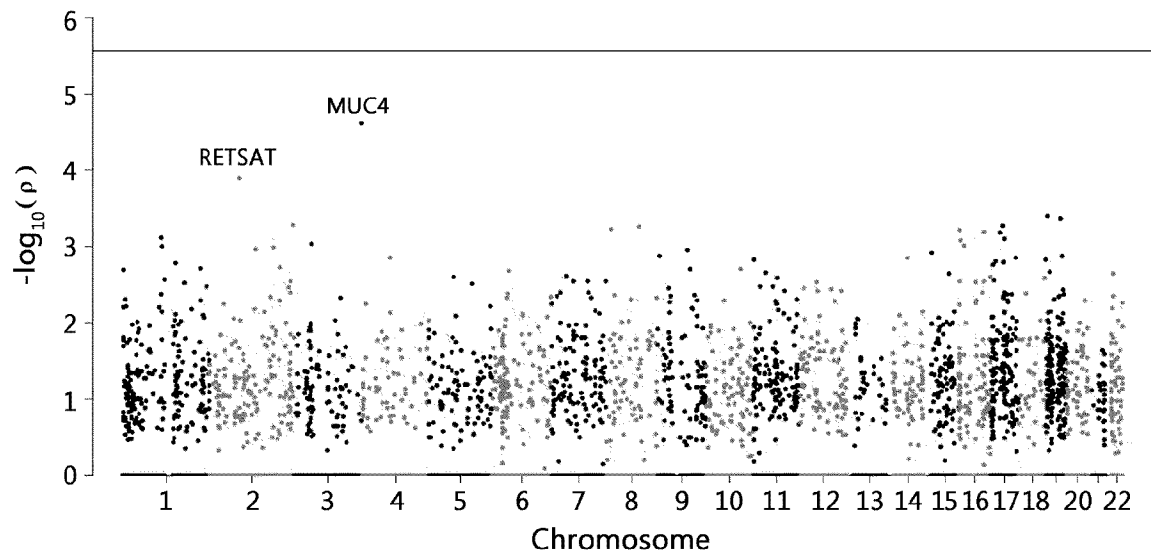
[도 1]



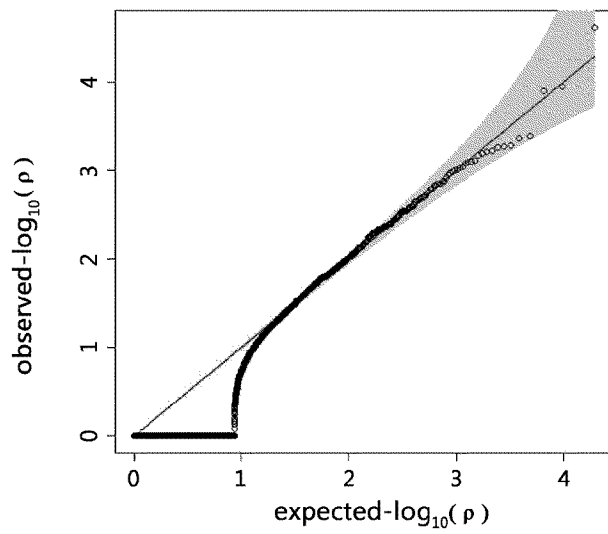
[도 2a]

Transcript	Gene	LOD	p value of LOD	CLRT	p value of CLRT
>NM_018406.6	MUC4	4.16	1.85x10 ⁻⁰⁵	106.6	<9.9x10 ⁻⁰⁹
>NM_005462.4	MAGEC1	2	0.000112	33.9	4.00x10 ⁻⁰⁶
>NM_017750.3	RETSAT	1.6724	0.000126	38.985	9.00x10 ⁻⁰⁶

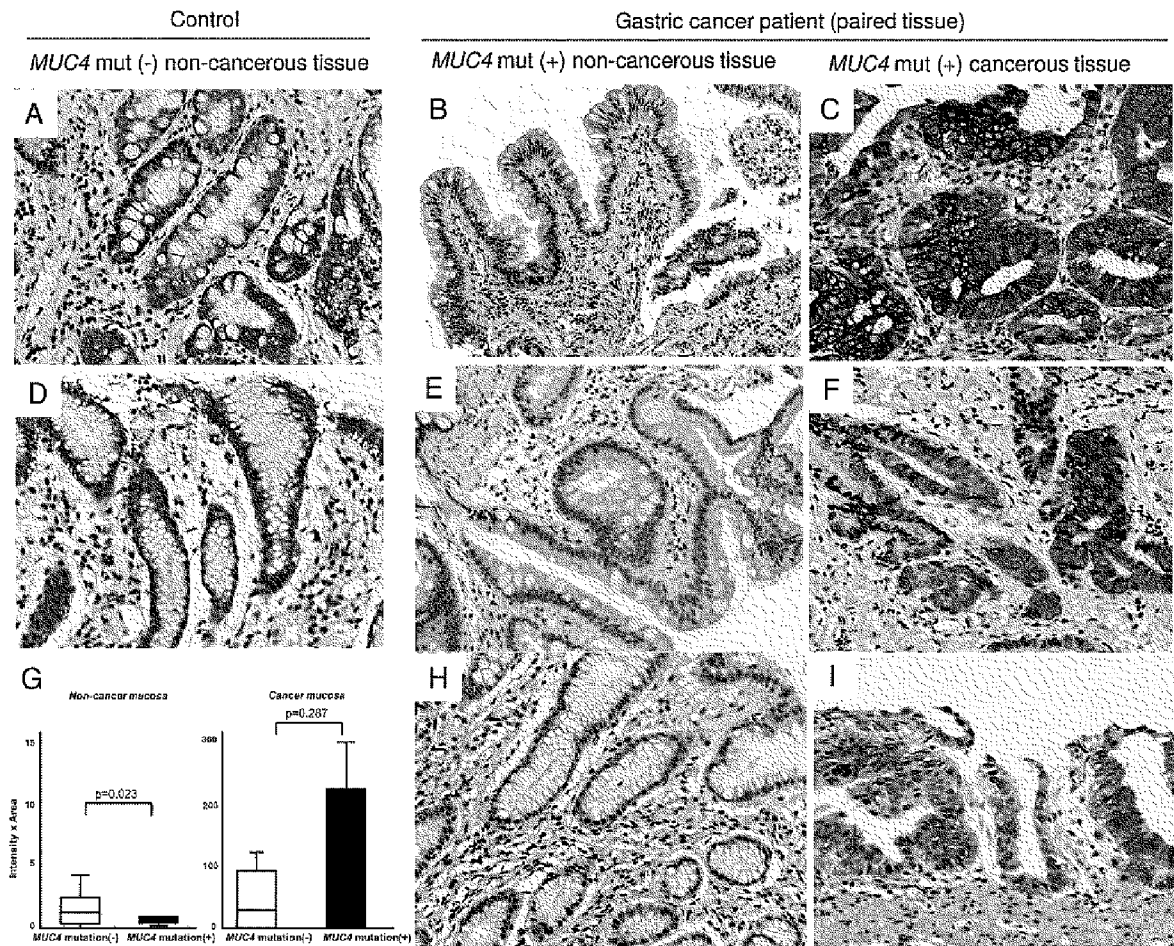
[도2b]



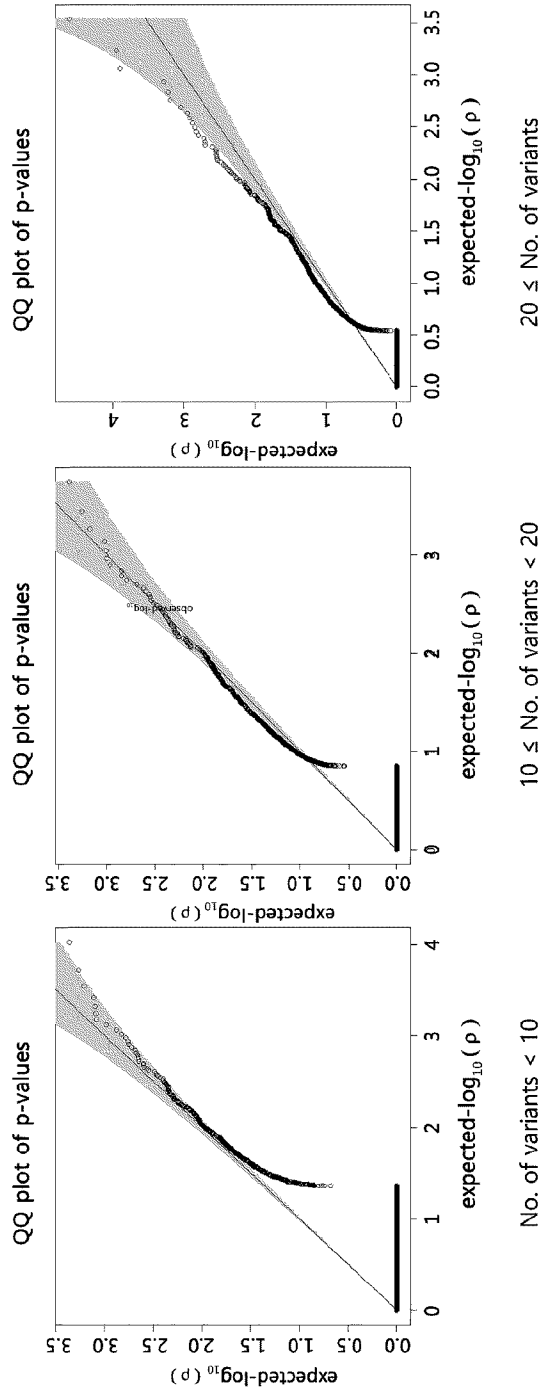
[도2c]



[도3]



[도4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/008803

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/6886(2018.01)i; G01N 33/574(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q 1/6886(2018.01); C12N 15/09(2006.01); C12N 15/11(2006.01); C12N 15/12(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); G01N 33/574(2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 뮤신 4(mucin 4, MUC 4), 유전자(gene), 돌연변이(mutation), 위암(gastric cancer), 예측(prediction), 진단(diagnosis), 키트(kit)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2012-167112 A2 (ILLUMINA, INC. et al.) 06 December 2012 (2012-12-06) See abstract, claims 1, 11 and 29-31, pages 2, 5 and 21-22, and tables 1-2 and 4.	1-17
A	KR 10-2011-0103592 A (DONG-A UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION FOR INDUSTRY-ACADEMY COOPERATION) 21 September 2011 (2011-09-21) See entire document.	1-17
A	JP 2008-167715 A (SYSMEX CORPORATION) 24 July 2008 (2008-07-24) See entire document.	1-17
A	CHOI, Y. J. et al. The role of rare variants in Muc4 in gastric cancer susceptibility in gastric cancer family. Gastroenterology. 2019, vol. 156, no. 6, p. S-500(abstract no. : Su1069). See entire document.	1-17
A	NABATCHIAN, F. et al. miR-581-related single nucleotide polymorphism, rs2641726, located in MUC4 gene, is associated with gastric cancer incidence. Ind. J. Clin. Biochem. 2019, vol. 34, no. 3, pp. 347-351. See entire document.	1-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “D” document cited by the applicant in the international application “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 04 November 2021		Date of mailing of the international search report 04 November 2021
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	<p>CHOI, Y. J. et al. Family-based exome sequencing combined with linkage analyses identified rare susceptibility variants of MUC4 for gastric cancer. PLoS ONE. 23 July 2020, vol. 15, no. 7, thesis no. : e0236179(pp. 1-17).</p> <p>See entire document.</p> <p>※ This document "CHOI, Y. J. et al." is a known document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.</p>	1-17

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions of groups 1-13 : respectively pertain to a composition for predicting or diagnosing gastric cancer, a kit comprising the composition, and an information providing method for predicting or diagnosing gastric cancer, the composition comprising an agent for detecting a mutation at one or more regions from among rs774527434, rs534579185, rs77250903, rs868067409, rs531395109, rs754808151, rs1304612772, rs774907241, rs771925912, rs745342765, rs148735556, rs11717039 and rs547775645 of an MUC 4 gene.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2021/008803

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2012-167112	A2	06 December 2012	None			
KR	10-2011-0103592	A	21 September 2011	KR	10-1169329	B1	30 July 2012
JP	2008-167715	A	24 July 2008	JP	5379350	B2	25 December 2013
				US	2008-0182259	A1	31 July 2008
				US	8187809	B2	29 May 2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/6886(2018.01)i; G01N 33/574(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/6886(2018.01); C12N 15/09(2006.01); C12N 15/11(2006.01); C12N 15/12(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); G01N 33/574(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 뮤신 4(mucin 4, MUC 4), 유전자(gene), 돌연변이(mutation), 위암(gastric cancer), 예측(prediction), 진단(diagnosis), 키트(kit)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2012-167112 A2 (ILLUMINA, INIC. 등) 2012.12.06 요약, 청구항 1, 11, 29-31, 페이지 2, 5, 21-22, 표 1-2, 4	1-17
A	KR 10-2011-0103592 A (동아대학교 산학협력단) 2011.09.21 전체 문헌	1-17
A	JP 2008-167715 A (SYSMEX CORPORATION) 2008.07.24 전체 문헌	1-17
A	CHOI, Y. J. 등, "The role of rare variants in Muc4 in gastric cancer susceptibility in gastric cancer family", Gastroenterology, 2019, 제156권, 제6호, 페이지 S-500(초록번호 : Su1069) 전체 문헌	1-17
A	NABATCHIAN, F. 등, "miR-581-related single nucleotide polymorphism, rs2641726, located in MUC4 gene, is associated with gastric cancer incidence", Ind. J. Clin. Biochem., 2019, 제34권, 제3호, 페이지 34 7-351 전체 문헌	1-17
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일	
2021년11월04일(04.11.2021)	2021년11월04일(04.11.2021)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	정다원 전화번호 +82-42-481-5373	

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	CHOI, Y. J. 등. “Family-based exome sequencing combined with linkage analyses identified rare susceptibility variants of MUC4 for gastric cancer”, PLoS ONE, 2020.07.23, 제15권, 제7호, 논문번호 : e0236179(페이지 1-17) 전체 문헌 ※ 위 문헌 “CHOI, Y. J. 등”은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임.	1-17

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - 서면 혹은 이미지 파일
 - b. PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
 - c. 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).
2. 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.
3. 추가 의견:

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

제1군 내지 제13군 발명 : 각각 MUC 4 유전자의 rs774527434, rs534579185, rs77250903, rs868067409, rs531395109, rs754808151, rs1304612772, rs774907241, rs771925912, rs745342765, rs148735556, rs11717039 및 rs547775645 중 어느 하나의 영역에서의 돌연변이 검출 체제를 포함하는, 위암 예측 또는 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 키트, 및 위암 예측 또는 진단을 위한 정보제공방법에 관한 발명입니다.

1. 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

- 이의신청에 관한 기재 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2012-167112 A2	2012/12/06	없음	
KR 10-2011-0103592 A	2011/09/21	KR 10-1169329 B1	2012/07/30
JP 2008-167715 A	2008/07/24	JP 5379350 B2	2013/12/25
		US 2008-0182259 A1	2008/07/31
		US 8187809 B2	2012/05/29