

【서식 1】

자체연구과제 지원신청서

1. 과제내역

(단위 : 천원)

연구책임자			과제명	연구기간	연구비
단과대학	학과	성명			
의과대학	의학과	김진수	대장암 수술 전후 혈액과 대변 검체에서 신데칸 유전자 메틸화의 비교분석	2018. 6. 1.~ 2019. 1. 31.	14,000

2. 학술연구 내용

구 분	내 역
연구계획 (목적,필요성)	(1) 연구의 배경 대장암은 전 세계적으로 3번째로 흔한 암이고 2번째로 사망률이 높은 암이다. 우리나라에서도 남성에서는 2번째, 여성에서는 5번째로 흔히 발생하는 암이다. 대장암은 절반이상이 완치가 어려운 진행성암으로 발견되거나 조기에 발견되는 경우는 수술을 통한 생존율이 90%이상으로 알려져 있다. 대장암은 85% 이상이 선종을 거쳐 암으로 발전하는 선종-암종 진행과정을 거치는 것으로 알려져 있는데 암종으로 진행하기 전에 발견하여 치료하는 경우 생존율을 높이고 사망률을 감소시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다. 그러나 선종 단계 또는 초기 대장암을 발견하기 위해서는 대장내시경 검사가 필수인데 대장내시경 검사를 위해서는 검사 전날 장세척을 해야하고 검사가 불편하며 장천공의 위험성으로 인해 대부분의 국가에서 대장내시경검사는 선별검사로 도입되지 못하는 실정이다. (2) 연구의 필요성 한편, DNA 메틸화는 DNA상에서 발생하는 후성유전적 변이로써 염기서열의 변화 없이 화학적 변화에 의해 유전자 발현에 영향을 미치는 것을 말한다. 이러한 현상은 특정 부위에 존재하는 사이토신 (C) 의 5' 위치에 DNA 메틸기

가 붙는 현상으로 주로 암 억제 유전자의 특정부위에서 일어난다. 메틸화가 되면 여러 가지 메틸화 관련 단백질들이 DNA에 결합하게 되어 암 억제 유전자의 발현을 차단 시키고 결국 암으로 진행된다고 알려져 있다. 비정상적인 DNA 메틸화현상은 유전적 변이와는 달리 암 발생의 초기 뿐 아니라 심지어는 암 전단계에 놓여있는 세포에서도 감지되기도 한다. 그리고 특정 암을 지닌 암환자 대부분에서 동일한 비정상적인 메틸화 현상을 볼 수 있기 때문에 조기 진단용 바이오마커의 소스로써 최적의 대상으로 여겨지고 있다.

현재 국제적으로 신규 바이오마커를 발굴/검증하고 이를 암조기 진단 제품으로 개발하기 위한 경쟁이 벌어지고 있으며 DNA 메틸화 바이오마커를 이용한 진단테스트의 개발은 높은 상용화 경쟁력을 가질 것으로 전망된다.

(3) 연구의 목적

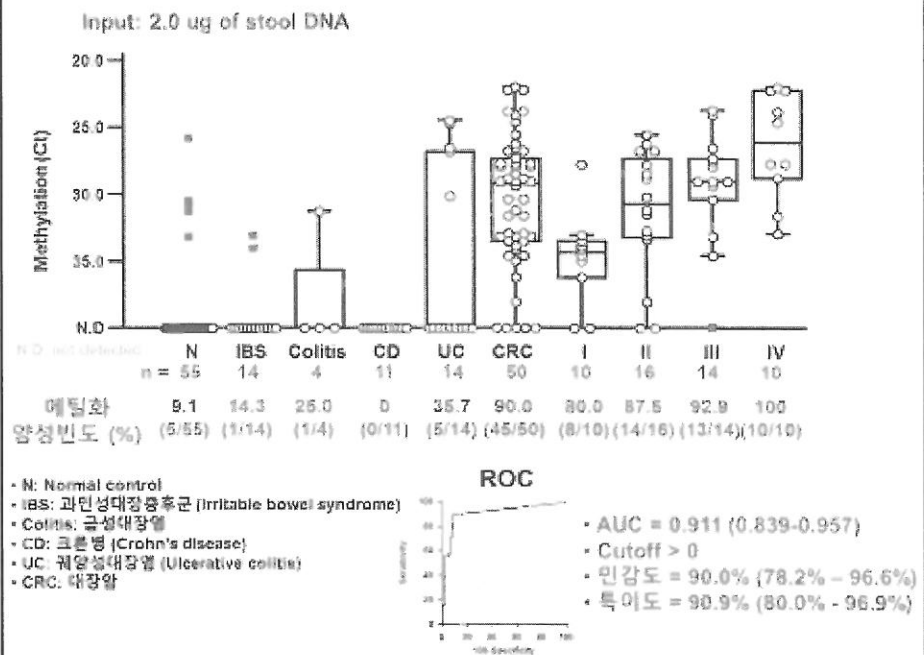
암특이적 메틸화 DNA는 혈액내의 세포유리 DNA 또는 대장의 이탈세포에 존재하므로 체액을 이용한 비침습적 암조기진단 기술 개발을 위한 최적의 표적으로 인식되고 있다. 현재까지 저렴하고 간편하면서도 정확한 대장암 선별검사는 없는 상태이다. 최근 연구에 의하면 신데칸 유전자의 메틸화는 대장암에서 후성유전적 변이와 밀접한 관계가 있는 것으로 확인 되었고 바이오마커로서의 가능성이 있다고 하겠다.

따라서 본 연구에서는 수술 전후의 환자 검체를 이용하여 신데칸 DNA 메틸화 분석을 통해 DNA 메틸화가 조기진단용 바이오마커로의 가능성을 알아 보고자 한다.

(4) 선행연구

신데칸2 유전자는 세포막을 구성하는 단백질로 세포증식, 이동 및 세포-세포간질의 상호작용에 관여하며, 장간막 세포에서 발현되고 정상적인 장 상피세포에서는 발현되지 않는다. 신데칸2 메틸화는 대장종양조직에서 의미 있게 메틸

화 되는 것으로 확인되었으며, 신데칸2 메틸화의 대장용종과 대장암 진단 능력 평가를 위해 총 49개의 대장용종 조직을 연구하였다. 병리적으로 용종 17개는 과증식 폴립이었고 32개는 샘종폴립이었으며 대장암 조직은 133명 환자의 암조직과 이와 연접한 정상 조직을 이용하였다. 정상대장조직과 비교하였을 때 과증식 폴립은 94%, 샘종폴립은 91%, 대장암은 97.7% 민감도로 메틸화가 되어 있었고 특이도는 100% 이었다. 이는 신데칸2가 대장암 뿐만 아니라 용종조직에서도 과메틸화 발현 됨을 보여준다. (그림)



(1) 환자등록

연구 기간 동안 대장암으로 근치적 목적의 수술 예정인 환자 36명을 등록할 것이다.

1) 선정기준

- 만 20세 이상 80세 미만의 성인
- 대장암 환자로서 근치적 절제술을 시행 받는 환자
- 수술 전 전체 대장내시경 검사를 시행 받은 환자

연구내용 및 방법

- 피험자 동의서에 서명한 환자

2) 제외기준

- 수술 전 항암치료 또는 방사선 치료를 시행한 환자
- 제거되지 않은 용종이 있는 환자
- 조절되지 않는 중증의 심혈관 질환, 신질환, 간 질환자
- 중증 전신 질환자 또는 정신과적 질환자
- 임상시험에 포함시키기 어렵다고 판단한 환자

(2) 검체 수집

대장암 환자에게서 수술 전 후 채혈 및 대변 수집을 시행한다. 수술 후는 1개월이 넘지 않는다. 수집된 검체는 인체자원은행으로 전달하여 지침에 따라 처리하고 BIMS 프로그램에 저장한다.

(3) DNA 분리방법

대변에서 DNA 분리는 QIAamp Stool Mini Kit (Qiagen)를 사용하여 분리하며, 혈청 및 혈장 DNA는 Viral NA kit (Life Technology)을 사용하여 분리한다.

(4) DNA에 대한 Bisulfite 처리

분리된 게놈 DNA EZ ENA methylation-Gold kit (Zymo Research, USA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 바이설파이트를 처리하고 최종적으로 증류수에 용출시킨다.

(5) 신데칸2 유전자 메틸화 분석

DNA 메틸화 분석은 실시간 정량 PCR (LAT-qMSP)방법으로 수행한다. 메틸화 분석 유전자는 대장암에서 메틸화되는 것으로 확인된 신데칸2 유전자를 대상으로 하며

	EarlyTect™-GI Syndecan2 Methylation Assay 키트를 사용하여 분석한다. 상기에서 설명된 바이설파이트로 전환된 게놈 DNA를 실시간 PCR 실험에 사용한다. 실시간 PCR은 Rotor Gene Q real time PCR 장비(Qiagen)를 이용하여 최종 부피 20ul 로 한 다음 내부대조유전자인 COL2A1도 동시에 증폭한다. 신데칸2 유전자의 메틸화 정도는 증폭계수 (Ct)를 사용하여 측정한다. (6) 자료 분석 등록된 환자의 임상자료를 확보하여 성별, 나이, 조직학적 데이터를 분석한다. 수술 전 후 수집된 대변, 혈청, 혈장을 대상으로 실시간 PCR을 통해 메틸화 바이오마커 유전자의 메틸화를 정량적으로 분석하여 수술 전에 비하여 수술 후에 유의한 양적인 감소변화가 있는지를 관찰한다. 본 연구를 통해 얻은 인체유래물은 지침에 따라 인체자원은행에 보관되며 DNA 메틸화 시험 후 규정에 따라 안전하게 폐기한다.
학문발전 및 실용에의 기여도	대장암 진단용 바이오마커 후보 유전자인 신데칸2 의 DNA 메틸화를 대장암 수술환자의 수술 전 후 대변 및 혈액에서 확인하여 대장암 환자 선별검사로써 적용이 가능한지에 대한 임상 유효성을 기대할 수 있다.
연구결과물	논문(√), 학술저서(), 공연 또는 전시()

3. 참여연구원 현황 및 예산

□ 참여연구원 현황

(단위 : 명)

참여구분	연구책임자	공동연구원	보조연구원	계
인 원	1	2		3

□ 예산편성

(단위 : 천원)

비 목	예 산	세 부 내 역
인건비		* 계획서 제출시에는 예산총액만 작성 선정후 산학종합정보시스템에서 "참여연구원 신규신청서" 제출로 세부내역 작성
연구수당	3,000	* 3,000천원까지 개설가능
연구장비 및 재료비	5,000	검체 보관 용품 DNA 분리 kit (QIAamp Stool Mini Kit) DNA 메틸화 분석 kit (EZ DNA methylation-Gold kit) EarlyTect™-GI Syndecan2 Methylation Assay kit PCR 장비 (Rotor Gene Q real time PCR) 이용료 기타 시약
연구활동비	6,000	연구용 컴퓨터 구입 (삼성전자 DM500T7A-A57 1대, 삼성전자 모니터 S24D300 2대) 시험분석, 학회참가비, 논문게재수수료, 소모성 사무용품 외장하드 등
계	14,000	

지원안내사항(계획서작성, 연구비사용, 결과물제출)을 숙지한 후 상기의 학술연구과제 신청하며, 지원목적을 달성하지 못할 경우 연구자의 책무(반납 등)를 이행하겠습니다.

2018년 5 월 23 일

연구책임자 : 김진수 (서명 또는 인)

상기 연구자를 2018년도 학술연구과제 지원대상으로 선정하며, 확정시 선정기관으로서의 책무를 이행하겠습니다.

2018년 5 월 24 일

의학연구소장 : 전병화 (서명 또는 인)

충남대학교 산학연구본부장 귀하