



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0041750
(43) 공개일자 2016년04월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) A61K 31/711 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/574 (2013.01)
A61K 31/711 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0105139
(22) 출원일자 2015년07월24일
심사청구일자 2015년07월24일
(30) 우선권주장
1020140135769 2014년10월08일 대한민국(KR)
기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93
(72) 발명자
장수환
경기도 남양주시 경춘로1286번길 35, 1604동 704호(평내동, 상록데시앙)
(74) 대리인
위병갑

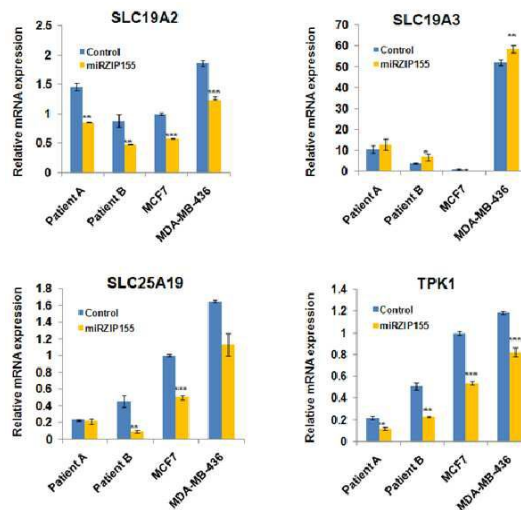
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 암 진단용 다중 바이오마커

(57) 요약

본 발명은 암 진단을 위한 바이오마커에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은 마이크로RNA-155(miR-155) 및 티아민(thiamine) 마커를 동시에 사용하여 정확성이 향상된 유방암 진단용 다중 바이오마커의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 바이오마커인 miR-155 및 티아민은 암 세포 내 발현 수준에 있어 서로 양의 상관관계를 나타냄을 확인하였다. 또한, 유방암 세포에서 miR-155의 발현억제로 인해 세포 증식이 억제되며, 티아민에 의해 다시 증식이 활성화되는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명의 miR-155 및 티아민은 항암제의 스크리닝 방법, 암의 진단을 위한 정보제공방법 등에 함께 사용되어 정확성을 향상시킬 수 있으며, 다른 질병 모델에서도 위 상관관계를 바탕으로 치료제 개발 등에 활용할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

C12Q 1/6886 (2013.01)

G01N 33/5011 (2013.01)

G01N 33/57415 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C1538

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 울산대학교 산학협력단

연구사업명 암정복추진연구개발사업

연구과제명 대사체 분석을 통한 난치성 유방암 발병과정에서의 microRNA-155 기능 규명

기 여 율 1/1

주관기관 국립암센터

연구기간 2013.05.01 ~ 2016.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

miR-155 및 티아민(thiamine)의 수준을 측정하는 물질을 포함하는, 암 진단 또는 예후 추정용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 miR-155는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 암은 유방암, 췌장암, 대장암 또는 폐암인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

티아민 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 티아민 억제제는 miR-155 억제제인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 miR-155 억제제는 서열번호 2로 이루어진 항-miR-155인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

시험관 내에서 miR-155를 이용하여 암 세포 내에서 티아민(thiamine)의 발현을 조절하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 방법은 서열번호 2의 항-miR-155 서열이 삽입된 벡터를 암 세포 내에 도입하여 miR-155의 발현을 억제함으로써 티아민의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

miR-155 및 티아민을 발현하는 암 세포에 시험물질을 처리하는 단계;

상기 시험물질이 miR-155 및 티아민의 발현에 미치는 영향을 분석하는 단계; 및

상기 시험물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 miR-155 및 티아민의 발현 수준을 감소시킨 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는, 암 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 10

피험자로부터 분리한 생물학적 시료로부터 miR-155의 발현량을 측정하는 단계;

상기 miR-155의 발현 수준을 정상 대조군 시료의 것과 비교하는 단계;

상기 miR-155의 발현 수준이 정상 대조군 시료의 것보다 증가한 피험자의 생물학적 시료로부터 티아민의 발현량을 측정하는 단계; 및

상기 티아민의 발현 수준이 정상 대조군 시료의 것보다 증가한 경우 암 의심 환자로 판정하는 단계를 포함하는, 암 진단을 위한 정보제공방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암 진단을 위한 바이오마커에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은 정확성이 향상된 유방암 진단용 다중 바이오마커로서 마이크로 RNA-155(miR-155) 및 티아민(thiamine)의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 마이크로 RNA (miRNA)는 19-23nt의 크기를 갖는 비암호화된(non-coding) RNA의 일종으로, 핵과 세포질 내에서 일련의 효소들에 의해 합성되는 것으로 알려져 있다[M. Sand, The pathway of miRNA maturation, Methods in molecular biology, 1095 (2014) 3-10]. 사람의 경우 약 1400개의 miRNA들이 알려져 있으며, 이들은 mRNA 기능의 60% 이상을 조절할 것으로 예상하고 있다[F. Akbari Moqadam, R. Pieters, M.L. den Boer, The hunting of targets: challenge in miRNA research, Leukemia, 27 (2013) 16-23]. 특히, 이들은 mRNA의 5' 또는 3' UTR (untranslated region)과 상호작용하여, 분해나 번역억제(translational repression)를 일으키는 것으로 알려져 있고, 지난 10년간의 광범위한 연구 결과에 따르면, 일부 miRNA들은 암을 포함한 특정 질병들과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다[J.K. Palanichamy, D.S. Rao, miRNA dysregulation in cancer: towards a mechanistic understanding, Frontiers in genetics, 5 (2014) 54]. 이들 중 miR-155는 B-세포 삽입 클러스터(B-cell Insertion Cluster, BIC)라 불리는 유전자로부터 전사되며, 그것은 바이러스의 삽입 부위로 알려져 있다[W. Tam, D. Ben-Yehuda, W.S. Hayward, bic, a novel gene activated by proviral insertions in avian leukosis virus-induced lymphomas, is likely to function through its noncoding RNA, Molecular and cellular biology, 17 (1997) 1490-1502]. 바이러스 삽입은 비암호화 유전자를 과발현시키며, 림프종을 유발하는 것으로 알려져 있다.

[0003] 한편, 티아민(비타민 B1)은 필수적인 수용성 비타민 중 하나이다. 티아민을 합성할 수 있는 박테리아나 식물과 달리, 포유류는 식이를 통해 티아민을 섭취하여야 한다. 티아민은 탄수화물 및 아미노산 대사에 필요한 것으로 알려져 있다[Z.V. Gorbach, et al, Characteristics of intracellular metabolism of carbohydrates and amino acids in animals with thiamine deficiency, Biokhimiia, 52 (1987) 42-52]. 특히, 그것은 TKT (transketolase), α-KGDH (alpha-ketoglutarate dehydrogenase) 및 PDH (Pyruvate dehydrogenase)와 같은 핵심적인 대사효소들의 필수 보조인자로 알려져 있다[C.K. Singleton, P.R. Martin, Molecular mechanisms of thiamine utilization, Current molecular medicine, 1 (2001) 197-207]. 티아민이 세포 안으로 흡수되기 위해서는 티아민 운반체(transporter)가 필요하며, SLC19A 패밀리에 속하는 운반체인 THTR1 (SLC19A2)과 THTR2 (SLC19A3)가 대표적인 운반체이다[A. Rajgopal, et al, SLC19A3 encodes a second thiamine transporter ThTr2, Biochimica et biophysica acta, 1537 (2001) 175-178]. 티아민 대사에서 중요한 또 다른 유전자는 티아민을 티아민 피로포스페이트(thiamine pyrophosphate, TPP)에 전달하는 TPK1 (thiamine pyrophosphokinase-1)이며, 이것은 조효소 활성을 갖는다[B. Deus, H.E. Blum, H. Holzer, Radiometric assay procedure for thiamine pyrophosphokinase activity, Analytical biochemistry, 27 (1969) 492-501]. 반면에, SLC25A19 유전자로부터 생성되는 티아민 피로포스페이트 전달자(thiamine pyrophosphate carrier, TPC)는, 미토콘드리아 막을 통해 TPP를 전달하여 피루베이트 탈수소화효소(pyruvate dehydrogenase) 및 알파-케토글루타레이트 탈수소화효소(alpha-ketoglutarate dehydrogenase)에 보조인자를 제공하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 그러나 아직까지 티아민 및 티아민 관련 유전자들과 암과의 관련성에 대해서는 자세히 연구 및 보고된 내용들이 없다.

[0005] 이에 본 발명자들은 암의 진단 및 치료를 위한 보다 효과적인 방법으로서, miR-155와 티아민을 함께 이용할 수 있음을 규명하였고, 특히 miR-155가 SLC19A2, SLC25A19 및 TPK1을 통해 티아민 대사를 조절한다는 사실을 밝히고, 암 세포에서 miR-155와 티아민의 수준에 대한 상관관계를 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 특허출원 2010-0093538

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 miR-155 및 티아민의 발현 수준을 측정하는 물질을 포함하는, 암 예후 추정용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 티아민 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 또한 본 발명의 또 다른 목적은 miR-155를 이용하여 암 세포 내에서 티아민(thiamine)의 발현을 조절하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 또한 본 발명의 또 다른 목적은 miR-155를 이용하여 암 세포 내에서 티아민의 활성을 측정하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 또한 본 발명의 또 다른 목적은 miR-155 및 티아민을 발현하는 유방암 세포에 시험물질을 처리하는 단계; 상기 시험물질이 miR-155 및 티아민의 발현에 미치는 영향을 분석하는 단계; 및 상기 시험물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 miR-155 및 티아민의 발현 수준을 감소시킨 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는, 암 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 또한 본 발명의 또 다른 목적은 피험자로부터 분리한 생물학적 시료로부터 miR-155의 발현량을 측정하는 단계; 상기 miR-155의 발현 수준을 정상 대조군 시료의 것과 비교하는 단계; 상기 miR-155의 발현 수준이 정상 대조군 시료의 것보다 증가한 피험자의 생물학적 시료로부터 티아민의 발현량을 측정하는 단계; 및 상기 티아민의 발현 수준이 정상 대조군 시료의 것보다 증가한 경우 암 의심 환자로 판정하는 단계를 포함하는, 암 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 miR-155 및 티아민(thiamine)의 수준을 측정하는 물질을 포함하는, 암 진단 또는 예후 추정용 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 miR-155는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 암은 유방암, 췌장암, 대장암 또는 폐암일 수 있다.
- [0016] 또한 본 발명은, 티아민 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 티아민 억제제는 miR-155 억제제인 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 miR-155 억제제는 서열번호 2로 이루어진 항-miR-155일 수 있다.
- [0019] 또한 본 발명은 시험관 내에서 miR-155를 이용하여 암 세포 내에서 티아민(thiamine)의 발현을 조절하는 방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 방법은 서열번호 2의 항-miR-155 서열이 삽입된 벡터를 암 세포 내에 도입하여 miR-155의 발현을 억제함으로써 티아민의 발현을 감소시키는 것일 수 있다.
- [0021] 또한 본 발명은, miR-155 및 티아민을 발현하는 암 세포에 시험물질을 처리하는 단계; 상기 시험물질이 miR-155 및 티아민의 발현에 미치는 영향을 분석하는 단계; 및 상기 시험물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 miR-155 및 티아민의 발현 수준을 감소시킨 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는, 암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0022] 나아가 본 발명은, 피험자로부터 분리한 생물학적 시료로부터 miR-155의 발현량을 측정하는 단계; 상기 miR-155

의 발현 수준을 정상 대조군 시료의 것과 비교하는 단계; 상기 miR-155의 발현 수준이 정상 대조군 시료의 것보다 증가한 피험자의 생물학적 시료로부터 티아민의 발현량을 측정하는 단계; 및 상기 티아민의 발현 수준이 정상 대조군 시료의 것보다 증가한 경우 암 의심 환자로 판정하는 단계를 포함하는, 암 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

발명의 효과

[0023] 본 발명의 바이오마커인 miR-155 및 티아민은 암 세포 내 발현 수준에 있어 서로 양의 상관관계를 나타냄을 확인하였다. 또한, 유방암 세포에서 miR-155의 발현억제로 인해 세포 증식이 억제되며, 티아민에 의해 다시 증식이 활성화되는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명의 miR-155 및 티아민은 항암제의 스크리닝 방법, 암의 진단을 위한 정보제공방법 등에 함께 사용되어 정확성을 향상시킬 수 있으며, 다른 질병 모델에서도 위 상관관계를 바탕으로 치료제 개발 등에 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 miR-155의 발현정도와 높은 상관관계를 나타낸 대사체를 생물정보학 기법을 이용하여 선정한 결과이다.

도 2는 형광현미경을 통해 본 발명의 일실시예에 따른 초기 유방암 세포(Patient A, Patient B)와 유방암 세포주(MCF7, MDA-MB-436)의 GFP 발현을 확인한 결과이다. 각각의 세포들에 대해 miRZIP155군(렌티바이러스 벡터를 통해 항-miR155 삽입)과 대조군으로 나누어져 있다.

도 3A는 본 발명의 일실시예에 따른 초기 유방암 세포(Patient A, Patient B)와 유방암 세포주(MCF7, MDA-MB-436)에 대한 RT-PCR 실험 결과이다.

도 3B는 본 발명의 일실시예에 따른 초기 유방암 세포(Patient A, Patient B)와 유방암 세포주(MCF7, MDA-MB-436)에 대한 루시페라제 활성 측정 결과이다.

도 4는 티아민을 조절하는 유전자들(SLC19A2, SLC19A3, SLC25A19, TPK1)의 발현 정도를 RT-PCR로 확인한 결과이다.

도 5는 miR-155와 상관관계를 보인 THTR1 (SLC19A2), TPC (SLC25A19), TPK1의 단백질 발현량을 웨스턴 블랏 분석으로 확인한 결과이다.

도 6은 LC-MS(Liquid chromatography-tandem mass spectrometry)를 사용하여 티아민의 양을 측정한 결과이다. 오른쪽 그림은 대조군/miRZIP155의 비율을 도식화한 것이다.

도 7은 트리플음성유방암 조직을 대상으로 RT-PCR 결과에 따라 miR-155의 발현량이 높은 그룹(H1-H15)과 낮은 그룹(L1-L15)으로 나뉜 결과이다.

도 8은 LC-MS로 miR-155의 발현량이 높은 그룹(H1-H15)과 낮은 그룹(L1-L15)의 티아민 양을 측정한 결과이다.

도 9는 항-miR-155 또는 티아민 처리에 따른 암 세포 증식속도 변화를 나타낸 그래프이다.

도 10은 유방암 세포를 대상으로 세포주기의 변화를 관찰하기 위한 7-AAD/BrdU assay 결과 그래프이다.

도 11은 티아민의 도입 및 대사에 관여하는 세가지 유전자를 조절하여 암세포내의 티아민 수준을 증가시키는 miR-155의 기작에 대한 도식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명은 마이크로RNA-155(miR-155) 및 티아민(thiamine)를 동시에 사용하여 정확성이 향상된 암 진단용 다중 바이오마커로서 용도를 제공한다. 이하 도면을 참조하여 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0026] 본 명세서에서 용어, "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)(예컨대, 전-전이성 또는 전이성 암 상태의 동정, 암의 단계 결정 또는 치료에 대한 암의 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.

[0027] 용어, "예후"는 암이 진단된 이후에 암의 완치 가능성, 치료 후 재발 가능성, 환자의 생존 가능성 등 암에 따른 환자의 각종 상태를 예측하는 것을 말한다. 암의 예후는 다양한 관점에서 추정될 수 있지만, 대표적으로 재발가

능성, 생존가능성, 무병생존가능성의 관점에서 판단될 수 있다. 본 발명의 목적상 예후는 암의 진단 이후 생존의 예후를 의미할 수 있다. 본 발명에서 제공하는 바이오 마커를 사용하면, 암 환자의 생존 예후를 보다 용이하게 예측할 수 있어, 고 위험군의 환자를 분류하거나, 추가 필요한 치료 방법의 사용 여부를 결정하는 데 활용할 수 있고, 이로써 암 발병 후의 생존율을 높이는 데 기여할 수 있다.

[0028] 용어, "추정"이란 환자가 치료법에 대해 선호적으로 또는 비선호적으로 반응하여 환자의 치료 후 생존할 여부 및/또는 가능성과 관련된다. 본 발명의 추정 방법은 암 발병 환자에 대한 가장 적절한 치료 방식을 선택함으로써 치료 결정을 하기 위해 임상적으로 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 추정 방법은 환자가 예를 들어 소정 치료제 또는 조합물, 외과적 개입, 화학요법 등의 투여를 비롯한 소정 치료 처방과 같은 치료 처방에 선호적으로 반응하는지를 확인하거나, 치료 처방 후 환자의 장기 생존이 가능한지 여부를 예측하는 데 사용될 수 있다.

[0029] 본 발명에서, 진단 및 치료할 수 있는 암의 종류로는 이에 제한되지는 않으나, 유방암, 췌장암, 대장암 또는 폐암일 수 있다.

[0030] "핵산"은 임의의 DNA 또는 RNA, 예를 들어, 조직 샘플에 존재하는 염색체, 미토콘드리아, 바이러스 및/또는 세균 핵산을 포함하는 의미이다. 이중가닥 핵산 분자의 하나 또는 두개 모두의 가닥을 포함하고, 무손상 핵산 분자의 임의의 단편 또는 일부를 포함한다.

[0031] "유전자"는 단백질 코딩 또는 전사시에 또는 다른 유전자 발현의 조절시에 기능적 역할을 갖는 임의의 핵산 서열 또는 그의 일부를 의미한다. 유전자는 기능적 단백질을 코딩하는 모든 핵산 또는 단백질을 코딩 또는 발현하는 핵산의 일부만으로 이루어질 수 있다. 핵산 서열은 엑손, 인트론, 개시 또는 종료 영역, 프로모터 서열, 다른 조절 서열 또는 유전자에 인접한 특유한 서열 내에 유전자 이상을 포함할 수 있다.

[0032] 본 발명에서 용어 "(바이오)마커, 진단하기 위한 마커 또는 진단 마커(diagnosis marker)"란 암이 발생한 세포 또는 조직을 정상 세포 또는 조직과 구분하여 관찰할 수 있는 물질로, 정상 세포에 비하여 암을 가진 세포에서 증가 양상을 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다.

[0033] 본 발명의 목적상, 상기 암 진단 마커 중 하나인 마이크로RNA-155(miR-155)는 서열번호 1의 염기서열(UUAAUGCUGAAUCGUGAUAGGGGU)로 구성된 것을 사용할 수 있다.

[0034] 또한 본 발명의 암 진단 마커 중 하나인 티아민(thiamine)은 3-((4-Amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl)-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazolium chloride으로 명명된 화합물 일 수 있다.

[0035] 보다 구체적으로, 본 발명은 암의 진단 또는 예후 추정용 마커로서 마이크로RNA-155(miR-155) 및/또는 티아민(thiamine)을 제공한다.

[0036] 본 명세서에 사용되는 "폴리뉴클레오타이드" (또는 뉴클레오타이드, 핵산)는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogues)도 포함한다.

[0037] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 특정의 아미노산 서열(폴리펩타이드)을 암호화하는 핵산 분자에 제한되지 않고, 특정 아미노산 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 아미노산 서열 또는 그에 상응하는 기능을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 것으로 해석된다.

[0038] 본 발명에 따른 암 진단 또는 예후 추정용 조성물은 miR-155 및 티아민의 수준을 측정하는 물질을 각각 포함하거나, 또는 miR-155 및 티아민의 수준을 포함하는 물질을 모두 포함할 수 있다. 상기 수준이란 시료 내에서 miR-155 또는 티아민의 발현량, 생성량 또는 활성정도를 말하는 것이다.

[0039] 구체적으로 본 발명에서 발현 측정 또는 검출이란, 정량 및/또는 정성 분석을 포함하는 것으로, 존재, 부존재의 검출 및 발현량 검출을 포함하는 것으로 이러한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 당업자라면 본원의 실시를 위해 적절한 방법을 선택할 수 있을 것이다.

[0040] 본 발명에서 상기 발현 수준을 측정하는 물질은 상기 miR-155의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질, 또는 양자 모두의 존재 여부, 존재량 및 존재 패턴 중에서 어느 하나 이상을 검출하는 물질일 수 있고, 또한 상기 티아민의 존재여부, 존재량 및 존재 패턴 중에서 어느 하나 이상을 검출하는 물질일 수 있다.

[0041] 본 발명은 miR-155를 핵산 수준 특히 mRNA 수준에서 정량적 및/또는 정성적 검출을 통해 암의 진단 또는 예후 측정에 사용될 수 있다. 본 발명에서 상기 miR-155의 발현 수준을 측정하는 물질은 상기 유전자의 뉴클레오타이드

드 서열, 그에 상보적인 서열, 상기 뉴클레오타이드의 단편 및 그에 상보적인 서열로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브, 앵타머 및 안티센스 중 어느 하나 이상일 수 있다.

[0042] 일례로, 상기 유전자의 mRNA의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 RT-PCR로 측정하기 위하여, 상기 유전자의 mRNA에 특이적인 프로브 및/또는 프라이머쌍을 포함한다. 프라이머 또는 프로브는 주형과 상보적으로 결합할 수 있고 역전사효소 또는 DNA 중합효소가 주형의 복제를 개시할 수 있도록 하는 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열을 의미한다. 본원에 사용되는 상기 유전자 발현 측정 물질은 신호검출을 위해 발색, 발광 또는 형광물질과 같은 것으로 표시될 수 있다. 일례로, mRNA 검출을 위해 노던블랏 또는 역전사 PCR (중합효소연쇄반응)이 사용된다. 후자의 경우 검체의 RNA를 특히 mRNA를 분리한 후, 이로부터 cDNA를 합성한 후, 특정 프라이머, 또는 프라이머 및 프로브의 조합을 사용하여, 검체 중의 특정 유전자를 검출하는 것으로, 특정 유전자의 존재/부존재 또는 발현량을 결정할 수 있는 방법이다.

[0043] 또한 본 발명에서 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 물질은 miR-155 유전자가 암호화하는 단백질, 또는 상기 유전자가 전사하는 전령 RNA(mRNA)의 결합체의 존재 여부, 존재량 및 존재 패턴 중에서 어느 하나 이상을 검출하는 물질일 수 있다.

[0044] 본 발명에서 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 물질은 당해 분야에서 공지된 다양한 유전자(바이오 마커) 검출 방법에 사용되는 물질을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 역전사 중합효소연쇄반응, 경쟁적 중합효소연쇄반응, 실시간 중합효소 연쇄반응, Nuclease 보호 분석(RNase, S1 nuclease assay), in situ 교잡법, DNA 마이크로어레이 이용법, 노던 블랏, 웨스턴 블랏, ELISA(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), 방사선 면역분석법, 면역 확산법, 면역 전기영동, 조직 면역염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS, 질량분석법(Mass spectrometry) 및 단백질 마이크로어레이 이용법 중에서 어느 하나 이상의 방법으로 유전자 발현을 측정하는 검출시약일 수 있다.

[0045] 또한, 단백질 발현수준 측정이란 암을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 암 마커 유전자로부터 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 바람직하게는, 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, 엘라이자(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로켓(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Flow Cytometry, FACS), 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0046] 또한 본 발명은 티아민 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0047] 암 치료를 위한 새로운 치료제를 발굴하던 중, 본 발명자들은 암 세포내에서 티아민의 발현양이 정상 세포의 수준에 비해 현저하게 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었고, 나아가 티아민의 발현 또는 활성을 억제할 경우, 암의 증식이 억제됨을 확인할 수 있었다.

[0048] 뿐만 아니라, 본 발명에서는 이러한 티아민을 직접으로 조절할 수 있는 조절자가 miR-155라는 것을 최초로 규명하였는데, miR-155의 억제제가 티아민을 억제할 수 있음을 확인하였고 본 발명의 일실시예에서는 티아민의 억제제로서 서열번호 2로 이루어진 항-miR-155를 사용하였다.

[0049] 즉, 본 발명의 일실시예에 따르면, miR-155의 억제제를 처리한 경우, 티아민의 발현 또는 활성이 감소됨을 확인할 수 있었다.

[0050] 또한, miR-155가 억제된 암세포주에 티아민을 투여한 경우, miR-155 억제에 따른 항암활성이 일부 회복되는 것으로 나타났다.

[0051] 따라서 본 발명자들은 이러한 결과를 토대로 miR-155와 티아민을 함께 억제한다면 보다 완벽하게 항암 활성을 유도할 수 있음을 알 수 있었고, miR-155와 티아민의 발현 정도를 동시에 분석할 경우, 암 진행 정도, 암 예후 정도에 대한 진단을 miR-155 또는 티아민 단독만 분석하는 경우에 비해 정확도를 더욱 향상시킬 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[0052] 그러므로 본 발명은 시험관 내에서 miR-155를 이용하여 암 세포 내에서 티아민(thiamine)의 발현을 조절하는 방법을 제공할 수 있으며, 상기 방법은 티아민이 발현되는 세포주에 miR-155의 억제제를 처리하는 과정을 통해 수행될 수 있다.

- [0053] 본 발명의 일실시예에서는 miR-155 서열번호 2의 항-miR-155 서열이 삽입된 벡터를 암 세포 내에 도입하여 miR-155의 발현을 억제함으로써 티아민의 발현을 감소시킬 수 있었다.
- [0054] 또한, 본 발명은 miR-155 및 티아민을 발현하는 유방암 세포에 시험물질을 처리하는 단계; 상기 시험물질이 miR-155 및 티아민의 발현에 미치는 영향을 분석하는 단계; 상기 시험물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 miR-155 및 티아민의 발현 수준을 감소시킨 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는, 암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0055] 본원에서 ‘생물학적 시료’란 바이오 마커 검출이 가능한 하나 이상의 성분을 포함하는 물질 또는 물질의 혼합물을 일컫는 것으로 생물체, 특히 인간 유래의 세포, 조직 또는 체액, 예를 들면 전혈, 뇨, 혈장, 및 혈청을 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 또한 생물체에서 직접적으로 유래된 것은 물론 인 비트로에서 배양된 세포 또는 조직을 포함한다. 본원에 따른 암 바이오 마커의 검출을 위해 다양한 시료가 사용될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다. 한 구현예에서는 뇨, 전혈, 혈청 및/또는 혈장이 사용될 수 있다. 다른 구현예에서는 암이 발생한 또는 발생이 의심되는 또는 발생가능성이 있는 생물체에서 수득한 조직/세포 또는 인비트로 세포 배양물이 사용될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다. 또한 상기 혈액, 세포 또는 조직의 분획 또는 유도물을 포함하는 것이다. 세포 또는 조직을 이용하는 경우, 세포 자체 또는 세포 또는 조직의 용해물이 사용될 수 있다.
- [0056] 본 발명에 따른 상기 암 진단 또는 예후 추정 방법에서의 miR155 및 티아민의 수준 측정은 당해 분야에서 공지된 다양한 핵산/단백질에 대한 정량/정성 측정 방법을 사용할 수 있다. 일례로, 역전사 중합효소연쇄반응, 경쟁적 중합효소 연쇄반응, 실시간 중합효소 연쇄반응, Nuclease 보호 분석(RNase, S1 nuclease assay), in situ 교잡법, DNA 마이크로어레이 이용법, 노던 블랏, 웨스턴 블랏, ELISA(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), 방사선 면역분석법, 면역 확산법, 면역 전기영동, 조직 면역염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS, 질량분석법(Mass spectrometry) 및 단백질 마이크로어레이 이용법 중에서 어느 하나 이상의 방법을 사용할 수 있으며, 티아민의 수준을 측정하는 방법은 LC-MS와 같이 화합물을 분석할 수 있는 방법이라면 모두 사용 가능하다.
- [0057] 본 발명에 따른 상기 암 진단 또는 예후 추정 방법에서 상기 miR155 및 티아민의 발현 수준 측정 결과를 대조군에 대한 측정 결과와 대비하여 암을 진단하거나 예후를 추정할 수 있다. 또는 미리 결정된 기준치(cut-off) 값과 대비하여 암을 진단하거나 예후를 추정할 수 있다. 대조군 또는 참조군으로는, 음성 대조군으로 정상 시료, 또는 암에 걸린 후 치료된 환자 유래의 시료, 양성 대조군으로 본원에 따른 마커 이외에 방법으로 암으로 판정된 환자 유래의 시료를 사용할 수 있다. 일례로, 정상인 유래의 시료, 암 판정 환자에서 채취한 정상 조직 시료, 암으로 판정 후 치료를 받은 환자 유래의 시료가 대조군 또는 참조군으로 사용되어, 수득된 프로파일의 비교에 사용될 수 있다. 일례로, 본 발명에 따른 암 바이오 마커인, miR-155 및 티아민thiamine 유전자는, 정상 세포 및 조직에 비하여 암 세포 및 조직에서 발현이 증가하고, 두 유전자 중 어느 하나 또는 두 유전자 모두 과 발현된 군에서 예후가 좋지 않다고 추정할 수 있다.
- [0058] 대조군과 시료를 이용한 시험군 사이의 마커 프로파일의 비교에는 당해 분야에서 공지된 다양한 방법이 사용될 수 있다. 예를 들면 발현 프로파일의 디지털 영상 비교, 발현 데이터에 대한 DB를 이용한 비교를 참조할 수 있다. 본원에 따른 마커 검출을 통하여 수득된 프로파일은 공지된 데이터 분석방법을 이용하여 처리될 수 있다. 일례로 nearest neighbor classifier, partial-least squares, SVM, AdaBoost 및 clustering-based classification 방법이 사용될 수 있다. 또한 본 발명에 따른 간암 진단 및 예후 추정 방법의 유의성을 확인하기 위하여, 다양한 통계처리 방법이 사용될 수 있다. 통계적 처리 방법으로 일 구현예에서는 logic regression 방법이 사용될 수 있다. 또한, 통계처리를 통해 암으로 진단하기 위해 시험물질과 대조군간의 유의한 차이에 관한 신뢰수준을 결정할 수 있다. 통계 처리에 사용되는 원 데이터는 각 마커에 대하여 이중, 삼중 또는 다중으로 분석된 값이다. 이러한 통계적 분석 방법은 바이오 마커는 물론, 임상 및 유전적 데이터의 통계적 처리를 통하여 임상 적으로 유의한 판단을 하는데 매우 유용하다.
- [0059] 본 발명에 따른 암 진단 및 예후 추정 방법은 암의 심각성 정도를 판단하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 양성 대조군 및 음성 대조군의 프로파일과 비교하여, 경증, 중간 정도 또는 중증으로 평가될 수 있다. 나아가 일정한 암 집단에 대한 마커 프로파일 분석을 수행하여, 프로파일 결과를 근거로 일정 기준에 따라 분류할 수 있다.
- [0060] 본 발명에 따른 암 진단 및 예후 추정 방법은 특정 기간 동안 예를 들어 1년에 걸쳐 수차례 수행될 수 있으며, 발현 패턴의 변화 추이 모니터링에 사용될 수 있다. 마커의 종류에 따라 발현의 증가 또는 감소를 암의 상태와 연관지을 수 있다. 동일 대상체에 대한 종전의 검사수치 또는 대조군의 수치와 비교하여, HCC 발병, 진행, 악화 등의 판단에 사용될 수 있다. 시간의 경과에 따른 바이오 마커의 변화를 근거로 간암 진행을 막기 위한 예방적

조치를 취할 수 있다. 나아가 암 확진을 위해, 기존의 암 진단 방법인 초음파, 컴퓨터단층촬영(computerized axial tomography(CT scan)) 또는 자기공명영상(magnetic resonance imaging (MRI)) 검사 등과 함께 사용될 수 있다.

[0061] 또한, 본 발명은 암의 진단 또는 예후 추정에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 인간의 생물학적 시료에 있는 miR-155의 발현 수준 및 티아민의 수준을 측정하는 단계를 통해 암 진단 또는 예후 추정용 바이오 마커를 검출하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 상기 암 진단 또는 예후 추정용 바이오 마커를 검출하는 방법에서의 유전자의 발현 수준 측정은 당해 분야에서 공지된 다양한 핵산/단백질에 대한 정량/정성 측정 방법을 사용할 수 있다. 일례로, 상기 상술한 바와 같이 역전사 중합효소연쇄반응, 경쟁적 중합효소 연쇄반응, 실시간 중합효소 연쇄반응, Nuclease 보호 분석(RNase, S1 nuclease assay), in situ 교잡법, DNA 마이크로어레이 이용법, 노던 블랏, 웨스턴 블랏, ELISA(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), 방사선 면역분석법, 면역 확산법, 면역 전기영동, 조직 면역염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS, 질량분석법(Mass spectrometry) 및 단백질 마이크로어레이 이용법 중에서 어느 하나 이상의 방법을 사용할 수 있으며 또한 LC-MS와 같이 화합물을 측정할 수 있는 방법을 사용할 수 있다.

[0062] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0063] <실시예 1>

[0064] 실험재료 및 방법

[0065] <1-1> 원발성 유방암 세포의 유도(derivation)

[0066] 유방암 환자 2명으로부터 원발성 유방암 조직을 획득하였다(아산병원, 서울). 암 조직을 잘게 자르고 3형 콜라게네이즈(collagenase type 3)를 20 시간 동안 처리하였다. 원심분리 후, 세포들을 콜라젠-코팅된 플레이트에 접종하였다. 5% FBS (Hyclone), hEGF (200 ng/ml, Gibco, Gaithersburg, MD, USA), 하이드로코르티솔(Hydrocortisol) (10 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 트랜스페린 (transferrin) (10 mg/ml, Sigma) 및 페니실린/스트렙토마이신 (Hyclone)을 첨가한 RPMI1640 배지(Hyclone, Logan, UT, USA)에서 원발성 유방암 세포를 배양하였다. 이와 같이 두 사람으로부터 수득하여 배양한 유방암 세포를 각각 "Patient A" 및 "Patient B"로 명명하였다.

[0067] <1-2> 세포배양, 트랜스펙션 및 바이러스 감염

[0068] 사람 유방암 세포주인 MCF7 (ATCC, Manassas, VA, USA), MDA-MB-436 (ATCC) 및 293TN 세포(System Biosciences, SBI, PA, USA)를 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 함유된 DMEM 배지(Hyclone)에서 배양 및 유지시켰다. 이후 각 세포주내에서 miR-155를 녹다운시키기 위하여, 항-miR-155 서열(miRZIP155)(서열번호2 :5' -ACCCCTATACAATTAGCATTAA-3') 또는 대조군 서열(pSIH-H1-siLuc-copGFP)(SBI사; Cat No. SI501A-1)을 포함한 렌티바이러스 컨스트럭트(construct)를 사용하였다. 렌티바이러스 생산은 SBI 제조사의 설명에 따라 진행하였다. 리포펙타민(lipofectamine) 2000 (Invitrogen)을 사용하여 293TN 세포들을 pPACK 플라스미드, 대조군 또는 miRZIP155 렌티바이러스 벡터로 각각 트랜스펙션시켰다. 최적의 플라스미드 발현을 녹색형광단백질(GFP)의 형광으로 추적하였다. 대조군 또는 miRZIP155-함유 렌티바이러스 입자들을 모아서 MCF7, MDA-MB-436 및 두 개의 사람 원발성 유방암 세포들("Patient A" 및 "Patient B")에 감염시켰다. 형질도입 24시간 후에, 위 세포들을 항생제인 푸로마이신(Puromycin) (1.5 mg/ml; Sigma) 선택배지에서 7일간 배양하였다. 이후 현미경(Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany)으로 트랜스펙션시킨 세포들의 사진을 찍었다.

[0069] <1-3> 정량적 RT-PCR (qRT-PCR)

[0070] 제조사의 설명에 따라 트리졸(TRizol) (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 세포들로부터 RNA를 추출하였다. cDNA 합성을 위해 1 mg의 총 RNA를 사용하였다(Superscript First-Strand Synthesis System; Invitrogen). SLC19A2, SLC19A3, TPK-1 및 SLC25A19의 발현수준을 LightCycler 480 II (Roche Applied

Sciences, Indianapolis, IN, USA)에서 SYBR Green PCR 키트로 측정하였는데, 각 유전자의 발현 수준 측정을 위해 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다:

[0071] 정방향 프라이머(서열번호3): 5'-CTAGCCTGCAGGTATTCAAATATTCCACAGA-3'

[0072] 역방향 프라이머(서열번호4): 5'-ATCCGGCCGGCCTGAAGATGGTTATGAACATA-3'

[0073] 이때, 사람 리보솜 단백질 유전자인 *RpL13a*를 대조군 유전자로 사용하였다. "비교(comparative) 2-(Δ CT)법"을 사용하여 폴드 발현(fold expression)을 계산하였다. miR-155의 정량적 분석을 위하여, 트리졸-분리된 RNA를 miScript 11 RT 키트(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 역전사시키고, LightCycler 480 II에서 miScript SYBR Green PCR 키트(Qiagen)로 측정하였다. 분석된 miRNAs의 사이클 임계(Ct) 값을 비암호화된, 소 핵 RNA 분자(small nuclear RNA molecule) U6 (RNU6)로부터 얻은 Ct 값에 표준화하였다.

[0074] <1-4> 웨스턴 블랏 분석

[0075] 웨스턴 블랏을 이용하여 THTR1, TPC, 및 TPK-1 단백질의 발현을 측정하였다. 공지된 방법에 따라 세포 용해물을 준비하고 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다[S. Chang, et al, Expression of human BRCA1 variants in mouse ES cells allows functional analysis of BRCA1 mutations, The Journal of clinical investigation, 119 (2009) 3160-3171]. THTR1 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), TPC (1:1000, Abgent, San Diego, CA, USA) 및 TPK-1 (1:1000, Abcam, Cambridge, UK)로 막을 블랏팅시켰다. 로딩(loading) 대조군으로, 항-베타-액틴 (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology) 항체를 사용하였다.

[0076] <1-5> 리포터 컨스트럭션(reporter construction) 및 루시페라제 어세이(luciferase assay)

[0077] miR-155의 3'-UTR 서열을 pMIR-REPORTTM 루시페라제 벡터(Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)에 도입하였다. 리포펙타민 2000(Invitrogen)을 사용하여, MCF, MDA-MB-436 및 두 개의 사람 원발성 유방암 세포들("Patient A" 및 "Patient B")을 빈 벡터 또는 miR-155 3'-UTR 루시페라제 벡터를 포함하는 플라스미드 DNA 2mg으로 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션 48시간 후에 세포들을 용해시키고, Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega Corp, Madison, WI, USA) 및 Victor Luminometer(Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA)를 이용하여 루시페라제 활성을 측정하였다.

[0078] <1-6> 인 비트로(*in vitro*) BrdU/7-AAD 삽입 어세이

[0079] 과량의 티아민에 의해 세포성장이 증가하는지 알아보기 위해, miRZIP155-발현 세포에 티아민(1.98 mg/ml, DMEM 내 티아민의 100배, Sigma)을 처리하였다. 24시간 후에, 대조군, miRZIP155, 및 티아민 처리된 miRZIP155를 가진 세포들에 10 μ m의 BrdU를 24시간 동안 가하였다. 인 비트로(*in vitro*) BrdU 키트(BD Pharmingen, San Diego, CA)를 제조사의 설명에 따라 사용하였다. 즉, 세포를 에탄올-함유 고정 버퍼로 고정시키고, Perm/Wash 버퍼로 세척하였다. BrdU 염색을 위해, 세포를 FITC-연결된 항-BrdU 항체로 실온에서 20분간 표지하였다. 배양 후에, 세포를 세척하고 FACS 염색 버퍼로 재현탁하였다. 마지막으로, BrdU-처리된 세포들을 AccuriFlow Cytometry (BD Biosciences)를 사용하여 분석하였다. GFP 세포의 비율은 CFlow 소프트웨어를 사용하여 계산하였다.

[0080] <1-7> 세포 생존율 측정

[0081] 세포 증식을 관찰하기 위하여, 대조군, miRZIP155 및 티아민 처리된 miRZIP155를 가진 세포를 96-웰 플레이트에서 배양하였다. 24시간 후에, alamarBlue시약(Invitrogen)을 배양 배지 내의 세포에 직접 첨가하였다. 추가로 4시간 동안 세포를 배양하고 세포 생존율을 측정하였다. 세포 생존율 측정은 마이크로플레이트 형광 분광광도계(GenTeksBiosciences, Inc., San-Chong, Taipei)를 이용한 형광 측정으로 이루어졌다.

- [0082] <1-8> 대사물질 분석을 위한 샘플 준비
- [0083] 대사물질 측정을 위해, 1백만 개의 사람 지방암 세포들을 메탄올로 용해시키고, 수용액 상에 CHCl_3 및 H_2O 를 가하여 티아민을 추출하였다. 조직 준비를 위하여, 100 mg의 사람 지방암 조직을 가위를 이용해 작은 조각으로 자르고, 600 μl 의 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2/1, v/v)를 조직에 가하였다. 상기 샘플을 Tissue Lyzer (Qiagen)를 이용하여 균질화하고, 원심분리 후에 상층액을 수득하였다. 300 μl 의 H_2O 를 상층액에 가하였다. 샘플 용액을 격렬히 교반(vortex)하고, 원심분리한 뒤 수용액 층을 수거하였다. 세포 및 조직으로부터 준비한 샘플 용액을 진공 원심분리를 사용하여 건조시킨 후, 분석 전까지 -20°C 에서 보관하였다. LC-MS/MS 분석에 앞서 건조된 물질을 50 % ACN으로 재구성(reconstitute)하였다.
- [0084] <1-9> LC-MS/MS (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry)
- [0085] 1290 HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), Qtrap 5500 (AB SCIEX, Framingham, MA, USA) 및 친수성 상호작용 정상 상 컬럼(hydrophilic interaction normal phase column) (Zorbax HILIC plus 3.5 μm , 100 $\times$ 2.1 mm)을 구비한 LC-MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry) 시스템을 사용하였다. 티아민 분석을 위한 분리 기울기(separation gradient)는 이동상 A ($\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ (50/50,v/v) 내 10 mM 포름산 암모늄(ammonium formate)) 및 이동상 B ($\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ (90/10,v/v) 내 10 mM 포름산 암모늄)를 사용하였고, 400 μl /분 및 25 $^\circ\text{C}$ 조건에서 진행하였다. 분리 기울기(separation gradient)는 다음과 같다: 40% A에서 3분, 40 내지 90% A에서 0.1분 홀드(hold), 90% A에서 12분, 90 내지 40% A에서 0.1분 홀드, 그 후 40% A에서 5분간 홀드. 양이온 모드에서 SRM (selected reaction monitoring) 모드를 사용하였고, 정량(quantification)을 위해 티아민에 대한 특정 트랜지션(transition) ($\text{Q1} = m/z$ 265, $\text{Q3} = m/z$ 122)에 대응되는 추출 이온 크로마토그램을 사용하였다. 티아민에 대한 캘리브레이션(calibration) 범위는 0.1-1000 nM이었다($r^2 \geq 0.99$).
- [0086] <1-10> 통계분석
- [0087] 모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차(SEM)로 나타났다. 두 개의 그룹 사이의 비교는 t -테스트를 사용하였다. $P < 0.05$ 의 값을 통계적으로 유의미한 것으로 간주하였다.
- [0088] <실시예 2>
- [0089] 생물정보학을 이용한 miR-155 관련 대사체의 선정
- [0090] 기존에 연구되어진 NCI 60개 암세포주에서 miR-155의 발현 정도가 높은 그룹과 낮은 그룹으로 나누어, miR-155의 발현 정도와 높은 상관관계가 있는 대사체를 선정하였고, 6가지 대사체들이 miR-155와 높은 상관관계를 보였다(도 1 및 표 1 참조). 이 중에서 본 발명자들은 miR-155와 티아민의 조절관계에 대한 연구를 하기에서 보다 구체적으로 수행하였다.
- [0091] [표 1]

[0092] miR-155와 높은 상관관계를 보이는 대사체

ID	Metabolite	p-value
47	glycodeoxycholate/glycochenodeoxycholate	0.013105
66	IMP	0.0147
129	fru-1,6-DP/fru-2,6-DP/glc-1,6-DP	0.019065
24	N-carbamoyl-beta-alanine	0.020372
111	uracil	0.048977
101	thiamine	0.049499

[0093]

[0094] <실시예 3>

[0095] 렌티바이러스 벡터를 이용한 유방암 세포내 miR-155의 발현 억제

[0096] RT-PCR과 루시퍼라제 활성 측정을 통해 항-miR155(서열번호 2)를 발현하는 유방암 세포 내에서 miR-155 발현을 확인하고자 유방암 환자 샘플에서 얻은 초기 유방암 세포 (Patient A, Patient B)와 유방암 세포주 (MCF7, MDA-MB-436)를 가지고 대조군과 항-miR-155가 발현되는 miRZIP155군으로 나눠 실험을 진행하였다. 형광현미경을 통해 각 세포들이 GFP를 잘 발현하는 것을 확인하였다(도 2 참조).

[0097] <3-1> RT-PCR을 통한 유방암 세포내 miR-155 발현 확인

[0098] 유방암 세포내 miR-155 발현을 RT-PCR로 확인하고자, 대조군 세포와 항-miR155를 발현하는 세포에서의 miR-155 정량을 Qiagen 사의 miscript RT system을 도입하여 측정하였다. miscript RT를 수행한 뒤 PCR은 CYBR green 을 이용하여 real-time으로 실험함으로써 시료내의 miRNA 양을 정확하게 정량하였다.

[0099] RT-PCR 실험결과, 유방암 세포들을 대상으로 수행한 대조군과 항-miR155(miRZIP155)가 도입된 군에서의 miR-155 발현정도를 비교한 결과, 항-miR155가 도입된 군의 경우 세포 내에서 miR-155의 발현정도가 대조군에 비해 많이 감소되어 있는 것을 알 수 있었다(도 3A 참조).

[0100] <3-2> 루시퍼라아제 활성 측정을 통한 유방암 세포내 miR-155 발현 확인

[0101] 항-miR155를 유방암 세포에 도입 후 대조군에 비하여 어느 정도 miR-155발현이 저해되었는지를 루시퍼라아제 활성 측정을 통해 분석하였다.

[0102] 항-miR-155가 함유된 루시퍼라제 벡터를 트랜스팩션 한 결과, 대조군에 비하여 항-miR155가 들어간 그룹에서 루시퍼라제 활성이 증가하였다(도 3B 참조).

[0103] <실시예 4>

[0104] miR-155와 티아민의 상관관계 분석

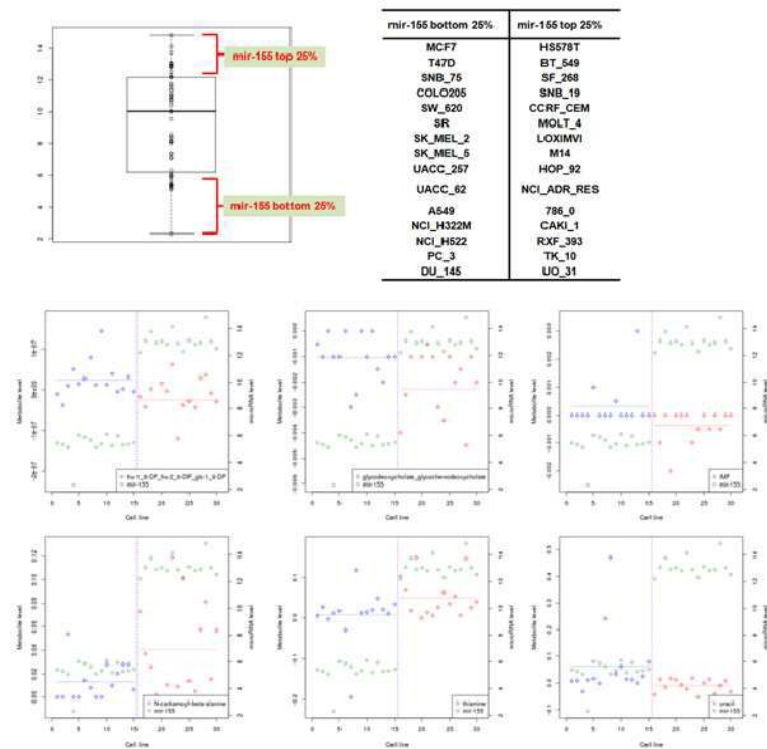
[0105] <4-1> miR-155 억제에 따른 티아민 조절 유전자, 단백질 및 대사체의 발현 변화 확인

[0106] 티아민을 조절하는 유전자들(SLC19A2, SLC19A3, SLC25A19, TPK1)의 발현 정도를 RT-PCR로 확인했을 때, SLC19A3를 제외한 모든 유전자의 발현이 감소하는 경향을 나타냈으며(도 4 참조), 이는 항-miR155로 인한 miR-155의 발현량 감소와 관련이 있는 것으로 볼 수 있다. 위 RT-PCR 결과를 바탕으로 miR-155와 상관관계를 보인 THTR1 (SLC19A2), TPC (SLC25A19), TPK1의 단백질 발현량을 웨스턴 블랏 분석으로 확인한 결과, RT-PCR과 같은 경향으로 항-miR155에 의해 3가지 단백질의 발현량이 줄어든 것을 확인할 수 있었다(도 5 참조). 또한, LC-MS(Liquid chromatography-tandem mass spectrometry)를 사용하여 티아민의 양을 측정한 결과, 대조군에 비하여 항-miR155를 처리한 그룹에서 티아민의 양이 줄어든 것을 확인하였다(도 6 참조).

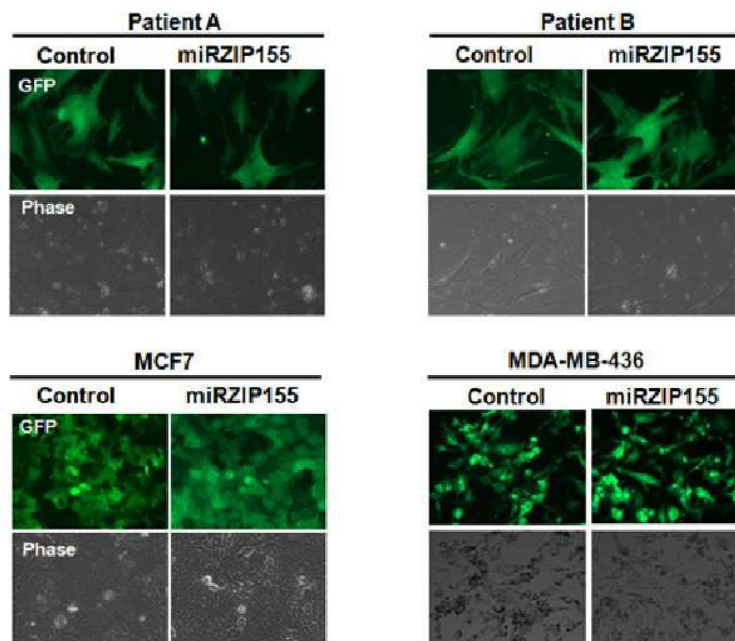
- [0107] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 miR155와 티아민을 억제할 수 있는 물질을 사용할 경우 보다 효과적으로 암을 억제할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0108] <4-2> 트리플음성유방암 샘플 내 티아민의 양 측정
- [0109] 트리플음성유방암 조직 80개로부터 Qiagen사의 miRNeasy FFPE 키트를 이용하여 RNA를 추출하였고, miR-155의 정량을 위하여 Qiagen사의 miScript RT system을 사용하였다. miRNA 특이적 RT를 수행 후 PCR은 CYBR green을 이용하여 실시간으로 실험함으로써 시료 내의 miRNA 양을 정확하게 정량하였다. RT-PCR 결과에 따라 miR-155의 발현량이 높은 그룹(H1-H15)과 낮은 그룹(L1-L15)의 조직을 나누고, 각 그룹 당 15개의 샘플을 마련하였다. MDA-MB-436 유방암 세포주가 miR-155의 발현이 높은 것으로 알려져 있어, 이 세포주를 기준으로 miR-155 이 발현량이 높은 그룹과 낮은 그룹을 분리하였다(도 7 참조).
- [0110] LC-MS로 티아민의 양을 측정한 결과, miR-155의 발현량이 높은 그룹 (H1-H15)은 낮은 그룹 (L1-L15)과 비교해 볼 때 티아민의 양도 전체적으로 높은 것을 확인하였다(도 8 참조). 이는 트리플음성유방암 샘플에서도 miR-155에 의해 티아민이 조절된다는 것을 알 수 있었다.
- [0111] 위와 같이 4가지 유방암 세포에서 miR-155을 억제할 경우 티아민의 양도 감소되는 것을 확인하였고, 트리플음성 유방암 샘플에서 miR-155가 높은 그룹에서 티아민의 양이 전체적으로 증가함을 재확인하였으므로, 전체적인 결과를 볼 때 miR-155에 의해 티아민이 조절된다는 것을 알 수 있었다.
- [0112] <실시예 5>
- [0113] **miR-155 발현 억제에 의한 암 세포 증식 감소**
- [0114] 유방암 세포에서 대조군과 항-miR155을 처리했을 때 암 세포의 증식 속도 또는 암 세포가 얼마나 증식되었는지를 알아보기 위하여 Invitrogen사의 alamar blue를 사용하여 세포의 대사작용에 따라 얼마나 빨간 형광빛을 내는지를 흡광도 기계를 사용하여 분석하였다. 또한 BDparMigen사의 BrdU를 사용하여 다른 방법으로 증식이 얼마나 이루어졌는지를 측정하였다. BrdU가 세포 내의 새로 만들어지는 DNA에 결합하게 되고, 항-BrdU 형광항체를 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다.
- [0115] 4가지 유방암 세포에서 대조군 그룹, 항-miR155가 처리된 그룹, 항-miR155에 티아민을 처리한 그룹으로 나누어 alamar blue와 BrdU assay를 수행한 결과, 항-miR-155를 처리한 그룹에서의 증식속도가 현저히 떨어졌으며, 이 그룹에 티아민을 24시간 처리하게 되면 세포의 증식속도가 약간 만회됨을 확인하였다(도 9 참조).
- [0116] 또한, 유방암 세포에서 대조군과 항-miR155를 처리했을 때 세포주기의 변화를 관찰하기 위해 BrdU/7-ADD double staining을 실시하였고 그 결과, 도 10에서 보는 바와 같이, BrdU/7-ADD 양성 세포의 비율이 낮아짐을 통해 miR-155의 저해는 세포주기의 진행을 방해하고, 이러한 저해는 티아민을 세포배양배지에 첨가하였을 경우 유의미하게 회복되는 것을 확인하였다. 따라서 티아민이 기능적으로 유방암 세포의 증식을 조절하는 인자임을 알 수 있었다.
- [0117] 종합적으로, 상기의 실시예 1 내지 5를 통해 miR-155는 티아민의 도입 및 대사에 관여하는 세가지 유전자를 조절하여 암세포 내의 티아민 수준을 증가시키고, 이는 암세포의 에너지 대사과정을 촉진하여 세포의 성질을 가속화시킴을 확인할 수 있었다(도 11 참조). 따라서 이러한 결과를 토대로 볼 때, miR-155과 티아민을 동시에 억제하는 것이 보다 효과적으로 암의 성장과 활성을 억제할 수 있다는 것을 알 수 있었다.
- [0118]
- [0119] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

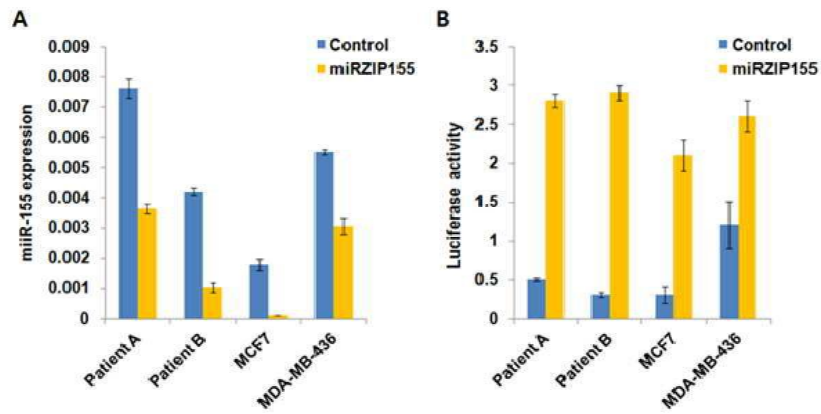
도면1



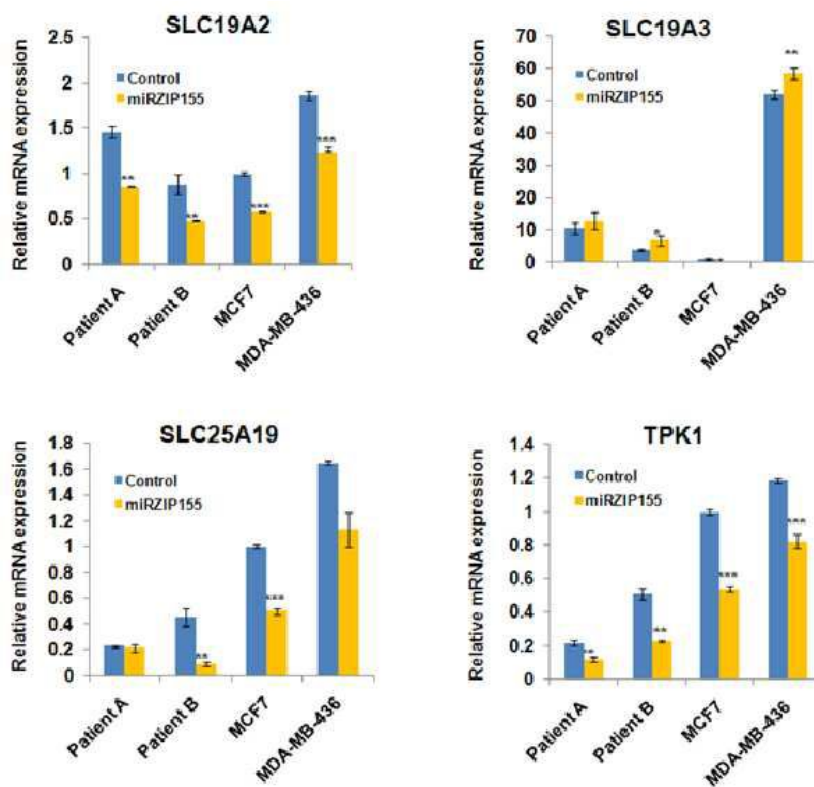
도면2



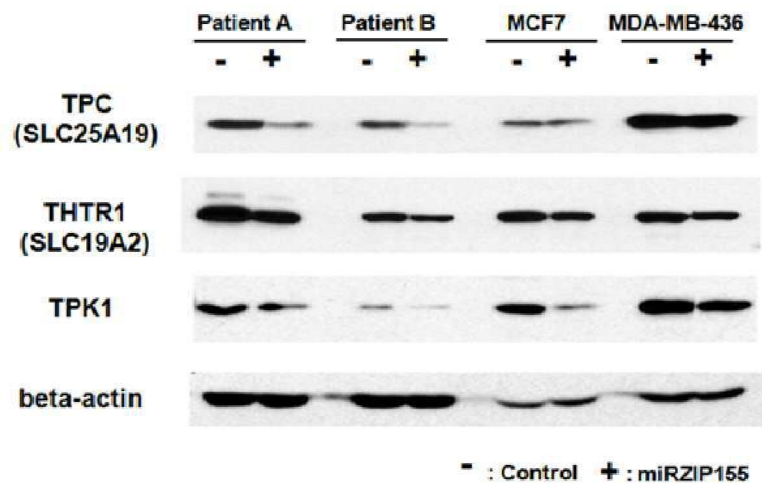
도면3



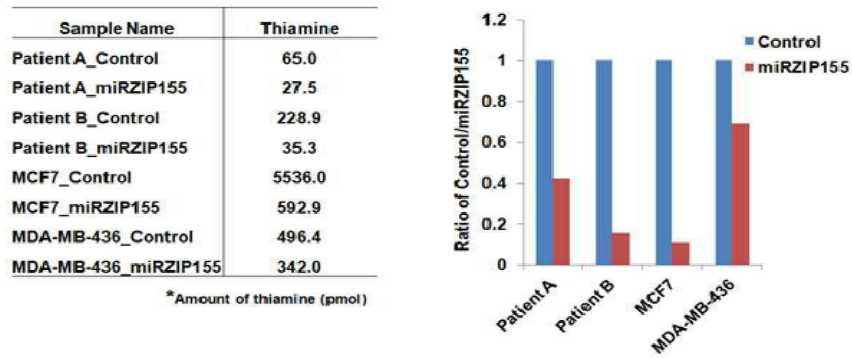
도면4



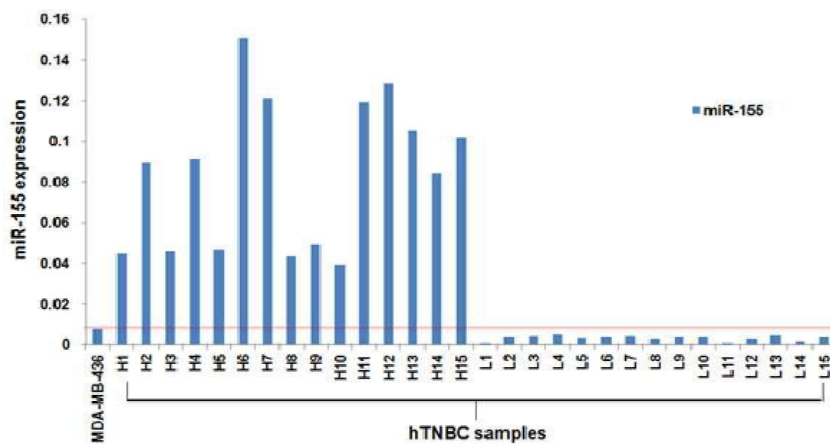
도면5



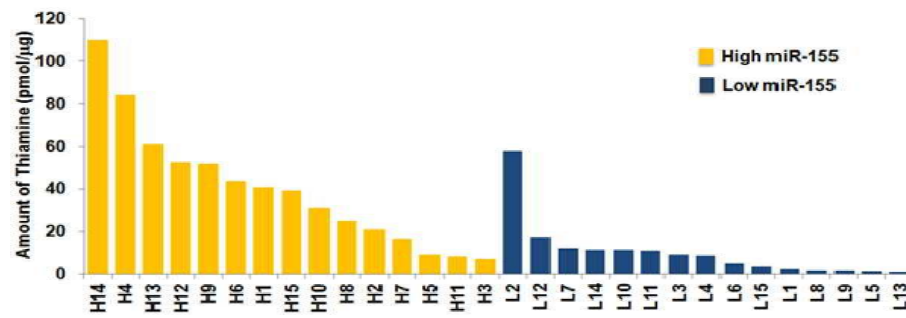
도면6



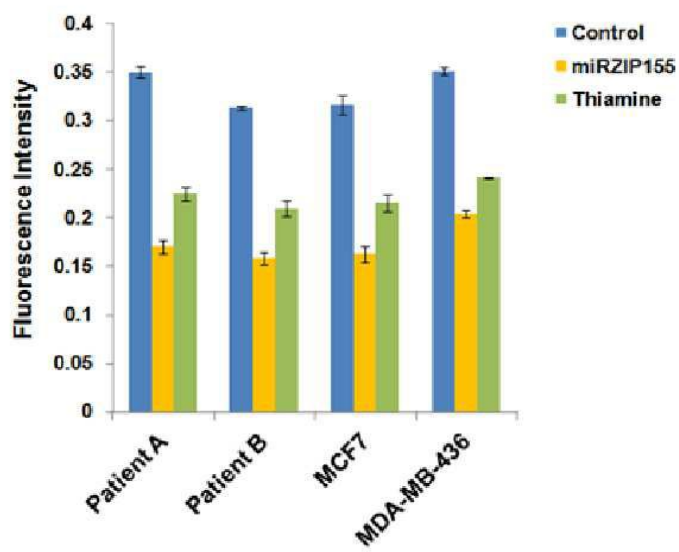
도면7



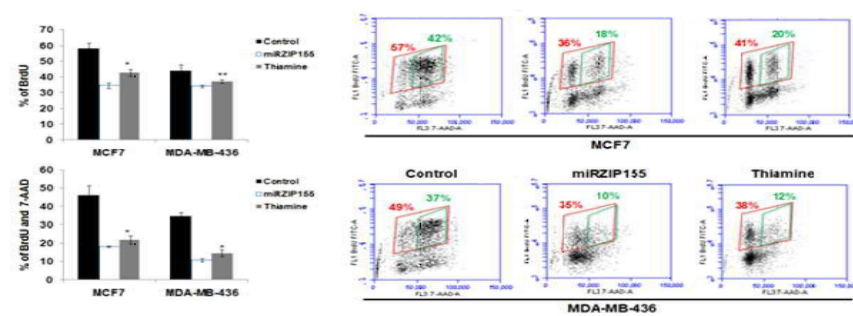
도면8



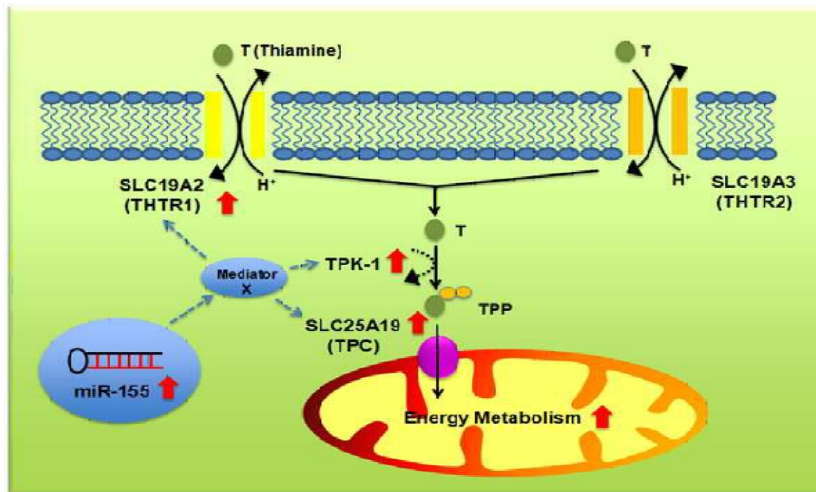
도면9



도면10



도면11



서열 목록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation of Ulsan University

<120> Multiple biomarker for diagnosing cancer

<130> PN1504-112

<160> 4

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 23

<212> RNA

<213> miR155 sequence

<400> 1

uuaaugcuaa ucgugauagg ggu

23

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> anti miR155 sequence

<400> 2

accctatca caattagcat taa

23

<

210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> miR155 F primer

<400> 3

ctagcctgca ggtattcaaa tatttccaca ga

32

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> miR155 R primer

<400> 4

atccggccgg cctgaagatg gttatgaaca ta

32