(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년07월23일
(11) 등록번호 10-1539098
(24) 등록일자 2015년07월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0180765
(22) 출원일자 2014년12월15일
심사청구일자 2014년12월15일
(56) 선행기술조사문헌
Int J Cancer. 2010 Mar 15;126(6):1378-89

(73) 특허권자
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
주웅
서울특별시 서초구 서초중앙로29길 28, 307동 602호 (반포동, 미도아파트)
박애경
서울특별시 서초구 명달로1길 51, 102동 1202호 (방배동, 방배어울림)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

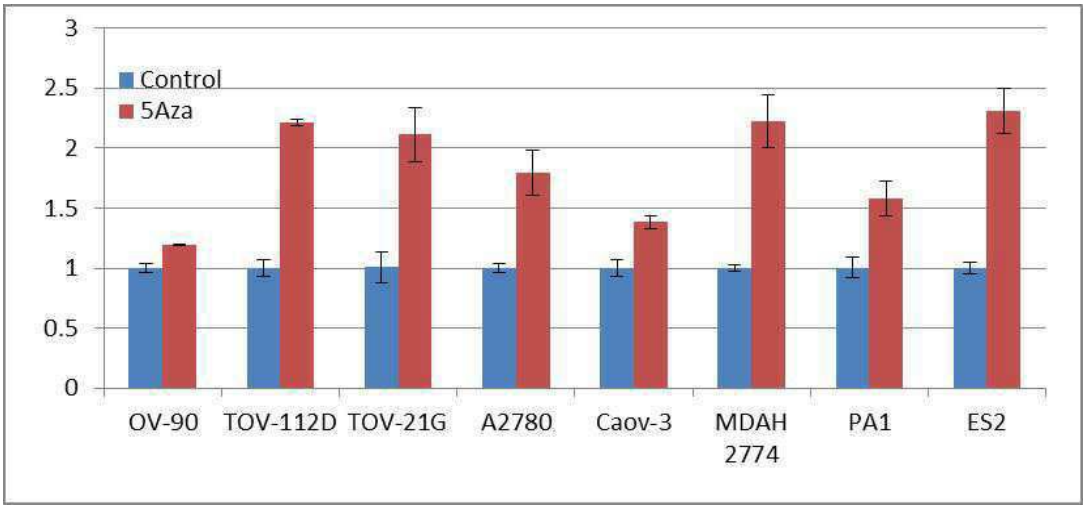
전체 청구항 수 : 총 10 항 심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 **CD302 유전자 프로모터의 CpG 메틸화 변화를 이용한 난소암의 항암제 치료 반응성 예측용 조성물 및 이의 이용**

(57) 요 약

본 발명은 CD302 (CD302 molecule) 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 검출함으로써, 난소암 환자의 항암제 치료 반응성을 예측하기 위한 조성물, 키트 및 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도4



(72) 발명자

안정혁

서울특별시 성동구 독서당로 175, 101동 605호 (옥수동, 극동그린아파트)

성혜윤

서울특별시 성동구 독서당로 343, 104동 201호 (금호동1가, 삼성래미안아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465015256
부처명	보건복지부
연구관리전문기관	한국보건산업진흥원
연구사업명	보건의료기술연구개발사업-병원특성화연구센터
연구과제명	재발 조기 예측을 위한 후성유전학적 진단법 개발(2세부)
기 여 율	1/1
주관기관	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2014.04.01~2015.03.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

CD302 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암 환자의 백금 기반의 항암제에 대한 반응성 예측용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제는,

비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소;

상기 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화된 서열에 특이적인 프라이머; 및

비메틸화된 서열에 특이적인 프라이머를 포함하는 것인 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 바이설파이트(bisulfite) 또는 이의 염인 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 메틸화 민감성 제한효소는 *Sma*I, *Sac*II, *Eag*I, *Hpa*II, *Msp*I, *Bss*HII, *Bst*UI 또는 *Not*I인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 유전자 프로모터의 CpG 부위는 서열번호 2 (2번 염색체의 159798495 내지 159798616 번째), 서열번호 3 (2번 염색체의 159798510 내지 159798631 번째) 또는 서열번호 4 (2번 염색체의 159798465 내지 159798586 번째)의 염기서열 중에 나타나는 CpG 를 포함하는 것인 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 난소암 환자의 백금 기반의 항암제에 대한 반응성 예측용 키트.

청구항 7

(a) 수득된 시료 내 게놈 DNA를 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소로 처리하는 단계; 및

(b) 상기 처리된 DNA를 CD302 유전자 프로모터의 CpG 부위를 증폭할 수 있는 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 증폭하는 단계를 포함하는,

난소암 환자의 백금 기반의 항암제에 대한 반응성 예측에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 환자의 시료로부터

CD302 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 검출하는 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 유전자 프로모터의 CpG 부위는 서열번호 2 (2번 염색체의 159798495 내지 159798616 번째), 서열번호 3 (2번 염색체의 159798510 내지 159798631 번째) 또는 서열번호 4 (2번 염색체의 159798465 내지 159798586 번째)의 염기서열 중에 나타나는 CpG 를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 바이설파이트(bisulfite) 또는 이의 염인 방법.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 메틸화 수준을 검출하는 방법은 메틸화 특이적 중합효소반응(methylation-specific polymerase chain reaction), 실시간 메틸화 특이적 중합효소반응(real time methylation-specific polymerase chain reaction), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 정량 PCR, 파이로시퀀싱 및 바이설파이트 시퀀싱으로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 CD302 (CD302 molecule) 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 검출함으로써, 난소암 환자의 항암제 치료 반응성을 예측하기 위한 조성물, 키트 및 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 난소암은 여성암 중 사망률이 가장 높은 난치성 암질환으로, 최근 생활양식이 서구화되고 호르몬 대체요법이 확산되고 노령인구가 증가함에 따라 그 빈도가 꾸준히 증가하고 있다. 난소암의 경우 초기에는 뚜렷한 증상이 나타나지 않으므로 약 70% 이상의 환자가 3기 이상인 진행성 난소암으로 최초 발견되며 약 75% 이상의 환자에서 최초 치료 후 2년 내 재발 및 전이가 일어나는 것으로 보고되어 있다.

[0003] 난소암은 초기에 발견되는 확률이 환자 전체의 15% 에 불과하며, 환자 전체의 65% 이상이 다른 조직에 전이가 발생된 채로 발견된다. 현재 난소암의 치료는 자궁, 난소, 림프절 등의 전이 병소 및 전이 의심 병소를 절제하는 외과적 수술과 파클리탁셀(paclitaxel) 또는 백금(platinum) 기반의 항암 화학요법을 병행하는 경우가 많다. 그러나, 현재의 치료법으로 80~90%는 초기에 양호한 반응을 보이나 최종적으로 10~15%만이 완전 관해에 이르며, 치료 이후에 재발된 환자는 65~75%가 항암 화학요법에 반응을 보이지 않는 것으로 보고되어 있어, 후속적인 치료가 매우 어렵다. 더욱이, 비슷한 임상적 특징을 가지는 환자들 중에서도 항암 화학요법에 대한 반응이 다양하게 나타나고, 같은 병기의 환자라 할지라도 환자의 생존에 상당한 차이를 보인다.

[0004] 따라서, 치료에 대한 종양의 반응 여부를 잘 예측하고 특정 치료법에 효과적인 환자군을 선별할 수 있는 바이오마커가 요구되고 있다. 이러한 바이오마커의 개발은 환자의 생존율과 치료 효율을 높이는데 크게 기여할 것으로 기대된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 국내특허공개 제2011-0043097호(2011. 4. 27 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에, 본 발명에서는 항암제에 민감성을 나타내는 세포주와 항암제 내성을 나타내는 세포주로부터 게놈 DNA 와 RNA 를 추출하여, DNA 메틸레이션 마이크로어레이 및 유전자 발현 마이크로어레이 분석을 실시하였으며, 난소암 세포주들에서 항암제에 대한 IC_{50} 값과 유전자 발현 및 프로모터 CpG의 DNA 메틸화 변화 정도의 유의성을 Pearson correlation 과 Spearman correlation 을 통해 분석하였다. 이들 결과를 통합 분석 (integration analysis)하여, 항암제 치료 내성에 관여하는 유전자 중 DNA 메틸화에 의해 발현이 조절되는 유전자를 최종 선별하여, 이와 같이 유전자의 발현에 영향을 준 특정 CpG 부위를 확인하였다. 또한, 해당 유전자의 특정 CpG 위치에서 일어나는 메틸화 정도를 측정함으로써 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측할 수 있다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007] 따라서, 본 발명의 하나의 목적은 ANXA4 (annexin A4), CD302 (CD302 molecule), CDC42EP2 [CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 2], EFTUD1 (elongation factor Tu GTP binding domain containing 1), KCNE4 (potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4), MBNL2 (muscleblind-like splicing regulator 2), MICAL2 (microtubule associated monoxygenase, calponin and LIM domain containing 2), PARP4 [poly (ADP-ribose) polymerase family, member 4], SPSB1 (splA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 1) 및 SYCP2 (synaptonemal complex protein 2)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 조성물을 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 키트를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 하나의 목적은 ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준의 측정하여, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 하나의 목적은 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 환자의 시료로부터 ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화를 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 ANXA4, CD302, CDC42EP2, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2 유전자 프로모터의 특정 CpG 부위가 항암제 내성 세포에서 특이적으로 저메틸화되며 이에 의하여 상기 유전자의 발현이 특이적으로 증가한다는 것과, EFTUD1 유전자 프로모터의 특정 CpG부위가 항암제 내성 세포에서 특이적으로 과메틸화되며 이에 의하여 상기 유전자의 발현이 특이적으로 감소한다는 것을 처음으로 밝혀내었으며, 상기 유전자들의 프로모터의 메틸화 정도를 바이오 마커로서 이용하여 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측하는 기술을 제공한다.

[0012] 상기 ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2 유전자 프로모터의 CpG는 각각 항암제 내성 세포에서 특이적인 메틸화 변화를 나타내므로, 이들 중 각각을 항암제에 대한 환자 반응성을 예측하기 위한 단독의 바이오 마커로 사용하거나, 이들 중 2종 이상을 복합 바이오 마커로 사용할 수도 있다.

[0013] 따라서 하나의 양태로서, 본 발명은 ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측용 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0014] 일구현예로, 본 발명은 ANXA4 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측하기 위한 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0015] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 조성물 및 키트는 CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0016] 다른 일구현예로, 본 발명은 CD302 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측하기 위한 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0017] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 조성물 및 키트는 ANXA4, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0018] 다른 일구현예로, 본 발명은 CDC42EP2 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측하기 위한 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0019] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 조성물 및 키트는 ANXA4, CD302, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0020] 다른 일구현예로, 본 발명은 EFTUD1 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측하기 위한 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0021] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 조성물 및 키트는 ANXA4, CD302, CDC42EP2, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0022] 다른 일구현예로, 본 발명은 KCNE4 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측하기 위한 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0023] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 조성물 및 키트는 ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0024] 다른 일구현예로, 본 발명은 MBNL2 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측하기 위한 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0025] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 조성물 및 키트는 ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MICAL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0026] 다른 일구현예로, 본 발명은 MICAL2 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측하기 위한 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0027] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 조성물 및 키트는 ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0028] 다른 일구현예로, 본 발명은 PARP4 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측하기 위한 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0029] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 조성물 및 키트는 ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, SPSB1 및 SYCP2로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0030] 다른 일구현예로, 본 발명은 SPSB1 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측하기 위한 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0031] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 조성물 및 키트는 ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4 및 SYCP2로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0032] 다른 일구현예로, 본 발명은 SYCP2 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측하기 위한 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0033] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 조성물 및 키트는 ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4 및 SPSB1로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0034] 본 발명에서, ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2 유전자는 공지된 유전자 데이터베이스에서 그 서열 정보를 확인할 수 있다. 예를 들어, 인간 ANXA4 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_001153 에서 확인할 수 있고, 인간 CD302 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_014880 에서 확인할 수 있고, 인간 CDC42EP2 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_006779 에서 확인할 수 있고, 인간 EFTUD1 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_024580 에서 확인할 수 있고, 인간 KCNE4 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_080671 에서 확인할 수 있고, 인간 MBNL2 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_144778 에서 확인할 수 있고, 인간 MICAL2 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_014632 에서 확인할 수 있고, 인간 PARP4 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_006437 에서 확인할 수 있고, 인간 SPSB1 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_025106 에서 확인할 수 있으며, 인간 SYCP2 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_014258 에서 확인할 수 있다.

[0035] 본 발명에서 용어, "메틸화" 또는 "메틸레이션"은 DNA를 구성하는 염기에 메틸기가 부착되는 것을 말한다. 바람직하게, 본 발명에서 메틸화 여부는 특정 유전자의 프로모터 부위의 특정 CpG 부위의 사이토신에서 일어나는 메틸화 여부를 의미한다. 메틸화가 일어난 경우 그로 인하여 전사인자의 결합이 방해를 받게 되어 특정 유전자의 발현이 억제되며, 반대로, 비메틸화 또는 저메틸화가 일어나는 경우 특정 유전자의 발현이 증가하게 된다.

[0036] 포유동물 세포의 게놈 DNA 에는 A, C, G 및 T 에 더하여, 사이토신 링의 다섯번째 탄소에 메틸 그룹이 부착된 5-메틸사이토신(5-methylcytosine, 5-mC)이라는 5번째 염기가 존재한다. 5-메틸사이토신의 메틸화는 CpG라고 불리는 CG 디뉴클레오티드(5'-mCG-3')의 C에서만 일어나고, CpG의 메틸화는 alu 또는 트랜스포존과 게놈의 반복서열이 발현되는 것을 억제한다. 또한, 상기 CpG의 5-mC가 자연적으로 탈아미노화하여 티민(T)이 되기 쉽기 때문에, CpG는 포유동물 세포에서 대부분의 후생유전학적 변화가 자주 일어나는 부위이다.

[0037] 본 발명에서 용어, "메틸화 수준의 측정"은 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것으로서, 메틸화 특이적인 PCR, 예를 들어 메틸화 특이적 PCR (methylation-specific polymerase chain reaction, MSP), 실시간 메틸화 특이적 PCR (real time methylation-specific polymerase chain reaction), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 또는 정량 PCR 등을 통해 측정할 수 있다. 또는, 파이로시퀀싱 및 바이설파이트 시퀀싱과 같은 자동염기분석 등의 방법으로 측정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 바람직하게, 본 발명에서 ANXA4 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 2번 염색체의 69770033 내지 69770154 번째 염기 중에 나타나는 CpG 부위의 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서는, 상기 2번 염색체의 69770033 내지 69770154 번째 염기를 서열번호 1로 나타내었다.

[0039] 더욱 바람직하게, 본 발명에서 ANXA4 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 2번 염색체의 69770093 번째 (서열번호 1의 61 번째) 위치하는 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다.

[0040] 또한 바람직하게, 본 발명에서 CD302 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 2번 염색체의 159798495 내지 159798616 번째 염기, 159798510 내지 159798631 번째 염기, 또는 159798465 내지 159798586 번째 염기 중에 나타나는 CpG 부위의 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서는, 상기 CpG 부위의 염기 서열을 각각 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로 나타내었다.

[0041] 더욱 바람직하게, 본 발명에서 CD302 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 2번 염색체의 159798555 번째 (서열번호 2의 61 번째), 159798570 번째 (서열번호 3의 61 번째) 또는 159798525번째 (서열번호 4의 61 번째)에 위치하는 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다.

[0042] 또한 바람직하게, 본 발명에서 CDC42EP2 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 11번 염색체의 65316855 내지 65316976 번째 염기, 또는 65316443 내지 65316564 번째 염기 중에 나타나는 CpG 부위의 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서는, 상기 CpG 부위의 염기 서열을 각각 서열번호 5 및 서열번호 6로 나타내었다.

[0043] 더욱 바람직하게, 본 발명에서 CDC42EP2 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 11번 염색체의 65316915 번째 (서열번호 5의 61 번째) 또는 65316503번째 (서열번호 6의 61 번째)에 위치하는 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다.

[0044] 또한 바람직하게, 본 발명에서 EFTUD1 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 15번 염색체의 82262935 내지 82263056 번째 염기 중에 나타나는 CpG 부위의 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서는, 상기 15번 염색체의 82262935 내지 82263056 번째 염기를 서열번호 7로 나타내었다.

[0045] 더욱 바람직하게, 본 발명에서 EFTUD1 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 15번 염색체의 82262995 번째 (서열번호 7의 61 번째) 위치하는 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다.

[0046] 또한 바람직하게, 본 발명에서 KCNE4 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 2번 염색체의 223051909 내지 223052030 번째 염기, 223051844 내지 223051965 번째 염기, 223052042 내지 223052163 번째 염기, 223051814 내지 223051935 번째 염기, 또는 223051724 내지 223051845 번째 염기 중에 나타나는 CpG 부위의 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서는, 상기 CpG 부위의 염기 서열을 각각 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12로 나타내었다.

[0047] 더욱 바람직하게, 본 발명에서 KCNE4 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 2번 염색체의 223051969 번째 (서열번호 8의 61 번째), 223051904 번째 (서열번호 9의 61 번째), 2번 염색체의 223052102 번째 (서열번호 10의 61 번째), 223051874 번째 (서열번호 11의 61 번째) 또는 223051784번째 (서열번호 12의 61 번째)에 위치하는 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다.

[0048] 또한 바람직하게, 본 발명에서 MBNL2 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 13번 염색체의 97257602 내지 97257723 번째 염기, 97225103 내지 97225224 번째 염기, 또는 97260256 내지 97260377 번째 염기 중에 나타나는 CpG 부위의 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서는, 상기 CpG 부위의 염기 서열을 각각 서열번호 13, 서열번호 14 및 서열번호 15로 나타내었다.

[0049] 더욱 바람직하게, 본 발명에서 MBNL2 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 13번 염색체의 97257662 번째 (서열번호 13의 61 번째), 97225163 번째 (서열번호 14의 61 번째) 또는 97260316 번째 (서열번호 15의 61 번째)에 위치하는 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다.

[0050] 또한 바람직하게, 본 발명에서 MICAL2 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 11번 염색체의 12138155 내지 12138276 번째 염기 중에 나타나는 CpG 부위의 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서는, 상기 11번 염색체의 12138155 내지 12138276 번째 염기를 서열번호 16으로 나타내었다.

[0051] 더욱 바람직하게, 본 발명에서 MICAL2 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 11번 염색체의 12138215 번째 (서열번호 16의 61 번째) 위치하는 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다.

[0052] 또한 바람직하게, 본 발명에서 PARP4 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 13번 염색체의 24511103 내지 24511224 번째 염기 중에 나타나는 CpG 부위의 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서는, 상기 13번 염색체의 24511103 내지 24511224 번째 염기를 서열번호 17로 나타내었다.

[0053] 더욱 바람직하게, 본 발명에서 PARP4 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 13번 염색체의 24511163 번째 (서열번호 17의 61 번째) 위치하는 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다.

[0054] 또한 바람직하게, 본 발명에서 SPSB1 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 1번 염색체의 9315508 내지 9315629 번째 염기 중에 나타나는 CpG 부위의 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서는, 상기 1번 염색체의 9315508 내지 9315629 번째 염기를 서열번호 18로 나타내었다.

[0055] 더욱 바람직하게, 본 발명에서 SPSB1 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 1번 염색체의 9315568 번째 (서열번호 18의 61 번째) 위치하는 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수

있다.

[0056] 또한 바람직하게, 본 발명에서 SYCP2 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 20번 염색체의 59933471 내지 59933592 번째 염기 중에 나타나는 CpG 부위의 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서는, 상기 20번 염색체의 59933471 내지 59933592 번째 염기를 서열번호 19로 나타내었다.

[0057] 더욱 바람직하게, 본 발명에서 SYCP2 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 20번 염색체의 59933531 번째 (서열번호 19의 61 번째) 위치하는 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다.

[0058] 본 발명에서는 상기 인간 게놈 염색체 부위의 염기서열은 최신 버전인 The December 2013 Human reference sequence (GRCh38)에 따라 표현하였지만, 상기 인간 게놈 염색체 부위의 구체적 서열은 게놈 서열 연구 결과가 업데이트됨에 따라서 그 표현이 다소 변경될 수 있으며, 이러한 변경에 따라 본 발명의 상기 인간 게놈 염색체 부위의 표현이 상이해질 수 있다. 따라서, 본 발명의 The December 2013 Human reference sequence (GRCh38)에 따라 표현된 인간 게놈 염색체 부위는 본 발명의 출원일 이후 인간 표준 염기서열(human reference sequence)이 업데이트되어 상기 인간 게놈 염색체 부위의 표현이 지금과 다르게 변경된다고 하여도, 본 발명의 범위가 상기 변경된 인간 게놈 염색체 부위에 미치게 됨은 자명하다고 할 것이다. 이러한 변경 내용은 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자라면 누구라도 용이하게 알 수 있는 사항이다.

[0059] 본 발명에서는 11종의 난소암 세포주에 대하여 시스플라틴 항암제에 대한 내성 정도를 조사하여 항암제 민감성 세포주와 항암제 내성 세포주로 분류하였고, 이들 세포주로부터 게놈 DNA 와 RNA 를 추출하여, Illumina Human Methylation 450 Bead Chip을 이용한 DNA 메틸레이션 마이크로어레이 및 Affymetrix Human Gene 1.0 ST를 이용한 유전자 발현 마이크로어레이 분석을 실시하였으며, 난소암 세포주들에서 항암제에 대한 IC_{50} 값과 유전자 발현 및 프로모터 CpG의 DNA 메틸화 변화 정도의 유의성을 Pearson correlation 과 Spearman correlation 을 통해 분석하였다. 이들 결과를 통합 분석 (integration analysis)하여, 항암제 치료 내성에 관여하는 유전자 중 DNA 메틸화에 의해 발현이 조절되는 유전자를 최종 선별하였다. 또한, 이와 같이 유전자의 발현에 영향을 준 특정 CpG 부위를 확인하였으며, 해당 유전자의 특정 CpG 위치에서 일어나는 메틸화 정도를 측정함으로써 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0060] 선별된 유전자 가운데 ANXA4는 항암제 민감성 세포주군에 대하여 내성 세포주군에서 유전자 발현이 5.6 배 증가함과 동시에 프로모터 CpG 부위에서 저메틸화 되어 있었으며, 11종의 난소암 세포주에서 시스플라틴 항암제에 대한 IC_{50} 값과 유전자 발현 및 프로모터 CpG의 DNA 메틸화 변화 정도가 Spearman correlation에서 유의성을 보였으므로, ANXA4 유전자의 프로모터 CpG 부위에서 일어나는 DNA 메틸레이션의 변화를 항암제 치료반응 예측 마커로 선정하였다.

[0061] CD302는 항암제 민감성 세포주군에 대하여 내성 세포주군에서 유전자 발현이 7.8 배 증가함과 동시에 프로모터 CpG 부위에서 저메틸화 되어 있었으며, 11종의 난소암 세포주에서 시스플라틴 항암제에 대한 IC_{50} 값과 유전자 발현 및 프로모터 CpG의 DNA 메틸화 변화 정도가 Pearson correlation 과 Spearman correlation에서 유의성을 보였으므로, CD302 유전자의 프로모터 CpG 부위에서 일어나는 DNA 메틸레이션의 변화를 항암제 치료반응 예측 마커로 선정하였다.

[0062] CDC42EP2는 항암제 민감성 세포주군에 대하여 내성 세포주군에서 유전자 발현이 1.59배 증가되어 있었으며, 11종의 난소암 세포주에서 시스플라틴 항암제에 대한 IC_{50} 값과 유전자 발현 및 프로모터 CpG의 DNA 메틸화 변화 정도가 Pearson correlation 과 Spearman correlation에서 유의성을 보였으므로, CDC42EP2 유전자의 프로모터 CpG 부위에서 일어나는 DNA 메틸레이션의 변화를 항암제 치료반응 예측 마커로 선정하였다.

[0063] EFTUD1는 항암제 민감성 세포주군에 대하여 내성 세포주군에서 유전자 발현이 2.36배 감소되어 있었으며, 11종의 난소암 세포주에서 시스플라틴 항암제에 대한 IC_{50} 값과 유전자 발현 및 프로모터 CpG의 DNA 메틸화 변화 정도가 Pearson correlation 과 Spearman correlation에서 유의성을 보였으므로, EFTUD1 유전자의 프로모터 CpG 부위에서 일어나는 DNA 메틸레이션의 변화를 항암제 치료반응 예측 마커로 선정하였다.

[0064] KCNE4는 항암제 민감성 세포주군에 대하여 내성 세포주군에서 유전자 발현이 3.63 배 증가함과 동시에 프로모터 CpG 부위에서 저메틸화 되어 있었으며, 11종의 난소암 세포주에서 시스플라틴 항암제에 대한 IC_{50} 값과 유전자

발현 및 프로모터 CpG의 DNA 메틸화 변화 정도가 Spearman correlation에서 유의성을 보였으므로, KCNE4 유전자의 프로모터 CpG 부위에서 일어나는 DNA 메틸레이션의 변화를 항암제 치료반응 예측 마커로 선정하였다.

[0065] MBNL2는 항암제 민감성 세포주군에 대하여 내성 세포주군에서 유전자 발현이 3.83 배 증가함과 동시에 프로모터 CpG 부위에서 저메틸화 되어 있었으며, 11종의 난소암 세포주에서 시스플라틴 항암제에 대한 IC_{50} 값과 유전자 발현 및 프로모터 CpG의 DNA 메틸화 변화 정도가 Spearman correlation에서 유의성을 보였으므로, MBNL2 유전자의 프로모터 CpG 부위에서 일어나는 DNA 메틸레이션의 변화를 항암제 치료반응 예측 마커로 선정하였다.

[0066] MICAL2는 항암제 민감성 세포주군에 대하여 내성 세포주군에서 유전자 발현이 7.73배 증가함과 동시에 프로모터 CpG 부위에서 저메틸화 되어 있었으며, 11종의 난소암 세포주에서 시스플라틴 항암제에 대한 IC_{50} 값과 유전자 발현 및 프로모터 CpG의 DNA 메틸화 변화 정도가 Pearson correlation 에서 유의성을 보였으므로, MICAL2 유전자의 프로모터 CpG 부위에서 일어나는 DNA 메틸레이션의 변화를 항암제 치료반응 예측 마커로 선정하였다.

[0067] PARP4는 항암제 민감성 세포주군에 대하여 내성 세포주군에서 유전자 발현이 1.62배 증가되어 있었으며, 11종의 난소암 세포주에서 시스플라틴 항암제에 대한 IC_{50} 값과 유전자 발현 및 프로모터 CpG의 DNA 메틸화 변화 정도가 Pearson correlation 과 Spearman correlation에서 유의성을 보였으므로, PARP4 유전자의 프로모터 CpG 부위에서 일어나는 DNA 메틸레이션의 변화를 항암제 치료반응 예측 마커로 선정하였다.

[0068] SPSB1는 항암제 민감성 세포주군에 대하여 내성 세포주군에서 유전자 발현이 2.4배 증가함과 동시에 프로모터 CpG 부위에서 저메틸화 되어 있었으며, 11종의 난소암 세포주에서 시스플라틴 항암제에 대한 IC_{50} 값과 유전자 발현 및 프로모터 CpG의 DNA 메틸화 변화 정도가 Pearson correlation 과 Spearman correlation에서 유의성을 보였으므로, SPSB1 유전자의 프로모터 CpG 부위에서 일어나는 DNA 메틸레이션의 변화를 항암제 치료반응 예측 마커로 선정하였다.

[0069] SYCP2는 항암제 민감성 세포주군에 대하여 내성 세포주군에서 유전자 발현이 5.43배 증가함과 동시에 프로모터 CpG 부위에서 저메틸화 되어 있었으며, 11종의 난소암 세포주에서 시스플라틴 항암제에 대한 IC_{50} 값과 유전자 발현 및 프로모터 CpG의 DNA 메틸화 변화 정도가 Pearson correlation 과 Spearman correlation에서 유의성을 보였으므로, SYCP2 유전자의 프로모터 CpG 부위에서 일어나는 DNA 메틸레이션의 변화를 항암제 치료반응 예측 마커로 선정하였다.

[0070] 따라서, ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및/또는 SYCP2 의 특정 CpG 위치에서 일어나는 DNA 메틸레이션의 저메틸화 또는 과메틸화는 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측할 수 있는 바이오 마커로 활용될 수 있다.

[0071] 본 발명에서, 환자는 난소암이 발병한 환자를 의미한다. 이들 난소암 환자로부터 획득한 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨 등으로부터 유전자 시료를 얻는데, 그 유전자 시료는 DNA, mRNA, 또는 mRNA로부터 합성되는 cDNA를 포함한다.

[0072] 본 발명에서 용어, "항암제에 대한 반응성 예측"이란 환자가 항암제 치료에 대해 선호적으로 또는 비선호적으로 반응할지 여부를 예측하는 것, 또는 항암제 내성의 여부 또는 내성의 위험성을 예측하는 것을 의미한다. 본 발명의 예측 방법은 난소암 발병 환자에 대한 가장 적절한 치료 방식을 선택함으로써 치료 결정을 하기 위해 임상적으로 사용될 수 있다. 바람직하게, 상기 항암제는 백금 기반의 항암제, 일예로 시스플라틴일 수 있다.

[0073] 일반적으로 난소암의 경우에는 항암 화학요법으로 치료를 시행하고 있고, 특히 시스플라틴 등의 백금 기반의 항암제 병합요법을 가장 많이 사용하고 있지만, 비슷한 임상적 특징 또는 비슷한 병기를 가지는 환자들 중에서도 항암 화학요법에 대한 반응이 다양하고 생존에 상당한 차이를 보인다. 본 발명의 상기 방법을 이용하면 항암 화학요법에 대한 반응성을 쉽게 예측할 수 있으며, 이에 따른 생존 예후를 판단할 수 있어, 항암 화학요법에 적절한 환자군을 선별하여 치료 효율을 높일 수 있다. 또한, 이로써 난소암 발병 후의 생존율을 높일 수 있다.

[0074] 또한, 항암제 내성 암 세포의 비정상적인 메틸레이션의 변화는 조직, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 생물학적 시료에서 얻은 게놈 DNA의 메틸레이션 변화와 상당한 유사성을 보이므로, 본 발명의 마커를 이용할 경우 환자의 항암제에 대한 반응성 예측에 대하여, 혈액이나 체액 등을 통한 손쉬운 진단이 가능하다는 장점이 있다.

[0075] 본 발명에서, CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제는 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소, ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및/또는 SYCP2

유전자 프로모터의 메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머, 및 비메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다.

[0076] 상기 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 바이설파이트(bisulfite) 또는 이의 염일 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 바람직하게는 소듐 바이설파이트일 수 있다. 이러한 바이설파이트를 이용하여 비메틸화 사이토신 잔기를 변형시켜 CpG 부위의 메틸화 여부를 검출하는 방법은 당 업계에 널리 공지되어 있다(WO01/26536; US2003/0148326A1).

[0077] 또한, 상기 메틸화 민감성 제한효소는 CpG 부위의 메틸화를 특이적으로 검출할 수 있는 제한효소로서 제한효소의 인식부위로 CG를 함유하는 제한효소일 수 있다. 예를 들면, *Sma*I, *Sac*II, *Eag*I, *Hpa*II, *Msp*I, *Bss*HII, *Bst*UI, *Not*I 등이 있으며 이에 제한되지 않는다. 상기 제한효소 인식부위의 C에서의 메틸화 또는 비메틸화에 따라 제한효소에 의한 절단 여부가 달라지고 이를 PCR 또는 서던블롯(Southern Blot) 분석을 통해 검출할 수 있게 된다. 상기 제한효소 이외의 다른 메틸화 민감성 제한효소는 당업계에 잘 알려져 있다.

[0078] 환자의 ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및/또는 SYCP2 유전자 프로모터의 CpG 부위에서의 메틸화 수준을 측정하는 대표적인 방법으로, 환자의 생물학적 시료에서 게놈 DNA를 수득하고, 수득한 DNA에 메틸화되지 않은 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소를 처리한 후, 상기 처리된 DNA를 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 증폭시키고 그 증폭된 결과물의 존부를 확인하는 것을 통해 측정할 수 있다.

[0079] 따라서, 본 발명의 제제는 ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및/또는 SYCP2 유전자의 메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머 및 비메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 본 발명에서, 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3 말단 수산화기를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 또한, 프라이머는, 7개 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 센스 및 안티센스 핵산으로서, DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 프라이머의 서열은 반드시 주형의 서열과 정확히 같을 필요는 없으며, 충분히 상보적이어서 주형과 혼성화될 수 있으면 된다. 프라이머의 위치 혹은 프라이머 결합부위는 프라이머가 혼성화하는 표적 DNA 절편을 말한다.

[0080] 본 발명의 프라이머는 메틸화 여부를 분석하는 대상이 되는 특정 CpG 부위의 서열에 따라 바람직하게 디자인될 수 있으며, 각각 메틸화되어 바이설파이트에 의해 변형되지 않았던 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍, 및 메틸화되지 않아 바이설파이트에 의해 변형된 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍일 수 있다.

[0081] 상기 조성물 및 키트에는 상기 제제 이외에도, 중합효소 아가로스, 전기영동에 필요한 완충용액 등이 추가로 포함될 수 있다.

[0082] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준의 측정하여, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성을 예측하는 방법에 관한 것이다.

[0083] 또한, 본 발명은 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 환자의 시료로부터 ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화를 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0084] 일예로, 본 발명은 난소암 환자의 시료로부터 ANXA4 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 대조구 시료의 해당 유전자 프로모터의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 상기 대조구 시료는 항암제 민감성 대조구 시료일 수 있다.

[0085] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 방법은 추가적으로, 환자의 시료로부터 CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 대조구 시료의 해당 유전자 프로모터의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 대조구 시료는 항암제 민감성 대조구 시료일 수 있다.

[0086] 다른 일예로, 본 발명은 난소암 환자의 시료로부터 CD302 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 대조구 시료의 해당 유전자 프로모터의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 상기 대조구 시료는 항암제 민감성 대조구 시료일 수 있다.

[0087] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 방법은 추가적으로, 환자의 ANXA4, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 해당 유전자 프로모터의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0088] 다른 일예로, 본 발명은 난소암 환자의 시료로부터 CDC42EP2 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 해당 유전자 프로모터의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0089] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 방법은 추가적으로, 환자의 시료로부터 ANXA4, CD302, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 해당 유전자 프로모터의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0090] 다른 일예로, 본 발명은 난소암 환자의 시료로부터 EFTUD1 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 해당 유전자 프로모터의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0091] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 방법은 추가적으로, 환자의 ANXA4, CD302, CDC42EP2, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 해당 유전자 프로모터의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0092] 다른 일예로, 본 발명은 난소암 환자의 시료로부터 KCNE4 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 해당 유전자 프로모터의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0093] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 방법은 추가적으로, 환자의 시료로부터 ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 해당 유전자 프로모터의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0094] 다른 일예로, 본 발명은 난소암 환자의 시료로부터 MBNL2 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 해당 유전자 프로모터의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0095] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 방법은 추가적으로, 환자의 시료로부터 ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MICAL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 해당 유전자 프로모터의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0096] 다른 일예로, 본 발명은 난소암 환자의 시료로부터 MICAL2 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 해당 유전자 프로모터의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0097] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 방법은 추가적으로, 환자의 시료로부터 ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자 프로모터의 CpG 부위의

메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 해당 유전자 프로모터의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0098] 다른 일예로, 본 발명은 난소암 환자의 시료로부터 PARP4 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 해당 유전자 프로모터의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0099] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 방법은 추가적으로, 환자의 시료로부터 ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, SPSB1 및 SYCP2 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 해당 유전자 프로모터의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0100] 다른 일예로, 본 발명은 난소암 환자의 시료로부터 SPSB1 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 해당 유전자 프로모터의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0101] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 방법은 추가적으로, 환자의 시료로부터 ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4 및 SYCP2 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 해당 유전자 프로모터의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0102] 다른 일예로, 본 발명은 난소암 환자의 시료로부터 SYCP2 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 해당 유전자 프로모터의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 난소암 환자의 항암제에 대한 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0103] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 방법은 추가적으로, 환자의 시료로부터 ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4 및 SPSB1 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 항암제 민감성 대조구 시료의 해당 유전자 프로모터의 CpG의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0104] 본 발명에서 용어 "환자의 시료"란 항암제 내성에 의해 ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및/또는 SYCP2 유전자의 메틸화 수준이 차이 나는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0105] 먼저, 환자로부터 게놈 DNA를 수득하여 메틸화 수준을 측정하기 위하여, 게놈 DNA의 수득은 당업계에서 통상적으로 사용되는 페놀/클로로포름 추출법, SDS 추출법(Tai et al., Plant Mol. Biol. Reporter, 8: 297-303, 1990), CTAB 분리법(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide; Murray et al., Nuc. Res., 4321-4325, 1980) 또는 상업적으로 판매되는 DNA 추출 키트를 이용하여 수행할 수 있다.

[0106] 상기 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계는, 보다 상세하게는, (a) 수득된 시료 내 게놈 DNA를 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소로 처리하는 단계; 및 (b) 상기 처리된 DNA를 해당 유전자의 특정 CpG 부위를 증폭할 수 있는 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 증폭하는 단계를 포함할 수 있다.

[0107] 상기 (a) 단계에서 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 바이설파이트일 수 있으며, 바람직하게는 소듐 바이설파이트일 수 있다. 이러한 바이설파이트를 이용하여 비메틸화 사이토신 잔기를 변형시켜 특정 CpG 부위의 메틸화 여부를 검출하는 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다.

[0108] 또한, 상기 (a) 단계에서 메틸화 민감성 제한효소는 상기에서 설명한 바와 같이, 특정 CpG 부위의 메틸화를 특이적으로 검출할 수 있는 제한효소로서 제한효소의 인식부위로 CG를 함유하는 제한효소일 수 있으며, 예를 들면, *Sma*I, *Sac*II, *Eag*I, *Hpa*II, *Msp*I, *Bss*HII, *Bst*UI, *Not*I 등이 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0109] 상기 (b) 단계에서 증폭은 통상적인 PCR 방법에 의해 수행될 수 있다. 이때 사용되는 프라이머는 상기에서 설명한 바와 같이, 메틸화 여부를 분석하는 대상이 되는 특정 CpG 부위의 서열에 따라 바람직하게 디자인될 수 있으며, 각각 메틸화되어 바이설파이트에 의해 변형되지 않았던 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍

및 메틸화되지 않아 바이설파이트에 의해 변형된 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 쌍일 수 있다.

[0110] 상기 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계는, (c) 상기 (b) 단계에서 증폭된 결과물의 존부를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 (c) 단계에서 증폭된 결과물의 존부는 당 업계에 공지된 방법, 예를 들면 전기영동을 수행하여 원하는 위치의 밴드의 검출 여부에 따라서 수행될 수 있다. 예를 들면, 비메틸화 사이토신 잔기를 변형시키는 화합물을 사용한 경우 상기 (a) 단계에서 사용한 두 종류의 프라이머쌍, 즉 메틸화되어 바이설파이트에 의해 변형되지 않았던 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍 및 메틸화되지 않아 바이설파이트에 의해 변형된 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍에 의해 각각 증폭된 PCR 결과물의 존부에 따라 메틸화 정도를 판단할 수 있다. 바람직하게, 샘플 게놈 DNA를 바이설파이트로 처리하고, 해당 유전자 프로모터의 CpG 부위를 PCR로 증폭하고, 증폭된 부위의 염기서열을 분석하는 바이설파이트 게놈 시퀀싱 방법을 사용하여 메틸화 여부를 판단할 수 있다.

[0111] 또한, 제한효소를 이용한 경우에도 당 업계에 공지된 방법, 예를 들어 mock DNA에서 PCR 결과물이 나타난 상태에서, 제한효소로 처리된 DNA에서 PCR 결과물이 있는 경우는 CpG 부위가 메틸화된 것으로 판단하고, 제한효소로 처리된 DNA에서 PCR 결과물이 없는 경우는 CpG 부위가 비메틸화 한 것으로 판단하는 것에 따라 그 메틸화 여부를 판단할 수 있으며, 이는 당업자에게 자명하다. 상기에서 mock DNA란 시료에서 분리되고 아무런 처리를 하지 않은 상태의 시료 DNA를 의미한다.

[0112] 이와 같은 방법에 따라, 환자 시료 내 ANXA4, CD302, CDC42EP2, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2 유전자 프로모터의 특정 CpG 부위가 저메틸화 상태로 측정되거나, EFTUD1 유전자 프로모터의 특정 CpG 부위가 과메틸화 상태로 측정되는 경우, 해당 환자가 항암제에 대하여 반응성을 나타낼 것으로 예측할 수 있는 것이다.

[0113] 따라서, 상기 본 발명에 따를 경우, ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및/또는 SYCP2 유전자 프로모터의 CpG의 메틸화 여부를 효과적으로 확인하여 난소암 환자의 항암제 반응성을 용이하게 예측할 수 있다.

발명의 효과

[0114] 본 발명에 따라, 환자의 생물학적 시료에서 채취한 게놈 DNA의 특정 유전자 프로모터 부위의 메틸화 정도를 PCR 기법을 기초로 한 MSP(methylation-specific PCR) 등의 방법으로 측정함으로써 수 시간 내에 난소암 환자의 항암제 반응성을 예측 할 수 있으므로, 정확도가 높고 편리한 진단 키트를 개발할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0115] 도 1은 난소암 환자의 항암제 치료 반응성 마커를 선정한 과정을 나타낸 것이다.

도 2는 난소암 세포주 11종 (OVCAR-3, TOV-21G, TOV-112D, CaOV-3, ES-2, OV-90, PA-1, MDAH 2774, A2780, A2780cp, SK-OV-3)을 시스플라틴 항암제에 반응하는 IC_{50} 에 따라 차례대로 나열하여 항암제에 민감한 군(Sensitive)과 내성을 갖고 있는 군(Resistant), 그리고 민감성 세포주군과 내성 세포주군 사이에 중간내성 정도를 갖는 세포주군(Intermediate)으로 분류한 결과를 나타낸다.

도 3은 난소암 세포주(OV-90, TOV-112D, A2780, PA-1 및 ES-2)에 5-aza-2'-deoxycytidin 을 처리한 후 ANXA4 유전자의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 4는 난소암 세포주(OV-90, TOV-112D, TOV-21G, A2780, Caov-3, MDAH2774, PA-1 및 ES-2)에 5-aza-2'-deoxycytidin 을 처리한 후 CD302 유전자의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 5는 난소암 세포주(OV-90, TOV-112D, TOV-21G, A2780, Caov-3, MDAH2774, OVCAR-3 ES-2 및 SKOV-3)에 5-aza-2'-deoxycytidin 을 처리한 후 CDC42EP2 유전자의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 6은 난소암 세포주(OV-90, TOV-112D, TOV-21G, A2780, A2780cis, MDAH2774, PA1, OVCAR-3, ES-2 및 SKOV-3)에 5-aza-2'-deoxycytidin 을 처리한 후 EFTUD1 유전자의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 7은 난소암 세포주(OV-90, TOV-112D, TOV-21G, A2780, Caov-3, PA1, OVCAR-3, ES-2 및 SKOV-3)에 5-aza-2'-deoxycytidin 을 처리한 후 KCNE4 유전자의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 8은 난소암 세포주(OV-90, TOV-112D, A2780, Caov-3, MDAH2774, PA1, OVCAR-3, ES-2 및 SKOV-3)에 5-aza-

2'-deoxycytidin 을 처리한 후 MBNL2 유전자의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 9는 난소암 세포주(OV-90, TOV-112D, TOV-21G, A2780, Caov-3, MDAH2774, PA1, OVCAR-3, ES-2 및 SKOV-3)에 5-aza-2'-deoxycytidin 을 처리한 후 MICAL2 유전자의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 10은 난소암 세포주(OV-90, TOV-112D, TOV-21G, A2780, A2780cis, Caov-3, MDAH2774, PA1, OVCAR-3, ES-2 및 SKOV-3)에 5-aza-2'-deoxycytidin 을 처리한 후 PARP4 유전자의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 11은 난소암 세포주(OV-90, TOV-112D, TOV-21G, A2780, A2780cis, Caov-3, MDAH2774, OVCAR-3, ES-2 및 SKOV-3)에 5-aza-2'-deoxycytidin 을 처리한 후 SPSB1 유전자의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 12는 난소암 세포주(OV-90, TOV-112D, TOV-21G, A2780, A2780cis, Caov-3, MDAH2774, PA1, OVCAR-3, ES-2 및 SKOV-3)에 5-aza-2'-deoxycytidin 을 처리한 후 SYCP2 유전자의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0116] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0117] **실시예 1. 세포주 배양**

[0118] 항암제 시스플라틴의 내성 정도를 알아보기 위하여 아래 11종의 난소암 세포주를 사용하였다(표 1). 실험에 사용한 11종의 난소암 세포주는 American type culture collection (ATCC)에서 구입하였고, SK-OV-3와 ES-2 세포주는 McCoy's 5a, PA-1 세포주는 MEM alpha, Caov-3 세포주는 DMEM, TOV-21G, TOV-112D 및 OV-90 세포주는 MCDB 105와 medium 199 (1:1 mix), OVCAR-3, MDAH2774, A2780 및 A2780cis 세포주는 RPMI1640에 10% 우태아혈청(fetal bovine serum), 100 U/mL 페니실린(penicillin) 및 100 μg/mL 스트렙토마이신(streptomycin)을 추가하여 배양하였다. A2780cis 세포주의 경우, 시스플라틴 내성을 유지하기 위해 배양 배지에 1 μM 시스플라틴을 첨가하여 배양하였다.

표 1

[0119]

Cat. (cell)	세포주	세포주 유래/관련 질환	형태학	배지	배지입수처
HTB-77	SKOV-3	인간/선암/전이상태에서 유래	epithelial	McCoy's 5a+10%FBS+1%P/S	(REF)16600-082(Gibco)
CRL-1978	ES-2	인간/암종	fibroblast	McCoy's 5a+10%FBS+1%P/S	(REF)16600-082(Gibco)
CRL-1572	PA-1	인간/기형암종	epithelial	MEM alpha+10%FBS+1%P/S	41061-029(Gibco)
HTB-75	Caov-3	인간/선암	epithelial	DMEM(1.5g/L sodium bicarbonate)+10%FBS+1% P/S	LM001-51(welgene)
CRL-11730	TOV-21G	인간/선암	epithelial	MCDB 105(1.5g/L sodium bicarbonate)&Medium 199(2.2g/L sodium bicarbonate) 1:1 mix	11150-059(Gibco, Medium199)
CRL-11731	TOV-112D	인간/선암	epithelial	MCDB 105(1.5g/L sodium bicarbonate)&Medium 199(2.2g/L sodium bicarbonate) 1:1 mix	11150-059(Gibco, Medium199)
CRL-11732	OV-90	인간/복수	epithelial	MCDB 105(1.5g/L sodium bicarbonate)&Medium 199(2.2g/L sodium bicarbonate) 1:1 mix	11150-059(Gibco, Medium199)
HTB-161	OVCAR-3	인간/선암	epithelial	RPMI 1640(25mM HEPES)+10%FBS+1%P/S	LM011-03(welgene)
CRL-10303	MDAH 2774	인간/선암	mucinous	RPMI 1640(25mM HEPES)+10%FBS+1%P/S	LM011-03(welgene)
93112519	A2780 (parent)	인간/암종	epithelial	RPMI 1640(25mM HEPES)+10%FBS+1%P/S	LM011-03(welgene)

93112517	A2780cis	인간/암종	epithelial	RPMI 1640(25mM HEPES)+10%FBS+1%P/S	LM011-03(welgene)

[0120]

[0121] **실시예 2. 시스플라틴 항암제 내성 측정**

[0122] 항암제 내성은 tetrazolium salt (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)방법으로 측정하였다. 96-well plate에 2×10^5/㎖ 세포의 밀도로 100 ㎕씩 분주하여 37℃, 95% O_2/5%CO_2 배양조에서 16~18시간 동안 안정화시켰다. 시스플라틴을 농도별(0~100㎛M)로 48시간 처리한 후 2.5 mg/ml MTT 용액을 20 ㎕/well씩 첨가하여 2시간 더 반응시켰다. Dimethyl sulfoxide (DMSO) 100 ㎕/well을 넣고 1시간 뒤 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. MTT assay로 측정한 세포의 시스플라틴에 대한 항암제 내성은 측정한 흡광도 값을 각각의 암세포들의 대조군에 대한 백분율로 표시하였고, 세포생존도가 50%로 감소하는 농도를 IC_{50} (50% inhibitory concentration)으로 표시하였다. 11종의 세포주를 시스플라틴 항암제에 반응하는 IC_{50} 에 따라 차례대로 나열하여 항암제에 민감한 군(Sensitive)과 내성을 갖고 있는 군(Resistant), 그리고 민감성 세포주군과 내성 세포주군 사이에 중간내성 정도를 갖는 세포주군(Intermediate)으로 나누었다.

[0123] **실시예 3. Total RNA와 genomic DNA 추출**

[0124] 각 세포주에서 각각 RNeasy mini kit (Qiagen)와 QIAmp mini kit (Qiagen)을 이용하여 total RNA와 genomic DNA를 추출하였다. 추출방법은 제조사의 매뉴얼을 따라 실시하였다. 추출된 total RNA와 genomic DNA는 spectrophotometer를 이용하여 정량하였으며, RNA와 DNA 상태는 1% agarose gel에서 전기영동하여 degradation 여부를 확인하였다.

[0125] **실시예 4. 바이설파이트(Bisulfite) 처리**

[0126] Genomic DNA에 바이설파이트(Bisulfite)를 처리하면 DNA 염기서열 중 5'-CpG-3' 부위의 사이토신이 메틸화된 경우에는 그대로 유지되지만, 비메틸화된 경우에는 우라실로 바뀌어서 메틸화 정도를 측정할 수 있다. 따라서, 메틸화된 시토신과 비메틸화된 시토신을 구별하기 위하여 genomic DNA 를 바이설파이트로 처리하였다. 우선, 2 ㎍의 genomic DNA를 EpiTech Bisulfite kit (Qiagen)을 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 처리하였고, 이렇게 만들어진 바이설파이트 처리된 DNA를 20 ㎕의 H_2O로 녹여서 사용 시까지 -20℃에서 보관하였다. 바이설파이트 처리된 DNA를 사용하여 PCR(polymerase chain reaction)로 증폭하였다.

[0127] **실시예 5. 정량적 실시간 (Quantitative real-time) PCR (qRT-PCR)**

[0128] cDNA합성을 위해 Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen)을 사용하였다. 1 ㎍의 total RNA 와 50 ng oligo dT를 70 ℃에서 10분간 denature한 후 여기에 5X RT buffer 4 ㎕, 0.1 mM DTT 2 ㎕, 2.5 mM dNTP mixture 4 ㎕, Superscript II reverse transcriptase 200 units, RNase inhibitor 10 units 포함한 반응액에 혼합한 20 ㎕반응액을 25 ℃ 에서 10분, 42 ℃에서 50분, 95 ℃에서 5분동안 반응하여 cDNA를 합성한 후 이것을 1:4로 희석하고 이 중 2㎕를 취하여 qRT-PCR의 주형으로 사용하였다. qRT-PCR은 cDNA 2㎕, SYBR Premix EX Taq (Takara Bio) 10㎕, Rox reference dye (50X Takara Bio) 0.4㎕, 각 유전자의 primer 200 nM를 포함한 20㎕ 반응액을 ABI 7500fast sequence detection system (Applied Biosystems)을 이용하여 95 ℃에서 30초 반응한 후, 40 cycles (95 ℃ 에서 3초, 60 ℃ 에서30초) 반복하여 증폭하였다. PCR product의 specificity는 95 ℃에서 15초, 60 ℃에서 1분, 95 ℃에서 15초 동안 반응하여 확인하였다. GAPDH발현을 internal control로 사용하였으며, ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2 유전자의 발현은 GAPDH발현 수준으로 ΔΔCT 방법으로 보정되었다. 사용된 oligonucleotide primer sequence는 다음과 같다 (표 2).

표 2

[0129]

	서열	서열번호
human ANXA4 (forward)	5'-CTGCTGGCTATAGTAAAGTGCATGA-3'	20
human ANXA4 (reverse)	5'-TGCCCGGATATCCAACATGT-3'	21
human CD302 (forward)	5′ -CCACACCCAGCTAACTTTTTGTATT-3′	22
human CD302 (reverse)	5′ -GTAAATGACGGTAGAGGAATAAGAGAAAA-3′	23
human CDC42EP2 (forward)	5′ -GCCTTGCCCTCAAGAACGT-3′	24
human CDC42EP2 (reverse)	5′ -TGCCAAACATCTGAATCAATGTC-3′	25
human EFTUD1 (forward)	5′ -CTGCCTGTTGCTGAAAGCTTT-3′	26
human EFTUD1 (reverse)	5′ -GAATGATCTCCCAATGGCTGAA-3′	27
human KCNE4 (forward)	5′ -AAAATGCTCTGCATGGATTGG-3′	28
human KCNE4 (reverse)	5′ -GCTGTATGTCAAAGCGGACTGA-3′	29
human MBNL2 (forward)	5′ -GCCAGACTTCATCCAGCTTGA-3′	30
human MBNL2 (reverse)	5′ -TCTGTAACAGGCAACTGGATGGT-3′	31
human MICAL2 (forward)	5′ -CTCACACGACACCTGGACCTA-3′	32
human MICAL2 (reverse)	5′ -CCACGCTTATCCAATTTGTACCA-3′	33
human PARP4 (forward)	5′ -GCCACAATGCTGGTACTACAGTTT-3′	34
human PARP4 (reverse)	5′ -TCTTACCCATTCACTTGCTTGCT-3′	35
human SPSB1 (forward)	5′ -TTTTAAAGATTTTCCTCCCTCCTGTT-3′	36
human SPSB1 (reverse)	5′ -TGAGGACGGCTGGGTCAA-3′	37
human SYCP2 (forward)	5′ -TGGCTAAAAGTGTCTTCTGTAATACTGAT-3′	38
human SYCP2 (reverse)	5′ -GCTCCTCTTCTAGCATGTCCTTAAG-3′	39
human GAPDH (forward)	5'-AATCCCATCACCATCTTCCA-3'	40
human GAPDH (reverse)	5'-TGGACTCCACGACGTACTCA-3'	41

[0130]

[0131] **실시예 6. 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) 처리**

[0132] 각 난소암 세포주에 메틸화 억제제인 5-aza-2'-deoxycytidine (Sigma-Aldrich)를 10μM 농도로 3일간 처리한 후 ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2 유전자 발현의 변화를 qRT-PCR 을 이용하여 측정하였다.

[0133] **실시예 7. 항암제 민감성 난소암 세포주 및 항암제 내성 난소암 세포주에서 유전자 발현변화 분석**

[0134] 11종의 난소암 세포주에서 RNA를 추출하여 Affymetrix Human Gene 1.0 ST 을이용하여 mRNA 마이크로어레이를 수행하였다. Scanning 후 얻어진 각 유전자의 발현량 (expression value)을 배경보정 (background correction), RMA 표준화 (RMA normalization) (Biostatistics. 2003 Apr;4(2):249-64. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data), 및 log2 변환 (log2 transformation)을 거쳐 최종적으로 통계분석에 사용하였다. 시스플라틴 민감성 세포군과 내성 세포군에서의 유전자 발현 정도를 비교하여, 시스플라틴 내성과 연관되어 유의하게 발현이 변화하는 유전자를 찾기 위하여 아래와 같은 3가지 분석을 수행하였고 각각의 분석결과에서 유의하게 나타난 유전자를, 두 군에서 차별적으로 발현되는 유전자 (Differentially expressed genes, DEGs)로 선정하였다:

[0135] a. 11종의 난소암 세포주를 시스플라틴 민감성군과 내성군으로 분류하여 두 군간의 발현 변화를 분석하여 민감성 세포주에 대하여 내성 세포주에서 발현 변화가 1.5배 이상 유의하게 변화하고($p < 0.05$) 최고 발현 정도가 7 이상(maximum log2 expression≥7), 및 11종 세포주 내에서 발현 정도의 변화가 1 이상(Δlog2 expression in 11 cell lines≥1.0) 되는 유전자를 찾았다.

[0136] b. 11종의 난소암 세포주의 IC_{50} 값과 각 유전자 발현의 Pearson correlation coefficient가 유의하고($p < 0.05$), 최고 발현 정도가 7 이상, 및 11종 세포주 내에서 발현 정도의 변화가 1 이상 되는 유전자를 찾았다.

[0137] c. 11종의 난소암 세포주의 IC_{50} 값과 각 유전자 발현의 Spearman correlation coefficient가 유의하고($p < 0.05$), 최고 발현 정도가 7 이상, 및 11종 세포주 내에서 발현 정도의 변화가 1 이상 되는 유전자를 찾았다.

[0138] **실시예 8. 항암제 민감성 난소암 세포주 및 항암제 내성 난소암 세포주에서 DNA methylation 변화 분석**

[0139] 11종의 난소암 세포주에서 DNA를 추출한 후 바이설파이트 전환(Bisulfite conversion)을 수행하여 비메틸화된 사이토신을 우라실로 바꾼 후, Human methylation 450 bead chip (illumina)을 사용하여 약 485,000 개의 CpG 부위에 대하여 메틸화 정도를 측정하였다. DNA 메틸레이션 정도는 0~1 값을 갖는 β 값으로 표시되며 β값 0은 해당 CpG 부위가 완전히 비메틸화 된 것을 의미하며, 1은 완전히 메틸화된 것을 의미한다. 시스플라틴 민감성 세포군과 내성 세포군에서의 메틸화 정도를 비교하여, 시스플라틴 내성과 연관되어 유의하게 메틸화 정도가 다른 CpG 부위를 찾기 위하여 아래와 같은 3가지 분석을 수행하였고 각각의 분석결과에서 유의하게 나타난 CpG 부위를 찾았고, 이를 두 군에서 차별적으로 메틸레이션되어 있는 유전자 (Differentially methylated genes, DMGs)로 선정하였다:

[0140] a. 11종의 난소암 세포주를 시스플라틴 민감성군과 내성군으로 분류하여 두 군간의 DNA 메틸레이션 변화를 분석하여 민감성 세포주에 대하여 내성 세포주에서 β value의 변화가 0.25 이상 유의하게 변화한 CpG 부위를 찾았다 ($\beta \geq 0.25$ & $p < 0.05$)

[0141] b. 11종의 난소암 세포주의 IC_{50} 값과 각 CpG 부위의 β value의 Pearson correlation coefficient가 유의한 CpG 부위를 찾았다 ($p < 0.05$)

[0142] c. 11종의 난소암 세포주의 IC_{50} 값과 각 CpG 부위의 β value의 Spearman correlation coefficient가 유의한 CpG 부위를 찾았다 ($p < 0.05$)

[0143] **실시예 9. 항암제 민감성 난소암 세포주 및 항암제 내성 난소암 세포주에서 DNA methylation 변화와 유전자 발현의 통합분석**

[0144] 항암제 치료 내성에 관여하는 유전자 중 메틸레이션에 의해 발현이 조절되는 유전자를 규명하기 위해, DNA 메틸레이션 분석 자료와 유전자 발현 분석자료를 통합 분석 (integration analysis)하여, 각각의 DNA 메틸레이션 분석 자료와 유전자 발현 분석자료에서 사용한 3가지 분석방법 중 2개 이상의 분석 결과에서 유의하게 DNA 저메틸화 및 이에 따른 발현 증가(hypomethylation-up_regulation), DNA 과메틸화 및 이에 따른 발현 감소(hypermethylation-down_regulation)의 관계를 보이는 유전자를 최종 선별하였다 (도 1).

[0145] **실험결과**

[0146] **1. 항암제 민감성 난소암 세포주 및 항암제 내성 난소암 세포주의 분류**

[0147] 난소암 세포주 11종 (OVCAR-3, TOV-21G, TOV-112D, CaOV-3, ES-2, OV-90, PA-1, MDAH 2774, A2780, A2780cp, SK-OV-3)을 시스플라틴 항암제에 반응하는 IC_{50} 에 따라 차례대로 나열하여 항암제에 민감한 군(Sensitive)과 내성을 갖고 있는 군(Resistant), 그리고 민감성 세포주군과 내성 세포주군 사이에 중간내성 정도를 갖는 세포주군(Intermediate)으로 나누었으며, 그 결과는 도 2와 같다.

[0148] **2. 프로모터 CpG 메틸레이션 변화를 이용한 항암제 치료반응 예측 마커의 선정**

[0149] 항암제 민감성 난소암 세포주 및 항암제 내성 난소암 세포주에서 유전자 발현변화 분석 결과를 표 3에 나타내었다. ANXA4, CD302, CDC42EP2, KCNE4, MBNL2, MICAL2, SPSB1 및 SYCP2 유전자의 경우 시스플라틴 민감성 난소암 세포주군에 비하여 내성 세포주군에서 유전자 발현이 증가되어 있었고, EFTUD1 유전자의 경우 내성 세포주군에서 유전자 발현이 감소되어 있었다. 또한, 11종의 난소암 세포주에서 시스플라틴 항암제에 대한 IC_{50} 값과 유전자 발현 정도의 유의성을 살펴본 결과, ANXA4 유전자는 Spearman correlation에서 유의성을 보였고 CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, PARP4, SPSB1 및 SYCP2 유전자는 Pearson correlation과 Spearman correlation 모두에서 유의성을 보였다.

표 3

[0150]

gene symbol	Resistant vs Sensitive		Pearson Correlation		Spearman correlation		Average expression[1)]	Range of expression[2)]
	log2 Fold change	p value	Pearson rho	p value	Spearman rho	p value		
ANXA4	2.48	0.01	0.54	0.085	0.63	0.044	10.76	3.8
CD302	2.96	0.002	0.86	0.001	0.85	0.002	10.01	4.67
CDC42EP2	0.67	0.034	0.76	0.006	0.81	0.004	9.48	1.47
EFTUD1	-1.24	0.001	-0.72	0.013	-0.69	0.023	8.03	2.06
KCNE4	1.86	0.009	0.65	0.029	0.65	0.037	7.19	3.8
MBNL2	1.94	0.018	0.61	0.047	0.63	0.044	10.67	3.92
MICAL2	2.95	0.007	0.74	0.009	0.68	0.025	9.19	4.76
PARP4	0.7	0.005	0.73	0.011	0.75	0.012	11.38	1.19
SPSB1	1.27	0.003	0.75	0.008	0.72	0.017	8.73	1.86
SYCP2	2.44	0.017	0.73	0.011	0.74	0.013	6.49	4.2

[0151] 1) 최고 발현 정도(maximum log2 expression)와 관련됨

[0152] 2) 11종의 세포주 내에서 발현 정도의 변화(Δlog2 expression in 11 cell lines)와 관련됨

[0153] 또한, 항암제 민감성 난소암 세포주 및 항암제 내성 난소암 세포주에서 DNA methylation 변화 분석 결과를 표 4에 나타내었다. ANXA4, CD302, CDC42EP2, KCNE4, MBNL2, MICAL2, SPSB1 및 SYCP2 유전자의 경우 항암제 내성 난소암 세포주에서 프로모터 CpG 부위의 DNA 메틸레이션이 감소하였으며, EFTUD1 의 경우 항암제 내성 난소암 세포주에서 프로모터 CpG 부위의 DNA 메틸레이션이 증가하였다. 또한, 11종의 난소암 세포주에서 시스플라틴 항암제에 대한 IC_{50} 값과 프로모터 CpG 메틸레이션의 변화 정도의 유의성을 살펴본 결과, KCNE4 및 MBNL2 유전자는 Spearman correlation에서 유의성을 보였고, MICAL2 유전자는 Pearson correlation에서 유의성을 보였고, ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, PARP4, SPSB1 및 SYCP2 유전자는 Pearson correlation과 Spearman correlation 모두에서 유의성을 보였다.

표 4

[0154]

gene symbol	Location of CpG site	Resistant vs Sensitive		Pearson Correlation		Spearman correlation		Range of methylation[1)]
		difference in β value	p value	Pearson rho	p value	Spearman rho	p value	
ANXA4	5'UTR	-0.56	0.017	-0.65	0.037	-0.63	0.036	0.81
CD302	TSS1500	-0.47	0.002	-0.77	0.008	-0.74	0.009	0.77
	TSS1500	-0.38	0.01	-0.91	0	-0.64	0.035	0.79
	TSS1500	-0.55	0.001	-0.79	0.006	-0.84	0.001	0.83
CDC42EP2	5'UTR	-0.34	0.051	-0.66	0.031	-0.77	0.006	0.78
	5'UTR	-0.2	0.154	-0.67	0.028	-0.63	0.039	0.8
EFTUD1	TSS1500	0.27	0.094	0.64	0.04	0.61	0.047	0.54
KCNE4	TSS200	-0.35	0.015	-0.84	0.003	-0.68	0.021	0.77
	TSS1500	-0.39	0.029	-0.62	0.048	-0.63	0.038	0.81
	TSS200	-0.31	0.04	-0.6	0.056	-0.66	0.027	0.72
	TSS1500	-0.41	0.036	-0.58	0.066	-0.63	0.038	0.81
	TSS1500	-0.43	0.012	-0.82	0.004	-0.71	0.014	0.81
MBNL2	5'UTR	-0.46	0.016	-0.66	0.031	-0.73	0.011	0.72
	5'UTR	-0.57	0.003	-0.52	0.107	-0.62	0.041	0.78
	5'UTR	-0.43	0.007	-0.84	0.003	-0.65	0.031	0.79
MICAL2	5'UTR	-0.5	0.021	-0.7	0.021	-0.54	0.088	0.76
PARP4	5'UTR	-0.42	0.138	-0.85	0.004	-0.63	0.049	0.92
SPSB1	5'UTR	-0.28	0.013	-0.63	0.044	-0.73	0.011	0.57
SYCP2	TSS1500	-0.66	0.001	-0.7	0.021	-0.82	0.002	0.8

[0155] 1) 11종의 세포주의 최대 β value에서 최소 β value를 뺀 값을 의미함

[0156] 표 5는 항암제 민감성 난소암 세포주 및 항암제 내성 난소암 세포주에서 유의적인 DNA 메틸레이션 발현 변화를 나타낸 CpG 부위의 위치를 나타낸 것이다. 염색체 위치는 The December 2013 Human reference sequence (GRCh38)에 따라 표시한 것이다.

표 5

[0157]

유전자	서열	염색체 위치
ANXA4	CTGGCCAAAATATGGACAAAAGACCGTCCGTAAGTTACTAGCTGGGTGCTAGGCTGGAAT[CG]ATTCTTATTTAAGATGGCCTAGTAGGCAGGCCTCCAAATTTGTTTTCATTCCTTTACCTT (서열번호 1)	ch2: 69770033-69770154
CD302	AGCTTCTCTAAATATTGACATTGTATATAACGCCAGTGCAGTGATCAAACACAGGGCACT[CG]CACTGGGATAATGCGATTAGCTAATCTACAGCACTTACCACATTTCATTAATTGCCCCTC (서열번호 2)	ch2: 159798495-159798616
	TGACATTGTATATAACGCCAGTGCAGTGATCAAACACAGGGCACTCGCACTGGGATAATG[CG]ATTAGCTAATCTACAGCACTTACCACATTTCATTAATTGCCCCTCTAAGGGTCCTTTTCT (서열번호 3)	ch2: 159798510-159798631
	AGCACAAGAGATTTCCGTAACCCTTCAGCCAGCTTCTCTAAATATTGACATTGTATATAA[CG]CCAGTGCAGTGATCAAACACAGGGCACTCGCACTGGGATAATGCGATTAGCTAATCTACA (서열번호 4)	ch2: 159798465-159798586
CDC42EP2	GTGAGTGAGACAGCTGTCAGGGACGCCCAATTTGTTGTGGAAACACTCAGGCTGTCTTGG[CG]CTGCCGTGTGATGGGGTTGGGGGTGCGGGGAGGACCTGGCCCAGGCTCTGGGTACATCCC (서열번호 5)	ch11: 65316855-65316976
	TAGATGGAGGAGATCTGGGGACCCACTGTTCCCAGCCTAGCTGTGAGCCCCTTTCTCTCC[CG]CTCCCCAAACATATTATGGAAGTAGGCGTGGCCCACTGCATGGGAACCACGTGGACCAGG (서열번호 6)	ch11: 65316443-65316564
EFTUD1	AAGAAACGGCTGGTGTAGCGGCGGGCCCGGGCTTGGGAGCCGACCTAGGGCCTAGGTGCA[CG]GAGCCGGCTCCTCGGGAACCCTGAGAGTGGCCGTCCCCCGGAGATGAAGGGACGAGGGCG (서열번호 7)	ch15: 82262935-82263056
KCNE4	ACTTTGGGGTAACGGTTCCAGCACAGCACATCCCTTTCTCCTCTTTTCACTCATCGTCAC[CG]CTACCTGAAAACCCTGGCCGGGTGCTGGGGCTTGAGGAGCAGTTCCCACTTCCCAGTCTT (서열번호 8)	ch2: 223051909-223052030
	GTAGCCCAATAATGGTTATTCCCCAGGAGCCGCGCGAAGCATGAGCTAATTTTCAGTGAG[CG]CGGACTTTGGGGTAACGGTTCCAGCACAGCACATCCCTTTCTCCTCTTTTCACTCATCGT (서열번호 9)	ch2: 223051844-223051965
	ACAGCTGCAAAGTTCAGGGAGTTGAACTGCAGTGCTTTCAGTTCACTGCTCACTCTGCCA[CG]ATCAATCTCTGTTGTAAATTTTCCTCCCAGAGCACGTGACGATGCACTTCTTGACTATAT (서열번호 10)	ch2: 223052042-223052163
	ATTATGGGATTCAGCTGCCTCTGAAAACCTGTAGCCCAATAATGGTTATTCCCCAGGAGC[CG]CGCGAAGCATGAGCTAATTTTCAGTGAGCGCGGACTTTGGGGTAACGGTTCCAGCACAGC (서열번호 11)	ch2: 223051814-223051935
	TTATTTGCATAAGGAGTGGAAGAACTGAAACCGAAGCCCCAGTTCCTTGACTGTAAATCC[CG]CACTTGCTTCCAACTGTCTTTCATCCAGATTATGGGATTCAGCTGCCTCTGAAAACCTGT (서열번호 12)	ch2: 223051724-223051845
MBNL2	GTCGATGTCTCAAGATTTCTTGGTTCATCTTTATGATGCCAAAGCACACACCCTCTACCT[CG]TTTGTTTCAGTCACCCTGGGTTCTTGTTGGAATGGCCCAGGGAGCTCCATGTAAATCATG (서열번호 13)	ch13: 97257602-97257723
	TTTCAATTTGCTGTTGCTATGGTGAAAACAAATCAATATCACATGGCTACCAGCCAGTCC[CG]CGCTCAGGGAGTGCCATAGAAATTCAAGATCAGGTACTCAAGATTCCAAGCAAGAATTGG (서열번호 14)	ch13: 97225103-97225224
	TGAAGGAGCAGTCAAAGGCCAGGATGGTTGGGGGGAGTCAGAAAGTATGGGGCCAGTCAC[CG]AGGTCAGTGTAGGCCGTCAGAAGACTCTTGACAGTCCCGCTCTGTGAGGTGGGGAGCCAT (서열번호 15)	ch13: 97260256-97260377
MICAL2	GGTGCCCTGACTGCAGCCAACAATAGAATTTGTTTAGCCATCTTGCTATTCCTTTCTTCA[CG]TGCAAAACTTGTTGGAGGCCAGGGAGAGATTCTCTGTCCATTTCCTCTTGCTGGGTGAAG (서열번호 16)	ch11: 12138155-12138276
PARP4	TTAAACATAAATCTGCGGTCTGTTCTTAGCACCTGCGGCTGCGTGGGAGGTATGGAAAGG[CG]CACTTTGGGTTTCGTGAAATCTCAAGTCAGGTCTTGACTTCTCTCTTTCCACAGATTCAT (서열번호 17)	ch13: 24511103-24511224
SPSB1	TCACATGACGGGGTGGGAGCTGAATGTGAATGTGACTCCTGAGCTGCAGCTTCTAACCAT[CG]AGTGATGCACACTCTGAGGCCCACAGTGACATGTGCATGGCACCCTTGGCCTGATGCCAG (서열번호 18)	ch1: 9315508-9315629

SYCP2	GCTTCTCGCCTGCCGGCTTGAAAGGCCAAGCCGAAGCCCCACCCTCCCTCCGCGCCCCGC[CG]TGGGGGAAGCCCACCCAGGCACTCTGCTCAACCTGCCTGCGGCAGGAGGCGTCCGCGTAG (서열번호 19)	ch20: 59933471-59933592

[0158] 항암제 민감성 난소암 세포주 및 항암제 내성 난소암 세포주에서 DNA methylation 변화와 유전자 발현의 통합분석 결과, 유의하게 DNA 저메틸화 및 이에 따른 발현 증가(hypomethylation-up_regulation), DNA 과메틸화 및 이에 따른 발현 감소(hypermethylation-down_regulation)의 관계를 보이는 유전자 10종(ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, SPSB1 및 SYCP2)을 항암제 치료 반응 예측 마커로 최종 선정하였다.

[0159] ANXA4는 항암제 민감성 세포주군에 대하여 내성 세포주군에서 유전자 발현이 5.6 배 증가함과 동시에 프로모터 CpG 부위에서 저메틸화 되어 있었으며, 11종의 난소암 세포주에서 시스플라틴 항암제에 대한 IC_{50} 값과 유전자 발현 및 프로모터 CpG의 DNA 메틸화 변화 정도가 Spearman correlation에서 유의성을 보였으므로, ANXA4 유전자의 프로모터 CpG 부위에서 일어나는 DNA 메틸레이션의 변화를 항암제 치료반응 예측 마커로 선정하였다.

[0160] CD302는 항암제 민감성 세포주군에 대하여 내성 세포주군에서 유전자 발현이 7.8 배 증가함과 동시에 프로모터 CpG 부위에서 저메틸화 되어 있었으며, 11종의 난소암 세포주에서 시스플라틴 항암제에 대한 IC_{50} 값과 유전자 발현 및 프로모터 CpG의 DNA 메틸화 변화 정도가 Pearson correlation 과 Spearman correlation에서 유의성을 보였으므로, CD302 유전자의 프로모터 CpG 부위에서 일어나는 DNA 메틸레이션의 변화를 항암제 치료반응 예측 마커로 선정하였다.

[0161] CDC42EP2는 항암제 민감성 세포주군에 대하여 내성 세포주군에서 유전자 발현이 1.59배 증가되어 있었으며, 11종의 난소암 세포주에서 시스플라틴 항암제에 대한 IC_{50} 값과 유전자 발현 및 프로모터 CpG의 DNA 메틸화 변화 정도가 Pearson correlation 과 Spearman correlation에서 유의성을 보였으므로, CDC42EP2 유전자의 프로모터 CpG 부위에서 일어나는 DNA 메틸레이션의 변화를 항암제 치료반응 예측 마커로 선정하였다.

[0162] EFTUD1는 항암제 민감성 세포주군에 대하여 내성 세포주군에서 유전자 발현이 2.36배 감소되어 있었으며, 11종의 난소암 세포주에서 시스플라틴 항암제에 대한 IC_{50} 값과 유전자 발현 및 프로모터 CpG의 DNA 메틸화 변화 정도가 Pearson correlation 과 Spearman correlation에서 유의성을 보였으므로, EFTUD1 유전자의 프로모터 CpG 부위에서 일어나는 DNA 메틸레이션의 변화를 항암제 치료반응 예측 마커로 선정하였다.

[0163] KCNE4는 항암제 민감성 세포주군에 대하여 내성 세포주군에서 유전자 발현이 3.63 배 증가함과 동시에 프로모터 CpG 부위에서 저메틸화 되어 있었으며, 11종의 난소암 세포주에서 시스플라틴 항암제에 대한 IC_{50} 값과 유전자 발현 및 프로모터 CpG의 DNA 메틸화 변화 정도가 Spearman correlation에서 유의성을 보였으므로, KCNE4 유전자의 프로모터 CpG 부위에서 일어나는 DNA 메틸레이션의 변화를 항암제 치료반응 예측 마커로 선정하였다.

[0164] MBNL2는 항암제 민감성 세포주군에 대하여 내성 세포주군에서 유전자 발현이 3.83 배 증가함과 동시에 프로모터 CpG 부위에서 저메틸화 되어 있었으며, 11종의 난소암 세포주에서 시스플라틴 항암제에 대한 IC_{50} 값과 유전자 발현 및 프로모터 CpG의 DNA 메틸화 변화 정도가 Spearman correlation에서 유의성을 보였으므로, MBNL2 유전자의 프로모터 CpG 부위에서 일어나는 DNA 메틸레이션의 변화를 항암제 치료반응 예측 마커로 선정하였다.

[0165] MICAL2는 항암제 민감성 세포주군에 대하여 내성 세포주군에서 유전자 발현이 7.73배 증가함과 동시에 프로모터 CpG 부위에서 저메틸화 되어 있었으며, 11종의 난소암 세포주에서 시스플라틴 항암제에 대한 IC_{50} 값과 유전자 발현 및 프로모터 CpG의 DNA 메틸화 변화 정도가 Pearson correlation 에서 유의성을 보였으므로, MICAL2 유전자의 프로모터 CpG 부위에서 일어나는 DNA 메틸레이션의 변화를 항암제 치료반응 예측 마커로 선정하였다.

[0166] PARP4는 항암제 민감성 세포주군에 대하여 내성 세포주군에서 유전자 발현이 1.62배 증가되어 있었으며, 11종의 난소암 세포주에서 시스플라틴 항암제에 대한 IC_{50} 값과 유전자 발현 및 프로모터 CpG의 DNA 메틸화 변화 정도가 Pearson correlation 과 Spearman correlation에서 유의성을 보였으므로, PARP4 유전자의 프로모터 CpG 부위에서 일어나는 DNA 메틸레이션의 변화를 항암제 치료반응 예측 마커로 선정하였다.

[0167] SPSB1는 항암제 민감성 세포주군에 대하여 내성 세포주군에서 유전자 발현이 2.4배 증가함과 동시에 프로모터 CpG 부위에서 저메틸화 되어 있었으며, 11종의 난소암 세포주에서 시스플라틴 항암제에 대한 IC_{50} 값과 유전자 발현 및 프로모터 CpG의 DNA 메틸화 변화 정도가 Pearson correlation 과 Spearman correlation에서 유의성을 보였으므로, SPSB1 유전자의 프로모터 CpG 부위에서 일어나는 DNA 메틸레이션의 변화를 항암제 치료반응 예측

마커로 선정하였다.

[0168] SYCP2는 항암제 민감성 세포주군에 대하여 내성 세포주군에서 유전자 발현이 5.43배 증가함과 동시에 프로모터 CpG 부위에서 저메틸화 되어 있었으며, 11종의 난소암 세포주에서 시스플라틴 항암제에 대한 IC_{50} 값과 유전자 발현 및 프로모터 CpG의 DNA 메틸화 변화 정도가 Pearson correlation 과 Spearman correlation에서 유의성을 보였으므로, SYCP2 유전자의 프로모터 CpG 부위에서 일어나는 DNA 메틸레이션의 변화를 항암제 치료반응 예측 마커로 선정하였다.

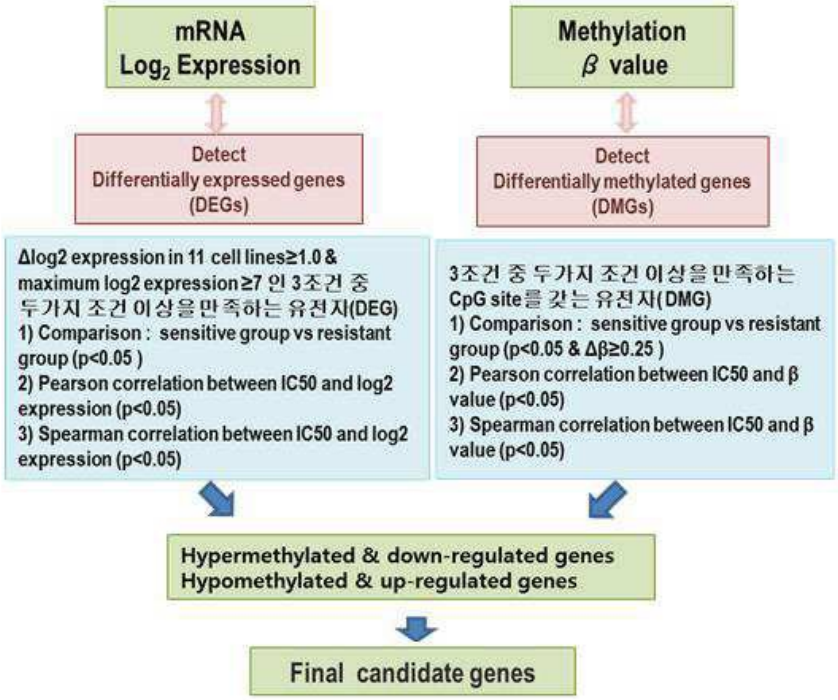
[0169] **3. 난소암 세포주에서 유전자의 프로모터 CpG 메틸레이션의 변화에 의한 유전자 발현의 조절 확인**

[0170] 각 난소암 세포주에 탈 DNA메틸레이션 제제인 5-aza-2'-deoxycytidin을 3일간 처리한 후, 선정된 유전자 10종 (ANXA4, CD302, CDC42EP2, EFTUD1, KCNE4, MBNL2, MICAL2, SPSB1 및 SYCP2) 의 유전자 발현의 변화를 조사한 결과, 이들 유전자 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 위 유전자들의 발현이 DNA methylation에 의해 조절되는 것을 의미한다 (도 3 내지 도 12).

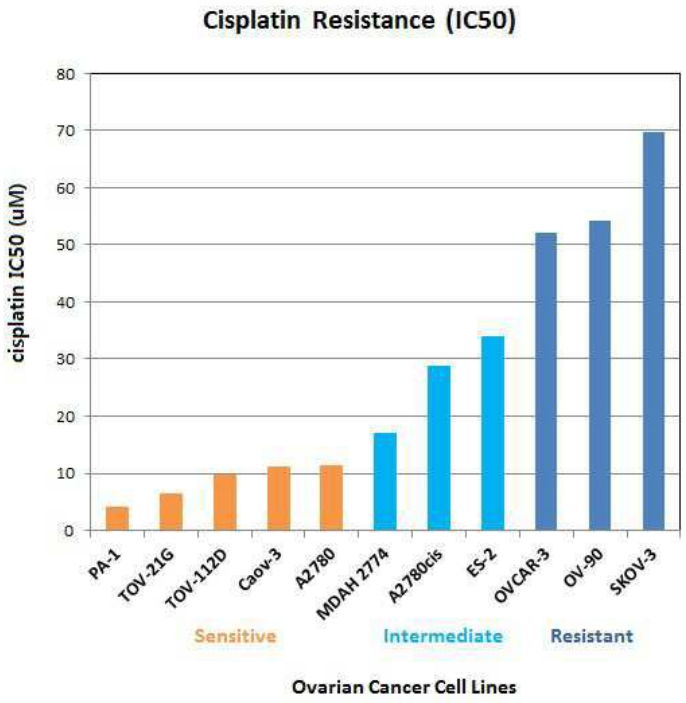
[0171] 이러한 실험 결과들은, 항암제 내성 난소암 세포주에서 유의적인 발현 변화를 나타내는 10종의 유전자가 각 유전자의 프로모터 부위의 특정 CpG 부위의 저메틸화 및/또는 과메틸화에 의해서 조절되며, 이를 항암제 치료 반응을 예측하기 위한 마커로 사용할 수 있음을 의미한다.

도면

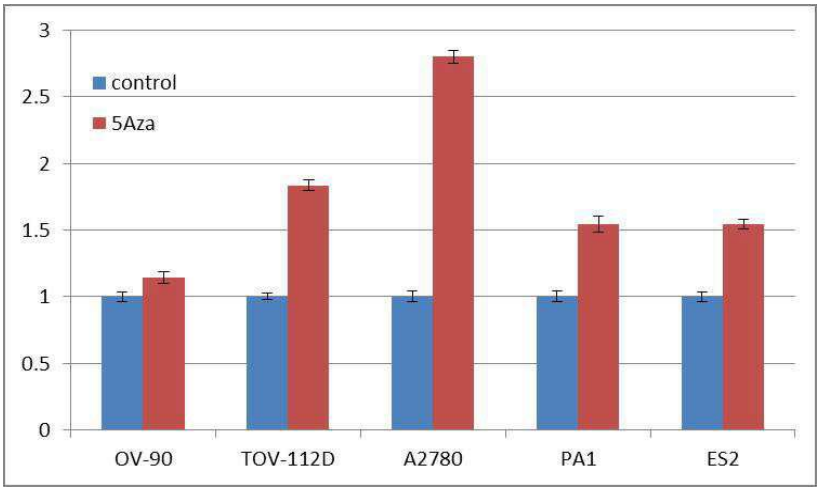
도면1



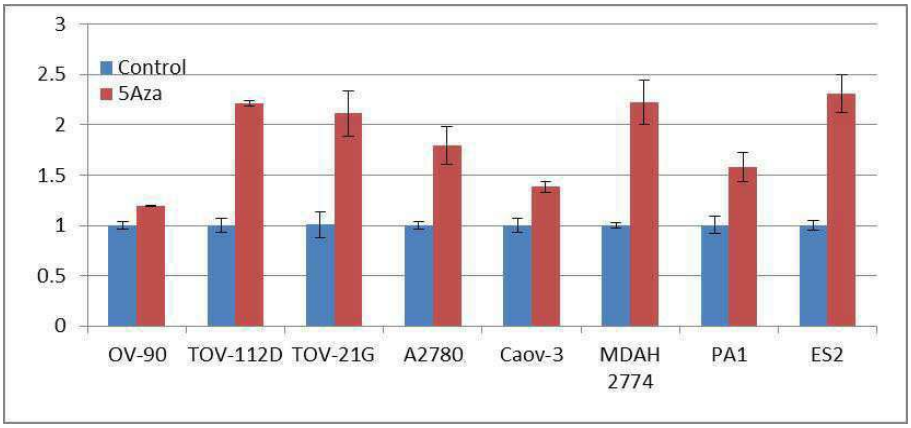
도면2


Cisplatin Resistance (IC50)
cisplatin IC50 (uM)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
PA-1
TOV-21G
TOV-112D
Caov-3
A2780
MDAH 2774
A2780cis
ES-2
OVCAR-3
OV-90
SKOV-3
Sensitive
Intermediate
Resistant
Ovarian Cancer Cell Lines

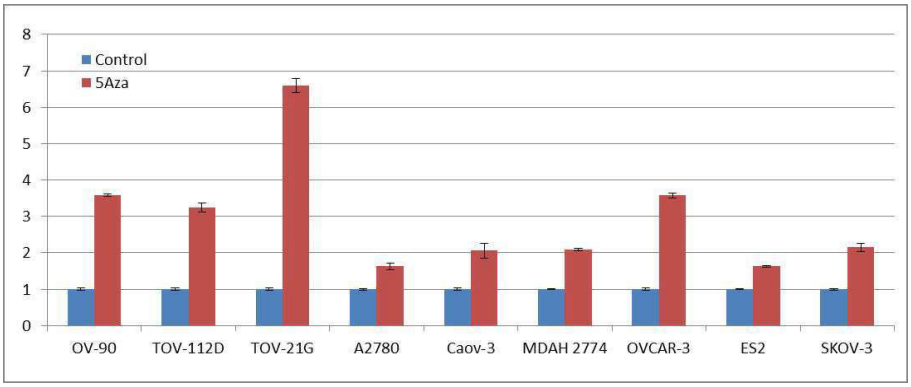
도면3


3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
control
5Aza
OV-90
TOV-112D
A2780
PA1
ES2

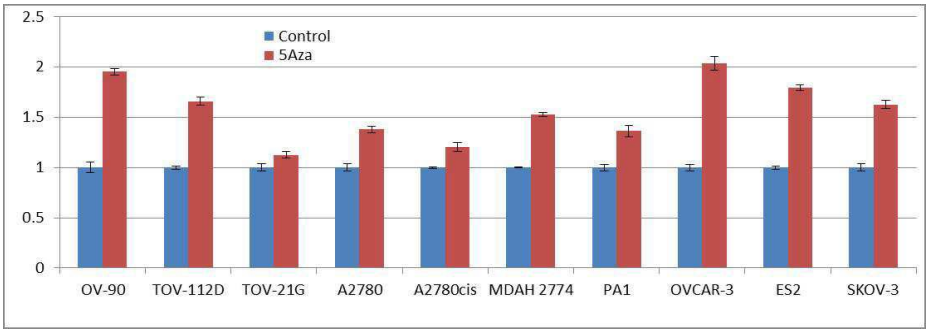
도면4


3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Control
5Aza
OV-90
TOV-112D
TOV-21G
A2780
Caov-3
MDAH 2774
PA1
ES2

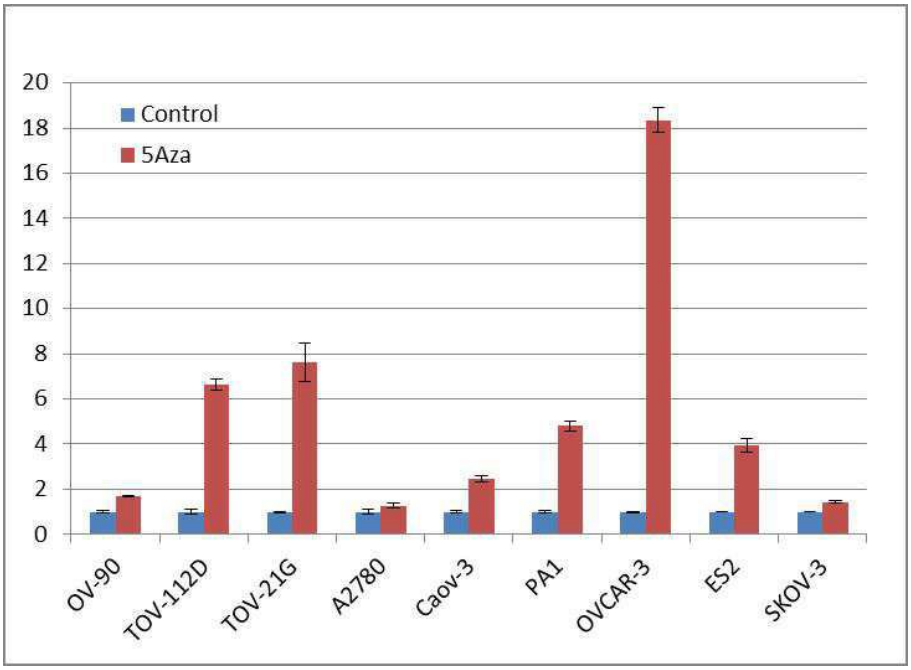
도면5


8
7
6
5
4
3
2
1
0
Control
5Aza
OV-90
TOV-112D
TOV-21G
A2780
Caov-3
MDAH 2774
OVCAR-3
ES2
SKOV-3

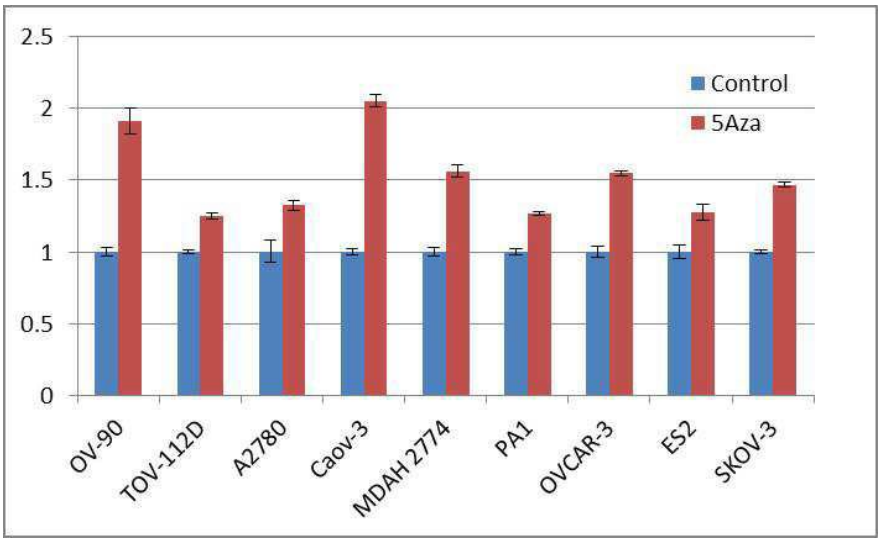
도면6


2.5
2
1.5
1
0.5
0
Control
5Aza
OV-90
TOV-112D
TOV-21G
A2780
A2780cis
MDAH 2774
PA1
OVCAR-3
ES2
SKOV-3

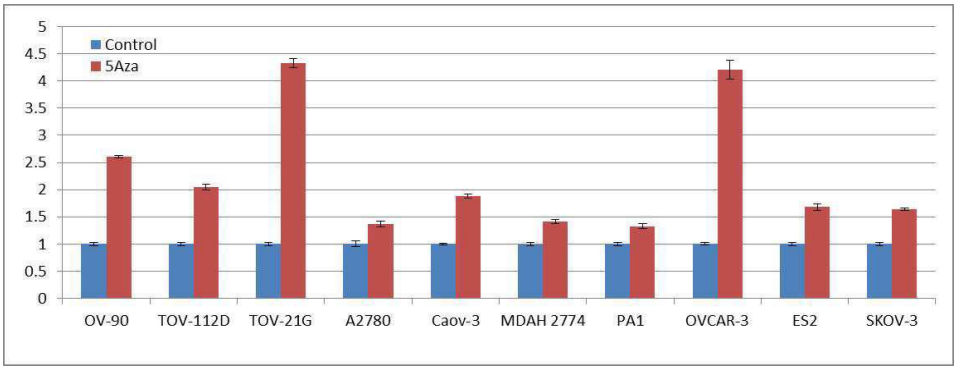
도면7


20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Control
5Aza
OV-90
TOV-112D
TOV-21G
A2780
Caov-3
PA1
OVCAR-3
ES2
SKOV-3

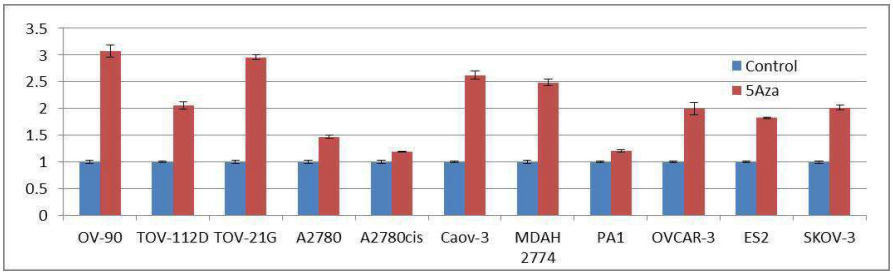
도면8


2.5
2
1.5
1
0.5
0
Control
5Aza
OV-90
TOV-112D
A2780
Caov-3
MDAH 2774
PA1
OVCAR-3
ES2
SKOV-3

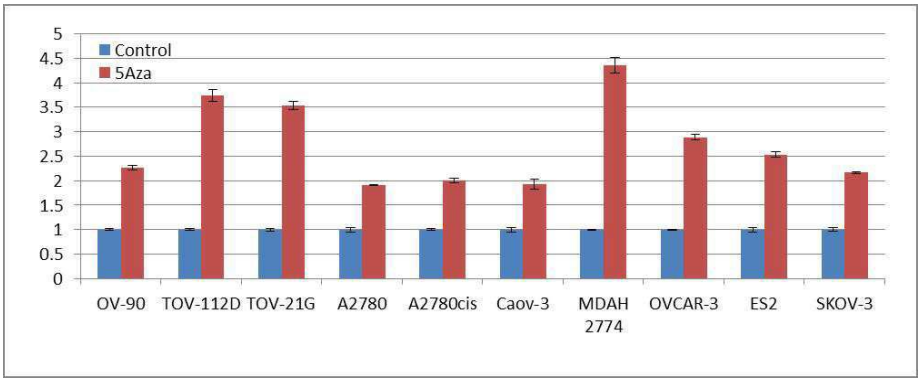
도면9



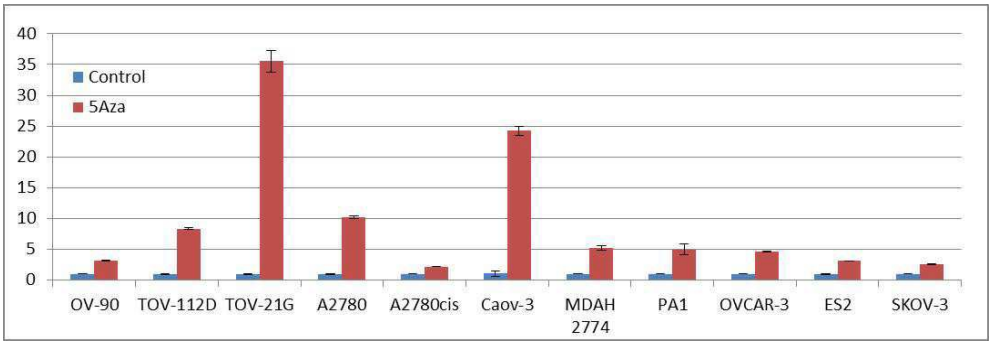
도면10



도면11



도면12



서 열 목 록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Composition for predicting the response to anti-cancer drug of ovarian cancer using CpG methylation status in promoter region of CD302 gene and uses thereof

<130> DPP20145429KR

<160> 41

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> promoter

<222> (1)..(122)

<223> CpG in promoter region of ANXA4 gene (Chr2: 69770033-69770154)

<400> 1

ctggccaaaa tatggacaaa agaccgtccg taagttacta gctgggtgct aggctggaat 60

cgattcttat ttaagatggc ctagtaggca ggcctccaaa tttgttttca ttcctttacc 120

tt 122

<210> 2

<211> 122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> promoter

<222> (1)..(122)

<223> CpG in promoter region of CD302 gene (Chr2: 159798495-159798616)

<400> 2

agcttctcta aatattgaca ttgtatataa cgccagtgca gtgatcaaac acagggcact 60

cgcactggga taatgcgatt agctaatcta cagcacttac cacatttcat taattgcccc 120

tc 122

<210> 3

<211> 122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> promoter

<222> (1)..(122)

<223> CpG in promoter region of CD302 gene (Chr2: 159798510-159798631)

<400> 3

tgacattgta tataacgcca gtgcagtgat caaacacagg gcactcgcac tgggataatg 60

cgattagcta atctacagca cttaccacat ttcattaatt gcccctctaa gggtcctttt 120

ct 122

<210> 4

<211> 122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> promoter

<222> (1)..(122)

<223> CpG in promoter region of CD302 gene (Chr2: 159798465-159798586)

<400> 4

agcacaagag atttccgtaa cccttcagcc agcttctcta aatattgaca ttgtatataa 60

cgccagtgca gtgatcaaac acagggcact cgcactggga taatgcgatt agctaatcta 120

ca 122

<210> 5

<211> 122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> promoter

<222> (1)..(122)

<223> CpG in promoter region of CDC42EP gene (Chr11: 65316855-65316976)

<400> 5

gtgagtgaga cagctgtcag ggacgcccaa tttgttgtgg aaacactcag gctgtcttgg 60

cgctgccgtg tgatggggtt gggggtgcgg ggaggacctg gcccaggctc tgggtacatc 120

cc 122

<210> 6

<211> 122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(122)

<223> CpG in promoter region of CDC42EP gene (Chr11: 65316443-65316564)

<400> 6

tagatggagg agatctgggg acccactgtt cccagcctag ctgtgagccc ctttctctcc 60

cgctccccaa acatattatg gaagtaggcg tggcccactg catgggaacc acgtggacca 120

gg 122

<210> 7

<211> 122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> promoter

<222> (1)..(122)

<223> CpG in promoter region of EFTUD1 gene (Chr15: 82262935-82263056)

<400> 7

aagaaacggc tggtgtagcg gcgggcccgg gcttgggagc cgacctaggg cctaggtgca 60

cggagccggc tcctcgggaa ccctgagagt ggccgtcccc cggagatgaa gggacgaggg 120

cg 122

<210> 8

<211> 122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> promoter

<222> (1)..(122)

<223> CpG in promoter region of KCNE4 gene (Chr2: 223051909-223052030)

<400> 8

actttggggt aacggttcca gcacagcaca tccctttctc ctcttttcac tcatcgtcac 60

cgctacctga aaaccctggc cgggtgctgg ggcttgagga gcagttccca cttcccagtc 120

tt 122

<210> 9

<211> 122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> promoter

<222> (1)..(122)

<223> CpG in promoter region of KCNE4 gene (Chr2: 223051844-223051965)

<400> 9

gtagcccaat aatggttatt ccccaggagc cgcgcgaagc atgagctaat tttcagtgag 60

cgcggacttt ggggtaacgg ttccagcaca gcacatccct ttctcctctt ttcactcatc 120

gt 122

<210> 10

<211> 122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> promoter

<222> (1)..(122)

<223> CpG in promoter region of KCNE4 gene (Chr2: 223052042-223052163)

<400> 10

acagctgcaa agttcaggga gttgaactgc agtgctttca gttcactgct cactctgcca 60

cgatcaatct ctgttgtaaa ttttcctccc agagcacgtg acgatgcact tcttgactat 120

at 122

<210> 11

<211> 122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> promoter

<222> (1)..(122)

<223> CpG in promoter region of KCNE4 gene (Chr2: 223051814-223051935)

<400> 11

attatgggat tcagctgcct ctgaaaacct gtagcccaat aatggttatt ccccaggagc 60

cgcgcgaagc atgagctaat tttcagtgag cgcggacttt ggggtaacgg ttccagcaca 120

gc 122

<210> 12

<211> 122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220

><221> promoter

<222> (1)..(122)

<223> CpG in promoter region of KCNE4 gene (Chr2: 223051724-223051845)

<400> 12

ttatttgcat aaggagtgga agaactgaaa ccgaagcccc agttccttga ctgtaaatcc 60

cgcacttgct tccaactgtc tttcatccag attatgggat tcagctgcct ctgaaaacct 120

gt 122

<210> 13

<211> 122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> promoter

<222> (1)..(122)

<223> CpG in promoter region of MBNL2 gene (Chr13: 97257602-97257723)

<400> 13

gtcgatgtct caagatttct tggttcatct ttatgatgcc aaagcacaca ccctctacct 60

cgtttgtttc agtcaccctg ggttcttgtt ggaatggccc agggagctcc atgtaaatca 120

tg 122

<210> 14

<211> 122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> promoter

<222> (1)..(122)

<223> CpG in promoter region of MBNL2 gene (Chr13: 97225103-97225224)

<400> 14

tttcaatttg ctgttgctat ggtgaaaaca aatcaatatc acatggctac cagccagtcc 60

cgcgctcagg gagtgccata gaaattcaag atcaggtact caagattcca agcaagaatt 120

gg 122

<210> 15

<211> 122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> promoter

<222> (1)..(122)

<223> CpG in promoter region of MBNL2 gene (Chr13: 97260256-97260377)

<400> 15

tgaaggagca gtcaaaggcc aggatggttg gggggagtca gaaagtatgg ggccagtcac 60

cgaggtcagt gtaggccgtc agaagactct tgacagtccc gctctgtgag gtggggagcc 120

at 122

<210> 16

<211> 122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> promoter

<222> (1)..(122)

<223> CpG in promoter region of MICAL2 gene (Chr11: 12138155-12138276)

<400> 16

ggtgccctga ctgcagccaa caatagaatt tgtttagcca tcttgctatt cctttcttca 60

cgtgcaaaac ttgttggagg ccagggagag attctctgtc catttcctct tgctgggtga 120

ag 122

<210> 17

<211> 122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> promoter

<222> (1)..(122)

<223> CpG in promoter region of PARP4 gene (Chr13: 24511103-24511224)

<400> 17

ttaaacataa atctgcggtc tgttcttagc acctgcggct gcgtgggagg tatggaaagg 60

cgcactttgg gtttcgtgaa atctcaagtc aggtcttgac ttctctcttt ccacagattc 120

at 122

<210> 18

<211> 122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220

><221> promoter

<222> (1)..(122)

<223> CpG in promoter region of SPSB1 gene (Chr1: 9315508-9315629)

<400> 18

tcacatgacg gggtgggagc tgaatgtgaa tgtgactcct gagctgcagc ttctaaccat 60

cgagtgatgc acactctgag gcccacagtg acatgtgcat ggcacccttg gcctgatgcc 120

ag 122

<210> 19

<211> 122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> promoter

<222> (1)..(122)

<223> CpG in promoter region of SYCP2 gene (Chr20: 59933471-59933592)

<400> 19

gcttctcgcc tgccggcttg aaaggccaag ccgaagcccc accctccctc cgcgccccgc 60

cgtgggggaa gcccacccag gcactctgct caacctgcct gcggcaggag gcgtccgcgt 120

ag 122

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human ANXA4 (forward) primer

<400> 20

ctgctggcta tagtaaagtg catga 25

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human ANXA4 (reverse) primer

<400> 21

tgcccggata tccaacatgt 20

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human CD302 (forward) primer

<400> 22

ccacacccag ctaacttttt gtatt 25

<210> 23

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human CD302 (reverse) primer

<400> 23

gtaaatgacg gtagaggaat aagagaaaa 29

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human CDC42EP2 (forward) primer

<400> 24

gccttgccct caagaacgt 19

<210> 25

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human CDC42EP2 (reverse) primer

<400> 25

tgccaaacat ctgaatcaat gtc 23

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> human EFTUD1 (forward) primer

<400> 26

ctgcctgttg ctgaaagctt t 21

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human EFTUD1 (reverse) primer

<400> 27

gaatgatctc ccaatggctg aa 22

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human KCNE4 (forward) primer

<400> 28

aaaatgctct gcatggattg g 21

<210> 29

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human KCNE4 (reverse) primer

<400> 29

gctgtatgtc aaagcggact ga 22

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human MBNL2 (forward) primer

<400> 30

gccagacttc atccagcttg a 21

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human MBNL2 (reverse) primer

<400> 31

tctgtaacag gcaactggat ggt 23

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human MICAL2 (forward) primer

<400> 32

ctcacacgac acctggacct a 21

<210> 33

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human MICAL2 (reverse) primer

<400> 33

ccacgcttat ccaatttgta cca 23

<210> 34

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human PARP4 (forward) primer

<400> 34

gccacaatgc tggtactaca gttt 24

<210> 35

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human PARP4 (reverse) primer

<400> 35

tcttacccat tcacttgctt gct 23

<210> 36

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human SPSB1 (forward) primer

<400> 36

ttttaaagat tttcctccct cctgtt 26

<210> 37

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human SPSB1 (reverse) primer

<400> 37

tgaggacggc tgggtcaa 18

<210> 38

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human SYCP2 (forward) primer

<400> 38

tggctaaaag tgtcttctgt aatactgat 29

<210> 39

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human SYCP2 (reverse) primer

<400> 39

gctcctcttc tagcatgtcc ttaag 25

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human GAPDH (forward) primer

<400> 40

aatcccatca ccatcttcca 20

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human GAPDH (reverse) primer

<400> 41

tggactccac gacgtactca 20