(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0034557
(43) 공개일자 2010년04월01일

(51) Int. Cl.
C12N 15/12 (2006.01) *C12N 15/10* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0093759
(22) 출원일자 2008년09월24일
심사청구일자 2008년09월24일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
김열홍
서울특별시 송파구 방이동 89 올림픽선수촌아파트 257-305
성재숙
서울특별시 구로구 개봉2동 333-8 스카이빌 203호
(74) 대리인
이문섭

전체 청구항 수 : 총 3 항

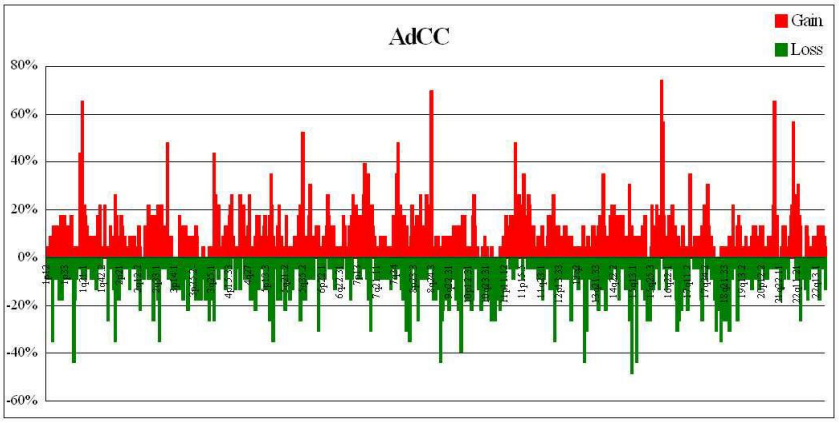
(54) 폐선암 수술 후 초기 재발 예측용 바이오마커

(57) 요 약

본 발명은 폐선암 수술 후 초기 재발 예측용 바이오마커에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 폐선암 환자의 전 염색체 상에서 특정 부위의 유전자 변이를 관찰함으로써 초기 재발 여부를 확인하기 위한 바이오 마커에 관한 것이다.

본 발명에서는 수술 및 치료 후 초기 재발 폐암 환자와 재발하지 않은 폐암 환자 사이의 염색체 변화 차이를 어레이-CGH 방법을 사용하여 확인하고, 두 그룹 간 통계적 유의성을 갖는 클론들을 선택하여 FISH 방법으로 재확인하였다. 또한 선택된 클론들과 재발 유무와의 연관성과 임상적 효용성을 ROC curve와 Kaplan-Meier 생존분석을 통해 확인하였다. 그리고 선택된 클론의 각 염색체 변화 부위에 존재하는 유전자들 중 암화 과정이나 전이, 예후에 관련된 유전자의 카피 수 변화를 real-time qPCR을 통해 확인하여 폐선암 환자의 재발 예측 마커로서의 유용성을 확인하였다.

대 표 도



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	A010250A7100407M700020A
부처명	한국보건산업진흥원
연구사업명	보건의료기술개발사업
연구과제명	(총괄)폐암 및 유방암/난소암 유전체 연구센터(산학)
주관기관	고려대학교
연구기간	2007년 4월 1일 ~ 2008년 3월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

인간의 전체 게놈 중 염색체 부위 5q21.3, 7p11.2, 9q34.11, 10p11.22, 11p13, 11p15.1, 11p15.4, 12p13.31, 16p13.12, 16q22.1, 17q11.2 및 21q22.11로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 염색체 부위 또는 그 핵산서열을 포함하는 폐선암 수술 후 초기 재발 예측을 위한 바이오 마커.

청구항 2

제 1항의 바이오 마커에 선택적으로 결합 가능한 핵산서열을 포함하고,

상기 바이오 마커에서 유전자 변이를 확인하기 위한 검출장치를 포함하는 폐선암 수술 후 초기 재발 예측용 진단키트.

청구항 3

폐선암 환자의 암조직 또는 암세포로부터 핵산을 추출하는 단계;

상기 핵산을 제 1항 바이오 마커에 선택적으로 결합 가능한 핵산서열과 혼성화시켜 교잡복합체를 형성시키는 단계; 및

상기 교잡복합체를 검출하는 단계를 포함하는 폐선암 수술 후 초기 재발 예측방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 폐선암 수술 후 초기 재발 예측용 바이오마커에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 폐암 환자들의 치료 후 높은 초기 재발을 예측함으로써 재발률을 낮추는 데 기여하기 위하여, 폐선암 환자의 전 염색체 상에서 특정 부위의 유전자 변이를 관찰함으로써 초기 재발 여부를 확인하기 위한 바이오 마커에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 세포의 유전자 변형은 종양의 발생과 진행에 밀접한 관계가 있다. 종양은 발생과 진행시기에 종양유전자, 종양억제유전자, DNA mismatch repair 유전자, 세포의 노화나 세포 자멸사 등과 관련된 유전자 변이가 동반되는 다단계 과정으로 알려져 있으며, 이는 염색체의 자리 옮김, 결손, 증폭 등의 현상으로 나타날 수 있다. 이러한 유전자변형을 찾기 위하여 다양한 세포유전학적 혹은 분자유전학적 기법들이 이용되어 왔으며 이에 의해 발견된 특이적인 염색체 이상은 암의 진단이나 예후를 평가하는데 적용될 수 있다.

[0003] 비교유전체보합법(comparative genomic hybridization, CGH)이란 통상적인 세포유전학적 분석으로는 용이하지 않았던 전 염색체 상에서의 상대적인 염색체의 변화를 한번에 알 수 있게 해주고 있다. 이는 종양조직으로부터 얻은 DNA와 정상 DNA를 각기 다르게 표지한 후 정상 중기 염색체에 경쟁적으로 결합시켜 정상 DNA 결합 신호에 대한 종양 DNA의 결합신호의 비율에 따라 종양에서의 증폭 혹은 결실된 부분을 쉽게 검출해낼 수 있는 방법으로, 여러 고형암에서의 활발한 연구가 진행되어 왔다. 그러므로 암 연구에서의 CGH 기법은 암의 진행과 클론의 진행 분석, 암의 세분류와 예후 등을 연구하는데 유용하게 이용될 수 있으며 암과 관련된 유전자를 규명하고 분석하는 데 이용된다. 그러나 CGH의 가장 큰 단점은 해상도가 20 Mb로 감별력이 낮아, 변형 유전자의 위치를 정확히 검출해 내지 못한다는 것에 있다. 또한, CGH 기술은 중기(Metaphase)로 유도한 염색체를 현미경 상에서 판단해야 하기 때문에 염색체 상의 미세한 부분의 변화를 알 수가 없어서 실제적인 해상력은 20Mb 이상이며 조작과 결과 분석의 어려움으로 인해 많은 시간과 노력을 요구한다. 따라서, 이러한 CGH 기술과 DNA chip 기술을 혼합하여 염색체 DNA의 수적 변화를 조사할 수 있는 새로운 genomic DNA chip (Array-CGH)이 고안되었다. 어레이-CGH(Array-CGH)는 글라스 슬라이드(Glass Slide) 위에 중기로 유도된 염색체 대신에 염색체 상에서 정확한 위치를 알고 있는 DNA 단편(DNA Fragment)을 심어 놓은 것으로 기존의 CGH와는 비교할 수 없는 높은 해상력을 가진다. 어레이-CGH인 BAC Chip은 슬라이드 위에 시퀀스맵핑(Sequence Mapping)이 끝난 BAC 클론을 올려놓음

으로써 각 클론의 수적인 변화를 한 번의 실험으로 확인할 수 있다. 이러한 시도는 앰플리콘(amplicons)안에서 질병의 중요한 요인인 유전자의 발견을 촉진할 뿐 아니라, 이미 알려진 유전자 발현 정보와의 수평적 비교를 통해 질병의 분자진단 및 치료에 많은 발전을 가져올 수 있다.

[0004] 현재 유방암에서 다양한 어레이-CGH 연구가 이루어진 것에 반해 폐암에서는 폐암의 조직형에 따른 염색체 카피 수(copy number)의 변화 연구와 폐암 세포 주에서의 염색체 변화 연구는 있었으나, 폐암에서 재발유무에 따른 염색체 카피 수 변화의 연구는 아직 이루어지지 않았다.

[0005] 폐암은 전 세계적으로 높은 치사율을 보이는 암 종이며, 한국에서 역시 암 종류 중 발생률 2위와 치사율 1위를 나타낸다. 폐암은 크게 소세포암과 비소세포암으로 구분되며, 비소세포암이 전체 폐암의 약 80%를 차지하며 선암 40%, 편평상피암 40%와 대세포암 및 기타로 구분된다. 폐암은 다른 조직형에 따라 다른 임상적 과정을 거치며, 개별적인 치료적 접근이 필요하다. 세포의 유전자 변형은 종양의 발생과 진행에 밀접한 관계가 있다. 어레이-CGH 방법을 이용한 염색체 변이 연구는 유방암에서의 다양한 어레이-CGH 연구가 이루어진 것에 반해 폐암에서는 폐암의 세포형에 따른 염색체 카피 수의 변화 연구와 폐암 세포 주에서의 염색체 변화 연구는 있었으나, 폐암에서 재발유무에 따른 염색체 카피 수 변화의 연구는 아직 이루어지지 않았다. 따라서 본 발명은 어레이-CGH 방법을 이용해 폐암 중 선암 환자의 수술 후 초기 재발 환자와 비재발 환자 사이의 통계적 유의성을 가지며 임상적 유용성이 있는 염색체 변화부위를 선별하여 초기 재발 가능성을 미리 예측하는데 사용하고자 한다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 수술 및 치료 후 초기 재발 폐암 환자와 재발하지 않은 폐암 환자 사이의 염색체 변화 차이를 어레이-CGH 방법을 사용하여 확인하고, 두 그룹 간 통계적 유의성을 갖는 클론들을 선택함으로서 이들 클론들이 폐선암 환자의 재발 예측 마커로 사용될 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 어레이-CGH 방법을 이용해 폐암 중 선암 환자의 수술 후 초기 재발 환자와 비재발 환자 사이의 통계적 유의성을 가지며, 임상적 유용성이 있는 염색체 변화부위를 선별하여 초기 재발 가능성을 미리 예측하는데 사용하고자 하는 폐선암 수술 후 초기 재발 예측용 바이오마커 및 이를 포함하는 진단키트를 제공하는 데 있다.

과제 해결수단

[0008] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 인간의 전체 게놈 중 염색체 부위 5q21.3, 7p11.2, 9q34.11, 10p11.22, 11p13, 11p15.1, 11p15.4, 12p13.31, 16p13.12, 16q22.1, 17q11.2 및 21q22.11로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 염색체 부위 또는 그 핵산서열을 포함하는 폐선암 수술 후 초기 재발 예측을 위한 바이오 마커를 제공한다.

[0009] 상기 12개의 염색체 부위는 본 발명에 따른 어레이-CGH 분석결과, 비소세포 폐암 중 선암의 초기 재발환자에게서 비재발 환자에 비해 DNA 카피 수가 변화됨을 확인하였다(도 4 참조).

[0010] 본 발명에서, 상기 염색체 부위는 인간의 중기 염색체를 염색하였을 때 나타나는 밴드 패턴인 사이토밴드(cytoband)의 명명법에 따라 명명되었다. 구체적으로 상기 염색체 부위에서 영문자 "p" 및 "q"는 DNA 복제가 끝나고 두 개의 염색분체가 동원체(centromere)에 의해 묶여있는 상태인 세포 분열 중기의 염색체에서 동원체를 기준으로 짧은 쪽을 단완(short-arm) 혹은 p 암(p-arm), 긴 쪽을 장완(long-arm) 혹은 q 암(q-arm)이라 하는데, 각각 "p 암" 및 "q 암"을 의미한다. 예를 들어, "염색체 8p23.1"은 인간의 8번 염색체의 p 암에 위치하고, "염색체 17p11.2"는 인간의 17번 염색체의 p 암에 위치한다.

[0011] 이를 좀 더 설명하면, 1960년도 후반에 과학자들은 키나크린 무스타드(quinacrine mustard) 염색된 식물의 염색체에서 특징적인 염색 패턴을 보이는 것을 발견했다(Caspersson et al., 1968). 이런 밴딩 기술은 인간의 염색체에 적용되었고(Caspersson et al., 1971), 이런 밴드 패턴은 세밀화될 수 있고, 정상의 염색체가 혼동 없이 쉽게 동정될 수 있을 뿐만 아니라 주요한 구조적 변형도 또한 특징화될 수 있다는 것이 밝혀졌다. 부위(region)와 밴드는 연속하여서 동원체로부터 각각의 염색체 암(arm)의 바깥쪽으로 번호가 정해졌다. 특정한 독특한 밴드 랜드마크(landmark)가 각각의 암을 부위(region)로 분할하기 위해 선택되었다. 이러한 랜드마크는 랜드마크의 끝쪽 부위에 전적으로 속하고 그 부위의 첫번째 밴드로 여겨졌다. 따라서 첫번째 발견되는 랜드마크는 부위

2의 시작이 된다. 이렇게 정해진 부위는 그 부위의 염색패턴에 따라 두개 또는 그 이상으로 나누어진다. 예를 들어, 부위 8q2는 4개의 밴드로 나누어져, 8q21, 8q22, 8q23, 8q24로 된다. 늦은 전기에서의 염색체를 사용한 증가된 밴드 해상도로, 중기 염색체의 낮은 해상도 밴드의 어떤 것들은 새롭게 등장하는 고해상도 밴드에 따라 더욱더 나누어질 수 있다. 만약 존재하는 밴드가 하위로 나누어질 때, 소수점이 원래의 밴드 위치 뒤에 놓이고 하위 밴드를 할당하는 숫자가 뒤따른다. 예를 들면 회색 염색, 고해상도 밴드는 8q22 밴드를 하위 밴드 8q22.1, 8q22.2, 8q22.3으로 나뉜다. 8q22.1가 8q22.3보다 동원체에 더 가깝다. 만약 하위 밴드가 더욱 나누어지면, 추가적인 숫자가 추가된다(Kuo-Ho Yen 등, Bioinformatics 2005 21(17):3469-3474).

[0012] 본 발명에 사용된 "어레이-CGH(Array-CGH)"는 글라스 슬라이드(Glass Slide) 위에 중기로 유도된 염색체 대신에 염색체 상에서 정확한 위치를 알고 있는 DNA 단편(DNA Fragment)을 심어 놓은 것이다. 본 발명의 실시예에서는 어레이-CGH로서 BAC(Bacterial artificial chromosome) Chip을 이용하였으며, 슬라이드 위에 시퀀스맵핑(Sequence Mapping)이 끝난 BAC 클론을 올려놓음으로써 각 클론의 수적인 변화를 한 번의 실험으로 확인할 수 있었다.

[0013] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 바이오 마커에 선택적으로 결합 가능한 핵산서열을 포함하고, 상기 바이오 마커에서 유전자 변이를 확인하기 위한 검출장치를 포함하는 폐선암 수술 후 초기 재발 예측용 진단키트를 제공한다.

[0014] 상기 바이오 마커에 선택적으로 결합 가능한 핵산서열은 어레이-CGH에 시퀀스맵핑이 끝난 클론으로부터 얻을 수 있다. 예를 들어 표 1을 참조하면, 본 발명에 사용된 어에리-CGH와 같이, BAC 클론 202에서 사이토밴드 11p15.4의 맵핑 위치는 2811177-2898536이고 이들의 시퀀스맵핑이 끝난 BAC 클론의 일부 또는 전체가 본 발명의 바이오 마커에 결합 가능한 핵산서열일 수 있다.

[0015] 본 발명의 진단키트에서, 상기 검출장치는 FISH 분석결과를 검출하기 위한 형광현미경 또는 마이크로어레이 분석결과를 검출하기 위한 이미지 스캐너 등이 사용될 수 있으며, 상기 바이오 마커에서 재현되는 유전자 변이를 다음과 같은 방법으로 측정하게 된다. 종양조직으로부터 얻은 DNA와 정상 DNA를 각기 다르게 표지한 후 상기 바이오 마커와 경쟁적으로 결합시켜 종양 DNA 결합 신호에 대한 정상 DNA의 결합신호의 비율에 따라 종양에서의 증폭 또는 소실을 검출하게 된다. 상기 결합신호의 비율이 대략 0.25 이상, -0.25 이하인 경우를 유전자 변이가 관찰된 것으로 판단한다.

[0016] 본 발명의 실시예에서는, 종양조직의 gDNA는 Cy3로, 참조 gDNA는 Cy5로 표지하고 상기 바이오 마커와 결합시킨 후 이미지 스캐너(검출장치)를 사용하여 Cy3:Cy5 결합신호 비율의 로그(log) 값을 구해 0.25 이상인 경우를 증가(gain), -0.25 이하인 경우를 감소(loss)로 판단하였다.

[0017] 본 발명에서, 상기 진단키트는 DNA 칩일 수 있다.

[0018] 상기 DNA 칩을 제작하는 방법은 하기 표 1과 같이 통상적인 방법을 사용할 수 있다.

[0019] [표 1]. 통상적인 DNA 칩 제작방법

제작기술	특징	종류
핀 마이크로어레이 (pin microarray)	핀을 이용한 마이크로스폿팅 (microspotting)	cDNA 및 올리고뉴클레오티드
잉크젯(inkjet)	잉크젯 원리를 이용한 마이크로드롭핑(microdropping)	cDNA 및 올리고뉴클레오티드
포토리소그래피 (photolithography)	포토리소그래피를 이용한 올리고뉴클레오티드 직접합성	올리고뉴클레오티드
전기적 어레이 (electronic array)	전기를 이용한 올리고뉴클레오티드 어드레싱(addressing)	올리고뉴클레오티드

[0020]

[0021] 더욱 구체적인 DNA 칩 제작방법은 일반적으로 다음과 같다. 염기서열이 밝혀진 DNA 서열들을 사용하여, 이들 DNA 서열의 시작과 끝 부분에 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 하기 위해 필요한 염기서열인 프라이머를 컴퓨터에 의하여 찾아낸다. 이들 프라이머들은 서로 비슷한 결합온도(annealing temperature)를 가지고 있어서 동시에 여러 DNA 서열들을 PCR할 수 있어야 한다. PCR을 한 후 성공 여부는 아가로스 겔에서 검사하고 증폭된 DNA 서열들을 적당한 농도로 농축을 한다. 이렇게 증폭, 농축된 DNA 서열들을 마이크로어레이어 기계로 보통 현미경

실험에 자주 쓰이는 글라스 슬라이드에 심는다. 글라스는 폴리-L-라이신 글라스 이외에도 실레인(silane), 실리레이트(silylate), 수퍼-아민(super-amine)으로 코팅된 글라스를 사용할 수 있다. 글라스의 코팅은 마이크로어레이어에 의해 옮겨진 프로브의 고정을 위해 필요하다. 프로브의 고정을 위해 프로브의 3' 또는 5' 위치에 글라스에 코팅된 물질과 상보적으로 공유결합을 할 수 있는 염기를 삽입할 수 있다. 예를 들면 아민기로 코팅된 글라스에 프로브를 고정시키기 위해서 프로브의 3' 또는 5' 위치에 링커컬럼을 이용하여 알데히드기를 삽입한다. 또한 공유결합 반응이 원활이 이루어지도록 하기 위해 적당한 습도에서 1시간 이상 반응을 유도하고, 6시간 이상 방치하여 DNA 프로브를 고정시킨다.

[0022] 상기 DNA 칩에서의 분석은, 시료 핵산을 위에서 언급한 것과 동일한 방법으로 Cy3와 Cy5로 표지한 후 DNA 칩에 결합시켜 결합 강도를 측정함으로써 유전자 변이 여부를 판단할 수 있다.

[0023] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 폐선암 환자의 암조직 또는 암세포로부터 핵산을 추출하는 단계; 상기 핵산을 제 1항 바이오 마커에 선택적으로 결합 가능한 핵산서열과 혼성화시켜 교잡복합체를 형성시키는 단계; 및 상기 교잡복합체를 검출하는 단계를 포함하는 폐선암 수술 후 초기 재발 예측방법을 제공한다.

[0024] 본 발명의 예측방법에서, 상기 교잡복합체를 검출하기 위해 Cy3-dUTP, Cy5-dUTP와 같은 형광물질을 사용할 수 있다. 이러한 형광 표지는 임의의 색깔차이로 인해 유전자 변이의 강도를 측정하기 위함이다. 유전자 변이의 강도를 측정할 때 Cy3는 532nm 파장에서 녹색을 띠게 되고 Cy5는 635nm에서 빨간색을 띠게 된다. 상기 예시된 형광물질 이외에도 다양한 표지 물질을 사용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0026] **실험대상**

[0027] 암 조직은 2001년 11월부터 2004년 10월까지 고려대학교 의료원에서 폐암 진단받고 수술 또는 조직 생검한 선암 환자 21예를 대상으로 하였다. 환자의 동결 폐 조직표본은 국가지정 동결폐조직은행으로부터 제공받았으며 고대의료원의 임상시험심사위원회(IRB)의 승인 하에 수행되었다. 초기 재발환자(Early-relapse)는 수술 후 2년 이내 재발한 환자로 11예이며, 비 재발 환자(Non-relapse)는 2년 이내 재발하지 않은 환자로 10예이다. 비 재발환자의 평균나이는 62세, 남자 5명, 여자 5명이며, 초기 재발환자의 평균나이는 64세, 남자 5명, 여자 6명이다.

[0028] **실시예 1. 조직 genomic DNA의 추출**

[0029] 상기 실험대상에서 얻은 각 조직으로부터의 genomic DNA의 추출은 PUREGENE DNA 정제 키트 (Gentra, Minneapolis, MN)를 이용하여 수행하였다. 동결 폐조직 10-20 mg에 600 ㎕의 세포용해 용액(lysis solution)을 넣어 균질화한 후, 3 ㎕의 프로티나아제 K 용액(proteinase K solution)을 넣고 섞은 후 55℃ 항온조에서 6시간 반응시켰다. RNase A 3 ㎕를 넣은 후 37℃에서 1시간 두었다. 200㎕의 단백질 침전 용액(protein precipitation solution)을 넣고 13,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상층액에 이소프로판올 600 ㎕ 넣어 부드럽게 섞은 후 13,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 DNA 침전에 70% 에탄올 600 ㎕를 넣어 2분간 원심분리 하여 상층액을 버리고 5분간 실온에서 말렸다. DNA hydration solution 100 ㎕를 넣고 65℃에서 1시간 동안 두었다가 농도를 측정하였다.

[0030] **실시예 2. 어레이-비교 유전체 보합법 (array-CGH) 분석**

[0031] MACArray™-Karyo 1.4K BAC-chip (Macrogen, Seoul, Korea)은 1440개의 BAC (bacterial artificial chromosome) 클론으로 이루어진 것으로 FISH를 통해 그 위치가 확인된 마이크로어레이 주형이며 해상도는 최대 2Mbp이다. 각 클론 번호의 서열 및 염색체 부위에 관한 정보는 www.macrogen.com/kor/biochip/genelist.jsp에서 확인할 수 있다.

[0032] Invitrogen Random priming labeling Kit(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 종양조직의 gDNA에 Cy3를, 대조군 gDNA에 Cy5를 표지하였다. 그 방법은 다음과 같다. 정제된 폐선암 환자들의 gDNA 0.5 ㎍과 대조군 gDNA(Promega, Madison, WI) 0.5 ㎍에 각각 증류수를 21 ㎕를 넣고, Random reaction solution(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 20 ㎕ 더해 100℃ heat block에서 5분간 변성시킨 후, 얼음에 5분간 두었다. 변성된 각 DNA는 3 ㎕의 Cy3와 Cy5를 넣어 표지하고, 1 ㎕의 크레노우 단편(klenow fragment)과 섞어 37℃에서 16시간 이상 인큐베이션 하였다. 표지된 각 DNA는 Qiagene spin column (Qiagene, Valencia, CA)을 사용하여 정제한 후

MACArray™-Karyo 1.4K BAC-chip (Macrogen, Seoul, Korea)에 보합버퍼(hybridization buffer; Macrogen, Seoul, Korea)를 사용하여 37℃의 보합챔버(hybridization chamber)에서 72시간 동안 보합반응 시켰다.

[0033] 보합반응이 끝나면 수세용액(50% formamide, 2X SSC)으로 수세하여 건조시킨 후, ArrayScanncer™ (Macrogen, Seoul, Korea)와 MAC Viewer v1.6.3 (Macrogen, Seoul, Korea)을 사용하여 Cy3:Cy5 intensity ratio의 log 값을 구해 0.25 이상인 경우를 증가(gain), -0.25 이하인 경우를 감소(loss)로 분석하였다.

[0034] 분석 결과, 클론 위치의 유전자 추정은 University of Calfonia, Santa Cruz (UCSC) human genome database (http://www.genome.ucsc.edu)를 사용하였다. 추정 결과는 하기 표 2에 나타내었다.

[0035] 도 1은 어레이-CGH를 이용하여 선암 환자들(AdCC)의 전체 염색체의 획득(gain) 또는 소실(loss)의 빈도수를 분석한 결과이고, 도 2a 및 도 2b는 그 중에서 초기 비재발환자(Non-relapse) 및 초기재발환자(Early-relapse)의 전체 염색체의 획득 또는 소실의 빈도수를 분석한 결과이다.

[0036] **실시예 3. 후보 클론들의 통계적 유의성 분석**

[0037] 상기 실시예 2의 그룹별 빈도수 결과를 오류발견률(False discovery rate, FDR) 테스트를 통해 환자 그룹(초기재발 환자와 비재발 환자) 간 통계적 유의성 있는 차이를 보이는 후보 클론들을 선정하고, 이들의 사이토밴드(cytoband)를 확인하였다. 여기서, 상기 FDR 테스트는 Case-control study에서 검사의 대상(N)이 증가 할수록 (예 100K, 1M chip, expression chip) 임의 오차 (random error)가 증가하기 때문에 다중검정 (multiple testing)의 문제점을 해결하기 위해서 개발된 분석기법 중 하나로서, 대량의 유전 마커를 이용한 연관성연구에 매우 유용한 방법이다. 본 실시예에서는 R 2.6.0 software(http://r-project.org)를 사용하여 FDR 테스트를 실시하였고 *p*-value의 값을 가장 큰 것부터 순서대로 나열하고 *p*-value가 0.05 이하의 12개의 후보 클론을 하기 표 2와 같이 선정하였다.

[0038] [표 2]. 초기 재발군과 비재발 군 간의 통계적 차이를 보이는 후보 클론들

BAC_No	BAC_start	BAC_end	Cyto.	Genes	*p*-value	N_gain (n)	N_loss (n)	E_gain (n)	E_loss (n)
202	2811177	2898536	11p15.4	KCNQ1, KCNQ1DN, CDKN1C, SLC22A18AS	0.0380	8(80%)	0	3(27.3%)	0
1406	106757798	106856173	5q21.3	EFNA5	0.0411	0	5(50%)	0	0
839	55002043	55102035	7p11.2	EGFR	0.0411	4(40%)	0	0	0
1112	5580555	5683898	12p13.31	TMEM16B	0.0443	1(10%)	3(30%)	0	0
1156	13369407	13465245	16p13.12	NA	0.0443	4(40%)	0	0	0
1245	132266880	132364697	9q34.11	HMCN2, ASS	0.0443	3(30%)	1(10%)	0	0
1250	32657344	32743665	10p11.22	EPC1	0.0443	0	4(40%)	0	0
1504	34544563	34630524	11p13	EHF	0.0443	4(40%)	0	0	0
1578	27246684	27409341	17q11.2	UTP6, SUZ12	0.0443	0	5(50%)	1(9%)	0
469	67959410	68054859	16q22.1	TERF2, CYB5B	0.0443	3(30%)	1(10%)	0	0
574	33763179	33831886	21q22.11	TMEM50B, RPS5L, GART	0.0443	0	4(40%)	0	0
810	19817846	19982397	11p15.1	NAV2	0.0443	4(40%)	0	0	0

[0039]

[0040] BAC_NO; BAC clone ID

[0041] BAC_start; 사이토밴드에서 BAC clone의 시작위치

[0042] BAC_end; 사이토밴드에서 BAC clone의 끝위치

[0043] Cyto.; 사이토밴드, 클론의 해당 염색체 위치

[0044] Genes; UCSC site(http://www.genome.ucsc.edu)를 통해 확인된 위치에 존재하는 유전자

[0045] *p*-value; FDR test를 통해 초기재발과 비재발 그룹간 차이의 통계분석 결과

[0046] N-gain (n); Non-relpase(비재발) 그룹에서 array CGH 분석결과 gain으로 확인된 개수 (n)

[0047] N-loss (n); Non-relpase(비재발) 그룹에서 array CGH 분석결과 loss로 확인된 개수 (n)

[0048] E-gain (n); Early-relpase(초기재발) 그룹에서 array CGH 분석결과 gain으로 확인된 개수 (n)

[0049] E-loss (n); Early-relpase(초기재발) 그룹에서 array CGH 분석결과 loss로 확인된 개수 (n)

[0050] 상기 표 2에서, N-그룹(비재발)에서 BAC 클론 ID 202, 839, 1156, 1245, 1504, 469, 810은 gain으로 분석되었으며, BAC 클론 ID 1406, 1112, 1250, 1578, 574는 loss로 분석되었다. 즉, BAC 클론 ID 202(11번 염색체 2811177~2898536)는 비재발 환자 그룹 10명중 8명(80%)이 $\log_2$ ratio 0.25이상으로 gain으로 확인되었고, 초기재발 환자 11명중에서는 3명(27.3%)이 gain으로 판정되었다. BAC 클론 ID 1406(5번 염색체 106757798~106856173) 부분은 비재발 환자 5명(50%)에서 $\log_2$ ratio가 -0.25이하로 loss로 확인되었고, 초기재발 환자군에서는 해당부위의 copy number 변화가 있는 환자가 없었다. BAC 클론 ID 839 (7번 염색체 55002043~55102035) 부분은 비재발 환자 4명(40%)에서만 gain으로 확인되었고, BAC 클론 ID 1112(12번 염색체 5580555~5683898)은 비재발 환자군에서 3명(30%)에서 loss로, BAC 클론 ID 1156(16번 염색체 13369407~13465245)은 비재발 환자 4명(40%)에서만 gain으로 확인되었고, BAC 클론 ID 1245(9번 염색체 132266880~132364697)는 비재발군 3명(30%)에서 gain, BAC 클론 ID 1250(10번 염색체 32657344~32743665)는 비재발군 4명(40%)에서 loss, BAC 클론 ID 1504(11번 염색체 34544563~34630524)는 비재발군 4명(40%)에서 gain, BAC 클론 ID 1578(17번 염색체 27246684~27409341)은 비재발군 5명(50%)가 loss, BAC 클론 ID 469(16번 염색체 67959410~68054859)는 비재발군 3명(30%)에서 gain, BAC 클론 ID 574(21번 염색체 33763179~33831886)는 비재발군 4명(40%)에서 loss, BAC 클론 ID 810(11번 염색체 19817846~19982397)은 비재발군 4명(40%)에서 gain으로 판정되었다. 이와 같이 어레이 CGH 방법을 통해 비재발 환자군과 초기재발 환자군사이에 다른 변화를 보이는 염색체 부분들을 screening하여, 통계적 의미있는 비재발 그룹에서 특이적으로 다른 염색체상 변이 부분 12개 부위를 확인하였다. 따라서 폐선암 수술 환자로부터 상기 클론에 해당하는 염색체 부위의 gain 또는 loss를 분석함으로써 수술 후 초기재발여부를 예측할 수 있으며, 이들 각각은 폐선암 수술 후 초기재발을 예측하는 마커로서 사용할 수 있다. 또한, 상기 각 마커들의 조합을 분석함으로써 초기재발 예측의 정확도를 더 높일 수 있다.

[0051] 도 3에서는, Cluster 2.11 software (http://bonsai.ims.u-tokyo.ac.jp/~mdehoon/software/cluster/software.htm)을 사용한 계층적 클러스터링(Hierarchical clustering)을 수행하여 선정된 클론들의 유의성을 다시 확인하였다. 선택된 12개 클론들에 대해 계측적 클러스터링 분석 결과, 두 그룹 간 완벽히 2개의 클러스터로 나누어지진 않았지만, N-그룹(비재발)들과 E-그룹(초기재발)이 유사하게 나누어지는 것으로 나타났다.

[0052] 하기 표 3에서는, 상기 표 2에 나타난 12개 클론들 중 변화된 클론 수인 컷오프(cutoff) 값에 따라 민감도(sensitivity)와 특이도(specificity)를 구하였으며, 컷오프 값이 4일 때 가장 의미 있는 민감도와 특이도를 가짐을 확인하였다.

[0053] [표 3]. 유의한 12개 클론들에서 cutoff 값에 따른 민감도와 특이도

Cutoff	Non-relapse (n=10)	Early-relapse (n=11)	Sensitivity	Specificity
1	8	5	0.80	0.45
2	8	1	0.80	0.91
4	8	0	0.80	1.00
5	5	0	0.50	1.00
7	4	0	0.40	1.00
8	3	0	0.30	1.00
10	2	0	0.20	1.00

[0054]

[0055] 또한 도 5a와 5b에서는, Kaplan-Meier method를 사용하여 relapse free survival(수술 및 치료 후 재발없이 생존한 기간)을 선택된 클론들의 컷오프 값(cutoff value)과 비교하였고, ROC curve(Receiver operating characteristic curve)를 구해 그 유의성을 확인하였다. 분석에는 SPSS 10.0 software (SPSS Inc., Cicago.I

L)를 사용하였다. 구체적으로, 도 5a에서 컷오프 값이 4일 때, area under the curve(AUC)는 0.894이고 *p*-value는 0.002로 통계적으로 유의한 값을 얻었고, 도 5b에서 컷오프 값이 4일 때 그렇지 않은 경우에 비해 통계적으로 유의하게 (*p*-value 0.00016) 재발 기간이 긴 것으로 확인되었다.

[0056] **실시예 4. 형광동소보합법(Fluorescence in situ hybridization, FISH)**

[0057] 파라핀 조직은 슬라이드를 만들어 씻어 말렸다. 프로브는 1.4 BAC-chip (Macrogen, Seoul, Korea)에서 사용된 BAC 클론과 동일 부위에 대해 동일한 사이즈로 제작된 MacProbe (Macrogen, Seoul, Korea)를 사용하였다. 따라서 어레이 CGH 결과에서 확인된 클론과 완전히 같은 부분을 재확인 할 수 있다. 각각 플루오레세인 이소치오시아네이트(fluorescein isothiocyanate, FITC)와 로다민(rhodamin)으로 표지된 프로브들이 들어있는 10 ㎕의 이중 보합 믹스(dual hybridization mix)를 사용하여 75℃에서 5분간 변성 후 37℃에서 16시간 보합반응을 시켰다. 프로브 라벨링은 MacProbe solution (Macrogen, Seoul, Korea)을 사용하였다. 보합 반응된 슬라이드를 씻어 말린 후 형광현미경 (Leica DM RXA2)을 통해 형광신호를 확인하여 해당 클론의 획득(gain) 혹은 소실(loss)을 판별하였다. 관찰된 조직 내 100개의 세포내에서 red/green 형광표지를 세어 그 비율(ratio)값을 구하고 실험군(target)과 대조군(control) 간 *t*-test를 통해 판정하였다.

[0058] 도 4에서는, 상기 표 2에서 선택된 12 클론들 중 FISH 분석이 가능한 사이트인 6개 클론에 대해 상기 FISH 방법을 사용하여 클론의 획득(gain)과 소실(loss)을 재확인하였으며, 어레이-GCH 결과와 일치함을 확인하였다.

[0059] 도 4를 구체적으로 설명하면, Rhodamin (orange) 표지는 어레이 CGH 분석결과 선택된 테스트 클론이고, FITC (green)표지는 같은 염색체내에서 변화를 보이지않는 위치의 BAC 클론으로 대조군에 해당된다. 왼쪽 패널은 정상 세포에서 Rhodamin (orange)과 FITC (green)표지가 한 카피씩 표지되는 것을 확인한 것이고 오른쪽 패널은 종양조직에서의 결과이다. 도 4A는 7p11.2 위치의 BAC no.839-Rhodamine과 대조군 BAC no.1418-FITC를 표지하여 확인한 결과 비재발 조직 슬라이드에서 테스트 클론 (오렌지표지)이 더 많은 gain으로 확인 (화살표)된 결과이다. 4B는 12p13.31 위치를 비재발 조직 슬라이드에서 #1112-Rhodamine, #766-FITC로 표지하여 확인한 결과 대조군 클론 (초록색 표지)이 더 나타남으로 loss로 확인된 결과이다. 4C는 16p13.12 위치를 비재발 조직 슬라이드에서 #1156-Rhodamine, #357-FITC로 표지하여 확인한 결과 테스트 클론 (오렌지표지)이 더 많은 gain으로 확인되었다. 4D는 9q34.11위치를 비재발 조직 슬라이드에서 #1245-Rhodamine, #681-FITC로 표지하여 확인한 결과 테스트 클론 (오렌지표지)이 더 많은 gain으로 확인되었다. 4E는 11p13위치를 비재발 조직 슬라이드에서 #1504-Rhodamine, #934-FITC로 표지하여 확인한 결과 테스트 클론 (오렌지표지)이 더 많은 gain으로 확인되었다. 4F는 21q22.1위치를 비재발 조직 슬라이드에서 #574-Rhodamine, #654-FITC로 표지하여 확인한 결과 대조군 클론 (초록색 표지)이 더 나타남으로 loss로 확인되었다. 이 결과는 어레이 CGH 분석결과 FDR test로 선택된 클론의 결과와 동일한 결과이다.

[0060] **실시예 5. 실시간 중합효소 연쇄반응 (Real-Time qPCR)을 통한 DNA 카피 수(copy number) 변화 확인**

[0061] 실험에 사용된 프라이머(primer)는 어레이-CGH 분석결과 증감이 확인된 후보 유전자들의 gDNA 서열을 고려하여 프라이머를 제작하였다. 2X IQ™SYBR green supermix (Bio-Rad, Hercules, CA) 10㎕, DNA 1 ㎕, 각 프라이머 1 ㎕ (10 pmol/㎕)에 전체 20 ㎕ 반응용액을 iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 real-time qPCR을 수행하였다. GAPDH 유전자와 인간 남성 전혈(human male whole blood) DNA를 대조군으로 사용하여 $2^{-\Delta\Delta}C_t$법 (Whang G *et al.*, Nucleic Acids Res 2004; 32(9):e76, Livak KJ and Schmittgen TD. Methods 2001;25(4):402-8)으로 relative DNA 카피 수를 계산하였다.

[0062] real-time qPCR에 사용된 프라이머 시퀀스는 다음 표 4와 같다.

[0063] [표 4]

	Forward	Reverse
CDKN1C	GGACGAGACAGGCGAACC	GAGAGGACAGCGAGAAGAAGG
EFNA5	TGGGGTGTGTGTTAGGGGAATGG	CACATCTGGGTGTTGGGCATCTG
EGFR	GCATGAACTACTTGGAGGAC	ACCTAAAGCCACCTCCTTAC
TMEM16B	CAGTGGTTCAAGGCAGTAGTTATG	ACGAGAGTGGCTTCCCTGAG
ASS1	GTCCTTGCCTACTTCTTCCTTCTG	AGATGAACTCCTCCACAAACTCC
EPC1	AATCTGGGAGGCGGAGGTTTC	AATCTTGAGGTGGGAGGATGTGG
EHF	ATCCTGTCCTTTCATCTTCCTTCC	TCTCTTTCTGTGTCTCTCCCTACC
SUZ12	AGTTGTCCAATAAGGCAAGTTCC	ACGAGTCACTCTAAATAGCAACG
TERF2	ACCCAGGAGATGGAGATTGC	AATGGCAGATGAGGGAGACC
GART	GAACTTGGGCGAGAGAGGAAG	TGGGAGTGATACAGTCTTGGTTTG
NAV2	TATGACAAGGATGAAGGGCAGTG	CCAGAGACCCAGAAGCAAAGG
DST	CCATCTTGCCAGCCACCTCTC	TGCCTCCATTAAGCCCATGATAAC
PAEP	TGCTGTCAACCAAACGAAGGC	AGAGGAAACACTGTGCTCAGAAAC
OSBPL3	TGCGACGGACTCAACTCAAG	TGGAGGAAACAAGGGCAAGAC
GAPDH	GGGCTCTCCAGAACATCATCC	CTCCGACGCCTGCTTCACC

[0064]

[0065] 하기 표 5에서, real time qPCR 방법으로 어레이-CGH결과 확인된 클론 부위에 존재하는 유전자들 중 암의 발생과 진행이나 전이에 관련된 유전자들의 DNA 카피 수 변화를 확인하였다. 선택된 12개 클론들 중 코딩 유전자를 포함하고 있지 않은 1개 클론을 제외한 11개 클론들에서 염색체상 클론 부위에 포함되는 유전자들 중 암과 연관된 후보 유전자들에 대해 real-time qPCR을 수행하여 DNA 카피 수를 확인한 결과, ASS와 TMEM16B 유전자를 제외하곤 어레이-CGH 결과와 거의 일치하는 것으로 확인하였다.

[0066] [표 5]. 지노믹 DNA를 사용한 real-time qPCR 방법으로 후보 유전자들의 DNA 카피 수 변화 확인

Cyto.	Candidate genes	Array CGH (n=21, gain n(%) /loss n(%))	Real-time qPCR (n=16, gain n(%) /loss n(%))
11p15.4	CDKN1C	11(52.4)/0	7(43.8)/0
5q21.3	EFNA5	0/5(23.8)	0/4(25)
7p11.2	EGFR	4(19)/0	4(25)/0
12p13.31	TMEM16B	1(5)/3(14.3)	0/4(25)
9q34.11	ASS	3(14.3)/0	0/1(6.3)
10p11.22	EPC1	0/4(19)	0/3(18.8)
11p13	EHF	4(19)/0	6(37.5)/0
17q11.2	SUZ12	0/5(23.8)	0/5(31.3)
16q22.1	TERF2	3(14.3)/1(5)	3(18.8)/1(6.3)
21q22.11	GART	0/4(19)	0/2(12.5)
11p15.1	NAV2	4(19)/0	2(12.5)/0

[0067]

[0068] gain n(%)/loss n(%); 각 분석 방법으로 분석결과 gain 또는 loss로 판정된 샘플수 n (백분율 %)

[0069] 이상의 결과에서, 특히 선암에서 확인된 상기 12개의 클론이 초기 재발과 비재발을 구분해 줄 수 있는 유용한 마커로 확인되었다. 본 발명을 통해 비소세포 폐암 중 선암의 초기 재발과 비재발을 예측할 수 있는 유용한 마커를 array CGH 방법을 사용하여 발굴하였고, FISH 분석과 real-time qPCR를 통해 염색체 변화가 있는 부위에 존재하는 후보 유전자들의 카피 수 변화와 연관성이 있음을 확인하였다. 이의 결과를 통해 선암에서 특이적인 염색체 변이의 마커를 이용하여 수술 후 초기 재발 유무를 예측하는데 임상적 유용성을 기대한다.

산업이용 가능성

[0070] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 초기 재발 폐선암 환자와 재발하지 않은 폐선암 환자 사이의 염색체 변화 차이를 어레이-CGH 방법을 사용하여 확인하고, 두 그룹 간 통계적 유의성을 갖는 클론들을 선택함으로서, 임상적 유용성이 있는 염색체 변화부위를 선별할 수 있고 이를 이용하여 폐선암 환자에서 수술 또는 치료 후 초기 재발 가능성을 미리 예측하기 위한 바이오 마커로서 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0071] 도 1은 어레이-CGH를 이용하여 선암 환자들의 전체 염색체의 획득(gain) 또는 소실(loss)의 빈도수를 분석한 결과를 어레이 스캐너 장치를 통해 얻은 결과이다.

[0072] 도 2a는 어레이-CGH를 이용하여 초기 재발 환자들의 전체 염색체의 획득 또는 소실의 빈도수를 분석한 결과를 어레이 스캐너 장치를 통해 얻은 결과이다.

[0073] 도 2b는 어레이-CGH를 이용하여 비재발 환자들의 전체 염색체의 획득 또는 소실의 빈도수를 분석한 결과를 어레이 스캐너 장치를 통해 얻은 결과이다.

[0074] 도 3은 선암 환자들에서 선택된 12개의 클론들에 대한 계측적 클러스터링(Unsupervised hierarchical clustering) 분석을 나타낸다.

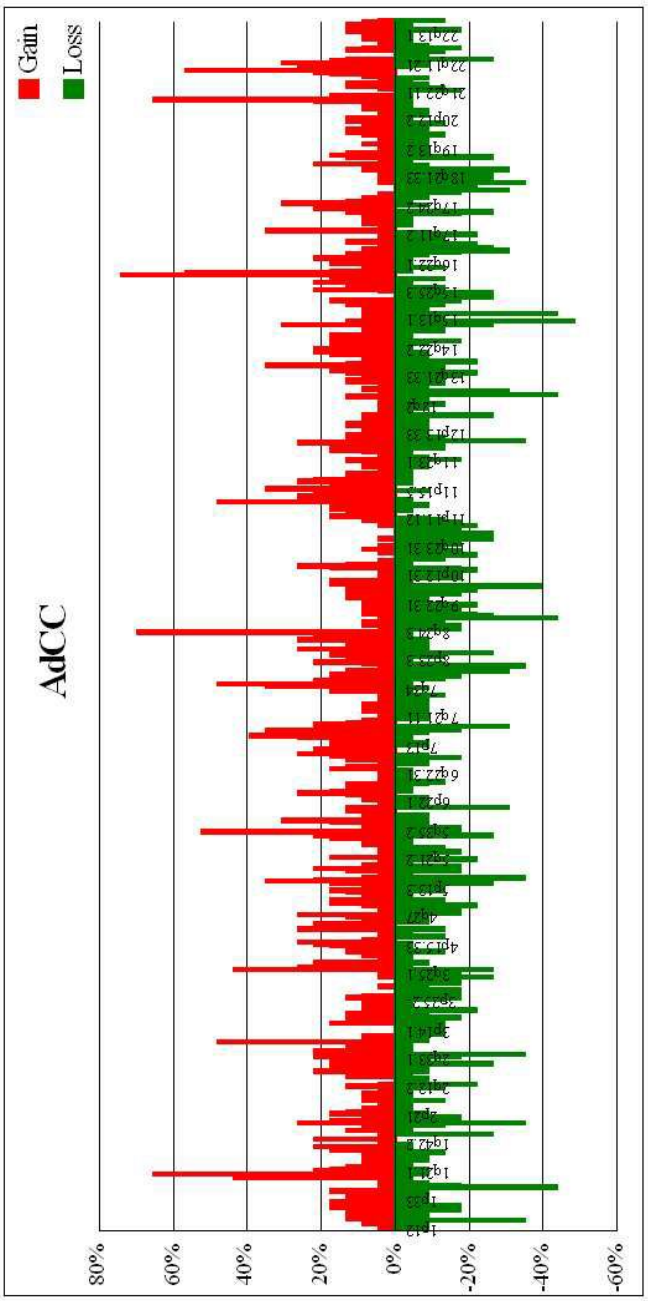
[0075] 도 4는 어레이-CGH 결과 확인된 클론들을 FISH 방법으로 재확인한 결과이다.

[0076] 여기서, Rhodamin-labeled target (orange), FITC-labeled control (green) BAC clones. A, #839-Rhodamine, #1418-FITC. B, #1112-Rhodamine, #766-FITC. C, #1156-Rhodamine, #357-FITC. D, #1245-Rhodamine, #681-FITC. E, #1504-Rhodamine, #934-FITC. F, #574-Rhodamine, #654-FITC.

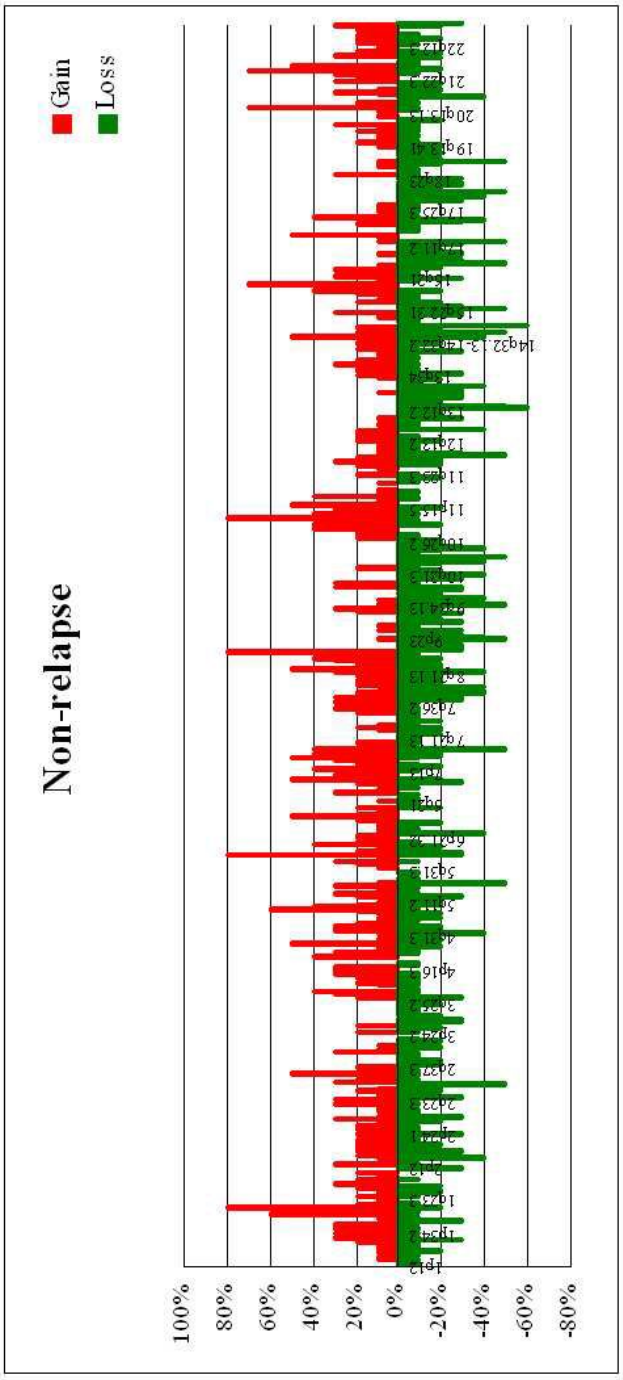
[0077] 도 5a와 5b는 각각 12개 클론들의 변화된 클론 수에 따른 컷오프 값에 대한 ROC curve 분석과 Kaplan-Meier 생존 곡선을 나타낸다.

도면

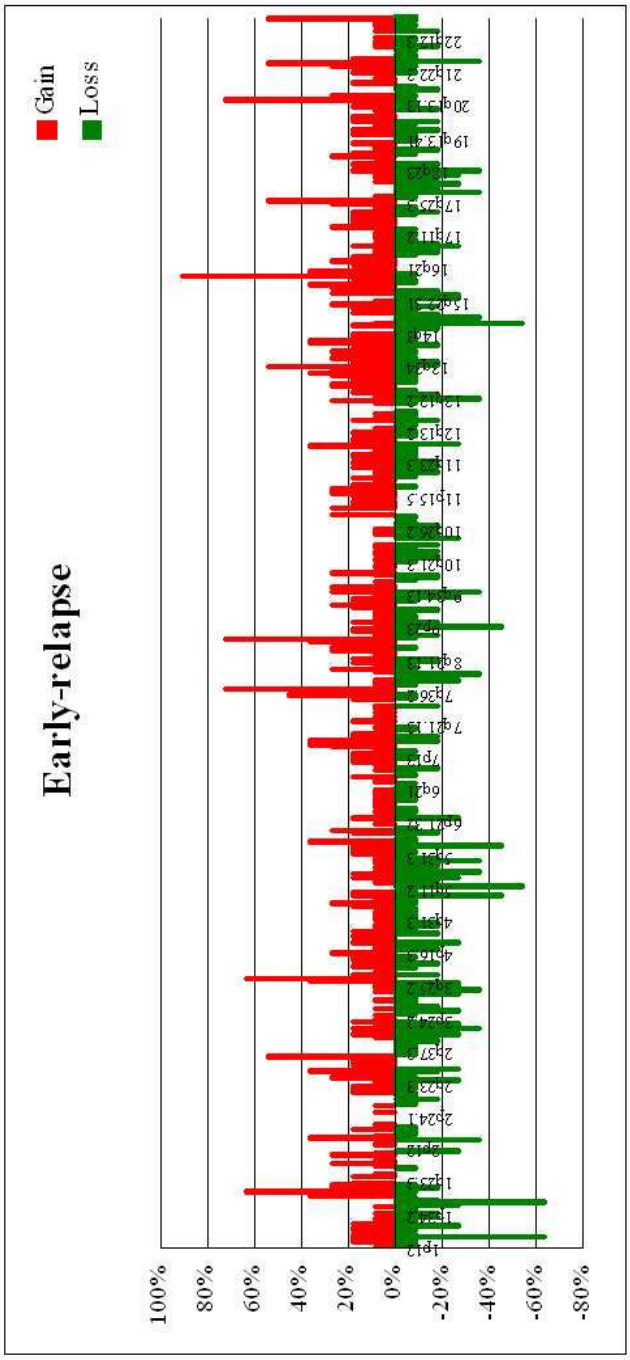
도면1



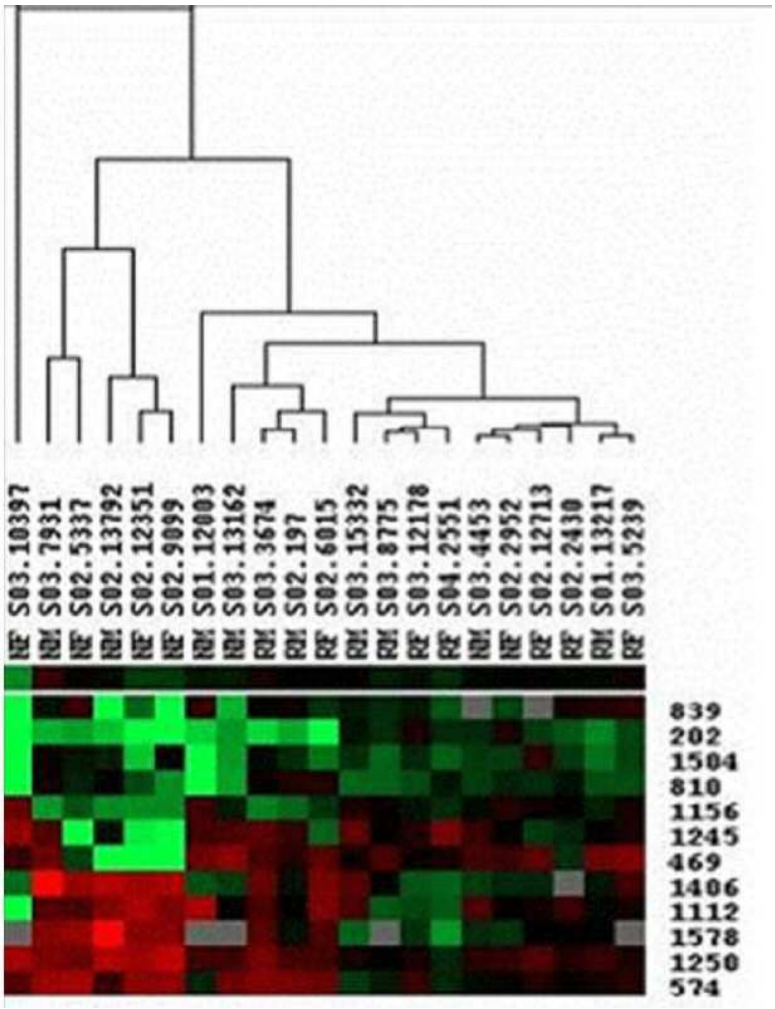
도면2a



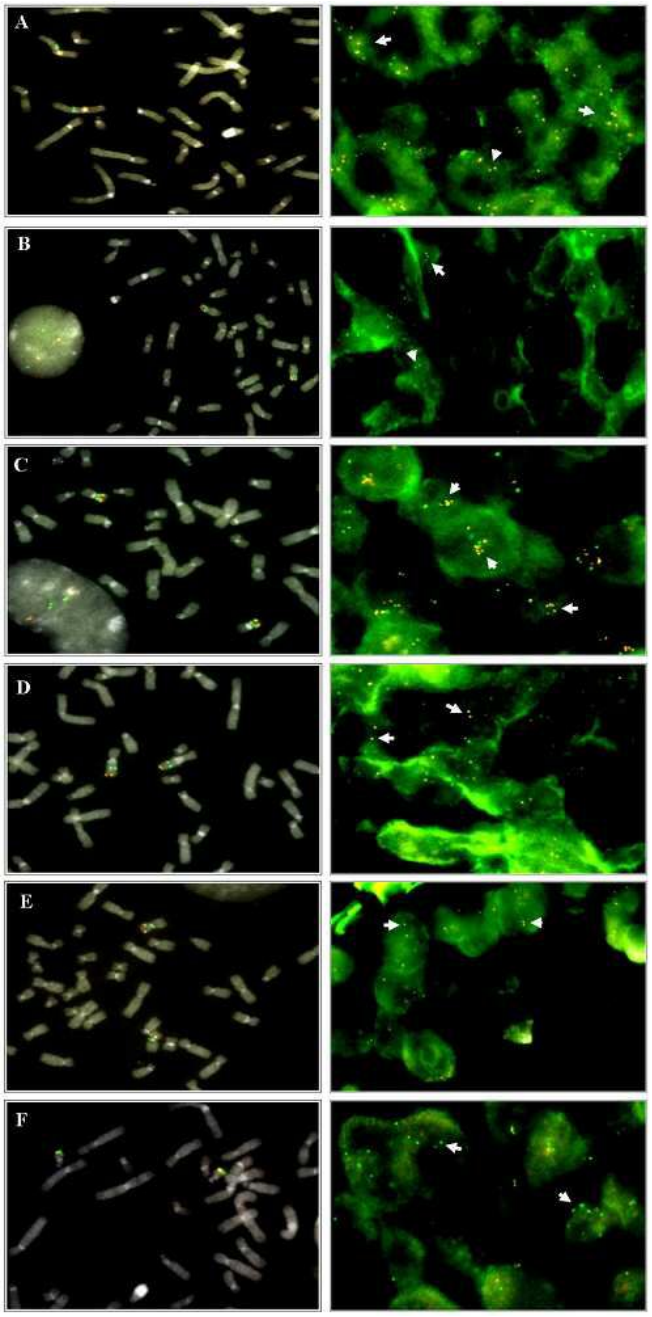
도면2b



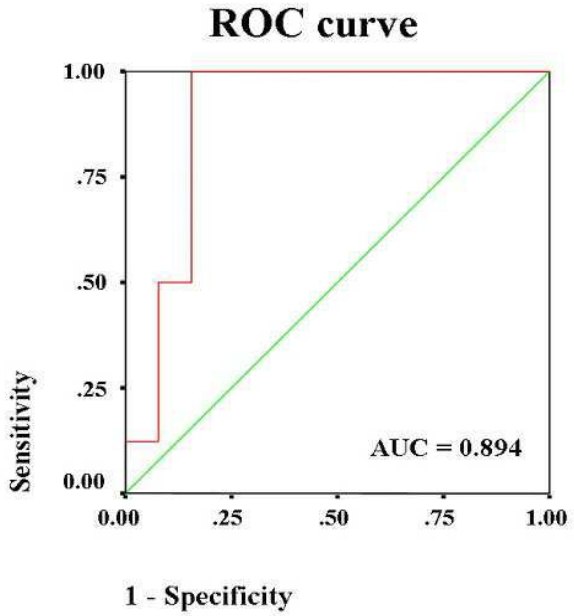
도면3


NE S03.10397
NB! S03.7931
NE S02.5337
NB! S02.13792
NE S02.12351
NE S02.9099
NB! S01.12003
NB! S03.13162
RB! S03.3674
RB! S02.197
RE S02.6015
RB! S03.15332
RB! S03.8775
RE S03.12178
RE S04.2551
NB! S03.4453
NE S02.2952
RE S02.12713
RE S02.2430
RB! S01.13217
RE S03.5239
839
202
1504
810
1156
1245
469
1406
1112
1578
1250
574

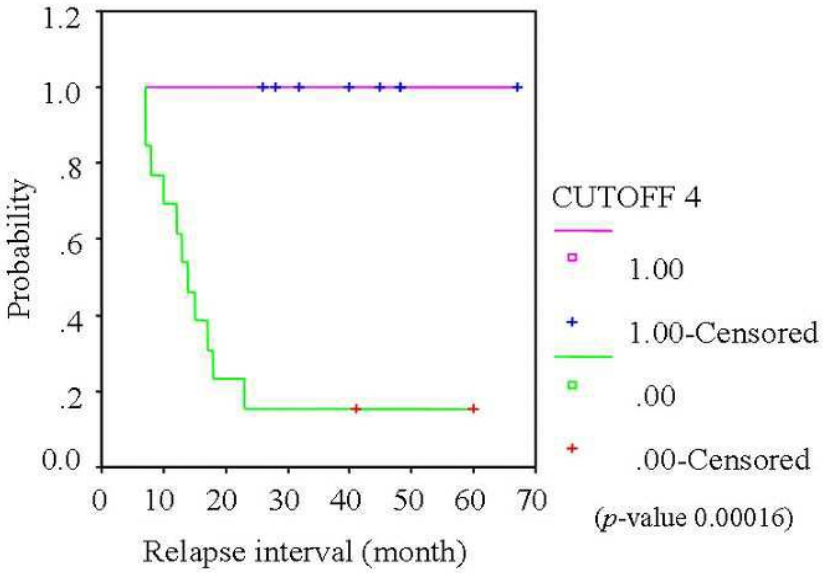
도면4



도면5a


ROC curve
1.00
.75
.50
.25
0.00
Sensitivity
AUC = 0.894
0.00
.25
.50
.75
1.00
1 - Specificity

도면5b


1.2
1.0
.8
.6
.4
.2
0.0
Probability
0
10
20
30
40
50
60
70
Relapse interval (month)
CUTOFF 4
1.00
1.00-Censored
.00
.00-Censored
(p-value 0.00016)