(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년02월15일
(11) 등록번호 10-2637032
(24) 등록일자 2024년02월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2022.01)
C12Q 2600/154 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0010053
(22) 출원일자 2020년01월28일
심사청구일자 2021년01월27일
(65) 공개번호 10-2021-0096509
(43) 공개일자 2021년08월05일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020160082028 A*
US20110287968 A1
WO2009069984 A2*
WO2019246625 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사 젠큐릭스
서울특별시 구로구 디지털로 243, 15층(1501-1514)(구로동, 지하이시티)
(72) 발명자
조상래
서울특별시 종로구 자하문로24길 41-26 (효자동)
문영호
서울특별시 서대문구 서소문로 27, 1616호 (충정로3가, 충정리시온)
한진일
서울특별시 구로구 경인로 240, 101동 1703호(오류동)
(74) 대리인
이희숙, 김석만

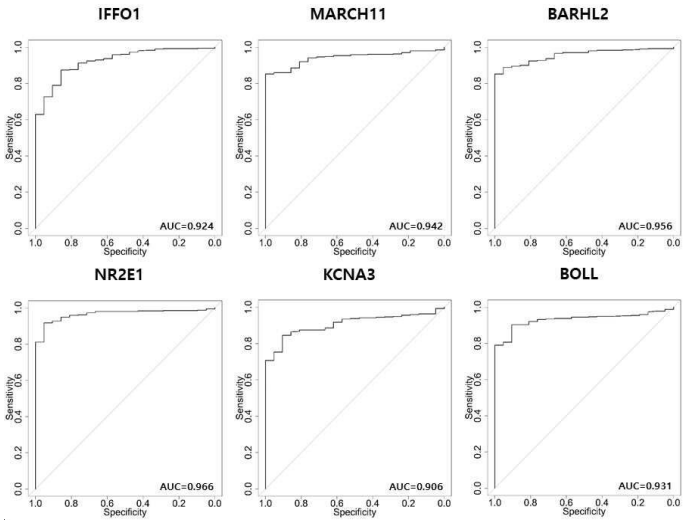
전체 청구항 수 : 총 11 항 심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 **특정 유전자의 CpG 메틸화 변화를 이용한 방광암 진단용 조성물 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 IFFO1, MARCH11, BARHL2, NR2E1, KCNA3 및 BOLL로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 검출함으로써, 방광암을 진단할 수 있는 조성물, 키트, 핵산 칩 및 방법에 관한 것이다. 본 발명의 유전자의 CpG 부위 과메틸화는 방광암에서 특이적으로 나타나므로, 본 발명에 따른 조성물, 키트, 칩 또는 방법을 이용하여 방광암을 정확하고 신속하게 진단할 수 있을 뿐만 아니라 조기진단 및 재발 모니터링에 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/156 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
C12Q 2600/16 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

NR2E1 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는 방광암 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 CpG 부위는 유전자의 전사 시작 부위로부터 +/- 3000 염기(base) (3kb) 사이에 위치하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제는

비메틸화 사이토신 또는 메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물;

NR2E1 유전자 CpG 부위의 메틸화된 서열에 특이적인 프라이머; 및

비메틸화된 서열에 특이적인 프라이머로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 바이설파이트(bisulfite), 이의 염이며, 상기 메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 Tet 단백질인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

NR2E1 유전자의 CpG 부위를 포함하는 단편을 증폭하기 위한 프라이머쌍을 포함하는 방광암 진단용 키트.

청구항 6

NR2E1 유전자의 CpG 부위를 포함하는 단편과 하이브리다이제이션할 수 있는 프로브가 고정되어 있는 방광암 진단용 핵산 칩.

청구항 7

방광암 발생이 의심되는 환자의 시료로부터 NR2E1 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및

상기 측정된 메틸화 수준을 정상 대조군 시료의 상기 동일한 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준과 비교하는 단계;를 포함하는, 방광암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 메틸화 수준을 측정하는 방법은 바이설파이트 비의존적 (bisulfite-free) 검출법, 메틸화 특이적 중합효소반응 (methylation-specific polymerase chain reaction), 실시간 메틸화 특이적 중합효소

반응 (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.

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈장, 혈청, 대변 및 소변으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 조성물은 IFFO1, MARCH11, BARHL2, KCNA3 및 BOLL로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방광암 진단용 조성물.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 메틸화 수준을 특정하는 단계는 IFFO1, MARCH11, BARHL2, KCNA3 및 BOLL로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 더 측정하는 것을 특징으로 하는, 방광암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 12

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 IFFO1, MARCH11, BARHL2, NR2E1, KCNA3 및 BOLL로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 검출함으로써, 방광암을 진단할 수 있는 조성물, 키트, 핵산 칩 및 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 방광암(bladder cancer)는 방광 점막에 발생하는 암으로서, 비뇨기과 암 중 가장 흔한 암이다. 방광암의 가장 흔한 증상은 혈뇨로 65세 이상의 고령층에서 혈뇨의 원인이 방광암일 경우가 약 25% 정도이다. 일반적으로 혈뇨 또는 방광의 자극 증상이 지속될 때 방광암의 가능성을 의심하여 방광암 진단을 위한 검사를 시행한다.

[0004] 방광암의 가장 기본적인 검사는 요검사와 요세포 검사가 있다. 요검사는 소변 내 적혈구와 염증 세포가 있는지 검사를 하며 요세포 검사는 소변에서 암세포가 떨어져 나와 있는지 알아보는 검사이다. 해당 검사에서 양성으로 나온 경우 방광암을 포함한 비뇨기계의 암이 있을 확률이 높다. 또한 비침습적 검사이고 가격도 저렴한 장점이 있지만 정확도가 떨어진다는 단점이 있다.

[0006] 방광경 검사는 요검사 또는 요세포 검사를 통해 방광암이 의심되며 육안적으로 혈뇨가 보이는 경우 실시하게 된다. 이 검사는 국소 마취하에 내시경을 요도에 삽입하여 직접 방광 내를 암 유무를 관찰을 통해 방광 내 종양의 유무와 위치, 모양, 개수 및 크기를 확인한다. 하지만 해당 방법은 검사 비용이 비싸며, 침습적이고 초기 방광암의 경우 발견이 힘들다는 단점이 존재한다.

[0008] 방광암의 조기 발견은 암의 좋은 예후와 연결되어 있으며 삶의 질과 직결된다. 또한 방광암은 재발이 흔해 주기적인 추적 검사가 필수적이기에 기존의 다양한 방광암 진단 방법의 단점을 극복하고 효율적으로 조기 진단 및 재발 모니터링이 가능한 비침습적 검사법 개발이 필요한 상황이다.

[0010] 한편, 후성유전학(epigenetics)은 DNA의 염기서열이 변화하지 않은 상태에서 이루어지는 유전자의 발현 조절을 연구하는 분야이다. 후성유전학은 DNA 메틸화, miRNA 또는 히스톤의 아세틸화, 메틸화, 인산화 및 유비퀴틴화

등과 같은 후성적 변이를 통한 유전자 발현 조절을 연구한다.

[0012] 이중 DNA 메틸화가 가장 많이 연구가 되어있는 후성적 변이이다. 후성적 변이는 유전자 기능 변이 및 종양 세포로의 변화를 초래할 수 있다. 따라서 DNA 메틸화는 세포 내 질환 조절 유전자의 발현(또는 억제 및 유도와)과 연관되어 있으며, 최근에 DNA 메틸화 측정을 통한 암 진단 방법들이 제시되고 있다. 특히 전암 단계의 조직에서도 암 특이적 메틸화 현상이 미리 발생하기도 하기에 암 특이적 메틸화의 검출은 암의 진단에 이용될 가능성이 높다.

[0014] 따라서 방광암의 위험 예측이 가능한 효과적인 방광암 특이적 메틸화 마커의 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 이에, 본 발명자들은 방광암에 있어서 특정 유전자 CpG 부위가 과메틸화된 상태인 것을 발견하고, 상기 메틸화 수준을 검출함으로써 방광암을 진단할 수 있는 조성물, 키트, 핵산 칩 및 방법을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

[0016] 따라서 본 발명의 목적은 특정 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는 방광암 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 또한 본 발명의 다른 목적은 특정 유전자의 CpG 부위를 포함하는 단편을 증폭하기 위한 PCR 프라이머쌍과 상기 프라이머쌍에 의하여 증폭된 PCR 산물을 파이로시퀀싱하기 위한 시퀀싱 프라이머를 함유하는 방광암 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0018] 또한 본 발명의 또 다른 목적은 특정 유전자의 CpG 부위를 포함하는 단편과 엄격한 조건하에서 하이브리다이제이션할 수 있는 프로브가 고정되어 있는 방광암 진단용 핵산 칩을 제공하는 것이다.

[0019] 또한 본 발명의 또 다른 목적은 각기 다른 시료로부터 특정 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하고 비교하는 단계를 포함하는, 방광암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[0020] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 방광암의 재발 또는 진행 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 개체에서 분리한 생물학적 시료에서 특정 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0021] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 IFFO1, MARCH11, BARHL2, NR2E1, KCNA3 및 BOLL로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는 방광암 진단용 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 IFFO1, MARCH11, BARHL2, NR2E1, KCNA3 및 BOLL로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 CpG 부위를 포함하는 단편을 증폭하기 위한 프라이머쌍을 포함하는 방광암 진단용 키트를 제공한다.

[0023] 또한 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 IFFO1, MARCH11, BARHL2, NR2E1, KCNA3 및 BOLL로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 CpG 부위를 포함하는 단편과 하이브리다이제이션할 수 있는 프로브가 고정되어 있는 방광암 진단용 핵산 칩을 제공한다.

[0024] 또한 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 방광암 발생이 의심되는 환자의 시료로부터 IFFO1, MARCH11, BARHL2, NR2E1, KCNA3 및 BOLL로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및

[0025] 상기 측정된 메틸화 수준을 정상 대조군 시료의 상기 동일한 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준과 비교하는 단계;를 포함하는, 방광암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0026] 또한, 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 방광암의 재발 또는 진행 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 개체에서 분리한 생물학적 시료에서 IFFO1, MARCH11, BARHL2, NR2E1, KCNA3 및 BOLL로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 방법을 제공한다.

[0028] 다른 정의가 없는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 당업자들에 의해 통상적으로 이해되는

동일한 의미를 가진다. 다음의 참고문헌은 본 발명의 명세서에 사용된 여러 용어들의 일반적인 정의를 갖는 기술(skill)의 하나를 제공한다: Singleton et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOTY(2th ed. 1994); THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY(Walkered., 1988); 및 Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY.

[0030] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0032] 본 발명은 IFFO1, MARCH11, BARHL2, NR2E1, KCNA3 및 BOLL로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는 방광암 진단용 조성물을 제공한다.

[0034] 본 발명에서 용어, "메틸화"는 DNA를 구성하는 염기에 메틸기가 부착되는 것을 말한다. 바람직하게, 본 발명에서 메틸화 여부는 특정 유전자의 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.

[0038] 본 발명에서 용어, "메틸화 수준의 측정"은 IFFO1, MARCH11, BARHL2, NR2E1, KCNA3 및 BOLL로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것으로서, 바이설파이트 처리에 따른 검출법 또는 바이설파이트 비의존적 검출법을 통해 측정할 수 있다. 메틸화 수준이 측정은 메틸화 특이적인 PCR, 예를 들어 메틸화 특이적 PCR (methylation-specific polymerasechain 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 자동염기분석으로 측정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 바이설파이트 비의존적 검출법으로써 TET 단백질(ten-eleven translocation protein)을 이용한 검출법을 이용하여 측정할 수 있다(Nature Biotechnology, volume 37, pages 424-429 (2019) 참고). 상기 TET 단백질은 DNA에 작용하는 효소로 염기의 화학적 변화에 관여하며, 바이설파이트를 처리할 경우 메틸화된 C를 제외한 모든 C가 T 염기로 바뀌는 것과 달리 Tet단백질은 메틸화된 C만이 T로 바뀌어 보다 효율적인 검출이 가능하다.

[0040] 바람직하게, IFFO1, MARCH11, BARHL2, NR2E1, KCNA3 및 BOLL로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 CpG 부위란, 상기 유전자의 DNA 상에 존재하는 CpG 부위를 말한다. 상기 유전자의 DNA는, 상기 유전자가 발현하는데 필요하며 서로 작동가능하게 연결되어 있는 일련의 구성 단위를 모두 포함하는 개념으로, 예를 들어, 프로모터 영역, 단백질 코딩 영역 (open reading frame, ORF)및 터미네이터 영역을 포함한다. 따라서, IFFO1, MARCH11, BARHL2, NR2E1, KCNA3 및 BOLL로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 CpG 부위는 해당 유전자의 프로모터 영역, 단백질 코딩 영역 (open reading frame, ORF) 또는 터미네이터 영역 등에 존재할 수 있다.

[0042] 바람직하게, 본 발명에서 IFFO1, MARCH11, BARHL2, NR2E1, KCNA3 및 BOLL로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 하기 표 1에 기재된 유전자의 CpG 부위의 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다.

표 1

[0044]

Symbol	Genome Build	Chromosome	Region
IFFO1	GRCh37	12	6664426-6665336
MARCH11	GRCh37	5	16179065-16180420
BARHL2	GRCh37	1	91185157-91185577
NR2E1	GRCh37	6	108485672-108490539
KCNA3	GRCh37	1	111216245-111217937
BOLL	GRCh37	2	198649752-198651599

[0046] 본 발명에 있어서, 상기 IFFO1, MARCH11, BARHL2, NR2E1, KCNA3 및 BOLL로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나

이상의 유전자의 CpG 부위는 유전자의 전사 시작 부위 (transcription start site, TSS)로부터 +/- 3000 염기(base) (3kb) 사이에 위치하는 것을 특징으로 한다.

[0048] 본 발명에서 인간 게놈 염색체 부위의 염기서열은 The February 2009 Human reference sequence (GRCh37)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 염색체부위의 표현이 상이해질 수 있다. 따라서, 본 발명의 The February 2009 Human reference sequence (GRCh 37)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.

[0050] 본 발명에서, 상기 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제는 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소, IFFO1, MARCH11, BARHL2, NR2E1, KCNA3 및 BOLL로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머, 및 비메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다.

[0052] 상기 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 비메틸화 사이토신 또는 메틸화 사이토신을 변형시키는 화합물이며, 비메틸화 사이토신을 변형시키는 바이설파이트(bisulfite) 또는 이의 염, 바람직하게는 소듐 바이설파이트이거나 메틸화 사이토신을 변형시키는 TET 단백질 일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 이러한 사이토신 염기를 변형시켜 CpG 부위의 메틸화 여부를 검출하는 방법은 당 업계에 널리 공지되어 있다(WO01/26536; US2003/0148326A1).

[0054] 또한, 상기 메틸화 민감성 제한효소는 CpG 부위의 메틸화를 특이적으로 검출할 수 있는 제한효소로서 제한효소의 인식부위로 CG를 함유하는 제한효소일 수 있다. 예를 들면, SmaI, SacII, EagI, HpaII, MspI, BssHII, BstUI, NotI 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 당 업계에 잘 알려져 있다.

[0056] 상기 프라이머는 IFFO1, MARCH11, BARHL2, NR2E1, KCNA3 및 BOLL로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머 및 비메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다.

[0058] 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.

[0060] 본 발명의 프라이머는 메틸화 여부를 분석하는 대상이 되는 특정 CpG 부위의 서열에 따라 바람직하게 디자인될 수 있으며, 보다 바람직하게는, 메틸화되어 바이설파이트에 의해 변형되지 않았던 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍, 메틸화되지 않아 바이설파이트에 의해 변형된 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍, 메틸화되어 Tet 계열의 단백질에 의해 변형된 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍 및 메틸화되지 않아 Tet 계열의 단백질에 의해 변형되지 않았던 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.

[0062] 따라서 본 발명은 IFFO1, MARCH11, BARHL2, NR2E1, KCNA3 및 BOLL로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 CpG 부위를 포함하는 단편을 증폭하기 위한 프라이머쌍을 포함하는 방광암 진단용 키트를 제공한다.

[0064] 상기 조성물 및 키트에는 상기 제제 이외에도, 중합효소 아가로스, 전기영동에 필요한 완충용액 등이 추가로 포함될 수 있다.

[0066] 또한 본 발명은 IFFO1, MARCH11, BARHL2, NR2E1, KCNA3 및 BOLL로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 CpG 부위를 포함하는 단편과 하이브리다이제이션할 수 있는 프로브가 고정되어 있는 방광암 진단용 핵산 칩을 제공한다.

[0068] 본 발명에서 용어 "핵산" 이란 올리고뉴클레오티드, 뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드를 의미하거나 이들의 단편, 단일가닥 또는 이중가닥의 게놈 기원 또는 합성 기원의 DNA 또는 RNA, 센스 또는 안티센스 가닥의 게놈 기원 또는 합성 기원의 DNA 또는 RNA, PNA(peptide nucleic acid) 또는 자연 기원 또는 합성 기원의 DNA 양 또는 RNA 양 물질을 말한다. 핵산이 RNA이면, 데옥시뉴클레오티드 A, G, C 및 T를 대신하여, 각각 리보뉴클레오티드 A, G, C 및 U로 대체된다는 것은 당해 분야 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명하다.

[0070] 메틸화는 유전자의 조절 부위의 외곽에서부터 시작되어 내부로 진행되기 때문에, 조절 부위의 외곽에서 메틸화를 검출하는 것으로 세포 형질전환에 관여하는 유전자를 조기 진단 및 치료 이후 진행 또는 재발 모니터링을 할 수 있다.

[0072] 따라서 상기 메틸화 유전자 마커를 이용하여 방광암을 형성할 가능성이 있는 세포의 조기 진단이 가능하다. 암세포에서 메틸화된다고 확인된 유전자가 임상적으로 또는 형태학적으로 정상으로 보이는 세포에서 메틸화되면, 상기 정상으로 보이는 세포는 암화가 진행되고 있는 것이다. 그러므로, 정상으로 보이는 세포에서의 방광암 특이적 유전자가 메틸화를 확인함으로, 방광암을 조기 진단 및 치료 이후 진행 또는 재발 모니터링을 할 수 있다.

[0074] 또한 본 발명은 방광암 발생이 의심되는 환자의 시료로부터 IFFO1, MARCH11, BARHL2, NR2E1, KCNA3 및 BOLL로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및

[0075] 상기 측정된 메틸화 수준을 정상 대조군 시료의 상기 동일한 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준과 비교하는 단계;를 포함하는, 방광암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0077] 상기 메틸화 수준을 측정하는 방법은 PCR, 메틸화 특이 PCR(methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR(real time methylation specific PCR), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 메틸화 민감성 제한효소를 사용한 메틸화 여부 측정, 정량 PCR, DNA 칩, 파이로시퀀싱 및 바이설파이트 시퀀싱으로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0079] 구체적으로, 메틸화 특이 PCR(methylation-specific PCR)의 방법은 시료 DNA에 중아황산염을 처리한 후에 PCR을 수행할 프라이머를 CpG 디뉴클레오타이드의 메틸화 여부에 따라 다른 종류의 프라이머를 디자인하여 사용하는 방법이다. 프라이머 결합 부위가 메틸화되었으면 메틸화된 프라이머에 의해 PCR이 진행되고, 메틸화가 되지 않았으면 정상 프라이머에 의해 PCR이 진행된다. 즉, 시료 DNA에 중아황산염을 처리한 후 두 가지 종류의 프라이머를 동시에 사용하여 PCR을 행한 후, 결과를 비교하는 방법이다.

[0081] 실시간 메틸화 특이 PCR은 메틸화 특이 PCR 방법을 실시간 측정방법으로 전환한 것으로, 지 노믹 DNA에 중아황산염(bisulfite)를 처리한 후, 메틸화된 경우에 해당하는 PCR 프라이머를 디자인하고, 이들 프라이머를 이용하여 실시간 PCR을 수행하는 것이다. 이때, 증폭된 염기서열과 상보적인 TanMan 프로브를 이용하여 검출하는 방법과 Sybergreen을 이용하여 검출하는 두 가지 방법이 있다. 따라서, 실시간 메틸화 특이 PCR은 메틸화된 DNA만을 선택적으로 정량 분석할 수 있다. 이때, in vitro methylated DNA 샘플을 이용하여 표준곡선을 작성하고, 표준화를 위하여 염기서열 내에 5'-CpG-3' 서열이 없는 유전자를 음성대조군으로 함께 증폭하여 메틸화 정도를 정량 분석하는 방법이다.

[0083] 메틸화 민감성 제한 효소를 사용하여 메틸화 여부를 측정하는 방법에서 메틸화 민감성 제한 효소는 CpG 디뉴클레오타이드를 작용부위로 하며, 이 부위가 메틸화된 경우에는 효소로서 작용하지 못한다. 따라서, 시료 DNA를 메틸화 민감성 제한효소로 처리한 후 효소 타깃 부위를 포함하도록 PCR로 증폭하면, 메틸화된 경우에는 제한효소가 작용되지 않아 PCR 증폭되지만 메틸화되지 않은 정상 부위는 제한 효소에 의해 절단되어 PCR 증폭되지 않으므로 특정 DNA 부위의 메틸화 여부를 측정할 수 있다.

[0085] 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR 또는 DNA 칩 방법은 메틸화 DNA에만 특이적으로 결합하는 단백질을 DNA와 섞어주게 되면, 메틸화 DNA에만 특이적으로 단백질이 결합하기 때문에 메틸화 DNA만을 선택적으로 분리할 수 있다. 지노믹 DNA를 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질과 섞어준 후, 메틸화된 DNA만을 선택적으로 분리한다. 이들 분리된 DNA를 인트론 부위에 해당하는 PCR 프라이머를 이용하여 증폭한 후, 아가로즈 전기영동으로 메틸화 여부를 측정하는 방법이다. 또한, 정량 PCR 방법으로도 메틸화 여부를 측정할 수 있으며, 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질로 분리한 메틸화 DNA는 형광 염료로 표지하여 상보적인 프로브가 집적된 DNA칩에 하이브리디제이션시킴으로써 메틸화 여부를 측정할 수 있다. 여기서 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질은 MBD2bt에 제한되지 않는다.

[0087] 또한, 중아황산염 처리된 DNA의 파이로시퀀싱(bisulfite pyrosequencing)은 다음과 같은 원리에 기초한다. CpG

디뉴클레오타이드 부위에서 메틸화가 발생되면 5-메틸시토신(5-mC)이 형성되는데, 이 변형된 염기는 중아황산염 처리시 우라실(uracil)로 변화된다. 시료로부터 추출된 DNA에 중아황산염을 처리할 때 CpG 디뉴클레오타이드가 메틸화 되었다면 시토신(cytosine)으로 보존되며, 나머지 메틸화 되지 않은 시토신은 우라실로 변화한다. 중아황산염 처리된 DNA의 서열분석은 바람직하게는 파이로시퀀싱(pyrosequencing) 방법을 사용하여 행할 수 있다. 파이로시퀀싱에 대한 상세한 설명은 선행문헌에 공지되어 있다[Ronaghi et al, Science 1998 Jul 17, 281(5375), 363-365; Ronaghi et al,Analytical Biochemistry 1996 Nov 1, 242(1), 84-9; Ronaghi et al. Analytical Biochemistry 2000 Nov 15, 286 (2): 282-288; Nyr, P. Methods Mol Biology 2007, 373, 114].

[0089] 한편, Tet 단백질을 이용한 바이설파이트 비의존적 검출법으로 Tet단백질을 사용해 메틸화된 C만이 T로 변환시켜 메틸화 부위의 염기를 검출할 수도 있다(LIU, Yibin, et al., Nature Biotechnology volume 37, pages 424-429 (2019) 참고).

[0091] CpG 디뉴클레오타이드 부위에서 메틸화가 발생되어 시토신이 5-메틸시토신(5-mC)이 형성된 경우 Tet (ten-eleven translocation) 단백질을 처리할 때 Cpg 디뉴클레오타이드가 메틸화 되었다면 우라실로 변화하며, 메틸화 되지 않은 시토신은 보존된다. Tet 처리된 DNA의 서열분석은 파이로시퀀싱 방법에 대해서만 제한된 것은 아니며 메틸화 민감 PCR (methylation-sensitive PCR, MSP), 마이크로어레이(microarray), 차세대 시퀀싱(next generation sequencing, NGS) 등의 방법을 사용하여 분석할 수 있다.

[0093] 바람직하게는, 본 발명의 방광암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법은 a) 개체로부터 시료를 수득하는 단계, b) 시료에서 게놈 DNA를 수득하는 단계, c) 수득된 게놈 DNA를 메틸화되지 않은 시토신 염기를 변형시키는 화합물을 처리하는 단계, d) 상기 처리된 DNA를 IFFO1, MARCH11, BARHL2, NR2E1, KCNA3 및 BOLL로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 프로모터를 증폭할 수 있는 파이로시퀀싱용 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 증폭시킴으로써 PCR 생산물을 얻는 단계 및 e) 상기 PCR 생산물을 시퀀싱 프라이머(sequencing primer)를 이용하여 파이로시퀀싱(pyrosequencing)함으로써 메틸화 정도를 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법에 의해 수행될 수 있다.

[0095] 상기 b)단계의 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.

[0097] 본 발명에서 용어 “시료”는 수행되는 분석의 종류에 따라, 개개인, 체액, 세포주, 조직 배양 등에서 얻어지는 모든 생물학적 체액, 포함하는 폭넓은 범위의 체액을 의미하는 것이다. 포유동물로부터 체액 및 조직 생검을 획득하는 방법은 통상적으로 널리 알려져 있으며, 본 발명에 있어서 상기 시료는 바람직하게는 조직, 세포, 혈액, 혈장, 혈청, 대변 및 소변을 포함하는 인체 유래물로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 암 조직의 비정상적인 메틸레이션의 변화는 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 생물학적 시료에서 얻은 게놈 DNA의 메틸레이션 변화와 상당한 유사성을 보이므로, 본 발명의 마커를 이용할 경우 방광암 발생 예측에 대하여, 혈액이나 체액 등을 통한 손쉬운 진단이 가능하다는 장점이 있다.

[0099] 한편, 본 발명은 방광암의 재발 또는 진행 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 개체에서 분리한 생물학적 시료에서 IFFO1, MARCH11, BARHL2, NR2E1, KCNA3 및 BOLL로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 방법을 제공한다.

[0101] 본 방법에서 “개체”는 동물, 바람직하게는 포유동물, 특히 인간을 포함하는 동물일 수 있으며, 동물에서 유래한 세포, 조직, 기관 등일 수도 있다. 상기 개체는 상기 효과가 필요한 환자(patient) 일 수 있으며, 바람직하게는 방광암으로 의심되는 환자, 방광암으로 진단된 환자 또는 방광암 치료를 받은 환자일 수 있다.

[0103] 또한 “시료”는 상기 기재한 바와 같으나, 바람직하게는 재발 또는 진행 진단을 위한 시료는 개체 또는 환자에서 수득한 소변일 수 있다.

[0105] 본 발명에서 방광암의 재발 또는 진행 진단은 방광암의 예후를 포함할 수 있으며, “예후”란 방광암 치료 중 또는 치료 후 병의 진행경과를 의미하는 것으로, 바람직하게는 치료 후 병의 진행경과를 의미할 수 있으며, 총생존율(overall survival), 무병생존률(disease free survival) 또는 무원발성전이생존율(distant metastasis free survival)을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 방광암의 진행이란 방광암의 완치, 재발, 전이 또는 전이성 재발을 포함하는 개념이며, 보다 더 바람직하게는 전이성 재발을 의미하나 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0106] 상기에서 살펴본 바와 같이, IFFO1, MARCH11, BARHL2, NR2E1, KCNA3 및 BOLL로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 CpG 부위 과메틸화는 방광암에서 특이적으로 나타나므로, 본 발명에 따른 조성물, 키트, 칩 또는 방법을 이용하여 방광암을 정확하고 신속하게 진단할 수 있으며, 더불어 조기진단 및 치료 이후 재발 모니터링을 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0107] 도 1은 본 발명에 따라 선별된 총 6종 유전자의 종양 조직(tumor) 그룹 과 비 종양 조직 (normal)그룹간 메틸화의 차이를 확인한 결과이다.

도 2는 종양 조직(tumor) 세포주 그룹에서 본 발명에 따라 선별된 총 6종 유전자의 메틸화 정보를 확인한 결과이다.

도 3은 말초 혈액 단핵세포에서 본 발명에 따라 선별된 총 6종 유전자의 메틸화 정보를 확인한 결과이다.

도 4는 말초 혈액 단핵세포의 세포 종류 별 본 발명에 따라 선별된 총 6종 유전자의 메틸화 정보를 확인한 결과이다.

도 5는 본 발명에 따라 선별된 총 6종 유전자의 방광암 진단 정확도를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0108] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 이에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0110] **실시예 1 : 방광암 특이적 메틸화 유전자 선별**

[0112] 방광암에서 특이적으로 발견되는 메틸화 유전자를 선별하고자, 대규모 메틸레이션 마이크로어레이 칩(methylation microarray chip) 데이터를 이용해 방광암 환자의 암 수술로부터 얻은 암 조직과 정상 조직의 대규모 메틸화 비교 연구를 수행하였다. 해당 연구에서 사용된 종양 조직(tumor tissue)은 방광암의 암 조직을 의미하며, 비종양 조직(non-tumor tissue)은 정상 조직을 포함한 암 조직 이외의 조직을 의미한다. 분석에 사용된 방광암 종양 조직의 수는 412개이며 비종양 조직의 수는 21개이다.

[0114] 방광암 특이적 메틸화 유전자 선별하기 위해서 각 조직에서 DNA를 추출하였으며, Infinium Human Methylation 450 Beadchip microarray를 이용해 유전자 부위의 메틸화 정도를 확인하였다.

[0116] 각 조직으로부터 추출된 DNA는 바이설파이트 처리를 통해 변환하였고, 이를 통해 DNA 부위의 메틸화 여부에 따라 사이토신 염기를 변형시켰다. 해당 microarray 실험에 사용되는 probe는 유전자의 메틸화 부위의 사이토신 염기의 변형 여부를 확인하기 위해 메틸화 (methylation), 비메틸화(unmethylation) 특이적으로 디자인 되었다.

[0118] 해당 microarray 실험은 각각 유전자의 메틸화 부위를 나타내는 약 45만개(450k)의 프로브(probe)들을 통해 유전자의 메틸화 정도를 측정하며 시험을 통해 도출된 각 프로브의 결과는 베타값(beta value)으로 제시되었다. 베타값은 0에서 1까지의 값을 가지며 1에 가까울수록 해당 유전 부위의 methylation 정도가 높다고 판단하였다.

[0120] 종양 그룹과 비종양 그룹간 차별적인 메틸화 부위 (differentially methylated regions, DMRs)를 확인하고자 경험적 베이즈 t-test (empirical Bayes t-test)인 Limma (Linear Models for Microarray Data) 방법을 사용하여 그룹 간 통계적으로 유의한 메틸화 차이를 보이는 유전자 부위를 확인하였다.

[0122] Limma 방법은 그룹 간 차이를 확인하는 여러 메틸화 통계 분석 방법 중 가장 이상치 (outlier)에 적은 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 따라서 일부 샘플의 비정상적 측정값으로부터 영향을 적게 받아 암 특이적 마커를 찾는데 적합한 방법이다. 본 실험에서는 Limma 방법을 통해 도출된 보정된 p값 (adjusted p-value)값이 적을수록 두 그룹 간 유의한 메틸화 차이가 있다고 판단하였다.

[0124] 특히 종양 특이적 메틸화 부위 탐색을 하기 위해서 종양과 비종양 그룹 간 유의한 베타값의 차이가 있는 유전자 부위 중 비종양보다 종양 조직에서 더 높은 메틸화를 부위를 암 특이적 바이오마커 후보로 선정하였다.

[0126] 그 결과 dataset에서 limma 분석 결과 비종양 그룹에 비해 종양 그룹 간 비교 시 45만개 프로브 중 1만번 째 이내의 낮은 p값을 가지며, 그룹 간 베타값 0.3 이상의 큰 차이를 유전자 부위를 종양 특이적 과메틸화 부위

(hypermethyalted regions)로 선별하였다. 이를 통해 약 45만개의 유전 부위 중 dataset에서 종양 특이적 과메틸화를 보이는 352개의 유전 부위를 바이오마커 후보로 선별하였다.

[0128] 이러한 유전 부위 중 위유전자(pseudogene)가 아니며 해당 부위가 CpG 섬 (CpG island) 부위에 존재하고 유전자의 전사 시작 부위(transcription start site, TSS)로부터 +/- 3000 염기 (base) (3kb) 사이에 선별된 유전 부위에 있으며 상염색체(autosome)에 존재하는 경우에 방광암 특이적 과메틸화 유전자로 선별하였다. 그 결과 하기 표 2과 같이, 총 6개의 유전자가 선별되었다(도 1 참고).

표 2

[0130]

Symbol	Name	Location (Chromosome)	CpG Island
IFFO1	intermediate filament family orphan 1 (IFFO; HOM-TES-103)	12	Island
MARCH11	membrane associated ring-CH-type finger 11 (RNF226; MARCHF11; MARCH-XI)	5	Island
BARHL2	BarH like homeobox 2	1	Island
NR2E1	nuclear receptor subfamily 2 group E member 1	6	Island
KCNA3	potassium voltage-gated channel subfamily A member 3 (MK3; HGK5; HLK3; PCN3; HPCN3; KV1.3; HUKIII)	1	Island
BOLL	boule homolog, RNA binding protein (BOULE)	2	Island

[0132] **실시예 2 : 세포주에서 방광암 진단 유전자의 방광암 특이성 확인**

[0134] 선별된 6개의 유전자의 높은 메텔화가 방광암 세포에 기인하는 것인지 확인하기 위해 공공 데이터베이스를 활용해 크게 방광암에서 유래된 20개의 암세포주 (cancer cell lines)에서의 메틸화 패턴을 분석하였다. 해당 데이터는 각 세포주에서 추출한 DNA를 표준화된 제조사의 메틸화 분석 시험 과정을 따라 Infinium Human Methylation 450 Beadchip microarray 실험을 수행되었다.

[0136] 수행된 실험의 결과값은 상기 실시예 1에서와 같이 약 45만개의 프로브들을 통해 유전자 메틸화 정도를 측정하며 각 프로브의 메틸화 값은 베타값으로 제시된다. 베타값은 0에서 1까지의 값을 가지며 1에 가까울수록 해당 유전 부위의 메틸화 정도가 높다고 판단한다.

[0137] 상기 20개의 방광암 세포주는 다음과 같다: 5637 (comic ID: 687452), 639-V (comic ID: 906798), 647-V (comic ID: 906797), BFTC-905 (comic ID: 910926), CAL-29 (comic ID: 1290730), DSH1 (comic ID: 753552), HT-1197 (comic ID: 907065), HT-1376 (comic ID: 907066), J82 (comic ID: 753566), KU-19-19 (comic ID: 907312), LB831-BLC (comic ID: 753584), RT-112 (comic ID: 909704), RT4 (comic ID: 687455), SCABER (comic ID: 1299051), SW1710 (comic ID: 909749), SW780 (comic ID: 687457), T-24 (comic ID: 724812), TCCSUP (comic ID: 687459), UM-UC-3 (comic ID: 724838), VM-CUB-1 (comic ID: 909780)

[0139] 선별된 6개의 유전자의 방광암 세포주에서 메틸화 수준을 확인한 결과 각 유전자의 메틸화 중앙값은 0.93 이상으로 종양 조직에서의 선별된 유전자의 높은 메틸화 수준과 같이 높은 수준의 메틸화 값을 보였다 (도 2 참고). 따라서 선별된 유전자는 방광암에서 특이적으로 메틸화를 가진다는 것이 확인되었다.

[0141] **실시예 3 : 말초 혈액 단핵세포에서 방광암 진단 유전자의 낮은 메틸화 수준 확인**

[0143] 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)는 구형 핵을 가진 말초 혈액 세포이다. 이러한 말초혈액단핵세포는 T 세포, B세포, 대식세포(macrophage), 수지상 세포 (dendritic cell), 자연살해세포(NK cell, natural killer cell) 등의 면역 관련 세포들을 포함한다.

[0145] 선별된 6개의 유전자의 메틸화 수준을 확인하기 위해서는 암 시료의 수득 단계가 요구된다. 이러한 시료는 수행되는 분석의 종류에 따라, 개개인, 체액, 세포주, 조직 배양 등에서 얻어지는 모든 암과 관련된 생물학적 체액, 포함하는 폭넓은 범위의 체액을 의미한다. 시료의 수득 과정에서 말초 혈액 단핵세포의 오염은 가장 빈번히 발생할 수 있는 메틸화 측정을 저해하는 요인으로 말초 혈액 단핵세포 내의 측정하고자 하는 유전자의 메틸화에 의해 암 시료의 유전자 메틸화 수준이 영향을 받는다.

[0147] 선별된 6개의 유전자가 말초 혈액 단핵세포의 오염으로부터 영향을 받는지 확인하기 위해 총 110명으로부터 말초 혈액 단핵세포의 메틸화 패턴을 분석하였다. 해당 데이터는 말초 혈액 단핵세포로부터 추출한 DNA를 실시예

1과 2에서와 같이 표준화된 제조사의 메틸화 분석 시험 과장을 따라 Infinium Human Methylation 450 Beadchip microarray 실험을 수행되었다. 수행된 실험의 결과값은 약 45만개의 프로브들을 통해 유전자 메틸화 정도를 측정하며 각 프로브의 메틸화 값은 베타값으로 제시된다. 베타값은 0에서 1까지의 값을 가지며 1에 가까울수록 해당 유전 부위의 메틸화 정도가 높다고 판단한다.

[0149] 선별된 6개의 유전자의 말초 혈액 단핵세포에서 메틸화 수준을 확인한 결과 각 유전자의 메틸화 중앙값은 0.10 미만으로 종양 조직에서의 선별된 유전자의 높은 메틸화 수준과 달리 낮은 수준의 메틸화 값을 보였다 (도 3 참고). 따라서 선별된 유전자는 방광암에서 특이적으로 메틸화를 가진다는 것이 확인되었다.

[0151] 또한 말초 혈액 단핵세포를 구성하는 세포군별로 나눠서 메틸화 분석을 수행하여 특정 세포군이 시료 내 메틸화 수준 측정에 영향을 주는지 분석을 수행하였다. 총 6명의 정상인의 혈액 시료에서 전체 혈액 (whole blood), 말초 혈액 단핵세포 (PBMC) 뿐 아니라 말초 혈액 단핵세포를 구성하는 과립구 (granulocyte), CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, CD56+ NK 세포, CD19+ B 세포, CD14+, 단핵구 (monocyte), 호중구 (neutrophil), 호산구 (eosinophilia)로 세포군을 분류하여 DNA 메틸화 수준을 분석하였다. 메틸화 수준은 실시예 1과 2에서와 같이 Infinium Human Methylation 450 Beadchip microarray 실험을 통해 측정되었다.

[0153] 선별된 6개의 유전자의 말초 혈액 단핵세포의 세부 세포군 별로 수준을 확인한 결과 각 유전자의 메틸화 중앙값은 최대 0.16 미만으로 선별된 유전자는 말초 혈액 단핵세포 각각에서도 낮은 수준의 메틸화 값을 보였다 (도 4 참고).

[0155] 이러한 결과는 선별된 유전자가 말초 혈액 단핵세포에서 낮은 메틸화 수준을 나타내 시료로부터 해당 유전자의 메틸화 측정에 말초 혈액 단핵세포의 오염으로부터 받는 영향이 극히 제한적임을 의미한다.

[0157] **실시예 4 : 방광암 진단 유전자의 진단 성능 평가**

[0159] 선별된 유전자의 방광암에서 진단 마커로서의 유용성을 확인하기 위해 메틸화 정도에 따른 방광암 진단의 정확도를 평가하였다.

[0161] 진단의 정확도를 평가하기 위해서는 민감도 (sensitivity)와 특이도 (specificity)를 사용한다. 연속된 진단 검사 측정치의 가능한 절단값(cut-off value)에 대한 민감도와 특이도의 값의 계산을 통해 절단값에 따른 민감도와 특이도의 변화를 제시하는 ROC (Receiver Operating Characteristic) curve를 나타낼 수 있다. 진단의 정확도는 ROC curve 아래의 면적 (area under the ROC curve, AUC)에 의해 측정될 수 있다. AUC값은 0.5에서 1 사이의 값을 가지고 그 값이 클수록 진단 정확도가 높다고 평가한다. 만약 AUC값이 1이라면 진단 결과가 완벽히 정확한 검사임을 의미하지만 0.5일 경우 무작위 결과와 동일하다고 판단한다.

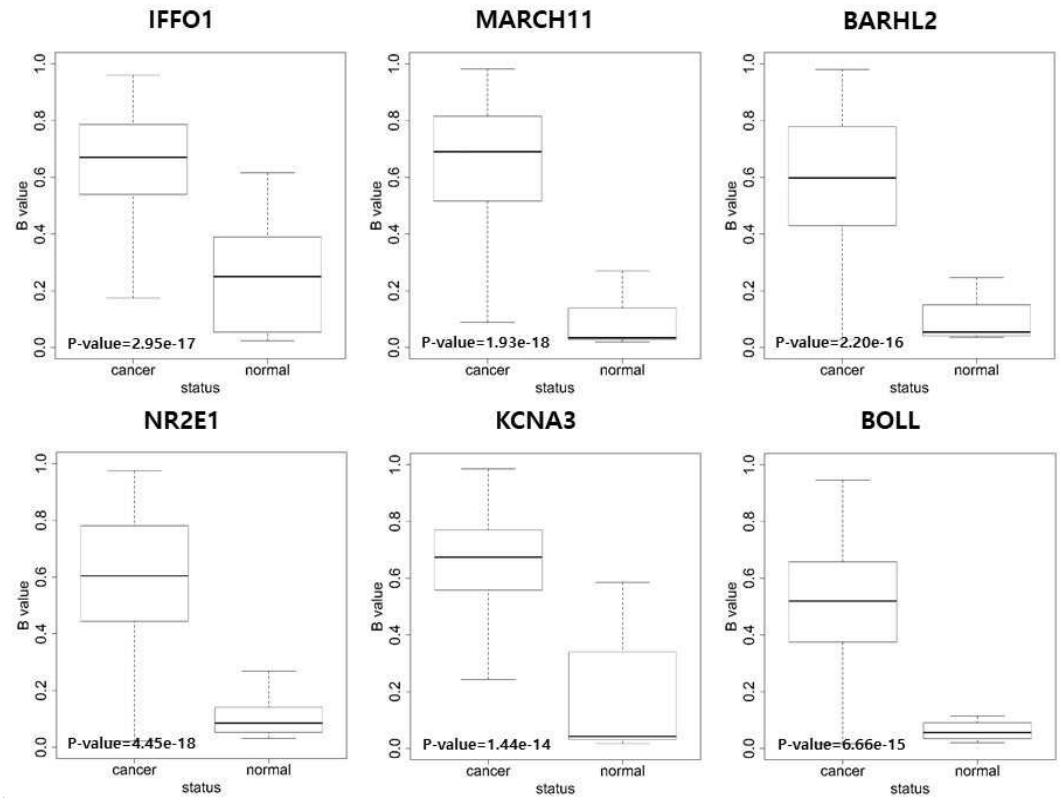
[0163] 선별된 유전자를 이용한 비종양 조직과 종양 조직 간의 메틸화 정도에 따른 암 분류 정확도를 수집된 메틸레이션 데이터셋을 이용해 분석한 결과 도 7과 같이, 모든 선별된 유전자는 0.906 이상의 AUC (Area Under Curve) 값을 가져 높은 진단 정확도를 보여 선별된 유전자가 방광암 진단에 유용한 것을 확인하였다 (도 5 참고).

산업상 이용가능성

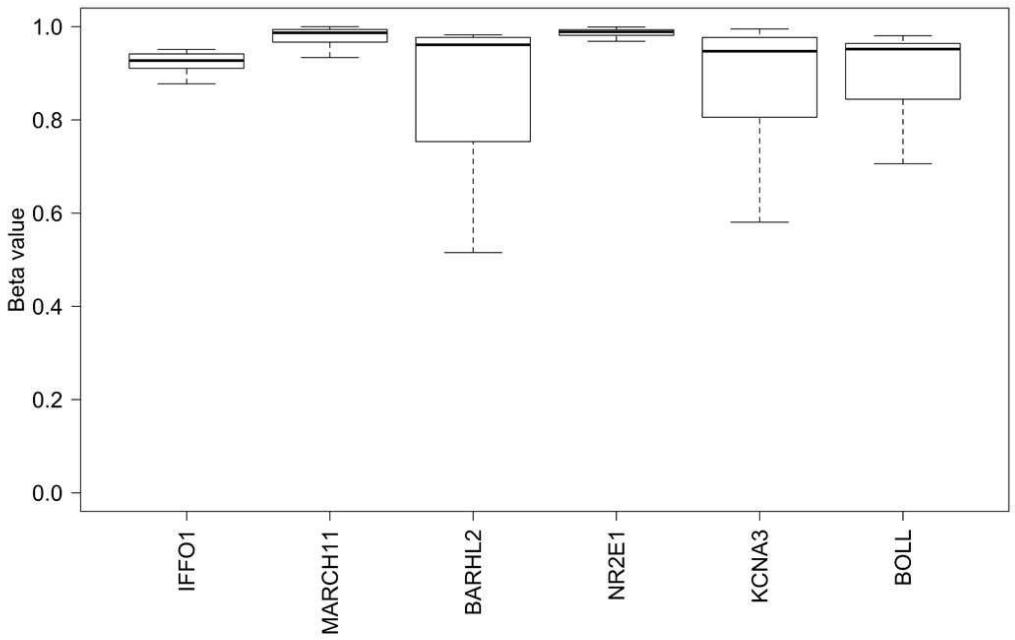
[0164] 이상 살펴본 바와 같이 IFFO1, MARCH11, BARHL2, NR2E1, KCNA3 및 BOLL로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 CpG 부위 과메틸화는 방광암에서 특이적으로 나타나므로, 본 발명에 따른 조성물, 키트, 칩 또는 방법을 이용하여 방광암을 정확하고 신속하게 진단할 수 있을 뿐만 아니라 조기진단 및 재발 모니터링에 이용할 수 있다.

도면

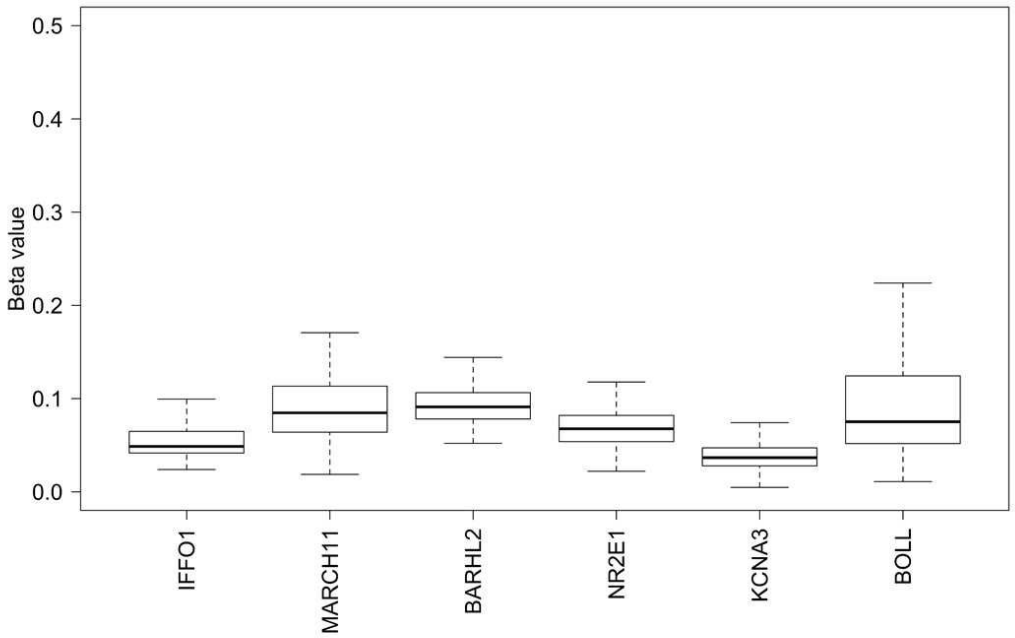
도면1


IFFO1
MARCH11
BARHL2
NR2E1
KCNA3
BOLL
B value
P-value=2.95e-17
P-value=1.93e-18
P-value=2.20e-16
P-value=4.45e-18
P-value=1.44e-14
P-value=6.66e-15
cancer
normal
status

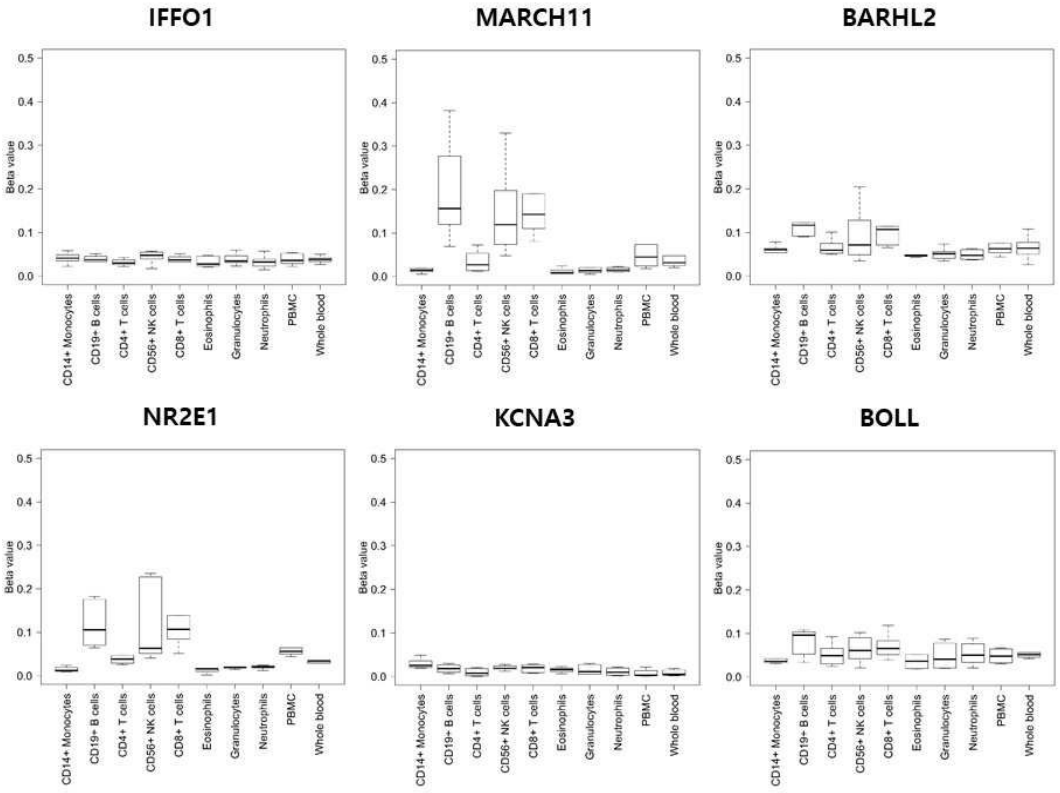
도면2


Beta value
IFFO1
MARCH11
BARHL2
NR2E1
KCNA3
BOLL

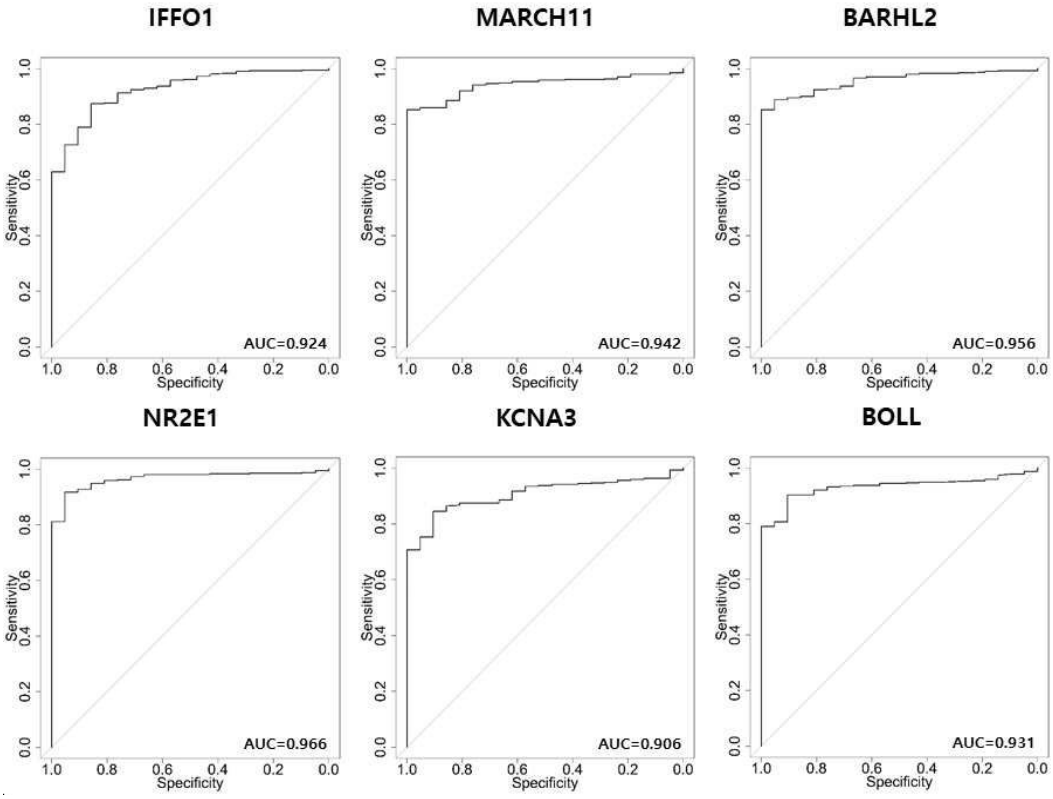
도면3


Beta value
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
IFFO1
MARCH11
BARHL2
NR2E1
KCNA3
BOLL

도면4


IFFO1
MARCH11
BARHL2
NR2E1
KCNA3
BOLL
Beta value
CD14+ Monocytes
CD19+ B cells
CD4+ T cells
CD56+ NK cells
CD8+ T cells
Eosinophils
Granulocytes
Neutrophils
PBMC
Whole blood

도면5


IFFO1
AUC=0.924
MARCH11
AUC=0.942
BARHL2
AUC=0.956
NR2E1
AUC=0.966
KCNA3
AUC=0.906
BOLL
AUC=0.931
Sensitivity
Specificity