

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국(43) 국제공개일
2010년 7월 29일 (29.07.2010)

PCT



(10) 국제공개번호

WO 2010/085124 A2

(51) 국제특허분류:

G01N 33/574 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/563 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2010/000442

(22) 국제출원일:

2010년 1월 22일 (22.01.2010)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2009-0005693 2009년 1월 22일 (22.01.2009) KR

(71) 출원인(US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 재단법인 한국원자력의학원 (KOREA INSTITUTE OF RADIOLOGICAL & MEDICAL SCIENCES) [KR/KR]; 서울 노원구 공릉동 215-4, 139-240 Seoul (KR).

(72) 발명자; 겸

(71) 출원인: 박은란 (PARK, Eun Ran) [KR/KR]; 서울 노원구 공릉동 715-3 공릉3 단지 아파트 302 호 411 호, 139-744 Seoul (KR).

(72) 발명자; 겸

(75) 발명자/출원인(US에 한하여): 이기호 (LEE, Kee Ho) [KR/KR]; 서울 도봉구 쌍문동 한양 6 차아파트 603 동 403 호, 132-030 Seoul (KR). 차부현 (CHA, Pu Hyeon) [KR/KR]; 서울 도봉구 창동 주공 2 단지 204 동 807

호, 132-040 Seoul (KR). 김상범 (KIM, Sang Bum) [KR/KR]; 서울 용산구 이촌 1동 코오롱아파트 106 동 1108 호, 140-744 Seoul (KR). 박선후 (PARK, Sun Hoo) [KR/KR]; 서울 노원구 중계 1동 우성 3차 아파트 301 동 2103 호, 139-952 Seoul (KR). 이동형 (LEE, Dong Hyoung) [KR/KR]; 서울 노원구 공릉 2동 238-3 번지 9/8 501 호, 139-800 Seoul (KR). 우선랑 (WOO, Seon Rang) [KR/KR]; 서울 노원구 하계 1동 한신아파트 2 동 818 호, 139-231 Seoul (KR). 한철주 (HAN, Chul Ju) [KR/KR]; 서울 강남구 도곡 2동 465 우성 4 차아파트 8 동 706 호, 135-505 Seoul (KR). 함용호 (HAM, Yong Ho) [KR/KR]; 서울 노원구 공릉동 217-13 장마리라 401 호, 139-240 Seoul (KR). 이은주 (LEE, Eun Ju) [KR/KR]; 서울 송파구 잠실본동 331 현대아파트 103 동 701 호, 138-867 Seoul (KR). 박명진 (PARK, Myoung Jin) [KR/KR]; 서울 노원구 공릉동 742 효성아파트 110 동 506 호, 139-240 Seoul (KR). 황상구 (HWANG, Sang Gu) [KR/KR]; 서울 노원구 중계 1동 주공아파트 509 동 1508 호, 139-781 Seoul (KR).

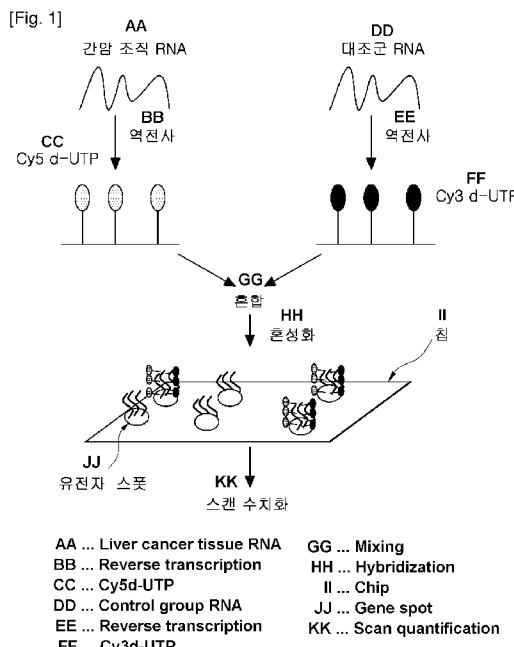
(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 서울 강남구 삼성동 159-9 도심 공항타워 6 층 한얼국제특허사무소, 135-973 Seoul (KR).

(81) 지정국(별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: MARKER FOR LIVER-CANCER DIAGNOSIS AND RECURRENCE AND SURVIVAL PREDICTION, A KIT COMPRISING THE SAME, AND PROGNOSIS PREDICTION IN LIVER-CANCER PATIENTS USING THE MARKER

(54) 발명의 명칭: 간암진단과 재발 및 생존 예측용 마커, 이를 포함한 키트 및 상기 마커를 이용한 간암환자 예후 예측



(57) Abstract: The present invention relates to a composition used in marker detection for liver-cancer diagnosis or prognosis prediction comprising a preparation for measuring the level of expression of UQCRH (ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein), to a kit comprising the composition, to a microarray for diagnosing liver cancer using the marker, to a method for detecting the marker, and to the prediction of recurrence following surgery in liver-cancer patients. According to the present invention, the marker has been judged to be able to greatly contribute to predicting the recurrence and the prognosis for survival following surgery in individuals who have had an early diagnosis and liver resection surgery for liver cancer, and provides significance to treatment targets for subsequent liver-cancer treatment.

(57) 요약서: 본 발명은 UQCRH (ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein)의 발현 수준을 측정하는 재제를 포함하는 간암 진단 또는 예후 예측을 위한 마커 검출용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 키트, 상기 마커를 이용하여 간암을 진단하기 위한 마이크로어레이 및 상기 마커의 검출 방법, 간암 환자의 수술 후 재발예측에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 상기 마커는 간암의 조기 진단 및 간 절제술을 받은 사람의 수술 후 재발 및 생존예후를 예측하는데 크게 기여 할 수 있을 것으로 판단되며 향후 간암 치료를 위한 치료 타겟에 대한 유의성을 제공한다.



HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,

GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 간암진단과 재발 및 생존 예측용 마커, 이를 포함한 키트 및 상기 마커를 이용한 간암환자 예후 예측

기술분야

[1] 본 발명은 UQCRH (ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein) 의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 간암을 진단하기 위한 마커 검출용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 키트, 상기 마커를 이용하여 간암을 진단하기 위한 마이크로어레이 및 상기 마커의 검출 방법, 간암 치료를 위한 치료 타겟에 대한 유효성 검증에 관한 것이다.

배경기술

[2] 간암 (hepatocellular carcinoma)은 세계적으로 가장 치명적인 암의 하나로, 특히 아시아와 사하라 이남 아프리카에서, 해마다 약 오십만 명 이상이 간암으로 사망하고 있다. 간암의 위험 요인은 B형 간염 또는 C형 간염 바이러스에 의한 고질적인 감염이라고 알려져 있으나, 간암 세포 내의 분자 메커니즘은 아직도 명확히 규명되지 않은 상태이며, 따라서 간암 진단에 탁월한 효과가 있는 진단마커가 개발되어 있지 않은 실정이다. 또한 간 절제술은 간암 환자 중에서 전이가 발생하지 않은 비교적 초기 환자의 치료법으로서, 현재 전체 간암 환자의 약 20% 내외가 간 절제술에 의한 치료를 받고 있으나, 간 절제술을 받은 간암 환자의 경우에도 장기 생존율은 높지 않은 편이며, 특히 수술 후 1년 안에 사망하는 환자가 많은 실정이다. 또한, 임상 병리 분석에 의한 생존율 예측이 예전부터 사용되고 있으나, 보편성과 타당성의 문제로 인해 모든 간암 환자에게 적용되지 못하고 있다. 따라서, 효과적인 간암 진단 마커 및 간 절제술 예후 예측 마커를 개발 해야 할 필요성이 크다.

[3] 간암의 분자 메커니즘을 규명하기 위한 기존의 연구는 개개의 유전자에 대한 연구에 초점이 맞추어져 왔으며, 최근의 연구에 의하면 간암 발생에 있어서 변형된 p53, 베타-카테닌, AXINI, p21(WAF1/CIP1) 및 p27 Kip 등의 유전자가 관련된다는 것이 밝혀졌다. 그러나 이러한 개개의 유전자의 변화들은 간암 환자들의 외적 특성과 임상 특성을 정확하게 반영하지 못하고 있어, 개체의 간암 내의 세포와 분자의 다양성은 기존의 유전자 연구 외에 새로운 접근 방식을 요구하고 있다. 이와 관련하여, cDNA 마이크로어레이 테크놀로지는 개개의 유전자의 측정범위를 넘어서 한번의 실험으로 수만여 개의 유전자 발현을 동시에 측정할 수 있는 새로운 기술로서 간암을 포함한 거의 대부분의 암 연구에 적용되어 왔으며, 암의 발생 과정에서 활발하게 참여하는 유전자의 측정과 그 유전자에서 발현되는 단백질 또는 효소를 측정함으로써 암 진단의 수준을 분자 수준에서 가능하도록 하였다. 비록 간암의 진단이 그들의 병리학적 연구결과에 의해 정확하게 결정되는 것은 어렵지만, 그들의 분자 발현 프로파일의 차이점에

의한 비 종양 간 조직으로부터 간암의 구별은 가능하다. 왜냐하면, 문자 발현 프로파일의 차이는 간암 발생에 포함된 유전자들의 정화한 세트(set)를 선택하는 것을 가능하게 하기 때문이다. 또한 이것은 필요에 대한 적절한 목표를 설정하는 것을 용이하게 할 수 있고 따라서 간암 치료상의 효과를 극대화할 것으로 기대되고 있다

[4]

[5] 간암을 포함한 인간 암에 관련된 유전자를 마이크로어레이 방법으로 규명하기 위하여 현재까지의 연구들은 유전자 발현의 패턴을 분석하는데 매우 유용한 방법인 언수퍼바이즈드 클러스터링 알고리즘(unsupervised clustering algorithm) 및 수퍼바이즈드 알고리즘을 개발하였다. 그러나 이 언수퍼바이즈드 클러스터링 분석은 그 측정결과의 통계적인 정확성을 제공하기 어려울 뿐 아니라, 주어진 목표의 많은 정보로부터 발현된 유전자의 특이 형태의 정확한 프로파일을 제공하는 것도 용이하지 않는 문제가 있다. 수퍼바이즈드 러닝 알고리즘(supervised learning algorithm)의 중요성조차도 오직 몇 개의 최근 보고서들만 암의 과 분류에 대한 러닝 알고리즘을 채택했고 암 환자의 임상 결과를 발견했을 뿐이다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7]

이에, 본 발명자들은 간암 진단 및 간 절제술 예후 예측의 수준을 문자 수준에서 정확하게 확인할 수 있는 마커를 개발하고자 노력한 결과, cDNA 마이크로어레이 결과를 분석하여 UQCRH 이 간암 조직 및 세포에서 특이적으로 발현이 증가하는 유전자임을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

과제 해결 수단

[8]

따라서, 본 발명의 목적은 UQCRH (ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein)의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는, 간암 진단 또는 예후 예측을 위한 마커 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

[9]

본 발명의 다른 목적은, 상기 조성물을 포함하는, 간암 진단 또는 예후 예측을 위한 마커 검출용 키트를 제공하는 것이다.

[10]

본 발명의 또 다른 목적은, UQCRH (ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein)를 포함하는, 간암을 진단하기 위한 마이크로어레이를 제공하는 것이다.

[11]

본 발명의 또 다른 목적은, 간암 마커 UQCRH (ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein)를 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

[12]

본 발명의 또 다른 목적은, 간암으로 간 절제술을 받은 사람의 수술 후 재발 및 생존예후를 예측하는 방법으로 본 발명이 마커를 사용할 수 있음을 제공하는 것이다.

[13]

본 발명의 또 다른 목적은 간암 환자들간의 UQCRH 발현을 분석하고 이를

바탕으로 생존기간을 분석함으로써 본 발명이 향후 간암 치료를 위한 치료타겟에 대한 유효성을 보여주는 것이다.

[14]

발명의 효과

[15] 본 발명자들은 정상 간 조직에 비해 간암조직에서 발현이 증가한 유전자들을 확인하였고, 이 유전자를 선별하여 간암의 진단 마커로서의 활용가능성을 평가하였다. 따라서, 본 발명에 따른 간암 진단 마커인 UQCRH를 사용하면 간암의 유무를 정확하고 손쉽게 측정할 수 있으며, 나아가 간암의 종양 형성의 연구에 활용될 수 있다. 또한 간암의 조기 진단과 간암환자의 재발 및 예후 예측에 큰 기여를 할 수 있을 것으로 판단되며 이를 바탕으로 향후 간암 치료 타겟에 대한 근거를 제공 할 수 있을 것으로 판단된다.

도면의 간단한 설명

[16] 도 1은 간암 진단 유전자의 발현 프로파일을 측정하기 위한 mRNA의 역전사와 DNA 칩에서 혼성화 및 분석 과정을 나타낸 모식도이다.

[17] 도 2는 선별된 간암 유전자인 UQCRH의 유전자 서열(서열번호 1) 및 단백질 서열(서열번호 2)을 나타낸 것이다.

[18] 도 3은 선별된 간암 진단 유전자인 UQCRH의 유전자의 발현을 측정할 수 있는 RT-PCR 용 프라이머 서열과 위치 및 RT-PCR 실험의 조건을 나타낸 것이다.

[19] 도 4는 선별된 간암 특이 유전자인 UQCRH의 발현을 30개의 종양조직에서 RT-PCR을 통해 재확인하고, 정상조직의 발현 값 대비 종양조직의 발현 값을 나타낸 것이다.

[20] 도 5는 도 4의 RT-PCR 결과를 토대로 UQCRH의 발현이 낮은 그룹과 높은 그룹으로 나누어 그런 간암환자의 생존 그래프를 나타낸 것이다.

[21] 도 6은 Real-time PCR 결과에 근거하여 UQCRH의 발현을 정상조직의 발현 값 대비 종양조직의 발현 값을 상대적으로 나타낸 것이다.

[22] 도 7은 Real-time PCR 결과에 근거하여 UQCRH의 발현 값을 비 종양조직에서의 유전자의 발현 값을 기준으로 150% 이상 상승된 값을 바탕으로 종양조직간의 높은 그룹과 낮은 그룹간의 간암환자의 수술 후 생존 그래프를 분석하여 나타낸 것이다.

[23] 도 8은 도 7의 Real-time PCR 결과값을 200% 이상 상승된 값을 바탕으로 종양조직간의 높은 그룹과 낮은 그룹간의 간암환자의 수술 후 생존 그래프를 분석하여 나타낸 것이다.

[24] 도 9는 도 6의 Real-time PCR 결과값을 3 그룹 기준으로 나누었을 때의 값을 바탕으로 높은 그룹과 낮은 그룹간의 간암환자의 수술 후 생존 그래프를 분석하여 나타낸 것이다.

[25] 도 10은 도 6의 Real-time PCR 결과에 근거하여 UQCRH의 발현 값을 비 종양조직에서의 유전자의 발현 값을 기준으로 200% 이상 상승된 값을 바탕으로

UQCRH 유전자 발현이 높은 그룹과 낮은 그룹간의 생존율 그래프를 분석하는데 있어서 간암 이외의 기타 질병과의 상관관계를 배제한 후 생존 그래프를 분석하여 나타낸 것이다.

[26]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[27]

상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 UQCRH (ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein)의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는, 간암 진단 또는 예후 예측을 하기 위한 마커 검출용 조성물에 관한 것이다.

[28]

본 발명에서 용어, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 간암 발병 여부를 확인하는 것이다.

[29]

본 발명에서 용어, "예후"는 간암 절제 수술의 재발, 전이성 확산, 및 약물 내성을 비롯한 간암-기인성 사망 또는 진행의 가능성 등 질병의 경과 및 완치 여부를 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상 예후는 간암 생존 예후를 의미하며, 바람직하게는 간암을 수술로 절제한 환자의 예후를 의미한다.

[30]

본 발명에서 용어, "예측"이란 환자가 수술, 화학요법 또는 방사선 치료 등 치료법에 대해 선호적으로 또는 비선호적으로 반응하여 환자가 치료된 후 생존할 여부에 대한 가능성과 관련된다.

[31]

본 발명에서 용어, "진단용 마커, 진단하기 위한 마커 또는 진단 마커(diagnostic marker)"란 간암 세포를 정상세포와 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상 세포에 비하여 간암을 가진 세포에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산 (예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질 또는 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자들을 포함한다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 간암진단 마커는 정상 간 조직의 세포에 비하여, 간암 세포에서 특이적으로 높은 수준의 발현을 보이는 UQCRH (ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein) 유전자이다.

[32]

본 발명에서 용어, "예후 예측을 위한 마커(prognostic marker)"란 간암 절제 수술 등 간암 치료 후에 병의 경과, 생존 여부 또는 완치 여부를 확인할 수 있는 물질로, 폴리펩타이드 또는 핵산 (예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질 또는 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자들을 포함한다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 간암 예후 예측용 마커는 UQCRH (ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein) 유전자이다.

[33]

UQCRH (ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein)는 마이토콘드리아 힌지 단백질 (mitochondrial hinge protein)을 인코딩하는 유전자로서, cytochrome c에 결합하는 역할을 한다. UQCRH는 QCR6와 MGC111572로도 불리며, 그 유전자 및 단백질 정보는 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에 등록되어 있다 (GeneID: 7388, NM_006004). 본원에서는 UQCRH의 유전자 및

아미노산 서열을 각각 서열번호 1과 서열번호 2에 나타내었다. UQCRH가 간암에서의 연구는 보고된 적이 없으며, 다른 암에서 진단 및 예후와의 관련성은 전혀 알려지지 않았다. 더불어 임상연구에 관한 보고도 전무한 실정이다.

[34] 본 발명자는 다음과 같은 입증을 통하여 UQCRH 이 간암 진단을 위한 마커와 재발 및 생존예후로 이용될 수 있음을 규명하였다.

[35] 구체적으로, 간암 환자 중 간암수술을 받은 환자로부터 종양조직 146개를 채취하여 RNA를 분리 정제 하였다. 그리고 5명의 비 간암 환자로부터 얻은 정상 간 조직에서 정제한 RNA를 대조 RNA로 사용하였다. 이렇게 조직으로부터 분리한 RNA와 대조 RNA를 역전사 (reverse transcription)시켜 cDNA를 제조하였는데, 이 과정에서 Cy5-dUTP, Cy3-dUTP를 cDNA에 각각 결합하도록 하였다 (도 1 참고). 이렇게 혼성화시킨 DNA 칩은 레이저 스캐너를 이용하여 각 스폿에서의 Cy3 와 Cy5의 강도 (intensity)를 측정하였다. 이 두 가지 종류의 형광강도의 상대적인 비율을 컴퓨터 소프트웨어(IMAGENE program)를 이용하여 수치화하여 발현도를 측정하였다.

[36] 수치화한 발현도를 정규화 과정을 거쳐 (normalization process) 표준화 하였다. 이렇게 정규화한 발현도의 자료를 바탕으로 생존 상관률(p)이 0.05이하인 유전자를 선별하였다. 그 중에서 cy3와 cy5의 강도를 비교하여, 정상조직(cy3)에 비해 종양조직(cy5)에서의 발현도가 높은 유전자를 선정한 뒤, 한 유전자에서 발현 정도의 차이를 나타내는 IQR이 마이크로어레이의 IQR 평균값이 0.43 이상 되는 유전자를 선별하였다. 이렇게 선정된 유전자들의 발현을 재확인 하기 위해, 각각 30개의 종양조직과 인접한 비 종양조직, 그리고 5명의 환자의 정상 간 조직에서 RNA를 추출한 뒤, 역전사 반응을 통해 cDNA를 합성하였다. RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction)을 통한 UQCRH 유전자 발현의 재확인 결과, 마이크로어레이 결과와 동일하게 정상조직과 비 종양조직에 비해 종양조직에서 UQCRH 의 발현이 확연히 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다(도 4). 그리고 100명의 간암 환자 샘플 군과 비 간암 환자 30명의 환자 샘플 군에서 추출한 cDNA를 바탕으로 UQCRH용 Taq-Man probe를 제작하여 실시간 PCR (Real-time PCR)을 통해서 이들 환자군에서의 UQCRH 의 발현을 정확하게 측정하였고 이를 근거로 간암 환자들간에서 발현의 차이에 따른 생존기간을 분석하였다. 그 결과 UQCRH 유전자의 발현이 높은 환자 군에서 낮은 발현 군에 비해 확연하게 수술 후 생존기간이 줄어들었음을 입증하였다 (도 6 내지 도 9).

[37] 본 발명에서 용어, "UQCRH (ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein)"의 발현수준을 측정하는 제제"란 상기와 같이 간암 세포에서 발현이 증가하는 마커인 UQCRH의 발현 수준을 확인함으로써 마커의 검출에 사용될 수 있는 분자를 의미하며 바람직하게는 마커에 특이적인 항체, 프라이머 또는 프로브를 말한다.

[38] UQCRH 의 발현 수준은 UQCRH 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 유전자에

의해 코딩 되는 단백질의 발현 수준을 확인함으로써 알 수 있다. 본 발명에서 mRNA 발현 수준 측정 이란 간암을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 간암 마커 유전자의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, mRNA의 양을 측정함으로써 알 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR (Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법 (RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅 (Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 단백질 발현수준 측정 이란 간암을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서의 간암 마커 유전자에서 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인한다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA:

Radioimmunoassay),방사면역확산법(radioimmunodiffusion),오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케이트(rocket) 면역 전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법 (Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법 (Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[39] 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 바람직하게는 프라이머 쌍 또는 프로브이며, UQCRH 유전자의 핵산 서열이 NM_006004 (NCBI)에 밝혀져 있으므로 당업자는 상기 서열을 바탕으로 이들 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭하는 프라이머 또는 프로브를 디자인 할 수 있다.

[40] 본 발명에서 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3말단 수산화기 (free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트 (template)와 염기쌍 (base pair)를 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이트 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4기지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시할 수 있다. 본 발명에서는 UQCRH 폴리뉴클레오티드이 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성 여부를 통해 간암을 진단할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[41] 본 발명에서 용어, "프로브"란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링 되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고 뉴클레오타이드 (oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 UQCRH 폴리뉴클레오티드와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부를 통해 간암을 진단할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을

기초로 변형할 수 있다.

- [42] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체 (예: 메틸 포스포네이트, 포스소트리에스테르, 포스포로아미레이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.
- [43] 단백질 수준을 측정하는 제제는 바람직하게는 항체이다.
- [44] 본 발명에서 용어, "항체"란 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 마커인 UQCRH에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는, 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩 되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 웨პ티도도 포함되며, 본 발명의 부분 웨პ티드로는, 최소한 7개의 아미노산, 바람직하게는 9개 아미노산, 더욱 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.
- [45] 본 발명의 간암 진단 마커의 검출에 사용되는 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태 뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [46]
- [47] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 간암 진단 마커 검출용 조성물을 포함하는, 간암을 진단하기 위한 마커 검출용 키트에 관한 것이다.
- [48] 본 발명의 키트는 간암 진단 마커인 UQCRH의 mRNA 발현 수준 또는 단백질의 발현 수준을 확인함으로써 마커를 검출할 수 있다. 본 발명의 마커 검출용 키트에는 간암 진단 마커의 발현 수준을 측정하기 위한 프라이머, 프로브 또는 선택적으로 마커를 인지하는 항체뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [49] 구체적인 일례로서, 본 발명에서 UQCRH의 mRNA 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는, 마커 유전자에 대하여 당업자가 디자인한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액 (pH 및

마그네슘 농도는 다양), 테옥시뉴클레오타이드 (dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수 (DEPC-water), 및 멜균수 등을 포함할 수 있다. 또한 정량 대조구로는 18s rRNA를 사용하였는데, 이에 대한 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 진단 마커 검출용 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는, 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기판을 포함하고 기판은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다.

- [50] 또 다른 구체적인 일례로서, 본 발명에서 UQCRH 의 단백질 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 및 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기에서 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스틸렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드 글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 페옥시다아제(peroxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase)가 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC, RITC 등이 사용 될 수 있고, 발색기질액으로는 ABTS(2,2'-아지노-비스-(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘) 등이 사용될 수 있다.
- [51]
- [52] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 본 발명에 따른 마커를 포함하는, 간암을 진단하기 위한 마이크로어레이에 관한 것이다. 본 발명의 마이크로어레이는 본 발명의 마커를 이용하여 당업계에서 통상적으로 사용되는 제조 방법에 의하여 용이하게 제조될 수 있다.
- [53]
- [54] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 간암 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 환자의 시료로부터 UQCRH 의 발현 수준을 정상 세포의 발현 수준과 비교하여 간암마커 UQCRH 를 검출하는 방법에 관한 것이다.
- [55] 보다 구체적으로는, 유전자의 발현을 mRNA 수준 또는 단백질 수준에서 검출할 수 있고, 생물학적 시료에서 mRNA 또는 단백질의 분리는 공자의 공정을 이용하여 수행할 수 있다.
- [56] 본 발명에서 용어 "환자의 시료"란 간암 마커 유전자인 UQCRH 의 발현 수준이 차이 나는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [57] 상기 검출 방법들을 통하여, 정상 대조군에서의 유전자 발현 수준을 간암의 심환자에서의 유전자 발현 수준과 비교함으로써 간암 의심 환자의 실제 암 환자 여부를 진단할 수 있다. 즉, 간암으로 추정되는 세포로부터 본 발명의 마커의 발현 수준을 측정하고, 정상 세포로부터 본 발명의 마커의 발현 수준을 측정하여 양자를 비교한 후, 본 발명의 마커의 발현 수준이 정상 세포의 것보다

간암으로 추정되는 세포 유래에서 더 많이 발현되면 간암으로 추정되는 세포를 간암으로 예측할 수 있는 것이다.

[58]

[59] mRNA 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅, DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 상기 검출 방법들을 통하여, 정상 대조군에서의 mRNA 발현량과 간암 의심 환자에서의 mRNA 발현량을 비교할 수 있고, 간암 마커 유전자에서 mRNA로의 유의한 발현량의 증감여부를 판단하여 간암 의심 환자의 실제 간암 발병 여부를 진단할 수 있다.

[60]

mRNA 발현수준 측정은 바람직하게는, 간암 마커로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머를 이용하는 역전사효소 중합효소반응법 또는 DNA 칩을 이용하는 것이다.

[61]

상기의 역전사효소 중합효소반응은 반응 후 전기영동하여 밴드 패턴과 밴드의 두께를 확인함으로써 간암 진단 마커로 사용되는 유전자의 mRNA 발현 여부와 정도를 확인 가능하고 이를 대조군과 비교함으로써, 간암 발생 여부를 간편하게 진단할 수 있다.

[62]

한편, DNA 칩은 상기 간암 마커 유전자 또는 그 단편에 해당하는 핵산이 유리 같은 기판에 고밀도로 부착되어 있는 DNA 칩을 이용하는 것으로서, 시료에서 mRNA를 분리하고, 그 말단 또는 내부를 형광 물질로 표지된 cDNA 프로브를 조제하여, DNA 칩에 혼성화시킨 다음 간암의 발병 여부를 판독할 수 있다.

[63]

[64] 단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는, 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로켓 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS, 단백질 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 상기 분석 방법들을 통하여, 정상 대조군에서의 항원-항체 복합체의 형성량과 간암 의심 환자에서의 항원-항체 복합체의 형성량을 비교할 수 있고, 간암 마커 유전자에서 단백질로의 유의한 발현량의 증가여부를 판단하여, 간암 의심 환자의 실제 간암 발병 여부를 진단할 수 있다.

[65]

본 발명에서 용어 "항원-항체 복합체"란 간암 마커 단백질과 이에 특이적인 항체의 결합물을 의미하고, 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정 가능하다.

[66]

단백질 발현수준 측정은 바람직하게는, ELISA법을 이용하는 것이다. ELISA는 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 표지된 항체를 이용하는 직접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 항체의 복합체에서 포획 항체를 인지하는 표지된 항체를 이용하는 간접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 표지된 또 다른 항체를 이용하는 직접적

샌드위치 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 또 다른 항체와 반응시킨 후 이 항체를 인지하는 표지된 2차 항체를 이용하는 간접적 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 포함한다. 보다 바람직하게는, 고체 지지체에 항체를 부착시키고 시료를 반응시킨 후 항원-항체 복합체의 항원을 인지하는 표지된 항체를 부착시켜 효소적으로 발색시키거나 항원-항체 복합체의 항원을 인지하는 항체에 대해 표지된 2차 항체를 부착시켜 효소적으로 발색시키는 샌드위치 ELISA 방법에 의해서 검출한다. 간암 마커 단백질과 항체의 복합체 형성 정도를 확인하여, 간암 발병 여부를 확인할 수 있다.

[67] 또한, 바람직하게는, 상기 간암 마커에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 웨스턴 블랏을 이용하는 것이다. 시료에서 전체 단백질을 분리하고, 이를 전기영동 하여 단백질을 크기에 따라 분리한 다음, 니트로셀루로즈 막으로 이동시켜 항체와 반응시킨다. 생성된 항원-항체 복합체의 양을 표지된 항체를 이용하여 확인하는 방법으로 유전자의 발현에 의해 생성된 단백질의 양을 확인하여, 간암 발병 여부를 확인할 수 있다. 상기 검출 방법은 대조군에서의 마커 유전자의 발현량과 간암이 발병한 세포에서의 마커 유전자의 발현량을 조사하는 방법으로 이루어진다. mRNA 또는 단백질 수준은 상기한 마커 단백질의 절대적(예: $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 상대적(예: 시그널의 상대 강도) 차이로 나타낼 수 있다.

[68] 또한, 바람직하게는, 상기 간암 마커에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 면역조직 염색을 실시하는 것이다. 정상 대장 상피 조직 및 간암으로 의심되는 조직을 채취 및 고정한 후, 당업계에서 널리 공지된 방법으로 파라핀 포매 블록을 제조한다. 이들을 수 μm 두께의 절편으로 만들어 유리 슬라이드에 붙인 후, 이와 상기의 항체 중 선택된 1개와 공지의 방법에 의하여 반응시킨다. 이후, 반응하지 못한 항체는 세척하고, 상기에 언급한 검출라벨 중의 하나로 표지하여 현미경 상에서 항체의 표지 여부를 판독한다.

[69] 또한, 바람직하게는, 상기 간암 마커에 대한 하나 이상의 항체가 기판 위의 정해진 위치에 배열되어 고밀도로 고정화되어 있는 단백질 칩을 이용하는 것이다. 단백질 칩을 이용하여 시료를 분석하는 방법은, 시료에서 단백질을 분리하고, 분리한 단백질을 단백질 칩과 혼성화시켜서 항원-항체 복합체를 형성시키고, 이를 판독하여, 단백질의 존재 또는 발현 정도를 확인하여, 간암 발병 여부를 확인할 수 있다.

[70]

[71] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 간암 절제 수술의 예후 예측에 필요한 정보를 제공하기 위하여 간암 절제 수술을 받은 환자의 시료로부터 UQCRH의 발현 수준을 정상 세포의 발현 수준과 비교하여 간암 마커 UQCRH를 검출하는 방법에 관한 것이다.

[72]

상기 검출 방법을 통하여, 예측 유전자의 발현 패턴을 분석함으로써 신규 간암절제 수술을 받은 환자의 재발 및 생존예후를 미리 예측할 수 있으며, 이런

예측을 바탕으로 환자의 예후 예측 타겟으로 활용할 수 있을 것이다.

[73]

[74] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 간암환자의 비정상적인 UQCRH의 유전자 발현을 정상환자의 수준으로 낮춤으로써 간암환자의 생존예후를 개선시키는 방법에 관한 것이다.

[75]

보다 구체적으로, UQCRH 를 특이적으로 인식하는 항체 또는 항체의 기능적인 단편을 사용하거나, UQCRH 유전자의 발현을 억제하는 올리고뉴클레오티드를 사용함으로써 간암환자의 비정상적인 UQCRH의 유전자 발현을 정상환자의 수준으로 낮출 수 있다. 바람직하게 상기 올리고뉴클레오티드는 UQCRH 의 mRNA에 대한 siRNA, shRNA 또는 UQCRH 의 mRNA에 상보적인 안티센스 핵산 서열일 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[76]

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.

[77]

실시예 1: 시험군 및 시험조직 샘플의 선택

[78]

시험용 표본은 원자력병원에서 간암 치료로 수술을 받은 98명의 환자와 서울대학병원에서 간암 치료로 수술을 받은 58명의 환자로부터 수득하였다. 연구 목적으로 수술 표본과 임상병리학적 데이터를 사용하겠다는 동의를 환자로부터 받았다. 모든 조직은 외과적으로 적출되고 즉시 액체 질소에서 재빨리 냉각한 후 영하 80°C에서 저장하였다. RNA는 시험 매뉴얼 (RNeasy MiniElute Cleanup Kit, Qiagen)에 따라 냉각된 조직으로부터 분리되었다. 총 RNA의 품질(quality)은 아가로즈 젤 전기영동 후 28S와 18S rRNA사이의 밴드 비율로부터 판단하였다.

[79]

실시예 2: cDNA 마이크로어레이 데이터 분석 및 유전자 선별

[80]

실험에 사용한 마이크로어레이는 인간 cDNA 클론 총 24,094개로 구성되어 있다. 마이크로어레이 실험 방법은 3DNA 어레이 검출 키트 (Genisphere Inc. PA, USA)를 사용하여 제조사가 제시하는 방법에 따라 수행하였다. 그 후 스캔어레이 스캐너 (PerkinElmer, Boston, MA, USA)를 사용하여 스캔하였다. 스캔한 이미지 파일로부터 IMAGE 4.0 (Biodiscovery, Marina del Rey, CA, USA)를 이용하여 수치화된 데이터를 얻었고, 형광 강도(intensity)와 스폫 위치를 고려하여 표준화(normalization)하였다 (spatially dependent method). 표준화된 마이크로어레이 데이터에서 생존 상관률(p)이 0.05이하인 유전자를 선별하였다. 그 중에서 cy3와 cy5의 강도를 비교하여, 정상조직(cy3)에 비해 종양조직(cy5)에서의 발현도가 높은 유전자를 선정한 뒤, 한 유전자에서 발현 정도의 차이를 나타내는 IQR이

마이크로어레이의 IQR 평균 값이 0.43 이상 되는 유전자를 선별하였다. 이렇게 선정된 유전자들의 발현을 재확인하기 위해, 각각 30개의 종양조직과 인접한 비종양조직, 그리고 5명의 환자의 정상 간 조직에서 RNA를 추출한 뒤, 역전사 반응을 통해 cDNA를 합성하였다. RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction)을 통한 UQCRH 유전자 발현의 재확인 결과, 마이크로어레이 결과와 동일하게 정상조직과 비종양조직에 비해 종양조직에서 UQCRH의 발현이 확연히 증가해 있는 것을 확인할 수 있었다. 마이크로어레이 데이터에서 UQCRH은 정상조직(cy3)에 비해 종양조직(cy5)에서의 강도(intensity)가 높았다.

[83]

실시예 3: 예측 유전자에 대한 역전사-PCR을 통한 발현 재확인 및 간암 예측

[84]

실시예 2에서 선정한 유전자들 중에서, UQCRH의 발현을 재확인하기 위해, 각각 30개의 종양조직과 인접한 비종양조직, 그리고 5명의 환자의 정상 간 조직에서 RNA를 추출한 뒤, 역전사 반응을 통해 cDNA를 합성하였다. 이를 표 1과 같은 조건의 RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction)을 통해 UQCRH 유전자 발현을 재확인하였다. 도 3은 UQCRH의 유전자의 발현 측정에 사용한 RT-PCR 용 프라이머 서열의 위치를 나타낸다.

[85]

[86]

표 1

이름	프라이머 서열(5' -> 3')	RT-PCR에서 annealing Tm	RT-PCR에서 사이클(cycle)수
F	ATGGGACTGGAGGACGAGC A(서열번호 3)	56°C	22
R	AAGAGTTGTGGGCCACGCA (서열번호 4)		

[87]

[88]

그 결과, 비종양조직에 비해 17개의 종양조직에서 UQCRH의 발현이 증가되었고, 정상 간조직에 비해 24개의 종양조직에서 이 마커의 발현이 확연히 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다(도 4).

[89]

[90]

실시예 4: 예측 유전자에 대한 역전사-PCR을 통한 간암환자의 생존기간 예측

[91]

30개의 종양조직과, 비종양조직 및 정상조직에서 UQCRH의 RT-PCR 결과는 아가로스 젤(agrose gel)을 전기영동(electrophoresis)해서 확인하였다. UQCRH의 발현 정도를 나타내는 밴드의 강도(intensity)는 프로그램 IMAGE J(NIH)를 통해 수치화 작업을 한 뒤, 정상조직(Nm: normal liver mix)의 수치화된 강도(intensity) 대비 종양조직의 수치화된 강도(intensity)를 구하였다. 이 대비값이 2미만인 그룹과 2이상인 그룹으로 나누어, 통계프로그램인 R-project를 이용하여 환자의

생존곡선 (Kaplan-Meier curve)을 그려보고, 유의성은 로그랭크테스트 (Log Rank test)를 수행하여 알아보았다. 그 결과, UQCRH의 생존 상관률은 $p=0.023$ 으로 의미있는 값은 가지므로, UQCRH 가 간암환자의 생존 기간예측 마커로 사용될 수 있음을 알 수 있었다 (도 5).

[93]

[94] 실시 예 5: 예측 유전자에 대한 실시간-PCR 을 통한 간암환자의 생존기간 예측

[95] 100명의 간암 환자 샘플 군과 비 간암 환자 30명의 환자 샘플 군에서 추출한 cDNA를 바탕으로 UQCRH용 Taq-Man probe를 제작하여 기존의 방법보다 더 정확한 실시간 PCR (Real-time PCR)을 통해서 이들 환자군에서의 UQCRH 의 발현을 정확하게 측정하였다 (도 6). 그리고 이를 근거로 간암 환자들 간에서 발현의 차이에 따른 생존기간을 분석하여 $p=0.041$ 으로 유효성 있는 결과를 도출하였다. 그 결과 UQCRH 유전자의 발현이 높은 환자 군에서 낮은 발현 군에 비해 확연하게 수술 후 생존기간이 줄어들었음을 입증하였다 (도 7 내지 도 9). 이러한 결과는 UQCRH가 향후 간암 치료타겟이 될 수 있음을 나타내는 근거로 제시될 수 있다.

청구범위

[청구항 1]

UQCRH (ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 간암 진단 또는 예후 예측을 위한 마커 검출용 조성물.

[청구항 2]

제1항에 있어서, 상기 유전자 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 UQCRH 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍인 조성물.

[청구항 3]

제1항에 있어서, 상기 유전자 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 UQCRH 유전자에 특이적으로 결합하는 프로브인 조성물.

[청구항 4]

제1항에서, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 UQCRH 단백질에 특이적인 항체인 조성물.

[청구항 5]

제1항에 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 간암 진단 또는 예후 예측용 키트.

[청구항 6]

제5항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트인 것을 특징으로 하는 간암 진단용 키트.

[청구항 7]

UQCRH 를 포함하는, 간암을 진단하기 위한 마이크로어레이.

[청구항 8]

간암 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 환자의 시료로부터 UQCRH 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및 상기 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 수준을 정상 대조구 시료의 해당 유전자의 발현 수준 또는 단백질 수준과 비교하는 단계를 포함하는 간암 마커 UQCRH 를 검출하는 방법.

[청구항 9]

제8항에 있어서, 상기 mRNA 발현 수준을 측정하는 방법은 UQCRH 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍 또는 프로브를 이용하는 것인 방법.

[청구항 10]

제8항에 있어서, 상기 mRNA 발현 수준을 측정하는 방법은 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 칩 중 어느 하나를 이용하는 것인 방법.

[청구항 11]

제8항에 있어서, 상기 단백질 발현 수준을 측정하기 위한 방법은 해당 단백질에 특이적인 항체를 이용하는 것인 방법.

[청구항 12]

제8항에 있어서, 상기 단백질 발현 수준을 측정하기 위한 방법은 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS 또는 단백질 칩 방법 중 어느 하나를 이용하는 것인 방법.

[청구항 13]

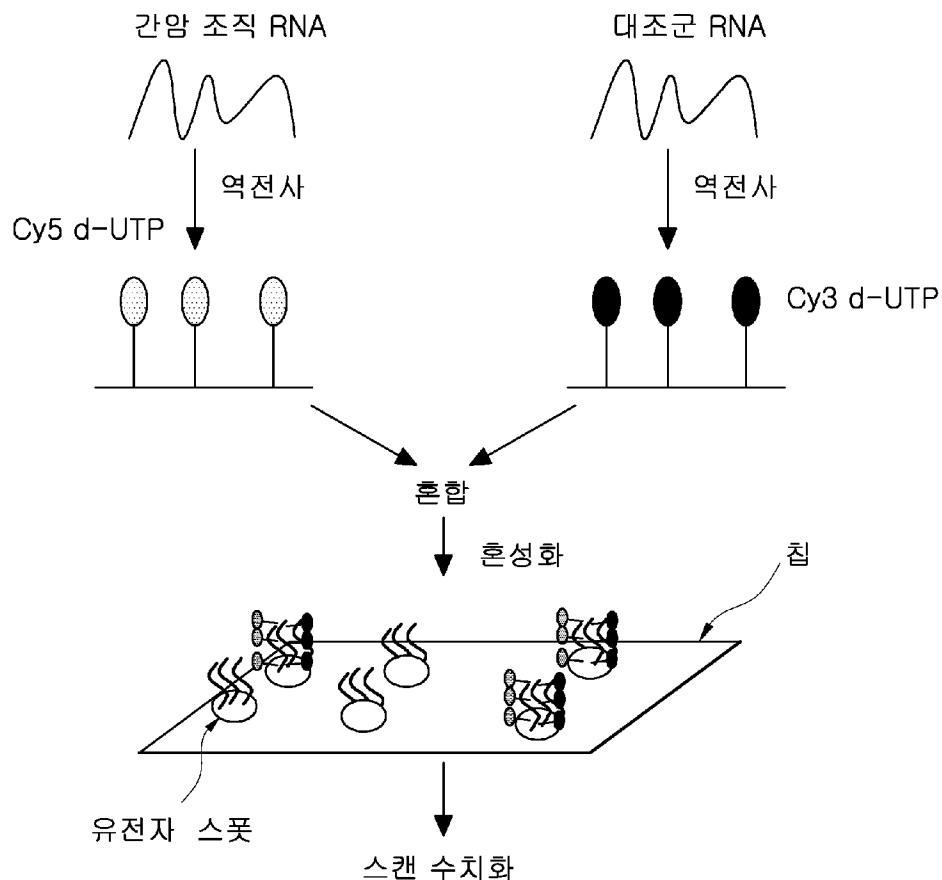
간암 절제 수술의 재발 및 예후 예측에 필요한 정보를 제공하기

위하여 간암 절제 수술을 받은 환자의 시료로부터 UQCRH 의 발현 수준을 정상 세포의 발현 수준과 비교하여 간암 마커 UQCRH 를 검출하는 방법.

[청구항 14]

간암환자의 비정상적인 UQCRH의 유전자 발현을 정상환자의 수준으로 낮춤으로써 간암환자의 생존예후를 개선시키는 방법.

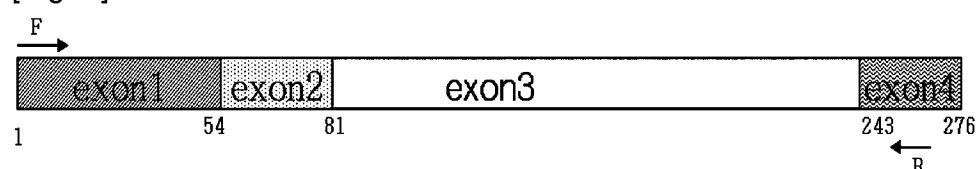
[Fig. 1]



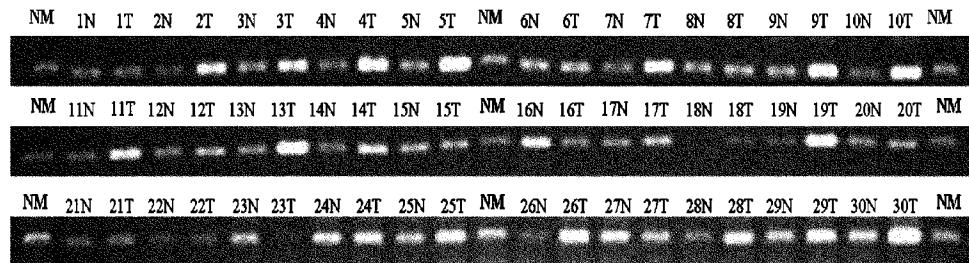
[Fig. 2]

등록번호	유전자명	기호	위치
NM_006004	ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein	UQCRH	마이토콘드리아 (mitochondria)
유전자(cDNA)서열			
ATGGGACTGGAGGACGAGCAAAAGATGCTTACCGAATCCGGAGATCCTGAGGAGGGAGGAAGAGGAAGAGG AGGAATTAGTGGATCCCCTAACAAACAGTGAGAGAGCAATGCGAGCAGTTGGAGAAATGTGAAAGGCCG GGAGCGGCTAGAGCTCTGTATGAGCGTGTATCCTCTCGATCACATACAGAAGAGGATTGCACGGAGGAG CTCTTTGACTTCTTGATGCGAGGGACCATTGCGTGCCCCACAAACTCTTAACAACTTGAAATAA			
단백질 서열			
MGLEDEQKMLTESGDPEEEEEEEELVDPLTTVREQCEQLEKCVKARERLELCDERVSSRSHTEDCTEE LFDFLHARDHCVAHKLFNNLK			

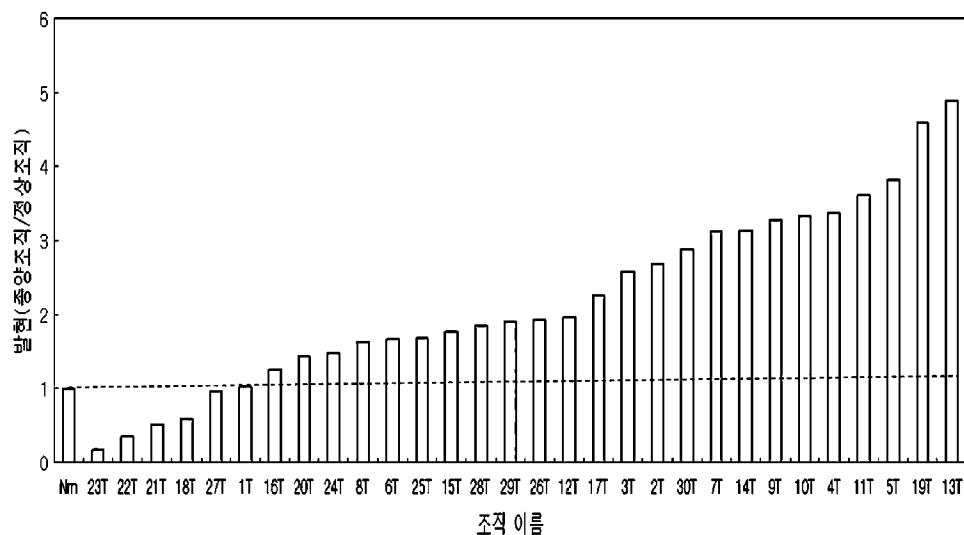
[Fig. 3]



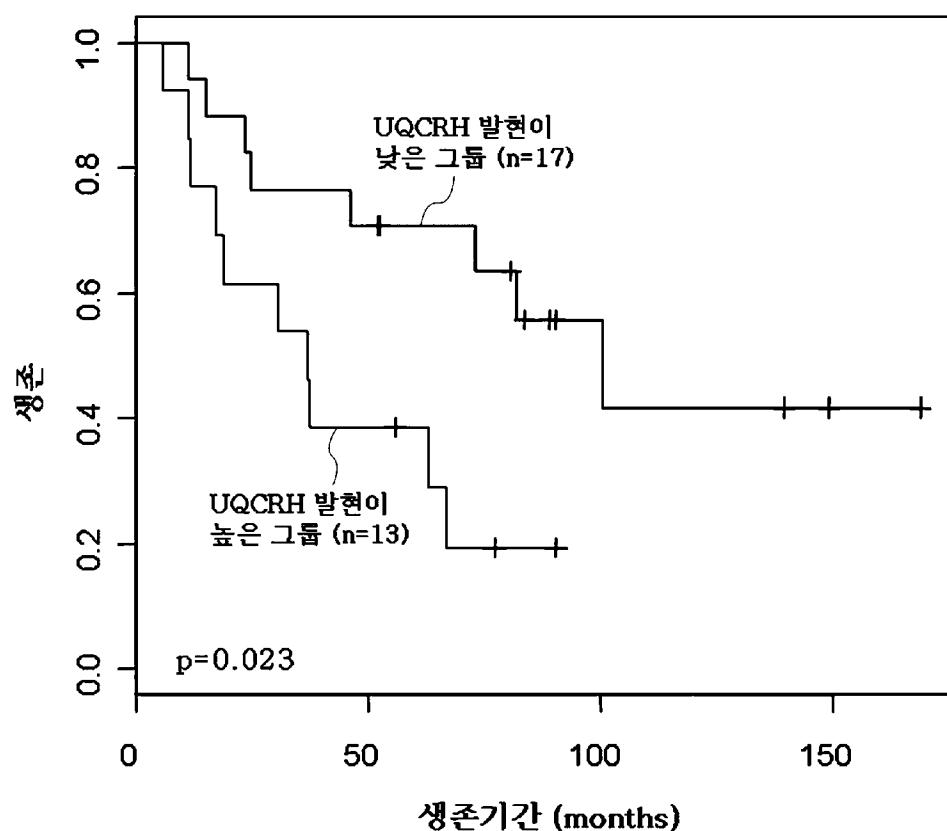
[Fig. 4]



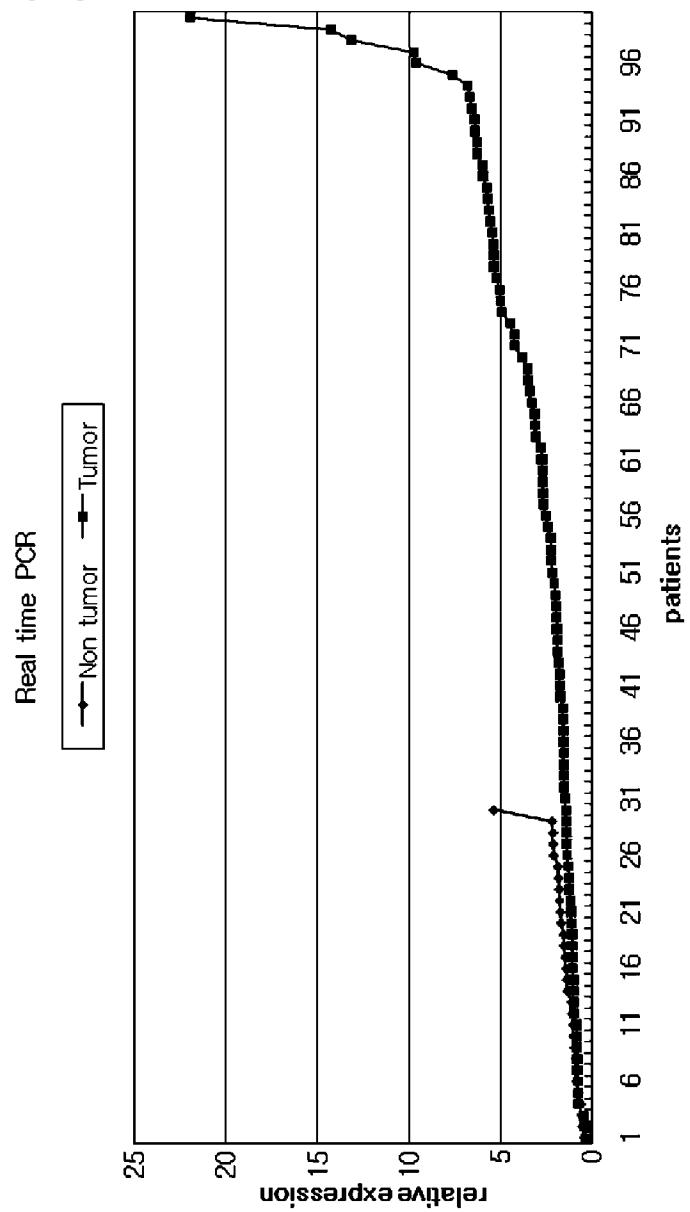
	종양조직 (T)과 그 인접한 비종 양 조직간(N)의 비교	정상조직 (Nm)과의 비교
UQCRH 의 발현이 증가된 종양조직 갯수	17	24
UQCRH 의 발현이 증가된 종양조직의 번호	2,3,4,5,7,9,10,11,13,14, 17,19,25,26,28,29,30	2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15 ,16,17,19,20,24,25,26,28,29,30



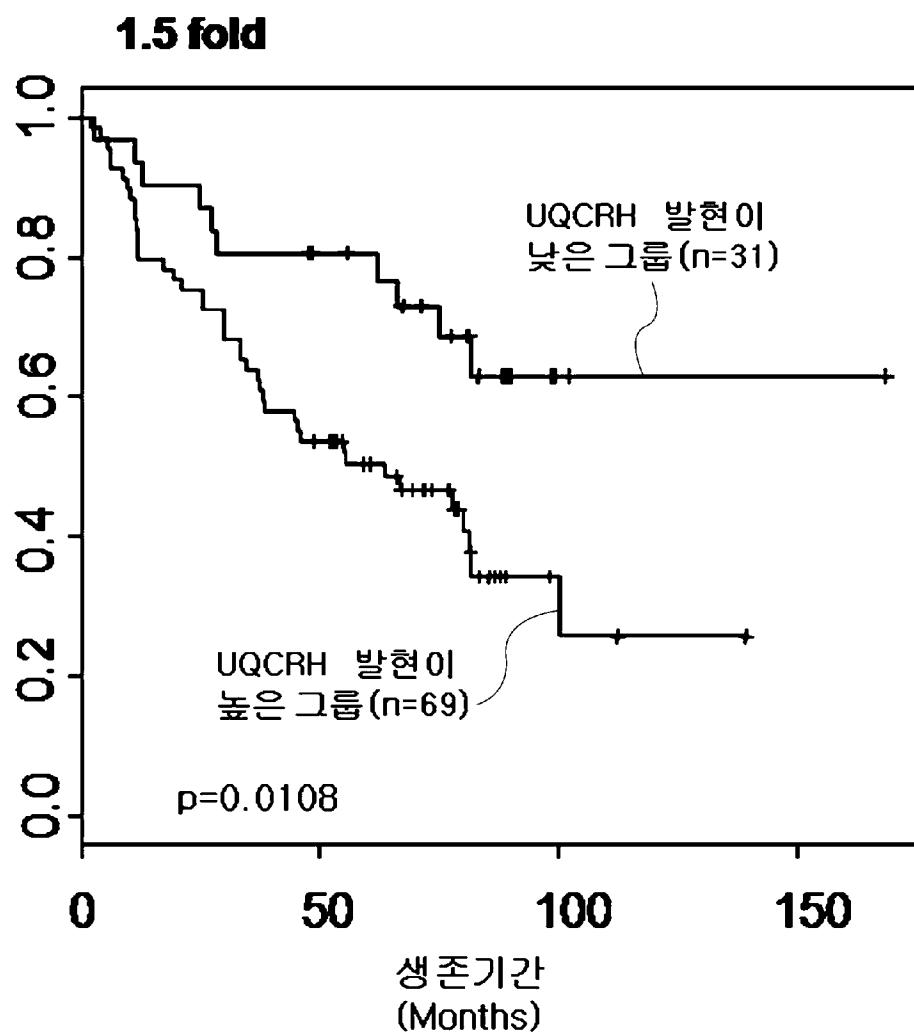
[Fig. 5]



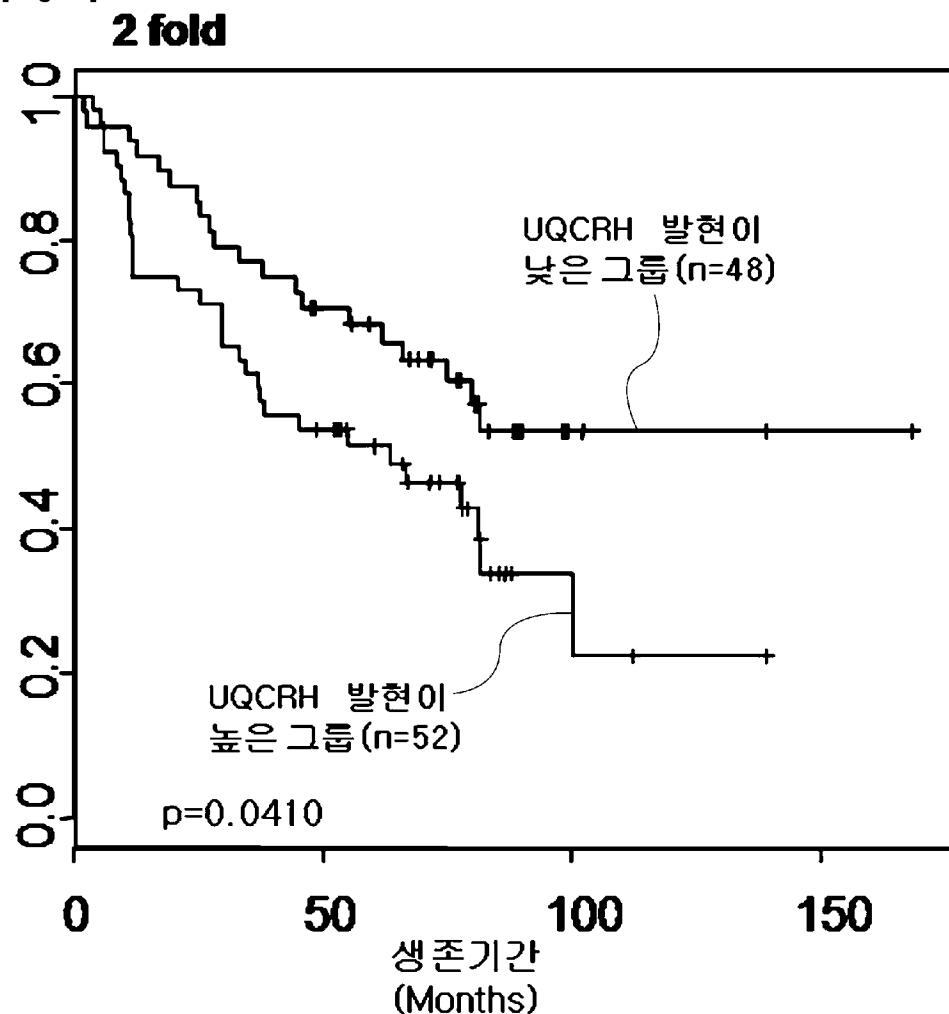
[Fig. 6]



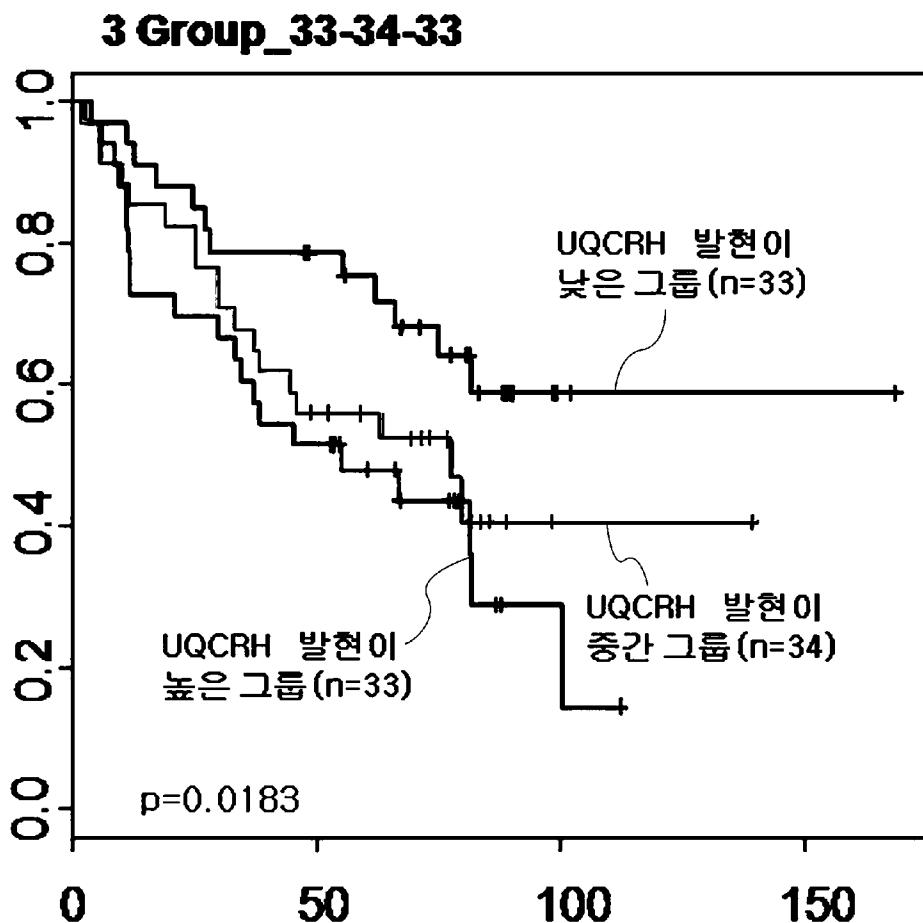
[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]



[Fig. 10]

Recurrence free survival graph