(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0052530
(43) 공개일자 2017년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12Q 1/68* (2006.01) *G06F 19/20* (2011.01)
(52) CPC특허분류
*C12Q 1/6851* (2013.01)
*G06F 19/20* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7036349
(22) 출원일자(국제) 2015년09월15일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2016년12월26일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2015/076085
(87) 국제공개번호 WO 2016/043170
국제공개일자 2016년03월24일
(30) 우선권주장
JP-P-2014-187685 2014년09월16일 일본(JP)

(71) 출원인
**도레이 카부시키가이샤**
일본국 도오교오도 쥬우오오구 니혼바시 무로마찌 2쪼메 1-1
(72) 발명자
**코조노 사토코**
일본국 가나가와켄 가마쿠라시 테비로 6쵸메 10-1 도레이 카부시키가이샤 키소켄큐 센터 나이
**콘도우 사토시**
일본국 가나가와켄 가마쿠라시 테비로 6쵸메 10-1 도레이 카부시키가이샤 키소켄큐 센터 나이
(74) 대리인
**하영욱**

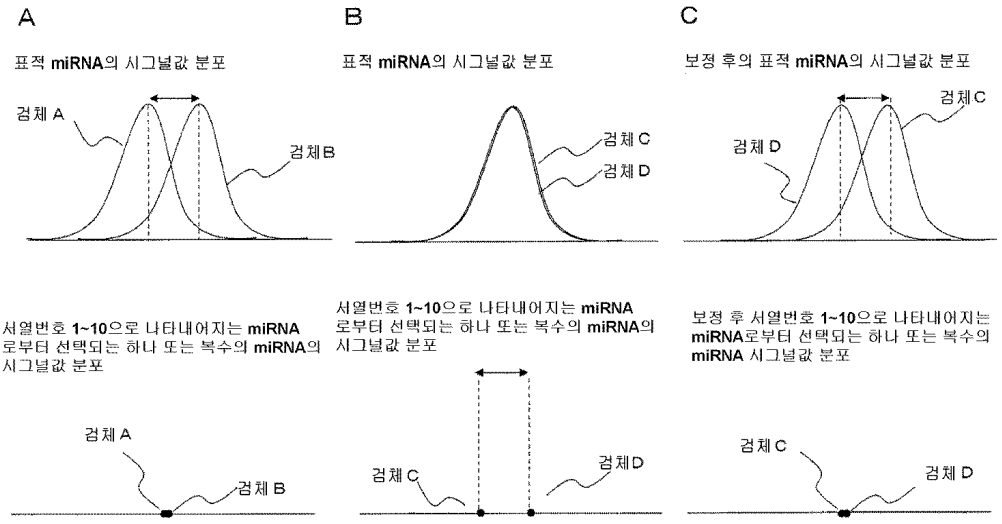
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **miRNA 발현량의 비교 해석 방법 및 장치**

## (57) 요 약

복수의 체액 검체 사이에서 miRNA의 발현량을 비교 해석하는 방법이 개시되어 있다. 본 발명의 비교 해석 방법에서는 체액 검체 중의 표적 miRNA의 발현량과 동시에 측정된 보정용 내인성 miRNA의 발현량을 이용하여, 해당 검체 중의 표적 miRNA의 발현량을 보정한다. 보정용 내인성 miRNA로서, 특정 10종의 보정용 내인성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 miRNA를 사용한다. 본 발명에 의하면, 체액 검체 사이에서의 표적 miRNA의 비교 해석을 종래보다 정확하게 실시할 수 있게 된다.

## 대 표 도



(52) CPC특허분류
*C12Q 2545/101* (2013.01)
*C12Q 2600/178* (2013.01)

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

복수의 체액 검체 사이에서 표적 miRNA의 발현량을 비교 해석하는 방법으로서,

복수의 체액 검체에 대해서, 표적 miRNA의 발현량의 측정 및 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정을 동시에 행하는 측정 공정;

각 체액 검체에 대해서, 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값으로부터 대표값을 취득하는 대표값 취득 공정;

보정용 내인성 miRNA의 발현량에 관해서 임의로 설정된 기준값과, 대표값 취득 공정에서 취득된 각 체액 검체의 대표값의 차 또는 비를, 각 체액 검체를 위한 표적 miRNA 발현량의 보정 계수로서 각각 취득하는 보정 계수 취득 공정; 및

각 체액 검체에 대하여 취득된 보정 계수를 각각 사용하여, 각 체액 검체에 있어서 측정된 표적 miRNA의 발현량을 보정하는 보정 공정을 포함하는 방법.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 보정 공정에서는,

(a) 상기 보정 계수 취득 공정에 있어서, 상기 대표값으로부터 상기 기준값을 감산한 값을 보정 계수로서 취득하는 경우, 표적 miRNA의 발현량의 측정값으로부터 보정 계수를 감산하는 것,

(b) 상기 보정 계수 취득 공정에 있어서, 상기 기준값으로부터 상기 대표값을 감산한 값을 보정 계수로서 취득하는 경우, 표적 miRNA의 발현량의 측정값에 보정 계수를 가산하는 것,

(c) 상기 보정 계수 취득 공정에 있어서, 상기 대표값을 상기 기준값으로 제산한 값을 보정 계수로서 취득하는 경우, 표적 miRNA의 발현량의 측정값을 보정 계수로 제산하는 것, 또는

(d) 상기 보정 계수 취득 공정에 있어서, 상기 기준값을 상기 대표값으로 제산한 값을 보정 계수로서 취득하는 경우, 표적 miRNA의 발현량의 측정값에 보정 계수를 승산하는 것에 의해 상기 보정을 행하는 방법.

### 청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 기준값은 보정용 내인성 miRNA 발현량에 관해서 임의로 정해진 고정 수치, 또는 상기 복수의 체액 검체로부터 임의로 선택된 제 1 체액 검체에 대해서 취득된 보정용 내인성 miRNA 발현량의 대표값인 방법.

### 청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 측정 공정은 지지체 상에 고정화된 복수의 표적 miRNA를 포착하기 위한 핵산 프로브 및 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브와, 표지 물질로 표지된 체액 검체 유래의 핵산 시료를 접촉시켜 하이브리다이제이션을 행하여, 표적 miRNA 및 상기 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량을 각각 시그널 강도 측정값으로서 얻는 것을 포함하는 방법.

### 청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 체액 검체는 혈액, 혈청 또는 혈장인 방법.

**청구항 6**

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 대표값은 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA 발현량의 측정값으로부터 산출된 로그값으로 나타내어진 평균값 또는 중앙값인 방법.

**청구항 7**

복수의 체액 검체에 있어서의 표적 miRNA의 발현량을 비교 해석하는 miRNA 발현 해석 장치로서,

복수의 체액 검체에 대해서 측정된 표적 miRNA의 발현량의 측정값 및 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값을 기억하는 기억 수단;

각 체액 검체에 대해서, 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값으로부터 대표값을 취득하는 대표값 취득 수단;

보정용 내인성 miRNA의 발현량에 관해서 임의로 설정된 기준값과, 상기 대표값 취득 수단에 의해 취득된 각 체액 검체의 대표값의 차 또는 비를, 각 체액 검체를 위한 표적 miRNA 발현량의 보정 계수로서 각각 취득하는 보정 계수 취득 수단;

각 체액 검체에 대하여 취득된 보정 계수를 각각 사용하여, 각 체액 검체에 있어서 측정된 표적 miRNA의 발현량을 보정하는 보정 수단; 및

보정이 완료된 표적 miRNA 발현량에 의해 적어도 2개의 체액 검체 사이에서 표적 miRNA 발현량을 대비한 결과를 출력하는 출력 수단을 포함하는 장치.

**청구항 8**

제 7 항에 있어서,

상기 보정 수단은,

(a) 상기 보정 계수 취득 수단에 있어서, 상기 대표값으로부터 상기 기준값을 감산한 값을 보정 계수로서 취득하는 경우, 표적 miRNA의 발현량의 측정값으로부터 보정 계수를 감산하는 것,

(b) 상기 보정 계수 취득 수단에 있어서, 상기 기준값으로부터 상기 대표값을 감산한 값을 보정 계수로서 취득하는 경우, 표적 miRNA의 발현량의 측정값에 보정 계수를 가산하는 것,

(c) 상기 보정 계수 취득 수단에 있어서, 상기 대표값을 상기 기준값으로 제산한 값을 보정 계수로서 취득하는 경우, 표적 miRNA의 발현량의 측정값을 보정 계수로 제산하는 것, 또는

(d) 상기 보정 계수 취득 수단에 있어서, 상기 기준값을 상기 대표값으로 제산한 값을 보정 계수로서 취득하는 경우, 표적 miRNA의 발현량의 측정값에 보정 계수를 승산하는 것에 의해 상기 보정을 행하는 장치.

**청구항 9**

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서,

상기 기억 수단에 기억되는 복수의 각 체액 검체에 포함되는 표적 miRNA의 발현량의 측정값 및 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값은, 지지체 상에 고정화된 복수의 표적 miRNA를 포착하기 위한 프로브 및 상기 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브와, 표지 물질로 표지된 체액 검체 유래의 핵산 시료를 접촉시켜 하이브리다이제이션을 행하고, 표적 miRNA 및 상기 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량을 시그널 강도 측정값으로서 각각 측정된 값인 장치.

**청구항 10**

복수의 체액 검체 사이에서 표적 miRNA의 발현량을 비교 해석하기 위해서 하나 또는 복수의 컴퓨터에,

복수의 각 체액 검체에 대해서, 표적 miRNA의 발현량의 측정 및 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인

성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정을 동시에 행하는 측정 공정;

각 체액 검체에 대해서, 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 각 측정값으로부터 대표값을 취득하는 대표값 취득 공정;

보정용 내인성 miRNA의 발현량에 관해서 임의로 설정된 기준값과, 대표값 취득 공정에서 취득된 각 체액 검체의 대표값의 차 또는 비를, 각 체액 검체를 위한 표적 miRNA 발현량의 보정 계수로서 각각 취득하는 보정 계수 취득 공정; 및

각 체액 검체에 대하여 취득된 보정 계수를 각각 사용하여, 각 체액 검체에 있어서 측정된 표적 miRNA의 발현량을 보정하는 보정 공정을 실행시키기 위한 프로그램.

**청구항 11**

복수의 체액 검체 사이에서 표적 miRNA의 발현량을 비교 해석하기 위해서 하나 또는 복수의 컴퓨터를,

복수의 각 체액 검체에 포함되는 표적 miRNA의 발현량의 측정값 및 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값을 기억하는 기억 수단;

각 체액 검체에 대해서, 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값으로부터 대표값을 취득하는 대표값 취득 수단;

보정용 내인성 miRNA의 발현량에 관해서 임의로 설정된 기준값과, 상기 대표값 취득 수단에 의해 취득된 각 체액 검체의 대표값의 차 또는 비를, 각 체액 검체를 위한 표적 miRNA 발현량의 보정 계수로서 각각 취득하는 보정 계수 취득 수단;

각 체액 검체에 대하여 취득된 보정 계수를 각각 사용하여, 각 체액 검체에 있어서 측정된 표적 miRNA의 발현량을 보정하는 보정 수단; 및

보정이 완료된 표적 miRNA 발현량에 의해 적어도 2개의 체액 검체 사이에서 표적 miRNA 발현량을 대비한 결과를 출력하는 출력 수단으로서 기능시키기 위한 프로그램.

**청구항 12**

제 10 항 또는 제 11 항에 기재된 프로그램을 기록한 컴퓨터 판독 가능한 기록 매체.

**청구항 13**

복수의 표적 miRNA를 포착하기 위한 프로브 및 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브가 고정화된 지지체를 포함하는 miRNA 발현 해석용 칩.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 발명은 복수의 체액 검체에 포함되는 miRNA의 발현량을 비교 해석하기 위한 방법 및 장치에 관한 것이다.

### *배 경 기 술*

[0002] miRNA(마이크로RNA)은 genomDNA로부터 헤어핀 모양 구조의 RNA(전구체)로서 전사되어 왔다. 이 전구체는 특정 효소 RNase III 절단 활성을 갖는 dsRNA 절단 효소(Drosha, Dicer)에 의해 절단된 후 2본쇄의 형태로 변화되고, 그 후 1본쇄가 된다. 그리고, 한 쪽의 안티센스쇄가 RISC라고 하는 단백질 복합체에 포함되어 mRNA 의 번역 억제에 관여한다고 생각되고 있다. 이와 같이, miRNA는 전사 후 각 단계에 있어서 그 형태는 다르기 때문에, 통상 miRNA를 타겟(검출 대상)으로 하는 경우에는 헤어핀 구조체, 2본쇄 구조체, 1본쇄 구조체 등의 각종 형태를 고려할 필요가 있다. miRNA는 15~25염기의 RNA로 이루어지고, 다양한 생물에서 그 존재가 확인되고 있다.

[0003] 최근, miRNA는 세포 내뿐만 아니라, 세포를 포함하지 않는 검체인 혈청, 혈장, 소변, 척수액 등의 체액에도 많이 존재하고, 그 발현량이 암을 비롯한 다양한 질환의 바이오마커가 될 가능성이 시사되고 있다. miRNA는 2014년 6월 현재, 인간에서 2500종 이상이 존재하여(miRBase release 20) 고감도한 DNA 마이크로 어레이 등의 측정

계를 이용했을 경우, 그 중 1000종을 초과하는 miRNA가 혈청·혈장 중에서 발현을 동시에 검출하는 것이 가능하다. 그래서, DNA 마이크로 어레이법을 이용하여 혈청·혈장, 소변, 척수액 등의 체액을 대상으로 한 바이오마커 탐색 연구가 실시되고 있다.

[0004] 한편, DNA 마이크로 어레이를 이용하여 유전자 발현 해석을 행하는 경우에는 검체나 실험자, 실험 조건에 의해 얻어지는 데이터에 오차가 생길 가능성이 있는 것이 알려져 있다. 그 때문에, 오차를 보정하기 위한 데이터 보정 방법이 고안되고 있다.

[0005] 보정에는 복수의 유전자의 발현 데이터를 한 덩어리로 하여 유전자 발현 데이터 군으로서 파악하는 경우, 유전자 발현 데이터 군 전체의 발현량에는 어떠한 검체이어도 차이가 없다는 원리를 전제로 한 방법이 사용되고 있다. 이 방법에는 글로벌 노멀라이제이션법, quantile법, lowess법, 75 percentile법 등이 포함된다.

[0006] 또한, 검체 사이에서 발현량이 동일한 특정 유전자(베타 엑틴이나 GAPDH 등)에 착안하여 그 유전자의 검출값이 일정해지도록 검체마다에 데이터를 보정하는 방법도 행해지고 있다.

[0007] 특정 miRNA의 발현량이 일정해지도록 보정하는 방법으로서, 검체에서 발현되고 있는 논코딩 RNA 중, 다양한 검체에 있어서 발현량이 일정하다는 하우스 키핑 RNA(U1 snoRNA, U2 snoRNA, U3 snoRNA, U4 snoRNA, U5 snoRNA, U6 snoRNA, 5S rRNA, 5.8S rRNA)를 이용하여 보정하는 방법이 제안되고 있다(특허문헌 1, 특허문헌 2). 즉, 특허문헌 1, 특허문헌 2에서는 miRNA를 검출할 때에 동시에 검출한 5S rRNA의 검출값이 모든 검체에서 일정하게 되도록 조작을 행하여 miRNA의 검출 결과를 보정하고 있다.

[0008] 한편으로, DNA 마이크로 어레이에서는 다수의 miRNA를 동시에 측정함으로써, 한정된 종류의 하우스 키핑 RNA만을 이용하여 보정하는 방법은 정확성이 결여되고, miRNA와 동시에 복수의 mRNA의 발현량도 측정하고 이들 복수의 mRNA의 발현량을 이용하여 miRNA의 보정을 행하는 방법이 제언되고 있다(특허문헌 3). 특허문헌 3에서는 miRNA를 검출할 때에 동시에 검출한 복수의 mRNA의 검출값이 모든 검체에서 일정하게 되도록 조작을 행하여 miRNA의 검출 결과를 보정하고 있다.

[0009] 비특허문헌 1에서는 마우스 혈청 중의 miRNA 발현량의 측정에 있어서, 내인성 miRNA를 발현량의 보정에 이용하여 그 유효성을 평가하고 있다. 또한, 내인성 miRNA란 대상으로 하는 검체 중(비특허문헌 1의 경우에는 마우스 혈청)에 자연히 존재하고 있는 그 검체를 제공한 생물에 유래하는 miRNA인 것을 나타낸다. 즉, 비특허문헌 1에서는 보정용 내인성 miRNA의 예로서 miR-16, miR-31, miR-223을 이용하여 마우스 혈청 중의 miRNA 발현량의 보정을 시도하고 있지만, 이들 miRNA의 발현량은 개체 사이에서 일정하지 않음으로써 내인성의 miRNA의 발현량에 의해 전체 데이터 보정을 행하는 방법은 채용하지 않고, 외부로부터 첨가한 RNA를 기준 물질로서 데이터 보정용으로 사용하는 것을 제안하고 있다. 요약하면, 이들 내인성 miRNA를 이용하여 miRNA 발현량의 보정을 하는 것은 적당하지 않다고 결론되고 있다.

[0010] 비특허문헌 2에서는 인간 혈청 중의 miRNA를 정량 RT-PCR이나 시퀀스법으로 검출할 때에 let-7d, let-7g, let-7i를 조합시켜 보정용 내인성 miRNA로서 사용하는 것을 제창하고 있다. 즉, let-7d, let-7g, let-7i의 발현량을 검체 사이에서 일정하게 하는 조작을 행함으로써 측정 대상으로 하는 miRNA의 발현량을 보정하고 있다.

## *선행기술문헌*

### *특허문헌*

[0011] (특허문헌 0001) 일본 특허 공개 2007-75095호 공보

(특허문헌 0002) 일본 특허공개 2007-97429호 공보

(특허문헌 0003) 일본 특허공개 2014-7995호 공보

### *비특허문헌*

[0012] (비특허문헌 0001) Roberts, T. C. 외, 2014년, PLoS ONE, 제 9(2)권, e89237

(비특허문헌 0002) Chen, X. 외, 2013년, PLoS ONE, 제 8(11)권, e79652

## 발명의 내용

[0013] 상기한 바와 같이, 유전자 발현을 검출하는 경우, 검체 사이에서 발현량의 변동이 적은 「하우스 키핑 유전자」의 발현량을 이용하여 검출 대상으로 하는 유전자의 발현량을 보정하는 방법이 일반적으로 사용되고 있다. 특히 잘 알려져 있는 하우스 키핑 유전자로서는 ACTB, GAPDH 등을 들 수 있다. 그러나, 이들 유전자는 miRNA와는 핵산 길이나 발현량의 절대값이 크게 달라, miRNA의 발현량을 보정하는 목적으로 사용하는 것은 바람직하지 않다.

[0014] 그 때문에, 종래 miRNA의 발현량을 검출하는 경우에는 U1 snoRNA, U2 snoRNA, U3 snoRNA, U4 snoRNA, U5 snoRNA, U6 snoRNA, 5S rRNA, 5.8S rRNA라고 한 하우스 키핑 RNA가 주로 보정용으로 사용될 수 있었다. 그러나, 체액 중의 miRNA의 발현량을 측정하여 그 데이터를 보정하려고 하는 경우, U1 snoRNA, U2 snoRNA, U3 snoRNA, U4 snoRNA, U5 snoRNA, U6 snoRNA, 5S rRNA, 5.8S rRNA는 핵 내나 세포질 내에 존재하는 RNA이기 때문에 세포를 포함하지 않는 검체인 혈청, 혈장, 소변, 척수액 등의 체액에 있어서는 거의 발현량을 검출할 수 없고, 이들을 체액 중의 miRNA의 발현량의 검출 보정을 위한 지표로 할 수 없다고 되어 있다.

[0015] 정량 RT-PCR법에 의한 miRNA의 발현량 검출에 있어서는 혈청이나 혈장 중에 존재하는 miRNA를 개별적으로 해석하고, 검체 사이에서의 발현량차가 없는 「체액 중 하우스 키핑 miRNA」를 찾아내려는 시도가 실시되고 있다. 상기한 바와 같이, 비특허문헌 2에서는 인간 혈청 중의 miRNA를 정량 RT-PCR이나 시퀀스법으로 검출하는데 있어서, let-7d, let-7g, let-7i를 조합시켜 사용하는 것을 제창하고 있다. 그렇지만, 이들 miRNA가 DNA 마이크로 어레이법에 있어서도 보정용 내인성 miRNA로서 기능하는지 아닌지는 불분명하다. 즉, DNA 마이크로 어레이를 사용한 체액 중의 miRNA 해석에 있어서는 특정 보정용 내인성 miRNA를 사용한 유효한 보정 방법이 없었다.

[0016] 한편, DNA 마이크로 어레이에 있어서 측정값의 보정을 실시하는 경우에는 DNA 마이크로 어레이에서 측정 가능한 다수(수백~수만)의 유전자의 전체 발현량(시그널값)을 이용하여 보정을 행하는 것이 일반적으로 행해지고 있다. 예를 들면, 글로벌 노멀라이제이션법, 퀀타일 노멀라이제이션법 등이 그 방법으로서 들 수 있다.

[0017] 그런데, miRNA의 발현량으로부터 얻어지는 기준값을 지표로 하는 경우, 기준값을 구성하기 위한 원데이터가 되는 miRNA가 몇개 있으면, 보편적인 보정용 기준값을 형성하는 것인가 하는 과제가 있다. 특히, 측정하는 miRNA의 수가 수개~수십개로 한정된 특정 용도를 향한 DNA 마이크로 어레이에 있어서는 글로벌 노멀라이제이션법 등을 적용하면 불충분한 보정 결과를 초래할 가능성이 크다. 또한, 검체 중의 다수의 mRNA의 발현량을 측정하고, 이것을 보정하기 위한 기준값으로 하는 특허문헌 3의 방법은 조직이나 세포 유래의 RNA에 대해서는 유효하지만, 체액 중의 mRNA의 발현량은 매우 낮아서, 이들을 miRNA의 발현량 보정을 위한 지표로 하는 것은 어렵다.

[0018] 이상과 같이, 복수의 체액 검체에 포함되는 miRNA의 발현량을 측정하고 비교 해석하려는 경우에, 그 측정값을 보정하는 유효한 방법은 찾지 못했다. 특히 DNA 마이크로 어레이에 의해 소수의 보정용 내인성 miRNA를 이용하여 유효한 보정을 행할 수 있는 방법은 존재하지 않는다. 본 발명은 이상과 같은 과제를 해결하려는 것이고, 특히 검사·진단 용도 등의 비교적 소수의 miRNA 측정용 DNA 마이크로 어레이의 실용화에 매우 중요한 과제를 해결하려는 것이다.

[0019] 본원발명자들은 상기 과제를 해결하도록 예의연구를 거듭한 결과, 이하의 발명을 완성시켰다.

[0020] (1) 복수의 체액 검체 사이에서 표적 miRNA의 발현량을 비교 해석하는 방법으로서,

[0021] 복수의 체액 검체에 대해서, 표적 miRNA의 발현량의 측정 및 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정을 동시에 행하는 측정 공정;

[0022] 각 체액 검체에 대해서, 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값으로부터 대표값을 취득하는 대표값 취득 공정;

[0023] 보정용 내인성 miRNA의 발현량에 관해서 임의로 설정된 기준값과, 대표값 취득 공정에서 취득된 각 체액 검체의 대표값의 차 또는 비를, 각 체액 검체를 위한 표적 miRNA 발현량의 보정 계수로서 각각 취득하는 보정 계수 취득 공정; 및

[0024] 각 체액 검체에 대하여 취득된 보정 계수를 각각 사용하여, 각 체액 검체에 있어서 측정된 표적 miRNA의 발현량을 보정하는 보정 공정을 포함하는 방법.

[0025] (2) (1)에 있어서, 상기 보정 공정에서는

[0026] (a) 상기 보정 계수 취득 공정에 있어서, 상기 대표값으로부터 상기 기준값을 감산한 값을 보정 계수로서 취득

하는 경우, 표적 miRNA의 발현량의 측정값으로부터 보정 계수를 감산하는 것,

[0027] (b) 상기 보정 계수 취득 공정에 있어서, 상기 기준값으로부터 상기 대표값을 감산한 값을 보정 계수로서 취득하는 경우, 표적 miRNA의 발현량의 측정값에 보정 계수를 가산하는 것,

[0028] (c) 상기 보정 계수 취득 공정에 있어서, 상기 대표값을 상기 기준값으로 제산한 값을 보정 계수로서 취득하는 경우, 표적 miRNA의 발현량의 측정값을 보정 계수로 제산하는 것, 또는

[0029] (d) 상기 보정 계수 취득 공정에 있어서, 상기 기준값을 상기 대표값으로 제산한 값을 보정 계수로서 취득하는 경우, 표적 miRNA의 발현량의 측정값에 보정 계수를 승산하는 것에 의해 상기 보정을 행하는 방법.

[0030] (3) (1) 또는 (2)에 있어서, 상기 기준값은 보정용 내인성 miRNA 발현량에 관해서 임의로 정해진 고정 수치, 또는 상기 복수의 체액 검체로부터 임의로 선택된 제 1 체액 검체에 대해서 취득된 보정용 내인성 miRNA 발현량의 대표값인 방법.

[0031] (4) (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 있어서, 상기 측정 공정은 지지체 상에 고정화된 복수의 표적 miRNA를 포착하기 위한 핵산 프로브 및 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브와, 표지 물질로 표지된 체액 검체 유래의 핵산 시료를 접촉시켜 하이브리다이제이션을 행하고, 표적 miRNA 및 상기 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량을 각각 시그널 강도 측정값으로서 얻는 것을 포함하는 방법.

[0032] (5) (1) 내지 (4) 중 어느 하나에 있어서, 상기 체액 검체는 혈액, 혈청 또는 혈장인 방법.

[0033] (6) (1) 내지 (5) 중 어느 하나에 있어서, 상기 대표값은 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA 발현량의 측정값으로부터 산출된 로그값으로 나타내어진 평균값 또는 중앙값인 방법.

[0034] (7) 복수의 체액 검체에 있어서의 표적 miRNA의 발현량을 비교 해석하는 miRNA 발현 해석 장치로서,

[0035] 복수의 체액 검체에 대해서 측정된 표적 miRNA의 발현량의 측정값 및 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값을 기억하는 기억 수단;

[0036] 각 체액 검체에 대해서, 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값으로부터 대표값을 취득하는 대표값 취득 수단;

[0037] 보정용 내인성 miRNA의 발현량에 관해서 임의로 설정된 기준값과, 상기 대표값 취득 수단에 의해 취득된 각 체액 검체의 대표값의 차 또는 비를, 각 체액 검체를 위한 표적 miRNA 발현량의 보정 계수로서 각각 취득하는 보정 계수 취득 수단;

[0038] 각 체액 검체에 대하여 취득된 보정 계수를 각각 사용하여, 각 체액 검체에 있어서 측정된 표적 miRNA의 발현량을 보정하는 보정 수단; 및

[0039] 보정이 완료된 표적 miRNA 발현량에 의해 적어도 2개의 체액 검체 사이에서 표적 miRNA 발현량을 대비한 결과를 출력하는 출력 수단을 포함하는 상기 장치.

[0040] (8) (7)에 있어서, 상기 보정 수단은

[0041] (a) 상기 보정 계수 취득 수단에 있어서, 상기 대표값으로부터 상기 기준값을 감산한 값을 보정 계수로서 취득하는 경우, 표적 miRNA의 발현량의 측정값으로부터 보정 계수를 감산하는 것,

[0042] (b) 상기 보정 계수 취득 수단에 있어서, 상기 기준값으로부터 상기 대표값을 감산한 값을 보정 계수로서 취득하는 경우, 표적 miRNA의 발현량의 측정값에 보정 계수를 가산하는 것,

[0043] (c) 상기 보정 계수 취득 수단에 있어서, 상기 대표값을 상기 기준값으로 제산한 값을 보정 계수로서 취득하는 경우, 표적 miRNA의 발현량의 측정값을 보정 계수로 제산하는 것, 또는

[0044] (d) 상기 보정 계수 취득 수단에 있어서, 상기 기준값을 상기 대표값으로 제산한 값을 보정 계수로서 취득하는 경우, 표적 miRNA의 발현량의 측정값에 보정 계수를 승산하는 것에 의해 상기 보정을 행하는 장치.

[0045] (9) (7) 또는 (8)에 있어서, 상기 기억 수단에 기억되는 복수의 각 체액 검체에 포함되는 표적 miRNA의 발현량의 측정값 및 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값은, 지지체 상에 고정화된 복수의 표적 miRNA를 포착하기 위한 프로브 및 상기

하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브와, 표지 물질로 표지된 체액 검체 유래의 핵산 시료를 접촉시켜 하이브리다이제이션을 행하고, 표적 miRNA 및 상기 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량을 시그널 강도 측정값으로서 각각 측정된 값인 장치.

[0046] (10) 복수의 체액 검체 사이에서 표적 miRNA의 발현량을 비교 해석하기 위해서 하나 또는 복수의 컴퓨터에,

[0047] 복수의 각 체액 검체에 대해서, 표적 miRNA의 발현량의 측정 및 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정을 동시에 행하는 측정 공정;

[0048] 각 체액 검체에 대해서, 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 각 측정값으로부터 대표값을 취득하는 대표값 취득 공정;

[0049] 보정용 내인성 miRNA의 발현량에 관해서 임의로 설정된 기준값과, 대표값 취득 공정에서 취득된 각 체액 검체의 대표값의 차 또는 비를, 각 체액 검체를 위한 표적 miRNA 발현량의 보정 계수로서 각각 취득하는 보정 계수 취득 공정; 및

[0050] 각 체액 검체에 대하여 취득된 보정 계수를 각각 사용하여 각 체액 검체에 있어서 측정된 표적 miRNA의 발현량을 보정하는 보정 공정을 실행시키기 위한 프로그램.

[0051] (11) 복수의 체액 검체 사이에서 표적 miRNA의 발현량을 비교 해석하기 위해서 하나 또는 복수의 컴퓨터를,

[0052] 복수의 각 체액 검체에 포함되는 표적 miRNA의 발현량의 측정값 및 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값을 기억하는 기억 수단;

[0053] 각 체액 검체에 대해서, 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값으로부터 대표값을 취득하는 대표값 취득 수단;

[0054] 보정용 내인성 miRNA의 발현량에 관해서 임의로 설정된 기준값과, 상기 대표값 취득 수단에 의해 취득된 각 체액 검체의 대표값의 차 또는 비를, 각 체액 검체를 위한 표적 miRNA 발현량의 보정 계수로서 각각 취득하는 보정 계수 취득 수단;

[0055] 각 체액 검체에 대하여 취득된 보정 계수를 각각 사용하여 각 체액 검체에 있어서 측정된 표적 miRNA의 발현량을 보정하는 보정 수단; 및

[0056] 보정이 완료된 표적 miRNA 발현량에 의해 적어도 2개의 체액 검체 사이에서 표적 miRNA 발현량을 대비한 결과를 출력하는 출력 수단으로서 기능시키기 위한 프로그램.

[0057] (12) (10) 또는 (11)에 기재된 프로그램을 기록한 컴퓨터 판독 가능한 기록 매체.

[0058] (13) 복수의 표적 miRNA를 포착하기 위한 프로브 및 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브가 고정화된 지지체를 포함하는 miRNA 발현 해석용 칩.

[0059] (발명의 효과)

[0060] 본 발명에 의하면, 복수의 체액 검체에 포함되는 표적 miRNA의 발현량을 비교 해석하는 경우, 특히 마이크로 어레이 등을 이용하여 다수의 miRNA의 발현량을 측정하여 검체 사이에서 miRNA 발현량을 비교하는 경우에, 종래보다 정확하게 miRNA 발현량을 보정할 수 있다. 본 발명에 의해, 검체 사이에서의 표적 miRNA의 비교 해석을 보다 정확하게 실시할 수 있게 된다.

## *도면의 간단한 설명*

[0061] 도 1은 본 발명의 방법의 개념도이다.

도 2는 본 발명의 해석 장치의 구성의 개략을 나타내는 블록도이다.

도 3은 본 발명에 의한 표적 miRNA의 발현량의 보정 처리의 플로우 차트의 일례이다.

도 4a는 실시예 2에 나타내는 방법으로 측정, 보정된 DNA 마이크로 어레이 검출에 의한 miRNA 시그널값의 히스토그램을 나타낸다. A: 보정 전, B: hsa-miR-6085에 의한 보정, C: hsa-miR-1227-5p에 의한 보정, D: hsa-miR-2861에 의한 보정, E: hsa-miR-149-3p에 의한 보정, F: hsa-miR-4463에 의한 보정, G: hsa-miR-4508에 의한 보정

도 4b는 실시예 2에 나타내는 방법으로 측정, 보정된 DNA 마이크로 어레이 검출에 의한 miRNA 시그널값의 히스토그램을 나타낸다. A: 보정 전, H: hsa-miR-6090에 의한 보정, I: hsa-miR-6775-5p에 의한 보정, J: hsa-miR-6803-5p에 의한 보정, K: hsa-miR-5787에 의한 보정

도 5는 실시예 2에 나타내는 방법으로 측정, 보정된 DNA 마이크로 어레이 검출에 의한 miRNA 시그널값의 히스토그램을 나타낸다.

도 6은 비교예 1에 나타내는 방법으로 측정, 보정된 DNA 마이크로 어레이 검출에 의한 miRNA 시그널값의 히스토그램을 나타낸다.

도 7은 비교예 2에 나타내는 방법으로 측정, 보정된 DNA 마이크로 어레이 검출에 의한 miRNA 시그널값의 히스토그램을 나타낸다.

도 8a는 실시예 4에 나타내는 방법으로 측정, 보정된 DNA 마이크로 어레이 검출에 의한 miRNA 시그널값의 히스토그램을 나타낸다. A: 보정 전, B: hsa-miR-149-3p, hsa-miR-1227-5p, hsa-miR-2861의 조합에 의한 보정, C: hsa-miR-149-3p, hsa-miR-1227-5p, hsa-miR-4508의 조합에 의한 보정, D: hsa-miR-149-3p, hsa-miR-1227-5p, hsa-miR-4463의 조합에 의한 보정, E: hsa-miR-149-3p, hsa-miR-2861, hsa-miR-4508의 조합에 의한 보정

도 8b는 실시예 4에 나타내는 방법으로 측정, 보정된 DNA 마이크로 어레이 검출에 의한 miRNA 시그널값의 히스토그램을 나타낸다. A: 보정 전, F: hsa-miR-149-3p, hsa-miR-2861, hsa-miR-4463의 조합에 의한 보정, G: hsa-miR-1227-5p, hsa-miR-2861, hsa-miR-4508의 조합에 의한 보정, H: hsa-miR-1227-5p, hsa-miR-2861, hsa-miR-4463의 조합에 의한 보정, I: hsa-miR-1227-5p, hsa-miR-4508, hsa-miR-4463의 조합에 의한 보정

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0062] 우선, 본 발명에서 행하는 표적 miRNA의 보정 방법의 개념에 대해서, 도 1 에 의거하여 설명한다. 도 1에서는 체액 검체 중의 RNA를 표지하고, 복수 종류의 표적 miRNA를 포착하기 위한 프로브(이하, 「표적 miRNA 포착 프로브」라고 함) 및 서열번호 1~10으로 나타내어지는 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 miRNA(이하, 「보정용 내인성 miRNA」라고 함)를 포착하기 위한 프로브(이하, 「보정용 내인성 miRNA 포착 프로브」라고 함)가 고정된 마이크로 어레이에서 검출된 결과를 각 miRNA의 발현량의 측정값인 시그널값의 히스토그램에 의해 모식적으로 나타내고 있다. 이하, 표적 miRNA를 포착하기 위한 프로브 또는 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브를 일반적으로 「miRNA 포착 프로브」 또는 간단히 「프로브」라고 한다.

[0063] 도 1A에서는 체액 검체 A 및 체액 검체 B로부터 추출한 검체의 표적 miRNA를 각각 DNA 마이크로 어레이를 이용하여 해석한 결과를 히스토그램으로 나타내고 있다. 마이크로 어레이에 탑재되어 있는 복수의 표적 miRNA 포착 프로브로부터 얻어진 시그널값, 및 본 발명의 보정용 내인성 miRNA 포착 프로브로부터 얻어진 시그널값의 히스토그램을 각각 나타내고 있다. 체액 검체 A와 체액 검체 B에서는 miRNA의 히스토그램이 크게 벗어나고 있다. 이로부터, 검체 사이에서 miRNA의 발현량에 큰 차이가 있다고 해석할 수 있다. 한편, 실험 오차에 의해 차이가 생기고 있다고 해석할 수 있다. 어느 쪽이 옳은지, miRNA의 히스토그램만으로는 판단할 수 없다.

[0064] 그런데, 여기에 체액 중의 존재량이 항상 일정한 보정용 내인성 miRNA가 존재하는 경우, 이 보정용 내인성 miRNA의 시그널값의 값은 검체 사이에서 일치할 것이다.

[0065] 도 1A로 나타낸 보정용 내인성 miRNA 포착 프로브로부터 얻어진 시그널값의 히스토그램은 체액 검체 A와 체액 검체 B에서 거의 동일한 분포를 나타내고 있다. 즉, 체액 검체 A와 체액 검체 B는 바로 실험에 제공되고 실험 오차는 없다고 판단할 수 있다. 이 경우에는 체액 검체 AB 사이에서 miRNA의 발현량에 큰 차이가 있다고 할 수 있게 되어, 체액 검체 사이에서의 비교를 하는데 있어서 miRNA의 시그널값의 보정은 불필요하다.

[0066] 도 1B에서는 DNA 마이크로 어레이를 이용하여 체액 검체 C 및 체액 검체 D를 해석한 결과를 모식적으로 나타내고 있다. 표적 miRNA 포착 프로브로부터 얻어진 시그널값, 및 보정용 내인성 miRNA 포착 프로브로부터 얻어진 시그널값을 각각 나타내고 있다.

[0067] 체액 검체 C와 체액 검체 D에서는 miRNA의 히스토그램이 동일하게 분포를 나타내고 있다. 한편, 보정용 내인성 miRNA 포착 프로브로부터 얻어진 시그널값의 히스토그램은 체액 검체 C와 체액 검체 D에서는 크게 벗어나고 있다. 이 점으로부터 체액 검체 C와 체액 검체 D의 검출 결과에는 어떠한 원인에 의해 실험 오차가 생기는 것을 알았다. 이러한 경우에는 체액 검체 CD 사이에서의 비교를 하는데에 있어서, miRNA의 시그널값을 적절하게 보정할 필요가 있다.

[0068] 본 발명에 따라서, 표적 miRNA의 시그널값을 보정한 후의 히스토그램을 도 1 C에 나타낸다. 보정의 구체적인 방법은 후술한 바와 같다. 체액 검체 C와 체액 검체 D의 보정용 내인성 miRNA 포착 프로브로부터 얻어진 시그널값의 히스토그램이 일치하도록 체액 검체 C의 데이터를 보정했다. 이 보정에 의해, 보정용 내인성 miRNA 포착 프로브로부터 얻어진 시그널값의 히스토그램은 체액 검체 C와 체액 검체 D에서 일치하게 되고, 동일한 보정 계수를 이용하여 보정된 표적 miRNA 포착 프로브의 시그널값의 히스토그램은 크게 벗어난다. 즉, 검체 CD 사이에서도, 표적 miRNA의 발현량에는 큰 차이가 있다고 할 수 있다.

[0069] 여기서는 2개의 체액 검체 사이에서의 miRNA의 시그널값을 보정하는 방법을 나타냈지만, 비교하는 체액 검체는 2개로 한정되지 않고, 무한으로 비교할 수 있다. 3개 이상의 체액 검체를 비교하는 경우에는, 예를 들면 미리 보정용 내인성 miRNA 포착 프로브로부터 얻어지는 시그널값을 일정한 수치(정수)로 가정해 두고, 이 정수에 대한 각 체액 검체의 보정용 내인성 miRNA 포착 프로브로부터 얻어지는 시그널값의 차 또는 비를 계산하여 그 차를 체액 검체 중의 표적 miRNA의 시그널값에 대하여 가산 또는 감산하거나, 비의 역수를 체액 검체 중의 표적 miRNA의 시그널값에 대하여 승산 또는 제산함으로써 용이하게 다수의 검체 사이의 보정을 행할 수 있다.

[0070] 본 발명에서는 복수의 검체 사이에서 miRNA의 발현량을 비교 해석한다. 검체수는 2개이어도 좋고, 3개 이상이어도 좋다.

[0071] 「miRNA」란 생체 내에서 만들어지는 쇄 길이 15~25염기 정도의 단쇄 RNA를 의미하는 논코딩 RNA(ncRNA)의 일종이고, mRNA의 발현을 조절하는 기능을 가지고 있다고 생각되고 있다. miRNA는 genomDNA로부터 헤어핀 모양 구조의 RNA(전구체)로서 전사된다. 이 전구체는 특정 효소 RNase III 절단 활성을 갖는 dsRNA 절단 효소(Drosha, Dicer)에 의해 절단된 후 2본쇄의 형태로 변화되고, 그 후 1본쇄가 된다. 그리고, 한 쪽의 안티센스쇄가 RISC라고 하는 단백질 복합체에 포함되어 mRNA 의 번역 억제에 관여한다고 생각되고 있다. 이와 같이, miRNA는 전사 후 각 단계에 있어서 그 형태는 다르기 때문에, 통상 miRNA를 타겟(검출 대상)으로 하는 경우에는 헤어핀 구조체, 2본쇄 구조체, 1본쇄 구조체 등의 각종 형태를 고려할 필요가 있다. miRNA는 다양한 생물에서 그 존재가 확인되고 있다.

[0072] 본 발명을 적용할 수 있는 검체는 생체로부터 분리된 체액 검체이고, 예를 들면 혈액, 혈청, 혈장, 소변, 골수액, 타액, 스왑액, 각종 조직액 등의 체액을 들 수 있지만, 이들로 한정되는 것은 아니다. 비교 해석하는 복수의 검체는 다른 체액에 유래하는 복수의 검체이어도 좋고, 다른 생체로부터 분리된 동일 종류의 체액에 유래하는 복수의 체액 검체이어도 좋다.

[0073] 이들 검체로부터 RNA를 추출하고, 이 RNA를 이용하여 miRNA의 발현량을 측정한다. 그러한 RNA의 추출 방법은 공지이고(예를 들면, Favaloro 외의 방법(Favaloro et. al., Methods Enzymol. 65:718-749(1980)) 등), 그 때문에 키트도 각종 시판되고 있다(예를 들면, Qiagen의 miRNeasy, Toray Industries, Inc.의 "3D-Gene" RNA extraction reagent from liquid sample 등).

[0074] 본 발명에서 「내인성」이라고 하는 경우, 인위적으로 검체에 첨가된 것은 아니고, 검체 중에 자연히 존재하는 것을 의미한다. 예를 들면, 「내인성 miRNA」라고 말한 경우, 검체 중에 자연히 존재하고 있는 그 검체를 제공한 생물에 유래하는 miRNA를 나타낸다.

[0075] <측정 공정>

[0076] 본 발명의 비교 해석 방법에서는 검체 중의 복수 종류의 표적 miRNA의 발현량의 측정과 동시에, 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정도 행한다. 보정용 내인성 miRNA의 발현량은 후술한 바와 같이, 표적 miRNA의 발현량을 보정하기 위한 보정 계수의 산출에 사용된다. 복수의 miRNA의 발현량의 동시 측정은, 예를 들면 대상의 miRNA에 특이적으로 결합하는 프로브를 지지체 상에 고정화 한 마이크로 어레이 등의 어레이 칩을 사용한 하이브리다이제이션 분석에 의해 행할 수 있다. 본 발명에 있어서는 복수의 표적 miRNA 포착 프로브와 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA 포착 프로브가 고정화된 지지체를 포함하는 어레이 칩을 사용하면 좋다.

[0077] 「포착 프로브」 또는 「포착하기 위한 프로브」란 포착 대상의 miRNA와 직접적 또는 간접적으로, 바람직하게는 직접적으로 또한 선택적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하고, 대표적인 예로서 핵산, 단백질, 당류 및 다른 항원성 화합물을 들 수 있다. 본 발명에 있어서는 핵산 프로브를 바람직하게 사용할 수 있다. 핵산은 DNA나 RNA 외, PNA(펩티드 핵산)나 LNA(Locked Nucleic Acid) 등의 핵산 유도체를 사용할 수 있다. 여기서 유도체란 핵산의 경우, 형광단 등에 의한 라벨화 유도체, 수식 뉴클레오티드(예를 들면, 할로겐, 메틸 등의 알킬, 메톡시 등의 알콕시, 티오, 카르복시메틸 등의 기를 포함하는 뉴클레오티드, 및 염기의 재구성, 이중결합의 포화, 탈아미노화, 산소분자의 황분자로의 치환 등을 포함하는 뉴클레오티드 등)를 포함하는 유도체 등의 화학 수식 유도체

를 의미한다.

[0078] 핵산 프로브의 쇄 길이는 하이브리다이제이션의 안정성과 특이성을 확보하는 관점에서, 검출 대상으로 하는 miRNA의 길이 이상으로 하는 것이 바람직하다. 통상, 17~25염기 정도의 쇄 길이로 하면, 프로브가 대상으로 하는 miRNA로의 선택적 결합성을 충분히 발휘할 수 있다. 그러한 쇄 길이가 짧은 올리고 핵산 프로브는 주지의 화학합성법 등에 의해 용이하게 조제할 수 있다.

[0079] 핵산 프로브는 대상의 miRNA와 완전히 상보적인 염기서열로 하는 것이 바람직하지만, 일부에 차이점이 있어도 대상의 miRNA와 스트린젠트한 조건에서 하이브리다이즈할 수 있는 정도로 상동성이 높은 염기서열이면, 포착 프로브로서 사용 가능하다.

[0080] 하이브리다이제이션시의 스트린젠트는 온도, 염 농도, 프로브의 쇄 길이, 프로브의 뉴클레오티드 배열의 GC 함량 및 하이브리다이제이션 완충액 중의 카오트로픽제의 농도의 함수인 것이 알려져 있다. 스트린젠트한 조건으로서는, 예를 들면 Sambrook, J. et al.(1998) Molecular Cloning: A Laboratory Manual(2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York에 기재된 조건 등을 사용할 수 있다. 스트린젠트한 온도 조건은 약 30℃ 이상이다. 기타 조건으로서는 하이브리다이제이션 시간, 세정제(예를 들면, SDS)의 농도, 및 캐리어 DNA의 존부 등이고, 이들 조건을 조합함으로써 다양한 스트린젠트를 설정할 수 있다. 당업자는 소망하는 검체 RNA의 검출을 위해서 준비한 포착 프로브로서의 기능을 얻기 위한 조건을 적당히 결정할 수 있다.

[0081] miRNA의 배열 정보는 GenBank(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) 등의 데이터베이스로부터 입수할 수 있다. 또한, miRNA의 배열 정보는, 예를 들면 miRBase의 웹 사이트(http://www.mirbase.org/)로부터 입수할 수 있다. 보정용 내인성 miRNA 포착 프로브 및 표적 miRNA 포착 프로브는 이들 사이트로부터 입수할 수 있는 배열 정보에 의거하여 설계할 수 있다.

[0082] 지지체 상에 고정화되는 miRNA 포착 프로브의 수는 특별히 한정되지 않는다. 예를 들면, 배열이 분류되어 있는 공지의 miRNA 모두를 망라하는 수의 miRNA 포착 프로브를 지지체 상에 고정화한 것을 이용하여 miRNA의 발현량을 측정해도 좋고, 소망의 수의 miRNA 포착 프로브를 지지체 상에 고정화한 것을 사용해도 좋다.

[0083] 포착 프로브가 정렬 고정화되는 지지체로서는 공지의 마이크로 어레이나 매크로 어레이 등에서 사용되고 있는 지지체와 동일한 것을 사용할 수 있고, 예를 들면 슬라이드글라스나 막, 비즈 등을 사용할 수 있다. 일본 특허 제4244788호 등에 기재되어 있는 표면에 복수의 볼록부를 갖는 형상의 지지체를 사용할 수도 있다. 지지체의 재질은 특별히 한정되지 않지만, 유리, 세라믹, 실리콘 등의 무기 재료; 폴리에틸렌테레프탈레이트, 아세트산 셀룰로오스, 폴리카보네이트, 폴리스티렌, 폴리메틸메타크릴레이트, 실리콘 고무 등의 폴리머 등을 들 수 있다.

[0084] 지지체에 포착 프로브를 고정화하는 방법으로서는 지지체 표면 상에서 올리고 DNA를 합성하는 방법과, 미리 합성해 둔 올리고 DNA를 지지체 표면에 적하하여 고정하는 방법이 알려져 있다.

[0085] 전자의 방법으로서는 Ronald 외의 방법(미국 특허 제5705610호 명세서), Michel 외의 방법(미국 특허 제6142266호 명세서), Francesco 외의 방법(미국 특허 제7037659호 명세서)을 들 수 있다. 이들 방법에서는 DNA 합성 반응시에 유기 용매를 사용하기 위해서, 지지체는 유기 용매에 내성이 있는 재질인 것이 바람직하다. 또한, Francesco 외의 방법에서는 지지체의 이면으로부터 광을 조사하여 DNA 합성을 제어하기 위해서, 지지체는 투광성을 갖는 재질인 것이 바람직하다.

[0086] 후자의 방법으로서는 히로타 외(일본 특허 제 3922454호)의 방법이나 스폿터를 사용하는 방법을 들 수 있다. 스폿의 방식으로서는 고상에의 핀 선단의 기계적인 접촉에 의한 핀 방식, 잉크젯 프린터의 원리를 이용한 잉크젯 방식, 모세관에 의한 캐피러리 방식 등을 들 수 있다. 스폿 처리한 후는 필요에 따라서 UV 조사에 의한 크로스링킹, 표면의 블록킹 등의 후처리가 행해진다. 표면 처리한 지지체 표면에 공유결합으로 올리고 DNA를 고정화시키기 위해서, 올리고 DNA의 말단에는 아미노기나 SH기 등의 관능기가 유입된다. 지지체의 표면 수식은, 통상 아미노기 등을 갖는 실란커플링제 처리에 의해 행해진다.

[0087] 지지체 상에 고정화된 각 miRNA 포착 프로브와의 하이브리다이제이션은 체액 검체로부터 추출한 RNA로부터, 표지 물질로 표지된 핵산 시료(체액 검체 유래의 핵산 시료)를 조제하고, 이 표지 핵산 시료를 프로브와 접촉시킴으로써 실시한다. 「체액 검체 유래의 핵산 시료」에는 체액 검체로부터 추출한 RNA 외, 상기 RNA로부터 역전사 반응에 의해 조제된 cDNA 및 cRNA가 포함된다. 표지된 체액 검체 유래의 핵산 시료는 검체 RNA를 직접적 또는 간접적으로 표지 물질로 표지한 것이어도 좋고, 또한 검체 RNA로부터 조제된 cDNA나 cRNA를 직접적 또는 간접적으로 표지 물질로 표지한 것이어도 좋다.

[0088] 체액 검체 유래의 핵산 시료에 표지 물질을 결합시키는 방법으로서는 핵산 시료의 3' 말단에 표지 물질을 결합시키는 방법, 5' 말단에 표지 물질을 결합시키는 방법, 표지 물질이 결합한 뉴클레오티드를 핵산에 포함시키는 방법을 들 수 있다. 3' 말단에 표지 물질을 결합시키는 방법, 5' 말단에 표지 물질을 결합시키는 방법에서는 효소 반응을 사용할 수 있다. 효소 반응에는 T4 RNA Ligase나 Terminal Deoxitidil Transferase, Poly A polymerase 등을 사용할 수 있다. 어느 표지 방법도 「Shao-Yao Ying편, miRNA 실험 프로토콜, Yodosha Co., Ltd., 2008년」에 기재되어 있는 방법을 참고로 할 수 있다. 또한, RNA의 말단에 직접 또는 간접적으로 표지 물질을 결합시키기 위한 키트가 각종 시판되고 있다. 예를 들면, 3' 말단에 직접 또는 간접적으로 표지 물질을 결합시키는 키트로서는 "3D-Gene" miRNA Labeling kit(Toray Industries, Inc.), miRCURY miRNA HyPower Labeling kit(Exiqon), NCode miRNA Labeling system(Life Technologies Corporation), FlashTag Biotin RNA Labeling Kit(Genisphere, LLC) 등을 예시할 수 있다.

[0089] 이 외에, 종래법과 마찬가지로 표지한 데옥시리보뉴클레오티드 또는 표지 한 리보뉴클레오티드의 존재 하에서 검체 RNA로부터 cDNA 또는 cRNA를 합성함으로써 표지 물질이 포함된 cDNA 또는 cRNA를 조제하고, 이것을 어레이 상의 프로브와 하이브리다이즈시키는 방법도 가능하다.

[0090] 본 발명에서는 복수의 검체를 사용하지만, 모두 동일한 표지 물질을 이용해도 좋다.

[0091] 본 발명에 있어서, 사용할 수 있는 표지 물질로서는 공지의 마이크로 어레이 해석에 있어서도 사용되고 있는 각종 표지 물질을 들 수 있다. 구체적으로는 형광 색소, 인광 색소, 효소, 방사선 동위체 등을 들 수 있지만, 이들로 한정되지 않는다. 바람직한 것은 측정이 간편하고, 시그널이 검출되기 쉬운 형광 색소이다. 구체적으로는 시아닌(시아닌 2), 아미노메틸쿠마린, 플루오레세인, 인도카르보시아닌(시아닌 3), 시아닌 3.5, 테트라메틸로다민, 로다민레드, 텍사스레드, 인도카르보시아닌(시아닌 5), 시아닌 5.5, 시아닌 7, 오이스터 등의 공지의 형광 색소를 들 수 있지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0092] 또한, 표지 물질로서는 발광성을 갖는 반도체 미립자를 사용해도 좋다. 이러한 반도체 미립자로서는, 예를 들면 카드뮴 셀레늄(CdSe), 카드뮴 텔루륨(CdTe), 인듐 갈륨 인(InGaP), 실버 인듐 황화아연(AgInZnS) 등을 들 수 있다.

[0093] 상기한 바와 같이 하여 표지된 체액 검체 유래의 핵산 시료를 지지체 상의 miRNA 포착 프로브와 접촉시켜 핵산 시료와 프로브를 하이브리다이즈시킨다. 이 하이브리다이제이션 공정은 종래와 완전히 동일하게 행할 수 있다. 반응 온도 및 시간은 하이브리다이즈시키는 핵산의 쇄 길이에 따라 적당히 선택되지만, 핵산의 하이브리다이제이션의 경우, 통상 30℃~70℃ 정도로 1분간~수십시간이다. 하이브리다이제이션을 행하고 세정 후 지지체 상의 개개의 프로브 고정화 영역에 있어서의 표지 물질로부터의 시그널 강도를 검출한다. 시그널 강도의 검출은 표지 물질의 종류에 따라 적당한 시그널 독해 장치를 이용하여 행한다. 형광 색소를 표지 물질로서 사용한 경우에는 형광 현미경이나 형광 스캐너 등을 사용하면 좋다.

[0094] 검출된 시그널값은 주변 노이즈와 비교된다. 구체적으로는 프로브 고정화 영역으로부터 얻어진 시그널값과, 그 이외의 위치로부터 얻어진 시그널값을 비교하여 전자의 수치가 상회하고 있는 경우를 검출되었다(유효 판정 양성)라고 한다.

[0095] 검출된 시그널값에, 백그라운드 노이즈가 포함되어 있는 경우에는 백그라운드 노이즈를 감산해도 좋다. 주변 노이즈를 백그라운드 노이즈로서 검출한 시그널값으로부터 감산할 수도 있다. 기타, 「후지부치 와타루, 호리모토 카츠히사편, 마이크로 어레이 데이터 통계 해성 프로토콜, Yodosha Co., Ltd., 2008년」에 기재되어 있는 방법을 사용해도 좋다.

[0096] 상기 방법에 의하면, 보정용 내인성 miRNA 및 표적 miRNA의 발현량의 측정값이 시그널 강도의 측정값로서 얻어진다.

[0097] <대표값 취득 공정>

[0098] 본 발명의 해석 방법에서는 이어서, 각 검체에 대해서 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값으로부터 대표값, 바람직하게는 로그값으로 나타내어진 대표값을 취득한다(대표값 취득 공정). 본 발명에 있어서의 「로그값」이란 밑이 2의 로그로 변환된 값을 의미한다.

[0099] 복수의 보정용 내인성 miRNA를 사용하는 경우, 대표값은 그들 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 각 측정값으로부터 산출된 평균값 또는 중앙값, 바람직하게는 로그값으로 나타내어진 평균값 또는 중앙값이 채용된다. 보정용 내인성 miRNA를 1개만 사용하는 경우, 해당 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값, 바람직하게는 상기

측정값의 로그값이 그대로 대표값으로서 채용될 수 있다. 또는, 후술하는 대로 1종류의 보정용 내인성 miRNA에 대하여 복수의 포착 프로브가 스폿되어 있는 어레이 칩을 사용하는 경우에는 그들 복수의 스폿(프로브 고정화 영역)으로부터의 시그널 측정값으로부터 평균값 또는 중앙값, 바람직하게는 로그값으로 나타내어진 평균값 또는 중앙값을 구하여 대표값이라고 할 수 있다.

[0100] 「로그값으로 나타내어진 평균값」이란 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값(예를 들면, 마이크로 어레이를 이용하여 얻어진 시그널 강도의 측정값)을 밑이 2의 로그로 변환한 로그값으로 구한 평균값을 의미한다. 대표값이 중앙값인 경우, 「로그값으로 나타내어진 중앙값」이란 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값(예를 들면, 마이크로 어레이를 이용하여 얻어진 시그널 강도의 측정값)을 밑이 2의 로그로 변환한 로그값의 중앙값, 또는 보정용 내인성 miRNA 발현량 측정값의 중앙값을 밑이 2의 로그로 변환한 로그값을 의미한다. 중앙값의 경우에는 측정값의 로그 변환을 먼저 행해도, 후에 행해도 동일한 값이 얻어진다.

[0101] 평균값 및 중앙값은 실제로 측정 대상으로 하는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 모든 측정값을 이용하여 구한 것이어도 좋고, 상기 복수의 보정용 내인성 miRNA 중으로부터 추출된 일부의 측정값을 이용하여 구한 것이어도 좋다. 예를 들면, 마이크로 어레이에 탑재되어 있는 보정용 내인성 miRNA 포착 프로브로 얻어진 모든 보정용 내인성 miRNA의 측정값을 이용하여 구해도 좋고, 전체 보정용 내인성 miRNA 포착 프로브 중 일부(예를 들면, 마이크로 어레이에 탑재되어 있는 보정용 내인성 miRNA 포착 프로브가 10종이라고 하면, 그 중 3종)를 추출하여 구해도 좋다. 또한, 1종의 보정용 내인성 miRNA에 대하여 복수 스폿되어 있는 보정용 내인성 miRNA 포착 프로브로부터 얻어지는 측정값이어도 좋다. 예를 들면, 비교 해석해야 할 모든 검체에 공통적으로 유효 판정 양성이었던 보정용 내인성 miRNA 포착 프로브 고정화 영역만을 추출하여 보정용 내인성 miRNA의 대표값을 취득할 수 있다.

[0102] 이어서, 대표값 취득 공정에서 얻어진 각 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값과, 보정용 내인성 miRNA의 발현량에 관해서 임의로 설정된 기준값을 이용하여 표적 miRNA의 발현량의 보정에 사용하는 보정 계수를 취득한다(보정 계수 취득 공정). 이 보정 계수 취득 공정에는 하기 보정 계수 취득 공정-1 또는 보정 계수 취득 공정-2의 공정을 적용할 수 있다.

[0103] <보정 계수 취득 공정-1>

[0104] 보정 계수 취득 공정-1은 보정용 내인성 miRNA의 대표값과 기준값의 차를 이용하는 방법이다. 본 공정에는 하기 1-1. 기준 검체 취득법, 또는 1-2. 고정 수치 보정법을 적용할 수 있다.

[0105] 1-1. 기준 검체 취득법

[0106] miRNA의 검출 대상으로 하는 복수의 체액 검체 중에서 임의로 1검체(제 1 검체)를 선택하고, 이것을 「기준 검체」라고 한다. 나머지의 하나 또는 그 이상의 검체(제 2 이후의 검체)가 「보정되는 검체」가 된다.

[0107] 또한, 본 명세서에 있어서 「제 2 이후의 검체」라고 하는 단어에는 제 2 검체도 포함된다. 예를 들면, 비교해야 할 복수의 검체가 2개이면 보정되는 검체는 제 2 검체만이고, 비교해야 할 복수의 검체가 3개이면 보정되는 검체는 제 2 검체 및 제 3 검체의 2개이다.

[0108] 이 방법에서는 기준 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값을 「기준값」이라고 한다. 해당 기준값과, 제 2 이후의 각 검체(보정되는 검체)의 보정용 내인성 miRNA의 대표값의 차를 해당 제 2 이후의 각 검체를 위한 보정 계수로서 사용한다. 보정 계수는 보정되는 검체의 수만 취득되게 된다.

[0109] 구체적으로는 보정 계수는 식 1 또는 식 1'로 구해진다.

[0110] $c_{1-1}$=(기준 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값(기준값))

[0111] -(보정되는 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값)···식 1

[0112] $c_{1-1}'$=(보정되는 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값)

[0113] -(기준 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값(기준값))···식 1'

[0114] 예를 들면, 마이크로 어레이를 이용하여 발현량의 측정을 실시하여 보정용 내인성 miRNA의 대표값으로서 평균값을 사용하는 경우, 보정되는 검체를 위한 보정 계수는 식 2 또는 식 2'로 구할 수 있다.

[0115] $$c_{1-1}=\frac{1}{n}\sum_{j=1}^{n}\log_2 Aj-\frac{1}{n}\sum_{j=1}^{n}\log_2 Xj \quad \cdots 식\ 2$$

[0116] $$c_{1-1}' = \frac{1}{n}\sum_{j=1}^{n}\log_2 Xj - \frac{1}{n}\sum_{j=1}^{n}\log_2 Aj \quad \cdots 식\ 2'$$

[0117] 여기서, 식 2, 식 2' 중,

[0118] n은 지지체 상의 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브 고정화 영역의 총수,

[0119] Aj는 기준 검체에 있어서의 j번째(1≤j≤n)의 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브 고정화 영역으로부터의 시그널 측정값,

[0120] Xj는 제 2 검체에 있어서의 j번째(1≤j≤n)의 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브 고정화 영역으로부터의 시그널 측정값이다.

[0121] 프로브가 보정용 내인성 miRNA와 1대1 대응인 경우, n은 지지체 상의 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브가 타겟으로 하는 보정용 내인성 miRNA의 수와 같다.

[0122] 식 2 및 식 2'에 있어서는 n 대신에, 비교해야 할 모든 검체에서 공통적으로 유효 판정 양성이었던 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브 고정화 영역의 총수(n')를 사용할 수도 있다.

[0123] 1-2. 고정 수치 보정법

[0124] 보정용 내인성 miRNA의 대표값에 대해서, 모든 검체에 있어서 일정한 수치를 취하는 것으로 미리 가정하는 방법이다. 즉, 고정한 수치와, 각 검체 유래의 보정용 내인성 miRNA의 대표값의 차를 얻고, 이 차를 보정 계수로서 이용한다. 해당 방법에서는 이 고정한 수치를 「기준값」으로 사용한다. 보정 계수는 보정되는 검체의 수만 취득하게 된다. 또한, 이 경우, 1-1.에 나타낸 「기준 검체」는 존재하지 않으므로, miRNA의 검출 대상으로 하는 복수의 검체 전부가 「보정되는 검체」가 된다.

[0125] 구체적으로는 보정 계수는 식 3 또는 식 3'으로 구해진다.

[0126] $r_{1-2}$=(고정 수치(기준값))

[0127] -(보정되는 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값)···식 3

[0128] $r_{1-2}'$=(보정되는 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값)

[0129] -(고정 수치(기준값))···식 3'

[0130] 예를 들면, 보정용 내인성 miRNA의 대표값으로서 평균값을 사용하는 경우, 보정되는 검체를 위한 보정 계수는 식 4 또는 식 4'로 구할 수 있다.

[0131] $$r_{1-2} = \alpha - \frac{1}{n}\sum_{j=1}^{n}\log_2 Yj \quad \cdots 식\ 4$$

[0132] $$r_{1-2}' = \frac{1}{n}\sum_{j=1}^{n}\log_2 Yj - \alpha \quad \cdots 식\ 4'$$

[0133] 여기서, 식 4, 식 4' 중,

[0134] α는 기준값,

[0135] n은 지지체 상의 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브 고정화 영역의 총수,

[0136] Yj는 검체에 있어서의 j번째(1≤j≤n)의 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브 고정화 영역으로부터의 시그널 측정값이다.

[0137] 프로브가 보정용 내인성 miRNA와 1대1 대응인 경우, n은 지지체 상의 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브가 타겟으로 하는 보정용 내인성 miRNA의 수와 같다.

[0138] 식 2 및 식 2'에 있어서는 n 대신에, 비교해야 할 모든 검체에서 공통적으로 유효 판정 양성이었던 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브 고정화 영역의 총수(n')를 사용할 수도 있다.

[0139] 고정 수치 보정법에서 기준값으로서 사용하는 고정 수치는 적어도 1회의 비교 해석에 있어서 모든 검체에 대하여 일관되게 동일한 수치를 사용하는 한, 어떠한 수치(단, 0 이외)를 사용해도 좋다. 동일 발현 측정 시스템을 사용하고, 또한 항상 동일 수치를 고정 수치로서 사용하는 것으로 하면 다른 날에 발현량의 측정을 행한 체액 검체 사이에서도 비교 해석이 가능하다. 특별히 한정되지 않지만, 고정 수치는 보정 계수의 취득에 사용하는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA가 일반적으로 취할 수 있는 발현량의 수치를 채용할 수 있다. 발현량의 측정에 사용되는 시스템에 의해 그러한 일반적으로 취할 수 있는 수치는 변동될 수 있기 때문에, 사용하는 시스템에 따라 고정 수치는 자유롭게 선택할 수 있다.

[0140] 예를 들면, 1종류의 보정용 내인성 miRNA를 사용하는 경우, 비교 해석 대상의 복수의 체액 검체에 있어서의 상기 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 평균값을 구하고, 이것을 고정 수치로서 이용해도 좋다. 3종류의 보정용 내인성 miRNA를 사용하는 경우, 복수의 체액 검체에 있어서의 이들 3종의 miRNA 모두 발현량의 평균값을 구하여, 이것을 고정 수치로서 이용해도 좋다. 또한, 다수의 체액 검체를 이용하여 미리 고정 수치를 정해 두고, 이 고정 수치를 그 후의 해석에 반복하여 사용해도 좋다.

[0141] <보정 계수 취득 공정-2>

[0142] 보정 계수 취득 공정-2는 보정용 내인성 miRNA의 대표값과 기준값의 비를 이용하는 방법이다. 본 공정에는 하기 2-1. 기준 검체 취득법 또는 2-2. 고정 수치 보정법을 적용할 수 있다.

[0143] 2-1. 기준 검체 취득법

[0144] miRNA의 검출 대상으로 하는 복수의 검체 중에서 임의로 1검체(제 1 검체)를 선택하여, 이것을 「기준 검체」라고 한다. 나머지의 제 2 이후의 검체가 「보정되는 검체」가 된다.

[0145] 이 방법에서는 기준 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값을 「기준값」이라고 하고, 해당 기준값과 제 2 이후의 각 검체(보정되는 검체)의 보정용 내인성 miRNA의 각 대표값의 비를 해당 제 2 이후의 각 검체를 위한 보정 계수로서 사용한다. 보정 계수는 보정되는 검체의 수만 취득하게 된다.

[0146] 구체적으로는 보정 계수는 식 5 또는 식 5'로 구해진다.

[0147] $c_{2\text{-}1}$=(기준 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값(기준값))

[0148] /(보정되는 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값)・・・식 5

[0149] $c_{2\text{-}1}$'=(보정되는 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값)

[0150] /(기준 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값(기준값))・・・식 5'

[0151] 예를 들면, 마이크로 어레이를 이용하여 발현량의 측정을 실시하여 보정용 내인성 miRNA의 대표값으로서 평균값을 사용하는 경우, 제 2 검체를 위한 보정 계수는 식 6 또는 식 6'로 구할 수 있다.

[0152] $$c_{2-1}=\frac{1}{n}\sum_{j=1}^{n}\log_2 Aj \div \frac{1}{n}\sum_{j=1}^{n}\log_2 Xj \quad \cdots 식\ 6$$

[0153] $$c_{2-1}'=\frac{1}{n}\sum_{j=1}^{n}\log_2 Xj \div \frac{1}{n}\sum_{j=1}^{n}\log_2 Aj \quad \cdots 식\ 6'$$

[0154] 여기서, 식 6, 식 6' 중,

[0155] n은 지지체 상의 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브 고정화 영역의 총수,

[0156] Aj는 기준 검체에 있어서의 j번째(1≤j≤n)의 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브 고정화 영역으로부터의 시그널 측정값,

[0157] Xj는 제 2 검체에 있어서의 j번째(1≤j≤n)의 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브 고정화 영역으로부터의 시그널 측정값이다.

[0158] 프로브가 보정용 내인성 miRNA와 1대1 대응인 경우, n은 지지체 상의 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브가 타겟으로 하는 보정용 내인성 miRNA의 수와 같다.

[0159] 식 6 및 식 6'에 있어서는 n 대신에, 비교해야 할 모든 검체에서 공통적으로 유효 판정 양성이었던 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브 고정화 영역의 총수(n')를 사용할 수도 있다.

[0160] 2-2.고정 수치 보정법

[0161] 보정용 내인성 miRNA의 대표값에 대해서, 모든 검체에 있어서 일정한 수치를 취하는 것으로 미리 가정하는 방법이다. 즉, 고정한 수치에 대한 각 검체 유래의 보정용 내인성 miRNA의 대표값의 비를 얻고, 이 비를 보정 계수로서 이용한다. 해당 방법에서는 이 고정한 수치를 「기준값」으로 사용한다. 보정 계수는 보정되는 검체의 수만 취득하게 된다. 또한, 이 경우 2-1.에 나타낸 「기준 검체」는 존재하지 않으므로, miRNA의 검출 대상으로 하는 복수의 검체 전부가 「보정되는 검체」가 된다.

[0162] 구체적으로는 보정 계수는 식 7 또는 식 7'로 구해진다.

[0163] $r_{2\text{-}2}$=(고정 수치(기준값))

[0164] /(보정되는 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값)・・・식 7

[0165] $r_{2\text{-}2}'$=(보정되는 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값)

[0166] /(고정 수치(기준값))・・・식 7'

[0167] 예를 들면, 보정용 내인성 miRNA의 대표값으로서 평균값을 사용하는 경우, 보정되는 검체를 위한 보정 계수는 식 8 또는 식 8'로 구할 수 있다.

[0168] $$r_{2-2}=\alpha \div \frac{1}{n}\sum_{j=1}^{n}\log_2 Yj \quad \cdots \text{식 } 8$$

[0169] $$r_{2-2}'=\frac{1}{n}\sum_{j=1}^{n}\log_2 Yj \div \alpha \quad \cdots \text{식 } 8'$$

[0170] 여기서, 식 8, 식 8'중,

[0171] α는 고정 수치,

[0172] n은 지지체 상의 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브 고정화 영역의 총수,

[0173] Yj는 검체에 있어서의 j번째(1≤j≤n)의 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브 고정화 영역으로부터의 시그널 측정값이다.

[0174] 프로브가 보정용 내인성 miRNA와 1대1 대응인 경우, n은 지지체 상의 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브가 타겟으로 하는 보정용 내인성 miRNA의 수와 같다.

[0175] 식 8 및 식 8'에 있어서는 n 대신에, 비교해야 할 모든 검체에서 공통적으로 유효 판정 양성이었던 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브 고정화 영역의 총수(n')를 사용할 수도 있다.

[0176] 여기서 기준값으로서 사용하는 「고정 수치」의 상세는 「1-2. 고정 수치 보정법」에 있어서의 고정 수치와 같다.

[0177] 이어서, 보정 계수 취득 공정-1 또는 보정 계수 취득 공정-2에서 얻어진 보정 계수를 이용하고, 보정 공정-1 또는 보정 공정-2의 방법을 이용하여 보정되는 검체에 있어서의 표적 miRNA의 발현량의 보정을 행한다.

[0178] <보정 공정-1>

[0179] 보정 공정-1은 보정 계수 취득 공정-1에서 얻어진 보정 계수를 이용하여 표적 miRNA의 발현량의 보정을 행하는 방법이고, 표적 miRNA의 발현량에 보정 계수를 가산 또는 상기 발현량으로부터 보정 계수를 감산함으로써 보정을 행한다. 본 공정에는 보정 계수 취득 공정-1의 기준 검체 취득법과 고정 수치 보정법에 각각 대응한 2가지의 보정 방법이 있다.

[0180] 1-1. 기준 검체 취득법

[0181] 제 2 이후의 검체에 있어서의 표적 miRNA의 발현량의 보정은 제 2 이후의 검체를 위한 보정 계수를 각각 사용하

여 실시한다. 즉, 제 2 검체에 대해서 표적 miRNA의 발현량을 보정하는 경우에는 제 2 검체를 위한 보정 계수($c2_{1-1}$ 또는 $c2_{1-1}'$)를 사용하고, 제 3 검체에 대해서 표적 miRNA 발현량을 보정하는 경우에는 제 3 검체를 위한 보정 계수($c3_{1-1}$ 또는 $c3_{1-1}'$)를 사용한다.

[0182] 보정 계수로서, 기준 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값으로부터 제 2 이후의 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값을 감산한 차를 사용하는 경우, 즉 상기 식 1의 경우에는 제 2 이후의 검체에 있어서의 각 표적 miRNA 발현량의 측정값의 로그값에 보정 계수를 가산함으로써, 제 2 이후의 각 검체에 관한 표적 miRNA의 발현량의 보정이 실시된다. 이 경우의 보정을 식으로 나타내면, 어느 「보정되는 검체」에 있어서의 i번째의 miRNA의 보정이 완료된 발현량(Ei)은 하기 식 9에 의해 구할 수 있다.

[0183] $$Ei = \log_2 Wi + c_{1-1} \quad \ldots 식9$$

[0184] 여기서, Wi는 i번째의 miRNA를 포착하기 위한 프로브 고정화 영역으로부터의 시그널 측정값이다.

[0185] 이것과는 반대로, 보정 계수로서 제 2 이후의 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값으로부터 기준 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값을 감산한 차를 사용하는 경우, 즉 상기 식 1'의 경우에는 제 2 이후의 검체에 있어서의 각 표적 miRNA 발현량의 측정값의 로그값으로부터 보정 계수를 감산함으로써 제 2 이후의 각 검체에 관한 표적 miRNA의 발현량의 보정이 실시된다. 이 경우의 보정을 식으로 나타내면, 어느 「보정되는 검체」에 있어서의 i번째의 표적 miRNA의 보정이 완료된 발현량(Ei)은 하기 식 9'에 의해 구할 수 있다.

[0186] $$Ei = \log_2 Wi - c_{1-1}' \quad \ldots 식\ 9'$$

[0187] 여기서, Wi의 정의는 상기 식 9와 같다.

[0188] 제 2 검체에 있어서 측정된 표적 miRNA 발현량을 보정하는 것이면, 해당 제 2 검체에 있어서의 각 표적 miRNA 발현량의 측정값의 로그값에 c2를 가산하거나 또는 c2'를 감산하면 좋다. 제 3 이후의 검체에 대해서도 마찬가지이다. 또한, 기준 검체로 한 제 1 검체의 대표값과 기준값의 차는 당연 0이지만, 프로그램의 구성상 제 1 검체의 표적 miRNA 발현량에 0을 가산 또는 감산하는 계산을 실시해도 상관없다.

[0189] 1-2. 고정 수치 보정법

[0190] 표적 miRNA 발현량의 보정은 대표값과 고정 수치(기준값)의 차에 의해 얻어진 보정 계수를 각각 사용하여 실시한다. 즉, 어느 검체에 대해서 표적 miRNA 발현량을 보정하는 경우에는 그 검체를 위한 보정 계수($r_{1-2}$ 또는 $r_{1-2}'$)를 사용한다.

[0191] 보정 계수로서 기준값으로부터 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값을 감산한 차를 사용하는 경우, 즉 상기 식 3의 경우에는 검체에 있어서의 각 표적 miRNA의 발현량의 측정값의 로그값에 보정 계수를 가산함으로써 각 검체에 관한 표적 miRNA의 발현량의 보정이 실시된다. 이 경우의 보정을 식으로 나타내면, 어느 「보정되는 검체」에 있어서의 i번째의 표적 miRNA의 보정이 완료된 발현량(Ei)은 하기 식 10에 의해 구할 수 있다.

[0192] $$Ei = \log_2 Wi + r_{1-2} \quad \ldots 식\ 10$$

[0193] 여기서, Wi는 i번째의 miRNA를 포착하기 위한 프로브 고정화 영역으로부터의 시그널 측정값이다.

[0194] 이것과는 반대로, 보정 계수로서 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값으로부터 고정 수치를 감산한 차를 사용하는 경우, 즉 상기 식 3'의 경우에는 검체에 있어서의 각 표적 miRNA 발현량의 측정값의 로그값으로부터 보정 계수를 감산함으로써 각 검체에 관한 표적 miRNA 발현량의 보정이 실시된다. 이 경우의 보정을 식으로 나타내면, 어느 「보정되는 검체」에 있어서의 i번째의 표적 miRNA의 보정이 완료된 발현량(Ei)은 하기 식 10'에 의해 구할 수 있다.

[0195] $$Ei = \log_2 Wi - r_{1-2}' \quad \ldots 식\ 10'$$

[0196] Wi의 정의는 상기 식 10과 같다.

[0197] <보정 공정-2>

[0198] 보정 공정-2는 보정 계수 취득 공정-2에서 얻어진 보정 계수를 이용하여 표적 miRNA의 발현량의 보정을 행하는 방법이고, 표적 miRNA의 발현량을 보정 계수에서 제산 또는 상기 발현량에 보정 계수를 승산함으로써 보정을 행한다. 본 공정에도, 보정 계수 취득 공정-2의 기준 검체 취득법과 고정 수치 보정법에 각각 대응한 2가지의 보정 방법이 있다.

[0199] 2-1. 기준 검체 취득법

[0200] 제 2 이후의 검체에 있어서의 표적 miRNA의 발현량의 보정은 제 2 이후의 검체를 위한 보정 계수를 각각 사용하여 실시한다. 즉, 제 2 검체에 대해서 표적 miRNA의 발현량을 보정하는 경우에는 제 2 검체를 위한 보정 계수($c2_{2-1}$ 또는 $c2_{2-1}'$)를 사용하고, 제 3 검체에 대해서 표적 miRNA 발현량을 보정하는 경우에는 제 3 검체를 위한 보정 계수($c3_{2-1}$ 또는 $c3_{2-1}'$)를 사용한다.

[0201] 보정 계수로서 보정되는 제 2 이후의 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값을 분모로 하고 기준 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값을 분자로 한 비를 사용하는 경우, 즉 상기 식 5의 경우에는 제 2 이후의 검체에 있어서의 각 표적 miRNA 발현량의 측정값의 로그값에 보정 계수를 승산함으로써 제 2 이후의 각 검체에 관한 표적 miRNA의 발현량의 보정이 실시된다. 이 경우의 보정을 식으로 나타내면, 어느 「보정되는 검체」에 있어서의 i번째의 표적 miRNA의 보정이 완료된 발현량(Ei)은 하기 식 11에 의해 구할 수 있다.

[0202] $$Ei = \log_2 Wi \times c2_{2-1} \quad \ldots 식\ 11$$

[0203] 여기서, Wi는 i번째의 miRNA를 포착하기 위한 프로브 고정화 영역으로부터의 시그널 측정값이다.

[0204] 이것과는 반대로, 보정 계수로서 기준 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값을 분모로 하고 제2 이후의 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값을 분자로 한 비를 사용하는 경우, 즉 상기 식 5'의 경우에는 제 2 이후의 검체에 있어서의 각 표적 miRNA 발현량의 측정값의 로그값을 보정 계수로 제산함으로써 제 2 이후의 각 검체에 관한 표적 miRNA의 발현량의 보정이 실시된다. 이 경우의 보정을 식으로 나타내면, 어느 「보정되는 검체」에 있어서의 i번째의 miRNA의 보정이 완료된 발현량(Ei)은 하기 식 11'에 의해 구할 수 있다.

[0205] $$Ei = \log_2 Wi \div c2_{2-1}' \quad \ldots 식\ 11'$$

[0206] 여기서, Wi의 정의는 상기 식 11과 같다.

[0207] 제 2 검체에 있어서 측정된 표적 miRNA 발현량을 보정하는 것이면, 해당 제 2 검체에 있어서의 각 표적 miRNA 발현량의 측정값의 로그값에 $c2_{2-1}$을 제산하거나 또는 $c2_{2-1}'$을 승산하면 좋다. 제 3 이후의 검체에 대해서도 마찬가지이다. 식 5 및 식 11의 순서에서도, 식 5' 및 식 11'의 순서에서도, 최종적으로 얻어지는 보정이 완료된 표적 miRNA의 발현량(Ei)의 값은 같다. 또한, 기준 검체로 한 제 1 검체의 대표값과 본 방법에 있어서의 고정 수치(기준값)의 비는 당연 1이지만, 프로그램의 구성상 제 1 검체의 표적 miRNA 발현량에 1을 승산 또는 상기 표적 miRNA 발현량을 1로 제산하는 계산을 실시해도 상관없다.

[0208] 2-2. 고정 수치 보정법

[0209] 표적 miRNA 발현량의 보정은 고정 수치(기준값)과의 비에 의해 얻어진 보정 계수를 각각 사용하여 실시한다. 즉, 어느 검체에 대해서 표적 miRNA 발현량을 보정하는 경우에는 그 검체를 위한 보정 계수($r_{2-2}$ 또는 $r_{2-2}'$)를 사용한다.

[0210] 보정 계수로서 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값을 분모로 하고 기준값을 분자로 한 비를 사용하는 경우, 즉 상기 식 7의 경우에는 검체에 있어서의 각 표적 miRNA의 발현량의 측정값의 로그값에 보정 계수를 승산함으로써 각 검체에 관한 표적 miRNA의 발현량의 보정이 실시된다. 이 경우의 보정을 식으로 나타내면, 어느 「보정되는 검체」에 있어서의 i번째의 표적 miRNA의 보정이 완료된 발현량(Ei)은 하기 식 12에 의해 구할 수 있다.

[0211] $$Ei = \log_2 Wi \times r_{2-2} \quad \ldots 식\ 12$$

[0212] 여기서, Wi는 i번째의 miRNA를 포착하기 위한 프로브 고정화 영역으로부터의 시그널 측정값이다.

[0213] 이것과는 반대로, 보정 계수로서 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값을 분모로 하고 기준값을 분자로 한 비를 사용하는 경우, 즉 상기 식 7'의 경우에는 검체에 있어서의 각 표적 miRNA 발현량의 측정값의 로그값을 보정 계수로 제산함으로써 각 검체에 관한 표적 miRNA 발현량의 보정이 실시된다. 이 경우의 보정을 식으로 나타내면, 어느 「보정되는 검체」에 있어서의 i번째의 표적 miRNA의 보정이 완료된 발현량(Ei)은 하기 식 12'에 의해 구할 수 있다.

[0214] $$Ei = \log_2 Wi \div r_{2-2'} \quad \cdots \text{식 } 12'$$

[0215] 여기서, Wi의 정의는 상기 식 12와 같다.

[0216] <비교 해석 공정>

[0217] 보정이 완료된 표적 miRNA 발현량에 의해 복수의 체액 검체 사이에서 표적 miRNA 발현량을 대비한다. 기준 검체 취득법에 의해 보정이 실시되는 경우에는 기준 검체로 한 제 1 검체의 표적 miRNA 발현량은 보정을 받지 않기 때문에, 예를 들면 제 1 검체와 제 2 검체 사이의 대비는 보정되지 않은 제 1 검체의 표적 miRNA 발현량과, 보정이 완료된 제 2 검체의 표적 miRNA 발현량 사이에서의 대비가 되지만, 대비하는 검체 중 적어도 1개는 반드시 보정된 검체가 된다. 따라서, 「보정이 완료된 표적 miRNA 발현량에 의해 복수의 체액 검체 사이에서 표적 miRNA 발현량을 대비한다」라는 단어에는 보정되지 않은 기준 검체와 보정된 것 외의 검체 사이에서 대비하는 형태도 포함된다.

[0218] 비교 해석 공정 자체는 종래법과 마찬가지로 행할 수 있다. 예를 들면, 스캐터 플롯이라고 불리는 발현량 데이터의 살포도로서 비교 해석 결과를 나타낼 수 있다. 비교해야 할 검체가 3개인 경우, 예를 들면 3개 중 어느 하나의 검체와 나머지의 각 검체를 비교 해석한 스캐터 플롯을 2개(예를 들면, 제 1 검체-제 2 검체 사이의 스캐터 플롯과 제 1 검체-제 3 검체 사이의 스캐터 플롯)를 작성하면 좋고, 필요에 따라서 나머지의 2개의 검체 사이(상술의 예인 경우에는 제 2 검체-제 3 검체 사이)에서 비교 해석한 스캐터 플롯을 더 작성해도 좋다. 4개 이상의 검체의 비교 해석도 마찬가지로 행할 수 있다. 또한, 3검체의 비교 해석이면 3차원적으로 스캐터 플롯을 작성할 수도 있다. 기준 검체 취득법의 경우이어도, 반드시 기준 검체와 다른 2검체를 각각 비교해야 하는 것은 아니고, 예를 들면 제 2 검체-기준 검체 사이의 비교와 제 2 검체-제 3 검체 사이의 비교를 행하게 해도 좋다.

[0219] 또한, 보정이 완료된 표적 miRNA 발현량에 의해 어느 하나의 검체와 나머지의 다른 검체 사이에서 표적 miRNA의 발현량의 차를 계산하고, 그 차를 가지고 로그화된 변화 배율(fold-change)로서 비교 해석 결과를 나타내도 좋다. 예를 들면, 기준 검체에 있어서의 표적 miRNA의 발현량(기준 검체 취득법의 경우) 또는 제 1 검체에 있어서의 보정이 완료된 표적 miRNA의 발현량(고정 수치 보정법의 경우)과, 제 2 이후의 검체에 있어서의 보정이 완료된 표적 miRNA의 발현량과의 차를 계산해도 좋다. 이 경우도 상기의 경우와 마찬가지로, 제 1 검체와 다른 검체의 차를 계산하는 것으로 한정되지 않고, 제 2 이후의 검체 중 어느 하나와 다른 검체의 차를 계산하는 것으로 해도 좋다.

[0220] 본 발명의 miRNA 발현 해석 장치는 상기 본 발명의 비교 해석법을 실시하는 장치로서,

[0221] 복수의 체액 검체에 대해서 측정된, 표적 miRNA의 발현량의 측정값 및 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값을 기억하는 기억 수단;

[0222] 각 체액 검체에 대해서, 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값으로부터 대표값, 바람직하게는 로그값으로 나타내어진 대표값을 취득하는 대표값 취득 수단;

[0223] 보정용 내인성 miRNA의 발현량에 관해서 임의로 설정된 기준값과, 상기 대표값 취득 수단에 의해 취득된 각 체액 검체의 대표값의 차 또는 비를, 각 체액 검체를 위한 표적 miRNA 발현량의 보정 계수로서 각각 취득하는 보정 계수 취득 수단;

[0224] 상기 보정 계수 취득 수단에 의해 취득된 각 보정 계수를 이용하여, 해당 각 체액 검체에 있어서 측정된 표적 miRNA의 발현량을 보정하는 보정 수단; 및

[0225] 보정이 완료된 표적 miRNA 발현량에 의해 적어도 2개의 체액 검체 사이에서 표적 miRNA 발현량을 대비한 결과를 출력하는 출력 수단을 포함한다.

[0226] 어느 하나의 양태에 있어서, 기준값은 임의로 선택된 제 1 검체(기준 검체)의 보정용 내인성 miRNA의 대표값이고, 제 2 이후의 체액 검체에 있어서 측정된 표적 miRNA의 발현량이 보정된다. 즉, 이 양태에 있어서, 본 발명

의 miRNA 발현 해석 장치는,

[0227] 복수의 검체의 각각에 대해서, 동시에 측정된 복수의 표적 miRNA의 발현량 및 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값을 기억하는 기억 수단과;

[0228] 각 체액 검체에 대해서, 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값으로부터 대표값, 바람직하게는 로그값으로 나타내어진 대표값을 취득하는 대표값 취득 수단과;

[0229] 임의로 선택된 제 1 검체를 기준 검체로 하고 기준 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값을 기준값으로 하여, 해당 기준값과 나머지의 제 2 이후의 검체의 보정용 내인성 miRNA 대표값의 차 또는 비를, 해당 제 2 이후의 검체를 위한 보정 계수로서 각각 취득하는 보정 계수 취득 수단과;

[0230] 보정 계수 취득 수단에 의해 취득된 제 2 이후의 검체를 위한 보정 계수를 각각 사용하여, 제 2 이후의 검체에 있어서 측정된 표적 miRNA의 발현량을 보정하는 보정 수단과;

[0231] 보정이 완료된 표적 miRNA 발현량에 의해 적어도 2개의 체액 검체 사이에서 표적 miRNA 발현량을 대비한 결과를 출력하는 출력 수단을 포함한다.

[0232] 다른 양태에 있어서, 기준값은 보정용 내인성 miRNA 발현량에 관해서 임의로 정해진 고정 수치이고, 제 1 검체를 포함하는 모든 검체에 대해서 표적 miRNA 발현량의 보정이 행해진다. 즉, 이 양태에 있어서, 본 발명의 miRNA 발현 해석 장치는,

[0233] 복수의 체액 검체의 각각에 대해서, 동시에 측정된 복수의 표적 miRNA의 발현량 및 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값을 기억하는 기억 수단과;

[0234] 각 검체에 대해서, 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값으로부터 대표값, 바람직하게는 로그값으로 나타내어진 대표값을 취득하는 대표값 취득 수단과;

[0235] 고정 수치를 기준값으로서 해당 기준값과 각 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값의 차 또는 비를, 해당 검체를 위한 보정 계수로서 각각 취득하는 보정 계수 취득 수단과;

[0236] 보정 계수 취득 수단에 의해 취득된 각 검체를 위한 보정 계수를 각각 사용하여, 각 검체에 있어서 측정된 표적 miRNA의 발현량을 보정하는 보정 수단과;

[0237] 보정이 완료된 표적 miRNA 발현량에 의해 적어도 2개의 체액 검체 사이에서 표적 miRNA 발현량을 대비한 결과를 출력하는 출력 수단을 포함한다.

[0238] 본 발명의 해석 장치의 일례의 구성의 개략을 나타내는 블록도를 도 2에 나타낸다. 본 발명의 해석 장치(10)는 입력부(110), 표시부(120), 출력부(130), 기억부(140), 제어부(150), 변환부(160), 해석부(170)를 구비한다. 또한, 도 3에는 본 발명에 의한 표적 miRNA의 발현량의 보정 처리의 플로우 차트의 일례를 나타낸다.

[0239] 입력부(110)는 해석 장치(10)의 동작에 관계되는 정보를 입력하는 수단이다. 키보드 등의 종래 공지의 입력 수단을 바람직하게 사용할 수 있다. 마이크로 어레이를 사용한 하이브리다이제이션 분석에 의해 얻어지는 발현량 데이터는, 예를 들면 본 발명의 장치와는 다른 스캐너 등의 판독 수단으로 판독하여 수치 데이터로 변환된 후, 입력부(110)로부터 해당 수치 데이터를 해석 장치(10)에 입력된다. 또는, 스캐너 등의 판독 수단이 본 발명의 해석 장치(10)에 포함되어 있어도 좋다(도시되지 않음).

[0240] 입력부(110)로부터 입력된 발현량 데이터, 또는 해석 장치(10)에 포함되는 판독 수단에 의해 판독되어 수치화된 발현량 데이터는 기억부(140)에 기억된다. 이 때, 기억부(140)는 복수의 검체의 각각에 대해서, 동시에 측정된 복수의 표적 miRNA의 발현량 및 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값을 기억하는 기억 수단으로서 작용한다.

[0241] 기억부(140)에 격납된 각 검체의 표적 miRNA 및 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값 데이터는 변환부(160)에 의해 밑이 2의 로그로 변환된다. 이어서, 해석부(170)에 의해 각 검체에 대해서, 로그 변환된 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값의 대표값이 취득된다. 대표값은 비교 해석법에 관한 설명에서 말한 대로, 예를 들면 하나 또는 복수의 보정용 내인성 miRNA 발현량의 평균값 또는 중앙값(1종류의 보정용 내인성 miRNA만을 보정에 사용하는 경우에도, 그것을 측정하기 위한 프로브 고정화 영역이 어레이 상에 복수개 존재하는 경우에는 대표값이 평균값 또는 중앙값이 될 수 있음), 또는 특정 1종류의 보정용 내인성 miRNA의 측정값일 수 있다.

[0242] 대표값이 취득된 후, 해석부(170)에 의해 기준 검체의 보정용 내인성 miRNA의 대표값과 제 2 이후의 검체의 보

정용 내인성 miRNA의 대표값의 차 또는 비가 산출되고, 해당 제 2 이후의 검체를 위한 보정 계수가 각각 취득된다. 보정 계수의 취득의 상세는 비교 해석법의 <보정 계수 취득 공정>에서 말한 대로이다. 또한, 프로그램의 구성상 기준 검체로 한 제 1 검체에 대해서도 보정 계수 0(차를 산출하는 경우) 또는 보정 계수 1(비를 산출하는 경우)을 취득하는 구성으로서도 상관없다.

[0243] 장치(10)에 있어서, 기준 검체의 선출은 장치(10)를 조작하는 사람이 입력부(110)로부터 임의인 1검체를 지정함으로써 행해져도 좋다. 또는, 장치(10)가 자동적으로 기준 검체가 되는 1검체를 선출해도 좋다. 예를 들면, 입력부(110)로부터 데이터가 입력되고, 기억부(140)에 최초에 데이터가 기억된 검체가 장치(10)에 의해 기준 검체로서 선출될 수 있다. 이 기준 검체의 선출 또는 입력의 스텝은 도 3에서는 편의적으로 대표값 취득 공정(S-3) 후에 위치되어 있지만, 이들로 한정되지 않고 보다 빠른 스텝에서, 예를 들면 데이터의 수용시에 실행되어도 좋다.

[0244] 이어서, 해석부(170)는 제 2 이후의 검체를 위한 보정 계수를 각각 사용하고, 제 2 이후의 검체에서 측정된 표적 miRNA의 발현량 데이터를 보정한다. 보정 조작의 상세는 비교 해석법의 <보정 공정>에서 말한 대로이다. 또한, 프로그램의 구성상 기준 검체로 한 제 1 검체의 표적 miRNA 발현량 데이터에 대해서도, 보정 계수 0(차를 산출하는 경우) 또는 보정 계수 1(비를 산출하는 경우)을 사용한 보정 조작을 실행하는 것으로서도 상관없다.

[0245] 이어서, 해석부(170)에 의해 기준 검체의 표적 miRNA 발현량과, 제 2 이후의 검체의 보정이 완료된 표적 miRNA 발현량의 대비가 행해진다. 대비의 결과는 출력부(130)에 의해 표시부(120)에 출력되어 표시된다. 또한, 프린터 등의 출력 장치나 기록 매체 등에 대비 결과가 출력될 수 있다. 또한, 출력부(130)는 네트워크를 통하여 장치 외부에 존재하는 데이터베이스 등의 외부 기억 장치에 대비 해석 결과를 출력하도록 구성할 수도 있다.

[0246] 기억부(140)는 복수의 표적 miRNA의 발현량 및 복수의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 측정값을 기억하는 것 이외에, 상기 각 공정에서 생기는 중간 해석 결과도 적당히 기억한다.

[0247] 장치(10)의 상기한 각종 동작은 제어부(150)에 의해 제어된다. 구체적으로는 도 2의 파선 화살표로 나타내는 바와 같이, 입력부(110), 표시부(120), 출력부(130), 기억부(140), 제어부(150), 변환부(160), 해석부(170)의 각 수단에 대하여 제어부(150)로부터 제어 정보가 출력되고, 이 제어 정보에 의거하여 각 수단이 제휴하여 동작하고, 장치(10) 전체가 동작한다.

[0248] 또한, 해당 해석 장치에 있어서는 기준 검체의 보정용 내인성 miRNA 대표값을 기준값으로서 이용하는 대신에, 장치(10)에 있어서 미리 지정한 고정 수치를 변환부(160) 등에 등록해 두고, 기준 검체에 있어서의 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 대표값을 대신하는 기준값으로서 이용해도 좋다. 이 경우의 방법의 상세는 비교 해석법의 <보정 계수 취득 공정>, <보정 공정>에서 말한 대로이다.

[0249] 또한, 본 발명은 컴퓨터를 상기한 해석 장치로서 기능시키기 위한 프로그램을 제공한다. 상기 프로그램은 구체적으로는 컴퓨터를 상기한 각 수단(즉, 기억 수단, 대표값 취득 수단, 보정 계수 취득 수단, 보정 수단, 및 출력 수단)으로서 기능시키기 위한 프로그램이다. 또한, 본 발명은 컴퓨터에 상기한 본 발명의 비교 해석 방법의 각 공정을 실행시키기 위한 프로그램을 제공한다. 비교 해석 방법에는 상기한 측정 공정, 대표값 취득 공정, 보정 계수 취득 공정, 및 보정 공정이 포함되고, 또한 보정이 완료된 표적 miRNA 발현량에 의해 복수의 체액 검체 사이에서 표적 miRNA 발현량을 대비하는 비교 해석 공정이 포함될 수 있다. 이들 프로그램은 마이크로 어레이 등에 의해 표적 miRNA의 발현량과 동시에 측정된 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 데이터를 이용하여 표적 miRNA의 발현량의 보정을 컴퓨터에 실행시키는 프로그램이다.

[0250] 또한, 본 발명은 상기 어느 하나의 프로그램을 기록한 컴퓨터 판독 가능한 기록 매체를 제공한다.

[0251] 「기록 매체」는 플렉시블 디스크, 광자기 디스크, ROM, EPROM, EEPROM, CD-ROM, MO, DVD 등의 임의인 「가반용 물리 매체」(비일과성 기록 매체)일 수 있다. 또는, LAN, WAN, 인터넷으로 대표되는 네트워크를 통하여 프로그램을 송신하는 경우의 통신회선이나 반송파와 같이, 단기에 프로그램을 유지하는 「통신 매체」일 수 있다.

[0252] 「프로그램」이란 임의의 언어나 기술 방법에 의해 기술된 데이터 처리 방법이고, 소스 코드나 이진 코드 등의 형식을 묻지 않는다. 또한, 「프로그램」은 반드시 단일적으로 구성되는 것으로 한정되지 않고, 복수의 모듈이나 라이브러리로서 분산 구성되는 것이나, OS(Operating System)로 대표되는 별개인 프로그램과 협동하여 그 기능을 달성하는 것도 포함한다. 또한, 실시형태에 나타낸 각 장치에 있어서 기록 매체를 판독하기 위한 구체적인 구성, 판독 순서, 또는 판독 후의 인스톨 순서 등에 대해서는 주지의 구성이나 순서를 사용할 수 있다.

[0253] 본 발명은 복수의 표적 miRNA를 포착하기 위한 프로브와 복수의 보정용 내인성 miRNA를 포착하기 위한 프로브가

고정화된 지지체를 포함한 miRNA 발현 해석용 칩을 제공한다. 해당 칩에 관한 바람직한 조건은 본 발명의 비교 해석 방법에 있어서 설명한 대로이다.

[0254] 본 발명에 있어서는 이하에 설명하는 서열번호 1~10으로 나타내어지는 miRNA 중 적어도 1개를 보정용 내인성 miRNA로서 사용한다.

[0255] 서열번호 1은 miRBase에 Accession No. MIMAT0023710에 등록되어 있는 hsa-miR-6085의 염기서열이다. 본 명세서에 있어서, 「miR-6085 유전자」또는 「miR-6085」라고 하는 용어는 서열번호 1에 기재된 hsa-miR-6085나 기타 생물종 호모로그 또는 오솔로그 등을 포함한다. hsa-miR-6085 유전자는 Voellenkle C 외, 2012년, RNA, 18권, p.472-484에 기재되는 방법에 의해 얻을 수 있다.

[0256] 서열번호 2는 miRBase에 Accession No. MIMAT0022941에 등록되어 있는 hsa-miR-1227-5p의 염기서열이다. 본 명세서에 있어서, 「miR-1227-5p 유전자」또는 「miR-1227-5p」라고 하는 용어는 서열번호 2에 기재된 hsa-miR-1227-5p나 기타 생 물종 호모로그 또는 오솔로그 등을 포함한다. hsa-miR-1227-5p 유전자는 Berezikov E 외, 2007년, Molecular Cell, 28권, p.328-336에 기재되는 방법에 의해 얻을 수 있다.

[0257] 서열번호 3은 miRBase에 Accession No. MIMAT0013802에 등록되어 있는 hsa-miR-2861의 염기서열이다. 본 명세서에 있어서, 「miR-2861 유전자」또는 「miR-2861」이라고 하는 용어는 서열번호 3에 기재된 hsa-miR-2861이나 기타 생물종 호모로그 또는 오솔로그 등을 포함한다. hsa-miR-2861 유전자는 Li H 외, 2009년, Journal of Clinical Investigation, 119권, p.3666-3677에 기재되는 방법에 의해 얻을 수 있다.

[0258] 서열번호 4는 miRBase에 Accession No. MIMAT0004609에 등록되어 있는 hsa-miR-149-3p의 염기서열이다. 본 명세서에 있어서, 「miR-149-3p 유전자」또는 「miR-149-3p」라고 하는 용어는 서열번호 4에 기재된 hsa-miR-149-3p나 기타 생물종 호모로그 또는 오솔로그 등을 포함한다. hsa-miR-149-3p 유전자는 Lagos-Quintana M 외, 2002년, Current Biology, 12권, p.735-739에 기재되는 방법에 의해 얻을 수 있다.

[0259] 서열번호 5는 miRBase에 Accession No. MIMAT0018987에 등록되어 있는 hsa-miR-4463의 염기서열이다. 본 명세서에 있어서, 「miR-4463 유전자」또는 「miR-4463」이라고 하는 용어는 서열번호 5에 기재된 hsa-miR-4463이나 기타 생물종 호모로그 또는 오솔로그 등을 포함한다. hsa-miR-4463 유전자는 Jima DD 외, 2010년, Blood, 116권, p.e118-e127에 기재되는 방법에 의해 얻을 수 있다.

[0260] 서열번호 6은 miRBase에 Accession No. MIMAT0019045에 등록되어 있는 hsa-miR-4508의 염기서열이다. 본 명세서에 있어서, 「miR-4508 유전자」또는 「miR-4508」이라고 하는 용어는 서열번호 6에 기재된 hsa-miR-4508이나 기타 생물종 호모로그 또는 오솔로그 등을 포함한다. hsa-miR-4508 유전자는 Jima DD 외, 2010년, Blood, 116권, p.e118-e127에 기재되는 방법에 의해 얻을 수 있다.

[0261] 서열번호 7은 miRBase에 Accession No. MIMAT0023715에 등록되어 있는 hsa-miR-6090의 염기서열이다. 본 명세서에 있어서, 「miR-6090 유전자」또는 「miR-6090」이라고 하는 용어는 서열번호 7에 기재된 hsa-miR-6090나 기타 생물종 호모로그 또는 오솔로그 등을 포함한다. hsa-miR-6090 유전자는 Yoo JK 외, 2012년, Stem Cells and Development, 21권, p.2049-2057에 기재되는 방법에 의해 얻을 수 있다.

[0262] 서열번호 8은 miRBase에 Accession No. MIMAT0027450에 등록되어 있는 hsa-miR-6775-5p의 염기서열이다. 본 명세서에 있어서, 「miR-6775-5p 유전자」또는 「miR-6775-5p」라고 하는 용어는 서열번호 8에 기재된 hsa-miR-6775-5p나 기타 생물종 호모로그 또는 오솔로그 등을 포함한다. hsa-miR-6775-5p 유전자는 Ladewig E 외, 2012년, Genome Research, 22권, p.1634-1645에 기재되는 방법에 의해 얻을 수 있다.

[0263] 서열번호 9는 miRBase에 Accession No. MIMAT0027506에 등록되어 있는 hsa-miR-6803-5p의 염기서열이다. 본 명세서에 있어서, 「miR-6803-5p 유전자」또는 「miR-6803-5p」라고 하는 용어는 서열번호 9에 기재된 hsa-miR-6803-5p나 기타 생물종 호모로그 또는 오솔로그 등을 포함한다. hsa-miR-6803-5p 유전자는 Ladewig E 외, 2012년, Genome Research, 22권, p.1634-1645에 기재되는 방법에 의해 얻을 수 있다.

[0264] 서열번호 10은 miRBase에 Accession No. MIMAT0023252에 등록되어 있는 hsa-miR-5787의 염기서열이다. 본 명세서에 있어서, 「miR-5787 유전자」또는 「miR-5787」이라고 하는 용어는 서열번호 10에 기재된 hsa-miR-5787이나 기타 생물종 호모로그 또는 오솔로그 등을 포함한다. hsa-miR-5787 유전자는 Yoo H 외, 2011년, Biochem Biophys Res Commun, 415권, p.567-572에 기재되는 방법에 의해 얻을 수 있다.

[0265] (실시예)

[0266] 이하, 본 발명을 실시예에 근거하여 보다 구체적으로 설명한다. 단, 본 발명은 하기 실시예로 한정되는 것은 아니다.

[0267] <실시예 1>

[0268] 이하의 과정에 의해, 본 발명에서 사용하는 보정용 내인성 miRNA를 선택했다.

[0269] (DNA 마이크로 어레이)

[0270] Toray Industries, Inc. 제작의 "3D-Gene" human miRNA oligo chip(miRBase release 20 대응)을 이용하여 이하의 실험을 행했다.

[0271] (검체 RNA의 조제)

[0272] 검체 RNA로서, 건상 인간 혈청 157검체로부터 "3D-Gene" RNA extraction reagent from liquid sample kit를 이용하여 추출한 RNA를 사용했다. 얻어진 검체 RNA를 "3D-Gene" miRNA Labeling kit(Toray Industries, Inc.)를 이용하여 표지했다. 표지한 검체 RNA는 "3D-Gene" miRNA chip(Toray Industries, Inc.)의 표준 프로토콜에 따라서 하이브리다이제이션과 세정을 행했다. 반응이 완료된 DNA 마이크로 어레이는 마이크로 어레이 스캐너(Toray Industries, Inc.)를 이용하여 형광 시그널을 검출했다. 스캐너의 설정은 레이저 출력 100%, 포토 멀티 플라이어의 전압 설정을 AUTO 설정으로 했다.

[0273] (miRNA 시그널값의 취득)

[0274] DNA 마이크로 어레이로부터 얻어진 miRNA의 시그널값을 밑이 2의 로그로 변환하고, RNA 추출 및 표지시에 첨가한 외부 표준 핵산에 의한 실험 오차 보정을 행했다.

[0275] (보정용 내인성 miRNA의 취득)

[0276] 얻어진 실험 오차 보정이 완료된 전체 157검체의 miRNA 시그널값에 대해서, geNorm법에 의한 검체간 최소 변동 miRNA의 추출을 행했다. GeNorm법은 Vandesompele 외에 의해 제창된 정량 RT-PCR법에 있어서의 내인성 하우스 키핑 유전자(레퍼런스 유전자)의 탐색법이다(Genome Biology 2002, 3: research0034-research0034.11). 대상으로 하는 검체에 특유의 내인성 하우스 키핑 유전자인 mRNA를 선발하는 방법으로서 사용된다. 구체적으로는 동일한 검체에 있어서의 모든 검출 대상의 유전자의 시그널값에 대해서, 2개의 유전자의 시그널값의 비를 모든 조합으로 계산한다. 다음에, 모든 유전자의 조합으로 얻어진 비의 값(A)에 대해서 검체 사이에서의 표준오차를 계산한다. 다음에, 특정 유전자에 대해서, 다른 유전자와의 관계로 얻어진 표준오차(V)의 총합(M)을 계산한다. 이 M값이 작은 유전자가 좋은 내인성 하우스 키핑 유전자라고 한다.

[0277] 한편으로, 상기 계산법에 의해 얻어지는 A 및 V는 시그널값이 작을수록 작은 값이 되고, 외관상 우수한 내인성 하우스 키핑 유전자가 되게 된다. 이번 사용한 DNA 마이크로 어레이는 miRBase release 20에 등록된 전체 miRNA를 망라적으로 검출하기 위해서 이 데이터를 이용하여 geNorm법을 실시하면, 시그널값이 작은 miRNA를 우선적으로 선택해버린다. 이러한 현상으로부터, 지금까지 geNorm법에 의해 DNA 마이크로 어레이 검출에 있어서의 내인성 하우스 키핑 유전자를 선택하는 것은 피해 왔다.

[0278] 본 실시예에서는 DNA 마이크로 어레이에서 검출된 miRNA 중, 시그널값이 전체 검체의 반수 이상으로 64를 초과하는 안정되게 검출되는 miRNA만을 geNorm법의 적용이 대상으로 하여 선택했다. 또한, geNorm법의 특성으로서 동일 검체 내에서의 유전자 발현량비에 의거하여 내인성 하우스 키핑 유전자를 선택하고 있음으로써, 크게 발현 패턴이 다른 검체 사이에서의 안정적 발현량을 나타내는 유전자 선택이 어려운 것을 근거로 하고, 미리 실험 오차 보정이 완료된 전체 157검체의 각 miRNA 시그널값에 대해서 CV(표준오차/평균값)를 얻고, CV가 0.1 이하인 miRNA만을 geNorm법의 대상으로서 선택했다. 그 결과, 2555종의 miRNA 검출용 프로브로부터 얻어진 시그널값 중, 281종의 miRNA를 검출하는 프로브의 시그널값을 geNorm법의 대상으로 하는 것이 적당하다고 생각되었다.

[0279] 실제로 geNorm법을 적용한 281종의 miRNA로부터 M값이 작은 내인성 하우스 키핑 유전자, 즉 보정용 내인성 miRNA로서 이용 가능한 10종을 선택했다. 이 10종의 보정용 내인성 miRNA의 서열번호, miRNA의 이름, miRBase에 등록된 MIMAT 번호, geNorm으로 계산한 M값, 염기서열, 및 배열 중 구아닌·시토신의 비율(GC%)을 표 1에 나타낸다.

표 1

[0280]

| 서열 번호 | miRNA명 | MIMAT ID | geNorm M값 | 염기서열 | GC% |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | hsa-miR-6085 | MIMAT0023710 | 0.058 | AAGGGGCUGGGGGAGCACA | 68 |
| 2 | hsa-miR-1227-5p | MIMAT0022941 | 0.058 | GUGGGGCCAGGCGGUGG | 82 |
| 3 | hsa-miR-2861 | MIMAT0013802 | 0.059 | GGGGCCUGGCGGUGGGCGG | 89 |
| 4 | hsa-miR-149-3p | MIMAT0004609 | 0.059 | AGGGAGGGACGGGGGCUGUGC | 76 |
| 5 | hsa-miR-4463 | MIMAT0018987 | 0.060 | GAGACUGGGGUGGGGCC | 76 |
| 6 | hsa-miR-4508 | MIMAT0019045 | 0.060 | GCGGGGCUGGGCGCGCG | 94 |
| 7 | hsa-miR-6090 | MIMAT0023715 | 0.061 | GGGGAGCGAGGGGCGGGGC | 89 |
| 8 | hsa-miR-6775-5p | MIMAT0027450 | 0.061 | UCGGGGCAUGGGGGAGGGAGGCUGG | 76 |
| 9 | hsa-miR-6803-5p | MIMAT0027506 | 0.062 | CUGGGGGUGGGGGGCUGGGCGU | 82 |
| 10 | hsa-miR-5787 | MIMAT0023252 | 0.063 | GGGCUGGGGCGCGGGGAGGU | 85 |

[0281] DNA 마이크로 어레이에 의한 miRNA의 검출은 표적의 miRNA와 그 표적 miRNA를 포착하기 위한 프로브에 의한 핵산 2중쇄를 형성하는 하이브리다이즈법에 의해 되기 위해서, 핵산 2중쇄를 안정화시키는 구아닌 및 시토신의 함유량이 높은 배열이 특히 안정적으로 DNA 마이크로 어레이에 의해 검출되는 것이 예상된다. 즉, 구아닌 및 시토신의 함유량이 높은 배열이 내인성 하우스 키핑 유전자로서 우선적으로 선택되면 일반적으로 상정된다. 그러나, 표 1에 나타내는 바와 같이 반드시 geNorm법에 의해 선택된 내인성 하우스 키핑 유전자(보정용 내인성 miRNA)는 구아닌 및 시토신의 함유율이 높다고 할 수 없었다. 반대로, 구아닌 및 시토신의 함유율이 높은 miRNA가 우선적으로 내인성 하우스 키핑 유전자(보정용 내인성 miRNA)가 되는 현상도 보이지 않았다.

[0282] <실시예 2>

[0283] 선택한 보정용 내인성 miRNA를 각각 단독으로 사용하여 복수의 체액 검체의 표적 RNA의 발현량 보정을 행했다.

[0284] RNA의 물질적 불안정함으로부터 RNA 발현량을 측정하는 경우, 그 품질이 다른, 즉 RNA의 분해도가 다른 검체 사이에서의 절대적인 발현량 비교를 요구하는 경우가 종종 있다. 검체가 체액인 경우에는 특히, 장시간 실온에 둔 검체 중의 표적 miRNA 발현량을 측정함으로써 하등의 결과를 얻으려고 하는 경우가 상정된다.

[0285] 이 때, 혈청 중에 포함되는 특정 보정용 내인성 miRNA의 양을 기준으로서 RNA의 분해도에 따른 보정을 행함으로써 RNA 품질에 관계없이, miRNA의 발현 프로파일(상대적인 miRNA의 발현량비)에 대해서 절대적인 검체간 비교가 가능하게 된다고 생각된다.

[0286] 본 실시예에서는 인간으로부터 채취한 혈청을 각종 조건으로 보존함으로써, 혈청 중에 포함되는 miRNA의 품질이 다양한 레벨에 있는 혈청을 작성하고, 이들 혈청 유래의 추출 RNA 검체의 측정값에 대하여 본 발명의 보정 방법을 적용했다.

[0287] (DNA 마이크로 어레이)

[0288] Toray Industries, Inc. 제작의 "3D-Gene" human miRNA oligo chip(miRBase release 20 대응, Toray Industries, Inc.)을 이용하여 이하의 실험을 행했다.

[0289] (검체 RNA의 조제)

[0290] 인간 혈청을 채혈, 혈청 분리 후에 하기 2종의 조건으로 정치하여 혈청에 포함되는 RNA의 품질을 변화시켰다. 2종의 조건을 이하에 나타낸다. 1: 혈청 분리 후 6시간 실온에 정치하여 RNA 추출을 행했다. 2: 혈청 분리 후 24시간 25℃에서 정치하여 RNA 추출을 행했다. 각각의 조건으로 작성된 혈청으로부터 "3D-Gene" RNA extraction reagent from liquid sample kit RNA를 이용하여 전체 RNA를 추출하여, 검체 RNA라고 했다.

[0291] 얻어진 검체 RNA를 각각 "3D-Gene" miRNA Labeling kit(Toray Industries, Inc.)를 이용하여 표지했다. 표지한 검체 RNA는 "3D-Gene" human miRNA oligo chip(Toray Industries, Inc.)의 표준 프로토콜에 따라서 하이브리다이제이션과 세정을 행했다. 반응이 완료된 DNA 마이크로 어레이는 마이크로 어레이 스캐너(Toray Industries,

Inc.)를 이용하여 형광 시그널을 검출했다. 스캐너의 설정은 레이저 출력 100%, 포토 멀티 플라이어의 전압 설정을 AUTO 설정으로 했다.

[0292] (miRNA 시그널값의 보정)

[0293] DNA 마이크로 어레이로부터 얻어진 miRNA의 시그널값을 밑이 2의 로그로 변환한 시그널값의 분포(즉, 미보정의 발현량 시그널값)를 도 4a-A에 나타낸다. 이에 대하여, 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA의 시그널값과, 미리 따로 설정한 고정 수치인 기준값에 의해 보정된, 보정이 완료된 시그널값의 분포를 도 4a~4b의 B~K에 나타낸다. 도면 중, Day-0(파선)이 조건 1의 검체 RNA이고, Day-1_25℃(실선)가 조건 2의 검체 RNA이다.

[0294] 여기서, 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA의 시그널값에 의한 보정은 이하에 나타내어지는 방법에 의해 행했다.

[0295] 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA에 대해서, 각각 기준값으로서 사용하는 고정 수치를 설정했다. 또한, 각 검체에 대해서, 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA의 시그널값을 밑이 2의 로그로 변환하고 이 변환 후의 시그널값을 대표값으로서 기준값의 비를 취하여(기준값/대표값), 보정 계수라고 했다. 보정 계수는 서열번호 1~10의 보정용 내인성 miRNA 각각에 대해서 설정되게 된다. 이들 보정 계수를 보정용 내인성 miRNA 마다에 각 검체의 모든 miRNA 시그널값에 승산함으로써 보정을 행했다.

[0296] 그 결과, 도 4B~K에 나타내어지는 대로, 서열번호 1~10으로 나타내어지는 보정용 내인성 miRNA 중 어느 하나를 단독으로 사용해도, 조건을 바꾼 2종의 검체의 발현 프로파일을 동일화시키는 것이 가능했다.

[0297] <실시예 3>

[0298] 실시예 2에 나타내는 바와 같이, 서열번호 1~10의 보정용 내인성 miRNA는 각각 단독으로도 충분한 표적 miRNA의 발현량의 보정 효과를 가지지만, 또한 이들을 조합함으로써 실험의 불비 등에 의한 일부의 보정용 내인성 miRNA 데이터의 손실이 일어난 경우에 의해서도, 이것을 보완할 수 있는 것이 상정된다. 그래서, 복수의 보정용 내인성 miRNA를 조합시켜 사용해서 표적 miRNA의 발현량의 보정을 행하고, 보정의 효과를 확인했다. 검체는 실시예 2와 동일한 것을 사용했다.

[0299] 서열번호 2, 4 및 5의 보정용 내인성 miRNA의 시그널값을 밑이 2의 로그로 변환하고, 이 변환 후의 시그널값의 평균값 또는 중앙값을 얻어 대표값으로 했다. 기준값으로서는 고정 수치를 사용했다. 실시예 2에서 조제한 2종의 검체를 포함하는 복수의 혈청 RNA 검체에 있어서의 3종류의 보정용 내인성 miRNA의 모든 발현량(로그 변환 후 시그널값)의 평균값을 구하고, 이 평균값을 고정 수치(기준값)로서 사용했다. 각 검체에 대해서, 보정용 내인성 miRNA의 대표값과 기준값의 비를 취하여(기준값/대표값), 해당 검체를 위한 보정 계수라고 했다. 이 보정 계수를 대응하는 각 검체의 모든 표적 miRNA 시그널값에 승산함으로써, 표적 miRNA 시그널값의 보정을 행했다.

[0300] 도 5는 보정용 내인성 miRNA의 발현량의 대표값으로서 로그 변환 후 시그널값의 평균값을 사용한 경우의 표적 miRNA의 보정이 완료된 시그널값의 분포이다. 서열번호 1~10의 보정용 내인성 miRNA를 각각 단독으로 사용하여 보정을 행한 실시예 2와 마찬가지로, 복수의 보정용 내인성 miRNA를 조합시켜 사용해서 보정을 행한 경우에도, 각 검체의 표적 miRNA의 발현 프로파일을 동일화시키는 것이 가능했다.

[0301] <실시예 4>

[0302] 실시예 3에 나타내는 바와 같이, 서열번호 1~10의 보정용 내인성 miRNA는 이들을 조합함으로써도 보정에 유용하다. 이 보정 효과에 대해서, 서열번호 1~10 중 어느 하나를 조합시켜도 동일한 효과를 나타내는 것을 확인했다. 검체는 실시예 2와 동일한 것을 사용했다.

[0303] 서열번호 2, 3, 4, 5 및 6의 보정용 내인성 miRNA의 시그널값을 밑이 2의 로그로 변환하고, 각 검체에 대해서 임의의 3종의 보정용 내인성 miRNA 변환 후의 시그널값의 평균값을 얻어, 해당 검체에 있어서의 대표값이라고 했다. 기준값은 고정 수치로 하여 대표값 취득에 사용한 3종의 보정용 내인성 miRNA의 로그 변환 후 시그널값의 실시예 2에서 조제한 2종의 검체를 포함하는 복수의 혈청 RNA 검체에서의 평균값을 고정 수치(기준값)로서 사용했다. 각 검체에 대해서, 대표값과 기준값의 비를 취하여(기준값/대표값), 해당 검체를 위한 보정 계수라고 했다. 이 보정 계수를 대응하는 각 검체의 모든 표적 miRNA 시그널값에 승산함으로써 각 검체의 miRNA 발현량의 보정을 행했다.

[0304] 보정이 완료된 시그널값의 분포를 도 8에 나타낸다. 도 8a-A는 미보정의 발현량 시그널값의 분포이고, 도 8a~

8b의 B~I가 보정이 완료된 발현량 시그널값의 분포이다. 서열번호 1~10의 보정용 내인성 miRNA를 각각 단독으로 사용하여 보정을 행한 실시예 2와 마찬가지로, 각 검체의 표적 miRNA의 발현 프로파일을 동일화시키는 것이 가능했다.

[0305] <비교예 1>

[0306] 실시예 1의 검토를 행했을 때, 혈청 RNA로부터 얻어진 검체 RNA를 각각 "3D-Gene" miRNA Labeling kit(Toray Industries, Inc.)를 이용하여 표지하는 스텝에 있어서, 외부로부터 첨가하는 기준 물질로서 2종의 합성 RNA 배열(각각 20mer, 스파이크 컨트롤 1 및 스파이크 컨트롤 2라고 칭함)을 첨가했다. 이들 합성 RNA 배열은 혈청 유래의 miRNA와 마찬가지로, 형광 표지되어 "3D-Gene" human miRNA oligo chip(Toray Industries, Inc.)에 의해 시그널량이 검출되었다. 그래서, 스파이크 컨트롤 1 및 스파이크 컨트롤 2의 각각 8점, 계 16점의 스폿으로부터 얻어진 시그널값을 밑이 2의 로그로 변환하고 그 중앙값을 얻어, 대표값이라고 했다. 이 대표값과, 미리 설정한 고정 수치(기준값)의 비를 취하여(기준값/각 검체의 대표값), 각 검체용 보정 계수를 얻었다. 이 보정 계수를 각 검체의 모든 miRNA 시그널값으로 승산함으로써 보정을 행했다. 보정 전의 시그널값의 분포를 도 6A에, 보정 후의 시그널값의 분포를 도 6B에 나타낸다. 표지시에 외부로부터 첨가된 스파이크 컨트롤에 의한 보정에서는 검체 중의 표적 miRNA의 시그널값은 충분히 보정되지 않는 것을 나타냈다.

[0307] <비교예 2>

[0308] 지금까지 선행예에 의해 miRNA의 발현량 보정용으로서 나타내고 있는 let-7d-5p, let-7g-5p, let-7i-5p, miR-16, miR-31, miR-223의 실시예 2에 있어서의 발현량을 표 2에 나타낸다. has-miR-16-5p 이외에는 얻어진 시그널값을 밑이 2의 로그로 변환한 경우, 0~5의 범위의 시그널만을 나타내지 않고, 발현량이 충분하지 않다는 이유로 전체 miRNA의 발현량을 보정하기 위한 기준에는 적합하지 않았다. 또한, hsa-miR-16-5p로 보정한 경우의 보정 시그널값의 분포를 도 7에 나타낸다. hsa-miR-16-5p의 발현량에 의한 보정에서는 검체 중의 표적 miRNA의 시그널값은 충분히 보정되지 않는 것을 나타냈다.

*표 2*

[0309]

| miRNA명 | ID | 발현량 Day0-1 | 발현량 Day-1_25℃ |
|---|---|---|---|
| hsa-let-7e-5p | MIMAT0000066 | 0.0 | 0.0 |
| hsa-let-7e-3p | MIMAT0004485 | 4.7 | 4.1 |
| hsa-let-7g-5p | MIMAT0000414 | 4.0 | 0.0 |
| hsa-let-7g-3p | MIMAT0004584 | 4.0 | 0.0 |
| hsa-let-7i-5p | MIMAT0000415 | 4.4 | 0.0 |
| hsa-let-7i-3p | MIMAT0004585 | 3.9 | 0.0 |
| hsa-miR-16-1-3p | MIMAT0004489 | 3.6 | 0.0 |
| hsa-miR-16-2-3p | MIMAT0004518 | 3.8 | 4.5 |
| hsa-miR-16-5p | MIMAT0000069 | 7.1 | 7.5 |
| hsa-miR-31-5p | MIMAT0000089 | 0.0 | 0.0 |
| hsa-miR-31-3p | MIMAT0004504 | 3.7 | 4.8 |
| hsa-miR-223-5p | MIMAT0004570 | 3.7 | 4.4 |
| hsa-miR-223-3p | MIMAT0000280 | 6.0 | 0.0 |

## *부호의 설명*

[0310] 10 장치 110 입력부

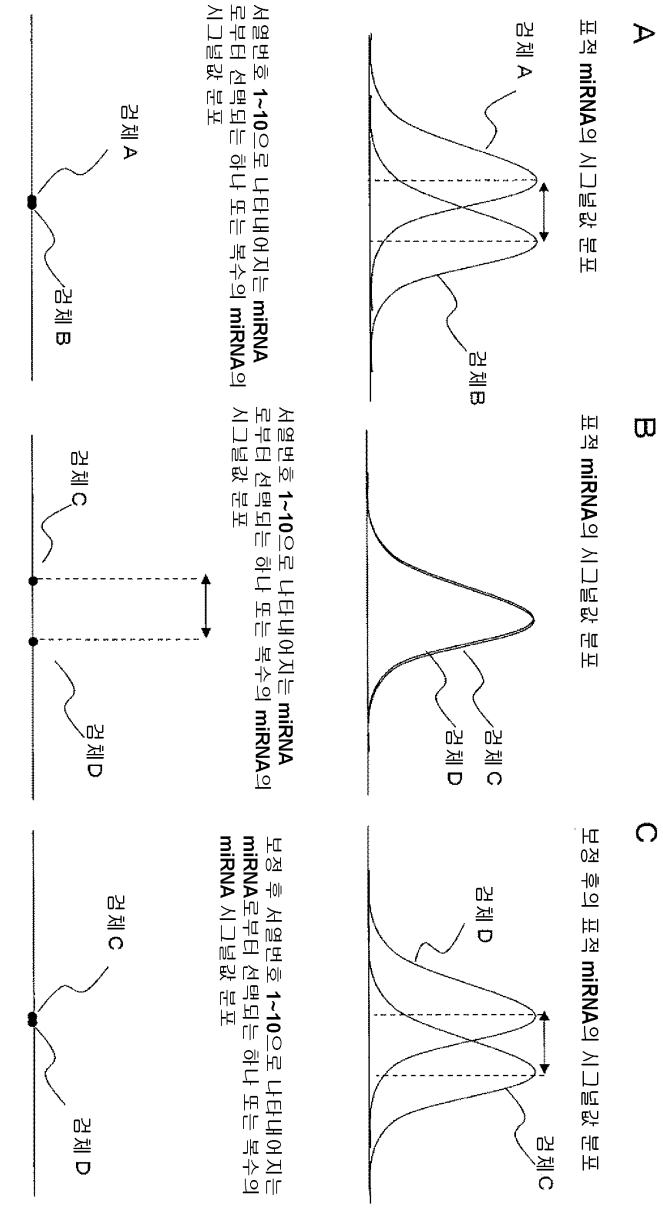
120 표시부 130 출력부

140 기억부 150 제어부

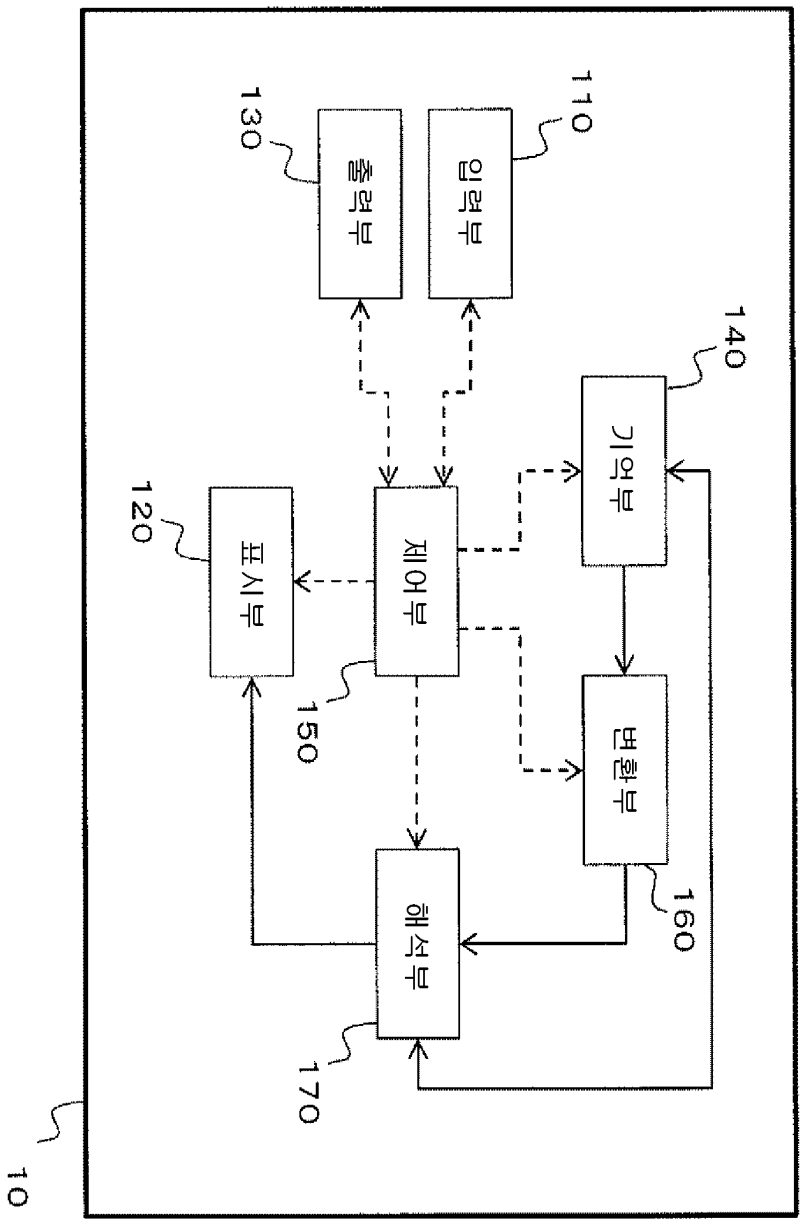
160 변환부 170 해석부

## 도면

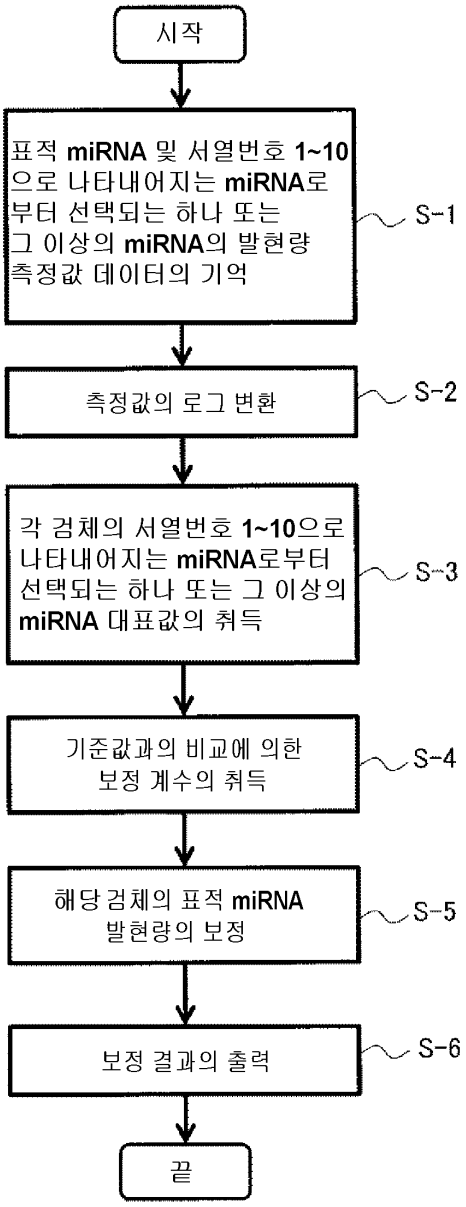
### 도면1


A
표적 miRNA의 시그널값 분포
검체 A
검체 B
서열번호 1~10으로 나타내어지는 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 miRNA의 시그널값 분포
검체 A
검체 B
B
표적 miRNA의 시그널값 분포
검체 C
검체 D
서열번호 1~10으로 나타내어지는 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 miRNA의 시그널값 분포
검체 C
검체 D
C
보정 후의 표적 miRNA의 시그널값 분포
검체 D
검체 C
보정 후 서열번호 1~10으로 나타내어지는 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 복수의 miRNA 시그널값 분포
검체 C
검체 D

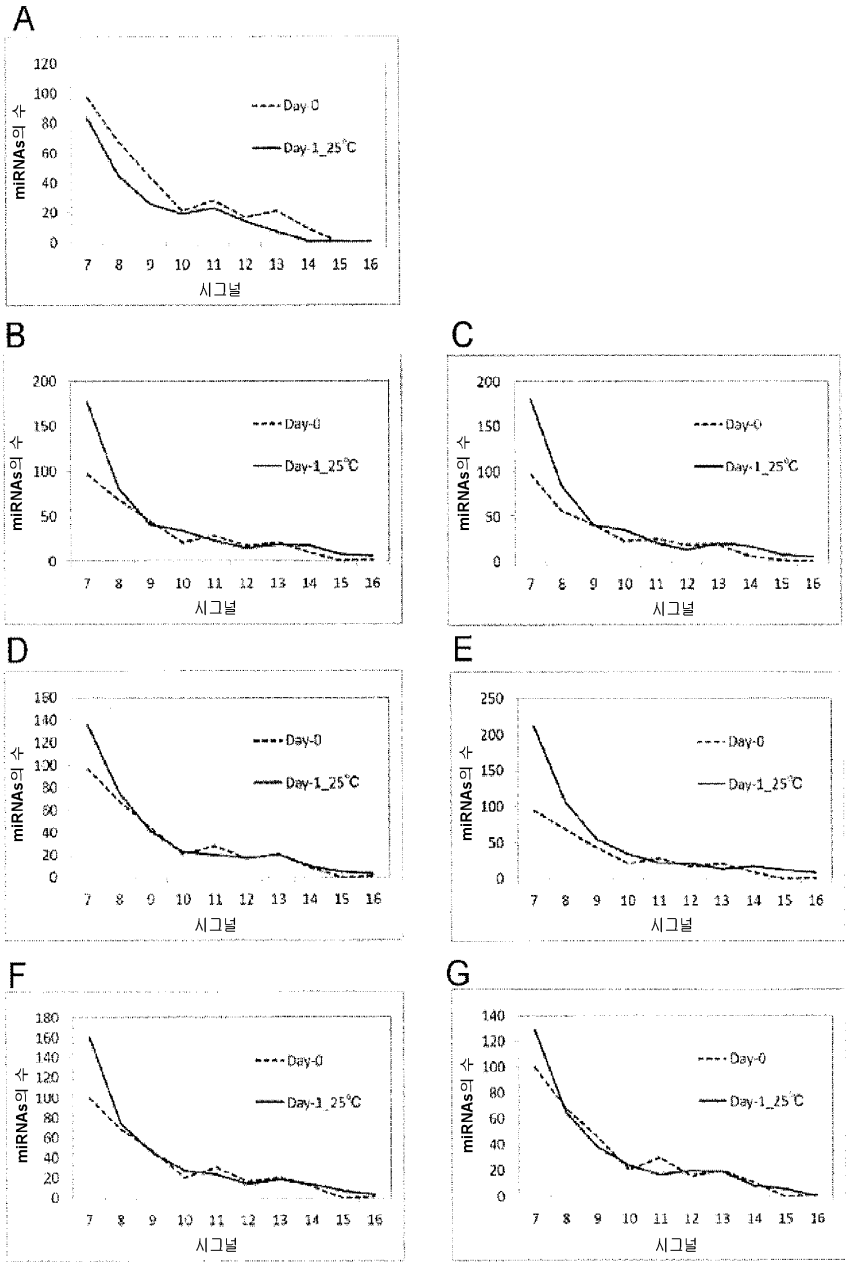
도면2



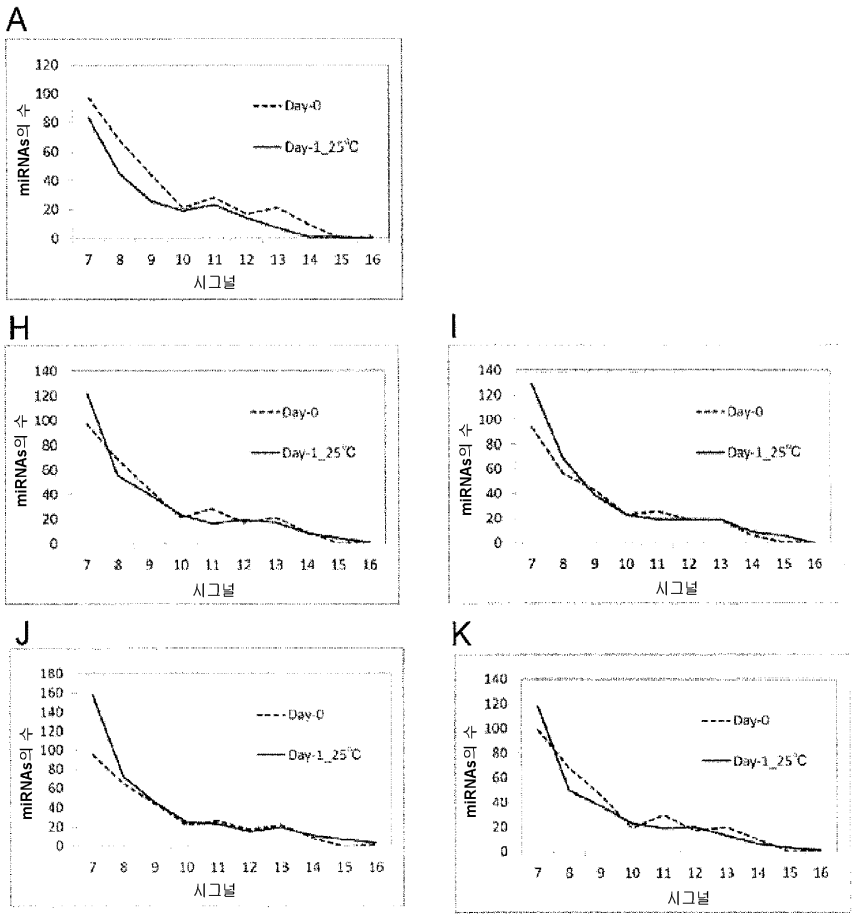
도면3


시작
표적 miRNA 및 서열번호 1~10으로 나타내어지는 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 miRNA의 발현량 측정값 데이터의 기억
S-1
측정값의 로그 변환
S-2
각 검체의 서열번호 1~10으로 나타내어지는 miRNA로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 miRNA 대표값의 취득
S-3
기준값과의 비교에 의한 보정 계수의 취득
S-4
해당 검체의 표적 miRNA 발현량의 보정
S-5
보정 결과의 출력
S-6
끝

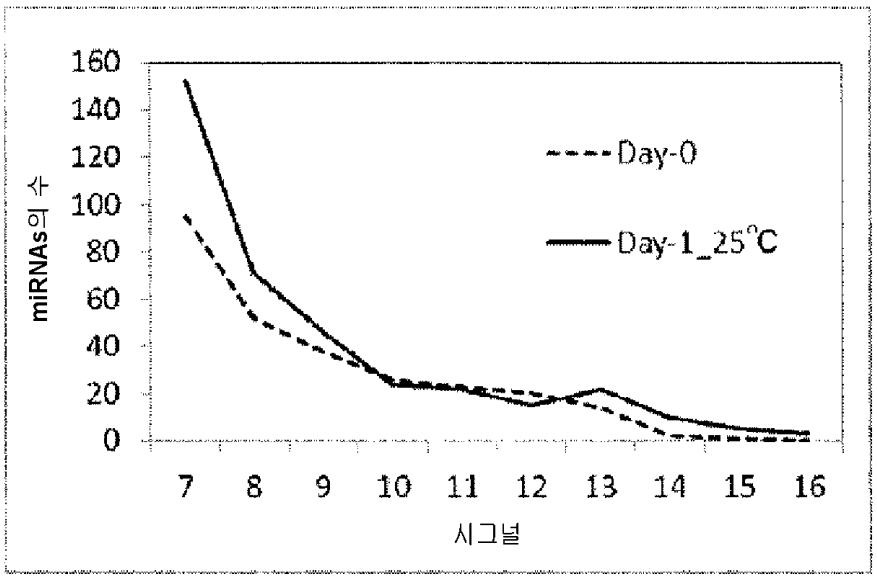
도면4a



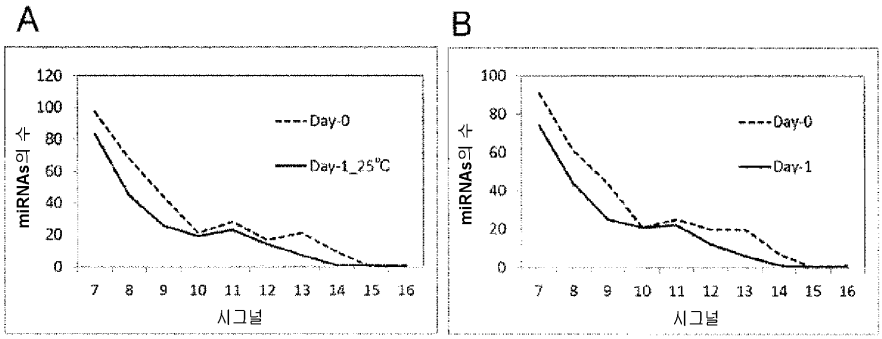
도면4b



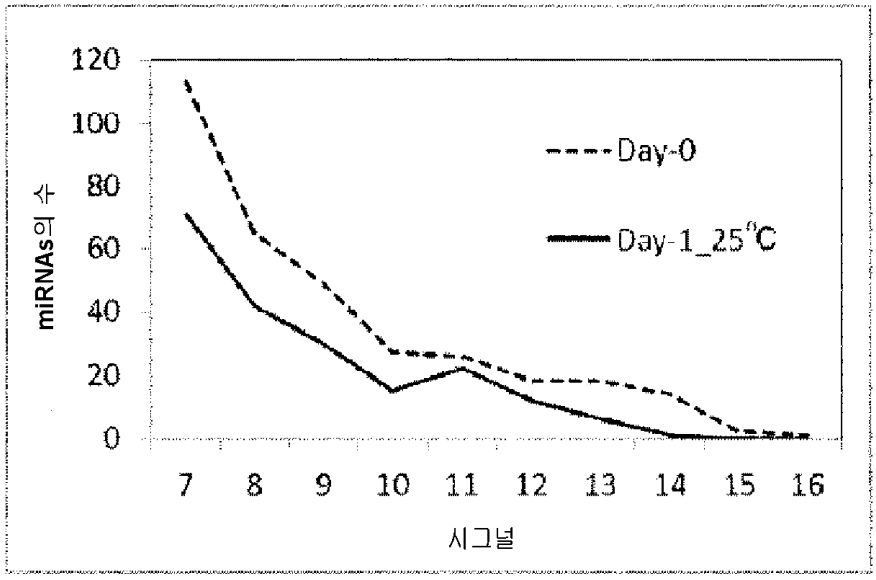

도면5



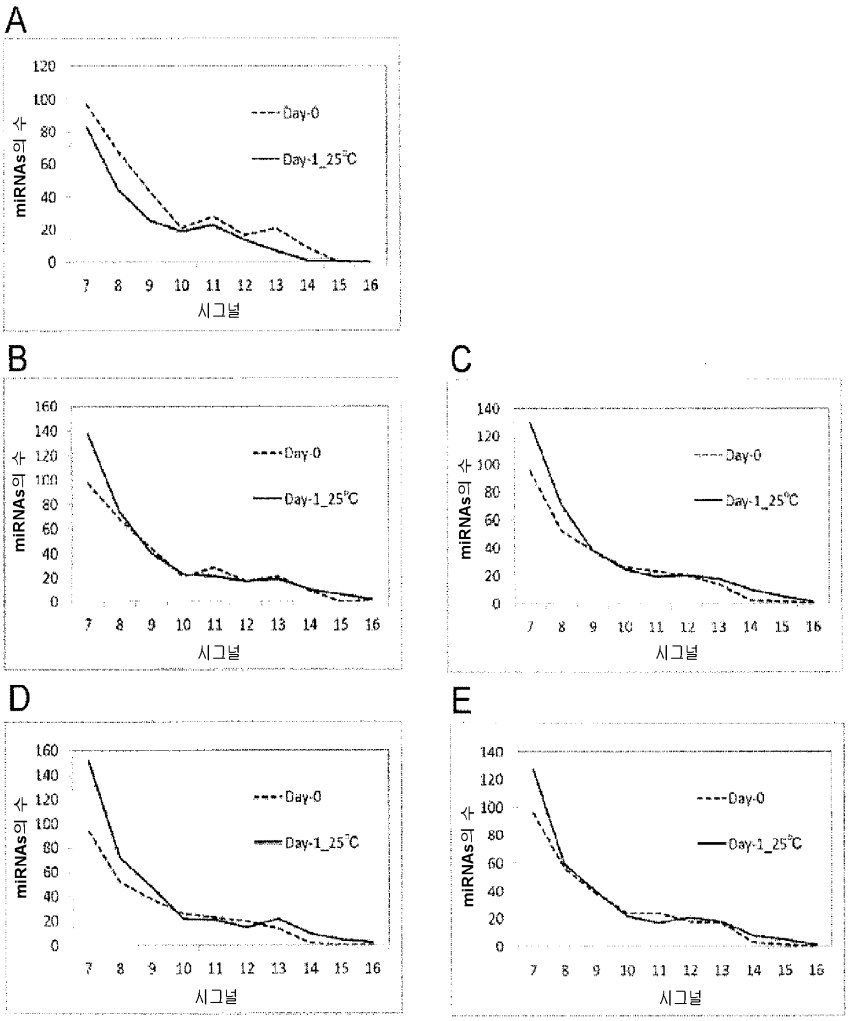
도면6


A
B
miRNAs의 수
시그널
Day-0
Day-1_25°C
Day-1

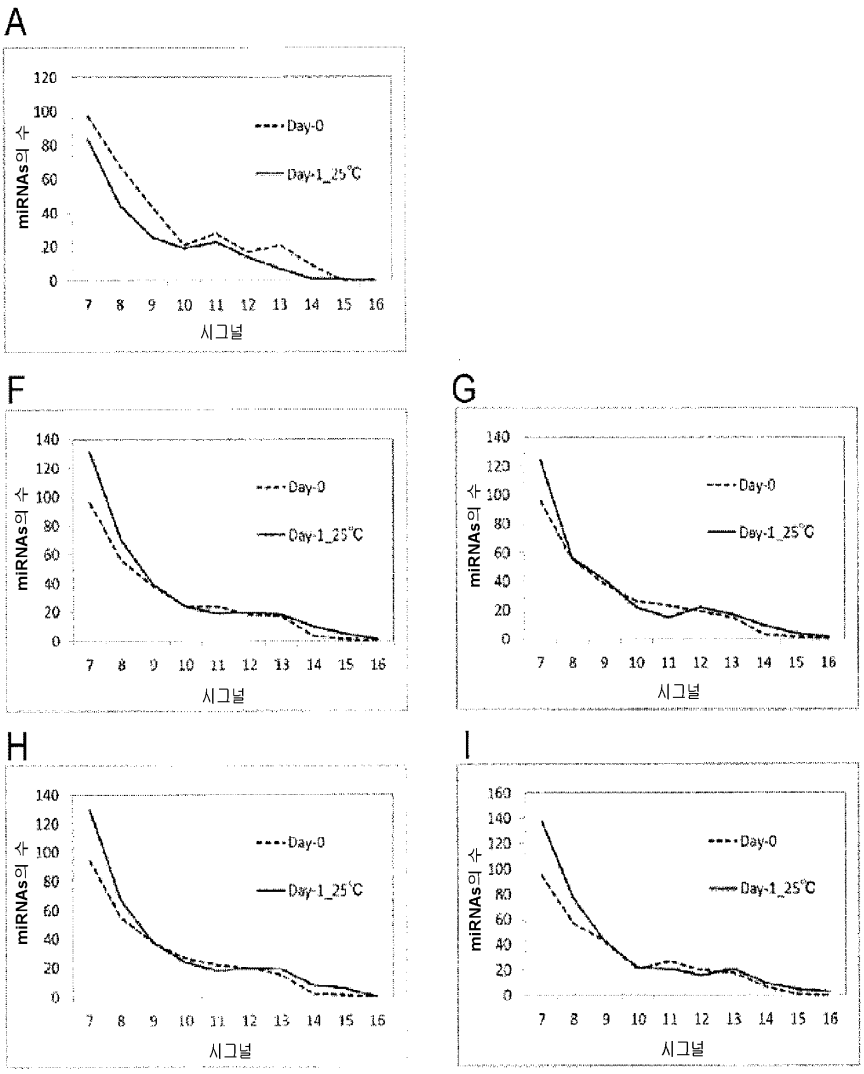
도면7


miRNAs의 수
시그널
Day-0
Day-1_25°C

도면8a



도면8b




서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Toray Industries, Inc.

<120> Method for comparative analysis of miRNA expression level and apparatus therefor

<130> PF543-PCT

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

aaggggcugg gggagcaca 19

<210> 2

<211> 17

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

guggggccag gcggugg 17

<210> 3

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

ggggccuggc ggugggcgg 19

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

agggagggac gggggcugug c 21

<210> 5

<211> 17

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

gagacugggg uggggcc 17

<210> 6

<211> 17

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

gcggggcugg gcgcgcg 17

<210> 7

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

ggggagcgag gggcggggc 19

<210> 8

<211> 25

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

ucggggcaug ggggagggag gcugg 25

<210> 9

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

cuggggggugg ggggcugggc gu 22

<210> 10

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

gggcuggggc gcggggaggu 20