



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0097954
(43) 공개일자 2017년08월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/544 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57438 (2013.01)
G01N 33/544 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0019694
(22) 출원일자 2016년02월19일
심사청구일자 2016년02월19일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
신윤용
서울특별시 서초구 반포대로 275, 122동 1401호 (반포동, 래미안퍼스티지아파트)
박소연
경기도 군포시 용호1로21번길 15, 108동 201호 (당동, 용호마을e편한세상)
(74) 대리인
안소영

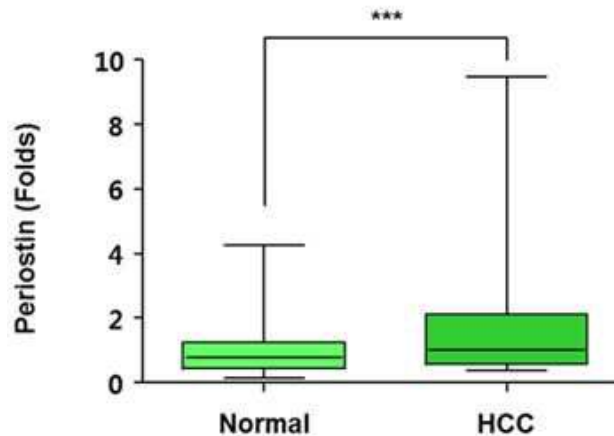
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 간암 진단 지표로서의 혈중 페리오스틴

(57) 요약

본 발명은 간암 진단 지표로서의 혈중 페리오스틴에 관한 것이다. 본 발명을 이용하면 신속하고 정확하게 혈액에서의 페리오스틴 발현 수준을 측정하여 간암 진단을 위한 정보를 제공할 수 있다. 따라서 간암의 조기 진단 및 치료 계획 수립에 중요하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 2333/46 (2013.01)

(72) 발명자

김민진

경기도 고양시 일산서구 후곡로 60, 305동 1502호
(일산동, 후곡마을3단지아파트)

박상아

광주광역시 남구 용대로74번길 11-1, 110동 301호
(봉선동, 골든트레빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C3313010014

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술연구개발사업-포스트게놈 다부처 유전체 사업

연구과제명 유전체 기반 혈중 암전이지표 기전연구 및 검증

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2014.12.01 ~ 2016.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

혈액에 포함된 페리오스틴(perioestin)의 발현 수준을 모세관 웨스턴 분석법으로 측정하는 제제를 포함하는 간암 진단용 조성물.

청구항 2

모세관 웨스턴 분석법으로 대상체의 혈액에서 페리오스틴의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 대상체에서 간암의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 혈액은 전혈, 혈청, 또는 혈장인, 대상체에서 간암의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 혈액은 희석된 것인, 대상체에서 간암의 진단을 위한 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 간암 진단 지표로서의 혈중 페리오스틴에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 간암은 간에서 일차적으로 발생한, 즉 원발성(原發性)의 악성 종양을 의미한다. 병리학적(조직적)으로 원발성 간암에는 간세포암종과 담관상피암종, 간모세포종, 혈관육종 등 다양한 종류가 있으며, 이중 간세포암종과 담관상피암종이 대부분을 차지한다. 2014년에 발표된 중앙암등록본부 자료에 따르면 간암은 전체 암 발생 중 7위를 차지했는데, 그 중에서 간세포암(hepatocellular carcinoma, HCC)이 74.8%로 가장 많았으며, 그다음이 담도암(cholangiocarcinoma) 16.0%이었다.

[0003] 간암은 증상이 초기에는 거의 없다가 서서히 나타나며, 이 때 증상도 배의 통증, 복부 팽만감, 피로감 등 소화 불량이나 체력저하와 혼동하기 쉬운 정도여서, 증상이 뚜렷해졌을 때는 이미 진행된 단계인 경우가 대부분이다. 간암은 일반적으로 만성 간염이나 간경변증 등의 지병과 관련이 있어, 다른 암종에서처럼 1기에서 4기까지로 나누는 데 그치지 않고 간 기능의 등급을 추가적 요소로 반영하여, 보편적으로 쓰이는 TNM 병기 분류법에 따라 간암의 개수와 크기, 혈관 침범 여부, 림프절(림프샘) 및 다른 장기로의 전이 여부 등을 종합적으로 고려하여 I, II, III, IV(IVA, IVB) 병기 중 하나로 구분한다(국가암정보센터-간암).

[0004] 페리오스틴(perioestin)은 세포외기질(Extracellular Matrix)의 90 kDa 크기의 단백질로, 혈관 신생 촉진 효과(국내 등록특허 제10-1584146호), 신경줄기세포 이동 유도 효과(국내 등록특허 제10-1339489호) 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 국내 등록특허 제10-1584146호 (발명의 명칭: 페리오스틴 단백질 또는 이의 단편을 유효성분으로 포함하는 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 조성물)

(특허문헌 0002) 국내 등록특허 제10-1339489호 (발명의 명칭: 페리오스틴의 신규한 용도)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 혈액에 포함된 페리오스틴(periostin)의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 간암 진단용 조성물을 제공한다.
- [0007] 본 발명에 있어서, 상기 간암은 간세포암(hepatocellular carcinoma, HCC)이다.
- [0008] 또한 본 발명은 모세관 웨스턴 분석법으로 대상체의 혈액에서 페리오스틴의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 대상체에서 간암의 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명자들은 혈액에서의 페리오스틴 발현 수준이 간암 여부와 상관 관계가 있다는 점을 발견하였다. 또한 모세관 웨스턴 분석법을 이용하면 혈액 자체를 시료로 하여 혈액 내의 페리오스틴 발현 수준을 간편하고 신속하게 측정할 수 있음을 발견하였다.
- [0010] 따라서 본 발명은 혈액에 포함된 페리오스틴(periostin)의 발현 수준을 모세관 웨스턴 분석법으로 측정하는 제제를 포함하는 간암 진단용 조성물을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 제제는 모세관 웨스턴 분석법으로 혈액에 존재하는 페리오스틴 발현 수준을 측정하는 제제가 될 수 있다.
- [0012] 모세관 웨스턴 분석법(capillary western blot assay)은 기존의 웨스턴 블롯팅 분석법의 단점을 극복하기 위하여 최근에 개발된 방법으로서, 전기영동 겔을 준비하고 영동된 단백질을 셀룰로오스 막으로 옮기는 과정이 생략된 분석법이다. 모세관 웨스턴 분석법에서는 시료를 모세관 내로 주입하면 모세관 내에서 크기에 따라 단백질이 분리되어 모세관 벽에 포획되며, 항체 및 시약으로 모세관을 세척함으로써 포획된 단백질 중 검출하고자 하는 단백질을 검출할 수 있다. 따라서 시료 손실이 적고 훨씬 더 간편한 방법으로 신속하게 혼재된 단백질의 분리 및 검출이 가능하다.
- [0013] 본 발명에 있어서, 혈액 시료를 모세관에 주입하고, 모세관 내에서 시료 내 단백질이 크기에 따라 분리되고 모세관 벽에 부동화되면, 페리오스틴에 특이적으로 결합하는 1차 항체 및 2차 항체를 주입하여 면역블롯에 따라 페리오스틴의 발현 수준을 정성적 및 정량적으로 측정할 수 있다. 기존의 방법은 혈액 시료 내의 페리오스틴 발현수준을 직접적으로 측정할 수 없었으나, 본 발명에 의하면 혈액 시료 자체를 주입하여 페리오스틴 발현수준을 측정할 수 있어 신속하고 간편하다. 또한 기존의 방법과 비교하여 적은 양의 페리오스틴도 정밀하게 검출할 수 있다.
- [0014] 또한 본 발명은 모세관 웨스턴 분석법으로 대상체의 혈액에서 페리오스틴의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 대상체에서 간암의 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일 구현예로서, 모세관 웨스턴 분석법으로 대상체의 혈액에서 페리오스틴의 발현 수준을 측정하였을 때 수치가 주목할 만한 정도로 높게 나타나면 간암 환자로 진단할 수 있다. 본 발명의 다른 구현예로서, 모세관 웨스턴 분석법으로 대상체의 혈액에서 페리오스틴의 발현 수준을 측정하였을 때 나타난 수치가 모세관 웨스턴 분석법으로 측정한 비-간암 환자의 혈액에서의 페리오스틴 발현 수준과 비교하여 유의하게 높거나, 또는 모세관 웨스턴 분석법으로 측정한 간암 환자의 혈액에서의 페리오스틴 발현 수준과 비교하여 동일 또는 유사한 경우, 그 대상체가 간암에 이환되었을 것으로 진단할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일 구현예로서, 본 발명의 방법은 비-간암 환자의 혈액 또는 간암 환자의 혈액에서 페리오스틴의 발현 수준을 모세관 웨스턴 분석법으로 측정하기 이전, 동시에, 또는 이후에 수행될 수 있다. 예를 들어, 간암 환자 또는 비-간암 환자의 혈액과 간암인지 여부를 확인하고자 하는 대상체의 혈액을 동시에 모세관 웨스턴 분석법으로 측정하여 페리오스틴 발현 수준을 비교할 수도 있고, 또는 간암 환자 또는 비-간암 환자의 혈액을 모세관 웨스턴 분석법으로 측정하여 얻은 페리오스틴 발현 수준을 결과를 데이터화 한 후, 간암 여부를 확인하고자 하는 대상체의 혈액에서 모세관 웨스턴 분석법으로 측정한 페리오스틴 발현 수준을 상기 데이터와 비교하는 것도 가능하다. 또한 대상체의 혈액에서 페리오스틴 발현 수준을 측정하고, 그 이후에 간암 환자 또는 비-간암 환자의 혈액에서 페리오스틴 발현 수준을 측정한 후, 결과를 서로 비교하는 것도 가능하다.

- [0017] 본 발명에 있어서, 상기 혈액은 전혈, 혈청, 또는 혈장일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 혈액은 혈액 회석액이 될 수 있다. 상기 회석액은 완충액, 예컨대 RIPA 완충액과 같은 완충액에 의해 회석된 것일 수 있다. 혈액의 회석 비율은 제한이 없으나, 예를 들어 1/2, 1/5, 1/10, 1/15, 1/20, 1/25, 1/30, 1/35, 1/40, 1/45, 1/50, 1/55, 1/60, 1/65, 1/70이 될 수 있으며, 예컨대 1/30, 1/40, 1/50이 될 수 있다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 상기 "대상체"는 인간을 포함하는 임의의 동물이 될 수 있다. 예를 들어, 상기 "대상체"는 인간이 될 수 있다. 또 다른 예로서, 상기 "대상체"는 임의의 실험동물, 예컨대 마우스, 랫트, 기니픽, 토끼, 돼지, 원숭이, 영장류 등이 될 수 있다. 본 발명의 대상체가 실험동물인 경우, 상기 실험동물은 암에 대한 다양한 동물 모델(형질전환 동물 모델, 이종이식 동물 모델, 동종동계이식 동물모델 등)이 될 수 있다. 그러나 본 발명의 방법의 대상체는 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 상기 방법에서, 상기 "대상체"는 간암인지 여부를 확인하고자 하는 임의의 대상체가 될 수 있다. 예를 들어, B형 간염 바이러스 간염, C형 간염 바이러스 감염, 알코올성 간염, 간경변증, 아플라톡신 B1 섭취자, 흡연자, 과체중 또는 비만인 자 등 간암의 위험요소를 가진 대상체가 본 발명의 방법에 의해 간암인지 여부를 확인하고자 하는 대상체가 될 수 있다. 또한 배의 통증, 복부 팽만감, 피로감 등 간암 의심증상이 있는 대상체 역시 본 발명의 방법에 의해 간암인지 여부를 확인하고자 하는 대상체가 될 수 있다. 40대 이상 남성과 같이 간암 발병률이 높은 집단에 속하는 자 역시 본 발명의 방법에 의해 간암인지 여부를 확인하고자 하는 대상체가 될 수 있다. 본 발명의 대상체는 상술한 것에 제한되지 않는다.
- [0021] 상기 방법에서, 상기 "비-간암 환자"는 간암에 이환되지 않은 환자를 의미하고, "간암 환자"는 간암에 이환된 환자를 의미한다. 비-간암 환자인지 또는 간암 환자인지 여부는 임의의 당업계에 알려진 진단 방법에 의해 확인된 것일 수 있다. 간암 환자의 혈중 페리오스틴 발현 수준은 비-간암 환자보다 유의하게 높다. 따라서 대상체의 혈중 페리오스틴 발현 수준이 비-간암 환자와 비교하여 유사하게 나타나거나 간암 환자와 비교하여 현저히 낮게 나타난 경우 그 대상체가 간암에 이환되지 않았다고 진단할 수 있다. 또한 대상체의 혈중 페리오스틴 발현 수준이 비-간암 환자와 비교하여 유의하게 높게 나타나거나 간암 환자와 유사하거나 더 높은 수준으로 나타난 경우 그 대상체가 간암에 이환되었다고 진단할 수 있다.
- [0022] 본 명세서에서 사용된 용어 "병기(stage)"는 암의 진행정도를 의미한다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예로서, 본 발명의 방법을 복수 회 수행함으로써 진단의 정확도를 높일 수 있다.

발명의 효과

- [0024] 본 발명을 이용하면 신속하고 정확하게 혈액에서의 페리오스틴 발현 수준을 측정하여 간암의 진단을 위한 정보를 제공할 수 있다. 따라서 간암의 조기 진단 및 치료 계획 수립에 중요하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 정상 대조군 및 간암 환자로부터 채취한 혈액 시료로 모세관 웨스턴 분석을 수행하는 과정을 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 인간 정상 대조군과 간암 환자군의 혈중 페리오스틴 농도 분포를 나타낸 도이다.
- 도 3은 인간 정상 대조군(Normal)과 I기 내지 IV기의 간암 환자군의 혈중 페리오스틴 농도 분포를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하에서 언급된 시약 및 용매는 특별한 언급이 없는 한 모두 ProteinSimple(San Jose, CA, USA)로부터 구입한 것이다.
- [0027] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0028] **실시예 1. 간암 환자 혈액 시료에서의 페리오스틴 발현 확인**
- [0029] 국립암센터, 고대구로병원, 인제대 부산백병원, 아주대병원, 및 계명대동산병원으로부터 총 519명의 정상 대조

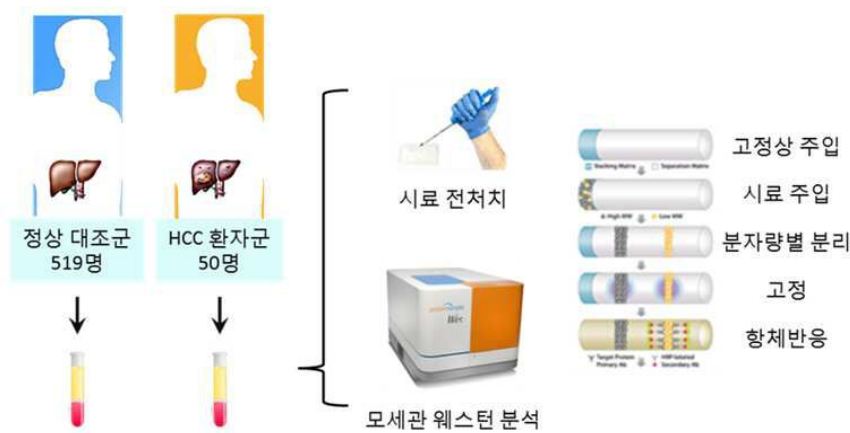
군의 혈액 시료 및 총 50명의 간암(Hepatocellular Carcinoma, HCC) 환자의 혈액 시료를 받아 준비하고, 평균 연령과 연령 분포도가 비슷하고, 기타 다른 질환이 없음을 확인하였으며, 식이에 대한 평가 수치가 비슷하도록 개체를 조정하였다. 모세관 웨스턴 분석법으로 혈중 페리오스틴의 발현량을 측정하였다(도 1).

[0030] 측정 결과, 정상 대조군의 혈액 시료에서는 평균적으로 775.8814 ng/ml의 페리오스틴이 측정된 반면, 정상 대조군에서는 490.9507 ng/ml의 페리오스틴이 측정되었다(도 2). 즉, 간암 환자에서 정상 대조군보다 혈중 페리오스틴 농도가 현저히 높았다.

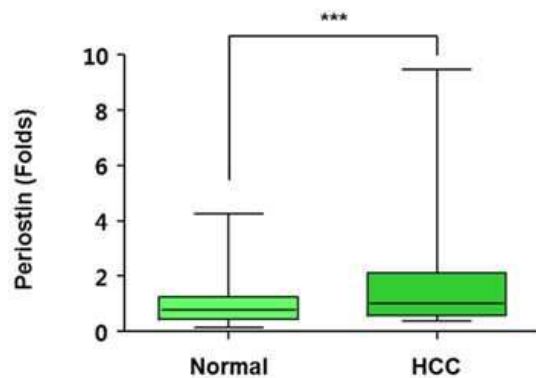
[0031] 또한 전이에 따른 혈중 페리오스틴 농도를 비교하였을 때, I기 내지 IV기의 간암 환자에서 모두 혈중 페리오스틴 농도가 정상 대조군보다 유의하게 높게 나타났으나, 병기에 따른 유의한 혈중 페리오스틴 발현량 차이는 나타나지 않았다(도 3). 따라서 혈중 페리오스틴 농도는 간암 전이에 대한 지표가 되지는 않지만, 간암 여부를 구별하는 지표로 활용할 수 있다.

도면

도면1



도면2



도면3

