(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0097950
(43) 공개일자 2017년08월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) *G01N 33/544* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57415 (2013.01)
G01N 33/544 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0019682
(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)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

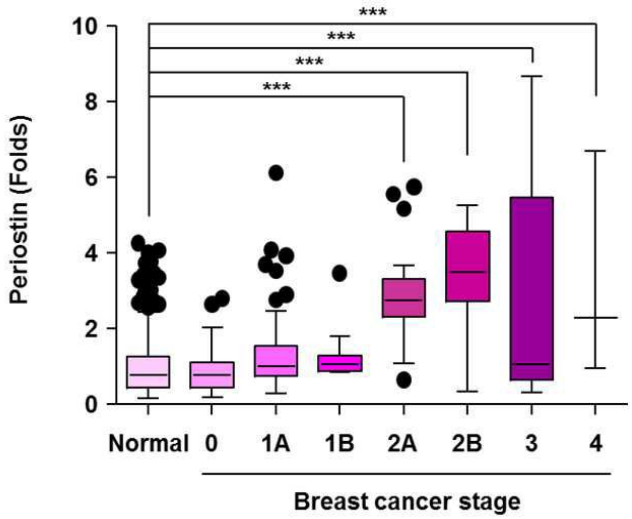
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **유방암 전이 진단 지표로서의 혈중 페리오스틴**

(57) 요 약

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

대 표 도 - 도19



(52) CPC특허분류
G01N 2333/46 (2013.01)
G01N 2800/56 (2013.01)
(72) 발명자
김민진
경기도 고양시 일산서구 후곡로 60, 305동 1502호
(일산동, 후곡마을3단지아파트)

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

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

명 세 서

청구범위

청구항 1

혈액에 포함된 페리오스틴(periostin)의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 유방암의 전이 여부 진단용 조성물.

청구항 2

모세관 웨스턴 분석법으로 유방암 환자의 혈액에서 페리오스틴의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 유방암의 전이 여부 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 혈액은 전혈, 혈청, 또는 혈장인 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 방법은 유방암의 폐로의 전이 진단을 위한 것인 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 방법은 유방암이 2A기 이상으로 진행되었는지 여부에 대한 정보를 제공하기 위한 것인 방법.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 방법은 유방암이 Basal 아형(subtype)인지 여부에 대한 정보를 제공하기 위한 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

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

배 경 기 술

[0002] 유방암의 생존율은 전이 여부에 따라 크게 달라진다. 2014년 12월 보건복지부 중앙암등록본부 발표자료에 따르면, 유방암의 병소가 원발 부위에 국한된 경우(Localized)에 발견하여 치료한 경우 5년 상대생존율은 97.7%에 달하고, 주변으로만 퍼진 경우(국소, Regional)에 발견하여 치료한 경우 90%에 달한다. 그러나 원발 부위로부터 먼 곳까지 림프관을 통해 전이된 경우(원격, Distant) 5년 상대생존율은 35.9%로 현저히 저하된다. 즉 유방암의 전이 여부를 조기에 진단하는 것이 매우 중요하다.

[0003] 유방암의 전이는 아형(subtype)에 따라 크게 달라진다. 예를 들어, 유방암을 분자 아형으로 분류했을 때 Basal 아형에 속하는 경우 전이 가능성이 매우 높다.

[0004] 페리오스틴(periostin)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 유방암의 전이 진단용 조성물을 제공한다.

[0007] 또한 본 발명은

[0008] 모세관 웨스턴 분석법으로 유방암 환자의 혈액에서 페리오스틴의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 유방암의 전이 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명자들은 혈액에서의 페리오스틴 발현 수준이 유방암의 전이와 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 측정하는 제제를 포함하는 유방암의 전이 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 유방암 환자의 혈액에서 페리오스틴의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 유방암의 전이 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명의 방법은 유방암 환자의 경우에서 전이가 일어나지 않은 경우는 혈중 페리오스틴 발현 수준이 낮으나 전이가 일어난 경우 현저히 높아지는 것에 기초한 것이다. 유방암 환자는 비-유방암 환자보다 혈중 페리오스틴 발현 수준이 다소 높게 나타나는데, 전이가 일어나면 혈중 페리오스틴 발현이 전이가 일어나지 않은 경우보다 현저히 높게 나타난다.

[0016] 본 발명의 일 구현예로서, 모세관 웨스턴 분석법으로 유방암 환자의 혈액에서 페리오스틴의 발현 수준을 측정하였을 때 수치가 주목할 만한 정도로 높게 나타나면 전이가 일어났을 것으로 진단할 수 있다. 본 발명의 다른 구현예로서, 모세관 웨스턴 분석법으로 유방암 환자의 혈액에서 페리오스틴의 발현 수준을 측정하였을 때 나타난 수치가 모세관 웨스턴 분석법으로 전이가 일어나지 않은 유방암 환자의 혈액에서 페리오스틴의 발현 수준을 측정하였을 때 나타난 수치보다 유의하게 높으면 전이가 일어났을 것으로 진단할 수 있다. 이 때 모세관 웨스턴 분석법 측정 결과 나타난 전이가 일어나지 않은 유방암 환자의 혈액 내 페리오스틴의 발현 수준은 본 발명의 방법을 실시하기 이전, 동시에 또는 이후에 측정된 것일 수 있다. 예컨대 본 발명의 방법을 실시하기 이전에 모세관 웨스턴 분석법으로 전이가 일어나지 않은 유방암 환자의 혈액 내 페리오스틴 발현 수준을 측정하여 데이터화

해 놓고, 본 발명의 방법으로 얻어진 수치를 상기 데이터와 비교할 수 있다. 또 다른 예로서 전이가 일어나지 않은 유방암 환자의 혈액과 전이 여부를 확인하고자 하는 유방암 환자의 혈액을 동시에 모세관 웨스턴 분석법으로 측정하여 페리오스틴 발현 수준을 비교할 수도 있고, 또는 전이가 일어나지 않은 유방암 환자의 혈액을 모세관 웨스턴 분석법으로 측정한 결과를 데이터화 한 후, 전이 여부를 확인하고자 하는 유방암 환자의 혈액에서 모세관 웨스턴 분석법으로 측정한 페리오스틴 발현 수준을 상기 데이터와 비교하는 것도 가능하다.

[0017] 본 발명에 있어서, 상기 혈액은 전혈, 혈청, 또는 혈장일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 혈액은 혈액 희석액이 될 수 있다. 상기 희석액은 완충액, 예컨대 RIPA 완충액과 같은 완충액에 의해 희석된 것일 수 있다. 혈액의 희석 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 "환자"는 인간을 포함하는 임의의 동물이 될 수 있다. 예를 들어, 상기 "환자"는 인간이 될 수 있다. 또 다른 예로서, 상기 "환자"는 임의의 실험동물, 예컨대 마우스, 랫트, 기니픽, 토끼, 돼지, 원숭이, 영장류 등이 될 수 있다. 본 발명의 개체가 실험동물인 경우, 상기 실험동물은 암에 대한 다양한 동물모델(형질전환 동물 모델, 이종이식 동물 모델, 동종동계이식 동물모델 등)이 될 수 있다. 그러나 본 발명의 방법의 개체는 이에 제한되지 않는다.

[0020] 상기 방법에서, 상기 "유방암 환자"는 전이 여부를 확인하고자 하는 임의의 유방암 환자가 될 수 있다.

[0021] 상기 방법에서, 상기 "전이가 일어나지 않은 유방암 환자"는 유방암에 이환되었으나 원암종 외의 신체 부위로 전이가 일어나지 않은 임의의 유방암 환자가 될 수 있다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 "전이"는 유방에 존재하는 원암종(primary tumor)에서 다른 신체 부위(림프관, 림프절, 폐, 뼈, 그 외 유방에서 원격에 위치한 장기 등)로 유방암 세포가 퍼진 상태를 의미한다. 유방암의 5년 생존률은 0기 암의 경우 100%에 가까우나 4기의 경우 20% 미만에 불과하여, 조기에 발견하여 전이를 막는 것이 매우 중요한 암에 해당한다. 유방암 환자의 40%는 초기에 뼈 전이가 일어나며, 뼈 전이가 일어난 환자의 15%는 병적인 골절이 생긴다. 뼈 전이 또는 척추 전이로 신경학적 이상이 일어나는 경우 심한 통증을 수반하기 때문에 환자들의 삶의 질이 크게 떨어지게 된다. 또한 유방암 환자의 상당수는 폐 전이가 일어나는데, 폐 전이는 환자의 호흡을 곤란하게 하여 삶의 질을 크게 떨어뜨리고 사망의 직접적인 원인이 되기도 한다.

[0023] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 "전이"는 유방암의 폐 전이가 될 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 방법은 유방암이 2A기 이상으로의 진행되었는지 여부를 진단하기 위한 것이 될 수 있다. 유방암이 2A기로 진행되었다는 것은 3개 이하의 소수이긴 하지만 겨드랑이 림프절로의 전이가 일어났음을 의미한다. 본 발명의 방법을 이용하면 이와 같이 전이 정도가 아직 미미한 단계에서도 전이 여부를 진단할 수 있다.

[0025] 본 명세서에서 사용된 용어 "병기(stage)"는 암의 진행정도를 의미하며, 당업계에 알려진 다양한 방법에 의해 설정된 병기를 의미한다. 병기는 크게 3가지 요소(종양의 상태, 림프관 전이 정도, 및 원격전이 정도, TNM(Tumor-Node-Metastasis))를 조합해서 고려하여 구분된다. 예를 들어, 일반적으로 유방암의 병기는 하기 표와 같이 상기 3가지 요소를 고려하여 크게 1~4기로 나누고, 이를 다시 하위 구분한다(국가암정보센터-유방암).

TNM병기		정의
종괴의 크기(T)	Tis	상피내암
	T0	종양의 크기가 불분명할 때
	T1	종양의 크기가 2cm 이하
	T2	종양의 크기가 2cm~5cm
	T3	종양의 크기가 5cm 초과
	T4	종양이 흉벽, 피부를 침범했거나 염증성 유방암일 때
림프절 전이(N)	N0	겨드랑이 림프절 전이가 없을 때
	N1	암세포가 전이된 겨드랑이 림프절이 3개 이하
	N1mi	림프절에 전이된 암조직의 크기가 2mm 이하인 미세전이
	N2	암세포가 전이된 겨드랑이 림프절이 4~9개
	N3	암세포가 전이된 겨드랑이 림프절이 10개 이상, 또는 쇄골상부 림프절 전이가 있을 때
다른 장기 침범 여부(M)	M0	다른 장기에 전이가 없을 때
	M1	다른 장기에 전이가 있을 때

[0026]

병기	종괴의 크기(T)	림프절 전이(N)	타장기 침범(M)
0기	Tis	N0	M0
1A기	T1	N0	M0
1B기	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
2A기	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
2B기	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
3A기	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
3B기	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
3C기	모든 T	N3	M0
4기	모든 T	모든 N	M1

[0027]

[0028] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 방법은 유방암이 Basal 아형(subtype)인지 여부에 대한 정보를 제공하기 위한 것일 수 있다. Basal 아형의 유방암은 다른 아형보다 전이성이 특히 높은데, 본 발명의 방법에 의하면 페리오스틴 발현 수준 역시 다른 아형의 유방암보다 현저히 높게 나타난다. 따라서 본 발명의 방법에 의해 페리오스틴 발현 수준이 높게 나타난 경우 유방암의 전이가 일어났을 것이라고 진단할 수 있고 아울러 이는 상기 유방암이 Basal 아형이기 때문이라고 진단할 수 있다.

[0029] 본 발명의 일 구현예로서, 본 발명의 방법을 복수 회 수행함으로써 진단의 정확도를 높일 수 있다.

발명의 효과

[0030] 본 발명을 이용하면 신속하고 정확하게 혈액에서의 페리오스틴 발현 수준을 측정하여 유방암의 전이 진단을 위한 정보를 제공할 수 있다. 따라서 유방암 치료 계획 수립에 중요하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 형질전환 동물모델에서 채혈 및 부검을 시행한 스케줄을 나타낸 도이다.

도 2는 형질전환 동물모델에서 종양 부피 및 폐 전이 정도를 확인한 도이다.

도 3은 형질전환 동물모델 및 암에 걸리지 않은 동물에서 혈중 페리오스틴 발현량을 확인한 도이다.

도 4는 형질전환 동물모델에서 암의 전이 정도에 따라 혈중 페리오스틴 발현량을 확인한 도이다.

도 5는 이종이식 동물 모델의 준비 및 채혈과 부검을 실시한 스케줄을 나타낸 도이다.

도 6은 이종이식 동물 모델에서 폐 전이 정도를 확인한 도이다.

도 7은 이종이식 동물 모델에서 암의 전이 정도에 따라 혈중 페리오스틴 발현량을 확인한 도이다.

도 8은 동종동계이식 동물 모델의 준비 및 채혈과 부검을 실시한 스케줄을 나타낸 도이다.

도 9는 혈중 페리오스틴 발현량에 대한 표준 곡선이다.

도 10은 동종동계이식 동물 모델 및 암에 걸리지 않은 동물에서의 혈중 페리오스틴 발현량을 비교한 도이다.

도 11A는 동종동계이식 동물 모델에서 원암종의 종양 부피와 혈중 페리오스틴 발현량의 상관관계를 나타낸 도이고, 도 11B는 동종동계이식 동물 모델에서 폐의 전이성 노듈 수와 혈중 페리오스틴 발현량의 상관관계를 나타낸 도이다.

도 12는 정상 대조군 및 유방암 환자로부터 채취한 혈액 시료로 모세관 웨스턴 분석을 수행하는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 13은 연령, 기타 질환 및 식이로 혈중 페리오스틴 발현량을 보정한 도이다.

도 14는 인간 비-유방암 환자의 혈중 페리오스틴 농도 분포를 나타낸 도이다.

도 15는 인간 유방암 환자의 혈중 페리오스틴 농도 분포를 나타낸 도이다.

도 16은 인간 비-유방암 환자 및 유방암 환자의 혈중 페리오스틴 농도의 상대값은 비교한 도이다.

도 17은 인간 유방암 환자에서 유방암 전이에 따른 혈중 페리오스틴 농도 변화를 나타낸 도이다.

도 18은 정상 대조군 및 유방암 질환군의 혈중 페리오스틴 발현 수준을 모세관 웨스턴 분석법으로 확인한 결과이다.

도 19는 도 18의 결과를 whisker 형식의 그래프로 나타낸 도이다.

도 20은 도 18의 결과를 막대 그래프로 나타낸 도이다.

도 21은 유방암의 HER2 아형, Luminal A 아형, Luminal B 아형, 및 Basal 아형에서 혈중 페리오스틴 발현량을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하에서 언급된 시약 및 용매는 특별한 언급이 없는 한 모두 ProteinSimple(San Jose, CA, USA)로부터 구입한 것이다.

[0033] 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.

[0034] **실시예 1. 형질전환 마우스 모델에서의 페리오스틴 발현 확인**

[0035] **1-1. 실험동물 준비**

[0036] 마우스 유방암 바이러스 promoter/enhancer의 전사적 조절을 통해 Polyoma Virus middle T antigen을 발현하는 형질전환 유방암 동물 모델 암컷 마우스(female carrier) 24마리를 중앙실험동물(서울, 대한민국)으로부터 구입하여 준비하였다(female FVB/N-Tg (MMTV-pyVT)634Mul/J, 이하 '유방암 질환군'). 상기 형질전환 마우스 모델은 성장하면서 자연적으로 유방암이 발병하며, 발병된 유방암은 폐로 전이되어 이차암을 형성하는 것으로 보고되어 있다(Journal of Cancer Therapy, 2013, 4, 1187-1197, The MMTV-PyVT Transgenic Mouse as a Multistage Model for Mammary Carcinoma and the Efficacy of Antineoplastic Treatment). 또한 정상 대조군으로 정상 암컷 마우스(female non-carrier) 15마리를 준비하였다.

[0037] **1-2. 혈액 채취, 암 부피 계산 및 폐 전이 평가**

[0038] 모세관 웨스턴 분석에 사용하기 위하여, 각 마우스에서 총 3회에 걸쳐 안와채혈로 혈액을 채취하였다. 안와채혈은 일차암이 생성되기 전인 9주령, 일차암이 생성된 13주령, 이차암이 생성될 것으로 예상되는 15주령에 이루어졌다. 3차의 안와채혈이 끝난 후, 암전이평가 및 조직분석을 위하여 부검을 진행하였다(도 1).

[0039] 또한 실험 진행기간동안 마이크로캘리퍼를 이용하여 외부에서 암의 장축 및 단축을 측정하여 일차암의 부피를

구하였고(부피=장축×단축^2×0.52), 부검시 인디아 잉크(India ink) 염색으로 폐전이를 확인하였다(폐전이가 일어나 결절(nodule)이 생긴 부분은 백색 스팟(white spot)으로 나타나며, 그 수에 따라 전이정도를 3가지(-, +, ++)로 구분하였음). 그 결과, 유방암 질환군 마우스 24마리 중 16마리에서 폐로 암전이가 일어난 것을 확인하였다(도 2).

[0040] **1-3. 페리오스틴 발현과 유방암의 관계 확인**

[0041] 유방암과 관련된 혈중 지표 단백질을 유전체분석을 통하여 1차적으로 스크리닝한 결과, 페리오스틴(periostin)이 유방암에 대한 혈중 지표가 될 가능성이 있다고 판단하였다. 따라서 모세관 웨스턴 분석법으로 구체적으로 분석하였다.

[0042] 유방암 질환군 및 정상 대조군에서 각각 실시예 1의 스케줄에 따라 안와채혈로 얻은 혈액 시료를 모세관 웨스턴 분석법을 이용하여 분석하였다. 분석은 Proteinsimple 사의 WES 기기를 사용하여 수행하였다. 구체적으로, 시료를 WES 분석 플레이트에 로딩하고 WES 기기에 장착하면 자동적으로 모세관으로 로딩되고 모세관 내의 분리 매트릭스 내를 따라 이동하면서 크기에 따라 분리가 일어난다. 분리된 단백질은 모세관 벽에 광활성화 포획 화학(photoactivated capture chemistry)에 의해 부동화된다. 표적 단백질은 1차 항체를 1차 항체 및 HRP-컨주게이션된 2차 항체와 화학발광 기질에 의해 면역블롯되고 야기되는 화학발광 신호가 검출 및 정량화된다. 이 분석법에 의하면 미량의 시료(최소 40 nL의 시료로도 분석 가능)로도 정확한 정량적 분석이 가능하며 재현성이 높다.

[0043] 그 결과, 유방암 질환군에서 정상 대조군보다 페리오스틴(periostin)의 혈중 농도가 유의성 있게 더 높은 것으로 나타났다(모세관 웨스턴 분석법의 대표도를 도 3에 나타냄). 또한 유방암 질환군에서도 폐 전이 정도가 높을수록 혈중 페리오스틴 발현량이 더 높게 나타났다(도 4).

[0044] 상기 결과로부터, 혈중 페리오스틴 발현량이 유방암 여부 진단에 있어서 유의성 있는 지표이고, 또한 유방암의 폐 전이 진단에 있어서도 유의성 있는 지표임을 알 수 있었다.

[0045] **실시예 2. 이종이식 마우스 모델에서의 페리오스틴 발현 확인**

[0046] **2-1. 실험동물 준비**

[0047] 사람 유래 유방암 세포인 MDA-MB-231 세포를 6주령의 면역결핍 마우스인 female NOD.CB17-Prkdc^{scid} 마우스의 #4 inguinal fat pad에 주입하였다(n=18). 암세포 주입 후 일차암이 형성되는 것을 관찰하였고, 암전이가 일어나 이차암이 생겼을 것으로 예상되는 7주차에 마우스를 부검하고 시료를 채취하였다.

[0048] **2-2. 혈액 채취 및 폐 전이 평가**

[0049] 이차암이 생겼을 것으로 예상되는 7주차에 복대정맥에서 혈액을 채취하여 이하에서 모세관 웨스턴 분석에 사용하였다(도 5). 또한 마우스를 부검하고 일차암 조직 및 폐로 전이된 이차암 조직을 H&E 조직 염색하고(형질전환 마우스에 비하여 이차암 크기가 작아 인디아 잉크 대신 H&E로 염색하였음), 이종이식된 MDA-MB-231 세포의 인간 GAPDH 발현량을 확인하여 폐 전이정도를 측정하고, 결과를 종합하여 전이정도를 4단계로 구분하였다(+, ++, +++, ++++)(도 6).

[0050] **2-3. 페리오스틴 발현과 유방암의 관계 확인**

[0051] 모세관 웨스턴 분석 방법은 상기 실시예 1에서와 같다.

[0052] 실시예 1에서 유방암 발병 및 유방암의 폐 전이와 가장 관련성이 높은 것으로 나타난 페리오스틴에 대한 모세관 웨스턴 분석 결과와 2-2의 유방암의 폐 전이 간의 상관관계에 대해 확인하였다. 그 결과, 혈중 페리오스틴 발현량과 유방암의 폐 전이 간에 높은 상관관계가 있음이 확인되었다(도 7). 따라서 혈중 페리오스틴 발현량이 유방암의 폐 전이정도를 대변하는 혈중지표의 가능성이 있음을 확인하였다.

[0053] **실시예 3. 동종동계이식 마우스 모델에서의 페리오스틴 발현 확인**

[0054] **3-1. 실험동물 준비**

[0055] 4T1 세포는 BALB/c 마우스 유래의 폐전이성 유방암 세포로, 폐 전이성이 강한 세포로 알려져 있다. 따라서 유방암 진행에 따른 전이기전을 연구하는 데에 적합하다고 판단하고 본 실시예에서 동종동계이식(syngenic) 마우스 모델을 구축하는 데 사용하였다.

[0056] 4T1 세포를 female BALB/c 마우스의 #4 inguinal fat pad에 주입하였다(n=13). 암세포 주입 1주 후에 일차암이

형성되는 것을 관찰하였고, 암전이가 일어나 이차암이 생겼을 것으로 예상되는 4주에 마우스를 부검하여 복대정맥에서 혈액을 채취하고 모세관 웨스턴 분석을 진행하였다 (도 8).

[0057] **3-2. 혈액 채취 및 폐 전이 평가**

[0058] 인디아 잉크 염색법을 통하여 폐의 이차암 형성을 확인하였다. 폐에 형성된 전이성 노듈(nodule) 수를 확인하고 그 수에 따라 전이정도를 구분하였다.

[0059] **3-3. 페리오스틴 발현과 유방암의 관계 확인**

[0060] 채취된 혈액에서 혈장을 분리하여 1/40배로 희석한 후, 모세관 웨스턴 분석을 통하여 혈중 페리오스틴을 정량분석하였다. 표준 곡선(Standard curve)을 이용하여 절대 정량을 하기 위해서, R&D사로부터 재조합 마우스 페리오스틴(recombinant mouse periostin)을 구입하여 기지 농도를 모세관 웨스턴 분석법으로 분석하였다. 각 개체의 혈중 페리오스틴의 양은 표준 곡선으로부터 계산하였다.

[0061] 모세관 웨스턴 분석 시스템을 활용하여 분석한 재조합 마우스 페리오스틴 표준 곡선은 최소농도 0.5 ng/ml부터 최고 농도 100 ng/ml까지 농도 의존적으로 AU값이 증가하였다(R^2=0.9989) (도 9).

[0062] 정상군 BALB/c 마우스와 유방암 질환군인 4T1 유방암 마우스의 혈중 페리오스틴 농도를 비교하였을 때, 폐전이가 증가할수록 혈중 페리오스틴 양이 유의하게 증가하는 경향이 보였다(도 10).

[0063] 보다 구체적으로, 혈중 페리오스틴 발현량이 대변할 수 있는 4T1 유방암 동물모델의 형질을 찾기 위해, 일차암의 크기 및 폐전이 정도와 상관관계 분석을 하였다.

[0064] 그 결과, 일차암의 크기와 혈중 페리오스틴의 양은 통계적으로 유의한 상관성을 보이지 않았으나, 폐에 전이되어 생긴 nodule 수와는 통계적으로 유의한 양의 상관관계가 나타났음(도 11).

[0065] 따라서 4주차의 4T1-orthotopic-grafted balb/c 마우스 모델에서는 일차암의 크기와 폐전이성 사이에는 상관관계가 없으나, 혈중 페리오스틴의 양과 폐전이성은 통계적으로 유의한 양의 상관관계가 있다는 사실을 알 수 있었다.

[0066] **실시예 4. 환자 혈액 시료에서의 페리오스틴 발현 확인**

[0067] 국립암센터, 고대구로병원, 인제대 부산백병원, 아주대병원, 및 계명대동산병원으로부터 총 519명의 정상 대조군의 혈액 시료 및 총 193명의 유방암 환자의 혈액 시료를 받아 준비하고, 모세관 웨스턴 분석법으로 혈중 페리오스틴의 발현량을 측정하였다(도 12). 각 유방암의 병기(0, 1A, 1B, 2A, 2B, 3 및 4) 군의 평균 연령과 연령분포도가 비슷하고, 기타 다른 질환이 없으며, 식이에 대한 평가 수치가 비슷하도록 개체를 조정하였다(도 13).

[0068] 측정 결과, 정상 대조군의 혈액 시료에서는 평균적으로 490.9507 ng/ml의 페리오스틴이 측정되었다(도 14). 반면 유방암 환자의 혈액 시료에서는 평균적으로 692.8716 ng/ml의 페리오스틴이 측정되었다(도 15). 정상 대조군과 유방암 환자군에서의 혈중 페리오스틴 농도를 비교했을 때, 상대적으로 유방암 환자군에서 현저히 높게 나타났다(도 16).

[0069] 상기 결과를 근거로, 합성 인간 페리오스틴에 대한 검량선을 작성하고 유방암 환자군을 확대하여 혈중 페리오스틴의 절대량을 확인한 바, 전이가 일어나기 전의 유방암 환자 혈중 페리오스틴의 농도 평균은 452.1659 ng/ml 이었으나 림프절 전이가 일어난 것으로 판명되는 2A기 유방암 이후의 평균은 1321.989 ng/ml 로 측정되었다(도 17). 즉, 유방암 환자 중에서도 림프절 전이(림프절→폐 및 그 외 장기로 전이되는게 일반적임)가 일어난 환자에서 혈중 페리오스틴 농도가 현저히 높아지는 것을 알 수 있었다.

[0070] 도 18은 정상 대조군 및 유방암 질환군의 혈중 페리오스틴 발현 수준을 모세관 웨스턴 분석법으로 확인한 결과이고, 도 19는 상기 결과를 whisker 형식으로 나타낸 그래프이며, 도 20은 이를 막대 그래프로 나타낸 도이다. 도 18 내지 20에서 정상 대조군보다 병기상 2A, 2B, 3, 및 4에 해당하는 유방암 환자의 혈중 페리오스틴 발현 수준이 유의하게 높게 나타남을 알 수 있다.

[0071] 유방암은 분자아형에 따라 HER2 아형, Luminal A 아형, Luminal B 아형, 및 Basal 아형으로 나뉘어진다. 각각의 아형에서 모세관 웨스턴 분석법에 의해 혈액 내 페리오스틴 발현량을 측정한 결과, Basal 아형에서 특히 높게 나타났다(도 21).

[0072] Basal 아형은 면역조직화학적 방법에 따라 분류하면 호르몬 치료 및 허셉틴으로의 치료에 반응하지 않는 삼중음성 유방암(Triple Negative Cancer, ER-, PR-, Her2-)인 경우가 많으며 암세포가 공격적이고 전이성이 강해

예후가 좋지 않다. 기존의 방법에 의하면 암세포의 아형을 알기 위해서 생검조직을 추출하여 조직 슬라이드를 만들고 IHC 등의 기법으로 조직학적 분석을 했기 때문에 장시간이 소요되었다. 그러나 상기와 같이 모세관웨스턴 분석법을 이용하여 혈액 내 페리오스틴 발현량을 측정함으로써 비침습적인 방법으로 신속하게 삼중 음성 유방암인지 여부를 진단하는데 활용할 수 있다.

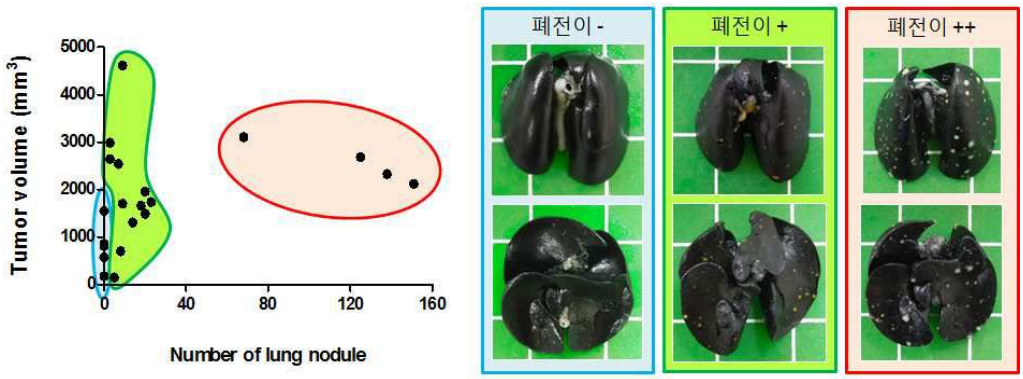
도면

도면1



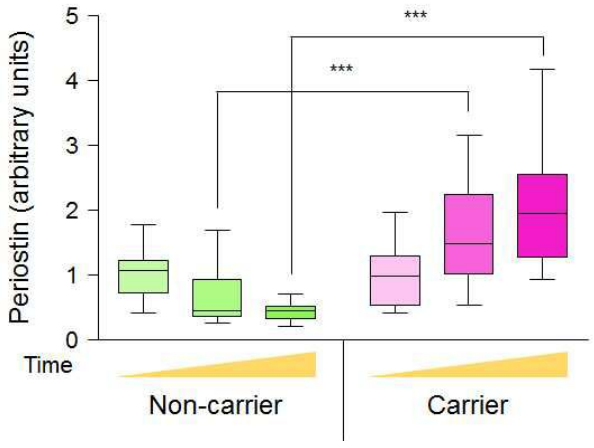
도면2

- **Non-carrier (n=15)**
- **Carrier (n=24); lung metastasis (n=16)**

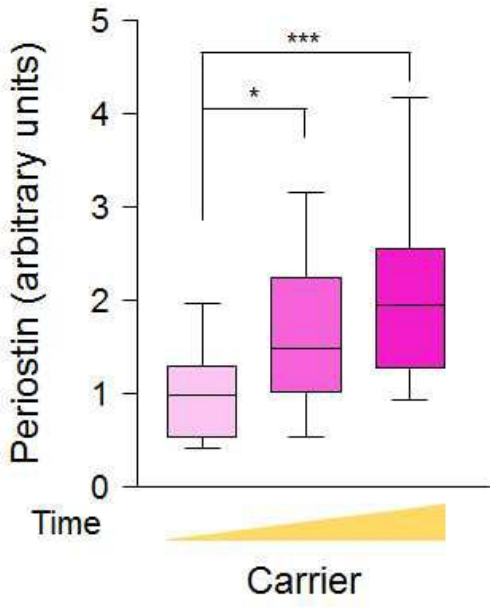


도면3

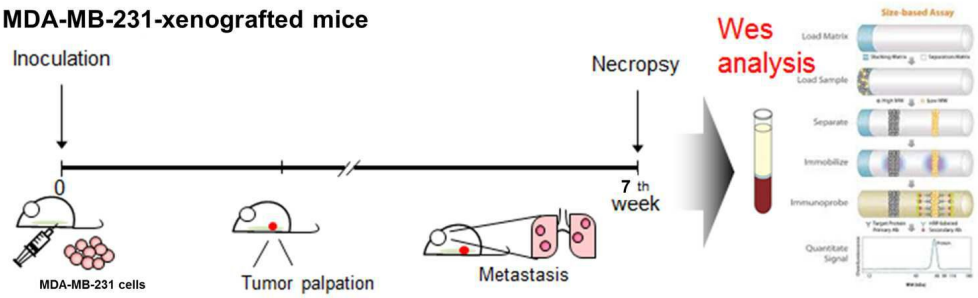




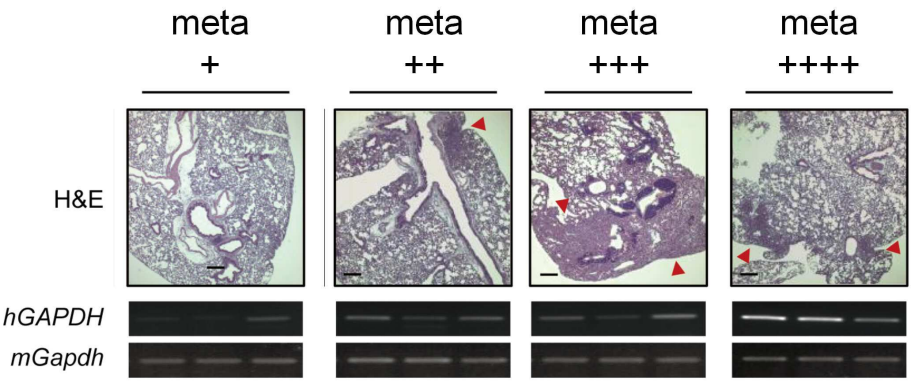
도면4


Periostin (arbitrary units)
5
4
3
2
1
0
***
*
Time
Carrier

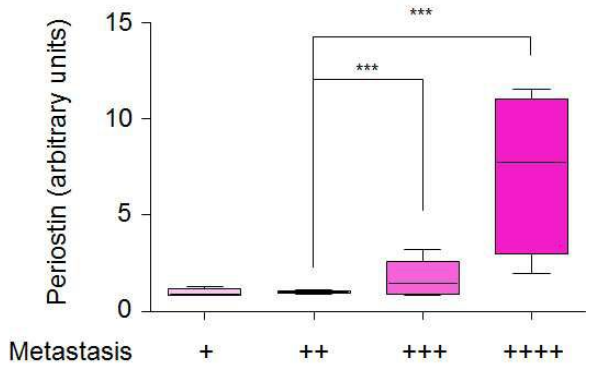
도면5


MDA-MB-231-xenografted mice
Inoculation
Necropsy
Wes analysis
0
7 th week
MDA-MB-231 cells
Tumor palpation
Metastasis

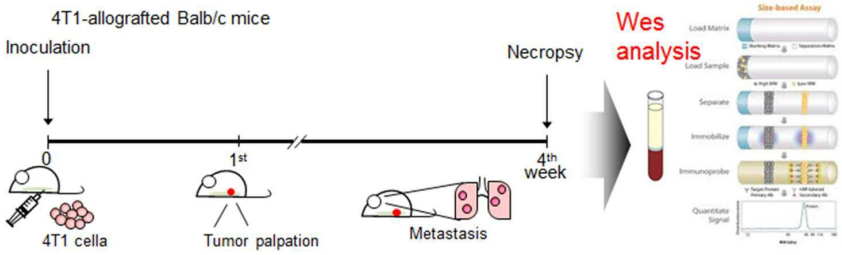
도면6


meta +
meta ++
meta +++
meta ++++
H&E
hGAPDH
mGapdh

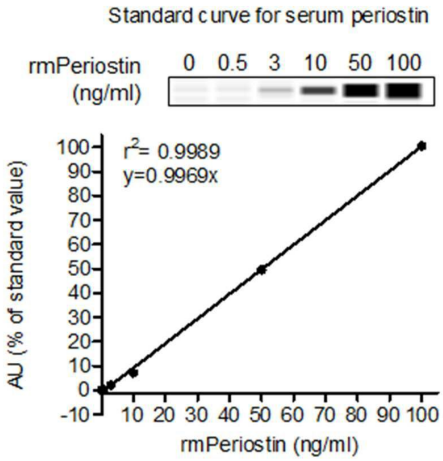
도면7


Periostin (arbitrary units)
15
10
5
0
***
***
Metastasis
+
++
+++
++++

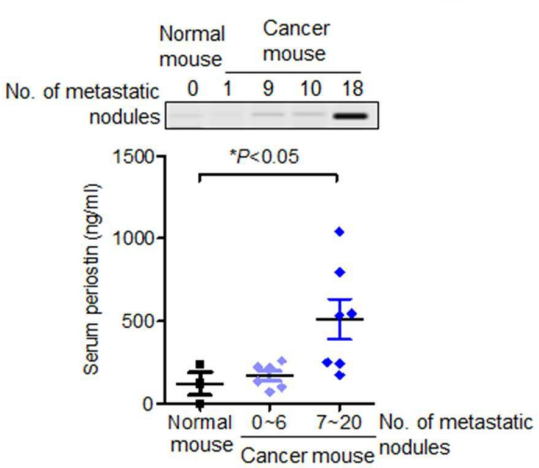
도면8


4T1-allografted Balb/c mice
Inoculation
Necropsy
0
1st
4th week
4T1 cella
Tumor palpation
Metastasis
Wes analysis

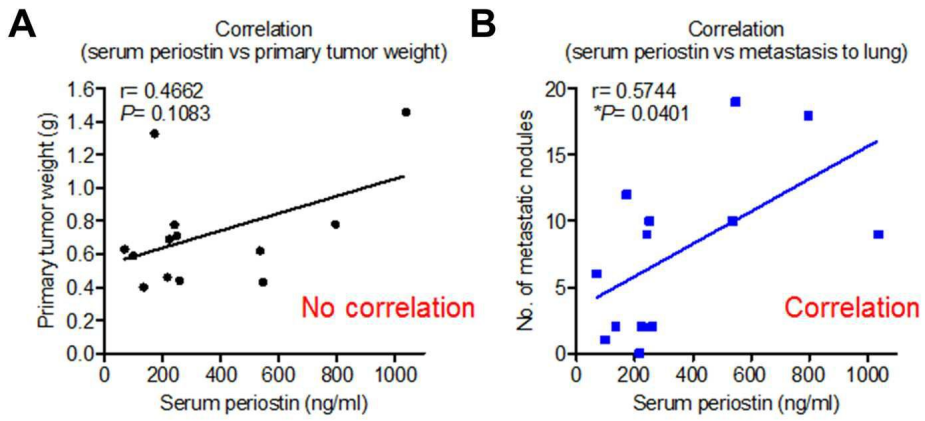
도면9


Standard curve for serum periostin
rmPeriostin (ng/ml)
0 0.5 3 10 50 100
r2= 0.9989
y=0.9969x
AU (% of standard value)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
rmPeriostin (ng/ml)

도면10



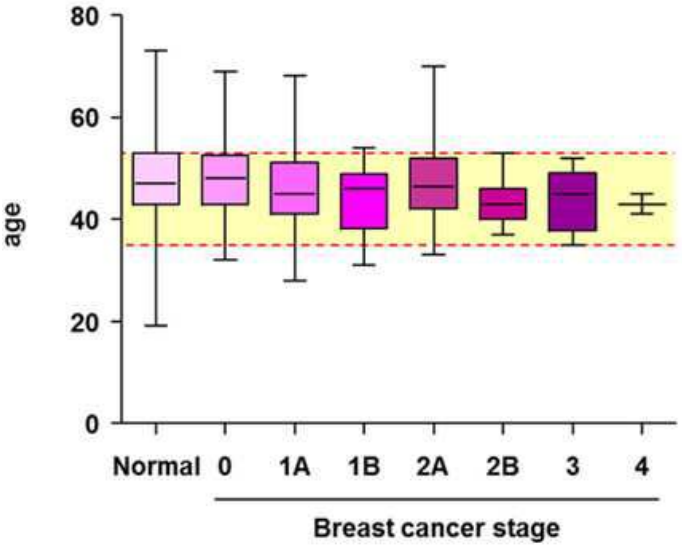
도면11



도면12



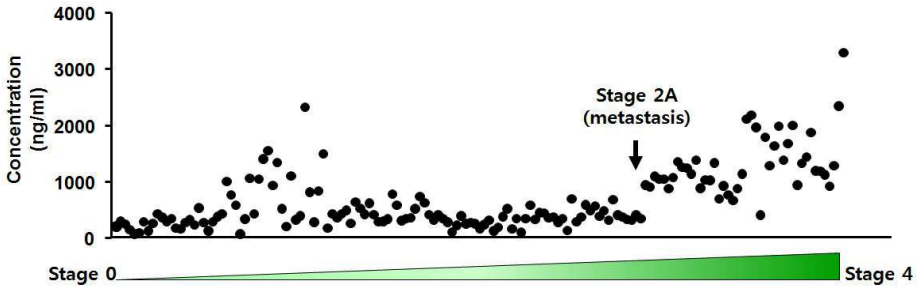
도면13



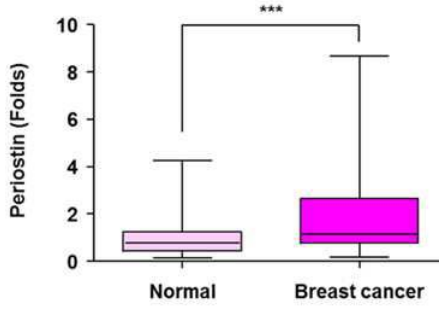
도면14



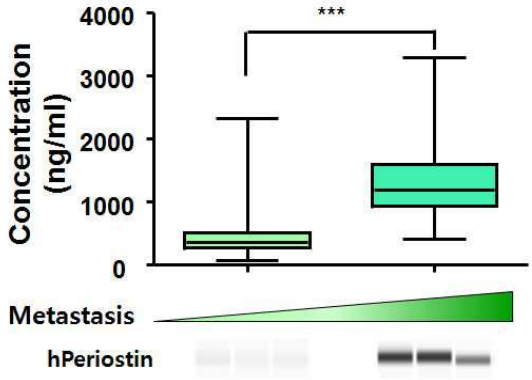
도면15



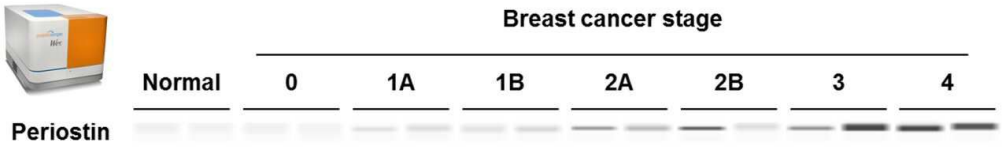
도면16



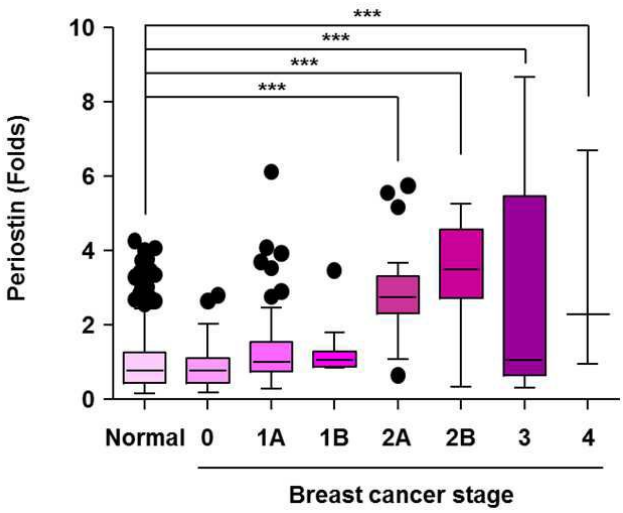
도면17



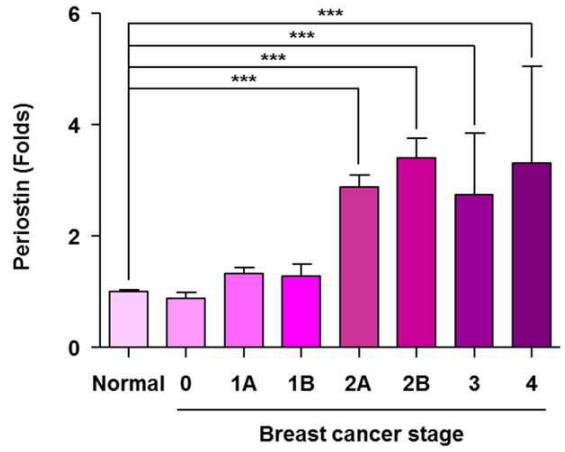
도면18



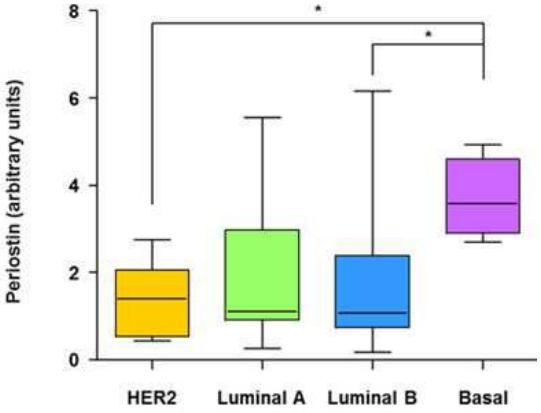
도면19



도면20


Periostin (Folds)
6
4
2
0
***
***
***
***
Normal
0
1A
1B
2A
2B
3
4
Breast cancer stage

도면21


Periostin (arbitrary units)
8
6
4
2
0
*
*
HER2
Luminal A
Luminal B
Basal