



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년11월13일
(11) 등록번호 10-1200552
(24) 등록일자 2012년11월06일

- (51) 국제특허분류(Int. C1.)
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/12* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2011-0020092(분할)
(22) 출원일자 2011년03월07일
심사청구일자 2011년03월07일
(65) 공개번호 10-2011-0036553
(43) 공개일자 2011년04월07일
(62) 원출원 특허 10-2008-0120460
원출원일자 2008년12월01일
심사청구일자 2008년12월01일
(56) 선행기술조사문헌
Cancer Res., 59:67, 1999

- (73) 특허권자
(주)지노픽트리
대전광역시 유성구 테크노10로 44-6 (탑립동)
(72) 발명자
안성환
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 504동 702호
(전민동, 엑스포아파트)
문영호
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 304동 107호
(전민동, 엑스포아파트)
오태정
대전광역시 유성구 가정로 63, 109동 1101호 (신
성동, 럭키하나아파트)
(74) 대리인
이처영

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 이준혁

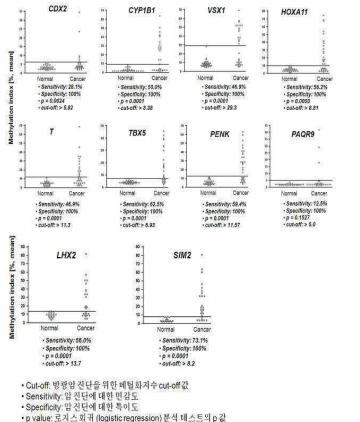
(54) 발명의 명칭 방광암 특이적 메틸화 마커 유전자를 이용한 방광암 진단용 키트 및 칩

(57) 요 약

본 발명은 방광암 특이적인 마커 유전자를 이용한 방광암 진단용 키트 및 핵산 칩에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 방광암 형질전환 세포에서 특이적으로 메틸화되는 방광암 특이적 마커 유전자의 프로모터 메틸화를 확인할 수 있는 방광암 진단용 키트 및 핵산 칩에 관한 것이다.

본 발명의 진단용 키트 및 진단용 핵산 칩을 이용하면, 방광암을 초기 형질전환 단계에서 진단할 수 있어, 조기 진단이 가능하고, 통상적인 방법보다 정확하고 빠르게 방광암을 진단할 수 있다.

대 표 도 - 도4



특허청구의 범위

청구항 1

방광암 마커 유전자 PENK (NM_006211) - 프로엔케팔린 (proenkephalin)의 메틸화된 프로모터를 함유하는 방광암 진단용 키트.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 프로모터는 적어도 하나의 메틸화된 CpG 디뉴클레오티드를 함유하는 것을 특징으로 하는 방광암 진단용 키트.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 프로모터는 서열번호 37로 표시되는 DNA 서열인 것을 특징으로 하는 방광암 진단용 키트.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 메틸화된 프로모터는 PCR, 메틸화 특이 PCR(methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR(real time methylation specific PCR), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 정량 PCR, 파이로시퀀싱 및 바이설파이트 시퀀싱으로 구성된 군에서 선택되는 방법으로 메틸화가 측정되는 것을 특징으로 하는 방광암 진단용 키트.

청구항 5

제1항에 있어서, 키트에 사용되는 임상 샘플은 암 의심 환자 또는 진단 대상 유래의 조직, 세포, 혈액 및 소변으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방광암 진단용 키트.

청구항 6

제1항에 있어서, 다음으로 구성된 군에서 선택되는 방광암 마커 유전자의 메틸화된 부위를 추가로 함유하는 방광암 진단용 키트:

- (1) CDX2 (NM_001265) - 미측형 호메오박스 전사 인자 2 (caudal type homeobox transcription factor 2);
- (2) CYP1B1 (NM_000104) - 시토크롬 P450, 폐밀리 1, 서브폐밀리 B, 폴리펩티드 1 (cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1);
- (3) VSX1 (NM_199425) - 비주얼 시스템 호메오박스 1 유사체, CHX10-유사 (제브라피쉬) (visual system homeobox 1 homolog, CHX10-like (zebrafish));
- (4) HOXA11 (NM_005523) - 호메오박스 A11 (homeobox A11);
- (5) T (NM_003181) - T, 브라카이우리 유사체 (마우스) (T, brachury homolog (mouse));
- (6) PAQR9 (NM_198504) - 프로제스틴 및 아디포큐 수용체 폐밀리 멤버 IV (progesterin and adipoQ receptor family member IV); 및
- (7) LHX2 (NM_004789) - 럼 호메오박스 2.

청구항 7

방광암 마커 유전자 PENK (NM_006211) - 프로엔케팔린 (proenkephalin)의 프로모터 CpG섬을 포함하는 단편과 하이브리다이제이션할 수 있는 프로브를 포함하는 방광암 진단용 핵산 칩.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 프로모터는 서열번호 37로 표시되는 DNA 서열인 것을 특징으로 하는 방광암 진단용 핵산 칩.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 핵산 칩에 적용되는 DNA 샘플은 PCR, 메틸화 특이 PCR(methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR(real time methylation specific PCR) 및 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR로 구성된 군에서 선택되는 방법으로 제작되는 것을 특징으로 하는 방광암 진단용 핵산 칩.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 DNA 샘플은 암 의심 환자 또는 진단 대상 유래의 조직, 세포, 혈액 및 소변으로 구성된 군에서 선택되는 임상샘플 유래인 것을 특징으로 하는 방광암 진단용 핵산 칩.

청구항 11

제7항에 있어서, 다음으로 구성된 군에서 선택되는 방광암 마커 유전자의 메틸화된 CpG섬을 포함하는 단편과 하이브리다이제이션할 수 있는 프로브를 추가로 함유하는 방광암 진단용 핵산 칩:

- (1) CDX2 (NM_001265) - 미측형 호메오박스 전사 인자 2 (caudal type homeobox transcription factor 2);
- (2) CYP1B1 (NM_000104) - 시토크롬 P450, 패밀리 1, 서브패밀리 B, 폴리펩티드 1 (cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1);
- (3) VSX1 (NM_199425) - 비주얼 시스템 호메오박스 1 유사체, CHX10-유사 (제브라피쉬) (visual system homeobox 1 homolog, CHX10-like (zebrafish));
- (4) HOXA11 (NM_005523) - 호메오박스 A11 (homeobox A11);
- (5) T (NM_003181) - T, 브라카이우리 유사체 (마우스) (T, brachyury homolog (mouse));
- (6) PAQR9 (NM_198504) - 프로제스틴 및 아디포큐 수용체 패밀리 멤버 IV (progesterin and adipoQ receptor family member IV); 및
- (7) LHX2 (NM_004789) - 림 호메오박스 2.

명세서**기술분야**

[0001]

본 발명은 방광암 특이적인 마커 유전자를 이용한 방광암 진단용 키트 및 핵산 칩에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 방광암 형질전환 세포에서 프로모터 부위가 특이적으로 메틸화되는 방광암 특이적 마커 유전자의 프로모터 메틸화를 확인할 수 있는 방광암 진단용 키트 및 핵산 칩에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

방광암은 비뇨기계 암 중 가장 흔한 암으로서, 발생 원인이 비교적 많이 밝혀졌다. 주로 흡연이나 여러 가지

화학 물질(가죽 등의 염색 도료, 대기 오염 물질, 인공 감미료, 질산염)이 체내에 흡수되었다가 소변으로 배설되어 나오면서 방광 벽을 자극하여 암을 유발시키는 것으로 알려져 있다.

[0003] 전통적인 방광암 검사로는 소변에서 비정상 세포를 찾아내는 방법을 사용하고 있으나, 이는 정확도가 낮다. 또한, 카테터(도관)를 방광에 밀어 넣어 의심되는 조직을 떼어내 검사하는 방광경 검사는 침습적 방법으로써 비교적 정확도가 높은 편이다.

[0004] 일반적으로 방광암을 조기에 진단하면 환자의 생존율이 높아지지만, 조기에 방광암을 진단하는 것은 쉽지 않은 실정이다. 현재 사용되고 있는 방광암 진단법은 신체의 일부를 절개하는 방법을 이용하고 있으나, 이는 방광암을 조기에 진단하는데 어려움이 있다.

[0005] 방광암은 방광근층 침범 여부에 따라 표재성 또는 침윤성 암으로 분류하며, 평균적으로 진단 당시 30% 가량의 환자가 침윤성 방광암에 해당된다. 따라서, 환자의 생존 기간을 늘리려면 병변 범위가 작을 때 조기 진단하는 것이 가장 좋은 방법이므로, 기존의 각종 방광암 진단 방법보다 효율적인 진단 방법, 즉 조기 진단이 가능하고, 대용량으로 검체를 처리할 수 있으며, 민감도 및 특이도가 높은 방광암 특이적 바이오 마커의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

[0006] 이에, 최근에는 DNA 메틸화 측정을 통하여 암을 진단하는 방법들이 제시되고 있는데, DNA 메틸화는 주로 특정 유전자의 프로모터 부위의 CpG 섬(CpG island)의 시토신(cytosine)에서 일어나고, 그로 인하여 전사 인자의 결합이 방해를 받게 되어 특정 유전자의 발현이 차단되는 것으로서, 종양 억제 유전자의 프로모터 CpG 섬의 메틸화를 검색하는 것이 암 연구에 큰 도움이 되며, 이를 메틸화 특이 PCR(methylation specific PCR, 이하, "MSP"라고 함)이나 자동 염기 분석 등의 방법으로 검사하여 암의 진단과 스크리닝 등에 이용하려는 시도가 활발하게 이루어지고 있다.

[0007] 프로모터 CpG 섬의 메틸화가 발암을 직접 유발하는지, 또는 발암의 2차적인 변화를 일으키는지에 대해 논란이 있으나, 여러 암에서 종양 억제 유전자(tumor suppressor gene), DNA 수선 유전자(DNA repair gene), 세포 주기 조절 유전자 등이 과메틸화(hyper-methylation)되어 있어 이들 유전자의 발현이 차단되어 있다는 것이 확인되었으며, 특히 암 발생의 초기 단계에서 특정 유전자의 프로모터 부위에 과메틸화가 일어난다는 것이 알려져 있다.

[0008] 따라서, 종양 관련 유전자의 프로모터 메틸화가 암의 중요한 지표이며, 이를 암의 진단 및 조기 진단, 발암 위험의 예측, 암의 예후 예측, 치료 후 추적 조사, 항암 요법에 대한 반응 예측 등 다방면으로 이용할 수 있다. 실제 혈액이나 객담, 침, 대변, 소변 등에서 종양 관련 유전자의 프로모터 메틸화를 조사하여 각종 암 진료에 사용하려는 시도가 최근 활발하게 이루어지고 있다 (Esteller, M. et al., *Cancer Res.*, 59:67, 1999; Sanchez-Cespedez, M. et al., *Cancer Res.*, 60:892, 2000; Ahlquist, D.A. et al., *Gastroenterol.*, 119:1219, 2000).

[0009] 이에, 본 발명자들은 방광암을 효과적으로 진단할 수 있는 진단용 키트를 개발하고자 예의 노력한 결과, 방광암 세포에서 특이적으로 메틸화되는 메틸화 관련 유전자의 프로모터를 바이오 마커로 이용하여 메틸화 정도를 측정함으로써, 방광암을 진단할 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 방광암 마커 유전자의 메틸화된 부위를 함유하는 방광암 진단용 키트를 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 방광암 특이적 마커 유전자의 CpG 섬을 포함하는 단편과 하이브리다이제이션 할 수 있는 프로브를 포함하는 방광암 진단용 핵산 칩을 제공하는데 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 임상 샘플 유래 유전자의 메틸화 여부를 측정하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (1) CDX2 (NM_001265) - 미측형 호메오박스 전사 인자 2 (caudal

type homeobox transcription factor 2); (2) CYP1B1 (NM_000104) - 시토크롬 P450, 폐밀리 1, 서브폐밀리 B, 폴리펩티드 1 (cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1); (3) VSX1 (NM_199425) - 비주얼 시스템 호메오박스 1 유사체, CHX10-유사체 (제브라피쉬) (visual system homeobox 1 homolog, CHX10-like (zebrafish)); (4) HOXA11 (NM_005523) - 호메오박스 A11 (homeobox A11); (5) T (NM_003181) - T, 브라카이우리 유사체 (마우스) (T, brachyury homolog (mouse)); (6) TBX5 (NM_080717) - T-박스 5 (T-box 5); (7) PENK (NM_006211) - 프로엔케팔린 (proenkephalin); (8) PAQR9 (NM_198504) - 프로제스틴 및 아디포큐 수용체 폐밀리 멤버 IV (progesterin and adipoQ receptor family member IV); (9) LHX2 (NM_004789) - 림 호메오박스 2 (LIM Homeobox 2); 및 (10) SIM2 (U80456) - 싱글-마인디드 호몰로그 2 (드로소필라) (single-minded homog 2 (Drosophila)로 구성된 군에서 선택되는 방광암 마커 유전자의 메틸화된 부위를 함유하는 방광암 진단용 키트를 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, (1) CDX2 (NM_001265) - 미측형 호메오박스 전사 인자 2 (caudal type homeobox transcription factor 2); (2) CYP1B1 (NM_000104) - 시토크롬 P450, 폐밀리 1, 서브폐밀리 B, 폴리펩티드 1 (cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1); (3) VSX1 (NM_199425) - 비주얼 시스템 호메오박스 1 유사체, CHX10-유사체 (제브라피쉬) (visual system homeobox 1 homolog, CHX10-like (zebrafish)); (4) HOXA11 (NM_005523) - 호메오박스 A11 (homeobox A11); (5) T (NM_003181) - T, 브라카이우리 유사체 (마우스) (T, brachyury homolog (mouse)); (6) TBX5 (NM_080717) - T-박스 5 (T-box 5); (7) PENK (NM_006211) - 프로엔케팔린 (proenkephalin); (8) PAQR9 (NM_198504) - 프로제스틴 및 아디포큐 수용체 폐밀리 멤버 IV (progesterin and adipoQ receptor family member IV); (9) LHX2 (NM_004789) - 림 호메오박스 2 (LIM Homeobox 2); 및 (10) SIM2 (U80456) - 싱글-마인디드 호몰로그 2 (드로소필라) (single-minded homog 2 (Drosophila)로 구성된 군에서 선택되는 방광암 마커 유전자의 CpG 섬을 포함하는 단편화 하이브리다이제이션 할 수 있는 프로브를 포함하는 방광암 진단용 핵산 칩을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한, CDX2, CYP1B1, VSX1, HOXA11, T, TBX5, PENK, PAQR9, LHX2 및 SIM2로 구성된 군에서 선택되는 임상 샘플 유래 유전자의 메틸화를 검출하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명은 방광암 특이적 마커 유전자의 CpG 섬의 메틸화를 진단할 수 있는 방광암 진단용 키트 및 진단용 핵산 칩을 제공하는 효과가 있다.

[0017] 본 발명의 진단용 키트 및 진단용 핵산 칩을 이용하면, 방광암을 초기 형질전환 단계에서 진단할 수 있어 초기 진단이 가능하고, 통상적인 방법보다 정확하고 빠르게 방광암을 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 정상인과 방광암 환자의 소변세포로부터 CpG 마이크로어레이 분석을 통하여 방광암 진단을 위한 메틸화 바이오 마커를 발굴하는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 2는 방광암 세포주에서 10개의 메틸화 바이오 마커의 파이로시퀀싱을 통한 정량적인 메틸화 정도를 나타낸 것이다.

도 3은 10개의 바이오 마커 유전자의 임상 시료에서의 메틸화 지수를 측정한 것이다. 10개의 유전자를 이용하여, 정상, 방광암, 혈뇨 그리고 방광암 환자 소변세포에서의 메틸화 정도를 측정한 것이다.

도 4는 10개의 메틸화 바이오 마커의 각각의 방광암 진단에 대한 민감도 (sensitivity) 및 특이도 (specificity)를 Receiver Operating Characteristic (ROC) 커브 분석을 통하여 측정한 것이다.

도 5는 정상인 및 방광암 환자 소변세포에서의 메틸화 양성 빈도를 나타낸 것이다.

도 6은 로지스 회귀분석을 이용하여 10개의 바이오마커중 방광암 진단을 위한 최적 6개의 바이오마커 패널의 메틸화 상태 프로파일과 방광암 진단에 대한 민감도 및 특이도를 나타낸 것이다.

도 7은 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질 MBD를 이용하여 방광암 메틸화 바이오 마커인 SIM2 유전자의 메틸화 여부를 방광암 세포주에서 PCR 방법으로 측정한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명은 일 관점에서, 방광암 마커 유전자의 메틸화된 부위를 함유하는 방광암 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0020] 본 발명은 다른 관점에서, 방광암 마커 유전자의 CpG섬을 포함하는 단편과 하이브리다이제이션할 수 있는 프로브를 포함하는 방광암 진단용 핵산 칩에 관한 것이다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 부위는 적어도 하나의 메틸화된 CpG 디뉴클레오티드를 함유하는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 메틸화 부위는 서열번호 31 내지 서열번호 40으로 표시되는 DNA 서열 중 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 상기 프로브는 바람직하게는 10bp~1kb의 크기를 가지고, 방광암 마커 유전자의 CpG섬을 포함하는 염기서열과 하이브리다이제이션할 수 있을 정도의 상동성을 가지는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 10bp~100bp의 크기를 가지고, 방광암 마커 유전자의 CpG섬을 포함하는 염기서열과 엄격한 조건에서 하이브리다이제이션할 수 있을 정도의 상동성을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다. 프로브의 크기가 10bp이하이면, 비특이적 혼성화가 일어나며, 1kb이상이면, 프로브끼리의 결합이 발생하여, 하이브리다이제이션 결과판독이 어렵다.
- [0023] 본 발명에 따른 메틸화 마커 유전자를 스크리닝하는 방법은 다음 단계를 포함한다: (a) 형질전환 세포 및 비형질전환 세포로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계; (b) 상기 분리된 게놈 DNA로부터 메틸화된 DNA에 결합하는 단백질과 반응시켜 메틸화된 DNA를 분리하는 단계; 및 (c) 상기 메틸화된 DNA를 중폭시킨 후, CpG 마이크로어레이에 하이브리다이제이션한 다음, 정상 세포와 암 세포 간 메틸화 정도의 차이가 가장 큰 유전자를 메틸화 마커 유전자로 선정하는 단계.
- [0024] 상기 메틸화 바이오 마커 유전자의 선별방법으로 방광암뿐만 아니라, 방광암으로 진행 중인 여러 이형증 단계에서 다양하게 메틸화되는 유전자를 찾아낼 수 있으며, 선별된 유전자는 방광암 스크리닝, 위험성 평가, 예측, 병명 확인, 병의 단계 진단 및 치료 타겟의 선정에도 사용될 수 있다.
- [0025] 방광암 및 여러 단계의 이상에서 메틸화되는 유전자를 확인하는 것은 정확하고 효과적으로 방광암을 조기 진단할 수 있게 하며, 다중 유전자를 사용한 메틸화 목록 확립 및 치료를 위한 새로운 타겟을 확인할 수 있다. 추가로, 본 발명에 따른 메틸화 데이터는 다른 비-메틸화 연관 바이오 마커 검출 방법과 연계하면 더욱 정확한 방광암 진단 시스템을 확립할 수 있을 것이다.
- [0026] 본 발명의 상기 방법으로, 검체로부터 얻어진 하나 이상의 핵산 바이오 마커의 메틸화 단계를 결정하는 것을 포함하는 여러 단계 또는 기(期)의 방광암 진행을 진단할 수 있다. 방광암의 각 단계의 검체에서 분리된 핵산의 메틸화 단계를 방광 조직의 세포 증식성 이상을 갖지 않는 검체로부터 얻어진 하나 이상의 핵산의 메틸화 단계와 비교하여, 검체의 방광암의 특정 단계를 확인할 수 있으며, 상기 메틸화 단계는 하이퍼메틸화일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 일례로, 핵산은 유전자의 조절 부위에서 메틸화될 수 있다. 다른 예로, 메틸화는 유전자의 조절 부위의 외곽에서부터 시작되어 내부로 진행되기 때문에, 조절 부위의 외곽에서 메틸화를 검출하는 것으로 세포 형질전환에 관여하는 유전자를 조기 진단할 수 있다.
- [0028] 다른 예로, 본 발명에서는 다음 예 중의 하나 이상의 핵산의 메틸화 상태를 키트 또는 핵산 칩을 이용하여 검출하는 것에 의하여, 검체에 존재하는 방광 조직의 세포 성장성 이상(이형증)을 진단할 수 있다: CDX2 (NM_001265, 미축형 호메오박스 전사 인자 2, caudal type homeobox transcription factor 2); CYP1B1 (NM_000104, 시토크롬 P450, 패밀리 1, 서브패밀리 B, 폴리펩티드 1, cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1); VSX1 (NM_199425, 비주얼 시스템 호메오박스 1 유사체, CHX10-유사 (제브라피쉬), visual system homeobox 1 homolog, CHX10-like (zebrafish)); HOXA11 (NM_005523, 호메오박스 A11, homeobox A11); T (NM_003181, T, 브라카이우리 유사체 (마우스), T, brachyury homolog (mouse)); TBX5 (NM_080717, T-박스 5, T-box 5); PENK (NM_006211, 프로엔케팔린, proenkephalin); 및 PAQR9 (NM_198504, 프로제스틴 및 아디포큐 수용체 패밀리 멤버 IV, progestin and adipoQ receptor family member IV); LHX2 (NM_004789) - 림 호메오박스 2 (LIM Homeobox 2); SIM2 (U80456) - 싱글-마인디드 호몰로그 2 (드로소필라) (single-minded homolog 2 (Drosophila)); 유전자 및 이들의 조합.
- [0029] 본 발명의 진단용 키트 또는 핵산 칩을 이용하면 검체의 방광 조직의 세포 성장성 이상 성향(이형증 진행도)을 결정할 수 있다. 상기 방법은 검체로부터 분리한 하나 이상의 핵산의 메틸화 상태를 결정하는 것을 포함하

고, 상기 하나 이상의 핵산의 메틸화 단계는 방광 조직의 세포 성장성 이상 성향(이형증)이 없는 검체로부터 분리한 핵산의 메틸화 단계와 비교하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0030] 예로 들 수 있는 핵산은 CDX2 (NM_001265, 미측형 호메오박스 전사 인자 2, caudal type homeobox transcription factor 2); CYP1B1 (NM_000104, 시토크롬 P450, 패밀리 1, 서브패밀리 B, 폴리펩티드 1, cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1); VSX1 (NM_199425, 비주얼 시스템 호메오박스 1 유사체, CHX10-유사 (제브라피쉬), visual system homeobox 1 homolog, CHX10-like (zebrafish)); HOXA11 (NM_005523, 호메오박스 A11, homeobox A11); T (NM_003181, T, 브라카이우리 유사체 (마우스), T, brachyury homolog (mouse)); TBX5 (NM_080717, T-박스 5, T-box 5); PENK (NM_006211, 프로엔케팔린, proenkephalin); 및 PAQR9 (NM_198504, 프로제스틴 및 아디포큐 수용체 패밀리 멤버 IV, progestin and adipoQ receptor family member IV); LHX2 (NM_004789) - 림 호메오박스 2 (LIM Homeobox 2); SIM2 (U80456) - 싱글-마인디드 호몰로그 2 (드로소필라) (single-minded homog 2 (Drosophila)); 유전자 및 이의 조합.

[0031] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 상기 메틸화 유전자 마커를 이용하여 방광암을 형성할 가능성이 있는 세포의 조기 진단이 가능하다. 암세포에서 메틸화된다고 확인된 유전자가 임상적으로 또는 형태학적으로 정상으로 보이는 세포에서 메틸화되면, 상기 정상으로 보이는 세포는 암화가 진행되고 있는 것이다. 그러므로, 정상으로 보이는 세포에서의 방광암 특이적 유전자가 메틸화를 확인함으로, 방광암을 조기 진단할 수 있다.

[0032] 본 발명의 메틸화 마커 유전자를 이용하면, 검체에서 방광 조직의 세포 성장성 이상(이형증진행)을 검출할 수 있다. 상기 방법은 검체로부터 분리한 하나 이상의 핵산을 포함하는 시료를 하나 이상의 메틸화 상태를 결정할 수 있는 제제와 접촉시키는 것을 포함한다. 상기 방법은 하나 이상의 핵산에서 하나 이상의 부위의 메틸화 상태를 확인하는 것을 포함하고, 상기 핵산의 메틸화 상태는 방광 조직의 세포 성장성 이상(이형증 진행)을 가지지 않는 검체의 핵산에서의 동일한 부위의 메틸화 상태와 차이가 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0033] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 상기 키트 또는 핵산 칩을 이용하여 마커 유전자의 메틸화를 검사하는 것에 의하여 형질전환된 방광암 세포를 확인할 수 있다.

[0034] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 상기 키트 또는 핵산 칩을 이용하여 마커 유전자의 메틸화를 검사하는 것에 의하여 방광암을 진단할 수 있다.

[0035] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 정상 표현형을 나타내는 샘플을 이용하여 상기 키트 또는 핵산 칩을 이용하여 마커 유전자의 메틸화를 검사하는 것에 의하여 방광암으로 진행될 수 있는 가능성을 진단할 수 있다. 상기 샘플은 고체 또는 액체 조직, 세포, 소변, 혈청 또는 플라즈마를 사용할 수 있다.

[0036] 본 발명은 또 다른 관점에서, 임상 샘플 유래 유전자 프로모터의 메틸화를 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0037] 본 발명에 있어서, 상기 메틸화 측정방법은 PCR, 메틸화 특이 PCR(methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR(real time methylation specific PCR), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 정량 PCR, 파이로시퀀싱 및 바이설파이트 시퀀싱으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 임상 샘플은 암 의심 환자 또는 진단 대상 유래의 조직, 세포, 혈액 또는 소변인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0038] 본 발명에 있어서, 상기 유전자의 프로모터 메틸화 여부를 검출하는 방법은 다음 단계를 포함한다: (a) 임상 샘플로부터 샘플 DNA를 분리하는 단계; (b) 상기 분리된 DNA를 CDX2, CYP1B1, VSX1, HOXA11, T, TBX5, PENK, PAQR9, LHX2 및 SIM2로 구성된 군에서 선택되는 유전자 프로모터의 CpG 섬을 포함하는 단편을 증폭할 수 있는 프라이머를 사용하여 증폭하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 증폭된 결과물의 생성 유무를 근거로 프로모터의 메틸화 여부를 결정하는 단계.

[0039] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 방광암에서 특이적으로 메틸화되는 유전자의 메틸화 빈도를 검토하고, 방광암 진행 가능성을 가지는 조직의 메틸화 빈도를 정하는 것에 의하여 조직의 방광암으로의 발전 가능성을 평가할 수 있다.

[0040] 본 발명은 (1) CDX2 (NM_001265) - 미측형 호메오박스 전사 인자 2 (caudal type homeobox transcription factor 2); (2) CYP1B1 (NM_000104) - 시토크롬 P450, 패밀리 1, 서브패밀리 B, 폴리펩티드 1 (cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1); (3) VSX1 (NM_199425) - 비주얼 시스템 호메오박스 1 유사체, CHX10-유사 (제브라피쉬) (visual system homeobox 1 homolog, CHX10-like (zebrafish)); (4) HOXA11 (NM_005523) - 호메오박스 A11 (homeobox A11); (5) T (NM_003181) - T, 브라카이우리 유사체 (마우스) (T, brachyury homolog (mouse)); (6) TBX5 (NM_080717) - T-박스 5 (T-box 5); (7) PENK (NM_006211) - 프로엔케팔린 (proenkephalin); (8) PAQR9 (NM_198504) - 프로제스틴 및 아디포큐 수용체 패밀리 멤버 IV

(progesterin and adiponectin receptor family member IV); (9) LHX2 (NM_004789) - 럼 호메오박스 2 (LIM Homeobox 2); 및 (10) SIM2 (U80456) - 싱글-마인디드 호몰로그 2 (드로소필라) (single-minded homog 2 (Drosophila)로 구성된 군에서 선택되는 유전자의 메틸화 부위를 함유하는 방광암 진단용 바이오마커를 제공한다.

[0041] *본 발명에서 사용된 "세포 형질전환"은 정상에서 비정상으로, 비-종양성에서 종양성으로, 미분화에서 분화로, 줄기세포에서 비-줄기세포로와 같이 세포의 특징이 한 형태에서 다른 형태로 바뀌는 것을 의미한다. 추가적으로, 상기 형질전환은 세포의 형태, 표현형, 생화학적 성질 등에 의하여 인식될 수 있다.

[0042] 본 발명에서 암의 "조기 확인"은 전이되기 전에 암의 가능성을 발견하는 것으로, 바람직하게는 검체 조직 또는 세포에서 형태학적 변화가 관찰되기 전에 발견하는 것이다. 추가적으로, 세포 형질전환의 "조기 확인"은 세포가 형질전환되는 형태가 되기 전에 초기 단계에서 형질전환이 일어날 가능성 높은 것을 말한다.

[0043] 본 발명에서 "하이퍼메틸화"는 CpG 섬의 메틸화를 의미한다.

[0044] 본 발명에서, "샘플" 또는 "검체 샘플"은 수행되는 분석의 종류에 따라, 개개인, 체액, 세포주, 조직 배양 등에서 얻어지는 모든 생물학적 샘플을 포함하는 폭넓은 범위의 샘플을 의미한다. 포유동물로부터 체액 및 조직 생검을 획득하는 방법은 통상적으로 널리 알려져 있다. 바람직한 소스는 방광의 생검(biopsy)이다.

메틸화 조절 바이오 마커의 스크리닝

[0045] 본 발명에서는 세포 또는 조직이 형질전환되거나 세포의 형태가 다른 형태로 변화될 때에 메틸화되는 바이오 마커 유전자를 스크리닝하였다. 여기서, "형질전환" 세포는 정상형태가 비정상형태로, 비-종양성이 종양성으로, 미분화형태가 분화형태로 바뀌는 등의 세포 또는 조직의 형태가 다른 형태로 변화되는 것을 의미한다.

[0046] 본 발명의 일 실시예에서는 정상인 및 방광암 환자의 소변으로부터 소변세포를 분리한 후, 상기 소변세포로부터 게놈 DNA를 분리하였다. 게놈 DNA로부터 메틸화된 DNA만을 획득하기 위하여, 상기 게놈 DNA를 메틸화된 DNA에 결합하는 McrBt와 반응시킨 후, McrBt 단백질에 결합하는 메틸화된 DNA를 분리하였다. 상기 분리된 McrBt 단백질에 결합하는 메틸화된 DNA를 증폭한 후, 정상인 유래 DNA는 Cy3으로, 방광암 환자 유래 DNA는 Cy5로 표지한 다음, human CpG 마이크로어레이에 하이브리다이제이션시켜 정상인과 방광암 환자간 메틸화 정도의 차이가 가장 큰 10개의 유전자를 바이오 마커로 선택하였다.

[0047] 본 발명에서는 상기 10개의 바이오 마커가 메틸화되었는지 추가로 확인하기 위하여, 파이로시퀀싱을 수행하였다.

[0048] 즉, 방광암 세포주 RT-4, J82, HT1197 및 HT1376로부터 전체 게놈 DNA를 분리하여 바이설파이트를 처리한 후, 바이설파이트로 전환된 게놈 DNA를 증폭하였다. 이후, 상기 증폭된 PCR 산물을 파이로시퀀싱을 수행하여 메틸화 정도를 측정하였다. 그 결과, 상기 10개의 바이오 마커 유전자가 모두 메틸화되어 있다는 것을 확인할 수 있었다.

방광암에 대한 바이오 마커

[0049] 본 발명에서는 방광암 진단을 위한 바이오 마커를 제공한다.

방광암에 대한 바이오 마커-정상세포와의 비교를 위한 암세포의 용도

[0050] 본 실시예에서, "정상" 세포는 비정상적 세포 형태 또는 세포학적 성질의 변화를 나타내지 않은 세포를 의미한다. "종양"세포는 암 세포를 의미하고, "비종양" 세포는 병증 조직의 일부이지만, 종양 부위는 아니라고 판단되는 세포를 의미한다.

[0051] 본 발명은 일 관점에서, 방광암과 다음에 기재된 10개 유전자의 하이퍼메틸화 사이의 관련성의 발견에 기반을 둔 것이다: CDX2 (NM_001265, 미측형 호메오박스 전사 인자 2, caudal type homeobox transcription factor 2); CYP1B1 (NM_000104, 시토크롬 P450, 폐밀리 1, 서브폐밀리 B, 폴리펩티드 1, cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1); VSX1 (NM_199425, 비주얼 시스템 호메오박스 1 유사체, CHX10-유사 (제브라피쉬), visual system homeobox 1 homolog, CHX10-like (zebrafish)); HOXA11 (NM_005523, 호메오박스 A11,

homeobox A11); T (NM_003181, T, 브라카이우리 유사체 (마우스), T, brachyury homolog (mouse)); TBX5 (NM_080717, T-박스 5, T-box 5); PENK (NM_006211, 프로엔케팔린, proenkephalin); 및 PAQR9 (NM_198504, 프로제스틴 및 아디포큐 수용체 패밀리 멤버 IV, progestin and adiponectin receptor family member IV); LHX2 (NM_004789) - 림 호메오박스 2 (LIM Homeobox 2); SIM2 (U80456) - 싱글-마인디드 호몰로그 2 (드로소필라) (single-minded homog 2 (Drosophila); 유전자.

[0055] 본 발명의 진단용 키트 및 핵산 칩의 다른 용도로, 검체에서 분리된 하나 이상의 핵산의 메틸화 단계를 결정하여 검체의 방광 조직의 세포 성장성 이상을 조기 진단할 수 있다. 상기 하나 이상의 핵산의 메틸화 단계는 방광 조직의 세포 성장성 이상을 가지고 있지 않은 검체로부터 분리된 하나 이상의 핵산의 메틸화 상태와 비교하는 것을 특징으로 할 수 있다. 핵산은 CpG 섬과 같은 CpG-함유 핵산인 것이 바람직하다.

[0056] 본 발명의 진단용 키트 및 핵산 칩의 다른 용도로, 검체로부터 분리된 하나 이상의 핵산의 메틸화를 결정하는 것을 포함하는 검체의 방광 조직의 세포 성장성 이상 소양을 진단할 수 있다. 상기 핵산은 CDX2 (NM_001265, 미축형 호메오박스 전사 인자 2, caudal type homeobox transcription factor 2); CYP1B1 (NM_000104, 시토크롬 P450, 패밀리 1, 서브패밀리 B, 폴리펩티드 1, cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1); VSX1 (NM_199425, 비주얼 시스템 호메오박스 1 유사체, CHX10-유사 (제브라피쉬), visual system homeobox 1 homolog, CHX10-like (zebrafish)); HOXA11 (NM_005523, 호메오박스 A11, homeobox A11); T (NM_003181, T, 브라카이우리 유사체 (마우스), T, brachyury homolog (mouse)); TBX5 (NM_080717, T-박스 5, T-box 5); PENK (NM_006211, 프로엔케팔린, proenkephalin); 및 PAQR9 (NM_198504, 프로제스틴 및 아디포큐 수용체 패밀리 멤버 IV, progestin and adiponectin receptor family member IV); LHX2 (NM_004789) - 림 호메오박스 2 (LIM Homeobox 2); SIM2 (U80456) - 싱글-마인디드 호몰로그 2 (드로소필라) (single-minded homog 2 (Drosophila); 유전자 및 그의 조합을 코딩하는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 하나 이상의 핵산의 메틸화 단계는 방광 조직의 세포 성장성 이상에 대한 소양을 가지고 있지 않은 검체로부터 분리된 하나 이상의 핵산의 메틸화 상태와 비교하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0057] 상기 "소양"은 상기 세포 성장성 이상에 걸리기 쉬운 성질을 의미한다. 소양을 가진 검체는 아직은 세포 성장성 이상을 가지고 있지 않지만, 세포 성장성 이상이 존재하거나 존재할 경향이 증가된 검체를 말한다.

[0058] 본 발명은 다른 관점에서, 검체의 핵산을 포함하는 시료를 시료의 메틸화 상태를 결정할 수 있는 제제와 접촉시키고, 하나 이상의 핵산의 하나 이상의 부위의 메틸화를 확인하는 것을 포함하는 검체의 방광 조직의 세포 성장성 이상을 진단하는 방법을 제공한다. 여기서, 하나 이상의 핵산의 하나 이상의 부위의 메틸화는 세포 성장성 이상을 가지지 않는 검체의 동일한 핵산의 동일한 부위의 메틸화 단계와 다른 것을 특징으로 할 수 있다.

[0059] 본 발명의 방법은 검체로부터 분리된 하나 이상의 핵산의 하나 이상의 부위의 메틸화를 결정하는 단계를 포함한다. 여기서, "핵산" 또는 "핵산 서열"이란 올리고뉴클레오티드, 뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드를 의미하거나 이들의 단편, 단일가닥 또는 이중가닥의 계획 기원 또는 합성 기원의 DNA 또는 RNA, 셀스 또는 안티센스 가닥의 계획 기원 또는 합성 기원의 DNA 또는 RNA, PNA(peptide nucleic acid) 또는 자연 기원 또는 합성 기원의 DNA 양 또는 RNA 양 물질을 말한다. 핵산이 RNA이면, 데옥시뉴클레오티드 A, G, C 및 T를 대신하여, 각각 리보뉴클레오티드 A, G, C 및 U로 대체된다는 것은 당해 분야 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명하다.

[0060] 서로 다르게 메틸화된 CpG 섬의 존재를 검출할 수 있는 핵산이라면 어떤 것이든 사용할 수 있다. 상기 CpG 섬은 핵산 서열에서 CpG가 풍부한 부위이다.

메틸화(methylation)

[0062] 본 발명에서의 정제되거나 정제되지 않은 형태의 어떠한 핵산도 사용될 수 있으며, 타겟 부위(예를 들면, CpG-함유 핵산)를 함유하는 핵산 서열을 함유하고 있거나 함유할 것으로 의심되는 어떠한 핵산도 사용될 수 있다. 차별적으로 메틸화될 수 있는 핵산 부위가 CpG 섬이고, 이는 다른 디뉴클레오티드 CpG 핵산 부위와 비교하여 높은 CpG 밀도를 가지는 핵산 서열이다. 이중(doublet) CpG는 G*C 염기쌍의 비율로 예측하였을 때, 척추동물 DNA에서 단 20% 정도의 확률로 나타난다. 특정 부위에서, 이중 CpG의 밀도는 계획의 다른 부위와 비교하여 10배나 더 높다. CpG 섬은 평균 G*C 비율이 약 60%로, 보통의 DNA의 G*C 비율은 평균 40%를 나타낸다. CpG 섬은 전형적으로 약 1~2kb 길이를 가지고, 인간 계획에는 약 45,000개의 CpG 섬이 존재한다.

[0063] 여러 유전자에서, CpG 섬은 프로모터의 업스트림(upstream)에서 시작하여, 다운스트림의 전사 부위까지 확장

된다. 프로모터에서 CpG 섬의 메틸화는 보통 유전자의 발현을 억제시킨다. CpG 섬은 또한 유전자 코딩 부위의 3' 부위뿐만 아니라, 유전자 코딩 부위의 5' 부위를 둘러싸고 있을 수 있다. 그러므로, CpG 섬은 프로모터 부위를 포함하는 조절 부위의 코딩 서열 업스트림, 코딩 부위(예를 들어, 엑손영역), 코딩 부위의 다운스트림, 예를 들면, 인핸서 부위 및 인트론을 포함하는 여러 부위에서 발견된다.

[0064] 통상적으로, CpG-함유 핵산은 DNA이다. 그러나, 본 발명의 방법은 예를 들면, DNA 또는 DNA와 mRNA를 포함하는 RNA를 함유하는 시료를 적용할 수 있으며, 여기서 DNA 또는 RNA는 단일가닥 또는 이중가닥일 수 있으며, 또는 DNA-RNA 하이브리드를 함유한 시료인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0065] 핵산 혼합물 또한 사용할 수 있다. 검출될 특이적인 핵산 서열은 큰 문자의 분획일 수 있고, 처음부터 특이 서열이 전체 핵산 서열을 구성하는 분리된 문자 형태로 존재할 수 있다. 상기 핵산 서열은 순수한 형태로 존재하는 핵산일 필요는 없으며, 핵산은 전체 인간 DNA가 포함되어 있는 것과 같이 복잡한 혼합물 내의 적은 분획일 수도 있다. 시료에 포함된 핵산의 메틸화 정도를 측정하는 데 사용되거나, 메틸화된 CpG 섬을 검출하는데 사용되는 시료에 포함된 핵산은 Sambrook 등(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY., 1989)에 기재된 여러 가지 방법으로 추출될 수 있다.

[0066] 핵산은 정보를 코드하거나 핵산의 전사를 조절하는 DNA 부위인 조절 부위를 포함할 수 있다. 조절 부위는 적어도 하나의 프로모터를 포함한다. "프로모터"는 전사를 지시하는데 필요한 최소한의 서열이고, 프로모터-의 존성 유전자에서 세포 타입 특이적, 조직 특이적 또는 외부 시그널이나 제제에 의한 유도성을 조절할 수 있다. 프로모터는 유전자의 5' 또는 3' 부위에 위치한다. 프로모터 부위의 전체 또는 부분의 핵산 수는 CpG 섬 부위의 메틸화를 측정하는데 적용될 수 있다. 타겟 유전자 프로모터의 메틸화는 외곽에서부터 내부로 진행한다. 그러므로, 세포 전환의 초기 단계는 프로모터 부위의 외곽에서의 메틸화를 분석함으로써 검출할 수 있다.

[0067] 검체로부터 분리된 핵산은 검체의 생물학적 시료에 의하여 얻어진다. 방광암이나 방광암의 진행 단계를 진단하고 싶다면, 스크랩이나 생검으로 방광 조직에서 핵산을 분리하여야 한다. 이러한 시료는 당해 분야에서 알려진 여러 의학적 과정에 의하여 얻어질 수 있다.

[0068] 본 발명의 한 양태에서, 검체로부터 얻어진 샘플의 핵산의 메틸화 정도는 방광 조직의 세포 성장성 이상이 없는 검체의 동일한 핵산 부분과 비교하여 측정한다. 하이퍼메틸화는 하나 이상의 핵산에서 메틸화된 대립유전자가 존재하는 것을 말한다. 방광 조직의 세포 성장성이 이상이 없는 검체는 동일한 핵산을 검사했을 때, 메틸화 대립유전자가 나타나지 않는다.

샘플(sample)

[0069] 본 발명은 방광암의 조기 확인에 대하여 기술하고 있으며, 방광암 특이적 유전자 메틸화를 이용하고 있다. 방광암 특이적 유전자의 메틸화는 종양 부위의 부근 조직에서도 일어났다. 그러므로, 방광암의 조기 확인 방법은 액체 또는 고체 조직을 포함하는 모든 샘플로 방광암-특이적 유전자의 메틸화의 유무를 확인할 수 있다. 상기 샘플은 조직, 세포, 소변, 혈청 또는 플라즈마를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

개별 유전자 및 패널

[0070] 본 발명은 진단 또는 예측 마커로서 각 유전자를 개별적으로 사용하거나, 몇몇 마커 유전자를 조합하여 패널 디스플레이 형태로 하여 사용할 수 있고, 몇몇의 마커 유전자는 전체적인 패턴 또는 메틸화된 유전자의 목록을 통하여 신뢰성 및 효율성을 향상시키는 것을 확인할 수 있다. 본 발명에서 확인된 유전자는 개별적으로, 또는 본 실시예에서 언급된 유전자가 조합된 유전자 세트로 사용될 수 있다. 또는, 유전자들은 함께 메틸화된 유전자의 수 및 그 중요도에 따라 순위를 매길 수 있고, 가중치를 둘 수 있으며, 암으로 발전할 가능성의 수준을 선정할 수 있다. 이러한 알고리즘은 본 발명에 속한다.

메틸화 검출 방법

메틸화 특이 PCR (methylation specific PCR)

[0071] 지노믹 DNA에 바이설파이트를 처리하면 5'-CpG'-3' 부위의 시토신이 메틸화된 경우에는 그대로 시토신으로 남

아 있고, 비메틸화된 경우에는 우라실로 변하게 된다. 따라서, 바이설파이트 처리 후 변환된 염기서열을 대상으로 5'-CpG-3' 염기서열이 존재하는 부위에 해당하는 PCR 프라이머를 제작하였다. 이때 메틸화된 경우에 해당되는 PCR 프라이머와 비메틸화된 경우에 해당하는 두 종류의 프라이머를 제작하였다. 지노믹 DNA를 바이설파이트로 변환시킨 다음, 상기 두 종류의 프라이머를 이용하여 PCR을 하면 메틸화된 경우에는 메틸화된 염기서열에 해당되는 프라이머를 사용한 것에서 PCR 산물이 만들어지게 되고, 반대로 비메틸화인 경우에는 비메틸화에 해당되는 프라이머를 이용한 것에서 PCR 산물이 만들어진다. 메틸화 여부는 아가로즈겔 전기영동방법으로 정성적으로 확인할 수 있다.

[0076] 실시간 메틸화 특이 PCR (real time methylation specific PCR)

실시간 메틸화 특이 PCR은 메틸화 특이 PCR 방법을 실시간 측정방법으로 전환한 것으로, 지노믹 DNA에 바이설파이트를 처리한 후, 메틸화된 경우에 해당하는 PCR 프라이머를 디자인하고, 이들 프라이머를 이용하여 실시간 PCR을 수행하는 것이다. 이때, 증폭된 염기서열과 상보적인 TanMan 프로브를 이용하여 검출하는 방법과 Sybergreen을 이용하여 검출하는 두 가지 방법이 있다. 따라서, 실시간 메틸화 특이 PCR은 메틸화된 DNA만을 선택적으로 정량 분석할 수 있다. 이때, *in vitro* methylated DNA 샘플을 이용하여 표준곡선을 작성하고, 표준화를 위하여 염기서열내에 5'-CpG-3' 서열이 없는 유전자를 음성대조군으로 함께 증폭하여 메틸화 정도를 정량 분석하였다.

[0078] 파이로시퀀싱

*파이로시퀀싱 방법은 바이설파이트 시퀀싱 방법을 정량적인 실시간 시퀀싱으로 변환한 방법이다. 바이설파이트 시퀀싱과 마찬가지로 지노믹 DNA를 바이설파이트를 처리하여 전환시킨 다음, 5'-CpG-3' 염기서열이 없는 부위에 해당하는 PCR 프라이머를 제작하였다. 지노믹 DNA를 바이설파이트로 처리한 후, 상기 PCR 프라이머로 증폭한 다음, 시퀀싱 프라이머를 이용하여 실시간 염기서열 분석을 수행하였다. 5'-CpG-3' 부위에서 시토신파티민의 양을 정량적으로 분석하여 메틸화 정도를 메틸화 지수로 나타내었다.

[0080] 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR 또는 정량 PCR 및 DNA 칩

메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR 또는 DNA 칩 방법은 메틸화 DNA에만 특이적으로 결합하는 단백질을 DNA와 섞어주게 되면, 메틸화 DNA에만 특이적으로 단백질이 결합하기 때문에 메틸화 DNA만을 선택적으로 분리할 수 있다. 지노믹 DNA를 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질과 섞어준 후, 메틸화된 DNA만을 선택적으로 분리하였다. 이들 분리된 DNA를 프로모터 부위에 해당하는 PCR 프라이머를 이용하여 증폭한 후, 아가로즈 전기영동으로 메틸화 여부를 측정하였다.

또한, 정량 PCR 방법으로도 메틸화 여부를 측정할 수 있으며, 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질로 분리한 메틸화 DNA는 형광 염료로 표지하여 상보적인 프로브가 접적된 DNA칩에 하이브리디제이션시킴으로써 메틸화 여부를 측정할 수 있다. 여기서 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질은 McrBt에 제한되지 않는다.

[0083] 차별적 메틸화의 검출-메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제

차별적 메틸화의 검출은 메틸화되지 않은 CpG 부위만을 절단하는 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제와 핵산샘플을 접촉시켜 비메틸화된 핵산을 절단하는 것으로 수행할 수 있다.

별도의 반응으로, 상기 샘플을 메틸화 및 비메틸화 CpG 부위를 모두 절단하는 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제의 이소키소머(isochizomer)와 접촉시켜, 메틸화된 핵산을 절단하였다.

특이적 프라이머를 핵산 샘플에 침가하고, 통상의 방법으로 핵산을 증폭시켰다. 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제를 처리한 샘플에서 증폭 산물이 존재하고, 메틸화 및 비메틸화 CpG 부위를 모두 절단하는 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제의 이소키소머를 처리한 샘플에서 증폭 산물이 존재하지 않으면, 분석된 핵산 부위에 메틸화가 일어난 것이다. 그러나, 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제를 처리한 샘플에서 증폭 산물이 존재하지 않고, 메틸화 및 비메틸화 CpG 부위를 모두 절단하는 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제의 이소키소머를

처리한 샘플에서도 증폭 산물이 존재하지 않는다는 것은 분석된 핵산 부위에 메틸화가 일어나지 않은 것이다.

[0087] 여기서, "메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제"는 인식 부위에 CG를 포함하고, C가 메틸화되지 않았을 때와 비교하여 C가 메틸화되었을 때 활성을 가지는 제한효소이다 (예를 들면, *Sma*I). 메틸레이션 민감성 제한 엔도뉴클레아제의 비제한적 예로써, *Msp*I, *Hpa*II, *Bss*HII, *Bst*UI 및 *Not*I이 포함된다. 상기 효소들은 단독으로 또는 조합하여 사용될 수 있다. 다른 메틸레이션 민감성 제한 엔도뉴클레오티드로는 예를 들어, *Sac*II 및 *Eag*I를 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0088] 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제의 이소키소머는 메틸레이션 민감성 제한 엔도뉴클레아제와 동일한 인식 부위를 갖는 제한 엔도뉴클레아제이지만, 메틸화된 CGs와 비메틸화된 CGs를 모두 절단하며, 예를 들면, *Msp*I를 들 수 있다.

[0089] 본 발명의 프라이머는 증폭될 로커스의 각 가닥과 "대체적으로" 상보성을 가지도록 제작되고, 상기에서 설명한 바와 같이, 적당한 G 또는 C 뉴클레오티드를 포함한다. 이것은 중합반응을 수행하는 조건에서 프라이머가 대응하는 핵산 가닥과 하이브리다이제이션 되기에 충분한 상보성을 가지는 것을 의미한다. 본 발명의 프라이머는 증폭 과정에 사용되며, 상기 증폭 과정은 예를 들면, PCR과 같은, 타겟 로커스가 많은 반응 단계를 거치면서 기하급수적인 숫자로 증가하는 효소 연속 반응이다. 전형적으로, 한 프라이머(안티센스 프라이머)는 로커스의 네가티브(-) 가닥에 대하여 상동성을 가지고, 나머지 하나의 프라이머(센스 프라이머)는 포지티브(+) 가닥에 대하여 상동성을 가진다. 변성된 핵산에 프라이머가 어닐링되면, DNA 폴리머라아제 I(Klenow) 및 뉴클레오티드와 같은 효소 및 반응물들에 의하여 사슬이 신장되고, 그 결과, 타겟 로커스 서열을 함유하는 + 와 - 가닥이 새롭게 합성된다. 상기 새로이 합성된 타겟 로커스가 주형으로도 사용되어 변성, 프라이머 어닐링 및 사슬 신장의 사이클이 반복되면 타겟 로커스 서열의 기하급수적인 합성이 진행된다. 상기 연속 반응의 산물은 반응에 사용된 특이 프라이머의 말단과 대응하는 말단을 가지는 독립적인 이중가닥 핵산이다.

[0090] 상기 증폭 반응은 당해 분야에서 보편적으로 사용되고 있는 PCR인 것이 바람직하다. 그러나, 리얼타임 PCR 또는 등온 효소를 사용한 선형증폭과 같은 대체적인 방법도 사용할 수 있으며, 멀티플렉스 증폭 반응 역시 사용할 수 있다.

[0091] 차별적 메틸화의 검출-바이설플라이트 시퀀싱 방법

[0092] 메틸화 CpG를 함유한 핵산을 검출하는 다른 방법은 핵산을 함유한 시료를 비메틸화 시토신을 변형시키는 제제와 접촉시키는 단계 및 CpG-특이적 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 시료의 CpG-함유 핵산을 증폭시키는 단계를 포함한다. 여기서, 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머는 변형된 메틸화 및 비메틸화 핵산을 구별하여 메틸화 핵산을 검출하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 증폭 단계는 선택적이고, 바람직하지만 필수적인 것은 아니다. 상기 방법은 변형된(예를 들면, 화학적으로 변형된) 메틸화 및 비메틸화 DNA를 구별하는 PCR 반응에 의존하는 것이다. 상기와 같은 방법은 미국특허 5,786,146에 개시되어 있으며, 상기 특허에는 메틸화 핵산의 검출을 위한 바이설플라이트(bisulfite) 시퀀싱과 연관하여 기재되어 있다.

[0093] 기질

[0094] 타겟 핵산 부위가 증폭되면 핵산 서열의 존재를 검출하기 위하여, 상기 핵산 증폭 산물은 고체 지지체(기질)에 고정된 알려진 유전자 프로브와 하이브리다이제이션될 수 있다.

[0095] 여기서, "기질"은 물질, 구조, 표면 또는 재료, 비생물학적이고, 합성되고, 무생물, 평면, 구형 또는 특이적 결합, 평편한 표면의 물질을 포함하는 혼합물 수단으로, 하이브리다이제이션 또는 효소 인식 부위 또는 대다수의 다른 인식 부위 또는 표면, 구조 또는 재료로 구성된 수많은 다른 분자 종을 넘어서는 수많은 다른 인식 부위를 포함할 수 있다. 상기 기질은 예를 들면, 반도체, (유기)합성 메탈, 합성 반도체, 인슐레이터 및 도판트; 금속, 합금, 원소, 화합물 및 미네랄; 합성되고, 분해되며, 에칭되고, 리소그라프되며, 프린트되고 마이크로패브리케이트된 슬라이드, 장치, 구조 및 표면; 산업적, 폴리머, 플라스틱, 맴브레인, 실리콘, 실리케이트, 유리, 금속 및 세라믹; 나무, 종이, 카드보드, 면, 울, 천, 직조 및 비직조 섬유, 재료 및 패브릭일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0096] 몇몇 형태의 맴브레인은 당해 분야에서 핵산 서열에 대하여 부착력을 가진다고 알려져 있다. 이러한 맴브레인의 특이적이고 비제한적인 예로 니트로셀룰로오스 또는 폴리비닐클로라이드, 디아조티즈드(diazotized) 페이

퍼 및 GENESCREEN™, ZETAPROBE™(Biorad) 및 NYTRAN™ 등의 상업적으로 사용되는 맴브레인과 같이 유전자 발현 검출용 맴브레인을 들 수 있다. 비드, 클래스, 웨이퍼 및 금속 기질도 포함된다. 이러한 목적물에 핵산을 부착시키는 방법은 당해 분야에서 잘 알려져 있다. 이와 다르게, 액체 상에서도 스크리닝을 수행할 수 있다.

[0097] 하이브리다이제이션 조건

[0098] 핵산 하이브리다이제이션 반응에서, 엄격한 특정 수준을 달성하기 위하여 사용되는 조건은 하이브리다이즈되는 핵산의 성질에 따라 다양하다. 예를 들면, 하이브리다이제이션되는 핵산 부위의 길이, 상동성 정도, 뉴클레오티드 서열 조성(예를 들면, GC/AT 조성비) 및 핵산 타입(예를 들면, RNA, DNA)등이 하이브리다이제이션 조건을 선택하는데 고려된다. 추가적인 고려 조건은 핵산이 예를 들면, 필터 등에 고정화되어 있는지의 여부이다.

[0099] 매우 엄격하게 진행되는 조건의 예를 들면 다음과 같다: 실온의 2X SSC/0.1% SDS(하이브리다이제이션 조건); 실온의 0.2X SSC/0.1% SDS(엄격성이 낮은 조건); 42°C에서의 0.2X SSC/0.1% SDS(보통의 엄격성을 가지는 조건); 68°C에서 0.1X SSC(높은 엄격성을 가지는 조건). 세척 과정은 이들 중 한가지 조건을 사용하여 수행할 수 있고, 예를 들면 높은 엄격성을 가지는 조건, 또는 상기 조건을 각각 사용할 수 있으며, 상기 기재된 순서대로 각각 10~15분씩, 상기 기재된 조건을 전부 또는 일부 반복하여 수행할 수 있다. 그러나 상기에 기술한 바와 같이, 최적 조건은 포함된 특별한 하이브리다이제이션 반응에 따라 다양하며, 실험을 통하여 결정할 수 있다. 일반적으로, 중요한 프로브의 하이브리다이제이션에는 높은 엄격성을 가지는 조건이 사용된다.

[0100] 표지(Label)

[0101] 중요한 프로브는 검출할 수 있도록 표지되며, 예를 들면 방사선 동위원소, 형광 화합물, 바이오 발광 화합물, 화학 발광 화합물, 금속 퀄레이트 또는 효소로 표지될 수 있다. 상기와 같은 프로브를 적당하게 표지하는 것은 당해 분야에서 널리 알려진 기술이며, 통상적인 방법을 통하여 수행할 수 있다.

[0102] 키트(Kit)

[0103] 본 발명에 의하면, 검체의 세포 성장성 이상을 검출하는 데 유용한 키트를 제공하고 있다. 본 발명의 키트는 샘플을 담는 구획된 캐리어 수단, 비메틸화 시토신을 민감하게 절단하는 제제를 함유하는 첫번째 용기, CpG 함유 핵산을 증폭하기 위한 프라이머를 함유하는 두번째 용기 및 절단된 또는 절단되지 않은 핵산의 존재를 검출하는 수단이 함유된 세번째 용기를 포함하는 하나 이상의 용기를 포함한다. 본 발명에 따라 사용되는 프라이머는 서열번호 1~20에 기재된 서열, 기능적 조합 및 그 단편을 포함한다. 기능적 조합 또는 단편은 게놈 상에서 메틸화가 일어났는지의 여부를 검출하는 프라이머로 사용된다.

[0104] 캐리어 수단은 병, 튜브와 같은 하나 이상의 용기를 함유하기에 적합하고, 각 용기는 본 발명의 방법에 사용되는 독립적 구성요소들을 함유한다. 본 발명의 명세서에서, 당해 분야의 통상의 지식을 가진 자는 용기 중의 필요한 제제를 손쉽게 분배할 수 있다. 예를 들면, 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제를 함유하는 용기를 하나의 용기로 구성할 수 있다. 하나 이상의 용기는 중요 핵산 로커스와 상동성을 가지는 프라이머를 포함할 수 있다. 또한, 하나 이상의 용기는 메틸화 민감성 제한효소의 이소키소머를 포함할 수 있다.

[0105] 실시예

[0106] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0107] 실시예 1: 방광암 특이적 메틸화 유전자 발굴

[0108] 방광암에서 특이적으로 메틸화된 바이오 마커를 선별하기 위하여, 방광암 환자 10명 및 정상인 10명의 소변 약 20mL를 각각 4,200ng에서 10분간 원심분리(한일과학)하여 소변세포를 분리하였다. 상층액을 버리고, PBS

5ml를 이용하여 세포 침전물을 2회 세척한 후, 상기 세포 침전물로부터 QIAamp DNA Mini kit(QIAGEN, USA)를 사용하여 게놈 DNA를 분리하였다. 상기 분리된 게놈 DNA 500ng을 초음파 분쇄(Vibra Cell, SONICS)하여, 약 200~300bp의 게놈 DNA 절편을 제작하였다.

[0109] 게놈 DNA로부터 메틸화된 DNA만을 획득하기 위하여, 메틸화 DNA에 결합한다고 알려진 메틸바인딩 도메인 (Methyl binding domain; MBD) (Fraga et al., 2003, Nucleic Acid Res., 31: 1765-1774)을 사용하였다. 즉, 6X His가 tagging된 MBD 2 μ g을 대장균 JM110(한국생명공학연구원 생명자원센터, No. 2638) 게놈 DNA 500ng과 pre-incubation시킨 다음, Ni-NTA 마그네틱 비드 (Qiagen, USA)에 결합시켰다. 여기에 상기 초음파 분쇄된 정상인 및 방광암 환자 소변세포에서 분리한 게놈 DNA 500ng을 결합 반응 용액(10mM Tris-HCl(pH 7.5), 50mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 3mM MgCl₂, 0.1% Triton-X100, 5% 글리세롤, 25mg/ml BSA)하에서 4°C, 20 분간 반응시킨 후, 700mM NaCl이 포함된 결합 반응 용액 500 μ l를 이용하여 3회 세척한 다음, MBD에 결합된 메틸화된 DNA를 QiaQuick PCR purification kit(QIAGEN, USA)을 사용하여 분리하였다.

[0110] 이후, 상기 MBD에 결합된 메틸화된 DNA를 게놈 증폭 키트(Sigma, USA, Cat. No. WGA2)를 이용하여 증폭한 후, 상기 증폭된 게놈 DNA 4 μ g을 BioPrime Total Genomic Labeling system I(Invitrogen Corp., USA)을 이용하여 정상인 유래 DNA는 Cy3, 방광암 환자 유래 DNA는 Cy5로 표지하였다. 상기 정상인 및 방광암 환자의 DNA를 혼합한 후, 244K human Cpg 마이크로어레이(Agilent, USA)에 하이브리다이제이션시켰다 (도 1). 상기 하이브리다이제이션 후, 일련의 세척 과정을 거친 다음, Agilent scanner를 이용하여 스캐닝하였다. 마이크로어레이 이미지로부터 시그널 값의 계산은 Feature Extraction 프로그램 v. 9.5.3.1(Agilent)을 이용하여 정상인과 방광암 환자 시료 간 시그널의 상대적인 강도 차이를 계산하였다.

[0111] 정상에서 메틸화되지 않은 스팟을 선택하기 위하여, 전체 Cy3 시그널 값의 평균값을 구한 후, 이 평균값의 10% 이하인 시그널 값을 갖는 스팟을 정상인의 시료에서 메틸화되지 않은 것으로 간주하였다. 그 결과, Cy3 시그널 값이 65 이하인 41,674개의 스팟을 구하였다.

[0112] 상기 스팟 중에 다시 방광암 환자의 시료에서 메틸화된 스팟을 구하기 위하여, Cy5 시그널 값이 130 이상인 스팟을 방광암에서 메틸화된 스팟으로 간주하였다. 그 결과, Cy5 시그널 값이 130 이상인 631개의 스팟을 구하였다. 상기 스팟으로부터 프로모터 부위에 해당하는 227개의 유전자를 방광암 특이적 메틸화 유전자로 확보하였다.

[0113] 이로부터 정상과 방광암 환자 사이에 메틸화 정도의 상대적인 차이가 가장 큰 10개의 유전자(CDX2, CYP1B1, VSX16, HOXA11, T, TBX5, PENK, PAQR9, LHX2, SIM2)를 선택하고, MethPrimer (~urolab/methprimer/index1.html)을 이용하여 상기 10개 유전자의 프로모터 부위에 CpG islands가 존재하는 것으로 확인하였으며, 이들을 방광암 진단을 위한 메틸화 바이오 마커로 확보하였다. 상기 10개의 유전자 목록과 정상인 대비 방광암 환자 소변세포에서의 상대적인 메틸화 정도를 표 1에 나타내었다.

표 1

10개의 방광암 진단용 메틸화 바이오 마커

방광암 바이오 마커	GenBank No.	Description	상대적인 메틸화 정도 ^a
CDX2	NM_001265	caudal type homeobox transcription factor 2	11.0
CYP1B1	NM_000104	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	14.6
VSX1	NM_199425	visual system homeobox 1 homolog, CHX10-like (zebrafish)	33.4
HOXA11	NM_005523	homeobox A11	14.2
T	NM_003181	T, brachyury homolog (mouse)	51.4
TBX5	NM_080717	T-box 5	18.7
PENK	NM_006211	proenkephalin	12.7
PAQR9	NM_198504	progesterin and adiponectin receptor family member IX	4.1
LHX2	NM_004789	LIM Homeobox 2	5.8
SIM2	U80456	Single-minded homolog 2 (Drosophila)	9.5

[0115] ^a CpG 마이크로어레이시 방광암 환자 시료에서의 평균 시그널(Cy5) 값을 정상인에서의 평균 시그널(Cy3) 값으로 나눈 정상과 방광암 사이의 상대적인 메틸화 정도

실시예 2: 암 세포주에서의 바이오 마커 유전자의 메틸화 측정

[0117] 상기 10개 유전자의 메틸화 상태를 추가적으로 확인하기 위하여, 각각의 프로모터에 대해 바이설파이트 시퀀싱을 수행하였다.

[0118] 바이설파이트(bisulfite)를 이용하여 메틸화되지 않은 시토신을 우라실로 변형하기 위하여, 방광암 세포주 RT-4(한국세포주은행 (KCLB 30002), J82(KCLB 30001), HT1197(KCLB 21473) 및 HT1376 (KCLB 21472)로부터 전체 게놈 DNA를 분리하여, 그 중 게놈 DNA 200ng에 EZ DNA methylation-Gold kit(Zymo Research, USA)를 이용하여 바이설파이트를 처리하였다. DNA를 바이설파이트로 처리하면, 비메틸화된 시토신은 우라실로 변형되고, 메틸화된 시토신은 변화없이 남게 된다. 상기 바이설파이트가 처리된 DNA를 멀균 증류수 20μl로 용출시켜 파이로시퀀싱(pyrosequencing)을 수행하였다.

[0119] 상기 10개의 유전자에 대한 파이로시퀀싱을 수행하기 위한 PCR 및 시퀀싱 프라이머는 PSQ assay design 프로그램(Biotage, USA)을 이용하여 설계하였다. 각 유전자의 메틸화 측정을 위한 PCR 및 시퀀싱 프라이머는 하기 표 2 및 표 3과 같다.

표 2

PCR 프라이머 및 조건

유전자	프라이머	서열 (5'→3')	서열번호	CpG 위치 ^a	앰플리콘 크기
CDX2	forward	TGG TGT TTG TGT TAT TAT TAA TAG	1	-138, -129, -121,	129bp
	reverse	Biotin-CAC CTC CTT CCCACT AAA CTA	2	-118	
CYP1B1	forward	GTA AGG GTA TGG GAA TTG A	3	+73, +83, +105	90bp
	reverse	Biotin-CCC TTA AAA ACCTAA CAA AAT C	4		
VSX1	forward	GGA GTG GGA TTG AGG AGA TTT	5	-1121, -1114,	89bp
	reverse	Biotin-AAA CCC AAC CAACCC TCA T	6	-1104, 1100	
HOXA11	forward	AGTAAGTTATGGGAGGGGATT	7	-415, -405, -388	243bp
	reverse	Biotin-CCCCCATACAACATACTTACTCA	8		
T	forward	GGAGGAATGTTATTGTTAAAGAGAT	9	-95, -89, -76,	326bp
	reverse	Biotin-CAACCCCTCTAAAAATATCC	10	-71, -69	
TBX5	forward	GGGTTTGGAGTTAGGTTATG	11	-645, -643, -628,	95bp
	reverse	Biotin-AAATCTAAACTTACCCCCAACT	12	-621	
PENK	forward	ATATTTTATTGTATGGGTTTTAATAG	13	-150, -148, -139,	322bp
	reverse	Biotin-ACAACCTCAACAAAAATC	14	-135, -133,	
PAQR9	forward	Biotin-AGA TAG GGG ATA ATT TTA T	15	-480, -475, -471,	54bp
	reverse	CCT CCC AAA CTA AAA TTT	16	-469	
LHX2	forward	GTA GAA GGG AAA TAA GGT TGA AA	17	+5093, +5102,	233bp
	reverse	Biotin-ACT AAA ACC CCA ATA CTC CCA	18	+5113, +5125,	
SIM2	forward	Biotin-GTGGATTTAGATTAGGATTTGT	19	+5127	205bp
	reverse	CACCCCTCCCCAAATTCTT	20	-6776, -6774, -6747, -6744,	

[0121] ^a 전사 개시점(+1)으로부터의 거리(nucleotide): 메틸화 측정에 사용된 CpG 부위의 게놈 DNA 상의 위치

표 3

[0122]

메틸화 마커 유전자의 시퀀싱 프라이머 서열

유전자	서열 (5' --> 3')	서열번호
CDX2	ATT AAT AGA GTT TTG TAA ATA T	21
CYP1B1	AAG GGT ATG GGA ATT G	22
VSX1	TTT GGG ATT GGG AAG	23
HOXA11	TAG TTT AGG GTA TTT TTT ATT TAT	24
T	GTG AAA GTA ATG ATA TAG TAG AAA	25
TBX5	TTT GGG GGT TGG GGA	26
PENK	GGG TGT TTTAGG TAG TT	27
PAQR9	CCT CCC AAA CTA AAA TTT C	28
LHX2	TGG GGG TAG AGG AGA	29
SIM2	CCT CCC CAA ATT CTT C	30

[0123]

상기의 바이설파이트로 전환된 게놈 DNA 20ng을 PCR로 증폭하였다. PCR 반응 용액(바이설파이트로 전환된 게놈 DNA 20ng, 10X PCR buffer(Enzyomics, Korea) 5 μ l, Taq polymerase(Enzyomics, Korea) 5units, 2.5mM dNTP(Solgent, Korea) 4 μ l, PCR 프라이머 2 μ l(10 pmole/ μ l))을 95°C에서 5분 동안 처리한 후, 95°C에서 40초, 60°C에서 45초, 72°C에서 40초로 총 45회 실시한 다음, 72°C에서 5분 동안 반응시켰다. 상기 PCR 산물의 증폭 여부는 2.0% 아가로오스겔을 사용한 전기영동으로 확인하였다.

[0124]

상기 증폭된 PCR 산물에 PyroGold 시약(Biotage, USA)을 처리한 후, PSQ96MA 시스템(Biotage, USA)을 이용하여 파이로시퀀싱을 수행하였다. 상기 파이로시퀀싱 후, 메틸화 지수(methylation index)를 계산함으로써 메틸화 정도를 측정하였다. 메틸화 지수는 각 CpG 부위에서 시토신이 결합하는 평균율을 구하여 계산하였다.

[0125]

도 2는 10개의 바이오 마커의 방광암 세포주에서의 메틸화 정도를 파이로시퀀싱 방법을 이용하여 정량적으로 나타낸 것이다. 그 결과, 상기 10개의 바이오 마커 유전자 모두가 최소 1개 이상의 세포주에서 높은 수준으로 메틸화되어 있는 것을 확인하였다. 표 4에서는 상기 10개 유전자의 프로모터의 서열을 나타낸 것이다.

표 4

[0126]

메틸화 마커 유전자 프로모터의 서열

유전자	서열번호
CDX2	31
CYP1B1	32
VSX1	33
HOXA11	34
T	35
TBX5	36
PENK	37
PAQR9	38
LHX2	39
SIM2	40

[0127]

실시예 3: 방광암 환자의 소변 세포에서의 바이오 마커 유전자의 메틸화 측정

[0128]

상기 10개의 유전자를 방광암 진단용 바이오 마커로 사용할 수 있는지 검증하기 위하여, 정상인 20명 및 방광암 환자 19명의 소변 약 20ml를 4,200 μ g에서 10분간 원심분리(한일과학)하여 세포를 분리하였다. 상층액을 버리고, PBS 5ml를 이용하여 세포 침전물을 2회 세척하였다. 상기 세척된 세포로부터 QIAamp DNA Mini kit(QIAGEN, USA)를 사용하여 게놈 DNA를 분리한 후, 상기 분리된 게놈 DNA 200ng에 EZ DNA methylation-Gold kit(Zymo Research, USA)를 이용하여 바이설파이트를 처리한 다음, 멸균 증류수 20 μ l로 용출하여 파이로시퀀싱에 사용하였다.

[0129]

상기 바이설파이트로 전환된 게놈 DNA 20ng을 PCR로 증폭하였다. PCR 반응 용액(바이설파이트로 전환된 게놈 DNA 20ng, 10X PCR buffer 5 μ l(Enzyomics, Korea), Taq polymerase 5 units(Enzyomics, Korea), 2.5mM dNTP

4 μ l(Solgent, Korea), PCR 프라이머 2 μ l(10pmole/ μ l))을 95°C에서 5분 동안 처리한 후, 95°C에서 40초, 60°C에서 45초, 72°C에서 40초로 총 45회 실시한 다음, 72°C에서 5분 동안 반응시켰다. 상기 PCR 산물의 증폭 여부는 2.0% 아가로오스겔을 사용한 전기영동으로 확인하였다.

[0130] 상기 증폭된 PCR 산물에 PyroGold 시약(Biotage, USA)을 처리한 후, PSQ96MA 시스템(Biotage, USA)을 이용하여 파이로시퀀싱을 수행하였다. 파이로시퀀싱 후, 메틸화 정도는 메틸화 지수(methylation index)를 계산함으로써 측정하였다. 메틸화 지수는 각 CpG 부위에서 시토신이 결합하는 평균율을 구하여 계산하였다. 또한, 정상인과 방광암 환자의 소변세포 DNA에서의 메틸화 지수를 측정한 후, 방광암 환자 진단을 위한 메틸화 지수 cut-off를 ROC(receiver operating characteristic) 커브 분석을 통하여 결정하였다.

[0131] 도 3은 상기 10개 바이오 마커 유전자의 소변세포에서의 메틸화를 측정한 결과이다. 정상에 비하여 방광암 환자의 시료에서 메틸화 정도 높게 증가하는 것을 볼 수 있다. 한편 방광암 환자와 혈뇨환자에서는 메틸화 정도가 정상 대조군과 유사하거나 드물게 정상보다 높은 수준을 보이는 경우도 존재한다. 도 4는 방광암 진단을 위한 cut-off 값을 구하기 위한 ROC 커브 분석 결과를 나타낸 것이다. 또한, ROC 커브 분석 결과 계산된 10개의 바이오 마커에 대한 메틸화 지수 cut-off 값을 표 5에 나타내었다.

표 5

10개 바이오 마커의 방광암 진단을 위한 메틸화 지수 cut-off 값

유전자	cut-off (%) ^a
<i>CDX2</i>	5.82 <
<i>CYP1B1</i>	8.38 <
<i>VSX1</i>	29.3 <
<i>HOXA11</i>	8.81 <
<i>T</i>	11.3 <
<i>TBX5</i>	6.93 <
<i>PENK</i>	11.57 <
<i>PAQR9</i>	5.0 <
<i>LHX2</i>	13.7 <
<i>SIM2</i>	8.2 <

[0133] 상기 10개 바이오 마커의 메틸화 분석은 각 바이오 마커의 임상 시료에서의 메틸화 지수를 구하고, 이로부터 ROC(receiver operating characteristic) 커브 분석을 통해 얻은 방광암을 진단하기 위한 메틸화 지수가 상기 cut-off 보다 높은 경우를 메틸화 양성으로 판정하였고, 이하인 경우에는 음성으로 판정하였다.

[0134] 표 6 및 도 5에 나타낸 바와 같이, ROC 커브 분석 결과 얻은 cut-off를 기준으로 하였을 경우, 정상인의 소변세포에서는 10개의 바이오 마커 전부가 메틸화 음성을 나타내었으나, 방광암 환자에서는 12.5% 내지 62.5%의 메틸화 양성 빈도를 나타내었다. 또한, 통계적인 분석을 수행한 결과, 10종의 바이오 마커중 9개가 정상에 비하여 방광암에서 유의한 수준 ($p < 0.01$)으로 메틸화 양성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이는 상기 10개의 메틸화 바이오 마커중 9개는 방광암에서 통계적으로 유의하게 특이적으로 메틸화되고, 방광암 유용성이 매우 높다는 것을 나타낸다.

표 6

10개 바이오 마커의 양성 메틸화 빈도

유전자	메틸화 양성 시료의 수/전체 시료수 (%) ^a		$p < b$
	정상인	방광암 환자	
<i>CDX2</i>	0/31 (0)	9/32 (28.1)	0.002
<i>CYP1B1</i>	0/31 (0)	16/32 (50.0)	< 0.001
<i>VSX1</i>	0/31 (0)	14/32 (45.2)	< 0.001

<i>HOXA11</i>	0/31 (0)	17/32 (53.1)	< 0.001
<i>T</i>	0/31 (0)	15/32 (46.9)	< 0.001
<i>TBX5</i>	0/31 (0)	20/32 (62.5)	< 0.001
<i>PENK</i>	0/31 (0)	19/32 (59.4)	< 0.001
<i>PAQR9</i>	0/31 (0)	4/32 (12.5)	0.113
<i>LHX2</i>	0/17 (0)	13/24 (54.2)	< 0.001
<i>SIM2</i>	0/17 (0)	15/24 (62.5)	< 0.001

[0136] ^a 메틸화 양성 시료의 빈도; ^b 카이스퀘어 테스트 결과 얻은 p 값

[0137] 실시예 4: 6개 바이오 마커 패널 유전자의 방광암 진단능력 평가

[0138] 상기 10개의 메틸화 바이오마커를 이용하여 방광암을 진단하기 위한 최적의 패널조합을 로지스 회귀(logistic regression) 분석을 수행하여 6개의 유전자의 패널을 구하였다. 도 6A는 6개의 메틸화 바이오마커(CYP1B1, HOXA11, SIM2, PENK, LHX2 및 TBX5)의 메틸화 상태를 나타낸 것이다. 실시예 3에 기술된 방법으로 메틸화 양성 및 음성을 판정하였을 경우에, 이들 6개의 바이오마커 유전자들은 정상시료에서는 전혀 메틸화가 되어 있지 않고 방광암 시료에서만 특이적으로 메틸화 양성을 나타내는 것을 알 수 있다. 특히 조기방광암에서도 높은 빈도의 메틸화 양성을 나타냄으로써, 조기진단에 대한 유용성이 높음을 보여준다. 이들 6개의 유전자를 패널로 하여 6개의 유전자중 최소 1개 유전자라도 메틸화된 경우에 방광암으로 진단하는 경우, 조기방광암에 대한 민감도 및 특이도는 각각 84.0%와 100%로 매우 우수하였다 (도 6B). 또한 진행형 방광암 진단에 대한 민감도 및 특이도는 각각 85.7%와 100%로 측정되었다 (도 6B). 또한 조기 및 진행형 방광암 전체에 대한 민감도 및 특이도는 84.4%와 100%로 측정되어 이들 6개 유전자의 메틸화를 이용한 방광암 조기진단의 유용성이 매우 높음을 보여준다.

[0139] 실시예 5: 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 바이오 마커 유전자의 메틸화 측정

[0140] 방광암에서 특이적으로 메틸화되는 바이오 마커의 메틸화 여부를 측정하기 위하여, 방광암 세포주 RT24 및 HT1197의 게놈 DNA 100ng을 초음파 분쇄(Vibra Cell, SONICS)하여, 약 200~400bp의 게놈 DNA 절편을 수득하였다.

[0141] 상기 게놈 DNA로부터 메틸화된 DNA만을 획득하기 위하여, 메틸화 DNA에 결합한다고 알려진 MBD를 사용하였다. 즉, 6XHis가 tagging된 MBD 2 μ g을 대장균 JM110(한국생명공학연구원 생명자원센터, No. 2638) 게놈 DNA 500ng과 pre-incubation시킨 다음, Ni-NTA 마그네티ック 비드(Qiagen, USA)에 결합시켰다. 여기에 상기 초음파 분쇄된 게놈 DNA 100ng을 결합 반응 용액(10mM Tris-HCl(pH 7.5), 50mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 3mM MgCl₂, 0.1% Triton-X100, 5% 글리세롤, 25mg/ml BSA)하에서 4°C, 20분간 반응시킨 후, 700mM NaCl이 포함된 결합 반응 용액 500 μ l를 이용하여 3회 세척한 다음, MBD에 결합된 메틸화된 DNA를 QiaQuick PCR purification kit(QIAGEN, USA)을 사용하여 분리하였다.

[0142] *이후, 상기 MBD에 결합한 메틸화된 DNA를 *SIM2* 유전자의 프로모터 부위(-6842 ~ -6775bp)에 상응하는 서열번호 41 및 서열번호 42의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0143] 서열번호 41: 5'-TTC TTA TTC TCA CCA GAC ATC TCA ACA CCC-3'

[0144] 서열번호 42: 5'-ATC TCC CAT CCT CCC TCC CAC TCT C-3'

[0145] PCR 조건은 94°C에서 5분, 94°C에서 30초간 처리한 후, 62°C에서 30초, 72°C에서 30초로 총 40회 실시한 다음, 72°C에서 5분 동안 반응시켰다. 상기 PCR 산물의 증폭 여부는 2% 아가로즈겔을 사용한 전기영동으로 확인하였다.

[0146] 그 결과, *SIM2* 유전자는 RT24 세포주 게놈 DNA에서만 168bp에 해당하는 증폭 산물이 검출되어 메틸화된 것으로 확인된 반면, HT1197 세포주에서는 증폭 산물이 검출되지 않아 메틸화되지 않은 것으로 확인되었다 (도

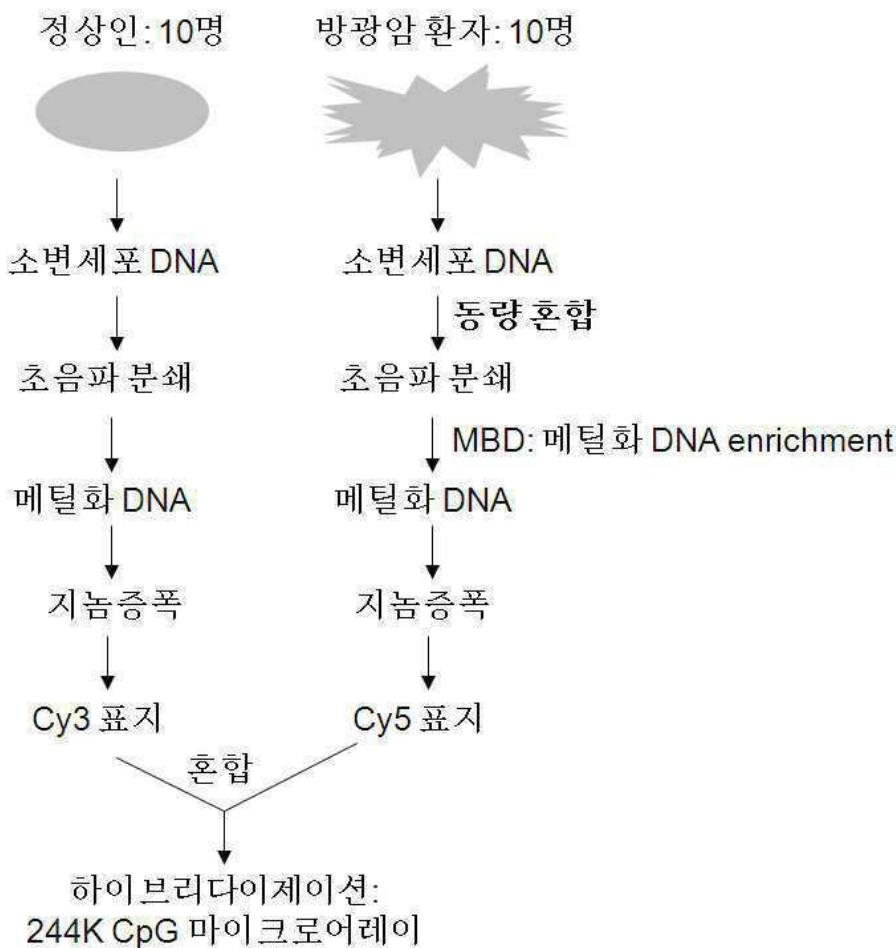
7). 상기 결과는 파이로시퀀싱 방법으로 확인한 메틸화 측정 결과와 일치하는 결과이다. 이러한 결과는 MBD를 이용하여 메틸화 DNA의 검출이 가능하다는 것을 보여준다.

[0147]

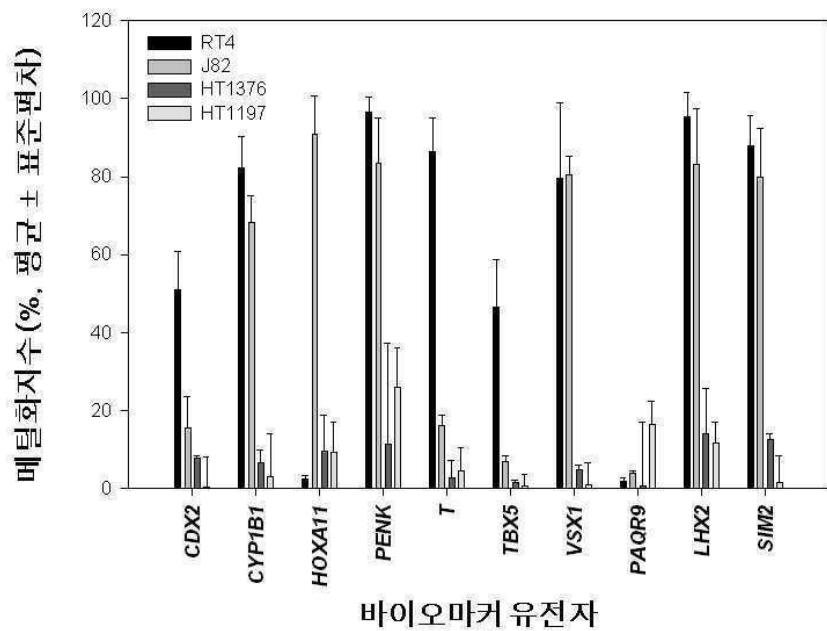
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

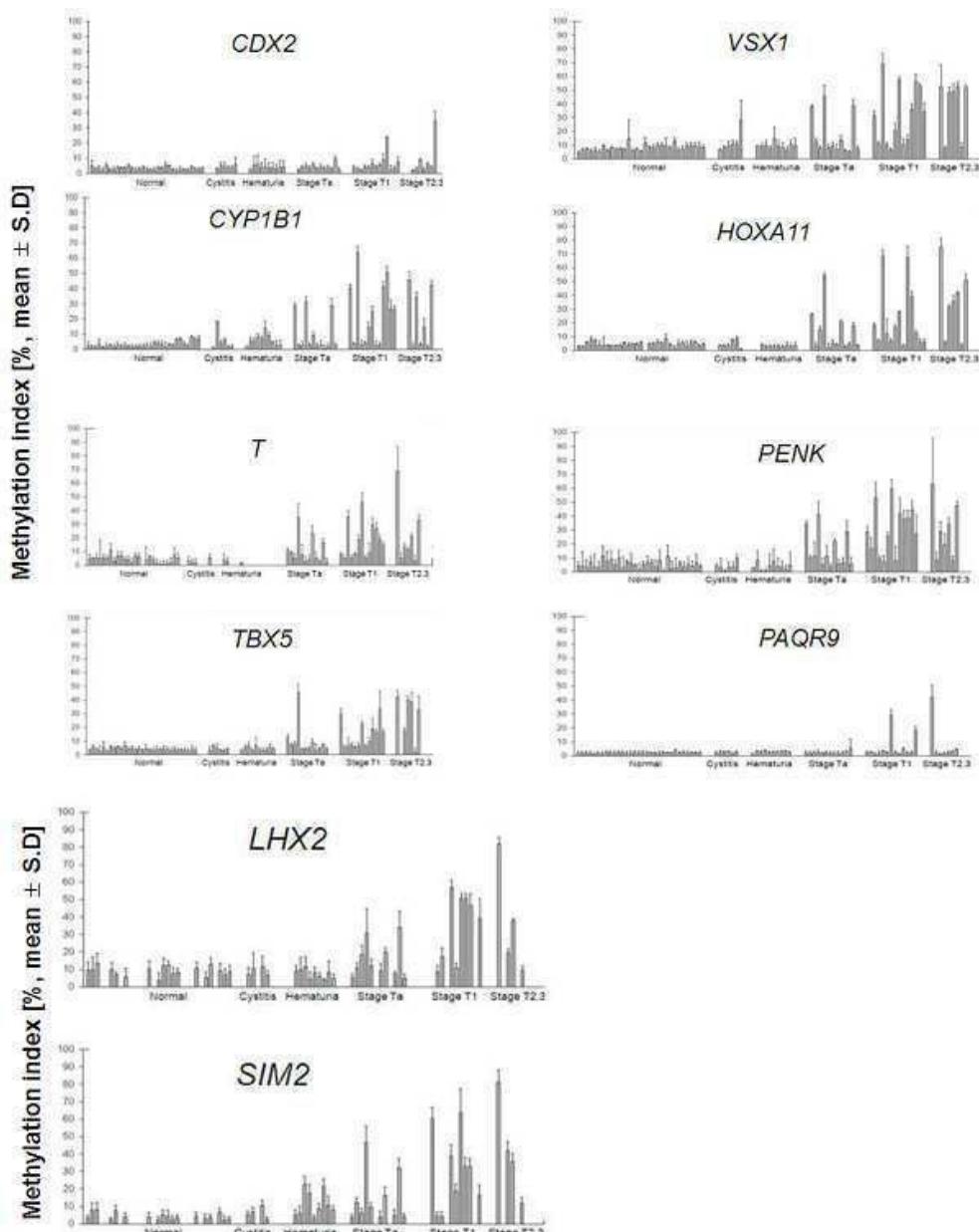
도면1



도면2

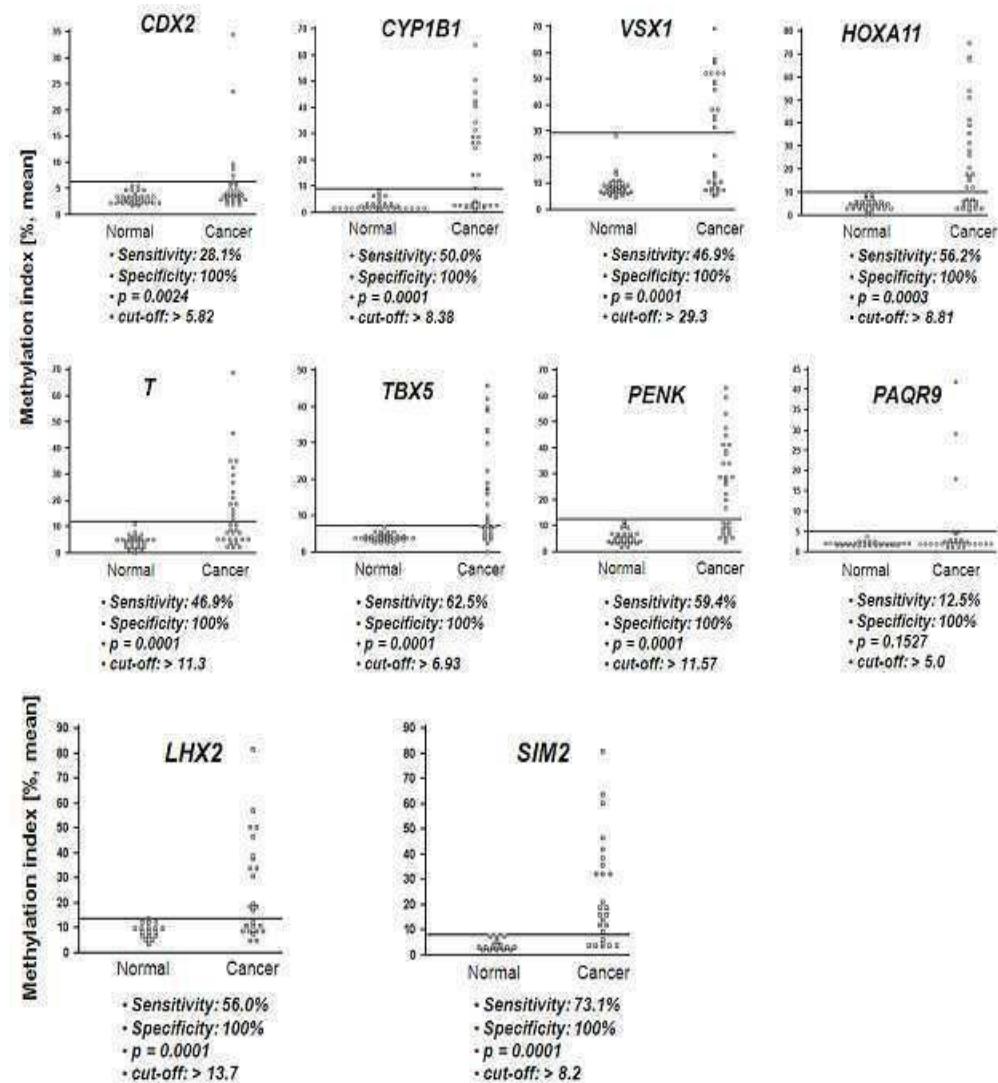


도면3



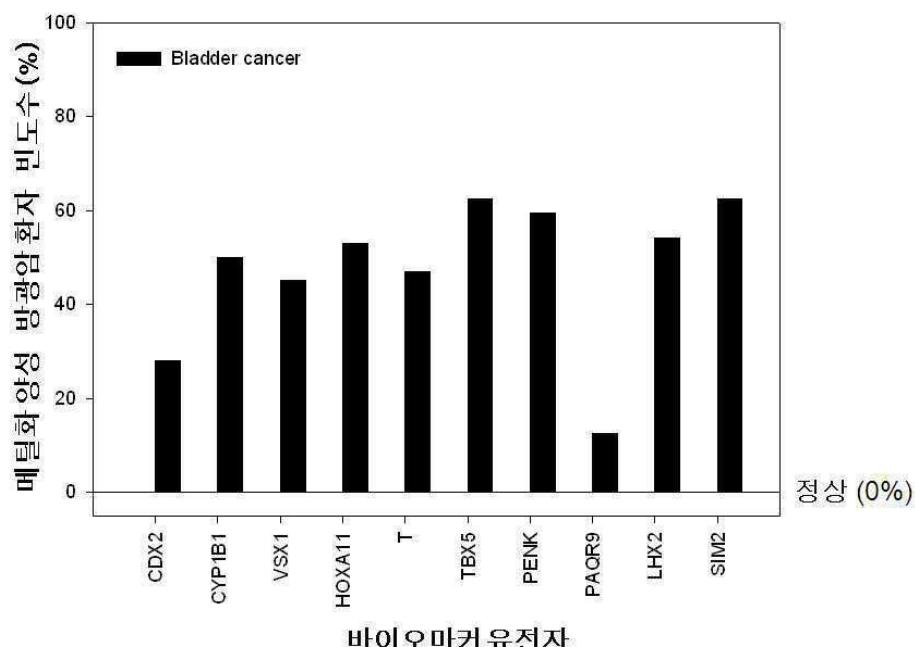
Normal: 정상, Cystitis: 방광염, Hematuria: 혈뇨, Stage T1, T2, T3: 방광암

도면4



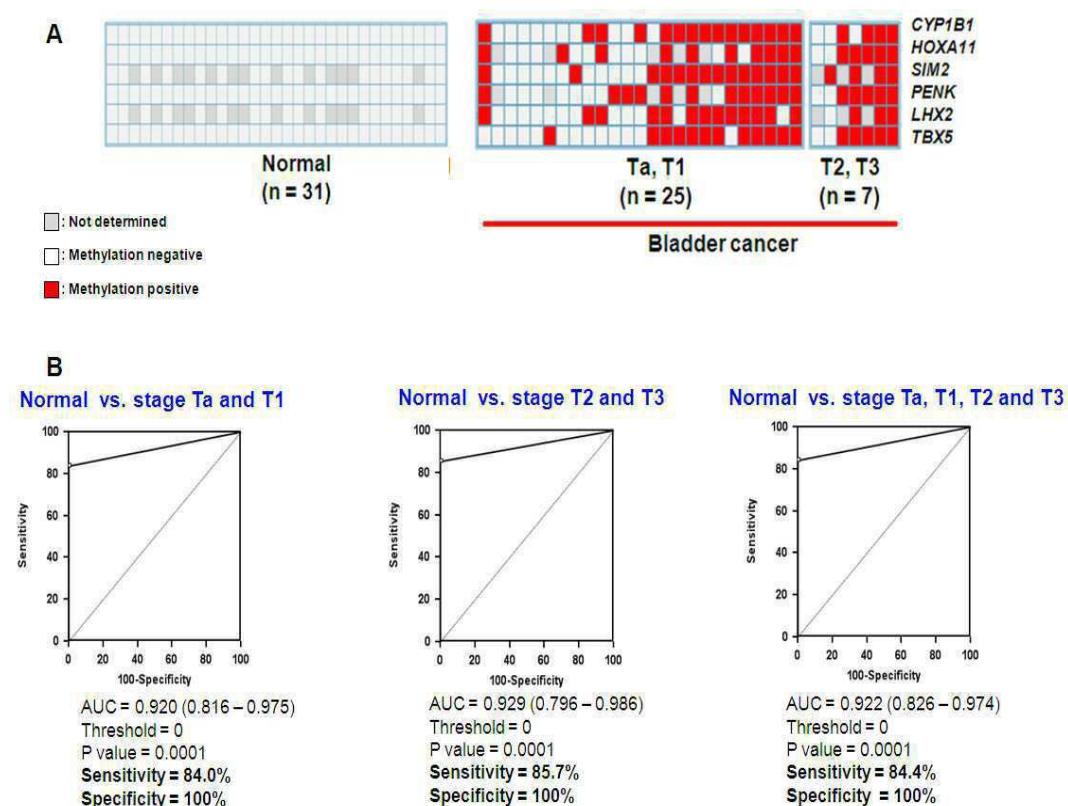
- Cut-off: 방광암 진단을 위한 메틸화지수 cut-off 값
- Sensitivity: 암 진단에 대한 민감도
- Specificity: 암 진단에 대한 특이도
- p value: 로지스 회귀 (logistic regression) 분석 테스트의 p 값

도면5

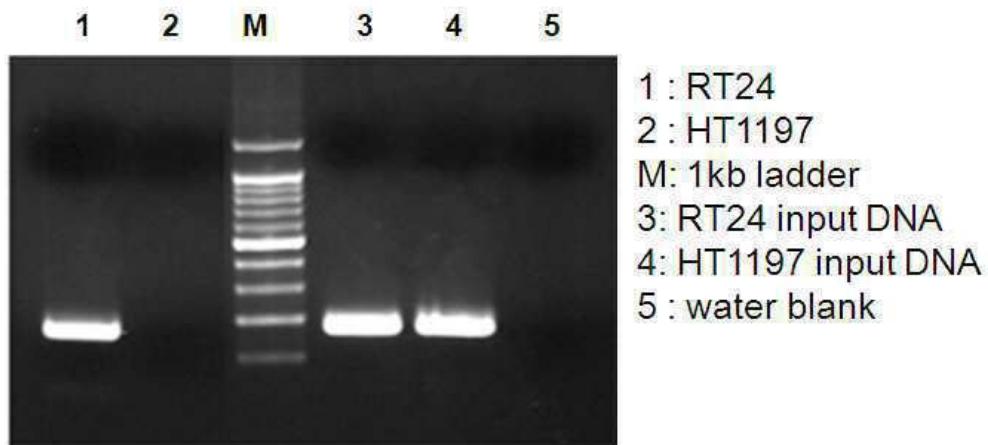


정상 (0%)

도면6



도면7



서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부