(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0080998
(43) 공개일자 2018년07월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01) *G01N 33/574* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2018.05)
G01N 33/57446 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0000344
(22) 출원일자 2018년01월02일
심사청구일자 2018년01월02일
(30) 우선권주장
1020170002076 2017년01월05일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김열홍
서울특별시 광장동 워커힐파크빌아파트 다동 201호
성재숙
서울특별시 구로구 개봉2동 현대홈타운 211동 903호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 20 항

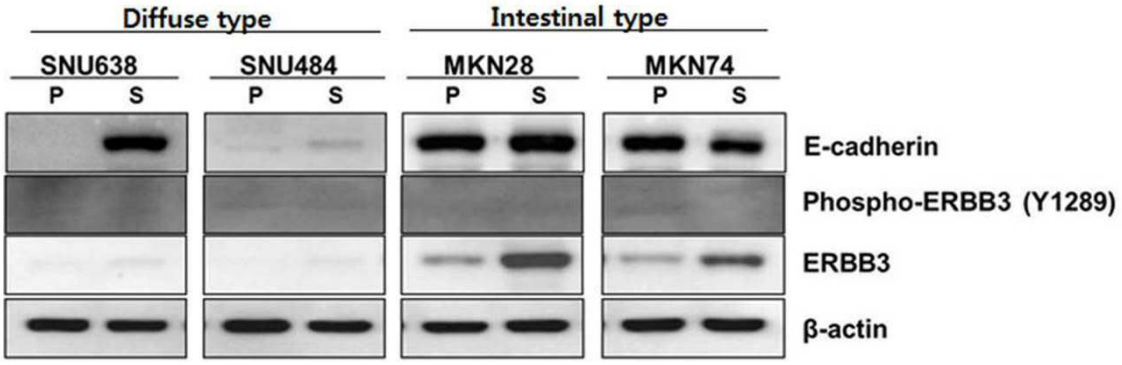
(54) 발명의 명칭 **위암 줄기세포 마커 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 위암 줄기세포 마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 SOX2(sex determining region Y-box 2), E-카드헤린(E-cadherin) 및 ERBB3(Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3)로 구성되는 군으로부터 선택되는 1개 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 위암 줄기세포 구별용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 키트, 위암 줄기세포 구별을 위한 정보의 제공 방법, 및 미만형/장형 위암 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

SOX2 및 E-카드헤린 유전자는 미만형; 및 ERBB3 유전자는 장형 위암 줄기세포 마커로 사용될 수 있으므로, 상기 유전자의 발현양을 측정하는 본 발명의 조성물은 장형/미만형 위암 줄기세포를 구별할 수 있을 뿐만 아니라, 위암의 병리학적 특성에 따른 치료제 개발에 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/4703 (2013.01)
G01N 2333/705 (2013.01)
G01N 2333/912 (2013.01)
G01N 2500/10 (2013.01)
(72) 발명자
정석
서울특별시 성북구 정릉동 정릉풍림아이원아파트 123동 704호

이종원
서울특별시 동대문구 청량리동 동부아파트 103동 206호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2010-0020986
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 (이공)일반연구자-기본(모험연구)
연구과제명 위암 줄기세포에서 공통 신호전달 경로 규명을 통한 위암 줄기세포 표적 치료 전략 개발
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교
연구기간 2012.09.01 ~ 2013.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

SOX2(sex determining region Y-box 2), E-카드헤린(E-cadherin) 및 ERBB3(Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3)로 구성되는 군으로부터 선택되는 1개 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 위암 줄기세포 구별용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 SOX2는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 E-카드헤린은 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 ERBB3는 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 것인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 위암 줄기세포는 미만형(diffuse type) 위암 줄기세포 또는 장형(intestinal type) 위암 줄기세포인 것인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 유전자의 발현 수준은 그의 mRNA 또는 단백질 수준인 것인, 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 수준은 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 사용하여 측정하는 것인, 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 4 및 5의 SOX2 측정용 프라이머 쌍, 서열번호 6 및 7의 E-카드헤린 측정용 프라이머 쌍 및 서열번호 8 및 9의 ERBB3 측정용 프라이머 쌍으로 구성되는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 단백질의 수준은 상기 단백질에 특이적인 항체 또는 프로브를 사용하여 측정하는 것인,

조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 위암 줄기세포 구별용 키트.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트인 것인, 키트.

청구항 12

(a) 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물을 사용하여, 위암 환자에서 분리된 생물학적 시료로부터 SOX2(sex determining region Y-box 2), E-카드헤린(E-cadherin) 및 ERBB3(Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3)로 구성되는 군으로부터 선택되는 1개 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 단계 (a)에서 측정된 발현 수준을 대조구 시료의 것과 비교하는 단계를 포함하는, 위암 줄기세포 구별을 위한 정보의 제공 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 위암 유래의 암 줄기세포인 것인, 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 단계 (a)에서 측정된 SOX2 또는 E-카드헤린의 발현 수준이 대조구 시료의 것보다 증가하는 경우, 상기 시료에 미만형 위암 줄기세포가 포함되어 있는 것으로 판단하는 것인, 방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 단계 (a)에서 측정된 ERBB3의 발현 수준이 대조구 시료의 것보다 증가하는 경우, 해당 시료에 장형 위암 줄기세포가 포함되어 있는 것으로 판단하는 것인, 방법.

청구항 16

제12항에 있어서, 상기 단계 (a)에서 측정된 SOX2, E-카드헤린 및 ERBB3의 발현 수준이 대조구 시료의 것보다 동등 또는 감소하는 경우, 해당 시료에 미만형 및 장형 위암 줄기세포가 포함되어 있지 않은 것으로 판단하는 것인, 방법.

청구항 17

(a) 미만형 위암 치료제의 후보물질이 처리된 미만형 위암 줄기세포에서 SOX2(sex determining region Y-box 2) 또는 E-카드헤린(E-cadherin) 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 단계 (a)의 발현 수준을 상기 후보물질을 처리하지 않은 시료의 것과 비교하는 단계를 포함하는, 미만형 위암 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 단계 (a)에서 측정된 SOX2 또는 E-카드헤린의 발현 수준이 상기 후보물질을 처리하지 않은 시료의 것보다 감소하는 경우, 상기 후보물질을 미만형 위암 치료제로 판단하는 (c) 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 19

(a) 장형 위암 치료제의 후보물질이 처리된 장형 위암 줄기세포에서 ERBB3(Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3) 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 단계 (a)의 발현 수준을 상기 후보물질을 처리하지 않은 시료의 것과 비교하는 단계를 포함하는, 장형 위암 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 단계 (a)에서 측정된 ERBB3의 발현 수준이 상기 후보물질을 처리하지 않은 시료의 것보다 감소하는 경우, 상기 후보물질을 장형 위암 치료제로 판단하는 (c) 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 위암 줄기세포 마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 SOX2(sex determining region Y-box 2), E-카드헤린(E-cadherin) 및 ERBB3(Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3)로 구성되는 군으로부터 선택되는 1개 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 위암 줄기세포 구별용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 위암 줄기세포 구별용 키트, 위암 줄기세포 구별을 위한 정보의 제공 방법, 및 미만형/장형 위암 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 위암은 세계에서 5번째로 발생 빈도가 높으며, 3번째로 사망률이 높은 암이다. 위암의 치료에는 수술적 방법과 세포독성화합물, 표적치료제 등을 사용한 항암화학요법이 수행되고 있다. 그러나, 수술이나 치료 후에도 전체 위암 환자의 40~60% 정도는 재발로 인해 생명을 잃는데, 이러한 위암 치료에 대한 내성이나 재발의 원인으로서 암 줄기세포가 제시되고 있다(Cancer Res, 2003 Sep, 15;63(18):5821-8.).

[0005] 암 줄기세포는 자가복제능력을 가지면서, 특정 조건에서는 다른 특징을 갖는 세포로 분화한다. 이러한 암 줄기세포를 표적하여 치료하는 것이 효과적인 암 치료가 될 수 있다는 연구들이 발표됨에 따라, 이의 특성을 규명하고, 분리하기 위한 연구가 많이 이루어지고 있다. 그 예로, 암 줄기세포의 종양형성능력을 이용하거나(Stem Cells. 2009 May;27(5):1006-20.), 세포 표면 표지자를 이용하여 암 줄기세포를 분리하는 방법 등이 이용되고 있다. 그러나, 규명된 CD44, CD90 등 일부 세포 표면 표지자들의 경우 위암 줄기세포 마커로는 활용될 수 없음이 문제 시 되고(J Cell Physiol. 2012 Jun;227(6):2686-93.), 종양형성능력을 이용하는 방법은 마우스에 따라 종양이 성장하는 미세환경이 다르며, 연구비가 많이 든다는 단점이 있었다.

[0006] 이에 따라, 암 줄기세포의 스피어 형성능력을 통해 줄기세포를 분리하고 특성을 확인하는 연구가 이어지고 있는데, 이와 관련하여 분화촉진 및 지속형 스페로이드 형태의 편도 유래 줄기세포의 배양 방법(한국특허공개공보 제10-2015-0073919호), 세포 스페로이드 형태의 이식용 성체 줄기세포 집합체 및 그 제조방법(한국 등록특허 10-1017710호) 등이 개발된 바 있다.

[0008] 한편, 암은 유전적 특성, 조직병리학적 특성 등에 의해 세분화되며, 각 아형에 따라 치료법도 다르게 적용된다.

위암의 구분에는 조직병리학적 특성에 따라 크게 미만형(Diffuse type) 또는 장형(Intestinal type)으로 분류하는 로렌(Lauren) 방법이 널리 이용되고 있다(J Surg Oncol. 2005;90:144-33.). 최근 들어, 암의 아형에 따라 암 줄기세포의 특징이 다를 수 있으며, 유전자의 변이 패턴도 다르다는 의견이 제시되고 있으며(Nature. 2014;513:202-9), 그 예로, RhoA 유전자의 경우에는 장형 위암 세포주보다 미만형 위암 세포주에서 활성화되어 있고, 이는 항암제 저항성에 관여한다는 연구가 보고되었다(Clin Cancer Res. 2016 Feb 15;22(4):971-83.). 그러나, 암 줄기세포를 표적하여 치료하는 것이 효과적인 방법임에도 불구하고, 현재 일반적인 위암 세포 마커에 대해서만 연구되고 있을 뿐, 암 줄기세포 특이적 마커 유전자는 보고된 바 없었다.

[0010] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 유형에 따른 위암을 효과적으로 진단하고 치료하는 방법을 개발하고자 예의 노력 연구한 결과, 미만형/장형의 위암 줄기세포 특성을 나타내는 스피어 세포를 형성 및 분리하였고, 상기 세포에서 특이적으로 발현되는 유전자를 규명하였는바, 상기 유전자를 미만형/장형 위암 줄기세포 특이적 유전자 마커로 활용할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 하나의 목적은 SOX2(sex determining region Y-box 2), E-카드헤린(E-cadherin) 및 ERBB3(Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3)로 구성되는 군으로부터 선택되는 1개 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 위암 줄기세포 구별용 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 조성물을 포함하는, 위암 줄기세포 구별용 키트를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 (a) 상기 조성물을 사용하여, 위암 환자에서 분리된 생물학적 시료로부터 SOX2, E-카드헤린 및 ERBB3로 구성되는 군으로부터 선택되는 1개 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)에서 측정된 발현 수준을 대조구 시료의 것과 비교하는 단계를 포함하는, 위암 줄기세포 구별을 위한 정보의 제공 방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 (a) 미만형 위암 치료제의 후보물질이 처리된 미만형 위암 줄기세포에서 SOX2 또는 E-카드헤린 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)의 발현 수준을 상기 후보물질을 처리하지 않은 시료의 것과 비교하는 단계를 포함하는, 미만형 위암 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 (a) 장형 위암 치료제의 후보물질이 처리된 장형 위암 줄기세포에서 ERBB3 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)의 발현 수준을 상기 후보물질을 처리하지 않은 시료의 것과 비교하는 단계를 포함하는, 장형 위암 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 하나의 양태는 SOX2(sex determining region Y-box 2), E-카드헤린(E-cadherin) 및 ERBB3(Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3)로 구성되는 군으로부터 선택되는 1개 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 위암 줄기세포 구별용 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명에서는, 각각 미만형/장형 위암 줄기세포의 특성을 나타내는 스피어 세포를 형성 및 분리하였고, 상기 세포 중에서 미만형 위암 줄기세포의 경우에는 SOX2 및 E-카드헤린 유전자, 장형 위암 줄기세포의 경우에는 ERBB3 유전자가 특이적으로 발현됨을 규명하였는바, 상기 유전자는 각각 미만형/장형 위암 줄기세포 특이적 유전자 마커로 활용할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성한 것이다.

[0022] 본 발명의 용어, "SOX2(sex determining region Y-box 2)"는 sex determining region Y-box 2를 암호화하고 있는 유전자를 의미하며, SOX2로도 명명된다. 상기 SOX2는 미분화 배아 줄기세포의 자가복제, 다분화능 등의 유지

에 필수적인 역할을 수행하며, 포유동물의 발달에 중요한 역할을 수행한다. 전사인자인 Sox 패밀리의 일종이며, 상기 유전자의 단백질 패밀리는 HMG(High-mobility group) box 도메인으로 알려진 보존된 DNA 결합 도메인을 공유하고 있다. 상기 SOX2의 염기서열 및 아미노산 서열은 NCBI의 GenBank 등 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있다(예: GenBank Accession NM_003106, NP_003097.1 등). 구체적으로, 상기 SOX2는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 용어, "E-카드헤린(E-cadherin)"은 카드헤린의 일종인 E-카드헤린을 암호화하고 있는 유전자를 의미하며, CDH1(Cadherin 1)로도 명명될 수 있다. 카드헤린(Cadherins; calcium-dependent adhesion)은 타입-1 막관통 단백질(type-1 transmembrane proteins)의 일종으로, 부착 결합(adherens junctions)을 형성함으로써 조직 내에서 세포들이 서로 결합하는 세포-세포 부착을 매개한다. 척추동물에서는 약 100여 종류가 넘는 카드헤린이 존재하며, 상피 조직에서 주로 발견되는 상기 E-카드헤린 이외에, 뉴런에서 주로 발견되는 N-카드헤린, 태반에서 주로 발견되는 P-카드헤린, T1-카드헤린, T2-카드헤린, H-카드헤린, M-카드헤린 등이 존재한다. 상기 E-카드헤린의 염기서열 및 아미노산 서열은 NCBI의 GenBank 등 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있다(예: GenBank Accession NM_004360, NM_001317184, NP_004351.1, NP_001304113.1 등). 구체적으로, 상기 E-카드헤린는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명의 용어, "ERBB3(Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3)"은 Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3를 암호화하고 있는 유전자를 의미하며, HER3(human epidermal growth factor receptor 3)로도 명명될 수 있다. ERBB3는 수용체 티로신 인산화효소의 표피 성장인자 수용체(EGFR/ERBB) 패밀리의 일종으로, ERBB3와 동종이량체를 형성할 수 있으며, 또한, 다른 ERBB 패밀리에 속하는 단백질과 이종이량체를 형성할 수 있다. ERBB3가 암세포에서 과발현된다는 증거는 제시된 적이 없으나, ERBB3의 구성적 활성화 또는 돌연변이가 암을 유발할 수 있음이 보고된 바 있다(Zhang K, et al., 1996, J. Biol. Chem., 271 (7): 3884-90.). 상기 ERBB3의 염기서열 및 아미노산 서열은 NCBI의 GenBank 등 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있다(예: GenBank Accession NM_001982, NM_001005915, NP_001005915.1, NP_001973.2 등). 구체적으로, 상기 ERBB3는 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명의 용어, "위암 줄기세포"는 위암 유래의 암 줄기세포를 의미한다. 암 줄기세포는 정상적인 줄기세포와 같은 특징을 갖는데, 자기재생과 분화능력을 통해 종양을 발생시킨다. 또한, 다른 종양 집단과 구별되는 새로운 종양을 발생시켜 암의 재발과 전이를 야기한다.

[0030] 본 발명의 목적상, 상기 위암 줄기세포는 미만형(diffuse type) 위암 줄기세포 또는 장형(intestinal type) 위암 줄기세포일 수 있다.

[0031] 본 발명의 용어, "미만형(diffuse type) 위암 줄기세포"는 병리학적 특성 기반의 로렌(Lauren) 분류 방법에 따라 미만형으로 구분된 위암 유래의 암 줄기세포를 의미한다. 본 발명의 목적상, 상기 미만형 위암 줄기세포는 미만형 위암 세포주로부터 유래한 스피어(sphere) 세포를 의미할 수 있다. 이때, 상기 용어, "미만형 위암"은 암세포의 점착력이 낮아 뚜렷한 종괴가 만들어지지 않은 상태에서 개별의 암세포가 위벽을 침윤하는 특성을 나타내는 위암을 의미한다.

[0032] 본 발명의 용어, "장형(intestinal type) 위암 줄기세포"는 병리학적 특성 기반의 로렌 분류 방법에 따라 장형으로 구분된 위암 유래의 암 줄기세포를 의미한다. 본 발명의 목적상, 상기 장형 위암 줄기세포는 장형 위암 세포주로부터 유래한 스피어 세포를 의미할 수 있다. 이때, 상기 용어, "장형 위암"은 암세포가 한 곳에서 뭉쳐서 덩어리로 자라는 특성을 나타내는 위암을 의미한다.

[0034] 본 발명의 용어, "유전자의 발현 수준을 측정하는 제제"는 상기 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제로서, 상기 유전자의 mRNA 또는 단백질에 특이적으로 결합하여 인식할 수 있도록 하거나 상기 mRNA 또는 단백질을 증폭시킬 수 있는 제제를 의미한다. 구체적인 예로, 상기 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또

는 프로브; 또는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 프로브일 수 있다.

[0035] 상기 제제는 상기 유전자의 발현 수준 측정을 위해 직접 또는 간접적으로 표지될 수 있다. 구체적으로, 상기 표지에는 리간드, 비드(bead), 방사성 핵종, 효소, 기질, 보조인자, 억제제, 형광물질(fluorescer), 화학발광물질, 자성 입자, 합텐 및 염료 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적인 예로, 상기 리간드에는 바이오틴, 아비딘 및 스트렙토아비딘 등이 포함되고, 상기 효소에는 루시퍼라아제, 퍼옥시다아제 및 베타 갈락토시다아제 등이 포함되며, 상기 형광물질에는 플루오레세인, 쿠마린, 로다민, 피코에리트린 및 설포로다민산 클로라이드(텍사스 레드: Texas red) 등이 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 이러한 검출 가능한 표지물로 공지의 표지물 대부분이 사용될 수 있고, 당업자라면 발명의 목적에 맞게 적절한 표지물을 선택할 수 있을 것이다.

[0036] 본 발명의 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 염기서열로서, 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 서열을 의미한다. 본 발명에서, 상기 유전자의 mRNA 증폭에 사용되는 프라이머는, 적절한 버퍼 중의 적절한 조건(예를 들면, 4개의 다른 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 DNA, RNA 폴리머라제 또는 역전사효소와 같은 중합제) 및 적당한 온도하에서 주형-지시 DNA 합성의 시작점으로서 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오티드가 될 수 있는데, 상기 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있다. 상기 프라이머 서열은 상기 유전자의 mRNA의 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드와 완전하게 상보적일 필요는 없으며, 혼성화할 정도로 충분히 상보적이면 사용가능하다.

[0037] 구체적으로, 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머는 서열번호 4 및 5의 SOX2 측정용 프라이머 쌍, 서열번호 6 및 7의 E-카드헤린 측정용 프라이머 쌍 및 서열번호 8 및 9의 ERBB3 측정용 프라이머 쌍으로 구성되는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명에서 이용되는 염기서열은, 생물학적으로 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기 용어, '실질적인 동일성'은 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인(align)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 더욱 구체적으로 70%의 상동성, 더더욱 구체적으로 80%의 상동성, 가장 구체적으로 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.

[0039] 따라서, 상기 서열번호 1 내지 9로 표시되는 염기서열과 높은 상동성을 갖는 염기서열, 예를 들면 그 상동성이 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 더욱 구체적으로 90% 이상의 높은 상동성을 갖는 염기서열도 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[0040] 본 발명의 용어, "항체"는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 가지는 면역글로불린 분자를 포함하는, 항원을 특이적으로 인식하는 항원의 수용체 역할을 수행하는 단백질 분자를 의미하며, 다클론항체, 단일클론항체, 전체(whole) 항체 및 항체 단편을 모두 포함한다. 전체 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며, 각각의 경쇄는 중쇄와 디설파이드(disulfide) 결합으로 연결되어 있다. 상기 전체 항체는 IgA, IgD, IgE, IgM 및 IgG를 포함하며, IgG는 아형(subtype)으로, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다.

[0041] 본 발명의 용어, "프로브"는 mRNA 또는 단백질과 특이적 결합을 이룰 수 있는, 라벨링(labeling)된 핵산 단편 또는 펩타이드를 의미한다. 구체적인 예로, 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단일 사슬 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중 사슬 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브, 올리고펩타이드(oligonucleotide peptide) 프로브, 폴리펩타이드(polypeptide) 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다.

[0043] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, SNU638 또는 SNU484의 미만형; 또는 MKN28 또는 MKN74의 장형 위암 세포주에서 암 줄기세포 특성을 갖는 스피어 세포를 형성 및 분리하였고(도 1), 상기 스피어 세포는 종양 형성 능력 및 항암제 저항성이 우수함을 확인함으로써 암 줄기세포 특성을 나타냄을 확인하였다(도 2 및 3). 또한, 상기 암 줄기세포의 특성을 갖는 스피어 세포에서, 일반 위암 세포에 비하여 발현이 증가하는 유전자를 규명하였는데, 미만형 위암 스피어 세포에서는 SOX2 및 E-카드헤린 유전자의 발현이 증가하며, 장형 위암 스피어 세포에서는 ERBB3 유전자의 발현이 증가함을 확인하였다(도 4 및 도 5).

[0044] 이는, SOX2 및 E-카드헤린 유전자는 미만형 위암 줄기세포의 마커, ERBB3 유전자는 장형 위암 줄기세포의 마커로 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[0046] 다른 하나의 양태는 상기 조성물을 포함하는, 위암 줄기세포 구별용 키트를 제공한다.

[0047] 이때, 상기 "위암 줄기세포"의 정의는 전술한 바와 같다.

[0049] 본 발명의 키트는, 상기 위암 줄기세포 구별용 조성물을 이용하여 상기 유전자의 발현수준, 즉 mRNA 또는 단백질의 발현 수준을 측정함으로써 위암 줄기세포를 구별할 수 있다. 구체적으로, 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 구체적인 예로, 상기 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. 예를 들어, RT-PCR 키트는 상기 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 디옥시뉴클레오타이드(dNTPs), 디디옥시뉴클레오타이드(ddNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNAse 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.

[0051] 또 다른 예로, 본 발명의 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 위암 줄기세포 구별용 DNA 칩 키트일 수 있다. 본 발명의 용어, "DNA 칩"은 수십만 개의 DNA의 각 염기를 한 번에 확인할 수 있는 DNA 마이크로어레이의 하나를 의미한다. 상기 DNA 칩 키트는, 일반적으로 편평한 고체 지지판, 전형적으로는 현미경용 슬라이드보다 크지 않은 유리 표면에 핵산 종을 격자형 배열(gridded array)로 부착한 것으로, 칩 표면에 핵산이 일정하게 배열되어, DNA 칩 상의 핵산과 칩 표면에 처리된 용액 내에 포함된 상보적인 핵산 간에 다중 혼성화(hybridization) 반응이 일어나 대량 병렬 분석이 가능하도록 하는 도구이다.

[0052] 또 다른 예로, 상기 키트는 단백질 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 위암 줄기세포 구별용 단백질 칩 키트일 수 있다. 상기 단백질 칩은 상기 유전자의 단백질에 대한 하나 이상의 항체가 기판 위의 정해진 위치에 배열되어 고밀도로 고정화되어 있는 것일 수 있다. 단백질 칩을 이용하여 시료를 분석하는 방법은, 시료에서 단백질을 분리하고, 분리한 단백질을 단백질 칩과 혼성화시켜서 항원-항체 복합체를 형성시키고, 이를 판독하여 단백질의 존재 또는 발현 정도를 확인함으로써, 위암 줄기세포를 구별할 수 있다.

[0054] 또 다른 하나의 양태는 (a) 상기 조성물을 사용하여, 위암 환자에서 분리된 생물학적 시료로부터 SOX2, E-카드헤린 및 ERBB3로 구성되는 군으로부터 선택되는 1개 이상의 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)에서 측정된 발현 수준을 대조구 시료의 것과 비교하는 단계를 포함하는, 위암 줄기세포 구별을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다.

[0055] 이때, 상기 "SOX2", "E-카드헤린", "ERBB3" 및 "위암 줄기세포"의 정의는 전술한 바와 같다.

[0057] 본 발명의 용어, "시료"는 위암 환자로부터 분리되어 SOX2, E-카드헤린 또는 ERBB3 유전자의 발현 수준이 측정되는 직접적인 대상을 의미하고, 구체적인 예로 위암 유래의 암 줄기세포일 수 있으나, 상기 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 한, 이에 제한되지 않는다.

[0058] 본 발명의 용어, "대조구 시료"는 위암 환자로부터 분리되어 SOX2, E-카드헤린 또는 ERBB3 유전자의 발현 수준이 측정되는 직접적인 대상을 의미하고, 구체적인 예로 위암 줄기세포를 포함하지 않는 일반적인 위암 세포 또는 조직 등이 될 수 있다. 본 발명의 목적상, 상기 대조구 시료는 위암 환자로부터 분리된 것일 수 있으며, 또는 MKN45, SNU484, SNU601, SNU668, MKN28, MKN74, SNU216, SNU719, AGS 등의 공지된 위암 세포주로부터 유래한 세포일 수 있으나, 상기 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있으며 위암 줄기세포를 포함하지 않는 한, 이에 제한되지 않는다.

[0060] 본 발명에서, 유전자의 발현 수준, 즉 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 상기 (a) 단계는 당업자에게 알려진 어떠한 방법이든 사용 가능하다. 구체적인 예로, PCR, 리가제 연쇄 반응(LCR), 전사증폭(transcription amplification), 자가유지 서열 복제, 핵산에 근거한 서열 증폭(NASBA), 웨스턴블롯(Western blot), 공동-면역침전 어세이(Co-Immunoprecipitation assay), ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay), 실시간 RT-PCR, 전

기영동, 조직 면역염색(immunostaining) 및 FACS(Fluorescence activated cell sorter) 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0061] 이때, 상기 단계 (a)에서 측정된 SOX2 또는 E-카드헤린의 발현 수준이 대조구 시료의 것보다 증가하는 경우 상기 시료에 미만형 위암 줄기세포가 포함되어 있는 것으로 판단하거나; 상기 단계 (a)에서 측정된 ERBB3의 발현 수준이 대조구 시료의 것보다 증가하는 경우, 해당 시료에 장형 위암 줄기세포가 포함되어 있는 것으로 판단하거나; 또는 상기 단계 (a)에서 측정된 SOX2, E-카드헤린 및 ERBB3의 발현 수준이 대조구 시료의 것보다 동등 또는 감소하는 경우, 해당 시료에 미만형 및 장형 위암 줄기세포가 포함되어 있지 않은 것으로 판단할 수 있다.

[0063] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 일반 위암 세포에 비하여, 상기 SOX2 및 E-카드헤린 유전자는 미만형 위암 스피어 세포에서 발현이 증가하며, 상기 ERBB3 유전자는 장형 위암 스피어 세포에서 발현이 증가함을 확인하였다(도 4 및 도 5).

[0064] 이는, 발현 수준이 증가하는 유전자의 종류에 따라 위암 줄기세포를 구별할 수 있으며, 또한 일반 위암 세포와 위암 줄기세포를 구별할 수 있음을 시사하는 것이다.

[0066] 또 다른 하나의 양태는 (a) 미만형 위암 치료제의 후보물질이 처리된 미만형 위암 줄기세포에서 SOX2 또는 E-카드헤린 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)의 발현 수준을 상기 후보물질을 처리하지 않은 시료의 것과 비교하는 단계를 포함하는, 미만형 위암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0067] 이때, 상기 "SOX2", "E-카드헤린" 및 "미만형 위암"의 정의는 전술한 바와 같다.

[0069] 본 발명에서, 상기 미만형 위암 줄기세포는 본 발명의 위암 줄기세포 구별용 조성물을 이용하여 분리된 것일 수 있다.

[0071] 본 발명의 용어, "미만형 위암 치료제의 후보물질"은 미만형 위암을 치료할 수 있을 것으로 예상되는 물질로서, 직접 또는 간접적으로 미만형 위암을 호전 또는 개선 시킬 수 있을 것으로 예상되는 물질이면 제한 없이 사용 가능하며, 화합물, 유전자 또는 단백질 등의 치료가능 예상물질을 모두 포함한다.

[0072] 본 발명에서, 유전자의 발현 수준, 즉 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 상기 (a) 단계는 당업자에게 알려진 어떠한 방법이든 사용 가능하다. 구체적인 예로, PCR, 리가제 연쇄 반응(LCR), 전사증폭(transcription amplification), 자가유지 서열 복제, 핵산에 근거한 서열 증폭(NASBA), 웨스턴블롯(Western blot), 공동-면역침전 어세이(Co-Immunoprecipitation assay), ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay), 실시간 RT-PCR, 전기영동, 조직 면역염색(immunostaining) 및 FACS(Fluorescence activated cell sorter) 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0073] 또한, 본 발명은 상기 단계 (a)에서 측정된 SOX2 또는 E-카드헤린의 발현 수준이 상기 후보물질을 처리하지 않은 시료의 것보다 감소하는 경우, 상기 후보물질을 미만형 위암 치료제로 판단하는 (c) 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0075] 또 다른 하나의 양태는 (a) 장형 위암 치료제의 후보물질이 처리된 장형 위암 줄기세포에서 ERBB3 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)의 발현 수준을 상기 후보물질을 처리하지 않은 시료의 것과 비교하는 단계를 포함하는, 장형 위암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0076] 이때, 상기 "ERBB3" 및 "장형 위암"의 정의는 전술한 바와 같다.

[0078] 본 발명에서, 상기 장형 위암 줄기세포는 본 발명의 위암 줄기세포 구별용 조성물을 이용하여 분리된 것일 수 있다.

[0080] 본 발명의 용어, "장형 위암 치료제의 후보물질"은 장형 위암을 치료할 수 있을 것으로 예상되는 물질로서, 직접 또는 간접적으로 장형 위암을 호전 또는 개선 시킬 수 있을 것으로 예상되는 물질이면 제한 없이 사용 가능하며, 화합물, 유전자 또는 단백질 등의 치료가능 예상물질을 모두 포함한다.

[0081] 본 발명에서, 유전자의 발현 수준, 즉 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 상기 (a) 단계는 당업자에게 알려진 어떠한 방법이든 사용 가능하다. 구체적인 예로, PCR, 리가제 연쇄 반응(LCR), 전사증폭(transcription amplification), 자가유지 서열 복제, 핵산에 근거한 서열 증폭(NASBA), 웨스턴블롯(Western blot), 공동-면역침전 어세이(Co-Immunoprecipitation assay), ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay), 실시간 RT-PCR, 전기영동, 조직 면역염색(immunostaining) 및 FACS(Fluorescence activated cell sorter) 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0082] 또한, 본 발명은 상기 단계 (a)에서 측정된 ERBB3의 발현 수준이 상기 후보물질을 처리하지 않은 시료의 것보다 감소하는 경우, 상기 후보물질을 장형 위암 치료제로 판단하는 (c) 단계를 추가로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0084] SOX2 및 E-카드헤린 유전자는 미만형; 및 ERBB3 유전자는 장형 위암 줄기세포 마커로 사용될 수 있으므로, 상기 유전자의 발현양을 측정하는 본 발명의 조성물은 장형/미만형 위암 줄기세포를 구별할 수 있을 뿐만 아니라, 위암의 병리학적 특성에 따른 치료제 개발에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0086] 도 1은 각 위암 세포주로부터 스피어 세포를 형성하는 방법 및 형성된 세포의 모습에 관한 것으로, a는 스피어 세포의 형성 방법을 보여주는 개략도, b는 스피어 세포의 형성 방법을 보여주는 개략도, b는 미만형(diffuse type) 위암 세포주인 SNU638로부터 형성된 스피어(spheroid) 또는 비-스피어(non-spheroid) 세포를 보여주는 이미지, c는 형성 단계에 따른 스피어 세포의 수 및 생존한 스피어 세포의 수를 보여주는 그래프 및 이미지, 및 d는 위암 세포주에 따라 형성된 스피어 세포의 모습을 보여주는 이미지이다. MKN45, SNU484, SNU601 및 SNU668은 미만형(diffuse type) 위암 세포주; MKN28, MKN74, SNU216, SNU719 및 AGS는 장형(intestinal type) 위암 세포주를 의미한다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 MKN28 세포주로부터 형성된, 스피어 세포의 종양 형성 능력을 보여주는 것으로, a는 일반 위암 세포(부모세포; parents)와 스피어 세포(spheroid)에서 형성된 종양의 크기를 보여주는 그래프이다. b는 주입한 암세포의 수에 따른 종양 형성 정도를 보여주는 표로서, '(종양을 형성한 마우스의 수)/(실험한 마우스의 수)'의 형태로 기재하였다. c는 형성된 종양의 모습을 보여주는 이미지이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 각 위암 세포주로부터 형성된, 스피어 세포의 항암제에 대한 저항성을 보여주는 것으로, a는 항암제 처리 시 일반 위암 세포(부모세포; parents)와 스피어 세포(spheroid)의 세포 사멸 정도를 보여주는 FACS 분석 결과이며, b는 상기 a의 결과를 정량한 그래프이다. c는 항암제 처리 시 일반 위암 세포와 스피어 세포에서 세포사멸/세포생존과 관련한 단백질의 발현을 분석한 웨스턴 블롯 이미지이다. 이때, 대조군으로서 DMSO(dimethyl sulfoxide), 항암제로서 5FU(Fluorouracil), CDDP(Cisplatin) 및 PTX(Paclitaxel)가 사용되었다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 각 위암 세포주로부터 형성된 스피어 세포, 및 일반 부모세포에서 OCT4, SOX2 및 NANOG 유전자의 발현양을 분석한 결과를 보여주는 것이다. a는 상기 유전자의 mRNA 발현양을 분석한 그래프로서, 부모세포에서의 발현양 대비 스피어 세포에서의 발현양으로 나타내었다. b는 상기 유전자의 단백질 발현양을 분석한 웨스턴 블롯 이미지로서, P는 부모세포, S는 스피어 세포를 의미한다. 이때, β-actin을 발현양의 표준 유전자로 사용하였다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 각 위암 세포주로부터 형성된 스피어 세포, 및 일반 부모세포에서 발현되는 E-카드헤린(E-cadherin), 인산화(Phospho)-ERBB3(Y1289) 및 ERBB3 유전자의 단백질 발현양을 분석한 웨스턴 블롯 이미지이다. P는 부모세포, S는 스피어 세포를 의미한다. 이때, β-actin을 발현양의 표준 유전자로 사용하였다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 제작된, SOX2 또는 E-카드헤린 유전자의 발현이 억제된 미만형 위암 세포주(SNU638 또는 SNU484)의 스피어 형성 능력에 관한 것이다. a는 상기 SNU638 또는 SNU484에서 발현되는 SOX2 또는 E-카드헤린의 단백질 양을 보여주는 웨스턴 블롯 이미지, b는 상기 SNU638 또는 SNU484로부터 형성된 스피어 세포를 보여주는 이미지, c는 형성된 스피어 세포의 수를 보여주는 그래프, 및 d는 형성된 스피어 세포의 직경을 보여주는 그래프이다. 이때, Dox 또는 Doxy는 독시사이클린(Doxycycline)을 의미하며, β-actin을 발현양의 표준 유전자로 사용하였다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 제작된, ERBB3 유전자의 발현이 억제된 장형 위암 세포주(MKN28 또는 MKN74)의 스피어 형성 능력에 관한 것이다. a는 상기 MKN28 또는 MKN74에서 발현되는 ERBB3의 단백질 양을 보여주는 웨스턴 블롯 이미지, b는 상기 MKN28 또는 MKN74로부터 형성된 스피어 세포를 보여주는 이미지, c는 형성된 스피어 세포의 수를 보여주는 그래프, 및 d는 형성된 스피어 세포의 직경을 보여주는 그래프이다. 이때, Dox 또는 Doxy는 독시사이클린을 의미하며, β-actin을 발현양의 표준 유전자로 사용하였다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따라 제작된, ERBB3 유전자의 발현이 억제된 장형 위암 세포주(MKN28)의 종양 형성 능력에 관한 것이다. a 및 b는 ERBB3 유전자의 발현이 정상이거나(Doxy-) 또는 억제된 경우(Doxy+)에 형성된 종양의 크기를 비교한 그래프 및 이미지이다. 이때, Doxy는 독시사이클린을 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0087] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0089] **실시예 1. 스피어(sphere) 세포의 분리 및 배양**

[0091] 위암 줄기세포 특이적 마커를 발굴하기 위하여, 먼저 위암 줄기세포 특성을 갖는 스피어 세포를 하기 실시예 1-1 내지 1-3에 따른 방법으로 분리 및 배양하였다.

[0093] **실시예 1-1. 일반 위암 세포의 배양**

[0095] 미만형(diffuse type) 위암 세포주로 SNU638, SNU484를 사용하였고, 장형(intestinal type) 위암 세포주로 MKN28, MKN74를 사용하였다. 상기 세포주는 모두 한국 세포주 은행에서 구입하였으며, 10% FBS, 1% 항생제, 25mM HEPES, 25mM $NaHCO_3$를 포함하는 RPMI1640 배지를 이용하여 일반 위암 세포를 배양하였다. 모든 세포 배양은 5% 이산화탄소를 포함하는 습식 인큐베이터에서 37℃의 조건으로 진행하였다.

[0097] **실시예 1-2. 스피어 세포의 형성 및 배양**

[0099] 위암 줄기세포 특성을 갖는 스피어 세포를 형성하기 위하여, 스페로이드 필름(Spheroid Film, Incyto 사)을 사용하였다.

[0100] 구체적으로, 도 1의 a에 도시된 방법에 따라 스피어 세포를 형성하였다. 먼저, 60mm 페트리 접시에 고정한 스페로이드 필름 위에 각각의 위암 세포주(NU638, SNU484, MKN28, MKN74)를 5 x 10^3개의 수로 분주하였다. 세포 분주 30분 후, 각 마이크로 웰에 들어가지 않은 세포들을 제거하기 위해 배지를 교체하였으며, 각 마이크로 웰에 하나씩의 세포가 들어간 것을 현미경을 통해 확인한 후, 4일에 한번 배지를 교체하며 2주간 배양함으로써 스피어 세포를 형성하였다.

[0101] 이때, 스피어 세포의 배양에는 recombinant human EGF 20ng/mL, recombinant human FGF 10ng/mL, 1X B27 supplement, 1% 항생제, 10mM HEPES를 포함하는 RPMI1640 배지를 이용하였다.

[0103] **실시예 1-3. 스피어 세포의 분리**

[0105] 스피어 세포로서, 세포끼리 밀접하게 부착하여 분명한 경계를 형성하며 구형으로 자라는 세포들 중에서 지름이 100 ㎛인 것을 선별하였다. 이때, 세포 간의 부착능력이 떨어져 포도송이 모양을 이루는 것은 제외하였다.

[0106] 이후, 많은 수의 스피어 세포를 수득하기 위하여 상기의 방법으로 분리한 스피어 세포를 계대배양하였다. 0.05% 트립신-EDTA를 5분간 처리하여 개별 세포로 분리된 세포들을 새로운 스페로이드 필름에 다시 2주간 같은 방법으로 배양하였다. 또한, 스피어 세포가 형성된 웰의 수를 세어 스피어 형성 능력의 변화를 확인하였다.

[0107] 그 결과, 도 1의 b 및 d에서 볼 수 있듯이, 미만형 위암 세포인 SNU638 및 SNU484, 및 장형 위암 세포주인 MKN28 및 MKN74로부터 구형의 스피어 세포를 형성할 수 있었으며, 도 1의 c에서 볼 수 있듯이, 계대배양 시 더 많은 수의 생존한 스피어 세포를 수득할 수 있음을 확인하였다.

[0109] **실시예 2. 스피어 세포의 종양 형성 능력 확인**

[0111] 암 줄기세포의 특징 중 하나는 자가복제 능력이다. 이에, 상기 실시예 1에서 분리한 스피어 세포가 암 줄기세포의 특징을 갖는지 확인하기 위하여 스피어 세포의 종양 형성 능력을 확인하였다.

[0112] 구체적으로, 5주령의 수컷 면역억제 쥐를 사용하였다. MKN28 세포주의 부모 세포(일반 위암 세포)와 스피어 세포를 각 5 x 10^5개의 수로 100uL PBS에 준비해 마우스의 좌우 옆구리 피하에 주사하여 종양을 형성하였다. 종양의 크기가 1,000 mm^3이 넘거나 괴사가 일어날 경우 고통 경감을 위해 안락사시켰다. 실험군은 4마리씩 지정하였다.

[0113] 그 결과, 도 2의 a에서 볼 수 있듯이, 부모 세포에 비하여, 분리한 스피어 세포에서 종양 형성 능력이 증가함을 확인할 수 있었다. 또한, 도 2의 b 및 c에서 볼 수 있듯이, 5 x 10^5개의 암세포를 주입하는 경우, 부모 세포 및 스피어 세포를 주입한 4마리의 마우스 모두에서 종양이 형성되었으나, 스피어 세포에서 유래된 종양의 크기가 부모세포에서 유래된 종양에 비하여 월등함을 확인하였다. 상기 결과를 통해, 스피어 세포는 종양형성능력이 높은 줄기세포의 특성을 나타냄을 알 수 있었다.

[0115] **실시예 3. 스피어 세포의 항암제 저항성 확인**

[0117] 암 줄기세포의 특징 중 하나는 항암 치료에 대한 내성 및 재발이다. 이에, 상기 실시예 1에서 분리한 스피어 세포가 암 줄기세포의 특징을 갖는지 확인하기 위하여 스피어 세포의 항암제 저항성을 확인하였다.

[0118] 구체적으로, 항암제로서 200 ㎍/mL 플루오로우라실(fluorouracil), 1 ㎍/mL 파클리탁셀(paclitaxel), 50 ㎍/mL 시스플라틴(cisplatin)을 사용하였고, 대조군으로서 DMSO를 사용하였다. 각 물질을 부모 세포(일반 위암 세포)와 스피어 세포에 처리하였고, 24시간 뒤 Annexin V-FITC 세포사멸 탐지 키트를 이용하여 사멸된 세포를 측정하였다. 세포는 FACS calibur를 이용하여 분석하였고, Annexin V-FITC와 PI 염색여부를 통해 초기 세포사멸(early apoptotic) 세포와 괴사(necrotic) 세포를 구분하였다.

[0119] 그 결과, 도 3의 a 및 b에서 볼 수 있듯이, 부모 세포에 비하여, 분리한 스피어 세포는 항암제에 의해 사멸된 세포의 수가 상대적으로 감소함을 확인할 수 있었다. 상기 결과를 통해, 스피어 세포는 항암제 저항성이 큰 줄기세포의 특성을 나타냄을 알 수 있었다.

[0121] 또한, 세포사멸과 연관된 단백질 발현의 변화는 웨스턴 블롯(western blot) 방법을 이용하여 분석하였다. 70-80% 자란 세포를 PRO-PREP 용해 버퍼를 이용하여 용해하였으며, BCA 어세이를 통해 전체 용해물의 농도를 측정하여 30 ㎍의 단백질을 이용하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 이후, PVDF 멤브레인으로 단백질을 이동시키고, 5% 탈

지분유가 포함된 PBS-T 용액으로 1시간 동안 블로킹(blocking)하였다. 1차 항체는 4℃에서 밤새 반응시켰고, HRP(horseradish phosphatase)가 결합된 2차 항체는 상온에서 1시간 반응시켰다. ECL 용액으로 단백질 발현 밴드를 확인하였고, ChemiDoc 시스템을 통해 관찰하였다. 이때, 1차 항체는 PARP, Caspase3, Bcl-xL, Bcl-2를 사용하였다.

[0122] 그 결과, 도 3의 c에서 볼 수 있듯이, 부모 세포에 비하여, 분리한 스피어 세포는 항암제 처리 시 세포 사멸과 관련한 단백질인 Cleaved PARP, Cleaved Caspase 3의 발현은 변화가 없으나, 세포 생존과 관련한 단백질인 Bcl-xL의 발현은 증가함을 확인할 수 있었다. 상기 결과를 통해, 스피어 세포는 항암제 저항성이 큰 줄기세포의 특성을 나타냄을 알 수 있었다.

[0124] **실시예 4. 위암 유형에 따른 스피어 세포의 마커 유전자 확인**

[0126] **실시예 4-1. 자가복제 조절인자의 발현양 확인**

[0128] 위암 유형에 따른 스피어 세포, 즉 위암 줄기세포의 마커 유전자를 규명하기 위하여, 먼저 줄기세포 내 자가복제 조절인자로 알려진 OCT4, SOX2 및 NANOG의 mRNA 및 단백질 수준을 미만형 위암 세포주인 SNU638, SNU484; 및 장형 위암 세포주인 MKN28, MKN74 세포에서 분석하였다.

[0129] 구체적으로, 전체 RNA는 TRIzol 방법으로 분리하였다. 1 ㎍의 전체 RNA를 Nanodrop으로 정량하고, M-MLV 역전사효소를 이용해 cDNA를 합성하였다. cDNA의 증폭은 CFX를 이용하였고, iQ SYBR Green Supermix를 사용하였다. 실시간 PCR을 통해 증폭된 각 유전자의 mRNA 발현 수준은 GAPDH의 mRNA 값으로 보정하였다. 이때, 사용한 프라이머는 하기 표 1에 정리하였다.

표 1

[0131]

유전자	구분		서열 (5' → 3')
OCT4	정방향	서열번호 4	GCA GCG ACT ATG CAC AAC GA
	역방향	서열번호 5	CCA GAG TGG TGA CGG AGA CA
SOX2	정방향	서열번호 6	CAT CAC CCA CAG CAA ATG ACA
	역방향	서열번호 7	GCT CCT ACC GTA CCA CTA GAA CTT
NANOG	정방향	서열번호 8	AAT ACC TCA GCC TCC AGC AGA TG
	역방향	서열번호 9	TGC GTC ACA CCA TTG CTA TTC TTC
GAPDH	정방향	서열번호 10	CAG CCT CAA GAT CAT CAG CAA TG
	역방향	서열번호 11	TCA TGA GTC CTT CCA CGA TAC CA

[0133] 그 결과, 부모세포에서의 유전자 발현양 대비 스피어 세포에서의 발현양을 나타낸 도 4의 a에서 볼 수 있듯이, 미만형 위암 세포주인 SNU638 및 SNU484의 스피어 세포에서는 부모 세포(일반 위암 세포)에 비하여, SOX2 및 NANOG 유전자의 mRNA 발현양이 현저히 증가함을 확인하였다. 그러나, 장형 위암 세포주인 MKN28, MKN74에서는 스피어 세포에서 상기 유전자들의 mRNA 발현양은 부모 세포(일반 위암 세포)와 비교 시 변화가 없음을 확인하였다.

[0135] 또한, 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하여 상기 세포에서의 OCT4, SOX2, NANOG 유전자의 단백질 발현 정도를 분석하였다.

[0136] 그 결과, 도 4의 b에서 볼 수 있듯이, 미만형 위암 세포주인 SNU638 및 SNU484의 스피어 세포(S)에서는 부모 세포(P)에 비하여, SOX2 유전자의 단백질 발현양이 현저히 증가함을 확인하였다. 그러나, 장형 위암 세포주인 MKN28, MKN74에서는 스피어 세포에서 상기 유전자들의 단백질 발현양은 부모 세포와 비교 시 변화가 없거나 오

히려 감소함을 확인하였다.

[0137] 상기 결과를 통해, SOX2 유전자는 미만형 위암 줄기세포의 마커로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0140] **실시예 4-2. 주요 신호전달 인자의 발현 확인**

[0142] 위암 유형에 따른 스피어 세포, 즉 위암 줄기세포의 마커 유전자를 규명하기 위하여, 암의 발달에 주요한 영향을 미치는 신호전달 인자들의 단백질 발현양을 미만형 위암 세포주인 SNU638, SNU484; 및 장형 위암 세포주인 MKN28, MKN74 세포에서 분석하였다.

[0143] 구체적으로, 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하여 상기 세포에서의 E-카드헤린(E-cadherin), 인산화(Phospho)-ERBB3(Y1289), ERBB3의 발현양을 조사하였다. 이때, E-카드헤린은 암의 발달에 중요한 EMT(epithelial-to-mesenchymal transition) 과정에 관여하며(Clin Cancer Res. 2004 Jun 15;10(12 Pt 1):4125-33.), ERBB3 및 인산화-ERBB3는 암세포의 증식에 중요한 ERBB3 신호전달에 관여한다(Acta Biochim Biophys Sin (2014) 46 (3): 190-198).

[0144] 그 결과, 도 5에서 볼 수 있듯이, 미만형 위암 세포주인 SNU638, SNU484의 스피어 세포(S)에서는 부모 세포(일반 위암 세포, P)에 비하여, E-카드헤린 유전자의 단백질 발현이 유도되며, 그 양이 현저히 증가함을 확인하였다. 또한, 장형 위암 세포주인 MKN28 및 MKN74의 스피어 세포에서는 부모 세포에 비하여, ERBB3 유전자의 단백질 발현이 유도되며, 그 양이 현저히 증가함을 확인하였다.

[0145] 상기 결과를 통해, E-카드헤린 유전자는 미만형 위암 줄기세포의 마커로 사용될 수 있으며, ERBB3 유전자는 장형 위암 줄기세포의 마커로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0147] **실시예 5. 마커 유전자의 발현이 억제된 위암 줄기세포의 스피어 형성능력 확인**

[0149] **실시예 5-1. 마커 유전자의 발현을 억제하는 벡터의 구축 방법**

[0151] 마커 유전자로서 SOX2, E-카드헤린 또는 ERBB3의 발현이 억제된 위암 줄기세포를 제작하기 위하여, 상기 유전자의 발현을 억제할 수 있는 재조합 벡터를 구축하여 사용하였다.

[0152] 먼저, Tet-pLKO-puro-Scrambled(#47541) 벡터와 Tet-pLKO-puro-SOX2(#47540) 벡터를 각각 대조군(Control) 또는 SOX2 발현 억제군의 제조를 위해 사용하였다.

[0153] 한편, E-카드헤린과 ERBB3를 타겟하는 벡터를 구축하기 위해 pLKO-Tet-On(#21915)벡터를 클로닝에 사용하였다. AgeI/EcoRI 제한효소를 처리하여 스터퍼(stuffer) 부분을 제거하고, 그 위치에 ERBB3 shRNA 올리고머를 도입하였다. 이때, 사용한 올리고머는 하기 표 2에 나열하였다.

표 2

[0155]

종류	Top	Bottom
ERBB3 shRNA 올리고머	5'-CCGGCCAGAGCTTCAAGACTGTTTACTCGAGTAAACAGTCTTGAAGCTCTGGTTTTT-3' (서열번호 12)	5'-AATTAAAAACCAGAGCTTCAAGACTGTTTACTCGAGTAAACAGTCTTGAAGCTCTGG-3' (서열번호 13)
E-카드헤린 shRNA 올리고머	5'-CCGGGCAGAAATTATTGGGCTCTTTCTCGAGAAAGAGCCCAATAATTTCTGCTTTTT-3' (서열번호 14)	5'-AATTAAAAAGCAGAAATTATTGGGCTCTTTCTCGAGAAAGAGCCCAATAATTTCTGC-3' (서열번호 15)

[0157] **실시예 5-2. 벡터를 포함하는 바이러스의 생산 및 표적세포로의 감염 방법**

[0159] SOX2, E-카드헤린 또는 ERBB3의 발현이 억제된 위암 줄기세포의 세포주를 제작하기 위하여, 상기 실시예 5-1에서 구축한 벡터를 포함하는 바이러스를 제조하였다. 각 벡터를 pMD2.G(#12259) 엔벨로프 플라스미드(envelop plasmid) 및 psPAX2(#12260) 패키징 플라스미드(packaging plasmid)와 함께 리포펙타민(Lipofectamin)을 이용하여 HEK-293T 세포주에 형질감염시켜 바이러스 배양액을 수득하였다. 이후, 생산된 바이러스를 미만형 위암 줄기세포주인 SNU638 및 SNU484, 장형 위암 줄기세포인 MKN28 및 MKN74에 감염시켰고, 퓨로마이신(puromycin) 1 ㎍/mL이 첨가된 배양액으로 선별하였다. 마지막으로, 선별한 세포에서 shRNA 발현을 유도하기 위하여, 독시사이클린(Doxycycline)을 500ng/mL 농도로 첨가하거나 첨가하지 않은 배지에서 72시간 동안 배양함으로써 각 유전자의 발현이 억제된 위암줄기세포를 제조하였다.

[0161] **실시예 5-3. 마커 유전자의 발현이 억제된 위암 줄기세포의 스피어 형성능력 확인**

[0163] SOX2, E-카드헤린 또는 ERBB3의 발현이 억제된 위암 줄기세포의 스피어 형성 능력을 확인하였다.

[0164] 그 결과, 도 6에서 볼 수 있듯이, 미만형 위암 줄기세포주인 SNU638 및 SNU484에서 SOX2 및 E-카드헤린의 발현이 억제되는 경우, 상기 미만형 위암 줄기세포의 스피어 형성 능력이 감소되는 것을 확인하였다.

[0165] 구체적으로, 도 6의 a에서 볼 수 있듯이, 독소사이클린의 처리에 의해 각 유전자의 shRNA가 발현되는 경우, 각 유전자의 발현이 감소되는 것을 확인하였다. 또한, 도 6의 b 내지 d에서도 볼 수 있듯이, shRNA에 의해 각 유전자의 발현이 감소하면 스피어의 크기(직경) 및 수가 현저히 감소하는 것을 확인하였다.

[0166] 그 결과, 도 7에서 볼 수 있듯이, 장형 위암 줄기세포주인 MKN28 및 MKN74에서 ERBB3의 발현이 억제되는 경우, 상기 장형 위암 줄기세포의 스피어 형성 능력이 감소되는 것을 확인하였다.

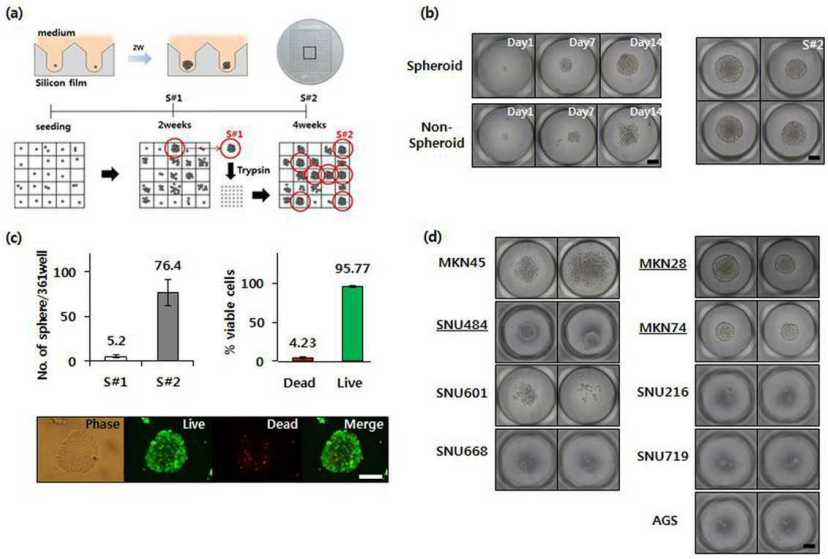
[0167] 구체적으로, 도 7의 a에서 볼 수 있듯이, 독소사이클린의 처리에 의해 각 유전자의 shRNA가 발현되는 경우, 각 유전자의 발현이 감소되는 것을 확인하였다. 또한, 도 7의 b 내지 d에서도 볼 수 있듯이, shRNA에 의해 각 유전자의 발현이 감소하면 스피어의 크기(직경) 및 수가 현저히 감소하는 것을 확인하였다.

[0168] 특히, 도 8에서 볼 수 있듯이, 장형 위암줄기세포에서 ERBB3의 발현이 억제되는 경우 종양 형성 능력도 감소하는 것을 확인하였다.

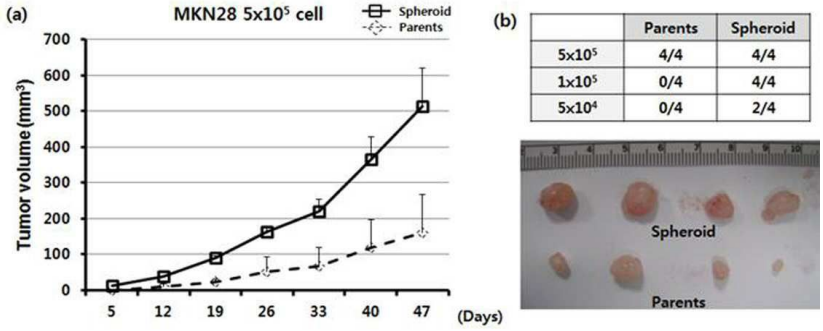
[0169] 상기 결과를 통해, 미만형 위암 줄기세포에서는 마커 유전자인 SOX2 또는 E-카드헤린의 발현이 억제되고, 장형 위암 줄기세포에서는 마커 유전자인 ERBB3의 발현이 억제되는 경우 위암 줄기세포만의 고유한 특징인 스피어 형성 능력 또는 종양 형성 능력이 감소하는 것을 알 수 있었다. 이에 따라, 상기 유전자는 각각 미만형 또는 장형 위암 줄기세포의 특이적 마커 유전자로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

도면

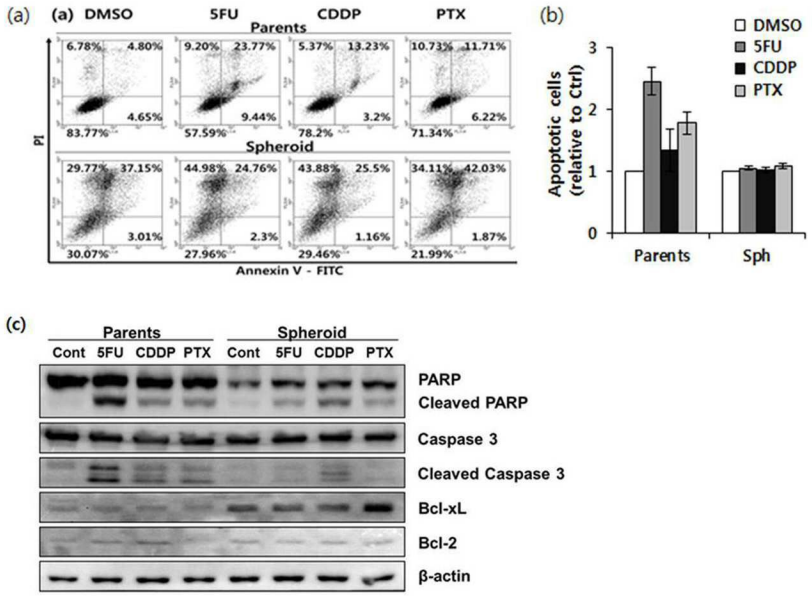
도면1



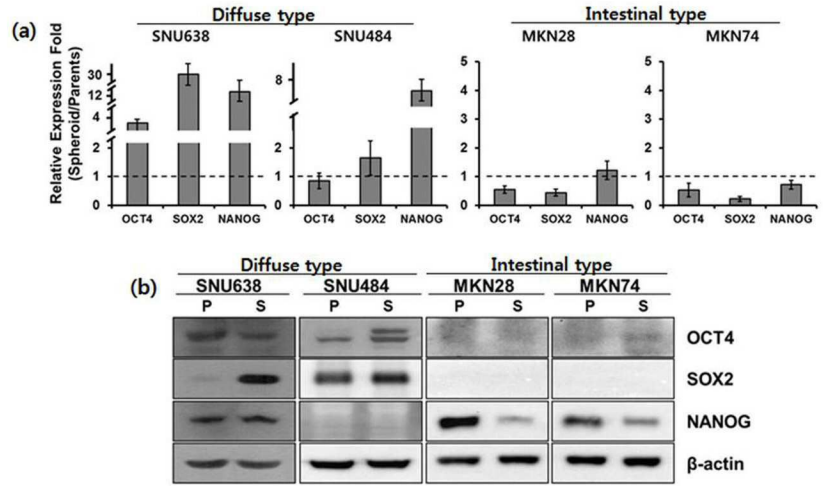
도면2



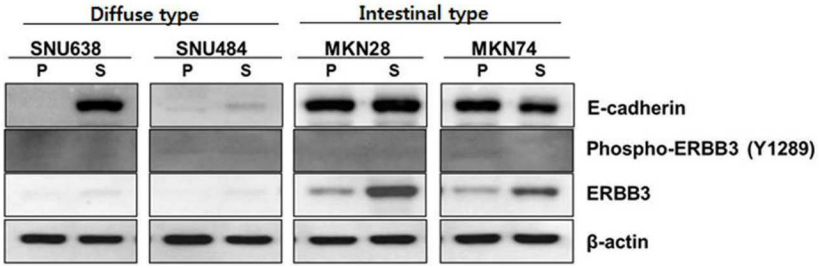
도면3



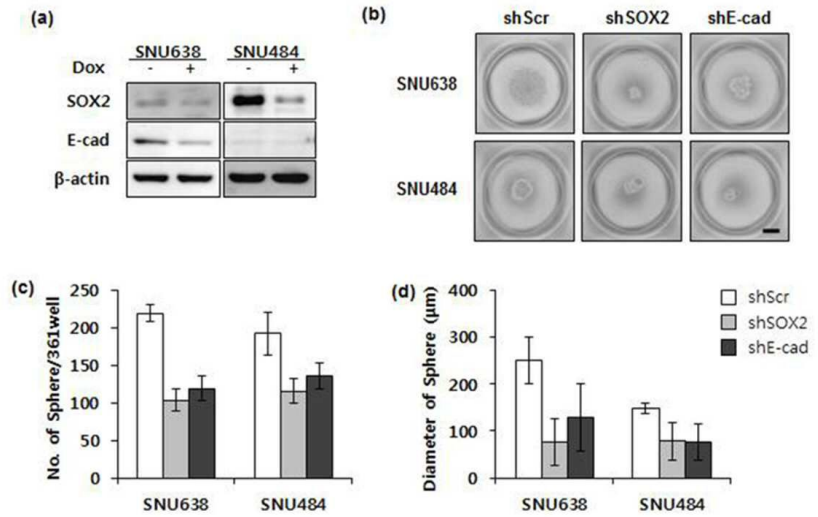
도면4


(a)
Diffuse type
SNU638
SNU484
Intestinal type
MKN28
MKN74
Relative Expression Fold (Spheroid/Parents)
OCT4
SOX2
NANOG
(b)
Diffuse type
Intestinal type
SNU638
SNU484
MKN28
MKN74
P
S
OCT4
SOX2
NANOG
β-actin

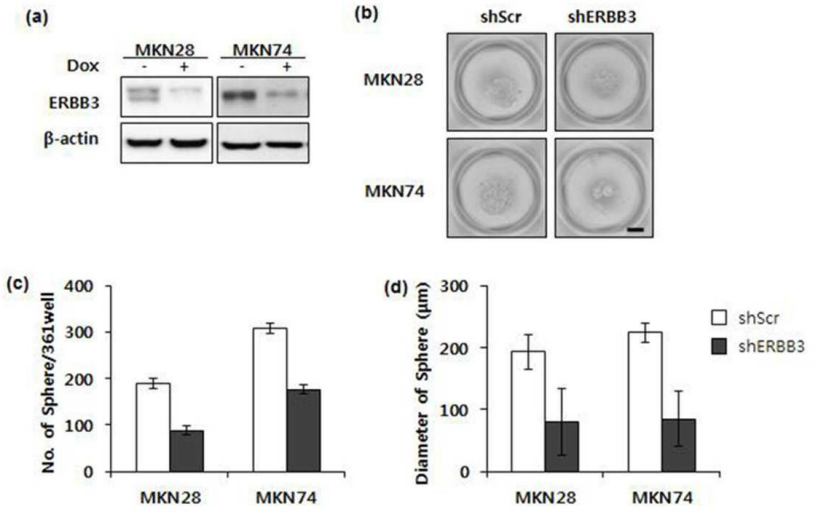
도면5


Diffuse type
Intestinal type
SNU638
SNU484
MKN28
MKN74
P
S
E-cadherin
Phospho-ERBB3 (Y1289)
ERBB3
β-actin

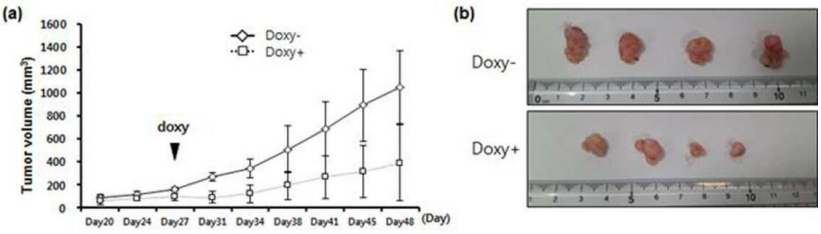
도면6


(a)
Dox
SNU638
SNU484
SOX2
E-cad
β-actin
(b)
shScr
shSOX2
shE-cad
SNU638
SNU484
(c)
No. of Sphere/361well
SNU638
SNU484
(d)
Diameter of Sphere (μm)
shScr
shSOX2
shE-cad
SNU638
SNU484

도면7



도면8



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Gastric cancer stem cell markers and uses thereof

<130> KPA161352-KR-P1

<150> KR 10-2017-0002076

<151> 2017-01-05

<160> 15

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 2450

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

aaggggaaa gtagtttgct gcctctttaa gactaggact gagagaaaga agaggagaga 60

gaaagaaagg gagagaagtt tgagccccag gcttaagcct ttccaaaaaa taataataac 120

aatcatcggc ggcggcagga tcggccagag gaggagggaa gcgctttttt tgatcctgat 180

tccagtttgc ctctctcttt ttttccccca aattattctt cgcctgattt tcctcgcgga 240

gccctgcgct cccgacaccc ccgcccgcct cccctcctcc tctcccccg cccgcgggcc 300

ccccaaagtc ccggccgggc cgagggtcgg cggccgccgg cgggccgggc ccgcgcacag 360

cgcccgcatg tacaacatga tggagacgga gctgaagccg ccgggcccgc agcaaacttc 420

gggggggcggc ggcggcaact ccaccgcggc ggcggccggc ggcaaccaga aaaacagccc 480

ggaccgcgtc aagcggccca tgaatgcctt catggtgtgg tcccgcgggc agcggcgcaa 540

gatggcccag gagaacccca agatgcacaa ctcggagatc agcaagcgcc tgggcgccga 600

gtggaaactt ttgtcggaga cggagaagcg gccgttcatc gacgaggcta agcggctgcg 660

agcgctgcac atgaaggagc acccggatta taaataccgg ccccggcgga aaaccaagac 720

gctcatgaag aaggataagt acacgctgcc cggcgggctg ctggcccccg gcggcaatag 780

catggcgagc ggggtcgggg tgggcgccgg cctgggcgcg ggcgtgaacc agcgcatgga 840

cagttacgcg cacatgaacg gctggagcaa cggcagctac agcatgatgc aggaccagct 900

gggctacccg cagcacccgg gcctcaatgc gcacggcgca gcgcagatgc agcccatgca 960

ccgctacgac gtgagcgccc tgcagtacaa ctccatgacc agctcgcaga cctacatgaa 1020

cggctcgccc acctacagca tgtcctactc gcagcagggc acccctggca tggctcttgg 1080

ctccatgggt tcggtggtca agtccgaggc cagctccagc ccccctgtgg ttacctcttc 1140

ctcccactcc agggcgccct gccaggccgg ggacctccgg gacatgatca gcatgtatct 1200

ccccggcgcc gaggtgccgg aacccgccgc ccccagcaga cttcacatgt cccagcacta 1260

ccagagcggc ccggtgcccg gcacggccat taacggcaca ctgcccctct cacacatgtg 1320

agggccggac agcgaactgg agggggggaga aattttcaaa gaaaaacgag ggaaatggga 1380

ggggtgcaaa agaggagagt aagaaacagc atggagaaaa cccggtacgc tcaaaaagaa 1440

aaaggaaaaa aaaaaatccc atcacccaca gcaaatgaca gctgcaaaag agaacaccaa 1500

tcccatccac actcacgcaa aaaccgcgat gccgacaaga aaacttttat gagagagatc 1560

ctggacttct ttttgggggа ctatttttgt acagagaaaa cctggggagg gtggggaggg 1620

cgggggaatg gaccttgtat agatctggag gaaagaaagc tacgaaaaac ttttaaaag 1680

ttctagtggt acggtaggag ctttgcagga agtttgcaaa agtctttacc aataatattt 1740

agagctagtc tccaagcgac gaaaaaaatg ttttaatatt tgcaagcaac ttttgtacag 1800

tatttatcga gataaacatg gcaatcaaaa tgtccattgt ttataagctg agaatttgcc 1860

aatatttttc aaggagaggc ttcttgctga attttgattc tgcagctgaa atttaggaca 1920

gttgcaaacg tgaaaagaag aaaattattc aaatttggac attttaattg tttaaaaatt 1980

gtacaaaagg aaaaaattag aataagtact ggcgaaccat ctctgtggtc ttgtttaaaa 2040

agggcaaaag ttttagactg tactaaattt tataacttac tgttaaaagc aaaaatggcc 2100

atgcaggttg acaccgttgg taatttataa tagcttttgt tcgatcccaa ctttccattt 2160

tgttcagata aaaaaaacca tgaaattact gtgtttgaaa tattttctta tggtttgtaa 2220

tatttctgta aatttattgt gatattttaa ggttttcccc cctttatttt ccgtagttgt 2280

attttaaaag attcggctct gtattatttg aatcagtctg ccgagaatcc atgtatatat 2340

ttgaactaat atcatcctta taacaggtac attttcaact taagttttta ctccattatg 2400

cacagtttga gataaataaa tttttgaaat atggacactg aaaaaaaaaa 2450

<210> 2

<211> 4845

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

tcagtggcgt cggaactgca aagcacctgt gagcttgcgg aagtcagttc agactccagc 60

ccgctccagc ccggcccgac ccgaccgcac ccggcgcctg ccctcgctcg gcgtccccgg 120

ccagccatgg gcccttggag ccgcagcctc tcggcgctgc tgctgctgct gcaggtctcc 180

tcttggctct gccaggagcc ggagccctgc caccctggct ttgacgccga gagctacacg 240

ttcacggtgc cccggcgcca cctggagaga ggccgcgtcc tgggcagagt gaattttgaa 300

gattgcaccg gtcgacaaag gacagcctat ttttccctcg acacccgatt caaagtgggc 360

acagatggtg tgattacagt caaaaggcct ctacggtttc ataacccaca gatccatttc 420

ttggtctacg cctgggactc cacctacaga aagttttcca ccaaagtcac gctgaataca 480

gtggggcacc accaccgccc cccgccccat caggcctccg tttctggaat ccaagcagaa 540

ttgctcacat ttcccaactc ctctcctggc ctcagaagac agaagagaga ctgggttatt 600

cctcccatca gctgcccaga aaatgaaaaa ggcccatttc ctaaaaacct ggttcagatc 660

aaatccaaca aagacaaaga aggcaaggtt ttctacagca tcactggcca aggagctgac 720

acacccccctg ttggtgtctt tattattgaa agagaaacag gatggctgaa ggtgacagag 780

cctctggata gagaacgcat tgccacatac actctcttct ctcacgctgt gtcatccaac 840

gggaatgcag ttgaggatcc aatggagatt ttgatcacgg taaccgatca gaatgacaac 900

aagcccgaat tcacccagga ggtctttaag gggtctgtca tggaaggtgc tcttccagga 960

acctctgtga tggaggtcac agccacagac gcggacgatg atgtgaacac ctacaatgcc 1020

gccatcgctt acaccatcct cagccaagat cctgagctcc ctgacaaaaa tatgttcacc 1080

attaacagga acacaggagt catcagtgtg gtcaccactg ggctggaccg agagagtttc 1140

cctacgtata ccctggtggt tcaagctgct gaccttcaag gtgaggggtt aagcacaaca 1200

gcaacagctg tgatcacagt cactgacacc aacgataatc ctccgatctt caatcccacc 1260

acgtacaagg gtcaggtgcc tgagaacgag gctaacgtcg taatcaccac actgaaagtg 1320

actgatgctg atgcccccaa taccccagcg tgggaggctg tatacaccat attgaatgat 1380

gatggtggac aatttgtcgt caccacaaat ccagtgaaca acgatggcat tttgaaaaca 1440

gcaaagggct tggattttga ggccaagcag cagtacattc tacacgtagc agtgacgaat 1500

gtggtacctt ttgaggtctc tctcaccacc tccacagcca ccgtcaccgt ggatgtgctg 1560

gatgtgaatg aagcccccat ctttgtgcct cctgaaaaga gagtggaagt gtccgaggac 1620

tttggcgtgg gccaggaaat cacatcctac actgcccagg agccagacac atttatggaa 1680

cagaaaataa catatcggat ttggagagac actgccaact ggctggagat taatccggac 1740

actggtgcca tttccactcg ggctgagctg gacagggagg attttgagca cgtgaagaac 1800

agcacgtaca cagccctaat catagctaca gacaatggtt ctccagttgc tactggaaca 1860

gggacacttc tgctgatcct gtctgatgtg aatgacaacg cccccatacc agaacctcga 1920

actatattct tctgtgagag gaatccaaag cctcaggtca taaacatcat tgatgcagac 1980

cttcctccca atacatctcc cttcacagca gaactaacac acggggcgag tgccaactgg 2040

accattcagt acaacgaccc aacccaagaa tctatcattt tgaagccaaa gatggcctta 2100

gaggtgggtg actacaaaat caatctcaag ctcatggata accagaataa agaccaagtg 2160

accaccttag aggtcagcgt gtgtgactgt gaaggggccg ctggcgtctg taggaaggca 2220

cagcctgtcg aagcaggatt gcaaattcct gccattctgg ggattcttgg aggaattctt 2280

gctttgctaa ttctgattct gctgctcttg ctgtttcttc ggaggagagc ggtggtcaaa 2340

gagcccttac tgcccccaga ggatgacacc cgggacaacg tttattacta tgatgaagaa 2400

ggaggcggag aagaggacca ggactttgac ttgagccagc tgcacagggg cctggacgct 2460

cggcctgaag tgactcgtaa cgacgttgca ccaaccctca tgagtgtccc ccggtatctt 2520

ccccgccctg ccaatcccga tgaaattgga aattttattg atgaaaatct gaaagcggct 2580

gatactgacc ccacagcccc gccttatgat tctctgctcg tgtttgacta tgaaggaagc 2640

ggttccgaag ctgctagtct gagctccctg aactcctcag agtcagacaa agaccaggac 2700

tatgactact tgaacgaatg gggcaatcgc ttcaagaagc tggctgacat gtacggaggc 2760

ggcgaggacg actaggggac tcgagagagg cgggccccag acccatgtgc tgggaaatgc 2820

agaaatcacg ttgctggtgg tttttcagct cccttccctt gagatgagtt tctggggaaa 2880

aaaaagagac tggttagtga tgcagttagt atagctttat actctctcca ctttatagct 2940

ctaataagtt tgtgttagaa aagtttcgac ttatttctta aagctttttt ttttttccca 3000

tcactcttta catggtggtg atgtccaaaa gatacccaaa ttttaatatt ccagaagaac 3060

aactttagca tcagaaggtt cacccagcac cttgcagatt ttcttaagga attttgtctc 3120

acttttaaaa agaaggggag aagtcagcta ctctagttct gttgttttgt gtatataatt 3180

ttttaaaaaa aatttgtgtg cttctgctca ttactacact ggtgtgtccc tctgcctttt 3240

ttttttttt aagacagggt ctcattctat cggccaggct ggagtgcagt ggtgcaatca 3300

cagctcactg cagccttgtc ctcccaggct caagctatcc ttgcacctca gcctcccaag 3360

tagctgggac cacaggcatg caccactacg catgactaat tttttaaata tttgagacgg 3420

ggtctccctg tgttacccag gctggtctca aactcctggg ctcaagtgat cctcccatct 3480

tggcctccca gagtattggg attacagaca tgagccactg cacctgccca gctccccaac 3540

tccctgccat tttttaagag acagtttcgc tccatcgccc aggcctggga tgcagtgatg 3600

tgatcatagc tcactgtaac ctcaaactct ggggctcaag cagttctccc accagcctcc 3660

tttttatttt tttgtacaga tggggtcttg ctatgttgcc caagctggtc ttaaactcct 3720

ggcctcaagc aatccttctg ccttggcccc ccaaagtgct gggattgtgg gcatgagctg 3780

ctgtgcccag cctccatgtt ttaatatcaa ctctcactcc tgaattcagt tgctttgccc 3840

aagataggag ttctctgatg cagaaattat tgggctcttt tagggtaaga agtttgtgtc 3900

tttgtctggc cacatcttga ctaggtattg tctactctga agacctttaa tggcttccct 3960

ctttcatctc ctgagtatgt aacttgcaat gggcagctat ccagtgactt gttctgagta 4020

agtgtgttca ttaatgttta tttagctctg aagcaagagt gatatactcc aggacttaga 4080

atagtgccta aagtgctgca gccaaagaca gagcggaact atgaaaagtg ggcttggaga 4140

tggcaggaga gcttgtcatt gagcctggca atttagcaaa ctgatgctga ggatgattga 4200

ggtgggtcta cctcatctct gaaaattctg gaaggaatgg aggagtctca acatgtgttt 4260

ctgacacaag atccgtggtt tgtactcaaa gcccagaatc cccaagtgcc tgcttttgat 4320

gatgtctaca gaaaatgctg gctgagctga acacatttgc ccaattccag gtgtgcacag 4380

aaaaccgaga atattcaaaa ttccaaattt ttttcttagg agcaagaaga aaatgtggcc 4440

ctaaaggggg ttagttgagg ggtagggggt agtgaggatc ttgatttgga tctcttttta 4500

tttaaatgtg aatttcaact tttgacaatc aaagaaaaga cttttgttga aatagcttta 4560

ctgtttctca agtgttttgg agaaaaaaat caaccctgca atcacttttt ggaattgtct 4620

tgatttttcg gcagttcaag ctatatcgaa tatagttctg tgtagagaat gtcactgtag 4680

ttttgagtgt atacatgtgt gggtgctgat aattgtgtat tttctttggg ggtggaaaag 4740

gaaaacaatt caagctgaga aaagtattct caaagatgca tttttataaa ttttattaaa 4800

caattttgtt aaaccattaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 4845

<210> 3

<211> 5765

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

actccagcct cgcgcgggag ggggcgcggc cgtgactcac ccccttccct ctgcgttcct 60

ccctccctct ctctctctct ctcacacaca cacacccctc ccctgccatc cctccccgga 120

ctccggctcc ggctccgatt gcaatttgca acctccgctg ccgtcgccgc agcagccacc 180

aattcgccag cggttcaggt ggctcttgcc tcgatgtcct agcctagggg cccccgggcc 240

ggacttggct gggctccctt caccctctgc ggagtcatga gggcgaacga cgctctgcag 300

gtgctgggct tgcttttcag cctggcccgg ggctccgagg tgggcaactc tcaggcagtg 360

tgtcctggga ctctgaatgg cctgagtgtg accggcgatg ctgagaacca ataccagaca 420

ctgtacaagc tctacgagag gtgtgaggtg gtgatgggga accttgagat tgtgctcacg 480

ggacacaatg ccgacctctc cttcctgcag tggattcgag aagtgacagg ctatgtcctc 540

gtggccatga atgaattctc tactctacca ttgcccaacc tccgcgtggt gcgagggacc 600

caggtctacg atgggaagtt tgccatcttc gtcatgttga actataacac caactccagc 660

cacgctctgc gccagctccg cttgactcag ctcaccgaga ttctgtcagg gggtgtttat 720

attgagaaga acgataagct ttgtcacatg gacacaattg actggaggga catcgtgagg 780

gaccgagatg ctgagatagt ggtgaaggac aatggcagaa gctgtccccc ctgtcatgag 840

gtttgcaagg ggcgatgctg gggtcctgga tcagaagact gccagacatt gaccaagacc 900

atctgtgctc ctcagtgtaa tggtcactgc tttgggccca accccaacca gtgctgccat 960

gatgagtgtg ccgggggctg ctcaggccct caggacacag actgctttgc ctgccggcac 1020

ttcaatgaca gtggagcctg tgtacctcgc tgtccacagc ctcttgtcta caacaagcta 1080

actttccagc tggaacccaa tccccacacc aagtatcagt atggaggagt ttgtgtagcc 1140

agctgtcccc ataactttgt ggtggatcaa acatcctgtg tcagggcctg tcctcctgac 1200

aagatggaag tagataaaaa tgggctcaag atgtgtgagc cttgtggggg actatgtccc 1260

aaagcctgtg agggaacagg ctctgggagc cgcttccaga ctgtggactc gagcaacatt 1320

gatggatttg tgaactgcac caagatcctg ggcaacctgg actttctgat caccggcctc 1380

aatggagacc cctggcacaa gatccctgcc ctggacccag agaagctcaa tgtcttccgg 1440

acagtacggg agatcacagg ttacctgaac atccagtcct ggccgcccca catgcacaac 1500

ttcagtgttt tttccaattt gacaaccatt ggaggcagaa gcctctacaa ccggggcttc 1560

tcattgttga tcatgaagaa cttgaatgtc acatctctgg gcttccgatc cctgaaggaa 1620

attagtgctg ggcgtatcta tataagtgcc aataggcagc tctgctacca ccactctttg 1680

aactggacca aggtgcttcg ggggcctacg gaagagcgac tagacatcaa gcataatcgg 1740

ccgcgcagag actgcgtggc agagggcaaa gtgtgtgacc cactgtgctc ctctgggggа 1800

tgctggggcc caggccctgg tcagtgcttg tcctgtcgaa attatagccg aggaggtgtc 1860

tgtgtgaccc actgcaactt tctgaatggg gagcctcgag aatttgccca tgaggccgaa 1920

tgcttctcct gccacccgga atgccaaccc atggagggca ctgccacatg caatggctcg 1980

ggctctgata cttgtgctca atgtgcccat tttcgagatg ggccccactg tgtgagcagc 2040

tgcccccatg gagtcctagg tgccaagggc ccaatctaca agtacccaga tgttcagaat 2100

gaatgtcggc cctgccatga gaactgcacc caggggtgta aaggaccaga gcttcaagac 2160

tgtttaggac aaacactggt gctgatcggc aaaacccatc tgacaatggc tttgacagtg 2220

atagcaggat tggtagtgat tttcatgatg ctgggcggca cttttctcta ctggcgtggg 2280

cgccggattc agaataaaag ggctatgagg cgatacttgg aacggggtga gagcatagag 2340

cctctggacc ccagtgagaa ggctaacaaa gtcttggcca gaatcttcaa agagacagag 2400

ctaaggaagc ttaaagtgct tggctcgggt gtctttggaa ctgtgcacaa aggagtgtgg 2460

atccctgagg gtgaatcaat caagattcca gtctgcatta aagtcattga ggacaagagt 2520

ggacggcaga gttttcaagc tgtgacagat catatgctgg ccattggcag cctggaccat 2580

gcccacattg taaggctgct gggactatgc ccagggtcat ctctgcagct tgtcactcaa 2640

tatttgcctc tgggttctct gctggatcat gtgagacaac accgggggggc actggggcca 2700

cagctgctgc tcaactgggg agtacaaatt gccaagggaa tgtactacct tgaggaacat 2760

ggtatggtgc atagaaacct ggctgcccga aacgtgctac tcaagtcacc cagtcaggtt 2820

caggtggcag attttggtgt ggctgacctg ctgcctcctg atgataagca gctgctatac 2880

agtgaggcca agactccaat taagtggatg gcccttgaga gtatccactt tgggaaatac 2940

acacaccaga gtgatgtctg gagctatggt gtgacagttt gggagttgat gaccttcggg 3000

gcagagccct atgcagggct acgattggct gaagtaccag acctgctaga gaaggggggag 3060

cggttggcac agccccagat ctgcacaatt gatgtctaca tggtgatggt caagtgttgg 3120

atgattgatg agaacattcg cccaaccttt aaagaactag ccaatgagtt caccaggatg 3180

gcccgagacc caccacggta tctggtcata aagagagaga gtgggcctgg aatagcccct 3240

gggccagagc cccatggtct gacaaacaag aagctagagg aagtagagct ggagccagaa 3300

ctagacctag acctagactt ggaagcagag gaggacaacc tggcaaccac cacactgggc 3360

tccgccctca gcctaccagt tggaacactt aatcggccac gtgggagcca gagcctttta 3420

agtccatcat ctggatacat gcccatgaac cagggtaatc ttggggagtc ttgccaggag 3480

tctgcagttt ctgggagcag tgaacggtgc ccccgtccag tctctctaca cccaatgcca 3540

cggggatgcc tggcatcaga gtcatcagag gggcatgtaa caggctctga ggctgagctc 3600

caggagaaag tgtcaatgtg taggagccgg agcaggagcc ggagcccacg gccacgcgga 3660

gatagcgcct accattccca gcgccacagt ctgctgactc ctgttacccc actctcccca 3720

cccgggttag aggaagagga tgtcaacggt tatgtcatgc cagatacaca cctcaaaggt 3780

actccctcct cccgggaagg cacccttttct tcagtgggtc tcagttctgt cctgggtact 3840

gaagaagaag atgaagatga ggagtatgaa tacatgaacc ggaggagaag gcacagtcca 3900

cctcatcccc ctaggccaag ttcccttgag gagctgggtt atgagtacat ggatgtgggg 3960

tcagacctca gtgcctctct gggcagcaca cagagttgcc cactccaccc tgtacccatc 4020

atgcccactg caggcacaac tccagatgaa gactatgaat atatgaatcg gcaacgagat 4080

ggaggtggtc ctgggggtga ttatgcagcc atgggggcct gcccagcatc tgagcaaggg 4140

tatgaagaga tgagagcttt tcaggggcct ggacatcagg ccccccatgt ccattatgcc 4200

cgcctaaaaa ctctacgtag cttagaggct acagactctg cctttgataa ccctgattac 4260

tggcatagca ggcttttccc caaggctaat gcccagagaa cgtaactcct gctccctgtg 4320

gcactcaggg agcatttaat ggcagctagt gcctttagag ggtaccgtct tctccctatt 4380

ccctctctct cccaggtccc agccccttttt ccccagtccc agacaattcc attcaatctt 4440

tggaggcttt taaacatttt gacacaaaat tcttatggta tgtagccagc tgtgcacttt 4500

cttctctttc ccaaccccag gaaaggtttt ccttattttg tgtgctttcc cagtcccatt 4560

cctcagcttc ttcacaggca ctcctggaga tatgaaggat tactctccat atcccttcct 4620

ctcaggctct tgactacttg gaactaggct cttatgtgtg cctttgtttc ccatcagact 4680

gtcaagaaga ggaaagggag gaaacctagc agaggaaagt gtaattttgg tttatgactc 4740

ttaacccccct agaaagacag aagcttaaaa tctgtgaaga aagaggttag gagtagatat 4800

tgattactat cataattcag cacttaacta tgagccaggc atcatactaa acttcaccta 4860

cattatctca cttagtcctt tatcatcctt aaaacaattc tgtgacatac atattatctc 4920

attttacaca aagggaagtc gggcatggtg gctcatgcct gtaatctcag cactttggga 4980

ggctgaggca gaaggattac ctgaggcaag gagtttgaga ccagcttagc caacatagta 5040

agacccccat ctctttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaactttag aactgggtgc 5100

agtggctcat gcctgtaatc ccagccagca ctttgggagg ctgagatggg aagatcactt 5160

gagcccagaa ttagagataa gcctatggaa acatagcaag acactgtctc tacaggggaa 5220

aaaaaaaaaa gaaactgagc cttaaagaga tgaaataaat taagcagtag atccaggatg 5280

caaaatcctc ccaattcctg tgcatgtgct cttattgtaa ggtgccaaga aaaactgatt 5340

taagttacag cccttgttta aggggcactg tttcttgttt ttgcactgaa tcaagtctaa 5400

ccccaacagc cacatcctcc tatacctaga catctcatct caggaagtgg tggtgggggt 5460

agtcagaagg aaaaataact ggacatcttt gtgtaaacca taatccacat gtgccgtaaa 5520

tgatcttcac tccttatccg agggcaaatt cacaaggatc cccaagatcc acttttagaa 5580

gccattctca tccagcagtg agaagcttcc aggtaggaca gaaaaaagat ccagcttcag 5640

ctgcacacct ctgtcccctt ggatggggaa ctaagggaaa acgtctgttg tatcactgaa 5700

gtttttttgtt ttgtttttat acgtgtctga ataaaaatgc caaagttttt tttcagcaaa 5760

aaaaa 5765

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for OCT4

<400> 4

gcagcgacta tgcacaacga 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for OCT4

<400> 5

ccagagtggt gacggagaca 20

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for SOX2

<400> 6

catcacccac agcaaatgac a 21

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for SOX2

<400> 7

gctcctaccg taccactaga actt 24

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for NANOG

<400> 8

aatacctcag cctccagcag atg 23

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for NANOG

<400> 9

tgcgtcacac cattgctatt cttc 24

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for GAPDH

<400> 10

cagcctcaag atcatcagca atg 23

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for GAPDH

<400> 11

tcatgagtcc ttccacgata cca 23

<210> 12

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ERBB3 shRNA oligomer (top)

<400> 12

ccggccagag cttcaagact gtttactcga gtaaacagtc ttgaagctct ggttttt 57

<210> 13

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ERBB3 shRNA oligomer (bottom)

<400> 13

aattaaaaac cagagcttca agactgttta ctcgagtaaa cagtcttgaa gctctgg 57

<210> 14

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> E-cadherin shRNA oligomer (top)

<400> 14

ccgggcagaa attattgggc tctttctcga gaaagagccc aataatttct gcttttt 57

<210> 15

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> E-cadherin shRNA oligomer (bottom)

<400> 15

aattaaaaag cagaaattat tgggctcttt ctcgagaaag agcccaataa tttctgc 57