(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0099721
(43) 공개일자 2020년08월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) *C12Q 1/6804* (2018.01)
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2018.05)
C12Q 1/6804 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2019-0017651
(22) 출원일자 2019년02월15일
심사청구일자 2019년02월15일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
구본석
대전광역시 서구 둔산북로 215, 12동 901호(둔산동, 가람아파트)
정승남
대전광역시 서구 계백로 1426, 904호(도마동, 도마동써머스빌주상복합)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

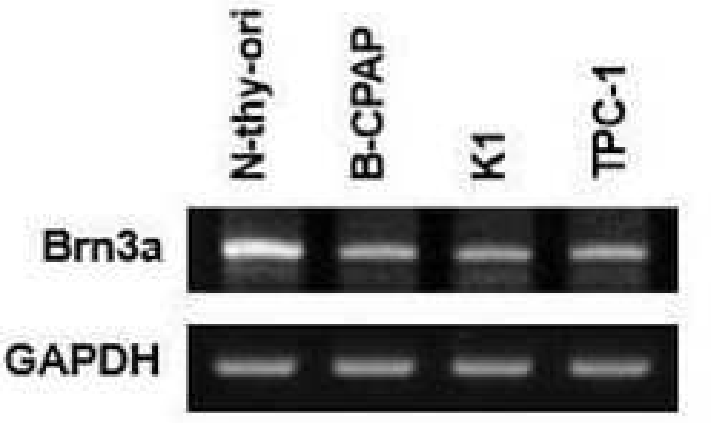
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **Brn3a를 포함하는 갑상선 암 진단 및 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 Brn3a를 포함하는 갑상선 암 진단용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 갑상선 암 진단용 조성물, 키트, 갑상선 암 진단을 위한 정보 제공 방법 및 Brn3a를 포함하는 갑상선 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 Brn3a는 갑상선 환자에서 발현이 감소되며, Brn3a는 갑상선암 세포의 세포 이동 및 세포 침습과 관련이 깊은 인자이므로, Brn3a를 바이오마커로 이용하면 갑상선 암의 갑상선 외 확장 또는 갑상선 암의 병기와 같은 정보를 제공하여 갑상선 암을 진단할 수 있을 뿐만 아니라, Brn3a는 갑상선 암세포의 이동 또는 침습을 억제하여 갑상선암이 전이되는 것을 억제하는 바, 갑상선 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로도 사용이 가능하여, 관련된 제약 및 의료 사업에 유용하게 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
G01N 33/5308 (2013.01)
G01N 33/57407 (2013.01)
C12Q 2600/154 (2013.01)
G01N 2333/4703 (2013.01)
G01N 2440/12 (2013.01)
(72) 발명자
장재원
대전광역시 유성구 엑스포로123번길 46-15, 503동 3002호(도룡동, 스마트시티)
류려화
대전광역시 중구 과례로 80, 203호(문화동)
오찬
전라북도 익산시 동서로61길 41, 102동 504호(어양동, 현대아파트)
원호륜
서울특별시 서초구 나루터로15길 37-6(잠원동)
강예은
대전광역시 중구 서문로 96, 212동 203호(문화동, 센트럴파크2단지아파트)

명 세 서

청구범위

청구항 1

Brn3a (brain-specific homeobox/POU domain protein 3A)를 포함하는 갑상선 암 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 갑상선 암은 갑상선 유두암, 갑상선 여포암, 갑상선 수질암 및 갑상선 역형성암으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 갑상선 암 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 3

Brn3a 검출용 제제 또는 Brn3a 프로모터의 과메틸화를 측정하는 제제를 포함하는 것을 특징으로 하는 갑상선 암 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 Brn3a 검출용 제제 또는 Brn3a 프로모터의 과메틸화를 측정하는 제제는 상기 Brn3a 또는 Brn3a의 mRNA에 특이적으로 결합하는 올리고펩타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메릭(chimeric) 항체, 리간드, PNA(peptide nucleic acid), 앱타머(aptamer), 프라이머, 프로브 또는 화합물; 또는 과메틸화된 Brn3a 프로모터에 특이적으로 결합하는 단백질, 프라이머, 프로브, 리포터, 펩타이드, PNA 또는 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 갑상선 암 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 갑상선 암 진단용 키트.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR키트, 마이크로어레이 칩 키트, DNA키트 및 단백질 칩 키트로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 갑상선 암 진단용 키트.

청구항 7

시료로부터 Brn3a의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 갑상선 암 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 시료는 혈액, 혈청, 혈장, 림프액, 뇌척수액, 복수, 요 및 조직 생검으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 갑상선암 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 정보는 갑상선 외 확장 및 갑상선 암의 병기로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 정보인 것을 특징으로 하는 갑상선암 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 10

Brn3a를 포함하는 갑상선 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 Brn3a는 갑상선 암 전이 억제용인 것을 특징으로 하는, 갑상선 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 Brn3a를 포함하는 갑상선 암 진단용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 갑상선 암 진단용 조성물, 키트, 갑상선 암 진단을 위한 정보 제공 방법 및 Brn3a를 포함하는 갑상선 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 암(癌, cancer)은 신체의 어느 조직에서나 발생할 수 있으며, 암세포는 일반적으로 인접한 조직에 침투하여 파괴하고, 점점 순환계를 침범하여 암 발생부위로부터 멀리 떨어진 신체의 다른 부위로 전이되어 결국 숙주를 죽게 한다. 암세포는 비정상적으로 분열하며, 현미경하에서 관찰해보면 정상적인 조직이나, 세포의 형태를 잃고 비정상적인 기능을 나타낸다. 비정상적인 성장을 하는 세포가 모두 악성 종양이 되지는 않으며, 양성 종양이 아닌 것만이 악성 종양인 암이 된다.

[0004] 갑상선암(甲狀腺癌, thyroid neoplasm, thyroid cancer)은 갑상선호르몬을 생산하고, 칼슘 농도를 조절하는 기능이 있는 갑상선에서 생기는 악성종양이다. 갑상선 암은 특히 대한갑상선 질병학회에 보고된 자료에 의하면 2006년 기준 국내 암 발병률의 4위를 차지하고 있으며 여성의 경우는 1위를 차지하고 있고, 이러한 증가는 갑상선유두암종(papillary thyroid carcinoma, PTC)의 증가로 인한 것으로 알려져 있으며, 현재 한국에서 갑상선 암의 약 97%가 유두암종이다.

[0005] 갑상선 암의 원인은 방사선 노출, 성호르몬 등으로 알려졌으나 아직 정확한 원인에 대한 규명은 이루어지지 않고 있다. 따라서, 상기 갑상선 암에 대한 암 발생 기전(tumorigenesis), 진단(Diagnosis), 암 진행(Cancer progression) 및 예후(Prognosis)에 대한 관심이 높아져왔다.

[0006] 갑상선 암은 조기에 발견하여 수술하면 생존율이 매우 높으므로 조기에 정확하게 진단하는 방법을 구축하는 것이 매우 중요한바, 갑상선 암에 대한 위험인자를 찾아내고 이를 활용하여 갑상선 암에 대한 예방 시스템을 구축하는 것이 필요하다.

[0007] 인체의 암은 일종의 암표지 항원이라 일컬어지는 다양한 분자들을 발현시켜 분비한다. 현재 다양한 종류의 암환자들의 혈청을 분석하여 암의 발병과 전이의 진단 및 치료에 사용될 수 있는 항원들이 제시되고 있다. 지금까지 발견된 암 마커는 약 60여종에 이르는데, 현재 상용화되고 있는 암 마커로는 AFP(간암), CEA(대장암, 위암, 췌장암, 유방암), HCG(융모상피암), PAP(전립선암), NSE(폐암), C15-3(유방암), CA19-9(대장암, 췌장암)등을 들 수 있다. 그러나 갑상선 암의 진단 및 치료에 탁월한 효과가 있는 진단 마커나 항암제는 개발되어 있지 않은 실정이다.

[0008] 또한 암의 검사수단은 물리적인 것이 대부분이다. 그 예로 위장 X선 촬영으로 이중조영법, 압박촬영법 또는 점막촬영법 등이 있다. 또한 내시경을 사용하여 내부 장기를 직접 육안으로 확인함으로써 X선 검사에서 나타나지

않는 아주 작은 병변까지 발견할 수 있을 뿐 아니라 암이 의심스러운 장소에서 직접 조직검사(생검)를 시행하여 그 진단율을 높이고 있다. 하지만 이 방법은 검사과정이 비교적 간단하다는 장점에도 불구하고 진단 성공률이 높지 않은 문제, 위생상의 문제 및 검사가 진행되는 동안 환자로 하여금 고통을 감수해야 하는 문제가 있어, 이를 대체할 만한 암의 진단 방법이 필요하다.

[0009] 암을 치료하기 위해서는 치료 이전의 단계에서 높은 민감도와 특이도를 가진 암의 진단이 무엇보다 중요하며, 이러한 진단은 암의 초기에 발견될 수 있는 것이어야 한다. 조기 진단된 암의 경우 매우 높은 완치율을 나타내기 때문이다. 따라서 비침습성이며, 고감도 및 고특이성으로 암을 조기에 진단할 수 있는 방법의 개발이 요구되고 있는 실정이다. 나아가 구체적 암에 대한 예후를 예측한 맞춤형 진단 및 치료가 필요하다. 하지만 현재까지 암 진단에 있어서 초기에 특이적으로 병소를 감지하여 발병 여부를 판단하는 분자적 진단 기술은 미미한 실정이고 특정 암에 대해서는 아직까지 그 방법이 전무한 상태라고 해도 과언이 아니다.

[0010] 이에 효과적인 갑상선 암 진단을 위한 진단 방법 또는 이를 진단할 수 있는 마커의 발견에 대한 필요성이 절실하다.

[0011] 갑상선 암은 갑상선 유두암, 갑상선 여포암, 갑상선 수질암, 갑상선 역형성 암으로 크게 분류되며, 갑상선 유두암, 갑상선 여포암, 갑상선 수질암이 전체 갑상선 암의 95%이상을 차지하며 치료 반응도 좋고, 예후가 불량하지 않지만, 갑상선 역형성 암은 전체 갑상선 암의 5% 미만을 차지하나 치료 반응도 나쁘고 예후가 불량한 것으로 알려져 있다. 또한 갑상선 암은 재발률이 27%에 이르고, 폐, 뼈, 림프절 전이가 많이 발생한다. 특히 갑상선 암이 폐에 전이되는 경우, 기존의 항암 치료 효과가 높지 않아 갑상선 암의 전이를 억제할 새로운 치료방법이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명자들은 갑상선의 진단 또는 치료를 위한 조성물을 연구하던 중, 갑상선 암 세포에서 Brn3a의 발현이 적은 것을 관찰하였고, Brn3a의 발현과 공격적 갑상선 암 표현형 간의 상관관계를 확인하여 Brn3a의 갑상선 암 진단용 바이오마커로써의 가능성을 확인하였다. 또한, Brn3a의 발현을 넉다운한 경우, 갑상선 암 세포의 이동과 침습이 증가함을 관찰하였고, 이와 관련된 기전을 확인하여 Brn3a의 갑상선 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물로써의 가능성을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0015] 따라서 본 발명의 목적은 Brn3a를 포함하는 갑상선 암 진단용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 갑상선 암 진단용 조성물, 키트, 갑상선 암 진단을 위한 정보 제공 방법 및 Brn3a를 포함하는 갑상선 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Brn3a를 포함하는 갑상선 암 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 Brn3a를 포함하는 갑상선 암 진단용 키트를 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 시료로부터 Brn3a 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 갑상선 암 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 Brn3a를 포함하는 갑상선 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명의 Brn3a는 갑상선 암 환자에서 적게 발현되며, 갑상선 암 세포의 세포 이동 및 세포 침습과 관련이 깊은 인자이므로, Brn3a를 바이오마커로 이용하면 갑상선 암을 진단할 수 있고, 갑상선 암의 표현형에 대한 정보를 얻을 수 있다. 또한, Brn3a는 갑상선 암세포의 전이를 억제하는 바 갑상선 암 치료에 활용될 수도 있어, 관

련된 제약 및 의료 사업에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 정상 대조군, 비-공격적 갑상선 암 군, 공격적 갑상선 암 군으로 나누어 Brn3a 유전자 프로모터의 과메틸화 수준을 비교한 도이다.

도 2는 정상 세포주(N-thy-ori)와 갑상선 암 세포주(B-CPAP, K1, TPC-1)의 Brn3a의 mRNA 발현을 RT-PCR을 통해 mRNA를 증폭한 뒤 전기영동을 통해 비교한 도이다.

도 3은 갑상선 암 세포주(B-CPAP)의 Brn3a 유전자 프로모터를 탈메틸화 하였을 때, Brn3a mRNA 발현량을 RT-PCR을 통해 mRNA를 증폭한 뒤 전기영동을 통해 확인한 도이다.

도 4는 갑상선 암 세포주(B-CPAP, K1, TPC-1)에서의 Brn3a 단백질 발현 수준을 웨스턴 블롯을 통해 확인한 도 4 (A) 및 3개의 갑상선 암 환자 조직에서 Brn3a 단백질 발현 수준을 웨스턴 블롯을 통해 확인한 도 4 (B)이다.

도 5는 Brn3a 과발현 벡터를 주입한 갑상선 암 세포주(B-CPAP, TPC-1)에서 Brn3a의 발현 수준을 웨스턴 블롯을 통해 확인한 도이다.

도 6는 Brn3a 과발현 벡터를 주입한 갑상선 암 세포주(B-CPAP, TPC-1)의 세포 증식 수준을 WST-1 어세이를 통해 확인한 도이다.

도 7은 Brn3a 과발현 벡터를 주입한 갑상선 암 세포주(B-CPAP, TPC-1)의 세포 이동 및 세포 침습 수준을 트랜스웰 어세이를 통해 확인한 도이다.

도 8은 Brn3a 과발현 벡터를 주입한 갑상선 암 세포주(B-CPAP, TPC-1)에서 상피-간엽 전이와 관련된 단백질(E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, snail, twist)의 발현 수준을 웨스턴 블롯을 통해 확인한 도이다.

도 9은 Brn3a siRNA를 형질주입하여 Brn3a 유전자를 넉다운한 갑상선 암 세포주(B-CPAP, TPC-1)의 세포 증식 수준을 WST-1 어세이를 통해 확인한 도이다.

도 10는 Brn3a siRNA를 형질주입하여 Brn3a 유전자를 넉다운 한 갑상선 암 세포주(B-CPAP, TPC-1)의 세포 이동 및 세포 침습 수준을 트랜스웰 어세이를 통해 확인한 도이다.

도 11은 Brn3a siRNA를 형질주입하여 Brn3a 유전자를 넉다운한 갑상선 암 세포주(B-CPAP, TPC-1)의 상피-간엽 전이 관련 단백질의 발현수준을 웨스턴 블롯을 통해 확인한 도이다.

도 12는 Brn3a 발현 여부에 따른, 다양한 신호 전달 경로와 관련된 단백질 발현의 변화를 확인한 도이다.

도 13은 갑상선 암 세포주(B-CPAP, TPC-1)에 Brn3a 과발현 벡터, 대조군 벡터, Brn3a 특이적 siRNA, 음성 대조군 siRNA를 각각 형질주입하여, STAT3와 인산화된 STAT3의 발현량을 웨스턴 블롯을 통해 확인한 도이다.

도 14는 STAT3 siRNA를 형질주입하여 STAT3 유전자를 넉다운 한 갑상선 암 세포주(B-CPAP, TPC-1)의 세포 이동 및 세포 침습 수준을 트랜스웰 어세이를 통해 확인한 도이다.

도 15는 STAT3 siRNA를 형질주입하여 STAT3 유전자를 넉다운 한 갑상선 암 세포주(B-CPAP, TPC-1)의 상피-간엽 전이 관련 단백질의 발현수준을 웨스턴 블롯을 통해 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명은 본 발명은 Brn3a(brain-specific homeobox/POU domain protein 3A)를 포함하는 갑상선 암 진단용 바이오마커 조성물 또는 Brn3a를 포함하는 갑상선 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0026] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0027] 본 발명의 Brn3a는 POU4F1 유전자에 의해 코딩되는 단백질로, 발달 중인 말초 감각 신경계, 중추 신경계의 특정 부위, 망막뉴런에서 과발현되는 class 4 POU 도메인을 포함하는 전사인자이다. 본 발명에서는 Brn3a는 갑상선 암 환자의 세포에서 발현량이 줄어드는 단백질로써, 갑상선 암 세포의 이동(migration) 및 침습(invasion)과 연관이 깊고, STAT3의 인산화를 감소시키는 단백질로써 갑상선 암 세포의 전이에서 중요한 역할을 수행하는 물질임을 확인하였으며, 상기 Brn3a를 포함하는 갑상선 암의 진단용 바이오마커 또는 갑상선 암 예방 또는 치료용

약학적 조성물을 제공한다.

[0028] 본 발명에서의 '갑상선 암'은 갑상선에 발생하는 종양을 모두 포함할 수 있고, 바람직하게는 주위 조직에 침윤하면서 빠르게 성장하고 신체 각 부위에 확산되거나 전이되어 생명을 위협하는 갑상선 유두암, 갑상선 여포암, 갑상선 수질암 및 갑상선 역형성암을 포함한다. 따라서 본 발명은 Brn3a를 포함하는 갑상선 유두암, 갑상선 여포암, 갑상선 수질암, 갑상선 역형성암을 진단하는 조성물을 제공하며, 본 발명에서 진단이 가능한 갑상선 암은 가장 바람직하게는 갑상선 유두암일 수 있다.

[0029] 본 발명에서의 용어 '진단'은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 상기 진단은 발병 여부뿐만 아니라 암의 경과, 병기, 전이 여부 등을 확인하는 것을 모두 포함하는 의미이다. 본 발명의 목적상, 진단은 갑상선 암의 발병, 경과, 병기 상태, 전이 여부 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다.

[0030] 특히, 본 발명의 갑상선 암의 진단용 바이오마커 조성물을 이용하면 갑상선 암 환자가 어떤 병기에 속하는지 또는 암 진행 단계에 대하여 진단할 수 있다. 구체적으로 갑상선암 환자가 T1, T2, T3, T4 로 이루어진 군에서 선택된 1종의 병기에 속하는지 진단이 가능하며, 갑상선 암 진행 단계가 1 내지 4의 스테이지 중 어느 스테이지에 속하는지 진단할 수 있다. 또한, 갑상선 암의 병기, 갑상선의 확장 등을 통해 공격적 갑상선 암인지 진단할 수 있다.

[0031] 본 발명에서의 용어 '바이오마커'는 진단용 마커 또는 진단 마커로도 쓰일 수 있으며, 생물학적 시료에서 갑상선암 발생 여부를 구분하여 진단할 수 있는 물질을 말한다. 본 발명은 구체적인 일실시예로, 갑상선암 세포에서 Brn3a의 발현이 감소하는 것을 확인하였는 바, Brn3a를 갑상선암 진단용 바이오마커로 활용할 수 있다.

[0032] 또한 본 발명은 Brn3a 검출용 제제 또는 Brn3a 프로모터의 과메틸화를 측정하는 제제를 포함하는 갑상선 암 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0033] 'Brn3a 검출용 제제'란 상기와 같이 갑상선 암 환자의 생물학적 시료에서 발현이 감소하는 마커인 Brn3a 단백질 또는 이를 코딩하는 mRNA에 특이적으로 결합하여, 이의 발현 수준을 확인함으로써 Brn3a의 검출에 사용될 수 있는 제제를 의미한다.

[0034] 또한 상기 Brn3a 검출용 제제는 상기 Brn3a에 특이적으로 결합하는 올리고 펩타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메릭(chimeric) 항체, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid) 또는 앱타머(aptamer) 일 수 있으며 또한, Brn3a의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 또는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 본 발명에 있어서, 'Brn3a 프로모터의 과메틸화를 측정'하는 방법으로는 Brn3a 프로모터의 메틸화 특이 PCR, Brn3a 프로모터의 실시간 메틸화 특이 PCR, Brn3a 프로모터 파이로시퀀싱, 메틸화된 Brn3a 프로모터 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR 또는 정량 PCR 또는 DNA 칩, 및 Brn3a 프로모터 바이설파이트 시퀀싱으로 구성된 군에서 선택되는 방법에 의해 수행될 수 있으며, 염기서열의 메틸화를 검출할 수 있는 방법이라면, 상기 방법에 한정되지 않고, 제한없이 사용할 수 있다.

[0036] 본 발명에 있어서, 'Brn3a 프로모터의 과메틸화를 측정하는 제제'란 Brn3a 유전자의 발현을 조절하는 프로모터 부위의 메틸화된 DNA와 특이적으로 결합하여, Brn3a 프로모터의 메틸화 수준을 확인하는 것에 사용될 수 있는 분자를 의미하며, 과메틸화된 Brn3a 프로모터에 특이적으로 결합하는, 단백질, 프라이머, 프로브, 리포터, 펩타이드, PNA, 올리고뉴클레오타이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0037] 또한 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 갑상선 암 진단용 키트를 제공한다.

[0038] 상기 키트는 RT PCR 키트, 마이크로어레이 칩(micro array chip) 키트, DNA 키트, 또는 단백질 칩 키트를 포함하며, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 키트는 마커 단백질에 해당하는 Brn3a의 발현 수준을 측정하여 이를 검출함으로써 갑상선 암의 진단을 할 수 있다. 본 발명의 키트에는 갑상선 암의 진단을 위하여 선택적으로 마커를 인지하는 항체뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액, 또는 장치가 포함될 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명의 Brn3a 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 및 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기에서 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스티렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드 글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(peroxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase) 등이 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있고, 발색기질액은

ABTS(2,2'-아지노-비스-(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(O-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘)가 사용될 수 있다.

[0040] 또한 본 발명은 시료로부터 Brn3a의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 갑상선 암 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0041] 상기 갑상선 암 진단을 위한 정보는 진단 대상 개체의 Brn3a 발현에 대한 측정 정보이고, 본 발명의 목적상, Brn3a의 발현이 감소된 것으로 측정되는 경우, 갑상선 암 세포의 이동 및 침습이 증가되며, 갑상선암이 발생했다는 사실을 제시하는 것으로, 상기와 같은 정보를 기반으로 본 발명은 개체의 갑상선 암의 발생 여부, 갑상선 암의 T 병기 및 진행단계, 다른 조직으로의 전이 여부를 포함한 구체적인 정보를 제공한다. 특히, 본 발명은 Brn3a의 발현 수준을 측정함으로써 갑상선 외 확장, 갑상선 암의 병기와 같은 사항을 진단할 수 있다.

[0042] 본 발명에 있어서, 'Brn3a의 발현 수준을 측정'이란 암의 진단을 위하여 생물학적 시료에서 마커 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 Brn3a 또는 Brn3a의 mRNA에 특이적으로 결합하는 물질을 이용해 Brn3a의 발현수준을 확인할 수 있다.

[0043] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 혈액, 혈청, 혈장, 림프액, 뇌척수액, 복수, 요 및 조직생검으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0044] 상기 Brn3a의 발현 수준을 측정하는 방법은 웨스턴 블랏(Western blot), 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선면역분석법(radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케트(Ouchterlony) 면역 전기 영동, 조직 면역 염색, 면역 침전 분석(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complete fixation assay), FACS(Flow Cytometry) 및 단백질 칩(protein chip)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0045] 또한 본 발명은 Brn3a를 포함하는 갑상선 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0046] 특히, 본 발명의 Brn3a는 STAT3의 인산화를 감소시키며, 상피-간엽 전이 관련 단백질의 발현을 감소시키는 것을 통해 갑상선 암세포의 이동과 침습을 억제할 수 있어, 갑상선 암세포의 전이 억제 효과가 뛰어나므로 갑상선 암 전이 억제용도로 사용될 수 있다.

[0047] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.

[0048] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0049] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로 제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0050] 상기 약학적 조성물은 목적 또는 필요에 따라 당업계에서 사용되는 통상적인 방법, 투여 경로, 투여량에 따라 적절하게 개체에 투여될 수 있다. 투여 경로의 예로는 경구, 비경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 및 비강 내로 투여될 수 있으며, 비경구 주입에는 피내, 근육 내, 정맥 내, 동맥 내, 복강 내 또는 피하투여가 포함된다. 또한 당업계에 공지된 방법에 따라 적절한 투여량 및 투여 횟수가 선택될 수 있으며, 실제로 투여되는 본 발명의 약학적 조성물의 양 및 투여 횟수는 치료하고자 하는 증상의 종류, 투여 경로, 성별, 건강 상태, 식이, 개체의 연령

및 체중, 및 질환의 중증도와 같은 다양한 인자에 의해 적절하게 결정될 수 있다.

[0051] 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

[0052] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0054] **실시예 1. Brn3a 발현확인을 위한 갑상선암 세포주 및 조직의 수득 및 보관**

[0055] 인간 정상 갑상선 세포 인 N-thy-ori, 인간 갑상선암 세포주 인 B-CPAP, K1, TPC-1은 한국 세포주 은행(Korean cell line bank) (서울, 한국)에서 분양받았다. B-CPAP, K1 및 TPC-1 세포는 high glucose DMEM (Gibco)에서 배양하였다. N-thy-ori는 RPMI 1640 배지 (Gibco)에서 배양하였다. 모든 세포에 10 % 태아 소 혈청 (FBS)과 100 u/mL 페니실린/스트렙토마이신 (Gibco)을 보충하고 가습 조건 하에서 5 % CO_2로 37℃에서 배양하였다.

[0057] **실시예 2. 갑상선 암 조직에서 과메틸화 유전자의 탐색 및 갑상선 암 조직내에서 Brn3a의 과메틸화 수준의 확인**

[0058] 공격성 갑상선 암 조직에서 과메틸화된 유전자의 탐색을 위해, MeDIA CpG microarray를 수행하였다. 구체적으로, DNeasy purification kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 시험군 및 대조군 조직으로부터 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 초음파로 단편화하고, 단편화된 DNA 0.5㎍을 2㎍의 재조합 MBD2bt 단백질과 함께 4℃에서 4 시간 동안 항온 배양하였다. 과메틸화된 DNA는 전체 게놈 증폭 키트 (GenomePlex®, Sigma, USA)를 사용하여 제조업체의 권장대로 증폭하였다. 대조군과 시험군의 증폭된 DNA를 Cy5와 Cy3으로 각각 표지하였다. 표지된 각각의 DNA 샘플을 PCR 정제 키트 (Qiagen, USA)로 정제한 후, 업체 프로토콜에 따라 human CpG island Microarray(Agilent, Santa Clara, CA, USA)에 공동 혼성화하였다.

[0059] 과메틸화 유전자 중 하나로 Brn3a를 확인하였으며, Brn3a 프로모터의 과메틸화 수준을 정상조직, 비-공격적 갑상선 암 조직, 공격적 갑상선 암 조직에서 비교한 결과를 도 1에 나타내었다.

[0060] 도 1에 나타낸 바와 같이, 공격적 갑상선 암 조직에서 정상조직 및 비-공격적 갑상선 암 조직에 비해 Brn3a 프로모터의 과메틸화가 많이 나타남을 확인하였다.

[0062] **실시예 3. 갑상선 암 세포에서 Brn3a mRNA의 발현량의 확인**

[0063] 갑상선 암세포에서 Brn3a의 mRNA 발현량을 측정하기 위해 RT-PCR을 실시하였다. 구체적으로, N-thy-ori, B-CPAP, K1, TPC-1세포를 Trizol 시약 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 total cellular RNA를 추출하고 역전사시킨 후 Brn3a와 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (이하, GAPDH)에 대한 특이한 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다: Brn3a-F: 5'-CGT ACC ACA CGA TGA ACA GC-3'/ Brn3a-R : 5'-AGG AGA TGTGGTCCA GCA GA-3' 및 GAPDH-F : 5'-ACC CAG AAG ACT GTG GAT-3 '/ GAPDH-R : F : 5'-TTC TAG ACG GCA GGT CAG GT-3'. PCR 생성물을 에티디움 브로마이드를 함유하는 2 % 아가로스 겔상에서 전기 영동에 의해 분리하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0064] 도 2에 나타낸 바와 같이, 정상 세포주인 N-thy-ori와 비교하여 갑상선암 세포주인 B-CPAP, K1, TPC-1에서 Brn3a의 mRNA발현이 감소한 것을 확인하였다.

[0066] **실시예 4. Brn3a 유전자 프로모터의 과메틸화와 Brn3a의 발현 저하의 관련성 확인**

[0067] 갑상선 암세포에서 Brn3a의 낮은 발현이 Brn3a 유전자 프로모터의 과메틸화에 의해 유도되었는지를 확인하기 위해, B-CPAP 세포를 탈메틸화제인 5-aza-2'-deoxycytidine (AZA) 및 trichostatin A (TSA)로 처리하여 Brn3a 유전자 프로모터를 탈메틸화하였다. 그리고 실시예 3의 방법과 동일한 방법으로 RT-PCR을 실시하여 Brn3a의 mRNA 발현량을 측정한 결과를 도 3에 나타내었다.

[0068] 도 3에 나타난 바와 같이 갑상선암 세포주인 B-CAP에서 낮게 발현된 Brn3a의 mRNA의 수준이 탈메틸화제인 5-aza-2'-deoxycytidine (AZA) 및 trichostatin A (TSA)의 처리에 의해 높게 회복된 것을 확인하였다. 이와 같은

결과를 통해 갑상선 암 세포에서 Brn3a 유전자 프로모터에 대한 메틸화가 Brn3a의 발현을 억제하는 것을 확인하였다.

[0070] **실시예 5. 갑상선 암조직 및 암세포에서 Brn3a 단백질 발현량 확인**

[0071] 갑상선 암 환자 조직 및 세포주에서 Brn3a 단백질의 발현 수준을 조사하기 위해 웨스턴블롯을 실시하였다. 구체적으로, 갑상선 암 세포주(B-CPAP, K1, TPC-1), 정상 세포주(N-thy-ori), 갑상선 암 환자의 암조직 세포, 정상 조직 세포를 150mM NaCl, 1.0 % nonidet-P 40 (NP40), 0.5 % sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 50 mM Tris, pH 8.0, protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science, Vienna, Austria, pH 7.4)을 함유하는 용해 완충액에서 용해하였다. 용해한 시료에서 단백질을 추출하기 위해 전기 영동을 실시예 3에 기술한대로 수행하였다. 추출한 단백질을 웨스턴 블롯(1차 항체로 anti-Brn3a 항체와 anti-β-actin항체를 사용하고, 2차 항체로 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:1,0000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)을 사용)으로 Brn3a 단백질을 검출하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0072] 도 4에 나타난 바와 같이, 갑상선암 세포주에서의 Brn3a 단백질 발현은 정상 대조군 (N-thy-ori)세포주와 비교하여 가변적임을 확인하였으며, 3개의 암 환자 조직 샘플 중 3 개 모두가 정상 조직에 비해 Brn3a 단백질의 발현이 낮은 것을 확인하였다.

[0074] **실시예 6. Brn3a의 발현과 다른 변수와의 상관관계 확인**

[0075] Bra3a의 유전자 발현이 갑상선암에서 하는 역할을 확인하고, Brn3a의 낮은 발현과 다른 변수와의 상관관계를 규명하기 위해 website (https://xena.ucsc.edu)에서 갑상선암 코호트에 해당하는 TCGA(The cancer genome atlas)-TCHA데이터를 다운로드하여, 데이터를 분석하였다. 구체적으로 RNA 시퀀스 데이터인 Hi-seq 데이터 베이스를 이용하여, Bran3a가 아예 발현되지 않는 그룹과 발현하는 그룹으로 2그룹을 나누었다. 총 505명의 갑상선암 환자들중 Brn3a가 발현하지 않는 group은 276명이었으며, Brn3a를 발현하는 group은 229명이었다. 변수 중 T stage, M stage의 정의와 관련된 내용을 표 1에, Stage 정의와 관련된 내용을 표 2에 나타내었고, 데이터 분석한 결과를 표 3에 나타내었다. P-value가 0.05 이하인 경우, 통계적인 유의성이 있는 것을 의미한다.

표 1

TNM 스테이지 분류		
	분류	정의
T stage	T1	종양의 지름이 2cm 이하인 경우
	T2	원발성 종양의 지름이 2cm 내지 4cm인 경우
	T3	원발성 종양의 지름이 4cm 이상인 경우
	T4a	크기와 무관하게 종양이 갑상선 캡슐 밖으로 확장되어 피하 연부조직, 후두, 기관, 식도, 또는 반회신경을 침습하는 경우
	T4b	종양이 척추 앞 근막(prevertebral fascia)까지 침습 또는 경동맥 또는 종격동 혈관(mediastinal vessles)을 감싸는 경우.
	TX	원발성 종양의 크기는 알 수 없으나, 종양의 갑상선 외 확장이 없는 경우.
N stage	N0	림프절 전이 없음
	N1a	Level VI (기도 전방 림프절, 기도 주변 림프절, 델피안 림프절)까지 전이
	N1b	일측성, 양측성, 반대측성(contralateral) 경부 또는 상종격동 림프절 전이
	NX	수술 시 림프절 절제 안 한 경우,
M stage	M0	원격 전이가 없는 경우
	M1	원격 전이가 있는 경우
	MX	원격 전이가 평가되지 않은 경우

[0076]

표 2

Stage	환자 연령 45세 미만	환자 연령 45세 이상
Stage I	모든 T stage, 모든 N stage, M0 stage	T1, N0, M0
Stage II	모든 T stage, 모든 N stage, M1 stage	T2, N0, M0
Stage III		T3, N0, M0
		T1, N1a, M0
		T2, N1a, M0
		T3, N1a, M0
Stage IVA		T4a, N0, M0
		T4a, N1a, M0
		T1, N1b, M0
		T2, N1b, M0
		T3, N1b, M0
		T4a, N1b, M0
Stage IVB		T4b, 모든 N stage, M0
Stage IVC		모든 T stage, 모든 N stage, M1

[0077]

[0078] 상기 표 1 및 표 2와 같이, T stage 는 갑상선 암 TNM stage 중 특히 종양 크기 및 갑상선외 확장과 관련된 stage 를 의미하며, Stage 는 총 stage 로 TNM stage 의 전체 단계를 의미한다.

표 3

[0079]

변수		환자 수	*Brn3a*		
			Negative (n=276)	Positive (n=229)	*P* value
연령			47.6±16.5	46.9±15.1	0.646
성별	남성	136	76	60	0.736
	여성	369	200	169	
종양의 크기, mm			14.7±10.9	13.1±10.4	0.108
T stage	T1	143	66	77	0.035*
	T2	166	94	72	
	T3	171	99	72	
	T4	23	17	6	
다발성 (Multifocality)	No	268	156	112	0.184
	Yes	227	116	111	
	Unknown	10	4	6	
갑상선 외 확장 (Extrathyroid extension)	No	335	176	159	0.030*
	Minimal	134	77	57	
	Moderate/Advanced	18	15	3	
림프절 전이 (lymph node metastasis)	No	230	121	109	0.540
	Yes	225	130	95	
M stage	M0	282	148	134	0.463
	M1	9	4	5	
	MX	214	123	91	
Stage	I	286	141	145	0.026*
	II	52	31	21	
	III	112	66	46	
	IV	55	38	17	
재발률	No	470	256	214	0.759
	Yes	35	20	15	

$BRAF^{V600E}$ mutation	No	256	137	119	0.584
	Yes	235	132	103	
	Fusion	9	5	4	
	Other mutation	5	3	2	

[0080] Brn3a 와 갑상선 암 변수와의 관련성을 확인한 결과, 표 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, Brn3a이 발현되지 않는 그룹(negative)은 발현되는 그룹(positive)에 비해 갑상선 외 확장과 같은 공격적인 암 표현형을 나타내는 것을 TCGA data를 통해 확인하였다. 그러나, Brn3a의 발현은 성별, 연령, 암 위치 및 조직학적 분류와 상관 관계가 없었다.

[0081] 이러한 데이터를 통해, Brn3a가 갑상선암 환자에서 특이적으로 발현이 감소하는 바이오 마커로서 활용될 수 있으며, 예컨대 T stage가 높은 환자에서 Brn3a가 발현되는 경우가 적은 것을 통해 Brn3a의 발현이 낮은 경우 T stage 가 높은 환자임을 예측, 진단할 수 있으므로, 갑상선암 환자의 병기 예측 바이오마커로써 활용 가능성을 확인하였다. 종합적으로 Brna3a의 발현 또는 이의 발현을 억제하는 과메틸화 측정을 통해, 갑상선 암을 진단할 수 있으며, 특히 갑상선 암의 병기, 갑상선 외 확장과 같은 공격적 갑상선 암을 진단할 수 있음을 확인하였다.

[0083] **실시예 7. 갑상선 암 세포의 세포 증식에 대한 Brn3a의 효과**

[0084] 갑상선 암세포에서 Brn3a의 기능적 중요성과 기전을 연구하기 위해, 먼저 갑상선 암세포에 Brn3a 유전자를 형질주입 시킨 후, 세포 증식에 대한 Brn3a의 효과를 확인하는 시험을 수행하였다. 구체적으로, Brn3a 과발현 벡터(pCMV6-POU4F1 (Myc-DDK-tagged))를 OriGene Technologies (Rockville, MD, USA)로부터 수득하였다. 과발현 벡터 전달용 시약으로 DNA transfection reagent (Polyplus)를 사용하였다. B-CPAP 및 TPC-1 세포가 60 % 컨플루언스에 도달하면 과발현 벡터를 형질주입하고, 형질주입된 세포를 10 % FBS를 함유하는 DMEM 배지의 96- 웰 플레이트에서 5 x 10^3 세포 / 웰의 밀도로 접종 하였다. 세포의 생존력을 Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA)을 사용하여 측정하였다. WST-1 formazan을 효소 결합 면역 흡착 분석 판독기(enzyme-linked immunesorbent assay)를 사용하여 450 nm에서 정량적으로 측정하였다. 상기 형질주입에 따른 Brn3a 발현 수준에 대한 결과 및 Brn3a 과발현에 의한 세포 증식에 대한 효과를 도 5와 도 6에 나타내었다.

[0085] 도 5에 나타난 바와 같이 Brn3a 벡터 형질 주입 시 Brn3a의 발현 수준은 특이적으로 증가하였으나, 도 6에 나타난 바와 같이, Brn3a의 과발현이 갑상선 암세포주(B-CPAP, TPC-1)의 세포 증식에 유의미한 영향을 주지는 않았다.

[0086] 이러한 결과를 통해 Brn3a가 갑상선 암세포에서 세포 증식과는 관련이 없음을 확인하였으며, 그에 따라 Brn3a가 갑상선 암세포의 이동과 침습에 미치는 영향을 검토할 필요성이 대두되었다.

[0088] **실시예 8. Brn3a가 갑상선암 세포의 세포 이동(migration)과 침습(invasion)에 미치는 영향 평가**

[0089] 암세포의 이동과 침습은 암 전이에 있어 중요하므로 Brn3a가 세포 이동과 침습에 미치는 영향을 확인하기 위한 시험을 수행하였다. Brn3a 과발현 벡터 또는 음성 대조군 벡터를 실시예 7과 같은 방법으로 B-CPAP 및 TPC-1 세포에 형질주입 하였다. 그리고 세포 이동 평가를 위해 트랜스웰 챔버에 배양하였으며, 세포 침습 평가를 위해 트랜스웰 막(24-well, Costar, Cambridge, MA, USA)에 매트리겔(Matrigel)을 6시간동안 코팅한 트랜스웰 챔버에 배양하였다.

[0090] 구체적인 배양방법은 하기와 같다.

[0091] 무혈청 배양액에 배양된 1 x 10^5개의 B-CPAP 및 TPC-1 세포를 상층 챔버(upper chamber)에 접종하고, 하부 챔버(lower chamber)에 10% 소 태아 혈청이 첨가된 600㎕ 배양액을 첨가하였다. 접종 24시간 후, 막의 상층 표면에 붙어있던 세포를 면봉으로 제거하였다. 하부 챔버에 부착된 세포는 이동 또는 침습한 세포이며, 이들 세포를 0.1% 크리스탈 바이올렛 염색하여 광학 현미경의 200배 배율로 숫자를 확인한 결과를 도 7에 나타내었다.

[0092] 도 7에 나타난 바와 같이, Brn3이 형질 주입된 갑상선 암세포에서 세포 이동 및 침습이 효과적으로 억제된 것을

확인하였다.

[0093] 상피-간엽 전이(Epithelial-mesenchymal transition)와 세포 침습 사이의 연관성은 이미 입증되어 있는 바, Brn3a가 상피-간엽 전이를 감소시키는지를 조사하였다. 구체적으로, Brn3a 과발현 벡터 또는 음성 대조군 벡터를 실시예 7과 같은 방법으로 B-CPAP 및 TPC-1 세포에 형질주입하고, 상피-간엽 마커인 E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Snail 및 Twist를 검출하기 위한 웨스턴 블롯(1차 항체로 anti-Vimentin 항체, anti-Snail 항체, anti-Twist 항체, anti-β-actin 항체 (1:1,000; Cell Signaling Technology Inc.), anti-Brn3a 항체, anti-E-cadherin 항체, anti-N-cadherin 항체 (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 사용하였고, 2차 항체로 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:1,0000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)을 사용하였다)을 실시예 5와 동일한 방법으로 수행하였으며 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0094] 도 8에 나타난 바와 같이 Brn3a가 형질 주입된 B-CPAP 및 TPC-1에서, Vimentin, Snail 및 Twist의 유의미한 감소를 보였다. 이러한 결과는 Brn3a가 갑상선 암세포에서 상피-간엽 전이를 감소시켜 세포 이동 및 침습을 억제한다는 것을 나타낸다.

[0096] **실시예 9. Brn3a 넉다운을 통한 갑상선 암세포의 증식, 이동, 침습에 대한 Brn3a의 영향 평가**

[0097] Brn3a의 역할을 재확인하기 위해 갑상선 암 세포에서 Brn3a을 넉다운 시켰을 때의 효과를 조사했다. B-CPAP 및 TPC-1 세포에 Brn3a 특이적 siRNA 또는 음성 대조군 siRNA를 형질 주입한 후, 세포 증식과 세포의 이동 및 침습을 측정하였다.

[0098] 구체적으로, Brn3a에 대한 siRNA는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 수득하였고 대조군에 대한 siRNA는 Bioneer (대전, 한국)에서 수득하였다. 사용한 siRNA는 3종류의 siRNA 이중가닥(duplexe) 풀(pool)로 되어있으며, 각각의 염기서열 정보는 다음과 같다. sc-29839A(Sense - CCAAGGAACUAUGUACAAAtt, Antisense: UUUGUACAUAGUUCCUUGGtt), sc-29839B(Sense: GACUCAUCUUGCUCUUCUAtt, Antisense: UAGAAGAGCAAGAUGAGUCtt), sc-29839C(Sense: CUGCUUUGUGUACAAGAUAtt, Antisense: UAUCUUGUACACAAAGCAGtt), siRNA 전달시약으로 Lipofectamine RNAi max 시약 (Invitrogen)을 사용하여 형질주입을 실시하고, 실시예 7과 동일하게 WST-1 분석을 통해 세포 증식을 측정하였으며, 실시예 8과 동일하게 트랜스웰 어세이를 통해 세포의 이동과 침습을 측정하였고, 그 결과를 도 9 및 도 10에 나타내었다.

[0099] 도 9에 나타난 바와 같이, Brn3a가 넉다운된 경우, 세포 증식에는 별다른 영향을 받지 않았으나, 도 10에 나타난 바와 같이 Brn3a가 넉다운된 경우, 세포 이동 및 세포 침습은 현저하게 향상된 것이 확인되었다.

[0100] 상기와 동일한 방법으로 Brn3a를 넉다운시킨 세포를 실시예 5와 동일한 방법으로 웨스턴 블롯을 실시(1차항체로, anti-Vimentin, anti-Snail, anti-Twist, anti-β(1:1,000; Cell Signaling Technology Inc.), anti-Brn3a, anti-E-cadherin, anti-N-cadherin (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 2차항체로 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:1,0000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)을 사용하였다)하여 상피-간엽 전이 관련 단백질의 발현을 조사하여 결과를 도 11에 나타내었다.

[0101] 도 11에 나타난 바와 같이 Brn3a이 넉다운된 경우, B-CPAP 및 TPC-1 세포에서 N-cadherin, vimentin, Snail 및 Twist가 증가함을 확인하였다.

[0102] 종합하면, 이러한 결과는 Brn3a가 넉다운되면, 갑상선 암세포의 증식에는 영향이 없으나, 상피-간엽 전이를 통해 갑상선암 세포의 이동과 침습이 증가한다는 것을 나타낸다.

[0104] **실시예 10. Brn3a의 세포 이동(migration)과 침습(invasion) 억제 기전 확인**

[0105] **10.1. Brn3a에 의한 이동, 침습관련 신호전달 경로 확인**

[0106] 실시예 8 내지 9에서 확인한 세포 이동과 침습을 보다 자세히 이해하기 위하여, Brn3a가 세포 이동과 침습을 억제할 때 어떤 세포 신호 전달 경로가 관련되어 있는지 확인하기 위해 갑상선 암의 형성과 전이와 관련된 다양한 경로를 조사하였다. Brn3a의 과발현 또는 넉다운에 의해 변하는 경로를 IPA(ingenuity pathway analysis)를 통해 분석하였다. 또한 Brn3a 발현 조절에 따른 단백질 발현 수준의 변화를 확인하기 위하여 웨스턴 블랏을 수행

하였다. 구체적으로 Brn3a 과발현 벡터, 대조군 벡터, Brn3a 특이적 siRNA, 음성 대조군 siRNA을 각각 B-CPAP에 실시예 7과 동일한 방법으로 형질 주입하고, 실시예 5와 동일한 방법의 웨스턴 블롯을 실시(1차항체로, anti-phospho-STAT3 (Tyr705), anti-total STAT3, anti-β-actin (1:1,000; Cell Signaling Technology Inc.), anti-Brn3a, (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) anti-p-C-Met(1:1000; Cell signaling Technology Inc), anti-C-Met(1:1000; Cell signaling Technology Inc), anti-p-AKT(1:1000; Cell signaling Technology Inc), anti-AKT(1:1000; Cell signaling Technology Inc), anti-p-P65(1:1000; Cell signaling Technology Inc),anti-p-P38(1:1000; Cell signaling Technology Inc),anti-P53(1:1000; Cell signaling Technology Inc), 2차항체로 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:1,0000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)을 사용하였다)하였으며, 웨스턴 블롯 분석 결과를 도 12에 나타내었다.

[0107] 도 12에 나타난 바와 같이, Brn3a가 과발현된 세포에서 인산화된 STAT3와 STAT3 총 수준이 감소되어있는 것을 확인하였고, Brn3a를 넉다운 시킨 세포의 경우, 인산화된 STAT3가 증가한 것을 확인하였으나, 다른 경로와 관련된 단백질의 경우 유의미한 변화가 관찰되지 않았다.

[0108] 따라서 이하에서는 Brn3a 와 STAT3 신호전달 경로의 상관관계를 추가적으로 확인하였다.

[0109] **10.2. Brn3a 발현과 STAT3, STAT3 인산화 관계 확인**

[0110] Brn3a 발현과 STAT3와 STAT3의 인산화의 관계를 알아보기 위하여, Brn3a 과발현 벡터, 대조군 벡터, Brn3a 특이적 siRNA, 음성 대조군 siRNA을 각각 B-CPAP와 TPC-1에 실시예 7과 동일한 방법으로 형질 주입하고, 실시예 5와 동일한 방법의 웨스턴 블롯을 실시(1차항체로, phospho-STAT3 (Tyr705), anti-total STAT3, anti-β-actin (1:1,000; Cell Signaling Technology Inc.), anti-Brn3a, (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 2차항체로 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:1,0000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)을 사용하였다)하여 STAT3와 인산화된 STAT3(p-STAT3)를 측정하였으며, 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[0111] 도 13에 나타난 바와 같이, Brn3a 과발현 벡터가 형질 주입되어 Brn3a가 과발현된 세포에서 인산화된 STAT3가 현저히 감소되어 있으며, STAT3 총 수준이 감소되어있는 것을 확인하였다. 반면에 Brn3a를 넉다운 시킨 세포의 경우, 인산화된 STAT3가 증가한 것을 확인하였다.

[0112] 이와 같은 사실은 Brn3a 과발현이 STAT3의 아미노산인 티로신 705에서 STAT3 인산화를 현저하게 감소시킨다는 것을 의미한다.

[0113] STAT3의 세포 이동과 침습에 대한 영향을 이해하기 위해, B-CPAP와 TPC-1세포에 STAT3의 발현을 STAT3 siRNA(STAT3 siRNA 염기서열 정보, sense: CUCCAACAUCUGUCAGAUG(dTdT), antisense: CAUCUGACAGAUGUUGGAG(dTdT))로 넉다운 시킨군과 대조군을 사용해서 실시예 8과 동일한 방법으로 세포 이동과 세포 침습을 평가하여 도 14에 나타내었으며, 상기 세포의 상피-간엽 마커인 E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Snail 및 Twist를 검출하기 위한 웨스턴 블롯을 실시예 5와 동일한 방법으로 실시(1차항체로, phospho-STAT3 (Tyr705), anti-total STAT3, anti-Slug, anti-Snail, anti-Twist, anti-β-actin (1:1,000; Cell Signaling Technology Inc.), anti-E-cadherin, anti-N-cadherin (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 2차항체로 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:1,0000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)을 사용하였다)하여 그 결과를 도 15에 나타내었다.

[0114] 도 14에 나타난 바와 같이 STAT3 넉다운된 세포에서 세포의 이동과 침습이 대조군과 비교해 감소된 것을 확인할 수 있었으며, 도 15와 같이 상피-간엽 전이와 관련있는 단백질인 slug, snail, twist가 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0115] 상기 결과를 통해, Brn3a이 STAT3의 신호체계를 불활성화시켜 갑상선암 세포의 이동과 침습을 억제하는 기전을 통해 갑상선 암 전이를 억제할 수 있는 바, 갑상선 암 치료제로 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0117] 이하 본 발명의 Brn3a을 포함하는 갑상선 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명을 한정하고자 함이 아니고 단지 이를 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0119] **제제예 1. 주사제의 제조**

[0120] Brn3a 10 mg

[0121] 만니톨 180 mg

[0122] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[0123] $Na_2HPO_42H_2O$ 26 mg

[0124] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0126] **제제예 2. 과립제의 제조**

[0127] Brn3a 50 mg

[0128] 대두추출물 50 mg

[0129] 포도당 200 mg

[0130] 전분 600 mg

[0131] 통상의 과립제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충진하여 제조한다.

[0133] **제제예 3. 산제의 제조**

[0134] Brn3a 2 g

[0135] 유당 1 g

[0136] 통상의 산제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조한다.

[0138] **제제예 4. 정제의 제조**

[0139] Brn3a 100 mg

[0140] 옥수수전분 100 mg

[0141] 유 당 100 mg

[0142] 스테아린산 마그네 2 mg

[0143] 통상의 정제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0145] **제제예 5. 환제의 제조**

[0146] Brn3a 1 g

[0147] 유당 1.5 g

[0148] 글리세린 1 g

[0149] 자일리톨 0.5 g

[0150] 통상의 환제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조한다.

[0152] **제제예 6. 캡슐제의 제조**

[0153] Bnr3a 10 mg

[0154] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[0155] 락토오스 14.8 mg

[0156] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[0157] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0159] **제제예 7. 좌제의 제조**

[0160] Brn3a 5.0 mg

[0161] 폴리에틸렌글리콜 1500 49.995 g

[0162] 폴리에틸렌글리콜 4000 50.0 g

[0163] 통상의 좌제 제조방법에 따라 상기 원료를 칭량한 다음 조제 용기에 넣고 액 온도를 80℃ 가온 교반하면서 완전 용해하고, 40℃ 냉각한 다음 진공 탈포하여 100 g의 좌제를 제조한다.

[0165] **제제예 8. 겔제의 제조**

[0166] Brn3a 2.5 mg

[0167] 에데트산나트륨 50.0 mg

[0168] 글리시리진산칼륨 50.0 mg

[0169] 부틸렌글리콜 3.0 g

[0170] 포비돈 K30 1.0 g

[0171] 카보머 300.0 mg

[0172] 트리에탄올아민 400.0 mg

[0173] 정제수 95.19875 g

[0174] 통상의 겔제 제조방법에 따라 상기 원료를 칭량한 다음 조제 용기에 넣고 액 온도를 80℃ 가온 교반하면서 완전 용해하고, 40℃ 냉각한 다음 진공 탈포하여 100 g의 겔제를 제조한다.

[0176] **제제예 9. 현탁제의 제조**

[0177] Brn3a 50 mg

[0178] 이성화당 10 g

[0179] 설탕 30 mg

[0180] 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 100 mg

[0181] 정제수 적량 가하여 전체 100 ㎖

[0182] 통상의 현탁제 제조방법에 따라 상기의 성분들을 혼합하여 통상적인 현탁제의 제조방법에 따라 현탁제를 제조한 후 100 ㎖ 용량의 갈색병에 충진하고 멸균하여 현탁제를 제조한다.

[0184] **제제예 10. 액제의 제조**

[0185] Brn3a 10mg

[0186] 이성화당 10 g

[0187] 만니톨 5 g

[0188] 정제수 적량

[0189] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충진하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

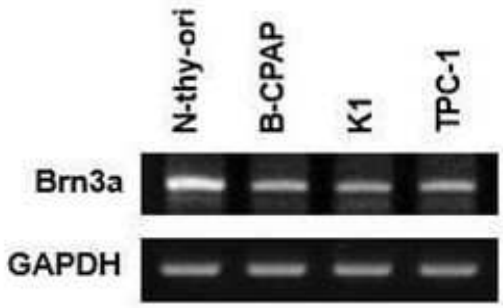
도면

도면1

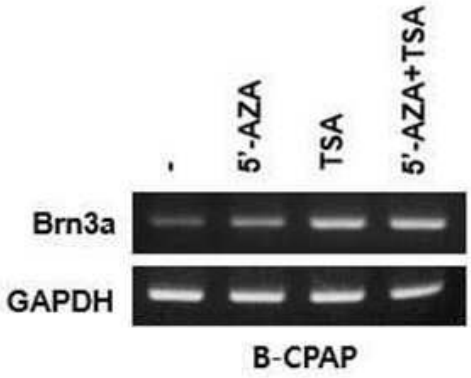
Normal			Non-aggressive			Aggressive		
Lab ID	Sample ID	Brn3a	Lab ID	Sample ID	Brn3a	Lab ID	Sample ID	Brn3a
NT16	4001334	4.89	FFPE83	S2004-11329	4.54	FFPE46	S2007-16616	6.81
NT18	4001271	4.10	FFPE84	S2006-12503	4.09	FFPE47	S2007-17447	13.63
NT20	4001596	2.93	FFPE86	S2007-13374	6.93	FFPE58		14.99
NT21	4001762	5.91	FFPE88	S2009-08174	2.16	FFPE49	S2010-03056	3.83
NT22	4001763	2.85	FFPE90	S2007-18128	2.11	FFPE50	S2005-04435	6.37
NT23	4001764	3.31	FFPE91	S2007-15968	2.13	FFPE51	S2006-00547	7.99
NT24	4001726	4.43	FFPE92	S2007-13853	0.78	FFPE52	S2007-09362	4.97
NT25	4001772	4.09	FFPE93	S2007-13681	0.52	FFPE77		5.03
NT28	4004096	5.45	FFPE94	S2008-12561	5.12	FFPE53	S2005-03980	13.67
NT29	4004109	3.26	FFPE95	S2009-02513	8.13	FFPE81		9.01
NT30	4004113	3.21	FFPE96	S2010-04755	3.47	FFPE55	S2007-11082	12.71
NT32	4004115	3.27	FFPE97	S2010-04756	3.32	FFPE56	S2007-11385	10.30
NT34	4004124	2.75	FFPE98	S2010-05742	3.76	FFPE57	S2007-14878	5.37
NT35	4004139	4.23	FFPE99	S2010-12524	5.10	FFPE87		3.97
NT43	4000563	4.34	FFPE100	S2010-01313	4.63	FFPE59	S2005-09983	14.03
NT45	4000820	0.82	FFPE105		5.68	FFPE60	S2005-11737	11.11
NT49	4001123	2.42	FFPE101	S2009-15645	2.40	FFPE71		31.19
NT50	4001313	3.15	FFPE102		2.24	FFPE62	S2007-10232	9.01
NT51	4001379	4.37	FFPE103	S2009-20719	7.53	FFPE63	S2007-17424	4.62
NT52	4001432	2.44	FFPE104	S2010-00703	4.19	FFPE64	S2006-00953	5.26
NT53	4001731	4.64	FFPE106	S2010-03911	5.10	FFPE65	S2006-04707	4.31
NT54	4001774	2.91	FFPE108	S2009-09740	4.07	FFPE66	S2006-15584	7.94
NT55	4001753	3.12				FFPE67	S2007-02322	22.10
NT57	4004103	4.44				FFPE68	S2007-02029	5.08
NT61	4004209	2.77				FFPE72	S2009-19274	13.94
NT62	4004211	3.06				FFPE74	S2003-14611	4.13
NT64	4004231	4.17				FFPE75	S2004-01294	6.52
NT65	4506112	6.12				FFPE78	S1998-08760	41.38
						FFPE79	S2005-01778	1.66
						FFPE82	S2004-08041	2.93
						FFPE109	S2004-04910	3.17

Hypermethylation (promoter_CpG) _35.5% -> Brn3a downregulation

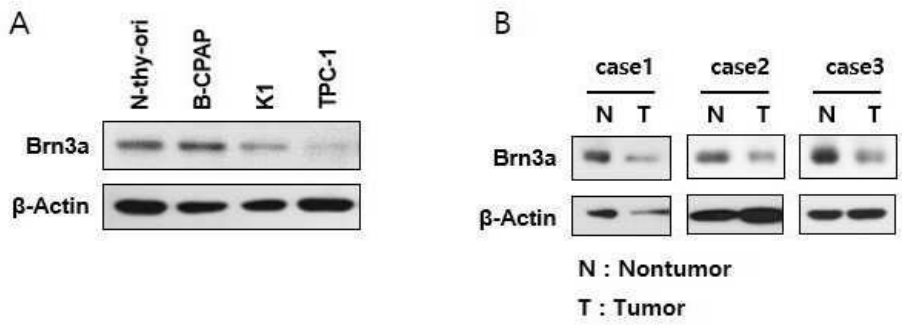
도면2



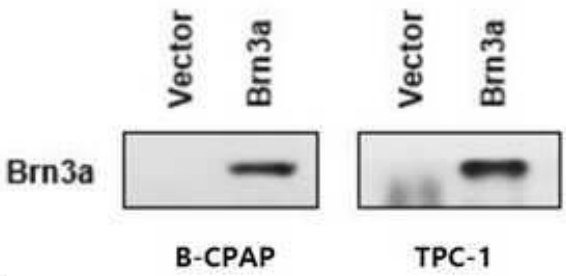
도면3



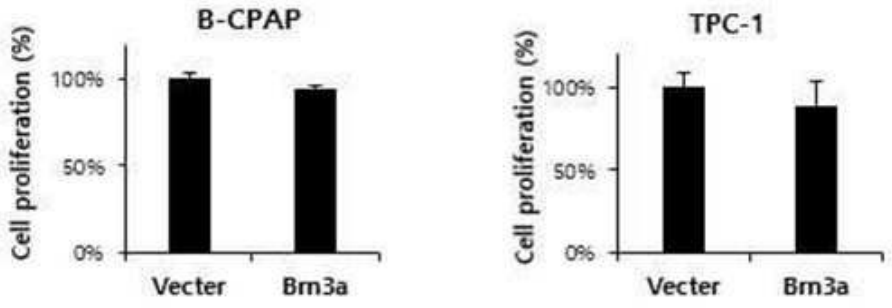
도면4



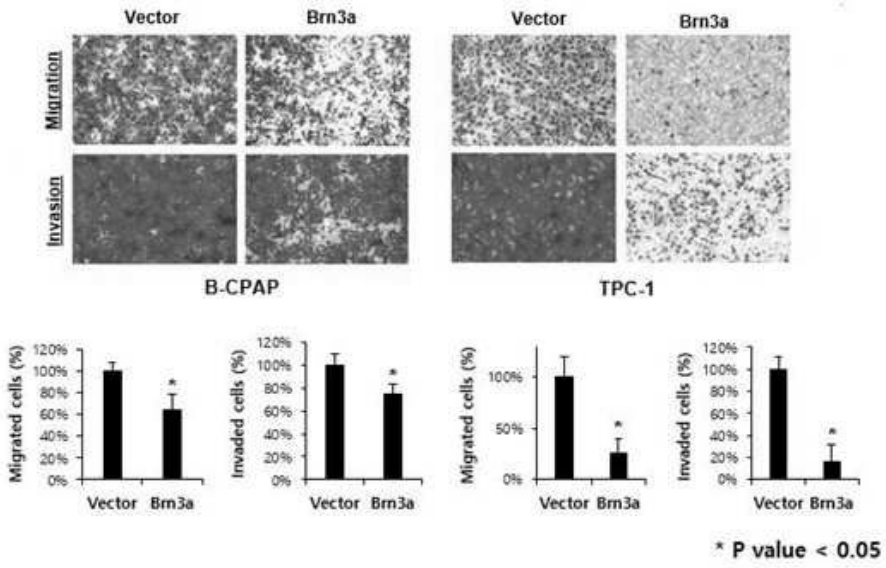
도면5



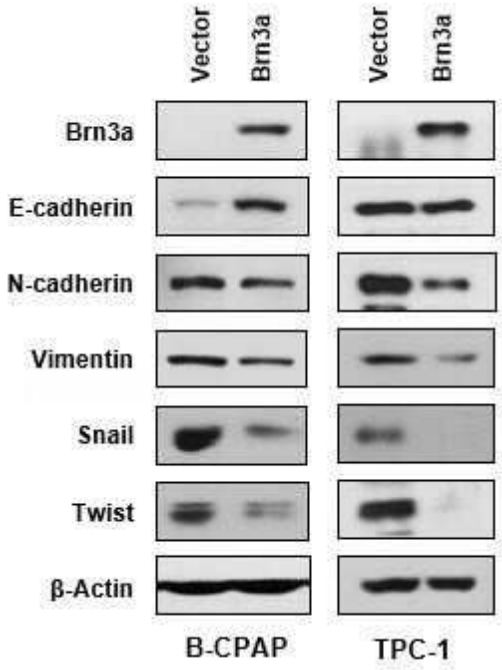
도면6


B-CPAP
Cell proliferation (%)
100%
50%
0%
Vecter
Brn3a
TPC-1
Cell proliferation (%)
100%
50%
0%
Vecter
Brn3a

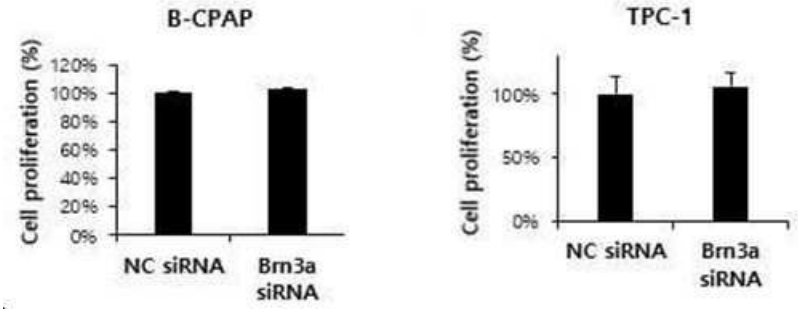
도면7


Vector
Brn3a
Vector
Brn3a
Migration
Invasion
B-CPAP
TPC-1
Migrated cells (%)
Invaded cells (%)
Migrated cells (%)
Invaded cells (%)
Vector Brn3a
Vector Brn3a
Vector Brn3a
Vector Brn3a
* P value < 0.05

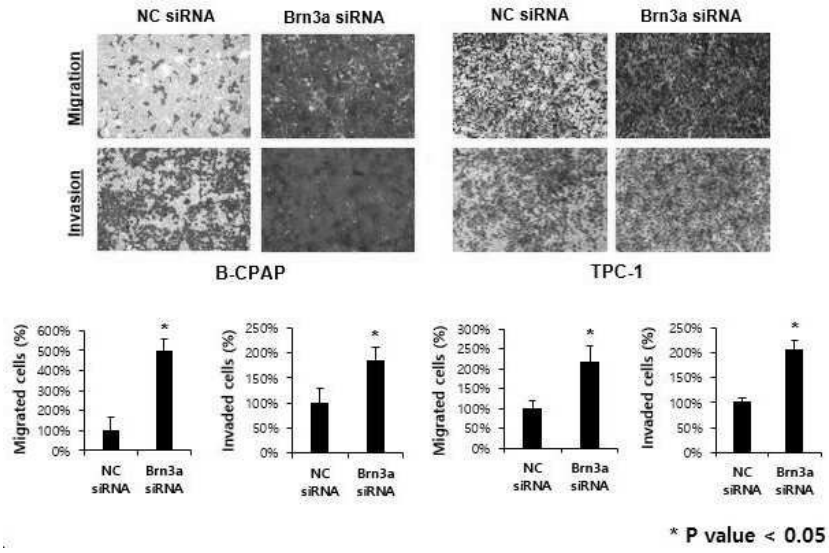
도면8


Vector
Brn3a
Vector
Brn3a
Brn3a
E-cadherin
N-cadherin
Vimentin
Snail
Twist
β-Actin
B-CPAP
TPC-1

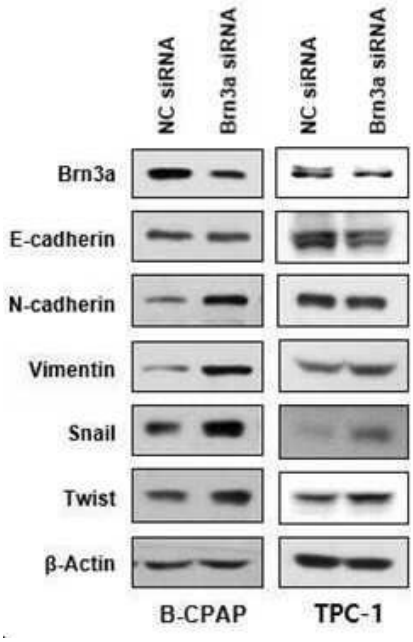
도면9


B-CPAP
Cell proliferation (%)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
NC siRNA
Brn3a siRNA
TPC-1
Cell proliferation (%)
100%
50%
0%
NC siRNA
Brn3a siRNA

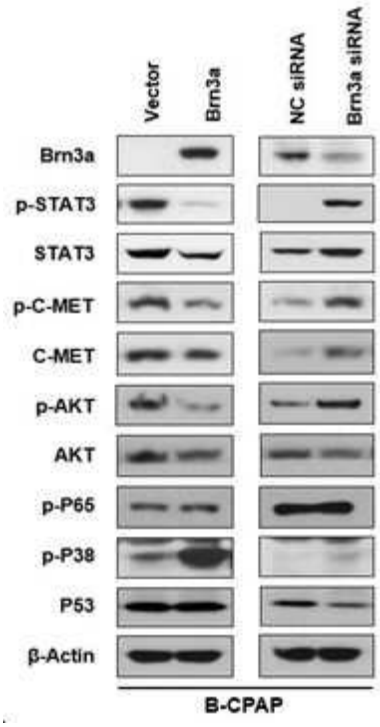
도면10


NC siRNA
Brn3a siRNA
NC siRNA
Brn3a siRNA
Migration
Invasion
B-CPAP
TPC-1
Migrated cells (%)
Invaded cells (%)
Migrated cells (%)
Invaded cells (%)
NC siRNA
Brn3a siRNA
* P value < 0.05

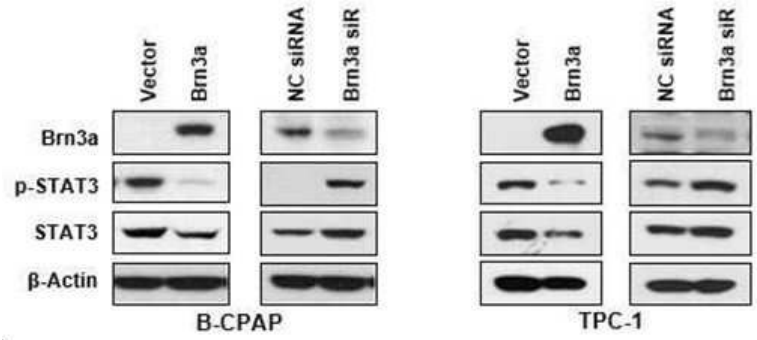
도면11


NC siRNA
Brn3a siRNA
NC siRNA
Brn3a siRNA
Brn3a
E-cadherin
N-cadherin
Vimentin
Snail
Twist
β-Actin
B-CPAP
TPC-1

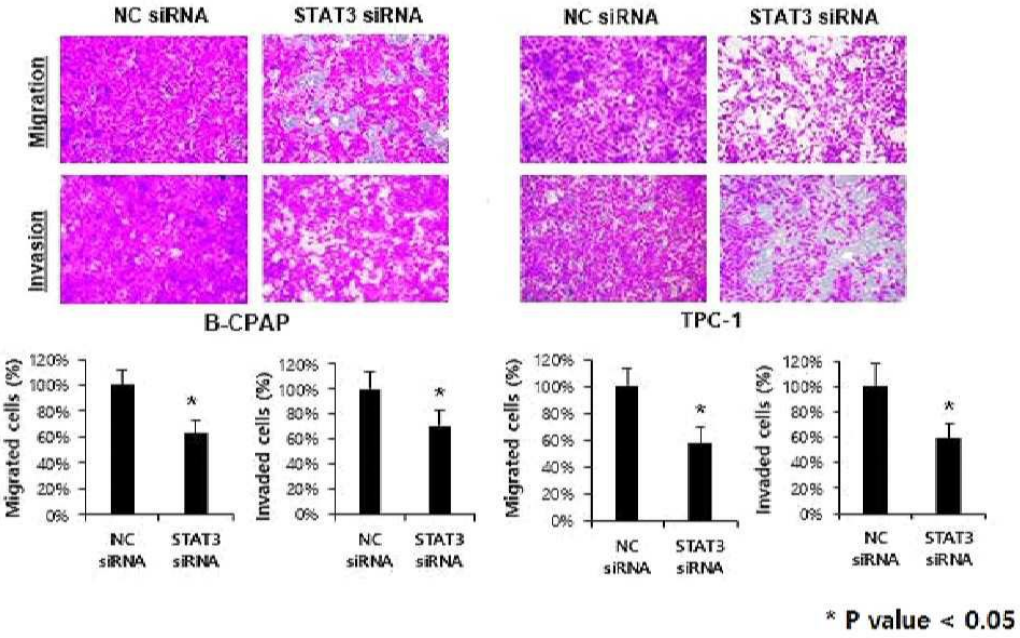
도면12


Vector
Brn3a
NC siRNA
Brn3a siRNA
Brn3a
p-STAT3
STAT3
p-C-MET
C-MET
p-AKT
AKT
p-P65
p-P38
P53
β-Actin
B-CPAP

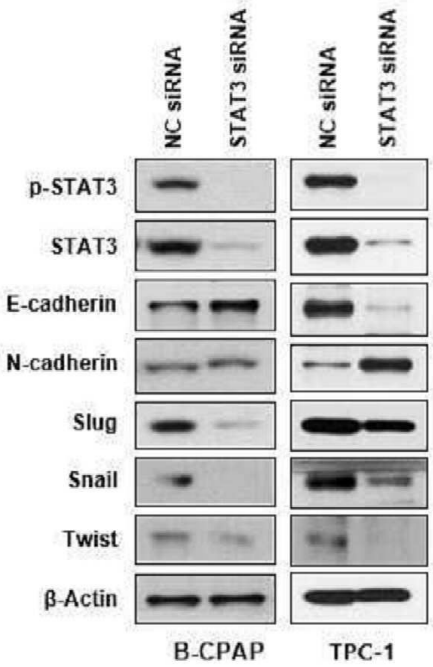
도면13


Vector
Brn3a
NC siRNA
Brn3a siR
Brn3a
p-STAT3
STAT3
β-Actin
B-CPAP
Vector
Brn3a
NC siRNA
Brn3a siR
TPC-1

도면14


NC siRNA
STAT3 siRNA
NC siRNA
STAT3 siRNA
Migration
Invasion
B-CPAP
TPC-1
Migrated cells (%)
Invaded cells (%)
Migrated cells (%)
Invaded cells (%)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
*
NC siRNA
STAT3 siRNA
* P value < 0.05

도면15


NC siRNA
STAT3 siRNA
NC siRNA
STAT3 siRNA
p-STAT3
STAT3
E-cadherin
N-cadherin
Slug
Snail
Twist
β-Actin
B-CPAP
TPC-1