



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년01월22일

(11) 등록번호 10-1587635

(24) 등록일자 2016년01월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6886 (2013.01)

C12Q 1/686 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0029188

(22) 출원일자 2015년03월02일

심사청구일자 2015년03월02일

(56) 선행기술조사문헌

US20130022974 A1

KR1020140059125 A

Pathol Int. 2014 Sep;64(9):415-22

(73) 특허권자

(주)지노믹트리

대전광역시 유성구 테크노10로 44-6 (탑립동)

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

안성환

대전광역시 유성구 엑스포로 448, 504동 702호
(전민동, 엑스포아파트)

오태정

대전광역시 유성구 가정로 63, 109동 1101호 (신성동, 럭키하나아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영

전체 청구항 수 : 총 20 항

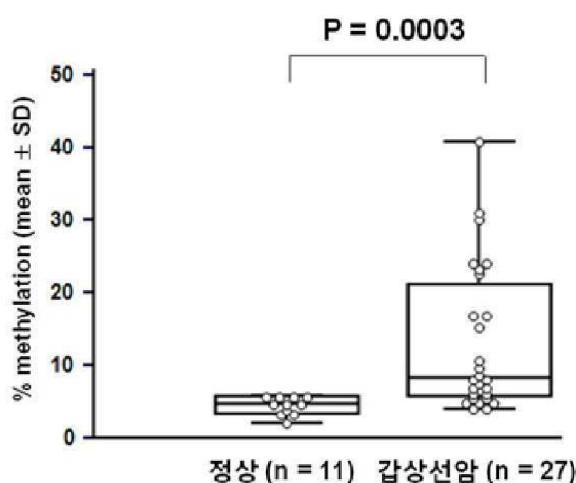
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 갑상선암 진단을 위한 갑상선암 특이적 메틸화 마커 유전자의 메틸화 검출방법

(57) 요약

본 발명은 갑상선암 (thyroid cancer) 또는 갑상선암 진행 단계 진단을 위한 갑상선암 특이적 메틸화 마커 유전자의 메틸화 검출방법, 갑상선암 특이적 메틸화 마커 유전자의 메틸화를 검출할 수 있는 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계 진단용 조성물, 이를 포함하는 키트 및 핵산칩에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 갑상선암 세포에서 특이적으로 메틸화되는 갑상선암 특이적 마커 유전자의 메틸화를 검출하여 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계 진단을 위한 정보를 제공하는 방법, 및 갑상선암 특이적 마커 유전자의 메틸화 여부를 검출할 수 있는 물질을 포함하는 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계 진단용 조성물, 이를 포함하는 키트 및 핵산칩에 관한 것이다.

대표도 - 도4a



(52) CPC특허분류

G01N 33/53 (2013.01)
C12Q 2521/331 (2013.01)
C12Q 2600/154 (2013.01)
G01N 2800/046 (2013.01)

구본석

대전광역시 서구 둔산북로 215, 12동 901호 (둔산동, 가람아파트)

(72) 발명자

이중훈

대전광역시 유성구 엑스포로339번길 320, 10동 402호 (원촌동, 싸이언스빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	0720560
부처명	보건복지부
연구관리전문기관	국립암센터
연구사업명	지역암센터연구사업
연구과제명	암 등록 사업과 연계한 암 바이오마커 개발 사업
기 여 율	1/1
주관기관	충남대학교병원
연구기간	2007.05.25 ~ 2016.05.24

명세서

청구범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 갑상선암의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 갑상선암 바이오마커 유전자 CpG 섬 부위의 메틸화를 검출하는 방법:

- (a) 임상샘플에서 DNA를 분리하는 단계; 및
- (b) 상기 분리된 DNA에서 *POU4F1* (POU class 4 homeobox 1) 갑상선암 바이오마커 유전자 CpG 섬 부위의 메틸화를 검출하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 다음의 단계를 포함하는 방법:

- (a') 정상 대조군에서 분리된 샘플 및 개체의 임상샘플에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- (b') 상기 분리된 게놈 DNA를 메틸화된 DNA와 비메틸화된 DNA를 상이하게 변형시키는 시약으로 처리하는 단계;
- (b'') 상기 시약으로 처리된 게놈 DNA 또는 이의 단편에서 *POU4F1* 유전자 CpG 섬 부위의 메틸화 상태를 확인하는 단계; 및
- (b''') 정상 대조군과 비교하여 *POU4F1* 유전자의 메틸화 수준이 증가하면 갑상선암으로 결정하는 단계.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 시약은 바이설파이트, 하이드로젠 설파이트, 다이설파이트 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 CpG 섬 부위는 *POU4F1* 유전자의 5' 발현조절부위에 위치하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 갑상선암 바이오마커 유전자의 CpG 섬 부위는 서열번호 16 또는 서열번호 17로 표시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 메틸화는 *POU4F1* 유전자 CpG 섬을 포함하는 단편을 증폭할 수 있는 프라이머로 증폭한 결과물의 생성 유무 또는 염기서열 변화를 통해 검출되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 메틸화 검출은 PCR, 메틸화 특이 PCR (methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR (real time methylation specific PCR), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 메틸화 DNA 특이적

결합 항체 또는 압타머를 이용한 PCR, 정량 PCR, 핵산 칩, 시퀀싱, 시퀀싱 바이 신세스 및 시퀀싱 바이 라이 게이션으로 구성된 군에서 선택되는 방법에 의하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 임상샘플은 암 의심 환자 또는 진단 대상 유래의 세포, 조직, 생검, 파라핀조직, 혈액, 혈청, 혈장, 미세침 흡인검체, 소변 및 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

POU4F1 갑상선암 바이오마커 유전자 CpG 섬 부위의 메틸화 여부를 검출할 수 있는 물질을 포함하는 갑상선암 진단용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 CpG 섬 부위의 메틸화 여부를 검출할 수 있는 물질은 메틸화된 CpG 섬 부위를 포함하는 단편을 증폭할 수 있는 프라이머쌍, 메틸화된 CpG 섬 부위와 혼성화할 수 있는 프로브, 메틸화된 CpG 섬 부위와 결합할 수 있는 메틸화 특이적 결합 단백질, 메틸화 특이적 결합 항체 또는 압타머, 메틸화 민감성 제한 엔도뉴 클라아제, 시퀀싱 프라이머, 시퀀싱 바이 신세스 프라이머 및 시퀀싱 바이 라이게이션 프라이머로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 CpG 섬 부위의 메틸화 여부를 검출할 수 있는 물질은 *POU4F1* 유전자의 메틸화된 CpG 섬 을 포함하는 단편을 증폭할 수 있는 프라이머쌍인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 프라이머쌍에 의해 증폭된 산물을 시퀀싱하기 위한 시퀀싱 프라이머를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 메틸화는 메틸화된 DNA와 비메틸화된 DNA를 상이하게 변형시키는 시약으로 처리된 게놈 DNA를 상기 *POU4F1* 유전자 CpG 섬 부위의 메틸화 여부를 검출할 수 있는 물질과 접촉시켜 확인되는 것을 특징으 로 하는 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 게놈 DNA는 암 의심 환자 또는 진단 대상 유래의 세포, 조직, 생검, 파라핀조직, 혈액, 혈청, 혈장, 미세침 흡인검체, 소변 및 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 임상샘플에서 분리된 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 시약은 바이설파이트, 하이드로젠 설파이트, 다이설파이트 또는 이들의 조합인 것을 특

정으로 하는 조성물.

청구항 16

제9항에 있어서, 상기 갑상선암 바이오마커 유전자의 CpG 섬 부위는 서열번호 16 또는 서열번호 17로 표시되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 17

제9항에 있어서, 상기 CpG 섬 부위는 *POU4F1* 유전자의 5' 발현조절부위에 위치하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 18

제9항에 있어서, 상기 메틸화는 PCR, 메틸화 특이 PCR (methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR (real time methylation specific PCR), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 메틸화 DNA 특이적 결합 항체 또는 압타머를 이용한 PCR, 정량 PCR, 핵산 칩, 시퀀싱, 시퀀싱 바이 신세스 및 시퀀싱 바이 라이게이션으로 구성된 군에서 선택되는 방법에 의하여 검출되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 19

제9항 내지 제18항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 갑상선암 진단용 키트.

청구항 20

POU4F1 갑상선암 바이오마커 유전자의 메틸화된 CpG 섬을 포함하는 단편과 하이브리다이제이션 할 수 있는 프로브를 포함하는 갑상선암 진단용 핵산칩.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 갑상선암 (thyroid cancer) 또는 갑상선암 진행 단계 진단을 위한 갑상선암 특이적 메틸화 마커 유전자의 메틸화 검출방법, 갑상선암 특이적 메틸화 마커 유전자의 메틸화를 검출할 수 있는 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계 진단용 조성물, 이를 포함하는 키트 및 핵산칩에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 갑상선암 세포에서 특이적으로 메틸화되는 갑상선암 특이적 마커 유전자의 메틸화를 검출하여 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계 진단을 위한 정보를 제공하는 방법, 및 갑상선암 특이적 마커 유전자의 메틸화 여부를 검출할 수 있는 물질을 포함하는 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계 진단용 조성물, 이를 포함하는 키트 및 핵산칩에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

의학이 발달한 오늘날에도 인체 암, 특히 대다수를 차지하는 고형암(solid tumor: 혈액암을 제외한 나머지 암)의 경우 5년 생존율은 50%미만이다. 전체 암환자의 약 3분의 2는 진행된 단계에서 발견되며, 이들 대부분은 진단 후 2년 이내에 사망한다. 이와 같이 저조한 암의 치료 효과는 치료법의 문제 뿐만은 아니며, 실제 암을 조기에 진단할 수 있는 방법과 진행된 암을 정확히 진단하고 치료 후 추적 조사하는 것이 용이하지 않기 때문이다.

[0003]

현재 임상에서 암의 진단은 문진 (history taking)과 신체검사, 임상병리검사를 거쳐 일단 의심이 되면 방사선 검사 및 내시경검사로 진행되며, 최종적으로는 조직검사로 확인된다. 그러나 현존 임상검사법으로는 암의 세포수가 10억개, 암의 직경이 1cm 이상이 되어야 진단이 가능하다. 이런 경우 이미 암세포는 전이능력을 갖고 있으

며, 실제 절반 이상에서 암이 이미 전이되어 있다. 한편, 암이 직간접으로 생산하는 물질을 혈액 내에서 찾는 종양마커(tumor markers)가 암 선별검사(cancer screening)에 이용되는데, 이는 정확도에 한계가 있어서 암이 있을 때도 약 절반까지 정상으로 나타나며, 암이 없을 때도 종종 양성으로 나타나서 혼란을 야기한다. 또한, 암의 치료에 주로 사용되는 항암제의 경우, 암의 용적이 적은 경우에만 그 효과를 나타내는 문제점이 있다.

[0004]

상기한 바와 같이, 암의 진단과 치료가 모두 어려운 것은 정상세포와 다른 점이 많고, 매우 복잡하고 다양하기 때문이다. 암은 제멋대로 과잉으로 계속 자라며, 사망에서 해방되어 계속 생존하고, 주위조직을 침범하고 원위 장기로 확산(전이)되어서 인간을 사망하게 한다. 면역기전의 공격이나 항암 치료에도 생존하고, 끊임없이 진화하며 생존에 가장 유리한 세포군(클론)이 선택적으로 증식한다. 암세포는 다수의 유전자의 변이에 의해 발생하는 고도의 생존능력을 가진 생존체이다. 하나의 세포가 암세포로 바뀌고, 임상에서 보는 악성의 암 덩어리로 발전해 나가기 위해서는 다수의 유전자에 변이가 일어나야 한다. 따라서 암을 근본적으로 진단하고 치료하기 위해서는 유전자 수준에서 접근할 필요가 있다.

[0005]

최근, 암의 진단에 유전자검사가 적극적으로 시도되고 있다. 가장 단순한 대표적 방법은 혈액에서 백혈병의 유전자 지표인 ABL:BCR 융합 유전자의 유무를 PCR로 찾는 것이다. 이는 정확도가 95% 이상이며, 단순 용이한 검사로 만성골수성 백혈병의 진단과 치료 후 결과 평가, 추적조사 등에 유용하게 사용되고 있다. 그러나, 이 방법은 소수 혈액암의 경우에만 적용이 가능하다.

[0006]

혈청(serum)이나 혈장(plasma)내 DNA를 사용하는 유전자검사가 최근 활발히 시도되고 있다. 이는 암세포에서 분리되어 혈액으로 나와서 혈청 내에 유리형(free DNA)으로 존재하는 암 관련 유전자를 찾는 방법이다. 실제 암환자에서는 혈청 내 DNA 농도가 정상인의 5~10배로 증가되며, 이렇게 증가된 DNA는 대부분이 암세포에서 유리되는 것으로 밝혀지고 있다. 이들 암에서 유리된 DNA를 가지고 암 유전자(oncogene)와 종양억제 유전자의 돌연변이나 소실, 기능상실 등, 암에 특이한 유전자 이상을 분석하면 암을 진단할 수 있다. 실제 혈청에서 돌연변이형의 K-Ras 암유전자나 p53 종양억제 유전자, p16 유전자의 메틸화, 그리고 마이크로세틀라이트(microsatellite)의 표지와 불안정성(instability) 등을 검사하여 폐암과 두경부암, 유방암, 대장암, 간암 등을 진단하는 것이 활발하게 시도되고 있다 (Chen, X.Q. *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 5:2297, 1999; Esteller, M. *et al.*, *Cancer Res.*, 59:67, 1999; Sanchez-Cespedes, M. *et al.*, *Cancer Res.*, 60:892, 2000; Sozzi, G. *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 5:2689, 1999).

[0007]

한편, 혈액 외의 검체에서도 암의 DNA를 검사할 수 있다. 폐암 환자에서 객담이나 기관지폐포 세척액(bronchoalveolar lavage) 내에 존재하는 암세포 및 암 유전자의 존재를 유전자검사나 항체검사로 찾는 방법이 시도되고 있으며(Palmisano, W.A. *et al.*, *Cancer Res.*, 60:5954, 2000; Sueoka, E. *et al.*, *Cancer Res.*, 59:1404, 1999), 갑상선암에서 미세침 흡인검체(FNAB; Fine needle Aspirated Biopsy) 내에 존재하는 돌연변이 및 메틸화 이상 유전자를 검사하는 방법 (Zhang B. *et al.*, *Diagnostic Pathology* 9:45, 2014)도 시도되고 있다. 하지만, 다수 유전자 이상을 동반하며 개개 암별로 제각기 다양한 변이를 보이는 암을 정확하게 진단하기 위해서는 다수의 유전자를 동시에, 그리고 정확하게 자동 분석할 수 있는 방법이 요구되나, 아직 이러한 방법은 정립되어 있지 않다.

[0008]

최근에는 DNA 메틸화 측정을 통하여 암을 진단하는 방법들이 제시되고 있다. 특정 유전자의 CpG 섬이 과메틸화되어 있을 때, 그 유전자의 발현은 차단(gene silencing)되게 된다. 이는 생체 내에서 유전자의 단백질 지정 코딩서열(coding sequence)에 돌연변이(mutation)가 없이도 그 유전자의 기능이 소실되는 주요 기전이며, 인체 암에서 다수의 종양억제 유전자(tumor suppressor genes)의 기능이 소실되는 원인으로 해석되고 있다. 따라서 종양억제 유전자의 CpG 섬의 메틸화를 검색하는 것은 암의 연구에 큰 도움이 되며, 이를 메틸화 특이 PCR (이하 MSP라고 함)이나 자동염기분석 등의 방법으로 검사하여 암의 진단과 스크리닝 등에 이용하려는 시도가 최근 활발하게 이루어지고 있다.

[0009]

상당수의 질환은 유전자의 이상에 의해 발생하고, 유전자 이상 중 가장 많은 형태는 유전자의 코딩서열에 변화가 오는 것으로 이러한 유전자 자체의 변화(genetic change)를 돌연변이라고 한다. 어떤 유전자에 돌연변이가 있을 때, 그 유전자가 코딩하는 단백질은 구조와 기능이 바뀌고 장애와 결손을 가져오게 되며, 이러한 돌연변이 단백질은 질병을 유발한다. 그러나 특정 유전자에 돌연변이가 없이도 그 유전자의 발현에 이상이 있으면 질병이 유발될 수 있다. 대표적인 예가 유전자 전사의 조절부위 CpG 섬의 시토신 염기부위에 메틸기가 붙는 메틸화로, 이 경우 그 유전자는 발현이 차단된다. 이와 같은 것을 후성유전적 변화(epigenetic change)라고 하며, 이것도 돌연변이와 마찬가지로 자손세포에 전달되며, 동일한 효과, 즉 해당 단백질의 발현 상실을 야기한다. 가장 대표적인 것이 암세포에서 유전자 발현 조절부위 CpG 섬의 메틸화에 의해 종양억제 유전자의 발현이 차단되는 것으

로, 이는 발암의 중요한 기전이 된다 (Robertson, K.D. *et al.*, *Carcinogenesis*, 21:461, 2000).

- [0010] 암을 정확히 진단하려면 변이유전자를 파악하는 것뿐만 아니라, 그 유전자의 변이가 나타나는 기전을 파악하는 것이 중요하다. 이전에는 유전자의 코딩서열의 돌연변이, 즉 점 돌연변이나 결실, 삽입 등의 미세변화나 거시적인 염색체 이상에 초점을 맞추어 연구해 왔다. 그러나 최근에는 이들만큼 유전자의 변화가 중요한 것으로 보고되고 있고, 대표적인 것이 유전자 발현 조절부위 CpG 섬의 메틸화이다.
- [0011] 포유류 세포의 게놈 DNA에는 A, C, G, T 외에 5번째 염기가 존재하며, 이는 시토신 환의 5번째 탄소에 메틸기가 붙은 5-메틸시토신(5-mC)이다. 5-mC는 항상 CG 다이뉴클레오타이드의 C에만 오며(5'-mCG-3'), 이러한 CG를 흔히 CpG라고 표시한다. CpG의 C는 대부분이 메틸기가 붙어서 메틸화되어 있다. 이러한 CpG의 메틸화는 알루(Alu)나 전이인자(transposon)와 같이 게놈 내에 반복되는 염기서열(repetitive sequence)이 발현되지 못하도록 억제하며, 포유류 세포에서 유전자와 변화가 가장 흔히 나타나는 부위이다. 이러한 CpG의 5-mC는 자연히 탈아미노화(deamination)되어 T로 바뀌며, 이에 따라 포유류 게놈내 CpG는 정상적으로 나타나야 할 빈도($1/4 \times 1/4 = 6.25\%$)보다 훨씬 낮은 1%의 빈도만을 나타낸다.
- [0012] CpG 중에 예외적으로 밀집되어 나타나는 것들이 있으며, 이를 CpG 섬이라고 한다. CpG 섬은 길이가 0.2-3kb이고, C 및 G염기의 분포백분율이 50%를 넘으며, CpG의 분포백분율이 3.75%이상으로 높게 집중되어 나타나는 부위를 가리킨다. CpG 섬은 전체 인체 유전체에 약 45,000개가 나타나며, 특히 유전자의 발현을 조절하는 프로모터 부위에 집중되어 나타난다. 실제로 인체 유전자중 약 절반을 차지하는 중요 유전자(housekeeping genes)의 프로모터에는 CpG 섬이 나타난다 (Cross, S. *et al.*, *Curr. Opin. Gene Develop.*, 5:309, 1995).
- [0013] 한편, 정상인의 체세포(somatic cell)에서는 이들 중요 유전자 발현조절 부위의 CpG 섬이 메틸화되어 있지 않으나, 발생 중에 발현되지 않도록 각인된(imprinted) 유전자와 비활성화(inactivation)된 X 염색체상의 유전자들은 메틸화되어 있다.
- [0014] 발암과정 중에는 발현조절 부위 CpG 섬에 메틸화가 나타나며, 그 해당 유전자의 발현에 장애가 나타나게 된다. 특히, 세포주기나 고사를 조절하고, DNA를 복구하며 세포의 부착과 세포간 상호협조 작용에 관여하고, 침윤과 전이를 억제하는 종양억제 유전자들의 발현조절 부위 CpG 섬에 메틸화가 발생하는 경우, 이는 코딩서열의 돌연변이와 동일하게 이들 유전자의 발현과 기능을 차단하며, 그 결과 암의 발생과 진행이 촉진된다. 그 외에도 노화에 따라 CpG 섬에 부분적으로 메틸화가 나타나기도 한다.
- [0015] 흥미로운 사실은 선천성 암에서는 돌연변이가 발암의 원인이 되나, 후천성암에서는 돌연변이가 나타나지 않는 유전자들의 경우, 돌연변이 대신에 CpG 섬의 메틸화가 나타난다는 것이다. 대표적인 예로, 후천성 신장암의 VHL(von Hippel Lindau), 유방암의 BRCA1, 대장암의 MLH1, 위암의 E-CAD와 같은 유전자의 발현조절 부위 메틸화가 있다. 아울러, 전체 암 중 약 절반에서 p16의 프로모터 메틸화나 Rb의 돌연변이가 나타나며, 나머지 절반은 p53의 돌연변이나 그 계열로 p73, p14 등의 발현조절 부위 메틸화를 보인다.
- [0016] 이러한 메틸화 현상은 암의 종류에 따라 해당 암의 조직세포에서 유전자 별로 다르게 일어나며, 특정암에서 특이적으로 메틸화되는 유전자를 해당 암의 메틸화 바이오마커로 선별할 수 있다.
- [0017] 특정암에 대한 메틸화 바이오마커에서 CpG에 관해 3가지 공통된 특징을 보이는데, 이는 종양억제 유전자의 발현조절 부위 CpG 섬의 과메틸화, 나머지 CpG 염기부위의 과소메틸화, 및 메틸화 효소, 즉 DNA 시토신 메틸트랜스퍼라제(DNMT)의 활성증가가 그것이다 (Singal, R. & Ginder, G.D., *Blood*, 93:4059, 1999; Robertson, K. *et al.*, *Carcinogenesis*, 21:461, 2000; Malik, K. & Brown, K.W., *Brit. J. Cancer*, 83:1583, 2000).
- [0018] 발현조절 부위 CpG 섬이 메틸화되어 있을 때, 그 해당 유전자의 발현이 차단되는 이유는 명확히 밝혀져 있지 않으나, 메틸화된 시토신에 메틸 CpG 부착 단백질(MECP)이나 CpG 부착 도메인 단백질(domain protein, MBD) 및 히스톤 디아세틸라제(histone deacetylase)가 부착되면서 염색체의 크로마틴 구조를 바꾸고 히스톤을 변화시키기 때문인 것으로 추측되고 있다.
- [0019] 발현조절 부위 CpG 섬의 메틸화가 발암을 직접 유발하는지, 또는 이것이 발암에 2차적인 변화인지에 대해 논란이 있으나, 분명한 사실은 종양관련 유전자의 발현 조절부위 메틸화가 암의 중요한 지표이며, 따라서 이는 암의 진단과 조기진단, 발암위험의 예측, 암의 예후 예측, 치료 후 추적조사, 항암요법에 대한 반응 예측 등 다방면으로 이용될 수 있다는 것이다. 실제 혈액이나 객담, 침, 대변, 소변, 미세침 흡인검체 등에서 종양관련 유전자의 발현조절 부위 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; Zhang B. *et al.*, *Diagnostic Pathology*

9:45, 2014).

- [0020] 이러한 기술적 배경하에서, 본 출원의 발명자들은 조기 진단, 발암 위험 또는 암의 예후 예측 등이 가능한 효과적인 갑상선암 특이적 메틸화 마커를 개발하고자 예의 노력한 결과, *POU4F1* (POU class 4 homeobox 1) 유전자가 갑상선암세포에서 특이적으로 메틸화되어 있으며, 이를 바이오마커로 이용하여 메틸화 정도를 측정함으로써 갑상선암을 진단할 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0021] 본 발명의 주된 목적은 갑상선암 진단에 효과적으로 사용될 수 있는 갑상선암에서 특이적으로 메틸화되는 갑상선암 특이적 메틸화 바이오마커를 제공하고, 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 갑상선암 바이오마커 유전자 CpG 섬 부위의 메틸화를 검출하는 방법을 제공하는 데 있다.
- [0022] 본 발명의 다른 목적은 갑상선암 특이적 메틸화 마커 유전자인 *POU4F1* (POU class 4 homeobox 1) 유전자의 메틸화를 검출할 수 있는 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계 진단용 조성물 및 이를 포함하는 키트를 제공하는 데 있다.
- [0023] 본 발명의 다른 목적은 갑상선암 특이적 메틸화 마커 유전자인 *POU4F1* (POU class 4 homeobox 1) 유전자의 메틸화를 검출할 수 있는 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계 진단용 핵산칩을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0024] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 임상샘플에서 DNA를 분리하는 단계; 및 (b) 상기 분리된 DNA에서 *POU4F1* (POU class 4 homeobox 1) 갑상선암 바이오마커 유전자 CpG 섬 부위의 메틸화를 검출하는 단계를 포함하는 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 갑상선암 바이오마커 유전자 CpG 섬 부위의 메틸화를 검출하는 방법을 제공한다.
- [0025] 본 발명은 또한, *POU4F1* 유전자 CpG 섬 부위의 메틸화 여부를 검출할 수 있는 물질을 포함하는 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계 진단용 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 포함하는 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계 진단용 키트를 제공한다.
- [0027] 본 발명은 더욱이, *POU4F1* 갑상선암 바이오마커 유전자의 메틸화된 CpG 섬을 포함하는 단편과 하이브리다이제이션 할 수 있는 프로브를 포함하는 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계 진단용 핵산칩을 제공한다.

발명의 효과

- [0028] 본 발명에 따른 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 갑상선암 바이오마커 유전자 CpG 섬 부위의 메틸화 검출 방법 및 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계 진단용 키트를 이용하면, 갑상선암을 초기 형질전환단계에서 진단할 수 있어 조기 진단이 가능하고, 통상적인 방법보다 정확하고 빠르게 갑상선암을 진단할 수 있어 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 정상조직과 갑상선암 조직으로부터 CpG 마이크로어레이 분석을 통하여 갑상선암 진단을 위한 메틸화 바이오 마커를 발굴하는 과정을 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 갑상선암 CpG 마이크로어레이 데이터로부터 갑상선암 특이적 과메틸화 유전자를 선별하는 과정을 나타낸 모식도이다.
- 도 3은 5개의 바이오 마커 후보 유전자의 갑상선암 세포주에서 메틸화 정도를 파이로시퀀싱으로 측정한 그래프이다.

도 4a는 *POU4F1* 메틸화 바이오마커의 갑상선암 조직 및 이와 연결하는 정상소견조직에서의 메틸화 정도를 파이로시퀀싱 방법으로 측정한 그래프이다.

도 4b는 독립적인 갑상선 조직시료를 대상으로 *POU4F1* 메틸화 바이오마커의 갑상선암 조직 및 이와 연결하는 정상소견조직에서의 메틸화 정도를 파이로시퀀싱 방법으로 측정한 그래프이다.

도 4c는 ROC 커브 분석을 수행하여 갑상선암 진단에 대한 민감도(sensitivity) 및 특이도(specificity)를 측정한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0031] 본 발명에서는 정상인과 갑상선암 환자간 메틸화 정도의 차이가 가장 큰 5개의 바이오마커 후보 유전자를 선별하였다. 바이오마커 후보 중 *POU4F1* 유전자가 갑상선암 진단에 유용함을 확인하였으며, 이에 본 발명은 갑상선암에서 특이적으로 메틸화되어 있는 유전자인 *POU4F1* (POU class 4 homeobox 1) 유전자의 CpG 섬을 바이오마커로 사용하는 것을 기초로 한다. 선별된 *POU4F1* 유전자는 갑상선암 스크리닝, 위험성 평가, 예측, 병명 확인, 병의 단계 진단 및 치료 타겟의 선정에도 사용될 수 있다.
- [0032] 하나의 실시예에서, 바이오마커 후보 유전자 선별 방법은 다음과 같다: (a) 정상 세포와 암 세포에서 게놈 DNA를 분리하는 단계; (b) 상기 분리된 게놈 DNA로부터 메틸화된 DNA에 결합하는 단백질과 반응시켜 메틸화된 DNA를 분리하는 단계; 및 (c) 상기 메틸화된 DNA를 증폭시킨 후, CpG 마이크로어레이에 하이브리다이제이션한 다음, 정상 세포와 암 세포 간 메틸화 정도의 차이가 가장 큰 유전자를 메틸화 마커 유전자로 선정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0033] 갑상선암 및 여러 단계의 이상에서 메틸화되는 유전자를 확인하는 것은 정확하고 효과적으로 갑상선암을 조기 진단할 수 있게 하는데, 상기 메틸화 유전자 마커를 이용하여 갑상선암을 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. 따라서, 정상으로 보이는 세포에서의 갑상선암 특이적 유전자가 메틸화를 확인함으로써, 갑상선암을 조기 진단할 수 있다.
- [0034] 본 명세서에서 암의 "조기 진단"은 전이되기 전에 암의 가능성을 발견하는 것으로, 바람직하게는 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 의미한다.
- [0035] "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.
- [0036] 또한, 갑상선 조직의 세포 성장성 이상 (이형증 진행)을 검출할 수 있으며, 갑상선암 진행 가능성을 가지는 조직의 메틸화 빈도를 정하는 것에 의하여 조직의 갑상선암으로의 발전 가능성을 평가할 수 있다.
- [0037] 더욱이, 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 갑상선암 진단 시스템을 확립할 수 있을 것이다.
- [0038] 개체의 임상샘플에서 핵산 바이오 마커의 메틸화를 확인함으로써, 여러 단계 또는 기(期)의 갑상선암 진행을 진단할 수 있다. 이 때, 상기 메틸화는 하이퍼메틸화일 수 있다.
- [0039] 하나의 실시예에서, 상기 CpG 섬 부위는 *POU4F1* 유전자의 5' 발현조절부위에 위치할 수 있으며, 다른 실시예에서 메틸화는 유전자 조절 부위의 외곽에서부터 시작되어 내부로 진행되기 때문에, 조절 부위의 외곽에서 검출될 수 있다.
- [0040] 구체적으로, 상기 갑상선암 바이오마커 유전자의 CpG 섬 부위는 서열번호 16 또는 서열번호 17로 표시되는 염기서열을 가질 수 있다. 상기 서열번호 16은 별도로 변형되지 않은 *POU4F1* 유전자 CpG 섬 부위의 염기서열을 포함하고, 상기 서열번호 17은 메틸화 확인을 위해 바이설파이트, 하이드로젠 설파이트, 다이설파이트 또는 이들

의 조합으로 변환하였을 때의 *POU4F1* 유전자 CpG 섬 부위의 염기 서열을 포함한다.

- [0041] 이를 바탕으로, 본 발명은 서열번호 17로 표시되는 *POU4F1* 유전자 또는 이의 단편을 포함하는 핵산으로, 상기 *POU4F1* 유전자 또는 이의 단편은 적어도 하나의 사이토신 염기를 우라실 또는 혼성화 과정에서 사이토신과 상이한 것으로 검출되는 다른 염기로 변환되도록 처리된 것을 특징으로 하는 갑상선암 검출용 변형 핵산에 관한 것이다.
- [0042] 또한, 본 발명은 서열번호 17로 표시되는 *POU4F1* 유전자 또는 이의 단편을 포함하는 변형 핵산 바이오마커로, 상기 *POU4F1* 유전자 또는 이의 단편은 적어도 하나의 사이토신 염기를 우라실 또는 혼성화 과정에서 사이토신과 상이한 것으로 검출되는 다른 염기로 변환되도록 처리된 것을 특징으로 하는 갑상선암 검출용 변형 핵산 바이오마커에 관한 것이다.
- [0043] 일 관점에서, 본 발명은 (a) 임상샘플에서 DNA를 분리하는 단계; 및 (b) 상기 분리된 DNA에서 *POU4F1* (POU class 4 homeobox 1) 갑상선암 바이오마커 유전자 CpG 섬 부위의 메틸화를 검출하는 단계를 포함하는 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 갑상선암 바이오마커 유전자 CpG 섬 부위의 메틸화를 검출하는 방법에 관한 것이다.
- [0044] 또한, 본 발명은 (a) 임상샘플에서 DNA를 분리하는 단계; 및 (b) 상기 분리된 DNA에서 *POU4F1* (POU class 4 homeobox 1) 갑상선암 바이오마커 유전자 CpG 섬 부위의 메틸화를 검출하는 단계를 포함하는, 갑상선암 바이오마커 유전자 CpG 섬 부위의 메틸화를 검출하여 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계를 진단하는 방법에 관한 것이다.
- [0045] 본 명세서에서 사용되는 "샘플," "임상샘플" 또는 "검체"는 수행되는 분석의 종류에 따라, 개개인, 체액, 세포주, 조직 배양 등에서 얻어지는 폭넓은 범위의 모든 생물학적 체액을 포함하고, 예를 들어, 혈액, 혈청, 혈장, 소변을 포함하며, 세포, 조직, 생검, 파라핀조직, 미세침 흡인검체 역시 포함될 수 있다. 즉, 상기 임상샘플은 예를 들어, 암 의심 환자 또는 진단 대상 유래의 세포, 조직, 생검, 파라핀조직, 혈액, 혈청, 혈장, 미세침 흡인검체, 소변 및 이의 조합으로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 포유동물로부터 체액 및 조직 생검을 획득하는 방법은 통상적으로 널리 알려져 있다.
- [0046] 하나의 실시예에서, (a') 정상 대조군에서 분리된 샘플 및 개체의 임상샘플에서 게놈 DNA를 분리하는 단계; (b') 상기 분리된 게놈 DNA를 메틸화된 DNA와 비메틸화된 DNA를 상이하게 변형시키는 시약으로 처리하는 단계; (b'') 상기 시약으로 처리된 게놈 DNA 또는 이의 단편에서 *POU4F1* 유전자 CpG 섬 부위의 메틸화 상태를 확인하는 단계; 및 (b''') 정상 대조군과 비교하여 *POU4F1* 유전자의 메틸화 수준이 증가하면 갑상선암으로 결정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0047] 이 때, 상기 메틸화는 *POU4F1* 유전자 CpG 섬을 포함하는 단편을 증폭할 수 있는 프라이머로 증폭한 결과물의 생성 유무 또는 염기서열 변화를 통해 검출될 수 있으며, 이 때 바이설파이트, 하이드로젠 설파이트, 다이설파이트 또는 이들의 조합인 시약을 처리하여 메틸화된 DNA와 비메틸화된 DNA를 상이하게 변형시킬 수 있다.
- [0048] 상기 메틸화는 예를 들어 PCR, 메틸화 특이 PCR (methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR (real time methylation specific PCR), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 메틸화 DNA 특이적 결합 항체 또는 압타머를 이용한 PCR, 정량 PCR, 핵산 칩, 시퀀싱, 시퀀싱 바이 신세스 및 시퀀싱 바이 라이게이션으로 구성된 군에서 선택되는 방법에 의하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 다른 관점에서, 본 발명은 *POU4F1* 유전자 CpG 섬 부위의 메틸화 여부를 검출할 수 있는 물질을 포함하는 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계 진단용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0050] 본 발명은 또한, *POU4F1* 유전자 CpG 섬 부위의 메틸화 여부를 검출할 수 있는 물질을 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계 진단용 조성물 또는 키트의 제조에 사용하기 위한 용도에 관한 것이다.
- [0051] 상기 CpG 섬 부위의 메틸화 여부를 검출할 수 있는 물질은 메틸화된 CpG 섬 부위를 포함하는 단편을 증폭할 수 있는 프라이머쌍, 메틸화된 CpG 섬 부위와 혼성화할 수 있는 프로브, 메틸화된 CpG 섬 부위와 결합할 수 있는 메틸화 특이적 결합 단백질, 메틸화 특이적 결합 항체 또는 압타머, 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클라아제, 시퀀싱 프라이머, 시퀀싱 바이 신세스 프라이머 및 시퀀싱 바이 라이게이션 프라이머로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0052] 하나의 실시예에서, 상기 CpG 섬 부위는 *POU4F1* 유전자의 5' 발현조절부위에 위치할 수 있으며, 다른 실시예에

서 메틸화는 유전자 조절 부위의 외곽에서부터 시작되어 내부로 진행되기 때문에, 조절 부위의 외곽에서 검출될 수 있다.

- [0053] 구체적으로, 상기 갑상선암 바이오마커 유전자의 CpG 섬 부위는 서열번호 16 또는 서열번호 17로 표시되는 염기 서열을 가질 수 있다. 상기 서열번호 16은 별도로 변형되지 않은 *POU4F1* 유전자 CpG 섬 부위의 염기 서열을 포함하고, 상기 서열번호 17은 메틸화 확인을 위해 바이설파이트, 하이드로젠 설파이트, 다이설파이트 또는 이들의 조합으로 변환하였을 때의 *POU4F1* 유전자 CpG 섬 부위의 염기 서열을 포함한다.
- [0054] 본 발명에 따른 키트의 일 예로는 *POU4F1* 유전자의 메틸화된 CpG 섬을 포함하는 단편을 증폭할 수 있는 프라이머를 포함하는 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 키트일 수 있다.
- [0055] 상기 키트는 샘플을 담는 구획된 캐리어 수단, 비메틸화 시토신을 민감하게 절단하는 제제를 함유하는 첫 번째 용기, CpG 함유 핵산을 증폭하기 위한 프라이머를 함유하는 두 번째 용기 및 절단된 또는 절단되지 않은 핵산의 존재를 검출하는 수단이 함유된 세번째 용기를 포함하는 하나 이상의 용기를 포함한다. 본 발명에 따라 사용되는 프라이머는 게놈상에서 메틸화가 일어났는지의 여부를 검출하는 프라이머로 사용된다.
- [0056] 상기 CpG 섬 부위의 메틸화 여부를 검출할 수 있는 물질은 메틸화된 CpG 섬 부위를 포함하는 단편을 증폭할 수 있는 프라이머쌍, 메틸화된 CpG 섬 부위와 혼성화할 수 있는 프로브, 메틸화된 CpG 섬 부위와 결합할 수 있는 메틸화 특이적 결합 단백질, 메틸화 특이적 결합 항체 또는 애타머, 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클라아제, 시퀀싱 프라이머, 시퀀싱 바이 신세스 프라이머 및 시퀀싱 바이 라이게이션 프라이머로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0057] 구체적으로, 본 발명에 따른 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 키트의 다른 예로는 *POU4F1* 유전자의 CpG섬 또는 그 발현조절 부위의 CpG섬을 포함하는 단편을 증폭하기 위한 PCR 프라이머쌍과 상기 프라이머쌍에 의하여 증폭된 PCR 산물을 파이로시퀀싱하기 위한 시퀀싱 프라이머를 함유하는 갑상선암 진단용 키트일 수 있다. 상기 PCR 프라이머 쌍은 예를 들어 서열번호 5 및/또는 서열번호 6의 서열을 가질 수 있고, 상기 PCR 산물을 파이로시퀀싱하기 위한 시퀀싱 프라이머는 예를 들어 서열번호 13의 서열을 가질 수 있다.
- [0058] 본 발명의 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계 진단용 조성물 및 이를 포함하는 키트를 이용하면 검체에서 갑상선 조직의 세포 성장성 이상 성향(이형증 진행도)을 결정할 수 있다. 이는 검체로부터 분리한 핵산의 메틸화 상태를 결정하는 것을 포함하고, 상기 핵산의 메틸화 단계는 갑상선 조직의 세포 성장성 이상 성향(이형증)이 없는 검체로부터 분리한 핵산의 메틸화 단계와 비교하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0059] 또 다른 관점에서, 본 발명은 *POU4F1* 갑상선암 바이오마커 유전자 CpG 섬의 메틸화 부위를 포함하는 단편과 하이브리다이제이션 할 수 있는 프로브를 포함하는 갑상선암 또는 갑상선암 진행단계 진단용 핵산칩에 관한 것이다.
- [0060] 상기 프로브는 갑상선암 바이오마커의 CpG와는 상보적이면서 동시에 상기 갑상선암 바이오마커 유전자 부위의 CpG를 포함하는 단편과 하이브리다이제이션할 수 있는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0061] 본 발명의 메틸화 마커 유전자를 이용하면, 검체에서 갑상선 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 갑상선 조직의 세포 성장성 이상(이형증 진행)을 가지지 않는 검체의 핵산에서의 동일한 부위의 메틸화 상태와 차이가 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0062] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 상기 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계 진단용 조성물, 이를 포함하는 키트 또는 핵산 칩을 이용하여 마커 유전자의 메틸화를 검사하는 것에 의하여 형질전환된 갑상선암 세포를 확인할 수 있다.
- [0063] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 상기 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계 진단용 조성물, 이를 포함하는 키트 또는 핵산 칩을 이용하여 마커 유전자의 메틸화를 검사하는 것에 의하여 갑상선암을 진단할 수 있다. 구체적으로, 다음의 단계를 통해 키트를 사용하여 개체 내 갑상선암을 진단할 수 있다:
- [0064] (a) 개체로부터 분리된 임상샘플에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- [0065] (b) 상기 분리된 게놈 DNA 또는 이의 단편을 메틸화된 DNA와 비메틸화된 DNA를 서로 다르게 변형시키는 하나 이

상의 시약으로 처리하는 단계;

- [0066] (c) 상기 처리된 게놈 DNA 또는 이의 단편에 대한 증폭효소 및 증폭 가능한 프라이머, 또는 이와 상보적이거나 엄격한 조건 하에서 혼성화할 수 있는 뉴클레오타이드의 연속적인 서열을 포함하는 하나 이상의 프라이머와 접촉시키되, 처리된 게놈 DNA 또는 이의 단편을 증폭시켜 하나 이상의 증폭산물을 만들거나 증폭시키지 않는 단계; 및
- [0067] (d) 상기 증폭산물의 존재 또는 부재에 기초하여 하나 이상의 CpG 다이뉴클레오타이드의 메틸화 상태 또는 수준을 결정함으로써, 갑상선암을 검출하는 단계.
- [0068] 이 때, 상기 프라이머는 예를 들어 서열번호 5 및/또는 서열번호 6의 서열을 가질 수 있고, 경우에 따라서 상기 증폭 산물을 시퀀싱하기 위한 시퀀싱 프라이머를 추가로 포함할 수 있다. 시퀀싱 프라이머는 예를 들어, 서열번호 13의 서열을 가질 수 있다.
- [0069] 상기 시약은 바이설파이트, 하이드로젠 설파이트, 다이설파이트 또는 이들의 조합일 수 있으며, 상기 증폭효소는 내열성 DNA 폴리머라제 또는 5'-3' 엑소뉴클레아제 활성을 갖지 않는 폴리머라제일 수 있다. 상기 개체로부터 분리된 임상샘플은 세포, 조직, 생검, 파라핀조직, 혈액, 혈청, 혈장, 미세침 흡인검체, 소변 및 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0070] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 정상 표현형을 나타내는 샘플을 이용하여 상기 갑상선암 또는 갑상선암 진행 단계 진단용 조성물, 이를 포함하는 키트 또는 핵산 칩을 이용하여 마커 유전자의 메틸화를 검사하는 것에 의하여 갑상선암으로 진행될 수 있는 가능성을 진단할 수 있다. 상기 샘플은 고체 또는 액체 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 미세침 흡인검체, 소변 및 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0071] 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, 시퀀싱 바이 신세스 (sequencing by synthesis), 시퀀싱 바이 라이게이션 (sequencing by ligation) 및 바이설파이트 시퀀싱으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0072] 본 발명에 있어서, 상기 유전자의 메틸화 여부를 검출하는 방법은 다음 단계를 포함한다: (a) 임상샘플로부터 샘플 DNA를 분리하는 단계; (b) 상기 분리된 DNA를 갑상선암 바이오마커 유전자의 CpG 섬을 포함하는 단편을 증폭할 수 있는 프라이머를 사용하여 증폭하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 증폭된 결과물의 생성 유무를 근거로 갑상선암 바이오마커 유전자 CpG 섬의 메틸화 여부를 결정하는 단계.
- [0073] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 갑상선암에서 특이적으로 메틸화되는 유전자의 메틸화 빈도를 검토하고, 갑상선암 진행 가능성을 가지는 조직의 메틸화 빈도를 정하는 것에 의하여 조직의 갑상선암으로의 발전 가능성을 평가할 수 있다.
- [0074] **메틸화 조절 바이오 마커의 스크리닝**
- [0075] 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.
- [0076] 본 발명의 일 실시예에서는 갑상선암 환자의 암조직과 이와 연결한 정상조직으로부터 게놈 DNA를 분리하였다. 게놈 DNA로부터 메틸화된 DNA만을 획득하기 위하여, 상기 게놈 DNA를 메틸화된 DNA에 결합하는 MBD2bt와 반응시킨 후, MBD2bt 단백질에 결합하는 메틸화된 DNA를 분리하였다. 상기 분리된 MBD2bt 단백질에 결합하는 메틸화된 DNA를 증폭한 후, 정상인 유래 DNA는 Cy3으로, 갑상선암 환자 유래 DNA는 Cy5로 표지한 다음, human CpG 마이크로어레이에 하이브리다이제이션시켜 정상조직과 갑상선암 조직간 메틸화 정도의 차이가 가장 큰 5개의 유전자를 바이오 마커 후보로 선택하였다.
- [0077] 본 발명에서는 상기 5개의 바이오 마커 후보가 메틸화되었는지 추가로 확인하기 위하여, 파이로시퀀싱을 수행하였다.
- [0078] 즉, 갑상선암 세포주 B-CPAP, K1, TPC-1, 8505C, SW-1736 및 HTH74로부터 전체 게놈 DNA를 분리하여 바이설파이트를 처리한 후, 바이설파이트로 전환된 게놈 DNA를 증폭하였다. 이후, 상기 증폭된 PCR 산물을 파이로시퀀싱

을 수행하여 메틸화 정도를 측정하였다. 그 결과, *POU4F1* 바이오 마커 유전자가 메틸화되어 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[0079]

갑상선암에 대한 바이오 마커

[0080]

본 발명에서는 갑상선암 진단을 위한 바이오 마커를 제공한다.

[0081]

갑상선암에 대한 바이오 마커-정상세포와의 비교를 위한 암세포의 용도

[0082]

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.

[0083]

본 발명은 일 관점에서, 갑상선암과 갑상선암 바이오마커 유전자의 하이퍼메틸화 사이의 관련성 발견에 기반을 둔 것이다.

[0084]

본 발명의 진단용 키트 및 핵산 칩의 다른 용도로, 검체에서 분리된 하나 이상의 핵산의 메틸화 단계를 결정하여 검체의 갑상선 조직의 세포 성장성 이상을 조기 진단할 수 있다. 상기 하나 이상의 핵산의 메틸화 단계는 갑상선 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.

[0085]

본 발명의 진단용 키트 및 핵산 칩의 다른 용도로, 검체로부터 분리된 갑상선암 바이오마커 유전자의 메틸화를 결정하는 것을 포함하는 개체의 갑상선 조직에서 세포 성장성 이상 소양을 진단할 수 있다.

[0086]

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.

[0087]

본 발명은 다른 관점에서, 검체의 핵산을 포함하는 시료를 시료의 메틸화 상태를 결정할 수 있는 제제와 접촉시키고, 핵산의 메틸화를 확인하는 것을 포함하는 개체의 갑상선 조직의 세포 성장성 이상을 진단하는 방법을 제공한다.

[0088]

본 발명의 방법은 검체로부터 분리된 하나 이상의 핵산의 하나 이상의 부위의 메틸화를 결정하는 단계를 포함한다. 여기서, "핵산" 또는 "핵산 서열"이란 올리고뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드, 폴리뉴클레오타이드를 의미하거나 이들의 단편, 단일가닥 또는 이중가닥의 게놈 기원 또는 합성 기원의 DNA 또는 RNA, 센스 또는 안티센스 가닥의 게놈 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, 테옥시뉴클레오타이드 A, G, C 및 T를 대신하여, 각각 리보뉴클레오타이드 A, G, C 및 U로 대체된다는 것은 당해 분야 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명하다.

[0089]

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

[0090]

메틸화(methylation)

[0091]

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 디뉴클레오타이드 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 게놈의 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 게놈에는 약 45,000개의 CpG 섬이 존재한다.

[0092]

여러 유전자에서, CpG 섬은 프로모터의 업스트림(upstream)에서 시작하여, 다운스트림의 전사 부위까지 확장된다. 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 들

면, 인헨서 부위 및 인트론을 포함하는 여러 부위에서 발견된다.

[0093] 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.

[0094] 핵산 혼합물 또한 사용할 수 있다. 검출될 특이적인 핵산 서열은 큰 분자의 분획일 수 있고, 처음부터 특이 서열이 전체 핵산 서열을 구성하는 분리된 분자 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 검출하는 데 사용되는 시료에 포함된 핵산은 Sambrook 등(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY., 1989)에 기재된 여러 가지 방법으로 추출될 수 있다.

[0095] 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-의존성 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 진행된다. 그러므로, 세포 전환의 초기 단계는 프로모터 부위의 외곽에서의 메틸화를 분석함으로써 검출할 수 있다.

[0096] 검체로부터 분리된 핵산은 개체의 생물학적 시료에 의하여 얻어진다. 갑상선암이나 갑상선암의 진행 단계를 진단하고 싶다면, 스크랩이나 생검으로 갑상선 조직에서 핵산을 분리하여야 한다. 이러한 시료는 당해 분야에서 알려진 여러 의학적 과정에 의하여 얻어질 수 있다.

[0097] 본 발명의 한 양태에서, 검체로부터 얻어진 샘플의 핵산의 메틸화 정도는 갑상선 조직의 세포 성장성 이상이 없는 검체의 동일한 핵산 부분과 비교하여 측정한다. 하이퍼메틸화는 하나 이상의 핵산에서 메틸화된 대립유전자가 존재하는 것을 말한다. 갑상선 조직의 세포 성장성 이상이 없는 검체는 동일한 핵산을 검사했을 때, 메틸화 대립유전자가 나타나지 않는다.

[0098] 샘플(sample)

[0099] 본 발명은 갑상선암의 조기 확인에 대하여 기술하고 있으며, 갑상선암 특이적 유전자 메틸화를 이용하고 있다. 갑상선암 특이적 유전자의 메틸화는 종양 부위의 부근 조직에서도 일어났다. 그러므로, 갑상선암의 조기 확인 방법은 액체 또는 고체 조직을 포함하는 모든 샘플로 갑상선암-특이적 유전자의 메틸화의 유무를 확인할 수 있다. 상기 샘플은 세포, 조직, 생검, 파라핀조직, 혈액, 혈청, 혈장, 미세침 흡인검체, 소변 및 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0100] 메틸화 검출 방법

[0101] 메틸화 특이 PCR (methylation specific PCR)

[0102] 지노믹 DNA에 바이설파이트를 처리하면 5'-CpG-3' 부위의 시토신이 메틸화된 경우에는 그대로 시토신으로 남아 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.

[0103] 실시간 메틸화 특이 PCR (real time methylation specific PCR)

[0104] 실시간 메틸화 특이 PCR은 메틸화 특이 PCR 방법을 실시간 측정방법으로 전환한 것으로, 지노믹 DNA에 바이설파

이트를 처리한 후, 메틸화된 경우에 해당하는 PCR 프라이머를 디자인하고, 이들 프라이머를 이용하여 실시간 PCR을 수행하는 것이다. 이때, 증폭된 염기서열과 상보적인 핵산프로브 (e.g., TaqMan 등)를 이용하여 검출하는 방법과 형광염료 (e.g., Sybergreen, Evagreen 등)를 이용하여 검출하는 두 가지 방법이 있다. 따라서, 실시간 메틸화 특이 PCR은 메틸화된 DNA만을 선택적으로 정량 분석할 수 있다. 이때, in vitro 메틸화 DNA 샘플을 이용하여 표준곡선을 작성하고, 표준화를 위하여 염기서열내에 5'-CpG-3' 서열이 없는 유전자를 음성대조군으로 함께 증폭하여 메틸화 정도를 정량 분석하였다.

[0105]

파이로시퀀싱

[0106]

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

[0107]

메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR 또는 정량 PCR 및 DNA 칩

[0108]

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, 아가로스 전기영동으로 메틸화 여부를 측정하였다.

[0109]

또한, 정량 PCR 방법으로도 메틸화 여부를 측정할 수 있으며, 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질로 분리한 메틸화 DNA는 형광 염료로 표지하여 상보적인 프로브가 집적된 DNA칩에 하이브리다이제이션시킴으로써 메틸화 여부를 측정할 수 있다. 여기서 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질은 MBD2bt에 제한되지 않는다.

[0110]

차별적 메틸화의 검출-메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제

[0111]

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

[0112]

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

[0113]

특이적 프라이머를 핵산 샘플에 첨가하고, 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.

[0114]

여기서, "메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제"는 인식 부위에 CG를 포함하고, C가 메틸화되지 않았을 때와 비교하여 C가 메틸화되었을 때 활성을 가지는 제한효소이다 (예를 들면, SmaI). 메틸레이션 민감성 제한 엔도뉴클레아제의 비제한적 예로써, *MspI*, *HpaII*, *BssHII*, *BstUI* 및 *NotI*이 포함된다. 상기 효소들은 단독으로 또는 조합하여 사용될 수 있다. 다른 메틸레이션 민감성 제한 엔도뉴클레오티드로는 예를 들어, *SacII* 및 *EagI*를 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0115]

메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제의 이소키소머는 메틸레이션 민감성 제한 엔도뉴클레아제와 동일한 인식 부위를 갖는 제한 엔도뉴클레아제이지만, 메틸화된 CGs와 비메틸화된 CGs를 모두 절단하며, 예를 들면, *MspI*를 들 수 있다.

[0116]

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.

[0117] 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.

[0118] **차별적 메틸화의 검출-바이설파이트 시퀀싱 방법**

[0119] 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. 상기과 같은 방법은 미국특허 5,786,146에 개시되어 있으며, 상기 특허에는 메틸화 핵산의 검출을 위한 바이설파이트(bisulfite) 시퀀싱과 관련하여 기재되어 있다.

[0120] **바이설파이트 시퀀싱 방법**

[0121] 메틸화 CpG를 함유한 핵산을 검출하는 다른 방법은 핵산을 함유한 시료를 비메틸화 시토신을 변형시키는 제제와 접촉시키는 단계 및 메틸화-비의존적(Methylation independent) 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 시료의 CpG-함유 핵산을 증폭시키는 단계를 포함한다. 여기서, 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머는 변형된 메틸화 및 비메틸화 핵산을 구별하지 않고 핵산을 증폭하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 증폭된 산물을 시퀀싱 프라이머를 이용하여 Sanger 방법으로 시퀀싱하거나 차세대 시퀀싱(next generation sequencing) 방법으로 메틸화 핵산의 검출을 위한 바이설파이트(bisulfite) 시퀀싱과 관련하여 기재되어 있다.

[0122] 여기서 차세대 시퀀싱 방법은 시퀀싱 바이 신세스시(Sequencing by synthesis)와 시퀀싱 바이 라이게이션(Sequencing by ligation) 방법으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다. 이 방법의 특징은 bacterial clone을 만드는 대신 단일 DNA 단편을 공간적으로 분리하여 in situ로 증폭하고(clonal amplification), 시퀀싱을 해낸다는 것이다. 이때, 수십 만개의 단편을 동시에 읽어내기 때문에 매시브 패러럴 시퀀싱(massively parallel sequencing) 방법으로 불리기도 한다.

[0123] 기본적으로는 시퀀싱 바이 신세스시(sequencing by synthesis) 방법이며, 모노 혹은 디뉴클레오티드를 순차적으로 붙여가면서 시그널을 얻는 방법을 사용하는데 파이로시퀀싱, ion torrent, Solexa 방법들이 여기에 해당한다.

[0124] 시퀀싱 바이 신세스시에 기반하는 NGS 장비로는 로슈(Roche)사의 454 플랫폼, 일루미나(Illumina)사의 HiSeq 플랫폼, 라이프테크놀로지(Life Technology)사의 Ion PGM 플랫폼, 마지막으로 퍼시픽바이오사이언스(Pacific BioSciences)상의 PacBio 플랫폼이 있다. 454와 Ion PGM은 클로날증폭(clonal amplification)방법으로 emulsion PCR을 사용하며, HiSeq은 브릿지 증폭(Bridge amplification)을 사용한다. 시퀀싱 바이 신세스시 방법은 한 개의 뉴클레오티드를 순차적으로 붙여가며 DNA를 합성시켜 나갈 때 발생하는 인산(phosphate), 수소이온, 혹은 미리 붙여 놓은 형광을 검출하여 서열을 읽어 나간다. 서열을 검출하는 방법에 있어, 454는 인산을 이용하는 파이로시퀀싱(pyrosequencing) 방법을 사용하며, Ion PGM은 수소이온 검출을 이용한다. HiSeq과 PacBio는 형광을 검출하여 서열을 해독한다.

- [0125] 시퀀싱 바이 라이게이션(Sequencing by ligation)은 DNA ligase를 이용하는 시퀀싱 기술로 DNA 염기서열에 존재하는 특정위치의 뉴클레오티드를 확인하는 기술이다. 대부분의 시퀀싱 기술이 중합효소를 사용하는 것과 달리 중합효소를 사용하지 않으며 DNA ligase가 미스매치 서열을 ligation하지 않는 특징을 이용한다. SOLiD 시스템이 여기에 해당한다. 이 기법에서는 간격을 두면서 두 개씩 염기를 읽는데, 프라이머 리셋(primer reset)을 통해 독립적으로 다섯 번을 반복하기 때문에, 최종적으로는 각 염기를 두 번씩 중복하여 읽어서 정확도를 높인다.
- [0126] 시퀀싱 바이 라이게이션 (Sequencing by ligation)의 경우, 16개 조합으로 만들어진 디뉴클레오티드 프라이머 세트 중, 해당 염기서열에 대응되는 디뉴클레오티드 프라이머가 순차적으로 라이게이션되며, 이 라이게이션들의 조합을 최종적으로 분석하여 해당 DNA의 염기서열이 완성된다.
- [0127] **메틸화 DNA 특이적 결합 단백질 또는 항체를 이용한 시퀀싱, 시퀀싱 바이 신세스 또는 시퀀싱 바이 라이게이션**
- [0128] 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질 또는 항체를 이용한 시퀀싱 또는 차세대 시퀀싱 방법은 메틸화 DNA에만 특이적으로 결합하는 단백질 또는 항체를 DNA와 섞어주게 되면, 메틸화 DNA에만 특이적으로 단백질 또는 항체가 결합하기 때문에 메틸화 DNA만을 선택적으로 분리할 수 있다. 지놈 DNA를 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질과 섞어준 후, 메틸화된 DNA만을 선택적으로 분리하였다. 이들 분리된 DNA를 PCR 프라이머를 이용하여 증폭한 후, Sanger 방법, 시퀀싱 바이 신세스 또는 시퀀싱 바이 라이게이션 방법으로 메틸화 여부를 측정하였다.
- [0129] 여기서 차세대 시퀀싱 방법은 Sequencing by synthesis 또는 Sequencing by ligation 방법으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다. 여기서 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질은 MBD2bt에 제한되지 않으며, 항체는 5'-methyl-cytosine 항체에 제한되지 않는다.
- [0130] **키트 (Kit)**
- [0131] 본 발명에 의하면, 검체의 세포 성장성 이상을 검출하는 데 유용한 키트를 제공하고 있다. 본 발명의 키트는 샘플을 담은 구획된 캐리어 수단, 샘플의 5'-CpG-3' 염기서열 부위를 증폭할 수 있는 프라이머를 함유하는 두 번째 용기 및 메틸화 CpG 함유 핵산을 증폭하기 위한 절단된 또는 절단되지 않은 핵산의 존재를 검출하는 수단이 함유된 세번째 용기를 포함하는 하나 이상의 용기를 포함한다. 하나의 실시예에서, 상기 프라이머는 게놈상에서 메틸화가 일어났는지의 여부를 검출하기 위한 PCR, 메틸화 특이 PCR (methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR (real time methylation specific PCR), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 메틸화 DNA 특이적 결합 항체 또는 압타머를 이용한 PCR, 정량 PCR, 핵산 칩, 시퀀싱, 시퀀싱 바이 신세스 또는 시퀀싱 바이 라이게이션에 사용하기 위한 프라이머일 수 있다.
- [0132] 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 재제를 손쉽게 분배할 수 있다.
- [0133] **기질**
- [0134] 타겟 핵산 부위가 증폭되면 핵산 서열의 존재를 검출하기 위하여, 상기 핵산 증폭 산물은 고체 지지체(기질)에 고정된 알려진 유전자 프로브와 하이브리다이제이션될 수 있다.
- [0135] 여기서, "기질"은 물질, 구조, 표면 또는 재료, 비생물학적이고, 합성되고, 무생물, 평면, 구형 또는 특이적 결합, 평평한 표면의 물질을 포함하는 혼합물 수단으로, 하이브리다이제이션 또는 효소 인식 부위 또는 대다수의 다른 인식 부위 또는 표면, 구조 또는 재료로 구성된 수많은 다른 분자 중을 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, 리소그래프되며, 프린트되고 마이크로패브리케이션된 슬라이드, 장치, 구조 및 표면; 산업적, 폴리머, 플라스틱, 멤브레인, 실리콘, 실리콘이트, 유리, 금속 및 세라믹; 나무, 종이, 카드보드, 면, 울, 천, 직조 및 비직조 섬유, 재료 및 패브릭일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0136] 몇몇 형태의 멤브레인은 당해 분야에서 핵산 서열에 대하여 부착력을 가진다고 알려져 있다. 이러한 멤브레인의

특이적이고 비제한적인 예로 니트로셀룰로오스 또는 폴리비닐클로라이드, 디아조티즈드(diazotized) 페이퍼 및 GENESCREEN™, ZETAPROBETM(Biorad) 및 NYTRAN™ 등의 상업적으로 사용되는 멤브레인과 같이 유전자 발현 검출용 멤브레인을 들 수 있다. 비드, 글래스, 웨이퍼 및 금속 기질도 포함된다. 이러한 목적물에 핵산을 부착시키는 방법은 당해 분야에서 잘 알려져 있다. 이와 다르게, 액체 상에서도 스크리닝을 수행할 수 있다.

[0137] 하이브리다이제이션 조건

핵산 하이브리다이제이션 반응에서, 엄격한 특정 수준을 달성하기 위하여 사용되는 조건은 하이브리다이제이션되는 핵산의 성질에 따라 다양하다. 예를 들면, 하이브리다이제이션되는 핵산 부위의 길이, 상동성 정도, 뉴클레오타이드 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.

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℃에서의 0.2X SSC/0.1% SDS(보통의 엄격성을 가지는 조건); 68℃에서 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.

[0140] 표지(Label)

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

[0142] [실시예]

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 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0144] 실시예 1: 갑상선암 특이적 메틸화 유전자 발굴

갑상선암에서 특이적으로 메틸화된 바이오 마커를 선별하기 위하여, 갑상선암환자 12명의 수술조직 (충남대병원 인체자원은행)으로부터 얻은 암 조직 및 이와 연결하는 정상조직 조직 게놈 DNA 그리고 11명의 갑상선 암환자의 수술조직 (충남대병원 인체자원은행) 게놈 DNA 500ng을 초음파 분쇄(Vibra Cell, SONICS)하여, 약 200~300bp의 게놈 DNA 절편을 제작하였다.

게놈 DNA로부터 메틸화된 DNA만을 획득하기 위하여, 메틸화 DNA에 결합한다고 알려진 메틸바인딩 도메인(Methyl binding domain; MBD2b) (Moon *et al.*, American Biotechnology Laboratory, 27(10): 23-25, 2009)을 사용하였다. 즉, 6X His가 tagging된 MBD2b 2μg를 게놈 DNA 500ng과 pre-incubation시킨 다음, Ni-NTA 마그네틱 비드 (Qiagen, USA)에 결합시켰다. 여기에 상기 초음파 분쇄된 정상인 및 갑상선암 환자 조직세포에서 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℃, 20 분간 반응시킨 후, 700mM NaCl이 포함된 결합 반응 용액 500μl를 이용하여 3회 세척한 다음, MBD2b에 결합된 메틸화된 DNA를 QiaQuick PCR purification kit(QIAGEN, USA)을 사용하여 분리하였다.

이후, 상기 MBD2b에 결합된 메틸화된 DNA를 게놈 증폭 키트(Sigma, USA, Cat. No. WGA2)를 이용하여 증폭한 후, 상기 증폭된 게놈 DNA 4μg를 BioPrime Total Genomic Labeling system I(Invitrogen Corp., USA)을 이용하여 Cy5로 표지하였다. 정상인과 갑상선암 환자간의 메틸화 정도를 간접적으로 비교하기 위하여 표준비교 DNA를 제작하였다. 표준비교 DNA는 메틸화 분석을 위해 사용한 12명의 갑상선암 환자의 암과 연결한 정상 조직의 게놈 DNA를 동량으로 혼합하고 이를 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 Cy3로 표지하였다. 상기 표준비교 DNA 및 정상인과 갑상선암 환자의 DNA 각각을 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 갑상선암 환자 시료 간 시그널의 상대적인 강도 차이를 계산하였다.

[0148] 신뢰할 만한 하이브리다이제이션 시스날을 갖는 프로브들을 선별하기 위하여 GeneSpring 7.3 프로그램 (미국 Agilent 사)을 이용하여 cross gene error model을 적용하여 Cy3 시그널이 총 10개의 array중 최소 8개 array 이상에서 397.0 이상인 64,639개의 프로브들을 신뢰할 만한 시그널을 갖는 프로브들로 선별하였다. 이로부터 갑상선 정상조직에서 비메틸화된 프로브들을 선별하기 위하여 2개의 정상조직 array 전부에서 Cy5 시그널이 1,200 이하인 17,210개 프로브들을 선별하였다. 갑상선암에 특이적으로 과메틸화 되어 있는 프로브들을 선별하기 위하여 상기 17,210개 프로브로부터 총 8개의 갑상선암 조직 array중에서 최소 6개 이상에서 2.0배 이상 과메틸화된 프로브들을 512개 선별하였다. 이중 약 400 bp 이내에 존재하는 2개 이상의 연결한 프로브에서 과메틸화를 동시에 나타내는 5개의 바이오마커 유전자 후보 (*BAPX1*, *PCBP1*, *POU4F1*, *SHQ1*, *TMED1*)를 발굴하였다 (도 2).

[0149] 상기 방법으로 분석한 바이오마커 후보 유전자들의 유전자들의 각 프로브에 해당하는 부위의 염기서열에 대해서 MethPrimer (<http://itsa.ucsf.edu/~urolab/methprimer/index1.html>)을 이용하여 CpG islands가 존재하는 것을 확인하였다.

[0150] [표 1] 갑상선암 진단용 메틸화 바이오 마커 후보유전자 목록

후보유전자	프로브 위치 ^a	GenBank No.	Description
<i>BAPX1</i>	+804, +920, +996	AF009802.1	bagpipe homeobox homolog 1 (Drosophila)
<i>PCBP1</i>	+581, +675, +755, +994	NM_006196.3	poly(rC) binding protein 1
<i>POU4F1</i>	+560, +681	NM_006237.3	POU class 4 homeobox 1
<i>SHQ1</i>	+400, +473, +562	NM_018130.2	SHQ1 homolog (S. cerevisiae); synonyms: FLJ10539
<i>TMED1</i>	-233, -166, -69	NM_006858.3	Transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast)

[0151]

[0152] ^a. 전사개시부위 (+1)로부터의 염기서열 거리 (bp)

[0153] **실시예 2: 암 세포주에서의 바이오마커 유전자의 메틸화 측정**

[0154] 실시예 1에서 선별된 바이오마커 후보 유전자의 메틸화 상태를 확인하기 위하여, 갑상선암 세포주를 대상으로 파이로시퀀싱을 수행하였다.

[0155] 바이설파이트(bisulfite)를 이용하여 메틸화되지 않은 시토신을 우라실로 변형하기 위하여, 충남대병원 이비인후과 연구실로부터 제공받은 갑상선암 세포주 B-CPAP, K1, TPC-1, 8505C, SW-1736 및 HTH74으로부터 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. 바이설파이트가 처리된 DNA를 멸균 증류수 20 μ l로 용출시켜 파이로시퀀싱(pyrosequencing)을 수행하였다.

[0156] 상기 5개의 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.

[0157] [표 2] PCR 프라이머

유전자	프라이머	서열 (5'→3')	서열 번호	앰플리콘 크기 (bp)
<i>BAPX1</i>	forward	AGGGGTTTGATTTTAAGTTT	1	127
	reverse	biotin-ACTACTCTCTCCACCTTACATTCTCC	2	
<i>PCBP1</i>	forward	TGAAGTTTTGGTAGGTAGTTTTTGAATAA	3	113
	reverse	biotin-CCCACCTCCTACCCTTATAT	4	
<i>POU4F1</i>	forward	GGGTTTAGGTGTTAGAGGAGTGTA	5	121
	reverse	Biotin-TACTACTACCAAACCCTCCCTC	6	
<i>SHQ1</i>	forward	GTTTTAGAGGGAGAATGTAAGGT	7	112
	reverse	Biotin-ACCCCTAAAAAAAACAATTCCC	8	
<i>TMED1</i>	forward	GGTATTTTTGGTTAAGGATAATATATAGA	9	123
	reverse	Biotin-ATCCCAATCACCTCTAATCTAC	10	

[0158]

[0159] [표 3] 메틸화 마커 유전자의 시퀀싱 프라이머 서열

유전자	서열 (5' → 3')	서열번호
<i>BAPX1</i>	TTTAAGTTTTAAGTTAAGTTATATT	11
<i>PCBP1</i>	AGGAGTATATTATTGTTTTTAATG	12
<i>POU4F1</i>	GGGGTTAGAGTTGTAGGAGA	13
<i>SHQ1</i>	GTAAGGTAGAGAGAGTAGTG	14
<i>TMED1</i>	ATAGAAAGTTATTGTTAATGAGTTT	15

[0160]

[0161] 바이셀파이트로 전환된 게놈 DNA 20ng을 PCR로 증폭하였다. PCR 반응 용액(바이셀파이트로 전환된 게놈 DNA 20ng, 10X PCR buffer(Enzynomics, Korea) 5 μ l, Taq polymerase(Enzynomics, Korea) 5units, 2.5mM dNTP(Solgent, Korea) 4 μ l, PCR 프라이머 2 μ l(10 pmole/ μ l))을 95℃에서 5분 동안 처리한 후, 95℃에서 40초, 적정 어닐링 온도에서 45초, 72℃에서 40초로 총 45회 실시한 다음, 72℃에서 5분 동안 반응시켰다. 상기 PCR 산물의 증폭 여부는 2.0% 아가로오스젤을 사용한 전기영동으로 확인하였다.

[0162] 상기 증폭된 PCR 산물에 PyroGold Q96 시약 (Qiagen, Germany)을 처리한 후, PyroMark Q96 ID 시스템(Qiagen, Germany)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.

[0163] 상기 바이오마커 후보 유전자의 갑상선암 세포주에서의 메틸화 정도를 파이로시퀀싱 방법을 이용하여 정량적으로 측정한 결과, 도 3에서 나타난 바와 같이, 상기 5개의 바이오 마커 후보 유전자중 *POU4F1* 유전자만이 6개의 세포주 전부에서 높은 수준으로 과메틸화되어 있는 것을 확인하였다. 나머지 4개 유전자는 갑상선암 세포주에서 메틸화가 되어 있지 않은 것으로 확인되어 바이오마커 후보에서 제외시켰다. 이에 다음과 같이, 이를 검증하기 위하여 조직시료를 이용한 메틸화 검증 실험을 추가로 진행하였다.

[0164] **실시예 3: 갑상선 조직에서의 바이오마커 후보유전자의 메틸화 측정**

[0165] 실시예 2의 *POU4F1* 바이오마커 후보유전자가 갑상선암 진단용 마커로서의 유용성을 가지려면, 갑상선 정상조직에서는 비메틸화 또는 낮은 메틸화 수준을 나타내어야 하고, 반면에 갑상선암 조직에서는 정상조직에 비하여 높은 메틸화 수준을 나타내어야 한다.

[0166] 따라서, 이를 검증하기 위하여, 1차적으로 바이오마커 발굴실험에 사용하였던 갑상선 정상조직 (n = 11)과 갑상선암 조직 (n = 27)으로부터 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. 게놈 DNA로부터 분리된 *POU4F1* 정상 서열은 서열번호 16에 나타내었고, 바이설파이트로 전환된 *POU4F1* 서열은 서열번호 17에 나타내었다.

[0167] 상기 바이설파이트로 전환된 게놈 DNA 20ng을 PCR로 증폭하였다. PCR 반응 용액(바이설파이트로 전환된 게놈 DNA 20ng, 10X PCR buffer 5 μ l(Enzymomics, Korea), Taq polymerase 5 units(Enzymomics, Korea), 2.5mM dNTP 4 μ l(Solgent, Korea), PCR 프라이머 2 μ l(10pmole/ μ l))을 95℃에서 5분 동안 처리한 후, 95℃에서 40초, 60℃에서 45초, 72℃에서 40초로 총 45회 실시한 다음, 72℃에서 5분 동안 반응시켰다. 상기 PCR 산물의 증폭 여부는 2.0% 아가로오스젤을 사용한 전기영동으로 확인하였다.

[0168] 상기 증폭된 PCR 산물에 PyroGold Q96 시약(Qiagen, Germany)을 처리한 후, PyroMark Q96 ID 시스템(Qiagen, Germany)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.

[0169] 그 결과, 도 4a에 나타난 바와 같이, *POU4F1* 유전자는 정상조직에 비하여 갑상선암 조직에서 매우 높은 수준 및 빈도로 과메틸화되어 있는 것을 확인하였다 (P = 0.0003, Mann-Whitney test). 이는 바이오마커 발굴을 위해 실험한 CpG microarray 실험과 일치하는 결과를 나타내 주는 것으로, *POU4F1* 유전자가 갑상선암 바이오마커로서의 유용성이 있을 가능성을 보여주는 결과이다.

[0170] **실시예 4: 독립적 갑상선암환자 조직에서의 바이오 마커 유전자의 메틸화 측정**

[0171] *POU4F1* 유전자의 갑상선암 진단용 바이오마커로서의 유용성을 보다 심도있게 평가하기 위하여 독립적인 갑상선 조직을 대상으로 메틸화 재검증을 진행하였다. 이를 위하여 59예의 갑상선암 조직 (충남대병원 인체자원은행)과 60예의 암과 연접한 정상조직 (충남대병원 인체자원은행)을 대상으로 실시예 3과 동일한 방법으로 메틸화 검증 실험을 진행하였다.

[0172] 독립적인 갑상선 조직시료를 대상으로 *POU4F1* 유전자의 메틸화 정도를 측정한 결과, 도 4b에 나타난 바와 같이, 정상 갑상선 조직에 비하여 갑상선암 조직에서 매우 높은 수준 (P < 0.0001, Mann-Whitney test) 및 빈도로 과메틸화되어 있는 것을 확인하였다.

[0173] **실시예 5: *POU4F1* 바이오마커 유전자의 갑상선암 진단능력 평가**

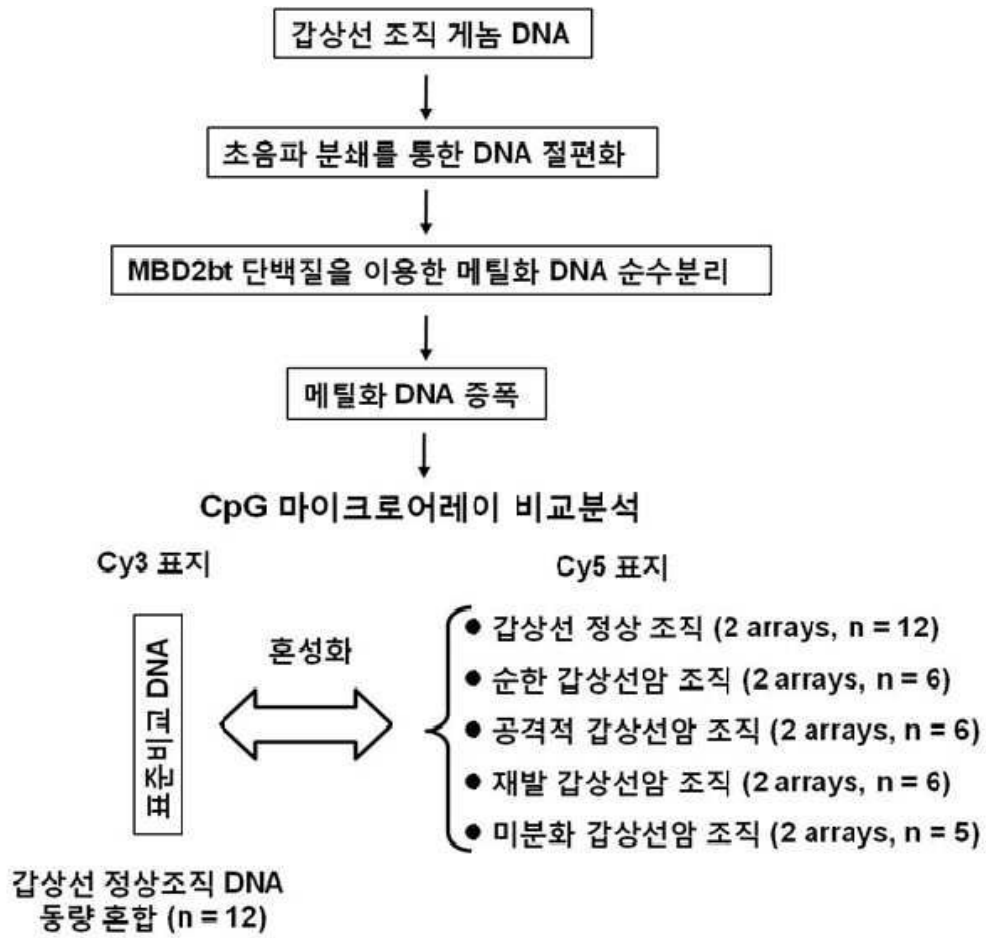
[0174] 실시예 3 및 4에서 갑상선암 마커로서의 유용성을 확인한 *POU4F1* 유전자에 대하여, 추가적으로 갑상선암 진단에 대한 능력을 평가하기 위하여 MedCalc 프로그램 (MEDCALC, 벨기에)을 이용한 ROC 커브 (Receiver Operating Characteristic) 분석을 수행하였다.

[0175] 그 결과, 도 4c에 나타난 바와 같이, *POU4F1* 유전자는 민감도 및 특이도가 각각 58.1% 그리고 81.7%를 나타내어 갑상선암 진단에 대한 능력이 매우 우수함을 확인할 수 있었다.

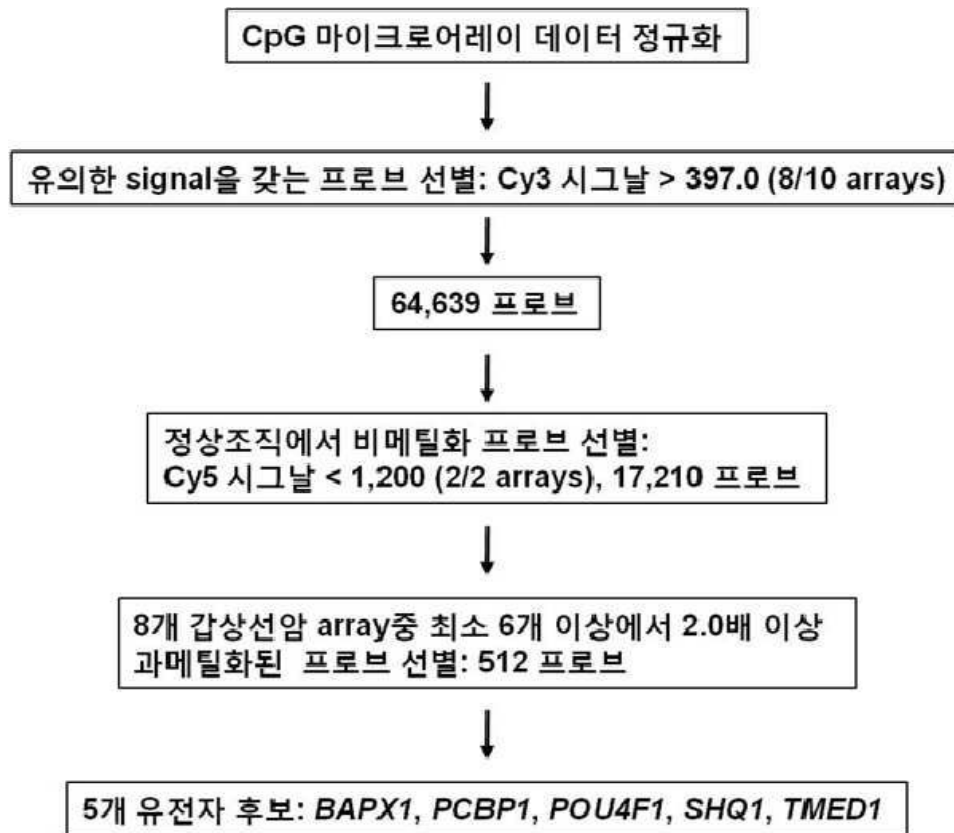
[0176] 이상으로 본 발명의 내용을 상세히 기술하였는바, 당 업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

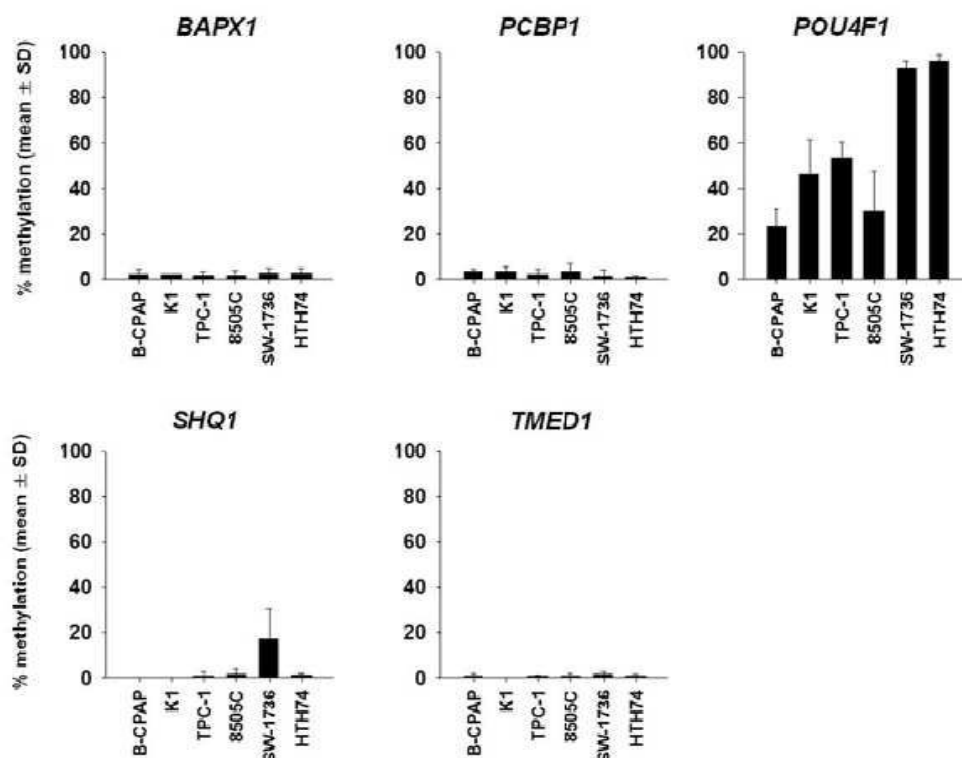
도면1



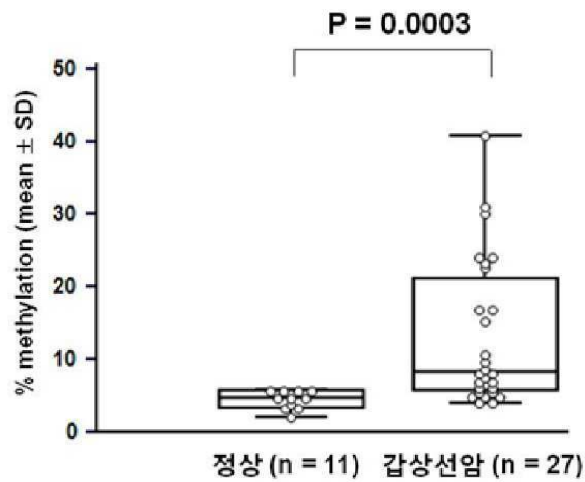
도면2



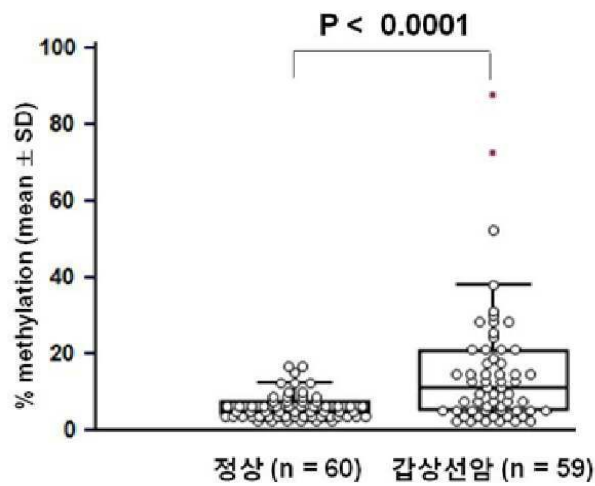
도면3



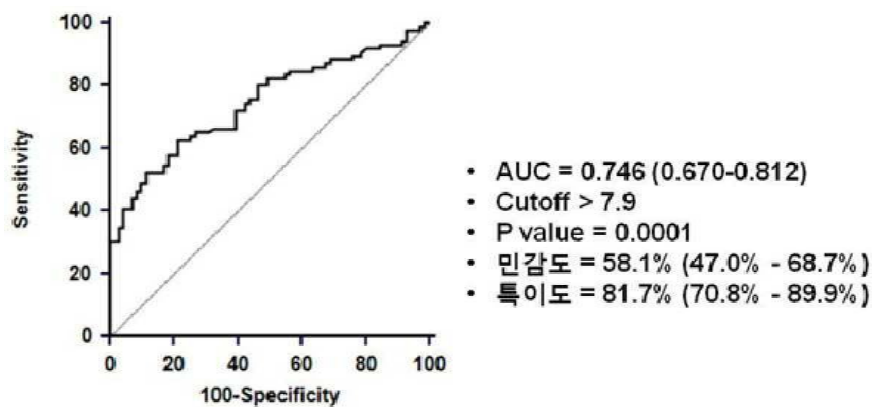
도면4a



도면4b



도면4c



서열 목록

<110>	Genomictree, Inc.	
<120>	Method for Detecting Methylation of Thyroid Cancer Specific Methylation Marker Gene for Thyroid Cancer Diagnosis	
<130>	034	
<160>	17	
<170>	KopatentIn 2.0	
<210>	1	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	BAPX1 Primer	
<400>	1	
	aggggtttga ttttaagttt	20
<210>	2	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	BAPX1 Primer	
<400>	2	
	actactctct ccaccttaca ttctcc	26
<210>	3	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCBP1 Primer	
<400>	3	
	tgaagttttg gtaggtagtt tttgaataa	29
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCBP1 Primer	
<400>	4	

cccacctcct acccttatat	20
<210> 5	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> POU4F1 Primer	
<400> 5	
gggttttaggt gtttagaggag tgta	24
<210> 6	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> POU4F1 Primer	
<400> 6	
tactactacc aaaccctccc tc	22
<210> 7	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SHQ1 Primer	
<400> 7	
gttttagagg gagaatgtaa ggt	23
<210> 8	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SHQ1 Primer	
<400> 8	
accctaataa aaaaacaatt ccc	23
<210> 9	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	TMED1 Primer	
<400>	9	
	ggtatTTTTg gTTaaggata atatataga	29
<210>	10	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TMED1 Primer	
<400>	10	
	atcccaatca cccTctaac tac	23
<210>	11	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Sequencing primer for BAPX1	
<400>	11	
	tTTaagTTTT aagTTaagTT atatt	25
<210>	12	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Sequencing primer for PCBP1	
<400>	12	
	aggagtatat tattgtTTTT aatg	24
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Sequencing primer for POU4F1	
<400>	13	
	ggggTTaagag ttgtaggaga	20
<210>	14	
<211>	20	

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Sequencing primer for SHQ1	
<400>	14	
	gtaaggtaga gagagtagtg	20
<210>	15	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Sequencing primer for TMED1	
<400>	15	
	atagaagtta ttgttaatga gttt	24
<210>	16	
<211>	3000	
<212>	DNA	
<213>	Unknown	
<220><223>	Confirmed from thyroid cancer patient	
<400>	16	
	gtgtgtgtgt acgctgaggg gaggaaggat cccaactaca ccctgttaac tgttttttcc	60
	ttttgattac tagaagcctt agatcacccg gagctcgttt gaaacgtggg tttgtacacg	120
	gttgaaggag acaacaata agagaaatgc acaatttcat ttcaacagct tttcccagat	180
	agaaagcaca cgctccttgt ggctcctaag tggctgtcac tggcgggtgcc tgacacagtt	240
	atattcaca caacaacaaa aaagtatgcg gaggaatta aattatatgg aaatcaatag	300
	cgtctgactg cttcaacaa atgtctgtca ccgcgattat tctccaggaa cctatttata	360
	aaccttttaa gaaacaggtt cttgcagcaa aagacagcac cttctgcatt tctgtgttgt	420
	tatttatact gtatacagag gaatgcgcgg gcataattta acgtagaaat gtccagctgt	480
	atacattata caacagcttg ttaggcattcc cgaagaggag gaatgcctaa gtaatgctca	540
	tatattcaag gcttgctatc agggagaaga aacatacaca catacacaca cagcacgca	600
	cacacacaca cacacacaca catagagggg cgtgcgcgca tctcgtcttt ttatttctaa	660
	aaggtgcccc cccttagaca atagctggac cttctgatct ttccagacca cgggtgggaaa	720
	ggtagggcgg gcagtgcgca tgcccggtga gctacagggt catcacctgc gctgtccttg	780
	ctggtgggtca ctataagagc ggctcccacg cgctggctgc ggccggacga gcgcgcgcgc	840

gcgcagacgc acggggccgc cgagaaggag agcgcgcgtc agacagacgg agacagctga	900
tgcctgtcag cgcggtgggg ccgcgagctc tcgcgagagc tccccgggac ggccgcgaga	960
agtggggctc aggtgttaga ggagtgcac ccgtcggcgc gcggggctag agctgtcgga	1020
gaagcgggac cgcgaggccg gcgcgcggcg ctctgcgcgg tcagaggag cgcctggcag	1080
cagcaggagc agcagcagca gcccgcggcg ggccgcgcgc cagccgcgcg gaccgcgcg	1140
gctgcagcct ccgaaggag gccgggtgag ccggcgtacg cactttccg cggactttcg	1200
gagtgtttgt ggatatacat gccaagccgc cacgatgatg tccatgaaca gcaagcagcc	1260
tcactttgcc atgcatccca cctccctga gcacaagtac ccgtcgtgc actccagctc	1320
cgaggccatc cggcgggctt gcctgccac gccgccgta agcggccac gccgcggcc	1380
ccggcccgcg cggccgccc tcccgtctc cgaaacgtg catgtcggg gctggtgtgt	1440
gcaggtcccg gtgcggggaa ctgcgggcag ggggtgtaga gcagtccgc agcagggcac	1500
gtttgtccg gcggccctta atgtcgtgtt cctgtctgcc tctgcctccg cgtcaggcgc	1560
ctgcgatcgg agtagggagc gctggggcca ggactctcga cttccctcta ctttctctgt	1620
taatttcacg cctcagaaag gcagtctctg tgcgtgctcg ggtgtgtgac acgggtcccc	1680
agctgcgagt tacatttcca tttctcttt tccctcttt tegtctccca cgcccgttc	1740
cggaatgtgt tcttgttcc ccttttctc ctacttctgt cccctctcc acgtcccat	1800
cccttctctg ctgcccctc cctggctctc aatgtgccc ctctccgtct tcccgtct	1860
ccactgccc caaacccgtt gttattttgg ttgctttgtg tttgccctc gcagtctgtg	1920
ctttccggcc tgtgtgtgtg tttcttctgt tgtttgttt tgccttttg gttttgtgt	1980
ttttttggtt tggtttgtgt cgctgcagc tgcagagcaa cctcttcgcc agcctggacg	2040
agacgctgct ggccggggcc gaggcgctgg cgccgtgga catcgccgtg tcccaggga	2100
agagccatcc tttcaagccg gacgccagt accacacgat gaacagcgtg ccgtgcacgt	2160
ccacttcac ggtgcctctg gcgcaccacc accaccacca ccaccaccac caggcgctcg	2220
aaccggcgga tctgttgac cacatctct ccgcgtcgt cgcgtcatg gccggcgcg	2280
gcggcgcggg cgcggcgcc ggccggcgcg gcgcccacga cggccgggg ggcggtggcg	2340
gcccgggcgg cggcgccggc ccggcgcgcg gcccggggg aggcggcggg ggcgcccg	2400
ggggcgcgcg cggcgcccg ggccggcgcc tctggcgcg ctcgcgcac cctcacccgc	2460
atatgcacag cctggccac ctgtcgacc ccgcggcgcc ggccgccatg aacatgccgt	2520
ccggcgctgc gcacccggg ctggtggcg cgccggcgca ccacggcgcg gcagcggcag	2580
cggcgccggc ggccggcgcc caggtggcag cgccatcgcc ggccggcgcc gtggtggcg	2640
cagcgccct gggtccatc tgcgactcgg acacggacc gcgcgagctc gaggcgttcg	2700

cggagcgcctt caagcagcgg cgcattcaagc tgggcgtgac gcaggccgac gtgggctcgg 2760
cgctggccaa cctcaagatc ccgggcgtgg gctcactcag ccagagcacc atctgcaggt 2820

tcgagtcgct cacgtctcgc cacaacaaca tgatcgcgct caagcccatc ctgcaggcgt 2880
ggctcgagga ggccgagggc gcccgagcgc agaaaatgaa caagcctgag ctcttcaacg 2940
gcggcgagaa gaagcgcaag cggacttcca tcgccgcgcc cgagaagcgc tccctcaggg 3000
3000

<210> 17
<211> 3000
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> CpG region of modified POU4F1
<400> 17

gtgtgtgtgt aggttgaggg gaggaaggat ttttaattata ttttgtaaat tgtttttttt 60

ttttgattat tagaagtttt agattattgg gagttggttt gaaaggtggg tttgtatagg 120
gttgaaggag ataaataata agagaaatgt ataattttat ttttaatagtt tttttggagt 180
agaaagtata ggttttttgt ggtttttaag tggttgttat tgggggtggt tgatatagtt 240
atatattataa taataataaa aaagtatggg gaggaatta aattatatgg aaattaatag 300
ggtttgattg ttttaataaa atgtttgtta tggggattat ttttaggaa tttatttata 360
aatttttaa gaaataggtt tttgtagtaa aagatagtat ttttgtatt tttgtgtgt 420
tatttatatt gtatatagag gaatgggggg gtataattta aggtagaaat gtttagttgt 480

atatattata taatagtttg ttaggtatit ggaagaggag gaatgttta gtaatgttta 540
tataattaa gtttgttatt agggagaaga aatatatata tatatatata taggtaggta 600
tatatatata tatatatata tatagagggg ggtgggggta tttggttttt tttatttta 660
aaggtgttta ttttagata atagttggat ttttgattt ttttagatta ggtgggaaa 720
ggtgaggggg gtagtgggta tgttgggta gttatagtg tattatttgg gttgttttg 780
ttggtggta ttataagagg ggttttttag ggttgggtgg ggtgggagga gggggggggg 840
gggtagaggt agggggtggt ggagaaggag aggggggggt agatagaggg agatagttga 900

tgtttgttag gggggtgggg tggggagttt tggggagagt ttttggggag ggtggggaga 960
agtgggggtt aggtgttaga ggagtgtatt tgggtggggg ggggggttag agttgtggga 1020
gaaggggat ggggaggtgg gggggggggg ttttgggggg ttagaggag ggtttggtag 1080
tagtaggagt agtagtagta gttggggggg gggtggtggt tagtggtggg gatggtggg 1140

gtttagtatt tgggaaggag gtggggtgag tgggggtagg tattttttgg gggattttgg	1200
gagtgtttgt ggatataat gttaagtgt taggatgatg tttatgaata gtaagtagtt	1260
ttattttgtt atgtatttta tttttttga gtataagtat tgggtgttgt attttagttt	1320
ggaggttatt ggggggggtt gtttgttttag gtggtgggta agggtttttag gttgggggtt	1380
tgggttgggg ggttggtttt ttttggtttt ggaaagggtt tatgtggggg gttggttgtt	1440
gtaggtttgg gtggggggaa ttgggggttag ggggtgtaga gtagtttggg agggaggtag	1500
gttttgttgg ggggttttta atgtggtgtt tttgtttgtt tttgttttgg ggttaggggt	1560
ttgggatggg agtagggagg gttgggggta ggattttgga ttttttttta tttttttgt	1620
taattttagg ttttagaaag gtagtttttg tgggtgttgg ggtgtgtgat aggggttttt	1680
agttgggagt tataatttta tttttttttt tttttttttt tggtttttta ggttgggttt	1740
gggaatgtgt ttttgtttt tttttttttt ttatttttgt tttttttttt aggtttttat	1800
tttttttggg ttgttttttt tttggtggtt aatgtgtttt ttttgggtt ttttggtttt	1860
ttattgtttt taaattggtt gttatttttg ttgttttggt tttgtttttg gtatgttgtg	1920
tttttgggtt tgtgtgtgtg ttttttttgt tgttttgttt tgtttttttg gtttgttgtt	1980
ttttttggtt tggtttgtgt ggttttgtat tgttagagtaa ttttttgggt agtttggagg	2040
agaggttgtt ggggggggtg gaggggttgg ggggtggtgga tatggtggtg ttttagggta	2100
agagtatttt ttttaagtgg gaggttaggt attataggat gaatagggtg tgggttaggt	2160
ttatttttag ggtgtttttg gggtattatt attattatta ttattattat taggggttgg	2220
aattggggga tttgttggtt tataattttt ggtggtggtt ggggtttatg gtgggggggg	2280
gggggggggg ggggggggtg gggggggggg ggggttttaga ggggttgggg gggggtgggg	2340
gttggggggg gggggggggt tggggggggg gtttgggggg aggggggggt gggggttggg	2400
gggggggggg ggggggttgg gggggggggt ttttgggggg tttggggtat ttttattggt	2460
atatgtatag tttgggttat ttgtggtatt tggggggggg ggtggttatg aatatgtgtt	2520
tggggttgtg gtatttgggg ttggtggggg ggggggggta ttaggggggg gtaggggtag	2580
gggggggggg gggggtgggg taggtggtag gggtatgggg ggggggggtg gtggtggggg	2640
taggggggtt ggggtttatt tgggattggg atagggttg gggggagtgt gaggggttgg	2700
gggagggttt taagtagggg ggtattaaat tgggggtgag gtaggtggag gtgggttggg	2760
ggttgggttaa ttttaagatt tggggggtgg gtttattttg ttagagtatt attttaggtt	2820
tggagtgttt taggttttgg tataataata tgatggggtt taagtatttt ttgtagggtt	2880
ggttggagga ggtggagggg gtttaggggg agaaaatgaa taagttttag ttttttaagg	2940

ggggggagaa gaagggaag gggattttta tgggtggggtt ggagaagggt tttttggagg

3000

3000