(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0030718
(43) 공개일자 2010년03월19일

(51) Int. Cl.
C12N 15/10 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0089569
(22) 출원일자 2008년09월11일
심사청구일자 2008년09월11일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
김열홍
서울특별시 송파구 방이동 89 올림픽선수촌아파트 257-305
성재숙
서울특별시 구로구 개봉2동 333-8 스카이빌 203호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이문섭

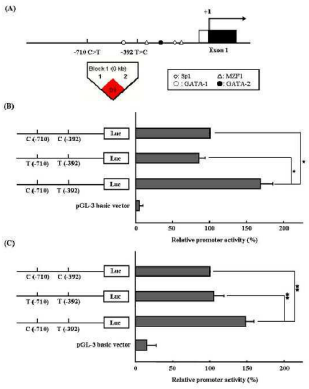
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) R A S S F 1 A 유전자를 이용한 폐암 감수성 진단용 마커 및 이를 이용한 폐암 감수성 예측 및 판단 방법

(57) 요 약

본 발명은 폐암 발생 위험도의 예측 및 선별을 가능하게 하는 폐암 감수성 진단용 마커에 관한 것으로, 보다 구체적으로 새로이 발견한 RASSF1A(Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1) 유전자의 단일 염기 다형성(SNP)인 -710 C>T 및 -392 T>C를 이용한 폐암 감수성 진단용 마커, 진단키트 및 이를 이용한 폐암 감수성 예측 및 진단 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 환자군이 폐암 발암 고위험군에 속하는지 여부의 예측 및 선별이 가능하여 폐암의 조기진단 및 치료 등에 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

한슬기로

서울 영등포구 여의도동 수정아파트 C동 1506호

황영미

서울특별시 종로구 창신3동 쌍용아파트 202동 807호

신은순

서울시 마포구 성산동 591-4 대명 비첸시티 3층 DNA Link

이재원

서울 서초구 반포동 반포아파트 84-401

이효정

서울 성북구 길음동 삼성래미안 1차 112동 1301호

류정선

인천 중구 신흥동 3가 인하대병원

최인근

서울 서초구 양재동 103-1 신우빌라 101호

김준석

서울특별시 서초구 방배동 88-53 엘지방배자이아파트 101-304

신상원

서울특별시 양천구 목동 907-14 벽산미라지타워 1704호

주진주

서울 성동구 옥수동 한남하이츠 아파트 6-101

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	R0603911
부처명	한국보건산업진흥원
연구사업명	보건의료기술개발사업
연구과제명	폐암 및 유방암/난소암 유전체 연구센터(정부)
주관기관	고려대학교
연구기간	2006년 4월 1일 ~ 2007년 3월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1로 이루어지는 폴리뉴클레오티드에서 서열번호 1의 342번째 염기 (RASSF1A;Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1 유전자의 번역시작점으로부터 -710번째) C가 T로 치환되고 상기 342번째 염기를 포함하는 10-1142개의 연속적인 DNA단편으로 구성되는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 1의 660번째 염기 (RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -392번째) T가 C로 치환되고 상기 660번째 염기를 포함하는 10-1142개의 연속적인 DNA단편으로 구성되는 폴리뉴클레오티드 및 이들의 상보적인 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상의 폴리뉴클레오티드로 이루어지는 폐암 감수성 진단용 마커.

청구항 2

서열번호 1로 이루어지는 폴리뉴클레오티드에서, 서열번호 1의 342번째(RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -710번째) 염기가 T이고, 서열번호 1의 660번째(RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -392번째) 염기가 C로 일배체형(haplotype)을 이루는 것을 특징으로 하는 감수성 진단용 마커.

청구항 3

서열번호 1의 342번째(RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -710번째) 염기 또는 서열번호 1의 660번째 (RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -392번째) 염기를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 증폭할 수 있는 프라이머.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 2 및 3 또는 서열번호 4 및 5로 표시된 올리고뉴클레오티드로 구성되는 것을 특징으로 하는 프라이머.

청구항 5

제3항 또는 제4항의 프라이머를 포함하는 폐암 감수성 진단용 키트.

청구항 6

서열번호 1로 이루어지는 폴리뉴클레오티드에서 서열번호 1의 342번째 염기(RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -710번째) C가 T로 치환되고 상기 342번째 염기를 포함하는 10-1142개의 연속적인 DNA단편으로 구성되는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 1의 660번째 염기(RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -392번째) T가 C로 치환되고 상기 660번째 염기를 포함하는 10-1142개의 연속적인 DNA단편으로 구성되는 폴리뉴클레오티드 및 이들의 상보적인 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상의 폴리뉴클레오티드로 이루어지는 폐암 감수성 진단용 마이크로어레이.

청구항 7

1) 피검체로부터 핵산시료를 수득하는 단계;

2) 수득한 핵산시료로부터 서열번호 1의 342번째 (RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -710번째) 염기 및 서열번호 1의 660번째 (RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -392번째) 염기 다형성 부위를 증폭하는 단계; 및

3) 상기 2)에서 증폭된 다형성 부위의 염기를 결정하여 폐암 발생 위험도를 분석하는 단계를 포함하는 폐암 감수성 예측 및 판단 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 3) 단계의 염기 결정은 DNA 서열분석 (sequencing), PCR-SSCP (single stranded conformation polymorphism) 분석, RFLP (restriction fragment length polymorphism) 분석, 대립형질 (allele) 특이적 혼성화 방법, DNA 칩 방법, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 방법 및 면역블롯 (immunoblot) 방법, 스냅샷(sNaPShot) 분석 방법, TDGS(Two-dimensional Gene Scanning), Taq-Man® 및 TOGATM 으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 스냅샷(SNaPShot) 분석 방법은 서열번호 6 또는 서열번호 7로 표시된 올리고뉴클레오티드로 구성되는 프라이머로 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 단계 3) 단계의 폐암 발생 위험도 분석은 스튜던트 t -검정 (Student's t-test), 카이-스퀘어 검정 (Chi-square test) 및 다중 기호 회귀 분석 (multiple logistic regression analysis)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 3)단계에서 결정된 서열번호 1의 342번째 (RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -710번째) 염기가 T이고, 서열번호 1의 660번째 (RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -392번째) 염기가 C인 경우에 폐암 발생 위험도가 감소되는 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 폐암 발생 위험도의 예측 및 선별을 가능하게 하는 폐암 감수성 진단용 마커에 관한 것으로, 보다 구체적으로 새로이 발견한 RASSF1A 유전자의 단일 염기 다형성(SNP)인 -710C>T 및 -392 T>C를 이용한 폐암 감수성 진단용 마커, 진단키트 및 이를 이용한 폐암 감수성 예측 및 진단 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 폐암은 폐에 발생하는 암이다. 흡연, 공해 등이 가장 큰 원인인 선진국형 암으로, 20세기에 들어서면서 구미 각국에서 급격히 증가하기 시작하여 전 세계적으로 매년 130만 명 이상이 폐암으로 사망하며, 암으로 인한 사망에서 가장 높은 비중을 차지하고 있다. 한국의 경우에도, 매년 10여 만 명의 암 환자가 새로 발생하고 5만 여명의 암 환자가 사망하고 있는 것으로 보고되었다. 더욱이 암의 발생 빈도는 최근 들어 더욱 증가하는 추세로 현재 암은 우리나라 성인 사망 원인의 2위를 차지하고 있다. 특히, 폐암은 한국 성인에서 발생하는 암중에서 약 12%를 차지하며 위암, 간암에 이어 제3위의 발생률을 보이며 매년 남녀 모두에서 발생율이 증가하고 있다. 폐암의 발생율은 여성보다 남성에서 현저히 높으며 상대적으로 45세 미만의 젊은 환자의 비율이 높은 것으로 보고되었다. 더구나 폐암은 진단 당시 이미 다른 장기로 전이를 하였거나 전이가 없는 경우에도 국소적으로 진행되어 근치적절제술, 함암화학요법, 방사선치료 등의 다양한 치료법에도 불구하고 치료 후 재발과 전이에 의해 5년 생존율이 5% 정도에 머무르는 완치율이 매우 낮은 종양으로 암에 의한 사망율 1위를 차지하고 있다. 따라서 치료 성적을 높이기 위해서는 폐암의 발생 및 그의 원인 기전, 암의 성장, 그리고 전이에 관여하는 분자생물학적 조절 기전 등을 규명하여 각 단계별로 대응하는 새로운 진단 및 치료 방법의 개발이 절실히 요구된다.

[0003] 1970년대부터 분자 생물학의 발달과 함께 종양 유전자 및 종양억제 유전자가 발굴되면서 암은 다단계 유전자 변이 질환임이 규명되었다. 즉, 암은 단일 유전자 결손 질환과 달리 여러개의 유전자가 유전자 돌연변이, 증폭, 결손, 치환 등의 단계적 변화 결과 악성으로 이행한다는 발암 기전이 제시되었다. 지금까지 '종양 유전학' 분야에서는 이러한 분자생물학적 다단계 모델 하에 미리 예측한 특정 1-2개의 유전자를 대상으로 그 발현이나 또는 돌연변이 유무를 조사해왔으나 종양의 다단계 모델을 완벽하게 밝히거나 발암 기전 규명에 효과적이지 못했다.

[0004] 생명과학 분야의 발달로 한꺼번에 수많은 유전자들의 발현을 측정할 수 있는 기법들이 개발되었거나 개발 중이기 때문에 21세기 생명 공학 분야는 엄청나게 축적된 유전암호들을 분석해서 그 유전자의 기능과 상호작용을 밝히는 functional genomics 시대로 이행해 가고 있다. 유전정보를 집중화하고 컴퓨터를 이용하여 비교 분석하는 생물정보학과 더불어 초정밀 집적 마이크로어레이를 이용한 다량의 유전자 발현을 고속 검색할 수 있는 기술은 분자생물학적 지식과 현대 기계 및 전자공학의 기술을 접목시킨 것으로 유전자 발현 연구에 획기적인 전지를 마련하였을 뿐만 아니라 functional genomics 라는 새로운 학문의 장을 개척하는 등 다양한 용도로 활용될 중요 기반 기술이다.

[0005] 최근 동일한 발암요인에 대해서도 개인이 지닌 유전적 감수성에 따라 위험도가 달라지며 이러한 개인 및 인종간의 감수성을 구분 짓는 가장 중요한 표지자로 단일 염기 다형성(SNP; single nucleotide polymorphism)이 제시되고 있다.

[0006] 단일 염기 다형성이란 개인과 개인 간의 DNA에 존재하는 한 염기쌍(single base-pair variation)의 차이를 말하는 것으로 DNA sequence 다형성(polymorphism)중에서 가장 많이 존재하는 형태이다 (약 1개/1kb).

[0007] 단일 염기 다형성이 주목을 끄는 이유는 가장 높은 빈도를 보이는 변이 형태이며, 상당히 안정적인 변이이고 낮은 변이율을 보인다는 점이다. 특히, 단백질을 만드는 유전자 부위에 위치한 중심 단일 염기 다형성의 경우는 기능적 중요성을 갖기 때문에 연구가 집중되고 있으며, 중요한 유전자들의 발현을 조절하는 부위에 대한 해당 유전자의 검색도 수행되고 있다. 또한, 단일 염기 다형성은 DNA chip 기술과 접목되어 질병 발생에 대한 개인의 감수성 차이를 규명하여 21세기 맞춤의학 혹은 예측의학이라는 새로운 시대로 나가는데 있어 가장 핵심적인 역할을 할 것으로 예상된다. 암 진단 및 치료의 초기 단계에서 이와 같은 약제학적으로 중요한 단백질의 유전적 다양성에 대한 효과를 고려하는 것은 항암치료의 실패에 대한 위험성을 낮출 수 있는 중요한 요소로 작용하여 개체간의 정확하고 신뢰할 수 있는 진단 및 치료 정보를 제공할 것이다.

[0008] 이와 같은 단일 염기 다형성 연구는 세계적으로 활발히 진행되고 있지만 각 나라마다 인종적인 차이 때문에 한계가 있다. 따라서 국내 단일 염기 다형성 연구는 국제적인 경쟁력이 충분히 있으며, 호흡기암에 대한 cSNPs에 대한 연구는 많지 않으므로 단일 염기 다형성의 체계적인 발굴과 기능 연구 등에 대한 효율적인 투자가 필요한 실정이다.

[0009] 암 억제 유전자이며 염색체 3p21에 위치하는 RASSF1A는 다양한 종양들에서 allelic loss의 발생과 프로모터의 과메틸화로 인한 유전자 침묵 때문에 많은 관심을 받고 있다. 그러나 현재 백인과 일본인 폐암 환자의 경우 코돈 133번 위치의 단일 염기 다형성 연구는 있었으나 프로모터 부위에 단일 염기 다형성과 폐암과의 연관성 연구는 전무한 실정이다. 더구나 한국인의 경우 코돈 133번 위치의 단일 염기 다형성은 폐암과 전혀 연관성이 없었다. 따라서 한국인 폐암환자와 정상 대조군에서 RASSF1A의 프로모터 부위에 존재하는 단일 염기 다형성과 이배체형을 선별하고, 이들과 폐암 간의 발생 위험도와 그 연관성을 확인함으로써 폐암에 대한 고 위험군을 미리 예측할 수 있는 방법을 개발하는 것은 매우 유의미한 작업이라 할 것이다.

[0010] 이에 본 발명자들은 환자군-대조군 연구, 루시퍼라아제 어세이 및 통계분석을 통해 본 발명의 RASSF1A 다형성 표지 인자가 폐암 발생 위험도를 예측하는데 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0011]

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 RASSF1A 유전자의 다형성 부위를 포함하는 폐암 감수성 진단용 마커를 제공하기 위한 것이다.

[0013] 또한, 본 발명의 목적은 RASSF1A 유전자의 다형성 부위를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 증폭하거나 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폐암 감수성 진단용 키트 및 마이크로어레이를 제공하기 위한 것이다.

[0014] 또한, 본 발명의 목적은 상기 폐암 감수성 진단용 마커를 이용하여 폐암의 감수성 예측 및 판단하는 방법을 제공하기 위한 것이다.

과제 해결수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0016] 본 발명은 RASSF1A 유전자의 다형성 부위를 포함하는 폐암 감수성 진단용 마커를 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 RASSF1A 유전자의 다형성 부위를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 증폭하거나 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폐암 감수성 진단용 키트 및 마이크로어레이를 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 폐암 감수성 진단용 마커를 이용하여 폐암의 감수성 예측 및 판단하는 방법을 제공한다.

[0019]

[0020] 본 발명은 서열번호 1로 이루어지는 폴리뉴클레오티드에서 서열번호 1의 342번째 염기(RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -710번째) C가 T로 치환되고 상기 342번째 염기를 포함하는 10-1142개의 연속적인 DNA단편으로 구성되는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 1의 660번째 염기(RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -392번째) T가 C로 치환되고 상기 660번째 염기를 포함하는 10-1142개의 연속적인 DNA단편으로 구성되는 폴리뉴클레오티드 및 이들의 상보적인 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상의 폴리뉴클레오티드로 이루어지는 폐암 감수성 진단용 마커를 제공한다.

[0021] 보다 구체적으로, 본 발명은

[0022] 1) 서열번호 1의 342번째 염기(RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -710번째) C가 T로 치환되고 상기 342번째 염기를 포함하는 10-1142개의 연속적인 DNA단편으로 구성되는 폴리뉴클레오티드 및 이들의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 한편 상기의 다형성 부위를 -710 C>T로 표시한다.

[0023] 2) 서열번호 1의 660번째 염기(RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -392번째) T가 C로 치환되고 상기 660번째 염기를 포함하는 10-1142개의 연속적인 DNA단편으로 구성되는 폴리뉴클레오티드 및 이들의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 한편, 상기의 다형성 부위를 -392 T>C로 표시한다.

[0024] 본 발명에서 용어 "진단"은 질병 발생 가능성을 예측하거나 질병 발생 위험도를 결정하거나 도출시키는데 사용되는 모든 유형의 분석을 포함한다.

[0025] 본 발명에서 용어 "감수성"은 폐암에 대한 민감도, 즉 폐암 발생 위험도의 증가 및 감소를 나타낸다.

[0026] 본 발명에서 용어 "다형성(polymorphism)"은 유전학적으로 결정된 집단 내에서 2 이상의 대체적 서열 또는 대체적 대립형질의 발생을 의미한다. 바람직한 다형성 마커는 선택된 집단에서 1% 이상, 더욱 바람직하기로는 10% 또는 20% 이상의 발생빈도를 나타내는 2개의 대립형질을 의미한다. 다형성 중에서, 사람에 따라 단일 염기만이 다른 것을 단일 염기 다형성(SNP)이라 한다.

[0027] 본 발명에서 용어, "마커"는 게놈에 있는 특정 서열로 특정 형질 다형성(polymorphism)을 가리키는 표지로서 이용될 수 있는 것을 의미한다.

[0028] 본 발명에서 용어, "뉴클레오티드"는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드이며, 다르게 특별하게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오티드의 유사체를 포함한다.(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990))

[0029] 본 명세서 용어, "폐암 발생 위험성이 낮은" 및 "폐암 감수성이 낮은"는 특별한 언급이 없는 한 동일한 의미로 사용하였다.

[0030] 본 발명에서 폐암 발생 위험도를 예측하기 위한 표지 인자로 선택된 인간 염색체 3p21에 위치하는 RASSF1A 유전자는 Gene Bank 등재번호 NT_022517로 공지되어 있으며, 본 발명에서는 NT_022517 서열 중 1번째 염기를 서열번호 1의 921번째 염기로 나타내었다.

[0031] 염색체 3p21 상의 RASSF1A 유전자 다형성은 단일 염기 다형성이 위치하는 염색체 번호, 염색체 상의 동원체를 중심으로 한 단완 (short arm: p)부분 및 밴드 번호를 알 수 있는바, 이는 3번 염색체 상의 단완 부분의 21밴드 상에 존재함을 의미한다.

[0032] DNA 단편의 크기는 전체 유전자의 full length가 아닌 한 다형성 부위의 염기를 포함하는 어떤 크기의 단편이라도 무방하나, 바람직하게는 10 내지 수백 염기인 것을 특징으로 하며, 더욱 바람직하게는 10-1142개 염기인 것을 특징으로 한다.

[0033] 10-1142개 염기의 경우는 상기 SNP를 탐지하기 위한 프로브 내지는 프라이머로 이용할 수 있으며, 그 이상의 염기의 경우는 PCR-RFLP 등에 이용될 수 있다.

[0034] 본 발명자들은 RASSF1A 유전자의 단일 염기 다형성 후보 중 유전자 기능에 가장 많은 영향을 미치나 이전에 연구된 바 없는 프로모터의 다형성(-710C>T 및 -392 T>C)을 선별하여 RASSF1A 유전자의 단일 염기 다형성과 폐암 감수성간의 관련성을 조사하였다.

[0035] 또한, 본 발명은 서열번호 1로 이루어지는 폴리뉴클레오티드에서, 서열번호 1의 342번째(RASSF1A 유전자의 번역

시작점으로부터 -710번째) 염기가 T이고, 서열번호 1의 660번째 (RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -392번째) 염기가 C로 일배체형(haplotype)을 이루는 것을 특징으로 하는 감수성 진단용 마커를 제공한다.

[0036] 본 발명에서 용어 "일배체형(haplotype)"은 개체로부터 단일 유전자에 대한 복수의 다형성 및 개체마다 상이한 다수의 다형성 부위에서 변이의 특정 조합을 말한다. 상기 일배체형은 각각의 단일염기다형성 부위를 포함하는 폴리뉴클레오티드 단편들의 조합 또는 복수의 단일염기다형성 부위를 포함하는 폴리뉴클레오티드 단편으로 이루어질 수 있다. 바람직하게는, 전자의 경우에는 각 단편이 10-1142개의 염기를 포함할수 있고 후자의 경우에는 1142개 이상의 염기를 포함할 수 있다.

[0037] 최근 연구들에서는 질병과의 연관성을 예측하는데 있어서 단일 염기 다형성 분석보다 일배체형 분석을 보다 상위에 두고 있다. (Sun, T., et al., J. Natl. Cancer Inst., 96, 1030-1036, 2004; Zhang, X., et al., J. Med. Genet., 42, 479-484, 2005; Judson, R., et al., Pharmacogenomics, 1, 15-26, 2000; 및 Judson, R. 및 Stephens, J. C., Pharmacogenomics, 2, 7-10, 2001).

[0038] 따라서, 본 발명자들은 폐암 환자군과 대조군에서 -710C>T 또는 -392 T>C 일배체형과 폐암 발생 위험도 간의 상관관계를 분석한 결과, 일배체형 -710C/-389T (C-T로 표시함)은 -710C/-389C (C-C로 표시함) 및 -710T/-389T (T-T로 표시함)를 갖는 일배체형에 비해 폐암 발생 위험도가 현저히 감소됨을 확인하였다(표 2). 상기와 같이 C-T 일배체형을 가지고 있는 개체는 폐암 발생 위험도가 현저히 증가됨을 알 수 있다 (dominant OR; 0.69, 95% CI; 0.46-0.99).

[0039] 특히, 일배체형 -710C/-389T은 여성보다는 남성의 폐암 발생 위험도(codominant OR; 0.59, 95% CI; 0.38-0.93, dominant OR; 0.58, 95% CI; 0.35-0.96)와 밀접하게 관련되어 있었고, 비흡연자보다는 흡연자의 폐암 발생 위험도 (codominant OR; 0.58, 95% CI; 0.36-0.93, dominant OR; 0.56, 95% CI; 0.33-0.96)와 밀접하게 관련되어 있었다(표2). 이는 흡연도 폐암에 있어 중요한 위험인자이기 때문에 본 발명의 결과가 생물학적으로도 충분히 타당한 결과임을 시사한다.

[0040] 따라서, 본 발명의 마커는 사람에게 적용되며, 바람직하게는 한국인에게 적용되며, 가장 바람직하게는 남성, 흡연자인 한국인에게 적용될 수 있다.

[0041] RASSF1A 일배체형과 폐암 발생 위험도 간의 관련성이 RASSF1A 프로모터 전사 활성에 의한 것인지 알아보기 위하여, 루시퍼라제 분석을 실시한 결과, C-T 일배체형을 가진 프로모터는 그외 일배체형을 가진 프로모터에 비하여 전사 활성이 현저하게 증가되었다. 이는 -710C>T 및 -392 T>C 다형성의 일배체형이 RASSF1A 발현에 영향을 줌으로써 최종적으로 폐암에 대한 유전적 감수성에 영향을 미치는 주요한 인자임을 나타내는 것이다(도1). 또한 비소세포암 세포주에서 RASSF1A 유전자의 활성도가 C-T 일배체형을 transfection시켰을 때 다른 반수체형을 가질 때 보다 30~50%이상 증가하는 결과를 확인하였다. 이는 C-T 일배체형이 특히 비소세포암의 발생 위험도를 낮추는데 현저한 효과가 있음을 의미한다.

[0042] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 342번째(RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -710번째) 염기 또는 서열번호 1의 660번째 (RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -392번째) 염기를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 증폭할 수 있는 프라이머를 제공한다.

[0043] 본 발명의 용어 "프라이머"는 적절한 버퍼 중의 적절한 조건(예를 들면, 4개의 다른 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 DNA, RNA 폴리머라제 또는 역전사 효소와 같은 중합체) 및 적당한 온도 하에서 주형-지시 DNA합성의 시작점으로 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오티드를 말한다. 상기 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있으나, 통상 15-30 뉴클레오티드이다. 짧은 프라이머 분자는 일반적으로 주형과 안정한 혼성체를 형성하기 위해서 더 낮은 온도를 필요로 한다. 프라이머 서열은 주형과 완전하게 상보적일 필요는 없으나, 주형과 혼성화 할 정도로 충분히 상보적이여야 한다. 프라이머 서열은 그 3'말단이 서열번호 1의 다형성 부위와 정렬하는 것이 바람직하다. 상기 프라이머는 다형성 부위를 포함하는 표적 DNA에 혼성화 하고, 완전한 상동성을 보이는 대립형질 형태의 증폭을 개시한다. 이 프라이머의 반대편에 혼성화하는 제2프라이머와 쌍을 이루어 사용된다. 증폭에 의하여 두개의 프라이머로부터 산물이 증폭되고, 이는 특정 대립형질 행태가 존재한다는 것을 의미한다.

[0044] 유전자의 폐암 발암 관련 다형성 부위를 탐색하기 위해서는 프라이머 디자인이 중요하다. 당업자가 디자인할 수 있는 모든 프라이머가 본 발명의 프라이머 범위에 포함될 수 있으나 바람직하게는 상기 프라이머는 서열번호 2 및 3 또는 서열번호 4 및 5로 표시된 올리고뉴클레오티드로 구성되는 것을 특징으로 하는 프라이머이다. 예를 들어, 본 발명의 -710 C>T에 대한 프라이머의 서열은 5'-CATGTTCAGCCCCTCAG-3' (정방향;서열번호 2)와 5'-

AGTCTCGACCTTCACTTGG-3' (역방향;서열번호 3)이고, -392 T>C에 대한 프라이머 서열은 5'-GAATGACCCCTGAACCTC-3' (정방향;서열번호 4)와 5'-CGTTGGCACGCTCCAG-3' (역방향;서열번호 5)이다.

[0045] 프라이머쌍 중에서 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머는 다형성 부위 염기에 인접한 서열과 어닐링 할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하여, 상기 정방향 또는 역방향 프라이머 3` 말단은 상기 다형성 부위 염기에 매칭되는 염기를 갖는다.

[0046] 예를 들어, 342번째 뉴클레오티드에 있는 단일 염기 다형성인 "T"를 검출하여 RASSF1A 유전자 변이체를 동정하는 경우, 상기 단일 염기 다형성의 업스트림에 상보적인 서열을 정방향 프라이머로서 이용할 수 있으며, 역방향 프라이머 3` 말단은 상기 단일 염기 다형성에 매칭되는 염기 즉, "T" 염기를 가지며, 나머지 부분은 서열번호 1에서 342번째 뉴클레오티드의 다운스트림에 위치한 서열과 실질적으로 대응되는 서열을 갖는다. 이러한 프라이머쌍을 이용하여 342번째 단일 염기 다형성 을 검출하는 증폭 반응을 실시할 수 있다.

[0047] 또한, 본 발명은 상기 프라이머를 포함하는 폐암 감수성 진단용 키트를 제공한다. 본 발명의 키트는 상술한 프라이머를 필수 구성요소로 하는바, 프라이머에 대한 상세한 설명은 본 발명의 키트에 이용되는 프라이머에도 적용된다. 따라서, 반복적인 기재에 따른 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 그 기재를 생략한다. 본 발명의 키트가 PCR 증폭반응에 적용되는 경우, 예컨대 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, 각 종의 중합효소 (예컨대, Thermus aquaticus (Taq), Thermus thermophilus (Tth), Thermusfiliformis, Thermis flavus, Thermococcus literalis 또는 Pyrococcus furiosus (Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

[0048] 또한, 본 발명은 서열번호 1로 이루어지는 폴리뉴클레오티드에서 서열번호 1의 342번째 염기(RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -710번째) C가 T로 치환되고 상기 342번째 염기를 포함하는 10-1142개의 연속적인 DNA단편으로 구성되는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 1의 660번째 염기(RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -392번째) T가 C로 치환되고 상기 660번째 염기를 포함하는 10-1142개의 연속적인 DNA단편으로 구성되는 폴리뉴클레오티드 및 이들의 상보적인 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상의 폴리뉴클레오티드로 이루어지는 폐암 감수성 진단용 마이크로어레이를 제공한다.

[0049] 상기 마이크로어레이는 DNA 또는 RNA 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것일 수 있다. 상기 마이크로어레이는 프로브 폴리뉴클레오티드에 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 제외하고는 통상적인 마이크로어레이로 이루어진다. 프로브 폴리뉴클레오티드를 기판 상에 고정화하여 마이크로어레이를 제조하는 방법은 당업계에서 잘 알려져 있다. 상기 "프로브 폴리뉴클레오티드"는 혼성화할 수 있는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것으로, 핵산의 상보성 가작에 서열 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 의미한다.

[0050] 즉, 본 발명에서 용어 "프로브"는 특정 뉴클레오티드 서열에 혼성화될 수 있는 디옥시뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드를 포함하는 자연 또는 변형되는 모노머 또는 결합을 갖는 성형의 올리고머를 의미한다. 바람직하게는, 프로브는 혼성화에서의 최대 효율을 위하여 단일가닥일 수 있다. 프로브는 바람직하게는 디옥시리보뉴클레오티드일 수 있다. 본 발명에 이용되는 프로브로서, 본 발명의 다형성 부위에 완전하게(perfectly) 상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 될 수도 있다.

[0051] 본 발명에서, 프로브는 서열번호 1의 342번째(RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -710번째) 염기 또는 서열번호 1의 660번째 (RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -392번째) 염기를 포함하는 폴리뉴클레오티드에 혼성화할 수 있는 서열을 포함한다. 보다 바람직하게는, 상기 프로브의 3` 말단, 5` 말단은 상기 단일 변이 염기에 상보적인 염기를 갖는다. 일반적으로, 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스(deuplex)의 안정성은 말단의 서열의 일치에 의해 결정되는 경향이 있기 때문에, 3` 말단, 5` 말단에 단일 변이 염기에 상보적인 염기를 갖는 프로브에서 말단 부분이 혼성화되지 않으면, 이러한 듀플렉스는 해체될 수도 있다. 이러한 프로브에는 Nielsen 등, Science 254, 1497-1500(1991)에 기재된 펩티드 핵산을 포함한다. 본 발명의 프로브는 대립형질 특이적 프로브로서, 핵산 단편 중에 다형성 부위가 존재하여, 다형성 부위에 단일염기변이 치환된 염기가 존재하는 DNA 단편에는 혼성화하나, 치환되지 않은 염기가 존재하는 DNA 단편에는 혼성화하지 않는다.

[0052] 혼성화에 적합한 조건은 Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., et al., Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시된 사항을 참조하여 결정할

수 있다. 혼성화에 이용되는 조건은 온도, 이온세기 (완충액 농도) 및 유기 용매와 같은 화합물의 존재 등을 조절하여 결정될 수 있다. 이러한 조건은 혼성화되는 서열에 의존하여 다르게 결정될 수 있다. 다만, 혼성화 조건은 대립형질간의 혼성화 강도에 있어서 유의한 차이를 보여, 대립형질 중 하나에만 혼성화하도록 설정되어야 한다.

[0053] 본 발명의 프로브 폴리뉴클레오티드를 기판 상에 고정시키는 단계도 또한 당업계에 알려진 방법으로 용이하게 제조할 수 있다. 또한, 마이크로어레이 상에서의 핵산 혼성화 및 혼성화 결과의 검출 방법 역시 당업계에 알려진 방법대로 수행될 수 있다. 예를 들면, 핵산 시료를 검출 가능한 신호를 발생시키는 표지 물질(예를 들어, 형광물질)로 표지한 다음 마이크로어레이 상에 혼성화하고 상기 표지물질로부터 발생하는 신호를 검출함으로써 혼성화 결과를 검출할 수 있다.

[0054] 또한, 본 발명은 폐암 감수성을 예측 및 판단하는 방법을 제공한다.

[0055] 보다 구체적으로,

[0056] 1) 피검체로부터 핵산시료를 수득하는 단계;

[0057] 2) 수득한 핵산시료로부터 서열번호 1의 342번째(RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -710번째) 염기 또는 서열번호 1의 660번째 (RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -392번째) 염기 다형성 부위를 증폭하는 단계; 및

[0058] 3) 상기 2)에서 증폭된 다형성 부위의 염기를 결정하여 폐암 발생 위험도를 분석하는 단계를 포함하는 폐암 감수성 예측 및 판단 방법을 제공한다.

[0059] 본 발명에서의 용어 "핵산시료"는 DNA(gDNA, cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖는다.

[0060] 본 발명의 방법에서 출발물질이 gDNA인 경우, gDNA의 분리는 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: Rogers & Bendich (1994)). 출발물질이 mRNA인 경우에는, 당업계에 공지된 통상의 방법에 총 RNA를 분리하여 실시된다(참조: Sambrook, J. et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001); Tesniere, C.et al., Plant Mol. Biol. Rep., 9:242(1991); Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Willey & Sons(1987); 및 Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. 162:156(1987)). 분리된 총 RNA는 역전사효소를 이용하여 cDNA로 합성한다.

[0061] 본 발명의 방법에 있어서, 피검체로부터 DNA를 분리하는 방법은 당업계에 알려진 방법을 통하여 이루어질 수 있다. 예를 들면, 조직 또는 세포로부터 DNA를 직접적으로 정제하거나 PCR과 같은 증폭 방법을 사용하여 특정한 영역을 특이적으로 증폭하고 이를 분리함으로써 이루어질 수 있다. 본 발명에 있어서, DNA란 DNA 뿐만 아니라 mRNA로부터 합성되는 cDNA도 포함하는 의미이다. 피검체로부터 핵산을 얻는 단계는 예를 들면, PCR 증폭법, 리가제 연쇄 반응(LCR)(Wu 및 Wallace, Genomics 4, 560(1989), Landegren 등, Science 241, 1077(1988)), 전사증폭(transcription amplification) (Kwoh 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173(1989)) 및 자가유지 서열 복제 (Guatelli 등, Proc. Natl. Acad. Sci.USA 87, 1874(1990)) 및 핵산에 근거한 서열 증폭 (NASBA)이 사용될 수 있다.

[0062] 분리된 DNA의 염기서열의 결정은 당업계에 알려진 다양한 방법에 의하여 이루어질 수 있다. 예를 들면, 디데옥시 법에 의하여 직접적인 핵산의 뉴클레오티드 서열의 결정을 통하여 이루어지거나 단일 염기 다형성 부위의 서열을 포함하는 프로브 또는 그에 상보적인 프로브를 상기 DNA와 혼성화시키고 그로부터 얻어지는 혼성화 정도를 측정함으로써 다형성 부위의 뉴클레오티드 서열을 결정하는 방법 등이 이용될 수 있다. 혼성화의 정도는 예를 들면, 검출가능한 표지를 표적 DNA에 표지하여, 혼성화된 표적 DNA 만을 특이적으로 검출함으로써 이루어질 수 있으나, 그외 전기적 신호 검출방법 등이 사용될 수 있다.

[0063] 다형성 부위를 증폭하는 단계는 당업계에 공지된 다양한 방법을 응용하여 실시될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 응용될 수 있는 기술은, 본 발명의 방법에 이용될 수 있는 증폭 기술은 PCR증폭 (참조: Miller, H. I. (WO 89/06700) 및 Davey, C. et al. (EP 329,822)), 리가아제 체인 반응 (LCR, Wu, D.Y. et al., Genomics 4:560 (1989)), 중합효소 리가아제 체인 반응 (Barany, PCR Methods and Applic., 1:5-16(1991)), Gap-LCR (WO 90/01069), 리페어 체인 반응 (EP 439,182), 3SR (Kwoh et al., PNAS, USA, 86:1173(1989)) 및 NASBA (U.S. Pat. No. 5,130,238)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 가장 바람직하게는 PCR 증폭에 따라 증폭한다.

[0064] 염기를 결정하는 단계는 당업계에 공지된 다양한 방법을 응용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, DNA 서열분석 (sequencing), PCR-SSCP (single stranded conformation polymorphism) 분석, RFLP (restriction fragment length polymorphism) 분석, 대립형질 (allele) 특이적 혼성화 방법, DNA 칩 방법, ELISA (enzyme-linked

immunosorbent assay) 방법 및 면역블랏 (immunoblot) 방법, SNaPShot 분석 방법, TDGS(Two-dimensional Gene Scanning), Taq-Man®및 TOGATM 으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0065] 상기 스냅샷(SNaPShot) 분석 방법은 서열번호 6 또는 서열번호 7로 표시된 올리고뉴클레오티드로 구성되는 프라이머로 수행되는 것을 특징으로 한다.

[0066] 스냅샷 분석 방법은 Single base pair primer extension assay의 원리를 이용하여 Single base extension을 하는 것이다. Single base extension 반응은 dideoxynucleotides(terminator)의 존재하에 cycle sequencing을 하는 것이 핵심인 기술인데 Terminator가 DNA strand로 끼어 들어가면 더 이상의 extension은 진행되지 않는다. 이때 사용되는 dideoxynucleotides를 각각 다른 dye로 label함으로써 Cycle sequencing을 통해 extension된 단 하나의 특정 nucleotide를 detection할 수 있게 된다. 따라서, 스냅샷 분석방법에는 형광이 부착된 dideoxy nucloetide 존재 하에서 단일 염기 다형성 위치를 포함하는 인접부위에서부터 증폭하여 단일 염기 다형성 바로 앞까지 붙도록 제작된 유전자형 분석 프라이머를 필요로 한다.

[0067] 본 발명에서는 바람직하게는 -710 C>T 단일 염기 다형성의 유전자형 분석 프라이머로 5’-TGCCATCCTCAATACCCA-3’ (정방향; 서열번호 6)와 -392 T>C 단일 염기 다형성의 유전자형 분석 프라이머로 5'-GTTGCTTCAGCAAACCGG-3’ (정방향;서열번호 7)를 사용할 수 있다.

[0068] 폐암 발생의 위험도를 분석하는 단계는 당업계에 공지된 다양한 방법을 응용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 스튜던트 t -검정 (Student's t-test), 카이-스퀘어 검정 (Chi-square test) 및 다중 로지스틱 회귀 분석 (multiple logistic regression analysis)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0069] 예를 들어, 폐암 발생의 위험도 분석에 있어서 오즈비와 95% 신뢰구간의 결과가 폐암 발생의 위험도를 분석하는 기준이 된다.

[0070] 상기 오즈비는 대조군에서 해당 단일 염기 다형성/일배체형을 가질 확률에 대한 환자군 중에서 해당 단일 염기 다형성/일배체형을 가질 확률의 비율을 나타낸다. 오즈비가 1을 초과하는 경우 해당 단일 염기 다형성/일배체형이 환자군과 연관성이 있음을 나태낸다. 오즈비가 클수록 상기 연관성도 증가한다.

[0071] 상기 95% 신뢰구간은 해당 오즈비가 존재할 확률이 95%인 구간을 나타내는 것이다. 즉, 신뢰구간의 하계가 1이하이고 상계가 1이상인 경우에는 질병과의 연관성을 유의하다고 판단할 수 없다.

[0072] p-value< 0.05일 때 폐암과의 연관성이 유의하다고 판단할 수 있다. 즉, 위험도 오즈비가 유의한 것으로 판단할 수 있다.

[0073] 보다 구체적으로 본 발명에서 상기 3)단계에서 결정된 서열번호 1의 342번째(RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -710번째) 염기가 T이고, 서열번호 1의 660번째 (RASSF1A 유전자의 번역시작점으로부터 -392번째) 염기가 C인 경우에 폐암 발생 위험도가 감소되는 것으로 예측 및 판단할 수 있다.

[0074] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허논문이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[0075] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

효 과

[0076] 이상, 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명 RASSF1A 유전자의 프로모터상에 위치하는 -710 C>T, -392 T>C 다형성을 포함하는 일배체형은 폐암 발생 위험도와 밀접한 관계를 나타내므로 폐암 발암 고위험군에 속하는지 여부의 예측 및 선별이 가능하도록 마커로 사용될 수 있으며, 이를 탐색할 수 있는 키트는 장차 폐암의 특정 환자군에 대한 조기진단 및 치료분야에 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0077] 실시예 1. 피검자의 선정 및 측정

[0078] 본 연구는 2001년 8월과 2006년 6월 사이에 폐암 및 유방암, 난소암 유전체센터/고려대 병원 (안암, 안산, 구로), 인하대 병원과 성모 병원에서 폐암 진단받은 환자군 410명과 심혈관 유전체센터, 알러지/호흡계질환 유전체센터와 계명대 동산 병원에서 모집된 정상군 410명에게서 동의서를 받아 진행되었다. 식이, 흡연, 음주와 과거병력 등을 인터뷰를 통해 확인하였다. 410명의 폐암 환자군중 399명의 흡연력, 308명의 음주력, 326명의 stage와 389명의 cell type 정보를 수득하였고, 410명의 대조군에서는 308명의 흡연력과 220명의 음주력 정보를 수득하였다. 본 연구는 해당기관의 생명윤리 심의위원회 심의를 통과하여 진행되었다.

[0079] 표 1. 폐암 환자 및 정상 대조군의 임상학적 특징

[0080]

특징	대조군 n = 410	실험군 n = 410
평균 연령	60.861.13±9.91	60.58±10.85
세포 타입		
Squamus cell carcinomas	123 (31.6%)	
Adenocarcinomas	157 (40.4%)	
Other carcinomasb	109 (28%)	
성별		
남성	303 (73.9%)	301 (73.4%)
여성	107 (26.1%)	109 (26.6%)
흡연여부		
비흡연자	111 (27.8%)	165 (53.6%)
흡연자	288 (72.2%)	143 (46.4%)
stage		
1-3a	93 (28.5%)	
3b-4	233 (71.5%)	
음주여부		
금주자	121 (39.3%)	77 (35%)
음주자	187 (60.7%)	143 (65%)

[0081] a $p < 0.001$.

[0082] b 작은 세포, 큰 세포, 혼합 세포를 포함한 암종 혹은 미분화된 암종

[0083] 실시예2. genomic DNA 준비와 RASSF1A 유전자의 direct sequencing

[0084] Puregene blood DNA kit (Gentra, Minneapolis, MN)을 사용하여 환자군과 정상군의 말초 혈액을 채취하여 gDNA를 준비하였다.

[0085] 한국인의 RASSF1A 유전자 프로모터 부위의 다형성 사이트를 확인하기위해, 폐암환자 48명의 말초혈액의 gDNA를 기초로 direct sequencing을 통해 RASSF1A 유전자의 프로모터 부위에 (~2Kbp) 존재하는 단일 염기 다형성을 발굴하였다. PCR 증폭은 AmpliTagGold (Roche, Branchburg, NJ)을 사용하여 PTC-225 Peltier Thermal cycler (MJ Research Inc, Waltham, MA)를 통해 수행하였다. 모든 증폭은 95℃에서 30초, 64℃ 1분, 72℃ 1분에서 35 cycle 후 72℃에서 10분간 수행되었다. PCR 생성물은 Montage PCR96 Cleanup kit (Millipore, Bedfore, MA)를 사용하여 정제하고 20㎕ nuclease free water로 희석시켰다. BigDye Terminator V 3.1 Cycle Sequencing kit (Perkin Elmer, Foster City, CA)를 사용하여 sequencing을 하였다. Multiscreen SEQ 384 well filter plates(Millipore, Bedfore, MA)를 사용하여 dye terminator를 제거하였고, Applied Biosystems 3700 DNA analyzer(Applied Biosystems, Foster City, CA)를 사용하여 서열을 분석하였다. 모든 단일 염기 다형성과 서열은 Polyphred software (http://droog.gs.washington.edu/polyphred)를 사용하여 분석하였다.

[0086] 실시예 3. 유전자형 분석

[0087] 유의한 빈도수로 (10%이상) 발굴된 -710 C>T와 -392 T>C부위를 나머지 폐암 환자 362명과 정상 대조군 410명에

서 스냅샷 분석 (SNaPShot assay)(ABI, Foster City, CA)을 통해 유전자형을 분석하고 빈도수를 확인하였다.

[0088] 상기 스냅샷 분석은 Single base pair primer extension assay의 원리를 이용하여 Single base extension을 하는 것으로 Single base extension 반응은 dideoxynucleotides(terminator)의 존재하에 cycle sequencing을 하는 것이 핵심 기술인데 Terminator가 DNA strand로 끼어 들어가면 더 이상의 extension은 진행되지 않는다. 이때 사용되는 dideoxynucleotides를 각각 다른 dye로 label함으로써 Cycle sequencing을 통해 extension된 단 하나의 특정 nucleotide를 detection할 수 있게 된다. 즉, 스냅샷 분석방법은 형광이 부착된 dideoxy nucloetide 존재 하에서 단일 염기 다형성 위치를 포함하는 인접부위에서부터 증폭하여 단일 염기 다형성 바로 앞까지 붙도록 제작된 프라이머를 이용하여 PCR을 시행하여 하나의 nucleotide를 연결하는 기술을 통해 유전자형을 분석하는 방법을 말한다.

[0089] 먼저, RASSF1A의 단일 염기 다형성을 포함하는 부위를 하기 프라이머 세트를 사용하여 PCR에 의해 증폭하였다. -710 C>T에 대한 프라이머의 서열은 5'-CATGTTCAGCCCCTCAG-3' (정방향)와 5'-AGTCTCGACCTTCACTTGG-3' (역방향)이고, -392 T>C에 대한 프라이머 서열은 5'-GAATGACCCCTGAACCTC-3' (정방향)와 5'-CGTTGGCACGCTCCAG-3' (역방향)이다. 이상의 프라이머 세트를 이용하여 95℃에서 10분간 initial denaturation 시킨 후 95℃ 30초, 63.9℃에서 annealing 1분, 72℃ 1분의 조건으로 35 cycle, 72℃ 단일 7분 연장 싸이클로 PCR을 수행한다.

[0090] 그 다음, 결과물인 1차 PCR 생성물에 Exo I (USB, Cleveland, OH) 10 unit과 1 unit의 shrimp alkaline phosphatase (Roche, Indianapolis, IN)를 넣어 37℃에서 1시간, 72℃에서 15분간 incubation하여 정제하고 1 ㎕의 정제된 PCR 생성물을 0.15pmol의 유전자형분석 프라이머와 SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 96℃ 10초, 50℃ 5초 그리고 60℃에서 30초로 25 cycle로 extension 반응시킨다. -710 C>T 단일 염기 다형성의 유전자형 분석 프라이머로 5'-ACGGTAGGAGTTATGGGT-3' (정방향)와 -392 T>C 단일 염기 다형성의 유전자형 분석 프라이머로 5'-CAACGAAGTCGTTTGGCC-3' (정방향)를 사용한다. extension 생성물은 1 unit의 shrimp alkaline phosphatase (Roche, Indianapolis, IN)를 넣어 37℃에서 1시간 incubation한 후 72℃에서 15분간 incubation하여 정제한다. 정제된 extension 생성물 1㎕를 deionized formamide 9㎕와 섞어 ABI Prism 3700 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA)와 GeneScan analysis, version 3.7 (Applied Biosystems, Foster City, CA)로 치환된 염기의 single nucleotide peak로서 유전자형을 분석한다.

[0091] <표2> RASSF1A 프로모터 단일염기단형성과 일배체형의 폐암 발생 위험도와의 연관성 분석

[0092]

					Codominant	¡¡	Dominant	¡¡	Recessive
Group	Loci	Genotype	Cases	Controls	OR (95% CI)[a]	¡¡	OR (95% CI)	¡¡	OR (95% CI)
Over all	-710 C>T	CC	121	143					
		CT	225	194	1.04 (0.82-1.31)	¡¡	1.26 (0.90-1.76)	¡¡	0.78 (0.51-1.19)
		TT	63	68					
	-392 T>C	TT	96	109					
		CT	225	206	1.11 (0.88-1.40)	¡¡	1.38 (0.96-1.98)	¡¡	0.93 (0.64-1.36)
		CC	89	94					
	ht1 C-C	-/-	97	108					
		+/-	223	202	1.10 (0.87-1.39)	¡¡	1.38 (0.96-1.98)	¡¡	0.92 (0.63-1.34)
		+/+	89	94					
	ht2 C-T	-/-	346	319					
		+/-	60	81	0.70 (0.48-1.03)	¡¡	0.69 (0.46-0.99)[b]		0.48 (0.10-2.24)
		+/+	3	4					
	ht3 T-T	-/-	121	143					
		+/-	226	193	1.03 (0.82-1.30)	¡¡	1.26 (0.90-1.77)	¡¡	0.77 (0.50-1.17)
		+/+	62	68		¡¡		¡¡	
Male	-710 C>T	CC	86	111					

		CT	172	140	1.13 (0.84-1.51)	¡¡	1.47 (0.98-2.22)	¡¡	0.79 (0.47-1.33)
		TT	45	46					
	-392 T>C	TT	69	81					
		TC	168	144	1.09 (0.83-1.45)	¡¡	1.51 (0.97-2.34)	¡¡	0.82 (0.52-1.29)
		CC	66	75					
	ht1 C-C	-/-	70	81					
		+/-	167	140	1.09 (0.83-1.45)	¡¡	1.54 (0.99-2.39)	¡¡	0.80 (0.51-1.27)
		+/+	66	75					
	ht2 C-T	-/-	260	229					
		+/-	41	63	0.59 (0.38-0.93)[c]	¡¡	0.58 (0.35-0.96)[c]	¡¡	0.29 (0.05-1.64)
		+/+	2	4					
	ht3 T-T	-/-	86	111					
		+/-	173	139	1.12 (0.84-1.50)	¡¡	1.48 (0.98-2.24)	¡¡	0.77 (0.45-1.30)
		+/+	44	46					
Female	-710 C>T	CC	35	32		¡¡		¡¡	
		CT	53	54	0.85 (0.57-1.25)	¡¡	0.84 (0.46-1.54)	¡¡	0.72 (0.35-1.48)
		TT	18	22					
	-392 T>C	TT	27	28					
		TC	57	62	1.19 (0.78-1.81)	¡¡	1.14 (0.60-2.18)	¡¡	1.39 (0.69-2.81)
		CC	23	19					
	ht1 C-C	-/-	27	27					
		+/-	56	62	1.16 (0.76-1.77)	¡¡	1.08 (0.57-2.07)	¡¡	1.39 (0.68-2.81)
		+/+	23	19					
	ht2 C-T	-/-	86	90					
		+/-	19	18	1.15 (0.56-2.34)	¡¡	1.07 (0.51-2.25)	¡¡	-
		+/+	1	0					
	ht3 T-T	-/-	35	32					
		+/-	53	54	0.84 (0.46-1.54)	¡¡	0.84 (0.46-1.54)	¡¡	0.72 (0.35-1.48)
		+/+	18	22		¡¡		¡¡	
Non-smoker	-710 C>T	CC	40	56					
		CT	54	79	0.81 (0.56-1.17)	¡¡	0.81 (0.48-1.37)	¡¡	0.69 (0.35-1.36)
		TT	16	29					
	-392 T>C	TT	23	40					
		TC	61	88	1.24 (0.86-1.80)	¡¡	1.34 (0.74-2.43)	¡¡	1.31 (0.12-2.37)
		CC	27	37					
	ht1 C-C	-/-	23	39					
		+/-	60	88	1.22 (0.84-1.77)	¡¡	1.28 (0.70-2.33)	¡¡	1.31 (0.72-2.37)
		+/+	27	37					
	ht2 C-T	-/-	91	136					
		+/-	18	27	1.06 (0.57-1.96)	¡¡	1.02 (0.53-1.97)	¡¡	2.37 (0.13-43.08)
		+/+	1	1					
	ht3 T-T	-/-	40	56					

		+/-	54	79	0.81 (0.56-1.17)	¡¡	0.81 (0.48-1.37)	¡¡	0.69 (0.35-1.36)
		+/+	16	29					
Smoker	-710 C>T	CC	77	51		¡¡		¡¡	
		CT	166	63	1.22 (0.89-1.67)	¡¡	1.66 (1.06-2.59)[b]	¡¡	0.86 (0.50-1.50)
		TT	45	25					
	-392 T>C	TT	68	44					
		TC	161	64	1.03 (0.76-1.39)	¡¡	1.37 (0.86-2.17)	¡¡	0.75 (0.46-1.24)
		CC	59	34					
	ht1 C-C	-/-	69	44					
		+/-	160	60	1.03 (0.76-1.39)	¡¡	1.40 (0.88-2.22)	¡¡	0.73 (0.45-1.21)
		+/+	59	34					
	ht2 C-T	-/-	248	105					
		+/-	38	30	0.58 (0.36-0.93)[b]	¡¡	0.56 (0.33-0.96)[b]	¡¡	0.32 (0.05-1.95)
		+/+	2	3					
	ht3 T-T	-/-	77	51					
		+/-	167	62	1.22 (0.89-1.67)	¡¡	1.67 (1.07-2.61)[b]	¡¡	0.84 (0.48-1.46)
		+/+	44	25		¡¡		¡¡	

[0093] [a] 오즈비율(ORs)과 95% 신뢰구간(95% CI)은 로지스틱회귀분석을 통해 분석하였고, 나이, 성별 및 흡연여부를 통해 수정된 값이다.

[0094] [b] $p < 0.05$

[0095] [c] $p < 0.03$ and $p_c < 0.05$

[0096] <u>실시예 4. RASSF1A 유전자 프로모터 분석을 위한 Plasmid construct 제작</u>

[0097] RASSF1A 전사활성에 대한 -710 C>T와 -392 T>C 다형성의 효과를 관찰하기 위해 3개의 일배체형 (C-C, T-T 와 C-T)으로 구성된 프로모터의 활성도를 측정하였다. RASSF1A 프로모터 부위를 (-1051부터 +91, +1을 엑손1의 전사시작점으로 봄) 다음의 프라이머를 사용하여 PCR하였다: (정방향) 5'-CATGTGTTCAGCCCCTCAG-3' ;서열번호 8과 (역방향) 5'-CGTTGGCACGCTCCAGC-3' ; 서열번호 9. PCR 생성물은 pGL3-basic plasmid (Promega, Madison, WI)의 luciferase gene upstream에 넣었다. 각 construct들의 구조는 sequencing으로 확인하였다.

[0098] <u>실시예 5. Transient transfection과 루시퍼라아제 리포터(luciferase reporter)분석</u>

[0099] 비소세포암 세포주인 H358과 H2009 세포주를 American Type Culture Collection (ATCC)로부터 구입하여 본 연구에 사용하였다. 세포는 transfection 하루전에 6 well plate에 1×10^5 cells/35mm로 분주한다. 세포가 75% 정도 자랐을때 1 μg의 plasmid DNA와 3 μl의 LipofectamineTM 2000 reagent (Gibco BRL, Rockville, MD)를 사용하여 트랜스펙션(transfection) 하였다. 실험의 음성 대조군으로 프로모터와 인핸서가 결핍되어있는 pGL3-basic 벡터를 사용하였고 양성 대조군으로 SV40 프로모터와 인핸서가 있는 pGL3-control 벡터를 사용하였다. 100ng의 β-galactosidase luciferase plasmid (Promega, Madison, WI)로 트랜스펙션 정도를 확인하였다. 트랜스펙션 후 48시간 뒤 세포를 5x lysis buffer (Promega, Madison, WI)로 모아 Luciferase reporter assay system (Promega, Madison, WI)과 TD-20/20 luminometer (Turner Designs, Sunnyvale, CA)을 사용하여 각 일배체형에 따른 프로모터 활성도 차이를 측정하였고, β-galactosidase luciferase 유전자의 활성도로 활성도를 normalization 하였다. β-galactosidase assay는 Luminescent β-galactosidase Detection kit II (Clontech, Hampshire, UK)를 사용하여 확인하였고 각 실험은 최소 4번 이상의 독립적인 실험으로 그 결과를 확

인하였다.

[0100] <u>실시예 6. 통계분석</u>

[0101] 대립형질 빈도 (allele frequency)와 유전자형 빈도를 구해 단일 염기 다형성을 이용하여 하디-와이버그 평형 (Hardy-Weinberg equilibrium; HWE)여부를 확인하였다. *p*-value < 0.05일때 하디-와이버그 평형이 성립하는 것으로 보았다. Linkage disequilibrium (LD)분석 (*D′*)은 Haploview program version 3.2을 사용하였다. 유전자형과 일배체형의 빈도수는 SAS 프로그램(SAS Institute, Cary, NC)을 이용하여 나이, 성별, 흡연 상태를 고려하여 보정한 오즈비 (Odd reatio; OR), 95% 신뢰구간 (95% CI)과 *p*-value를 구하여 폐암 발생 위험도와의 연관성을 확인하였다.또한, 본페로니 분석 방법 (p_c value)으로 엄격한 다중 분석을 시행하였다. 신뢰구간의 상, 하안값이 1을 포함하지 않고 *p*-value < 0.05일때 폐암과의 연관성분석 즉, 위험도 오즈비율이 유의한 것으로 판단한다.

[0102] 표2에서 보는 바와 같이, ht2 C-T(남성, 흡연자, 전체) 및 ht 3 T-T(흡연자) 및 -710 C>T는 P< 0.05로 확인되었다.

산업이용 가능성

[0103] 본 발명 RASSF1A 유전자의 프로모터상에 위치하는 -710 C>T, -392 T>C 다형성을 포함하는 일배체형은 폐암 발생 위험도와 밀접한 관계를 나타내므로 폐암 발암 고위험군에 속하는지 여부의 예측 및 선별이 가능하도록 마커로 사용될 수 있으며, 이를 탐색할 수 있는 키트는 장차 폐암의 특정 환자군에 대한 조기진단 및 치료 등에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0104] 도 1은 RASSF1A 프로모터에 존재하는 단일염기다형성의 일배체형을 이용한 프로모터 전사 활성도 비교한 것이다.

[0105] (A); 이 도면은 한국인에서 보이는 RASSF1A 프로모터에 존재하는 단일염기다형성의 위치와 연관불평형 검증 (Linkage disequilibrium; LD) 블록을 나타낸다. 여기서 +1은 RASSF1A 단백질 합성이 시작되는 위치를 표시한다.

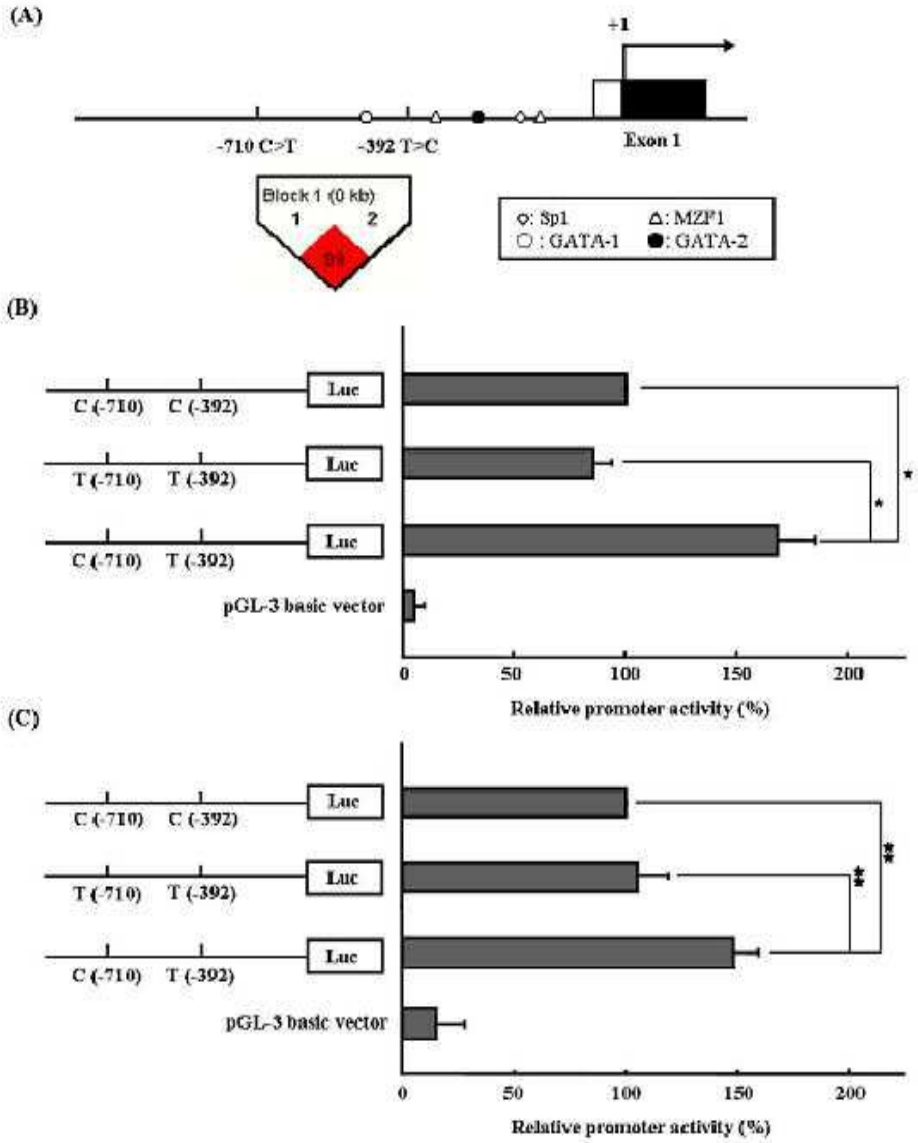
[0106] (B); H2009 세포주에서 프로모터 활성도 측정한 것이다.

[0107] (C); H358 세포주에서 프로모터 활성도 측정한 것이다.

[0108] p-values는 Student's t-test를 사용. * p < 0.005, ** p < 0.025.

도면

도면1



서 열 목 록

<110> korea university industry and academy collaboration foundation

<120> Makers for the diagnosis of susceptibility to lungcancer using RASSF1A gene and method for predictingand analyzing susceptibility to lung cancer using the same

<160> 9

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 1142
<212> DNA
<213> homo sapiens RASSF1A promoter

<400> 1
catgtgttca gcccctcaga gcaggacctg cggctgcagg cgcgaaggta aggcctgtgg 60

aaatggcagg gagggtggag gggatgcagg aggcatggat gtgggtgggg tgcccccacc 120

ttccagggcc agtcagacct tcctgacttt cccccaggtg ggctgagacc tacaggctgg 180

atgtgctaga ggcagtggct ccagagcggc cccgctgtgc ttactgcagt gcagaggctt 240

ctaagcgctg ctcacgatgc cagaatgagt ggtattgctg caggtgaggg tatcctagaa 300

ccttggacct ctaagcccta ctcccacatc ccccacatgc attgccatcc tcaataccca 360

cctgcctgca gggagtgcca agtcaagcac tgggaaaagc atggaaagac ttgtgtcctg 420

gcagcccagg gtgacagagc caaatgaggg ctgcagttgc tgagggccga ccacccatgc 480

caagggaatc cacccagaat gcacccctga acctcaagat cacggtccag cctctgccgg 540

agccccagtc tccgcagtgg agagcagagc gggcggtaaa gctgctgacc gatctccctc 600

ctcctcaccc caagtgaagg ctcgagactt cctgccccac ccagtgggta ggccaagtgt 660

gttgcttcag caaaccggac caggagggcc agggccggat gtggggaccc tcttcctcta 720

gcacagtaaa gctggcctcc agaaacacgg gtatctccgc gtggtgcttt gcggtcgccg 780

tcgttgtggc cgtccggggt ggggtgtgag gaggggacga aggagggaag gaagggcaag 840

gcgggggggg ctctgcgaga gcgcgcccag ccccgccttc gggccccaca gtccctgcac 900

ccaggtttcc attgcgcggc tctcctcagc tccttcccgc cgcccagtct ggatcctggg 960

ggaggcgctg aagtcggggc ccgccctgtg gccccgcccg gcccgcgctt gctagcgccc 1020

aaagccagcg aagcacgggc ccaaccgggc catgtcgggg gagcctgagc tcattgagct 1080

gcgggagctg gcacccgctg ggcgcgctgg gaagggccgc acccggctgg agcgtgccaa 1140

cg 1142

<210> 2
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RASSF1A gene forward primer for -710 C>T polymorphism

<400> 2
catgttcagc ccctcag 17

<210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RASSF1A gene reverse primer for -710 C>T polymorphism

<400> 3
agtctcgacc ttcacttgg 19

<210> 4
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RASSF1A gene forward primer for -392 T>C polymorphism

<400> 4

gaatgacccc tgaacctc 18

<210> 5
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RASSF1A gene reverse primer for -392 T>C polymorphism

<400> 5
cgttggcacg ctccag 16

<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> The SNP genotyping forward primer for - 710 C>T polymorphism

<400> 6
tgccatcctc aataccca 18

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> The SNP genotyping forword primer for -392 T>C polymorphism

<400> 7
gttgcttcag caaaccgg 18

<210> 8
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer for RASSF1A promoter assay

<400> 8
catgtgttca gcccctcag 19

<210> 9
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer for RASSF1A promoter assay

<400> 9
cgttggcacg ctccagc 17