(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0004674
(43) 공개일자 2018년01월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57488 (2013.01)
G01N 33/57407 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0084428
(22) 출원일자 2017년07월03일
심사청구일자 2017년07월03일
(30) 우선권주장
1020160083361 2016년07월01일 대한민국(KR)
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
재단법인 의약바이오컨버전스연구단
경기 수원시 영통구 광교로 145, 차세대융합기술연구원내 B동 8층 (이의동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
김성훈
서울특별시 강남구 남부순환로365길 42, 역삼한신아파트 4-1005 (도곡동)
양원석
경기도 부천시 소사구 부광로 22번길 45, 나동 508호 (괴안동, 대현청실아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이희숙, 김석만

전체 청구항 수 : 총 14 항

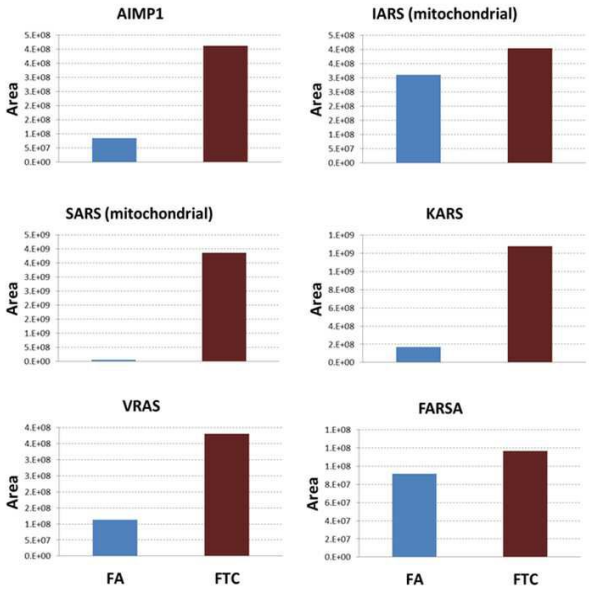
(54) 발명의 명칭 **아미노아실 티알엔에이 중합효소 관련 단백질 발현 수준을 이용한 갑상선 여포암 진단용 조성물과 진단 마커 검출 방법**

(57) 요 약

본 발명은 아미노아실 티알엔에이 중합효소 관련 단백질 발현 수준을 이용한 갑상선 여포암 진단용 마커 검출 방법에 대한 것으로, 보다 구체적으로는 갑상선 여포암(follicular thyroid carcinoma)이 의심되는 환자에서 갑상선 여포암의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 (a) 갑상선 여포암이 의심되는 피검체로부터 시료를 제공하

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도2



는 단계; (b) 상기 시료에서 아미노아실 티알엔에이 중합효소(aminoacyl-tRNA synthetase) 또는 아미노아실 티알엔에이 중합효소 복합체-결합 다기능 단백질(aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein)의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 측정된 단백질 발현 수준을 대조군과 비교하여 단백질 발현 수준의 변화가 확인된 피검체를 갑상선 여포암에 걸린 것으로 판정하는 단계를 포함하는 갑상선 여포암의 마커를 검출하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명에서 개시하고 있는 단백질 종류들은 수술을 통한 조직 채취 없이 간단하고 명확하게 갑상선 여포함의 진단이 가능하며, 진단 민감도 및 특이성이 높다.

(72) 발명자

김경곤

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88(풍납동)

김원구

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88(풍납동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015M3A6A4076532
부처명 미래창조부
연구관리전문기관 혁신형의약바이오컨버젼스사업단
연구사업명 혁신형의약바이오컨버젼스사업
연구과제명 임상 시료 내 Aminoarcyl-tRNA synthetase 다중 검출 기술 개발
기 여 율 1/2
주관기관 서울아산병원
연구기간 2016.01.01 ~ 2016.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-M3A6A4-2010-0029785
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업 - 글로벌프런티어사업
연구과제명 중앙연계사업
기 여 율 1/2
주관기관 (재) 의약바이오컨버젼스연구단
연구기간 2010.10.22 ~ 2019.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

갑상선 여포암(follicular thyroid carcinoma)의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여

(a) 갑상선 여포암이 의심되는 피검체로부터 시료를 제공하는 단계;

(b) 상기 시료에서 아미노아실 티알엔에이 중합효소(aminoacyl-tRNA synthetase, ARS) 또는 아미노아실 티알엔에이 중합효소 복합체-결합 다기능 단백질(aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein, AIMP)의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 측정된 단백질 발현 수준을 대조군과 비교하여 단백질 발현 수준의 변화가 확인된 피검체를 갑상선 여포암에 걸린 것으로 판정하는 단계를 포함하는 갑상선 여포암의 마커를 검출하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 시료는 갑상선 조직, 혈액, 혈장, 혈청, 림프액 및 소변으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 대조군은 갑상선 여포 선종(thyroid follicular adenoma)이 확인된 환자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 단백질 발현 수준의 변화는 아미노아실 티알엔에이 중합효소 복합체-결합 다기능 단백질 1(AIMP1), 이소류신 티알엔에이 중합효소 미토콘드리아형(IARS mitochondrial), 세린 티알엔에이 중합효소 미토콘드리아형(SARS mitochondria), 라이신 티알엔에이 중합효소(KARS), 발린 티알엔에이 중합효소(VARS) 및 페닐알라닌 티알엔에이 중합효소 알파 서브유닛(FARSA)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질의 발현 수준의 증가인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 단백질 발현 수준의 변화는 알라닌 티알엔에이 중합효소(AARS), 아스파르테이트 티알엔에이 중합효소(DARS), 이중기능성 글루타메이트 프롤린 티알엔에이 중합효소(EPRS), 트립토판 티알엔에이 중합효소 (WARS), 글리신 티알엔에이 중합효소(GARS), 이소류신 티알엔에이 중합효소 세포질형(IARS cytoplasmic), 타이로신 티알엔에이 중합효소(YARS), 아스파라진 티알엔에이 중합효소(NARS), 글루타민 티알엔에이 중합효소(QARS), 아르지닌 티알엔에이 중합효소(RARS), 세린 티알엔에이 중합효소 세포질형(SARS cytoplasmic) 및 트레오닌 티알엔에이 중합효소(TARS)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질의 발현 수준의 감소인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 단백질 수준 측정은 웨스턴 블랏팅(western blotting), 닷 블랏팅(dot blotting), 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 방사능 면역분석법(RIA), 방사면역확산법, 오우크테

로니 면역 확산법, 로케트 면역 전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전법(immunoprecipitation), 보체 고정 분석법, 유세포 분석법(FACS), 단백질 칩(chip) 및 질량 분석(mass spectrometry) 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나에 의한 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

아미노아실 티알엔에이 중합효소(aminoacyl-tRNA synthetase, ARS) 또는 아미노아실 티알엔에이 중합효소 복합체-결합 다기능 단백질(aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein, AIMP)의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 갑상선 여포암의 진단용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 아미노아실 티알엔에이 중합효소(ARS)는 이소류신 티알엔에이 중합효소 미토콘드리아형(IARS mitochondrial), 세린 티알엔에이 중합효소 미토콘드리아형(SARS mitochondria), 라이신 티알엔에이 중합효소(KARS), 발린 티알엔에이 중합효소(VARS), 페닐알라닌 티알엔에이 중합효소 알파 서브유닛(FARSA), 알라닌 티알엔에이 중합효소(AARS), 아스파르테이트 티알엔에이 중합효소(DARS), 이중기능성 글루타메이트 프롤린 티알엔에이 중합효소(EPRS), 트립토판 티알엔에이 중합효소 (WARS), 글리신 티알엔에이 중합효소(GARS), 이소류신 티알엔에이 중합효소 세포질형(IARS cytoplasmic), 타이로신 티알엔에이 중합효소(YARS), 아스파라진 티알엔에이 중합효소(NARS), 글루타민 티알엔에이 중합효소(QARS), 아르지닌 티알엔에이 중합효소(RARS) 및 세린 티알엔에이 중합효소 세포질형(SARS cytoplasmic) 및 트레오닌 티알엔에이 중합효소(TARS)로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 아미노아실 티알엔에이 중합효소 복합체-결합 다기능 단백질(AIMP)는 아미노아실 티알엔에이 중합효소 복합체-결합 다기능 단백질 1(AIMP1)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 진단은 갑상선 여포암과 여포 선종을 구분하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 단백질을 검출하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 결합도메인을 갖는 펩타이드, 항체, 또는 앱타머인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제7항의 조성물을 포함하는 갑상선 여포암의 진단용 키트.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 아미노아실 티알엔에이 중합효소(ARS)는 이소류신 티알엔에이 중합효소 미토콘드리아형(IARS mitochondrial, GenBank GI No. 94730583), 세린 티알엔에이 중합효소 미토콘드리아형(SARS mitochondria, GenBank GI No. 23822219), 라이신 티알엔에이 중합효소(KARS, GenBank GI No. 20178333), 발린 티알엔에이 중합효소(VARS, GenBank GI No. 1194845281), 페닐알라닌 티알엔에이 중합효소 알파 서브유닛(FARSA, GenBank GI No. 12643946), 알라닌 티알엔에이 중합효소(AARS, GenBank GI No. 115502460), 아스파르

테이트 티알엔에이 중합효소(DARS, GenBank GI No. 20178330), 이중기능성 글루타메이트 프롤린 티알엔에이 중합효소(EPRS, GenBank GI No. 288558855), 트립토판 티알엔에이 중합효소 (WARS, GenBank GI No. 135191), 글리신 티알엔에이 중합효소(GARS, GenBank GI No. 313104283), 이소류신 티알엔에이 중합효소 세포질형(IARS cytoplasmic, GenBank GI No. 239938717), 타이로신 티알엔에이 중합효소(YARS, GenBank GI No. 13638438), 아스파라진 티알엔에이 중합효소(NARS, GenBank GI No. 3915059), 글루타민 티알엔에이 중합효소(QARS, GenBank GI No. 1351170), 아르지닌 티알엔에이 중합효소(RARS, GenBank GI No. 20178331) 및 세린 티알엔에이 중합효소 세포질형(SARS cytoplasmic, GenBank GI No. 19860217) 및 트레오닌 티알엔에이 중합효소(TARS, GenBank GI No. 60267755)로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 아미노아실 티알엔에이 중합효소 복합체-결합 다기능 단백질(AIMP)는 아미노아실 티알엔에이 중합효소 복합체-결합 다기능 단백질 1(AIMP1, GenBank GI No. 215490009)인 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 아미노아실 티알엔에이 중합효소 관련 단백질 발현 수준을 이용한 갑상선 여포암(follicular thyroid carcinoma)의 진단 마커 검출 방법에 대한 것으로, 보다 구체적으로는 갑상선 여포암이 의심되는 환자에서 갑상선 여포암의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, (a) 갑상선 여포암이 의심되는 피검체로부터 시료를 제공하는 단계; (b) 상기 시료에서 아미노아실 티알엔에이 중합효소(aminoacyl-tRNA synthetase) 또는 아미노아실 티알엔에이 중합효소 복합체-결합 다기능 단백질(aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein)의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 측정된 단백질 발현 수준을 대조군과 비교하여 단백질 발현 수준의 변화가 확인된 피검체를 갑상선 여포암에 걸린 것으로 판정하는 단계를 포함하는 갑상선 여포암의 마커를 검출하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 전체 갑상선암의 약 20% 정도를 차지하는 갑상선 여포암(follicular thyroid carcinoma, FTC)은 여성에게서 많이 발생하고, 예후가 좋은 분화 갑상선암에 속한다. 갑상선 여포암은 갑상선암 중 대부분을 차지하는 갑상선 유두암(papillary thyroid carcinoma)과 비교하여 나이가 든 연령에 주로 나타나며, 갑상선 유두암이 주로 임파절을 통해 전이가 이루어지는 데 반해, 갑상선 여포암은 혈관을 통해 전이가 이루어진다는 차이점이 있다. 한편, 갑상선 유두암은 특징적인 핵의 형태를 관찰하여 비교적 쉽게 미세침흡인검사로 진단이 가능하지만, 갑상선 여포암은 명확한 기준이 확립되어 있지 않아 정확하게 진단하는 데에는 어려움이 존재한다. 특히 갑상선의 양성 종양인 여포 선종(follicular adenoma)의 20~30%는 미세침흡인검사에 의하여 갑상선 여포암과 식별이 불가능하기 때문에 갑상선 여포암이 여포 선종으로 분류되는 경우도 발생한다.

[0005] 현재 갑상선 여포암을 확진하기 위하여서는 수술을 통하여 갑상선 조직을 채취하여 조직 내 병리를 확인하는 방법이 거의 유일하다. 이처럼 수술을 포함하는 병리 검사는 우선 결절이 발견된 갑상선의 절반을 수술로 절제하여 조직 검사를 실시하고, 이후 갑상선 여포암으로 진단되면 예후가 좋은 초기 암을 제외하고는 다시 수술을 통해 나머지 절반을 다시 제거해내야 하기 때문에 매우 번거로운 방법이다. 따라서, 미세침흡인검사 시 수득되는 갑상선 조직 또는 혈액에서 갑상선 여포암과 여포 선종을 구별하고 갑상선 여포암을 확진할 수 있는 바이오마커의 개발이 필요하다. 특히 단백질 기반의 바이오마커를 개발하게 되면, 항체 등을 이용하여 해당 마커의 발현 수준을 측정하여 신속하게 진단에 필요한 정보를 도출할 수 있으며, 병리 검사를 위한 수술을 할 필요가 없다.

[0007] 갑상선 여포암의 바이오마커로 제안된 바 있는 BRAF, RET/PTC, RAS, PAX8/PPAR gamma, P53 등의 유전자들의 돌연변이는 그 발생 비율이 높지 않아 진단에 실제로 활용되지 못하고 있다. 또한 ELMO1, EMCN, ITIH5, KCNAB1,

SLCO2A1 등 5개 유전자의 발현 수준이 여포 선종 조직과 비교하여 갑상선 여포암 조직에서 감소한 것을 확인한 연구는 갑상선 여포암과 여포 선종을 구별할 수 있는 마커로 개발될 가능성을 제시하였으나, 이는 조직으로부터 mRNA를 추출해 내는 과정을 거쳐야하는 등 마커로 활용하는데 제한이 많다(Pfeifer et al. *BMC Medical Genomics*, 2013, 6:380). 갑상선암을 판별하는 단백질 마커들이 조직면역염색법(immunohistochemistry)으로 활용되고 있으나(Wiseman SM et al., *Annals of Surgical Oncology*, 2008, 15:2811-2826), 갑상선 여포암과 여포 선종을 구분하는 데는 활용 가능성이 거의 없을 정도로 특이성이 낮다.

[0009] 이에 따라, 갑상선 여포암과 여포 선종 등 양성 종양으로부터 명확하게 구분할 수 있는 바이오마커의 개발이 시급한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 이에 본 발명자들은 갑상선 여포암과 여포 선종으로 확인된 환자에서 병리 조직을 채취하여 질량 분석으로 광범위한 단백질의 수준을 분석한 결과, 다수의 아미노아실 티알엔에이 중합효소(aminoacyl-tRNA synthetase) 관련 단백질 수준이 갑상선 여포암과 여포 선종 조직에서 차별적으로 나타나는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0013] 따라서 본 발명의 목적은

[0014] 갑상선 여포암(follicular thyroid carcinoma)의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여

[0015] (a) 갑상선 여포암이 의심되는 피검체로부터 시료를 제공하는 단계;

[0016] (b) 상기 시료에서 아미노아실 티알엔에이 중합효소(aminoacyl-tRNA synthetase, ARS) 또는 아미노아실 티알엔에이 중합효소 복합체-결합 다기능 단백질(aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein, AIMP)의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0017] (c) 상기 측정된 단백질 발현 수준을 대조군과 비교하여 단백질 발현 수준의 변화가 확인된 피검체를 갑상선 여포암에 걸린 것으로 판정하는 단계를 포함하는 갑상선 여포암의 마커를 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0019] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0020] 갑상선 여포암(follicular thyroid carcinoma)의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여

[0021] (a) 갑상선 여포암이 의심되는 피검체로부터 시료를 제공하는 단계;

[0022] (b) 상기 시료에서 아미노아실 티알엔에이 중합효소(aminoacyl-tRNA synthetase, ARS) 또는 아미노아실 티알엔에이 중합효소 복합체-결합 다기능 단백질(aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein, AIMP)의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0023] (c) 상기 측정된 단백질 발현 수준을 대조군과 비교하여 단백질 발현 수준의 변화가 확인된 피검체를 갑상선 여포암에 걸린 것으로 판정하는 단계를 포함하는 갑상선 여포암의 마커를 검출하는 방법을 제공한다.

[0024]

[0025] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0027] **본 발명은 갑상선 여포암(follicular thyroid carcinoma)의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여**

[0028] **(a) 갑상선 여포암이 의심되는 피검체로부터 시료를 제공하는 단계;**

[0029] **(b) 상기 시료에서 아미노아실 티알엔에이 중합효소(aminoacyl-tRNA synthetase, ARS) 또는 아미노아실 티알엔에이 중합효소 복합체-결합 다기능 단백질(aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein, AIMP)의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계; 및**

[0030] **(c) 상기 측정된 단백질 발현 수준을 대조군과 비교하여 단백질 발현 수준의 변화가 확인된 피검체를 갑상선 여포암에 걸린 것으로 판정하는 단계를 포함하는 갑상선 여포암의 마커를 검출하는 방법을 제공한다.**

[0032] 상기 (a) 단계는 본 발명의 방법에 따라 갑상선 여포암이 의심되는 환자에서 감상선 여포암의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 피검체의 시료를 제공하는 단계이다.

[0034] 본 발명에서 '진단' 은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명에서의 진단은 아미노아실 티알엔에이(ARS) 또는 아미노아실 티알엔에이 중합효소 복합체-결합 다기능 단백질(AIMP)의 발현 수준을 측정하여 갑상선 여포암이 발생한 것으로 판정하는 것이며, 특히 여포 선종과 같은 양성 종양과 구분하여 갑상선 여포암인 것으로 확인하는 것을 의미한다.

[0036] '갑상선 여포암(follicular thyroid cancer, FTC)' 은 갑상선에 생기는 악성 종양으로, 주로 갑상선호르몬의 생성과 관련이 있는 선 조직에서 발병하는 갑상선 분화암의 한 가지이며, 혈액을 통하여 다른 조직으로 전이되는 특징이 있다. 갑상선 여포암은 주로 건강검진의 초음파 검사 또는 촉진 등에 의하여 통증 없이 우연히 갑상선 결절로 발견되는 경우가 많다. 갑상선암은 갑상선 초음파 검사를 통하여 갑상선 종양의 크기, 위치, 모양 등을 확인되며, 초음파로 갑상선을 관찰하면서 미세침으로 갑상선을 찔러 갑상선 세포를 채취하여 세포 모양을 확인하여 진단을 내리게 되는데(미세침흡인세포검사, fine needle aspiration cytology), 갑상선 여포암의 경우에는 세포 모양이 여포 선종(follicular adenoma, FA) 등 양성 종양과 같아 구분되지 않는다. 따라서 현재 진단 방법은 병리 조직을 외과적 방법으로 채취하고, 조직 검사에 의하여 최종 확인하는 것으로, 악성 종양인 것이 확실하지 않은데도 수술을 해야 하고, 악성 종양인 것이 확인되면 종양을 완전히 제거하기 위하여 재수술을 해야 하는 경우도 생기는 등 효율적이지 않다.

[0037] 이에 본 발명의 방법은 갑상선에 종양이나 결절이 발견되어 종양의 악성 여부를 확인해야 하는 환자에서 비외과적인 방법으로 갑상선 여포암을 명확하게 진단할 수 있는 새로운 진단 마커와 방법을 제공하기 위한 것이다.

[0039] 일실시예에서 본 발명자들은 갑상선 여포암과 여포 선종 조직에서 질량 분석(MS)과 단백질 시퀀싱으로 총 4000개 이상의 단백질을 동정하고, 양 병리 조직에서의 단백질 수준을 비교 분석하였다. Gene ontology 분석 결과, 여포 선종에서는 oxidation/reduction, protein localization, intracellular transport와 관련된 단백질들이 두드러진 반면, 갑상선 여포암에서는 proteolysis, macromolecule catabolic process, RNA processing 그리고 cell cycle 관련된 단백질들이 우세한 것으로 나타났다.

[0040] 특히 상기 동정된 단백질 중, 아미노아실 티알엔에이 중합효소와 이와 관련된 단백질에 대하여 MS peak area를 이용하여 정량분석을 실시한 결과, 다수의 단백질이 갑상선 여포암과 여포 선종에서 존재 수준이 상이한 것을 확인하였다. 구체적으로, AARS, DARS, EPRS, WARS, GARS, IARS cytoplasmic, YARS, NARS, QARS, RARS, SARS cytoplasmic, TARS는 여포 선종과 비교하여 갑상선 여포암에서 단백질 수준이 감소한 것으로 관찰되었으며, 반대로 AIMP1, IRS mitochondrial, SARS mitochondrial, KARS, VARS, FARSA는 갑상선 여포암에서 단백질 수준이 높은 것으로 확인되었다.

[0042] 따라서 본 발명자들이 상기 규명한 아미노아실 티알엔에이 중합효소와 이와 관련된 단백질의 수준의 차이를 이용하여, 즉 상기 기재된 단백질 중 한 종류 이상을 선택하여 피검체의 시료에서 단백질 수준을 측정함으로써 세포학적으로는 구분이 어려운 갑상선 여포암과 여포 선종을 구별할 수 있는 진단용 마커로 개발할 수 있음을 이해할 수 있다.

[0044] 앞서 서술한 바와 같이, 본 발명의 방법에서의 피검체는 갑상선 여포암이 의심되는 환자일 수 있다. 즉, 갑상선에 종양이나 결절이 발견되어 종양이나 결절이 악성인 갑상선 여포암인지, 양성인 여포 선종인지를 구별해야 하는 환자가 피검체가 된다.

[0046] 또한 본 발명의 방법을 실시하기 위한 시료는 갑상선 조직, 혈액, 혈장, 혈청, 림프액 및 소변으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다. 상기 시료는 공지의 방법에 따라 피검체에서 적절하게 채취될 수 있으며, 단백질 검출 방법에 따라 필요한 전처리 과정을 거칠 수 있다.

[0048] 상기 (b) 단계는 (a) 단계에서 채취한(분리한) 피검체의 시료에서 아미노아실 티알엔에이 중합효소(aminoacyl-tRNA synthetas, ARS) 또는 아미노아실 티알엔에이 중합효소 복합체-결합 다기능 단백질(aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein, AIMP)의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계이다.

[0050] 본 발명에서 '단백질'은 '폴리펩타이드(polypeptide)' 또는 '펩타이드(peptide)'와 호환성있게 사용되며, 예컨대, 자연 상태의 단백질에서 일반적으로 발견되는 바와 같이 아미노산 잔기의 중합체를 말한다.

[0052] 본 발명에서 '아미노아실 티알엔에이 중합효소(aminoacyl-tRNA synthetase 또는 aminoacyl-tRNA ligase, ARS)'는 아미노산을 적절한 티알엔에이(tRNA)에 연결시키는 아미노아실레이션(aminoacylation) 반응을 매개하는 효소이다. 티알엔에이 결합효소(tRNA ligase)라고 부르기도 한다. 20가지 아미노산 중, 글루탐산(glutamic acid)와 프롤린(proline)은 세포질에서는 하나의 ARS에 의하여 tRNA에 연결되는데, 이를 이중 기능성 아미노아실 티알엔에이 중합효소(bifunctional aminoayl-tRNA synthetase) 또는 bifunctional glutamyl-prolyl-tRNA synthetase라고 부른다. ARS는 크게 tRNA의 아데노신 뉴클레오티드의 2'-OH 말단에 aminoacylation 반응을 매개하는 Class I 계열과 3'-OH 말단에 aminoacylation 반응을 매개하는 Class II 계열로 나뉜다. Class I에는 아르기닌(arginine), 시스테인(cysteine), 글루탐산(glutamic acid), 글루타민(glutamine), 이소류신(isoleucine), 류신(leucine), 메치오닌(methionine), 트립토판(tryptophan), 발린(valine), 티로신(tyrosine)의 티알엔에이 중합효소가 있으며, Class II에는 알라닌(alanine), 아스파르트산(aspartic acid), 아스파라긴(asparagine), 글리신(glycine), 히스티딘(histidine), 리신(lysine), 페닐알라닌(phenyalanine), 프롤린(proline), 트레오닌(threonine), 세린(serine)의 티알엔이 중합효소가 있다.

[0053] 또한 세포내 분포 위치에 따라 세포질형(cytoplasmic) 또는 미토콘드리아형(mitochondrial)으로 존재하며, 본 명세서에서는 별도로 표시하지 않으면 세포질에 존재하는 형태인 것을 의미한다.

[0055] 본 발명의 관점에서 갑상선 여포암을 진단하기 위한 바이오마커로서 ARS는 보다 구체적으로는, 이소류신 티알엔에이 중합효소 미토콘드리아형(isoleucyl-tRNA synthetase mitochondrial, IARS mitochondrial), 세린 티알엔에이 중합효소 미토콘드리아형(seryl-tRNA synthetase mitochondrial, SARS mitochondrial), 라이신 티알엔에이 중합효소(lysyl-tRNA synthetase, KARS), 발린 티알엔에이 중합효소(valyl-tRNA synthetase, VARS), 페닐알라닌 티알엔에이 중합효소 알파 서브유닛(phenylalanyl-tRNA synthetase, FARS alpha subunit(FARSA)), 알라닌 티알엔에이 중합효소(alanyl-tRNA synthetase, AARS), 아스파르테이트 티알엔에이 중합효소(aspartyl-tRNA synthetase, DARS), 이중기능성 글루타메이트 프롤린 티알엔에이 중합효소(bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase 또는 glutamyl-prolyl-tRNA synthetase, EPRS), 트립토판 티알엔에이 중합효소(tryptophanyl-tRNA synthetase, WARS), 글리신 티알엔에이 중합효소(glycyl-tRNA synthetase, GARS), 이소류신 티알엔에이 중합효소 세포질형(isoleucyl-tRNA synthetase cytoplasmic, IARS cytoplasmic), 타이로신 티알엔에이 중합효소(tyrosyl-tRNA synthetase, YARS), 아스파라진 티알엔에이 중합효소(asparagyl-tRNA synthetase, NARS), 글루타민 티알엔에이 중합효소(glutaminyl-tRNA synthetase, QARS), 아르지닌 티알엔에이 중합효소(arginyl-tRNA synthetase, RARS), 세린 티알엔에이 중합효소 세포질형(seryl-tRNA synthetase cytoplasmic, SARS cytoplasmic) 및 트레오닌 티알엔에이 중합효소(threonyl-tRNA synthetase, TARS) 중에서 선택된 하나 이상의 단백질일 수 있다. 상기 ARS 들은 인간 유래인 것이라면 그 구체적 서열이 특별히 제한되지 않으나, 본 명세서 **표 5**에 기재된 서열정보를 참고로 할 수 있다.

[0057] 본 발명에서 '아미노아실 티알엔에이 중합효소 복합체-결합 다기능 단백질(aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein, AIMP)'은 다중-tRNA 합성효소 복합체(multi-tRNA synthetase complex, MSC)에 결합하여 다중-tRNA 합성효소의 촉매 활성(catalytic activity)을 증진시키는 것으로 알려진 단백질로, 인간에서는 AIMP1(aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 1), AIMP2(aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 2), AIMP3(aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 3) 등이 알려져 있다. 보다 구체적으로, 본 발명에서의 AIMP는 p43으로도 알려져 있는 AIMP1일 수 있다. 상기 AIMP(특히, AIMP1)는 인간 유래인 것이라면 그 구체적 서열이 특별히 제한되지 않으나, 본 명세서 **표 5**에 기재된 서열정보를 참고로 할 수 있다.

[0059] 본 발명에서 '발현(expression)'은 세포에서 단백질 또는 핵산이 생성되는 것을 의미한다. 본 발명에서 단백질 발현 수준을 측정하는 방법은 공지의 방법을 적절히 선택하여 실시할 수 있다. 예를 들어, 웨스턴 블랏팅(western blotting), 닷 블랏팅(dot blotting), 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 방사능 면역분석법(RIA), 방사면역확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역 전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전법(immunoprecipitation), 보체 고정 분석법, 유세포 분석법(FACS), 단백질 칩(chip), 질량 분석(mass spectrometry) 방법 등이 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다. 가장 바람직하게는 질량 분석 방법으로 시료에서 단백질 수준을 측정할 수 있다.

[0061] 상기 (c) 단계는 상기 측정된 단백질 발현 수준을 대조군과 비교하여 단백질 발현 수준의 변화가 확인된 피검체를 갑상선 여포암에 걸린 것으로 판정하는 단계이다.

[0063] 갑상선 여포암이 의심되는 피검체에서 측정한 ARS 또는 AIMP의 발현 수준을 대조군과 비교하여;

[0064] 아미노아실 티알엔에이 중합효소 복합체-결합 다기능 단백질 1(AIMP1), 이소류신 티알엔에이 중합효소 미토콘드리아형(IARS mitochondrial), 세린 티알엔에이 중합효소 미토콘드리아형(SARS mitochondria), 라이신 티알엔에이 중합효소(KARS), 발린 티알엔에이 중합효소(VARS) 및 페닐알라닌 티알엔에이 중합효소 알파 서브유닛(FARSA) 중 하나 이상의 단백질의 수준이 증가한 경우; 및/또는

[0065] 알라닌 티알엔에이 중합효소(AARS), 아스파르테이트 티알엔에이 중합효소(DARS), 이중기능성 글루타메이트 프롤린 티알엔에이 중합효소(EPRS), 트립토판 티알엔에이 중합효소 (WARS), 글리신 티알엔에이 중합효소(GARS), 이소류신 티알엔에이 중합효소 세포질형(IARS cytoplasmic), 타이로신 티알엔에이 중합효소(YARS), 아스파라진 티알엔에이 중합효소(NARS), 글루타민 티알엔에이 중합효소(QARS), 아르지닌 티알엔에이 중합효소(RARS), 세린 티알엔에이 중합효소 세포질형(SARS cytoplasmic) 및 트레오닌 티알엔에이 중합효소(TARS) 중 하나 이상의 단백질의 수준이 감소한 경우;

[0066] 에 피검체가 갑상선 여포암에 걸린 것으로, 또는 피검체에서 발견된 갑상선 종양 또는 결절이 갑상선 여포암인 것으로 판단할 수 있다.

[0068] 상기 대조군은 갑상선에 종양 또는 결절이 존재하며, 상기 종양 또는 결절이 양성 종양인 여포 선종(FA)으로 확인된 환자인 것이 바람직하다. 이 경우, 피검체에서 갑상선 여포암의 마커를 검출하기 전, 미리 다수 FA 환자에 대하여 ARS 또는 아미노아실 티알엔에이 중합효소 복합체-결합 다기능 단백질(AIMP)을 측정하여 FA로 확인되는 환자에서 기대되는 단백질 수준의 범위 또는 기준치를 도출하고, 이후 갑상선 여포암이 의심되는 피검체에서 측정된 단백질 수준과 비교하여 차이를 판단하는 방식으로 본 발명의 방법을 실시하게 된다.

[0069] 상기 갑상선 여포암이 의심되는 피검체의 ARS 또는 AIMP의 발현 수준을 대조군과 비교하는 단계는 본 발명에 따른 마커 단백질을 이용하여 FTC와 FA를 명확하게 판별할 수 있는 방법이라면 제한 없이 사용하여 실시할 수 있다. 예를 들어, 본 명세서의 일실시예에서 기재한 바와 같이, 비교 대상 그룹에서 측정된 ARS 단백질 또는 AIMP 단백질 발현 수준을 나타내는 수치, 즉 조직 시료에서 측정된 마커 단백질의 농도 또는 MS 분석으로 도출된 마커 단백질의 ion peak area 등의 수치를 직접 비교할 수 있다. 또한 'FA 환자군 대비 FTC 환자군의 ARS 또는

AIMP 단백질 발현 수준의 비율' 과 같이 비교 대상 그룹 간의 상대적인 수치를 판단의 척도로 할 수도 있다.

[0070] 나아가 상기 열거한 ARS 또는 AIMP 마커 단백질은 FA 또는 FTC를 구분짓는 특정한 발현 패턴을 나타내므로, 갑상선 여포암을 진단하기 위하여 복수의 마커 단백질을 선택하여 발현 수준을 측정하고, 발현 패턴을 도출하여 이를 기초로 FTC를 진단할 수도 있다. 상기 발현 패턴이란 다수의 마커 단백질의 발현 수준을 측정하고 동시에 비교하여 관찰되는 발현 양상이나 마커 단백질들의 발현 순위 등의 지표로 표현되는 것으로서, 발현의 정성적인 특징을 나타내는 것이다.

[0072] **또한 본 발명은 아미노아실 티알엔에이 중합효소(aminoacyl-tRNA synthetase, ARS) 또는 아미노아실 티알엔에이 중합효소 복합체-결합 다기능 단백질(aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein, AIMP)의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 갑상선 여포암의 진단용 조성물을 제공한다.**

[0074] 상기 본 발명의 갑상선 여포암의 진단용 조성물은 바람직하게 감상선 여포암과 여포 선종을 구분용 조성물 일 수 있으며, 구체적인 ARS 및 AIMP의 종류, 이들의 검출 특성은 전술한 바를 참조하여 이해될 수 있다.

[0076] 본 발명의 ARS 및 AIMP의 발현 수준을 측정하는 제제는 전술한 구체적 단백질에 특이적으로 부착하는 리간드라면 그 종류가 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어 상기 단백질에 특이적인 결합도메인을 갖는 펩타이드, 항체, 또는 앱타머일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0078] 상기 "항체" 란 당해 기술분야에 공지된 용어로서 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역 글로불린을 의미한다. 상기 언급한 하나 이상의 단백질 주입을 통해 제조된 것 또는 시판되어 구입한 것이 모두 사용 가능하다. 또한, 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체, 키메릭 항체 및 에피토프와 결합할 수 있는 단편 등을 포함한다.

[0080] 상기 "펩타이드" 란 온전한 항체의 구조를 갖지는 않지만, 항원성 부위에 대해 지시되는 특이적인 항원결합부위(결합 도메인)를 갖는 폴리펩티드를 의미한다. 상기 펩타이드는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 갖는 완전한 형태의 항체가 아닌 항체 분자의 기능적 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미한다. 상기 펩타이드의 길이는 특별히 제한되지 않으나, 예를 들어 2 내지 100개의 아미노산을 포함하는 것 일 수 있고, 바람직하게는 5 내지 50개의 아미노산을 포함하는 것 일 수 있다.

[0082] 상기 "앱타머" 는 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 올리고뉴클레오타이드 분자를 말한다. 상기 앱타머는 RNA, DNA, 수식(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 직쇄상 또는 환상의 형태일 수 있다.

[0084] **또한 본 발명은 상기 아미노아실 티알엔에이 중합효소(aminoacyl-tRNA synthetase, ARS) 또는 아미노아실 티알엔에이 중합효소 복합체-결합 다기능 단백질(aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein, AIMP)의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 갑상선 여포암의 진단용 키트를 제공한다.**

[0086] 본 발명의 진단용 키트에는 ARS 또는 AIMP 발현 수준을 측정하기 위하여 선택적으로 상기 단백질들을 마커로 인식하는 펩타이드, 항체, 앱타머 뿐만아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 조성물(항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(항체와 컨주게이트된 형태로서) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질, 효소와 발색 반응할 기질 및 결합되지 않은 단백질 등은 제거하고 결합된 단백질 마커 만을 보유할 수 있는 세척액또는 용리액 등), 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.

발명의 효과

[0088] 따라서, 본 발명은 아미노아실 티알엔에이 중합효소 관련 단백질 발현 수준을 이용한 갑상선 여포암 진단 마커 검출 방법을 제공한다. 본 발명자들은 갑상선의 양성 종양인 여포 선종과 갑상선 여포암 조직에서 다수의 아미노아실 티알엔에이 중합효소와 관련 단백질의 수준이 차별적이라는 점을 확인하였으며, 구체적으로 본 발명에서 개시하고 있는 단백질 종류들은 수술을 통한 조직 채취 없이 간단하고 명확하게 갑상선 여포함의 진단이 가능하며, 진단 민감도 및 특이성이 높다.

도면의 간단한 설명

[0090] 도 1은 여포 선종(FA)과 갑상선 여포암(FTC) 조직의 단백질체 분석 결과로 동정된 단백질의 수를 나타낸다.

도 2는 여포 선종(FA)과 갑상선 여포암(FTC) 조직에서 AIMP1, IARS mitochondrial, SARS mitochondrial, KARS, VARS, FARSA(FARS alpha subunit)의 단백질 수준을 비교하는 MS(질량분석기) 실험 결과를 나타낸다. 그래프의 y축은 해당 단백질들을 구성하는 peptide들에 대하여 질량분석기로 검출된 ion peak area를 표시하며, 이는 양적 수치(quantitative value)로 활용할 수 있다.

도 3은 여포 선종(FA)과 갑상선 여포암(FTC) 조직에서 AARS, DARS, EPRS, WARS, GARS, IARS cytoplasmic의 단백질 수준을 비교하는 MS(질량분석기) 실험 결과를 나타낸다. 그래프의 y축은 해당 단백질들을 구성하는 peptide들에 대하여 질량분석기로 검출된 ion peak area를 표시하며, 이는 양적 수치(quantitative value)로 활용할 수 있다.

도 4는 여포 선종(FA)과 갑상선 여포암(FTC) 조직에서 YARS, NARS, QARS, RARS, SARS cytoplasmic, TARS의 단백질 수준을 비교하는 MS(질량분석기) 실험 결과를 나타낸다. 그래프의 y축은 해당 단백질들을 구성하는 peptide들에 대하여 질량분석기로 검출된 ion peak area를 표시하며 이는 양적 수치(quantitative value)로 활용할 수 있다.

도 5는 여포선종(Follicular adenoma)과 갑상선 여포암(Follicular thyroid carcinoma) 조직에서 AIMP1 단백질 수준을 웨스턴블롯으로 비교한 결과를 나타낸다.

도 6은 여포선종(Follicular adenoma)과 갑상선 여포암(Follicular thyroid carcinoma) 조직에서 AIMP1 단백질 수준을 웨스턴블롯으로 확인한 후, 상기 웨스턴블롯에 의한 Band intensity를 도출하여 Receiver Operating Characteristic (ROC) 분석을 수행하고 Area Under Curve (AUC)를 산출한 결과를 나타낸다.

도 7은 AIMP1 단백질 수준 측정에 의한 여포선종(FA)과 갑상선 여포암(FTC) 의 구분에 있어서 Interactive plotting 분석 결과를 나타내는 것으로서, AIMP1은 갑상선 여포암과 여포 선종을 민감도 90%, 특이도 70%로 구분할 수 있음을 확인하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0091] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0092] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0094] **< 실험 방법 >**

[0095] 1. 임상 시료

[0096] 갑상선 조직은 서울아산병원 세포조직자원센터에 연구를 위한 인체유래물 기증 동의서를 작성하고 기증된 검체를 사용하였다. 연구와 관련된 프로토콜은 서울아산병원 임상윤리심의위원회(승인번호: 2013-0539)에서 승인받았다. 본 연구에서는 갑상선 여포암(FTC) 환자로부터 채취된 갑상선 조직 10례, 여포 선종(FA) 환자로부터 채취된 갑상선 조직 10례를 조직 시료로 사용하였다. 대상 환자는 artificial bias를 최소화하기 위해 환자의 나이와 성별을 무작위로 선택하여 선정하였다.

[0098] 2. 단백질 분석

[0099] FTC와 FA 환자에서 채취한 갑상선 조직은 각각 tissue homogenization하고, 1% SDS와 protease/phosphatase inhibitor cocktail이 추가된 RIPA buffer로 protein extraction을 실시하였다. 추출된 단백질은 BCA 정량 후, 각 환자의 시료 100㎍씩 혼합하여 pooling set을 제조하였다. Filter-aided sample preparation(FASP)법으로 peptide를 제조하고, Nano LC-Q Exactive 질량 분석(mass spectrometry)과 단백질 분석을 수행하였다. 구체적인 실험 방법은 다음과 같다:

[0100] - 20cm C18 capillary column(OD 360㎛, ID 75㎛)으로 120분 분획하고;

[0101] - 80분 gradient (5~45% acetonitrile and 0.1% formic acid solution)으로 분획하고;

[0102] - Top 5 intensity precursor에 대해 data dependent acquisition(DDA) mode로 data 수집한 후;

[0103] - 수집된 데이터는 Proteome discoverer 1.4 프로그램을 이용하여 sequence database와 비교하고, peak area를 분석하였다. 또한 DAVID gene ontology 분석을 수행하였다.

[0105] 3. Western blot 분석

[0106] FTC와 FA 환자 각각 10명에서 채취한 갑상선 조직 lysate 20ug씩을 취하고 SDS PAGE 전기 영동을 수행하였다. 전기 영동된 PAGE gel을 폴리비닐리덴 다이플로라이드(polyvinlylidene difluoride, PVDF) membrane (Millipore) 으로 단백질을 이동 시킨 후, Bovine sreum albumin으로 blocking을 수행하였다. 1차 반응은 monoclonal mouse anti-human AIMP1 항체 (1:500) 및 mouse anti-human beta actin (1:1000) 항체로 4도씨에서 6시간 반응 후 goat anti-mouse HRP-결합 2차 항체 (1:4000)를 이용하여 블롯 (blot) 검출을 진행하였다. Band Intensity는 ImageJ (version 1.48)을 이용하여 측정하였으며 Receiver Operating Characteristics (ROC) 분석 및 Area Under Curve (AUC), Inteactive plot 분석은 MedCalc (vesion 17.6)을 이용하여 수행하였다.

[0108] **<실시예 1>**

[0109] **갑상선 조직 단백질 동정**

[0110] 여포 선종 조직에서 총 2,909개, 갑상선 여포암 조직에서 각각 2,739개 단백질을 동정하였으며, 총 4,162개의 단백질들을 동정하였다(**도 1**). 이는 이때까지 학계에 보고된 바 없는, 가장 광범위한 갑상선암 관련 단백질 분석 결과이다.

[0112] **<실시예 2>**

[0113] **Gene ontology 분석**

[0114] Gene ontology 분석 결과, 여포 선종 환자군의 시료에서는 oxidation/reduction, protein localization, intracellular transport와 관련된 단백질들의 기능적 분류가 두드러진 반면(**표 2**), 갑상선 여포암 환자군의 경우, proteolysis, macromolecule catabolic process, RNA processing 그리고 cell cycle 관련된 단백질들의 기능적 분류가 차별적으로 나타났다(**표 1**).

표 1

FTC 특이적으로 발현되는 단백질군

Functional annotation (FTC specific proteome)

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
proteolysis	RT		65	8.9	4.9E-3	1.9E-1
protein localization	RT		59	8.0	1.3E-3	6.4E-2
establishment of protein localization	RT		56	7.6	2.3E-4	1.6E-2
intracellular transport	RT		55	7.5	6.2E-6	6.2E-4
protein transport	RT		54	7.4	5.8E-4	3.4E-2
macromolecule catabolic process	RT		54	7.4	1.0E-3	5.3E-2
RNA processing	RT		50	6.8	1.6E-6	2.1E-4
cell cycle	RT		50	6.8	6.4E-3	2.1E-1
negative regulation of macromolecule metabolic process	RT		49	6.7	3.6E-3	1.5E-1
positive regulation of macromolecule metabolic process	RT		49	6.7	4.9E-2	5.9E-1

[0116]

표 2

FA 특이적으로 발현되는 단백질군

Functional annotation (FA specific proteome)

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
oxidation reduction	RT		56	7.1	4.0E-6	5.3E-3
protein localization	RT		54	6.8	2.3E-2	6.2E-1
intracellular transport	RT		52	6.6	1.4E-4	3.9E-2
protein transport	RT		50	6.3	9.1E-3	4.5E-1
establishment of protein localization	RT		50	6.3	1.1E-2	4.7E-1
phosphorylation	RT		48	6.1	4.3E-2	7.0E-1
translation	RT		45	5.7	1.5E-10	3.9E-7
biological adhesion	RT		45	5.7	1.9E-2	5.9E-1
cell adhesion	RT		45	5.7	2.0E-2	5.9E-1
vesicle-mediated transport	RT		44	5.5	1.0E-3	1.5E-1

[0118]

[0120] 특히 갑상선 여포암 갑상선 조직에서 특이적으로 발현되는 단백질 중, focal adhesion과 관련된 단백질들이 여포 선종 갑상선 조직에 비해 유의적으로 증가한 것으로 나타났다. 또한 spliceosome과 관련된 단백질도 갑상선 여포암에서 특이적으로 증가한 것으로 나타났다.

[0121]

[0122] **<실시예 3>**

[0123] **ARS(aminoacyl-tRNA synthetase) 관련 단백질 발현 경향 분석**

[0124] 분석 결과로 동정된 단백질 중, ARS 관련 단백질들을 선별하여 peak area를 기준으로 label free semi-quantification을 수행하였다. 그 결과, 여포 선종 조직에서는 20개, 갑상선 여포암 조직에서는 21개의 ARS와

AIMP가 확인되었으며, 정량 분석 결과는 하단의 표에 나타낸 바와 같다(표 3, 표 4).

표 3

FA에서 발현되는 ARS와 AIMP 단백질

ARSs in Follicular adenoma tissue

Description	Gene Symbol	Uniprot ID	Peak Area
Alanine-tRNA ligase, cytoplasmic	AARS	SYAC_HUMAN	1125849500
Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1	AIMP1	AIMP1_HUMAN	85053716
Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2	AIMP2	A8MU58_HUMAN	71773240
Arginine-tRNA ligase, cytoplasmic	RARS	SYRC_HUMAN	661244666
Asparagine-tRNA ligase, cytoplasmic	NARS	SYNC_HUMAN	943432533
Aspartyl-tRNA synthetase, isoform CRA	DARS	D3DP78_HUMAN	796052746
Bifunctional glutamate/proline-tRNA ligase	EPRS	SYEP_HUMAN	1905052478
Glycine-tRNA ligase	GARS	SYG_HUMAN	289437841
Isoleucine-tRNA ligase, cytoplasmic	IARS	J3KR24_HUMAN	543348221
Isoleucine-tRNA ligase, mitochondrial	IARS2	SYIM_HUMAN	310599507
Lysine-tRNA ligase	KARS	SYK_HUMAN	171681552
Phenylalanine-tRNA ligase alpha subunit	FARSA	B4E363_HUMAN	91568703
QARS protein (Fragment)	QARS	Q96AW5_HUMAN	382807833
Serine-tRNA ligase, cytoplasmic	SARS	SYSC_HUMAN	13939590732
Serine-tRNA ligase, mitochondrial	SARS2	SYSM_HUMAN	54572943
Threonine-tRNA ligase, cytoplasmic	TARS	SYTC_HUMAN	366450168
Tryptophan-tRNA ligase, cytoplasmic	WARS	SYWC_HUMAN	1005292231
Tyrosine-tRNA ligase, cytoplasmic	YARS	SYYC_HUMAN	2381826769
Tyrosine-tRNA ligase, mitochondrial	YARS2	SYYM_HUMAN	78858264
Valyl-tRNA synthetase (Fragment)	VARS	A2BEY0_HUMAN	112446540

[0126]

표 4

FTC에서 발현되는 ARS와 AIMP 단백질

ARSs in Follicular thyroid carcinoam tissue

Description	Gene Symbol	Uniprot ID	Peak Area
Aspartate-tRNA ligase, cytoplasmic	DARS	SYDC_HUMAN	676501313
Isoleucine-tRNA ligase, mitochondrial	IARS2	SYIM_HUMAN	405032150
Serine-tRNA ligase, cytoplasmic	SARS	Q5T5C7_HUMAN	6841913593
Alanine-tRNA ligase, cytoplasmic	AARS	SYAC_HUMAN	259092335
Asparagine-tRNA ligase, cytoplasmic	NARS	SYNC_HUMAN	699339102
Tryptophan-tRNA ligase, cytoplasmic	WARS	SYWC_HUMAN	488259749
Tyrosine-tRNA ligase, cytoplasmic	YARS	SYYC_HUMAN	289391829
Valine-tRNA ligase	VARS	B0V043_HUMAN	380930687
Phenylalanine-tRNA ligase alpha subunit	FARSA	SYFA_HUMAN	116709397
Histidine-tRNA ligase, cytoplasmic	HARS	J3KNE5_HUMAN	244441275
Threonine-tRNA ligase, cytoplasmic	TARS	B4DEG8_HUMAN	226134539
FARSB protein (Fragment)	FARSB	Q9BR63_HUMAN	209463210
Cysteine-tRNA ligase, cytoplasmic	CARS	B4DKY1_HUMAN	64458226
Glutamine-tRNA ligase	QARS	SYQ_HUMAN	293130531
Serine-tRNA ligase, mitochondrial	SARS2	SYSM_HUMAN	3864844815
Glycine-tRNA ligase	GARS	SYG_HUMAN	276263425
Isoleucine-tRNA ligase, cytoplasmic	IARS	J3KR24_HUMAN	229288160
Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1	AIMP1	AIMP1_HUMAN	412726062
Lysine-tRNA ligase	KARS	SYK_HUMAN	1278127747
Bifunctional glutamate/proline-tRNA ligase	EPRS	SYEP_HUMAN	399164615
Arginine-tRNA ligase, cytoplasmic	RARS	SYRC_HUMAN	196971392

[0127]

[0128] 특히, 갑상선 여포암 조직에서는 비교대상인 여포 선종 조직보다 AARS(Alanine-tRNA ligase)는 감소하고 AIMP1(aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 1)과 KARS(lysine-tRNA ligase), VARS(valine-tRNA ligase)는 증가하는 것으로 나타났다(**도 2**, **도 3**). 갑상선 여포암 조직에서 양성 종양인 여포 선종과 비교하여 AIMP1과 KARS가 증가하는 것은 본 연구에서 처음으로 확인된 것이다.

[0129] 그 밖에, AARS를 비롯한 DARS(aspartate-tRNA ligase), EPRS(bifunctional glutamate/proline-tRNA ligase), WARS(tryptophan-tRNA ligase), GARS(glycine-tRNA ligase), IARS cytoplasmic(isoleucine-tRNA ligase cytoplasmic), YARS(tyrosine-tRNA ligase), NARS(asparagine-tRNA ligase), QARS(glutamine-tRNA ligase), RARS(arginine-tRNA ligase), SARS cytoplasmic(serine-tRNA ligase cytoplasmic), TARS(threonine-tRNA ligase) 등은 여포 선종과 비교하여 갑상선 여포암에서 단백질 수준이 감소한 것으로 관찰되었으며(**도 3**, **도 4**), 이와는 반대로 AIMP1를 비롯한 IARS mitochondrial(isoleucine-tRNA ligase mitochondrial), SARS mitochondrial(serine-tRNA ligase mitochondrial), KARS(lysine-tRNA ligase), VARS(valine-tRNA ligase), FARS alpha subunit(phenylalanine-tRNA ligase alpha subunit) 등은 반대의 경향을 나타내었다(**도 2**). 이러한

차이를 나타내는 단백질들은 여포 선종으로부터 갑상선 여포암을 구분하는 바이오마커로서 이용가능하며, 본 발명에서 발굴된 바이오마커들의 서열정보를 하기 **표 5**에서 제공한다.

표 5

[0131]

구분	Gene symbol	seq. refernce (NCBI GenBank GI No.)
up	AIMP1	215490009
	IARS mitochondrial	94730583
	SARS mitochondria	23822219
	KARS	20178333
	VARS	1194845281
	FARSA	12643946
down	AARS	115502460
	DARS	20178330
	EPRS	288558855
	WARS	135191
	GARS	313104283
	IARS cytoplasmic	239938717
	YARS	13638438
	NARS	3915059
	QARS	1351170
	RARS	20178331
	SARS cytoplasmic	19860217
	TARS	60267755

[0133] **<실시예 4>**

[0134] **FA와 FTC 그룹에서 AIMP1 단백질 정량 분석**

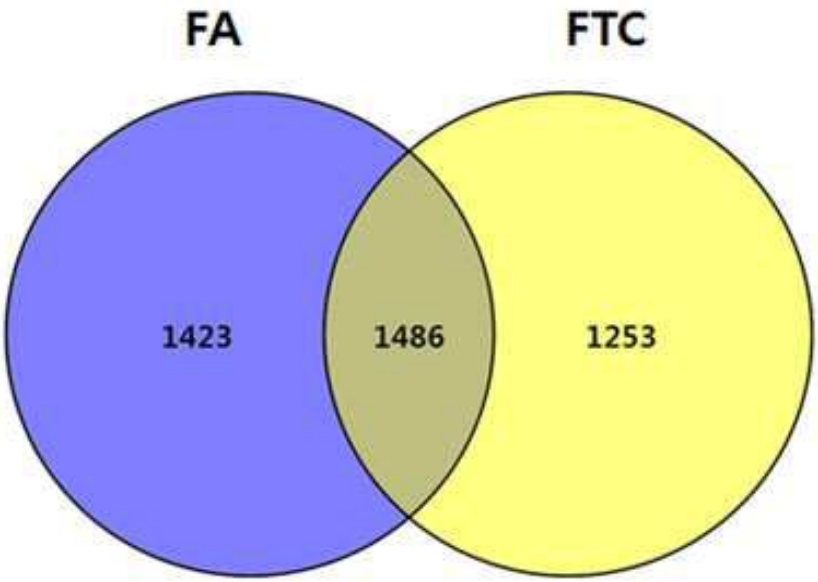
[0135] 상기 실시예 3에서 발굴한 FTC와 FA 구분 바이오마커들 중에서 대표적으로 AIMP1을 사용하여, 이의 검출 능력을 확인하였다. 여포 선종 조직 10개와 갑상선 여포암 조직 10개에서의 AIMP1 단백질의 양을 Western blot으로 분석하였으며, 대표적인 분석 결과는 **도 5**에 나타내었다. Band intensity를 도출하여 Receiver Operating Characteristic (ROC) 분석을 수행하였으며 Area Under Curve (AUC)를 산출하였다. 그 결과 AUC는 0.770으로 나타났으며 significance level은 0.0195로 나타났다(**도 6** 참조). **도 7**에서 보는 바와 같이, Interactive plotting 분석 결과 AIMP1은 갑상선 여포암과 여포 선종을 민감도 90%, 특이도 70%로 구분할 수 있는 것으로 나타났다.

산업상 이용가능성

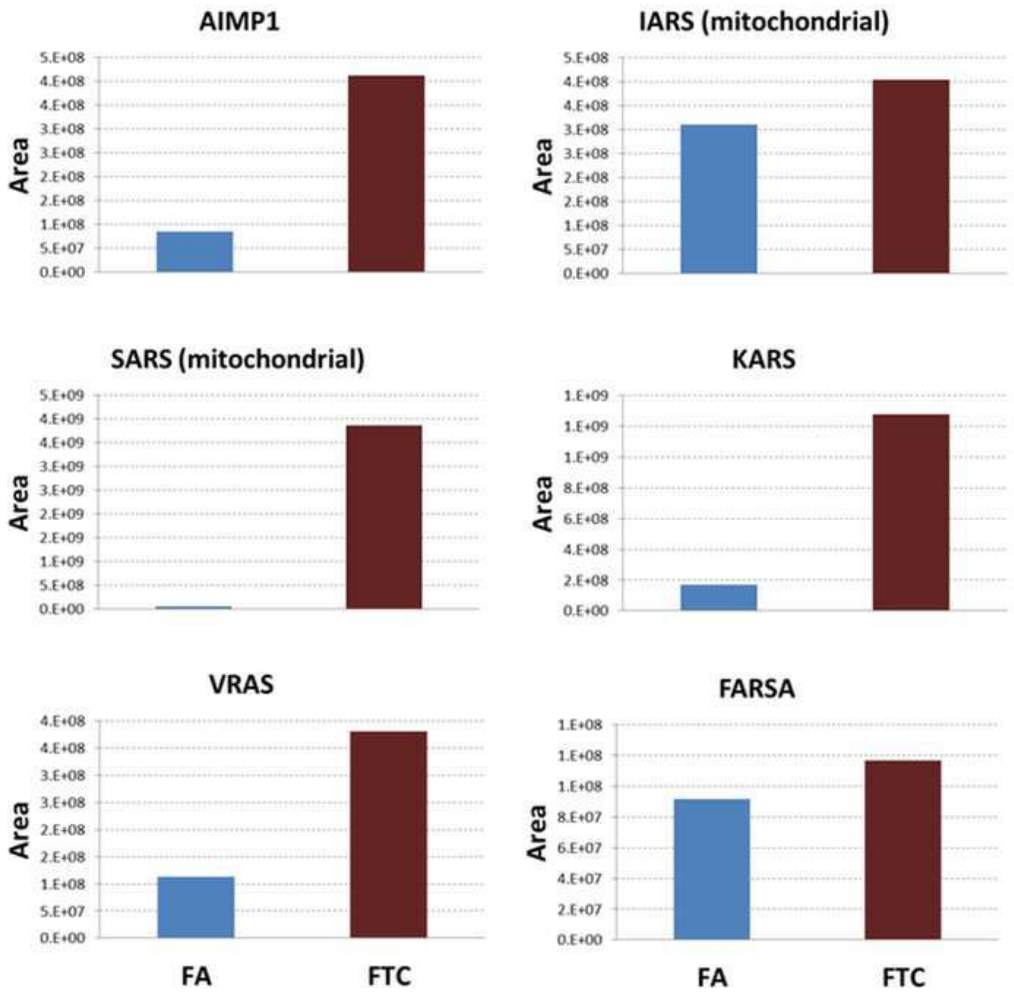
[0137] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에서 개시하는 ARS 또는 AIMP 단백질 종류들은 간단하고 명확한 진단 방법이 부재한 갑상선 여포암에 대하여 수술을 통한 조직 채취 없이 여포 선종 등의 양성 종양과 구분할 수 있는 진단용 마커로서, 체외 진단 산업 등의 분야에서 유용하게 이용될 수 있다.

도면

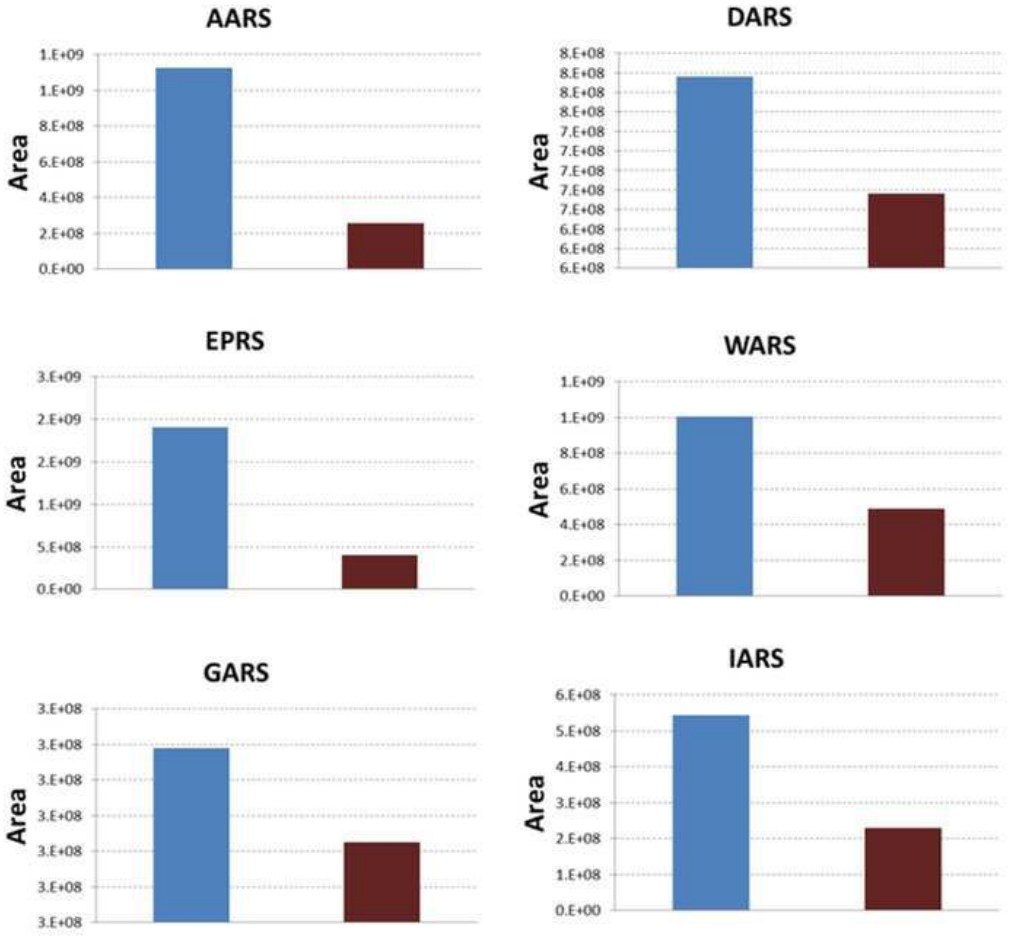
도면1


FA
FTC
1423
1486
1253

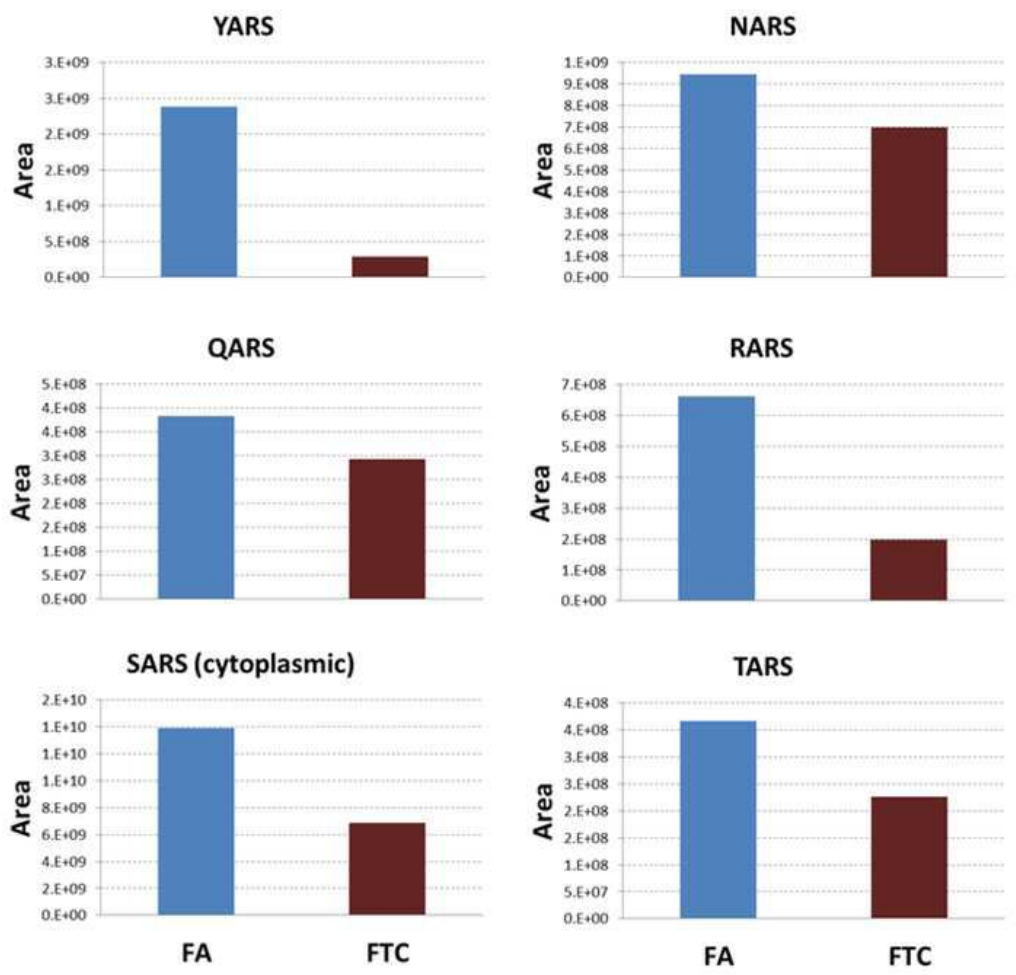
도면2


AIMP1
IARS (mitochondrial)
SARS (mitochondrial)
KARS
VRAS
FARSA
Area
FA
FTC

도면3


AARS
Area
1.E+09
1.E+09
8.E+08
6.E+08
4.E+08
2.E+08
0.E+00
DARS
Area
8.E+08
8.E+08
8.E+08
8.E+08
7.E+08
7.E+08
7.E+08
7.E+08
7.E+08
6.E+08
6.E+08
6.E+08
EPRS
Area
3.E+09
2.E+09
2.E+09
1.E+09
5.E+08
0.E+00
WARS
Area
1.E+09
1.E+09
8.E+08
6.E+08
4.E+08
2.E+08
0.E+00
GARS
Area
3.E+08
3.E+08
3.E+08
3.E+08
3.E+08
3.E+08
3.E+08
IARS
Area
6.E+08
5.E+08
4.E+08
3.E+08
2.E+08
1.E+08
0.E+00

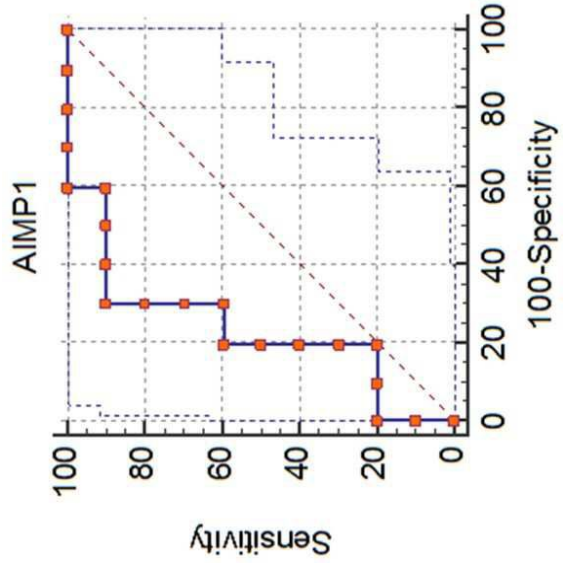
도면4


YARS
NARS
QARS
RARS
SARS (cytoplasmic)
TARS
Area
FA
FTC

도면5


AIMP
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Follicular adenoma
Anti-AIMP1
Anti-beta actin
Follicular thyroid carcinoma
Anti-AIMP1
Anti-beta actin

도면6

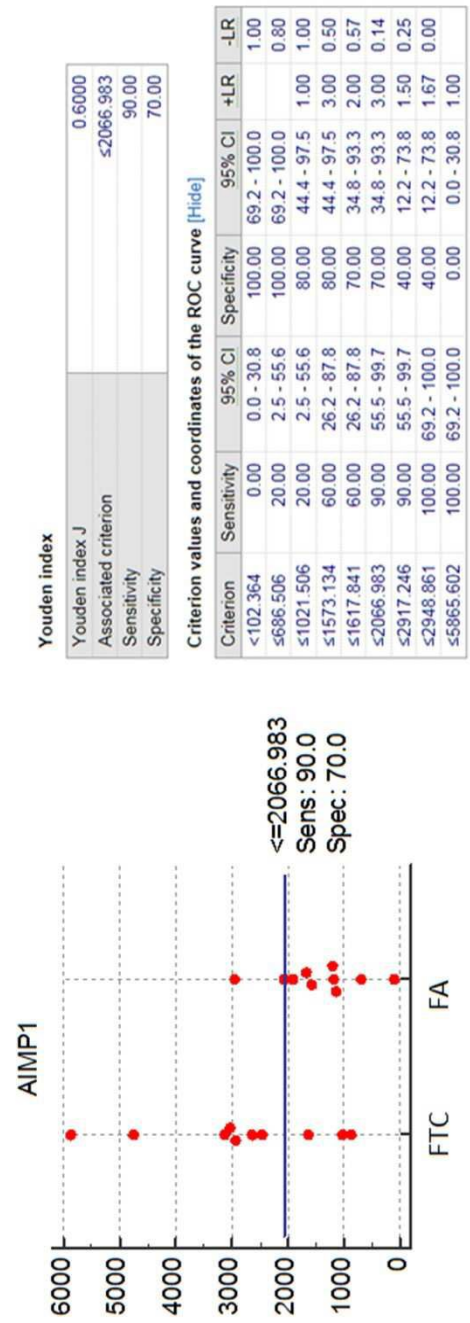


Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0.770
Standard Error [a]	0.116
95% Confidence interval [b]	0.530 to 0.926
z statistic	2.336
Significance level P (Area=0.5)	0.0195

[a] DeLong et al., 1988
[b] Binomial exact

도면7



Youden index

Youden index J	0.6000
Associated criterion	≤2066.983
Sensitivity	90.00
Specificity	70.00

Criterion values and coordinates of the ROC curve [Hide]

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
<102.364	0.00	0.0 - 30.8	100.00	69.2 - 100.0		1.00
≤686.506	20.00	2.5 - 55.6	100.00	69.2 - 100.0		0.80
≤1021.506	20.00	2.5 - 55.6	80.00	44.4 - 97.5	1.00	1.00
≤1573.134	60.00	26.2 - 87.8	80.00	44.4 - 97.5	3.00	0.50
≤1617.841	60.00	26.2 - 87.8	70.00	34.8 - 93.3	2.00	0.57
≤2066.983	90.00	55.5 - 99.7	70.00	34.8 - 93.3	3.00	0.14
≤2917.246	90.00	55.5 - 99.7	40.00	12.2 - 73.8	1.50	0.25
≤2948.861	100.00	69.2 - 100.0	40.00	12.2 - 73.8	1.67	0.00
≤5865.602	100.00	69.2 - 100.0	0.00	0.0 - 30.8	1.00	