(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0154724
(43) 공개일자 2024년10월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0050719
(22) 출원일자 2023년04월18일
심사청구일자 2023년04월18일

(71) 출원인
한국 한의학 연구원
대전광역시 유성구 유성대로 1672 (전민동)
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교 산학협력관 201호(신당동)
(72) 발명자
신소진
대구광역시 수성구 청수로 261, 1411동 1803호 (황금동, 캐슬골드파크 4단지)
정지연
전라북도 익산시 동서로19길 43, 2층 1호 (신동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

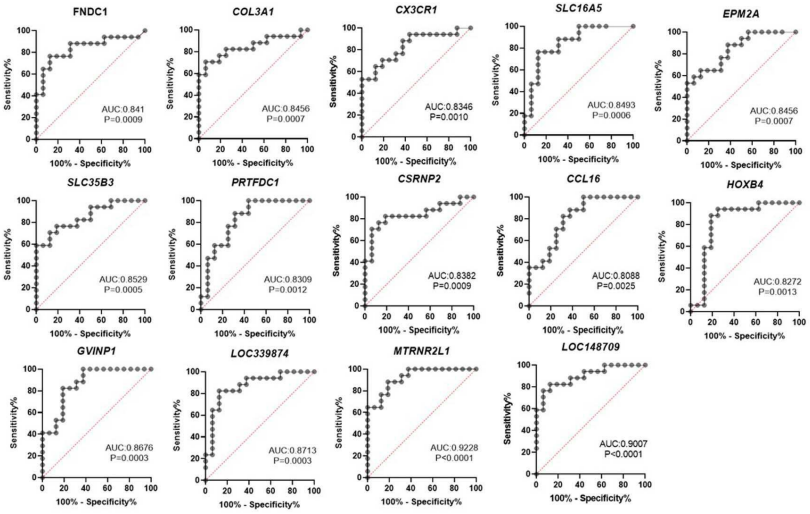
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **자궁근종 증식 속도 예측용 유전자 마커 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 자궁근종 증식 속도 예측용 유전자 마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 *FNDC1*, *COL3A1*, *CX3CR1*, *SLC16A5*, *EPM2A*, *SLC35B3*, *PRTFDC1*, *CSRNP2*, *CCL16*, *HOXB4*, *GVINP1*, *LOC339874*, *MTRNR2L1* 및 *LOC148709*로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 유효성분으로 포함하는 자궁근종 증식 속도 예측용 바이오 마커 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/118 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2800/36 (2013.01)

(72) 발명자
신사라
세종특별자치시 다정남로 22, 116동 1102호 (다정동, 가온마을1단지)
이소민
대전광역시 유성구 와룡로 206, 110동 1204호 (봉산동, 유성 대광로제비앙 리버포레 아파트)
장지혜
대전광역시 대덕구 대청로 43, 103동 2404호 (신탄진동, 대전 동일스위트 리버스카이 1단지)
서지혜
대구광역시 달서구 상원로 142, 107동 702호 (상인동, 상인자이)
김진영
대구광역시 수성구 수성로 393, 102동 301호 (수성동4가, 수성하이츠)
하은영
대구광역시 중구 달구벌대로 1955, 102동 502호 (대신동, 대신센트럴자이)
이승미
대구광역시 수성구 범안로 40, 203동 1101호 (범물동, 범물청아타운)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711195901
과제번호 KSN2311020 (KSN2311021)
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국한의학연구원
연구사업명 한국한의학연구원연구운영비지원(R&D)(주요사업비)
연구과제명 한의이론 기반 건강노화 제어기술 개발 (세부과제명: 건강노화를 위한 한의이론 과학화 연구)
기 여 율 24.5/100
과제수행기관명 한국한의학연구원
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711195898
과제번호 KSN1823210 (KSN1823213)
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국한의학연구원
연구사업명 한국한의학연구원연구운영비지원(R&D)(주요사업비)
연구과제명 한의의료기술의 임상근거 강화 (세부과제명: 대사질환 어혈 진단/치료 유효성 검증 연구)
기 여 율 24.5/100
과제수행기관명 한국한의학연구원
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465038887
과제번호 HI22C157400
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 공익적 의료기술연구사업
연구과제명 멀티오믹스기반 자궁근종 바이오마커 및 치료타겟 발굴
기 여 율 35.7/100
과제수행기관명 계명대학교산학협력단
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711186817
과제번호 2022R1A2C1005544
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 신장암 발생과 진행에서 글라이신 디카복실레이즈 (glycine decarboxylase)의 역할과 종양 슬리밍(slimming) 유도 기전 규명을 통한 항암제 개발 가능성 탐색
기 여 율 15.3/100
과제수행기관명 계명대학교
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

FNDC1 (fibronectin type Ⅲ domain containing 1), *COL3A1* (collagen type Ⅲ alpha 1), *CX3CR1* (C-X3-C motif chemokine receptor 1), *SLC16A5* (solute carrier family 16 member 5), *EPM2A* (epilepsy, progressive myoclonus type 2A, Lafora disease (laforin)), *SLC35B3* (solute carrier family 35 member B3), *PRTFDC1* (phosphoribosyl transferase domain containing 1), *CSRNP2* (cysteine and serine rich nuclear protein 2), *CCL16* (C-C motif chemokine ligand 16), *HOXB4* (homeobox B4), *GVINP1* (GTPase, very large interferon inducible pseudogene 1), *LOC339874*, *MTRNR2L1* (MT-RNR2-like 1) 및 *LOC148709*로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 유효성분으로 포함하는 자궁근종 증식 속도 예측용 바이오 마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 *FNDC1*, *COL3A1*, *CX3CR1*, *SLC16A5*, *EPM2A*, *SLC35B3*, *PRTFDC1*, *CSRNP2*, *CCL16*, *HOXB4*, *GVINP1*, *LOC339874*, *MTRNR2L1* 및 *LOC148709* 유전자는 순차적으로 서열번호 1 내지 14의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 자궁근종 증식 속도 예측용 바이오 마커 조성물.

청구항 3

FNDC1, *COL3A1*, *CX3CR1*, *SLC16A5*, *EPM2A*, *SLC35B3*, *PRTFDC1*, *CSRNP2*, *CCL16*, *HOXB4*, *GVINP1*, *LOC339874*, *MTRNR2L1* 및 *LOC148709*로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 전사체 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 자궁근종 증식 속도 예측용 마커 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 유전자의 전사체 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 자궁근종 증식 속도 예측용 마커 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 단백질 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체 또는 압타머인 것을 특징으로 하는 자궁근종 증식 속도 예측용 마커 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 *FNDC1*, *COL3A1*, *CX3CR1*, *SLC16A5*, *EPM2A*, *SLC35B3*, *PRTFDC1*, *CSRNP2*, *CCL16*, *HOXB4*, *GVINP1*, *LOC339874*, *MTRNR2L1* 및 *LOC148709* 유전자는 순차적으로 서열번호 1 내지 14의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 자궁근종 증식 속도 예측용 마커 조성물.

청구항 7

제3항 내지 제6항 중 어느 한 항의 마커 조성물을 포함하는 자궁근종 증식 속도 예측용 키트.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction), 실시간(real-time) PCR, 등온(isothermal) PCR, 노던 블랏팅, RNA 분해효소 보호분석법(RNase protection assay) 또는 마이크로어레이 칩인 것을 특징으로 하는 자궁근종 증식 속도 예측용 키트.

청구항 9

자궁근종 진단 개체로부터 분리된 근종 조직에서 표적 유전자의 전사체 또는 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

상기 측정된 발현 수준을 증식 속도가 느린 자궁근종 조직의 발현 수준과 비교하는 단계;를 포함하는, 자궁근종 진단 개체의 자궁근종 증식 속도 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 표적 유전자는 *FNDC1, COL3A1, CX3CR1, SLC16A5, EPM2A, SLC35B3, PRTFDC1, CSRNP2, CCL16, HOXB4, GVINP1, LOC339874, MTRNR2L1* 및 *LOC148709*로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 자궁근종 진단 개체의 자궁근종 증식 속도 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 증식 속도가 느린 자궁근종 조직은 평활근종 세포(leiomyoma cell)의 배가시간(doubling time)이 144시간 초과인 것을 특징으로 하는, 자궁근종 진단 개체의 근종 증식 속도 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 12

자궁근종 진단 개체로부터 분리된 근종 조직에서 표적 유전자의 전사체 또는 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

상기 측정된 발현 수준을 증식 속도가 느린 자궁근종 조직의 발현 수준과 비교하는 단계;를 포함하는, 자궁근종 진단 개체의 자궁근종 증식 속도를 예측하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 자궁근종 증식 속도 예측용 유전자 마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 자궁근종으로 흔히 불리는 자궁평활근종은 자궁의 평활근에서 발생하여 과량의 세포외기질(extracellular matrix)을 생성하여 근종(fibroid)을 형성하는 질환이다. 아직까지 발생 원인이 정확히 밝혀지진 않았지만 가족력이 있는 경우 발생 위험도도 높아지고 또 여성의 삶의 질을 떨어뜨리는 만큼 정기적인 검사가 필요하다.

[0003] 건강보험심사평가원에 따르면 국내에서 자궁근종으로 내원한 환자는 2017년 37만6962명에서 2021년 60만 7035명으로 4년간 23만명, 즉 61%나 급증했다. 연령별로는 2021년 기준 40대가 22만 8029명(37.5%)으로 가장 많다. 그 뒤로 50대 18만 7802명(30.9%), 30대 10만 4206명(17.1%) 순이었다. 환자 10명 중 7~8명이 30~50대이지만 20대 환자도 1만 8498명(3%)으로 집계됐다. 근종이 갑자기 커지면서 매우 드물긴 하지만 1% 미만의 확률로 악성변화가 일어날 수 있다. 자궁근종이 빠르게 자라 3~5 ㎝를 넘거나 개수가 많아 통증이 심해지거나 혹은 임신에 영향을 미칠 우려가 있는 근종이라면 꼭 치료해야 한다.

[0004] 자궁근종의 진단은 주로 초음파 검사, CT나 MRI 등의 방사선 검사를 통해 이루어진다. 특히, 진단된 자궁근종이 성장하며 자궁내막의 형태변형을 유발할지에 대한 예후를 판단할 수 있는 기술은 전무한 실정이며, 주기적인 초음파 검사나 CT, MRI 등의 방사선 검사를 통해 성장과정을 추적 관찰하는 방법이 유일하다.

[0005] 한편, 한국공개특허 제2017-0068157호에는 GPER (G protein-coupled estrogen receptor 1) 단백질 또는 이의 발현을 조절하는 핵산을 검출하는 제제를 포함하는 '자궁근종 진단용 마커 조성물'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2001-0029625호에는 '사이클린 G 또는 그것의 유전자를 이용한 자궁근종 진단방법 및 진단 키트'가 개시되어 있으나, 본 발명의 '자궁근종 증식 속도 예측용 유전자 마커 및 이의 용도'에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 자궁근종의 증식(성장) 속도를 예측할 수 있는 분자마커를 제공하고자 하였다. 이를 위해, 자궁근종 환자로부터 분리된 평활근종 세포의 증식 속도를 평가한 후 증식 속도가 빠르거나(144시간 미만), 느린(144시간 초과) 자궁근종 조직의 전사체 분석을 통해 두 그

룹 간 유의미한 차이를 나타내는 14종의 유전자(*FNDC1*, *COL3A1*, *CX3CR1*, *SLC16A5*, *EPM2A*, *SLC35B3*, *PRTFDC1*, *CSRNP2*, *CCL16*, *HOXB4*, *GVINP1*, *LOC339874*, *MTRNR2L1* 및 *LOC148709*)를 선발함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 *FNDC1* (fibronectin type Ⅲ domain containing 1), *COL3A1* (collagen type Ⅲ alpha 1), *CX3CR1* (C-X3-C motif chemokine receptor 1), *SLC16A5* (solute carrier family 16 member 5), *EPM2A* (epilepsy, progressive myoclonus type 2A, Lafora disease (laforin)), *SLC35B3* (solute carrier family 35 member B3), *PRTFDC1* (phosphoribosyl transferase domain containing 1), *CSRNP2* (cysteine and serine rich nuclear protein 2), *CCL16* (C-C motif chemokine ligand 16), *HOXB4* (homeobox B4), *GVINP1* (GTPase, very large interferon inducible pseudogene 1), *LOC339874*, *MTRNR2L1* (MT-RNR2-like 1) 및 *LOC148709*로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 유효성분으로 포함하는 자궁근종 증식 속도 예측용 바이오 마커 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 *FNDC1*, *COL3A1*, *CX3CR1*, *SLC16A5*, *EPM2A*, *SLC35B3*, *PRTFDC1*, *CSRNP2*, *CCL16*, *HOXB4*, *GVINP1*, *LOC339874*, *MTRNR2L1* 및 *LOC148709*로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 전사체 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 자궁근종 증식 속도 예측용 마커 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 마커 조성물을 포함하는 자궁근종 증식 속도 예측용 키트를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 자궁근종 진단 개체로부터 분리된 근종 조직에서 표적 유전자의 전사체 또는 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 발현 수준을 증식 속도가 느린 자궁근종 조직의 발현 수준과 비교하는 단계;를 포함하는, 자궁근종 진단 개체의 자궁근종 증식 속도 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 자궁근종 진단 개체로부터 분리된 근종 조직에서 표적 유전자의 전사체 또는 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 발현 수준을 증식 속도가 느린 자궁근종 조직의 발현 수준과 비교하는 단계;를 포함하는, 자궁근종 진단 개체의 자궁근종 증식 속도를 예측하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명의 유전자 마커를 이용하면 자궁근종의 증식 속도를 예측할 수 있으므로 자궁근종의 예후 예측에 관한 정보제공에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 증식 속도에 차이가 있는 자궁근종 조직간 유의미한 차이가 있는 DEG (differentially expressed genes)를 보여준다.

도 2는 선발된 14개 유전자 마커의 ROC curve 분석 결과로, 모두 AUC >0.8 이상의 결과를 나타내어, 진단 마커로서의 가능성을 확인하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *FNDC1* (fibronectin type Ⅲ domain containing 1), *COL3A1* (collagen type Ⅲ alpha 1), *CX3CR1* (C-X3-C motif chemokine receptor 1), *SLC16A5* (solute carrier family 16 member 5), *EPM2A* (epilepsy, progressive myoclonus type 2A, Lafora disease (laforin)), *SLC35B3* (solute carrier family 35 member B3), *PRTFDC1* (phosphoribosyl transferase domain containing 1), *CSRNP2* (cysteine and serine rich nuclear protein 2), *CCL16* (C-C motif chemokine ligand 16), *HOXB4* (homeobox B4), *GVINP1* (GTPase, very large interferon inducible pseudogene 1), *LOC339874*, *MTRNR2L1* (MT-RNR2-like 1) 및 *LOC148709*로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 유효성분으로 포함하는 자궁근종 증식 속도 예측용 바이오 마커 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명에서 용어 "자궁근종"이란 자궁의 평활근에서 발생하여 과량의 세포외기질(extracellular matrix)을 생성하여 근종(fibroid)을 형성하는 질환을 의미하며, '자궁평활근종'과 동일한 의미로, 본 명세서에서 혼용되어 사용될 수 있다.

[0016] 본 발명에 따른 자궁근종 증식 속도 예측용 바이오 마커 조성물에 있어서, 상기 *FNDC1, COL3A1, CX3CR1, SLC16A5, EPM2A, SLC35B3, PRTFDC1, CSRNP2, CCL16, HOXB4, GVINP1, LOC339874, MTRNR2L1* 및 *LOC148709* 유전자는 순차적으로 서열번호 1 내지 14의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 또한, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1 내지 14의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0018] 본 발명은 또한, *FNDC1, COL3A1, CX3CR1, SLC16A5, EPM2A, SLC35B3, PRTFDC1, CSRNP2, CCL16, HOXB4, GVINP1, LOC339874, MTRNR2L1* 및 *LOC148709*로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 전사체 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 자궁근종 증식 속도 예측용 마커 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명에 따른 자궁근종 증식 속도 예측용 마커 조성물에 있어서, 상기 '유전자의 전사체'는 바람직하게는 mRNA일 수 있으며, 상기 유전자의 전사체 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 프라이머, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드는 *FNDC1, COL3A1, CX3CR1, SLC16A5, EPM2A, SLC35B3, PRTFDC1, CSRNP2, CCL16, HOXB4, GVINP1, LOC339874, MTRNR2L1* 및 *LOC148709* 유전자의 염기서열을 참고하여, 당업계의 통상의 실시자가 공지된 방법, 프로그램 또는 툴을 이용하여 디자인할 수 있다.

[0020] 본 발명에서, 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR (polymerase chain reaction) 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[0021] 본 발명에서, 용어 "프로브"는 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링 되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클로타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중연쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명에서 '단백질의 발현 수준 측정'은, 자궁근종 증식 속도 예측을 위해 생물학적 시료에서 *FNDC1, COL3A1, CX3CR1, SLC16A5, EPM2A, SLC35B3, PRTFDC1, CSRNP2, CCL16, HOXB4, GVINP1, LOC339874, MTRNR2L1* 및 *LOC148709* 유전자로부터 발현되는 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 통상적으로 단백질의 양을 확인함으로써 수행될 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 웨스턴 블랏(Western blot), 방사선면역분석(radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) 및 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0023] 본 발명에서 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 이에 한정되지는 않으나, 바람직하게는 *FNDC1, COL3A1, CX3CR1, SLC16A5, EPM2A, SLC35B3, PRTFDC1, CSRNP2, CCL16, HOXB4, GVINP1, LOC339874, MTRNR2L1* 및 *LOC148709* 유전자로부터 발현되는 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머일 수 있다.

[0024] 본 발명에서, 용어 "항체"는 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 유전자 마커로부터 발현되는 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는, 각 표적 유전자의 전장 혹은 일부를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 표적 유전자의 전장 혹은 일부에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질을 면역원(항원)으로 사용하여 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 기능적인 단편도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다. 상기 항체

분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')2 및 ScFv 등이 있다.

[0025] 본 발명에서, 용어 "압타머(aptamer)"는 안정된 삼차구조를 유지하면서 특정 분자에 특이적으로 강하게 결합할 수 있는 핵산을 의미한다. 특이적 결합을 하는 기능 때문에 항체와 비교되며 항체의 대체 기술로 평가되고 있다.

[0026] 본 발명에 따른 자궁근종 증식 속도 예측용 마커 조성물에 있어서, 상기 *FNDC1, COL3A1, CX3CR1, SLC16A5, EPM2A, SLC35B3, PRTFDC1, CSRNP2, CCL16, HOXB4, GVINP1, LOC339874, MTRNR2L1* 및 *LOC148709*로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자는 자궁근종 세포의 증식 속도에 따라 발현 수준에 유의미한 차이가 있는 유전자 마커이다.

[0027] 본 발명은 또한, 상기 자궁근종 증식 속도 예측용 마커 조성물을 포함하는 자궁근종 증식 속도 예측용 키트를 제공한다.

[0028] 본 발명의 키트는 *FNDC1, COL3A1, CX3CR1, SLC16A5, EPM2A, SLC35B3, PRTFDC1, CSRNP2, CCL16, HOXB4, GVINP1, LOC339874, MTRNR2L1* 또는 *LOC148709* 유전자의 전사체 또는 이의 단백질의 검출 및 발현 수준을 확인함으로써 자궁근종 증식 속도를 예측할 수 있다. 본 발명의 키트에는 *FNDC1, COL3A1, CX3CR1, SLC16A5, EPM2A, SLC35B3, PRTFDC1, CSRNP2, CCL16, HOXB4, GVINP1, LOC339874, MTRNR2L1* 또는 *LOC148709* 유전자의 발현 수준을 검출하기 위한 제제(예컨대, 프라이머 또는 프로브) 또는 단백질을 특이적으로 검출할 수 있는 제제(예컨대, 항체 또는 압타머) 뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.

[0029] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction), 실시간(real-time) PCR, 등온(isothermal) PCR, 노던 블랏팅, RNA 분해효소 보호분석법(RNase protection assay) 또는 마이크로어레이 칩일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0030] 본 발명에서 *FNDC1, COL3A1, CX3CR1, SLC16A5, EPM2A, SLC35B3, PRTFDC1, CSRNP2, CCL16, HOXB4, GVINP1, LOC339874, MTRNR2L1* 또는 *LOC148709* 유전자의 전사체(mRNA) 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는, 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-중합효소 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한 정량 대조구로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명의 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 진단 또는 예측용 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는, 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기판, 및 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한, 기판은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다.

[0032] 본 발명은 또한, 자궁근종 진단 개체로부터 분리된 근종 조직에서 표적 유전자의 전사체 또는 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 발현 수준을 증식 속도가 느린 자궁근종 조직의 발현 수준과 비교하는 단계;를 포함하는, 자궁근종 진단 개체의 자궁근종 증식 속도 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0033] 본 발명에 따른 정보 제공 방법에 있어서, 상기 표적 유전자는 *FNDC1, COL3A1, CX3CR1, SLC16A5, EPM2A, SLC35B3, PRTFDC1, CSRNP2, CCL16, HOXB4, GVINP1, LOC339874, MTRNR2L1* 및 *LOC148709*로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있고, 상기 유전자의 전사체 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준 측정법은 전술한 것과 같다.

[0034] 또한, 본 발명에 따른 정보 제공 방법에 있어서, 상기 증식 속도가 느린 자궁근종 조직은 평활근종 세포(leiomyoma cell)의 배가시간(doubling time)이 144시간 초과인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 본 발명의 일 구현 예에 따른 정보 제공 방법에 있어서, 상기 자궁근종 진단 개체로부터 분리된 근종 조직에서 측정된 *CCL16, HOXB4, GVINP1, LOC339874, MTRNR2L1* 또는 *LOC148709* 유전자의 발현 수준이 증식 속도가 느린 자궁근종 조직으로부터 측정된 동일 유전자의 발현 수준보다 높은 경우, 또는 상기 자궁근종 진단 개체로부터 분리된 근종 조직에서 측정된 *FNDC1, COL3A1, CX3CR1, SLC16A5, EPM2A, SLC35B3, PRTFDC1* 또는 *CSRNP2* 유전자

의 발현 수준이 증식 속도가 느린 자궁근종 조직으로부터 측정된 동일 유전자의 발현 수준보다 낮은 경우 자궁근종 진단 개체로부터 분리된 근종은 증식 속도가 빠른 것으로 예측될 수 있다(도 1 참고). 상기 '증식 속도가 빠른 것'은 자궁근종 조직의 평활근종 세포의 배가시간이 144시간 미만인 것을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0036] 상기 낮은 수준 또는 높은 수준은 비교 대조군의 값과 비교하여 통계적으로 유의한 감소 또는 증가일 수 있으나, 통상의 기술자라면 절대적인 감소량 또는 증가량이 특정되지 않더라도, 비교 대조군 대비 유의하게 낮아지거나 높아진 변화를 명확하게 이해할 수 있을 것이다. 상기 비교 대조군 값은 예를 들어 적어도 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 10개 이상 또는 15개 이상의 비교 대조군 값의 평균값인 것일 수 있다.

[0037] 본 발명은 또한, 자궁근종 진단 개체로부터 분리된 근종 조직에서 표적 유전자의 전사체 또는 상기 유전자로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 발현 수준을 증식 속도가 느린 자궁근종 조직의 발현 수준과 비교하는 단계;를 포함하는, 자궁근종 진단 개체의 자궁근종 증식 속도를 예측하는 방법을 제공한다.

[0038] 본 발명에 따른 자궁근종 진단 개체의 자궁근종 증식 속도 예측 방법에 있어서, 상기 유전자는 *FNDC1, COL3A1, CX3CR1, SLC16A5, EPM2A, SLC35B3, PRTFDC1, CSRNP2, CCL16, HOXB4, GVINP1, LOC339874, MTRNR2L1* 및 *LOC148709*로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있고, 상기 유전자의 전사체 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준 측정법은 전술한 것과 같으며, 상기 증식 속도가 느린 자궁근종 조직은 평활근종 세포의 배가시간이 144시간 초과인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0039] 또한, 본 발명에 따른 자궁근종 진단 개체의 자궁근종 증식 속도 예측 방법에 있어서, 상기 개체는 바람직하게는 인간 또는 인간을 제외한 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0041] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0043] **재료 및 방법**

[0044] **1. 자궁근종 세포의 배양**

[0045] 자궁근종 조직 시료는 2018년에서 2022년 사이에 계명대학교 동산의료원(대구)에서 자궁근종절제술(myomectomy) 또는 자궁적출술(hysterectomy)을 시행한 34명의 환자로부터 제공받았다. 본 연구는 계명대학교 동산의료원 생명윤리위원회의 승인을 받아 수행되었다(승인번호 DSMC 2021-03-009).

[0046] 자궁근종 조직은 저미기 전에 차가운 PBS로 2회 세척 후, 5 mm 크기로 자른 후 25 mM HEPES(2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid), 100 units/㎖의 항생제, 1.5 mg/㎖의 콜라게나제 V(Sigma-Aldrich) 및 0.2 mg/㎖의 DNase I으로 보충된 HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)를 포함하는 50 ㎖ 코니칼 튜브로 옮겼다. 37℃의 항온수조에서 약하게 교반하며 3시간 동안 반응시킨 후, 여과하고 1,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 펠렛을 HBSS로 헹군 후 HBSS는 제거하고 10% FBS(fetal bovine serum) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM/F12 완전배지를 사용하여 평활근종 세포(leiomyoma cell)를 배양하였다. 세포의 배가시간(doubling time)을 결정하기 위해, 100 mm 디쉬에 $3X10^5$ 개의 세포를 분주하여 실험을 진행하였다.

[0048] **2. RNA-Seq. 분석**

[0049] 자궁근종 조직으로부터 Trizol reagent (Invitrogen)를 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 추출한 총 RNA의 품질과 정량은 각각 RNA 6000 Nano Chip (Agilent Technologies, Amstelveen, The Netherlands)을 사용한 Agilent 2100 bioanalyzer 및 ND-2000 Spectrophotometer (Thermo Inc., DE, USA)로 평가하였다. RNA 라이브러리의 준비는 QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit (Lexogen, Inc., Austria)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 수행하였으며, 시퀀싱 분석은 NextSeq 500 (Illumina, Inc., USA)을 이용한 single-end 75 sequencings으로 수행하였다.

[0050] 리드 카운트 데이터는 edgeR 소프트웨어(Gentleman et al.,2004, Genome Biology 2004;5(10):R80)를 이용하여 4분위수 정규화(quantile normalization) 방법에 기반하여 처리하였다. DEG (differentially expressed genes) 세트는 fold change (>2), log2(normalized value; >3) 및 p value (<0.001)에 근거하여 선발하였다.

[0052] **실시예 1. 자궁근종 증식 속도 예측을 위한 유전자 마커의 선발 및 검증**

[0053] 계명대학교 동산의료원으로부터 제공받은 자궁근종 조직의 세포를 분리하여 배가시간을 측정한 결과, 배가시간이 144시간 미만인 그룹(n=14)과 144시간 초과인 그룹(n=14)으로 나눌 수 있었으며, 각 시료를 제공한 환자의 일반적인 정보를 확인한 결과 평균연령, BMI 지수, 근종 개수, 근종 크기 및 출산수(parity)에 큰 차이가 없는 것으로 나타났다(표 1).

표 1

마커 선발용 지질 프로파일링에 사용된 시료를 제공한 환자의 특성

	Fast (n=17)	Slow (n=17)	P value [a]
Age	40.35±3.02 [38.69-41.86][b]	40.82±3.83 [38.65-42.74]	0.693
BMI	23.27 ± 4.15 [20.95-25.1]	24 ± 4.008 [21.81-25.76]	0.604
Myoma number	2.824±2.767 [1.236-2.995]	3.706±3.531 [1.451-3.912]	0.234
Myoma size (mm)	82.13±32.75 [66.84-91.19]	111.3±170.5 [56.82-109]	0.494
Parity	1.05±0.75	1.41±0.94	0.234

[a] p-value using the independent t-test in continuous variables.

[b] Data are expressed as mean ± standard deviation [Geometric Mean (95% confidential interval)]

[0054]

[0055] 상기 배가시간이 144시간 미만인 그룹을 fast로, 144시간 초과인 그룹을 slow로 명명한 뒤, 두 그룹의 근종 조직을 이용하여 전사체 분석을 수행하였다. 분석된 DEG (differentially expressed genes) 결과에서 배수 변화(fold change, >2), log2(normalized value; >3) 및 p value (<0.001)에 근거하여 총 14종의 유전자가 선발되었다(도 1 및 표 2). *CCL16, HOXB4, GVINP1, LOC339874, MTRNR2L1* 및 *LOC148709* 유전자의 경우 fast 그룹에서 더 높은 발현 수준을 보여주었으며, *FNDC1, COL3A1, CX3CR1, SLC16A5, EPM2A, SLC35B3, PRTFDC1* 또는 *CSRNP2* 유전자의 경우 slow 그룹에서 더 높은 발현 수준을 보여주었다.

표 2

[0056] 선발된 14종 유전자의 정보

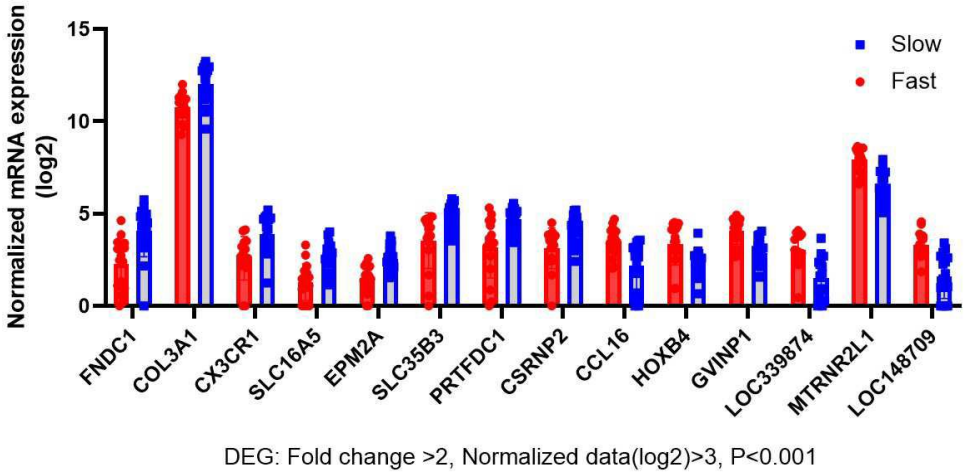
Gene symbol		NIH/Gene ID	UniProtKB/Swiss-Prot
FNDC1	fibronectin type Ⅲ domain containing 1	84624	Q4ZHG4
COL3A1	collagen type Ⅲ alpha 1	1281	P02461
CX3CR1	C-X3-C motif chemokine receptor 1	1524	P49238
SLC16A5	solute carrier family 16 member 5	9121	O15375
EPM2A	epilepsy, progressive myoclonus type 2A, Lafora disease (laforin)	7957	O95278
SLC35B3	solute carrier family 35 member B3	51000	Q9H1N7
PRTFDC1	phosphoribosyl transferase domain containing 1	56952	Q9NRG1
CSRNP2	cysteine and serine rich nuclear protein 2	81566	Q9H175
CCL16	C-C motif chemokine ligand 16	6360	O15467
HOXB4	homeobox B4	3214	P17483
GVINP1	GTPase, very large interferon inducible pseudogene 1	387751	Q7Z2Y8
LOC339874	uncharacterized LOC339874 / NUDT16-DT NUDT16 divergent transcript	339874	Q96DE0
MTRNR2L1	MT-RNR2-like 1	100462977	P0CJ68

LOC148709	actin pseudogene /ACTG1P25 actin gamma 1 pseudogene 25	148709	*하기 URL 참고
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=148709 http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000234996;r=1:202861754-202875241			

[0057] 또한, 상기 14개의 유전자에 대해 각각 GraphPad Prism version 9 (GraphPad software, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 ROC curve 분석을 수행한 결과, 모두 0.8 이상의 AUC 값을 나타내어 이들 유전자가 분자마커로서 기능할 수 있음을 확인하였다(도 2).

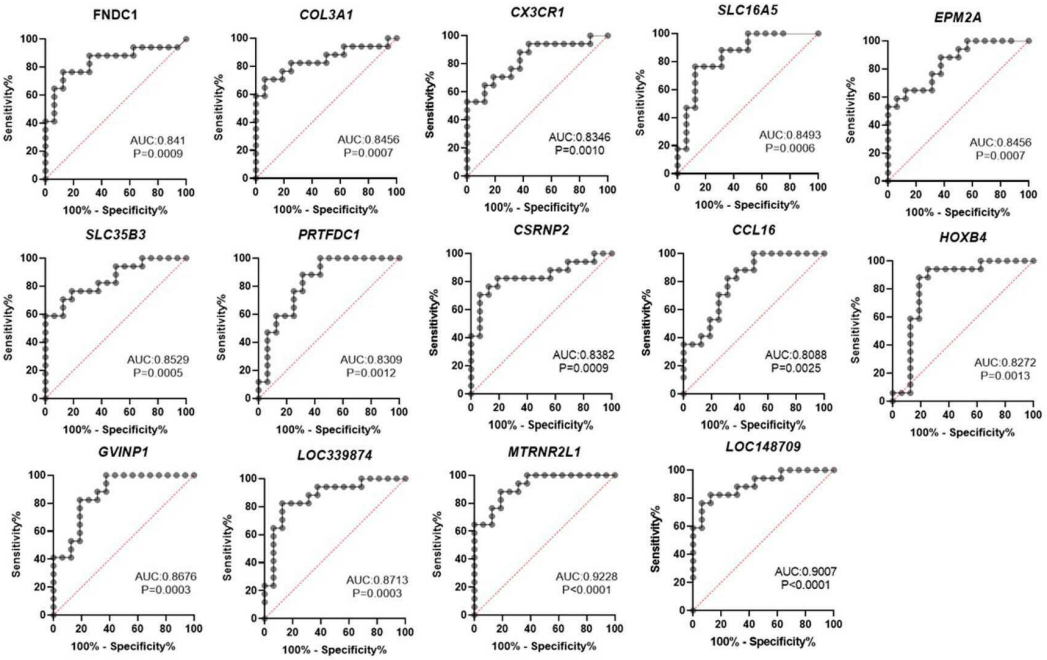
도면

도면1



DEG: Fold change >2, Normalized data(log2)>3, P<0.001

도면2



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.