



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0167706
(43) 공개일자 2022년12월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/57438 (2019.01)

G01N 2800/52 (2021.08)

(21) 출원번호 10-2021-0077017

(22) 출원일자 2021년06월14일

심사청구일자 2021년06월14일

(71) 출원인

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자

전은성

서울특별시 강동구 아리수로97길 20, 507동 102호(강일동, 강일리버파크5단지아파트)

김상엽

서울특별시 송파구 토성로 37, 303동 905호(풍납동, 현대리버빌아파트)

(74) 대리인

제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **췌장암의 예후 예측 방법 및 이를 위한 키트**

(57) 요약

본 발명은 종양 세포 및/또는 면역 세포의 조직 내 존재 빈도를 측정할 수 있는 췌장암의 예후 예측용 조성물, 이를 포함하는 키트 및 이를 이용하여 췌장암의 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 분석 마커의 조합 및 이를 이용한 종양 세포 및/또는 면역 세포의 표현형 분석(phenotyping) 방법은 높은 민감성과 특이성으로 췌장암 환자의 예후 예측에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1

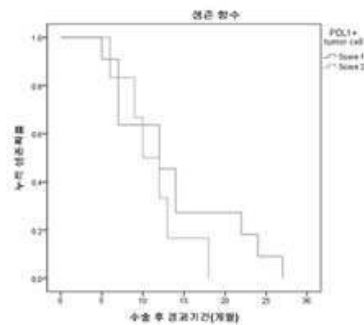
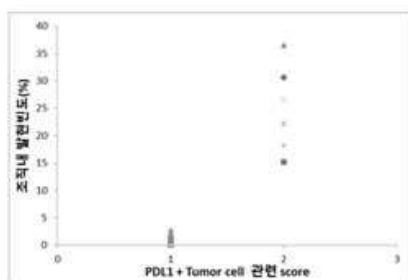
	개별 분석 score	
	1	2
PDL1+종양세포	10% 이하	10% 초과

1. 그룹별 평균 생존기간

- 그룹 1 (PDL1+종양세포 10% 이하): 평균 13.7개월

- 그룹 2 (PDL1+종양세포 10% 초과): 평균 11.3개월

2. 생존률 분석 : p value = 0.286



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345315360
과제번호	2018R1D1A1B07048823
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	퀘장의 Eicosanoid 대사체 분석을 통한, 전암성 병변의 마커 발굴 및 종양미세환경
에서 기능 연구	
기 여 율	50/100
과제수행기관명	서울아산병원
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711119859
과제번호	2020M3A9I4038667
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오. 의료기술개발(R&D)
연구과제명	생체대응성이 높은 환자 유래 비임상 모델 구축 및 면역세포치료제의 효능 평가
기 여 율	50/100
과제수행기관명	서울아산병원
연구기간	2020.06.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

개체로부터 분리한 생물학적 시료에서,

i) PD-L1+ 종양 세포, PD-L1+ 대식 세포, 세포독성 T 세포 및 도움 T 세포; ii) T 세포; iii) T 세포, 대식 세포 및 단핵구; iv) 종양 세포, T 세포, 대식 세포 및 단핵구; 또는 v) 이들의 임의의 조합의 종양 조직 내 존재 빈도 수준을 측정하는 단계를 포함하는 채장암의 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 개체는 채장암 환자이며, 상기 생물학적 시료는 채장암 환자의 종양 조직으로부터 분리한 것인, 채장암의 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 i) 내지 v)의 종양 조직 내 존재 빈도 수준을 측정하는 단계는 다중 면역조직화학염색법(Multiplex Immunohistochemistry)을 이용하는 것인, 채장암의 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 PD-L1+ 종양 세포는 사이토케라틴(CK), PD-L1 및 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)에 대한 염색에 양성이고, CD4, FOXP3, CD8 및 CD68에 대한 염색에 음성인 종양 세포이고,

상기 PD-L1+ 대식 세포는 CD68, PD-L1 및 DAPI에 대한 염색에 양성이고, CD4, CD8 및 FOXP3에 대한 염색에 음성인 대식세포이고,

상기 세포독성 T 세포는 CD8 및 DAPI에 대한 염색에 양성이고, FOXP3, CD4 및 CD68에 대한 염색에 음성인 세포독성 T세포이고,

상기 도움 T 세포는 CD4 및 DAPI에 대한 염색에 양성이고, FOXP3, CD8 및 CD68에 대한 염색에 음성인 도움 T세포이고,

상기 종양 세포는 CK 및 DAPI에 대한 염색에 양성이고, CD3, CD11c, CD56 및 CD68에 대한 염색에 음성인 종양 세포이고,

상기 T 세포는 CD3 및 DAPI에 대한 염색에 양성이고, CD56 및 CD68에 대한 염색에 음성인 T 세포이고,

상기 대식 세포는 CD68 및 DAPI에 대한 염색에 양성이고, CD3에 대한 염색에 음성인 대식세포이고,

상기 단핵구는 CD11c 및 DAPI에 대한 염색에 양성이고, CD3, CD68 및 CD56에 대한 염색에 음성인 단핵구인, 채장암의 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 i) 내지 v)의 종양 조직 내 존재 빈도 수준에 따라 점수를 부여하는 단계; 및

상기 부여된 점수의 총합에 따라 개체의 예후를 예측하는 단계를 포함하는, 채장암의 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 점수는 각 세포의 조직 내 존재 빈도의 평균값을 기준으로 부여하는 것인, 췌장암의 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 점수는 PD-L1+ 종양 세포 및 PD-L1+ 대식 세포의 조직 내 존재 빈도(%)가 각각 평균값 이하인 경우 1점, 평균값 초과인 경우 2점으로 부여하고, 세포독성 T 세포 및 도움 T 세포의 조직 내 존재 빈도(%)가 각각 평균값 초과인 경우 1점, 평균값 이하인 경우 2점으로 부여하며, 상기 부여된 점수의 총합을 기준치와 비교하는 것인, 췌장암의 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 점수는 종양 세포 및 T 세포의 조직 내 존재 빈도(%)가 각각 평균값 초과인 경우 1점, 평균값 이하인 경우 2점으로 부여하고, 대식 세포 및 단핵구의 조직 내 존재 빈도(%)가 각각 평균값 초과인 경우 1점, 평균값 이하인 경우 2점으로 부여하며, 상기 부여된 점수의 총합을 기준치와 비교하는 것인, 췌장암의 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제1항의 상기 i) 내지 v)의 종양 조직 내 존재 빈도 수준을 측정하는 단계에서 사용되는 췌장암의 예후 예측용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 i) 내지 v)의 종양 조직 내 존재 빈도 수준을 측정하는 단계는 다중 면역조직화학염색법(Multiplex Immunohistochemistry)을 이용하는 것인, 췌장암의 예후 예측용 조성물.

청구항 11

제9항 또는 제10항의 조성물을 포함하는 췌장암의 예후 예측용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 종양 조직 내의 면역세포 및/또는 종양세포 분포에 대한 분석을 바탕으로 췌장암의 예후 예측에 관한 정보를 제공하는 방법, 이러한 방법에 사용되는 췌장암의 예후 예측용 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 췌장암은 예후가 불량한 치명적인 질환으로, 췌장암의 5년 생존율은 9.4% 정도로 매우 적으며, 외과적 치료 절제술 이후 장기(10년 이상) 생존율은 3.9%에 불과하다. 특히, 최근 10년간 생존율이 증가하지 않은 거의 유일한 암종에 해당하며 다른 암종과 비교해도 예후가 매우 나쁘다. 2014년 국립암센터 조사에 따르면, 췌장암 입원수가 12,195명으로 전년대비 36.3% 증가하였고, 이는 10대 암종 중 가장 높은 증가율이며, 지속적으로 증가할 것으로 판단된다. 특히 췌장암의 경우 환자 1인당 입원비가 약 664만2천원으로 가장 많은 비용이 필요하여 수술비가 많이 지출되며 입원기간이 길어 개인, 사회적 비용이 많이 드는 암종이다. 2017년에 국립암센터에서 발표한 자료에 따르면, 연간 췌장암 발생자수는 6,342명으로 전체 암종 중 8위에 해당하는 수치이며, 2008년 이후, 췌장암 조발생율(명/인구 10만명당)을 비교 시, 지속적인 증가추세에 있다.

[0003] 췌장암 예후에 관한 메타분석 연구 결과에 따르면 췌장암 진단 시에 수술이 가능한 환자는 20% 미만이다. 30-40%는 진행성 췌장암이며, 나머지 50-60%는 원격전이를 동반한다. 수술을 받지 못하는 경우, 생존기간이 1년 미만에 불과하며, 수술적 절제가 가능한 환자의 경우에도 수술 후 생존 기간이 2년에 불과하다. 췌장이 후복막에 위치하고, 주변 림프절, 신경절 등으로 전이가 잘되어 완전히 절제하기 어렵고 수술 후에도 재발율이 높은 편이다. 따라서 췌장암 환자의 예후 향상을 위해서 췌장암 특이적 진단법과 치료법 개발이 필요하며, 치료에 대한 반응성과 전이를 빨리 확인할 수 있는 바이오 마커 발굴이 시급하다.

[0004] 최근 proteomics, metabolomics, microRNA 등에 대한 연구가 활발해지면서, 다양한 방법들에 의한 바이오 마커들이 발굴되고 있지만, 여전히 췌장암에 대한 특이성과 민감도는 떨어지는 상태이다. 예를 들면, CA 19-9는 췌장암 진단에 있어 사용되는 대표적인 바이오 마커 중의 하나이나, 민감도가 60-70%, 특이성이 70-85%에 불과하다. 따라서 추가적인 연구를 통해 췌장암에 대한 특이성과 민감도가 우수한 예측방법을 개발하는 것이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) KR 10-2020-7034437, 2019.05.30

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에 본 발명자들은 췌장암 환자의 예후를 예측하는 방법에 대해 연구한 결과, 췌장암 환자의 병리 조직의 면역 세포 및 종양 세포를 다중 면역조직화학염색법(Multiplex Immunohistochemistry)으로 염색하고 여러 조합의 면역 세포 및 종양 세포들의 표현형(phenotyping)을 분석하여, 췌장암 환자의 예후를 예측하는 방법을 발견함으로써 본 발명을 완성시켰다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은, i) PD-L1+ 종양 세포, PD-L1+ 대식 세포, 세포독성 T 세포 및 도움 T 세포; ii) T 세포; iii) T 세포, 대식 세포 및 단핵구; iv) 종양 세포, T 세포, 대식 세포 및 단핵구; 또는 v) 이들의 임의의 조합의 종양 조직 내 존재 빈도 수준을 측정하는 단계를 포함하는 췌장암의 예후 예측에 필요한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 측면은, 상기 i) 내지 v)의 종양 조직 내 존재 빈도 수준을 측정하는 단계에서 사용되는 췌장암의 예후 예측용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 조성물을 포함하는 췌장암의 예후 예측용 키트를 제공하는 것이다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따른 종양 세포 및/또는 면역 세포의 표현형(phenotyping) 분석은 높은 민감성과 특이성으로 췌장암 환자의 예후 예측에 유용하게 활용될 수 있다. 이에 따라 추가적인 항암 치료, 면역 치료 또는 방사선 치료 등 향후 치료법을 결정하는 데 도움을 줄 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 PD-L1+ 종양 세포의 조직 내 존재 빈도에 따른 췌장암 환자의 생존율 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 PD-L1+ 대식 세포의 조직 내 존재 빈도에 따른 췌장암 환자의 생존율 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 세포독성 T 세포의 조직 내 존재 빈도에 따른 췌장암 환자의 생존율 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 도움 T 세포의 조직 내 존재 빈도에 따른 췌장암 환자의 생존율 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 PD-L1+ 종양 세포, PD-L1+ 대식 세포, 세포독성 T 세포 및 도움 T 세포의 조직 내 존재 빈도에 따른 췌

장암 환자의 생존율 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 종양 세포의 조직 내 존재 빈도에 따른 췌장암 환자의 생존율 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 T 세포의 조직 내 존재 빈도에 따른 췌장암 환자의 생존율 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 대식 세포의 조직 내 존재 빈도에 따른 췌장암 환자의 생존율 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 단핵구의 조직 내 존재 빈도에 따른 췌장암 환자의 생존율 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 T 세포, 대식 세포 및 단핵구의 조직 내 존재 빈도에 따른 췌장암 환자의 생존율 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 종양 세포, T 세포, 대식 세포 및 단핵구의 조직 내 존재 빈도에 따른 췌장암 환자의 생존율 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명의 일 측면은 개체로부터 분리한 생물학적 시료에서, i) PD-L1+ 종양 세포, PD-L1+ 대식 세포, 세포독성 T 세포 및 도움 T 세포; ii) T 세포; iii) T 세포, 대식 세포 및 단핵구; iv) 종양 세포, T 세포, 대식 세포 및 단핵구; 또는 v) 이들의 임의의 조합의 종양 조직 내 존재 빈도 수준을 측정하는 단계를 포함하는 췌장암의 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 용어 "췌장암"은 악성종양인 췌관 관세포암(pancreatic ductal adenocarcinoma), 선방세포 암종(acinar cell carcinoma), 신경 내분비 종양(neuroendocrine tumor)과 낭종성 양성종양인 장액성 낭성 종양(serous cystadenoma), 점액성 낭성 종양(mucinous cystic neoplasm), 췌관 내 유두상 점액 종양(intraductal papillary mucinous neoplasm, IPMN), 고형 가유두상 종양(solid pseudopapillary tumor)을 포함하는 것이며, 또한 1기, 2기 등과 같이 분류되는 암의 진행단계에 따른 췌장암을 포함한다.
- [0014] 본 발명의 용어 "예후"는 대상체에서 질병의 경과 또는 결과를 예측하는 것으로, 예를 들어, 특정한 경과 또는 결과가 발생할 증가된 확률을 말한다.
- [0015] 본 발명의 용어 "PD-L1+ 종양 세포"는 사이토케라틴(CK), PD-L1 및 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)에 대한 염색에 양성이고, CD4, FOXP3, CD8 및 CD68에 대한 염색에 음성인 종양 세포를 의미한다.
- [0016] 본 발명의 용어 "PD-L1+ 대식 세포"는 CD68, PD-L1 및 DAPI에 대한 염색에 양성이고, CD4, CD8 및 FOXP3에 대한 염색에 음성인 대식세포를 의미한다.
- [0017] 본 발명의 용어 "세포독성 T 세포"는 CD8 및 DAPI에 대한 염색에 양성이고, FOXP3, CD4 및 CD68에 대한 염색에 음성인 세포독성 T세포를 의미한다.
- [0018] 본 발명의 용어 "도움 T 세포"는 CD4 및 DAPI에 대한 염색에 양성이고, FOXP3, CD8 및 CD68에 대한 염색에 음성인 도움 T세포를 의미한다.
- [0019] 본 발명의 용어 "종양 세포"는 CK 및 DAPI에 대한 염색에 양성이고, CD3, CD11c, CD56 및 CD68에 대한 염색에 음성인 종양 세포를 의미한다.
- [0020] 본 발명의 용어 "T 세포"는 CD3 및 DAPI에 대한 염색에 양성이고, CD56 및 CD68에 대한 염색에 음성인 T 세포를 의미한다.
- [0021] 본 발명의 용어 "대식 세포"는 CD68 및 DAPI에 대한 염색에 양성이고, CD3에 대한 염색에 음성인 대식세포를 의미한다.
- [0022] 본 발명의 용어 "단핵구"는 CD11c 및 DAPI에 대한 염색에 양성이고, CD3, CD68 및 CD56에 대한 염색에 음성인 단핵구를 의미한다.
- [0023] 본 발명의 용어 "조직 내 존재 빈도"는 조직 내 전체 세포 수에 대한 각 면역 세포 또는 종양 세포의 수를 백분율(%)로 나타낸 것을 의미한다.
- [0024] 본 발명의 용어 "개체"는 췌장암의 예후를 예측하기 위한 개체를 말한다. 상기 개체는 췌장암이 발병할 수 있는 동물이라면 그 종류를 한정하지 않으나, 구체적으로 포유동물일 수 있고, 예를 들어 인간(Homo sapiens)일 수 있다.

- [0025] 본 발명의 용어 "생물학적 시료" 또는 "시료"란 개체로부터 수득한 임의의 생물학적 표본으로서, 췌장암 환자의 수술 조직에서 채취한 종양 조직일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 일 실시예에서는 1기 내지 3기에 해당하는 항암 치료 전 췌장암 환자의 종양 조직에서 채취한 생물학적 시료를 사용하였다.
- [0026] 상기 사이토케라틴(CK)은 상피 조직의 세포질 내 세포 골격에서 발견되는 케라틴 단백질이다. 상피 세포 내에서 사이토케라틴의 발현은 특정 기관이나 조직에 특이적이므로, 다양한 인간 종양의 기원 세포를 확인하기 위해 임상적으로 사용된다. 상기 PD-L1는 CD274, B7-H1라고도 부르며, 암세포 또는 조혈세포의 표면에 있는 단백질이다. 상기 DAPI는 DNA의 아데닌 - 티민이 풍부한 영역에 강하게 결합하는 형광성 색소로, 널리 형광현미경 하에서 DNA검출(염색소, 바이러스, 마이코플라스마, 효소위미토콘드리아, 염색체내 DNA 등)에 사용하고 있다. 상기 CD4는 도움 T 세포, 단핵구, 대식세포, 수지상세포 등 면역세포의 표면에 있는 당단백질 분자이다. 상기 FOXP3는 scurf인라고도 알려져 있으며, 면역 시스템의 반응에 관여하는 단백질이다. 조절 T 세포의 발달과 기능을 조절하는 경로에 대한 중요한 조절자의 역할을 한다. 상기 CD8는 T 세포 수용체(TCR)의 공동수용체 역할을 하는 막관통 당단백질이며 1형 MHC에 특이적이다. 상기 CD68는 단핵구 계통의 세포에서 고도로 발현되는 막관통 당단백질이다. 상기 CD3는 T세포의 항원수용체를 구성하는 막항원의 하나이며, 세포독성 T 세포와 도움 T 세포를 활성화하는 데 관여하는 단백질 복합체이다. 상기 CD11c는 인테그린 알파 X 사슬 단백질이며, 베타 2 사슬(ITGB2)과 결합하여 불활성화된 C3b (iC3b) 수용체 4 (CR4)라고 하는 백혈구 특이적 인테그린을 형성한다. 상기 CD56는 신경세포접촉분자(NCAM)이라고도 하며, 대부분 자연살해세포와 관련이 있다.
- [0027] 상기 i) 내지 v)의 종양 조직 내 존재 빈도 수준을 측정하는 방법으로는, 면역크로마토그래피, 면역조직화학법, 흡광도측정법, 웨스턴블랏팅, 자석비드-항체면역침강법, ELISA, 질량분석기, 방사선 면역분석법, 면역침전법 등이 사용될 수 있다.
- [0028] 상기 i) 내지 v)의 종양 조직 내 존재 빈도 수준을 측정하는 방법의 예시로, 다중 면역조직화학염색법(Multiplex Immunohistochemistry; Multiplex IHC)을 이용하여 종양 조직 내 존재 빈도 수준을 측정할 수 있으며, 이에 제한되지는 않는다. 상기 면역조직화학염색법은 조직이나 세포에 존재하는 특정 항원을 표지 항체를 이용하여 가시화하여 광학현미경 및 전자현미경으로 관찰할 수 있게 조작하는 기술로서, 조직 절편상의 항원에 특이항체를 결합시키고, 가시화에 필요한 물질로 표지한 2차항체로 특이하게 결합된 항체의 위치를 검출하는 방법을 의미한다. 구체적으로, 2차항체의 가시화에는 형광항체법, 효소항체법, 아비딘·비오틴-과산화효소복합체(ABC)법, 과산화효소 항과산화효소복합체(DAP)법 및 면역금표지법(Immunogoldtechniques) 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명의 다른 측면은, 상기 i) 내지 v)의 종양 조직 내 존재 빈도 수준을 측정하는 단계에서 사용되는 췌장암의 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [0030] 구체적으로, 상기 조성물에는 CK, PD-L1, CD4, CD8, FOXP3, CD68, DAPI, CD3, CD56 및 CD11c 중 어느 하나를 검출할 수 있는 항체 등을 포함할 수 있으며, 다중 면역조직화학염색법에서 사용되는 시약 등을 포함할 수 있다.
- [0031] 예를 들어, 상기 CK, PD-L1, CD4, CD8, FOXP3, CD68, CD3, CD56 및 CD11c를 검출할 수 있는 항체로서, 각각 AE1/AE3 (Novus; NBP2-29429), EIL3N (Cell signaling technology; 136845S), EPR6855 (abcam; ab133616), 4B11 (Biorad; MCA1817), 236A/E7 (abcam; ab20034), SP251 (abcam; ab192847), 2GV6 (Ventana; 790-4341), EP2567Y (abcam; ab75813) 및 EP1347Y (abcam; ab52632)가 사용될 수 있고, 상기 다중 면역조직화학염색법에서 사용되는 시약으로서 Ethanol (Merck; 1.07017.2511), ER1 (Leica; AR9961), ER2 (Leica; AR9640), Wash solution (Leica; AR9590), Dewax (Leica; AR9222) 등이 사용될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 조성물을 포함하는 췌장암의 예후 예측용 키트를 제공한다. 구체적으로, 상기 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 상기 조성물, 용액 또는 장치로 구성된다.
- [0034] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 실험예 1 및 2에서 수행한 통계 분석에 있어 범주형 변수들을 피셔(Fisher) 정확 검정을 이용하여 비교하고, 연속 변수들을 맨 휘트니(Mann Whitney) U-검정을 이용하여 비교하였다. 또한 Kaplan-Meier 방법을 통해, 각 그룹

과 환자의 생존율의 상관 관계에 대한 분석을 진행하였으며, p 값 ≤ 0.05 일 때 유의적인 것으로 간주하였다. IBM SPSS 통계 윈도우즈, 버전 23.0(IBM 코포레이션, 미국)를 통계 분석에 사용하였다.

[0037] 실시예 1. 생물학적 검체 수집 및 처리

[0038] 췌장암 1기 내지 3기 판정을 받은 환자들의 수술 조직을 활용하였다. 서울아산병원 임상연구심의위원회(IRB)를 통해 임상자원을 통한 연구에 대해 승인 받았으며, 서울아산병원 조직세포자원센터(BRC)를 통해 췌장암 환자의 종양자원을 분양 받았다. 총 17명 환자의 성별, 나이, 수술날짜, 수술방법, 수술전 혈액검사결과, 조직검사결과, 종양 표지자 마커(CA 19-9), KRAS 변이, 수술 후 재발 여부, 환자의 생존유무 등에 대한 정보를 확인하였다. 각 종양 조직을 통해 파라핀 블록을 만들고, 이를 활용하여 면역염색을 진행하였다.

[0039] 실시예 2. 면역세포 및/또는 종양세포 분포 분석을 위한 종양조직의 다중 면역조직화학염색법(Multiplex IHC)

[0040] 실시예 2.1. 슬라이드 준비(Dewax step)

[0041] 표준 고정 기술을 사용하여 Opal로 검출할 조직 또는 세포를 준비한다. 각 슬라이드를 1시간 동안 60℃의 오븐에서 가열한다; Dewax solution으로 탈왁스(dewax)시키고(72℃, 30초) 에탄올 용액을 통해 재수화한다(100% EtOH).

[0042] 실시예 2.2. Epitope retrieval step (pH 9.0)

[0043] Epitope retrieval solution 2(EDTA based pH 9.0)으로 100℃에서 30분간 반응시킨 후 wash solution으로 세척한다.

[0044] 실시예 2.3. 차단(Blocking)

[0045] 차단 버퍼(PIK Blocking buffer)로 상온에서 5분 동안 조직 슬라이드를 배양한다.

[0046] 실시예 2.4. 1차 항체 배양(Primary Antibody Incubation)

[0047] 차단 버퍼를 배출하고 1차 항체 작용 용액(primary antibody working solution)을 상온에서 30분간 배양한다. 조직 섹션을 완전히 덮을 수 있는 충분한 부피를 사용한다(슬라이드 당 150 μ L). Wash solution에서 슬라이드를 행군다.

[0048] 실시예 2.5. 2차-HRP(Secondary-HRP)의 도입

[0049] 2차 항체 작용 용액(secondary antibody working solution)을 상온에서 10분간 배양한다. 조직 섹션을 완전히 덮을 수 있는 충분한 부피를 사용한다(슬라이드 당 150 μ L). Wash solution에서 슬라이드를 행군다.

[0050] 구체적으로, 티라미드 신호 증폭(Tyramide signal amplification, TSA) 기법을 이용한 염색법을 사용한다. TSA를 기본으로 다양한 형광을 결합시켜 개발된 멀티 라벨링(multi-labeling) 프로토콜로 동일한 샘플에서 동일한 종의 서로 다른 기본 항체를 사용할 수 있다. 첫 번째 항원에 항체를 붙이고 다수의 겨자무과산화효소(HRP; horseradish peroxidase)가 결합된 이차 항체(secondary antibody)를 이용하여 불활성 형광 티라미드를 활성화시켜 항원 주변에 표지 한다. 반응이 끝난 항체는 실시예 2.7. 단계에서 Epitope retrieval step으로 제거하므로 항체는 제거되지만 신호는 항원에 남아있다. 이전 항체를 제거한 후 새로운 항체를 사용하므로 교차 반응에 대한 문제 없이 염색을 계속 할 수 있다.

[0051] 실시예 2.6. Opal 신호 생성(Opal signal generation)

[0052] 150 μ L의 Opal Fluorophore 작업 용액을 각 슬라이드에 배출한다. 사용하는 조직이나 항체의 특성에 따라 반응 시간은 달리한다. Wash solution에서 슬라이드를 행군다.

[0053] 실시예 2.7. Epitope retrieval step (pH 6.0)

[0054] Epitope retrieval solution(Citrate based pH 6.0)으로 95℃에서 20분간 반응시킨다. 이후 wash solution에서 슬라이드를 행군다. 이 epitope retrieval step은 1차-2차 HRP 복합체를 제거하여 다음 1차 항체의 도입을 허용한다. 다음 타겟을 검출하려면, 실시예 2.3. 차단(Blocking)에서 프로토콜을 다시 시작한다. 모든 타겟이 검출된 경우, 실시예 2.8. 로 진행한다.

[0055] 실시예 2.8. 대비염색(Counterstain) 및 마운트(Mount)

[0056] DAPI Working Solution을 상온에서 5분 동안 배양한 후 wash solution에 슬라이드를 행군다. 이후 봉입제

(mounting medium)로 커버슬립(cover slip)한다.

[0057] **실시예 2.9. 이미징(Imaging) 및 분석(Analysis)**

[0058] 7-색 Opal 슬라이드의 시각화는 Mantra 또는 Vectra Quantitative Pathology Imaging Systems를 사용하여 수행할 수 있다. 고급 분석을 위해 inForm® Advanced Image Analysis 소프트웨어를 사용하여 스펙트럼 이미징(spectral imaging) 및 분석을 수행할 수 있다.

[0059] 1) 다중형광을 영상할 때 발생하는 중첩 신호의 제거를 위한 스펙트럼 이미징(spectral imaging) 및 신호 분할(spectrum unmixing)

[0060] 스펙트럼 이미징은 일반 RGB 또는 형광 이미징과는 달리 420 내지 720 nm 범위의 모든 신호를 수집하여 샘플에 컬러 신호를 기록한다. 형광의 고유한 스펙트럼을 이용하여 조직 염색에 혼재된 신호를 분리하여 이미지를 재구성하게 되므로 7 내지 9개의 형광의 정확한 이미지를 얻을 수 있다.

[0061] 2) 정량 분석의 표준화 문제를 해결하기 위한 세포 유형의 식별 및 정량 통계

[0062] 다중 형광으로 표지된 조직 이미지를 InForm 소프트웨어를 사용하여 정량 분석을 수행한다. 이미지에 기록된 스펙트럼 신호를 바이오 마커 및 조직 형태 정보와 상관시키는 프로세스 기반의 정량적 병리학 분석 인터페이스를 사용하여 종양 조직 미세 환경에 대한 다양한 정보를 제공한다. 형광 신호를 분리하고 counter staining 마커로 암 특이 발현 마커를 이용하여 머신러닝 후 조직 세그멘테이션(segmentation)을 수행한다. DAPI를 이용하여 각 세포의 세그멘테이션(segmentation) 후 세포 별 고유 번호를 부여한다.

[0063] **실험예 1. CK (cytokeratin), PD-L1, CD4, CD8, FOXP3, CD68, DAPI에서 선택되는 하나 이상의 분석 마커를 이용한 종양 미세환경에서의 종양 세포 및/또는 면역 세포 분포 조사**

[0064] **실험예 1.1. 면역 세포 분포 조사를 위한 패널 구성**

[0065] 췌장암 환자 병리 조직의 종양 세포 및 면역 세포를 multiplex IHC 기법으로 염색한 후, CK, PD-L1, CD4, CD8, FOXP3, CD68 및 DAPI에서 선택되는 어느 하나 이상의 분석 마커를 이용하여 종양 세포구(tumor cell nest)와 기질(stroma)에서 면역 세포들의 표현형을 분석하였다. 특히, 상기 분석 마커를 이용하여 PD-L1+ 종양 세포, PD-L1+ 대식 세포, 세포독성 T 세포 및 도움 T 세포의 분포 조사를 수행하였다.

[0066] 구체적으로, 염색 후 Vectra polaris를 이용하여 슬라이드를 스캔하고 신호 분할(sepctrum unmixing)을 통해 개별 형광 신호에 맞는 이미지를 획득하였다. Inform 소프트웨어를 이용하여 CK 마커 염색을 이용하여 머신러닝을 통해 조직 분할(Tissue segmentation)을 수행하였다. 그 결과 CK 양성 영역을 종양 세포구(tumor cell nest)로 지정하고 CK 음성 영역을 기질(stroma)로 지정하였다. 또한 DAPI 염색으로 세포 핵을 염색하고 셀 분할(cell segmentation)을 수행하여 전체 세포 각각의 고유 번호를 부여하였다. 면역세포의 염색을 위한 대표 마커를 이용하여 염색 패턴과 염색 강도를 이용하여 표현형 분석을 위한 알고리즘을 구축하였다. 이 후 분석 알고리즘을 이용하여 염색한 모든 슬라이드를 적용하여 면역 세포 프로파일링을 수행하였다. 그 결과를 TIBCO Spotfire 프로그램에 로딩하고 종양 세포 및 면역 세포들의 영역 별 분포 분석을 수행하였다.

[0067] **실험예 1.2. PD-L1+ 종양 세포의 분포 조사 및 췌장암 환자의 예후 예측**

[0068] 도 1은 PD-L1+ 종양 세포의 조직 내 존재 빈도에 따른 췌장암 환자의 생존을 분석 결과이다. PD-L1+ 종양 세포의 조직 내 존재 빈도가 10% 이하인 경우 그룹 1, 10% 초과인 경우 그룹 2로 나누었다. 그룹 1은 평균 생존기간이 13.7개월이고, 그룹 2는 평균 생존기간이 11.3개월이다. 즉, 그룹 2가 그룹 1에 비하여 생존율이 감소하는 경향을 보였다.

[0069] **실험예 1.3. PD-L1+ 대식 세포의 분포 조사 및 췌장암 환자의 예후 예측**

[0070] 도 2는 PD-L1+ 대식 세포의 조직 내 존재 빈도에 따른 췌장암 환자의 생존을 분석 결과이다. PD-L1+ 대식 세포의 조직 내 존재 빈도가 20% 이하인 경우 그룹 1, 20% 초과인 경우 그룹 2로 나누었다. 그룹 1은 평균 생존기간이 15.0개월이고, 그룹 2는 평균 생존기간이 11.0개월이다. 즉, 그룹 2가 그룹 1에 비하여 생존율이 감소하는 경향을 보였다.

[0071] **실험예 1.4. 세포독성 T 세포의 분포 조사 및 췌장암 환자의 예후 예측**

[0072] 도 3은 세포독성 T 세포의 조직 내 존재 빈도에 따른 췌장암 환자의 생존을 분석 결과이다. 세포독성 T 세포의 조직 내 존재 빈도가 20% 초과인 경우 그룹 1, 20% 이하인 경우 그룹 2로 나누었다. 그룹 1은 평균 생존기간이

15.4개월이고, 그룹 2는 평균 생존기간이 10.7개월이다. 즉, 그룹 2가 그룹 1에 비하여 생존율이 감소하는 경향을 보였다.

[0073] **실험예 1.5. 도움 T 세포(Helper T cell)의 분포 조사 및 췌장암 환자의 예후 예측**

[0074] 도 4는 도움 T 세포의 조직 내 존재 빈도에 따른 췌장암 환자의 생존을 분석 결과이다. 도움 T 세포의 조직 내 존재 빈도가 12% 초과인 경우 그룹 1, 12% 이하인 경우 그룹 2로 나누었다. 그룹 1은 평균 생존기간이 15.5개월이고, 그룹 2는 평균 생존기간이 10.6개월이다. 즉, 그룹 2가 그룹 1에 비하여 생존율이 감소하는 경향을 보였다.

[0075] **실험예 1.6. PD-L1+ 종양 세포, PD-L1+ 대식 세포, 세포독성 T 세포 및 도움 T 세포의 분포 조사 및 췌장암 환자의 예후 예측**

[0076] 상기 실험예 1.1 내지 1.5의 분석 결과를 통합하여 췌장암 예후 예측 스코어를 만들고, 췌장암 환자의 예후를 더욱 효과적으로 예측할 수 있는 조합을 확인하였다.

[0077] 우선, PD-L1+ 종양 세포, PD-L1+ 대식 세포, 세포독성 T 세포 및 도움 T 세포의 양 차이에 따라 각각 그룹1, 그룹2로 나누었다. 각각 그룹 1의 경우 점수 1점, 그룹 2의 경우 점수 2점을 부여하였다. 총 4가지 마커에 대한 점수를 합하여 췌장암 예후 예측 스코어를 구성하였다. 점수의 총합이 4점인 경우 예후 예측 스코어 1로, 4점 초과인 경우에는 예후 예측 스코어 2로 구분하였다. 도 5에 따르면, 예후 예측 스코어 1의 경우 평균 생존기간이 17.2개월이고, 예후 예측 스코어 2의 경우 평균 생존기간이 11.1개월이었다. 즉, 예후 예측 스코어 2의 경우 예후 예측 스코어 1에 비하여 생존율이 감소하며, 나아가 통계적으로 유의미한 것으로 분석되었다($p < 0.05$).

[0078] **실험예 2. CD3, CD56, CD68, CD11c, CK 및 DAPI에서 선택되는 하나 이상의 분석 마커를 이용한 종양 미세환경에서의 종양 세포 및/또는 면역 세포 분포 조사**

[0079] **실험예 2.1. 종양 세포 및/또는 면역 세포 분포 조사를 위한 패널 구성**

[0080] 췌장암 환자 병리 조직의 종양 세포 및 면역 세포를 multiplex IHC 기법으로 염색한 후, CD3, CD56, CD68, CD11c, CK 및 DAPI에서 선택되는 어느 하나 이상의 분석 마커를 이용하여 종양 세포구(tumor cell nest)와 기질(stroma)에서 종양 세포 및/또는 면역 세포들의 표현형을 분석하였다. 특히, 상기 분석 마커를 이용하여 i) T 세포; ii) T 세포, 대식 세포 및 단핵구 및 iii) 종양 세포, T 세포, 대식 세포 및 단핵구로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 종양 세포 및/또는 면역 세포의 분포 조사를 수행하였다.

[0081] 구체적으로, 염색 후 Vectra polaris를 이용하여 슬라이드를 스캔하고 신호 분할(sepectrum unmixing)을 통해 개별 형광 신호에 맞는 이미지를 획득하였다. Inform 소프트웨어를 이용하여 CK 마커 염색을 이용하여 머신러닝을 통해 조직 분할(Tissue segmentation)을 수행하였다. 그 결과 CK 양성 영역을 종양 세포구(tumor cell nest)로 정하고 CK 음성 영역을 기질(stroma)로 지정하였다. 또한 DAPI 염색으로 세포 핵을 염색하고 셀 분할(cell segmentation)을 수행하여 전체 세포 각각의 고유 번호를 부여하였다. 면역세포의 염색을 위한 대표 마커를 이용하여 염색 패턴과 염색 강도를 이용하여 표현형 분석을 위한 알고리즘을 구축하였다. 이 후 분석 알고리즘을 이용하여 염색한 모든 슬라이드를 적용하여 면역 세포 프로파일링을 수행하였다. 그 결과를 TIBCO Spotfire 프로그래밍에 로딩하고 종양 세포 및 면역 세포들의 영역 별 분포 분석을 수행하였다.

[0082] **실험예 2.2. 종양 세포의 분포 조사 및 췌장암 환자의 예후 예측**

[0083] 도 6은 종양 세포의 조직 내 존재 빈도에 따른 췌장암 환자의 생존을 분석 결과이다. 종양 세포의 조직 내 존재 빈도가 92% 초과인 경우 그룹 1, 92% 이하인 경우 그룹 2로 나누었다. 그룹 1은 평균 생존기간이 16.1개월이고, 그룹 2는 평균 생존기간이 14.3개월이다. 즉, 그룹 2가 그룹 1에 비하여 생존율이 감소하는 경향을 보였다.

[0084] **실험예 2.3. T 세포의 분포 조사 및 췌장암 환자의 예후 예측**

[0085] 도 7은 T 세포의 조직 내 존재 빈도에 따른 췌장암 환자의 생존을 분석 결과이다. T 세포의 조직 내 존재 빈도가 35% 초과인 경우 그룹 1, 35% 이하인 경우 그룹 2로 나누었다. 그룹 1은 평균 생존기간이 16.1개월이고, 그룹 2는 평균 생존기간이 9.3개월이다. 즉, 그룹 2가 그룹 1에 비하여 생존율이 감소하는 경향을 보였다. 나아가 통계적으로 유의미한 것으로 분석되었다($p < 0.05$).

[0086] **실험예 2.4. 대식 세포의 분포 조사 및 췌장암 환자의 예후 예측**

[0087] 도 8은 대식 세포의 조직 내 존재 빈도에 따른 췌장암 환자의 생존을 분석 결과이다. 대식 세포의 조직 내 존재

빈도가 48% 이하인 경우 그룹 1, 48% 초과인 경우 그룹 2로 나누었다. 그룹 1은 평균 생존기간이 14.5개월이고, 그룹 2는 평균 생존기간이 12.0개월이다. 즉, 그룹 2가 그룹 1에 비하여 생존율이 감소하는 경향을 보였다.

[0088] 실험예 2.5. 단핵구의 분포 조사 및 채장암 환자의 예후 예측

[0089] 도 9는 단핵구의 조직 내 존재 빈도에 따른 채장암 환자의 생존을 분석 결과이다. 단핵구의 조직 내 존재 빈도가 7% 이하인 경우 그룹 1, 7% 초과인 경우 그룹 2로 나누었다. 그룹 1은 평균 생존기간이 15.9개월이고, 그룹 2는 평균 생존기간이 10.2개월이다. 즉, 그룹 2가 그룹 1에 비하여 생존율이 감소하는 경향을 보였다.

[0090] 실험예 2.6. T 세포, 대식 세포 및 단핵구의 분포 조사 및 채장암 환자의 예후 예측

[0091] 상기 실험예 2.3 내지 2.5의 분석 결과를 통합하여 채장암 예후 예측 스코어를 만들고, 채장암 환자의 예후를 더욱 효과적으로 예측할 수 있는 조합을 확인하였다.

[0092] 우선, T 세포, 대식 세포 및 단핵구의 조직 내 존재 빈도의 차이에 따라 각각 그룹1, 그룹2로 나누었다. 각각 그룹 1의 경우 점수 1점, 그룹 2의 경우 점수 2점을 부여하였다. 총 4가지 마커에 대한 점수를 합하여 채장암 예후 예측 스코어를 구성하였다. 점수의 총합이 3점인 경우 예후 예측 스코어 1로, 4 또는 5점인 경우 예후 예측 스코어 2로, 6점인 경우 예후 예측 스코어 3으로 구분하였다. 도 10에 따르면, 예후 예측 스코어 1의 경우 평균 생존기간이 19.7개월이고, 예후 예측 스코어 2의 경우 평균 생존기간이 13.4개월이고, 예후 예측 스코어 3의 경우 평균 생존기간이 8.4개월이었다. 즉, 예후 예측 스코어 1, 2, 3의 순서로 채장암 환자의 생존기간이 길며, 나아가 통계적으로 유의미한 것으로 분석되었다($p < 0.05$).

[0093] 실험예 2.7. 종양 세포, T 세포, 대식 세포 및 단핵구의 분포 조사 및 채장암 환자의 예후 예측

[0094] 상기 실험예 2.2 내지 2.5의 분석 결과를 통합하여 채장암 예후 예측 스코어를 만들고, 채장암 환자의 예후를 더욱 효과적으로 예측할 수 있는 조합을 확인하였다.

[0095] 우선, 종양 세포, T 세포, 대식 세포 및 단핵구의 조직 내 존재 빈도의 차이에 따라 각각 그룹1, 그룹2로 나누었다. 각각 그룹 1의 경우 점수 1점, 그룹 2의 경우 점수 2점을 부여하였다. 총 4가지 마커에 대한 점수를 합하여 채장암 예후 예측 스코어를 구성하였다. 점수의 총합이 4 또는 5점인 경우 예후 예측 스코어 1로, 6점인 경우 예후 예측 스코어 2로, 7 또는 8점인 경우 예후 예측 스코어 3으로 구분하였다. 도 11에 따르면, 예후 예측 스코어 1의 경우 평균 생존기간이 18.0개월이고, 예후 예측 스코어 2의 경우 평균 생존기간이 12.3개월이고, 예후 예측 스코어 3의 경우 평균 생존기간이 9.2개월이었다. 즉, 예후 예측 스코어 1, 2, 3의 순서로 채장암 환자의 생존기간이 길며, 나아가 통계적으로 유의미한 것으로 분석되었다($p < 0.05$).

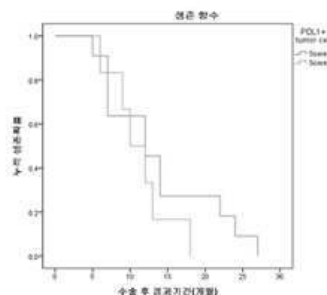
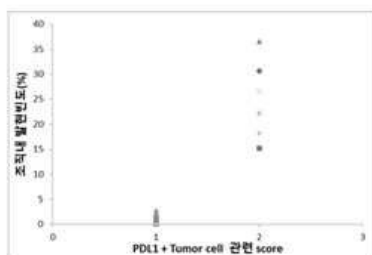
도면

도면1

	개별 분석 score	
	1	2
PDL1+ 종양세포	10% 이하	10% 초과

1. 그룹별 평균 생존기간
 - 그룹 1(PDL1+ 종양세포 10% 이하): 평균 13.7 개월
 - 그룹 2(PDL1+ 종양세포 10% 초과): 평균 11.3 개월

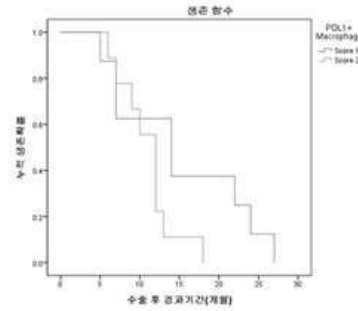
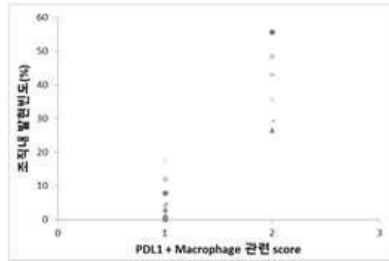
2. 생존률 분석: p value = 0.286



도면2

	개별 분석 score	
	1	2
PDL1 + macrophage	20% 이하	20% 초과

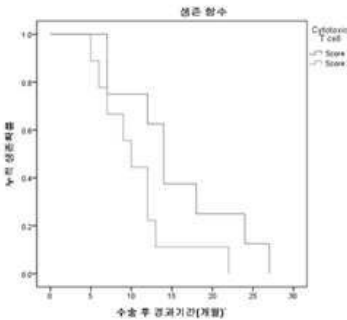
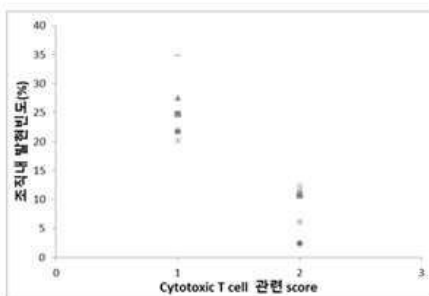
1. 그룹별 평균 생존기간
- 그룹 1 (PDL1 + macrophage 20% 이하): 평균 15.0 개월
- 그룹 2 (PDL1 + macrophage 20% 초과): 평균 11.0 개월
2. 생존률 분석 : p value = 0.094



도면3

	개별 분석 score	
	1	2
cytotoxic T cell	20% 초과	20% 이하

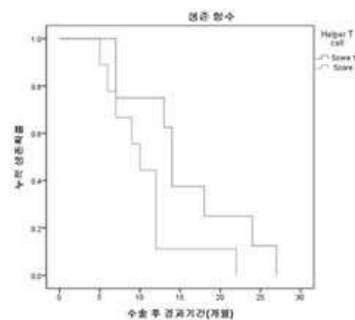
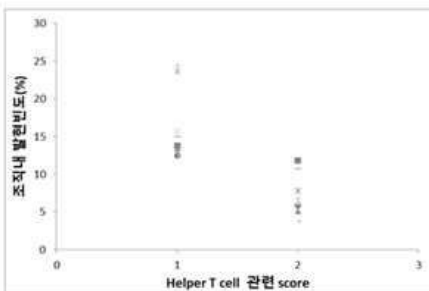
1. 그룹별 평균 생존기간
- 그룹 1 (cytotoxic T cell 20% 초과): 평균 15.4 개월
- 그룹 2 (cytotoxic T cell 20% 이하): 평균 10.7 개월
2. 생존률 분석 : p value = 0.065



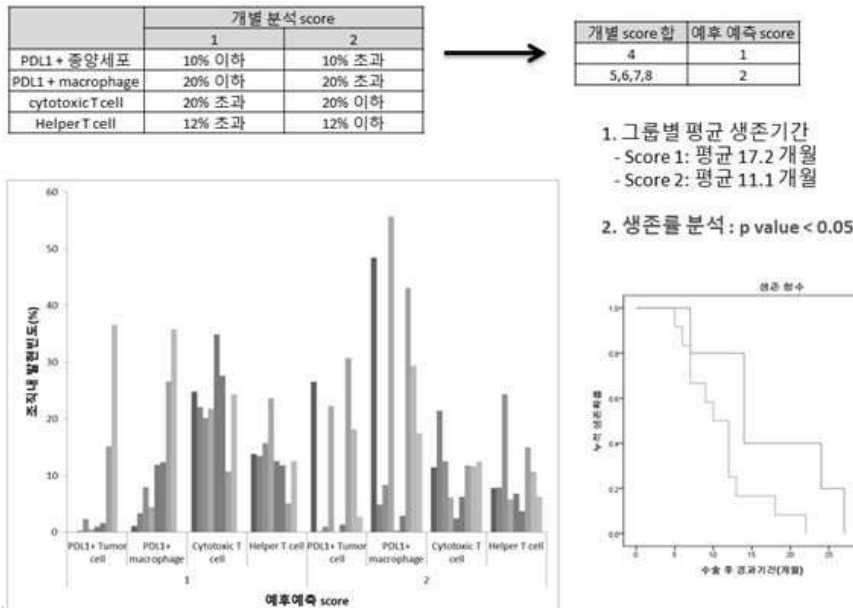
도면4

	개별 분석 score	
	1	2
Helper T cell	12% 초과	12% 이하

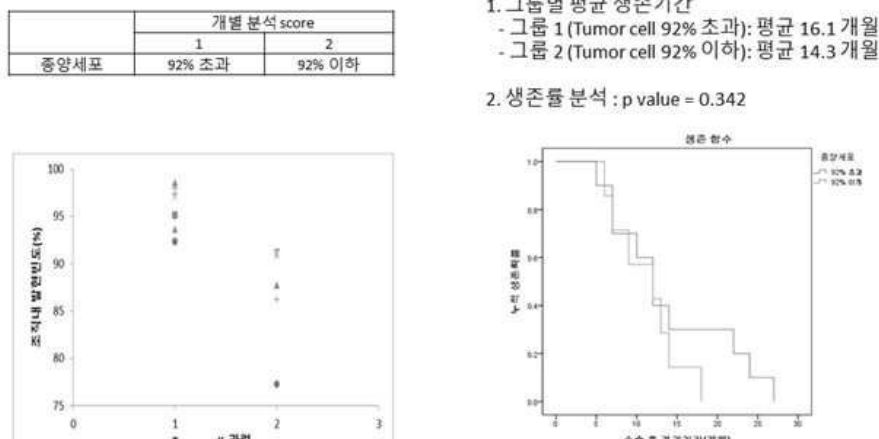
1. 그룹별 평균 생존기간
- 그룹 1 (Helper T cell 12% 초과): 평균 15.5 개월
- 그룹 2 (Helper T cell 12% 이하): 평균 10.6 개월
2. 생존률 분석 : p value = 0.065



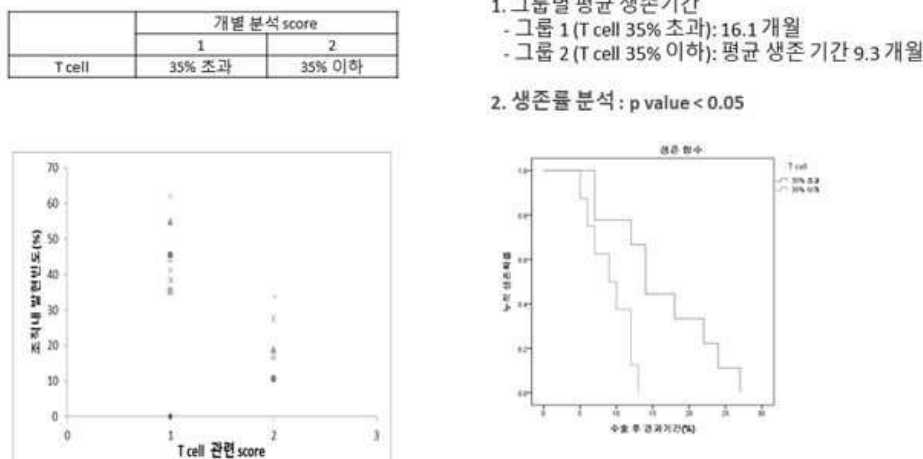
도면5



도면6

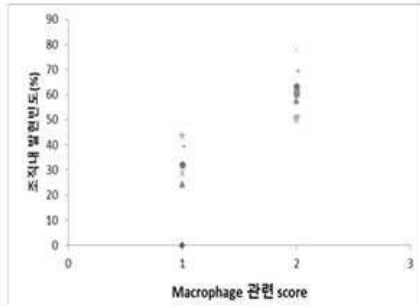


도면7

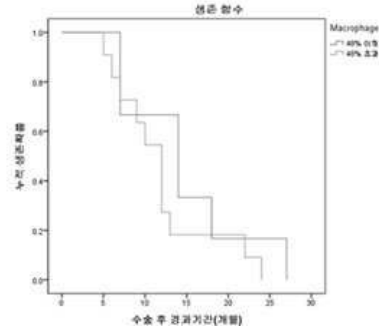


도면8

	개별 분석 score	
	1	2
macrophage	48% 이하	48% 초과

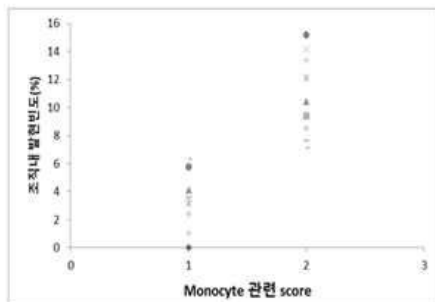


1. 그룹별 평균 생존기간
 - 그룹 1 (Macrophage 48% 이하): 평균 14.5 개월
 - 그룹 2 (Macrophage 48% 초과): 평균 12.0 개월
2. 생존률 분석 : p value = 0.264

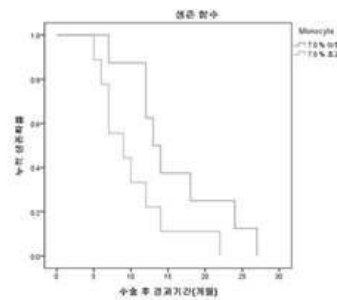


도면9

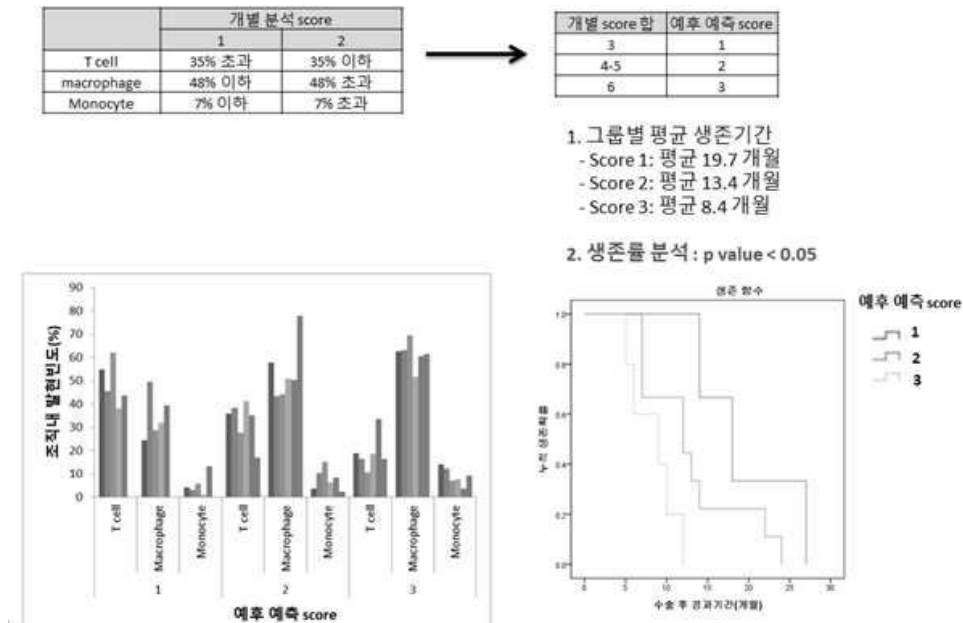
	개별 분석 score	
	1	2
Monocyte	7% 이하	7% 초과



1. 그룹별 평균 생존기간
 - 그룹 1 (monocyte 7% 이하): 평균 15.9 개월
 - 그룹 2 (monocyte 7% 초과): 평균 10.2 개월
2. 생존률 분석 : p value = 0.056



도면10



도면11

