

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0165003
(43) 공개일자 2023년12월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) *C12Q 1/6886* (2018.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57423 (2019.01)
C12Q 1/6886 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2022-0064841
(22) 출원일자 2022년05월26일
심사청구일자 2022년05월26일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
전영주
경기도 광명시 양지로 16, 105동 2202호(일직동,
광명역 씨밋플레이스)
강지안
대전광역시 중구 보문로230번길 62, 102호(
대흥동)
(74) 대리인
최규환

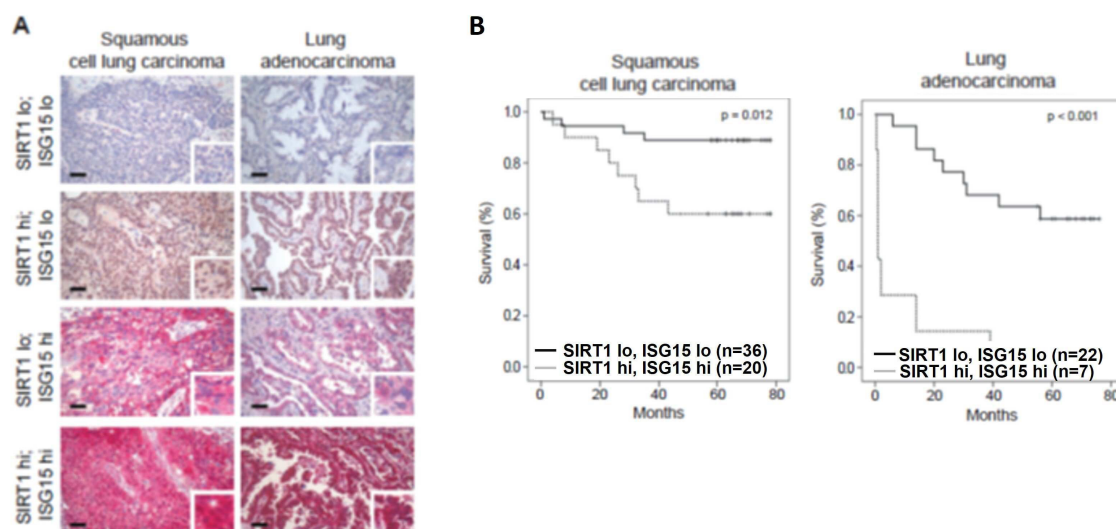
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 SIRT1의 ISG15화 기반 폐암 예후 예측용 바이오 마커

(57) 요약

본 발명은 SIRT1 및 ISG15 발현을 이용한 폐암 환자의 예후 예측 방법에 관한 것으로, 본 발명의 방법은 폐암 환자의 중증도 예측, 치료제 선택 및 예후적 특성에 따른 맞춤치료 등에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

C12Q 2525/205 (2013.01)

C12Q 2600/118 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2800/52 (2021.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711166019

과제번호 2019R1A2C2002324

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)

연구과제명 단백질번역 후 변형(post-translational protein modifications)에 의한 스트레스파
립(stress granule) 다이내믹스 조절과 압화 및 발암 제어 연구

기 여 율 1/1

과제수행기관명 충남대학교

연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

폐암 환자로부터 분리된 폐 조직에서 SIRT1 단백질 및 ISG15 단백질의 발현 점수를 각각 산출하는 단계; 및
상기 산출된 SIRT1 단백질 및 ISG15 단백질 발현 점수가 컷오프 값(cutoff value) 이상일 경우에 폐암 환자의 예후가 좋지 않은 것으로 판단하는 단계;를 포함하는 폐암 환자의 예후를 예측하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단백질 발현 점수는 동일 폐 조직 유래 2개의 독립적인 박편에서 각 단백질의 발현 강도 점수와 발현 범위 점수를 각각 측정된 후, 각 점수를 합한 값으로 산출하는 것을 특징으로 하는 폐암 환자의 예후를 예측하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 발현 강도 점수는 염색의 강도를 0~3으로 수치화한 것이고, 상기 발현 범위 점수는 양성으로 염색된 세포의 비율을 0~5로 수치화한 것을 특징으로 하는 폐암 환자의 예후를 예측하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 컷오프 값은 SIRT1 단백질 발현 점수 및 ISG15 단백질 발현 점수가 각각 11인 것을 특징으로 하는 폐암 환자의 예후를 예측하는 방법.

청구항 5

SIRT1 단백질 및 ISG15 단백질 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 폐암 환자의 예후 예측용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 SIRT1 단백질 및 ISG15 단백질 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체 또는 압타머를 포함하는 것인 폐암 환자의 예후 예측용 조성물.

청구항 7

제5항 또는 제6항의 조성물을 포함하는 폐암 환자의 예후 예측용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 SIRT1의 ISG15화 기반 폐암 예후 예측용 바이오 마커에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 폐암이란 폐에 생긴 악성 종양을 말하는 것으로, 폐 자체에서 발생하는 원발성 폐암과 다른 장기에서 생긴 암이 폐로 전이되어 발생하는 전이성 폐암으로 나뉜다. 원발성 폐암은 암세포의 크기와 형태를 기준으로 비소세포 폐암(non-small cell lung cancer)과 소세포 폐암(small cell lung cancer)으로 구분된다. 폐암 중 80~85%는 비소세포 폐암이며, 이는 다시 선암(샘암), 편평상피세포암, 대세포암 등으로 나뉜다. 소세포 폐암은 전반적으로 악성도가 높아서 발견 당시에 이미 림프관 또는 혈관을 통하여 다른 장기나 반대편 폐, 종격동으로 전이되어 있는 경우가 많다고 알려져 있다.

[0003] SIRT1(silent information regulator 1)은 히스톤과 비히스톤 단백질을 탈아세틸화시켜 염증매개물질을 조절하는 NAD⁺ 의존성 단백질로, 노화, 스트레스, 대사, 세포사멸 등에 긍정적인 역할을 한다는 연구 결과들이 보고되고 있다.

[0004] ISG15(interferon stimulated gene 15)는 유비퀴틴(ubiquitin) 유사 단백질로, 표적 단백질의 라이신(lysine) 잔기에 결합하여 단백질의 변형을 유도하며 이러한 과정을 ISG15화(ISGylation)라고 한다. ISG15에 의해 변형된 단백질은 전사(transcription), DNA 수선, 신호전달, 오토파지, 세포주기 조절, 세포사멸 등 세포 내 주요 과정을 조절한다고 알려져 있다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제0855355호에는 'SIRT1 발현 억제제 함유 방사선 감수성 증진 조성물 및 이를 이용하여 암 세포의 방사선 감수성 증진 방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1917677호에는 '폐암의 예후 예측용 바이오 마커로서 메티오닐-티알라닌 함성효소(MRS)의 유용성'이 개시되어 있으나, 본 발명의 'SIRT1의 ISG15화 기반 폐암 예후 예측용 바이오 마커'에 대해서는 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 폐암 환자의 폐 조직에서 SIRT1 단백질 및 ISG15 단백질 발현 점수를 산출하였고, 상기 단백질 발현 점수를 이용하여 작성한 ROC(receiver operating characteristic) 커브를 분석한 결과, SIRT1 단백질 및 ISG15 단백질 발현 점수의 컷오프 값이 각각 11인 것을 확인하였다. 또한, 폐조직 내 SIRT1 단백질 및 ISG15 단백질 발현 점수가 11 이상인 폐암 환자는 예후가 좋지 않은 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 폐암 환자로부터 분리된 폐 조직에서 SIRT1 단백질 및 ISG15 단백질 발현 점수를 각각 산출하는 단계; 및 상기 산출된 SIRT1 단백질 및 ISG15 단백질 발현 점수가 컷오프 값(cutoff value) 이상일 경우에 폐암 환자의 예후가 좋지 않은 것으로 판단하는 단계;를 포함하는 폐암 환자의 예후를 예측하는 방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 SIRT1 단백질 및 ISG15 단백질 발현 수준을 측정하는 재제를 포함하는 폐암 환자의 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 폐암 환자의 예후 예측용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명은 SIRT1 및 ISG15 발현을 이용한 폐암 환자의 예후 예측 방법에 관한 것으로, 본 발명의 방법은 폐암 환자의 중증도 예측, 치료제 선택 및 예후적 특성에 따른 맞춤치료 등에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 자궁경부암세포주(C-33A, HeLa), 폐암세포주(A549, H23) 및 간암세포주(Huh7, HepG2)에서의 SIRT1 단백질(A) 및 ISG15 단백질(B)의 발현을 확인한 결과이며, Dox는 항암제인 독소루비신(doxorubicin)이다.

도 2는 폐암세포주(A549, H23)에서 ISG15 단백질과 SIRT1 단백질의 ISG15화를 확인한 면역침강(immunoprecipitation, IP) 실험 결과이며, Dox는 항암제인 독소루비신(doxorubicin)이다.

도 3은 *SIRT1* 유전자 녹아웃 세포(SIRT1 KO), *SIRT1* 유전자 녹아웃 세포에 *SIRT1* 유전자를 재발현시킨 세포(SIRT1 KO+WT), *SIRT1* 유전자 녹아웃 세포에 라이신 잔기 돌연변이 *SIRT1* 유전자를 재발현시킨 세포(SIRT1 KO+KR)에서의 SIRT1 단백질 발현을 확인한 결과(A) 및 독소루비신(Dox) 처리에 의한 세포 증식을 확인한 결과(B)이다.

도 4는 *SIRT1* 유전자 녹아웃 세포(SIRT1 KO), *SIRT1* 유전자 녹아웃 세포에 *SIRT1* 유전자를 재발현시킨 세포(SIRT1 KO+WT), *SIRT1* 유전자 녹아웃 세포에 라이신 잔기 돌연변이 *SIRT1* 유전자를 재발현시킨 세포(SIRT1 KO+KR)를 주입한 누드마우스에 독소루비신(Dox)을 주사한 후 종양의 크기를 측정한 결과이다.

도 5는 폐암 환자의 폐 조직을 이용한 조직 미세배열(tissue microarray, TMA) 및 면역조직화학염색(immunohistochemistry, IHC)을 통한 SIRT1 단백질 또는 ISG15 단백질 발현 점수를 이용하여 작성한 ROC(receiver operating characteristic) 커브이다.

도 6은 폐암 환자의 SIRT1 단백질 및, 또는 ISG15 단백질 발현 점수를 산출한 후, 추적 검사를 통해 생존율을

분석한 결과로, hi는 단백질 발현 점수가 11 이상인 경우이고, lo는 단백질 발현 점수가 11 미만인 경우이다.

도 7A는 편평상피세포암(squamous cell carcinoma) 환자 및 선암(adenocarcinoma) 환자의 폐조직을 이용하여 SIRT1 단백질 및 ISG15 단백질 발현 점수를 산출하기 위한 폐 조직 염색 결과이고, 7B는 SIRT1 단백질 및 ISG15 단백질의 발현 점수를 산출한 후, 추적 검사를 통해 생존율을 분석한 결과이다. hi는 단백질 발현 점수가 11 이상인 경우이고, lo는 단백질 발현 점수가 11 미만인 경우이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0013] 폐암 환자로부터 분리된 폐 조직에서 SIRT1 단백질 및 ISG15 단백질 발현 점수를 각각 산출하는 단계; 및
- [0014] 상기 산출된 SIRT1 단백질 및 ISG15 단백질 발현 점수가 컷오프 값(cutoff value) 이상일 경우에 폐암 환자의 예후가 좋지 않은 것으로 판단하는 단계;를 포함하는 폐암 환자의 예후를 예측하는 방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 폐암 환자의 예후를 예측하는 방법에 있어서, 상기 SIRT1(silent information regulator 1) 단백질은 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어질 수 있으며, 상기 ISG15(interferon stimulated gene 15) 단백질은 바람직하게는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0016] 또한, 상기 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. 본 발명에 있어서, 용어 '기능적 동등물'이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다.
- [0017] 본 발명에서, 용어 "예후(prognosis)"는 폐암 중증도의 증가 및 감소를 의미한다. 암 환자에 있어서 예후는 통상적으로 암 발병 또는 외과적 시술 후 일정기간 내에 전이 여부 또는 생존기간을 뜻한다. 예후의 예측은 특히 폐암 환자의 화학치료 여부를 비롯하여 향후 치료의 방향에 대한 단서를 제시하는 것으로, 질환의 치료 후 환자의 생리적 또는 환경적 상태를 종합적으로 고려하여 치료 후 경과를 예측하는 모든 행위로 해석될 수 있다.
- [0018] 따라서, 본 발명의 목적상 상기 예후 예측은 폐암 치료 후 질환의 경고 및 완치 여부를 미리 예상하여 폐암 환자의 무병생존율 또는 생존율을 예측하는 것을 의미한다. 예를 들어, "예후가 좋다"고 예측하는 것은 폐암 치료 후 환자의 무병생존율 또는 생존율이 높은 수준을 나타내어 폐암 환자가 치료될 가능성이 높다는 것을 의미하고, "예후가 나쁘다"고 예측하는 것은 폐암 치료 후 환자의 무병생존율 또는 생존율이 낮은 수준을 나타내어 폐암 환자로부터 암이 재발하거나 또는 폐암으로 인하여 사망할 가능성이 높다는 것을 의미한다. 상기 무병생존율은 폐암 치료 후 환자가 암의 재발없이 생존할 수 있는 가능성을 의미하고, 생존율이란 폐암 치료 후 환자가 암의 재발여부에 관계없이 생존할 수 있는 가능성을 의미한다.
- [0019] 또한, 본 발명에서 "단백질 발현 점수"는 바람직하게는 동일 폐 조직 유래 2개의 독립적인 박편에서 발현 강도 점수(intensity score)와 발현 범위 점수(area score)를 각각 측정된 후, 각 점수를 합한 값으로 산출하는 것이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 상기 발현 강도 점수는 염색의 강도를 0~3으로 수치화한 것이고, 상기 발현 범위 점수는 양성으로 염색된 세포의 비율을 0~5로 수치화한 것이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 따라서, 상기 단백질 발현 점수는 2개의 독립적인 박편에서 0~3의 발현 강도 점수와 0~5의 발현 범위 점수를 합한 값으로 산출하므로, 그 범위는 0~16이다.
- [0022] 본 발명의 폐암 환자의 예후를 예측하는 방법에 있어서, 상기 컷오프 값은 SIRT1 단백질 발현 점수 및 ISG15 단백질 발현 점수가 각각 11인 것이 바람직하다.
- [0023] 본 발명에서 "컷오프 값"은 생체 시료에 대해 2 이상의 상태(예를 들면, 폐암 환자의 예후가 좋지 않은 것 및 예후가 좋은 것) 간의 분류의 중재에 사용되는 수치를 의미한다. 예를 들면, 파라미터가 컷오프 값 이상일 경우, 정량적 데이터의 제1 분류(예를 들면, 폐암 환자의 예후가 좋지 않은 것)가 이루어지고, 또는 파라미터가 컷오프 값 미만일 경우, 정량적 데이터의 다른 분류(예를 들면, 폐암 환자의 예후가 좋은 것)가 이루어진다.
- [0024] 본 발명에서는 SIRT1 단백질 발현 점수 및 ISG15 단백질 발현 점수를 컷오프 값 기준으로 나누어 폐암 환자의 예후를 예측하였다. 폐암 환자의 SIRT1 단백질 발현 점수 및 ISG15 단백질 발현 점수가 각각 11 이상인 경우에

는 폐암 환자의 예후가 좋지 않은 것으로 예측할 수 있다.

- [0025] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 "예후가 좋지 않은 것"은 SIRT1 단백질 및 ISG15 단백질의 발현 점수가 컷오프 값 이상인 폐암 환자의 생존율이 SIRT1 단백질 및 ISG15 단백질의 발현 점수가 컷오프 값 미만인 폐암 환자의 생존율 대비 1/2 수준인 것에 근거하여 판단한 것이다.
- [0026] 본 발명은 또한, SIRT1 단백질 및 ISG15 단백질 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 폐암 환자의 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 폐암 환자의 예후 예측용 조성물에 있어서, 상기 단백질 발현 수준을 측정하는 방법은 전술한 것과 같으며, 폐암 환자에서 SIRT1 단백질 발현 점수 및 ISG15 단백질 발현 점수가 각각 컷오프 값(11) 이상인 경우에는 폐암 환자의 예후가 좋지 않은 것으로 판단할 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 단백질 발현 수준을 측정하는 제제는 이에 한정되지는 않으나, 바람직하게는 SIRT1 단백질 또는 ISG15 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머일 수 있다.
- [0029] 본 발명에서, 용어 "항체"는 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 마커인 SIRT1 단백질 또는 ISG15 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는, *SIRT1* 유전자 또는 *ISG15* 유전자의 전장 혹은 일부를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 *SIRT1* 유전자 또는 *ISG15* 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.
- [0030] 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.
- [0031] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 폐암 환자의 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [0032] 본 발명의 키트는 SIRT1 단백질 및 ISG15 단백질의 검출여부를 확인함으로써 폐암 환자의 예후를 예측할 수 있다. 본 발명의 폐암 환자의 예후를 예측하기 위한 키트에는 SIRT1 단백질 및 ISG15 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.
- [0033] 본 발명의 키트가 SIRT1 단백질 및 ISG15 단백질의 발현 수준을 측정하기 위한 키트일 경우, 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기에서 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스티렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(peroxidase), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline Phosphatase)가 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC(Fluorescein isothiocyanate), RITC(Rhodamine B isothiocyanate) 등이 사용될 수 있고, 발색 기질액은 ABTS(2,2'-아지노비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸벤지딘)가 사용될 수 있다.
- [0034] 이하, 본 발명의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0035] **실시예 1. 암세포에서의 SIRT1 및 ISG15 단백질의 발현 확인**
- [0036] 자궁경부암세포주(C-33A, HeLa), 폐암세포주(A549, H23) 및 간암세포주(Huh7, HepG2)를 ATCC에서 구입하여 실험에 사용하였다. 각 세포를 10% FBS 및 항생제가 포함된 DMEM 배지에서 37℃, 5% CO₂ 조건으로 배양한 후, 세포를 용해시켜 단백질을 추출한 후, 항-SIRT1 항체(1:100, Santa Cruz Biotechnology)를 이용하여 웨스턴 블랏을 수행한 결과, SIRT1 단백질은 자궁경부암세포주(C-33A, HeLa), 폐암세포주(A549, H23) 및 간암세포주(Huh7, HepG2)에서 모두 발현되고 있는 것을 확인하였다(도 1A).
- [0037] 또한, 각 세포주에 항암제인 독소루비신(doxorubicin, 0.5 μM)을 24시간 동안 처리한 후, 항-ISG15 항체(1:100, Atlas Antibodies AB)를 이용하여 ISG15 단백질의 발현을 웨스턴 블랏을 통해 분석한 결과, 폐암세포주

(A549, H23)에서 독소루비신에 의해 ISG15 단백질의 발현이 현저히 증가하는 것을 확인하였다(도 1B).

[0038] 실시예 2. 폐암세포주에서의 SIRT1 단백질의 ISG15화 발현 확인

[0039] 본 발명자들은 LC-MS/MS 기법을 이용하여 ISG15에 의해 단백질번역 후 변형되는 표적 단백질로 SIRT1을 새로이 발굴하였고 E1 activating enzyme인 UBE1L, E2 conjugating enzyme인 UbcH8 및 ISG15을 과다 발현시켰을 때, SIRT1이 ISG15화되는 것을 확인하였다.

[0040] 이에, 폐암세포주에서의 SIRT1 단백질의 ISG15화되는 것을 확인하고자 하였다. 폐암세포주(A549, H23)에 독소루비신($0.5 \mu\text{M}$)을 24시간 동안 처리하고, 세포를 용해시켜 단백질을 추출한 후, SIRT1 단백질에 대한 항체로 면역침강(immunoprecipitation, IP)시킨 후 ISG15 단백질에 대한 항체로 웨스턴 블랏을 수행하였다. 또한, 반대로 ISG15 단백질에 대한 항체로 면역침강시킨 후 SIRT1 단백질에 대한 항체로 웨스턴 블랏을 수행하였다.

[0041] 그 결과, 독소루비신을 24시간 동안 처리한 시료에서 SIRT1 단백질이 ISG15화되는 것을 확인함으로써(도 2), 폐암세포에서 SIRT1은 ISG15에 의해 단백질 번역 후 변형되는 표적 단백질을 알 수 있었다.

[0042] 실시예 3. SIRT1 단백질의 ISG15화에 의한 영향 분석

[0043] *SIRT1* 유전자 녹아웃 세포(*SIRT1* KO), *SIRT1* 유전자 녹아웃 세포에 *SIRT1* 유전자를 재발현시킨 세포(*SIRT1* KO+WT) 및 *SIRT1* 유전자 녹아웃 세포에 ISG15에 의해 변형(ISG15화)되지 못하는 돌연변이 *SIRT1* 유전자를 재발현시킨 세포(*SIRT1* KO+KR: 라이신 잔기 돌연변이, 314, 444 및 519번째 라이신 모두를 아르기닌으로 치환한 돌연변이)를 실험에 사용하였다. 상기 *SIRT1* 유전자 녹아웃 세포(*SIRT1* KO)는 CRISPR-Cas9 유전체 교정 방법을 이용하여 제조한 것으로, 폐암세포주(A549)에 gRNA 표적 서열(5'-CTCCGCAAGAGCCGCGAG-3': 서열번호 3)이 클로닝된 CRISPRv2 벡터(Addgene, #52961)를 삽입하여 제조하였다. *SIRT1* 유전자를 재발현시킨 세포(*SIRT1* KO+WT) 또는 라이신 잔기 돌연변이 *SIRT1* 유전자를 재발현시킨 세포(*SIRT1* KO+KR)는 *SIRT1* 유전자 또는 라이신 잔기 돌연변이 *SIRT1* 유전자 서열이 클로닝된 pLenti6.3-V5-DEST 벡터(Thermo Fisher, #V49610)를 *SIRT1* 유전자 녹아웃 세포(*SIRT1* KO)에 삽입하여 제조하였다.

[0044] 3-1. 항암제 내성 분석

[0045] 각 재조합세포를 배양한 후, 세포를 용해시키고 항-SIRT1 항체를 이용하여 웨스턴 블랏을 수행한 결과, *SIRT1* KO 세포는 SIRT1 단백질이 발현되지 않은 반면, *SIRT1* KO+WT 및 *SIRT1* KO+KR 세포는 SIRT1 단백질이 정상적으로 발현되는 것을 확인함으로써(도 3A), 각 재조합세포가 정상적으로 제조된 것을 확인하였다.

[0046] 또한, 또한, 500개씩 seeding 한 각 재조합세포에 독소루비신($0.5 \mu\text{M}$)을 13일 동안 처리한 후, 형성된 콜로니를 포름알데하이드로 고정 후 크리스탈 바이올렛으로 염색한 후 콜로니 개수를 측정한 콜로니 형성 분석(colony formation assay)을 수행한 결과, *SIRT1* KO+WT 세포 대비 *SIRT1* KO 세포 및 *SIRT1* KO+KR 세포는 독소루비신에 의해 세포 증식이 현저하게 억제되는 것을 확인함으로써(도 3B), SIRT1 단백질이 ISG15화 되면 항암제에 대한 내성이 생기는 것을 알 수 있었다.

[0047] 3-2. 종양 크기 분석

[0048] 상기 *SIRT1* KO, *SIRT1* KO+WT 및 *SIRT1* KO+KR 세포(7.5×10^6 개)를 누드마우스(중양실험동물)의 피하에 주사 하고 4일째부터 일주일에 두 번씩 1.25 mg/kg 의 독소루비신을 5주 동안 복강주사하였다. 일주일에 한 번씩 종양의 크기를 측정하였으며 42일째에 마우스를 희생시켜 종양을 적출하였다.

[0049] 그 결과, *SIRT1* KO+WT 세포 주입군은 *SIRT1* KO 세포 주입군 또는 *SIRT1* KO+KR 세포 주입군 대비 종양의 형성이 현저하게 증가하는 것을 확인함으로써(도 4), SIRT1 단백질이 ISG15화 되면 폐암의 진행을 촉진하는 것을 알 수 있었다.

[0050] 실시예 4. SIRT1 단백질 또는 ISG15 단백질 발현의 컷오프 값 산출

[0051] 전북대학교병원으로부터 폐암 환자 89명의 폐 조직 샘플을 제공받아 실험에 사용하였다. Allred 등(1998, Mod Pathol. 11(2):155-168), Park 등(2018, J Exp Clin Cancer Res. 37(1):107), Hussein 등(2018, BMC Cancer. 18(1):836) 및 Bae 등(2016, Am J Pathol. 186(12):3297-3315)에 기술된 방법에 따라 조직 미세배열(tissue microarray, TMA) 블록을 이용한 면역조직화학염색(immunohistochemistry, IHC)을 수행한 후, SIRT1 단백질 또는 ISG15 단백질 발현 점수를 산출하였고 이를 이용하여 작성한 ROC(receiver operating characteristic) 커브 분석을 통해 컷오프(cut-off) 값을 산출하였다.

[0052] 보다 구체적으로는, 폐암 환자의 종양 부위로부터 3 mm 직경의 코어를 각 샘플당 2개씩 채취하여 TMA 블록을 제작하고 마이크로톰으로 4 μ m 두께로 박절한 후, IHC를 수행하였다. 항-SIRT1 항체(1:100, Santa Cruz Biotechnology) 및 항-ISG15 항체(1:100, Atlas Antibodies AB)를 1차 항체로 하여 4℃에서 2시간 동안 반응시킨 후, SIRT1은 OptiView DAB IHC Detection Kit(Roche Korea Diagnostics Ltd.), ISG15은 UltraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit(Roche Korea Diagnostics Ltd.)를 이용하여 발색시켰다. 이후, IHC 염색 결과에서 SIRT1 단백질 또는 ISG15 단백질의 발현 강도 점수(intensity score)와 발현 범위 점수(area score)를 측정 한 후, 각 점수를 합하여 단백질 발현 점수를 계산하였다. 상기 발현 강도 점수는 염색의 강도를 0~3(0; 없음, 1; 약, 2; 중, 3; 강)으로 수치화하였고, 상기 발현 범위 점수는 양성으로 염색된 세포의 비율을 0~5(0; 0%, 0; 0%, 1; 1%, 2; 2~10%, 3; 11~33%, 4; 34~66%, 5; 67~100%)로 수치화하였으며, 상기 수치화는 다중 현미경(magnification; $\times$ 400, area of one field; 0.238 mm²)을 이용하여 분석하였다. 하나의 시료에 대한 각 단백질 발현 점수는 2개의 TMA 블록에서 각각 측정하였으므로 각 단백질 발현 점수는 0~16으로 나타났다으며, 이를 이용하여 작성한 ROC 커브에서 곡선의 증가율이 가장 큰 지점을 컷오프 값으로 산출하였다.

[0053] 그 결과, SIRT1 단백질 또는 ISG15 단백질 발현 점수의 컷오프 값은 11로 확인되었다(표 1, 도 5).

표 1

[0054] ROC 커브 분석 결과

구분	컷오프	AUC	P
SIRT1/ISG15	All	0.738	<0.001
	≥ 11	0.673	0.008
SIRT1	All	0.651	0.021
	≥ 11	0.612	0.087
ISG15	All	0.664	0.012
	≥ 11	0.622	0.061

[0055] (AUC: area under the curve)

[0056] 실시예 5. SIRT1 단백질 또는 ISG15 단백질 발현 점수의 컷오프 값을 이용한 폐암 환자의 예후 분석

[0057] 89명의 폐암 환자 조직으로부터 SIRT1 단백질 또는 ISG15 단백질 발현 점수를 산출한 후, 80개월 동안 각 환자에 대한 추적 검사를 실시하여 생존율을 분석하였다. 각 단백질의 발현 점수가 11 이상일 경우에는 높게 발현되는 것으로, 11 미만일 경우에는 낮게 발현되는 것으로 분류하였다.

[0058] 그 결과, SIRT1 단백질 단독 또는 ISG15 단백질 단독의 발현 점수가 11 이상인 환자의 생존율이 SIRT1 단백질 단독 또는 ISG15 단백질 단독의 발현 점수가 11 미만인 환자보다 낮은 것을 확인하였다. 또한, SIRT1 단백질 및 ISG15 단백질의 발현 점수가 모두 11 이상인 환자의 생존율이 SIRT1 단백질 및 ISG15 단백질의 발현 점수가 모두 11 미만인 환자보다 현저히 낮은 것을 확인하였다(도 6).

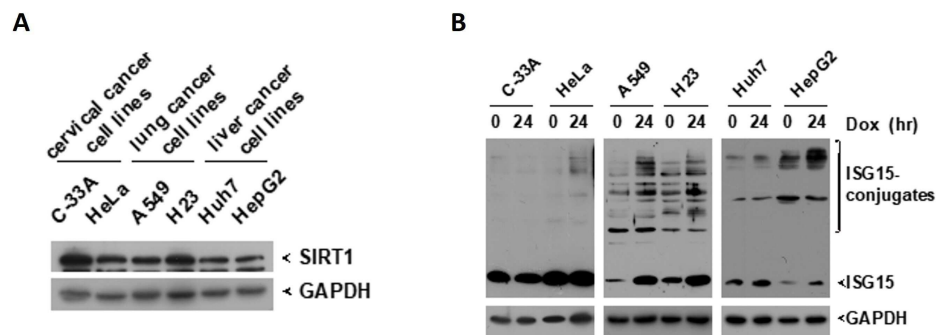
[0059] 또한, 89명의 폐암 환자를 편평상피세포암(squamous cell carcinoma) 환자와 선암(adenocarcinoma) 환자로 나눈 후, SIRT1 단백질 또는 ISG15 단백질 발현 점수를 산출한 후, 80개월 동안 각 환자에 대한 추적 검사를 실시하여 생존율을 분석하였다.

[0060] 그 결과, SIRT1 단백질 및 ISG15 단백질의 발현 점수가 모두 11 이상인 환자의 생존율이 SIRT1 단백질 및 ISG15 단백질의 발현 점수가 모두 11 미만인 환자보다 현저히 낮았으며, 선암 환자군에서 특히 매우 낮은 생존율을 보였다(도 7).

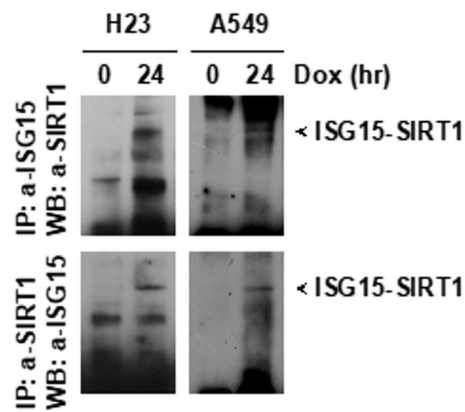
[0061] 상기 결과를 통해, 폐암 환자에서 SIRT1 단백질 및 ISG15 단백질이 높은 수준으로 발현되면 SIRT1 단백질이 ISG15와 되어, 항암제에 대한 내성이 생기고 종양의 크기가 증가하여, 예후가 좋지 않음을 유추할 수 있었다.

도면

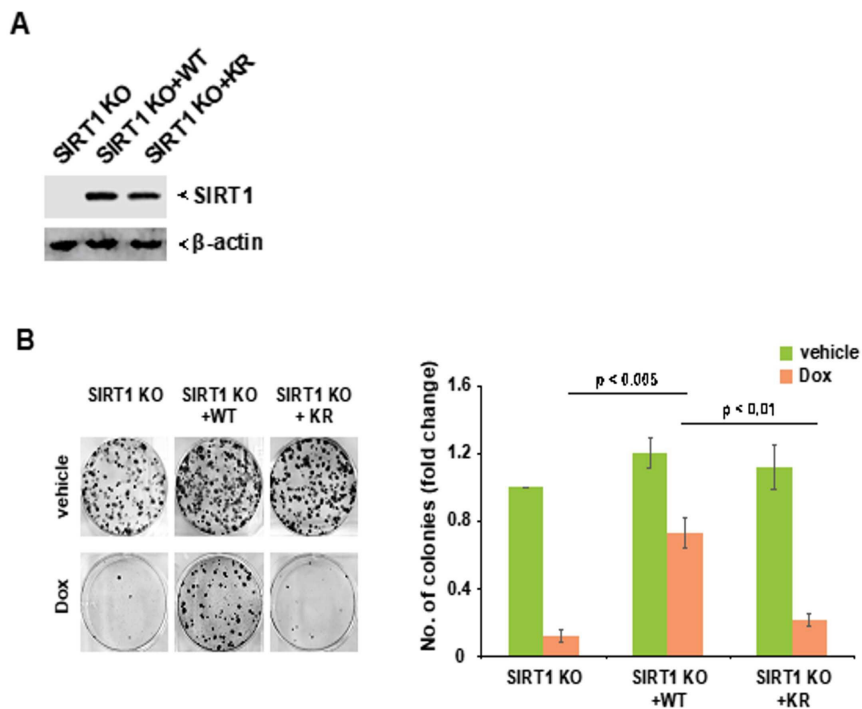
도면1



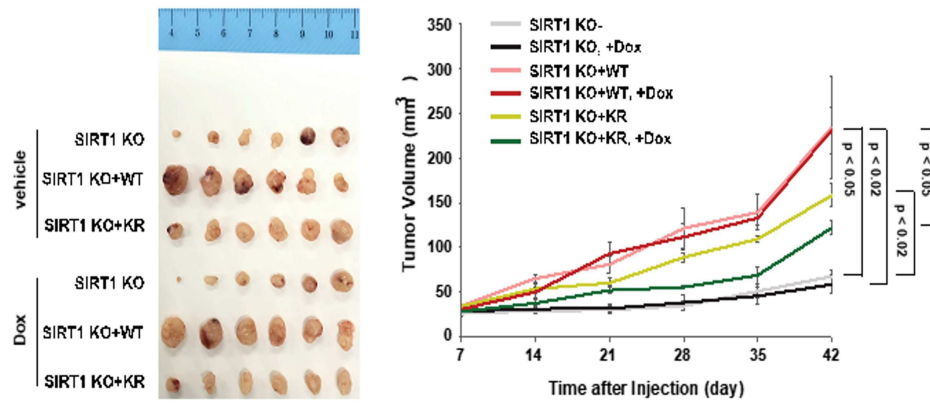
도면2



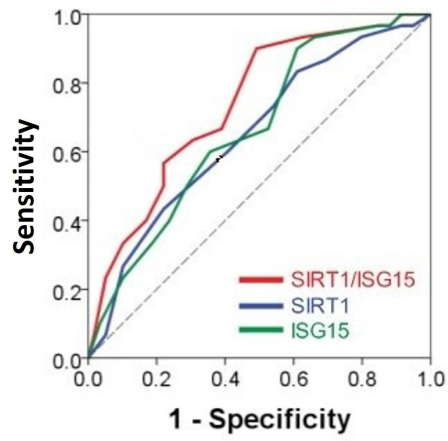
도면3



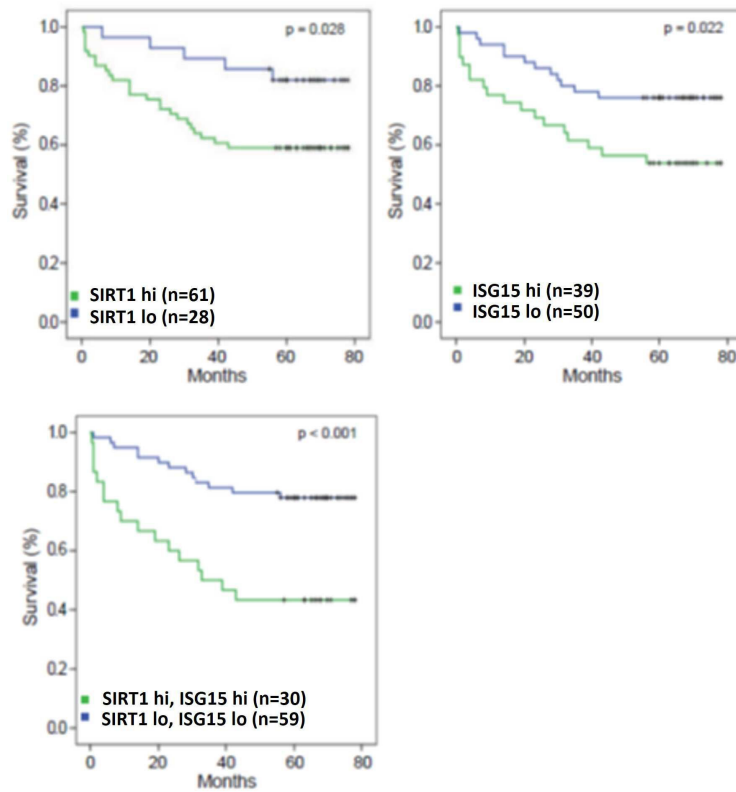
도면4



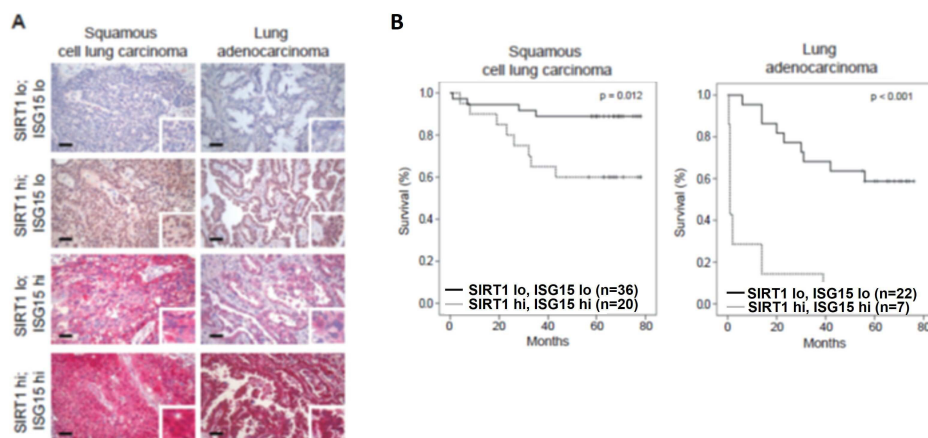
도면5



도면6



도면7



서열목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Biomarker based on ISGylation of SIRT1 for predicting prognosis of lung cancer
- <130> PN22087
- <160> 3
- <170> KoPatent In 3.0

<210> 1
 <211> 555
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Met Ile Gly Thr Asp Pro Arg Thr Ile Leu Lys Asp Leu Leu Pro Glu
 1 5 10 15
 Thr Ile Pro Pro Pro Glu Leu Asp Asp Met Thr Leu Trp Gln Ile Val
 20 25 30
 Ile Asn Ile Leu Ser Glu Pro Pro Lys Arg Lys Lys Arg Lys Asp Ile
 35 40 45
 Asn Thr Ile Glu Asp Ala Val Lys Leu Leu Gln Glu Cys Lys Lys Ile
 50 55 60
 Ile Val Leu Thr Gly Ala Gly Val Ser Val Ser Cys Gly Ile Pro Asp
 65 70 75 80
 Phe Arg Ser Arg Asp Gly Ile Tyr Ala Arg Leu Ala Val Asp Phe Pro
 85 90 95
 Asp Leu Pro Asp Pro Gln Ala Met Phe Asp Ile Glu Tyr Phe Arg Lys
 100 105 110
 Asp Pro Arg Pro Phe Phe Lys Phe Ala Lys Glu Ile Tyr Pro Gly Gln
 115 120 125
 Phe Gln Pro Ser Leu Cys His Lys Phe Ile Ala Leu Ser Asp Lys Glu
 130 135 140
 Gly Lys Leu Leu Arg Asn Tyr Thr Gln Asn Ile Asp Thr Leu Glu Gln
 145 150 155 160
 Val Ala Gly Ile Gln Arg Ile Ile Gln Cys His Gly Ser Phe Ala Thr
 165 170 175
 Ala Ser Cys Leu Ile Cys Lys Tyr Lys Val Asp Cys Glu Ala Val Arg
 180 185 190
 Gly Ala Leu Phe Ser Gln Val Val Pro Arg Cys Pro Arg Cys Pro Ala
 195 200 205
 Asp Glu Pro Leu Ala Ile Met Lys Pro Glu Ile Val Phe Phe Gly Glu

210 215 220
 Asn Leu Pro Glu Gln Phe His Arg Ala Met Lys Tyr Asp Lys Asp Glu
 225 230 235 240

 Val Asp Leu Leu Ile Val Ile Gly Ser Ser Leu Lys Val Arg Pro Val
 245 250 255
 Ala Leu Ile Pro Ser Ser Ile Pro His Glu Val Pro Gln Ile Leu Ile
 260 265 270
 Asn Arg Glu Pro Leu Pro His Leu His Phe Asp Val Glu Leu Leu Gly
 275 280 285
 Asp Cys Asp Val Ile Ile Asn Glu Leu Cys His Arg Leu Gly Gly Glu
 290 295 300
 Tyr Ala Lys Leu Cys Cys Asn Pro Val Lys Leu Ser Glu Ile Thr Glu

 305 310 315 320
 Lys Pro Pro Arg Thr Gln Lys Glu Leu Ala Tyr Leu Ser Glu Leu Pro
 325 330 335
 Pro Thr Pro Leu His Val Ser Glu Asp Ser Ser Ser Pro Glu Arg Thr
 340 345 350
 Ser Pro Pro Asp Ser Ser Val Ile Val Thr Leu Leu Asp Gln Ala Ala
 355 360 365
 Lys Ser Asn Asp Asp Leu Asp Val Ser Glu Ser Lys Gly Cys Met Glu
 370 375 380

 Glu Lys Pro Gln Glu Val Gln Thr Ser Arg Asn Val Glu Ser Ile Ala
 385 390 395 400
 Glu Gln Met Glu Asn Pro Asp Leu Lys Asn Val Gly Ser Ser Thr Gly
 405 410 415
 Glu Lys Asn Glu Arg Thr Ser Val Ala Gly Thr Val Arg Lys Cys Trp
 420 425 430
 Pro Asn Arg Val Ala Lys Glu Gln Ile Ser Arg Arg Leu Asp Gly Asn
 435 440 445
 Gln Tyr Leu Phe Leu Pro Pro Asn Arg Tyr Ile Phe His Gly Ala Glu

 450 455 460

Val Tyr Ser Asp Ser Glu Asp Asp Val Leu Ser Ser Ser Ser Cys Gly
465 470 475 480
Ser Asn Ser Asp Ser Gly Thr Cys Gln Ser Pro Ser Leu Glu Glu Pro
485 490 495
Met Glu Asp Glu Ser Glu Ile Glu Glu Phe Tyr Asn Gly Leu Glu Asp
500 505 510
Glu Pro Asp Val Pro Glu Arg Ala Gly Gly Ala Gly Phe Gly Thr Asp
515 520 525

Gly Asp Asp Gln Glu Ala Ile Asn Glu Ala Ile Ser Val Lys Gln Glu
530 535 540
Val Thr Asp Met Asn Tyr Pro Ser Asn Lys Ser
545 550 555
<210> 2
<211> 165
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2

Met Gly Trp Asp Leu Thr Val Lys Met Leu Ala Gly Asn Glu Phe Gln
1 5 10 15
Val Ser Leu Ser Ser Ser Met Ser Val Ser Glu Leu Lys Ala Gln Ile
20 25 30

Thr Gln Lys Ile Gly Val His Ala Phe Gln Gln Arg Leu Ala Val His
35 40 45
Pro Ser Gly Val Ala Leu Gln Asp Arg Val Pro Leu Ala Ser Gln Gly
50 55 60
Leu Gly Pro Gly Ser Thr Val Leu Leu Val Val Asp Lys Cys Asp Glu
65 70 75 80
Pro Leu Ser Ile Leu Val Arg Asn Asn Lys Gly Arg Ser Ser Thr Tyr
85 90 95
Glu Val Arg Leu Thr Gln Thr Val Ala His Leu Lys Gln Gln Val Ser
100 105 110
Gly Leu Glu Gly Val Gln Asp Asp Leu Phe Trp Leu Thr Phe Glu Gly

115 120 125
Lys Pro Leu Glu Asp Gln Leu Pro Leu Gly Glu Tyr Gly Leu Lys Pro
130 135 140
Leu Ser Thr Val Phe Met Asn Leu Arg Leu Arg Gly Gly Gly Thr Glu
145 150 155 160
Pro Gly Gly Arg Ser
165

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<

213> Artificial Sequence

<220><223> gRNA target sequence

<400> 3

ctccgcaaga ggccgcggag

20