



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0097956
(43) 공개일자 2017년08월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/558 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57415 (2013.01)
G01N 33/54306 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0019700
(22) 출원일자 2016년02월19일
심사청구일자 2016년02월19일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
신윤용
서울특별시 서초구 반포대로 275, 122동 1401호 (반포동, 래미안퍼스티지아파트)
박소연
경기도 군포시 용호1로21번길 15, 108동 201호 (당동, 용호마을e편한세상)
(74) 대리인
안소영

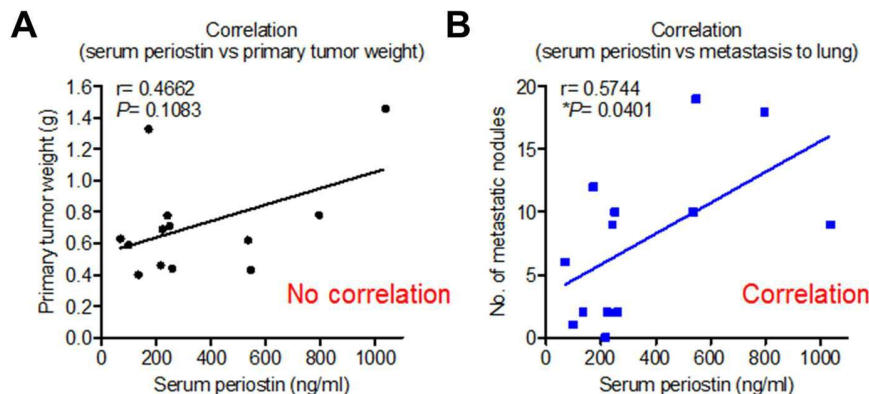
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 모세관 웨스턴 분석법을 이용한 암 지표 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 모세관 웨스턴 분석법을 이용하여 암 지표 또는 암 전이 지표를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다. 본 발명을 이용하면 신속하고 정확하게 암 지표 또는 암 전이 지표를 스크리닝할 수 있다. 따라서 암의 조기 진단 및 병기 판단을 위한 유용한 지표 발굴에 중요하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도16



(52) CPC특허분류

G01N 33/558 (2013.01)

G01N 33/57438 (2013.01)

(72) 발명자

김민진

경기도 고양시 일산서구 후곡로 60, 305동 1502호
(일산동, 후곡마을3단지아파트)

박상아

광주광역시 남구 용대로74번길 11-1, 110동 301호
(봉선동, 골든트레빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C3313010014

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술연구개발사업-포스트게놈 다부처 유전체 사업

연구과제명 유전체 기반 혈중 암전이지표 기전연구 및 검증

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2014.12.01 ~ 2016.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 모세관 웨스턴 분석법으로 암에 걸린 개체의 생체시료에서 단백질의 발현량을 검출하는 단계;
- 2) 상기 1) 단계의 검출 결과를, 모세관 웨스턴 분석법으로 상기 1) 단계의 암에 걸리지 않은 개체의 생체시료에서 단백질의 발현량을 검출한 결과와 비교하는 단계; 및
- 3) 상기 2) 단계에서 암에 걸린 개체의 생체시료 및 암에 걸리지 않은 개체의 생체시료에서 발현량이 상이하게 검출된 단백질을 선별하는 단계를 포함하는, 모세관 웨스턴 분석법을 이용하여 암 지표를 스크리닝하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 생체 시료는 전혈, 혈청, 혈장, 요, 분변, 객담, 타액, 조직, 세포, 세포 추출물, 및 체외 세포 배양물로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 것인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 암은 유방암 또는 간암인 방법.

청구항 4

- 1) 모세관 웨스턴 분석법으로 임의의 병기(stage)의 암에 걸린 개체의 생체 시료에서 단백질 발현량을 검출하는 단계; 및
- 2) 서로 다른 병기의 암에 걸린 개체의 생체 시료에서 발현량이 상이하게 검출된 단백질을 선별하는 단계를 포함하는, 모세관 웨스턴 분석법을 이용하여 암 전이 지표를 스크리닝하는 방법.

청구항 5

- 1) 모세관 웨스턴 분석법으로 일 아형(subtype)의 암에 걸린 개체의 생체시료에서 단백질의 발현량을 검출하는 단계;
- 2) 상기 1) 단계의 검출 결과를, 모세관 웨스턴 분석법으로 상기 1) 단계의 아형의 암에 걸리지 않은 개체의 생체시료에서 단백질의 발현량을 검출한 결과와 비교하는 단계; 및
- 3) 상기 2) 단계에서 일 아형의 암에 걸린 개체의 생체시료 및 상기 아형의 암에 걸리지 않은 개체의 생체시료에서 발현량이 상이하게 검출된 단백질을 선별하는 단계를 포함하는, 모세관 웨스턴 분석법을 이용하여 아형 특이적 암 지표를 스크리닝하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 모세관 웨스턴 분석법을 이용하여 암 지표 또는 암 전이 지표를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 웨스턴 블롯팅 분석법(western blot assay)은 혼재된 단백질을 전기 영동 겔(sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 상에서 크기별로 분리하고, 영동된 단백질을 그 위치 그대로 셀룰로오스 막 등으로 옮긴 후 검출하고자 하는 특정 단백질을 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체로 검출하는 방법을 의미한다. 이 방법은 여러 종류의 단백질이 혼재되어 있는 경우에 특정 단백질을 검출할 수 있고, 소량의 시료만으로도 가능하다는 장점이 있어 생명공학 분야에서 널리 이용되어 왔다. 그러나 종래의 웨스턴 블롯팅 분석법은 전기영동 겔을 준비하고, 전기영동을 하고, 영동된 단백질을 셀룰로오스 막으로 옮긴 후, 1차 항체와 2차 항체를 첨가하여 검출을 수행하는 단계가 매우 번거롭고 시간이 오래 걸린다는 단점이 있었다.

[0003] 모세관 웨스턴 분석법(capillary western blot assay)은 이러한 단점을 극복하기 위하여 최근에 개발된 방법으로서, 전기영동 겔을 준비하고 영동된 단백질을 셀룰로오스 막으로 옮기는 과정이 생략된 분석법이다. 모세관 웨스턴 분석법에서는 시료를 모세관 내로 주입하면 모세관 내에서 크기에 따라 단백질이 분리되어 모세관 벽에 포획되며, 항체 및 시약으로 모세관을 세척함으로써 포획된 단백질 중 검출하고자 하는 단백질을 검출할 수 있다. 따라서 시료 손실이 적고 훨씬 더 간편한 방법으로 신속하게 혼재된 단백질의 분리 및 검출이 가능하다.

[0004] 그러나 모세관 웨스턴 분석법은 매우 최근에 개발되어 실제 활용 분야에 대해서는 제대로 밝혀져 있지 않다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) Gwendolyn J. Anderson, Cynthia Cipolla, and Robert T. Kennedy (2012). Western Blotting using Capillary Electrophoresis. Anal Chem. 2011 February 15; 83(4): 1350-1355.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 모세관 웨스턴 분석법을 이용하여 암 지표 또는 암 전이 지표를 스크리닝하는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명자들은 모세관 웨스턴 분석법이 적은 양의 시료로도 수행될 수 있다는 점에 주목하였다. 환자 또는 실험 동물로부터 취득될 수 있는 생체 시료의 양에는 한계가 있어 분석에 어려움이 있으므로, 적은 양의 시료로도 분석이 가능한 모세관 웨스턴 분석법이 생체 시료를 이용한 분석에 적합할 것으로 생각하였다. 또한 본 발명자들은 모세관 웨스턴 분석법이 기존 웨스턴 블롯 분석법과 비교할 때 간편하고 신속하게 수행될 수 있고, 정확한 정성적 및 정량적 분석이 가능하므로, 신속하고 정밀하게 복수 회의 단백질의 정성적 및 정량적 분석이 모두 필요한 상황에 이용하기에 적합할 것으로 보고, 스크리닝 방법에 이용하기에 적합할 것으로 보았다. 이에 본 발명자들은 모세관 웨스턴 분석법을 이용한 암 지표 또는 암 전이 지표 스크리닝 방법을 개발하였다.

[0008] 상기 과제를 달성하기 위하여, 본 발명은

[0009] 1) 모세관 웨스턴 분석법으로 암에 걸린 개체의 생체시료에서 단백질의 발현량을 검출하는 단계;

[0010] 2) 상기 1) 단계의 검출 결과를, 모세관 웨스턴 분석법으로 상기 1) 단계의 암에 걸리지 않은 개체의 생체시료에서 단백질의 발현량을 검출한 결과와 비교하는 단계; 및

[0011] 3) 상기 2) 단계에서 암에 걸린 개체의 생체시료 및 암에 걸리지 않은 개체의 생체시료에서 발현량이 상이하게 검출된 단백질을 선별하는 단계를 포함하는, 모세관 웨스턴 분석법을 이용하여 암 지표를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0012] 상기 방법에서, 암에 걸린 개체의 생체시료 및 상기 암에 걸리지 않은 개체의 혈액 시료에서 발현량이 상이하게 검출된 단백질은 암에 걸리지 않은 개체에서보다 암에 걸린 개체에서 발현량이 증가 또는 감소한 단백질이므로 암 지표(biomarker)가 될 수 있다.

[0013] 상기 방법에서, 상기 2) 단계의 "암에 걸리지 않은 개체"는 1) 단계의 "암에 걸린 개체"가 걸린 암에 걸리지 않은 개체를 의미한다. 즉, 상기 "암에 걸리지 않은 개체"는 어떤 암에도 걸리지 않은 개체, 또는 1) 단계의 암이 아닌 다른 암 또는 암이 아닌 다른 질환에 걸린 개체가 될 수 있다.

[0014] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 2) 단계의 "모세관 웨스턴 분석법으로 비-암 환자의 생체 시료에서 단백질의 발현량을 검출한 결과"는, 암에 걸린 개체의 생체 시료를 모세관 웨스턴 분석법으로 분석하기 이전, 동시에, 또는 그 이후에 상기 암에 걸리지 않은 개체의 생체 시료를 모세관 웨스턴 분석법으로 분석하여 얻어진 결과일 수 있다. 예를 들어, 암에 걸린 개체의 생체 시료와 상기 암에 걸리지 않은 개체의 생체 시료를 동시에 모세관 웨스턴

턴 분석법으로 분석하여 결과를 비교할 수도 있고, 또는 암에 걸리지 않은 개체의 생체 시료를 모세관 웨스턴 분석법으로 분석한 결과를 데이터화 한 후, 암에 걸린 개체의 생체 시료를 모세관 웨스턴 분석법으로 분석한 결과를 상기 데이터와 비교하는 것도 가능하다.

[0015] 또한 본 발명은

[0016] 1) 모세관 웨스턴 분석법으로 임의의 병기(stage)의 암에 걸린 개체의 생체 시료에서 단백질 발현량을 검출하는 단계; 및

[0017] 2) 서로 다른 병기의 암에 걸린 개체의 생체 시료에서 발현량이 상이하게 검출된 단백질을 선별하는 단계를 포함하는, 모세관 웨스턴 분석법을 이용하여 암 전이 지표를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0018] 서로 다른 병기의 암에 걸린 개체의 생체 시료에서 발현량이 상이하게 검출된 단백질은 암의 병기에 따라 발현량이 증가 또는 감소한 단백질이므로 암 전이 지표(biomarker)가 될 수 있다.

[0019] 본 명세서에서 사용된 용어 "병기(stage)"는 암의 진행정도를 의미하며, "임의의 병기"란 당업계에 알려진 다양한 방법에 의해 설정된 병기를 의미한다. 병기는 크게 3가지 요소(종양의 상태, 림프관 전이 정도, 및 원격전이 정도, TNM(Tumor-Node-Metastasis))를 조합해서 고려하여 구분된다. 예를 들어, 일반적으로 유방암의 병기는 하기 표와 같이 상기 3가지 요소를 고려하여 크게 1~4기로 나누고, 이를 다시 하위 구분한다(국가암정보센터-유방암).

TNM병기		정의
종괴의 크기(T)	Tis	상피내암
	T0	종양의 크기가 불분명할 때
	T1	종양의 크기가 2cm 이하
	T2	종양의 크기가 2cm~5cm
	T3	종양의 크기가 5cm 초과
	T4	종양이 흉벽, 피부를 침범했거나 염증성 유방암일 때
림프절 전이(N)	N0	겨드랑이 림프절 전이가 없을 때
	N1	암세포가 전이된 겨드랑이 림프절이 3개 이하
	N1mi	림프절에 전이된 암조직의 크기가 2mm 이하인 미세전이
	N2	암세포가 전이된 겨드랑이 림프절이 4~9개
	N3	암세포가 전이된 겨드랑이 림프절이 10개 이상, 또는 쇄골상부 림프절 전이가 있을 때
다른 장기 침범 여부(M)	M0	다른 장기에 전이가 없을 때
	M1	다른 장기에 전이가 있을 때

[0020]

병기	종괴의 크기(T)	림프절 전이(N)	타장기 침범(M)
0기	Tis	N0	M0
1A기	T1	N0	M0
1B기	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
2A기	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
2B기	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
3A기	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
3B기	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
3C기	모든 T	N3	M0
4기	모든 T	모든 N	M1

[0021]

[0022] 또한 병기 설정 방법은 암의 종류에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어 일반적으로 간암은 일반적으로 만성 간염

이나 간경변증 등의 지병이 있는 경우가 대부분이므로, 다른 암종에서처럼 1기에서 4기까지로 나누는 데 그치지 않고 간 기능의 등급을 추가적 요소로 반영하여, 보편적으로 쓰이는 TNM 병기 분류법에 따라 간암의 개수와 크기, 혈관 침범 여부, 림프절(림프샘) 및 다른 장기로의 전이 여부 등을 종합적으로 고려하여 I, II, III, IV(IVA, IVB) 병기 중 하나로 구분한다(국가암정보센터-간암).

- [0023] 본 발명은
- [0024] 1) 모세관 웨스턴 분석법으로 일 아형(subtype)의 암에 걸린 개체의 생체시료에서 단백질의 발현량을 검출하는 단계;
- [0025] 2) 상기 1) 단계의 검출 결과를, 모세관 웨스턴 분석법으로 상기 1) 단계의 아형의 암에 걸리지 않은 개체의 생체시료에서 단백질의 발현량을 검출한 결과와 비교하는 단계; 및
- [0026] 3) 상기 2) 단계에서 일 아형의 암에 걸린 개체의 생체시료 및 상기 아형의 암에 걸리지 않은 개체의 생체시료에서 발현량이 상이하게 검출된 단백질을 선별하는 단계를 포함하는, 모세관 웨스턴 분석법을 이용하여 아형 특이적 암 지표를 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 "아형"은 면역조직화학적 아형, 분자 아형 및 그 외 다양한 방법으로 분류된 암의 하위 유형을 의미한다. 예를 들어, 유방암의 경우 면역조직화학적으로 ER+, PR+, HER2+, 삼중음성(상기 3가지를 모두 발현하지 않음)으로 분류되며, 분자 아형에 따라 Luminal A, Luminal B, Basal 등으로 분류된다. 암의 아형은 그 암의 전이와 깊은 관련성이 있으며, 암의 아형에 따라 치료적 접근법도 달라지게 된다. 예를 들어, 유방암의 경우 삼중음성 유방암 또는 Basal 아형의 경우 전이 가능성이 매우 높고 허셉틴이나 호르몬 치료에 반응하지 않으므로 초기에 상기 아형의 암에 해당하는지 여부를 파악하는 것이 매우 중요하다. 본 발명의 방법을 이용하면 특정 아형의 암에서 발현량이 증가 또는 감소하는 암 지표를 효과적으로 스크리닝할 수 있다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 모세관 웨스턴 분석법은 혈액 시료를 모세관에 주입하고, 모세관 내에서 시료 내 단백질이 크기에 따라 분리되고 모세관 벽에 부동화되면, 1차 항체 및 2차 항체를 주입하여 면역블롯에 따라 검출하고자 하는 단백질의 발현을 정성적 및 정량적으로 검출하는 방식으로 수행된다. 주입하는 항체에 따라 혈액 시료 내에 존재하는 다양한 단백질의 발현량을 검출할 수 있다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 "암"은 임의의 암이 될 수 있으며, 예를 들어 갑상선암, 위암, 대장암, 폐암, 간암, 유방암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 림프종 등이 될 수 있고, 예컨대 유방암 또는 간암이 될 수 있다. 그러나 본 발명에 있어서 암의 종류는 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 "단백질"은 생체 시료 내 존재하는 임의의 단백질이 될 수 있다. 본 발명의 일 구현예로서, 상기 단백질은 다른 1차적 스크리닝 방법, 예를 들어 유전체분석에 의해 발굴된 암, 암 재발 가능성, 암 전이 가능성 등과 상관관계가 있는 것으로 예상되는 단백질이 될 수 있다. 이 경우, 본 발명의 방법을 통하여 1차적 스크리닝 결과 발굴된 단백질들 중에서 실제로 암, 암 재발, 또는 암 전이에 대한 혈중 지표가 될 수 있는 단백질들을 선별할 수 있다.
- [0031] 본 발명에 있어서, "생체 시료"는 혈액(전혈, 혈청, 혈장) 요, 분변, 객담, 타액, 조직, 세포, 세포 추출물, 체외 세포 배양물 등과 같은 시료들을 포함하고, 바람직하게는 혈액, 보다 바람직하게는 혈장이 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 상기 "개체"는 인간을 포함하는 임의의 동물이 될 수 있다. 예를 들어, 상기 "개체"는 인간이 될 수 있다. 또 다른 예로서, 상기 "개체"는 임의의 실험동물, 예컨대 마우스, 랫트, 기니픽, 토끼, 돼지, 원숭이, 영장류 등이 될 수 있다. 본 발명의 개체가 실험동물인 경우, 상기 실험동물은 암에 대한 다양한 동물 모델(형질전환 동물 모델, 이종이식 동물 모델, 동종동계이식 동물모델 등)이 될 수 있다. 그러나 본 발명의 방법의 개체는 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 본 발명의 일 구현예로서, 본 발명의 방법을 조건을 변경하여 복수 회 수행함으로써 스크리닝의 범위를 좁힐 수 있다. 예를 들어 유전체 분석 등의 1차적 스크리닝 방법을 통하여 암과 관련된 지표가 될 가능성이 있는 단백질들을 발굴하고, 상기 단백질들을 특정 동물 모델의 생체시료를 이용하여 본 발명의 방법을 통하여 스크리닝하여 암과 관련된 지표가 될 가능성이 높은 단백질들을 선별하고, 상기 선별된 단백질들에 대하여 또 다른 동물 모델, 또는 인간 환자의 생체시료를 이용하여 다시 본 발명의 방법으로 스크리닝하여 암과 관련된 지표로 사용될 수 있는 단백질들을 결정할 수 있다.

발명의 효과

[0034] 본 발명을 이용하면 신속하고 정확하게 암 지표 또는 암 전이 지표를 스크리닝할 수 있다. 따라서 암의 조기 진단, 유형 판단 및 병기 판단을 위한 유용한 지표 발굴에 중요하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 형질전환 동물모델에서 채혈 및 부검을 시행한 스케줄을 나타낸 도이다.
 도 2는 형질전환 동물모델에서 종양 부피 및 폐 전이 정도를 확인한 도이다.
 도 3은 형질전환 동물모델 및 암에 걸리지 않은 동물에서 혈중 페리오스틴 발현량을 확인한 도이다.
 도 4는 형질전환 동물모델에서 암의 전이 정도에 따라 혈중 페리오스틴 발현량을 확인한 도이다.
 도 5는 형질전환 동물모델 및 암에 걸리지 않은 동물에서 혈중 TIMP-1 발현량을 확인한 도이다.
 도 6은 형질전환 동물모델에서 암의 전이 정도에 따라 혈중 TIMP-1 발현량을 확인한 도이다.
 도 7은 형질전환 동물 모델 및 암에 걸리지 않은 동물에서 혈중 ANGPTL4 발현량을 확인한 도이다.
 도 8은 형질전환 동물 모델에서 암의 전이 정도에 따라 혈중 ANGPTL4 발현량을 확인한 도이다.
 도 9는 이종이식 동물 모델의 준비 및 채혈과 부검을 실시한 스케줄을 나타낸 도이다.
 도 10은 이종이식 동물 모델에서 폐 전이 정도를 확인한 도이다.
 도 11은 이종이식 동물 모델에서 암의 전이 정도에 따라 혈중 페리오스틴 발현량을 확인한 도이다.
 도 12는 이종이식 동물 모델에서 암의 전이 정도에 따라 혈중 TIMP-1 발현량을 확인한 도이다.
 도 13은 동종동계이식 동물 모델의 준비 및 채혈과 부검을 실시한 스케줄을 나타낸 도이다.
 도 14는 혈중 페리오스틴 발현량에 대한 표준 곡선이다.
 도 15는 동종동계이식 동물 모델 및 암에 걸리지 않은 동물에서의 혈중 페리오스틴 발현량을 비교한 도이다.
 도 16A는 동종동계이식 동물 모델에서 원암종의 종양 부피와 혈중 페리오스틴 발현량의 상관관계를 나타낸 도이고, 도 16B는 동종동계이식 동물 모델에서 폐의 전이성 노들 수와 혈중 페리오스틴 발현량의 상관관계를 나타낸 도이다.
 도 17은 인간 비-유방암 환자의 혈중 페리오스틴 농도 분포를 나타낸 도이다.
 도 18은 인간 유방암 환자의 혈중 페리오스틴 농도 분포를 나타낸 도이다.
 도 19는 인간 유방암 환자에서 유방암 전이에 따른 혈중 페리오스틴 농도 변화를 나타낸 도이다.
 도 20은 유방암의 HER2 아형, Luminal A 아형, Luminal B 아형, 및 Basal 아형에서 혈중 페리오스틴 발현량을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이하에서 언급된 시약 및 용매는 특별한 언급이 없는 한 모두 ProteinSimple(San Jose, CA, USA)로부터 구입한 것이다.

[0037] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0038] 실시예 1. 형질전환 마우스 모델에서의 암 지표 스크리닝

[0039] 1-1. 실험동물 준비

[0040] 마우스 유방암 바이러스 promoter/enhancer의 전사적 조절을 통해 Polyoma Virus middle T antigen을 발현하는 형질전환 유방암 동물 모델 암컷 마우스(female carrier) 24마리를 중앙실험동물(서울, 대한민국)으로부터 구입하여 준비하였다(female FVB/N-Tg (MMTV-pyVT)634Mul/J, 이하 '유방암 질환군'). 상기 형질전환 마우스 모델은 성장하면서 자연적으로 유방암이 발병하며, 발병된 유방암은 폐로 전이되어 이차암을 형성하는 것으로 보고되어

있다(Journal of Cancer Therapy, 2013, 4, 1187-1197, The MMTV-PyVT Transgenic Mouse as a Multistage Model for Mammary Carcinoma and the Efficacy of Antineoplastic Treatment). 또한 정상 대조군으로 정상 암컷 마우스(female non-carrier) 15마리를 준비하였다.

1-2. 혈액 채취, 암 부피 계산 및 폐 전이 평가

모세관 웨스턴 분석에 사용하기 위하여, 각 마우스에서 총 3회에 걸쳐 안와채혈로 혈액을 채취하였다. 안와채혈은 일차암이 생성되기 전인 9주령, 일차암이 생성된 13주령, 이차암이 생성될 것으로 예상되는 15주령에 이루어졌다. 3차의 안와채혈이 끝난 후, 암전이평가 및 조직분석을 위하여 부검을 진행하였다(도 1).

또한 실험 진행기간동안 마이크로캘리퍼를 이용하여 외부에서 암의 장축 및 단축을 측정하여 일차암의 부피를 구하였고(부피=장축×단축²×0.52), 부검시 인디아 잉크(India ink) 염색으로 폐전이를 확인하였다(폐전이가 일어나 결절(nodule)이 생긴 부분은 백색 스팟(white spot)으로 나타나며, 그 수에 따라 전이정도를 3가지(-, +, ++로 구분하였음). 그 결과, 유방암 질환군 마우스 24마리 중 16마리에서 폐로 암전이가 일어난 것을 확인하였다(도 2).

1-3. 모세관 웨스턴 분석법을 이용한 혈중 암 지표 스크리닝

유방암과 관련된 혈중 지표 단백질을 유전체분석을 통하여 1차적으로 스크리닝한 결과, 페리오스틴(periostin), TIMP-1 및 ANGPTL4가 각각 관련성이 있을 수 있는 혈중 지표로서 스크리닝 되었다. 따라서 상기 단백질들에 대하여 모세관 웨스턴 분석법으로 분석하였다.

(1) 페리오스틴 발현 분석

유방암 질환군 및 정상 대조군에서 각각 실시예 1의 스케줄에 따라 안와채혈로 얻은 혈액 시료를 모세관 웨스턴 분석법을 이용하여 분석하였다. 분석은 Proteinsimple 사의 WES 기기를 사용하여 수행하였다. 구체적으로, 시료를 WES 분석 플레이트에 로딩하고 WES 기기에 장착하면 자동적으로 모세관으로 로딩되고 모세관 내의 분리 매트릭스 내를 따라 이동하면서 크기에 따라 분리가 일어난다. 분리된 단백질은 모세관 벽에 광활성화 포획 화학(photoactivated capture chemistry)에 의해 부동화된다. 표적 단백질은 1차 항체를 1차 항체 및 HRP-컨주게이션된 2차 항체와 화학발광 기질에 의해 면역블롯되고 야기되는 화학발광 신호가 검출 및 정량화된다. 이 분석법에 의하면 미량의 시료(최소 40 nL의 시료로도 분석 가능)로도 정확한 정량적 분석이 가능하며 재현성이 높다.

그 결과, 유방암 질환군에서 정상 대조군보다 페리오스틴(periostin)의 혈중 농도가 유의성 있게 더 높은 것으로 나타났다(모세관 웨스턴 분석법의 대표도를 도 3에 나타냄). 또한 유방암 질환군에서도 폐 전이 정도가 높을수록 혈중 페리오스틴 발현량이 더 높게 나타났다(도 4).

상기 결과로부터, 혈중 페리오스틴 발현량이 유방암 여부 진단에 있어서 유의성 있는 지표이고, 또한 유방암의 폐 전이 진단에 있어서도 유의성 있는 지표임을 알 수 있었다.

(2) TIMP-1 발현 분석

유방암 질환군 및 정상 대조군에서 각각 실시예 1의 스케줄에 따라 안와채혈로 얻은 혈액 시료를 모세관 웨스턴 분석법을 이용하여 분석하였다. 분석은 상기 (1)과 마찬가지로 Proteinsimple 사의 WES 기기를 사용하여 수행하였다.

그 결과, TIMP-1의 발현량은 유방암 질환군 및 정상 대조군에서 유의한 차이를 나타내지 않았다(도 5). 한편 유방암 질환군에서 폐 전이 정도가 높을수록 TIMP-1의 발현량이 유의하게 증가함을 알 수 있었다. 이러한 차이는 1차 채혈에서 강하게 나타났고, 2차 채혈 및 3차 채혈에서는 훨씬 더 작게 나타났다(도 6).

상기 결과로부터, 혈중 TIMP-1 발현량은 유방암 여부 진단에 있어서 유의성 있는 지표가 될 수 없으나, 폐 전이가 일어난 유방암의 폐 전이 정도 진단에 있어서는 보조적인 지표로 사용될 수 있는 가능성이 있음을 알 수 있었다.

(3) ANGPTL4 발현 분석

유방암 질환군 및 정상 대조군에서 각각 실시예 1의 스케줄에 따라 안와채혈로 얻은 혈액 시료를 모세관 웨스턴 분석법을 이용하여 분석하였다. 분석은 상기 (1) 및 (2)와 마찬가지로 Proteinsimple 사의 WES 기기를 사용하여 수행하였다.

그 결과, ANGPTL4의 발현량은 암전이가 일어난 3차 채혈시기에 유방암 질환군 및 정상 대조군에서 유의한 차이

가 있는 것으로 나타났지만(도 8), 이는 유방암 질환군에서 ANGPTL4의 발현량이 더 높게 나타난 유전체 분석 결과와 상반되는 것이어서 유의한 결과로 볼 수 없다고 판단하였다. 또한 유방암 질환군에서 폐 전이 정도와 ANGPTL4의 발현량 간에 유의한 차이가 나타나지 않았다(도 7).

[0057] 상기 결과로부터, 혈중 ANGPTL4의 발현량은 유방암 여부 진단에 있어서 유의성 있는 지표가 될 수 없고, 유방암의 폐 전이 정도에 대해서도 유의성 있는 지표가 될 수 없음을 알 수 있었다.

[0058] 실시예 2. 이종이식 마우스 모델에서의 암 지표 스크리닝

[0059] 2-1. 실험동물 준비

[0060] 사람 유래 유방암 세포인 MDA-MB-231 세포를 6주령의 면역결핍 마우스인 female NOD.CB17-Prkdcscid 마우스의 #4 inguinal fat pad에 주입하였다(n=18). 암세포 주입 후 일차암이 형성되는 것을 관찰하였고, 암전이가 일어나 이차암이 생겼을 것으로 예상되는 7주차에 마우스를 부검하고 시료를 채취하였다.

[0061] 2-2. 혈액 채취 및 폐 전이 평가

[0062] 이차암이 생겼을 것으로 예상되는 7주차에 복대정맥에서 혈액을 채취하여 이하에서 모세관 웨스턴 분석에 사용하였다(도 9). 또한 마우스를 부검하고 일차암 조직 및 폐로 전이된 이차암 조직을 H&E 조직 염색하고(형질전환 마우스에 비하여 이차암 크기가 작아 인디아 잉크 대신 H&E로 염색하였음), 이종이식된 MDA-MB-231 세포의 인간 GAPDH 발현량을 확인하여 폐 전이정도를 측정하고, 결과를 종합하여 전이정도를 4단계로 구분하였다(+, ++, +++, ++++)(도 10).

[0063] 2-3. 모세관 웨스턴 분석법을 이용한 혈중 암 지표 스크리닝

[0064] (1) 페리오스틴 발현 분석

[0065] 모세관 웨스턴 분석 방법은 상기 실시예 1에서와 같다.

[0066] 실시예 1에서 유방암 발병 및 유방암의 폐 전이와 가장 관련성이 높은 것으로 나타난 페리오스틴에 대한 모세관 웨스턴 분석 결과와 2-2의 유방암의 폐 전이 간의 상관관계에 대해 확인하였다. 그 결과, 혈중 페리오스틴 발현량과 유방암의 폐 전이 간에 높은 상관관계가 있음이 확인되었다(도 11). 따라서 혈중 페리오스틴 발현량이 유방암의 폐 전이정도를 대변하는 혈중지표의 가능성이 있음을 확인하였다.

[0067] (2) TIMP-1 발현 분석

[0068] 실시예 1에서 유방암의 폐 전이와 어느 정도 관련성이 있는 것으로 나타난 TIMP-1에 대하여 모세관 웨스턴 분석 결과와 2-2의 유방암의 폐 전이 간의 상관관계에 대해 확인하였다. 그 결과, TIMP-1 발현량은 유방암의 폐 전이 정도에 따라 증가하는 양상을 보였으나 통계적 유의성은 없었다(도 12). 따라서 혈중 TIMP-1 발현량이 유방암의 폐 전이정도와 관련성은 있다고 보이지만 혈중지표로서의 특성은 약한 것으로 보고, 이하에서는 페리오스틴에 대해서만 확인하였다.

[0069] 실시예 3. 동종동계이식 마우스 모델에서의 암 지표 스크리닝

[0070] 3-1. 실험동물 준비

[0071] 4T1 세포는 BALB/c 마우스 유래의 폐전이성 유방암 세포로, 폐 전이성이 강한 세포로 알려져 있다. 따라서 유방암 진행에 따른 전이기전을 연구하는 데에 적합하다고 판단하고 본 실시예에서 동종동계이식(syngenic) 마우스 모델을 구축하는 데 사용하였다.

[0072] 4T1 세포를 female BALB/c 마우스의 #4 inguinal fat pad에 주입하였다(n=13). 암세포 주입 1주 후에 일차암이 형성되는 것을 관찰하였고, 암전이가 일어나 이차암이 생겼을 것으로 예상되는 4주에 마우스를 부검하여 복대정맥에서 혈액을 채취하고 모세관 웨스턴 분석을 진행하였다 (도 13).

[0073] 3-2. 혈액 채취 및 폐 전이 평가

[0074] 인디아 잉크 염색법을 통하여 폐의 이차암 형성을 확인하였다. 폐에 형성된 전이성 노둑(nodule) 수를 확인하고 그 수에 따라 전이정도를 구분하였다.

[0075] 3-3. 모세관 웨스턴 분석법을 이용한 혈중 암 지표 스크리닝

[0076] 채취된 혈액에서 혈장을 분리하여 1/40배로 희석한 후, 모세관 웨스턴 분석을 통하여 혈중 페리오스틴을 정량분

석하였다. 표준 곡선(Standard curve)을 이용하여 절대 정량을 하기 위해서, R&D사로부터 재조합 마우스 페리오스틴(recombinant mouse periostin)을 구입하여 기지 농도를 모세관 웨스턴 분석법으로 분석하였다. 각 개체의 혈중 페리오스틴의 양은 표준 곡선으로부터 계산하였다.

[0077] 모세관 웨스턴 분석 시스템을 활용하여 분석한 재조합 마우스 페리오스틴 표준 곡선은 최소농도 0.5 ng/ml부터 최고 농도 100 ng/ml까지 농도 의존적으로 AU값이 증가하였다($R^2=0.9989$) (도 14).

[0078] 정상군 BALB/c 마우스와 유방암 질환군인 4T1 유방암 마우스의 혈중 페리오스틴 농도를 비교하였을 때, 폐전이 가 증가할수록 혈중 페리오스틴 양이 유의하게 증가하는 경향이 보였다(도 15).

[0079] 보다 구체적으로, 혈중 페리오스틴 발현량이 대변할 수 있는 4T1 유방암 동물모델의 형질을 찾기 위해, 일차암의 크기 및 폐전이 정도와 상관관계 분석을 하였다.

[0080] 그 결과, 일차암의 크기와 혈중 페리오스틴의 양은 통계적으로 유의한 상관성을 보이지 않았으나, 폐에 전이되어 생긴 nodule 수와는 통계적으로 유의한 양의 상관관계가 나타났다(도 16).

[0081] 따라서 4주차의 4T1-orthotopic-grafted balb/c 마우스 모델에서는 일차암의 크기와 폐전이성 사이에는 상관관계가 없으나, 혈중 페리오스틴의 양과 폐전이성은 통계적으로 유의한 양의 상관관계가 있다는 사실을 알 수 있었다.

[0082] 실시예 4. 환자 혈액 시료에서의 혈중 암 지표 스크리닝

[0083] 4-1. 유방암 환자에서의 혈중 페리오스틴 확인

[0084] 국립암센터, 고대구로병원, 인제대 부산백병원, 아주대병원, 및 계명대동산병원으로부터 총 519명의 정상 대조군의 혈액 시료 및 총 193명의 유방암 환자의 혈액 시료를 받아 준비하고, 모세관 웨스턴 분석법으로 혈중 페리오스틴의 발현량을 측정하였다.

[0085] 정상 대조군의 혈액 시료에서는 평균적으로 490.9507 ng/ml의 페리오스틴이 측정되었다(도 17). 반면 유방암 환자의 혈액 시료에서는 평균적으로 692.8716 ng/ml의 페리오스틴이 측정되었다(도 18). 즉, 유방암 환자에서 정상 대조군보다 혈중 페리오스틴 농도가 현저히 높았다.

[0086] 또한 전이에 따른 혈중 페리오스틴 농도를 비교하였을 때, 전이가 일어나기 전의 유방암 환자 혈중 페리오스틴의 농도 평균은 452.1659 ng/ml 이었으나 림프절 전이가 일어난 것으로 판명되는 2A기 유방암 이후의 평균은 1321.989 ng/ml 로 측정되었다(도 19. 참고로, 도 18에서 유방암 환자 혈중 페리오스틴 농도는 도 19보다 다소 낮게 나타나나 유의성이 인정되지 않는 범위 내임). 즉, 유방암 환자 중에서도 림프절 전이(림프절→폐 및 그 외 장기로 전이되는게 일반적임)가 일어난 환자에서 혈중 페리오스틴 농도가 현저히 높아지는 것을 알 수 있었다.

[0087] 4-2. 유방암 환자의 아형에 따른 혈중 페리오스틴 확인

[0088] 유방암은 분자아형에 따라 HER2 아형, Luminal A 아형, Luminal B 아형, 및 Basal 아형으로 나뉘어진다. 각각의 아형에서 모세관 웨스턴 분석법에 의해 혈액 내 페리오스틴 발현량을 측정한 결과, Basal 아형에서 특히 높게 나타났다(도 21).

[0089] Basal 아형은 암세포가 공격적이고 전이성이 강해 예후가 좋지 않으며, 면역조직화학적 방법에 따라 분류하면 호르몬 치료 및 허셉티노의 치료에 반응하지 않는 삼중 음성 유방암(Triple Negative Cancer, ER-, PR-, Her2-)인 경우가 많아 그 외 유방암과 다른 치료적 접근이 필요하다. 모세관 웨스턴 분석법을 이용하여 이와 같이 특정 아형에서 높게 발현되는 혈중 지표를 스크리닝할 수 있다.

[0090] 4-3. 간암 환자에서의 혈중 페리오스틴 확인

[0091] 상기 4-1에서 확인한 내용을 간암에서도 확인할 수 있는지 파악하고자, 간암(Hepatocellular carcinoma; HCC) 환자의 혈액 시료 및 정상 대조군 환자의 혈액 시료로 상기 4-1과 동일한 실험을 수행하였다. 혈액 시료는 아주대병원의 간세포암종 환자 50명의 혈액 시료를 이용하였다.

[0092] 그 결과, 간암 환자의 혈중 페리오스틴의 농도는 전체 평균 775.8814 ng/ml로서, 정상대조군의 평균 농도인 490.9507 ng/ml보다 높게 측정되었다.

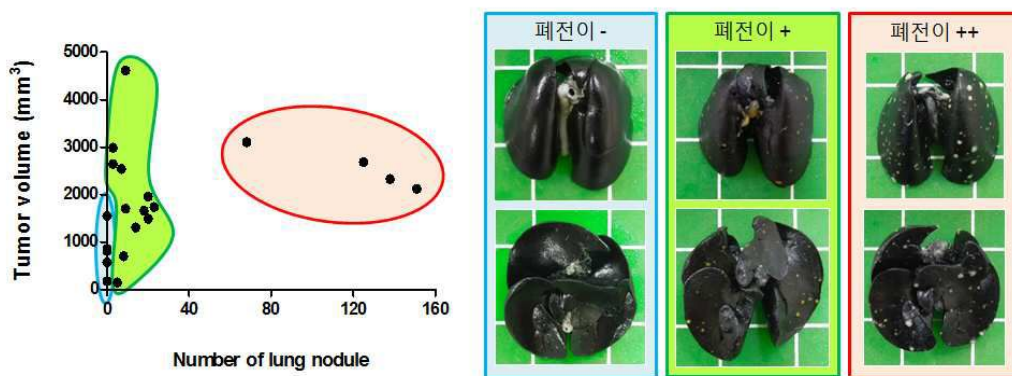
도면

도면1

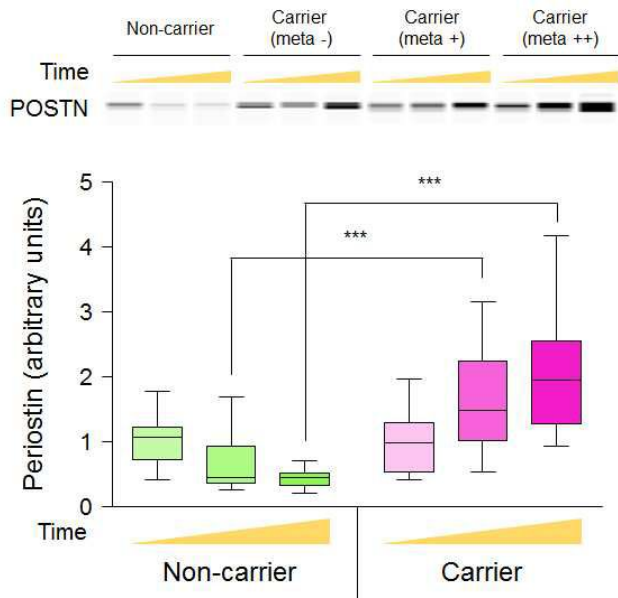


도면2

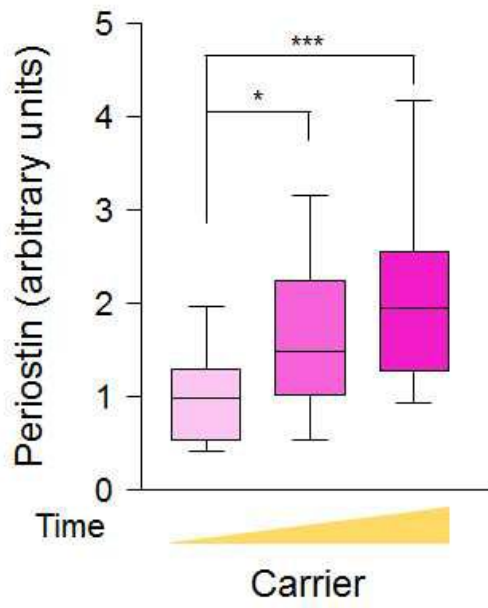
- Non-carrier (n=15)
- Carrier (n=24); lung metastasis (n=16)



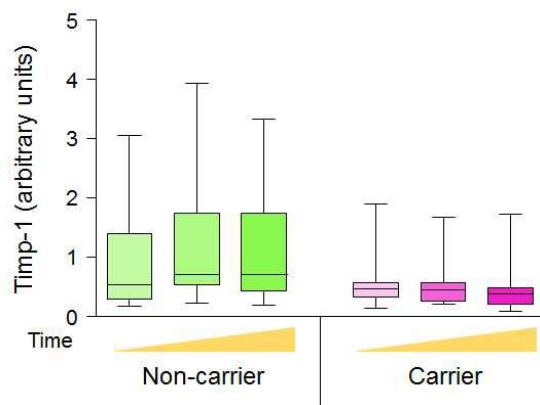
도면3



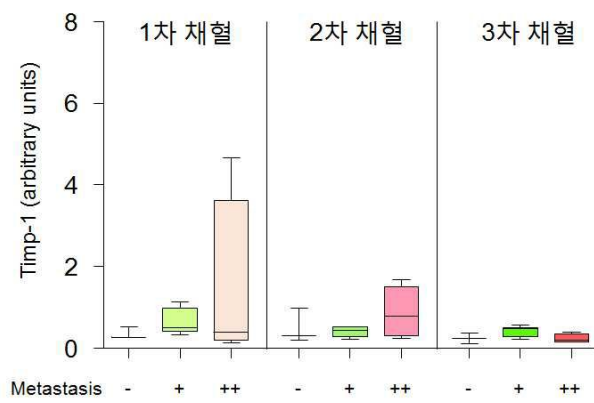
도면4



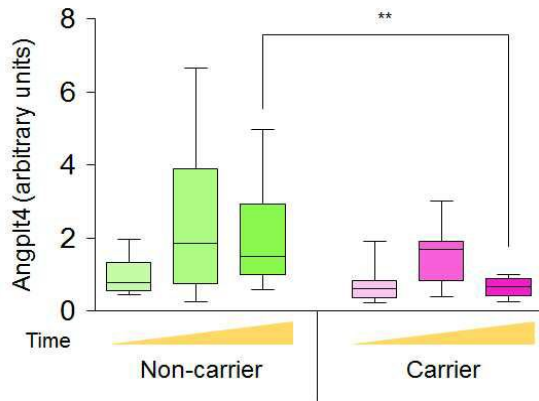
도면5



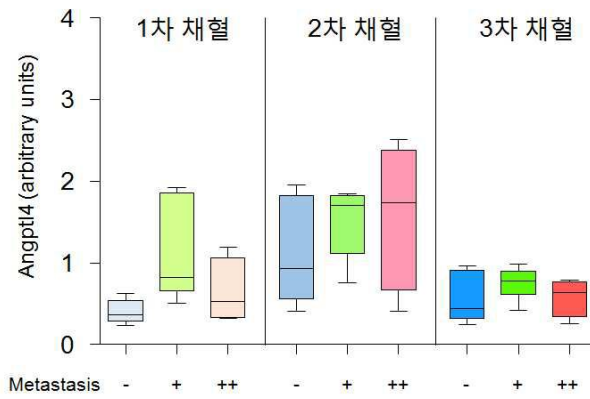
도면6



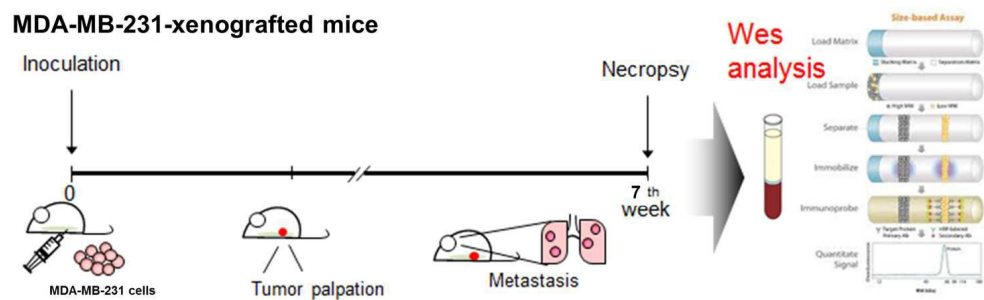
도면7



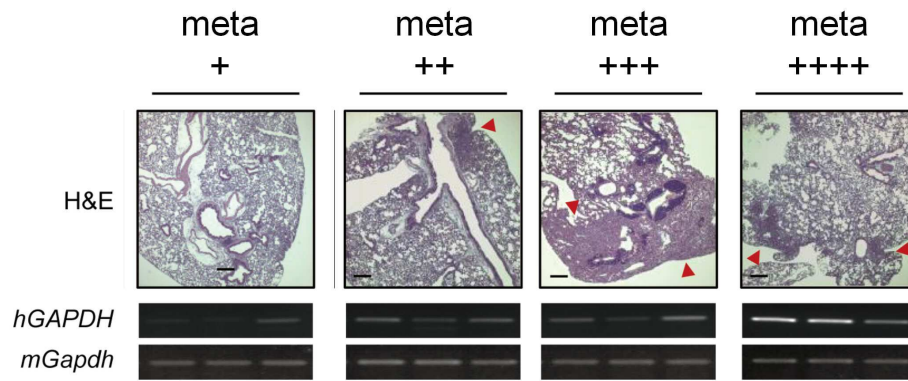
도면8



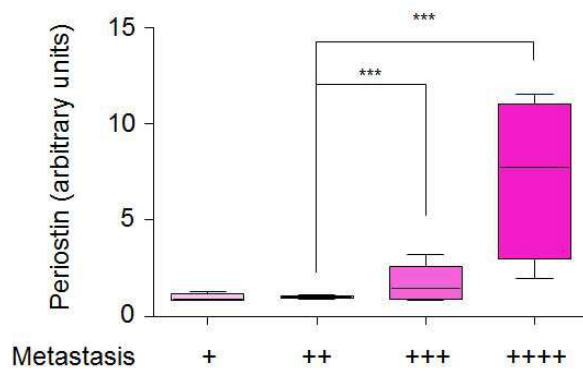
도면9



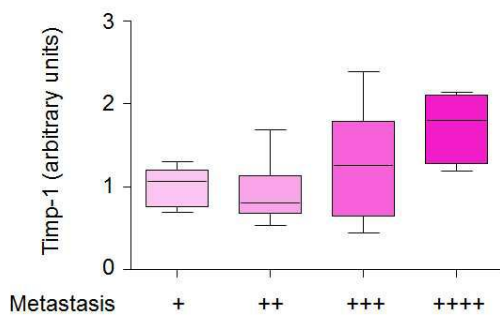
도면10



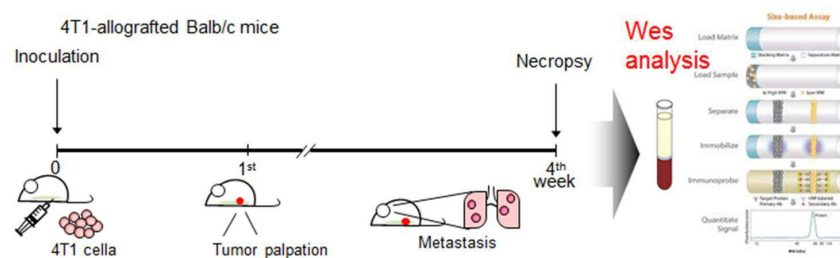
도면11



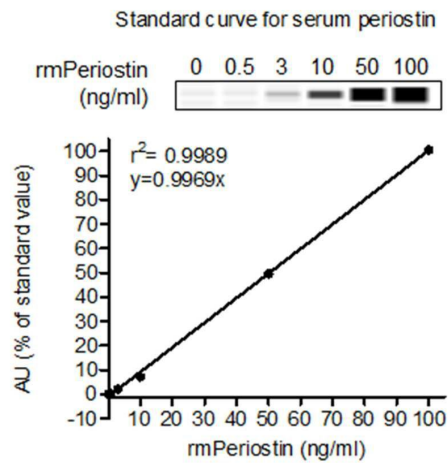
도면12



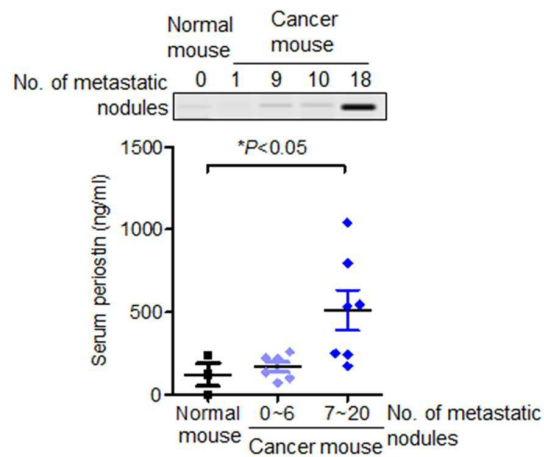
도면13



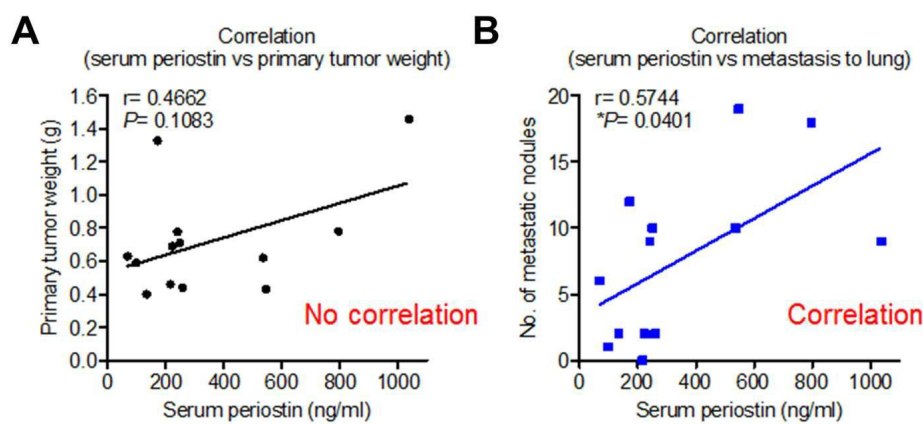
도면14



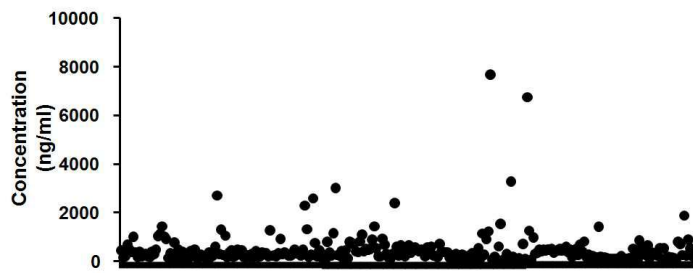
도면15



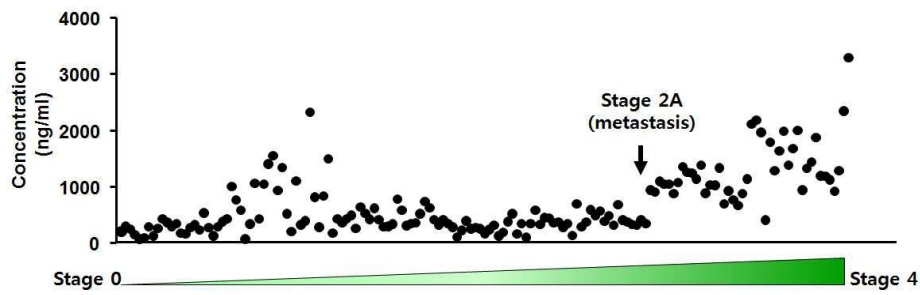
도면16



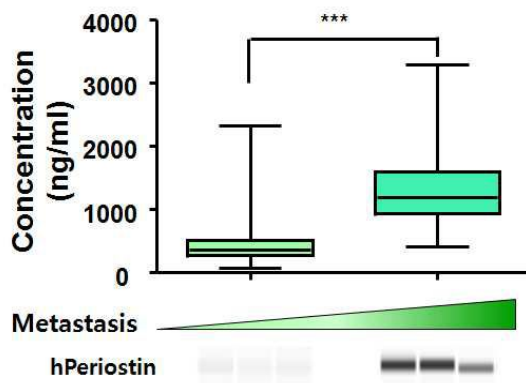
도면17



도면18



도면19



도면20

