(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0100046
(43) 공개일자 2011년09월09일

(51) Int. Cl.
*A61B 5/055* (2006.01) *G01N 24/08* (2006.01)
*G01N 33/483* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0019123
(22) 출원일자 2010년03월03일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
**인하대학교 산학협력단**
인천 남구 용현동 253 인하대학교
(72) 발명자
**박성혁**
인천광역시 남구 용현4동 인하대학교 의과대학
**이돈행**
인천광역시 남구 용현4동 인하대학교 의과대학 소화기내과
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**이은철**

전체 청구항 수 : 총 4 항

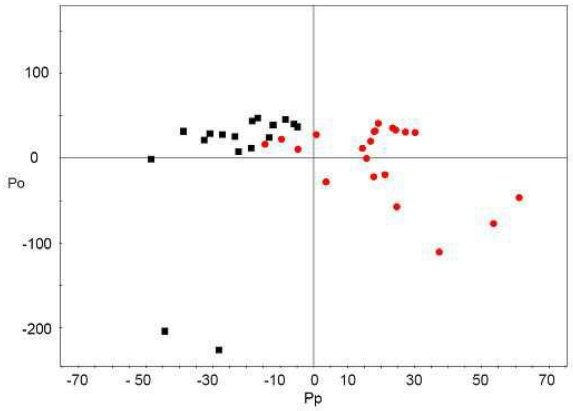
# (54) 자기공명 대사체학을 이용한 담도암 진단법

## (57) 요 약

본 발명은 자기공명 대사체학을 이용한 담도암 진단법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 핵자기공명분광법(NMR)을 통해 얻은 데이터를 직교 부분 최소 자승 판별 분석(OPLS-DA; orthogonal partial least square discriminant analysis) 및 예측 모델(prediction model) 방법을 이용하여 담도암을 진단하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 담도암 진단법은 종래의 진단방법과 비교하여 민감도 및 특이도가 우수하므로 담도암 여부를 초기단계에서 빠르고 정확하게 조기 진단하는 것이 가능할뿐더러 외과적인 수술을 하지 않고서도 담도암의 진행 정도를 판단할 수 있다.

*대 표 도* - 도1



(72) 발명자

**강진호**

인천광역시 남구 용현4동 인하대학교 의과대학

**문혁**

인천광역시 남구 용현4동 인하대학교 의과대학

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A092006 / A084338

부처명 보건복지 가족부 / 보건복지 가족부

연구관리전문기관

연구사업명 보건의료 연구개발사업(신약개발기반구축사업) / 보건의료 기술연구개발사업(단독중개연구)

연구과제명 신약개발 구조정보 통합연구센타 / Pharmacometabolomics를 이용한 statin계 약물의 초기 및 고감도 안전성 평가지표 개발 연구

기여율

주관기관 서울대학교 산학협력단 / 인하대학교 산학협력단

연구기간 2009년11월1일~2014년10월31일 / 2008년11월1일~2010년10월31일

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

(1) 환자에게서 담즙 시료를 얻는 단계;

(2) NMR 데이터를 얻는 단계;

(3) 상기 NMR 데이터로부터 Simca-P 프로그램을 이용하여 주성분 분석(PCA, principal component analysis) 및 데이터를 직교 부분 최소 자승 판별 분석(OPLS-DA)을 수행하는 단계; 및

(4) 상기 PCA 및 OPLS-DA를 수행하여 얻은 스코어 플롯과 로딩 플롯으로 예측 모델(prediction model)을 작성하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 NMR 기반 대사체학(NMR-based metabolomics)을 이용한 담도암 진단법.

### 청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 (1) 단계에서 시료는 (a) 환자에게서 피부간경유쓸개관조영술(PTC, Percutaneous Transhepatic Cholangiography) 및 내시경역행쓸개이자조영술(ERCP, endoscopic retrograde cholangiopancreatography)을 이용하여 담즙 시료를 얻는 단계; (b) 상기 담즙 시료를 그대로 동결 건조하는 단계; (c) 상기 동결 건조된 담즙 시료를 중수소($D_2O$)와 메탄올의 혼합용액($D_2O$ : MeOH = 1 : 1)에 완충시키는 단계; 및 (d) 내표준(internal standard)으로 트리메틸실란 프로피온산(TSP, trimethylsilane propionic acid)을 첨가한 후 원심분리 하여 상층액을 얻는 단계;를 포함하여 제조하는 것을 특징으로 하는 NMR 기반 대사체학(NMR-based metabolomics)을 이용한 담도암 진단법.

### 청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 (2) 단계에서 NMR 데이터는 500㎒의 양성자(proton) NMR 주파수(frequency)에서 1초간의 반복 시간을 사용하여 $^1H$ NMR 분광광도계로부터 얻는 것을 특징으로 하는 NMR 기반 대사체학(NMR-based metabolomics)을 이용한 담도암 진단법.

### 청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 진단법은 외과적 수술 없이 담도암의 진행 정도를 판단하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 NMR 기반 대사체학(NMR-based metabolomics)을 이용한 담도암 진단법.

## 명 세 서

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 자기공명 대사체학(magnetic resonance metabolomics)을 이용한 담도암 진단법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 핵자기공명분광법(NMR)을 통해 얻은 데이터를 직교 부분 최소 자승 판별 분석(OPLS-DA; orthogonal partial least square discriminant analysis) 및 예측 모델(prediction model) 방법을 이용하여 담도암을 진단하는 방법에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[0002] 담도암은 간의 담관에 생기는 암으로 간암과 같은 줄기세포에서 발생하는데(Sell and Dunsford Am J. Pathol. 134:1347-1363, 1989), 치명적인 질병으로서 그 사망률이 증가하는 추세이다. 특히, 담도암은 높은 재발률 때문에 외과적 절제술이 효과적이지 않고, 보통의 화학요법이나 방사선요법이 잘 듣지 않는다(Pederson et al., Cancer Res. 4325-4332, 1997).

[0003] 지금까지 담도암의 진단방법으로는 영상학적 진단(imaging), 조직검사(생검 및 세포학 검사), 혈청(serum)의 종

양표지자(tumor maker) 등을 이용하였으나 특이도(specificity)와 민감도(sensitivity)에 있어서 만족스럽지 못하여 담도암의 진단에 어려움을 겪고 있다.

[0004] 종래의 담도암 진단법인 세포조직학적 방법과 탄수화물 항원 19-9(CA(carbohydrate antigen) 19-9) 및 암배아항원(CEA, carcinoembryonic antigen)을 이용하는 경우 민감도와 특이도가 각각 41%, N/A; 81%, 53%; 및 20%, 100%이다. 암배아항원은 특이도 면에서는 100%의 완벽함을 보여주지만 민감도가 너무 낮아 실제 응용에 있어서 효용 가치가 극히 떨어진다. 또한, 담즙(bile)을 이용한 세포학적 방법은 이론상 가장 완벽한 방법일 수 있으나 민감도가 41% 정도로 매우 낮은 편이다.

[0005] 이러한 이유로 빠른 초기치료를 위해 새로운 보다 발전된 효과적인 진단방법이 요구되고 있다.

[0006] 대사체학(metabolomic)은 세포 또는 조직 내의 대사체의 거동, 분비 변화 등을 체계적으로 확인, 정량하고, 그 결과로부터 대사체군을 다양한 생리, 병리적 상태와 연관 지어 대사체 네트워크를 다시 해석하는 총체적 연구이며, 주 분석 장비로 핵자기공명 분광법(NMR, Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)을 사용한다.

[0007] 또한, 대사체학은 질병 상태에서 변화되는 주요 대사체군 및 대사체를 검출 및 규명하고, 정상 상태의 대사체 계수(profile)와 비교함으로써 질병을 진단하며, 특히 극소량의 대사체 변화를 신뢰성 있고 감도가 우수한 방법으로 검출하여 질병의 증상이 발현되지 않는 초기 상태에서의 조기 진단을 가능하게 한다.

## *발명의 내용*

### *해결하려는 과제*

[0008] 이에 본 발명자들은 자기공명분광법(NMR)을 통해 얻은 데이터를 다변량 분석법 중 데이터를 직교 부분 최소 자승 판별 분석(OPLS-DA) 및 예측 모델(prediction model) 방법을 이용, 이를 분석하여 종래의 방법보다 민감도와 특이도를 높임으로써 담도암 여부를 초기에 빠르고 정확하게 진단할 수 있는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0009] 결국, 본 발명의 주된 목적은 담도암의 조기 진단이 가능한 자기공명 대사체학(magnetic resonance metabolomics)을 이용한 담도암 진단법을 제공하는데 있다.

### *과제의 해결 수단*

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 NMR 기반 대사체학(NMR-based metabolomics)을 이용한 담도암 진단법을 제공한다.

[0011] 구체적으로, 본 발명의 NMR 기반 대사체학(NMR-based metabolomics)을 이용한 담도암 진단법은 (1) 환자에게서 담즙 시료를 얻는 단계; (2) NMR 데이터를 얻는 단계; (3) 상기 NMR 데이터로부터 Simca-P 프로그램을 이용하여 주성분 분석(PCA, principal component analysis) 및 데이터를 직교 부분 최소 자승 판별 분석(OPLS-DA)을 수행하는 단계; 및 (4) 상기 PCA 및 OPLS-DA를 수행하여 얻은 스코어 플롯과 로딩 플롯으로 예측 모델(prediction model)을 작성하는 단계;를 포함한다.

[0012] 이때, 상기 (1) 단계에서 담도암 진단을 위한 시료는 (a) 환자에게서 피부간경유쓸개관조영술(PTC, Percutaneous Transhepatic Cholangiography) 및 내시경역행쓸개이자조영술(ERCP, endoscopic retrograde cholangiopancreatography)을 이용하여 담즙 시료를 얻는 단계; (b) 상기 담즙 시료를 그대로 동결 건조하는 단계; (c) 상기 동결 건조된 담즙 시료를 중수소($D_2O$)와 메탄올의 혼합용액($D_2O$ : MeOH = 1 : 1)에 완충시키는 단계; 및 (d) 내표준(internal standard)으로 트리메틸실란 프로피온산(TSP, trimethylsilane propionic acid)을 첨가한 후 원심분리 하여 상층액을 얻는 단계;를 포함하여 제조할 수 있다.

[0013] 또한, 상기 (2) 단계에서 NMR 데이터는 500㎒의 양성자(proton) NMR 주파수(frequency)에서 1초간의 반복 시간을 사용하여 $^1H$ NMR 분광광도계로부터 얻는 것이 바람직하다.

[0014] 본 발명은 또한 외과적 수술 없이 담도암의 진행 정도(cancer stage)를 판단하는 것이 가능한 담도암 진단법을 제공한다.

[0015] 담즙은 간에서 생성되고, 담낭에 저장되므로 간암이나 담낭암 등에도 본 발명의 방법을 적용할 수 있으며, 담즙 외 혈액, 뇌척수액, 소변 등 여타의 생체액을 대상으로 주요 장기의 암을 진단하는 데에도 응용될 수 있다.

## 발명의 효과

[0016] 본 발명의 NMR 기반 대사체학을 이용한 담도암 진단법은 종래의 진단방법과 비교하여 민감도 및 특이도가 우수하므로 담도암 여부를 초기단계에서 빠르고 정확하게 조기 진단하는 것이 가능하다.

[0017] 또한, 본 발명에 따른 진단법은 외과적인 수술을 하지 않고서도 담도암의 진행 정도를 판단하는데 유용하게 사용될 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본 발명에 따른 OPLS-DA 스코어 플롯(score plot)으로, 검은색 사각형(■)은 담도암, 붉은색 원형(●)은 비담도암 질환에 해당한다.

도 2는 상기 도 1을 로딩 플롯(loading plot) 후 S-TOSCY로 나타낸 것이다(1: 1.15ppm; 2: 1.06ppm; 3: 3.70ppm).

도 3은 본 발명에 따른 성별에 대한 OPLS-DA 스토어 플롯으로, 사각형(■)은 담도암, 삼각형(△)은 비담도암 질환에 해당한다.

도 4는 본 발명에 따른 나이에 대한 OPLS-DA 스토어 플롯으로, 도 4a는 old(정상인 55세 이상; 암환자 68세 이상), 도 4b는 young(정상인 55세 미만; 암환자 68세미만)의 결과이며, 각각에 대해 사각형(■)은 담도암, 삼각형(△)은 비담도암 질환에 해당한다.

도 5는 본 발명에 따른 예측 플롯(prediction plot)으로, 검은색 사각형(■)은 담도암, 붉은색 원형(●)은 비담도암 질환에 해당한다.

도 6은 본 발명에 따라 담도암 진행 정도(cancer stage)를 판단한 스코어 플롯(score plot)으로, 사각형(■)은 담도암 1기 및 2기, 삼각형(△)은 담도암 3기에 해당한다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0020] **실시예 1. 시료 제조**

[0021] 치료목적의 담즙배액술을 시행하고 있는 환자로부터 피부간경유쓸개관조영술(PTC) 및 내시경역행쓸개이자조영술(ERCP)을 이용하여 담즙을 채취하여 동결건조한 다음, 건조된 담즙을 100㎎씩 정량하고 10mM 인산나트륨이 들어있는 500㎕ 중수소를 가진 물($D_2O$)과 메탄올의 1 : 1 혼합용액(w/w)에 완충시킨 후 내표준(internal standard)으로 0.025% 트리메틸실란 프로피온산(TSP)을 첨가하여 원심분리 후 상층액을 NMR 시료로 준비하였다.

[0022] **실시예 2. NMR 측정**

[0023] 전체 8000전의 복소 데이터를 획득한 후, 1초간의 반복 시간을 사용하여 $^1H$ NMR 분광광도계는 Avance DRX-500(Bruker biospin, Germany)로부터 500㎒ $^1H$ NMR 데이터를 얻었다. 다음, 푸리에 변환(Fourier transformation)을 수행하고 위상을 조절하여 얻은 스펙트럼을 다시 베이스라인(baseline)을 교정한 후 전체 스펙트럼 중 신호의 강도를 0.025% TSP 신호 및 전체 면적에 대하여 표준화 시키고, 이 신호의 강도를 아스키 파일로 변환하였다.

[0024] **실시예 3. 데이터 분석**

[0025] 상기 NMR 데이터에서 얻은 신호의 강도를 숫자로 바꾸고, 매 0.04ppm 단위로 적분하였다. 이때 물에 해당하는 신호(4.6-5.0ppm)와 메탄올에 해당하는 신호(3.25-3.35ppm)는 제외하였다.

[0026] Simca-P 프로그램(Umietrics, Sweden)을 이용하여 직교 부분 최소 자승 판별 분석(OPLS-DA)을 수행하고 얻어진

스코어 플롯(Score plot)과 로딩 플롯(loading plot)으로 예측 모델을 작성하였다.

[0027] 도 1은 실시예 1에서 제조한 담즙 시료에 대한 스코어 플롯 결과로, 담도암과 비담도암 질환을 효과적으로 구분할 수 있다.

[0028] **실험예 1.**

[0029] 담도암과 비담도암 질환이 차이가 나는 이유를 알아보기 위하여, 로딩 플롯을 실시하여 이를 S-tocsy로 표현하였다(도 2 참조).

[0030] 도 2에서 나타난 바와 같이, 1.50ppm, 1.06ppm 및 3.70ppm의 첨두(peak)가 담도암과 비담도암 질환을 구분하는데 기여가 많음을 확인할 수 있다.

[0031] **실험예 2.**

[0032] 담도암과 비담도암 질환을 구분함에 있어서, 순수 질환만이 아닌 성별과 나이에도 영향을 줄 수 있기 때문에 본 발명의 예측 모델이 성별과 나이의 영향을 받지 않는다는 것을 검증하기 위하여, 먼저 성별을 남성만으로 한정한 후 OPLS-DA를 실시하였다(도 3 참조).

[0033] 그 결과, 전체를 대상으로 실시했던 OPLS-DA(도 1)과 비교할 때 유의적인 차이가 없었으며, 상기 결과로부터 성별이 주는 영향이 없음을 확인할 수 있었다.

[0034] **실험예 3.**

[0035] 본 발명의 예측 모델이 나이의 영향을 받지 않는다는 것을 검증하기 위해, 나이를 기준(정상인의 경우 55세, 암환자의 경우 68세 기준)으로 older 와 younger 을 구분하여 OPLS-DA를 실시하였다.

[0036] 그 결과를 나타낸 도 4에서도 알 수 있듯이, 양상이 전체를 가지고 진행한 모델과 유사한바, 본 발명의 예측 모델은 나이의 영향을 받지 않음을 확인하였다.

[0037] **실험예 4.**

[0038] 상기 직교 부분 최소 자승 판별 분석(OPLS-DA)의 결과에 대하여 담도암과 비담도암 질환 시료 중에서 한번에 하나씩 데이터를 빼내어 미지 시료로 삼고 나머지 시료의 결과에 대입하여 예측하는 Leave-one-out 분석 방법으로 예측 모델을 작성하였다.

[0039] 그 결과, 비담도암 질환 시료는 21개 중 18개 시료를, 담도암 시료는 17개 시료 중 15개 시료를 정확히 예측하여, 민감도와 특이도가 각각 88% 및 81%인 것으로 확인되었으며, 종래 담도암 진단방법과 비교하여 민감도와 특이도가 향상되었음을 알 수 있었다(도 5 참조).

[0040] 또한, 도 5에서 보는 바와 같이, 0.5 line을 기준으로 예측(prediction) 했을 때 위쪽에 존재하면 비담도암 질환으로, 아래쪽에 존재하면 담도암인 것으로 진단할 수 있다.

[0041] **실험예 5.**

[0042] 담도암의 진행 정도를 확인하기 위해, 동일한 담즙 시료에 대하여 상기와 동일한 방법으로 예측 모델을 작성한 후 암 진행 정도를 예측하였다.

[0043] 그 결과, 도 6에서 나타난 바와 같이, 외과적인 수술, 즉 개복수술을 해야만 알 수 있었던 담도암의 진행 정도를 수술 없이도 예측 가능함을 확인하였다.

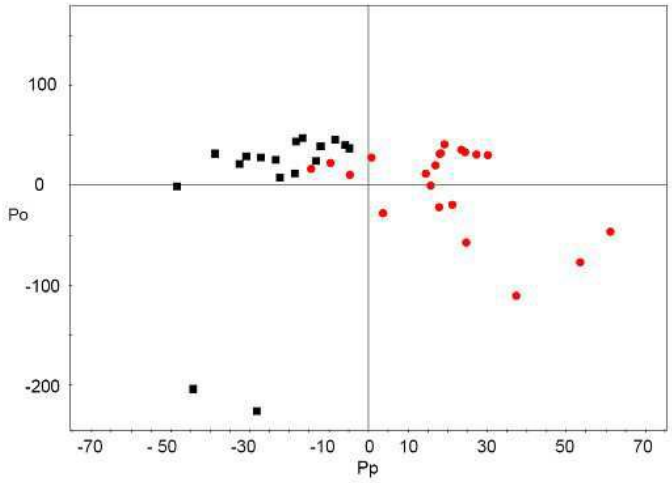
[0044]

[0045] 이상, 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은

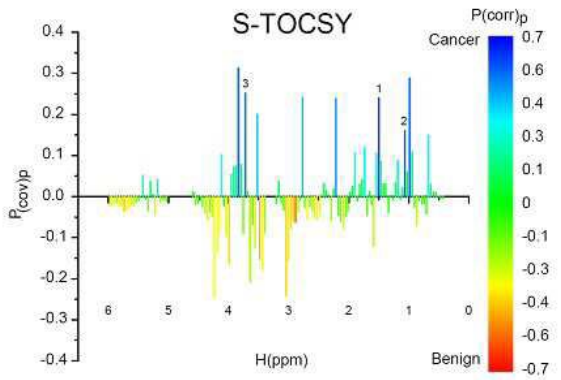
명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

## 도면

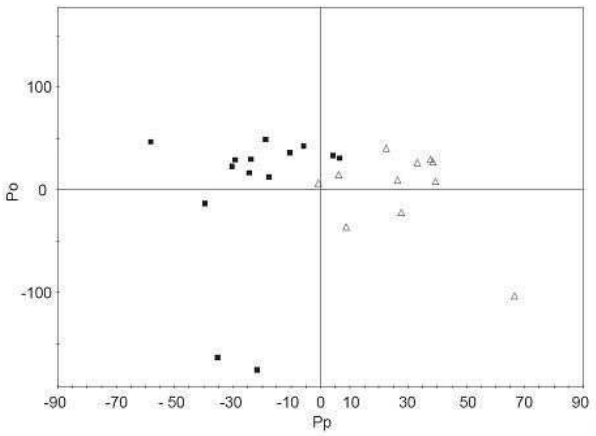
### 도면1



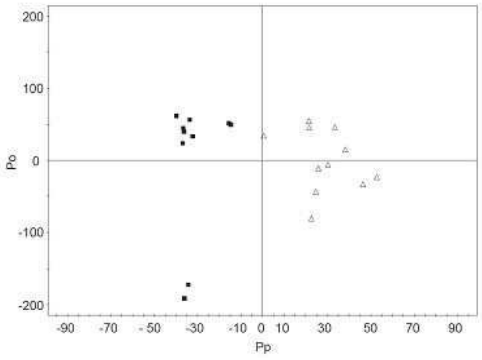

### 도면2



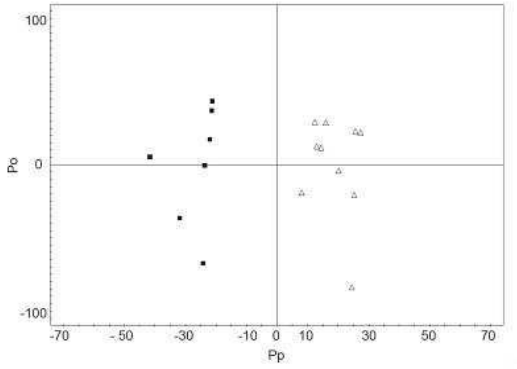

### 도면3



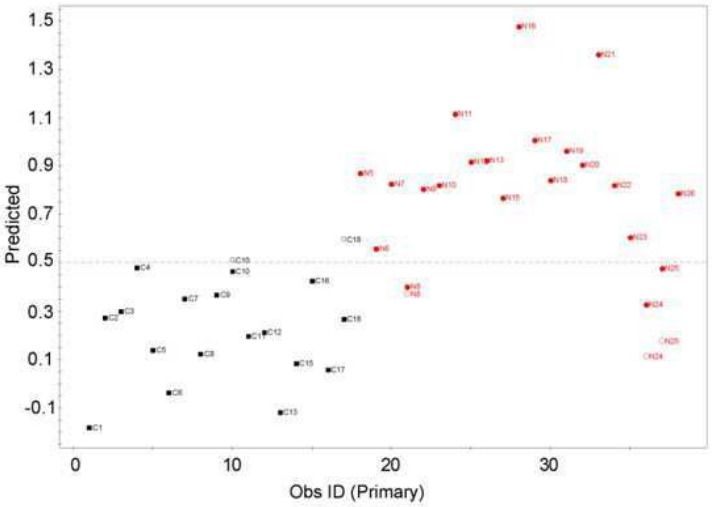
도면4a




도면4b




도면5



도면6

