(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년06월17일
(11) 등록번호 10-1275266
(24) 등록일자 2013년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0022240
(22) 출원일자 2013년02월28일
심사청구일자 2013년02월28일
(56) 선행기술조사문헌
Exp Mol Med. 2011 Feb 28;43(2):91-100

(73) 특허권자
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
안정혁
서울특별시 성동구 옥수동 극동그린아파트 101동 605호
성혜윤
서울특별시 성동구 금호1가 벽산아파트 202동 403호
주웅
서울특별시 서초구 반포4동 미도아파트 307동 602호
(74) 대리인
유미특허법인

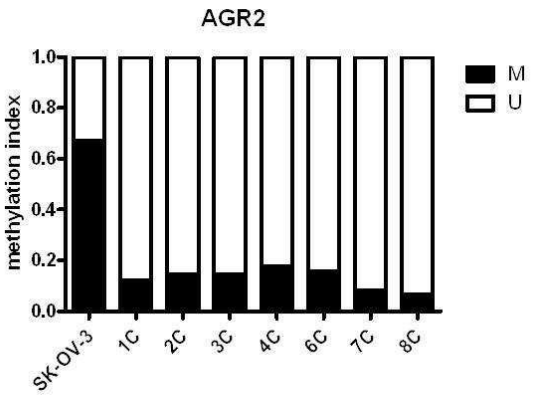
전체 청구항 수 : 총 13 항 심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 **ＡＧＲ２ 유전자 프로모터의 ＣｐＧ 메틸화 변화를 이용한 전이성 난소암 진단용 조성물 및 이의 이용**

(57) 요 약

본 발명은 AGR2 (anterior gradient-2) 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 검출함으로써, 난소암 전이를 진단 또는 전이 위험성을 예측하기 위한 조성물, 키트 및 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도11



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	A120071120002
부처명	보건복지부
연구사업명	보건의료기술연구개발사업-병원특성화연구센터
연구과제명	재발 조기 예측을 위한 후성유전학적 진단법 개발(2세부)
주관기관	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2012.05.01~2017.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

AGR2 (anterior gradient-2) 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암의 전이 진단 또는 전이 위험성 예측용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제는 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소, AGR2 유전자 프로모터의 메틸화된 서열에 특이적인 프라이머, 및 비메틸화된 서열에 특이적인 프라이머를 포함하는 것인 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 바이설파이트(bisulfite) 또는 이의 염인 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 메틸화 민감성 제한효소는 *Sma*I, *Sac*II, *Eag*I, *Hpa*II, *Msp*I, *Bss*HII, *Bst*UI 또는 *Not*I인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 유전자 프로모터의 CpG 부위는 서열번호 1 (7번 염색체의 16844546 내지 16844667 번째)의 염기서열 중에 나타나는 CpG 를 포함하는 것인 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 난소암의 전이 진단 또는 전이 위험성 예측용 키트.

청구항 7

난소암 전이가 의심되는 환자의 생물학적 시료로부터 AGR2 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 원발 난소암 대조군 시료의 AGR2 유전자 프로모터의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함하는,

난소암의 전이 진단 또는 전이 위험성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준의 측정 단계는,

(a) 수득된 시료 내 게놈 DNA를 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소로 처리하는 단계; 및

(b) 상기 처리된 DNA를 AGR2 유전자 프로모터의 CpG 부위를 증폭할 수 있는 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 증폭하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 유전자 프로모터의 CpG 부위는 서열번호 1 (7번 염색체의 16844546 내지 16844667 번째)의 염기서열 중에 나타나는 CpG 를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 바이설파이트(bisulfite) 또는 이의 염인 방법.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 메틸화 수준을 측정하는 방법은 메틸화 특이적 중합효소반응 (methylation-specific polymerase chain reaction), 실시간 메틸화 특이적 중합효소반응 (real time methylation-specific polymerase chain reaction), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 정량 PCR, 파이로시퀀싱 및 바이설파이트 시퀀싱으로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 12

제7항에 있어서, 상기 생물학적 시료가 환자의 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제7항에 있어서, 원발 난소암 대조군 시료의 경우보다 환자 시료 내 AGR2 유전자 프로모터의 CpG 부위가 저메틸화 상태로 측정되는 경우 난소암이 전이되거나 전이 위험성이 있다고 예측하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 AGR2 (anterior gradient-2) 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 검출함으로써, 난소암 전이를 진단 또는 전이 위험성을 예측하기 위한 조성물, 키트 및 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 난소암은 여성암 중 사망률이 가장 높은 난치성 암질환으로, 최근 생활양식이 서구화되고 호르몬 대체요법이 확산되고 노령인구가 증가함에 따라 그 빈도가 꾸준히 증가하고 있다. 난소암의 경우 초기에는 뚜렷한 증상이 나타나지 않으므로 약 70% 이상의 환자가 3기 이상인 진행성 난소암으로 최초 발견되며 약 75% 이상의 환자에서 최초 치료 후 2년 내 재발 및 전이가 일어나는 것으로 보고되어 있다.

[0003] 난소암의 치료 방법은 암의 종류 및 단계에 따라 결정되며, 수술 요법, 방사선 요법, 화합요법 등이 있지만, 재발에 의한 전이 암의 치료에는 크게 효과가 없다. 이는, 암 전이가 신생혈관의 생성 유도 및 세포의 이동을 수반하는 것이어서 암 자체와는 그 현상이 상이하며, 암의 전이를 막기 위해서는 신생혈관의 생성 유도 및 세포의 이동까지 억제하여야 하므로 항전이의 효과와 항암 효과는 서로 상이하기 때문이다. 따라서, 암의 발병에 대한 진단도 중요하지만, 이와는 별도로 난소암 치료 후 재발 및 전이 여부를 미리 판단 할 수 있는 바이오 마커의 개발이 생존율과 치료 효율을 높이는데 크게 기여 할 것으로 기대되고 있다. 또한, 암의 재발 및 전이는 암의 발병과는 근본적으로 차이가 있기 때문에, 암의 재발과 전이를 예측하기 위해서는 암의 발병을 진단하는 바이오 마커와는 다른 바이오 마커를 개발할 필요가 있다.

[0004] 보다 상세하게, 전이 암은 원발 부위에 생성된 초기 암과는 생물학적인 특성이 다르다고 보고되고 있다. 이는 전이 암의 유전자 발현과 원발 부위의 암의 유전자 발현 양상이 다르기 때문이다. 예를 들면, 종양세포가 성장하기 위하여 다양한 성장 호르몬이 필요하며, 항암제의 영향을 극복하고 생존해야 하므로, 궁극적으로 전이 암세포는 생존에 유리하도록 유전자 발현의 변화가 유도되어야 하며. 이러한 발현 양상은 암의 전이를 결정하는데 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 따라서, 종양 세포 (원발 부위)에서 이에 관련 유전자 중 하나의 유전자의 발현이 증가한다고 하여 전이가 된다고 보기는 어렵다.

[0005] 이러한 측면에서, 본 발명에서는 원발암 세포와 전이된 조직 간의 유전자 발현 양상을 비교하였으며, 전이된 조직에서 유전자 발현의 변화를 나타낸 유전자들 중 프로모터 부위에 존재하는 CpG 의 메틸레이션 변화가 유전자 발현에 영향을 준 것으로 확인된 유전자들을 최종 선별하였다. 나아가, 이와 같이 유전자의 발현에 영향을 준 특정 CpG 부위를 확인하였으며, 해당 유전자 프로모터의 특정 CpG 위치에서 일어나는 메틸화 정도를 측정함으로써 난소암 전이 위험도를 예측할 수 있다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0006] 한편, 국내 특허등록 0983386호, 일본 특허공개 2008-520228호, 일본 특허공개 2009-505632호, 국내 특허등록 1007571호, 국내 특허공개 2012-0034593호 등은, 본 발명에서 선별한 유전자들이 각종 암의 발병 여부를 진단하는 마커로 사용할 수 있음을 개시하고 있으나, 상기 문헌들과 비교하여 본 발명은 해당 유전자의 프로모터 CpG

부위의 특이적인 저메틸화를 이용하여 난소암의 재발 및 전이를 진단 또는 예측한다는 점에서 확연한 차이가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은 AGR2 (anterior gradient 2), CA9 (carbonic adj anhydrase 9), GABRP (gamma-aminobutyric acid receptor pi subunit), IFITM1 (interferon-induced transmembrane 1) 및 MUC13 (mucin 13)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암의 전이 진단 또는 전이 위험성 예측용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 조성물을 포함하는 난소암의 전이 진단 또는 전이 위험성 예측용 키트를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준의 측정하여 난소암의 전이를 진단하거나 전이의 위험성을 예측하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 하나의 목적은 난소암의 전이가 의심되는 환자의 생물학적 시료로부터 상기 유전자 프로모터의 특정 CpG 부위에서의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 난소암의 전이 진단 또는 전이 위험성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 AGR2, CA9, GABRP, IFITM1 및 MUC13 유전자 프로모터의 특정 CpG부위가 난소암 전이 조직에 특이적으로 저메틸화된다는 발견에 기초한 것으로, 상기 유전자들의 프로모터의 메틸화 정도를 바이오 마커로서 이용하여 난소암 전이를 진단하거나 전이 위험성을 예측하는 기술을 제공한다.

[0012] 상기 AGR2, CA9, GABRP, IFITM1 및 MUC13 유전자 프로모터의 CpG 는 각각 난소암 전이 조직에 특이적으로 저메틸화되므로, 이들 중 각각을 난소암 전이를 진단하거나 전이 위험성을 예측하기 위한 단독의 바이오 마커로 사용하거나, 이들 중 2종 이상을 복합 바이오 마커로 사용할 수도 있다.

[0013] 따라서 하나의 양태로서, 본 발명은 AGR2, CA9, GABRP, IFITM1 및 MUC13 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암의 전이 진단 또는 전이 위험성 예측용 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0014] 바람직한 하나의 양태로서, 본 발명은 AGR2 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암의 전이 진단 또는 전이 위험성 예측용 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0015] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 조성물 및 키트는 CA9, GABRP, IFITM1 및 MUC13 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0016] 바람직한 또 하나의 양태로서, 본 발명은 CA9 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암의 전이 진단 또는 전이 위험성 예측용 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0017] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 조성물 및 키트는 AGR2, GABRP, IFITM1 및 MUC13 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0018] 바람직한 또 하나의 양태로서, 본 발명은 GABRP 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암의 전이 진단 또는 전이 위험성 예측용 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0019] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 조성물 및 키트는 AGR2, CA9, IFITM1 및 MUC13 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0020] 바람직한 또 하나의 양태로서, 본 발명은 IFITM1 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 난소암의 전이 진단 또는 전이 위험성 예측용 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0021] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 조성물 및 키트는 AGR2, CA9, GABRP 및 MUC13 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0022] 바람직한 또 하나의 양태로서, 본 발명은 MUC13 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를

포함하는, 난소암의 전이 진단 또는 전이 위험성 예측용 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0023] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 조성물 및 키트는 AGR2, CA9, GABRP 및 IFITM1 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명에서, AGR2, CA9, GABRP, IFITM1 및 MUC13 유전자는 공지된 유전자 데이터베이스에서 그 서열 정보를 확인할 수 있다. 예를 들어, 인간 AGR2 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_006408 에서 확인할 수 있고, 인간 CA9 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_001216 에서 확인할 수 있고, 인간 GABRP 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_014211 에서 확인할 수 있고, 인간 IFITM1 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_003641 에서 확인할 수 있으며, 인간 MUC13 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_033049 에서 확인할 수 있다.

[0025] 본 발명에서 용어, "메틸화"는 DNA를 구성하는 염기에 메틸기가 부착되는 것을 말한다. 바람직하게, 본 발명에서 메틸화 여부는 특정 유전자의 프로모터 부위의 특정 CpG 부위의 사이토신에서 일어나는 메틸화 여부를 의미한다. 메틸화가 일어난 경우 그로 인하여 전사인자의 결합이 방해를 받게 되어 특정 유전자의 발현이 억제되며, 반대로, 비메틸화 또는 저메틸화가 일어나는 경우 특정 유전자의 발현이 증가하게 된다.

[0026] 포유동물 세포의 게놈 DNA 에는 A, C, G 및 T 에 더하여, 사이토신 링의 다섯번째 탄소에 메틸 그룹이 부착된 5-메틸사이토신(5-methylcytosine, 5-mC)이라는 5번째 염기가 존재한다. 5-메틸사이토신의 메틸화는 CpG라고 불리는 CG 디뉴클레오티드(5'-mCG-3')의 C에서만 일어나고, CpG의 메틸화는 alu 또는 트랜스포존과 게놈의 반복서열이 발현되는 것을 억제한다. 또한, 상기 CpG의 5-mC가 자연적으로 탈아미노화하여 티민(T)이 되기 쉽기 때문에, CpG는 포유동물 세포에서 대부분의 후생유전학적 변화가 자주 일어나는 부위이다.

[0027] 본 발명에서 용어, "메틸화 수준의 측정"은 AGR2 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것으로서, 메틸화 특이적인 PCR, 예를 들어 메틸화 특이적 PCR (methylation-specific polymerase chain reaction, MSP), 실시간 메틸화 특이적 PCR (real time methylation-specific polymerase chain reaction), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 또는 정량 PCR 등을 통해 측정할 수 있다. 또는, 파이로시퀀싱 및 바이설파이트 시퀀싱과 같은 자동염기분석 등의 방법으로 측정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 바람직하게, 본 발명에서 AGR2 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 7번 염색체의 16844546 내지 16844667 번째 염기 중에 나타나는 CpG 부위의 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서는, 상기 7번 염색체의 16844546 내지 16844667 번째 염기를 서열번호 1로 나타내었다.

[0029] 더욱 바람직하게, 본 발명에서 AGR2 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 7번 염색체의 16844606 번째 (서열번호 1의 61 번째) 위치하는 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다.

[0030] 또한 바람직하게, 본 발명에서 CA9 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 9번 염색체의 35673849 내지 35673970 번째 염기 중에 나타나는 CpG 부위의 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서는, 상기 9번 염색체의 35673849 내지 35673970 번째 염기를 서열번호 2로 나타내었다.

[0031] 더욱 바람직하게, 본 발명에서 CA9 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 9번 염색체의 35673909 번째 (서열번호 2의 61 번째) 위치하는 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다.

[0032] 또한 바람직하게, 본 발명에서 GABRP 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 5번 염색체의 170209700 내지 170209821 번째 염기 또는 170209521 내지 170209642 번째 염기 중에 나타나는 CpG 부위의 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서는, 상기 CpG 부위의 염기 서열을 각각 서열번호 3 및 서열번호 4로 나타내었다.

[0033] 더욱 바람직하게, 본 발명에서 GABRP 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 5번 염색체의 170209760 번째 (서열번호 3의 61 번째) 또는 170209581번째 (서열번호 4의 61 번째)에 위치하는 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다.

[0034] 또한 바람직하게, 본 발명에서 IFITM1 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 11번 염색체의 313984 내지 314105 번째 염기 중에 나타나는 CpG 부위의 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서는, 상기 CpG 부위의 염기 서열을 서열번호 5로 나타내었다.

[0035] 더욱 바람직하게, 본 발명에서 IFITM1 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 11번 염색체의 314044 번째 (서열번호 5의 61 번째) 위치하는 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수

있다.

[0036] 또한 바람직하게, 본 발명에서 MUC13 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 3번 염색체의 124653658 내지 124653779 번째 염기 또는 124653599 내지 124653720 번째 염기 중에 나타나는 CpG 부위의 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서는, 상기 CpG 부위의 염기 서열을 각각 서열번호 6 및 서열번호 7로 나타내었다.

[0037] 더욱 바람직하게, 본 발명에서 MUC13 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 3번 염색체의 124653718 번째 (서열번호 6의 61 번째) 또는 124653659 번째 (서열번호 7의 61 번째)에 위치하는 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다.

[0038] 본 발명에서는 상기 인간 게놈 염색체 부위의 염기서열은 최신 버전인 The February 2009 Human reference sequence (GRCh 37)에 따라 표현하였지만, 상기 인간 게놈 염색체 부위의 구체적 서열은 게놈 서열 연구 결과가 업데이트됨에 따라서 그 표현이 다소 변경될 수 있으며, 이러한 변경에 따라 본 발명의 상기 인간 게놈 염색체 부위의 표현이 상이해질 수 있다. 따라서, 본 발명의 The February 2009 Human reference sequence (GRCh 37)에 따라 표현된 인간 게놈 염색체 부위는 본 발명의 출원일 이후 인간 표준 염기서열(human reference sequence)이 업데이트되어 상기 인간 게놈 염색체 부위의 표현이 지금과 다르게 변경된다고 하여도, 본 발명의 범위가 상기 변경된 인간 게놈 염색체 부위에 미치게 됨은 자명하다고 할 것이다. 이러한 변경 내용은 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자라면 누구라도 용이하게 알 수 있는 사항이다.

[0039] 본 발명자들은 암의 원발 부위에 생성된 초기 암과 전이된 암 부위의 유전자 발현이 다르다는 것에 착안하여, 원발암 세포주와 전이된 조직 간의 유전자 발현 양상을 비교하였으며, 전이된 조직에서 유전자 발현의 변화를 나타낸 유전자들 중 프로모터 부위에 존재하는 CpG 의 메틸레이션 변화가 유전자 발현에 영향을 준 것으로 확인된 유전자들을 최종 선별하였다. 나아가, 이와 같이 유전자의 발현에 영향을 준 특정 CpG 부위를 확인하였으며, 해당 유전자 프로모터의 특정 CpG 위치에서 일어나는 메틸화 정도를 측정함으로써 난소암의 전이 및 전이 위험도를 예측할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0040] 보다 상세하게, 본 발명자들은 원발 난소암 세포주 SK-OV-3를 10 마리의 누드 마우스 복강에 이식하여 난소암 전이 동물 모델을 확립하였고, 이 동물 모델에서 얻은 종양조직의 게놈 DNA와 RNA를 추출하여, Illumina Human Methylation 450 Bead Chip을 이용한 DNA 메틸레이션 마이크로어레이와 Affymetrix Human Gene 1.0 ST를 이용한 유전자 발현 마이크로어레이 분석을 실시하였으며, 이들 분석 결과를 통합 분석 (integration analysis)을 통하여 각 유전자의 프로모터 부위에 존재하는 CpG의 메틸레이션의 변화가 유전자 발현에 영향을 주었다고 추정되는 유전자들을 선별하였다.

[0041] 이 선정된 유전자들 가운데 AGR2는 난소암 전이 모델 쥐에서 원발암 세포주에 비해 26-188배 까지 유전자의 발현이 증가되어 있었으며, 동시에 3.5-7배 정도 DNA 메틸레이션이 감소되어 있었다. CA9은 난소암 전이 모델 쥐에서 원발암 세포주에 비해 54.4-372.4배까지 유전자의 발현이 증가되어 있었으며, 동시에 1.6-7.0배 정도 프모로터의 특정 CpG DNA 메틸레이션이 감소되어 있었다. GABRP은 난소암 전이 모델 쥐에서 원발암 세포주에 비해 17.3-86.6배까지 유전자의 발현이 증가되어 있었으며, 동시에 4.7-6.6배 정도 프로모터의 특정 CpG DNA 메틸레이션이 감소되어 있었다. IFITM1은 난소암 전이 모델 쥐에서 원발암 세포주에 비해 4.5-9.5배까지 유전자의 발현이 증가되어 있었으며, 동시에 2.5-3.8배 정도 프로모터의 특정 CpG DNA 메틸레이션이 감소되어 있었다. MUC13은 난소암 전이 모델 쥐에서 원발암 세포주에 비해 3.4-68.8배까지 유전자의 발현이 증가되어 있었으며, 동시에 1.8-2.0배 정도 프로모터의 특정 CpG DNA 메틸레이션이 감소되어 있었다.

[0042] 또한, 원발 세포주 SKOV-3에 탈DNA 메틸레이션 제제인 5-aza-2'-deoxycytidin을 처리하면, AGR2 유전자의 발현이 약 2배 정도, CA9 유전자의 경우 약 3.4배, GABRP유전자의 경우 약 1.8 배 정도, IFITM1 유전자의 경우 약 1.7 배, MUC13 유전자의 경우 약 17.8 배 정도 발현이 증가하는데, 이것은 상기 유전자들의 발현이 DNA 메틸레이션에 의해 조절되는 것을 의미한다.

[0043] 따라서, AGR2, GABRP, IFITM1 및/또는 MUC13 의 특정 CpG 위치에서 일어나는 DNA 메틸레이션의 저메틸화는 난소암의 전이를 진단하거나 전이 위험도를 예측할 수 있는 바이오 마커로 활용될 수 있다.

[0044] 본 발명에서, "전이 진단" 이란 난소암이 난소 이외의 다른 조직에 전이되어 있는 상태를 확인하는 것을 의미한다. 난소암은 복강을 통하여 각종 장기 조직으로 전이되는 것이 일반적이므로, 상기 난소 이외의 조직이란, 예를 들어, 대장, 소장, 간 주변부를 포함하는 각종 복강 내 장기 조직일 수 있다. 보다 바람직하게, 본 발명에서 전이 진단이란, 전이가 되지 않은 원발 난소암 시료와 전이 환자의 시료를 구분하여 진단함으로써, 난소암의 전

이 상태를 확인하는 것을 의미할 수 있다.

[0045] 본 발명에서, "전이 위험성 예측" 이란 난소암이 난소 이외의 다른 조직에 전이될 가능성을 미리 판단하는 것을 의미한다. 보다 바람직하게, 본 발명에서 전이 위험도 예측이란, 난소암 전이 환자가 수술 요법, 방사선 요법, 화합요법 등을 이용하여 난소암 치료를 받은 후, 치료된 조직에서 난소암이 재발 및 전이될 가능성을 미리 판단하는 것을 의미할 수 있다. 또 다른 측면에서, 본 발명에서 전이 위험성 예측이란, 전이가 되지 않은 원발 난소암 시료와 전이 위험성이 있는 환자의 시료를 구분하여 진단함으로써, 난소암 환자의 전이 가능성을 미리 판단하는 것을 의미할 수 있다.

[0046] 또한, 암 조직의 비정상적인 메틸레이션의 변화는 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 생물학적 시료에서 얻은 게놈 DNA의 메틸레이션 변화와 상당한 유사성을 보이므로, 본 발명의 마커를 이용할 경우 난소암의 전이 진단 또는 전이 위험성 예측에 대하여, 혈액이나 체액 등을 통한 손쉬운 진단이 가능하다는 장점이 있다.

[0047] 본 발명에서, CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제는 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소, AGR2, GABRP, IFITM1 및/또는 MUC13 유전자의 메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머, 및 비메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다.

[0048] 상기 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 바이설파이트(bisulfite) 또는 이의 염일 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 바람직하게는 소듐 바이설파이트일 수 있다. 이러한 바이설파이트를 이용하여 비메틸화 사이토신 잔기를 변형시켜 프로모터의 메틸화 여부를 검출하는 방법은 당 업계에 널리 공지되어 있다(WO01/26536; US2003/0148326A1).

[0049] 또한, 상기 메틸화 민감성 제한효소는 CpG 부위의 메틸화를 특이적으로 검출할 수 있는 제한효소로서 제한효소의 인식부위로 CG를 함유하는 제한효소일 수 있다. 예를 들면, *Sma*I, *Sac*II, *Eag*I, *Hpa*II, *Msp*I, *Bss*HII, *Bst*UI, *Not*I 등이 있으며 이에 제한되지 않는다. 상기 제한효소 인식부위의 C에서의 메틸화 또는 비메틸화에 따라 제한효소에 의한 절단 여부가 달라지고 이를 PCR 또는 서던블롯(Southern Blot) 분석을 통해 검출할 수 있게 된다. 상기 제한효소 이외의 다른 메틸화 민감성 제한효소는 당 업계에 잘 알려져 있다.

[0050] 난소암 전이가 의심되는 환자의 AGR2, GABRP, IFITM1 및/또는 MUC13 유전자의 프로모터 특정 CpG 부위에서의 메틸화 수준을 측정하는 대표적인 방법으로, 환자의 생물학적 시료에서 게놈 DNA를 수득하고, 수득한 DNA에 메틸화되지 않은 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소를 처리한 후, 상기 처리된 DNA를 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 증폭시키고 그 증폭된 결과물의 존부를 확인하는 것을 통해 측정할 수 있다.

[0051] 따라서, 본 발명의 제제는 AGR2, GABRP, IFITM1 및/또는 MUC13 유전자의 메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머 및 비메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 본 발명에서, 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3 말단 수산화기를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 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. 또한, 프라이머는, 7개 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 센스 및 안티센스 핵산으로서, DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다.

[0052] 본 발명의 프라이머는 메틸화 여부를 분석하는 대상이 되는 특정 CpG 부위의 서열에 따라 바람직하게 디자인될 수 있으며, 각각 메틸화되어 바이설파이트에 의해 변형되지 않았던 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍, 및 메틸화되지 않아 바이설파이트에 의해 변형된 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍일 수 있다.

[0053] 상기 조성물 및 키트에는 상기 제제 이외에도, 중합효소 아가로스, 전기영동에 필요한 완충용액 등이 추가로 포함될 수 있다.

[0054] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 AGR2, CA9, GABRP, IFITM1 및 MUC13 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자 프로모터의 특정 CpG 부위에서의 메틸화 수준을 측정하여 난소암 전이를 진단하거나 전이 위험성 예측하는 방법에 관한 것이다.

[0055] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 난소암의 전이가 의심되는 환자의 생물학적 시료로부터 상기 유전자 프로모터의 특정 CpG 부위에서의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 난소암의 전이 진단 또는 전이 위험성 예측을

위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0056] 바람직한 하나의 양태로서, 본 발명은 난소암 전이가 의심되는 환자의 생물학적 시료로부터 AGR2 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 원발성 난소암 시료의 해당 유전자 프로모터의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 난소암의 전이 진단 또는 전이 위험성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0057] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 방법은 추가적으로, 난소암 전이가 의심되는 환자의 생물학적 시료로부터 CA9, GABRP, IFITM1 및 MUC13 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 원발성 난소암 시료의 해당 유전자 프로모터의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0058] 바람직한 또 하나의 양태로서, 본 발명은 난소암 전이가 의심되는 환자의 생물학적 시료로부터 CA9 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 원발성 난소암 시료의 해당 유전자 프로모터의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 난소암의 전이 진단 또는 전이 위험성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0059] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 방법은 추가적으로, 난소암 전이가 의심되는 환자의 생물학적 시료로부터 AGR2, GABRP, IFITM1 및 MUC13 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 원발성 난소암 시료의 해당 유전자 프로모터의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0060] 바람직한 또 하나의 양태로서, 본 발명은 난소암 전이가 의심되는 환자의 생물학적 시료로부터 GABRP 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 원발성 난소암 시료의 해당 유전자 프로모터의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 난소암의 전이 진단 또는 전이 위험성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0061] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 방법은 추가적으로, 난소암 전이가 의심되는 환자의 생물학적 시료로부터 AGR2, CA9, IFITM1 및 MUC13 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 원발성 난소암 시료의 해당 유전자 프로모터의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0062] 바람직한 또 하나의 양태로서, 본 발명은 난소암 전이가 의심되는 환자의 생물학적 시료로부터 IFITM1 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 원발성 난소암 시료의 해당 유전자 프로모터의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 난소암의 전이 진단 또는 전이 위험성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0063] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 방법은 추가적으로, 난소암 전이가 의심되는 환자의 생물학적 시료로부터 AGR2, CA9, GABRP 및 MUC13 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 원발성 난소암 시료의 해당 유전자 프로모터의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0064] 바람직한 또 하나의 양태로서, 본 발명은 난소암 전이가 의심되는 환자의 생물학적 시료로부터 MUC13 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 원발성 난소암 시료의 해당 유전자 프로모터의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 난소암의 전이 진단 또는 전이 위험성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0065] 이 경우, 보다 바람직하게, 상기 방법은 추가적으로, 난소암 전이가 의심되는 환자의 생물학적 시료로부터 AGR2, CA9, GABRP 및 IFITM1 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 원발성 난소암 시료의 해당 유전자 프로모터의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0066] 본 발명에서 용어 "생물학적 시료"란 난소암 전이에 의해 AGR2, CA9, GABRP, IFITM1 및/또는 MUC13 유전자의 메틸화 수준이 차이 나는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0067] 먼저, 난소암 전이가 의심되는 환자로부터 게놈 DNA를 수득하여 메틸화 수준을 측정하기 위하여, 게놈 DNA의 수득은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 페놀/클로로포름 추출법, SDS 추출법(Tai et al., Plant Mol. Biol.

Reporter, 8: 297-303, 1990), CTAB 분리법(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide; Murray et al., Nuc. Res., 4321-4325, 1980) 또는 상업적으로 판매되는 DNA 추출 키트를 이용하여 수행할 수 있다.

[0068] 상기 유전자 프로모터의 특정 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계는, 보다 상세하게는, (a) 수득된 시료 내 게놈 DNA를 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소로 처리하는 단계; 및 (b) 상기 처리된 DNA를 해당 유전자 프로모터의 특정 CpG 부위를 증폭할 수 있는 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 증폭하는 단계를 포함할 수 있다.

[0069] 상기 (a) 단계에서 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 바이설파이트일 수 있으며, 바람직하게는 소듐 바이설파이트일 수 있다. 이러한 바이설파이트를 이용하여 비메틸화 사이토신 잔기를 변형시켜 프로모터의 메틸화 여부를 검출하는 방법은 당 업계에 널리 공지되어 있다.

[0070] 또한, 상기 (a) 단계에서 메틸화 민감성 제한효소는 상기에서 설명한 바와 같이, 특정 CpG 부위의 메틸화를 특이적으로 검출할 수 있는 제한효소로서 제한효소의 인식부위로 CG를 함유하는 제한효소일 수 있으며, 예를 들면, *Sma*I, *Sac*II, *Eag*I, *Hpa*II, *Msp*I, *Bss*HII, *Bst*UI, *Not*I 등이 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0071] 상기 (b) 단계에서 증폭은 통상적인 PCR 방법에 의해 수행될 수 있다. 이때 사용되는 프라이머는 상기에서 설명한 바와 같이, 메틸화 여부를 분석하는 대상이 되는 특정 CpG 부위의 서열에 따라 바람직하게 디자인될 수 있으며, 각각 메틸화되어 바이설파이트에 의해 변형되지 않았던 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍 및 메틸화되지 않아 바이설파이트에 의해 변형된 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 쌍일 수 있다.

[0072] 상기 유전자 프로모터의 특정 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계는, (c) 상기 (b) 단계에서 증폭된 결과물의 존부를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 (c) 단계에서 증폭된 결과물의 존부는 당 업계에 공지된 방법, 예를 들면 전기영동을 수행하여 원하는 위치의 밴드의 검출 여부에 따라서 수행될 수 있다. 예를 들면, 비메틸화 사이토신 잔기를 변형시키는 화합물을 사용한 경우 상기 (a) 단계에서 사용한 두 종류의 프라이머쌍, 즉 메틸화되어 바이설파이트에 의해 변형되지 않았던 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍 및 메틸화되지 않아 바이설파이트에 의해 변형된 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍에 의해 각각 증폭된 PCR 결과물의 존부에 따라 메틸화 정도를 판단할 수 있다. 바람직하게, 샘플 게놈 DNA를 바이설파이트로 처리하고, 해당 유전자의 CpG 부위를 PCR로 증폭하고, 증폭된 부위의 염기서열을 분석하는 바이설파이트 게놈 시퀀싱 방법을 사용하여 메틸화 여부를 판단할 수 있다.

[0073] 또한, 제한효소를 이용한 경우에도 당 업계에 공지된 방법, 예를 들어 mock DNA에서 PCR 결과물이 나타난 상태에서, 제한효소로 처리된 DNA에서 PCR 결과물이 있는 경우는 프로모터가 메틸화된 것으로 판단하고, 제한효소로 처리된 DNA에서 PCR 결과물이 없는 경우는 프로모터가 비메틸화 한 것으로 판단하는 것에 따라 그 메틸화 여부를 판단할 수 있으며, 이는 당업자에게 자명하다. 상기에서 mock DNA란 시료에서 분리되고 아무런 처리를 하지 않은 상태의 시료 DNA를 의미한다.

[0074] 이와 같은 방법에 따라, 환자 시료 내 AGR2, CA9, GABRP, IFITM1 및/또는 MUC13 유전자 프로모터의 CpG 부위가 저메틸화 상태로 측정되는 경우, 난소암이 전이되거나 전이 위험성이 있다고 예측할 수 있는 것이다.

[0075] 따라서, 상기 본 발명에 따를 경우, AGR2, CA9, GABRP, IFITM1 및/또는 MUC13 유전자 프로모터의 메틸화 여부를 효과적으로 확인하여 난소암의 전이 또는 전이 위험도를 용이하게 판단할 수 있다.

발명의 효과

[0076] 본 발명에 따라, 환자의 생물학적 시료에서 채취한 게놈 DNA의 특정 유전자 프로모터 부위의 메틸화 정도를 PCR 기법을 기초로 한 MSP(methylation-specific PCR) 등의 방법으로 측정함으로써 수 시간 내에 난소암 전이 위험도를 진단 할 수 있으므로, 정확도가 높고 편리한 진단 키트를 개발할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0077] 도 1은 mRNA 및 CpG 메틸레이션 데이터를 통합하는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 2는 SK-OV-3 세포주를 누드 마우스의 복강에 주입하여, 난소암 전이 동물 모델을 구축하였음을 확인한 사진이다.

도 3은 원발 난소암 세포주 (SK-OV-3) 및 난소암 전이 동물 7개체의 종양조직(n=7; 1C~8C 로 명명)에서 전체적

인 DNA 메틸레이션 분포경향을 나타낸 결과이다.

도 4는 원발 난소암 세포주와 비교하여 전이 종양조직에서 유의하게 발현의 변화를 나타낸 유전자에 대한 Heatmap 결과이다.

도 5는 전이성 난소암 동물 모델에서 DNA 메틸레이션의 변화와 유전자 발현의 변화를 나타낸 결과이다.

도 6은 전이성 난소암 동물모델(n=7; 1C~8C 로 명명)의 종양조직에서 AGR2 유전자의 발현 변화를 qRT-PCR로 검증한 결과를 나타낸다.

도 7은 전이성 난소암 동물모델(n=7; 1C~8C 로 명명)의 종양조직에서 CA9 유전자의 발현 변화를 qRT-PCR로 검증한 결과를 나타낸다.

도 8은 전이성 난소암 동물모델(n=7; 1C~8C 로 명명)의 종양조직에서 GABRP 유전자의 발현 변화를 qRT-PCR로 검증한 결과를 나타낸다.

도 9는 전이성 난소암 동물모델(n=7; 1C~8C 로 명명)의 종양조직에서 IFITM1 유전자의 발현 변화를 qRT-PCR로 검증한 결과를 나타낸다.

도 10은 전이성 난소암 동물모델(n=7; 1C~8C 로 명명)의 종양조직에서 MUC13 유전자의 발현 변화를 qRT-PCR로 검증한 결과를 나타낸다.

도 11은 전이성 난소암 동물모델(n=7; 1C~8C 로 명명)의 종양조직에서 AGR2 유전자의 프로모터 CpG부위에서 DNA 메틸레이션의 변화를 DNA 메틸레이션 마이크로어레이로 분석한 결과를 나타낸다.

도 12는 전이성 난소암 동물모델(n=7; 1C~8C 로 명명)의 종양조직에서 CA9 유전자의 프로모터 CpG부위에서 DNA 메틸레이션의 변화를 DNA 메틸레이션 마이크로어레이로 분석한 결과를 나타낸다.

도 13은 전이성 난소암 동물모델(n=7; 1C~8C 로 명명)의 종양조직에서 GABRP 유전자의 프로모터 CpG부위에서 DNA 메틸레이션의 변화를 DNA 메틸레이션 마이크로어레이로 분석한 결과를 나타낸다.

도 14는 전이성 난소암 동물모델(n=7; 1C~8C 로 명명)의 종양조직에서 IFITM1 유전자의 프로모터 CpG부위에서 DNA 메틸레이션의 변화를 DNA 메틸레이션 마이크로어레이로 분석한 결과를 나타낸다.

도 15는 전이성 난소암 동물모델(n=7; 1C~8C 로 명명)의 종양조직에서 MUC13 유전자의 프로모터 CpG부위에서 DNA 메틸레이션의 변화를 DNA 메틸레이션 마이크로어레이로 분석한 결과를 나타낸다.

도 16은 SK-OV-3세포주에 5-aza-2'-deoxycytidin 처리한 후 AGR2 유전자 발현의 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 17은 SK-OV-3세포주에 5-aza-2'-deoxycytidin 처리한 후 CA9 유전자 발현의 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 18은 SK-OV-3세포주에 5-aza-2'-deoxycytidin 처리한 후 GABRP 유전자 발현의 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 19는 SK-OV-3세포주에 5-aza-2'-deoxycytidin 처리한 후 IFITM1 유전자 발현의 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 20은 SK-OV-3세포주에 5-aza-2'-deoxycytidin 처리한 후 MUC13 유전자 발현의 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0078] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0079] **실시예 1. 세포주 및 난소암 전이 모델쥐**

[0080] 사람 난소암 세포주 SK-OV-3는 American type culture collection (ATCC no.HTB-77)에서 구입하여 10% FBS (fetal bovine serum), 100 U/mL 페니실린 및 100 μg/mL 스트렙토마이신을 포함하고 있는 McCoy's 5a 배지에

서 배양하였다.

[0081] 난소암 전이 모델 쥐를 만들기 위하여 2 x 10^6 개의 SK-OV-3 세포를 세포배양 배지에 현탁하여 10마리의 4-6주령 암컷 BALB/c 누드 마우스의 복강에 주입하였다. 4주 후 세포주가 복강을 따라 이동하여 종양이 형성된 쥐의 종양 조직 (대장, 소장, 간 주변부를 포함한 각종 복강 내 장기 조직)을 떼어 내어 액체질소에 보관하였다.

[0082] **실시예 2. Total RNA 추출**

[0083] SK-OV-3 세포주와 종양 조직에서 각각 RNeasy mini kit (Qiagen)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출방법은 제조사의 매뉴얼을 따라 실시하였다. 추출된 total RNA는 spectrophotometer를 이용하여 정량하였으며, RNA 상태는 1% agarose gel에서 전기영동하여 degradation여부를 확인하였다.

[0084] **실시예 3. 정량적 실시간 (Quantitative real-time) PCR (qRT-PCR)**

[0085] cDNA합성을 위해 Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen)을 사용하였다. 1 μg의 total RNA 와 50 ng oligo dT를 70 ℃에서 10분간 denature한 후 여기에 5X RT buffer 4 μl, 0.1 mM DTT 2 μl, 2.5 mM dNTP mixture 4 μl, Superscript II reverse transcriptase 200 units 및 RNase inhibitor 10 units 를 포함한 반응액에 혼합한 20 μl 반응액을 25 ℃ 에서 10분, 42 ℃에서 50분, 95 ℃에서 5분 동안 반응하여 cDNA를 합성한 후 이것을 1:4로 희석하고 이 중 2 μl를 취하여 qRT-PCR의 주형으로 사용하였다. qRT-PCR은 cDNA 2 μl, SYBR Premix EX Taq (Takara Bio) 10 μl, Rox reference dye (50 x, Takara Bio) 0.4 μl, 각 유전자의 프라이머 200 nM를 포함한 20 μl 반응액을 ABI 7500fast sequence detection system (Applied Biosystems)을 이용하여 95 ℃에서 30초 반응한 후, 40 cycles (95 ℃ 에서 3초, 60 ℃ 에서 30초) 반복하여 증폭하였다. PCR 산물의 specificity는 95 ℃에서 15초, 60 ℃에서1분, 95 ℃에서 15초 동안 반응하여 확인하였다. 18S rRNA 발현을 internal control로 사용하였으며, AGR2, CA9, GABRP, IFITM1 및 MUC13 유전자의 발현은 각각 18S rRNA발현 수준으로 컴C_T 방법으로 보정하였다. 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다.

표 1

[0086]

	서열	서열번호
human AGR2 (forward)	5'-AGTTTGTCCTCCTCAATCTGGTTT-3'	8
human AGR2 (reverse)	5'-GACATACTGGCCATCAGGAGAAA-3'	9
human CA9 (forward)	5'-TGACTCTCGGCTACAGCTGAACT-3'	10
human CA9 (reverse)	5'-CCACTCCAGCAGGGAAGGA-3'	11
human GABRP (forward)	5'-CTCGATTCAGTCCCTGCAAGA-3'	12
human GABRP (reverse)	5'-GTGCGGGACCCGATCAT-3'	13
human IFITM1 (forward)	5'-CGCCAAGTGCCTGAACATCT-3'	14
human IFITM1 (reverse)	5'-TACCAGTAACAGGATGAATCCAATG-3'	15
human MUC13 (forward)	5'-AGAAACATTCCATGGCCTATCAA-3'	16
human MUC13 (reverse)	5'-TGTCCATAAACAGATGTGCCAAA-3'	17
human 18S rRNA (forward)	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'	18
human 18S rRNA (reverse)	5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'	19

[0087]

[0088] **실시예 4. 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) 처리**

[0089] SK-OV-3 세포주에 메틸화 억제제인 5-aza-2'-deoxycytidine (Sigma-Aldrich)를 5, 10 μM 농도로 3일간 처리한 후 AGR2, CA9, GABRP, IFITM1, MUC13 유전자 발현의 변화를 qRT-PCP을 이용하여 측정하였다.

[0090] **실시예 5. mRNA 마이크로어레이**

[0091] GeneChip Human Gene 1.0 ST arrays 사용하여 mRNA 마이크로어레이를 수행하였다.

[0092] Scanning 후 얻어진 각 유전자의 발현량 (expression value)을 배경보정 (background correction), RMA 표준화

(RMA normalization) (Biostatistics. 2003 Apr;4(2):249-64. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data), 및 log2 변환 (log2 transformation)을 거쳐 최종적으로 통계분석에 사용하였다. 두 군에서 차별적으로 발현되는 유전자 (Differentially expressed genes, DEGs) 확인하기 위하여 Bayesian t-test (Limma: Linear Models for. Microarray Data. Gordon K. Smyth.) 방법을 사용하였다. 최종적으로 p value<0.05 이면서 log2(fold change)의 절대값이 0.585 보다 큰 유전자를 DEG로 선정하였다.

[0093] **실시예 6. DNA 메틸레이션 마이크로어레이**

[0094] Infinium(®) Human Methylation 450K BeadChip을 사용하여, DNA 메틸레이션 마이크로어레이를 수행하였다. DNA 메틸레이션 정도는 0~1 값을 갖는 β값으로 표시되며 β값 0은 해당 CpG 부위가 완전히 비메틸화 된 것을 의미하며, 1은 완전히 메틸화된 것을 의미한다.

[0095] 두 군에서 차별적으로 메틸레이션되어 있는 유전자 (Differentially methylated genes, DMGs)를 확인하기 위하여 Bayesian t-test 방법을 사용하였다. 최종적으로 p value<0.05이면서 절대값 β 차이=0.3 인 CpG 부위를 차별적으로 메틸레이션되어 있는 CpG 부위 (differentially methylated CpG site)로 선정하고 이 중에서 프로모터 부분에 존재하는 CpG 부위의 메틸레이션 정도가 변한 유전자를 DMG로 선정하였다.

[0096] **실시예 7. DEG 및 DMG 자료의 통합분석**

[0097] 도 1의 과정에 따라, 최종 결정된 DEG 및 DMG 자료를 통합하였다.

[0098] **실험결과**

[0099] **1. 난소암 전이 동물 모델 구축**

[0100] SK-OV-3 난소암 세포주를 10 마리의 암컷 누드 마우스의 복강에 각각 주입하여 난소암 전이 동물 모델을 구축하였다 (도 2).

[0101] **2. 난소암 전이 동물 모델의 후성유전학적 변화 분석**

[0102] 전이 동물 모델에서 얻은 종양 조직(대장, 소장, 간 주변부를 포함한 각종 복강 내 장기 조직)과 SK-OV-3 난소암 세포주에서 게놈 DNA를 추출하여 Illumina Human Methylation 450 BeadChip 을 이용하여 DNA 메틸레이션 마이크로어레이를 실시하여 원발 난소암 세포주와 비교하여 전이 종양조직에서 유의하게 DNA 메틸레이션의 변화를 나타낸 CpG 부위를 분석하였다. 분석 결과, 원발 난소암 세포주와 비교하여 전이 종양조직에서 DNA 메틸레이션의 분포가 전체적으로 낮아진 글로벌 저메틸화 (global hypomethylation)를 보이는 것이 관찰되었다 (도 3).

[0103] **3. 전이성 난소암 동물 모델의 유전자 발현의 변화 분석**

[0104] 전이 동물모델에서 얻은 종양 조직과 SK-OV-3 난소암 세포주에서 RNA를 추출하여 Affymetrix Human Gene 1.0 ST 이용하여 발현 마이크로어레이 (expression microarray)를 실시하여 원발 난소암 세포주와 비교하여 전이 종양조직에서 유의하게 발현의 변화를 나타낸 유전자를 분석하였다 (도 4). 분석 결과, 대체적으로 세포 부착 (cell adhesion), 세포 주기 (cell cycles), 상처 치료 (wound healing) 및 응집 (coagulation) 과 관련한 유전자들의 발현이 증가된 반면, 전사 (transcription), 전사조절, 세포사멸 및 세포사멸 조절에 관여하는 유전자들의 발현이 현저히 감소되어 있었다 (표 2).

표 2

[0105]

	클러스터 번호	Enrichment Score	유전자 기능 (GOTERM_BP_FAT)	개수	P값	BH p값

발현 증가	Cluster 1	8.2	세포 부착	85	2.35E-10	1.10E-07
			생물학적 부착	85	2.52E-10	1.01E-07
	Cluster 2	7.6	M 기	51	5.34E-10	1.88E-07
			세포 주기	58	1.53E-09	4.77E-07
	Cluster 3	6.6	뉴클레오솜 조립	27	9.48E-13	2.67E-09
			염색질 조립	27	2.36E-12	3.31E-09
	Cluster 4	5.4	칼슘-의존성 세포-세포간 부착	11	2.70E-07	4.22E-05
			세포외 구조 조직	28	9.53E-07	1.34E-04
	Cluster 5	2.7	상처 치유	25	3.62E-04	0.029
			응집	16	8.98E-04	0.063
발현 감소	Cluster 1	5.6	전사	263	2.78E-08	1.04E-04
			전사 조절	311	1.05E-07	1.97E-04
	Cluster 2	3.2	미토콘드리아 조직	29	4.72E-05	0.029
			세포소기관 내 단백질 국소화	28	3.22E-04	0.11
	Cluster 3	3.1	tRNA 대사 과정	27	1.96E-05	0.018
			tRNA 아미노아실화	12	0.0025	0.27
	Cluster 4	3.1	tRNA 대사 과정	27	1.96E-05	0.018
			ncRNA 대사 과정	42	2.58E-05	0.019
	Cluster 5	2.5	세포예정사 조절	104	3.81E-04	0.12
			세포죽음 조절	104	4.51E-04	0.13

[0106]

[0107] **4. 전이성 난소암 동물 모델의 후성유전학적 변화와 유전자 발현의 통합분석**

[0108] 원발 난소암 세포주와 비교하여 전이 종양조직에서 DNA 메틸레이션에서 차이를 나타내는 유전자와 유전자 발현에서 차이를 나타내는 유전자들을 선택하여, 이들 분석 결과를 통합분석(integration analysis)을 통하여 각 유전자의 프로모터 부위에 존재하는 CpG의 메틸레이션의 변화가 유전자 발현에 영향을 주었다고 추정되는 유전자들을 선별하였다 (도 5).

[0109] 또한, mRNA 발현 및 CpG 메틸레이션 자료를 통합한 결과, 전이군에서 프로모터 CpG 의 저메틸화(hypomethylation)에 의해서 유전자 발현이 증가한 유전자 153개를 선정하였고, 프로모터 CpG 의 과메틸화(hypermethylation)에 의해서 유전자 발현이 감소한 유전자 77개를 선정하였다.

[0110] **5. 프로모터 CpG 메틸레이션 변화를 이용한 난소암 전이 진단 마커 선정**

[0111] 통합 분석 (integration analysis)을 통하여 각 유전자의 프로모터 부위에 존재하는 CpG의 메틸레이션의 변화가 유전자 발현에 영향을 주었다고 추정되는 유전자들을 선별한 후, 이들 유전자들 중 암 전이와 관련하여 유전자의 기능이 보고된 유전자들을 2차 선별하였으며, 이들 유전자들의 발현 변화를 Quantitative real-time PCR을 이용하여 검증하여 유의한 차이를 보이는 전이 특이적 분자 표적 후보 유전자를 선정하였다. 또한, 원발 세포주 SK-OV-3에 탈 DNA 메틸레이션 제제인 5-aza-2'-deoxycytidin을 처리하여, 이들 유전자들 중 DNA 메틸레이션에 의해 유전자 발현이 조절되는 것으로 확인된 5종의 유전자 (AGR2, CA9, GABRP, IFITM1, MUC13)를, 프로모터 CpG 메틸레이션 변화를 이용한 난소암 전이 진단 마커로 최종 선정하였다.

표 3

[0112]

유전자명	GenBank No.	발현 logFC (fold change)	발현 P값	β 차이	β P 값
AGR2	NM_006408	4.52	2.33E-05	-0.58	5.57E-07
CA9	NM_001216	2.96	6.64E-05	-0.57	9.06E-09
GABRP	NM_014211	2.84	2.45E-05	-0.66	4.30E-10
IFITM1	NM_003641	2.36	4.37E-07	-0.36	2.56E-06
MUC13	NM_033049	2.65	0.00373788	-0.39	2.66E-06

[0113]

[0114] **6. 전이성 난소암 동물모델의 종양조직에서 선별된 유전자의 프로모터 CpG 메틸레이션의 변화와 유전자 발현의 변화**

[0115] 전이성 난소암 동물모델의 종양조직에서 5종의 유전자 (AGR2, CA9, GABRP, IFITM1, MUC13) 모두의 발현이 증가되어 있는 것을 발현 마이크로어레이의 결과를 통해 확인할 수 있었으며 qRT-PCR로 검증한 결과도 유사한 발현 경향을 확인할 수 있었다 (도 6 내지 도 10).

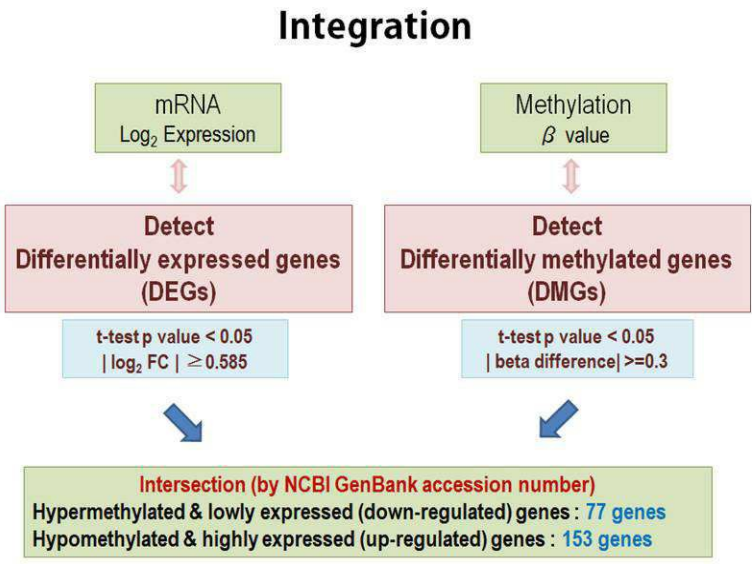
[0116] 또한, DNA 메틸레이션 마이크로어레이 분석결과, AGR2 유전자의 경우 프로모터에 존재하는 특정 CpG 부위(ch7: 16844546-16844667)의 DNA 메틸레이션이 현저히 낮아져 있었다. CA9 유전자 경우 프로모터에 존재하는 특정 CpG 부위(ch9: 35673849-35673970)가, GABRP 유전자의 경우 프로모터에 존재하는 특정 CpG 부위 (ch5: 170209700-170209821 및 ch5: 170209521-170209642)가, IFITM1 유전자의 경우 프로모터에 존재하는 특정 CpG 부위 (ch11: 313984-314105)가, 그리고 MUC13 유전자의 경우 프로모터에 존재하는 특정 CpG 부위 (ch3: 124653658-124653779 및 ch3: 124653599-124653720)가, 특이적으로 저메틸화되어 있는 것을 확인할 수 있었다 (도 11 내지 도 15).

[0117] 또한, 원발 세포주 SK-OV-3에 탈 DNA 메틸레이션 제제인 5-aza-2'-deoxycytidin을 3일간 처리한 후 5종의 유전자 (AGR2, CA9, GABRP, IFITM1, MUC13) 발현의 변화를 조사한 결과, DNA 메틸레이션이 줄어들면 상기 유전자들의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 상기 5종 유전자의 발현이 DNA 메틸레이션에 의해 조절되는 것을 의미한다 (도 16 내지 도 20).

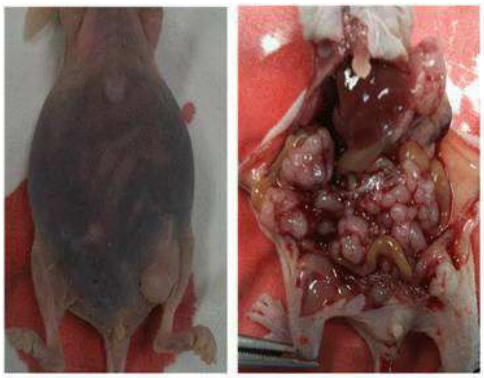
[0118] 이러한 실험 결과들은, 난소암 전이 모델에서 나타나는 5종의 유전자 (AGR2, CA9, GABRP, IFITM1, MUC13)의 급격한 증가가 각 유전자의 프로모터 부위의 특정 CpG 부위의 저메틸화에 의해서 조절되며 난소암 전이모델에서 특이적으로 나타나는 현상임을 보여준다.

도면

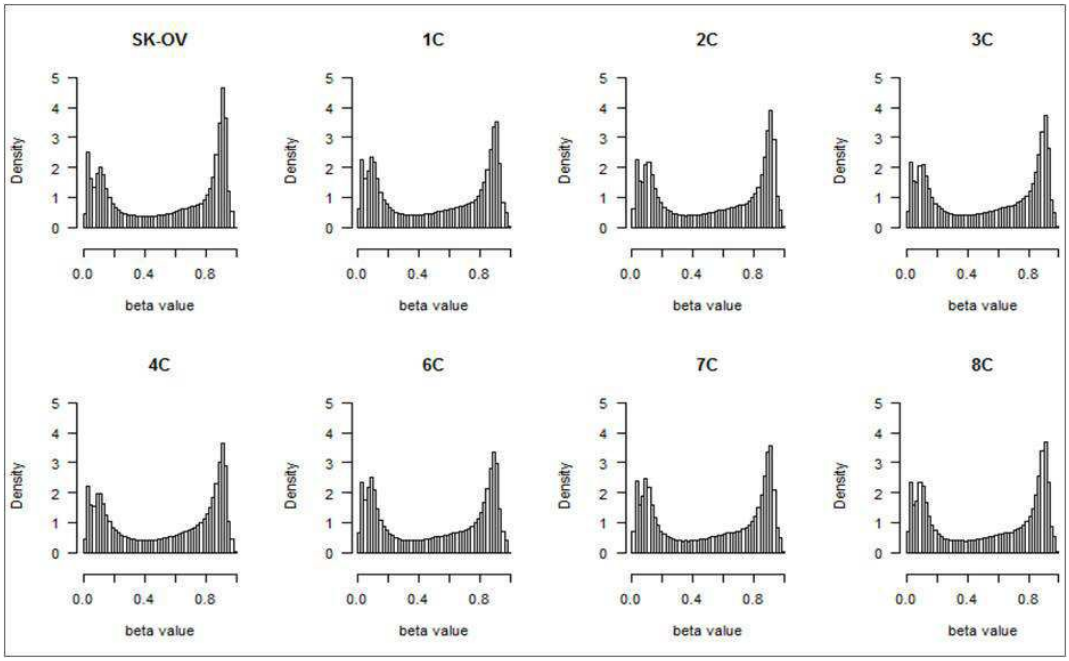
도면1



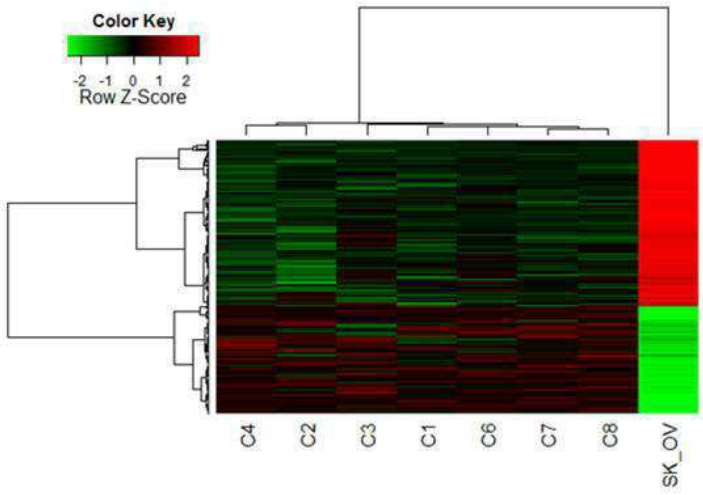
도면2



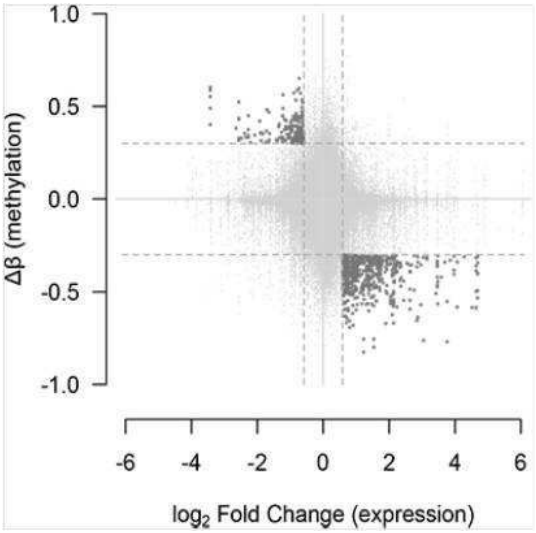
도면3


SK-OV
1C
2C
3C
4C
6C
7C
8C
Density
beta value
0.0
0.4
0.8
0
1
2
3
4
5

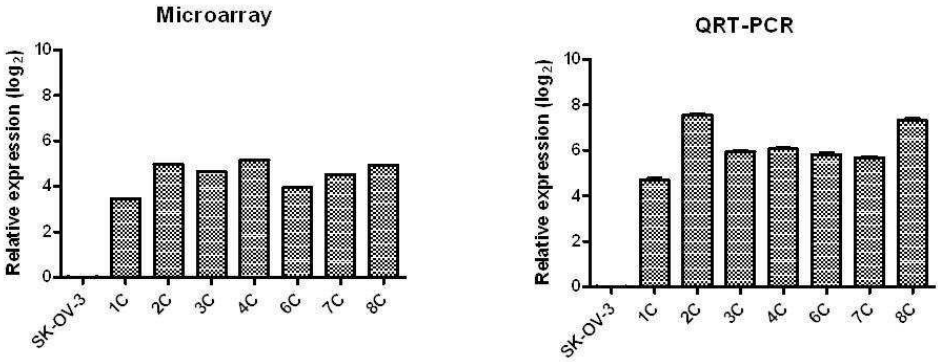
도면4


Color Key
-2 -1 0 1 2
Row Z-Score
C4
C2
C3
C1
C6
C7
C8
SK_OV

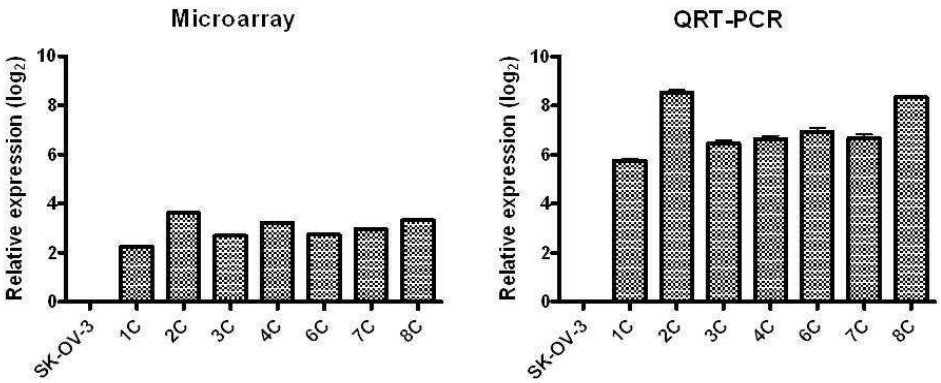
도면5


1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
Δβ (methylation)
-6
-4
-2
0
2
4
6
log2 Fold Change (expression)

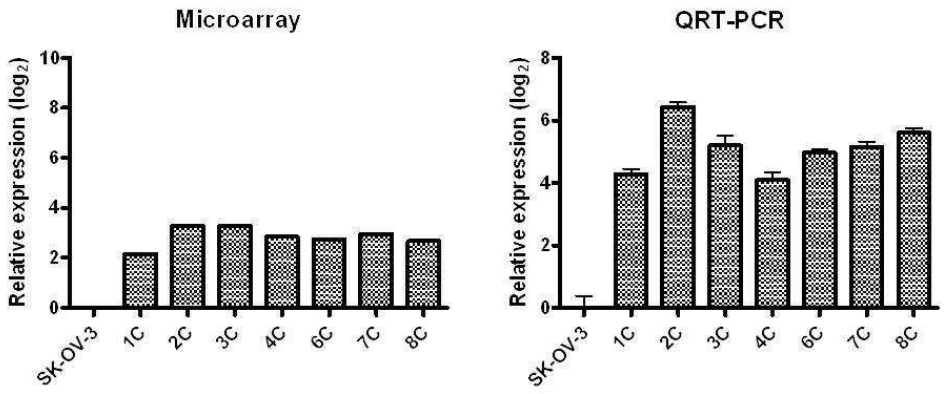
도면6


Microarray
Relative expression (log2)
SK-OV-3
1C
2C
3C
4C
6C
7C
8C
QRT-PCR
Relative expression (log2)
SK-OV-3
1C
2C
3C
4C
6C
7C
8C

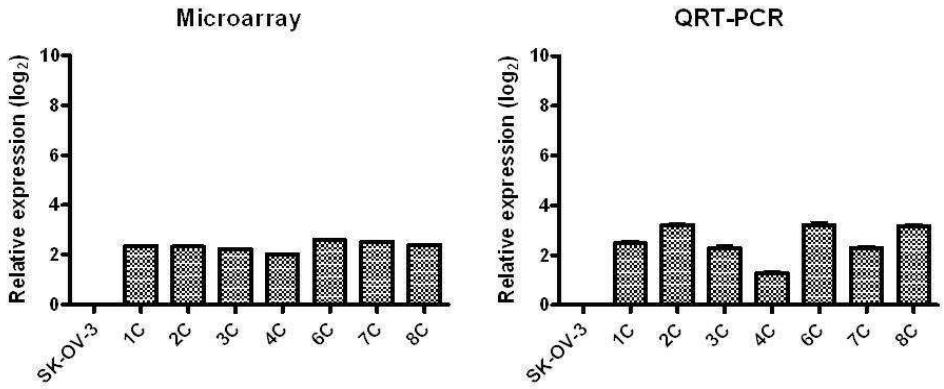
도면7


Microarray
Relative expression (log2)
SK-OV-3
1C
2C
3C
4C
6C
7C
8C
QRT-PCR
Relative expression (log2)
SK-OV-3
1C
2C
3C
4C
6C
7C
8C

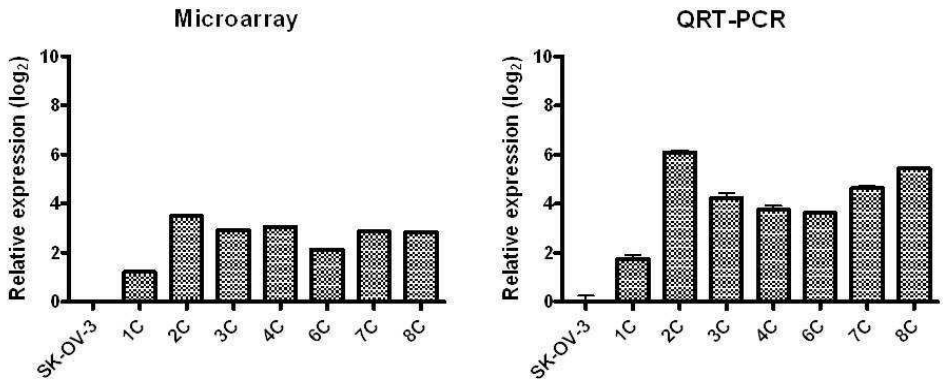
도면8


Microarray
QRT-PCR
Relative expression (log2)
SK-OV-3
1C
2C
3C
4C
6C
7C
8C

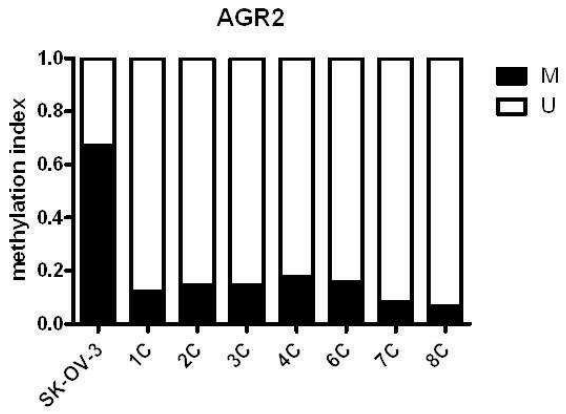
도면9


Microarray
QRT-PCR
Relative expression (log2)
SK-OV-3
1C
2C
3C
4C
6C
7C
8C

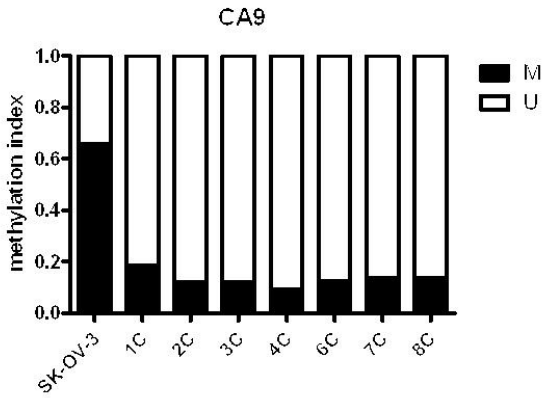
도면10


Microarray
QRT-PCR
Relative expression (log2)
SK-OV-3
1C
2C
3C
4C
6C
7C
8C

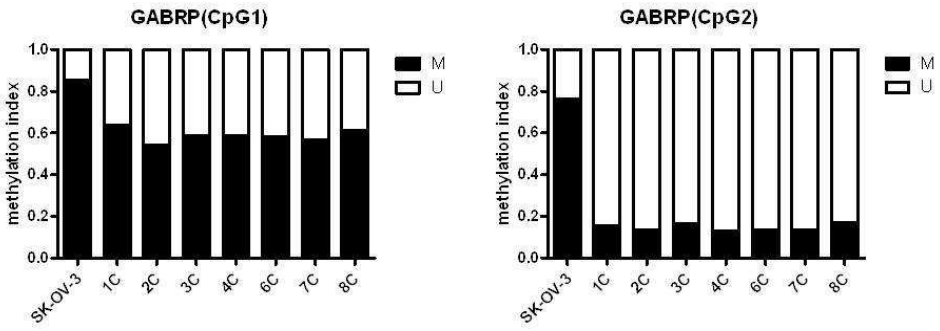
도면11



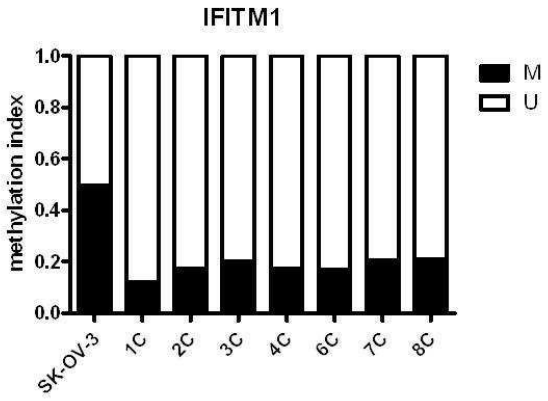
도면12



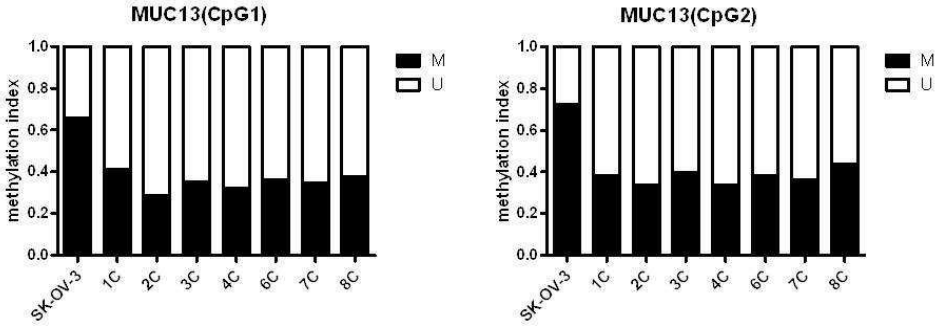
도면13



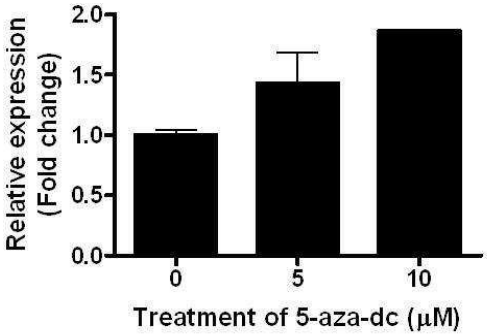
도면14



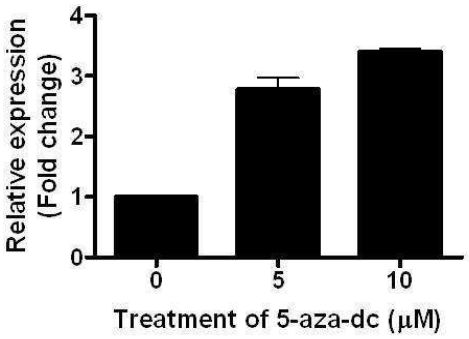
도면15



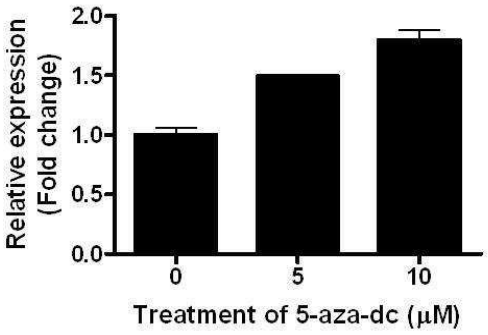
도면16



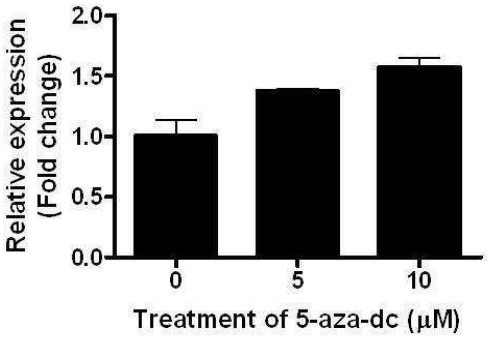
도면17



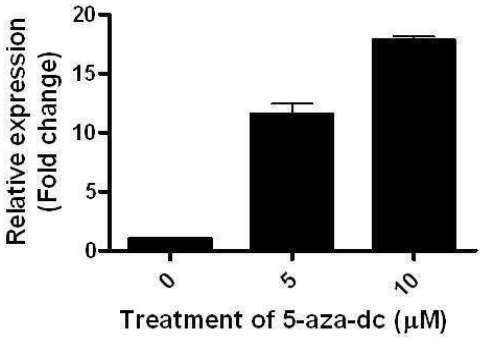
도면18



도면19



도면20



서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부