



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0066921
(43) 공개일자 2020년06월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2018.05)
G01N 33/53 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2018-0153659
(22) 출원일자 2018년12월03일
심사청구일자 2018년12월03일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
이승현
서울특별시 송파구 올림픽로 119, 132동 801호(잠실동, 엘스아파트)
공문규
서울특별시 성북구 오패산로16가길 40, 111동 1304호(하월곡동, 꿈의숲푸르지오아파트)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 11 항

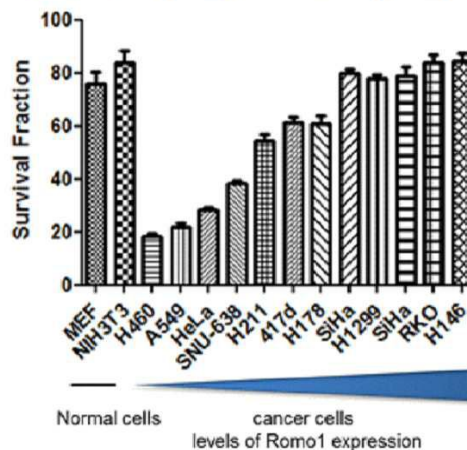
(54) 발명의 명칭 ROMO1를 측정하는 제제를 포함하는 방사선 저항성 또는 감수성 예측용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 ROMO1를 측정하는 제제를 포함하는 방사선 저항성 또는 감수성 예측용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 ROMO1를 측정하는 제제를 포함하는 방사선 저항성 또는 감수성 예측용 조성물을 이용 시, 방사선을 조사한 다양한 암세포의 Romo1 발현을 분석한 결과 ROMO1 발현이 높은 암세포에서 방사선 저항성이 나타남을 확인하였다. 또한, 방사선 치료를 받은 폐암 환자의 ROMO1 발현을 분석한 결과, 특정 컷-오프값으로 분류된 ROMO1 단백질 고 발현군에서는 재발이 많고, 생존기간이 유의하게 단축됨을 확인하여, Romo1 발현은 항암 방사선 치료에 대한 암세포의 감수성 및 저항성 예측할 수 있는 효과가 있어, 관련 산업에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도2

Survival fractions by MTT in 4 Gy irradiation



(52) CPC특허분류

G01N 33/6893 (2013.01)

C12Q 2600/106 (2013.01)

C12Q 2600/136 (2013.01)

G01N 2500/00 (2013.01)

G01N 2800/52 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

ROM1(Reactive Oxygen Species Modulator 1) 유전자 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 암세포의 방사선 저항성 또는 감수성 예측용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 암은 폐암, 대장암, 자궁경부암, 직장암, 결장암, 유방암, 자궁내막암, 나팔관암종, 난소암, 질암종, 음문암종, 간암, 위암, 식도암, 소장암, 췌장암, 담낭암, 신장암, 방광암, 요도암, 음경암, 전립선암, 고환암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 비소세포성폐암, 골암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구 내 흑색종, 호지킨병, 내분비선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 혈액암, 중추신경계종양, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 유전자 수준을 측정하는 제제는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 암세포의 방사선 저항성 또는 감수성은 컷-오프(cut-off)값이 200인 것인, 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 유전자의 발현 수준의 측정은 역전사 중합효소연쇄반응, 경쟁적 중합효소 연쇄반응, 실시간 중합효소 연쇄반응, Nuclease 보호 분석(RNase, S1 nuclease assay), in situ 교잡법, DNA 마이크로어레이 이용법, 노던 블롯, 웨스턴 블롯, ELISA(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), 방사선 면역분석법, 면역확산법, 면역 전기영동, 조직 면역염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS, 질량분석법(Mass spectrometry) 및 단백질 마이크로어레이 이용법으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 수행되는 것인 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 단백질 발현 수준의 측정은 웨스턴 블롯, 엘라이자(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선 면역분석(Radioimmunoassay, RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 조성물.

청구항 8

제1항의 암세포의 방사선 저항성 또는 감수성 예측용 조성물을 포함하는 암세포의 방사선 저항성 또는 감수성 진단용 키트.

청구항 9

생물학적 시료로부터 ROM1 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

상기 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 정상 대조군 시료로부터의 상기 단백질 또는 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 암세포의 방사선 저항성 또는 감수성을 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 시료는 방사선 치료를 받은 암 환자로부터 분리된 조직, 전혈, 혈청 및 혈장으로 이루어진 군에서 선택된 것인, 방법.

청구항 11

암 환자로부터 분리된 시료에 후보 약물을 처리하는 단계; 및

상기 후보 약물이 처리된 시료에서 ROMO1의 유전자 또는 단백질 발현의 억제 또는 발현 정도를 분석하는 단계를 포함하는, 암세포의 방사선 저항성 또는 감수성 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 ROMO1를 측정하는 제제를 포함하는 방사선 저항성 또는 감수성 예측용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] ROMO1은 2006년에 처음 보고된 단백질로서 항암제 내성 관련 유전자를 탐색 중에 확인되었다. ROMO1 유전자는 미토콘드리아에 위치하며 발현이 증가할 경우 세포 내 활성산소를 증가시키는 것으로 알려져 있다(Chung YM et al., Biochem Biophys Res Commun., 347:649-55, 2006). 그러나 ROMO1 발현에 의한 세포 내 활성산소 증가는 NADPH oxidase, xanthine oxidase, cyclooxygenases 또는 lipoxigenases 등의 효소와 다른 방식으로 이루어지는 것으로 보인다. ROMO1은 미토콘드리아 막에 위치하며 8.9 kDa의 분자량을 가진 transmembrane 단백질이기 때문에 효소보다는 막에 위치하는 통로(channel)로서 작용을 하여 미토콘드리아에서 발생하는 활성산소를 세포질로 수송하는 역할을 갖고 있을 것으로 추정된다(Kim JJ et al., Cell Death Differ., 17:1420-34, 2011; Bae YS et al., Mol Cells., 32:491-509, 2011).

[0003] 폐암은 조직형에 따라 크게 소세포 폐암(small cell lung cancer)과 비소세포 폐암(non-small cell lung cancer)로 구분하는데, 소세포암의 경우 병의 진행 속도가 매우 빠르지만 항암요법이나 방사선요법에 잘 반응하는 특징이 있어 비소세포암과 치료 방법이 완전히 다른 특징을 가진다. 따라서 폐암은 조직학적 진단, 즉 조직검사의 결과가 치료방침을 결정하는 데 아주 중요하지만, 진행된 폐암이더라도 증상이 없는 경우가 흔하고 증상이 미약하더라도 이미 진행된 경우가 많아 실제 폐암 환자의 약 5~15%는 무증상일 때 폐암으로 진단을 받는 것으로 알려져 있다.

[0004] 현재 암 환자 중 국내 35%, 미국의 경우 50% 정도가 방사선 치료를 받고 있으며, 국내에서도 방사선 치료를 받는 암 환자의 비중이 꾸준히 증가하고 있고, 암 치료에 있어 방사선 치료의 중요성 또한 증가하고 있다. 이와 같이 방사선 치료는 현재 다양한 종류의 암에 필수적인 치료방법으로 알려져 있으나 암세포의 방사선 저항성, 저산소증 세포의 존재는 종래 암 방사선치료에서 국부적 실패를 일으키는 중요한 인자이다(Int. J. Radiation oncology Biol. Phys., 1988, 14, 831-833). 또한, 이러한 방사선 항암 치료의 실패에 따라 방사선량을 증가시킨 고선량 방사선 조사 치료 시 인체정상조직의 파괴 등 방사선 치료의 부작용이 나타나는 문제점이 대두되었다. 따라서, 방사선 치료 시 그 효율성을 증대시킬 수 있는 방사선 치료 증진제 및 방사선 증감성 화합물에 관한 연구들이 계속 진행되고 있다(Oncogene, 2004, 23, 1599-1607; Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., 2006, 64(5), 1466-1474; Clin. Cancer Res, 2007, 13(16), 4891-4899).

[0005] 이에 본 발명자들은 방사선을 조사한 다양한 암세포의 Romo1 발현을 분석한 결과 ROMO1 발현이 높은 암세포에서 방사선 저항성이 나타남을 확인하였다. 또한, 방사선 치료를 받은 폐암 환자의 ROMO1 발현을 분석한 결과, 특정 컷-오프값으로 분류된 ROMO1 단백질 고 발현군에서는 재발이 많고, 생존기간이 유의하게 단축됨을 확인하여, Romo1 발현은 항암 방사선 치료에 대한 암세포의 감수성 및 저항성 예측할 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 목적은 암세포의 방사선 저항성 또는 감수성 예측용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0007] 또한 본 발명의 목적은 암세포의 방사선 저항성 또는 감수성 진단용 키트를 제공할 수 있다.
- [0008] 또한 본 발명의 목적은 암세포의 방사선 저항성 또는 감수성을 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공할 수 있다.
- [0009] 또한 본 발명의 목적은 암세포의 방사선 저항성 또는 감수성 치료제 스크리닝 방법을 제공할 수 있다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적의 달성을 위해, 본 발명은 ROMO1(Reactive Oxygen Species Modulator 1) 유전자 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 암세포의 방사선 저항성 또는 감수성 예측용 조성물을 제공한다.
- [0011] 또한 본 발명은 상기 암세포의 방사선 저항성 또는 감수성 예측용 조성물을 포함하는 암세포의 방사선 저항성 또는 감수성 진단용 키트를 제공한다.
- [0012] 또한 본 발명은 생물학적 시료로부터 ROMO1 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 정상 대조군 시료로부터의 상기 단백질 또는 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 암세포의 방사선 저항성 또는 감수성을 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0013] 또한 본 발명은 암 환자로부터 분리된 시료에 후보 약물을 처리하는 단계; 및 상기 후보 약물이 처리된 시료에서 ROMO1의 유전자 또는 단백질 발현의 억제 또는 발현 정도를 분석하는 단계를 포함하는, 암세포의 방사선 저항성 또는 감수성 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명의 ROMO1를 측정하는 제제를 포함하는 방사선 저항성 또는 감수성 예측용 조성물을 이용 시, 방사선을 조사한 다양한 암세포의 Romo1 발현을 분석한 결과 ROMO1 발현이 높은 암세포에서 방사선 저항성이 나타남을 확인하였다. 또한, 방사선 치료를 받은 폐암 환자의 ROMO1 발현을 분석한 결과, 특정 컷-오프값으로 분류된 ROMO1 단백질 고 발현군에서는 재발이 많고, 생존기간이 유의하게 단축됨을 확인하여, Romo1 발현은 항암 방사선 치료에 대한 암세포의 감수성 및 저항성 예측할 수 있는 효과가 있어, 관련 산업에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 종양 조직 절편에서 Romo1에 대한 면역 조직 화학 염색 강도를 나타낸 도이다(x200). ((A) 얼룩이 없음, (B) 약한 염색 (C) 보통 염색 (D) 강한 염색).
- 도 2는 방사선을 조사한 다양한 암세포주에서 Romo1 발현 정도를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 낮은 Romo1 발현군 및 높은 Romo1 발현군에서의 전체 생존율(overall survival) 곡선을 나타낸 도이다.
- 도 4는 국소 재발 없는 생존율(loco-regional recurrence-free survival)에 대한 Romo1 단백질 저 발현군 및 고 발현군에서의 생존 곡선을 나타낸 도이다.
- 도 5는 발병 무 진행 생존율(disease progression-free survival)에 대한 Romo1 단백질 저 발현군 및 고 발현군에서의 생존 곡선을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 상기 목적의 달성을 위해, 본 발명은 ROMO1(Reactive Oxygen Species Modulator 1) 유전자 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 암세포의 방사선 저항성 또는 감수성 예측용 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명에서 용어 "저항성"은 방사선 조사에 의해 쉽게 영향을 받지 않으며, 방사선에 노출시 세포 복구 또는 증식에 거의 변화가 없는 상태를 말한다.
- [0018] 본 발명에서 용어 "감수성"은 방사선 조사에 의해 쉽게 영향을 받으며, 방사선에 노출시 세포 복구 또는 증식에

변화를 보이는 상태를 말한다.

- [0019] 본 발명의 방사선 저항성 또는 감수성 예측용 조성물은 정상 암세포 대비 방사선 저항성 암세포에서 차등적 발현 수준을 갖는 유전자로 구성되어, 개체나 세포의 방사선 저항성을 판단할 수 있게 한다. 즉, 본 발명의 조성물에서 ROMO1 유전자 또는 단백질의 발현 수준이 대조군보다 높거나 낮은 개체나 암세포는 방사선 감수성 또는 저항성을 갖는 것으로 판단할 수 있다.
- [0020] 본 발명에서 용어 "암세포"는 다세포 생물의 조직 또는 기관에서 조절되지 않은 성장을 나타내는 임의의 세포를 의미한다.
- [0021] 본 발명의 조성물은 암 환자, 바람직하게는 폐암 환자, 더욱 바람직하게는 비소세포폐암의 방사선 치료에 대한 반응성을 예측하는 것을 특징으로 한다. 감수성이 있는 개체나 암세포에서 ROMO1의 유전자 또는 단백질 발현 수준은 대조군 암세포에서의 ROMO1의 유전자 또는 단백질 발현 수준에 비해서 낮으며, 반대로 방사선 치료 저항성이 있는 개체나 암세포에서 ROMO1의 유전자 또는 단백질 발현 수준은 대조군 암세포에서의 ROMO1의 유전자 또는 단백질 발현 수준에 비해서 높다.
- [0022] 또한, 방사선 치료를 수행한 암 환자로부터 분리한 시료에 면역 조직 화학 염색법(Immunohistochemical)을 수행하여 조직학적 지수(H score)를 본 발명의 수학적 식 1을 이용하여 도출한 값에 대한 컷-오프 (cut-off)값은 200임을 확인하였다. 따라서, 조직학적 지수(H score)값이 200 미만이면 ROMO1 단백질 저 발현군으로서 방사선 치료에 대한 감수성을 가진 것으로 판단한다. 또한, 조직학적 지수(H score)값이 200 이상이면 ROMO1 단백질 고 발현군으로서 방사선 치료에 대한 저항성을 가진 것으로 판단한다.
- [0023] 방사선 치료에 대한 반응성을 예측한다면, 예측 결과에 따라 방사선 치료의 실시 여부, 또는 방사선치료시의 방사선 조사량을 결정할 수 있으므로, 방사선 치료의 효과를 향상시킬 수 있다.
- [0024] 상기 암은 폐암, 대장암, 자궁경부암, 직장암, 결장암, 유방암, 자궁내막암, 나팔관암종, 난소암, 질암종, 음문암종, 간암, 위암, 식도암, 소장암, 췌장암, 담낭암, 신장암, 방광암, 요도암, 음경암, 전립선암, 고환암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 비소세포성폐암, 골암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구 내 흑색종, 호지킨병, 내분비선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 혈액암, 중추신경계 종양, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이고, 바람직하게는 폐암이며, 더욱 바람직하게는 비소세포폐암이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 폐암의 종류는 암세포의 크기와 형태를 기준으로 비소세포폐암과 소세포 폐암으로 구분할 수 있다. 본 발명에서 용어, 비소세포폐암(non small cell lung cancer)은 폐암의 80~85%를 차지하고, 비소세포폐암은 다시 편평상피세포암 (Squamous cell carcinoma), 선암(Adenocarcinoma), 대세포암(large-cell carcinoma), 선(腺)편평세포암(Adenosquamous Carcinoma), 육종양암(Sarcomatoid Carcinoma), 카르시노이드 종양(Carcinoid Tumor), 타액선 암종(carcinomas of salivary gland type), 미분류암(Unclassified carcinoma) 으로 분류할 수 있다.
- [0026] 상기 비소세포폐암은 TNM법으로 1-4기까지 병기(stage)를 정하며, 암의 크기, 림프절 전이 유무, 다른 장기로의 전이 여부를 판단하게 된다. 1기는 암이 폐에만 존재하며, 림프절로는 전이되지 않은 상태이며, 1A기는 종양의 크기가 3cm 이하, 1B기는 종양의 크기가 3cm 초과일때 이다. 2기는 암이 폐에 국한되어 있으며 근처 림프절이나 폐문부 림프절까지 전이된 상태 또는 흉벽, 횡격막, 종격동, 흉막, 심낭막 등으로 진행된 상태이다. 2A기는 종양의 크기가 3cm 이하이며, 근처 또는 폐문부 림프절 전이가 있는 경우이고, 2B기는 종양의 크기가 3cm 초과되고, 림프절 전이 없이 흉벽, 횡격막, 종격동, 흉막, 심낭막 등을 침범하거나 기관지 내부로 많이 자라 올라온 경우에 진단된다. 3기는 암이 폐에 국한되어 있으며 종격동 림프절까지 전이가 있거나, 악성흉수, 큰 혈관, 기관, 식도 등을 침범한 경우이다. 3A기는 같은 족 종격동 림프절까지 전이가 있거나 흉벽, 횡격막, 종격동, 흉막, 심낭막 등에 침범이 있고, 근처 림프절에만 전이가 있는 경우이고, 3B기는 반대쪽 종격동 림프절까지 전이되었거나 악성 흉수, 큰 혈관, 기관, 식도 등을 침범한 경우에 진단된다. 4기는 다른 장기로 전이된 상태(반대편 폐, 뇌, 뼈, 간, 부신, 골수 등)에 진단되며, 본 발명의 목적 상, 바람직하게는 3기에 대한 방사선 저항성 또는 감수성을 예측할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 폐암은 유방암, 두경부암, 췌장암, 자궁경부암, 림프종, 전립선암 등과 함께 방사선치료가 빈번하게 수행되는 암이다. 방사선치료는 유방암, 자궁경부암, 전립선암 등 호르몬과 연관된 암의 치료에 사용되는 경우가 많다. 현재 호르몬과 연관된 암에서 방사선치료에 대한 저항성 또는 감수성을 예측할 수 있는 바이오마커에 대하여는 보고된 바가 있으나, 폐암에서 방사선치료에 대한 저항성 또는 감수성을 예측할 수 있는 바이오 마커는 보고된 바가 없다. 따라서 본 발명은 폐암에 대한 방사선치료의 저항성 또는 감수성을 예측할 수 있는 마커를 최초로

발견한 것이다.

- [0028] 본 발명에서 용어 "마커(marker) 또는 바이오마커(biomarker)"는 암 세포 또는 암 질환을 가진 개체를 방사선 치료 반응성이 있거나 없는 것으로 구분하여 예측할 수 있는 물질로, 정상 암세포에 비하여 사전치료에 반응성을 나타내는 암세포 또는 개체에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산 (예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질 또는 당 (예: 당당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자들을 포함한다.
- [0029] 본 발명에서 용어 "유전자의 수준 측정"은 방사선치료에 대한 저항성 또는 감수성을 예측하기 위하여 생물학적 시료에서 마커 유전자들의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 바람직하게는 mRNA의 양을 측정하는 것을 지칭한다. 이를 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명에서 용어 "단백질의 수준 측정"은 방사선치료에 대한 저항성 또는 감수성을 예측하기 위하여 생물학적 시료에서 마커 유전자로부터 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정을 지칭하는 것으로, 바람직하게는, 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블롯, 엘라이자(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선면역분석(Radioimmunoassay, RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명에서 상기 유전자들의 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있고, 상기 프라이머는 공지의 데이터 베이스에 공지된 상기 유전자의 서열을 바탕으로 당업자가 다양한 프로그램을 이용하여 제작할 수 있다.
- [0032] 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. 본 발명의 프라이머는, 각 마커 유전자 특이적인 프라이머로 7개 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 센스 및 안티센스 핵산이다. 프라이머는 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 본 발명의 프라이머는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다. 핵산은 하나 이상의 부가적인 공유 결합된 잔기, 예를 들면, 단백질(예: 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그날 펩타이드, 폴리-L-리신 등), 삽입체(예: 아크리딘, 프소랄렌 등), 킬레이트화제(예: 금속, 방사성 금속, 철, 산화성 금속 등) 및 알킬화제를 함유할 수 있다. 본 발명의 핵산 서열은 또한 검출 가능한 시그널을 직접적으로 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형시킬 수 있다. 표지의 예로는 방사성 동위원소, 형광성 분자, 비오틴 등이 있다.
- [0033] 본 발명에서 상기 유전자의 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 용어 "항체"는 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 항체를 생성하는 것은 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다. 다클론 항체는 상기한 수술전 방사선 치료 반응성 예측용 마커 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 제조 가능하다. 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method)(Kohler 및 Milstein (1976) European Journal of Immunology 6:511-519 참조), 또는 파지 항체 라이브러리(Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정

제할 수 있다.

- [0035] 또한 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [0036] 본 발명에서의 용어, "그레이(Gy)"는 대표적인 생물학 조직 1kg에서 1J을 방출하는 방사선의 양이다.
- [0038] 또한 본 발명은 상기 암세포의 방사선 저항성 또는 감수성 예측용 조성물을 포함하는 암세포의 방사선 저항성 또는 감수성 진단용 키트를 제공한다.
- [0039] 본 발명에서 용어 "키트"는 ROMO1 유전자의 발현 수준을 측정하기 위한 프라이머, 프로브 또는 선택적으로 마커를 인지하는 항체뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 1종 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액, 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [0041] 또한 본 발명은 생물학적 시료로부터 ROMO1 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 정상 대조군 시료로부터의 상기 단백질 또는 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 암세포의 방사선 저항성 또는 감수성을 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0042] 생물학적 시료의 ROMO1의 유전자 또는 단백질 발현 수준이 대조군 암세포에서의 ROMO1의 유전자 또는 단백질 발현 수준에 비해서 낮으면 감수성인 것으로 예측한다. 반대로, 생물학적 시료의 ROMO1의 유전자 또는 단백질 발현 수준이 대조군 암세포에서의 ROMO1의 유전자 또는 단백질 발현 수준에 비해서 높으면 저항성인 것으로 예측한다.
- [0043] 또한, 방사선 치료를 수행한 암 환자로부터 분리한 시료에 면역 조직 화학 염색법(Immunohistochemical)을 수행하여 조직학적 지수(H score)를 본 발명의 수식식 1을 이용하여 도출한 값에 대한 컷-오프 (cut-off)값은 200임을 확인하였다. 따라서, 조직학적 지수(H score)값이 200 미만이면 ROMO1 단백질 저 발현군으로서 방사선 치료에 대한 감수성을 가진 것으로 판단한다. 또한, 조직학적 지수(H score)값이 200 이상이면 ROMO1 단백질 고 발현군으로서 방사선 치료에 대한 저항성을 가진 것으로 판단한다.
- [0045] 또한 본 발명은 방사선 저항성 또는 감수성이 의심되는 암 환자로부터 분리된 시료에 후보 약물을 처리하는 단계; 및 상기 후보 약물이 처리된 시료에서 ROMO1의 유전자 또는 단백질 발현의 억제 또는 발현 정도를 분석하는 단계를 포함하는, 암세포의 방사선 저항성 또는 감수성 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0047] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.
- [0049] <준비에 1> 암세포주 준비
- [0050] 정상세포주(MEF, NIH3T3), 폐암 세포(H1299, H460, A549, H211, H146), 자궁경부암 세포(SiHa, HeLa), 위암 세포(SNU-638), 대장암 세포(RKO), 소세포암(h178, 417d)을 준비하였다.
- [0051] 본 발명에서 사용한 위암세포주(SNU-638)와 간암세포주(SNU-739)는 한국세포주 은행으로부터 구입하였고 나머지 세포주는 미국 세포주 은행 (ATCC)에서 구입하였다. RKO, Hep3B 세포주는 10% 태아송아지 혈청, 페니실린 100 units/ml 및 스트렙토마이신 100 µg/ml을 함유하는 EMEM 배양 배지(GIBCO/BRL, Grand Island, NY)에서 배양하였고, H1299, H460, SNU-638 세포주는 10% 태아송아지 혈청, 페니실린 100 units/ml 및 스트렙토마이신 100 µg/ml을 함유하는 RPMI 배양 배지(GIBCO/BRL, Grand Island, NY)에서 배양하였다. SiHa, HeLa 세포주는 10% 태아송아지 혈청, 페니실린 100 units/ml, 및 스트렙토마이신 100 µg/ml을 함유하는 DMEM 배양 배지(GIBCO/BRL, Grand Island, NY)에서 배양하였다. A549 세포주는 10% 태아송아지 혈청, 페니실린 100 units/ml, 및 스트렙토마이신 100 µg/ml을 함유하는 F-12배양 배지(GIBCO/BRL, Grand Island, NY)에서 배양하였다.

[0053] <준비에 2> 환자 시료 준비, Romo 1 단백질 발현 측정 방법 및 방사선 치료 방법

[0054] 2-1. 환자 시료 준비

[0055] 환자의 선정기준(inclusion criteria)은 조직학적으로 확정된 3기의 비소 세포 폐암(stage III non-small cell cancer), 항암 화학 요법의 유무에 따른 방사선 치료(radiation treatment, RT) 효과, ECOG(Eastern Cooperative Oncology Group) 기능 상태 지수=2, 이용 가능한 암 조직 표본, 흉곽 방사선 치료(RT) 이력이 없음, 치료 완료를 저해할 이전 병력 또는 현재의 병이 없음과 관련된 데이터로 선별하였다. 수술 후 또는 일시적인 방사선 치료(RT)를 받은 환자는 제외하였으며, 면역 조직 화학 염색에 적합하지 않은 조직 표본은 제외하여, 최종적으로 49명의 환자의 시료를 포함하였다. 초기 진단은 조직학적으로 내시경 기관지 또는 경피 바늘 생검 중 하나를 기반으로 모든 환자에서 수행되었다.

[0056] 전처리 평가는 완치 이력 및 신체 검사(complete history and physical examination), 기초 실험 연구(basic laboratory studies), 폐 기능 검사(pulmonary function test), 심전도(electrocardiogram), 경-흉부 심장 초음파상(trans-thoracic echocardiogram), 흉부 방사선 촬영(chest radiography), 흉부 컴퓨터 단층 촬영 스캔(chest computed tomography (CT) scan), 뇌 자기 공명 영상(brain magnetic resonance imaging) 및 양전자 방출 단층 촬영(positron emission tomography)하여 평가하였다.

[0058] 2-2. Romo 1 단백질 발현 측정

[0059] Romo1 단백질의 발현 측정은 포르말린-고정된 파라핀-포함 암 조직을 표본으로 사용하였고 면역 조직 화학 염색법(Immunohistochemical)을 이용하였다. 구체적으로, Bond Polymer Refine Detection System (LeicaBiosystems, Newcastle, United Kingdom)을 이용하여 제조 업체의 매뉴얼에 따라, 4 μ m의 조직 섹션으로 수행하였다. H&E(haematoxylin-eosin)으로 염색된 슬라이드에서 1 차 평가에 의해 선택된 대표적인 파라핀 블록으로 면역 조직 화학법을 수행하였다.

[0060] 포르말린-고정된 파라핀-포함된 조직의 4 μ m 섹션 샘플을 Bond Dewax Solution (LeicaBiosystems)로 탈파라핀화(deparaffinized)하고, 항원 회복을 위해 Bond Epitope Retrieval Solution 1 (LeicaBiosystems)을 이용하여 20분간, 100도로 수행하였다. 내인성 과산화효소(Endogenous peroxidase)를 과산화수소로 15분 동안 배양하여 억제하였다. 섹션 샘플은 비오틴 제거 중합 HRP(horseradish peroxidase)로 표지된 Romo1 (1:200; OTI2C12, OriGene, Rockville, MD, USA)에 대한 1차 마우스 단일클로날 항체를 이용하여 Bond-max automatic slide stainer (LeicaBiosystems)에 15분 동안 주위 온도(ambient temperature)로 배양하였다. 결합된 퍼옥시다제는 발색체로서 다이아미노벤지딘(diaminobenzidine)의 용액을 이용하여 가시화하였고, 핵은 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하였다. 대장 선암과 정상 유방 조직은 외부 양성 대조군으로 이용하였고, 종양 주위의 내피 세포를 내부 양성 대조군으로 이용하였다. 세포질 염색은 Romo1에 대한 양성 대조군으로서 염색하였다. 염색 강도는 0에 나타난 바와 같이, 200x의 광학 현미경 하에, 0은 염색되지 않음; 1은 약한 강도; 2는 중간 강도; 3은 강한 강도의 염색으로 평가하였다. 양성(0-100%)의 정량화는 각각의 강도를 갖는 종양 세포의 퍼센트를 기초로 하였다. 최종 조직학적 지수(H score)는 다음 수학적식을 따라서 확인하였으며, H score의 범위는 0 내지 300이다.

[0061] [수학식 1]

[0062]
$$H \text{ score} = (\text{염색이 없는 종양 세포의 비율} \times 0) + (\text{약한 강도의 종양 세포의 비율} \times 1) + (\text{중간 정도의 강도를 갖는 종양 세포의 비율} \times 2) + (\text{강한 강도} \times 3 \text{를 갖는 종양 세포의 비율}),$$

[0064] 2-3. 방사선 치료 및 통계방법

[0065] 모든 환자는 CT로 계획된 방사선 치료(RT)를 받았다. 흉부 CT와 PET로 시각화된 원발성 종양의 전체 범위와 관련된 림프절은 방사선 치료의 표적 병변이다. 선택적 결절 조사(elective nodal irradiation)는 수행하지 않았고, 치료를 위한 선량은 표적 병변의 크기, 환자의 일반적인 상태, 방사선 치료(RT)에 의한 독성 가능성을 고려하였다. 일일 1.8-2.5 Gy로, 주당 5회 조사하여, 총 57.5-70.4 Gy가 되도록 하였다. 상이한 방사선 치료(RT) 조사의 표준적인 비교를 위하여, α/β 비율이 10인 선형 2차 모델을 사용하여 생물학적으로 동등한 방사선 조사

량을 계산 하였다. 상기 방사선 치료는 환자 각각의 상태 및 순응도에 따라 개별화하였다. 1차 endpoint는 전체 생존율(overall survival)이고, 2차 endpoint는 국소 재발 없는 생존율(loco-regional recurrence-free survival), 원격 전이 없는 생존율(distant metastasis-free survival), 무 진행 생존율(disease progression-free survival)이다. 국소 재발은 동측 흉부(ipsilateral thorax), 동측 및/또는 반대측 폐문(contralateral hilum), 종격동(mediastinum) 및 쇄골 상부 림프절 부위에서 표적 병변의 크기 또는 새로운 병변이 나타날 때로 정의하였다. 원격 전이는 다른 영역에서의 종양 발생으로 정의하였다.

[0066] 그룹간의 기준치의 특성은 이산 변수(discrete variable)에 대한 Wilcoxon rank-sum test 및 연속 변수에 대한 Mann-Whitney U test를 이용하여 비교하였다. 또한, Actuarial survival rates는 Kaplan-Meier 방법을 이용하여 도출하였으며, 그룹간의 비교는 log-rank test를 이용하여 수행하였다. 생존 기간은 폐암 진단 날짜로부터 최종 방문 날짜 등으로 계산하였으며, 다변량 분석(Multivariate analysis)은 Cox의 비례 위험 회귀 검정과 역행렬을 사용하여 수행하였다. 모든 검사는 양면 검사였고 P < 0.05는 통계적으로 유의하다고 간주하였으며, 모든 분석은 SPSS 버전 21.0 (IBM corporation, Armonk, NY, USA)을 사용하여 수행하였다.

[0068] <실시예 1> 다양한 암세포주에 방사선 조사에 따른 세포 생존율 확인

[0069] 방사선 조사에 따른 Romo1 단백질의 발현 정도를 확인하기 위하여, 정상세포주(MEF, NIH3T3), 폐암 세포(H1299, H460, A549, H211, H146), 자궁경부암 세포(SiHa, HeLa), 위암 세포(SNU-638), 대장암 세포(RKO), 소세포 폐암(h178, 417d)를 준비하였다. 상기 정상세포 및 다양한 암세포주에 4Gy 방사선을 조사하고 24 시간 후, 세포 생존율의 차이를 확인하였다.

[0070] 도 2에 나타난 바와 같이, Romo1의 발현이 낮은 암 세포는 폐암 세포(H1299, H460, H211), 자궁경부암 세포(HeLa), 위암 세포(SNU-638), 소세포 폐암(417d, h178)임을 확인하였고, 세포 사멸이 유의하게 감소되고 방사선에 대한 감수성이 존재하여 방사선 치료 효과가 우수할 것으로 예측할 수 있음을 확인하였다.

[0071] 반면, 자궁경부암 세포(SiHa), 폐암 세포(A549, H146)에서는 Romo1의 발현이 높고 세포 사멸이 증가함을 확인함에 따라, 상기 암세포주는 방사선에 대한 저항성이 존재하여 방사선 치료 효과가 감수성과 비교하여 낮을 것으로 예측할 수 있음을 확인하였다.

[0072] 따라서, 암세포에 방사선을 조사함에 따라 Romo1의 발현에 차이가 존재하고, Romo1 발현이 높은 암세포에서 방사선 저항성이 있음을 확인하였다. 또한, 동일한 암에 대한 세포주라 할지라도, Romo1의 발현에 따라 방사선에 대한 저항성 정도는 다르게 확인되는 바, Romo1의 발현은 암의 방사선 치료에 대한 감수성 및 저항성 정도를 예측할 수 있는 마커로서 유용함을 확인하였다.

[0074] <실시예 2> 환자 및 종양에 따른 Romo1 단백질의 발현 확인

[0075] 환자의 특징 및 종양에 따른 Romo1 단백질의 발현 정도를 확인하기 위하여, Romo1 단백질의 발현에 대한 H-score 값을 도출하였고, 중앙값은 155 (range, 10-295)임을 확인하였다. 이에, Romo1 단백질에 대한 저 발현군 또는 고 발현군의 분리를 위한 H-score 값의 최적 컷-오프 값은, 모든 가능한 H-score 값에 대한 log-rank test에 의해 가장 낮은 P 값을 갖는 지점으로 도출하였으며, 최적 컷-오프 값은 200이다. 표 1에 나타난 바와 같이, 상기 컷-오프 값에 따라 35명의 환자가 Romo1 단백질에 대한 저 발현군으로 분리하고, 14명의 환자는 고 발현군으로 분리하였다. 18명의 환자가 파클리탁셀(paclitaxel) 및 카보플라틴(carboplatin) 요법인 항암화학요법(chemotherapy)을 받았다. 이 환자 중 4명은 추가적인 병합 화학요법을 받았으며, 6 명의 환자가 시스플라틴(cisplatin)과 에토포사이드(etoposide)의 요법으로 유도 화학 요법만을 받았다. 10 명의 환자는 치료와 관련된 독성으로 인해 일시적인 방사선 치료(RT) 중단을 경험했으며, 방사선 치료(RT)의 중단의 중간 기간은 5 일(범위, 4-17)이었다. 모든 환자의 추적 관찰 기간에 대한 중앙값은 21.0 개월(4-80)이었다. Romo1 단백질 저 발현 군과 고 발현군의 환자 및 종양 특징에는 유의한 차이가 없음을 확인하였다.

표 1

Characteristics	Romo1 expression		P-value
	Low (H-score ≤200) (n=35)	High (H-score >200) (n=14)	
Age (years)			
Median (range)	72.3 (49.2-85.1)	71.6 (60-79.8)	0.871

Gender Male/female	30/5	11/3	0.412
Histology SqCC/Adeno	25/10	8/6	0.318
AJCC stage IIIA vs. IIIB	22/13	7/7	0.305
ECOG performance status 0/1/2	5/19/11	1/10/3	0.288
Smoking status Current/former/never	17/10/8	9/2/3	0.501
RT technique IMRT/3D-CRT	12/23	3/11	0.301
Total dose (BED, Gy ₁₀) Median (range)	76.2 (70.1-84)	74.3 (70.1-80.5)	0.248
Daily dose (Gy) Median (range)	2.1 (1.8-2.5)	2.0 (1.8-2.2)	0.364
RT interruption Yes/no	7/28	3/11	0.597
Chemotherapy Yes/no	20/15	9/5	0.276
Chemotherapy Induction Concurrent	4	2	0.872
Induction+concurrent	12	6	
Concurrent+adjuvant	1	0	
	3	1	
SqCC, squamous cell carcinoma; Adeno, adenocarcinoma; AJCC, American Joint Committee on Cancer; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; RT, radiotherapy; IMRT, intensity-modulated radiotherapy; 3D-CRT, 3-dimensional conformal radiotherapy; BED, biologically equivalent dose			

[0078] <실시예 3> Romo1 단백질 발현에 대한 전체 생존률(overall survival) 확인

[0079] Romo1 단백질 저 발현군 또는 고 발현군의 전체 생존률을 확인하였다. 전체 생존률은 상기 준비예의 방법으로 도출하였다.

[0080] 도 3에 나타난 바와 같이, 1년 및 2년 전체 생존율은 Romo1 단백질 저 발현군에서 75.7 % 및 55.0 %였으며, Romo1 단백질 고 발현군에서는 각각 57.1 % 및 30.6 %임을 확인하였다. 따라서, Romo1 단백질 고 발현군의 전체 생존율은 Romo1 단백질 저 발현군보다 낮음을 확인하였다.

[0081] 또한, 표 2에 나타난 바와 같이, 단변량(Univariate) 분석 결과, Romo1 단백질 발현의 P-value값은 0.038이고, ECOG 수행 상태(ECOG performance status)는 0.036인 것으로 확인되어, 전체 생존과 유의한 관련이 있음을 확인하였다. 또한, 다변량(Multivariate)에서 Romo1 단백질 발현의 P-value값은 전체 생존율에 유의한 예후 인자임을 확인하였다(위험 비(hazard ratio), 0.253; 95 % 신뢰 구간, 0.096-0.665, P = 0.005). 또한, 연령(위험 비, 0.214, 95 % 신뢰 구간, 0.067-0.683, P = 0.008), ECOG 성능 상태(위험 비, 0.207, 95 % 신뢰 구간, 0.078-0.551, P = 0.002)뿐만 아니라, 일시적 방사선 치료(RT) 중단(위험 비, 3.708, 95 % 신뢰 구간, 1.405-9.785, P = 0.009)은 전체 생존율과 유의한 관련이 있음을 확인하였다(위험 비 3.051, 95 % 신뢰 구간 1.151-8.091, P = 0.025).

표 2

[0082]

Variables	2-year overall survival rate (%)	P-value	
		단변량(Univariate)	다변량(Multivariate)
Romo1 expression Low vs. high	55.0 vs. 30.6	0.038	0.005

Age (years) <70 vs. =70	54.6 vs. 53.5	0.755	0.008
Sex Male vs. female	52.9 vs. 62.5	0.641	0.380
Histology SqCC vs. Adeno	45.4 vs. 47.5	0.393	0.370
AJCC stage IIIA vs. IIIB	52.9 vs. 48.8	0.369	0.074
ECOG performance status 0-1 vs. 2	60.3 vs. 28.8	0.036	0.002
Smoking status Current vs. former or never	31.4 vs. 70.0	0.092	0.445
RT technique IMRT vs. 3D-CRT	67.5 vs. 49.2	0.128	0.387
Total dose (BED, Gy ₁₀) <76 vs. =76	44.9 vs. 50.4	0.505	0.882
Daily dose (Gy) =2 vs. >2	39.6 vs. 59.6	0.104	0.025
RT interruption Yes vs. no	48.3 vs. 64.3	0.424	0.009
Chemotherapy Yes vs. no	41.9 vs. 58.5	0.708	0.133
SqCC, squamous cell carcinoma; Adeno, adenocarcinoma; AJCC, American Joint Committee on Cancer; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; RT, radiotherapy; IMRT, intensity-modulated radiotherapy; 3D-CRT, 3-dimensional conformal radiotherapy; BED, biologically equivalent dose			

[0084] <실시예 4> Romo1 단백질 발현에 대한 국소 재발 없는 생존율(loco-regional recurrence-free survival) 확인

[0085] Romo1 단백질 저 발현군 또는 고 발현군의 국소 재발 없는 생존율을 확인하였다. 국소 재발 없는 생존율은 상기 준비예의 방법으로 도출하였다.

[0086] 도 4 및 표 3에 나타낸 바와 같이, 1년 및 2년 국소 재발이 없는 생존율은 Romo1 단백질 저 발현군에서 73.3 % 및 59.5 % 였고, Romo1 단백질 고 발현군 에서는 39.7 % 및 39.7 %였다. Romo1 단백질 고 발현군의 국소 재발 없는 생존율은 Romo1 단백질 저 발현군보다 낮음을 확인하였다. 국소 재발이 없는 생존율에 대한 예후 인자를 분석하여 표 3에 기재하였다. 단변량 분석 결과, Romo1 발현 만이 국소 재발 없는 생존과 유의한 관련이 있음을 확인하였다(P = 0.041). 다변량 분석 결과에서도, Romo1 발현은 국소 재발이 없는 생존율에 중요한 예후 인자임을 확인하였다(위험 비, 0.225; 95 % 신뢰 구간, 0.081-0.626; P = 0.004).

표 3

Variables	2-year loco-regional recurrence-free survival rate (%)	P-value	
		Univariate	Multivariate
Romo1 expression Low vs. high	59.5 vs. 39.7	0.041	0.004
Age (years) <70 vs. =70	35.6 vs. 64.9	0.060	0.013
Sex Male vs. female	50.4 vs. 75.0	0.408	0.752
Histology SqCC vs. Adeno	53.6 vs. 49.2	0.584	0.539
AJCC stage IIIA vs. IIIB	56.9 vs. 49.5	0.265	0.235
ECOG performance status 0-1 vs. 2	54.2 vs. 57.5	0.925	0.065

Smoking status Current vs. former or never	46.6 vs. 63.2	0.281	0.528
RT technique IMRT vs. 3D-CRT	52.5 vs. 55.2	0.757	0.404
Total dose (BED, Gy ₁₀) <76 vs. =76	52.6 vs. 55.0	0.287	0.134
Daily dose (Gy) =2 vs. >2	57.7 vs. 51.6	0.883	0.738
RT interruption Yes vs. no	50.0 vs. 55.5	0.766	0.265
Chemotherapy Yes vs. no	67.6 vs. 45.1	0.055	0.035
SqCC, squamous cell carcinoma; Adeno, adenocarcinoma; AJCC, American Joint Committee on Cancer; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; RT, radiotherapy; IMRT, intensity-modulated radiotherapy; 3D-CRT, 3-dimensional conformal radiotherapy; BED, biologically equivalent dose			

[0089] <실시예 5> Romo1 단백질 발현에 대한 원격 전이 없는 생존율(distant metastasis-free survival) 확인

[0090] Romo1 단백질 저 발현군 또는 고 발현군의 원격 전이 없는 생존율을 확인하였다. 원격 전이 없는 생존율은 상기 준비예의 방법으로 도출하였다.

[0091] 그 결과, 1년 및 2년 무병 생존율은 Romo1 단백질 저 발현군에서 76.5 %와 53.2 %이고, Romo1 단백질 고 발현군에서 51.4 %와 51.4 % 각각 높았다. 원격 전이가 없는 생존율에 대한 예후 인자를 분석하여 표 4에 나타내었다. 단변량 분석과 다변량 분석 결과, 모두 중요한 예후 인자를 확인하지 못했다. Romo1 발현은 또한 원격 전이 없는 생존율과 연관성이 없음을 확인하였다.

표 4

[0092]

Variables	2-year distant metastasis-free survival rate (%)	P-value	
		Univariate	Multivariate
Romo1 expression Low vs. high	53.2 vs. 51.4	0.150	0.075
Age (years) <70 vs. =70	39.4 vs. 59.0	0.516	0.277
Sex Male vs. female	51.7 vs. 57.1	0.639	0.643
Histology SqCC vs. Adeno	39.7 vs. 60.0	0.687	0.848
AJCC stage IIIA vs. IIIB	58.2 vs. 47.3	0.441	0.326
ECOG performance status 0-1 vs. 2	53.5 vs. 59.2	0.612	0.186
Smoking status Current vs. former or never	50.2 vs. 59.9	0.233	0.434
RT technique IMRT vs. 3D-CRT	64.2 vs. 47.6	0.269	0.435
Total dose (BED, Gy ₁₀) <76 vs. =76	39.0 vs. 59.3	0.567	0.860
Daily dose (Gy) =2 vs. >2	44.6 vs. 60.6	0.354	0.905
RT interruption Yes vs. no	60.0 vs. 52.6	0.755	0.630
Chemotherapy Yes vs. no	58.7 vs. 44.7	0.259	0.091

SqCC, squamous cell carcinoma; Adeno, adenocarcinoma; AJCC, American Joint Committee on Cancer; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; RT, radiotherapy; IMRT, intensity-modulated radiotherapy; 3D-CRT, 3-dimensional conformal radiotherapy; BED, biologically equivalent dose

[0094] <실시예 6> Romo1 단백질 발현에 대한 발병 무 진행 생존율(disease progression-free survival) 확인

[0095] Romo1 단백질 저 발현군 또는 고 발현군의 발병 무 진행 생존율을 확인하였다. 발병 무 진행 생존율은 상기 준비예의 방법으로 도출하였다.

[0096] 도 5 및 표 5에 나타난 바와 같이, 1년 및 2년 발병 무 진행 생존율은 Romo1 단백질 저 발현군에서 52.5 % 및 42.4 % 였고, Romo1 단백질 고 발현군에서는 32.1 % 및 32.1 %임을 확인하였다. Romo1 단백질 고 발현군의 발병 무 진행 생존율은 Romo1 단백질 저 발현군보다 낮음을 확인하였다. 발병 무 진행 생존율에 대한 예후 인자를 분석하여 표 5에 요약하였다. 다변량 분석 결과, 흡연 상태는 무 진행 생존율과 유의한 관련이 있음을 확인하였다 ($P = 0.045$). 다변량 분석 결과, 흡연 상태는 무 진행 생존율에 유의한 예후 인자임을 확인하였다(위험 비, 2.793; 95 % 신뢰 구간, 1.107-7.050, $P = 0.030$). Romo1 발현은 다변량 분석에서도 유의한 예후 인자임을 확인하였다(위험 비 0.304; 95 % 신뢰 구간 0.121-0.763; $P = 0.011$). 또한 연령(위험 비, 3.055, 95 % 신뢰 구간, 1.323-7.053, $P = 0.009$)과 전체 RT 선량 (위험 비, 2.655, 95 % 신뢰 구간, 1.013-6.962, $P = 0.047$)또한 유의한 인자임을 확인하였다.

표 5

[0097]

Variables	2-year disease progression-free survival rate (%)	P-value	
		Univariate	Multivariate
Romo1 expression Low vs. high	42.4 vs. 32.1	0.056	0.011
Age (years) <70 vs. ≥70	23.7 vs. 48.2	0.085	0.009
Sex Male vs. female	37.3 vs. 50.0	0.656	0.207
Histology SqCC vs. Adeno	35.0 vs. 37.5	0.635	0.720
AJCC stage IIIA vs. IIIB	46.9 vs. 30.0	0.052	0.107
ECOG performance status 0-1 vs. 2	39.7 vs. 41.0	0.522	0.069
Smoking status Current vs. former or never	23.5 vs. 58.8	0.045	0.030
RT technique IMRT vs. 3D-CRT	46.7 vs. 36.2	0.224	0.436
Total dose (BED, Gy ₁₀) <76 vs. ≥76	36.8 vs. 41.2	0.124	0.047
Daily dose (Gy) =2 vs. >2	33.0 vs. 47.6	0.062	0.389
RT interruption Yes vs. no	40.0 vs. 39.9	0.793	0.621
Chemotherapy Yes vs. no	37.9 vs. 41.2	0.680	0.199
SqCC, squamous cell carcinoma; Adeno, adenocarcinoma; AJCC, American Joint Committee on Cancer; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; RT, radiotherapy; IMRT, intensity-modulated radiotherapy; 3D-CRT, 3-dimensional conformal radiotherapy; BED, biologically equivalent dose			

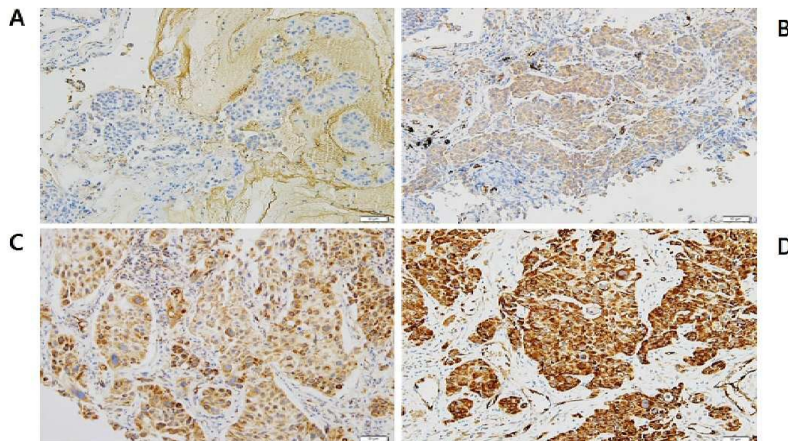
[0099] <실시예 7> 단독 방사선 치료(RT) 환자에서의 Romo1 단백질 발현 확인

[0100] Romo1 단백질 발현이 단독 방사선 치료 환자의 생존 결과와 관련이 있는지 알아보기 위하여, 방사선 치료만을 투여받은 20 명의 환자에서 하위 그룹 분석을 실시했다. 20 명의 환자 중 15명은 Romo1 단백질 저 발현군으로 분류되었고, 5명은 Romo1 단백질 고 발현군으로 분류되었다. 단변량 분석을 수행한 결과, Romo1 발현은 전체 생존율($P = 0.046$), 국소 재발 없는 생존율($P = 0.035$) 및 발병 무 진행 생존율($P = 0.048$)에 유의한 예후 인자임을 확인하였다. 다변량 분석을 수행한 결과, Romo1 단백질 발현은 전체 생존율($P = 0.035$), 국소 재발없는 생존율($P = 0.029$) 및 발병 무 진행 생존율($P = 0.040$)에 유의한 예후 인자임을 확인하였다.

[0101] 일련의 결과를 통하여, 방사선을 조사한 다양한 암세포 또는 동일한 암세포라도 Romo1 발현이 높은 암세포에서 방사선 저항성이 나타남을 확인하였다. 또한, 방사선 치료를 받은 폐암, 특히 비소세포폐암 환자의 조직에서 Romo1의 발현은 전체 생존율(overall survival), 국소 재발 없는 생존율(loco-regional recurrence-free survival), 무 진행 생존율(disease progression-free survival)에 유의적인 예측 인자인 것으로 확인되었다. 또한, Romo1 고 발현군은 치료 후 재발이 많고, 생존기간이 유의하게 단축되는 바, Romo1 발현 정도에 따라 항암 방사선 치료에 대한 종양의 감수성 및 저항성을 예측에 효과적임을 확인하였다.

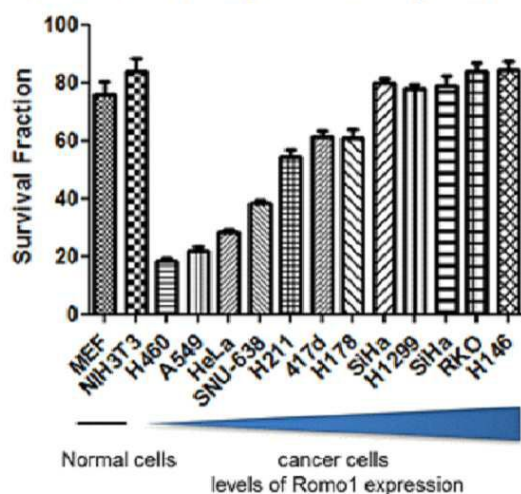
도면

도면1

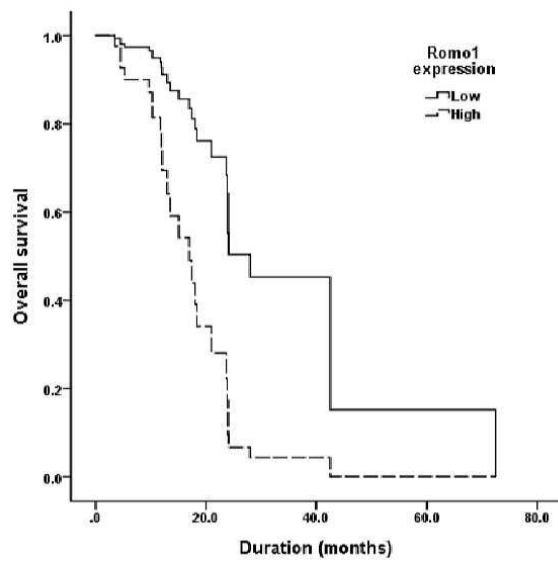


도면2

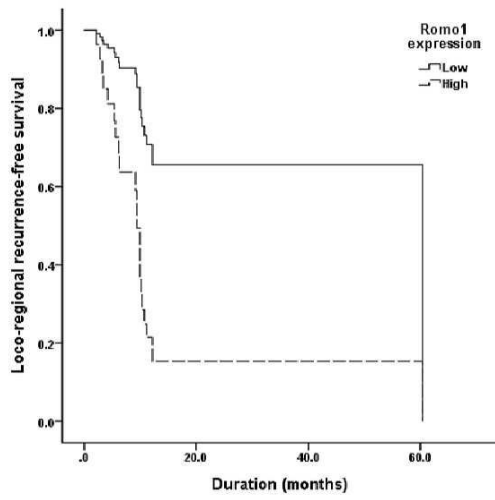
Survival fractions by MTT in 4 Gy irradiation



도면3



도면4



도면5

