



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0025706
(43) 공개일자 2020년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2018.05)
G01N 33/57407 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0103488
(22) 출원일자 2018년08월31일
심사청구일자 2018년08월31일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
구본석
대전광역시 서구 둔산북로 215, 12동 901호(둔산동, 가람아파트)
송민호
대전광역시 중구 계백로1716번길 87, 306동 1202호(문화동, 센트럴파크3단지아파트)
(74) 대리인
김순웅

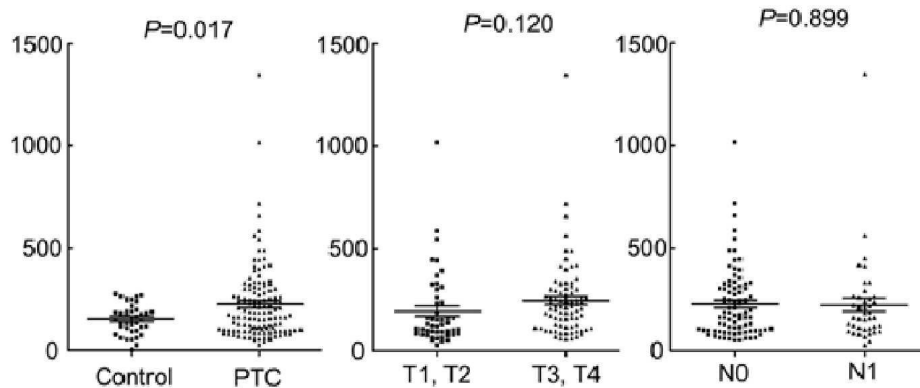
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 FGF 21을 포함하는 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측용 바이오마커 조성물

(57) 요약

본 발명은 FGF 21을 포함하는 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측용 조성물, 키트, 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측을 위한 정보 제공 방법 및 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다. 본 발명의 FGF21은 갑상선 암환자에서 과발현되며, FGF 21은 갑상선암 세포의 세포 성장, 세포 이동 및 세포 침습과 관련이 깊은 인자이므로, FGF21을 바이오마커로 이용하면 갑상선 암을 진단할 수 있을 뿐만 아니라, 갑상선 암 환자의 예후까지 정확하게 예측할 수 있어, 관련된 제약 및 의료 사업에 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/118 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2333/50 (2013.01)

G01N 2800/52 (2013.01)

(72) 발명자

강예은

대전광역시 중구 서문로 96, 212동 203호(문화동,
센트럴파크2단지아파트)

김정태

대전광역시 서구 가수원로 106, 303동 901호(가수
원동, 은아아파트3단지)

명세서

청구범위

청구항 1

FGF(fibroblast growth factor) 21을 포함하는 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 갑상선 암은 갑상선 유두암, 갑상선 여포암, 갑상선 수질암 및 갑상선 역형성암으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 진단은 T1, T2, T3, T4, N0 및 N1으로 이루어진 군에서 선택된 1종의 병기임을 진단하는 것을 특징으로 하는, 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 FGF21은 갑상선 암 세포의 이동(migration) 및 침습(invasion)을 증진시키는 것을 특징으로 하는, 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 FGF21은 갑상선 암 세포의 FGFR(Fibroblast growth factor receptor) 신호전달을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 6

FGF 21의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 FGF21의 발현수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 FGF21에 특이적으로 결합하는 올리고펩타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메라(chimeric) 항체, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid) 또는 앵타머(aptamer); 또는 상기 FGF21의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 또는 화합물; 인 것을 특징으로 하는 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측용 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측용 키트.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR 키트, 마이크로어레이 칩 키트, DNA 키트 및 단백질 칩 키트로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측용 키트.

청구항 10

시료로부터 FGF21의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 시료는 혈액, 혈청, 혈장, 림프액, 뇌척수액, 복수, 요 및 조직생검으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 12

- (a) 갑상선 암 세포에서 FGF21의 발현 수준을 측정하는 단계;
- (b) 갑상선 암 치료제 후보물질을 처리하는 단계;
- (c) 상기 후보물질이 처리된 세포에서 FGF21의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- (d) 상기 (a) 단계의 FGF21의 발현과 상기 (c) 단계의 FGF21의 발현 수준을 비교하는 단계;를 포함하는 갑상선 암 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 FGF 21을 포함하는 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측용 조성물, 키트, 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측을 위한 정보 제공 방법 및 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 갑상선암(甲状腺癌, 영어: thyroid neoplasm, thyroid cancer)은 갑상선호르몬을 생산하고, 칼슘 농도를 조절하는 기능이 있는 갑상선에서 생기는 악성종양이다. 갑상선 암은 특히 대한갑상선 질병학회에 보고된 자료에 의하면 2006년 기준 국내 암 발병률의 4위를 차지하고 있으며 여성의 경우는 1위를 차지하고 있고, 이러한 증가는 갑상선유두암종(papillary thyroid carcinoma, PTC)의 증가로 인한 것으로 알려져 있으며, 현재 한국에서 갑상선암의 약 97%가 유두암종이다(Ahn HS, et al., Engl J Med 2014;371:1765-7)(<http://www.cancer.go.kr>).

[0004] 갑상선암의 원인은 방사선 노출, 성호르몬 등으로 알려졌으나 아직 정확한 원인에 대한 규명은 이루어지지 않고 있다(Tronko ND, et al. Thyroid gland and radiation (Ukrainian-American Thyroid Project). International Congress Series 2003;1258:91-104; Robbins J, Schneider AB. Radioiodine-induced thyroid cancer: Studies in the aftermath of the accident at Chernobyl. Trends Endocrinol Metab 1998;9:87-94). 따라서, 상기 갑상선암에 대한 종양 발생 기전(tumorigenesis), 진단(Diagnosis), 암진행(Cancer progression) 및 예후(Prognosis)에 대한 관심이 높아져왔다.

[0005] 갑상선암은 조기에 발견하여 수술하면 생존율이 매우 높으므로 조기에 정확하게 진단하는 방법을 구축하는 것이 매우 중요한바, 갑상선암에 대한 위험인자를 찾아내고 이를 활용하여 갑상선암에 대한 예방 시스템을 구축하는 것이 필요하다.

[0006] 인체의 종양은 일종의 암표지 항원이라 일컬어지는 다양한 분자들을 발현시켜 분비한다. 현재 다양한 종류의 암 환자들의 혈청을 분석하여 암의 발병과 전이의 진단 및 치료에 사용될 수 있는 항원들이 제시되고 있다. 지금까

지 발견된 종양 마커는 약 60여종에 이르는데, 현재 상용화되고 있는 종양 마커로는 AFP(간암), CEA(대장암, 위암, 췌장암, 유방암), HCG(융모상피암), PAP(전립선암), NSE(폐암), C15-3(유방암), CA19-9(대장암, 췌장암)등을 들 수 있다. 그러나 갑상선 암의 진단 및 치료에 탁월한 효과가 있는 진단 마커나 항암제는 개발되어 있지 않은 실정이다.

[0007] 또한 암의 검사수단은 물리적인 것이 대부분이다. 그 예로 위장 X선 촬영으로 이중조영법, 압박촬영법 또는 점막촬영법 등이 있다. 또한 내시경을 사용하여 내부 장기를 직접 육안으로 확인함으로써 X선 검사에서 나타나지 않는 아주 작은 병변까지 발견할 수 있을 뿐 아니라 암이 의심스러운 장소에서 직접 조직검사(생검)를 시행하여 그 진단율을 높이고 있다. 하지만 이 방법은 검사과정이 비교적 간단하다는 장점에도 불구하고 진단 성공률이 높지 않은 문제, 위생상의 문제 및 검사가 진행되는 동안 환자로 하여금 고통을 감수해야 하는 문제가 있어, 이를 대체할 만한 암의 진단 방법이 필요하다.

[0008] 암을 치료하기 위해서는 치료 이전의 단계에서 높은 민감도와 특이도를 가진 암의 진단이 무엇보다 중요하며, 이러한 진단은 암의 초기에 발견될 수 있는 것이어야 한다. 초기 진단된 암의 경우 매우 높은 완치율을 나타내기 때문이다. 따라서 비침습성이며, 고감도 및 고특이성으로 암을 초기에 진단할 수 있는 방법의 개발이 요구되고 있는 실정이다. 나아가 구체적 암에 대한 예후를 예측한 맞춤형 진단 및 치료가 필요하다. 하지만 현재까지 암 진단에 있어서 초기에 특이적으로 병소를 감지하여 발병 여부를 판단하는 분자적 진단 기술은 미미한 실정이고 특정 암에 대해서는 아직까지 그 방법이 전무한 상태라고 해도 과언이 아니다.

[0009] 이에 효과적인 갑상선 암 진단 또는 예후 예측을 위한 진단 방법 또는 이를 진단할 수 있는 마커의 발견에 대한 필요성이 절실하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 갑상선암은 생존률이 다른 암에 비하여 높다고 알려진 암에 해당하나, 수술 후 10년 이상 경과시 15~20%에서 재발 혹은 전이를 하는 난치성 갑상선암으로 가는 경우가 있다. 그럼에도 불구하고, 아직까지 어떤 환자군이 그러한 난치성 임상경과를 보이는지에 대한 예후 예측인자는 없는 것이 현실이다. 이에 본 발명자들은 갑상선의 진단 또는 예후를 예측하기 위한 바이오마커를 연구하던 중, 갑상선 암환자의 혈청을 분석한 결과 FGF21이 갑상선 암 환자에서만 특이적으로 과발현되는 것을 관찰하고, FGF21의 갑상선암 진단 또는 예후 예측하기 위한 바이오마커로서의 가능성을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0012] 따라서 본 발명의 목적은 FGF 21을 포함하는 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측용 조성물, 키트, 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측을 위한 정보 제공 방법 및 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 FGF(fibroblast growth factor) 21을 포함하는 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0015] 또한 본 발명은 FGF 21의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[0016] 또한 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측용 키트를 제공한다.

[0017] 또한 본 발명은 시료로부터 FGF21의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0018] 또한 본 발명은 (a) 갑상선 암 세포에서 FGF21의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 갑상선 암 치료제 후보물질을 처리하는 단계; (c) 상기 후보물질이 처리된 세포에서 FGF21의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (d) 상기 (a) 단계의 FGF21의 발현과 상기 (c) 단계의 FGF21의 발현 수준을 비교하는 단계;를 포함하는 갑상선 암 치료제의 스

크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 FGF21은 갑상선 암환자에서 과발현되며, FGF 21은 갑상선암 세포의 세포 성장, 세포 이동 및 세포 침습과 관련이 깊은 인자이므로, FGF21을 바이오마커로 이용하면 갑상선 암을 진단할 수 있을 뿐만 아니라, 갑상선 암 환자의 예후까지 정확하게 예측할 수 있어, 관련된 제약 및 의료 사업에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 갑상선암 환자의 FGF21 발현양을 ELISA 방법으로 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 갑상선암 세포주 BCPAP 및 TPC-1 각각에서 FGFR(Fibroblast growth factor receptor) 신호전달과 관련된 및 비 관련된 인자의 FGF21의 농도별 처리에 의한 발현 증가 여부를 확인한 실험 결과를 나타낸 도(도 2A 내지 도 2D)이다.

도 3은 갑상선암 세포주 BCPAP에서 FGF21의 처리를 통한 세포의 이동 및 침습의 정도 증가를 확인한 도(도 3A 및 B) 및 TPC-1에서 FGF21의 처리를 통한 세포의 이동 및 침습의 정도 증가를 확인한 도(도 3C 및 D)이다.

도 4는 FGF21 발현이 높은 군과 낮은 군 환자들의 갑상선 암 무재발 생존율(Recurrence-free survival)을 확인한 결과(도 4A) 및 전체 생존율(overall survival)을 확인한 결과(도 4B)를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명은 본 발명은 FGF(fibroblast growth factor) 21을 포함하는 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0023] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0025] 본 발명의 Fibroblast growth factor(섬유아세포 성장인자, FGF)-21은 인간 FGF21 유전자에 의해 코딩되는 단백질로, 섬유아세포 성장인자 중 하나이다. 섬유아세포 성장인자는 배아 발달 세포 성장, 형태 형성, 조직 복구, 중앙 성장 및 침입을 비롯한 다양한 생물학적 과정에 관여하는 것이 당업계에 널리 알려져 있다. 이 중 FGF-21은 갑상선 암 환자의 혈청에서 발현양이 상승하는 인자로서, 갑상선 암세포의 이동(migration) 및 침습(invasion)과 연관이 깊고, FGFR 신호전달을 활성화시키는 물질로 갑상선 암세포의 증식 및 생존에서 중요한 역할을 수행물질인 바, 본 발명에서는 상기 FGF21을 갑상선 암의 진단 및 예후를 예측용 바이오마커로 사용하였다.

[0026] 본 발명에서 용어 "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 상기 진단은 발병 여부뿐만 아니라 암의 경과, 병기 등을 확인하는 것을 모두 포함하는 의미이다. 본 발명의 목적상, 진단은 갑상선 암의 발병, 경과, 병기 상태 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다.

[0027] 특히, 본 발명의 갑상선 암의 진단 및 예후를 예측용 바이오마커 조성물을 이용하면 갑상선 암 환자가 어떤 병기에 속하는지 진단할 수 있으며, 구체적으로 갑상선암 환자가 T1, T2, T3, T4, N0 및 N1으로 이루어진 군에서 선택된 1종의 병기에 속하는지 진단이 가능하다. 갑상선 암 환자의 병기 중 T 병기는 종양의 크기에 따라 결정되는 병기로, 종양의 크기가 4cm보다 작은 경우 T1, T2 병기로, 종양의 크기가 4cm 이상이고, 갑상선보다 크기가 커진 상태를 T3, T4 병기에 속한다고 판단한다. T 병기와 관련하여, FGF21의 검출량이 높은 경우 갑상선 암 환자가 T3, T4에 해당하는 것으로, FGF21의 검출량이 낮은 경우 갑상선 암 환자가 T1, T2에 해당하는 것으로 진단할 수 있다. 갑상선 암 환자의 병기 중 N 병기는 림프절로의 전이 정도에 따라 결정되는 병기로, 주변 림프절로 전이가 일어나지 않은 상태를 N0기로, 주변 림프절까지 암세포가 퍼진 경우를 N1 기로 판단한다. N 병기와 관련하여, FGF21의 검출량이 높은 경우 갑상선 암 환자가 N0에 해당하는 것으로, FGF21의 검출량이 낮은 경우 갑상선 암 환자가 N1에 해당하는 것으로 진단할 수 있다.

[0028] 본 발명에서 용어 "예후"란 암의 치료 후 해당 개체의 재발, 전이, 약물 반응성, 내성 등과 같은 여부를 판단하는 것을 의미한다. 바람직하게는 개체의 치료로부터 본 발명의 FGF 21의 발현 수준을 확인함으로써 해당 개체의 갑상선 암 발병 여부뿐만 아니라 향후 해당 개체의 생존 예후가 좋을지 여부에 대해서까지 예측이 가능한 것을

의미한다.

- [0029] 본 발명에서 용어, "바이오마커"는 진단용 마커 또는 진단 마커로도 쓰일 수 있으며, 생물학적 시료에서 갑상선 암 발생 여부를 구분하여 진단할 수 있는 물질을 말한다. 본 발명은 구체적인 일실시예로, 갑상선암 환자의 혈청에서 FGF21의 발현이 증가하는 것을 확인하였는바, FGF21을 갑상선암 진단 또는 예후 예측용 바이오마커로 활용할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 갑상선 암은 주위 조직에 침윤하면서 빠르게 성장하고 신체 각 부위에 확산되거나 전이되어 생명을 위협하는 갑상선 유두암, 갑상선 여포암, 갑상선 수질암 및 갑상선 역형성암을 포함하며, 본 발명에서 진단 및 예후 예측이 가능한 갑상선 암은 바람직하게는 갑상선 유두암일 수 있다.
- [0032] 또한 본 발명은 FGF 21의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [0033] 본 발명에 있어서, "FGF 21의 발현 수준을 측정하는 제제"란 상기와 같이 갑상선암 환자의 생물학적 시료에서 발현이 증가하는 마커인 FGF21의 단백질 또는 이를 코딩하는 mRNA에 특이적으로 결합하여, 이의 발현 수준을 확인함으로써 FGF 21의 검출에 사용될 수 있는 분자를 의미한다.
- [0034] 또한 상기 FGF21의 발현수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 FGF21에 특이적으로 결합하는 올리고펩타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메라(chimeric) 항체, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid) 또는 앵타머(aptamer) 일 수 있으며 또한, FGF21의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 또는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0036] 또한 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [0037] 상기 키트는 RT PCR 키트, 마이크로어레이 칩(micro array chip) 키트, DNA 키트, 또는 단백질 칩 키트를 포함하며, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 키트는 마커 단백질에 해당하는 FGF21의 발현 수준을 확인하여 이를 검출함으로써 갑상선 암의 진단 또는 예후 예측을 할 수 있다. 본 발명의 키트에는 갑상선 암의 진단 또는 예후 예측을 위하여 선택적으로 마커를 인지하는 항체뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액, 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [0038] 단백질의 발현 수준 측정은 암의 진단 또는 예후 예측을 위하여 생물학적 시료에서 마커 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 FGF21에 특이적으로 결합하는 항체를 이용해 단백질의 양을 확인할 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명의 FGF21 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 및 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기에서 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스티렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리된 슬라이드 글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(oxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase) 등이 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있고, 발색기질액은 ABTS(2,2'-아지노-비스-(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(O-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘)가 사용될 수 있다. 바람직하게는 개체의 시료로부터 본 발명의 FGF21 발현 수준을 확인함으로써 해당 개체의 갑상선 암 발병 여부뿐만 아니라, 향후 해당 개체의 생존 예후가 좋을지 여부에 대해서까지 예측할 수 있다.
- [0041] 또한 본 발명은 시료로부터 FGF21의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0042] 상기 갑상선 암 진단 또는 갑상선 암 예후 예측을 위한 정보는 갑상선암 환자의 FGF21 발현에 대한 측정 정보이고, 본 발명의 목적상, FGF21의 발현이 증가된 것으로 측정되는 경우, 갑상선암 세포의 세포 성장, 세포 이동 및 세포 침습이 증가되어 갑상선암이 야기된다는 것을 제시하는 것으로, 상기과 같은 정보를 기반으로 본 발명은 대상의 갑상선 암의 T 및 N 병기 및 예후 예측을 포함한 구체적인 정보를 제공한다.
- [0043] 본 발명에 있어서 상기 시료는 혈액, 혈청, 혈장, 림프액, 뇌척수액, 복수, 요 및 조직생검으로 이루어진 군에

서 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0044] 상기 FGF21의 발현 수준을 확인하는 방법은 웨스턴 블랏(Western blot), 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선면역분석법(radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunoassay), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케트(Ouchterlony) 면역 전기 영동, 조직 면역 염색, 면역 침전 분석(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complete fixation assay), FACS(Flow Cytometry) 및 단백질 칩(protein chip)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0046] 또한 본 발명은 (a) 갑상선 암 세포에서 FGF21의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 갑상선 암 치료제 후보물질을 처리하는 단계; (c) 상기 후보물질이 처리된 세포에서 FGF21의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (d) 상기 (a) 단계의 FGF21의 발현과 상기 (c) 단계의 FGF21의 발현 수준을 비교하는 단계;를 포함하는 갑상선 암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0047] 구체적으로, 갑상선 암 치료제 후보 물질의 존재 및 부존재하에서 FGF21 발현의 증가 또는 감소를 비교하는 방법으로 암 치료제를 스크리닝하는데 유용하게 사용할 수 있다. FGF21의 발현 수준을 간접적으로 또는 직접적으로 감소시키는 물질은 본 발명에서 개시하고 있는 갑상선암의 치료제로서 선택할 수 있다.

[0048] 상기 (c) 단계에서, 대상 물질이 실험군의 FGF21의 발현을 억제시키는 경우 이는 갑상선암 세포주의 세포 성장, 세포 이동 및 세포 침습을 억제시킬 수 있으므로 갑상선암 치료제로서 선별될 수 있다.

[0050] 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

[0052] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0055] 실시예 1. FGF21 발현 확인을 위한 갑상선 암 세포주 및 조직의 수득

[0056] FGF21의 발현을 확인하기 위하여, 갑상선암 세포주 2개(BCPAP 및 TPC-1)를 선정하고, Dr. M. Santoro (Universita di Napoli Federico II, Naples, Italy) 와 Dr. Masahide Takahashi (Nagoya University, Nagoya, Japan) 에게서 분양받았다. 또한 2008년부터 2017년까지 충남대학교 병원 이비인후과 및 외과에서 수술한 총 127명의 갑상선 유두암 환자를 FGF21의 발현을 확인하기 위한 실험군으로 선정하였다. 특히, 상기 127명의 환자 중 63명은 FGF21의 발현이 낮았고, 나머지 64명은 FGF21이 강하게 발현되는 환자였으며, 본 연구는 충남대학교 의과대학의 임상시험심사위원회로부터 승인되었다.

[0057] 각각의 세포주들을 최적 배양배지인 DMEM(Invitrogen) 또는 RPMI1640(Invitrogen) 배지에 10%의 우태아 혈청(Fetal Bovine Serum, FBS, Hyclon) 및 페니실린/스트렙토마이신(1mg/ml Penicillin/Streptomycin, Sigma)을 보충한 후, 5-6일간 배양시킨 후, 사용하였다.

[0059] 실시예 2. FGF21의 발현양 확인을 통한 FGF21의 암 진단 및 예후 예측의 바이오마커로서의 가능성 확인

[0060] FGF(fibroblast growth factor) 21이 갑상선 암을 진단 및 암 환자의 예후를 예측할 수 있는 마커로서의 이용 가능성을 확인하기 위하여, 상기 실시예 1에서 결정한 갑상선 유두암 환자와 정상인의 혈청 내 FGF21 발현양의 차이를 비교하였다. 상기 실시예 1의 10년 이상의 follow up 주기를 지닌 갑상선 유두암 환자 127명을 실험군으로 하고, 갑상선암이 없는 정상인을 대조군으로 하였다. 또한 T 병기(T1, T2, T3 및 T4) 및 N 병기(N0 및 N1)의 갑상선암 환자의 FGF21 발현양을 ELISA 방법으로 측정하여, 그 결과를 도 1에 나타내었다. 혈청 내 FGF21 발현양을 정확하게 측정하기 위하여, 환자군 및 대조군은 8시간 이상의 금식기간을 가진 후, 아침 공복 시에 채혈한 혈액을 이용하여 혈청의 상태로 충남대학교 인체자원은행에 -70℃에 보관되어 있었던 샘플을 이용하였다.

[0061] 도 1에 나타난 바와 같이, 갑상선 유두암 환자군(PTC)에서는 혈청 내 FGF21의 발현양이 대조군에서 검출된 양에 비해 통계학적으로 의미있게 증가한 것을 확인하였다. 따라서, 갑상선 암 환자에서만 특이적으로 발현이 증가하는 FGF21이 바이오마커로서 활용될 수 있으며, 또한 혈중 FGF21의 발현양을 측정하면 갑상선 암을 손쉽게 진단할 수 있음을 확인하였다. 혈청 FGF21이 예후 예측을 할 수 있는 바이오마커에 해당하는지 알기 위하여, 갑상선 암 환자들의 다양한 임상양상에 따라 혈청 FGF21의 발현양을 비교하였다. 갑상선 암환자에 있어서, 종양의 크기가 4cm 보다 작은 T1 및 T2 병기 환자에서 FGF21의 발현양보다 종양의 크기가 4cm 이상이고, 갑상선보다 더 종양의 크기가 커진 T3 및 T4 병기 환자에서 FGF21의 검출양이 더욱 크게 증가한 것을 확인하였다. N 병기에서 주변 림프절까지 암세포가 퍼진 N1 보다 림프절까지 암이 퍼지지 않은 N0 병기에서 더 FGF21의 검출양이 증가하였다. 상기와 같은 결과를 통하여, 혈중 FGF21의 발현양을 측정하는 경우, 갑상선 암의 진단이 가능함과 동시에, 갑상선 암 환자의 구체적인 병기를 알 수 있고 따라서 이를 통하여 구체적으로 암의 전이여부 및 종양의 크기까지 예측할 수 있음을 확인하였다.

[0063] 실시예 3. 갑상선암 환자에 있어서 FGF21 발현양 측정을 통한 갑상선 암 예후 예측의 확인

[0064] 상기 실시예 2에서 갑상선암 진단을 위한 바이오마커로서의 가능성을 확인한 바이오마커 FGF21이 갑상선 환자에 그 구체적인 병기 및 다양한 임상양상, 특히 재발까지 예측할 수 있는지 재확인하기 위하여 실험을 수행하였다. 상기 실시예의 10년 이상의 follow up 주기를 지닌 갑상선 유두암 환자 127명을 실험군으로 결정하였고, 상기 127명을 FGF21의 발현양이 높은 군과 낮은 군으로 나누어 다양한 임상양상, 특히 재발을 예측할 수 있는지를 다중회귀분석을 통하여 확인하였으며, 그 결과를 표 1 및 표 2에 나타내었다.

[0066] [표 1]

Variables		Patients (Number)	Low FGF21 Group (N = 63)	High FGF21 Group (N = 64)	P value
Age, years	< 45	42	22	20	0.660
	≥ 45	85	41	44	
Gender	Male	18	6	12	0.136
	Female	109	57	52	
Tumor size	≤ 2cm	108	57	51	0.088
	> 2cm	19	6	13	
T stage	Stage 1-2	48	33	15	0.001*
	Stage 3-4	79	30	49	
Multicentricity	No	93	47	46	0.728
	Yes	34	16	18	
Microscopic capsular invasion	No	41	27	14	0.011*
	Yes	86	36	50	
Extrathyroid extension	No	58	37	21	0.003*
	Yes	69	26	43	
Lymphovascular invasion	No	27	15	12	0.486
	Yes	100	48	52	
Lymph node metastasis	No	85	42	43	0.950
	Yes	42	21	21	
Central lymph node metastasis	No	85	42	43	0.950
	Yes	42	21	21	
Lateral lymph node metastasis	No	114	57	57	0.793
	Yes	13	6	6	
Recurrence	No	118	62	56	0.017*
	Yes	9	1	8	
BRCA ^{F508} mutation	No	3	2	1	0.097
	Yes	21	6	15	
	Unknown	103	55	48	

[0068] [표 2]

Factors	Exp(β)	SE	95.0% CI	P value
T stage (Stage 3-4)	3.671	0.776	(0.802, 16.811)	0.094
Microscopic capsular invasion	0.907	0.630	(0.264, 3.120)	0.877
Extrathyroid extension	1.121	0.637	(0.321, 3.908)	0.858
Recurrence	9.985	1.110	(1.135, 87.868)	0.038*

[0071] 표 1에서 확인한 바와 같이, 갑상선암 환자에 있어서 FGF21 발현양과 관련이 있는 임상양상은 T 병기와 피막 침입, 종양의 갑상선 외 전파, 재발인 것으로 확인되었다. 혈청 FGF21의 발현양이 표 1에서 확인된 다양한 임상양상 중, 독립적으로 영향을 미치는 인자를 찾기 위하여 다중회귀분석을 시행하였다. 상기 표 2에 나타난 바와 같이, FGF21의 발현양이 높은 경우 갑상선 환자에 있어서 암의 재발을 통계학적으로 의미있게 독립적으로 예측함을 확인하였다. 따라서, FGF 21의 발현양 측정을 하면, 갑상선 암의 진단 뿐 아니라 그 예후까지 정확하게 예측할 수 있음을 본 실시예를 통하여 다시 한번 확인할 수 있었다.

[0073] 실시예 4. FGF21 처리를 통한 FGFR(Fibroblast growth factor receptor) 신호전달 증가 확인

[0074] FGF21의 발현증가가 갑상선 암 세포에서 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 실시예 1에서 수득한 BCPCP 세포주 및 TPC-1 세포주에 FGF21을 50nM, 100nM, 200nM 및 300nM로 각각 처리하고 FGFR 신호전달 인자들의 변화를 웨스턴 블랏으로 측정하였다. FGF21은 0.1% BSA를 용매로 하였기 때문에, 아무것도 처리 하지 않은 negative 군 및 0.1% BSA만을 처리한 군과 FGF21을 처리한 실험군의 발현을 비교한 결과를 도 2A 내지 D에 나타내었다.

[0075] 도 2A 내지 2B에서 확인한 바와 같이, 갑상선 암세포주 BCPCP 및 TPC-1에서 FGF21의 처리량이 높아질수록 갑상선 암에서 암세포의 증식과 생존 및 전이와 관련이 깊다고 알려진 상피 간엽 이행(Epithelial mesenchymal transition, EMT) 신호전달관련 인자에 해당하는 vimetin과 cadherin이 변하는 것을 확인하였다. 또한 갑상선암에서의 악성화와 관련된 FGFR 신호전달(signaling) 관련 인자들에 해당하는 ERK의 인산화, AKT의 인산화, STAT3의 인산화 등의 발현이 증가하는 하는 것을 확인하였다. 도 2C 및 2D에서 확인한 바와 같이, 기존에 FGF21은 미토콘드리아 스트레스를 유도한다고 알려져 있는 미토콘드리아 비접합단백반응 단백질에 해당하는 물질들의 발현은 확인하였으나, BCPCP 및 TPC-1에 FGF21을 처리하여도 FGFR 신호전달과 연관 없는 인자들은 발현양이 변화하지 않음을 확인하였다. 따라서, 갑상선암 세포주에 있어서 FGF21이 FGFR 신호전달을 활성화시키는 물질로, 갑상선 암세포의 증식 및 생존에도 큰 영향을 미치는 물질임을 확인하였다.

[0077] 실시예 5. FGF21 처리를 통한 갑상선 암세포의 이동(migration) 및 침습(invasion)의 증가 확인

[0078] FGF21의 발현증가가 갑상선 암 세포의 이동(migration) 및 침습(invasion)을 증가시킬 수 있는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 실시예 1에서 수득한 BCPCP 세포주 및 TPC-1 세포주에 FGF21을 12시간 처리하고, 이를 FGF21을 미처리한 대조군과 비교하여, FGF21이 갑상선 암세포의 이동 및 침습의 증가를 유도할 수 있는지 확인하였다. 암세포 이동 및 침습의 정도를 파악하기 위하여 transwell assay를 이용하였으며, 각 세포주를 crystal violet으로 염색하고 대조군과 FGF21처리 세포주를 현미경을 통해 분석하였다. 대조군과 FGF21을 처리한 세포주 간 이동 및 침습된 세포수를 비교하여 계수함으로써 이동 및 침습의 정도에 대한 분석을 수행하였고, 그 결과를 도 3A 내지 3D에 나타내었다.

[0079] 도 3A 및 도 3C에 나타난 바와 같이, BCPCP 및 TPC-1 세포주에서는 FGF21 미처리 대조군 대비 갑상선 암 세포의 이동성이 증가된 것을 확인하였다. 또한 도 3B 및 도 3D에 나타난 바와 같이, BCPCP 및 TPC-1 세포주에 각각 FGF21이 처리된 경우, 갑상선 암 세포의 침습이 대략 2배 이상 증가한 것을 확인하였다. 즉, 갑상선 암 세포주에 FGF21이 처리되는 경우, 처리된 암 세포의 이동 및 전이를 유의할 정도로 증가시키는 것을 확인하였고, 이를 통해 갑상선 암 세포의 이동 및 전이와 FGF21이 깊게 연관되어 있음을 확인할 수 있었다.

[0081] 실시예 6. FGF21 발현양 측정을 통한 갑상선 암 예후 예측

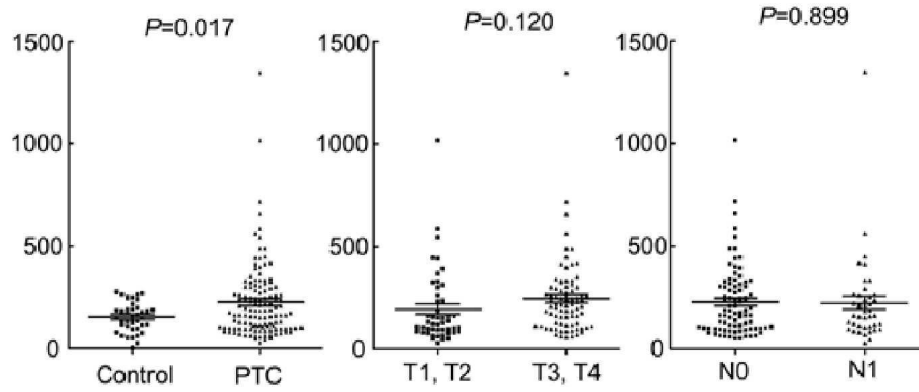
[0082] 혈중 FGF21의 발현양 측정이 예후 예측 진단까지 효과적으로 수행할 수 있음을 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 상기 실시예에서 FGF21의 발현이 높은 군과 FGF21 발현이 낮은 군 환자들의 무재발 생존율(Recurrence-free survival) 및 전체 생존율(overall survival)을 측정하고 이를 각각 도 4A 및 도 4B에 나타내었다.

[0083] 도 4A에서 확인한 바와 같이, 무재발 생존율은 FGF21이 낮게 발현하는 군이 생존 기간이 길어져도 생존율의 변화 없이 일정하게 높았으며, 또한 도 4B에서 확인한 바와 같이, 갑상선 암 환자의 전체 생존율은 FGF21 발현이 높지 않은 군이 FGF21 발현이 높은 군보다 유의하게 높은 것을 확인하였다. 종합해보면, FGF21의 발현이 높은

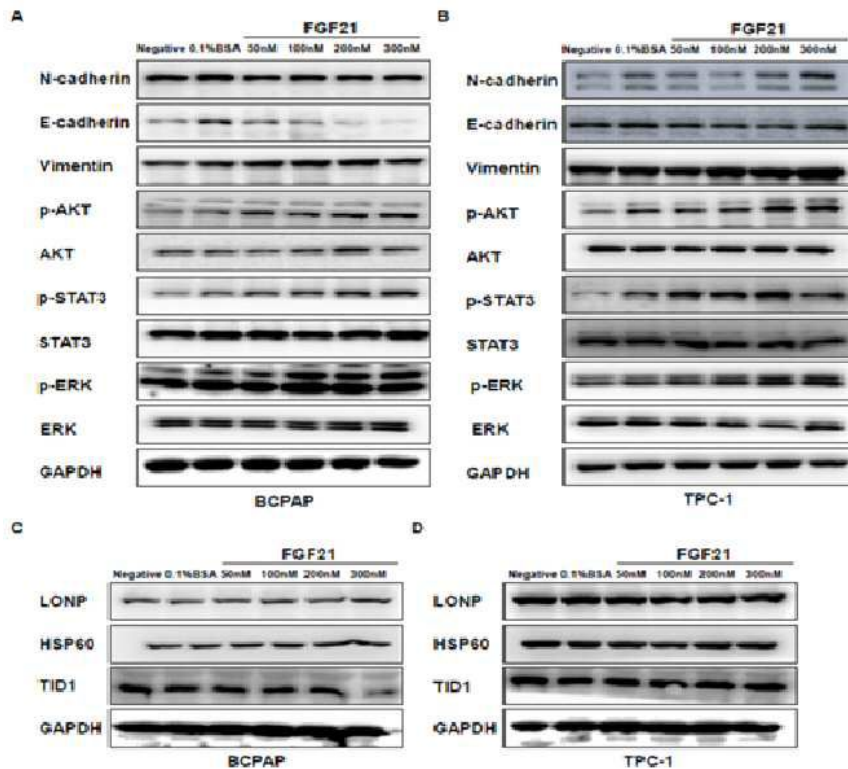
환자는 재발하지 않은 경우에도 그 생존율이 낮고, 갑상선 암이 재발된 경우를 포함한 전체 생존율에서도 생존율이 높지 않아 FGF21의 발현이 높을수록 갑상선 암환자의 예후가 좋지 않음을 확인할 수 있었다. 따라서, FGF21의 발현양을 측정하면 갑상선 암환자의 예후까지 정확하게 예측할 수 있어, FGF21이 갑상선 암 진단 및 예후 예측을 위한 바이오마커로서 효율적으로 활용될 수 있음을 확인하였다.

도면

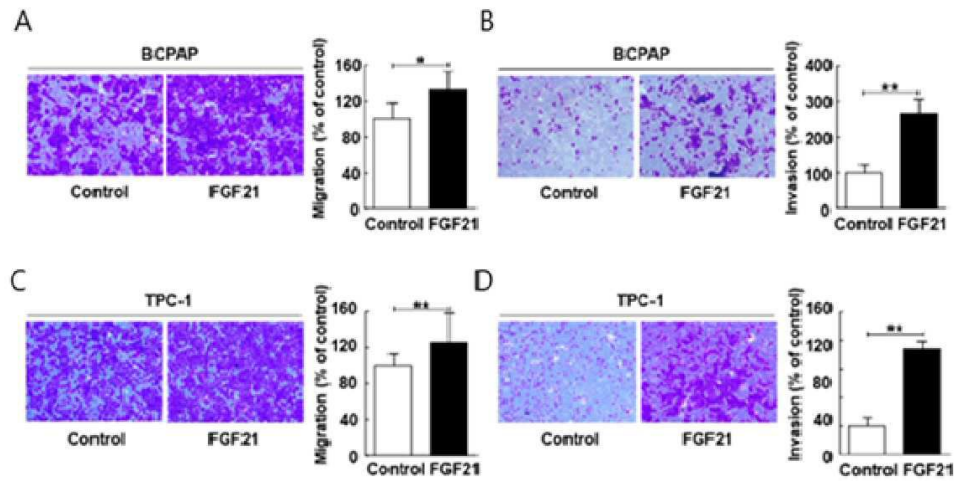
도면1



도면2



도면3



도면4

