

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0054917

(43) 공개일자 2021년05월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6886 (2018.01) G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6886 (2018.05)

G01N 33/57438 (2019.01)

(21) 출원번호 10-2019-0141186

(22) 출원일자 2019년11월06일

심사청구일자 2019년11월06일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김성수

서울특별시 송파구 잠실로 88, 102동 301호(잠실동, 레이크팰리스)

최대규

서울특별시 동대문구 경희대로 26 의과대학 419호 분자생물학교실 (회기동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인(유한)아이시스

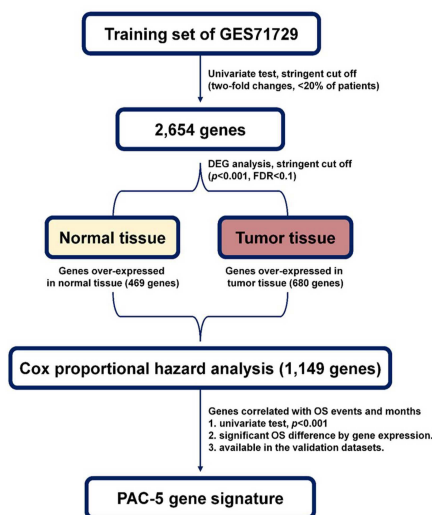
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **췌장암 예후 예측용 유전자 마커 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 췌장암의 예후 예측을 위한 유전자 마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 췌장암 또는 췌장암의 보조 치료에 대한 예후 예측 및 췌장암 진단용 유전자 마커 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 유전자 마커인 PAC-5 시그니처 즉, LAMA3, E2F7, IFI44, SLC12A2 및 LRIG1 유전자들은 췌장 선암 환자에서 예후를 예측하는데 유용하게 이용될 수 있을 뿐만 아니라 췌장암을 진단하고 더불어 개인의 맞춤 의학 측면에서 수술 후 보조 치료요법의 시행 시 혜택을 얻을 수 있는 환자를 선별하여 이들의 예후를 예측하고 생존 연장에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/118 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2800/52 (2013.01)

G01N 2800/60 (2013.01)

(72) 발명자

김지은

서울특별시 동대문구 외대역동로18길 30, 옥탑 4층(이문동)

조용화

서울특별시 성북구 종암로24가길 53, 101동 107호
(종암동, 종암에스케이아파트)

신윤희

경상남도 함천군 함천읍 충효로 87-3 2층

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20171924

부처명 한국연구재단(통합)

과제관리(전문)기관명 한국연구재단(학술진흥)

연구사업명 이공분야기초연구사업/일반연구

연구과제명 [기본, 2/2]간암 진행 및 전이에서 저산소 유도인자 1 α 의한 라이신 특이적 탈 메틸
화효소 1의 발현 및 기능 연구

기 여 율 1/2

과제수행기관명 경희대학교 산학협력단

연구기간 2016.11.01 ~ 2018.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20190480

부처명 한국연구재단(통합)

과제관리(전문)기관명 한국연구재단(학술진흥)

연구사업명 이공분야기초연구사업/중점연구소지원사업

연구과제명 이지바로[중점연구소(이공),2/3] 경희대학교 의과학 연구소 - 활성산소 조절을 통한
만성질환 예방 치료에 관한 연구

기 여 율 1/2

과제수행기관명 경희대학교 산학협력단

연구기간 2018.06.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

LAMA3(laminin subunit alpha 3; GenBank 접근(accession) 번호: NM_000227, NM_001127717, NM_001127718, NM_001302996, NM_198129), IFI44(interferon induced protein 44; NM_006417), E2F7(E2F transcription factor 7; NM_203394), SLC12A2(solute carrier family 12 member 2; NM_001046, NM_001256461) 및 LRIG1(leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1; NM_015541)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 췌장암 예후 예측용 조성물.

청구항 2

LAMA3(laminin subunit alpha 3; GenBank 접근(accession) 번호: NM_000227, NM_001127717, NM_001127718, NM_001302996, NM_198129), IFI44(interferon induced protein 44; NM_006417), E2F7(E2F transcription factor 7; NM_203394), SLC12A2(solute carrier family 12 member 2; NM_001046, NM_001256461) 및 LRIG1(leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1; NM_015541)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 췌장암의 보조 치료요법에 대한 예후 예측용 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 췌장암은 췌장 선암(pancreatic adenocarcinoma)인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자가 암호화하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 6

제2항에 있어서,
상기 보조 치료요법은 화학 요법(Chemotherapy), 방사선 요법(Radiotherapy) 또는 표적 분자 치료요법(Targeted Molecular Therapy)인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 표적 분자 치료는 엘로티닙(erlotinib)에 의한 것임을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 8

제1항의 조성물을 포함하는, 췌장암 예후 예측용 키트.

청구항 9

제2항의 조성물을 포함하는, 췌장암의 보조 치료요법에 대한 예후 예측용 키트.

청구항 10

LAMA3(laminin subunit alpha 3; GenBank 접근(accession) 번호: NM_000227, NM_001127717, NM_001127718, NM_001302996, NM_198129), IFI44(interferon induced protein 44; NM_006417), E2F7(E2F transcription factor 7; NM_203394), SLC12A2(solute carrier family 12 member 2; NM_001046, NM_001256461) 및 LRIG1(leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1; NM_015541)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 췌장암 진단용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 췌장암은 췌장 선암(pancreatic adenocarcinoma)인 것을 특징으로 하는, 진단용 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 진단용 조성물.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자가 암호화하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 것을 특징으로 하는, 진단용 조성물.

청구항 14

제10항의 조성물을 포함하는, 췌장암 진단용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 췌장암의 예후 예측을 위한 유전자 마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 췌장암 또는 췌장암의 보조 치료요법에 대한 예후 예측, 및 췌장암 진단용 유전자 마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 췌장암은 난치성의 악성 종양으로 미국에서 암으로 인한 사망의 4번째 주요 원인이며, 2019년에는 56,770건의 새로운 사례와 45,750건의 사망이 보고되었다. 췌장암으로 인한 사망은 모든 암으로 인한 사망 건수의 7.2%로 작은 부분을 차지하나, 5년 생존율이 9%인 치명적인 암 중 하나이다. 췌장암의 대다수 (> 85%)는 췌장의 외분비선에서 발생하는 선암이며, 대부분의 췌장 선암(pancreatic adenocarcinoma; PAC) 환자는 진단 시 일반적으로 진행된 단계를 나타낸다. 치료법으로는 외과적 수술이 가장 효과적이며 유일한 치료로 간주되지만 환자의 20%만이 절제가 가능하다.

[0003] AJCC(American Joint Committee on Cancer) 병기 결정 시스템은 전 세계적으로 췌장 선암(PAC)의 예후 평가 및 치료 결정에 대한 지침을 제공하는데 널리 이용되어 왔다. AJCC 병기 결정 시스템은 3가지 요소, 즉 원발성 종양의 크기 및/또는 국소 정도 (T), 국소 림프절 (N) 및 전이 (M)의 포함을 기반으로 한다. 그러나 종양 작용을 종합적으로 설명 할 수는 없다. 실제로, 동일한 AJCC 단계를 갖는 PAC 환자들은 동일한 치료를 받은 후에 다른 임상적 예후를 나타낼 수 있다. 따라서, 현재 병리학적 병기 결정을 보완하기 위해 검증된 모델이 추가로 제안되어야 한다.

[0004] PAC 환자에서, 젬시타빈(gemcitabine)은 여전히 보조 화학요법의 기준 약물로 사용된다. 그 후, 젬시타빈과 FOLFIRINOX 또는 알부민이 결합된 파클리탁셀(nab- paclitaxel)의 병용이 1차 표준 치료법이 되었다. 그러나, 대부분의 환자는 이러한 화학요법에 잘 반응하지 않으며, 치료 실패는 오히려 약물 내성 및 전이성 진행을 가속화시킨다. 이러한 현상은 종양의 진행 동안 여러 단계에서 일어나는 종양 내 분자적 이질성에 의해 뒷받침된다. PAC의 종양 형성은 유전자 돌연변이 및 미세환경 조건을 포함한 다양한 인자들 간의 상호작용을 포함한다. 또한, 종양 이질성은 치료 민감성과 밀접한 관련이 있다. 그러므로 치료 효과를 높이고 환자의 예후를 개선하기 위해서는 이러한 기본 메커니즘을 이해하는 것이 중요하다.

[0005] 생물정보학 기술의 현저한 진보와 함께, 예후 유전자 발현 시그니처가 광범위하게 개발되었으며, 이는 다양한 임상병리학 및 인구학적 요인을 반영한다. 현재까지 두경부암 및 유방암과 같은 다양한 암 환자에서 예후를 예측하고 치료 결정을 돕기 위해 상업적 유전자 시그니처가 성공적으로 확립되었다(N Engl J Med. 2016;375(8):717-729). PAC에서도, 이전에 보고된 몇몇 연구들을 통해 예후 예측 또는 치료적 이익에 대한 종양 서브타입을 개발하려는 시도가 있었으나 임상 적용은 아직까지 가능하지 않다. 따라서, PAC에서의 종양 이질성의 이해를 통해 개별 환자의 예후를 정확하게 예측하는 분자적 분류법을 개발할 필요가 있다. 또한, 우수한 분자적 분류법은 환자의 과치료를 인한 유해성을 최소화하여 안전한 치료적 이점을 제공한다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 PAC 환자의 예후를 정확하게 예측하는 종양 특이적 유전자 발현과 밀접하게 관련된 신규한 분자적 분류법을 확립하였다. PAC-5 유전자 발현 시그니처는 보조 치료요법에 적합한 환자를 선별함으로써 PAC 환자에게 도움을 줄 수 있을 것이다. 더욱이, 광범위한 분석을 통해 PAC 이질성에 대한 예후 모델을 개선할 수 있는 가능성을 제공하고자 하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 전술한 바와 같이, 본 발명자들은 췌장암 중에서도 가장 큰 비율을 차지하는 췌장 선암을 진단하고 환자의 예후를 효과적으로 예측할 수 있는 신규한 유전자 마커를 발굴하기 위해 연구 노력한 결과, PAC-5라고 명명된 LAMA3, IFI44, E2F7, SLC12A2 및 LRIG1 유전자 세트를 발굴하였으며, PAC-5 시그니처가 췌장암을 진단하고 췌장암 환자 및 췌장암 환자에서 보조 치료요법 후의 예후를 예측하는데 유효함을 검증하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0008] 이에, 본 발명은 LAMA3, IFI44, E2F7, SLC12A2 및 LRIG1으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 체제를 포함하는, 췌장암 예후 예측용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 췌장암 예후 예측용 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 LAMA3, IFI44, E2F7, SLC12A2 및 LRIG1으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 체제를 포함하는, 췌장암의 보조 치료요법에 대한

예후 예측용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 췌장암의 보조 치료요법에 대한 예후 예측용 키트를 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

- [0010] 또한, 본 발명은 LAMA3, IFI44, E2F7, SLC12A2 및 LRIG1으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 췌장암 진단용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 췌장암 진단용 키트를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 LAMA3(laminin subunit alpha 3; GenBank 접근(accession) 번호: NM_000227, NM_001127717, NM_001127718, NM_001302996, NM_198129), IFI44(interferon induced protein 44; NM_006417), E2F7(E2F transcription factor 7; NM_203394), SLC12A2(solute carrier family 12 member 2; NM_001046, NM_001256461) 및 LRIG1(leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1; NM_015541)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 췌장암 예후 예측용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 췌장암 예후 예측용 키트를 제공한다.

- [0012] 또한, 본 발명은 LAMA3(laminin subunit alpha 3; GenBank 접근(accession) 번호: NM_000227, NM_001127717, NM_001127718, NM_001302996, NM_198129), IFI44(interferon induced protein 44; NM_006417), E2F7(E2F transcription factor 7; NM_203394), SLC12A2(solute carrier family 12 member 2; NM_001046, NM_001256461) 및 LRIG1(leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1; NM_015541)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 췌장암의 보조 치료요법에 대한 예후 예측용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 췌장암의 보조 치료요법에 대한 예후 예측용 키트를 제공한다.

- [0013] 또한, 본 발명은 LAMA3(laminin subunit alpha 3; GenBank 접근(accession) 번호: NM_000227, NM_001127717, NM_001127718, NM_001302996, NM_198129), IFI44(interferon induced protein 44; NM_006417), E2F7(E2F transcription factor 7; NM_203394), SLC12A2(solute carrier family 12 member 2; NM_001046, NM_001256461) 및 LRIG1(leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1; NM_015541)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 췌장암 진단용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 췌장암 진단용 키트를 제공한다.

- [0014] 본 발명의 일구현예로, 상기 췌장암은 췌장 선암(pancreatic adenocarcinoma)일 수 있다.

- [0015] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있다.

- [0016] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자가 암호화하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다.

- [0017] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 보조 치료요법은 화학 요법(Chemotherapy), 방사선 요법(Radiotherapy) 또는 표적 분자 치료요법(Targeted Molecular Therapy)인 것일 수 있다.

- [0018] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 표적 분자 치료는 엘로티닙(erlotinib)에 의한 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명자들은 PAC-5 시그니처 즉, LAMA3, E2F7, IFI44, SLC12A2 및 LRIG1 유전자를 췌장암의 예후 예측용 바이오마커로 발굴하였으며, 다양한 데이터세트를 이용하여 환자의 예후를 예측할 수 있는 독립적 예측 인자로서 그 유효성을 검증하였다. 상기 유전자 마커들은 췌장 선암 환자에서 예후를 예측하는데 유용하게 이용될 수 있을 뿐만 아니라 췌장암을 진단하고 더불어 개인의 맞춤 의학 측면에서 수술 후 보조 치료요법의 시행 시 혜택을 얻을 수 있는 환자를 선별하여 이들의 반응성과 예후를 예측하고 생존 연장에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 본 발명에 따른 예후 예측 모델을 구축하기 위해 진행된 연구 과정을 플로우차트로 도시한 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 PAC-5 시그니처를 확립한 결과로서, 도 2a는 시험 데이터세트에서 두 개 위험군(High risk group 및 low risk group)의 히트맵과 관련된 생존율 및 임상 정보를 나타낸 결과이고, 도 2b는 시험 데이터세트에서 두 개 위험군의 전체 생존율(OS)을 분석한 Kaplan-Meier plot 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 검증 데이터세트에서 PAC-5 시그니처의 Kaplan-Meier 생존율 분석결과를 나타낸 것으로, 도 3a 및 도 3b는 각각 검증 데이터세트에서 분류된 두 개 위험군(High-risk 및 Low-risk)의 전체 생존율(OS) 및 무재발 생존율(RFS)에 대한 Kaplan-Meier plot 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 췌장 선암의 병기 단계인 IB, IIA 및 IIB 단계 환자들에 대한 Kaplan-Meier 생존율 분석결과를 나타낸 것으로, 각각 단계 IB, IIA 및 IIB의 환자들을 PAC-5 시그니처에 따라 저위험 및 고위험군으로 분류하고 이들 그룹 간의 전체 생존율(OS) 차이를 Kaplan-Meier 생존율 분석 결과로 나타낸 것이다.

도 5는 보조 치료요법으로써 화학 치료요법을 받은 췌장 선암 환자들에 대한 Kaplan-Meier 전체 생존율(OS) 및 무재발 생존율(RFS) 분석결과를 나타낸 것이다.

도 6은 보조 치료요법으로써 방사선 치료를 받은 췌장 선암 환자들에 대한 Kaplan-Meier 생존율 분석결과를 나타낸 것으로, 도 6a 및 도 6b는 방사선 치료를 받거나 받지 않은 환자군을 PAC-5 시그니처에 따라 고위험군(High-risk) 및 저위험군(Low-risk)으로 분류하고 이들 그룹 간의 각각 전체 생존율(OS) 및 무재발 생존율(RFS) 차이를 Kaplan-Meier 생존율 분석 결과로 나타낸 것이다.

도 7은 보조 치료요법으로써 표적 분자 치료를 받은 췌장 선암 환자들에 대한 Kaplan-Meier 생존율 분석결과를 나타낸 것으로, 도 7a 및 도 7b는 표적 분자 치료를 받거나 받지 않은 환자군을 PAC-5 시그니처에 따라 고위험군(High-risk) 및 저위험군(Low-risk)으로 분류하고 이들 그룹 간의 각각 전체 생존율(OS) 및 무재발 생존율(RFS) 차이를 Kaplan-Meier 생존율 분석 결과로 나타낸 것이다.

도 8은 PAC-5 시그니처와 KRAS 돌연변이와의 상관관계를 알아보기 위한 Kaplan-Meier 생존율 분석 결과로서, 도 8a 및 도 8b는 각각 KRAS 야생형(KRAS-WT)을 갖거나 이의 돌연변이(KRAS-MT)를 갖는 환자군에서 PAC-5 시그니처에 따라 저위험(Low) 및 고위험군(High)으로 분류하고 이들 그룹 간의 각각 전체 생존율(OS) 및 무재발 생존율(RFS) 차이를 Kaplan-Meier 생존율 분석 결과로 나타낸 것이다.

도 9는 PAC-5 시그니처에 따라 분류된 두 개 위험군에서 LAMA3 및 LRIG1 유전자의 메틸화를 분석한 결과로서, 도 9a는 상기 각 유전자와 이들의 메틸화 간의 상관관계를 나타낸 것이고, 도 9b는 위험군에 따라 PAC-5 유전자 메틸화 경향을 히트맵으로 나타낸 것이다.

도 10은 PAC-5 유전자 시그니처에서 단백질-단백질간 상호작용 네트워크를 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명자들은 췌장암, 보다 바람직하게는 췌장 선암을 진단하고 환자의 예후를 효과적으로 예측할 수 있는 신규한 유전자 마커를 발굴하기 위해 연구 노력한 결과, PAC-5라고 명명된 LAMA3, IFI44, E2F7, SLC12A2 및 LRIG1의 5개 유전자 세트를 발굴하였으며, PAC-5 시그니처가 췌장암을 진단하고 췌장암 환자 및 췌장암 환자에서 보조 치료요법 후의 예후를 예측하는데 유효함을 검증하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0022] 보다 구체적으로, 본 발명의 일실시예에서는, 정상 췌장 조직과 췌장 선암 조직 사이에서 차등적으로 발현되는 1,149개의 유전자 후보군을 1차적으로 추출하고, 이 후보군을 바탕으로 췌장 선암 환자들의 생존율과 밀접한 연관성이 있는 유전자 5개의 독특한 발현 패턴을 확인함으로써 췌장 선암 조직 특이적 유전자세트를 확립하였다. 상기 유전자세트를 'PAC-5 시그니처' 라고 명명하였으며, 상기 PAC-5 시그니처에 기초하여 시험 데이터세트를 이용해 췌장 선암 환자군을 두 개의 위험군으로 분류하고 생존율을 분석한 결과 유의한 차이가 나타나는 것을 확인하였다(실시예 2 참조).

[0023] 본 발명의 다른 실시예에서는, 검증 데이터세트를 이용하여 생존 분석을 실시하고 임상적 연관성을 분석하여 본 발명에 따른 PAC-5 시그니처가 중요한 예후 가치를 나타냄을 확인함으로써 유효성을 검증하였다(실시예 3 참조).

[0024] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, AJCC 병기 결정 시스템에 근거한 1기 및 2기 췌장 선암 환자에서 PAC-5 시그니처의 유효성을 검증한 결과 IB기, IIA, IIB기 환자군을 전체 생존율에 대하여 저위험군 및 고위험군으로 유의하게 분류하는 것을 확인하였다(실시예 4 참조).

- [0025] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, PAC-5 시그니처와 보조 치료요법 간의 상관관계를 분석하였는데, 보다 구체적으로 PAC-5 시그니처를 각각 화학 요법, 방사선 요법 및 표적 분자 치료요법(TMT)에 통합함으로써 각각 고위험군 및 저위험군 환자에서 방사선 요법의 유무와 PAC-5 시그니처의 관련성을 분석하였다. 그 결과, 화학 요법으로 치료를 받은 환자군에서 PAC-5 시그니처에 기초하여 분류된 두 위험군 간에 전체 생존율의 유의한 차이가 나타남을 확인하였고, 고위험군 환자에서는 보조 방사선 요법에 따라 전체 생존율에 유의한 차이가 나타남을 확인하였으며, 또한 고위험군 환자에서 TMT에 따라 전체 생존율에 유의한 차이가 나며 TMT를 받은 환자군에서 TMT를 받지 않은 환자군에 비해 전체 생존율(OS) 및 무재발 생존율(RFS)이 유의하게 더 높게 나타난 것을 확인하였다(실시예 5 참조).
- [0026] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 대부분의 췌장 선암에서 빈번하게 돌연변이가 일어나는 KRAS 유전자의 상태와 PAC-5 시그니처와의 상관관계를 분석하였으며, 그 결과 PAC-5 시그니처는 KRAS 돌연변이를 갖는 환자를 저위험군과 고위험군으로 분류했으며 상기 위험군 간의 전체 생존율(OS)에 유의한 차이가 있는 것을 확인하였다(실시예 6 참조).
- [0027] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 177명의 환자 정보를 이용하여 PAC-5 유전자 발현과 관련된 DNA 메틸화에 대한 분석을 수행하였다(실시예 7 참조).
- [0028] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, PAC-5 유전자가 어떻게 PAC 진행에 기여할 수 있는지를 조사하기 위해 PAC-5 시그니처 유전자들과 관련된 단백질-단백질 상호작용 네트워크를 분석하였으며, 그 결과 2개 유전자 LRIG1 및 SLC12A2는 EGFR 티로신 인산화효소 억제제 저항성에 관련된 유전자들과 잠재적으로 상호작용하는 것을 확인하였다(실시예 8 참조).
- [0029] 상기와 같은 실시예를 통해 본 발명에 따른 5개 유전자 시그니처를 발굴하고 이의 유효성을 확인할 수 있었다.
- [0030] 이에, 본 발명은 LAMA3(laminin subunit alpha 3; GenBank 접근(accession) 번호: NM_000227, NM_001127717, NM_001127718, NM_001302996, NM_198129), IFI44(interferon induced protein 44; NM_006417), E2F7(E2F transcription factor 7; NM_203394), SLC12A2(solute carrier family 12 member 2; NM_001046, NM_001256461) 및 LRIG1(leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1; NM_015541)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, 췌장암 예후 예측용 마커 조성물을 제공한다.
- [0031] 또한, 본 발명은 LAMA3(laminin subunit alpha 3; GenBank 접근(accession) 번호: NM_000227, NM_001127717, NM_001127718, NM_001302996, NM_198129), IFI44(interferon induced protein 44; NM_006417), E2F7(E2F transcription factor 7; NM_203394), SLC12A2(solute carrier family 12 member 2; NM_001046, NM_001256461) 및 LRIG1(leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1; NM_015541)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 체제를 포함하는, 췌장암 예후 예측용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 췌장암 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [0032] 또한, 본 발명은 LAMA3(laminin subunit alpha 3; GenBank 접근(accession) 번호: NM_000227, NM_001127717, NM_001127718, NM_001302996, NM_198129), IFI44(interferon induced protein 44; NM_006417), E2F7(E2F transcription factor 7; NM_203394), SLC12A2(solute carrier family 12 member 2; NM_001046, NM_001256461) 및 LRIG1(leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1; NM_015541)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, 췌장암의 보조 치료요법에 대한 예후 예측용 마커 조성물을 제공한다.
- [0033] 또한, 본 발명은 LAMA3(laminin subunit alpha 3; GenBank 접근(accession) 번호: NM_000227, NM_001127717, NM_001127718, NM_001302996, NM_198129), IFI44(interferon induced protein 44; NM_006417), E2F7(E2F transcription factor 7; NM_203394), SLC12A2(solute carrier family 12 member 2; NM_001046, NM_001256461) 및 LRIG1(leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1; NM_015541)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 체제를 포함하는, 췌장암의 보조 치료요법에 대한 예후 예측용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 췌장암의 보조 치료요법에 대한 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 상기 췌장암은 바람직하게는 “췌장 선암(pancreatic adenocarcinoma)”으로서, 이는 췌관의 샘세포에 종양이 생긴 것으로, 췌장암의 90% 이상을 차지하며 종양 내 높은 이질성과 나쁜 예후를 보이는 암이다.

- [0035] 본 발명에서 사용되는 용어 “예후”는 병세의 진행, 회복에 관한 예측을 의미하는 것으로, 전망 내지는 예비적 평가를 말한다. 본 발명에서 예후는 체장암의 재발, 전이, 약물 저항성, 생존, 또는 무재발 생존 등을 의미하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명에 사용되는 용어, “체장암의 보조 치료요법에 대한 예후 예측”은 체장암의 수술 후 보조 치료요법을 시행할 때 치료의 혜택을 받아 좋은 예후를 보일 것으로 판단되는 환자를 선별하기 위한 것으로, 이를 통해 환자의 치료 반응성을 상승시킴으로써 환자의 생존 연장에 도움을 줄 수 있다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 보조 치료요법은 화학 요법(Chemotherapy), 방사선 요법(Radiotherapy) 또는 표적 분자 치료요법(Targeted Molecular Therapy)일 수 있으며, 상기 표적 분자 치료는 선택적 표피 성장인자 수용체(EGFR) 티로신 인산화효소 억제제(TKI)인 엘로티닙(erlotinib)에 의해 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명에서 사용되는 용어, “프라이머”란 DNA 합성의 기시점이 되는 짧은 유전자 서열로써, 진단, DNA 시퀀싱 등에 이용할 목적으로 합성된 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 상기 프라이머들은 통상적으로 15 내지 30 염기쌍의 길이로 합성하여 사용할 수 있으나, 사용 목적에 따라 달라질 수 있으며, 공지된 방법으로 메틸화, 캡화 등으로 변형시킬 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 사용되는 용어, “프로브”란 효소 화학적인 분리정제 또는 합성과정을 거쳐 제작된 수 염기 내지 수백 염기길이의 mRNA와 특이적으로 결합할 수 있는 핵산을 의미한다. 방사성 동위원소, 효소, 또는 형광체 등을 표지하여 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있으며, 공지된 방법으로 디자인하고 변형시켜 사용할 수 있다.
- [0041] 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 유전자가 암호화하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명에서 사용되는 용어, “항체”는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하며, 단클론(monoclonal) 항체 및 다클론(polyclonal) 항체를 모두 포함한다. 또한, 상기 항체는 키메라성 항체(예를 들면, 인간화 무인 항체) 및 이중결합항체(예를 들면, 양특이성 항체)와 같은 유전공학에 의해 생산된 형태를 포함한다.
- [0043] 본 발명에 따른 예후 예측용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치로 구성될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 체장암 환자 유래 생물학적 시료에서 LAMA3(laminin subunit alpha 3; GenBank 접근(accession) 번호: NM_000227, NM_001127717, NM_001127718, NM_001302996, NM_198129), IFI44(interferon induced protein 44; NM_006417), E2F7(E2F transcription factor 7; NM_203394), SLC12A2(solute carrier family 12 member 2; NM_001046, NM_001256461) 및 LRIG1(leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1; NM_015541)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는 체장암 예후 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0045] 또한, 본 발명은 체장암 환자 유래 생물학적 시료에서 LAMA3(laminin subunit alpha 3; GenBank 접근(accession) 번호: NM_000227, NM_001127717, NM_001127718, NM_001302996, NM_198129), IFI44(interferon induced protein 44; NM_006417), E2F7(E2F transcription factor 7; NM_203394), SLC12A2(solute carrier family 12 member 2; NM_001046, NM_001256461) 및 LRIG1(leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1; NM_015541)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는 체장암의 보조 치료요법에 대한 예후 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0046] 본 발명에 있어서, 체장암 환자의 예후 또는 체장암의 보조 치료요법에 대한 예후는 본 발명에 따른 5개 유전자 시그니처(PAC-5)를 이용하여 예후 지수를 도출함으로써 예측될 수 있다. 보다 구체적으로, 각 환자에 따라 상기 5개의 시그니처 유전자를 적용하여 환자에 대한 예후 지수를 도출하여, 상기 예후 지수의 중앙 값인 -0.060239를 기준으로 예후 지수가 중앙값보다 높은 환자들은 예후가 나쁜 고위험군으로 분류하고 예후 지수가 중앙값보다

다 낮은 환자들은 고위험군에 비해 유의적으로 예후가 더 좋은 저위험군으로 분류할 수 있다.

[0047] 상기 예후 지수 (y)는 하기 수학적식에 의해 계산되며, w_i 및 x_i 는 각각 i 번째 유전자에 대한 중량 및 유전자 발현 로그 값을 의미한다.

[0048] [수학적식]

$$y = \sum_{n=1}^i (w_i \cdot x_i) - 0.037658$$

[0049]

[0050] 본 발명에 있어서, 구체적인 실시예를 통해 종양 조직 간 분석에서 상기 시그니처 유전자 가운데 LAMA3, E2F7 및 IFI44의 발현은 저위험군 보다 고위험군에서 더 높게 발현되었으며, SLC12A2 및 LRIG1는 저위험군 보다 고위험군에서 더 낮게 발현되는 것을 확인하였다(실시예 2 참조).

[0051] 본 발명에서 사용되는 용어, “예후 예측을 위한 정보제공방법”은 예후 예측을 위한 예비적 단계로써 췌장암 또는 췌장암의 보조 치료요법에 대한 예후 예측을 위해 필요한 객관적인 기초정보를 제공하는 것을 의미하며, 의사의 임상학적 판단 또는 소견은 제외된다.

[0052] 본 발명에 있어서, 상기 생물학적 시료는 췌장 종양 조직일 수 있고, 보다 바람직하게는 포르말린 등의 고정액으로 고정하여 파라핀에 포매한 췌장 종양 조직을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 상기 mRNA의 발현수준은 당업계에 알려진 통상적인 방법에 따라 나노스트링 엔카운터 분석(NanoString nCounter analysis), 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있으며, 보다 바람직하게는 나노스트링 엔카운터 분석을 통해 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0054] 상기 단백질 발현수준은 당업계에 알려진 통상적인 방법에 따라 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역 분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군 으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 본 발명자들은 정상 췌장조직과 췌장 선암 종양 조직에서 차등적으로 발현되는 유전자를 추출하여 최종적으로 상기 PAC-5 유전자 시그니처를 발굴하였다.

[0056] 이에, 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 LAMA3(laminin subunit alpha 3; GenBank 접근(accession) 번호: NM_000227, NM_001127717, NM_001127718, NM_001302996, NM_198129), IFI44(interferon induced protein 44; NM_006417), E2F7(E2F transcription factor 7; NM_203394), SLC12A2(solute carrier family 12 member 2; NM_001046, NM_001256461) 및 LRIG1(leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1; NM_015541)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, 췌장암 진단용 마커 조성물을 제공한다.

[0057] 또한, 본 발명은 LAMA3(laminin subunit alpha 3; GenBank 접근(accession) 번호: NM_000227, NM_001127717, NM_001127718, NM_001302996, NM_198129), IFI44(interferon induced protein 44; NM_006417), E2F7(E2F transcription factor 7; NM_203394), SLC12A2(solute carrier family 12 member 2; NM_001046, NM_001256461) 및 LRIG1(leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1; NM_015541)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 체제를 포함하는 췌장암 진단용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 췌장암 진단용 키트를 제공한다.

[0058] 본 발명에서 사용되는 용어, “진단(diagnosis)”이란 넓은 의미로는 환자의 병의 실태를 모든 면에 걸쳐서 판단하는 것을 의미한다. 판단의 내용은 병명, 병인, 병형, 경중, 병상의 상세한 양태, 및 합병증의 유무 등이다. 본 발명에서 진단은 췌장암, 바람직하게는 췌장 선암의 발병 여부 및 진행단계 수준 등을 판단하는 것이다.

[0059] 또한, 본 발명은 췌장암 환자의 생물학적 시료에서 LAMA3(laminin subunit alpha 3; GenBank 접근(accession) 번호: NM_000227, NM_001127717, NM_001127718, NM_001302996, NM_198129), IFI44(interferon induced protein 44; NM_006417), E2F7(E2F transcription factor 7; NM_203394), SLC12A2(solute carrier family 12

member 2; NM_001046, NM_001256461) 및 LRIG1(leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1; NM_015541)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는 췌장암의 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0060] 본 발명에 있어서, LAMA3, E2F7, IFI44 및 SLC12A2 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현수준이 정상대조군의 췌장 조직의 해당 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현수준보다 더 높은 경우 췌장암, 보다 바람직하게는 췌장 선암으로 진단할 수 있다.

[0061] 본 발명에 있어서, LRIG1 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현수준이 정상대조군의 췌장 조직의 해당 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현수준보다 더 낮은 경우 췌장암, 보다 바람직하게는 췌장 선암으로 진단할 수 있다.

[0063] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0064]

[0065] [실시예]

[0066] 실시예 1. 실험재료 및 실험방법

[0067] 1-1. 환자 및 유전자 발현 데이터

[0068] 모든 임상정보 및 유전자 발현 데이터는 유전자 발현 오픈베이스 데이터베이스 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), ArrayExpress (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>), ICGC(International Cancer Genome Consortium, <https://icgc.org>) 및 TCGA(The Cancer Genome Atlas, <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga/>)로부터 얻었다. 사용된 모든 데이터세트는 생존 여부 및 시간에 대한 환자의 임상정보를 포함하였다. TCGA 데이터세트의 경우 유전자 발현 데이터, 돌연변이, 메틸화 및 임상 정보는 캘리포니아 산타 크루즈 대학교 (<http://xena.ucsc.edu/>)에서 얻었다. TCGA 및 ICGC의 2개의 RNA-시퀀싱 데이터세트는 췌장 신경 내분비 종양 및 다른 유형 암종의 종양 조직에 대한 데이터를 포함하였다. PAC 조직을 구별하기 위해 TCGA 및 ICGC의 임상 정보에서 제공된 조직학적 하위 유형을 지침에 따라 검토하였다 (Lloyd, R.V.; Osamura, R.Y.; Kloppel, G.n.; Rosai, J.; World Health Organization.; International Agency for Research on Cancer., WHO classification of tumours of endocrine organs. 4th edition. ed.; International Agency for Research on Cancer (IARC): Lyon, France, 2017; p 355 pages. , Puleo, F.; Nicolle, R.; Blum, Y.; Cros, J.; Marisa, L.; Demetter, P.; Quertinmont, E.; Svrcek, M.; Elarouci, N.; Iovanna, J.; et al., Stratification of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas Based on Tumor and Microenvironment Features. Gastroenterology 2018, 155, 1999-2013 e3.). 나아가 유전자 발현 데이터는 RMA(robust multiarray averaging method) 방법을 사용하여 정규화하였다. 또한 882명 환자에 대한 6개의 마이크로어레이 및 3개의 RNA-서열분석 데이터세트를 분석에 사용하였다. GSE71729(Agilent-014850 Whole Human Genome Microarray 4x44K G4112F) 데이터세트는 125명의 췌장 선암(PAC) 환자와 46명의 정상 췌장을 갖는 피험자를 포함하는 다수의 암 환자로부터 환자의 유전자 발현 데이터를 포함하며, 유전자 시그니처를 규명하기 위한 시험 데이터세트로 이용하였다. 검증 데이터세트는 GSE17891(n=27, Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 어레이), GSE57495(n=63, Rosetta/Merck Human RSTA Custom Affymetrix 2.0 마이크로어레이), GSE62452(n=66, Affymetrix Human Gene 1.0 ST 어레이), E-MEXP-2780(n=30, Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0), E-MTAB-6134(n=288, Affymetrix Human Genome U219 Array), GSE79668(n=51), ICGC(n=82) 및 TCGA(n=150)를 이용하였다. 검증 데이터세트에서, 대다수의 환자는 IIB기 병기 (490/727, 64.7%)에 해당되었으며, 특히 117/201명의 환자는 화학 요법을 받았고(58.2%), 42/187명의 환자 (22.5%) 및 102/139명의 환자가 표적 분자 치료(73.4 %)를 받았다.

[0070] 1-2. 예후 유전자 발현 시그니처 개발

[0071] 예후 위험성을 예측하기 위한 유전자 시그니처는 GSE71729 시험 데이터세트를 이용하여 발굴하였다. 먼저, 19,749개 유전자를 환자의 20% 미만에서 적어도 log2 척도의 절대 값으로 여과하였다. 다음으로, 정상 췌장 (n=46)과 PAC 조직(n=125) 사이에서 차등적으로 발현되는 유전자(DEG)를 분석하여 종양 특이적 유전자를 분리하

였다. 다음으로 단변량 평균 테스트(1000회)를 엄격한 p 값($p < 0.001$) 및 FDR(false discovery rate < 0.1)을 차등적으로 발현된 유전자들에 대한 컷오프로 설정하였다. 이후, 외부 검증 데이터세트와 양립하지 않거나 개별 생존 곡선에서 유의하지 않은 유전자는 제외하였다. 나아가 예후 예측을 위해, 시그니처 유전자를 생존 위험 예측 분석에 적용하였다. 이 방법은 시험 데이터세트의 주요 구성요소를 활용하여 각 환자에 대한 예후 지수(prognostic index; PI)를 생성하였다. 예후 지수 (y)는 하기 수학적식에 의해 계산되며, w_i 및 x_i 는 각각 i 번째 유전자에 대한 중량 및 유전자 발현 로그 값을 의미한다.

[수학적식]

$$y = \sum_{n=1}^i (w_i \cdot x_i) - 0.037658$$

모든 유전자의 중량 값은 다음과 같다; wLAMA3; 0.306929, wE2F7; 0.118701, wIFI44; 0.263742, wSLC12A2; -0.4137 및 wLRIG1; -0.190012. 한편, 예후 지수의 중앙 값인 -0.060239를 기준으로 하여 환자들을 2개의 위험 군으로 분류하였다. 예후 지수가 중앙값보다 높은 환자들은 고위험군에 배정하고, 저위험군은 중앙 값 미만의 예후 지수를 가진 환자로 구성하였다. 예후 유전자의 덴드로그램(dendrogram)은 클러스터링 알고리즘에 대한 기본 설정을 사용하여 R의 히트맵 기능을 사용하여 생성하였다.

1-3. 예후 예측 유전자 시그니처의 검증

유전자 시그니처의 유효성 검증은 외부 데이터세트를 이용하여 수행하였다. 상이한 데이터세트로부터 얻은 유전자 발현 데이터를 샘플에 걸쳐 중간 발현 값을 감산함으로써 개별적으로 조정하였다. 또한 이 모델을 더욱 개선하고 예측된 결과를 하위 계층화하기 위해 클래스 예측 알고리즘으로 화합물 공변량 예측기(Compound covariate predictor; CCP)를 이용하였다. 견고성은 LOOCV(Leave-One-Out Cross-Validation) 동안 결정된 분류오류 비율을 통해 추정하였다.

환자를 2개의 위험군으로 분류한 후에 Kaplan-Meier 생존 분석을 수행하였고, 카이-제곱(χ^2) 및 로그-랭크 검정을 이용하여 2개의 위험군 사이의 생존 위험도를 평가하였다. 또한 단변량 및 다변량 콕스 비례 위험 회귀분석을 이용하여 생존과 관련된 독립적 예후 인자를 평가한 다음 유전자 시그니처, 중앙 등급 및 병리학적 특성을 공변량으로 이용하였다.

1-4. 네트워크 및 신호전달 경로 분석

NetworkAnalyst 3.0은 포괄적인 프로파일링, 메타 분석 및 유전자 발현 데이터의 시스템 수준 해석을 위한 웹 기반 비주얼 분석 플랫폼이다 (<https://www.networkanalyst.ca/>). NetworkAnalyst 3.0을 적용하여 단백질-단백질 상호작용(PPI) 네트워크를 생성한 다음 KEGG pathway enrichment 분석을 수행하였다. PPI 네트워크 분석은 실험적 증거와 함께 STRING 데이터베이스 v11.0(<https://string-db.org/>)을 통해 수행되었다. 또한 KEGG pathway enrichment 분석을 수행하여 발현 시그니처의 유전자가 관련된 경로를 파악하였다. 모든 enrichment 분석에 대하여 조정된 $p < 0.05$ 의 값을 유의한 것으로 간주하였다.

1-5. 유전자 조절에 대한 DNA 메틸화 분석

유전자 조절에 대한 DNA 메틸화 프로파일링 분석은 TCGA DNA 메틸화 데이터 (Illumina Infinium HumanMethylation450 플랫폼)를 이용하여 수행하였다. CpG 부위(CpGs)상의 DNA 메틸화 β 값은 메틸화 및 비메틸화 대립유전자 사이의 강도 비율을 이용하여 메틸화 수준의 추정치를 나타냈다. CpG의 메틸화 값에 대한 역치는 중앙 및 인접한 정상 조직 사이의 $\Delta \beta = \beta_{\text{Tumor}} - \beta_{\text{Normal}} > 0.1$ 의 절대 값으로 설정하였고, $\Delta \beta > 0.1$ 은 과메틸화된 부위로 정의하고 $\Delta \beta < -0.1$ 은 저메틸화된 부위로 결정하였다. 근위 유전자 발현과 DNA 메틸화 사이의 연관성은 피어슨 상관관계수(r)로 표시하였다. 상관관계 값은 $0.1 < |r| \leq 0.4$, 약한 상관관계; $0.4 < |r| \leq 0.7$, 중간 상관관계; $r = 0.7 < |r| \leq 0.9$, 강한 상관관계로 나타내었다.

[0086] 1-6. 통계분석

[0087] 유전자 발현 데이터셋을 BRB-Array Tools 버전 4.6 (<https://brb.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools/>)을 사용하여 분석하였다. 다른 모든 통계분석은 R language environment(<http://www.r-project.org>) 및 SPSS(Statistical Package for Social Sciences) 소프트웨어(버전 25, SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 이용해 수행하였다. 모든 통계적 분석에서, p 값이 0.05 미만의 경우에 유의한 것으로 간주하였다.

[0089] 실시예 2. 예후 예측 유전자 시그니처의 발굴

[0090] 췌장 선암(PAC) 환자를 저위험군 및 고위험군으로 분류하는 분자적 분류인자를 발굴하기 위하여, 생존 정보와 관련된 유전자 발현 프로파일링을 조사하였으며, 시험 데이터셋으로 GSE71729를 사용하였다. 유전자 시그니처를 발굴하기 위해 진행된 연구 과정은 도 1에 플로우차트로 도시하였다. 보다 구체적으로, 먼저 유전자 세트의 강도(intensity)를 필터링함으로써 2,654개 유전자를 도출하였다. 다음으로, 정상 췌장과 종양 샘플 간의 DEG 분석을 수행하여 암 관련 유전자를 분류하고(단변량 분석에서 $p < 0.001$) 종양 특이적인 1,149개의 유전자를 추출하였다. 이어서, 상기 유전자들을 이용하여 생존 종료점으로서 전체 생존율(OS)에 대한 LASSO(least absolute shrinkage and selection operator) 회귀분석을 실시하였다. 그 결과, LAMA3, E2F7, IFI44, SLC12A2, LRIG1, DUOX1 및 RBM1이 예후 유전자의 서브셋으로 도출되었다. 그러나, DUOX1 발현수준은 환자를 별개의 위험군으로 분류하기 위한 독립적인 예후 예측 바이오마커로서 작용하지 않았으며, RBM1 유전자의 발현 데이터는 외부 검증 데이터셋 내에는 존재하지 않았다. 따라서, PAC 환자의 OS와 관련된 최종 유전자 발현 시그니처에서 상기 DUOX1 및 RBM1 유전자를 배제하였다. 결과적으로, 본 발명자들은 상기 LAMA3, IFI44, E2F7, SLC12A2 및 LRIG1 5개 유전자를 예후 예측 모델로 확립하였으며, 이를 PAC-5 시그니처라고 명명하였다. 나아가 PAC-5 시그니처에 포함된 5개 유전자의 발현 패턴을 살펴본 결과, 도 2a에 나타낸 바와 같이 저위험군과 고위험군에서 두 개의 클러스터로 나타났다. 나아가, PAC-5 시그니처에서 5개의 유전자가 종양-특이적으로 발현되는지를 확인하기 위해, 정상 피험자와 PAC 환자의 위험군에 대하여 5개 유전자의 mRNA 발현수준을 평가하였다. 그 결과, 4개 유전자 즉, LAMA3, E2F7, IFI44 및 SLC12A2의 발현수준은 정상 췌장보다 PAC에서 더 높게 나타났다. 이에 반해, LRIG1 mRNA는 정상 췌장보다 PAC에서 덜 발현된 것을 확인하였다. 종양 조직간의 분석에서, LAMA3, E2F7 및 IFI44의 mRNA는 저위험군 보다 고위험군의 조직에서 더 많이 발현된 반면, 다른 두 유전자인 SLC12A2 및 LRIG1의 발현은 저위험군 보다 고위험군에서 더 낮게 발현된 것으로 나타났다. 각 환자 및 정상 피험자에 대한 예후 지표는 PAC-5 시그니처에 기초하여 계산하였다. 도 2a의 하위 히스토그램에서 볼 수 있는 바와 같이 환자들은 예후 지수에 의존하는 위험도에 따라 저위험 ($n=63$) 및 고위험 ($n=73$) 그룹으로 분류되었으며, 또한 고위험군의 예후 지수는 다른 군에서의 수치보다 유의하게 높게 나타났다.

[0091] Moffitt 등 (GSE71729 검증 데이터셋)은 이전에 PAC 환자의 예후 예측을 위한 두 가지 독특한 하위 유형을 제안했는데, 이 중 'basal-like subtype'은 'classical subtype'보다 더 나쁜 예후 결과를 보였다. 이러한 Moffitt 분류의 하위 유형은 PAC에서 유전자 발현 패턴 및 조직학적 세포성과 관련이 있었다. 흥미롭게도, PAC-5 시그니처에서 LAMA3 유전자는 하위 유형 구별에서 유전자들과 공유되었으며, 이 중 과발현은 'basal-like subtype'과 관련이 있었다. 따라서, PAC-5 시그니처와 Moffitt 분류 간의 관련성을 더욱 이해하기 위해 비교 분석을 실시하였다. 카이 제곱(χ^2) 검정을 이용한 연관 분석에서, PAC-5 시그니처에 의한 위험군은 Moffitt 분류와 유의한 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 또한 시험 데이터셋에서 저위험군과 고위험군 간의 생존율 차이를 추가로 검증하기 위해 Kaplan-Meier 생존 곡선 분석을 이용하였다. 그 결과, 도 2b에 나타낸 바와 같이 Kaplan-Meier 플롯은 저위험군 및 고위험군에서 각각 전체 생존율(OS)의 중간 값이 27.4개월과 13.7개월로 유의한 예후 차이를 나타내는 것을 확인하였다($p=8.37E-04$).

[0093] 실시예 3. 검증 데이터셋에서 PAC-5의 생존 분석 및 임상적 연관성 분석

[0094] 다음으로, 상기에서 규명한 예후 예측인자의 견고성을 추가적으로 검증하기 위해, 본 발명자들은 5개의 마이크로어레이 또는 3개의 RNA 시퀀싱 데이터셋에서 PAC-5 시그니처의 유효성을 검증하였다. LOOCV 동안 CCP에서 위험을 정확하게 예측하기 위한 특이성과 민감도는 각각 0.839와 0.905로 나타났다. 또한 도 3a에 나타낸 바와 같이 PAC-5 시그니처는 병합된 합동 검증 데이터셋에서 환자를 저위험군 및 고위험군으로 유의하게 분류하였으며 전체 생존율의 중간 값이 각각 30.4 및 17.7개월의 차이를 나타내었고($p=1.88E-07$), 도 3b에서 볼 수 있는 바와 같이 검증 데이터셋에서 무재발 생존율(RFS)을 분석한 결과 중간 값이 저위험군과 고위험군에서 각각

17.5 및 15.5개월로 나타났다($p=0.046$). 더욱이 Kaplan-Meier 플롯 분석 결과 마이크로어레이 데이터세트 및 RNA-시퀀싱 데이터세트에서 유의한 예후 차이를 보였다(OS에 대하여 각각 $p=4.87E-03$ 및 $p=6.94E-07$).

[0095]

하나의 외부 데이터세트인 GSE62452는 종양 조직의 데이터와 쌍을 이루는 종양과 인접한 조직에서의 유전자 발현 데이터를 보유하고 있다($n=61$). 본 발명자들은 PAC-5 유전자가 종양 특이적으로 발현되는지 여부를 보다 확실히 검증하기 위하여, PAC 환자의 두 위험군에 해당하는 인접 조직과 이들의 종양 조직 간의 5개 유전자의 mRNA 발현 수준을 평가하였다. 그 결과 시험 데이터세트에서의 결과와 유사하게, LAMA3, E2F7, IFI44 및 SLC12A2의 발현 수준은 인접한 조직에서보다 PAC에서 더 높게 나타났으며, LRIG1 mRNA는 인접한 조직보다 PAC에서 덜 발현된 것을 확인하였다. 종양 조직간의 분석에서, LAMA3, E2F7 및 IFI44의 mRNA는 저위험군 보다 고위험군의 조직에서 더 많이 발현되는 반면, SLC12A2 및 LRIG1은 고위험군에서 더 낮은 수준으로 발현되었다. 또한 고위험군에 대한 예후 지수 값은 다른 두 군에 비해 유의하게 높은 것을 확인하였다.

[0096]

나아가 본 발명자들은 시험 데이터세트에서 생존 시간에 대한 PAC-5 시그니처의 예후 예측의 정확성을 조사하기 위해 단변량 콕스 회귀 분석을 실시하였다. 그 결과 PAC-5 시그니처의 유의한 값을 얻었다(HR 1.781, 95 % CI 1.105-2.873, $p=0.018$). 그러나 시험 데이터세트에는 임상병리학적 특성이 없었기 때문에, PAC-5 시그니처의 예후 가치를 예후 공변량과 비교할 수 없었다. 이에 PAC-5 시그니처의 예후 가치를 예후 공변량과 추가적으로 비교하기 위해, 병합된 검증 데이터세트를 이용하여 단변량 및 다변량 콕스 회귀분석을 실시하였다. 그 결과, 하기 표 1에 나타난 바와 같이 단변량(Univariate) 분석에서, 병리학적 등급, 원발성 종양 크기, 림프절 전이, AJCC 병기 단계 및 PAC-5 시그니처가 병리학적 등급 4를 제외하고 이들의 레퍼런스와 비교해 전체 생존율과 유의한 상관관계가 있는 것을 확인하였다. 또한 유의한 공변량과 PAC-5 시그니처를 이용하여 다변량(Multivariate) 분석을 실시하였으며, 그 결과 병리학적 등급(G2 및 G3), 원발성 종양의 크기 (T2 및 T3), 림프절 전이 및 PAC-5가 여전히 중요한 예후 가치를 나타내는 것을 확인하였다.

표 1

[0097]

Variables		OS					
		Univariate			Multivariate		
		HR	95% CI	p-value	HR	95% CI	p-value
Age							
	≤65 (referent)	1					
	>65	1.316	0.997-1.738	0.053			
Gender							
	Female (referent)	1					
	Male	0.898	0.735-1.097	0.292			
Family history							
	No (referent)	1					
	Yes	0.862	0.476-1.560	0.624			
Race							
	Black (referent)	1					
	Other	1.246	0.544-2.856	0.614			
Pancreatitis							
	No (referent)	1					
	Yes	1.033	0.491-2.173	0.931			
Diabetes							
	No (referent)	1					
	Yes	0.817	0.542-1.230	0.332			
Grade							
	G1 (referent)	1			1		
	G2	1.363	1.047-1.773	0.021	1.324	1.005-1.744	0.046
	G3	2.270	1.706-3.022	1.89E-08	1.924	1.410-2.627	3.72E-05
	G4	1.634	0.515-5.182	0.405	2.399	0.746-7.718	0.142
T							
	T1 (referent)	1			1		

	T2	2.010	1.018-3.970	0.044	2.309	1.015-5.524	0.046
	T3	2.434	1.295-4.574	0.006	2.778	1.199-6.438	0.017
	T4	2.966	1.168-7.534	0.022	5.418	0.643-45.63 ₂	0.120
N							
	N0 (referent)	1			1		
	N1	1.938	1.504-2.496	3.08E-07	2.021	1.466-2.787	1.76E-05
AJCC Staging							
	1 (referent)	1			1		
	2	1.611	1.140-2.277	0.007	0.676	0.342-1.338	0.261
	3	2.173	1.215-3.888	0.009	0.420	0.025-7.122	0.548
	4	2.735	1.346-5.555	0.005	0.590	0.130-2.675	0.494
PAC-5							
	Low (referent)	1			1		
	High	1.599	1.333-1.895	2.41E-07	1.349	1.080-1.685	0.008

[0098]

[0099] **실시예 4. 1기 및 2기 PAC 환자에서 PAC-5 시그니처의 유효성 검증**

[0100] AJCC 병기 결정 시스템은 PAC에서 가장 널리 인정되는 예후 모델이다. 그러나 AJCC 병기의 예후적 가치는 실질적인 한계가 있으며, 이에 의해 IB, IIA 및 IIB 환자의 생존율은 동일하게 나타난다. 따라서, 본 발명자들은 PAC-5 시그니처가 검증 데이터세트에서 1기 또는 2기의 환자들을 2개의 위험 그룹으로 적절하게 분류할 수 있는지 조사하였다. 검증 데이터세트는 1기(n=66, 9%) 및 2기(n=621, 85.4%) 환자들의 생존율 정보를 포함하였다. 실제로, 본발명자들은 AJCC 병기 결정 시스템이 생존율에 대하여 병기 IA, IB, IIA 및 IIB의 환자를 적절하게 분류하지 못하는 것을 확인하였다. 특히, 단계 IB와 IIA의 Kaplan-Meier 생존 곡선은 유의한 차이를 나타내지 않았다(p=0.297). 이에 반해, 도 4에 나타난 바와 같이 PAC-5 시그니처는 IB기 또는 IIA기 환자를 전체 생존율에 대하여 저위험군 및 고위험군으로 유의하게 분류하는 것을 확인하였다(단계 IB의 경우 p=0.047, 단계 IIA의 경우 p=0.043). 또한, IIB기 환자 역시 2개의 위험군으로 명확하게 분류되었다(p=8.61E-05). 반면, 단계 IA의 환자는 PAC-5 시그니처에 의해 두 개의 위험군으로 유의하게 분류되지 못하였다(p=0.109).

[0102] **실시예 5. PAC-5 시그니처와 보조 치료요법 간의 상관관계 분석**

[0103] **5-1. 화학 요법(Chemotherapy)**

[0104] 겐시타빈(Gemcitabine)에 기반한 보조 화학 요법은 현재 PAC 수술 후 표준 요법으로 권장되고 있다. 그러나 상당수의 PAC 환자는 화학 요법 치료에 잘 반응하지 않아 약물 저항과 전이가 진행된다. 실제로, 임상 병리학적 정보는 GSE79668 및 TCGA RNA-시퀀싱 데이터 세트에서 화학 요법 치료에 불완전하였다. TCGA 데이터세트의 임상 정보는 보조 화학 요법을 받은 환자만을 나타냈다(n=100). GSE79668 데이터세트의 경우, 화학 요법 정보에 대한 세부 사항은 약물 이름: 예(n=17) 및 아니오(n=6)로 저장되어 있어 본 발명자들은 각 위험 그룹에서 PAC-5 시그니처에 의한 치료적 이득을 얻을 수 있는 환자를 평가할 수 없었다. 그러나, 도 5에 나타난 바와 같이 PAC-5 시그니처는 화학 요법 약물을 투여 받은 환자(n=117)를 전체 생존율(OS)에 대하여 2개의 하위 위험군으로 유의하게 분류하였으며(p=0.022), 반면에 무재발 생존율(RFS)에 대해서는 환자를 유의하게 분류하지는 못했다(p=0.087).

[0106] **5-2. 방사선 요법(Radiotherapy)**

[0107] 보조 방사선 요법은 PAC를 치료하기 위한 필수 요법으로 자주 이용된다. 그러나 환자에게 방사선 치료가 도움이 되는지에 대해서는 여전히 논쟁의 여지가 있다. 따라서, 보조 방사선 치료에 대한 반응과 PAC-5 시그니처의 연관성을 조사하였다. 그 결과 GSE79668 및 TCGA RNA-시퀀싱 검증 데이터세트에서 방사선 요법 자체는 전체생존율에 대해서는 치료적 효과를 보여주었지만(p=4.81E-03), 무재발 생존율에 대한 유의한 효과는 없었다(p=0.631).

[0108] 나아가 PAC-5 시그니처를 방사선 요법 정보에 통합함으로써 각각 고위험군 및 저위험군 환자에서 방사선 요법의 유무와 PAC-5 시그니처의 관련성을 분석하였다. 그 결과, 도 6a에 나타난 바와 같이 고위험군 환자에서는 보조 방사선 요법에 따라 전체 생존율에 유의한 차이가 나며 방사선 요법을 받은 환자에서 전체 생존율이 유의하게 더 높게 나타났다($p=2.82E-04$). 저위험군 환자에서는 방사선 요법이 전체 생존율에 유의한 영향을 미치지 않았다($p=0.832$). 이에 반해, 도 6b에서 볼 수 있는 바와 같이 고위험군과 저위험군 모두에서 방사선 요법에 의한 무재발 생존율(RFS)의 유의한 차이는 나타나지 않았다.

[0110] **5-3. 표적 분자 치료요법(Targeted molecular therapy)**

[0111] 표적 분자 치료요법(TMT)은 암에서 신호전달 경로를 유도하는 종양 단백질을 억제함으로써 암을 치료하도록 설계된 개인 맞춤형 치료요법으로 제안되었다. PAC 치료에서, 선택적 표피 성장인자 수용체(EGFR) 티로신 인산화 효소 억제제(TKI)인 엘로티닙(erlotinib)은 FDA에 의해 승인된 유일한 표적 치료제이다. 이에 본 발명자들은 TCGA RNA-seq 검증 데이터세트에서 TMT에 대한 반응과 PAC-5 시그니처의 연관성을 조사하고자 하였다. 먼저 TMT를 받은 환자는 TMT를 받지 않은 환자에 비해 전체생존율(OS) 및 무재발 생존율(RFS)이 증가하는 치료효과가 있는 것을 확인하였다(OS의 경우 $p=8.53E-04$, RFS의 경우 $p=0.018$).

[0112] 나아가 PAC-5 시그니처를 TMT에 통합함으로써 각각 고위험군 및 저위험군 환자에서 TMT 유무와 PAC-5 시그니처의 관련성을 분석하였다. 그 결과, 도 7a 및 7b에 나타난 바와 같이 고위험군 환자에서는 TMT에 따라 전체 생존율에 유의한 차이가 나며 TMT를 받은 환자군에서 TMT를 받지 않은 환자에 비해 전체 생존율(OS) 및 무재발 생존율(RFS)이 유의하게 더 높게 나타났다(OS의 경우 $p=1.10E-08$, RFS의 경우 $p=1.25E-03$). 이에 반해, 저위험군 환자에서는 TMT 유무에 따라 치료 결과에 유의한 차이가 나타나지 않았다(OS의 경우 $p=0.172$, RFS의 경우 $p=0.832$).

[0114] **실시예 6. KRAS 상태와 PAC-5 시그니처와의 상관관계 분석**

[0115] 암세포의 악성 행동은 발암유전자와 종양 억제 유전자의 돌연변이에 의해 촉발된다. PAC에서 가장 빈번하게 돌연변이가 일어나는 유전자는 KRAS로(약 95%), GSE79668 및 TCGA RNA-시퀀싱 데이터세트에서 KRAS 돌연변이는 모든 췌장 종양 케이스의 82.4%에서 관찰되었다. 그러나 KRAS 상태 자체는 전체 생존율 및 무재발 생존율 모두에 대해 PAC 환자의 예후적 결과에 유의한 차이를 보이지 않았다.

[0116] 나아가, KRAS 돌연변이 상태와 PAC-5 시그니처와의 상관관계를 분석한 결과, 도 8a에 나타난 바와 같이 PAC-5 시그니처는 KRAS 야생형(KRAS-WT)을 갖는 환자군을 전체 생존율에 대하여 저위험군 및 고위험군으로 유의하게 분류하지는 못하였으나($p=0.218$), KRAS 변이체(KRAS-MT)를 갖는 환자군에서는 두 위험군으로 유의하게 분류할 수 있음을 확인하였다($p=9.19E-04$). 그러나 무재발 생존율(RFS)의 경우, 도 8b에서 볼 수 있는 바와 같이 KRAS 상태에 관계없이 PAC-5 시그니처가 환자를 두 위험군으로 유의하게 분류하지 못한 것을 확인하였다.

[0117] 또한, KRAS 상태가 PAC-5 시그니처에 의해 두 위험군으로 분류된 환자들에게 영향을 미치는지 여부를 추가적으로 평가하기 위해 KRAS 상태를 통합한 환자군에서 PAC-5 시그니처에 기초해 두 위험군으로 분류하였으나 역시 유의한 결과는 얻지 못하였다.

[0119] **실시예 7. PAC-5 시그니처 유전자들의 발현을 조절하는 DNA 메틸화 분석**

[0120] DNA 메틸화는 암의 후성 유전체학에서 유전자 조절에 중요한 메커니즘이다. DNA 메틸화가 PAC-5 유전자의 발현에 영향을 미치는지 여부를 평가하기 위해, 유전자 발현 수준과 상기 유전자들의 CpG 부위(CpG)상의 DNA 메틸화 상태 사이의 상관관계를 분석 하였다. CpG의 메틸화 값에 대한 역치는 종양 및 인접한 정상 조직 사이의 $\Delta\beta = \beta_{\text{Tumor}} - \beta_{\text{Normal}} > 0.1$ 의 절대 값으로 설정되었다; $\Delta\beta > 0.1$ 은 과메틸화 부위로 정의되었고 $\Delta\beta < -0.1$ 은 저메틸화 부위로 간주되었다. 근위 유전자 발현과 DNA 메틸화 사이의 연관성은 피어슨의 상관계수(r)에 의해 결정되었다. 두 기준 ($r > 0.4$ 및 $p < 0.05$)이 만족되었을 때, 상관 값은 유의한 것으로 간주하였다. 그 결과, 도 9a에 나타난 바와 같이 중간 정도의 r 값을 갖는 LAMA3 및 LRIG1 유전자에 대해 유의한 CpG를 얻었다. 이들 유전자에 대한 DNA 메틸화의 히트맵은 도 9b에 나타내었다. 그러나 다른 유전자의 조절에 대해서는 유의한 CpG가 발견되지 않았다.

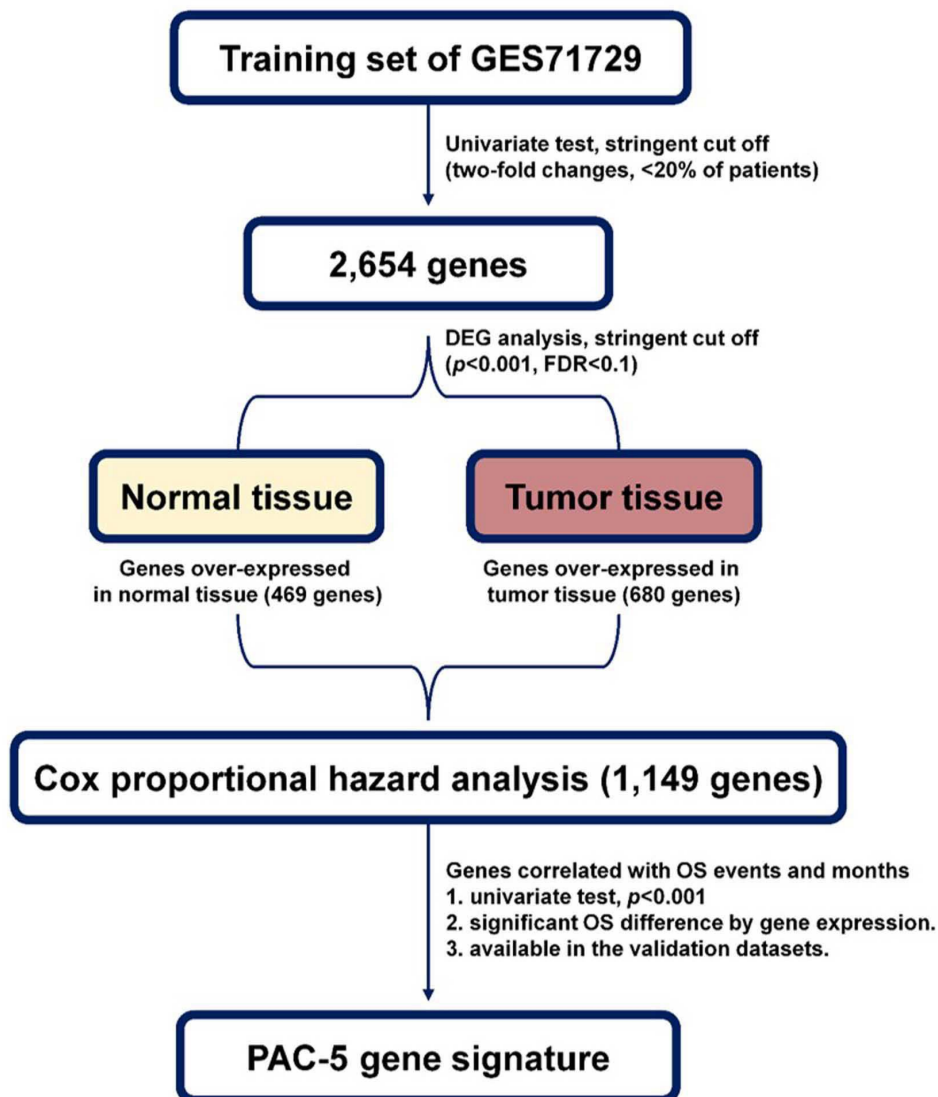
[0122] 실시예 8. PAC-5 시그니처와 관련된 단백질-단백질 상호작용 네트워크의 확인

[0123] PAC-5 유전자가 어떻게 PAC 진행에 기여할 수 있는지를 조사하기 위하여, 본 발명자들은 NetworkAnalyst 툴을 이용해 PPI 분석을 실시하였다. 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이 PAC-5 유전자들을 이용하여 단백질을 나타내는 53개의 노드와 단백질 간의 상호작용을 나타내는 51개의 이음선으로 3개의 PPI 네트워크가 생성되었다. 또한, 추가적으로 PAC-5 유전자와 상호작용하는 단백질의 기능에 주석을 달기 위해 KEGG 경로 분석을 수행하였다. 중요하게, PAC-5 시그니처의 2개 유전자 LRIG1 및 SLC12A2는 EGFR 티로신 인산화효소 억제제 저항성에 관련된 유전자들과 잠재적으로 상호작용하는 것을 확인하였다.

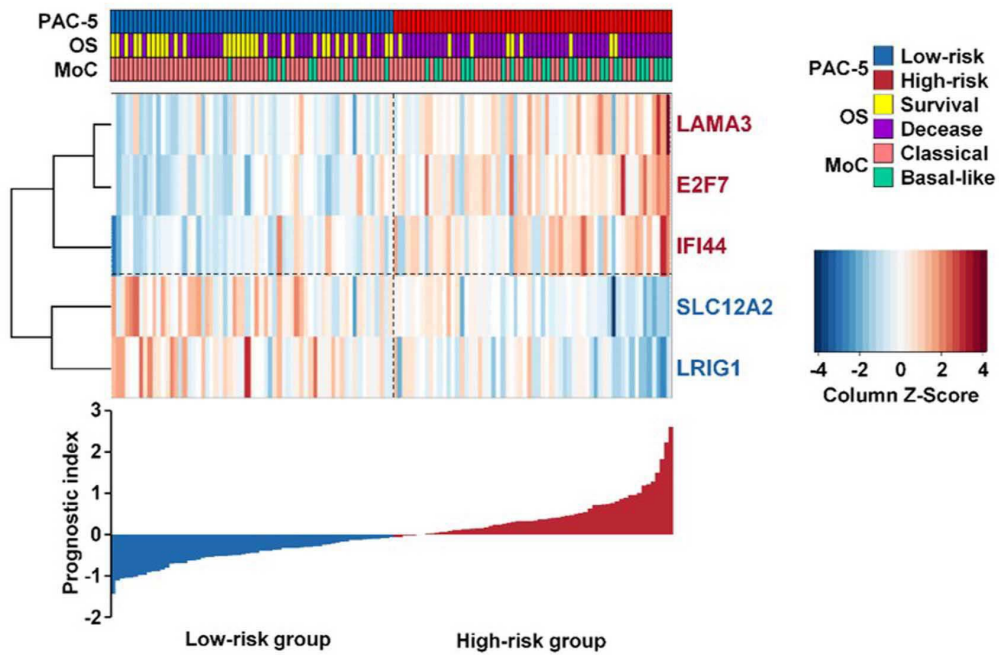
[0125] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

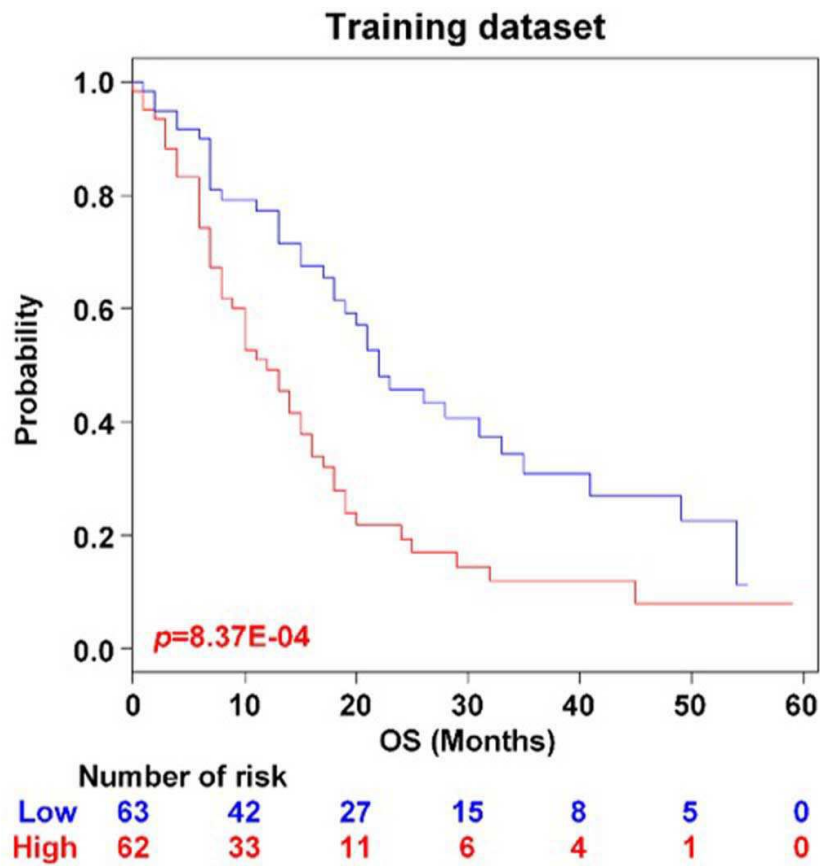
도면1



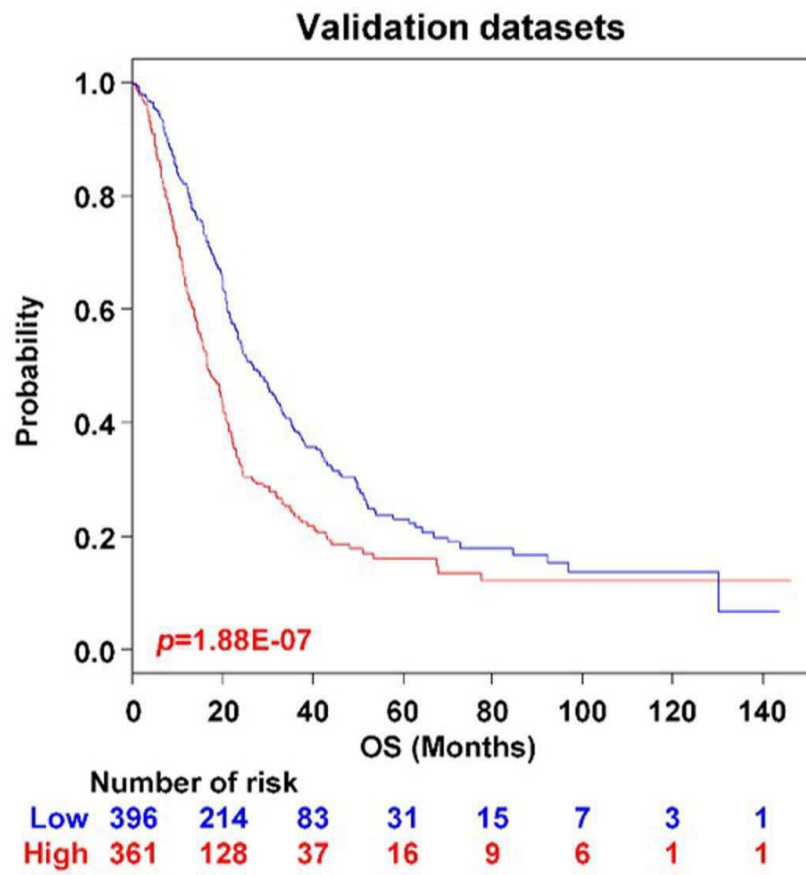
도면2a



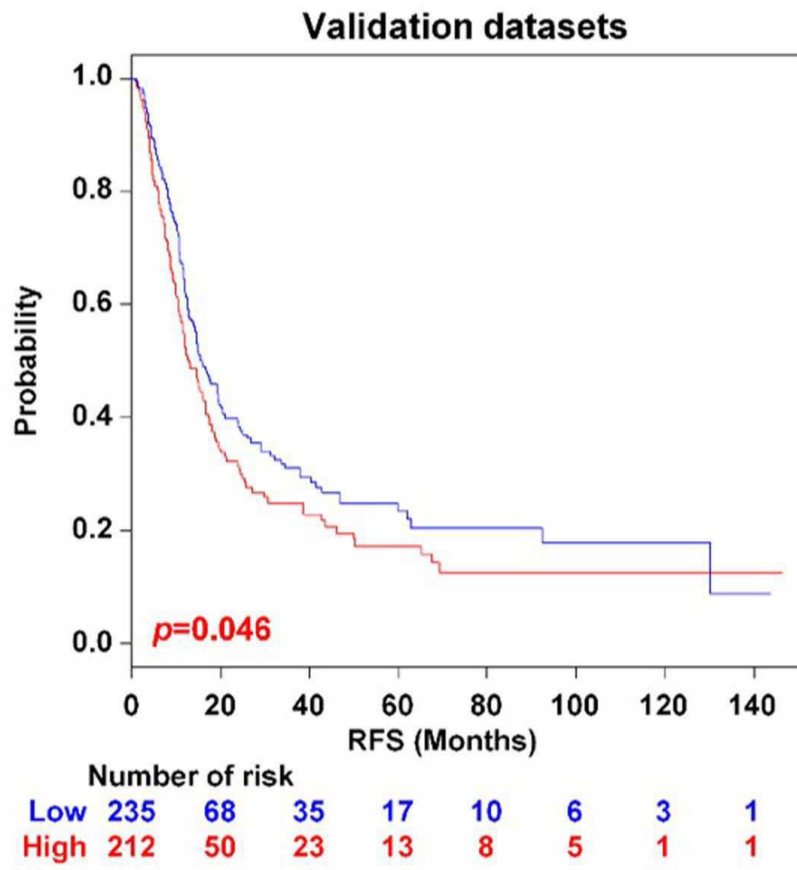
도면2b



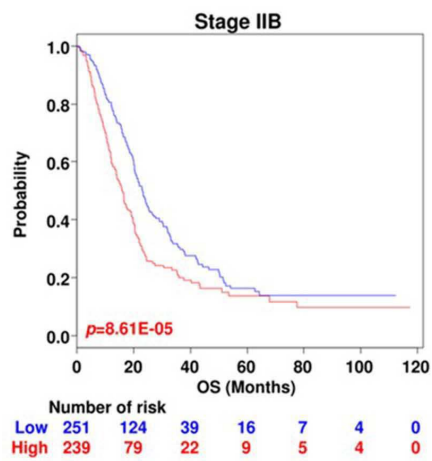
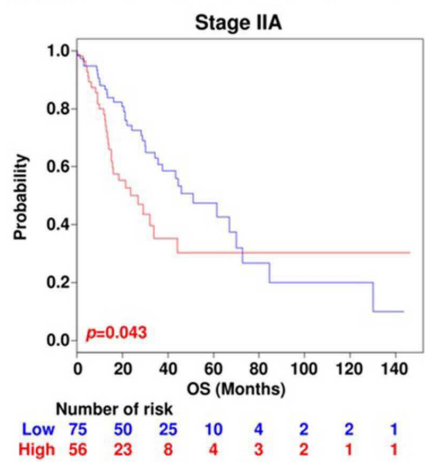
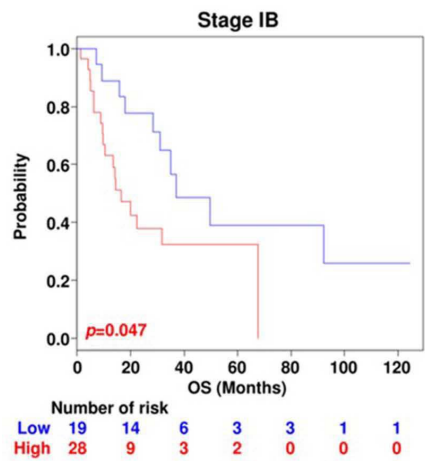
도면3a



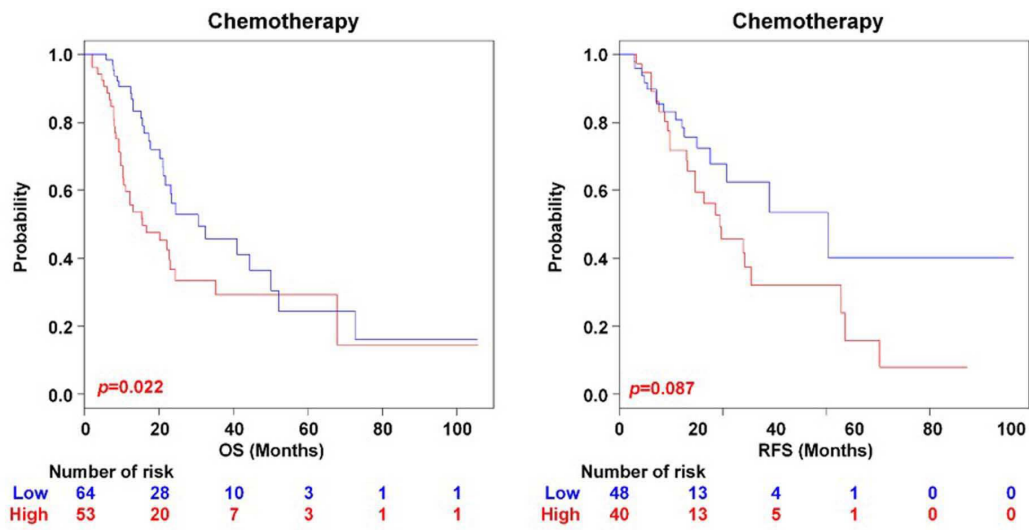
도면3b



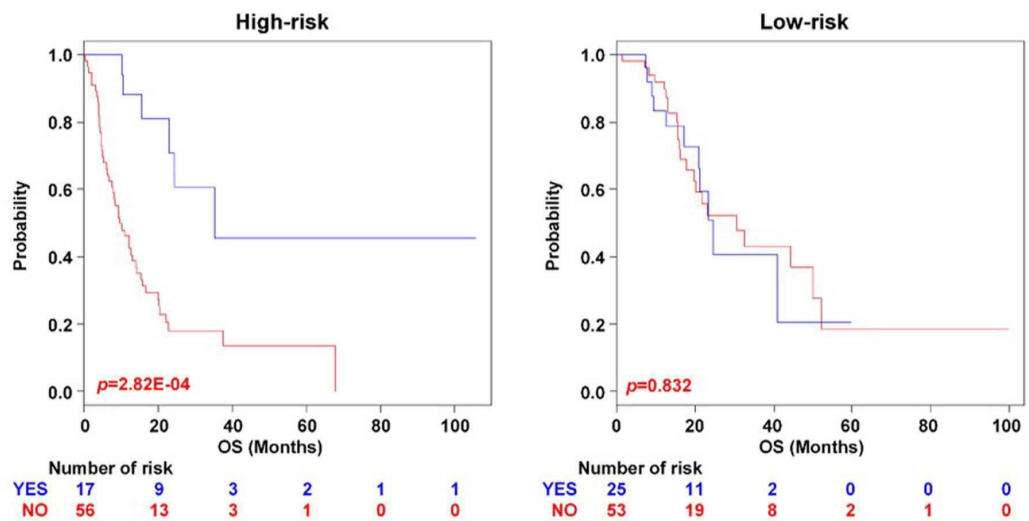
도면4



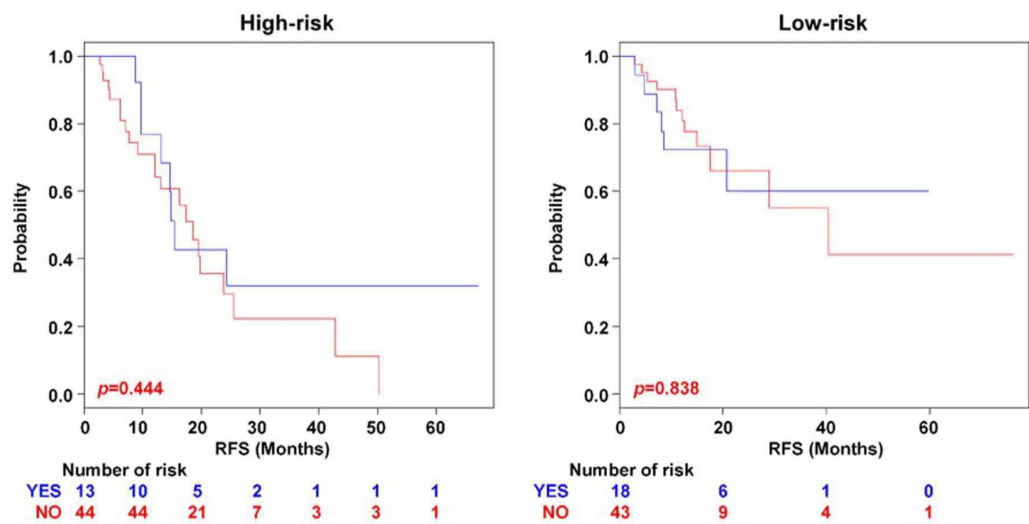
도면5



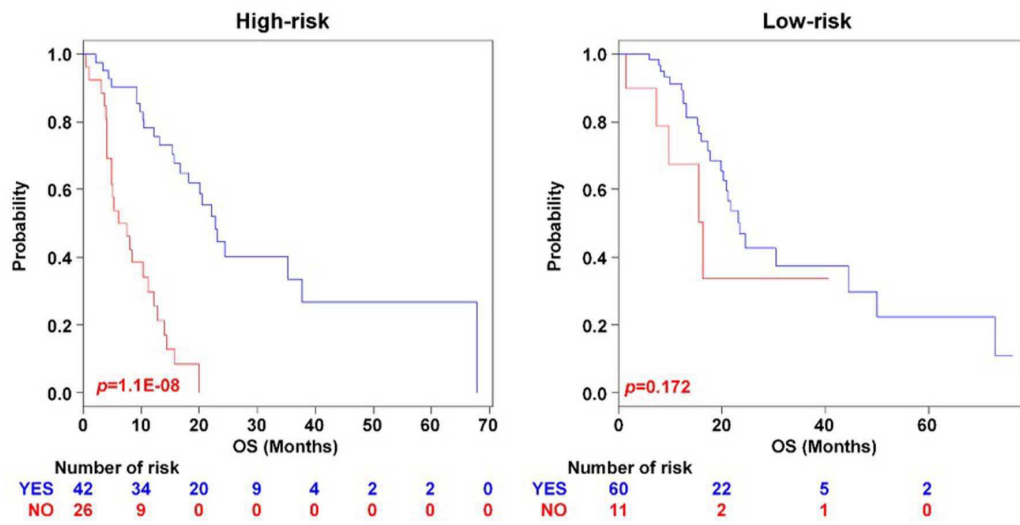
도면6a



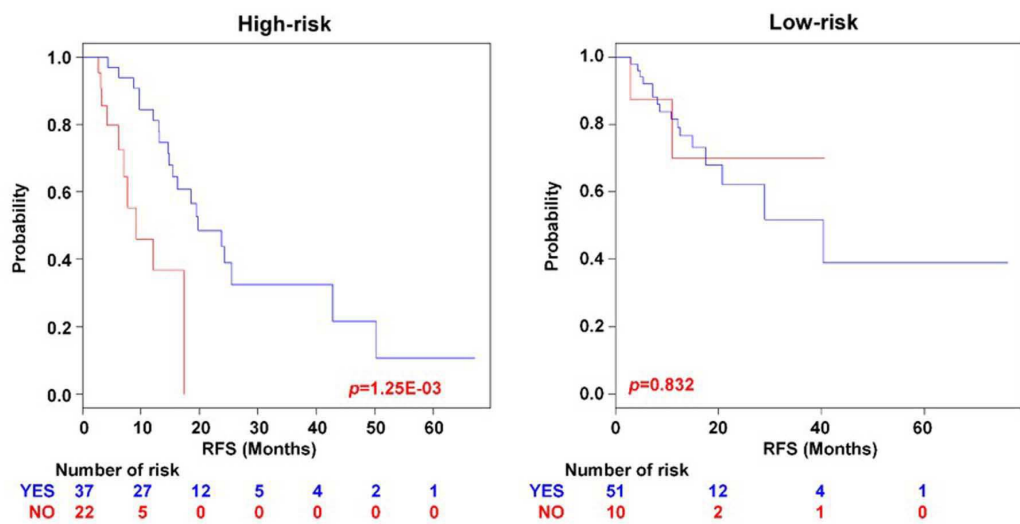
도면6b



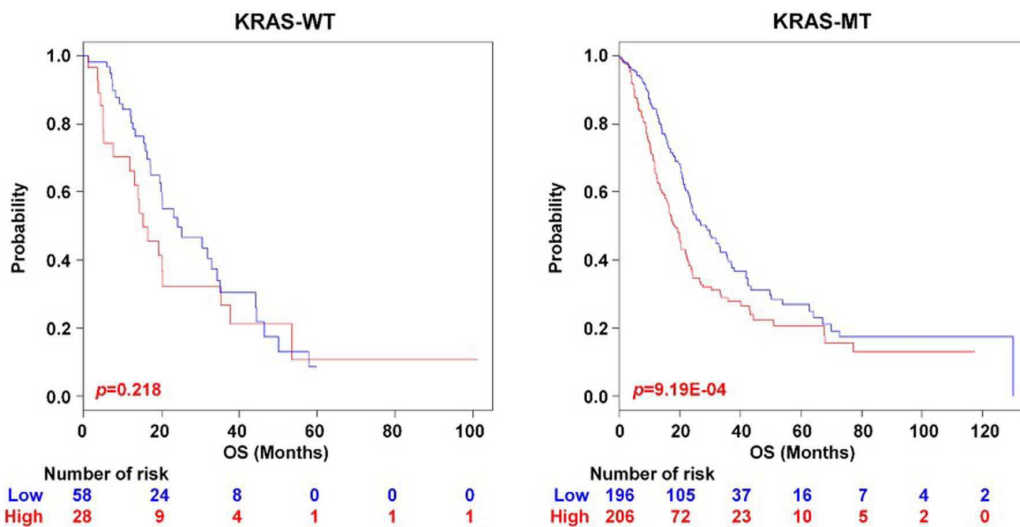
도면7a



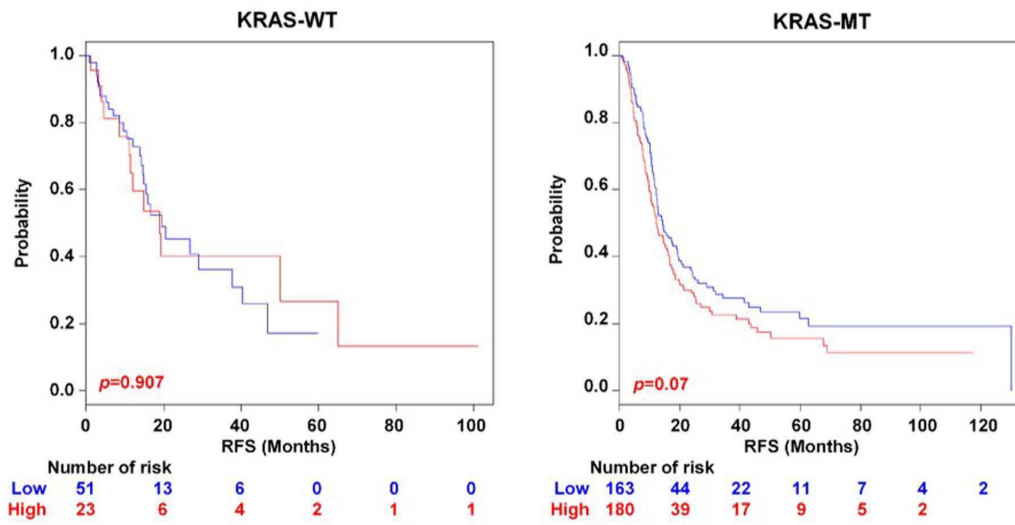
도면7b



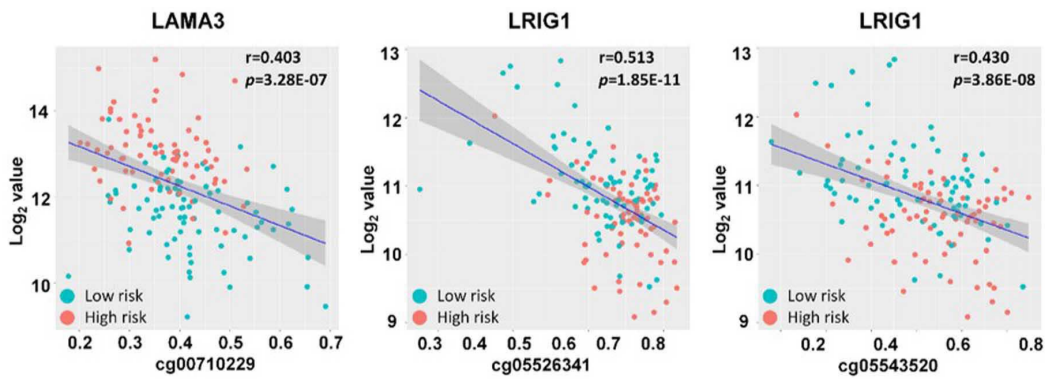
도면8a



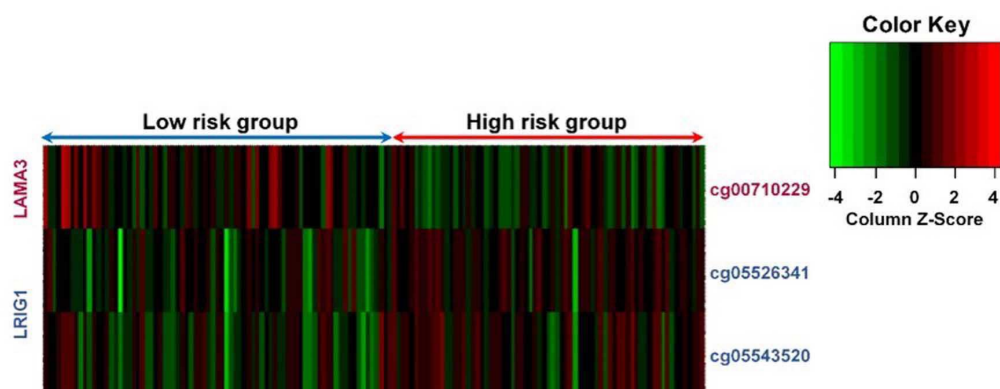
도면8b



도면9a



도면9b



도면10

