



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0155085
(43) 공개일자 2022년11월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6886 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6886 (2022.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0062878

(22) 출원일자 2021년05월14일

심사청구일자 2021년05월14일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교
산학협력관 201호(신당동)

(72) 발명자

안근수

대구광역시 수성구 청호로 345(황금동, 태왕아너
스아파트)

한진이

대구광역시 남구 중앙대로22길 205-4(봉덕동, 봉
덕로알타운)

(74) 대리인

특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 9 항

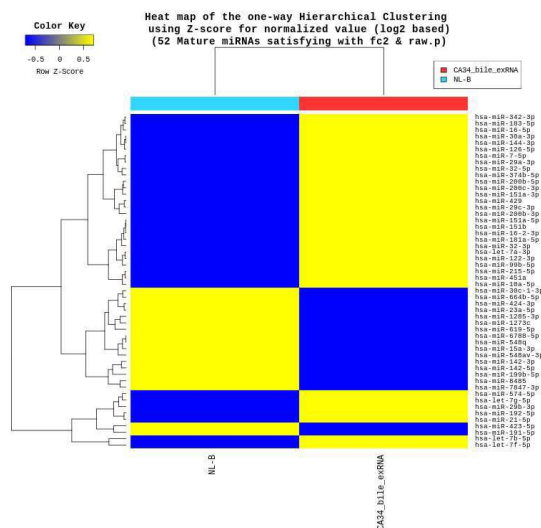
(54) 발명의 명칭 담관암 진단을 위한 담즙 유래 miRNA 바이오마커 내지 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 담관암을 진단하기 위한 담즙 유래 miRNA 바이오마커 내지 이의 용도에 대한 것이다.

본 발명의 담즙, 특히 담즙 내 엑소솜 유래 miRNA 바이오마커를 이용하는 경우 조직 유래 miRNA 를 이용한 경우와 동일하거나 보다 우수한 정확도로 담관암을 진단할 수 있으므로, 비침습 담관암 진단용 바이오마커 조성물 내지 비침습적 담관암 진단을 위한 정보제공방법에 효과적으로 사용할 수 있다. 또한 체액보다 엑소솜에서 비 코딩 RNA의 안정성이 높기 때문에 엑소솜을 통한 유전자 분석이 담즙 자체 분석보다 더 좋을 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/178 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711109866

과제번호 2018R1C1B3004435

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 신진연구지원사업

연구과제명 임상-유전학적 통합 분석을 통한 담도암의 분자생물학적 아형 예측 모델 확립 및 아형 특이적 표적치료 전략 수립

기 여 율 1/1

과제수행기관명 계명대학교 산학협력단

연구기간 2018.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-let-7a-3p, hsa-miR-429, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-574-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-23a-5p, hsa-miR-619-5p, hsa-miR-8485, hsa-miR-15a-3p, hsa-miR-1273c, hsa-miR-7847-3p 및 hsa-miR-1285-3p 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 담관암 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 miRNA 는 담즙 유래인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 miRNA 는 담즙 내 엑소좀(exosome) 유래인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항의 조성물을 포함하는 담관암 진단용 키트.

청구항 5

개체로부터 분리된 시료에서,

hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-let-7a-3p, hsa-miR-429, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-574-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-23a-5p, hsa-miR-619-5p, hsa-miR-8485, hsa-miR-15a-3p, hsa-miR-1273c, hsa-miR-7847-3p 및 hsa-miR-1285-3p 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 를 포함하는 담관암 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 miRNA 중 hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-let-7a-3p, hsa-miR-429, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-29c-3p 및 hsa-miR-574-5p 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자 발현 수준이 대조군에 비하여 증가하는 경우 담관암으로 진단하는 것을 특징으로 하는 정보제공방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 miRNA 중 hsa-miR-191-5p, hsa-miR-23a-5p, hsa-miR-619-5p, hsa-miR-8485, hsa-miR-15a-3p, hsa-miR-1273c, hsa-miR-7847-3p 및 hsa-miR-1285-3p 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준이 대조군에 비하여 감소하는 경우 담관암으로 진단하는 것을 특징으로 하는 정보제공방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 시료는 담즙 인 것을 특징으로 하는 정보제공방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 시료는 담즙 내 엑소좀(exosome) 인 것을 특징으로 하는 정보제공방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 담관암을 진단하기 위한 담즙 유래 miRNA 바이오마커 내지 이의 용도에 대한 것이다.

배경 기술

[0003] 담관암 (CCA, Cholangiocarcinoma)은 담관 세포에서 발생하는 악성 질환으로 CCA의 진단을 위해서는 조직 생검이 필요하나 침습적으로 수행하기가 어렵다. 또한, CEA 및 CA 19-9와 같은 혈청 바이오마커의 진단적인 의미도 제한적이다. 대다수의 환자들은 특별한 증상이 없고 조기 진단이 어려워 CCA 환자의 생존율은 매우 좋지 않다.

[0004] CCA 환자의 생존을 향상시키기 위해서는 조기 진단이 가능한 분자적인 바이오마커가 필요하다. 최근 조직을 이용한 분자적인 연구가 많이 진행되고 있으며 이러한 접근법을 통해 다양한 분자 마커가 확인되고 잠재적인 표적 치료법으로 제안되고있다. 그러나 내시경 또는 경피적 생검은 사용 가능한 조직의 양이 제한적으로 외과적 절제 전 충분한 조직을 확보하는 것이 불가능하며, 수술 전 분자 특성을 확인하고 표적 접근법 개발이 더욱 어려워 CCA에서 바이오마커의 임상 적용은 매우 제한적이다. 담즙은 종양 세포와 직접 접촉하므로, 종양 유래 물질이 담즙에 많이 존재할 수 있다. 또한 CCA는 병리적 및 분자적인 이질성으로 담즙분석은 조직보다 더욱 분자적 특징이 반영될 수 있다.

[0005] 엑소좀은 대부분의 세포 유형에서 담즙을 포함한 체액으로 분비되는 작은 소포(직경 30-100nm)로 엑소좀은 주로 융합 단백질과 수송체, 포스포리파아제 및 기타 지질 관련 단백질이 포함되어 종양 유래 엑소좀은 종양 진행에 필요한 핵산과 발암 단백질을 운반한다. 엑소좀은 단백질, mRNA, microRNA (miRNA)를 운반 및 신호전달이 가능하므로 암 연구에 이상적인 생체물이 될 수 있다. 엑소좀은 종양과 종양 주변의 강한 신호전달 분자로, 종양뿐 아니라 종양 미세 환경 정보를 암시한다. 최근, 암 진행 촉진자로서 엑소좀의 역할을 강조하는 연구가 증가하고 있고 많은 연구들 중 엑소좀에 포함된 miRNA가 암 발병, 증식, 침입, 전이 및 혈관 신생 유도를 포함한 암 진행과 관련한다는 사실이 명확히 입증되었다.CCA에서는 담즙보다 엑소좀에서 비 코딩 RNA의 안정성이 높아 엑소좀을 통한 유전자 분석이 담즙 분석 보다 더욱 유용하다.

[0006] 지금까지는 담즙을 활용한 유전자 분석은 수행되지 않고 있다. 비록 담즙 유래 엑소좀에서 miRNA 프로파일링을 조사한 몇 연구는 있으나, NGS (Next-generation Sequencing)를 이용한 통합 miRNA-mRNA 분석은 없다.

[0007] 대한민국 특허출원 제10-2013-0122635호 는 “담도암 진단용 바이오마커의 추출 방법, 이를 위한 컴퓨팅 장치, 담도암 진단용 바이오마커 및 이를 포함하는 담도암 진단 장치” 에 대한 것으로서, 혈액 또는 조직에서 수득한 마이크로 RNA를 이용한 담도암 진단용 바이오마커의 추출 방법 및 이를 위한 컴퓨팅 장치, 그리고 담도암 진단용 바이오마커 및 이를 포함하는 담도암 진단 장치를 제공한다. 그러나, 담즙 및 NGS 분석을 통한 통합 miRNA-mRNA 분석은 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명자들은 비침습적인 방법으로 담관암을 진단할 수 있는 바이오마커를 제공하고자 노력한 결과, 특히 담즙에 존재하는 엑소좀 내 miRNA 를 바이오마커로서 이용하는 경우 담관암을 높은 정확도로 진단할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0010] 따라서, 본 발명의 목적은 담관암을 진단하기 위한 담즙 유래 miRNA 바이오마커 내지 이의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-let-7a-3p, hsa-miR-429, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-574-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-23a-5p, hsa-miR-619-5p, hsa-miR-8485, hsa-miR-15a-3p, hsa-miR-1273c, hsa-miR-7847-3p 및 hsa-miR-1285-3p 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 정도를 측정하는 제제를 포함하는 담관암 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 miRNA 는 담즙 유래인 것이다.
- [0014] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 miRNA 는 담즙 내 엑소좀(exosome) 유래인 것이다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 담관암 진단용 키트를 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 개체로부터 분리된 시료에서,
- [0017] hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-let-7a-3p, hsa-miR-429, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-574-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-23a-5p, hsa-miR-619-5p, hsa-miR-8485, hsa-miR-15a-3p, hsa-miR-1273c, hsa-miR-7847-3p 및 hsa-miR-1285-3p 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 를 포함하는 담관암 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 miRNA 중 hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-let-7a-3p, hsa-miR-429, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-29c-3p 및 hsa-miR-574-5p 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자 발현 수준이 대조군에 비하여 증가하는 경우 담관암으로 진단하는 것이다.
- [0019] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 miRNA 중 hsa-miR-191-5p, hsa-miR-23a-5p, hsa-miR-619-5p, hsa-miR-8485, hsa-miR-15a-3p, hsa-miR-1273c, hsa-miR-7847-3p 및 hsa-miR-1285-3p 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준이 대조군에 비하여 감소하는 경우 담관암으로 진단하는 것이다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 시료는 담즙 인 것이다.
- [0021] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 시료는 담즙 내 엑소좀(exosome) 인 것이다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명의 담즙, 특히 담즙 내 엑소좀 유래 miRNA 바이오마커를 이용하는 경우 조직 유래 miRNA 를 이용한 경우와 동일하거나 보다 우수한 정확도로 담관암을 진단할 수 있으므로, 비침습적 담관암 진단용 바이오마커 조성물 내지 비침습적인 담관암 진단을 위한 정보제공방법에 효과적으로 사용할 수 있다. 또한 체액보다 엑소좀에서 비코딩 RNA의 안정성이 높기 때문에 엑소좀을 통한 유전자 분석이 담즙 자체 분석보다 더 유용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1 은 $|\text{fold change}| \geq 2$ 및 raw.p 값 < 0.05 를 만족하는 52 개의 성숙한 miRNA를 기반으로 정규화된 값(log2 기반)에 대해 Z-score 을 사용하는 단방향 계층적 클러스터링의 히트맵을 나타낸다.
- 도 2 는 miRNA-mRNA 조절 네트워크를 나타낸다. 22 개의 DEMiRNA 중 14 개의 netwDEMiRNA는 miRNA-표적 상호

작용의 최소 수에 대한 임계 값이 4이고 FDR < 0.01 인 microRNA 네트워크를 가지고 있었다. 굵은 파란색 상자는 정상 및 암 담즙 샘플간 비교 발현된 mRNA를 나타낸다.

도 3 은 miRNA-mRNA 상호 작용의 기능적 평가에서 RAS 경로를 나타낸다. 강조 표시된 빨간색 및 노란색 상자는 각각 본 발명에서 다르게 발현된 miRNA 및 mRNA 신호를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 본 발명은 차세대 염기서열 분석법(NGS, Next generation sequencing) 및 통합 mRNA 시퀀싱을 사용하여 담즙 유래 엑소솜에서 순환하는 miRNA 발현 프로파일링을 조사하여 조절 장애가 있는 miRNA 특징과 발암 경로를 확인하고 담관암(CCA, cholangiocarcinoma)에서 표적 mRNA에 미치는 영향을 확인하였다. 또한 담즙 유래 엑소솜을 이용한 유전자 분석이 조직을 이용한 유전자 분석을 대체할 수 있는 가능성을 조사하였다.
- [0027] 구체적으로 대조군으로 담관 결석(bile duct stone)이 있는 환자와, 치료적 절제술 전에 간문부 담관암(perihilar CCA) 환자로부터 담즙을 채취하였다. 담즙에서 엑소솜을 분리하고 분리된 엑소솜을 사용하여 차세대 miRNA 시퀀싱을 수행하였다. miRNA-mRNA 상호 작용을 평가하기 위해 두 환자 모두에서 담즙을 사용하여 mRNA 시퀀싱을 수행하였다.
- [0028] 그 결과, 22 개의 차별적으로 발현된 miRNA를 확인하였다. 이러한 miRNA의 예측된 mRNA 표적의 65 % 이상이 실제로 대조군과 CCA 담즙 샘플간에 차별적으로 발현되었다. 기능적 경로 분석에서 22 개의 miRNA의 표적은 주로 MAPK, PDGF, VEGF, EGFR 및 p53 신호 전달이 많았다. 특히, miRNA-mRNA 상호 작용의 기능적 평가에서 하류경로(PI3K-AKT-mTOR 및 RAS-RAF-MEK-ERK)를 포함한 RAS 경로가 강화된 것으로 확인되었다.
- [0029] 즉, 담즙 유래 엑소솜에서 순환하는 miRNA는 CCA에서 miRNA 분석 개발을 위한 새로운 정보를 제공하였다. 이러한 miRNA는 CCA 조직의 발암 특성을 나타낼 수 있으므로 CCA 진단을 위하여 조직 샘플 대신 사용할 수 있다.
- [0031] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0033] CCA에서는 조직 생검에 의한 조기 진단이 제한적이라는 점을 감안할 때 혈액이나 체액에서 암 유래 순환 miRNA를 검출하기 위한 액체 생검은 진단 스크리닝을 위한 이상적인 바이오마커 방법이 될 수 있다. 그러나 혈액에서 순환하는 miRNA의 진단 정확도는 많은 연구에서 일정하게 나타나지 않는다. 또한 혈액과 조직 샘플에서 얻은 결과 간의 불일치도 종종 관찰된다. 따라서 혈액에서 순환하는 miRNA의 연구는 종양 조직의 유전적 특성을 나타내지 않을 수 있으며 CCA에 대한 혈액 순환 miRNA의 진단적인 의미도 제한적이다. CCA의 경우 담즙이 종양 세포에 직접 접촉하고 종양 유래 물질이 담즙에 마노이 존재할 수 있다. 따라서 담즙은 바이오마커와 CCA의 분자 분석에 이상적인 바이오 생체물이 될 수 있으며, 세포 외 소포에 둘러싸인 miRNA가 순환 반감기를 증가시킬 수 있다는 점을 고려하면 담즙 유래 엑소솜에서 miRNA 프로파일링은 조직 생검을 대체할 수 있을 것이다.
- [0034] 본 발명에서 상기 두 샘플간 비교 발현된 miRNA(DEmiRNA)의 예측 mRNA 표적이 65 % 이상으로 정상 및 암 담즙 샘플간 비교 발현되었다. 또한 CCA 조직에서 흔히 볼 수 있는 RAS, VEGF, EGFR, p53 및 TGF- β 신호 전달 경로를 포함한 DEmiRNA의 여러 발암 경로도 담즙 엑소솜에 존재하였다. 특히, 하류 경로 (PI3K-AKT-mTOR 및 RAS-RAF-MEK-ERK)를 포함한 RAS 경로가 많이 있었다. RAS 단백질과 그 하류 효소는 CCA 조직에서 활성화되고 KRAS 및 NRAS를 포함한 RAS 유전자의 발암성 돌연변이가 발생하였다. 이는 담즙 유래 엑소솜이 CCA 조직의 발암 특성을 나타내며 침습적인 조직 생검을 대체할 수 있음을 시사한다.
- [0036] 따라서, 본 발명은 hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-let-7a-3p, hsa-miR-429, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-574-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-23a-5p, hsa-miR-619-5p, hsa-miR-8485, hsa-miR-15a-3p, hsa-miR-1273c, hsa-miR-7847-3p 및 hsa-miR-1285-3p 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 담관암 진단용 바이오마커 조성물을 제공할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 “진단(diagnosis)”은 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 바람직하게는 담관암 및 이의 발병 위험성을 판단하는 것이다.

[0038] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 miRNA 는 담즙 유래인 것일 수 있으며, 바람직하게는 상기 miRNA 는 담즙 내 엑소좀(exosome) 유래인 것일 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명은 조성물을 포함하는 담관암 진단용 키트를 제공할 수 있다.

[0041] 본 발명의 키트는 통상적으로 사용되는 발현 수준 분석방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치로 구성될 수 있다. 예를 들어, 단백질 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충 용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등을 포함할 수 있다.

[0042] 본 발명의 키트는 평가 대상체로부터 샘플을 수득하기 위한 샘플 추출 수단을 포함할 수 있다. 샘플 추출 수단은 바늘 또는 시린지 등을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 키트는 액체, 기체 또는 반고체일 수 있는, 추출된 샘플을 수용하기 위한 샘플 수집 용기를 포함할 수 있다. 키트는 사용 지침을 추가로 포함할 수 있다. 상기 샘플은 상기 miRNA 가 존재하거나 분비될 수 있는 임의의 신체 샘플일 수 있으나, 바람직하게는 담즙일 수 있으며, 보다 바람직하게는 담즙 내 엑소좀일 수 있다. 신체 샘플에서 상기 miRNA 의 측정은 전체 샘플 또는 가공된 샘플 상에서 수행될 수 있다.

[0044] 또한, 본 발명은 개체로부터 분리된 시료에서,

[0045] hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-let-7a-3p, hsa-miR-429, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-574-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-23a-5p, hsa-miR-619-5p, hsa-miR-8485, hsa-miR-15a-3p, hsa-miR-1273c, hsa-miR-7847-3p 및 hsa-miR-1285-3p 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 를 포함하는 담관암 진단을 위한 정보제공방법을 제공할 수 있다.

[0046] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 miRNA 중 hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-let-7a-3p, hsa-miR-429, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-29c-3p 및 hsa-miR-574-5p 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자 발현 수준이 대조군에 비하여 증가하는 경우 담관암으로 진단하는 것일 수 있다.

[0047] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 miRNA 중 hsa-miR-191-5p, hsa-miR-23a-5p, hsa-miR-619-5p, hsa-miR-8485, hsa-miR-15a-3p, hsa-miR-1273c, hsa-miR-7847-3p 및 hsa-miR-1285-3p 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA 유전자의 발현 수준이 대조군에 비하여 감소하는 경우 담관암으로 진단하는 것일 수 있다.

[0048] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 시료는 담즙 인 것일 수 있으며, 바람직하게는 상기 시료는 담즙 내 엑소좀(exosome) 인 것일 수 있다.

[0050] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석하지 않는 것은 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명한 것이다. 하기 실시예에 사용된 에탄올을 비롯한 시약들은 Sigma (St. Louis, MO, USA) 에서 구입하였다.

실시예 1

[0052] 실험준비

[0053] <1-1> 환자

[0054] 2018 년 8 월부터 2020 년 3 월까지 계명대학교 동산 병원에 총 2 명의 환자가 등록되었다. 담즙은 치료적 절제 전에 IIIa 형 비스무트 분류를 가진 간문부 담관암(perihilar CCA) 를 가진 61 세 남성으로부터 채취되었다. 대

조군으로는 담관 결석이 있는 환자에서 담즙을 채취하였으며 이 환자는 87 세 여성이었다. 이 전향적 연구는 계명대학교 동산 의료원 기관 심의위원회 (DSMC 2018-06-054)의 승인을 받았으며, 인간 유래 물질의 2 차 사용을 포함하였다.

[0056] <1-2> 담즙 수집 및 준비

[0057] CCA 의 경우 담관염 또는 폐쇄성 황달을 완화하고, 대조군의 경우 CBD 결석을 제거하여 담관염을 완화하기 위해 PTBD 시점에 두 그룹의 담즙 샘플을 수집하였다. 두 환자 모두 PTBD 시술 후 최소 3 일 후 담관염을 해결한 후 담즙을 채취하였다. 수집된 담즙을 즉시 16,000g에서 4 °C에서 10 분 동안 원심 분리하여 상층액 (담즙)을 얻었다. 각 펠릿을 냉각된 PBS (2 배)에 재현탁한 후, 영국 런던에 있는 Abi Zabron Imperial College의 프로토콜에 설명 된대로 4 °C에서 5 분 동안 16,000g에서 원심 분리하여 담즙 펠릿을 얻었다. 모든 실험은 Avanti J-25I (Beckman, CA, USA)로 수행되었으며 담즙과 펠릿은 -80 °C에서 보관되었다. 분리 후 모든 실험에서 이 샘플을 사용하였다.

[0058]

실시예 2

[0059] miRNA 정량

[0060] <2-1> 엑소좀 분리

[0061] Exo2d™분리 키트(EXOSOMEplus; Seoul, Republic of Korea)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 엑소좀을 분리하였다. 1 mL의 담즙을 3000g에서 15 분 동안 원심 분리하여 세포 파편과 더 큰 소포를 제거하였다. 상층액을 Exo2D™와 혼합하고 37 °C에서 15 분 동안 배양하였다. 3000g에서 30 분 동안 원심 분리한 후, 엑소좀 펠릿을 추가 분석을 위하여 100 µL의 인산염 완충 식염수에 재 현탁 하였다.

[0063] <2-2> miRNA 분리 및 qRT-PCR

[0064] miRNeasy®Serum/Plasma Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 miRNA를 정제하였다. 담즙 엑소좀은 QIAzol Lysis Reagent(QIAGEN; Hilden, Germany)로 용해하였다. 클로로포름을 첨가한 후, 용 해물을 15 분 동안 12000g에서 원심 분리하여 수상 및 유기상으로 분리하였다. RNA는 상부 수성상으로 분리되고, DNA는 계면(interphase)으로 분리되고 단백질은 하부 유기상 또는 계면으로 분리되었다. 상부 수성상을 추출하고 에탄올을 첨가하여 약 18 개 뉴클레오티드 이상의 모든 RNA 분자에 대해 적절한 결합 조건을 제공하였다. 이후에 샘플을 RNeasy MinElute 스핀 컬럼에 적용하여 총 RNA가 막에 결합하고 페놀 및 기타 오염 물질을 효율적으로 세척하였다. 고품질 RNA는 소량의 RNase가 없는 물에서 용출 되었다. miRNA 발현은 Quanti-iT RiboGreen RNA 시약과 kit를 사용하여 측정된 총 RNA농도로 정량하였다 (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Quanti-iT RiboGreen RNA시약은 RNA를 정량하기위한 초고감도 형광핵산이고 RiboGreen RNA quantification kit는 정확한 RNA 농도 측정용으로 타겟 miRNA와 일치하는 합성 RNA 올리고 뉴클레오티드 (Cosmo Genetech Co. Ltd., Seoul)를 30~3*10⁴ copy의 표준곡선을 위해 사용하였다. 모든 샘플은 qRT-PCR 3회 실행을 위해 정제되었다.

실시예 3

[0066] 라이브러리 구축

[0067] <3-1> SMARTer smRNA 라이브러리

[0068] 각 샘플에서 분리된 RNA는 제조업체의 프로토콜에 따라 Illumina 용 SMARTer smRNA-Seq 키트 (Illumina Inc.; San Diego, CA, USA)로 시퀀싱 라이브러리를 구성하는데 사용되었다. 간단히, 입력 RNA를 먼저 폴리아데닐화하여 올리고 (dT) 프라이머에 대한 프라이밍 서열을 제공하였다. cDNA 합성은 3 'smRNA dT Primer에 의해 프라이밍 되었으며, 각 RNA 템플릿의 5' 끝에 어댑터 서열이 통합되었다. 이 접근법은 더 큰 감도를 위해 잠금 핵산 (LNA) 기술로 강화 된 SMRT smRNA 올리고에 의해 결합된 비 템플레이트 뉴클레오티드를 추가하였다. 템플릿 전

환 단계에서 PrimeScript RT는 SMART smRNA Oligo를 각 첫 번째 가닥 cDNA 분자의 3' 말단에 두 번째 어댑터 시퀀스를 추가하기 위한 템플릿으로 사용하였다. 다음 단계에서는 PCR 증폭 중에 전체 길이 Illumina 어댑터 (샘플 멀티플렉싱용 인덱스 시퀀스 포함)를 추가하였다. 정방향 PCR 프라이머는 SMART smRNA Oligo에 의해 추가된 서열에 결합되고 역방향 PCR 프라이머는 3' smRNA dT Primer에 의해 추가된 서열에 결합되었다. 결과 라이브러리 cDNA 분자에는 Illumina 플로우셀의 클러스터링에 필요한 시퀀스가 포함되었다. 라이브러리는 blue pippin 으로 겔 정제되었으며 Agilent Bioanalyzer에서 크기, 순도 및 농도를 확인하여 검증되었다. 라이브러리를 몰량으로 풀링하고 Illumina HiSeq 2500 기기에서 시퀀싱하여 51-base 리드를 생성하였다. 이미지 분해 및 품질 값 계산은 Illumina 파이프 라인의 모듈을 사용하여 수행되었다.

[0070] <3-2> miRNA 시퀀싱

[0071] 작은 RNA의 원 리드는 어댑터 서열을 제거하기 위하여 전처리 되었다. 원 리드의 어댑터는 Cutadapt 프로그램을 사용하여 트리밍 되었다. 시퀀스가 3' 어댑터 시퀀스의 처음 5bp 이상과 일치하는 경우 어댑터 시퀀스로 간주되어 리드에서 트리밍 되었다. 길이가 18bp보다 긴 트리밍된 리드는 매핑 안정성을 위해 선택되었다. 나머지 리드는 어댑터 시퀀스가 시퀀싱 되지 않은 비 어댑터 리드로 분류되었다. 분석에서 트림된 리드와 비 어댑터 리드가 결합되었고 하류 스트림 분석을 위해 처리된 리드로 간주되었다. 계산 효율성을 위하여 시퀀스 중복성을 최소화하고자 처리된 리드를 시퀀스별로 클러스터링 하였다. 고유 클러스터는 시퀀스와 길이가 동일한 리드로 구성되었다. rRNA를 제거하기 위해 호모 사피엔스(Homo sapiens)의 45S pre-rRNA 및 미토콘드리아 rRNA에 정렬된 리드는 제외되었다. miRDeep2 소프트웨어 알고리즘을 사용하여 알려진 새로운 microRNA의 서열 정렬 및 검출을 수행하였다. rRNA 필터링된 판독은 miRDeep2 정량 모듈을 사용하여 miRBase v22.1 에서 얻은 Homo sapiens 의 성숙 및 전구체 miRNA에 정렬되었다. miRDeep2 알고리즘은 miRNA biogenesis 모델을 기반으로 하였다. 리드를 잠재적인 헤어핀 구조에 정렬하여 매핑 컨텍스트가 Dicer 처리와 일치하는지 확인하고 헤어핀이 진정한 miRNA 전구체일 확률을 나타내는 점수를 할당하였다. miRDeep2를 사용하여 RNA 폴드 알고리즘에 따라 성숙, 스타 및 루프 서열에서 새로운 miRNA를 예측하였다. RNA fold 함수는 가장 가까운 이웃 열역학 모델을 사용하여 RNA 서열의 최소 자유 에너지 2 차 구조를 예측하였다. 다음으로, 고유하게 클러스터링된 판독을 참조 게놈, miRBase v22.1 및 비 코딩 RNA 데이터베이스 RNA 중앙 릴리스 14.0 에 순차적으로 정렬하여 분류를 위한 알려진 miRNA 및 기타 유형의 RNA를 식별하였다. 시퀀싱은 Macrogen Incorporated(Seoul, Korea)에서 수행되었다.

[0073] <3-3> mRNA 시퀀싱 라이브러리 준비 및 시퀀싱

[0074] 분석 전 저품질 및 어댑터 시퀀스를 제거하기 위해 시퀀서에서 원 리드를 전처리하고 HISAT v2.1.0을 사용하여 처리된 리드를 호모 사피엔스(Homo sapiens; GRCh38)에 정렬하였다. HISAT는 정렬을 위해 두 가지 유형의 인덱스 (전역, 전체 게놈 인덱스 및 수만 개의 작은 로컬 인덱스)를 사용하였다. 이 두 가지 유형의 인덱스는 Bowtie2와 동일한 BWT (Burrows-Wheeler 변환) 그래프 FM 인덱스 (GFM)를 사용하여 구성되었다. 이러한 효율적인 데이터 구조와 알고리즘을 사용하므로 HISAT는 널리 사용되는 Bowtie 및 BWA보다 몇 배 빠른 집합 정렬을 생성하였다. Homo sapiens (GRCh38)의 참조 게놈 서열과 주석 데이터는 NCBI 데이터베이스에서 다운로드하였다. 알려진 성적표의 어셈블리는 StringTie v2.1.3b 에 의해 처리되었다. 결과에 기초하여, 전사체 및 유전자의 발현은 샘플 당 판독 횟수 또는 FPKM 값 (매핑된 백만 개의 단편당 엑손 킬로베이스 당 단편)으로 계산되었다.

실시예 4

[0076] 차별적으로 발현된 miRNA 및 유전자 확인

[0077] 원래 2,656 개의 성숙한 miRNA가 2 개의 샘플에서 확인되었다. R 라이브러리의 edgeR에서 calNormFactors 방법을 사용하여 M-value (TMM) 정규화의 절사평균 후, 두 샘플 모두에서 백만 리드 당 카운트 (CPM)가 0 인 miRNA 는 제거되었다. 나머지 537 개의 miRNA에 대해 추가 분석을 수행하였다. 두 샘플 간의 비교 발현된 miRNA(DEmiRNA)를 식별하기 위한 통계 분석은 Fold Change, exactTest를 사용하여 비교 쌍당 edgeR을 사용하여 수행되었다. | fold change | ≥ 2 인 중요한 DEmiRNA는 선택되었다.

[0078] 그 결과, | fold change | ≥ 2 및 $P < 0.05$ 인 52 개의 성숙한 miRNA(도 1) 확인되었으며 마지막으로 FDR < 0.05 인 총 22 개의 DEmiRNA를 얻었다(표 1).

표 1

Mature_ID	Mature_Accession	Expression in cancer	Fold change	FDR
hsa-miR-10a-5p	MIMAT0000253	Overexpression	-67.767703	0.00012733
hsa-miR-215-5p	MIMAT0000272	Overexpression	-48.324761	0.000529565
hsa-miR-451a	MIMAT0001631	Overexpression	-43.744868	0.000689058
hsa-miR-200b-3p	MIMAT0000318	Overexpression	-19.853105	0.000553049
hsa-miR-181a-5p	MIMAT0000256	Overexpression	-14.278010	0.039863367
hsa-miR-7-5p	MIMAT0000252	Overexpression	-14.105898	0.005415661
hsa-miR-29b-3p	MIMAT0000100	Overexpression	-13.110731	0.001585767
hsa-miR-29a-3p	MIMAT0000086	Overexpression	-12.526952	0.009207718
hsa-let-7a-3p	MIMAT0004481	Overexpression	-10.396281	0.039863367
hsa-miR-429	MIMAT0001536	Overexpression	-7.862975	0.021996697
hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	Overexpression	-7.527874	0.016703169
hsa-miR-192-5p	MIMAT0000222	Overexpression	-7.116456	0.020183338
hsa-miR-29c-3p	MIMAT0000681	Overexpression	-7.050205	0.036428041
hsa-miR-574-5p	MIMAT0004795	Overexpression	-5.922845	0.039863367
hsa-miR-191-5p	MIMAT0000440	Downexpression	6.835257	0.021996697
hsa-miR-23a-5p	MIMAT0004496	Downexpression	17.394801	0.039863367
hsa-miR-619-5p	MIMAT0026622	Downexpression	43.733993	0.000369095
hsa-miR-8485	MIMAT0033692	Downexpression	45.424422	2.47901E-05
hsa-miR-15a-3p	MIMAT0004488	Downexpression	55.527950	0.039863367
hsa-miR-1273c	MIMAT0015017	Downexpression	56.059374	0.003623524
hsa-miR-7847-3p	MIMAT0030422	Downexpression	66.683607	1.51028E-05
hsa-miR-1285-3p	MIMAT0005876	Downexpression	112.015712	0.00012733

miRNA-mRNA 상호 작용 분석을 위해 R 라이브러리의 edgeR 패키지를 사용하여 종양과 대조군 조직 사이의 비교 발현된 유전자(DEG)를 분석하였다. 전처리 후 $|\text{fold change}| \geq 2$ 조건에서 유의한 DEG를 선택하였다. FDR < 0.05 이고, 총 1,286 개의 유의한 DEG가 확인되었다.

실시예 5

miRNA-mRNA 조절 네트워크

miRNA-mRNA 조절 네트워크는 miRTarBase 기반 Mienturnet (userver.bio.romal.it)으로 분석되었다. 22 개의 DEMiRNA 중 17 개는 표적 유전자 (FDR < 0.05)를 예측했다(hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-let-7a-3p, hsa-miR-429, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-23a-5p, hsa-miR-15a-3p 및 hsa-miR-1285-3p). 22 개의 DEMiRNA의 예측된 mRNA 표적의 65 % 이상이 실제로 정상 담즙과 암 담즙 샘플간에 비교 발현되었다(도 2).

실시예 6

경로 및 기능 분석

22 개의 DEMiRNA의 기능적 주석 및 miRNA 경로 클러스터링은 Gene Trail 을 기반으로 하는 miRNA Enrichment 분석 및 Annotatio Tool (miEAA)을 사용하여 수행되었다. 기능적 평가는 이들의 표적이 주로 RAS, MAPK, mTOR, PDGF, VEGF, EGFR 및 p53 신호 전달이 풍부하고 조절 장애가 있음을 보여주었다. 또한 염증 및 세포주기 관련 경로도 조절되지 않았다. 하기 [표 2] 는 FDR < 0.05 인 상위 30 개 유의하게 증가된 경로를 나타낸다.

표 2

[0090]

Subcategory	FDR	Involved miRNAs/precursors
WP314 FAS pathway and Stress induction of HSP regulation	0.0012	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-191-5p; hsa-miR-429; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
P00046 Oxidative stress response	0.0013	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-429; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
P04393 Ras Pathway	0.0015	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-191-5p; hsa-miR-429; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
WP400 p38 MAPK Signaling Pathway	0.0023	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-429; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
WP69 TCR Signaling Pathway	0.0025	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-191-5p; hsa-miR-429; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
hsa04210 Apoptosis	0.0026	hsa-miR-1285-3p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-191-5p; hsa-miR-429; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
WP395 IL 4 signaling pathway	0.0027	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-429; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
WP286 IL 3 Signaling Pathway	0.0029	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-429; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
hsa04150 mTOR signaling pathway	0.0029	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-191-5p; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
P00047 PDGF signaling pathway	0.0033	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-191-5p; hsa-miR-429; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
WP1545 miRNAs involved in DDR	0.0034	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-1285-3p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-191-5p; hsa-miR-429; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
P00056 VEGF signaling pathway	0.0034	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-191-5p; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
hsa04666 Fc gamma R mediated phagocytosis	0.0035	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-429; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
WP127 IL 5 signaling pathway	0.0035	hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-429; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
WP437 EGF EGFR Signaling Pathway	0.0041	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-191-5p; hsa-miR-429; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p; hsa-miR-23a-5p

WP364 IL 6 signaling pathway	0.0041	hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-429; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
P00036 Interleukin signaling pathway	0.0041	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-191-5p; hsa-miR-429; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
P00059 p53 pathway	0.0042	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-1285-3p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-191-5p; hsa-miR-429; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
P04398 p53 pathway feedback loops 2	0.0042	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-1285-3p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-191-5p; hsa-miR-429; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
WP195 IL 1 signaling pathway	0.0042	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-191-5p; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
WP49 IL 2 Signaling pathway	0.0043	hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-429; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
hsa04512 ECM receptor interaction	0.0043	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
WP45 G1 to S cell cycle control	0.0047	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-1285-3p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-191-5p; hsa-miR-429; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
WP707 DNA damage response	0.0048	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-1285-3p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-191-5p; hsa-miR-429; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
P00053 T cell activation	0.0057	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-191-5p; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
hsa04012 ErbB signaling pathway	0.0058	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-191-5p; hsa-miR-429; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
P00031 Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling	0.0063	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-191-5p; hsa-miR-429; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
hsa04310 Wnt signaling pathway	0.0063	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-1285-3p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-429; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
hsa04630 Jak STAT signaling pathway	0.0071	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-451a; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-429; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p
P00052 TGF beta signaling pathway	0.0116	hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-215-5p; hsa-miR-200b-3p; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-7-5p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-192-5p; hsa-miR-429; hsa-miR-29c-3p; hsa-miR-181a-5p

[0092] DEG의 기능적 경로를 평가하기 위해 주석, 시각화 및 통합 발견을 위한 온라인 데이터베이스 데이터베이스 (DAVID, 버전 6.8)를 사용하여 경로 강화 분석을 수행하였다.

[0093] miRNA-mRNA 상호 작용의 기능적 평가에서 하류경로 (PI3K-AKT-mTOR 및 RAS-RAF-MEK-ERK)를 포함한 RAS 경로는 miRNA 및 mRNA 기능 경로 분석 전체에서 많았다(도 3).

도면

도면1

