



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0106429
(43) 공개일자 2009년10월09일

(51) Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0096633

(22) 출원일자 2008년10월01일

심사청구일자 2008년10월01일

(30) 우선권주장

61/042,760 2008년04월06일 미국(US)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

김열홍

서울특별시 송파구 방이동 89 올림픽선수촌아파트
257-305

한슬기로

서울 영등포구 여의도동 수정아파트 C동 1506호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이문섭

전체 청구항 수 : 총 13 항

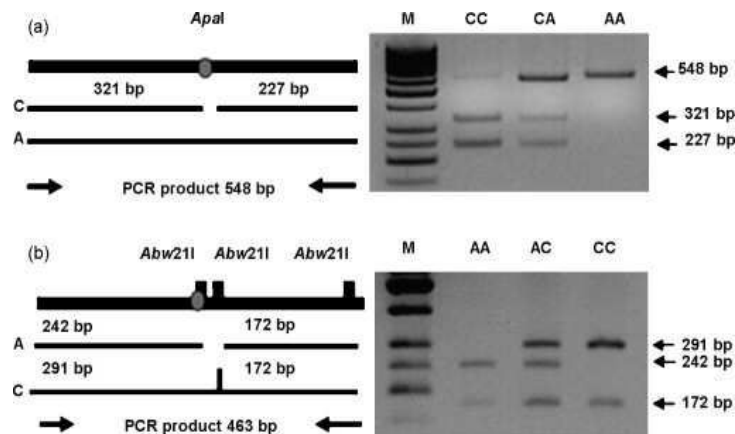
(54) IGFBP-3 유전자를 이용한 폐암 감수성 진단용 마커 및 이를 이용한 폐암 감수성 예측 및 판단 방법

(57) 요약

본 발명은 폐암 발생 위험도의 예측 및 선별을 가능하게 하는 폐암 감수성 진단용 마커에 관한 것으로, 보다 구체적으로 새로이 발견한 IGFBP-3 (Insulin-like growth factor binding protein-3) 유전자의 단일 염기 다형성 (SNP)인 -1590 C>A 및 -202 A>C 와 이들의 일배체형(haplotype)을 이용한 폐암 감수성 진단용 마커, 진단키트 및 이를 이용한 폐암 감수성 예측 및 진단 방법에 관한 것이다.

본 발명에 의하면, 환자군이 폐암 발암 고위험군에 속하는지 여부의 예측 및 선별이 가능하여 폐암의 조기진단 및 치료 등에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

박경화

서울 강남구 개포3동 주공아파트 606-1303

성재숙

서울특별시 구로구 개봉2동 333-8 스카이빌 203호

황영미

서울특별시 종로구 창신3동 쌍용아파트 202동 807호

김연정

서울시 은평구 녹번동 5번지 국립보건연구원 유전체센터 3층

신은순

서울시 마포구 성산동 591-4 대명 비첸시티 3층
DNA Link

이재원

서울 서초구 반포동 반포아파트 84-401

이효정

서울 성북구 길음동 삼성래미안 1차 112동 1301호

류정선

인천 중구 신흥동 3가 인하대병원

최인근

서울 서초구 양재동 103-1 신우빌라 101호

서재홍

미국 마이애미 01002 압허스트 그린드라이브 롤링
103

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1로 이루어지는 폴리뉴클레오티드에서 서열번호 1의 349번째 염기 (IGFBP-3; Insulin-like growth factor binding protein-3 유전자의 전사시작점으로부터 -1590번째) C가 A로 치환되고 상기 349번째 염기를 포함하는 10-2159개의 연속적인 DNA단편으로 구성되는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 1의 1737번째 염기(IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -202번째) A가 C로 치환되고 상기 1737번째 염기를 포함하는 10-2159개의 연속적인 DNA단편으로 구성되는 폴리뉴클레오티드 및 이들의 상보적인 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상의 폴리뉴클레오티드로 이루어지는 폐암 감수성 진단용 마커.

청구항 2

서열번호 1로 이루어지는 폴리뉴클레오티드에서, 서열번호 1의 349번째(IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -1590번째) 염기가 A이고, 서열번호 1의 1737번째(IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -202번째) 염기가 C로 일배체형(haplotype)을 이루는 것을 특징으로 하는 폐암 감수성 진단용 마커.

청구항 3

서열번호 1의 349번째(IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -1590번째) 염기 또는 서열번호 1의 1737번째 (IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -202번째) 염기를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 증폭할 수 있는 프라이머.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 2 및 3 또는 서열번호 4 및 5로 표시된 올리고뉴클레오티드로 구성되는 것을 특징으로 하는 프라이머.

청구항 5

제 3항 또는 제 4항의 프라이머를 포함하는 폐암 감수성 진단용 키트.

청구항 6

서열번호 1로 이루어지는 폴리뉴클레오티드에서 서열번호 1의 349번째 염기(IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -1590번째) C가 A로 치환되고 상기 349번째 염기를 포함하는 10-2159개의 연속적인 DNA단편으로 구성되는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 1의 1737번째 염기(IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -202번째) A가 C로 치환되고 상기 1737번째 염기를 포함하는 10-2159개의 연속적인 DNA단편으로 구성되는 폴리뉴클레오티드 및 이들의 상보적인 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상의 폴리뉴클레오티드로 이루어지는 폐암 감수성 진단용 마이크로어레이.

청구항 7

- 1) 피검체로부터 핵산시료를 획득하는 단계;
- 2) 획득한 핵산시료로부터 서열번호 1의 349번째 (IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -1590번째) 염기 및 서열번호 1의 1737번째 (IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -202번째) 염기 다형성 부위를 증폭하는 단계; 및
- 3) 상기 2)에서 증폭된 다형성 부위의 염기를 결정하여 폐암 발생 위험도를 분석하는 단계를 포함하는 폐암 감수성 예측 및 판단 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 3) 단계의 염기 결정은 DNA 서열분석 (sequencing), PCR-SSCP (single stranded conformation polymorphism) 분석, PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 분석, 대립형질 (allele) 특이적 혼성화 방법, DNA 칩 방법, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 방법 및 면역블롯 (immunoblot) 방법, 스냅샷(SNaPSHOT) 분석 방법, TDGS(Two-dimensional Gene Scanning), Taq-Man[®] 및 TOGATM으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 7항에 있어서, 단계 3) 단계의 폐암 발생 위험도 분석은 스튜던트 t -검정 (Student's t-test), 카이-스퀘어 검정 (Chi-square test) 및 다중 기호 회귀 분석 (multiple logistic regression analysis)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 8항에 있어서, 상기 3)단계에서 결정된 서열번호 1의 349번째 (IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -1590 번째) 염기가 A인 경우에 폐암 발생 위험도가 증가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 8항에 있어서, 상기 3)단계에서 결정된 서열번호 1의 1737번째 (IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -202 번째) 염기가 C인 경우에 폐암 발생 위험도가 증가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 8항에 있어서, 상기 3)단계에서 결정된 서열번호 1의 349번째 (IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -1590 번째) 염기가 A이고, 서열번호 1의 1737번째 (IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -202번째) 염기가 C인 경우에 폐암 발생 위험도가 증가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 8항에 있어서, 상기 3)단계에서 결정된 서열번호 1의 349번째 (IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -1590 번째) 염기가 C이고, 서열번호 1의 1737번째 (IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -202번째) 염기가 A인 경우에 폐암 발생 위험도가 감소되는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

<1> 본 발명은 폐암 발생 위험도의 예측 및 선별을 가능하게 하는 폐암 감수성 진단용 마커에 관한 것으로, 보다 구체적으로 새로이 발견한 IGFBP-3 유전자의 단일 염기 다형성(SNP)인 -1590 C>A 및 -202 A>C 와 이들의 일배체형 (haplotype)을 이용한 폐암 감수성 진단용 마커, 진단키트 및 이를 이용한 폐암 감수성 예측 및 진단 방법에 관한 것이다.

배경기술

<2> 폐암은 폐에 발생하는 암이다. 흡연, 공해 등이 가장 큰 원인인 선진국형 암으로, 20세기에 들어서면서 구미 각국에서 급격히 증가하기 시작하여 전 세계적으로 매년 130만 명 이상이 폐암으로 사망하며, 암으로 인한 사망에서 가장 높은 비중을 차지하고 있다. 한국의 경우에도, 매년 10여 만 명의 암 환자가 새로 발생하고 5만 여명의 암 환자가 사망하고 있는 것으로 보고되었다. 더욱이 암의 발생 빈도는 최근 들어 더욱 증가하는 추세로 현재 암은 우리나라 성인 사망 원인의 2위를 차지하고 있다. 특히, 폐암은 한국 성인에서 발생하는 암중에서 약 12%를 차지하며 위암, 간암에 이어 제3위의 발생률을 보이며 매년 남녀 모두에서 발생율이 증가하고 있다. 폐암의 발생율은 여성보다 남성에서 현저히 높으며 상대적으로 45세 미만의 젊은 환자의 비율이 높은 것으로 보고되었다. 더구나 폐암은 진단 당시 이미 다른 장기로 전이를 하였거나 전이가 없는 경우에도 국소적으로 진행되어 근치적절제술, 함암화학요법, 방사선치료 등의 다양한 치료법에도 불구하고 치료 후 재발과 전이에 의해 5년 생존율이 5% 정도에 머무르는 완치율이 매우 낮은 종양으로 암에 의한 사망율 1위를 차지하고 있다. 따라서 치료 성적을 높이기 위해서는 폐암의 발생 및 그의 원인 기전, 암의 성장, 그리고 전이에 관여하는 분자생물학적 조절 기전 등을 규명하여 각 단계별로 대응하는 새로운 진단 및 치료 방법의 개발이 절실히 요구된다.

<3> 1970년대부터 분자 생물학의 발달과 함께 종양 유전자 및 종양억제 유전자가 발굴되면서 암은 다단계 유전자 변이 질환임이 규명되었다. 즉, 암은 단일 유전자 결손 질환과 달리 여러개의 유전자가 유전자 돌연변이, 증폭, 결손, 치환 등의 단계적 변화 결과 악성으로 이행한다는 발암 기전이 제시되었다. 지금까지 '종양 유전학' 분야

에서는 이러한 분자생물학적 다단계 모델 하에 미리 예측한 특정 1-2개의 유전자를 대상으로 그 발현이나 또는 돌연변이 유무를 조사해왔으나 종양의 다단계 모델을 완벽하게 밝히거나 발암 기전 규명에 효과적이지 못했다.

<4> 생명과학 분야의 발달로 한꺼번에 수많은 유전자들의 발현을 측정할 수 있는 기법들이 개발되었거나 개발 중이기 때문에 21세기 생명 공학 분야는 엄청나게 축적된 유전암호들을 분석해서 그 유전자의 기능과 상호작용을 밝히는 functional genomics 시대로 이행해 가고 있다. 유전정보를 집중화하고 컴퓨터를 이용하여 비교 분석하는 생물정보학과 더불어 초정밀 집적 마이크로어레이를 이용한 다량의 유전자 발현을 고속 검색할 수 있는 기술은 분자생물학적 지식과 현대 기계 및 전자공학의 기술을 접목시킨 것으로 유전자 발현 연구에 획기적인 전지를 마련하였을 뿐만 아니라 functional genomics 라는 새로운 학문의 장을 개척하는 등 다양한 용도로 활용될 중요한 기반 기술이다.

<5> 최근 동일한 발암요인에 대해서도 개인이 지닌 유전적 감수성에 따라 위험도가 달라지며 이러한 개인 및 인종간의 감수성을 구분 짓는 가장 중요한 표지자로 단일 염기 다형성(SNP; single nucleotide polymorphism)이 제시되고 있다.

<6> 단일 염기 다형성이란 개인과 개인 간의 DNA에 존재하는 한 염기쌍(single base-pair variation)의 차이를 말하는 것으로 DNA sequence 다형성(polymorphism)중에서 가장 많이 존재하는 형태이다 (약 1개/1kb).

<7> 단일 염기 다형성이 주목을 끄는 이유는 가장 높은 빈도를 보이는 변이 형태이며, 상당히 안정적인 변이이고 낮은 변이율을 보인다는 점이다. 특히, 단백질을 만드는 유전자 부위에 위치한 중심 단일 염기 다형성의 경우는 기능적 중요성을 갖기 때문에 연구가 집중되고 있으며, 중요한 유전자들의 발현을 조절하는 부위에 대한 해당 유전자의 검색도 수행되고 있다. 또한, 단일 염기 다형성은 DNA chip 기술과 접목되어 질병 발생에 대한 개인의 감수성 차이를 규명하여 21세기 맞춤의학 혹은 예측의학이라는 새로운 시대로 나가는데 있어 가장 핵심적인 역할을 할 것으로 예상된다. 암 진단 및 치료의 초기 단계에서 이와 같은 약제학적으로 중요한 단백질의 유전적 다양성에 대한 효과를 고려하는 것은 항암치료의 실패에 대한 위험성을 낮출 수 있는 중요한 요소로 작용하여 개체간의 정확하고 신뢰할 수 있는 진단 및 치료 정보를 제공할 것이다.

<8> 이와 같은 단일 염기 다형성 연구는 세계적으로 활발히 진행되고 있지만 각 나라마다 인종적인 차이 때문에 한계가 있다. 따라서 국내 단일 염기 다형성 연구는 국제적인 경쟁력이 충분히 있으며, 호흡기암에 대한 cSNPs에 대한 연구는 많지 않으므로 단일 염기 다형성의 체계적인 발굴과 기능 연구 등에 대한 효율적인 투자가 필요한 실정이다.

<9> Insulin-like growth factor (IGF) 신호 경로는 malignant phenotype의 유지, malignant transforming cell과 상당한 관련성이 있고, 대부분 암 발생 환자의 경우 IGF-I 또는 IGF-II 리간드 생성과 6개의 IGF-binding proteins (IGFBPs)와의 복합체 형성 등으로 인해 IGF 수용체의 과발현이 나타난다. 또한 IGF는 강력한 mitogen으로써 pericellular space에서 결합하는 단백질에 의해 조절되며 IGF-I 수용체와 결합하여 활성화되어 하위신호를 세포 내 전달하여 세포증식에 영향을 미친다. 혈액 내 90% 이상의 경우에 IGF와 IGFBP-3 단백질이 결합하여 active free IGF의 활성을 조절한다. IGFBP-3는 암 억제 유전자로 알려져 왔으며 이 유전자의 생리활성은 IGF와 그것의 수용체와의 결합을 차단함으로써 암세포의 증식을 억제하는데 있다. 또한 IGF와 수용체간의 결합에 비의존적인 방법으로서 retinoid receptor α (RXR- α), transferrin 등과 상호작용하여 세포사멸을 유도할 수도 있음이 보고되고 있다.

<10> Epidemiological 연구들에서는 circulating IGF-I의 수준이 높되 혈청 IGFBP-3의 수준이 낮을 때 대장암, 유방암, 폐암 발병 위험과 관련되어있을 가능성이 있음을 제시해왔다. 또한, 최근 연구에서는 폐암과 관련하여 IGFBP-3 혈청 농도가 높은 경우 비소세포폐암의 advanced stage에 있는 환자의 생존율이 그렇지 않은 환자 보다 높은 것으로 나타나 IGFBP-3의 폐암에서 잠재적 예후인자로서의 주요성이 대두되고 있다. 암 억제 기능을 보이는 IGFBP-3의 발현이 암세포에서 빈번하게 저해되어 있으며 IGFBP-3 발현 억제 기전으로 이 유전자의 프로모터 부위의 다형성과 과메틸레이션 (hypermethylation) 등이 알려지고 있다.

<11> 그러나 폐암의 발병 단계에서 IGFBP-3 유전자의 단일 염기 다형성이 미치는 역할에 관한 연구는 미흡하며 폐암에서 혈청 중 다형성을 갖는 IGFBP-3의 농도에 대한 연구는 지금까지 보고된 바 없다.

<12> 이에 본 발명자들은 환자군-대조군 연구, β -lactamase activity 분석 및 통계분석을 통해 본 발명의 IGFBP-3 다형성 표지 인자가 폐암 발생 위험도를 예측하는데 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <13> 본 발명의 목적은 IGFBP-3 유전자의 다형성 부위를 포함하는 폐암 감수성 진단용 마커를 제공하기 위한 것이다.
- <14> 또한, 본 발명의 목적은 IGFBP-3 유전자의 다형성 부위를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 증폭하거나 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폐암 감수성 진단용 키트 및 마이크로어레이를 제공하기 위한 것이다.
- <15> 또한, 본 발명의 목적은 상기 폐암 감수성 진단용 마커를 이용하여 폐암의 감수성 예측 및 판단하는 방법을 제공하기 위한 것이다.

과제 해결수단

- <16> 상기 목적을 달성하기 위하여,
- <17> 본 발명은 IGFBP-3 유전자의 다형성 부위를 포함하는 폐암 감수성 진단용 마커를 제공한다.
- <18> 또한, 본 발명은 IGFBP-3 유전자의 다형성 부위를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 증폭하거나 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폐암 감수성 진단용 키트 및 마이크로어레이를 제공한다.
- <19> 또한, 본 발명은 상기 폐암 감수성 진단용 마커를 이용하여 폐암의 감수성 예측 및 판단하는 방법을 제공한다.
- <20> 본 발명은 서열번호 1로 이루어지는 폴리뉴클레오티드에서 서열번호 1의 349번째 염기(IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -1590번째) C가 A로 치환되고 상기 349번째 염기를 포함하는 10-2159개의 연속적인 DNA단편으로 구성되는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 1의 1737번째 염기(IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -202번째) A가 C로 치환되고 상기 1737번째 염기를 포함하는 10-2159개의 연속적인 DNA단편으로 구성되는 폴리뉴클레오티드 및 이들의 상보적인 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상의 폴리뉴클레오티드로 이루어지는 폐암 감수성 진단용 마커를 제공한다.
- <21> 보다 구체적으로, 본 발명은
- <22> 1) 서열번호 1의 349번째 염기(IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -1590번째) C가 A로 치환되고 상기 349번째 염기를 포함하는 10-2159개의 연속적인 DNA단편으로 구성되는 폴리뉴클레오티드 및 이들의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 한편 상기의 다형성 부위를 -1590 C>A로 표시한다.
- <23> 2) 서열번호 1의 1737번째 염기(IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -202번째) A가 C로 치환되고 상기 1737번째 염기를 포함하는 10-2159개의 연속적인 DNA단편으로 구성되는 폴리뉴클레오티드 및 이들의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 한편, 상기의 다형성 부위를 -202 A>C로 표시한다.
- <24> 본 발명에서 용어 "진단"은 질병 발생 가능성을 예측하거나 질병 발생 위험도를 결정하거나 도출시키는데 사용되는 모든 유형의 분석을 포함한다.
- <25> 본 발명에서 용어 "감수성"은 폐암에 대한 민감도, 즉 폐암 발생 위험도의 증가 및 감소를 나타낸다.
- <26> 본 발명에서 용어 "다형성(polymorphism)"은 유전학적으로 결정된 집단 내에서 2 이상의 대체적 서열 또는 대체적 대립형질의 발생을 의미한다. 바람직한 다형성 마커는 선택된 집단에서 1% 이상, 더욱 바람직하기로는 10% 또는 20% 이상의 발생빈도를 나타내는 2개의 대립형질을 의미한다. 다형성 중에서, 사람에 따라 단일 염기만이 다른 것을 단일 염기 다형성(SNP)이라 한다.
- <27> 본 발명에서 용어, "마커"는 게놈에 있는 특정 서열로 특정 형질 다형성(polymorphism)을 가리키는 표지로서 이용될 수 있는 것을 의미한다.
- <28> 본 발명에서 용어, "뉴클레오티드"는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드이며, 다르게 특별하게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오티드의 유사체를 포함한다.(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990))
- <29> 본 명세서 용어, "폐암 발생 위험성이 낮은" 및 "폐암 감수성이 낮은"는 특별한 언급이 없는 한 동일한 의미로 사용하였다.

- <30> 본 발명에서 폐암 발생 위험도를 예측하기 위한 표지 인자로 선택된 인간 염색체 7p14-12에 위치하는 IGFBP-3 유전자는 GenBank sequence(accession no. NT_007819)로 공지되어 있으며, 본 발명에서는 NT_007819 서열 중 45451770 번째 염기를 서열번호 1의 1번째 염기로 나타내었다. 서열번호 1의 염기서열은 역방향(reverse) 서열을 나타낸 것이다.
- <31> IGFBP-3유전자 다형성은 단일 염기 다형성이 위치하는 염색체 번호, 염색체 상의 동원체를 중심으로 한 단완(short arm: p)부분 및 밴드 번호를 알 수 있는바, 이는 7번 염색체 상의 단완 부분의 14-12밴드 상에 존재함을 의미한다.
- <32> DNA 단편의 크기는 전체 유전자의 full length가 아닌 한 다형성 부위의 염기를 포함하는 어떤 크기의 단편이라도 무방하나, 바람직하게는 10 내지 수백 염기인 것을 특징으로 하며, 더욱 바람직하게는 2159개 염기인 것을 특징으로 한다.
- <33> 2159개 염기의 경우는 상기 SNP를 탐지하기 위한 프로브 내지는 프라이머로 이용할 수 있으며, 그 이상의 염기의 경우는 PCR-RFLP 등에 이용될 수 있다.
- <34> 본 발명자들은 IGFBP-3유전자의 단일 염기 다형성 후보 중 유전자 기능에 가장 많은 영향을 미치나 이전에 연구된 바 없는 프로모터의 다형성(-1590 C>A 및 -202 A>C)을 선별하여 IGFBP-3 유전자의 단일 염기 다형성과 폐암 감수성간의 관련성을 조사하였다.
- <35> 폐암 환자군과 대조군의 대립인자 빈도수 (allele frequencies)와 유전자형 분포 (genotype distributions)에 대한 폐암 감수성과의 관계를 성별, 흡연력 여부에 따라 구분하여 표 2에서 도시하였다.
- <36> 폐암 환자군과 대조군의 혈액으로부터 유래된 DNA의 -1590 C>A 와 -202 A>C의 두 개의 단일 염기 다형성을 포함하는 유전자형 빈도수는 대상군 모두 Hardy-Weinberg equilibrium 평형 상태에 있다. 두 개의 다형성은 강한 linkage disequilibrium ($r^2 = 0.90$, $|D'| = 1.00$)을 이룬다.
- <37> 각 단일 염기 다형성의 대립 형질들과 폐암 감수성 간에는 환자군과 대조군에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 성별, 흡연력을 변수로 하여 dominant model에 대한 분석 결과 -1590 C>A에서 A 유전자형, -202 A>C에서 C 유전형을 가진 여성 (-1590 C>A; adjusted OR = 2.11, 95% CI = 1.08 - 4.12, -202 A>C; adjusted OR = 1.96, 95% CI = 1.02 - 3.75, respectively) 및 비흡연자 (-1590 C>A; adjusted OR = 2.06, 95% CI = 1.12 - 3.78, -202 A>C; adjusted OR = 1.99, 95% CI = 1.10 - 3.62, respectively)에게서 단일 염기 다형성과 폐암 감수성간에 관련성이 있음을 알 수 있다. 즉, dominant model에서 -1590A 와 -202C의 단일 염기 다형성들이 여성(-1590 C>A; aOR = 2.11, 95% CI = 1.08 - 4.12, -202 A>C; aOR = 1.96, 95% CI = 1.02 - 3.75, 각각)과 비흡연자(-1590 C>A; aOR = 2.06, 95% CI = 1.12 - 3.78, -202 A>C; aOR = 1.99, 95% CI = 1.10 - 3.62, 각각)에서 폐암의 위험도를 현저히 증가시켰다.
- <38> 또한, 본 발명은 서열번호 1로 이루어지는 폴리뉴클레오티드에서, 서열번호 1의 349번째 (IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -1590번째) 염기가 A이고, 서열번호 1의 1737번째 (IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -202번째) 염기가 C로 일배체형(haplotype)을 이루는 것을 특징으로 하는 감수성 진단용 마커를 제공한다.
- <39> 또한, 본 발명은 서열번호 1로 이루어지는 폴리뉴클레오티드에서, 서열번호 1의 349번째 (IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -1590번째) 염기가 C이고, 서열번호 1의 1737번째 (IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -202번째) 염기가 A로 일배체형(haplotype)을 이루는 것을 특징으로 하는 감수성 진단용 마커를 제공한다.
- <40> 본 발명에서 용어 "일배체형(haplotype)"은 개체로부터 단일 유전자에 대한 복수의 다형성 및 개체마다 상이한 다수의 다형성 부위에서 변이의 특정 조합을 말한다. 상기 일배체형은 각각의 단일염기다형성 부위를 포함하는 폴리뉴클레오티드 단편들의 조합 또는 복수의 단일염기다형성 부위를 포함하는 폴리뉴클레오티드 단편으로 이루어질 수 있다. 바람직하게는, 전자의 경우에는 각 단편이 10-2159개의 염기를 포함할 수 있고 후자의 경우에는 2159개 이상의 염기를 포함할 수 있다.
- <41> 최근 연구들에서는 질병과의 연관성을 예측하는데 있어서 단일 염기 다형성 분석보다 일배체형 분석을 보다 상위에 두고 있다. (Sun, T., et al., J. Natl. Cancer Inst., 96, 1030-1036, 2004; Zhang, X., et al., J. Med. Genet., 42, 479-484, 2005; Judson, R., et al., Pharmacogenomics, 1, 15-26, 2000; 및 Judson, R. 및 Stephens, J. C., Pharmacogenomics, 2, 7-10, 2001).
- <42> 따라서, 본 발명자들은 폐암 환자군과 대조군에서 -1590 C>A 또는 -202 A>C 일배체형과 폐암 발생 위험도 간의

상관관계를 분석한 결과, 일배체형 -1590C/-202A (C-A로 표시함)은 -1590C/-202C (C-C로 표시함) 및 -1590A/-202A (A-A로 표시함)를 갖는 일배체형에 비해 폐암 발생 위험도가 현저히 감소됨을 확인하였다. 반면 일배체형 -1590A/-202C (A-C)은 -1590C/-202C (C-C로 표시함) 및 -1590A/-202A (A-A로 표시함)를 갖는 일배체형에 비해 폐암 발생 위험도가 현저히 증가됨을 확인하였다.

- <43> 특히, 여성과 비흡연자의 경우에서 C-A 일배체형 및 A-C 일배체형과 폐암 감수성간에 관련성이 높게 나타났다. C-A 일배체형을 가진 여성(recessive adjusted OR = 0.51, 95% CI = 0.29 - 0.90), 비흡연자(codominant adjusted OR = 0.59, 95% CI = 0.38 - 0.90 and recessive adjusted OR = 0.50, 95% CI = 0.30 - 0.85)는 폐암 발생 위험도가 현저히 감소됨을 알 수 있다.
- <44> 이에 반해, 일배체형 -1590A/-202C (A-C)를 가진 여성(dominant aOR = 2.05, 95% CI = 1.14 - 3.68) 과 비흡연자(codominant aOR = 1.71, 95% CI = 1.11 - 2.64 와 dominant aOR = 1.99, 95% CI = 1.17 - 3.40)는 폐암에 걸릴 위험도가 상당히 높게 나타났다. (표 3)
- <45> 본 발명의 마커는 사람에게 적용되며, 바람직하게는 한국인에게 적용되며, 가장 바람직하게는 여성, 비흡연자인 한국인에게 적용된다.
- <46> IGFBP-3 단일 염기 다형성이 IGFBP-3 프로모터 전사 활성도에 영향을 미치는지 알아보기 위하여, β -lactamase 분석법을 수행하였다. 분석을 실시한 결과, A-C 일배체형을 가진 프로모터는 C-A 일배체형을 가진 프로모터에 비하여 전사 활성이 현저하게 감소하여 전사가 억제되었다 ($p < 0.05$, t-test). 반면, -202 번째 유전자형은 IGFBP-3의 전사 활성도에 영향을 주지 않았다.
- <47> 이는 A-C 일배체형이 IGFBP-3 발현에 영향을 줌으로써 최종적으로 폐암에 대한 유전적 감수성에 영향을 미치는 주요한 인자임을 나타내는 것이다(도2).
- <48> 또한, 본 발명은 서열번호 1의 349번째 (IGFBP-3유전자의 전사시작점으로부터 -1590번째) 염기 또는 서열번호 1의 1737번째 (IGFBP-3유전자의 전사시작점으로부터 -202번째) 염기를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 증폭할 수 있는 프라이머를 제공한다.
- <49> 본 발명의 용어 "프라이머"는 적절한 버퍼 중의 적절한 조건(예를 들면, 4개의 다른 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 DNA, RNA 폴리머라제 또는 역전사 효소와 같은 중합체) 및 적당한 온도 하에서 주형-지시 DNA합성의 시작점으로 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오티드를 말한다. 상기 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있으나, 통상 15-25 뉴클레오티드이다. 짧은 프라이머 분자는 일반적으로 주형과 안정한 혼성체를 형성하기 위해서 더 낮은 온도를 필요로 한다. 프라이머 서열은 주형과 완전하게 상보적일 필요는 없으나, 주형과 혼성화 할 정도로 충분히 상보적이어야 한다. 프라이머 서열은 그 3'말단이 서열번호 1의 다형성 부위와 정렬하는 것이 바람직하다. 상기 프라이머는 다형성 부위를 포함하는 표적 DNA에 혼성화 하고, 완전한 상동성을 보이는 대립형질 형태의 증폭을 개시한다. 이 프라이머의 반대편에 혼성화하는 제2프라이머와 쌍을 이루어 사용된다. 증폭에 의하여 두개의 프라이머로부터 산물이 증폭되고, 이는 특정 대립형질 행태가 존재한다는 것을 의미한다.
- <50> 유전자의 폐암 발암 관련 다형성 부위를 탐색하기 위해서는 프라이머 디자인이 중요하다. 당업자가 디자인할 수 있는 모든 프라이머가 본 발명의 프라이머 범위에 포함될 수 있으나 바람직하게는 상기 프라이머는 서열번호 2 및 3 또는 서열번호 4 및 5로 표시된 올리고뉴클레오티드로 구성되는 것을 특징으로 하는 프라이머이다. 예를 들어, 본 발명의 -1590 C>A에 대한 프라이머의 서열은 5 '-GCAGACCTGGGACCTCAA-3' (정방향;서열번호 2)와 5' -CGATCTCTCGCCAGTGT-3' (역방향;서열번호 3)이고, -202 A>C에 대한 프라이머 서열은 5 '-CCACGAGGTACACGAATG-3' (정방향;서열번호 4)와 5' -AGCCGAGTGCTCGCATCTGG-3' (역방향;서열번호 5)이다.
- <51> 프라이머쌍 중에서 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머는 다형성 부위 염기에 인접한 서열과 어닐링 할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하여, 상기 정방향 또는 역방향 프라이머 3' 말단은 상기 다형성 부위 염기에 매칭되는 염기를 갖는다.
- <52> 예를 들어, 349번째 뉴클레오티드에 있는 단일 염기 다형성인 "A"를 검출하여 IGFBP-3유전자 변이체를 동정하는 경우, 상기 단일 염기 다형성의 업스트림에 상보적인 서열을 정방향 프라이머로서 이용할 수 있으며, 역방향 프라이머 3' 말단은 상기 단일 염기 다형성에 매칭되는 염기 즉, "A" 염기를 가지며, 나머지 부분은 서열번호 1에서 349번째 뉴클레오티드의 다운스트림에 위치한 서열과 실질적으로 대응되는 서열을 갖는다. 이러한 프라이머 쌍을 이용하여 349번째 단일 염기 다형성을 검출하는 증폭 반응을 실시할 수 있다.

- <53> 또한, 본 발명은 상기 프라이머를 포함하는 폐암 감수성 진단용 키트를 제공한다. 본 발명의 키트는 상술한 프라이머를 필수 구성요소로 하는바, 프라이머에 대한 상세한 설명은 본 발명의 키트에 이용되는 프라이머에도 적용된다. 따라서, 반복적인 기재에 따른 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 그 기재를 생략한다. 본 발명의 키트가 PCR 증폭반응에 적용되는 경우, 예컨대 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, 각 종의 중합효소 (예컨대, *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermusfiliformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litalis* 또는 *Pyrococcus furiosus* (Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- <54> 또한, 본 발명은 서열번호 1로 이루어지는 폴리뉴클레오티드에서 서열번호 1의 349번째 염기(IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -1590번째) C가 A로 치환되고 상기 349번째 염기를 포함하는 10-2159개의 연속적인 DNA단편으로 구성되는 폴리뉴클레오티드, 서열번호 1의 1737번째 염기(IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -202번째) A가 C로 치환되고 상기 1737번째 염기를 포함하는 10-2159개의 연속적인 DNA단편으로 구성되는 폴리뉴클레오티드 및 이들의 상보적인 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상의 폴리뉴클레오티드로 이루어지는 폐암 감수성 진단용 마이크로어레이를 제공한다.
- <55> 상기 마이크로어레이는 DNA 또는 RNA 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것일 수 있다. 상기 마이크로어레이는 프로브 폴리뉴클레오티드에 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 제외하고는 통상적인 마이크로어레이로 이루어진다. 프로브 폴리뉴클레오티드를 기판 상에 고정화하여 마이크로어레이를 제조하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 상기 "프로브 폴리뉴클레오티드"는 혼성화할 수 있는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것으로, 핵산의 상보성 가작에 서열 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 의미한다.
- <56> 즉, 본 발명에서 용어 "프로브"는 특정 뉴클레오티드 서열에 혼성화될 수 있는 디옥시뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드를 포함하는 자연 또는 변형되는 모노머 또는 결합을 갖는 성형의 올리고머를 의미한다. 바람직하게는, 프로브는 혼성화에서의 최대 효율을 위하여 단일가닥일 수 있다. 프로브는 바람직하게는 디옥시리보뉴클레오티드일 수 있다. 본 발명에 이용되는 프로브로서, 본 발명의 다형성 부위에 완전하게(perfectly) 상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 될 수도 있다.
- <57> 본 발명에서, 프로브는 서열번호 1의 349번째(IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -1590번째) 염기 또는 서열번호 1의 1737번째 (IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -202번째) 염기를 포함하는 폴리뉴클레오티드에 혼성화할 수 있는 서열을 포함한다. 보다 바람직하게는, 상기 프로브의 3' 말단, 5' 말단은 상기 단일 변이 염기에 상보적인 염기를 갖는다. 일반적으로, 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스(deuplex)의 안정성은 말단의 서열의 일치에 의해 결정되는 경향이 있기 때문에, 3' 말단, 5' 말단에 단일 변이 염기에 상보적인 염기를 갖는 프로브에서 말단 부분이 혼성화되지 않으면, 이러한 듀플렉스는 해체될 수도 있다. 이러한 프로브에는 Nielsen 등, Science 254, 1497-1500(1991)에 기재된 펩티드 핵산을 포함한다. 본 발명의 프로브는 대립형질 특이적 프로브로서, 핵산 단편 중에 다형성 부위가 존재하여, 다형성 부위에 단일염기변이 치환된 염기가 존재하는 DNA 단편에는 혼성화하나, 치환되지 않은 염기가 존재하는 DNA 단편에는 혼성화하지 않는다.
- <58> 혼성화에 적합한 조건은 Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., et al., Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시된 사항을 참조하여 결정할 수 있다. 혼성화에 이용되는 조건은 온도, 이온세기 (완충액 농도) 및 유기 용매와 같은 화합물의 존재 등을 조절하여 결정될 수 있다. 이러한 조건은 혼성화되는 서열에 의존하여 다르게 결정될 수 있다. 다만, 혼성화 조건은 대립형질간의 혼성화 강도에 있어서 유의한 차이를 보여, 대립형질 중 하나에만 혼성화하도록 설정되어야 한다.
- <59> 본 발명의 프로브 폴리뉴클레오티드를 기판 상에 고정시키는 단계도 또한 당업계에 알려진 방법으로 용이하게 제조할 수 있다. 또한, 마이크로어레이 상에서의 핵산 혼성화 및 혼성화 결과의 검출 방법 역시 당업계에 알려진 방법대로 수행될 수 있다. 예를 들면, 핵산 시료를 검출 가능한 신호를 발생시키는 표지 물질(예를 들어, 형광물질)로 표지한 다음 마이크로어레이 상에 혼성화하고 상기 표지물질로부터 발생하는 신호를 검출함으로써 혼성화 결과를 검출할 수 있다.
- <60> 또한, 본 발명은 폐암 감수성을 예측 및 판단하는 방법을 제공한다.

- <61> 보다 구체적으로,
- <62> 1) 피검체로부터 핵산시료를 수득하는 단계;
- <63> 2) 수득한 핵산시료로부터 서열번호 1의 349번째 (IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -1590번째) 염기 또는 서열번호 1의 1737번째 (IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -202번째) 염기 다형성 부위를 증폭하는 단계; 및
- <64> 3) 상기 2)에서 증폭된 다형성 부위의 염기를 결정하여 폐암 발생 위험도를 분석하는 단계를 포함하는 폐암 감수성 예측 및 판단 방법을 제공한다.
- <65> 본 발명에서의 용어 "핵산시료"는 DNA(gDNA, cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖는다.
- <66> 본 발명의 방법에서 출발물질이 gDNA인 경우, gDNA의 분리는 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: Rogers & Bendich (1994)). 출발물질이 mRNA인 경우에는, 당업계에 공지된 통상의 방법에 총 RNA를 분리하여 실시된다(참조: Sambrook, J. et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001); Tesniere, C. et al., Plant Mol. Biol. Rep., 9:242(1991); Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons(1987); 및 Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. 162:156(1987)). 분리된 총 RNA는 역전사효소를 이용하여 cDNA로 합성한다.
- <67> 본 발명의 방법에 있어서, 피검체로부터 DNA를 분리하는 방법은 당업계에 알려진 방법을 통하여 이루어질 수 있다. 예를 들면, 조직 또는 세포로부터 DNA를 직접적으로 정제하거나 PCR과 같은 증폭 방법을 사용하여 특정한 영역을 특이적으로 증폭하고 이를 분리함으로써 이루어질 수 있다. 본 발명에 있어서, DNA란 DNA 뿐만 아니라 mRNA로부터 합성되는 cDNA도 포함하는 의미이다. 피검체로부터 핵산을 얻는 단계는 예를 들면, PCR 증폭법, 리가제 연쇄 반응(LCR)(Wu 및 Wallace, Genomics 4, 560(1989), Landegren 등, Science 241, 1077(1988)), 전사 증폭(transcription amplification) (Kwoh 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173(1989)) 및 자가유지 서열 복제 (Guatelli 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1874(1990)) 및 핵산에 근거한 서열 증폭 (NASBA)이 사용될 수 있다.
- <68> 분리된 DNA의 염기서열의 결정은 당업계에 알려진 다양한 방법에 의하여 이루어질 수 있다. 예를 들면, 디데옥시 시 법에 의하여 직접적인 핵산의 뉴클레오타이드 서열의 결정을 통하여 이루어지거나 단일 염기 다형성 부위의 서열을 포함하는 프로브 또는 그에 상보적인 프로브를 상기 DNA와 혼성화시키고 그로부터 얻어지는 혼성화 정도를 측정함으로써 다형성 부위의 뉴클레오타이드 서열을 결정하는 방법 등이 이용될 수 있다. 혼성화의 정도는 예를 들면, 검출가능한 표지를 표적 DNA에 표지하여, 혼성화된 표적 DNA 만을 특이적으로 검출함으로써 이루어질 수 있으나, 그외 전기적 신호 검출방법 등이 사용될 수 있다.
- <69> 다형성 부위를 증폭하는 단계는 당업계에 공지된 다양한 방법을 응용하여 실시될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 응용될 수 있는 기술은, 본 발명의 방법에 이용될 수 있는 증폭 기술은 PCR증폭 (참조: Miller, H. I. (WO 89/06700) 및 Davey, C. et al. (EP 329,822)), 리가아제 체인 반응 (LCR, Wu, D.Y. et al., Genomics 4:560 (1989)), 중합효소 리가아제 체인 반응 (Barany, PCR Methods and Applic., 1:5-16(1991)), Gap-LCR (WO 90/01069), 리페어 체인 반응 (EP 439,182), 3SR (Kwoh et al., PNAS, USA, 86:1173(1989)) 및 NASBA (U.S. Pat. No. 5,130,238)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 가장 바람직하게는 PCR 증폭에 따라 증폭한다.
- <70> 염기를 결정하는 단계는 당업계에 공지된 다양한 방법을 응용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, DNA 서열분석 (sequencing), PCR-SSCP (single stranded conformation polymorphism) 분석, PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 분석, 대립형질 (allele) 특이적 혼성화 방법, DNA 칩 방법, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 방법 및 면역블랏 (immunoblot) 방법, SNaPSHOT 분석 방법, TDGS(Two-dimensional Gene Scanning), Taq-Man[®] 및 TOGATM 으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- <71> PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 분석은 제한효소 절단 절편의 길이 다양성에 기초한 유전자 검색법이다.
- <72> 스냅샷 분석 방법은 Single base pair primer extension assay의 원리를 이용하여 Single base extension을 하는 것이다. Single base extension 반응은 dideoxynucleotides(terminator)의 존재하에 cycle sequencing을 하는 것이 핵심인 기술인데 Terminator가 DNA strand로 끼어 들어가면 더 이상의 extension은 진행되지 않는다. 이때 사용되는 dideoxynucleotides를 각각 다른 dye로 label함으로써 Cycle sequencing을 통해 extension된 단 하나의 특정 nucleotide를 detection할 수 있게 된다. 따라서, 스냅샷 분석방법에는 형광이 부착된 dideoxy

nucleotide 존재 하에서 단일 염기 다형성 위치를 포함하는 인접부위에서부터 증폭하여 단일 염기 다형성 바로 앞까지 불도록 제작된 유전자형 분석 프라이머를 필요로 한다.

- <73> 본 발명의 구체적인 예에 따르면, PCR-RFLP 분석을 통해 대상군의 염기를 결정하고, 확인차 스냅샷 분석 방법을 이용하였다.
- <74> 본 발명에서는 스냅샷 분석 방법을 위해 바람직하게는 -1590 C>A 단일 염기 다형성의 유전자형 분석 프라이머로 5' -AAGACAAGAACAATGGAG -3' (역방향; 서열번호 6)와 -202 A>C 단일 염기 다형성의 유전자형 분석 프라이머로 5' -GGCACCTGCTCCTCGTGC -3' (역방향; 서열번호 7)를 사용할 수 있다.
- <75> 폐암 발생의 위험도를 분석하는 단계는 당업계에 공지된 다양한 방법을 응용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 스튜던트 t -검정 (Student's t-test), 카이-스퀘어 검정 (Chi-square test) 및 다중 로지스틱 회귀 분석 (multiple logistic regression analysis)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- <76> 예를 들어, 폐암 발생의 위험도 분석에 있어서 오즈비와 95% 신뢰구간의 결과가 폐암 발생의 위험도를 분석하는 기준이 된다.
- <77> 상기 오즈비는 대조군에서 해당 단일 염기 다형성/일배체형을 가질 확률에 대한 환자군 중에서 해당 단일 염기 다형성/일배체형을 가질 확률의 비율을 나타낸다. 오즈비가 1을 초과하는 경우 해당 단일 염기 다형성/일배체형 이 환자군과 연관성이 있음을 나타낸다. 오즈비가 클수록 상기 연관성도 증가한다.
- <78> 상기 95% 신뢰구간은 해당 오즈비가 존재할 확률이 95%인 구간을 나타내는 것이다. 즉, 신뢰구간의 하계가 1이 하이고 상계가 1이상인 경우에는 질병과의 연관성을 유의하다고 판단할 수 없다.
- <79> p-value< 0.05일 때 폐암과의 연관성이 유의하다고 판단할 수 있다. 즉, 위험도 오즈비가 유의한 것으로 판단할 수 있다.
- <80> 보다 구체적으로 본 발명에서 상기 3)단계에서 결정된 서열번호 1의 349번째 (IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -1590번째) 염기가 A이거나, 서열번호 1의 1737번째 (IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -202번째) 염기가 C인 경우에 폐암 발생 위험도가 증가되는 것으로 예측 및 판단할 수 있다.
- <81> 보다 구체적으로 본 발명에서 상기 3)단계에서 결정된 서열번호 1의 349번째 (IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -1590번째) 염기가 C이고, 서열번호 1의 1737번째 (IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -202번째) 염기가 A인 경우에 폐암 발생 위험도가 감소되는 것으로 예측 및 판단할 수 있다.
- <82> 또한, 본 발명에서 상기 3)단계에서 결정된 서열번호 1의 349번째 (IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -1590번째) 염기가 A이고, 서열번호 1의 1737번째 (IGFBP-3 유전자의 전사시작점으로부터 -202번째) 염기가 C인 경우에 폐암 발생 위험도가 증가되는 것으로 예측 및 판단할 수 있다.
- <83> 특히, 한국인 여성 혹은 비흡연자 개체의 경우에 상기와 같이 예측 및 판단하는 것이 바람직하다.
- <84> 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허논문이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.
- <85> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

효 과

- <86> 이상, 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명 IGFBP-3유전자의 프로모터상에 위치하는 -1590 C>A, -202 A>C 다형성 및 이를 포함하는 일배체형은 폐암 발생 위험도와 밀접한 관계를 나타내므로 폐암 발암 고위험군에 속하는지 여부의 예측 및 선별이 가능하도록 마커로 사용될 수 있으며, 이를 탐색할 수 있는 키트는 장차 폐암의 특정 환자군에 대한 조기진단 및 치료분야에 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <87> 실시예 1. 피검자의 선정 및 측정

<88> 본 연구는 2001년 8월과 2007년 2월 사이에 폐암 및 유방암, 난소암 유전체센터, 인하대 병원과 성모 병원에서 폐암 진단받은 환자군 415명과 심혈관 유전체센터, 국립 유전체 연구 협회, 알러지/호흡계질환 유전체센터와 계명대 동산 병원에서 모집된 정상군 415명에게서 동의서를 받아 진행되었다. 나이, 흡연력을 인터뷰를 통해 확인하였다. 본 연구는 해당기관의 생명윤리 심의위원회 심의를 통과하여 진행되었다.

<89> 하기 표는 실험 대상 정상군 415명, 폐암 환자군 415명의 임상학적 특징(baseline characteristics)를 나타낸다.

<90> <표 1> 폐암 환자 및 정상 대조군의 임상학적 특징

	Cases (n = 415)	Controls (n = 415)	p-value
나이 (연)			
평균 ± 편차	61.03 ± 9.67	60.81 ± 10.61	0.6060 ^a
성별, no. (%)			0.9372 ^b
남성	306 (73.7)	305 (73.5)	
여성	109 (26.3)	110 (26.5)	
흡연력, no. (%)			0.0001 ^b
무(Never)	110 (27.2)	168 (53.5)	
유(Ever)	294 (72.8)	146 (46.5)	

<92> 실시예 2. genomic DNA 준비와 IGFBP-3 유전자의 direct sequencing

<93> 실험 수행을 위해 동의를 받은 환자군과 정상군을 포함한 총 830명의 대상군에서 혈액을 채취하고 the PUREGENE® DNA purification system (Gentra, Minneapolis, MN)을 이용하여 게놈 DNA (genomic DNA; gDNA)를 추출하였다. 추출된 gDNA 50 µl elution buffer에 희석하여 제조한 gDNA 50 ng을 PCR을 수행하여 증폭시켰다.

<94> 7p14-p12에서 전체 IGFBP-3 유전자 중 5' regulatory 부분의 2kb를 AmpliTaqGold (Roche, Branchburg, NJ)를 사용하여 PTC-225 Peltier Thermal cycler (MJ research Inc, Waltham, MA)를 통해 증폭하였다. 모든 증폭은 95℃에서 30초, 64℃ 1분, 72℃ 1분에서 35 cycle 후 72℃에서 10분간 수행되었다. PCR 생성물은 Montage PCR96 Cleanup kit (Millipore, Bedford, MA)를 사용하여 정제하고 20µl nuclease free water로 희석시켰다. BigDye Terminator V 3.1 Cycle Sequencing kit (Perkin Elmer, Foster City, CA)를 사용하여 sequencing을 하였다. Multiscreen SEQ 384 well filter plates(Millipore, Bedford, MA)를 사용하여 dye terminator를 제거하였고, Applied Biosystems 3700 DNA analyzer(Applied Biosystems, Foster City, CA)를 사용하여 서열을 분석하였다. 모든 단일 염기 다형성과 서열은 Polyphred software (<http://droog.gs.washington.edu/polyphred>)를 사용하여 분석하였다.

<95> 폐암환자로부터 무작위로 선택한 41개의 샘플의 유전자형 분석을 위해서 direct sequencing을 수행하였다. IGFBP-3의 전사 시작부위에서 SNPs와 관련된 프라이머 디자인과 positioning은 GenBank sequence(accession no. NT_007819)에 기초하였다. IGFBP-3 promoter 부분의(-1590 C>A; -202 A>C)에서 두 개의 SNPs에 중점을 두었다. 선별한 분포 중 두 개의 loci (-1590 C>A; -202 A>C)에서 단일 염기 다형성이 분포하는 빈도는 각각 79%와 77%를 보였다.

<96> 실시예 3. 유전자형 분석- PCR-based restriction length polymorphism (PCR-RFLP) 분석

<97> 415명의 폐암환자와 415명의 정상인에서 두 IGFBP-3 SNPs 및 빈도수를 분석하기 위해서 PCR-based restriction length polymorphism (PCR-RFLP) 분석을 수행하였다. PCR은 Takara Thermo Cycler (Takara Inc., Tokyo, Japan)을 이용하여 수행하였다. -1590번째 유전자를 포함한 DNA fragment를 증폭시키기 위한 PCR 프라이머는 5'-GCAGACCTGGGACCTCAA-3'(forward)와 5'-CGATCTCTGCCAGTGT-3'(reverse)이고, -202번째 유전자를 포함한 DNA fragment를 증폭시키기 위한 PCR 프라이머는 5'-CCACGAGGTACACGAATG-3'(forward), 5'-AGCCGAGTGCTCGCATCTGG-3'(reverse)로 디자인하였다. 50µl (-1590 SNP)와 20µl (-202 SNP) PCR mixtures의 조성물은 25 - 50 ng of DNA, 1 unit of Han Taq DNA polymerase (Genenmed, Seoul, Korea) 및 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 6 µl 증류수, 0.5 µM 프라이머를 함유한 1x Han PCR buffer이다. 각 주제의 유전자형을 결정하기 위해서 PCR 산물을 적절한 제한효소로 절단하였다. 제한 효소에 의해 잘려진 DNA fragment는 2~3% agarose gel에 loading하여 ethidium bromide에 staining하여 결과를 검출하였다.

- <98> -1590 SNP의 경우, PCR 산물은 ApaI (New England Biolabs, Beverly, MA)로 절단하였다.
- <99> ApaI site에 C allele가 있는 경우 즉, -1590번째 유전자형이 C인 경우에는 548 bp 절편이 321 bp 절편과 227 bp 절편으로 절단된다 (Fig. 1a). 유전자형이 A인 경우에는 ApaI로 절단되지 않으므로 548 bp 길이의 단일 밴드로 나타난다. 또한, the heterozygous genotype (CA)의 경우에는 세개의 절단 밴드(548, 321, and 227 bp)가 나타난다.
- <100> -202 SNP의 경우, PCR 산물은 Alw21I (MBI Fermentas, Flamborough, Canada)로 절단하였다. -202 번째 유전자형이 A 인 경우에는 242 와 172 bp 길이의 밴드로 절단되고, C인 경우에는 291 와 172 bp 길이의 밴드로 절단된다.
- <101> 유의한 빈도수로 (10%이상) 발굴된 -1590 C>A와 -202 A>C부위를 나머지 폐암 환자 362명과 정상 대조군 410명에서 스냅샷 분석 (SNaPshot assay)(ABI, Foster City, CA)을 통해 유전자형을 분석하고 빈도수를 확인하였다. DNA 샘플의 10%이상을 무작위 추출하여 SNaPshot (PE Applied Biosystems, Warrington, UK) ddNTP primer extension method 을 통해 유전자형을 재확인한 결과 PCR-RFLP 분석 결과와 완벽히 일치하였다.
- <102> 실시예 4. IGFBP-3 유전자 프로모터 Transient transfection과 리포터(reporter)분석
- <103> -1590 C>A과 -202 A>C 다형성이 IGFBP-3 유전자의 전사 활성화에 영향을 주는지를 실험하기 위하여 β -lactamase 분석법을 수행하였다.
- <104> IGFBP-3의 -1645에서 +64까지의 promoter 부분과 -202A/C부분을 bla(M) reporter gene(GeneBLAzer[®], Invitrogen, Carlsbad, CA,)의 coding region의 upstream에 삽입하였다. 또한, IGFBP-3 promoter activity에서 두 개의 SNPs의 시너지 효과가 미치는 영향을 조사하기 위해서 -1590C/-202A 또는 -1590A/-202C를 포함하는 DNA constructs를 준비했다.
- <105> 이 constructs는 DNA sequencing에 의해 확인되어졌고, beta-lactamase reporter를 포함하는 4개의 IGFBP-3 프로모터 plasmids를 H1703 세포주(American Type Culture, Rockville, MD)에 GenePORTER[®] Transfection Reagent 2 μ l (Gene Therapy Systems, San Diego, CA)을 사용하여 transfection하였다. beta-lactamase activity는 GeneBLAzerTM detection kits (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 세포주에 transfection 후 24시간 후에 검사하였다.
- <106> 상대적 β -lactamase activity는 DNA 없이 transfection reagent로 처리된 세포의 기본 활성도로 각각의 reporter plasmid로 트랜스펙트된 세포의 평균 활성도를 나눈 값이다. 데이터는 세개의 독립된 실험들의 대표값을 나타낸 것이다.
- <107> 그 결과, H1703 폐암 세포주에 -1590과 -202 위치에 haplotype을 갖는 DNA fragment를 도입하여 IGFBP-3 유전자의 promoter 활성을 측정한 경우에는 유의적으로 이 유전자의 전사가 억제되었다 ($p < 0.05$, t-test). 그러나 -202 위치에 C 유전자형은 IGFBP-3의 promoter 활성화에 영향을 주지 않았다.
- <108> 실시예 5. IGFBP-3와 IGF-I, 유리 IGF-I의 혈청 수준 분석
- <109> IGFBP-3 유전자의 SNPs가 IGFBP-3와 IGF-1의 circulating levels에 영향을 주는지 조사하기 위해서 enzyme-linked immunosorbent assays(Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX)을 사용하여 폐암환자로부터 serum 샘플에서 상기 단백질을 조사하였다. IGF-1 분석은 IGF-1과 결합하는 단백질을 제거하는 동시에 GF-1 측정 시에 방해 요소를 제거하기 위해 산-에탄올 침전 단계를 거쳐 시행하였다. 유리 IGF-1은 immunoradiometric assay(IRMA)에 의해 측정하였다(DSL, Webster, TX).
- <110> <표 4> IGFBP-3와 IGF-I, 유리 IGF-I의 혈청 수준과 폐암과의 관련성

<111>

SNP	Genotype	Number of cases	Serum levels (ng/ml)					
			IGFBP-3		Total IGF-I		Free IGF-I	
			Mean (95% CI)	^a _p -value	Mean (95% CI)	^a _p -value	Mean (95% CI)	^a _p -value

-1590	CC	142	2203.01 (2078.39-2327.63)	0.26	190.86 (168.61-213.11)	0.84	1.13 (0.92-1.34)	0.34
	CA	82	2132.80 (1974.5-2291.09)		206.16 (177.78-234.54)		1.17 (0.9-1.44)	
	AA	16	1994.17 (1646.62-2341.71)		184.19 (122.14-246.24)		1.43 (0.84-2.02)	
-202	AA	136	2209.59 (2081.89-2337.28)	0.25	190.92 (168.11-213.74)	0.73	1.14 (0.92-1.36)	0.35
	AC	88	2128.95 (1976.87-2281.03)		204.80 (177.73-234.64)		1.15 (0.89-1.41)	
	CC	16	1994.69 (1647.28-2342.10)		184.12 (122.03-246.40)		1.43 (0.84-2.02)	
Number of alleles at risk								
	0	136	2209.59 (2018.89-2337.28)	0.42	197.11 (75.88-218.34)	0.67	1.10 (0.90-1.31)	0.64
	1,2,3	88	2128.95 (1976.87-2281.03)		210.98 (84.53-237.43)		1.12 (0.87-1.37)	
	4	16	1994.69 (647.28-2342.10)		190.30 (128.63-251.98)		1.40 (0.81-1.98)	

<112>

<113> 표 4는 폐암 환자에서 폐암 발병 위험에 대한 다양한 유전자형의 경우의 수와 두 개의 단일 염기 다형성에 따른 유전자형과 혈청 IGFBP-3, 총 IGF-I, 유리 IGF-I의 혈청 수준과의 연관성을 나타내었다. 평균 blinded samples에서 추출된 IGFBP-3, 총 IGF-I, 유리 IGF-I에 대한 변이의 평균 the inter-assay coefficients 는 각각 9.9%, 4.2% 및 11.0% 였다. IGFBP-3 유전자의 프로모터 부위의 위험변이의 수와 환자의 혈청에서 IGFBP-3, 총 IGF-I, 유리 IGF-I 수준과는 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않았다 (표 4). 그러나 유전자형의 variant를 가진 경우와 IGFBP-3 혈청 수준의 감소 및 유리 IGF-I 수준이 증가와 비례하는 결과를 나타냈다 (도 3).

<114> 실시예 6. 통계분석

<115> 대립형질 빈도 (allele frequency)와 유전자형 빈도를 구해 단일 염기 다형성의 하디-와이버그 평형 (Hardy-Weinberg equilibrium; HWE)여부를 확인하였다. p-value < 0.05일때 하디-와이버그 평형이 성립하는 것으로 보았다. Linkage disequilibrium (LD)분석 (D')은 Haploview program version 3.2을 사용하였다. 유전자형과 일배체형의 빈도수는 SAS 프로그램(SAS Institute, Cary, NC)을 이용하여 나이, 성별, 흡연 상태를 고려하여 보정한 오즈비 (Odd ratio; OR), 95% 신뢰구간 (95% CI)과 p-value를 구하여 폐암 발생 위험도와와의 연관성을 확인하였다. 또한, 본페로니 분석 방법 (pc value)으로 엄격한 다중 분석을 시행하였다. 신뢰구간의 상, 하한값이 1을 포함하지 않고 p-value < 0.05일때 폐암과의 연관성분석 즉, 위험도 오즈비율이 유의한 것으로 판단한다.

<116> 이하는 상기 분석 방법을 통해 IGFBP-3 프로모터 단일 염기 다형성 및 일배체형과 폐암 발생 위험도와와의 연관성을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

<117> <표2> IGFBP-3프로모터 단일염기다형성과 폐암 발생 위험도와의 연관성 분석

<118>

					Codominant	Dominant	Recessive
Group	Loci	Genotype	Cases n (%)	Controls n (%)	OR (95% CI) ^a	OR (95% CI) ^a	OR (95% CI) ^a
Overall	-1590 C>A	CC	248 (60.2)	266 (64.1)			
		CA	142 (34.5)	128 (30.8)	1.13 (0.87–1.47)	1.18 (0.86–1.63)	1.06 (0.53–2.14)
		AA	22 (5.3)	21 (5.1)			
	-202 A>C	AA	236 (57.6)	247 (60.1)			
		AC	152 (37.1)	141 (34.3)	1.07 (0.82–1.39)	1.11 (0.81–1.53)	0.96 (0.48–1.90)
		CC	22 (5.4)	23 (5.6)			
Gender							
Female	-1590 C>A	CC	64 (58.7)	81 (73.6)			
		CA	40 (36.7)	25 (22.7)	1.73 (0.98–3.06)	2.11 (1.08–4.12) ^b	1.12 (0.24–5.36)
		AA	5 (4.6)	4 (3.6)			
	-202 A>C	AA	59 (54.6)	75 (68.8)			
		AC	44 (40.7)	30 (27.5)	1.66 (0.95–2.90)	1.96 (1.02–3.75) ^b	1.12 (0.23–5.35)
		CC	5 (4.6)	4 (3.7)			
Male	-1590 C>A	CC	184 (60.7)	185 (60.7)			
		CA	102 (33.7)	103 (33.8)	1.00 (0.74–1.35)	1.00 (0.69–1.45)	1.00 (0.45–2.22)
		AA	17 (5.6)	17 (5.6)			
	-202 A>C	AA	177 (58.6)	172 (57)			
		AC	108 (35.8)	111 (36.8)	0.94 (0.69–1.27)	0.93 (0.65–1.35)	0.88 (0.41–1.91)
		CC	17 (5.6)	19 (6.3)			
Smoking history							
Never	-1590 C>A	CC	62 (56.4)	116 (69.1)			
		CA	41 (37.3)	44 (26.2)	1.75 (1.07–2.88) ^b	2.06 (1.12–3.78) ^b	1.76 (0.49–6.26)
		AA	7 (6.4)	8 (4.8)			
	-202 A>C	AA	56 (51.4)	106 (63.9)			
		AC	46 (42.2)	51 (30.7)	1.70 (1.04–2.77) ^b	1.99 (1.10–3.62) ^b	1.60 (0.46–5.52)
		CC	7 (6.4)	9 (5.4)			
Ever	-1590 C>A	CC	179 (61.5)	87 (59.6)			
		CA	97 (33.3)	49 (33.6)	0.89 (0.61–1.31)	0.90 (0.56–1.46)	0.74 (0.28–1.95)
		AA	15 (5.2)	10 (6.9)			
	-202 A>C	AA	173 (59.7)	80 (55.6)			
		AC	102 (35.2)	55 (38.2)	0.85 (0.58–1.26)	0.82 (0.51–1.33)	0.83 (0.30–2.27)
		CC	15 (5.2)	9 (6.3)			

<119>

<120> ^a 오즈비율(ORs)과 95% 신뢰구간(95% CI)은 로지스틱회귀분석을 통해 분석하였고, 나이, 성별을 통해 수정된 값이다.

<121> ^b $p < 0.05$, p-value of Bonferroni corrected unconditional logistic regression analysis.

<122> 폐암 환자군과 정상인의 혈액으로부터 유래된 DNA의 -1590 C>A 와 -202 A>C의 두 개의 SNP를 포함하는 유전자형 빈도수는 대상군 모두 Hardy-Weinberg equilibrium 평형 상태에 있다. 두 개의 다형성은 강한 linkage disequilibrium ($r^2 = 0.90$, $|D'| = 1.00$)을 이룬다. 두 대상군의 대립인자 빈도수 (allele frequencies)와 유전자형 분포 (genotype distributions)에 대한 폐암발병위험과의 관계를 성별, 흡연력에 따라 구분한 표는 표 2이다. 표 2에 나타낸 각 단일 염기 다형성의 대립형질들의 빈도수는 환자군과 정상인군에서 유의적인 차이를 보이지 않았다(표 2의 overall). 그러나 성별, 흡연력을 변수로 한 dominant에 대한 분석 결과(표2의 gender 및 Ever), -1590 C>A에서 A 유전자형, -202 A>C에서 C 유전형을 가진 여성 (-1590 C>A; adjusted OR = 2.11, 95% CI = 1.08 - 4.12, -202 A>C; adjusted OR = 1.96, 95% CI = 1.02 - 3.75, respectively), 비흡연자 (-1590 C>A; adjusted OR = 2.06, 95% CI = 1.12 - 3.78, -202 A>C; adjusted OR = 1.99, 95% CI = 1.10 - 3.62, respectively)에서 폐암과 관련성이 있는 것을 발견하였다.

<123> <표3> IGFBP-3프로모터 Haplotype과 폐암 발생 위험도와의 연관성 분석

<124>

					Codominant	Dominant	Recessive
Group	Haplotypes (-1590/-202)		Cases n (%)	Controls n (%)	OR (95% CI) ^a	OR (95% CI) ^a	OR (95% CI) ^a
Overall	C-A	-/-	22 (5.4)	23 (5.6)			
		+/-	152 (37.1)	141 (34.3)	0.94 (0.75-1.18)	1.05 (0.57-1.91)	0.90 (0.68-1.19)
		+/+	236 (57.6)	247 (60.1)			
	A-C	-/-	248 (60.5)	263 (64)			
		+/-	140 (34.2)	128 (31.1)	1.12 (0.89-1.42)	1.16 (0.87-1.54)	1.11 (0.60-2.07)
		+/+	22 (5.4)	20 (4.9)			
Gender							
Female	C-A	-/-	5 (4.6)	4 (3.7)			
		+/-	44 (40.7)	30 (27.5)	0.60 (0.37-0.99)	0.89 (0.23-3.51)	0.51 (0.29-0.90) ^b
		+/+	59 (54.6)	75 (68.8)			
	A-C	-/-	64 (59.3)	80 (73.4)			
		+/-	39 (36.1)	25 (23)	1.69 (1.02-2.78)	2.05 (1.14-3.68) ^b	1.12 (0.29-4.40)
		+/+	5 (4.6)	4 (3.7)			
Male	C-A	-/-	17 (5.6)	19 (6.3)			
		+/-	108 (35.8)	111 (36.8)	1.07 (0.82-1.39)	1.14 (0.58-2.24)	1.07 (0.77-1.48)
		+/+	177 (58.6)	172 (57)			
	A-C	-/-	184 (61)	183 (60.6)			
		+/-	101 (33.4)	103 (34.1)	1.00 (0.77-1.31)	0.99 (0.71-1.37)	1.06 (0.53-2.15)
		+/+	17 (5.6)	16 (5.3)			
Smoking history							

Never	C-A	-/-	7 (6.4)	9 (5.4)			
		+/-	46 (42.2)	51 (30.7)	0.59 (0.38-0.90) ^b	0.63 (0.21-1.85)	0.50 (0.30-0.85) ^b
		+/+	56 (51.4)	106 (63.9)			
	A-C	-/-	62 (56.9)	114 (68.7)			
		+/-	40 (36.7)	44 (26.5)	1.71 (1.11-2.64) ^b	1.99 (1.17-3.40) ^b	1.74 (0.58-5.29)
		+/+	7 (6.4)	8 (4.8)			
Ever	C-A	-/-	15 (5.2)	9 (6.3)			
		+/-	102 (35.2)	55 (38.2)	1.17 (0.83-1.65)	1.21 (0.50-2.93)	1.21 (0.80-1.84)
		+/+	173 (59.7)	80 (55.6)			
	A-C	-/-	179 (61.7)	86 (59.7)			
		+/-	96 (33.1)	49 (34)	0.90 (0.64-1.27)	0.89 (0.59-1.36)	0.83 (0.34-2.00)
		+/+	15 (5.2)	9 (6.3)			

<125> 상기 표3에서 보듯이 Haplotype 분석 결과, C-A haplotype을 가진 여성(recessive adjusted OR = 0.51, 95% CI = 0.29 - 0.90), 비흡연자(codominant adjusted OR = 0.59, 95% CI = 0.38 - 0.90 and recessive adjusted OR = 0.50, 95% CI = 0.30 - 0.85)의 경우에는 폐암 발병의 위험도가 낮았으나 A-C haplotype을 가진 여성, 비흡연자 (adjusted OR = 2.05, 95% CI = 1.14 - 3.68 and adjusted OR = 1.99, 95% CI = 1.17 - 3.40, respectively)의 경우에는 dominant에 대한 분석 결과 폐암 발병 위험도가 유의적으로 높았다.

산업이용 가능성

<126> 본 발명 IGFBP-3 유전자의 프로모터상에 위치하는 -1590 C>A, -202 A>C 다형성 및 다형성을 포함하는 일배체형은 폐암 발생 위험도와 밀접한 관계를 나타내므로 폐암 발암 고위험군에 속하는지 여부의 예측 및 선별이 가능하도록 마커로 사용될 수 있으며, 이를 탐색할 수 있는 키트는 장차 폐암의 특정 환자군에 대한 조기진단 및 치료 등에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<127> 도 1은 IGFBP-3 유전자의 PCR-RFLP 분석 결과를 나타낸 것이다.

<128> (A); IGFBP-3 유전자 promoter의 -1590 번째 단일 염기 다형성 부위를 ApaI 제한 효소로 절단하였을 때 대립인자의 유전자형에 따른 DNA 절편의 표현형을 나타낸 것이다.

<129> (B); IGFBP-3 유전자 promoter의 -202 번째 단일 염기 다형성 부위를 Abw21I 제한 효소로 절단하였을 때 대립인자의 유전자형에 따른 DNA 절편의 표현형을 나타낸 것이다.

<130> 도 2는 -202A vs -202C 유전자형과 -1590C/-202A vs -1590A/-202C haplotype의 IGFBP-3 유전자 promoter 활성도에 미치는 영향을 분석한 것이다.

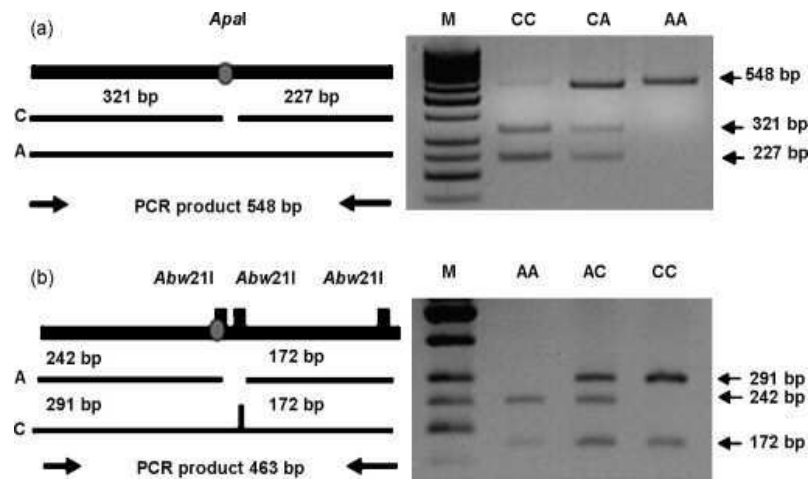
<131> (A); 이들 유전자형과 haplotype을 포함하는 DNA를 β -lactamase 플라스미드에 삽입한 구조를 나타낸 것이다.

<132> (B); 각 -202A, -202C 대립인자, -1590C/-202A, -1590A/-202C haplotype을 1703 세포주에 transfection 시킨 후 β -lactamase 분석 시스템을 이용하여 IGFBP-3 promoter의 전사 활성을 측정하여 각각 비교 분석한 것이다.

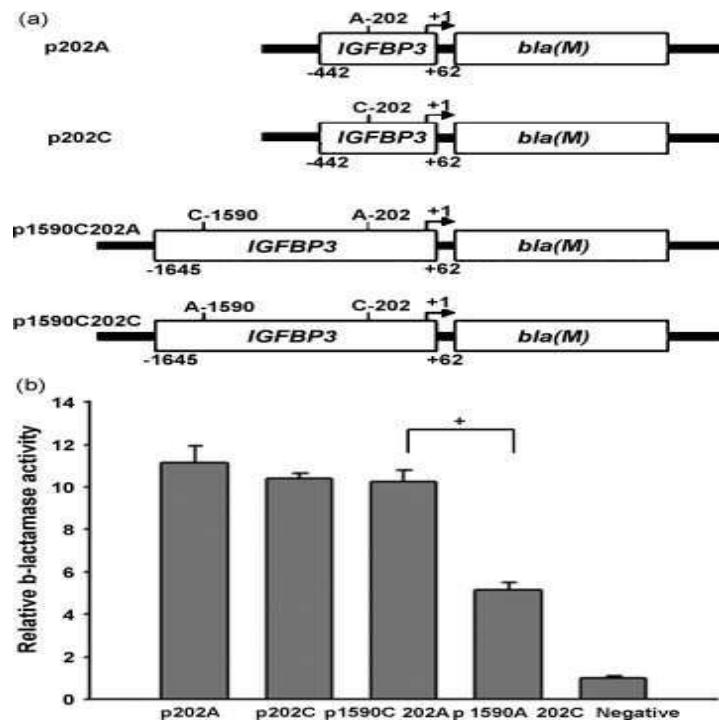
<133> 도3은 IGFBP-3 유전자의 프로모터 부위에 -1590, -202 위치의 대립인자 수에 따른 IGFBP-3, 총 IGF-I, 유리 IGF-I의 평균 혈청 수준 비교 분석한 것이다.

도면

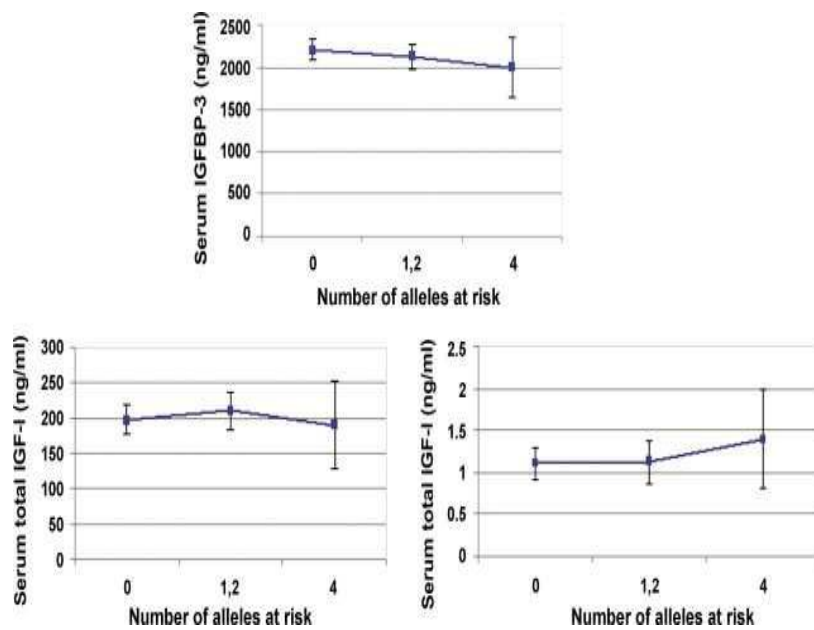
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110> korea university industry and academy collaboration foundation
 <120> Makers for the diagnosis of susceptibility to lung cancer using IGFBP-3 gene and method for predicting and analyzing susceptibility to lung cancer using the same

<160> 7

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
 <211> 2159
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 tctgctgcaa cattgcacta accagaactg cagacctggg acctcaagaa ttgcatttga 60

tgccgaaccc gctctaattt cagagtcaag gtctctgcga gtatttaagg aacggatgta 120

aacctggggg attcgttttg ttctcttcaa ttctcaatg aaatcagaga tctgttctt 180

gggtgtcaac gcagatacta gaaggagggtg atacaagaga aaggaacag caagcgacga 240

ttatggcacg gtttctgta aacaaggttg agtgtagcca cagcctgagc actgtgggag	300
aagagctcat aagaaaatga cggtgctggg ccttcgtcac cccggggcac tccattgttc	360
ttgtctttgg tcicctttta ttgttagagg tccaattatt tatttattta gtacaagagg	420
gaacgaaatt gatctttcca ttctaaaagg agagtatata tgtataaaag gaagctgtat	480
agatatgggg gaagaggttg acagggggaa aaggggagag gacgagagag agaaaggagag	540
ggagagggac aaggagagac actgggagag agatcgatta ggagagacag aatgatgaa	600
tgaagattaa cttcacccaa ggcttcgtgc tggaggggaa tggaggagct cctgatttgc	660
tattactact ccaaactgca aagggtcctt tcaagtcacc tatccacctc ctaaggcaag	720
cgccaattt caacagcgtt caggaaagtc tcctcccgcg gaggtctcac cgcttccac	780
tccacccca caaactcttt ggaaaagtgc cttgaaaaat ttaatctca atccaatct	840
ggaccaccag cgtcctctgt tggtcaccga agggaggggg tgcgcagaca aaactgaaga	900
aactcgagtg ccagagaagg ccgacaggag ttacagcgac ctcagcgcg aattgcgccc	960
ccgaacttta ctgaaaagtg tttagattgc agagataagc tagaatcca acgcatcgag	1020
aatacagtaa tacgaagtcg ccttcaaaaa atgacaatga aaattgccta ttaaaggact	1080
atttggttaa ttacgtttca gcagtgccca gtttattgtc tttattattc ttttgcattg	1140
ggtgtaaact ccatttgaaa acataatcag ggagaatacc caagacaaga agaacagttg	1200
tcatttaaaa tatttgaaaa gccctgcctt aaggacgcat tcgcttgccg gtccactctt	1260
aattggagac ttgcggtgta gcaacacgtg agagtcttct tgcgttgaga agtaagcctg	1320
gaaaggggag aaggccccgg gcgcattctc agatgcgtat ttgtgggccc ctggggatat	1380
aaacagccca gcgggtgtaa attaaacccc gcagtgcctt ggctccctga gacccaaatg	1440

taagtcagaa atgtcccaag acttcgcctg ccaacggaat taaatitttag aaagctccac	1500
gaggtacaca cgaatgcgga gcgctgtatg ccagtttccc cgacaccggc tcgccgcagg	1560
gagacctcac cccgagagcg gaaggggtaa gggcggcggg gtcaaggaga tcgggggtgc	1620
tgagttggcc aggagtgact ggggtgaccg ggggtgctga ggtggcctgg agtgccgggg	1680
tggccgggca caccttggtt cttgtagacg acaaggtgac ccgggctccg ggcgtgcgca	1740
cgaggagcag gtgcccgggc gagtctcgag ctgcacgccc ccgagctcgg ccccgctgc	1800
tcagggcgaa gcacgggccc ccgcagccgt gcctgcgccg acccgcccc ctccaaccc	1860
ccactcctgg gcgcgccgtt ccggggcgtg tcctgggcca ccccgcttc tatatagcgg	1920
ccggcgccgc cgggccgccc agatcgagc actgcgctg ggcgtgagg atcagccgt	1980
tcctgcctgg attccacagc ttgcgcctg gtactgtgc cccatccctg cgcgccagc	2040
ctgccaagca gcgtgcccc gttgcaggcg tcatgcagcg ggcgcgacc acgctctggg	2100
ccgctgcgt gactctgtg gtgctgtcc gcgggccgcc ggtggcggg gctggcgcg	2159

<210> 2
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> The IGFBP-3 gene forward primer for -1590 C>A polymorphism

<400> 2	
gcagacctgg gacctcaa	18

<210> 3
 <211> 18
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> The IGFBP-3 gene reverse primer for -1590 C>A polymorphism

<400> 3

cgatctctcg cccagtgt

18

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> The IGFBP-3 gene forward primer for -202 A>C polymorphism

<400> 4

ccacgaggta cacacgaatg

20

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> The IGFBP-3 gene reverse primer for -202 A>C polymorphism

<400> 5

agccgcagtg ctgcacatctg g

21

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> The IGFBP-3 gene SNaPshot reverse primer for -1590 A>C polymorphism

<400> 6
aagacaagaa caatggag 18

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> The IGFBP-3 gene SNaPshot reverse primer for -202 A>C polymorphsm

<400> 7
ggcacctgct cctcgtgc 18