



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0082951
(43) 공개일자 2020년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57438 (2019.01)
G01N 33/57484 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0174057
(22) 출원일자 2018년12월31일
심사청구일자 2018년12월31일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김경희
대전광역시 유성구 은구비남로 34, 802동 702호(노은동, 열매마을아파트 8단지 새미래)
은혁수
대전광역시 중구 서문로 96, 209동 1401호(문화동, 센트럴파크2단지아파트)
(74) 대리인
특허법인 공간

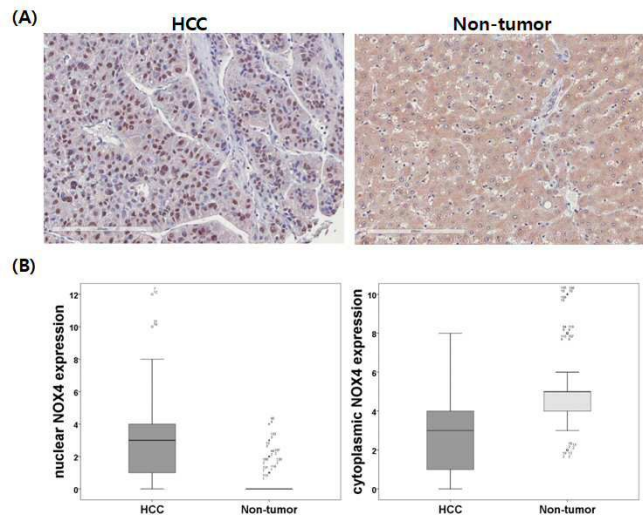
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 NOX4를 포함하는 간세포암종 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물

(57) 요약

본 발명은 NADPH 옥시다아제 4(NOX4)를 포함하는 간세포암종 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물에 관한 것으로, 간세포암종의 종양 간세포와 비종양 간세포에서 면역조직화염색 방법을 이용하여 NOX4 단백질을 발현을 분석한 결과, 비종양 간세포에 비해 종양 간세포에서 NOX4 단백질의 핵 내 발현이 현저히 증가하고, 간세포암종의 병기가 나빠질수록 종양 간세포의 핵 내 NOX4 단백질의 발현이 증가한다는 것을 확인함으로써, 본 발명의 NOX4가 간세포암종의 바이오마커로 이용가능하며, 이러한 NOX4 단백질의 간세포암종의 종양 간세포의 핵 내 발현을 분석을 통해 간세포암종의 진단 및 예후 예측이 가능하고, 간세포암종의 예방 또는 치료제 개발에 있어서도 활용 가치가 높을 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 2333/90209 (2013.01)

G01N 2800/50 (2013.01)

G01N 2800/52 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016R1D1A1B01014311

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 충남대학교 산학협력단

연구사업명 이공분야기초연구사업

연구과제명 암조직을 이용한 생체 외 항암제 반응성 검사 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2016.06.01 ~ 2022.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

NADPH 옥시다아제 4(NADPH oxidase 4, NOX4)를 유효성분으로 포함하는 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC) 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 NADPH 옥시다아제 4는 정상 간 조직과 비교하여 간세포암종의 종양 간세포에서의 핵 내 발현이 증가되는 것을 특징으로 하는 간세포암종 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 NADPH 옥시다아제 4에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 간세포암종 진단 또는 예후 예측용 키트.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 항체는 단클론 항체(monoclonal antibody, mAb) 또는 다클론 항체(polyclonal antibody, pAb)인 것을 특징으로 하는 간세포암종 진단 또는 예후 예측용 키트.

청구항 5

간세포암종 환자의 종양 간세포에서의 핵에서 발현되는 NADPH 옥시다아제 4 단백질 발현 수준을 측정하는 1단계;

상기 핵에서의 NADPH 옥시다아제 4 단백질 발현 수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 2단계; 및,

상기 환자의 종양 간세포에서의 핵에서의 NADPH 옥시다아제 4 단백질 발현 수준이 정상 대조군 시료보다 높은 경우 간세포암종으로 판단하는 3단계;

를 포함하는 간세포암종 진단 또는 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 NADPH 옥시다아제 4 단백질 발현 수준은 항원-항체 반응을 통해 측정하는 것을 특징으로 하는 간세포암종 진단 또는 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 항원-항체 반응은 웨스턴 블롯(western blot), 면역조직화학염색법(immunohistochemical stain), 방사선면역분석(radioimmunoassay), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 면역침전 분석법(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complement fixation assay) 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 방법인 것을 특징으로 하는 간세포암종 진단 또는 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 NOX4(NADPH oxidase 4)를 포함하는 간세포암종 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 간암(liver cancer)은 간에서 발생하는 모든 악성종양을 총칭하는 것으로, 전 세계적으로 암 사망 순위 4위이며, 우리나라의 경우 40, 50대 남자의 주요 사망원인이다. 이러한 간암은 크게 전이성 간암과 간 내에서 발생하는 일차성 간암으로 나뉜다. 일차성 간암 중에서는 간세포에서 유래하는 간세포암종이 가장 많으며, 이를 주로 간암이라고 한다(김지훈, 2013).

[0003] 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC)은 우리나라 암 발생 순위 3위인 주요 암이며, 5년 관찰 생존율 9.6%로 예후가 매우 불량한 암이다(Bae, S.H., 2008). 간세포암종의 원인 인자로는 간염 바이러스, 아플라톡신 B1, 음주, 당뇨 등의 다양한 인자들이 알려져 있으며, 간암의 발생 과정 또한 유전체 및 후성 유전체 변이 등의 다단계 과정을 거쳐 일어나는 것으로 알려져 있다(우현구, 2011).

[0004] 간세포암종은 40대부터 발생이 급격히 증가하고 60대 정도에 최고치를 이룬다. 간세포암종은 증상이 별로 없고, 이 시기는 사회 활동을 적극적으로 해나가는 시기로 피로감, 식욕부진, 전신 쇠약감 등이 어느 정도 수반될 수 밖에 없기 때문에 초기에 나타날 수 있는 증상들이 간과되어 조기 발견을 어렵게 하는 요인이 된다(김지훈, 2013).

[0005] 간세포암종의 최근 진단기술과 치료 방법의 발달에도 불구하고 많은 환자에서 병기(stage)가 진행되어 발견되는 경우가 많아 효과적인 치료가 어렵다. 따라서, 이러한 간암을 조기에 진단하여 근치적인 시술을 행하는 것이 환자의 생존율을 높일 수 있는 가장 효과적인 방법이다.

[0006] NADPH(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) 산화 효소(NADPH oxidase, NOX)는 다양한 자극에 반응하여 활성산소(reactive oxygenspecies, ROS)를 발생시키는 효소로서, NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX 1(dual oxidase 1), DUOX2의 7개의 이성질체(isoform)가 알려져 있다. 간 내에서 NOX에 의해 발생하는 산화스트레스는 만성 C형 간염(de Mochel, N.S., et al., 2010), 알코올성 간질환(Kono, H., et al., 2000), 담즙정체성간질환(cholestatic liver injury)(Reinehr, R., et al., 2005), 간 섬유화(De Minicis, S., et al., 2010; Jiang, J.x., et al., 2012) 및 간세포암종(Lu, C.L., et al., 2011)과 같은 다양한 간질환에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 나아가, NOX가 많은 고형암의 전이에 관련되어 있는 신생혈관형성을 촉진한다는 것이 밝혀져 있고, 위선암(gastric adenocarcinoma), 난소암, 악성흑색종, 신경교종에서 NOX4가 과발현되어 있음이 보고되었다.

[0007] 최근 연구에 따르면, 활성산소량, 슈퍼옥사이드(super oxide) 생산 및 NOX 활성이 HepG2 세포에 비해 침윤성 간세포암종인 SK-Hep1 세포에서 2배 정도 높게 나타났으며(Liu, Z.M., et al., 2015), NOX4 mRNA 발현이 인접한 비종양 조직에서보다 간세포암종에서 더 높았고, 간암 제거술 이후에는 NOX4가 간세포암종의 예후 인자가 아니라고 보고하였다(Lu, C.L., et al., 2011). 그러나 간세포암종에서 NOX4 단백질 과발현 여부와 간세포암종에서의 발현의 예후적 중요성에 대해서는 아직까지 명확하게 밝혀지지 않았다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 간세포암종 진단 또는 예후 예측을 위한 바이오마커를 연구하는 과정에서, 간세포암종의 종양 간세포와 비종양 간세포에서 면역조직화학염색 방법을 이용하여 인간 NOX4 단백질의 발현 정도를 분석한 결과, 비종양 간세포에 비해 종양 간세포에서 인간 NOX4 단백질의 핵 내 발현이 현저히 증가한다는 것을 확인하였고, NOX4 단백질의 핵 내 발현이 증가할수록 간세포암종의 병기가 나빠지며, 환자의 사망 위험율이 증가하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성할 수 있었다.

[0009] 종래 선행기술로서 한국등록특허 제1143575호에는 NOX4 폴리펩티드로 구성된 암 진단용 조성물이 기재되어 있으나, 유방암 진단용 조성물로, 본 발명의 간세포암종의 종양 간세포의 핵 내 NOX4 단백질 발현 증가 및 이를 이용한 간세포암종 진단용 조성물과는 그 구성이 차이가 있다.

[0010] 비특허문헌인 Ha, S.Y., et al., 2016. 및 Jiang, J.X., et al., 2014.에는 간세포암종의 세포질 또는 세포 내 NOX4의 발현이 감소되는 것이 기재되어 있으나, 본 발명의 간세포암종에서 핵 내 NOX4의 발현 증가는 전혀 기재 및 암시되어 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1143575호, NADPH 옥시데이즈 복합체 단백질을 유효성분으로 하는 암을 치료, 및 진단하기 위한 조성물, 2012. 04. 30. 등록.

비특허문헌

- [0012] (비특허문헌 0001) 김지훈, 간세포암, 2013년 대한내과학회 추계학술대회, 2013.
- (비특허문헌 0002) 우현구, 간세포암의 유전체 프로파일링 연구, 분자세포생물학뉴스, 2011.
- (비특허문헌 0003) Bae, S.H., Up-to-date Information for Hepatocellular Carcinoma Treatment, J. Korean Med. Assoc., 51(5), 457-474, 2008.
- (비특허문헌 0004) Clackson, T., et al., Making antibody fragments using phage display libraries, Nature, 352, 624-628, 1991.
- (비특허문헌 0005) De Minicis, S., et al., Role and cellular source of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in hepatic fibrosis, Hepatology, 52, 1420-1430, 2010.
- (비특허문헌 0006) de Mochel, N.S., et al., Hepatocyte NAD(P)H oxidases as an endogenous source of reactive oxygen species during hepatitis C virus infection, Hepatology, 52, 47-59, 2010.
- (비특허문헌 0007) Ha, S.Y., et al., NADPH oxidase 1 and NADPH oxidase 4 have opposite prognostic effects for patients with hepatocellular carcinoma after hepatectomy, Gut and Liver, 10(5), 826-835, 2016.
- (비특허문헌 0008) Jiang, J.X., et al., Liver fibrosis and hepatocyte apoptosis are attenuated by GKT137831, a novel NOX4/NOX1 inhibitor in vivo, Free Radic. Biol. Med., 53, 289-296, 2012.
- (비특허문헌 0009) Jiang, J.X., et al., NADPH oxidases in chronic liver diseases, Advances in Hepatology, 2014, Article ID 742931, 2014.
- (비특허문헌 0010) Kohler, G., et al., Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion, European J Immunology, 6, 511-519, 1976.
- (비특허문헌 0011) Kono, H., et al., NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease, J. Clin. Invest., 106, 867-872, 2000.
- (비특허문헌 0012) Liu, Z.M., et al., Transforming growth factor beta-interacting factor-induced malignant progression of hepatocellular carcinoma cells depends on superoxide production from NOX4, Free Radic. Biol. Med., 84, 54-64, 2015.
- (비특허문헌 0013) Lu, C.L., et al., NADPH oxidase DUOX1 and DUOX2 but not NOX4 are independent predictors in hepatocellular carcinoma after hepatectomy, Tumour Biol., 32, 1173-1182, 2011.
- (비특허문헌 0014) Reinehr, R., et al., Bile salt-induced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation, Gastroenterology, 129, 2009-2031, 2005.
- (비특허문헌 0015) Shono, T., et al., Enhanced expression of NADPH oxidase NOX4 in human gliomas and its roles in cell proliferation and survival, Int. J. cancer, 123, 787-792, 2008.
- (비특허문헌 0016) Vaquero, E.C., et al., Reactive oxygen species produced by NAD(P)H oxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells, J. Biol. Chem., 279, 34643-34654, 2004.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 NOX4를 포함하는 간세포암종 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 NADPH 옥시다아제 4(NADPH oxidase 4, NOX4)를 유효성분으로 포함하는 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC) 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

[0015] 상기 NADPH 옥시다아제 4는 정상 간 조직과 비교하여 간세포암종의 종양 간세포에서의 핵 내 발현이 증가될 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 NADPH 옥시다아제 4에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 간세포암종 진단 또는 예후 예측용 키트에 관한 것이다.

[0017] 상기 항체는 단클론 항체(monoclonal antibody, mAb) 또는 다클론 항체(polyclonal antibody, pAb)일 수 있다.

[0018] 본 발명은 또한, 간세포암종 환자의 종양 간세포에서의 핵에서 발현되는 NADPH 옥시다아제 4(NOX4) 단백질 발현 수준을 측정하는 1단계; 상기 핵에서의 NADPH 옥시다아제 4(NOX4) 단백질 발현 수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 2단계; 및, 상기 환자의 종양 간세포에서의 핵에서의 NADPH 옥시다아제 4(NOX4) 단백질 발현 수준이 정상 대조군 시료보다 높을 경우 간세포암종으로 판단하는 3단계;를 포함하는 간세포암종 진단 또는 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0019] 상기 NADPH 옥시다아제 4 단백질 발현 수준은 항원-항체 반응을 통해 측정할 수 있다.

[0020] 상기 항원-항체 반응은 웨스턴 블롯(western blot), 면역조직화학염색법(immunohistochemical stain), 방사선면역분석(radioimmunoassay), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사면역확산법(radioimmunoassay), 면역침전 분석법(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complement fixation assay) 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 확인할 수 있다.

[0021] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0022] 본 발명은 NADPH 옥시다아제 4(NOX4)를 유효성분으로 포함하는 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC) 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

[0023] 본 발명에 있어서, "간세포암종"은 간세포에서 유래하는 일차성 간암을 의미한다.

[0024] 본 발명에 있어서, "예후"는 간세포암종의 재발(relapse) 또는 재발(recurrence), 전이성 확산 및 약물 내성을 비롯한 간세포암종-기인성 사망 또는 진행의 가능성 등의 병의 경과 및 완치 여부를 의미한다.

[0025] 본 발명에 있어서, "예측"이란 환자가 화학요법 또는 방사선 치료 등의 치료법에 대해 선호적으로 또는 비선호적으로 반응하여 환자가 치료, 예를 들어 특정 치료제, 및/또는 원발성 종양의 수술로 제거, 및/또는 암의 재발 없이 특정 시기 동안 화학요법으로 치료된 후의 생존 여부 및/또는 가능성과 관련된다. 본 발명의 예측 방법은 임의의 특정 환자에 대한 가장 적절한 치료방식을 선택하여 적용함으로써 임상적으로 사용될 수 있다. 본 발명의 예측방법은 환자가, 예를 들어 소정의 치료제 또는 조합물, 외과적 개입, 화학요법 등의 투여를 비롯한 소정의 치료 처방과 같은 치료법에 선호적으로 반응하는지를 확인하거나, 치료 처방 후 환자의 장기 생존 또는 전신 또는 국소 재발이 가능한지를 예측할 수 있다. 또한 이를 통하여 불필요한 보조 항암요법을 최소화하거나 전신 또는 국소 재발이 예측되는 환자에게는 더욱 효과적인 보조 항암요법을 사용할 수 있도록 계획할 수 있다.

[0026] 본 발명에 있어서, "바이오마커(biomarker)"란 정상이나 병적인 상태를 구분할 수 있거나 치료 반응을 예측할 수 있고, 객관적으로 측정할 수 있는 표지자를 의미하는 것으로, DNA, RNA와 같은 유전자, 단백질, 지방질, 대사물질 등과 그 패턴의 변화 등이 이용되고 있다.

[0027] 상기 바이오마커 조성물은 NADPH 옥시다아제 4 단백질 또는 이의 면역원성 단편을 포함하는 조성물일 수 있다.

[0028] 상기 NADPH 옥시다아제 4는 NADPH 옥시다아제 패밀리 중 하나이며, 인간 NADPH 옥시다아제 4일 수 있다.

[0029] 상기 NADPH 옥시다아제 4는 정상 간 조직과 비교하여 간세포암종에서 종양 부분의 간세포 중, 세포질에서는 발현이 감소되나, 핵에서는 발현이 증가한다. 또한, 간세포암종의 병기가 나빠질수록 핵에서의 발현이 증가한다.

- [0030] 상기 NADPH 옥시다아제 4의 간세포암종의 종양 간세포의 핵 내 발현 증가는 세포질 내 발현 감소에 비해 간세포암종의 진단 또는 예후 예측의 정확성이 높다.
- [0031] 본 발명에 있어서, "병기(stage)"는 암의 진행도를 분류하는 개념으로, 통상적으로 1기에서 4기까지 4단계로 분류하는데, 암의 진행 정도가 심해질수록 숫자가 올라간다.
- [0032] 상기 NADPH 옥시다아제 4의 핵에서의 발현 증가는 단백질 발현 증가일 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명은 NADPH 옥시다아제 4에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 간세포암종 진단 또는 예후 예측용 키트에 관한 것이다.
- [0034] 상기 NADPH 옥시다아제 4에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 간세포암종 진단 또는 예후 예측용 키트는 간세포암종의 종양 간세포의 핵에서 발현되는 NADPH 옥시다아제 4 단백질을 검출하기 위한 것으로, 항체의 면역학적 검출을 위하여 기재, 적당한 완충용액, 발색효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기에서 기재로는 니트로셀룰로오스 멤브레인, 폴리비닐 수지로 합성된 96-웰 플레이트, 폴리스틸렌 수지로 합성된 96-웰 플레이트, 유리로 된 슬라이드 글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소로는 퍼옥시다아제(Peroxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase) 등이 사용될 수 있다. 또한, 형광물질로는 FITC, RITC, Cy3, Cy5 등이 사용될 수 있고, 발색기질로는 ABTS(2,2'-아지노-비스-(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)), OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘) 등이 사용될 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 있어서, "항체(antibody, Ab)"는 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 바람직하게는 상기 항체는 NADPH 옥시다아제 4 단백질 또는 이의 면역원성 단편에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 단클론 항체(monoclonal antibody, mAb), 다클론 항체(polyclonal antibody, pAb) 및 재조합 항체를 모두 포함할 수 있다. 상기 항체를 생성하는 것은 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다. 상기 다클론 항체는 NADPH 옥시다아제 4 단백질 또는 이의 면역원성 단편(항원)을 동물에 주사한 뒤 채혈한 혈청에서 얻을 수 있다. 상기 동물로는 염소, 토끼, 돼지, 양 등 임의의 동물 숙주를 이용할 수 있다. 상기 단클론 항체는, 본 발명이 속하는 기술분야에 널리 알려진 대로, 하이브리도마 방법(Kohler, G. et al., 1976), 또는, 파지 항체 라이브러리(Clackson, T. et al., 1991) 기술을 이용하여 제조할 수 있다. 상기 하이브리도마 방법을 수행하기 위해서는 마우스와 같은 면역학적으로 적합한 숙주동물의 세포와, 암 또는 골수종 세포주를 이용할 수 있다. 이 후, 폴리에틸렌글라이콜 등을 이용하는 방법, 즉, 본 발명이 속하는 기술 분야에 널리 공지된 방법으로, 이러한 두 종류의 세포들을 융합시킨 후, 항체 생산 세포를 표준적인 조직 배양 방법으로 증식시킬 수 있다. 이 후, 한계 희석법(limited dilution technique)에 의한 서브클로닝에 의해 균일한 세포 집단을 얻은 후, 본 발명의 NADPH 옥시다아제 4 단백질에 대해 특이적인 항체를 생산할 수 있는 하이브리도마를 표준 기술에 따라 시험관 내 또는 생체 내에서 대량 배양할 수 있다. 상기 파지 항체 라이브러리 방법은, 본 발명의 NADPH 옥시다아제 4 단백질 또는 이의 면역원성 단편을 특이적으로 인식하는 항체 유전자를 획득하여, 이를 파지(phage)의 표면에 융합 단백질 형태로 발현하여 항체 라이브러리를 시험관 내에서 제작하고, 상기 라이브러리로부터 본 발명의 NADPH 옥시다아제 4 단백질 또는 이의 면역원성 단편과 결합하는 단클론 항체를 분리 및 제작하여 수행할 수 있다. 상기 방법들에 의하여 제조된 항체는 전기영동, 투석, 이온교환 크로마토그래피, 친화 크로마토그래피 등의 방법으로 분리할 수 있다.
- [0036] 상기 항체는 2개의 전체 길이 경쇄(light chain) 및 2개의 전체 길이 중쇄(heavy chain)를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 항체 분자의 기능적 단편이란 적어도 항원 결합기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂, F(ab)₂, Fv 등이 있다.
- [0037] 상기 항체를 포함하는 간세포암종 진단 또는 예후 예측용 키트는 항체 대신에 NADPH 옥시다아제 4 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 압타머(aptamer), 펩타이드(peptide) 등을 포함할 수 있다.
- [0038] 본 발명에 있어서, "압타머"란, 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 특별한 종류의 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)으로 구성된 폴리뉴클레오타이드의 일종으로, 압타머는 항체와 동일하게 항원성 물질에 특이적으로 결합할 수 있으면서도, 단백질보다 안정성이 높고, 구조가 간단하며, 합성이 용이한 폴리뉴클레오타이드로 구성되어 있으므로, 항체를 대체하여 사용될 수 있다.
- [0039] 본 발명에 있어서, "펩타이드"는 표적 물질에 대한 결합력 높은 장점이 있으며, 열/화학 처리시에도 변성이 일어나지 않는다. 또한, 분자 크기가 작기 때문에 다른 단백질에 붙어서 융합 단백질로의 이용이 가능하다. 구체

적으로 고분자 단백질 체인에 붙여서 이용이 가능하므로 진단 키트 및 약물전달 물질로 이용될 수 있다.

[0040] 본 발명은 또한, 간세포암종 환자의 종양 간세포에서의 핵에서 발현되는 NADPH 옥시다아제 4 단백질 발현 수준을 측정하는 1단계; 상기 핵에서의 NADPH 옥시다아제 4 단백질 발현 수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 2단계; 및, 상기 환자의 종양 간세포에서의 핵에서의 NADPH 옥시다아제 4 단백질 발현 수준이 정상 대조군 시료보다 높을 경우 간세포암종으로 판단하는 3단계;를 포함하는 간세포암종 진단 또는 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0041] 상기 NADPH 옥시다아제 4 단백질 발현 수준은 항원-항체 반응을 통해 측정할 수 있다.

[0042] 상기 항원-항체 반응은 종래에 개발된 다양한 정량적 또는 정성적 면역분석 프로토콜에 따라 실시될 수 있다. 상기 면역분석 포맷은 웨스턴 블롯(western blot), 면역조직화학염색법(immunohistochemical stain), 방사선면역분석(radioimmunoassay), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사면역확산법(radioimmunoassay), 면역침전 분석법(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complement fixation assay) 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0043] 본 발명은 NADPH 옥시다아제 4(NOX4)를 포함하는 간세포암종 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물에 관한 것으로, 간세포암종의 종양 간세포와 비종양 간세포에서 면역조직화학염색 방법을 이용하여 NOX4 단백질 발현을 분석한 결과, 비종양 간세포에 비해 종양 간세포에서 NOX4 단백질의 핵 내 발현이 현저히 증가하고, 간세포암종의 병기가 나빠질수록 종양 간세포의 핵 내 NOX4 단백질의 발현이 증가한다는 것을 확인하였다.

[0044] 이에 따라, 본 발명의 NOX4는 간세포암종의 바이오마커로 이용가능하며, 이러한 NOX4 핵 내 발현을 분석을 통해 간세포암종의 진단 및 예후 예측이 가능하고, 간세포암종의 예방 또는 치료제 개발에 있어서도 활용 가치가 높을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 면역조직화학염색 한 간세포암종 환자의 간 조직에서의 인간 NOX4 단백질 발현을 분석한 결과로, (A)의 광학현미경 사진으로부터 간세포암종의 종양 부분(HCC)에서는 핵에서 NOX4 단백질이 과발현 된 반면에, 비종양 부분(Non-tumor)에서는 NOX4 단백질의 핵 내 발현은 없고 세포질에서만 발현되는 것을 확인하였고, (B)는 염색된 정도를 핵(nuclear)과 세포질(cytoplasm)로 나누어 분석하여 종양 부분(HCC)과 비종양 부분(Non-tumor)에서의 인간 NOX4의 단백질 발현 정도를 비교한 결과를 보여주고 있다.

도 2는 4종의 간세포암종 세포주의 핵(N)과 세포질(C)에서의 NOX4 단백질 발현 정도를 확인한 결과를 보여주고 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하 본 발명의 바람직한 실시 예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시 예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0047] <실시예 1. 간세포암종 환자의 임상정보 및 간 조직 확보>

[0048] 간세포암종의 진단 또는 예후 예측 관련 바이오마커를 찾기 위해 간세포암종 환자의 간 조직을 확보했다.

[0049] 간세포암종 환자의 간 조직은 1999년부터 2013년까지 충남대학교 병원에서 간세포암종 절제 수술한 하기 표 1의 134명의 조직을 이용하였다. 간 조직의 경우, 파라핀으로 고정 후, H&E 염색(hematoxylin and eosin stain)된 것으로, 조직 슬라이드에서 종양 부분과 비종양 부분을 선택하여 표시하였다. 종양 부분과 비종양 부분의 조직을 직경이 3.0mm가 되도록 천공하고, 천공한 조직 컬럼(tissue column)을 30개씩 모아 새로운 파라핀 블록을 만들어 조직 마이크로어레이(tissue microarray)를 제조하였다.

표 1

간세포암종 환자 (n=134)		환자수 (명)
성별	남성	103

	여성	31
나이	≤65	110
	>65	24
HBV 또는 HCV 감염 여부	비감염	25
	감염	109
간경화 여부	비간경화	33
	간경화	101
암세포 크기	≤5.0cm	113
	>5.0cm	21
림프관 침윤	비침윤	31
	침윤	103
조직학적 등급 (histological grade)	1 및 2 등급	113
	3 및 4 등급	21
병리학적 병기 (pathological stage)	I 단계	45
	II-IV 단계	89
병리학적 병기 (pathological stage)	I-II 단계	125
	III-IV 단계	9

[0051] <실시예 2. 간세포암종 환자의 간조직 염색을 통한 인간 NADPH 옥시다아제 4(NOX4) 단백질 발현 정도 확인>

[0052] 상기 실시예 1에서 확보한 간세포암종 환자의 간 조직 마이크로어레이에 인간 NADPH 옥시다아제 4(NADPH oxidase 4, NOX4)를 인식하는 항체(NOX4항체, ab79971, Abcam사, UK)를 처리하여 면역조직화학염색(immunohistochemical stain)을 수행하고, 디지털 스캔한 조직 파일과 ScanScope 프로그램(Aperio ScanScope CS system, Vista, USA)을 이용하여 염색된 정도를 분석하였고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0053] 도 1에서 보듯이, 간세포암종 조직의 면역조직화학염색 이미지 결과에서(A), 종양 간세포(HCC)의 경우, 핵에서 NOX4 단백질이 주로 발현되는 반면에, 비종양 간세포(Non-tumor)의 경우에는 세포질에서 주로 발현되는 것으로 관찰되었고, 비종양 간세포(Non-tumor)와 종양 간세포(HCC) 간의 NOX4 발현율을 비교한 경우에도(B), 종양 간세포의 세포질 내 NOX4의 발현이 비종양 간세포보다 낮은 반면에, 종양 간세포의 핵 내 NOX4의 발현은 비종양 간세포 보다 높은 것을 확인하였다.

[0054] 이를 통해, 본 발명의 인간 NOX4 단백질 발현의 경우, 간세포암종의 종양 간세포의 핵 내 발현이 증가한다는 것을 알 수 있었다.

[0055] <실시예 3. 간세포암종 환자의 임상병리학적 특성과 인간 NOX4 발현율과의 관련성 확인>

[0056] 상기 실시예 1의 134명의 간세포암종 환자의 임상병리학적 특성과 인간 NOX4의 단백질 발현율과의 관련성을 확인하기 위해, 상기 실시예 2의 면역조직화학염색 된 간세포암종 환자의 조직으로부터 면역조직화학염색 강도(intensity)와 염색된 종양(HCC) 또는 비종양(Non-tumor) 간세포 비율(proportion)을 평가하였다. 비율 점수는 0~5로(0은 0; >0~1/100은 1; >1/100~1/10은 2; >1/10~1/3은 3; >1/3~2/3은 4; >2/3~1은 5), 강도 점수는 0~3으로(0은 음수(negative), 1은 약함(weak), 2는 보통(moderate), 3은 강함(strong)) 나타냈었고, 전체 강도(0~15)는 각 조직의 면역조직화학염색 강도 점수와 비율 점수를 곱한 값으로 나타내었고, 하기 표 2에 나타내었다. 이때, 두 집단 간의 통계적 차이가 있는지를 검증하기 위해 비모수 검정 방법인 만-위트니 U 검정(Mann-Whitney U test) 방법을 이용하였고, 만-위트니 U 검정 값이 0에 가까울수록 집단에 따른 평균차가 존재한다는 것을 의미한다.

표 2

[0057]

간세포암종 환자 (n=134)		환자수 (명)	핵 내 NOX4		세포질 내 NOX4	
			전체 강도	만-위트니 U 검정	전체 강도	만-위트니 U 검정
암세포 크기				0.050		0.231
	≤5.0cm	113	2.87±2.210		2.79±1.876	
	>5.0cm	21	3.33±2.415		2.29±1.454	
림프관 침윤				0.060		0.810
	비침윤	31	2.23±1.647		2.65±1.854	
	침윤	103	3.16±2.355		2.73±1.819	

조직학적 등급 (histological grade)				0.422		0.674
	1 및 2 등급	113	2.88±2.213		2.74±1.839	
	3 및 4 등급	21	3.29±2.411		2.52±1.750	
병리학적 병기 (pathological stage)				0.186		0.669
	I 단계	45	2.53±1.914		2.80±1.687	
	II-IV 단계	89	3.15±2.372		2.66±1.893	

[0058] 상기 표 2의 NOX4 단백질의 발현 강도와 임상병리학적 상관관계를 분석한 결과에서 보듯이, 간세포암종의 중앙 간세포의 핵 내 NOX4 단백질 발현이 암의 크기, 림프관 침윤, 조직학적 등급 및 병리학적 병기와 양의 상관관계 (positive correlation) 경향, 즉, 핵 내 NOX4 단백질 발현이 강할수록 간세포암종의 진행이 빠르거나 예후가 나쁘다는 것을 확인하였다.

[0059] 또한, 134명의 간세포암종 환자의 NOX4 단백질의 핵 내 높은 발현 및 세포질 내 낮은 발현, 나이, 성별, B형 간염 또는 C형 간염 바이러스 감염, 간경변, 수술 후 화학요법, 조직학적 등급 및 병리학적 병기를 대상으로 하여 콕스의 비례 위험 회귀 모델(Cox's proportional hazard regression model)을 이용한 전체 생존율(overall survival; 특정 시간 이후에 살아남을 것으로 예상되는 진단 내 비율로, 특정 질환이 원인이 된 사망뿐만 아니라 특정 질환이 원인이 아닌 사망도 포함됨) 및 무병생존율(disease-free survival; 치료 후 특정 시간에 질병이 없이 암 치료를 받는 환자 비율)의 다변량 분석을 실시하였고, 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다. 이때, HR(hazard ratio)의 수치가 높을수록 사망 위험율이 높음을 의미하고, 콕스의 비례 위험 회귀 모델(Cox's proportional hazard regression model)의 P값이 낮을수록 정확도가 높다는 것을 의미한다.

표 3

[0060]

예후 인자	전체생존율		무병생존율	
	HR (95% CI)	P*	HR (95% CI)	P*
High N/C NOX4				
No	1 (reference)		1 (reference)	
Yes	2.787 (1.170-6.635)	0.021	1.227 (0.675-2.232)	0.502
Age at operation	0.993 (0.952-1.036)	0.750	0.988 (0.965-1.011)	0.298
Sex				
Male	1 (reference)		1 (reference)	
Female	1.063 (0.420-2.689)	0.897	1.669 (0.939-1.011)	0.081
HBV or HCV				
No	1 (reference)		1 (reference)	
Yes	1.234 (0.436-3.494)	0.692	1.113 (0.588-2.105)	0.743
Cirrhosis				
No	1 (reference)		1 (reference)	
Yes	1.205 (0.464-3.131)	0.701	1.532 (0.775-3.028)	0.219
Chemotherapy				
No	1 (reference)		1 (reference)	
Yes	2.841 (1.208-6.682)	0.017	8.531 (4.474-16.267)	<0.001
Histologic Grade		0.058		0.084
1 (well)	1 (reference)		1 (reference)	
2 (moderate)	0.424 (0.147-1.221)	0.112	0.743 (0.365-1.513)	0.412
3 (poorly)	1.182 (0.357-3.917)	0.784	1.459 (0.635-3.353)	0.374
4 (undifferentiated)	NA	NA	NA	NA
Pathologic Stage		0.018		0.001
I	1 (reference)		1 (reference)	
II	1.207 (0.515-2.830)	0.666	2.154 (1.189-3.902)	0.011
III	2.563 (0.582-11.285)	0.213	7.126 (2.599-19.539)	<0.001
IV	11.927 (1.999-71.172)	0.007	7.477 (1.379-40.545)	0.020

*, multivariate Cox regression analysis; HR, hazard ratio; CI, confidence interval; high N/C NOX4, high nuclear and low cytoplasmic NOX4 expression in cancer cells; HBV, hepatitis B viral infection; HCV, hepatitis C viral infection; and Chemotherapy, postoperative chemotherapy.

[0061] 상기 표 3에서 보듯이, 다변량 분석 결과 간세포암종 환자의 종양 간세포의 핵 내 NOX4 단백질 발현이 높고 세포질 내 단백질 발현이 낮을수록 전체생존율 및 무병생존율 모두, HR 수치가 증가함으로써 사망 위험율이 높아지는 것으로 나타났고, 이 결과는 나이, 성별, B형 간염 또는 C형 간염 바이러스 감염, 간경변, 수술 후 화학요법, 조직학적 등급(histologic grade) 및 병리학적 병기(pathological stage)의 공변량들의 영향을 보정한 후에도 독립된 예후인자로써의 가치가 높음을 확인하였다.

[0062] 이를 통해, NOX4 단백질은 간세포암종의 종양 간세포 핵에서 발현이 증가되고, 간세포암종의 예후가 나빠질수록 핵 내 발현이 증가된다는 것을 알 수 있었고, 이는 NOX4의 간세포암종의 종양 간세포에서의 핵 내 높은 단백질 발현이 간세포암종 진단 및 예후 예측을 위한 바이오마커로서 이용가능하다는 것을 보여주는 것이라 사료된다.

[0063] <실시예 4. 간세포암종의 종양 간세포 내 NOX4 발현 부위에 따른 간세포암종 환자의 예후 비교>

[0064] 간세포암종에서의 NOX4의 발현 부위에 따른 간세포암종의 예후를 확인하기 위해, 상기 실시예 1의 134명의 간세포암종 환자의 NOX4 단백질의 종양 간세포 핵 내 발현, NOX4 단백질의 종양 간세포 세포질 내 발현, 나이, 성별, B형 간염 또는 C형 간염 바이러스 감염, 간경변, 수술 후 화학요법, 조직학적 등급 및 병리학적 병기를 대상으로 하여 콕스의 비례 위험 회귀 모델(Cox's proportional hazard regression model)을 이용한 전체생존율의 다변량 분석을 실시하였고, 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

예후 인자	전체생존율	
	HR (95% CI)	P*
Nuclear NOX4	1.196 (1.007-1.421)	0.042
Cytoplasmic NOX4	0.818 (0.658-1.015)	0.069
Age at operation	0.992 (0.953-1.034)	0.715
Sex		
Male	1 (reference)	
Female	0.837 (0.319-2.195)	0.717
Histologic Grade		0.044
1 (well)	1 (reference)	
2 (moderate)	0.342 (0.117-0.999)	0.050
3 (poorly)	0.918 (0.277-3.049)	0.889
4 (undifferentiated)	NA	NA
Pathologic Stage		0.023
I	1 (reference)	
II	1.094 (0.474-2.524)	0.834
III	2.544 (0.615-10.535)	0.198
IV	2.011 (1.898-76.004)	0.008
Chemotherapy		
No	1 (reference)	
Yes	2.430 (1.001-5.898)	0.050
Radiation therapy		
No	1 (reference)	
Yes	2.977 (1.064-8.327)	0.038
*, multivariate Cox regression analysis; HR, hazard ratio; CI, confidence interval; Nuclear NOX4, nuclear NOX4 expression in cancer cells; Cytoplasmic NOX4, cytoplasmic NOX4 expression in cancer cells; Chemotherapy, postoperative chemotherapy; and Radiation therapy, postoperative radiation therapy.		

[0066] 상기 표 4에서 보듯이, 간세포암종의 종양 간세포의 핵 내 NOX4 단백질의 발현이 높을 경우, HR이 증가하여 사망 위험율이 증가하는 것으로 나타났고, 이는 세포질 내 NOX4의 발현이 감소되는 경우와 비교하여도 상대적 위험비가 더 높은 결과를 통해, 핵 내 NOX4의 발현이 가장 중요한 간세포암종의 예후 예측 인자임을 확인하였다. 이러한 결과는 나이, 성별, B형 간염 또는 C형 간염 바이러스 감염, 간경변, 수술 후 화학요법, 조직학적 등급(histologic grade) 및 병리학적 병기(pathological stage)의 예후에 영향을 미치는 주요한 공변량들의 영향을 보정한 후에도 독립된 예후인자로써의 가치가 높음을 확인하였다.

[0067] 이를 통해, 간세포암종에서의 NOX4의 세포질 발현 감소보다는 NOX4의 핵 내 발현 증가가 간세포암종의 예후 진

단에 있어서 더 정확한 바이오마커가 될 수 있음을 알 수 있었다.

<실시예 5. 간세포암종 세포에서의 NOX4 발현 확인>

간세포암종 세포주를 이용하여 NOX4 단백질의 핵 내 또는 세포질 발현 정도를 웨스턴 블롯을 통해 확인하였다.

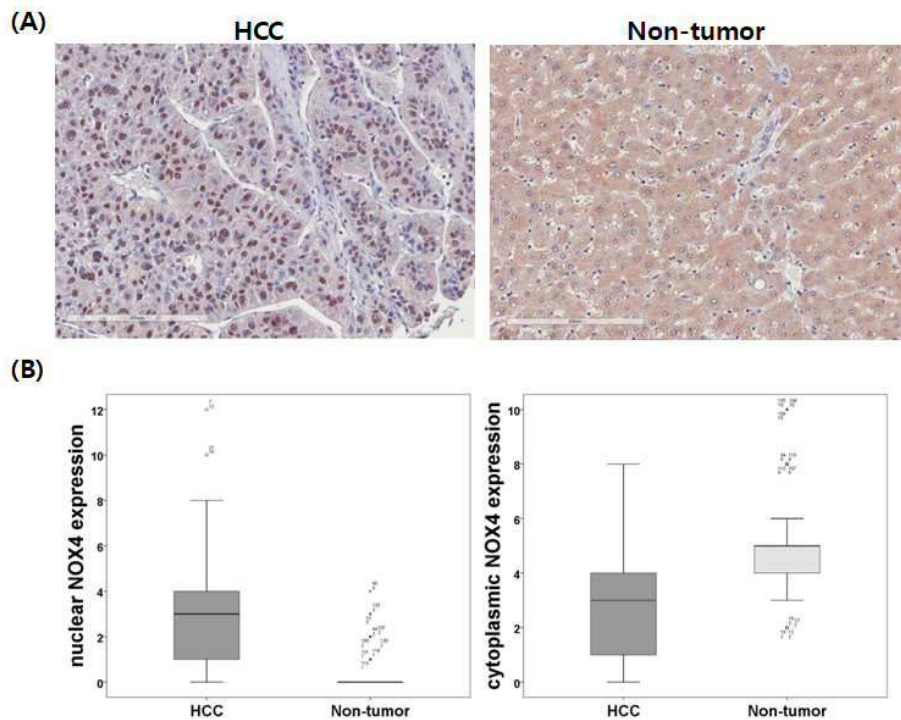
HepG2, Hep3B, Huh7 및 SkHep1 간세포암종 세포를 핵과 세포질 단백질을 분리할 수 있는 시약(NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents, Thermo science 78833, Pierce, 미국) 및 제조사로부터 제공받은 매뉴얼을 이용하여 각각의 세포의 핵과 세포질 단백질을 분리하였다. 분리한 단백질 30 μ g씩을 이용해 웨스턴 블롯을 수행하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다. 이때, NOX4 단백질을 검출하기 위해 항-NOX4 항체와 로딩 대조군으로 β -액틴을 검출하기 위한 β -액틴 항체를 처리하였다.

도 2에서 보듯이, HepG2, Hep3B, Huh7 및 SkHep1의 간세포암종 세포 모두 핵(N) 단백질에서 높은 NOX4 발현이 확인된 반면에, 세포질(C) 단백질에서는 핵에서 보다 훨씬 낮게 발현되는 것을 확인하였다.

이를 통해, 간세포암종의 종양 간세포의 핵 내 NOX4 단백질이 간세포암종 진단을 위한 바이오마커로서 이용가능하다는 것을 알 수 있었다.

도면

도면1



도면2

