(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0002002
(43) 공개일자 2022년01월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) *C12Q 1/6886* (2018.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57446 (2019.01)
C12Q 1/6886 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2020-0080618
(22) 출원일자 2020년06월30일
심사청구일자 2020년06월30일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
홍승모
서울특별시 강남구 역삼로 314, 304동 601호(개나리푸르지오아파트)
김지섭
서울특별시 강동구 천호대로 1092, 1214호(성내동, 에스케이허브진)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

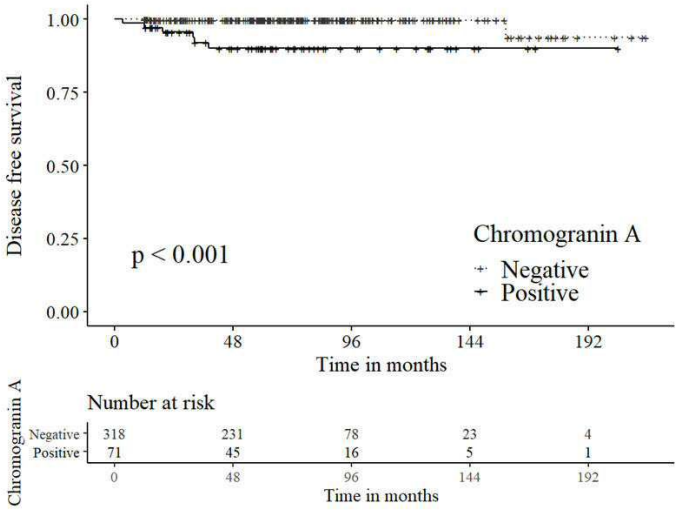
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **직장 신경내분비종양의 예후 예측 방법**

(57) 요 약

본 발명은 생물학적 시료부터 크로모그라닌 A의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계 및 상기 측정된 발현 수준을 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 직장 신경내분비종양의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법; 크로모그라닌 A의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 직장 신경내분비종양의 예후 예측용 조성물; 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
G01N 33/57484 (2013.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 2600/118 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2800/52 (2021.08)

명 세 서

청구범위

청구항 1

생물학적 시료부터 크로모그라닌 A (Chromogranin A)의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

상기 측정된 발현 수준을 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 직장 신경내분비종양의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 크로모그라닌 A의 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것인 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 타액 및 뇨로 이루어진 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 조직은 종양 조직인 것인 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 종양 조직은 직장 신경내분비종양 환자에서 절제된 것인 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 측정은 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction), competitive RT-PCR, real-time quantitative RT-PCR, RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던블럿(northern blot), DNA 칩 분석법(DNA chip technology assay), ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay), 웨스턴블럿(western blot), 면역블럿(immunoblot) 및 면역조직화학법 (Immunohistochemistry)으로 이루어진 군에서 선택된 방법으로 수행된 것인 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 크로모그라닌 A의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 대조군에 비해 높은 경우 직장 신경내분비종양의 재발 가능성이 높을 것으로 판단하는 단계를 추가적으로 더 포함하는 것인 방법.

청구항 8

크로모그라닌 A의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 직장 신경내분비종양의 예후 예측용 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 제제는 크로모그라닌 A에 특이적인 프라이머, 프로브, 앱타머 또는 항체인 것인 조성물.

청구항 10

제 10 항에 있어서,

상기 크로모그라닌 A의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준은 직장 신경내분비종양 환자에서 절제된 종양 조직으로부터 측정된 것인 조성물.

청구항 11

제 8 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 직장 신경내분비종양의 예후 예측용 키트.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 키트는 마이크로 어레이, 유전자 증폭 키트, 면역분석(immunoassay)용 키트, 단백질 마이크로어레이 키트 및 ELISA 키트로 이루어진 군에서 선택되는 것인 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 크로모그라닌 A의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 직장 신경내분비종양의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법; 크로모그라닌 A의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 직장 신경내분비종양의 예후 예측용 조성물; 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 건강 검진에서 대장 내시경 검사의 증가 및 개선된 내시경 영상 품질에 의하여, 위장관과 췌장에서 발생한 신경내분비종양(gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor, GEP NET) 중에서, 특히 직장에서 발생한 신경내분비종양(rectal neuroendocrine tumor)의 발생 빈도가 지속적으로 증가하고 있는 추세이다. 직장에서 발생한 신경내분비종양은 현재 미국, 한국, 일본, 대만 등의 국가에서 위장관 및 췌장에서 발생한 신경내분비종양 중 가장 높은 비율을 차지하고 있다 (Cho MY et al., Multicenter Study. Cancer Res Treat. 2012;44:157-165; Tsai HJ et al., PLoS One. 2013;8:e62487; Fraenkel M et al., Endocr Relat Cancer. 2014;21:R153-163; 및 Ito T et al., J Gastroenterol. 2010;45:234-243).

[0004] 특히, 10 mm (또는 15 mm 초과)를 초과한 종양 크기와 점막표면의 궤양 또는 함몰(depression)은 직장 신경내분비종양의 림프절전이 또는 원격전이의 위험성을 높이는 것으로 잘 알려진 내시경 소견이다. 또한, 직장의 고유근층 침범, 림프관 혈관 침범 및 높은 조직학적 등급을 가진 직장 신경내분비종양은 림프절 전이 또는 원격 전이의 가능성을 높이는 것으로 보고되고 있다 (Park CH et al., Endoscopy. 2011;43:790-795). 대조적으로, 10 mm 미만의 작은 크기를 가진 직장신경내분비종양은 장기적으로 예후가 우수한 것으로 보고되고 있다 (Moon CM et al., A KASID Multicenter Study. Am J Gastroenterol. 2016;111:1276-1285; 및 Sekiguchi M et al., J Gastroenterol. 2015;50:1184-1189). 따라서, 영상의학적으로 발견된 림프절 전이나 원격 전이가 없다면, 고유근층 침범이 없는 10-14 mm 미만의 크기를 가진 직장 신경내분비종양은 내시경 또는 경항문 절제술(trans-anal excision)과 같은 국소적 절제를 통하여 치료가 되고 있다 (de Mestier L et al., Endoscopy. 2013;45:1039-1046; 및 de Mestier L et al., Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2019;33:101293).

[0005] L-세포 타입의 직장 신경내분비종양은 비 L-세포 타입의 신경 내분비종양에 비해 내시경 또는 병리학적으로 안 좋은 소견 (예를 들어, 더 큰 종양 크기, 고유근육층 침범, 림프관/혈관 침범, 신경주위공간 침범 및 높은 조직학적 등급)을 보일 빈도가 낮으며 (Lee SH et al., Am J Surg Pathol. 2013;37:1044-1052), 기존 2010년 WHO 등급체계에서 불확실한 악성잠재성 (uncertain malignant potential)을 가진 것으로 간주되었다 (Bosman FT et al., 4th ed. International Agency for Research on Cancer: Lyon 2010). 그러나, 새로운 2019년 WHO 등급체

계에서는 L-세포 표현형 여부와 관계없이, 모든 직장 신경내분비종양을 악성으로 분류하고 있다 (WHO Classification of Tumours Editorial Board. Digestive system tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer: 2019). 이러한 변화는 L-세포 타입을 가진 직장 신경내분비종양의 최대 37 %에서 고유근층 침윤, 림프절 및 원격 전이와 같은 나쁜 양상을 보이기 때문일 수 있다. 따라서, L-세포 타입에 대한 표지자는 현재 직장 신경내분비종양에서 관심이 있는 예후인자로 간주되지 않는다.

[0006] 반면, 위장관과 췌장에서 발생한 신경내분비종양(GEP NET)의 주요 혈청학적 마커인 혈장 크로모그라닌 A (plasma chromogranin A)는 췌장 및 소장 신경내분비종양 환자에서 나쁜 예후와 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (Yao JC et al., The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2011;96:3741-3749; Chou WC et al., Anticancer Res. 2014;34:5661-5669; Monica T-M et al., Endocrine-Related Cancer. 2013;20:187-196; Fuksiewicz M et al., Endocr Connect. 2018;7:803-810; 및 Wang YH et al., Medicine (Baltimore). 2014;93:e247). 그러나, 직장 신경내분비종양의 예후와는 관련이 없는 것으로 보고되었다 (Koenig A et al., PLoS One. 2017;12:e0188876).

[0007] 이에 본 발명자들은 직장에서 절제된 종양조직으로부터 크로모그라닌 A의 발현 수준을 측정하여 직장 신경내분비종양의 예후 예측이 가능함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) 1. Chou WC, Chen JS, Hung YS, et al. Plasma chromogranin A levels predict survival and tumor response in patients with advanced gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. Anticancer Res. 2014;34:5661-5669.

(비특허문헌 0002) 2. Monica T-M, Jennifer AC, Susanne MH, et al. Clinical presentation, recurrence, and survival in patients with neuroendocrine tumors: results from a prospective institutional database. Endocrine-Related Cancer. 2013;20:187-196.

(비특허문헌 0003) 3. Fuksiewicz M, Kowalska M, Kolasinska-Cwikla A, et al. Prognostic value of chromogranin A in patients with GET/NEN in the pancreas and the small intestine. Endocr Connect. 2018;7:803-810.

(비특허문헌 0004) 4. Wang YH, Yang QC, Lin Y, et al. Chromogranin A as a marker for diagnosis, treatment, and survival in patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasm. Medicine (Baltimore). 2014;93:e247.

(비특허문헌 0005) 5. Koenig A, Krug S, Mueller D, et al. Clinicopathological hallmarks and biomarkers of colorectal neuroendocrine neoplasms. PLoS One. 2017;12:e0188876.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 생물학적 시료부터 크로모그라닌 A의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 발현 수준을 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 직장 신경내분비종양의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 크로모그라닌 A의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 직장 신경내분비종양의 예후 예측용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 직장 신경내분비종양의 예후 예측용 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 생물학적 시료부터 크로모그라닌 A의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 발현 수준을 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 직장 신경내분비종양의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 크로모그라닌 A의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 직장 신경내분비종양의 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 직장 신경내분비종양의 예후 예측용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 방법은 생물학적 시료부터 크로모그라닌 A의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하고, 측정된 발현 수준을 대조군과 비교하여, 크로모그라닌 A의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 대조군에 비해 높은 경우 직장 신경내분비종양의 재발 가능성이 높을 것으로 판단함으로써, 직장 신경내분비종양의 예후 예측에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 환자 선택 흐름도를 나타낸 것이다.

도 2는 크로모그라닌 A 또는 시냅토피신에 대한 면역조직화합법(면역표지법)을 사용하여 정상 직장 점막 및 직장 신경내분비종양의 대표 이미지를 나타낸 것이다 (a: 정상 직장 점막의 신경내분비 세포에서 크로모그라닌 A의 발현 양상; b: 크로모그라닌 A의 미발현(no); c: 크로모그라닌 A의 점상(spotty) 발현 양상; d: 크로모그라닌 A의 국소성(focal) 발현 양상; e: 크로모그라닌 A의 미만성(diffuse) 발현 양상; 및 f: 시냅토피신의 미만성 발현 양상).

도 3a은 종양 절제 시점에 조직 크로모그라닌 A의 발현이 있는 직장 신경내분비종양 환자와 발현이 없는 환자에서 혈장 크로모그라닌 A의 발현 수준을 비교한 결과이다.

도 3b는 추적 관찰 기간 동안 조직 크로모그라닌 A의 발현이 있는 직장 신경내분비종양 환자와 발현이 없는 신경내분비종양 환자에서 혈장 크로모그라닌 A의 발현 수준을 비교한 결과이다.

도 4는 크로모그라닌 A 발현이 있는 직장 신경내분비종양 환자와 발현이 없는 신경내분비종양 환자에서 직장 신경내분비종양 환자의 무병생존율(disease-free survival, DFS) 결과를 나타낸 것이다.

도 5a는 조직 크로모그라닌 A의 발현을 있는 직장 신경내분비종양 1 등급 환자와 발현이 없는 1 등급 환자에서 직장 신경내분비종양 환자의 무병생존율 결과를 나타낸 것이다.

도 5b는 조직 크로모그라닌 A의 발현을 있는 직장 신경내분비종양 2 등급 환자와 발현이 없는 2 등급 환자에서 직장 신경내분비종양 환자의 무병생존율 결과를 나타낸 것이다.

도 5c는 1 cm 미만 크기의 직장 신경내분비종양을 가진 환자 중 조직 크로모그라닌 A의 발현이 있는 환자와 발현이 없는 환자에서 직장 신경내분비종양 환자의 무병생존율 결과를 나타낸 것이다.

도 5d는 1 cm 이상 크기의 직장 신경내분비종양을 가진 환자 중 조직 크로모그라닌 A의 발현이 있는 환자와 발현이 없는 환자에서 직장 신경내분비종양 환자의 무병생존율 결과를 나타낸 것이다.

도 5e는 조직 크로모그라닌 A의 발현이 있는 pT1 직장 신경내분비종양 환자와 발현이 없는 pT1 환자에서 직장 신경내분비종양 환자의 무병생존율 결과를 나타낸 것이다.

도 5f는 조직 크로모그라닌 A 발현이 있는 pT2-4 직장 신경내분비종양 환자와 발현이 없는 pT2-4 환자에서 직장 신경내분비종양 환자의 무병생존율 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명은 생물학적 시료부터 크로모그라닌 A (Chromogranin A)의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 발현 수준을 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 직장 신경내분비종양의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0022] 상기에서, 크로모그라닌 A(Protein Accession No.: P10645.7)의 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0023] 상기에서, 생물학적 시료는 조직, 세포, 타액 및 뇨로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있고, 바람직하게는 조직 또는 세포인 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 종양 조직 또는 종양 세포인 것일 수 있다.

[0024] 상기에서, 종양 조직 또는 종양 세포는 직장 신경내분비종양 환자에서 제거 또는 절제된 종양 조직 또는 종양 세포인 것일 수 있다.

[0025] 상기에서, 크로모그라닌 A의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준의 측정은 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction), competitive RT-PCR, real-time quantitative RT-PCR, RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던블럿(northern blot), DNA 칩 분석법(DNA chip technology assay), ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay), 웨스턴블럿(western blot), 면역블럿(immunoblot) 및 면역조직화학법 (Immunohistochemistry)으로 이루어진 군에서 선택된 방법으로 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 또한, 본 발명은 상기 크로모그라닌 A의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 대조군에 비해 높은 경우 직장 신경내분비종양의 재발 가능성이 높을 것으로 판단하는 단계를 추가적으로 더 포함하는 것일 수 있다.

[0027] 특히, 본 발명은 면역조직화학법과 같은 면역표지법을 통해 종양 조직 또는 종양 세포에서의 표지 또는 염색된 크로모그라닌 A의 비율을 측정 및 분석함으로써, 크로모그라닌 A의 발현 수준이 대조군에 비해 높은지 여부를 확인할 수 있다.

[0028] 상기에서, 전체적으로 크로모그라닌 A가 발현된 것을 100 %으로 할 경우, 크로모그라닌 A가 1 % 미만으로 발현될 경우 "발현없음(no)"로 판단하고, 1 % 이상에서 5 % 미만으로 발현될 경우 "점상(spotty)" 발현으로 판단하며, 5 % 이상에서 50 % 미만으로 발현될 경우 "국소성(focal)" 발현으로 판단하고, 50 % 이상으로 발현될 경우 "미만성(diffuse)" 발현으로 판단할 수 있다.

[0029] 상기에서, 크로모그라닌 A의 발현이 없거나 점상(spotty) 발현의 경우에는 크로모그라닌 A의 발현을 음성으로 간주할 수 있고, 국소성(focal) 발현이나 미만성(diffuse) 발현의 경우에는 크로모그라닌 A의 발현을 양성으로 간주할 수 있다.

[0030] 즉, 크로모그라닌 A의 발현이 없거나 점상(spotty) 발현의 경우에는 대조군에 비하여 크로모그라닌 A의 발현이 낮은 것으로 판단할 수 있고, 국소성(focal) 발현이나 미만성(diffuse) 발현의 경우에는 대조군에 비하여 크로모그라닌 A의 발현이 높은 것으로 판단할 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명은 크로모그라닌 A의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 직장 신경내분비종양의 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[0033] 상기에서, 크로모그라닌 A의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 크로모그라닌 A에 특이적인 프라이머, 프로브, 앱타머 또는 항체인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 본 발명에서의 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3-말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 염기서열로서, 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고, 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 짧은 염기서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머레이트 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지의 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.

[0035] 본 발명에서의 용어, "프로브"는 유전자에 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며, 표지되어 있어 특정 유전자의 존재 유무 및 발현양을 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA)프로브, RNA

프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.

[0036] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트(phosphoramidite) 고체 지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 염기서열은 또한 당해 기술 분야에 공지된 다양한 방법을 통해 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오티드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오티드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.

[0037] 본 발명에서의 용어, "앱타머"는 목적 분자에 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드 또는 펩티드 분자로서, 핵산 앱타머의 경우 SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)라 불리는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide) 라이브러리를 이용한 진화적인 방법에 의해 특정 화학 분자나 생물학적 분자에 높은 친화력과 선별력을 갖고 결합하는 올리고머를 분리하여 수득할 수 있다.

[0038] 본 발명에서의 용어, "항체"는 생체의 면역계에서 혈액이나 림프를 순환하면서 외부 물질인 항원이 침입한 경우 이에 반응하는 물질을 말하며, 림프조직에서 형성되는 글로불린계 단백질로 면역글로불린이라고도 불린다. 항체는 B 세포에 의해 생산되며, 항원과 특이적으로 결합한다. 하나의 항체 분자에는 두 개의 중사슬(heavy chain)과 두 개의 경사슬(light chain)이 있으며, 각각의 중사슬과 경사슬은 각각 N-말단에 가변영역을 포함하고 있다. 각각의 가변영역은 3 개의 상보성 결정부위 (Complementarity determining region: CDR)와 4 개의 구조형성부위 (framework regions: FRs)로 구성되는데, 상보성 결정 부위들은 항체의 항원 결합 특이성을 결정하고, 가변영역의 구조형성 부위들로 유지되는 비교적 짧은 펩티드 서열로 존재한다.

[0039] 상기에서, 크로모그라닌 A의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준은 직장 신경내분비종양 환자에서 제거 또는 절제된 종양 조직으로부터 측정된 것일 수 있다.

[0041] 또한, 본 발명은 크로모그라닌 A의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제가 포함된 직장 신경내분비종양의 예후 예측용 조성물을 포함하는 직장 신경내분비종양의 예후 예측용 키트를 제공한다.

[0042] 상기에서, 키트는 마이크로 어레이, 유전자 증폭 키트, 면역분석(immunoassay)용 키트, 단백질 마이크로어레이 키트 및 ELISA 키트로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0046] **실시예 1. 실험방법**

[0047] **1.1. 증례 선택 (Case selection)**

[0048] 본 발명자들은 병리 데이터베이스에서 1994 년에서 2014 년 사이에 치료된 1 등급(G1) 및 2 등급(G2)의 고분화(well-differentiated) 직장 신경내분비종양 718 증례를 선택하였다. 코호트에 적용한 포함기준 및 제외기준을 보여주는 흐름도는 도 1에 나타내었다. 저분화 신경내분비암 (poorly differentiated neuroendocrine carcinoma) 또는 리뷰를 위한 슬라이드가 없는 180 건은 제외되었다. 최종적으로 내시경적(n = 480) 또는 외과적(n = 58)으로 절제된 고분화 직장 신경내분비종양을 가진 총 538 명의 환자가 후속 분석을 위해 최종 선택되었다. 선택된 증례의 전자의무기록을 검토하여 연령, 성별, 시술방법 및 생존 결과의 정보를 수집하였다. 또한, 직장 신경내분비종양 환자에서 절제 당시 및 추적 기간에 혈장 크로모그라닌 A 발현수준을 기록하였다. 본 발명은 기관검토위원회 (승인번호: 2017-1298)에 의해 승인되었다.

[0050] **1.2. 병리 분석방법 (Pathologic evaluation)**

[0051] 병리보고서에 기록된 진단, 종양 위치 및 종양 크기에 대한 정보를 수집하였다. 본 발명에 포함된 직장 신경내분비종양의 헤마톡실린과 에오신 염색(Hematoxylin-Eosin staining) 슬라이드가 모두 재평가되었다. 재평가된

병리조직학적 특징에는 조직학적 등급 [10 개의 고배율시야(high power field, HPF) 당 유사분열수(mitotic count) 및 Ki-67 표지지수(Ki-67 labeling index)에 근거], 종양의 침범깊이(tumor invasion depth), 림프관/혈관 침범(lymphovasuclar invasion), 신경주변부 침범(perineural invasion), 절제연 상태(resection marginal status), 림프절 전이(lymph node metastatic status) 및 원격전이(distant metastatic status)가 포함되었다.

[0052] 종양의 침습깊이(tumor extension)는 AJCC (American Joint Committee on Cancer)의 종양 병기 매뉴얼 제8판에 근거하여 평가되었다. 간단히, 1 등급(G1)은 "mitotic rate < 2/10 HPF" 및/또는 "Ki-67 labeling index < 3 %"인 종양인 것이고, 2 등급(G2)는 "mitotic rate 2-20 / HPF" 및/또는 "3-20 %의 Ki-67 labeling index"를 가진 종양인 것이며, 3 등급(G3)는 "mitotic rate > 20/ HPF" 및/또는 "Ki-67 labeling index > 20 %"인 종양으로 정의하였다.

[0054] **1.3. 면역조직화학법 (Immunohistochemistry)**

[0055] 면역조직화학법은 대표적인 포르말린-고정의 파라핀-포매 (FFPE) 조직 블록에 대한 4㎛ 두께의 연속된 조직 절편에서 수행되었다. 조직에 자일렌(xylene)과 농도 단계별 에탄올을 침투시켜, 파라핀을 제거하고 수화(hydration)시켰다. 조직의 내인성 퍼옥시다제는 3 % H_2O_2에 10 분 동안 배양하여 차단시켰고, 이후, 열-유도 항원성복원(antigen retrieval)을 수행하였다. 염색 과정은 제조사의 지시에 따라, Optview DAB IHC Detection Kit (Ventana medical systems)와 함께 Benchmark XT auto-immunostainer (Ventana medical systems, Tucson, AZ)를 사용하여 수행하였다. 파라핀 절편은 크로모그라닌 A (마우스, 1:1600 희석, 클론 DAK-A3; DAKO, Glostrup, 덴마크), 시냅토피신 (토끼, 1:200 희석, 클론 MRQ-40; Marque, Rocklin, CA), 및 Ki-67 (마우스, 1:200 희석, 클론 MIB1; DAKO)에 대한 1차 항체를 사용하여 실온에서 32 분 동안 배양되었다. 면역염색된 절편은 헤마톡실린으로 가볍게 대조 염색되고, 에탄올에서 탈수되었으며, 자일렌으로 청소되었다.

[0056] 면역반응성(immunoreactivity)은 임상병리 정보를 모르는 두 명의 병리학자에 의해 독립적으로 평가되었다.

[0057] 크로모그라닌 A 및 시냅토피신 표지는 종양 세포에서 세포질에 표지되는 비율에 따라, 다음 중 하나로 등급을 평가하였다: 발현없음(no), 점상(spotty: > 1 % 및 < 5 %), 국소성(focal: 5 - 50 %), 또는 미만성(diffuse: > 50 %). 국소성 또는 미만성으로 표지된 직장 신경내분비종양을 크로모그라닌 A에 대한 양성(positive)으로 분류하였고, 발현이 없거나 점상 발현인 사례는 크로모그라닌 A에 대한 음성(negative)으로 분류하였다. 이는 양성 발현이 정상 직장 상피조직에 있는 신경내분비세포에 비해 크로모그라닌 A 발현이 유의하게 높았기 때문이다. 정상 직장 점막과 신경내분비종양에서의 크로모그라닌 A 및 시냅토피신 발현의 대표적인 도면은 도 2에 나타내었다.

[0059] **1.4. 성과 측정 (Outcome measures)**

[0060] 일차적 성과 지표는 치료 후 신경내분비종양 재발까지의 시간으로 정의되는 무병생존율(disease free-survival rate)을 사용하였다. 수술 당시 원격전이가 있는 동시성 원격전이(synchronous distant metastasis), 및/또는 절제연(resection margin) 침범이 있는 환자(n = 97), 및 추적 기간이 12 개월 미만의 환자(n = 52)는 무병생존율 분석에서 제외되었다. 이에 따라, 389 명의 환자가 생존분석에 포함되었다 (도 1).

[0061] 직장 신경내분비종양 환자 추적에 대한 엄격한 프로토콜은 적용되지 않았지만, 모든 환자는 절제연의 상태에 따른 내시경적 또는 수술적 절제 후 3-12 개월 이내에 주기적인 추적검사 (S상 결장경검사 또는 전대장 내시경 검사)를 받았고, 일부에서는 68Ga-DOTATOC 양전자방출 단층촬영 (PET), 컴퓨터 단층 촬영 (CT) 또는 자기공명영상 (MRI) 검사도 받았다. 국소 재발은 직장 내강, 기존 절제 부위의 종양기저부 또는 국소림프절 생검에 의하여 확인되었다.

[0063] **1.5. 통계분석 (Statistical analysis)**

[0064] 임상병리학적 변수(clinicopathologic variable)의 기술 통계는 평균 ± 표준편차, 또는 범위를 가진 중앙값으로 기재하였다. 연속 변수(Continuous variable)는 독립적 t-검정 또는 Mann-Whitney U 검정으로 비교하였다. 범주형 변수(Categorical variable)는 카이제곱 검정(chi-square test) 또는 Fischer 정확 검정(Fisher's

exact test)으로 검사하였다. 생존곡선은 카플란-마이어법(Kaplan-Meier method)을 사용하여 추정하였고, 생존곡선 간의 차이는 로그순위테스트(log-rank test)를 사용하여 비교하였다.

[0065] 단변량 Cox 비례위험 회귀분석(univariable Cox proportional hazards regression analysis)을 사용하여 무병생존율에 대한 중요한 임상병리학적 변수를 확인하였다. 다변량 Cox 비례위험 회귀분석(multivariable Cox proportional hazards regression analysis)을 수행하여 무병생존율에 대한 독립적인 예후 인자를 조사하였다.

[0066] 모든 통계적 평가는 SPSS 버전 21.0 (IBM Corp, Armonk, NY)을 사용하여 수행하였다. P 값 < 0.05 가 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0068] **실시예 2. 직장 신경내분비종양 환자의 기저 특성**

[0069] 직장 신경내분비종양 환자의 임상병리학적 특성은 표 1에 기재하였다. 환자의 평균 연령은 48.8 ± 11.7 세 (범위, 19 - 85세)이고, 남성과 여성의 비율은 1.4 로 확인되었다. 직장 신경내분비종양 1 등급(G1)은 499 증례(92.8 %)를 차지하였고, 2 등급(G2) 종양은 39 증례(7.2 %)를 차지하였다. 최종 연구 코호트에서 3 등급(G3)의 직장 신경내분비종양은 관찰되지 않았다.

[0070] 평균 종양 크기는 0.6 ± 0.5 cm 이었고, 두 그룹으로 나누었을 때, 1 cm 미만의 종양이 480 증례(89.2 %)에서 관찰되었고, 1 cm 이상의 종양이 58 증례(10.8 %)에서는 관찰되었다.

[0071] AJCC 암 병기 시스템의 대장 및 결장에 대한 T 분류체계에 따라, 직장 신경내분비종양은 pT1이 510 증례(94.8 %), pT2가 19 증례(3.5 %), pT3가 8 증례(1.5 %), pT4가 1 증례(0.2 %)이었다.

[0072] 직장의 고유근층 침범(proper muscle invasion)이 22 증례(4.1 %)에서 관찰되었다. 림프혈관 침범(lymphovascular invasion) 및 신경주변부 침범(perineural invasion)은 각각 23 증례(4.3 %) 및 9 증례(1.7 %)에서 관찰되었다. 림프절 전이(lymph node metastasis)는 20 증례(3.7 %)에서 관찰되었다.

[0073] 국소절제(local excision)가 510 명 (내시경 점막 절제술, 387 증례; 내시경 점막하절제술, 93 증례; 및 경항문 절제술, 30 증례)에서 시행되었으며, 근치적절제술(radical resection)이 28 명 (전방절제술, 21 증례; 마일즈 수술, 2 증례; 및 구역절제술, 5증례)에서 시행되었다.

[0074] 6 증례(1.1 %)에서는 간(liver)에서 동시성 원격전이(synchronous distant metastasis)가 있었다. 간에 전이된 3 증례 및 여러 기관(간, 폐 및 뼈)에 전이된 1 증례를 포함하여 4 증례에서 이시성 원격전이(metachronous distant metastasis)가 관찰되었다.

[0075] 396 증례(73.6 %)에서는 절제연이 음성이었고, 93 증례(17.3 %)에서는 절제연 침범을 보였으며, 49 증례(9.1 %)에서는 절제연 상태가 불분명하였다.

[0076] 12 개월 이상의 추적 관찰 기간을 가진 코호트 내 389명의 환자에 대하여, 추적 관찰 기간의 중앙값은 66.9 개월 (범위, 12.1 - 215.1 개월)로 확인되었다. 크로모그라닌 A 음성 (중앙값 67.8 개월, 범위 12.1 - 215.1 개월)과 크로모그라닌 A 양성 (중앙값 63.5 개월, 범위 12.6 - 203.9 개월, p = 0.394) 사이의 추적 관찰 기간에 대해서는 유의미한 차이가 없었다.

[0078] **실시예 3. 크로모그라닌 A 및 시냅토피신의 발현 양상**

[0079] 크로모그라닌 A의 발현은 창자샘 기저부에 있는 정상 신경내분비세포에서 관찰되었으며, 정단으로 좁은 피라미드 모양과 흩어진 양상으로 나타났다 (도 2a). 직장 신경내분비종양 증례 중 388 증례(72.1 %)에서는 크로모그라닌 A의 발현이 관찰되지 않았으며, 39 증례(7.2 %)에서는 점상 발현(> 1 % 및 < 5 %)이 관찰되었다. 7 증례(1.3 %)에서는 국소성 발현(5-50 %)이 관찰되었고, 104 증례(19.3%)에서는 미만성 발현(> 50 %)이 관찰되었다 (도 2b 내지 2e). 따라서, 본 코호트에서 111 증례 (20.6 %)의 직장 신경내분비종양에서 크로모그라닌 A 발현이 양성으로 확인되었다.

[0080] 반면, 시냅토피신은 직장 신경내분비종양에서 100 %로 관찰되었고 (538/538 증례), 모두 미만성(광범위성) 발현으로 관찰되었다 (도 2f).

[0082] **실시예 4. 직장 신경내분비종양에서 크로모그라닌 A 발현과 관련된 요인**

[0083] 본 발명자들은 크로모그라닌 A의 발현 프로파일을 크로모그라닌 A 양성(국소성 및 미만성) 또는 음성 (발현없음 또는 점상)으로 이등분한 후, 크로모그라닌 A의 발현과 임상병리학적 인자 사이의 관계를 비교하는 실험을 수행하였다.

[0084] 크로모그라닌 A가 발현된 직장 신경내분비종양은 50 세 이상 ($p = 0.013$), 남성 ($p = 0.002$), 근치적 절제술 (radical resection, $p = 0.003$), 큰 종양크기 (≥1 cm; $p = 0.038$), 고유근층 침범 (proper muscle invasion, $p = 0.002$), 림프혈관 침범 (lymphovascular invasion, $p = 0.014$) 및 신경주변부 침범 (perineural invasion, $p < 0.001$), 절제연 침범 (resection margin, $p = 0.028$), 및 림프절 전이 (lymph node metastasis, $p = 0.003$)와 관련이 있음을 확인하였다 (표 1).

[0085] 그러나, 크로모그라닌 A의 발현과 조직학적 등급(histologic grade, $p = 0.422$) 또는 동시성 원격전이 (synchronous distant metastasis, $p = 0.638$) 사이에는 유의한 상관관계가 없음을 확인하였다 (표 1).

표 1

[0087]

변수	전체	크로모그라닌 A 발현		*p*-값
		음성 (n=427)	양성 (n=111)	
나이				**0.013***
< 50 세	294	245 (83.3%)	49 (16.7%)	
≥50 세	244	182 (74.6%)	62 (25.4%)	
성별				**0.002***
남성	312	233 (74.7%)	79 (25.3%)	
여성	226	194 (85.8%)	32 (14.2%)	
절제방법				**0.003**
국소적 절제	510	411 (80.6%)	99 (19.4%)	
근치적 절제	28	16 (57.1%)	12 (42.9%)	
조직학적 분화도				0.422
G1	499	398 (79.8%)	101 (20.2%)	
G2	39	29 (74.4%)	10 (25.6%)	
종양 크기				**0.038***
< 1cm	480	387 (80.6%)	93 (19.4%)	
≥1cm	58	40 (69.0%)	18 (31.0%)	
고유근층 침범				**0.002***
없음	516	416 (80.6%)	100 (19.4%)	
있음	22	11 (50.0%)	11 (50.0%)	
림프관/혈관 침범				**0.014***
없음	515	414 (80.4%)	101 (19.6%)	
있음	23	13 (56.5%)	10 (43.5%)	
신경주변부 침범				**<0.001***
없음	529	425 (80.3%)	104 (19.7%)	
있음	9	2 (22.2%)	7 (77.8%)	
절제연 상태				**0.028***
미침범 또는 불분명	445	361 (81.1%)	84 (18.9%)	
침범	93	66 (71.0%)	27 (29.0%)	
림프절 전이				**0.003***
없음	518	417 (80.5%)	101 (19.5%)	
있음	20	10 (50.0%)	10 (50.0%)	
원격 전이				>0.999
없음	532	422 (79.3%)	110 (20.7%)	

있음	6	5 (83.3%)	1 (16.7%)	

[0089] **실시예 5. 혈장 크로모그라닌 A의 발현 수준**

[0090] 혈장 크로모그라닌 A의 발현 수준은 종양 절제 시점에서 직장 신경내분비종양을 가진 59 명의 환자와 추적 관찰 기간동안의 71 명의 환자에서 확인되었다. 또한, 조직 크로모그라닌 A의 발현이 있는 환자와 없는 환자 사이에서 혈장 크로모그라닌 A의 발현 수준이 비교되었다.

[0091] 종양 절제 시점에서 혈장 크로모그라닌 A의 발현 수준은 조직 크로모그라닌 A의 발현이 있는 직장 신경내분비종양 환자 (n = 11, 평균 70.9 ± 24.1 ng/mL)와 발현이 없는 환자 (n = 48, 평균 58.5 ± 38.1 ng/mL) 사이에서 어떠한 차이가 나타나지 않았음을 확인하였다 (참조 범위: 27 ~ 94 ng/mL; p = 0.307) (도 3A).

[0092] 그러나, 추적 관찰 기간 동안의 혈장 크로모그라닌 A의 발현 수준은 조직 크로모그라닌 A의 발현이 있는 직장 신경내분비종양 환자 (n = 20; 평균, 101.3 ± 72.1ng/mL)에서 발현이 없는 신경내분비종양 환자 (n = 51; 60.5 ± 27.6 ng/mL)에 비해 유의하게 더 높았음을 확인하였다 (p = 0.023) (도 3B).

[0094] **실시예 6. 크로모그라닌 A 발현 상태에 따른 무병생존율 결과**

[0095] 직장 신경내분비종양 전체 환자의 10 년 무병생존율(DFS)은 98.2 % 이었다. 그러나, 크로모그라닌 A 발현이 있는 직장 신경내분비종양 환자의 10 년 무병생존율(DFS)은 91.5 % 이었고, 이는 크로모그라닌 A 발현이 없는 환자(99.7%) 보다 유의미하게 생존율이 낮아, 나쁜 예후를 보였음을 확인하였다 [위험률 (HR), 14.438; 95% 신뢰구간 (CI), 2.911-71.598; log-rank p < 0.001] (표 2 및 도 4).

[0096] 종양 등급 (1 등급과 2 등급)을 기반으로 하는 하위 집단 분석 결과에서, 조직 크로모그라닌 A의 발현을 보이는 직장 신경내분비종양 1 등급 환자(95.3 %)가 크로모그라닌 A의 발현이 없는 1 등급 환자(99.7 %)에 비해 10 년 무병생존율이 유의하게 더 낮았음을 확인하였다 (log-rank p = 0.011) (도 5a). 유사하게, 조직 크로모그라닌 A의 발현이 있는 직장 신경내분비종양 2 등급 환자(57.1 %)는 크로모그라닌 A 발현이 없는 2 등급 환자(100 %)에 비해 10 년 무병생존율이 상당히 낮은 것으로 확인되었다 (log-rank p =0.001) (도 5B).

[0097] 종양 크기 (< 1 cm 및 ≥ 1 cm)를 기반으로 하는 하위 집단 분석 결과에서, 1 cm 미만 크기의 직장 신경내분비종양을 가진 환자 중 조직 크로모그라닌 A의 발현이 있는 환자(96.5 %)가 발현이 없는 환자(100%)에 비해 10 년 무병생존율이 유의하게 더 낮았음을 확인하였다 (log-rank p = 0.016) (도 5C). 유사하게, 1 cm 이상 크기의 직장 신경내분비종양을 가진 환자 중 조직 크로모그라닌 A의 발현이 있는 환자(71.4 %)가 발현이 없는 환자(96.6%)에 비해 10 년 무병생존율이 유의하게 낮았음을 확인하였다 (log-rank p = 0.017) (도 5D).

[0098] 종양의 침범 깊이 (pT1 vs. pT2-4)에 기초한 하위 집단 분석 결과에서, 조직 크로모그라닌 A의 발현이 있는 pT1 직장 신경내분비종양 환자(95.1%)는 발현이 없는 pT1 환자(100%)에 비해 10 년 무병생존율이 유의하게 낮았음을 확인하였다 (log-rank p = 0.001) (도 5E). 또한, 조직 크로모그라닌 A 발현이 있는 pT2-4 직장 신경내분비종양 환자(70.0 %)는 발현이 없는 pT2-4 환자(88.9 %)에 비해 10 년 무병생존율이 낮았으나, 이는 통계적으로 유의하지는 않았다 (log-rank p = 0.347) (도 5F).

[0100] **실시예 7. 직장 신경내분비종양의 무병생존율 결과와 관련된 요인: 다변량 분석 결과**

[0101] 유의한 임상병리학적 변수는 단변량 Cox 비례 위험 회귀 분석에서 다변량 Cox 비례 위험 회귀 분석에서 보정되었다. 그 결과, 조직 크로모그라닌 A 발현은 직장 신경내분비종양에서 더 낮은 무병생존율에 대한 유일한 독립적인 예후인자인 것으로 확인되었다 (HR, 12.099; 95 % CI, 2.044-71.608; p = 0.006) (표 2). 나머지 변수에 대해서는 다변량 생존 분석에서 예후적인 유의성을 나타내지 않았다.

표 2

[0103]

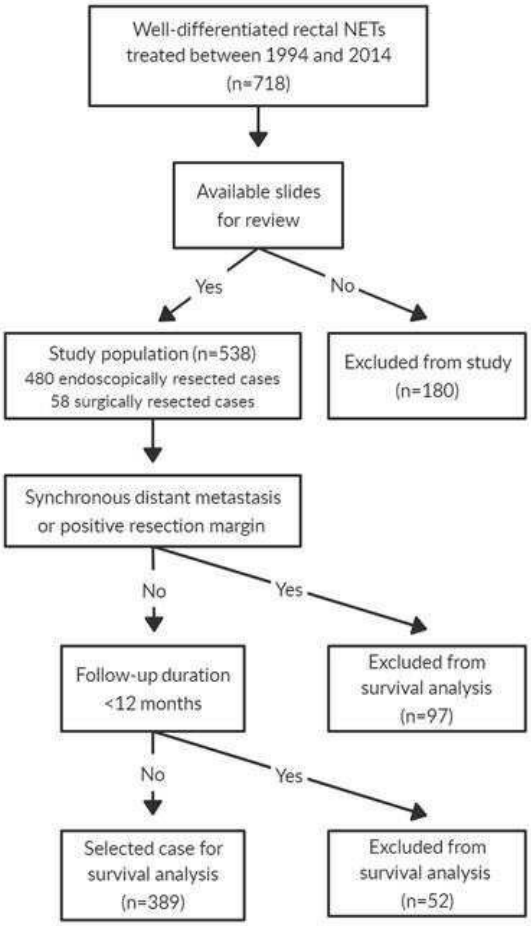
변수	Univariable			Multivariable		
	HR	95% 신뢰구간	p-값	HR	95% 신뢰구간	p-값
나이						
< 50 세	1	-				
≥50 세	3.488	0.700-17.386	0.127	NA	NA	NA
성별						
남성	1	-				
여성	1.208	0.302-4.833	0.790	NA	NA	NA
절제방법						
국소적 절제	1	-		1	-	
근치적 절제	22.830	5.108-102.034	**<0.001***	2.060	0.061-69.530	0.687
조직학적 분화도						
G1	1	-		1	-	
G2	10.060	2.251-44.964	**0.003***	1.205	0.115-12.615	0.876
종양 크기						
< 1cm	1	-	-	1	-	
≥1cm	20.122	3.903-103.725	**<0.001***	5.561	0.667-46.352	0.113
고유근층 침범						
없음	1	-		1	-	
있음	35.675	7.978-159.517	**<0.001***	5.225	0.286-95.514	0.265
림프관/혈관 침범						
없음	1	-		1	-	
있음	14.945	3.343-66.816	**<0.001***	1.969	0.138-28.014	0.617
신경주위공간 침범						
없음	1	-		1	-	
있음	8.493	1.022-70.561	**0.048***	0.280	0.022-3.644	0.331
림프절 전이						
없음	1	-		1	-	
있음	21.195	4.743-94.719	**<0.001***	0.462	0.034-6.289	0.562
크로모그라닌 A 발현						
음성	1	-		1	-	
양성	14.438	2.911-71.598	**<0.001***	12.099	2.044-71.608	**0.006***

[0105] 상기와 같이, 직장 신경내분비종양 환자에서 절제된 종양 조직에서 크로모그라닌 A의 발현 여부는 직장 신경내분비종양의 10 년 무병생존율과 유의한 상관관계가 있음을 확인하였다.

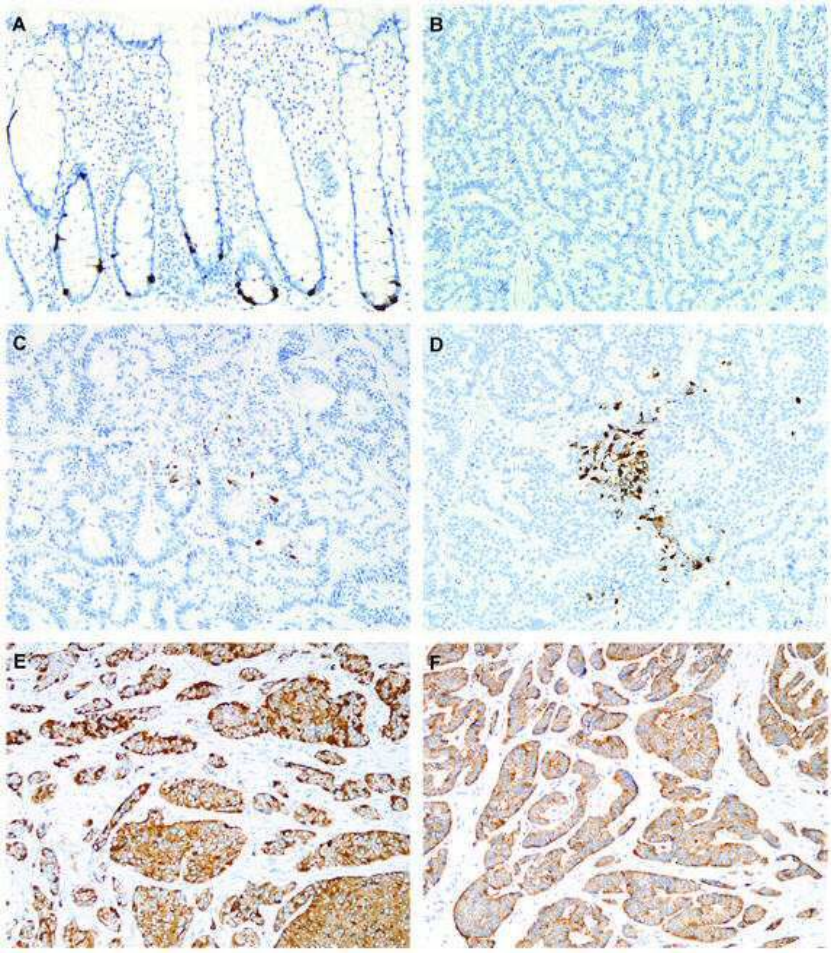
[0106] 따라서, 종양 조직으로부터 크로모그라닌 A의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 대조군 시료와 비교하여 판단함으로써, 직장 신경내분비종양의 예후 예측이 가능함을 확인하였다.

도면

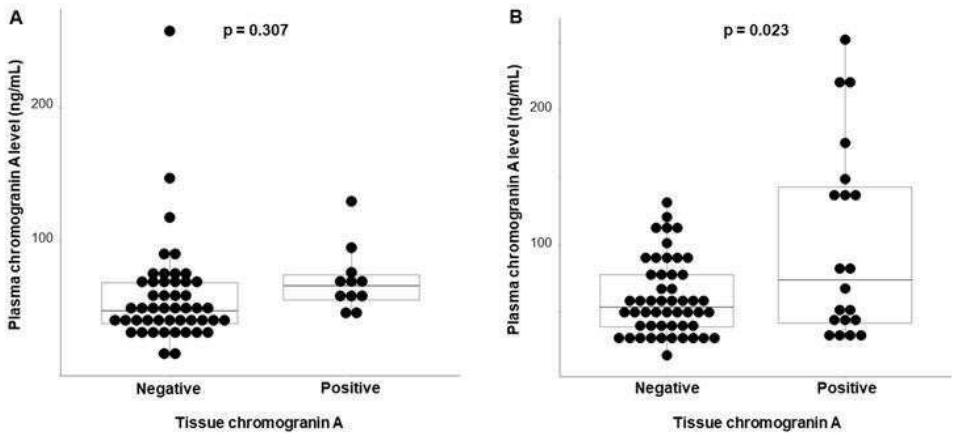
도면1


Well-differentiated rectal NETs treated between 1994 and 2014 (n=718)
Available slides for review
Yes
No
Study population (n=538) 480 endoscopically resected cases 58 surgically resected cases
Excluded from study (n=180)
Synchronous distant metastasis or positive resection margin
No
Yes
Follow-up duration <12 months
Excluded from survival analysis (n=97)
No
Yes
Selected case for survival analysis (n=389)
Excluded from survival analysis (n=52)

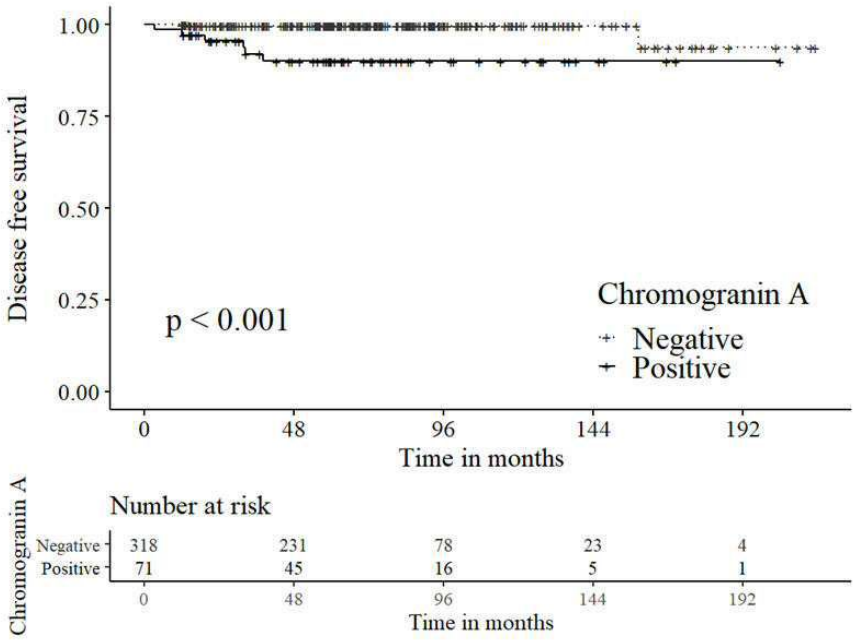
도면2


A
B
C
D
E
F

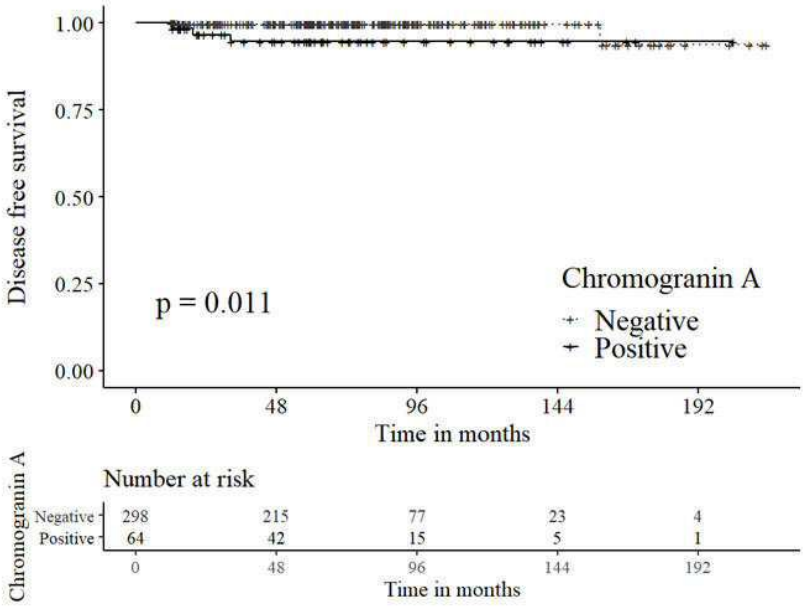
도면3


A
p = 0.307
Plasma chromogranin A level (ng/mL)
200
100
Negative
Positive
Tissue chromogranin A
B
p = 0.023
Plasma chromogranin A level (ng/mL)
200
100
Negative
Positive
Tissue chromogranin A

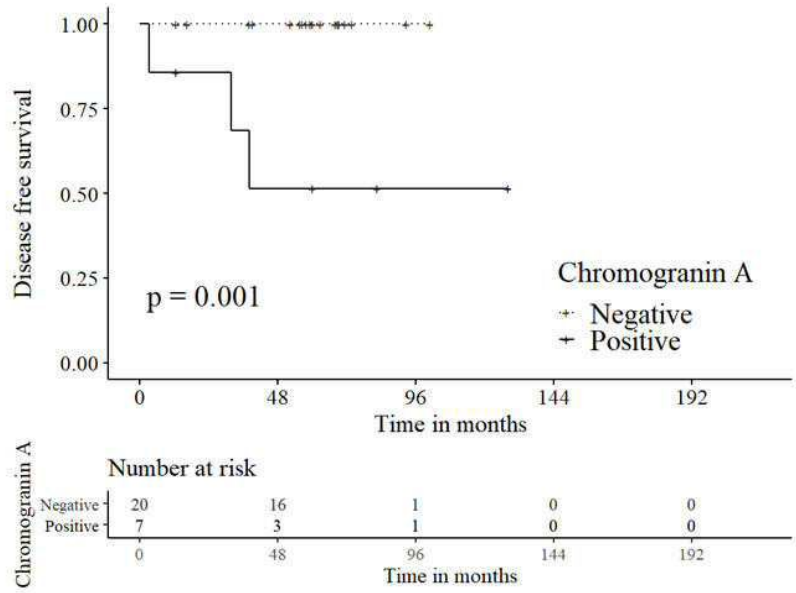
도면4


1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
Disease free survival
p < 0.001
Chromogranin A
Negative
Positive
0
48
96
144
192
Time in months
Chromogranin A
Number at risk
Negative 318 231 78 23 4
Positive 71 45 16 5 1
0
48
96
144
192
Time in months

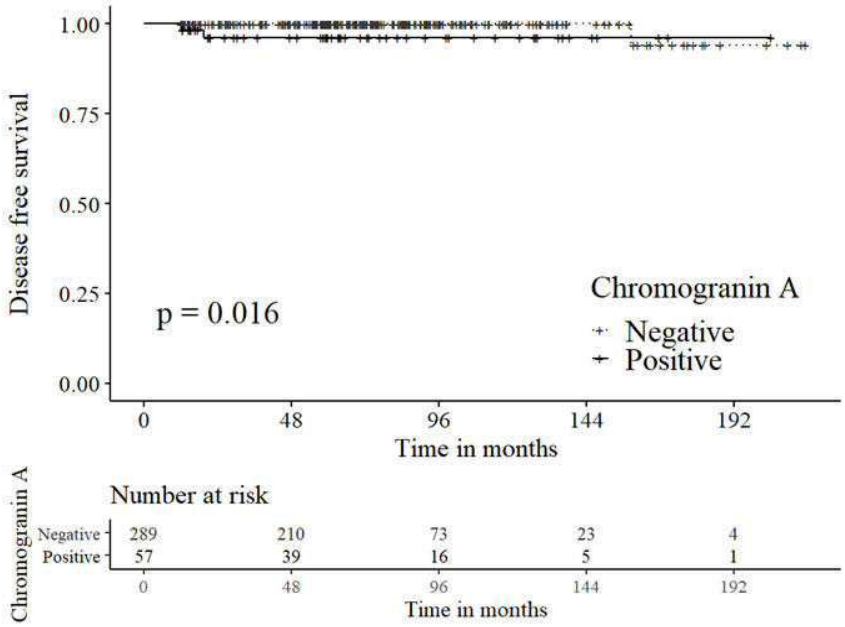
도면5a


1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
Disease free survival
p = 0.011
Chromogranin A
Negative
Positive
0
48
96
144
192
Time in months
Chromogranin A
Number at risk
Negative 298 215 77 23 4
Positive 64 42 15 5 1
0
48
96
144
192
Time in months

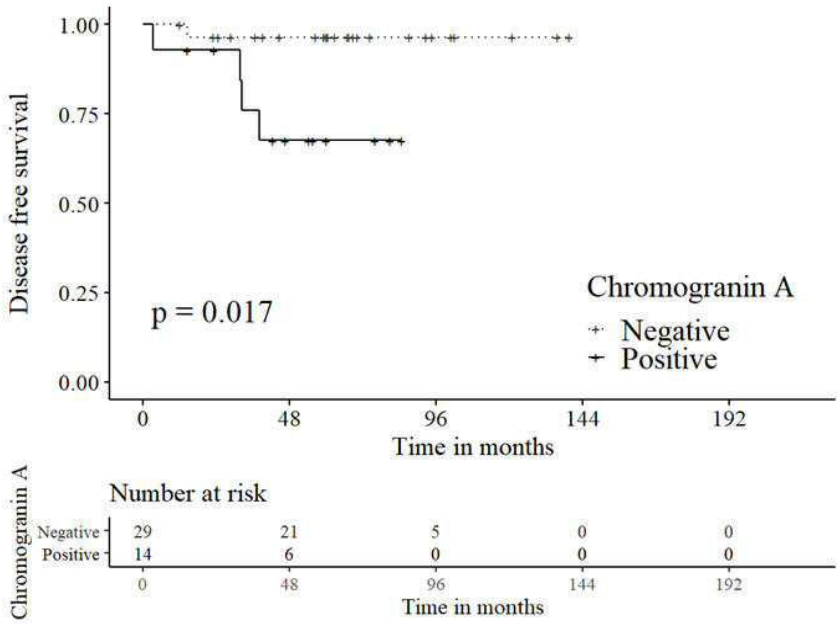
도면5b


1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
Disease free survival
p = 0.001
Chromogranin A
Negative
Positive
0
48
96
144
192
Time in months
Chromogranin A
Number at risk
Negative 20 16 1 0 0
Positive 7 3 1 0 0
0
48
96
144
192
Time in months

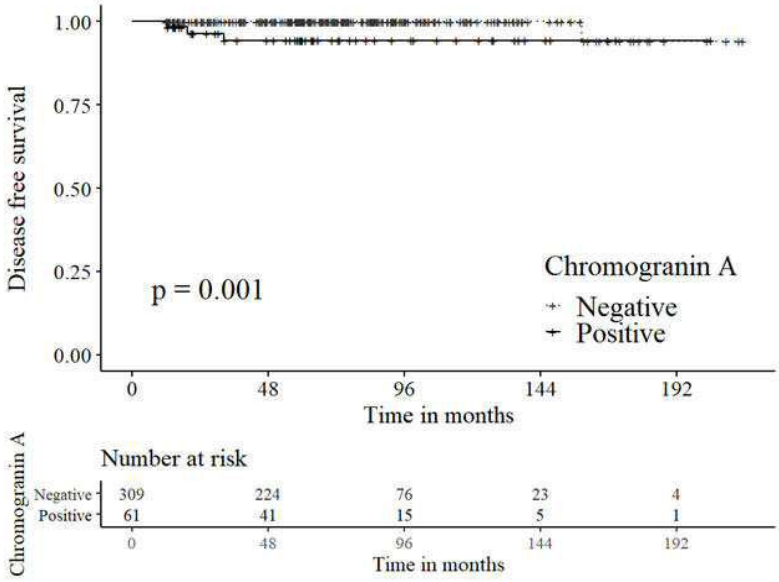
도면5c


1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
Disease free survival
p = 0.016
Chromogranin A
Negative
Positive
0
48
96
144
192
Time in months
Chromogranin A
Number at risk
Negative 289 210 73 23 4
Positive 57 39 16 5 1
0
48
96
144
192
Time in months

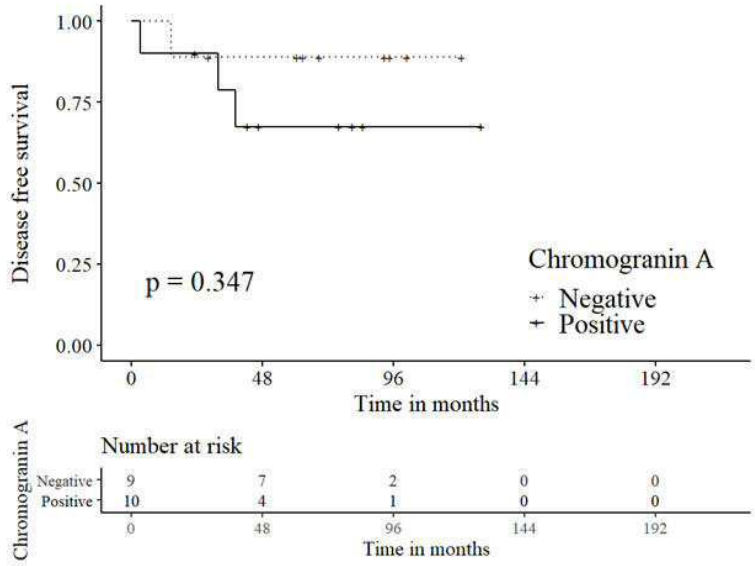
도면5d


Disease free survival
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
p = 0.017
Chromogranin A
Negative
Positive
0
48
96
144
192
Time in months
Chromogranin A
Number at risk
Negative 29 21 5 0 0
Positive 14 6 0 0 0
0
48
96
144
192
Time in months

도면5e


Disease free survival
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
p = 0.001
Chromogranin A
Negative
Positive
0
48
96
144
192
Time in months
Chromogranin A
Number at risk
Negative 309 224 76 23 4
Positive 61 41 15 5 1
0
48
96
144
192
Time in months

도면5f



서 열 목 록

<110> UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION

<120> Method for predicting prognosis of retal neuroendocrine tumor

<130> 1067451

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 457

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of Chromogranin A (Protein Accession No.: P10645.7)

<400> 1

Met Arg Ser Ala Ala Val Leu Ala Leu Leu Leu Cys Ala Gly Gln Val
1 5 10 15

Thr Ala Leu Pro Val Asn Ser Pro Met Asn Lys Gly Asp Thr Glu Val
20 25 30

Met Lys Cys Ile Val Glu Val Ile Ser Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ser
35 40 45

Pro Met Pro Val Ser Gln Glu Cys Phe Glu Thr Leu Arg Gly Asp Glu
50 55 60

Arg Ile Leu Ser Ile Leu Arg His Gln Asn Leu Leu Lys Glu Leu Gln
65 70 75 80
Asp Leu Ala Leu Gln Gly Ala Lys Glu Arg Ala His Gln Gln Lys Lys
85 90 95

His Ser Gly Phe Glu Asp Glu Leu Ser Glu Val Leu Glu Asn Gln Ser
100 105 110
Ser Gln Ala Glu Leu Lys Glu Ala Val Glu Glu Pro Ser Ser Lys Asp
115 120 125
Val Met Glu Lys Arg Glu Asp Ser Lys Glu Ala Glu Lys Ser Gly Glu
130 135 140
Ala Thr Asp Gly Ala Arg Pro Gln Ala Leu Pro Glu Pro Met Gln Glu
145 150 155 160
Ser Lys Ala Glu Gly Asn Asn Gln Ala Pro Gly Glu Glu Glu Glu Glu
165 170 175
Glu Glu Glu Ala Thr Asn Thr His Pro Pro Ala Ser Leu Pro Ser Gln
180 185 190
Lys Tyr Pro Gly Pro Gln Ala Glu Gly Asp Ser Glu Gly Leu Ser Gln
195 200 205
Gly Leu Val Asp Arg Glu Lys Gly Leu Ser Ala Glu Pro Gly Trp Gln
210 215 220
Ala Lys Arg Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Glu Ala Gly
225 230 235 240

Glu Glu Ala Val Pro Glu Glu Glu Gly Pro Thr Val Val Leu Asn Pro
245 250 255
His Pro Ser Leu Gly Tyr Lys Glu Ile Arg Lys Gly Glu Ser Arg Ser
260 265 270
Glu Ala Leu Ala Val Asp Gly Ala Gly Lys Pro Gly Ala Glu Glu Ala
275 280 285
Gln Asp Pro Glu Gly Lys Gly Glu Gln Glu His Ser Gln Gln Lys Glu
290 295 300
Glu Glu Glu Glu Met Ala Val Val Pro Gln Gly Leu Phe Arg Gly Gly

305 310 315 320

Lys Ser Gly Glu Leu Glu Gln Glu Glu Glu Arg Leu Ser Lys Glu Trp

325 330 335

Glu Asp Ser Lys Arg Trp Ser Lys Met Asp Gln Leu Ala Lys Glu Leu

340 345 350

Thr Ala Glu Lys Arg Leu Glu Gly Gln Glu Glu Glu Glu Asp Asn Arg

355 360 365

Asp Ser Ser Met Lys Leu Ser Phe Arg Ala Arg Ala Tyr Gly Phe Arg

370 375 380

Gly Pro Gly Pro Gln Leu Arg Arg Gly Trp Arg Pro Ser Ser Arg Glu

385 390 395 400

Asp Ser Leu Glu Ala Gly Leu Pro Leu Gln Val Arg Gly Tyr Pro Glu

405 410 415

Glu Lys Lys Glu Glu Glu Gly Ser Ala Asn Arg Arg Pro Glu Asp Gln

420 425 430

Glu Leu Glu Ser Leu Ser Ala Ile Glu Ala Glu Leu Glu Lys Val Ala

435 440 445

His Gln Leu Gln Ala Leu Arg Arg Gly

450 455