



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0088045
(43) 공개일자 2023년06월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) *G01N 33/574* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2022.01)
G01N 33/574 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-0176863
(22) 출원일자 2021년12월10일
심사청구일자 2021년12월10일
- (71) 출원인
가톨릭대학교 산학협력단
서울특별시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교
성의교정내 (반포동)
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이
화여자대학교)
디어젠 주식회사
대전광역시 서구 청사로 136, 18층 R1846호 (월평
동)
(72) 발명자
고윤호
서울특별시 서초구 신반포로 270, 105동 303호(반
포동, 반포자이아파트)
안영호
서울특별시 강서구 양천로 344, 7층 비-706호(마
곡동)
김대승
경기도 안양시 동안구 평촌대로40번길 100, 302동
201호(호계동, 샘마을아파트)
(74) 대리인
특허법인 정안

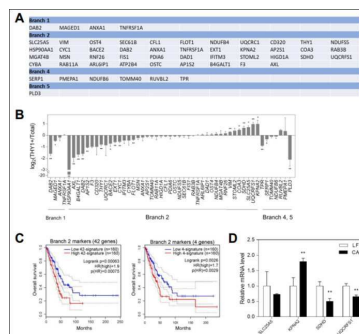
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 암 연관 섬유아세포 아형 식별을 위한 바이오마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 암 연관 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts, CAFs) 아형 식별을 위한 바이오마커 조성물, 상기 바이오마커의 발현 수준을 측정하여 암 연관 섬유아세포 아형을 식별하는 단계를 포함하는 암 예후 예측을 위한 정보 제공 방법 및 상기 바이오마커 조성물을 포함하는 암 연관 섬유아세포 아형 식별을 위한 키트에 관한 것이다. 본 발명에 따른 바이오마커는 폐선암종 환자의 낮은 전체생존기간과 관련이 있는 신항원 제시 CAFs (neo-antigen presenting CAFs) 아형을 식별할 수 있고 또한, 상기 신항원 제시 CAFs 아형의 특이적 바이오마커의 발현 수준을 측정하여 폐선암종 환자의 암세포가 주변 조직으로의 침윤 여부 및 폐암 진행 가능성을 예측할 수 있으므로, 이를 통해 폐암의 예후 예측이 가능하다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/112 (2013.01)

C12Q 2600/118 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2800/52 (2021.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345328490

과제번호 2018R1D1A1A02085738

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)

연구과제명 단일 세포 유전자전사체 분석(transcriptome)을 이용한 폐암-연관 섬유아세포 아형 특성 규명 및 억제내성에 대한 연구

기 여 율 1/3

과제수행기관명 가톨릭대학교(성의교정)

연구기간 2020.11.01 ~ 2021.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711135282

과제번호 2020R1A5A2019210

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 집단연구지원(R&D)

연구과제명 염증-암 미세환경 연구센터

기 여 율 1/3

과제수행기관명 이화여자대학교

연구기간 2021.06.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465033371

과제번호 HA17C0036010021

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 국립암센터

연구사업명 암정복추진연구개발사업

연구과제명 심층신경망 인공지능 기법을 통한 폐암환자의 예후 예측

기 여 율 1/3

과제수행기관명 가톨릭대학교 산학협력단

연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

DAB2, MAGED1, ANXA1 및 TNFRSF1A로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 바이오마커 제1군;
SLC25A5, HSP90AA1, MGAT4B, CYBA, VIM, CYC1, MSN, RAB11A, OST4, BACE2, RNF26, ARL6IP1, SEC61B, DAB2, FIS1, ATP2B4, CFL1, ANXA1, PDIA6, OSTC, FLOT1, TNFRSF1A, DAD1, AP1S2, NDUFB4, EXT1, IFITM3, B4GALT1, UQCRC1, KPNA2, STOML2, F3, CD320, AP2S1, HIGD1A, AXL, THY1, COA3, SDHD, NDUFS5, RAB3B 및 UQCRC1로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 바이오마커 제2군;

SERP1, PMEPA1, NDUFB6, TOMM40, RUVBL2 및 TPR로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 바이오마커 제3군; 및

PLD3을 포함하는 바이오마커 제4군;을 포함하는 암 연관 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts, CAFs) 아형 식별을 위한 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 바이오마커 제1군은 면역억제성 CAFs (immunosuppressive CAFs)를 식별하는 바이오마커인 것을 특징으로 하는 암 연관 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts, CAFs) 아형 식별을 위한 바이오마커 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 바이오마커 제2군은 신항원 제시 CAFs (neo-antigen presenting CAFs)를 식별하는 바이오마커인 것을 특징으로 하는 암 연관 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts, CAFs) 아형 식별을 위한 바이오마커 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 바이오마커 제3군은 근섬유아세포성 CAFs (myofibroblastic CAFs)를 식별하는 바이오마커인 것을 특징으로 하는 암 연관 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts, CAFs) 아형 식별을 위한 바이오마커 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 바이오마커 제4군은 증식성 CAFs (proliferative CAFs)를 식별하는 바이오마커인 것을 특징으로 하는 암 연관 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts, CAFs) 아형 식별을 위한 바이오마커 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 암은 뇌종양, 양성성상세포종, 악성성상세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌립프종, 핏지교종, 두개내인

종, 상의세포종, 뇌간종양, 두경부 종양, 후두암, 구인두암, 비강/부비동암, 비인두암, 침샘암, 하인두암, 갑상선암, 흉부종양, 폐선암종, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흉선암, 종격동 종양, 식도암, 유방암, 남성유방암, 복부종양, 위암, 간암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 췌관선암종, 소장암, 대장암, 항문암, 방광암, 신장암, 남성생식기종양, 음경암, 요도암, 전립선암, 여성생식기종양, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 자궁육종, 질암, 여성외부생식기암, 여성요도암, 피부암, 골수종, 백혈병 및 악성림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 암 연관 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts, CAFs) 아형 식별을 위한 바이오마커 조성물.

청구항 7

환자의 분리된 생물학적 샘플로부터

DAB2, MAGED1, ANXA1 및 TNFRSF1A로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 바이오마커 제1군;
SLC25A5, HSP90AA1, MGAT4B, CYBA, VIM, CYC1, MSN, RAB11A, OST4, BACE2, RNF26, ARL6IP1, SEC61B, DAB2, FIS1, ATP2B4, CFL1, ANXA1, PDIA6, OSTC, FLOT1, TNFRSF1A, DAD1, AP1S2, NDUFB4, EXT1, IFITM3, B4GALT1, UQCRC1, KPNA2, STOML2, F3, CD320, AP2S1, HIGD1A, AXL, THY1, COA3, SDHD, NDUFS5, RAB3B 및 UQCRC1로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 바이오마커 제2군;

SERP1, PMEPA1, NDUFB6, TOMM40, RUVBL2 및 TPR로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 바이오마커 제3군; 및

PLD3을 포함하는 바이오마커 제4군;의 mRNA 발현 수준 또는 단백질 발현 수준을 측정하여 암 연관 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts, CAFs) 아형을 식별하는 단계;를 포함하는 암 예후 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 바이오마커 제1군은 면역억제성 CAFs (immunosuppressive CAFs)를 식별하는 바이오마커인 것을 특징으로 하는 암 예후 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 바이오마커 제2군은 신항원 제시 CAFs (neo-antigen presenting CAFs)를 식별하는 바이오마커인 것을 특징으로 하는 암 예후 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 바이오마커 제3군은 근섬유아세포성 CAFs (myofibroblastic CAFs)를 식별하는 바이오마커인 것을 특징으로 하는 암 예후 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 바이오마커 제4군은 증식성 CAFs (proliferative CAFs)를 식별하는 바이오마커인 것을 특징으로 하는 암

예후 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 12

제7항에 있어서,

상기 암은 뇌종양, 양성성상세포종, 악성성상세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌립프종, 핍지교종, 두개내인종, 상의세포종, 뇌간종양, 두경부 종양, 후두암, 구인두암, 비강/부비동암, 비인두암, 침샘암, 하인두암, 갑상선암, 흉부종양, 폐선암종, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흉선암, 종격동 종양, 식도암, 유방암, 남성유방암, 복부종양, 위암, 간암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 췌관선암종, 소장암, 대장암, 항문암, 방광암, 신장암, 남성생식기종양, 음경암, 요도암, 전립선암, 여성생식기종양, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 자궁육종, 질암, 여성외부생식기암, 여성요도암, 피부암, 골수종, 백혈병 및 악성림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 암 예후 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 13

제7항에 있어서,

상기 생물학적 샘플은 세포, 조직, 생검, 파라핀조직, 혈액, 혈청, 혈장, 체액, 타액, 소변, 미세침 흡인검체, 세포 파쇄물 또는 세포 배양액인 것을 특징으로 하는 암 예후 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 14

제7항에 있어서,

상기 mRNA 발현 수준은 역전사효소 증합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 증합효소반응(competitive RT-PCR), 실시간 역전사효소 증합효소반응(real time quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 방법(DNA chip technology) 및 RNA 염기서열분석법(RNA-sequencing; RNA-seq)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법에 의해 측정하는 것을 특징으로 하는 암 예후 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 15

제7항에 있어서,

상기 단백질 발현 수준은 웨스턴 블랏(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선 면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radial immunodiffusion), 오우크테로니면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동(rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 면역침전분석법(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complement Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(immunochromatography), FACS 분석법(fluorescenceactivated cell sorter analysis), 단백질 칩 방법(protein chip technology) 및 역상 단백질 어레이(reverse phase protein array; RPPA)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법에 의해 측정하는 것을 특징으로 하는 암 예후 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 16

제1항에 따른 바이오마커 조성물을 포함하는 암 연관 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts, CAFs) 아형 식별을 위한 키트.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 암 연관 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts, CAFs)는 면역억제성 CAFs (immunosuppressive CAFs), 신항원 제시 CAFs (neo-antigen presenting CAFs), 근섬유아세포성 CAFs (myofibroblastic CAFs) 및 증식성 CAFs (proliferative CAFs)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 암 연관 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts, CAFs) 아형 식별을 위한 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암 연관 섬유아세포 아형 식별을 위한 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 암 연관 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts, CAFs) 아형 식별을 위한 바이오마커 조성물, 상기 바이오마커의 발현 수준을 측정하여 암 연관 섬유아세포 아형을 식별하는 단계를 포함하는 암 예후 예측을 위한 정보 제공 방법 및 상기 바이오마커 조성물을 포함하는 암 연관 섬유아세포 아형 식별을 위한 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 상피 종양이 진행됨에 따라 주변 기질 조직은 성장인자 및 사이토카인의 분비, 세포외기질의 변형, 다른 유형의 세포(예: 섬유아세포, 면역세포, 혈관주위 세포 및 혈관내피 세포)의 동원 및 새로운 혈관 형성을 포함한 수많은 변화를 겪게 된다(1, 2). 활성 종양 기질은 암세포의 증식, 이동 및 침윤을 위한 최적의 환경을 제공한다. 따라서, 기질 구획의 동적 변화의 조절은 암 진행의 중요한 결정 요인이다(3). 종양 기질의 섬유아세포, 즉 암 연관 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts, CAFs)는 종양 기질의 주요 세포 구성요소로 직간접적인 상호작용을 통해 암세포의 이동과 침윤을 촉진한다(4-6). 이러한 상호작용을 통해 CAFs와 암세포는 서로 교육하고 활성화하여 암의 진행과 전이를 촉진시킨다(6-8).

[0003] 수십 년 동안 폐암은 전 세계적으로 암 관련 사망의 주요 원인으로 남아 있다(9). 현재까지 표적치료제나 면역치료제 등 폐암에 대한 혁신적인 치료법이 개발되었지만, 폐암 환자의 예후는 크게 개선되지 않았으며, 이는 주로 종양의 진행과 이질성의 높은 유병률에 기인한다(10, 11). 암이 발달하고 진행되는 동안 종양 덩어리를 구성하는 암세포는 더 많은 유전적 및 표현형 다양성을 획득하여 유전자 발현, 형태, 증식, 운동성, 침윤성 및 전이 가능성 측면에서 더욱 이질적으로 되며(12, 13), 이는 화학 요법에 대한 내성을 유발하는 것으로 간주된다. 또한, 암세포뿐만 아니라 대식세포(14) 및 CAFs (15-19)와 같은 주변 세포도 이질성을 획득한다는 사실을 뒷받침하는 증거가 늘어나고 있다. CAFs가 암세포의 운동성과 침윤성을 촉진하고 항암제에 대한 피난처를 제공한다는 점을 고려할 때 CAF 모집단(population)의 이질성은 암 진행 및 전이 과정에서 중요한 역할을 할 수 있다.

[0004] 세포 이질성은 단일 세포 RNA 시퀀싱(single cell RNA sequencing, scRNA-seq)을 통해 분석할 수 있다(20). 분자 바코드 시스템을 사용하여 개별 세포의 전사체 데이터(transcriptomic data)를 확보한 후 유의한 선별된 특징의 표현을 기반으로 데이터의 차원을 줄이고 클러스터링 및 궤적 추론을 적용하여 세포 이질성을 상세히 분석한다.

[0005] 유방 CAFs에 대한 scRNA-seq 분석으로 혈관성 기질성, 세포주기성 및 발생성 CAFs와 같은 기능적으로 구별되는 CAFs의 하위집단(subpopulations)을 밝혀냈다(15). 췌관선암종(pancreatic ductal adenocarcinomas)에서 근모세포성, 염증성 및 항원 제시 CAFs가 확인되었다(21).

[0006] 원발성 및 전이성 두경부 종양의 CAFs는 근섬유아세포, 활성화되지 않은 휴식 섬유아세포, 활성화된 CAFs (CAF1 및 CAF2)의 4가지 아형(subtype)으로 나누어진다(22).

[0007] 폐 종양 미세 환경에서는 콜라겐 및 기타 세포외기질(extracellular matrix, ECM) 구성 요소의 발현 패턴이 다른 5가지 고유한 유형의 섬유아세포가 확인되었다(23).

[0008] 그러나, 대부분의 scRNA-seq 연구에서는 전체 종양 조직을 모집단으로 분석한 다음 CAFs 집단을 생물정보학적으로 추출했다. 본 연구에서는 순수한 CAF 모집단에 대한 보다 정확한 분석을 위해 scRNA-seq를 수행하기 전에 세포 유형-특이적 마커(cell type-specific marker)를 사용하여 인간 폐 종양에서 CAFs를 분리했다. 총 CAFs를 먼저 음성 선별에 의해 분리한 다음, 인간 폐암에서 나쁜 예후와 관련이 있는 것으로 보고된 THY1 발현(THY1+) CAFs(24)를 양성 선별에 의해 추가로 분리했다. 전체 CAF 모집단 내에서 클러스터링 분석은 뚜렷한 유전자 발현

패턴을 가진 여러 부분모집단(subpopulation)을 나타낸다. 궤적 추론은 총 CAFs와 THY1+ CAFs가 서로 다른 유사 시간 분기(pseudotemporal branch)에 위치함을 보여준다. 또한, 분기 2-특이적 마커(Branch 2-specific marker) 중 하나인 KPNA2의 발현억제는 CAF 침윤성을 약화시키는데, 이는 폐 CAFs가 기능적으로 구별되는 부분 모집단으로 나뉠 수 있음을 시사한다.

[0010] 본 명세서에서 언급된 특허문헌 및 참고문헌은 각각의 문헌이 참조에 의해 개별적이고 명확하게 특정된 것과 동일한 정도로 본 명세서에 참조로 삽입된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2021-0134551호 (공개일자: 2021.11.10)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명자들은 폐 암 연관 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts, CAFs) 아형 식별을 위한 바이오마커들을 발굴하기 위해 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 폐선암종 환자의 종양조직에서 분리한 CAFs에서 다양한 CAFs 아형이 존재하는 것을 확인하였으며, 이 중 신항원 제시 CAFs(neo-antigen presenting CAFs)로 명명된 아형의 특이적 바이오마커 유전자가 폐선암종 환자의 낮은 전체생존기간과 관련이 있음을 확인하였고, 상기 신항원 제시 CAFs 아형의 특이적 바이오마커 중에서 정상 폐섬유아세포에 비해 CAFs에서 높게 발현되는 KPNA2가 암세포 침윤을 촉진하여 폐암 진행을 촉진할 수 있음을 실험적으로 입증 및 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0013] 따라서, 본 발명의 목적은 암 연관 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts, CAFs) 아형 식별을 위한 바이오마커 조성물을 제공하는 것에 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 환자의 분리된 생물학적 샘플로부터 상기 바이오마커의 발현 수준을 측정하여 암 연관 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts, CAFs) 아형을 식별하는 단계를 포함하는 암 예후 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것에 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 바이오마커 조성물을 포함하는 암 연관 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts, CAFs) 아형 식별을 위한 키트를 제공하는 것에 있다.

[0017] 본 발명의 다른 목적 및 기술적 특징은 이하의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 구체적으로 제시된다.

과제의 해결 수단

[0018] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 DAB2, MAGED1, ANXA1 및 TNFRSF1A로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 바이오마커 제1군; SLC25A5, HSP90AA1, MGAT4B, CYBA, VIM, CYC1, MSN, RAB11A, OST4, BACE2, RNF26, ARL6IP1, SEC61B, DAB2, FIS1, ATP2B4, CFL1, ANXA1, PDIA6, OSTC, FLOT1, TNFRSF1A, DAD1, AP1S2, NDUFB4, EXT1, IFITM3, B4GALT1, UQCRC1, KPNA2, STOML2, F3, CD320, AP2S1, HIGD1A, AXL, THY1, COA3, SDHD, NDUFS5, RAB3B 및 UQCRCF1로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 바이오마커 제2군; SERP1, PMEPA1, NDUFB6, TOMM40, RUVBL2 및 TPR로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 바이오마커 제3군; 및 PLD3을 포함하는 바이오마커 제4군;을 포함하는 암 연관 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts, CAFs) 아형 식별을 위한 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명에서 용어 "바이오마커"는 암 연관 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts, CAFs) 아형 식별에 사용될 수 있는 유전자를 의미하며, 총 CAFs와 비교하여 THY1+ CAFs에서 상향 조절되거나 하향 조절된 유전자들 CAFs 아형-특이적 바이오마커로 선택됨을 의미한다.

- [0020] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 바이오마커 제1군은 면역억제성 CAFs (immunosuppressive CAFs)를 식별하는 바이오마커일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 바이오마커 제2군은 신항원 제시 CAFs (neo-antigen presenting CAFs)를 식별하는 바이오마커일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 바이오마커 제3군은 근섬유아세포성 CAFs (myofibroblastic CAFs)를 식별하는 바이오마커일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 바이오마커 제4군은 증식성 CAFs (proliferative CAFs)를 식별하는 바이오마커일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 암은 뇌종양, 양성성상세포종, 악성성상세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌립프종, 췌지교종, 두개내인종, 상의세포종, 뇌간종양, 두경부 종양, 후두암, 구인두암, 비강/부비동암, 비인두암, 침샘암, 하인두암, 갑상선암, 흉부종양, 폐선암종, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흉선암, 종격동 종양, 식도암, 유방암, 남성유방암, 복부종양, 위암, 간암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 췌관선암종, 소장암, 대장암, 항문암, 방광암, 신장암, 남성생식기종양, 음경암, 요도암, 전립선암, 여성생식기종양, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 자궁육종, 질암, 여성외부생식기암, 여성요도암, 피부암, 골수종, 백혈병 및 악성림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.
- [0025] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 환자의 분리된 생물학적 샘플로부터 DAB2, MAGED1, ANXA1 및 TNFRSF1A로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 바이오마커 제1군; SLC25A5, HSP90AA1, MGAT4B, CYBA, VIM, CYC1, MSN, RAB11A, OST4, BACE2, RNF26, ARL6IP1, SEC61B, DAB2, FIS1, ATP2B4, CFL1, ANXA1, PDIA6, OSTC, FLOT1, TNFRSF1A, DAD1, AP1S2, NDUFB4, EXT1, IFITM3, B4GALT1, UQCRC1, KPNA2, STOML2, F3, CD320, AP2S1, HIGD1A, AXL, THY1, COA3, SDHD, NDUFS5, RAB3B 및 UQCRC1로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 바이오마커 제2군; SERP1, PMEPA1, NDUFB6, TOMM40, RUVBL2 및 TPR로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 바이오마커 제3군; 및 PLD3을 포함하는 바이오마커 제4군;의 mRNA 발현 수준 또는 단백질 발현 수준을 측정하여 암 연관 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts, CAFs) 아형을 식별하는 단계;를 포함하는 암 예후 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0026] 본 발명에서 용어 "예후"는 암의 치료 후 해당 개체의 재발, 전이, 약물 반응성, 내성 등과 같은 여부를 판단하는 것을 의미한다. 본 발명의 폐선암종 환자의 종양조직에서 분리한 CAFs에서 다양한 CAFs 아형이 존재하는 것을 확인하였으며, 이 중 신항원 제시 CAFs(neo-antigen presenting CAFs)로 명명된 아형의 특이적 바이오마커 유전자의 발현 수준을 확인함으로써 폐선암종 환자에서의 암세포의 침윤 여부뿐만 아니라 향후 폐선암종 환자의 생존 예후가 좋을지 여부에 대해서까지 예측이 가능함을 의미한다. 예컨대, 폐선암종 환자의 종양조직으로부터 분리된 CAFs중에서 신항원 제시 CAFs(neo-antigen presenting CAFs) 아형의 특이적 바이오마커 유전자의 발현 수준을 측정하여 상향 조절된 것으로 진단되면 암세포가 주변 조직으로의 침윤 여부 및 환자의 예후가 좋지 않음을 예측할 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 용어 암 예후 "예측"은 폐암환자의 폐암 진행 가능성이 상대적으로 높은지 여부를 판별하는 것을 의미한다.
- [0028] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 정보 제공 방법에서, 상기 바이오마커 제1군은 면역억제성 CAFs (immunosuppressive CAFs)를 식별하는 바이오마커일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 정보 제공 방법에서, 상기 바이오마커 제2군은 신항원 제시 CAFs (neo-antigen presenting CAFs)를 식별하는 바이오마커일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 정보 제공 방법에서, 상기 바이오마커 제3군은 근섬유아세포성 CAFs (myofibroblastic CAFs)를 식별하는 바이오마커일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 정보 제공 방법에서, 상기 바이오마커 제4군은 증식성 CAFs (proliferative CAFs)를 식별하는 바이오마커일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 정보 제공 방법에서, 상기 암은 뇌종양, 양성성상세포종, 악성성상세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌립프종, 췌지교종, 두개내인종, 상의세포종, 뇌간종양, 두경부 종양, 후두암, 구인두암, 비강/부비동암, 비인두암, 침샘암, 하인두암, 갑상선암, 흉부종양, 폐선암종, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흉선암, 종격동 종양, 식도암, 유방암, 남성유방암, 복부종양, 위암, 간암, 담낭암, 담

도암, 췌장암, 췌관선암종, 소장암, 대장암, 항문암, 방광암, 신장암, 남성생식기종양, 음경암, 요도암, 전립선암, 여성생식기종양, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 자궁육종, 질암, 여성외부생식기암, 여성요도암, 피부암, 골수종, 백혈병 및 악성림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.

[0033] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 정보 제공 방법에서, 상기 생물학적 샘플은 세포, 조직, 생검, 파라핀조직, 혈액, 혈청, 혈장, 체액, 타액, 소변, 미세침 흡인검체, 세포 파쇄물 또는 세포 배양액을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.

[0034] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 정보 제공 방법에서, 상기 mRNA 발현 수준은 역전사효소 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 중합효소반응(competitive RT-PCR), 실시간 역전사효소 중합효소반응(real time quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 방법(DNA chip technology) 및 RNA 염기서열분석법(RNA-sequencing; RNA-seq)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법에 의해 측정할 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.

[0035] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 정보 제공 방법에서, 상기 단백질 발현 수준은 웨스턴 블랏(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사면역 확산법(radial immunodiffusion), 오우크테로니면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로켓 면역전기영동(rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 면역침전분석법(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complement Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(immunochromatography), FACS 분석법(fluorescence activated cell sorter analysis), 단백질 칩 방법(protein chip technology) 및 역상 단백질 어레이(reverse phase protein array; RPPA) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법에 의해 측정할 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.

[0036] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명의 바이오마커 조성물을 포함하는 암 연관 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts, CAFs) 아형 식별을 위한 키트를 제공한다.

[0037] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 키트에서 상기 암 연관 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts, CAFs)는 면역억제성 CAFs (immunosuppressive CAFs), 신항원 제시 CAFs (neo-antigen presenting CAFs), 근섬유아세포성 CAFs (myofibroblastic CAFs) 및 증식성 CAFs (proliferative CAFs)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

발명의 효과

[0038] 본 발명은 암 연관 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts, CAFs) 아형 식별을 위한 바이오마커 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 바이오마커는 폐선암종 환자의 낮은 전체생존기간과 관련이 있는 신항원 제시 CAFs(neo-antigen presenting CAFs) 아형을 식별할 수 있고 또한, 상기 신항원 제시 CAFs 아형의 특이적 바이오마커의 발현 수준을 측정하여 폐선암종 환자의 암세포가 주변 조직으로의 침윤 여부 및 폐암 진행 가능성등의 암 예후 예측이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 CAFs의 분리 및 특성화를 나타낸 것이다. 도 1a는 CAFs의 분리과정을 나타낸 것이다. 도 2b는 분리된 CAFs의 세포 형태를 나타낸 것으로, 대표적인 위상차(위) 및 형광 현미경 이미지(아래)를 나타낸다. 총 CAFs(total CAFs)와 THY1+ CAFs는 Alexa 594(빨간색)와 결합된 팔로이딘 및 DAPI(파란색)로 염색되었다. 도 1c는 총 CAFs 및 THY1+ CAFs에서 세포 유형-특이적 마커에 대한 qRT-PCR 분석결과를 나타낸 것으로, 발현 수준을 RPL32 mRNA 수준으로 정규화하였으며, 평균 + SD(n=3)로 나타낸다. 도 1d는 총 CAFs 및 THY1+ CAFs에서의 CAF-특이적 마커에 대한 qRT-PCR 분석결과를 나타낸 것으로, 평균 + SD(n=3)로 나타낸다.

도 2는 총 CAFs 및 THY1+ CAFs의 단일 세포 RNA 시퀀싱(scRNA-seq)분석 결과를 나타낸 것이다. 도 2a는 CAF 분리에서 scRNA-seq 분석까지의 전과정을 보여주는 다이어그램이다. 도 2b 및 도 2c는 Seurat 방법을 사용한 CAFs 클러스터링을 나타내는 것으로, 데이터는 UMAP(2b) 또는 tSNE(2c)로 시각화되었고, 총 8개의 부분모집단(subpopulation)이 확인되었다. 도 2d는 클러스터-특이적 마커 유전자의 히트맵(Heatmap)을 나타낸 것이다. 도 2e는 클러스터-특이적 마커 유전자의 유전자 온톨로지(gene ontology, GO) 분석을 나타낸 것이다. 도 2f는 총 CAFs 및 THY1+ CAFs에서의 세포-유형 특이적 마커의 발현 수준을 보여주는 Violin plots이다. 도 2g는 총 CAFs

및 THY1+ CAFs에서의 세포-유형 특이적 마커의 발현 패턴을 보여주는 tSNE 플롯이다.

도 3은 CAF scRNA-seq 데이터의 세포 궤적 분석(cell trajectory analysis)을 나타낸 것이다. 도 3a는 두 CAFs(총 CAFs 및 THY1+ CAFs)의 세포 궤적 분석을 나타낸 것으로, 색상 강도는 의사 시간(pseudotime)을 의미한다. 도 3b는 총 CAFs 및 THY1+ CAFs의 세포 궤적 매핑을 나타낸다. 도 3c는 세포 궤적 분석을 통해 5개의 분기(branch)를 식별하여 나타낸 것이다. 분기 1은 "면역억제성 CAFs(immunosuppressive CAFs)"로, 분기 2는 "신항원 제시 CAFs(neo-antigen presenting CAFs)"로, 분기 4는 "근섬유아세포성 CAFs(myofibroblastic CAFs)"로, 분기 5는 "증식성 CAFs(proliferative CAFs)"로 나타내었다. 도 3d는 분기-특이적 마커 유전자의 GO 분석을 나타낸 것이다.

도 4는 분기-특이적 마커의 특성화를 나타낸 것이다. 도 4a는 분기-특이적 마커의 목록을 나타낸다. 도 4b는 총 CAFs 및 THY1+ CAFs에서 분기-특이적 마커의 qRT-PCR 분석 결과를 나타낸다. 도 4c는 폐선암종 환자의 전체생존기간(overall survival)을 보여주는 Kaplan-Meier 플롯(TCGA 데이터)으로 분기 2 마커 유전자 발현 수준에 따라 두 그룹으로 나누어 나타내었다(좌: 총 42개 유전자, 우: 대표 4개 유전자). 도 4d는 마우스 정상 폐 섬유아세포(LF) 및 CAFs에서의 분기 2 마커 유전자에 대한 qRT-PCR 결과를 나타내었다.

도 5는 CAF 활성화에 대한 KPNA2의 효과를 나타낸 것이다. 도 5a는 비표적 대조군(NTC) 또는 Kpna2 siRNA(#1 및 #2)로 형질감염된 쥐(murine) CAFs에서의 Kpna2 발현에 대한 qRT-PCR 결과를 나타내는 것으로, 발현 수준은 Rp132 mRNA 수준으로 정규화되었고 NTC의 상대적인 값(1.0으로 설정됨)이 표시되었다. *P*, 양측 스튜던트 *t* 검정. 평균 $\pm$ SD(*n*=3). 도 5b는 NTC 또는 Kpna2 siRNA(si#1 및 #2)로 형질감염된 CAFs와 공동 배양된 344SQ 세포에서의 스펜도이드 침윤(invansion) 분석 결과를 나타낸 것이다. 344SQ 세포는 mCherry(적색 형광)로 표지되었고 CAFs는 GFP(녹색 형광)로 표지되었다. Hanging-drop cultures로 만든 스펜도이드를 콜라겐 젤에 넣어 굳힌 뒤 이를 동안 배양했으며, ImageJ를 사용하여 스펜도이드 침윤 비율(전체 세포 영역 대 중앙 스펜도이드 영역의 비율)을 측정했다. 평균 $\pm$ SD(+NTC, *n*=71; +Kpna2 si#1, *n*=38; si#2, *n*=48). *P*, 양측 스튜던트 *t* 검정. 도 5c는 대조군 벡터(+VEC) 또는 Kpna2 과발현 벡터(+Kpna2)로 형질감염된 쥐 정상 폐섬유아세포(LFs)에서 Kpna2 발현에 대한 qRT-PCR 결과를 나타낸 것이다. *P*, 양측 스튜던트 *t* 검정. 평균 $\pm$ SD(*n*=3). 도 5d는 대조군(+VEC) 또는 Kpna2 과발현 벡터(+Kpna2)로 형질감염된 LFs와 공동 배양된 344SQ 세포에서의 스펜도이드 침윤 분석 결과를 나타낸 것이다. 평균 $\pm$ SD(+VEC, *n*=72, +Kpna2, *n*=156). *P*, 양측 스튜던트 *t* 검정. 도 5e는 폐선암종 환자의 무병 생존기간(disease-free survival)을 보여주는 Kaplan-Meier 플롯을 나타낸 것으로, 환자를 KPNA2 mRNA 발현 수준에 따라 두 그룹(KPNA2_high 및 KPNA2_low)으로 나누어 나타냈다. *P*-값은 로그-순위 테스트(log-rank test)로 결정되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 본 명세서에서 설명된 구체적인 실시예는 본 발명의 바람직한 구현에 또는 예시를 대표하는 의미이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되지는 않는다. 본 발명의 변형과 다른 용도가 본 명세서 특허청구범위에 기재된 발명의 범위로부터 벗어나지 않는다는 것은 당업자에게 명백하다.

[0042] 실시예

[0044] 실험 재료 및 방법

[0045] 1. CAFs (cancer-associated fibroblasts)의 분리

[0046] 본 발명은 가톨릭의료원 임상연구심사위원회의 승인을 받았으며, 인간 연구 지침에 따라 수행되었다. 치료 목적으로 폐엽 절제술을 받았고 사전 동의를 제공한 치료되지 않은 원발성 비전이성 폐 종양이 있는 환자만 이 연구에 포함되었다.

[0047] 수술실에서 절제된 폐조직으로부터 종양 샘플을 분리하여 연구시설로 신속하게 이송했으며, 종양 샘플을 종양 위치에 대해 거시적으로 조사하였다. 종양 샘플은 이후 3개의 조각으로 나뉘었는데, 한 조각은 주로 종양 코어에서 유래한 조직을 포함하고, 다른 조각은 주로 종양 가장자리에서 유래한 조직을 포함하고, 나머지 조각은 다른 두 샘플의 중간 위치에서 유래했다.

[0048] 종양 샘플을 PBS로 행구고 2 mL MACS 조직 저장 용액(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)을 포함하

는 튜브에 밤새 담갔다. CAFs는 이전에 설명한 세포 유형-특이적 마커에 대한 항체와 함께 magnetic-activated cell sorting(MACS)을 사용하여 종양에서 분리되었다[25]. 총 CAFs를 CD45 (립프구: BD #555480, Franklin Lakes, NJ), CD68 (대식세포: BD #556059), CD31 (내피 세포: BD #550389) 및 EpCAM (상피 세포: BD #554276)을 포함하는 세포 유형-특이적 마커로 음성 선별 후 수득하였고, THY1+ CAFs를 THY1 (섬유아세포: BD #555593) 마커로 양성 선별 후 분리하였다. CAFs는 10% 소태아혈청(FBS; HyClone, Logan, UT), 페니실린/스트렙토마이신 (100 U/100 µg, Welgene), 2 mM L-글루타민(Welgene) 및 1 mM 피루브산나트륨(Welgene)을 포함하는 알파-MEM (Welgene, 경산, 한국)으로 37° C, 5% CO₂ 존재하에서 배양하였다.

2. 세포 배양

344SQ 쥐(murine) 폐암 세포를 10% FBS와 함께 RPMI 1640(Welgene)에서 배양했다. 정상 쥐 폐섬유아세포(LF)와 CAF를 이전에 설명한 대로 분리하고 배양했다(25). *Kpna2* siRNA를 Bioneer(대전, 한국)에서 구입했으며, TransIT-X2 Dynamic Delivery System(Mirus Bio, Madison, WI)을 사용하여 쥐 CAFs에 일시적으로 형질감염시켰다. 마우스 *Kpna2* cDNA(pCMV-SPORT6_*Kpna2*, # mMU001935)는 한국인간유전자은행, 의료유전체학연구센터, (KRIBB, 한국)에서 구입하여 pLVX-Puro 벡터(Clontech, 마운틴 뷰, 캘리포니아)로부터 변형된, pLVX-Blast 벡터에 삽입하였다. 마우스 *Kpna2*는 렌티바이러스 감염에 의해 LF에 도입되었다(5). 344SQ(mCherry로 표지됨) 및 쥐 섬유아세포(GFP로 표지됨)를 사용한 스페로이드 침윤 분석(spheroid invasion assay)은 앞서 설명한 대로 수행되었다(5).

3. Quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR)

총 RNA는 제조업체의 프로토콜에 따라 AccuPrep Universal RNA Extraction Kit(Bioneer)를 사용하여 CAFs 또는 인간 폐 종양에서 분리되었다. ELISP RT Prime Kit(Elpis-Biotech, Daejeon, Korea)로 역전사한 후, BioFACT A-Star Real-time PCR Kit with SFCgreen I(BioFACT, Daejeon, Korea)를 이용하여 real-time PCR을 수행하였다. mRNA 수준은 Rp132 mRNA로 정규화되었다. 상기 qRT-PCR에서 사용한 프라이머를 하기 표 1에 나타내었다.

[표 1]

gene	forward	reverse
TNFRSF1A	CCGCTTCAGAAAACACCTCAG	ATGCCGGTACTGGTTCCTCCTG
MAGED1	TCTGGGAGGCACTACGCAAGAT	TGTTGGGCACTCGTCTGTAGTC
SLC25A5	GCCGCTACTTTCGGTATCTATG	CAGCAGTGACAGTCTGTGCGAT
OST4	TCGCTCTTCTTGCTTGTCGT	GGATTGTTGACGGCCACGTA
SEC61B	CCGCACAACCTCGGCAGGCA	CAGAAGCGATGAACAGAAGACTC
CFL1	GCAACCTATGAGACCAAGGAGAG	TCTTGATGGCGTCCTTGAGCT
NDUFB4	GCTGAAACGAGAGTACCTGCTTC	TCCACACAGAGCTCCCATGAGT
UQCRC1	TGTCTCGTGCAGACTTGACCGA	GCGAGGTCTAACAGTTGCTGGT
CD320	CTGAGCGATGACTGCATTCCAC	AGAGGTGACACTCTCCAGGGTC
NDUFS5	CGGTTATACTCGGGCAGAGAAAG	CTTATCCCGCTGCTTCCTGATG
CYC1	CCAGATAGCCAAGGATGTGTGC	GACTGACCACTTGTGCCGCTTT
BACE2	GACGAGAACTCCAGCAGGTCAT	ACCGATCACCAGCGCATTTGTG
EXT1	GGCAAAGCACAAAGATTCTCGC	CTGCAAAGCCTCCAGGAATCTG
KPNA2	CTGTTGGCTCTCCTTGCACTTC	GCAGGATTCTTGTGCGGCAAAG
AP2S1	GAAGCTGATCGAGGAGGTGCAT	CCAGCATAGCGGCGGTAAATGA
COA3	CCAGTGGCAGAAAGTCTCTACC	GCTCATCTAGGAAACGCTCCTG
RAB3B	CGCTATGCTGATGACACGTTTAC	CCCACGGTAATAGGCTGTTGTG
MGAT4B	TGATGTACGCGCAGTCCAAAGG	TCATCCAGTCCCTCTGAAGGCTG
MSN	CTGATGGAGAGGCTGAAGCAGA	ACGCTTCCGTTCTGCTCAAGT
RNF26	CAGGACCATCAGAGTGACACCT	GCAACACTGTCTTGCTCTGGTC
FIS1	CAAGGAACTGGAGCGGCTCATT	GGACACAGCAAGTCCGATGAGT
PDIA6	TCAGAAAGGCGAGTCTCCTGTG	CCTCTTGGCAATGTCTCCTGTTG
DAD1	CAGTTCCGTTACTGTCTCCTCG	GGAGATGCCTTGGAAATCCGCT

STOML2	TCCTCATCCCTGTGTTAGACCG	CGCAGGTAAAGGACTCCATCGA
HIGD1A	AAGATCAGGGATCAAACTCATTCG	TAGTATTTCCCCTGCTCTCAGTT
SDHD	GCAGCACATACACTGTACCG	GGGAATAGTCCATCGCAGAGCA
UQCRRF1	CCTGTGTTGGACCTGAAGCGG	CAGAGAAGTCAGGCACCTTGATG
CYBA	ACCAGGAATTACTATGTTCCGGC	TAGGTAGATGCCGCTCGCAATG
RAB11A	AGCACCATTGGAGTAGAGTTTGC	AAGGCACCTACAGCTCCACGAT
OSTC	GCCATGACTGTGTATGCTCTGG	GTCATAGAACCAGACTTGGAGG
B4GALT1	GTATTTTGGAGGTGTCTCTGCTC	GGGCGAGATATAGACATGCCTC
F3	CAGAGTTCACACCTTACCTGGAG	GTTGTTCTCTCTGACTAAAGTCCG
SERP1	TATGGCCAACGAGAAGCACA	GGGGCATTCTCGAGGTCTT
PMEPA1	CTGAGCCACTACAAGCTGTCTG	GGATTCCGTTGCCTGACACTGT
NDUFB6	TTCATCATGTACTTGTACCTGTC	TCTGGACTTCTTTCAACTATGCC
TOMM40	CGAAGTTTGTGAAGTGGCAGGTG	AAGGCGTGATGCTCTGGAGGTA
RUVBL2	GGTCTACTCACTCTTCTGAC	GGATGACATCCAAGTCAAGGAGG
TPR	GCTCAGGTTGAGAGTCTGCGTT	CAGTTCTTCATGCTGAGCCATTG
PLD3	CGTCTGCATACCAAGTTCTGG	GCTGCAGTTGTACATGACCACG
DAB2	CTCTGTCCAGTCCCTCACCACAT	GTTCTGAGACGGGAGGAGCAAA
ANXA1	GCGAAACAATGCACAGCGTCAAC	CAACCTCCTCAAGGTGACCTGT
FLOT1	CCATCTCAGTCACTGGCATTGC	CCTCTAACGCTCTCCAGGGCAAT
HSP90AA1	TCTGCCTCTGGTGATGAGATGG	CGTTCACAAAGGCTGAGTTAGC
IFITM3	CTGGGCTTCATAGCATTCCGCT	AGATGTTCCAGGCACTTGGCGGT
ARL6IP1	GGTTGGTGGAACGCCTCTTCA	GGTAGGTGAGAAGCAGGTTGTG
AP1S2	CAAGAGAACTTGTTCAGACCGTTT	GTCCTGATCCTCAATAGCACAGC
AXL	GTTTGGAGCTGTGATGGAAGGC	CGCTTCACTCAGGAAATCCTCC
CD45	CTTCAGTGGTCCCATTGTGGTG	CCACTTTGTCTCGGCTTCCAG
CD68	CGAGCATCATCTTTCCACCAGCT	ATGAGAGGCAGCAAGATGGACC
CD31	AAGTGAGTCCAGCCGCATATC	ATGGAGCAGGACAGGTTGAGTC
EPCAM	GCCAGTGTACTTCACTTGGTGC	CCCTTCAGGTTTGTCTCTCTCC
THY1	GAAGGTCTCTCTATATCCGCC	TGATGCCCTCACACTTGACCAG
FSP1	CAGAACTAAAGGAGCTGCTGACC	CTTGGAAGTCCACCTCGTTGTC
FAP	GGAAGTGCCTGTTCCAGCAATG	TGTCTGCCAGTCTTCCCTGAAG
aSMA	CTATGCCTCTGGACGCACAAC	CAGATCCAGACGCATGATGGCA
TNC	ATGTCTCTGACAGCCGAGAA	AGTCACGGTGAGGTTTCCAGC
VIM	AGGCAAAGCAGGAGTCCACTGA	ATCTGGCGTTCCAGGGACTCAT
FN1	ACAACACCCAGGTGACTGAGAC	GGACACAACGATGCTTCTGAG
RPL32	ACAAAGCACATGTGCCCAGTG	TTCCACGATGGCTTTGCGGTTT

[0057]

[0059]

4. 단일 세포 RNA 시퀀싱(single-cell RNA sequencing) 및 데이터 분석

[0060]

세포는 제조업체의 지침(10x Genomics, Pleasanton, CA)에 따라 10x Chromium single-cell encapsulation chip에 탑재되었다. 라이브러리는 Chromium Single Cell 3' v2 시약 키트로 준비했다. 시퀀싱(sequencing)은 Illumina HiSeq2500(San Diego, CA)에서 수행되었다. 시퀀싱이 완료되면 10x Genomics Cell Ranger(버전 3.0.2) 툴킷(toolkit)을 사용하여 로우 파일(raw files)을 처리했다. 모든 quality-passed reads는 레퍼런스 인간 게놈(reference human genome)(GRCh37)에 맵핑되었다. Seurat(버전 3.1.2)를 사용하여 각 단일 세포에서 알려진 유전자의 발현 수준을 정량화했다. 저품질 및/또는 죽어가는 세포와 더블릿(doublers)을 걸러내기 위해 unique feature counts가 2,500개 이상인 세포는 제거되었다. 또한, >10% 미토콘드리아 수가 있는 세포도 제거되었다. 신뢰할 수 없는 세포를 제거한 후 모든 유전자의 unique counts를 로그 변환하고 IntegrateData 기능을 사용하여 모든 샘플의 데이터를 하나의 개체로 통합했다. 적절한 비교를 위해 모든 feature counts를 각 기능에 대해 개별적으로 회귀한 다음 ScaleData 함수를 사용하여 결과 잔차(resulting residuals)의 크기를 조정하고 중앙에 배치했다. 모든 다운스트림 분석은 상기 처리된 데이터로 수행되었다.

[0062]

5. mRNA 시퀀싱 및 데이터 분석

[0063]

라이브러리는 CAFs에서 추출한 RNA와 함께 SureSelect Strand-Specific Library Prep 키트를 사용하여 구성한 다음 Illumina HiSeq2500을 사용하여 시퀀싱했다. Trimmomatic을 사용하여 시퀀싱 품질에 따라 시퀀싱된 리드(Sequenced reads)를 트리밍한 다음 STAR를 사용하여 레퍼런스 인간 게놈(reference human genome)(GRCh37)에

정렬했다. RSEM은 transcripts per kilobase million (TPM) 방법을 사용하여 많은 알려진 모든 유전자를 추정하는 데 사용되었다. CAF-연관 유전자는 샘플에 걸친 TPM 값의 평균이 1보다 크고, fold-change가 2보다 크거나 작은 경우에 규정되었다.

[0065] **6. 비지도 군집(Unsupervised clustering)**

[0066] 식별된 CAF-연관 유전자는 Seurat를 사용한 비지도 차원 축소 분석(unsupervised dimensional reduction analysis)을 위한 가변 feature genes으로 사용되었다. 기본 구성 요소는 Seurat에서 구현된 JackStraw 및 PCEIbowPlot 기능을 사용하여 선택되었다. 비지도 군집(Unsupervised clustering)은 기본 구성 요소와 함께 FindClusters 기능을 사용하여 수행되었으며, 클러스터는 UMAP(uniform manifold approximation and projection) 및 t-SNE(t-distributed stochastic neighbor embedding) 플롯에서 시각화되었다.

[0068] **7. 궤적 분석(trajecory analysis)을 통한 CAF 아형(subtype) 예측**

[0069] 세포 궤적 및 차원 축소 분석(cell trajectory and dimensional reduction analysis)은 식별된 CAF-연관 유전자와 함께 Monocle2를 사용하여 수행되었다. CAF 아형-특이적 바이오마커 유전자(시그니처 유전자)를 식별하기 위해 Seurat 패키지에 구현된 FindAllMarkers 기능을 사용하여 차등적으로 발현된 유전자(DEG) 분석을 수행했다. 다음 기준이 충족되는 경우, 아형-특이적 시그니처 유전자로 규정되었다: fold-change의 log2가 0.15 보다 크거나 작음; 조정된 p-값은 0.05 이하임; 발현은 세포의 적어도 30%에서 검출됨. 유전자 온톨로지(gene ontology, GO) 분석은 시그니처 유전자가 있는 g:Profiler를 사용하여 수행되었다. 궤적-기반 CAF 아형의 기능적 추론은 GO 분석에 따라 수행되었다.

[0071] **8. CAF 아형-특이적 바이오마커 유전자의 식별**

[0072] Wx(26)라는 딥 러닝-기반 분류 알고리즘을 사용하여 CAF 아형을 정확하게 구분할 수 있는, 신뢰할 수 있는 바이오마커 유전자를 식별했다.

[0074] **9. 생존분석(survival analysis)**

[0075] 외과적으로 절제된 인간 폐선암종 조직(n=48)에서 분리된 총 RNA를 *KPNA2* mRNA 수준을 측정하기 위해, 상기 설명한 대로 qRT-PCR에 적용했다. 환자를 *KPNA2* mRNA 수준에 따라 두 그룹(높음 및 낮음)으로 나누었다. survminer R 패키지를 사용하여 가장 유의미한(log-rank test) 분할이 있는 최적의 컷오프를 결정하고 GraphPad Prism을 사용하여 환자의 무병 생존에 대한 Kaplan-Meier 분석을 수행했다.

[0077] **10. 면역조직화학염색법(immunohistochemistry)**

[0078] 면역조직화학염색법(immunohistochemistry, IHC)에 파라핀 포매된 종양 부위 블록을 사용했다. 간단히 설명하면, 섹션을 탈파라핀화하고 크실렌과 알코올을 사용하여 재수화했다. 항원 복원(antigen retrieval)은 슬라이드를 Tris-EDTA 완충액(pH 9.0)에서 20분 동안 가열하여 수행하고, 내인성 과산화효소 활성은 메탄올 중 3% 과산화수소로 10분 동안 급랭하여 차단했다. 제조업체의 지침에 따라 ImmPRESS Universal Reagent anti-Mouse/Rabbit IgG, Peroxidase kit(MP-7500; Vector Laboratories, Burlingame, CA)를 사용하여 IHC의 다음 단계를 수행했다. 섹션을 토끼 다클론성 KPNA2(1:200, ab84440; Abcam, Cambridge, UK)에 대한 1차 항체와 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션했다. 항체 결합은 ImmPACT DAB Peroxidase(HRP) 기질 키트(SK-4105; Vector, Burlingame, CA, USA)로 시각화되었다.

[0080] **실험결과**

[0082] **1. 인간 폐선암종으로부터 CAFs의 분리**

[0083] magnetic-activated cell sorting을 사용하여 폐선암종(EGFR 돌연변이; 낮은 PD-L1)으로 진단된 환자로부터 외과적으로 절제된 종양에서 CAFs를 분리했다. 종양 덩어리는 효소 및 기계적으로 단일 세포로 해리되었고 림프구, 대식세포, 혈관 내피 세포 및 상피암 세포와 같은 다른 유형의 세포를 세포 유형-특이적 마커(각각 CD45, CD68, CD31 및 EpCAM)를 사용한 음성 선별을 통해 제거했다. 상기 용출액에 포함된 세포를 "총 CAFs(total CAFs)"로 명명했다. 총 CAFs는 다시 CAF-특이적 마커(THY1)로 양성 선별되었고, 최종적으로 용출된 세포는 "THY1+ CAFs"로 명명되었다(도면 1a).

[0084] 형태학적으로, 총 CAFs와 THY1+ CAFs는 모두 활성 섬유아세포 특성을 유지했다: 길쭉한 방추형 또는 별 형상, 길고 얇은 세포질 돌출부 및 두드러진 액틴 스트레스 섬유(도 1b). 이러한 CAFs에서 마커 유전자의 mRNA 발현 수준은 정량적 RT-PCR(qRT-PCR)에 의해 분석되었다. THY1 mRNA는 두 CAFs 군에서 모두 높게 발현되었으며, CD45, CD31 및 EpCAM mRNA는 거의 또는 전혀 발현되지 않았다; 그러나, CD68 mRNA는 유의한 발현을 보였다(도 1c). 이는 세포 표면 단백질이 아닌 세포질 mRNA의 측정 때문일 수 있으며, CD68은 섬유아세포를 비롯한 비골수성 세포에서도 발현되는 것으로 알려져 있다(27). CAF 마커는 총 CAFs 및 THY1+ CAFs 모두에서 높게 발현되었으며(도 1d), CAFs가 폐 종양에서 적절하게 분리되었음을 확인했다.

[0086] 2. 인간 폐 CAFs의 단일 세포 RNA 시퀀싱(scRNA-seq)

[0087] 최근 점점 더 많은 연구 결과들이 췌관선암종(19), 유방암(18) 및 폐선암종(23)을 포함한 상피암의 종양 미세환경에서 CAFs의 이질성을 뒷받침한다.

[0088] 폐 CAFs의 기능적 이질성을 추가로 설명하고 CAF 부분모집단(subpopulations)에 대한 특정 마커를 식별하기 위해 본 발명자들은 총 CAFs와 THY1+ CAFs를 사용하여 10X Genomics scRNA-seq를 수행했다. 품질 검사를 통과한 후 총 CAFs 5,139개(mean reads per cell=122,073, median genes per cell=4,371) 및 THY1+ CAFs 4,038개(mean reads per cell=138,550, median genes per cell=5,076)에서 얻은 2개의 독립적인 scRNA-seq 데이터가 통합되어 다음 단계로 이동했다(도 2a).

[0089] 총 CAFs와 THY1+ CAFs의 차이를 보다 직관적으로 표시하기 위해 두 CAFs의 추가적인 벌크 RNA-seq에서 얻은 차등적으로 발현된 유전자(differentially expressed genes, DEG)를 클러스터링 분석을 위한 주요 특징 유전자로 채택했다.

[0090] UMAP(uniform manifold approximation and projection)(도 2b) 또는 tSNE(t-distributed stochastic neighbor embedding)(도 2c) 알고리즘을 사용하는 비지도 군집(unsupervised clustering) 분석은 CAFs 모집단을 8개의 부분모집단(클러스터 0-7)으로 세분화했다. 클러스터-특이적 마커 유전자의 발현 수준에 초점을 맞출때, 각 클러스터 사이에 명확한 구별이 관찰되었다(도 2d).

[0091] 유전자 온톨로지(GO) 분석 결과, 각 클러스터 대표 유전자들은 세포외기질, 세포외 소포(클러스터 0, 4~10) 및 세포내 소기관(클러스터 1~3, 도 2e) 등에 연관성이 있다.

[0092] 도 1c의 qRT-PCR 결과와 유사하게, PTPRC(CD45 인코딩), EPCAM 및 PECAM1(CD31 인코딩)은 거의 또는 전혀 발현을 나타내지 않았고, CD68은 중간 발현을 나타내었고, THY1은 모든 클러스터에서 높은 발현을 나타내었다(도 2f 및 도 2g). 이러한 결과는 폐암 환자의 단일 종양에서도 CAFs의 다양한 부분모집단 이 존재하며, 이러한 CAFs는 scRNA-seq 방법을 통해 구별할 수 있음을 시사한다.

[0094] 3. CAF scRNA-seq 데이터에 대한 세포 궤적 분석

[0095] 다음으로 scRNA-seq 데이터를 사용하여 차등 세포 계통 또는 부분모집단을 식별하는 데 적용할 수 있는 궤적 또는 의사시간 추론을 시도했다(28). CAF scRNA-seq 데이터에 대한 궤적 분석은 2개의 분기점과 5개의 별개의 분기(branch)를 나타냈다(도 3a). 흥미롭게도 이 분석을 통해 총 CAFs와 THY1+ CAFs의 차이가 명확히 관찰되었다: THY1+ CAFs는 분기 1(THY1+ CAFs의 51.9%) 및 분기 2(45.3%)에 우세하게 분포하였고, 총 CAFs는 분기 4(총 CAFs의 19.8%) 및 분기 5(77.2%)에 우세하게 분포하였다(도 3b 및 3d). 그런 다음, 각 분기 사이의 DEG를 추출하고 이러한 유전자를 분기-특이적 마커(branch-specific marker)로 지정했다. 이러한 마커에 대한 GO 용어 분석을 기반으로 각 분기는 기능적으로 명명되었다(도 3c 및 3d).

[0096] 분기 1 마커는 "세포사멸 과정의 조절(P=1.5E-12)", "사이토카인에 대한 반응(P=7.3E-11)" 및 "면역계 과정

($P=0.008$)" 등에 연관성이 있었다. 따라서, 분기 1을 "면역억제성 CAFs(immunosuppressive CAFs)"라고 명명했다.

[0097] 분기 2 마커는 "사이토카인 자극에 대한 세포 반응($P=1.4E-13$)", "항원 처리 및 제시($P=1.7E-13$)" 및 "T 세포 수용체 신호 전달 경로($P=3.9E-06$)"와 연관되었다. 따라서, 분기 2는 "신항원 제시 CAFs(neo-antigen presenting CAFs)"로 명명되었다.

[0098] 분기 4는 "근섬유아세포성 CAFs(myofibroblastic CAFs)"로 명명되었는데, 그 마커가 "세포외기질 조직($P=6.9E-19$)", "세포 이동($P=2.6E-09$)" 및 "세포-기질 접착($P=5.6E-08$)"에 관련되어 있기 때문이다.

[0099] 분기 5는 "증식성 CAFs(proliferative CAFs)"로 명명되었는데, 그 마커가 "유사분열 세포주기 과정($P=1.0E-19$)", "세포 분열($P=1.7E-13$)" 및 "세포 대사 과정($P=5.9E-07$)"과 관련되기 때문이다.

[0100] 분기 3은 비율이 낮아(0.4% 미만) 정의되지 않았다.

[0102] 4. 분기-특이적(branch-specific) 마커의 특성화

[0103] 본 발명자들은 벌크 RNA-seq 데이터와 Wx 알고리즘을 통합하여 분기-특이적 마커 목록을 더욱 세분화했다(26). 상기 언급한 것처럼(도 3b), THY1+ CAFs가 분기 1 및 2에서 풍부하기 때문에 총 CAFs와 비교하여 THY1+ CAFs에서 상향 조절된 분기 마커(fold-change > 2)만이 분기 1- 또는 분기 2- 특이적 마커로 선택되었다(도 4a).

[0104] 반대로, THY1+ CAFs에서 하향 조절된 분기 마커는 분기 4- 또는 분기 5- 특이적 마커로 선택되었다.

[0105] 그런 다음, qRT-PCR을 통해 총 CAFs와 THY1+ CAFs에서의 분기 마커의 mRNA 발현을 확인했다(도 4b).

[0106] 총 CAFs 또는 THY1+ CAFs가 각 분기에 독점적으로 분포하지 않았기 때문에 분기 마커의 발현 패턴은 눈에 띄는 경향을 보이지 않았다.

[0107] 항원 제시 CAFs(antigen-presenting CAFs)는 최근 체장암에서 scRNA-seq에 의해 CAFs의 부분모집단 중 하나로 밝혀졌으며(21), CD8+ T 세포의 세포독성 능력을 감소시켜 암세포를 보호하는 것으로 알려졌다(29); 따라서, 본 발명자들은 분기 2, 신항원 제시 CAFs(neo-antigen presenting CAFs)에 초점을 맞추었다.

[0108] TCGA 데이터에서, 모든 분기 2 마커를 포함하는 42개 유전자 시그니처는 폐선암종(lung adenocarcinoma, LUAD, 도 4c) 환자에서의 더 나쁜 전체 생존기간(overall survival)과 관련이 있음을 나타내었다.

[0109] 특히, THY1+ CAFs에서 상향 조절된 4개(KPNA2, UQCRC1, SLC25A5 및 SDHD)의 분기 2 마커가 있는 시그니처는 LUAD 환자에서 나쁜 예후 마커인 것으로 입증되었으며, 이는 분기 2, 신항원 제시 CAFs(neo-antigen presenting CAFs)가 폐암 진행을 악화시킬 수 있음을 암시한다.

[0110] 4개의 분기 2 마커 중에서, 정상 폐 섬유아세포(LFs, 도 4d)에 비해 쥐 CAFs에서 높게 발현되는 KPNA2를 선택하여, siRNAs를 사용하여 CAFs에서 Kpna2를 녹다운시켰다(도 5a).

[0111] 대조군 또는 Kpna2-녹다운 CAFs와 함께 344SQ 쥐 폐암 세포로 구성된 스페로이드를 콜라겐 겔에 접종한 다음 2 일 동안 스페로이드 침윤을 모니터링했다. 현저하게, 스페로이드의 3차원 침윤은 Kpna2 녹다운에 의해 억제되었다(도 5b). 또한, Kpna2가 과발현된 폐섬유아세포는 대조군 섬유아세포보다 암세포 침윤을 더 잘 촉진함을 확인하였다(도 5c 및 5d).

[0112] 또한, KPNA2 mRNA의 높은 발현 수준은 폐선암종 환자의 낮은 무병 생존율과 관련이 있었으며(도 5e), 이는 분기 2-특이적 마커인, KPNA2가 CAF 침윤성을 활성화하고 폐암 진행을 촉진할 수 있음을 의미한다.

[0114] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0116] 참조문헌

[0117] [1] D.C. Hinshaw, L.A. Shevde, The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression,

Cancer Res, 79 (2019) 4557-4566.

- [0118] [2] M. De Palma, D. Biziato, T.V. Petrova, Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis, *Nat Rev Cancer*, 17 (2017) 457-474.
- [0119] [3] T.L. Whiteside, The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth, *Oncogene*, 27 (2008) 5904-5912.
- [0120] [4] Y.H. Ahn, J.S. Kim, Long Non-Coding RNAs as Regulators of Interactions between Cancer-Associated Fibroblasts and Cancer Cells in the Tumor Microenvironment, *Int J Mol Sci*, 21 (2020).
- [0121] [5] S. Lee, J.H. Hong, J.S. Kim, J.S. Yoon, S.H. Chun, S.A. Hong, E.J. Kim, K. Kang, J. Lee Kang, Y.H. Ko, Y.H. Ahn, Cancer-associated fibroblasts activated by miR-196a promote the migration and invasion of lung cancer cells, *Cancer letters*, 508 (2021) 92-103.
- [0122] [6] E. Sahai, I. Astsaturov, E. Cukierman, D.G. DeNardo, M. Egeblad, R.M. Evans, D. Fearon, F.R. Greten, S.R. Hingorani, T. Hunter, R.O. Hynes, R.K. Jain, T. Janowitz, C. Jorgensen, A.C. Kimmelman, M.G. Kolonin, R.G. Maki, R.S. Powers, E. Puré, D.C. Ramirez, R. Scherz-Shouval, M.H. Sherman, S. Stewart, T.D. Tlsty, D.A. Tuveson, F.M. Watt, V. Weaver, A.T. Weeraratna, Z. Werb, A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts, *Nat Rev Cancer*, 20 (2020) 174-186.
- [0123] [7] H. Yamaguchi, R. Sakai, Direct Interaction between Carcinoma Cells and Cancer Associated Fibroblasts for the Regulation of Cancer Invasion, *Cancers (Basel)*, 7 (2015) 2054-2062.
- [0124] [8] T. Liu, L. Zhou, D. Li, T. Andl, Y. Zhang, Cancer-Associated Fibroblasts Build and Secure the Tumor Microenvironment, *Frontiers in cell and developmental biology*, 7 (2019) 60.
- [0125] [9] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA Cancer J Clin*, 71 (2021) 209-249.
- [0126] [10] K.D. Miller, L. Nogueira, A.B. Mariotto, J.H. Rowland, K.R. Yabroff, C.M. Alfano, A. Jemal, J.L. Kramer, R.L. Siegel, Cancer treatment and survivorship statistics, 2019, *CA Cancer J Clin*, 69 (2019) 363-385.
- [0127] [11] C. Tang, Z. Liao, K. Hess, W.W. Chance, Y. Zhuang, G. Jensen, T. Xu, R. Komaki, D.R. Gomez, Prognosis and predictors of site of first metastasis after definitive radiation therapy for non-small cell lung cancer, *Acta Oncol*, 55 (2016) 1022-1028.
- [0128] [12] I. Dagogo-Jack, A.T. Shaw, Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies, *Nat Rev Clin Oncol*, 15 (2018) 81-94.
- [0129] [13] R. Fisher, L. Pusztai, C. Swanton, Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics, *Br J Cancer*, 108 (2013) 479-485.
- [0130] [14] K. Wu, K. Lin, X. Li, X. Yuan, P. Xu, P. Ni, D. Xu, Redefining Tumor-Associated Macrophage Subpopulations and Functions in the Tumor Microenvironment, *Front Immunol*, 11 (2020) 1731.
- [0131] [15] M. Bartoschek, N. Oskolkov, M. Bocci, J. Løvrot, C. Larsson, M. Sommarin, C.D. Madsen, D. Lindgren, G. Pekar, G. Karlsson, M. Ringnér, J. Bergh, Å. Björklund, K. Pietras, Spatially and functionally distinct subclasses of breast cancer-associated fibroblasts revealed by single cell RNA sequencing, *Nat Commun*, 9 (2018) 5150.
- [0132] [16] Z. Chen, L. Zhou, L. Liu, Y. Hou, M. Xiong, Y. Yang, J. Hu, K. Chen, Single-cell RNA sequencing highlights the role of inflammatory cancer-associated fibroblasts in bladder urothelial carcinoma, *Nat Commun*, 11 (2020) 5077.
- [0133] [17] X. Geng, H. Chen, L. Zhao, J. Hu, W. Yang, G. Li, C. Cheng, Z. Zhao, T. Zhang, L. Li, B. Sun, Cancer-Associated Fibroblast (CAF) Heterogeneity and Targeting Therapy of CAFs in Pancreatic Cancer,

Frontiers in cell and developmental biology, 9 (2021) 655152.

- [0134] [18] Y. Kieffer, H.R. Hocine, G. Gentric, F. Pelon, C. Bernard, B. Bourachot, S. Lameiras, L. Albergante, C. Bonneau, A. Guyard, K. Tarte, A. Zinovyev, S. Baulande, G. Zalcman, A. Vincent-Salomon, F. Mechta-Grigoriou, Single-Cell Analysis Reveals Fibroblast Clusters Linked to Immunotherapy Resistance in Cancer, *Cancer Discov*, 10 (2020) 1330-1351.
- [0135] [19] Y. Wang, Y. Liang, H. Xu, X. Zhang, T. Mao, J. Cui, J. Yao, Y. Wang, F. Jiao, X. Xiao, J. Hu, Q. Xia, X. Zhang, X. Wang, Y. Sun, D. Fu, L. Shen, X. Xu, J. Xue, L. Wang, Single-cell analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma identifies a novel fibroblast subtype associated with poor prognosis but better immunotherapy response, *Cell Discov*, 7 (2021) 36.
- [0136] [20] Y.H. Choi, J.K. Kim, Dissecting Cellular Heterogeneity Using Single-Cell RNA Sequencing, *Mol Cells*, 42 (2019) 189-199.
- [0137] [21] E. Elyada, M. Bolisetty, P. Laise, W.F. Flynn, E.T. Courtois, R.A. Burkhart, J.A. Teinor, P. Belleau, G. Biffi, M.S. Lucito, S. Sivajothi, T.D. Armstrong, D.D. Engle, K.H. Yu, Y. Hao, C.L. Wolfgang, Y. Park, J. Preall, E.M. Jaffee, A. Califano, P. Robson, D.A. Tuveson, Cross-Species Single-Cell Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Reveals Antigen-Presenting Cancer-Associated Fibroblasts, *Cancer Discov*, 9 (2019) 1102-1123.
- [0138] [22] S.V. Puram, I. Tirosh, A.S. Parikh, A.P. Patel, K. Yizhak, S. Gillespie, C. Rodman, C.L. Luo, E.A. Mroz, K.S. Emerick, D.G. Deschler, M.A. Varvares, R. Mylvaganam, O. Rozenblatt-Rosen, J.W. Rocco, W.C. Faquin, D.T. Lin, A. Regev, B.E. Bernstein, Single-Cell Transcriptomic Analysis of Primary and Metastatic Tumor Ecosystems in Head and Neck Cancer, *Cell*, 171 (2017) 1611-1624.e1624.
- [0139] [23] D. Lambrechts, E. Wauters, B. Boeckx, S. Aibar, D. Nittner, O. Burton, A. Bassez, H. Decaluwé, A. Pircher, K. Van den Eynde, B. Weynand, E. Verbeken, P. De Leyn, A. Liston, J. Vansteenkiste, P. Carmeliet, S. Aerts, B. Thienpont, Phenotype molding of stromal cells in the lung tumor microenvironment, *Nat Med*, 24 (2018) 1277-1289.
- [0140] [24] M.J. Schliekelman, C.J. Creighton, B.N. Baird, Y. Chen, P. Banerjee, N. Bota-Rabassedas, Y.H. Ahn, J.D. Roybal, F. Chen, Y. Zhang, D.K. Mishra, M.P. Kim, X. Liu, B. Mino, P. Villalobos, J. Rodriguez-Canales, C. Behrens, Wistuba, II, S.M. Hanash, J.M. Kurie, Thy-1(+) Cancer-associated Fibroblasts Adversely Impact Lung Cancer Prognosis, *Sci Rep*, 7 (2017) 6478.
- [0141] [25] J.D. Roybal, Y. Zang, Y.H. Ahn, Y. Yang, D.L. Gibbons, B.N. Baird, C. Alvarez, N. Thilaganathan, D.D. Liu, P. Saintigny, J.V. Heymach, C.J. Creighton, J.M. Kurie, miR-200 Inhibits lung adenocarcinoma cell invasion and metastasis by targeting Flt1/VEGFR1, *Molecular cancer research : MCR*, 9 (2011) 25-35.
- [0142] [26] S. Park, B. Shin, W. Sang Shim, Y. Choi, K. Kang, K. Kang, Wx: a neural network-based feature selection algorithm for transcriptomic data, *Sci Rep*, 9 (2019) 10500.
- [0143] [27] E. Gottfried, L.A. Kunz-Schughart, A. Weber, M. Rehli, A. Peuker, A. Müller, M. Kastenberger, G. Brockhoff, R. Andreesen, M. Kreutz, Expression of CD68 in non-myeloid cell types, *Scand J Immunol*, 67 (2008) 453-463.
- [0144] [28] K. Van den Berge, H. Roux de Bézieux, K. Street, W. Saelens, R. Cannoodt, Y. Saeys, S. Dudoit, L. Clement, Trajectory-based differential expression analysis for single-cell sequencing data, *Nat Commun*, 11 (2020) 1201.
- [0145] [29] M.A. Lakins, E. Ghorani, H. Munir, C.P. Martins, J.D. Shields, Cancer-associated fibroblasts induce antigen-specific deletion of CD8 (+) T Cells to protect tumour cells, *Nat Commun*, 9 (2018) 948.
- [0146] [30] L. Bu, H. Baba, N. Yoshida, K. Miyake, T. Yasuda, T. Uchihara, P. Tan, T. Ishimoto, Biological heterogeneity and versatility of cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment,

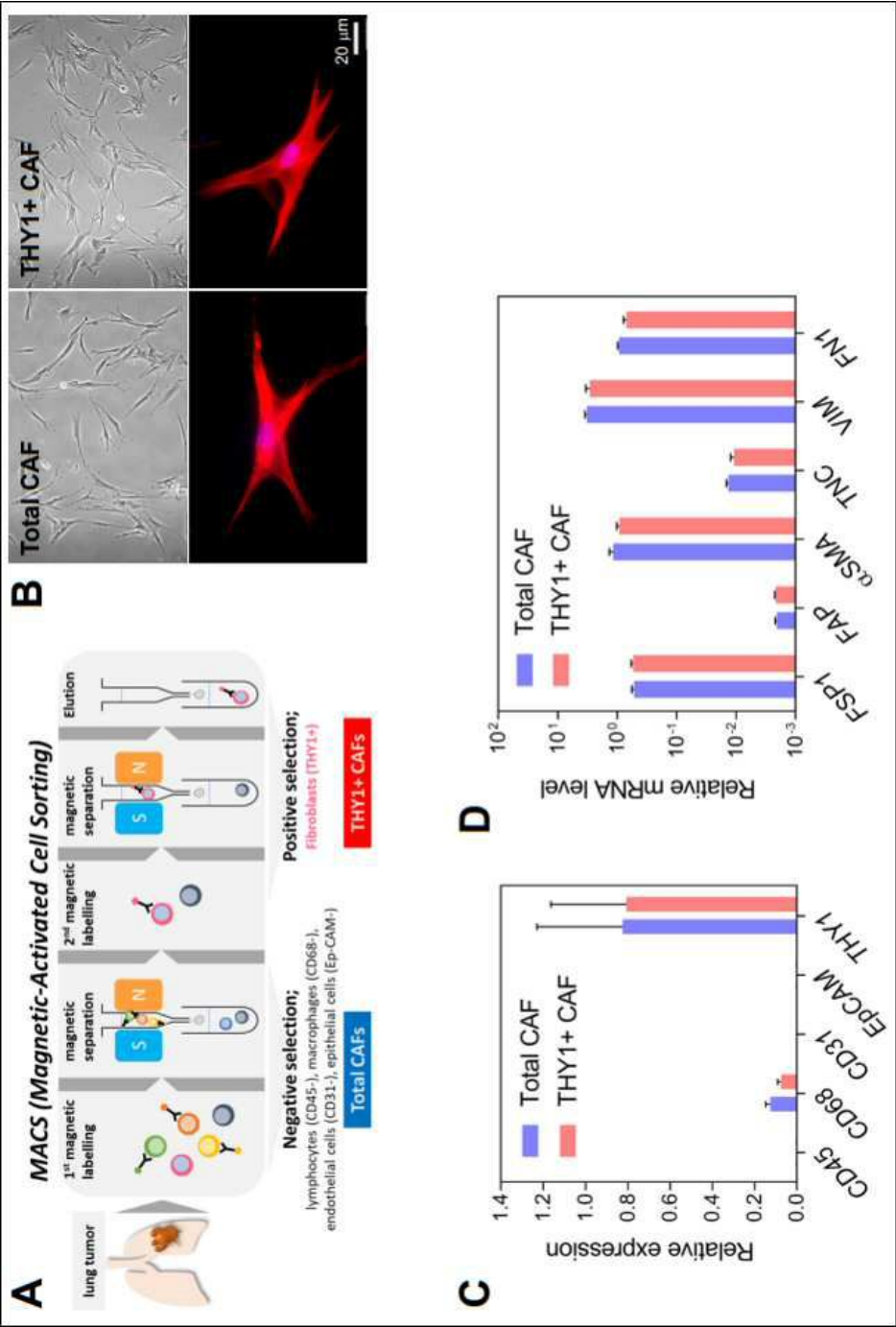
Oncogene, 38 (2019) 4887-4901.

- [0147] [31] K.A. Gieniec, L.M. Butler, D.L. Worthley, S.L. Woods, Cancer-associated fibroblasts-heroes or villains?, Br J Cancer, 121 (2019) 293-302.
- [0148] [32] Y. Kinugasa, T. Matsui, N. Takakura, CD44 expressed on cancer-associated fibroblasts is a functional molecule supporting the stemness and drug resistance of malignant cancer cells in the tumor microenvironment, Stem cells (Dayton, Ohio), 32 (2014) 145-156.
- [0149] [33] M. Nurmik, P. Ullmann, F. Rodriguez, S. Haan, E. Letellier, In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers, International journal of cancer, 146 (2020) 895-905.
- [0150] [34] D. Pankova, Y. Chen, M. Terajima, M.J. Schliekelman, B.N. Baird, M. Fahrenholtz, L. Sun, B.J. Gill, T.J. Vadakkan, M.P. Kim, Y.H. Ahn, J.D. Roybal, X. Liu, E.R. Parra Cuentas, J. Rodriguez, Wistuba, II, C.J. Creighton, D.L. Gibbons, J.M. Hicks, M.E. Dickinson, J.L. West, K.J. Grande-Allen, S.M. Hanash, M. Yamauchi, J.M. Kurie, Cancer-Associated Fibroblasts Induce a Collagen Cross-link Switch in Tumor Stroma, Molecular cancer research : MCR, 14 (2016) 287-295.
- [0151] [35] E. Pfeifer, J.M. Burchell, F. Dazzi, D. Sarker, R. Beatson, Apoptosis in the Pancreatic Cancer Tumor Microenvironment-The Double-Edged Sword of Cancer-Associated Fibroblasts, Cells, 10 (2021).
- [0152] [36] T.S. Cheung, A. Galleu, M. von Bonin, M. Bornhöfer, F. Dazzi, Apoptotic mesenchymal stromal cells induce prostaglandin E2 in monocytes: implications for the monitoring of mesenchymal stromal cell activity, Haematologica, 104 (2019) e438-e441.
- [0153] [37] C. Prunier, P.H. Howe, Disabled-2 (Dab2) is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition (EMT), The Journal of biological chemistry, 280 (2005) 17540-17548.
- [0154] [38] Y. Jiang, A.N. Woosley, N. Sivalingam, S. Natarajan, P.H. Howe, Cathepsin-B-mediated cleavage of Disabled-2 regulates TGF- β -induced autophagy, Nature cell biology, 18 (2016) 851-863.
- [0155] [39] X. Wang, X. Gao, Y. Xu, MAGED1: molecular insights and clinical implications, Annals of medicine, 43 (2011) 347-355.
- [0156] [40] M.A. Sugimoto, J.P. Vago, M.M. Teixeira, L.P. Sousa, Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance, Journal of immunology research, 2016 (2016) 8239258.
- [0157] [41] C. Katanov, S. Lerrer, Y. Liubomirski, L. Leider-Trejo, T. Meshel, J. Bar, R. Feniger-Barish, I. Kamer, G. Soria-Artzi, H. Kahani, D. Banerjee, A. Ben-Baruch, Regulation of the inflammatory profile of stromal cells in human breast cancer: prominent roles for TNF- α and the NF- κ B pathway, Stem cell research & therapy, 6 (2015) 87.
- [0158] [42] G.S. Karagiannis, T. Poutahidis, S.E. Erdman, R. Kirsch, R.H. Riddell, E.P. Diamandis, Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue, Molecular cancer research : MCR, 10 (2012) 1403-1418.
- [0159] [43] C.X. Dominguez, S. Müller, S. Keerthivasan, H. Koeppen, J. Hung, S. Gierke, B. Breart, O. Foreman, T.W. Bainbridge, A. Castiglioni, Y. Senbabaoglu, Z. Modrusan, Y. Liang, M.R. Junttila, C. Klijn, R. Bourgon, S.J. Turley, Single-Cell RNA Sequencing Reveals Stromal Evolution into LRRC15(+) Myofibroblasts as a Determinant of Patient Response to Cancer Immunotherapy, Cancer Discov, 10 (2020) 232-253.
- [0160] [44] N. Kim, H.K. Kim, K. Lee, Y. Hong, J.H. Cho, J.W. Choi, J.I. Lee, Y.L. Suh, B.M. Ku, H.H. Eum, S. Choi, Y.L. Choi, J.G. Joung, W.Y. Park, H.A. Jung, J.M. Sun, S.H. Lee, J.S. Ahn, K. Park, M.J. Ahn, H.O. Lee, Single-cell RNA sequencing demonstrates the molecular and cellular reprogramming of metastatic lung adenocarcinoma, Nat Commun, 11 (2020) 2285.

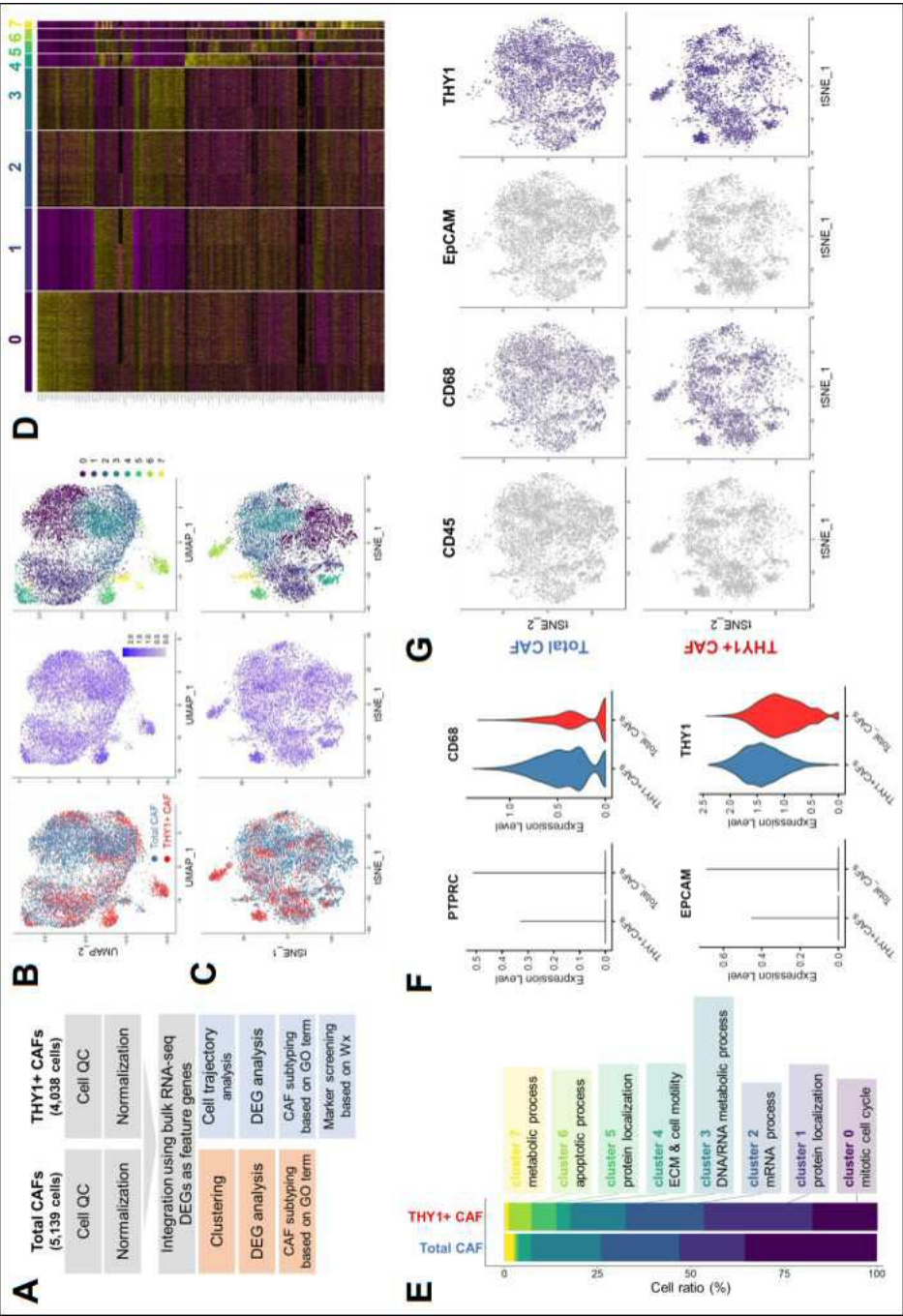
- [0161] [45] T. Liu, C. Han, S. Wang, P. Fang, Z. Ma, L. Xu, R. Yin, Cancer-associated fibroblasts: an emerging target of anti-cancer immunotherapy, *Journal of hematology & oncology*, 12 (2019) 86.
- [0162] [46] A.L. Gavin, D. Huang, C. Huber, A. Mårtensson, V. Tardif, P.D. Skog, T.R. Blane, T.C. Thinnes, K. Osborn, H.S. Chong, F. Kargaran, P. Kimm, A. Zeitjian, R.L. Sielski, M. Briggs, S.R. Schulz, A. Zarpellon, B. Cravatt, E.S. Pang, J. Teijaro, J.C. de la Torre, M. O'Keeffe, H. Hochrein, M. Damme, L. Teyton, B.R. Lawson, D. Nemazee, PLD3 and PLD4 are single-stranded acid exonucleases that regulate endosomal nucleic-acid sensing, *Nature immunology*, 19 (2018) 942-953.
- [0163] [47] M. Osisami, W. Ali, M.A. Frohman, A role for phospholipase D3 in myotube formation, *PloS one*, 7 (2012) e33341.
- [0164] [48] Y. Han, X. Wang, The emerging roles of KPNA2 in cancer, *Life sciences*, 241 (2020) 117140.
- [0165] [49] A.T. Alshareeda, O.H. Negm, A.R. Green, C.C. Nolan, P. Tighe, N. Albarakati, R. Sultana, S. Madhusudan, I.O. Ellis, E.A. Rakha, KPNA2 is a nuclear export protein that contributes to aberrant localisation of key proteins and poor prognosis of breast cancer, *Br J Cancer*, 112 (2015) 1929-1937.
- [0166] [50] C.I. Wang, C.L. Wang, C.W. Wang, C.D. Chen, C.C. Wu, Y. Liang, Y.H. Tsai, Y.S. Chang, J.S. Yu, C.J. Yu, Importin subunit alpha-2 is identified as a potential biomarker for non-small cell lung cancer by integration of the cancer cell secretome and tissue transcriptome, *International journal of cancer*, 128 (2011) 2364-2372.

도면

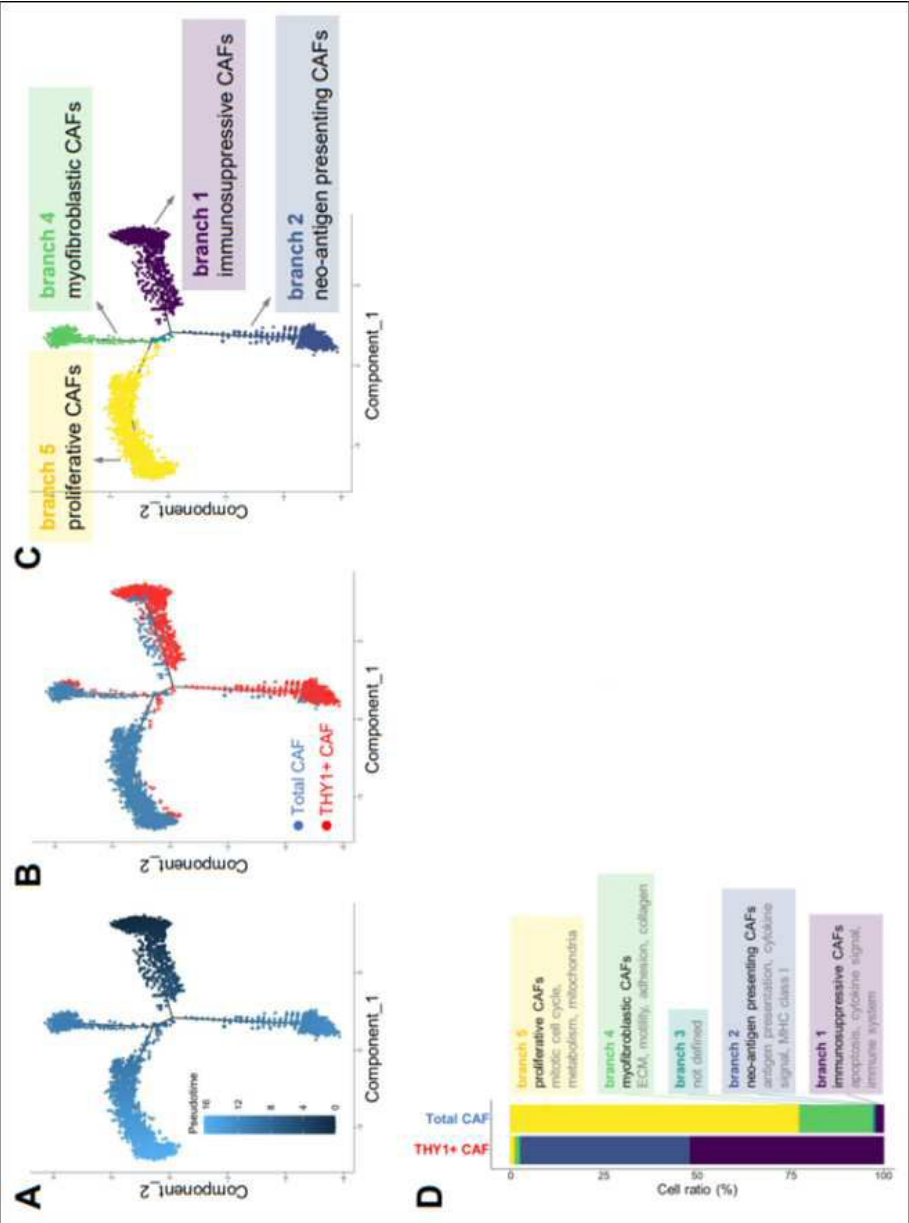
도면1



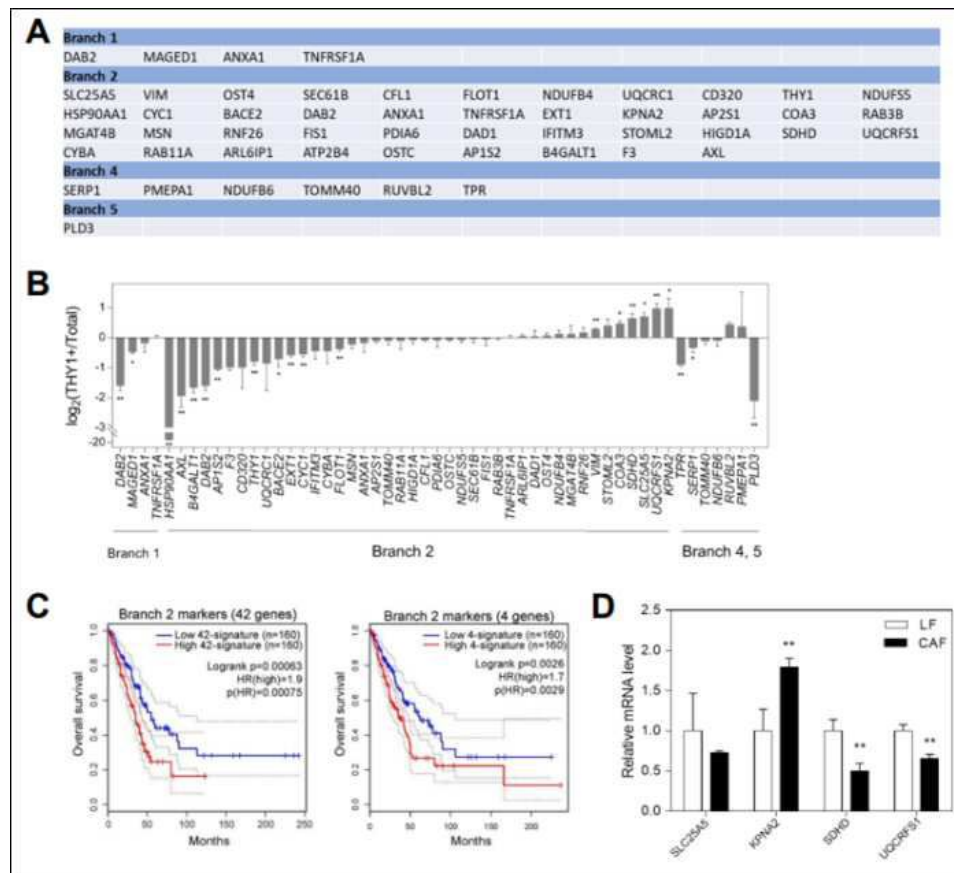
도면2



도면3



도면4



도면5

