



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년03월09일

(11) 등록번호 10-2508156

(24) 등록일자 2023년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/574 (2006.01) C12Q 1/6886 (2018.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/57438 (2019.01)

C12Q 1/6886 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2021-0038156

(22) 출원일자 2021년03월24일

심사청구일자 2021년03월24일

(65) 공개번호 10-2022-0132956

(43) 공개일자 2022년10월04일

(56) 선행기술조사문헌

Guangshun Sun et al, Cancer Management and Research (2021.03.16.), vol 13, pp 2483-2498.

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

강신애

서울특별시 강남구 언주로63길 20, 강남세브란스 병원 미래의학연구센터 4층 내과비서실(역삼동)

이민영

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 연세대학교 의과대학 본관 3층 내과학교실(신촌동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

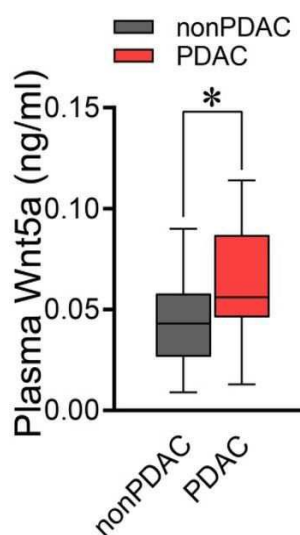
파도특허법인유한회사, 특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 **췌장암의 향후 발병 예측용 조성물****(57) 요약**

본 발명은 췌장암 발병 예측용 조성물 및 당뇨병 환자에서의 췌장암 진단용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 혈장의 Wnt5a 수준 측정을 통해 췌장암이 임상적으로 발병하지 않은 미확진 대상체의 향후 발병 위험성을 높은 신뢰도로 예측함으로써 치료 전략의 조기 수립 및 환자의 생존율 개선에 유용하게 이용될 수 있다. 본 발명은 또한 현재 발병한 당뇨병이 단순한 대사질환인지 혹은 췌장암에 의해 촉발된 고혈당 상태인지를 식별할 수 있는 원인 질환 선별용 바이오마커로 적용됨으로써 중요한 임상 정보를 제공할 수 있다.

대표도 - 도4b

(52) CPC특허분류

C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2500/00 (2013.01)
G01N 2800/50 (2013.01)

(72) 발명자

박호선

서울특별시 강남구 도곡로 237, 강남세브란스병원
의생명연구센터(역삼동)

박준성

경기도 성남시 분당구 정자일로 248, 613동 1105
호(정자동, 파크뷰)

(56) 선행기술조사문헌

Anthony L Schwartz et al, A Novel Approach for
the Treatment of Pancreatic Cancer, Russ
College of Engineering and Technology (2009.),
pp 1-32.

US20100004304 A1

W02020077204 A1

Xinger Wu et al, Endocrine (2017), vol 55, pp
398-409.

Custodia Garcia Jimenez et al, Journal of
Molecular Endocrinology (2014), vol 52, pp
R51-R66.

Isabelle Relling et al, J Clin Metab
(2018.11.), vol 103(11), pp 4253-4264.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711113801
과제번호	2019R1A2C108614812
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	췌도 미세환경을 조절을 통한 베타세포 재생 타겟 발굴
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

혈액 내 Wnt5a 단백질의 활성 또는 발현량을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 췌장암으로 진단되지 않은 당뇨병 환자에서의 췌장암 발병 예측용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 상기 혈액 내 Wnt5a 단백질의 활성 또는 발현량을 측정한 시점으로부터 36개월 이내의 췌장암 발병 여부를 예측하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 제제는 상기 Wnt5a 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 또는 상기 Wnt5a 단백질에 특이적으로 결합하는 앵타머인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 제제는 상기 Wnt5a 단백질을 인코딩하는 유전자의 핵산 분자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

췌장암으로 진단되지 않은 당뇨병 환자로부터 분리된 혈액 내 Wnt5a 단백질의 활성 또는 발현량을 측정하는 단계를 포함하는, 췌장암으로 진단되지 않은 당뇨병 환자에서의 췌장암 발병 예측에 필요한 정보 제공 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 개체 내 혈장 Wnt5a의 농도를 측정함으로써 췌장암, 구체적으로는 췌장선암(PDAC)의 향후 발병 위험성을 예측하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 췌장선암(PDAC) 5년 생존률이 낮은 매우 불량한 예후의 암으로 이는 85%의 PDAC 환자가 진단 시점에 이미 절제술을 시행할 수 없는 단계일 뿐 아니라 유효한 전신적 화학치료 또는 면역치료제가 개발되지 못했기 때문이다 (Chari et al., 2015; Ntala et al., 2018). PDAC와 당뇨 간의 유의한 상관관계가 일관되게 보고되고 있으며 (Mitsen et al., 2017; Hart 및 Chari, 2013), PDAC 환자에서 당뇨의 새로운 발병 또는 이미 발병한 당뇨의 악화가 일반적으로 관찰되고 있다. 최근 연구에서 PDAC 환자의 중앙 부피가 1-2 mL에 불과한 진단 3년 전부터 혈당 수준이 오르는 것으로 보고되었다(Sharma et al., 2018). 그러나, PDAC와 당뇨 간의 관련성이 어떠한 기작에 의한 것인지, 특히 PDAC-유도 고혈당증에 어떠한 인자가 기여하는지는 알려져 있지 않다. 이에, PDAC-관련 고혈당증의 병리 생리학 및 분자적 경로 규명은 PDAC의 조기 진단을 위한 최적의 바이오마커 발굴과 PDAC-관련 고혈당증의 치료전략 수립에 매우 중요한 문제이다.

[0004] PDAC에서의 고혈당증을 야기하는 인자를 조사하는 가장 정확한 방법은 PDAC 환자로부터 수득한 췌장 조직을 분석하는 것이다. 이에, 본 발명자들은 PDAC를 포함하는 다양한 이유로 췌장 절제술을 받은 160명의 환자에 대한 전향적 코호트를 구축하였다. 본 발명자들은 수술 전후 환자-유래 췌장 시료를 이용하여 Wnt/ β -카데닌의 관점에서 당대사 인자의 종합적인 조사로 구성된 전향적 코호트 데이터베이스를 이용하여 PDAC-유도 당뇨의 분자적 기작을 규명하고자 하였다. 이를 통해 PDAC의 조기 진단을 가능하게 하는 PDAC-유도 당뇨에 대한 바이오마커를 발굴하고자 하였다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1. Dana K. Andersen et al., Diabetes, Pancreatogenic Diabetes, and Pancreatic Cancer Diabetes 66:1103-1110 (2017)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 낮은 조기 진단율과 불량한 예후로 인하여 높은 사망률을 보이는 췌장암에 대해, 발병 전 시점에 향후의 발병 위험성을 미리 예측함으로써 치료 전략을 미연에 수립할 수 있는 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 췌장암에 걸린 환자의 상당수가 당뇨병을 수반하며, 이러한 췌장암-유도 당뇨병에서는 췌장암이 발병하기 전부터 혈장의 Wnt5a 수준이 현저하게 증가함을 관찰함으로써 췌장암이 임상적으로 검출되지 않은 환자의 향후 췌장암 발병 위험성은 물론 현재 발병된 당뇨병이 단순한 대사질환인지 혹은 췌장암에 의해 촉발된 고혈당 상태인지를 식별할 수 있는 신뢰도 높은 바이오마커로 기능할 수 있음을 발견하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 췌장암 발병 예측용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 당뇨병 환자에서의 췌장암 진단용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 췌장암을 수반하는 당뇨병의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 인슐린 분비 촉진용 조성물의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0017] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 Wnt5a 단백질의 활성 또는 발현량을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 개체에서의 췌장암 발병 예측용 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명자들은 낮은 조기 진단율과 불량한 예후로 인하여 높은 사망률을 보이는 췌장암에 대해, 발병 전 시점에 향후 발병 위험성을 미리 예측함으로써 치료 전략을 미연에 수립할 수 있는 효율적인 바이오마커를 발굴하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 췌장암에 걸린 환자의 상당수가 당뇨병을 수반하며, 이러한 췌장암-유도 당뇨병에서는 췌장암이 발병하기 전부터 혈장의 Wnt5a 수준이 현저하게 증가함을 규명함으로써, 췌장암이 임상적으로 검출되지 않은 환자의 향후 췌장암 발병 위험성은 물론 현재 발병된 당뇨병이 단순한 대사질환인지 혹은 췌장암에 의해 촉발된 고혈당 상태인지를 식별할 수 있는 신뢰도 높은 바이오마커로 기능할 수 있음을 발견하였다.
- [0019] 본 명세서에서 용어 “개체(subject)”는 Wnt5a 단백질의 활성 또는 발현량을 측정하기 위한 시료를 제공하고, 궁극적으로 향후 췌장암 발병 위험성의 분석 대상이 되는 개체를 의미한다. 개체는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함하며, 구체적으로는 인간이다.
- [0020] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 개체는 췌장암으로 진단되지 않은 개체이다. 본 발명의 조성물은 향후 췌장암이 발병할 개체 내재적인 위험성을 예측하기 위한 정보를 제공하기 때문에, 본 발명의 개체는 분석 시점에 췌장암이 발병하지 않은 개체이거나 적어도 임상적으로 췌장암으로 확진되기 전의 개체이다. 이에, 본 발명의 개체는 췌장암이 확진되지 않은 당뇨병 환자일 수 있으며 또는 당뇨병과 췌장암이 모두 발병하지 않은 정상개체(healthy subject)일 수도 있다.
- [0021] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 상기 측정 시점으로부터 36개월 이내의 췌장암 발병 여부를 예측한다.
- [0022] 후술하는 실시예에서 보는 바와 같이, 본 발명자들은 췌장암에 의해 유도된 고혈당증에서 췌장암과 무관한 고혈당증에 비해 혈장 Wnt5a 수준이 현저히 증가함을 관찰하였으며, 췌장암-유도 고혈당 상태는 췌장암의 임상적인 발병 약 36개월 전부터 나타남이 알려졌으므로(Sharma et al., *Gastroenterology*. 155(2):490-500 (2018)), 본 발명은 췌장암의 실제 발병 시점 최대 36개월 전에 발병 위험성의 예측을 예측할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 제제는 상기 Wnt5a 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 또는 상기 Wnt5a 단백질에 특이적으로 결합하는 앵타머이다.
- [0024] 본 발명에 따르면, 본 발명의 Wnt5a 단백질을 항원-항체 반응을 이용한 면역분석(immunoassay) 방법에 따라 검출 및 정량하여 개체의 췌장암 발병 위험성을 분석하는 데 이용될 수 있다. 이러한 면역분석은 종래에 개발된 다양한 면역분석 또는 면역염색 프로토콜에 따라 실시될 수 있다.
- [0025] 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35})로 표지된 항체가 이용될 수 있다. 본 발명에서 Wnt5a 단백질을 특이적으로 인식하는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다.
- [0026] 본 발명의 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519 (1976)), 제조법 DNA 방법(미국 특허 제4,816,567호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al., *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. et al and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, 1999; 및 Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, 1984에 상세하게 기재되어 있다.
- [0027] 상술한 면역분석 과정에 의한 최종적인 시그널의 강도를 분석한 결과 개체의 시료에서 Wnt5a 단백질에 대한 시그널이 정상 시료 보다 강하게 나오는 경우 개체의 향후 36개월 내 췌장암 발병 위험성이 증가한 것으로 판단된다.
- [0028] 본 명세서에서 용어 “항원 결합 단편(antigen binding fragment)”은 면역글로불린 전체 구조 중 항원이 결합할 수 있는 폴리펩티드의 일부를 의미하며, 예를 들어 F(ab')₂, Fab', Fab, Fv 및 scFv를 포함하나, 이에 제한되는

것은 아니다.

- [0029] 본 명세서에서 용어, "특이적으로 결합(specifically binding)" 은 "특이적으로 인식(specifically recognizing)"과 동일한 의미로서, 항원과 항체(또는 이의 단편)가 면역학적 반응을 통해 특이적으로 상호작용하는 것을 의미한다.
- [0030] 본 발명은 항체 대신 Wnt5a 단백질에 특이적으로 결합하는 앵타머를 이용할 수도 있다. 본 명세서에서 용어 “앵타머”는 특정 표적물질에 높은 친화력과 특이성으로 결합하는 단일 줄기의(single-stranded) 핵산(RNA 또는 DNA) 분자 또는 펩타이드 분자를 의미한다. 앵타머의 일반적인 내용은 Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". *J Mol Med*. 78(8):426-30(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R . "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". *Proc Natl Acad Sci USA*. 95(24):14272-7(1998)에 상세하게 개시되어 있다.
- [0031] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 제제는 상기 Wnt5a 단백질을 인코딩하는 유전자의 핵산 분자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브이다.
- [0032] 본 명세서에서, 용어 “핵산 분자”는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).
- [0033] 본 명세서에서 사용되는 용어 “프라이머”는 핵산쇄(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합체의 존재, 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용하는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 구체적으로는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며, 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 프라이머는 타겟 핵산에 어닐링 되어 주형-의존성 핵산 중합효소에 의해 타겟 핵산에 상보적인 서열을 형성하는 연장 프라이머(extension primer)일 수 있으며, 이는 고정화 프로브가 어닐링 되어 있는 위치까지 연장되어 프로브가 어닐링 되어 있는 부위를 차지한다.
- [0035] 본 발명에서 이용되는 연장 프라이머는 타겟 핵산, 예를 들어 *Wnt5a* 유전자의 특정 염기서열에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 용어 “상보적”은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary)인 경우 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 경우를 모두 포괄하는 의미이며, 구체적으로는 완전히 상보적인 경우를 의미한다. 본 명세서에서 용어 “실질적으로 상보적인 서열”은 완전히 일치되는 서열뿐만 아니라, 특정 서열에 어닐링하여 프라이머 역할을 할 수 있는 범위 내에서, 비교 대상의 서열과 부분적으로 불일치되는 서열도 포함되는 의미이다.
- [0036] 프라이머는, 중합체의 존재 하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, pH 및 프라이머의 소스(source)에 따라 결정되지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다. 이러한 프라이머의 설계는 타겟 뉴클레오타이드 서열을 참조하여 당업자가 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.
- [0037] 본 명세서에서 용어 “프로브”는 특정 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하는 자연 또는 변형되는 모노머 또는 결합을 갖는 선형의 올리고머를 의미한다. 구체적으로, 프로브는 혼성화에서의 최대 효율을 위하여 단일가닥이며, 더욱 구체적으로는 디옥시리보뉴클레오타이드이다. 본 발명에 이용되는 프로브로서, 상기 *Wnt5a* 유전자의 특정 염기서열에 완전하게(perfectly) 상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다. 일반적으로, 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스(duplex)의 안정성은 말단의 서열의 일치에 의해 결정되는 경향이 있기 때문에, 타겟 서열의 3' -말단 또는 5' -말단에 상보적인 프로브를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0038] 혼성화에 적합한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., et al., *Nucleic Acid Hybridization, A Practical*

Approach, IRL Press, Washington, D.C.(1985)에 개시된 사항을 참조하여 결정할 수 있다.

- [0039] 본 명세서에서 용어 “상보적”은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건하에서 발현 억제용 핵산 분자가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 상보적인 것을 의미한다. 본 명세서에서 용어 “실질적으로 상보적인 서열”은 완전히 일치되는 서열 뿐만 아니라, 특정 서열에 어닐링하여 서열 특이적인 혼성화가 일어날 수 있는 범위 내에서, 비교 대상의 서열과 부분적으로 불일치되는 서열도 포함되는 의미이다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 개체로부터 분리된 생물학적 시료 내 Wnt5a 단백질의 활성 또는 발현량을 측정하는 단계를 포함하는, 개체에서의 췌장암 발병 예측에 필요한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0041] 본 발명에서 이용되는 Wnt5a 단백질의 활성 또는 발현량 측정 수단 및 Wnt5a 수준과 췌장암의 발병 위험성 간의 상관관계에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.
- [0043] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 Wnt5a 단백질의 활성 또는 발현량을 측정하는 체제를 유효성분으로 포함하는 당뇨병 환자에서의 췌장암 진단용 조성물을 제공한다.
- [0044] 후술하는 실시예에서 보는 바와 같이, 본 발명자들은 췌장암과 무관한 일반적인 고혈당증에 비해 췌장암-유도된 고혈당증에서 혈장 Wnt5a 농도가 현저히 높다는 사실을 규명함으로써, 신규 발병한 당뇨병이 췌장암과 관련된 대사 변화인지를 여부를 식별할 수 있는 바이오마커로서 Wnt5a가 중요한 기능을 할 수 있음을 발견하였다.
- [0045] 본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질환에 대한 개체의 감수성(susceptibility)의 판정, 특정 질환을 현재 개체가 가지고 있는 지 여부의 판정, 및 특정 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)의 판정을 포함한다. 본 발명의 목적 상 본 명세서의 용어 “진단”은 개체가 현재 특정 질환을 가지고 있는지 여부 및 향후 특정 질환에 걸릴 위험성이 있는지의 판정, 구체적으로는 당뇨병에 걸린 개체가 췌장암도 발병하였는지 혹은 향후 췌장암도 발병할 위험이 있는지의 판정을 의미한다. 췌장암의 발병 여부를 통해 개체가 가진 당뇨의 성격도 일반적인 대사 이상인지 혹은 췌장암에 의해 유발된 고혈당 상태인지를 판정할 수 있다.
- [0046] 본 명세서에서 용어 “진단용 조성물”은 당뇨병 환자의 췌장암 발병 여부를 판단하거나 발병 가능성을 예측하기 위해 Wnt5a 단백질 또는 *Wnt5a* 유전자의 발현량 측정수단을 포함하는 통합적인 혼합물(mixture) 또는 장비(device)를 의미하며, 이에 “진단용 키트”로 표현될 수도 있다.
- [0047] 본 명세서에서 용어 “당뇨병”은 포도당-비관용(intolerance)을 초래하는 인슐린의 상대적 또는 절대적 부족으로 특징되는 만성질환을 의미한다. 본 발명에서 췌장암과의 관련성 여부의 분석 대상이 되는 당뇨병은 모든 종류의 당뇨병을 포함하며, 예를 들어, 제1형 당뇨, 제2형 당뇨 및 유전성 당뇨를 포함한다. 제1형 당뇨는 인슐린 의존성 당뇨병으로서, β -세포의 파괴에 의해 주로 초래되고, 제2형 당뇨는 인슐린 비의존성 당뇨병으로서, 식사 후 불충분한 인슐린 분비에 의해 초래되거나 또는 인슐린 내성에 의해 초래된다.
- [0048] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 인슐린 분비 촉진용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0049] (a) Wnt5a를 발현하는 세포를 포함하는 생물학적 시료에 시험물질을 접촉시키는 단계;
- [0050] (b) 상기 생물학적 시료 내 Wnt5a의 활성 또는 발현량을 측정하는 단계,
- [0051] 상기 Wnt5a의 활성 또는 발현량이 감소한 경우, 상기 시험물질은 인슐린 분비 촉진용 조성물로 판정한다.
- [0052] 본 발명에 따르면, 본 발명자들은 췌장암-유도된 당뇨병에서 인슐린 저항성에 큰 변화가 없는 반면 인슐린 분비 기능이 현저히 저하되며, Wnt5a의 활성 또는 발현량을 억제할 경우 저하된 인슐린 분비 기능이 유의하게 회복됨을 관찰함으로써, 췌장암-유도된 당뇨병에서 Wnt5a는 인슐린 저항성이 아닌 인슐린 분비 감소를 매개함을 규명하였다. 이에, Wnt5a를 억제하는 시험물질은 췌장암 환자에서 인슐린 분비 결핍을 복구할 수 있다.
- [0053] 본 발명에서 용어 “생물학적 시료”는 인간을 포함한 포유동물로부터 얻어지는, Wnt5a 또는 이를 발현하는 세포를 포함하고 있는 모든 시료로서, 조직, 기관, 세포 또는 세포 배양액을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0054] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 생물학적 시료는 췌장암 환자 유래 시료이다. 보다 구체적으로는 췌장암 환자 유래 췌장 조직 또는 체액(body fluid)이다. 보다 구체적으로는, 상기 체액은 혈액이다.
- [0055] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 “후보물질”은 Wnt5a 또는 이를 발현하는 세포를 포함하

는 시료에 첨가되어 Wnt5a의 활성 또는 발현량에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 화합물, 뉴클레오타이드, 펩타이드 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 시험물질을 처리한 생물학적 시료에서 Wnt5a의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계는 당업계에 공지된 다양한 발현량 및 활성 측정방법에 의해 수행될 수 있다. 측정 결과, Wnt5a의 발현량 또는 활성이 감소한 경우 상기 시험물질은 인슐린 분비 촉진용 조성물로 판정될 수 있다.

[0056] 본 명세서에서 용어 “활성 또는 발현량의 감소”는 Wnt5a에 의해 유도되는 β -세포에서의 β -카테닌 단백질 인산화 및 Wnt/ β -카테닌 경로 활성화가 유의하게 억제되어 췌장암 환자에서의 인슐린 분비 저하가 측정 가능한 수준으로 개선될 정도로 Wnt5a의 발현량 또는 생체 내 고유한 기능이 감소하는 것을 의미한다. 활성(activity)의 감소는 단순한 기능(function)의 감소 뿐 아니라 안정성(stability)의 감소로 기인한 궁극적인 활성 저해를 포함한다. 구체적으로는 상기 시험물질을 처리하지 않은 대조군에 비하여 활성 또는 발현량이 20% 이상 감소한 상태, 보다 구체적으로는 40% 이상 감소한 상태, 더욱 구체적으로는 60% 이상 감소한 상태를 의미할 수 있다.

[0057] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 조성물은 췌장암 환자에서의 인슐린 분비 촉진용 조성물이다.

발명의 효과

[0059] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0060] (a) 본 발명은 췌장암 발병 예측용 조성물, 당뇨병 환자에서의 췌장암 진단용 조성물 및 췌장암을 수반하는 당뇨병의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0061] (b) 본 발명은 혈장의 Wnt5a 수준 측정을 통해 췌장암이 임상적으로 발병하지 않은 미확진 대상체의 향후 발병 위험성을 높은 신뢰도로 예측함으로써 치료 전략의 조기 수립 및 환자의 생존율 개선에 유용하게 이용될 수 있다.

[0062] (c) 본 발명은 또한 현재 발병한 당뇨병이 단순한 대사질환인지 혹은 췌장암에 의해 촉발된 고혈당 상태인지를 식별할 수 있는 원인 질환 선별용 바이오마커로 적용됨으로써 중요한 임상 정보를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0064] 도 1은 PDAC 및 비-PDAC 환자의 당대사 및 조직병리학적 특성을 보여주는 그림이다. PDAC와 비-PDAC 환자 간의 전당뇨와 당뇨; 당뇨; 및 신규 당뇨의 발병(도 1a), 2시간 OGTT 동안의 혈청 글루코스 수준(도 1b), HbA1c(도 1c), 2시간 OGTT 동안의 혈청 인슐린수준(도 1d), HOMA- β (도 1e), 인슐린 생성 지수(도 1f) 및 인슐린 분비 지수(도 1g)를 비교하였다. 도 1h는 인슐린에 대한 대표적 면역조직화학 염색 결과를 보여준다. 도 1i는 췌장 절제 표본 중 인슐린-양성 영역의 비율을 나타낸다. 모든 데이터는 4분위 영역으로 나타내었다. *비-PDAC 대비 $P < 0.05$; NS, 통계적 유의성 없음. HbA1c, 당화 헤모글로빈 A1c; HOMA- β , β -세포 기능에 대한 항상성 모델 평가; OGTT, 경구당부하검사; PDAC, 췌장선암.

도 2는 췌장절제술 14일 후의 당대사 파라미터 변화를 보여주는 그림이다. 도 2a는 PDAC 및 비-PDAC 그룹에서 PPPD 전 및 14일 후의 BMI를 보여준다. 도 2b는 PPPD 수술전 대비 14일 후의 BMI 변화를 나타낸 그림이다. 도 2c는 PDAC 및 비-PDAC 그룹에서 PPPD 전 및 14일 후 2시간 OGTT 동안 혈청 글루코스 수준을 나타낸다. 도 2d는 수술 전 대비 PPPD 14일 후 2시간 OGTT 동안 혈청 글루코스 수준을 나타낸다. 도 2e는 PPPD 전 및 14일 후 PDAC 및 비-PDAC 그룹에서의 HbA1c를 보여주는 그림이다. 도 2f는 수술 전 대비 PPPD 14일 후의 HbA1c를 나타낸 그림이다. 도 2g는 PDAC 및 비-PDAC 그룹에서 PPPD 전 및 14일 후 2시간 OGTT 동안 혈청 인슐린수준을 나타낸 그림이다. 도 2h는 수술 전 대비 PPPD 14일 후의 2시간 OGTT 동안 혈청 인슐린 수준의 차이를 보여주는 그림이다. 도 2i는 PPPD 전 및 14일 후의 PDAC 및 비-PDAC 그룹에서 2시간 OGTT 동안의 인슐린 AUC를 나타낸다. 도 2j는 수술 전 대비 PPPD 14일 후의 2시간 OGTT 동안의 인슐린 AUC 차이를 나타낸다. 도 2k는 PPPD 전 및 14일 후의 PDAC 및 비-PDAC 그룹에서의 인슐린 생성 지수를 나타낸다. 도 2l은 수술 전 대비 PPPD 14일 후의 인슐린 생성 지수 차이를 보여준다. 도 2m은 PDAC 및 비-PDAC 그룹에서 PPPD 전 및 14일 후의 HOMA-IR를 보여준다. 도 2n은 수술 전 대비 PPPD 14일 후의 HOMA-IR의 차이를 보여주는 그림이다. 도 2o는 PDAC 및 비-PDAC 그룹의 수술 전과 PPPD 14일 후의 Matsuda 지표를 나타낸 그림이다. 도 2p는 수술 전 대비 PPPD 14일 후의 Matsuda 지표의 차이를 보여주는 그림이다. 모든 데이터는 사분 범위의 중앙값으로 나타내었다. * $P < 0.05$; NS, 통계적 유의성 없음. AUC, 곡선 밑 면적; BMI, 체질량지수; HbA1c, 당화 헤모글로빈 A1c; HOMA-IR, 인슐린 저항성의 항상성 모델 평가; OGTT, 경구당부하검사; PDAC, 췌장선암; PPPD, 유문보존 췌두부절제술; Pre, 수술전 상태;

Post 14D, 수술 후 14일 뒤 상태.

도 3은 췌장의 β -카테닌 발현과 이의 수술 전 당대사 파라미터와의 관련성을 보여주는 그림이다. 도 3a는 당뇨에 걸렸거나 걸리지 않은 PDAC 및 비-PDAC 환자의 췌장 조직을 이용한 β -카테닌(녹색) 및 인슐린(붉은색)에 대한 대표적 면역형광 염색 이미지를 보여준다. 스케일바, 100 μ m. 도 3b는 PDAC 및 비-PDAC 그룹에서의 췌장 β -카테닌 발현을 나타낸 그림이다. 도 3c는 PDAC 및 비-PDAC 그룹에서 당뇨 상태에 따른 췌장 β -카테닌 발현을 보여주는 그림이다. PDAC 및 비-PDAC 환자에서 췌장 β -카테닌 발현과 글루코스(도 3d), HbA1c(도 3e), HOMA- β (도 3f) 및 인슐린 생성 지수(도 3g) 간의 관련성을 각각 상관 행렬로 나타내었다. 췌장 β -카테닌 발현은 ImageJ 소프트웨어로 정량화된 소도 영역 당 β -카테닌 통합 신호 밀도로 나타내었다. 각 슬라이드 단면에서 배율 x 200로 관찰된 모든 소도(환자당 평균 6-7 islets)를 통계적 분석에 사용하였다. * $P < 0.05$; NS, 통계적 유의성 없음. HbA1c, 당화 헤모글로빈 A1c; HOMA- β , β -세포 기능의 항상성 모델 평가; PDAC, 췌장선암.

도 4는 Wnt-5a 수준과 이의 수술 전 당대사 파라미터와의 관계를 보여주는 그림이다. 도 4a는 PDAC 및 비-PDAC 환자의 췌장 조직에서 수득한 Wnt5a(붉은색)와 췌관상피세포 마커인 사이토케라틴 8+18+19(녹색)에 대한 대표적 면역형광 염색 이미지를 보여준다. 스케일바, 50 μ m. 도 4b는 PDAC 및 비-PDAC 그룹(47명의 PDAC 및 53명의 비-PDAC 환자)에서의 혈장 Wnt5a 수준을 나타낸다. PDAC 환자에서 수술전 혈장 Wnt5a 수준과 PDAC 종양 크기(도 4c) 및 소도 면적당 통합 신호 밀도(도 4c) 간의 관계를 상관 행렬로 나타내었다. PDAC 및 비-PDAC 환자에서 혈장 Wnt5a 수준과 HbA1c(도 4e), HOMA- β (도 4f) 및 인슐린 생성지수(도 4g) 간의 관계를 상관 행렬로 나타내었다. * $P < 0.05$. HbA1c, 당화 헤모글로빈 A1c; HOMA- β , β -세포 기능에 대한 항상성 모델 평가; PDAC, 췌장선암.

도 5a는 인슐리노마 β -세포에서 Wnt5a 처리(4시간 동안 500 ng/mL) 후 웨스턴 블롯 분석 및 β -카테닌의 인산화 형태의 정량화 결과를 보여주는 그림이다. β -액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다. 도 5b는 PDAC 및 비-PDAC 환자의 췌장 조직을 이용한 E-카드헤린(녹색) 및 인슐린(붉은색)에 대한 면역형광 염색 결과를 나타낸다. * $P < 0.05$. 배율, 400x. 스케일바, 100 μ m.

도 6a는 코호트 환자 선정과정을 보여주는 모식도이다. 도 6b는 비-PDAC로 진단된 환자의 구성을 요약한 그림이다. 도 6c는 PDAC 및 비-PDAC 환자가 받은 수술의 형태를 나타낸다. 도 6d는 췌장암에서의 유전자 온톨로지 증폭 분석 결과를 보여준다. 도 6e는 당뇨의 생물학적 진행에 대한 정규화된 증폭 점수를 나타낸다.

도 7은 췌장절제술 1년 후의 당대사 파라미터 변화를 보여주는 그림이다. 도 7a는 PPPD 1년 후 PDAC 및 비-PDAC 그룹의 BMI를 나타낸다. 도 7b는 수술전 대비 PPPD 1년 후의 BMI 차이를 보여주는 그림이다. 도 7c는 2시간 OGTT 동안의 PDAC 및 비-PDAC 그룹에서의 PPPD 전 및 1년 후의 혈청 글루코스 수준을 나타낸다. 도 7d는 수술전 대비 PPPD 1년 후의 2시간 OGTT 동안의 혈청 글루코스 수준의 차이를 보여주는 그림이다. 도 7e는 PPPD 전 및 1년 후의 PDAC 및 비-PDAC 그룹에서의 HbA1c를 나타낸 그림이다. 도 7f는 수술전 대비 PPPD 1년 후의 HbA1c를 나타낸 그림이다. 도 7g는 PDAC 및 비-PDAC 그룹에서 2시간 OGTT 동안의 PPPD 전 및 1년 후의 혈청 인슐린 수준을 보여주는 그림이다. 도 7h는 수술전 대비 PPPD 1년 후의 2시간 OGTT 동안의 혈청 인슐린 수준의 차이를 보여주는 그림이다. 도 7i는 PDAC 및 비-PDAC 그룹에서 PPPD 전 및 1년 후의 HOMA- β 를 보여주는 그림이다. 도 7j는 수술전 대비 PPPD 1년 후의 HOMA- β 의 차이를 보여주는 그림이다. 도 7k는 PDAC 및 비-PDAC 그룹에서 PPPD 전 및 1년 후의 HOMA-IR를 보여주는 그림이다. 도 7l은 수술전 대비 PPPD 1년 후의 HOMA-IR 차이를 나타낸 그림이다. 모든 데이터는 4분위간 범위 내 중앙값으로 나타내었다. * $P < 0.05$; NS, 통계적 유의성 없음. AUC, 곡선 밑 면적; BMI, 체질량지수; HbA1c, 당화 헤모글로빈 A1c; HOMA- β , β -세포 기능에 대한 항상성 모델 평가; HOMA-IR, 인슐린 저항성에 대한 항상성 모델 평가; OGTT, 경구당부하검사; PDAC, 췌장선암; PPPD, 유문보존 췌두부절제술; Pre, 수술전 상태; Post 1Yr, 수술 1년 후 상태.

도 8은 췌장에서의 β -카테닌 발현 및 수술 전 당대사 파라미터와의 관련성을 보여주는 그림이다. PDAC 및 비-PDAC 환자에서의 췌장 β -카테닌 발현과 2h OGTT 동안의 120분 췌의 글루코스(도 8a), 2h OGTT 동안의 글루코스 AUC(도 8b), 공복 인슐린(도 8c), 2h OGTT 동안의 120분 췌의 인슐린(도 8d), 2h OGTT 동안의 인슐린 AUC(도 8e), HOMA-IR(도 8f) 및 인슐린 분비지수(도 8g) 간의 관계를 상관행렬로 나타내었다. 도 8h는 PDAC 환자에서 췌장 β -카테닌 발현과 PDAC 종양 크기 간의 관계를 보여주는 상관행렬이다. 췌장 β -카테닌 발현은 ImageJ 소프트웨어로 정량화된 소도(islet) 면적당 β -카테닌 통합 신호밀도로 측정하였다. 41명 환자의 각 슬라이드 단면에서 관찰된 모든 소도(환자당 평균 6-7 islets, 배율 x 200)를 통계적 분석에 사용하였다. * $P < 0.05$; NS, 통계적 유의성 없음. AUC, 곡선 밑 면적; HbA1c, 당화 헤모글로빈 A1c; HOMA-IR, 인슐린 저항성의 항상성 모델 평가; OGTT, 경구당부하검사; PDAC, 췌장선암.

도 9는 혈장 Wnt-5a 수준과 이의 수술 전 당대사 파라미터와의 관련성을 보여주는 그림이다. 수술전 혈장 Wnt5a 수준과 2h OGTT 동안의 글루코스 AUC(도 9a), 2h OGTT 동안의 인슐린 AUC(도 9b), Mastuda 지표(도 9c) 및 PDAC와 비-PDAC 환자의 인슐린 분비지수(도 9d) 간의 관련성을 상관행렬로 나타내었다. *P<0.05. AUC, 곡선 밑 면적; OGTT, 경구당부하검사; PDAC, 췌장선암.

도 10은 혈장 Wnt-5a 수준 및 이의 췌장절제술 후의 당대사 파라미터와의 관련성을 보여주는 그림이다. 도 10a는 PPPD 전 7일 또는 이후 14일째의 PDAC 및 비-PDAC 그룹에서의 혈장 Wnt5a 수준을 나타낸다. PPPD 7일 또는 14일 후의 혈장 Wnt5a 수준과 HbA1c(도 10b) 및 인슐린 생성지수(도 10c) 간의 관계를 수술 전 PDAC 및 비-PDAC 그룹과 비교하여 상관 행렬로 각각 나타내었다. PDAC 및 비-PDAC 환자에서 수술 전 혈장 Wnt5a 수준과 공복 혈당(도 10d), HbA1c(도 10e), HOMA- β (도 10f) 및 HOMA-IR(도 10g)의 PPPD 1년 후 및 수술 전의 차이 간의 관계를 상관 행렬로 각각 나타내었다. 각 파라미터의 차이는 [수술후 값-수술전 값]으로 계산하였다. HbA1c, 당화 헤모글로빈 A1c; HOMA- β , 항상성 모델 평가 for β -세포 기능; HOMA-IR, 인슐린 저항성에 대한 항상성 모델 평가; OP., 수술; PDAC, 췌장선암; PPPD, 유문보존 췌두부절제술.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

실험방법

실험 참가자

강남 세브란스병원에서 2014년 12월부터 2019년 2월까지 췌장절제술, 주로 유문보존 췌두부절제술(PPPD)을 받은 160명 환자(72명의 PDAC 환자, 88명의 비-PDAC 환자)로 구성된 전향적 코호트를 구축하였다(도 6a). 다음의 환자는 제외되었다: (i)신경내분비성 췌장종양으로 진단받은 환자(n=4), (ii) 선암종 외의 췌장암(예를 들어 점액 유상피암종, 선형평상피암종)(n=3), 및 (ii) 수술 전 스테로이드를 투여한 환자(n=1). 당뇨는 미국당뇨병학회 가이드라인의 2019년 개정판(American Diabetes, 2019)에 기반하여 정의하였다. 전당뇨(Prediabetes)는 다음과 같이 정의하였다: 공복 혈당 100-125mg/dL 또는 식후 2시간 뒤 혈당 140-199mg/dL 또는 HbA1c 5.7-6.4%. 신규 당뇨는 코호트 선발 전 2년 이내에 당뇨로 진단받은 경우로 정의하였고, 최근 악화된 당뇨는 코호트 선발 1년 미만 전 이내에 인지된 당뇨 환자에서의 비조절성(uncontrolled) 고혈당증이 진행된 경우로 정의하였다. 160명 환자의 특성은 표 1에 정리하였으며, 연구과정은 임상연구윤리위원회의 승인(3-2014-0024)을 받았다.

표 1

PDAC와 비-PDAC 대상자 간의 기저 특성 비교

	전체 대상자 (n=160)	비 PDAC인 대상자 (n=88)	PDAC인 대상자(n=72)	P-값
연령 (yr)	64 [57, 72]	63 [57, 71]	65 [57, 72]	0.644
남성 (n, %)	94 (58.8)	53 (60.2)	41 (56.9)	0.675
Pre-DM 및 DM(n, %)	124 (77.5)	62 (70.5)	62 (86.1)	0.018
DM (n, (%))	75 (46.9)	35 (39.8)	40 (55.6)	0.047
신규발병 당뇨(n, (%)) [§]	40 (25.6)	17 (19.3)	23 (31.9)	0.012
신규발병 또는 최근 악화된 당뇨 (n, %) [§]	56 (35.0)	23 (26.1)	33 (45.8)	0.009
급성 또는 만성 췌장염	7 (4.6)	5 (6.0)	2 (2.9)	0.454
BMI (kg/m ²)	23.8 ± 3.0	23.3 ± 3.2	23.6 ± 2.8	0.600
2hr OGTT				
글루코스 0 min	112 [101, 136]	106 [96, 119]	123 [106, 148]	< 0.001
글루코스 120 min	220 [158, 318]	181 [143, 247]	300 [218, 349]	< 0.001
글루코스 0~120 min AUC	24285 [18885, 30195]	21758 [17689, 26779]	27600 [22838, 33173]	0.001

인슐린 0 min (mIU/mL)	6.4 [4.1, 11.0]	7.6 [4.3, 12.4]	6.0 [3.9, 10.3]	0.063
인슐린 120 min (mIU/mL)	34.7 [17.5, 63.9]	45.4 [21.8, 78.1]	27.7 [14.4, 48.9]	0.026
인슐린 0~120 min AUC	3589 [1843, 6095]	4679 [3192, 8284]	2366 [1192, 3652]	< 0.001
HbA1c (%)	5.8 [5.4, 6.9]	5.6 [5.2, 6.4]	6.2 [5.6, 8.1]	< 0.001
공복 C-펩타이드 (ng/mL)	2.25 [1.61, 3.71]	2.58 [1.78, 4.40]	2.00 [1.44, 2.84]	0.013
공복 글루카곤 (pg/mL)	178 [106, 256]	185 [90, 287]	177 [108, 228]	0.468
중성지방 (mg/dL)	133 [84, 191]	140 [83, 217]	127 [84, 161]	0.170
HDL-콜레스테롤 (mg/dL)	39 [31, 47]	37 [31, 45]	41 [32, 49]	0.115
LDL-콜레스테롤 (mg/dL)	112 [89, 140]	113 [90, 141]	108 [86, 141]	0.578
총 빌리루빈(bilirubin) (mg/dL)	0.9 [0.6, 2.4]	0.9 [0.6, 2.2]	0.1 [0.6, 2.6]	0.464
γ -글루타밀 트랜스퍼라제 (U/L)	565 [19, 257]	65 [19, 205]	67 [18, 335]	0.508
eGFR (CKD-EPI) (mL/min/1.73m ²)	101.0 [88.0, 118.8]	98.5 [85.3, 117]	101.5 [93.3, 126.8]	0.070
항상성 모델 평가	전체 대상자 (n=131)	비 PDAC인 대상자 (n=72)	PDAC인 대상자 (n=59)	P-값
HOMA-IR (mg/dL*mIU/mL)	1.9 [1.1, 3.2]	1.8 [1.1, 3.5]	1.9 [1.1, 3.1]	0.660
HOMA- β (%)	48.5 [27.4, 81.0]	63.0 [36.3, 95.1]	33.6 [23.1, 63.9]	< 0.001
인슐린 민감성 및 분비 지수	전체 대상자 (n=83)	비 PDAC인 대상자 (n=46)	PDAC인 대상자 (n=37)	P-값
Matsuda 지수	4.9 [3.2, 7.6]	4.2 [3.2, 6.8]	6.4 [3.1, 8.1]	0.127
인슐린 생성지수 (μ U/mL*mg/dL-1)	0.30 [0.07, 0.54]	0.39 [0.17, 0.63]	0.12 [0.04, 0.34]	0.001
DI(Disposition index)	0.93 [0.32, 2.30]	1.81 [0.56, 2.99]	0.49 [0.20, 1.47]	0.001
췌장에 대한 조직학적 평가	전체 대상자 (n=74)	비 PDAC인 대상자 (n=47)	PDAC인 대상자 (n=27)	P-값
	15 [3, 35]	12 [3, 24]	33 [8, 58]	0.001

[0072] 데이터는 평균±표준편차 또는 중앙값으로 나타내었다[사분범위]. P-값은 Student' t-검정 또는 만-휘트니 U-검정을 적절하게 사용하여 수술전 및 1년 후 사이의 PDAC 환자와 비-PDAC 환자 간의 차이를 비교한 것이다. $p < 0.05$ 인 경우 통계적 유의성을 가지는 것으로 간주하였다. * $P < 0.05$ 는 각 그룹의 수술전 상태, # $P < 0.05$ 는 비-PDAC 대상자와 비교한 값이다.

[0074] 세포

[0075] 인슐리노마 β -세포주, Min6 세포는 10% 우태아 혈청(FBS)과 항생제(100*?U/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신)가 보충된 DMEM(GibcoTM, Life Technologies Corporation)에서 유지하였다. 이들 세포는 연세대학교 의과대학의 이명식 교수로부터 공급받았다.

[0077] 췌장 시료의 수집

[0078] 인간 췌장 표본은 강남세브란스병원에서 췌장절제술 과정 중 취득하여 조직학적 분석에 사용하였다. 모든 췌장 조직은 포르말린으로 고정하고 파라핀 포매하여 냉동된 췌장 표본으로 만들었다.

[0080] 조직학적 분석

[0081] 췌장을 5mm×5mm 절편으로 썰고 10%의 중성용액으로 완충된 포르말린에 48시간 동안 고정시킨 뒤 파라핀에 포매하였다. 마이크로톰(Reichert Scientific Instruments, Buffalo, NY)을 이용하여 조직 단면(4 μ m)을 제작하고 유리 슬라이드위에 놓았다. Masson 삼색 염색으로 췌장 섬유화를 측정하였다. 인슐린의 면역조직화학 염색을 위해 파라핀 단면을 자르고 자일렌과 에탄올로 탈파라핀화하였다. BLOXALL 용액(SP-6000, Vector laboratories, Burlingame, CA)으로 22±2° C에서 10분간 내재적 퍼옥시다제를 불활성화시킨 후, 시료를 10% 정상 고트 혈청으로 1시간 동안 블로킹하였다. 이후 조직을 마우스 항-인슐린 항체(1:1000, I2018, Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO)와 함께 4℃에서 밤새 배양하였다. 세척 후, 조직을 적절한 2차 항체(HRP-접합 고티 항-마우스 IgG, 1:200, PI-200, Vector laboratories)와 함께 2시간 동안 상온에서 배양하였다. 단면을 3,3'-디아미노벤지딘(DAB, SK-4100, Vector laboratories)과 함께 5분간 배양하고 헤마톡실린으로 대조염색하였다. 염색된 단면을 슬라이드 스캐너(Leica SCN400F, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany)로 스캐닝하고 및 이미지 뷰어(SCN400image viewer version 2.2, Leica Microsystems CMS GmbH)로 슬라이드 이미지를 캡처하였다. 이미지는 ImageJ 프로그램(version 1.8.9_112, <http://imagej.nih.gov/ij/>, NIH, Bethesda, MD)으로 분석하였다. 단면 이미지 내에서 역치를 조정된 뒤, 역치 위의 표면적의 백분율을 측정하여 절대적 인슐린-염색 부위 및 인슐린 양성 염색 부위의 총 면적의 백분율을 계산하였다.

[0083] 면역형광 염색

[0084] 파라핀 시료를 잘라 평균 두께가 5μm가 되도록 하였다. 탈파라핀화 후 시트르산 완충액(pH 6.0)으로 항원 복구를 수행하였다. 단면은 PBS로 세척하고, PBS 내 0.2% 트리트론 X-100을 10분간 처리한 뒤, 블로킹 용액(PBS with 10% 정상 동키 혈청) 내에서 1시간 동안 배양하였다. 슬라이드를 마우스 항-인슐린 항체(1:500) 및 래빗 항-β-카테닌 항체(A302-010A, 1:100, bethyl Laboratories, Montgomery, TX) 또는 래빗 항-Wnt5a 항체(ab174963, 1:50, Abcam®, Cambridge, MA) 또는 마우스 항-사이토케라틴 8+18+19 (ab41825, 1:50, Abcam®) 항체와 함께 4℃에서 밤새 배양하였다. PBS로 5분간 3회 세척한 뒤 슬라이드를 블로킹 완충액에서 Cy3-접합 동키 항-마우스 IgG 항체(Cy™3 AffiniPure, Cat.# 715-165-151, 1:1000, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 및 FITC-접합 동키 항-래빗 IgG 항체(FITC AffiniPure, Cat.# 711-095-152, 1:1000, Jackson ImmunoResearch)와 함께 상온에서 30분 간 각각 배양하였다. 단면은 세척 후 형광 마운팅 배지와 함께 커버슬립을 덮었다. Zeiss 레이저 주사 공초점현미경(LSM 780, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 형광 이미지를 캡처하였다. 모든 이미지는 12-bit, 1024×1024 어레이의 동일한 획득 파라미터를 이용하여 획득하였다. ImageJ 소프트웨어를 이용하여 인슐린, β-카테닌 및 Wnt5a에 대한 면역형광 염색의 상대적 수준을 정량하였다.

[0086] 생화학적 측정

[0087] 환자들은 제창절제술 직전, 2주 뒤 및 1년 뒤에 75g 경구당부하검사(OGTT)를 받았다. 밤새 금식한 뒤, 0, 30, 60, 90 및 120분 샘플링을 하면서 75g 경구 OGTT를 수행하여 혈장 글루코스 및 인슐린 수준을 측정하였다. 밤새 금식한 뒤 및 정상 식사 후 2시간 뒤 당대사 지표를 포함한 혈청 생화학 파라미터를 평가하였다. 747 Automatic Analyzer(Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용한 글루코스 산화효소 방법을 통해 혈장 글루코스를 측정하였다. 효소측색방법(Hitachi 747, Daiichi, Tokyo, Japan)으로 총 콜레스테롤, 중성지방 및 고밀도 지단백질 콜레스테롤(HDL-C) 수준을 정량하였다. 저밀도 지단백질 콜레스테롤 함량(LDL-C)을 프리데발트 공식(Friedewald et al., 1972)으로 계산하였다. HbA1c 수준을 HPLC (high-performance liquid chromatography, Cobas Integra 800, Roche, Mannheim, Germany)로 측정하였다. 인슐린 및 글루카곤 수준은 방사면역어세이 방법(Roche Diagnostics for insulin; MP Biomedicals for glucagon)으로 측정하였다.

[0089] 대사 평가

[0090] β-세포 기능의 항상성 모델 평가(HOMA-β) 및 인슐린 저항성의 항상성 모델 평가(HOMA-IR)를 계산하였다(Matthews et al., 1985). Matsuda 지표는 $10,000/\sqrt{(\text{공복 혈당} \times \text{공복 인슐린} \times \text{평균 글루코스} \times \text{평균 인슐린})}$ (Matsuda and DeFronzo, 1999)로 정의하였다. 인슐린 생성 지수는 $(\text{인슐린 [30분]} - \text{인슐린 [0분]})/(\text{글루코스 [30분]} - \text{글루코스 [0분]})$ 의 공식으로 계산하였다(Stumvoll et al., 2000). OGTT로부터 획득한 인슐린 분비 지수를 이용하여 종합적인 인슐린 분비 정도 및 인슐린 민감성을 평가하여 Matsuda 지표 x 인슐린 생성 지수를 계산하였다(Oh et al., 2019).

[0092] 글루코스 항상성의 인 비보 어세이

[0093] 배양된 소도 세포에서의 글루코스로 자극된 인슐린 분비(GSIS)를 종래에 보고된 방법(Park et al., 2019)으로 분석하였다. 15개의 균일한 크기의 소도(islets)를 골라 분석에 사용하였다. 이들 소도를 2.8 mM 글루코스와 함께 1시간 동안 KRBB(Krebs Ringer Bicarbonate Buffer)에서 배양하고 5.6 또는 20mM 글루코스로 각 1시간 동안 자극하였다. 각 배양 완충액의 상등액을 수집하고 분비된 인슐린을 정량하였다. 동일한 세트의 소도를 사용하여 총 인슐린 함량을 측정하였다. 요약하면, 소도를 24시간 동안 4℃에서 0.2M HCl를 함유하는 75% 산성-에탄올에서 배양하고 상등액으로 분석을 수행하였다. GSIS의 정도를 분비 백분율로 표현하였으며, KRBB에서 분비된 인슐린 양을 동일한 배치 내 총 인슐린 함량으로 나누어 계산하였다.

- [0095] *Wnt5a*의 ELISA
- [0096] 오리지널 코호트의 26명 환자 혈장 시료에 더하여, 추가적인 26명 환자의 혈장 시료로 혈장 내 Wnt5a 기저수준 및 PPPD 7일 후 수준을 측정하였다. 이들 환자는 PPPD 14일 뒤 혈액 채취를 하지 않았으므로 오리지널 코호트엔 포함되지 않았으나, 7일째엔 채취를 하였다. Wnt5a의 혈장 수준을 ELISA 키(catalog #SEP549Hu, Cloud-Clone Corp., Houston, TX)으로 제조자의 지시에 따라 정량하였다. 엑스 비보 분석을 위해 배양 상등액의 인슐린 수준을 ELISA 키(80-INSMH-E01, ALPCO., Salem, NH)으로 측정하였다.
- [0098] 웨스턴 블롯 분석
- [0099] Min6 세포를 지정된 시간 동안 Wnt5a 500mg/ml로 자극하고 세포를 세척한 뒤 프로테아제 억제제 및 포스파타아제 억제제 카테일을 포함하는 용해 완충액에 행구었다. 종래 보고된 방법(Choi et al., 2016)에 따라 항-phospho- β -카테닌(Ser33/37/Thr41, Cat.#9561, 1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA), 항- β -카테닌(Cat.A302-010A, 1:100-1:1000, bethyl laboratories, Montgomery, TX) 및 항- β -액틴(Cat.A3854, 1:30000, Sigma Aldrich, St Louis, MO) 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다.
- [0101] 유전자 온톨로지 증폭 분석
- [0102] 췌장암(Pei et al., 2009) 및 당뇨병(Marselli et al., 2010) 관련 GEO(Gene Expression Omnibus)의 공공 데이터베이스 라이브러리로부터 마이크로어레이 데이터 세트를 획득하였다. 유전자 세트 증폭분석(GSEA) 및 유전자 온톨로지(GO) 증폭분석을 적용하여 이들 데이터 세트로부터 상이하게 발현되는 유전자(DEG)를 선정하였다. 유전자 세트는 MSigDB(Molecular Signatures Database)의 GO 및 홀마크 유전자 세트에 기반하여 정의하였다. Java GSEA version 3.0 플랫폼을 이용하여 GSEA를 수행함으로써 초기하 검정을 통해 증폭된 경로와 DEG에 대한 증폭된 GO를 동정하였다.
- [0104] 통계적 분석
- [0105] 데이터는 정규적으로 분포된 연속적인 변수에 대해 평균±표준편차(SD)로, 비-정규적으로 분포된 연속적인 변수에 대해 사분범위(IQR)의 중앙값으로, 카테고리 변수에 대해 백분율 수로 표시하였다. 데이터가 정규적으로 분포되었는지 여부는 콜모코르프-스미르노프 검정으로 결정하였다. 스피어만 상관계수를 사용하여 β -카테닌 또는 Wnt5a 발현 수준과 당대사 파라미터 간의 상관 정도를 측정하였다. 엑스 비보 실험을 위해 데이터를 평균±표준오차로 표시하였다. 통계적 유의성은 독립 *t*-검정 또는 만-휘트니 U-검정을 이용하여 판단하였다. $P < 0.05$ 인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다. 모든 통계적 분석은 SPSS 소프트웨어 버전 23.0(IBM Corp., Armonk, NY)을 이용하여 수행하였다.
- [0107] 실험결과
- [0108] PDAC는 당뇨병의 신규 발병 및 인슐린 분비 기능 감소와 유의하게 연관된다
- [0109] 췌장절제술 코호트에서 전향적으로 선발된 160명의 환자 중 72명은 PDAC 환자이고 나머지 88명은 비-PDAC 환자였다(도 6a). 기저 특성 및 수술 전의 대사 및 조직학적 평가 결과는 표 1에 정리하였다. 비-PDAC 그룹의 개별 임상적 진단결과는 도 6b에 표시하였다. 비-PDAC 개체와 비교하여 PDAC 환자는 당뇨병 유병률이 높았으며(55.6% vs 39.8%; $p=0.047$), 신규 환자(< 2년)의 비율이 높았다(31.9% vs 19.3; $p=0.012$)(도 1a). 비-PDAC 환자와 비교하여 PDAC 환자는 공복 및 식후 혈당, OGT 동안의 글루코스 곡선 밑 면적(AUC) 및 HbA1c와 같은 고혈당증 지표가 나뉘었다(도 1b 및 1c, 표 1). PDAC 그룹은 또한 현저히 낮아진 인슐린 분비 기능을 보여, 비-PDAC 그룹보다 감소된 공복 c-펩타이드, 식후 인슐린, OGTT 동안의 인슐린 AUC, HOMA- β , 인슐린 생성 지수 및 인슐린 분비 지수를 나타냈다($p < 0.05$, 도 1d-1g, 표 1). 그럼에도, 수술 후 췌장 표본에 대한 조직학적 분석 결과 인슐린-염색된 β -세포 영역엔 두 그룹 간 유의한 차이가 없었으며(도 1h 및 1i) HOMA-IR 및 Matsuda 지표를 포함한 인슐린 저항성-관련 파라미터에도 차이가 없었다(표 1).
- [0111] PDAC 환자에서의 중앙 제거에 의해 고혈당증과 β -세포 기능장애가 개선된다
- [0112] 수술 후 대사특성의 변동을 분석하기 위해, 유문보존 췌두부절제술(PPPD)을 받은 환자의 데이터를 분석하여 외과적 조건을 통합하였다(전체 대상자 중 $n=106$ (66.3%); 도 6c). PPPD 14일 및 1년 뒤 당대사 파라미터의 변화를 표 2와 S3에 각각 정리하였다. PPPD 14일 뒤, 체질량지수(BMI)는 PDAC 및 비-PDAC 그룹($p < 0.001$, 도 2a) 모두에서 감소하였으나, BMI 감소 정도는 두 그룹간 유의한 차이를 보였다($p=0.129$, 도 2b). PDAC 및 비-PDAC 그룹 모두에서, 글루코스 AUC와 HbA1c 수준은 수술 14일 뒤 유의하게 감소하였다(도 2c 및 2e, 표 2). PDAC 그룹은 식후 글루코스(-61 vs -23 mg/dL, $p=0.002$) 및 HbA1c(-0.4 vs -0.1%, $p=0.015$) 수준이 비-PDAC 그룹에 비

해 현저히 감소하였다(도 2d 및 2f, 표 2). OGTT 동안의 인슐린 AUC와 같은 인슐린 분비지수와 인슐린 생성 지수는 PPPD 이후 비-PDAC 그룹에서만 유의하게 감소하고, PDAC 그룹에선 변화가 없었다(도 2f-2i, 표 2). HOMA-IR 및 Matsuda 지표의 개선 정도는 PDAC 및 비-PDAC 그룹 간 차이가 없었다(도 2m-2p). PDAC 군에서 인슐린 분비 지수가 유의하게 개선된 반면, 비-PDAC 그룹에서는 PPPD 후 14일째에도 변화가 없었다(표 2).

표 2

PPPD 14일 후 당대사 파라미터의 변화

	비 PDAC인 대상자(n=58)			PDAC인 대상자 (n=39)			P-값
	Pre	Post 14d	Diff.	Pre	Post 14d	Diff.	
BMI (kg/m ²)	24.2 ± 3.2	23.5 ± 3.2*	-1.0 [-1.7, -0.4]	23.4 ± 2.7	22.6 ± 2.7*	-0.8 [-1.3, -0.32]	0.129
2hr OGTT							
글루코스 0 min	106[96, 115]	113[104, 136]*	8[-4, 22]	120[106, 152] [#]	127[110, 149]	0[-1.6, 16]	0.085
글루코스 120 min	191[151, 243]	174[139, 223]	-23 [-54, 10]	297[213, 352] [#]	199[158, 274]*	-61[-108, -30]	0.002
글루코스 0~120 min AUC	23985 ± 7667	19260 [17359, 24510]*	-3233[-7714, 863]	28155 ± 8086	23235[18180, 27225]*	-4335[-7995, -2168]	0.311
인슐린 0 분 (mcIU/mL)	8.4 [4.8, 13.1]	4.8[3.0, 7.6]*	-2.5 [-7.7, 0.0]	5.4[3.8, 10.5]	4.7[2.9, 6.6]*	-1.8[-4.4, 0.0]	0.239
인슐린 120 min (mc IU/mL)	43.5 [22.5, 74.6]	18.7 [11.5, 29.8]*	-23.1 [-42.4, -9.3]	25.3 [12.6, 41.7] [#]	14.4[8.0, 24.8]*	-11.4 [-18.3, -2.1]	0.119
인슐린 0~120 min AUC	4346[3190, 6224]	2084[1073, 3541]*	-2103[-3014, -810]	1344 [1017, 3564] [#]	1116[801, 2787]	-239[-1191, -84]	0.002
HbA1c (%)	5.5 [5.1, 6.2]	5.3 [5.0, 5.8]*	-0.1 [-0.5, 0.1]	6.5 [5.7, 7.5] [#]	5.8 [5.4, 6.7]*	-0.4 [-1.0, -0.1]	0.015
HOMA-IR (mg/dL*mcIU/mL)	2.08[1.31, 3.61]	1.38[0.87, 2.15]*	-0.47[-2.27, 0.06]	1.87[1.19, 2.75]	1.39[1.02, 2.20]*	-0.53[-1.48, 0.06]	0.489
HOMA-β (%)	66.6 [38.8, 102.7]	40.7 [21.5, 52.0]*	-27.2 [-52.0, -2.6]	34.0 [21.5, 71.2] [#]	26.5 [16.6, 44.5]*	-12.4 [-28.9, -2.5]	0.091
Matsuda 지수	3.96 [3.21, 6.63]	8.58 [5.64, 15.12]*	3.60 [1.06, 8.74]	6.99 ± 3.71	8.86 [5.58, 15.89]*	2.13 [-1.37, 9.32]	0.588
인슐린 생성지수 (μU/mL*mg/dL ⁻¹)	0.38[0.16, 0.62]	0.21[0.08, 0.44]*	-0.10[-0.28, 0.03]	0.10[0.02, 0.36] [#]	0.09[0.05, 0.39]	0.01[-0.02, 0.07]	0.018
DI(Disposition index)	1.81 [0.61, 2.39]	1.31 [0.83, 3.09]	0.09 [-0.87, 0.99]	0.50 [0.17, 1.64] [#]	1.09 [0.42, 1.95]*	0.58 [-0.09, 1.13]	0.190

데이터는 평균±표준편차 또는 중앙값으로 나타내었다[사분범위]. P-값은 Student' t-검정 또는 만-휘트니 U-검정을 적절하게 사용하여 수술전 및 1년 후 사이의 PDAC 환자과 비-PDAC 환자 간의 차이를 비교한 것이다. p<0.05인 경우 통계적 유의성을 가지는 것으로 간주하였다. *p<0.05는 각 그룹의 수술전 상태, [#]p<0.05는 비-PDAC 대상자와 비교한 값이다.

[0117] PPPD 1년 후의 당대사 파라미터 변화는 표 3과 도 7에 나타내었다. PPPD 1년 후, PDAC 및 비-PDAC 그룹 내의 대상자에서 BMI의 다소간 감소가 있었으나 그룹 간 차이는 나타나지 않았다($p=0.108$, 도 7a 및 7b). PDAC 및 비-PDAC 그룹 모두에서, OGTT 동안 글루코스 수준은 감소하였으나(도 7c), 공복 혈당수준은 PDAC 그룹에서 유의하게 감소하였다($p=0.001$, 도 7d). 또한, HbA1c은 PDAC 그룹에서 수술 1년 후 유의하게 감소하였으나($p=0.027$) 비-PDAC 그룹(도 7e 및 7f)에서는 그렇지 않았다. 흥미롭게도, 인슐린 수준은 OGTT 동안 비-PDAC 그룹에서 감소한 반면 PDAC 그룹에서는 PPPD 후 1년간 상대적으로 보존되었다(도 7g 및 7h). HOMA- β 로 측정되는 인슐린 분비 기능은 PDAC 그룹($p=0.012$)에서 유의하게 개선되었으나 비-PDAC 그룹에서는 그렇지 않았다($p=0.642$, 도 7i). PPPD 1년 후 HOMA- β 의 변화 정도는 PDAC 그룹이 비-PDAC 그룹보다 현저하였다($p=0.008$, 도 7j). 반면, 인슐린 저항성을 반영하는 HOMA-IR는 PPPD 1년 후 PDAC 및 비-PDAC 그룹 모두에서 변화가 없었다(도 7k 및 7l). 종합하면, 이들 데이터를 통해 PPPD 1년 뒤 비-PDAC 그룹보다 PDAC 그룹에서 혈당 조절이 두드러지게 개선되며, 이에 의해 인슐린 저항성의 변화보다는 인슐린 분비 기능이 유의하게 회복됨을 알 수 있었다.

표 3

[0118] PPPD 1년 후 당대사 파라미터의 변화

	비 PDAC인 대상자 (n=30)			PDAC인 대상자 (n=28)			P-값
	Pre	Post 1yr	Diff.	Pre	Post 1yr	Diff.	
BMI (kg/m^2)	23.9 \pm 3.5	23.3 \pm 3.3*	-0.6 \pm 1.3	23.5 \pm 2.8	22.2 \pm 2.8*	-1.3 \pm 1.9	0.108
2hr OGTT							
글루코스 0분	107 [96, 117]	105 [97, 118]	1 [-13, 9]	130 [107, 155] [#]	109 [94, 120]*	-17 [-59, -2]	0.001
글루코스 120분	188 [151, 246]	140 [110, 198]*	-40 [-96, -11]	309 [195, 362] [#]	187 [140, 236]*	-77 [-139, -36]	0.123
글루코스 0~120분 AUC	25133 \pm 7967	17018 [16313, 23464]*	4808 [-6653, -1414]	31114 \pm 6604	23685 [20479, 28095]	-1455[-12465, 390]	0.954
인슐린 0분 (mcIU/mL)	7.3 [4.9, 11.0]	6.9 [4.2, 8.1]	-0.4 [-4.4, 1.8]	4.7 [3.4, 7.6]	6.4 [3.9, 9.1]	1.0[-1.4, 3.3]	0.225
인슐린 120분 (mcIU/mL)	61.1 [25.9, 89.0]	24.5 [17.0, 39.7]*	-23.0 [-71.2, 0.9]	20.5 [12.6, 173.3]	26.9 [14.5, 36.7]	3.7[-20.4, 8.8]	0.203
인슐린 0~120분 AUC	4995[3240, 8838]	3794 [3382, 5180]	-603 [-2999, 178]	1212 [954, 5449] [#]	2795 [1508, 6996]	998[-915, 2412]	0.096
HbA1c (%)	5.5 [5.0, 6.4]	5.8 [5.4, 6.2]	0.2 [-0.2, 0.6]	6.5 [5.7, 8.1] [#]	6.0 [5.4, 6.7]*	-0.3[-1.0, 0.2]	0.007
HOMA-IR (mg/dL*mcIU/mL)	3.20 [1.82, 5.78]	2.39 [1.72, 3.68]	0.55 [-0.03, 2.00]	2.70 [1.96, 4.80]	2.56 [1.62, 2.89]	0.72 [-0.04, 1.99]	0.731
HOMA- β (%)	60.9 [39.3, 89.7]	58.7 [38.5, 77.1]	-2.0 [-17.4, 13.8]	30.1 [13.8, 48.5] [#]	51.4 [18.3, 87.6]*	17.1 [4.0, 41.8]	0.017
Matsuda 지수	3.40 [2.18, 5.90]	5.95 \pm 2.66	1.41 \pm 2.51	6.59 [1.45, 7.39]	5.38 \pm 3.47	0.20 \pm 3.02	0.351
인슐린 생성지수 ($\mu\text{U/mL} \cdot \text{mg/dL}^{-1}$)	0.38 [0.17, 0.78]	0.51 [0.23, 0.91]	0.07 [-0.16, 0.16]	0.06 [0.03, 0.37] [#]	0.15 [0.06, 0.55]	0.03 [-0.01, 0.32]	0.688
DI(Disposition index)	1.87 [0.66, 4.69]	2.50 [1.18, 6.12]*	0.87 [0.32, 2.78]	0.47 [0.28, 1.05]	0.74 [0.63, 1.83]	0.34 [0.19, 0.69]	0.083

[0119] 데이터는 평균 \pm 표준편차 또는 중앙값으로 나타내었다[사분범위]. P-값은 Student' t-검정 또는 만-휘트니 U-검정을 적절하게 사용하여 수술전 및 1년 후 사이의 PDAC 환자와 비-PDAC 환자 간의 차이를 비교한 것이다. $p <$

0.05인 경우 통계적 유의성을 가지는 것으로 간주하였다. * $P < 0.05$ 는 각 그룹의 수술전 상태, # $P < 0.05$ 는 비-PDAC 대상자와 비교한 값이다.

[0121] 췌장 β -카테닌 발현은 PDAC에서 고혈당증과 인슐린 분비 기능 이상의 정도와 관련된다

[0122] PDAC와 당뇨병 소도(islet) 조직에 대한 공개된 마이크로어레이 데이터를 이용하고(도 6d 및 6e)(Marselli et al., 2010; Pei et al., 2009) wnt/ β -카테닌 경로 관련 문헌(Bordonaro, 2009; Chocarro-Calvo et al., 2013; Garcia-Jimenez et al., 2014; Lee et al., 2008; Zeng et al., 2006)을 참조하여, 본 발명자들은 PDAC-관련 고혈당증에 관여하는 후보 분자로 β -카테닌을 선정하였다. 이를 확인하기 위해 β -카테닌의 췌장 발현을 측정하고 이의 발현 수준과 다양한 당대사 파라미터 간의 상관성을 분석하였다. 모든 PPPD 환자에서 동일한 해부학적 위치를 가지는 PPPD 동안의 췌장 절제 부위를 이용하여 조직학적 분석을 수행하였다. PDAC 환자 췌장의 외분비선 뿐 아니라 β -세포 영역에서도 β -카테닌 발현이 PDAC에 걸리지 않은 개체에 비하여 유의하게 높음을 확인하였다(도 3a 및 3b). PDAC 그룹에서, 당뇨 환자는 당뇨가 없는 환자에 비해 소도의 β -카테닌 발현 정도가 매우 높은 반면($p=0.004$), 비-PDAC 그룹에서는 당뇨 상황에 따른 β -카테닌 발현 수준에 차이가 없었다($p=0.160$, 도 3c). 나아가, β -카테닌 발현 정도는 PDAC 그룹에서 공복 및 식후 혈당, 글루코스 AUC 및 HbA1c와 유의한 관련성을 보인 반면 비-PDAC 그룹에서는 관련성이 관찰되지 않았다(도 3d 및 3e, 도 8a 및 8b 및 표 4). 또한, OGTT 동안 인슐린 AUC로 측정된 인슐린 분비기능, HOMA- β 및 인슐린 생성 지수는 PDAC 그룹에서만 β -카테닌 발현 수준과 음의 상관관계를 보였다(도 3f 및 3g, 도 8c-8e 및 표 4). 아울러, 췌장 β -카테닌 발현은 PDAC 환자에서 원발 종양 크기와 유의한 연관성을 보였다(도 8h, 표 4).

표 4

[0123] 수술전 혈장 Wnt5a 수준과 당대사 파라미터 간의 관계

	비 PDAC인 대상자 (n=53)		PDAC인 대상자 (n=47)	
	r	p-값	r	p-값
연령 (years)	-0.116	0.408	0.059	0.692
BMI (kg/m^2)	-0.002	0.993	-0.173	0.444
당뇨 지속기간 (years)	-0.110	0.431	0.185	0.214
PDAC 종양 크기 (cm)	*?*	*?*	0.381	0.024
2hr 경구 글루코스 내성검사				
글루코스 0 min	-0.224	0.107	-0.046	0.759
글루코스 120 min	-0.050	0.807	0.090	0.648
글루코스 0~120 min AUC	-0.076	0.736	0.489	0.039
인슐린 0 min (mIU/mL)	-0.328	0.028	-0.237	0.126
인슐린 120 min (mIU/mL)	-0.053	0.814	-0.024	0.916
인슐린 0~120 min AUC	0.022	0.922	-0.499	0.030
HbA1c (%)	-0.070	0.623	0.379	0.009
Matsuda 지수	0.158	0.483	-0.107	0.644
HOMA-IR ($\text{mg}/\text{dL} \cdot \text{mIU}/\text{mL}$)	-0.350	0.019	-0.191	0.220
HOMA- β (%)	-0.215	0.156	-0.316	0.044
인슐린 생성지수 ($\mu\text{U}/\text{mL} \cdot \text{mg}/\text{dL}^{-1}$)	0.076	0.736	-0.649	0.005
DI(Disposition index)	0.030	0.895	-0.312	0.158
CEA (ng/mL)	-0.172	0.218	0.259	0.079
CA 19-9 (U/mL)	-0.072	0.625	0.419	0.005

[0124] 데이터는 스피어만 순위 상관계수(r)로 나타내었다.

[0126] 혈장 Wnt5a 수준을 통해 PDAC-유도 고혈당증과 비-PDAC 유도 고혈당증을 구분할 수 있다

[0127] 본 발명자들은 췌장 및 혈액에서 Wnt/ β -카테닌 경로의 신호분자인 Wnt5a 수준을 조사하고자 하였다. Wnt5a는 PDAC 환자의 췌장 조직에서 비-PDAC 환자에 비해 고발현되었으며(도 4a) 혈장의 Wnt5a 농도는 비-PDAC 그룹에 비해 PDAC 그룹에서 유의하게 증가하였다($p < 0.001$, 도 4b). 나아가, 혈장 Wnt5a 수준은 PDAC 환자에서 원발 종양 크기와 유의하게 연관되어 있었다(도 4c 및 표 5). 이러한 결과를 통해 Wnt5a가 고혈당증이 신규 발병한 환자에서 PDAC-유도된 대사 변화를 구별할 수 있는 바이오마커로의 가능성이 있음을 알 수 있었다. 혈장 Wnt5a 수준은 PDAC 그룹에서 췌장 β -카테닌 발현과도 양의 상관관계를 가졌다(도 4d 및 표 5). Wnt5a의 혈장 수준은

PDAC 그룹에서 HbA1c 및 글루코스 AUC와 양의 상관관계(도 4e 및 S4a), 인슐린 AUC, HOMA- β 와 같은 인슐린 분비 마커, 그리고 인슐린 생성 지수와 음의 상관관계를 가졌으나, 비-PDAC 그룹에서는 그렇지 않았다(도 4f 및 4g, 도 9b 및 표 5). 흥미롭게도, 혈장 Wnt5a 수준은 췌장암의 혈청 바이오마커로 널리 사용되는 CEA 및 CA19-9와 양의 상관관계를 보였다(표 5). PPPD 후 7일 또는 14일 뒤, 혈장 Wnt5a 수준은 PDAC 그룹에서만 유의하게 감소하였다($p=0.018$, 도 10a). 이러한 현저한 혈장 Wnt5a 감소는 PDAC 그룹에서의 HbA1c 감소 및 인슐린 생성 지수 개선과 관련되어 있었다(도 10b 및 10c). PDAC 그룹의 췌장절제술 1년 뒤 더 높은 혈장 Wnt5a의 기저수준은 공복 혈당 및 HbA1c 수준의 감소와 유의하게 연관되어 있었다(도 9d 및 9e). PDAC 그룹에서만 췌장절제술 1년 뒤의 혈장 Wnt5a의 기저수준이 높을수록 HOMA- β 의 개선 정도도 높았다($p=0.013$, 도 10f). 그러나, PDAC 및 비-PDAC 그룹 모두에서 HOMA-IR의 변화는 혈장 Wnt5a 기저수준과 관련성이 없었다(도 10g).

표 5

[0128]

췌장 β -카테닌 발현수준과 기저 당대사 파라미터 간의 관계

	비 PDAC인 대상자 (n=19)		PDAC인 대상자 (n=19)	
	<i>r</i>	<i>p</i> -값	<i>r</i>	<i>p</i> -값
연령 (years)	-0.271	0.261	0.311	0.195
BMI (kg/m^2)	-0.154	0.652	-0.089	0.849
당뇨 지속기간 (years)	0.054	0.825	0.346	0.147
PDAC 종양 크기 (cm)	*?*	*?*	0.532	0.034
2hr 경구 글루코스 내성검사				
글루코스 - 0 min	0.119	0.628	0.510	0.037
글루코스 - 120 min	0.327	0.185	0.698	0.008
글루코스 - 0~120 min AUC	0.174	0.489	0.664	0.026
인슐린 - 0 min (mcIU/mL)	-0.107	0.663	-0.348	0.187
인슐린 - 120 min (mcIU/mL)	0.267	0.284	-0.664	0.026
인슐린 - 0~120 min AUC	0.131	0.604	-0.727	0.011
HbA1c (%)	0.278	0.249	0.736	< 0.001
Matsuda 지수	-0.112	0.657	0.545	0.083
HOMA-IR ($\text{mg/dL} \cdot \text{mcIU/mL}$)	-0.109	0.658	-0.186	0.431
HOMA- β (%)	-0.074	0.764	-0.557	0.031
인슐린 생성지수 ($\mu\text{U/mL} \cdot \text{mg/dL}^{-1}$)	-0.032	0.900	-0.736	0.010
DI(Disposition index)	-0.011	0.964	-0.806	0.005
CEA (ng/mL)	0.105	0.668	0.312	0.193
CA 19-9 (U/mL)	0.277	0.282	-0.047	0.852
혈장 Wnt5a(ng/mL)	0.282	0.272	0.547	0.035

[0129]

데이터는 스피어만 순위 상관계수(*r*)로 나타내었다.

[0131]

Wnt5a에 의한 β -카테닌 활성화는 E-카드헤린 발현을 감소시킴으로써 인슐린 분비를 현저히 억제한다

[0132]

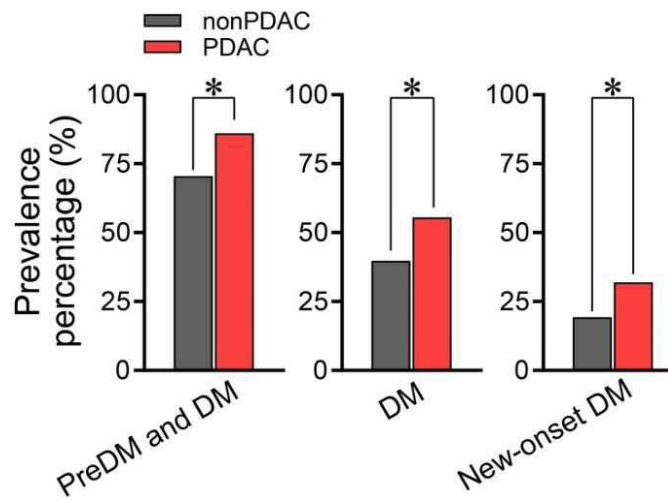
Wnt5a 처리는 인슐리노마 β -세포에서 β -카테닌 단백질의 인산화 형태를 유의하게 감소시켜, Wnt/ β -카테닌 경로를 활성화시킴을 알 수 있다(도 5a)(Griesmann et al., 2013; Mahdi et al., 2012). PDAC 및 비-PDAC 환자의 췌장 조직을 이용하여 E-카드헤린 및 인슐린에 대한 면역형광염색을 수행하였다(도 5b). E-카드헤린의 췌장 발현은 비-PDAC 환자에 비해 PDAC 환자에서 감소하였다.

[0134]

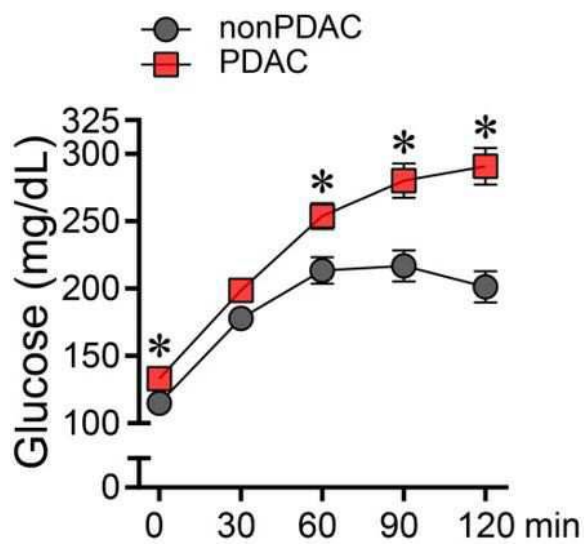
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

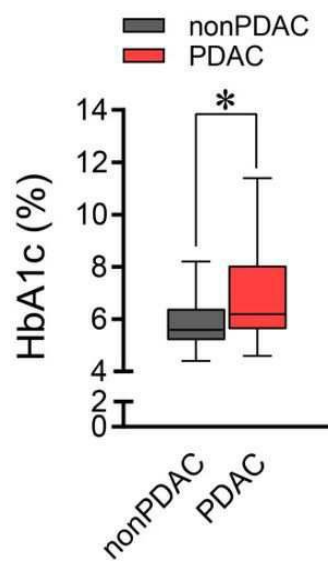
도면1a



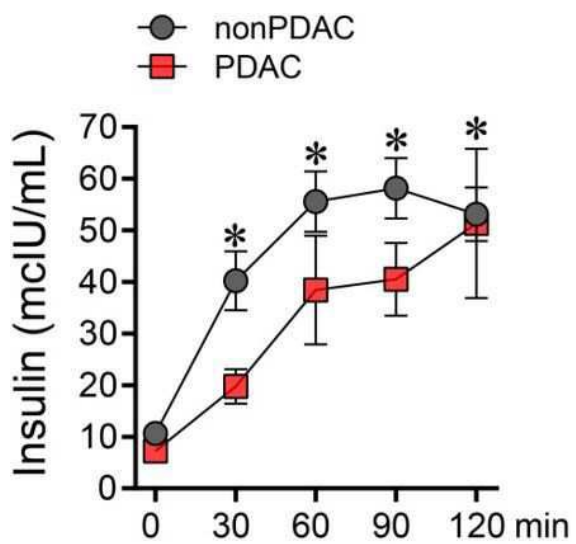
도면1b



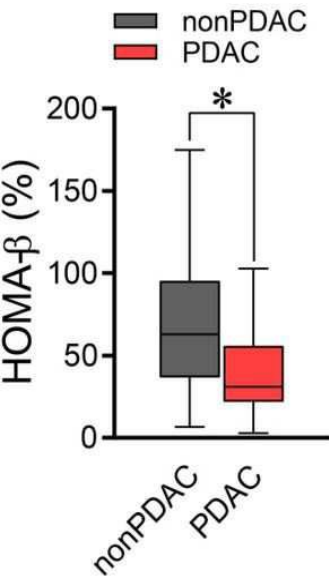
도면1c



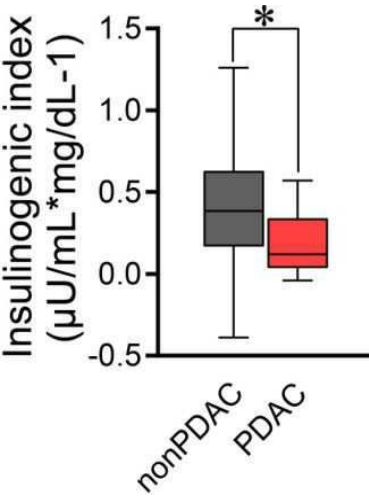
도면1d



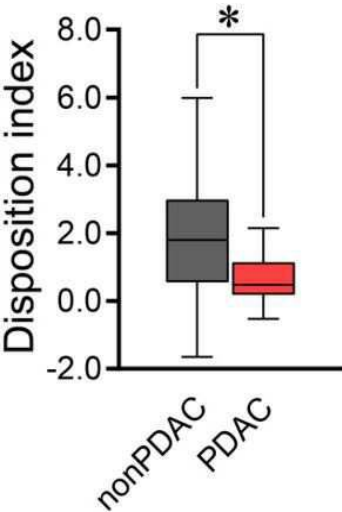
도면1e



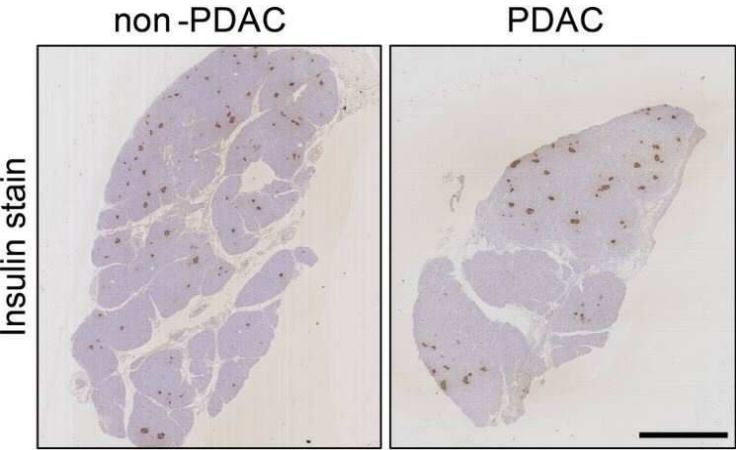
도면1f



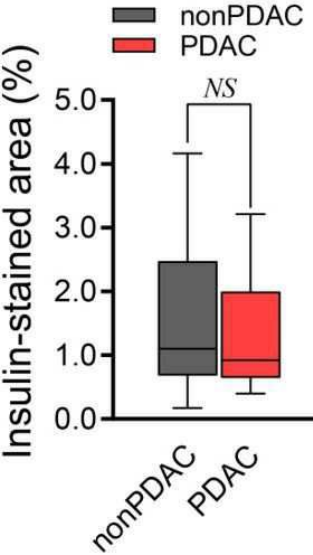
도면1g



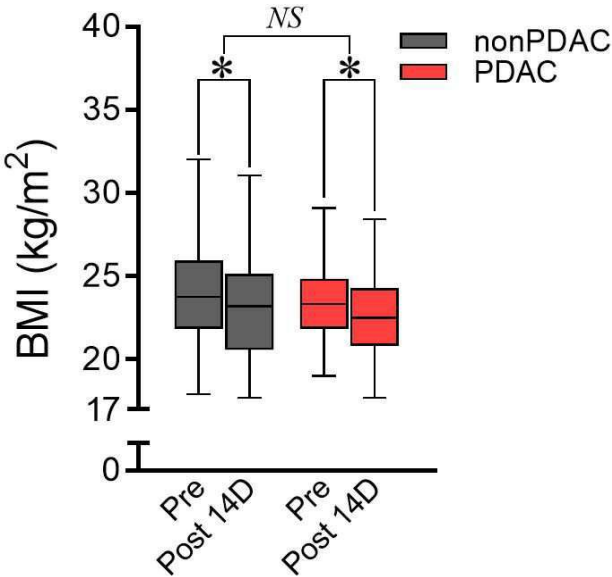
도면1h



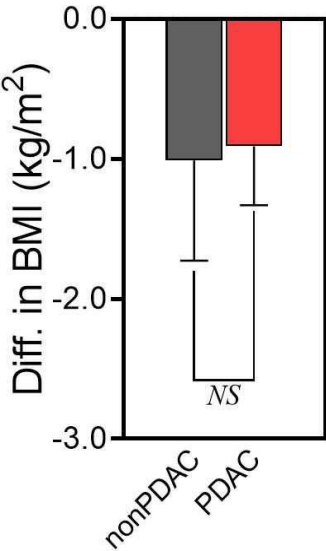
도면1i



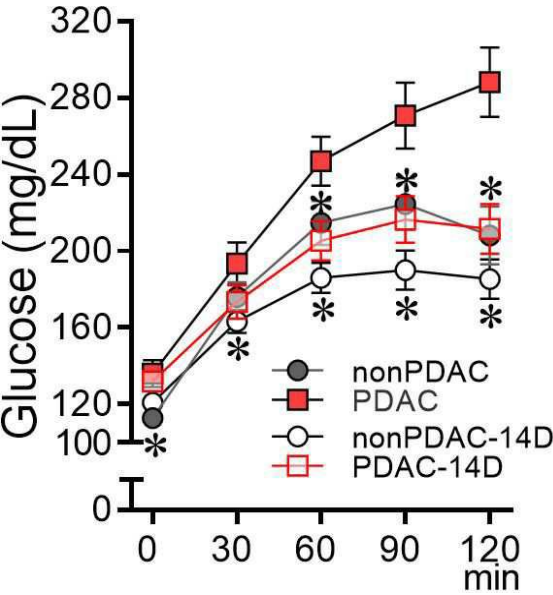
도면2a



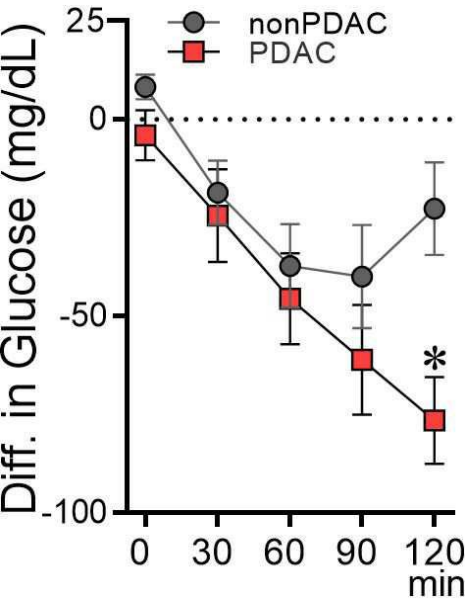
도면2b



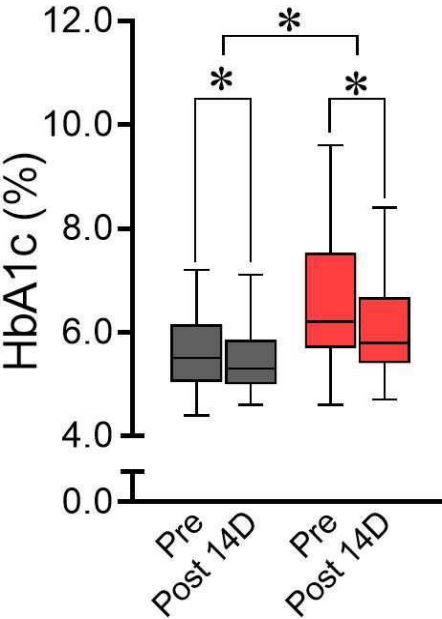
도면2c



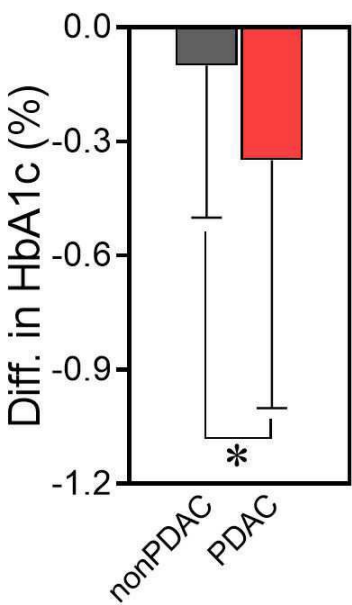
도면2d



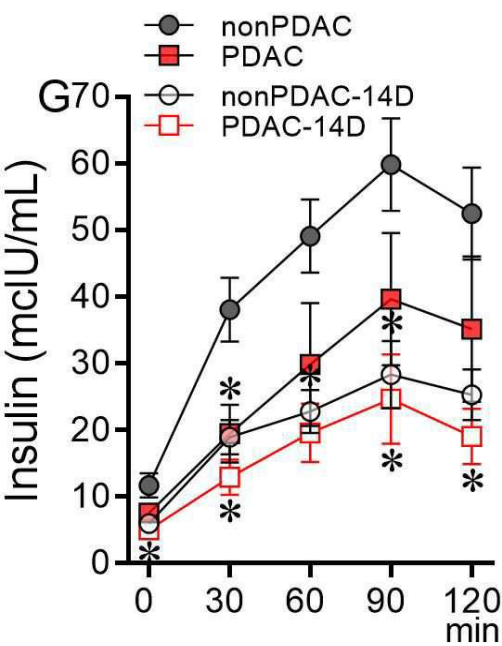
도면2e



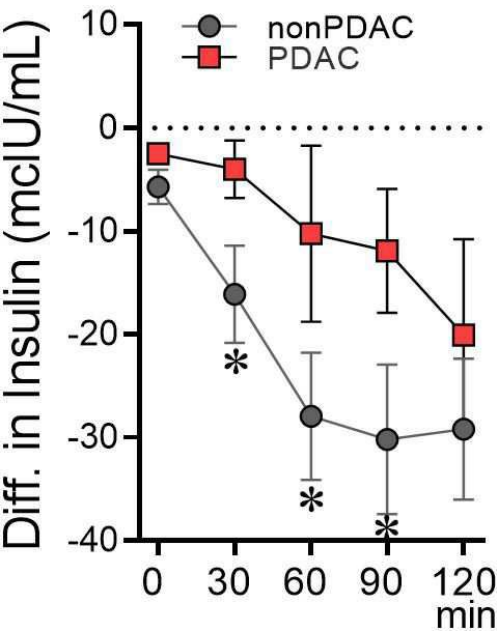
도면2f



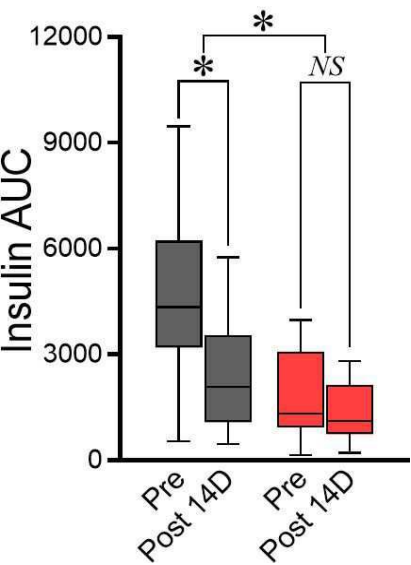
도면2g



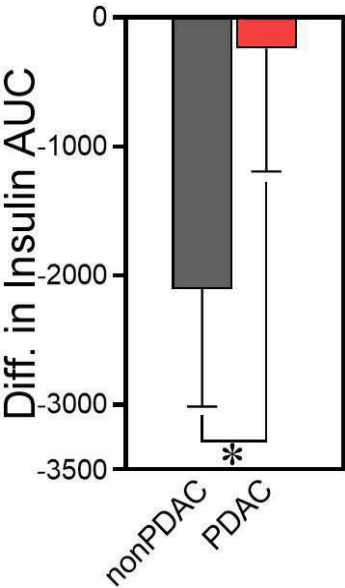
도면2h



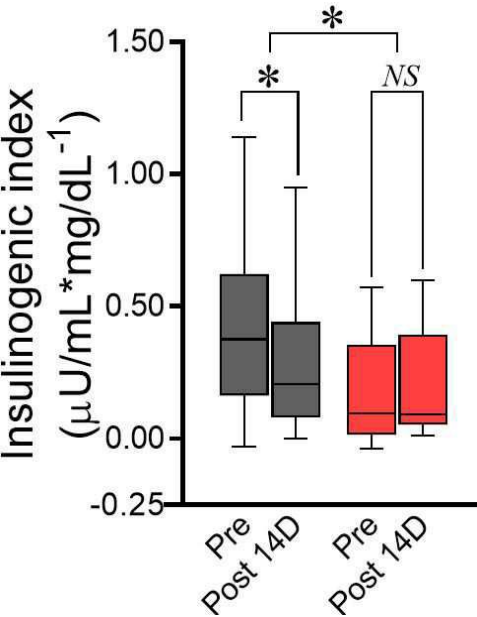
도면2i



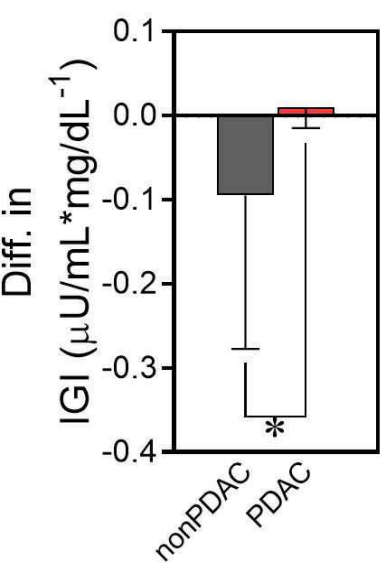
도면2j



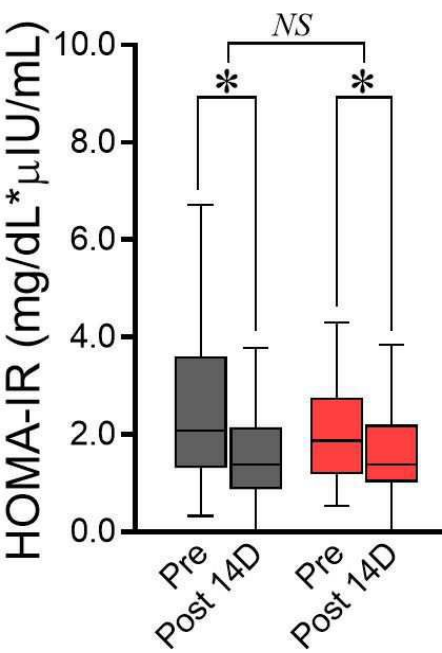
도면2k



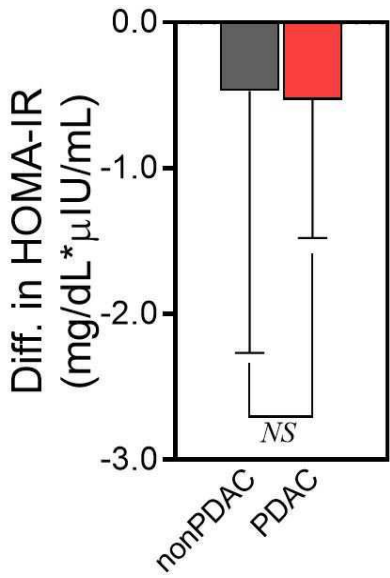
도면21



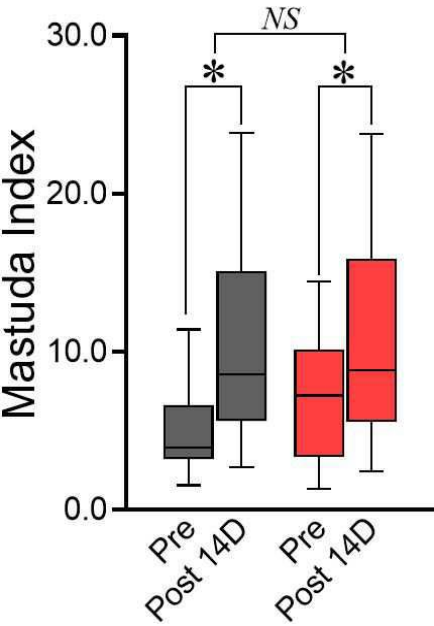
도면22



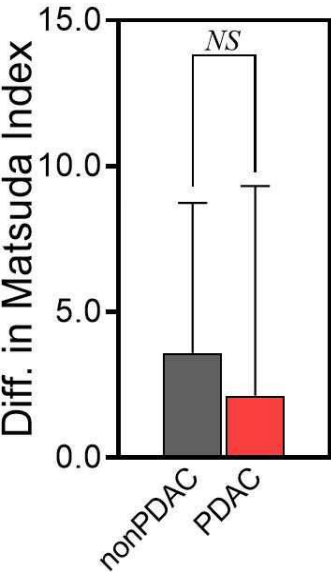
도면2n



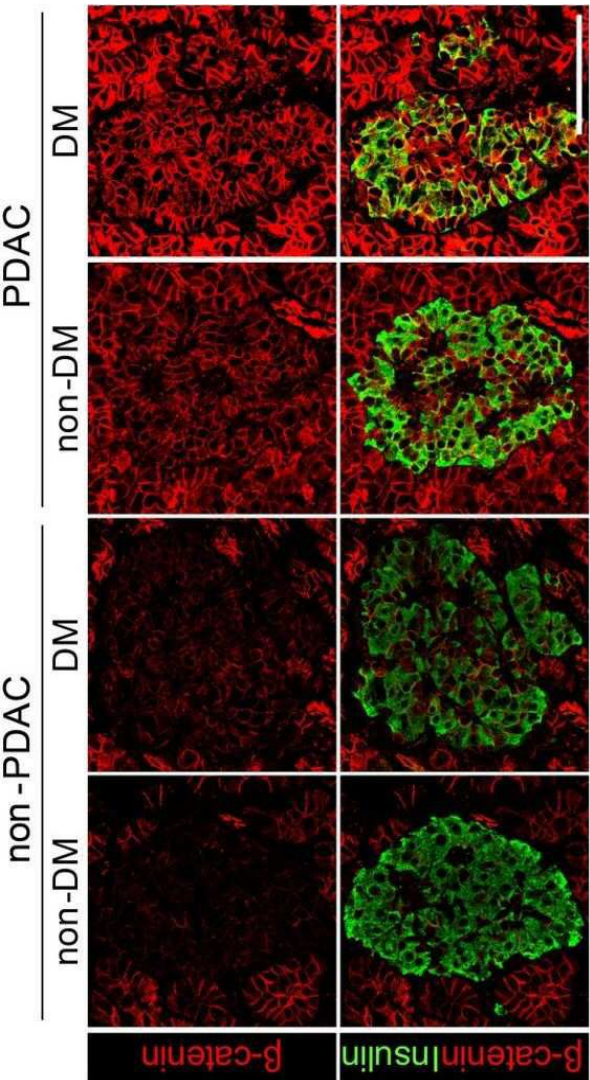
도면2o



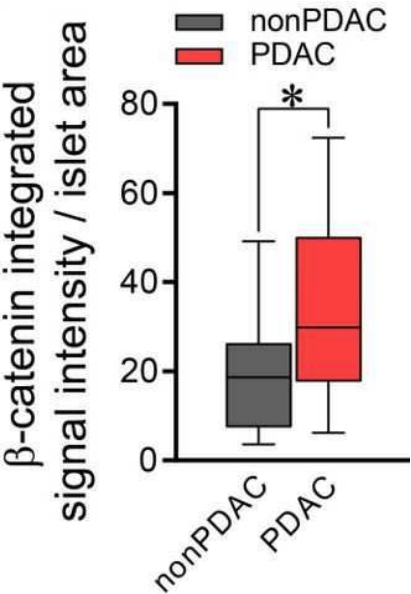
도면2p



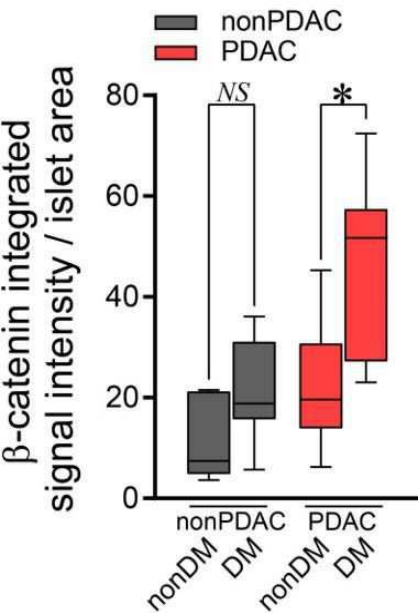
도면3a



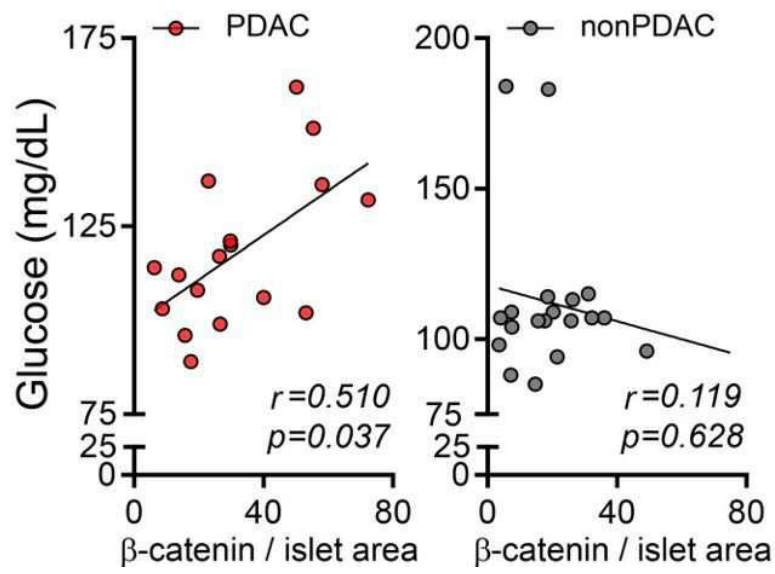
도면3b



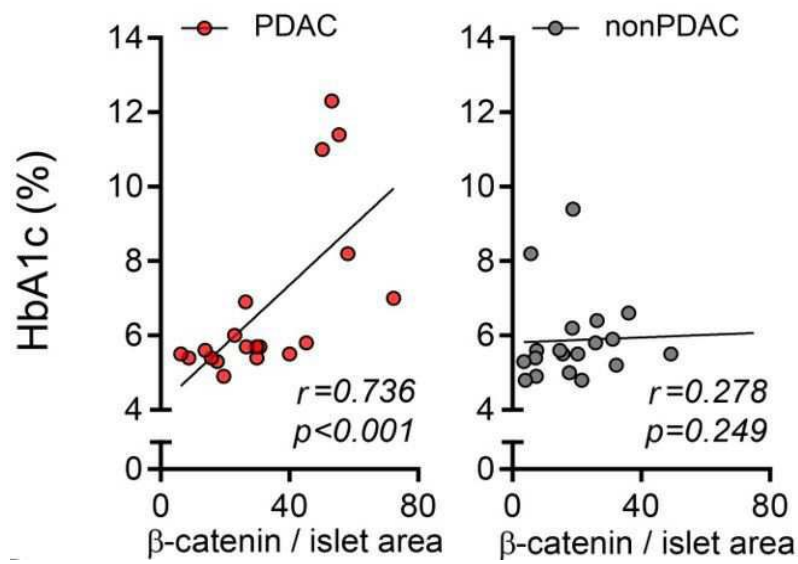
도면3c



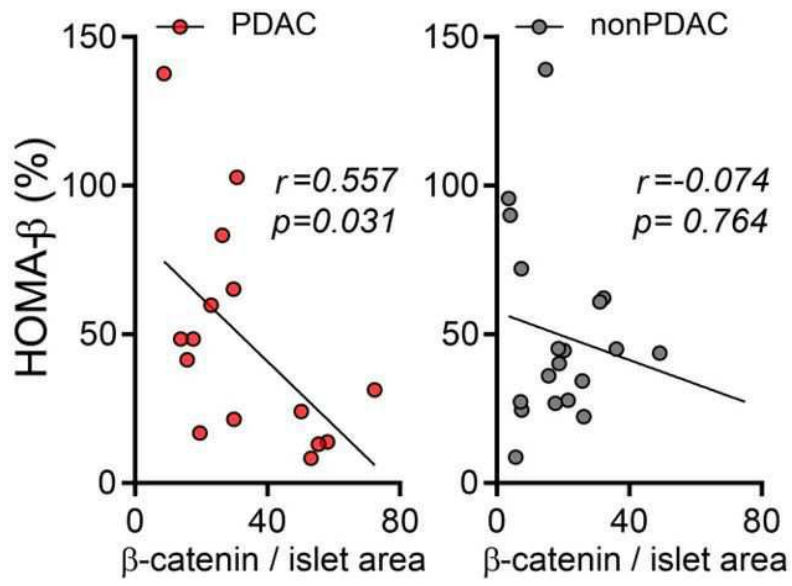
도면3d



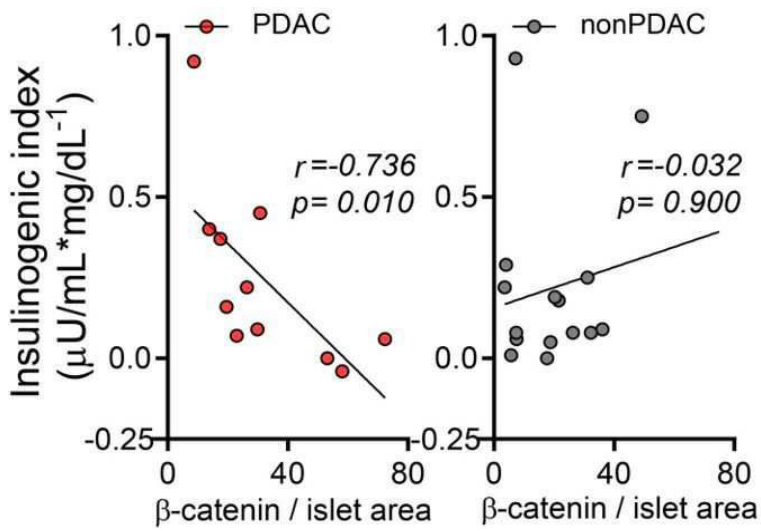
도면3e



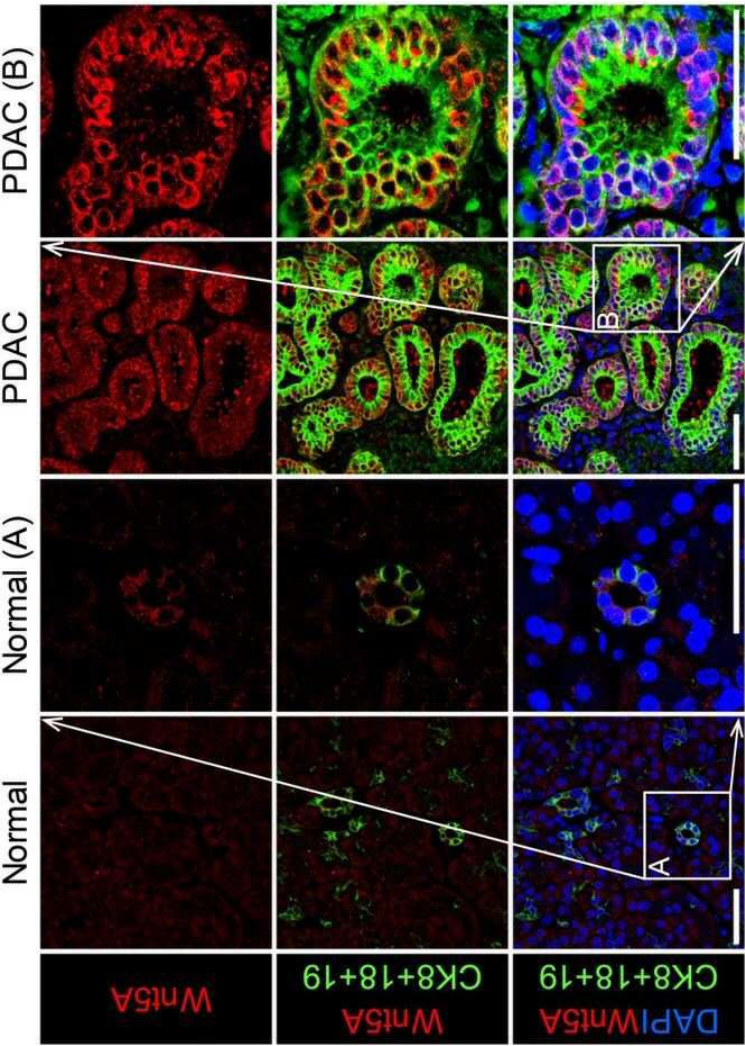
도면3f



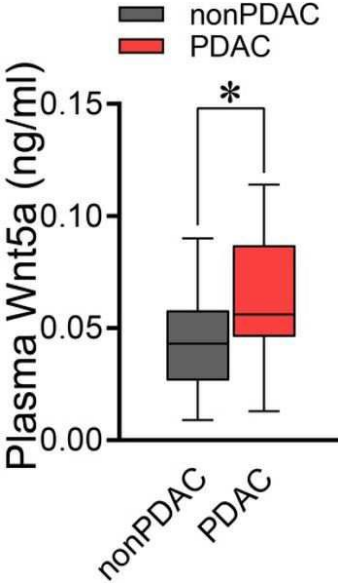
도면3g



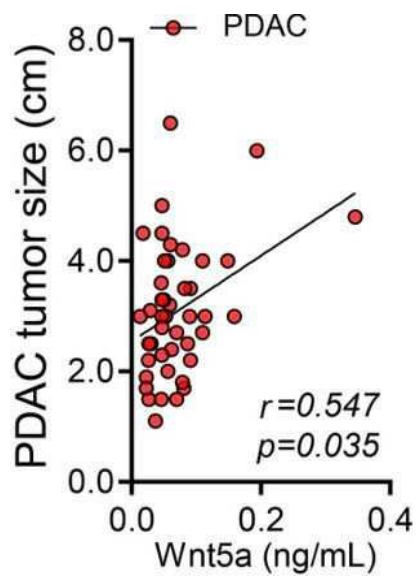
도면4a



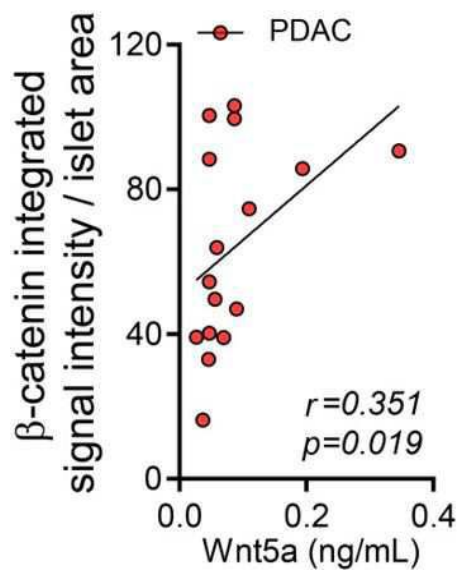
도면4b



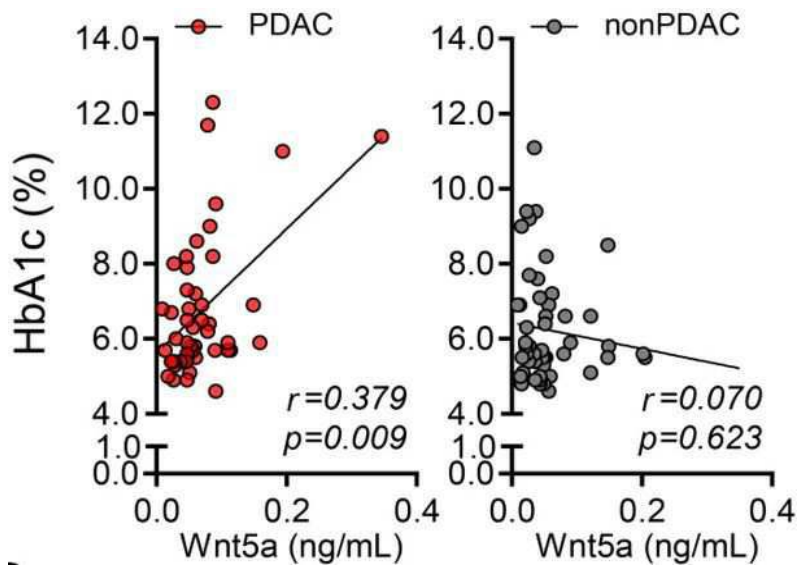
도면4c



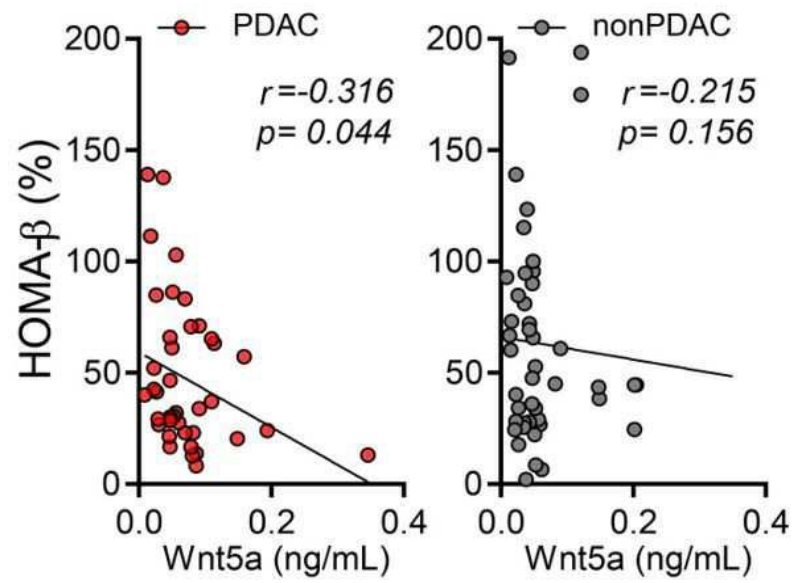
도면4d



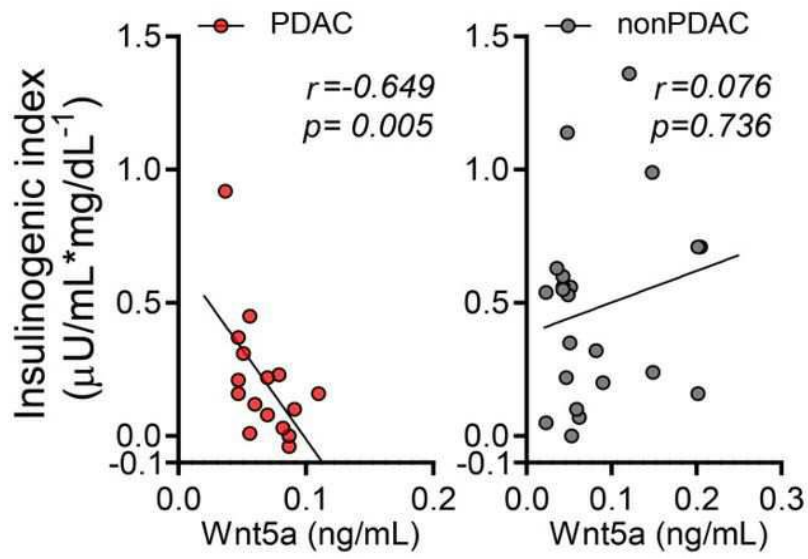
도면4e



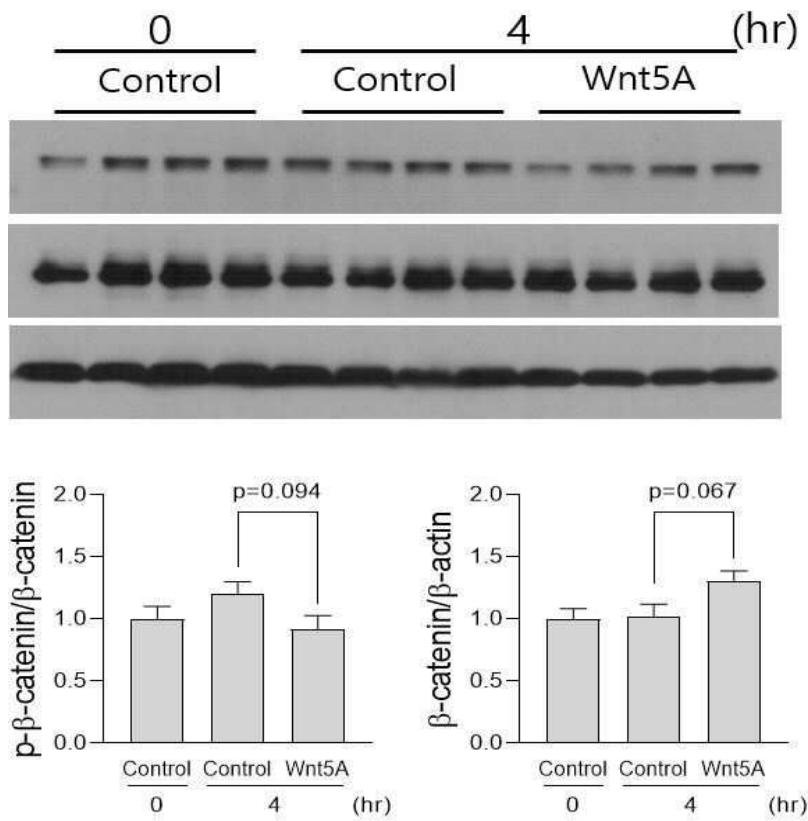
도면4f



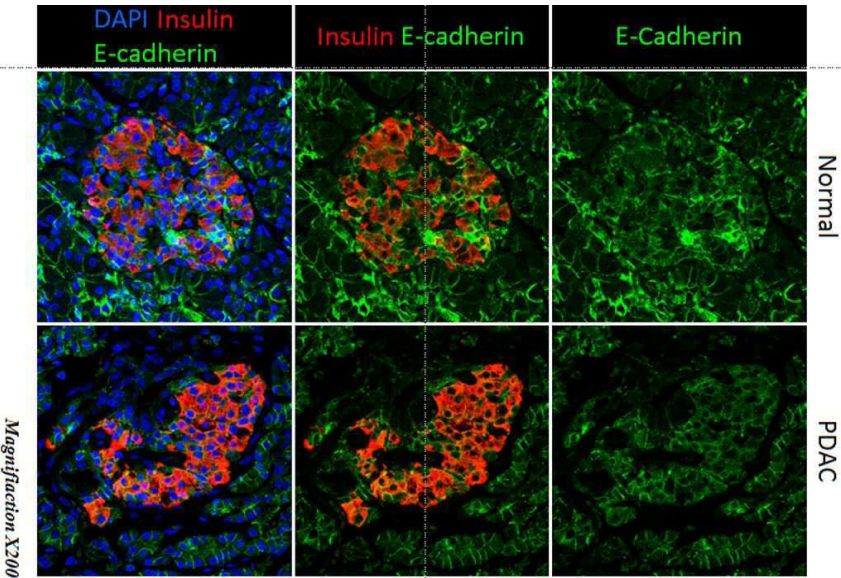
도면4g



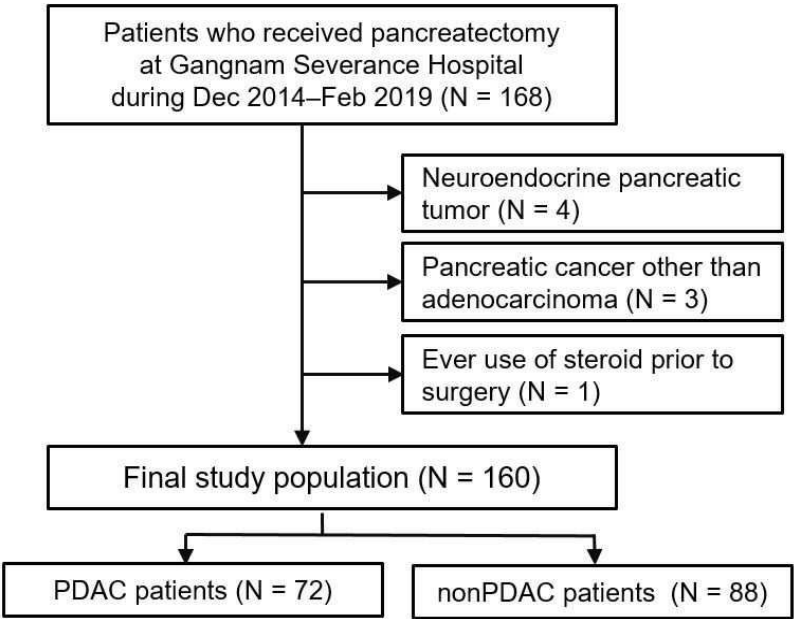
도면5a



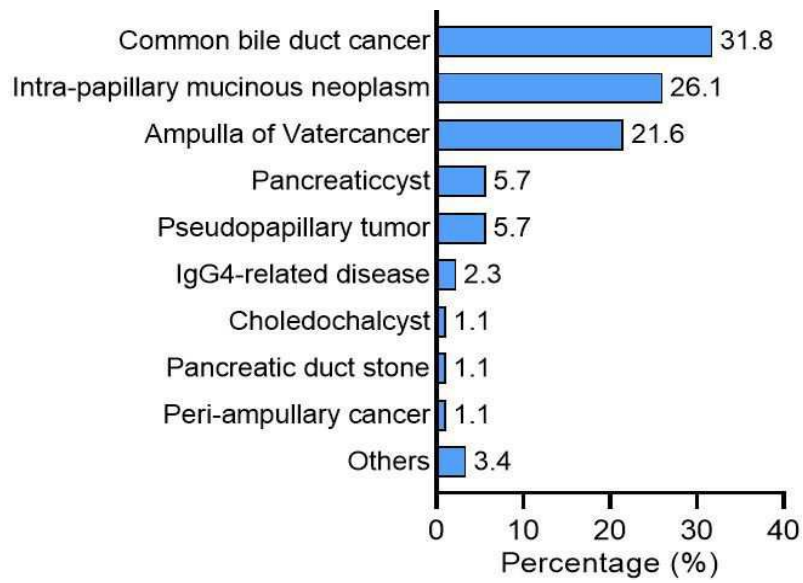
도면5b



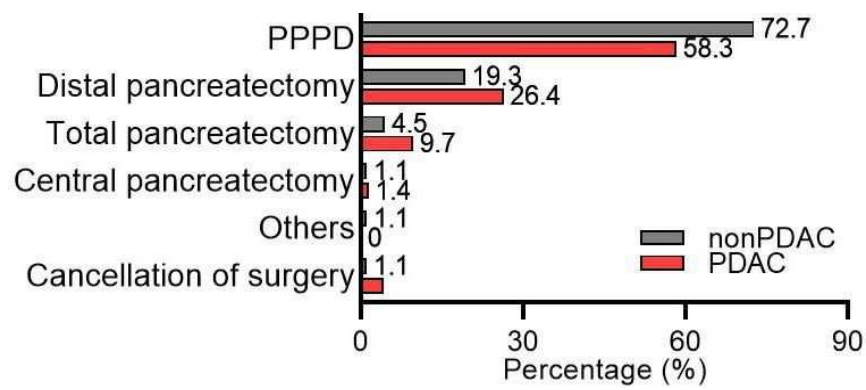
도면6a



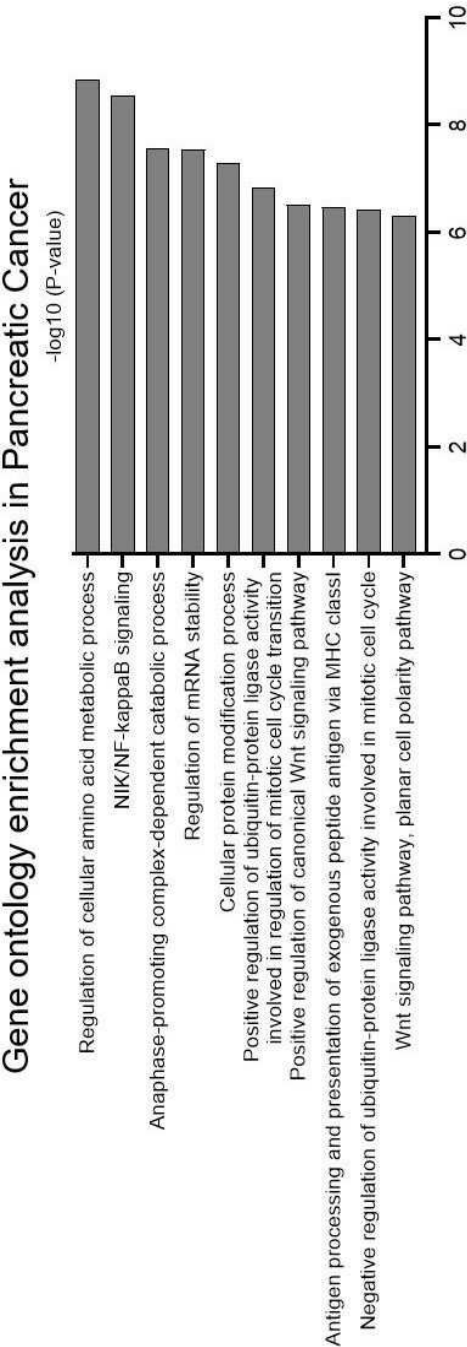
도면6b



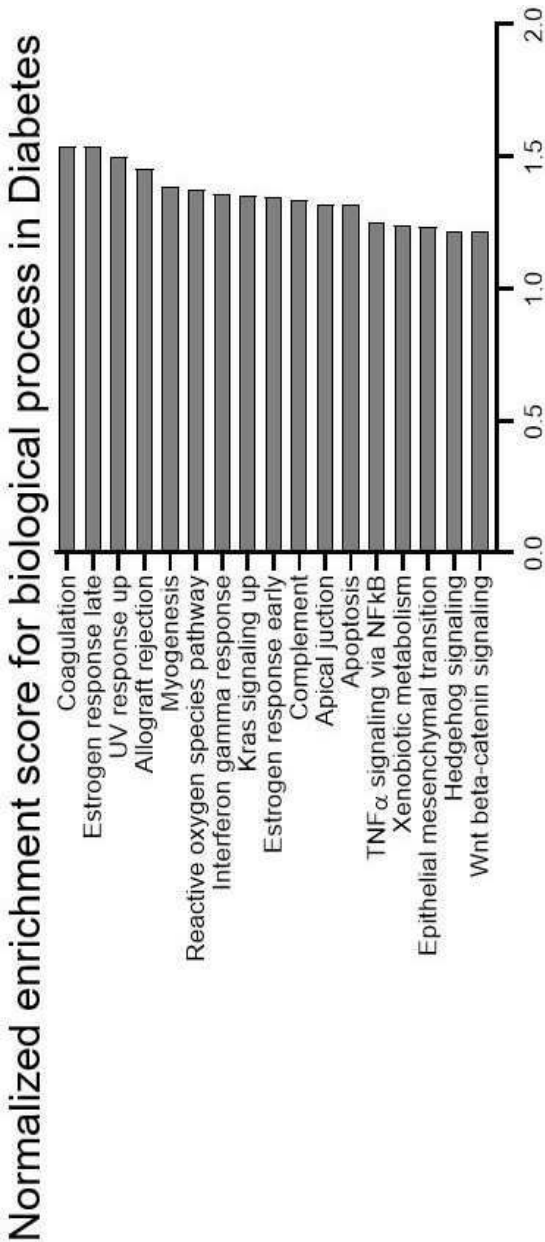
도면6c



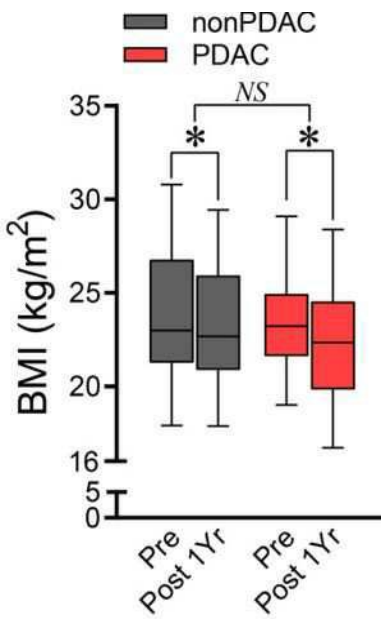
도면6d



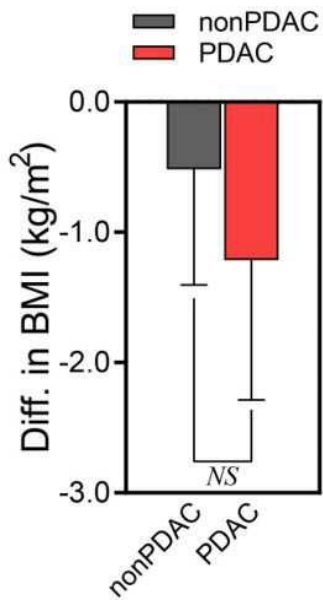
도면6e



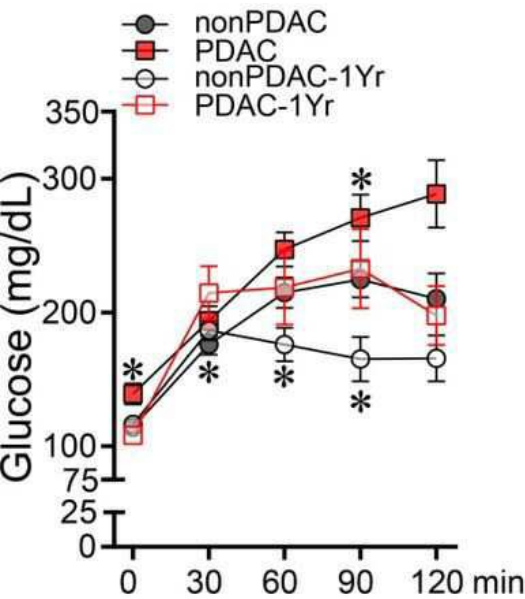
도면7a



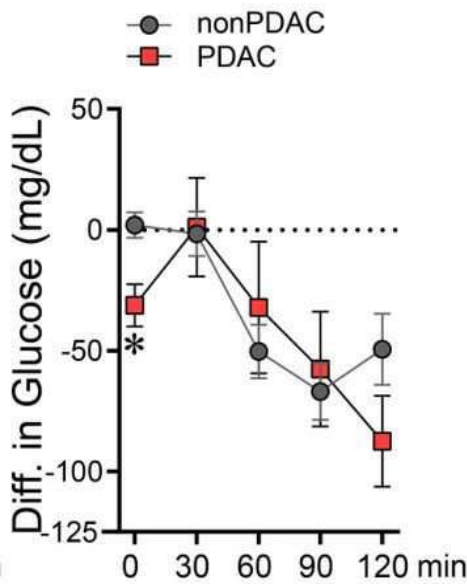
도면7b



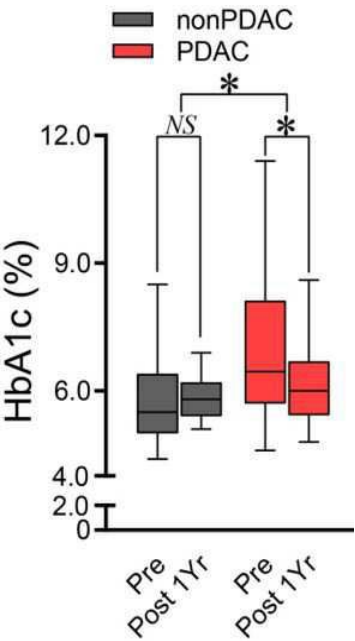
도면7c



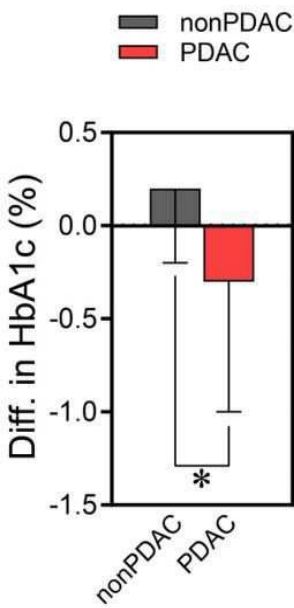
도면7d



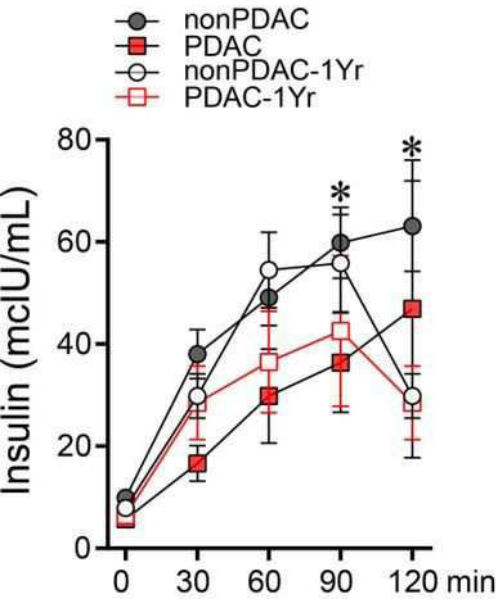
도면7e



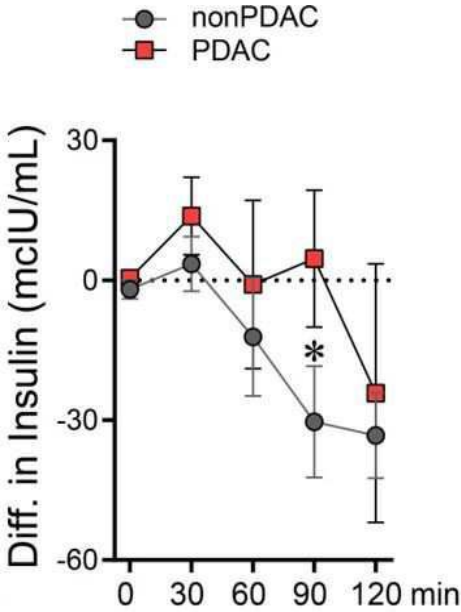
도면7f



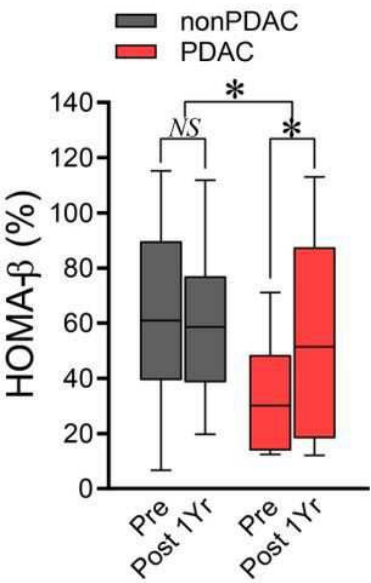
도면7g



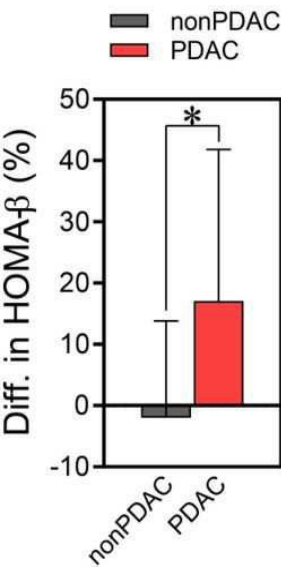
도면7h



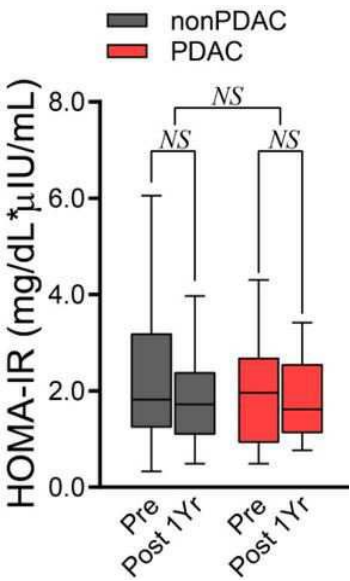
도면7i



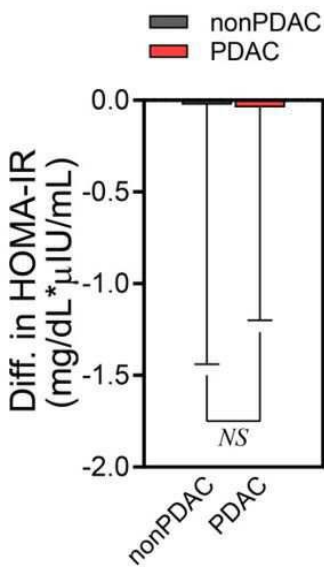
도면7j



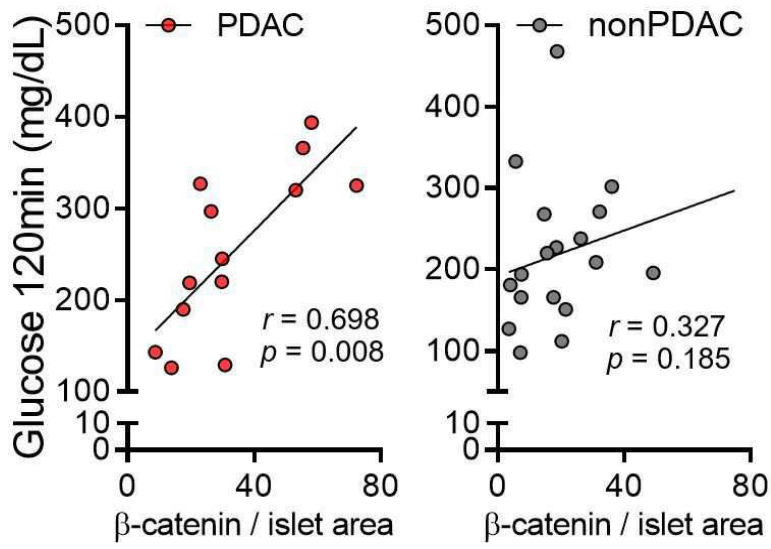
도면7k



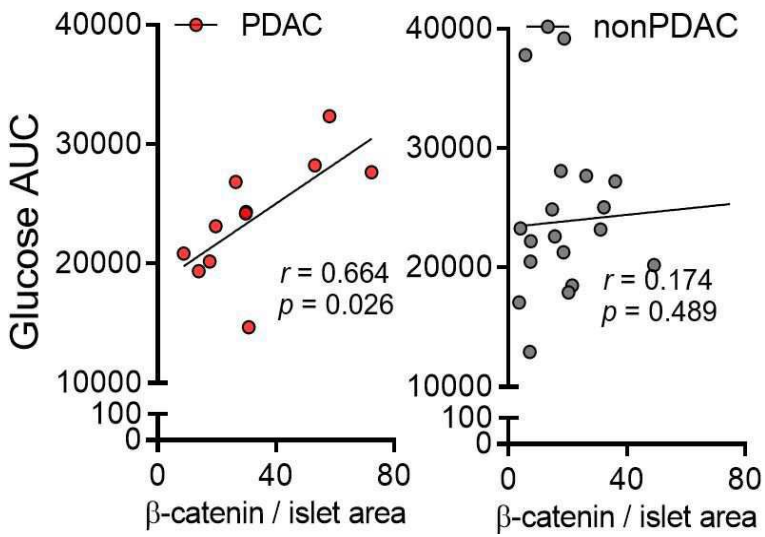
도면7l



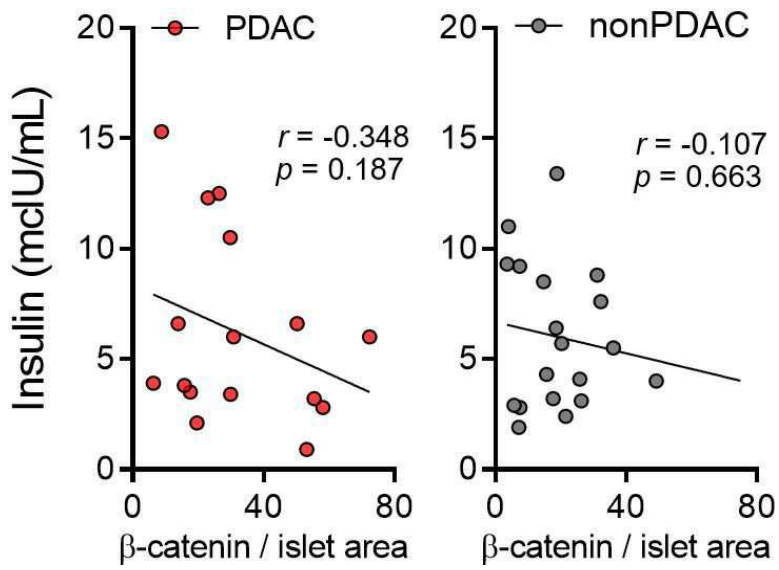
도면8a



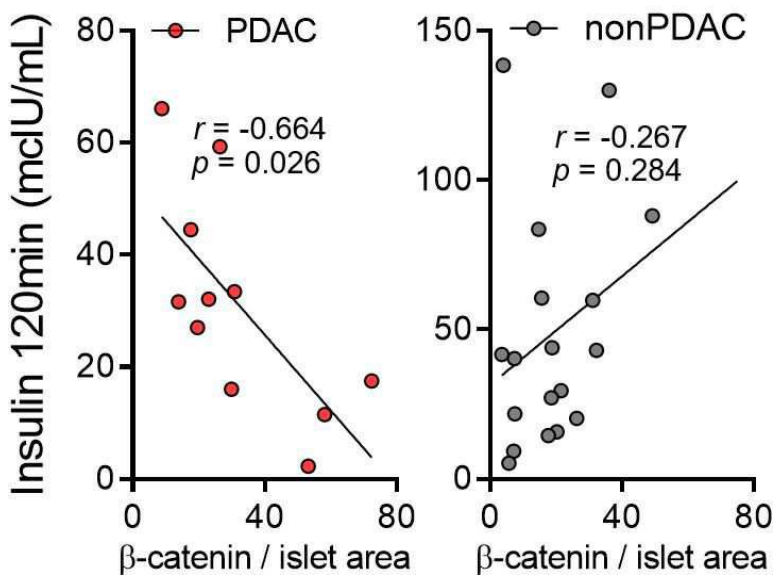
도면8b



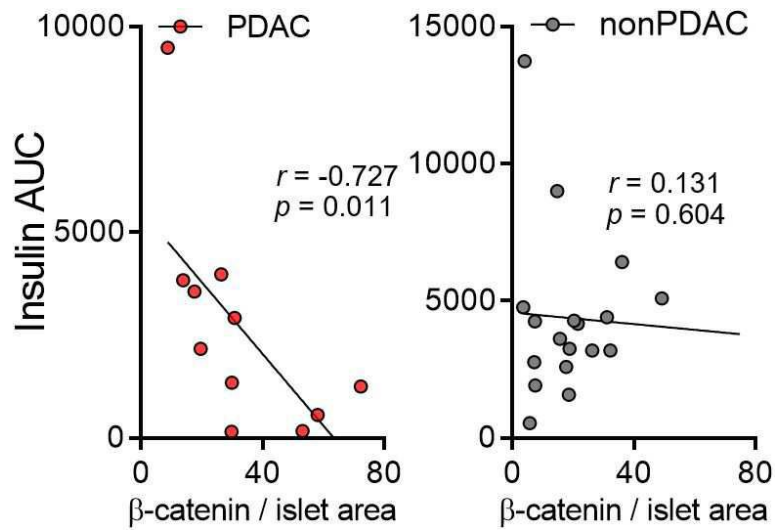
도면8c



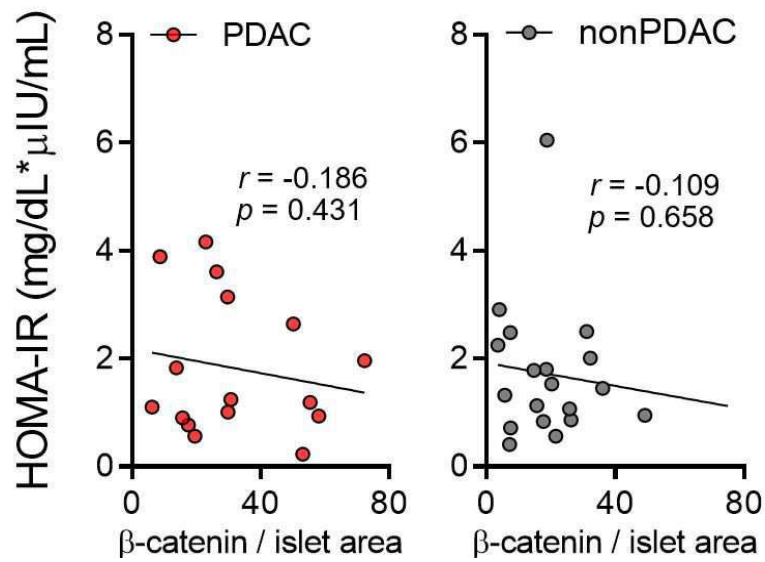
도면8d



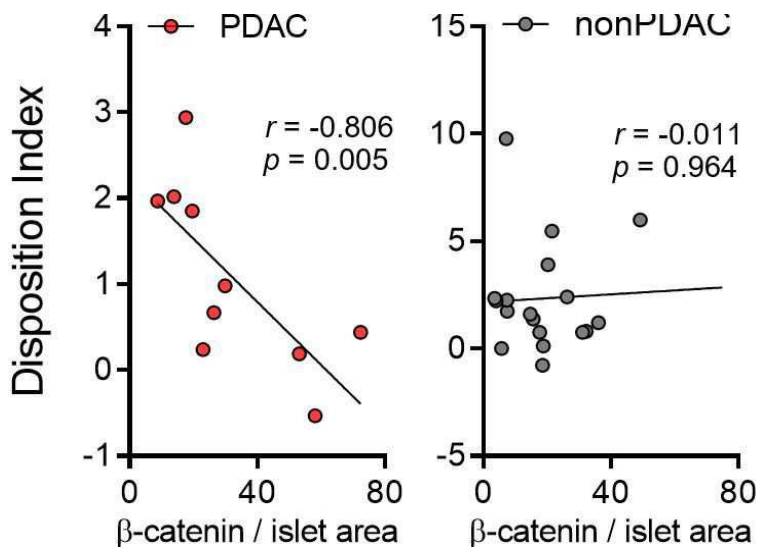
도면8e



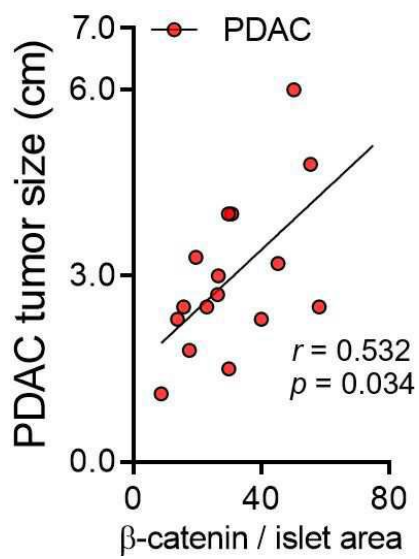
도면8f



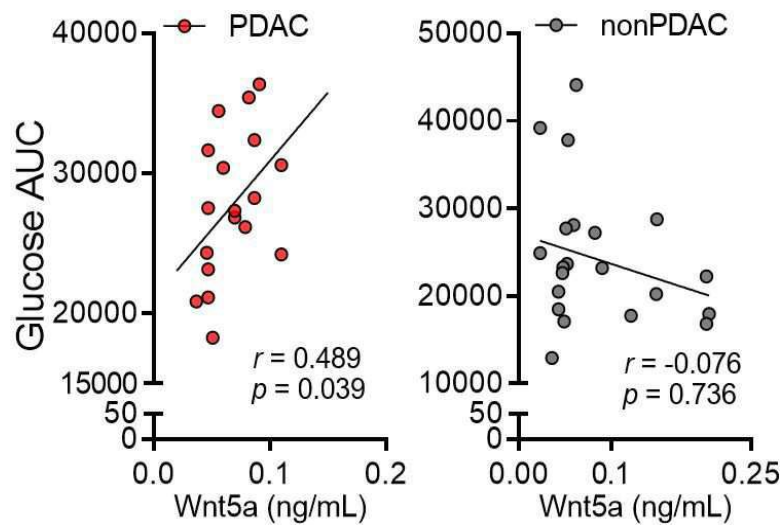
도면8g



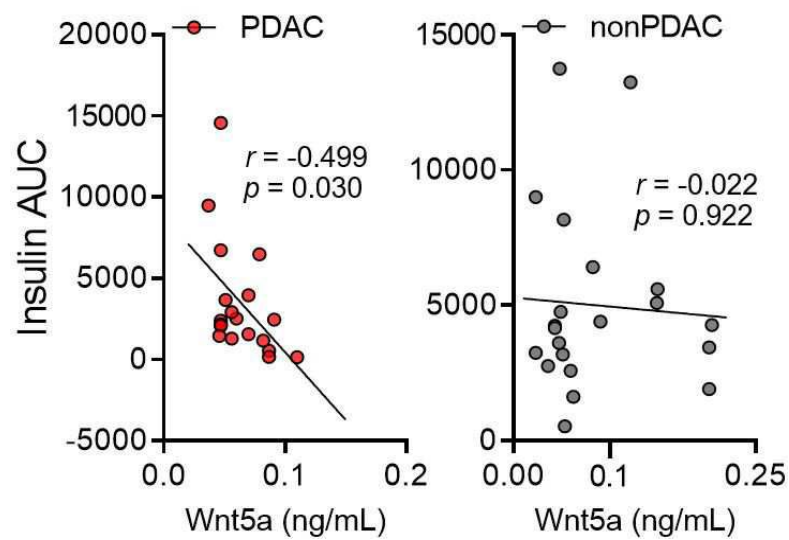
도면8h



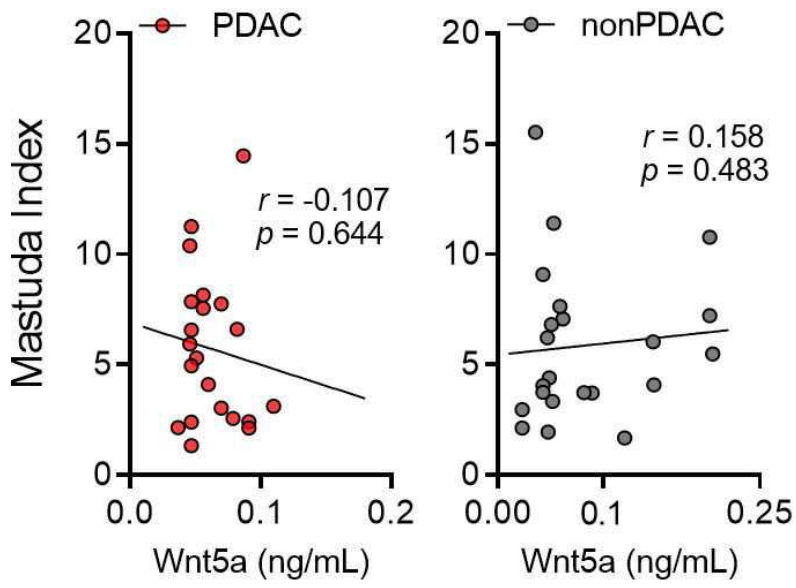
도면9a



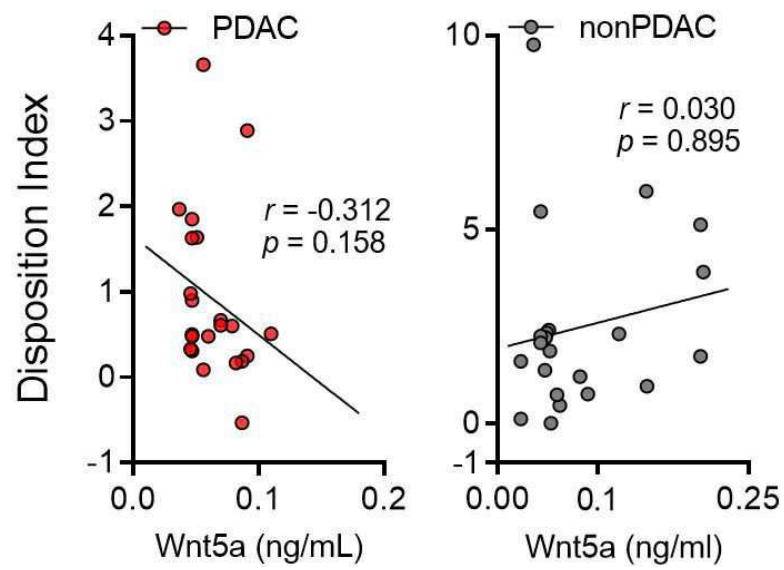
도면9b



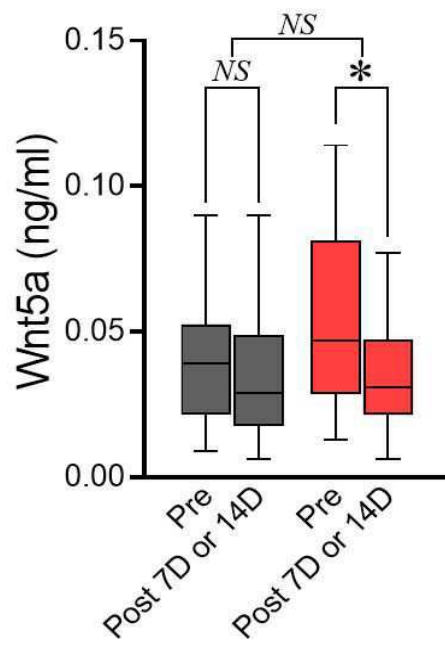
도면9c



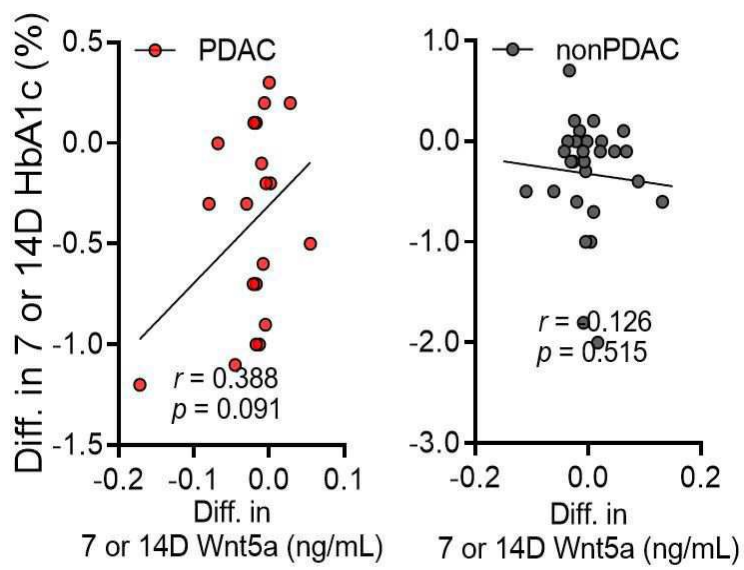
도면9d



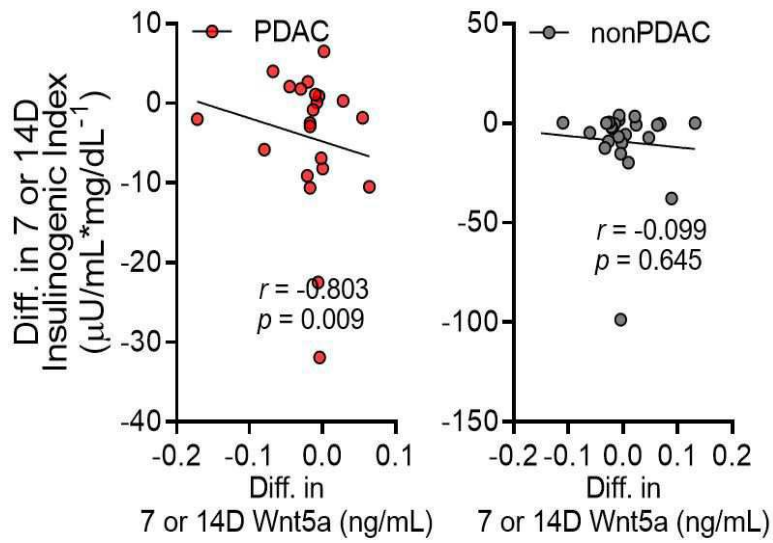
도면10a



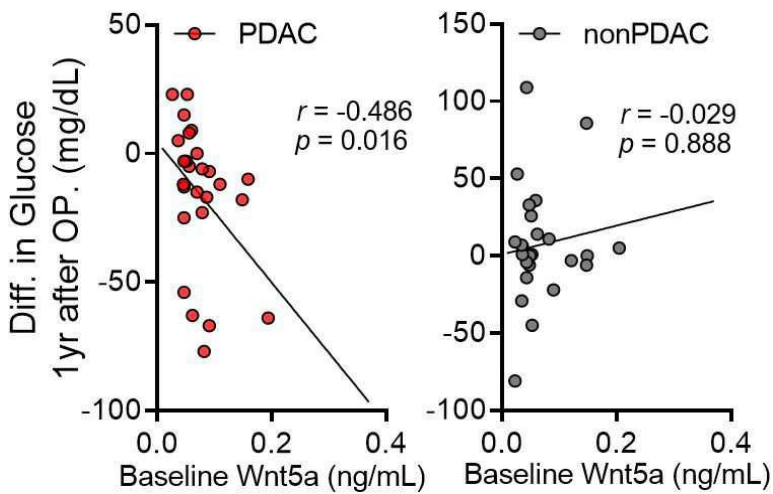
도면10b



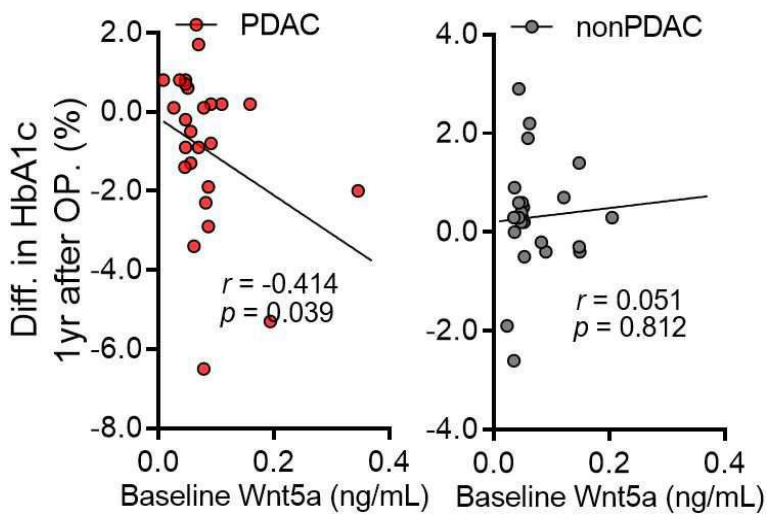
도면10c



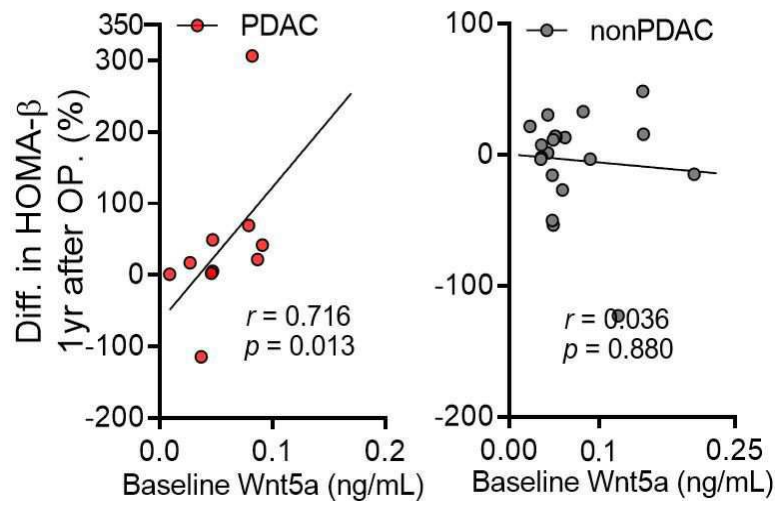
도면10d



도면10e



도면10f



도면10g

