(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년01월06일
(11) 등록번호 10-2199000
(24) 등록일자 2020년12월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) *G01N 33/574* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2018.05)
G01N 33/57438 (2019.01)
(21) 출원번호 10-2020-0124542
(22) 출원일자 2020년09월25일
심사청구일자 2020년09월25일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020170143134 A
KR1020170105184 A
US20200123613 A1

(73) 특허권자
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
국립암센터
경기도 고양시 일산동구 일산로 323 (마두동)
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
김태수
서울특별시 성북구 북악산로 844, 101동 1304호 (돈암동, 브라운스톤 돈암 아파트)
채영규
경기도 안산시 상록구 해양1로 11, 604동 603호 (사동, 안산고잔6차푸르지오)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 9 항 심사관 : 이준혁

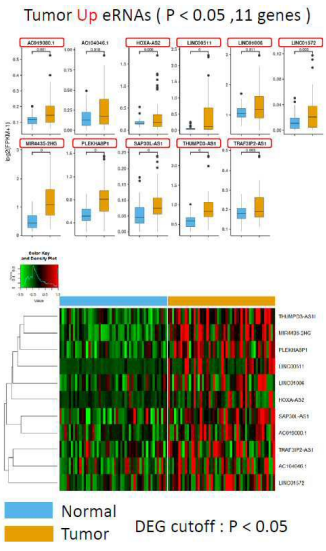
(54) 발명의 명칭 **간암 진단을 위한 신규 바이오마커**

(57) 요 약

본 발명은 TRAF3IP2-AS1을 포함하는 간암 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

본 발명에 따른 바이오마커들은 간암의 진단에 우수한 효과를 보여, 간암 환자의 분류, 이에 따른 치료제 선택, 및 치료 계획 수립에 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/158 (2013.01)
(73) 특허권자
한양대학교 에리카산학협력단
경기도 안산시 상록구 한양대학로 55
강원대학교 산학협력단
강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자
이연수
경기도 김포시 김포한강3로 290-16, 802동 401호 (장기동, 고창마을 이니스더원)
이용선
경기도 고양시 일산동구 일산로 241, 103동 402호 (마두동, 백마마을1단지아파트)
최선심
강원도 춘천시 방송길 70, 105동 804호 (온의동, 온의 롯데캐슬 스카이클래스)
김락균
서울특별시 강남구 삼성로57길 42, 202호(대치동, 라이프라인)
이지연
서울특별시 성동구 마조로 51-3, 506호 (마장동)
이보배
서울특별시 영등포구 문래로4길 6, 201동 906호 (문래동6가, 현대아파트)
김지현
서울특별시 서대문구 성산로24길 26, 105호 (신촌동, 아트빌라)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711105267
과제번호	2017M3A9G7073033
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명	eRNomics 기반 간암 특이적 발병기전 연구 및 신규 바이오마커 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2020.02.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

TRAF3IP2-AS1의 eRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 간암의 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 eRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 eRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머를 포함하는 것인, 간암의 진단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, eRNA의 발현 수준의 측정은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나에 의한 것인, 간암의 진단용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, eRNA의 발현 수준의 측정은 ChIP-Seq, ChIP-qPCR, ATAC-Seq, DNase-seq, FAIRE-seq, CLIP-seq, RIP-seq 및 luciferase assay로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 간암의 진단용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, CRAMP1, CTSA, DCAF15, DHX37, ERVK3-1, PRPF31, REXO4, SNRPA, STX16 및 ZNF234로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 더 포함하는 것인, 간암의 진단용 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 간암의 진단용 키트.

청구항 7

(a) 분리된 생물학적 시료로부터 TRAF3IP2-AS1의 발현 수준을 측정하는 단계;

(b) 상기 측정된 발현 수준을 대비되는 정상 대조군 시료의 TRAF3IP2-AS1의 발현 수준과 비교하는 단계; 및

(c) 상기 생물학적 시료의 TRAF3IP2-AS1의 발현 수준이 대비되는 정상 대조군의 TRAF3IP2-AS1의 발현 수준보다 높을 경우 간암으로 판정하는 단계를 포함하는, 간암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 (a) 단계의 발현 수준 측정은 eRNA의 발현 수준을 측정하는 것인, 간암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 (a) 단계의 발현 수준의 측정은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나에 의한 것인, 간암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 간암 진단을 위한 신규 바이오마커 조성물, 이를 이용한 간암의 진단 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암은 세계적으로 높은 사망률을 보이고 있으며, 서구 사회에서는 심혈관 질환 다음으로 가장 일반적인 사망 원인이다. 특히, 인구의 고령화와 더불어 흡연 인구의 증가 및 대기 오염으로 인해 폐암이 증가하고 있으며, 식생활이 서구화되어 고지방식의 섭취가 일반화되고, 환경오염 물질의 급격한 증가, 음주량의 증가 등으로 간암, 대장암, 유방암, 전립선암 등이 지속적으로 증가하는 추세에 있다. 이러한 실정에서 암의 조기 예방 및 치료를 가능하게 하여 인간 건강의 증진, 건강한 삶의 질 향상 및 인류 보건 증진에 기여할 수 있는 항암 물질의 창출이 절실히 요구되고 있다.

[0003] 그 중에서도 간암은 한국인 남성에서 4위, 그리고 여성에서 6위를 차지하는 암으로써 국내 전체 암 사망자 중 약 22% 이상 (2015년 기준)을 차지하는 대표적인 고위험 한국인 호발암이다. 또한, 환자 1명당 치료비용이 약 6,622만원으로 한국인 호발암 중 가장 많은 치료비용이 필요하며 사회·경제적 의료 부담을 증가시키는 주요 질환에 해당한다. 간암은 바이엘사의 넥사바(Nexavar)가 현재 유일한 치료제인데 연평균 10% 이상의 고성장을 통해 연간 1조 2천억원의 시장을 형성하고 있다.

[0004] 간암의 진단은 뚜렷한 고위험군에 대한 감시 검사로 주로 진행되었으나 국내에서 간암으로 진단받은 환자 중 검진에 의해 발견되는 경우가 50%에 미치지 못한다. 현재까지 간암 진단을 위해 AFP와 PIVKA II 단백질을 이용한 바이오마커 개발이 진행되었으나 간암 환자별 치료 효과 및 예후를 예측할 수 있는 고성능 바이오마커 및 진단 시스템 개발은 부진한 상태이다. 또한, 최근 TCGA (The Cancer Genome Atlas)와 같은 대규모 암유전체 프로젝트에서 암에 대한 대규모 유전체/전사체/후성유전체 분석을 수행하여 다수의 유전체/전사체/후성유전체 변이를 보고하고 새로운 분자아형들을 제시하고 있으나, 간암 환자 예후와 연관성 있는 바이오마커는 아직까지 체계적으로 개발되어 있지 않은 상태이다.

[0005] 한편, 인간 게놈의 약 90%에서 RNA polymerase에 의한 전사가 일어나며 대부분의 RNA는 단백질을 암호화하지 않는 noncoding RNA이다. 이러한 noncoding RNA는 길이 및 기능에 따라 분류되며, transfer RNA, ribosomal RNA, miRNA, siRNA, 그리고 long noncoding RNA (lncRNA)의 기능에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근 새로운 noncoding RNA의 한 종류로서, 활성화된 enhancer에서 만들어지는 enhancer RNA (eRNA)의 존재가 밝혀졌다. eRNA는 길이와 만들어지는 방식에 따라 1D(unidirectional) eRNA와 2D(bidirectional) eRNA로 구분이 된다. 최근 활발히 연구되고 있는 lncRNA와 달리 5' capping은 일어나지만 splicing이나 polyadenylation은 나타나지 않는 것으로 알려져 있다.

[0006] 따라서, 간암 세포주, 환자 유래의 조직 및 오가노이드를 기반으로 한국인 간암 특이적 enhancer 및 eRNA들을 발굴하여 암 발병기전을 이해하고 간암 진단 및 치료를 위한 신규 타겟을 제시할 필요성이 있다. 더욱이, 신규 enhancer 및 eRNA의 조절기전을 규명하여 간암 특이적 예측 시스템을 개발하기 위한 노력이 필요하다.

[0007] 한편, 간은 체내의 혈액을 대부분 여과하고 다양한 독성을 나타낼 수 있는 약물의 작용을 완화시키는 역할을 하는데, 이러한 간에 암이 발생하게 되면 독성 문제로 인하여 사용가능한 항암제의 종류가 매우 제한되게 된다. 이에 따라, 일반적으로 넥사바(소라페닙)를 치료제로써 사용하고 있는데, 치료 효과가 다른 항암제에 비해 충분히 만족스럽지 못하여 새로운 약물에 대한 요구가 상당히 많은 실정이다. 특히, 간암의 경우, 3기 또는 4기에 이르게 되면 원격성 전이가 많이 일어나게 되어 폐나 기타 장기들로 암의 전이가 많이 일어나게 되며, 이러한 전이에 대해서, 위 언급한 간 자체의 문제로 인하여 약물의 사용이 매우 한정되기 때문에, 전이에 대한 치료를 해결하지 못하여 다수의 환자가 사망하게 되는 결과를 나타낸다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2019-0024379호

(특허문헌 0002) 한국공개특허 제10-2019-0002874호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이에, 본 발명자들은 간암 세포주들을 이용하여 통합 전사체 분석을 실시하고, 간암 세포주에서 활성화된 enhancer를 발굴하기 위해 histone H3, H3K4me1과 H3K27ac에 대한 ChIP-sequencing을 실시하였으며, Enhancer 부위 확인을 위해 ATAC-seq을 수행하여 히스톤 ChIP-seq에서 확보한 enhancer peaks로 통합 분석을 수행하였다.

[0010] 이에 따라, 간암 세포주로부터 활성화된 enhancer를 발굴하고, TRAF3IP2-AS1을 The Cancer Genome Atlas(TCGA)의 데이터를 통해 분석한 결과, 정상인 대비 간암 환자에서 증가되어 있는 것으로 나타났다.

[0011] 이러한 실험 결과를 바탕으로 검토하여 볼 때, TRAF3IP2-AS1이 간암에 대한 특이적인 바이오마커로 활용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0012] 특히, 본 발명에 따른 바이오마커들은 ChIP-seq 분석, TCGA에서 모두 동일 결과를 나타내는 것을 확인하였다는 점에서 마커로써 우수한 효과가 인정된다.

[0013] 또한, 본 발명에 따른 바이오마커는 TRAF3IP2-AS1 자체 뿐만 아니라 발현 상관관계 기반 타겟 유전자에서도 동일한 발현 패턴을 확인하고 관련 그룹을 더 포함할 수 있는 점에서 보다 더 정확한 진단 정보를 제공할 수 있다.

[0014] 상기 발현 상관관계 기반 타겟 유전자에 대해 보다 구체적으로 설명하면, eRNA는 유전자 발현조절, 특히 타겟 유전자 발현의 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있기 때문에, eRNA의 발현 정도와 타겟 유전자의 발현 정도는 매우 높은 상관관계를 나타낼 가능성이 있다. 따라서 각 eRNA(발현의 증가 혹은 감소)와 동일한 발현 변화 패턴을 나타내는 유전자들을 선별하고 이를 발현 상관관계 기반 타겟 유전자의 대상으로 검토할 수 있다. 여기서 검출된 동일 발현 패턴을 보이는 유전자들을 발현 상관관계 기반 타겟 유전자로 선정하였다. 즉, eRNA가 regulator의 역할을 할 수 있기 때문에, eRNA의 발현량과 유의한 연관성이 있는 mRNA를 correlation test를 통해 선별하여 이를 eRNA의 타겟 유전자로 정의하였다.

[0015] 더욱이 TRAF3IP2-AS1은 타암종에서 유사 발현 변화를 나타내지 않고, 간암에 특이적으로만 정상대조군과 차이를 나타내는 발현 변화를 보이는 점에서 간암에 대해 특이적인 바이오마커로 이용될 가능성이 매우 높다.

[0016] 본 발명의 하나의 목적은 TRAF3IP2-AS1 바이오마커를 포함하는 간암의 진단용 바이오 마커 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 다른 하나의 목적은 TRAF3IP2-AS1 eRNA(바이오마커)의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 간암의 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0018] TRAF3IP2-AS1의 eRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 간암의 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 (a) 분리된 생물학적 시료로부터 TRAF3IP2-AS1의 eRNA 발현 수준을 측정하는 단계;

[0020] (b) 상기 측정된 발현 수준을 대비되는 정상 대조군 시료의 TRAF3IP2-AS1의 발현 수준과 비교하는 단계; 및

[0021] (c) 상기 생물학적 시료의 TRAF3IP2-AS1의 발현 수준이 대비되는 정상 대조군의 TRAF3IP2-AS1의 발현 수준보다 높을 경우 간암으로 판정하는 단계를 포함하는, 간암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0022] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 TRAF3IP2-AS1의 바이오마커를 포함하는 간암의 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0023] 상기 하나 이상의 eRNA는 독립적 또는 조합으로 간암의 진단용 바이오마커로 사용될 수 있다.

[0024] 간암은 간세포가 지속적인 다양한 자극에 의해 자신의 고유 기능을 상실하고 암세포로 변신하여 끊임없는 자기 증식을 이루면서 주변 또는 먼 곳으로 퍼져 나가는 특징을 갖게 되는 종양을 말하며, 원발성 종양과 간에서 발생하여 다른 장기로 이전된 전이암이 있다. 원발성 간암은 간세포의 이상으로 발생하는 간세포암과 담관세포의 이상으로 발생하는 담관암, 맥관육종을 포함하며, 90% 이상이 간세포암(Hepatocellular carcinoma, HCC)이다.

[0025] 본원에 따른 간암은 조직 자체에서 발생하는 원발성 악성 종양이며, 간세포암이다. 간세포암은 알콜 남용, 바이러스성 간염 및 간경변 또는 간경화를 포함하는 대사성 간질환과 같은 위험인자를 갖는 고위험군 환자에서 빈발

한다. 간세포암은 섬유성 스트로마가 없어 출혈과 세포괴사가 발생하며, 간문맥 시스템으로의 혈관침윤이 일어나며, 심한 경우 간파열 및 복강내혈액삼출로 이어질 수 있다.

[0026] 암의 진단 및 병기는 일반적으로 수술이나 생검으로 획득한 조직을 조직검사를 통해 암 세포의 종류와 분화도, 전이 정도 등에 따라 암종의 진행 병기를 결정한다. 즉 일반적인 고형암은 치료 및 예후가 TNM 병기에 의해 결정된다.

[0027] 그러나, 간암의 경우, TNM 병기만으로 치료방법을 선택하거나 예후를 예측하기 어려울 수 있다. 이는 대부분의 간암환자에서 만성 간질환이 병발되어 암과는 별개의 진행된 간질환만으로도 치료방법 선택에 제한이 있기 때문이다.

[0028] 따라서, 본 발명에 따른 마커를 사용하는 경우 간암의 발병을 모니터링하고 조기 진단할 수 있다. 본 발명에서 진단은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 간암의 발병 여부, 간암의 예후, 간암으로 진행 가능성 등을 확인하는 것이다. 예를 들어, 병명을 판정하는 일을 말하고, 간암의 병명, 병의 상태, 병기, 병인, 합병증의 유무, 예후, 및 재발 등을 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명에서 바이오마커는 간암을 정상 간세포 등과 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 간암에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예: eRNA, mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질 또는 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다. 본 발명의 목적상, 간암 진단용 바이오마커는 정상 간의 세포에 비해 간암에서 특이적으로 높은 수준의 발현을 나타내는 TRAF3IP2-AS1의 eRNA이다.

[0030] 본 발명에서 enhancer RNA (eRNA)는 noncoding RNA의 한 종류로서 활성화된 enhancer에서 만들어지는 것으로 알려져 있다.

[0031] 본 발명에서 TRAF3IP2-AS1(TRAF3IP2 antisense RNA 1) (ENSG00000231889) 정보는 NCBI(National Center for Biotechnology Information) 에 GeneID: 643749로 등록되어 있다.

[0032]

[0033] 본 발명의 일실시양태에 따르면, TRAF3IP2-AS1을 The Cancer Genome Atlas (TCGA)의 데이터 간암 샘플을 통해 분석한 결과, 정상인 대비 간암 환자에서 증가되어 있는 것으로 나타났다.

[0035] 이러한 실험 결과를 바탕으로 검토하여 볼 때, TRAF3IP2-AS1이 간암에 대한 특이적인 바이오마커로 활용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0036] 본 발명에 있어서, 상기 바이오마커 조성물은 단독으로 이용될 수 있고, 기타의 간암에 대한 마커들과 함께 조합되어 이용될 수 있다.

[0037] 예를 들어, TRAF3IP2-AS1 eRNA와 관련된 mRNA로 CRAMP1(cramped chromatin regulator homolog 1, GeneID: 57585), CTSA(cathepsin A, GeneID: 5476), DCAF15(DDB1 and CUL4 associated factor 15, GeneID: 90379), DHX37(DEAH-box helicase 37, GeneID: 57647), ERVK3-1(endogenous retrovirus group K3 member 1, GeneID: 105372481), PRPF31(pre-mRNA processing factor 31, GeneID: 26121), REXO4(REX4 homolog, 3'-5' exonuclease, GeneID: 57109), SNRPA(small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A, GeneID: 6626), STX16(syntaxin16, GeneID: 8675) 및 ZNF234(zinc finger protein 234, GeneID: 10780)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 마커로 더 포함할 수 있다. 즉, TRAF3IP2-AS1 eRNA와 관련하여 TCGA LIHC Tumor 상 상관관계가 높은 mRNA로 CRAMP1, CTSA, DCAF15, DHX37, ERVK3-1, PRPF31, REXO4, SNRPA, STX16, ZNF234은 TRAF3IP2-AS1 eRNA와 유사하게 정상 시료와 대비하여 간암 시료에서 높게 발현된다.

[0039] 상기 관련된 mRNA(발현 상관관계 기반 타겟 유전자들)는 TRAF3IP2-AS1 eRNA와 간암 및 정상 조직에서 동일 유사 발현 패턴을 보이기 때문에, 보다 정확한 진단 정보를 제공할 수 있다. 즉, 상기 언급된 mRNA들은 정상 간 조직과 대비할 때 간암에서 높게 발현된다.

[0041] 본 발명은 또한, TRAF3IP2-AS1의 eRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 간암의 진단용 조성물을 제공한다.

[0042] TRAF3IP2-AS1의 바이오마커의 발현 수준은 eRNA의 발현 수준을 확인함으로써 알 수 있다.

[0043] 본 발명에서 "eRNA 및/또는 mRNA 발현수준 측정"이란 간암을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 상기 eRNA 및/또는 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, eRNA 및/또는 mRNA의 양을 측정함으로써 알 수 있다.

이를 위한 분석 방법으로는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0044] eRNA 및/또는 mRNA 수준을 측정하는 제제는 바람직하게는 프라이머 쌍 또는 프로브이며, TRAF3IP2-AS1의 유전자의 핵산 서열이 밝혀져 있으므로 당업자는 상기 서열을 바탕으로 이들 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭하는 프라이머 또는 프로브를 디자인할 수 있다.

[0045] 본 발명에서 프라이머는 짧은 자유 3말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 합성을 개시할 수 있다.

[0046] 본 발명에서는 예를 들어 TRAF3IP2-AS1의 유전자의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성 여부를 통해 간암을 진단할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[0047] 본 발명에서 프로브는 eRNA 및/또는 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링 되어 있어서 특정 eRNA 및/또는 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클로타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 예를 들어 본 발명에서는 TRAF3IP2-AS1의 폴리뉴클레오티드와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부를 통해 간암을 진단할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[0049] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, "캡화", 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.

[0050] 상기 TRAF3IP2-AS1의 수준을 측정하는 제제 및 방법에 대한 예시는 CRAMP1, CTSA, DCAF15, DHX37, ERVK3-1, PRPF31, REXO4, SNRPA, STX16, ZNF234에도 동일하게 적용될 수 있다.

[0052] 본 발명에 있어서, 상기 간암의 진단용 조성물은 단독, 또는 2 이상의 바이오마커의 조합에 대한 eRNA, 및/또는 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 제한없이 포함할 수 있다.

[0054] 예를 들어, 본 발명에 따른 간암의 진단용 조성물은 TRAF3IP2-AS1 eRNA와 관련된 mRNA로 CRAMP1, CTSA, DCAF15, DHX37, ERVK3-1, PRPF31, REXO4, SNRPA, STX16 및 ZNF234로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 더 포함할 수 있다.

[0055] 상기 관련된 mRNA는 TRAF3IP2-AS1 eRNA와 간암 및 정상 조직에서 동일 유사 발현 패턴을 보이기 때문에, 보다 정확한 진단 정보를 제공할 수 있다.

[0056] 또한, 필요에 따라, 마커의 양을 확인할 수 있는 공지된 방법이면 제한없이 이용할 수 있기 때문에, 다중 마커들, 즉 eRNA의 다량 분석을 위해 ChIP-Seq, ChIP-qPCR, ATAC-Seq, DNase-seq, FAIRE-seq, CLIP-seq, RIP-seq 및 luciferase assay로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상이 이용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0058] 또한, 상기 mRNA를 고려할 때의 발현 수준의 측정은 이의 단백질 발현 수준을 측정하는 제제를 이용하는 것일 수 있다. 즉, CRAMP1, CTSA, DCAF15, DHX37, ERVK3-1, PRPF31, REXO4, SNRPA, STX16 및 ZNF234에 대해서는 이의 단백질 발현 수준을 측정하는 제제로써 이의 발현 변화의 측정을 하는 것이 또한 가능하다.

[0059] "단백질의 수준 측정"이란 암을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 마커 유전자로부터 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 구체적으로는, 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항

체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다.

[0060] 본 발명에서, "항체"란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 상기한 바와 같이 마커 단백질이 규명되었으므로, 이를 이용하여 항체를 생성하는 것은 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다.

[0061] 다클론 항체는 상기한 마커 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 제조 가능하다.

[0062] 단일클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method)(Kohler 및 Milstein (1976) European Jounral of Immunology 6:511-519 참조), 또는 파지 항체 라이브러리(Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전지영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제할 수 있다.

[0063] 또한 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab') 2 및 Fv 등이 있다.

[0064] 상기 항체를 이용하여 이와 결합한 표적 단백질의 양을 확인하기 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, 엘라이자(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0066] 본 발명은 또한 TRAF3IP2-AS1의 eRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 간암의 진단용 키트를 제공한다.

[0067] 본 발명의 키트는 간암 진단을 위한 바이오마커인 TRAF3IP2-AS1의 바이오마커, 즉 eRNA의 발현 수준을 확인함으로써 검출할 수 있다. 본 발명의 진단용 키트에는 간암 바이오마커의 발현 수준을 측정하기 위한 프라이머, 프로브 뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.

[0068] 구체적으로, TRAF3IP2-AS1의 eRNA 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는, 바이오마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 RT-PCR 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNAse 억제제, DEPC-수(DEPCwater), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한 정량 대조구로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다. 또한 바람직하게는, 본 발명의 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 진단용 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는, 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기판, 및 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한, 기판은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다. 예를 들어, 핵산 증폭용 시약은 중합효소, dNTP, 완충제, 핵산, 조효소, 형광물질, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 중합 효소는 예를 들어 Taq 중합효소이다. 상기 키트는 핵산 분리용 시약을 더 포함할 수 있다. 상기 핵산 분리용 시약은 세포 용해 용액을 포함할 수 있다. 세포 용해 용액은 염, 계면활성제, 금속 이온, 당, 환원제(예, DTT), 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0070] 본 발명에 있어서, 상기 간암의 진단용 키트는 앞서 살핀 조성물에서와 같이 단독, 2 이상의 바이오마커의 조합에 대한 즉, eRNA; 및 상기 관련 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 제한없이 포함할 수 있으며, 바람직한 예는 앞서 살핀 바와 같다.

[0071] mRNA의 발현 수준 측정에 관한 사항은 앞서는 eRNA의 발현 수준 측정에 관한 사항을 적절히 적용할 수 있다.

[0073] 이에 따라, TRAF3IP2-AS1 eRNA와 관련된 mRNA로 CRAMP1, CTSA, DCAF15, DHX37, ERVK3-1, PRPF31, REXO4, SNRPA, STX16 및 ZNF234로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준

을 측정하는 제제를 더 포함하여 키트를 구성할 수 있다.

[0074] eRNA 및 mRNA를 기반으로 측정되고 제공되는 키트는 위 살핀바와 같다.

[0075] 한편, mRNA 마커의 단백질을 기초로 고려할 때, 이의 단백질 발현 수준을 측정하는 제제를 이용하는 키트가 더 포함되어 제공될 수 있다. 예를 들어, ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. ELISA 키트는 마커 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 각 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 ELISA 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 컨주게이트됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다.

[0077] 본 발명은 (a) 분리된 생물학적 시료로부터 TRAF3IP2-AS1의 발현 수준을 측정하는 단계;

[0078] (b) 상기 측정된 발현 수준을 대비되는 정상 대조군 시료의 TRAF3IP2-AS1의 발현 수준과 비교하는 단계; 및

[0079] (c) 상기 생물학적 시료의 TRAF3IP2-AS1의 발현 수준이 대비되는 정상 대조군의 TRAF3IP2-AS1의 발현 수준보다 높을 경우 간암으로 판정하는 단계를 포함하는, 간암 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0081] 상기 (a) 및 (b) 단계의 발현 수준을 eRNA 수준에서 검출할 수 있고, 생물학적 시료에서 eRNA 분리는 공지의 공정을 이용하여 수행할 수 있다.

[0082] 본 발명에서 "시료"란 세포, 조직, 전혈, 혈청, 혈장, 뇌척수액, 타액, 객담 또는 뇨와 같은 시료를 포함하며, 바람직하게 간 조직 시료이다.

[0083] 상기 발현 수준 측정을 통하여, 정상 대조군에서의 eRNA 발현 수준을 간암 의심환자에서의 eRNA 발현 수준과 비교함으로써 간암 의심 환자의 간암 여부 발병 및 진행을 진단할 수 있다.

[0084] 즉, 간암으로 추정되는 세포로부터 본 발명의 바이오마커의 발현 수준을 측정하고, 정상 세포로부터 본 발명의 마커의 발현 수준을 측정하여 양자를 비교한 후, 본 발명의 마커의 발현 수준이 정상 세포의 것보다 더 많이 발현되면 간암으로 추정되며, 이에 따라 간암으로 예측할 수 있는 것이다.

[0085] eRNA 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅, DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 상기 검출 방법들을 통하여, 정상 대조군에서의 eRNA 발현량과 간암 의심환자에서의 eRNA 발현량을 비교할 수 있고, 간암 바이오마커 유전자에서 eRNA로의 유의한 발현량의 증가여부를 판단하여 간암 의심 환자의 발병 여부를 진단할 수 있다.

[0086] eRNA 발현수준 측정은 바람직하게는, 간암 바이오마커로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머를 이용하는 역전사효소 중합효소반응법 또는 DNA 칩을 이용하는 것이다.

[0087] 상기의 역전사효소 중합효소반응은 반응 후 전기영동하여 밴드 패턴과 밴드의 두께를 확인함으로써 간암 바이오마커로 사용되는 유전자의 eRNA 발현 여부와 정도를 확인 가능하고 이를 대조군과 비교함으로써, 간암 발생 여부를 간편하게 진단할 수 있다.

[0088] DNA 칩은 상기 간암 바이오마커 유전자 또는 그 단편에 해당하는 핵산이 유리 같은 기판에 고밀도로 부착되어 있는 DNA 칩을 이용하는 것으로서, 시료에서 eRNA를 분리하고, 그 말단 또는 내부를 형광 물질로 표지된 cDNA 프로브를 조제하여, DNA 칩에 혼성화시킨 다음 간암의 발병 여부를 판독할 수 있다.

[0090] 본 발명에 있어서, 상기 간암의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법은 앞서 살핀 조성물에서와 같이 2 이상의 바이오마커의 조합에 대한 발현 수준 측정을 제한없이 포함할 수 있으며 바람직한 예는 앞서 살핀 바와 같다.

[0091] 상기 언급한 (a) 단계의 eRNA의 측정에 더하여, 추가로 CRAMP1, CTSA, DCAF15, DHX37, ERVK3-1, PRPF31, REXO4, SNRPA, STX16 및 ZNF234로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 하는 단계를 포함할 수 있다. 이에 따라, (b) 상기 측정된 발현 수준을 대비되는 정상 대조군 시료의 CRAMP1, CTSA, DCAF15, DHX37, ERVK3-1, PRPF31, REXO4, SNRPA, STX16 및 ZNF234로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준과 비교하는 단계; 및 (c) 상기 생물학적 시료의 CRAMP1, CTSA, DCAF15, DHX37, ERVK3-1, PRPF31, REXO4, SNRPA, STX16 및 ZNF234로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준이 대비되는 정상 대조군의 TRAF3IP2-AS1의

발현 수준보다 높을 경우 간암으로 판정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0092] 상기 측정 및 판정 방법은 위 살핀 내용을 적절히 변형하여 적용할 수 있다.

[0094] 본 발명은 (a) 분리된 생물학적 시료로부터 TRAF3IP2-AS1의 발현 수준을 측정하는 단계;

[0095] (b) 상기 측정된 발현 수준을 대비되는 정상 대조군 시료의 TRAF3IP2-AS1의 발현 수준과 비교하는 단계; 및

[0096] (c) 상기 생물학적 시료의 TRAF3IP2-AS1의 발현 수준이 대비되는 정상 대조군의 TRAF3IP2-AS1의 발현 수준보다 높을 경우 간암으로 판정하는 단계; 및

[0097] (d) 상기 간암으로 판정된 환자에게 약학적으로 유효한 양의 항암제를 투여하는 단계를 포함하는 간암의 치료 방법을 제공한다.

[0098] 상기 약학적으로 유효한 양은 의학적 용도에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 혈관 투과성 증가를 억제 또는 완화하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0099] 상기 투여는 어떠한 적절한 방법으로 대상에게 항암제를 도입하는 것을 말하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0100] 또한, 위 언급한 바와 같이, 각 단계에서 추가로 상기 관련 mRNA 의 발현 수준에 대한 확인 및 판단을 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0101] 본 발명에 따른 TRAF3IP2-AS1의 바이오마커와 이와 관련된 유전자들은 간암의 진단에 우수한 효과를 보여, 간암 환자의 분류, 이에 따른 치료제 선택, 및 치료 계획 수립에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0102] 도 1은 간암 특이적 enhancer 및 eRNA 발굴을 위한 전체 프로세스에 대한 모식도를 나타낸다.

도 2는 TCGA(The Cancer Genome Atlas) 데이터를 기초로 정상대조군 대비 간암에서 높게 발현되는 eRNA를 분석한 결과를 나타낸다.

도 3은 TCGA(The Cancer Genome Atlas) 데이터를 기초로 정상대조군 대비 간암에서 높게 발현되는, TRAF3IP2-AS1과 발현 상관관계 분석을 통해 확인된 하위 타겟유전자의 발현량 차이, 유의성을 확인한 박스플랏 결과를 나타낸다.

도 4는 TCGA(The Cancer Genome Atlas) 데이터를 기초로 정상대조군 대비 간암에서 높게 발현되는, TRAF3IP2-AS1과 발현 상관관계 분석을 통해 확인된 하위 타겟유전자의 발현량 차이, 유의성, 발현 패턴을 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0103] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 제제예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 제제예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예 또는 제제예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0105] **<실험예 1> ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation-sequencing) 분석**

[0106] 간암 특이적 enhancer 및 eRNA 발굴을 위해 총 8개의 간암(HCC) 세포주 (FT 3-7, Huh 7, Huh 7-5, PCLC PRF 5, SNU 182, SNU 387, SNU 449, HepG2)를 이용하였다

[0107] HCC 세포주들을 1 % 파라포름알데히드로 고정하고 글리신을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 펠릿을 용해 완충액(5mM PIPES pH 8.0, 85nM KCl, 0.5 % NP40, 1X 프로테아제 억제제 (Roche))에 용해시키고 sonication 완충액

(10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.1% SDS, 0.1 % Na-Deoxycholate, 1 % Triton X-100)으로 대부분의 조각 크기가 200 ~ 300bp 범위에 있을때까지 milliTUBE 또는 microTUBE에서 60 분 동안 초음파처리(diagenode)하였다. 각각의 면역 침강에 대해 항체를 첨가하고 실온에서 2 시간 회전시켜 비드 (DynabeadsTM Protein A, Invitrogen)에 결합시켰다. 사용된 항체는 H3 (면역 침 전당 2㎍, Abcam ab1791), H3K27ac (면역 침 전당 2㎍, Abcam ab4729) 및 H3K4me1 (면역 침 전당 2㎍, Abcam ab8895)이었다. 대조군 라이브러리의 경우, 1 ㎍의 비특이적 IgG 마우스 항체를 사용한 면역 침전이 사용되었다. block된 항체-접합된 비드를 자석에 놓고 상층액을 제거하고 초음파 처리된 용해물을 비드에 첨가한 다음 회전기, 4 ° C에서 3 ~ 4 시간 동안 배양하였다. 비드를 세척한 다음 태그를 반응시켰다 (Nextra® DNA Library Prep Kit, illumina). 비드를 세척하고 2.5㎕의 Proteinase K (Roche) 및 1.5ul의 10 % SDS를 포함하는 1X TE 완충액 (10mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA)으로 65 ° C에서 밤새도록 용출하여 포름알데히드 cross-linking을 revert하였다. 마지막으로, DNA를 AMPure XP 비드로 정제하고 각 라이브러리를 증폭하였다 (Nextra® DNA Library Prep Kit, Nextra® Index Kit, illumina). 증폭된 라이브러리는 AMPure XP 비드를 사용하여 정제한 다음 AMPure XP 비드를 사용하여 크기를 선택하여 200-400bp의 조각 길이를 가진 라이브러리를 복구하였다. RNA 라이브러리 시퀀싱은 Illumina HiSeq2000 플랫폼에서 수행되었다.

[0108] **<실험예 2> ChIP-seq 및 Total RNA-seq 분석**

[0109] 활성화된 enhancer 발굴을 위해 H3K4 monomethylation (H3K4me1)과 H3K27 acetylation에 대한 ChIP-seq을 수행하였다. 또한 활성화된 enhancer로부터 발현되는 eRNA의 발굴을 위해 상기 8개의 간암세포주로부터 총 RNA 추출하여 total RNA-seq을 수행하였다.

[0110] 구체적으로, Chip seq를 위하여, 'FastQC' 로 리드 퀄리티 체크 진행 후, 'Trimmomatic' 으로 리드 필터링을 진행하였다. 'Bowtie2' 로 alignment를 진행한 뒤 non-uniquely aligned reads 및 potential PCR duplicates를 제거한 BAM파일을 생성하였다. 이후 'MACS14' 를 사용해 peack calling을 진행하고, 'HOMER' 로 peak annotation을 진행하였다.

[0111] 또한, RNA seq를 위하여, 'FastQC' 로 리드 퀄리티 체크 진행 후, 'Trimmomatic' 으로 리드 필터링을 진행하였다. 'Tophat' 을 사용하여 total RNA-seq 리드를 Reference genom에 alignment하였다. Reference genome은 Ensembl의 GRCh38을 사용하였다. 이후 'Cufflinks' 를 수행하고, 유전자의 발현량을 FPKM으로 구하였다.

[0112] **<실험예 3> 간암 특이적 enhancer 및 eRNA 발굴**

[0113] 간암세포주에서 특이적으로 활성화된 enhancer 및 이로부터 발현되는 eRNA 발굴을 위해, 활성화된 enhancer에서 높게 나타나는 것으로 알려진 H3K27 acetylation peaks을 전체 genome 상에서 선별하였다. 활성화된 enhancer만을 발굴하기 위해 유전자의 promoter나 내부에서 나타나는 H3K27 acetylation peaks은 제외하였다. 다음으로 enhancer에 대한 마커로 알려진 H3K4 monometylation (H3K4me1)의 peaks을 전체 genome에서 선별하였고, 최종적으로 H3K27 acetylation과 H3K4 monomethylation이 동시에 높게 존재하는 활성화된 enhancer 부위를 선별하였다.

[0114] 또한 활성화된 enhancer에서 발현되는 eRNA를 발굴하기 위해 total RNA-seq 데이터와 통합 분석을 진행하였다.

[0115] 이와 관련된 일련의 분석 모식도를 도 1에 나타내었다.

[0116] **<실험예 4> eRNA의 하위 타겟유전자 선별**

[0117] **발현 상관관계 기반 타겟유전자 선별 (Correlation-based identification of target genes)**

[0118] eRNA는 유전자 발현조절, 특히 타겟유전자 발현의 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 eRNA의 발현정도와 타겟유전자의 발현 정도는 매우 높은 상관관계를 나타낼 가능성이 있다. 따라서 각 eRNA(발현의 증가 혹은 감소)와 동일한 발현변화 패턴을 나타내는 유전자들을 선별하여 이를 타겟유전자 후보군으로 선정하였다.

[0119] **<실험예 5> TCGA(The Cancer Genome Atlas) 데이터를 이용한 검증**

[0120] 정산인 간암 시료 50례와 간암환자 시료 50례에서 생산된 RNA-seq 데이터를 활용하여 선별된 eRNA의 발현 패턴을 분석하였다.

[0121] 또한, 기타의 TCGA(The Cancer Genome Atlas) 로 유방암, 두경부암, 신세포암, 폐선암, 폐편평상피세포암 및 위암에 대해서 선별된 eRNA 중 TRAF3IP2-AS1에 대한 발현 변화를 분석하였다.

[0123] **<실험결과>**

[0124] **1. 간암세포주에서 발현되는 eRNA 발굴 및 4개의 간암세포주를 이용한 분석**

[0125] 전체 8개의 간암세포주를 이용하여 활성화된 enhancer와 이로부터 발현되는 eRNA를 분석하여, 총 6개의 eRNA를 발굴하였다.

[0126] 그리고 나서, 8개의 간암세포주 중 유전자 발현 패턴이 유사한 4개의 간암세포주 (F-3-7, Huh-7-5, SNU182, PLC-PRF-5)를 이용하여 총 45개의 eRNA을 선별하였고, 이 중 6개의 eRNA는 8개의 간암 세포주 모두에서 발현되는 것을 확인하였다.

[0127] 그 구체적 분석 결과를 아래 표 1에 나타내었다.

[0128] **[표 1]**

(45 eRNAs)				
AC005104.1	AC096947.1	AL513327.1	LINC-PINT	THRB-AS1
AC007319.1	AC103591.3	CASC19	MIR181A2HG	THRB-IT1
AC007388.1	AC104046.1	DLEU1	MIR4435-2HG	**THUMPD3-AS1**
AC019080.1	AC105942.1	HOXA-AS2	OLMALINC	**TRAF3IP2-AS1**
AC025031.4	AC231533.1	LINC00261	PLEKHA8P1	Z93930.2
AC068631.1	AL023755.1	**LINC00511**	PROX1-AS1	
AC073332.1	AL031963.1	LINC01006	PSMA3-AS1	
AC087482.1	**AL136311.1**	**LINC01572**	**SAP30L-AS1**	
AC090673.1	AL137782.1	LINC01578	SNHG22	
AC096921.1	AL355916.1	LINC02331	STARD13-AS	

[0129]

[0130] 상기 표 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, THUMPD3-AS1, TRAF3IP2-AS1, LINC00511, SAP30L-AS1, LINC01572, AL136311.1의 6종 eRNA가 8개의 간암세포주에서 모두 발현되는 것이 확인되었다.

[0131] **2. TCGA 데이터를 이용한 검증**

[0132] **(1) 간암에서의 검증**

[0133] TCGA 데이터를 이용하여 발굴된 45개의 eRNA의 발현패턴을 확인하였다. 총 11개의 eRNA는 정상(Normal) 간조직(50례) 대비 간암조직(Tumor) (50례)에서 발현이 증가하였다. 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 그 중 특히 TRAF3IP2-AS1의 경우 우수한 진단 효과(즉, 간암과 정상 대조군 사이에 매우 유의적 의미를 가지는 발현 차이를 나타냄)를 나타내었다.

[0134] **(2) 기타 암종에서의 검증**

[0135] TCGA(The Cancer Genome Atlas) 로 유방암, 두경부암, 신세포암, 폐선암, 폐편평상피세포암 및 위암에 대해서 선별된 eRNA 중 TRAF3IP2-AS1에 대한 발현 변화를 분석한 결과, 위 암종들에 대해서는 TRAF3IP2-AS1이 발현 변화가 크게 없거나 오히려 일부 감소하는 등의 결과가 나왔다.

[0136] **(3) 정리**

[0137] 상기 TCGA 데이터를 이용한 검증에서는 간암에서 TRAF3IP2-AS1이 우수한 진단 효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 즉, 암종의 특이성을 고려하여서 간암 특이적으로 우수한 진단 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[0138] **3. eRNA의 하위 타겟유전자 확인**

[0139] **발현 상관관계 분석을 통한 하위 타겟유전자 선별**

[0140] eRNA(발현의 증가 혹은 감소)와 동일한 발현변화 패턴을 나타내는 유전자들을 선별하여 이를 타겟유전자 후보군으로 선정하여 검토한 결과 총 14개의 관련 유전자 중 10 종에 대해서 동일 발현 패턴(즉, 정상대조군 대비 간암에서 증가, 71.43%)을 나타내는 것을 확인하였다.

[0141] 해당 결과를 표 2 및 도 3과 도 4에 나타내었다. Q < 0.01 이면서 normal.mean < tumor.mean 인 유전자들을 선별하였다. box plot에 표기된 유의값은 Q value(adjusted P)이다.

표 2

[0142]

eRNA	mRNA	TCGA normal.mean	TCGA tumor.mean	adjust.p	Pval	Cor	R.squared
TRAF3IP2-AS1	CRAMP1	4.54E-01	7.06E-01	2.68E-09	2.78E-03	9.05E-01	8.24E-01
TRAF3IP2-AS1	CTSA	4.46E+00	5.48E+00	1.37E-15	2.78E-03	9.05E-01	8.21E-01
TRAF3IP2-AS1	DCAF15	2.14E+00	2.38E+00	1.03E-03	2.78E-03	-9.05E-01	7.43E-01
TRAF3IP2-AS1	DHX37	1.37E+00	1.78E+00	1.04E-09	2.78E-03	-9.05E-01	8.37E-01
TRAF3IP2-AS1	ERVK3-1	9.58E-01	1.16E+00	3.41E-05	3.97E-04	-1.00E+00	8.41E-01
TRAF3IP2-AS1	PRPF31	3.58E+00	3.93E+00	1.23E-05	2.78E-03	-9.05E-01	8.21E-01
TRAF3IP2-AS1	REXO4	2.70E+00	2.96E+00	1.03E-03	2.78E-03	-9.05E-01	7.33E-01
TRAF3IP2-AS1	SNRPA	3.22E+00	3.77E+00	1.06E-07	2.78E-03	-9.05E-01	8.56E-01
TRAF3IP2-AS1	STX16	2.39E+00	2.64E+00	4.47E-04	2.78E-03	9.05E-01	7.30E-01
TRAF3IP2-AS1	ZNF234	5.50E-01	7.07E-01	1.82E-03	2.78E-03	-9.05E-01	8.19E-01

[0144] P val : P < 0.05, Cor: |Cor| > 0.9, R.squared: >= 0.7

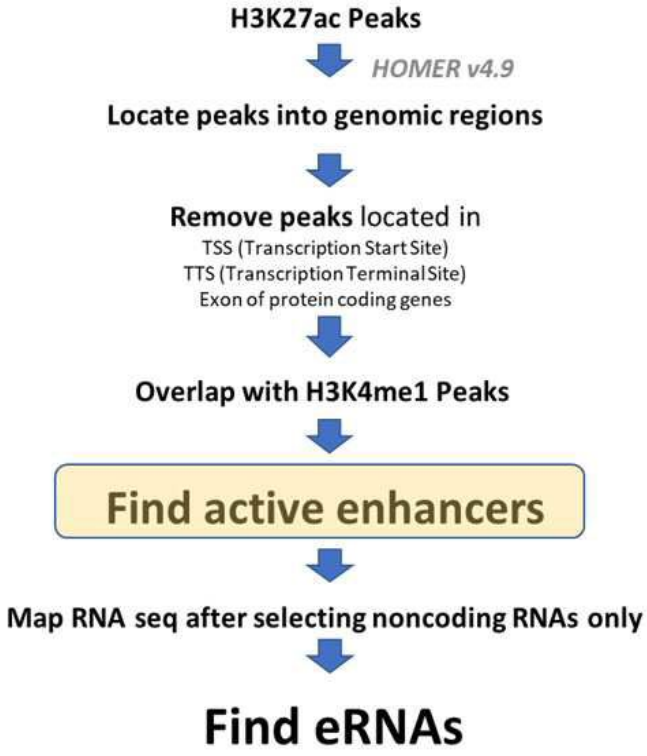
[0145] kendall-tau correlation test를 진행하여 Cor값(=tau값)이 계산되었고, 이 테스트에 대한 P val이다. R.squared 값은 두 값으로 회귀선을 그었을 때, x값이 y값을 얼마나 잘 설명하고 있느냐에 대한 score 값이다.

[0146] 도 3 및 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 발현 상관관계 분석에서 동일 발현 패턴을 나타내는 10종의 유전자는 CRAMP1, CTSA, DCAF15, DHX37, ERVK3-1, PRPF31, REXO4, SNRPA, STX16 및 ZNF234로 확인되었다.

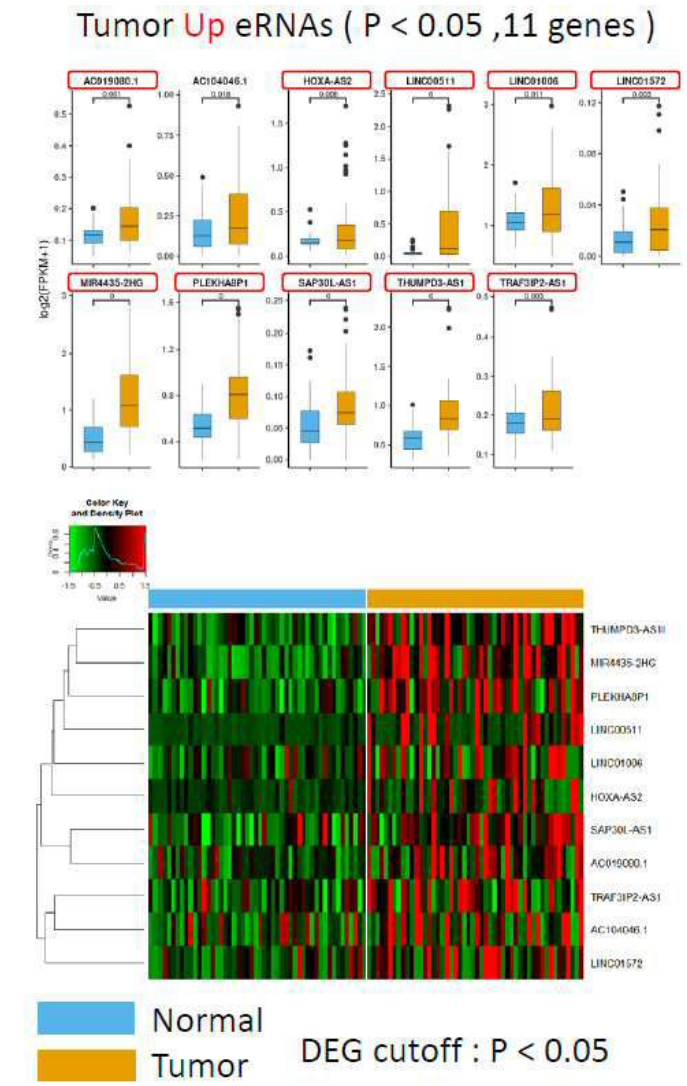
[0147] 상기 결과를 통해서, TRAF3IP2-AS1 뿐만 아니라 이의 발현 상관관계 분석을 통한 하위 타겟유전자가 간암의 진단 마커로 이용될 수 있음을 확인하였다.

도면

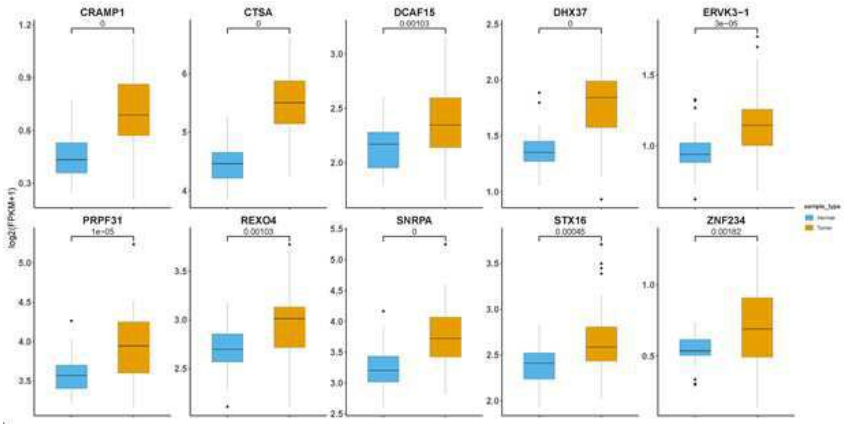
도면1


H3K27ac Peaks
HOMER v4.9
Locate peaks into genomic regions
Remove peaks located in
TSS (Transcription Start Site)
TTS (Transcription Terminal Site)
Exon of protein coding genes
Overlap with H3K4me1 Peaks
Find active enhancers
Map RNA seq after selecting noncoding RNAs only
Find eRNAs

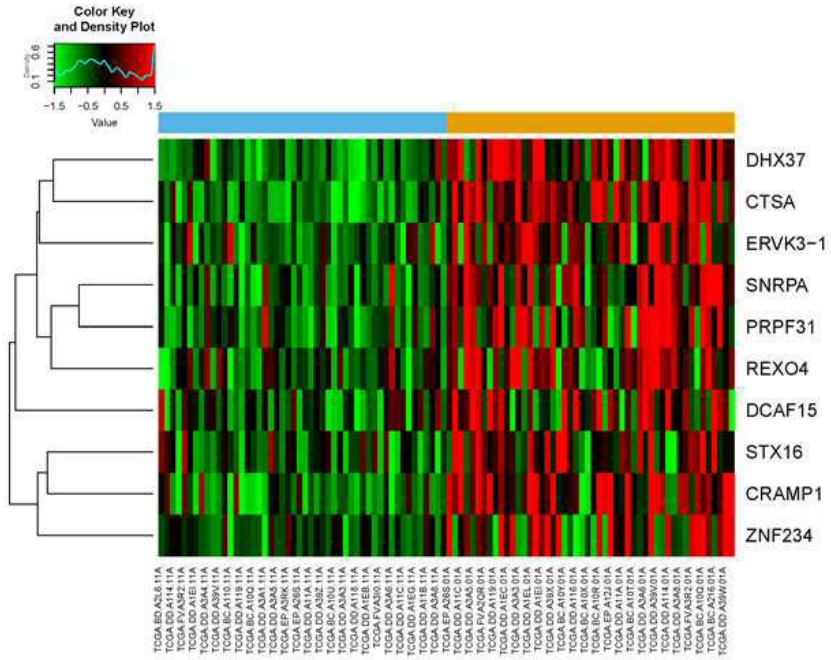
도면2


Tumor Up eRNAs (P < 0.05 ,11 genes)
AC019080.1
AC104046.1
HOXA-AS2
LINC00511
LINC01006
LINC01572
MIR4435-2HG
PLEKHA8P1
SAP30L-AS1
THUMPD3-AS1
TRAF3IP2-AS1
log2(FPKM+1)
Color Key and Density Plot
Value
Normal
Tumor
DEG cutoff : P < 0.05

도면3


CRAMP1
CTSA
DCAF15
DHX37
ERVK3-1
PRPF31
REXO4
SNRPA
STX16
ZNF234
log2(FPKM+1)

도면4



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 2

【변경전】

제1항에 있어서, 상기 eRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 바이오마커에 특이적으로 결합하는 프라이머를 포함하는 것인, 간암의 진단용 조성물.

【변경후】

제1항에 있어서, 상기 eRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 eRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머를 포함하는 것인, 간암의 진단용 조성물.