



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년05월29일
(11) 등록번호 10-2116870
(24) 등록일자 2020년05월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6886 (2018.05)

C12Q 1/6851 (2018.05)

(21) 출원번호 10-2018-0006624

(22) 출원일자 2018년01월18일

심사청구일자 2018년01월18일

(65) 공개번호 10-2019-0088275

(43) 공개일자 2019년07월26일

(56) 선행기술조사문헌

US06946256 B1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 원주산학협력단

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1

(72) 발명자

이혜영

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 미
래관 205호

박선영

강원도 원주시 흥업면 울업2길 19 조은빌 402호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인키

전체 청구항 수 : 총 14 항

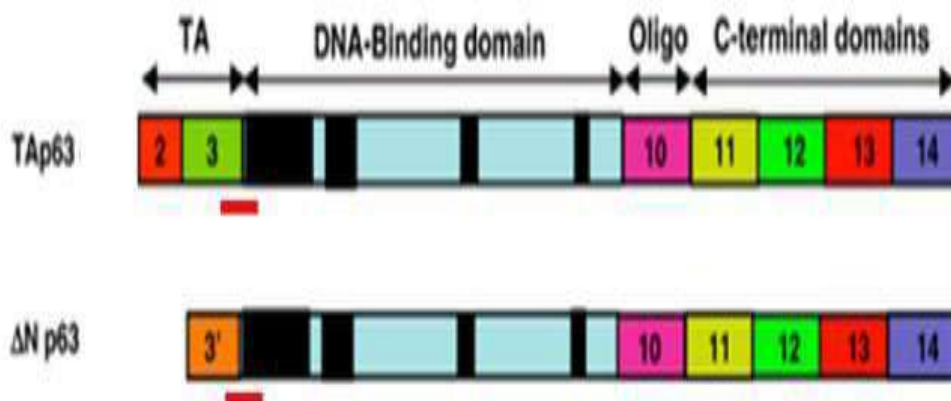
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 실시간 역전사효소 중합반응 기반 자궁경부암 환자의 예후 정보를 제공하는 p63 발현비를 이
용한 분자진단법 및 그 키트

(57) 요약

본 발명은 실시간 역전사효소 중합반응기반 자궁경부암 환자의 예후 정보를 제공하는 p63 발현비를 이용한 분자
진단법 및 그 키트에 관한 것으로, 본 발명은 신속하게 환자의 조직을 이용하여, 환자의 종양의 p63 유전자의
발암 가능성 (Δ Np63의 발현양) 및 종양억제 (TAp63의 발현양) 상태를 한번의 assay과정을 통해 도출하고, 그 발
현비에 따라 환자의 예후정보를 확인할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2563/107 (2013.01)

C12Q 2600/118 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

(72) 발명자

이수지

전라남도 곡성군 겸면 가정길 68

정다은

강원도 원주시 일산로 20 연세대학교 원주세브란스
기독병원 2층 산부인과

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A2A2A04004455

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업

연구과제명 발암기전 연구를 통한 자궁경부암 바이오마커 발굴

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교 원주산학협력단

연구기간 2017.05.01 ~ 2018.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 분리된 조직 또는 분리된 세포로부터 전장 RNA를 분리하는 단계;
- b) 상기 분리된 전장 RNA로부터 cDNA를 합성하는 단계;
- c) 상기 합성된 cDNA를 p63 유전자의 TAp63과 Δ Np63을 증폭할 수 있는 프라이머쌍 및 프로브를 이용하여 실시간 중합효소연쇄반응법을 수행하는 단계;
- d) 상기 증폭된 TAp63과 Δ Np63 발현량을 정상인과 비교하는 단계; 및
- e) Δ Np63/TAp63 발현비를 분석하는 단계를 포함하는 자궁경부암의 예후정보를 제공하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 증폭된 양을 정상인에 대해 증폭된 양과 비교하고 그 발현비를 분석하는 단계는 표준 또는 컷오프 값에 의하여 수행되는 것을 특징으로 하는 자궁경부암의 예후정보를 제공하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 방법은 TAp63과 Δ Np63 Ct 값을 30이하로 하고, 여기에서 Ct 값이란 PCR과정 중 증폭이 뚜렷하게 증가되기 시작한 사이클의 수치를 의미하는 것을 특징으로 하는 자궁경부암의 예후정보를 제공하는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 TAp63을 증폭할 수 있는 프라이머쌍은 서열번호 1 내지 2 에 기재된 프라이머쌍인 것을 특징으로 하는 자궁경부암의 예후정보를 제공하는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 TAp63에 대한 프로브는 서열번호 5에 기재된 프로브인 것을 특징으로 하는 자궁경부암의 예후정보를 제공하는 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, Δ Np63을 증폭할 수 있는 프라이머쌍은 서열번호 3 내지 4에 기재된 프라이머쌍인 것을 특징으로 하는 자궁경부암의 예후정보를 제공하는 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 Δ Np63에 대한 프로브는 서열번호 6에 기재된 프로브인 것을 특징으로 하는 자궁경부암의 예후정보를 제공하는 방법.

청구항 8

서열번호 1 내지 2의 프라이머쌍 및 서열번호 3 내지 4의 프라이머쌍을 유효성분으로 포함하는 자궁경부암의 예후 진단용 조성물.

청구항 9

서열번호 5의 프로브 및 서열번호 6의 프로브를 유효성분으로 포함하는 자궁경부암의 예후 진단용 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 프로브의 5'말단은 형광물질로 표지된 것을 특징으로 하는 자궁경부암의 예후 진단용 조

성물.

청구항 11

삭제

청구항 12

서열번호 1 내지 2의 프라이머쌍 및 서열번호 3 내지 4의 프라이머쌍을 포함하는 자궁경부암의 예후 진단용 키트.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 키트는 서열번호 5의 프로브 및 서열번호 6의 프로브를 추가로 포함하는 자궁경부암의 예후 진단용 키트.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 프로브의 5'말단은 형광물질로 표지된 것을 특징으로 하는 자궁경부암의 예후 진단용 키트.

청구항 15

제 12항에 있어서, 상기 키트는 cDNA 합성에 필요한 시약을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 자궁경부암의 예후 진단용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 실시간 역전사효소 증합반응 기반 p63 발현비를 이용하여 자궁경부암 환자의 예후정보를 제공하는 진단법 및 그 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 자궁경부암은 여성의 암 사망의 주요 원인으로 세계 보건기구(World Health Organization)에 따르면, 전 세계적으로 약 530,000 건의 새로운 사례와 275,000 건의 사망이 발생한다 (Torre, L.A., et al., Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin, 2015; Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, Cancer Statistics, 2017. CA Cancer J Clin, 2017).

[0003] 우리 나라에서는 약 3,500 명의 환자가 자궁경부암으로 진단 받았고 960 명의 환자가 매년 사망한다. 자궁경부암의 주기적인 선별 검사와 적절한 진단 및 치료 전략과 같은 효과적인 가이드라인으로 발생율과 사망률을 감소 하였으나 (Chang, C., et al., Tumor Size Has a Time-Varying Effect on Recurrence in Cervical Cancer. J Low Genit Tract Dis, 2016; Yang, A., et al.; Tomao F, Maruccio M, Preti EP, Boveri S, Ricciardi E, Zanagnolo V, Landoni F (2017) Conization in Early Stage Cervical Cancer: Pattern of Recurrence in a 10-Year Single-Institution Experience. Int J Gynecol Cancer 27: 1001-1008),

[0004] 자궁경부암의 5년 생존율은 약 70%로. 생존율은 전암단계에서 93 %, Stage I에서 87 %, Stage II에서 60 %, Stage III에서 33 %, Stage IV에서 16 %으로 초기 단계에서 후기 단계로 갈수록 치료가 잘되지 않는다 (Edge SB, Compton CC (2010) The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. Ann Surg Oncol 17: 1471-1474).

[0005] 대부분의 자궁 경부암환자는 표준 치료법에 비교적 잘 반응하지만 일부 종양은 여전히 생물학적으로 더 공격적이거나 치료 후 재발을 보인다 (Chang, C., et al., Tumor Size Has a Time-Varying Effect on Recurrence in Cervical Cancer. J Low Genit Tract Dis, 2016; Hanprasertpong, J. and I. Jiamset, Late Recurrence of Early Stage Cervical Cancer more than 3 Years after Radical Hysterectomy with Pelvic Node Dissection. Oncol Res Treat, 2017).

[0006] 환자의 개인 특성과 예후의 다양성 때문에 환자의 종양 특성을 파악하기 위한 추가적인 분자 검사법이

필요하다.

- [0007] p63 및 p73은 구조적 및 기능적으로 유사하기 때문에 잘 알려진 종양 억제 유전자 인 p53 family이다. 전사활성화 (TA) 도메인, DNA 결합 도메인 (DBD) 및 올리고머 도메인 (OD)의 p53 family 와 비슷한 구조를 가지고 있으며, 일반적으로 세포주기정지와 세포사멸을 유도한다. 그러나, p53과 달리, p63과 p73은 $\Delta Np63$ 과 $\Delta Np73$ 을 지닌 결실 TA 도메인을 가지고 있다. 특히, p63은 주로 표피에서, p73은 뉴런에서 주로 발현하며 (Pflaum J, Schlosser S, Muller M (2014) p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. Front Oncol 4: 285; Gonfloni S, Caputo V, Iannizzotto V (2015) P63 in health and cancer. Int J Dev Biol 59: 87-93; Nekulova M, Holcakova J, Coates P, Vojtesek B (2011) The role of p63 in cancer, stem cells and cancer stem cells. Cell Mol Biol Lett 16: 296-327; Inoue K, Fry EA (2014) Alterations of p63 and p73 in human cancers. Subcell Biochem 85: 17-40.),
- [0008] 자궁경부암은 대부분 편평상피암이므로 자궁경부암에서 p63의 발현을 이해하는 것이 유용하다.
- [0009] p63은 N-말단 부위의 전사활성화 부위(TA)에서 두 개의 프로모터의 선택적인 스플라이싱으로 두 개의 isoform, TAp63과 $\Delta Np63$ 을 암호화한다. p63유전자의 프로모터 부위 P1은 전사활성화(TA) 도메인이 포함된 'N 말단 TA 도메인'을 합성하고, P2는 TA 도메인이 결여된 ' $\Delta Np63$ '을 유도한다. TAp63 및 $\Delta Np63$ 전사체는 C-말단 선택적 스플라이싱을 거쳐 6 개의 추가 C-말단 이소 타입, TAp63 α , β , γ 및 $\Delta Np63$ α , β , γ 를 생성한다.
- [0010] p63 단백질의 기능은 상피 줄기 세포의 상피 증화, 분화 및 증식을 한다고 알려져 있다. 정상적인 발달과 항상성에서의 역할 외에도 유방, 두경부, 자궁 경부 및 폐의 편평 상피암 (SCC)과 같은 다양한 유형의 암에서 p63 발현의 조절 완화가 관찰된다(King KE, Ha L, Camilli T, Weinberg WC (2013) Delineating Molecular Mechanisms of Squamous Tissue Homeostasis and Neoplasia: Focus on p63. J Skin Cancer 2013: 632028; Dotsch V, Bernassola F, Coutandin D, Candi E, Melino G (2010) p63 and p73, the ancestors of p53. Cold Spring Harb Perspect Biol 2: a004887.
- [0011] 특히, TAp63은 종양 억제 기능을 한다고 알려져 있으며, 상피 줄기 세포의 유지 및 세포주기 정지, 노화 및 세포 자멸사를 유도한다. 반면, $\Delta Np63$ 은 발암기능으로서 배아 세포와 표피 세포의 분화, 세포 증식, 자가 재생 및 억제를 일으킨다고 알려져 있다. 한 유전자 내에서 발암조절과 억제 조절이 둘 다 일어날 수 있기 때문에, 이 두 유전자의 발현양상 및 그 비를 측정하는 것은 매우 중요할 것이다.
- [0012] 그러나, 현재의 예후를 확인하기 위한 p63 진단법은 항체를 이용한 검사법으로 TAp63과 $\Delta Np63$ 를 구분없이 검출하는 DNA oligomerization 부위에 한정된 epitope을 가지고 있어, TAp63과 $\Delta Np63$ 을 구분하여 확인하기에는 한계가 있으며, 이에 따라 환자 내의 p63의 역할이 Oncogene과 Tumor suppressor 발현의 현재 상태를 파악하기 어려운 점이 있다.
- [0013] [선행 특허 문헌]
- [0014] 대한민국 특허공개번호 제2003-0080002호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0015] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 신규한 자궁경부암의 예후를 확인하기 위한 p63 진단법을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 다른 목적은 신규한 자궁경부암의 예후를 확인하기 위한 조성물을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 분자진단을 이용하여 자궁경부암 환자의 예후 정보를 제공하는 진단용 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0018] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 a) 조직 또는 세포로부터 전장 RNA를 분리하는 단계;
- [0019] b) 상기 분리된 전장 RNA로부터 cDNA를 합성하는 단계;
- [0020] c) 상기 합성된 cDNA를 p63 유전자의 TAp63과 $\Delta Np63$ 을 증폭할 수 있는 프라이머쌍 및 프로브를 이용하여 실시

간 중합효소연쇄반응법을 수행하는 단계;

- [0021] d) 상기 증폭된 TAp63과 ΔNp63 발현양을 정상인과 비교하는 단계; 및
- [0022] e) ΔNp63/TAp63 발현비를 분석하는 단계를 포함하는 자궁경부암의 예후정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0023] 일반적으로 사용되는 전장 RNA(Total RNA)를 분리하는 방법 및 이로부터 cDNA를 합성하는 방법은 공지된 방법을 통해 수행될 수 있으며, 이 과정에 대한 자세한 설명은 Joseph Sambrook 등, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001); 및 Noonan, K.F. 등에 개시되어 있어 본 발명의 참조로서 삽입될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 프라이머는 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 비제한적인 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. 핵산은 하나 이상의 부가적인 공유 결합된 잔기, 예를 들면, 단백질(예: 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그널 펩타이드, 폴리-L-리신 등), 삽입제(예: 아크리딘, 프소탈렌 등), 킬레이트화제(예: 금속, 방사성 금속, 철, 산화성 금속 등), 및 알킬화제를 함유할 수 있다. 본 발명의 핵산 서열은 또한 검출 가능한 시그널을 직접 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형시킬 수 있다. 표지의 예로는 방사성 동위원소, 형광성 분자, 바이오틴 등이 있다.
- [0025] 상기 표지 물질은 형광, 인광, 화학발광단 또는 방사성을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 표지 물질은 루오리신(fluorescein), 피코에리트린(phycoerythrin), 로다민, 리사민(lissamine) Cy-5 또는 Cy-3일 수 있다. 표적 서열의 증폭시 프라이머의 5'-말단 및/또는 3' 말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 real-time RT-PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광표지 물질로 표지될 수 있다.
- [0026] 본 발명에 적용되는 real-time RT-PCR 방법은 당업계에서 통상적으로 사용되는 공지의 과정을 통해 수행될 수 있다.
- [0027] mRNA 발현수준을 측정하는 단계는 통상의 mRNA 발현수준을 측정할 수 있는 방법이면 제한 없이 사용될 수 있으며, 사용한 프로브 표지의 종류에 따라 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 증폭 산물을 검출하는 방법 중의 하나로서, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 real-time RT-PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지되며, 이렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사성 측정 방법은 real-time RT-PCR 수행시 ³²P 또는 ³⁵S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하여 증폭 산물을 표지한 후, 방사성 측정기구, 예를 들면, 가이거 계수기(Geiger counter) 또는 액체섬광계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 방사성을 측정할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 바람직한 일 구현예에 따르면, 상기 realtime RT-PCR을 통해 증폭된 PCR 산물에 형광이 표지된 프로브가 붙어 특정 파장의 형광을 내게 되고, 증폭과 동시에 realtime PCR 장치의 형광 측정기에서 본 발명의 유전자들의 mRNA 발현수준을 실시간으로 측정하고, 측정된 값이 계산되어 PC를 통해 시각화 되게 되어 검사자는 쉽게 그 발현정도를 확인할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 증폭된 양을 정상인에 대해 증폭된 양과 비교하고 그 발현비를 분석하는 단계는 표준 또는 컷오프 값에 의하여 수행되는 것을 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0030] 본 발명에서 $\Delta Np63/TAp63$ 발현 비 = $\Delta Np63 / \Delta \Delta Ct / TAp63 \Delta \Delta Ct = 2^{-(\text{환자군}(\Delta Np63\text{-reference}) - \text{정상군}(\Delta Np63\text{-reference})Ct)} / 2^{-(\text{환자군}(TAp63\text{-reference}) - \text{정상군}(TAp63\text{-reference})Ct)}$ 으로 계산하였다.
- [0031] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 방법은 ΔNp63/TAp63 Ct 값을 30이하로 하고, 여기에서 Ct 값이란 PCR과정 중 증폭이 뚜렷하게 증가되기 시작한 사이클의 수치를 의미한다.
- [0032] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 TAp63을 증폭할 수 있는 프라이머쌍은 서열번호 1 내지 2 에 기재된 프라이머쌍인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니하고, 상기 TAp63에 대한 프로브는 서열번호 5에 기재된 프로브인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니하며,
- [0033] 상기 ΔNp63을 증폭할 수 있는 프라이머쌍은 서열번호 3 내지 4에 기재된 프라이머쌍인 것이 바람직하고, 상기

Δ Np63에 대한 프로브는 서열번호 6에 기재된 프로브인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

- [0034] 또 본 발명은 서열번호 1 내지 2의 프라이머쌍 및 서열번호 3 내지 4의 프라이머쌍을 유효성분으로 포함하는 자궁경부암의 예후 진단용 조성물을 제공한다.
- [0035] 또한 본 발명은 서열번호 5의 프로브 및 서열번호 6의 프로브를 유효성분으로 포함하는 자궁경부암의 예후 진단용 조성물을 제공한다.
- [0036] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 프로브의 5'말단은 형광물질로 표지된 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0037] 또한 본 발명은 서열번호 1 내지 2의 프라이머쌍 및 서열번호 3 내지 4의 프라이머쌍, 서열번호 5 및 6의 프로브를 유효성분으로 포함하는 자궁경부암 진단용 조성물을 제공한다.
- [0038] 또한 본 발명은 서열번호 1 내지 2의 프라이머쌍 및 서열번호 3 내지 4의 프라이머쌍을 포함하는 자궁경부암의 예후 진단용 키트를 제공한다.
- [0039] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 키트는 서열번호 5의 프로브 및 서열번호 6의 프로브를 추가로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니하며,
- [0040] 상기 키트는 cDNA 합성에 필요한 시약을 추가로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0041] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0042] 본 발명에서는 환자의 예후 정보 제공을 위한 실시간 중합효소 연쇄반응 기반 분자진단법을 개발하였다.
- [0043] 본 발명의 분자진단 검사방법으로 실시간 역전사효소 중합반응을 이용할 경우, 2시간 내에 발현양을 확인할 수 있는 점이 큰 장점이다. 본 발명에서는 개발된 TAp63과 Δ Np63을 이용하여 임상정보를 알고 있는 자궁경부암 조직 대상으로 유용성을 평가해 보았다.
- [0044] 본 발명의 구현 예에 있어서, cDNA 합성에 필요한 시약으로 버퍼 및 dNTP, MMLV, DTT를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 아니한다.
- [0045] 본 발명은 실시간 중합효소 반응을 자궁 경부 FFPE 조직에서 Δ Np63의 발현 수준을 조사하고 Δ Np63과 자궁경부암 조직의 임상 변수 사이의 관계를 조사하는 것을 목표로 한다; 종양 크기, FIGO 병기, 림프절, HPV 검사 등이 포함된다. 또한, 본 발명은 자궁경부암의 진단 및 예후 지표로서 Δ Np63의 유용성을 확인했다.
- [0046] 본 발명은 자궁경부암환자의 예후에 대한 정보를 제공하기 위한 분자진단 검사법으로 실시간 중합효소 연쇄반응 법기반을 이용하여 자궁경부암의 예후가 확인된 환자 조직의 RNA를 이용하여 상기 키트의 임상적 유용성을 평가해 보았다.
- [0047] 본 발명의 실시간 중합효소연쇄반응 분자진단법기반 진단키트는 p63 유전자의 N-말단 부분의 TA 도메인 유전자 부위의 결손이 일어난 Δ Np63부위와 결손이 일어나지 않은 TAp63 유전자를 증폭하는 프라이머를 포함하며, 형광 프로브를 이용하여 TAp63과 Δ Np63에 특이적인 PCR (RT-qPCR)로 기 발명된 유전자 발현양의 정량 검사를 수행한다.
- [0048] 한 환자내의 TAp63과 Δ Np63의 발현양 측정값과 그 환자의 Δ Np63/TAp63의 발현비를 구하여 정량화 하는 분자진단 검사법으로 구성되었다. 역전사효소 중합반응 (1시간) 및 실시간 중합효소 연쇄반응법을 진행하는 데 걸리는 시간은 PCR 진행 (1시간)내에 확인이 가능한 부분이 큰 장점이다.

발명의 효과

- [0049] 본 발명은 신속하게 환자의 조직을 이용하여, 환자의 종양의 p63 유전자의 발암 가능성 (Δ Np63의 발현양) 및 종양억제 (TAp63의 발현양) 상태를 한번의 assay과정을 통해 도출하고, 그 발현비에 따라 환자의 예후정보를 확인할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0051] 도 1은 p63 유전자 서열 및 TAp63과 Δ Np63의 프라이머 및 프로브 위치에 대한 그림,
- 도 2는 자궁경부암 세포주를 이용한 TAp63및 Δ Np63의 발현비의 실시예,

- 도 3은 정상대비 자궁경부암 환자의 TAp63 발현양 및 ΔNp63 발현양 분석결과의 실시예,
 도 4는 정상대비 자궁경부암 환자의 ΔNp63/ TAp63 발현비 분석결과의 실시예,
 도 5는 임상적 유용성을 확인하기 위한 ΔNp63 및 ΔNp63/TAp63 발현비의 ROC 분석 결과의 실시예,
 도 6은 ΔNp63의 발현양과 Ki67 및 hTERT 발현양의 상관성을 분석한 실시예,
 도 7은 ΔNp63/TAp63 발현비과 Ki67 및 hTERT 발현양의 상관성을 분석한 실시예 및
 도 8은 ΔNp63의 발현양과 ΔNp63/TAp63 발현비의 예후를 분석한 실시예

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0052] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재한 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.
- [0053] 본 발명에 사용된 검체는 원주 기독교병원 병리과에 보관된 자궁경부암 환자의 포르말린 고정(FFPE) 조직을 대상으로 환자의 임상정보 및 생존여부를 알고 있는 검체를 대상으로 실시하였다.
- [0054] 본 발명의 프라이머 및 프로브 유용성을 확인하기 위하여 자궁경부암 세포주의 RNA를 이용하여 TAp63 및 ΔNp63의 발현양을 확인하는데 사용하였다.
- [0055] 본 발명의 프라이머 및 프로브의 임상적 유용성을 확인하기 위하여 ΔNp63/TAp63 발현비 결과는 환자의 임상정보 및 환자의 생존 결과를 이용하여 통계학적인 분석을 실시하였다.
- [0057] 실시예 1. 조직 검체로부터 RNA의 분리 및 역전사효소 중합반응
- [0058] 자궁경부암 환자 및 정상 FFPE 검체에서 RNA를 분리하여 역전사효소 중합반응으로 mRNA 유전자들을 증폭하고 이를 실시간 중합효소 연쇄반응법기반 assay에 사용하였다.
- [0060] 실시예 1-1. 조직검체로부터 RNA 분리
- [0061] FFPE 조직 3-4개의 절편을 Scroll된 상태로 취하여, Deparaffinization solution (Qiagen, Hilden, Germany)을 넣어 탈파라핀 후, Qiagen RNeasy FFPE kits (Qiagen, Hilden, Germany)의 프로토콜을 이용하여 RNA를 추출하였다.
- [0063] 실시예 1-2. cDNA 합성
- [0064] 추출된 RNA와 cDNA 합성 시약 (0.25μg의 random hexamer (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), dNTP Mixture (각 2.5mM), DEPC 처리 된 물, 5X 버퍼 (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), 0.1M DTT (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) 및 200 U 역전사 효소 (MMLV-RT, Invitrogen, Carlsbad, California, USA)를 25 °C에서 10 분간, 37 °C에서 50 분간, 70 °C에서 15 분간 반응하여 합성하였다.
- [0066] 실시예 1-3. p63 유전자 증폭 및 발현양 확인
- [0067] 상기 실시예 1-1과 실시예 1-2를 통해 준비한 환자의 cDNA로부터 자궁경부암환자의 p63 유전자를 검출하기 위하여 실시간 중합효소 연쇄반응을 수행하였다.
- [0068] 실험과정의 조성은 10 μL 2 x Tunderbird 프로브 qPCR 믹스 (Toyobo, Osaka, Japan), 3 μL 프라이머 및 TaqMan 프로브 혼합물, 2 μL 주형 cDNA 및 증류수 (DW)를 샘플 당 최종 용량 20 μL로 수행한다.
- [0069] PCR 반응은 Pre-denaturation 과정으로 94 °C에서 3분, denaturation 과정으로 94 °C 3초와 annealing과 elongation과정으로 55°C에서 30초로 40사이클을 수행하여 실시간으로 발현양을 확인할 수 있으며 만들어지는 산물은 96-126bp이다.
- [0070] 본 발명에서 사용된 프라이머 및 프로브(한국 바이오니아에 의뢰하여 합성) 서열은 표 1과 표 2에 기재하였고, 그 p63의 위치는 도 1에 표기하였다.

표 1

유전자	Oligomer	서열번호	염기서열(5' ->3')*	비고
-----	----------	------	-----------------	----

p63	TAp63-F	서열번호 1	TGTATCCGCATGCAGGACT	TAp63 증폭
	TAp63-R	서열번호 2	CTGTGTTATAGGGACTGGTGGAC	
ΔNp63	ΔNp63-F	서열번호 3	AGTGAGCCACAGTACACG	ΔNp63 증폭
	ΔNp63-R	서열번호 4	CCTGAACAGCATGGACCAGCAG	

[0073] 표 1은 본 발명에 사용된 프라이머 서열

표 2

유전자	Oligomer	서열번호	염기서열(5' →3')*	비고
p63	TAp63-P	서열번호 5	TCCTGAACAGCATGGACCAGCA	TAp63 검출
	ΔNp63-P	서열번호 6	CCCTATAACACAGACCACG	ΔNp63 검출
0.		1. 각 probe는 5' 에 FAM dye를 표지하고, 3'에는 BHQ-1 dye를 표지하여 합성하였음.		

[0076] 표 2은 본 발명에 사용된 프로브 서열

[0078] 실시예 2. p63의 발현양 및 ΔNp63/TAp63의 발현비 확인

[0079] TAp63과 ΔNp63의 발현은 형광이 배경 형광보다 훨씬 높은 값을 초과하는 데 필요한 PCR 사이클의 수로 정의되는 Ct를 측정하여 정량화하였다. TAp63과 ΔNp63 mRNA의 양은 CFX Manager Software v1.6 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 참조 유전자에 상대적인 mRNA를 측정하는 비교 CT 방법 (ΔΔCt 방법) (Livak KJ, Schmittgen TD. Methods. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, 2001)을 사용하여 결정 하였다. ΔNp63 ΔΔCt / TAp63 ΔΔCt 의 수식을 이용하여 발현비를 확인하였다.

[0081] 상기 실시예의 결과를 하기에서 서술한다.

[0083] TAp63과 ΔNp63 프라이머 및 프로브의 유용성 평가

[0084] HPV 특성이 다른 다양한 5개의 자궁경부암 세포주 ME-180, SiHa, CaSki, C33A 및 HeLa를 이용하여 TAp63과 ΔNp63 프라이머 및 프로브의 유용성을 평가하였다. 자궁경부암 세포주에서 모두 TAp63 발현양에 비해 ΔNp63 발현양이 높게 나타났고, 통계학적인 유의성을 보임을 확인하였다. 또한, ΔNp63/ TAp63 발현비를 분석하였을 때, 적게는 1.3배에서 많게는 92.5배까지 발현비가 증가함을 확인하였다 [도 2].

[0086] 임상검체에서의 TAp63과 ΔNp63 발현 및 ΔNp63/TAp63의 발현비의 유용성 평가

[0087] 원주기독 병원으로부터 사용된 환자의 특성은 표 3에 요약되어있다. 본 발명에서는 정상 40명 (25 %), CIN1 30명 (18.8 %), CIN3 38명 (23.7 %), SCC 52명 (32.5 %)이다. 환자의 전기 의료 기록 (EMR)에서 연령, 종양 크기, FIGO 병기, 림프절 전이 및 HPV 검사 자료를 검토 하였다. FIGO IIB 이상이 28명 (53.9 %), 림프절 전이가 22명 (42.3 %), 종양 크기가 4 cm 이상인 경우가 22명 (42.3 %), HPV 검사 양성인 경우가 44명 (84.6%) 이었다 [표 3].

표 3

Total (n = 160)	Normal (n = 40)	Pre-cancer (n = 68)		Cancer (n = 52)
	n (%)	CIN1 (n = 30)	CIN3 (n = 38)	n (%)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Age				
< 50 years	26 (65.0)	17 (56.6)	31 (81.6)	19 (36.5)
≥ 50 years	14 (35.0)	13 (43.3)	7 (18.4)	33 (63.5)
Histology				
SCC				52 (100.0)
Tumor size				
< 4 cm				30 (57.7)
≥ 4 cm				22 (42.3)
FIGO stage				
< IIB				21 (40.4)
≥ IIB				28 (53.9)
Unknown*				3 (5.8)
Lymph node metastasis				
Negative				28 (53.8)
Positive				22 (42.3)
Unknown*				2 (3.8)
HPV test				
Negative				8 (15.38)
Positive				44 (84.6)

[0088]

[0089] 표 3은 원주기독병원 자궁경부 정상 및 전암병변과 자궁경부암의 임상정보 결과

[0090] 자궁경부암에서 ΔNp63 mRNA 발현양은 유의하게 증가 하였지만, TAp63 mRNA 발현양은 정상과 암 사이에 유의한 차이를 보이지 않았다 (P = 0.61) [도 3A] (P = 0.0002) [도 3B]. 임상적 유용성을 확인하기 위해, ROC 곡선 분석이 수행되었으며, 곡선 아래의 면적 (AUC) 값에 의해 민감도와 특이도를 확인하였다. AUC 값이 1.0에 가까울수록 민감도와 특이도는 100 %에 가깝다. TAp63의 AUC 값은 0.5135 [95 % 신뢰 구간 (CI) 0.3891-0.6378]이었고 ΔNp63의 AUC 값은 0.7529 [95 % CI 0.6549-0.8509]이다.

[0091] 또한, ΔNp63/TAp63 발현비는 정상대비 암에서 유의하게 증가하였으며 [도 4], 임상적인 유용성을 비교하였을 때, AUC 값은 0.8149 [95 % CI 0.7302-0.8996]이다. 임상적인 ROC 곡선 분석에 따라 도출된 Cut off를 이용하여, 민감도와 특이성을 확인하였을 때, ΔNp63 cut-off 값은 7.6이고, 그에 따른 민감도는 44% 특이도는 95%이었다. ΔNp63/TAp63 cut-off 값은 1.0이고, 그에 따른 민감도는 52 % 였고 특이도는 95 %였다 [도 5].

[0092] 설정된 임상적 cut-off 값을 이용하여, ΔNp63 및 ΔNp63/TAp63을 분석하여 비교한 결과, ΔNp63 컷오프 값이 7.6 일 때 ΔNp63 양성률은 정상인의 경우 5.0 % (2/40), 전암의 경우 25.0 % (17/68), 암의 경우 44.2 %

(23/52)으로 정상에 비해 전암과 암으로 진행될수록 점진적으로 증가하였다. 또한, $\Delta\text{Np63}/\text{TAp63}$ 의 발현율이 1인 경우 양성률은 정상인은 5.0 % (2/40), 전암은 30.9 % (21/68), 전암은 52.0 % (27/52)으로 점진적으로 증가하였다 [표 4]. 결과적으로, $\Delta\text{Np63}/\text{TAp63}$ 으로 분석하였을 때, 더 높은 민감도를 나타내었으며, 정상대비 전암과 암을 진단함에 유용함을 확인하였다.

표 4

ΔNp63 and $\Delta\text{Np63}/\text{TAp63}(\text{Ratio})$ mRNA expression ratio assay				
	ΔNp63 -Positive Cases	Chi-square	Ratio-Positive Cases	Chi-square
	n (%)	(P value)	n (%)	(P value)
Normal (n = 40)	2 (5.0)	Reference	2 (5.0)	Reference
Pre-cancer (n = 68)	17 (25.0)	< 0.01	21 (30.9)	< 0.005
Cancer (n = 52)	23 (44.2)	< 0.001	27 (52.0)	< 0.001

표 4는 ΔNp63 발현 및 $\Delta\text{Np63}/\text{TAp63}$ 발현비이 정상대비 전암과 암을 구분할 수 있는지 분석한 결과 비교표

자궁경부암 조직에서 ΔNp63 발현양과 $\Delta\text{Np63}/\text{TAp63}$ 발현비 및 환자의 임상정보 (나이, 종양 크기, FIGO 병기, 림프절 전이 및 HPV 감염여부)의 연관성을 알아보기 위해 ΔNp63 발현양과 $\Delta\text{Np63}/\text{TAp63}$ 을 cut-off 값에 따라 음성군과 음성군으로 나눈 후, 임상적 연관성을 분석하였다. $\Delta\text{Np63}/\text{TAp63}$ 발현비에서 종양 크기와 통계적으로 유의한 상관관계를 확인하였다 ($P = 0.04$) [표 5].

표 5

Variables	No. of cancer cases	ΔNp63 expression		Chi-square <i>P</i> -value	ΔNp63 to TAp63 expression ratio		Chi-square <i>P</i> -value
	(n = 52)	Positive (n)	Negative (n)		Positive (n)	Negative (n)	
Age (year)							
<50	19	9	10	0.11	8	11	0.39
≥50	33	14	19		19	14	
Tumor size (cm)							
<4	30	10	20	0.06	12	18	0.04
≥4	22	13	9		15	7	
FIGO stage							
Ia-IIa	21	11	10	0.51	11	10	0.93
IIb-IVb	28	12	16		15	13	
Unknown	3		3		1	2	
Lymph node metastasis							
No	28	11	17	0.45	13	15	0.57
Yes	22	11	11		12	10	
Unknown	2	1	1		2		
HPV test							
Negative	8	3	5	1.00	4	4	1.00
Positive	44	20	24		23	21	

[0099]

[0100]

표 5는 ΔNp63 발현 및 ΔNp63/TAp63 발현비와 환자의 임상정보(나이, 종양크기, FIGO 병기, 림프절 전이, HPV 감염여부)와의 상관성 분석

[0101]

ΔNp63/TAp63 발현비와 종양의 크기와 관련 있음을 확인 한 임상결과를 확인한 후, 종양의 특성과 p63의 관계를 파악하기 위해, 종양 증식과 연관되어있다고 알려진 Ki67 및 세포의 불멸화를 유도한다고 알려진 hTERT를 분석하였다. Ki67 mRNA 발현량은 ΔNp63 mRNA 양과 비교 시, 양의 상관 관계를 보였으며 ($r = 0.4284$, $P = 0.0015$) [도 6A], hTERT mRNA 발현량은 ΔNp63 mRNA 발현량과 상관 관계가 없었다 ($r = 0.0336$, $P = 0.8126$) [도 6B].

[0102]

또한, ΔNp63/TAp63 발현비와 Ki67 발현량을 비교하였을 때, 컷 오프 기준 발현 비 음성보다 발현 비 양성에서 Ki67 발현량이 유의하게 높았다 ($P = 0.0197$). 반면 hTERT는 ΔNp63/TAp63 발현비에 따라 유의한 차이를 보이지 않았다 [도 7A 및 도 7B]. 이러한 결과는 ΔNp63 및 ΔNp63/TAp63 발현비와 세포증식과 관련이 있음을 시사한다.

[0103]

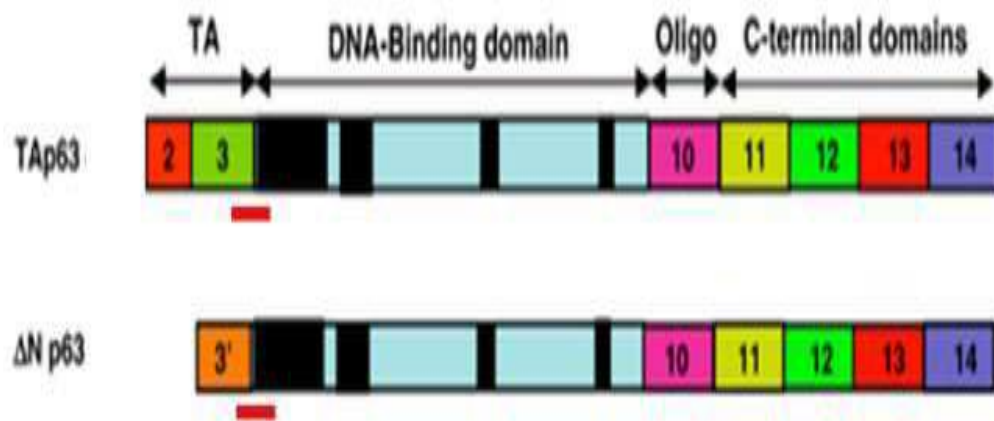
생존분석을 통한 예후를 분석하였다. 자궁경부암 환자 52명 중 33명을 대상으로 5년 생존율을 생존 분석을 하였다. ΔNp63은 7.6의 컷오프 값에 따라 14명의 양성군과 19명의 음성군으로 분류하였다. ΔNp63의 양성군의 생존율은 78.6%였으며, 양성군은 84.2%였다. ΔNp63의 양성 군은 음성 군보다 생존율이 낮았지만 통계적으로 유의하지는 않았다 ($P = 0.62$) [그림 8A].

[0104]

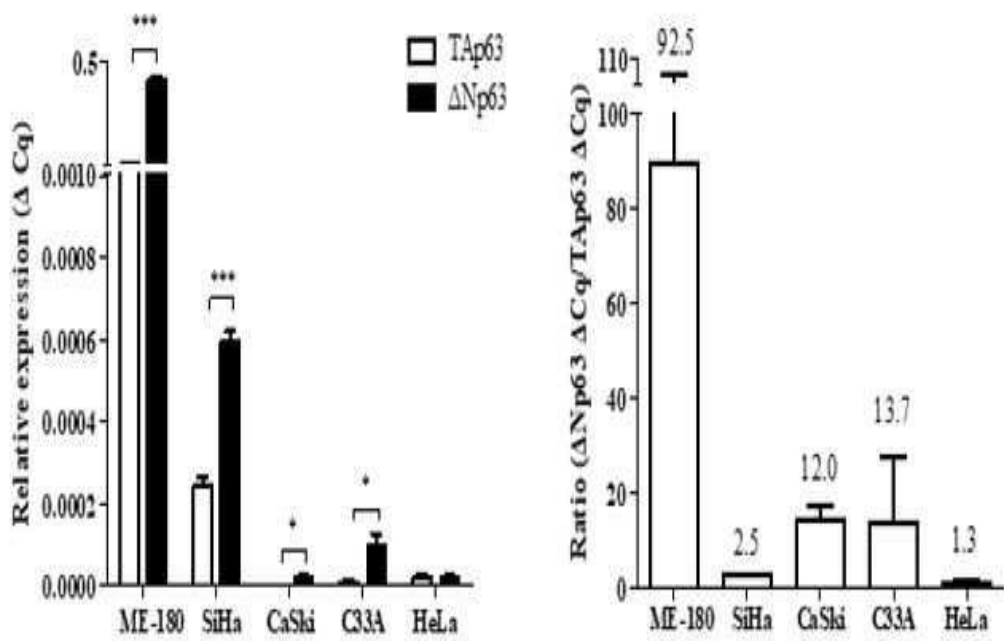
ΔNp63/TAp63 발현비 또한 cut-off 값 1을 기준으로 16명의 양성군과 17명의 음성 군으로 나누었다. 양성 군의 생존율은 68.8 % 였고 음성 군은 93.3 %였다. ΔNp63/TAp63 발현비의 양성군 생존율은 음성군과 비교하여 유의하게 감소함을 확인하였다 ($P = 0.04$) [도 8B]. 이러한 결과는 자궁 경부암 환자의 불량 예후가 ΔNp63의 과발현으로 인한 것이 아니라 TAp63 및 ΔNp63의 균형 붕괴에 기인한다는 것을 시사한다.

도면

도면1

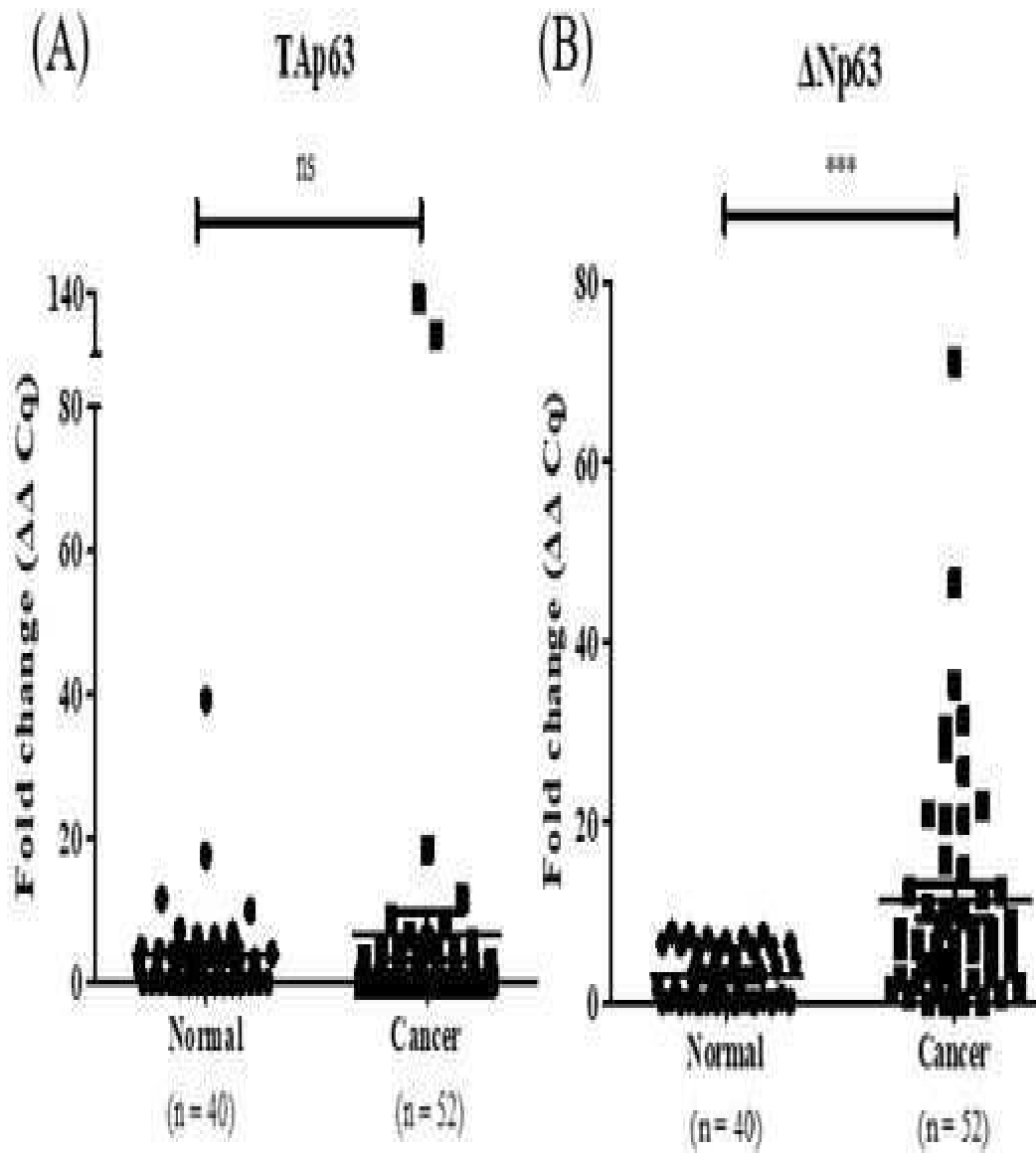


도면2



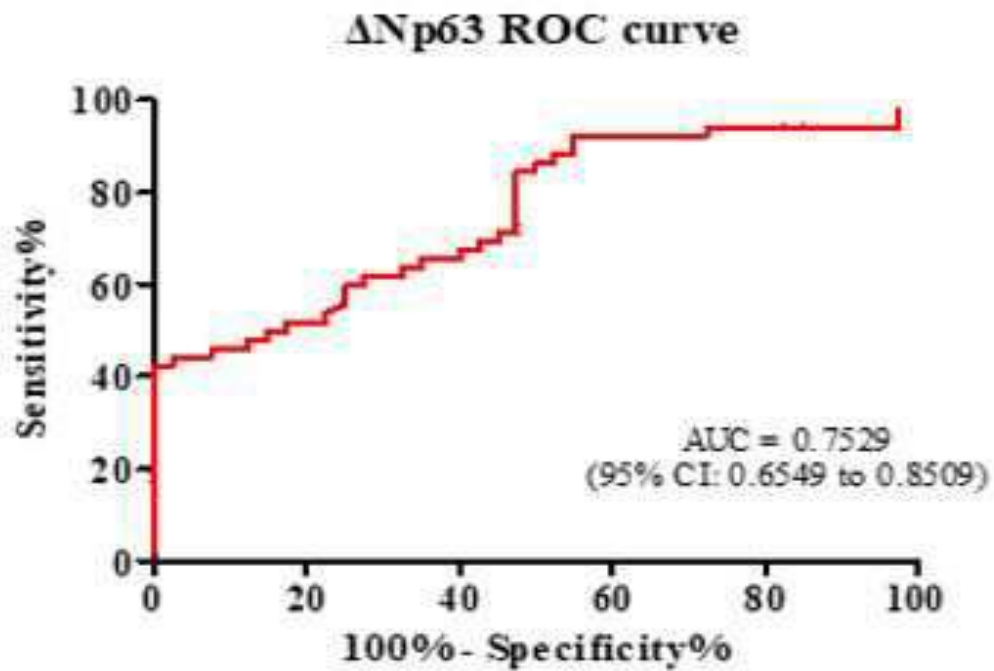
	ME-180	SiHa	CaSki	C33A	HeLa
Disease	Squamous cell carcinoma	Squamous cell carcinoma	Squamous cell carcinoma	Squamous cell carcinoma	Adenocarcinoma
HPV	HPV 68/18	HPV 16	HPV 16	HPV negative	HPV 18

도면3



도면5a

(A)



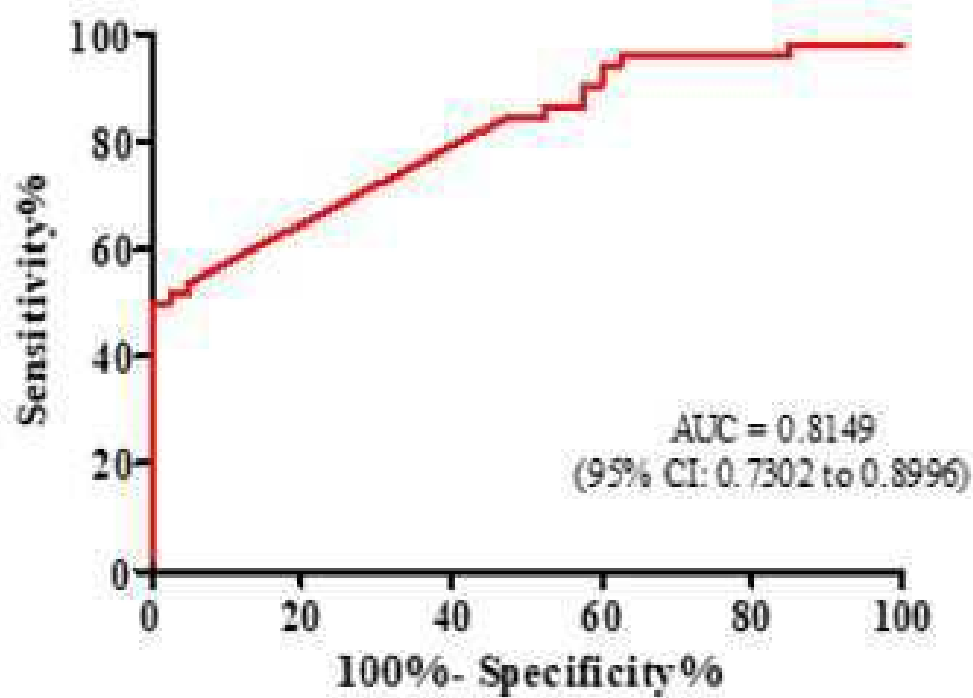
Cut-off value 7.6

Sensitivity: 44%, Specificity: 95%

도면5b

(B)

Δ Np63 to TAp63 expression ratio ROC curve



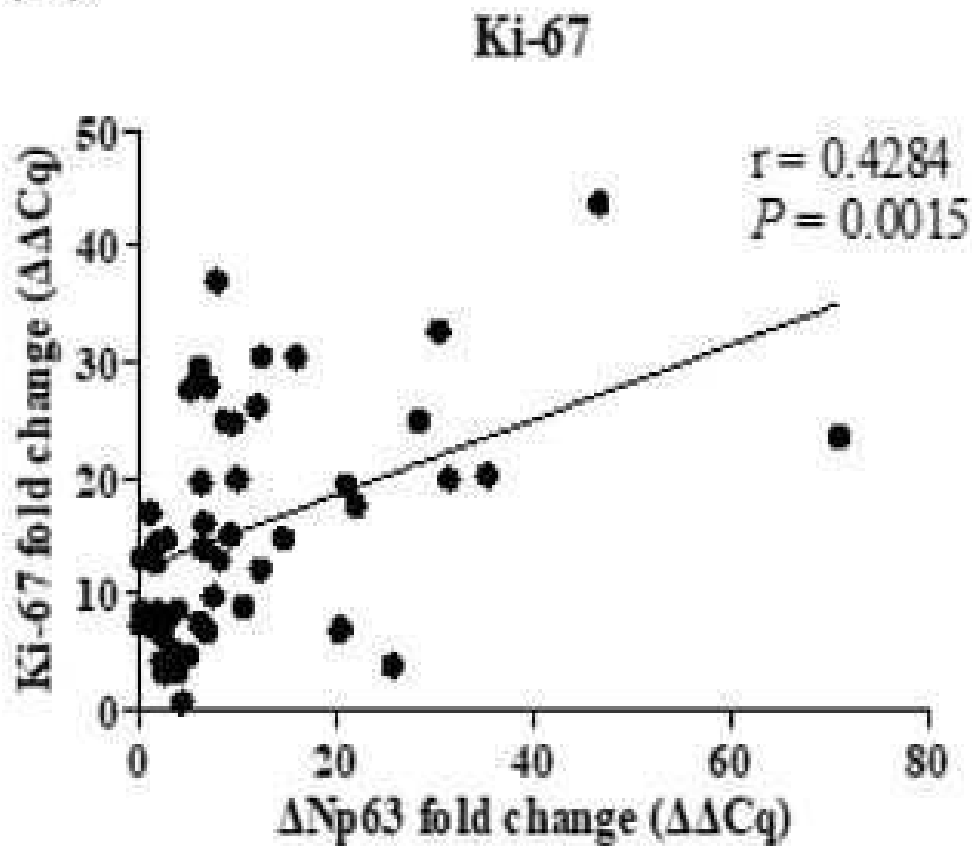
Cut-off value 1.0

Sensitivity: 52%, Specificity: 95%

도면6a

*Ki-67: proliferation marker

(A)

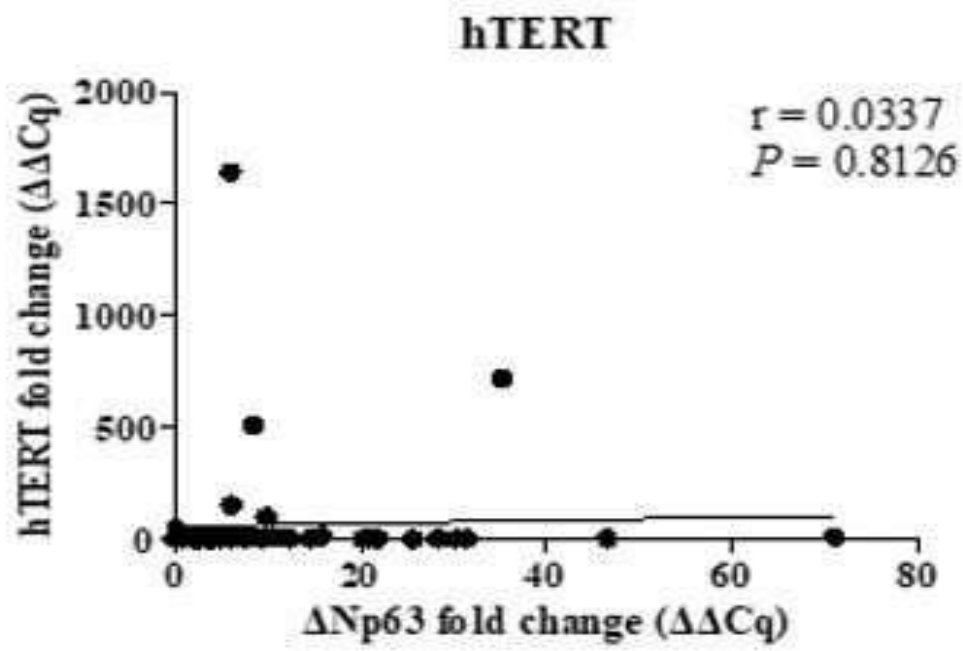


*r, Pearson correlation r

도면6b

*hTERT: immortalization marker

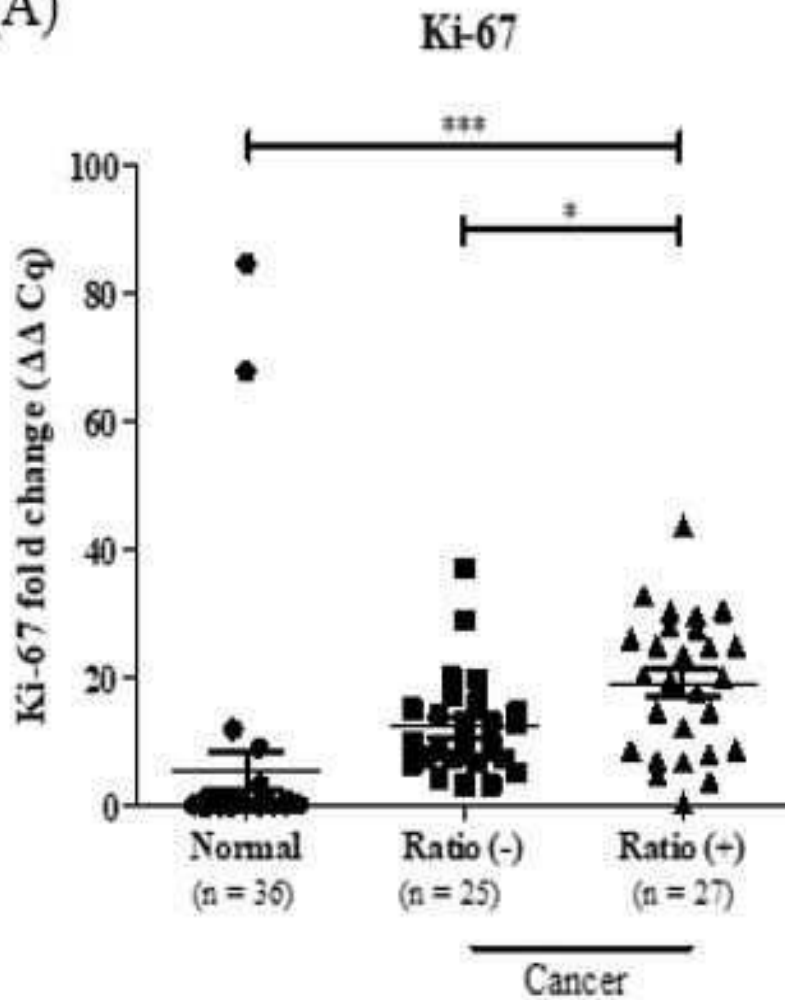
(B)



도면7a

*Ki67: cell proliferation marker

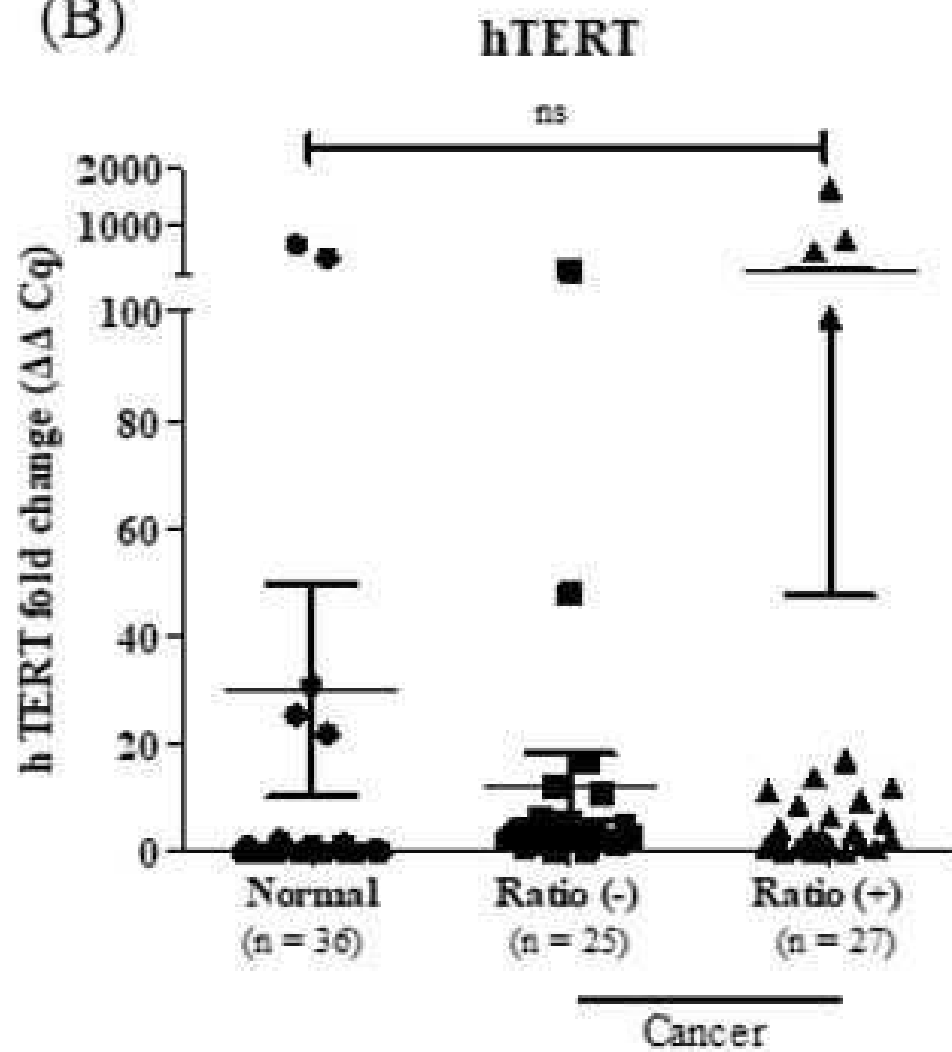
(A)



도면7b

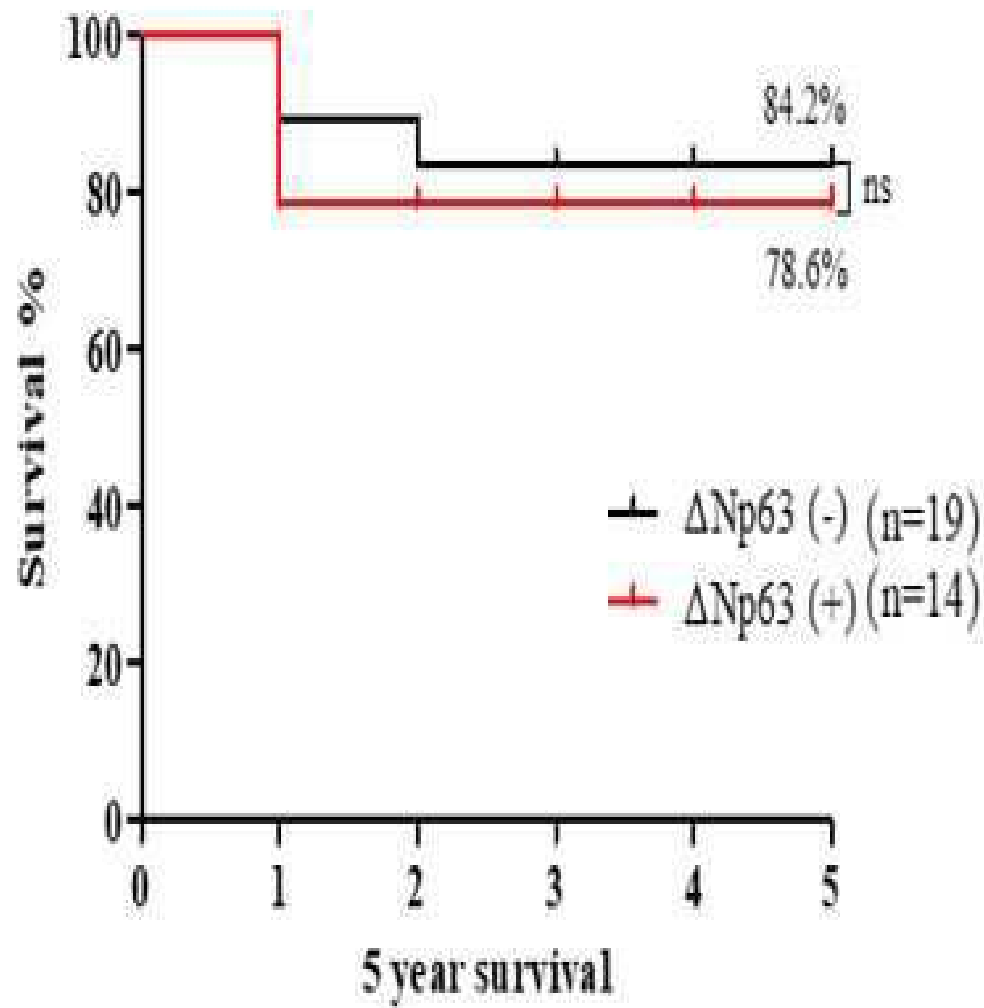
*hTERT: immortalization marker

(B)



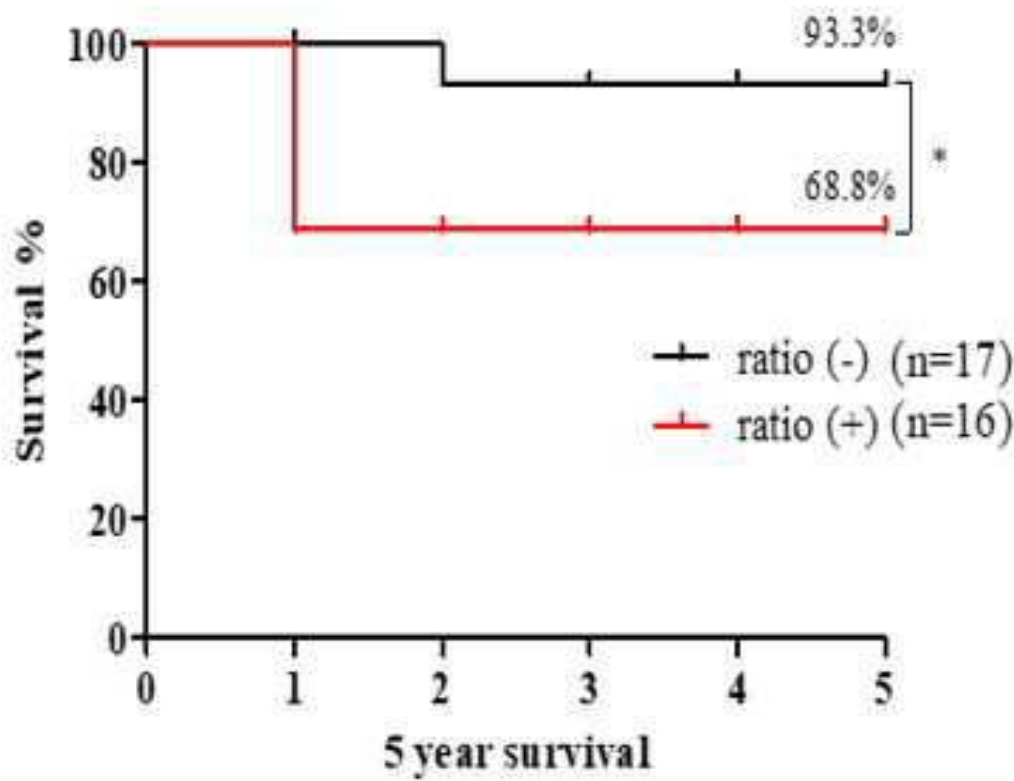
도면8a

(A) Δ Np63



도면8b

(B) ΔNp63 to TAp63 expression ratio



서열 목록

- <110> UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY WONJU CAMPUS
- <120> A method for providing prognosis in cervical cancer, and a kit therefor based reverse transcription real time PCR using p63 expression ratio
- <130> P18-0005HS
- <160> 6
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer
- <400> 1
- tgtatccgca tgcaggact

<210> 2
 <211>
 > 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 2
 ctgtgttata gggactgggtg gac 23
 <210> 3
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 3
 agtgagccac agtacacg 18
 <210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4
 cctgaacagc atggaccagc ag 22

 <210> 5
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 5
 tcctgaacag catggaccag ca 22
 <210> 6
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe

<400> 6

ccctataaca cagaccacg

19