



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월13일
(11) 등록번호 10-2178432
(24) 등록일자 2020년11월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 1/6886 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2019-0055713
(22) 출원일자 2019년05월13일
심사청구일자 2019년05월13일
(56) 선행기술조사문헌
Jihua Guo et al., 'Splicing factor poly(rC)-binding protein 1 is a novel and distinctive tumor suppressor', J Cell Physiol., (2018.08.21.), Vol. 234, pp 33-41. 1부.*
US20160007893 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
강석구
경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 76, 6114동 601호 (이의동, 이편한세상광교)
박준성
서울특별시 강동구 천중로5길 47, 강변깎러시 아파트 203동 403호
(74) 대리인
이재영

전체 청구항 수 : 총 14 항

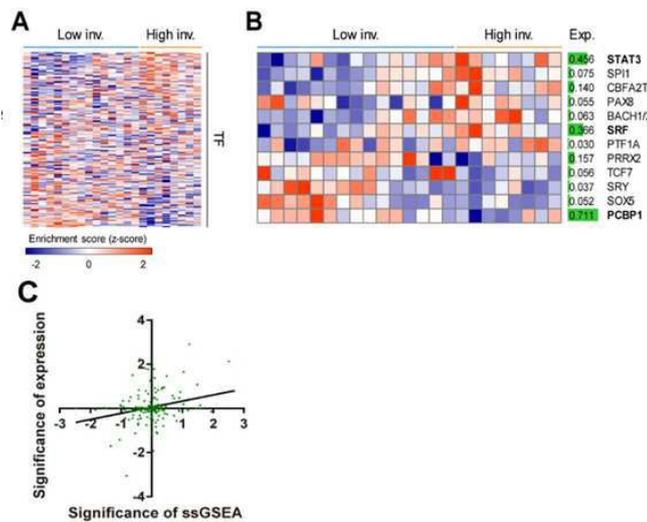
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 **침윤성 뇌암의 진단용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 침윤성 뇌암의 진단용 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 PCBP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 경우에는 목적하는 개체의 침윤성을 매우 효과적으로 예측할 수 있기 때문에, 환자에 적절한 치료 방법 등을 제공하여 이와 같은 치료로 인한 사회적 비용을 현저하게 감소시킬 수 있다. 나아가, 상기 PCBP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 감소되어 있는 경우에는 침윤성이 높아져 전체 생존율이 감소될 수 있기 때문에 뇌암의 예후를 매우 효과적으로 예측할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

- G01N 33/57407 (2013.01)
- G01N 33/57484 (2013.01)
- C12Q 2600/118 (2013.01)
- C12Q 2600/136 (2013.01)
- C12Q 2600/158 (2013.01)
- G01N 2500/04 (2013.01)
- G01N 2800/52 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

- 과제고유번호 HI17C2586
- 부처명 보건복지부
- 과제관리(전문)기관명
- 연구사업명 한국보건산업진흥원-질병중심중개연구(중점연구)
- 연구과제명 에너지대사 조절을 활용한 악성 신경교종 치료제 개발
- 기여율 1/3
- 과제수행기관명 연세대학교 산학협력단
- 연구기간 2017.12.21 ~ 2020.09.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

- 과제고유번호 NRF-2017M2A2A7A01071036
- 부처명 과학기술정보통신부
- 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
- 연구사업명 원자력연구개발사업-방사선기술개발사업
- 연구과제명 방사선치료 저항성 극복을 위한 암 생체에너지 대사 조절 병용 교모세포종 치료 기술 개발

기여율

- 기여율 1/3
- 과제수행기관명 연세대학교 산학협력단
- 연구기간 2017.09.21 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

- 과제고유번호 2017R1C1B2003686
- 부처명 과학기술정보통신부
- 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
- 연구사업명 신진연구자지원사업-신진연구자지원사업(신진연구)
- 연구과제명 통합 유전체 분석을 이용한 교모세포종의 침윤-결정 전사 네트워크 발굴 및 이를 표적으로 하는 새로운 치료 전략 제시

기여율

- 기여율 1/3
- 과제수행기관명 연세대학교 산학협력단
- 연구기간 2017.03.01 ~ 2020.02.29

공지에외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

PCBP1(Poly(RC) Binding Protein 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 침윤성 뇌암의 진단용 조성물로,

상기 뇌암은 교모세포종(Glioblastoma)인 것인, 침윤성 뇌암의 진단용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 뇌암은 암 종양구인 것인, 침윤성 뇌암의 진단용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머인 것인, 침윤성 뇌암의 진단용 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 프라이머 쌍 또는 프로브인 것인, 침윤성 뇌암의 진단용 조성물.

청구항 6

제 1항, 제 3항 내지 제 5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 침윤성 뇌암의 진단용 키트.

청구항 7

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서,

PCBP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 침윤성 뇌암을 예측하기 위한 정보 제공 방법으로,

상기 뇌암은 교모세포종인 것인, 침윤성 뇌암을 예측하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 상기 PCBP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 낮은 경우, 상기 목적하는 개체의 뇌암이 침윤성이 높을 것으로 예측하는 것인, 침윤성 뇌암을 예측하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 9

제 7항에 있어서,

상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계는 웨스턴블랏, ELISA, 방사선면역분석, 면역확산법, 면역 전기영동, 조직 면역염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS, 질량분석, MRM 분석 및 단백질 마이크로어레이로 구

성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 통해 측정하는 것인, 침윤성 뇌암을 예측하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 10

제 7항에 있어서,

상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계는 중합효소연쇄반응, 역전사 중합효소연쇄반응, 경쟁적 중합효소연쇄반응, Nuclease 보호 분석(RNase, S1 nuclease assay), in situ 교잡법, 핵산 마이크로어레이 및 노던블랏으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 통해 측정하는 것인, 침윤성 뇌암을 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

PCBP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 뇌암의 예후 예측용 조성물로,

상기 뇌암은 교모세포종인 것인, 뇌암의 예후 예측용 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

제 11항에 있어서,

상기 뇌암은 암 종양구인 것인, 뇌암의 예후 예측용 조성물.

청구항 14

제 11항 및 제 13항 중 어느 한 항을 포함하는 뇌암의 예후 예측용 키트.

청구항 15

뇌암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 목적하는 후보물질을 처리하는 단계; 및

상기 생물학적 시료에서 PCBP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 확인하는 단계를 포함하는, 침윤성 뇌암 치료제의 스크리닝 방법으로,

상기 뇌암은 교모세포종인 것인, 침윤성 뇌암 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 16

제 15항에 있어서,

상기 후보물질을 처리한 뒤, 상기 생물학적 시료에서 측정된 PCBP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 증가되는 경우, 침윤성 뇌암의 치료제로 선별하는 단계를 더 포함하는 것인, 침윤성 뇌암 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 17

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 침윤성 뇌암의 진단용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 전세계적으로 가장 보편적인 사망원인 중의 하나이다. 약 천만 건의 새로운 케이스가 매년 발생하며, 전체 사망원인의 약 12%를 차지하여 세 번째로 많은 사망의 원인이 되고 있다. 여러 가지 종류의 암 중에서 특히 뇌

암은 연령에 관계없이 발생되며, 소아에 발생 빈도가 다른 암에 비하여 높은 특징이 있다. 상기 뇌암은 뇌 조직과 뇌를 싸고 있는 뇌막에서 발생하는 원발성 뇌암과 두개골이나 신체의 다른 부위에서 발생한 암으로부터 전이된 이차성 뇌암을 통칭하여 일컫는 것으로, 다른 장기에서 발생하는 암과 다른 특징을 나타낸다.

[0003] 신경교종(Glioma)은 원발성 뇌 암(Primary brain tumor)의 60%를 차지하는 종양으로서, 발생 빈도가 높고 치료가 어려워, 현재까지도 방사선 치료 외엔 특별한 치료법이 없는 악성 종양에 해당한다. 신경교종 중에서 특히 교모세포종(GBM; Glioblastoma multiforme)은 인간에서 나타나는 120 가지의 다양한 유형의 원발성 뇌암 중에서 가장 보편적으로 나타나는 형태이며, 공격적인 악성 원발성 뇌암으로서, 신경교세포와 관련된 모든 두개내 종양 중에서 가장 많은 부분을 차지한다. 교모세포종의 경우 유럽 및 북아메리카에서 100,000명 당 2 ~ 3건 정도 발병된다.

[0004] 한편, 상기 뇌암의 경우, 뇌혈관 장벽(Brain Blood Barrier)이 존재하기 때문에 치료를 위한 약물 전달이 목적하는 뇌 부위로 전달되기 어려울 뿐만 아니라, 상대적으로 뇌신경 생물학에 대한 이해가 부족하여 치료제의 개발이 활발하지 못한 것이 현실이다. 더욱이, 교모세포종은 다른 뇌암과 비교해볼 때 공격적 변이(Aggressive variant)를 나타내어, 이를 빠른 시일 내에 치료하지 않으면 몇 주 이내에 치명적인 결과를 초래할 수 있다. 나아가, 상기 교모세포종의 경우 두개강 외에 전이되는 경향성이 매우 높아 다른 뇌암에 비하여 더욱 공격적이라는 특징을 갖는다.

[0005] 현재까지 상기 교모세포종의 치료 방법으로는 동시 또는 순차적인 화학요법, 방사선요법, 항혈관형성 요법, 면역요법, 감마 나이프 방사선 수술 및 코르티코 스테로이드를 이용한 대증 치료뿐만 아니라, 절제술과 같은 치료 방법이 존재한다. 그럼에도 불구하고 교모세포종의 경우 중추 신경계 악성 종양 중에서 예후가 매우 나쁘며, 교모세포종 환자의 경우 평균 생존율이 1년 밖에 되지 않을 뿐만 아니라, 환자의 약 3%만이 3년 이상 생존한다는 한계점이 존재한다. 이에 따라, 뇌암을 조기에 진단하고 예후를 예측할 수 있는 새로운 진단 및 치료 표적에 대한 연구가 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 일 목적은 침윤성 뇌암의 진단용 조성물 및 이를 포함하는 키트를 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 침윤성 뇌암의 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 침윤성 뇌암의 예후 예측용 조성물 및 이를 포함하는 키트를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 침윤성 뇌암의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 침윤성 뇌암의 치료제를 스크리닝 하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 일 구현 예에서는 침윤성 뇌암의 진단용 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 상기 조성물은 PCBP1(Poly(RC) Binding Protein 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함한다.
- [0014] 본 발명의 상기 PCBP1 단백질은 인간의 2번 염색체(70.17-70.17 Mb) 상에 위치하는 유전자에 의해 암호화되는 단백질로서, 주요 세포성 폴리(rC)-결합 단백질을 형성하는 기능을 갖는다. 상기 PCBP1 단백질이 높은 수준으로 존재하는 경우, 유방암 및 난소암 환자의 침윤성이 높을 수 있다(IUBMB Life., 2019 Feb;71(2):177-182.). 반면, 침윤성이 낮은 뇌암 환자와 비교하여, 침윤성이 높은 뇌암 환자에서 PCBP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 현저하게 낮아져 있는 것을 확인하였다(도 2 참고). 본 발명의 목적상 상기 조성물을 이용하여 목적하는 개체에서, 정상 대조군(뇌암이 없는 것으로 확인된 개체 또는 침윤성이 낮은 뇌암이 있는 개체)과 비교하여 PCBP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 낮아져 있는 경우에는 침윤성 뇌암으로 예측할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 상기 PCBP1 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되

는 것은 아니다.

- [0016] 본 발명의 상기 단백질을 암호화하는 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 본 발명의 상기 PCBP1 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열과 최소한 70%의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열로 구성되어, 아미노산 서열의 자연적 또는 인위적인 부가, 결실, 치환 또는 조합된 폴리 펩타이드도 모두 포함되는 것으로서, 예를 들면, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명의 상기 "상동성"이란, 아미노산 서열 간의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 본 발명의 아미노산 서열과 상기와 같은 퍼센트 이상의 동일한 서열을 가지는 서열을 포함한다. 이러한 상동성은 두 서열을 육안으로 비교하여 결정할 수도 있으나, 비교대상이 되는 서열을 나란히 배열하여 상동성 정도를 분석해 주는 생물정보 알고리즘(Bioinformatic algorithm)을 사용하여 결정할 수 있다. 상기 두 개의 아미노산 서열 사이의 상동성은 백분율로 표시될 수 있다. 유용한 자동화된 알고리즘은 Wisconsin Genetics Software Package(Genetics Computer Group, Madison, W, USA)의 GAP, BESTFIT, FASTA와 TFASTA 컴퓨터 소프트웨어 모듈에서 이용 가능하다. 상기 모듈에서 자동화된 배열 알고리즘은 Needleman & Wunsch와 Pearson & Lipman과 Smith & Waterman 서열 배열 알고리즘을 포함한다. 다른 유용한 배열에 대한 알고리즘과 상동성 결정은 FASTP, BLAST, BLAST2, PSIBLAST 및 CLUSTAL W를 포함하는 소프트웨어에서 자동화될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 상기 "뇌암"이란, 두개강 내에서 발생된 모든 종양을 의미하는 것으로서, 예를 들면, 신경교종일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명의 상기 "신경교종"은 원발성 뇌 종양(primary brain tumor)의 60%를 차지하는 종양으로서, 발생 빈도가 높고 치료가 어려워, 현재까지도 방사선 치료 외엔 특별한 치료법이 없는 악성 종양으로서, 예를 들면, 성상세포종, 교모세포종 또는 피지교종 등 일 수 있고, 바람직하게는 교모세포종일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명의 상기 뇌암은 암 종양구인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명의 상기 "암 종양구"란, 암 조직을 구성하는 세포 중 줄기세포(Stem cell)와 유사한 특성을 가지는 일부의 세포가 3차원 배양 조건에서 형성될 수 있는 세포 응집체를 의미한다.
- [0023] 본 발명의 상기 "침윤성"이란, 원발 장기에서 발생된 종양 세포가 암이 진행됨에 따라 전이(metastasis)에 필요한 새로운 유전 형질을 획득한 뒤, 혈관과 림프선으로 침윤(Invasion)되는 현상으로서, 이와 같은 침윤성 높은 경우에는 혈관과 림프선으로 침윤된 종양 세포가 림프를 따라 순환함으로써 원발 장기로부터 다른 장기에 존재하는 조직에 정착한 뒤 증식됨으로써 궁극적으로 다른 장기에 암이 쉽게 전이될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 시료에 포함된 측정 대상이 되는 유전자로부터 암호화되는 단백질의 발현 수준을 측정하기 위한 제제를 의미한다.
- [0025] 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 앵타머일 수 있다. 구체적으로, 상기 제제는 웨스턴 블롯 분석(Western blot assay), ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석 (RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(Radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트 면역전기영동(Rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법(Immunohistochemical staining), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 면역형광법 (Immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(Immunochemistry), FACS(Fluorescenceactivated cell sorter analysis) 및 단백질 칩 분석법(protein chip technology assay) 등의 방법에 사용되는 항체 또는 앵타머를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 상기 "항체"는 단백질 또는 펩티드 분자의 항원성 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 분자를 의미한다. 상기 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리 클로날 항체, 모노 클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이라면, 항체의 일부인 경우라도 포함될 수 있고, 모든 종류의 면역 글로불린 항체가 포함될 수 있다. 또한, 인간화 항체 등의 특수 항체가 포함될 수 있고, 상기 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 의미하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv 등이 될 수 있다.

으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0027] 본 발명의 상기 “엡타머”는 단일 가닥 올리고 뉴클레오티드를 의미하는 것으로, 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 말한다. 상기 엡타머는 그 염기 서열에 따라 다양한 3차원 구조를 가질 수 있으며, 항원-항체 반응과 같이 특정 물질에 대하여 높은 친화력을 가질 수 있다. 엡타머는 소정의 표적 분자에 결합함으로써 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다. 상기 엡타머는 RNA, DNA, 변형된(Modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 그 형태가 직쇄상 또는 환상(環狀)일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 상기 항체는, PCBP1 유전자, 예를 들면 서열번호 2로 표시되는 염기 서열을 통상적인 방법에 따라 발현 벡터에 클로닝하여 상기 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 얻은 뒤에 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있고, 상기 엡타머는 상기 염기 서열을 참조하여 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 공지된 방법에 따라 쉽게 제작할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 상기 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 시료에 포함된 측정 대상이 되는 유전자의 발현 수준을 확인하기 위하여, 상기 측정 대상이 되는 유전자로부터 전사된 유전자, 예를 들면 유전자로부터 전사된 mRNA의 수준을 측정하는 방법에 사용될 수 있는 제제를 의미한다. 구체적으로, 상기 제제는 RT-PCR, 정량 실시간 PCR(quantified real time PCR), 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(real time quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯 분석(Northern blot assay), DNA 칩 분석법 등의 방법에 사용되는 측정 대상이 되는 mRNA에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 쌍 또는 프로브를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명의 상기 “프라이머”는 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3'hydroxyl group)를 가지는 염기 서열로 상보적인 주형 가닥(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고, 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 기능을 하는 짧은 염기 서열을 의미한다. 상기 프라이머는 적절한 완충 용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성이 개시될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 상기 “프로브”는 상기 유전자, 또는 상기 유전자로부터 전사되는 mRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하고, 이와 같은 프로브는 특정 mRNA의 존재 유무, 발현되는 수준(발현량)을 확인할 수 있도록 라벨링되어 있을 수 있다. 상기 프로브는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA)프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명의 상기 프라이머 또는 프로브는 공지된 PCBP1의 염기 서열, 예를 들면 서열번호 2로 표시되는 염기 서열을 참조하여 당해 기술 분야에서 통상이 지식을 가진 자가 공지된 방법에 의해 쉽게 제작될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 다른 구현 예에서는 본 발명의 상기 침윤성 뇌암의 진단용 조성물을 포함하는 침윤성 뇌암의 진단용 키트를 제공한다.
- [0035] 본 발명의 상기 진단용 키트는 상기 침윤성 뇌암의 진단용 조성물을 사용하여 정상 대조군에 비하여 목적하는 개체의 생물학적 시료에서 PCBP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 감소되어 있는 경우, 뇌암의 침윤성이 높을 수 있음을 매우 효과적으로 예측할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 상기 진단용 키트에서, PCBP1 단백질 및 이를 암호화하는 유전자, 침윤성, 뇌암, 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제, 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제 등은 상기 진단용 조성물에서 기재한 바와 중복되어, 이하 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.
- [0037] 본 발명의 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(Rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트 등 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 상기 키트가 유전자의 발현 수준을 측정하기 위한 경우에는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 테옥시뉴클레오티드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등이 더 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 상기 키트가 단백질의 발현 수준을 측정하기 위한 경우에는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기재, 적

당한 완충 용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등이 포함될 수 있다.

- [0040] 본 발명의 상기 기제는 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지 또는 폴리스티렌 수지로 형성된 96웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드글라스 등이 사용될 수 있고, 상기 발색 효소는 퍼옥시다아제(peroxidase), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline Phosphatase)가 사용될 수 있으며, 형광물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있고, 발색 기질액은 ABTS(2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)), OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘)가 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 침윤성 뇌암을 예측하기 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0043] 본 발명의 상기 정보 제공 방법은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, PCBP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0044] 본 발명의 상기 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 상기 PCBP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 낮은 경우, 상기 목적하는 개체의 뇌암이 침윤성이 높을 것으로 예측할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 상기 "정상 대조군"은 뇌암으로 진단받지 않은 개체 또는 타 기관으로 암 세포의 침습이 일어나지 않은 것으로 확인된 개체일 수 있고, 바람직하게는 타 기관으로 암 세포의 침습이 일어나지 않은 것으로 확인된 개체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명의 상기 침윤성 뇌암을 예측하기 위한 정보 제공 방법에서, PCBP1 단백질 및 이를 암호화하는 유전자, 침윤성, 뇌암 등은 상기 진단용 조성물에서 기재한 바와 중복되어, 이하 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.
- [0047] 본 발명의 상기 PCBP1 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계는 본 발명의 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 이용하여, 웨스턴블랏, ELISA, 방사선면역분석, 면역확산법, 면역 전기영동, 조직 면역염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS, 질량분석, MRM 분석 및 단백질 마이크로어레이로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 통해 측정할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 상기 PCBP1 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계는 본 발명의 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 이용하여, 중합효소연쇄반응, 역전사 중합효소연쇄반응, 경쟁적 중합효소연쇄반응, Nuclease 보호 분석(RNase, S1 nuclease assay), 인 시츄(in situ) 교잡법, 핵산 마이크로어레이 및 노던블랏으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 통해 측정하는 것일 수 있다.
- [0049] 본 발명의 상기 생물학적 시료는 개체로부터 얻어지거나 개체로부터 유래된 임의의 물질, 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것으로, 예를 들면, 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma) 및 혈청(serum)을 포함하는 혈액, 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 골반 내 유체액(pelvic fluids), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid) 등 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 뇌암의 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [0052] 본 발명의 상기 예후 예측용 조성물은 PCBP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함한다.
- [0053] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 PCBP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 감소되어 있는 경우, 뇌암의 침윤성이 증가되고 이를 통해 궁극적으로 뇌암이 발생한 개체의 전체 생존율이 현저하게 감소될 수 있음을 확인하였다(도 5 A 및 B 참고). 본 발명의 목적상 상기 PCBP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 감소되어 있는 경우에는 뇌암의 침윤성이 증가되어 있고, 이에 따라 뇌암이 발생한 개체의 전체 생존율이 현저하게 감소되어 예후가 나쁠 수 있음을 매우 효과적으로 예측할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 상기 예후 예측용 조성물에서, PCBP1 단백질 및 이를 암호화하는 유전자, 뇌암, 단백질의 발현 수준

을 측정할 수 있는 제제, 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제 등은 상기 진단용 조성물에서 기재한 바와 중복되어, 이하 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.

- [0056] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 침윤성 뇌암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0057] 본 발명의 상기 스크리닝 방법은 뇌암 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 목적하는 후보물질을 처리하는 단계; 및 상기 생물학적 시료에서 PCBP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 확인하는 단계를 포함한다.
- [0058] 본 발명의 상기 후보물질을 처리한 뒤, 상기 생물학적 시료에서 측정된 PCBP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 증가되는 경우, 침윤성 뇌암의 치료제로 선별하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 상기 스크리닝 방법에서, PCBP1 단백질 및 이를 암호화하는 유전자, 뇌암, 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계, 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계, 생물학적 시료 등은 상기 진단용 조성물 및 침윤성 뇌암을 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법에서 기재한 바와 중복되어, 이하 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.
- [0060] 본 발명의 상기 후보물질은 침윤성 뇌암을 치료하기 위한 활성, 즉 PCBP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현을 증가시킬 수 있는 활성이 존재하는지 여부에 대해 테스트하기 위한 약제를 의미하며, 단백질, 올리고펩타이드, 유기 분자, 다당류, 폴리뉴클레오티드 및 광범위한 화합물 등의 임의의 분자를 포함한다. 이러한 후보물질은 천연물질뿐만 아니라, 합성 물질도 모두 포함하는 것일 수 있다.

[서열목록]

[0063] 서열번호 1: 아미노산 서열

[0064] 10 20 30 40 50

[0065] MDAGVTESGL NVTLTIRLLM HGKEVGSIIIG KKGESVKRIR EESGARINIS

[0066] 60 70 80 90 100

[0067] EGNCPERIIT LTGPTNAIFK AFAMIIDKLE EDINSSMTNS TAASRPPVTL

[0068] 110 120 130 140 150

[0069] RLVVPATQCG SLIGKGGCKI KEIRESTGAQ VQVAGDMLPN STERAITIAG

[0070] 160 170 180 190 200

[0071] VPQSVTECVK QICLVMLETL SQSPQGRVMT IPYQPMPASS PVICAGGQDR

[0072] 210 220 230 240 250

[0073] CSDAAGYPHA THDLEGPLD AYSIQGQHTI SPLDLAKLNQ VARQQSHFAM

[0074] 260 270 280 290 300

[0075] MHGGTGFAGI DSSSPEVKGY WASLDASTQT THELTIPNNL IGCIIQRQGA

[0076] 310 320 330 340 350

[0077] NINEIRQMSG AQIKIANPVE GSSGRQVTIT GSAASISLAQ YLINARLSSE

[0078] KGMGCS

[0080] 서열번호 2: 유전자 서열

[0081] 1 gaaagcgggc ttcccgcgc gccagaccg ccgagcctgc cgcgggagtc gccaccgcgc

[0082] 61 cgcctcgc caccgcgcgc ccgcgcctc ccggccccgc tcgccccctc cgcgcgcgc

[0083] 121 gccgcctc ggcactacgc tgcggcctc cgcgcctc cgctcctc cgcgcgcctc

[0084] 181 gctcgcctc cgcggcagc ttgggccta cacctccct cccccgcca gccgcaaaag

[0085] 241 acttgaccac gtaacgagcc caactcccc gaacgcgcgc cgcgcctcgc catggatgcc

[0086] 301 ggtgtgactg aaagtggact aaatgtgact ctcaccattc ggcttcttat gcacggaaag
 [0087] 361 gaagtaggaa gcatcattgg gaagaaggagg gagtcggtta agaggatccg cgaggagagt
 [0088] 421 ggcgcgcgga tcaacatctc ggaggggaat tgtccggaga gaatcatcac tctgaccggc
 [0089] 481 cccaccaatg ccatctttaa ggctttcgct atgatcatcg acaagctgga ggaagatatic
 [0090] 541 aacagctcca tgaccaacag taccgcgcc agcaggcccc cggtcaccct gaggctggtg
 [0091] 601 gtgccggcca cccagtgcgg ctccctgatt gggaaaggcg ggtgtaagat caaagagatc
 [0092] 661 cgcgagagta cgggggcgca ggtccaggtg gcgggggata tgctgccaa ctccaccgag
 [0093] 721 cgggcatca ccatcgtgg cgtgccgag tctgtcaccg agtgtgtcaa gcagatttgc
 [0094] 781 ctggtcatgc tggagacgct ctcccagtct ccgcaaggga gagtcatgac cattccgtac
 [0095] 841 cagcccatgc cggccagctc cccagtcac tgccggggcg gccaaagatcg gtgcagcgac
 [0096] 901 gctgcgggct accccatgc cacccatgac ctggagggac cacctctaga tgctactcg
 [0097] 961 attcaaggac aacacacat ttctccgctc gatctggcca agctgaacca ggtggcaaga
 [0098] 1021 caacagtctc actttgcat gatgcacggc gggaccggat tcgccggaat tgactccagc
 [0099] 1081 tctccagagg taaaaggcta ttgggcaagt ttggatgcat ctactcaac cacccatgaa
 [0100] 1141 ctcaccattc caaataactt aattggctgc ataatcgggc gccaaaggcg caacattaat
 [0101] 1201 gagatccgc agatgtccgg ggcccagatc aaaattgcca acccagtga aggtcctct
 [0102] 1261 ggtaggcagg ttactatcac tggctctgct gccagtatta gtctggccca gtatctaate
 [0103] 1321 aatgccagc tttcctctga gaaggcagtg ggtgcagct agaacagtgt aggttcctc
 [0104] 1381 aataaccct ttctgctgtt ctccatgat ccaactgtgt aatttctggt cagtattcc
 [0105] 1441 aggttttaaa taattgttaa gtgttcagtt tctacacaac tttatcatcc gctaagaatt
 [0106] 1501 taaaaatcac attctctgtt cagctgttaa tgctgggac catatttagt tttataagct
 [0107] 1561 tttcctgtt tttagtttg tttgggttt tttggctcat gaattttatt tctgtttgct
 [0108] 1621 gataagaaat gtaagagtg aatgtaata aatttcagtt tagttctgta atgtcaagaa
 [0109] 1681 ttaagaatt aaaaaacgga ttggttaaaa aatgcttcat attgaaaaa gctgggaatt
 [0110] 1741 gctgtcttaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aa

발명의 효과

[0112] 본 발명의 조성물을 이용하여 PCBP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 경우에는 목적하는 개체의 침윤성을 매우 효과적으로 예측할 수 있기 때문에, 환자에 적절한 치료 방법 등을 제공하여 이와 같은 치료로 인한 사회적 비용을 현저하게 감소시킬 수 있다. 나아가, 상기 PCBP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 감소되어 있는 경우에는 침윤성이 높아져 전체 생존율이 감소될 수 있기 때문에 너암의 예후를 매우 효과적으로 예측할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0113] 도 1의 A 내지 C는 본 발명의 일 실시예에 따른 교모세포종 종양구 형성을 현미경으로 확인한 결과(도 1의 A 및 B)와, 교모세포종 종양구의 침윤성을 매트릭셀(Matrigel) 분석 방법을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다(도 1의 C).

도 2의 A 내지 C는 본 발명의 일 실시예에 따른 침윤성이 높은(High inv.) 교모세포종 종양구와, 침윤성이 낮은(Low inv.) 교모세포종 종양구 간의 유전자 발현 수준을 유전자 프로파일링 분석 방법을 통해 비교한 결과를 나

타낸 것이다.

도 3의 A 및 B는 본 발명의 일 실시예에 따른 침윤성과 관련된 유전자의 상호작용과, 상기 유전자의 돌연변이 비율을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4의 A 및 B는 본 발명의 일 실시예에 따른 교모세포종 종양구 형성을 확인한 결과와(도 4의 A), 교모세포종 종양구의 침윤성을 확인한 결과를 나타내며(도 4의 B), 도 4의 C는 본 발명의 일 실시예에 따른 교모세포종 종양구에서 단백질의 발현 수준을 웨스턴 블롯 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 5의 A 및 B는 교모세포종 종양구 이식 쥐 및 교모세포종 환자의 생존율 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0114] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0116] **실시예**

[0118] **[준비에 1] 환자 정보 및 MR(Magnetic resonance) 이미지 촬영**

[0119] 외과적 수술, 화학 요법 또는 방사선 치료와 같은 처치 없이 새롭게 진단받은 23명(침윤성 낮음 15명, 침윤성 높음 8명)의 환자 조직을 본 연구에서 사용하였다. 각각의 환자에서 암 조직을 제거하기 위한 수술을 진행하기 전, 7일 내에 Achieva 3.0T 시스템(Philips Medical Systems)을 이용하여 MR 이미지를 촬영하였다. 뇌돌보(Corpus callosum)의 전부(Anterior) 및 후부(Posterior) 가장자리에 평행하도록 하여 축상(Axial) 이미지를 촬영하였다. 종양 조직의 침윤의 경우, T2 FLAIR - T1 contrast enhanced (CE)/T1 CE에 의해 점유된 영역으로 정량화 하여 나타내었다.

[0120] 본 연구에 대해서는 연세대학교 의과대학 세브란스 병원의 제도 검토위원회(4-2012-0212, 4-2014-0649)를 통해 승인 받았으며, 연구에서 사용된 조직의 공여자에게 모두 서면 동의를 받았다.

표 1

특징	침윤성 낮음 (n = 15)	침윤성 높음 (n = 8)
나이 (평균)	61	54.5
성별 (남성/여성)	9/6	5/3
IDH1 유전자 돌연변이	0	0
1p19q 코-결실(co-deletion)	0	0
MGMT 유전자 프로모터에 메틸화(methylation in promoter)	4	2
EGFR 증폭(amplification)	11	4
Ki-67 발현 수준 (평균)	17.5	35
전체 생존율 (평균)	11.92	7.52

[0124] **[준비에 2] 교모세포종(Glioblastoma multiforme; GBM) 종양구의 분리 및 배양**

[0125] 상기 준비예 1의 환자로부터 GBM 세포를 분리한 뒤, 종양구(Tumor sphere; TS)를 생성하는 세포만을 선별하여, 교모세포종 종양구를 최종적으로 분리하였다(도 1의 A).

[0126] 상기 교모세포종 종양구의 경우, 1 × B27 (인비트로젠, 미국), 20 ng/mL의 bFGF 및 20 ng/mL의 EGF (시그마알드리치, 미국)가 포함되어 있는 DMEM/F12(미디에테크, 미국)에서 37 °C, 5 %의 CO₂ 조건에서 배양하였다.

[0128] **[준비에 3] 교모세포종 이식 동물 모델 제작 및 사육**

[0129] 4 내지 8주령의 수컷 흉선 누드 마우스(athymic nude mice)(Central Lab. Animal Inc., 한국)를 마이크로-아이솔레이터 케이지(micro-isolator cages)에 넣고, 균이 존재하지 않는 조건에서 연구 시작 1주일 전부터 사육하였다. 이때, 조명, 온도 및 습도는 중앙에서 제어될 수 있도록 하였다.

[0130] 가이드-스크류 시스템(Guide-Screw system)을 이용하여, 깊이 4.5 mm의 깊이로 상기 마우스의 오른쪽 전두엽에

상기 준비예 2에서 분리된 침윤성이 낮은 교모세포종 종양구인 TS14-15(이하, 'TS14-15'라 함) 또는 침윤성이 높은 교모세포종 종양구인 TS13-64(이하, 'TS13-64'라 함)를 이식하였다. 이때, 이식이 완료된 상기 마우스의 체중이 최대치에 비하여 15 % 이상 감소된 경우에는 승인된 프로토콜에 따라 마우스를 안락사 시켰다. IVIS 이미징 시스템 및 Living Image v4.2 소프트웨어 (Caliper Life Sciences)를 사용하여 Bioluminescence 수집 및 분석을 수행하였다. 아래의 실시예를 수행하기 15분 전에 100 μ L D-루시퍼린(D-luciferin, 30 mg / mL; Promega)을 상기 마우스의 복강 내 주사하였으며, 2.5 %의 이소플루렌(Isoflurane)을 이용하여 마취된 상태에서 수행하였다. 이와 같은 모든 실험 절차는 연세대 의과대학 기관 동물 관리 및 사용위원회의 승인을 받았다.

[0132] **[실시예 1] 교모세포종 종양구의 3D 침윤성 분석**

[0133] 교모세포종 종양구의 침윤성 분석을 확인하기 위하여, 매트릭셀(Matrigel) 및 1형 콜라겐(Type I Collagen)을 96웰 플레이트에 넣고, 상기 매트릭셀이 겔화되기 전에 상기 준비예 2의 교모세포종 종양구를 분주한 뒤, 상기 준비예 2의 배지를 첨가하였다. 그런 다음 0시간 내지 72시간 동안 배양하고, 현미경을 통해 구형 형성을 확인하여 그 결과를 도 1의 B에 나타내었다. 또한, 0시간 때에 상기 교모세포종 종양구가 존재하는 지역을 기준으로 침윤성 정도를 수치화하여, 그 결과를 도 1의 C에 나타내었다.

[0134] 도 1의 B 및 C에서 보는 바와 같이, 교모세포종 종양구의 경우 침윤성이 낮은 경우(Low inv.)와 침윤성이 높은 경우(High inv.)로 나뉘었다. 구체적으로, TS13-03, TS13-20, TS13-30, TS13-64, TS13-71, TS15-67, TS15-88 및 TS16-117의 경우 침윤성이 높았으며, 그 중에서 TS15-88 및 TS13-64의 침윤성이 가장 높았다.

[0135] 상기 결과를 통해 본 발명에서 환자로부터 분리된 교모세포종 종양구의 경우에도 침윤성이 높은 경우 및 침윤성이 낮은 경우로 분리될 수 있음을 알 수 있다.

[0137] **[실시예 2] 교모세포종 종양구 침윤성과 관련된 유전자 동정**

[0138] 교모세포종 종양구의 침윤성과 관련된 전사 조절 네트워크를 확인하기 위하여 단일 샘플 유전자 세트 응축 분석(Single sample gene set enrichment analysis; ssGSEA)을 수행하였다. 키아젠 RNeasy 플러스 미니 키트(Qiagen RNeasy Plus Mini kit, Qiagen, 미국)을 이용하여 제조사가 제공하는 방법에 따라, 상기 준비예 2에서 분리된 교모세포종 종양구로부터 전체 RNA를 추출하였다. 상기 추출된 전체 RNA를 일루미나 휴먼HT-12 v4 발현 비드칩(Illumina HumanHT-12 v4 Expression BeadChip, Illumina, 미국)에 로딩하였다. 데이터 변형의 안정화 및 표준화를 위해 R/ Bioconductor lumi 패키지를 사용하는 분위 일반화(quantile normalization) 방법을 사용하였다. GENE-E 소프트웨어를 사용하여 피어슨의 상관관계를 거리 메트릭로서 평균 연결 계층적 클러스터링(average linkage hierarchical clustering)을 수행하고, 각각의 유전자의 발현 수준을 히트 맵으로 나타내었다.

[0139] MSigDB c3.tft v5.1에서 검색된 전사인자(Transcriptional factor; TF) 표적 유전자 세트를 사용하여 교모세포종 종양구의 유전자 발현 프로파일을 ssGSEA에 적용하였다. 여기서, 동일한 전사인자로 계산된 농축 점수(Enrichment scores)는 각 전사인자마다 단일 값을 얻기 위해 평균화하였으며, 이 평균화된 점수를 모든 표본에서 양적 표준화 하였다. 그런 다음, 상기 실시예 1에서 확인된 침윤성이 낮은 교모세포종 종양구 그룹과 침윤성이 높은 교모세포종 종양구 그룹(two-tailed Student's t-test) 간의 차이를 비교하였다. 상기 두 그룹 간의 차이가 있는 것으로 확인된 전사인자를 사이토스케이프(Cytoscape) 및 리액툼 FI 9 플러그-인(Reactome FI 9 plug-in)을 이용하여 네트워크 맵으로 구성하여, 기능적 상호작용 분석을 수행하였다. 또한, 교모세포종 환자에서 선택된 전사인자의 게놈 변이 분석을 위해 TCGA 데이터 세트(n=273)를 검색하여, 그 결과를 도 2의 A 내지 C 및 도 3의 A 및 B에 나타내었다.

[0140] 도 2의 A 내지 C에서 보는 바와 같이, 침습성이 낮은 교모세포종(Low inv.) 그룹에 비하여, 침습성이 높은 교모세포종(High inv.) 그룹에서 STAT3(Signal transducer and activator of transcription 3), SPI1(Transcription factor PU.1), SBFA2T(SBF activated by Bck2), PAX8(Paired box gene 8), BACH1/2(Transcription regulator protein BACH1), SRF(Serum response factor), 및 PTF1A(Pancreas transcription factor 1 subunit alpha)가 높은 농축 점수를 갖고, PRRX2(Paired Related Homeobox 2), TCF7(Transcription factor 7), SRY(Sex-determining Region Y), SOX5(SRY-related HMG-box 5) 및 PCBP1(Poly(RC) Binding Protein 1)가 낮은 농축 점수를 갖는 것으로 확인되었다. 이와 같은 전사인자 중에서 특히 PCBP1의 경우, 침습성이 낮은 경우에 비하여 침습성이 높은 교모세포종 그룹에서 전반적으로 낮은 수준으로 존재하였다.

[0141] 도 3의 A 및 B에서 보는 바와 같이, 상기 확인된 전사인자들의 기능적인 상호작용과 돌연변이 정도를 확인한 결

과, 전사인자의 돌연변이(미스센스, 결실 및 증폭)율이 높지 않은 것으로 보아 교모세포종 침윤에 관여하는 전사인자의 변화는 외부 요인에 의해 변경된 것을 알 수 있다.

[0142] 상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 PCBP1 전사인자의 발현 수준이 감소되어 있는 경우 뇌암, 예를 들면 교모세포종, 특히 교모세포종 종양구의 침윤성이 높은 것을 알 수 있다. 나아가, 이와 같이 PCBP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자가 뇌암의 침윤성이 증가되도록 유도할 수 있음을 알 수 있다.

[0144] **[실시예 3] 교모세포종 종양구의 침윤성과 관련된 전사인자 확인**

[0145] 상기 실시예 2에서 확인된 전사인자와 교모세포종 종양구의 침윤성과의 관계를 확인하기 위하여, 교모세포종 종양구에서 STAT3 및 PCBP1 유전자를 침묵(Silencing)시킨 뒤, 침윤성 및 단백질 발현 수준을 확인하였다.

[0146] 구체적으로, TS14-15와 TS13-64를 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 상기 종양구 각각에 STAT3 또는 PCBP1에 특이적인 siRNA 이중가닥(바이오니아, 한국)을 리포펙타민 3000(인비트로젠, 미국)을 이용하여 형질전환시켰다. 이때, 무작위 siRNA 서열을 음성 대조군으로 사용하였다. 형질전환 후 72시간 동안 배양한 뒤, 상기 실시예 1에서와 같이 구형 형성 여부 및 침윤성 분석을 수행하여, 그 결과를 도 4의 A 및 B에 나타내었다.

[0147] 또한, 상기 교모세포종 종양구에서 단백질의 발현 수준을 확인하기 위해, 상기 종양구로부터 분리된 단백질을 10% 트리스-글리신 겔에 전기영동 한 뒤, 니트로셀룰로스 막에 옮긴 뒤에 STAT3(Cell Signaling Technology), β-카테닌(β-catenin, Cell Signaling Technology), PCBP1(Abcam), N-카드헤린(N-cadherin, R&D Systems), Zeb1(Sigma-Aldrich); SRF(Santa Cruz Biotechnology) 및 GAPDH (Santa Cruz Biotechnology)에 특이적인 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하여, 그 결과를 도 4의 C에 나타내었다.

[0148] 도 4의 A 및 B에서 보는 바와 같이, 음성 대조군(Control)과 비교하여, 침습성이 높은 그룹에서 증가되어 있는 STAT3에 특이적인 siRNA가 형질전환된 TS13-64의 경우(TS13-64, siSTAT3) 침습 지역이 6배 정도 감소되었다. 반면, 침습성이 높은 그룹에서 감소되어 있는 PCBP1에 특이적인 siRNA가 형질전환된 TS14-15(TS14-15, siPCBP1) 및 TS13-64(TS13-64, siPCBP1)에서 모두 침습 지역이 약 2배 증가되었다.

[0149] 또한, 도 4의 C에서 보는 바와 같이, PCBP1에 특이적인 siRNA가 형질전환된 경우, 모든 교모세포종 종양구에서 침윤 및 중간엽 전이(Mesenchymal transition)와 관련되어 있는 단백질인 N-카드헤린, β-카테닌 및 Zeb1 단백질의 발현 수준이 증가되었다.

[0150] 상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 PCBP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자는 뇌암, 예를 들면 교모세포종, 특히 교모세포종 종양구의 전이를 억제할 수 있는 기능을 갖는 것으로서, 이와 같은 단백질 또는 이를 암호화하는 단백질의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 낮은 수준으로 존재하는 경우에는 침윤성이 높은 것으로 예상할 수 있음을 알 수 있다.

[0152] **[실시예 4] 교모세포종 종양구의 침윤성과 예후와의 관계 확인**

[0153] 상기 실시예 1 내지 3의 결과를 토대로 교모세포종 환자, 특히 교모세포종 종양구를 갖는 환자에서 교모세포종의 침윤성과 예후와의 상관관계가 있는지 확인하였다.

[0154] Kaplan-Meier 곡선을 기반으로 상기 준비예 3에서 제작된 동물 모델과, 상기 준비예 2에서 분리된 교모세포종 종양구와 일치되는 환자의 전반적인 생존율을 분석하여, 그 결과를 도 5의 A 및 B에 나타내었다.

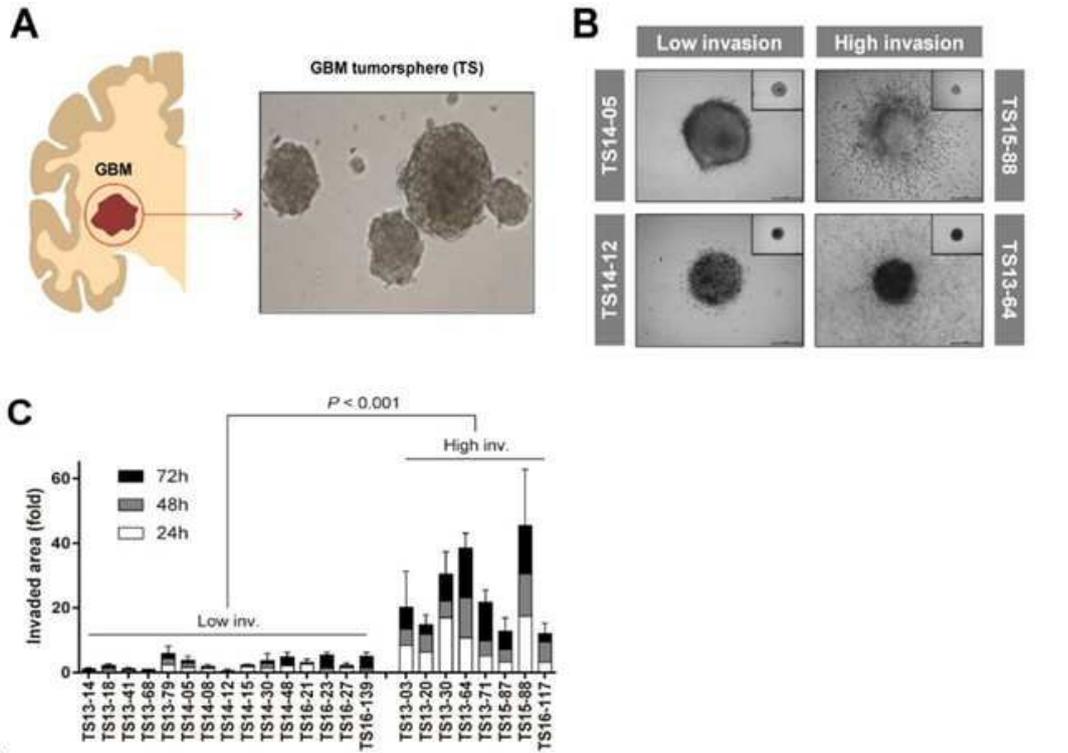
[0155] 도 5의 A 및 B에서 보는 바와 같이, 침윤성이 낮은 경우(Low)의 생존율과 비교하여, 침윤성이 높은 경우(High)의 생존율이 현저하게 낮았다.

[0156] 상기 결과를 통해, 본 발명에서와 같이 PCBP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 낮은 경우에는 침윤성이 높으며, 나아가 이와 같이 침윤성이 높은 경우에는 예후가 나쁠 수 있음을 알 수 있다.

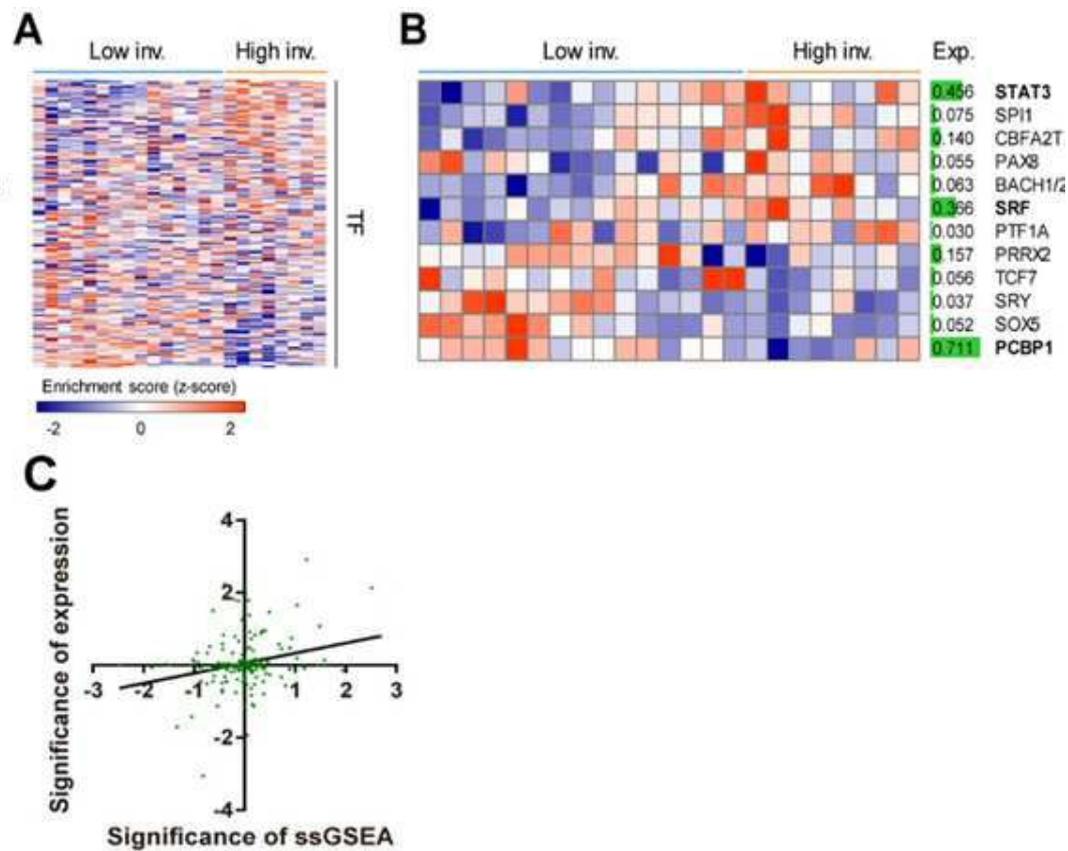
[0157] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

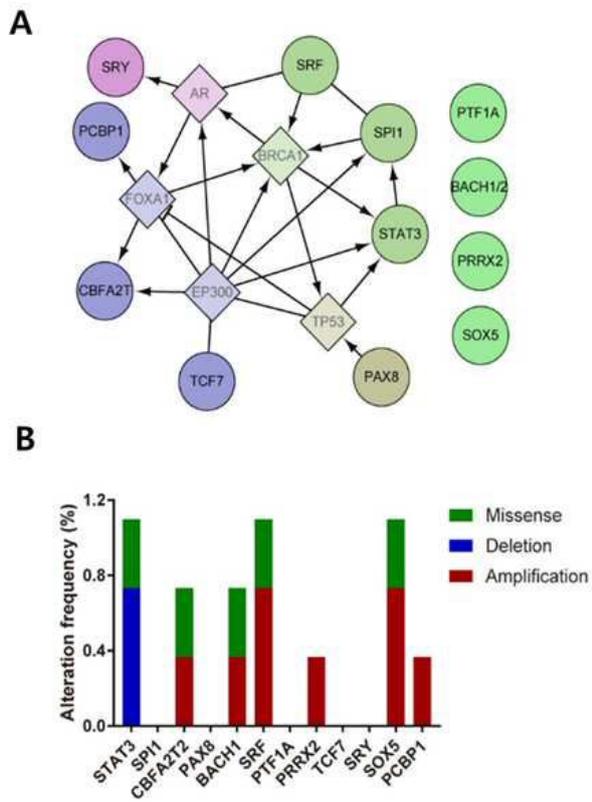
도면1



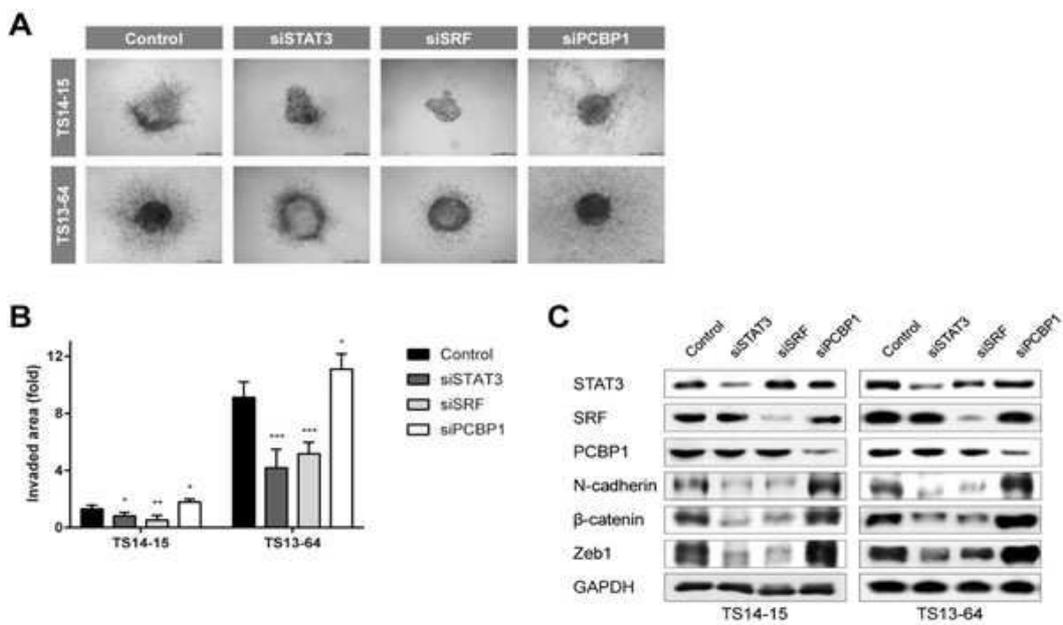
도면2



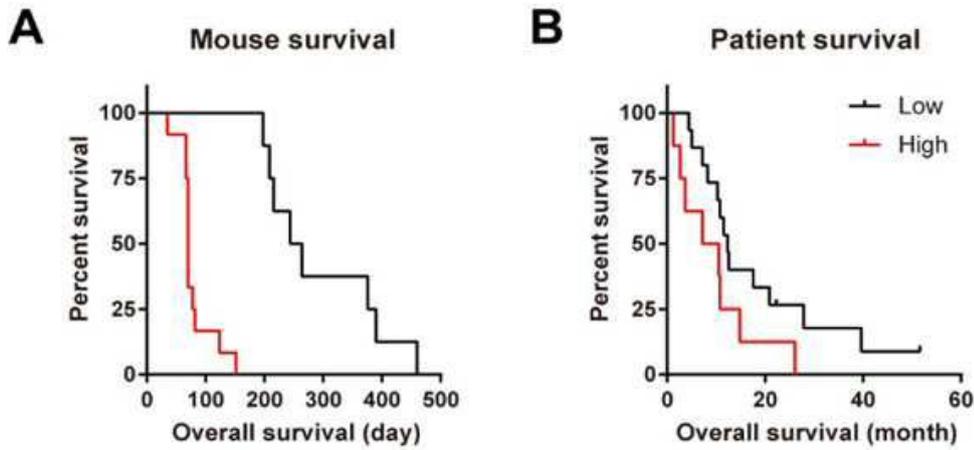
도면3



도면4



도면5



서열목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> A Composition Using Diagnosis of invasiveness brain cancer
- <130> PDPB192073
- <160> 2
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 356
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Asp Ala Gly Val Thr Glu Ser Gly Leu Asn Val Thr Leu Thr Ile

1 5 10 15

Arg Leu Leu Met His Gly Lys Glu Val Gly Ser Ile Ile Gly Lys Lys

20 25 30

Gly Glu Ser Val Lys Arg Ile Arg Glu Glu Ser Gly Ala Arg Ile Asn

35 40 45

Ile Ser Glu Gly Asn Cys Pro Glu Arg Ile Ile Thr Leu Thr Gly Pro

50 55 60

Thr Asn Ala Ile Phe Lys Ala Phe Ala Met Ile Ile Asp Lys Leu Glu

65 70 75 80

Glu Asp Ile Asn Ser Ser Met Thr Asn Ser Thr Ala Ala Ser Arg Pro

85 90 95

Pro Val Thr Leu Arg Leu Val Val Pro Ala Thr Gln Cys Gly Ser Leu
 100 105 110
 Ile Gly Lys Gly Gly Cys Lys Ile Lys Glu Ile Arg Glu Ser Thr Gly
 115 120 125
 Ala Gln Val Gln Val Ala Gly Asp Met Leu Pro Asn Ser Thr Glu Arg
 130 135 140
 Ala Ile Thr Ile Ala Gly Val Pro Gln Ser Val Thr Glu Cys Val Lys
 145 150 155 160
 Gln Ile Cys Leu Val Met Leu Glu Thr Leu Ser Gln Ser Pro Gln Gly
 165 170 175

 Arg Val Met Thr Ile Pro Tyr Gln Pro Met Pro Ala Ser Ser Pro Val
 180 185 190
 Ile Cys Ala Gly Gly Gln Asp Arg Cys Ser Asp Ala Ala Gly Tyr Pro
 195 200 205
 His Ala Thr His Asp Leu Glu Gly Pro Pro Leu Asp Ala Tyr Ser Ile
 210 215 220
 Gln Gly Gln His Thr Ile Ser Pro Leu Asp Leu Ala Lys Leu Asn Gln
 225 230 235 240
 Val Ala Arg Gln Gln Ser His Phe Ala Met Met His Gly Gly Thr Gly
 245 250 255
 Phe Ala Gly Ile Asp Ser Ser Ser Pro Glu Val Lys Gly Tyr Trp Ala
 260 265 270
 Ser Leu Asp Ala Ser Thr Gln Thr Thr His Glu Leu Thr Ile Pro Asn
 275 280 285
 Asn Leu Ile Gly Cys Ile Ile Gly Arg Gln Gly Ala Asn Ile Asn Glu
 290 295 300
 Ile Arg Gln Met Ser Gly Ala Gln Ile Lys Ile Ala Asn Pro Val Glu
 305 310 315 320

 Gly Ser Ser Gly Arg Gln Val Thr Ile Thr Gly Ser Ala Ala Ser Ile
 325 330 335
 Ser Leu Ala Gln Tyr Leu Ile Asn Ala Arg Leu Ser Ser Glu Lys Gly

aataaccct ttctgctgtt ctcccatgat ccaactgtgt aatttctggt cagtgattcc	1440
aggttttaa taatttgtaa gtgttcagtt tctacacaac tttatcatcc gctaagaatt	1500
taaaaatcac attctctgtt cagctgttaa tgctgggatc catatntagt tttataagct	1560
ttccctgtt ttiagttttg ttttgggttt tttggctcat gaattttatt tctgtttgtc	1620
gataagaaat gtaagagigg aatgtaata aatttcagtt tagttctgta atgtcaagaa	1680
tttaagaatt aaaaaacgga ttggttaaaa aatgcttcat atttgaaaa gctgggaatt	1740
gctgtcttaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aa	1772