



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년02월16일
(11) 등록번호 10-2216590
(24) 등록일자 2021년02월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) C12Q 1/68 (2018.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57484 (2013.01)
C12Q 1/6886 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2016-0127632
(22) 출원일자 2016년10월04일
심사청구일자 2019년08월23일
(65) 공개번호 10-2018-0037462
(43) 공개일자 2018년04월12일
(56) 선행기술조사문헌
Eun Kyung Lee et al, Molecular Cell (2012),
vol 45, pp 826-835.
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
가톨릭대학교 산학협력단
서울특별시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교
성의교정내 (반포동)
아주대학교산학협력단
경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)
(72) 발명자
이은경
경기도 수원시 영통구 도청로17번길 23, 5302동
2903호
김욱
경기도 수원시 영통구 도청로17번길 23, 5302동
2903호
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 9 항

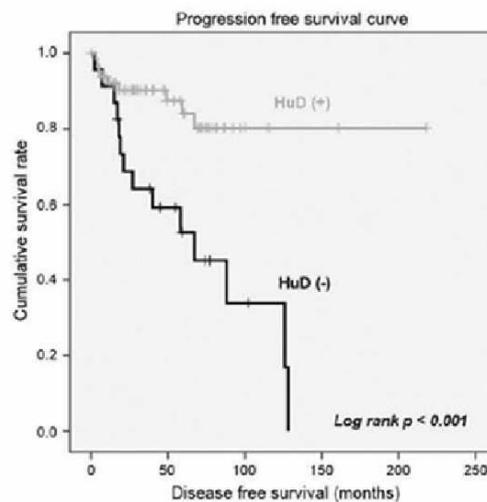
심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 **혜장 신경내분비종양의 진단을 위한 조성물**

(57) 요약

본 발명은 혜장 신경내분비종양의 진단 및 예후 판단을 위한 조성물 및 방법에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 HuD 발현에 따라 혜장 신경내분비종양의 연관성을 확인함으로써, HuD를 혜장 신경내분비종양의 진단 및 예후 판단에 이용하는 것에 대한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

G01N 33/57438 (2019.01)
 C12Q 2600/158 (2013.01)
 G01N 2800/50 (2013.01)
 G01N 2800/52 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

Chongtae Kim, The Journal of Biological Chemistry (2014), vol 289, no 1, pp 112-121.
 T R Halfdanarson et al, Annals of Oncology (2008), vol 19, pp 1727-1733.
 김종태 저, 가톨릭대학교 대학원 의생명·건강과학과 의학세포생물학 전공 이학박사 학위논문 (2016.03.), pp 1-91.
 S Humayun Gultekin et al, Intrenational Journal of Surgical Pathology (2000), vol 8(2), pp 109-117.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A2A1A11053431
 부처명 미래창조과학기술부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 중견연구자지원사업(핵심)
 연구과제명 HuD 기능네트워크 확립을 통한 인슐린 저항성 조절기전 연구
 기여율 25/100
 과제수행기관명 한국연구재단
 연구기간 2014.11.01 ~ 2017.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A5A2047939
 부처명 미래창조과학기술부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 선도연구센터지원사업-MRC
 연구과제명 암진화 연구센터
 기여율 25/100
 과제수행기관명 한국연구재단
 연구기간 2012.09.01 ~ 2018.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A2A1A15054227
 부처명 미래창조과학부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 중견연구자지원사업(성과확산)
 연구과제명 말초조직 특이적 cannabinoid 1 receptor 활성 억제를 통한 당뇨 제어 연구
 기여율 45/100
 과제수행기관명 아주대학교
 연구기간 2015.11.01 ~ 2017.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093826
 부처명 교육부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 대학중점연구소 지원사업
 연구과제명 신개념 그린융합소재 발굴 및 확보
 기여율 5/100
 과제수행기관명 아주대학교
 연구기간 2013.09.01 ~ 2018.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

HuD 유전자의 발현양을 측정하는 제제를 포함하는, 췌장 신경내분비종양 예후 진단용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 HuD 유전자의 발현양 측정은 HuD 유전자의 mRNA 양 또는 HuD 단백질 수준의 측정인, 췌장 신경내분비종양 예후 진단용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 췌장 신경내분비종양은 인슐린종인, 췌장 신경내분비종양 예후 진단용 조성물.

청구항 4

HuD 단백질에 대한 항체를 포함하는, 췌장 신경내분비종양 예후 진단용 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 췌장 신경내분비종양은 인슐린종인, 췌장 신경내분비종양 예후 진단용 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

인체로부터 분리된 시료에서 HuD 발현양을 측정하는 단계를 포함하는, 췌장 신경내분비종양 환자의 예후 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 췌장 신경내분비종양 환자의 예후는 무질병생존율(DFS; Diseasefree survival) 또는 무진행 생존율(progression free survival)인, 췌장 신경내분비종양 환자의 예후 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

제 9항에 있어서, 상기 HuD 발현양의 측정은 HuD 유전자의 mRNA 양 또는 HuD 단백질 수준을 측정하여 확인하는, 췌장 신경내분비종양 환자의 예후 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 12

제 9항에 있어서, 상기 췌장 신경내분비종양은 인슐린종인, 췌장 신경내분비종양 환자의 예후 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 췌장 신경내분비종양의 진단 및 예후 판단을 위한 조성물 및 방법에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 HuD의 발현 정도를 확인함으로써 췌장 신경내분비종양을 진단하고 이의 예후를 예측하는 방법에 대한 것이다.

배경기술

[0002] Hu 패밀리는 HuB, HuC 및 HuD를 포함하며, 이들 Elav/Hu 단백질들은 일반적으로 보존된 RNA 인식 모티브들 (RRMs 1-3)을 통해 표적 전사체의 U 또는 AU가 풍부한 RNA 부위에 결합하는 것으로 알려져 있다 (Hinman and Lou, 2008; Pascale et al., 2008). HuD는 축삭생성(neurite outgrowth)을 촉진시키는 것으로 알려졌으나 (Kasashima et al., 1999; Abdelmohsen et al., 2010), 동물에서의 HuD의 생리학적 역할은 복잡한 것으로 알려져 있다. HuD는 신경에서 우선적으로 발현되는 여러 단백질들, 예컨대, GAP-43, 아세틸콜린에스테라제 (acetylcholinesterase), tau, PSD-95, 뉴로세르핀(neuroserpin) 및 musashi-1를 암호화하는 mRNA들을 표적으로 한다.

[0003] 한편, 위장관과 췌장, 직장에 주로 발생하는 신경내분비종양은 암이 발생하는 부위마다 증상과 생존율이 각기 달라 조기 치료가 중요하다. 그 중, 췌장 신경내분비종양(Pancreatic neuroendocrine tumors, PNETs)은 전체 유병률이 10만명 당 1명 이하의 드문 질환으로 알려져 있어 임상 양상 및 생존과 관련된 예후 인자는 정확히 알려져 있지 않았으나 (Halfdanarson TR, Rabe KG, Rubin J, Petersen GM. Pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs): incidence, prognosis and recent trend toward improved survival. Ann Oncol 2008;19:1727-33.), 최근 발생 빈도가 높아지고 있다 (Fischer L, Bergmann F, Schimmack S, Hinz U, Priess S, Muller-Stich BP, et al. Outcome of surgery for pancreatic neuroendocrine neoplasms. Br J Surg 2014;101:1405-12.). 췌장 신경내분비종양은 임상 양상에 따라 기능성과 비기능성 신경내분비종양으로 분류할 수 있는데, 현미경적으로는 감별이 어렵고 종양 자체에서 분비하는 활성 신경내분비 호르몬과 연관된 임상 증상의 발현 여부를 바탕으로 분류한다. 기능성 신경내분비종양은 종양에서 분비하는 신경내분비 호르몬과 연관된 임상 증상이 나타나는 것으로 알려져 있으나, 실제 임상에서는 그러한 증상을 호소하더라도 질환의 회귀성 때문에 의심하여 진단하기가 쉽지 않기 때문에 진단과 적절한 치료가 지연되는 경우가 많다. 췌장의 신경내분비종양 중 기능성 신경내분비종양의 경우, 주변 조직으로의 침습이나 원격 전이가 있는 고악성도 종양의 빈도가 인슐린종은 10%, 가스트린종은 60%, 비기능성 신경내분비종양은 50%-90% 정도로 알려져 있고 (Ectors N. Pancreatic endocrine tumors: diagnostic pitfalls. Hepa-togastroenterology 1999;46:679-90.), 췌장선암에 비해서는 성장 속도가 느리나, 악성화가 진행된 경우 대부분 간부전으로 사망하게 되는 것으로 보고되고 있다 (Eriksson B, Oberg K. Neuroendocrine tumours of the pancreas. Br J Surg 2000;87:129-31.).

[0004] 췌장 신경내분비종양의 병기 분류는 크게 AJCC 7판 분류 및 World Health Organization (WHO) 분류로 나뉘어진다. American Joint Committee on Cancer (AJCC) 7판에서는 6판까지 별도의 분류가 없었던 췌장 신경내분비종양의 병기가 도입되었으나 기존 췌장암의 분류방법을 적용하였다. 2010년에 개정된 WHO 분류는 2005년 유럽 신경내분비종양 학회에서 제시되었던 핵감수분열 및 Ki-67 지수를 반영하여 종양을 3개의 등급으로 나누었으나 (Rindi G, Kloppel G, Alhman H, Caplin M, Couvelard A, de Herder WW, et al. TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. Virchows Arch 2006;449:395-401.) 이전 분류 기준에 포함되어있던 종양의 크기가 제외되었고 그 임상적 가치는 아직 충분히 밝혀지지 않은 상태이다.

[0005] 췌장 신경내분비종양은 아직은 잘 알려지지 않았지만, 검진으로도 잘 발견되지 않는 췌장에 발생할 경우 예후가 좋지 않아 사망에 이르는 무서운 질병 중 하나이다. 또한, 최근 들어 발생 빈도가 높아지는 암이므로, 학계의 연구와 관심을 통한 진단법의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Rindi G, Kloppel G, Alhman H, Caplin M, Couvelard A, de Herder WW, et al. TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. Virchows Arch 2006;449: 395-401.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명에서는 HuD 발현양과 췌장 신경내분비종양과의 상관관계를 확인함으로써, 이를 췌장 신경내분비종양의 진단 및 예후 판단에 활용하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적의 달성을 위해, 본 발명은 HuD 유전자의 발현양을 측정하는 제제를 포함하는, 췌장 신경내분비종양 진단용 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 HuD 단백질에 대한 항체를 포함하는, 췌장 신경내분비종양 예후 진단용 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 인체로부터 분리된 시료에서 HuD 발현양을 측정하는 단계를 포함하는, 췌장 신경내분비종양 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0011] 아울러, 본 발명은 인체로부터 분리된 시료에서 HuD 발현양을 측정하는 단계를 포함하는, 췌장 신경내분비종양 환자의 예후 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따르면, HuD 발현이 감소하면 췌장 신경내분비종양의 성장이 촉진되며, HuD 발현이 감소된 췌장 신경내분비종양 환자는 예후가 좋지 않았으며, HuD를 과발현시키면 췌장 신경내분비종양이 억제되고, HuD 발현이 증가된 췌장 신경내분비종양 환자는 생존율이 높아 예후가 좋은 것을 확인하였으므로, HuD를 췌장 신경내분비종양의 진단 및 예후 판단에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 췌장 유래 신경내분비 환자의 조직에서의 HuD 단백질의 발현 정도와 이에 따른 세포분열(mitotic count) 및 종양 크기를 나타낸 도이다.

도 2는 HuD 음성군 및 HuD 양성군 췌장 유래 신경내분비 환자 조직에서 p27 및 Ki-67의 발현 양상을 확인한 도이다.

도 3은 HuD 발현 (HuD 음성군 및 HuD 양성군)에 따른 인간 췌장유래 신경내분비종양 환자의 무질병생존율(DFS; Diseasefree survival) 및 무진행 생존율(progression free survival)을 통한 생존율을 나타낸 도이다.

도 4는 HuD 발현 억제에 따른 인슐린종 세포주의 생존율을 나타낸 도이다.

도 5는 HuD 발현 억제에 따른 인슐린종 세포주의 세포주기 변화 및 세포성장을 나타낸 도이다.

도 6은 HuD 발현 억제에 따른 인슐린종 세포주의 성장을 콜로니 형성 분석(colony formation assay)을 통해 확인한 도이다.

도 7은 HuD 발현 억제에 따른 인슐린종의 크기를 통해 인슐린종 형성을 확인한 도이다.

도 8은 HuD가 과발현된 인슐린종 세포주의 생존율을 나타낸 도이다.

도 9는 HuD가 과발현된 인슐린종 세포주기 변화 및 세포성장을 나타낸 도이다.

도 10은 HuD가 과발현에 따른 인슐린종 세포주의 성장을 콜로니 형성 분석을 통해 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 본 발명은 다양한 형태로 변경 또는 변형되어 구현될 수 있으며, 여기에서 설명하는 구현예에 한정되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명에서 사용된 용어 "검출" 또는 "측정"은 검출 또는 측정된 대상의 농도를 정량하는 것을 의미한다.

[0016] 본 발명에서 사용한 "HuD 유전자의 발현양을 측정하는 제제"란 HuD 유전자의 발현 수준을 확인함으로써 HuD 유전자의 mRNA 양 또는 HuD 단백질 수준을 검출할 수 있는 분자를 의미하고, 바람직하게는 HuD에 특이적인 항체,

프라이머 또는 프로브를 의미한다.

- [0017] 본 발명에서 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3말단 수산화기 (free 3 hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍 (base pair)를 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응 (즉, DNA 폴리머레이트 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시할 수 있다. 본 발명에서는 HuD 유전자의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용해 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성 여부 및 그 수준의 측정을 통해 HuD 발현 정도를 판별할 수 있다. 상기 PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 통상의 기술분야에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있으므로 본 발명에서는 이에 대해 특별히 한정하지 않는다.
- [0018] 본 발명에서 용어, "프로브"란 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 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고 뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 HuD 유전자와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부를 통해 HuD 유전자 발현 정도를 진단할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 통상의 기술분야에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있으므로 본 발명에서는 이에 대해 특별히 한정하지 않는다.
- [0019] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포포아미다이트 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, 포스포아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체 (예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.
- [0020] 본 발명에서 용어, "항체"란 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 마커인 HuD 유전자에서 발현되는 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 상기 항체의 제조방법은 널리 공지된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함된다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.
- [0021] 일 측면에서, 본 발명은 HuD(human antigen D) 유전자의 발현양을 측정하는 제제를 포함하는, 척장 신경내분비종양 진단용 조성물에 관한 것이다. 일 구현예에서, 상기 HuD 유전자의 발현양 측정은 HuD 유전자의 mRNA의 발현수준 또는 유전자에 의해 코딩되는 HuD 단백질 수준을 확인함으로써 알 수 있다. HuD 유전자의 mRNA의 양은 프라이머 쌍 또는 프로브를 이용하여 확인할 수 있으며, 이를 위한 분석 방법으로는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR (Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법 (RNase protection assay, RPA), 노던 블랏팅 (Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 상기 HuD 유전자에 의해 코딩되는 HuD 단백질의 양은 상기 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있으며, 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법 (Immunoprecipitation assay), 보체 고정분석법 (Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 구현예에서, 상기 척장 신경내분비종양은 호르몬 분비와 관련된 기능성 종양일 수 있고, 인슐린종일 수 있으며, 호르몬 종류에 따라 인슐린종, 가스트린종 또는 글루카곤종일 수 있으나, 인슐린종인 것이 가장 바람직하다.
- [0022] 일 측면에서, 본 발명은 HuD 단백질에 대한 항체를 포함하는, 척장 신경내분비종양 예후 진단용 조성물에 관한 것이다. 일 구현예에서, 상기 척장 신경내분비종양은 호르몬 분비와 관련된 기능성 종양일 수 있고, 인슐린종일 수 있으며, 호르몬 종류에 따라 인슐린종, 가스트린종 또는 글루카곤종일 수 있으나, 인슐린종인 것이 가장 바람직하다.
- [0023] 일 측면에서, 본 발명은 인체로부터 분리된 시료에서 HuD 발현양을 측정하는 단계를 포함하는, 척장 신경내분비종양 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 일 구현예에서, 상기 척장 신경내분비종양은 호르몬 분

비와 관련된 기능성 종양일 수 있고, 인슐린종일 수 있으며, 호르몬 종류에 따라 인슐린종, 가스트린종 또는 글루카곤종일 수 있으나, 인슐린종인 것이 가장 바람직하다. 일 구현예에서, HuD 발현양의 측정은 HuD 유전자의 mRNA 양 또는 HuD 단백질 수준을 측정하여 확인할 수 있다. 일 구현예에서, 상기 방법은 췌장 신경내분비종양 진단을 위한 정보를 제공하기 위하여 환자로부터 분리된 시료에서 HuD 유전자의 mRNA 양 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 질병에 걸리지 않은 환자로부터 분리한 대조구 시료와 비교하는 단계를 포함하는 췌장 신경내분비종양의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법일 수 있다. 일 구현예에서, 상기 방법은 질병에 걸리지 않은 정상인의 HuD 발현량에 비해 50% 이상 발현 감소하면 췌장 신경내분비종양에 걸릴 위험도가 높다고 판단하는 단계를 포함할 수 있다.

[0024] 상기 환자의 시료란 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 구체적인 방법은 상기 유전자의 발현을 mRNA 수준 또는 단백질 수준에서 검출할 수 있고, 생물학적 시료에서 mRNA 또는 단백질의 분리는 공지된 공정을 이용하여 수행할 수 있다. 상기 HuD 유전자의 mRNA 또는 HuD 단백질 수준은 절대적(예:ug/ml) 또는 상대적(예: 시그널의 상대 강도) 차이로 나타낼 수 있다. 바람직하게는, 상기 HuD 단백질에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 면역조직 염색을 실시할 수 있다. 환자에게서 시료를 채취 및 고정된 후 당업계에서 널리 공지된 방법으로 파라핀포매 블록을 제조할 수 있다. 이들을 수 um 두께의 절편으로 만들어 유리 슬라이드에 붙인 후, 상기 파라핀포매 블록을 상기의 항체 중 선택된 어느 것과 공지의 방법에 의하여 반응시킬 수 있다. 이후 반응하지 못한 항체는 세척하고, 상기에 언급한 검출라벨 중의 하나로 표지하여 현미경 상에서 항체의 표지 여부를 판독할 수 있다.

[0025] 일 측면에서, 본 발명은 인체로부터 분리된 시료에서 HuD 발현양을 측정하는 단계를 포함하는, 췌장 신경내분비종양 환자의 예후 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 일 구현예에서, 상기 췌장 신경내분비종양 환자의 예후는 무질병생존율(DFS; Diseasefree survival) 또는 무진행 생존율(progression free survival)로 위험도를 판단될 수 있다. 일 구현예에서, 상기 HuD 발현양의 측정은 HuD 유전자의 mRNA 양 또는 HuD 단백질 수준을 측정하여 확인할 수 있다. 일 실시예에서, HuD 양성군은 음성군에 비해 G1기에 머무는 세포가 현저히 증가하였고, 유사분열기인 세포가 현저히 감소하여, 세포분열이 현저하게 감소하는 것을 확인하였다(표 1 참조). 일 구현예에서, 상기 췌장 신경내분비종양은 호르몬 분비와 관련된 기능성 종양일 수 있고, 인슐린종일 수 있으며, 호르몬 종류에 따라 인슐린종, 가스트린종 또는 글루카곤종일 수 있으나, 인슐린종인 것이 가장 바람직하다. 일 구현예에서, 상기 방법은 질병에 걸리지 않은 정상인의 HuD 발현량에 비해 50% 이상 발현 감소하면 예후의 위험도가 높다고 판단하는 단계를 포함할 수 있다.

[0026] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0027] **실시예 1. HuD 발현과 췌장 유래 신경내분비종양의 상관 관계 확인**

[0028] **1-1. 췌장유래 신경내분비종양에서의 HuD 발현 양상 확인**

[0029] 췌장 유래 신경내분비 환자 88명의 조직을 항-HuD 항체 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)로 염색한 뒤, DAB 신호의 밝기를 slide scanner로 분석하여 DAB 신호의 세기정도를 분석함으로써 HuD 단백질의 발현 정도를 확인하였다. HuD 단백질 특이적으로 반응한 DAB 신호의 밝기의 유무에 따라 췌장 조직을 HuD 음성군과 HuD 양성군으로 분류하였다. TNM (tumor-Node-Metastasis) 분류법을 통하여 병변에 따라 분류된 인간 췌장유래 신경내분비종양 환자의 임상적 데이터를 분석하여 HuD의 발현정도 (HuD 음성군 및 HuD 양성군)와 종양의 크기, 전이, 분화도 간의 상관관계를 분석하여 하기의 표 1에 기재하였다.

표 1

[0030]

	HuD			P
	Negative (23)	Positive (65)		
Sex				
male	43	13 (56.5)	20 (46.2)	0.393
female	45	10 (43.5)	35 (53.8)	
Age (year)	54	53.4±13.5	52.3±11.4	0.488
Size (cm)	2.4	4.6±4.2	2.7±2.8	0.006*
Grade by 2010 WHO classification				
G1	64	11 (47.8)	53 (81.5)	<0.001*

G2	20	8 (34.8)	12 (18.5)	
G3	4	4 (17.4)	0 (0.0)	
Ki-67 index (%)		4.1±8.9	1.2±2.5	0.271
Mitotic count (10HPF)		5.9±10.9	0.7±2.1	0.001*
Extent of invasion				
Limited in pancreas	63	11 (47.8)	52 (80.0)	0.003*
Extended to other organ	25	12 (52.2)	13 (20.0)	
Angioinvasion				
Absent	58	11 (47.8)	47 (72.3)	0.033*
Present	30	12 (52.2)	18 (27.7)	
pT (AJCC 7th ed)				
1	32	3 (13.0)	29 (44.6)	0.004*
2	31	8 (34.8)	23 (35.4)	
3	25	12 (52.2)	13 (20.0)	
pN				
0	80	21 (26.3)	59 (90.8)	0.980
1	8	2 (8.7)	6 (9.2)	
pM				
0	81	21 (91.3)	60 (92.3)	1.000
1	7	2 (8.7)	5 (7.7)	
Associated syndrome				
Sporadic	80	18 (78.3)	62 (95.4)	0.009*
Von-Hippel-Lindau syndrom (VHL)	5	2 (8.7)	3 (4.6)	
Multiple endocrine neoplasm (MEN)	3	3 (13.0)	0 (0.0)	

[0031] meanSD, * P < 0.05

[0032] 그 결과, HuD 음성군은 HuD 양성군에 비하여 세포분열(mitotic count) 및 종양 크기가 유의적으로 증가했으며, 종양의 분열 능력이 증가한 것을 관찰하였다 (도 1).

[0033] **1-2. 세포주기 분석을 통한 세포분열 확인**

[0034] HuD 음성군 및 HuD 양성군 조직에서 세포주기 조절인자인 p27 단백질과 세포분열 마커인 Ki-67에 특이적인 항체 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)를 이용하여 상기 1-1.에서와 같이 면역염색법으로 분석하였다. 염색 후 DAB 신호를 디지털 이미지로 변환한 후 Image J 소프트웨어를 사용하여 두 그룹 간 단백질의 차이를 정량분석 하였다.

[0035] 그 결과, HuD 음성군은 HuD 양성군에 비하여 p27 단백질의 감소와 Ki-67의 증가의 특성을 보이는 것으로 확인하였다 (도 2). 또한, 이를 이용하여 HuD의 발현과 p27의 상관관계를 분석한 바, HuD와 p27은 양의 상관관계가 있음을 확인하였다.

[0036] **실시예 2. HuD 발현과 췌장 유래 신경내분비종양 환자의 예후 분석**

[0037] TNM (tumor-Node-Metastasis) 분류법을 통하여 병변에 따라 분류된 인간 췌장유래 신경내분비종양 환자의 임상적 데이터를 이용하여 HuD 발현과 무질병생존율(DFS; Diseasefree survival) 및 무진행 생존율(progression free survival)의 연관성을 Excel 및 Graphpad를 이용하여 추적 분석하였다.

[0038] 그 결과, HuD 음성군에서 생존율이 양성군에 비해 현저하게 감소하여, HuD 음성군으로 나타난 환자가 나쁜 예후를 보임을 알 수 있었다 (도 3). 또한, 췌장 신경내분비 종양에서 HuD 단백질의 특이성을 추가적으로 검증하기 위하여 췌장 신경내분비 종양환자의 임상지표를 HuD 단백질 유무에 따라 univariate 분석과 multivariate 분석을 각각 분석하였다. 그 결과 두 분석 결과 모두 HuD의 상대적 발현양은 췌장 신경내분비종양의 크기와 유의적인 차이가 있음을 확인하였다.

표 2

	N	Univariate analysis			Multivariate analysis		
		progress n(%)	Mean(month) meanSE	P	hazard ratio [95% CI]	P	
HuD							
Negative	23	14 (60.9)	70 ± 11	<0.001*	3.506	[1.246-9.871]	0.018*
Positive	65	9 (13.8)	181 ± 11		1		
Sex							
male	43	14 (32.6)	134 ± 18	0.042*	1		
female	45	9 (20.0)	114 ± 10		0.28	[0.095-0.827]	0.021*
Age (year)		0.998	[0.962-1.036]	0.931			
Size ()		1.298	[1.178-1.431]	<0.001*	1.209	[1.071-1.385]	0.002*
Grade by 2010 WHO classification							
G1	64	12 (18.7)	158 ± 17	0.001*			
G2	20	7 (35.0)	88 ± 14				
G3	4	4 (100.0)	38 ± 29				
Ki-67 index (%)		1.042	[1.005-1.080]	0.025*	1.01	[0.963-1.058]	0.694
Mitotic count (10HPF)		1.101	[1.059-1.145]	<0.001*			
Extent of invasion							
Limited in pancreas	63	10 (15.9)	148 ± 21	<0.001*	1		
Extended to other organ	25	13 (52.0)	70 ± 12		1.113	[0.332-3.726]	0.862
Angioinvasion							
Absent	58	7 (12.1)	170 ± 19	<0.001*	1		
Present	30	16 (53.3)	70 ± 11		3.338	[1.128-9.8722]	0.029*
Perineural invasion							
Absent	73	16 (21.9)	133 ± 18	0.005*	1		
Present	15	7 (46.7)	46 ± 8		0.842	[0.210-3.384]	0.843
pT (AJCC 7th ed)							
1	32	2 (6.2)	192 ± 16	<0.001*			
2	31	8 (25.8)	94 ± 11				
3	25	13 (52.0)	70 ± 12				
pN							
0	80	19 (23.7)	129 ± 18	0.002*	1		
1	8	5 (62.5)	36 ± 11		3.097	0.680-14.119]	0.144
pM							
0	81	18 (22.2)	128	0.003*	1		
1	7	5 (71.4)	59		2.029	[0.435-9.458]	0.368

[0040] by Cox regression analysis, hazard ratio [95% confidence interval], * P < 0.05

[0041] **실시예 3. HuD 발현 억제를 통한 인슐린종 성장 확인**

[0042] **3-1. HuD 발현 억제 인슐린종 세포의 생존율 확인**

[0043] 생쥐의 인슐린종 (insulinoma) 세포주인 βTC6를 10% FBS와 1% 항생제를 포함하는 DMEM 미디어에서 배양하였다. 배양한 세포주에 HuD에 특이적인 siRNA (GCAUCCUGGUUGAUCAGU) (Genolution Inc.)를 리포펙타민 2000 (Invitrogen)을 이용하여 리포솜 형태로 세포 내부로 주입하였다. 그 후, 세포에 20mg/ml MTT 용액을 첨가한 후 16시간 후에 formazane 형성정도를 비교하는 MTT assay를 통해 세포주의 생존율을 확인하였다.

[0044] 그 결과, siRNA로 HuD의 발현을 억제한 인슐린종 세포주의 생존율이 증가하여 HuD의 억제가 인슐린종 세포수를 증가시키는 것으로 유추되었다 (도 4).

[0045] **3-2. HuD 발현 억제 인슐린종 세포의 세포주기 및 세포 성장 확인**

[0046] 상기 실시예 3-1.에서와 같이 인슐린종 세포주에 HuD siRNA를 트랜스펙션한 후 48시간 동안 배양하였다. 배양한 세포를 에탄올 용액에 고정된 후 FACS 장비를 사용하여 세포주기 변화를 분석하였다. 또한, control siRNA를 처리한 대조군과 HuD siRNA를 처리한 실험군 세포를 동일한 양으로 배양 접시에 접종한 뒤 3일 동안 배양한 후

FACS 장비로 총 세포의 수를 조사하여 세포 성장을 분석하였다.

[0047] 그 결과, HuD siRNA를 처리한 세포에서는 대조군과 비교하여 세포주기의 G2/M기 상태의 세포가 증가하고 반면 G0/G1기의 세포수가 감소함을 확인하였고 이를 통해 HuD의 발현 저하는 인슐린종 세포주의 세포분열을 증가시킴으로써 세포 성장이 촉진되고 세포수가 증가한 것으로 확인되었다 (도 5).

[0048] **3-3. HuD 발현 억제 인슐린종 세포의 성장 확인**

[0049] 상기 실시예 3-1.에서와 같이 인슐린종 세포주에 control siRNA 및 HuD siRNA를 각각 트랜스펙션한 후 세포 100개씩 35mm 배양 접시에 분주한 후 3주 동안 배양하여 형성된 콜로니의 수를 확인하였다.

[0050] 그 결과, siRNA를 이용하여 HuD 발현을 억제한 인슐린종 세포들이 대조군에 비해 현저하게 생장이 증가함을 알 수 있었다 (도 6).

[0051] **3-4. HuD 발현 억제 인슐린종의 종양 형성능 확인**

[0052] 당뇨병모델 마우스는 6주령의 BALB/c를 사용하였고, 스트렙토조토신 약제를 200 mg/Kg의 용량으로 주사하였다. 인슐린종 세포의 이식을 위하여 마트리젤과 인슐린종 세포를 혼합하여 생쥐의 피하조직 내로 주 3회 주사하였으며, 이 과정을 총 10회 실시하였다. 접종 후 약 5주간 종양 형성을 관찰하였다. 모든 동물실험은 아주대학교 및 가톨릭대학교 동물실험연구윤리규정을 준수하여 수행하였다.

[0053] 그 결과, HuD의 발현이 억제된 인슐린종의 경우 그렇지 않은 대조군 세포와 비교하여 종양형성능이 유의적으로 증가되어 있음을 확인할 수 있었다 (도 7).

[0054] **실시예 4. HuD 과발현을 통한 인슐린종 성장 억제능 확인**

[0055] **4-1. HuD 과발현 인슐린종 세포의 생존율 확인**

[0056] 상기 실시예 3-1.과는 반대로, HuD의 과발현에 의한 인슐린종의 성장을 확인하고자 하였다. 구체적으로, 리포펙타민을 이용해 myc-tagged HuD 플라스미드를 인슐린종 세포주 β TC6에 트랜스펙션하여 HuD의 과발현을 유도한 뒤, MTT assay를 통해 HuD 과발현 세포주의 세포 생존율을 확인하였다.

[0057] 그 결과, HuD가 과발현된 인슐린종 세포주의 생존율이 40% 이상 감소하여, HuD가 인슐린종의 사멸을 유발하는 것으로 유추되었다 (도 8).

[0058] **4-2. HuD 과발현 인슐린종 세포의 세포주기 및 세포 성장 확인**

[0059] 인슐린종 세포주 β TC6에 myc-tagged HuD 플라스미드를 트랜스펙션하여 HuD를 과발현시킨 뒤, FACS 장비를 이용하여 상기 실시예 4-2와 동일한 방법으로 세포 주기 및 세포 성장 변화를 분석하였다.

[0060] 그 결과, HuD 과발현될 경우, 대조군에 비하여 G2/M기의 세포가 감소하고 G0/G1기의 세포는 증가함을 확인하였으며, HuD 과발현은 인슐린종 세포의 성장을 억제함을 확인하였다 (도 9).

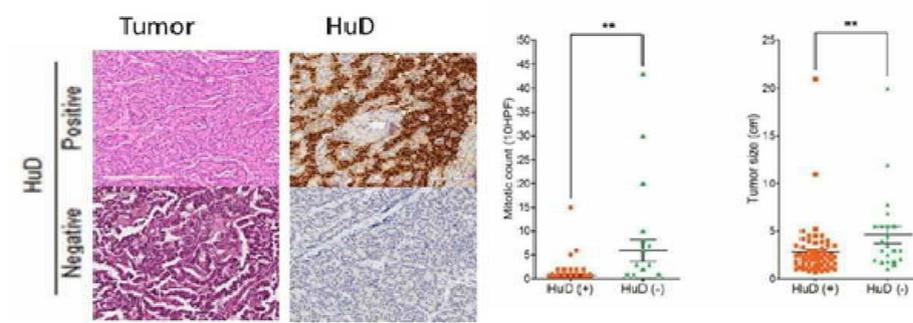
[0061] **4-3. HuD 과발현 인슐린종 세포의 성장 확인**

[0062] 인슐린종 세포주 β TC6에 myc-tagged HuD 플라스미드를 트랜스펙션한 후 세포 100개씩 35mm 배양 접시에 분주하였다. 분주 후 3주 동안 세포주들을 배양하고 형성된 콜로니의 수를 확인하였다.

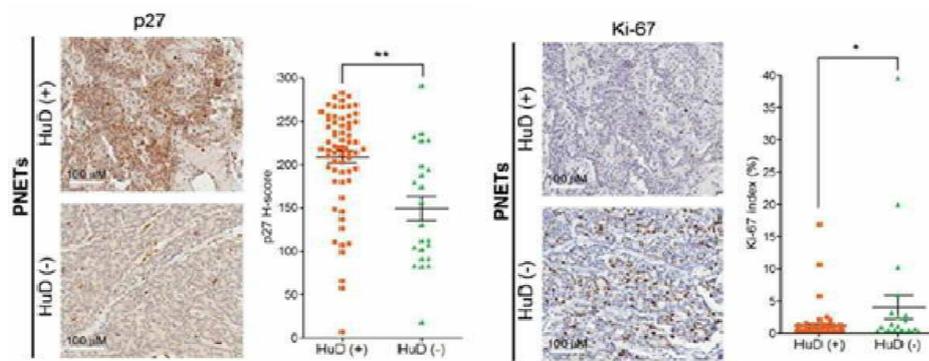
[0063] 그 결과, HuD의 과발현에 의해 인슐린종 세포주가 대조군에 비해 생장이 감소되었다 (도 10).

도면

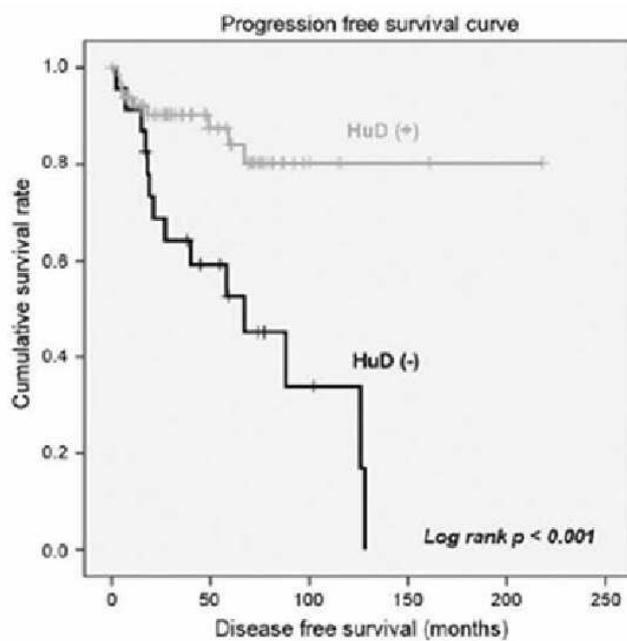
도면1



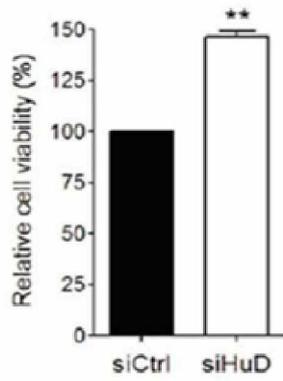
도면2



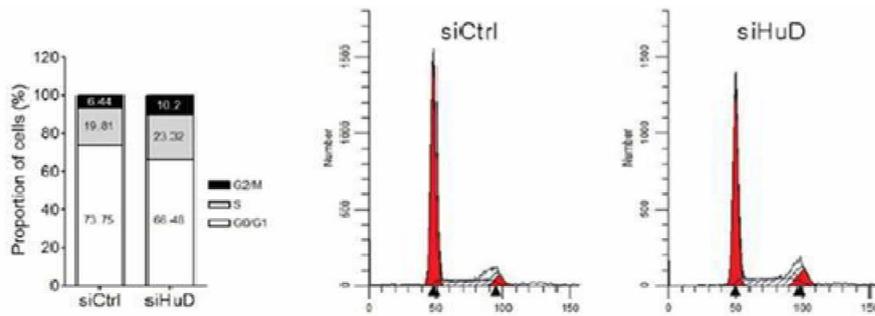
도면3



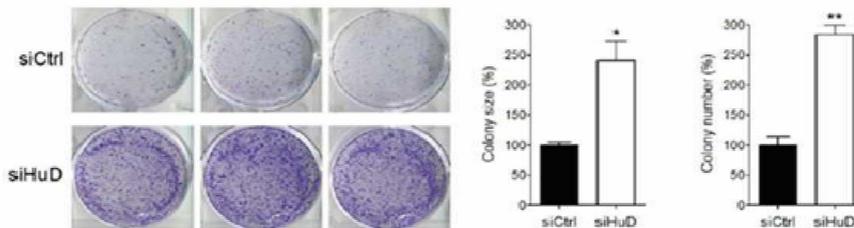
도면4



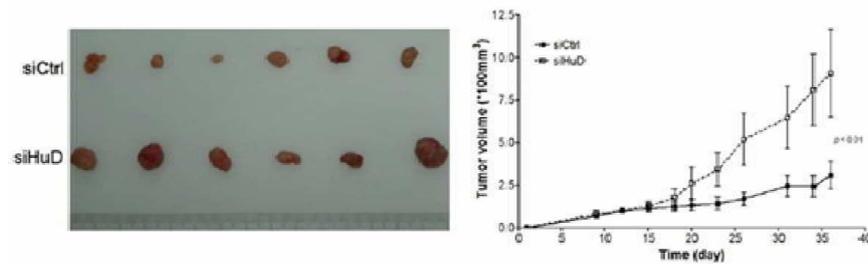
도면5



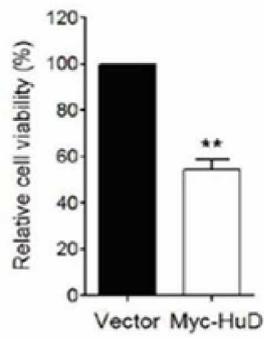
도면6



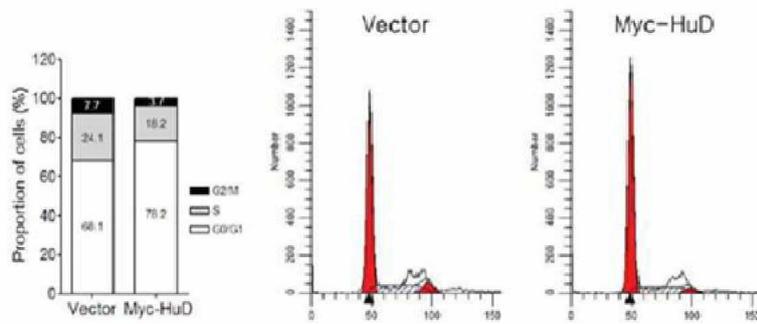
도면7



도면8



도면9



도면10

