



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년02월21일
(11) 등록번호 10-2080384
(24) 등록일자 2020년02월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) G01N 33/569 (2017.01)
G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2018.05)
G01N 33/56966 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0024305
(22) 출원일자 2018년02월28일
심사청구일자 2018년02월28일
(65) 공개번호 10-2019-0103640
(43) 공개일자 2019년09월05일
(56) 선행기술조사문헌
Genes Dev, 29(12): 1203-1217 (2015.06.15.)*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
주식회사 마크로젠
서울특별시 금천구 벚꽃로 254, 월드메르디앙벤처
센터 10층 (가산동)
(72) 발명자
임창임
경기도 고양시 덕양구 충장로 118-30, 224동 901
호(행신동, 샘터마을2단지아파트)
방솔희
경기도 광명시 금당로 11, 606동 207호 (하안동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 5 항

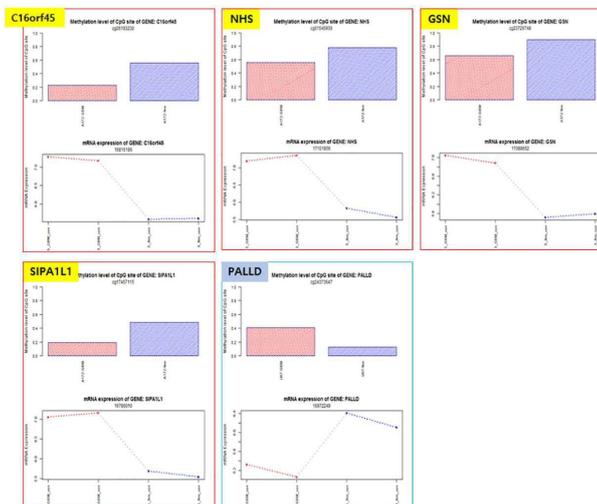
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 암줄기세포 특이적 바이오마커

(57) 요약

본 발명은 암줄기세포능에 특이적으로 발현 및 메틸화 정도가 변화하는 바이오마커들에 관한 것으로, 본 발명의 암줄기세포 특이적 마커인 유전자 및 마이크로 RNA는 교모세포종의 암줄기세포능에 특이적으로 발현 및 메틸화 정도가 변화하므로, 이들을 교모세포종의 암줄기세포 특이적인 바이오마커로서 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

G01N 33/574 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/154 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2500/00 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020170068504 A
JP2017136077 A
KR1020170125493 A
KR1020160147182 A

(72) 발명자

신상윤

경기도 성남시 분당구 느티로 22, B동 3004호(정자동, 백궁동양파라곤)

최은지

경기도 수원시 권선구 세권로77번길 33, 202호(세류동)

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017R1A1A1A05000839

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (구)신진연구지원사업 (후속연구지원)

연구과제명 미세환경에서 암 줄기세포능 유전자간의 후성유전학적 조절기전 연구

기 여 율 1/1

주관기관 (주) 마크로젠

연구기간 2017.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

C16orf45(chromosome 16 open reading frame 45), NHS(NHS actin remodeling regulator), GSN(gelsolin), SIPA1L1(signal induced proliferation associated 1 like 1), PALLD(palladin), ZFAND5(zinc finger AN1-type containing 5), SSBP2(single stranded DNA binding protein 2) 및 SH3BP4(SH3 domain binding protein 4) 유전자에 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 교모세포종의 암줄기세포 검출용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 1 및 2의 프라이머 쌍, 서열번호 3 및 4의 프라이머 쌍, 서열번호 5 및 6의 프라이머 쌍, 서열번호 7 및 8의 프라이머 쌍, 서열번호 9 및 10의 프라이머 쌍, 서열번호 11 및 12의 프라이머 쌍, 서열번호 13 및 14의 프라이머 쌍, 및 서열번호 15 및 16의 프라이머 쌍을 포함하는, 교모세포종의 암줄기세포 검출용 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, ZFAND5, SSBP2 및 SH3BP4 유전자에 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 교모세포종의 암줄기세포 검출용 키트.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 1 및 2의 프라이머 쌍, 서열번호 3 및 4의 프라이머 쌍, 서열번호 5 및 6의 프라이머 쌍, 서열번호 7 및 8의 프라이머 쌍, 서열번호 9 및 10의 프라이머 쌍, 서열번호 11 및 12의 프라이머 쌍, 서열번호 13 및 14의 프라이머 쌍, 및 서열번호 15 및 16의 프라이머 쌍을 포함하는, 교모세포종의 암줄기세포 검출용 키트.

청구항 8

C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, ZFAND5, SSBP2 및 SH3BP4 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 교모세포종의 암줄기세포 검출용 키트.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암줄기세포 특이적 마커들에 관한 것으로, 교모세포종의 암줄기세포능에 특이적으로 발현 및 메틸화 정도가 변화하는 바이오마커들에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뇌종양(뇌암)은 발생하는 부위에 따라 원발성 뇌종양과 전이성 뇌종양으로 구분하며, 악성도에 따라 악성 뇌종양과 양성 뇌종양으로 나눌 수 있으며, 뇌종양을 구성하는 세포에 따라 교모세포종, 뇌수막종, 신경초종, 뇌하수체종양 등으로 구분하기도 한다. 그 중에서 흔한 원발성 뇌종양으로는 교모세포종이 가장 많다. 특히, 교모세포종은 신경원, 신경교세포에서 기원하며, 신경교세포란 신경세포와 신경세포 사이, 신경세포와 혈관 사이에 있으며, 영양이나 산소를 신경세포에 공급하는 역할을 담당하는 세포이다. 신경교종은 전체적으로 악성이 많으며, 그 세포의 형태나 성질별로 자세하게 분류되어 있다.

[0003] 최근 방사선치료 후 암의 재발은 암줄기세포(cancer stem cell)가 주된 원인이라는 주장이 주목받고 있다. 암줄기세포는 고형암이나 혈액 종양에서 작은 부분집합(side population: SP라고도 말한다)을 이루는 존재로서, 오직 자기 복제를 반복함으로써 미분화능을 지니한 암줄기세포를 유지하면서 다수의 암 세포를 낳는다. 또한, 끊임없이 자가재생(self-renewal) 할 수 있으며, 줄기세포와 같이 다양한 잠재적 능력(pulprint potency)을 보이는 특정 세포군으로 적은 세포 수로도 실험동물 모델에 종양을 생성할 수 있으며 필수적인 암 치료방법인 방사선과 항암제치료에 놀라울 정도로 저항성을 가지고 있다고 알려져 있다 (B.M. Boman, M.S. Wicha, J. Clin. Oncol. 26(2008) 2795-2799). 암줄기세포의 존재는 처음 급성골수성 백혈병(leukemia)에서 증명되었으며 최근에는 유방암을 포함한 일반 고형암에서도 암줄기세포를 증명함으로써 고형암중에서도 줄기세포의 존재를 확인하게 되었다(D. Bonnet, J.E. Dick. Nat. Med. 3(1997)730- 737; M. Al-Hajj, M.F. Clarke, Self-renewal and tumor stem cells. Oncogene. 23(2003)7274-7284).

[0004] 교모세포종(Glioblastoma)은 가장 공격적인 뇌종양으로, 방사선 치료 및 항암 치료와 같은 표준 요법에 대해 저

항성을 보여, 나쁜 치료 예후와 낮은 생존률(~13 내지 15개월)을 보인다. 최근 연구에 의하면, 교모세포종은 자기 증식성 교모세포종 줄기세포(Glioblastoma stem cells, GSCs)의 적은 비율을 포함하여 유의적인 이질성을 드러냈다. 또한, 교모세포종 줄기세포는 성상교세포(agstrocyte), 희소돌기신경교세포(oligodendrocyte), 또는 뉴런으로의 다중계통분화나, SOX-2 및 NESTIN와 같은 분화능 관련 다양한 유전자의 발현과 같이 일반적인 줄기세포와 유사한 특성을 공유한다. 교모세포종 줄기세포는 침입, 면역 반응의 변화, 및 높은 운동성과 같은 종양 줄기세포 유사 특성을 보유하여, 교모세포종 줄기세포의 높은 침투 특성에 기여한다. 더욱이, 표준 요법에 대한 교모세포종의 저항성은 신경교종 줄기세포의 DNA 손상 반응에 대한 선택적 활성화에 의한 유전자 독성 또는 방사성 조사에 대한 치료적 저항성 때문에 발생한다. 이러한 교모세포종 줄기세포의 특성들은 잔존 세포들이 치료를 회피하고, 증식 및 침투를 재개할 수 있도록 한다. 따라서, 교모세포종 유래 종양의 진행과 재발을 방지하여 전통적인 항암 요법의 제한점을 극복하기 위해서는 교모세포종 줄기세포의 본질적인 분자적 특성을 이해하는 것이 매우 중요하다.

[0005] GSC-유사 구체를 형성하는 특정 조건에서 줄기세포능의 마커인 SOX2(sex determining region Y (SRY)-box 2)가 증가하는 것을 확인한 바 있다 (Im, C.N.; Yun,H.H.; Yoo, H.J.; Park, M.J.; Lee, J.H. *Oncol Rep* 2015, 34, 920-928.). GSCs가 TMZ와 같은 항암제에 저항성을 가지는 것이 잘 알려져 있고, TMZ 저항성이 교모세포종 및 SOX2의 발현이 높은 세포에서 SOX2의 발현과 양의 상관 관계를 나타냈다 (Im, C.N.; Kang, N.Y.; Ha, H.H.; Bi, X.; Lee, J.J.; Park, S.J.; Lee, S.Y.; Vendrell, M.; Kim, Y.K.; Lee, J.S., *et al. Angew Chem Int Ed Engl* 2010, 49, 7497-7500.).

[0006] 마이크로 RNA(miRNAs)는 22 bp 이하의 짧은 뉴클레오타이드로서, 단일가닥의 비-코딩 RNA 분자이다. miRNA는 전사 후 유전자 조절에서 중요한 역할을 하며, 특히, 상보적인 염기쌍 형성(base pairing)을 통해 메신저 RNA(mRNA) 분해 또는 번역 억제(translational repression)를 유도하는 것으로 알려져 있다. 인간 게놈에서는 1000개 이상의 miRNA가 동정되어 있으며(miRBase), 대부분의 miRNA는 하나 이상의 mRNA를 표적한다. 또한, 여러 miRNA는 동일한 mRNA를 표적하며, 이는 상승적 효과를 유도할 수 있다. miRNA는 분화, 증식, 세포자살, 대사 항상성, 종양형성 및 DNA 메틸화와 같은 다양한 세포 과정들에서 중요한 역할을 한다 (Li H, *et al.*, *Hypertension* 2003;42(5):895-900).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명에서는 교모세포종의 암줄기세포에 특이적으로 mRNA 발현 및 DNA 메틸화가 변화하는 유전자 및 마이크로 RNA를 교모세포종의 암줄기세포의 검출 용도로 사용하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적의 달성을 위해, 본 발명은 암줄기세포 검출용 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 암줄기세포 검출용 키트를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 암줄기세포 억제제 스크리닝용 키트를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 항암줄기세포 후보 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0012] 아울러, 본 발명은 암줄기세포 특성의 암을 예측 및 진단하기 위한 정보의 제공 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따르면, 본 발명의 유전자 및 마이크로 RNA는 교모세포종의 암줄기세포능에 특이적으로 발현 및 메틸화 정도가 변화하므로, 이들을 교모세포종의 암줄기세포 특이적인 마커로서 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 일반적인 교모세포종의 배양 방법 (혈청/부착 배양)과 암 줄기세포능을 촉진하는 배양 방법 (무혈청/비부착)에 따른 교모세포종의 배양 양상을 확인한 도이다.

도 2는 일반적인 배양 방법 (혈청/부착 배양) 및 암 줄기세포능을 촉진하는 배양 방법 (무혈청/비부착)으로 배양한 교모세포종에서의 SOX2의 mRNA 발현량을 비교한 그래프이다.

도 3은 교모세포종을 무혈청/비부착 배양한 경우와 혈청/부착 배양한 경우의 유전자 C16orf45(chromosome 16 open reading frame 45), NHS(NHS actin remodeling regulator), GSN(gelsolin), SIPA1L1(signal induced proliferation associated 1 like 1) 및 PALLD(palladin)의 mRNA 발현량 및 메틸화 정도를 확인한 도이다.

도 4는 교모세포종을 무혈청/비부착 배양한 경우와 혈청/부착 배양한 경우의 마이크로 RNA MIR542, MIR1977, MIR663 및 MIR891B의 메틸화 수준의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 5는 암 줄기세포능을 촉진 조건에서의 교모세포종에서의 MIR891B의 표적 유전자인 ZFAND5(zinc finger AN1-type containing 5), SSBP2(single stranded DNA binding protein 2) 및 SH3BP4(SH3 domain binding protein 4)의 mRNA 발현 수준 변화를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0016] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0018] 일 측면에서, 본 발명은 C16orf45(chromosome 16 open reading frame 45), NHS(NHS actin remodeling regulator), GSN(gelsolin) 및 SIPA1L1(signal induced proliferation associated 1 like 1) 유전자 발현 억제제, PALLD(palladin) 유전자 발현 촉진제, ZFAND5(zinc finger AN1-type containing 5) 및 SSBP2(single stranded DNA binding protein 2) 유전자 발현 억제제, SH3BP4(SH3 domain binding protein 4) 유전자 발현 촉진제, C16orf45, NHS, GSN 및 SIPA1L1의 메틸화제, PALLD의 탈메틸화제, MIR542, MIR1977 및 MIR663의 메틸화제 또는 MIR891B의 탈메틸화제를 함유하는 교모세포종 줄기세포 성장 억제용 조성물에 관한 것이다.

[0019] 일 구현예에서, 유전자 발현 억제제는 작은 간섭 RNA(short interfering RNA; siRNA) 또는 마이크로 RNA(micro RNA, miRNA) 일 수 있다.

[0020] 일 실시예에서, 본 발명의 교모세포종 암줄기세포능에 mRNA 발현량 변화가 특이적인 유전자는 C16orf45(NM_001142469), GSN(NM_001127663), NHS(NM_001291867), SIPA1L1(NM_001284245), PALLD(NM_001166108), ZFAND5(NM_001102420.2), SSBP2(NM_001256732.2), SH3BP4(NM_014521.2)이며, 메틸화 정도의 변화가 특이적인 유전자 및 마이크로 RNA는 C16orf45(NM_001142469), GSN(NM_001127663), NHS(NM_001291867), SIPA1L1(NM_001284245), PALLD(NM_001166108)이고, 마이크로 RNA는 MIR542(MI0003686(NC_000023.11), MIR1977(MI0009987), MIR663(MI0003672) 및 MIR891B(MI0005534)이다.

[0021] 본 발명에서 사용되는 용어, "siRNA(small interfering RNA)"란 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 일반적으로 siRNA는 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성되나, 본 발명의 이중 가닥 siRNA는 센스 RNA 가닥이 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 siRNA (BCL2 유전자에 대한 안티센스 가닥)이고, 안티센스 RNA 가닥이 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 siRNA (BI-1 유전자에 대한 안티센스 가닥)이므로, 이중 가닥의 siRNA가 각각 동시에 BCL2 유전자 및 BI-1 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운(knock-down) 방법으로서 또는, 유전자치료(gene therapy)의 방법으로 제공된다.

[0022] 본 발명에서 사용되는 용어, "발현 억제"란 표적 유전자의 (mRNA로의) 발현 또는 (단백질로의) 번역 저하를 야기하는 것을 의미하며, 바람직하게는 이에 의해 표적 유전자 발현이 탐지 불가능해지거나 무의미한 수준으로 존재하게 되는 것을 의미한다.

[0023] 일 측면에서, 본 발명은 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, ZFAND5, SSBP2 또는 SH3BP4 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 포함하는 암줄기세포 검출용 조성물에 관한 것이다.

- [0024] 일 구현예에서, 상기 유전자의 발현양 측정은 유전자의 mRNA의 발현수준 또는 유전자에 의해 코딩되는 단백질 수준을 확인함으로써 알 수 있다. 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 유전자에 의해 코딩되는 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) 면역 확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법 (Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법 (Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 일 측면에서, 본 발명은 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, ZFAND5, SSBP2 또는 SH3BP4 유전자에 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 암줄기세포 검출용 조성물에 관한 것이다.
- [0026] 일 구현예에서, 상기 프라이머는 서열번호 1 및 2의 프라이머 쌍, 서열번호 3 및 4의 프라이머 쌍, 서열번호 5 및 6의 프라이머 쌍, 서열번호 7 및 8의 프라이머 쌍, 서열번호 9 및 10의 프라이머 쌍, 서열번호 11 및 12의 프라이머 쌍, 서열번호 13 및 14의 프라이머 쌍, 또는 서열번호 15 및 16의 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.
- [0027] 일 구현예에서, 암은 신경교종(glioma), 교모세포종(glioblastoma), 다형성 교모세포종(glioblastoma multiforme), 뇌수막종(meningioma), 뇌하수체선종(pituitary adenoma) 또는 신경초종(schwannoma)일 수 있으며, 교모세포종인 것이 가장 바람직하다.
- [0028] 본 발명에서 사용된 용어 "검출" 또는 "측정"은 검출 또는 측정된 대상의 농도를 정량하는 것을 의미한다.
- [0029] 본 발명에서 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3 말단 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 시작 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시할 수 있다.
- [0030] 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 상기 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, ZFAND5, SSBP2 또는 SH3BP4 유전자와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부를 통해 상기 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.
- [0031] 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.
- [0032] 본 발명에서, 프로브를 cDNA 분자와 혼성화시키는 적합한 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 이런 절차는 연구실에서 사용을 위한 프로토콜을 수립하기 위하여 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시된다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 프로브의 길이 및 GC 양 및 타겟 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, Nucleic Acid Hybridization, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 확인할 수 있다. 예를 들어, 상기 엄격조건 중에서 고 엄격조건은 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS(sodium dodecyl sulfate), 1mM EDTA에서 65℃ 조건으로 혼성화하고, 0.1 x SSC(standard saline citrate)/0.1% SDS에서 68℃ 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 또는, 고 엄격조건은 6 x SSC/0.05% 소듐 파이로포스페이트에서 48℃ 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 저 엄격조건은 예를 들어, 0.2 x

SSC/0.1% SDS에서 42℃ 조건으로 세척하는 것을 의미한다.

- [0033] 본 발명에서 용어, "항체"란 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 마커인 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, ZFAND5, SSBP2 또는 SH3BP4 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. 본발명의 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.
- [0034] 일 측면에서, 본 발명은 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, MIR542, MIR1977, MIR663 또는 MIR891B의 CpG섬을 포함하는 단편을 증폭하기 위한 PCR 프라이머쌍과 상기 프라이머쌍에 의하여 증폭된 PCR 산물을 파이로시퀀싱하기 위한 시퀀싱 프라이머를 함유하는 암줄기세포 검출용 조성물에 관한 것이다.
- [0035] 일 구현예에서, 암은 신경교종(glioma), 교모세포종(glioblastoma), 다형성 교모세포종(glioblastoma multiforme), 뇌수막종(meningioma), 뇌하수체선종(pituitary adenoma) 또는 신경초종(schwannoma)일 수 있으며, 교모세포종인 것이 가장 바람직하다.
- [0036] 일 측면에서, 본 발명은 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, ZFAND5, SSBP2 또는 SH3BP4 유전자에 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 암줄기세포 검출용 키트에 관한 것이다.
- [0037] 일 구현예에서, 상기 프라이머는 서열번호 1 및 2의 프라이머 쌍, 서열번호 3 및 4의 프라이머 쌍, 서열번호 5 및 6의 프라이머 쌍, 서열번호 7 및 8의 프라이머 쌍, 서열번호 9 및 10의 프라이머 쌍, 서열번호 11 및 12의 프라이머 쌍, 서열번호 13 및 14의 프라이머 쌍, 또는 서열번호 15 및 16의 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.
- [0038] 일 측면에서, 본 발명은 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, ZFAND5, SSBP2 또는 SH3BP4 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 암줄기세포 검출용 키트에 관한 것이다.
- [0039] 일 측면에서, 본 발명은 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, MIR542, MIR1977, MIR663 또는 MIR891B의 CpG섬을 포함하는 단편과 하이브리다이제이션할 수 있는 프로브를 포함하는, 암줄기세포 검출용 키트에 관한 것이다.
- [0040] 본 발명에서 용어 “암줄기세포 검출용 키트”는 암줄기세포의 존재 여부의 진단용 조성물이 포함된 키트를 의미한다. 따라서, 상기 표현 “암줄기세포 검출용 키트”는 “암줄기세포 존재 여부의 진단용 조성물”과 서로 교차 또는 혼용하여 사용이 가능하다. 본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)(예컨대, 전-전이성 또는 전이성 암 상태의 동정, 암의 단계 결정 또는 치료에 대한 암의 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.
- [0041] 본 발명에서 용어 “진단용 마커, 진단하기 위한 마커 또는 진단 마커(diagnosis marker)”란 암줄기세포 (또는 조직)를 정상 세포 또는 암세포 (또는 조직)과 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상 세포 또는 일반 암세포에 비하여 암줄기세포를 가진 세포 또는 조직에서 발현 또는 메틸화 증가 또는 감소 양상을 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다. 본 발명의 목적상, 상기 암줄기세포 검출 또는 진단 마커는 유전자 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, ZFAND5, SSBP2 및 SH3BP4, 및 마이크로 RNA MIR542, MIR1977, MIR663 및 MIR891B로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상으로서, 암줄기세포 특이적으로 mRNA 발현 또는 메틸화 정도가 증가 또는 감소하는 유전자 또는 마이크로 RNA이다. 이러한 마커들은 유전자 또는 마이크로 RNA뿐만 아니라 어느 하나의 마커와 상보적인 DNA 또는 mRNA를 포함하며, 이들 마커들이 둘 이상 포함된 복합 마커인 것이 바람직하다.
- [0042] 일 측면에서, 본 발명은 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, ZFAND5, SSBP2 또는 SH3BP4 유전자의 발현량을 mRNA 또는 단백질 수준에서 측정하는 제제를 포함하는 암줄기세포 억제제 스크리닝용 키트에 관한 것이다.
- [0043] 일 구현예에서, mRNA 수준에서 측정하는 제제는 서열번호 1 및 2의 프라이머 쌍, 서열번호 3 및 4의 프라이머 쌍, 서열번호 5 및 6의 프라이머 쌍, 서열번호 7 및 8의 프라이머 쌍, 서열번호 9 및 10의 프라이머 쌍, 서열번호 11 및 12의 프라이머 쌍, 서열번호 13 및 14의 프라이머 쌍, 또는 서열번호 15 및 16의 프라이머 쌍일 수 있다.
- [0044] 일 구현예에서, 단백질 수준에서 측정하는 제제는 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, ZFAND5, SSBP2 또는

SH3BP4 단백질에 대한 항체일 수 있다.

- [0045] 일 측면에서 본 발명은 (a) 암 줄기세포의 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, ZFAND5, SSBP2 또는 SH3BP4 유전자 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 암 줄기세포에 항암 줄기세포 후보 물질을 투여하고 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, ZFAND5, SSBP2 또는 SH3BP4 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (c) (a) 단계에서의 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, ZFAND5, SSBP2 또는 SH3BP4 유전자 발현 수준보다 (b) 단계에서의 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, ZFAND5 또는 SSBP2 유전자 발현 수준이 낮아지거나, PALLD 또는 SH3BP4 유전자 발현 수준이 높아진 경우, 상기 항암 줄기세포 후보 물질을 효과적인 항암 줄기세포 물질로 판단하는 단계를 포함하는, 항암 줄기세포 후보 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0046] 일 측면에서, 본 발명은 (a) 암 줄기세포의 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, MIR542, MIR1977, MIR663 또는 MIR891B의 메틸화 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 암 줄기세포에 항암 줄기세포 후보 물질을 투여하고 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, MIR542, MIR1977, MIR663 또는 MIR891B의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 (c) (a) 단계에서의 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, MIR542, MIR1977, MIR663 또는 MIR891B 메틸화 수준보다 (b) 단계에서의 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, MIR542, MIR1977 또는 MIR663의 메틸화 수준이 증가하거나, PALLD 또는 MIR891B의 메틸화 수준이 감소한 경우, 상기 항암 줄기세포 후보 물질을 효과적인 항암 줄기세포 물질로 판단하는 단계를 포함하는, 항암 줄기세포 후보 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0047] 일 측면에서, 본 발명은 (a) 암 줄기세포가 존재하지 않는 암세포의 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, ZFAND5, SSBP2 또는 SH3BP4 유전자 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, ZFAND5, SSBP2 또는 SH3BP4 유전자 발현 수준을 측정하는 단계; (c) (b) 단계에서의 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, ZFAND5 또는 SSBP2 유전자 발현 수준이 (a) 단계에서의 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, ZFAND5 또는 SSBP2 유전자 발현 수준보다 높거나, (b) 단계에서의 PALLD 또는 SH3BP4 유전자 발현 수준이 (a) 단계에서의 PALLD 또는 SH3BP4 유전자 발현 수준보다 낮을 경우, 상기 암 환자로부터 분리된 생물학적 시료가 암 줄기세포를 포함한 암으로 판단하는 단계를 포함하는, 암 줄기세포 특성의 암을 예측 및 진단하기 위한 정보의 제공 방법에 관한 것이다.
- [0048] 일 구현예에서, 유전자 발현 수준은 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 또는 실시간 중합 효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction)을 통해 확인될 수 있다.
- [0049] 일 측면에서, 본 발명은 (a) 암 줄기세포가 존재하지 않는 암세포의 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, MIR542, MIR1977, MIR663 또는 MIR891B의 메틸화 수준을 측정하는 단계; (b) 암 환자로부터 분리된 생물학적 시료의 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, MIR542, MIR1977, MIR663 또는 MIR891B의 메틸화 수준을 측정하는 단계; (c) (b) 단계에서의 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, MIR542, MIR1977, MIR663 또는 MIR891B 메틸화 수준이 (a) 단계에서의 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, MIR542, MIR1977 또는 MIR663 메틸화 수준보다 낮거나, (b) 단계에서의 PALLD 또는 MIR891B의 메틸화 수준이 (a) 단계에서의 PALLD 또는 MIR891B의 메틸화 수준보다 높을 경우, 상기 암 환자로부터 분리된 생물학적 시료가 암 줄기세포를 포함한 암으로 판단하는 단계를 포함하는, 암 줄기세포 특성의 암을 예측 및 진단하기 위한 정보의 제공 방법에 관한 것이다.
- [0050] 일 구현예에서, 메틸화 수준은 PCR, 메틸화 특이 PCR(methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR(real time methylation specific PCR), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 정량 PCR, DNA 칩, 파이로시퀀싱 또는 마이셀과이트 시퀀싱으로 측정될 수 있다.
- [0051] 일 구현예에서, 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료를 포함할 수 있다.
- [0053] 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.
- [0055] **실시예 1. 교모세포종 세포주의 암 줄기세포능 특이적 배양**
- [0056] 모든 인간 교모세포종(glioblastoma) U87 세포주(U87-MG)를 American Type Culture Collection(ATCC, 미국)으로부터 구입하여, 열-불활화 우태아혈청(FBS) 10%, 페니실린 100 units/ml 및 스트렙토마이신 100 mg/ml이 함유된 DMEM (Hyclone, Logan, UT, USA) 배지를 이용하여, 37°C의 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다 (혈청/부착배양) (도 1). 암 줄기세포능을 촉진하는 배양 조건인 구체 형성(sphere forming, SP) 배양을 위해서는 세포를 트립신처리(trypsinization) 하여 단일 세포를 분리하고, 이를 B27-첨가된 배지 DMEM/F12 (Cellgro, Manassas,

VA, USA)에서 혈청 없이 epidermal growth factor 및 basic fibroblast growth factor (10 ng/mL each: R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 첨가하여 초저온 부착 플레이트(attachment plates) (Corning, Tewksbury, MA)에서 각각 1×10^5 cells/mL 밀도로 구체 형성 배양을 수행하였다 (무혈청/비부착 배양) (도 1). 구체 형성 조건으로 배양된 교모세포종 세포주에서 줄기세포능 마커인 SOX2의 mRNA 수준을 확인하기 위하여, 각각의 조건으로 배양한 세포들로부터 RNA를 추출한 뒤, 이를 cDNA로 역전사 한 후, 하기의 프라이머들과 SYBR Green Core Reagents (SYBR Premix Ex Taq II, Takara, Japan)를 이용하여 qPCR을 수행하였다. qPCR 조건은 95°C에서 3분간 변성 (1 사이클), 변성을 위해 95°C에서 10 초 동안 및 어닐링을 위해 60°C에서 30초 동안 증폭, 95°C에서 10초 동안 및 65°C에서 30초 동안 최종 용융 곡선 (1 사이클)이다. 데이터는 ViiA7 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)의 $2^{-\Delta \Delta CT}$ 방법으로 분석하였다.

표 1

[0057]

유전자	서열	서열번호
SOX2	Forward: 5'-TACCTCTTCTCCCACTCCA-3'	17
	Reverse: 5'-ACTCTCTCTTTTGCACCCC-3'	18
β-actin	Forward: 5'-AGTACTCCGTGTGGATCG GC-3'	19
	Reverse: 5'-GCTGATCCACATCTGCTGGA-3'	20

[0058]

그 결과, 교모세포종을 무혈청/비부착 배양한 경우 SOX2의 mRNA 수준이 혈청/부착 배양한 경우에 비해 현저하게 증가되어 있었다 (도 2). 이를 통해, 교모세포종의 혈청/부착배양 조건이 암줄기세포능을 향상시키는 것을 알 수 있었다.

[0060]

실시예 2. 교모세포종 암줄기세포능 관련 유전자 선별

[0061]

2-1. 마이크로에레이 분석(microarray analysis)

[0062]

무혈청/비부착 배양 조건에서 배양된 교모세포종 구체(sphere)를 3일 뒤에 수득한 후, Affymetrix GeneChip human 2.0 ST arrays (Macrogen, Seoul, Korea)를 사용하여 마이크로에레이 분석을 수행하였다. QC(quality control)를 위해 RNA의 오염도를 OD 260/280 비율로 평가하고, Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)로 분석하였다. Affymetrix Whole Transcript Expression array 과정은 제조사의 프로토콜 (GeneChip Whole Transcript PLUS reagent Kit; Macrogen)에 따라 진행되었다. cDNA를 GeneChip WT Amplification kit (Macrogen)을 사용하여 합성한 뒤 센스(sense) cDNA를 분절시키고, GeneChip WT Terminal labeling kit (Macrogen)를 사용하여 말단데옥시뉴클레오티드전달효소(terminal deoxynucleotidyl transferase)로 비오틴 표지하였다. 16시간 동안 45°C의 조건에서 약 5.5 μg의 표지된 DNA를 Affymetrix GeneChip Human 2.0 ST Array에 혼성화하였다. 혼성화된 어레이(array)를 세척하고 GeneChip Fluidics Station 450에서 염색한 뒤, GCS3000 Scanner (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)로 스캔하였다. 시그널(Signal) 값은 Affymetrix GeneChip Command Console 소프트웨어를 사용하여 계산하였고, 초기 데이터는 Affymetrix에서 제공된 소프트웨어의 데이터-추출 프로토콜에 따라 자동적으로 추출되었다. CEL 파일을 불러온 후, 데이터는 Affymetrix Expression Console Software (Affymetrix)에서 사용되는 RMA (robust multi-average) 방법으로 요약되고 정규화되었다. 그 후, 유전자 수준의 RMA 분석 결과를 추출하여 DEG(differentially expressed gene) 분석을 수행하였다. 대조군(control sample)과 실험군 사이의 비교 분석은 독립적인 t-test 를 사용하여 수행되었고, null hypothesis는 그룹사이에 존재하지 않았다. FDR(false discovery rate)은 Benjamini-Hochberg 알고리즘을 사용하여 p value를 조절함으로써 통제되었다. DEG(differentially expressed gene) 세트에 대하여, 계층적 클러스터 분석은 유사도의 측정으로서 완전연관과 유클리디안 거리를 사용하여 수행되었다. 모든 통계적 테스트와 DEG(differentially expressed gene)의 시각화는 statistical language v.3.1.2.(www.r-project.org)을 사용하여 수행되었다.

[0063]

그 결과, 교모세포종을 무혈청/비부착 배양한 경우와 혈청/부착 배양한 경우에 발현량이 유의적으로 변화하는 유전자로 C16orf45(chromosome 16 open reading frame 45), NHS(NHS actin remodeling regulator), GSN(gelsolin), SIPAIL1(signal induced proliferation associated 1 like 1) 및 PALLD(palladin)를 선별했으며, 메틸화의 발현량이 변화하는 마이크로 RNA로 MIR542, MIR1977, MIR663 및 MIR891B를 선별하였다.

[0065]

2-2. mRNA 발현량 확인

[0066]

혈청/부착 배양하거나 무혈청/비부착 배양한 교모세포종 세포주 U87에서 각각 RNA를 추출한 뒤 상기 실시예 2-1

에서 선별한 유전자 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1 및 PALLD의 mRNA 수준을 하기 표 2의 프라이머를 이용하여 상기 실시예 1과 같은 방법으로 확인하였다.

표 2

[0067]

유전자	서열	서열번호
C16orf45	Forward: 5'-ATTCTTCCATGTGGGGCGAC-3'	1
	Reverse: 5'-TCCCGGAGACGCTGAATTTT-3'	2
NHS	Forward: 5'-GACCCTGGTTGGAAGCAAGT-3'	3
	Reverse: 5'-TTCCTGGGGAGGATGACAA-3'	4
GSN	Forward: 5'-TTCCCAAAGCTCAGCCCAA-3'	5
	Reverse: 5'-TCCATAAAGGTTGGTGGGCA-3'	6
SIPA1L1	Forward: 5'-ATAGCAGTCCAGGGCAACAG-3'	7
	Reverse: 5'-TGTGCCATGGCTACCGAAAT-3'	8
PALLD	Forward: 5'-ATAGGCAAGGCCACACCTC-3'	9
	Reverse: 5'-CCAGAGGCACTGGAACCTGT-3'	10

[0068]

그 결과, 암줄기세포 조건 (무혈청/비부착)으로 배양한 교모세포종 세포주에서 C16orf45, NHS, GSN 및 SIPA1L1의 mRNA 발현이 증가하였으며, PALLD의 mRNA 발현이 감소한 것을 확인할 수 있었다 (도 3).

[0070]

2-3. 메틸화 확인

[0071]

혈청/부착 배양하거나 무혈청/비부착 배양한 교모세포종 세포주 U87에서 gDNA를 추출하여 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, MIR542, MIR1977, MIR663 및 MIR891B의 메틸화 수준을 비교 분석하였다. 구체적으로, 메틸화 정도를 확인하기 위해, 상기 실시예 1에서와 같이 혈청/부착 배양하거나 무혈청/비부착 배양한 세포주에서 각각 gDNA를 추출한 뒤, NanoDrop® ND-1000 UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 DNA 품질을 확인하였다. 그 후, 그런 다음 각각의 gDNA들을 아가로스 젤에서 전기 영동하고 젤 상에서 스미어링이 나타나지 않은 비손상 gDNA를 선택하여 Quant-iT Pico Green (Invitrogen, Carlsbad, CA) 정량 결과를 기준으로 50ng/μl 농도로 희석하였다. 그 후, Zymo EZ DNA methylation kit 프로토콜에 따라 상기 gDNA를 바이설파이트-전환(bisulfite-converted)하고, 증폭 및 BeadChips에 혼성화한 뒤, BeadChips 상에서 대립유전자 특이적 단일-염기 연장 및 염색을 수행하여 0.53μm 픽셀 해상도의 2 색 (532nm/658nm) 공 초점 형광 스캐너인 Illumina iScan Reader로 이미지화하였다. 이미지 강도는 Illumina의 iScan Control 소프트웨어를 사용하여 확인하였다.

[0072]

그 결과, 암줄기세포 조건 (무혈청/비부착)으로 배양한 교모세포종 세포주에서 C16orf45, NHS, GSN 및 SIPA1L1의 DNA 메틸화가 감소하였으며, PALLD의 DNA 메틸화가 증가한 것을 확인할 수 있었고 (도 3), MIR542, MIR1977 및 MIR663의 메틸화가 감소하였으며, MIR891B의 메틸화가 증가된 것을 확인할 수 있었다 (도 4).

[0074]

실시예 3. MIR891B의 타겟 유전자의 mRNA 발현 수준 확인

[0075]

상기 실시예 2에서 교모세포종 세포주의 암줄기세포능에 특이적인 것으로 선별된 MIR891B의 표적 유전자인 ZFAND5(zinc finger AN1-type containing 5), SSBP2(single stranded DNA binding protein 2) 및 SH3BP4(SH3 domain binding protein 4)의 무혈청/비부착 배양한 교모세포종 세포주에서의 mRNA 발현 정도를 하기 표 3의 프라이머 세트를 이용하여 확인하였다.

표 3

[0076]

유전자	서열	서열번호
ZFAND5	Forward: 5'-CTCTTTTCCCTCACAGCCCG-3'	11
	Reverse: 5'-CGCGTAGGAGATGCACACAG-3'	12
SSBP2	Forward: 5'-TAGGTCCTGTACCACAGGG-3'	13
	Reverse: 5'-TGCAATGGCCACCCATATT-3'	14
SH3BP4	Forward: 5'-TGCAACGTGTCTTGTAGCAC-3'	15
	Reverse: 5'-AAAGTCTGGTTGGGTACAGAAA-3'	16

[0077]

그 결과, ZFAND5 및 SSBP2의 mRNA 발현은 혈청/부착 배양 조건의 교모세포종 세포에서보다 증가하였으며, SH3BP4의 mRNA 발현은 감소하는 것으로 나타났다 (도 5).

[0079]

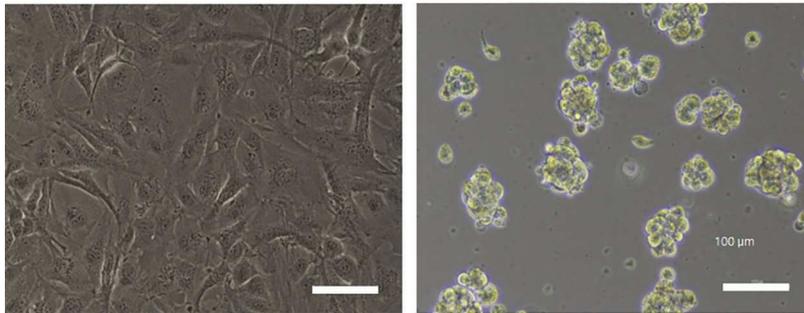
상기 결과들을 통해, 교모세포종 세포주의 암줄기세포능에 특이적인 mRNA 발현 및 메틸화 정도를 나타낸 C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1 및 PALLD 유전자는 이의 DNA 메틸화 정도와 mRNA 발현도가 역상관 관계를 나타냈으며, C16orf45, NHS, GSN, SIPA1L1, PALLD, MIR542, MIR1977, MIR663 및 MIR891B의 mRNA 발현량 또는 메틸화 수준과, MIR891B의 표적 유전자인 ZFAND5, SSBP2 및 SH3BP4의 mRNA 발현 수준이 교모종 세포 암줄기세포능에 특이적이므로, 상기 유전자 및 miRNA들을 교모세포종의 암줄기세포능과 연관된 바이오마커로 사용할 수 있다.

도면

도면1

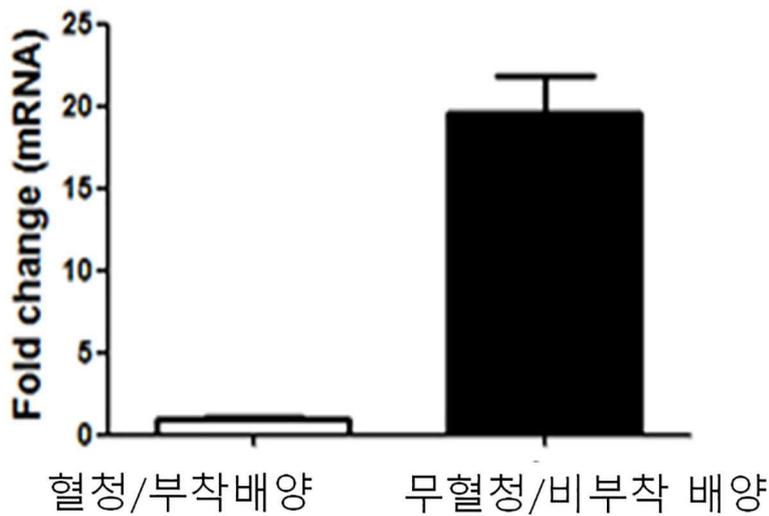
혈청/부착배양

무혈청/비부착 배양

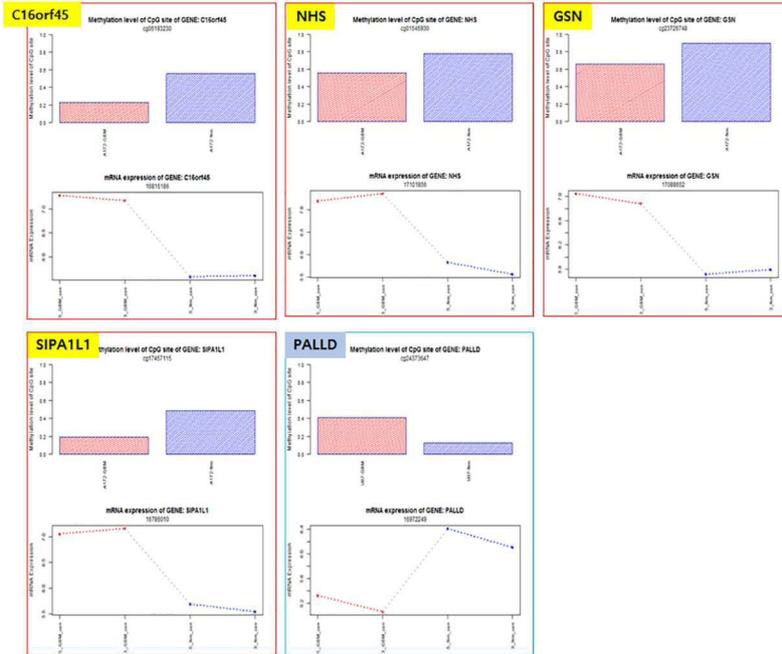


도면2

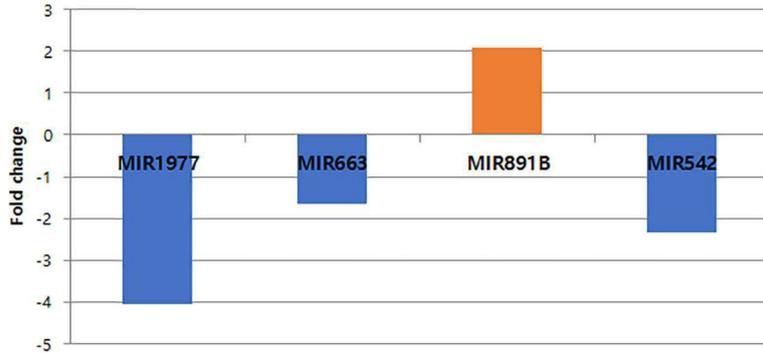
SOX2



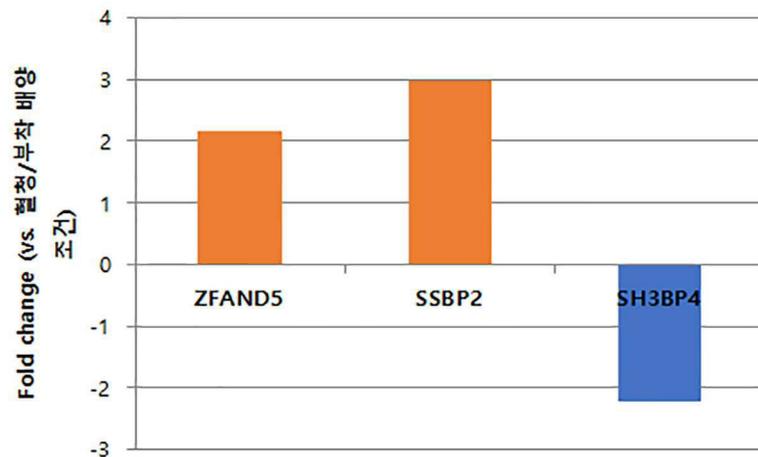
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110> MACROGEN INC.
 <120> CANCER STEM CELL-SPECIFIC BIOMARKERS
 <130> PN1802-069
 <160> 20
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C16orf45 forward primer
 <400> 1
 attcttccat gtggggcgac 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C16orf45 reverse primer
 <400> 2
 tcccgagac gctgaatttt 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NHS forward primer
 <400> 3
 gaccctggtt ggaagcaagt 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NHS reverse primer
 <400> 4
 ttccctgggg aggatgacaa 20

<210> 5
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GSN forward primer
 <400>
 5
 ttcccaaagc tcagcccaa 19
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GSN reverse primer
 <400> 6
 tccataaagg ttggtgggca 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SIPA1L1 forward primer
 <400> 7
 atagcagtcc agggcaacag 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SIPA1L1 reverse primer
 <400> 8
 tgtgcatgg ctaccgaaat 20
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PALLD forward primer

<400> 9
 ataggcaagg ccacaacctc 20
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PALLD reverse primer
 <400> 10
 ccagaggcac tggaaactgt 20

 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZFAND5 forward primer
 <400> 11
 ctcttttccc tcacagcccg 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ZFAND5 reverse primer
 <400> 12
 cgcgtaggag atgcacacag 20
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SSBP2 forward primer

 <400> 13
 taggtcctgt accaccaggg 20
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> SSBP2 reverse primer
 <400> 14
 tgcattggcc cacccatatt 20
 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SH3BP4 forward primer
 <400> 15
 tgcaactgtg cttgtagcac 20
 <210> 16
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SH3BP4 reverse primer
 <400> 16
 aaagtctggt tgggtacaga aa 22
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SOX2 forward primer
 <400> 17
 tacctcttcc tccactcca 20
 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SOX2 reverse primer
 <400> 18
 actctctct tttgcacccc 20
 <210> 19

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> beta-actin forward primer
 <400> 19
 agtactccgt gtggatcggc 20
 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> beta-actin reverse primer
 <400> 20
 gctgatccac atctgctgga 20