



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년12월09일

(11) 등록번호 10-1576053

(24) 등록일자 2015년12월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-0009595
- (22) 출원일자 2014년01월27일
 심사청구일자 2014년01월27일
- (65) 공개번호 10-2015-0089227
- (43) 공개일자 2015년08월05일
- (56) 선행기술조사문헌
 KR1020110128316 A

- (73) 특허권자
 연세대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자
 김희정
 경기도 광명시 영당안로7번길 18 (소하동)
 김영태
 서울특별시 서초구 신반포로15길 19 20-10 (반포동, 신반포아파트)
- (74) 대리인
 특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 8 항

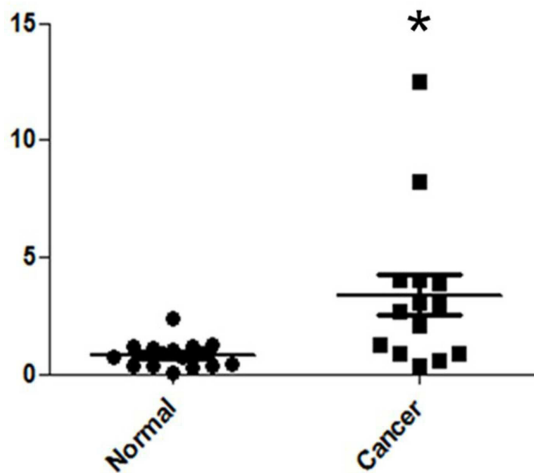
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 **난소암 진단용 바이오마커**

(57) 요약

본 발명은 체내의 SRA1의 레벨 측정에 의한 난소암의 진단 방법에 관한 것이다. 특히, 난소암 진단에 필요한 정보를 제공하기 위해, 환자의 시료로부터 얻은 RNA에서 SRA1 Inc RNA의 레벨을 상대적으로 측정하는 것을 특징으로 한다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A1A2040271

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 난소암 줄기세포에서의 long non-coding RNAs의 메카니즘 규명

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2015.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

난소암 진단에 필요한 정보를 제공하기 위해, 환자의 시료로부터 얻은 RNA에서 Homo sapiens steroid receptor RNA activator 1 (SRA1) long non-coding RNA의 레벨을 검출하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기에서 정상군의 Homo sapiens steroid receptor RNA activator 1 (SRA1)의 레벨을 기준으로 하는 Homo sapiens steroid receptor RNA activator 1 (SRA1) long non-coding RNA의 상대적인 레벨이 측정되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 다음의 단계를 포함하는 Homo sapiens steroid receptor RNA activator 1 (SRA1) long non-coding RNA의 레벨을 검출하는 방법:

(i) 환자의 시료에서 RNA를 추출하는 단계;

(ii) 추출된 RNA에서 Homo sapiens steroid receptor RNA activator 1 (SRA1) long non-coding RNA를 증폭하는 단계; 및

(iii) 정상군의 Homo sapiens steroid receptor RNA activator 1 (SRA1)의 레벨과 시료의 Homo sapiens steroid receptor RNA activator 1 (SRA1) long non-coding RNA의 레벨을 비교하는 단계.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 추출된 RNA를 증폭하는 단계는 PCR를 이용하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 PCR에서 SRA1 lncRNA의 증폭 조건은 95° C 에서 3분간 초기 변성; 95° C에서 15초간 변성, 60° C에서 60초간 어닐링, 및 72° C에서 60초간 신장(elongation)의 40 사이클; 그리고 72° C에서 5분간 최종 신장을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 PCR에 사용되는 PCR 프라이머 서열은 다음 서열번호 1 내지 4에서 선택되는 하나 또는 그 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

서열번호 1: 5' -CTCCCTTCTACCACCACCA-3' (sense),

서열번호 2: 5' -TGCAGATACACAGGGAGCAG-3' (antisense);

서열번호 3: 5' -CTCGCTTCGGCAGCACA-3' (sense),

서열번호 4: 5' -AACGCTTCAGGAATTTGCGT-3' (antisense).

청구항 8

서열번호 5로 표시되는 siRNA를 포함하는 난소암 치료용 조성물.

서열번호 5: 5' -CUC AUA ACA UGC AUU UCA AUU -3'

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 서열번호 5로 표시되는 siRNA는 Homo sapiens steroid receptor RNA activator 1 (SRA1) long non-coding RNA를 차단하는 것을 특징으로 하는 난소암 치료용 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 체내의 SRA1의 레벨 측정에 의한 난소암의 진단 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 여성의 생식기는 크게 외부생식기와 골반 내에 존재하는 내부생식기로 구분할 수 있는데, 내부생식기는 구체적으로 질, 자궁, 난관, 난소 등을 말한다. 이중 난소는 쌍을 이루어 존재하며, 여성의 생식능력을 담당하는 기관으로서 여성호르몬을 분비하고 매달 난자를 배출하는 역할을 한다. 난소에서 분비하는 여성호르몬은 에스트로젠과 프로게스테론으로 여성으로서의 특성을 나타내게 한다.

[0003] 난소암은 가장 일반적인 여성질환 중 하나로서 부인과 암의 약 20%를 차지하고 있으며, 대부분 환자에게서 가장 늦게 진단되는 암 중 하나이다. 암이 발생한 후 복강 내 전이가 일어날 때까지 증상이 전혀 없는 경우가 대부분이어서 처음 진단 시 약 2/3에서 이미 진행된 상태(3기 이상)로 발견되기 때문에 여성 생식기에서 발생하는 부인암 중 가장 예후가 나쁜 암으로 알려져 있다. 효과적인 스크리닝 방법이 없어서, 난소암을 진단받은 여성들은 이미 상당히 암이 진행된 상태가 대부분이어서 생존 확률이 매우 낮다.

[0004] 난소암은 증상이 미미하여 약 60% 정도가 이미 상당히 진행된 상태에서 병원을 찾게 되므로, 증상이 없더라도 1년에 한 번 정도는 반드시 정기적인 부인암 검진을 받는 것이 조기진단의 지름길이다. 산부인과 의사가 내진을 하여 난소가 커져 있는지 혹은 만져지는지 등을 확인하고 필요하다고 여겨지면 초음파 검사로 난소의 혹을 검사한다. 또한 단순한 양성 물혹인지 암인지를 감별하기 위해 혈액검사로 CA125라는 종양 표지인자를 확인하기도 한다. 현재 난소암 진단용 마커로는 CA125가 알려져 있으며, 혈청 CA125는 난소암의 선별, 양성파 악성 난소 덩어리간의 구별 및 예후에 사용되어 왔다 (Zurawski, V. R. et al., Int J. Cancer, 42:677-80, 1988; Vasilev S.A et al., Obstet Gynecol. 71:751-6, 1988; Rubin S.C. et al., Am J Obstet Gynecol. 160:667-71, 1989; Bridgewater J.A. et al., J. Clin Oncol. 17:501-8, 1999). 그러나 상기 CA125는 단지 I기 난소암 여성의 약 1/2에서만 상승되는 경향이 있기 때문에 단일 마커로서 한계가 있다. 이에 일반적으로 초음파 검사와 CA125 검출의 두 검사를 병행하고는 있으나, 난소암을 진단하기 위한 효과적인 진단방법은 아직 개발되어 있지 않은 실정이다.

[0005] 이에 따라 CA15-3, CA19-9, OVX1, 리소포스파이드산(LPA) 및 암배아 항원(CEA) 등과 같은 새로운 난소암 마커들이 제시되고 있으나, 이들 역시 난소암을 정확하게 진단하기에 충분하지 않기 때문에 현재에는 오직 CA125와 초음파 촬영술을 함께 병행하는 방법만이 이용되고 있다.

[0006] 난소암의 진단 결과로 나타난 확산 정도에 따라 치료 방법이 달라짐으로, 이러한 병기의 판단이 중요하다. 병기는 다음과 같이 분류된다. 1기, 암이 한쪽 또는 양쪽의 난소에만 머물러 있는 상태; 2기, 난소 주위 (난관, 자궁, 직장, 방광 등)의 복막으로 암이 전이한 상태; 3기, 난소 주위 (골반내)의 복막과 상복부와 후복막 림프절

로 전이한 상태; 4기, 암이 복강 밖으로 전이하거나 간장으로 전이한 상태. 1, 2기의 경우에는 수술로 완전히 절제할 수 있지만 3, 4기에는 수술만으로는 완전히 제거할 수 없으므로, 진행성 암으로 정의된다.

[0007] 단백질의 합성에 직접 관여하는 RNA는 mRNA, tRNA, rRNA 등이 있다. 반면, 논코딩 RNA (non-coding RNAs)는 DNA에서 전사되었지만 단백질을 합성하지 않는 RNA이다. 발견된 논코딩 RNA의 종류도 micro RNA, siRNA, piRNA 등등 여러가지가 있는데, 이들 중 핵산의 길이가 200 이상인 것을 long non-coding RNA 줄여서 lncRNA라고 하고, 200 이하는 small ncRNAs (20-200 nt)라고 한다. nc RNAs의 기능 및 임상적 중요도에 대한 분석에 의하여 유전자 조절의 주요 인자이고, 일반 및 암 세포 표현형에 영향을 미침을 밝혀냈다. 최근 데이터에 따르면 3000 이상의 인간 long intervening non-coding RNA(lincRNAs)와 대부분의 long ncRNAs는 DNA-결합 단백질과 결합되어, multiple gene의 발현을 후성적으로 (epigenetically) 조절함을 보여주었다. lncRNA의 전사는 외부 온코제닉 자극 및 DNA 손상에 대한 반응으로 유전자 활성을 조절하는 것으로 알려졌다. 이러한 발견은 인간 질병, 특히 암과 lncRNA의 관련성을 시사하는 것이다. lnc RNA는 암 생성과정 및 암 전이과정에서 새롭게 동정된 조절자로 인식되고 있다. 이러한 RNA의 기능 및 이러한 발현 메커니즘이 알려져 있지는 않지만, 최근 연구에 따르면 인간 암과 질병에 중요한 열쇠가 됨을 암시하고 있다.

[0008] 스테로이드 수용체 액티베이터(steroid receptor activator: SRA) RNA는 non-coding RNA로서 작용하는 독특한 공-조절자(coregulator)이다. SRA는 핵 수용체(nuclear receptor: NRs), *myogenic differentiation 1* (MyoD) 및 공억제제(corepressors)와 같은 더 큰 다양한 단백질과 기능적으로 결합하여 공-조절자 복합체의 어셈블리/안정성에 대한 스캐폴드로서 lncRNA가 작용하도록 하는 것으로 보고되었다. SRA RNA는 유방, 난소 및 방광 암생성 및 전이 동안 과발현된다고 보고되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이에 본 발명자들은 난소암을 조기에 정확하게 진단할 수 있는 새로운 진단 방법을 개발하고자 연구한 결과, 난소암의 경우 SRA1이 정상군에서보다 난소암 세포에서 확연히 상승함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 난소암 진단을 위한 새로운 바이오마커를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 SRA1의 레벨을 측정함으로써 난소암을 진단하는 방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 난소암 진단에 필요한 정보를 제공하기 위해, 환자의 시료로부터 RNA를 추출하여 SRA1 lnc RNA의 레벨을 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0013] 상기에서 SRA1 lnc RNA의 상대적인 레벨이 측정되는 것을 특징으로 한다.

[0014] 상기 시료는 혈액, 혈청, 혈장, 림프액, 뇌척수액, 복수, 요 및 조직 생검으로 구성되는 그룹 중에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 난소암의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위한 방법이다:

[0016] (i) 시료를 채취하는 단계;

[0017] (ii) 시료에서 RNA를 추출하는 단계;

[0018] (iii) 추출된 RNA에서 SRA1 lnc RNA를 증폭하는 단계; 및

- [0019] (iv) 정상군의 SRA1의 레벨과 시료의 SRA1 lnc RNA의 레벨을 비교하는 단계.
- [0020] 상기 RNA는 lncRNA인 것을 특징으로 한다.
- [0021] 상기 추출된 RNA를 증폭하는 단계는 PCR를 이용할 수 있다.
- [0022] 상기 PCR에서 SRA1 lncRNA의 증폭 조건은 95° C에서 3분간 초기 변성; 95° C에서 15초간 변성, 60° C에서 60초간 어닐링 및 72° C에서 60초간 신장(elongation)의 40 사이클; 그리고 72° C에서 5분간 최종 신장을 특징으로 한다.
- [0023] 상기 PCR에 사용되는 PCR 프라이머 서열은 서열번호 1 내지 4에서 선택될 수 있다.
- [0024] 서열번호 1: 5' -CTCCCTTCTACCACCACCA-3' (sense),
- [0025] 서열번호 2: 5' -TGCAGATACACAGGGAGCAG-3' (antisense);
- [0026] 서열번호 3: U6, 5' -CTCGCTTCGGCAGCACA-3' (sense),
- [0027] 서열번호 4: 5' -AACGCTTCAGGAATTTGCGT-3' (antisense).
- [0028] 본 발명의 다른 양태로서, 서열번호 5로 표시되는 siRNA를 포함하는 난소암 치료용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0029] 서열번호 5: 5' -CUC AUA ACA UGC AUU UCA AUU- 3'
- [0030] 상기 서열번호 5로 표시되는 siRNA는 SRA1 lncRNA를 차단하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0031] 따라서, 본 발명은 난소암을 진단할 수 있는 새로운 방법을 제공한다. 본 발명은 SRA1이 난소암을 진단할 수 있는 새로운 바이오마커를 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은 인간 난소암에서 발견되는 SRA1의 레벨을 보여주는 그래프이다.
- 도 2는 다양한 난소암 세포주에서 발견되는 SRA1의 레벨을 보여주는 그래프이다.
- 도 3은 SRA1 유전자 특이적 siRNA와 음성 대조구 siRNA가 형질주입된 세포의 성장을 보여주는 그래프이다.
- 도 4는 난소암 세포에서의 SRA1의 이동과 침습을 보여주는 사진으로서, (a)는 상기 siRNA가 형질주입된 세포의 이동을 측정하기 위한 wound healing 분석의 결과를 보여주는 사진이고, (b)는 매트릭셀 침습 분석의 결과를 보여주는 사진이다.
- 도 5는 SRA1 녹다운이 MMP9와 VEGF 발현을 감소시키는 실험결과를 나타내는 사진과 그래프이며, (a)와 (b)는 각각 MMP-9 및 VEGF 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석 사진과 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.
- [0034] 본 발명은 일반적으로 난소암과 관련된 바이오마커에 관한 것이다.
- [0035] 본 발명은 SRA1 발현이 난소암 조직 또는 세포에서 정상 조직에 비하여 높은 수준으로 발현됨을 발견함에 기초

한다. 특히, SRA1은 암 세포에서의 전이와 관련성이 높아서 난소암의 전이를 진단하는 특이적 마커로서 역할을 할 수 있을 것이다.

[0036] 본 발명에서 사용된 용어 난소암 진단 마커란 난소암 조직 및 세포에서 발현되고 이의 발현 여부를 확인함으로써 난소암의 발병을 확인할 수 있는 물질, 바람직하게는 정상 조직과 난소암 조직에서 유의한 차이를 보이는 단백질 또는 mRNA 등과 같은 유기 생체 분자를 의미한다. 본 발명에서 암 진단 마커는 난소암 조직 및 세포에서만 특이적으로 정상 세포에 비하여 훨씬 더 발현이 증가하는 SRA1의 lncRNA이며, 이를 공지된 검출방법, 예를 들어, PCR에 따른 증폭 및 추출 및 확인 방법을 통해 확인함으로써 난소암을 진단할 수 있다.

[0037] 본 발명에서 사용된 용어 생물학적 시료 또는 시료는 혈액 및 생물학적 기원의 기타 액상 시료, 생검 표본, 조직배양과 같은 고형 조직 시료 또는 이로부터 유래된 세포가 포함된다. 보다 구체적으로 예를 들면 이에 한정되지는 않으나 조직, 추출물, 세포 용해물, 전혈, 혈장, 혈청, 침, 안구액, 뇌척수액, 땀, 뇨, 젖, 복수액, 활액, 복막액 등일 수 있다. 상기 시료는 동물, 바람직하게는 포유동물, 가장 바람직하게는 인간으로부터 수득될 수 있다. 상기 시료는 검출에 사용하기 전에 전처리할 수 있다. 예를 들어, 여과, 증류, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다. 또한, 상기 시료로부터 핵산 및 단백질을 분리하여 검출에 사용할 수 있다.

[0038] 본 발명의 일 실시예에서는 난소암에서 SRA1의 발현이 증가됨을 확인하였다. SRA1 lncRNA의 발현을 난소암 조직(n=14) 및 상응하는 정상 조직(n=16)에서 qRT-PCR를 이용하여 측정된 결과, 난소암 조직에서 SRA1 발현은 비종양 조직에서 보다 3.5 배 정도 높게 나타났으며 (도 1), 이는 난소암에서 SRA1의 발현이 비조절됨을 의미하는 것이다.

[0039] 또한, 본 발명의 다른 실시예에서는 OVCA429 세포에 siSRA1을 형질주입하여 세포 증식의 여부를 관찰하였다. 즉, 난소암에서 SRA1의 기능적 역할을 결정하기 위하여, siRNA를 이용하여 SRA1 발현을 하향 조절시켰다. 이를 위하여, OVCAR3, SKOV3, TOV112D, OVCA433, 및 OVCA429 난소암 세포주에서 SRA1 발현을 qRT-PCR를 이용하여 우선 측정하였다. 도 2에 나타난 바와 같이, SRA1 발현은 OVCA429, TOV112D, SKOV3 세포에서 OVCA433 및 OVCAR3 세포에서보다 더 높다. 따라서, SRA1 발현이 높게 나타난 OVCA429 세포가 SRA1 녹다운에 사용된다. SRA1 유전자 특이적 siRNA의 효율을 평가하기 위하여, 세포를 24 시간동안 SRA1 siRNA로 형질주입하였고 그 결과, SRA1 RNA 발현이 60% 감소하였다 (도 3A). 이후 난소암 세포 성장에서 SRA1의 역할을 연구하기 위하여, siSRA1이 형질주입된 OVCA429 세포가 CCK-8 분석에 사용되었다. 음성 대조군 siRNA와 비교하여 siSRA1을 형질주입한 OVCA429 세포에서 siSRA1 형질주입 후 72 시간 및 96 시간에서 세포 성장을 감소시켰다 (도 3B). 이러한 결과는 SRA1이 난소암 세포의 증식과 관련이 있음을 보여준다.

[0040] 또한, 본 발명은 또다른 실시예에서는 SRA1에 의한 난소암 세포의 이동 및 침습에 관한 역할을 확인하였다. 세포의 이동 및 침습에 대한 SRA1의 기능적 역할을 결정하기 위하여, siSRA1-형질주입된 세포를 상처 치유 및 매트릭스 침습 분석에 각각 이용하였다. 상처 폐쇄(closure)의 넓이는 siRNA negative control (siNC)-형질주입된 세포보다 siSRA1-형질주입된 세포에서 더 크다 (도 4A). 따라서, SRA1의 하향 조절은 난소암 세포의 이동을 감소시켰다. SRA1의 녹다운은 OVCA429 세포 침습을 95% 이상 저해하였다 (도 4B). 이러한 결과는 SRA1이 난소암 세포의 이동 및 침습을 증가시킨다는 것을 보여준다.

실시예 1

[0041] **난소암 세포주에서의 SRA1 발현 측정**

[0042] <1-1> 난소암 세포주 준비

- [0043] <1-1-1> 인간 조직
- [0044] 난소암 샘플은 2007년 내지 2012년 사이에 연세 세브란스 병원에서 수술받은 14명의 여성 환자로부터 획득하였다. 병존하는 부인과 암을 가진 환자의 시편은 이 연구에서 배제하였다. 무종양 조직(n=16)을 대조군으로 확보하였다. 모든 시편은 액상 질소에서 급냉하여 RNA 추출시까지 -80도에서 보존하였다. 본 연구는 헬싱키 선언의 기초에 따라 수행되었고, 연세 세브란스 병원 윤리 위원회에 의하여 승인을 받았다.
- [0045] <1-1-2> 세포 배양
- [0046] 인간 상피 난소암 세포주 OVCAR3, OVCA433, OVCA429, TOV112D 및 SKOV3를 Dulbecco's Modified Eagle Medium에 배양하고, HEK293 세포를 RPMI-1640 medium (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA)에서 배양하였다. 배양 배지는 10% (vol/vol) 태아 소 혈청 및 페니실린/스트렙토마이신을 첨가하였다. 모든 세포주는 5% CO₂ 및 95% 공기의 습윤화된 대기에서 37° C로 유지하였다. 모든 실험에 사용된 세포의 계대수는 20계대를 넘기지 않았다.
- [0047] <1-2> 정량적 실시간 폴리머라아제 연쇄 반응(qRT-PCR)
- [0048] SRA1 lncRNA의 농도를 측정하였다. TRIzol® reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 OVCA429 세포주 및 난소암 샘플 및 무종양 조직 샘플(100 mg)로부터 전체 RNA를 추출하고, 역전사 시약 키트 (Invitrogen)를 사용하여 전체 RNA 중 2 µg를 역전사하여 cDNA를 만들었다. SYBR® Green Real-time PCR Kit (TOYOBO Co. Ltd, Osaka, Japan)를 이용하여, SYBR® Green master PCR mix 10 µl, 각 순방향 및 역방향 프라이머 5 pmole, 희석된 cDNA 주형 1 µl, 및 적절한 양의 멸균 증류수를 함유하는 20-µl 반응부피에서 qRT-PCR를 수행하였다. SRA1 lncRNA의 증폭 조건은 다음과 같다: 95° C 에서 3분간 초기 변성; 95° C에서 15초간 변성, 60° C에서 60초간 어닐링 및 72° C에서 60초간 신장(elongation)의 40 사이클; 그리고 72° C에서 5분간 최종 신장 단계를 ABI StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에서 qRT-PCR을 수행하였다. 모든 정량화는 U6로 수행하였다. PCR 프라이머 서열은 다음과 같다: SRA1: 5' -CTCCCTTCTTACCACCACCA-3' (sense), 5' -TGCAGATACACAGGGAGCAG-3' (antisense); and U6, 5' -CTCGCTTCGGCAGCACCA-3' (sense), 5' -AACGCTTCAGGAATTTGCGT-3' (antisense). 상대적 유전자 발현은 2^{ΔΔCT} 방법을 이용하여 분석하였고, 그 결과는 대조군에 있어서 변화의 정도로서 표현되었다. qRT-PCR 실험은 적어도 3회 반복하였다.
- [0049] SRA1 lncRNA의 발현은 난소암 조직(n=14) 및 상응하는 정상 조직(n=16)에서 qRT-PCR를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 난소암 조직에서 SRA1 발현은 비종양 조직에서 보다 3.5 배 정도 나타난다 (도 1). 이는 난소암에서 SRA1의 발현이 비조절됨을 시사하는 것이다.
- 실시예 2**
- [0050] 난소암 세포주에서 세포 증식 분석
- [0051] <2-1> 소 간섭(Small interfering) RNA (siRNA) 형질주입(transfection)
- [0052] SRA1 siRNA (siSRA1) 및 음성 대조군 siRNA (siNC)를 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 구입하였다. OVCA429 세포 (3×10⁵ cells/well)를 6-well 플레이트에 접종하고, G-Fectin Kit (Genolution Pharmaceuticals Inc., Seoul, Korea)를 이용하여 siRNA 20 nM으로 형질주입하였다. 이러한 siRNA-형질주입된 세포를 생체의 실험 분석하기 위하여 형질주입한지 48 시간 후에 이용하였다. SRA1 siRNA의 표적 서열은 다음과 같다: siRNA, 5' -CUC AUA ACA

UGC AUU UCA AUU -3'

[0053] <2-2> 난소암 세포주에서 SRA1 녹다운에 의한 세포 증식 분석

[0054] 세포 증식을 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)을 이용하여 평가하였다. OVCA429 세포(1×10^4 cells/well)를 100 μ L의 완전배지에서 96-well 평평한 바닥 플레이트에 접종하였다. 세포를 밤새 항온처리하여 세포를 부착시켜 회수하고, siNC 또는 siSRA1로 24, 48, 72 및 96 시간 동안 형질주입시켰다. CCK-8 용액(10 μ L)를 각 웰에 첨가하고, 세포를 추가 2시간 동안 항온처리하였다. 흡수율을 450 nm에서 마이크로플레이트 리더를 사용하여 측정하였다. 독립적 실험을 3회 반복 수행하였다.

[0055] 난소암에서 SRA1의 기능적 역할을 결정하기 위하여, siRNA를 이용하여 SRA1 발현을 하향 조절시켰다. 이를 위하여, OVCAR3, SKOV3, TOV112D, OVCA433, 및 OVCA429 난소암 세포주에서 SRA1 발현을 qRT-PCR를 이용하여 우선 측정하였다. 도 2에 나타난 바와 같이, SRA1 발현은 OVCA429, TOV112D, SKOV3 세포에서 OVCA433 및 OVCAR3 세포에서보다 더 높다. 따라서, SRA1 발현이 높게 나타난 OVCA429 세포가 SRA1 녹다운에 사용된다. SRA1 유전자 특이적 siRNA의 효율을 평가하기 위하여, 세포를 24 시간동안 SRA1 siRNA로 형질주입하였고 그 결과, SRA1 RNA 발현이 60% 감소하였다 (도 3A). 이후 난소암 세포 성장에서 SRA1의 역할을 연구하기 위하여, siSRA1이 형질주입된 OVCA429 세포가 CCK-8 분석에 사용되었다. 음성 대조군 siRNA와 비교하여 siSRA1을 형질주입한 OVCA429 세포에서 siSRA1 형질주입 후 72 시간 및 96 시간에서 세포 성장을 감소시켰다 (도 3B). 이러한 결과는 SRA1이 난소암 세포의 증식과 관련이 있음을 보여준다.

실시예 3

[0056] 난소암 세포주에서 SRA1에 의한 세포 이동능 측정

[0057] siNC 또는 siSRA1 (3×10^5 cells/well)가 형질주입된 OVCA429 세포를 혈청함유 배지를 갖는 6-well 배양 플레이트에 접종하고, 세포 밀도가 약 90% confluence 하도록 배양하였다. 혈청-함유 배지를 제거하고, 세포를 24 시간동안 혈청을 주입하지 않았다. 세포 밀도가 약 100% confluence되면, 멸균 200- μ L 피펫 팁으로 단일층을 스크래칭하여 인공의 균등한 상처를 만들었다. 스크래칭 후, 세포를 무혈청 배지로 세척하였다. 상처로 세포가 이동하는 사진을 현미경을 이용하여 0, 24 그리고 48 시간에 촬영하였다. 상기 분석을 3회 반복 수행하였다.

[0058] 세포의 이동 및 침습에 대한 SRA1의 기능적 역할을 결정하기 위하여, siSRA1-형질주입된 세포를 상처 치유 분석에 이용하였다. 상처 폐쇄(closure)의 넓이는 siNC-형질주입된 세포보다 siSRA1-형질주입된 세포에서 더 크다 (도 4A). 따라서, SRA1의 하향 조절은 난소암 세포의 이동을 감소시켰다. 이러한 결과는 SRA1이 난소암 세포의 이동능을 증가시킨다는 것을 보여준다.

실시예 4

[0059] 난소암 세포주에서 SRA1에 의한 세포 침습능 분석

[0060] 매트릭셀 침습 분석(Matrigel invasion assay)을 BD Biocoat Matrigel Invasion Chamber (pore size: 8 mm, 24-well; BD Biosciences, Bedford, MA, USA)를 사용하여 수행하였다. siSRA1-형질주입된 세포 및 siNC-형질주입된 OVCA429 세포 (5×10^4 cell/plate)를 무혈청 배지에서 상층 챔버에서 플레이트하고, 완전 배지를 하층 챔버에 첨가하였다. 매트릭셀 침습 챔버를 48 시간동안 37° C에서 5% CO₂ 하에서 수행하였다. 비침습 세포를 면봉을 이용하여 상층 챔버에서 제거하였다. 필터의 아래측면에 포어를 통하여 침습하는 세포를 염색하였다 (Diff Quik, Sysmes, Kobe, Japan). 그리고 이것들을 헤모사이토미터를 이용하여 계수하였다. 상기 분석을 3회 이상 반복하였다.

[0061] 세포의 침습에 대한 SRA1의 기능적 역할을 결정하기 위하여, siSRA1-형질주입된 세포를 매트릭셀 침습 분석에 이용하였다. 음성 대조군 siRNA와 비교하여 SRA1을 형질주입한 OVCA429 세포에서 세포 침습을 95% 이상 저해하였다 (도 4B). 이러한 결과는 SRA1이 난소암 세포의 침습을 증가시킨다는 것을 보여준다.

실시예 5

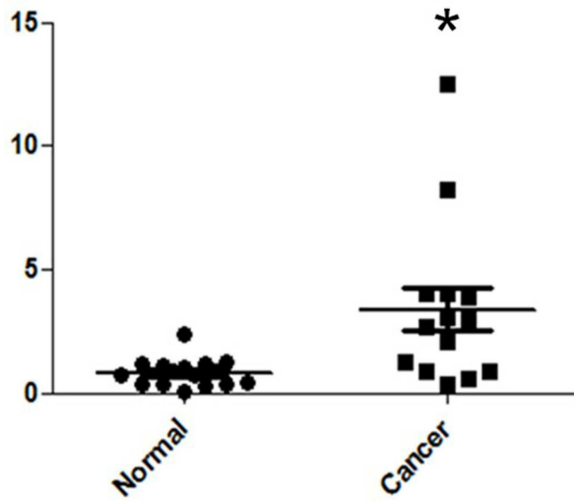
[0062] 난소암 세포주에서 SRA1에 의한 MMP-9 및 VEGF 발현 조절

[0063] OVCA429 세포를 siNC 또는 siSRA1를 이용하여 48 시간동안 형질주입시킨 후, 차가운 0.01 M PBS (pH 7.2)로 세척하고, 프로테아제 저해제가 첨가된 라이시스 버퍼(50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM 식염수, 1% NonidetP-40, 및 0.1% 나트륨 도데실 설페이트[SDS])로 용해시켰다. 단백질 농도는 Bio-Rad protein assay reagent를 이용하여 Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에 따라 측정하였다. 샘플을 5분동안 끓이고, 10% SDS-폴리아크릴아미드 겔에서 전기영동시키고, 폴리비닐리덴 디플루오라이드 멤브레인(Millipore, Billerica, MA, USA)으로 이동시켰다. 이후 5% 탈지분유가 포함된 0.1% Tween 20을 함유하는 1× Tris 완충된 식염수(TBST; pH7.6) 용액에서 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 그리고 계속 교반하면서 4° C 에서 밤새 1차 항체와 함께 반응시켰다. 사용된 1차 항체는 마우스 항-인간 VEGF 항체(1:1000 희석; BD Biosciences), 토끼 항-인간 MMP-9 항체(1:1000 희석; Cell Signaling, Beverly, MA, USA), 및 마우스 항-인간 β-액틴 항체(1:10000 dilution; Sigma, St. Louis, MO, USA)를 포함한다. 멤브레인을 1× TBST로 3회 세척하고, 호스래디쉬 퍼시다제-컨쥬게이트된 항-토끼 2차 항체(1:3000 희석; Abcam, Cambridge, MA, USA) 또는 항-마우스 2차 항체(1:3000 희석; Abcam)와 함께 1 시간동안 실온에서 계속 교반하여 항온처리시켰다. 이후 1× TBST로 3회 세척하였다. 단백질을 enhanced chemiluminescence system (ECL™; Amersham, Little Chalfont, UK)을 이용하여 시각화시키고, 밴드 강도를 Luminescent Image Analyzer (LAS-4000 mini, Fujifilm, Uppsala, Sweden)를 이용하여 정량화하였다. VEGF 및 MMP-9 발현은 β-액틴의 발현으로 평균화되었다. siSRA1-형질전환된 세포에서 VEGF 및 MMP-9 발현은 siNC-형질주입된 세포의 백분율(100%)로 표현된다.

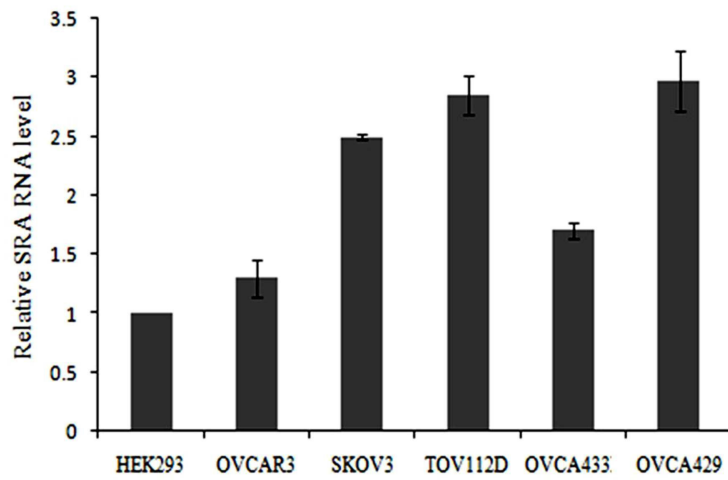
[0064] MMP-9 및 VEGF는 이동과 침습을 증진함으로써 암의 진행에 중요한 역할을 한다. 따라서, 이러한 단백질의 발현 수준에 미치는 SRA1의 효과는 OVCA429 세포에서 결정된다. MMP-9 및 VEGF 단백질 발현은 siNC-형질주입된 세포에서 보다 siSRA1-형질주입된 세포에서 훨씬 더 낮았다 (도 5A와 5B). 모두 고려하여 볼때, 이러한 결과들은 SRA1가 MMP-9 및 VEGF 발현의 상향 조절을 통하여 난소암 세포의 이동 및 침습을 증진시킴을 보여주는 것이다.

도면

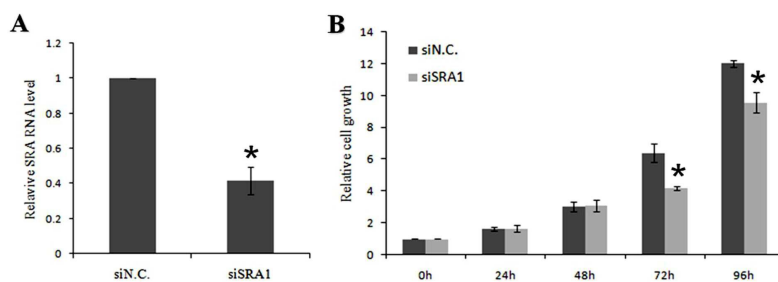
도면1



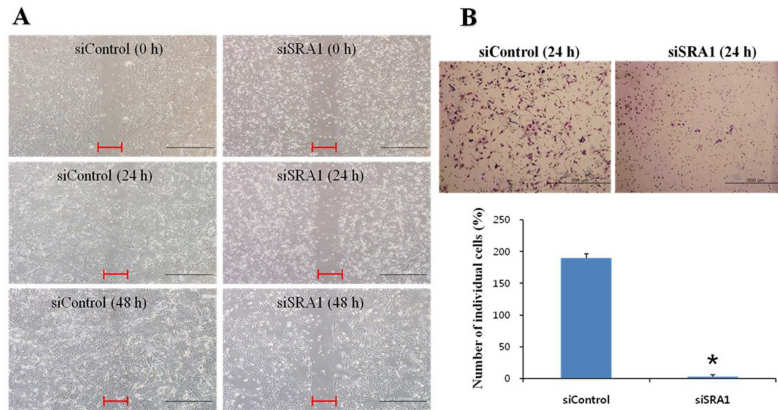
도면2



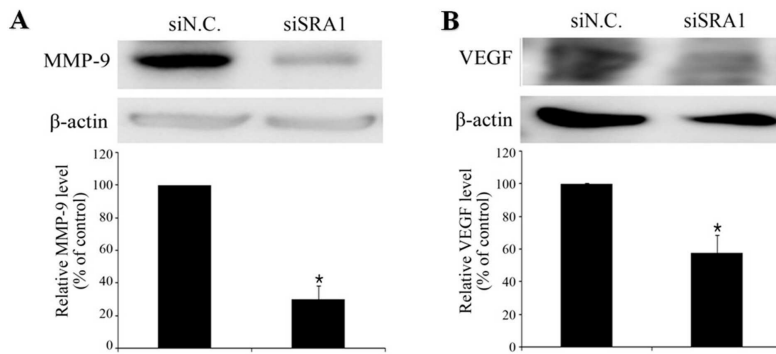
도면3



도면4



도면5



서열목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> BIOMARKER FOR DIAGNOSIS OF OVARIAN CANCER CELLS
- <130> 4635
- <160> 5
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer for PCR
- <400> 1
- ctcccttctt accaccacca
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> primer for PCR
 <400> 2
 tgcagataca caggagcag 20

<210> 3
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer for PCR
 <400> 3
 ctcgcttcgg cagcaca 17

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer for PCR
 <400> 4
 aacgcttcag gaatttgcgt 20

<210> 5
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> si RNA
 <400> 5
 cucuaacau gcuuucaau u 21