



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년10월02일

(11) 등록번호 10-1556403

(24) 등록일자 2015년09월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2014-0054963
 (22) 출원일자 2014년05월08일
 심사청구일자 2014년05월08일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020110085436 A*
 US20020193300 A1*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
 (72) 발명자
차봉수
 서울 강남구 압구정로 113, 25동 507호 (압구정동, 미성아파트)
이용호
 서울 서대문구 연희로28길 35-28, 203-1601 (연희동, 성원상떼빌팰리스)
 (74) 대리인
양부현

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 김승오

(54) 발명의 명칭 지방간, 비만 및 당뇨병과 관련된 유전자 및 그의 용도

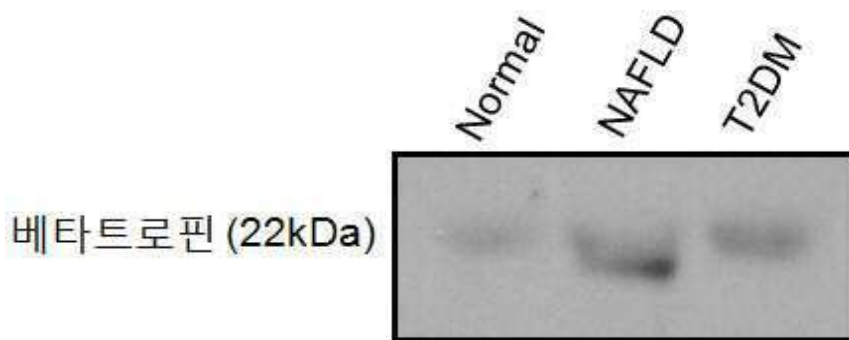
(57) 요약

본 발명은 지방간, 비만 또는 당뇨병에 대한 새로운 바이오 마커 및 이에 기반한 이들 질환의 진단키트 관한 것이다.

본 발명은 유전자 또는 단백질 마커를 사용함으로써 대사 질환의 신뢰도 있는 조기진단 또는 발병 위험성 예측에 유용하게 이용될 수 있다.

본 발명은 혈액, 혈장 또는 혈청 시료에 포함된 바이오 마커를 이용한 진단을 가능케 함으로써 진단 편이성과 환자 순응도, 비용절감의 측면에서 보다 우수한 채액 진단에 적용될 수 있다.

대표도 - 도5b



명세서

청구범위

청구항 1

서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머를 포함하는 지방간, 비만 또는 당뇨병의 진단 키트.

청구항 2

서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 지방간, 비만 또는 당뇨병의 진단 키트.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 진단 키트.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지방간은 비알콜성 지방간인 것을 특징으로 하는 진단키트.

청구항 5

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 당뇨병은 2형 당뇨병인 것을 특징으로 하는 진단키트.

청구항 6

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드가 고발현된 인간은 증가된 지방간, 비만 또는 당뇨병의 위험도를 나타내는 것을 특징으로 하는 진단키트.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 혈액, 혈장 또는 혈청 시료에 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 진단 키트.

청구항 8

제 2 항 또는 제 3 항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드는 혈액, 혈장 또는 혈청 시료에 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 진단키트.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 비만, 지방간 및 당뇨병에 대한 신규 바이오 마커 및 이를 이용한 비만, 지방간 및 당뇨병의 진단방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 식생활이 서구화되고 평균수명이 연장되면서는 전 사회계층 및 연령대에서 비만·당뇨 합병증을 비롯한 대사 증후군 유병률이 크게 증가하고 있으며, 이에 따른 사회적 비용도 날로 늘어나고 있다. 당뇨병, 고혈압, 지질대사이상, 인슐린저항성 등을 수반하는 대사증후군(metabolic syndrome)은 상호간의 발생위험을 증가시키며, 노화, 스트레스 및 면역기능저하 등의 다원적인 생체대사변화와 관련이 있는 공통 질환이다.

[0003] 비알코올성 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease, 이하 NAFLD)은 음주와 관계없이 간내에 중성지방이 축적되는 질환을 의미하고, 여기에는 단순 지방간(steatosis)과 비알코올성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)을 포함한다. NASH는 1980년 Ludwig 등에 의하여 처음으로 명명되었고 지방간과 함께 염증 혹은 섬유화를 동반하는 것이 특징이다. 한편, 단순 지방간은 임상적으로 예후가 양호한 양성 질환으로 생각되고 있으나 NASH는 진행성 간질환으로 간경변이나 간암을 유발하는 전구 질환으로 인지되고 있다. 비알코올성 지방간의 위험인자로 크게 비만, 당뇨병, 고지혈증이 대표적이고 이외에 단백질-칼로리 결핍, 몸무게를 갑자기 감량하는 경우나 정맥주사로 전체영양을 취하는 경우에도 발병할 수 있다고 알려져 있다. 이러한 지방간은 비알코올성 지방간염이나 간경변으로 진행될 수 있어 점차 심각한 간질환으로 인식되고 있다.

[0004] 소아 당뇨병이라 불리는 제1형 당뇨병과 달리, 제2형 당뇨병은 운동부족, 비만 또는 스트레스 등에 의한 후천적 요인으로 인슐린의 분비 조절은 원활하나 인슐린이 제기능을 하지 못하여 혈당 조절이 실패하는 경우 발생한다(Stumvoll M, et al., Lancet 365:1333-46(2005)). 제2형 당뇨병은 40세가 넘으면 유병률이 급격히 증가하여 50대에는 20%에 달하는 것으로 나타났다. 우리나라의 경우 인슐린 비의존형의 제2형 당뇨병환자가 전체 당뇨병환자의 90-95%를 차지하고 있으며 선진국뿐만 아니라 개발도상국의 사람들도 점차 신체활동은 줄고 비만은 늘면서, 제2형 당뇨병의 발생이 무서운 속도로 증가하고 있다.

[0005] 이러한 지방간이나 2형 당뇨와 같은 대사 질환은 대사체, 염증 마커, 산화적 마커 및 조직 내 지방 비율의 측정 등을 통해 진단되고 있으나, 이들 질환의 초기 진행기작에 대한 포괄적인 이해는 아직까지 연구되어 있지 않다. 따라서 증상이 뚜렷하지 않은 초기 환자를 진단하거나 발병 전 대상체의 유전적 위험성을 예측하기 위한 신뢰도 있는 유전자 마커의 개발이 요구되고 있다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 지방간, 비만, 당뇨병 등의 대사질환에 대한 유전적 위험성을 예측할 수 있는 신뢰도 있는 진단방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 베타트로핀(beta-trophin) 유전자 및 단백질의 발현 변화가 이들 질환의 발병 및 진행과 매우 밀접하게 연관되어 있으며, 임상적으로 지방간, 비만 또는 당뇨병으로 확진된 대상체에서 베타트로핀 유전자 및 단백질의 발현이 유의하게 증가한다는 사실을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서 본 발명의 목적은 지방간, 비만 또는 당뇨병의 진단 키트를 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머를 포함하는 지방간, 비만 또는 당뇨병 진단 키트를 제공한다.
- [0011] 본 발명자들은 지방간, 비만, 당뇨병 등의 대사질환에 대한 유전적 위험성을 예측할 수 있는 신뢰도 있는 진단 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 베타트로핀(betaatrophin) 유전자 및 단백질의 발현 변화가 이들 질환의 발병 및 진행과 매우 밀접하게 연관되어 있으며, 이러한 발현 양상은 특정 조직 뿐 아니라 혈액 내에서도 반영되어, 베타트로핀이 이들 질환에 대한 신뢰도 있는 체액진단 마커로서 기능할 수 있음을 발견하였다.
- [0012] 본 발명에 따르면, 임상적으로 지방간, 비만 또는 당뇨병으로 확진된 대상체에서 베타트로핀 유전자 및 단백질의 발현이 유의하게 증가하였다.
- [0013] 본 발명에 따르면, 서열목록 제2서열의 아미노산 서열은 베타트로핀(betaatrophin) 단백질의 아미노산 서열이다.
- [0014] 본 명세서에서 용어 “폴리펩타이드”는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다. 본 발명의 폴리펩타이드는 해당 아미노산 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은 본 발명의 아미노산 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 사용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 90%의 상동성을 나타내는 아미노산 서열을 의미한다.
- [0015] 본 명세서에서 용어 “지방간”은 간의 지방대사 장애로 지방이 간세포에 과도한 양으로 축적된 상태를 말하며, 구체적으로는 간 조직 무게의 5% 이상을 지질이 차지하고 있는 병적 상태를 가리킨다. 지방간은 협심증, 심근경색, 뇌졸중, 동맥경화, 지방간 및 췌장염 등과 같은 다양한 질병의 원인이 된다.
- [0016] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에 의해 진단될 수 있는 지방간은 비알콜성 지방간이다. 본 명세서에서 용어 “비알콜성 지방간(non- alcoholic fatty liver)은 음주와 관계없이 간 내에 지방이 축적되는 질환을 의미한다.
- [0017] 본 명세서에서 용어 “당뇨병”은 포도당-비관용(intolerance)을 초래하는 인슐린의 상대적 또는 절대적 부족으로 특징되는 만성질환을 의미한다. 용어 당뇨병은 모든 종류의 당뇨병을 포함하며, 예를 들어, 제1형 당뇨, 제2형 당뇨 및 유전성 당뇨를 포함한다. 1형 당뇨는 인슐린 의존성당뇨병으로서, β -세포의 파괴에 의해 주로 초래된다. 2형 당뇨는 인슐린 비의존성 당뇨병으로서, 식사 후 불충분한 인슐린 분비에 의해 초래되거나 또는 인슐린 저항성에 의해 초래된다.
- [0018] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에 의해 진단될 수 있는 당뇨병은 2형 당뇨병이다.
- [0019] 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(예컨대, 대사 이상 또는 당뇨병의 동정), 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드를 마커로 하여, 이의 발현량이 정상인에 비하여 유의하게 높다는 사실이 공지된 방법을 통해 확인되면 지방간, 비만 또는 당뇨병의 발병 위험도가 높은 것으로 판단된다.
- [0020] 본 발명에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드를 항원-항체 반응을 이용한 면역분석(immunoassay) 방법에 따라 검출하여 지방간, 비만 또는 당뇨병을 진단하는 데 이용될 수 있다.
- [0021] 이러한 면역분석은 종래에 개발된 다양한 면역분석(immunoassay) 또는 면역염색(immunostaining) 프로토콜에 따라 실시될 수 있다.
- [0022] 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35})로 레이블링된 항체가 본 발명의 폴리펩타이드를 검출하는 데 이용될 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 이용되는 서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드에 대한 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다.

- [0024] 본 발명의 폴리펩타이드에 대한 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,567호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY, 1991에 상세하게 기재되어 있다. 예를 들어, 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에 필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며 용이하게 실시할 수 있다. 폴리클로날 항체는 서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.
- [0025] 상술한 면역분석 과정에 의한 최종적인 시그널의 세기를 분석함으로써, 지방간, 비만 또는 당뇨병을 진단할 수 있다. 즉, 인간의 시료에서 서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드에 대한 시그널이 정상 시료 보다 강하게 나오는 경우에는 지방간, 비만 또는 당뇨병의 발병 위험도가 높은 것으로 진단된다.
- [0026] 본 발명의 키트는 항체 대신에 서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드 마커에 특이적으로 결합하는 앵타머를 이용할 수 있다. 본 명세서에서 용어 “앵타머”는 단일 줄기의(single-stranded) 핵산(RNA 또는 DNA) 분자 또는 펩타이드 분자로서 특정 표적물질에 높은 친화력과 특이성으로 결합하여 작용을 나타내는 것을 의미한다. 앵타머의 일반적인 내용은 Bock LC et al., *Nature* 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". *J Mol Med.* 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(24):142727(1998)에 상세하게 개시되어 있다.
- [0027] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 지방간, 비만 또는 당뇨병 진단 키트를 제공한다.
- [0028] 본 명세서에서, 용어 “뉴클레오타이드”는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이며, 다르게 특별하게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오타이드의 유사체를 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).
- [0029] 본 명세서에서 사용되는 용어 “프라이머”는 올리고뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 핵산쇄(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합제의 존재, 그리고 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용할 수 있다. 바람직하게는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드이며 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 프라이머는 타겟 핵산에 어닐링 되어 주형-의존성 핵산 중합효소에 의해 타겟 핵산에 상보적인 서열을 형성하는 연장 프라이머(extension primer)일 수 있으며, 이는 고정화 프로브가 어닐링 되어 있는 위치까지 연장되어 프로브가 어닐링 되어 있는 부위를 차지한다.
- [0031] 본 발명에서 이용되는 연장 프라이머는 타겟 핵산의 제1위치에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 용어 “상보적”은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 상보적인 것을 의미한다. 본 명세서에서, 프라이머 서열과 관련하여 사용되는 용어, “실질적으로 상보적인 서열”은 완전히 일치되는 서열뿐만 아니라, 특정 서열에 어닐링하여 프라이머 역할을 할 수 있는 범위 내에서, 비교 대상의 서열과 부분적으로 불일치되는 서열도 포함되는 의미이다.

- [0032] 프라이머는, 중합제의 존재 하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, 응용분야 및 프라이머의 소스(source)에 따라 결정되지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다. 용어 “어닐링” 또는 “프라이밍”은 주형 핵산에 올리고디옥시뉴클레오타이드 또는 핵산이 병치(apposition)되는 것을 의미하며, 상기 병치는 중합효소가 뉴클레오타이드를 중합시켜 주형 핵산 또는 그의 일부분에 상보적인 핵산 분자를 형성하게 한다.
- [0033] 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화 되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 족하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 상술한 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 이러한 프라이머의 디자인은 상술한 뉴클레오타이드 서열을 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.
- [0034] 본 명세서에서, 용어 “핵산 분자”는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).
- [0035] 본 발명의 키트에서 출발물질이 gDNA인 경우, gDNA의 분리는 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: Rogers & Bendich (1994)).
- [0036] 출발물질이 mRNA인 경우에는, 당업계에 공지된 통상의 방법에 총 RNA를 분리하여 실시된다(참조: Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001); Tesniere, C. et al., *Plant Mol. Biol. Rep.*, 9:242(1991); Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Willey & Sons(1987); 및 Chomczynski, P. et al., *Anal. Biochem.* 162:156(1987)). 분리된 총 RNA는 역전사효소를 이용하여 cDNA로 합성된다. 상기 총 RNA는 인간(예컨대, 비만 또는 당뇨 환자)으로부터 분리된 것이기 때문에, mRNA의 말단에는 폴리-A 테일을 갖고 있으며, 이러한 서열 특성을 이용한 올리고 dT 프라이머 및 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 용이하게 합성할 수 있다(참조: *PNAS USA*, 85:8998(1988); Libert F, et al., *Science*, 244:569(1989); 및 Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)).
- [0037] 본 발명의 키트에 있어서, 상기 특정 서열을 규명하는 것은 당업계에 공지된 다양한 방법을 응용하여 실시될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 응용될 수 있는 기술은, 형광 인 시투 혼성화(FISH), 직접적 DNA 서열결정, PFGE 분석, 서던 블롯 분석, 단일-가닥 컨퍼메이션 분석(SSCA, Orita et al., *PNAS, USA* 86:2776(1989)), RNase 보호 분석(Finkelstein et al., *Genomics*, 7:167(1990)), 닷트 블롯 분석, 변성 구배 젤 전기영동(DGGE, Wartell et al., *Nucl.Acids Res.*, 18:2699(1990)), 뉴클레오타이드 미스매치를 인식하는 단백질(예: *E. coli*의 mutS 단백질)을 이용하는 방법(Modrich, *Ann. Rev. Genet.*, 25:229-253(1991)), 및 대립형-특이 PCR을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 다른 기술들은 일반적으로 본 발명의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 프로브 또는 프라이머를 이용한다.
- [0039] 예를 들어, RNase 보호 분석에서, 본 발명의 뉴클레오타이드를 포함하는 서열에 상보적인 리보프로브가 이용된다. 상기 리보프로브와 인간으로부터 분리한 DNA 또는 mRNA를 혼성화시키고, 이어 미스매치를 검출할 수 있는 RNase A 효소로 절단한다. 만일, 미스매치가 있어 RNase A가 인식을 한 경우에는, 보다 작은 밴드가 관찰된다.
- [0040] 혼성화 시그널을 이용하는 분석에서, 본 발명의 뉴클레오타이드를 포함하는 서열에 상보적인 프로브가 이용된다. 이러한 기술에서, 프로브와 타겟 서열의 혼성화 시그널을 검출하여 직접적으로 질환의 위험도를 결정한다.
- [0041] 본 명세서에서, 용어 “프로브”는 특정 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하는 자연 또는 변형되는 모노머 또는 결합을 갖는 선형의 올리고머를 의미한다. 바람직하게는, 프로브는 혼성화에서의 최대 효율을 위하여 단일가닥이다. 프로브는 바람직하게는 디옥시리보뉴클레오타이드이다.

- [0042] 본 발명에 이용되는 프로브로서, 상기 뉴클레오타이드를 포함하는 서열에 완전하게(perfectly) 상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다. 바람직하게는, 본 발명에 이용되는 프로브는 본 발명의 뉴클레오타이드를 포함하는 서열에 혼성화될 수 있는 서열을 포함한다. 보다 바람직하게는, 상기 프로브의 3' -말단 또는 5' -말단은 상기 뉴클레오타이드에 상보적인 염기를 갖는다. 일반적으로, 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스(duplex)의 안정성은 말단의 서열의 일치에 의해 결정되는 경향이 있기 때문에, 3' -말단 또는 5' -말단에 상기 뉴클레오타이드 염기에 상보적인 염기를 갖는 프로브에서 말단 부분이 혼성화되지 않으면, 이러한 듀플렉스는 엄격한 조건에서 해체될 수 있다.
- [0043] 혼성화에 적합한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., et al., *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C.(1985)에 개시된 사항을 참조하여 결정할 수 있다. 혼성화에 이용되는 엄격한 조건(stringent condition)은 온도, 이온세기(완충액 농도) 및 유기 용매와 같은 화합물의 존재 등을 조절하여 결정될 수 있다. 이러한 엄격한 조건은 혼성화되는 서열에 의존하여 다르게 결정될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진다. 본 발명에 따르면, 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열은 베타트로핀 유전자의 뉴클레오타이드 서열이다.
- [0045] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드가 고발현된 인간은 증가된 지방간, 비만 또는 당뇨병의 위험도를 나타낸다.
- [0046] 본 명세서에서 용어 “고발현”은 본 발명의 뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드의 발현량이 정상인에 비하여 유의하게 높은 경우를 의미하며, 바람직하게는 본 발명의 뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드의 발현량이 정상인의 130% 이상인 경우를 의미한다.
- [0047] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 진단 마커가 되는 폴리펩타이드 및 뉴클레오타이드는 혈액, 혈장 또는 혈청 시료에 포함되어 있다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 진단 마커인 베타트로핀(beta-trophin) 유전자 및 단백질의 발현은 지방간, 비만 또는 당뇨병으로 확진된 대상체의 특정 조직(예를 들어 간) 뿐 아니라 혈액 내에서도 유의적으로 증가하여, 이들 질환에 대한 신뢰도 있는 채액진단 마커로서 기능할 수 있다. 따라서, 본 발명은 조직채취가 수반되는 조직검사 없이도 간단한 혈액검사로 진단이 가능하여 우수한 진단 편이성 및 환자 순응도 뿐 아니라 비용의 절감을 이룰 수 있다.

발명의 효과

- [0048] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0049] (a) 본 발명은 지방간, 비만 또는 당뇨병에 대한 새로운 바이오 마커 및 이에 기반한 이들 질환의 진단키트를 제공한다.
- [0050] (b) 본 발명은 유전자 또는 단백질 마커를 사용함으로써 대사 질환의 신뢰도 있는 조기진단 또는 발병 위험성 예측에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0051] (c) 본 발명은 혈액, 혈장 또는 혈청 시료에 포함된 바이오 마커를 이용한 진단을 가능케 함으로써 진단 편이성과 환자 순응도, 비용절감의 측면에서 보다 우수한 채액 진단에 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0052] 도 1은 당뇨병 및 비만 마우스 모델에서의 베타트로핀의 발현 양상을 나타낸 그림이다.
- 도 2는 지방간이 유도된 간 세포에서의 베타트로핀의 발현 양상을 나타낸 그림이다.
- 도 3은 글루코스 농도의 변화에 따른 베타트로핀의 발현 양상 및 조절 기전을 보여주는 그림이다. 도 3a는 HepG2 세포에 저농도 글루코스(5.5mM) 또는 고농도 글루코스(25mM)를 각각 처리한 뒤 베타트로핀 mRNA의 발현을

측정함으로써 혈당 변화에 따른 베타트로핀의 발현 양상을 조사한 결과는 나타낸 그림이다. 도 3b-3c는 siPPAR α 또는 대조군 스크램블 siRNA(siCTRL)를 HepG2 세포에 각각 처리하고 48시간 후 PPAR α (도 3b) 및 베타트로핀(도 3c)의 mRNA 발현을 측정하여 확인한 결과를 나타낸 그림이다.

도 4는 지방간 및 비만 유도 동물 모델에서의 기존의 고지혈증, 지방간 및 기존의 당뇨병 치료제 투여에 따른 베타트로핀의 발현 양상 변화를 측정하여 나타낸 그림이다. Chow, 보통 식이 마우스; HFD, 지방간 및 비만 유도 마우스.

도 5는 정상인, 비알코올성 지방간 환자 및 당뇨병 환자의 혈청에서 베타트로핀 수준을 웨스턴 블롯팅을 통해 측정하여 나타낸 결과(도 5a) 및 이를 밀도분석(densitometry)으로 정량화 한 결과(도 5b)를 각각 보여주는 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0054] **실시예**

[0055] **실험방법**

[0056] 실험동물

[0057] 수컷 Otsuka Long-Evans Tokushima 비만 랫트는 Otsuka Pharmaceutical (Tokushima, Japan)에서 구입하였으며, 수컷 C57BL/6 마우스는 Orient Bio(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 고지방 식이(지방 열량 60% kcal)는 Research Diet (Bethlehem, PA, USA)에서 구입하였다.

[0058] *RNA 분리 및 실시간 PCR*

[0059] TRIzol 시약(Invitrogen, 15596-018)을 이용하여 제조사의 설명서에 따라 총 RNA를 분리하고 SuperScript III First-strand kit(Invitrogen, 18080-051)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 실시간 PCR은 SYBR Green(Takara, RR820)을 이용하여 수행하였고, 상대적인 mRNA 수준을 측정하기 위하여 StepOnePlus™(Life technologies, 4376357) 상에서 구동하였다. PCR 조건은 다음과 같다: 95°C에서 15초 간 초기 변성(denaturation) 및 효소 활성화, 60°C에서 60초 간 어닐링, 및 72°C에서 30초 간 연장(extension). PCR에 사용된 프라이머는 다음과 같다: 마우스-베타트로핀, 정방향 프라이머 5' - gcittacaccttcgagctga-3' 및 역방향 프라이머 5' - atccaggtagtctcaggctg-3' ; 인간 베타트로핀, 정방향 프라이머 5' -gagactcagatggaggagga-3' 및 역방향 프라이머 5' -atgctgctgtgccaccatct-3' ; 인간-PPAR α , 정방향 프라이머 5' -ACTCCACCTGCAGAGCAACCA -3' 및 역방향 프라이머 5' -TAGATCTCCTGCAGTAGCGGG -3' ; 인간-액틴, 정방향 프라이머 5' -GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3' 및 역방향 프라이머 5' -AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3' ; 마우스-GAPDH, 정방향 프라이머 5' -AACTTGGCATTGTGGAAGG-3' 및 역방향 프라이머 5' -TGTCCTACCCCAATGTGT-3' . 정량 분석은 $\Delta\Delta$ 순환역가법($\Delta\Delta$ cycle threshold method)을 통해 StepOne 소프트웨어 버전 2.2.2를 이용하여 수행하였다.

[0060] **세포 배양**

[0061] 인간 간세포암 세포주인 HepG2(HB-8065)는 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구입하여, 10% FBS(Hyclone Thermo Scientific), 페니실린(100 IU/ml, Gibco, Carlsbad, CA, USA) 및 스트렙토마이신(100 mg/ml, Gibco)이 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, WelGENE Inc., Daegu, LM001-05)에서 5% CO₂/95% 공기 및 37°C의 조건 하에서 유지하였다. 약리학적인 연구를 위하여, 세포를 0.2 mM 팔미트산(PA, Sigma, P0500), 피오그리타존(25 μ M, Sigma, E6910) 또는 페노피브릭산(50 μ M, Sigma, 6020) 하에서 대조군(5.5mM) 또는 고-글루코스(25mM) 배지에서 24시간 배양하였다.

[0062]

[0063] *siRNA (Small interfering RNA) 형질전환*

[0064] PPAR α 및 대조군 siRNA(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, sc-36307)를 이용하여 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 11668-027)을 통해 제조자의 설명서대로 너-다운 실험을 수행하였다.

[0065]

[0066] 자유 지방산의 제조

[0067] 자유 지방산 용액을 종래에 보고된 방법으로 제작하였다[1]. 요약하면, 20 mM 팔미트산 (Sigma, P0500)을 70 °C에서 10mM NaOH와 함께 준비한 뒤 여과하였다. 1% (질량/부피) 무-팔미트산 BSA(Calbiochem, 126575) 용액을 무혈청 DMEM에서 준비하였다. 팔미트산이 용해된 후, 팔미트산 용액을 BSA 함유 무혈청 DMEM에 첨가하였다. 40°C 수조에서 적절한 양의 팔미트산을 5% BSA와 혼합함으로써 5 mM 팔미트산/5% BSA 용액을 제작하였다.

[0068] 실험결과

[0069] 당뇨병 및 비만 쥐에서의 베타트로핀 의 발현 양상

[0070] 보통 식이(chow diet)를 8주 동안 섭취한 16주령의 정상 마우스(수컷 C57BL6, #1), 당뇨병이 발생한 30주령의 수컷 OLETF(Otsuka Long-Evans Tokushima fatty) 랫트(#2) 및 고지방 식이(high fat diet, HFD)를 8주 동안 섭취하여 비만 및 지방간이 유도된 16주령의 마우스(수컷 C57BL6, #3)의 간 조직에서 베타트로핀의 발현을 분석한 결과, 당뇨병 마우스 및 비만, 지방간 유도 마우스에서 정상 마우스에 비해 간 조직에서 베타트로핀의 mRNA 발현이 유의하게 증가되어 있음을 확인하였다(도 1).

[0071] 지방간이 유도된 간 세포에서의 베타트로핀 의 발현 양상

[0072] 지방간 유도를 위해 사람 간세포에 고혈당 및 포화지방산(palmitate, PA)을 24시간 동안 처리하여 지방을 축적시킨 상태에서 베타트로핀의 발현을 확인하였다. 고혈당 조건에서 간세포를 배양하면서, 지방간 유도를 위해 팔미트산(PA, 0.2mM)을 처리하거나, 당뇨병 치료제인 피오그리타존(pioglitazone(Pio), 25 μ M, Takeda, Japan)와 고지혈증 치료제인 페노피브릭산(fenofibrate(FF), 50 μ M, 녹십자)를 각각 처리하여 24시간 동안 배양한 뒤, 간세포에서 베타트로핀 mRNA 발현 정도를 측정된 결과, 정상 상태의 간세포에 비해 지방이 축적된 간세포에서 베타트로핀의 발현이 유의하게 증가되어 있음을 확인하였으며, 지방간의 억제 및 치료 효과가 있는 것으로 알려진 약물인 피오그리타존 및 페노피브릭산의 처리로 인해 베타트로핀의 발현이 상대적으로 억제됨을 관찰하였다(도 2).

[0073] 포도당 농도의 변화에 따른 베타트로핀 의 발현 양상 및 조절 기전

[0074] 혈당 변화에 따른 베타트로핀의 발현 양상 변화를 알아보기 위하여, HepG2 세포에 저농도 글루코스(5.5mM) 또는 고농도 글루코스(25mM)를 각각 처리하여 24, 48시간 동안 배양한 뒤 베타트로핀 mRNA의 발현을 측정된 결과, 당뇨병 환자에서처럼 혈당이 증가할수록 간세포에서의 베타트로핀 발현이 증가함을 확인하였다(도 3a).

[0075] 이에, 본 발명자들은 베타트로핀의 발현을 조절하는 기전을 확인하기 위해 지방간 및 이상지혈증 관련 주요 전사인자인 PPAR α 의 역할을 조사하고자 하였다. 이를 위하여 siRNA-PPAR α (siPPAR α) 또는 대조군 스크램블 siRNA(siCTRL)를 HepG2 세포에 각각 처리하고 48시간 후에 베타트로핀의 발현을 측정하였으며, siPPAR α 처리시 PPAR α 길항제로 알려진 페노피브릭산(50 μ M)도 함께 처리하였다. 그 결과, siPPAR α 를 처리한 세포에서 PPAR α 의 mRNA 발현이 감소하며(도 3b), PPAR α 의 발현이 감소된 HepG2 세포에서 베타트로핀의 발현이 증가함을 확인하였다(도 3c). 이러한 결과는 지방간 및 이상지혈증의 주요 전사인자인 PPAR α 이 베타트로핀 발현 변화에 관여함을 보여준다.

[0076] 지방간 및 비만 유도 동물 모델에서의 고지혈증, 지방간, 당뇨병 치료약제 투여에 따른 베타트로핀 의 발현 양상 변화

[0077] 8주령의 수컷 C57BL6 마우스를 각 5마리 씩 배분하여, #1: 보통 식이(chow diet), #2: 고지방 식이(HFD, 60%

fat, Research Diet), #3: 고지방 식이+ 페노피브릭산(100mg/kg), #4: 고지방 식이 + 피오그리타존(30mg/kg)을 12주간 투여한 결과, 비만 및 지방간이 유도된 마우스(HFD)에서 정상 마우스(Chow)에 비해 간 조직에서 베타트로핀의 mRNA 발현이 유의하게 증가되어 있었으며, 지방간 및 고지혈증 치료에 효과가 있는 것으로 알려진 페노피브릭산을 함께 투약한 군에서는 베타트로핀 발현이 감소하였고, 당뇨병 및 지방간 치료제로 알려진 피오그리타존을 투약한 군에서도 베타트로핀 발현이 감소함을 확인하였다(도 4).

[0078] 정상인, 비알코올성 지방간 환자 및 당뇨병 환자의 혈청 내 베타트로핀 측정

[0079] 지방간이 없고 정상 혈당을 가지는 정상인(Normal), 복부초음파를 통해 지방간이 진단된 환자(NAFLD) 및 제2형 당뇨병을 진단받은 환자(T2DM)에 대하여, 각각 공복상태에서 채혈 후 혈청에서 베타트로핀의 발현 정도를 웨스턴 블롯팅으로 측정하였다(도 5a). 이를 밀도분석(densitometry)을 통해 정량화 한 결과, 정상인에 비해 지방간 환자에서 베타트로핀의 혈청 농도가 약 3.3배 증가되어 있으며, 당뇨병 환자에서는 정상인보다 약 2.3 배 증가되어있음을 관찰하였다. 따라서, 베타트로핀은 간 조직에서 뿐 아니라 혈액 내에서도 환자와 정상인 간 유의한 발현량 차이를 보임으로서 이들 질환에 대한 신뢰도 있는 채액진단 마커로서 기능할 수 있음을 확인하였다.

[0080]

[0081] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

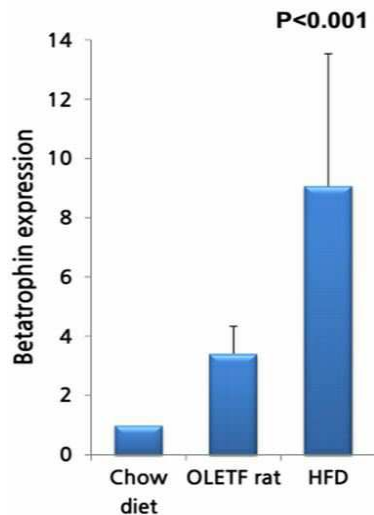
[0082] 참고문헌

[0083] 1. Mayer CM, Belsham DD. Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphateactivated protein kinase activation. *Endocrinology* 151:576-85(2010)

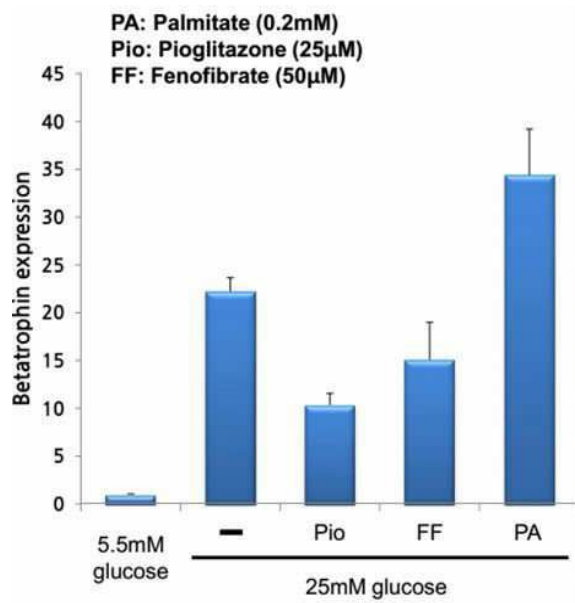
도면

도면1

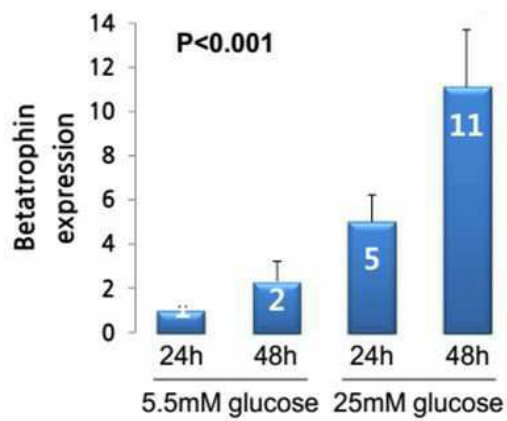
- #1. C57 mice + chow diet
- #2. OLETF rat
- #3. C57 mice + High fat diet



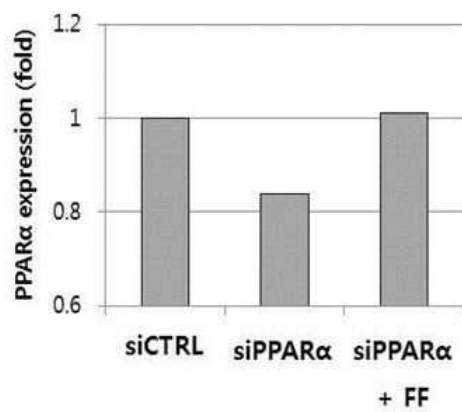
도면2



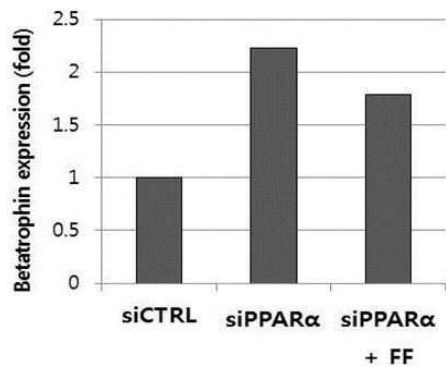
도면3a



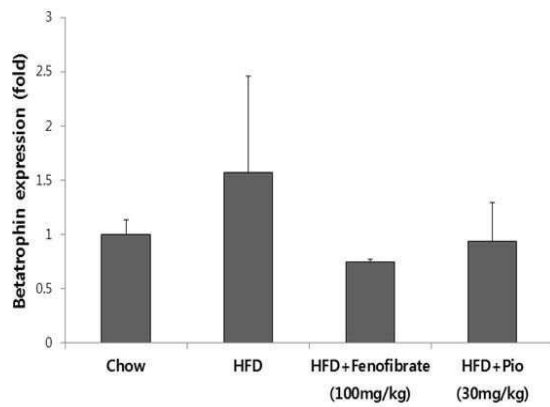
도면3b



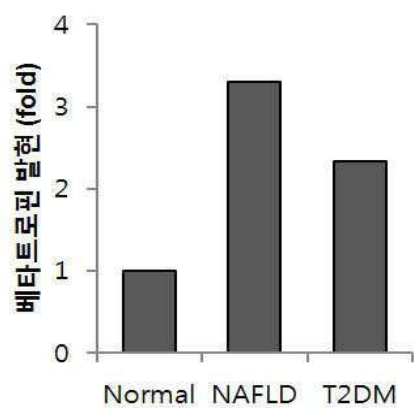
도면3c



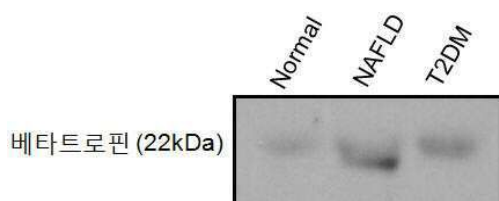
도면4



도면5a



도면5b



서열목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation Yonsei University
 <120> Gene Implicated in Obesity, Fatty Liver and Diabetes Mellitus and Use Thereof
 <130> PN140112
 <160> 2
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 888
 <212> RNA
 <213> homo sapiens
 <400> 1
 ataccttaga ccctcagtca tgccagtgcc tgetctgtgc ctgctctggg ccctggcaat 60
 ggtgaccggg cctgcctcag cggcccccat gggcggccca gaactggcac agcatgagga 120
 gctgacctg ctcttccatg ggacctgca gctgggccag gccctcaacg gtgtgtacag 180

 gaccacggag ggacggctga caaaggccag gaacagcctg ggtctctatg gccgcacaat 240
 agaactcctg gggcaggagg tcagccgggg cgggatgca gcccaggaac ttcgggcaag 300
 cctgttgag actcagatgg aggaggatat tctgcagctg caggcagagg ccacagctga 360
 ggtgctgggg gagtgggccc aggcacagaa ggtgctacgg gacagcgtgc agcggctaga 420
 agtccagctg aggagcgcct ggctgggccc tgcctaccga gaatttgagg tcttaaaggc 480
 tcacgctgac aagcagagcc acatcctatg ggccctcaca ggccacgtgc agcggcagag 540
 gcgggagatg gtggcacagc agcatcggct gcgacagatc caggagagac tccacacagc 600

 ggcgctccca gcctgaatct gcctggatgg aactgaggac caatcatgct gcaaggaaca 660
 cttccacgcc ccgtgagccc cctgtgcagg gaggagctgc ctgttactg ggatcagcca 720
 gggcgccggg ccccacttct gagcacagag cagagacaga cgcaggcggg gacaaaggca 780
 gaggatgtag cccattggg gaggggtgga ggaaggacat gtaccctttc atgectacac 840
 acccctcatt aaagcagagt cgtggcatct caaaaaaaaa aaaaaaaaa 888
 <210> 2
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 2

Met Pro Val Pro Ala Leu Cys Leu Leu Trp Ala Leu Ala Met Val Thr

1 5 10 15

Arg Pro Ala Ser Ala Ala Pro Met Gly Gly Pro Glu Leu Ala Gln His

20 25 30

Glu Glu Leu Thr Leu Leu Phe His Gly Thr Leu Gln Leu Gly Gln Ala

35 40 45

Leu Asn Gly Val Tyr Arg Thr Thr Glu Gly Arg Leu Thr Lys Ala Arg

50 55 60

Asn Ser Leu Gly Leu Tyr Gly Arg Thr Ile Glu Leu Leu Gly Gln Glu

65 70 75 80

Val Ser Arg Gly Arg Asp Ala Ala Gln Glu Leu Arg Ala Ser Leu Leu

85 90 95

Glu Thr Gln Met Glu Glu Asp Ile Leu Gln Leu Gln Ala Glu Ala Thr

100 105 110

Ala Glu Val Leu Gly Glu Val Ala Gln Ala Gln Lys Val Leu Arg Asp

115 120 125

Ser Val Gln Arg Leu Glu Val Gln Leu Arg Ser Ala Trp Leu Gly Pro

130 135 140

Ala Tyr Arg Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala His Ala Asp Lys Gln Ser

145 150 155 160

His Ile Leu Trp Ala Leu Thr Gly His Val Gln Arg Gln Arg Arg Glu

165 170 175

Met Val Ala Gln Gln His Arg Leu Arg Gln Ile Gln Glu Arg Leu His

180 185 190

Thr Ala Ala Leu Pro Ala

195