(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0104275
(43) 공개일자 2015년09월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0025785
(22) 출원일자 2014년03월05일
심사청구일자 2014년03월05일
기술이전 희망 : **기술양도**, **실시권허여**, **기술지도**

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93
(72) 발명자
장연진
서울특별시 송파구 양재대로64길 20, 1동 103호(가락동, 신현대빌라)
박혜순
서울특별시 송파구 중대로 24, 215동 101호(문정동, 훼미리아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 15 항

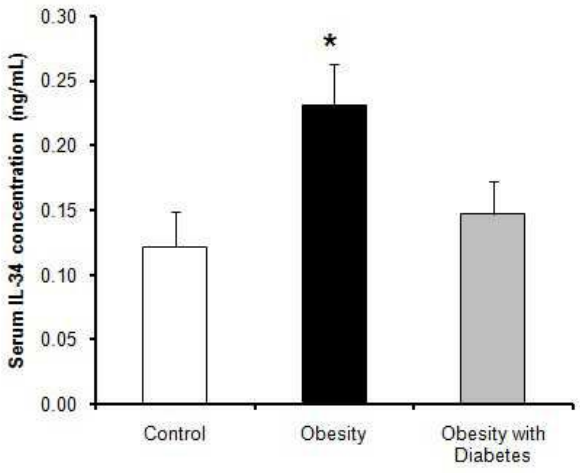
(54) 발명의 명칭 **비만 관련 질환의 진단과 치료를 위한 IL-34의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 비만 관련 질환의 진단과 치료를 위한 IL-34의 용도에 관한 것으로, 더 상세하게는 혈청 내 IL-34의 발현을 통하여 비만을 진단하고, IL-34의 발현 또는 활성 저해제를 이용하여 비만 또는 인슐린 저항성 당뇨병을 예방 또는 치료하기 위한 IL-34의 신규한 용도에 관한 것이다.

본 발명은 비만 환자에서 특이적이로 발현이 증가되는 IL-34를 비만 진단 마커로 사용하여 비만을 정확하고 용이하게 진단할 수 있으며, IL-34의 안티센스 뉴클레오티드, shRNA, siRNA, 항체 등과 같은 IL-34의 발현 또는 활성 저해제를 사용하여 비만 또는 인슐린 저항성 당뇨병을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

김종혁

서울특별시 강남구 영동대로112길 67, 1002호(삼성동)

허윤석

서울특별시 영등포구 선유동2로 56, 203동 801호(당산동, 유원 2차 아파트)

이연지

서울특별시 마포구 월드컵북로 43길 11, 102동 1204호(상암동, 휴먼시아 1단지)

송영숙

서울특별시 서초구 남부순환로364길 7-6, 303호(양재동)

이슬기

경기도 성남시 중원구 시민로28번길 6, 103동 906호(하대원동, 현대아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011-0017028, 2012-0005468
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	핵심연구지원사업
연구과제명	인간 지방조직 IL-34의 발현과 비만-유발 염증에서의 역할
기 여 율	90/100
주관기관	울산대학교 산학협력단
연구기간	2011.05.01 ~ 2013.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2008-0062286
부처명	미래부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	기초연구센터지원사업(의학분야)
연구과제명	세포기능장애 연구센터
기 여 율	10/100
주관기관	울산대학교 산학협력단
연구기간	2013.09.01 ~ 2014.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

검체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 IL-34의 양을 측정하는 단계;를 포함하는 비만 진단 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 검체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 IL-34의 양을 측정한 후, 정상 체중의 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터 측정된 IL-34에 비해 그 발현 또는 분비량이 증가된 경우 비만으로 판단하는 단계;를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 비만 진단 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 비만은 비당뇨성 비만인 것을 특징으로 하는 비만 진단 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 혈청인 것을 특징으로 하는 비만 진단 방법.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 발현 또는 분비량이 증가된 경우란, 정상 체중의 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터 측정된 IL-34 양에 비해 검체의 IL-34 양이 25% 이상 증가되거나; 검체의 혈청내 IL-34 양이 0.23±0.03 ng/mL 이상인 경우인 것을 특징으로 하는 비만 진단 방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 IL-34는 대식세포의 침윤에 의해 그 발현이 증가하는 것을 특징으로 하는 비만 진단 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 IL-34의 발현 증가는 대식세포에서 분비되는 TNFα 또는 IL-1β 의해 유도되는 것을 특징으로 하는 비만 진단 방법.

청구항 8

IL-34의 발현 또는 활성 저해제를 포함하는 비만 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 IL-34의 발현 또는 활성 저해제는 지방조직의 중성지방 축적을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 IL-34의 발현 저해제는 IL-34 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, shRNA(short hairpin RNA) 및 siRNA(short interfering RNA)로 구성된 군 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 IL-34 활성 저해제는 IL-34에 결합하는 항체임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

IL-34의 발현 또는 활성 저해제를 포함하는 인슐린 저항성 당뇨병 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 IL-34의 발현 또는 활성 저해제는 인슐린에 의한 포도당 수송을 회복시키는 것을 특징으로 하는 인슐린 저항성 당뇨병 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 IL-34의 발현 저해제는 IL-34 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, shRNA(short hairpin RNA) 및 siRNA(short interfering RNA)로 구성된 군 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 15

제12항에 있어서,

상기 IL-34 활성 저해제는 IL-34에 결합하는 항체임을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 비만 관련 질환의 진단과 치료를 위한 IL-34의 용도에 관한 것으로, 더 상세하게는 혈청 내 IL-34의 발현을 통하여 비만을 진단하고, IL-34의 발현 또는 활성 저해제를 이용하여 비만 또는 인슐린 저항성 당뇨병을 예방 또는 치료하기 위한 IL-34의 신규한 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 비만은 염증성 사이토카인과 급성기 단백질(acute-phase proteins)의 순환기 수치의 증가로 특징지을 수 있는 만성 염증의 일종으로, 비만에 의한 염증 반응은 인슐린 저항성 및 제2형 당뇨병 등의 비만 관련 합병증의 병인 요소로 알려져 있다. 지방 조직은 비만에 있어서 초기에 염증이 유발되는 부위로, 비만에 의해 유도되는 염증 반응의 주요한 특징은 지방 조직 내로 대식세포가 침윤한다는 것이다. 이러한 과정에 대해 그 기전이 아직 명확하게 알려져 있지는 않지만, 대식세포는 주로 더 많은 스트레스를 경험하는 비대 비만세포와 같은 비만세포로부터 유래된 스트레스 신호에 대한 반응으로 지방 조직에 침윤하는 것으로 예상된다. 즉, 지방조직의 대식세포는 에너지 취득 기간 동안 비만증이 증가하면서 지방 조직으로 모집되는 골수 유래 세포인 것으로 보인다. 체질량 지수(BMI)와 지방 조직에 있는 대식세포의 양은 정적인 상관관계(positive correlation)를 나타내는 것으로 알려졌는데, 이는 지방 조직의 확장이 대식세포의 모집과 연관되어 있음을 나타낸다. 따라서, 지방세포에서 대사 신호(metabolic signal)나 스트레스는 화학주성인자(chemoattractant)의 생성, 단핵세포의 내피 세포를 가로지르는 이동 및 비만 환자의 지방 조직에서 대식세포로의 분화로 이어지는 현상을 초래할 수 있다. 이와 같은 지방세포와 대식세포의 상호작용은 차례로 TNFα, IL-1β 같은 염증성 사이토카인의 생산을 자극하고 궁극적으로는 대사 조절 장애와 만성 염증과 같은 지방세포 기능의 손상을 야기시킨다. 따라서, 염증 반응과 관련하여 지방세포로부터 분비되는 인자를 식별하는 것은 이러한 기능 연구에 있어서 매우 중요한 요소라 할 수 있을 것이다.

[0003] 한편, IL-34는 인간 단핵세포가 증식하는 과정에서 스크리닝 분석을 통하여 CFS 1R(colony-stimulating

factor-1 receptor)에 결합하는 새로운 사이토카인으로 식별되었는데, IL-34는 241개의 아미노산으로 구성된 단량체(monomer) 두 개가 결합하여 이루어진 동종이량체(homodimer)로 그 분자량은 39kDa이다. IL-34는 CSF-1과 염기서열상의 상동성은 없는 것으로 확인되지만, IL-34와 CSF-1은 모두 CSF-1R에 결합하는 리간드로써, 단핵 세포, 대식 세포, 파골 세포와 같은 단핵 식세포의 생존, 증식 및 분화 과정에서 주요한 조절 인자로 작용한다. IL-34도 CSF-1과 마찬가지로 CSF-1R과 협력하여 인간 단핵세포에서 세포외 신호 조절 키나아제 1/2의 인산화를 유도하는 것으로 확인되었는데, 따라서 이들 두 사이토카인에 의한 일부 신호 전달 경로는 상호 오버랩되는 것으로 생각된다. 반면에 IL-34와 CSF-1은 생물학적 활성과 신호 활성화 반응속도에서 차이가 있고, 대식세포의 표현형과 기능은 이들 리간드들에 의해 차등 조절되는 것으로 보인다.

[0004] IL-34 사이토카인은 심장, 뇌, 폐, 간, 신장, 비장과 대장을 비롯한 다양한 기관에서 발현된다. 한편, IL-34은 만성 염증성 질환인 류마티스 관절염에서 혈청 수치가 상승하고, 염증성 활막에서 과발현된다. 그러나, 비만 또는 비만 관련 질환 및 지방 조직에서 IL-34의 발현에 대한 연구는 아직까지 이루어진바 없다. 다만, IL-34 유전자의 단일염기다형성이 제2형 당뇨병의 감수성과 연관되어 있음을 멕시코계 미국인에서 게놈 수준의 연관 연구와 메타 분석을 통해 확인할 수 있을 뿐이었다.

[0005] 따라서 본 발명자들은 인간 지방 조직 및 비만과 관련하여, 분화된 인간 지방세포에서 IL-34가 발현되고 조절되는 양상에 대해 연구하였고, 비만 여성과 정상 체중 여성에서 IL-34의 발현 수준을 비교하였으며, 복강경 위우회술(RYGB, Roux-en-Y gastric bypass) 후 비만 환자에서 혈청 내 IL-34 농도가 어떻게 변화하는지 그리고 비만 환자의 혈청 내 IL-34의 농도 변화와 이들 비만 환자의 체중 감소와의 상관관계를 조사해 보았다. 또한, 대식세포와 공배양 과정 및 분화 과정의 인간 지방세포에서 IL-34의 발현과 분비를 조사하였고, 재조합 인간 IL-34의 생리학적 효과를 인간의 분화된 지방세포에서 확인하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1284521호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 상기와 같은 연구를 통한 본 발명의 목적은 검체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 IL-34의 양을 측정하여 비만을 진단하는 신규한 비만 진단 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 IL-34의 발현 또는 활성 저해제를 포함하는 비만 치료용 약학적 조성물 및 인슐린 저항성 당뇨병 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 검체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 IL-34의 양을 측정하는 단계;를 포함하는 비만 진단 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 진단방법은 상기 검체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 IL-34의 양을 측정한 후, 정상 체중의 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터 측정된 IL-34에 비해 그 발현 또는 분비량이 증가된 경우 비만으로 판단하는 단계;를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 비만은 비당뇨성 비만일 수 있다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈청일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 발현 또는 분비량이 증가된 경우란, 정상 체중의 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터 측정된 IL-34 양에 비해 검체의 IL-34 양이 25% 이상 증가되거나; 검체의 혈청내 IL-34 양이 0.23±0.03 ng/mL 이상인 경우일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 IL-34는 대식세포의 침윤에 의해 그 발현이 증가하는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 IL-34의 발현 증가는 대식세포에서 분비되는 TNFα 또는 IL-1β의해 유도되는 것일 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명은 IL-34의 발현 또는 활성 저해제를 포함하는 비만 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 IL-34의 발현 또는 활성 저해제는 지방조직의 중성지방 축적을 억제하는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 IL-34의 발현 저해제는 IL-34 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, shRNA(short hairpin RNA) 및 siRNA(short interfering RNA)로 구성된 군 중에서 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 IL-34 활성 저해제는 IL-34에 결합하는 항체일 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 IL-34의 발현 또는 활성 저해제를 포함하는 인슐린 저항성 당뇨병 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 IL-34의 발현 또는 활성 저해제는 인슐린에 의한 포도당 수송을 회복시키는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 IL-34의 발현 저해제는 IL-34 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, shRNA(short hairpin RNA) 및 siRNA(short interfering RNA)로 구성된 군 중에서 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 IL-34 활성 저해제는 IL-34에 결합하는 항체일 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명은 비만 환자에서 특이적으로 발현이 증가되는 IL-34를 비만 진단 마커로 사용하여 비만을 정확하고 용이하게 진단할 수 있으며, IL-34의 안티센스 뉴클레오티드, shRNA, siRNA, 항체 등과 같은 IL-34의 발현 또는 활성 저해제를 사용하여 비만 또는 인슐린 저항성 당뇨병을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 비당뇨성 비만군, 제2형 당뇨성 비만군 및 정상 체중 대조군에서 혈청 내 IL-34를 확인한 결과이다.

도 2는 지방조직에서 IL-34 mRNA 발현을 확인한 것으로, A) 내장지방조직(VAT)과 피하지방조직(SAT), B) 지방조직으로부터 얻은 지방세포(adipocyte)와 기질/혈관 세포(SV) 분획에서의 IL-34 mRNA 발현을 RT-PCR로 비교하였다.

도 3은 인간 지방세포에서 IL-34 유전자의 발현을 확인한 것으로, A) 피하지방조직(SAT)에서 분리된 지방전구세포를 지방세포로 분화하는 과정에서 IL-34의 mRNA양을 real-time PCR을 통해 분석하고, B) 분화된 인간 지방세포에서 CM 처리에 따른 IL-34 mRNA 유도 효과, C) 분화된 인간 지방세포에서 TNFα(10 ng/mL) 또는 IL-1β(10 ng/mL) 처리에 따른 IL-34 mRNA 유도 효과, D) 분화된 인간 지방세포에서 TNFα(10 ng/mL) 또는 IL-1β(10 ng/mL) 처리에 따른 IL-34 단백질 분비 효과를 관찰한 것이다.

도 4는 인간 지방세포에 미치는 IL-34의 효과를 관찰한 것으로, A) 인슐린에 의한 포도당 수송에 IL-34가 미치는 영향을 2-DG 흡수율을 통해 관찰하고, B) 인간 피하지방조직(SAT)에서 분리된 지방전구세포를 지방세포로 분화시킨 후 IL-34 처리에 따른 중성지방의 축적을 oil red-O 염색하여 관찰한 후, 염색을 추출한 후 마이크로 플레이트를 이용하여 염색 강도를 측정한 결과이다.

도 5는 위우회술에 따른 비만 환자에서 A) 혈청 내 IL-34 농도와 체중 감소, B, C) 수술 후 혈청 내 IL-34 수치 (IL-34 = serum IL-34 concentration after surgery - serum IL-34 concentration before surgery) 와 BMI(B) 및 hsCRP(C) 간의 상관관계를 관찰한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.

[0027] IL-34는 CSF-1R에 결합하는 리간드로, 만성 염증성 류마티스 관절염의 활막 조직에서 IL-34의 과발현과 혈청 내 농도 상승이 보고되어 있고, IL-34의 농도는 병증의 심각도와 연관되어 있음이 알려져 있다. 이에 본 발명자들은 IL-34가 비만 지방 조직에서 과발현되어 비만에 의해 유도되는 염증을 유도하고, 인슐린 저항성과 같은 관련 질환의 발병 기전에 연관되어 있는지 확인해 보았는데, 그 결과 정상 체중 대조군에 비해 비만인 여성에 있어서 혈청 내 IL-34의 농도는 약 2배 이상 높은 것으로 나타났다(도 1 참조). 또한, 혈청 IL-34는 BMI, 복부 지방 영역 등과 같은 비만도의 척도와 밀접한 상관관계를 나타내었을 뿐만 아니라, HOMA-IR, 순환성 인슐린, hsCRP, 렙틴의 농도와 같이 인슐린 저항성과 만성 염증을 나타내는 징후와도 직접적인 상관관계가 있는 것으로 나타났다(표 3 참조). 또한, 혈청 내 IL-34는 위우회술에 의해 유도되는 체중 감량에 따라 현저히 감소하였는데(도 5 참조), 이러한 결과를 통하여 비만에서 순환성 IL-34와 인슐린 저항성과의 밀접한 상관관계를 알 수 있었다.

[0028] 비록 IL-34는 다양한 기관에서 광범위하게 발현되고 있지만, 지방 조직에서의 발현은 보고된 바 없는데, 본 발명자들은 IL-34 mRNA가 피하지방조직과 내장지방조직에서 모두 발현되고 있으며, 특히 내장지방조직에서는 피하지방조직에 비해 2배 높은 발현 양상을 나타내고 있음을 확인하였다(도 2A 참조). 또한, 지방 조직에서 IL-34 단백질이 발현됨을 면역조직화학법에 의해 확인하였고(데이타 미도시), IL-34 mRNA가 기질/혈관 세포 뿐 아니라 지방세포에서도 발현됨을 확인하였다(도 2B 참조). 한편, 지방세포 형성과정 중에 IL-34 mRNA는 현저히 증가하는 것으로 나타났고(도 3A 참조), 지방 조직의 대식세포로부터 분비되는 전염증성 사이토카인인 대식세포의 CM(conditioned media), TNFα, IL-1β와 함께 배양하였을 때, 지방세포의 IL-34의 발현과 분비가 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 3B 및 3D 참조). 따라서, 지방 조직은 비만 환자에 있어서 혈청 내 IL-34의 증가에 주요한 역할을 담당하고 있는 것을 알 수 있었다.

[0029] 혈청 내 IL-34는 본 발명의 비만 환자들에서 위우회술에 의해 유도된 체중 감량에 따른 혈청 내 hsCRP 수치의 변화와 강한 양적 상관관계를 나타내었는데(도 5C 참조), 이를 통하여 순환성 IL-34가 비만과 같은 낮은 수준의 염증에 대한 새로운 진단용 마커로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0030] 본 발명은 또한 혈청 내 IL-34와 HOMA-IR간의 강한 양적 상관관계를 나타내고 있는데(표 3 참조), HOMA-IR은 인슐린 저항성의 지표로, 혈청 내 IL-34와 HOMA-IR간의 강한 양적 상관관계는 종래 알려진 비만과 인슐린 저항성의 양적 상관관계와 일치하는 결과이다. 또한, 인간 재조합 IL-34는 분화된 인간 지방세포에서 인슐린에 의해 자극된 포도당 수송을 현저히 감소시키는 것으로 확인되었는데, 이를 통하여 IL-34가 지방세포에서 인슐린 저항성을 유도할 수 있음을 알 수 있었다(도 4A 참조). 또한, 지방 생성 과정에서 IL-34를 보충하면 지방 축적이 증가하는데(도 4B 참조), 이러한 결과로부터 지방세포의 비대와 인슐린 저항성을 초래할 수 있음을 알 수 있었다.

[0031] 상기와 같은 연구 결과로부터 본 발명은 검체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 IL-34의 양을 측정하는 단계를 포함하는 비만 진단 방법을 제공한다. 상기 방법은 검체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 IL-34의 양을 측정한 후, 정상 체중의 검체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 측정된 IL-34에 비해 그 발현 또는 분비량이 증가된 경우 비만으로 판단하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 생물학적 시료는 인체로부터 분리된 모든 시료를 의미하며, 바람직하게는 혈청 또는 지방조직일 수 있다. 또한, 상기 지방조직은 내장지방조직(VAT) 또는 피하지방조직(SAT)일 수 있다. 한편, 상기 IL-34는 대식세포의 침윤에 의해 그 발현이 증가할 수 있으며, 대식세포에서 분비되는 TNFα 또는 IL-1β에 의해 유도되는 것으로 확인되었다.

[0032] 한편, 본 발명에 따른 IL-34는 지방조직에서 중성지방을 축적하는 것으로 나타난 바, 본 발명은 IL-34의 발현 또는 활성 저해제를 포함하는 비만 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명에 있어서, 상기 IL-34의 발현 저해제는 IL-34 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, shRNA(short hairpin RNA) 및 siRNA(short interfering RNA)로 구성된 군 중에서 선택된 어느 하나일 수 있다. 또한, 본 발명에 있어서, 상기 IL-34 활성 저해제는 IL-34에 결합하는 항체일 수 있다.

[0033] 또한, IL-34은 인슐린에 의한 포도당 수송을 억제하는 것으로 나타난 바, 본 발명은 IL-34의 발현 또는 활성 저해제를 포함하는 인슐린 저항성 당뇨병 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명에 있어서, 상기 IL-34의 발현 저해제는 IL-34 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, shRNA(short hairpin RNA) 및 siRNA(short interfering RNA)로 구성된 군 중에서 선택된 어느 하나일 수 있다. 또한, 본 발명에 있어서, 상기 IL-34 활성 저해제는 IL-34에 결합하는 항체일 수 있다.

[0034] 본 발명에서 용어, "안티센스 뉴클레오티드란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 특징이 있다. 본 발명의 안티센스 서열은 IL-34 mRNA에 상보적이고 IL-34 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고 IL-34 mRNA의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모

든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 뉴클레오티드의 길이는 6 내지 100 염기이고, 바람직하게는 8 내지 60 염기이고, 보다 바람직하게는 10 내 40 염기이다.

[0035] 상기 안티센스 뉴클레오티드는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al, Curr Opin Struct Biol., 5(3):343-55, 1995). 핵산 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 뉴클레오티드는 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 뉴클레오티드은 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-me 피리미딘(특히 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N6 (6-아미노헥실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다. 또한 본 발명의 안티센스 뉴클레오티드은 상기 안티센스 뉴클레오티드의 활성 및 세포 흡착성을 향상시키는 하나 이상의 모이어티(moiety) 또는 컨쥬게이트(conjugate)와 화학적으로 결합될 수 있다. 콜레스테롤 모이어티, 콜레스테릴 모이어티, 콜릭산, 티오에테르, 티오콜레스테롤, 지방성 사슬, 인지질, 폴리아민, 폴리에틸렌 글리콜 사슬, 아다맨탄 아세트산, 팔미틸 모이어티, 옥타데실아민, 헥실아미노-카르보닐-옥시콜에스테롤 모이어티 등의 지용성 모이어티 등이 있고 이에 제한되지는 않는다. 지용성 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오티드와 제조 방법은 본 발명의 기술 분야에서 이미 잘 알려져 있다(미국특허 제5,138,045호, 제5,218,105호 및 제5,459,255호). 상기 변형된 핵산은 뉴클레아제에 대한 안정성을 증가시키고 안티센스 뉴클레오티드과 표적 mRNA와의 결합 친화력을 증가시킬 수 있다. 안티센스 RNA의 경우 통상의 방법으로 시험관에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 할 수 있다. 시험관에서 안티센스 RNA를 합성하는 한 예는 RNA 폴리머라제를 이용하는 것이다.

[0036] 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 하는 한가지 예는 인식부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 것이다. 이런 안티센스 RNA는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다.

[0037] 본 발명에서 용어, "siRNA란 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 표적유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 넉다운 방법으로서 또는, 유전자치료(gene therapy)의 방법으로 제공된다.

[0038] siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 더욱 바람직하게는 20 내지 70 염기이다. siRNA 말단 구조는 표적유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt)말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3 말단 돌출한 구조와 5 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다. 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다. 예를 들어, 염기 수로는 1 내지 8 염기 , 바람직하게는 2 내지 6 염기로 할 수 있다. 본 명세서에서 siRNA의 전장은, 중앙의 이중사슬 부분의 길이와 양 말단의 단일사슬 돌출을 구성하는 길이의 합으로 나타내었다. 또한, siRNA는 표적유전자의 발현억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 예를 들어, 한 쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA분자 또는 인공의 RNA분자)를 포함할 수 있다. siRNA 말단구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중사슬 RNA의 일방의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스템 루프형 구조일 수도 있다. 링커의 길이는 스템 부분의 쌍을 이루는 데 지장이 없는 길이면 특별히 한정되지 않는다.

[0039] 본 발명에서 용어, 'shRNA'는 siRNA의 고가의 생합성 비용, 낮은 세포 형질감염 효율로 인한 RNA 간섭 효과의 단시간 유지 등의 단점을 극복하기 위한 것으로 RNA 중합효소 Ⅲ의 프로모터로부터 아데노바이러스, 렌티 바이러스 및 플라스미드 발현 벡터 시스템을 이용하여 이를 세포 내로 도입하여 발현시킬 수 있으며, 이러한 shRNA는 세포 내에 존재하는 siRNA 프로세싱 효소(Dicer or Rnase Ⅲ)에 의해 정확한 구조를 갖는 siRNA로 전환되어 목적 유전자의 사일런싱을 유도함이 널리 알려져 있다.

[0040] 본 발명에서 용어, 항체란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 IL-34를 특이적으로 인지하는 항체를 의미하며, 다클론 항체 및 단클론 항체를 모두 포함한다. 항체의 생산은 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다.

[0041] 다클론 항체는 상기한 IL-34 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득

하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 제조 가능하다.

[0042] 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 융합 방법(fusion method)(Kohler 및 Milstein (1976) European Jounral of Immunology 6:511-519 참조), 재조합 DNA 방법(미국특허 제4,816,567호) 또는 파지 항체 라이브러리(Clackson et al, Nature, 352, 624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222, 58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조될 수 있다.

[0043] 본 발명의 IL-34 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 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')2 및 Fv 등이 있다.

[0044] 본 발명의 IL-34 항체는 비만 진단에 사용될 뿐만 아니라, 치료에도 사용될 수 있다. 치료용 항체로 사용될 경우, 항체는 기존의 치료제와 직접 또는 링커 등을 통하여 간접적으로 커플링(예를 들어, 공유결합)시킬 수 있다.

[0045] 항체는 그 자체 또는 항체를 포함하는 조성물로 투여될 수 있다. 치료용 조성물의 경우 투여 방식에 따라 허용 가능한 담체를 포함하여 적절한 제제로 제조된다. 투여 방식에 적합한 제제는 공지되어 있고, 전형적으로 막을 통과한 이동을 용이하게 하는 계면활성제를 포함한다. 이러한 계면활성제는 스테로이드에서 유도된 것이거나 N-[1-(2,3-디올레오일)프로필-N,N,N-트리메틸암모늄클로라이드(DOTMA) 등의 양이온성 지질, 또는 콜레스테롤 헤미숙시네이트, 포스파티딜 글리세롤 등의 각종 화합물 등이 있다.

[0046] 본 발명의 항체를 포함하는 조성물은 비만 및 인슐린 저항성 당뇨병을 치료하기 위하여 약학적으로 효과적인 양으로 투여될 수 있다. 약학 조성물은 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 항체를 포함하는 조성물은 비경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 및 비강 내, 및 국부적 면역억제치료를 위해 필요하다면 병변 내 투여를 포함하는 적합한 방법에 의해 투여된다. 비경구 주입에는 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하투여가 포함된다. 제제의 pH는 항체 안정성(화학적 및 물리적 안정성)의 균형을 맞추고 투여되는 환자에게 적절하도록 하는데 일반적으로, pH 4와 pH 8 범위이다. 그 외에도 경피 투여 및 경구 투여 등의 투여를 위한 다른 기술들을 적절하게 변형시켜 이용하여, 적당한 제제를 고안할 수 있다. 전형적인 투여량 수준은 표준 임상적 기술을 사용하여 최적화할 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 항체를 암호화하는 핵산의 형태로 투여되어 세포내에서 항체가 생성되도록 할 수 있다(WO96/07321).

[0047] 본 발명의 안티센스 뉴클레오티드, shRNA, siRNA를 포함하는 약제학적 조성물은 환자의 비만 또는 인슐린 저항성 당뇨병을 치료하기 위하여 추가의 물질을 포함할 수 있으며, 또한 siRNA 또는 안티센스 뉴클레오티드 분자의 유입을 촉진시키는 제제 예를 들어, 리포좀 (미국특허 제4,897,355호, 제4,394,448호, 제4,235,871호, 제4,231,877호, 제4,224,179호, 제4,753,788호, 제4,673,567호, 제4,247,411호, 제4,814,270)을 이용하거나 콜레스테롤, 콜레이트 및 데옥시콜산을 비롯한 다수의 스테롤류중 1종의 친유성 담체와 함께 배합할 수도 있다. 또한, 안티센스 뉴클레오티드은 세포에 의해 흡수되는 펩티드에 접합시킬 수도 있다. 유용한 펩타이드의 예로는 펩타이드 호르몬, 항원 또는 항체 및 펩타이드 독소 등이 있다(Haralambid et al, WO 8903849; Lebleu et al, EP 0263740).

[0048] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 투여될 수 있으며, 경구 투여시에는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릴시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다.

[0049] 본 발명의 약제학적 조성물에 함유되는 IL-34의 mRNA에 특이적인 siRNA 또는 안티센스 뉴클레오티드의 유효 투여량의 범위는 성별, 중증도, 연령, 투여 방법, 표적 세포, 발현 수준 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0050] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 경구적으로 또는 정맥내, 피하, 비강내 또는 복강내 등에 비경구적으로 사람과 동물에게 투여된다. 비경구적 투여는 피하주사, 근육내 주사 및 정맥주사와 같은 주사법 및 점적법을 포함한다. 이외의 본 발명 약제학적 조성물은 각종 제형의 형태로 통용되는 기법에 따라 제조할 수 있다.

[0051] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 본 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0052] **<실시예 1>**

[0053] **환자군의 설정과 환자군 간의 임상적 특성 및 신진대사 특성의 비교**

[0054] 1-1. 환자군 설정

[0055] 본 발명을 위한 환자군은 당뇨 질환이 없는 19명의 비만 여성(BMI=30), 제2형 당뇨로 진단된 9명의 비만 여성, 27명의 정상 체중을 가진 여성(18.5<BMI=25)으로 구성되었다. 모든 비만 환자는 인하대학교 병원 비만 센터(한국 인천시)에서 복강경 위우회술(RYGB)을 시행하였고, 수술 4일 전 입원하여 일상적인 신체 검사, 금식 후의 체계적인 생화학 분석 및 복부 전산화 단층 촬영(CT)을 실시하였다. 서울 아산 병원의 산부인과(한국 서울시)에서 양성 조건(benign condition)을 위해 선택 복부 수술(elective abdominal surgery)을 받은 정상 체중의 여성들을 대조군으로 설정하였다. 임신, 수유, 악성 종양, 중증의 간 또는 신장 질환과 같이 비만을 유발하는 2차 요인을 가지고 있는 여성들은 본 발명을 위한 실험에서 배제하였다. 본 발명에 관한 실험을 위해 환자 등록시 모든 환자로부터 서면 동의서를 받았고, 본 발명을 위한 연구는 서울 아산 병원 및 인하대학교 병원의 연구 윤리 심의위원회(the institutional review boards)의 승인 하에 진행되었으며, 인간 지원자의 윤리적 사용에 관한 제반 제도적 규제를 준수하였다. 각 환자는 혈압(BP)과 신체 계측을 실시하였고, BMI는 체중(kg)을 키(m)의 제곱으로 나누어 계산하였다(kg/m^2).

[0056] 1-2. 복부 지방 분포 측정

[0057] 복부 지방 분포는 CT를 이용하여 측정하였는데, 총 복부 지방 조직(TAT), 내장지방조직(VAT), 피하지방조직(SAT)은 L4, L5 척추 디스크 공간을 중심으로 한 단면 스캔을 이용하여 평가하였다. 또한, 내장 비만의 지표인 내장지방조직(VAT) 대 피하지방조직(SAT)의 비율(VSR)을 계산하였다.

[0058] 1-3. 신진대사 계수 측정

[0059] 채혈 3일 전부터 당뇨병과 고혈압 약물을 중단하고, 12시간 단식 후 혈액을 수득하였으며, 수득한 혈액으로부터 혈장과 혈청을 즉시 원심분리하였다. 이후 혈장 콜레스테롤, 포도당, 인슐린 농도를 측정하였다. 또한, 인슐린 저항성 지표의 항상성 모형 평가(HOMA-IR)를 산출하였다. 고감도 C-반응성 단백질(hsCRP)을 Roche/Hitachi cobas c702 system을 이용하여 면역탁도계 분석에 의해 측정하였다. 아디포넥틱(AdipoGen, Incheon, Korea), 렙틴(R&D Systems, Abingdon, Oxfordshire, UK)의 혈청 농도를 제조자 방식에 따라 상업화된 효소-결합 면역분석 키트를 이용하여 측정하였다.

[0060] 1-4. 환자군 간의 임상적 특성 및 신진대사 특성 비교

[0061] 비당뇨성 비만, 제2형 당뇨성 비만 및 정상 체중 대조군의 임상적 특성을 하기 표 1에 나타내었고, 신진대사 특성을 하기 표 2에 나타내었다. 하기 표에서 볼 수 있듯이, 비당뇨성 비만군은 제2형 당뇨성 비만군 및 정상 체중 대조군에 비해 평균 연령이 더 어린 것으로 나타났으나, BMI는 훨씬 높은 것으로 나타났다. 또한, 정상 체중 대조군에 비하여 비만 환자들은 현저히 높은 혈압 및 HOMA-IR 수치를 나타내었고, 중성지방(triglyceride), hsCRP, 렙틴(leptin)의 순환 농도도 높은 것으로 나타났으며, 아디포넥틴(adiponectin)의 혈청 수준은 현저히 낮은 것으로 나타났다. 복부 CT는 또한, 대조군에 비해 비만 환자에게서 훨씬 높은 VAT, SAT, TAT 지역을 나타내었으나, VSR은 제2형 당뇨성 비만 환자군에서만 높게 나타났다.

표 1

	Control	Obesity	Obesity with diabetes
n	27	19	9
Menopause	2	1	1
Fatty liver	0	14	0
Gynecological surgery patients			
Myoma	12		
Teratoma	5		
Cystadenoma	5		
Others	5		
Duration of diabetes			
2–9 y			3
≥ 10 y			6
Receiving treatment			
Hypertension	0	1	4
Beta-receptor blocker			1
Angiotensin receptor blocker			4
Calcium channel blocker			1
Diabetes	0	0	9
Metformin			4
Sulfonamides			2
Insulin			2
Glucosidase inhibitor			1
Dyslipidemia	0	0	2
Statins	0	0	2

[0062]

표 2

	Control	Obesity	Obesity with diabetes
n	27	19	9
Age (y)	39.8 ± 2.1	32.5 ± 2.0 *	44.3 ± 2.9 #
BMI (kg/m^2)	22.3 ± 0.4	39.7 ± 1.3 *	32.9 ± 0.9 *,#
Systolic BP (mmHg)	115.3 ± 3.4	142.2 ± 3.8 *	136.3 ± 5.3 *
Diastolic BP (mmHg)	73.6 ± 2.5	84.1 ± 2.1 *	84.1 ± 3.0 *
Glucose (mg/dL)	99.8 ± 3.4	98.1 ± 3.5	212.4 ± 16.0 *,#
Insulin (μU/mL)	6.2 ± 0.9	24.1 ± 2.6 *	21.7 ± 4.9 *
HOMA-IR	1.5 ± 0.2	5.9 ± 0.7 *	11.8 ± 2.9 *
Total cholesterol (mg/dL)	184.3 ± 7.0	178.1 ± 7.4	201.1 ± 18.1
HDL-cholesterol (mg/dL)	43.4 ± 2.3	48.4 ± 2.1	38.4 ± 3.2
LDL-cholesterol (mg/dL)	99.0 ± 6.3	113.8 ± 6.1	127.8 ± 12.3
Triglyceride (mg/dL)	72.7 ± 5.7	112.5 ± 10.9 *	201.1 ± 42.7 *,#
hsCRP (mg/dL)	0.17 ± 0.07	0.54 ± 0.09 *	0.38 ± 0.11 *
Leptin (ng/mL)	4.48 ± 0.53	37.73 ± 4.29 *	18.10 ± 3.71 *,#
Adiponectin (μg/mL)	7.17 ± 1.06	3.14 ± 0.47 *	4.58 ± 1.86 *
Abdominal CT			
TAT area (cm^2)	211.7 ± 23.4	679.7 ± 35.5 *	527.6 ± 19.3 *,#
VAT area (cm^2)	58.6 ± 9.0	152.6 ± 14.2 *	211.9 ± 13.0 *,#
SAT area (cm^2)	152.8 ± 17.7	530.3 ± 32.0 *	315.7 ± 24.1 *
VSR	0.40 ± 0.06	0.30 ± 0.04	0.70 ± 0.07 #

[0063]

[0064] **<실시예 2>**

[0065] **비만 환자군에서 혈청 IL-34의 증가**

[0066] 비만 환자군과 정상 체중 대조군 사이의 혈청내 IL-34 수치를 비교해 보고자 채혈 3일 전부터 당뇨병과 고혈압 약물을 중단하고, 12시간 단식 후 혈액을 수득하였으며, 수득한 혈액으로부터 혈장과 혈청을 즉시 원심분리하고, IL-34(Wuhan EIAab Science Co., Ltd, Wuhan, China)의 혈청 농도를 제조자 방식에 따라 상업화된 효소-결합 면역분석 키트를 이용하여 측정하였다. IL-34의 분석 감도는 3.9pg/ml, 변이의 분석내 계수 및 분석간 계수는 각각 3.3%와 5.5%로 나타났다.

[0067] 비당뇨성 비만군(n=19), 제2형 당뇨성 비만군(n=9), 정상 체중 대조군(n=27)에서 혈청 내 IL-34 수치를 비교한 결과,혈청 내 IL-34는 대조군과 비교하여 비당뇨성 비만군에서 약 25% 이상 차이가 나는 것으로 나타났다(0.23±0.03 ng/mL *vs.* 0.12±0.03 ng/mL, respectively; $p < 0.01$; 도 1 참조). 혈청 내 IL-34는 당뇨성 비만 환자군에서도 다소 높은 것으로 확인되었으나(0.15±0.03 ng/mL), 통계적으로 유의한 정도는 아닌 것으로 나타났다. 이는 본 발명의 당뇨성 비만 환자군이 비당뇨성 비만 환자군에 비해 현저히 낮은 평균 BMI 수치를 나타내기 때문일 수 있을 것이다(32.9±0.9 kg/m^2 *vs.* 39.7±0.3 kg/m^2; $P < 0.01$; 상기 표 2 참조). 한편, 혈청 내 IL-34(0.15±0.03 ng/mL) 수치는 비만이 아닌 당뇨 환자군(n = 10; BMI = 25.6±0.4 kg/m^2; 데이터 미도시) 및 대조군 사이에서 큰 차이는 없는 것으로 나타났다. 이를 통하여 본 발명자들은 혈청 내 IL-34 수치가 혈당증 보다는 비만증과 밀접한 상관관계가 있음을 알 수 있었다.

[0068] **<실시예 3>**

[0069] **혈청 IL-34의 증가와 신진대사 지표와의 연관성**

[0070] 혈청 내 IL-34와 신진대사 지표와의 연관성을 확인하고자 전체 연구 집단(n=55)을 분석하였다. 그 결과, 하기 표 3에서 볼 수 있듯이, 혈청 내 IL-34 수치는 BMI, 수축성 혈압, 공복 혈장 인슐린, HOMA-IR, 혈청 렙틴(leptin), hsCRP, TAT, VAT, SAT와 같은 비만증 지표 및 신진대사 바이오마커와 양의 상관관계(positive correlation)가 있는 것으로 나타났다.

표 3

	r	*P*
BMI	0.372	0.007
Systolic BP	0.275	0.049
Diastolic BP	0.178	0.206
Glucose	-0.030	0.833
Insulin	0.481	<0.001
HOMA-IR	0.421	0.002
Total cholesterol	-0.090	0.525
HDL-cholesterol	0.031	0.829
LDL-cholesterol	0.001	0.994
Triglyceride	0.110	0.442
Leptin	0.376	0.006
Adiponectin	-0.091	0.516
hsCRP	0.540	<0.001
Abdominal CT		
TAT area	0.360	0.009
VAT area	0.362	0.030
SAT area	0.498	0.002
VSR	-0.057	0.742

[0071]

[0072] **<실시예 4>**

[0073] **지방조직에서의 IL-34의 발현**

[0074] 상기 실시예 2와 실시예 3을 통하여 혈청 내 IL-34가 비만과 상관관계가 있음을 확인할 수 있었는데, 이에 본 발명자들은 real-time RT-PCR을 이용하여 환자군의 내장지방조직(VAT) 및 피하지방조직(SAT)에서 IL-34의 발현을 추가로 조사해보았다.

[0075] 4-1. 지방 조직 샘플링

[0076] 수술 과정에서 2~5g의 내장지방조직(VAT)와 피하지방조직(SAT)을 절개하였다. 내장지방조직(VAT)은 대망막(epiploon)의 말단에서 수득하였고, 피하지방조직(SAT)은 하복부의 수술 절개 부위에서 수득하였다. 샘플은 ice-cold 0.9% (w/v) 식염수에 넣고, 액체 질소로 동결한 후, 이후 분석을 위해 -80℃에서 보관하였다.

[0077] 4-2. 지방세포와 기질/혈관 세포의 분획

[0078] 지방 조직의 지방세포(adipocyte)와 기질/혈관(stroma/vascular, SV) 세포 분획에서 IL-34 mRNA 발현을 확인해 보고자, 양성 부인과 수술을 받은 정상 체중 여성(n=10, BMI=22.5±0.60, age=45.3±2.65년)과 위우회술을 받은 비만 여성(n=6, BMI=40.3±2.32, age=34.5±4.13년)을 모집하여, 수술과정에서 10~15g의 내장지방조직(VAT)을 제거하였다. 지방세포와 기질/혈관 세포로 분획할 수 있는 충분한 양을 수득할 수 있는 내장지방조직(VAT)을 사용하였으며, 신선한 지방 조직을 Krebs-Ringer-Henseleit (KRH) 버퍼로 세척하고, 1%(w/v) BSA를 함유하는 KRH 버퍼 상에서 1 mg/mL collagenase (Worthington, Freehold, NJ)를 이용하여 37℃에서 40~60분간 반응하였다. 이후 1 mg/mL collagenase (Worthington, Freehold, NJ)로 분해된 부분을 분해되지 않은 부분과 100 ㎛ nylon mesh (Falcon, Franklin Lakes, NJ)를 이용하여 필터링하고, 부유하는 지방세포 분획을 수득하여 KRH 버퍼로 3번 세척하였다. collagenase로 반응 후 부유하지 않는 세포를 1000rpm에서 15분간 원심분리하였고, 이를 기질/혈관 세포 분획으로 수집하였다. 이후 지방세포와 기질/혈관 세포 분획을 mRNA 추출을 위해 사용하였다.

[0079] 4-3. mRNA 분리와 real-time qRT-PCR

[0080] 우선, 정상 체중 대조군(n=27), 비당뇨성 비만군(n=19), 제2형 당뇨성 비만군(n=9)에서 내장지방조직(VAT)과 피하지방조직(SAT)을 채취하여 IL-34의 mRNA 양을 확인하였으며, 이를 AU(arbitrary unit)으로 나타내었다. β-actin은 reference gene으로 사용되었다(* $p < 0.05$ *vs.* SAT).

[0081] 또한, 양성 산부인과 수술을 받은 정상 체중 대조군(n = 10; BMI = 22.5±0.60; age = 45.3±2.65 years)과 위우회술을 받은 비만군(n = 6; BMI = 40.3±2.32; age = 34.5±4.13 years)에서 수술 도중 제거된 내장지방조직(VAT)을 collagenase로 반응시켜 부유하는 지방세포와 부유하지 않는 기질/혈관 세포로 분획한 뒤, 각 분획의 IL-34의 mRNA 양을 확인하였다. IPO8은 reference gene으로 사용되었다.

[0082] 지방 조직 내 IL-34 mRNA는 real-time RT-PCR을 이용하여 분석하였는데, 이를 위하여 지방 조직로부터 총 RNA를 제조자 방식에 따라 TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA; 1 mL/100 mg tissue)을 이용하여 수득하였다. RNA 순도를 NanoDrop spectrophotometer로 확인한 후, Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen)와 oligo-dT primers를 이용하여 cDNA로 역전사하였다. 증폭 반응은 25 킄 aliquots와 SYBR Green QPCR master mix kit (Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 Roche Light Cycler system (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)으로 실험하였고, 본 발명에 사용된 프라이머는 하기와 같다. human IL-34 5'-tacaggagccgacttcag-3'(forward), 5'-ctcaccaagacccacaga-3'(reverse); b-actin 5'-gacggggtcacccacac-3'(forward), 5'gtggtggtgaagctgtagcc-3'(reverse); importin 8 (IPO8) 5'-gaggaggaagatgatgactgg-3'(forward), 5'-cgactctgcacagttatcagagc-3'(reverse).

[0083] 상기와 같은 실험 결과, IL-34 mRNA는 두 지방 조직에서 모두 발현되었으나, 피하지방조직(SAT)에 비하여 내장지방조직(VAT)에서 두 배 많은 양의 mRNA가 발현되는 것으로 나타났다(도 2A 참조). 그러나, 두 지방 조직에서 IL-34 mRNA 수치는 강한 상관관계를 나타내었다($r = 0.413$; $p = 0.002$; n = 55). 한편, 본 발명자들은 세 실험군 사이의 지방 조직에서 IL-34 mRNA 수치의 현저한 차이는 확인할 수 없었다. 또한, 지방 조직과 혈청 내 IL-34 수치와의 현저한 상관관계도 확인할 수 없었다. 지방 조직 샘플로부터 지방세포와 기질/혈액 세포를 분획하였을 때, 이들 두 분획 간에 비교할 만한 수치로 IL-34 mRNA가 발현되는 것으로 나타났다(도 2B 참조). 그러나, 비만 환자와 정상 체중의 대조군으로부터 얻은 지방 조직의 IL-34 mRNA 수치는 별다른 차이를 나타내지 않은 것으로 나타났다.

[0084] **<실시예 5>**

[0085] **분화된 인간 지방세포에서 염증성 사이토카인에 의한 IL-34의 발현 및 분비**

[0086] 5-1. 인간 지방전구세포의 분리와 분화

[0087] 인간 지방조직을 유방 재건 수술 중 횡단 직근 복부 피부근육판으로부터 폐기된 피하 조직으로부터 얻었고, 모든 실험방법은 아산 생명과학 연구소(한국 서울시)의 윤리 위원회의 승인 및 모든 환자들의 서면 동의 하에 실시되었다. 인간 지방전구세포의 분리는 지방조직을 1% collagenase가 포함된 a-MEM에 넣고 잘게 잘라준 후 37도 수조에서 50분 정도 흔들어 주며 조직을 분해한 후 100 마이크론 나일론 세포망에 조직을 넣어 걸러낸 후 원심분리를 통해 지방전구세포들을 모았다. 이 후 적혈구 제거 후 다시 원심분리하여 얻은 지방전구세포를 지방세포

분화배지(10% 우혈청, 5㎍/㎖ 인슐린, 0.25μM dexamethasone, 0.5mM methylisobutylxanthine(IBMX), 33 μM biotin, 17μM pantothenate, 10μM rosiglitazone이 포함된 α-MEM 배지에서 2주간 배양하여 지방세포로 분화하였다.

[0088] 5-2. 인간 혈액 단핵세포-유도 대식세포의 준비

[0089] 인간 말초 혈액 단핵세포(PBMCs)는 건강한 전혈 헌혈자로부터 자발적으로 수득한 후 Ficoll gradients (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)로 원심분리하고, 단핵세포 층을 회수하여 대식세포 분화 및 성장인자인 인간 M-CSF를 100 ng/ml의 농도로 α-MEM 배지에서 24시간 배양하여 대식세포를 분화하였다.

[0090] 대식세포-조건 배지(CM)는 LPS(1ng/ml)로 24시간 처리 유무에 따라 배양한 대식세포로부터 상층액을 수집하여 준비하였다. 이 배지는 추후 분화된 인간 지방세포에서 IL-34의 발현에 미치는 영향을 평가하는데 사용되었다.

[0091] 5-3. 인간 지방전구세포의 지방세포 분화에 따른 IL-34 발현 및 분비

[0092] 피하지방조직(SAT)에서 분리된 지방전구세포를 지방세포로 분화하는 과정에서 , real-time PCR을 통해 IL-34 mRNA 양을 측정한 후, 이를 AU(arbitrary unit)으로 나타내었다. 이 때, IPO8은 reference gene으로 사용되었다. 그 결과, 인간 지방 전구세포의 IL-34 mRNA를 확인해 본 결과, 지방세포 형성과정에서 그 수치는 3배 가까이 증가하는 것으로 나타났다(도 3A 참조).

[0093] 한편, 대식세포 침윤이 비만 지방 조직의 주요한 특성이기 때문에, 본 발명자들은 대식세포에서 분비된 인자가 지방세포에서 IL-34의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인해 보고자 하였다. 이를 위하여 인간의 분화된 지방세포를 혈액 단핵세포에서 분화된 대식세포를 배양하며 얻은 CM(conditioned media)을 포함하거나 포함하지 않는 조건에서 각각 24시간 동안 배양하고 이에 따른 IL-34 mRNA 유도 효과를 관찰하였다. 그 결과, IL-34 mRNA는 CM의 존재 하에서 그 양이 현저히 증가하였고, 특히 LPS-활성화된 CM에서는 더욱 그 양이 증가하는 것으로 나타났다(도 3B 참조, $*p < 0.05$ *vs.* control).

[0094] 이후, 본 발명자들은 TNFα와 IL-1β비만 지방 조직에서 대식세포에 의해 분비되는 전형적인 사이토카인)가 지방세포에서 IL-34의 발현 및 분비에 미치는 영향을 추가로 확인해 보고자, TNFα(10 ng/mL) 또는 IL-1β(10 ng/mL)를 24시간 처리 후 분화된 인간 지방세포에서의 IL-34 mRNA 유도 효과를 RT-PCR을 이용하여 관찰하고, 배양 배지 상의 IL-34 단백질 양을 ELISA를 이용하여 관찰하였다. 그 결과, IL-34 mRNA의 발현은 TNFα와 IL-1β처리에 따라 각각 24배, 6배 증가하였고(도 3C 참조), IL-34 단백질의 분비도 TNFα와 IL-1β처리에 따라 각각 5배, 3배 증가하는 것으로 나타났다(도 3D 참조).

[0095] **<실시예 6>**

[0096] **인간 지방세포에서 IL-34의 효과**

[0097] 지방 조직에 미치는 IL-34의 영향을 확인해 보고자, 인슐린에 의한 포도당 수송에 IL-34가 미치는 영향을 2-DG 흡수율로 확인하고, 인간 피하지방조직(SAT)에서 분리된 지방전구세포를 지방세포로 분화시킨 후, 인간 재조합 IL-34 처리에 따른 중성지방(triglyceride)의 축적을 oil red-O 염색으로 관찰해 보았다.

[0098] 6-1. DG 흡수 효과

[0099] 인간 지방전구세포를 24 웰 배양용 플레이트에 분주하고 분화시킨 후, 완전히 분화된 지방세포에서 2-DG(2-Deoxyglucose) 흡수를 측정하였다. 이를 위하여 혈청이 제거된 DMEM 배지에서 지방세포를 밤새도록 배양한 후, 24웰 플레이트에 분주하여 0.5mM 포도당과 2% BSA를 포함하는 Krebs-Ringer bicarbonate 버퍼(KRB: 118mM NaCl, 4.7mM KCl, 1.3mM $CaCl_2$, 1.2mM $MgSO_4$, 1.2mM NaH_2PO_4, 25mM $NaHCO_3$, pH 7.4)를 이용하여 재조합 인간 (rh) IL-34 (R&D Systems, Minneapolis, MN)를 24시간 동안 처리하고 5% CO_2를 포함하는 습식 배양기에서 배양하였다. 2-DG 흡수 분석 30분 전 인슐린(100nM)을 추가하였다. 인슐린 자극된 또는 기본적인 2-DG 흡수에 대한 삼투 효과를 확인하기 위하여, 표준 KRB에 59mM까지 NaCl의 농도가 감소하도록 hypo-, iso-, hyper-osmotic modified media를 준비하고, no sucrose(hypo-osmotic), 118mM sucrose(iso-osmotic) 및 384 mM

sucrose(hyper-osmotic)로 보충된 배지를 제조하였다. 삼투압 측정은 Osmmette A automatic osmometer(Precision Systems Inc., Natick, MA)을 이용하여 어는점 내림으로 측정하였고, 각각 174±6mOsm/kg H_2O, 304±5mOsm/kg H_2O, 578±29mOsm/kg H_2O로 나타났다. 실험 결과는 0 ng/mL IL-34로 전처리된 세포에서 측정된 2DG 흡수에 대한 흡수 비율로 표시하였다(*p < 0.05 *vs.* 0 ng/mL).

[0100] 그 결과, 인간 재조합 IL-34를 처리하여도 분화된 인간 지방세포의 2-DG 흡수율은 변화하지 않았으나, 100ng/mL의 IL-34는 인슐린에 의한 2-DG 흡수를 현저히 저해하는 것으로 나타났다(도 4A 참조). 이는 혈청 내 IL-34와 HOMA-IR과의 in vivo 상의 현저한 연관관계와도 일치하는 결과이다(데이터 미도시).

표 4

Multiple regression analysis using serum IL-34 concentration as the dependent variable and BMI, HOMA-IR, serum leptin and hsCRP concentrations as the independent variables

	Unstandardized coefficients		Standardized		Adjusted R^2
	B	S.E.	β	p-value	(p-value)
BMI	-0.001	0.010	-0.023	0.927	0.226
HOMA-IR	-0.059	0.157	-0.079	0.710	(0.006)
Leptin	0.088	0.189	0.117	0.643	
hsCRP	0.329	0.120	0.535	0.009	

n = 55

Abbreviations: BMI, body mass index; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; hsCRP, high-sensitive C-reactive protein

[0101]

[0102] 6-2. Oil red-O 염색

[0103] 인간으로부터 분리된 지방전구세포의 분화과정 중 인간 재조합 IL-34이 지방세포 형성에 미치는 영향을 확인해 보고자 하였다. 이를 위하여 인간 피하지방조직(SAT)에서 분리된 지방전구세포를 지방세포로 분화시키고, 분화된 인간 지방세포에서 중성지방의 축적을 oil red-O(Sigma-Aldrich [Include location])로 확인해 보았다. 즉, 99% 이소프로판올에 1% oil red-O 용액을 만든 후(stock solution), 이 중 60ml을 40ml의 1% 덱스트린에 희석하고, 밤새 둔 후 필터링 하였다. 이를 이용하여 지방세포를 10분간 염색하고, 60% 이소프로판올로 헹군 뒤, 물로 다시 한 번 세척하였다. 핵은 0.1% acid alum hematoxylin(e.g., Mayer' undiluted or Lillie's diluted 1 to 4 in 2% acetic acid or Ehrlich' diluted 1 to 5 in 2% acetic acid)으로 약 5분간 염색한 후, 0.3% sodium borate을 넣고, 이후 tap water에 넣어 푸른색으로 염색하였다. 이후, 지방세포를 마운팅 솔루션을 이용하여 마운팅하였다. 이 후, 염색은 이소프로판올로 반응하여 용출시키고, 강도는 마이크로 플레이트 리더를 이용하여 500nm의 흡광도로 측정하였다.

[0104] 그 결과 인간 재조합 IL-34는 그 처리량에 비례해서 지방세포 형성 과정에서 중성지방(triglyceride)의 축적을 증가시키는 것으로 나타났고, 특히 100ng/mL을 처리하였을 때 통계적으로 유의한 결과를 나타내었다(도 4B 참조). 한편, 인간 재조합 IL-34는 분리된 인간 지방전구세포의 증식에는 어떠한 영향도 미치지 않았다(데이터 미도시). 한편, 인간 재조합 IL-34 또는 항-IL-34 항체의 첨가는 지방세포 CM- 또는 TNFα-자극된 인간 PBMC의 이동에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(데이터 미도시).

[0105] **<실시예 7>**

[0106] **위우회술에 의한 체중 감소와 혈청 내 IL-34의 감소**

[0107] 지방세포 형성 과정이 IL-34와 밀접하게 연관되어 있음을 상기 실시예를 통하여 알 수 있었다. 따라서, 본 발명자들은 위우회술에 따른 비만 환자에서 혈청 내 IL-34의 농도가 체중 감소와 신진대사에 미치는 영향을 확인해 보고자 하였다. 26명의 고도 비만 환자의 위우회술을 실시하고(male:female = 6:20; mean age = 37.5±2.2 years; BMI = 38.1±1.4 kg/m^2), 혈청 내 IL-34의 농도와 신진대사 물질을 수술 직전 및 수술 후 5~9 개월(평균

7.2개월) 경과 후 확인해 보았다.

[0108] 그 결과, 몸무게와 다른 신진대사 물질들은 수술 후 현저한 변화를 나타내었는데, 특히 비만 환자의 위우회술에 따른 혈청 내 IL-34 0.22±0.02 ng/mL에서 0.11±0.02 ng/mL로 현저히 감소하였다(도 5A 참조). 또한, 수술 후 혈청 내 IL-34 수치 변화(IL-34 = serum IL-34 concentration after surgery - serum IL-34 concentration before surgery)는 BMI 및 혈청 내 hsCRP와도 유의한 양적인 상관관계(positive correlation)가 있음을 확인할 수 있었다(각각 (r = 0.534; p = 0.005) , (r = 0.534; p = 0.005) , 도 5B, 도 5C 참조).

[0109] **<실시예 8>**

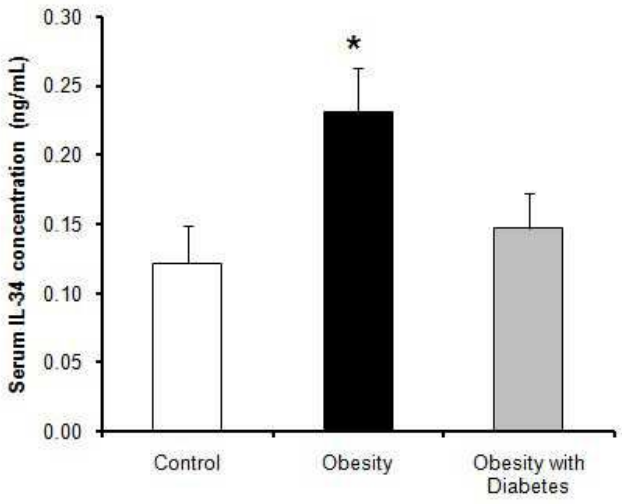
[0110] **통계분석**

[0111] 데이터는 평균켈E로 나타내었고, pair-wise group comparisons을 위해 student paired 또는 unpaired t test를 실시하였다. > 2 groups 일 때, ANOVA에 따른 Tukey test를 실시하였다. HOMA-IR 지표, 지방조직에서의 IL-34 mRNA 수치, 인슐린, 중성지방, 아디포넥틴, 렙틴, hsCRP 및 IL-34의 순환 수치와 같은 비정규 분포 자료는 정규 분포화하기 위하여 분석에 앞서 로그 전환하였다. 측정치 간의 상관계수는 Pearson's correlation을 이용하여 계산하였고, 모든 실험에 있어서 $P < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다. 모든 통계분석은 SPSS (version 19.0 for IBM; SPSS, Chicago, IL)를 이용하여 수행되었다.

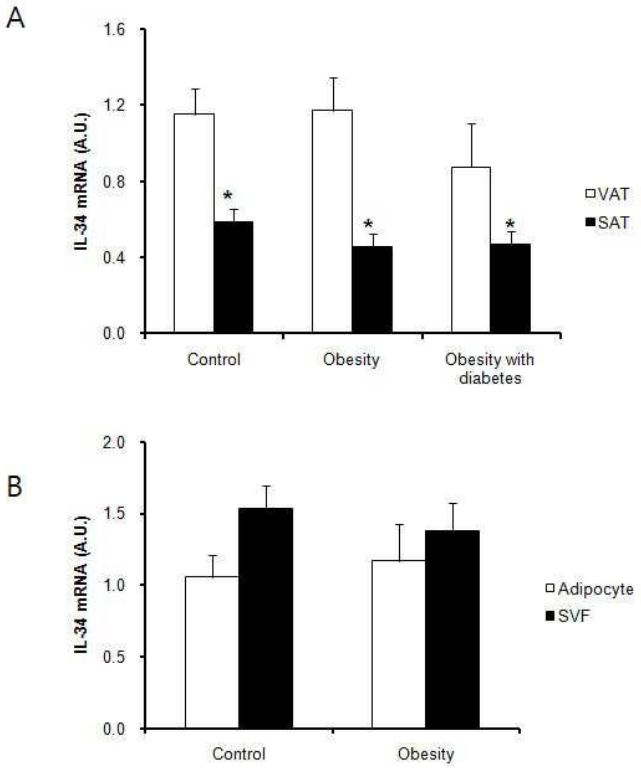
[0112] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

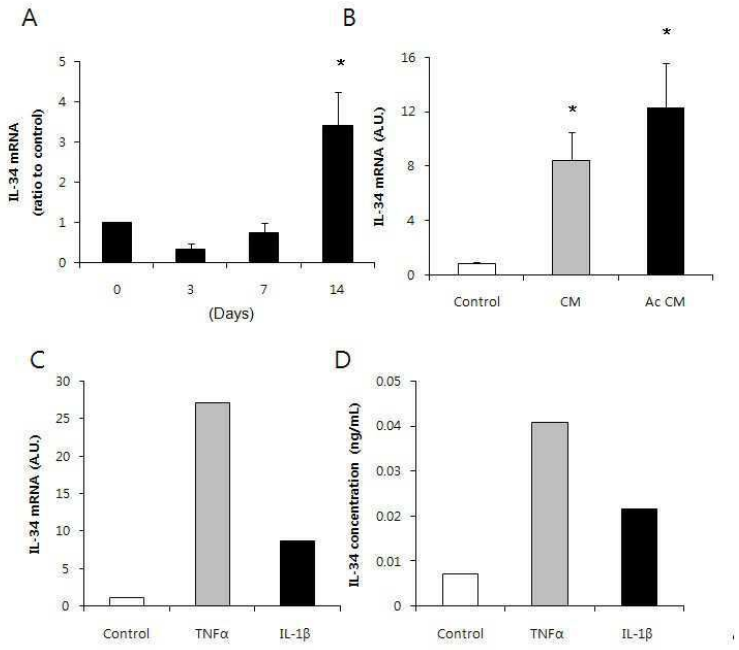
도면1



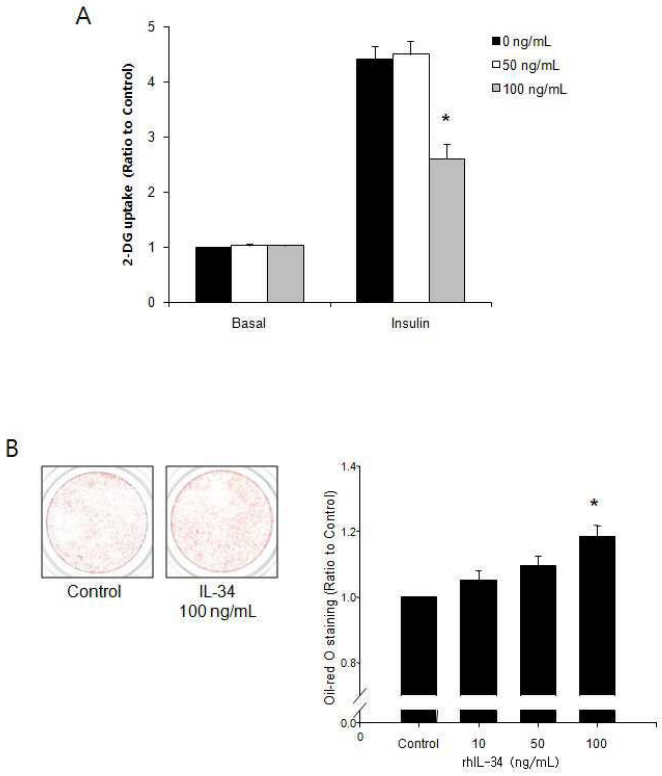
도면2


A
IL-34 mRNA (A.U.)
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
*
*
*
Control
Obesity
Obesity with diabetes
VAT
SAT
B
IL-34 mRNA (A.U.)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Control
Obesity
Adipocyte
SVF

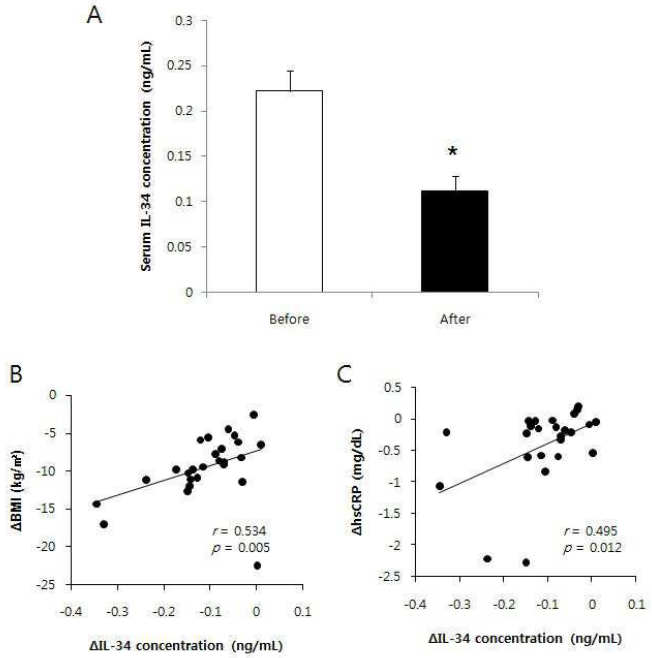
도면3


A
IL-34 mRNA (ratio to control)
5
4
3
2
1
0
*
0
3
7
14
(Days)
B
IL-34 mRNA (A.U.)
16
12
8
4
0
*
*
Control
CM
Ac CM
C
IL-34 mRNA (A.U.)
30
25
20
15
10
5
0
Control
TNFα
IL-1β
D
IL-34 concentration (ng/mL)
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
Control
TNFα
IL-1β

도면4


A
2-DG uptake (Ratio to Control)
0 ng/mL
50 ng/mL
100 ng/mL
*
Basal
Insulin
B
Control
IL-34
100 ng/mL
Oil-red O staining (Ratio to Control)
*
Control
10
50
100
rhIL-34 (ng/mL)

도면5


A
Serum IL-34 concentration (ng/mL)
*
Before
After
B
ΔBMI (kg/m²)
r = 0.534
p = 0.005
ΔIL-34 concentration (ng/mL)
C
ΔhsCRP (mg/dL)
r = 0.495
p = 0.012
ΔIL-34 concentration (ng/mL)