(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0026185
(43) 공개일자 2018년03월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
G01N 33/57484 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0113225
(22) 출원일자 2016년09월02일
심사청구일자 2016년09월02일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
김영주
서울특별시 양천구 목동서로 38, 120동 902호(목동, 목동신시가지아파트1단지)
유영아
경기도 용인시 기흥구 동백8로 103, 2704동 205호 (동백동, 백현마을주공7단지아파트)
권은진
경상북도 경주시 초당길43번길 23, 가동 1005호 (동천동, 동원아파트)
(74) 대리인
유미특허법인

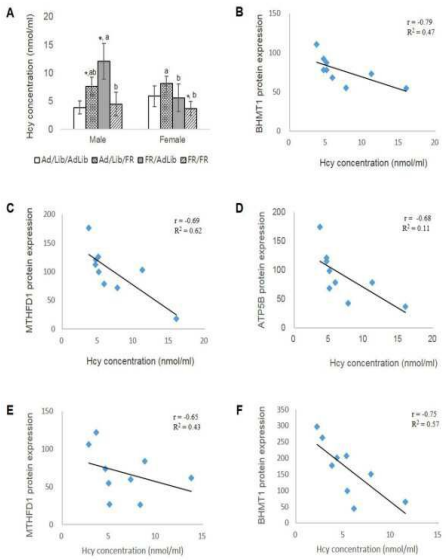
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **부당경량아 또는 저체중아에서의 고호모시스테인혈증 또는 이와 관련된 질환의 발병 위험성 예측 마커 및 이의 이용**

(57) 요 약

본 발명은 동물모델을 이용하여 임신 중 저식이를 급여한 모성의 저체중 자손에서 발견한 MTHFD1 및/또는 BHMT1를 이용하여 부당경량아 또는 저체중아가 성장 후 고호모시스테인혈증 또는 이와 관련된 질환의 발병 위험성을 예측하는 조성물, 키트 및 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
G01N 33/577 (2013.01)
G01N 33/6815 (2013.01)
G01N 2800/108 (2013.01)
G01N 2800/2821 (2013.01)
G01N 2800/2871 (2013.01)
G01N 2800/32 (2013.01)
G01N 2800/50 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013R1A1A2004833
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업(학술진흥)-일반연구자지원사업-기본연구
연구과제명 제대혈에서후생유전학적비만관련마커개발및코호트확립
기 여 율 1/1
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2013.06.01 ~ 2016.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

부당경량아 또는 저체중아로부터 분리된 시료 내 MTHFD1 및 BHMT1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 농도를 측정하는 단계를 포함하는,

부당경량아 또는 저체중아의 성장 후 고호모시스테인혈증 또는 이와 관련된 질환의 발병 위험성 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

부당경량아 또는 저체중아로부터 분리된 시료로부터 MTHFD1 및 BHMT1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 농도를 측정하는 단계, 및

상기 MTHFD1 및 BHMT1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 농도가 정상 신생아보다 낮을 경우, 성장 후 고호모시스테인혈증 또는 이와 관련된 질환의 발병 위험성이 있다고 예측하는 단계를 포함하는 것인, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 MTHFD1 및 BHMT1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 농도의 측정은 MTHFD1 및 BHMT1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커에 특이적인 항체를 이용하여 수행되는 것인, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 항체는 단클론항체 또는 다클론항체인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 부당경량아 또는 저체중아는 남아인 것인, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 고호모시스테인혈증 관련 질환은 뇌혈관질환, 심혈관질환, 말초정맥혈전증, 반복자연유산, 임신중 합병증, 골다공증, 신경관 결함, 암 및 알츠하이머 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질환인 것인, 방법.

청구항 7

MTHFD1 및 BHMT1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 농도를 측정하는 제제를 포함하는,

부당경량아 또는 저체중아의 성장 후 고호모시스테인혈증 또는 이와 관련된 질환의 발병 위험성 진단용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 MTHFD1 및 BHMT1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 농도를 측정하는 제제는 MTHFD1 및 BHMT1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상에 특이적인 항체인 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 고호모시스테인혈증 관련 질환은 뇌혈관질환, 심혈관질환, 말초정맥혈전증, 반복자연유산, 임신중 합병증, 골다공증, 신경관 결함, 암 및 알츠하이머 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질환인 것인, 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 항체는 단클론항체 또는 다클론항체인 조성물.

청구항 11

제7항 내지 제10항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는,

부당경량아 또는 저체중아의 성장 후 고호모시스테인혈증 또는 이와 관련된 질환의 발병 위험성 진단용 키트.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 고호모시스테인혈증 관련 질환은 뇌혈관질환, 심혈관질환, 말초정맥혈전증, 반복자연유산, 임신중 합병증, 골다공증, 신경관 결함, 암 및 알츠하이머 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질환인 것인, 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 동물모델을 이용하여 임신 중 저식이를 급여한 모성의 저체중 자손에서 발견한 MTHFD1 및/또는 BHMT1를 이용하여 부당경량아 또는 저체중아가 성장 후 고호모시스테인혈증 또는 이와 관련된 질환의 발병 위험성을 예측하는 조성물, 키트 및 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 임신 기간중의 모성 영양 섭취는 인간 및 동물에서 엄마, 태반 및 태아 사이에의 영양학적 및 호르몬적 상호작용을 통하여 태아 성장에 영향을 미친다. 구체적으로, 모성의 음식 섭취가 제한되어 최적화되지 않은 자궁 내 환경은 태아의 성장 제한(intrauterine growth restriction, IUGR)을 야기한다. 정상적인 식이-급여를 한 모성에 의해 보육된 IUGR 자손은 신속하게 따라잡기(catch-up) 성장을 나타내고, 이는 이후의 삶에서 대사 및 심혈관 질환에 대한 위험에 있어 중요한 역할을 하게 된다.

[0004] 종래, 본 발명자들은 임신기간 중 모성의 50% 음식 제한(food restriction, FR)을 하고 수유 중에 정상적인 식이를 한 경우의 래트 새끼들이 따라잡기(catch-up) 성장을 나타내고, 그 결과 자손의 성별에 따라 혈장 내 더 높은 트리글리세라이드 및 렙틴 수준을 갖는 비만 새끼가 되는 것을 확인하였다. 게다가 래트에서의 모성 음식 제한은 인슐린 저항성 및 임신성 고혈당을 야기하는 자성(雌性) 자손들의 첫 번째 세대에서 췌장 베타 세포의 양과 수를 감소시키게 된다. 모성 단백질 제한은 또한 래트 새끼들이 자라서 성체가 되었을 때 고혈압 및 혈관 부전을 유도한다. 양에서는, 모성 영양 제한이 신장 기능을 떨어지게하고 사구체 경화증(glomerulosclerosis)의 발생을 증가시키고 염증발현조절에 관여하는 단백질 발현에 이상이 생겨 신장 내 아폽토시스를 증가시키게 된다. 이러한 증가된 질환에 대한 감수성은 영양과 후성 유전학적 메커니즘 간의 연결관계에 의한 태아 프로그래밍 과정에서 설명된다.

[0005] 태반 및 태아 성장에서, 단일-탄소 대사(one-carbon metabolism)는 메티오닌 및 엽산 사이클에 깊게 연관되어 있고, 간의 중요한 대사적 기능에 해당된다. 이는 공통적인 메틸 공여자, S-아데노실메티오닌의(AdoMet)의 이용가능성을 변화시킬 수 있다. 이러한 경로에서, 상기 메틸공여자는 메티오닌에 대한 호모시스테인의 재메틸화에 영향을 끼친다. 단일-탄소 대사의 결여된 기능은 몇몇 분자적 또는 단백질의 변화에 영향을 미치고, 이는 세포 항상성을 위태롭게 할 수 있고, 그 결과, 인간 및 실험 동물들에서 몇몇 병적인 상태의 발현을 촉발시킬 수 있다. 손상된 단일-탄소 대사로부터 야기되는 고호모시스테인혈증은 특정 암, 심혈관 질환, 신경관 결함 및 알츠하이머 질환에 대한 위험인자이다. 그러나, IUGR자손의 간에서의 단일-탄소 대사와 관련된 변화에 관하여는 거

의 알려진 바가 없다.

[0006] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 모성의 식이, 스트레스 등으로 인하여 자궁내 부적합한 환경으로 태아의 성장이 저하되어 태어난 부당경량아 또는 저체중아 중에서 손상된 단일-탄소 대사로부터 야기되는 고호모시스테인혈증 관련 질환이 발생되기 이전의 상기 질환에 대한 발병 위험성을 시사하는 예측 표지자를 발굴하여 상기 질환의 예방, 경감 또는 조기 치료에 기여하고자 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은, MTHFD1 및 BHMT1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 농도를 측정하는 제제를 포함하는, 부당경량아(smallfordate infant) 또는 저체중아(low birth-weight infant)의 성장 후 고호모시스테인혈증 또는 이와 관련된 질환의 발병 위험성 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 하나의 목적은, 상기 조성물을 포함하는, 자손의 성장 후 고호모시스테인혈증 또는 이와 관련된 질환의 발병 위험성 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 하나의 목적은, 부당경량아 또는 저체중아로부터 분리된 시료 내 MTHFD1 및 BHMT1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 농도를 측정하는 단계를 포함하는, 부당경량아 또는 저체중아의 성장 후 고호모시스테인혈증 또는 이와 관련된 질환의 발병 위험성 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 일예로, 본 발명은 MTHFD1 및 BHMT1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 농도를 측정하는 제제를 포함하는, 부당경량아 또는 저체중아의 성장 후 고호모시스테인혈증 또는 이와 관련된 질환의 발병 위험성 진단용 조성물에 관한 것이다.

[0013] 본 발명에서는, MTHFD1 및 BHMT1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질은 임신 중 저식이를 섭취한 산모로부터 출생한 자손의, 바람직하게 간의 혈액중에서 높은 호모시스테인 농도를 유발하는 단일-탄소 대사와 관계된 단백질 마커임을 최초로 확인하였다. 이와 관련하여, BHMT는 베타인-호모시스테인 S-메틸트랜스퍼라제 1로, 콜린 산화, 황 아미노산 및 단일-탄소 대사 사이의 계면에 존재한다. 간 BHMT의 활성 수준은 용량 의존적으로 식이에서의 메티오닌 및 콜린 및 베타인을 포함하는 메틸 공여자에 의해 영향을 받는다. 게다가, BHMT 활성은 정상 간 글루타치온 수치를 유지하는데 필요하고 임의의 식이 조건 하에서 간 지방의 축적을 방해한다.

[0014] 또한 MTHFD1는 C1-테트라하이드로폴레이트(THF) 신타아제로, 이는 티민 또는 퓨린 합성에 의해 요구되는 다양한 산화 상태간의 폴레이트 유도체를 상호변경한다. MTHFD1는 정상 세포 기능, 성장 및 분화에서 중요하고, MTHFD는 NADPH-5,10-methenyl-THF의 5,10-methylene-THF로의 의존적이고 가역적인 환원을 촉진한다. BHMT 및 MTHFD1 활성은 간 AdoMet 및 총 혈장 Hcy 활성의 충분한 수준을 유지하는데 요구된다.

[0016] 본 발명에서 용어, "진단" 또는 "예측"이란, 부당경량아 또는 저체중아에 대하여 성장 후 성인이 되었을 때 고호모시스테인혈증 또는 이와 관련된 질환이 발병될 위험이 상대적으로 높은지 여부를 판별하는 것을 말한다. 본 발명은 부당경량아 또는 저체중아에 대하여, 성장 후 성인이 되었을 때 고호모시스테인혈증 또는 이와 관련된 질환의 발병 위험성을 조기에 진단하고, 이에 대하여 성장과정에서부터 특별하고 적절한 관리를 통하여 상기 질환을 경감 또는 방지하는 데 사용될 수 있다. 또한, 본 발명은 상기 질환들을 조기에 진단하여 가장 적절한 치료 방식을 선택함으로써 치료 결정을 하기 위해 임상적으로 사용될 수 있다.

[0017] 본 발명에서 용어, "저식이 산모"란 임신 중, 보다 구체적으로는 임신 후기에 정상 식이보다 적은 양의 식이를 섭취한 산모, 바람직하게는 정상 식이에 비해 50% 이내 적은 양의 식이를 섭취한 산모를 의미한다. 나아가, 저식이 산모의 자손은 상기와 같은 저식이 산모로부터 출산한 신생아를 비롯한 자손을 의미하며, 자궁내 좋지 못한 환경에서 태어난 조산아, 부당경량아, 저체중아, 또는 정상 분만된 저체중아를 모두 포함한다. 바람직하게

는 상기 자손은 웅성, 즉 남아일 수 있고, 또한 바람직하게 미숙아일 수 있다. 또한, 본 발명에서 "부당경량아(smallfordate infant)"란 신생아의 출생 체중을 재태 기간과 비교시, 재태 주수의 표준적 출생 체중보다 작은 신생아를 의미한다. 구체적으로 재태주수의 평균체중을 M, 표준편차를 σ로 했을 때, M-3/2σ미만의 체중의 신생아를 의미한다. 나아가, "저체중아"는 수정 이후 분만까지 정상적인 성장이 중단 또는 지연된 결과로 체중이 2.5kg 이하로 태어난 신생아를 의미한다.

[0018] 본 발명에서 용어, "고호모시스테인 혈증"이란, 혈액 중에 호모시스테인의 농도가 상대적으로 높은 상태를 의미하는 것이다. 혈장이나 혈청과 같은 체액 중 호모시스테인(Hcy)의 총 농도는 특정 질환의 중요한 마커로 알려져 있다. 1960년 대 후반에, 인체에서 호모시스테인의 중요한 역할이 알려진 후, 다수의 임상적 연구가 호모시스테인이 심혈관 질환 및 죽상동맥경화증의 발병에 대한 예후 마커라는 것을 입증했다. 나아가, 이러한 고호모시스테인혈증은 뇌혈관질환, 심혈관질환, 말초정맥 혈전증, 반복자연유산 등 다양한 혈관성질환을 일으키는 독립적 위험인자로 알려져 있다. 구체적인 일 예로서, 본 발명에서 사용되는 "고호모시스테인 혈증 관련 질환"은 뇌혈관질환, 심혈관질환, 말초정맥혈전증, 반복자연유산, 임신중 합병증, 골다공증, 신경관 결함, 암 및 알츠하이머 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질환을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명에서 용어, "진단용 마커, 진단하기 위한 마커 또는 진단 마커(diagnosis marker)" 또는 "표지자"란 부당 경량아 및 저체중아 중에서 고호모시스테인 혈증 또는 이의 관련 질환의 발병 위험성이 있는 자손과 그렇지 않은 자손을 미리 예측하여 구분할 수 있는 물질로, 정상 자손의 시료에 비하여 성인이 된 후 고호모시스테인 혈증 또는 이의 관련 질환의 발병 위험성이 있을 것으로 예측되는 산모의 시료에서 유의적인 농도의 증가 또는 감소를 보이는 생체 유기 분자들을 의미한다. 본 발명의 목적상, 이러한 마커 또는 표지자는 고호모시스테인 혈증 또는 이의 관련 질환의 발병 위험성이 있는 부당 경량아 및 저체중아에서 특이적으로 감소된 농도를 나타내는 MTHFD1 또는 BHMT1 를 의미한다.

[0020] 보다 구체적으로, 본 발명은 부당경량아 또는 저체중아의 추후 고호모시스테인 혈증 또는 이의 관련 질환을 나타낼 것으로 진단하는 마커로서 MTHFD1 및 BHMT1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 제공한다.

[0021] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 임신 후기에 50% 이내의 저식이를 제공한 래트로부터 출생한 저식이 산모 래트의 자손(출생 후 정상 식이 및 저식이 급여 포함)과 정상식이를 제공한 래트로부터 출생한 정상 식이 산모 래트의 자손을 3주간 양육시키고 이들의 간 조직을 채취하여 단백질체학적 분석을 수행하여, 정상 자손과 저식이 산모 래트의 자손의 간에서의 단백질 프로파일을 비교하였다. 또한, 정상 자손의 간에 비해 단백질 발현이 10배 이상 차이가 나는 저식이 산모 래트의 단백질 스팟을 동정하여 유의적으로 발현 수준이 감소한 단백질을 확인하였다.

[0022] 그 결과, 본 발명에 다른 MTHFD1 및 BHMT1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커들이 감소되는 경우 손상된 단일-탄소 대사를 의미하며, 이후 고호모시스테인 혈증이 발병한다는 위험성을 갖는다는 유의한 결과를 확인할 수 있었다.

[0023] 따라서, 부당경량아 또는 저체중아의 시료 내 MTHFD1 및 BHMT1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커들의 농도를 측정함으로써 고호모시스테인 혈증 또는 이의 관련 질환의 발병 위험성을 예측 및 진단할 수 있는 바, 상기 질환의 예측 및 진단을 위한 지표로 활용할 수 있다.

[0024] 일 구현예로, 본 발명에서 MTHFD1 및 BHMT1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커들의 농도를 측정하는 제제는 이들 각각에 특이적인 항체일 수 있다.

[0025] 본 발명에서, "항체"란 항원성 부위에 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 상기 마커에 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 단클론항체, 다클론항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다.

[0026] 단클론항체는 당해 분야에 널리 공지된 하이브리도마 방법(Kohler 및 Milstein(1976)European journal of Immunology 6:511-519), 또는 파지 항체 라이브러리(Clarkson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol.,222:58, 1-597, 1991)기술을 이용하여 제조될 수 있다.

[0027] 다클론항체는 상기한 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당해 분야에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 제조 가능하다. 또한, 본 발명의 항체에는 키메라 항체, 인간화 항체, 인간항체 등의 특수항체도 포함된다.

[0028] 나아가, 본 발명에 사용되는 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 결합기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab') 2 및 Fv 등을 예시할 수 있다.

[0029] 이러한 항체를 이용하여 시료 내 MTHFD1 및 BHMT1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커들의 농도를 측정하기 위한 방법으로는, 시료에 상기 항체를 처리하여 항원-항체 복합체의 생성 정도를 확인할 수 있는 방법이라면 제한없이 사용할 수 있다. 상기 "항원-항체 복합체"란 IL-13 및 이에 특이적인 항체의 결합물을 의미하고, 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정 가능하다.

[0030] 예를 들어, 웨스턴 블랏(Western blot), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 면역침전분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorecence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질 칩(protein chip), 방사면역측정(radioimmunoassay, RIA), 효소면역분석(enzyme immunoassays, EIA), 형광 면역분석(fluorescence immunoassays, FIA), 형광 편광 면역분석(fluorescence polarization immunoassays, FPIA), 비탁 억제 면역분석(nephelometric inhibition immunoassays, NIA), 미량입자 효소 면역분석(microparticle enzyme immunoassays, MEIA), 화학발광 자기 면역분석(chemiluminescent magnetic immunoassay, CMIA) 등을 예시할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 다른 예로, 본 발명은 부당경량아 또는 저체중아의 성장 후 고호모시스테인혈증 또는 이와 관련된 질환의 발병 위험성 진단용 조성물을 포함하는 진단 키트에 관한 것이다.

[0032] 본 발명의 키트는 부당경량아 또는 저체중아의 시료 내 MTHFD1 및 BHMT1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커들의 농도를 측정할 수 있는 제제뿐만 아니라, 농도 분석에 적합한 한 종류 이상의 조성물, 용액 또는 장치를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 지지체 또는 적합한 담체, 기질, 검출 라벨(또는 검출 라벨로 표지된 2차 항체), 완충용액, 반응 정지제, 용해제, 세척액 및/또는 안정화제 등을 포함할 수 있다.

[0033] 적합한 담체 또는 지지체의 예로는 고분자, 유리, 금속, 실리콘 또는 생체막(membrane) 등을 예시할 수 있다. 구체적으로는, 폴리부틸렌숙시네이트, 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 아가로스, 셀룰로즈, 니트로셀룰로즈, 덱스트란, 세파덱스, 세파로즈, 리포솜, 카복시메틸 셀룰로즈, 폴리아크릴아미드, 폴리스테린, 반려암, 여과지, 이온교환수지, 플라스틱 필름, 플라스틱 튜브, 폴리아민-메틸 비닐-에테르-말레산 공중합체, 아미노산 공중합체, 에틸렌-말레산 공중합체, 나일론, 금속, 유리, 글래스비드, 또는 자성 입자 등이 포함된다. 그 외의 다른 고체 기질로는 배양 플레이트, ELISA 플레이트, 튜브 및 폴리머성 막이 있다. 상기 지지체는 임의의 가능한 형태, 예를 들어 구형(비드), 원통형(시험관 또는 웰 내면), 평면형(시트, 시험 스트립)을 가질 수 있다.

[0034] 구체적인 일례로, 상기 부당경량아 또는 저체중아의 성장 후 고호모시스테인혈증 또는 이와 관련된 질환의 발병 위험성 진단용 키트는 ELISA 키트, 샌드위치 ELISA등 다양한 ELISA 방법을 구현하기 위하여, ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트일 수 있다. ELISA 키트는 상기 단백질들에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 각 마커에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론항체, 다클론항체 또는 재조합 항체일 수 있다. 또한 ELISA 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromopores), 효소 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다.

[0035] 이 외에도, 상기 키트는 웨스턴 블랏, 면역침전분석법, 보체 고정 분석법, 유세포분석, 또는 단백질 칩 등을 구현하기 위한 키트일 수 있으며, 각 분석 방법에 적합한 부가적인 구성을 추가로 포함할 수 있다. 이 분석 방법들을 통하여, 항원-항체 복합체 형성량을 정량화함으로써 부당경량아 또는 저체중아가 성장하여 성인이 된 후 고호모시스테인혈증 또는 이와 관련된 질환의 발병할 위험성을 진단할 수 있으며, 이에 따라 출생 초기부터 방지하여 고호모시스테인 혈증뿐 아니라, 이와 깊은 관련이 있다고 알려진 뇌혈관질환, 심혈관질환, 말초정맥혈전증, 반복자연유산, 임신중 합병증, 골다공증, 신경관 결함, 암 및 알츠하이머 질환 등을 출생 초기부터 예방 또는 경감시키데 사용할 수 있다.

[0036] 상기 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정 가능하다. 검출 라벨은 MTHFD1 및 BHMT1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커들에 특이적으로 결합하

는 항체에 표지하거나, 상기 항체를 인지할 수 있으며 검출 라벨로 표지된 2차 항체를 반응시켜 측정할 수 있다. 예를 들어, 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨의 형광, 발광, 화학발광(chemiluminescence), 흡광도, 반사 또는 투과를 통하여 측정할 수 있다. 이를 위하여, 상기 검출 라벨은 효소, 형광물질, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 콜로이드, 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다.

[0037] 검출 라벨의 정량적 측정 방법으로, 초고속 스크리닝(high throughput screening, HTS) 시스템을 이용할 수 있다. 여기에는 검출체로 형광물질이 부착되어 형광을 검출함으로써 수행되는 형광법, 검출체로 방사선 동위원소가 부착되어 방사선을 검출함으로써 수행되는 방사선법, 검출체의 표지 없이 표면의 플라즈몬 공명 변화를 실시간으로 측정하는 SPR(surface plasmon resonance) 방법, 또는 SPR 시스템을 영상화하여 확인하는 SPRI(surface plasmon resonance imaging) 방법 등을 이용하는 것이 가능하나, 이에 한정되지 않는다.

[0038] 다른 예로, 본 발명은 부당경량아 또는 저체중아로부터 분리된 시료 내 MTHFD1 및 BHMT1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 농도를 측정하는 단계를 포함하는, 부당경량아 또는 저체중아의 성장 후 고호모시스테인혈증 또는 이와 관련된 질환의 발병 위험성 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[0039] 바람직한 일예로, 본 발명은 부당경량아 또는 저체중아로부터 분리된 시료로부터 MTHFD1 및 BHMT1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커들의 농도를 측정하는 단계, 및 상기 MTHFD1 및 BHMT1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커들의 농도가 정상 신생아보다 낮거나 임계값(cut-off)보다 낮을 경우 고호모시스테인혈증 또는 이와 관련된 질환이 발병할 위험성이 있다고 예측하는 단계를 포함하는, 고호모시스테인혈증 또는 이와 관련된 질환의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0040] 상기 방법에서 부당경량아 또는 저체중아로부터 분리된 시료는 세포, 조직, 혈청, 혈액, 혈장, 타액, 대소변, 질분비액, 림프액, 뇌척수액, 점막 분비액, 복막액, 복수, 제대혈, 융모막 융모 및 양모 등 다양한 조직에서 채취될 수 있으나, 상기와 같은 질환의 예측 또는 진단을 위해서는 혈액에서 채취하는 것이 바람직하고, 이러한 시료의 채취는 통상적인 채취 방법, 예를 들어 주사기 등으로 채혈하는 방법 등을 사용하여 수행될 수 있다.

[0041] 또한, 시료는 마커의 탐지 감도를 증가시키도록 준비될 수 있는데, 예를 들어 산모로부터 추출한 양수 시료는 음이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 크기별 배제크로마토그래피(size exclusion chromatography), 액체 크로마토그래피, 연속추출(sequential extraction) 또는 젤 전기영동 등의 방법을 이용하여 전처리될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0042] 부당경량아 또는 저체중아로부터 분리된 시료에서 상기 마커들의 농도를 측정하는 과정은 공지의 공정을 이용하여 수행할 수 있으며, 예컨대, 앞서 언급한 다양한 항원-항체 복합체 측정 방법으로 측정할 수 있다. 일구현예로, 본 발명은 상기 마커들의 농도의 측정은 각 마커에 특이적인 항체를 이용하여 수행될 수 있다. 상기 항체는 각 마커에 특이적인 단클론항체 또는 다클론항체일 수 있으나, 나아가 항원결합활성을 보유하는 항체의 기능적 단편일 수 있다.

[0043] 본 발명에 따른 마커 및 이를 이용한 고호모시스테인 혈증 또는 이의 관련 질환의 발병 위험의 예측 또는 진단 방법은 검출이 용이하고 민감도와 특이도가 높은 표지자를 간단히 채혈 등을 통해 수득한 시료로부터 검출하여 수행함으로써 저식이 산모로부터 출생한 자손들의 상기 질환 발병 가능성을 조기에 정확하고 손쉽고 안전하게 진단할 수 있어 매우 유용하다.

발명의 효과

[0045] 본 발명을 이용하여 부당경량아 또는 저체중아가 이후 성인으로 성장시 고호모시스테인혈증과 이와 관련된 뇌질환, 심혈관질환, 말초정맥 혈전증, 반복자연유산 등 다양한 질환이 발병할 위험성을 조기에 진단하여 이들 질환을 조기에 파악하여 예방 또는 치료하는데 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 2-DE에 의한 단백질의 분리를 보여주는 도면이다. (A)AdLib/AdLib, (B) AdLib/FR, (C) FR/AdLib 및 (D) FR/FR 그룹의 자손들의 간으로부터 얻어진 단백질 스폿이다.

도 2는 모성 식이에 따른 자손들의 간 단백질 발현을 비교한 도면으로서

(A) 웅성 및 (B) 자성 자손의 간에서의 BHMT1, MTHFD1, 및 ATP5B 밀도(광학 밀도 [OD × mm]/α-tubulin [OD × mm])를 나타내었다.

도 3은 시그널링 경로를 나타낸 도면이다. 붉은 색으로 표기된 단백질들은 AdLib/AdLib 군에 비해 FR/Ad Lib군의 자손의 간에서 더욱 높게 발현된 단백질을 의미하고, PC는 파이루베이트 카르복실레이즈, BHMT는 베타인-호모시스테인 S-메틸트랜스퍼라제 1, AHCY는 아데노실호모시스테이나아제, MTHFA1은 메틸렌테트라하이드로폴레이드 데하이드로게나아제 1, EGFR은 표피성장인자수용체, STAT3는 signal transducers and activators of transcription 3 및 DNMT1는 DNA 메틸트랜스퍼라제 1을 나타낸다.

도 4는 자손들 간에서의 단백질 발현과 혈청 Hcy 농도 간의 관계를 나타낸 도면으로, (A) 모든 자손에서의 혈청 Hcy 농도를 비교하였다. (B) 내지 (D)는 각각 FR/AdLib 자성 자손에서의 (n = 9) BHMT1, MTHFD1 및 ATP5B를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0049] 본 발명에서 사용되는 약어는 다음의 의미를 갖는다.

[0050] AdLib: 자유 식이(ad libitum)

[0051] AdoMet: S-아데노실메티오닌

[0052] Ahcy: 아데노실호모시스테인

[0053] ATP5B: ATP 신타아제 서브유닛 베타, 미토콘드리아성 ATP

[0054] ATP5O: ATP 신타아제 서브유닛 O, 미토콘드리아성 전구체

[0055] BHMT1: 베타인-호모시스테인 S-메틸트랜스퍼라제 1

[0056] ELISA: 효소결합면역흡착검사

[0057] FR: 식이 제한(food restriction)

[0058] Hcy: 호모시스테인

[0059] IUGR: 자궁 내부 성장 제약(intrauterine growth restriction)

[0060] MS: 질량분석

[0061] MTHFD1: 메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게나제 1

[0062] THF: C1-테트라하이드로폴레이트

[0063] SD: Sprague-Dawley 래트

[0065] **실시예 1: 실험방법**

[0066] **1-1) 동물실험**

[0067] 모두 연구는 이화여자대학교 의학대학의 동물 시험 위원회의 승인을 받고 진행되었으며, 시험 동물들의 보호에 관한 국제적 가이드라인에 따라 진행되었다.

[0069] 8주령의 웅성 및 자성 Sprague-Dawley(SD) 래트는 오리엔트 바이오(성남, 경기도, 한국)으로부터 구입하였다. 래트는 12시간 명/암 사이클을 갖는 온도 조절된 방에서 길러졌으며, 물과 비정제된 표준 실험실용 chow(퓨리나, 평택, 한국)을 급여하였다. 1주간의 적응기가 지난 후에 래트를 교접시켰다. 자성 래트들을 검사하여 임신 1일로 간주되는 래트들을 질 플러그를 사용하여 표시하였다.

[0070] 임신 10일째 되는 날에 임신중인 SD 래트를(n = 10) 2개의 그룹으로 나누고, 출산 전까지 한군은 마음대로, 한군은 50% 음식 제한을 하였다. 모든 영양 구성성분은 50% FR 식이에서 동일하게 감소시켰다. 출산 후에, 래트를 4개의 자손 그룹으로 나누었다: AdLib/AdLib(임신 및 수유기간 중 정상 식이 급여), AdLib/50% FR 군(수유 중에 50% 식이 제한(food restriction)), FR/AdLib (임신 중에 50% FR), 및 FR/FR (임신 및 수유 중에 50% FR). 각각의 표기된 시점(출생, 3일 후, 3주 후)에 체중을 측정하였다.

[0071] 3주령의 자손은 졸레틸(Virbac, Carros, France) 마취 하에서 방혈시켜 희생시켰고, 간은 즉시 분리하여 -80° C에서 보관하였다. 자손으로부터의 얻어진 샘플들은(n = 9 males, 9 females/group)은 무작위적으로 선택되었다.

[0073] **1-2) 단백질 추출**

[0074] 동결된 간의 약 0.2 g을 20 mM Tris, 15.0mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1 mM b-글리세롤 포스페이트, l mM NaF, 1 mM Na 3 VO 4 및 Protease Inhibitor Cocktail TM (Roche Molecular Biochemicals, Indiananpolis, IN, USA)를 포함하는 용해 버퍼에 얼음 상에서 준비하였다. 각 샘플은 30초 동안 초음파 처리를 하고 30분간 4° C에서 14000 rpm으로 원심분리하였다. 상징액을 수집하고, 단백질 농도는 BCA protein assay kit (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 결정하였다. 분해산물을 동량, 구체적으로 250 μg 및 40 μg을 사용하여 2-DE 및 웨스턴 블럿을 수행하였다.

[0076] **1-3) 2-DE 분석 및 영상 분석**

[0077] 간 기능에 대한 각각의 편차를 줄이기 위하여, 대조군, AdLib/FR, FR/AdLib 및 FR/FR 군들로부터의 서로 다른 개체에서 나온 간 조직을 결합시켰고, 이후, 2-DE 및 영상 분석을 서로 다른 결합된 샘플들을 사용하여 3회 수행하였다. 1차원 전기영동은 IPGphor IEF 장치를 사용하여 수행되었고, 이후 스트립들은 100V-1 h, 200V-1 h, 500V-1 h, 1,000V-1 h, 5,000V-1.5 h, 8,000V-1.5 h, 및 8,000-90,000V h에 초점이 맞추어졌다. 등전분리후에, 스트립들은 6 M urea, 75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 30%(v/v) 글리세롤, 2% (w/v) SDS, 0.002% (w/v) 브로모페놀블루, 및 2% (w/v) DTT를 포함하는 평형 버퍼 A를 사용하여 15분간 실온에서 평형을 맞추었다. 상기 스트랩들은 평형 버퍼 B(평형 버퍼 A에 2.5% (w/v) 아이오도아세타마이드(Sigma, St. Louis, MO, USA)가 추가)를 포함하고, DTT가 없는 평형 버퍼 A)를 사용하여 두 번째로 평형을 맞추었다. 상기 스트립을 12.5% (w/v) SDS-PAGE 겔과 함께 100 V 1 h 및 브로모페놀 블루 프론트가 겔의 더 낮은 말단으로 이동하기 시작할때까지 500 V 2차원 전기영동을 수행하였다. 단백질들은 각각의 군에 대해 서로 다른 2D-분석용 겔 내에서 로딩되었다. 분자량은 6.5 내지 200 kDa였고 pH 는 3-11. 겔들은 제조업자의 안내서에 따라 영상 분석을 위해 은 염색되었다(Amersham Pharmacia Bio-tech). 이후, 겔들은 고해상도 GS-800 calibrated scanner(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 스캔하였다. 포착된 점들을 PD Quest 8.0 software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 매치하고 분석하였다.

[0078]

[0079] **1-4) 단백질 동정**

[0080] in-gel trypsin digestion에 단백질들을 투입하였다. 절단된 겔 스팟들은 100 ml of 탈색 용액 100ml(30 mM potassium ferricyanide, 100 mM sodium thiosulfate)를 사용하여 5분 안 흔들어서 탈색시켰다.

[0081] 용액을 제거한 후에 겔 스팟들을 20분간 암모늄 바이카보네이트를 사용하여 인큐베이션 하였다. 겔 조각들을 100 μl 아세토나이트릴을 사용하여 탈수시키고, 진공 원심분리를 하여 건조시켰다. 이러한 공정을 3번 반복하였다. 건조된 겔 조각들은 0.2mg 수식된 트립신(Promega, Madison, WI, USA)을 포함하는 50 mM 암모늄 바이카보네이트 20ml를 사용하여 얼음 상에서 45분간 재수화시켰다. 용액을 제거한 후, 50 mM 암모늄 바이카보네이트를 부가하였다. 소화를 밤새 37 ° C에서 수행하였다. 펩타이드 용액은 C18 nano column(Homemade)을 통해 탈염시켰다. 자체 제작한 크로마토그래프용 컬럼을 mass spectrophotometric analysis 전에 펩타이드 혼합물을 탈염시키고 농축하기 위하여 사용하였다.

[0083] 주문 제작한 크로마토그래피 컬럼을 사용하여 질량 분석을 하기 전에 펩타이드 혼합물을 탈염 및 농축시켰다. Poros reverse phase R2 material(20-30 μm bead size, Perseptive Biosystems) 100-300nL로 구성된 컬럼은

수축된 GELoader tip (Eppendorf, Hamburg, Germany) 내에 채워넣었다.

[0085] 10-ml 주사기를 사용하여 가벼운 공기압을 적용하여 컬럼을 액체가 통과하도록 하였다. 소화된 상층액으로부터 나온 펩타이드 혼합물 30 mL 를 5% 포름산 30 μl에 희석하고, 이를 컬럼에 로딩하고, 5% 포름산 30 μl으로 세척하였다. MS/MS 분석을 위해 펩타이드를 50% 에탄올/49% H2O/1% 포름산 1.5 μl를 사용하여 예비 코팅된 보로실리케이트 나노-일렉트로스프레이 바늘(Hanger Worldwide Inc., Hickory NC, USA) 내로 직접 용출시켰다.

[0087] **1-5) 전기 분무 질량 분석법**

[0088] 인-겔 소화에 의해 생성된 펩타이드의 MS/MS는 MicroQ-TOF2 III mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)를 사용하여 나노-전기 분무법 (ESI)에 의해 수행되었다.

[0089] 원료의 온도는 상온이었다(RT). 안정적인 유체 흐름(10-30 μl/min)을 생성하기 위해, 1 kV의 포텐셜을 0-5 psi의 질소 배압과 결합시켜, 이온 소스 내에 예비-코팅된 보로실리케이트 나노-전기스프레이 바늘에 적용하였다(Hanger Worldwide Inc, Hickory NC, USA). 콘 전압은 40 V였다. 쿼드러플 분석기는 헥사폴 충돌 세포 내에서의 파쇄를 위한 전구체 이온을 선택하기 위해 사용되었다. 충돌 가스는 6-7×10^{-5} mbar 압력의 아르곤을 사용하였고, 충돌에너지는 25-40V였다.

[0091] **1-6) 데이터베이스 서칭**

[0092] MS/MS는 MASCOT software (v2.4, Matrix Science, London, UK)에서 이온 서치 옵션으로 조절하였다. 펩타이드 단편 파일은 ESI-MS/MS에 의한 ESI/MS에서 펩타이드 피크로부터 수득하였다. 트립신을 하나의 잠재적인 결손 절단 부위 (missing cleavage site)를 갖는 효소로서 선택하였다. ESI-QTOF를 장치로서 선택하였다. 펩타이드 단편 파일들은 MASCOT 서치 엔진[Mascot search engine, Database: NCBInr 20140807(47,520,513 sequences; 16,962,606,718 residues) Timestamp: 7 Jul 2015]을 사용하여 데이터베이스상에서 서치하였고, Rattus norvegicus로 한정하였다.

[0093] 산화된 메티오닌은 variable modification으로 설정하였고, 카바미도 메틸화된 시스테인은 fixed modification으로 설정하였다. mass tolerance는 펩타이드 및 단편 각각에 대해 ± 0.5 및 ± 0.8 Da로 설정되었다.

[0094] 높은 점수를 나타내는 펩타이드는 MASCOT에서 기본 유의적 임계수준(default significance threshold)을 넘는 펩타이드에 해당하였다($p<0.05$, peptide score ≥ 35). 질량분석 프로테오믹스 데이터는 dataset identifier PXD002578를 갖는 PRIDE 파트너 저장소를 경유하여 ProteomeXchange Consortium에 저장되었다.

[0096] **1-7) 웨스턴 블럿 분석**

[0097] 2-DE 결과를 확인하기 위하여, AdLib/AdLib(n = 4 males, n = 4 females), AdLib/FR, FR/AdLib, 및 FR/FR 군(n = 5 males, n = 5 females/group) 3주령의 자손의 간을 사용하여 웨스턴 블럿 분석을 수행하였다.

[0098] 간략하게, 동량의 용해물(40 μg)를 SDS-PAGE에 의해 분리하고, 이를 폴리비닐리덴 디플루오라이드 멤브레인(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)에 80V에서 2시간 동안 옮겼다. 멤브레인은 0.01%의 트윈20을 함유하는 Tris-buffered saline (TBS) 내의 2.5% 탈지유에서 1시간 동안 차단되었다. 그 다음 멤브레인을 TBS-T에서 세척하였고, 항-메틸렌테트라하이드로폴레이트 데하이드로게네이즈 1(1:1000; GeneTex Inc., Irvine, CA, USA), 항-베타인-호모시스테인-S-메틸트랜스퍼레이즈(1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), 항-ATP 신테이즈 서브유닛 베타(1:2000; GeneTex Inc.) 및 항-알파튜불린(1:2000; AbFrontier, Seoul, Korea) 항체를 4℃에 밤새두었다. 상기 멤브레인은 TBS-T로 세척하였다. 이차 항-토끼 또는 항-마우스 HRP-컨주게이트(Santa Cruz Biotechnology)는 상온에서 1시간 동안 블로킹 버퍼에의 1:3000의 희석액으로 부가되었다. 상기 멤브레인은 TBS-T 로 다시 세척되었고, 향상된 화학발광제(enhanced chemiluminescence reagents, Santa Cruz Biotechnology)를 사용하여 진행되었다.

[0100] **1-8) 시그널링 경로**

[0101] 차별화되게 발현된 단백질의 생물학적 기능과 시그널링 경로를 가시화하기 위하여, Pathway Studio software(v 9.0, Aridane Genomics)를 사용하였다.

[0103] **1-9) 혈청 내 호모시스테인 농도의 결정**

[0104] 웨스턴 블럿 분석에 의해 확인된 단백질과 단일-탄소 대사와의 관계를 혈청 Hcy 농도를 사용하여 결정하였다. AdLib/AdLib and FR/AdLib(n = 9 males, n = 9 females/group) 군의 3주령 자손들로부터 얻은 혈청 Hcy 농도를 Rat Homocysteine ELISA Kit(Cusabio Biotech Co. LTD, China)의 프로토콜을 따라 enzyme-linked immunoassay(ELISA)에 의해 측정하였다.

[0106] **1-10) 통계적 분석**

[0107] SPSS version 18.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 통계학적 분석을 수행하였다. 본 발명자들은 AdLib/AdLib 및 FR 군의 3주령의 자손의 간 사이에서 어떠한 단백질 스폿이 차별화되게 풍부한지(> 10-fold) 결정하기 위하여 Student's t-test($p < 0.05$)를 사용하였다. 데이터는 평균±표준편차(SD)로 나타내었다. 본 발명자들은 두 군에서 각각의 차이를 평가하기 위해 Wilcoxon rank-sum test($p < 0.05$)를 사용하였다. Spearman 상관(Spearman's correlations)은 발현된 단백질과 혈청 Hcy 농도간의 차이점을 분석하기 위하여 계산하였다.

[0109] **실시예 2: 결과**

[0110] **2-1) 3주령 자손의 체중 및 간 무게의 변화**

[0111] 하기 표 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 임신 후기 동안의 모성 식이 제한은 낮은 출생시 체중을 야기하였다 ($p < 0.01$). 3일 후 임신 후기 동안 FR 식이를 투여한 모성의 자손들은 AdLib 모성($p < 0.01$)의 자손들보다 훨씬 적게 무게가 나갔다. 그러나, IUGR 자손의 체중 및 간의 무게가 AdLib 자손보다 출생 시 낮았다고 하더라도, AdLib 모성에 의해 양육된 3주령의 IUGR 자손은 AdLib/AdLib 자손을 추월하는 체중 및 간의 괄목할만한 증가를 나타내었다. 대조적으로 FR 모성 에서 양육된 자손의 체중은 AdLib/AdLib 자손에 비해 3주째에서 유의적으로 더 낮았다 ($p < 0.05$).

표 1

[0112] 출생 후 3일 및 3주 후의 체중 및 간 무게의 비교

		Ad lib[a] /Ad lib[b]	Ad lib/FR	FR/Ad lib	FR/FR
체중(g)	출생직후	7.63 ± 0.32	-	6.92 ±0.81 **	-
	3일후	9.69±0.63	8.44±0.78 **	8.14±0.86 **	7.56±0.72 **
	3주후	56.30±3.66	18.10±1.19 **	54.58±8.50	16.67±1.70 **
간의 습중량(g)	3일후	0.28±0.04	0.22±0.05 *	0.29±0.06	0.21±0.05 *
	3주후	2.36±0.39	0.52±0.09 **	1.98±0.38	0.49±0.08 **

[0113] a: 출산까지 10일 전부터의 모성 식이

[0114] b: 3주간 수유 기간 상의 모성 식이

[0115] *: AdLib/AdLib에 비해 유의적인 차이($p < 0.05$)를 나타냄.

[0116] **: AdLib/AdLib에 비해 유의적인 차이($p < 0.01$)을 나타냄.

[0118] **2-2) 3주령 자손의 간에서의 단백질 발현의 단백질체학적 분석**

[0119] 간 기능상의 태아 프로그래밍의 역할을 분석하기 위해, 본 발명자들은 3주령 자손의 간에서의 단백질 프로파일을 비교하였다. 본 발명자들은 AdLib/AdLib 자손의 간에 비해 단백질 발현이 10배 차이가 나는 FR/AdLib 자손의

단백질 스팟을 동정하였다 ($p < 0.05$, 도 1). 하기 표 2는 AdLib/AdLib 대조군 및 실험군에서의 간 단백질의 차별화된 발현을 나타냈다. BHMT1, MTHFD1, 및 ATP5B의 발현 수준은 AdLib/AdLib 자손에 비해 FR/AdLib 새끼들의 간에서 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.05$). 게다가, BHMT1, MTHFD1의 발현 수준은 유의적으로 감소하였으나, ($p < 0.05$), ATP5B는 FR/FR 자손의 간에서 실질적으로 증가하였다.

표 2

[0120] 단백질체학에 의한 래트 자손 간에서의 단백질 발현의 비교

스팟 번호[a]	gi 번호[b]	단백질 설명	심볼	MS[c]	배수변화[d]		
					1) vs. 2)	1) vs. 3)	1) vs. 4)
1670	gi 6729935	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B	2105	0.56	0.10*	7.11
2153	gi 13624295	Glia maturation factor beta	GMFB	201	0.97	0.10	0.06
3210	gi 13540663	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1	BHMT1	84	0.37	NE *	NE *
3774	gi 929988	Pyruvate carboxylase	PC	634	1.90	0.35	4.74
4102	gi 4139571	Adenosylhomocysteinase	AHCY	195	0.40	0.07	NE
4309	gi 59808745	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1	MTHFD1	328	1.03	0.03*	0.31*
9163	gi 20302061	ATP synthase subunit O, mitochondrial precursor	ATP50	104	1.90	0.09	0.20

[0121] a: 2D-분석에서의 스폿 번호를 나타냄

[0122] b: NCBI 데이터베이스의 단백질 입수번호

[0123] c:MS: MASCOT 스코어는 10 log (p)로서, p는 관찰된 매치가 무작위 사상(random event)일 확률을 나타낸다. 35 이상의 스코어는 동일하거나 또는 광범위한 상동성을 나타낸다.

[0124] d: 1); Ad Lib/Ad Lib 군, 2); Ad Lib/ FR 군, 3); FR/FR 군, 및 4); FR/Ad Lib 군의 자손의 간에서 발현되는 단백질들의 배수 차이를 나타낸다. . NE: 미발현. * : AdLib/AdLib과 비교시 $p < 0.05$인 것을 의미한다.

[0126] **2-3) 웨스턴 블러팅을 사용한 단백질 확인**

[0127] 2-DE를 사용하여 동정한 단백질의 차별화된 발현은 추가적으로 상업적으로 이용 가능한 항체(도 2)를 사용하여 웨스턴 블럿팅 분석을 하여 검토하였다. 웨스턴 블럿은 BHMT1, MTHFD1, 및 ATP5B의 발현 수준이 유의적으로 FR/AdLib 모성에서의 웅성 자손의 간에서 감소되는 것을 나타내었고, 이는 2-DE 연구결과와 일치한다 ($p < 0.05$, 도 2A and 2C); 그러나, BHMT1, MTHFD1 및 ATP5B의 간 수치는 자성 자손간과 다르지 않다(도 2B and 2D). BHMT1 및 MTHFD1 발현은 FR/FR 웅성 자손의 간에서 유의적으로 감소되는 반면, 이 군에서의 ATP5B 발현은 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$, 도 2A and 2C). 본 발명자들은 FR/FR 자성 자손의 간에서의 이러한 단백질들의 발현에서 차이점을 확인하지 못하였다(도 2B and 2D).

[0129] **2-4) 시그널링 경로**

[0130] 데이터베이스 서치를 통하여 확인된 각 차별화된 발현된 단백질의 유전자들을 관련된 시그널링 경로를 결정하기 위해 Pathway Studio 내로 도입시켰다. 2종의 경로가 4종의 단백질과 유의적으로 관련성이 있었고 ($p < 0.05$), 이를 표 3에 나타내었다.

표 3

[0131] Pathway Studio에 의해 동정된, 차별화되게 발현된 단백질들과 관련된 시그널링 경로

시그널링 경로	중복된 단백질	P-값
Ariadne Metabolic Pathways		
메티오닌 대사	Bhmt1, Ahcy	0.0004

호흡연쇄 및 산화적 인산화	Atp5b, ATP50	0.0220

[0133] Ad lib/Ad lib 및 Ad lib/FR 군의 자손의 간에서 차별화되게 발현된(> 10배) 단백질들 중에서, 적어도 5종이 위의 경로에 포함되었다 ($p<0.05$).

[0135] BHMT1 및 아데노실호모시스테이나제(Ahcy)가 메티오닌 대사와 관련이 있었다. ATP5B 및 ATP50는 호흡 사슬 및 산화적 인산화와 관련이 있었다. 도식적 이미지는 생리학적 기능 및 동정된 단백질들의 상호작용 양쪽과의 관련성을 포함하고 있었다. 발견된 단백질들은 서로 상호작용을 한다. 나아가, 본 발명자들은 손상된 엽산-메티오닌 대사와 관련된 고호모시스테인혈증에 초점을 맞추었다(도 3)

[0137] **2-5) 단백질 발현 및 호모시스테인 농도 사이의 관련성**

[0138] 본 발명자는 3주령 자손에서의 손상된 단일-탄소 대사를 나타내기 위해 혈청 Hcy 농도를 사용하였다. 임신 후기 및/또는 수유 중의 모성 식이는 새끼 간의 혈청 Hcy 농도에서의 유의하게 변화와 관련이 있었다. 특히, AdLib/FR 및 FR/AdLib 모성의 웅성 자손에서의 혈청 Hcy 농도는 AdLib/AdLib 모성의 웅성 자손의 것보다 유의적으로 더 높은 반면($p < 0.05$), FR/FR 및 AdLib/AdLib 웅성 자손 간의 혈청 Hcy 농도는 차이가 없었다. 자성 자손에서, Hcy 수준은 AdLib/FR, FR/AdLib, 및 대조군 사이에서 차이가 없었다; 그러나, FR/FR 자손의 Hcy 농도는 그들에 비해 유의적으로 더 낮았다($p < 0.05$, 도 4A). AdLib/FR 자손의 Hcy 농도는 FR/AdLib 및 FR/FR 자손($p < 0.05$)의 Hcy 농도에 비해 유의적으로 높았다.

[0140] BHMT1, MTHFD1, 및 ATP5B 발현 수준은 웅성 FR/AdLib 자손의 간에서의 Hcy 농도와 음성적으로 관련되어 있었다(r=각각 -0.79, -0.69 및 -0.68; $p<0.05$, 도 4B, C, 및 D). 자성 FR/AdLib 자손에서, 간에서는 MTHFD1 발현이 Hcy 농도와 음성적으로 관련이 있었다($r = -0.75$ $p < 0.05$; 도 4E). 게다가, BHMT1 발현 수준은 FR/FR 자성 자손 간에서의 Hcy 농도와 음성적으로 관련이 있었으나 ($r = -0.750$ $p < 0.05$; 도 4E) 다른 식이 그룹의 자손에서는 관련이 없었다. 따라서, AdLib/AdLib 웅성 자손과 비교하여, Hcy 수준의 증가 및 단백질 발현과의 음성적 관련성은 다른 그룹의 웅성에 비해 FR/AdLib 웅성 자손에서 더욱 크게 나타났다($p < 0.05$).

[0142] **<u>실시예 3: 논의</u>**

[0143] 본 발명자들은 임신 후기 및 수유 동안의 모성 음식 섭취가 간 성장에서의 변화(변질) 및 단일-탄소 대사와 관련되어 있다는 것을 확인하였다. 본 발명은 태아 프로그래밍-관련 손상된 단일-탄소 마커로서의 BHMT1, MTHFD1 및 ATP5B에서의 변화를 처음으로 확인하였다.

[0144] 흥미롭게도, 이러한 단백질들은 FR/AdLib 웅성 자손에서 혈중 Hcy 농도의 증가와 음성적으로 관련이 있었다. 이러한 발견은 FR/AdLib 웅성 자손이 이후의 삶에서 질환에 걸릴 민감성이 증가되는 위험성을 가지고 있다는 것을 의미한다.

[0145] 인간 및 동물에서의 몇몇 연구는 모성 음식 섭취, 출생시 체중 및 비만, 제2형 당뇨와 같은 질환에의 감수성과 이후의 삶에서의 고혈압과의 관련성이 있음을 제시하였다.

[0146] 임신 후기의 모성 식이 제한 및 수유시 정상식이를 사용한 예전의 실험 동물 모델은 낮은 출생시 체중 및 대사성 증후군과의 관련성을 확인해주었다.

[0147] 임신한 래트의 단백질 제한 식이는 이후의 삶에서 고혈압과 신장 저하의 위험과 관련되어있었다.

[0148] Desai 등은 AdLib 모성으로 양육된 IUGR 자손이 성인과 같이 비만이고, 고지혈증 및 인슐린 저항성의 증거를 나타내고 있었음을 보고하였다. 후속적인 연구에서는 많은 수의 유전자의 발현에서의 변화가 특정 장기 예를 들어 태반, 간, 신장 및 시상하부의 대사와 관련이 있음을 보여주었다.

[0149] Rees 등은 모성 단백질 제한이 태아 간에서의 DNA의 과메틸화를 야기한다는 것을 보고하였다. 최근에, 본 발명

자들은 IUGR 자손의 뇌에 있는 유비퀴틴 카르복시-말단 가수분해효소 L1의 감소된 발현이 비만과 관련이 있음을 보고한 바 있다. 따라서, 수유 동안 정상 식이를 공급하는 모성에 의해 양육된 IUGR 자손의 출생 후 성장은 즉시 및 장기간의 프로그래밍에 의해 영향을 받을 수 있다.

[0150] BHMT1, MTHFD1, 및 ATP5B들이 메티오닌 대사 및 자손의 간에서의 호흡 사슬 및 산화적 인산화에 관련되어 있다는 사실은 상기 단백질들의 서로 다른 발현 수준으로부터 명백하다(표 2). 단백질-결핍의 모성 식이는 이러한 경로를 무너뜨리고, Hcy 농도를 변화시킨다는 것을 보여주었다. 흥미롭게도 FR/AdLib 웅성 자손의 간 무게 및 표현형은 3주령의 자손들에서는 대조군과 유사하였으나, MTHFD1, BHMT1, 및 ATP5B의 발현 수준은 낮아졌고, 혈청 Hcy 농도는 대조군에 비해 FR/AdLib 웅성 자손에서 더 높았다. 반대로, 본 발명자들은 대조군에 비해 자성 자손에서의 이러한 단백질들의 증가된 발현에 따른 경향을 발견하였으나, 그 차이는 통계학적으로 유의하지 않았다. 증가된 혈장 Hcy 농도는 단백질 영양실조와 엽산 및 비타민 B12의 결핍으로부터 야기되는 손상된 단일-탄소 대사와 관련이 있었다.

[0151] Ree 등은 단백질 제한 식이에서의 메티오닌 함량(content)이 증가된 혈청 Hcy를 야기하는 영양 요구를 초과한다는 것이 확인되었다. 본 발명자들은 혈청 Hcy가 50% FR/AdLib 식이를 공급한 모성의 3주령의 웅성 자손에서 증가된다는 것을 확인하였고, 이는 임신 후기 및 수유기의 차별화된 식이 섭취가 자손의 간에서의 메티오닌으로의 호모시스테인 재메틸화를 위한 능력에 영향을 미친다는 것을 제시하는 것이다.

[0152] 증가된 Hcy 농도는 trans-sulfuration pathway를 경유하여 시스테인으로 변경되거나, 메티오닌으로 재생될 수 있다.

[0153] 따라서, Hcy의 혈장 농도에서의 변화는 세포 내에서의 Hcy 축적을 야기하는 세포 대사에서의 변화와 관련이 있다. 따라서 혈청 Hcy 농도에서의 증가는 자손의 간에서의 BHMT 1 및 MTHFD1의 감소된 발현을 통한 손상된 단일-탄소 대사의 결과일 수도 있다.

[0155] BHMT 및 MTHFD1 활성은 간 AdoMet 및 총 혈장 Hcy 활성의 충분한 수준을 유지하는데 요구된다.

[0156] BHMT는 콜린 산화, 황 아미노산 및 단일-탄소 대사 사이의 계면에 있다. 간 BHMT의 활성 수준은 용량 의존적으로 식이에서의 메티오닌 및 콜린 및 베타인을 포함하는 메틸 공여자에 의해 영향을 받는다. 게다가, BHMT 활성은 정상 간 글루타치온 수치를 유지하는데 필요하고 임의의 식이 조건 하에서 간 지방의 축적을 방해한다.

[0157] MTHFD1는 C1-테트라하이드로폴레이트(THF) 신타아제로, 이는 티민 또는 퓨린 합성에 의해 요구되는 다양한 산화상태간의 폴레이트 유도체를 상호변경한다.

[0158] MTHFD1는 정상 세포 기능, 성장 및 분화에서 중요하고, MTHFD는 NADPH-5,10-methenyl-THF의 5,10-methylene-THF로의 의존적이고 가역적인 환원을 촉진한다.

[0159] BHMT 및 MTHFD1의 감소된 발현 수준은 혈청 Hcy 농도의 증가를 야기한다. 게다가, BHMT는 증가된 내장 지방 및 혈청 트리글리세라이드 수준을 통해 간 지방의 축적을 야기할 수도 있다.

[0160] 본 발명자들은 혈청 트리글리세라이드 수준이 3주령의 FR/AdLib 자손에서 중대하게 증가되었고, 24주령에서 혈청 트리글리세라이드 수준이 다른 군에 비해 유의적으로 증가하였음을 보고한 바 있다. Desai는 혈청 트리글리세라이드 수준은 3 및 36주령 FR/AdLib 자손 에서 유의적으로 증가하였다는 것을 보고하였다.

[0162] 마우스에서의 MTHFD1 파괴는 간 AdoMet 수준(세포 메틸화 반응을 위한 단일-탄소의 공급원인)의 감소와 관련이 있다. 게다가, MTHFD1 효소에서의 변화는 혈청 Hcy 농도 및 폴레이트-민감성 신경 튜브 결함의 위험을 증가시켰다. 본 발명에 따르면 ATP5B(mitochondrial ATP synthase) 수준은 FR/AdLib 자손에서 감소되고, FR/FR 자손에서 증가하였다. 지방산의 생산 및 산화와 관련된 간 ATPase는 간에서의 트리글리세라이드의 방출과 관련되어 있음을 확인하였는데, 이는 감소된 FR/AdLib 자손에서의 ATP5B 수준이 간 지방의 축적에 관여한다는 것을 제시하는 것이다. BHMT1 및 MTHFD1의 발현이 AdLib/AdLib 자손과 비교시 FR/AdLib 및 FR/FR dams의 웅성 자손에서 감소되었으나, ATP5B 발현은 FR/AdLib 에서 더욱 낮아지고, AdLib/AdLib 대조군 새끼에 비해 FR/FR 자손에서 더욱 높아졌다. 이러한 결과는 FR/FR 자손의 간에서의 높은 수준의 ATP5B가 호모시스테인을 정상화시키는데 작용하는 것에 반해, FR/AdLib 자손의 간에서의 ATP5B 감소된 발현이 Hcy의 증가된 수준에 역할을 하는 것임을 제시한다.

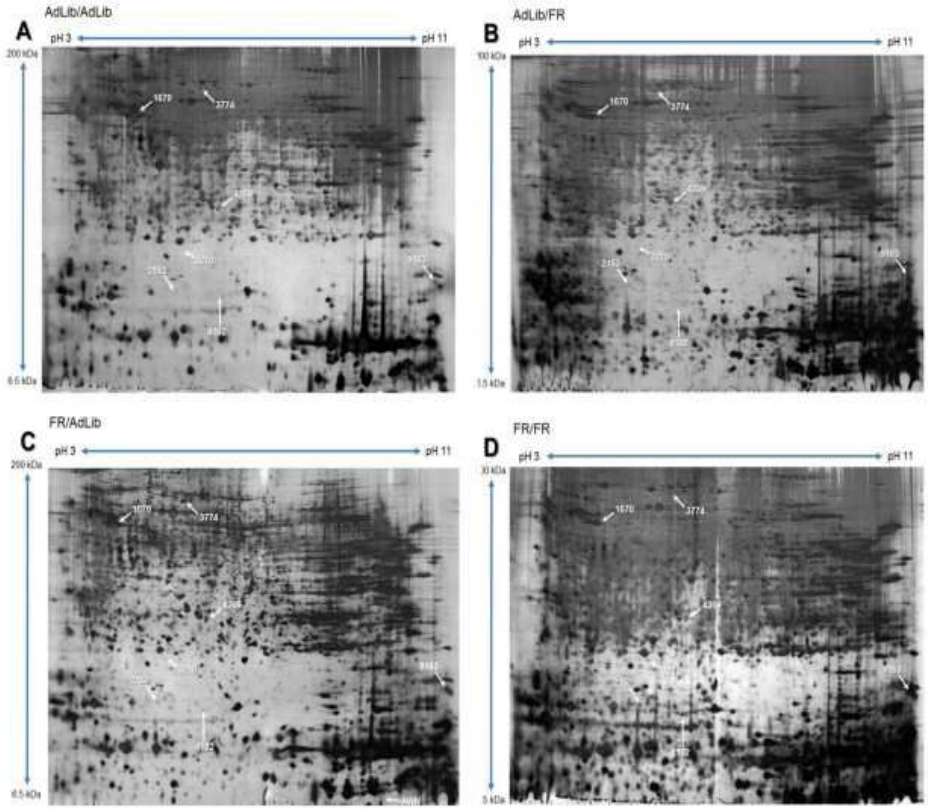
[0163] 따라서, 임신 후기에서의 FR 식이 및 수유시의 정상 식이를 급여하는 모성에서의 태아 프로그래밍은 그들의 자

손의 간 기능을 손상시킨다. 종합하면, 본 발명은 임신 후기 및 수유시의 모성에 의한 차별화된 음식 섭취가 3주령 자손의 간에서의 BHMT1, MTHFD1, 및 ATP5B 발현에 유의적인 영향을 미친다는 것을 제시한다. 특히, BHMT1 및 MTHFD1의 발현은 단일-탄소 대사의 방해를 통해 웅성 자손에서의 혈청 Hcy의 유의적인 증가와 관련이 있었다. 이는 임신 후기의 모성 식이 제한 및 수유시의 정상 식이가 래트 자손에서의 단일-탄소 대사에 관한 간 기능의 성별 특이적인 결손을 야기한다는 것을 제안한다.

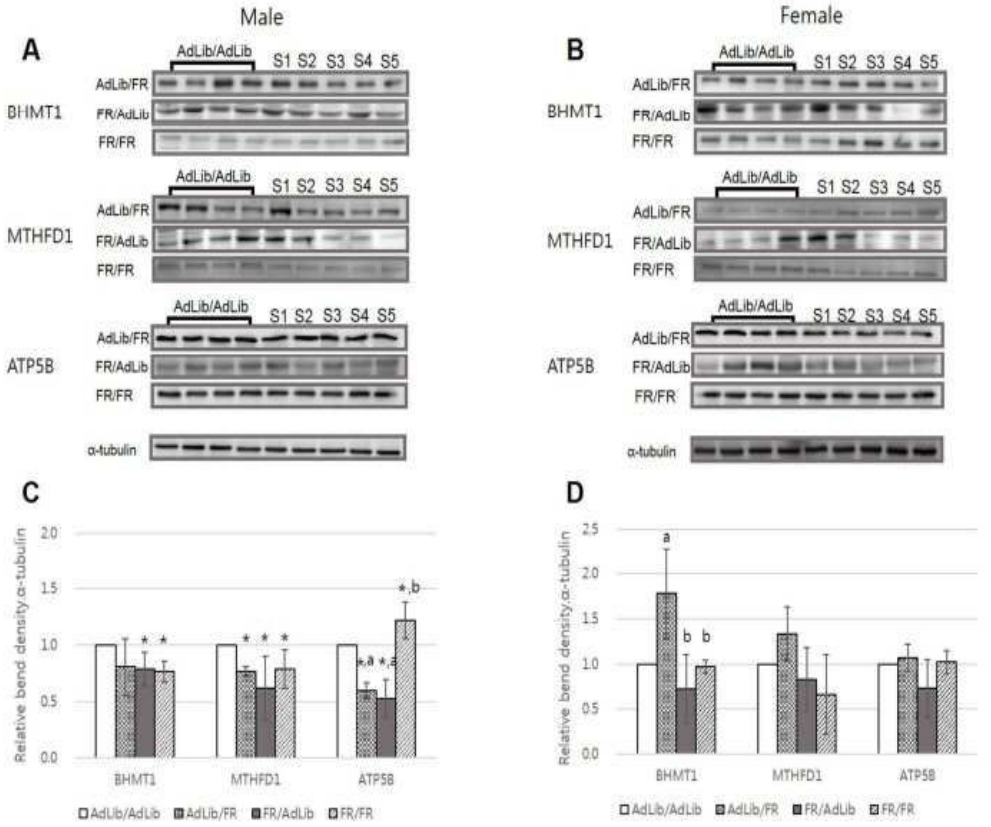
[0164] 게다가 웅성 자손은 대사성 증후군, 심혈관 질환 및 신경관 결손 등과 같은 질환의 증가된 감수성을 갖는다.

도면

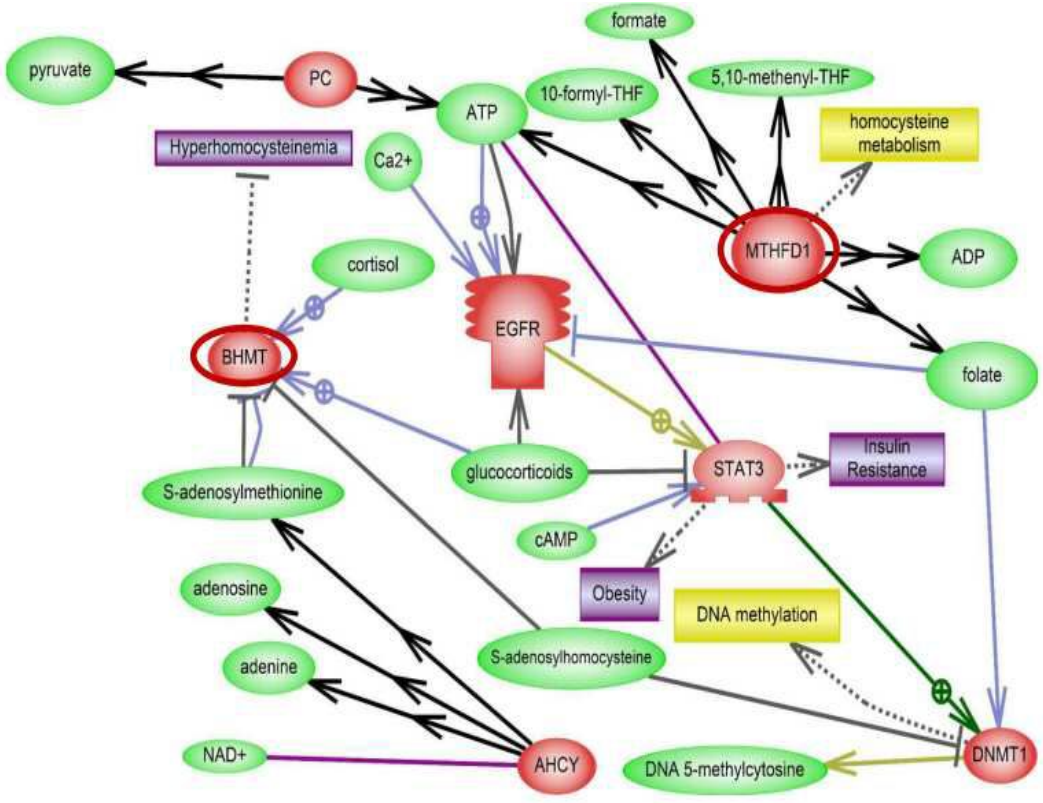
도면1



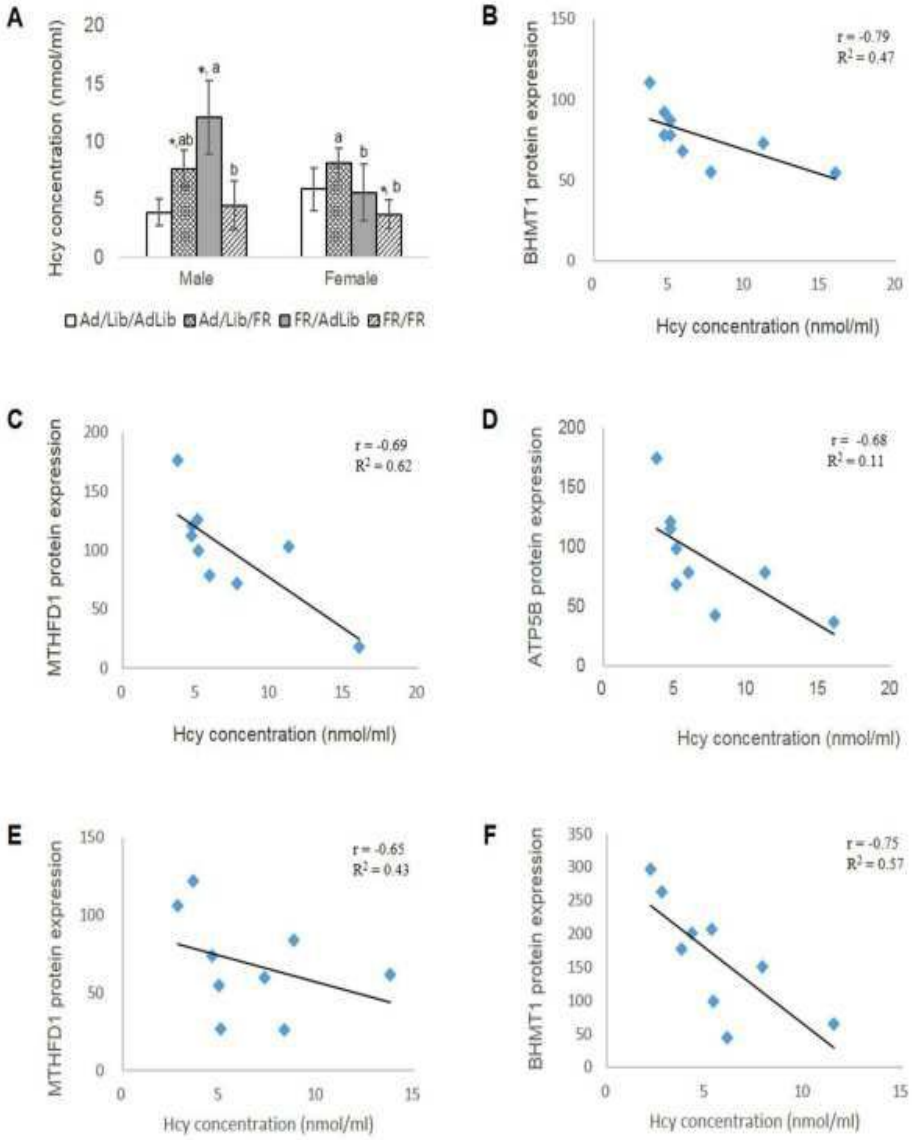
도면2


Male
Female
A
B
AdLib/AdLib
S1 S2 S3 S4 S5
AdLib/FR
FR/AdLib
FR/FR
BHMT1
MTHFD1
ATP5B
α-tubulin
C
D
Relative bend density:α-tubulin
BHMT1
MTHFD1
ATP5B
AdLib/AdLib
AdLib/FR
FR/AdLib
FR/FR

도면3


pyruvate
PC
ATP
formate
10-formyl-THF
5,10-methenyl-THF
homocysteine metabolism
Hyperhomocysteinemia
Ca2+
cortisol
MTHFD1
ADP
EGFR
BHMT
folate
glucocorticoids
STAT3
Insulin Resistance
S-adenosylmethionine
cAMP
adenosine
Obesity
DNA methylation
adenine
S-adenosylhomocysteine
NAD+
AHCY
DNA 5-methylcytosine
DNMT1

도면4


A
Hcy concentration (nmol/ml)
20
15
10
5
0
*, a
*, ab
a
b
b
*, b
Male
Female
Ad/Lib/AdLib
Ad/Lib/FR
FR/AdLib
FR/FR
B
BHMT1 protein expression
150
100
50
0
r = -0.79
R² = 0.47
0
5
10
15
20
Hcy concentration (nmol/ml)
C
MTHFD1 protein expression
200
150
100
50
0
r = -0.69
R² = 0.62
0
5
10
15
20
Hcy concentration (nmol/ml)
D
ATP5B protein expression
200
150
100
50
0
r = -0.68
R² = 0.11
0
5
10
15
20
Hcy concentration (nmol/ml)
E
MTHFD1 protein expression
150
100
50
0
r = -0.65
R² = 0.43
0
5
10
15
Hcy concentration (nmol/ml)
F
BHMT1 protein expression
350
300
250
200
150
100
50
0
r = -0.75
R² = 0.57
0
5
10
15
Hcy concentration (nmol/ml)