(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년11월14일
(11) 등록번호 10-1455284
(24) 등록일자 2014년10월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0090464
(22) 출원일자 2014년07월17일
심사청구일자 2014년07월17일
(56) 선행기술조사문헌
Human Reproduction, Vol.27, No.8 pp. 2541-2548 (2012.06.06.)

(73) 특허권자
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
안정혁
서울특별시 성동구 독서당로 175, 101동 605호 (옥수동, 극동그린아파트)
성혜윤
서울특별시 성동구 독서당로 343, 104동 201호 (금호동1가, 삼성래미안아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

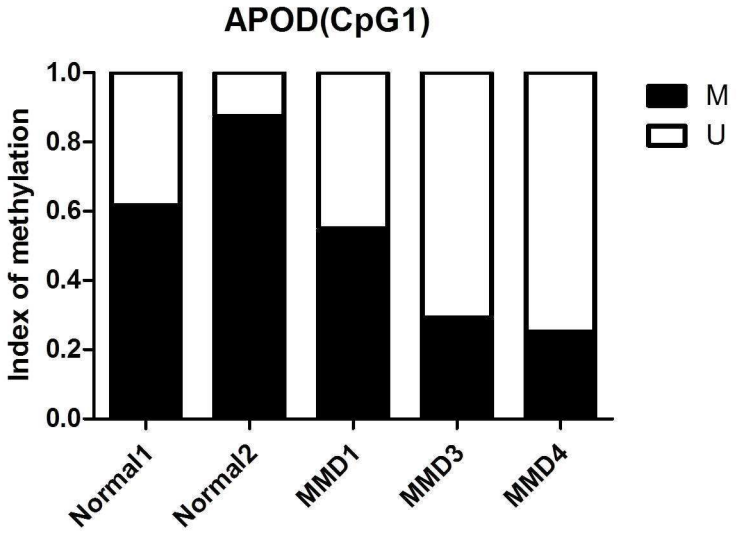
전체 청구항 수 : 총 11 항 심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 **APOD 유전자 프로모터의 CpG 메틸화 변화를 이용한 모야모야병 진단용 조성물 및 이의 이용**

(57) 요 약

본 발명은 APOD(apolipoprotein D) 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 검출함으로써, 모야모야병(Moyamoya disease)을 진단하기 위한 조성물, 키트 및 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

김승기

서울특별시 서초구 방배로 14, 6동 504호 (방배동, 임광아파트)

이지연

서울특별시 성동구 행당로 79, 105동 1412호 (행당동, 행당동대림아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI12C0066
부처명	보건복지부
연구관리전문기관	한국보건산업진흥원
연구사업명	보건의료기술연구개발사업
연구과제명	소아청소년 뇌신경계 희귀질환 집중연구센터(기능적 단백질체 및 대사체 분석연구)
기 여 율	1/1
주관기관	이화여자대학교 산학협력단/ 서울대학교병원
연구기간	2012.05.01 ~ 2018.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

APOD(apolipoprotein D) 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 모야모야병 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제는,

비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소;

APOD 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화된 서열에 특이적인 프라이머; 및

비메틸화된 서열에 특이적인 프라이머를 포함하는 것인 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 바이설파이트(bisulfite) 또는 이의 염인 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 메틸화 민감성 제한효소는 *Sma*I, *Sac*II, *Eag*I, *Hpa*II, *Msp*I, *Bss*HII, *Bst*UI 또는 *Not*I인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 유전자 프로모터의 CpG 부위는 서열번호 1(3 번 염색체의 195583952 내지 195584073 번째) 또는 서열번호 2(3 번 염색체의 195583956 내지 195584077 번째)의 염기서열 중에 나타나는 CpG 를 포함하는 것인 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 모야모야병 진단용 키트.

청구항 7

모야모야병 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 모야모야병이 의심되는 환자의 생물학적 시료로부터 APOD 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 검출하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 검출하는 방법은,

(a) 수득된 시료 내 게놈 DNA를 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소로 처리하는 단계; 및

(b) 상기 처리된 DNA를 APOD 유전자 프로모터의 CpG 부위를 증폭할 수 있는 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 증폭하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 유전자 프로모터의 CpG 부위는 서열번호 1(3 번 염색체의 195583952 내지 195584073 번째) 또는 서열번호 2(3 번 염색체의 195583956 내지 195584077 번째)의 염기서열 중에 나타나는 CpG 를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 바이설파이트(bisulfite) 또는 이의 염인 방법.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 메틸화 수준을 검출하는 방법은 메틸화 특이적 중합효소반응(methylation-specific polymerase chain reaction), 실시간 메틸화 특이적 중합효소반응(real time methylation-specific polymerase chain reaction), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 정량 PCR, 파이로시퀀싱 및 바이설파이트 시퀀싱으로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 APOD(apolipoprotein D) 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 검출함으로써, 모야모야병(Moyamoya disease)을 진단하기 위한 조성물, 키트 및 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 모야모야병은 특별한 원인 없이 대뇌에 혈액을 공급하는 내경동맥의 말단부나 그 분지부위에 협착과 폐색이 일어나고 뇌기저부에 이상 혈관들이 관찰되는 만성 뇌혈관 질환을 말한다. 어린이의 경우 주로 반복적인 일과성 뇌허혈 발작의 형태로 나타나고, 성인에서는 뇌출혈이 흔히 나타난다. 모야모야병은 대부분 소아기에 발생하여 발달 과정에 있는 소아의 뇌에 지속적이며 심각한 손상을 야기하여, 지능저하, 인지기능저하 및 정서적 발달에 악영향을 미친다. 따라서, 장기적인 학업과 사회생활에 장애를 초래한다.

[0003] 현재 모야모야병 진단에 사용되고 있는 뇌혈관 조영술은 침습적인 진단기술이라 반복적으로 행해지는 검사에 부적절하다. 또한, MRI/MRA는 비침습 진단 방법이기는 하나, 고가의 장비를 사용하므로 스크리닝을 목적으로 하기에는 경제성이 떨어지는 단점이 있다.

[0004] 따라서, 보다 간편하고 정확하고 안정적으로 모야모야병을 진단할 수 있는 기술의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 미국특허공개 제2011-0028331호(2011. 2. 3)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 APOD 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 검출함으로써, 모야모야병을 진단하기 위

한 조성물, 키트 및 방법을 제공하는 것이다.

[0007] 보다 상세하게, 본 발명의 하나의 목적은 APOD 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 모야모야병 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 조성물을 포함하는 모야모야병 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 하나의 목적은 모야모야병 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 모야모야병이 의심되는 환자의 생물학적 시료로부터 APOD 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 하나의 목적은 APOD 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 검출하여 모야모야병을 진단하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 APOD 유전자 프로모터의 특정 CpG 부위가 모야모야병 환자의 혈관내피 전구세포(Endothelial progenitor cell, EPC)에서 특이적으로 저메틸화된다는 발견에 기초한 것으로, 상기 유전자들의 프로모터의 메틸화 정도를 바이오 마커로 이용하여 모야모야병을 진단하는 기술을 제공한다.

[0012] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 모야모야병 환자 3명과 정상인 대조군 2명의 혈액에서 얻은 혈관내피 전구세포에서 게놈 DNA와 RNA를 추출하여, DNA 메틸레이션 마이크로어레이와 mRNA 마이크로어레이 분석을 실시하였으며, 이들 분석 결과를 통합 분석(integration analysis)하여 각 유전자의 프로모터 부위에 존재하는 CpG의 메틸레이션의 변화가 유전자 발현에 영향을 준 유전자들을 선별하였다. 이렇게 선별된 APOD 유전자는 모야모야병의 혈관내피 전구세포에서 대조군 혈관내피 전구세포에 비해 유전자의 발현이 2.6배 정도 증가되어 있었으며, 동시에 프로모터 부위의 2군데 특정 CpG 부위에서 DNA 메틸화가 각각 2.0배 및 1.9배 감소되어 있었다.

[0013] 따라서, 모야모야병 환자의 시료에서 APOD 유전자의 특정 CpG 부위에서 일어나는 DNA 메틸레이션의 특이적인 저메틸화는 모야모야병을 진단하는 바이오 마커로 활용될 수 있다.

[0014] 따라서 하나의 양태로서, 본 발명은 APOD 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 모야모야병 진단용 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0015] 본 발명에서, APOD 유전자는 공지된 유전자 데이터베이스에서 그 서열 정보를 확인할 수 있다. 예를 들어, 인간 APOD 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_001647 에서 확인할 수 있다.

[0016] 본 발명에서 용어, "메틸화"는 DNA를 구성하는 염기에 메틸기가 부착되는 것을 말한다. 바람직하게, 본 발명에서 메틸화 여부는 특정 유전자의 프로모터 부위의 특정 CpG 부위의 사이토신에서 일어나는 메틸화 여부를 의미한다. 메틸화가 일어난 경우 그로 인하여 전사인자의 결합이 방해를 받게 되어 특정 유전자의 발현이 억제되며, 반대로, 비메틸화 또는 저메틸화가 일어나는 경우 특정 유전자의 발현이 증가하게 된다.

[0017] 포유동물 세포의 게놈 DNA 에는 A, C, G 및 T 에 더하여, 사이토신 링의 다섯번째 탄소에 메틸 그룹이 부착된 5-메틸사이토신(5-methylcytosine, 5-mC)이라는 5번째 염기가 존재한다. 5-메틸사이토신의 메틸화는 CpG라고 불리는 CG 디뉴클레오티드(5'-mCG-3')의 C에서만 일어나고, CpG의 메틸화는 alu 또는 트랜스포존과 게놈의 반복서열이 발현되는 것을 억제한다. 또한, 상기 CpG의 5-mC가 자연적으로 탈아미노화하여 티민(T)이 되기 쉽기 때문에, CpG는 포유동물 세포에서 대부분의 후생유전학적 변화가 자주 일어나는 부위이다.

[0018] 본 발명에서 용어, "메틸화 수준의 측정"은 APOD 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것으로서, 메틸화 특이적인 PCR, 예를 들어 메틸화 특이적 PCR(methylation-specific polymerase chain reaction, MSP), 실시간 메틸화 특이적 PCR(real time methylation-specific polymerase chain reaction), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 또는 정량 PCR 등을 통해 측정할 수 있다. 또는, 파이로시퀀싱 및 바이설파이트 시퀀싱과 같은 자동염기분석 등의 방법으로 측정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 바람직하게, 본 발명에서 APOD 유전자의 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, 3 번 염색체의 195583952 내지 195584073 번째 염기서열(서열번호 1) 또는 3 번 염색체의 195583956 내지 195584077 번째 염기서열(서열번호 2) 중 61번째 염기에 나타나는 CpG 부위의 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다.

[0020] 본 발명에서는 상기 인간 게놈 염색체 부위의 염기서열은 최신 버전인 The December 2011 Human reference sequence(GRCh38/hg38)에 따라 표현하였지만, 상기 인간 게놈 염색체 부위의 구체적 서열은 게놈 서열 연구 결

과가 업데이트됨에 따라서 그 표현이 다소 변경될 수 있으며, 이러한 변경에 따라 본 발명의 상기 인간 게놈 염색체 부위의 표현이 상이해질 수 있다. 따라서, 본 발명의 The December 2011 Human reference sequence(GRCh38/hg38)에 따라 표현된 인간 게놈 염색체 부위는 본 발명의 출원일 이후 인간 표준 염기서열(human reference sequence)이 업데이트되어 상기 인간 게놈 염색체 부위의 표현이 지금과 다르게 변경된다고 하여도, 본 발명의 범위가 상기 변경된 인간 게놈 염색체 부위에 미치게 됨은 자명하다고 할 것이다. 이러한 변경 내용은 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자라면 누구라도 용이하게 알 수 있는 사항이다.

[0021] 본 발명에서 용어, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 모야모야병 발병 여부를 확인하거나, 나아가 질환의 진행 여부 또는 심화 여부를 확인하는 것이다.

[0022] 본 발명에서 혈관내피 전구세포의 비정상적인 메틸레이션의 변화는 조직, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 또는 뇨와 같은 생물학적 시료에서 얻은 게놈 DNA의 메틸레이션 변화와 상당한 유사성을 보이므로, 본 발명의 마커를 이용할 경우 모야모야병 진단에 대하여, 혈액이나 체액 등을 통한 손쉬운 진단이 가능하다는 장점이 있다.

[0023] 본 발명에서, CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제는 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소, APOD 유전자의 메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머, 및 비메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다.

[0024] 상기 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 바이설파이트(bisulfite) 또는 이의 염일 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 바람직하게는 소듐 바이설파이트일 수 있다. 이러한 바이설파이트를 이용하여 비메틸화 사이토신 잔기를 변형시켜 프로모터의 메틸화 여부를 검출하는 방법은 당 업계에 널리 공지되어 있다(WO01/26536; US2003/0148326A1).

[0025] 또한, 상기 메틸화 민감성 제한효소는 CpG 부위의 메틸화를 특이적으로 검출할 수 있는 제한효소로서 제한효소의 인식부위로 CG를 함유하는 제한효소일 수 있다. 예를 들면, *Sma*I, *Sac*II, *Eag*I, *Hpa*II, *Msp*I, *Bss*HII, *Bst*UI, *Not*I 등이 있으며 이에 제한되지 않는다. 상기 제한효소 인식부위의 C에서의 메틸화 또는 비메틸화에 따라 제한효소에 의한 절단 여부가 달라지고 이를 PCR 또는 서던블롯(Southern Blot) 분석을 통해 검출할 수 있게 된다. 상기 제한효소 이외의 다른 메틸화 민감성 제한효소는 당 업계에 잘 알려져 있다.

[0026] 모야모야병이 의심되는 환자의 APOD 유전자의 프로모터 특정 CpG 부위에서의 메틸화 수준을 측정하는 대표적인 방법으로, 환자의 생물학적 시료에서 게놈 DNA를 수득하고, 수득한 DNA에 메틸화되지 않은 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소를 처리한 후, 상기 처리된 DNA를 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 증폭시키고 그 증폭된 결과물의 존부를 확인하는 것을 통해 측정할 수 있다.

[0027] 따라서, 본 발명의 제제는 APOD 유전자의 메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머 및 비메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 본 발명에서, 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3 말단 수산화기를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 또한, 프라이머는, 7개 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 센스 및 안티센스 핵산으로서, DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다.

[0028] 본 발명의 프라이머는 메틸화 여부를 분석하는 대상이 되는 특정 CpG 부위의 서열에 따라 바람직하게 디자인될 수 있으며, 각각 메틸화되어 바이설파이트에 의해 변형되지 않았던 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍, 및 메틸화되지 않아 바이설파이트에 의해 변형된 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍일 수 있다.

[0029] 상기 조성물 및 키트에는 상기 제제 이외에도, 중합효소 아가로스, 전기영동에 필요한 완충용액 등이 추가로 포함될 수 있다.

[0030] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 APOD 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 검출하여 모야모야병을 진단하는 방법에 관한 것이다.

[0031] 또한, 본 발명은 모야모야병 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 모야모야병이 의심되는 환자의 생물학적 시료로부터 APOD 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0032] 일예로, 본 발명은 모야모야병이 의심되는 환자의 생물학적 시료로부터 APOD 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메

틸화 수준을 검출하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 대조군 시료의 해당 유전자 프로모터의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 모야모야병 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0033] 본 발명에서 용어 "생물학적 시료"란 모야모야병에 의해 APOD 유전자 프로모터의 메틸화 수준이 차이 나는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 먼저, 모야모야병이 의심되는 환자로부터 게놈 DNA를 수득하여 메틸화 수준을 검출하기 위하여, 게놈 DNA의 수득은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 페놀/클로로포름 추출법, SDS 추출법(Tai et al., Plant Mol. Biol. Reporter, 8: 297-303, 1990), CTAB 분리법(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide; Murray et al., Nuc. Res., 4321-4325, 1980) 또는 상업적으로 판매되는 DNA 추출 키트를 이용하여 수행할 수 있다.

[0035] 상기 유전자 프로모터의 특정 CpG 부위의 메틸화 수준을 검출하는 단계는, 보다 상세하게는, (a) 수득된 시료 내 게놈 DNA를 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소로 처리하는 단계; 및 (b) 상기 처리된 DNA를 해당 유전자 프로모터의 특정 CpG 부위를 증폭할 수 있는 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 증폭하는 단계를 포함할 수 있다.

[0036] 상기 (a) 단계에서 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 바이설파이트일 수 있으며, 바람직하게는 소듐 바이설파이트일 수 있다. 이러한 바이설파이트를 이용하여 비메틸화 사이토신 잔기를 변형시켜 프로모터의 메틸화 여부를 검출하는 방법은 당 업계에 널리 공지되어 있다.

[0037] 또한, 상기 (a) 단계에서 메틸화 민감성 제한효소는 상기에서 설명한 바와 같이, 특정 CpG 부위의 메틸화를 특이적으로 검출할 수 있는 제한효소로서 제한효소의 인식부위로 CG를 함유하는 제한효소일 수 있으며, 예를 들면, *Sma*I, *Sac*II, *Eag*I, *Hpa*II, *Msp*I, *Bss*HII, *Bst*UI, *Not*I 등이 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0038] 상기 (b) 단계에서 증폭은 통상적인 PCR 방법에 의해 수행될 수 있다. 이때 사용되는 프라이머는 상기에서 설명한 바와 같이, 메틸화 여부를 분석하는 대상이 되는 특정 CpG 부위의 서열에 따라 바람직하게 디자인될 수 있으며, 각각 메틸화되어 바이설파이트에 의해 변형되지 않았던 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍 및 메틸화되지 않아 바이설파이트에 의해 변형된 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 쌍일 수 있다.

[0039] 상기 유전자 프로모터의 특정 CpG 부위의 메틸화 수준을 검출하는 단계는, (c) 상기 (b) 단계에서 증폭된 결과물의 존부를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 (c) 단계에서 증폭된 결과물의 존부는 당 업계에 공지된 방법, 예를 들면 전기영동을 수행하여 원하는 위치의 밴드의 검출 여부에 따라서 수행될 수 있다. 예를 들면, 비메틸화 사이토신 잔기를 변형시키는 화합물을 사용한 경우 상기 (a) 단계에서 사용한 두 종류의 프라이머쌍, 즉 메틸화되어 바이설파이트에 의해 변형되지 않았던 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍 및 메틸화되지 않아 바이설파이트에 의해 변형된 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍에 의해 각각 증폭된 PCR 결과물의 존부에 따라 메틸화 정도를 판단할 수 있다. 바람직하게, 샘플 게놈 DNA를 바이설파이트로 처리하고, 해당 유전자의 CpG 부위를 PCR로 증폭하고, 증폭된 부위의 염기서열을 분석하는 바이설파이트 게놈 시퀀싱 방법을 사용하여 메틸화 여부를 판단할 수 있다.

[0040] 또한, 제한효소를 이용한 경우에도 당 업계에 공지된 방법, 예를 들어 mock DNA에서 PCR 결과물이 나타난 상태에서, 제한효소로 처리된 DNA에서 PCR 결과물이 있는 경우는 프로모터가 메틸화된 것으로 판단하고, 제한효소로 처리된 DNA에서 PCR 결과물이 없는 경우는 프로모터가 비메틸화 한 것으로 판단하는 것에 따라 그 메틸화 여부를 판단할 수 있으며, 이는 당업자에게 자명하다. 상기에서 mock DNA란 시료에서 분리되고 아무런 처리를 하지 않은 상태의 시료 DNA를 의미한다.

[0041] 이와 같은 방법에 따라, 환자 시료 내 APOD 유전자 프로모터의 CpG 부위가 저메틸화 상태로 검출되는 경우, 모야모야병이라고 진단 또는 예측할 수 있는 것이다.

[0042] 따라서, 상기 본 발명에 따를 경우, APOD 유전자 프로모터의 특정 CpG 부위의 저메틸화는 모야모야병 환자의 시료에서 특이적으로 나타나며 모야모야병 환자의 APOD 의 발현에 영향을 미치므로, APOD 유전자 프로모터의 저메틸화 여부를 바이오마커로 사용하여 모야모야병 진단에 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0043] 본 발명은 환자의 생물학적 시료에서 채취한 게놈 DNA의 특정 유전자 프로모터 부위의 메틸화 정도를 측정하여 모야모야병을 진단하는 분자생물학적 진단법을 제공하며, 이는 간편하고 비침습적이며 경제적인 장점이 있다.

또한, DNA 메틸화 변화는 검출이 용이하고, 종래 단백질이나 RNA 마커들에 비해 안정적이며 분석이 쉬운 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 mRNA 및 CpG 메틸레이션 데이터를 통합하는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 2는 정상인(Normal1, Normal2) 및 모야모야병 환자(MMD1, MMD3, MMD4)의 혈관내피 전구세포에서 APOD 유전자의 발현 정도를 확인한 결과를 나타낸다.

도 3은 정상인(Normal1, Normal2) 및 모야모야병 환자(MMD1, MMD3, MMD4)의 혈관내피 전구세포에서 APOD 유전자의 프로모터 CpG 부위에서 DNA 메틸레이션의 변화를 DNA 메틸레이션 마이크로어레이로 분석한 결과를 나타낸다.

도 4는 정상인(Normal1, Normal2) 및 모야모야병 환자(MMD1, MMD3, MMD4)의 혈관내피 전구세포에서 APOD 유전자의 프로모터 CpG 부위에서 DNA 메틸레이션의 변화를 DNA 메틸레이션 마이크로어레이로 분석한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0046] <u>실시예 1. 혈관내피 전구세포의 수득 및 배양</u>

[0047] 서울대학교 어린이병원에서 모야모야병으로 진단되어 수술받은 환자 3명 및 정상대조군 2명에서 공여 받은 말초혈액 각각에 대하여, 동량의 RPMI로 1:1 희석한 후, Ficoll 1077 g/mL (Histopaque-1077; Sigma, St. Louis, MO)을 사용하여 밀도차이를 이용한 방법으로 mononuclear cell 층을 분리하였다. 분리한 mononuclear cell을 모아 washing 해준 뒤 cell counting하여 $2x10^6$ cells/well 로 collagen type 1으로 코팅된 6-well culture dish (BD BioCoat; BD Biosciences, Mountain View, CA)에 배양하였으며, 37℃, 5% CO_2 배양기 조건에서 media는 3일에 한번씩 갈아주었다.

[0048] <u>실시예 2. Total RNA 추출</u>

[0049] 정상인 2명 및 모야모야병 환자 3명의 혈관내피 전구세포에서 각각 RNeasy mini kit(Qiagen)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출방법은 제조사의 매뉴얼을 따라 실시하였다. 추출된 total RNA는 spectrophotometer를 이용하여 정량하였으며, RNA 상태는 1% agarose gel에서 전기영동하여 degradation 여부를 확인하였다.

[0050] <u>실시예 3. Genomic DNA 추출</u>

[0051] 정상인 2명 및 모야모야병 환자 3명의 혈관내피 전구세포에서 각각 QIAmp DNA mini kit(Qiagen)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출방법은 제조사의 매뉴얼을 따라 실시하였다. 추출된 genomic DNA는 spectrophotometer를 이용하여 정량하였으며, DNA 상태는 1% agarose gel에서 전기영동하여 degradation 여부를 확인하였다.

[0052] <u>실시예 4. mRNA 마이크로어레이</u>

[0053] GeneChip Human Gene 2.0 ST arrays를 사용하여 mRNA 마이크로어레이를 수행하였다.

[0054] 배경보정(background correction), RMA 표준화(RMA normalization)(Biostatistics. 2003 Apr; 4(2):249-64. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data), 및 log2 변환(log2 transformation)을 거쳐 최종적으로 통계분석에 사용하였다. 두 군에서 차별적으로 발현되는 유전자(Differentially expressed genes, DEGs)를 확인하기 위하여 Bayesian t-test(Limma: Linear Models for.

Microarray Data. Gordon K. Smyth.) 방법을 사용하였다. 최종적으로 p value<0.05 이면서 log2(fold change)의 절대값이 0.585 보다 큰 유전자를 DEG로 선정하였다.

[0055] 실시예 5. DNA 메틸레이션 마이크로어레이

[0056] Infinium(®) Human Methylation 450K BeadChip을 사용하여, DNA 메틸레이션 마이크로어레이를 수행하였다. DNA 메틸레이션 정도는 0~1 값을 갖는 β 값으로 표시되며 β 값 0은 해당 CpG 부위가 완전히 비메틸화 된 것을 의미하며, 1은 완전히 메틸화된 것을 의미한다.

[0057] 두 군에서 차별적으로 메틸레이션되어 있는 유전자(Differentially methylated genes, DMGs)를 확인하기 위하여 Bayesian t-test 방법을 사용하였다. 최종적으로 p value<0.05이면서 절대값 β 차이≥0.3 인 CpG 부위를 차별적으로 메틸레이션되어 있는 CpG 부위(differentially methylated CpG site)로 선정하고, 이 중에서 프로모터 부분에 존재하는 CpG site의 메틸레이션 정도가 변한 유전자를 DMG로 선정하였다.

[0058] 실시예 6. DEG 및 DMG 자료의 통합분석

[0059] 도 1의 과정에 따라, 최종 결정된 DEG 및 DMG 자료를 통합하였다.

[0060] 실험결과

[0061] 1. 혈관내피 전구세포의 후성유전학적 변화와 유전자 발현의 통합분석

[0062] 정상인의 혈관내피 전구세포와 비교하여 모야모야병 환자의 혈관내피 전구세포에서 DNA 메틸레이션의 차이를 나타내는 유전자와 유전자 발현에서 차이를 나타내는 유전자들을 선택하여, 이들 분석 결과를 통합분석(integration analysis)을 통하여 각 유전자의 프로모터 부위에 존재하는 CpG의 메틸레이션의 변화가 유전자 발현에 영향을 주었다고 추정되는 유전자로, APOD 를 선별하였다(표 1).

표 1

[0063]

유전자	Genbank 등록번호	Expression logFC	Expression P.Value	Beta difference	Beta P.Value
APOD	NM_001647	1.394194355	0.040378983	0.38107182	0.049852699
APOD	NM_001647	1.394194355	0.040378983	0.42796088	0.001644122

[0064] 2. 모야모야병 혈관내피 전구세포에서 APOD 유전자의 프로모터 CpG 메틸레이션의 변화와 유전자 발현 변화

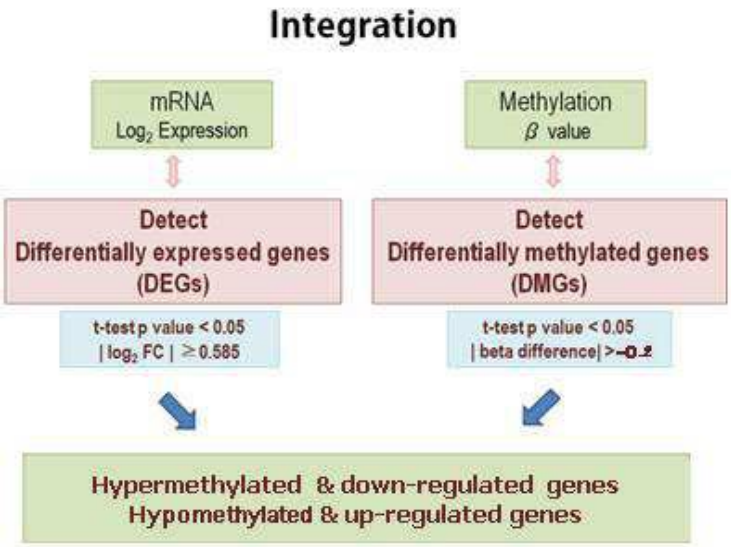
[0065] 정상인의 혈관내피 전구세포와 비교하여 모야모야병 환자의 혈관내피 전구세포에서 APOD유전자의 발현이 증가되어 있는 것을 mRNA 발현 마이크로어레이의 결과를 통해 확인할 수 있었다(도 2).

[0066] 또한, DNA 메틸레이션 마이크로어레이 분석 결과, APOD 유전자의 프로모터에 존재하는 특정 CpG 부위(Chr3:195583952-195584073; 및 Chr3:195583956-195584077의 61번째)의 DNA 메틸레이션이 현저히 낮아져 있었다(도 3 및 도 4).

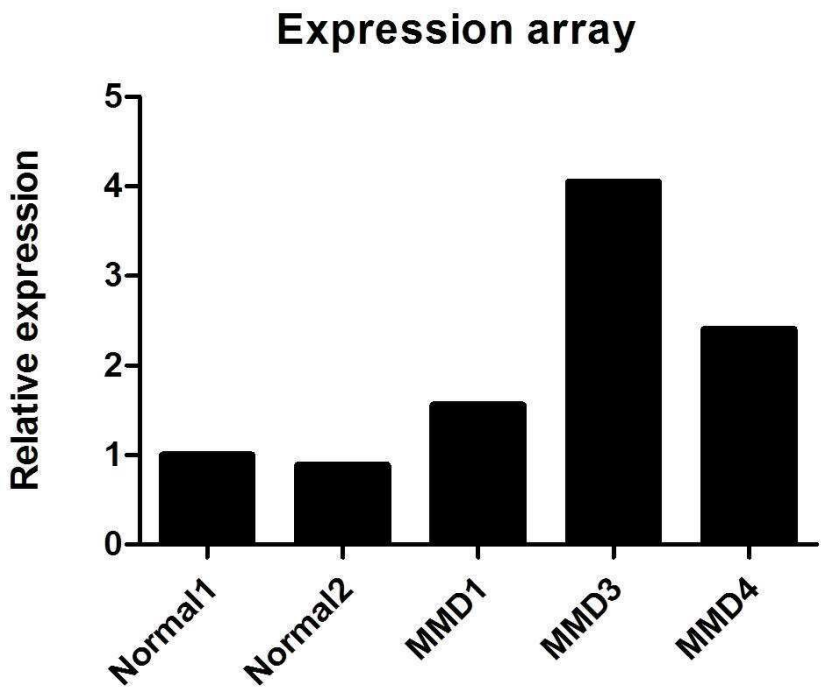
[0067] 이러한 실험 결과는 모야모야병 혈관내피 전구세포에서 나타나는 APOD 유전자의 발현 증가가, APOD 프로모터 부위의 특정 CpG 부위의 저메틸화에 의해서 조절되며, 모야모야병에서 특이적으로 나타나는 현상임을 보여준다.

도면

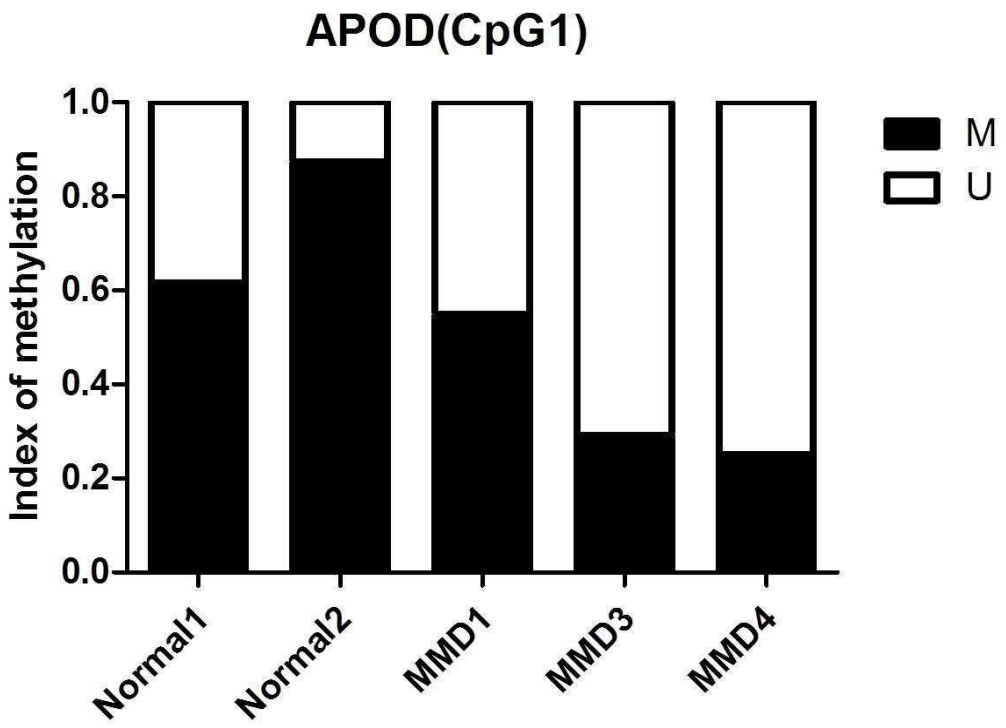
도면1


Integration
mRNA
Log2 Expression
Methylation
β value
Detect
Differentially expressed genes
(DEGs)
Detect
Differentially methylated genes
(DMGs)
t-test p value < 0.05
| log2 FC | ≥ 0.585
t-test p value < 0.05
| beta difference| > 0.2
Hypermethylated & down-regulated genes
Hypomethylated & up-regulated genes

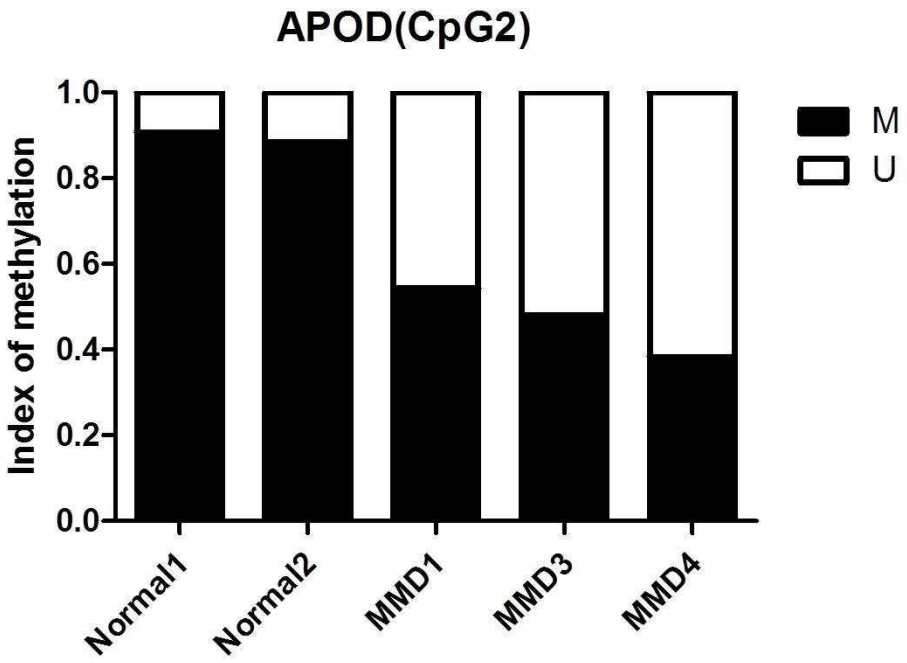
도면2


Expression array
Relative expression
0
1
2
3
4
5
Normal1
Normal2
MMD1
MMD3
MMD4

도면3



도면4



서 열 목 록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

SNU R&DB FOUNDATION

<120> Composition for diagnosing Moyamoya disease using CpG methylation status in promoter region of APDO gene and uses thereof

<130> DPP20142115KR

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> promoter

<222> (1)..(122)

<223> CpG in promoter region of APOD gene (Chr3:195583952-195584073)

<400> 1

tctcccaagc tattttataa gcttcttcag gtctctgatg tttacttttc atgcatgcca 60

cgcccgccgc ccccatccag tcaggagggt tggcctaaaa gcttagtctg tatcgaaaca 120

ca 122

<210> 2

<211> 122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> promoter

<222> (1)..(122)

<223> CpG in promoter region of APOD gene (Chr3:195583956-195584077)

<400> 2

ccaagctatt ttataagctt cttcaggtct ctgatgttta cttttcatgc atgccacgcc 60

cgccgccccc atccagtcag gagggttggc ctaaaagctt agtctgtatc gaaacacaaa 120

ga 122