(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0046889
(43) 공개일자 2018년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
C12Q 2600/136 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0140357
(22) 출원일자 2017년10월26일
심사청구일자 2017년10월26일
(30) 우선권주장
1020160141863 2016년10월28일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
홍재상
서울특별시 강서구 곰달래로41길 14, 303호(화곡동, 오케이파크빌)
이도훈
서울특별시 성북구 개운사1길 8, 406호(안암동5가)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

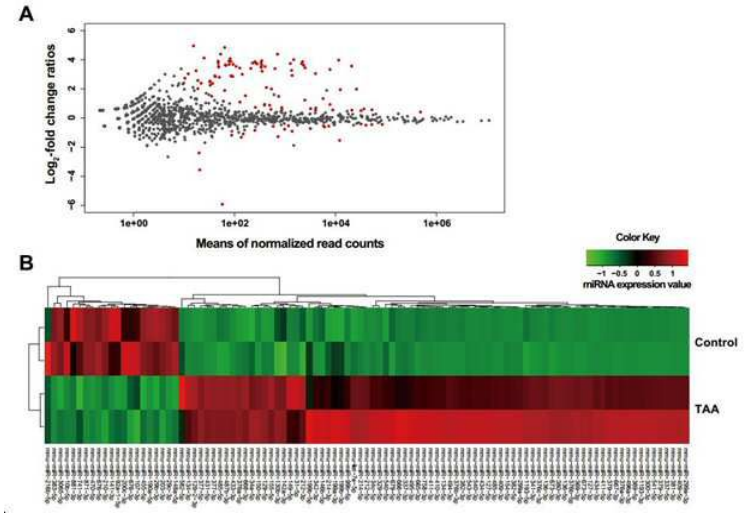
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **마이크로RNA를 포함하는 간질환 진단용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 마이크로RNA를 포함하는 간질환 진단용 바이오마커 조성물 및 간질환 진단을 위한 정보제공 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 마이크로RNA는 간섬유화를 포함하는 간질환의 발병 시 발현량이 변화하므로, 상기 마이크로RNA는 간질환 진단을 위한 바이오마커 조성물로 활용될 수 있다. 아울러 본 발명에 따른 마이크로RNA는 관련 질병의 기전의 규명, 치료 약물의 탐색, 진단법의 개발 등에 다양하게 활용될 수 있어 간질환 치료연구에 크게 기여할 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/158 (2013.01)
C12Q 2600/178 (2013.01)

(72) 발명자
장유진
서울특별시 중랑구 사가정로37길 54, 201호(면목동, 한일그랑빌)
김종훈
서울특별시 성동구 마장로 137, 212동 505호(상왕십리동, 텐즈힐)

이영식
서울특별시 종로구 명륜길 15-16(명륜3가)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI14C1562020015
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 보건의료기술연구개발사업
연구과제명 중간엽줄기세포 유래 엑소좀 분석을 통한 만성 간섬유화 치료용 후보 RNA 발굴
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2014.10.01 ~ 2016.09.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 101로 표시되는 염기서열로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 마이크로RNA를 포함하는 간질환 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 마이크로RNA는 서열번호 1 내지 8로 표시되는 염기서열로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 것인, 간질환 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 서열번호 1 내지 6으로 표시되는 마이크로RNA는 간질환에 의해 발현이 증가하는 것을 특징으로 하는, 간질환 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 서열번호 7 내지 8로 표시되는 마이크로RNA는 간질환에 의해 발현이 감소하는 것을 특징으로 하는, 간질환 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 5

서열번호 1 내지 101로 표시되는 염기서열로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 마이크로RNA의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 간질환 진단용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 마이크로RNA의 발현수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 마이크로RNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 간질환 진단용 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 간질환은 급만성 간염, 알코올성 지방간, 비알코올성 지방간, 황달, 간농양, 간혈관종, 간섬유화, 간경변 및 간암으로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 것을 특징으로 하는, 간질환 진단용 조성물.

청구항 8

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 간질환 진단용 키트.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR, 실시간 RT-PCR, 노던 블랏팅, RNA 보호분석법 또는 마이크로어레이 칩 용인 것을 특징으로 하는, 간질환 진단용 키트.

청구항 10

생물학적 시료로부터 서열번호 1 내지 101로 표시되는 염기서열로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 마이크로RNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 간질환 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 시료는 혈액, 혈청, 혈장, 림프액, 뇌척수액, 복수, 요 및 조직생검으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택되는 것을 특징으로 하는, 간질환 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 12

(a) 생물학적 시료에 후보물질을 처리하는 단계;

(b) 상기 생물학적 시료로부터 서열번호 1 내지 101로 표시되는 염기서열로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 마이크로RNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 마이크로RNA의 발현 수준을 대조군과 비교하는 단계;를 포함하는 간질환 예방 또는 치료물질의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 마이크로RNA를 포함하는 간질환 진단용 바이오마커 조성물 및 간질환 진단을 위한 정보제공 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 국내 만성 간질환은 발병률이 높은 질병 중 하나로 주요 사망 원인중 하나로 손꼽힌다. 간섬유화는 초기단계에서는 통증이나 자각증상이 나타나지 않고 말기에 발견되기 때문에 사망률이 높아 사회적인 문제를 일으키고 있다. 우리나라의 경우 간경화로 대표되는 간 질환 환자는 70년대 후반부터 꾸준히 늘어나는 추세로 특히, 2001년 사망원인 통계연보에 따르면 국내 40대 남성의 사망원인 1위인 것으로 확인되었으며, 이 후 의약학 분야의 많은 발전에도 불구하고 2003년부터 2012년까지의 질환에 의한 사망원인 통계청 자료에 따르면 간질환에 의한 사망률은 현재까지도 인구 10만명당 13.5 내지 20.5명으로 높게 유지되고 있다.

[0004] 만성 간질환의 대표적인 질환 중 하나인 간섬유화(Liver fibrosis)는 간 조직의 손상으로 인해 염증반응이 계속 진행되어 활성 간성상세포(hepatic stellate cell)에서 다량 분비된 교원질(collagen)과 세포 외기질(extracellular matrix, ECM)의 결합으로 통증이 발생하는 질환으로, 간섬유화가 지속적으로 진행되면 간 조직 내 교원질이 다량 침착되고, 재생결절이 교원질로 둘러싸여 비정상적인 구조를 지니게 되는 간경화(Liver cirrhosis)로 발전된다. 더 나아가 만성 간질환은 두번째로 높은 암 사망 질환인 간암으로 발전될 수 있다.

[0005] 현재 간섬유화 진행을 억제 또는 치료하는 방법에 대해서는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 그 방법으로는 크게 간세포 손상의 원인 제거, 간 조직 내 염증반응 완화, 간섬유화 인자 활성억제, 활성 간성상세포 활성억제, 세포외기질 분해 등의 방법이 알려져있다. 다만, 유전자 치료 및 줄기세포를 이용한 간섬유화 치료방법에 대한 연구는 활발하게 이루어지고 있지 않다.

[0006] ncRNA는 RNA 전사체의 일종으로 단백질로 번역(translation)되지는 않지만 다양한 유전자의 안정성, 전사 및 번역을 조절하는 것으로 보고되고 있다. 특히 인간 유전체로부터 전사되는 RNA들 가운데 97%는 단백질로 번역되지

않는 ncRNA이다. ncRNA 중 microRNA는 뉴클레오티드 약 22개의 크기를 갖는 작은 RNA(small RNA)로 상보적인 염기서열을 가진 mRNA를 분해하거나 단백질로의 번역을 억제함으로써 유전자 발현을 조절하는 RNA 간섭현상을 유발한다. RNA 간섭은 생체의 발생 및 생리, 세포의 분화, 증식 및 사멸, 및 유전체의 안정성 등 거의 모든 생물학적 과정과 밀접하게 관련되어 있으며, 바이러스에 대한 저항성 및 다양한 인간 질병과도 밀접하게 연관되어 있는 것으로 알려져 있다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 특정 마이크로RNA가 간질환 환자, 특히 간섬유화 환자에서 발현 변화가 발생함을 확인하였고, 더 나아가 상기 마이크로RNA를 간질환 진단용 바이오 마커 조성물 등으로 사용할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국특허공개번호 10-2006-0064156호

(특허문헌 0002) 한국특허공개번호 10-2015-0009441호

(특허문헌 0003) 한국특허공개번호 10-2014-0022099호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 마이크로RNA, 보다 구체적으로는 서열번호 1 내지 101로 표시되는 염기서열로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 마이크로RNA를 포함하는 간질환 진단용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 간질환 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

[0011] 또한, 본 발명의 목적은 상기 조성물을 이용하여 간질환 예방 또는 치료 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 101로 표시되는 염기서열로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 마이크로RNA를 포함하는 간질환 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 101로 표시되는 염기서열로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 마이크로RNA의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 간질환 진단용 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 간질환 진단용 키트를 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 생물학적 시료로부터 서열번호 1 내지 101로 표시되는 염기서열로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 마이크로RNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 간질환 진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 (a) 생물학적 시료에 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 생물학적 시료로부터 서열번호 1 내지 101로 표시되는 염기서열로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 마이크로RNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 마이크로RNA의 발현 수준을 대조군과 비교하는 단계;를 포함하는 간질환 예방 또는 치료물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따른 마이크로RNA는 간섬유화를 포함하는 간질환의 발병 시 발현량이 변화하므로, 상기 마이크로RNA

는 간질환 진단을 위한 바이오마커 조성물로 활용될 수 있다. 아울러 본 발명에 따른 마이크로RNA는 관련 질병의 기전의 규명, 치료 약물의 탐색, 진단법의 개발 등에 다양하게 활용될 수 있어 간질환 치료연구에 크게 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 간섬유화 생쥐 동물모델 제작에서 간섬유화 유도 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다(A: 간독성 여부 확인; B: 간섬유화 연관 유전자(col1α1, col1α2, α-SMA)의 발현 양상 확인; C: 콜라겐 침착 여부 확인; D: 활성 간성상세포 및 간 대식세포 발현 여부 확인).

도 2는 간 조직 유래 cDNA 라이브러리로부터 확보한 작은RNA 서열 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 간 조직 유래 각각의 cDNA 라이브러리에서 분석된 서열의 길이 분포(length distribution)를 나타낸 도이다.

도 4는 각 간 조직 유래 cDNA 라이브러리 (Control 및 TAA)부터 확인된 생쥐 마이크로RNA 개수를 나타내는 도이다.

도 5는 간 섬유화가 유도된 간 조직에서 발현 변화가 유도된 마이크로RNA의 발현 패턴(A: scatter plot; B: Hierarchical clustering 및 heatmap)을 보여주는 도이다.

도 6은 간조직에서 RT-qPCR을 이용하여 마이크로RNA의 발현 변화를 나타낸 도이다(Control: 대조군; TAA: TAA로 간섬유화가 유도된 간조직).

도 7은 TGF-β1를 처리한 간성상세포의 활성화를 확인한 결과를 나타낸 도이다(mock: 대조군으로 TGF-β1를 처리하지 않은 간성상세포).

도 8은 TGF-β1에 의해 유도된 활성 간성상세포에서 RT-qPCR을 이용하여 마이크로RNA의 발현 변화를 나타낸 도이다(mock: 대조군으로 TGF-β1를 처리하지 않은 간성상세포; TGF-β1: TGF-β1에 의해 유도된 활성 간성상세포).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명은 마이크로RNA, 보다 구체적으로 서열번호 1 내지 101로 표시되는 염기서열로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 마이크로RNA를 포함하는 간질환 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0023] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0024] 본 발명에 있어서, 진단용 바이오 마커는 간질환, 특히 간섬유화를 정상 간 조직과 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상 조직에 비하여 간섬유화 조직에서 발현 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질 또는 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함하며, 바람직하게는 마이크로RNA이며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 서열번호 1 내지 101로 표시되는 염기서열의 변이체 또한 본 발명의 범위 내에 포함된다. 본 발명은 상기 염기서열의 등가물, 예를 들어, 일부 염기서열이 결실(deletion), 치환(substitution) 또는 삽입(insertion)에 의해 변형되었지만, 간질환의 진단용 바이오마커로서 상기 마이크로RNA와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체(variants)를 포함하는 개념이다. 구체적으로, 상기 마이크로RNA는 각 서열번호 1 내지 101의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 상기 RNA에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 RNA 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 마이크로RNA는 바람직하게는 서열번호 1 내지 8로 표시되는 염기서열로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 것일 수 있다.

[0027] 본 발명에 있어서, 상기 “마이크로RNA(miRNA)”는 여러 종에 걸쳐 게놈 상에 암호화되어있는 작은 RNA로, 1차 마이크로RNA (primary miRNA), 전구체 마이크로RNA (precursor miRNA) 및 성숙한 마이크로RNA (mature miRNA)

로 발생되어 기능하게 되며, 본 발명에 따른 서열번호 1 내지 101로 표시되는 염기서열로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 마이크로RNA는 성숙한 마이크로RNA이나, 이에 본 발명이 제한되는 것은 아니다.

[0028] 또한, 본 발명에 있어서 상기 마이크로RNA는, 특별히 언급하지 않는 한 헤어핀 형상 구조의 RNA 전구체로서 전사되고, RNaseⅢ 절단 활성을 갖는 dsRNA 절단 효소에 의해 절단되어, RISC라고 불리는 단백질 복합체에 도입되고, mRNA의 번역 억제에 관여하는 16 내지 25 염기, 바람직하게는 18 내지 25 염기, 보다 바람직하게는 20 내지 25 염기의 비코딩 RNA를 의도하여 사용된다. 또한, 본 명세서에서 사용하는 마이크로RNA는 특정한 염기 서열(또는 서열 번호)로 나타내는 마이크로RNA 뿐만 아니라, 상기 마이크로RNA의 전구체(pre-miRNA 또는 pri-miRNA)를 함유하고, 이것들에 의해 코딩되는 마이크로RNA와 생물학적 기능이 동등한 마이크로RNA, 예를 들어 동족체(즉, 호몰로그 또는 오솔로그), 유전자 다형 등의 변이체, 및 유도체를 코딩하는 마이크로RNA도 포함한다. 본 발명은 일 실시예에서 간질환 발병에 의해 발현변화가 유도된 마이크로RNA들 중 miR-411-5p, miR-127-3p, miR-381-3p, miR-136-3p, miR-541-5p, miR-409-5p, miR-383-5p 및 miR-10b-5p를 선별하였다.

[0029] 본 발명의 서열번호 1 내지 6으로 표시되는 마이크로RNA는 간질환에 의해 발현이 증가하는 마이크로RNA이며, 서열번호 7 내지 8로 표시되는 마이크로RNA는 간질환에 의해 발현이 감소하는 마이크로RNA이다.

[0030] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 101로 표시되는 염기서열로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 마이크로RNA의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 간질환 진단용 조성물을 제공한다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 제제는 상기 마이크로RNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명에 있어서, “진단”은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 상기 “진단”은 간질환 특히, 간섬유화 여부를 확인하는 것일 수 있다. 간섬유화를 앓는 환자에서 본 발명에 따른 마이크로RNA의 발현 변화가 발생하므로, 개체의 시료로부터 본 발명의 마이크로RNA의 발현량을 확인함으로써 해당 개체의 간질환, 특히 간섬유화 여부에 대해서 예측이 가능하다.

[0033] 본 발명에 있어서, "프로브"는 유전자의 발현에 의해 발생한 RNA 또는 거기에서 유래되는 폴리뉴클레오티드를 특이적으로 검출하기 위해 사용되는 폴리뉴클레오티드 및/또는 그것에 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0034] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 유전자의 발현에 의해 발생한 RNA 또는 거기에서 유래되는 폴리뉴클레오티드를 특이적으로 인식하여 증폭시킨, 연속하는 폴리뉴클레오티드 및/또는 그것에 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0035] 여기서 상보적인 폴리뉴클레오티드(상보쇄, 역쇄)란, 서열 번호에 의해 정의되는 염기 서열, 또는 상기 염기 서열에서 u가 t인 염기 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드의 전장 서열, 또는 그의 부분 서열(여기에서는 편의상, 이것을 정쇄라고 칭함)에 대하여 A:T(U), G:C와 같은 염기쌍 관계에 기초하여, 염기적으로 상보적인 관계에 있는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 단, 이와 같은 상보쇄는, 대상으로 하는 정쇄의 염기 서열과 완전히 상보 서열을 형성하는 경우에 한하지 않고, 대상으로 하는 정쇄와 엄격한 조건에서 혼성화할 수 있을 정도의 상보 관계를 갖는 것이어도 된다.

[0036] 본 발명에 있어서, 상기 간질환은 급만성 간염, 알코올성 지방간, 비알코올성 지방간, 황달, 간농양, 간혈관종, 간섬유화, 간경변 또는 간암일 수 있고, 바람직하게는 간섬유화, 간경변 또는 간암일 수 있으며, 보다 바람직하게는 간섬유화일 수 있으나, 이에 본 발명이 제한되는 것은 아니다.

[0037] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 101로 표시되는 염기서열로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 마이크로RNA의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 간질환 진단용 조성물을 포함하는 간질환 진단용 키트를 제공한다.

[0038] 본 발명의 마이크로RNA의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 간질환 진단용 키트로 활용하는 방법은 특별한 제한이 있는 것은 아니다. 이러한 본 발명에 따른 간질환 진단용 키트는 서열번호 1 내지 101로 표시되는 염기서열인 마이크로RNA의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 포함한다. 또한 상기 키트는 바람직하게는 상기 마이크로RNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 간질환 진단용 바이오마커 조성물을 포함할 수 있다.

[0039] 본 발명의 간질환 진단용 키트는 RT-PCR, 실시간 RT-PCR, 노던 블랏팅, RNA 보호분석법 또는 마이크로어레이 칩용인 것일 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명은 생물학적 시료로부터 서열번호 1 내지 101로 표시되는 염기서열로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 마이크로RNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 간질환 진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다.

[0041] 본 발명에 있어서, 상기 "생물학적 시료"는 혈액 및 생물학적 기원의 기타 액상 시료, 생검 표본, 조직배양과 같은 고형 조직 시료 또는 이로부터 유래된 세포가 포함된다. 보다 구체적으로 혈액, 혈청, 혈장, 림프액, 뇌척수액, 복수, 요 및 조직생검으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 시료는 검출에 사용하기 전에 전처리할 수 있다. 예를 들어, 여과, 증류, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다. 또한, 상기 시료로부터 핵산을 분리하여 검출에 사용할 수 있다. 바람직하게는 간 조직을 말하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 본 발명에 있어서, 마이크로RNA의 발현 수준 확인은 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Realtime RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등을 이용하여 수행할 수 있으며, 바람직하게는 RT-PCR을 이용할 수 있으며, 이를 이용하여 정상 발현과 비교하여 간질환을 앓는 환자에서 상기 마이크로RNA의 발현의 증가 또는 감소를 확인하여 간질환을 진단할 수 있다.

[0043] 상기 발현 수준을 언급하면서 사용되는 용어들은 "정상" 발현 수준 혹은 값과 비교해서 차동(differential) 수준 혹은 차동 값을 지니거나 상이하게 발현된 것으로서 지칭될 수 있으며, 발현에 있어서 정량적 차이뿐만 아니라 정성적 차이의 둘 모두를 포함한다.

[0044] 특정 구현예에 있어서, 상기 간질환 진단을 위한 정보제공 방법은 본 발명의 서열번호 1 내지 101로 표시되는 염기서열로 이루어진 마이크로RNA에 대하여 수행될 수 있고, 바람직하게는 서열번호 1 내지 8로 표시되는 염기서열로 이루어진 마이크로RNA인 miR-411-5p, miR-127-3p, miR-381-3p, miR-136-3p, miR-541-5p, miR-409-5p, miR-383-5p 및 miR-10b-5p으로 이루어지는 간질환에 대한 바이오마커 세트(총 8개)에 대하여 수행될 수 있다. 상기 마이크로RNA 중 miR-411-5p, miR-127-3p, miR-381-3p, miR-136-3p, miR-541-5p 및 miR-409-5p의 발현이 대조군에 비하여 유의하게 증가하는 경우 및 상기 마이크로RNA 중 miR-383-5p 및 miR-10b-5p의 발현이 유의하게 감소하는 경우 간질환이 발병하였거나, 발병할 위험이 높은 것으로 예측하고, 그렇지 않은 경우는 정상이라고 예측할 수 있다.

[0045] 또한, 본 발명은 (a) 생물학적 시료에 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 생물학적 시료로부터 서열번호 1 내지 101로 표시되는 염기서열로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 마이크로RNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 마이크로RNA의 발현 수준을 대조군과 비교하는 단계;를 포함하는 간질환 예방 또는 치료물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0046] 구체적으로, 간질환 예방 또는 치료용 후보 물질의 존재 및 부존재하에서 마이크로RNA의 발현의 증가 또는 감소를 비교하는 방법으로 간질환 예방 또는 치료물질을 스크리닝하는데 유용하게 사용할 수 있다. 마이크로RNA의 발현 수준을 간접적으로 또는 직접적으로 감소시키는 물질은 본 발명에서 개시하고 있는 간질환 예방 또는 치료물질로서 선택할 수 있다.

[0047] 즉, 간질환 예방 또는 치료용 후보 물질을 처리한 경우에 상기 물질이 세포에서 서열번호 1 내지 6으로 표시되는 마이크로RNA의 발현을 감소시키거나, 서열번호 7 내지 8로 표시되는 마이크로RNA의 발현을 증가시켰다면, 상기 물질을 간질환 예방 또는 치료 물질로 예측할 수 있다.

[0048] 본 발명에 있어서, 상기 대조군은 실험 결과가 제대로 도출되었는지 여부를 판단하기 위해 어떤 조작이나 조건도 가하지 않은 집단을 말하며, 실험의 직접적인 목적을 이루기 위해 설정된 집단인 실험군과 달리, 대조군은 실험군의 결과를 좀 더 확실하게 하기 위해 설정된 집단이다. 본 발명에서의 대조군은 바람직하게는 간질환이 발병한 집단으로부터 얻은 시료에 후보물질을 처리하지 않은 집단을 말한다.

[0049] 상기 스크리닝 방법에서, 후보물질은 통상적인 선정방식에 따라 간질환, 구체적으로 간섬유화, 간경화 또는 간암 등을 포함하는 질환의 예방 또는 치료의 가능성을 지닌 것으로 추정되거나 또는 무작위적으로 선정된 개별적인 핵산, 단백질, 기타 추출물 또는 천연물, 화합물 등이 될 수 있다.

[0050] 이러한 스크리닝 방법에 의하여 얻어진 물질은 이후 간질환의 예방 또는 치료제 개발 과정에서 선도 물질(leading compound)로서 작용하게 되며, 선도 물질을 변형시키고 최적화함으로써, 새로운 간질환의 예방 또는 치료제를 개발할 수 있다.

[0051] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

[0053] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 및 실험예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예 및 실험예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0055] **실시예 1. 간섬유화 생쥐 동물모델 제작**

[0056] **1-1. 사육조건**

[0057] 간섬유화 생쥐 동물모델 제작을 위해 C57BL/6 생쥐(몸무게 20-22 g, 5주령)를 12시간 간격의 명암주기 환경에서 적절한 온도와 습도를 유지하며 사육하였고, 자유롭게 사료와 물에 접근할 수 있는 환경을 조성하였다. 간섬유화를 유도하기 위하여 티오아세타마이드(thioacetamide, TAA)를 복강주사를 통해 한 마리당 200 mg/kg의 용량으로 장기투여(10주, 주 3회)하여 간섬유화 생쥐모델을 제작하였다. 대조군으로 사용하기 위한 생쥐(n = 3)는 실험군 생쥐 (n = 3)와 같은 환경에서 함께 사육하였다.

[0059] **1-2. 간섬유화 생쥐 동물모델 제작 여부 확인**

[0060] 먼저, 간섬유화의 유도 여부를 확인하기 위하여 생쥐의 혈액에서 혈청 (serum)을 채취하여 간독성 여부를 확인할 수 있는 아스파라진산 아미노전이효소(aspartate aminotransferase, AST)와 아스파라진산 아미노전달효소(alanine aminotransferase, ALT) 양을 IDEXX VetTest Chemistry Analyzer(IDEXX Laboratories) 장비를 이용하여 확인하였다. 그 결과를 도 1의 A에 나타내었다.

[0061] 도 1의 A에 나타낸 바와 같이, TAA를 처리한 실험군에서 대조군(saline 투여) 보다 간독성 값이 유의적으로 높게 나타남을 확인하였다. 이를 통해, 간섬유화가 유도되었음을 예측할 수 있었다.

[0062] 다음으로, 간 조직을 분리하여 mRNA 및 단백질 수준에서 간섬유화 연관 유전자의 발현 양상을 조사하였다. mRNA 발현양상을 확인하기 위하여 total RNA를 Trizol(Invitrogen)을 이용하여 추출하였으며, 1 μg의 RNA를 M-MLV(Invitrogen)를 이용하여 역전사를 진행하였다. 생성된 cDNA를 이용하여 콜라겐 타입 1 알파 1(col1α1), 콜라겐 타입 1 알파 2(col1α2) 및 α-SMA의 발현량을 비교분석 하였으며, 18S rRNA를 내부 대조군으로 사용하였다. 그 결과를 도 1의 B(좌측)에 나타내었다. 사용된 프라이머들은 모두 표 1에 나타내었다.

표 1

[0063]

명칭	서열(5'-3')
col1α1-RT-F	GTG AAG CTG GTC CCC AAG
col1α1-RT-R	GCA CCA TTG GCA CCT TTA G
col1α2-RT-F	GCT GTA GGT GCC CCT GGT
col1α2-RT-R	AGC AGG ACC AGC AAA TCC AT
α-SMA-RT-F	TGA AGA TCA AGA TCA TTG CCC
α-SMA-RT-R	TAG AAG CAT TTG CGG TGG AC
18S rRNA-RT-F	GCA ATT ATT CCC CAT GAA CG
18S rRNA-RT-R	GGC CTC ACT AAA CCA TCC AA
miR-411-5p-F	TAG TAG ACC GTA TAG CGT ACG
miR-127-3p-F	TCG GAT CCG TCT GAG CTT GGC T
miR-381-3p-F	TAT ACA AGG GCA AGC TCT CTG T
miR-136-3p-F	ATC ATC GTC TCA AAT GAG TCT T
miR-541-5p-F	AAG GGA TTC TGA TGT TGG TCA CAC T
miR-409-5p-F	AGG TTA CCC GAG CAA CTT TGC AT
miR-10b-5p-F	TAC CCT GTA GAA CCG AAT TTG TG
miR-383-5p-F	AGA TCA GAA GGT GAC TGT GGC T
U6 snRNA-F	CAA AAT CGT GAA GCG TTC CA

universal-R	AGG CAG TGG TAT CAA CGC AGA
miR-RT-adaptor	AGG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT VN
- V는 A, C, 또는 G를 의미한다; N은 A, C, G, 또는 T를 의미한다.	

[0065] 도 1의 B에 나타낸 바와 같이, mRNA 양은 모두 대조군에서 증가됨을 확인하였다.

[0066] 또한, 분리한 간 조직에서 활성 간성상세포(activated hepatic stellate cells, activated HSCs)의 지표로 활용될 수 있는 α-SMA의 단백질 양을 비교분석하기 위하여 passive lysis buffer[50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.5% NP-40 및 protease inhibitor(Roche)]를 이용하여 전체 단백질을 추출하였고, 이를 BCA 단백질 분석 키트(Pierce)를 이용해 농도를 정량하였다. 대조군 및 실험군에서 추출한 단백질 30 μg를 SDS-PAGE를 통해 크기에 따라 분류하였으며, PVDF membrane에 트랜스퍼(transfer)하였다. 이후 α-SMA(1:1000, Sigma)에 대한 1차 항체를 이용하여 블랏팅을 진행하였으며, 로딩 대조군으로 anti-β-Actin(1:5000, Santa Cruz)을 사용하였다. 이들 1차 항체와 membrane을 4℃에서 하룻밤 동안 보관하였고, 2차 항체(HRP-conjugated secondary antibody)와 반응시켰다. 블랏들은 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate(Thermo Scientific)를 이용해 현상하였으며, 발현량을 LAS4000(GE Healthcare) 장비를 이용하여 이미지를 수득하였다. 그 결과를 도 1의 B(우측)에 나타내었다.

[0067] 도 1의 B에 나타낸 바와 같이, mRNA 발현량과 마찬가로 TAA를 투여한 생쥐의 간에서만 간성상세포가 활성화되어 있음을 확인하였다.

[0068] 더불어 분리한 간 조직에서 간섬유화로 인해 유도된 콜라겐(collagen) 침착 여부를 확인하기 위하여 시리우스-레드 염색(Sirius Red staining)을 진행하였다. 우선적으로 분리된 간 조직은 10% 포르말린 용액에서 고정한 후 파라핀블록을 제작하였으며, 4 μm 크기로 조직을 잘라 다음 과정을 진행하였다. 파라핀을 조직에서 제거하기 위하여 자일렌(xylene)에서 보관한 후 100% 에탄올, 15분 > 100% 에탄올, 15분 > 90% 에탄올, 10분 > 80% 에탄올, 10분 > 70% 에탄올, 10분 > 30% 에탄올, 10분씩 보관하여 조직을 수화시켰다. 이후 weigert's hematoxylin(Sigma) 용액에 8분간 보관하여 핵을 염색하였으며, 피크로(picro) 시리우스-레드(Sigma) 용액에 한 시간 동안 보관하여 콜라겐을 염색하였다. 이후 과정에서 수화과정을 역방향으로 30% 에탄올, 5분 > 70% 에탄올, 5분 > 80% 에탄올, 5분 > 90% 에탄올, 5분 > 100% 에탄올, 10분 > 100% 에탄올, 10분 > 자일렌, 10분 > 자일렌, 10분을 순차적으로 진행하였으며, 최종적으로 캐나다 발삼(Canada balsam, Sigma)을 이용하여 샘플을 마운팅하였다. 그 결과를 도 1의 C에 나타내었다.

[0069] 도 1의 C에 나타낸 바와 같이, 대조군에 비해 실험군(TAA)에서 더 많은 콜라겐이 침착되어 있음을 확인하였다.

[0070] 최종적으로, 간섬유화 진행 시 유도되는 간 대식세포(macrophage, Kupffer cell) 및 활성 간성상세포의 여부를 비교분석하기 위하여 면역염색을 진행하였다. 수화과정을 거친 조직 샘플을 항원복구(antigen retrival)를 위해 10 mM 소듐 시트레이트(sodium citrate) (pH 6.0) 용액에서 끓였으며, 세포막 투과화(permeabilization) 및 블로킹(blocking)을 위해 0.1% triton X-100, 0.1% 소듐 시트레이트 용액에서 8분, 5% Blocking ONE(Nacalai tesque)을 함유한 TBST 용액에서 1시간 동안 보관하였다. 이후 1차 항체로 α-SMA(Sigma) 및 F4/80(AbD Serotec)를 각각 붙였으며, 형광을 나타내는 2차 항체를 각각 넣어 보관하였다. 면역염색이 완료된 샘플을 DAPI가 포함되어있는 마운팅 미디엄(VECTOR LABORATORIES)을 이용하여 마운팅하였으며, 공초점 레이져 현미경(confocal laser scanning microscope, Carl Zeiss)에서 확인하여 활성 간성상세포 및 간 대식세포의 발현 여부를 비교분석하였다. 그 결과를 도 1의 D에 나타내었다.

[0071] 도 1의 D에 나타낸 바와 같이, 대조군 대비 실험군 간 조직에서만 대식세포 및 간성상세포가 활성화된 것을 확인하였다.

[0073] **실시예 2. 간 조직 유래 작은 RNA cDNA 라이브러리(small RNA cDNA library) 제작**

[0074] 본 발명의 마이크로RNA를 얻기 위하여 간 조직 유래 작은 RNA cDNA 라이브러리를 제작하였다. 먼저 상기 실시예 1에서 티오아세타마이드(TTA) 처리를 통해 확립된 간섬유화 생쥐 모델의 간 조직으로부터 전체 RNA를 분리하였다. 보다 구체적으로 간섬유화 생쥐 모델에서 분리한 20 내지 30 mg의 간 조직을 트리졸(Trizol, Invitrogen사) 용액에서 분쇄하여 전체 RNA를 추출한 후 애질런트 바이오애널라이저 2100(Agilent bioanalyzer 2100, Agilent

Technologies사)을 이용하여 QC(quality control)를 실시하였고, 이로부터 RNA의 질을 확인하고 양을 정량화하였다.

[0075] 그 후 총 4개의 작은 RNA 샘플(n=2, 대조군; n=2, 실험군(TAA 처리군))을 TruSeq 작은 RNA 제작 키트(TruSeq small RNA preparation kit, Illumina)를 이용하여 작은 RNA에 대한 cDNA 라이브러리를 제작하였다. 보다 구체적으로 각각의 5', 3' RNA 어답터와 작은 RNA의 라이게이션(ligation)을 실시한 후, 3' 어답터 특이적인 RNA 프라이머를 이용하여 역전사(reverse transcription, RT)를 실시하였다. 생성된 cDNA를 이용하여 라이브러리를 제작하는 과정에서 각 작은 RNA 샘플을 표지할 수 있는 인덱스 시퀀스(index sequence)를 지닌 프라이머 (primer)들을 이용하여 11회 사이클을 통한 PCR(polymerase chain reaction) 반응을 통해 작은 RNA cDNA 라이브러리를 제작하였다. 제작된 작은 RNA cDNA 라이브러리를 확인하기 위해 상기와 같이 애질런트 바이오애널라이저 2100을 이용해 QC를 실시하였고, 이로부터 각 라이브러리에 대한 작은 RNA cDNA의 질을 확인하고 그 양을 정량화하였다.

[0077] **실시예 3. 생물학 정보를 이용한 마이크로RNA 선별 및 분석**

[0078] **3-1. 서열 크기에 따른 작은 RNA 분류**

[0079] 간질환 진단에 사용할 본 발명의 마이크로RNA를 선별하기 위해 상기 실시예 2에서 제작된 작은 RNA cDNA 라이브러리에 대하여 Nextseq 500(Illumina)의 클러스터 제작 및 고속대량스크리닝(high-throughput sequencing)을 실시하였고, 실시 결과를 이용하여 생명정보학으로 작은 RNA cDNA 라이브러리를 상세하게 분석하였다.

[0080] 보다 구체적으로, 실시예 2에서 확보한 작은 RNA cDNA 라이브러리에 이 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법으로 고속대량스크리닝을 실시한 후, 그 결과 분류한 염기서열 중 쿼러티 스코어(quality score)가 13 이상인 염기서열만을 택하여 낮은 질을 보이는 염기서열들을 제거한 후, Galaxy 프로그램을 이용하여 어답터 및 그 외 오염물질을 제거하여 16 nt 이상의 작은 RNA 서열을 확보하였다. 이후 크기에 따른 마이크로RNA의 분포를 확인하였다. 확보한 작은 RNA 서열 분석 결과를 도 1에 나타내었고, 이들을 크기 분포도로 나타낸 그래프는 도 2에 나타내었다. 본 실험은 생쥐의 개체별 오차를 최소화하기 위해 동일한 조건으로 2회 반복 실험을 하였으며, 그 결과는 각각 control-1과 control-2 및 TAA-1과 TAA-2로 나타내었다.

[0081] 도 1에 나타낸 바와 같이, 고속대량스크리닝을 통해 control-1, control-2, TAA-1 및 TAA-2 샘플에서 확보한 작은 RNA 서열은 각각 64,571,359 리드(read), 70,236,541 리드, 67,696,012 리드 및 78,730,133 리드의 서열을 확보할 수 있었으며, 보다 구체적으로 16 이상 길이의 뉴클레오티드의 리드는 평균적으로 작은 RNA cDNA 라이브러리의 전체 리드의 95.52%에 해당하는 67,087,904 리드임을 확인하였다. 또한 도 2에 나타낸 바와 같이, 각 샘플에서 마이크로RNA의 평균길이에 해당하는 22 길이의 뉴클레오티드가 가장 많은 분포를 보임을 확인하였다.

[0083] **3-2. cDNA 라이브러리로부터 마이크로RNA 선별**

[0084] 상기 실시예 3-1에서 확인한 깨끗한 리드(clean read)가 생쥐 게놈(mm10)과 매칭되는지 여부를 Bowtie 프로그램을 이용하여 분류하였다. 동시에 release 83(Ensembl) 출처 데이터베이스를 이용하여 매칭되는 서열이 어떤 RNA 종에 해당되는 지를 확인하였으며, 특히 마이크로RNA는 release 21 데이터베이스를 이용하여 종을 확인하였다. 확인한 성숙 마이크로RNA는 각 샘플에서 42,609,845 리드, 6,224,018 리드, 43,836,911 리드 및 48,878,003 리드인 것으로 작은 RNA 중 가장 높은 풍부도를 나타내었다.

[0085] htseq-count 프로그램을 이용하여 각 라이브러리에서 확인되는 마이크로RNA의 수를 산술화 하여 각 마이크로RNA의 수를 표준화하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다. 최종적으로 간 섬유화가 유도된 간조직에서 발현 변화되는 마이크로RNA를 선별하기 위하여 이들을 DEseq2 프로그램을 이용하여 마이크로RNA의 발현 변화를 정량화하였으며, 이를 통계적으로 분석하였다. p-value가 0.05 보다 작은 마이크로RNA를 실험군인 TAA에 의해 간섬유화가 발병된 생쥐의 간 조직에서 발현 변화하는 마이크로RNA로 선별하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0086] 도 3에 나타낸 바와 같이, 현재까지 전체 생쥐 성숙 마이크로RNA 1,907 리드 중 1,256 리드가 확인되며, 651 리드는 발현량이 적거나 없기 때문에 확인되지 않았다. 대조군 그룹에서는 1,125 리드, 실험군 그룹에서는 1,162 리드의 마이크로RNA가 확인되었다. 공통적으로 확인된 마이크로RNA는 1,031 리드이며, 94 리드 및 131 리드의 마이크로RNA는 대조군 및 실험군에서 발현이 특이적으로 확인되었다. 통계적인 발현량 차이를 바탕으로 선별한

마이크로RNA를 나타내는 도 4의 A 및 B에 따르면 마이크로RNA의 101 리드에서 발현 변화를 확인하였고, 그 중 80 리드에서는 대조군보다 실험군에서 마이크로RNA의 발현이 증가하고 21 리드에서는 발현이 감소하는 것을 확인하였다. 따라서 최종 선별된 마이크로RNA 101개를 간질환, 특히 간섬유화의 진단에 활용할 수 있음을 확인하였다.

[0088] **실시예 4. 간 조직에서 RT-qPCR을 통해 선별된 마이크로RNA 발현변화 확인**

[0089] 실시예 3에서 선별한 마이크로RNA의 발현변화 검증을 위하여 선별된 101개의 마이크로RNA 중 다시 8개를 선별하여 RT-qPCR을 수행하였고, 이를 위해 필요한 작은 RNA를 상기 대조군 및 실험군으로부터 분리하기 위하여 트리졸(Trizol) 방법을 변형한 방법을 실시하였다. 먼저 간 조직을 트리졸 700 ㎕와 혼합한 후, 140 ㎕의 클로로포름을 혼합하여 볼텍싱(vortexing)을 수행하였다. 상기 볼텍싱한 혼합물을 15,000X G로 4℃에서 15분간 원심분리하여 유기용매층과 수용액층으로 분리시킨 후 수용액층의 물질을 따로 분리하고, 분리한 물질에 70% 에탄올 500 ㎕을 혼합하여 약 200개 이상의 뉴클레오티드를 가지는 RNA를 침전시켰다. 이후 다시 15,000X G로 4℃에서 15분간 원심분리를 수행하여 침전물을 분리시켰고, 상층액만을 분리하였으며 분리한 상층액에 500 ㎕의 100% 에탄올 및 1 ㎕의 10 mg/ml 글리코겐을 넣고 섞어주었다. 이후 30분 동안 상온에서 보관하여 약 200개 이하의 뉴클레오티드를 가지는 RNA를 침전시켰다. 이후 추가적으로 15,000X G로 4℃에서 15분간 원심분리를 수행하여 침전물을 분리시켰고 상층액을 제거한 후 남은 침전물에 700 ㎕의 70% 에탄올을 넣어주어 세척을 수행하였다. 마지막으로 15,000X G로 4℃에서 5분간 원심분리를 수행하여 침전물을 분리하였고, 무(free) 뉴클레이즈 증류수 5 ㎕를 이용하여 분리된 RNA를 녹여주었다.

[0090] 다음으로, 상기 분리된 작은 RNA를 이용하여 다중 아데닐화 및 역전사를 한 단계로 수행하였다. 보다 구체적으로, 0.5 μg의 작은 RNA와 함께 폴리A 중합효소(NEB사), M-MLV 역전사효소(Invitrogen), 어답터가 부착된 역전사 프라이머, rATP, dNTPs 및 적정한 버퍼를 혼합하여 37℃에서 1시간 30분, 80℃에서 5분 동안 반응을 수행하여 작은 RNA에 대한 cDNA를 생성하였다. 그 후 마이크로RNA 염기서열을 지닌 정방향 프라미어와 역전사 프라이머에 부착가능한 유니버셜 프라이머(universal primer)와 ABI StepOnePlus(Thermo Fisher)를 이용하여 RT-qPCR을 진행하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다. 사용된 프라이머 서열은 실시예 1에 개시한 표 1과 동일하다.

[0091] 도 5에 나타낸 바와 같이, 실시예 3-2에서 선별된 마이크로 RNA 중 mmu-miR-411-5p(서열번호 1), mmu-miR-127-3p(서열번호 2), mmu-miR-381-3p(서열번호 3), mmu-miR-136-3p(서열번호 4), mmu-miR-541-5p(서열번호 5) 및 mmu-miR-409-5p(서열번호 6)은 TAA로 간섬유화가 유도된 생쥐에서 발현이 유의하게 증가하는 것을 확인하였고, mmu-miR-383-5p(서열번호 7) 및 mmu-miR-10b-5p(서열번호 8)는 TAA로 간섬유화가 유도된 생쥐에서 발현이 유의하게 감소하는 것을 확인하였으며, 아울러 고속대량스크리닝을 통하여 확인한 마이크로RNA와 유의적으로 동일한 패턴으로 발현 변화가 발생하는 것임을 확인하였다. 이는 실시예 3-2에서 선별한 마이크로RNA가 간질환, 특히 간섬유화의 진단에 활용될 수 있음을 시사한다.

[0093] **실시예 5. TGF-β1에 의해 유도된 활성 간성상세포에서 마이크로RNA 발현변화 확인**

[0094] 상기 실시예 3 내지 4에서 확인한 바와 같이 TAA 처리로 간섬유화가 유도된 생쥐에서 발현변화가 발생하는 마이크로RNA가 TGF-β1에 의해 활성이 유도된 간 성상세포에서도 발현변화가 유도되는지 여부를 확인하였다. 간 성상세포주로써 인간 hTert-HSC(이하, HSC라 지칭함)를 실험에 사용하였으며, 이는 37℃에서 5% 이산화탄소가 존재하는 대기 조건에서 DMEM(Gibco)에 10% 소태아혈청(Corning), 100U/ml 페니실린 및 100 μg/ml 스트렙토마이신(Gibco)이 포함된 배양액에서 배양하였다.

[0095] 먼저, HSC를 0.2% FBS가 포함된 DMEM에서 24시간 동안 배양하여 불활성화시킨 후, 10 ng/ml의 인간 재조합 TGF-β1을 첨가하여 48시간 동안 추가적으로 배양함으로써 이의 활성화를 유도하였다. 간성상세포의 활성 지표인 α-SMA; 및 TGF-β1 신호전달체계의 활성지표인 pSMAD;의 발현 변화를 웨스턴 블랏팅을 통하여 확인함으로써 상기 활성화를 확인하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0096] 도 6에 나타낸 바와 같이, 내부 대조군으로 사용된 β-액틴의 농도는 일정하게 유지되었음을 확인하였고, TGF-β1 처리에 따라 α-SMA의 발현과 SMAD2 단백질의 발현이 증가하였음을 확인하였다. 이는 TGF-β1 처리에 의하여 간성상세포가 활성화 되었음을 나타낸다.

[0097] 다음으로, TGF-β1에 의하여 활성화된 간성상세포에 대하여 실시예 4에서 수행한 방법과 동일한 방법을 이용하

여 HSC의 작은 RNA의 역전사를 실시하였고, 이 중 TAA 처리에 의해 발현변화가 유도된 마이크로RNA들 중 인간 오솔로그(ortholog) 마이크로RNA 8개를 선별하여 비교하였다. 그 결과는 도 7에 나타내었다.

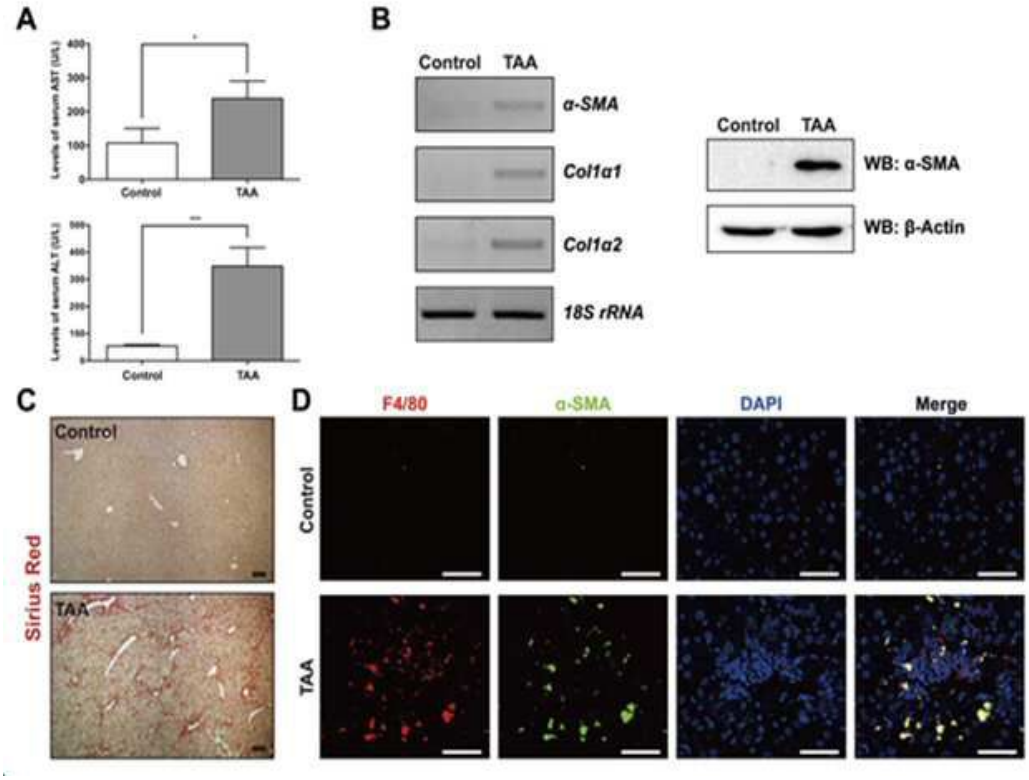
[0098] 도 7에 나타낸 바와 같이, 실시예 4에서 발현 변화를 확인했던 마이크로RNA인 hsa-miR-411-5p(서열번호 1), hsa-miR-127-3p(서열번호 2), hsa-miR-381-3p(서열번호 3), hsa-miR-136-3p(서열번호 4), hsa-miR-541-5p(서열번호 5) 및 hsa-miR-409-5p(서열번호 6)의 발현이 유의하게 증가함을 확인하였고, hsa-miR-383-5p(서열번호 7) 및 hsa-miR-10b-5p(서열번호 8)의 발현이 유의하게 감소함을 확인하여, 이들 모두 실시예 3 및 4에서 확인한 발현 변화 패턴과 일치함을 확인하였다. 상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 마이크로RNA가 간질환 진단을 위한 바이오마커로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0100] 종합적으로, 이상의 실험 결과를 통해 본 발명에 따른 선별된 마이크로RNA는 간질환, 특히 간섬유화의 진단에 활용될 수 있으며, 선별된 101개의 마이크로RNA 중 본 실험에서 발현을 구체적으로 확인한 8개의 마이크로RNA를 이용하여 보다 명확하게 간질환을 진단할 수 있다. 따라서 본 발명의 마이크로RNA를 간질환 진단용 바이오마커 조성물로 활용할 수 있고, 더 나아가 관련 질병의 기전의 규명, 치료 약물의 탐색, 진단법의 개발 등에 다양하게 활용될 수 있어 간질환 치료연구에 크게 기여할 수 있다.

[0102] 비록 본 발명이 상기에 언급된 바람직한 실시예 및 실험예로서 설명되었으나, 발명의 요지와 범위로부터 벗어남이 없이 다양한 수정이나 변형을 하는 것이 가능하다. 또한 첨부된 청구 범위는 본 발명의 요지에 속하는 이러한 수정이나 변형을 포함한다.

도면

도면1



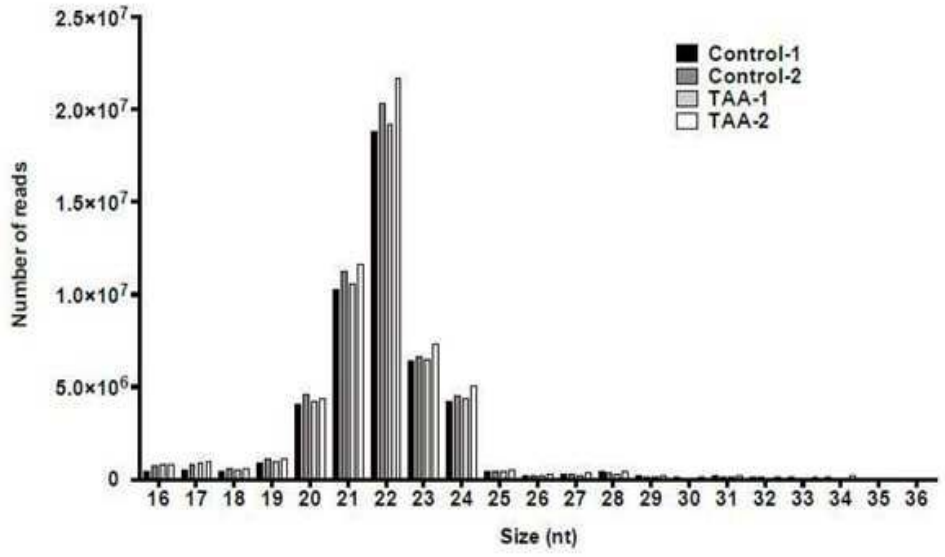
도면2

Sequencing results for small RNA cDNA libraries

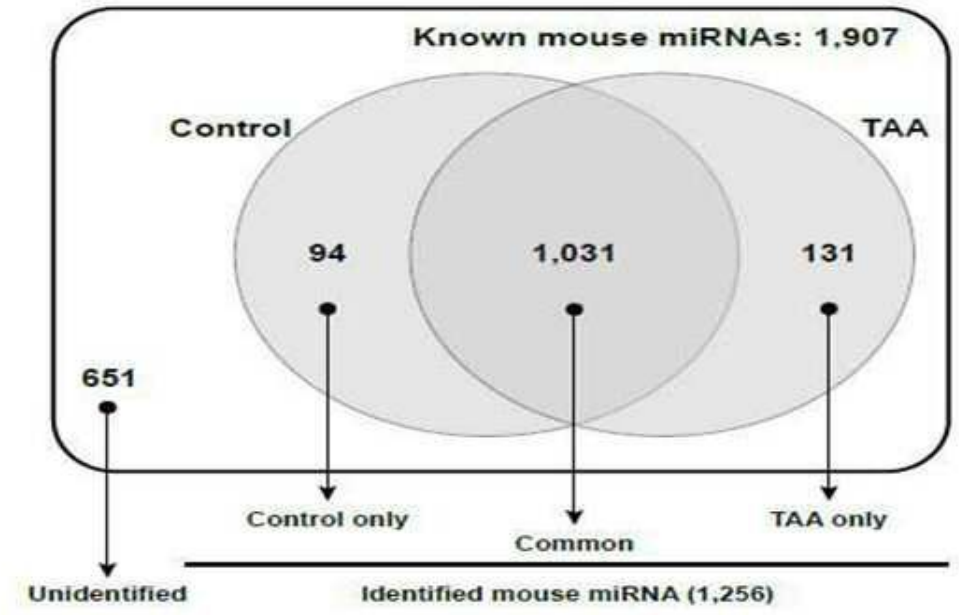
Category	Control-1		Control-2		TAA-1		TAA-2	
	Counts	%	Counts	%	Counts	%	Counts	%
Raw reads	64,571,359	100.00	70,236,541	100.00	67,696,012	100.00	78,730,133	100.00
Low-quality reads	237,270	0.29	217,288	0.23	328,915	0.41	294,974	0.30
Adaptor sequences	53,331	0.08	54,966	0.08	68,224	0.10	85,149	0.11
Short reads (< 16 nts)	1,921,426	2.98	2,671,254	3.80	3,356,591	4.96	3,593,042	4.56
Clean reads (≥ 16 nts)	62,359,332	96.65	67,293,033	95.88	63,942,282	94.53	74,756,968	95.03
Clean reads (≥ 16 nts)	62,359,332	100.00	67,293,033	100.00	63,942,282	100.00	74,756,968	100.00
Genome-matching reads	57,516,882	92.23	61,580,031	91.51	59,396,028	92.89	68,638,124	91.82
Non-genome-matching reads	4,842,450	7.77	5,713,002	8.49	4,546,254	7.11	6,118,844	8.18
Genome-matching reads	57,516,882	100.00	61,580,031	100.00	59,396,028	100.00	68,638,124	100.00
Precursor miRNA	42,624,234	74.11	46,254,442	75.11	43,851,454	73.83	48,894,957	71.24
rRNA	567,225	0.99	530,156	0.86	517,241	0.87	678,076	0.99
tRNA	625,204	1.09	113,945	0.19	125,698	0.21	587,683	0.86
snRNA	13,349	0.02	15,521	0.03	21,062	0.04	25,087	0.04
snoRNA	409,917	0.71	394,152	0.64	411,383	0.69	543,314	0.79
scaRNA	38,293	0.07	28,192	0.05	29,500	0.05	34,834	0.05
lincRNA	287,039	0.50	264,822	0.43	261,093	0.44	365,202	0.53
misc_RNA	7,739	0.01	6,117	0.01	7,075	0.01	9,687	0.01
miRNA	1,351,957	2.35	1,524,227	2.48	1,555,402	2.62	1,946,841	2.84
Unannotated[a]	11,591,925	20.15	12,448,457	20.22	12,616,120	21.24	15,552,443	22.66
Precursor miRNA	42,624,234	100.00	46,254,442	100.00	43,851,454	100.00	48,894,957	100.00
Mature miRNA	42,609,845	99.97	46,224,018	99.93	43,836,911	99.97	48,878,003	99.97

[a] Sequences do not match any known RNA species.

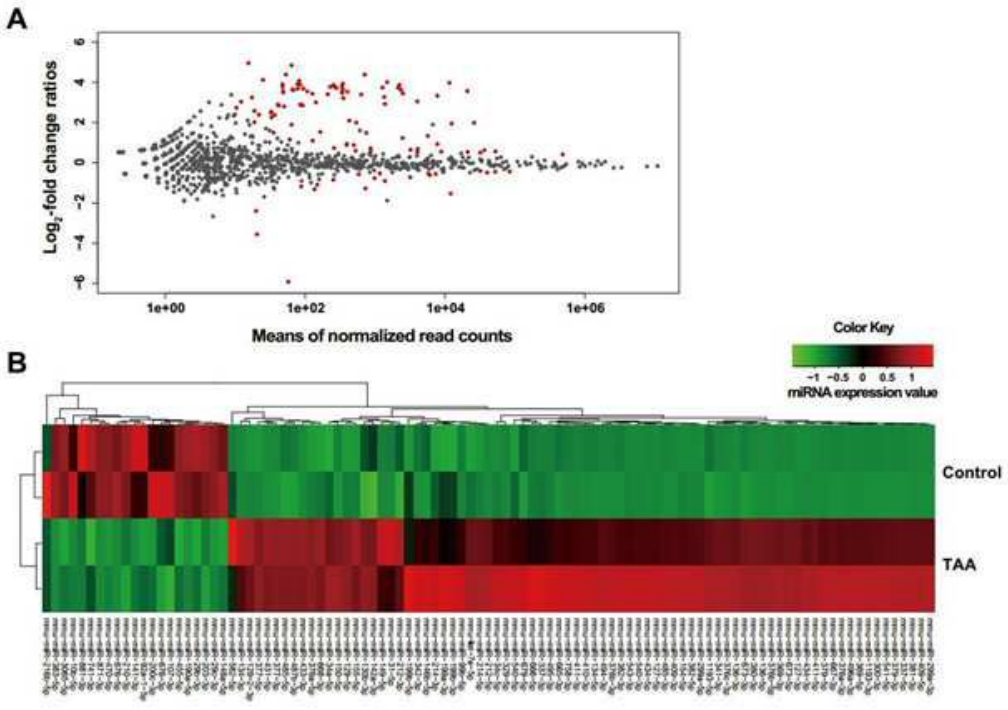
도면3



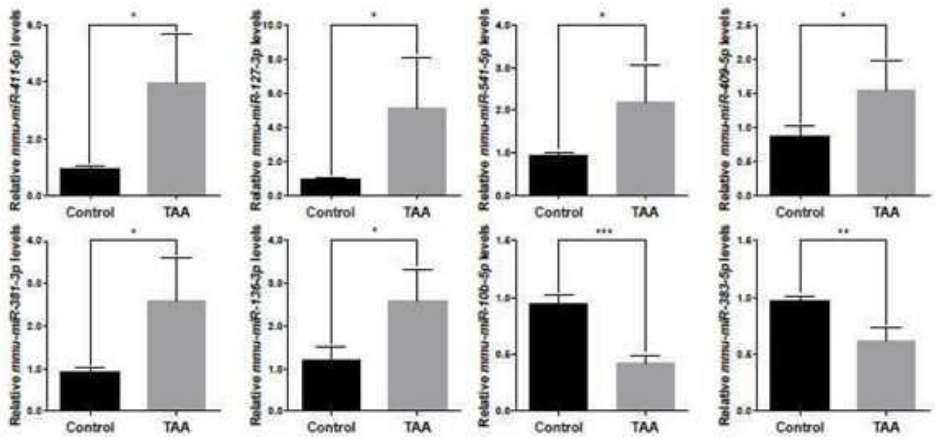
도면4


Known mouse miRNAs: 1,907
Control
TAA
94
1,031
131
651
Control only
Common
TAA only
Unidentified
Identified mouse miRNA (1,256)

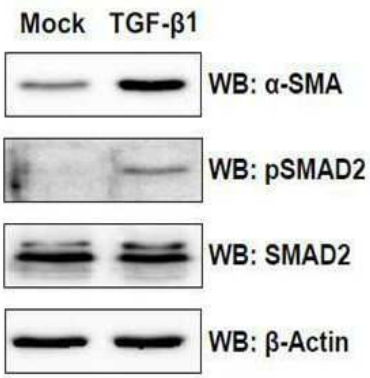
도면5


A
Log2-fold change ratios
6
4
2
0
-2
-4
-6
1e+00
1e+02
1e+04
1e+06
Means of normalized read counts
B
Color Key
−1 −0.5 0 0.5 1
miRNA expression value
Control
TAA

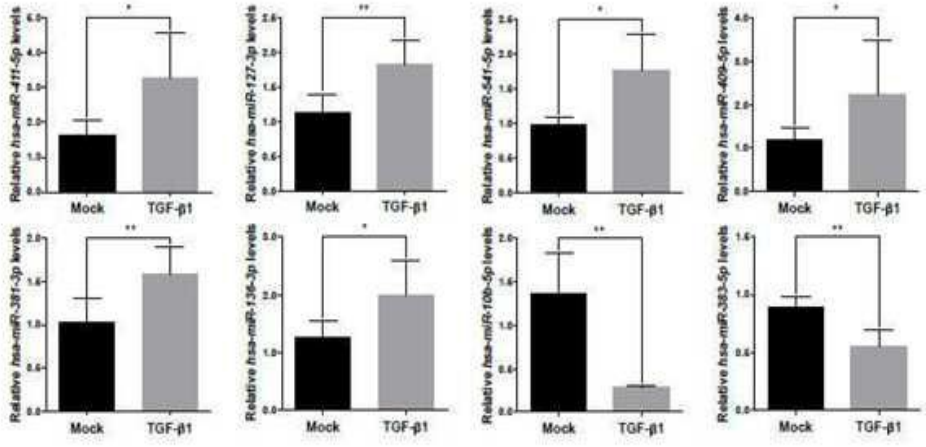
도면6



도면7



도면8



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Composition comprising microRNA for diagnosing liver disease

<130> p-175

<160> 101

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-411-5p

<400> 1

uaguagaccg uauagcguac g 21

<210> 2

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-127-3p

<400> 2

ucggauccgu cugagcuugg cu 22

<210> 3

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-381-3p

<400> 3

uauacaaggg caagcucucu gu 22

<210> 4

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-136-3p

<400> 4

aucaucgucu caaaugaguc uu 22

<210> 5

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-541-5p

<400> 5

aagggauucu gauguugguc acacu 25

<210> 6

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-409-5p

<400> 6

agguuacccg agcaacuuug cau 23

<210> 7

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-383-5p

<400> 7

agaucagaag gugacugugg cu 22

<210> 8

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-10b-5p

<400> 8

uacccuguag aaccgaauuu gug 23

<210> 9

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-let-7e-5p

<400> 9

ugagguagga gguuguauag uu 22

<210> 10

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-107-3p

<400> 10

agcagcauug uacagggcua uca 23

<210> 11

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-1193-3p

<400> 11

uaggucaccc guuuuacuau c 21

<210> 12

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-1193-5p

<400> 12

ugguagaccg gugacguaca 20

<210> 13

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-127-5p

<400> 13

cugaagcuca gagggcucug au 22

<210> 14

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-129-2-3p

<400> 14

aagcccuuac cccaaaaagc au 22

<210> 15

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-129-5p

<400> 15

cuuuuugcgg ucugggcuug c 21

<210> 16

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-130b-3p

<400> 16

cagugcaaug augaaagggc au 22

<210> 17

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-134-3p

<400> 17

cugugggcca ccuagucacc 20

<210> 18

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-134-5p

<400> 18

ugugacuggu ugaccagagg gg 22

<210> 19

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-136-5p

<400> 19

acuccauuug uuuugaugau gg 22

<210> 20

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-141-3p

<400> 20

uaacacuguc ugguaaagau gg 22

<210> 21

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-142a-3p

<400> 21

uguaguguuu ccuacuuuau gga 23

<210> 22

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-146b-5p

<400> 22

ugagaacuga auuccauagg cu 22

<210> 23

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-148a-5p

<400> 23

aaaguucuga gacacuccga cu 22

<210> 24

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-149-5p

<400> 24

ucuggcuccg ugucuucacu ccc 23

<210> 25

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-150-5p

<400> 25

ucucccaacc cuuguaccag ug 22

<210> 26

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-154-5p

<400> 26

uagguuaucc guguugccuu cg 22

<210> 27

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-155-5p

<400> 27

uuaaugcuaa uugugauagg ggu 23

<210> 28

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-190a-5p

<400> 28

ugauauguuu gauauauuag gu 22

<210> 29

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-199a-3p

<400> 29

acaguagucu gcacauuggu ua 22

<210> 30

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-199b-3p

<400> 30

acaguagucu gcacauuggu ua 22

<210> 31

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-199b-5p

<400> 31

cccaguguuu agacuaccug uuc 23

<210> 32

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-200c-3p

<400> 32

uaauacugcc ggguaaugau gga 23

<210> 33

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-203-3p

<400> 33

gugaaauguu uaggaccacu ag 22

<210> 34

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-210-3p

<400> 34

cugugcgugu gacagcggcu ga 22

<210> 35

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-212-3p

<400> 35

uaacagucuc cagucacggc ca 22

<210> 36

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-212-5p

<400> 36

accuuggcuc uagacugcuu acu 23

<210> 37

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-214-3p

<400> 37

acagcaggca cagacaggca gu 22

<210> 38

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-214-5p

<400> 38

ugccugucua cacuugcugu gc 22

<210> 39

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-216b-5p

<400> 39

aaaucucugc aggcaaaugu ga 22

<210> 40

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-299a-3p

<400> 40

uaugugggac gguaaaccgc uu 22

<210> 41

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-299a-5p

<400> 41

ugguuuaccg ucccacauac au 22

<210> 42

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-29b-3p

<400> 42

uagcaccauu ugaaaucagu guu 23

<210> 43

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-29c-3p

<400> 43

uagcaccauu ugaaaucggu ua 22

<210> 44

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-300-3p

<400> 44

uaugcaaggg caagcucucu uc 22

<210> 45

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-31-5p

<400> 45

aggcaagaug cuggcauagc ug 22

<210> 46

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-329-5p

<400> 46

agagguuuuc ugggucucug uu 22

<210> 47

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-337-3p

<400> 47

ucagcuccua uaugaugccu uu 22

<210> 48

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-337-5p

<400> 48

cggcgucaug caggaguuga uu 22

<210> 49

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-341-3p

<400> 49

ucggucgauc ggucggucgg u 21

<210> 50

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-342-3p

<400> 50

ucucacacag aaaucgcacc cgu 23

<210> 51

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-34a-5p

<400> 51

uggcaguguc uuagcugguu gu 22

<210> 52

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-34c-5p

<400> 52

aggcagugua guuagcugau ugc 23

<210> 53

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-369-3p

<400> 53

aauaauacau gguugaucuu u 21

<210> 54

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-369-5p

<400> 54

agaucgaccg uguuauauuc gc 22

<210> 55

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-376a-3p

<400> 55

aucguagagg aaaauccacg u 21

<210> 56

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-376a-5p

<400> 56

gguagauucu ccuucuauga gu 22

<210> 57

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-376b-3p

<400> 57

aucauagagg aacauccacu u 21

<210> 58

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-376b-5p

<400> 58

guggauauuc cuucuauggu ua 22

<210> 59

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-376c-3p

<400> 59

aacauagagg aaauuucacg u 21

<210> 60

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-377-3p

<400> 60

aucacacaaa ggcaacuuuu gu 22

<210> 61

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-377-5p

<400> 61

agagguugcc cuuggugaau uc 22

<210> 62

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-379-3p

<400> 62

uauguaacau gguccacuaa cu 22

<210> 63

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-379-5p

<400> 63

ugguagacua uggaacguag g 21

<210> 64

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-380-3p

<400> 64

uauguaguau gguccacauc uu 22

<210> 65

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-382-3p

<400> 65

ucauucacgg acaacacuuu uu 22

<210> 66

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-382-5p

<400> 66

gaaguuguuc gugguggauu cg 22

<210> 67

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-409-3p

<400> 67

gaauguugcu cggugaaccc cu 22

<210> 68

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-410-3p

<400> 68

aauauaacac agauggccug u 21

<210> 69

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-411-3p

<400> 69

uauguaacac gguccacuaa cc 22

<210> 70

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-431-5p

<400> 70

ugucuugcag gccgucaugc a 21

<210> 71

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-433-3p

<400> 71

aucaugaugg gcuccucggu gu 22

<210> 72

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-434-3p

<400> 72

uuugaaccau cacucgacuc cu 22

<210> 73

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-434-5p

<400> 73

gcucgacuca ugguuugaac ca 22

<210> 74

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-455-5p

<400> 74

uaugugccuu uggacuacau cg 22

<210> 75

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-470-5p

<400> 75

uucuuggacu ggcacuggug agu 23

<210> 76

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-485-3p

<400> 76

agucauacac ggcucuccuc uc 22

<210> 77

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-485-5p

<400> 77

agaggcuggc cgugaugaau uc 22

<210> 78

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-487b-3p

<400> 78

aaucguacag ggucauccac uu 22

<210> 79

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-494-3p

<400> 79

ugaaacauac acgggaaacc uc 22

<210> 80

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-495-3p

<400> 80

aaacaaacau ggugcacuuc uu 22

<210> 81

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-496a-3p

<400> 81

ugaguauuac auggccaauc uc 22

<210> 82

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-540-3p

<400> 82

aggucagagg ucgauccugg 20

<210> 83

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-540-5p

<400> 83

caagggucac ccucugacuc ugu 23

<210> 84

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-543-3p

<400> 84

aaacauucgc ggugcacuuc uu 22

<210> 85

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-582-5p

<400> 85

auacaguugu ucaaccaguu ac 22

<210> 86

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-665-3p

<400> 86

accaggaggc ugaggucccu 20

<210> 87

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-666-5p

<400> 87

agcgggcaca gcugugagag cc 22

<210> 88

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-667-3p

<400> 88

ugacaccugc cacccagccc aag 23

<210> 89

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-668-3p

<400> 89

ugucacucgg cucggcccac uacc 24

<210> 90

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-673-3p

<400> 90

uccggggcug aguucugugc acc 23

<210> 91

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-673-5p

<400> 91

cucacagcuc ugguccuugg ag 22

<210> 92

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-676-3p

<400> 92

ccguccugag guuguugagc u 21

<210> 93

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-676-5p

<400> 93

acucuacaac cuuaggacuu gc 22

<210> 94

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-679-5p

<400> 94

ggacugugag gugacucuug gu 22

<210> 95

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-741-3p

<400> 95

ugagagaugc cauucuaugu aga 23

<210> 96

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-758-3p

<400> 96

uuugugaccu gguccacua 19

<210> 97

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-871-3p

<400> 97

ugacuggcac cauucuggau aau 23

<210> 98

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-881-3p

<400> 98

aacugugucu uuucugaaua ga 22

<210> 99

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-92a-1-5p

<400> 99

agguugggau uugucgcaau gcu 23

<210> 100

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-99b-5p

<400> 100

cacccguaga accgaccuug cg 22

<210> 101

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-3065-5p

<400> 101

ucaacaaaau cacugaugcu gg 22