



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0109629
(43) 공개일자 2024년07월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0001086
(22) 출원일자 2023년01월04일
심사청구일자 2023년01월04일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교
산학협력관 201호(신당동)
(72) 발명자
임승순
서울특별시 강남구 도곡로77길 15-1(대치동)
이재호
대구광역시 달서구 달구벌대로199길 52(호산동)
(74) 대리인
특허법인(유한)아이시스

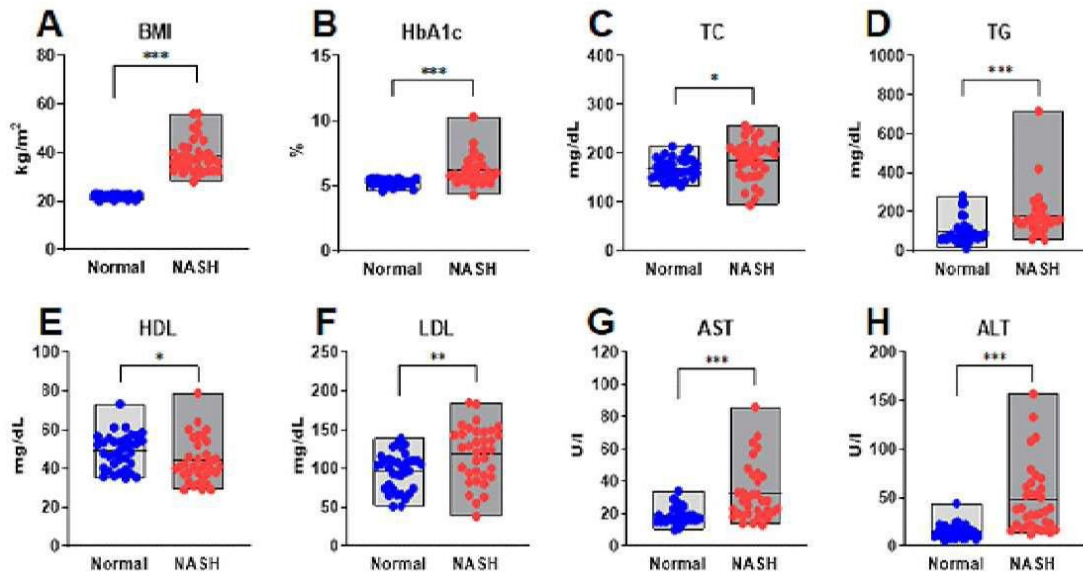
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 리포칼린 2 유전자 또는 단백질을 포함하는 비알콜성 지방간 진단 또는 예후예측용 조성물 및 이를 이용한 진단방법

(57) 요약

본 발명은 비알콜성 지방간 진단 또는 예후예측을 위한 마커 조성물 및 이를 이용한 진단방법에 관한 것이다. 본 발명자들은 비알콜성 지방간 및/또는 간섬유화 환자의 시료에서 리포칼린 2 유전자 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준이 증가함을 확인하였으며, 이를 이용하는 경우 비알콜성 지방간 및/또는 간섬유화를 정확하게 신속하게 진단할 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/118 (2013.01)
 C12Q 2600/136 (2013.01)
 C12Q 2600/158 (2013.01)
 G01N 2800/085 (2013.01)
 G01N 2800/52 (2021.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711146280
과제번호	2019R1A2C2085302
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	스테롤조절인자에 의한 리포칼린2 매개 비알콜성 지방간염 발병기전 및 제어전략
기 여 율	1/1
과제수행기관명	계명대학교 산학협력단
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

리포칼린 2 (lipocalin-2, LCN2) 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, 비알콜성 지방간 진단 또는 예후예측용 마커 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, SREBP-1c 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 더 포함하는, 비알콜성 지방간 진단 또는 예후예측용 마커 조성물.

청구항 3

리포칼린 2 (lipocalin-2, LCN2) 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 수준을 측정하는 재제를 포함하는, 비알콜성 지방간 진단 또는 예후예측용 키트.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 재제는 리포칼린 2 유전자 또는 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 모방체, 기질 유사체, 앵타머 및 항체로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상인, 비알콜성 지방간 진단 또는 예후예측용 키트.

청구항 5

청구항 3에 있어서, SREBP-1c 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 재제를 더 포함하는, 비알콜성 지방간 진단 또는 예후예측용 키트.

청구항 6

개체로부터 분리된 시료로부터 리포칼린 2 (lipocalin-2, LCN2) 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

상기 측정된 시료의 리포칼린 2 유전자 또는 단백질의 발현 수준이 대조군의 리포칼린 2 유전자 또는 단백질의 발현 수준 대비 증가한 경우, 비알콜성 지방간으로 진단하는 단계;를 포함하는, 비알콜성 지방간 진단 또는 예후예측을 위한 정보제공방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 리포칼린 2 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계는 차세대 염기서열 분석(NGS), 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), 정량적 중합효소연쇄반응(qPCR), 경쟁적 역전사 중합효소연쇄반응(Competitive RT-PCR), 실시간 정량중합효소연쇄반응(RT-qPCR), 역 중합효소 연쇄반응(Inverse PCR) 및 RNase 보호분석법(RNase RPA)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 이용하여 수행되는 것인, 정보제공방법.

청구항 8

청구항 6에 있어서, 개체로부터 분리된 시료로부터 SREBP-1c 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

상기 측정된 시료의 SREBP-1c 유전자 또는 단백질의 발현 수준이 대조군의 SREBP-1c 유전자 또는 단백질의 발현 수준 대비 증가한 경우, 비알콜성 지방간으로 진단하는 단계;를 더 포함하는, 비알콜성 지방간 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 9

청구항 6에 있어서, 개체로부터 분리된 시료로부터 물리적 또는 생화학적 매개변수로서 체질량 지수, 당화혈색소, 총콜레스테롤, 중성지방, 저밀도 지단백 콜레스테롤, 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제, 알라닌 아미노트랜스퍼라제 및 고밀도 지단백 콜레스테롤로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 수준을 측정하는 단계; 및

상기 측정된 물리적 또는 생화학적 매개변수의 수준을 하기 (a) 또는 (b)와 같이 비교하여 비알콜성 지방간으로 진단하는 단계;를 더 포함하는, 정보제공방법,

(a) 상기 측정된 시료의 체질량 지수, 당화혈색소, 총콜레스테롤, 중성지방, 저밀도 지단백 콜레스테롤, 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제 및 알라닌 아미노트랜스퍼라제의 수준이 대조군의 수준에 비해 증가한 경우, 비알콜성 지방간으로 진단;

(b) 상기 측정된 시료의 고밀도 지단백 콜레스테롤 수준이 대조군의 수준에 비해 감소하는 경우, 비알콜성 지방간으로 진단.

청구항 10

비알콜성 지방간 치료후보 물질을 질환이 발병된 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 처리하여 리포칼린 2 (lipocalin-2, LCN2) 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 단계; 및

상기 측정한 유전자 또는 단백질의 수준을 후보물질을 처리하지 않은 대조군의 수준과 비교하는 단계;를 포함하는, 비알콜성 지방간 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 리포칼린 2 유전자 또는 단백질을 포함하는 비알콜성 지방간 진단 또는 예후예측용 조성물 및 이를 이용한 진단방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 간은 소화기계와 전신순환계 사이에 위치함으로써 소화기계로 들어온 생체 외 물질로부터 전신을 방어하는 기능을 수행하고 있는 매우 중요한 장기이다. 일단 생체내로 들어온 생체 외 물질이 간을 통과하는 까닭에 간은 영양소 외에도 많은 독성물질에 대한 노출 위험이 다른 장기보다 많아 그만큼 손상될 확률도 다른 장기에 비해 높다.

[0003] 한편, 비알콜성 지방간은 과도한 알콜 섭취 없이 간 세포에 중성지방인 트리글리세라이드의 축적 등으로 발생될 수 있는 질환이다. 비알콜성 지방간은 현대인의 고지방 및 고탄수화물 섭취와 관련된 영양 과다에 따라 계속 증가하고 있다. 비만, 당뇨병인 경우 비알콜성 지방간이 흔히 관찰되지만, 다양한 인자가 비알콜성 지방간과 관련된 것으로 알려져 있다. 비알콜성 지방간을 지닌 성인의 80%가 인슐린 저항성 당뇨병 및 심장질환 등 대사이상 질환으로 발전된다고 보고되고 있다.

[0004] 비알콜성 지방간은 비알콜성 단순 지방간 (non-alcoholic simple steatosis)과 염증을 동반한 비알콜성 지방간염 (non-alcoholic steatohepatitis; NASH)으로 분류되는데, 장기간 방치 시, 간염, 간섬유, 간경변 등의 심각한 간 질환으로 이행될 수 있다. 비알콜성 지방간은 간 세포 (hepatocyte)에서 지방의 축적 (지방 침윤)을 갖는

것을 특징으로 한다. 특히, 비알콜성 지방간염은 과체중, 높은 콜레스테롤 및 트리글리세라이드 수치, 및/또는 인슐린 저항성을 갖는 사람들에서 종종 발생한다.

[0005] 다만, 리포칼린 2가 비알콜성 지방간 및 간섬유화 진단에 이용될 수 있는 바이오마커에 해당함 대해서는 아직까지 밝혀진 바 없으며, 이를 이용한 비알콜성 지방간 및 간섬유화를 진단 및 예후예측하는 방법에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1504069호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 일 양상은 리포칼린 2 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, 비알콜성 지방간 진단 또는 예후예측용 마커 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 다른 양상은 리포칼린 2 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 비알콜성 지방간 진단 또는 예후예측용 키트를 제공하는 것이다.

[0009] 다른 양상은 개체로부터 분리된 시료로부터 리포칼린 2 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 시료의 리포칼린 2 유전자 또는 단백질의 발현 수준이 대조군의 리포칼린 2 유전자 또는 단백질의 발현 수준 대비 증가한 경우, 비알콜성 지방간으로 진단하는 단계;를 포함하는, 비알콜성 지방간 진단 또는 예후예측을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

[0010] 또 다른 양상은 비알콜성 지방간 치료후보 물질을 질환이 발병된 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 처리하여 리포칼린 2 (lipocalin-2, LCN2) 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 단계; 및 상기 측정한 유전자 또는 단백질의 수준을 후보물질을 처리하지 않은 대조군의 수준과 비교하는 단계;를 포함하는, 비알콜성 지방간 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명자들은 리포칼린 2가 간 세포를 간성상세포로 유도하는 인자임을 확인하였으며, 리포칼린 2 유전자 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준을 확인함으로써, 비알콜성 지방간 및 간섬유화 등의 간 질환의 진단 및 예후예측에 이용할 수 있음을 확인하였다.

[0012] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0014] 본 발명은 리포칼린 2 (lipocalin-2, LCN2) 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 포함하는, 비알콜성 지방간 진단 또는 예후예측용 마커 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명에서는 비알콜성 지방간 환자의 시료에서 리포칼린 2 및 SREBP-1c의 발현이 증가함을 확인하였으며, 이에 따라 정상 마우스에 비해 간섬유화 진행이 증가됨을 확인하였다. 이를 통해 리포칼린 2가 비알콜성 지방간 및 간섬유화의 바이오마커로 이용될 수 있음을 확인하였다. 따라서, 리포칼린 2 유전자 또는 단백질은 비알콜성 지방간 및 간섬유화의 진단 및 예후예측에 유용하게 사용될 수 있다.

[0016] 본 명세서에서 "리포칼린 2 (Lipocalin 2, LCN2)"는 리포칼린 패밀리의 일원으로, 지질 및 여타 소수성 분자와 결합하거나 그들을 운반할 수 있다. 또한, LCN2는 세포의 아포토시스 및 생존 모두에서 중요하며, 배발생 (embryogenesis) 중에 신장에서 세포 분화를 유도하는데 중심적인 역할을 하고, 신장을 허혈성 손상으로부터 보호하는 데 작용할 수 있다. 또한, 다양한 형태의 위장관 손상에서 LCN2는 세포 이동을 촉진함으로써 점막의 재생을 용이하게 할 수 있다.

[0017] 다만, LCN2 유전자 및 이로부터 발현되는 단백질의 바이오마커로서의 용도는 알려진 바가 없다. 본 발명의 발명

자들은 개체의 시료 내에서 LCN2 유전자 또는 단백질의 수준 측정을 통해 비알콜성 지방간이 발병되었거나 발병이 의심되는 개체의 발병여부를 정확하게 진단할 수 있음을 확인하였다.

- [0018] 본 명세서에서 “지방간”은 단순 지방간(fatty liver), 알코올성 지방간(alkoholic fatty liver), 영양성 지방간, 기아성 지방간, 비만성 지방간, 당뇨병성 지방간, 지방간염(steatohepatitis), 비알콜성 지방간 질환(non-alkoholic fatty liver disease, NAFLD), 비알콜성 지방간염(non-alkoholic steatohepatitis, NASH) 및 섬유증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [0019] 본 명세서에서 “비알콜성 지방간”은 운동 부족, 고열량 식사 등의 나쁜 생활 습관에 의하여 과잉된 에너지가 간에 중성지방 형태로 쌓여 발생하는 질환을 말한다. 방치할 경우 간염, 간경화에서 간암까지 진행할 수 있으나, 현재까지는 마땅한 치료약이 없어 운동 및 식생활 개선을 통한 치료가 주로 이루어지고 있다. 본 발명에서 상기 비알콜성 지방간은 단순히 지방만 끼어 있고 간세포 손상은 거의 없는 단순 비알콜성 지방간, 간세포 손상이 심하고 지속되는 만성 비알콜성 지방간염, 간경변증에 이르는 다양한 형태의 간질환을 포함한다.
- [0020] 본 명세서에서 “간섬유화”는 간경변증(liver cirrhosis), 간신증후군(hepatorenal syndrome), 간자반병(peliosis hepatis), 대사성 간질환, 만성 간질환, B형 간염 바이러스 감염, C형 간염 바이러스 감염, D형 간염 바이러스 감염, 주혈흡충증(Schistosomiasis), 알콜성 간질환, 비알콜성 지방간염, 당뇨, 단백질 결핍증, 관상동맥질환, 자가면역 간염, 알파-1 항트립신 결핍증(α -1-Antitrypsin deficiency) 및 일차성 담즙성 간경화증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 간섬유증 또는 간경변은 비알콜성 지방간염에 의해 유발된 것일 수 있다.
- [0022] 본 명세서에서 “마커(marker)”는 비알콜성 지방간을 가진 개체를 정상군 개체와 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 비알콜성 지방간을 갖는 개체에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산, 지질, 당지질, 당단백질 또는 당 등과 같은 유기 생체 분자들을 모두 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 마커는 비알콜성 지방간을 갖는 개체에서 수준이 증가되는 유전자 또는 이로부터 발현되는 단백질일 수 있으며, 일 구체예에서, 상기 마커는 리포칼린 2 (lipocalin-2, LCN2) 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질일 수 있다.
- [0024] 본 명세서에서 “진단”은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 비알콜성 지방간 발병 여부를 확인하는 것을 의미할 수 있다.
- [0025] 본 명세서에서 “예후예측”은 “예후”와 동일한 의미로 사용되는데, 질환의 경과 및 결과를 미리 예측하는 행위를 의미한다. 보다 구체적으로, 예후예측이란 질환의 치료 후 경과를 환자의 생리적 또는 환경적 상태에 따라 달라질 수 있으며, 이러한 환자의 상태를 종합적으로 고려하여 치료 후 병의 경과를 예측하는 모든 행위를 의미하는 것으로 해석될 수 있다. 본 발명의 목적상 상기 예후예측은 비알콜성 지방간의 치료 후, 질환의 경과를 미리 예상하여 비알콜성 지방간 또는 간섬유화의 진행 및/또는 재발 등의 위험도를 예측하는 행위로 해석될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 마커 조성물은 SREBP-1c 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질을 더 포함할 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명은 리포칼린 2 (lipocalin-2, LCN2) 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 비알콜성 지방간 진단 또는 예후예측용 키트를 제공한다.
- [0029] 본 발명에서 “유전자 수준 측정”이란 비알콜성 지방간 또는 간섬유화를 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 비알콜성 지방간 또는 간섬유화 마커 유전자들의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 mRNA의 양을 측정하는 것일 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명에서 “유전자 측정 제제”는 비알콜성 지방간 또는 간섬유화를 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 비알콜성 지방간 또는 간섬유화 마커 유전자인 본 발명의 LCN2 유전자 존재 자체를 확인하는 과정으로, 예를 들어, 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 것일 수 있다.
- [0031] 본 발명에서 “단백질의 수준을 측정하는 제제”는 시료에 포함된 표적 단백질의 수준을 측정하는 방법에 사용되는 제제를 의미한다. 단백질의 수준을 측정하는 제제는 당업계에 공지된 단백질 검출 제제를 포함할 수 있고,

예를 들어, 웨스턴 블롯 (western blotting), ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석 (Radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법 (radioimmunodiffusion), 오우크테로니 (Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓 면역전기영동 (rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법 (immunohistochemical staining), 면역침전 분석법 (Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법 (Complement Fixation Assay), 면역형광법 (immunofluorescence), 면역크로마토그래피법 (immunochromatography), FACS (fluorescenceactivated cell sorter analysis), 단백질 칩 분석법 (protein chip technology assay) 및 나노진단 칩 분석법 (nano-diagnosis chip assay) 등의 방법에 사용되는 항체를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0032] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 유전자 또는 단백질 수준 측정 제제는 리포칼린 2 유전자 또는 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 모방체, 기질 유사체, 앵타머 및 항체로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 상기 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기재, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등을 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 기재는 특별히 이에 제한되지 않으나 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스티렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 특별히 이에 제한되지 않으나 퍼옥시다아제 (peroxidase), 알칼라인 포스파타아제 (Alkaline Phosphatase)가 사용될 수 있다. 형광물질은 이에 제한되지 않으나 FITC, RITC 등이 될 수 있고, 발색 기질액은 특별히 이에 제한되지 않으나 ABTS (2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD (o-페닐렌디아민), TMB (테트라메틸 벤지딘)가 될 수 있다.
- [0035] 본 발명에 있어서 키트는 개체의 비알콜성 지방간 진단에 사용하기 위한 시약을 더 포함할 수 있다. 시약은 버퍼, 지시약, 또는 그 조합을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 키트는 SREBP-1c 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 더 포함할 수 있다.
- [0038] 또한, 본 발명은 개체로부터 분리된 시료로부터 리포칼린 2 (lipocalin-2, LCN2) 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0039] 상기 측정된 시료의 리포칼린 2 유전자 또는 단백질의 발현 수준이 대조군의 리포칼린 2 유전자 또는 단백질의 발현 수준 대비 증가한 경우, 비알콜성 지방간으로 진단하는 단계;를 포함하는, 비알콜성 지방간 진단 또는 예후예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0040] 본 명세서에서 "개체"는 비알콜성 지방간이 발병되었거나 발병할 가능성이 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다. 동물은 인간뿐만 아니라 이와 유사한 증상의 치료를 필요로 하는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있다.
- [0041] 본 명세서에서 "시료"란, 비알콜성 지방간이 발병된 환자로부터 분리되어 LCN2 유전자 또는 단백질의 수준을 측정하는 직접적인 대상을 의미하며, 일 구체예에서, 상기 시료는 개체로부터 분리된 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장 및 소변으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0042] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 리포칼린 2 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계는 차세대 염기서열 분석(NGS), 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), 정량적 중합효소연쇄반응(qPCR), 경쟁적 역전사 중합효소연쇄반응(Competitive RT-PCR), 실시간 정량중합효소연쇄반응(RT-qPCR), 역 중합효소 연쇄반응(Inverse PCR) 및 RNase 보호분석법(RNase RPA)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 이용하여 수행되는 것일 수 있다.
- [0043] 본 명세서에서 "대조군"이란 "정상 환자"로도 표현될 수 있으며, 비알콜성 지방간이 발병되지 않거나, 발병이 의심되지 않는 개체를 의미한다.
- [0044] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 정보제공방법은 개체로부터 분리된 시료로부터 SREBP-1c 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 시료의 SREBP-1c 유전자 또는 단백질의 발현 수준이 대조군의 SREBP-1c 유전자 또는 단백질의 발현 수준 대비 증가한 경우, 비알콜성 지방간으로 진단

하는 단계;를 더 포함할 수 있다.

[0045] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 정보제공방법은 개체로부터 분리된 시료로부터 물리적 또는 생화학적 매개변수로서 체질량 지수, 당화혈색소, 총콜레스테롤, 중성지방, 저밀도 지단백 콜레스테롤, 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제, 알라닌 아미노트랜스퍼라제 및 고밀도 지단백 콜레스테롤로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 수준을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 물리적 또는 생화학적 매개변수의 수준을 하기 (a) 또는 (b)와 같이 비교하여 비알콜성 지방간으로 진단하는 단계;를 더 포함할 수 있다. 구체적으로, (a) 상기 측정된 시료의 체질량 지수, 당화혈색소, 총콜레스테롤, 중성지방, 저밀도 지단백 콜레스테롤, 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제 및 알라닌 아미노트랜스퍼라제의 수준이 대조군의 수준에 비해 증가한 경우, 비알콜성 지방간으로 진단; 또는 (b) 상기 측정된 시료의 고밀도 지단백 콜레스테롤 수준이 대조군의 수준에 비해 감소하는 경우, 비알콜성 지방간으로 진단할 수 있다.

[0047] 또한, 본 발명은 비알콜성 지방간 치료후보 물질을 질환이 발병된 개체로부터 분리된 생물학적 시료에 처리하여 LCN2 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정하는 측정 단계, 및 측정된 유전자 또는 단백질의 수준을 후보물질을 처리하지 않은 대조군의 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 비알콜성 지방간 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0048] 본 명세서에서 "치료후보 물질"이란 개체의 시료에서 측정되는 LCN2 유전자 또는 단백질의 수준을 감소시키며, 비알콜성 지방간의 치료 가능성이 있는 물질로, 올리고 뉴클레오타이드, 단백질, 화합물 등을 포함할 수 있다.

[0049] 본 발명에 따른 스크리닝 방법의 비교 단계에서, 개체로부터 분리되는 생물학적 시료내의 LCN2 유전자 또는 단백질 수준이 대조군에 비해서 유의미하게 감소하는 경우, 후보물질은 비알콜성 지방간의 치료제로서 가능성이 있음을 의미한다.

[0050] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물에 의해 골 질환에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

발명의 효과

[0051] 본 발명의 리포칼린 2 유전자 또는 이에 의해 암호화되는 단백질을 포함하는 비알콜성 지방간 및/또는 간섬유화 진단 또는 예후예측용 조성물은 리포칼린 2의 발현 수준 측정을 통해 비알콜성 지방간 및/또는 간섬유화의 진행 정도를 효과적으로 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 정상 대조군 26명과 NASH 환자 35명의 체질량 지수(BMI, body mass index), 혈액에서 분리한 혈청으로 당화혈색소(HbA1c, glycated hemoglobin), 총콜레스테롤(TC, total cholesterol), 중성지방(TG, triglyceride), 고밀도 지단백 콜레스테롤(HDL, high density lipoprotein), 저밀도 지단백 콜레스테롤(LDL, low density lipoprotein), 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제(AST, aspartate aminotransferase) 및 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT, alanine aminotransferase)를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 지방대사 관련 효소들의 발현을 조절하는데 핵심이 되는 전사인자인 SREBP-1c와 LCN2의 유전자 발현 수준을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 정상 대조군 및 NASH 환자의 혈액에서 분리한 혈청을 시료로 사용하여 리포칼린 2의 발현 수준을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0055] 실시예 및 실험예

[0056] 실험예 1. 정상 및 NASH 환자의 혈청에서 물리적 및 생화학적 매개변수 비교

- [0057] 정상 및 NASH(nonalcoholic steatohepatitis) 환자의 혈청을 통해 물리적 및 생화학적 매개변수의 차이를 비교 분석하였다.
- [0058] 구체적으로, 정상 및 NASH 환자의 물리적 및 생화학적 매개변수를 비교하기 위하여 정상 환자 26명과 NASH 환자 35명의 체질량 지수(BMI, body mass index)를 측정하였으며, 혈액에서 분리한 혈청으로 당화혈색소(HbA1c, glycated hemoglobin), 총콜레스테롤(TC, total cholesterol), 중성지방(TG, triglyceride), 고밀도 지단백 콜레스테롤(HDL, high density lipoprotein), 저밀도 지단백 콜레스테롤(LDL, low density lipoprotein), 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제(AST, aspartate aminotransferase) 및 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT, alanine aminotransferase)를 분석하였다.
- [0059] 그 결과, 체질량 지수, 당화혈색소, 총콜레스테롤, 중성지방, 저밀도 지단백 콜레스테롤, 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제 및 알라닌 아미노트랜스퍼라제는 정상 환자에 비해 NASH 환자에서 증가함을 확인하였으며, 고밀도 지단백 콜레스테롤은 NASH 환자보다 정상 환자에서 높음을 확인하였다 (도 1 참조).
- [0061] **실험예 2. 정상 및 NASH 환자의 유전자 및 단백질 발현 확인**
- [0062] 리포칼린 2가 간섬유화 유발에 관여하는 중요한 표적유전자 인지를 확인하였다.
- [0063] 구체적으로, 간섬유화에 리포칼린 2가 중요한 인자인지를 확인하기 위해서 정상 및 NASH 환자의 간 조직에서 분리한 유전자와 단백질을 통해 스테롤 조절인자 결합단백질-1c (SREBP-1c, sterol regulatory element-binding transcription factor-1c)와 리포칼린 2(LCN2, lipocalin 2)의 발현량을 측정하여 비교하였다.
- [0064] 유전자는 TriZol(Invitrogen, Waltham, MA, USA)을 이용하여 정상 및 NASH 환자의 간 조직으로부터 총 RNA를 분리하였으며, cDNA는 iScript™ cDNA 합성 키트(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 합성하였다. 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하기 위해 CFX96™ 실시간 PCR 시스템(Bio-Rad Laboratories)을 이용하여 qPCR을 수행하였다. mRNA 수준은 델타-델타 역치 사이클 방법을 계산하여 리보솜 단백질 RPLP0 mRNA의 발현으로 정규화하였다. qPCR에 사용된 유전자의 프라이머 서열은 하기 [표 1]에 표시하였다.
- [0065] 웨스턴 블랏 분석의 단백질 샘플은 정상 및 NASH 환자의 간 조직에서 추출하여 수행하였다. 프로테아제 및 포스포타아제 억제제(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)가 보충된 T-PER™(Tissue Protein Extraction Reagent; Thermo Scientific)를 사용하여 간 조직 용해물을 추출하였다. 단백질 농도는 제조사의 프로토콜에 따라 BCA protein assay reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 결정하였다. 단백질을 5x 샘플 버퍼(EBA-1052, ELPIS BIOTECH, 한국 서울)로 희석하고 95℃에서 5분 동안 가열하였다. 이후 단백질을 5-15% Tris-HCl SDS/PAGE 겔 전기영동으로 분리하고 니트로셀룰로오스 막(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)으로 옮겼다. 사용된 1차 항체는 SREBP1(SC-13551X, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), LCN2(ab63929, Abcam, Cambridge, UK), GAPDH(2118, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)이며, 모든 면역 블롯은 화학 발광이 강화된 HRP- 접합 2차 항체에 의해 개발하였다(Clarify™ Western ECL Substrate, Bio-Rad Laboratories). 그 후 단백질 밴드는 화학 발광 이미징 시스템(Fusion Fx, Vilber Lourmat, Eberhardzell, Germany)에 의해 검출하였다.
- [0066] 상기 방법에 따라 지방대사 관련 효소들의 발현을 조절하는데 핵심이 되는 전사인자인 SREBP-1c와 LCN2의 유전자 발현 수준을 측정하였다. 그 결과, 정상 환자에 비해 NASH 환자에서 지방대사와 관련된 유전자인 SREBP-1c의 mRNA와 단백질의 발현량이 증가하였고, 간섬유화 유발에 중요한 인자인 LCN2의 mRNA와 단백질 발현량도 증가하는 것을 확인하였다 (도 2A 내지 2B). 이는 리포칼린 2가 NASH 및 간섬유화 진행에 중요한 인자임을 나타낸다.

표 1

[0067]

프라이머	염기서열
SREBP-1c*	Forward GGAGCCATGGATTGCACTTT (서열번호 1)
	Reverse TCAAATAGGCCAGGAAGTCA (서열번호 2)
LCN2**	Forward CAAGGAGCTGACTTCGGAAC (서열번호 3)
	Reverse GACAGGGAAGACGATGTGGT (서열번호 4)
RPLP0***	Forward GTGCTGATGGCAAGAAC (서열번호 5)
	Reverse AGGTCTCCTTGGTGAAC (서열번호 6)

[0068] *SREBP-1c, sterol regulatory element-binding transcription factor-1c;

[0069] **LCN2, lipocalin 2;

[0070] ***RPLP0, ribosomal protein lateral stalk subunit P0.

[0072] **실험예 3. 정상 및 NASH 환자의 리포칼린 2 발현량 확인**

[0073] 간섬유화 발달 단계에 따른 리포칼린 2의 발현양의 변화를 확인하였다.

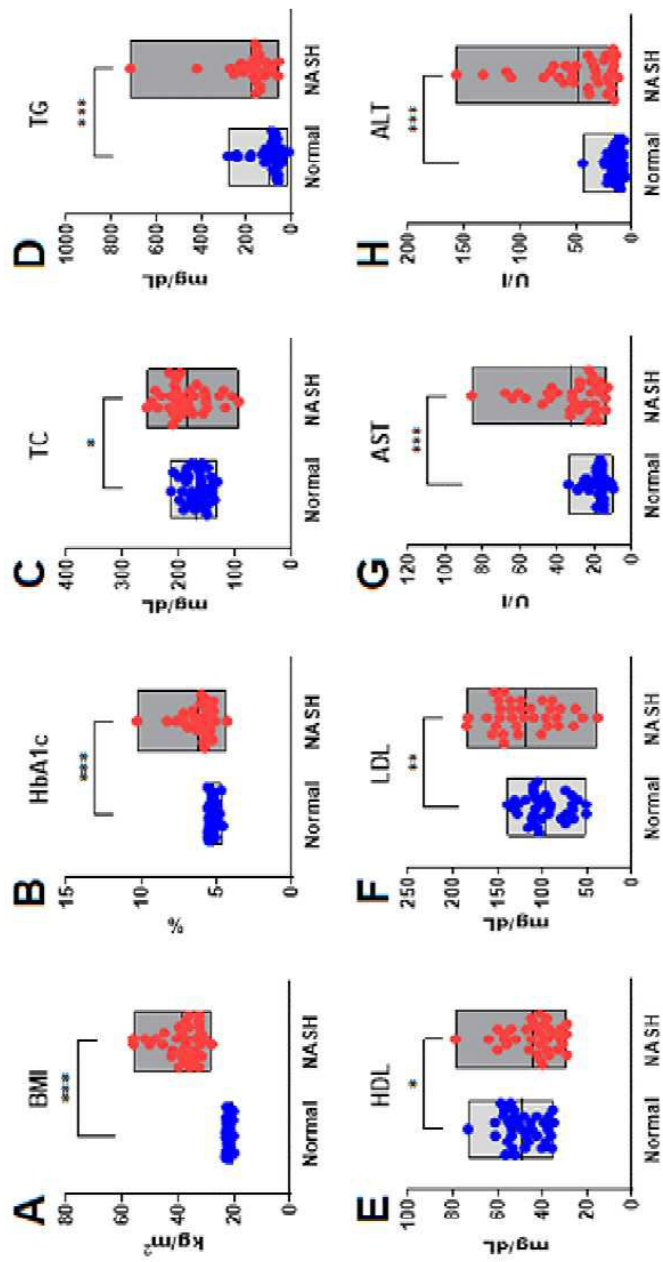
[0074] 구체적으로, 간섬유화에 리포칼린 2가 관여하여 NASH 환자에서 발현량이 증가하는지 확인하기 위해 정상 및 NASH 환자의 혈액에서 분리한 혈청을 시료로 사용하여 리포칼린 2의 발현 수준을 측정하였다. 리포칼린 2는 human lipocalin 2 측정 키트(DLCN20, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 측정하였다.

[0075] 그 결과, 혈청 내 리포칼린 2의 발현량이 정상 환자에 비해 NASH 환자에서 발현량이 증가하는 것을 확인하였다 (도 3 참조). 이는 NASH 환자 및 간섬유화 환자와 리포칼린 2 사이에 상호관계가 있음을 나타내는 결과이다.

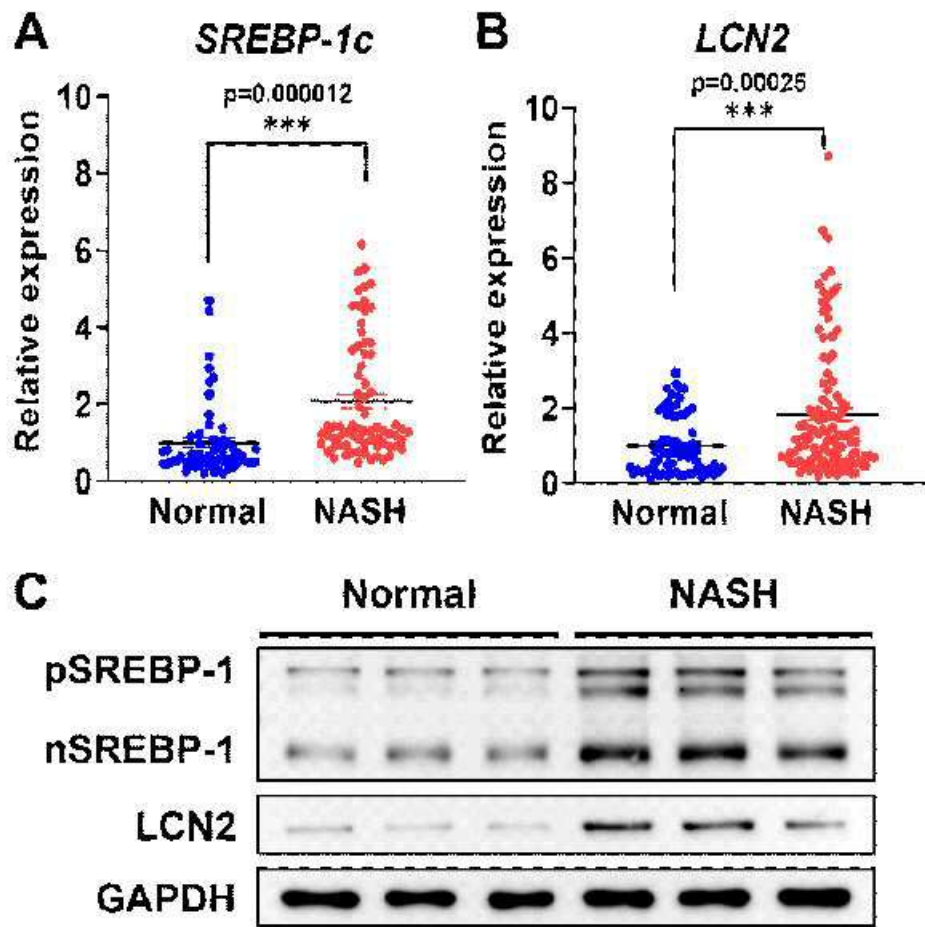
[0076] 상기와 같은 실험을 통해 리포칼린 2가 NASH 및 간섬유화 유발에 연관성이 있음을 확인할 수 있었다.

도면

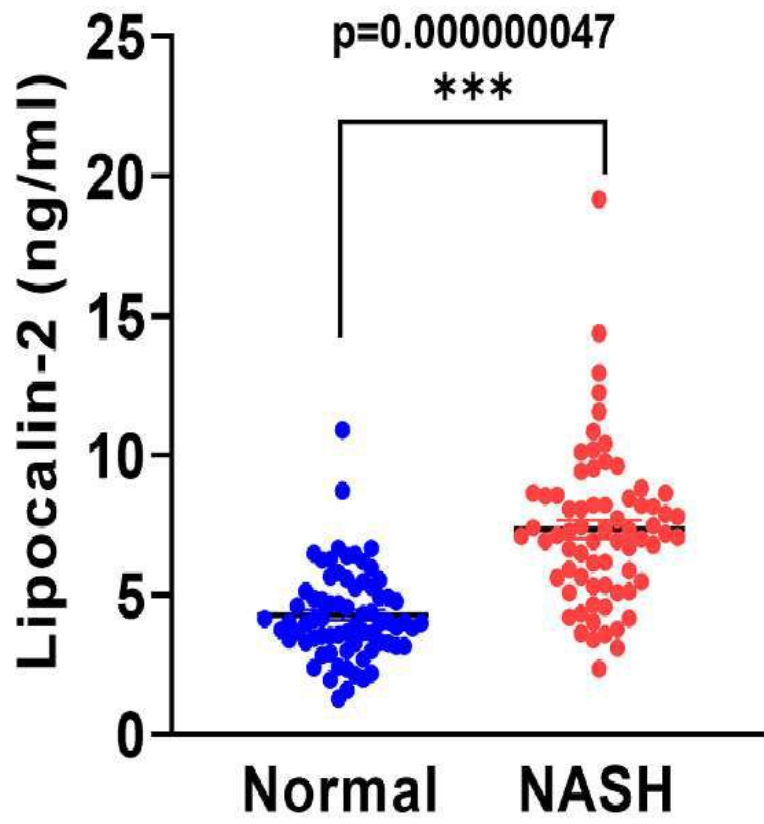
도면1



도면2



도면3



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.