



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0116797
(43) 공개일자 2013년10월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/53 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)
C12N 5/0786 (2010.01)
(21) 출원번호 10-2013-0027015
(22) 출원일자 2013년03월14일
심사청구일자 2013년03월14일
(30) 우선권주장
1020120038892 2012년04월16일 대한민국(KR)

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
조은경
대전광역시 유성구 봉명로48, 805동 702호(원신흥
동, 신안인스빌아파트)
이혜미
대전광역시 서구 가장로 106 삼성래미안1단지아파
트 116동 1501호
구본정
대전광역시 서구 둔산로155, 108동 306호(둔산동,
크로바아파트)
(74) 대리인
김원준

전체 청구항 수 : 총 3 항

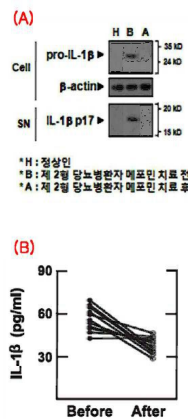
(54) 발명의 명칭 I L - 1 베타 측정을 포함하는 제 2 형 당뇨병 진단 및 추적관찰용 시약과 시험방법

(57) 요약

본 발명은 제2형 당뇨병 환자 진단에 관한 것으로, 보다 상세하게는 당뇨병자 단핵세포 유래 대식세포를 이용한 기본적인 생성 및 면역매개 물질 자극으로 IL-1베타 생성의 측정 방법을 처음으로 밝힌 것이다.

본 발명의 활성형 IL-1베타 측정으로 제2형 당뇨병 환자 진단에 있어 효과적인 실험 방법으로 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

- (A) 잠재 당뇨병 환자의 혈액의 단핵세포로부터 대식세포를 유도, 배양하는 단계;
 - (B) 상기 배양된 대식세포에서 분비하는 활성형 IL-1 베타의 농도를 측정하는 단계;
 - (C) 활성형 IL-1 베타의 농도가 소정수치 이상이면 상기 잠재 당뇨병 환자가 제2형 당뇨병 유병자로 판단하는 단계;
- 를 포함하는 것을 특징으로 하는 새로운 방식의 제2형 당뇨병 진단방법.

청구항 2

- (A) 소정의 치료방법에 따라 치료중인 제2형 당뇨병 환자의 혈액의 단핵세포로부터 대식세포를 유도, 배양하는 단계;
 - (B) 상기 배양된 대식세포에서 분비하는 활성형 IL-1 베타의 농도를 측정하는 단계;
 - (C) 활성형 IL-1 베타의 농도가 소정수치 이하이면 상기 치료방법이 상기 제2형 당뇨병 환자의 치료에 유효한 것으로 판단하는 단계;
- 를 포함하는 것을 특징으로 하는 새로운 방식의 제2형 당뇨병에 대한 치료효과의 판정방법.

청구항 3

- (A) 제2형 당뇨병 환자의 혈액의 단핵세포로부터 대식세포를 유도, 배양하는 단계;
 - (B) 상기 배양중인 대식세포에 염증매개물질을 처리하는 단계;
 - (C) 상기 배양된 대식세포에서 분비하는 활성형 IL-1 베타의 농도를 측정하는 단계;
 - (D) 활성형 IL-1 베타의 농도가 소정수치 이하이면 상기 제2형 당뇨병 환자가 당뇨병 합병증에 취약한 것으로 판단하는 단계;
- 를 포함하는 것을 특징으로 하는 새로운 방식의 제2형 당뇨병 환자의 합병증 취약성의 판정방법.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 활성형 IL-1베타 측정을 이용하여 제2형 당뇨병 환자를 진단 및 추적관찰하기 위한 시약 및 시험 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 인슐린 저항성과 췌장 베타세포의 기능부전에 의해 발병되는 것으로 알려진 제 2형 당뇨병은 현재 선진국과 개발도상국을 포함하여 전 세계적인 문제가 되고 있는 질환이다. 특히 그 환자의 연령 분포가 점차 낮아져 청소년들에서도 발병하고 있는 추세임으로 치료제 개발 및 진단이 시급한 실정이다.
- [0003] 그리고 당뇨병 환자의 경우 선천면역 반응의 이상 조절에 의해 과도한 염증 반응이 일어나고 있으며 다른 질환이 발병에 취약한 상황이다. 그러므로 치료 못지 않게 진단이 더욱 중요하다.
- [0004] 현재 당뇨병 진단 방법은 임상증상, 요검사, 혈당검사, 당화 혈색소 및 프락토사민 등의 수치를 확인하고 있다.

하지만 이는 검사 시기나 방법, 채취시간, 피검자의 신체조건에 따라 그 기준의 차이가 적지 않아서 오진을 할 때가 있을 뿐만 아니라 진단방법에 따라서는 잠재환자에게 적지 않은 심적 육체적 부담을 주기도 한다.

[0005] 최근 보고에 의하면 당뇨병 환자의 단핵세포에서 IL-1베타가 정상인에 비해 증가되어 있음을 확인하였다. 하지만 세포 배양액을 통한 분비량을 효소면역검사법 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)에 의존하여 측정하고 있으며 아직까지 당뇨병 환자의 단핵세포 유래 대식세포 배양액으로부터 발현되는 IL-1베타의 발현에 관련된 연구는 없다.

[0006] 본 발명자들은 당뇨병 환자의 단핵세포 유래 대식세포에서 IL-1베타의 발현이 증가하며, 당뇨병 환자에 염증매개 물질을 자극하였을 때 정상인 단핵세포에 비해 IL-1베타의 발현이 더욱 증가되고, 더욱이 당뇨병 환자에 대한 메포민 약제 치료 후 IL-1베타의 생성이 감소됨 최초로 발견하였다. 본 발명은 이와 같은 새로운 발견에 기초하여 완성된 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 제2형 당뇨병 환자를 간단하고 정확하게 진단하는 방법을 제공하고자 한다.

[0008] 또한 본 발명은 제2형 당뇨병 환자의 치료효과를 확인하는 새로운 방법을 제공하고자 한다.

[0009] 또한 본 발명은 제2형 당뇨병 환자가 합병증에 취약할 것인지 여부를 사전에 판단하는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 (A) 잠재 당뇨병 환자의 혈액의 단핵세포로부터 대식세포를 유도, 배양하는 단계; (B) 상기 배양된 대식세포에서 분비하는 활성형 IL-1 베타의 농도를 측정하는 단계; (C) 활성형 IL-1 베타의 농도가 소정수치 이상이면 상기 잠재 당뇨병 환자가 제2형 당뇨병 유병자로 판단하는 단계;를 포함하는 새로운 방식의 제2형 당뇨병 진단방법에 관한 것이다.

[0011] 또한 본 발명은 (A) 소정의 치료방법에 따라 치료중인 제2형 당뇨병 환자의 혈액의 단핵세포로부터 대식세포를 유도, 배양하는 단계; (B) 상기 배양된 대식세포에서 분비하는 활성형 IL-1 베타의 농도를 측정하는 단계; (C) 활성형 IL-1 베타의 농도가 소정수치 이하이면 상기 치료방법이 상기 제2형 당뇨병 환자의 치료에 유효한 것으로 판단하는 단계;를 포함하는 새로운 방식의 제2형 당뇨병에 대한 치료효과의 판정방법에 관한 것이다.

[0012] 또한 본 발명은 (A) 제2형 당뇨병 환자의 혈액의 단핵세포로부터 대식세포를 유도, 배양하는 단계; (B) 상기 배양중인 대식세포에 염증매개물질을 처리하는 단계; (C) 상기 배양된 대식세포에서 분비하는 활성형 IL-1 베타의 농도를 측정하는 단계; (D) 활성형 IL-1 베타의 농도가 소정수치 이하이면 상기 제2형 당뇨병 환자가 당뇨병 합병증에 취약한 것으로 판단하는 단계;를 포함하는 새로운 방식의 제2형 당뇨병 환자의 합병증 취약성의 판정방법에 관한 것이다.

[0013] 본 발명은 인간의 질병을 진단하는 방법, 치료효과를 판정하는 방법, 합병증 취약성을 판정하는 방법의 발명이지만 인체를 직접 대상으로 하는 것이 아니라 인간으로부터 채취된 혈액을 처리하는 방법에 관한 것으로서 의료 행위와는 분리 가능한 별개의 단계로 이루어진 발명이므로 산업상 이용할 수 있는 발명에 해당한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명은, 종래의 제2형 당뇨병 진단방법과는 달리 환자에게 심리적, 육체적 부담이 없고 정확한 진단이 가능하기 때문에 제2형 당뇨병의 진단에 유용하게 이용될 수 있다.

[0015] 또한 본 발명은 제2형 당뇨병 환자에게 처방된 치료법이 그 환자에게 잘 작용하고 있는지를 빠르게 확인함으로써 환자에게 보다 적합한 치료법을 찾아서 적용할 수 있게 한다.

- [0016] 본 발명에 의하면 제2형 당뇨병 환자가 합병증에 취약할 가능성이 있는지 조기에 판단하여 합병증에 대한 주의와 사전처방을 할 수 있게 된다.
- [0017] 본 발명의 사용된 재료는 제조사 사용 방법에 의하여 제조되어 사용 수 있으며, 환자의 연령, 성별 및 상태, 치료의 중증 정도 등에 무관하게 본 발명이 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 정상인과 제 2형 당뇨병 환자의 무처리한 단핵세포 유래 대식세포의 배양액으로부터 IL-1베타 분비 농도를 보여주는 그래프.
- 도 2는 정상인과 제 2형 당뇨병 환자의 메포민 처리 전 후의 무처리 대식세포의 세포내 및 세포 배양액의 IL-1베타 분비 농도 및 단백질 발현을 보여주는 Western blot 결과로 전기영동 사진 및 그래프.
- 도 3은 정상인과 제 2형 당뇨병 환자의 대식세포에 염증매개물질인 리포다당류를 처리한 후 IL-1베타 분비 농도 및 세포내 및 세포배양액의 단백질 발현을 보여주는 그래프와 Western blot 결과로 전기영동 사진.
- 도 4는 정상인과 제 2형 당뇨병 환자의 단핵세포 유래 대식세포에 염증매개물질 (ATP, MSU, FFA, IAPP)를 단독 처리하거나 IL-1베타 억제제를 전처리한 후 IL-1베타 분비 농도를 보여주는 그래프.
- 도 5는 제 2형 당뇨병 환자의 메포민 처리 전 후의 대식세포의 염증매개물질(ATP, MSU, FFA) 처리에 따른 IL-1베타 분비 농도를 보여주는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 또한 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0020] 실험방법

[0021] 1. 환자 및 정상인의 단핵세포 유래 대식세포 준비 및 세포 배양

- [0022] 제2형 당뇨병 환자와 정상인으로부터 정맥혈을 제공받아 Histopaque-1077(Sigma-Aldrich)을 이용한 밀도구배 원심분리로 말초혈액단핵세포 (peripheral blood mononuclear cells)를 수집하였다. 수집한 말초혈액단핵세포는 배양액 [RPMI 1640 (Gibco-BRL, 미국) with 10% fetal bovine serum (Gibco-BRL), sodium pyruvate, nonessential amino acids, penicillin G (100 IU/ml) 및 streptomycin (100 mg/ml)]에 2×10^6 /ml의 농도로 부유시켜 37℃, 5% CO₂ 조건에서 48 well culture plate에 부착시켰다. 1시간 후에 부착되지 않은 상층액은 제거하고 새 배지로 채워 plate에 부착된 단핵구를 5일 배양시킨 후 실험에 사용하였다. 분리된 단핵구의 순도는 항 CD14 항체를 이용한 유세포 측정으로 95% 이상임을 확인하였다.

[0023] 2. 활성형 IL-1 베타의 분석

- [0024] 실험방법 1에 따라 단핵세포 유래 대식세포를 5일간 배양 후 무처리 혹은 각종 염증매개 물질을 처리한 세포배양액을 수집하여 분리된 세포 배양액을 methanol (배양액과 동량) 과 chloroform (배양액의 1/4)을 넣고 잘 섞은 후 원심분리 (12000 rpm, 10 분) 한다. 상층액은 버린 후 methanol을 500 μ l 넣는다. 원심분리 후 상층액을 버리고 55℃에서 말린다. western blot 샘플 버퍼로 세포를 용해시킨 후 100℃에서 10분간 끓인다.
- [0025] 상기 방법을 통해 얻은 샘플을 통상의 Western blot 기법으로 분석하여 활성형 IL-1베타의 발현도를 분석하였다.

[0026] 실시예

[0027] 1. 활성형 IL-1 베타 분비량 비교를 통한 제2형 당뇨병 진단

[0028] 정상인 36명과 제2형 당뇨병 환자 31명의 무처리한 단핵세포 유래 대식세포로부터 세포 배양액을 분리하여 분비된 활성형 IL-1베타의 농도를 조사하여 도 1에 도시하였다.

[0029] 이하 모든 도면에서 HC는 정상인, T2D는 제2형 당뇨병 환자, Cell은 세포내 단백질, SN은 세포 배양액내 단백질, un은 무처리를 나타낸다.

[0030] 도 1에서 볼 수 있듯이, 정상인의 대식세포에서 IL-1 베타의 분비가 거의 없음에 비하여 제2당뇨병 환자에서는 평균 15~30(pg/ml)의 IL-1 베타를 분비하고 있음을 알 수 있다.

[0031] 따라서 검사대상이 되는 사람의 정맥혈을 활용하여 대식세포를 배양하고 그 세포 배양액에 분비된 IL-1 베타의 농도를 측정함으로써 종래 공복혈당검사, 당부하검사 또는 당화혈색소 검사 등과 같은 당뇨병 진단방법에 비해 잠재환자에게 부담이 적고 진단효율이 높은 당뇨병 진단이 가능하게 됨을 알 수 있다.

[0032] 2. 활성형 IL-1 베타 함량검사를 통한 제2형 당뇨병 환자의 치료상태 진단

[0033] 제2형 당뇨병으로 진단받은 환자 11명을 대상으로 메포민 치료방법(500-1000mg 단독 처방)에 따라 2개월 동안 치료기간을 거친 후에 전술한 방법에 따라 대식세포의 활성형 IL-1베타의 세포내 및 배양액 중 단백질발현을 조사하여 도 2에 도시하였다. 도면에서 (A)는 세포내(Cell)와 배양액(SN)의 웨스턴 블롯팅 결과 사진이고, (B)는 ELISA 분석방법으로 배양액 중의 단백질 발현량을 정량한 결과를 보여주는 그래프이다.

[0034] 도시된 바와 같이, 메포민 2개월 치료 후 제2형 당뇨병 환자의 대식세포 유래 활성형 IL-1베타의 세포내 및 배양액 중 단백질 발현이 치료 전에 비해 유의하게 감소하였음을 확인할 수 있었다.

[0035] 나아가 치료 후 제2형 당뇨병 환자의 대식세포 유래 활성형 IL-1 베타의 세포내 및 배양액 중 단백질발현이 매우 낮아 치료과정에서 IL-1베타의 활성이 억제되는 것으로 보인다.

[0036] 이러한 결과로 보아, 제2형 당뇨병 환자 대식세포의 활성형 IL-1베타의 발현 추이(감소경향 여부)를 관찰함으로써 당뇨병 환자의 상태 내지 치료효과를 간접적으로 확인할 수 있음을 알 수 있다.

[0037] 분비 및 발현이 위 결과를 토대로 제2형 당뇨병 환자에서 발현되고 있는 IL-1베타의 발현이 치료 후 정상인 수준으로 낮아짐을 확인할 수 있었다.

[0038] 3. 제2형 당뇨병 환자의 합병증 유발 가능성 분석

[0039] 제2형 당뇨병 환자는 일반적으로 염증과 관련된 합병증을 갖게 될 가능성이 높다. 하지만 어떤 환자들은 혈당 조절이 잘 됨에도 불구하고 합병증의 발생에 취약하다고 보고되고 있으나 그 원인에 대하여는 아직 알려지지 않고 있다.

[0040] 따라서 초기 제2형 당뇨병 환자가 염증매개물질에 대한 반응을 분석하여 합병증에 취약한 환자인지 여부를 판별할 수 있을 것이다.

[0041] (1) LPS 처리에 따른 민감도 분석

[0042] 염증매개물질 및 IL-1베타 발현에 촉진물질로 것으로 알려진 리포 다당류(LPS)를 대식세포에 처리했을 때의 변화를 분석하였다.

[0043] 정상인 및 제2형 당뇨병 환자의 대식세포에 리포다당류를 10 ng/ml로 처리한 후 전술한 방법에 따라 세포 배양액 중의 활성형 IL-1베타의 농도 및 세포내 및 배양액 중 단백질 발현을 측정하였다(도 3).

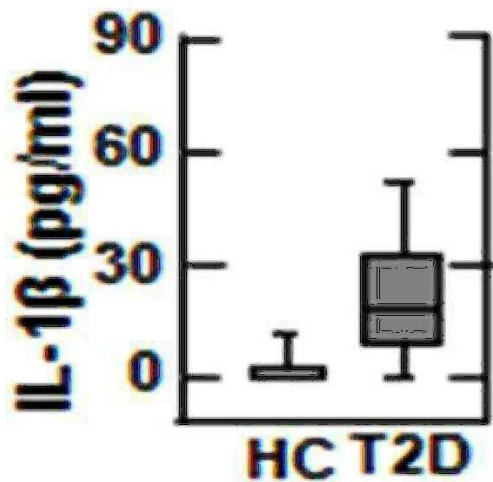
[0044] 도 3에서 볼 수 있듯이, 정상인에 비해 제2형 당뇨병 환자에서 염증매개물질 자극에 의한 활성형 IL-1베타의 농도 및 단백질 발현이 현저히 증가함을 알 수 있었다.

[0045] (2) 염증매개물질에 대한 반응 및 인플라마좀 활성을 통한 합병증 유발 가능성 분석

- [0046] 염증매개물질의 처리에 따른 IL-1 베타 분비는 인플라마좀 활성화에 의한 것으로 생각된다. 따라서 인플라마좀 활성을 억제시키는 억제제를 전처리한 후 염증매개물질의 처리에 따른 제2형 당뇨병 환자에서 분비되는 활성형 IL-1 베타의 변화를 확인하였다.
- [0047] 대식세포에 각종 염증매개물질(ATP (1 mM, 1 h), MSU (100 ug/ml, 6 h), FFA (200 uM, 16 h), IAPP (10 uM, 16h); Sigma-Aldrich, 미국)을 처리한 후 전술한 방법에 따라 IL-1 베타의 농도를 측정하였다 (도 4에서 sc). 또한 염증매개물질을 처리하기 전 인플라마좀 활성 억제제인 zYVAD-fmk (20 uM; Tocris Bioscience, 미국)를 45분간 전처리하고 동일한 방법으로 IL-1 베타의 농도를 측정하였다(도 4에서 z).
- [0048] 조사결과, 각종 염증매개물질에 의한 IL-1 베타 분비는 정상인에 비해 제 2당뇨병 환자에서 유의하게 증가되어 있음을 확인할 수 있었다. 이상으로 볼 때, 제2형 당뇨병 환자에서 기본적으로 IL-1 베타의 분비가 증가되어 있고 염증매개물질에 노출될 경우 그 분비량이 더욱 증가됨을 확인할 수 있었다.
- [0049] (3) IL-1 베타 분비 억제제에 의한 염증매개물질의 영향 감소 효과 분석
- [0050] 전술한 메포민 치료방법에 따라 2개월 동안 치료기간을 거친 대식세포에 LPS (10ng/mL)를 4시간 동안 전처리 한 다음 전술한 염증매개물질을 처리하고 ELISA 분석방법으로 배양액 중의 단백질 발현량을 정량하여 도 5에 그래프로 도시하였다. 도에서 U는 염증매개물질 미처리군이고 Before, After는 각각 메포민 치료 전과 후를 나타낸다.
- [0051] 도시된 바와 같이, IL-1 베타 분비를 억제시키는 억제제를 처리하면 염증매개물질에 의한 IL-1 베타 분비량 증가를 대폭 억제할 수 있음을 알 수 있었다.

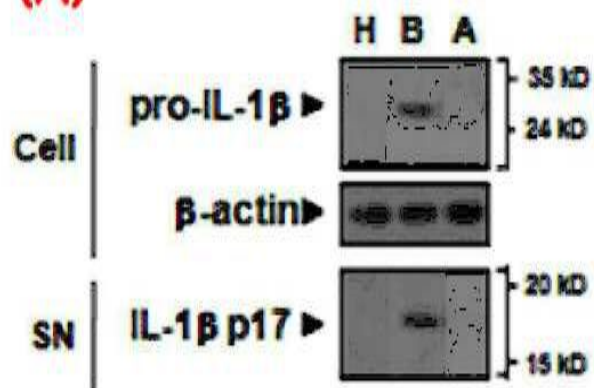
도면

도면1



도면2

(A)

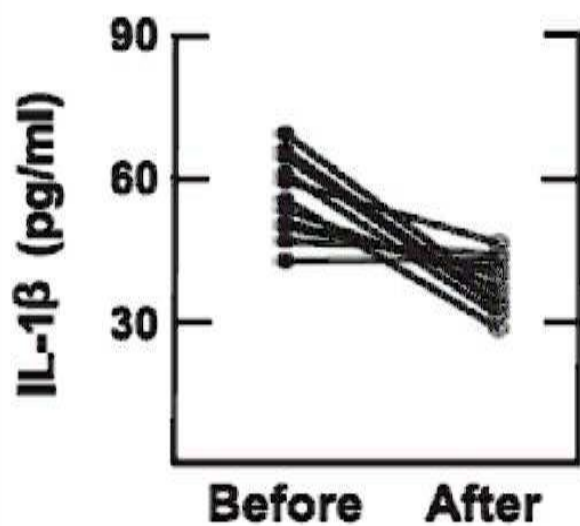


*H : 정상인

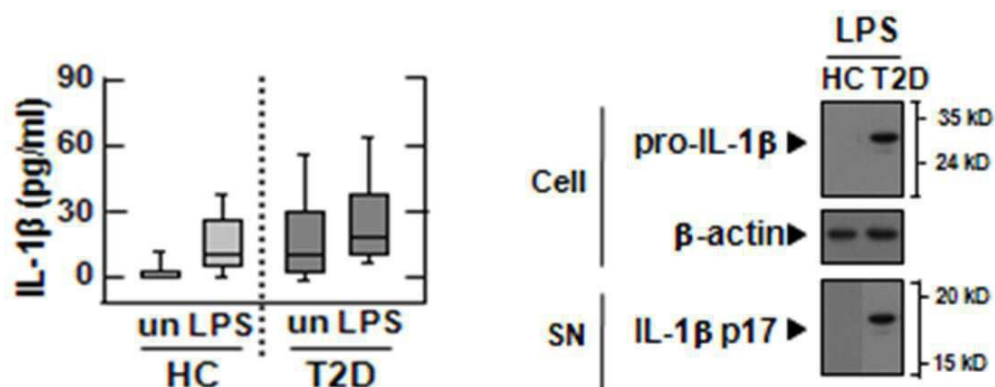
*B : 제 2형 당뇨병환자 메포민 치료 전

*A : 제 2형 당뇨병환자 메포민 치료 후

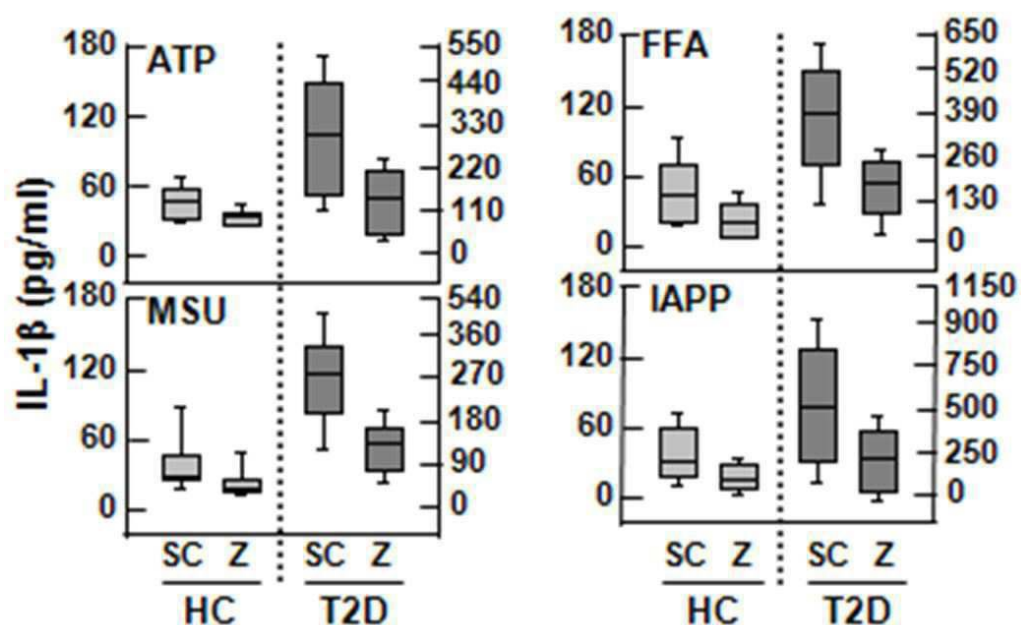
(B)



도면3



도면4



도면5

