



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0154301
(43) 공개일자 2024년10월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/92 (2006.01) G01N 30/72 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/92 (2013.01)

G01N 30/7233 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0050716

(22) 출원일자 2023년04월18일

심사청구일자 2023년04월18일

(71) 출원인

한국 한의학 연구원

대전광역시 유성구 유성대로 1672 (전민동)

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교
산학협력관 201호(신당동)

(72) 발명자

신소진

대구광역시 수성구 청수로 261, 1411동 1803호 (황금동, 캐슬골드파크 4단지)

정지연

전라북도 익산시 동서로19길 43, 2층 1호 (신동)
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

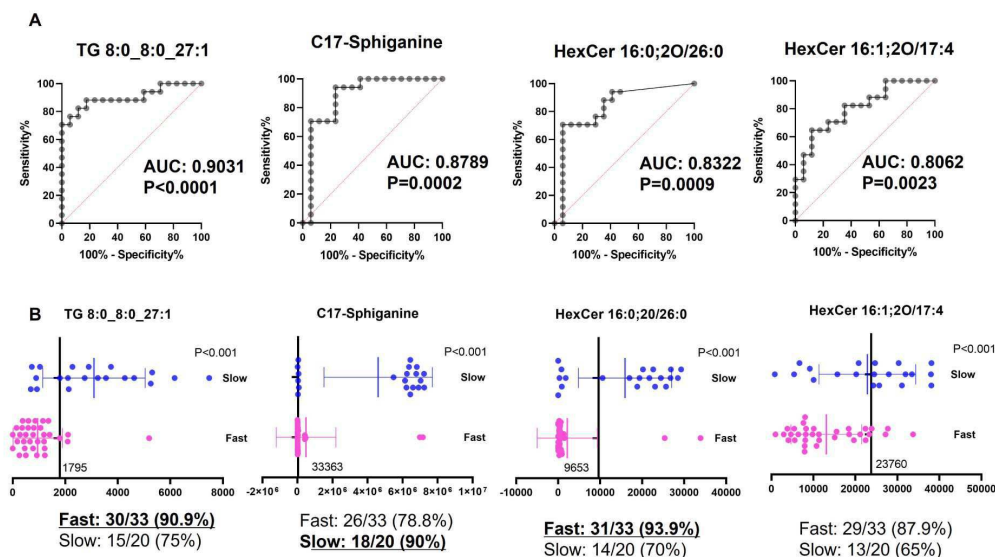
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 자궁근종 증식 속도 예측용 지질 대사체 마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 자궁근종 증식 속도 예측용 지질 대사체 마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 TG 8:0_8:0_27:1, C17-Sphinganine, HexCer 16:0;20/26:0 및 HexCer 16:1;20/17:4로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 지질 대사체를 유효성분으로 함유하는 자궁근종 증식 속도 예측용 마커 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

신사라

세종특별자치시 다정남로 22, 116동 1102호 (다정동, 가온마을1단지)

이슬기

대전광역시 유성구 구즉로 25, 301동 1501호 (송강동, 송강그린아파트)

이소민

대전광역시 유성구 와룡로 206, 110동 1204호 (봉산동, 유성 대광로제비앙 리버포레 아파트)

장지혜

대전광역시 대덕구 대청로 43, 103동 2404호 (신탄진동, 대전 동일스위트 리버스카이 1단지)

하은영

대구광역시 중구 달구벌대로 1955, 102동 502호 (대신동, 대신센트럴자이)

김진영

대구광역시 수성구 수성로 393, 102동 301호 (수성동4가, 수성하이츠)

서지혜

대구광역시 달서구 상원로 142, 107동 702호 (상인동, 상인자이)

이승미

대구광역시 수성구 범안로 40, 203동 1101호 (범물동, 범물청아타운)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711195901
과제번호	KSN2311020 (KSN2311021)
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국한의학연구원
연구사업명	한국한의학연구원연구운영비지원(R&D)(주요사업비)
연구과제명	한의원론 기반 건강노화 제어기술 개발 (세부과제명: 건강노화를 위한 한의원론 과학화 연구)
기 여 율	44.1/100
과제수행기관명	한국한의학연구원
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711195898
과제번호	KSN1823210 (KSN1823213)
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국한의학연구원
연구사업명	한국한의학연구원연구운영비지원(R&D)(주요사업비)
연구과제명	한의원료기술의 임상근거 강화 (세부과제명: 대사질환 어혈 진단/치료 유효성 검증 연구)
기 여 율	4.9/100
과제수행기관명	한국한의학연구원
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465038887
과제번호	HI22C157400
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	공익적 의료기술연구사업
연구과제명	멀티오믹스기반 자궁근종 바이오마커 및 치료타겟 발굴
기 여 율	35.7/100
과제수행기관명	계명대학교산학협력단
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711186817
과제번호	2022R1A2C1005544
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	신장암 발생과 진행에서 글라이신 디카복실레이즈 (glycine decarboxylase)의 역할
과 중양 슬리밍(slimming)	유도 기전 규명을 통한 항암제 개발 가능성 탐색
기 여 율	15.3/100
과제수행기관명	계명대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

TG 8:0_8:0_27:1, C17-Sphinganine, HexCer 16:0;20/26:0 및 HexCer 16:1;20/17:4로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 지질 대사체를 유효성분으로 함유하는 자궁근종 증식 속도 예측용 마커 조성물.

청구항 2

TG 8:0_8:0_27:1, C17-Sphinganine, HexCer 16:0;20/26:0 및 HexCer 16:1;20/17:4로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 지질 대사체에 대한 정량장치를 포함하는 자궁근종 증식 속도 예측용 키트.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 정량장치는 액체 크로마토그래피-질량분석기(LC/MS), 핵자기공명분광기, 자외선분광기, 적외선분광기, 형광분광기 및 질량분석기로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 자궁근종 증식 속도 예측용 키트.

청구항 4

자궁근종 진단 개체로부터 분리된 근종 조직의 지질 대사체 수준을 측정하는 단계; 및
상기 측정된 지질 대사체의 수준을 증식 속도가 느린 자궁근종 조직의 지질 대사체 수준과 비교하는 단계;를 포함하는, 자궁근종 진단 개체의 자궁근종 증식 속도 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 지질 대사체는 TG 8:0_8:0_27:1, C17-Sphinganine, HexCer 16:0;20/26:0 및 HexCer 16:1;20/17:4로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 자궁근종 진단 개체의 자궁근종 증식 속도 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 지질 대사체 수준의 측정법은 질량분석법, 광흡수분석법 또는 크로마토그래피법인 것을 특징으로 하는 자궁근종 진단 개체의 자궁근종 증식 속도 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 증식 속도가 느린 자궁근종 조직은 평활근종 세포(leiomyoma cell)의 배가시간(doubling time)이 144시간 초과인 것을 특징으로 하는 자궁근종 진단 개체의 자궁근종 증식 속도 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 8

자궁근종 진단 개체로부터 분리된 근종 조직의 지질 대사체 수준을 측정하는 단계; 및
상기 측정된 지질 대사체의 수준을 증식 속도가 느린 자궁근종 조직의 지질 대사체 수준과 비교하는 단계;를 포함하는, 자궁근종 진단 개체의 자궁근종 증식 속도를 예측하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 증식 속도가 느린 자궁근종 조직은 평활근종 세포(leiomyoma cell)의 배가시간(doubling time)이 144시간 초과인 것을 특징으로 하는 자궁근종 진단 개체의 자궁근종 증식 속도를 예측하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 자궁근종 증식 속도 예측용 지질 대사체 마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 자궁근종으로 흔히 불리는 자궁평활근종은 자궁의 평활근에서 발생하여 과량의 세포외기질(extracellular matrix)을 생성하여 근종(fibroid)을 형성하는 질환이다. 자궁평활근종은 가임기 여성의 80%에서 발견되며, 약 30%의 여성은 자궁평활근종에 의한 증상을 호소할 정도로 유병률이 매우 높은 질환이고, 월경통, 부정출혈, 월경과다와 함께 불임 및 유산, 조산의 원인이 된다. 자궁평활근종은 흔한 질환이고, 증상이 가벼워 쉽게 생각하는 사람이 많지만, 근종이 빠른 속도로 자라거나 근종의 크기가 커서 다른 장기, 특히 방광을 누르는 경우, 근종으로 인한 출혈이 있는 경우, 또는 불임과 관계되어 있을 경우 치료가 필요하다. 또한, 폐경기에 근종이 빠른 속도로 자라는 경우 암으로 발전할 수도 있어 주의를 요하기도 한다.

[0003] 자궁평활근종의 진단은 주로 초음파 검사, CT나 MRI 등의 방사선 검사를 통해 이루어진다. 특히, 진단된 자궁평활근종이 성장하며 자궁내막의 형태변형을 유발할지에 대한 예후를 판단할 수 있는 기술은 전무한 실정이며, 주기적인 초음파 검사나 CT, MRI 등의 방사선 검사를 통해 성장과정을 추적 관찰하는 방법이 유일하다.

[0004] ESI-MS (electrospray ionization mass spectrometry)에 기반한 shotgun lipidomics는 화학적 정보의 손실 없이 샘플의 심층 분자 프로파일링을 가능하게 하였다(Rochat, B. Trends Anal. Chem. (2016) 84, 151-164; Chagovets, V. et al. J. Am. Soc. Mass Spectrom. (2018) 29, 323-330). 지질체학(lipidomics)의 높은 진단 잠재력은 폐, 갑상선, 유방, 위, 췌장, 대장, 간, 신장, 전립선 및 난소 등의 종약학 영역에서 확인되었다. 조직과 혈장의 지질 프로파일에 대한 MS 연구는 자궁내막증(endometriosis)의 새로운 분자마커를 밝혀냈다. Heinonen H. R. 그룹의 연구(Br. J. Cancer (2017) 117, 1855-1864) 외 현재까지 자궁근종에 대한 충분한 대사체학(metabolomics) 결과는 없는 실정이다.

[0005] 한편, 한국공개특허 제2017-0068157호에는 GPER(G protein-coupled estrogen receptor 1) 단백질 또는 이의 발현을 조절하는 핵산을 검출하는 제제를 포함하는 '자궁근종 진단용 마커 조성물'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2020-0029686호에는 'MicroRNA를 이용한 자궁내막 형태변형 유발 평활근종 진단법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 '자궁근종 증식 속도 예측용 지질 대사체 마커 및 이의 용도'에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 자궁근종의 증식(성장) 속도를 예측할 수 있는 분자마커를 제공하고자 하였다. 이를 위해, 자궁근종 환자로부터 분리된 평활근종 세포의 증식 속도를 평가한 후 증식 속도가 빠르거나(144시간 미만), 느린(144시간 초과) 자궁근종 조직간 지질 대사체를 비교분석하여, 유의미한 차이를 나타내는 4종의 지질 대사체(TG 8:0_8:0_27:1, C17-Sphinganine, HexCer 16:0;20/26:0 및 HexCer 16:1;20/17:4)를 선별하였으며, 상기 선별된 지질 대사체가 증식 속도에 차이가 있는 검증(validation) 세트에서도 상대적 수준(강도)에 유의미한 차이가 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 TG 8:0_8:0_27:1, C17-Sphinganine, HexCer 16:0;20/26:0 및 HexCer 16:1;20/17:4로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 지질 대사체를 유효성분으로 함유하는 자궁근종 증식 속도 예측용 마커 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 TG 8:0_8:0_27:1, C17-Sphinganine, HexCer 16:0;20/26:0 및 HexCer 16:1;20/17:4로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 지질 대사체에 대한 정량장치를 포함하는 자궁근종 증식 속도 예측용 키트를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 자궁근종 진단 개체로부터 분리된 근종 조직의 지질 대사체 수준을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 지질 대사체의 수준을 증식 속도가 느린 자궁근종 조직의 지질 대사체 수준과 비교하는 단계;를 포함하는, 자궁근종 진단 개체의 자궁근종 증식 속도 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 자궁근종 진단 개체로부터 분리된 근종 조직의 지질 대사체 수준을 측정하는 단계; 및 상기 측

정된 지질 대사체의 수준을 증식 속도가 느린 자궁근종 조직의 지질 대사체 수준과 비교하는 단계;를 포함하는, 자궁근종 진단 개체의 자궁근종 증식 속도를 예측하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 지질 대사체 마커는 자궁근종(자궁평활근종) 진단 환자의 예후를 예측할 수 있는 정보를 제공할 수 있으므로, 자궁근종의 진단, 치료 결정 등에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 증식 속도에 차이가 있는 자궁근종 조직의 지질 대사체 분석 결과로, (A)는 일차 배양(primary-cultured) 평활근종 세포의 현미경 관찰 이미지로, 배가시간(doubling time)이 144시간 초과인 slow 그룹과, 144시간 미만인 fast 그룹의 세포 모습이고, (B)는 OPLS-DA 모델로부터 유도된 점수 산점도(score scatter plot)이며, (C)는 100-반복 순열검정 결과이고, (D)는 유의적으로 변한 지질 대사체의 상대적인 강도를 보여준다(세로축: Relative intensity). 지질 대사체는 OPLS-DA (VIP>1.5) 및 t-test ($p<0.05$)의 통계분석의 조합으로부터 선별하였다.

도 2(A)는 선별된 지질 대사체 마커의 ROC (receiver operating characteristic) 곡선 분석 결과로, 4종의 지질 대사체 모두 AUC (area under the ROC curve) 값이 0.8 이상인 것을 확인할 수 있었고, 이를 통해 각 지질 대사체들이 진단 마커로서 가능성이 있음을 확인할 수 있었다. (B)는 외부 검정 세트(fast 환자 시료: 33, slow 환자 시료: 20)에서 선별된 4종의 지질 대사체 마커의 상대적인 수준(강도)을 보여준다(가로축: Relative intensity).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 TG 8:0_8:0_27:1, C17-Sphinganine, HexCer 16:0_20/26:0 및 HexCer 16:1_20/17:4로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 지질 대사체를 유효성분으로 함유하는 자궁근종 증식 속도 예측용 마커 조성물을 제공한다.

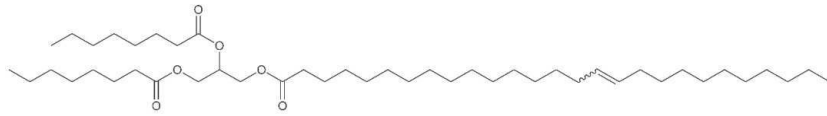
[0014] 본 발명에서 용어 "자궁근종"이란 자궁의 평활근에서 발생하여 과량의 세포외기질(extracellular matrix)을 생성하여 근종(fibroid)을 형성하는 질환을 의미하며, '자궁평활근종'과 동일한 의미로, 본 명세서에서 혼용되어 사용될 수 있다.

[0015] 본 발명에서 용어 "지질(lipid)"이란 지방, 밀랍(wax), 스테롤(sterol), 지용성 비타민(A, D, E, K), 모노글리세리드(monoglyceride), 디글리세리드(diglyceride), 트리글리세리드(triglyceride) 및 인지질(phospholipid)을 포함하는 천연 분자 그룹이다. 지질은 소수성 또는 양친매성(amphiphilic) 소형분자로 정의된다. 양친매성이라는 특성으로 인해 일부 지질은 소포, 다층/단층의 리포솜, 또는 수성 환경에서 막(membrane)과 같은 구조를 형성한다. 생체 지질은 온전히 또는 부분적으로 서로 다른 두 종류의 생화학적 소단위체 또는 케토아실기(ketoacyl group) 및 이소프렌기(isoprene group)와 같은 요소(building-blocks)로부터 유래한다. 이러한 맥락에서 지질은 지방산(fatty acids), 글리세로지질(glycerolipid), 글리세로인지질(glycerophospholipid), 폴리케티드(polyketide)(케토아실 소단위가 응축되어 생김), 프레놀지질(prenol lipid)(이소프렌 소단위가 응축되어 생김), 사카로지질(saccharolipid), 스펅고지질(sphingolipid) 및 스테롤 지질(sterol lipid)의 8개의 범주로 나눌 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명에서 용어 "대사체(metabolites)"란 생체 내 대사의 결과로서 생성되는 물질로서, 대사물질, 중간대사물질, 대사중간체 등으로 표기될 수 있으며, 주로 세포 과정 중 발생하는 소분자의 대사산물 전체(metabolome)를 뜻한다.

[0017] 본 발명에 따른 자궁근종 증식 속도 예측용 마커 조성물에 있어서, 상기 TG 8:0_8:0_27:1은 하기 화학식 1의 구조를 가지는 Triglyceride 8:0/8:0/27:1(16Z)을 의미한다.

화학식 1



[0018]

[0019] 또한, 본 발명에 따른 자궁근종 증식 속도 예측용 마커 조성물에 있어서, 상기 C17-Sphinganine은 하기 화학식 2의 구조를 가지는 Sphinganine (d17:0) (또는 2-amino-1,3-dihydroxyheptadecane)을 의미한다.

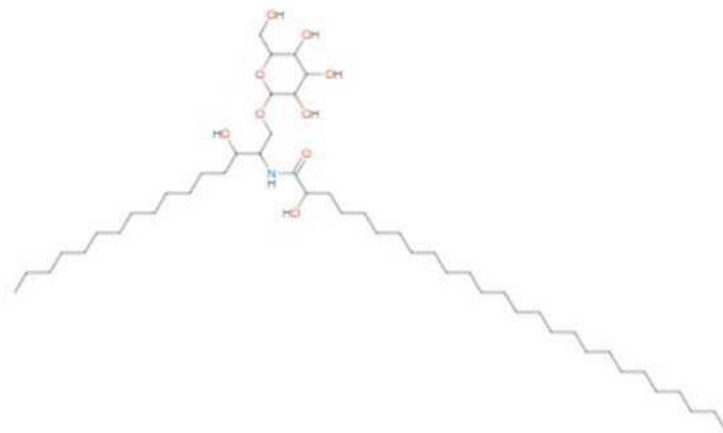
화학식 2



[0020]

[0021] 또한, 본 발명에 따른 자궁근종 증식 속도 예측용 마커 조성물에 있어서, 상기 HexCer 16:0;20/26:0은 하기 화학식 3의 구조를 가지는 Hexosyl ceramides 16:0;20/26:0을 의미한다.

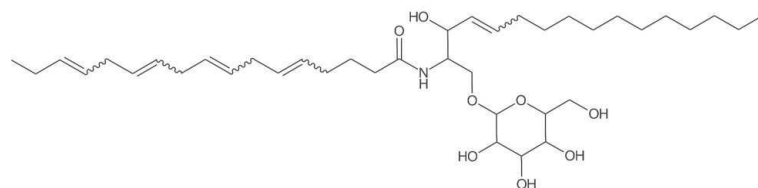
화학식 3



[0022]

[0023] 또한, 본 발명에 따른 자궁근종 증식 속도 예측용 마커 조성물에 있어서, 상기 HexCer 16:1(4Z);20/17:4는 하기 화학식 4의 구조를 가지는 Hexosyl ceramides 16:1(4Z);20/17:4(5Z,8Z,11Z,14Z)을 의미한다.

화학식 4



[0024]

- [0025] 본 발명에 따른 마커 조성물에 있어서, 상기 4종의 지질 대사체는 평활근종 세포(leiomyoma cell)의 증식 속도가 빠르거나(144시간 미만) 느린(144시간 초과) 그룹간에 유의미한 차이가 있는 지질 대사체로, ROC 곡선 분석 결과 AUC 값이 모두 0.8 이상으로 확인되었다.
- [0026] 본 발명은 또한, TG 8:0_8:0_27:1, C17-Sphinganine, HexCer 16:0;20/26:0 및 HexCer 16:1;20/17:4로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 지질 대사체에 대한 정량장치를 포함하는 자궁근종 증식 속도 예측용 키트를 제공한다.
- [0027] 본 발명에 따른 키트에 있어서, 상기 TG 8:0_8:0_27:1, C17-Sphinganine, HexCer 16:0;20/26:0 및 HexCer 16:1;20/17:4의 지질 대사체는 전술한 것과 같다.
- [0028] 본 발명에 따른 키트에 있어서, 상기 정량장치는 액체 크로마토그래피-질량분석기(LC/MS), 핵자기공명분광기, 자외선분광기, 적외선분광기, 형광분광기 및 질량분석기로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 본 발명은 또한, 자궁근종 진단 개체로부터 분리된 근종 조직의 지질 대사체 수준을 측정하는 단계; 및
- [0030] 상기 측정된 지질 대사체의 수준을 증식 속도가 느린 자궁근종 조직의 지질 대사체 수준과 비교하는 단계;를 포함하는, 자궁근종 진단 개체의 자궁근종 증식 속도 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0031] 본 발명에 따른 자궁근종 진단 개체의 자궁근종 증식 속도 예측을 위한 정보 제공 방법에 있어서, 상기 지질 대사체는 TG 8:0_8:0_27:1, C17-Sphinganine, HexCer 16:0;20/26:0 및 HexCer 16:1;20/17:4로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 또한, 본 발명에 따른 자궁근종 진단 개체의 자궁근종 증식 속도 예측을 위한 정보 제공 방법에 있어서, 상기 지질 대사체 수준의 측정은 당업계에 공지된 통상의 방법을 이용하여 측정될 수 있으며, 바람직하게는 질량분석법, 광흡수분석법 또는 크로마토그래피법일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 또한, 본 발명의 일 구현 예에 따른 자궁근종 진단 개체의 자궁근종 증식 속도 예측을 위한 정보 제공 방법에 있어서, 상기 증식 속도가 느린 자궁근종 조직은 평활근종 세포(leiomyoma cell)의 배가시간(doubling time)이 144시간 초과인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 본 발명의 일 구현 예에 따른 정보 제공 방법에 있어서, 상기 자궁근종 진단 개체로부터 분리된 근종 조직에서 측정된 지질 대사체의 수준이 증식 속도가 느린 자궁근종 조직으로부터 측정된 지질 대사체의 수준보다 낮은 경우 자궁근종 진단 개체로부터 분리된 근종은 증식 속도가 빠른 것으로 예측될 수 있다 (도 1 참고). 상기 '증식 속도가 빠른 것'은 자궁근종 조직의 평활근종 세포의 배가시간이 144시간 미만인 것을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 본 명세서에서 "낮은 수준"은 비교 대조군 (평활근종 세포의 배가시간이 144시간 초과인 자궁근종 조직에서 측정된 지질 대사체의 평균 수준)으로부터 양(quantity)의 감소, 수준(level)의 감소, 또는 농도(concentration)의 감소 등을 의미한다. 구체적으로, 액체 크로마토그래피-질량분석기 등의 분석 결과 자궁근종 조직 내 지질 대사체의 상대적 함량 또는 상대적 농도일 수 있다.
- [0036] 예를 들어, 상기 낮은 수준은 비교 대조군 값의 0.5배 이상의 감소 또는 통계적으로 유의한 감소일 수 있으나, 통상의 기술자라면 절대적인 감소량이 특정되지 않더라도, 비교 대조군 대비 유의하게 감소된(낮아진) 변화를 명확하게 이해할 수 있을 것이다. 상기 비교 대조군 값은 예를 들어 적어도 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 10개 이상 또는 15개 이상의 비교 대조군 값의 평균값일 것일 수 있다.
- [0037] 상기 감소를 나타내는 용어, 예를 들어 "낮은", "더", "더 낮은", "유의하게 낮은", "통계적으로 유의하게 낮은" 등의 용어는 상기 기술된 바와 같이 동일한 의미로 사용된다. 대조적으로, 용어 "유의하지 않게", "동등하게", "실질적으로 동일", "실질적으로 변화 없는" 등은 비교 대조군의 $\pm 10\%$ 이내, $\pm 5\%$ 이내, $\pm 3\%$ 이내, 또는 $\pm 2\%$ 이내 등, 비교 대조군 값으로부터 변화가 거의 없거나 유의하지 않은 변화를 보이는 것을 의미한다.
- [0038] 본 발명은 또한, 자궁근종 진단 개체로부터 분리된 근종 조직의 지질 대사체 수준을 측정하는 단계; 및
- [0039] 상기 측정된 지질 대사체의 수준을 증식 속도가 느린 자궁근종 조직의 지질 대사체 수준과 비교하는 단계;를 포함하는, 자궁근종 진단 개체의 자궁근종 증식 속도를 예측하는 방법을 제공한다.
- [0040] 본 발명에 따른 자궁근종 진단 개체의 자궁근종 증식 속도 예측 방법에 있어서, 상기 지질 대사체는 TG

8:0_8:0_27:1, C17-Sphinganine, HexCer 16:0;20/26:0 및 HexCer 16:1;20/17:4로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있고, 대사체 수준의 측정 방법은 질량분석법, 광흡수분석법 또는 크로마토그래피법일 수 있으며, 증식 속도가 느린 자궁근종 조직은 평활근종 세포(leiomyoma cell)의 배가시간(doubling time)이 144시간 초과인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0041] 또한, 본 발명에 따른 자궁근종 진단 개체의 자궁근종 증식 속도 예측 방법에 있어서, 상기 개체는 바람직하게는 인간 또는 인간을 제외한 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0043] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0045] 재료 및 방법

[0046] 1. 자궁근종 세포의 배양

[0047] 자궁근종 조직 시료는 2018년에서 2022년 사이에 계명대학교 동산의료원(대구)에서 자궁근종절제술(myomectomy) 또는 자궁적출술(hysterectomy)을 시행한 34명의 환자로부터 제공받았다. 본 연구는 계명대학교 동산의료원 생명윤리위원회의 승인을 받아 수행되었다(승인번호 DSMC 2021-03-009).

[0048] 자궁근종 조직은 저미기 전에 차가운 PBS로 2회 세척 후, 5 mm 크기로 자른 후 25 mM HEPES(2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid), 100 units/ml의 항생제, 1.5 mg/ml의 콜라게나제 V(Sigma-Aldrich) 및 0.2 mg/ml의 DNase I으로 보충된 HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)를 포함하는 50 ml 코니칼 튜브로 옮겼다. 37℃의 항온수조에서 약하게 교반하며 3시간 동안 반응시킨 후, 여과하고 1,000 rpm 으로 5분간 원심분리하였다. 펠렛을 HBSS로 행균 후 HBSS는 제거하고 10% FBS(fetal bovine serum) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM/F12 완전배지를 사용하여 평활근종 세포(leiomyoma cell)를 배양하였다. 세포의 배가시간(doubling time)을 결정하기 위해, 100 mm 디쉬에 3×10^5 개의 세포를 분주하여 실험을 진행하였다.

[0050] 2. 지질 프로파일링(lipid profiling)

[0051] 자궁근종 조직 30 mg을 산화지르코늄(zirconium oxide) 비드를 포함하는 precellys lysing 튜브 (Precellys 24, Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France)에서 700 μ l의 차가운 50% 메탄올과 5,000 rpm의 속도로 반응시켜 균질화하는 과정을 2회 반복하였다. 1분 동안 볼텍싱한 후 반응물을 4℃에서 15분간 정치시킨 후, 13,200 rpm, 4℃, 20분의 조건으로 원심분리를 수행하였다. 하층의 지질층을 분리하고 고속진공농축기(Hanil Science Medical, Republic of Korea)로 용매를 증발시켰다. 내부 대조구로서 SPLASH (1:20, v/v)를 포함하는 이소프로필 알코올에 아세트니트릴을 10% 첨가한 용액의 210 μ l에 상기에서 얻어진 지질 펠렛을 reconstituted한 뒤, 자궁근종 조직의 지질 프로파일을 quadrupole time-of-flight mass spectrometry (Q-TOF MS, 6545XT Q-TOF system, Agilent Technologies) 시스템을 갖춘 ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC, 1290 infinity II LC system, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)로 분석하였다.

표 1

UHPLC Q-TOF 분석 조건

LC conditions			
Instrument system	1290 Infinity II UHPLC system (Agilent)		
Column	ACQUITY CSH C18 Column, 2.1×100 mm, 1.7 μm (Waters)		
Column oven temperature	35 °C		
Injection volume	1.5 μL		
Flow rate	0.25 mL/min		
Mobile phase	Solvent A in positive mode: 10 mM ammonium acetate (or ammonium formate in negative mode) in an acetonitrile-water mixture (4:6, v/v)		
	Solvent B in positive mode: 10 mM ammonium acetate (or ammonium formate in negative mode) in acetonitrile-isopropyl alcohol (1:9, v/v)		
Sequential gradient conditions	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.0	60	40
	5.0	35	65
	12.0	30	70
	15.0	1	99
	17.0	1	99
	17.1	60	40
	20.0	60	40
MS conditions			
Instrument system	6545XT Q-TOF MS system (Agilent)		
Sheath gas temperature and flow	350 °C and 11 L/min		
Gas temperature and drying gas flow	325 °C and 8 L/min		
Fragmentor and skimmer voltage	125 and 65 V		
Capillary and nozzle voltage	3500 and 1000 V		

[0052]

[0053] 분석된 지질 대사체는 Liebisch G 등(J Lipid Res. 2020;61(12):1539-1555)의 보고 및 LIPID MAPS[®] (<https://lipidmaps.org/>) 등을 이용하여 확인 및 명명하였다.

[0055] 3. 자궁근종 증식 속도 예측을 위한 지질 대사체 마커 선발

[0056] 증식 속도에 차이가 있는 자궁근종 조직간 지질 프로파일에서 차별성이 있는 후보 물질은 SIMCA-P+ 소프트웨어 (version 14.0; Umetrics, Sweden)를 사용하여, 다변량(multivariate) 통계 분석에 사용되는 통계기법인 직교 부분최소자승판별(Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis, OPLS-DA) 모델을 사용하여 분석하였다.

[0057] OPLS-DA는 분류(classification)를 통해 집합이라는 종속변수를 부여하여 판별에 기여하는 각 데이터의 시각화를 극대화하고 실험군 간 차이가 있는 대사산물을 찾을 수 있게 도와주는 통계 기법으로서, 예측모델의 확립과 판별에 기여하는 변수 탐색에 가장 적합한 방법이다(Bylesjo et al., (2006) J. Chemom. 20:341-351; Hong, (2014) J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 43:179-186; Westerhuis et al., (2010) Metabolomics 6:119-128).

실시예 1. 자궁근종 증식 속도 예측을 위한 지질 대사체 마커의 선발 및 검증

계명대학교 동산의료원으로부터 제공받은 자궁근종 조직의 세포를 분리하여 배가시간을 측정한 결과, 배가시간이 144시간 미만인 그룹(n=14)과 144시간 초과인 그룹(n=14)으로 나눌 수 있었으며, 각 시료를 제공한 환자의 일반적이 정보를 확인한 결과 평균연령, BMI 지수, 근종 개수, 근종 크기 및 출산수(parity)에 큰 차이가 없는 것으로 나타났다(표 2).

표 2

마커 선발용 지질 프로파일링에 사용된 시료를 제공한 환자의 특성

	Fast (n=17)	Slow (n=17)	P value ^a
Age	40.35±3.02 [38.69-41.86] ^b	40.82±3.83 [38.65-42.74]	0.693
BMI	23.27 ± 4.15 [20.95-25.1]	24 ± 4.008 [21.81-25.76]	0.604
Myoma number	2.824±2.767 [1.236-2.995]	3.706±3.531 [1.451-3.912]	0.234
Myoma size (mm)	82.13±32.75 [66.84-91.19]	111.3±170.5 [56.82-109]	0.494
Parity	1.05±0.75	1.41±0.94	0.234

^a p-value using the independent t-test in continuous variables.

^b Data are expressed as mean ± standard deviation [Geometric Mean (95% confidential interval)]

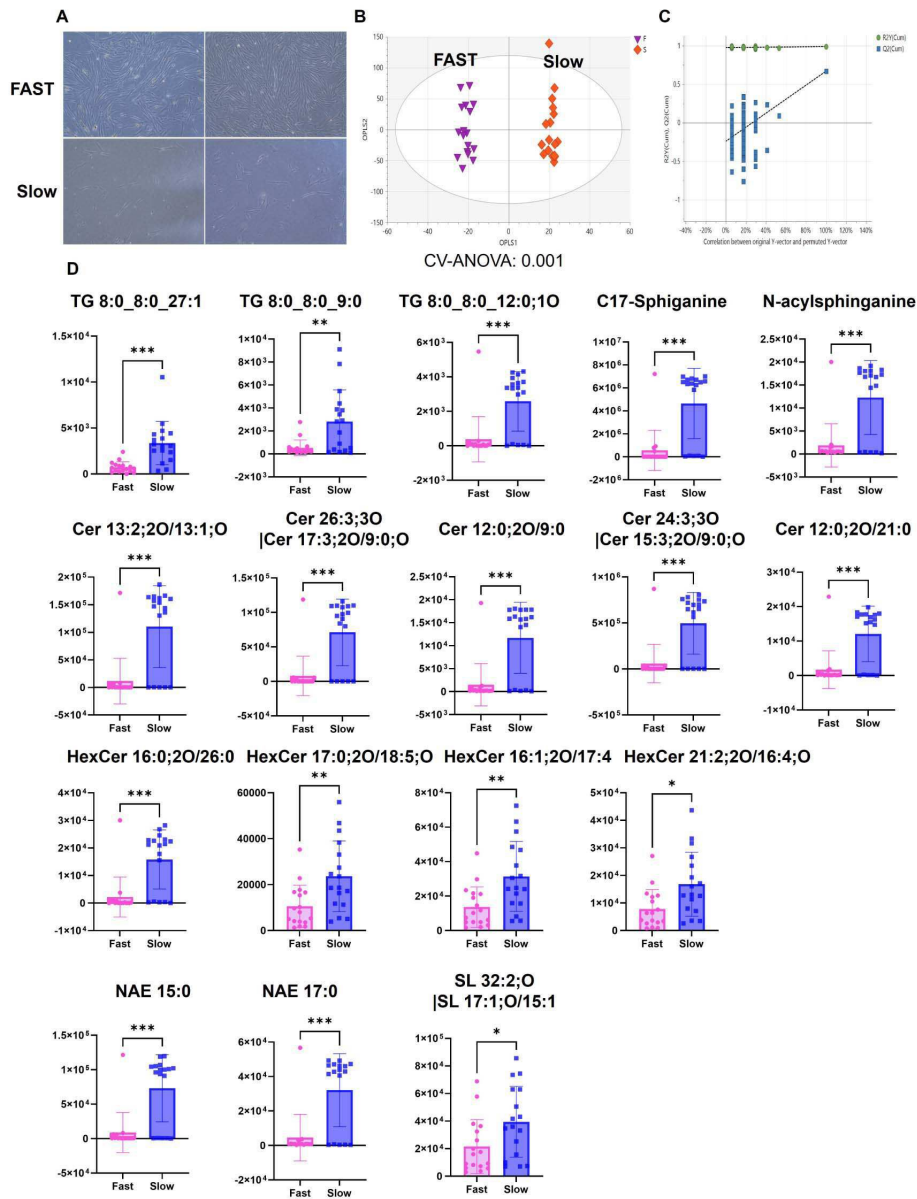
상기 배가시간이 144시간 미만인 그룹을 fast로, 144시간 초과인 그룹을 slow로 명명한 뒤, 두 그룹의 근종 조직을 이용하여 지질 프로파일링을 수행하였다. 자궁근종 증식 속도 예측을 위한 지질 대사체 마커 선발을 위해 분석된 지질 대사체의 발현 수준(강도)을 OPLS-DA (VIP>1.5) 및 t-test (p<0.05)의 통계분석의 조합을 통해 분석하였다. 그 결과, 17개의 지질 대사체가 양 그룹간 발현 수준(강도)에 유의적인 차이가 있는 것으로 확인되었다(도 1D).

또한, 상기 17개의 지질 대사체에 대해 각각 GraphPad Prism version 9 (GraphPad software, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 ROC curve 분석을 수행한 결과, TG 8:0_8:0_27:1, C17-Sphinganine, HexCer 16:0;20/26:0 및 HexCer 16:1;20/17:4의 지질 대사체가 0.8 이상의 AUC 값을 나타내어 이들을 최종적으로 선발하였다(도 2A). 최종 선발된 4종의 지질 대사체가 자궁근종 증식 속도 예측을 위한 마커로서 활용될 수 있는지 검증하기 위해, 외부 검정 세트(fast 환자: 33, slow 환자: 20)의 조직 내 각 지질 대사체의 수준(강도)을 분석한 결과, 도 2B에 나타난 바와 같이 TG 8:0_8:0_27:1, HexCer 16:0;20/26:0 및 HexCer 16:1;20/17:4의 경우 각각 90.9%, 93.9% 및 87.9%의 높은 수준으로 예측 결과(fast)와 표현형이 일치함을 알 수 있었고, C17-Sphinganine의 경우 발현 수준(강도) 분석을 통해 slow 그룹에서 90%의 높은 수준으로 예측 결과와 표현형이 일치함을 확인할 수 있었다.

이상의 결과를 통해 본 발명의 지질 대사체 4종은 자궁근종 증식 속도 예측을 위한 분자마커로서 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면

도면1



도면2

