



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년08월13일
(11) 등록번호 10-2010652
(24) 등록일자 2019년08월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
G01N 33/6872 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0105714
(22) 출원일자 2017년08월21일
심사청구일자 2017년08월21일
(65) 공개번호 10-2019-0020581
(43) 공개일자 2019년03월04일
(56) 선행기술조사문헌

Eaum Seok Lee et al., 'Growth Differentiation Factor 15 Predicts Chronic Liver Disease Severity', *Gut and Liver*, (2017.03.), Vol. 11, pp 276-282. 1부.*
PLoS ONE, 2015, Vol. 10, e0127518.
Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, (2017.08.12), Vol. 15, pp 403-407.

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 13 항

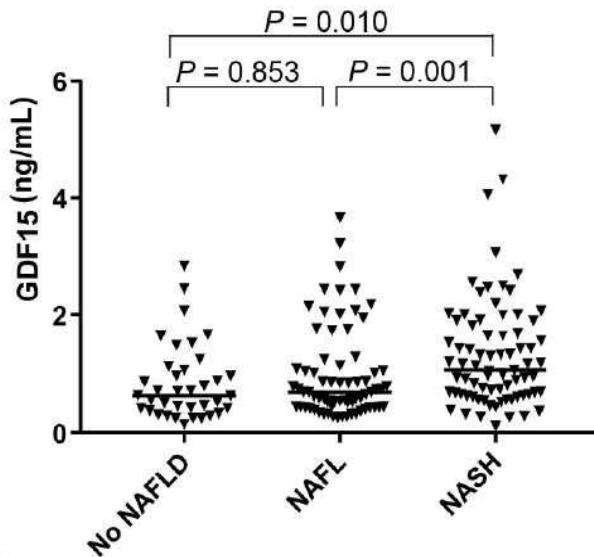
심사관 : 차명훈

- (54) 발명의 명칭 간질환 예측 또는 진단용 조성물 및 이를 이용한 간질환 예측 또는 진단 방법

(57) 요약

본 발명은 간질환 예측 또는 진단용 조성물 및 이를 이용한 간질환 예측 또는 진단 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 비알코올 지방간에서의 간섬유화를 예측 또는 진단하기 위한 마커 및 이를 이용하여 예측 또는 진단하는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 간질환 예측 또는 진단용 조성물을 이용하면 비알코올 지방간 질환에서의 간섬유화와 양의 상관관계가 있는 GDF15 단백질의 수치를 확인할 수 있으므로, 이를 효과적으로 NAFLD에서의 간섬유화 예측 및 진단에 이용할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

G01N 2333/475 (2013.01)
G01N 2500/04 (2013.01)
G01N 2800/085 (2013.01)
G01N 2800/50 (2013.01)

이) 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016934590
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 이공학개인기초연구지원
 연구과제명 비알코올 지방간 질환 환자의 조직학적 간섬유화 진행 예측을 위한 신규 바이오마커 개발
 을 위한 협동 중개 연구
 기여율 70/100
 주관기관 서울특별시보라매병원
 연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

이) 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465023825
 부처명 보건복지부
 연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
 연구사업명 질환극복기술개발
 연구과제명 대규모 한국인 비알코올 지방간 전향 코호트에서 간병리 조직소견에 따른 혈청 대사체 분석
 기여율 30/100
 주관기관 서울특별시보라매병원
 연구기간 2017.04.10 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

성장 분화 인자 15(growth differentiation factor 15; 이하 GDF15) 단백질을 코딩하는 핵산 서열의 발현 또는 GDF15 단백질의 활성을 측정하는 제제를 포함하는, 비알코올 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)에서의 간섬유화 예측 또는 진단용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 GDF15 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 비알코올 지방간 질환에서의 간섬유화 예측 또는 진단용 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 제제는 GDF15 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합할 수 있는 항체인 것인, 비알코올 지방간 질환에서의 간섬유화 예측 또는 진단용 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 GDF15 단백질은 검체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 유래한 것인, 비알코올 지방간 질환에서의 간섬유화 예측 또는 진단용 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액 또는 생검조직으로부터 얻어지는 것인, 비알코올 지방간 질환에서의 간섬유화 예측 또는 진단용 조성물.

청구항 8

시료로부터 성장 분화 인자 15(growth differentiation factor 15; GDF15) 단백질을 코딩하는 핵산 서열의 발현 정도 또는 GDF15 단백질의 농도를 측정하는 측정 단계를 포함하는, 비알코올 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)에서의 간섬유화 예측 또는 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

제 8 항에 있어서, 상기 GDF15 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 비알코올 지방간 질환에서의 간섬유화 예측 또는 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 12

제 8 항에 있어서, 상기 GDF15 단백질은 검체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 유래한 것인, 비알코올 지방간

질환에서의 간섬유화 예측 또는 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액 또는 생검조직으로부터 얻어지는 것인, 비알코올 지방간 질환에서의 간섬유화 예측 또는 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 14

제 8 항에 있어서, 상기 측정 단계는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 비색법(colorimetric method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particle counting method), 육안측정법(visual assessment), 섬광계수법(scintillation counting method) 및 조직면역염색법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법을 이용하여 수행되는 것인, 비알코올 지방간 질환에서의 간섬유화 예측 또는 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 15

제 8 항에 있어서, 상기 측정 단계는 GDF15 단백질의 농도가 1.52 ng/mL 이상인지의 여부를 측정하는 것인, 비알코올 지방간 질환에서의 간섬유화 예측 또는 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 16

다음 단계를 포함하는 비알코올 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)에서의 간섬유화 예방, 치료 또는 개선 후보물질 스크리닝 방법:

피검시료를 성장 분화 인자 15(growth differentiation factor 15; GDF15) 단백질에 처리하는 처리 단계; 및 상기 GDF15 단백질의 활성을 억제하는 피검시료를 선별하는 분석 단계.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

다음 단계를 포함하는 비알코올 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)에서의 간섬유화 예방, 치료 또는 개선 후보물질 스크리닝 방법:

피검시료를 성장 분화 인자 15(growth differentiation factor 15; GDF15) 단백질 발현 세포에 처리하는 처리 단계; 및

상기 세포에서 GDF15 단백질의 발현을 억제시키는 피검시료를 선별하는 분석 단계.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 간질환 예측 또는 진단용 조성물 및 이를 이용한 간질환 예측 또는 진단 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 비알코올 지방간에서의 간섬유화를 예측 또는 진단하기 위한 마커 및 이를 이용한 예측 또는 진단 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 성장 분화 인자 15(growth differentiation factor 15; GDF15)는 포유류 조직에 광범위하게 분포하며 염증, 암 및 심혈관 질환에서 다각적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 최근에, 혈청 GDF15 수치가 간경화 및 만성 B형 간염 또는 C형 간염 바이러스의 감염과 관련된 간세포 암종 질환 환자에서 증가하는 것으로 나타났다. 간 질환에 있어서의 GDF15의 역학적 역할은 분명하지 않지만, GDF15는 성장 인자 β 1(transforming growth factor beta 1; TGF- β 1)의 발현을 자극할 뿐만 아니라 간 섬유화/발암 경로에서 중요한 역할을 하는 SMAD 신호 시스템을 직접 활성화하는 것으로 밝혀졌다.
- [0003] 최근에, 근감소증이 비알코올 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis; NASH) 및 비알코올 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)의 독립적인 위험인자임이 보고되었다. GDF15 발현은 근육 소모 조건에서 증가하므로, 혈청 GDF15 수치는 근육량을 조절하여 NAFLD의 조직학적 중증도에 영향을 줄 수 있다고 예상되었다.
- [0004] 따라서, 알려진 대사성 위험 인자와 독립적으로, GDF15가 생검을 통해 검증된 NAFLD 환자들 사이에서 NASH 발병의 위험 및 진행성 섬유화(Advanced fibrosis)를 증가시키는지, 간세포가 고농도의 GDF15에 노출되는 것이 간섬유화에 영향을 미치는지의 여부를 조사하여 NAFLD의 발병과 진행에서 GDF15의 병원성 역할을 확립할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명자들은 비알코올 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)에서의 간섬유화를 예측 또는 진단하기 위한 마커 및 이를 이용한 예측 또는 진단 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다.
- [0006] 그 결과 성장 분화 인자 15(growth differentiation factor 15; GDF15) 단백질의 수치와 간섬유화 간에 양의 상관 관계가 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0007] 따라서 본 발명의 목적은, 성장 분화 인자 15(growth differentiation factor 15; 이하 GDF15) 단백질을 코딩하는 핵산 서열의 발현 또는 GDF15 단백질의 활성을 측정하는 제제를 포함하는 간질환 예측 또는 진단용 조성물을 제공함에 있다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은, 시료로부터 GDF15 단백질을 코딩하는 핵산 서열의 발현 정도 또는 GDF15 단백질의 농도를 측정하는 측정 단계를 포함하는 간질환 예측 또는 진단 방법을 제공함에 있다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은, 다음 단계를 포함하는 간질환 예방, 치료 또는 개선 후보물질 스크리닝 방법을 제공함에 있다:
- [0010] 피검시료를 GDF15 단백질에 처리하는 단계; 및
- [0011] 상기 GDF15 단백질의 활성을 억제하는 피검시료를 선별하는 단계.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은, 다음 단계를 포함하는 간질환 예방, 치료 또는 개선 후보물질 스크리닝 방법을 제공함에 있다:
- [0013] 피검시료를 GDF15 단백질 발현 세포에 처리하는 단계; 및
- [0014] 상기 세포에서 GDF15 단백질의 발현을 억제시키는 피검시료를 선별하는 단계.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명은 간질환 예측 또는 진단용 조성물 및 이를 이용한 간질환 예측 또는 진단 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 비알코올 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)에서의 간섬유화를 예측 또는 진단하기 위한 마커를 포함한다. 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [0016] 본 발명의 일 양태는 성장 분화 인자 15(growth differentiation factor 15; 이하 GDF15) 단백질을 코딩하는 핵산 서열의 발현 또는 GDF15 단백질의 활성을 측정하는 제제를 포함하는 간질환 예측 또는 진단용 조성물이다.
- [0017] 상기 간질환은 간섬유화, 간경화, 급성간염, 만성간염, 간경변 또는 간암일 수 있고, 예를 들어, 간섬유화일 수

있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 상기 간섬유화는 비알코올 지방간 질환에서의 간섬유화일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0019] 상기 GDF15 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0020] 상기 제제는 GDF15 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합할 수 있는 항체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 상기 제제는 상기 GDF15 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합할 수 있는 항체에 특이적으로 결합하는 검출체를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0022] 상기 검출체는 발색효소, 형광물질, 방사성 동위원소 또는 콜로이드 등으로 표지한 접합체(conjugate); 또는 상기 GDF15 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합할 수 있는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 2차 항체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 상기 GDF15 단백질은 검체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 유래한 것일 수 있다.

[0024] 상기 생물학적 시료는 혈액 또는 생검조직으로부터 얻어지는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0025] 본 발명의 다른 양태는 시료로부터 성장 분화 인자 15(growth differentiation factor 15; GDF15) 단백질을 코딩하는 핵산 서열의 발현 정도 또는 GDF15 단백질의 농도를 측정하는 측정 단계를 포함하는 간질환 예측 또는 진단 방법이다.

[0026] 상기 간질환은 간섬유화, 간경화, 급성간염, 만성간염, 간경변 또는 간암일 수 있고, 예를 들어, 간섬유화일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 상기 간섬유화는 비알코올 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)에서의 간섬유화일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 상기 GDF15 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0029] 상기 GDF15 단백질은 검체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 유래한 것일 수 있다.

[0030] 상기 생물학적 시료는 혈액 또는 생검조직으로부터 얻어지는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 상기 측정 단계는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 비색법(colorimetric method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particle counting method), 육안측정법(visual assessment), 섬광계수법(scintillation counting method) 및 조직면역색법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법을 이용하여 수행될 수 있고, 예를 들어, ELISA를 이용하여 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 상기 측정 단계는 GDF15 단백질의 농도가 1.52 ng/mL 이상인지를 여부를 측정하는 것일 수 있다.

[0033] 본 발명의 일 실시예에서, 혈청 GDF15 수치의 측정값을 4개의 군(quartiles; Q)으로 분류하였다. GDF15의 수치가 가장 높은 군은 Q4로, 이는 GDF15 단백질의 농도가 1.52 ng/mL 이상인 것을 의미하며, 이 경우 중증 섬유화의 유병률은 41.7%로 나타났다.

[0034] 따라서, GDF15 수치가 Q4에 해당하는 경우 진행성 섬유화와 관련이 있는 것으로 볼 수 있으므로 GDF15 단백질의 농도가 1.52 ng/mL 이상인지를 여부를 측정하는 방법을 이용하여, GDF15를 비알코올 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)에서의 간섬유화를 예측 또는 진단하기 위한 마커로 활용할 수 있다.

[0035] 본 발명의 또 다른 양태는 다음 단계를 포함하는 간질환 예방, 치료 또는 개선 후보물질 스크리닝 방법이다:

[0036] 피검시료를 성장 분화 인자 15(growth differentiation factor 15; GDF15) 단백질에 처리하는 처리 단계; 및

[0037] 상기 GDF15 단백질의 활성을 억제하는 피검시료를 선별하는 분석 단계.

[0038] 상기 간질환은 간섬유화, 간경화, 급성간염, 만성간염, 간경변 또는 간암일 수 있고, 예를 들어, 간섬유화일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 상기 간섬유화는 비알코올 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)에서의 간섬유화일 수 있으

나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 상기 피검시료는 혈액 또는 생검조직으로부터 얻어지는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 상기 분석 단계는 GDF15 단백질의 활성을 측정하기 위하여 SDS-PAGE, 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석 및 단백질 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법을 이용하여 수행할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 상기 GDF15 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0043] 본 발명의 또 다른 양태는 다음 단계를 포함하는 간질환 예방, 치료 또는 개선 후보물질 스크리닝 방법이다:

[0044] 피검시료를 성장 분화 인자 15(growth differentiation factor 15; GDF15) 단백질 발현 세포에 처리하는 처리 단계; 및

[0045] 상기 세포에서 GDF15 단백질의 발현을 억제시키는 피검시료를 선별하는 분석 단계.

[0046] 상기 간질환은 간섬유화, 간경화, 급성간염, 만성간염, 간경변 또는 간암일 수 있고, 예를 들어, 간섬유화일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0047] 상기 간섬유화는 비알코올 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)에서의 간섬유화일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0048] 상기 피검시료는 혈액 또는 생검조직으로부터 얻어지는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 상기 분석 단계는 GDF15 단백질의 발현을 측정하기 위하여 웨스턴블랏(Western blotting), 효소-면역화학검출법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 면역조직화학 염색법(immunohistochemical staining), 면역침강(immunoprecipitation) 및 면역형광법(immunofluorescence)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법을 이용하여 수행할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0050] 상기 GDF15 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

발명의 효과

[0051] 본 발명은 간질환 예측 또는 진단용 조성물 및 이를 이용한 간질환 예측 또는 진단 방법에 관한 것으로서, 상기 조성물을 통해 비알코올 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)에서의 간섬유화와 양의 상관관계가 있는 성장 분화 인자 15(growth differentiation factor 15; GDF15) 단백질의 수치를 확인할 수 있으므로, 이를 효과적으로 NAFLD에서의 간섬유화 예측 및 진단에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1a는 비알코올 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)의 조직학적 중증도에 따라 성장 분화 인자 15(growth differentiation factor 15; GDF15) 수치가 유의하게 증가함을 나타낸 그래프이다.

도 1b는 지방증 등급에 따른 평균 GDF15 수치를 나타낸 그래프이다.

도 1c는 풍선변성(ballooning) 등급에 따른 평균 GDF15 수치를 나타낸 그래프이다.

도 1d는 간소엽 염증 등급에 따른 평균 GDF15 수치를 나타낸 그래프이다.

도 1e는 섬유화 단계에 따른 평균 GDF15 수치를 나타낸 그래프이다.

도 1f는 섬유화 단계를 중증도에 따라 구분하여 평균 GDF15 수치를 나타낸 그래프이다.

도 2a는 섬유화 단계 F0에 해당하는 간 조직을 메이슨트리크롬(Masson's trichrome) 염색하여 나타낸 사진이다.

도 2b는 섬유화 단계 F0에 해당하는 간 조직을 항-GDF15 항체로 염색하여 나타낸 사진이다.

도 2c는 섬유화 단계 F1에 해당하는 간 조직을 메이슨트리크롬 염색하여 나타낸 사진이다.

도 2d는 섬유화 단계 F1에 해당하는 간 조직을 항-GDF15 항체로 염색하여 나타낸 사진이다.

도 2e는 섬유화 단계 F2에 해당하는 간 조직을 메이슨트리크롬 염색하여 나타낸 사진이다.

도 2f는 섬유화 단계 F2에 해당하는 간 조직을 항-GDF15 항체로 염색하여 나타낸 사진이다.

도 2g는 섬유화 단계 F3에 해당하는 간 조직을 메이슨트리크롬 염색하여 나타낸 사진이다.

도 2h는 섬유화 단계 F3에 해당하는 간 조직을 항-GDF15 항체로 염색하여 나타낸 사진이다.

도 3a는 GDF15 수치와 간 경직 정도 간의 상관 관계를 나타낸 그래프이다.

도 3b는 혈청 GDF15 수치와 당뇨병 상태에 따라 확인된 진행성 섬유화(Advanced fibrosis)를 나타낸 그래프이다.

도 4a는 인간 간 성상세포(Human Hepatic Stellate Cell; HSCs)인 LX-2 세포의 추출물에 재조합 인간 GDF15(Recombinant human GDF15; rhGDF15) 처리 후 시간 경과에 따라 나타낸 α -평활근액틴(α -smooth muscle actin; α -SMA)의 면역블로팅 사진이다.

도 4b는 LX-2 세포에 rhGDF15 처리 후 시간 경과에 따라 나타낸 α -SMA의 면역형광 사진이다.

도 4c는 LX-2 세포에 rhGDF15 처리 후 시간 경과에 따라 나타낸 α -SMA의 면역블로팅 사진이다.

도 4d는 간세포의 추출물에 rhGDF15 처리 후 시간 경과에 따라 나타낸 α -SMA의 면역블로팅 사진이다.

도 5a는 간세포, HSCs 세포 및 쿠퍼 세포에 팔미트산을 처리하고 3시간 경과 후 GDF15 mRNA의 발현량을 나타낸 그래프이다.

도 5b는 간세포, HSCs 세포 및 쿠퍼 세포에 팔미트산을 처리하고 6시간 경과 후 GDF15 mRNA의 발현량을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0055]

실험예 1: 대상자 선정

[0056]

대상자는 간 지방증의 방사선학적 기록이 있는지의 여부를 기준으로 선별하였다.

[0057]

대상자의 적격성 기준은 다음과 같다:

[0058]

(i) 18세 이상;

[0059]

(ii) 초음파 스캐닝(간/신장 에코 발생 및 후방 감쇠 증가)에서 밝은 에코가 생성되는 간; 및

[0060]

(iii) 6개월 이내에 기준치를 초과한 알라닌 트랜스아미네이즈(Alanine Transaminase, ALT) 수치의 원인불명의 상승.

[0061]

다음의 제외 기준이 적용되었다:

[0062]

(i) B형 간염 또는 C형 간염 바이러스 감염;

[0063]

(ii) 자가 면역성 간염;

[0064]

(iii) 약물에 의한 간 손상 또는 지방증;

[0065]

(iv) 월슨 병 또는 혈색소 침착증;

[0066]

(v) 과도한 음주(남자> 30 g/day, 여자> 20 g/day); 및

[0067]

(vi) 악성 종양 진단.

[0068]

실험군에는 비알코올 지방간염(nonalcoholic Steatohepatitis; NASH) 또는 섬유화가 의심되는 간 생검 환자가 포함되었다.

[0069]

또한, 대조군은 간 조직의 간 생검 및 공여자 간 이식을 위한 사전 평가에서 수집된 혈청 또는 방사선 결과에

기초하여, 간 지방증의 징후는 없으나 간 선종 또는 국소 결절 과형성으로 의심되는 고형 간암의 확인을 위해 수집된 혈청을 포함하도록 설정되었다.

[0071] 실험예 2: 측정 방법

[0072] 신체 질량 지수(Body mass index, BMI, $\geq 25 \text{ kg/m}^2$)는 세계 보건기구 아시아-태평양 기준에 근거하여 비만을 판단하는 기준으로 사용하였다.

[0073] 대사 증후군은 개정된 국가 콜레스테롤 교육 프로그램 성인 치료 패널 III 기준(National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria)에 의하여 정의되었다.

[0074] 인슐린 저항성은 12시간(하룻밤) 동안 빠르게 생검을 수행한 정맥혈 샘플에 대하여 인슐린 저항성(homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR)의 항상성 모델 평가를 사용하여 평가하였다.

[0075] 근감소증(Sarcopenia)은 사지 골격근(appendicular skeletal muscle; ASM)의 질량을 체중으로 나눈 값으로 평가하였다(ASM/weight, ASM%).

[0076] 골격근량 결핍(Low skeletal muscle mass; LSMM)은 미국 국립보건원 근감소증 프로젝트(National Institutes of Health Sarcopenia Project) 지침에 따라 골격근 질량(ASM)을 BMI로 나눈 값(ASM/BMI)으로 정의되었다.

[0077] 성장 분화 인자 15(growth differentiation factor 15; GDF15) 수치는 상업적으로 이용 가능한 효소 면역 흡착 분석 키트(enzyme-linked immunosorbent assay kit; ELISA; R & D Systems, Minneapolis, MN)를 사용하여 측정되었다. 상기 GDF15의 아미노산 서열 정보는 하기 표 1과 같다.

표 1

서열번호	명칭	서열
1	GDF15	ARARNGDHCPPLGPGRCRRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVP ASYN PMVLIQKTDTGVLQTYDDLLAKIDCHCI

[0079] 간 경직의 측정을 위해, 진행성 섬유화(Advanced fibrosis)를 예측하기 위한 일시적 탄력성 검사(transient elastography; TE)를 수행하였다.

[0080] 섬유화 지수(NAFLD fibrosis score; NFS), 섬유화-4(Fibrosis-4; Fib4) 기준 및 아스파테이트 아미노전이효소(aspartate aminotransferase; AST), 혈소판 비 지수(Platelet Ratio Index; APRI)를 계산하여 GDF15에 대한 이들 지수를 진행성 섬유화 예측 및 진단의 관점에서 비교하였다.

[0084] 실험 예 3: 간 조직학적 평가

[0085] 비알코올 지방간 질환 (non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)은 5% 이상의 거대 수포성 지방증의 존재 여부에 따라 진단되었다. NASH는 거대 세포로 구성된 조직학적 간 손상의 전체 패턴을 기반으로 진단되었다. 이와 같은 기준에 따라 섬유화가 확인되었다. 진행성 섬유화는 F3 이상의 단계에 해당하는 것에 한하여 진단되었다.

[0087] 실험 예 4: GDF15 존재 하에서의 간세포 배양

[0088] GDF15 100 ng/mL 및 TGF- β 10 ng/mL 존재 하에서 배양된 LX-2 세포(인간 간 성상세포; Human Hepatic Stellate Cell, KAIST) 및 마우스의 간에서 직접 분리한 1차 간세포(primary hepatocytes cells) 당 3×10^5 cells/6웰(well)에 재조합 인간 GDF15(Recombinant human GDF15; rhGDF15; R&D Systems; 957-GD-025)를 100 ng/mL 첨가하였다. 알파 평활근 액틴(Alpha-smooth muscle actin; α -SMA) 및 콜라겐 1(Collagen 1)과 같은 섬유화 마커의 수치는 면역블로팅, 면역조직화학 염색 및 면역형광 염색으로 확인하였다.

[0090] 실험 예 5: 팔미트산 처리에 의한 GDF15 mRNA의 발현량 변화 확인

[0091] 1차 간세포를 분리하여, 간세포, HSCs(LX-2), 쿠퍼(Kupffer) 세포 및 간 혈관 내피 세포(liver sinusoidal endothelial cells; LSECs)로 분화시켰다. 쿠퍼 세포는 간에 존재하는 대식세포이며, 염증의 개시에 필수적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0092] 쿠퍼 세포와 LSECs를 구분하기 위해, MiniMACS™ 분리 시스템(Miltenyi Biotec, Seoul, Korea)을 사용하여 자기-활성화 세포 선별(magnetic-activated cell sorting; MACS)을 수행하였다. LSECs의 순도는 항-PE 항체(순도

90% 이상)를 이용한 형광-활성화 세포 분류 방법에 의해 평가되었다.

[0093] 1차 세포를 1.5 mL의 무혈청(serum-free) 배지에서 4시간 동안 배양하고, 5(w/w)% 소 혈청 알부민(bovine serum albumin; BSA 대조군), 200 uM 팔미트산 / 5(w/w)% BSA 용액 및 500 uM 팔미트산 / 5(w/w)% BSA 용액을 각각 처리하였다.

[0094] 3시간 및 6시간 경과 후, 세포를 수집하여 추가로 분석하였다. 역전사 중합 효소 연쇄 반응(Reverse-transcription polymerase chain reaction; RT-PCR) 및 실시간 PCR(real-time PCR)을 수행하여 팔미트산 처리 후의 GDF15 mRNA의 발현을 평가하였다.

0096] 실험예 6: 통계 분석

[0097] 그룹 간 차이는 독립 t-검정, 만-위트니 U(Mann-Whitney U) 검정, 분산 분석(analysis of variance; ANOVA) 또는 연속 변수에 대한 크루스컬-월리스(Kruskal-Wallis) 검정 및 범주 형 변수에 대한 카이 제곱(chi-square) 검정을 사용하여 평가되었다. 스피어먼(Spearman)의 상관 분석은 GDF15 수치와 조직학적 매개변수 사이의 관계를 평가하기 위해 수행되었다.

[0098] 나이, 성별, 인슐린 저항성(homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR)을 보정한 일반적인 선형 모델을 사용하여 NASH 또는 진행성 섬유화 상태에 따른 GDF15 수치를 비교하였다.

[0099] NASH 또는 섬유화의 독립적인 예측 인자를 조사하기 위해, 공변량(covariates)이 조정된 바이너리 로지스틱 회귀 모델(binary logistic regression model)을 생성하였다. 유의성은 P <0.05로 정의되었다.

[0100] 모든 통계 분석은 IBM SPSS 통계 버전 20.0(IBM Inc., Armonk, NY)을 사용하여 수행되었다.

0102] 결과예 1: NAFLD의 조직학적 스펙트럼에 따른 임상적 특징

[0103] 표 2에 나타난 바와 같이, 150명의 NAFLD 환자와 40명의 대조군을 조사하였다. NAFLD 환자들은 생검을 통하여 비알코올 지방간(non-alcoholic fatty liver; NAFL) 72명(남자 65.3%)과 NASH 78명(남자 44.9%)으로 구분되었다.

표 2

[0105]	대조군	NAFL	NASH	P-value ³
N	40	72	78	
남성(Male), n (%)	17 (42.5)	47 (65.3)	35 (44.9)	0.732
연령(Age), year	54.1 ± 13.9	53.0 ± 12.1	52.9 ± 16.2	0.903
신체질량지수(BMI), kg/m ²	24.8 (23.4, 26.3)	27.4 (25.0, 29.5)	28.4 (25.8, 31.6)	<0.001
수축기혈압(SBP), mmHg	123.2 ± 12.9	126.4 ± 13.7	128.8 ± 17.0	0.154
이완기혈압(DBP), mmHg	77.2 ± 7.4	79.1 ± 11.4	79.6 ± 12.5	0.529
허리둘레(WC), cm	87.1 (82.0, 93.5)	92.0 (87.6, 99.6)	95.1 (89.1, 103.6)	<0.001
당뇨병(Diabetes), n (%)	5 (12.5)	25 (34.7)	32 (41.0)	0.003
고혈압(Hypertension), n (%)	15 (37.5)	33 (45.8)	46 (59.0)	0.021
대사 증후군(Metabolic syndrome), n (%)	14 (35.0)	45 (65.2)	61 (79.2)	<0.001
비만(Obesity) ¹ , n (%)	16 (40.0)	55 (76.4)	65 (83.3)	<0.001
LSMM ² , n (%)	2 (5.0)	13 (18.6)	26 (34.2)	<0.001
ALT, IU/L	22.5 (13.3, 34.8)	28.0 (22.0, 45.8)	59.5 (36.8, 108.0)	<0.001
AST, IU/L	25.0 (19.3, 37.0)	28.5 (22.0, 34.8)	54.0 (35.8, 80.3)	<0.001
혈소판(Plt), x10 ⁹ /L	228.4 ± 44.7	242.5 ± 62.3	218.6 ± 61.1	0.046
알부민(Albumin), mg/dL	4.1 ± 0.4	4.2 ± 0.3	4.3 ± 0.3	0.022
HbA1c, %	5.7 (5.4, 5.8)	5.8 (5.4, 6.5)	6.2 (5.6, 7.0)	<0.001
크리글리세리드(Triglyceride), mg/dL	94.0 (71.3, 127.0)	145.5 (106.5, 192.0)	142.0 (107.0, 191.8)	<0.001
LDL 콜레스테롤(cholesterol), mg/dL	109.3 ± 34.0	103.7 ± 33.6	108.2 ± 30.3	0.602

ASM/BMI	0.73(0.60, 0.89)	0.81(0.64, 0.90)	0.67(0.55, 0.81)	0.005
인슐린(Insulin), uIU/mL	7.8 (6.2, 9.6)	10.4 (7.9, 13.2)	15.7 (11.0, 25.2)	<0.001
인슐린 저항성(HOMA-IR)	2.05 (1.69, 2.54)	2.62 (1.97, 3.55)	4.30 (2.95, 7.86)	<0.001
GDF15, ng/mL	0.71 (0.41, 1.22)	0.67 (0.43, 1.07)	1.1 (0.65, 1.83)	0.002
섬유화 단계(Fibrosis stage)				
0	23 (57.5)	24 (33.3)	4 (5.1)	<0.001
1	13 (32.5)	42 (58.3)	24 (30.8)	
2	2 (5.0)	2 (2.8)	27 (34.6)	
3	1 (2.5)	4 (5.6)	9 (11.5)	
4	1 (2.5)	0	14 (17.9)	

[0107] 상기 표 2에서 확인할 수 있듯이, NAFLD의 중증도와 BMI, 허리 둘레, 관련 조건(당뇨병, 고혈압 및 황반증), 알라닌 트랜스아미네이즈(Alanine Transaminase; ALT) 및 아스파트산 트랜스아미네이즈(Aspartate Transaminase; AST) 수치, 인슐린 저항성(HOMA-IR)과의 선형 상관관계를 발견하였다(¹BMI $\geq 25\text{kg}/\text{m}^2$, ²미국 국립보건원 근감소증 프로젝트(National Institutes of Health Sarcopenia Project) 지침에 따른 남성 < 0.789 및 여성 < 0.512 이상의 ASM/BMI, ³연속변수를 위한 독립적 t-test 또는 Mann-Whitney 분석테스트; 범주형 변수에 대한 카이 제곱 검정).

[0108] 표 3에서 확인할 수 있듯이, NAFLD 환자(n = 150) 중 진행성 섬유화 환자는 나이가 많고, 여성이 더 많았으며, 진행성 섬유화가 확인되지 않은 NAFLD 환자보다 유의하게 낮은 혈청 알부민 수치와 혈소판 수치를 보였다.

표 3

	F0-2	F3-4	P-value ³
N	123	27	
남성(Male), n (%)	73 (59.3)	9 (33.3)	0.014
연령(Age), year	50.7 \pm 14.2	63.1 \pm 9.9	<0.001
신체질량지수(BMI), kg/m^2	27.7 (25.2, 30.6)	27.4 (25.6, 30.0)	0.959
수축기혈압(SBP), mmHg	127.3 \pm 15.6	129.2 \pm 15.2	0.561
이완기혈압(DBP), mmHg	80.0 \pm 12.1	76.4 \pm 11.0	0.156
허리둘레(WC), cm	92.8 (88.6, 100.5)	93.8 (89.0, 102.7)	0.459
당뇨병(Diabetes), n (%)	40 (32.5)	17 (63.0)	0.003
고혈압(Hypertension), n (%)	57 (46.3)	22 (81.5)	0.001
대사 증후군(Metabolic syndrome), n (%)	85 (70.8)	21 (80.3)	0.303
비만(Obesity) ¹ , n (%)	98 (79.7)	22 (81.5)	0.832
LSMM ² , n (%)	30 (25.0)	9 (34.6)	0.315
ALT, IU/L	40.0 (25.0, 75.0)	46.0 (28.0, 85.0)	0.492
AST, IU/L	34.0 (25.0, 58.0)	53.0 (35.0, 75.0)	0.003
혈소판(Plt), $\times 10^9/\text{L}$	239.0 \pm 60.3	189.2 \pm 57.7	<0.001
알부민(Albumin), mg/dL	4.3 \pm 0.3	4.1 \pm 0.2	0.028
HbA1c, %	6.0 (5.5, 6.4)	6.7 (5.6, 7.8)	0.005
크리글리세리드(Triglyceride), mg/dL	144.0 (112.0, 192.0)	121.0 (82.0, 197.0)	0.136
LDL 콜레스테롤(cholesterol), mg/dL	108.6 \pm 32.2	94.2 \pm 28.2	0.037
ASM/BMI	0.77 (0.61, 0.88)	0.61 (0.54, 0.76)	0.008
인슐린(Insulin), uIU/mL	11.3 (8.7, 15.6)	19.9 (12.5, 24.5)	<0.001
인슐린 저항성(HOMA-IR)	2.97 (2.21, 4.35)	5.10 (3.98, 7.91)	<0.001
GDF15, ng/mL	0.73 (0.52, 1.24)	1.81 (1.01, 2.17)	<0.001

- [0112] 진행성 섬유화는 당뇨병과 고혈압, 높은 인슐린 저항성, 낮은 ASM/BMI($P: 0.003, 0.001, <0.001, 0.008$)의 조건들과 유의한 상관 관계를 보였으나, 허리 둘레나 BMI와는 유의한 상관 관계를 보이지 않았다($^1\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$, $^2\text{미국 국립보건원 근감소증 프로젝트(National Institutes of Health Sarcopenia Project) 지침에 따른 남성} < 0.789$ 및 여성 < 0.512 이상의 ASM/BMI, $^3\text{연속 변수에 대한 ANOVA 또는 Kruskal-Wallis 테스트; 범주형 변수에 대한 카이 제곱 검정}.$)
- [0114] 결과예 2: GDF15 수치와 진행성 섬유화와의 관계
- [0115] 상기 표 2에 의하면 GDF15 수치는 NAFLD의 조직학적 중증도에 따라 유의하게 증가하였다.
- [0116] 도 1a에서 확인할 수 있듯이, NASH 환자는 대조군(No NAFLD) 또는 NAFL 환자보다 유의하게 높은 GDF15 수치를 나타냈다.
- [0117] 반면 도 1b에서 확인할 수 있듯이, GDF15 수치와 지방증 등급과의 연관성은 없었다($P = 0.202$)
- [0118] 도 1c 및 1d에서 확인할 수 있듯이, 혈청 GDF15 수치는 풍선변성(ballooning)(Spearman's ρ , 0.200 ; $P = 0.006$) 및 간소엽 염증의 중증도(Spearman's ρ , 0.271 ; $P < 0.001$)에 따라 유의하게 증가하였다.
- [0119] 도 1e에서 확인할 수 있듯이, 섬유화 정도는 혈청 GDF15 수치와 유의한 상관 관계가 있었다(Spearman's ρ , 0.337 ; $P < 0.001$).
- [0120] 도 1f에서 확인할 수 있듯이, 진행성 섬유화에 해당하는 대상자인 F3 및 F4는 그렇지 않은 대상자인 F0 내지 F2와 비교하여 유의하게 높은 GDF15 수치를 보였다($P < 0.001$).
- [0121] 결과적으로 혈청 GDF15 수치와 NAFLD의 조직학적인 중증도 사이에 계단식 연관성이 있음을 확인할 수 있으며, 간소엽 염증, 풍선변성 및 섬유화의 중증도와 양의 상관관계가 있음을 확인할 수 있다.
- [0122] 도 2에서 확인할 수 있듯이, 면역 조직 화학적 분석에 따라 확인한 바에 의하면, 도 2h로 표시되는 진행성 섬유화를 나타내는 대상자의 간에서의 GDF15 발현 정도는, 도 2b, 2d 및 2f로 표시되고 진행성 섬유화가 확인되지 않은 대상자의 경우에 비해 현저히 높게 나타났다.
- [0123] GDF15 수치가 진행성 섬유화($\geq F3$)와 독립적으로 관련되어 있기 때문에, GDF15 수치와, 섬유화의 중증도를 간경직도로 나타낸 TE 수치 사이에 상관 관계가 성립하는지를 조사하였다.
- [0124] 도 3a에서 확인할 수 있듯이, GDF15 수치와 간 경직도 간에 유의한 양의 상관 관계가 있음을 발견하였다 (Spearman's ρ , 0.525 ; $P < 0.001$).
- [0125] 다음으로, GDF15 수치를 4개의 군(quartiles; Q)으로 분류하였다; Q1과 Q4는 각각 가장 낮은 군과 가장 높은 군이다. 중증 섬유화의 유병률은 각각 Q1, Q2, Q3 및 Q4에서 2.2%, 8.2%, 8.5% 및 41.7%였다($P < 0.001$). GDF15의 가장 높은 군(Q4; GDF15 수치 $\geq 1.52 \text{ ng/mL}$)는 진행성 섬유화와 관련이 있었다(unadjusted odds ratio [OR], 10.56 ; 95% confidence interval [CI], $4.35\text{--}25.60$; $P < 0.001$).
- [0127] 결과예 3: NAFLD에서 섬유화의 결정적 인자로서의 GDF15 확인
- [0128] 이후 GDF15 수치에 의해 섬유화 진행의 위험을 예측하는 것이 NAFLD 환자에서만 제한적으로 가능한 것인지의 여부를 조사하였다.
- [0129] 표 4와 같이, 다변수 모델 1은 연령, 성별 및 체질량 지수를 조정하였고, 다변수 모델 2는 모델 1에 포함된 요인 외에도 흡연, 고혈압 및 당뇨병에 대하여, 다변수 모델 3은 모델 2에 포함된 요인 외에도 AST, 혈소판 및 알부민에 대하여, 다변수 모델 4는 모델 3에 포함된 요인 외에도 HOMA-IR에 대하여, 다변수 모델 5는 모델 4에 포함된 요인 외에도 LSMM을 변수로 추가하여 조정되었다.

표 4

[0131]	NASH		Advanced fibrosis ($\geq F3$)		
	NAFLD (n=150)	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value
조정 전	1.79 (0.85, 3.76)	0.123	9.18 (3.65, 23.12)	<0.001	
나이, 성별 조정	1.94 (0.88, 4.27)	0.099	6.39 (2.35, 17.39)	<0.001	
다변수 모델 1	1.95 (0.88, 4.31)	0.098	6.39 (2.35, 17.40)	<0.001	
다변수 모델 2	1.87 (0.82, 4.27)	0.135	6.56 (2.20, 19.61)	0.001	

다변수 모델 3	1.36 (0.47, 3.96)	0.575	5.48 (1.71, 17.59)	0.004
다변수 모델 4	1.53 (0.47, 5.02)	0.480	4.39 (1.08, 17.90)	0.039
다변수 모델 5	1.36 (0.39, 4.75)	0.630	4.27 (1.04, 17.63)	0.045

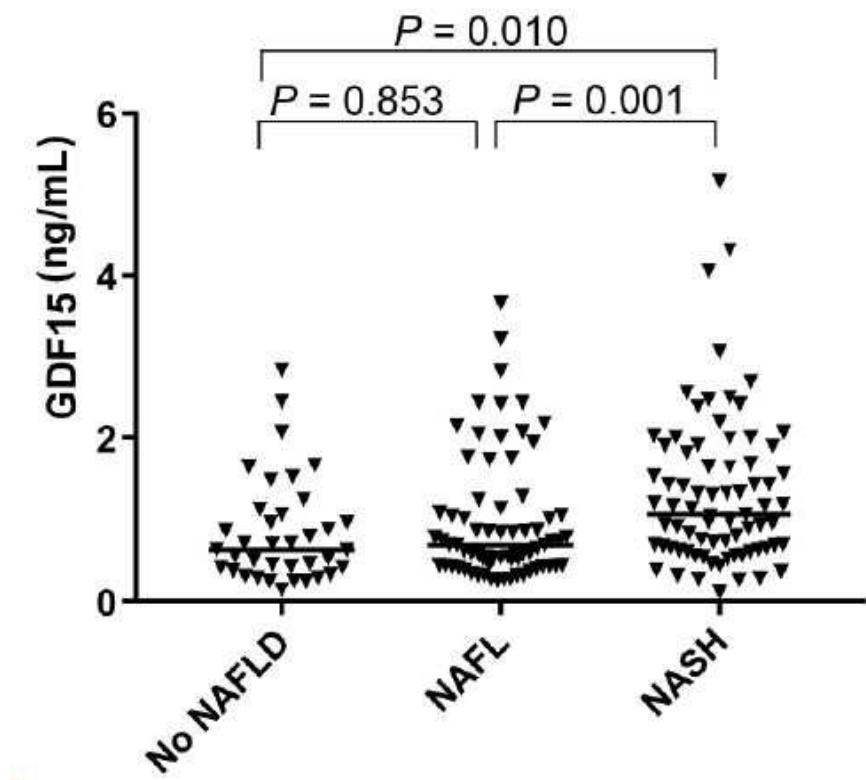
- [0133] Q4의 GDF15 수치는 나이, 성별, BMI, 흡연 상태에 따라 조정된 다변수 모델(Multivariate model) 분석에서 유의미한 상태를 유지하는 진행성 섬유화, 고혈압, 당뇨병, AST 수치, 혈소판 수치, 알부민 수치를 나타냈다.
- [0134] 인슐린 저항성 및 LSMM에 대한 추가 조정은 GDF15 수치와 진행성 섬유화 사이의 연관성에 통계적 유의성을 나타냈다. 대조적으로, Q4의 GDF15 수치는 NAFLD 대상자 중 NASH의 발병 위험과는 연관성이 없었다.
- [0135] 그러나, GDF15는 LSMM 및 인슐린 저항성에 대한 조정 후에도 NAFLD의 진행성 섬유화에 독립적인 결정 인자로 기능하는 것을 확인할 수 있다.
- [0137] **결과예 4: 당뇨병 유무와 진행성 섬유화 유병률 간의 상관관계**
- [0138] GDF15가 당뇨병 유무에 관계없이 진행성 섬유화에 결정적인 영향을 미칠 수 있는지 조사하였다.
- [0139] 도 3b에서 확인할 수 있듯이, GDF15 수치를 4개의 군으로 나누어 총화 분석한 결과는 진행성 섬유화의 중증도에 대한 추가적인 차이를 나타냈다.
- [0140] 특히, 당뇨병이 있는 대상자 중, 진행성 섬유화의 유병률은 Q4의 GDF15 수치에 해당하는 경우 54.2% 였고, Q1 내지 Q3의 GDF15 수치에 해당하는 경우에는 12.1%에 불과하였다. 특히 GDF15 수치가 Q4에 해당하는 경우 비 당뇨병 환자에서도 중증 섬유화에 해당하는 유병률이 31.3%로 나타났으며, 이는 Q1 내지 Q3에 해당하는 GDF15 수치를 지닌 비 당뇨병 환자의 위험도에 비해 섬유화 진행 위험도가 6배 이상 높음을 나타낸다(OR, 6.72, 95% CI, 1.50-30.13).
- [0141] 당뇨병 유무에 관계없이 GDF15 수치와 관련한 진행성 섬유화 유병률은 NAFLD 군에서 29.8%(17/57), 10.8%(10/93)였다($P = 0.003$, 카이 제곱 검정).
- [0143] **결과예 5: GDF15 처리에 의한 LX-2 세포에서의 섬유화 유도**
- [0144] 도 4a에서 확인할 수 있듯이, rhGDF15 처리에 의해 LX-2 세포에서 α -SMA 및 콜라겐 1(Collagen 1)과 같은 기존 섬유화 마커의 발현이 증가하였고, 세포 사멸에는 영향을 미치지 않았다.
- [0145] 도 4b에서 확인할 수 있듯이, 면역블로팅(immunoblotting)과 마찬가지로 면역형광(immunofluorescence) 염색법에 의해 확인한 결과 12시간 동안 GDF15를 처리한 경우 흰색 화살표로 나타나는 부분과 같이 α -SMA가 높은 발현량을 나타내었다.
- [0146] 도 4c에서 확인할 수 있듯이, GDF15가 인간 간세포에서 SMAD2 및 SMAD3의 인산화를 증가시킴으로써 섬유화를 유도한다는 것을 검증하였다.
- [0147] 도 4d에서 확인할 수 있듯이, GDF15의 처리는 1차 간세포에서 SMAD2 및 SMAD3의 인산화를 상향 조절함으로써 섬유화를 유도하였다.
- [0148] GDF15 처리 후 12 시간 이내에 α -SMA 수치가 증가하였고, SMAD 인산화는 3시간 이내로 매우 빠르게 유도되었다. GDF15 처리 후 간세포 활성화 및 섬유화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 SMAD2와 SMAD3의 인산화가 증가함으로써, GDF15가 인간 간세포를 활성화시키고 섬유화를 유도한다는 것을 발견하였다.
- [0149] 간세포에 대한 GDF15의 급성 자극 효과는 12시간 후에 현저하게 감소하였으며, 이는 GDF15가 간 손상 또는 염증에 대한 초기 반응에 관여할 수 있음을 시사한다.
- [0151] **결과예 6: 팔미트산 처리에 따른 GDF15 mRNA의 발현 증가**
- [0152] GDF15가 LSMM에 관계없이 진행성 섬유화에 결정적인 영향을 미칠 수 있는지 조사하였다. 근감소 현상을 유도하는 것으로 알려진 팔미트산을 간세포에 시간 및 용량 의존적으로 처리한 다음 GDF15 mRNA 발현을 평가하였다.
- [0153] 도 5a에서 확인할 수 있듯이, 팔미트산 처리 3시간 후 간세포에서는 변화가 없었고, HSCs에서는 팔미트산 200 μ M을 처리하였을 경우 GDF15 mRNA 발현 수준이 약간 상승하였으나 유의하지는 않았다. 그러나 쿠퍼 세포에서는 팔미트산 500 μ M을 처리하였을 경우 GDF15 mRNA 발현 수준의 약 2배로 유의하게 증가하였다($P = 0.004$).
- [0154] 도 5b에서 확인할 수 있듯이, 팔미트산 처리 6시간 경과 후 간세포와 HSCs에서의 GDF15 mRNA 발현 수치에서는

유의한 변화가 없었다. 쿠퍼 세포에서의 GDF15 mRNA 발현량은 팔미트산 200 μ M을 처리한 경우 2.5배 증가하였고 ($P = 0.009$), 팔미트산을 500 μ M 처리한 경우 1.5 배 증가하였다($P = 0.032$).

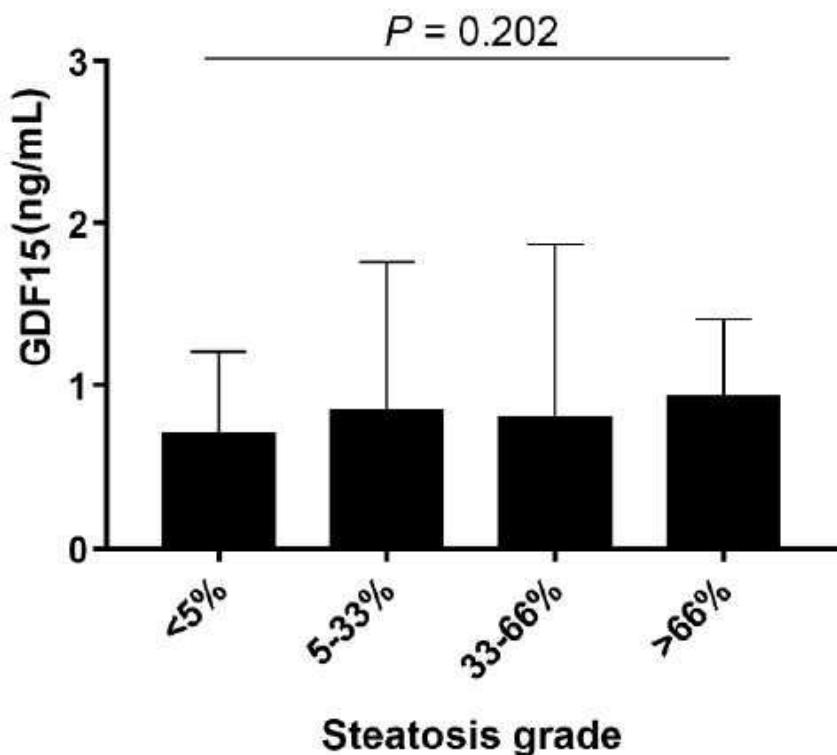
[0155] 결과적으로, 팔미트산을 처리할 경우 쿠퍼 세포에서 GDF15 mRNA 발현량을 증가시킬 수 있음을 확인하였으며, 이는 GDF15의 발현량과 근육량 간에 역의 상관관계가 있다는 것을 의미한다.

도면

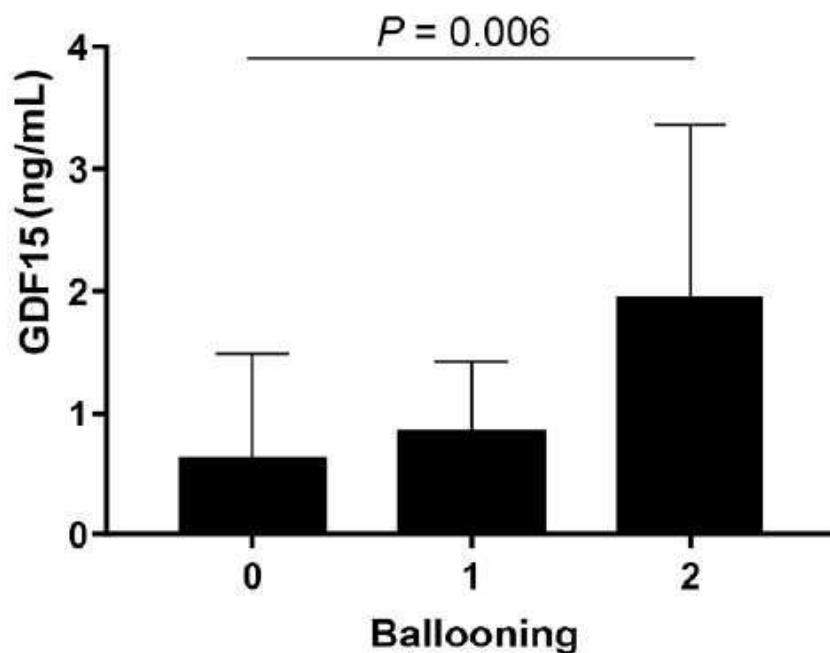
도면1a



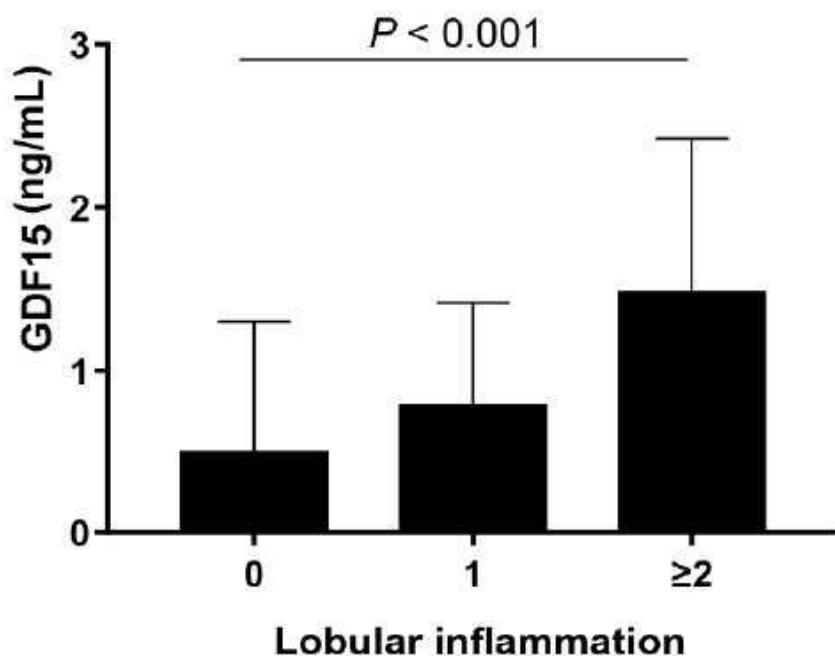
도면1b



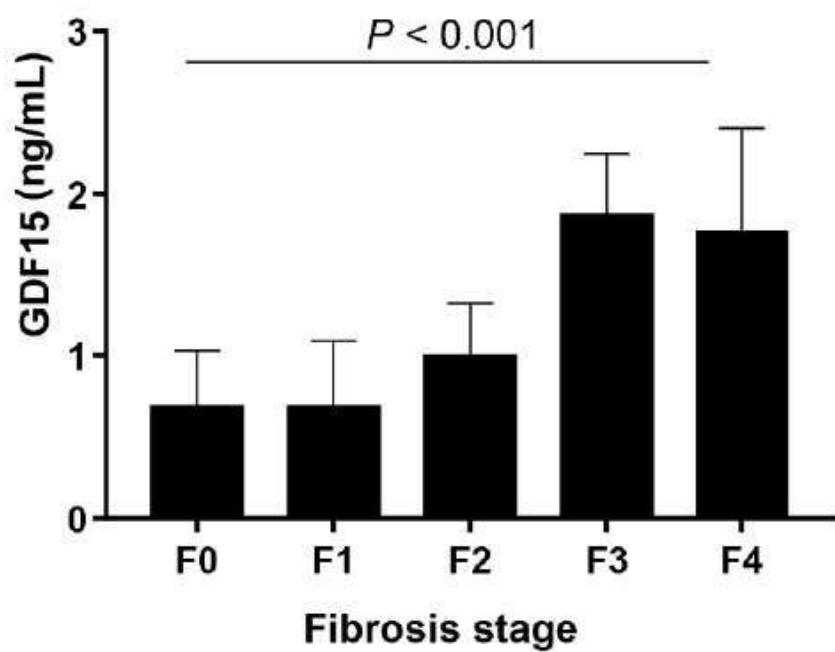
도면1c



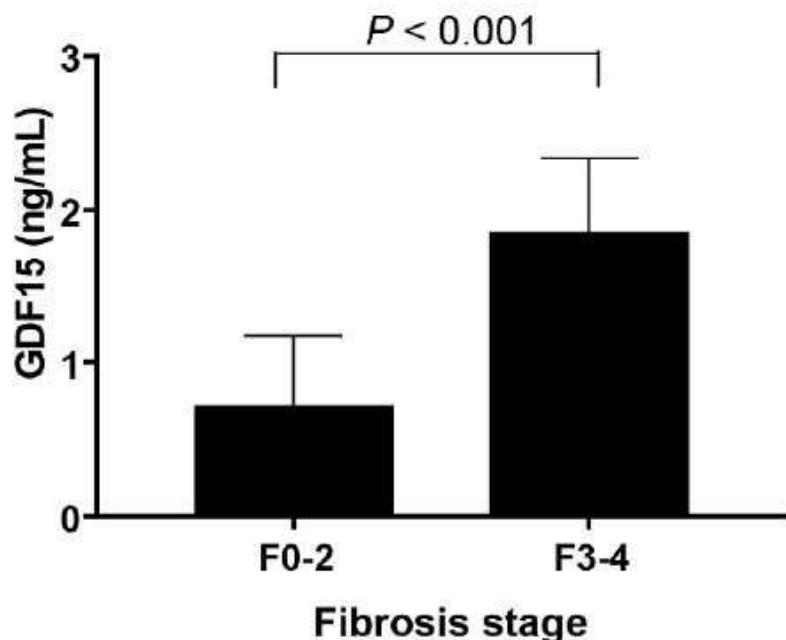
도면 1d



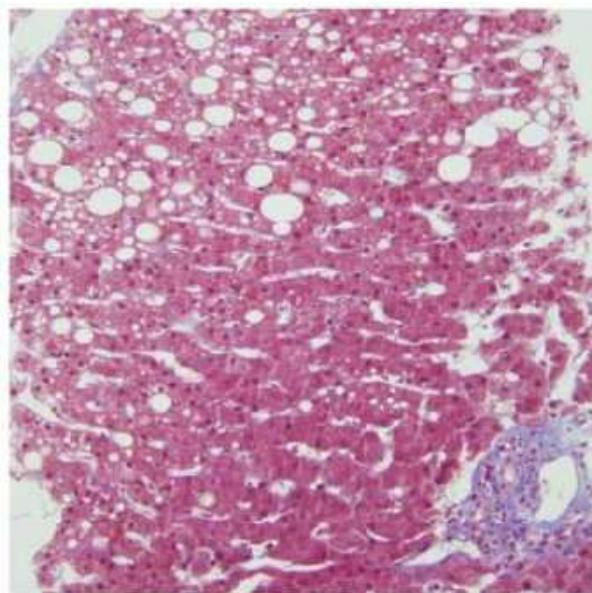
도면 1e



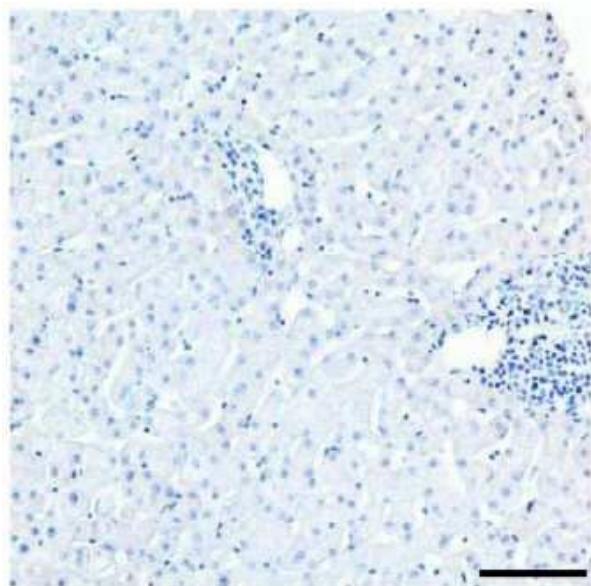
도면1f



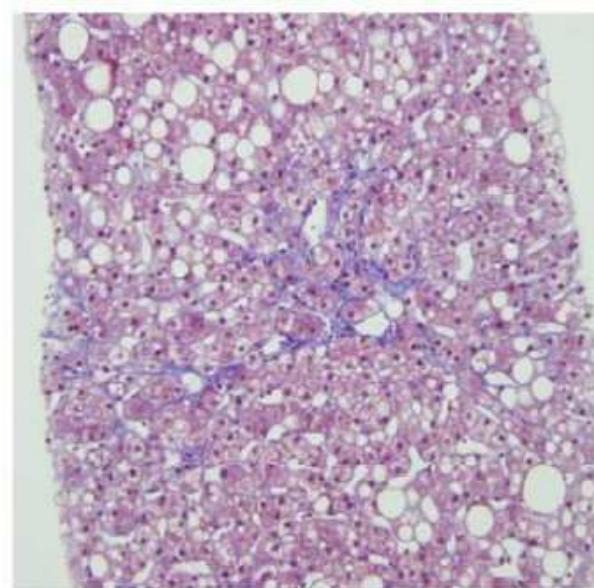
도면2a



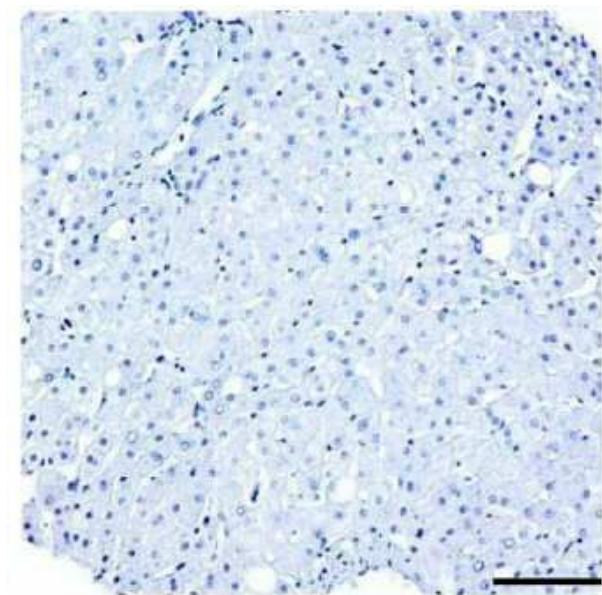
도면2b



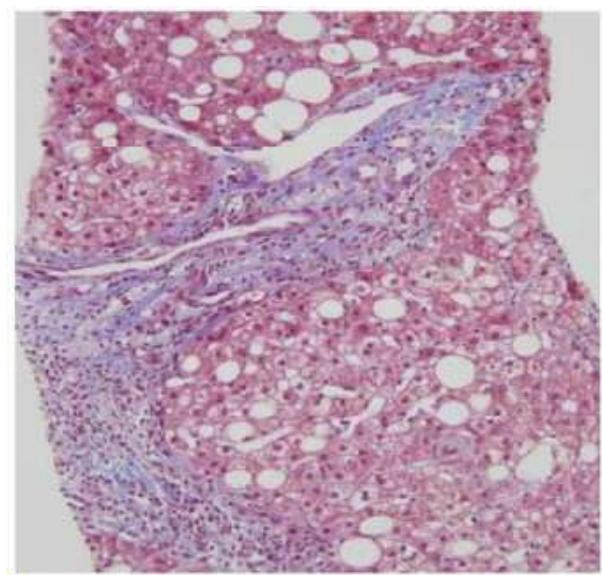
도면2c



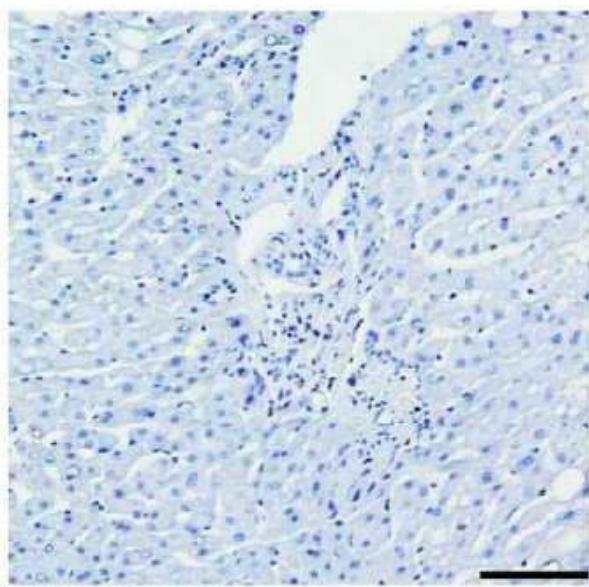
도면2d



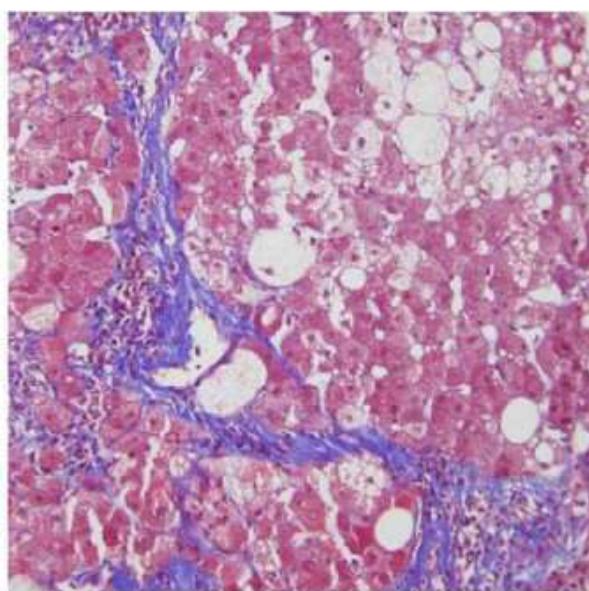
도면2e



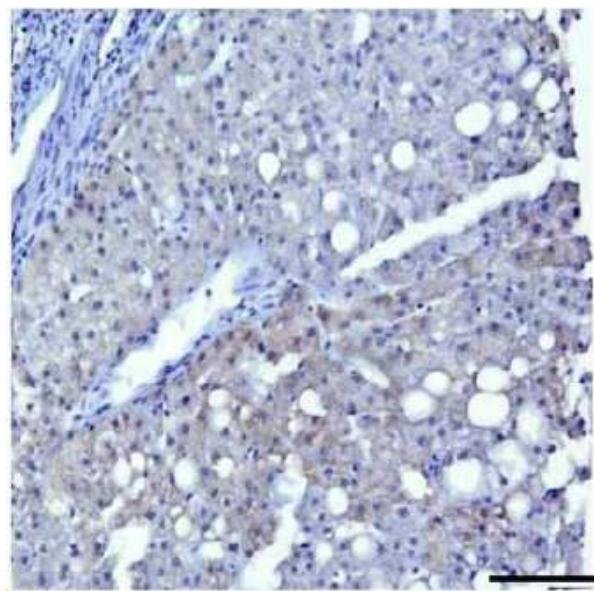
도면2f



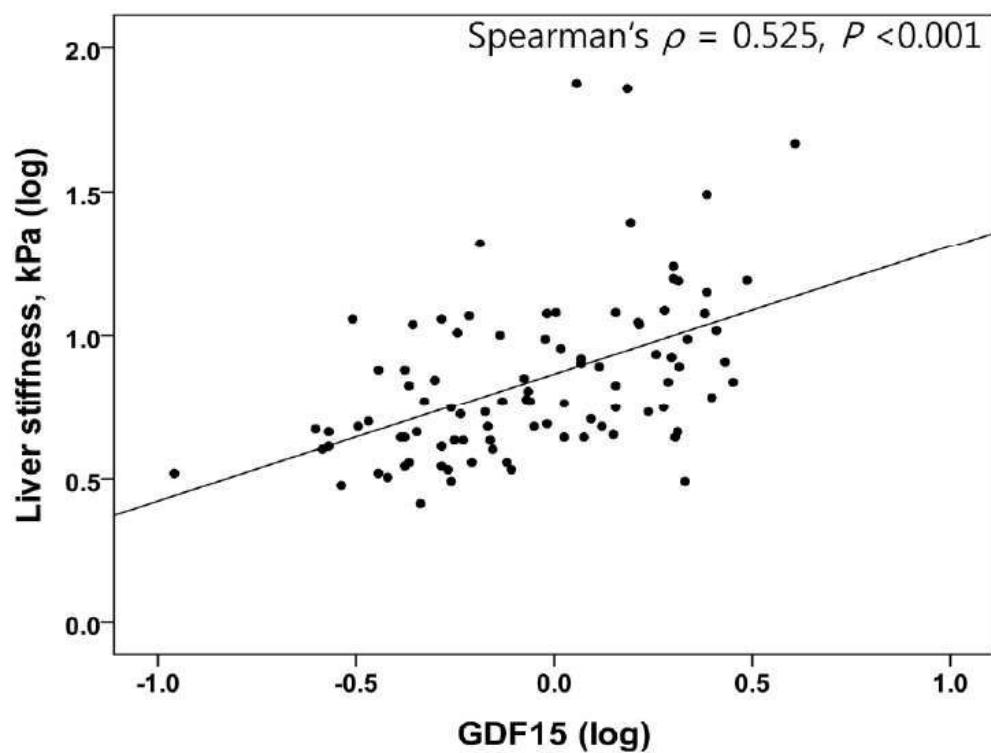
도면2g



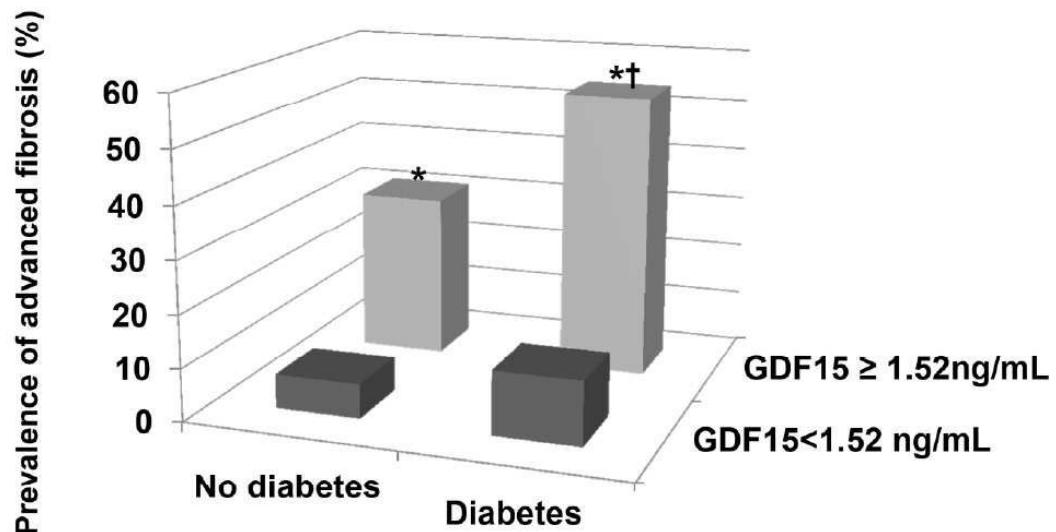
도면2h



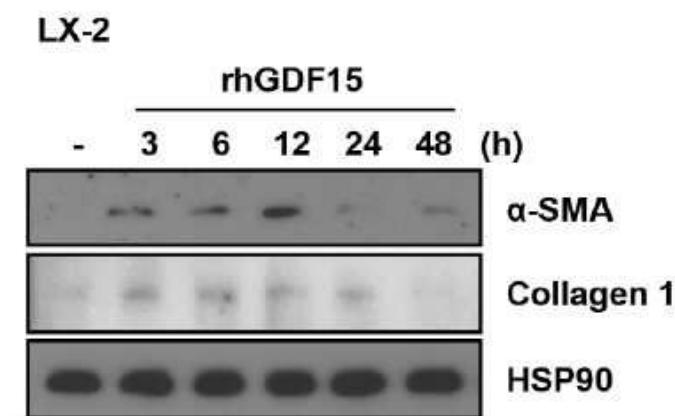
도면3a



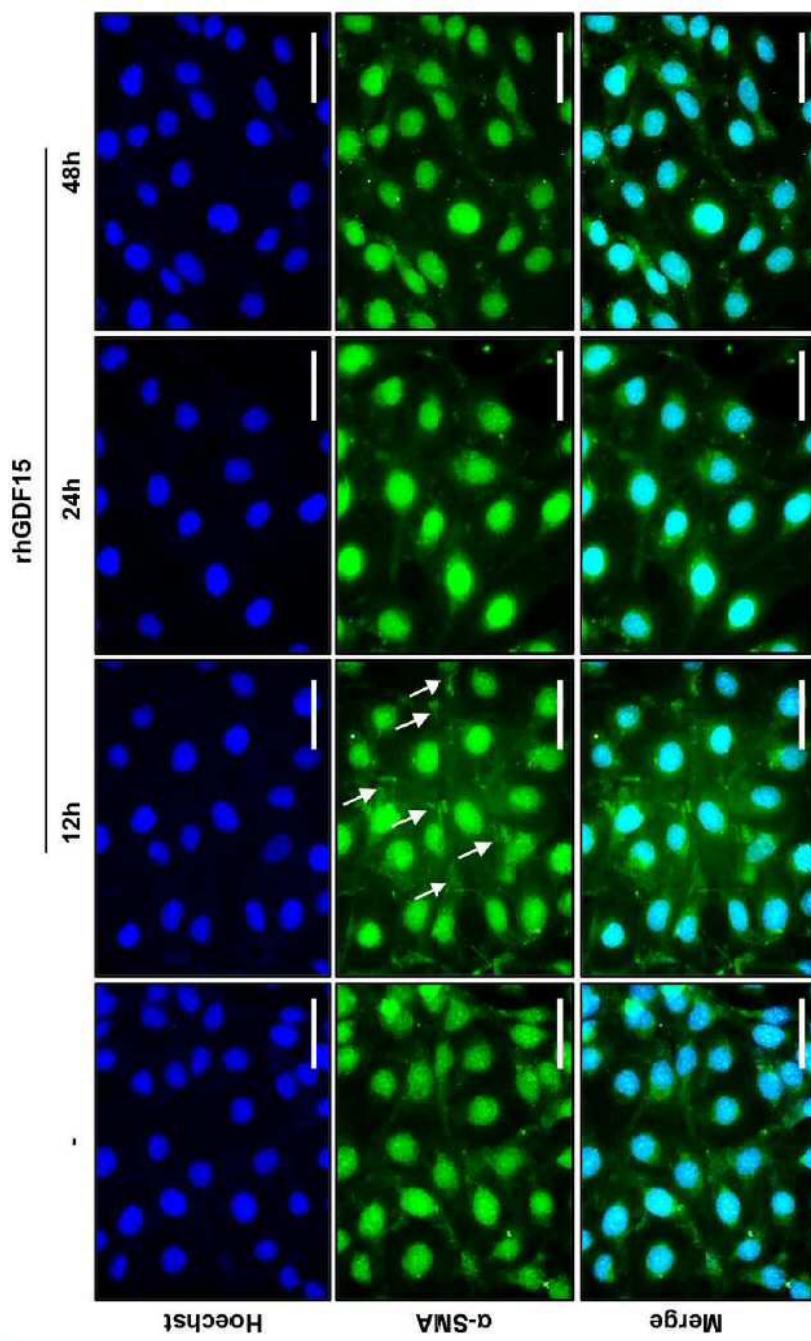
도면3b



도면4a

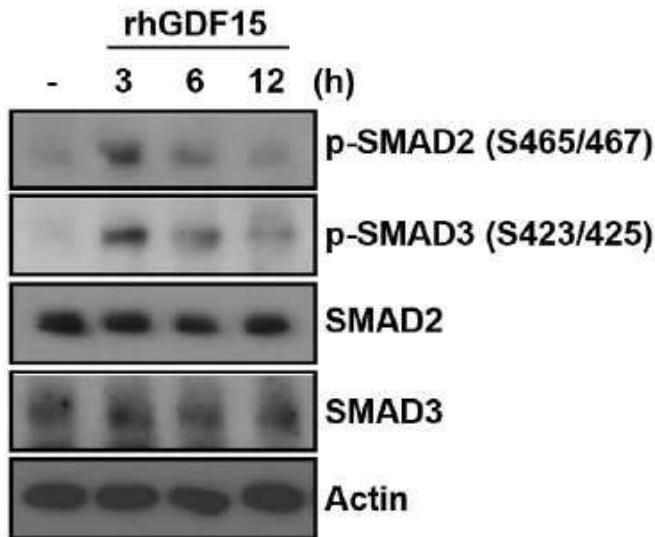


도면4b



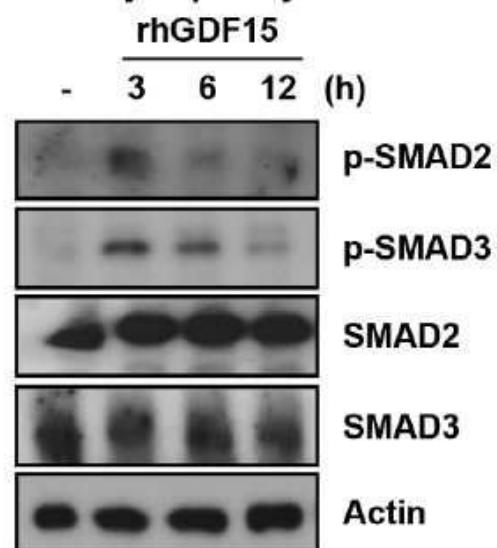
도면4c

LX-2

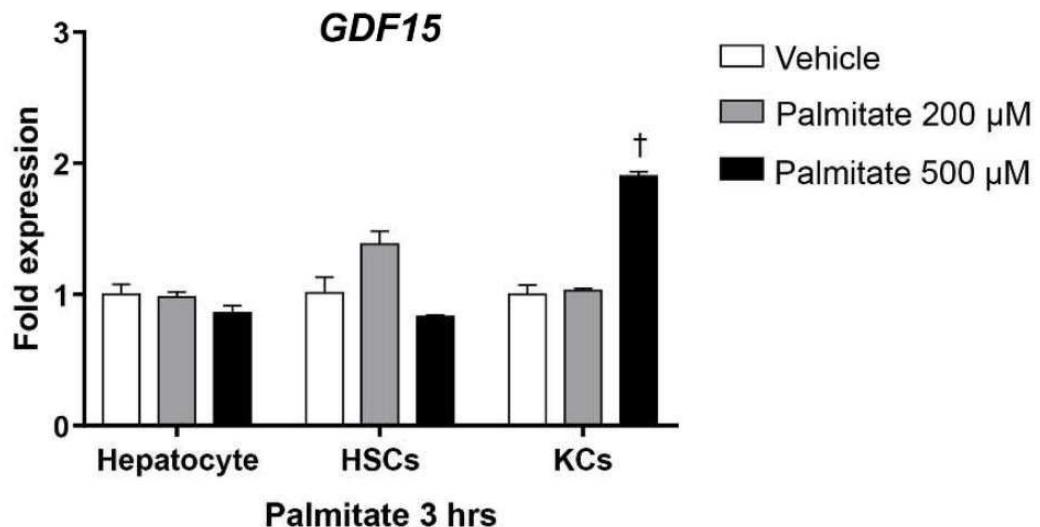


도면4d

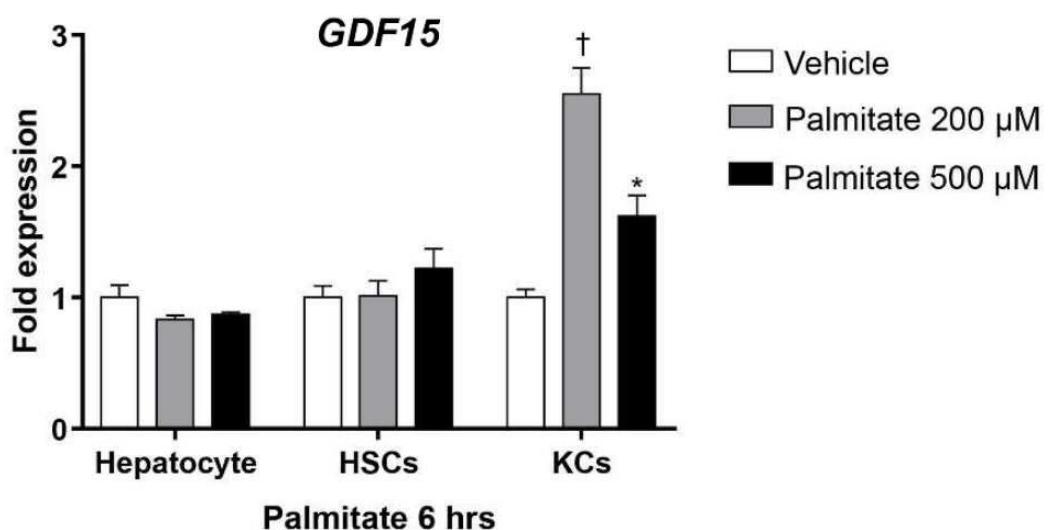
Primary hepatocyte



도면5a



도면5b



서 열 목록

- <110> Industry-University Cooperation Foundation Chungbuk University
- <120> Composition for predicting or diagnosing liver disease and method for predicting or diagnosing using the same
- <130> PN170184
- <160> 1
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 114
- <212> PRT

<213> Human GDF15

<400> 1

Ala Arg Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys

1 5 10 15

Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala

20 25 30

Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly

35 40 45

Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys

50 55 60

Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys

65 70 75 80

Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr

85 90 95

Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His

100 105 110

Cys Ile