



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년08월30일
(11) 등록번호 10-1302173
(24) 등록일자 2013년08월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0141957

(22) 출원일자 2012년12월07일

심사청구일자 2012년12월07일

(56) 선행기술조사문헌

US4666829 A

US5231000 A

(73) 특허권자

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

안정혁

서울특별시 성동구 옥수동 극동그린아파트 101동 1909호

성혜윤

서울특별시 성동구 금호1가동 벽산아파트 202동 403호

(74) 대리인

유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 14 항

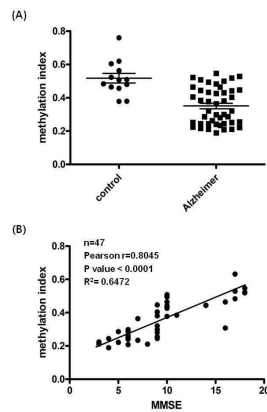
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 HMOX1 유전자의 메틸화 변화를 이용한 알츠하이머 질환의 진단용 조성물 및 이를 이용한 알츠하이머 질환의 진단방법

(57) 요약

본 발명은 HMOX1 유전자 프로모터의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는 알츠하이머 질환 진단용 조성물, 진단 키트 및 이를 이용한 알츠하이머 질환 진단방법에 관한 것이다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2012004214
부처명	교육과학부
연구사업명	기초연구사업
연구과제명	알츠하이머성 치매에서 시냅스가소성 관련 유전자 발현조절기전 및 병인연구
주관기관	이화여자대학교
연구기간	2012.05.01 ~ 2014.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2012010689
부처명	교육과학부
연구사업명	기초연구사업
연구과제명	알츠하이머 질환에 관여하는 HMOX1의 세포내 역할과 기능 그리고 후성 유전적 조절 기전
주관기관	이화여자대학교
연구기간	2012.05.01 ~ 2014.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

HMOX1 (Heme oxygenase 1) 유전자 프로모터의 메틸화 수준을 측정하는 재제를 포함하는 알츠하이머 질환 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유전자 프로모터의 메틸화 수준을 측정하는 재제는 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소, HMOX1 유전자 프로모터의 메틸화된 서열에 특이적인 프라이머, 및 비메틸화된 서열에 특이적인 프라이머를 포함하는 것인 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 HMOX1 유전자 프로모터의 메틸화된 서열에 특이적인 프라이머는 서열번호 10 및 서열번호 13의 서열번호로 구성되는 프라이머쌍이고, 상기 HMOX1 유전자 프로모터의 비메틸화된 서열에 특이적인 프라이머는 서열번호 11 및 서열번호 13의 서열번호로 구성되는 프라이머쌍인 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 바이설파이트(bisulfite)인 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 메틸화 민감성 제한효소는 *SmaI*, *SacII*, *EagI*, *HpaII*, *MspI*, *BssHII*, *BstUI* 또는 *NotI*인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 HMOX1 (Heme oxygenase 1) 유전자 프로모터의 메틸화는 서열번호 1의 627번째(HMOX1 유전자의 전사시작점으로부터 -374번째)에 위치하는 사이토신 염기의 메틸화를 포함하는 것인 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 알츠하이머 질환 진단용 키트.

청구항 8

알츠하이머 질환이 의심되는 환자의 생물학적 시료로부터 HMOX1 유전자 프로모터의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 알츠하이머 질환이 아닌 대조군 시료의 해당 유전자 프로모터의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 알츠하이머 질환 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 유전자의 메틸화 수준의 측정 단계는

(a) 수득된 시료 내 게놈 DNA를 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소로 처리하는 단계; 및

(b) 상기 처리된 DNA를 HMOX1 유전자 프로모터의 CpG 부위를 증폭할 수 있는 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 증폭하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 HMOX1 (Heme oxygenase 1) 유전자 프로모터의 메틸화는 서열번호 1의 627번째(HMOX1 유전자의 전사시작점으로부터 -374번째)에 위치하는 사이토신 염기의 메틸화를 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 10 및 서열번호 13의 서열번호로 구성되는 메틸화 특이적인 프라이머쌍 및 서열번호 11 및 서열번호 13의 서열번호로 구성되는 비메틸화 특이적인 프라이머쌍인 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 바이설파이트(bisulfite)인 방법.

청구항 13

제8항에 있어서, 상기 메틸화 수준을 측정하는 방법은 메틸화 특이적 중합효소반응 (methylation-specific polymerase chain reaction), 실시간 메틸화 특이적 중합효소반응 (real time methylation-specific polymerase chain reaction), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 정량 PCR, 파이로시퀀싱 및 바이설파이트 시퀀싱으로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 14

제8항에 있어서, 상기 생물학적 시료가 환자의 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 HMOX1 (Heme oxygenase 1) 유전자 프로모터의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는 알츠하이머 질환 진단용 조성물, 진단 키트 및 이를 이용한 알츠하이머 질환 진단방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 알츠하이머는 신경세포의 퇴화 및 이로 인한 인지, 기억능력의 상실을 가져오는 대표적인 퇴행성 뇌질환으로, 오래 지속될 경우 여타 합병증으로 사망에 이르게 된다. 알츠하이머 질환은 40 또는 50 대에도 발병할 수 있고, 노화에 따라 발병가능성이 증가하여, 85 내지 90 세에는 발병률이 40 내지 50%까지 증가하게 된다.

[0003] 최근 사회의 노령화에 따라 알츠하이머 질환이 급속하게 증가하는 추세에 있어, 조기진단, 예방 및 치료에 대한 필요성이 시급한 실정이나, 현재까지 알츠하이머 질환의 진단은 신경심리화학적 검사(예를 들어, mini-mental state examination (MMSE))나 특화된 MRI 촬영과 같은 많은 시간과 경비가 소요되는 방법들만이 가능하였다.

[0004] 알츠하이머 질환의 진단을 위한 다른 방법으로, 뇌척수액 또는 혈청에서 베타 아밀로이드 단백질을 검출하는 방법, tau 단백질의 농도를 측정하는 방법, 신경교원섬유 산성 단백질(glial fibrillary acidic protein, GFAP)-항체를 검출하는 방법 등의 생화학적 방법들이 제안되었으나, 진단의 간편성과 정확도 등의 문제가 제기되고 있다 (국제공개특허 제92/17152호; 미국특허 제4,666,829호; 국제공개특허 제89/06242호; 미국특허 제5,231,000호 등).

[0005] 한편, HMOX1 (Heme oxygenase 1)은 소포체 (endoplasmic reticulum)에 존재하는 열충격단백질 32 (heat shock protein 32, HSP32)로, NADPH 시트크롬 p450 환원효소와 결합하여 체내 산화촉진제인 헴(heme)을 CO, Fe²⁺ 및 빌리베르딘(biliverdin)으로 전환시키며, 빌리베르딘은 빌리베르딘 환원효소에 의해 항산화제인 빌리루빈(bilirubin)으로 전환되어 세포를 산화적 스트레스로부터 보호하는 역할을 한다. 그러나, HMOX1 유전자 프로모터의 메틸화 정도에 의한 후생유전학적 (epigenetic) 변화가 알츠하이머의 진단에 사용될 수 있다는 것은 알려져 있지 않다.

[0006] 본 발명자들은 HMOX1 유전자의 프로모터가 알츠하이머 질환에 특이적으로 저메틸화(hypomethylation)되는 것을 확인하고, 이를 바이오마커로 이용하여 HMOX1 유전자의 프로모터의 메틸화 정도를 측정함으로써 알츠하이머 질환을 진단할 수 있다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 하나의 목적은 HMOX1 유전자 프로모터의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는 알츠하이머 질환 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 조성물을 포함하는 알츠하이머 질환 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 하나의 목적은 HMOX1 유전자 프로모터의 특정 CpG 부위에서의 메틸화 수준을 측정하여 알츠하이머 질환을 진단하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 하나의 목적은 알츠하이머 질환이 의심되는 환자의 생물학적 시료로부터 HMOX1 유전자 프로모터의 특정 CpG 부위에서의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 알츠하이머 질환 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 HMOX1 유전자의 프로모터가 알츠하이머 질환에 특이적으로 저메틸화된다는 발견에 기초한 것으로, HMOX1 유전자의 프로모터의 메틸화 정도를 바이오마커로 이용하여 알츠하이머 질환을 진단하는 기술을 제공한다.
- [0012] 따라서 하나의 양태로서, 본 발명은 HMOX1 (Heme oxygenase 1) 유전자의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는 알츠하이머 질환 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0013] 본 발명에서 용어, "메틸화"는 게놈 DNA를 구성하는 염기에 메틸기가 부착되는 것을 말한다. 바람직하게, 본 발명에서 메틸화 여부는 특정 유전자의 프로모터 부위의 특정 CpG 부위의 사이토신에서 일어나는 메틸화 여부를 의미하고, 메틸화가 일어난 경우 그로 인하여 전사인자의 결합이 방해받게 되어 특정 유전자의 발현이 억제되며, 비메틸화 또는 저메틸화가 일어나는 경우 특정 유전자의 발현이 증가하게 된다.
- [0014] 본 발명에서 용어, "메틸화 수준의 측정"은 HMOX1 유전자의 프로모터의 메틸화 수준을 측정하는 것으로서, 메틸화 특이적인 PCR, 예를 들어 메틸화 특이적 PCR (methylation-specific polymerase chain reaction, MSP), 실시간 메틸화 특이적 PCR (real time methylation-specific polymerase chain reaction), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR 및 정량 PCR을 통해 측정할 수 있다. 또는, 파이로시퀀싱 및 바이설파이트 시퀀싱과 같은 자동염기분석 등의 방법으로 측정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 알츠하이머 질환이 아닌 사람의 시료에서는 HMOX1 유전자의 프로모터에 메틸화 상태가 상대적으로 높게 나타나지만, 알츠하이머 질환 환자의 시료에서는 HMOX1 유전자의 프로모터에서의 저메틸화가 특이적으로 나타나는 것을 통해서, 프로모터의 메틸화 여부에 따라 알츠하이머 질환 여부를 진단할 수 있다.
- [0015] 바람직하게, 본 발명에서 HMOX1 유전자의 프로모터의 메틸화 수준을 측정하는 것은 HMOX1 유전자의 프로모터 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있고, 보다 바람직하게는 HMOX1 유전자의 전사시작점으로부터 -374번째에 위치하는 CpG 부위의 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 의미할 수 있다. HMOX1 유전자 프로모터의 서열을 서열번호 1로 나타내었으며, HMOX1 유전자의 전사시작점으로부터 -374번째 CpG 부위의 사이토신 염기는, 서열번호 1을 기준으로 할 때 서열번호 1의 627번째 염기에 해당한다.
- [0016] 포유동물 세포의 게놈 DNA에는 A, C, G 및 T에 더하여, 사이토신 링의 다섯번째 탄소에 메틸 그룹이 부착된 5-메틸사이토신(5-methylcytosine, 5-mC)이라는 5번째 염기가 존재한다. 5-메틸사이토신의 메틸화는 CpG라고 불리는 CG 디뉴클레오타이드(5'-mCG-3')의 C에서만 일어나고, CpG의 메틸화는 alu 또는 트랜스포존과 게놈의 반복서열이 발현되는 것을 억제한다. 또한, 상기 CpG의 5-mC가 자연적으로 탈아미노화하여 티민(T)이 되기 쉽기 때문에, CpG는 포유동물 세포에서 대부분의 후생유전학적 변화가 자주 일어나는 부위이다.
- [0017] 본 발명에서 용어, "HMOX1 유전자"는 소포체 (endoplasmic reticulum)에 존재하는 Heme oxygenase 1를 코딩하는 유전자로, Heme oxygenase 1은 체내 산화촉진제인 헴(heme)을 NADPH 시트크롬 p450 환원효소와 결합하여 CO, Fe²⁺ 및 빌리베르딘(biliverdin)으로 전환시키며, 빌리베르딘은 빌리베르딘 환원효소에 의해 항산화제인 빌리루빈(bilirubin)으로 전환되어 세포를 산화적 스트레스로부터 보호하는 역할을 한다. 인간 HMOX1 유전자의 핵산 서열은 Genbank 등록번호 NM_002133.2에서 확인할 수 있다.
- [0018] 본 발명자들은 알츠하이머 질환에서 HMOX1 유전자의 프로모터 부위의 특정CpG 부위의 비정상적인 메틸화 상태를 조사하고, 그 결과를 알츠하이머 질환 환자의 임상병리학적 특징과 연관지어 본 결과, HMOX1 유전자의 프로모터 부위의 특정 CpG 부위에서의 메틸화 수준을 측정한다면 알츠하이머 질환을 진단할 수 있음을 알 수 있었다.

- [0019] 본 발명의 구체적인 실시 예에서는, Methylation array의 분석결과 알츠하이머 질환 모델인 APP-swedish mutant를 발현하는 H4 세포주 (H4-sw)에서 정상 세포와 비교하여 HMOX1의 메틸화 수준이 감소되어 있었으며, 메틸화 특이적 PCR (MSP) 결과에서도 유사한 저메틸화 경향을 확인할 수 있었다 (도 2). 또한, 정상 H4 세포주에 탈메틸화제인 5-aza-2'-deoxycytidin을 처리하였을 때 HMOX1의 발현이 증가하였는데, 이는 HMOX1의 발현이 DNA 메틸화에 의해 조절되는 것을 의미한다 (도 3).
- [0020] 나아가, 본 발명자들은 바이설파이트 유전자 서열분석을 통하여 HMOX1 유전자의 전사 개시점으로 부터 -374 bp 에 위치한 CpG 부위가 정상 H4 세포주와 비교하여 특이적으로 저메틸화 되어 있는 것을 확인할 수 있었으며 (도 4), 70세 이상 알츠하이머 환자의 혈액 시료 분석 결과에서도 HMOX1 -374 CpG 부위의 메틸화 상태가 대조군과 비교하여 낮아져 있었으며, 알츠하이머 환자군의 MMSE (mini-mental state examination)가 -374 CpG 부위의 메틸화 수준과 연관성이 있음을 확인할 수 있었다 (도 5). 또한, 알츠하이머 환자군에서 인지장애가 심할수록 메틸화 수준이 낮아져 있었다.
- [0021] 따라서, HMOX1의 특정 프로모터 부위(RNA 전사 개시 시작부위에서 -374 염기서열에 위치한 CpG 부위)의 메틸화 정도는 알츠하이머성 치매의 진행 정도를 측정할 수 있는 진단 바이오 마커로 활용될 수 있음을 알 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 용어, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 알츠하이머 질환 발병 여부를 확인하거나, 나아가 질환의 진행 여부 또는 심화 여부를 확인하는 것이다.
- [0023] 본 발명에서, 유전자의 메틸화 수준을 측정하는 제제는 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소, HMOX1 유전자의 메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머, 및 비메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다.
- [0024] 상기 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 바이설파이트(bisulfite)일 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 바람직하게는 소듐 바이설파이트이다. 이러한 바이설파이트를 이용하여 비메틸화 사이토신 잔기를 변형시켜 프로모터의 메틸화 여부를 검출하는 방법은 당 업계에 널리 공지되어 있다(WO01/26536; US2003/0148326A1).
- [0025] 또한, 상기 메틸화 민감성 제한효소는 CpG 부위의 메틸화를 특이적으로 검출할 수 있는 제한효소로서 제한효소의 인식부위로 CG를 함유하는 제한효소일 수 있다. 예를 들면, *SmaI*, *SacII*, *EagI*, *HpaII*, *MspI*, *BssHII*, *BstUI*, *NotI* 등이 있으며 이에 제한되지 않는다. 상기 제한효소 인식부위의 C에서의 메틸화 또는 비메틸화에 따라 제한효소에 의한 절단 여부가 달라지고 이를 PCR 또는 서던블롯(Southern Blot) 분석을 통해 검출할 수 있게 된다. 상기 제한효소 이외의 다른 메틸화 민감성 제한효소는 당 업계에 잘 알려져 있다.
- [0026] 알츠하이머 질환이 의심되는 환자의 HMOX1 유전자의 프로모터 특정 CpG 부위에서의 메틸화 수준은 환자의 생물학적 시료에서 게놈 DNA를 수득하고, 수득한 DNA에 메틸화되지 않은 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소를 처리한 후, 상기 처리된 DNA를 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 증폭시키고 그 증폭된 결과물의 존재를 확인하는 것을 통해 측정할 수 있다.
- [0027] 따라서, 본 발명의 제제는 HMOX1 유전자의 메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머 및 비메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 본 발명에서, 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3 말단 수산화기를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 또한, 프라이머는, 7개 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 센스 및 안티센스 핵산으로서, DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 프라이머는 메틸화 여부를 분석하는 대상이 되는 특정 CpG 부위의 서열에 따라 바람직하게 디자인될 수 있으며, 각각 메틸화되어 바이설파이트에 의해 변형되지 않았던 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍, 및 메틸화되지 않아 바이설파이트에 의해 변형된 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍일 수 있다. 바람직하게, 상기 HMOX1 유전자의 메틸화된 서열에 특이적인 프라이머는 서열번호 10 및 서열번호 13의 서열 한 쌍으로 구성되는 프라이머이고, 상기 HMOX1 유전자의 비메틸화된 서열에 특이적인 프라이머는 서열번호 11 및 서열번호 13의 서열 한 쌍으로 구성되는 프라이머일 수 있다.
- [0029] 상기 알츠하이머 질환 진단용 조성물에는 상기 제제 이외에도, 중합효소 아가로스, 전기영동에 필요한 완충용액 등이 추가로 포함될 수 있다.

- [0030] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 알츠하이머 질환 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0031] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 HMOX1 유전자 프로모터의 특정 CpG 부위에서의 메틸화 수준을 측정하여 알츠하이머 질환을 진단하는 방법에 관한 것이다.
- [0032] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 알츠하이머 질환이 의심되는 환자의 생물학적 시료로부터 HMOX1 유전자 프로모터의 특정 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 알츠하이머 질환이 아닌 대조군 시료의 해당 유전자 프로모터의 특정 CpG 부위의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 알츠하이머 질환 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0033] 본 발명에서 용어 "생물학적 시료"란 알츠하이머 질환 발병에 의해 HMOX1 유전자의 메틸화 수준이 차이 나는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게, 본 발명의 생물학적 시료는 조직일 수 있다.
- [0034] 먼저, 알츠하이머 질환이 의심되는 환자로부터 게놈 DNA를 획득하여 메틸화 수준을 측정하기 위하여, 게놈 DNA의 획득은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 페놀/클로로포름 추출법, SDS 추출법(Tai et al., Plant Mol. Biol. Reporter, 8: 297-303, 1990), CTAB 분리법(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide; Murray et al., Nuc. Res., 4321-4325, 1980) 또는 상업적으로 판매되는 DNA 추출 키트를 이용하여 수행할 수 있다.
- [0035] 상기 유전자의 메틸화 수준의 측정 단계는 (a) 획득된 시료 내 게놈 DNA를 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소로 처리하는 단계; 및 (b) 상기 처리된 DNA를 HMOX1 유전자 프로모터의 특정 CpG 부위를 증폭할 수 있는 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 증폭하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0036] 상기 (a) 단계에서 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 바이설파이트일 수 있으며, 바람직하게는 소듐 바이설파이트일 수 있다. 이러한 바이설파이트를 이용하여 비메틸화 사이토신 잔기를 변형시켜 프로모터의 메틸화 여부를 검출하는 방법은 당 업계에 널리 공지되어 있다.
- [0037] 또한, 상기 (a) 단계에서 메틸화 민감성 제한효소는 상기에서 설명한 바와 같이, 특정 CpG 부위의 메틸화를 특이적으로 검출할 수 있는 제한효소로서 제한효소의 인식부위로 CG를 함유하는 제한효소일 수 있으며, 예를 들면, *SmaI*, *SacII*, *EagI*, *HpaII*, *MspI*, *BssHII*, *BstUI*, *NotI* 등이 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 상기 (b) 단계에서 증폭은 통상적인 PCR 방법에 의해 수행될 수 있다. 이때 사용되는 프라이머는 상기에서 설명한 바와 같이, 메틸화 여부를 분석하는 대상이 되는 특정 CpG 부위의 서열에 따라 바람직하게 디자인될 수 있으며, 각각 메틸화되어 바이설파이트에 의해 변형되지 않았던 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍 및 메틸화되지 않아 바이설파이트에 의해 변형된 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 쌍일 수 있다. 바람직하게, 상기 HMOX1 유전자의 메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머는 서열번호 10 및 서열번호 13의 서열 한 쌍으로 구성되는 프라이머이고, 상기 HMOX1 유전자의 비메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머는 서열번호 11 및 서열번호 3의 서열 한 쌍으로 구성되는 프라이머일 수 있다.
- [0039] 상기 HMOX1 (Heme oxygenase 1) 유전자 프로모터의 특정 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계는 (c) 상기 b) 단계에서 증폭된 결과물의 존부를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 (c) 단계에서 증폭된 결과물의 존부는 당 업계에 공지된 방법, 예를 들면 전기영동을 수행하여 원하는 위치의 밴드의 검출 여부에 따라서 수행될 수 있다. 예를 들면, 비메틸화 사이토신 잔기를 변형시키는 화합물을 사용한 경우 상기 (a) 단계에서 사용한 두 종류의 프라이머쌍, 즉 메틸화되어 바이설파이트에 의해 변형되지 않았던 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍 및 메틸화되지 않아 바이설파이트에 의해 변형된 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍에 의해 각각 증폭된 PCR 결과물의 존부에 따라 메틸화 정도를 판단할 수 있다. 바람직하게, 샘플 게놈 DNA를 바이설파이트로 처리하고, HMOX1 유전자의 CpG 부위를 PCR로 증폭하고, 증폭된 부위의 염기서열을 분석하는 바이설파이트 게놈 시퀀싱 방법을 사용하여 메틸화 여부를 판단할 수 있다.
- [0040] 또한, 제한효소를 이용한 경우에도 당 업계에 공지된 방법, 예를 들어 mock DNA에서 PCR 결과물이 나타난 상태에서, 제한효소로 처리된 DNA에서 PCR 결과물이 있는 경우는 프로모터가 메틸화된 것으로 판단하고, 제한효소로 처리된 DNA에서 PCR 결과물이 없는 경우는 프로모터가 비메틸화 것으로 판단하는 것에 따라 그 메틸화 여부를 판단할 수 있으며, 이는 당업자에게 자명하다. 상기에서 mock DNA란 시료에서 분리되고 아무런 처리를 하지 않은 상태의 시료 DNA를 의미한다.
- [0041] 따라서, 상기 본 발명의 알츠하이머 질환 진단을 위하여 정보를 제공하는 방법을 이용하면 HMOX1 유전자 프로모터의 메틸화 여부를 효과적으로 확인하여 알츠하이머 질환 여부를 진단할 수 있다.

발명의 효과

- [0042] 본 발명에서 밝혀진 바와 같이, HMOX1 유전자 프로모터의 특정 CpG 부위의 저메틸화는 알츠하이머 질환세포에서 특이적으로 나타나며 알츠하이머 질환 환자의 시료에서 HMOX1의 발현에 영향을 미치므로, HMOX1 유전자 프로모터의 메틸화 여부를 바이오마커로 사용하여 알츠하이머 질환 진단에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0043] 도 1의 (A)는 알츠하이머 질환 세포주 모델 (H4-sw)과 정상 세포주(H4)에서 HMOX1의 발현 정도를 확인한 결과를 나타내고, (B)는 알츠하이머 동물 모델인 APP swe/PS1 형질전환 쥐의 뇌조직 (Hippocampus, Frontal cortex, cerebellum)에서 HMOX1의 발현 정도를 확인한 결과를 나타낸다.

도 2는 알츠하이머 질환 세포주 모델 (H4-sw)과 정상 세포주(H4)에서 HMOX1 유전자 프로모터의 메틸화 및 비메틸화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 3의 (A)는 정상 H4 세포주의 경우 및 H4 세포주에 5-aza-2'-deoxycytidin를 처리한 경우의 HMOX1의 발현 정도를 확인한 결과를 나타내고, (B)는 정상 H4 세포주의 경우 및 H4 세포주에 5-aza-2'-deoxycytidin를 처리한 경우의 HMOX1 유전자 프로모터의 메틸화 및 비메틸화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 4의 (A)는 알츠하이머 질환 세포주 모델 (H4-sw)과 정상 세포주(H4)에서 Bisulfite sequencing PCR (BSP)를 이용한 Bisulfite 유전자 서열분석을 이용하여 전사 개시점으로부터 500bp 인근에 위치한 프로모터 CpG 부위의 메틸화 상태를 조사한 결과를 나타내고, (B)는 454 GS-FLX system을 이용한 Bisulfite 유전자 서열분석을 이용하여 전사 개시점으로부터 500bp 인근에 위치한 프로모터 CpG 부위의 메틸화 상태를 조사한 결과를 나타낸다.

도 5의 (A)는 70세 이상 뇌졸중 환자군(MMSE26 이상)과 알츠하이머 치매 환자군(MMSE 3~19)의 혈액 시료에서 HMOX1 유전자의 -374 프로모터 CpG 부위에서 DNA 메틸화를 비교한 결과를 나타내고, (B)는 알츠하이머 치매 환자의 HMOX1 유전자의 -374 프로모터 CpG 부위에서 DNA 메틸화 변화가 MMSE와 밀접한 연관성이 있음을 보여주는 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0044] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0045] 실시예 1. 세포주 및 형질전환 쥐

- [0046] 사람 신경교모세포종 세포주 H4 (human neuroglioblastoma cells)는 10% 우태아혈청, 100 U/mL 페니실린, 100 µg/mL 스트렙토마이신, 및 2 mM L-글루타민을 포함하고 있는 Dulbecco's modified Eagle medium에서 배양하였으며, APP695-Swedish mutant (K595N/M596L)를 발현하는 알츠하이머 질환 세포주 모델인 H4-sw세포주는 H4 배양배지에 500 µg/mL geneticine을 추가하여 배양하였다.

- [0047] 알츠하이머 질환모델 쥐로 APP Swedish mutant 와 9번째 엑손이 결손된 mutant를 동시에 발현하는 12개월령의 APP swe/PS1 형질전환 쥐 (B6C3-Tg(APP695)85Dbo Tg(PSEN1)85Dbo)를 사용하였으며, 형질전환 쥐와 littermate 정상 쥐의 뇌조직 (frontal cortex, hippocampus, cerebellum)을 분리하여 유전자 발현의 변화를 조사하였다.

[0048] 실시예 2. Total RNA 추출

- [0049] 세포주와 뇌조직에서 total RNA는 RNeasy mini kit (Qiagen)을 이용하여 추출하였다. 추출방법은 제조사의 매뉴얼을 따라 실시하였다. 추출된 total RNA는 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 정량하였으며, RNA 상태는 1% 아가로스 겔에서 전기영동하여 degradation 여부를 확인하였다.

[0050] 실시예 3. 정량적 실시간 (Quantitative real-time) PCR (qRT-PCR)

- [0051] cDNA합성을 위해 Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen)을 사용하였다. 1 µg의 total RNA 와 50

ng oligo dT를 70℃에서 10분간 denature한 후 여기에 5X RT buffer 4 μ l, 0.1 mM DTT 2 μ l, 2.5 mM dNTP mixture 4 μ l, Superscript II 역전사효소 200 units, RNase inhibitor 10 units 포함한 반응액에 혼합한 20 μ l 반응액을 25℃ 에서 10분, 42℃에서 50분, 95℃에서 5분 동안 반응하여 cDNA를 합성한 후 이것을 1:4로 희석하여 이 중 2 μ l를 취하여 qRT-PCR의 주형으로 사용하였다. qRT-PCR은 cDNA 2 μ l, SYBR Premix EX Taq (Takara Bio) 10 μ l, Rox reference dye (50 $\times$ Takara Bio) 0.4 μ l, 각 유전자의 primer 200 nM를 포함한 20 μ l 반응액을 ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems)을 이용하여 50℃ 에서 2분, 95℃에서 10분간 반응한 후, 40 cycles (95℃에서 15초, 60℃ 에서 1분) 반복하여 증폭하였다. PCR 산물의 specificity는 95℃에서 15초, 60℃에서 20초, 95℃에서 15초 동안 반응하여 확인하였다. GAPDH mRNA발현을 internal control로 사용하였으며, HMOX1 유전자의 발현은 GAPDH 발현 수준으로 $\Delta\Delta C_T$ 방법으로 보정하였다. 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머 서열은 다음과 같다.

표 1

[0052]

	서열	서열번호
human HMOX1 (forward)	5'-GGAAC TTTCAGAAGGCCAG-3'	2
human HMOX1 (reverse)	5'-GGAAGTAGACAGGGGCGAAG-3'	3
human GAPDH (forward)	5'-AATCCCATCACCATCTTCCA-3'	4
human GAPDH (reverse)	5'-TGGACTCCACGACTACTCA-3'	5
mouse HMOX1 (forward)	5'-CACTTCGTCAGAGGCTGCTA-3'	6
mouse HMOX1 (reverse)	5'-GTCTGGGATGAGCTAGTGCTGAT-3'	7
mouse GAPDH (forward)	5'-AATGTGTCCGTCGTGGATCT-3'	8
mouse GAPDH (reverse)	5'-GGTCCTCAGTGTAGCCCAAG-3'	9

[0053]

[0054] **실시예 4. 게놈 DNA 추출 및 바이설파이트를 이용한 DNA 변형**

[0055] 세포주와 혈액의 buffy coat로부터 QIAamp DNA mini kit(Qiagen)를 이용하여 게놈 DNA를 분리하였다. 추출한 DNA에 바이설파이트(bisulfate)를 처리하게 되면, DNA 염기 중 사이토신이 우라실로 전환되는데 이때 메틸기를 가지고 있는 사이토신은 우라실로 전환되지 못하고 그대로 사이토신으로 남아있게 되어 메틸화된 사이토신(methylated cytosine)과 메틸화되지 않은 사이토신(unmethylated cytosine)을 구별할 수 있다. 바이설파이트를 이용한 DNA 변형은 EPiTech Bisulfite kit(Qiagen)를 사용하여 제조사의 매뉴얼을 따라 실시하였다.

[0056] **실시예 5. 정량적 메틸화 특이적 PCR (Quantitative Methylation specific PCR ,qMSP)**

[0057] HMOX1 유전자의 프로모터에 존재하는 특정 CpG 부위에서의 메틸화 정도를 측정하기 위하여 게놈 DNA를 바이설파이트 처리한 후 특정 CpG 부위에서 메틸화된 DNA와 비 메틸화된 DNA를 구별할 수 있도록 각각의 프라이머를 이용하였다. 사용된 프라이머 염기서열은 다음과 같다.

표 2

[0058]

	서열	서열번호
Methylated HMOX1 (forward)	5'-TTATTAGGTTATTGTTTGTAGTAGC-3'	10
unmethylated HMOX1 (forward)	5'-TTATTAGGTTATTGTTTGTAGTAGT-3'	11
internal control HMOX1 (forward)	5'-AGTAGGTGATATTTAGGGAGT-3'	12
methylated/unmethylated/internal control HMOX1 (reverse)	5'-TCCCAAAAAATCCAAAAACTAAA-3'	13

[0059]

[0060] qMSP는 바이설파이트 처리된 DNA 2 μ l (10-100 ng/ μ l), SYBR Premix EX Taq (Takara Bio) 10 μ l, Rox reference dye (50 $\times$ Takara Bio) 0.4 μ l, 각 프라이머 200 nM를 포함한 20 μ l 반응액을 ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems)을 이용하여 50℃ 에서 2분, 95℃에서 10분간 반응한 후, 40 cycles (95℃ 에서 15초, 60℃ 에서 1분) 반복하여 증폭하였다. PCR 산물의 specificity는 95℃에서 15초, 60℃에서 20초, 95℃에서 15초 동안 반응하여 확인하였다. 특정 CpG 부위에서의 메틸화와 비메틸화 정도는 내부

대조군(internal control)으로 보정되어 다음과 같이 산출되었다 (Ct는 threshold cycles를 나타낸다).

$$C_{\text{meth}} = 2^{-(Ct_{\text{methyl}} - Ct_{\text{internal}})}$$

$$C_{\text{unmeth}} = 2^{-(Ct_{\text{unmethyl}} - Ct_{\text{internal}})}$$

실시예 6. 바이설퍼아이트 시퀀싱 PCR (Bisulfite sequencing PCR, BSP)

H4와 H4-sw 세포주의 게놈 DNA를 대상으로 HMOX1 유전자의 프로모터 부위에서 메틸화의 차이를 보이는 CpG 부위를 탐색하기 위하여 BSP를 실시하였다. HMOX1의 특정 프로모터 부분 (UCSC gene database human GRCh37/hg19, chromosome 22, 35,776,557~35,777,029)을 증폭할 수 있는 프라이머를 제작하여 바이설퍼아이트를 처리한 DNA를 증폭했다. 사용한 프라이머의 염기서열은 다음과 같다.

표 3

	서열	서열번호
human HMOX1_BSP (forward)	5'-TAAAGAGGGTGTGAGGAGGT-3'	14
human HMOX1_BSP (reverse)	5'-ACAACATAATACCCACTTTCTAA-3'	15

PCR 반응은 95℃에서 5분간 초기 열 변성하고, 30 cycle로 95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초 동안 반복 증폭한 후 72℃에서 5분간 마지막 합성을 진행하였다. 증폭된 BSP 산물은 1.5% 아가로스 겔에서 전기 영동하여 해당 밴드만 추출한 후 정제하고 yT&A 클로닝 벡터(Yeastern Biotech)로 클로닝했다. 클론에 삽입된 각각의 BSP 산물의 CpG 부위 메틸화 정도는 DNA 서열분석기를 이용하여 분석하였다.

실시예 7. 454 GS-FLX system을 이용한 바이설퍼아이트 유전자 서열분석

정제된 BSP 산물을 이용하여 단일가닥 DNA 라이브러리 제작과 emulsion PCR을 진행한 후 파이로시퀀싱(pyrosequencing)을 염기서열 분석기 제조사인 Roche/454 Life Sciences의 방법에 따라 DNA link사에서 실시하였으며, GS FLX titanium system (Roche/454 Life Sciences)을 이용하여 염기서열 분석을 시행하였다.

실시예 8. 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) 처리

H4 세포주에 메틸화 억제제인 5-aza-2'-deoxycytidine (Sigma-Aldrich)를 10 μM 농도로 3일간 처리한 후 억제된 메틸화의 정도를 MSP로 확인하였고 HMOX1 유전자 발현의 변화는 qRT-PCR을 이용하여 측정하였다.

실험결과

1. 알츠하이머 질환 모델에서 HMOX1 유전자의 발현 증가

전사체(transcriptome) 분석 결과, 정상 세포와 비교하여 APP-swedish mutant를 발현하는 H4 세포주에서 HMOX1의 발현이 4.8배 이상 증가하였으며, Quantitative RT-PCR로 확인한 결과 유사한 발현 패턴을 보이는 것을 확인하였다 (도 1(A)). 또한, 12개월령 알츠하이머 질환 모델 APP swe/PS1 형질전환 쥐 (Borchelt; B6C3-Tg(APP695)85Dbo/Tg(PSEN1)85Dbo)의 hippocampus, frontal cortex, cerebellum 에서도 HMOX1의 발현이 정상 쥐에 비해 증가되어 있음을 확인할 수 있었다 (도 1(B)).

2. DNA 메틸화에 의한 HMOX1의 발현 조절

Methylation array의 분석결과, 정상 세포와 비교하여 APP-swedish mutant를 발현하는 H4 세포주 (H4-sw)에서 HMOX1 유전자 프로모터의 메틸화 수준이 감소되어 있었으며, 메틸화 특이적 PCR (MSP) 결과에서도 유사한 저메

틸화(hypomethylation) 경향을 확인할 수 있었다(도 2). 또한, 정상 H4 세포주에 탈메틸화제(demethylating agent)인 5-aza-2'-deoxycytidin을 처리하였을 때 HMOX1의 발현이 증가하였는데(도 3), 이는 HMOX1의 발현이 DNA 메틸화에 의해 조절되는 것을 의미한다.

[0077] 3. HMOX1의 발현에 결정적 역할을 하는 특이적 CpG 부위 발견

[0078] 바이셀파이트 시퀀싱 PCR (BSP)와 454 GS-FLX system을 이용한 바이셀파이트 유전자 서열분석을 이용하여 전사 개시점으로부터 500bp 인근에 위치한 프로모터 CpG 부위의 메틸화 상태를 조사한 결과, H4-sw 세포주에서 전사 개시점으로부터 -374 bp에 위치한 CpG 부위가 정상 H4 세포주와 비교하여 특이적으로 저메틸화 되어 있는 것을 확인할 수 있었다 (도 4).

[0079] 4. 치매환자 혈액의 HMOX1의 DNA 메틸화 상태와 인지 장애간의 밀접한 연관성

[0080] 70세 이상 알츠하이머 환자 47명(MMSE 3~19)과 대조군으로 70세 이상 뇌졸중 환자 13명(MMSE 26 이상)의 혈액에서 게놈 DNA를 추출하여 HMOX1 -374 CpG 부위의 메틸화 상태를 조사한 결과, 알츠하이머 환자군의 메틸화 상태가 대조군과 비교하여 낮아져 있었으며, 알츠하이머 환자군의 MMSE (mini-mental state examination, 간이정신상태검사)는 -374 CpG 부위의 메틸화 수준과 연관성이 있음을 확인할 수 있었다 (도 5). 또한, 알츠하이머 환자군에서 인지장애가 심할수록 메틸화 수준이 낮아져 있었다.

[0081] 이상의 결과들을 종합하면, HMOX1의 특정 프로모터 부위(RNA 전사 개시 시작부위에서 -374 염기서열에 위치한 CpG 부위)의 메틸화 정도는 알츠하이머성 치매의 진행 정도를 측정할 수 있는 진단 바이오 마커로 활용될 수 있음을 알 수 있다.

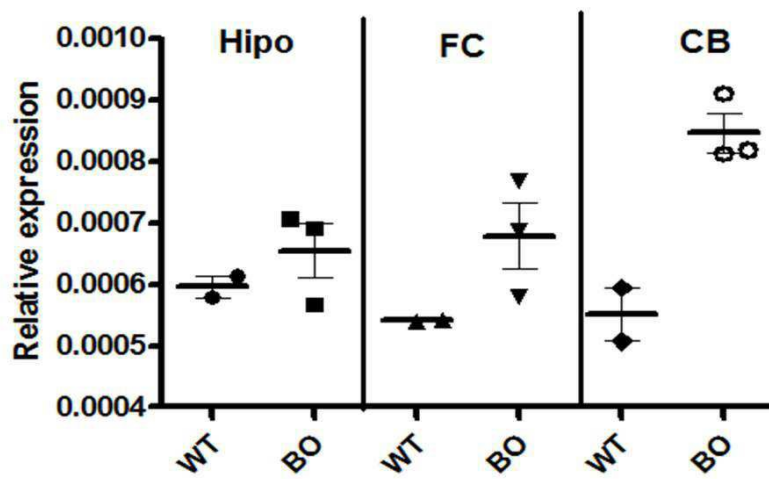
도면

도면1

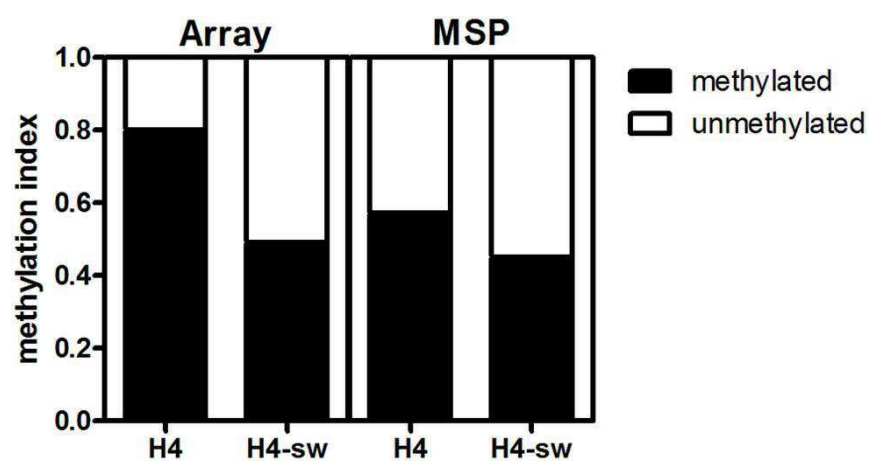
(A)



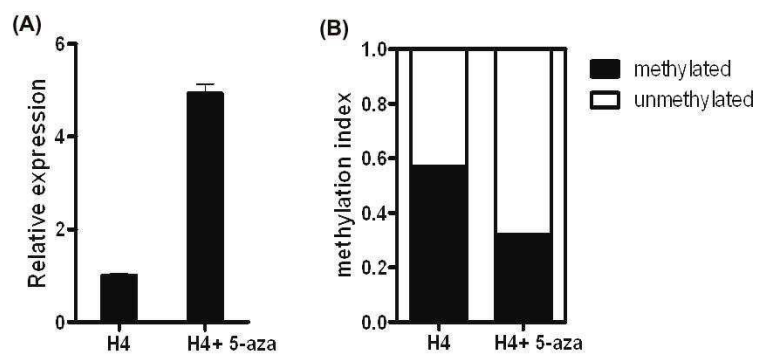
(B)



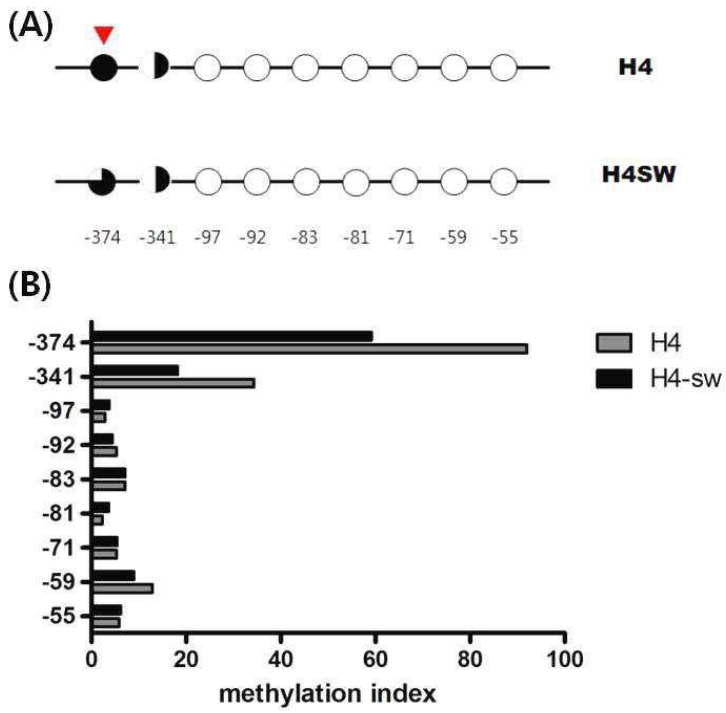
도면2



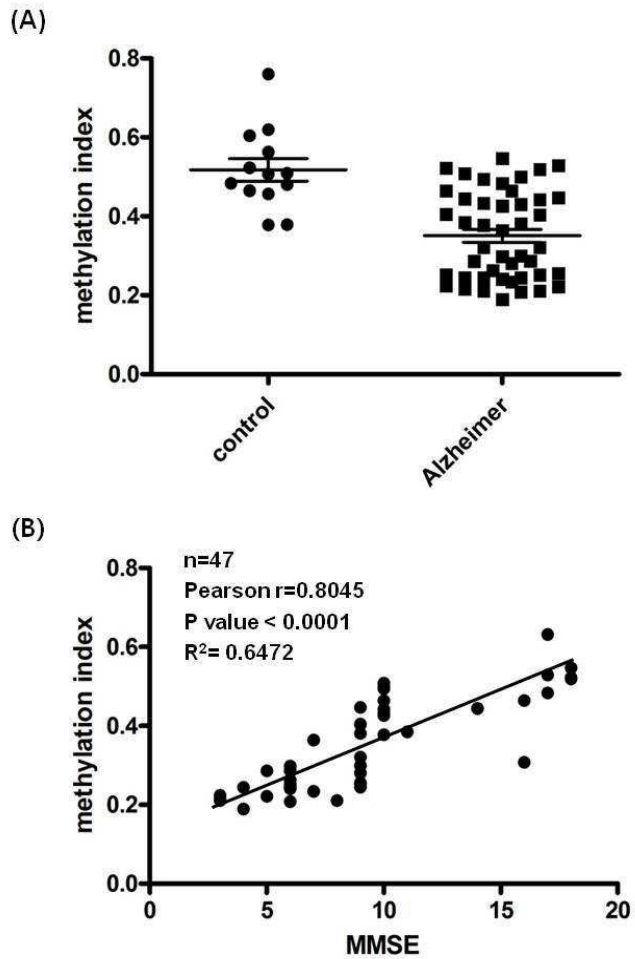
도면3



도면4



도면5



서열목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)