(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0174329
(43) 공개일자 2024년12월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
C12Q 2600/154 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0073597
(22) 출원일자 2023년06월08일
심사청구일자 2023년06월08일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
홍수종
서울특별시 강남구 압구정로29길 71, 24동 902호
김권일
서울특별시 동대문구 경희대로 26-6, 경희대학교 1004호
김효빈
서울특별시 강남구 선릉로 222, 109동 1501호
(74) 대리인
특허법인더웨이브

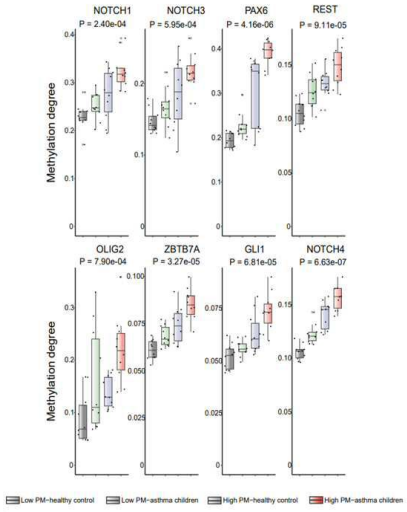
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **태아기에 미세먼지 노출에 따른 소아 천식의 발병 여부 예측 또는 진단용 조성물 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명의 일 양상에 따른 태아기에 미세먼지 노출에 따른 소아 천식의 발병 여부 예측 또는 진단용 조성물 및 이의 용도에 따르면, 태반의 후성유전체 분석을 통해 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A를 발굴하고, 이를 이용해 산모가 임신 중 고농도의 미세먼지에 노출된 경우 소아 천식 발병 여부를 예측 또는 진단할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

인제대학교 산학협력단
경남 김해시 인제로 197, 내 (어방동, 인제대학교)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711137566
과제번호 2021R1F1A1063759
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 출생 코호트 기반 임신 중 고농도 대기 미세먼지 노출에 의한 소아 천식 발생의 태반 매개 기전 규명 및 후생유전체 예측인자 발굴
기 여 율 50/100
과제수행기관명 인제대학교
연구기간 2021.06.01 ~ 2022.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711172315
과제번호 2022R1F1A1076174
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 태반 매개 후성 유전학적 검증을 통한 임신 중 고농도 대기 미세먼지 노출에 의한 소아 천식 발생 원인 규명 및 예측인자 발굴
기 여 율 50/100
과제수행기관명 인제대학교
연구기간 2022.06.01 ~ 2023.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

피험자로부터 분리된 생물학적 시료에서 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 메틸화 수준을 검출하는 제제를 포함하는, 천식 예측 또는 진단용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 검출된 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 메틸화 수준이 정상 대조군에 비하여 높은 경우 천식이 발병할 것으로 예측 또는 진단하는 것인, 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 유전자의 메틸화 수준을 측정할 수 있는 제제는 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소, 유전자의 메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머, 비메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머, 메틸화된 CpG 결합 도메인, 또는 메틸화 DNA에 특이적으로 결합하는 메틸화 DNA 항체 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 조성물.

청구항 4

피험자로부터 분리된 생물학적 시료에서 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 단백질 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 검출된 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 단백질 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 낮은 경우 천식이 발병할 것으로 예측 또는 진단하는 것인, 조성물.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 유전자 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 조성물.

청구항 7

청구항 4에 있어서, 상기 단백질 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 특이적으로 인식하는 항체, 올리고펩티드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앱타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것인 조성물.

청구항 8

청구항 1또는 청구항 4에 있어서, 상기 피험자는 태아기에 미세먼지에 노출된 피험자인 것인, 조성물.

청구항 9

청구항 1 또는 청구항 4에 있어서, 상기 생물학적 시료는 피험자의 태반인 것인, 조성물.

청구항 10

청구항 1내지 청구항 9 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 천식 예측 또는 진단용 키트.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 키트는 피험자의 샘플로부터 얻어진 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 메틸화 수준이 정상 대조군 보다 높은 경우 천식이 발병할 것으로 예측 또는 진단하는 것인, 키트.

청구항 12

청구항 10에 있어서, 상기 키트는 피험자의 샘플로부터 얻어진 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 단백질 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 낮은 경우 천식이 발병할 것으로 예측 또는 진단하는 것인, 키트.

청구항 13

피험자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계; 및

상기 추출된 게놈 DNA에서 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 메틸화 수준을 측정하는 단계;를 포함하는, 천식 예측 또는 진단에 대한 정보제공방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 정보제공방법은 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 메틸화 수준이 정상 대조군 보다 높은 경우 천식이 발병할 것으로 예측 또는 진단하는 단계;를 추가로 포함하는, 정보제공방법.

청구항 15

피험자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계; 및

상기 추출된 게놈 DNA에서 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;를 포함하는, 천식 예측 또는 진단에 대한 정보제공방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 정보제공방법은 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 단백질의 발현 수준이 정상 대조군 보다 낮은 경우 천식이 발병할 것으로 예측 또는 진단하는 단계;를 추가로 포함하는, 정보제공방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 태아기에 미세먼지 노출에 따른 소아 천식의 발병 여부 예측 또는 진단용 조성물 및 이의 용도 에 대한 발명이다.

배 경 기 술

[0002] 태아기는 태아의 신체 기관이 형성되기 시작하는 시기이다. 태아는 여러 가지 후성적 외부 또는 내부의 환경요인 노출에 의해 성인보다 유전적 손상이 더 쉽고 DNA 복구 효율 능력이 떨어져 태아의 각 기관이 형성되기 시작하는 시기에 산모의 유해 환경 인자 노출은 태아의 폐 발달 과정뿐 아니라 출생 이후 호흡기계 질환 발생에 영향을 미칠 수 있다. 여러 가지 유해 인자 중 고농도의 미세먼지는 태반까지 침투하여 유전자의 메틸화 변화를 일으킬 수 있고, 천식의 발생과 악화의 중요한 인자로 알려져 있으나 그 기전은 명확히 밝혀져 있지 않다.

[0003] 천식(asthma)이란 기관지에 발병하는 질환으로 특정 유발 원인 물질에 노출되었을 때, 기관지의 염증에 의해 기

관지가 심하게 좁아져 기침, 호흡곤란 및 가슴 답답함 등이 반복적으로 나타나는 질병이다. 천식은 소아기에 가장 흔한 만성 호흡기질환 중 하나로, 전 세계적으로 발생률이 증가하고 있는 추세이나 그 병인기전이 명확히 규명되지 않아 이들의 자연경과를 예측하거나 적절한 치료법 선택이 매우 어렵다.

[0004] 유전자 메틸화는 환경 유해인자 노출(특히, 미세먼지)에 의해 역동적으로 변화하는 것으로 알려진 생물학적 척도로서 미세먼지 노출에 의한 소아 천식 환자를 구분하는데 생물학적으로 적합한 특성이다. 그러나 아직까지 유전자 수준의 후성유전체 연구는 미흡한 수준이고, 더욱이 임신 중 실외 미세먼지 노출에 의한 소아 천식에 대해 직접적으로 입증한 연구는 거의 없는 실정이다.

[0005] 따라서, 임신 중 미세먼지 노출에 따른 태반 기능 변화와 이에 따른 소아 천식 발생을 태반 검체에서 후성유전체 분석 기법을 활용하여 규명하고, 소아 천식을 예측 또는 진단할 수 있는 바이오마커의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 일 양상은 피험자로부터 분리된 생물학적 시료에서 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 메틸화 수준을 검출하는 제제를 포함하는, 천식 예측 또는 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 다른 양상은 피험자로부터 분리된 생물학적 시료에서 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 단백질 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 다른 양상은 상기 천식 예측 또는 진단용 조성물을 포함하는 키트를 제공하는 것이다.

[0009] 다른 양상은 피험자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계; 및 상기 추출된 게놈 DNA에서 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 메틸화 수준을 측정하는 단계;를 포함하는, 천식 예측 또는 진단에 대한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

[0010] 다른 양상은 피험자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계; 및 상기 추출된 게놈 DNA에서 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;를 포함하는, 천식 예측 또는 진단에 대한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 일 양상은 피험자로부터 분리된 생물학적 시료에서 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 메틸화 수준을 검출하는 제제를 포함하는 천식 예측 또는 진단용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 명세서의 용어 "천식(asthma)"은 기관지에 발병하는 질환으로서, 천식 환자가 특정한 유발 원인 물질에 노출되었을 때, 기관지의 염증에 의해 기관지가 심하게 좁아져 기침, 호흡곤란 및 가슴 답답함 등이 반복적으로 나타난다. 천식의 증상으로서, 기관지의 염증으로 인한 기관지 점막의 부어오름 및 점액 분비, 기관지 근육의 수축으로 인한 기관지 막힘으로 인한 호흡 곤란 등이 있다.

[0013] 본 명세서의 용어 "소아 천식(pediatric asthma)"은 소아 연령에서 발병하는 천식을 의미한다. 소아 천식의 발병은 유전적 요인 및 환경적 요인의 영향을 받는다.

[0014] 본 명세서의 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 대상(subject)의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 대상이 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 대상의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 개체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함할 수 있다.

[0015] 본 명세서의 용어 "생물학적 시료"는 임신 중 미세먼지에 노출된 모체로부터 분리된 시료일 수 있다. 구체적으로, 상기 생물학적 시료는 태반(placenta)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0016] 본 명세서의 용어, "유전자"는 유전형질의 기능적 단위 즉, 모든 생명체가 세포 내에 가지고 있는 유전체 DNA의 특정 부위에 위치하는 정보서열로서 세포를 형성하며 유기적 생명현상을 유지하는 데 필요한 단백질 등을 생산해낼 수 있는 정보를 의미한다. 상기 유전자는 단백질 등을 발현하는데 필요하며 서로 작동 가능하게 연결되어 있는 일련의 구성 단위를 모두 포함하는 개념으로, 예를 들어, 프로모터(promoter) 영역, 단백질 코딩 영역(open reading frame, ORF) 및 터미네이터(terminator) 영역을 포함한다.

[0017] 본 명세서의 용어, "유전자의 CpG 부위" 란, 유전자의 DNA 상에 존재하는 CpG 부위를 말한다. 상기 CpG는 사이토신(C) 뉴클레오티드 다음에 구아닌(G) 뉴클레오티드가 인산기(p)를 사이에 두고 연결된 상태를 의미할 수 있다. 상기 유전자의 CpG 부위는 해당 유전자의 프로모터 영역, 단백질 코딩 영역(open reading frame, ORF) 또는 터미네이터 영역 등에 존재할 수 있다.

[0018] 본 명세서의 용어, "메틸화" 또는 "메틸레이션"은 DNA를 구성하는 염기에 메틸기가 부착되는 것을 말한다. 구체적으로, 메틸화 여부는 특정 유전자의 CpG 부위의 사이토신에서 일어나는 메틸화 여부를 의미한다. 과메틸화가 일어난 경우 그로 인하여 전사인자의 결합이 방해를 받게 되어 특정 유전자의 발현이 억제되며, 반대로, 비메틸화 또는 저메틸화가 일어나는 경우 특정 유전자의 발현이 증가하게 된다.

[0019] 본 명세서의 용어, "메틸화 상태"는 DNA 염기서열 내에서의 하나 이상의 CpG 디뉴클레오티드의 5-메틸사이토신(5-methylcytosine, 5-mC)의 존재를 의미하고, 상기 5-메틸사이토신은 사이토신 링의 다섯번째 탄소에 메틸 그룹이 부착된 것을 의미한다.

[0020] 일 구체예에 있어서, 상기 피험자는 태아기에 미세먼지에 노출된 피험자인 것일 수 있다. 유전자 메틸화는 미세먼지와 같은 환경 유해 인자 노출에 의해 역동적으로 변화하는 것으로 알려진 생물학적 척도로서, 태아기에 미세먼지에 노출된 피험자로부터 분리된 생물학적 시료를 이용하여 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 메틸화 수준 검출을 통해 천식 발병 여부를 예측 또는 진단할 수 있다.

[0021] 본 명세서의 용어 "태아기"는 태아의 수정 후부터 출산 시까지의 기간을 의미한다.

[0022] 본 명세서의 용어 "피험자"는 국내에서 출생한 소아 중 소아 천식의 발병 여부가 추적된 소아를 의미한다. 구체적으로, 피험자는 기저질환이 없는 산모로부터 임신 37주에서 41주 사이에 출산된 소아를 의미할 수 있다. 예를 들어, 다태아 및 선천성 기형아를 임신한 임산부, 결핵과 같은 내과적 합병증이 있는 임산부, 임신 20주 이전에 고혈압이 나타난 임산부 및 정신과 병력이 있는 임산부로부터 출산된 소아는 피험자에서 제외될 수 있다.

[0023] 일 구체예에 있어서, 천식 발병 여부를 예측 또는 진단하기 위한 생물학적 시료로는 상기 피험자의 태반을 이용할 수 있다.

[0024] 일 구체예에 있어서, 상기 검출된 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 메틸화 수준이 정상 대조군에 비하여 높은 경우 천식이 발병하는 것으로 예측 또는 진단하는 것일 수 있다.

[0025] 본 명세서의 용어, "메틸화 수준"은 예를 들면 모든 게놈 영역 및 일부 비-게놈 영역 내의 표적 DNA 메틸화 유전자의 DNA 염기서열에 존재하는 메틸화의 양을 의미한다.

[0026] 본 명세서의 용어, "메틸화 수준의 측정"은 유전자 CpG 부위의 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, 또는 정량 PCR 등을 통해 측정할 수 있다. 또는, 파이로시퀀싱 또는 바이설파이트 시퀀싱과 같은 자동염기분석 등의 방법으로 측정하거나, DNA 메틸레이션 마이크로어레이, 또는 메틸화된 CpG 결합 도메인 또는 항-메틸사이토신 항체를 이용한 면역침강법 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 본 명세서의 용어, "CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제" 는 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소, 유전자의 메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머, 비메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머, 메틸화된 CpG 결합 도메인, 또는 메틸화 DNA에 특이적으로 결합하는 메틸화 DNA 항체(예를 들어, 메틸사이토신에 특이적으로 결합하는 항체) 등을 포함할 수 있다.

[0028] 상기 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 바이설파이트(bisulfite) 또는 이의 염일 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 바람직하게는 소듐 바이설파이트일 수 있다. 바이설파이트 변형된 DNA는 서열분석 또는 메틸화 특이적 PCR 등 다양한 방법을 통하여 메틸화를 검출할 수 있으며, 이러한 바이설파이트를 이용하여 비메틸화

사이토신 잔기를 변형시켜 유전자의 메틸화 여부를 검출하는 방법은 당 업계에 널리 공지되어 있다.

[0029] 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.

[0030] 상기 유전자의 메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머 및 비메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머는 환자의 시료에서 게놈 DNA를 수득하고, 수득한 DNA에 메틸화되지 않은 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소를 처리하는 방법으로 얻을 수 있다. 상기 유전자의 메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머 및 비메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 증폭시키고 그 증폭된 결과물의 존부를 확인하는 것을 통해 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정할 수 있다.

[0031] 본 명세서의 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3 말단 수산화기를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍을 형성할 수 있고 주형 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 뉴클레오티이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 또한, 프라이머는 7개 내지 50개의 뉴클레오티드 서열을 가진 센스 및 안티센스 핵산으로서 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다.

[0032] 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.

[0033] 한편, 상기 메틸화 DNA 항체는 DNA 중의 메틸화된 염기에 특이적으로 결합하는 항체를 말한다. 구체적으로는, 메틸사이토신에 대한 항체와 같이, DNA 사슬 중 메틸화된 사이토신을 인식하여 결합하는 성질을 가진 항체를 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 메틸화 DNA 항체는 메틸화된 염기, 메틸화 DNA 등을 항원으로 하여 통상의 방법에 의해 제작할 수 있다. 예를 들어, 메틸사이토신 항체를 제조하기 위해서는, 5-메틸사이티딘, 5-메틸사이토신, 또는 5-메틸사이토신을 포함하는 DNA 등을 항원으로 하여 항체를 제조한 후 DNA 중의 메틸사이토신으로의 특이적인 결합을 지표로서 선별할 수 있다.

[0034] 또한, 메틸화된 CpG 결합 도메인(CpG binding domain: MBD) 또는 메틸화 DNA 항체를 이용하여 메틸화 수준을 측정하는 경우, 이들을 이용하여 메틸화된 DNA를 면역침강시킨 후, 서던블롯, PCR, 마이크로어레이, 또는 서열분석(sequencing) 등을 통해 특정 CpG 부위를 확인할 수 있다. 또한, 항체의 면역학적 검출 또는 정량을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질 표지, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체 및 발색 기질 등을 사용할 수 있다. 상기에서 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스틸렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드 글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(peroxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase) 등이 사용될 수 있고, 형광 물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있고, 발색기질액은 2,2'-아지노-비스-(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)(ABTS) 또는 o-페닐렌디아민(OPD), 테트라메틸 벤지딘(TMB)이 사용될 수 있고, 그 외 방사성 동위원소 표지, 라텍스 비드 표지, 콜로이드 표지, 비오틴 표지 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 다른 양상은 피험자로부터 분리된 생물학적 시료에서 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 단백질 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0036] 본 명세서에서 용어 "바이오마커(biomarker) 또는 마커(marker)"는 정상 대조군과 태아기 미세먼지 노출로 인한 소아 천식 환자군을 구분할 수 있는 물질로, 태아기 미세먼지 노출 개체에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩티드, 단백질, 핵산, 유전자, 지질, 당지질, 당단백질 또는 당 등과 같은 유기 생체분자들을 모두 포함할 수 있다. 일 구체예에서는, 태아기 미세먼지 노출 개체의 태반에서 그 발현 수준이 변화되는 유전자 또는 단백질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 본 명세서의 용어, "NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A"는 정상 대조군과 태아기 미세먼지 노출 소아 천식 환자군의 태반에서 발현의 차이를 보이는 유전자 또는 단백질이다.

[0038] 본 명세서에서 용어, "유전자 발현 수준 측정"은 소아 천식 발병 예측 또는 진단할 수 있는 마커 유전자의 mRNA 발현 정도를 확인하는 과정으로, mRNA의 양을 측정하여 수행될 수 있다. 상기 mRNA 수준 측정을 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응 (Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응 (Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(Rnase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting) 또는 DNA 마이크로어레이 칩(DNA microarray 칩) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 본 명세서의 용어 "유전자의 발현 수준을 측정하는 제제"란 소아 천식 발병 여부에 따라 발현 수준이 증가 또는 감소하는 마커인 유전자의 발현 수준을 확인함으로써 상기 마커의 검출에 사용될 수 있는 제제를 의미한다.

[0040] 일 구체예에 있어서 상기 유전자 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머(primer), 프로브(probe) 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 본 명세서의 용어 "프라이머"는 타겟 유전자 서열을 인지하는 정방향 및 역방향의 프라이머로 이루어진 모든 조합의 프라이머 쌍을 포함하며, 바람직하게는 특이성 및 민감성을 가지는 분석 결과를 제공하는 프라이머 쌍을 의미하는 것일 수 있다. 상기 프라이머는 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오티드 트리포스페이트, 중합반응 효소 존재, 온도, 완충액 등)하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 인자, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변이가 있지만 전형적으로 15~30 뉴클레오티드이다.

[0042] 상기 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 또한 상기 프라이머는 표적 유전자의 mRNA(즉, cDNA) 서열에 상보적인 서열로 제조될 수 있다. 이러한 프라이머의 디자인은 표적 유전자의 cDNA 서열을 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있다.

[0043] 본 명세서의 용어 "프로브"는 생물학적 시료 내의 검출하고자 하는 타겟 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 타겟 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다. 구체적으로, 상기 프로브는 당 업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있고, 구체적으로 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편일 수 있고, 라벨링되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무, 발현 양을 확인할 수 있다.

[0044] 상기 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트(phosphoramidite) 고체 지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 또한 상기 프라이머 또는 프로브는 당해 기술분야에 공지된 다양한 방법을 통해 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오티드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오티드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.

[0045] 본 명세서의 용어, "안티센스 올리고뉴클레오티드"는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 포함하는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체로서, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드 서열은 상기 유전자들의 mRNA에 상보적이고 상기 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미한다. 이는 상기 유전자 mRNA의 번역, 세포질 내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오티드의 길이는 6 내지 100 염기, 바람직하게는 8 내지 60 염기, 보다 바람직하게는 10 내지 40 염기일 수 있다. 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드는 통상의 방법으로 시험관 내에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 올리고뉴클레오티드가 합성되도록 할 수 있다.

[0046] 본 명세서의 용어 "단백질의 발현 수준을 측정하는 제제"란 소아 천식 발병 여부에 따라 발현 수준이 증가 또는 감소하는 마커인 단백질의 발현 수준을 확인함으로써 상기 마커의 검출에 사용될 수 있는 분자를 의미한다.

[0047] 일 구체예에 있어서, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질을 특이적으로 인식하는 항체, 올리고펩티드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앱타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 명세서의 용어, "항체"는 항원과 특이적으로 결합하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질을 의미한다. 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 상기 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, 예를 들어 Fab, F(ab'), F(ab')2 또는 Fv 등일 수 있다. 또한 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 또한 상기 항체는 당 업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조될 수 있다.

[0049] 본 명세서의 용어, "PNA(peptide nucleic acid)"는 인공적으로 합성된, DNA 또는 RNA와 비슷한 중합체를 의미한다. 구체적으로 인산-리보스당 골격을 갖는 DNA와는 달리, PNA는 펩티드 결합에 의해 연결된 반복된 N-(2-아미노에틸)-글리신 골격을 가지며 이로 인해 DNA 또는 RNA에 대한 결합력과 안정성이 크게 증가될 수 있다.

[0050] 본 명세서의 용어, "앱타머"는 표적분자에 친화적, 특이적으로 결합할 수 있는 핵산(DNA, RNA) 또는 펩티드(peptide)를 의미한다.

[0051] 일 구체예에 있어서, 상기 검출된 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 단백질 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 낮은 경우 천식이 발병할 것으로 예측 또는 진단하는 것일 수 있다.

[0053] 다른 양상은 상기 조성물을 포함하는 천식 예측 또는 진단용 키트를 제공한다.

[0054] 상기 메틸화, 메틸화 수준 및 메틸화 수준 측정 제제, 유전자 또는 단백질 발현의 수준을 측정하는 제제 등은 전술한 바와 같다.

[0055] 일 구체예에 있어서, 상기 키트는 유전자의 메틸화 수준을 검출하는 제제, 장치 및 알고리즘이 내장된 컴퓨터를 포함할 수 있고, 상기 알고리즘을 통해 상기 마커의 수준 측정 결과를 소아 천식과 연관시키는 키트에 관한 것일 수 있다. 더욱 구체적으로, 상기 키트는 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 메틸화 수준을 검출하는 제제를 포함하는 천식 발병 예측 또는 진단용 조성물을 포함할 수 있으나. 이에 제한되는 것은 아니다.

[0056] 일 구체예에 있어서, 상기 키트는 피험자의 샘플로부터 얻어진 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 메틸화 수준이 정상 대조군 보다 높은 경우 천식이 발병할 것으로 예측 또는 진단하는 것을 의미한다.

[0057] 일 구체예에 있어서, 상기 키트는 피험자로부터 분리된 생물학적 시료에서 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 단백질 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 조성물을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로, 상기 키트는 피험자의 샘플로부터 얻어진 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 단백질 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 낮은 경우 천식이 발병할 것으로 예측 또는 진단하는 것을 의미한다.

[0058] 일 구체예에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 키트는 분석방법에 적합한 하나 이상의 다른 구성성분, 용액 또는 장치를 더 포함하여 구성될 수 있다.

[0059] 일 구체예에 있어서, 상기 키트는 통합 자기-전기화학 센서(integrated magneto-electrochemical sensor) 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 통합 자기-전기화학 센서는 자성 비드(magnetic bead)를 사용하여 효소적 신호 증폭에 의한 전기적 신호를 검출하는 시스템을 지칭한다. 구체적으로는, 자성 비드에 표적 물질을 검출할 수 있는 물질(예를 들면 항체)을 부착시키고, 상기 표적 물질을 검출할 수 있는 발색 물질(예를 들면 호스래디쉬 퍼옥시다아제(horse radish peroxidase: HRP), 알칼리 포스파타제(Alkaline Phosphatase: ALP), α-D-갈락토시다제(α-D-galactosidase, α-Gal)에 의해서 발생되는 효소적 신호 증폭에 의한 전기적 신호를 검출하는 시스템을 지칭할 수 있다.

[0060] 일 구체예에 있어서, 상기 조성물 및 키트에는 상기 제제 이외에도, 중합효소 아가로스, 전기영동에 필요한 완충용액 등이 추가로 포함될 수 있다. 또한, 상기 키트는 DNA 메틸화 마이크로어레이 형태로 구현될 수 있다.

[0062] 또 다른 양상은 피험자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계; 및 상기 추출된 게놈 DNA에서 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 메틸화 수준을 측정하는 단계;를 포함하는 천식 발병 예측 또는 진단에 대한 정보제공방법을 제공한다.

[0063] 상기 메틸화, 메틸화 수준 및 메틸화 수준 측정 제제, 유전자 또는 단백질 발현의 수준을 측정하는 제제 등은 전술한 바와 같다.

[0064] 일 구체예에 있어서, 상기 정보제공방법은 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자의 메틸화 수준이 정상 대조군보다 높은 경우 천식이 발병할 것으로 예측 또는 진단하는 정보제공단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0065] 또 다른 양상은 피험자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계; 및 상기 추출된 게놈 DNA에서 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;를 포함하는, 천식 발병 예측 또는 진단에 대한 정보제공방법을 제공한다.

[0066] 일 구체예에 있어서, 상기 정보제공방법은 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 또는 단백질의 발현 수준이 정상 대조군 보다 낮은 경우 천식이 발병할 것으로 예측 또는 진단하는 정보제공 단계를 추가로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0067] 일 양상에 따른 태아기에 미세먼지 노출에 따른 소아 천식의 발병 여부 예측 또는 진단용 조성물, 키트 및 이를 이용한 천식 발병 예측 또는 진단에 대한 정보제공방법에 따르면, 정상 대조군과 태아기에 미세먼지에 노출된 소아 천식 환자군의 DNA 메틸화 수준의 차이를 보이는 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A를 확인하고, 이를 이용해 산모가 임신 중 미세먼지에 노출된 경우 태아의 천식 발병 여부를 예측 또는 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0068] 도 1은 미세먼지 노출 여부에 따른 정상 대조군과 태아기에 미세먼지에 노출된 소아 천식 환자군의 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A의 DNA 메틸화 정도를 나타낸 그래프이다.

도 2는 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 유전자의 메틸화 정도와 기도 과민성의 상관관계를 나타낸 그래프이다.

도 3은 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 유전자의 메틸화 정도와 폐기능 수치의 상관관계를 나타낸 그래프이다.

도 4는 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 유전자의 메틸화 정도와 혈액 내 혈청 총 IgE 농도의 상관관계를 나타낸 그래프이다.

도 5는 미세먼지 노출 여부에 따른 정상 대조군과 태아기에 미세먼지에 노출된 소아천식 환자군의 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 유전자의 발현 정도를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0069] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0071] **실시예 1. 대상 피험자의 특성**

[0072] 실험에 참여한 피험자의 인구통계학적 및 임상적 특성은 다음과 같다.

[0073] 국내에서 출생한 소아 중 소아 천식의 발병 여부가 추적된 소아이다. 구체적으로, 기저질환이 없는 산모로부터 임신 37주에서 41주 사이에 출산된 소아이고, 다태아 및 선천성 기형아를 임신한 임산부, 결핵과 같은 내과적

합병증이 있는 임산부, 임신 20주 이전에 고혈압이 나타난 임산부 및 정신과 병력이 있는 임산부로부터 출산된 소아는 피험자에서 제외하였다.

[0074] 상기 피험자를 미세먼지에 제 1 수준으로 노출되고 소아 천식이 발병하지 않은 군(제1군; 정상 대조군), 미세먼지에 제 1 수준으로 노출되고 소아 천식이 발병한 군(제2군), 미세먼지에 제 2 수준으로 노출되고 소아 천식이 발병하지 않은 군(제3군), 미세먼지에 제 2 수준으로 노출되고 소아 천식이 발병한 군(제4군)으로 나누었다.

[0075] 미세먼지에 노출된 제1 수준 및 제 2수준의 정의는 다음과 같다.

[0076] 피험자들이 임신 중에 노출된 미세먼지 노출지수는 국가 지리정보시스템 Arc GIS (Geographic Information System)을 이용하여 확보된 개별 노출값을 중간값을 기준으로 나누었을 때, 낮은 군을 제 1 수준으로, 높은 군을 제 2 수준으로 정의하였다.

[0078] **실시예 2. 태반 내 후성유전체를 분석**

[0079] **2.1 태아기 미세먼지에 노출된 소아의 태반 내 후성유전체를 분석**

[0080] 상기 실시예 1의 등록된 피험자들의 태반 내 후성유전체를 분석하였다. 구체적으로, 태반조직에서 DNeasy Blood & Tissue Kit를 이용하여 genomic DNA를 추출한 후, Infinium MethylationEPIC BeadChip Kit를 이용하여 차등 DNA 메틸화 정도를 확인하였다. 각 CpG 부위의 메틸화 수준은 메틸화 대 비메틸화 신호의 비율을 계산하여 산출된 값으로 평가하였으며, 원시데이터의 전처리 과정 (Background Correction & Dye Bias Equalization, Filtering, BMIQ Normalization, Data Transformation을 순차적으로 진행) 을 통해 데이터의 체계적인 편향을 줄여 통계적 오류를 방지하였다.

[0081] 태반 내 후성유전체를 통계학적으로 분석한 결과, 건강한 정상 대조군과 대비하여 태아기 미세먼지 노출이 높은 소아의 태반내 유전자 메틸화 양상이 다름을 확인하였다. 이는 미세먼지 노출에 따른 자궁 내 환경 변화에 따라 특정 유전자의 메틸화가 일어났음을 의미한다.

[0082] **2.2 태아기 미세먼지 노출 및 소아천식 유무에 따른 태반 내 유전자 메틸화 정도 비교를 통한 바이오마커 발굴**

[0083] 실시예 2.1에서 확인한 정상 대조군과 대비하여 메틸화 양상이 다른 유전자 중 태아기에 고농도의 미세먼지에 노출된 소아의 태반에서 유의미한 메틸화 수준을 보이는 유전자를 선별하였다. 신경 분화/증식(neuronal differentiation/proliferation) 혹은 Notch 신호 경로(Notch signaling pathway)에 관여하는 유전자가 유의하게 과메틸화 되어 있었다. 특히 해당 경로의 중심에 있는 8개 유전자 (NOTCH1/3/4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6, ZBTB7A)가 과메틸화 되어 있음을 확인하였다.

[0084] 구체적으로, 미세먼지에 제 1 수준으로 노출되고 소아 천식이 발병하지 않은 군(제 1군; 정상 대조군), 미세먼지에 제 1 수준으로 노출되고 소아 천식이 발병한 군(제 2군), 미세먼지에 제 2 수준으로 노출되고 소아 천식이 발병하지 않은 군(제3군), 미세먼지에 제 2 수준으로 노출되고 소아 천식이 발병한 군(제4군)의 피험자의 태반에서 유전자의 메틸화 정도를 확인하였고, 이를 도 1에 나타내었다.

[0085] 도 1은 미세먼지 노출 여부에 따른 정상 대조군과 소아 천식 환자의 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A의 DNA 메틸화 정도를 나타낸 그래프이다.

[0086] 도1에서 보는 바와 같이, 태아기에 고농도의 미세먼지에 노출되고, 소아 천식이 발병한 군(제4군)의 경우 상기 유전자의 메틸화 수준이 가장 높음을 확인하였다.

[0087] **실시예 3. 바이오마커와 소아천식 임상지표와의 상관관계 확인**

[0088] **3.1 바이오마커와 기도과민성의 상관관계 확인**

[0089] 실시예 2에서 확인한 미세먼지 노출이 높은 소아의 태반 내 과메틸화 되어 있는 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 유전자의 메틸화 정도와 소아천식 임상지표인 기도과민성과의 상관관계를 확인하였다.

[0090] 구체적으로, 소아천식 임상지표 중, 기도과민성은 PC20수치로 확인하였다. 기도과민성 수치는 기관지가 비정상적으로 경련 및 수축 등을 일으키는 정도를 나타내는 지표로서, PC20(Provocative Concentration of Methacholine Causing a 20% Decrease in Forced Expiratory Volume in 1 second)은 메타콜린(methacholine)의 흡입에 따라 환자의 강제호기량이 기저치에 비해20% 감소하게 하는 메타콜린의 농도를 나타내는 지표이다.

PC20의 값이 증가할수록 기도과민성이 감소함을 의미한다.

[0091] 도 2는 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 유전자의 메틸화 정도와 기도과민성의 상관관계를 나타낸 그래프이다.

[0092] 도 2에 나타낸 바와 같이, NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 유전자의 메틸화 수준이 높을수록 PC20의 수치가 감소한다. PC20가 감소하는 경우, 기관지의 비정상적인 수축으로 인해 소아 천식이 발병할 수 있다.

[0093] **3.2 바이오마커와 폐기능 수치의 상관관계 확인**

[0094] 실시예 2에서 확인한 미세먼지 노출이 높은 소아의 태반 내 과메틸화 되어 있는 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 유전자의 메틸화 정도와 소아 천식 임상지표인 폐기능 수치와의 상관관계를 확인하였다.

[0095] 구체적으로, NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 유전자와 폐기능 수치간의 상관관계를 도 3에 나타내었다. 소아 천식 임상지표 중, 폐기능 수치는 폐에서 강제로 내쉴 수 있는 공기의 양을 반영하는 FEV1/FVC 비율로 확인한다. FEV1/FVC 수치는 폐 기능 검사에서 기관지 확장제 흡입 후 노력성 폐활량 (FVC)에 대한 1초간 노력성 호기량 (FEV1)의 비율을 백분율로 표시한다. FEV1/FVC의 수치가 감소할수록 기관지 폐쇄 상태로 폐기능의 저하를 의미한다.

[0096] 도 3에 나타낸 바와 같이, OLIG2 및 REST 유전자의 메틸화 수준이 높을수록 FEV1/FVC의 수치가 감소한다. FEV1/FVC수치가 감소하는 경우, 기도 수축 및 염증의 발생으로 인해 소아 천식이 발병할 수 있다.

[0097] **3.3 바이오마커와 혈액 내 혈청 총 IgE 농도의 상관관계 확인**

[0098] 실시예 2에서 확인한 미세먼지 노출이 높은 소아의 태반 내 과메틸화 되어 있는 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 유전자의 메틸화 정도와 소아 천식 임상지표인 혈액 내 혈청 총 IgE 농도와의 상관관계를 확인하였다.

[0099] 구체적으로, NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 유전자와 혈액 내 혈청 총 IgE 농도 간의 상관관계를 도 4에 나타내었다.

[0100] 도4는 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 유전자의 메틸화 정도와 혈액 내 혈청 총 IgE 농도의 상관관계를 나타낸 그래프로서, 도4에 나타낸 바와 같이, NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, REST, PAX6 및 ZBTB7A 유전자의 메틸화 정도가 증가할수록, 혈액 내 혈청 총 IgE 농도가 증가한다.

[0101] NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, REST, PAX6 및 ZBTB7A 유전자의 메틸화 정도가 증가할수록 혈액 내 혈청 총 IgE 농도의 수치가 증가하는 것은 기관지 내부에 과다한 알레르기 염증물질이 분비되었다는 것을 의미할 수 있다. 과다한 알레르기 염증물질의 분비는 피험자의 소아 천식 발병을 유발한다.

[0102] 상기한 바와 같이, NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 유전자의 메틸화 정도와 소아 천식 임상지표(기도과민성, 폐기능 수치 및 혈액 내 혈청 총 IgE 농도)는 높은 상관관계가 있음을 확인하였다.

[0103] 이는 높은 미세먼지 노출에 따른 소아 천식 환자 발생을 예측하는데 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 유전자를 바이오마커로 활용할 수 있음을 의미한다.

[0105] **실시예 4. 바이오마커의 발현량 감소 확인**

[0106] 실시예 2에서 확인한 태아기에 미세먼지에 노출된 소아의 태반에서 과메틸화 되어 있는 8개의 유전자 발현량을 확인하였다.

[0107] 구체적으로, 태반조직에서 TRIzol reagent를 이용하여 총 RNA를 추출한 후 SuperscriptTM II RT-PCR System을 이용하여 cDNA를 합성하였다. TaqMan Gene Expression Assay를 이용하여 qPCR을 측정하여 유전자의 발현량을 확인하였고, 이를 도 5에 나타내었다.

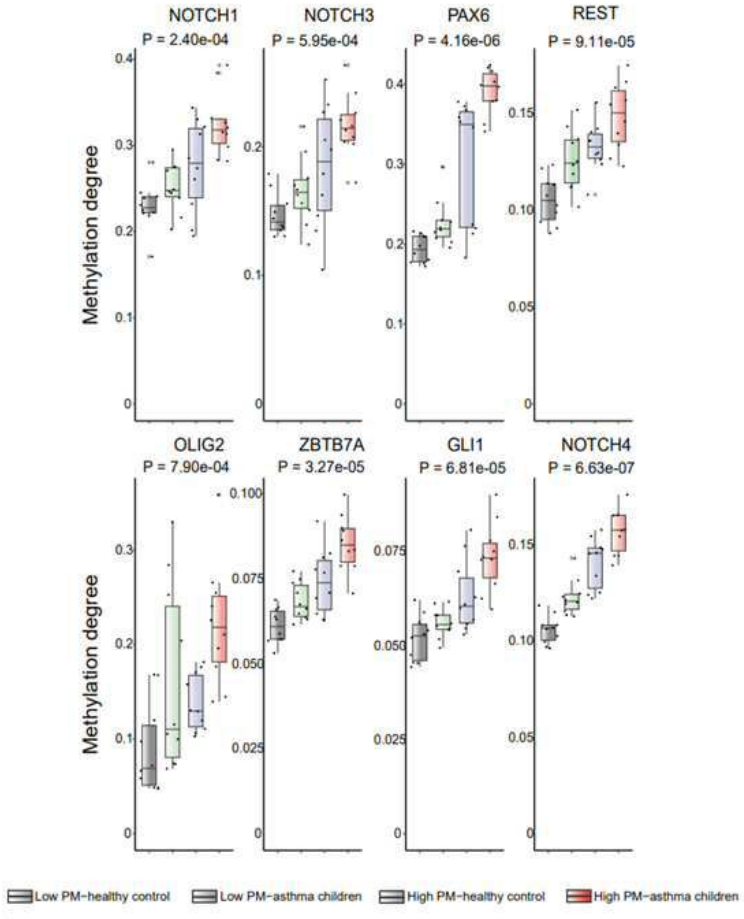
[0108] 도 5는 미세먼지 노출 여부에 따른 정상 대조군과 소아 천식 환자의 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A의 유전자 발현 정도를 나타낸 그래프이다.

[0109] 도 5에서 보는 바와 같이, 상기 실험을 통하여 미세먼지 노출이 높은 소아의 태반 내 과메틸화 되어 있는 8개

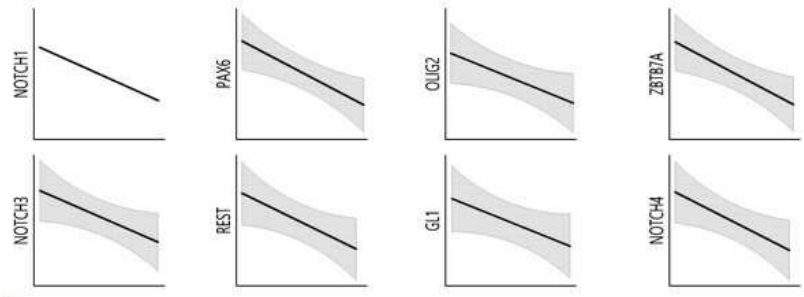
유전자들 모두 태반에서 유전자 발현량이 감소되어 있는 것을 확인하였다. 이는 높은 미세먼지 노출에 따른 소아 천식 환자 발생을 예측하는데 NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, GLI1, OLIG2, REST, PAX6 및 ZBTB7A 유전자를 바이오마커로 사용할 수 있음을 의미한다.

도면

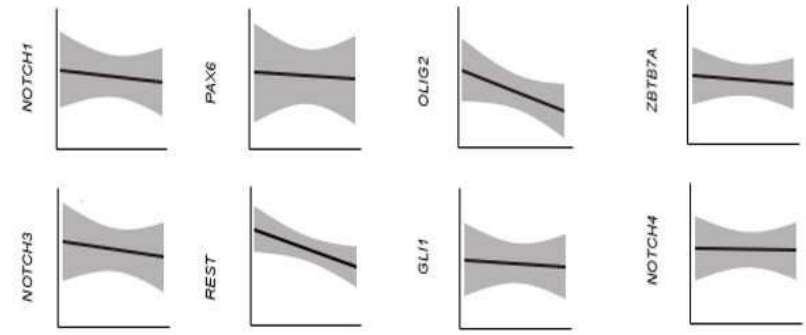
도면1



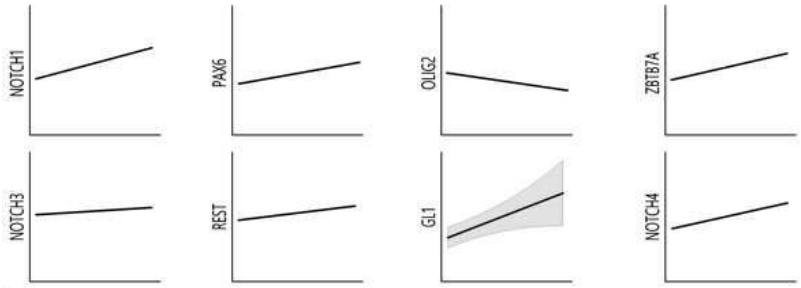
도면2



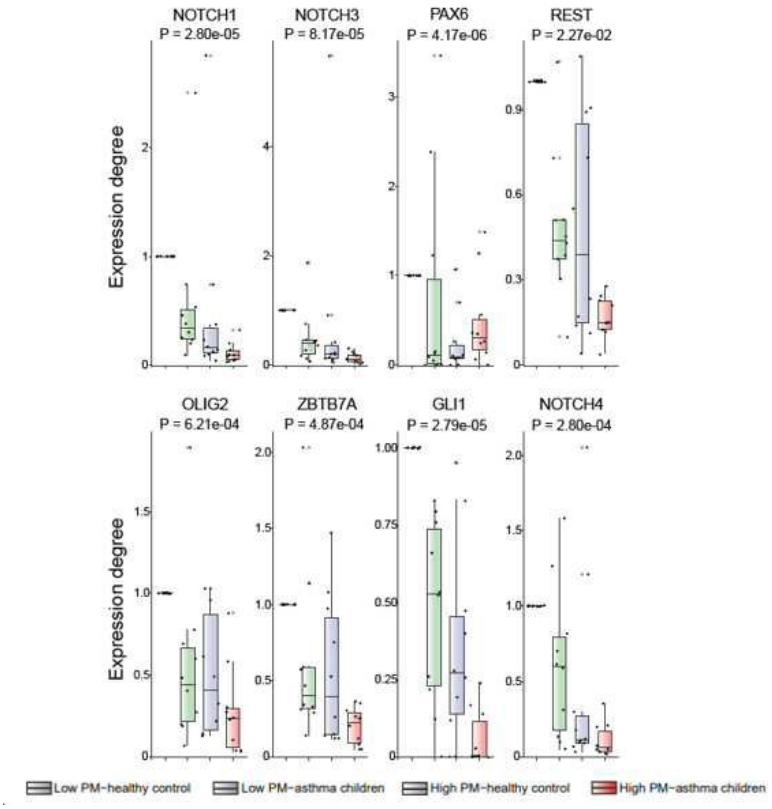
도면3


NOTCH1
PAX6
OLIG2
ZBTB7A
NOTCH3
REST
GLI1
NOTCH4

도면4


NOTCH1
PAX6
OLIG2
ZBTB7A
NOTCH3
REST
GLI1
NOTCH4

도면5


NOTCH1
P = 2.80e-05
NOTCH3
P = 8.17e-05
PAX6
P = 4.17e-06
REST
P = 2.27e-02
OLIG2
P = 6.21e-04
ZBTB7A
P = 4.87e-04
GLI1
P = 2.79e-05
NOTCH4
P = 2.80e-04
Expression degree
Expression degree
Low PM-healthy control
Low PM-asthma children
High PM-healthy control
High PM-asthma children