



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0010962
(43) 공개일자 2024년01월25일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) C12Q 1/6851 (2018.01)
C12Q 1/689 (2018.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
C12Q 1/6851 (2018.05)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-0088394</p> <p>(22) 출원일자 2022년07월18일
심사청구일자 2022년07월18일</p> | <p>(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)</p> <p>(72) 발명자
석기태
강원도 원주시 늘품로 199, 109동 1032호(반곡동, 원주반곡아이파크)</p> <p>박희진
강원도 춘천시 행촌로 11, 105동 1503호(퇴계동, 한성한진아파트)
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
특허법인본</p> |
|--|---|

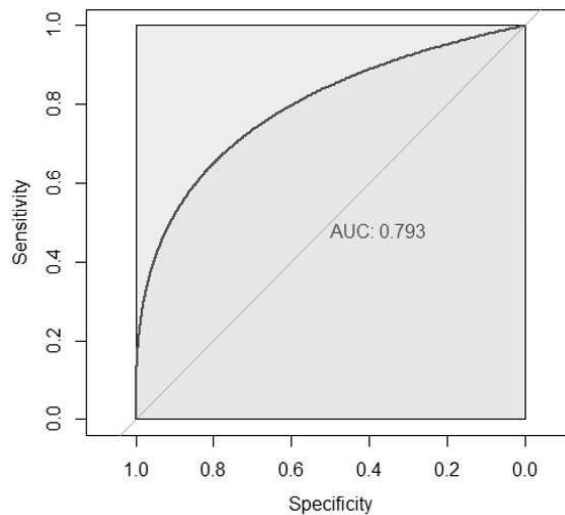
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 베일로넬라 디스파 균주를 이용한 비알코올성 지방간 질환 진단 방법

(57) 요약

본 개시에 의하면 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 진단하는 방법으로서, 대상체로부터 혈액 샘플을 수집하는 제1 단계; 대상체로부터 수집한 혈액 샘플을 원심분리한 다음 펠렛을 수집하는 제2 단계; 수집한 펠렛으로부터 DNA를 추출하는 제3 단계; 추출한 DNA에 서열번호 1 및 2로 나타나는 프라이머를 사용하여 qPCR을 수행하여 베일로넬라 디스파(Veillonella dispar) 균주의 유전자 함량을 측정하는 제4 단계; 및 대상체의 혈액 샘플로부터 측정된 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 발현량이 정상 대조군의 혈액 샘플로부터 측정된 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 발현량을 비교하여 대상체의 비알코올성 지방간 질환 보유 여부를 결정하는 제5 단계를 포함하는, 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 진단하는 방법이 제공된다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12Q 1/689 (2018.05)

C12Q 2545/10 (2019.08)

(72) 발명자

최미란

강원도 춘천시 동면 소양강로 104, 102동 604호 (춘천장학사랑으로부영아파트)

김동준

강원도 춘천시 후석로 325, 102동 2408호(후평동, 춘천더샵아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345349551

과제번호 2020R1A6A1A03043026

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 중점연구소지원사업

연구과제명 장내 마이크로바이옴을 이용한 간질환 진단 및 치료기술 개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 한림대학교

연구기간 2020.06.01 ~ 2029.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711159001

과제번호 2018M3A9F3020956

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 장내 마이크로바이옴을 활용한 만성간질환 치료용파마바이오틱스 후보제 발굴 및 효

능검증

기 여 율 1/2

과제수행기관명 한림대학교

연구기간 2018.04.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

대상체로부터 혈액 샘플을 수집하는 제1 단계;

대상체로부터 수집한 혈액 샘플을 원심분리한 다음 펠렛을 수집하는 제2 단계;

수집한 펠렛으로부터 DNA를 추출하는 제3 단계;

추출한 DNA에 qPCR을 수행하여 베일로넬라 디스파(*Veillonella dispar*) 균주의 유전자 함량을 측정하는 제4 단계; 및

대상체의 혈액 샘플로부터 측정한 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 발현량이 정상 대조군의 혈액 샘플로부터 측정한 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 발현량을 비교하여 대상체의 비알코올성 지방간 질환 보유 여부를 결정하는 제5 단계를 포함하는,

대상체의 비알코올성 지방간 질환을 진단하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 추출한 DNA에 qPCR을 수행하여 베일로넬라 디스파(*Veillonella dispar*) 균주의 유전자 함량을 측정하는 단계는 서열번호 1 및 2로 나타나는 프라이머를 사용하여 수행되는, 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 진단하는 방법.

청구항 3

대상체로부터 혈액 샘플을 수집하는 제1 단계;

대상체로부터 수집한 혈액 샘플을 원심분리한 다음 펠렛을 수집하는 제2 단계;

수집한 펠렛으로부터 DNA를 추출하는 제3 단계;

추출한 DNA에 qPCR을 수행하여 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 함량을 측정하는 제4 단계; 및

대상체의 혈액 샘플로부터 측정한 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 발현량이 정상 대조군의 혈액 샘플로부터 측정한 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 발현량을 비교하여 대상체의 비알코올성 지방간 질환 보유 여부를 결정하는 단계로서,

상기 대상체의 혈액 샘플로부터 측정한 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 발현량이 정상 대조군의 혈액 샘플로부터 측정한 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 발현량을 기준으로 0.01 내지 0.3배인 경우 상기 대상체가 비알코올성 지방간 질환을 가지는 대상체로 결정되는 제5 단계를 포함하는,

대상체의 비알코올성 지방간 질환을 진단하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 추출한 DNA에 qPCR을 수행하여 베일로넬라 디스파(*Veillonella dispar*) 균주의 유전자 함량을 측정하는 단계는 서열번호 1 및 2로 나타나는 프라이머를 사용하여 수행되는, 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 진단하는 방법.

청구항 5

대상체로부터 혈액 샘플을 수집하는 제1 단계;

대상체로부터 수집한 혈액 샘플을 원심분리한 다음 펠렛을 수집하는 제2 단계;

수집한 펠렛으로부터 DNA를 추출하는 제3 단계;

추출한 DNA에 qPCR을 수행하여 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 함량을 측정하는 제4 단계; 및

대상체의 혈액 샘플로부터 측정된 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 발현량이 정상 대조군의 혈액 샘플로부터 측정된 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 발현량을 비교하여 대상체의 비알코올성 지방간 질환 보유 여부를 결정하는 단계로서,

상기 대상체의 혈액 샘플로부터 측정된 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 발현량이 정상 대조군의 혈액 샘플로부터 측정된 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 발현량을 기준으로 0.05 내지 0.2배인 경우 상기 대상체가 비알코올성 지방간 질환을 가지는 대상체로 결정되는 제5 단계를 포함하는,

대상체의 비알코올성 지방간 질환을 진단하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 추출한 DNA에 qPCR을 수행하여 베일로넬라 디스파(*Veillonella dispar*) 균주의 유전자 함량을 측정하는 단계는 서열번호 1 및 2로 나타나는 프라이머를 사용하여 수행되는, 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 진단하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 베일로넬라 디스파(*Veillonella dispar*) 균주를 이용한 비알코올성 지방간 진단 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 혈액 샘플에 존재하는 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 함량을 qPCR로 분석하여 비알코올성 지방간을 진단하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 마이크로바이옴(microbiome)이란 미생물(micro)와 생태계(biome)를 합친 용어로, 체내의 미생물 및 이러한 미생물의 유전정보를 의미한다. 체내에는 수많은 종류의 미생물이 존재하는데, 대부분의 마이크로바이옴은 장에 존재하며 건강에 영향을 미친다[de Vos, W.M.; Tilg, H.; Van Hul, M.; Cani, P.D. Gut microbiome and health: mechanistic insights. Gut 2022, 71, 1020-1032, doi:10.1136/gutjnl-2021-326789.]

[0003] 비알코올성 지방간 질환은 간질환의 일종으로, 우리나라 성인의 약 3~4명 중 1명은 비알코올성 지방간 질환을 가지고 있다고 할 수 있을 정도로 매우 흔한 간질환이며, 그 유병률이 점차 증가하고 있음에도 불구하고 아직까지 명확한 치료법이 제안되지 않았다. 비알코올성 지방간 질환은 음주자뿐만 아니라 금주자, 또는 술을 거의 마시지 않는 대상에게서도 관찰되는 질환으로, 술을 섭취하지 않아도 서구화된 식습관 및 비만을 비롯한 대사증후군 환자에게서 발견되며, 이러한 대사증후군 환자의 증가로 인해 비알코올성 지방간 환자 또한 지속적으로 증가하는 추세이다. 비알코올성 지방간 질환의 일부는 염증 반응과 간세포 괴사를 동반할 수 있으며, 간이 굳고 결절이 관찰되는 간경변증으로 진행될 수 있다.

[0004] 서구화된 식습관은 장내 미생물의 불균형(dysbiosis)을 초래한다. 장내 불균형은 장 상피의 투과성을 증가시키며, 이로 인한 장내 마이크로바이옴과 대사물질의 혈액을 통한 순환을 통해 마이크로바이옴의 변화에 영향을 미친다. 간은 모두 장-간축의 일부인 문맥을 통해 장-위장관 환경에 직접 연결되는데, 이를 바탕으로 간은 장내 미생물에 의해 형성된 다양한 대사물질들이 혈액을 통해 순환됨에 따라 마이크로바이옴의 변화에 영향을 준다 [Suppli, M.P.; Bagger, J.I.; Lelouvier, B.; Broha, A.; Demant, M.; Konig, M.J.; Strandberg, C.; Lund, A.; Vilsboll, T.; Knop, F.K. Hepatic microbiome in healthy lean and obese humans. JHEP Rep 2021, 3, 100299, doi:10.1016/j.jhepr.2021.100299.].

[0005] 비알코올성 지방간 질환에 대한 평가는 일반적인 생화학적 검사와 간 조직검사로 구분될 수 있다. 일반적인 생화학적 검사는 민감도 및 특이도가 높지 않고, 간 조직검사는 비용이 많이 들고 합병증이 발생할 가능성이 있기 때문에, 정확하고 안전한 비알코올성 지방간 질환에 대한 비침습적 진단 방법이 요구되고 있는 실정이다.

[0006] 본 발명에서는 비알코올성 지방간 질환으로 인해 발생하는 마이크로바이옴의 변화를 분석하여 높은 정확성과 민감도를 가지는 비알코올성 지방간 질환의 진단 방법에 대해 연구한 결과, 혈액 샘플 내에 존재하는 베일로넬라 디스파 균주의 함량을 측정하여 높은 민감도와 특이도를 가지면서도 간편한 비침습적 비알코올성 지방간 질환의 진단 방법을 도출하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 종래의 생화학적 검사 방식과 비교하여 높은 민감도 및 높은 특이도를 가지면서도, 종래의 간 조직검사와 비교하여 낮은 비용이 소요되면서도 합병증이 발생할 가능성이 거의 없는 비알코올성 지방간 질환의 비침습적 진단 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 보다 구체적으로는 본 발명은 대상체로부터 얻은 혈액 샘플에서 유전자를 추출한 다음 이에 대하여 qPCR을 수행하여, 정상 대조군으로부터 얻은 혈액 샘플로부터 추출한 유전자에 대하여 qPCR을 수행한 결과와 비교하여, 베일로넬라 디스파 균주의 함량의 차이를 비교하는 것을 통해, 상기 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 진단하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 본 발명이 해결하고자 하는 과제들은 이상에서 언급된 과제로 제한되는 것은 아니며, 언급되지 않은 본 발명이 해결하고자 하는 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술분야에서 보통의 지식을 가진 자(이하 “통상의 기술자”라 한다)에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 전술한 목적을 달성하기 위하여 제공되는 본 발명에 따른 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 진단하는 방법은,
- [0011] 대상체로부터 혈액 샘플을 수집하는 제1 단계;
- [0012] 대상체로부터 수집한 혈액 샘플을 원심분리한 다음 펠렛을 수집하는 제2 단계;
- [0013] 수집한 펠렛으로부터 DNA를 추출하는 제3 단계;
- [0014] 추출한 DNA에 서열번호 1 및 2로 나타나는 프라이머를 사용하여 qPCR을 수행하여 베일로넬라 디스파(Veillonella dispar) 균주의 유전자 함량을 측정하는 제4 단계; 및
- [0015] 대상체의 혈액 샘플로부터 측정한 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 발현량이 정상 대조군의 혈액 샘플로부터 측정한 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 발현량을 비교하여 대상체의 비알코올성 지방간 질환 보유 여부를 결정하는 제5 단계를 포함하는,
- [0016] 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 진단하는 방법일 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명에 따른 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 진단하는 방법은,
- [0018] 대상체로부터 혈액 샘플을 수집하는 제1 단계;
- [0019] 대상체로부터 수집한 혈액 샘플을 원심분리한 다음 펠렛을 수집하는 제2 단계;
- [0020] 수집한 펠렛으로부터 DNA를 추출하는 제3 단계;
- [0021] 추출한 DNA에 서열번호 1 및 2로 나타나는 프라이머를 사용하여 qPCR을 수행하여 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 함량을 측정하는 제4 단계; 및
- [0022] 대상체의 혈액 샘플로부터 측정한 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 발현량이 정상 대조군의 혈액 샘플로부터 측정한 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 발현량을 비교하여 대상체의 비알코올성 지방간 질환 보유 여부를 결정하는 단계로서,
- [0023] 상기 대상체의 혈액 샘플로부터 측정한 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 발현량이 정상 대조군의 혈액 샘플로부터 측정한 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 발현량을 기준으로 0.01 내지 0.3배인 경우 상기 대상체가 비알코올성 지방간 질환을 가지는 대상체로 결정되는 제5 단계를 포함하는,
- [0024] 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 진단하는 방법일 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명에 따른 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 진단하는 방법은,
- [0026] 대상체로부터 혈액 샘플을 수집하는 제1 단계;
- [0027] 대상체로부터 수집한 혈액 샘플을 원심분리한 다음 펠렛을 수집하는 제2 단계;

- [0028] 수집한 펠렛으로부터 DNA를 추출하는 제3 단계;
- [0029] 추출한 DNA에 서열번호 1 및 2로 나타나는 프라이머를 사용하여 qPCR을 수행하여 베일로넬라 디스와 균주의 유전자 함량을 측정하는 제4 단계; 및
- [0030] 대상체의 혈액 샘플로부터 측정된 베일로넬라 디스와 균주의 유전자 발현량이 정상 대조군의 혈액 샘플로부터 측정된 베일로넬라 디스와 균주의 유전자 발현량을 비교하여 대상체의 비알코올성 지방간 질환 보유 여부를 결정하는 단계로서,
- [0031] 상기 대상체의 혈액 샘플로부터 측정된 베일로넬라 디스와 균주의 유전자 발현량이 정상 대조군의 혈액 샘플로부터 측정된 베일로넬라 디스와 균주의 유전자 발현량을 기준으로 0.05 내지 0.2배인 경우 상기 대상체가 비알코올성 지방간 질환을 가지는 대상체로 결정되는 제5 단계를 포함하는,
- [0032] 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 진단하는 방법일 수 있다.

발명의 효과

- [0033] 본 발명에 의하면 대상체로부터 용이하게 획득할 수 있는 혈액 샘플을 이용하여 상기 혈액 샘플에 포함된 베일로넬라 디스와 균주의 유전자 함량을 qPCR을 사용하여 분석하는 것을 통해 비알코올성 지방간 질환을 진단할 수 있고, 비침습적 진단 방법으로서 상대적으로 저렴한 비용으로 제공되면서도 합병증의 위험이 적고, 높은 민감도와 특이도를 가지는 비알코올성 지방간 질환 진단 방법이 제공됨에 따라, 비알코올성 지방간 질환의 위험군을 조기에 진단 및 예측하는 효과를 가지므로, 비알코올성 지방간에 대한 예방과 진단에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1은, 대상체의 혈액 샘플로부터 측정된 베일로넬라 디스와 균주의 유전자 발현량과 정상 대조군의 혈액 샘플로부터 측정된 베일로넬라 디스와 균주의 유전자 발현량을 비교한 도면이다.
- 도 2는, 본 발명에서 사용된 서열번호 1 및 2로 나타나는 프라이머의 베일로넬라 디스와 균주에 대한 검증의 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 3은, 대상체(37명)의 혈액 샘플로부터 측정된 베일로넬라 디스와 균주의 유전자 발현량을 변수로 한 비알코올성 지방간 질환의 진단 모형을 나타낸 도면이다.
- 도 4는, 대상체(33명)의 혈액 샘플로부터 측정된 베일로넬라 디스와 균주의 유전자 발현량을 변수로 한 비알코올성 지방간 질환의 진단 모형을 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0035] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.
- [0036] 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통용되는 사전적 의미로 한정하여 해석되도록 의도된 것이 아니며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 보통의 지식을 가진 자(이하 '통상의 기술자')는 상기 용어 또는 단어를 본 명세서 및 특허청구범위가 자명하게 전달하고자 하는 관념을 표현하는 범위 내에서 본 발명이 의미하는 바를 전달하기 위한 범위의 의미로 사용된 것으로 명확하게 이해할 수 있을 것이다.
- [0037] 또한, 본 명세서에 기재된 실시예 및 상기 실시예에 기재된 구성들은 통상의 기술자에게 본 발명이 이해되고 또 이를 재현할 수 있도록 하기 위해 단지 예시로 제시된 바람직한 실시예에 불과할 뿐이고, 본 발명을 이에 한정시키고자 하는 의도가 아님을 통상의 기술자는 명확하게 이해할 수 있을 것이다.
- [0038] 또한, 본 명세서에서 기술되는 각각의 구성에 관한 설명 및 구체적인 실시 양태는 각각의 다른 설명 및 실시 양태에도 자명하게 적용될 수 있다. 즉, 본 명세서에서 개시되는 다양한 구성과 구체적인 실시 양태의 모든 조합은 본 발명이 개시하는 범위에 속하는 것으로 통상의 기술자는 명확하게 이해할 수 있을 것이다.
- [0039] 본 명세서에서 사용되는 용어 '및/또는'은, 언급된 항목들의 각각 및 하나 이상의 모든 조합을 포함하는 용어이다. 또한, 단수형 용어는 별도로 언급되지 않는 한 복수형도 포함한다.
- [0040] 본 명세서에서 사용하는 '포함한다(comprising)' 및/또는 '포함하는(comprising)'의 용어는 언급된 항목들 외의 다른 항목의 존재 또는 추가를 배제하지 않는 용어이다.
- [0041] 본 명세서에서 용어 '내지'를 사용하여 나타낸 수치 범위는, 상기 용어의 앞과 뒤에 기재된 값을 각각 하한

값과 상한 값으로서 포함하는 수치 범위를 나타낸다. 임의의 수치 범위의 상한과 하한으로서의 수치 값이 각각 복수 개로 개시된 경우, 본 명세서에서 개시하는 수치의 범위는 복수의 하한 값 중 임의의 하나의 값 및 복수의 상한 값 중 임의의 하나의 값을 각각 하한 값 및 상한 값으로 하는 임의의 수치의 범위로 이해될 수 있다.

[0042] 본 명세서에서 사용되는 용어 '약' 또는 '대략'은, 사용되는 경우, 상기 용어의 뒤에 기재된 값 또는 수치 범위의 10% 이내의 값 또는 수치 범위를 의미한다.

[0043] 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적인 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 안되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예에 기재된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고, 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0044] 한편, 본 명세서에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 명세서에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속하고, 일 구현예에서 생략된 기재는 다른 구현예에서 기재된 바와 같은 방식으로 해석될 수 있다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0045] 본 발명의 일 실시 양태에 따르면, 본 발명에 따른 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 진단하는 방법은,

[0046] 대상체로부터 혈액 샘플을 수집하는 제1 단계;

[0047] 대상체로부터 수집한 혈액 샘플을 원심분리한 다음 펠렛을 수집하는 제2 단계;

[0048] 수집한 펠렛으로부터 DNA를 추출하는 제3 단계;

[0049] 추출한 DNA에 서열번호 1 및 2로 나타나는 프라이머를 사용하여 qPCR을 수행하여 베일로넬라 디스파(Veillonella dispar) 균주의 유전자 함량을 측정하는 제4 단계; 및

[0050] 대상체의 혈액 샘플로부터 측정한 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 발현량이 정상 대조군의 혈액 샘플로부터 측정한 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 발현량을 비교하여 대상체의 비알코올성 지방간 질환 보유 여부를 결정하는 제5 단계를 포함하는,

[0051] 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 진단하는 방법일 수 있다.

[0052] 상기 서열번호 1 및 2은 다음 표 1에서와 같이 나타낼 수 있다.

표 1

[0053]	서열번호	서열
	1(Forward)	5' -AACGCGTTGAAATTCGTCATGAAC-3'
	2(Reverse)	5' -GTGTAACAAGGGAGTACGGACC-3'

[0054] 본 발명의 일 실시 양태에 따르면, 본 발명에 따른 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 진단하는 방법은,

[0055] 대상체로부터 혈액 샘플을 수집하는 제1 단계;

[0056] 대상체로부터 수집한 혈액 샘플을 원심분리한 다음 펠렛을 수집하는 제2 단계;

[0057] 수집한 펠렛으로부터 DNA를 추출하는 제3 단계;

[0058] 추출한 DNA에 서열번호 1 및 2로 나타나는 프라이머를 사용하여 qPCR을 수행하여 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 함량을 측정하는 제4 단계; 및

[0059] 대상체의 혈액 샘플로부터 측정한 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 발현량이 정상 대조군의 혈액 샘플로부터 측정한 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 발현량을 비교하여 대상체의 비알코올성 지방간 질환 보유 여부를 결정하는 단계로서,

[0060] 상기 대상체의 혈액 샘플로부터 측정한 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 발현량이 정상 대조군의 혈액 샘플로부터 측정한 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 발현량을 기준으로 0.01 내지 0.3배인 경우 상기 대상체가 비알

코올성 지방간 질환을 가지는 대상체로 결정되는 제5 단계를 포함하는,

[0061] 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 진단하는 방법일 수 있다.

[0062] 본 발명의 일 실시 양태에 따르면, 본 발명에 따른 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 진단하는 방법은,

[0063] 대상체로부터 혈액 샘플을 수집하는 제1 단계;

[0064] 대상체로부터 수집한 혈액 샘플을 원심분리한 다음 펠렛을 수집하는 제2 단계;

[0065] 수집한 펠렛으로부터 DNA를 추출하는 제3 단계;

[0066] 추출한 DNA에 서열번호 1 및 2로 나타나는 프라이머를 사용하여 qPCR을 수행하여 베일로넬라 디스카 균주의 유전자 함량을 측정하는 제4 단계; 및

[0067] 대상체의 혈액 샘플로부터 측정한 베일로넬라 디스카 균주의 유전자 발현량이 정상 대조군의 혈액 샘플로부터 측정한 베일로넬라 디스카 균주의 유전자 발현량을 비교하여 대상체의 비알코올성 지방간 질환 보유 여부를 결정하는 단계로서,

[0068] 상기 대상체의 혈액 샘플로부터 측정한 베일로넬라 디스카 균주의 유전자 발현량이 정상 대조군의 혈액 샘플로부터 측정한 베일로넬라 디스카 균주의 유전자 발현량을 기준으로 0.05 내지 0.2배인 경우 상기 대상체가 비알코올성 지방간 질환을 가지는 대상체로 결정되는 제5 단계를 포함하는,

[0069] 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 진단하는 방법일 수 있다.

[0070] 이하, 아래의 실시예를 사용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 통상의 기술자에게 자명하게 이해되어야 한다.

[0071] 실시예 1: 샘플의 수집

[0072] 비알코올성 지방간 질환의 증상이 없는 정상 대조군 13명과 비알코올성 지방간 질환 환자 37명을 대상체로서 선정하였다. 상기 비알코올성 지방간 질환 환자는 복부초음파 또는 CT 스캔을 통한 이미지 검사 및 간수치를 기준으로 평가되었고, 남성의 경우 평균적으로 7일 동안 소주 1병 이상, 여성의 경우 평균적으로 7일 동안 소주 2/3병 이상을 섭취하지 않는 환자 중에서 선택되었으며, 바이러스성 간질환, 자가면역성 간질환, 및 간암이 없는 환자 중에서 선택되었다. 또한 상기 대상체는 비알코올성 지방간염 질환을 가지지 않는 대상체로서, 비알코올성 지방간 질환을 가지는 경우 혈액 샘플 내 간수치(AST 및 ALT)가 45 이상 상승한 경우는 비알코올성 지방간염 질환을 가지는 것으로 보고 제외하였다. 상기 정상 대조군 및 대상체 각각으로부터 혈액 샘플을 수집하였다.

[0073] 실시예 2: 혈액 샘플로부터 DNA의 추출

[0074] 수집된 혈액 샘플 각각으로부터 DNA를 추출하기 위해 1.5mL 튜브에 500마이크로리터의 혈액을 넣고 1mL의 RBC lysis 버퍼로 10분간 처리하였다. 이후 15도씨에서 5분간 500 X g로 원심분리를 수행하였다. 이후 원심분리한 튜브에서 상등액을 제거하고 펠렛을 취했다. 펠렛이 상등액과 명확하게 구분되지 않는 경우 진술한 원심분리를 1회 추가로 실시하였다. 취한 펠렛에 25mM의 NaOH와 0.2mM EDTA로 조성된 버퍼를 100마이크로리터를 가한 다음 98도씨에서 60분간 가열한 다음 방치하여 15도씨로 냉각하였다. 이후 40mM 트리스-HCl(pH 5.5) 용액 100마이크로리터를 가하고 4,000rpm에서 5분간 원심분리를 수행하였다. 이후 얻어진 상등액을 나노드롭(nanodrop)을 이용하여 DNA의 양을 1000ng/100마이크로리터로 정량하였다. 상기 정상 대조군 및 대상체 각각으로부터 수집한 혈액 샘플 모두에 대해 반복하였다.

[0075] 실시예 3: 추출한 DNA를 사용한 qPCR 분석

[0076] 추출한 DNA에 서열번호 1 및 2로 나타나는 프라이머를 사용하여 qPCR을 사용한 후, 상대 정량법으로 정상 대조군 및 대상체 군을 비교하였다. 각 웰(well) 당 DNA 템플릿 10마이크로리터, 프라이머 10pmol, 2x PowerUP™ SYBR™ Green Master MIX 10마이크로리터를 사용하여 총 22마이크로리터로 반응시켰다. 이때 PCR 조건은 초기 50도씨에서 12분, 이후 95도씨에서 4분 반응시킨 후, 순차적으로 95도씨에서 15초, 58도씨에서 20초, 및 72도씨에서 1분으로 이루어지는 사이클을 40회 반복하였다. 상대 정량시 각 검체의 bacterial universal 16S rDNA 시퀀스로 보정(normalization)하였으며, 보정값에 대해 정상 대조군과 비알코올성 지방간 질환을 가진 대상체 군의 각 평균값(±표준오차)을 t-test 검정을 통해 비교하였다. 그 결과를 다음 표 2에 나타내었다.

표 2

	정상대조군	비알코올성 지방간
평균값(±표준오차)	18.03±7.57	2.04±0.78

[0077]

[0078]

그 결과 정상 대조군 및 대상체 군으로부터 수집한 혈액 샘플에서 분리한 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 함량의 현저한 차이가 관측되었다. 상기 결과를 통해 진단하고자 하는 대상의 혈액 샘플에서 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 함량을 측정하고 이를 정상 대조군의 혈액 샘플에서 측정한 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 함량과 비교하는 것을 통해 대상체를 비알코올성 지방간 질환을 가지는 대상체로 진단할 수 있음을 확인하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0079]

실시예 4: 프라이머의 1차 특이성 검증

[0080]

서열번호 1 및 2로 나타나는 프라이머가 베일로넬라 디스파 균주에 대하여 잘 증폭되는지 확인하였다. 확인 결과 본 발명에서 사용된 서열번호 1 및 2로 나타나는 프라이머는 베일로넬라 디스파 균주에 대하여만 증폭되었으며, 정확한 증폭산물 크기를 형성함을 확인하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0081]

실시예 5: 혈액 내의 베일로넬라 디스파 균주 유전자 분석을 통한 진단 방법 개발

[0082]

상기 실시예 3에서 확인한 결과를 바탕으로, 대상체의 혈액 샘플에서 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 함량을 확인하여 정상 대조군과 비교하는 것을 통해 비알코올성 지방간 질환을 진단할 수 있음을 확인하였다. 이를 구체화하기 위하여 실시예 3에서 확인한 qPCR 결과를 바탕으로 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 함량을 변수로 하여 로지스틱 방법을 통해 비알코올성 지방간 질환 진단 모형을 제작하였다.

[0083]

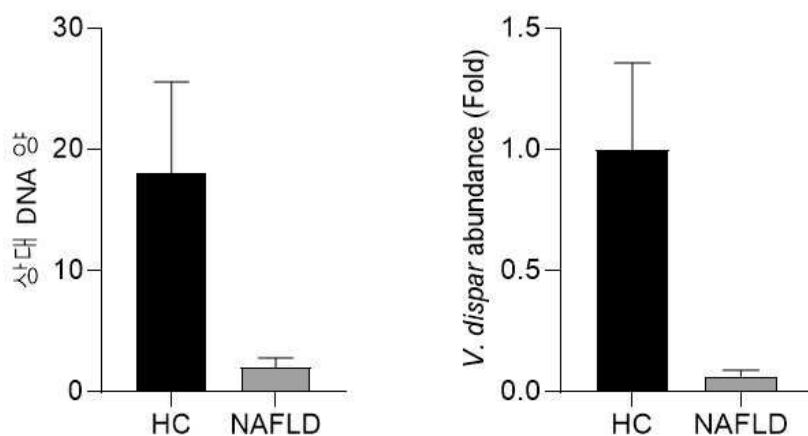
그 결과 진단적 유용성의 지표인 AUC(Area Under Curve)가 0.793으로 관찰되었으며(도 3 참조), 관측된 데이터 범위에서 벗어난 순위 중 1 내지 4 순위에 해당하는 대상체를 제외한 경우 AUC가 0.877까지 증가함이 관찰되었다(도 4 참조).

[0084]

이를 바탕으로, 본 발명에 따른 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 진단하는 모형을 이용하여 대상체로부터 수집한 혈액 샘플로부터 추출한 DNA를 qPCR을 통해 측정한 베일로넬라 디스파 균주의 유전자 발현량을 변수로 하여 진단하는 경우, 진단 정확성이 매우 높으면서도 간편하고 안전한 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 진단 방법으로서 사용될 수 있음이 확인되었다.

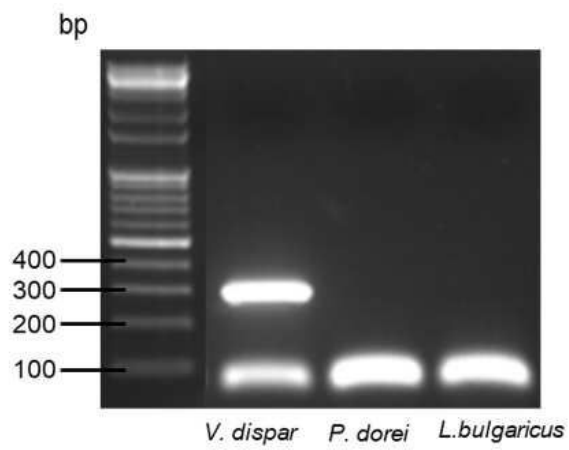
도면

도면1



HC: 정상대조군 NAFLD: 비알코올성 지방간

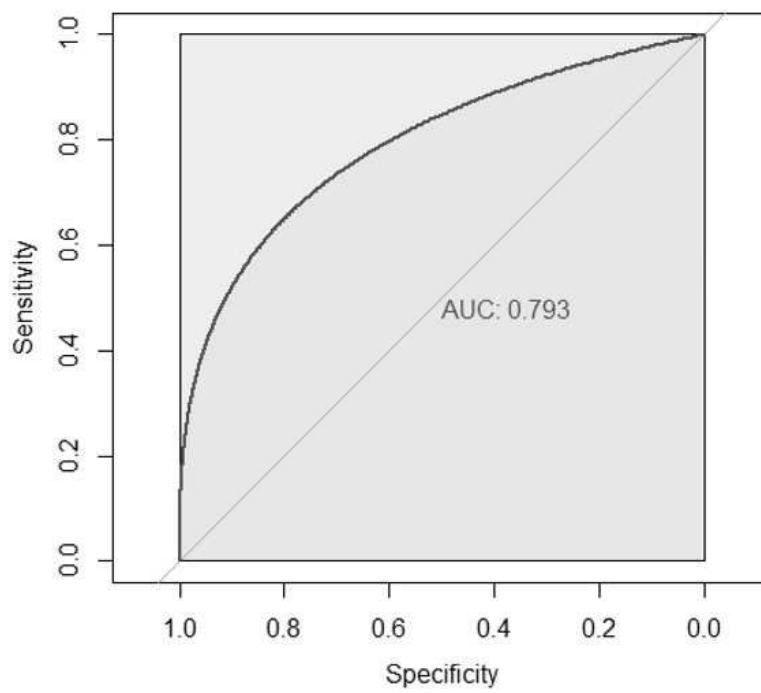
도면2



▶ Product size

Veillonella dispar: 312bp

도면3



도면4

