



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0154618
(43) 공개일자 2022년11월22일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-0054344</p> <p>(22) 출원일자 2022년05월02일
심사청구일자 2022년05월02일</p> <p>(30) 우선권주장
1020210061734 2021년05월13일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)</p> <p>(72) 발명자
이영선
서울특별시 강남구 연주로 110, 1동 605호 (개포동, 강남아파트)</p> <p>김정안
경기도 군포시 공단로 356-54, 1동 2701호 (산본동)
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
특허법인 무한</p> |
|--|---|

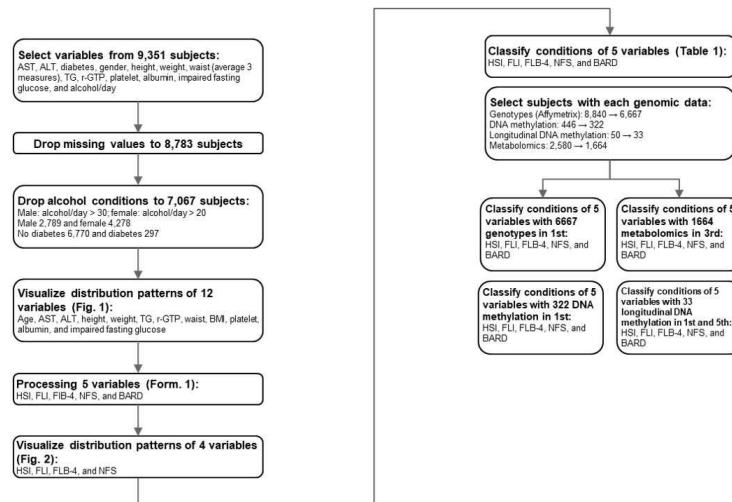
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **대규모 코호트 유래 전장 유전체 연관 분석 및 DNA 메틸화 분석을 이용한 간 섬유화 진단용 바이오마커 조성물**

(57) 요약

본 발명은 대규모 코호트 유래 전장 유전체 연관 분석 및 DNA 메틸화 분석을 이용한 간 섬유화 진단용 바이오마커 조성물 등에 관한 것으로서, 비알코올 지방간 질환으로부터 간 섬유화가 발생 또는 진행에 있어서 특이적인 DNA 메틸화 패턴을 확인하고, 유전자 데이터에 대한 기계학습 및 코호트 분석 결과를 활용하여 상기 패턴을 설명하는 주요 바이오마커를 발굴함으로써, 간 섬유화를 진단할 수 있으며, 나아가 효과적인 치료제가 없는 간 섬유화의 신규 치료 타겟을 개발함으로써 환자의 예후를 호전시키고, 신약 개발을 통한 경제적 효과를 기대할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/154 (2013.01)

(72) 발명자

방수민

서울특별시 영등포구 당산로45길 7-3, 101동 707호
(당산동5가, 반도보라빌)

고영경

서울특별시 양천구 화곡로4길 27, 101동 501호 (신
월동, 대근아트빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711130161
과제번호	2021R1C1C100944511
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(이공)우수신진연구
연구과제명	진행성 간암환자의 전신치료 반응 예측인자 및 치료 타겟 발굴과 검증
기 여 율	1/2
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345320184
과제번호	2020R1I1A1A0105270112
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	창의도전연구기반지원
연구과제명	만성질환 환자의 유전체와 역학 정보 기반 질병 관리 모델 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

유전자의 CpG 부위를 포함하는, 간 섬유화 진단용 바이오마커 조성물로서,

상기 유전자는 *AGAP1*, *AGPAT9*, *AKR1C2*, *ANKRD36B*, *AOAH*, *APOA5*, *BAZ2B*, *C10orf46*, *CCL4L2*, *DKFZp686A1627*, *FAM189A1*, *FARS2*, *HCN3*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRB1*, *HLA-DRB5*, *HLA-DRB6*, *HOPX*, *IGSF21*, *IL17RA*, *IL8RBP*, *LMF1*, *LOC222699*, *LPHN3*, *LSM5*, *MGAT5B*, *MMEL1*, *MMP27*, *MYH11*, *NCAPH*, *NCF4*, *NDRG1*, *NEDD4L*, *NFASC*, *OPRD1*, *OR10K1*, *PCSK6*, *PPAPDC1A*, *PTPRN2*, *PVT1*, *RNASE4*, *SLC47A2*, *SLIT3*, *SMYD3*, *SNORD115-29*, *TANC1*, *TGFB3*, *TM2D2*, *VSX2*, *WDR8*, *XRCC2*, *ZFYVE28*, *ZNF492*, 및 *ZNF573*로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 바이오마커 조성물.

청구항 2

유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 간 섬유화 진단용 조성물로서,

상기 유전자는 *AGAP1*, *AGPAT9*, *AKR1C2*, *ANKRD36B*, *AOAH*, *APOA5*, *BAZ2B*, *C10orf46*, *CCL4L2*, *DKFZp686A1627*, *FAM189A1*, *FARS2*, *HCN3*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRB1*, *HLA-DRB5*, *HLA-DRB6*, *HOPX*, *IGSF21*, *IL17RA*, *IL8RBP*, *LMF1*, *LOC222699*, *LPHN3*, *LSM5*, *MGAT5B*, *MMEL1*, *MMP27*, *MYH11*, *NCAPH*, *NCF4*, *NDRG1*, *NEDD4L*, *NFASC*, *OPRD1*, *OR10K1*, *PCSK6*, *PPAPDC1A*, *PTPRN2*, *PVT1*, *RNASE4*, *SLC47A2*, *SLIT3*, *SMYD3*, *SNORD115-29*, *TANC1*, *TGFB3*, *TM2D2*, *VSX2*, *WDR8*, *XRCC2*, *ZFYVE28*, *ZNF492*, 및 *ZNF573*로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제는, 바이설파이트(bisulfite) 또는 이의 염, 메틸화 민감성 제한효소, 상기 유전자의 CpG 부위의 메틸화된 서열에 특이적인 프라이머, 비메틸화된 서열에 특이적인 프라이머, 메틸화된 CpG 결합 도메인, 또는 메틸사이토신에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 4

제2항의 조성물을 포함하는, 간 섬유화 진단용 키트.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 키트는 *AGAP1*, *AGPAT9*, *AKR1C2*, *ANKRD36B*, *AOAH*, *APOA5*, *BAZ2B*, *C10orf46*, *CCL4L2*, *DKFZp686A1627*, *FAM189A1*, *FARS2*, *HCN3*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRB1*, *HLA-DRB5*, *HLA-DRB6*, *HOPX*, *IGSF21*, *IL17RA*, *IL8RBP*, *LMF1*, *LOC222699*, *LPHN3*, *LSM5*, *MGAT5B*, *MMEL1*, *MMP27*, *MYH11*, *NCAPH*, *NCF4*, *NDRG1*, *NEDD4L*, *NFASC*, *OPRD1*, *OR10K1*, *PCSK6*, *PPAPDC1A*, *PTPRN2*, *PVT1*, *RNASE4*, *SLC47A2*, *SLIT3*, *SMYD3*, *SNORD115-29*, *TANC1*, *TGFB3*, *TM2D2*, *VSX2*, *WDR8*, *XRCC2*, *ZFYVE28*, *ZNF492*, 및 *ZNF573*로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 각각에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트, 및 핵산 증폭용 시약을 포함하는, 키트.

청구항 6

하기 단계를 포함하는 간 섬유화 진단을 위한 정보제공방법:

(a) 간 섬유화가 의심되는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 DNA를 분리하는 단계;

(b) 상기 분리된 DNA에서 *AGAP1*, *AGPAT9*, *AKR1C2*, *ANKRD36B*, *AOAH*, *APOA5*, *BAZ2B*, *C10orf46*, *CCL4L2*, *DKFZp686A1627*, *FAM189A1*, *FARS2*, *HCN3*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRB1*, *HLA-DRB5*, *HLA-DRB6*, *HOPX*, *IGSF21*, *IL17RA*, *IL8RBP*, *LMF1*, *LOC222699*, *LPHN3*, *LSM5*, *MGAT5B*, *MMEL1*, *MMP27*, *MYH11*, *NCAPH*, *NCF4*, *NDRG1*, *NEDD4L*, *NFASC*, *OPRD1*, *OR10K1*, *PCSK6*, *PPAPDC1A*, *PTPRN2*, *PVT1*, *RNASE4*, *SLC47A2*, *SLIT3*, *SMYD3*, *SNORD115-29*, *TANC1*, *TGFB3*, *TM2D2*, *VSX2*, *WDR8*, *XRCC2*, *ZFYVE28*, *ZNF492*, 및 *ZNF573*로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 정상 대조군의 동일 유전체 상 영역의 CpG 부위의 메틸화 수준과 비교하는 단계.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 (a) 단계는 FIB-4(fibrosis-4), NFS(NAFLD fibrosis score), BARD, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 지표를 통해 간 섬유화가 의심되는 개체인지 여부를 결정하는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 (a) 단계는 HSI(hepatic steatosis index) 또는 FLI(fatty liver index)의 지표를 통해 비알코올 지방간 질환이 의심되는 개체인지 여부를 결정한 후, 간 섬유화가 의심되는 개체인지 여부를 결정하는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 간 섬유화 의심 환자 유래의 조직, 객담, 세포, 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 점액, 타액, 눈물, 척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액, 기도액, 장액, 비뇨생식관액, 모유, 림프계 체액, 정액, 뇌척수액, 기관계내 체액, 복수, 낭성 종양 체액, 양수액 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 정보제공방법.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 메틸화 수준의 측정은 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR), 메틸화 특이 PCR(methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR(real time methylation specific PCR), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 정량 PCR, DNA 칩, 파이로시퀀싱 및 바이셀파이트시퀀싱으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 11

제6항에 있어서,

상기 (c) 단계 이후, *AGAP1*, *AKR1C2*, *ANKRD36B*, *BAZ2B*, *C10orf46*, *CCL4L2*, *DKFZp686A1627*, *FARS2*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRB1*, *IGSF21*, *IL17RA*, *IL8RBP*, *LOC222699*, *LSM5*, *MGAT5B*, *MYH11*, *NCAPH*, *NCF4*, *NDRG1*, *NFASC*, *OR10K1*, *PCSK6*, *PPAPDC1A*, *SLC47A2*, *SLIT3*, *SMYD3*, *TANC1*, *TM2D2*, *VSX2*, *ZFYVE28*, *ZNF492*, 및 *ZNF573*로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자에서 측정된 메틸화 수준이 정상 대조군에서 측정된 발현 수준에 비해 증가한 경우, 상기 개체는 간 섬유화에 걸리거나 간 섬유화에 걸릴 확률이 높은 것으로 결정하는 단계를 추가적으로 포함하는, 정보제공방법.

청구항 12

제6항에 있어서,

상기 (c) 단계 이후, *AGPAT9*, *AOAH*, *APOA5*, *FAM189A1*, *HCN3*, *HLA-DRB5*, *HLA-DRB6*, *HOPX*, *LMF1*, *LPHN3*, *MMEL1*, *MMP27*, *NEDD4L*, *OPRD1*, *PTPRN2*, *PVT1*, *RNASE4*, *SNORD115-29*, *TGFB3*, *WDR8*, 및 *XRCC2*로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자에서 측정된 메틸화 수준이 정상 대조군에서 측정된 발현 수준에 비해 감소한 경우, 상기 개체는 간 섬유화에 걸리거나 간 섬유화에 걸릴 확률이 높은 것으로 결정하는 단계를 추가적으로 포함하는, 정보제공방법.

청구항 13

하기 단계를 포함하는 간 섬유화 예방 또는 치료용 약제의 스크리닝 방법:

(a) 간 섬유화가 의심되는 개체에 후보물질을 처리하고, *AGAP1*, *AGPAT9*, *AKR1C2*, *ANKRD36B*, *AOAH*, *APOA5*, *BAZ2B*, *C10orf46*, *CCL4L2*, *DKFZp686A1627*, *FAM189A1*, *FARS2*, *HCN3*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRB1*, *HLA-DRB5*, *HLA-DRB6*, *HOPX*, *IGSF21*, *IL17RA*, *IL8RBP*, *LMF1*, *LOC222699*, *LPHN3*, *LSM5*, *MGAT5B*, *MMEL1*, *MMP27*, *MYH11*, *NCAPH*, *NCF4*, *NDRG1*, *NEDD4L*, *NFASC*, *OPRD1*, *OR10K1*, *PCSK6*, *PPAPDC1A*, *PTPRN2*, *PVT1*, *RNASE4*, *SLC47A2*, *SLIT3*, *SMYD3*, *SNORD115-29*, *TANC1*, *TGFB3*, *TM2D2*, *VSX2*, *WDR8*, *XRCC2*, *ZFYVE28*, *ZNF492*, 및 *ZNF573*로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준의 변화를 확인하여, 상기 후보물질을 간 섬유화 예방 또는 치료용 약제로 선정하는 단계.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 (b) 단계는 *AGAP1*, *AKR1C2*, *ANKRD36B*, *BAZ2B*, *C10orf46*, *CCL4L2*, *DKFZp686A1627*, *FARS2*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRB1*, *IGSF21*, *IL17RA*, *IL8RBP*, *LOC222699*, *LSM5*, *MGAT5B*, *MYH11*, *NCAPH*, *NCF4*, *NDRG1*, *NFASC*, *OR10K1*, *PCSK6*, *PPAPDC1A*, *SLC47A2*, *SLIT3*, *SMYD3*, *TANC1*, *TM2D2*, *VSX2*, *ZFYVE28*, *ZNF492*, 및 *ZNF573*로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자에서 측정된 메틸화 수준이 감소하는 경우, 상기 후보물질을 간 섬유화 예방 또는 치료용 약제로 선정하는 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 (b) 단계는 *AGPAT9*, *AOAH*, *APOA5*, *FAM189A1*, *HCN3*, *HLA-DRB5*, *HLA-DRB6*, *HOPX*, *LMF1*, *LPHN3*, *MMEL1*, *MMP27*, *NEDD4L*, *OPRD1*, *PTPRN2*, *PVT1*, *RNASE4*, *SNORD115-29*, *TGFB3*, *WDR8*, 및 *XRCC2*로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자에서 측정된 메틸화 수준이 증가하는 경우, 상기 후보물질을 간 섬유화 예방 또

는 치료용 약제로 선정하는 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 대규모 코호트 유래 전장 유전체 연관 분석 및 DNA 메틸화 분석을 이용한 간 섬유화 진단용 바이오마커 조성물 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 질병과 관련된 인자의 신뢰성과 재현성을 확보하기 위해, 보다 많은 수의 대상자로부터 질병 관련 생활습관과 유전형을 발굴하는 것은 중요하다. 대상자를 늘리기 위해서는 개별 연구자 또는 연구기관에서 주도하기 어렵고, 이미 구축된 유전정보 및 역학정보를 포함하는 코호트(cohort)를 활용할 수 있다.

[0004] 코호트는 각 참여자별로 유전정보 및 역학정보를 포함하고 있는데, 유전정보에 해당되는 유전형(genotype) 정보는 참여자 당 범주형 변수로서 25만개, DNA 메틸화 정보는 참여자당 연속형 변수로서 45만개가 존재한다. 역학 정보는 설문지에 대한 답변자료 및, 혈액 또는 체액(소변 등)을 기반으로 병원의 진단검사의학과 검사실에서 확보한 검사자료로 이루어져 있으며, 참여자당 범주형 또는 연속형 변수로서 2,000여개가 존재한다.

[0005] 코호트 내 참여자 수는 약 10,000명 정도로, 상기 유전정보 및 역학정보는 빅데이터로서 적절히 프로세싱할 수 있는 기법이 필요하다.

[0007] 비알코올 지방간 질환(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 전세계적으로 유병률이 증가하고 있고, 우리나라도 전체 인구의 30% 내외가 비알코올 지방간 질환을 가지고 있다고 보고되고 있다. 비알코올 지방간 질환을 가지고 있는 사람은 전체 사망률 및 간질환에 의한 사망률이 증가하는 것으로 알려져 있다. 전장 유전체 분석과 DNA 메틸화를 이용한 분석은 질병의 발생과 진행을 예측할 수 있는 좋은 분석 도구이지만 많은 환자에서 시행하기에는 어려움이 있다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 기존에 보유하고 있는 한국인유전체역학조사사업(Korean genome and epidemiology study; KoGES)의 전장 유전체 분석과 DNA 메틸화 데이터를 이용하여 간 섬유화를 진단하는 바이오마커와 이를 치료할 수 있는 치료 타겟을 발굴하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 유전자의 CpG 부위를 포함하는 비알코올 지방간 질환, 바람직하게는 간 섬유화 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는 간 섬유화 진단용 조성물 및 키트를 제공하는 것이다.

[0012] 또한, 본 발명의 다른 목적은 간 섬유화 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

[0013] 또한, 본 발명의 다른 목적은 간 섬유화 예방 또는 치료용 약제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 또한, 본 발명의 다른 목적은 간 섬유화 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 또한, 본 발명의 다른 목적은 간 섬유화 진단용 바이오마커의 선별 방법을 제공하는 것이다.

[0016] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0018] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 유전자의 CpG 부위를 포함하는 간 섬유화 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 유전자는 *AGAP1*, *AGPAT9*, *AKR1C2*, *ANKRD36B*, *AOAH*, *APOA5*, *BAZ2B*, *C10orf46*, *CCL4L2*, *DKFZp686A1627*, *FAM189A1*, *FARS2*, *HCN3*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRB1*, *HLA-DRB5*, *HLA-DRB6*, *HOPX*, *IGSF21*, *IL17RA*, *IL8RBP*, *LMF1*, *LOC222699*, *LPHN3*, *LSM5*, *MGAT5B*, *MMEL1*, *MMP27*, *MYH11*, *NCAPH*, *NCF4*, *NDRG1*, *NEDD4L*, *NFASC*, *OPRD1*, *OR10K1*, *PCSK6*, *PPAPDC1A*, *PTPRN2*, *PVT1*, *RNASE4*, *SLC47A2*, *SLIT3*, *SMYD3*, *SNORD115-29*, *TANC1*, *TGFB3*, *TM2D2*, *VSX2*, *WDR8*, *XRCC2*, *ZFYVE28*, *ZNF492*, 및 *ZNF573*로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 유전자의 CpG 부위는 사이토신에서 메틸화가 일어나는 것일 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명은 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 체제를 포함하는 간 섬유화 진단용 조성물 및 키트를 제공한다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 유전자는 *AGAP1*, *AGPAT9*, *AKR1C2*, *ANKRD36B*, *AOAH*, *APOA5*, *BAZ2B*, *C10orf46*, *CCL4L2*, *DKFZp686A1627*, *FAM189A1*, *FARS2*, *HCN3*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRB1*, *HLA-DRB5*, *HLA-DRB6*, *HOPX*, *IGSF21*, *IL17RA*, *IL8RBP*, *LMF1*, *LOC222699*, *LPHN3*, *LSM5*, *MGAT5B*, *MMEL1*, *MMP27*, *MYH11*, *NCAPH*, *NCF4*, *NDRG1*, *NEDD4L*, *NFASC*, *OPRD1*, *OR10K1*, *PCSK6*, *PPAPDC1A*, *PTPRN2*, *PVT1*, *RNASE4*, *SLC47A2*, *SLIT3*, *SMYD3*, *SNORD115-29*, *TANC1*, *TGFB3*, *TM2D2*, *VSX2*, *WDR8*, *XRCC2*, *ZFYVE28*, *ZNF492*, 및 *ZNF573*로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 체제는, 바이설파이트(bisulfite) 또는 이의 염, 메틸화 민감성 제한효소, 상기 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화된 서열에 특이적인 프라이머, 비메틸화된 서열에 특이적인 프라이머, 메틸화된 CpG 결합 도메인, 또는 메틸사이토신에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 것일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 키트는 상기 유전자 각각에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트, 및 핵산 증폭용 시약을 포함하는 것일 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 간 섬유화 진단방법 또는 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0028] (a) 간 섬유화가 의심되는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 DNA를 분리하는 단계;
- [0029] (b) 상기 분리된 DNA에서 *AGAP1*, *AGPAT9*, *AKR1C2*, *ANKRD36B*, *AOAH*, *APOA5*, *BAZ2B*, *C10orf46*, *CCL4L2*, *DKFZp686A1627*, *FAM189A1*, *FARS2*, *HCN3*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRB1*, *HLA-DRB5*, *HLA-DRB6*, *HOPX*, *IGSF21*, *IL17RA*, *IL8RBP*, *LMF1*, *LOC222699*, *LPHN3*, *LSM5*, *MGAT5B*, *MMEL1*, *MMP27*, *MYH11*, *NCAPH*, *NCF4*, *NDRG1*, *NEDD4L*, *NFASC*, *OPRD1*, *OR10K1*, *PCSK6*, *PPAPDC1A*, *PTPRN2*, *PVT1*, *RNASE4*, *SLC47A2*, *SLIT3*, *SMYD3*, *SNORD115-29*, *TANC1*, *TGFB3*, *TM2D2*, *VSX2*, *WDR8*, *XRCC2*, *ZFYVE28*, *ZNF492*, 및 *ZNF573*로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및
- [0030] (c) 상기 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 당뇨족부궤양이 재발하지 않은 대조군의 동일 유전체 상 영역의 CpG 부위 메틸화 수준과 비교하는 단계.
- [0031] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 (a) 단계는 FIB-4(fibrosis-4), NFS(NAFLD fibrosis score), BARD, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 지표를 통해 간 섬유화가 의심되는 개체인지 여부를 결정하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 HSI(hepatic steatosis index) 또는 FLI(fatty liver index)의 지표를 통해 비알코올 지방간 질환(NAFLD)이 의심되는 개체인지 여부를 결정한 후, 간 섬유화가 의심되는 개체인지 여부를 결정하는 것일 수 있다. 이 때, HSI가 36 이상인 경우 또는 FLI가 60 이상인 경우, 비알코올 지방간 질환이 예측되는 것으로 보고, FLB-4가 1.45 이상인 경우, NFS가 -1.455 이상인 경우, 또는 BARD가 2 이상인 경우, 간 섬유화가 진행된 것으로 볼 수 있다.

- [0032] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 생물학적 시료는 간 섬유화 의심 환자 유래의 조직, 객담, 세포, 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 점액, 타액, 눈물, 척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액, 기도액, 장액, 비뇨생식관액, 모유, 림프계 체액, 정액, 뇌척수액, 기관계내 체액, 복수, 낭성 종양 체액, 양수액 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 메틸화 수준의 측정은 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR), 메틸화 특이 PCR(methylation specific PCR), 실시간 메틸화 특이 PCR(real time methylation specific PCR), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 정량 PCR, DNA 칩, 파이로시퀀싱 및 바이셀파이트시퀀싱으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상에 의해 수행되는 것일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 (c) 단계 이후, *AGAP1*, *AKR1C2*, *ANKRD36B*, *BAZ2B*, *C10orf46*, *CCL4L2*, *DKFZp686A1627*, *FARS2*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRB1*, *IGSF21*, *IL17RA*, *IL8RBP*, *LOC222699*, *LSM5*, *MGAT5B*, *MYH11*, *NCAPH*, *NCF4*, *NDRG1*, *NFASC*, *OR10K1*, *PCSK6*, *PPAPDC1A*, *SLC47A2*, *SLIT3*, *SMYD3*, *TANC1*, *TM2D2*, *VSX2*, *ZFYVE28*, *ZNF492*, 및 *ZNF573*로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자에서 측정된 메틸화 수준이 정상 대조군에서 측정된 발현 수준에 비해 증가하거나, *AGPAT9*, *AOAH*, *APOA5*, *FAM189A1*, *HCN3*, *HLA-DRB5*, *HLA-DRB6*, *HOPX*, *LMF1*, *LPHN3*, *MMEL1*, *MMP27*, *NEDD4L*, *OPRD1*, *PTPRN2*, *PVT1*, *RNASE4*, *SNORD115-29*, *TGFB3*, *WDR8*, 및 *XRCC2*로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자에서 측정된 메틸화 수준이 정상 대조군에서 측정된 발현 수준에 비해 감소한 경우, 상기 개체는 간 섬유화에 걸리거나 간 섬유화에 걸릴 확률이 높은 것으로 결정하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 간 섬유화 예방 또는 치료용 약제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0037] (a) 간 섬유화가 의심되는 개체에 후보물질을 처리하고, *AGAP1*, *AGPAT9*, *AKR1C2*, *ANKRD36B*, *AOAH*, *APOA5*, *BAZ2B*, *C10orf46*, *CCL4L2*, *DKFZp686A1627*, *FAM189A1*, *FARS2*, *HCN3*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRB1*, *HLA-DRB5*, *HLA-DRB6*, *HOPX*, *IGSF21*, *IL17RA*, *IL8RBP*, *LMF1*, *LOC222699*, *LPHN3*, *LSM5*, *MGAT5B*, *MMEL1*, *MMP27*, *MYH11*, *NCAPH*, *NCF4*, *NDRG1*, *NEDD4L*, *NFASC*, *OPRD1*, *OR10K1*, *PCSK6*, *PPAPDC1A*, *PTPRN2*, *PVT1*, *RNASE4*, *SLC47A2*, *SLIT3*, *SMYD3*, *SNORD115-29*, *TANC1*, *TGFB3*, *TM2D2*, *VSX2*, *WDR8*, *XRCC2*, *ZFYVE28*, *ZNF492*, 및 *ZNF573*로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및
- [0038] (b) 상기 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준의 변화를 확인하여, 상기 후보물질을 간 섬유화 예방 또는 치료용 약제로 선정하는 단계.
- [0039] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 (b) 단계는 *AGAP1*, *AKR1C2*, *ANKRD36B*, *BAZ2B*, *C10orf46*, *CCL4L2*, *DKFZp686A1627*, *FARS2*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRB1*, *IGSF21*, *IL17RA*, *IL8RBP*, *LOC222699*, *LSM5*, *MGAT5B*, *MYH11*, *NCAPH*, *NCF4*, *NDRG1*, *NFASC*, *OR10K1*, *PCSK6*, *PPAPDC1A*, *SLC47A2*, *SLIT3*, *SMYD3*, *TANC1*, *TM2D2*, *VSX2*, *ZFYVE28*, *ZNF492*, 및 *ZNF573*로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자에서 측정된 메틸화 수준이 감소하거나, *AGPAT9*, *AOAH*, *APOA5*, *FAM189A1*, *HCN3*, *HLA-DRB5*, *HLA-DRB6*, *HOPX*, *LMF1*, *LPHN3*, *MMEL1*, *MMP27*, *NEDD4L*, *OPRD1*, *PTPRN2*, *PVT1*, *RNASE4*, *SNORD115-29*, *TGFB3*, *WDR8*, 및 *XRCC2*로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자에서 측정된 메틸화 수준이 증가하는 경우, 상기 후보물질을 간 섬유화 예방 또는 치료용 약제로 선정하는 것일 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명은 *AGAP1*, *AGPAT9*, *AKR1C2*, *ANKRD36B*, *AOAH*, *APOA5*, *BAZ2B*, *C10orf46*, *CCL4L2*, *DKFZp686A1627*, *FAM189A1*, *FARS2*, *HCN3*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRB1*, *HLA-DRB5*, *HLA-DRB6*, *HOPX*, *IGSF21*, *IL17RA*, *IL8RBP*, *LMF1*, *LOC222699*, *LPHN3*, *LSM5*, *MGAT5B*, *MMEL1*, *MMP27*, *MYH11*, *NCAPH*, *NCF4*, *NDRG1*, *NEDD4L*, *NFASC*, *OPRD1*, *OR10K1*, *PCSK6*, *PPAPDC1A*, *PTPRN2*, *PVT1*, *RNASE4*, *SLC47A2*, *SLIT3*, *SMYD3*, *SNORD115-29*, *TANC1*, *TGFB3*, *TM2D2*, *VSX2*, *WDR8*, *XRCC2*, *ZFYVE28*, *ZNF492*, 및 *ZNF573*로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 변화시키는 제제를 포함하는, 간 섬유화 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0042] 또한, 상기 제제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 간 섬유화 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0043] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 제제는 *AGAP1*, *AKR1C2*, *ANKRD36B*, *BAZ2B*, *C10orf46*, *CCL4L2*, *DKFZp686A1627*, *FARS2*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRB1*, *IGSF21*, *IL17RA*, *IL8RBP*, *LOC222699*, *LSM5*, *MGAT5B*, *MYH11*, *NCAPH*,

NCF4, *NDRG1*, *NFASC*, *OR10K1*, *PCSK6*, *PPAPDC1A*, *SLC47A2*, *SLIT3*, *SMYD3*, *TANC1*, *TM2D2*, *VSX2*, *ZFYVE28*, *ZNF492*, 및 *ZNF573*로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자에서 측정된 메틸화 수준을 감소시키거나, *AGPAT9*, *AOAH*, *APOA5*, *FAM189A1*, *HCN3*, *HLA-DRB5*, *HLA-DRB6*, *HOPX*, *LMF1*, *LPHN3*, *MME11*, *MMP27*, *NEDD4L*, *OPRD1*, *PTPRN2*, *PVT1*, *RNASE4*, *SNORD115-29*, *TGFB3*, *WDR8*, 및 *XRCC2*로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자에서 측정된 메틸화 수준을 증가시키는 것일 수 있다.

- [0045] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 간 섬유화 진단용 바이오마커의 선별 방법을 제공한다.
- [0046] (a) HSI(hepatic steatosis index) 또는 FLI(fatty liver index)의 지표를 통해 비알코올 지방간 질환이 의심되는 개체인지 여부를 결정하는 단계;
- [0047] (b) FIB-4(fibrosis-4), NFS(NAFLD fibrosis score), BARD, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 지표를 통해 간 섬유화가 의심되는 개체인지 여부를 결정하는 단계;
- [0048] (c) 상기 간 섬유화가 의심되는 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 DNA를 분리하는 단계;
- [0049] (d) 상기 분리된 DNA로부터 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 획득하는 단계; 및
- [0050] (e) 상기 메틸화 수준을 바탕으로 간 섬유화와 관련이 있는 유전자를 선별하는 단계.

발명의 효과

- [0052] 본 발명은 대규모 코호트 유래 전장 유전체 연관 분석 및 DNA 메틸화 분석을 이용한 간 섬유화 진단용 바이오마커 조성물 등에 관한 것으로서, 비알코올 지방간 질환으로부터 간 섬유화가 발생 또는 진행에 있어서 특이적인 DNA 메틸화 패턴을 확인하고, 유전자 데이터에 대한 기계학습 및 코호트 분석 결과를 활용하여 상기 패턴을 설명하는 주요 바이오마커를 발굴함으로써, 간 섬유화를 진단할 수 있으며, 나아가 효과적인 치료제가 없는 간 섬유화의 신규 치료 타겟을 개발함으로써 환자의 예후를 호전시키고, 신약 개발을 통한 경제적 효과를 기대할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 효과는 이상에서 언급된 것들에 한정되지 않으며, 언급되지 아니한 다른 효과들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0055] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 진행 순서를 나타내는 모식도이다.
- 도 2는 FLI, HSI, FIB-4, NFS 4개의 변수를 기준으로 정상군과 비알코올 지방간 질환 환자군에서 각각 특이적으로 갖고 있는 유전형을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 FLI, HSI, FIB-4, NFS, BARD 5개의 연속형 변수의 증감과 관련된 유전형을 발굴하기 위해, linear regression을 수행한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4 및 5는 HSI 및 FIB-4를 기준으로 간 섬유화와 관련하여 DNA 메틸화 수준에 차이가 있는 유전자들을 heatmap으로 나타낸 것이다.
- 도 6 및 7은 HSI 및 NFS를 기준으로 간 섬유화와 관련하여 DNA 메틸화 수준에 차이가 있는 유전자들을 heatmap으로 나타낸 것이다.
- 도 8 및 9는 FLI 및 FIB-4를 기준으로 간 섬유화와 관련하여 DNA 메틸화 수준에 차이가 있는 유전자들을 heatmap으로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0056] 본 발명은 대규모 코호트 유래 전장 유전체 연관 분석 및 DNA 메틸화 분석을 이용한 간 섬유화 진단용 바이오마커 조성물 등에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 한국인유전체역학조사사업(Korean genome and epidemiology study; KoGES)의 안성-안산 코호트로부터 수집한 전장 유전체를 대상으로 한 유전형과 DNA 메틸화 양상을 역학

정보와 기계학습 및 통계적 기법을 활용하여, 비알코올 지방간 질환 환자 중 간 섬유화가 진행된 환자들을 분류하여 간 섬유화를 진단하기 위한 바이오마커를 발굴하였다. 상기 바이오마커는 간 섬유화 치료를 위한 타겟으로 활용될 수 있다.

[0057] 본 발명의 코호트 유래 모든 참여자의 유전정보와 역학정보는 질병관리청으로부터 적법하게 분양받았고, 분양을 위해 고려대학교 기관생명윤리위원회의 승인을 받았다.

[0058] 보다 구체적으로, R과 Python을 주요 분석 언어로 사용했으며, Python의 Scikit-learn library를 활용하여, 유전정보와 역학정보 데이터의 연관성, 상관관계를 분석하고, 상기 결과를 시각화하였다. 또한 R의 biocouductor, ggplot2, circlize library를 활용하여 통계분석 및 시각화를 수행하였다. 이 때, R에서 data.table package의 fread 함수를 써서 빅데이터에 해당하는 참여자별 유전정보 및 역학정보를 dataframe 형태로 불러왔다.

[0059] 추후 R과 Python을 이용하여, Decision tree, random forest, neural network, SVM, PCA, t-SNE, LASSO 등의 통계적 기법 또는 기계학습 기법을 적용하고, 이를 통해 참여자의 역학정보를 바탕으로 하여 질병과 관련이 있을 것으로 예측되는 인자들을 탐지하고 발굴하였다.

[0060] 연구 도구로는 기존에 보유하고 있는 분석용 서버 컴퓨터를 활용했으며, Python 구동 시 Google Colab platform을 활용했다.

[0062] 이에, 본 발명은 유전자의 CpG 부위를 포함하는 간 섬유화 진단용 바이오마커, 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는 간 섬유화 진단용 조성물 및 키트 등을 제공한다.

[0064] 본 발명에서, 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 개체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 개체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 개체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다.

[0066] 본 발명에서 용어, “메틸화” 또는 “메틸레이션”은 DNA를 구성하는 염기에 메틸기가 부착되는 것을 말한다. 바람직하게, 본 발명에서 메틸화 여부는 특정 유전자 프로모터의 CpG 부위의 사이토신에서 일어나는 메틸화 여부를 의미한다. 메틸화가 일어난 경우 그로 인하여 전사인자의 결합이 방해받게 되어 특정 유전자의 발현이 억제되며, 반대로, 비메틸화 또는 저메틸화가 일어나는 경우 특정 유전자의 발현이 증가하게 된다.

[0067] 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 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.

[0068] 본 발명에서 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 바이셀과이트 시퀀싱과 같은 자동염기분석 등의 방법으로 측정하거나, DNA 메틸레이션 마이크로레이, 또는 메틸화된 CpG 결합 도메인 또는 항-메틸사이토신 항체를 이용한 면역침강법 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0069] 본 발명에서, “유전자의 CpG 부위”란, 유전자의 DNA 상에 존재하는 CpG 부위를 말한다. 유전자의 DNA는, 유전자가 발현하는데 필요하며 서로 작동가능하게 연결되어 있는 일련의 구성 단위를 모두 포함하는 개념으로, 예를 들어, 프로모터 영역, 단백질 코딩 영역(open reading frame, ORF) 및 터미네이터 영역을 포함한다. 따라서, 유전자의 CpG 부위는 해당 유전자의 프로모터 영역, 단백질 코딩 영역(open reading frame, ORF) 또는 터미네이터 영역 등에 존재할 수 있다.

[0070] 본 발명에서, “CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제”는 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소, 유전자의 메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머, 비메틸화된 대립형질 서열

에 특이적인 프라이머, 메틸화된 CpG 결합 도메인, 또는 메틸화 DNA에 특이적으로 결합하는 메틸화 DNA 항체(예를 들어, 메틸사이토신에 특이적으로 결합하는 항체) 등을 포함할 수 있다.

- [0071] 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.
- [0072] 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.
- [0073] 개체의 유전자의 특정 CpG 부위에서의 메틸화 수준을 측정하는 대표적인 일 예로서, 환자의 시료에서 게놈 DNA를 추출하고, 추출한 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.
- [0074] 따라서, 본 발명의 체계는 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 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 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.
- [0075] 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.
- [0076] 한편, 본 발명에서 "메틸화 DNA 항체"란, DNA 중의 메틸화된 염기에 특이적으로 결합하는 항체를 말한다. 구체적으로는, 메틸사이토신에 대한 항체와 같이, DNA 사슬 중 메틸화된 사이토신을 인식하여 결합하는 성질을 가진 항체를 들 수 있다. 또한, 시판되고 있는 메틸화 DNA 항체 중에서, 본원에 기재된 메틸화 상태의 DNA를 특이적으로 인식하여 특이적으로 결합할 수 있는 항체일 수 있다.
- [0077] 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.
- [0078] 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 ABTS(2,2'-아지노-비스-(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘)가 사용될 수 있고, 그 외 방사성 동위원소 표지, 라텍스 비드 표지, 콜로이드 표지, 비오틴 표지 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0079] 상기 조성물 및 키트에는 상기 체계 이외에도, 중합효소 아가로스, 전기영동에 필요한 완충용액 등이 추가로 포함될 수 있다. 또한, 상기 키트는 DNA 메틸화 마이크로어레이 형태로 구현될 수 있다.
- [0080] 본 발명에 있어서, 용어 "프로브"는, 표적 핵산과 부분적으로 또는 완전히 상보적인 핵산 가닥으로서, 표적 핵

산과 염기 특이적인 방식으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드이다. 바람직하게는, 표적 핵산에 완전 상보적인 올리고뉴클레오타이드이다. 상기 프로브는 핵산뿐만 아니라, 펩티드 핵산을 포함한 상보적 결합을 할 수 있는 종래 알려진 임의의 핵산 유도체가 포함된다.

[0082] 또한, 본 발명은 간 섬유화가 의심되는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하는 간 섬유화 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0083] 본 발명에서, 용어 “생물학적 시료”는 조직, 객담, 세포, 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 점액, 타액, 눈물, 척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액, 기도액, 장액, 비뇨생식관액, 모유, 림프계 체액, 정액, 뇌척수액, 기관계 내 체액, 복수, 낭성 종양 체액, 양수액 및 이들의 조합 등일 수 있으며, 바람직하게는 혈액, 혈장, 또는 혈청 일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. “개체”는 쥐, 가축, 인간 등 포유류일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다.

[0085] 또한, 본 발명은 간 섬유화가 의심되는 개체에 후보물질을 처리하고, 유전자의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하는 간 섬유화 예방 또는 치료용 약제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0086] 상기 후보물질은 유전자의 CpG 부위의 메틸화를 촉진하거나 억제하는 것일 수 있으며, siRNA, aptamer, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 화합물 등일 수 있으나, 메틸화를 조절하는 물질이라면 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0088] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안 된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, “포함하다” 또는 “가지다” 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0089] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0090] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0092] 실시예 1. 코호트 분석 및 DNA 메틸화 패턴 확인을 통한 바이오마커 발굴

[0093] 비알코올 지방간 질환 및 간 섬유화 여부를 확인하기 위해 코호트 내 총 9,351명의 참여자를 대상으로 결측치를 제외하고, 알코올 섭취량이 일정 수준 이상인 참여자(남성은 30/day, 여성은 20/day)를 제외하고, 12개의 변수(Age, AST(aspartate amino-transferase), ALT(alanine amino-transferase), height, weight, TG(triglyceride), r-GTP, waist, BMI, platelet, albumin, 및 impaired fasting glucose)를 선정하였다. 또한, 5개의 변수(HSI(hepatic steatosis index), FLI(fatty liver index), FIB-4(fibrosis-4), NFS(NAFLD fibrosis score), 및 BARD)를 확보하였다.

[0094] 상기 5개의 변수별로 참여자들을 분류하였으며, 각 변수를 잘 설명하는 유전형(genotype)을 PLINK를 통해 확보하고, 유전체 영역별로 유의성을 Manhattan plot 형태로 나타내었다. 각 변수를 잘 설명하는 DNA 메틸화 패턴을 확인하기 위하여 두 군간 DNA 메틸화 수준이 통계적으로 유의하게 차이나는 인자들을 추출하였다. 이 때, t-test를 통해 p-value와 두 군간 DNA 메틸화 수준의 평균 차이인 fold change를 기준으로 통계적으로 유의미한 결과를 도출하였다(도 1).

[0096] 실시예 2. 지방간, 섬유화와 관련된 유전자의 유전형 확인

[0097] FLI, HSI, FIB-4, NFS 4개의 변수를 활용하여, 각 변수별 조건에 따라 참여자를 크게 세 그룹(0 : 분석대상이 아닌 경우(수치가 intermediate이거나 결측치인 경우), 1 : 수치가 정상 범위인 경우, 2 : 수치가 질병 범위인 경우)으로 나누었다.

[0098] FLI를 기준으로, 정상과 질병 참여자들 각각 특이적으로 갖고 있는 유전형을 확인했을 때, 염색체 12번에서 유의하게 차이나는 인자가 보이거나 p-value가 1×10^{-8} 이하에 도달하지 못하였다.

[0099] HSI를 기준으로, 정상과 질병 참여자들 각각 특이적으로 갖고 있는 유전형을 확인했을 때, XG 및 CD99의 인트론에 위치한 유전자 내 유전형으로 밝혀졌다. 즉, 비알코올 지방간 질환 환자군에서 XG 및 CD99 유전자가 많이 발견되었다고 볼 수 있다(표 1).

표 1

[0100]

SNP	BP	A1	F_A	F_U	A2	CHISQ	P	OR	rs No	Gene symbol
SNP_A-4207757	2699575	C	0.443	0.2651	T	36.16	1.82E-09	2.205	rs311150	XG
SNP_A-4261588	1829262	G	0.1707	0.05391	C	34.55	4.16E-09	3.613		
SNP_A-4207871	800985	T	0.1902	0.07317	C	31.53	1.96E-08	2.975	rs5988299	
SNP_A-4207886	657628	T	0.2239	0.09231	C	31.17	2.36E-08	2.837	rs4911921	
SNP_A-4261502	2017013	T	0.2876	0.1433	A	30.51	3.32E-08	2.413	rs7473962	
SNP_A-4207813	2668316	A	0.1451	0.0419	C	29.86	4.65E-08	3.883	rs312258	CD99

[0102] FLI와 FIB-4를 기준으로, 정상과 질병 참여자들 각각 특이적으로 갖고 있는 유전형들을 확인했을 때, p-value가 1×10^{-8} 이하에 도달한 유전형은 발굴되지 않았다.

[0103] HSI와 FIB-4를 기준으로, 정상과 질병 참여자들 각각 특이적으로 갖고 있는 유전형들을 확인했을 때, p-value가 1×10^{-8} 이하에 도달한 유전형은 발굴되지 않았다.

[0104] FLI와 NFS를 기준으로, 정상과 질병 참여자들 각각 특이적으로 갖고 있는 유전형들을 확인했을 때, p-value가 1×10^{-8} 이하에 도달한 유전형은 발굴되지 않았다.

[0105] HSI와 NFS를 기준으로, 정상과 질병 참여자들 각각 특이적으로 갖고 있는 유전형들을 확인했을 때, p-value가 1×10^{-8} 이하에 도달한 유전형은 발굴되지 않았다(도 2).

[0107] 또한, FLI, HSI, FIB-4, NFS, BARD 5개의 연속형 변수를 활용하여, 상기 연속형 변수의 증감과 관련된 유전형을 발굴하기 위해, linear regression을 수행하였다.

[0108] FLI의 증감과 관련된 유전형이 염색체 12번에서 1개가 발굴되었으며, 나머지 변수에서는 p-value가 1×10^{-8} 이하에 도달한 유전형이 없었다(도 3).

[0110] 실시예 3. 지방간, 섬유화와 관련된 유전자의 DNA 메틸화 수준 확인

[0111] HSI가 36 이상인 129개의 subject 중, FIB-4가 1.45 이상인 32개의 subject를 high group으로 분류하고, 1.45

미만인 97개의 subject를 low group으로 분류하였다. 즉, high group은 지방간으로 인하여 섬유화가 진행된 군이고, low group은 지방간이 예측되는 환자이나 간 섬유화가 진행되지 않은 군으로 볼 수 있다.

[0112] 양 군간 t-test 분석을 수행한 결과, DNA 메틸화 수준의 차이(fold change)는 평균적으로 0.1 이상이였으며, 이중 p-value가 0.05 이하(위; 23개) 또는 0.01 이하(아래; 6개)로 차이나는 유전자들에 대해 heatmap을 통해 시각화하였다. Column annotation bar에서 high group은 주황색, low group은 파란색으로 표시하였으며, Row annotation bar에서 두 군간 유의할수록 검은색, high group에서 메틸화가 많이 될수록 빨간색, low group에서 메틸화가 많이 될수록 파란색으로 표시하였다. Column clustering을 활성화하여, 두 group의 clustering pattern을 확인하였다(도 4 및 5).

[0113] 그 결과, p-value가 0.05이하이며, fold change의 절댓값이 0.1 이상인 유전자는 AGAP1, AGPAT9, AKR1C2, AOA5, APOA5, BAZ2B, C10orf46, DKFZp686A1627, FAM189A1, HLA-DQA1, HOPX, IL8RBP, MGAT5B, MMP27, NDRG1, NEDD4L, OR10K1, PVT1, SMYD3, VSX2, XRCC2, ZFYVE28, ZNF573였으며, p-value가 0.01이하이고, fold change의 절댓값이 0.1 이상인 유전자는 APOA5, FAM189A1, HOPX, OR10K1, SMYD3, VSX2였다(표 2).

표 2

[0114]

유전자	Full name	Fold change	p-value	메틸화 (high group에서)
AGAP1	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 1	0.121921642	0.041088874	과메틸
AGPAT9	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9	-0.117180445	0.023473138	저메틸
AKR1C2	Aldo-Keto Reductase Family 1 Member C2	0.123936167	0.038173098	과메틸
AOA5	Acyloxyacyl Hydrolase	-0.158718577	0.008811741	저메틸
APOA5	Apolipoprotein A5 gene	-0.105426258	0.021050924	저메틸
BAZ2B	Bromodomain Adjacent to Zinc Finger Domain 2B	0.126904603	0.041320087	과메틸
C10orf46	CDK2 associated cullin domain 1	0.109992739	0.039076042	과메틸
DKFZp686A1627	PHD finger protein 2 pseudogene 1	0.123005841	0.017834692	과메틸
FAM189A1	family with sequence similarity 189 member A1	-0.105027126	0.008898292	저메틸
HLA-DQA1	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	0.110331038	0.043867945	과메틸
HOPX	HOP homeobox	-0.117288471	0.003699896	저메틸
IL8RBP	C-X-C motif chemokine receptor 2 pseudogene 1	0.12368828	0.033779128	과메틸
MGAT5B	alpha-1,6-mannosylglycoprotein 6-beta-N-acetylglucosaminyltransferase B	0.112522914	0.02860389	과메틸
MMP27	matrix metalloproteinase 27	-0.105426258	0.021050924	저메틸
NDRG1	N-myc downstream regulated 1	0.123005841	0.017834692	과메틸
NEDD4L	NEDD4 like E3 ubiquitin protein ligase	-0.105027126	0.008898292	저메틸
OR10K1	olfactory receptor family 10 subfamily K member 1	0.110331038	0.043867945	과메틸
PVT1	Pvt1 oncogene	-0.109385848	0.032115387	저메틸
SMYD3	SET and MYND domain containing 3	0.12368828	0.033779128	과메틸
VSX2	visual system homeobox 2	0.112522914	0.02860389	과메틸
XRCC2	X-ray repair cross complementing 2	-0.105426258	0.021050924	저메틸
ZFYVE28	zinc finger FYVE-type containing 28	0.126904603	0.041320087	과메틸
ZNF573	zinc finger protein 573	0.114709428	0.008650738	과메틸

[0116] HSI가 36 이상인 129개의 subject 중, NFS가 -1.455 이상인 32개의 subject를 high group으로 분류하고, -1.455 미만인 97개의 subject를 low group으로 분류하였다. 즉, high group은 지방간으로 인하여 섬유화가 진행된 군이고, low group은 지방간이 예측되는 환자이나 간 섬유화가 진행되지 않은 군으로 볼 수 있다.

[0117] 양 군간 t-test 분석을 수행한 결과, DNA 메틸화 수준의 차이(fold change)는 평균적으로 0.1 이상이였으며, p-value가 0.05 이하(위; 18개) 또는 0.01 이하(아래; 6개)로 차이나는 유전자들에 대해 heatmap을 통해 시각화하였다. Column annotation bar에서 high group은 주황색, low group은 파란색으로 표시하였으며, Row annotation bar에서 두 군간 유의할수록 검은색, high group에서 메틸화가 많이 될수록 빨간색, low group에서 메틸화가 많이 될수록 파란색으로 표시하였다. Column clustering을 활성화하여, 두 group의 clustering pattern을 확인하였다(도 6 및 7).

[0118] 그 결과, p-value가 0.05이하이며, fold change의 절댓값이 0.1 이상인 유전자는 AKR1C2, C10orf46, FAM189A1, FARS2, HCN3, IL17RA, MMP27, MYH11, NCF4, NEDD4L, NFASC, PCSK6, RNASE4, SLC47A2, SLIT3, VSX2, WDR8, ZNF492였으며, p-value가 0.01이하이고, fold change의 절댓값이 0.1 이상인 유전자는 AKR1C2, FAM189A1, HCN3, MYH11, NCF4, WDR8였다(표 3).

표 3

유전자	Full name	Fold change	p-value	메틸화 (high group에서)
AKR1C2	Aldo-Keto Reductase Family 1 Member C2	0.123936167	0.038173098	과메틸
C10orf46	CDK2 associated cullin domain 1	0.109992739	0.039076042	과메틸
FAM189A1	family with sequence similarity 189 member A1	-0.105027126	0.008898292	저메틸
FARS2	phenylalanyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	0.102762664	0.012661764	과메틸
HCN3	hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 3	-0.124287041	0.013695892	저메틸
IL17RA	interleukin 17 receptor A	0.115000146	0.046269955	과메틸
MMP27	matrix metalloproteinase 27	-0.105426258	0.021050924	저메틸
MYH11	myosin heavy chain 11	0.126904603	0.041320087	과메틸
NCF4	neutrophil cytosolic factor 4	0.114709428	0.008650738	과메틸
NEDD4L	NEDD4 like E3 ubiquitin protein ligase	-0.105027126	0.008898292	저메틸
NFASC	neurofascin	0.102762664	0.012661764	과메틸
PCSK6	proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	0.118353366	0.046846469	과메틸
RNASE4	ribonuclease A family member 4	-0.117288471	0.003699896	저메틸
SLC47A2	solute carrier family 47 member 2	0.128767418	0.005272194	과메틸
SLIT3	slit guidance ligand 3	0.115000146	0.046269955	과메틸
VSX2	visual system homeobox 2	0.112522914	0.02860389	과메틸
WDR8	WD repeat containing, antisense to TP73	-0.158718577	0.008811741	저메틸
ZNF492	zinc finger protein 492	0.109992739	0.039076042	과메틸

[0121] FLI가 60 이상인 116개의 subject 중, FIB-4가 1.45 이상인 17개의 subject를 high group으로 분류하고, 1.45 미만인 99개의 subject를 low group으로 분류하였다. 즉, high group은 지방간으로 인하여 섬유화가 진행된 군이고, low group은 지방간이 예측되는 환자이나 간 섬유화가 진행되지 않은 군으로 볼 수 있다.

[0122] 양 군간 t-test 분석을 수행한 결과, DNA 메틸화 수준의 차이(fold change)는 평균적으로 0.1 이상이였으며, p-value가 0.05 이하(위; 23개) 또는 0.01 이하(아래; 4개)로 차이나는 유전자들에 대해 heatmap을 통해 시각화하

였다. Column annotation bar에서 high group은 주황색, low group은 파란색으로 표시하였으며, Row annotation bar에서 두 군간 유의할수록 검은색, high group에서 메틸화가 많이 될수록 빨간색, low group에서 메틸화가 많이 될수록 파란색으로 표시하였다. Column clustering을 활성화하여, 두 group의 clustering pattern을 확인하였다(도 8 및 9).

[0123]

그 결과, p-value가 0.05이하이며, fold change의 절댓값이 0.1 이상인 유전자는 ANKRD36B, AOA, CCL4L2, FARS2, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRB1, HLA-DRB5, HLA-DRB6, IGSF21, LMF1, LOC222699, LPHN3, LSM5, MMEL1, NCAPH, OPRD1, PPAPDC1A, PTPRN2, SNORD115-29, TANC1, TGFB3, TM2D2였으며, p-value가 0.01이하이고, fold change의 절댓값이 0.1 이상인 유전자는 ANKRD36B, HLA-DQA1, LPHN3, PTPRN2였다(표 4).

표 4

[0124]

유전자	Full name	Fold change	p-value	메틸화 (high group에서)
ANKRD36B	Ankyrin Repeat Domain 36B	0.112522914	0.02860389	과메틸
AOAH	Acyloxyacyl Hydrolase	-0.158718577	0.008811741	저메틸
CCL4L2	C-C motif chemokine ligand 4 like 2	0.114709428	0.008650738	과메틸
FARS2	phenylalanyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	0.102762664	0.012661764	과메틸
HLA-DQA1	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	0.110331038	0.043867945	과메틸
HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	0.11835366	0.046846469	과메틸
HLA-DRB1	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1	0.116367319	0.028481293	과메틸
HLA-DRB5	major histocompatibility complex, class II, DR beta 5	-0.174863874	0.000762873	저메틸
HLA-DRB6	major histocompatibility complex, class II, DR beta 6	-0.109385848	0.032115387	저메틸
IGSF21	immunoglobulin superfamily member 21	0.128767418	0.005272194	과메틸
LMF1	lipase maturation factor 1	-0.107390059	0.030400445	저메틸
LOC222699	transducer of ERBB2, 2 pseudogene 1	0.121921642	0.041088874	과메틸
LPHN3	adhesion G protein-coupled receptor L3	-0.117180445	0.023473138	저메틸
LSM5	LSM5 homolog, U6 small nuclear RNA and mRNA degradation associated	0.123936167	0.038173098	과메틸
MMEL1	membrane metalloendopeptidase like 1	-0.158718577	0.008811741	저메틸
NCAPH	non-SMC condensin I complex subunit H	0.109992739	0.039076042	과메틸
OPRD1	opioid receptor delta 1	-0.124287041	0.013695892	저메틸
PPAPDC1A	phospholipid phosphatase 4	0.116367319	0.028481293	과메틸
PTPRN2	protein tyrosine phosphatase receptor type N2	-0.174863874	0.000762873	저메틸
SNORD115-29	small nucleolar RNA, C/D box 115-29	-0.107390059	0.030400445	저메틸
TANC1	tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 1	0.121921642	0.041088874	과메틸
TGFB3	transforming growth factor beta 3	-0.117180445	0.023473138	저메틸
TM2D2	TM2 domain containing 2	0.123936167	0.038173098	과메틸

[0126]

따라서, AGAP1, AGPAT9, AKR1C2, ANKRD36B, AOA, APOA5, BAZ2B, C10orf46, CCL4L2, DKFZp686A1627, FAM189A1, FARS2, HCN3, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRB1, HLA-DRB5, HLA-DRB6, HOPX, IGSF21, IL17RA, IL8RBP,

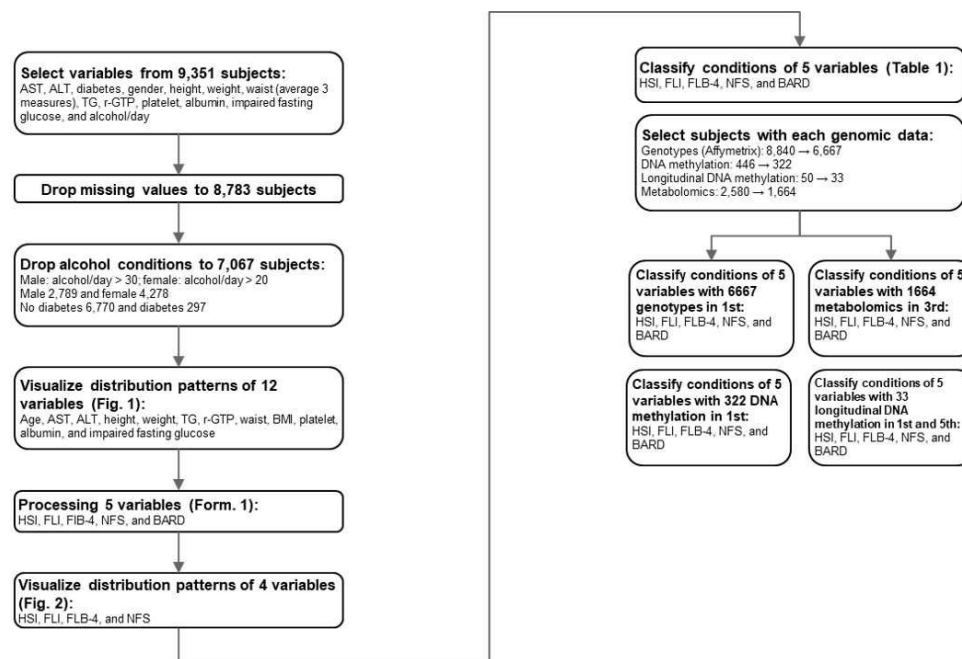
LMF1, LOC222699, LPHN3, LSM5, MGAT5B, MMEL1, MMP27, MYH11, NCAPH, NCF4, NDRG1, NEDD4L, NFASC, OPRD1, OR10K1, PCSK6, PPAPDC1A, PTPRN2, PVT1, RNASE4, SLC47A2, SLIT3, SMYD3, SNORD115-29, TANC1, TGFB3, TM2D2, VSX2, WDR8, XRCC2, ZFYVE28, ZNF492, 및 ZNF573로 유전자는 비알코올 지방간 질환 환자 중 간 섬유화가 진행된 환자군에서 특이적인 메틸화 패턴을 나타내므로, 간 섬유화 진단용 바이오마커 등으로 활용될 수 있다.

[0128] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

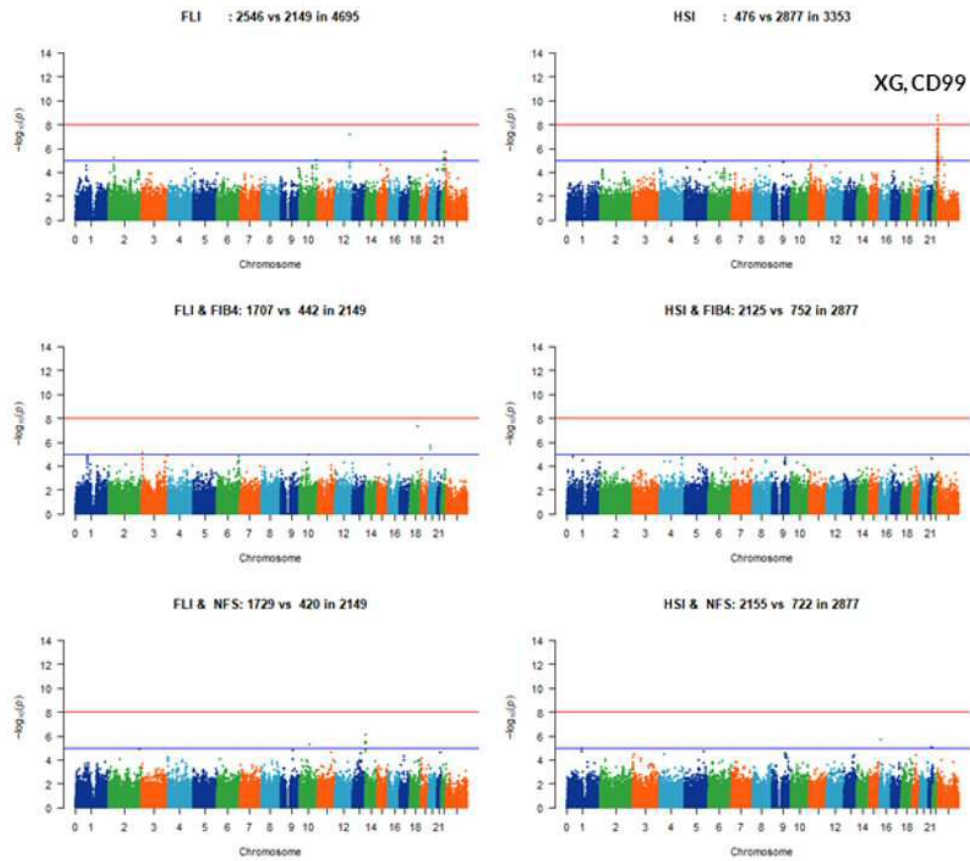
[0129] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

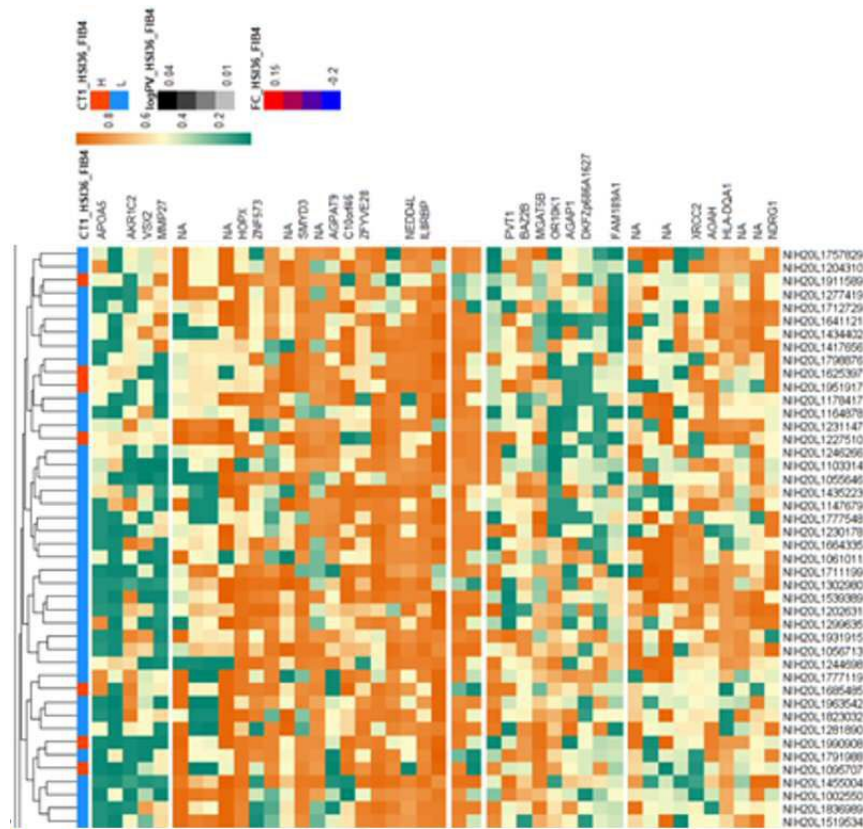
도면1



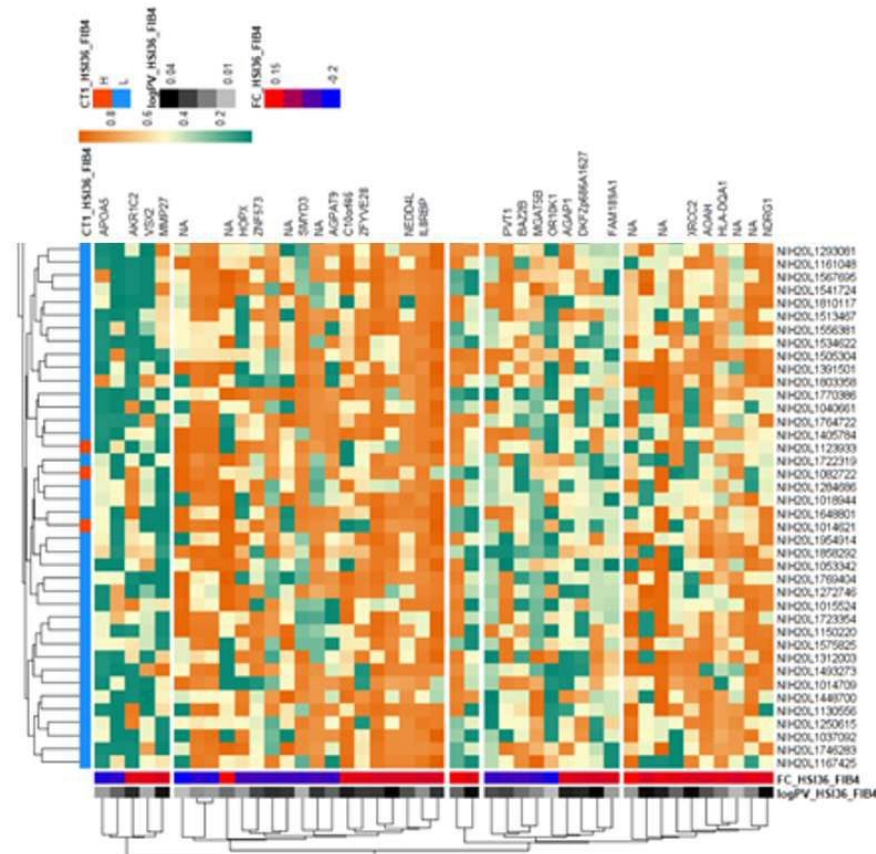
도면2



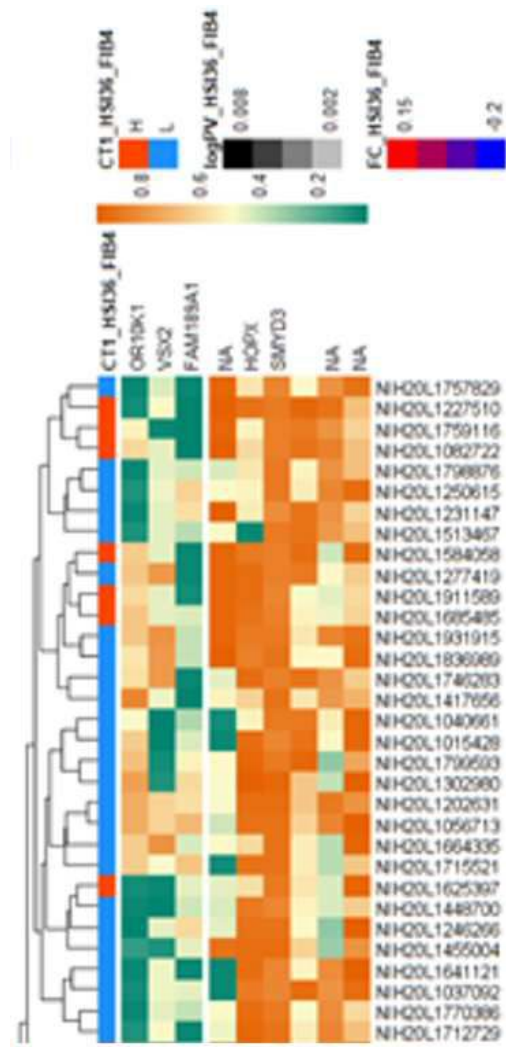
도면4b



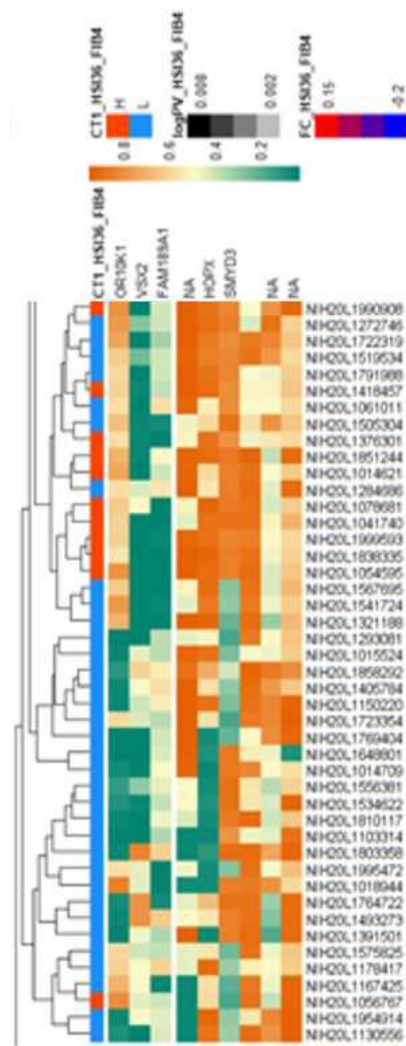
도면4c



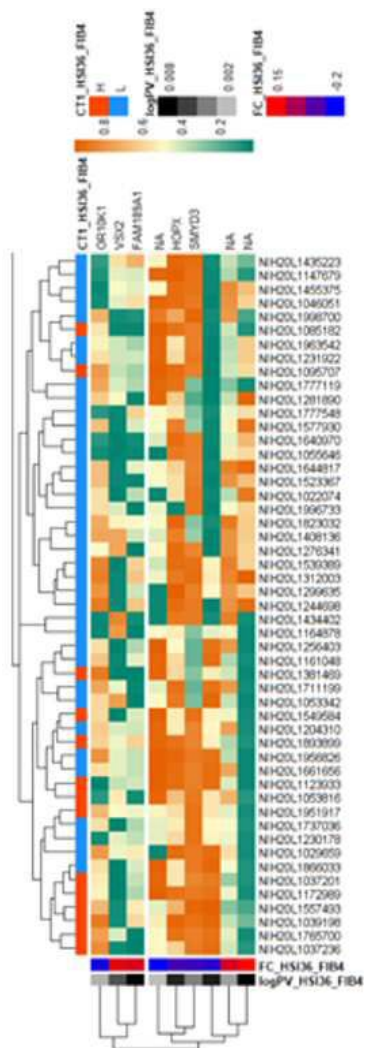
도면5a



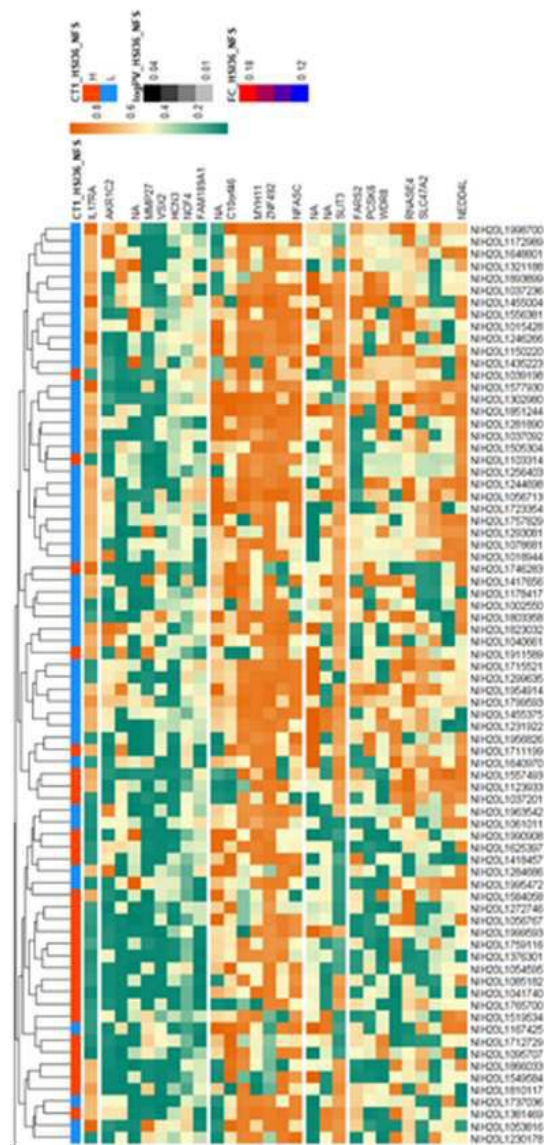
도면5b



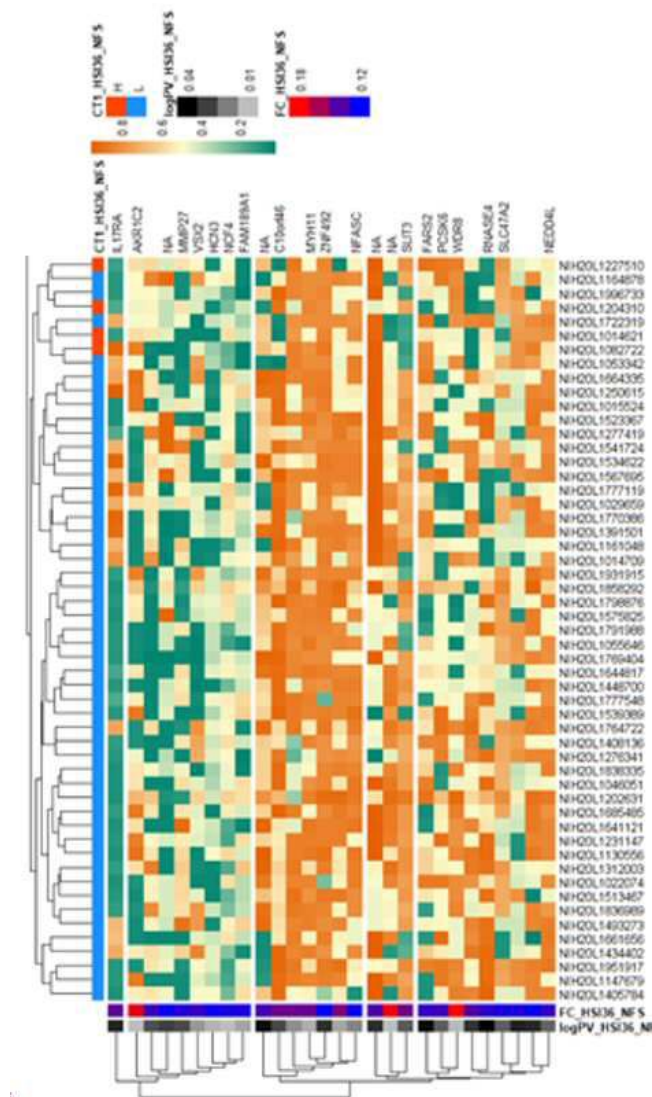
도면5c



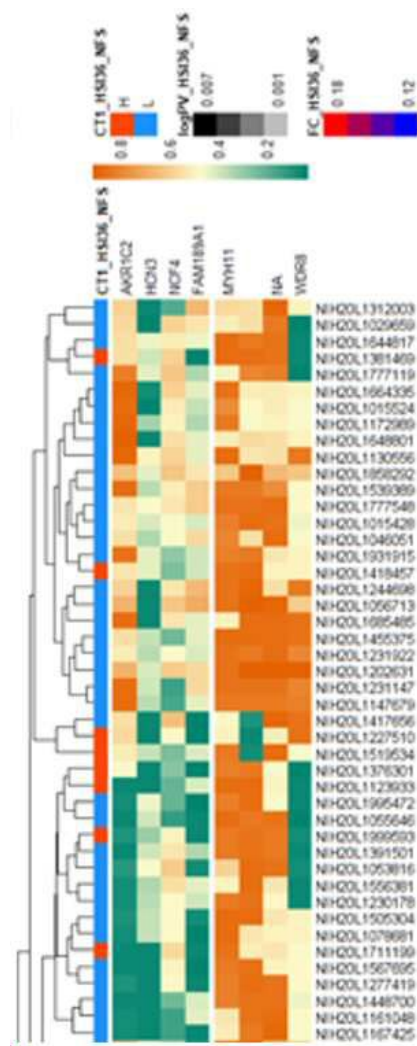
도면 6a



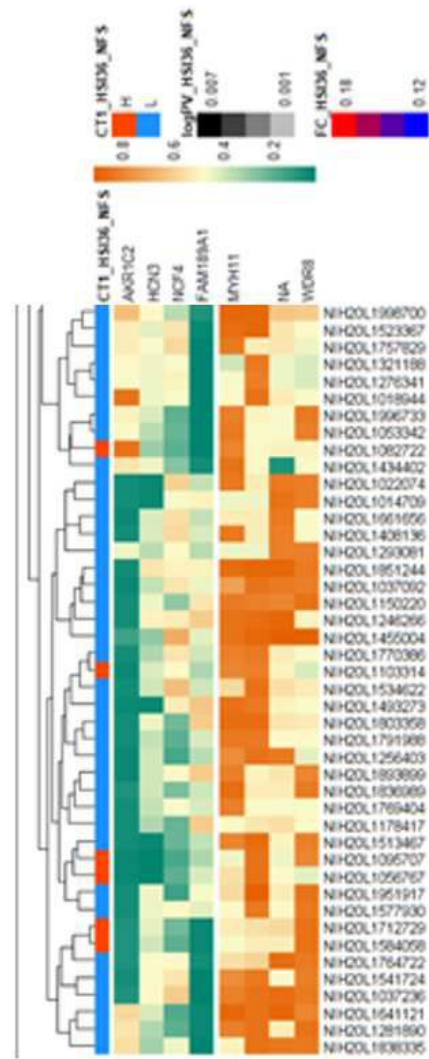
도면 6b



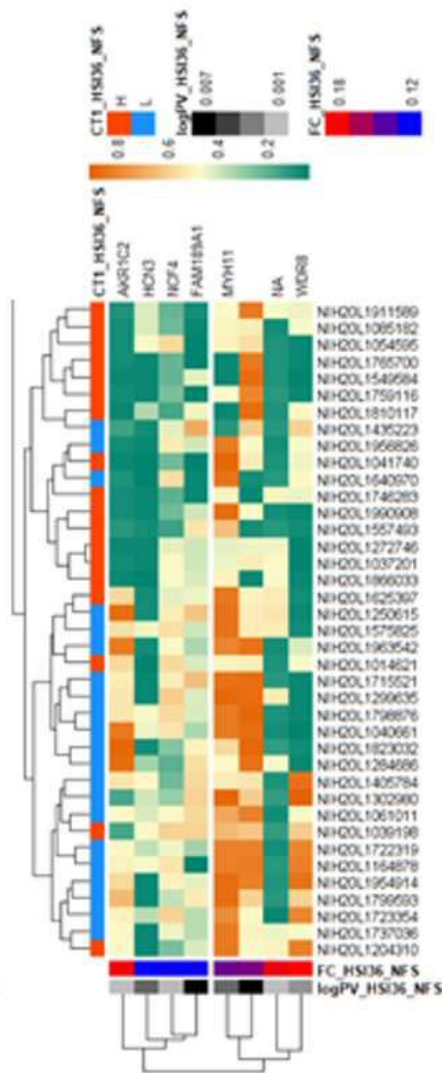
도면7a



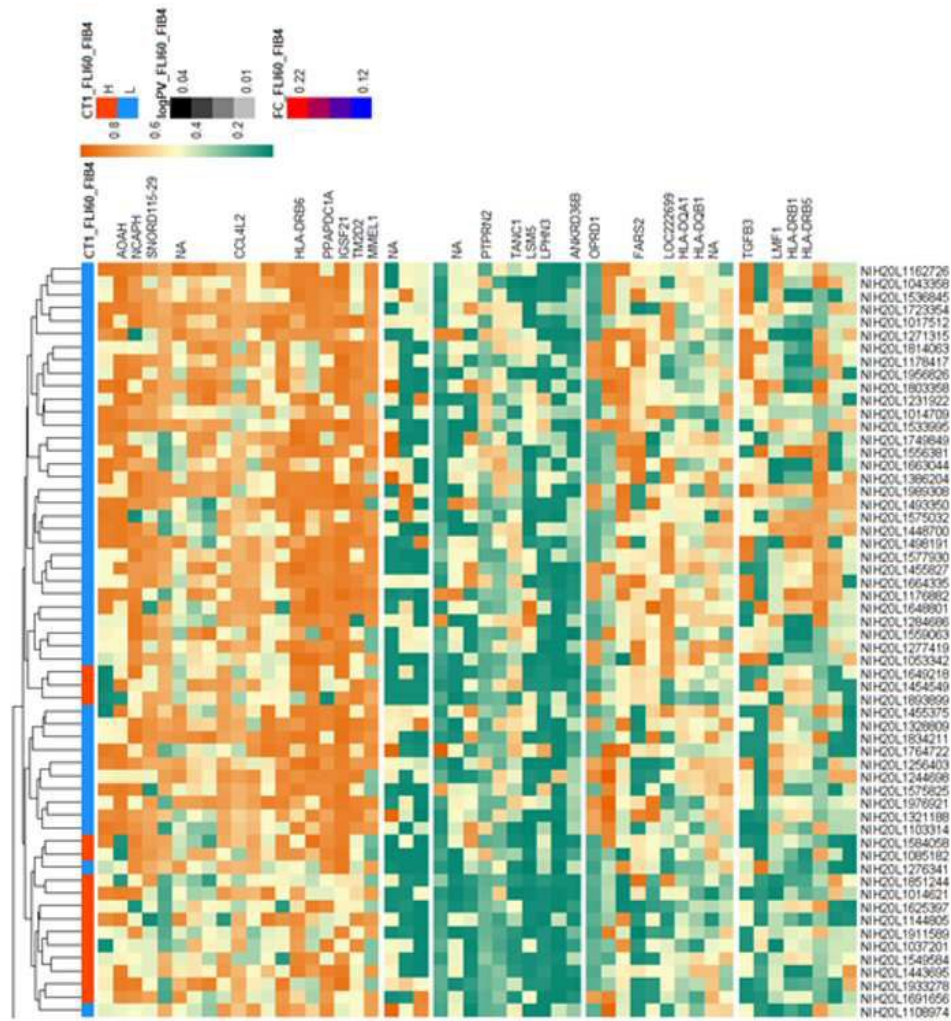
도면7b



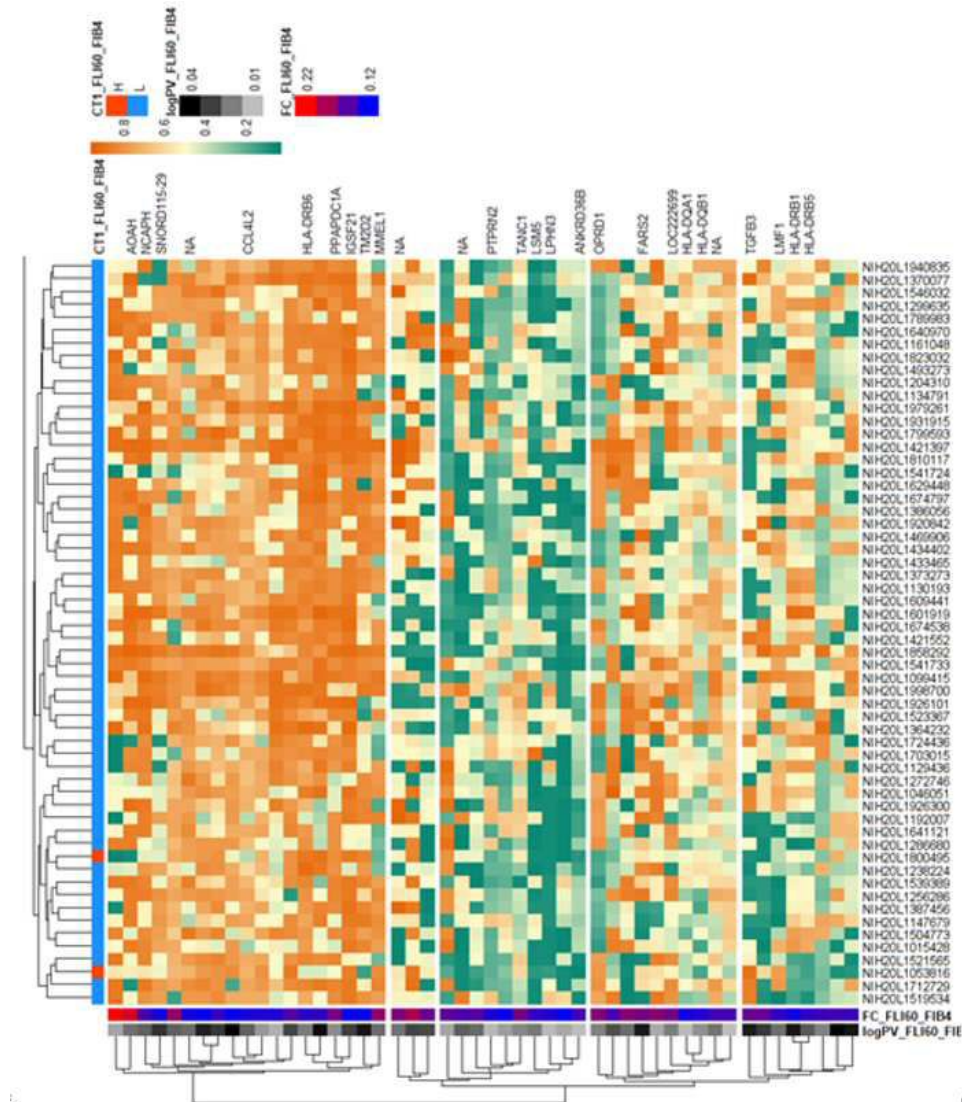
도면7c



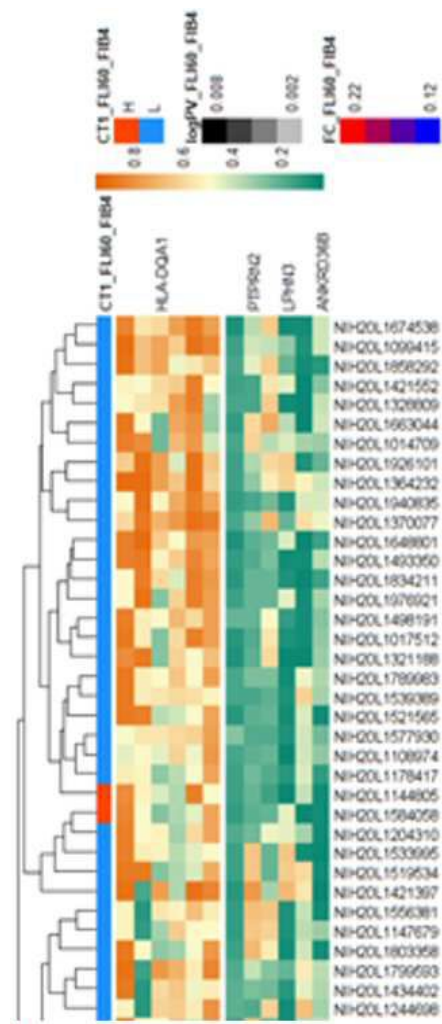
도면8a



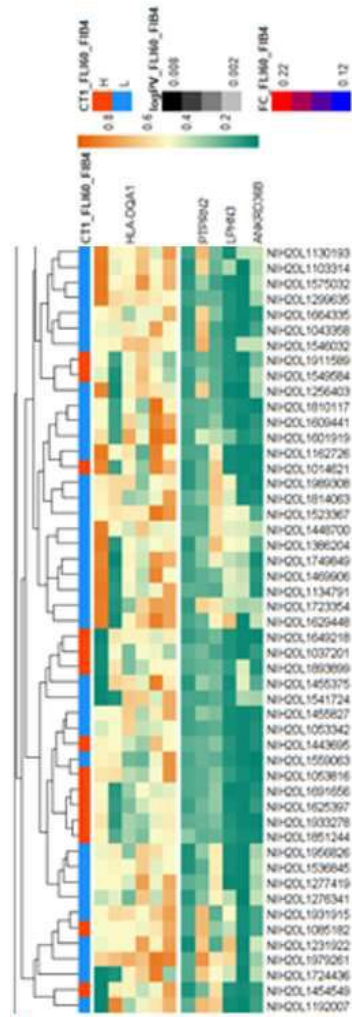
도면 8b



도면9a



도면9b



도면9c

