



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0083912
(43) 공개일자 2019년07월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
G01N 33/6893 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0001927
(22) 출원일자 2018년01월05일
심사청구일자 2018년01월05일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
이상호
서울특별시 송파구 양재대로 1218 218동 308호 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트)
이유호
경기도 고양시 일산서구 강선로 141 후곡마을 1606동 1003호
(74) 대리인
손민

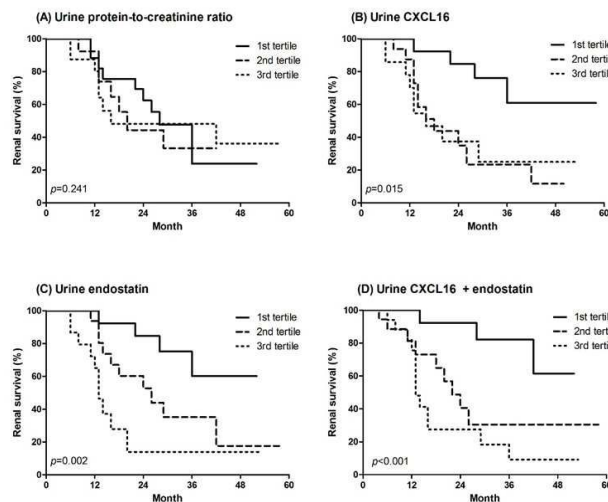
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 당뇨병성 신증 환자의 신장 섬유화 및 신기능 저하 예측용 조성물

(57) 요약

본 발명은 신장 섬유증 및 신기능 저하의 마커 단백질을 증폭 또는 검출할 수 있는 제제를 포함하는 신장 섬유증 및 신기능 저하의 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 키트 및 상기 조성물 또는 키트를 이용하여 신장 섬유증 및 신기능 저하 정도를 진단하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/118 (2013.01)
 C12Q 2600/158 (2013.01)
 G01N 2333/4704 (2013.01)
 G01N 2333/521 (2013.01)
 G01N 2800/52 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2012M3A9C6050511
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	바이오/의료기술개발사업
연구과제명	신장 손상 보호 및 신조직 재생을 위한 Substnace-P/가동화 줄기세포의 유용성 평가
기 여 율	1/1
주관기관	경희대학교 산학협력단
연구기간	2012.10.01 ~ 2017.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

CXCL16 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 16), 엔도스타틴(endostatin) 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 1개 이상의 유전자 mRNA, 또는 단백질 수준을 검출하는 제제를 포함하는, 신장 섬유증(renal fibrosis) 또는 신기능 저하 (decline in kidney function) 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 신장 섬유증 또는 신기능 저하는 당뇨병성 신증이 발병된 개체에서 발병되는 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 mRNA 수준을 검출하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머쌍 또는 프로브를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 단백질 수준을 검출하는 제제는 CXCL16 또는 엔도스타틴에 특이적으로 결합하는 항체, 상기 항체의 단편, 또는 앵타머인 것인 조성물.

청구항 5

제1항의 조성물을 포함하는, 당뇨병성 신증 환자의 신장 섬유증 또는 신기능 저하 진단용 키트.

청구항 6

- (a) 당뇨병성 신증이 발생된 개체의 조직 시료를 획득하는 단계;
- (b) 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물 또는 제5항의 키트를 이용하여, 상기 획득한 조직 시료로부터 CXCL16, 엔도스타틴 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 마커의 발현수준을 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 개체의 신장 섬유증 또는 신기능 저하의 발병 또는 경과를 판정하는 단계를 포함하는, 신장 섬유증 또는 신기능 저하의 진단 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 조직시료는 소변인 것인 방법.

청구항 8

- (a) 당뇨병성 신증이 발생된 개체의 조직 시료를 획득하는 단계;
- (b) 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물 또는 제5항의 키트를 이용하여, 상기 획득한 조직 시료로부터

CXCL16, 엔도스타틴 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 마커의 발현수준을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 개체의 신장 섬유증 또는 신기능 저하의 발병 또는 경과를 판정하는 단계를 포함하는, 신장 섬유증 또는 신기능 저하의 예후예측을 위한 정보의 제공방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 조직시료는 소변인 것인 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 (b) 단계에서 측정된 CXCL16, 엔도스타틴 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 마커의 발현수준이 대조군 시료보다 높은 수준인 경우, 상기 개체의 경과가 나쁜 것으로 판단하는 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 당뇨병성 신증 환자의 신장 섬유증 및 신기능 저하의 예후 예측용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 CXCL16 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 16) 및 엔도스타틴(endostatin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 마커를 증폭 또는 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 신장 섬유증(renal fibrosis) 또는 신기능 저하 (decline in kidney function) 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 당뇨병성 신증 환자의 신장 섬유증 또는 신기능 저하 진단용 키트, 신장 섬유증 또는 신기능 저하의 진단 방법, 경과 예측을 위한 정보의 제공방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 신장은 혈액 내 노폐물을 여과하여 소변으로 배출하는 척추동물의 배설기관으로서, 바깥쪽 피질 부분, 그 안쪽에 위치한 수질 부분, 수질 안쪽의 신우로 구성된다. 그 중 수질 부분은 세뇨관을 포함하는 집합관으로 구성되어 있으며, 집합관의 말단이 신우에 열려 있다. 신장의 세뇨관은 구획에 따라 서로 다른 유형의 세포로 구성되는데, 사구체에 가까운 부위부터 이를 근위세뇨관, 가는내림세뇨관, 가는오름세뇨관, 원위세뇨관, 그리고 집합관으로 불린다. 신장은 쉬지 않고 그 역할을 수행하고 있으므로, 신장 질환을 빠르고 간편하게 진단할 수 있는 기술의 개발이 요구되고 있다.

[0004] 이러한 신장 질환 중에서도, 당뇨병성 신증 (Diabetic nephropathy)는 전 세계적으로 말기 신 질환 (end-stage renal disease)의 주요 원인이다. 일반적으로, 당뇨병성 신증은 전형적인 임상 결과를 따르는 것으로 보이고 있으며, 신장 기능 장애가 발생하기 전에 단백뇨 현상(proteinuria)이 나타나는 것으로 알려져 있다. 단백뇨의 양은 신장 기능 저하에 있어 가장 중요한 예측 인자 중 하나였으며, 특히 당뇨병 (diabetes mellitus) 초기 단계에 있는 환자의 경우 더욱 그러하였다 (JASN 2007 vol.18, no.4, 1353-1361, CJASN 2012 vol.7, no.1, 78-84).

[0005] 그러나 최근에는 당뇨병성 신증의 경과가 그리 간단하게 진행되지는 않는다는 여러 증거가 제시되고 있다. 대규모 역학 연구에 따르면, 단백뇨가 없는 신장 기능 손상 환자가 꾸준히 증가하는 동안에도 당뇨병성 신증 환자의 단백뇨 발생률은 감소된 것으로 보고되었다 (JAMA 2016; 316(6):602-10). 또한, 이러한 단백뇨만으로는 당뇨병성 신증 환자의 임상 경과를 정확하게 예측하기 어렵다는 여러 연구 결과도 제시되고 있다 (J Nephropathol 2, 234-240 (2013), PLoS One. 2012; 7(5):e36041). 따라서, 당뇨병성 신증의 경과를 정확히 예측하기 위한 새로운 마커에 대한 요구가 증가하고 있다.

[0006] 지난 2010년 신장 병리 학회 (Renal Pathology Society)에서는 사구체 (glomerular), 요세관간질 (tubulointerstitial) 및 혈관 성분을 포함하는 당뇨병성 신증의 새로운 병리학적 분류 시스템을 확립하였으며 (J Am Soc Nephrol. 2010 Apr;21(4):556-63), 3 가지 연구에서 상기 분류 시스템이 당뇨병성 신증 환자의 신장 기능을 예측하는데 유용하게 사용될 수 있음을 보였다 (Diabetes Res Clin Pract. 2012 Sep;97(3):418-24,

Nephrology (Carlton). 2012 Jan;17(1):68-75, Nephrol Dial Transplant. 2015 Feb;30(2):257-66). 신조직 검사 (renal biopsy)를 통해 확인된 당뇨병성 신증의 발생률이 급격히 증가하고 있는 점을 고려할 때, 이러한 새로운 분류 시스템은 의료진이 당뇨병성 신증의 임상 경과를 예측하는데 도움이 될 수 있다.

[0007] 그러나 당뇨병성 신증의 가능성이 높은 환자에 대해서는 일반적으로 임상에 있어 신조직 검사를 진행하지 않는다는 문제가 있다. 따라서, 상기 분류 시스템은 신조직 검사를 통해 확인된 당뇨병성 신증 환자에게만 적용 가능하다는 한계가 있다.

[0009] 당뇨병성 신증의 진행을 예측하기 위한 기존 마커의 한계를 극복하기 위해 다양한 소변 마커에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 당뇨병성 신증의 발생 및 진행의 주요 원인 중 하나가 경도 염증 (low grade inflammation)인 점에서, 다양한 마커 중에서도 특히 염증 마커가 주목받고 있다. 다양한 연구에 의하면, 여러 염증 마커가 신장 기능 저하와 관련되어 있는 것으로 밝혀졌다 (Kidney Int 58: 1492-1499, 2000, Diabetes 55: 2993-3003, 2006, Diabetes 51: 3532-3544, 2002, J Am Soc Nephrol 19: 789-797, 2008, Pol Merkur Lekarski 13: 28-32, 2002, Cytokine Growth Factor Rev 17: 441-450, 2006). 그러나, 대부분의 연구는 당뇨병성 신증의 초기 단계 평가에 초점을 맞추고 있다. 또한, 당뇨병성 신증은 임상적 증거를 토대로 진단되기 때문에, 종래 연구에서는 소변 염증 마커와 당뇨병성 신증의 병리학적 특징간의 관련성에 대해서는 연구되지 않았다.

[0011] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 신조직 검사로 확진된 당뇨병성 신증 환자의 경과, 신기능 저하, 신장 섬유화 정도를 효과적으로 확인할 수 있는 소변 내 바이오 마커를 연구한 결과, 소변에서 검출될 수 있는 다양한 단백질 마커 중 CXCL16 및 엔도스타틴(Endostatin)의 발현량이 이와 높은 관련성을 가짐을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 하나의 목적은, CXCL16 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 16), 엔도스타틴(endostatin) 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 1개 이상의 유전자 mRNA, 또는 단백질 수준을 검출하는 체제를 포함하는, 신장 섬유증(renal fibrosis) 또는 신기능 저하 (decline in kidney function) 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 하나의 목적은, 당뇨병성 신증 환자의 신장 섬유증 또는 신기능 저하 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은, 당뇨병성 신증이 발생된 개체의 조직 시료를 수득하는 단계; 상기 조성물 또는 키트를 이용하여, 상기 수득한 조직 시료로부터 CXCL16, 엔도스타틴 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 마커의 발현수준을 측정하는 단계; 및 상기 개체의 신장 섬유증 또는 신기능 저하의 발병 또는 경과를 판정하는 단계를 포함하는, 신장 섬유증 또는 신기능 저하의 진단 방법을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은, 당뇨병성 신증이 발생된 개체의 조직 시료를 수득하는 단계; 상기 조성물 또는 키트를 이용하여, 상기 수득한 조직 시료로부터 CXCL16, 엔도스타틴 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 마커의 발현수준을 측정하는 단계; 및 상기 개체의 신장 섬유증 또는 신기능 저하의 발병 또는 경과를 판정하는 단계를 포함하는, 신장 섬유증 또는 신기능 저하의 예후예측을 위한 정보의 제공방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에

속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

- [0020] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 CXCL16 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 16), 엔도스타틴(endostatin) 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 1개 이상의 유전자 mRNA, 또는 단백질 수준을 검출하는 제제를 포함하는, 신장 섬유증(renal fibrosis) 또는 신기능 저하 (decline in kidney function) 진단용 조성물을 제공한다.
- [0021] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는 CXCL16 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 16), 엔도스타틴(endostatin) 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 마커를 증폭 또는 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 간질 섬유증 및 세관 위축 (Interstitial fibrosis and tubular atrophy, IFTA) 진단용 조성물을 제공한다.
- [0022] 본 발명에서 CXCL16 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 16)는 CXC 케모카인 계통에 속하는 작은 사이토카인으로, 림프기관 T 세포 구역에서 발견된 수상 돌기 세포, 비장의 적비수(red pulp)에서 발견되는 세포에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다. 몇몇 연구에서 혈중 CXCL16은 신장 섬유증과 연관이 있는 것으로 보고가 되었으나 (Sci Rep. 2016 Jun 29;6:28715, Curr Opin Nephrol Hypertens. 2014 Jan;23(1):93-100, Hypertension. 2013 Dec;62(6):1129-37, J Am Soc Nephrol. 2011 Oct;22(10):1876-86) 소변내 CXCL16 은 연구된 바가 없으며, 특히 당뇨병성 신증에서의 역할, 또한 신기능 저하 진단 용도에 대해서는 알려진 바가 없어, 이러한 용도는 본 발명인에 의해 최초로 규명되었다.
- [0023] 본 발명에서 엔도스타틴(endostatin)은 유형 XVIII 콜라겐으로부터 유래된 20kDa의 물질로, 안지오스타틴 및 트롬보스포딘과 유사하게 혈관 신생 억제제로 작용하는 것으로 알려져 있다. 혈중 엔도스타틴은 신기능 저하를 반영한다는 연구가 보고된 바가 있으나 (Am J Nephrol. 2012 May; 35(4): 335-340), 소변내 엔도스타틴의 의미는 연구된 바가 없으며, 신장 섬유증 또는 신기능 저하 진단 용도에 대해서는 알려진 바가 없어, 이러한 용도는 본 발명인에 의해 최초로 규명되었다.
- [0024] 상기 CXCL16 (58191) 및 엔도스타틴 (AAF69009.1) 마커의 구체적인 단백질 정보는 NCBI 등의 데이터베이스에 공지되어 있다. 본 발명은 이들을 각각 단독으로 사용하거나, 또는 모두 사용하는 경우를 포함한다. 또한, 단백질의 아미노산 서열 일부에 변이, 결실, 또는 치환 등이 일어나더라도, 신장 섬유증 또는 신기능 저하의 진단이 가능하다면 제한 없이 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0025] 본 발명에서 신장 섬유증(신장 섬유화, renal fibrosis)은 신장 조직 내에 세포외 기질 (extracellular matrix)이 축적되는 상태로 만성 콩팥병으로 이행되는 모든 콩팥 질환에서 보이는 공통된 현상이다. 아직 신장 조직 검사 이외에 신장 섬유화의 정도를 정확하게 확인하기 위한 방법은 없는 상태이다.
- [0026] 본 발명에서 신기능 저하 (decline in kidney function)는 eGFR 로 대변되는 신기능의 연간 감소율을 뜻한다. 당뇨병성 신증 환자는 일반적으로 단백뇨의 양이 신기능 저하를 예측할 수 있는 것으로 알려져 있으나 진행된 당뇨병성 신증 환자에서는 알려진 바가 없다.
- [0027] 본 발명에서 간질 섬유증 및 세관 위축 (interstitial fibrosis and tubular atrophy, IFTA) 은 신장 내 간질과 세관의 만성 손상에 의해 일어나는 비가역적인 기능상실 상태를 뜻한다. 신장 섬유증에서 흔히 나타나는 특징으로, 간질 섬유증 및 세관 위축이 심한 환자는 신장 예후가 나쁜 것으로 알려져 있으나, 신장 섬유화와 마찬가지로, 신장 조직 검사 이외에는 간질 섬유증 및 세관 위축의 정도를 확인 할 수 있는 방법이 없다.
- [0028] 신장 섬유증 또는 신기능 저하는 당뇨병성 신증이 발병된 개체에서 발병되는 것일 수 있다. 본 발명에서 당뇨병성 신증(diabetic nephropathy)은 당뇨병성 신장질환 (diabetic kidney disease) 으로도 불리며, 당뇨병, 고혈당 등에 의해 지속적으로 신장 내부의 사구체가 손상되어 신장 기능이 저하되는 질환을 의미한다. 당뇨병이 오랫동안 지속되면 신체의 작은 혈관들이 손상되는데, 그에 따라 혈액 여과를 담당하고 있는 사구체가 손상되면서 단백뇨가 나타나며 신장 기능이 저하된다.
- [0030] 본 발명에서 상기 유전자 mRNA, 또는 단백질 수준을 검출하는 제제란 상기 마커 단백질의 발현수준을 확인 또는 측정하기 위하여, 상기 마커를 증폭 또는 검출하는데 사용되는 수단을 의미하며, 시료에 포함된 표적 단백질의 수준을 측정하는 방법에 사용되는 제제를 의미한다. 이의 예로 웨스턴 블롯(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법

(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩 분석법(protein chip assay) 등의 방법에 사용되는 항체 또는 상기 단백질과 결합할 수 있는 앵타머 등이 될 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 mRNA 수준을 검출하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머쌍 또는 프로브일 수 있으며, 상기 단백질 수준을 검출하는 제제는 CXCL16 또는 엔도스타틴에 특이적으로 결합하는 항체, 상기 항체의 단편, 또는 앵타머인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0031] 본 발명에서 용어 "항체"란, 단백질 또는 펩티드 분자의 항원성 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질성 분자를 의미한다. 상기 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함될 수 있을 뿐만 아니라, 인간화 항체 등의 특수 항체를 포함할 수도 있다. 아울러, 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 될 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 용어, "앵타머"는 그 자체로 안정된 삼차구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특성을 가진 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형 핵산)을 의미한다.
- [0033] 본 발명에 있어서, 상기 항체, 항체의 단편, 또는 앵타머는 상기 CXCL16 또는 엔도스타틴 마커를 검출할 수 있는 한 그의 아미노산 서열 또는 염기 서열이 특별히 제한되지 않으며, 서열을 구성하는 아미노산 또는 핵산의 개수에 특별히 제한되지 않는다.
- [0034] 본 발명의 용어 "진단"이란, 병리 상태의 존재, 특징, 질병의 진행 경과, 치료 시 질환의 치료 효과 등을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 진단은 CXCL16 또는 엔도스타틴을 소변에서 검출함으로써 신장 섬유증 또는 신기능 저하를 진단하는 것을 의미하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 본 발명의 일 실시예에서는, 당뇨병성 신증이 발병된 환자의 병리학적 분류 및 소변 염증 마커의 관련성을 분석한 결과, 높은 등급의 IFTA 환자에서 CXCL16 및 엔도스타틴의 발현량이 유의하게 상승하였으며 (표 8, 12), ITFA 및 / 또는 간질 염증 점수가 높은 환자에서 말기 신장질환 (ESRD)에 도달하는 비율이 더욱 높게 나타남을 확인하였는바 (도 4의 B, C), 당뇨병성 신증 환자의 소변에서 CXCL16 및/또는 엔도스타틴의 발현량을 확인함에 따라 당뇨병성 신증 환자의 신장 섬유증 및 신기능 저하 정도를 예측할 수 있음을 알 수 있다 (도 6).
- [0037] 본 발명의 다른 하나의 양태는, 상기 조성물을 포함하는, 당뇨병성 신증 환자의 신장 섬유증 또는 신기능 저하 진단용 키트를 제공한다.
- [0038] 본 발명의 다른 하나의 양태는, 상기 조성물을 포함하는, 당뇨병성 신증 환자의 간질 섬유증 및 세관 위축 진단용 키트를 제공한다.
- [0039] 본 발명의 키트는 당뇨병성 신증이 발생한 개체의 조직 시료로부터 CXCL16 또는 엔도스타틴의 발현수준을 측정하여 신장 섬유증 또는 신기능 저하 발생 여부 또는 예후를 진단하는데 사용될 수 있으며, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 CXCL16 또는 엔도스타틴을 검출하기 위한 항체, 상기 항체의 단편, 또는 앵타머뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수도 있다.
- [0040] 감도를 높이기 위해서는 소변을 원심분리하거나, 농축 등의 처리를 수행할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 키트에 사용되는 기제는 소변 접촉 시 이의 접촉여부를 확인하기 위한 발색단을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [0042] 상기 키트는 민감도 및 특이도를 높이기 위하여 기존의 신장질환 진단 키트들과 함께 사용하는 것, 예컨대 복합 키트 형태로 사용하는 경우도 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명에서 상기 마커의 발현수준을 측정하기 위한 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기재, 적당한 완충 용액, 발색효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체 및 발색기질 등을 포함할 수 있다. 상기에서 기재는 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96-웰 플레이트, 폴리스틸렌 수지로 합성된 96-웰 플레이트, 유리로 된 슬라이드 글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(oxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase) 등이 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있고, 발색기질은 ABTS(2,2'-아지

노-비스-(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘)가 사용될 수 있다.

[0044] 아울러, 상기 항체 또는 앵타머를 검출할 수 있는 2차 항체를 추가로 포함할 수 있고 형광물질, 방사선 동위원소 등으로 표지된 것을 사용할 수 있다.

[0046] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, (a) 당뇨병성 신증이 발생된 개체의 조직 시료를 수득하는 단계; (b) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물 또는 제4항의 키트를 이용하여, 상기 수득한 조직 시료로부터 CXCL16, 엔도스타틴 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 마커의 발현수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 개체의 신장 섬유증 또는 신기능 저하의 발병 또는 경과를 판정하는 단계를 포함하는, 신장 섬유증 또는 신기능 저하의 진단 방법을 제공한다.

[0047] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 본 발명은 (a) 당뇨병성 신증이 발생된 개체의 조직 시료를 수득하는 단계; (b) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물 또는 제4항의 키트를 이용하여, 상기 수득한 조직 시료로부터 CXCL16, 엔도스타틴 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 마커의 발현수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 개체의 신장 섬유증 또는 신기능 저하의 발병 또는 경과를 판정하는 단계를 포함하는, 신장 섬유증 또는 신기능 저하의 예후예측을 위한 정보의 제공방법을 제공한다.

[0048] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 상기 (a) 내지 (c) 단계를 포함하는, 간질 섬유증 및 세관 위축의 진단 방법, 예후예측을 위한 정보의 제공방법을 제공한다.

[0049] 이때, 상기 조성물, 키트, CXCL16, 엔도스타틴, 신장 섬유증 또는 신기능 저하는 상술한 바와 동일하고, 상기 시료로는 분변, 혈액, 혈장, 혈청, 림프액, 뇌척수액, 분리된 조직, 분리된 세포, 타액, 소변 등이 될 수 있으며, 보다 구체적으로 소변일 수 있으나 이에 특별히 제한되지는 않는다.

[0050] 본 발명의 상기 방법은, 상기 (b) 단계에서 측정된 CXCL16, 엔도스타틴 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 마커의 발현수준이 대조군 시료의 것 보다 높은 수준인 경우, 상기 개체의 예후가 나쁜 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0052] 본 발명은 신장 생검이 어려운 당뇨병성 신증 환자로부터 소변 내 CXCL16 또는 엔도스타틴의 발현 수준만을 측정함으로써, 당뇨병성 신증 환자의 신장 섬유화 및 신기능 저하 진행 정도를 용이하게 진단 및 예측할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0054] 도 1은 환자를 모집한 기관, 구체적인 질환 별로 분류한 환자수를 나타내는 도이다. (약어: DN, diabetic nephropathy; NDRD, non-diabetic renal disease; KNDP, Korea national diabetes program)

도 2는 대조군과, 신장 조직 검사에서 입증된 당뇨병성 신증 환자에서의 소변 염증 마커의 발현 수준을 나타낸 도이다. (약어: DM, diabetes mellitus; DN, diabetic nephropathy; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; RANTES, Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; IP-10, interferon gamma-induced protein-10; IL-6, interleukin-6; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; VEGF, vascular endothelial growth factor)

도 3은 소변 PCR과 eGFR의 감소 사이의 상관 관계를 나타낸 도이다. (약어: PCR, protein-to-creatinine ratio; eGFR, estimated glomerular filtration rate)

도 4는 당뇨병성 신증의 병리학적 분류에 따른 환자의 신장 결과를 나타낸 도이다. (A) 다양한 사구체 병변에서의 신장 생존율, (B) 간질 섬유증 및 세관 위축, (C) 간질 염증, (D) 세동맥의 유리질증 및 (E) 동맥 경화.

도 5는 소변 마커의 발현 수준에 따른 환자의 신장 결과를 나타낸 도이다. (A) 소변 단백질 - 크레아티닌 비율 (PCR), (B) CXCL16, (C) 엔도스타틴 및 (D) CXCL16과 엔도스타틴의 조합.

도 6은 (A) 소변 단백질 대 크레아티닌 비율 (PCR), (B) CXCL16, (C) 엔도스타틴 및 (D) CXCL16과 엔도스타틴의 조합을 사용하여 신장 결과를 예측하기 위한 ROC (Receiver operating characteristic) 곡선을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0057] 실시예 1: 실험 재료 및 방법

[0059] 1-1. 환자 선택 및 실험 디자인

[0061] 환자 선택 및 모집은 도 1에 도시된 바와 같이 진행하였다. 구체적으로, 이전 연구에서, 순수 신장 조직 검사로 당뇨병성 신증이 진단되었으면서도 소변 샘플링을 허용한 환자들을 선정하였다. 2012년 1월부터 2016년 12월까지의 기간 동안 6곳의 서로 다른 병원에서 신장 생검을 받은 220명의 제2형 당뇨병 환자를 등록하였다. 다른 신장 질환이 발병하지 않고, 순전히 당뇨병성 신증만을 진단받은 114명의 환자 중 70명의 환자가 추후 바이오 마커 연구를 위한 소변 샘플 수집에 동의하였다.

[0062] 신장 조직 검사의 적응증은, 5년 미만의 당뇨병 발병 기간; 당뇨병망막병증 (diabetic retinopathy) 없이 단백뇨 발생이 명확할 것; 빈번한 요침전물 (urinary sediment) 발생; 및/또는 혈뇨가 발생하거나, 불명확한 원인으로 인한 신기능의 급속한 감소 등이 있다.

[0063] 대조군으로 나이와 성별이 일치하는 6명의 고위험 당뇨병 (공복혈당장애(impaired fasting glucose) 및/또는 내당증 장애(impaired glucose tolerance)가 있는 것으로 정의됨) 환자와, 단백뇨가 없는 10명의 당뇨병 환자를 추가적으로 모집하여, 소변 염증 마커의 비교군으로 하였다 (도 1의 우측).

[0065] 연령, 성별, 신장, 체중, 당뇨병 지속 기간, 및 고혈압 유무를 기록하였고, 신장 생검시 HbA1c, 헤모글로빈, 혈청 알부민, 크레아티닌, 및 콜레스테롤 등을 포함하는 일반적인 검사도 진행하였다. 가능한 한 단백뇨의 양은 24시간 소변 채취로 측정하거나, spot urine protein-to-creatinine ratio (PCR, g/gCr)로 계산하였다. 당뇨병성 신증으로 진단받은 환자는 약물 투여 금기가 없는 한, 안지오텐신 전환 효소 억제제(angiotensin-converting enzyme) 또는 안지오텐신 수용체 억제제(angiotensin receptor blocker)를 사용하여 보존적인 관리를 받았다. 투석 또는 신장 이식이 필요한 말기 신장질환 (ESRD, End-stage renal disease)으로의 진행 정도에 따라 신장 기능 정도를 평가하였다.

[0067] 1-2. 샘플 채취 및 다중 효소 면역 측정법(ELISA)을 이용한 소변 염증 마커 측정

[0069] 환자의 신장 생검일 아침에 추가적인 소변 샘플을 수집하여, 소변 염증 마커를 측정하였다. 샘플을 실온에서 2,000 x g로 20분 간 원심분리한 후, 상등액을 튜브에 넣고 분석 전까지 -80℃ 온도의 냉동실에 보관하였다. 모든 샘플은 수집 후 1시간 이내에 처리 및 저장되었다.

[0070] 제조사의 지시서(R&D Systems, MN)에 따라, customized Magnetic Luminex Screening Assay를 이용하여 다양한 소변 염증 마커를 동시에 측정하였다. 그 결과를 토대로, 다음과 같은 총 10개의 후보 마커를 선정하였다: monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES), interferon gamma-induced protein-10 (IP-10), CXCL16, endostatin, interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), vascular endothelial growth factor (VEGF), CXCL9 및 growth/differentiation factor-15 (GDF-15).

- [0071] 각 염증 마커는 Luminex 200™ (Luminex Corp., Austin, TX)에 의해 검출하였으며, 그 농도는 기준 샘플로부터 생성된 표준 곡선을 토대로 계산하였다. 마지막으로, 모든 소변 염증 마커는 소변 크레아티닌 농도 (pg/mg Cr)에 비례하여 표현하였다.
- [0073] 1-3. 등록된 환자의 병리학적 분석 및 분류
- [0075] 모든 생검 검체는 광학 현미경 (LM), 면역 형광 및 전자 현미경(EM)을 이용한 일반적인 검사를 위해 표준 방법으로 처리한 다음, 각 병원의 병리학 전문가에게 검사를 의뢰하였다. 당뇨병성 신증의 병리학적 진단은, 다음과 같은 기준을 토대로 이루어졌다 (J Am Soc Nephrol. 2010;21:556-63): 사구체 기저막의 확산 비후 (여성에서 395nm이상, 남성에서 430nm 이상) 및/또는 결절성 사구체 경화증(nodular glomerulosclerosis)이 수반되거나 수반되지 않은 사구체 간질(mesangial)의 팽창. 신장 질환이 비 당뇨병성인 것으로 확인된 환자는 실험에서 제외하였다.
- [0076] 환자들을 신장 병리 학회 (Renal Pathology Society)의 병리학적 분류에 따라 추가적으로 분류하였다. 등록된 환자를 분류하기 위해, 다음과 같은 5개의 서로 다른 병리학적 매개 변수(parameters)가 사용되었다: 간질 섬유증 및 세관 위축 (IFTA, interstitial fibrosis and tubular atrophy), 간질 염증(interstitial inflammation), 세동맥의 유리질증 (arteriolar hyalinosis) 및 동맥 경화증(arteriosclerosis).
- [0078] 사구체 병변(Glomerular lesions)은 다음과 같이 점수를 부여하였다.
- [0079] class I, 전자 현미경으로 확인된 사구체 기저막의 비후, 간질 변화 없음;
- [0080] class II, 광학 현미경으로 확인된 간질 팽창;
- [0081] class III, 결절성 사구체 경화증이 하나 이상 존재; 및
- [0082] class IV, 관찰된 사구체의 50% 이상에서 사구체 경화증 발생.
- [0084] 간질 섬유증 및 세관 위축 (IFTA)은 다음과 같이 점수를 부여하였다.
- [0085] 0, IFTA의 흔적 없음;
- [0086] 1, 전체 면적의 25% 이상;
- [0087] 2, 전체 면적의 26 내지 50%;
- [0088] 3, 전체 면적의 50% 이상
- [0090] 간질 염증은 다음과 같이 점수를 부여하였다.
- [0091] 0, 흔적 없음;
- [0092] 1, IFTA와 관련한 염증세포의 침윤;
- [0093] 2, IFTA가 없는 영역에서의 염증 세포 침윤
- [0095] 세동맥의 유리질증은 다음과 같이 점수를 부여하였다.
- [0096] 0, 흔적 없음;
- [0097] 1, 적어도 하나의 면적에 세동맥 유리질증 발생;

[0098] 2, 세동맥 유리질증이 하나 이상의 면적에 발생

[0100] 마지막으로, 동맥경화증은 다음과 같이 점수를 부여하였다.

[0101] 0, 내막 비후가 없음;

[0102] 1, media의 두께보다 얇은 내막 비후;

[0103] 2, media의 두께보다 더 두꺼운 내막 비후

[0105] 1-4. 통계 분석

[0107] 모든 통계 분석은 Windows 용 SPSS, 버전 20.0 (SPSS, Chicago, IL)으로 수행하였다. 임상 특성 및 임상 지표는 평균 $\pm$ 표준 편차 (SD) 또는 환자 수와 백분율로 표시하였다. 분산 분석 (ANOVA)과 카이 제곱 검정을 사용하여 기준 특성과 검사 소견을 비교하였다. 소변 염증 마커는 중앙값 (1, 3 사분위 간 범위 [IQR])으로 기술하였으며, 이러한 데이터는 비 정규 분포에 해당함을 고려하여 Kruskal-Wallis 분석을 수행하였다. 피어슨 상관 분석을 통해 소변 염증 마커, 소변 PCR (protein-to-creatinine ratio) 및 eGFR 감소율을 비교하였다. 신장 결과에 대한 Time-to-Event 분석은 log-rank test로 수행하였다. 마지막으로, 당뇨병성 신증 진행이 신속히 이루어지는 환자를 구별하기 위해, 소변 염증 마커의 예측력 평가를 위한 수신기 작동 특성 (ROC) 곡선 및 곡선 아래 영역 (AUC)을 확인하였다. 0.05 이하의 P 값은 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0109] **실시예 2: 실험 결과**

[0111] 2-1. 등록된 환자의 임상적 특징 및 소변 염증 마커 확인

[0113] 생검으로 확인한 당뇨병성 신증의 기본적인 임상 특징을 표 1에 요약하였다.

표 1

[0115] 생검으로 입증된 당뇨병성 신증 환자의 임상 특성 및 검사 매개 변수 (laboratory parameters)

	Patients with biopsy-proven diabetic nephropathy (n=70)
Age (years)	57.3 $\pm$ 11.4
Sex (Male, %)	45 (64.3)
BMI (kg/m ²)	25.2 $\pm$ 3.4
Duration of diabetes (years)	11.4 $\pm$ 8.3
Hypertension (n, %)	62 (88.6)
HbA1c (%)	7.8 $\pm$ 2.0
Hemoglobin (g/dL)	10.4 $\pm$ 2.0
eGFR (ml/min)	36.1 $\pm$ 23.7
Albumin (g/dL)	3.3 $\pm$ 0.7
Total cholesterol (mg/dL)	195.8 $\pm$ 64.7
Urine PCR (g/gCr)	7.77 $\pm$ 6.80

[0116] (BMI, body mass index; eGFR, estimated glomerular filtration rate; PCR, protein-to-creatinine ratio)

[0118] 평균 연령은 57.3 세, 남성은 64.3 % (45/70), 평균 당뇨병 발생 기간은 11.4 년이었다. 대부분의 환자는 신장 생검시 중간 정도에서 보다 심각한 정도의 신기능 장애를 보였고, 평균 eGFR은 1.73 m² 당 36.1 ml/min, 평균 소변 PCR은 7.77 g/gCr이었다.

[0119] 단백뇨가 없는 당뇨병 환자와 고위험군 환자의 기준 인구 통계를 도 1에 나타내었다. 나이와 성별은 당뇨병성 신증 환자 간에 차이가 없었으며, eGFR 및 단백뇨는 대조군에서 정상 범위로 나타났다.

[0121] 대조군과, 생검에서 입증된 당뇨병성 신증을 갖는 환자의 소변 염증 마커의 발현 수준을 도 2에 나타내었다. CXCL9를 제외한 대부분의 소변 염증 마커는 대조군과 비교하여 생검으로 입증된 당뇨병성 신증 환자에서 유의하게 높은 것으로 확인되었다. 한편, 당뇨병의 위험성이 높은 환자와, 단백뇨가 없는 당뇨병 환자 간에는 소변 염증 마커의 발현 수준에 차이가 없었다. 소변 내 GDF-15의 수치는 전체 환자의 50 % 이상에서 범위를 초과하여, 분석이 이루어지지 않았다.

[0123] 2-2. 병리학적 분류에 따른 환자의 임상 특징 및 소변 염증 마커 확인

[0125] 상기 실시예 1-3에 기술한 바와 같이, 생검으로 확인된 당뇨병성 신증 환자는 5가지 병리학적 분류 기준에 따라 분류되었으며, 이들의 임상적 특징을 표 2 내지 표 6에 나타내었다.

표 2

[0127]

	사구체 병변(Glomerular lesions)			
	Class II (n=14)	Class III (n=32)	Class IV (n=24)	p value
Age (years)	63.9±11.1	54.3±11.6	57.5±9.9	0.030
Sex (male, %)	7 (50.0)	23 (71.9)	15 (62.5)	0.353
BMI (kg/m ²)	25.3±3.2	24.5±3.1	26.0±3.9	0.262
Duration of diabetes (year)	15.3±10.5	11.0±8.1	9.6±6.6	0.116
Hypertension (n, %)	13 (92.9)	28 (87.5)	21 (87.5)	0.853
HbA1c (%)	7.7±1.9	7.8±2.0	7.7±2.1	0.941
Hemoglobin (g/dL)	10.7±2.3	10.3±1.6	10.4±2.3	0.758
eGFR (ml/min/1.73m ²)	38.5±21.7	39.0±24.6	30.8±23.5	0.408
Albumin (g/dL)	3.7±0.5	3.1±0.6	3.2±0.8	0.032
Total cholesterol (mg/dL)	189±27	213±76	182±61	0.145
Urine PCR (g/gCr)	5.46±5.12	9.55±7.98	6.77±5.42	0.114

표 3

[0129]

	간질 섬유증 및 세관 위축(Interstitial fibrosis and tubular atrophy)			
	0 and 1 (n=43)	2 (n=17)	3 (n=10)	p value
Age (years)	58.4±10.7	55.9±11.5	55.0±14.6	0.599
Sex (male, %)	28 (65.1)	9 (52.9)	8 (80.0)	0.360
BMI (kg/m ²)	25.1±3.6	25.3±3.3	25.4±2.7	0.966
Duration of diabetes (year)	11.8±8.4	9.1±6.6	13.5±10.3	0.371
Hypertension (n, %)	36 (83.7)	16 (94.1)	10 (100)	0.100
HbA1c (%)	7.7±1.7	7.9±2.5	7.9±2.6	0.928
Hemoglobin (g/dL)	10.9±2.1	9.7±1.3	9.4±2.2	0.019

eGFR (ml/min/1.73m ²)	45.1±23.2	26.2±18.7	14.3±8.1	<0.001
Albumin (g/dL)	3.4±0.7	3.0±0.5	3.0±0.6	0.051
Total cholesterol (mg/dL)	198±64	181±62	209±75	0.519
Urine PCR (g/gCr)	5.58±3.90	12.66±10.26	8.92±5.19	0.123

표 4

[0131]

	간질 염증(Interstitial inflammation)			
	0 (n=12)	1 (n=42)	2 (n=16)	p value
Age (years)	57.2±12.1	57.4±10.8	57.3±13.1	0.999
Sex (male, %)	5 (41.7)	30 (71.4)	10 (62.5)	0.163
BMI (kg/m ²)	25.7±3.3	25.2±3.7	24.8±2.8	0.779
Duration of diabetes (year)	10.7±8.1	10.5±7.0	14.2±11.1	0.306
Hypertension (n, %)	10 (83.3)	38 (90.5)	14 (87.5)	0.787
HbA1c (%)	8.2±2.3	7.8±2.0	7.4±2.8	0.656
Hemoglobin (g/dL)	10.6±2.1	10.5±2.0	9.9±2.0	0.606
eGFR (ml/min/1.73m ²)	42.2±29.4	38.9±23.6	24.0±14.4	0.059
Albumin (g/dL)	3.3±0.8	3.3±0.7	3.2±0.5	0.775
Total cholesterol (mg/dL)	213±79	181±55	224±69	0.044
Urine PCR (g/gCr)	6.15±5.34	7.91±7.59	8.64±5.58	0.624

표 5

[0133]

	세동맥의 유리질증(Arteriolar hyalinosis)			
	0 (n=7)	1 (n=58)	2 (n=5)	p value
Age (years)	61.3±11.1	56.5±11.4	61.0±12.6	0.442
Sex (male, %)	3 (42.9)	21 (36.2)	5 (100)	0.049
BMI (kg/m ²)	26.5±3.4	24.9±3.3	27.4±4.3	0.154
Duration of diabetes (year)	7.3±9.4	11.5±7.8	16.0±11.4	0.197
Hypertension (n, %)	7 (100)	50 (86.2)	5 (100)	0.836
HbA1c (%)	7.6±1.9	7.8±2.1	7.5±1.0	0.922
Hemoglobin (g/dL)	10.4±2.3	10.3±2.0	11.7±2.0	0.325
eGFR (ml/min/1.73m ²)	37.8±31.1	36.2±23.4	32.4±20.0	0.925
Albumin (g/dL)	3.2±0.7	3.3±0.7	3.2±0.6	0.991
Total cholesterol (mg/dL)	194±53	193±66	225±70	0.588
Urine PCR (g/gCr)	3.86±1.47	8.01±7.01	10.51±6.72	0.203

표 6

[0135]

	동맥경화증(Arteriosclerosis)			
	0 (n=33)	1 (n=31)	2 (n=6)	p value
Age (years)	56.5±9.5	55.8±12.1	69.8±10.8	0.016

Sex (male, %)	24 (72.7)	14 (45.2)	4 (66.7)	0.306
BMI (kg/m^2)	25.1 ± 2.9	25.5 ± 3.7	24.4 ± 4.5	0.778
Duration of diabetes (year)	10.8 ± 8.1	10.9 ± 8.0	16.8 ± 10.3	0.243
Hypertension (n, %)	29 (87.9)	27 (87.1)	6 (100)	0.594
HbA1c (%)	7.6 ± 2.0	8.2 ± 2.0	6.6 ± 0.4	0.216
Hemoglobin (g/dL)	10.7 ± 2.3	10.1 ± 1.7	10.4 ± 2.0	0.533
eGFR (ml/min/1.73m^2)	35.5 ± 23.8	34.9 ± 22.3	45.4 ± 31.3	0.604
Albumin (g/dL)	3.3 ± 0.7	3.3 ± 0.6	3.3 ± 0.4	1.000
Total cholesterol (mg/dL)	205 ± 70	193 ± 61	160 ± 44	0.302
Urine PCR (g/gCr)	6.76 ± 4.63	8.64 ± 8.61	8.91 ± 6.57	0.502

[0137] (약어: BMI, body mass index; eGFR, estimated glomerular filtration rate; PCR, protein-to-creatinine ratio)

[0139] 사구체 병변의 경우, class I의 환자는 없었으며, 한 1 명의 환자는 14 명 (20.0 %)의 환자가 class II, 32 명 (45.7 %)의 환자가 class III, 24 명 (34.3 %)의 환자가 class IV에 해당하였다. eGFR의 수치는 각 그룹간에 차이가 없었다.

[0140] ITFA 점수 0, 1, 2, 3 에 해당하는 환자는 각각 2 명 (2.9 %), 41 명 (58.8 %), 17 명 (24.3 %), 10 명 (14.3 %)이었다. ITFA 점수가 0 인 환자의 수가 너무 적었기 때문에 ITFA 점수가 0과 1 인 사람들을 더한 후 통계 분석을 수행하였다. ITFA 점수가 높게 나타난 환자는 현저히 낮은 eGFR과 낮은 수준의 헤모글로빈 수치를 보였다 (각각 $p < 0.001$ 과 0.019).

[0141] 간질 염증 점수 0, 1, 2 에는 각각 12 명 (17.1 %), 42 명 (60.0 %), 16 명 (22.9 %)의 환자가 해당되었다. 비록 통계적으로 유의한 것으로 나타나진 않았으나 ($p = 0.059$), 간질 염증의 정도가 높은 환자는 낮은 eGFR 수치를 나타내는 경향을 보였다.

[0142] 세동맥의 유리질증 점수 0, 1, 2에 해당하는 환자는 각각 7 명 (10.0 %), 58 명 (82.9 %), 5 명 (7.1 %)이었고, 동맥경화증 점수는 0, 1, 2에 해당하는 환자는 각각 33 명 (47.1 %), 31 명 (44.3 %), 6 명 (8.6 %)이었다. 세동맥의 유리질증 또는 동맥경화증 등급이 다른 환자들 간에는 임상 양상에 차이가 나타나지 않았다.

[0144] 요약하면, 당뇨병성 신증의 다양한 병리학적 특징 중에서 특히 ITFA가 신장 기능과 유의적으로 연관성이 높은 병리 소견에 해당하였다. 반면, 사구체 병변, 간질 염증 및 기타 혈관 병변은 임상적 매개 변수와 직접적인 관련이 없는 것으로 확인되었다.

[0146] 추가적으로, 소변 마커가 신장 내 병리학적 소견을 반영할 수 있는지 평가하였다. 서로 다른 병리학 분류에 따른 소변 염증 마커의 발현 수준을 표 7 내지 표 11에 나타내었다

표 7

[0148]

	사구체 병변(Glomerular lesions)			
	Class II (n=14)	Class III (n=32)	Class IV (n=24)	p value
MCP-1/Cr	6.4 (2.9, 15.2)	12.7 (5.7, 25.0)	8.9 (4.0, 20.9)	0.180
RANTES/Cr	0.1 (0, 0.3)	0.2 (0.1, 0.3)	0.1 (0, 0.3)	0.310
IP-10/Cr	0.4 (0.2, 1.1)	0.6 (0.3, 0.9)	0.3 (0.2, 0.5)	0.106

CXCL16/Cr	3.6 (1.6, 9.3)	4.6 (2.5, 8.6)	7.7 (3.8, 16.6)	0.280
Endostatin/Cr	447.1 (114.9, 1172.0)	694.5 (356.8, 1957.2)	1119.1 (364.1, 3093.7)	0.452
IL-6/Cr	0.1 (0, 0.2)	0.3 (0.1, 0.8)	0.3 (0, 0.5)	0.154
TNF- α /Cr	0 (0, 0)	0 (0, 0.1)	0 (0, 0.1)	0.100
VEGF/Cr	1.2 (1.0, 1.8)	1.7 (1.2, 2.3)	1.4 (1.0, 1.8)	0.075
CXCL9/Cr	1.1 (0.8, 2.3)	1.8 (1.1, 3.2)	1.6 (0.9, 2.3)	0.202

표 8

[0150]

	간질 섬유증 및 세관 위축(Interstitial fibrosis and tubular atrophy)			
	0 and 1 (n=43)	2 (n=17)	3 (n=10)	p value
MCP-1/Cr	6.5 (2.7, 14.5)	13.4 (7.8, 34.3)	20.7 (9.0, 35.5)	0.004
RANTES/Cr	0.2 (0.1, 0.3)	0.1 (0, 0.4)	0.2 (0.1, 0.3)	0.773
IP-10/Cr	0.4 (0.2, 0.8)	0.4 (0.3, 0.8)	0.4 (0.4, 0.7)	0.517
CXCL16/Cr	3.6 (1.6, 6.3)	8.4 (5.4, 19.8)	16.5 (6.1, 23.0)	<0.001
Endostatin/Cr	443.7 (231.4, 947.6)	1905.4 (1014.1, 7489.8)	3967.9 (1403.2, 7827.5)	<0.001
IL-6/Cr	0.1 (0, 0.5)	0.4 (0.1, 0.6)	0.5 (0.1, 0.9)	0.178
TNF- α /Cr	0 (0, 0.1)	0 (0, 0.1)	0.2 (0, 0.3)	0.179
VEGF/Cr	1.4 (1.0, 2.0)	1.5 (1.1, 2.2)	1.5 (1.0, 3.8)	0.670
CXCL9/Cr	1.3 (0.8, 2.1)	2.9 (1.1, 4.3)	2.1 (1.2, 2.8)	0.402

표 9

[0152]

	간질 염증(Interstitial inflammation)			
	0 (n=12)	1 (n=42)	2 (n=16)	p value
MCP-1/Cr	12.2 (3.6, 21.2)	8.3 (4.0, 18.2)	15.9 (5.7, 27.2)	0.331
RANTES/Cr	0.2 (0.1, 0.3)	0.1 (0, 0.3)	0.2 (0.1, 0.3)	0.949
IP-10/Cr	0.5 (0.2, 0.9)	0.4 (0.3, 0.7)	0.4 (0.3, 1.1)	0.761
CXCL16/Cr	6.2 (0.8, 8.4)	4.7 (2.1, 10.1)	7.3 (3.4, 17.0)	0.391
Endostatin/Cr	928.2 (83.0, 1215.8)	548.4 (342.1, 1666.2)	1428.2 (460.0, 8156.2)	0.076
IL-6/Cr	0.3 (0.1, 0.5)	0.2 (0.1, 0.6)	0.4 (0.1, 0.8)	0.690
TNF- α /Cr	0 (0, 0.1)	0 (0, 0.1)	0 (0, 0.2)	0.702
VEGF/Cr	1.3 (0.9, 2.0)	1.5 (1.1, 2.1)	1.4 (0.8, 2.8)	0.576
CXCL9/Cr	1.6 (0.5, 3.6)	1.3 (0.9, 2.8)	2.1 (1.3, 2.7)	0.393

표 10

[0154]

	세동맥의 유리질증(Arteriolar hyalinosis)			
	0 (n=7)	1 (n=58)	2 (n=5)	p value
MCP-1/Cr	4.3 (2.6, 20.1)	9.5 (4.9, 18.4)	32.3 (2.9, 100.2)	0.574
RANTES/Cr	0.2 (0, 0.3)	0.1 (0, 0.3)	0.2 (0.1, 6.2)	0.258
IP-10/Cr	0.4 (0.3, 0.9)	0.4 (0.3, 0.8)	0.5 (0.3, 1.1)	0.798
CXCL16/Cr	3.6 (1.8, 17.3)	5.1 (2.2, 10.2)	4.6 (2.1, 31.2)	0.865
Endostatin/Cr	515.6 (264.7, 8320.6)	799.8 (337.8, 1739.0)	515.6 (263.9, 13195.7)	0.878

IL-6/Cr	0.1 (0, 0.4)	0.2 (0.1, 0.6)	0.9 (0.1, 0.5)	0.453
TNF- α /Cr	0 (0, 0.1)	0 (0, 0.1)	0.2 (0, 0.3)	0.179
VEGF/Cr	1.4 (0.8, 3.3)	1.5 (1.1, 2.1)	1.4 (0.9, 4.0)	0.892
CXCL9/Cr	2.6 (1.4, 2.9)	1.3 (0.9, 2.5)	2.5 (1.1, 11.9)	0.182

표 11

	동맥경화증(Arteriosclerosis)			p value
	0 (n=33)	1 (n=31)	2 (n=6)	
MCP-1/Cr	9.5 (3.5, 19.4)	9.2 (4.2, 19.8)	16.0 (5.2, 72.8)	0.574
RANTES/Cr	0.1 (0, 0.3)	0.2 (0, 0.3)	0.3 (0.1, 3.7)	0.210
IP-10/Cr	0.4 (0.3, 0.7)	0.4 (0.2, 0.7)	0.8 (0.6, 1.4)	0.064
CXCL16/Cr	4.4 (2.0, 12.5)	9.6 (2.5, 10.7)	4.7 (2.1, 15.2)	0.857
Endostatin/Cr	799.8 (275.0, 1642.7)	721.9 (356.7, 2733.6)	446.1 (341.0, 5210.4)	0.784
IL-6/Cr	0.2 (0, 0.7)	0.2 (0.1, 0.5)	1.0 (0.1, 1.3)	0.299
TNF- α /Cr	0 (0, 0.1)	0 (0, 0.1)	0 (0, 0.1)	0.536
VEGF/Cr	1.5 (1.0, 2.0)	1.4 (1.2, 2.2)	1.8 (1.0, 3.8)	0.681
CXCL9/Cr	1.3 (0.9, 2.2)	1.8 (1.1, 3.0)	3.7 (0.9, 8.2)	0.071

Data are expressed as median (25th, 75th percentages)

(약어: MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; RANTES, Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; IP-10, interferon gamma-induced protein-10; IL-6, interleukin-6; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; VEGF, vascular endothelial growth factor)

사구체 병변의 등급에 따라 환자를 분류했을 때 소변 염증 마커의 발현 수준에는 유의적인 차이가 없었다. 또한, 간질 염증, 세동맥의 유리질증, 동맥경화증의 중증도와도 마커 발현량과 유의적인 연관성이 나타나지 않았다.

반면, MCP-1, CXCL16 및 엔도스타틴 3가지 소변 염증 마커의 발현량이 높은 등급의 IFTA 환자에서 유의하게 상승하였음을 확인하였다 (각각 $p = 0.004$, <0.001 및 <0.001).

상관 분석 결과, RANTES를 제외한 대부분의 소변 염증 마커는 소변 PCR과 유의한 상관 관계가 있는 것으로 확인 되었으며 (표 12), 특히 MCP-1, CXCL16, 엔도스타틴 및 IL-6은 소변 염증 마커로서 유의성이 가장 높은 것으로 나타났다 (각각 $R = 0.687$, 0.490 , 0.540 , 0.527). 상기 4개 마커는 또한 eGFR의 연중 감소(annual decline)와 유의성 있는 음의 상관 관계(negative correlation)를 보였다 (각각 $R = -0.496$, -0.520 , -0.602 , -0.476). 소변 PCR 자체는 eGFR의 감소와 관련이 있었으나, 상관 계수는 상기 소변 마커보다 낮은 것으로 확인되었다 ($R = -0.315$, 도 3)

표 12

소변 염증 마커, 요 단백/크레아티닌 비율, 및 신장 기능 연간 감소(annual decline) 간의 관련성

	Urine PCR (g/gCr)		Decline in eGFR (%/yr)	
	R	p	R	p
MCP-1	0.687	<0.001	-0.496	0.001
RANTES	0.228	0.057	-0.255	0.108

IP-10	0.372	0.002	-0.207	0.194
CXCL16	0.490	<0.001	-0.520	<0.001
Endostatin	0.540	<0.001	-0.602	<0.001
IL-6	0.527	<0.001	-0.476	0.002
TNF- α	0.320	0.007	-0.281	0.075
VEGF	0.324	0.006	-0.299	0.057
CXCL9	0.433	<0.001	-0.351	0.024

[0168] (약어: PCR, protein-to-creatinine ratio; eGFR, estimated glomerular filtration rate; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; IP-10, interferon gamma-induced protein-10; IL-6, interleukin-6; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; VEGF, vascular endothelial growth factor)

[0170] 2-3 병리학적 분류 및 소변 염증 마커에 따른, 생검으로 확인된 당뇨병성 신증 환자의 신장 기능 결과 확인

[0172] 병리학적 분류 및 소변 염증 마커에 따른 환자의 신장 결과를 도 4 및 5에 나타내었다. 신장 결과에 대한 상기 마커들의 효과를 평가하기 위해, 소변 PCR과 염증 마커에 따라 환자를 삼분의 일로 나누었다.

[0173] 말기 신장질환 (ESRD)에 도달하는 비율은 ITFA 및 / 또는 간질 염증 점수가 높은 환자에서 유의성 있게 더욱 높은 것으로 나타났다 (각각 $p = 0.009$ 및 0.016 , 도 4의 B 및 C). 한편, 사구체 병변, 세동맥의 유리질증 및 동맥경화증은 신장 생존에 영향을 미치지 않았다 (도 4의 A, D 및 E).

[0174] 흥미롭게도 소변 PCR은 ESRD 발생과 관련이 없는 것으로 나타났다 ($p = 0.241$, 도 5의 A). 한편, CXCL16, 엔도스타틴 및 두 마커의 조합이 증가된 발현 수치를 나타내는 환자는 ESRD에 도달하는 비율이 더 높은 것으로 나타났다 ($p = 0.015$ 및 $p = 0.002$ 및 <0.001 ; 각각 도 5의 B, C 및 D).

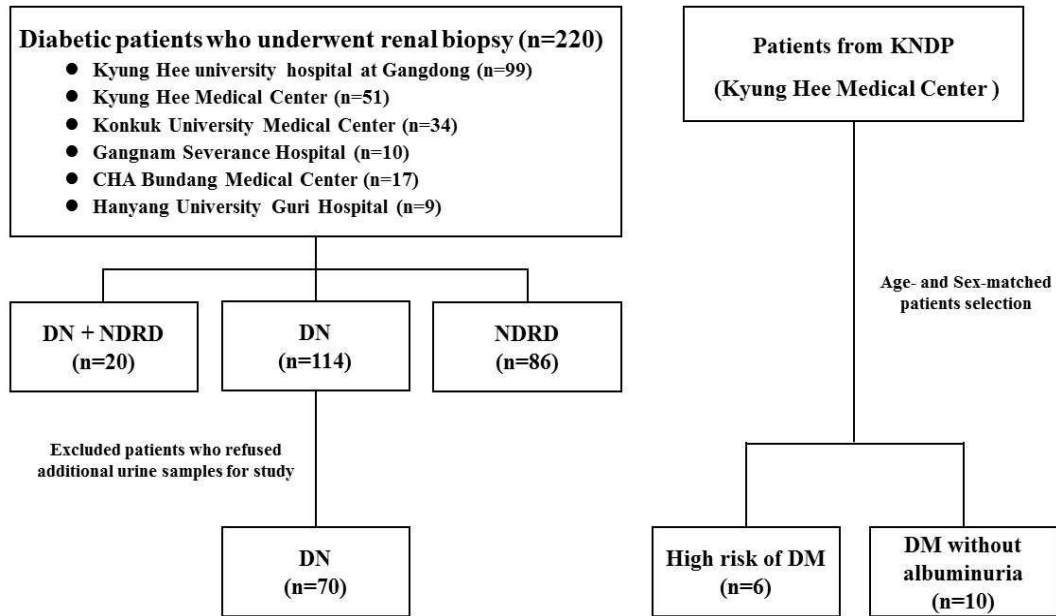
[0176] 마지막으로 ROC 곡선을 통해 ESRD로의 진행 예측력을 평가했다 (도 6). 상기 설명한 결과와 유사하게, 소변 PCR은 ESRD의 발생과 관련성이 없는 것으로 나타났다 (AUC 값은 0.534 , 도 6의 A). 반면, 소변 내 CXCL16과 엔도스타틴은 각각 0.693 과 0.756 의 AUC 값을 나타내어, ESRD의 발생 및 진행 양상을 예측하는데 사용될 수 있음을 확인하였으며(도 6의 B 및 C), 두 마커를 조합하였을 때 구별력(discriminative power)이 더 높아짐을 확인하였다 (AUC 값은 0.824 , 도 6의 D).

[0178] 따라서, 이러한 내용을 종합할 때, 소변에서 발현되는 CXCL16 및 엔도스타틴이 소변 단백뇨와 조직검사의 예후 예측력이 떨어지는 진행성 당뇨병성 신증 환자에 대한 신장 기능 저하 정도, 신장 섬유화를 예측하기 위한 바이오 마커로서 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

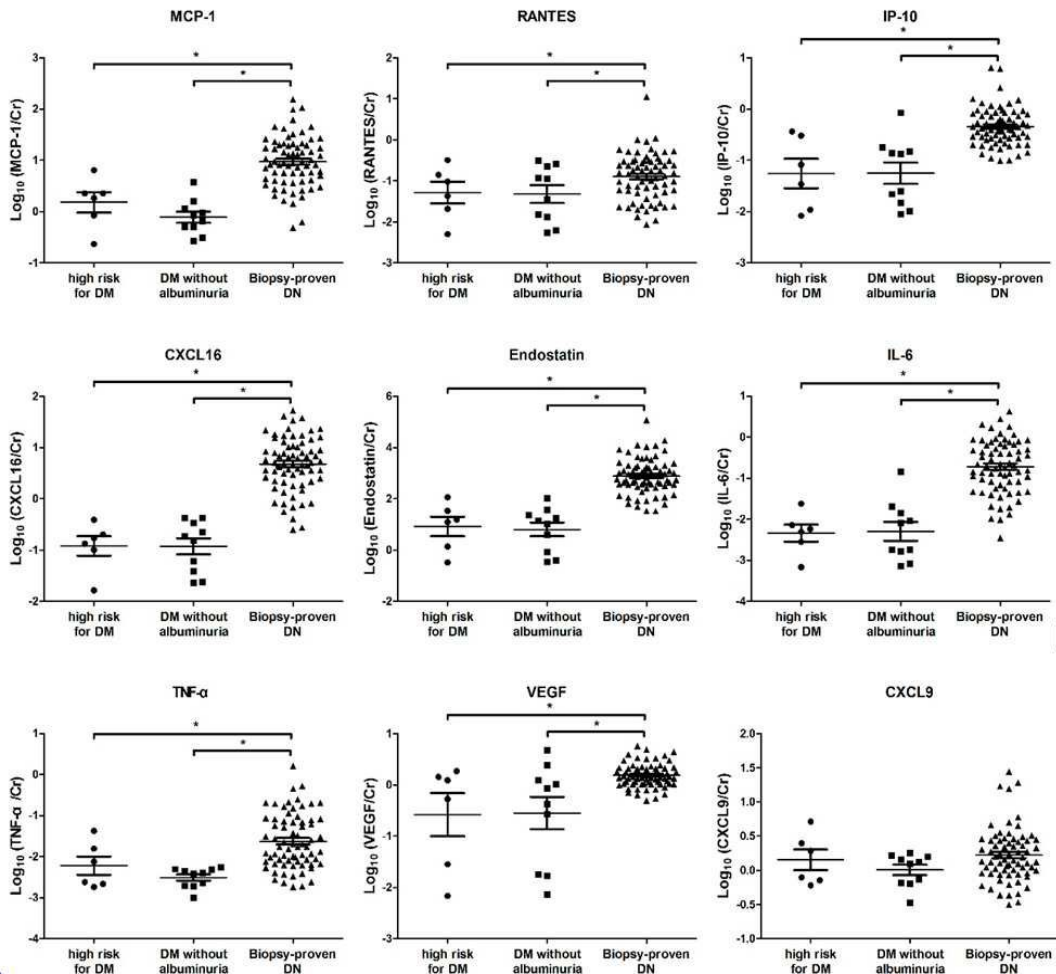
[0180] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

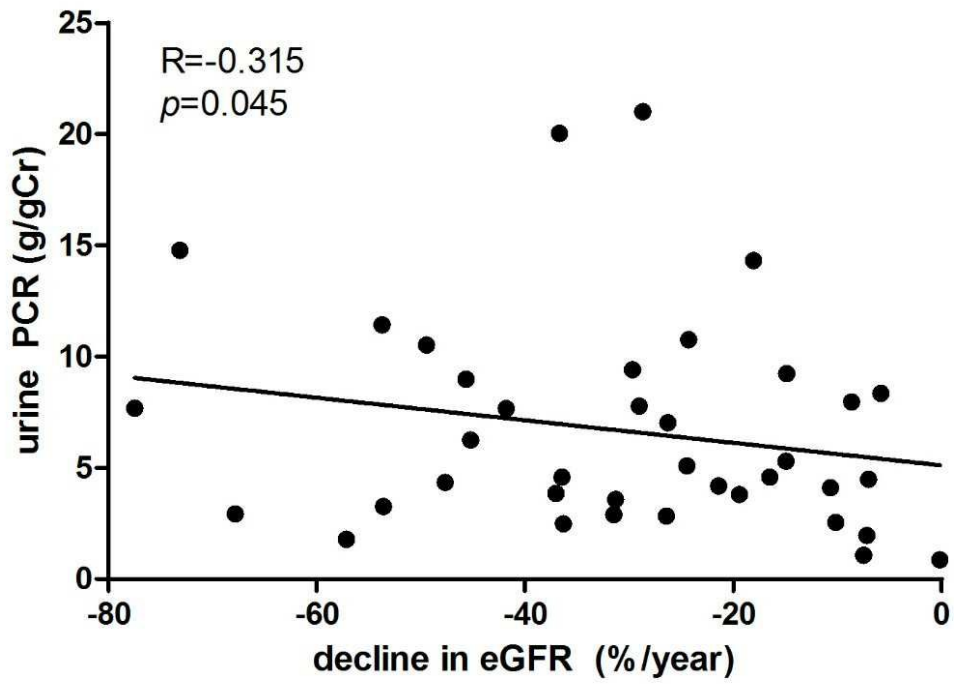
도면1



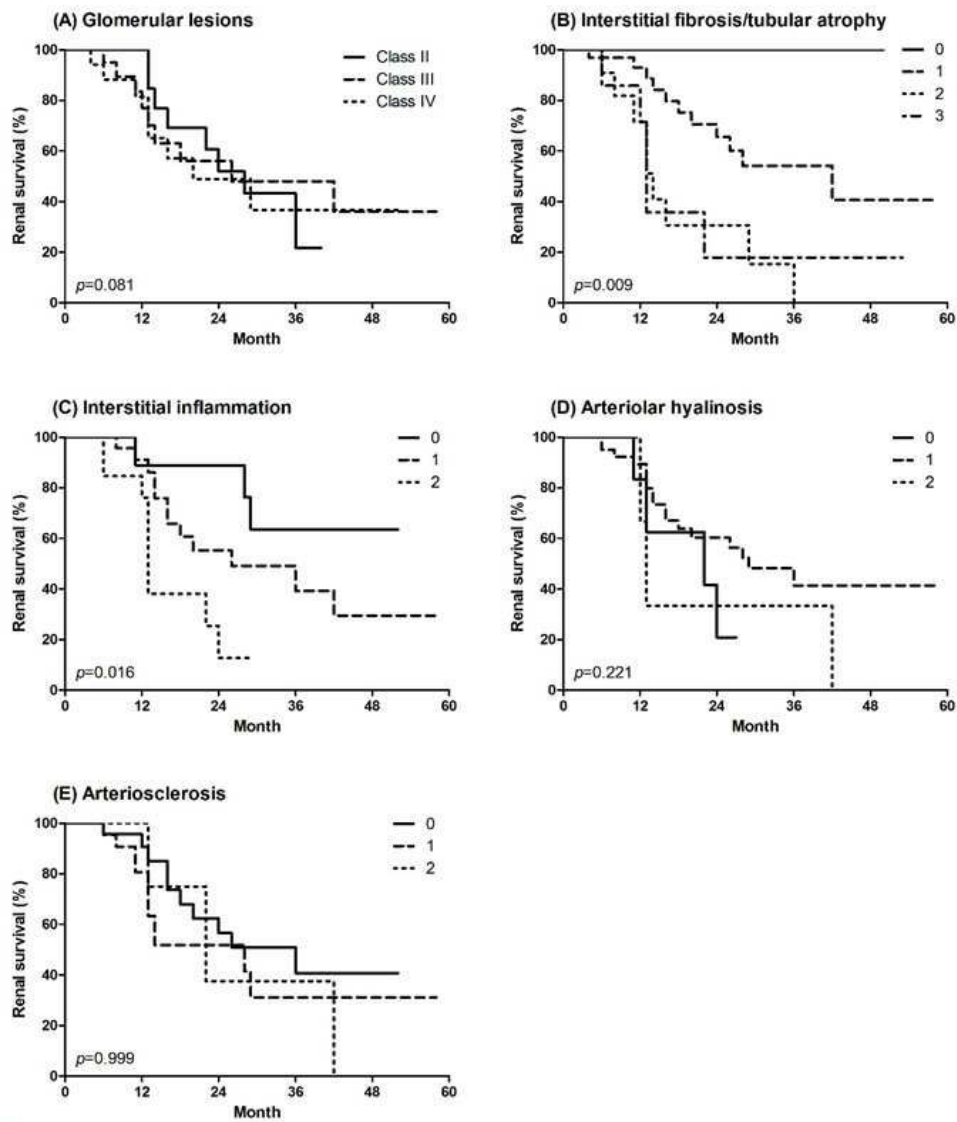
도면2



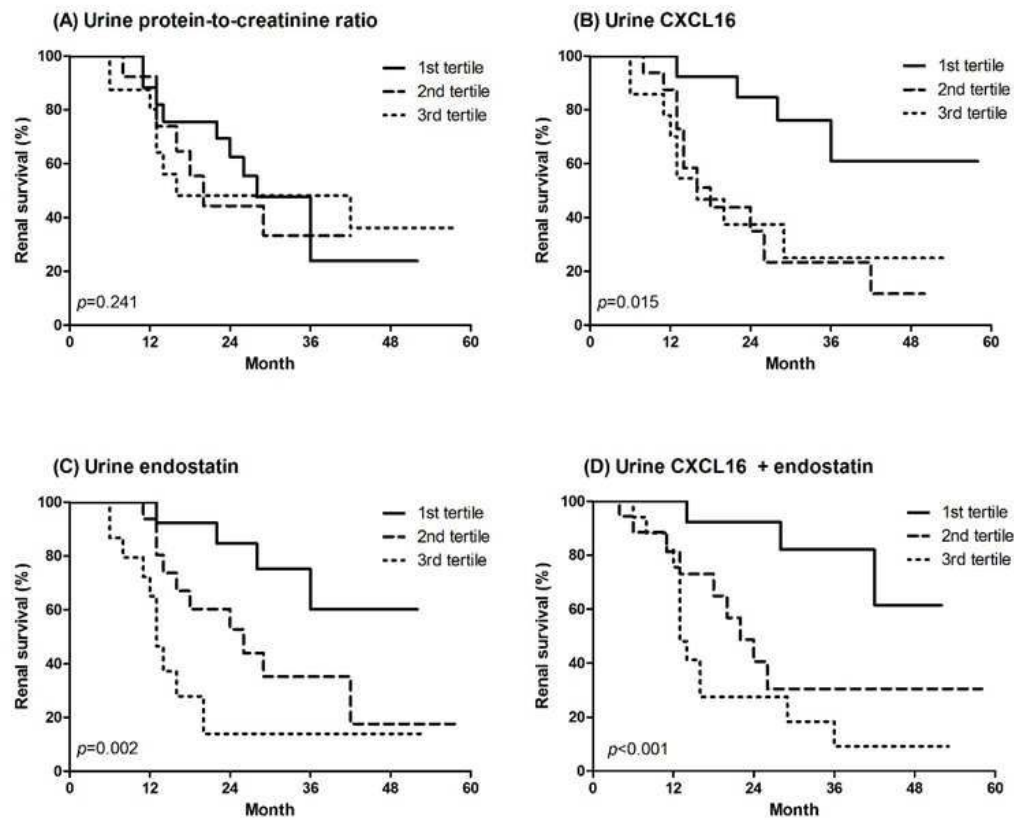
도면3



도면4



도면5



도면6

