



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0041660
(43) 공개일자 2022년04월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) C12Q 1/689 (2018.01)
G16B 20/00 (2019.01) G16B 30/20 (2019.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
C12Q 1/689 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2020-0125205
(22) 출원일자 2020년09월25일
심사청구일자 2020년09월25일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
송대진
서울특별시 서초구 잠원로3길 8 반포한신타워 102동 1206호
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 9 항

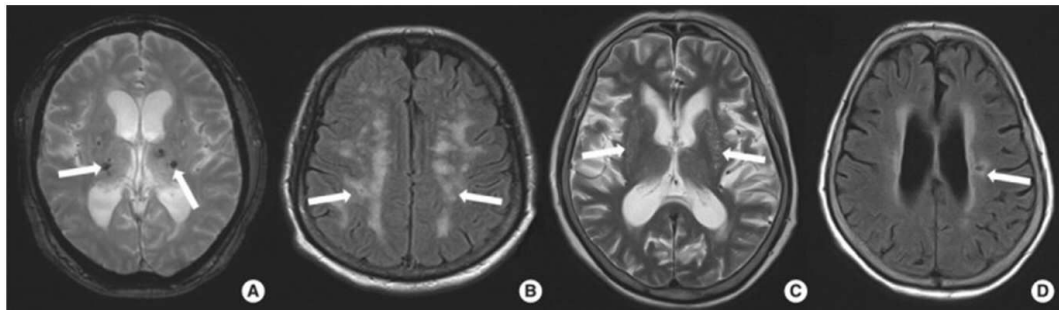
(54) 발명의 명칭 뇌 소혈관질환 진단 방법

(57) 요약

본 발명은 세균 메타게놈 분석을 통한 뇌 소혈관질환(cerebral small vessel disease)인 백질고신호강도(white matter hyperintensity), 열공성 경색(lacunar infarction), 미세출혈(microbleeds), 혈관주위공간(perivascular space)의 예측 또는 진단에 관한 것이다.

본 발명에 따른 방법은 피검체 유래 혈액 샘플을 이용해 세균 메타게놈 분석을 수행하여 세균 유래 세포밖 소포의 함량 증감을 분석함으로써 뇌 소혈관질환의 발병을 예측할 수 있는 바, 뇌 소혈관질환 발병의 원인인자 및 발병의 위험도를 미리 진단함으로써 뇌 소혈관질환 위험군을 조기에 진단하여 적절한 관리를 통해 발병 시기를 늦추거나 발병을 예방할 수 있으며, 뇌 소혈관질환으로 진단받은 환자가 메타게놈 분석을 통해 원인인자 노출을 피할 수 있도록 유도함으로써 질병의 경과를 좋게 할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G16B 20/00 (2019.02)

G16B 30/20 (2019.02)

C12Q 2600/158 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345318407

과제번호 2018R1D1A1B07040959

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)

연구과제명 만성신질환 상태에서 발생하는 혈전과 뇌경색에서 마이크로바이옴 유래 나노소포의
역할

기 여 율 1/1

과제수행기관명 이화여자대학교

연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 피검체 유래 샘플에서 분리한 세포막 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;

(b) 상기 추출한 DNA의 서열분석을 통하여 뇌 소혈관질환이 없는 뇌졸중 환자 유래 샘플과 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 비교하는 단계를 포함하고,

상기 피검체 유래 샘플은 혈액이고,

상기 (b) 단계에서, 뇌 소혈관질환이 없는 뇌졸중 환자 유래 샘플과 비교하여

세균 유래 세포막 소포의 함량이 감소하는 경우, 뇌 소혈관질환으로 진단하는 것인, 뇌 소혈관질환 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 뇌 소혈관질환은 백질고신호강도, 열공성 경색, 미세출혈, 혈관주위공간으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 정보제공방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 (b) 단계에서, 뇌 소혈관질환이 없는 뇌졸중 환자 유래 샘플과 비교하여

슈도모나스속(*Pseudomonas*), 스프링고모나스속(*Sphingomonas*), 칸디다투스 아퀴루나속(*Candidatus Aquiluna*), 플랑크토마이세스속(*Planctomyces*), 다이아리스터속(*Dialister*), 비피도박테리움속(*Bifidobacterium*), 블라우티아속(*Blautia*), 아그로박테리움속(*Agrobacterium*), 아커만시아속(*Akkermansia*), 및 클로아시박테리움속(*Cloacibacterium*)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 세균 유래 세포막 소포의 함량이 감소하는 경우, 중등도 이상의 백질고신호강도로 진단하는 것인, 정보제공방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 (b) 단계에서, 뇌 소혈관질환이 없는 뇌졸중 환자 유래 샘플과 비교하여

테피디모나스속(*Tepidimonas*), 및 도레속(*Dorea*)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 세균 유래 세포막 소포의 함량이 감소하는 경우, 열공성 경색으로 진단하는 것인, 정보제공방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 (b) 단계에서, 뇌 소혈관질환이 없는 뇌졸중 환자 유래 샘플과 비교하여

클로스트리디움(*Clostridiaceae*) SMB53속, 유박테리움속(*Eubacterium*), 아그로박테리움속(*Agrobacterium*), 펄브리모나스속(*Fimbriimonas*), 및 미츠오켈라속(*Mitsuokella*)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 세균 유래 세포막 소포의 함량이 감소하는 경우, 높은 정도의 혈관주위공간으로 진단하는 것인, 정보제공

방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 (b) 단계에서, 뇌 소혈관질환이 없는 뇌졸중 환자 유래 샘플과 비교하여

다이어트지아속(*Dietzia*), 헤모필루스속(*Haemophilus*), 데이노코쿠스속(*Deinococcus*), 메틸로테네라속(*Methylobacterium*), 및 후소박테리움속(*Fusobacterium*)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 세균 유래 세포벽 소포의 함량이 감소하는 경우, 미세출혈로 진단하는 것인, 정보제공방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 혈액은 전혈, 혈청, 혈장, 또는 혈액 단핵구인 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 피검체 유래 샘플은 뇌졸중 발병 이력이 있는 피검체 유래 샘플인 것인, 정보제공방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 서열분석은 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머를 이용한 PCR을 통해 분석하는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세균 메타게놈 분석을 통한 뇌 소혈관질환(cerebral small vessel disease)인 백질고신호강도(white matter hyperintensity), 열공성 경색(lacunar infarction), 미세출혈(microbleeds), 혈관주위공간(perivascular space)의 예측 또는 진단에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 뇌 소혈관질환(cerebral small vessel disease)은 한국에서 특히 중요한 위치를 차지하고 있는 질환으로, 일반적으로 뇌 CT 또는 MRI상에서 발견되는 뇌내 소혈관질환의 이상소견을 의미한다. 이러한 뇌 소혈관질환에는 백질고신호강도(white matter hyperintensity), 열공성 경색(lacunar infarction), 미세출혈(microbleeds), 혈관주위공간(perivascular space) 등이 있다. 이러한 뇌 소혈관질환은 향후 뇌졸중, 뇌경색, 뇌출혈, 치매, 파킨슨 증후군 등의 다양한 신경계 후유장애와 연관되어 있거나 상기 장애를 유발한다. 따라서 이러한 뇌 소혈관질환의 발생, 및 존재 여부를 확인하여 적절하게 대처하면 향후 뇌졸중, 뇌경색, 뇌출혈, 치매, 파킨슨 증후군 등의 다양한 신경계 후유장애의 위험성을 낮출 수 있어 신경계분야에서는 중요한 이슈 중의 하나이며 진단, 치료의 중요 목표이다. 뇌 소혈관질환의 주요 위험인자는 고혈압, 당뇨병, 이상지질혈증, 흡연 등이 있으며 그 외에도 유전질환 등이 있다.

[0004] 한편, 미생물총(microbiota)은 주어진 거주지에 존재하는 세균(bacteria), 고세균(archaea), 진핵생물(eukarya)을 포함한 미생물 군집(microbial community)을 의미한다. 인체에 공생하는 미생물은 100조에 이르고, 이 중 장내 미생물총은 사람의 생리현상에 중요한 역할을 하며, 인체 세포와 상호작용을 통해 인간의 건강과 질병에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 우리 몸에 공생하는 세균은 다른 세포와 유전자, 단백질 등의 정보를 교환하기 위하여 나노미터 크기의 소포(vesicle)를 분비한다. 점막은 200 나노미터(nm) 크기 이상의 입자는 통과할 수 없는 물리적인 방어막을 형성하여 점막에 공생하는 세균인 경우에는 점막을 통과하지 못하지만, 세균

유래 세포는 크기가 대개 100 나노미터 크기 이하이므로 비교적 자유롭게 점막을 통과하여 우리 몸에 흡수된다.

[0005] 메타게놈학은 환경 유전체학이라고도 명명되며 환경에서 채취한 샘플에서 얻은 메타게놈 자료에 대한 분석학이다(국내공개특허 제2011-0073049호). 최근 16s 리보솜 RNA(16s rRNA) 염기서열을 기반으로 한 방법으로 인간의 미생물총의 세균 구성을 목록화하는 것이 가능해졌으며, 16s 리보솜 RNA의 유전자인 16s rDNA 염기서열을 차세대 염기서열분석(next generation sequencing, NGS) 플랫폼을 이용하여 분석한다.

[0006] 그러나 뇌 소혈관질환에 있어서, 혈액 등의 인체 유래물에서 세균 유래 세포에 존재하는 메타게놈 분석을 통해 뇌 소혈관질환의 원인인자를 동정하고 뇌 소혈관질환을 예측하는 방법에 대해서는 보고된 바가 없다.

[0007] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 피검체 유래 샘플인 혈액에 존재하는 세균 유래 세포막 소포로부터 유전자를 추출하고 이에 대하여 메타게놈 분석을 수행하였으며, 그 결과 뇌 소혈관질환의 원인인자로 작용할 수 있는 세균 유래 세포막 소포를 동정하였는 바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 하나의 목적은 (a) 피검체 유래 샘플에서 분리한 세포막 소포로부터 DNA를 추출하는 단계; (b) 상기 추출한 DNA의 서열분석을 통하여 뇌 소혈관질환이 없는 뇌졸중 환자 유래 샘플과 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 비교하는 단계를 포함하고, 상기 피검체 유래 샘플은 혈액이고, 상기 (b) 단계에서, 뇌 소혈관질환이 없는 뇌졸중 환자 유래 샘플과 비교하여 세균 유래 세포막 소포의 함량이 감소하는 경우, 뇌 소혈관질환으로 진단하는 것인, 뇌 소혈관질환 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명, 및 실시형태는 각각의 다른 설명, 및 실시형태에도 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.

[0012] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 발명에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 하나의 양태는 (a) 피검체 유래 샘플에서 분리한 세포막 소포로부터 DNA를 추출하는 단계; (b) 상기 추출한 DNA의 서열분석을 통하여 뇌 소혈관질환이 없는 뇌졸중 환자 유래 샘플과 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 비교하는 단계를 포함하고, 상기 피검체 유래 샘플은 혈액이고, 상기 (b) 단계에서, 뇌 소혈관질환이 없는 뇌졸중 환자 유래 샘플과 비교하여 세균 유래 세포막 소포의 함량이 감소하는 경우, 뇌 소혈관질환으로 진단하는 것인, 뇌 소혈관질환 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0016] 본 발명에서 용어, "뇌 소혈관질환(cerebral small vessel disease)"은 일반적으로 뇌 CT 또는 MRI상에서 발견되는 뇌내 소혈관질환의 이상조건을 의미한다. 이러한 뇌 소혈관질환에는 백질고신호강도(white matter hyperintensity), 열공성 경색(lacunar infarction), 미세출혈(microbleeds), 혈관주위공간(perivascular space) 등이 있다. 이러한 뇌 소혈관질환은 향후 뇌졸중, 뇌경색, 뇌출혈, 치매, 파킨슨 증후군 등의 다양한 신경계 후유장애와 연관되어 있거나 상기 장애를 유발할 수 있다. 뇌 소혈관질환의 주요 위험인자는 고혈압, 당뇨병, 이상지질혈증, 흡연 등이 있으며 그 외에도 유전질환 등이 있다. 그러나 현재까지도 뇌 소혈관질환의 위험인자에 대해서는 완전하게 밝혀지지 않은 실정이다. 본 발명에 있어서, 상기 뇌 소혈관질환은 백질고신호강도(white matter hyperintensity), 열공성 경색(lacunar infarction), 미세출혈(microbleeds) 또는 혈관주위공간(perivascular space) 중 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0018] 본 발명에서 용어, "뇌 소혈관질환 진단"이란 환자에 대하여 뇌 소혈관질환이 발병할 가능성이 있는지, 뇌 소혈관질환이 발병할 가능성이 상대적으로 높은지, 또는 뇌 소혈관질환이 이미 발병하였는지 여부를 판별하는 것을 의미한다. 본 발명의 방법은 임의의 특정 환자에 대한 뇌 소혈관질환 위험도가 높은 환자로서 특별하고 적절한 관리를 통하여 발병 시기를 늦추거나 발병하지 않도록 하는데 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 뇌 소혈관질환을 조기에 진단하여 가장 적절한 치료방식을 선택함으로써 치료를 결정하기 위해 임상적으로 사용될 수 있다.
- [0020] 본 발명에서 용어, "메타게놈(metagenome)"이란 군유전체라고도 하며, 흙, 동물의 장 등 고립된 지역 내의 모든 바이러스, 세균, 곰팡이 등을 포함하는 유전체의 총합을 의미하는 것으로, 주로 배양이 되지 않는 미생물을 분석하기 위해서 서열분석기를 사용하여 한꺼번에 많은 미생물을 동정하는 것을 설명하는 유전체의 개념으로 쓰인다. 특히, 메타게놈은 한 종의 게놈 또는 유전체를 말하는 것이 아니라, 한 환경단위의 모든 종의 유전체로서 일종의 혼합유전체를 말한다. 이는 오믹스적으로 생물학이 발전하는 과정에서 한 종을 정의할 때 기능적으로 기존의 한 종뿐만 아니라, 다양한 종이 서로 상호작용하여 완전한 종을 만든다는 관점에서 나온 용어이다. 기술적으로는 빠른 서열분석법을 이용해서, 종에 관계없이 모든 DNA, RNA를 분석하여, 한 환경 내에서의 모든 종을 동정하고, 상호작용, 대사작용을 규명하는 기법의 대상이다. 본 발명에서는 혈청에서 분리한 세균 유래 세포막 소포를 이용하여 메타게놈 분석을 실시하였다.
- [0022] 본 발명에서 용어, "세균 유래 소포"란 세균, 및 고세균에서 분비되는 세포막 소포를 포함하나, 이것으로 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 상기 (a) 단계에서, 상기 피검체 유래 샘플은 뇌졸중 발병 이력이 있는 피검체로부터 유래한 샘플인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 상기 (a) 단계에서, 피검체 유래 샘플은 혈액일 수 있고, 상기 혈액은 바람직하게 전혈, 혈청, 혈장, 또는 혈액 단핵구일 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 상기 (b) 단계에서, 추출한 DNA의 서열분석은 추출한 DNA에 대하여 서열번호 1, 및 서열번호 2의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하고 이를 통해 수득한 PCR 산물을 서열분석하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 상기 (b) 단계에서, 피검체 유래 샘플을 뇌 소혈관질환이 없는 뇌졸중 환자 유래 샘플과 비교하여
- [0031] 슈도모나스속(*Pseudomonas*), 스펅고모나스속(*Sphingomonas*), 칸디다투스 아퀴루나속(*Candidatus Aquiluna*), 플랑크토마이세스속(*Planctomyces*), 다이아리스터속(*Dialister*), 비피도박테리움속(*Bifidobacterium*), 블라우티아속(*Blautia*), 아그로박테리움속(*Agrobacterium*), 아커만시아속(*Akkermansia*), 및 클로아시박테리움속(*Cloacibacterium*)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 세균 유래 세포막 소포의 함량이 감소하는 경우, 중등도 이상의 백질고신호강도로 진단할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 상기 (b) 단계에서, 피검체 유래 샘플을 뇌 소혈관질환이 없는 뇌졸중 환자 유래 샘플과 비교하여
- [0033] 테피디모나스속(*Tepidimonas*), 및 도레속(*Dorea*)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 세균 유래 세포막 소포의 함량이 감소하는 경우, 열공성 경색으로 진단할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 상기 (b) 단계에서, 피검체 유래 샘플을 뇌 소혈관질환이 없는 뇌졸중 환자 유래 샘플과 비교하여
- [0035] 클로스트리디움(*Clostridiaceae*) SMB53속, 유박테리움속(*Eubacterium*), 아그로박테리움속(*Agrobacterium*), 펄브리모나스속(*Fimbriimonas*), 및 미츠오켈라속(*Mitsuokella*)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 세균 유래 세포막 소포의 함량이 감소하는 경우, 높은 정도의 혈관주위공간으로 진단할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0036] 또한, 상기 (b) 단계에서, 피검체 유래 샘플을 뇌 소혈관질환이 없는 뇌졸중 환자 유래 샘플과 비교하여
- [0037] 다이얼트지아속(*Dietzia*), 헤모필루스속(*Haemophilus*), 데이노코쿠스속(*Deinococcus*), 메틸로테네라속(*Methylobacterium*), 및 후소박테리움속(*Fusobacterium*)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 세균 유래 세포벽 소포의 함량이 감소하는 경우, 미세출혈로 진단할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 본 발명의 일 구현예에서는 상기 세균 유래 세포벽 소포에 대한 메타게놈 분석을 실시하였으며, 목(order), 과(family), 속(genus) 및 종(species) 수준에서 각각 분석하여 실제로 뇌 소혈관질환의 원인으로 작용할 수 있는 세균 유래 소포를 동정하였다.
- [0040] 구체적으로, 본 발명의 일 구현예에서 중증도 이상의 백질고신호강도 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에 대하여 목(order) 수준에서 분석한 결과, 중증도 이상의 백질고신호강도가 있는 환자와 없는 환자는 플랑크토마이세테스목(*Planctomycetes*), 피시스페라레스목(*Phycisphaerales*), 솔리박테라레스목(*Solibacterales*), 및 스트렙토피타목(*Streptophyta*)에 차이가 있었다(표 2). 구체적으로, 중증도 이상의 백질고신호강도가 있는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에서는 중증도 이상의 백질고신호강도가 없는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포보다 플랑크토마이세테스목, 피시스페라레스목, 솔리박테라레스목, 및 스트렙토피타목 세균 유래 세포벽 소포의 함량이 감소하였다.
- [0041] 과(family) 수준에서 분석한 결과, 중증도 이상의 백질고신호강도가 있는 환자와 없는 환자는 악티노박테리아(*Actinobacteria*) EB1017과, 비피도박테리아과(*Bifidobacteriaceae*), 박테리오포락스과(*Bacteriovoraceae*), 프로카박테리아과(*Procabacteriaceae*), 레지오넬라과(*Legionellaceae*), 리조비아세아에과(*Rhizobiaceae*), 및 악티노박테리아 클러스터(*Actinobacterial cluster*) ACK-M1과에 차이가 있었다(표 2). 구체적으로, 중증도 이상의 백질고신호강도가 있는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에서는 중증도 이상의 백질고신호강도가 없는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포보다 EB1017과, 비피도박테리아과, 박테리오포락스과, 프로카박테리아과, 레지오넬라과, 리조비아세아에과, 및 ACK-M1과 세균 유래 세포벽 소포의 함량이 감소하였다.
- [0042] 속(genus) 수준에서 분석한 결과, 중증도 이상의 백질고신호강도가 있는 환자와 없는 환자는 슈도모나스속(*Pseudomonas*), 스펅고모나스속(*Sphingomonas*), 칸디다투스 아퀴루나속(*Candidatus Aquiluna*), 플랑크토마이세스속(*Planctomyces*), 다이아리스터속(*Dialister*), 비피도박테리움속(*Bifidobacterium*), 블라우티아속(*Blautia*), 아그로박테리움속(*Agrobacterium*), 아커만시아속(*Akkermansia*), 및 클로아시박테리움속(*Cloacibacterium*)에 차이가 있었다. 구체적으로, 중증도 이상의 백질고신호강도가 있는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에서는 중증도 이상의 백질고신호강도가 없는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포보다 슈도모나스속, 스펅고모나스속, 칸디다투스 아퀴루나속, 플랑크토마이세스속, 다이아리스터속, 비피도박테리움속, 블라우티아속, 아그로박테리움속, 아커만시아속, 및 클로아시박테리움속 세균 유래 세포벽 소포의 함량이 감소하였다.
- [0043] 이와 같이, 세균 바이오마커로 진단모형을 개발하였을 때, 중증도 이상의 백질고신호강도에 대한 진단적 성능이 유의하게 나타났다(표 2, ROC표: AUC값이 세균보정 전 0.75에서 세균보정 후 0.79로 유의하게 증가함).
- [0045] 본 발명의 일 구현예에서 열공성 경색 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에 대하여 목 수준에서 분석한 결과, 열공성 경색이 있는 환자와 없는 환자는 레지오넬라목(*Legionellales*), 스펅고모나스목(*Sphingomonadales*)에 차이가 있었다(표 3). 구체적으로, 열공성 경색이 있는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에서는 레지오넬라목, 스펅고모나스목 세균 유래 세포벽 소포의 함량이 감소하였다.
- [0046] 과 수준에서 분석한 결과, 열공성 경색이 있는 환자와 없는 환자는 비피도박테리아과(*Bifidobacteriaceae*), EB1017과에 차이가 있었다(표 3). 구체적으로, 열공성 경색이 있는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에서는 열공성 경색이 없는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포보다 비피도박테리아과, EB1017과 세균 유래 세포벽 소포의 함량이 감소하였다.
- [0047] 속 수준에서 분석한 결과, 열공성 경색이 있는 환자와 없는 환자는 테피디모나스속(*Tepidimonas*), 도레속(*Dorea*)에 차이가 있었다(표 3). 구체적으로, 열공성 경색이 있는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에서는 열공성 경색이 없는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포보다 테피디모나스속, 도레속 세균 유래 세포벽 소포의 함량이 감소하였다.

- [0048] 이와 같이, 세균 바이오마커로 진단모형을 개발하였을 때, 열공성 검색에 대한 진단적 성능이 유의하게 나타났다(표 3, ROC표: AUC값이 세균보정 전 0.76에서 세균보정 후 0.79로 유의하게 증가함).
- [0050] 본 발명의 일 구현예에서 높은 정도의 혈관주위공간이 있는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에 대하여 목(order) 수준에서 분석한 결과, 높은 정도의 혈관주위공간이 있는 환자와 없는 환자는 락토바실러스목(*Lactobacillales*), 박테로이데스목(*Bacteroidales*)에 차이가 있었다(표 4). 구체적으로, 높은 정도의 혈관주위공간이 있는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에서는 락토바실러스목, 박테로이데스목 세균 유래 세포밖 소포의 함량이 감소하였다.
- [0051] 과 수준에서 분석한 결과, 높은 정도의 혈관주위공간이 있는 환자와 없는 환자는 비피도박테리아과(*Bifidobacteriaceae*)에 차이가 있었다(표 4). 구체적으로, 높은 정도의 혈관주위공간이 있는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에서는 높은 정도의 혈관주위공간이 없는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포보다 비피도박테리아과 세균 유래 세포밖 소포의 함량이 감소하였다.
- [0052] 속 수준에서 분석한 결과, 높은 정도의 혈관주위공간이 있는 환자와 없는 환자는 클로스트리디움(*Clostridiaceae*) SMB53속, 유박테리움속(*Eubacterium*), 아그로박테리움속(*Agrobacterium*), 펴브리모나스속(*Fimbrimonas*), 미츠오켈라속(*Mitsuokella*)에 차이가 있었다. 구체적으로, 높은 정도의 혈관주위공간이 있는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에서는 높은 정도의 혈관주위공간이 없는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포보다 SMB53속, 유박테리움속, 아그로박테리움속, 펴브리모나스속, 미츠오켈라속 세균 유래 세포밖 소포의 함량이 감소하였다.
- [0053] 이와 같이, 세균 바이오마커로 진단모형을 개발하였을 때, 높은 정도의 혈관주위공간에 대한 진단적 성능이 유의하게 나타났다(표 4, ROC표: AUC값이 세균보정 전 0.86에서 세균보정 후 0.90로 유의하게 증가함).
- [0055] 본 발명의 일 구현예에서 미세출혈 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에 대하여 과 수준에서 분석한 결과, 미세출혈이 있는 환자와 없는 환자는 비피도박테리아과(*Bifidobacteriaceae*), 미크로코쿠스과(*Micrococcaceae*), 사이토파가시예과(*Cytophagaceae*), 파이렐루라시예과(*Pirellulaceae*), 카울로박테리아과(*Caulobacteraceae*), 인트라스포란기아시예과(*Intrasporangiaceae*), 및 사프로스피라과(*Saprospiraceae*)에 차이가 있었다(표 5). 구체적으로, 미세출혈이 있는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에서는 미세출혈이 없는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포보다 비피도박테리아과, 미크로코쿠스과, 사이토파가시예과, 파이렐루라시예과, 카울로박테리아과, 인트라스포란기아시예과, 및 사프로스피라과 세균 유래 세포밖 소포의 함량이 감소하였다.
- [0056] 속 수준에서 분석한 결과, 미세출혈이 있는 환자와 없는 환자는 다이어트지아속(*Dietzia*), 헤모필루스속(*Haemophilus*), 데이노코쿠스속(*Deinococcus*), 메틸로테네라속(*Methylothera*), 및 후소박테리움속(*Fusobacterium*)에 차이가 있었다. 구체적으로, 미세출혈이 있는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에서는 미세출혈이 없는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포보다 다이어트지아속, 헤모필루스속, 데이노코쿠스속, 메틸로테네라속, 및 후소박테리움속 세균 유래 세포밖 소포의 함량이 감소하였다.
- [0057] 이와 같이, 세균 바이오마커로 진단모형을 개발하였을 때, 미세출혈에 대한 진단적 성능이 유의하게 나타났다(표 5, ROC표: AUC값이 세균보정 전 0.75에서 세균보정 후 0.79로 유의하게 증가함).
- [0059] 본 발명은 상기와 같이 피검체에서 분리한 세균 유래 세포밖 소포의 함량 증감을 분석함으로써 백질고신호강도, 열공성 검색, 미세출혈, 혈관주위공간을 포함하는 뇌 소혈관질환의 발병을 예측 또는 진단할 수 있음을 최초로 확인한 것에 의의가 있다.

발명의 효과

- [0061] 본 발명에 따른 방법은 피검체 유래 혈액 샘플을 이용해 세균 메타게놈 분석을 수행하여 세균 유래 세포밖 소포의 함량 증감을 분석함으로써 뇌 소혈관질환의 발병을 예측할 수 있는 바, 뇌 소혈관질환 발병의 원인인자 및 발병의 위험도를 미리 진단함으로써 뇌 소혈관질환 위험군을 조기에 진단하여 적절한 관리를 통해 발병 시기를

늦추거나 발병을 예방할 수 있으며, 뇌 소혈관질환으로 진단받은 환자가 메타게놈 분석을 통해 원인인자 노출을 피할 수 있도록 유도함으로써 질병의 경과를 좋게 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 뇌 소혈관질환의 MRI(magnetic resonance imaging) 소견을 나타낸 도이다. (A) 미세출혈(화살표), (B) 중증도 이상의 백질고신호강도(화살표), (C) 높은 정도의 혈관주위공간(화살표), (D) 무증상 열공성 경색(화살표).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 뇌 소혈관질환 여부 확인

뇌졸중 환자 198명의 MRI(magnetic resonance imaging)로부터 뇌 소혈관질환의 여부를 확인하였다.

뇌 소혈관질환 진단을 위한 MRI는 이전의 방법(Song TJ, et al; Association between Aortic Atheroma and Cerebral Small Vessel Disease in Patients with Ischemic Stroke; J Stroke. 2016 Sep;18(3):312-320.)과 같이 수행하였다.

구체적으로, MRI는 3.0T MRI 스캐너(MAGNETOM Trio 3.0T, Siemens, Germany 또는 Achieva 3.0T, Philips Medical Systems, Best, Netherlands)를 사용하여 평가하였다. MRI 프로토콜에는 유체 감쇠 전도 회복(fluid attenuated inversion recovery)(시간 반복: 9000ms, 시간 에코: 120ms, 시야각: 230x230mm, 슬라이스 두께: 5mm, 픽셀 간격: 0.449x0.449mm), T2 가중치 이미지(T2-weighted images)(시간 반복: 9000ms, 시간 에코: 100ms, 시야각: 230x230mm, 슬라이스 두께: 5mm, 픽셀 간격: 0.240x0.240mm), 및 구배 리콜 에코 T2 가중치 이미징(gradient recalled echo T2 -weighted imaging)(시간 반복: 600, 시간 에코: 16ms, 시야각: 250x250mm, 슬라이스 두께: 5mm, 픽셀 간격: 0.449x0.449mm)이 포함되었다.

중증도 이상의 백질고신호강도(white matter hyperintensity)는 2점 이상의 Fazekas 척도로 정의되었다(도 1).

열공성 경색(lacunar infarction)은 난형(ovoid) 또는 둥근(round) 모양으로 뇌피질부위 이외에 존재하며 직경이 3-15mm로서 T1 가중치 이미지에서 저신호 병변과 T2 가중치 이미지에서 고신호 병변으로 확인되는 경우로 정의되었다.

혈관주위공간(perivascular space)은 T2 가중치 이미지에서 3mm 미만의 최대 직경을 수반하는 기저핵 또는 중추반관(centrum semiovale)에 위치한 선형의 고신호강도로 정의되었다. 높은 정도의 혈관주위공간은 2~4단계의 고신호강도로 정의되었다.

또한, 미세출혈(microbleeds)은 구배 리콜 에코 이미지에서 최대 직경이 10mm 미만인 원형의 저신호강도 병변으로 정의되었다.

실시예 2. 혈액에서 세균 유래 세포막 소포 분리

뇌졸중 환자 198명의 혈액에서 소포를 분리하고 DNA를 추출하기 위해, 먼저 10 ml 튜브에 혈액을 넣고 원심분리(3,500 x g, 10 분, 4℃)를 실시하여 부유물을 가라앉혀 상등액을 회수한 후 새로운 10 ml 튜브에 옮겼다. 0.22 μ m 필터를 사용하여 상기 회수한 상등액으로부터 세균, 및 이물질질을 제거한 후, 센트리피레그알 필터(centrifuge filters 50 kD)에 옮기고 1500 x g, 4℃에서 15분간 원심분리하여 50 kD 보다 작은 물질은 버리고 10 ml까지 농축시켰다. 다시 한 번 0.22 μ m 필터를 사용하여 박테리아, 및 이물질질을 제거한 후, Type 90ti 로터로 150,000 x g, 4℃에서 3시간 동안 초고속원심분리방법을 사용하여 상등액을 버리고 덩어리진 pellet을 생리식염수(PBS)로 녹여 소포를 수득하였다.

수득한 소포 100 μ l를 100℃에서 끓여서 내부의 DNA를 지질 밖으로 나오게 한 후 얼음에 5분 동안 식혔다. 다음

으로 남은 부유물을 제거하기 위하여 10,000 x g, 4℃에서 30분간 원심분리하고 상등액만을 모아 DNA를 수득하였다. 수득한 DNA를 증폭시키기 위해 하기 표 1에 나타난 16s rDNA 프라이머로 PCR을 수행하였다.

표 1

서열번호	서열명	서열
1	16S_V3_F	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'
2	16S_V4_R	5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

실시예 3. 세균 유래 세포밖 소포 메타게놈 분석 기반 뇌 소혈관질환 진단 모형 개발

실시예 2에서 증폭된 DNA를 대상으로 시퀀싱(Illumina MiSeq sequencer)을 수행하였다. 결과를 SFF(Standard Flowgram Format) 파일로 출력하고 GS FLX software(v2.9)를 이용하여 SFF 파일을 서열 파일(.fasta)과 뉴클레오타이드 품질 점수(nucleotide quality score) 파일로 변환한 다음 리드의 신용도 평가를 확인하고, window(20 bps) 평균 base call accuracy가 99% 미만(Phred score <20)인 부분을 제거하였다. 품질이 낮은 부분을 제거한 후, 결과 분석을 위해 리드의 길이가 300 bps 이상인 것만 이용하여(Sickle version 1.33), OUT(Operational Taxonomy Unit)를 UCLUST와 USEARCH를 이용하여 시퀀스 유사도에 따라 클러스터링을 수행하였다. 구체적으로 속(genus)은 94%, 과(family)는 90%, 목(order)은 85%, 강(class)은 80%, 문(phylum)은 75% 시퀀스 유사도를 기준으로 클러스터링을 하고 각 OTU의 문, 강, 목, 과, 속, 종 레벨의 분류를 수행하고, BLASTN와 GreenGenes의 16S DNA 시퀀스 데이터베이스(108,453 시퀀스)를 이용하여 97% 이상의 시퀀스 유사도를 갖는 박테리아를 분석(QIIME)하는 메타게놈 시퀀싱을 수행하였다.

뇌 소혈관질환에 대한 진단 모형 개발은 먼저 t-test에서 두 군 사이의 p값이 0.05 이하이고, 두 군 사이에 2배 이상 차이가 나는 군주를 선정하고 난 후, 로지스틱 회귀 분석(logistic regression analysis) 방법으로 진단적 성능 지표인 ROC(receiver operation curve)를 이용하여 진단적 성능 지표인 AUC(area under curve)를 산출하였다.

3-1. 중증도 이상의 백질고신호강도

혈액 내 세균유래 소포를 목(order) 수준에서 분석한 결과, 중증도 이상의 백질고신호강도가 있는 환자와 없는 환자는 플랑크토마이세테스목(*Planctomycetales*), 피시스페라레스목(*Phycisphaerales*), 솔리박테라레스목(*Solibacterales*), 및 스트렙토피타목(*Streptophyta*)에 차이가 있었다(표 2). 구체적으로, 중증도 이상의 백질고신호강도가 있는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에서는 중증도 이상의 백질고신호강도가 없는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포보다 플랑크토마이세테스목, 피시스페라레스목, 솔리박테라레스목, 및 스트렙토피타목 세균 유래 세포밖 소포의 함량이 감소하였다.

과(family) 수준에서 분석한 결과, 중증도 이상의 백질고신호강도가 있는 환자와 없는 환자는 악티노박테리아(*Actinobacteria*) EB1017과, 비피도박테리아과(*Bifidobacteriaceae*), 박테리오보락스과(*Bacteriovoracaceae*), 프로카박테리아과(*Procabacteriaceae*), 레지오넬라과(*Legionellaceae*), 리조비아세아에과(*Rhizobiaceae*), 및 악티노박테리아 클러스터(Actinobacterial cluster) ACK-M1과에 차이가 있었다(표 2). 구체적으로, 중증도 이상의 백질고신호강도가 있는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에서는 중증도 이상의 백질고신호강도가 없는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포보다 EB1017과, 비피도박테리아과, 박테리오보락스과, 프로카박테리아과, 레지오넬라과, 리조비아세아에과, 및 ACK-M1과 세균 유래 세포밖 소포의 함량이 감소하였다.

속(genus) 수준에서 분석한 결과, 중증도 이상의 백질고신호강도가 있는 환자와 없는 환자는 슈도모나스속(*Pseudomonas*), 스펡고모나스속(*Sphingomonas*), 칸디다투스 아퀴루나속(*Candidatus Aquiluna*), 플랑크토마이세스속(*Planctomyces*), 다이아리스터속(*Dialister*), 비피도박테리움속(*Bifidobacterium*), 블라우티아속(*Blautia*), 아그로박테리움속(*Agrobacterium*), 아커만시아속(*Akkermansia*), 및 클로아시박테리움속(*Cloacibacterium*)에 차이가 있었다. 구체적으로, 중증도 이상의 백질고신호강도가 있는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에서는 중증도 이상의 백질고신호강도가 없는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포보다 슈도모나스속, 스펡고모나스속, 칸디다투스 아퀴루나속, 플랑크토마이세스속, 다이아리스터속, 비피도박테리움속, 블라

우티아속, 아그로박테리움속, 아커만시아속, 및 클로아시박테리움속 세균 유래 세포막 소포의 함량이 감소하였다.

[0089] 이와 같이, 세균 바이오마커로 진단모형을 개발하였을 때, 중등도 이상의 백질고신호강도에 대한 진단적 성능이 유의하게 나타났다(표 2, ROC표: AUC값이 세균보정 전 0.75에서 세균보정 후 0.79로 유의하게 증가함).

표 2

[0091]

Taxon	High grade WMH (-)		High grade WMH (+)		등분산 검정	t-test	Training set			Test set		
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	p-value	AUC	Sensitivity	Specificity	AUC	Sensitivity	Specificity
k_Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Pseudomonadales;f__Pseudomonadaceae;g__Pseudomonas	0.0618	0.0743	0.0403	0.0289	<u>0.0000</u>	<u>0.0046</u>	0.7100	0.3200	0.9900	0.6100	0.2100	1.0000
k_Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Sphingomonadales;f__Sphingomonadaceae;g__Sphingomonas	0.0154	0.0352	0.0070	0.0110	<u>0.0000</u>	<u>0.0115</u>	0.7200	0.4400	0.8400	0.6200	0.5000	0.8100
k_Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Microbacteriaceae;g__Candidatus Aquiluna	0.0009	0.0029	0.0002	0.0008	<u>0.0000</u>	<u>0.0163</u>	0.7500	0.8800	0.5100	0.6600	0.8400	0.5600
k_Bacteria;p__Planctomycetes;c__Planctomycetia;o__Planctomycetales;f__Planctomycetales;g__Planctomyces	0.0008	0.0027	0.0002	0.0008	<u>0.0000</u>	<u>0.0206</u>	0.6000	0.4300	0.7000	0.4800	0.4400	0.4400
k_Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Veillonellaceae;g__Dialister	0.0067	0.0142	0.0034	0.0055	<u>0.0000</u>	<u>0.0215</u>	0.6400	0.6600	0.5200	0.4300	0.5600	0.3300
k_Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Bifidobacteriales;f__Bifidobacteriaceae;g__Bifidobacterium	0.0198	0.0253	0.0127	0.0143	<u>0.0001</u>	<u>0.0221</u>	0.7200	0.3200	0.9900	0.6200	0.2100	1.0000
k_Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__Blautia	0.0070	0.0134	0.0039	0.0059	<u>0.0000</u>	<u>0.0300</u>	0.6800	0.4100	0.8500	0.5200	0.4300	0.8000
k_Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales;f__Rhizobiaceae;g__Agrobacterium	0.0022	0.0090	0.0006	0.0016	<u>0.0000</u>	<u>0.0352</u>	0.6000	0.4300	0.7000	0.4800	0.4400	0.4400
k_Bacteria;p__Verrucomicrobia;c__Verrucomicrobiae;o__Verrucomicrobiales;f__Verrucomicrobiaceae;g__Akermansia	0.0119	0.0251	0.0066	0.0096	<u>0.0000</u>	<u>0.0365</u>	0.7100	0.3200	0.9900	0.6100	0.2100	1.0000

k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Flavobacteriia;o__Flavobacteriales;f__[Weeksellaceae];g__Cloacibacterium	0.0006	0.0033	0.0000	0.0002	<u>0.0000</u>	<u>0.0392</u>	0.6900	0.4000	0.8500	0.5300	0.4400	0.8100
--	--------	--------	--------	--------	---------------	---------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

3-2. 열공성 경색

혈액 내 세균유래 소포를 목 수준에서 분석한 결과, 열공성 경색이 있는 환자와 없는 환자는 레지오넬라목(*Legionellales*), 스펡고모나스목(*Sphingomonadales*)에 차이가 있었다(표 3). 구체적으로, 열공성 경색이 있는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에서는 레지오넬라목, 스펡고모나스목 세균 유래 세포막 소포의 함량이 감소하였다.

과 수준에서 분석한 결과, 열공성 경색이 있는 환자와 없는 환자는 비피도박테리아과(*Bifidobacteriaceae*), EB1017과에 차이가 있었다(표 3). 구체적으로, 열공성 경색이 있는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에서는 열공성 경색이 없는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포보다 비피도박테리아과, EB1017과 세균 유래 세포막 소포의 함량이 감소하였다.

속 수준에서 분석한 결과, 열공성 경색이 있는 환자와 없는 환자는 테피디모나스속(*Tepidimonas*), 도레속(*Dorea*)에 차이가 있었다(표 3). 구체적으로, 열공성 경색이 있는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에서는 열공성 경색이 없는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포보다 테피디모나스속, 도레속 세균 유래 세포막 소포의 함량이 감소하였다.

이와 같이, 세균 바이오마커로 진단모형을 개발하였을 때, 열공성 경색에 대한 진단적 성능이 유의하게 나타났다(표 3, ROC표: AUC값이 세균보정 전 0.76에서 세균보정 후 0.79로 유의하게 증가함).

표 3

Taxon	ALI (-)		ALI (+)		등분산 검정	t-test	Training set			Test set		
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	p-value	AUC	Sensitivity	Specificity	AUC	Sensitivity	Specificity
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Comamonadaceae;g__Tepidimonas	0.0010	0.0052	0.0001	0.0004	<u>0.0000</u>	<u>0.0316</u>	0.6300	0.2600	0.8900	0.5200	0.3400	0.8600
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__Dorea	0.0023	0.0087	0.0008	0.0015	<u>0.0000</u>	<u>0.0386</u>	0.7500	0.4000	0.8900	0.6800	0.4200	0.9300

3-3. 높은 정도의 혈관주위공간

혈액 내 세균유래 소포를 목 수준에서 분석한 결과, 높은 정도의 혈관주위공간이 있는 환자와 없는 환자는 락토바실러스목(*Lactobacillales*), 박테로이데스목(*Bacteroidales*)에 차이가 있었다(표 4). 구체적으로, 높은 정도의 혈관주위공간이 있는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에서는 락토바실러스목, 박테로이데스목 세균 유래 세포막 소포의 함량이 감소하였다.

과 수준에서 분석한 결과, 높은 정도의 혈관주위공간이 있는 환자와 없는 환자는 비피도박테리아과(*Bifidobacteriaceae*)에 차이가 있었다(표 4). 구체적으로, 높은 정도의 혈관주위공간이 있는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에서는 높은 정도의 혈관주위공간이 없는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포보다 비피

도박테리아과 세균 유래 세포밖 소포의 함량이 감소하였다.

[0104] 속 수준에서 분석한 결과, 높은 정도의 혈관주위공간이 있는 환자와 없는 환자는 클로스트리디움(*Clostridiaceae*) SMB53속, 유박테리움속(*Eubacterium*), 아그로박테리움속(*Agrobacterium*), 펴브리모나스속(*Fimbrimonas*), 미츠오텔라속(*Mitsuokella*)에 차이가 있었다. 구체적으로, 높은 정도의 혈관주위공간이 있는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에서는 높은 정도의 혈관주위공간이 없는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포보다 SMB53속, 유박테리움속, 아그로박테리움속, 펴브리모나스속, 미츠오텔라속 세균 유래 세포밖 소포의 함량이 감소하였다.

[0105] 이와 같이, 세균 바이오마커로 진단모형을 개발하였을 때, 높은 정도의 혈관주위공간에 대한 진단적 성능이 유의하게 나타났다(표 4, ROC표: AUC값이 세균보정 전 0.86에서 세균보정 후 0.90로 유의하게 증가함).

표 4

[0107]

Taxon	HPVs (-)		HPVs (+)		동분산 검정	t-test	Training set			Test set		
	Mean	SD	Mean	SD	p-value	p-value	AUC	Sensitivity	Specificity	AUC	Sensitivity	Specificity
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Clostridiaceae;g_SMB53	0.0003	0.0009	0.0000	0.0000	<u>0.0000</u>	<u>0.0008</u>	0.6400	0.6600	0.5200	0.4300	0.5600	0.3300
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Erysipelotrichi;o_Erysipelotrichales;f_Erysipelotrichaceae;g_Eubacterium	0.0010	0.0041	0.0000	0.0000	<u>0.0000</u>	<u>0.0009</u>	0.6300	0.2600	0.8900	0.5200	0.3400	0.8600
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Rhizobiaceae;g_Agrobacterium	0.0020	0.0084	0.0000	0.0000	<u>0.0000</u>	<u>0.0017</u>	0.7500	0.8800	0.5100	0.6600	0.8400	0.5600
k_Bacteria;p_Armatimonadetes;c_Fimbrimonadiales;o_Fimbrimonadales;f_Fimbrimonadaceae;g_Fimbrimonas	0.0010	0.0040	0.0000	0.0001	<u>0.0000</u>	<u>0.0023</u>	0.6700	0.3000	0.9200	0.5900	0.3100	0.9400
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Veillonellaceae;g_Mitsuokella	0.0006	0.0029	0.0000	0.0000	<u>0.0000</u>	<u>0.0077</u>	0.6000	0.4300	0.7000	0.4800	0.4400	0.4400

[0109] 3-4. 미세출혈의 경우

[0110] 혈액 내 세균유래 소포를 과 수준에서 분석한 결과, 미세출혈이 있는 환자와 없는 환자는 비피도박테리아과(*Bifidobacteriaceae*), 미크로코쿠스과(*Micrococcaceae*), 사이토파가시예과(*Cytophagaceae*), 파이렐루라시예과(*Pirellulaceae*), 카울로박테리아과(*Caulobacteraceae*), 인트라스포란기아시예과(*Intrasporangiaceae*), 및 사프로스피라과(*Saprospiraceae*)에 차이가 있었다(표 5). 구체적으로, 미세출혈이 있는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에서는 미세출혈이 없는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포보다 비피도박테리아과, 미크로코쿠스과, 사이토파가시예과, 파이렐루라시예과, 카울로박테리아과, 인트라스포란기아시예과, 및 사프로스피라과 세균 유래 세포밖 소포의 함량이 감소하였다.

[0111] 속 수준에서 분석한 결과, 미세출혈이 있는 환자와 없는 환자는 다이어트지아속(*Dietzia*), 헤모필루스속(*Haemophilus*), 데이노코쿠스속(*Deinococcus*), 메틸로테네라속(*Methylothera*), 및 후소박테리움속(*Fusobacterium*)에 차이가 있었다. 구체적으로, 미세출혈이 있는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포에서는 미세출혈이 없는 환자 유래 혈액 샘플에 존재하는 소포보다 다이어트지아속, 헤모필루스속, 데이노코쿠스속, 메

틸로테네라속, 및 후소박테리움속 세균 유래 세포밖 소포의 함량이 감소하였다.

[0112] 이와 같이, 세균 바이오마커로 진단모형을 개발하였을 때, 미세출혈에 대한 진단적 성능이 유의하게 나타났다 (표 5, ROC표: AUC값이 세균보정 전 0.75에서 세균보정 후 0.79로 유의하게 증가함).

표 5

[0114]

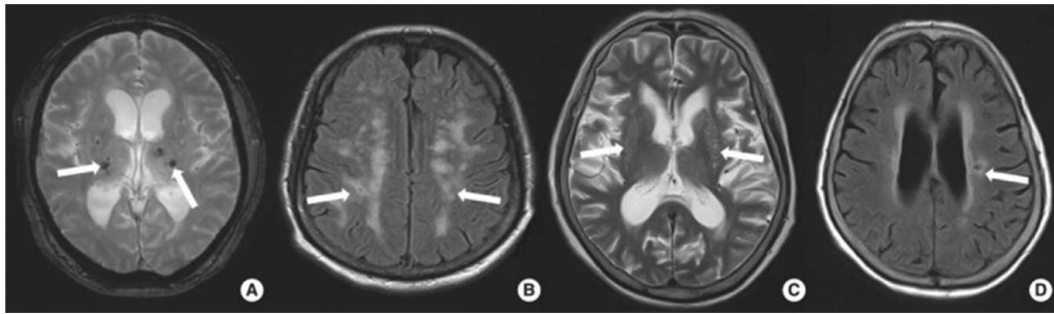
	0	1			등분산검정	t-test	Training set			Test set		
Taxon	Mean	SD	Mean	SD	p-value	p-value	AUC	Sensitivity	Specificity	AUC	Sensitivity	Specificity
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Dietziaceae;g__Dietzia	0.0009	0.0029	0.0001	0.0005	<u>0.0000</u>	<u>0.0012</u>	0.7500	0.4000	0.8900	0.6800	0.4100	0.9200
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Pasteurellales;f__Pasteurellaceae;g__Haemophilus	0.0012	0.0030	0.0004	0.0011	<u>0.0000</u>	<u>0.0051</u>	0.8700	0.7100	0.8900	0.8000	0.5900	0.7800
k__Bacteria;p__[Thermi];c__Deinococci;o__Deinococcales;f__Deinococcaceae;g__Deinococcus	0.0020	0.0088	0.0002	0.0010	<u>0.0000</u>	<u>0.0103</u>	0.7200	0.4400	0.8400	0.6200	0.5000	0.8100
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Methylophilales;f__Methylophilaceae;g__Methylothera	0.0002	0.0009	0.0000	0.0000	<u>0.0000</u>	<u>0.0272</u>	0.6700	0.3000	0.9200	0.5900	0.3100	0.9400
k__Bacteria;p__Fusobacteria;c__Fusobacteriia;o__Fusobacteriales;f__Fusobacteriaceae;g__Fusobacterium	0.0001	0.0008	0.0000	0.0000	<u>0.0000</u>	<u>0.0336</u>	0.6400	0.6600	0.5200	0.4300	0.5600	0.3300

[0116] 상기의 결과로부터, 피검체 유래 혈액 샘플을 이용해 세균 메타게놈 분석을 수행하여 뇌 소혈관질환 중 i) 중등도 이상의 백질고신호강도의 경우에는 슈도모나스속, 스펡고모나스속, 칸디다투스 아퀴루나속, 플랑크토마이세스속, 다이아리스터속, 비피도박테리움속, 블라우티아속, 아그로박테리움속, 아커만시아속, 및 클로아시박테리움속 세균. ii) 열공성 경색의 경우에는 테피디모나스속, 및 도레속 세균, iii) 높은 정도의 혈관주위공간의 경우에는 SMB53속, 유박테리움속, 아그로박테리움속, 펄브리모나스속 및 미즈오켈라속 세균, iv) 미세출혈의 경우에는 다이어트지아속, 헤모필루스속, 데이노코쿠스속, 메틸로테네라속, 및 후소박테리움속 세균 유래 세포밖 소포의 함량 증감을 분석함으로써 뇌 소혈관질환의 발병을 예측할 수 있는 바, 뇌 소혈관질환 발병의 원인인자 및 발병의 위험도를 미리 진단함으로써 뇌 소혈관질환 위험군을 조기에 진단하여 적절한 관리를 통해 발병 시기를 늦추거나 발병을 예방할 수 있으며, 뇌 소혈관질환으로 진단받은 환자가 메타게놈 분석을 통해 원인인자 노출을 피할 수 있도록 유도함으로써 질병의 경과를 좋게 할 수 있다.

[0118] 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 청구범위의 의미, 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1



서열 목록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Method for prediction of stroke recurrence

<130> KPA200731-KR

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16S_V3_F

<400> 1

tcgtcggcag cgtcagatgt gtataagaga cagcctacgg gnggcwgcag 50

<210> 2

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16S_V4_R

<400> 2

gtctcgtggg ctcggagatg tgtataagag acaggactac hvvggtatct aatcc 55