



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0154337
(43) 공개일자 2022년11월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
C12Q 2600/118 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0061733

(22) 출원일자 2021년05월13일
심사청구일자 2022년04월05일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자
오지연

서울특별시 서초구 반포대로 275, 120동 2301호 (반포동, 래미안퍼스티지아파트)

김정안

경기도 군포시 공단로 356-54, 1동 2701호 (산본동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 무한

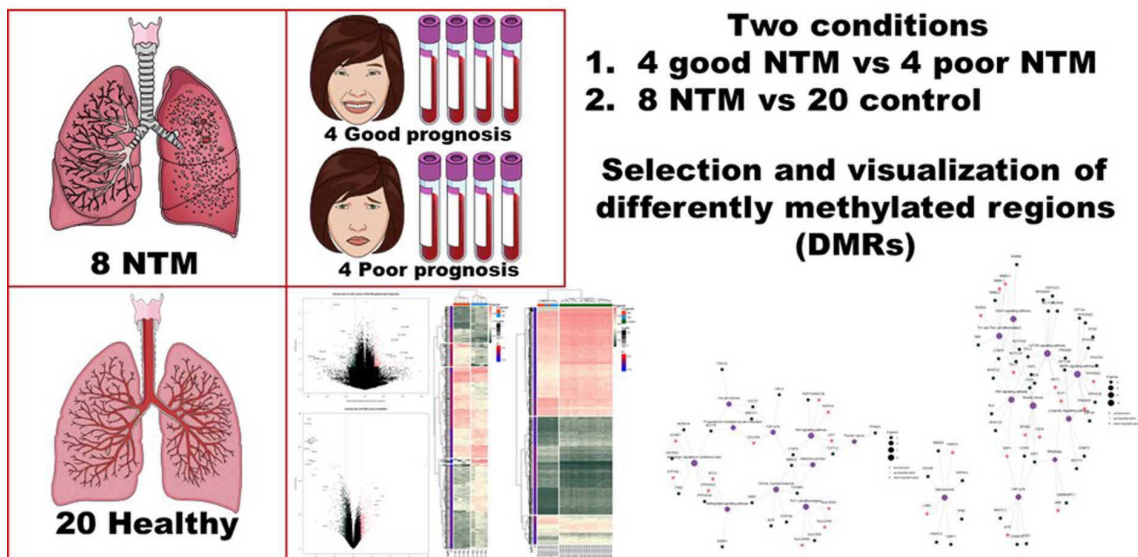
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 비결핵 항산균 감염질환의 진단 또는 예후 예측용 메틸화 바이오마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 비결핵 항산균 감염질환의 진단 또는 예후 예측용 메틸화 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로는 LRP5, ADCY3, E2F1, HLA-DRB5, HLA-DRB1 및 TGFBr1으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 내 CpG 부위를 포함하는, 비결핵 항산균 감염질환 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물, 진단 또는 예후 예측용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 진단 또는 예후 예측용 키트, 및 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 비결핵 항산균 감염질환 진단 또는 예후 예측용 바이오마커는 비결핵 항산균 감염 환자 또는 의심 환자 유래의 혈액과 같은 시료로부터 후성유전체 분석연구를 통해 바람직하게 비결핵 항산균 폐질환을 신속하고 효과적으로 조기 진단할 수 있고 예후를 예측하여 치료의 효율성을 높이는 데 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/154 (2013.01)

(72) 발명자

고영경

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

전민하

경기도 화성시 탄요1길 86, 123동 (반송동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2022911
과제번호	K2022911
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	신임교원정착연구비
연구과제명	오믹스 기반 결핵 및 비결핵 항산균 폐질환 바이오마커 발굴
기 여 율	1/3
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2020.09.01 ~ 2023.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711127014
과제번호	2019M3E5D1A0106899421
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업
연구과제명	대사체를 이용한 결핵 환자의 진단 및 예후 예측을 위한 바이오마커 발굴
기 여 율	1/3
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345320184
과제번호	2020R1I1A1A0105270111
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	창의도전연구기반지원
연구과제명	만성질환 환자의 유전체와 역학 정보 기반 질병 관리 모델 개발
기 여 율	1/3
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2020.06.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

LRP5 (GenBank accession No. NM_002335, LDL receptor related protein), ADCY3 (GenBank accession No. NM_004036, adenylate cyclase 3), E2F1 (GenBank accession No. NM_005225, E2F transcription factor 1), HLA-DRB5 (GenBank accession No. NM_002125, major histocompatibility complex, class II, DR beta 5), HLA-DRB1 (GenBank accession No. NM_002124, major histocompatibility complex, class II, DR beta 1) 및 TGFBr1 (GenBank accession No. NM_004612, transforming growth factor beta receptor 1)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 내 CpG 부위를 포함하는, 비결핵 항산균 (*nontuberculous mycobacterium*) 감염질환 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 비결핵 항산균 감염질환은 비결핵 항산균 폐질환인 것을 특징으로 하는, 바이오마커 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 CpG 부위는 LRP5 또는 E2F1 유전자의 코딩 서열 (coding sequence)에 위치하는 것을 특징으로 하는, 바이오마커 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 CpG 부위는 ADCY3, HLA-DRB5, HLA-DRB1 또는 TGFBr1 유전자의 인트론 (intron) 영역에 위치하는 것을 특징으로 하는, 바이오마커 조성물.

청구항 5

LRP5 (GenBank accession No. NM_002335, LDL receptor related protein), ADCY3 (GenBank accession No. NM_004036, adenylate cyclase 3), E2F1 (GenBank accession No. NM_005225, E2F transcription factor 1), HLA-DRB5 (GenBank accession No. NM_002125, major histocompatibility complex, class II, DR beta 5), HLA-DRB1 (GenBank accession No. NM_002124, major histocompatibility complex, class II, DR beta 1) 및 TGFBr1 (GenBank accession No. NM_004612, transforming growth factor beta receptor 1)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 내 CpG 부위의 메틸화 수준을 분석할 수 있는 물질을 포함하는, 비결핵 항산균 (*nontuberculous mycobacterium*) 감염질환 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 비결핵 항산균 감염질환은 비결핵 항산균 폐질환인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 CpG 부위의 메틸화 수준을 분석할 수 있는 물질은 CpG 부위를 포함하는 단편을 증폭할 수 있는 프라이머쌍; CpG 부위를 포함하는 영역의 시퀀싱용 프라이머쌍; 메틸화된 CpG 부위와 혼성화할 수 있는 프로브; 메틸화 특이적 결합 단백질, 항체 또는 압타머; 및 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 시퀀싱용 프라이머쌍은 하기의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 조성물:

- i) LRP5: 서열번호 1 및 서열번호 2;
- ii) ADCY3: 서열번호 3 및 서열번호 4;
- iii) E2F1: 서열번호 5 및 서열번호 6;
- iv) HLA-DRB5: 서열번호 7 및 서열번호 8;
- v) HLA-DRB1: 서열번호 9 및 서열번호 10; 및
- vi) TGFBr1: 서열번호 11 및 서열번호 12.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 시퀀싱은 바이설파이트 시퀀싱 (bisulfite sequencing)인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 10

제5항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 비결핵 항산균 (*nontuberculous mycobacterium*) 감염질환 진단 또는 예후 예측용 키트.

청구항 11

하기의 단계를 포함하는, 비결핵 항산균 (*nontuberculous mycobacterium*) 감염질환 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법:

- (a) 비결핵 항산균 감염 환자 또는 감염 의심환자 유래의 생물학적 시료에서 DNA를 분리하는 단계; 및
- (b) 상기 분리된 DNA에서 LRP5 (GenBank accession No. NM_002335, LDL receptor related protein), ADCY3 (GenBank accession No. NM_004036, adenylate cyclase 3), E2F1 (GenBank accession No. NM_005225, E2F transcription factor 1), HLA-DRB5 (GenBank accession No. NM_002125, major histocompatibility complex, class II, DR beta 5), HLA-DRB1 (GenBank accession No. NM_002124, major histocompatibility complex, class II, DR beta 1) 및 TGFBr1 (GenBank accession No. NM_004612, transforming growth factor beta receptor 1)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 내 CpG 부위의 메틸화 수준을 분석하는 단계.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 비결핵 항산균 감염질환은 비결핵 항산균 폐질환인 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 메틸화 수준을 분석하는 단계는 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 (pyrosequencing) 및 바이설파이트 시퀀싱 (bisulfite sequencing)으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 방법을 통해 수행되는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 비결핵 항산균 감염질환의 진단 또는 예후 예측용 메틸화 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로는 LRP5, ADCY3, E2F1, HLA-DRB5, HLA-DRB1 및 TGFBr1으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자와 관련된 CpG 부위를 포함하는, 비결핵 항산균 감염질환의 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물, 진단 또는 예후 예측용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 키트, 및 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

DNA 메틸화 (methylation)는 DNA에 메틸기가 추가되는 것으로, 사이토신-구아닌 디뉴클레오타이드 (cytosine-guanine dinucleotide; CpG) 부위에서 자주 발생한다. DNA 메틸화 프로파일은 일생 동안 변화하고, 연령, 환경, 운동, 약물 투여 등 다양한 외부 또는 내부 자극에 의해 변화되어 유전자의 발현을 조절한다. 또한, DNA 메틸화 프로파일은 질병이 진행되는 동안 변화하므로 질병을 식별할 수 있어, DNA 메틸화는 질병 및 질병 진행의 바이오마커로 연구되어 왔다.

[0003]

종래 특정 유전자의 발현수준 차이에 기반한 바이오마커는 mRNA 기반의 전사체 발현수준을 확인해야 하는데, RNA는 상대적으로 분해되기 쉽고 많은 양을 얻기 어렵기 때문에 의료 현장에서 마커로 활용하기 어렵다. 이에 반해, DNA 메틸화 양상을 확인하기 위해서는 혈액 유래의 DNA를 분리하여 바이설파이트 시퀀싱 (bisulfite sequencing; BSP) 등의 방법을 활용해 메틸화 정도를 확인할 수 있으므로, 특정 질환의 진단 및 예후 예측을 상대적으로 쉽고 빠르게 할 수 있다. 예컨대 이미 대장암 등에서는 분변 등의 시료로부터 DNA 메틸화 양상을 확인하여 대장암의 진단 또는 예후 예측에 적용하고자 하는 키트가 개발되었으나, 아직까지 다른 질환에서는 DNA 메틸화 정보에 기반한 키트 개발 및 바이오마커의 발굴 연구가 상대적으로 잘 이루어지지 않은 실정이다.

[0004]

한편, 비결핵 항산균 (*nontuberculous mycobacterium*; NTM)은 결핵균과 나병균을 제외한 항산균으로, 유형에 따라 폐질환, 림프절염, 피부·연조직·골감염증, 파종성 질환을 유발할 수 있지만 90% 이상이 폐질환으로 나타난다. 비결핵 항산균 폐질환은 손상된 면역 체계를 가진 사람들에게서 만연한 질환으로 발생률과 중요성이 급격히 증가하고 있으며, 대개 서서히 진행되지만 완치시키기는 어려운 질환이다. 대부분의 비결핵 항산균 폐질환 환자는 결핵과 유사한 임상 증상 및 영상 소견으로 내원하므로 전염성이 있는 결핵 초기에 감별할 수 있는 유용한 바이오마커가 필요하다. 기존 비결핵 항산균 폐질환의 진단은 객담검사서 균이 동정되면 확진이지만 배양 검사에 2달이라는 시간이 걸리고 격리가 필요한 결핵과 영상의학적으로 감별되지 않기 때문에 이를 조기에 진단하는 것이 치료 및 격리 여부 판단, 전과 관리 측면에서 매우 중요하다. 또한 비결핵 항산균 폐질환은 부작용을 동반하는 약제로 장기간의 치료가 필요하나 비결핵 항산균에 감염된 환자의 예후 및 치료결과는 유전적 및 면역학적 요인에 따라 다르게 나타난다. 일부 환자는 자발적으로 치유되기도 하는 반면 2~3년의 지속적인 항생제 처방에도 불구하고 불응성을 나타내는 환자들도 있다. 따라서 비결핵 항산균 감염여부의 신속한 진단 및 적절한 치료에 반응할 환자를 선별하고 예후를 예측할 수 있는 특이적 바이오마커의 개발이 절실히 필요한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) Genes Dis. 2018 Jan 31;5(1):1-8.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 상기와 같은 배경 하에, 본 발명자들은 유전체 내 주요 CpG 부위에 대한 DNA 메틸화 양상을 확인할 수 있는 DNA 메틸화 마이크로어레이 칩을 활용하여, 비결핵 항산균 폐질환의 예후가 상이한 군, 그리고 비결핵 항산균 폐질환 환자와 정상군 간에 차등적인 DNA 메틸화 양상을 보이는 주요 CpG 부위를 선정하고 최종적으로 비결핵 항산균 폐질환의 진단 또는 예후 예측을 위한 후성유전체 바이오마커를 도출하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0007] 이에, 본 발명은 비결핵 항산균 감염질환의 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 비결핵 항산균 감염질환의 진단 또는 예후 예측용 조성물, 및 상기 조성물을 포함하는 비결핵 항산균 감염질환의 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 비결핵 항산균 감염질환의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0011] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 LRP5 (GenBank accession No. NM_002335, LDL receptor related protein), ADCY3 (GenBank accession No. NM_004036, adenylate cyclase 3), E2F1 (GenBank accession No. NM_005225, E2F transcription factor 1), HLA-DRB5 (GenBank accession No. NM_002125, major histocompatibility complex, class II, DR beta 5), HLA-DRB1 (GenBank accession No. NM_002124, major histocompatibility complex, class II, DR beta 1) 및 TGFBr1 (GenBank accession No. NM_004612, transforming growth factor beta receptor 1)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 내 CpG 부위를 포함하는, 비결핵 항산균 (*nontuberculous mycobacterium*) 감염질환의 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일구현예로, 상기 비결핵 항산균 감염질환은 비결핵 항산균 폐질환일 수 있다.

[0014] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 CpG 부위는 LRP5 또는 E2F1 유전자의 코딩 서열 (coding sequence)에 위치하는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 CpG 부위는 ADCY3, HLA-DRB5, HLA-DRB1 또는 TGFBr1 유전자의 인트론 (intron) 영역에 위치하는 것일 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명은 LRP5 (GenBank accession No. NM_002335, LDL receptor related protein), ADCY3 (GenBank accession No. NM_004036, adenylate cyclase 3), E2F1 (GenBank accession No. NM_005225, E2F transcription factor 1), HLA-DRB5 (GenBank accession No. NM_002125, major histocompatibility complex, class II, DR beta 5), HLA-DRB1 (GenBank accession No. NM_002124, major histocompatibility complex, class II, DR beta 1) 및 TGFBr1 (GenBank accession No. NM_004612, transforming growth factor beta receptor 1)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 내 CpG 부위의 메틸화 수준을 분석할 수 있는 물질을 포함하는, 비결핵 항산균 (*nontuberculous mycobacterium*) 감염질환의 진단 또는 예후 예측용 조성물을

제공한다.

- [0017] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 비결핵 항산균 (*nontuberculous mycobacterium*) 감염질환의 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일구현예로, 상기 CpG 부위의 메틸화 수준을 분석할 수 있는 물질은 CpG 부위를 포함하는 단편을 증폭할 수 있는 프라이머쌍; CpG 부위를 포함하는 영역의 시퀀싱용 프라이머쌍; 메틸화된 CpG 부위와 혼성화할 수 있는 프로브; 메틸화 특이적 결합 단백질, 항체 또는 압타머; 및 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 시퀀싱용 프라이머쌍은 하기의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0020] i) LRP5: 서열번호 1 및 서열번호 2;
- [0021] ii) ADCY3: 서열번호 3 및 서열번호 4;
- [0022] iii) E2F1: 서열번호 5 및 서열번호 6;
- [0023] iv) HLA-DRB5: 서열번호 7 및 서열번호 8;
- [0024] v) HLA-DRB1: 서열번호 9 및 서열번호 10; 및
- [0025] vi) TGFBr1: 서열번호 11 및 서열번호 12.
- [0026] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 시퀀싱은 바이설파이트 시퀀싱 (bisulfite sequencing)일 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 비결핵 항산균 (*nontuberculous mycobacterium*) 감염질환 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0028] (a) 비결핵 항산균 감염 환자 또는 감염 의심환자 유래의 생물학적 시료에서 DNA를 분리하는 단계; 및
- [0029] (b) 상기 분리된 DNA에서 LRP5 (GenBank accession No. NM_002335, LDL receptor related protein), ADCY3 (GenBank accession No. NM_004036, adenylate cyclase 3), E2F1 (GenBank accession No. NM_005225, E2F transcription factor 1), HLA-DRB5 (GenBank accession No. NM_002125, major histocompatibility complex, class II, DR beta 5), HLA-DRB1 (GenBank accession No. NM_002124, major histocompatibility complex, class II, DR beta 1) 및 TGFBr1 (GenBank accession No. NM_004612, transforming growth factor beta receptor 1)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 내 CpG 부위의 메틸화 수준을 분석하는 단계.
- [0030] 본 발명의 일구현예로, 상기 메틸화 수준을 분석하는 단계는 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 (pyrosequencing) 및 바이설파이트 시퀀싱 (bisulfite sequencing)으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 방법을 통해 수행될 수 있다.

발명의 효과

- [0031] 본 발명에 따른 비결핵 항산균 감염질환의 진단 또는 예후 예측용 바이오마커는 비결핵 항산균 감염 환자 또는 의심 환자의 혈액과 같은 시료로부터 후성유전체 분석연구를 통해 바람직하게는 비결핵 항산균 폐질환을 신속하고 효과적으로 조기 진단할 수 있고, 예후를 미리 예측하여 치료의 효율성을 높이는 데 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은 비결핵 항산균 폐질환 환자군에서 예후가 상이한 그룹 간, 및 비결핵 항산균 폐질환 환자군과 정상대조군 간의 차등적 DNA 메틸화를 히트맵으로 나타낸 결과로서, 도 1a는 예후가 좋은 환자군 (파란색 줄, GD) 및 예후가 나쁜 환자군 (빨간색 줄, PR) 간의 DNA 메틸화 배수 변화 (fold change)를 보여주는 결과이고, 도 1b는 환자군과 정상대조군 (초록색 줄) 간의 DNA 메틸화 배수 변화를 보여주는 결과이다. 히트맵에서 각 행은 유전자에 위치한 CpG 부위를 의미하며, 각 열은 각 환자 및 정상대조군 유래 샘플을 의미한다. 빨간색에 가까울수록 CpG 부위의 과메틸화, 초록색에 가까울수록 저메틸화되어 있음을 의미하는 것이다.

도 2는 비결핵 항산균 폐질환 환자군에서 예후가 상이한 그룹 간에 차등적으로 메틸화된 영역 (differently methylated regions; DMRs)의 Enriched terms 및 기능적 농축 네트워크를 분석한 결과로서, 도 2a는 예후가 나

뿐 환자군에서 P -값이 0.03 미만으로 메틸화 > 0.1 (빨강) 또는 < 0.1 (초록)의 배수 변화가 있는 DMRs을 나타낸 volcano plot 결과이고, 도 2b는 10개의 관련 enriched terms을 갖는 55개 유전자의 메틸화 양상을 나타낸 upset plot 결과이며, 도 2c는 비결핵 항산균 폐질환 환자군의 메틸화된 양상 (각 유전자의 원 색상에서, 빨간색은 과메틸화 및 초록색은 저메틸화를 의미함) 및 관련된 유전자 수 (enriched term의 원의 크기가 클수록 관련된 유전자들이 많음을 의미함)를 나타내는 network plot 결과이다.

도 3은 8명의 비결핵 항산균 폐질환 환자군 및 20명의 정상대조군 간에 차등적으로 메틸화된 영역 (DMRs)의 enriched terms 및 기능적 농축 네트워크를 분석한 결과로서, 도 3a는 8명의 환자군에서 P -값이 0.001 미만으로 메틸화 > 0.08 (빨강) 또는 < -0.08 (초록)의 배수 변화가 있는 DMRs을 나타낸 volcano plot 결과이고, 도 3b는 10개의 관련 enriched terms을 갖는 31개 유전자의 메틸화 양상을 나타낸 upset plot 결과이며, 도 3c는 예후가 나쁜 환자군의 유전자에서 메틸화된 양상 (각 유전자의 원 색상) 및 관련된 유전자 수 (enriched term의 원 크기)를 나타내는 network plot 결과이다.

도 4는 예후가 상이한 환자군 간, 및 환자군과 정상대조군 간의 상위 3개 유전자에서 차등적으로 메틸화된 영역 (DMRs)의 수준을 비교한 결과로서, 도 4a는 환자군에서 예후가 좋은 환자군 및 예후가 나쁜 환자군 간의 상위 3개 유전자 (TGFB1, HLA-DRB5 및 HLA-DRB1)에 위치한 CpG 부위에 대한 각 메틸화 수준을 비교한 결과이며, 도 4b는 환자군 및 정상대조군 간의 상위 3개 유전자 (LRP5, ADCY3 및 E2F1)에 위치한 CpG 부위에 대한 각 메틸화 수준을 비교한 결과이다.

도 5는 비결핵 항산균 감염질환의 진단 또는 예후 예측용 메틸화 바이오마커 발굴을 위한 본 발명의 실험 전략 및 결과를 간략히 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 본 발명자들은 비결핵 항산균 감염, 특히 이에 의한 폐질환을 신속히 진단하고 예후를 예측할 수 있는 바이오마커를 발굴하기 위해, DNA 메틸화 마이크로어레이 칩을 활용하여 비결핵 항산균 폐질환의 예후가 상이한 그룹 간, 그리고 비결핵 항산균 폐질환 환자군과 정상군 간에 메틸화 양상을 분석한 결과, 차이를 보이는 주요 CpG 부위를 확인함으로써 최종적으로 본 발명에 따른 6종의 바이오마커를 발굴하였다.
- [0034] 이에, 본 발명은 LRP5 (GenBank accession No. NM_002335, LDL receptor related protein), ADCY3 (GenBank accession No. NM_004036, adenylate cyclase 3), E2F1 (GenBank accession No. NM_005225, E2F transcription factor 1), HLA-DRB5 (GenBank accession No. NM_002125, major histocompatibility complex, class II, DR beta 5), HLA-DRB1 (GenBank accession No. NM_002124, major histocompatibility complex, class II, DR beta 1) 및 TGFB1 (GenBank accession No. NM_004612, transforming growth factor beta receptor 1)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 내 CpG 부위를 포함하는, 비결핵 항산균 (*nontuberculous mycobacterium*) 감염질환 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 비결핵 항산균 감염질환은 비결핵 항산균 감염이 원인이 되어 유발될 수 있는 질환을 모두 포함하고, 바람직하게는 폐질환, 림프절염, 피부·연조직·골감염증, 또는 파종성 질환일 수 있으며, 가장 바람직하게는 비결핵 항산균 폐질환일 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 사용되는 용어, “CpG (CpG)”는 사이토신(Cytosine; C)과 구아닌 (Guanine; G)이 인산기(phosphate) 하나로 연결된 부위이다. 인간의 유전체에는 CpG라는 이중 염기서열이 다량으로 존재하고, 이중 약 70%를 차지하는 C에는 메틸기 ($-CH_3$)가 결합되어 있는데, 이를 DNA 메틸화 (Methylation)라고 한다. DNA 메틸화 현상은 유전체의 각종 반복 서열 등에서 흔히 관찰되며, 이는 유전체의 안정성 유지 등에 매우 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 CpG 부위는 LRP5 또는 E2F1 유전자의 코딩 서열 (coding sequence)에 위치할 수 있고, ADCY3, HLA-DRB5, HLA-DRB1 또는 TGFB1 유전자의 인트론 (intron) 영역에 위치할 수 있다. 바람직하게 LRP5, ADCY3, E2F1, HLA-DRB5, HLA-DRB1 및 TGFB1 유전자의 CpG 부위는 각각 HumanEPIC BeadChip에서 Illumina ID로 표시되는 cg01666550, cg20227471, cg19593285, cg18424635, cg05383619 및 cg13431688일 수 있다.
- [0038] 또한, 본 발명은 LRP5 (GenBank accession No. NM_002335, LDL receptor related protein), ADCY3 (GenBank accession No. NM_004036, adenylate cyclase 3), E2F1 (GenBank accession No. NM_005225, E2F transcription factor 1), HLA-DRB5 (GenBank accession No. NM_002125, major histocompatibility complex, class II, DR beta 5), HLA-DRB1 (GenBank accession No. NM_002124, major histocompatibility complex,

class II, DR beta 1) 및 TGFBr1 (GenBank accession No. NM_004612, transforming growth factor beta receptor 1)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 내 CpG 부위의 메틸화 수준을 분석할 수 있는 물질을 포함하는, 비결핵 항산균 (*nontuberculous mycobacterium*) 감염질환 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공한다.

- [0039] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 비결핵 항산균 (*nontuberculous mycobacterium*) 감염질환 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 상기 CpG 부위의 메틸화 수준을 분석할 수 있는 물질은 CpG 부위를 포함하는 단편을 증폭할 수 있는 프라이머쌍; CpG 부위를 포함하는 영역의 시퀀싱용 프라이머쌍; 메틸화된 CpG 부위와 혼성화할 수 있는 프로브; 메틸화 특이적 결합 단백질, 항체 또는 압타머; 및 메틸화 민감성 제한 엔도뉴클레아제로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 사용되는 용어, “프라이머”란 DNA 합성의 기시점이 되는 짧은 유전자 서열로써, 진단, DNA 시퀀싱 등에 이용할 목적으로 합성된 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 상기 프라이머들은 통상적으로 15 내지 30 염기쌍의 길이로 합성하여 사용할 수 있으나, 사용 목적에 따라 달라질 수 있으며, 공지된 방법으로 메틸화, 캡핑 등으로 변형시킬 수 있다.
- [0042] 본 발명에서, 상기 시퀀싱 프라이머쌍은 다음과 같은 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. LRP5: 서열번호 1 및 서열번호 2; ADCY3: 서열번호 3 및 서열번호 4; E2F1: 서열번호 5 및 서열번호 6, HLA-DRB5: 서열번호 7 및 서열번호 8; HLA-DRB1: 서열번호 9 및 서열번호 10; 및 TGFBr1: 서열번호 11 및 서열번호 12.
- [0043] 본 발명에서 상기 시퀀싱은 바이설파이트 시퀀싱 (bisulfite sequencing)일 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명의 진단 또는 예후예측용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치로 구성될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 비결핵 항산균 (*nontuberculous mycobacterium*) 감염질환 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0046] (a) 비결핵 항산균 감염 환자 또는 감염 의심환자 유래의 생물학적 시료에서 DNA를 분리하는 단계; 및
- [0047] (b) 상기 분리된 DNA에서 LRP5 (GenBank accession No. NM_002335, LDL receptor related protein), ADCY3 (GenBank accession No. NM_004036, adenylate cyclase 3), E2F1 (GenBank accession No. NM_005225, E2F transcription factor 1), HLA-DRB5 (GenBank accession No. NM_002125, major histocompatibility complex, class II, DR beta 5), HLA-DRB1 (GenBank accession No. NM_002124, major histocompatibility complex, class II, DR beta 1) 및 TGFBr1 (GenBank accession No. NM_004612, transforming growth factor beta receptor 1)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 내 CpG 부위의 메틸화 수준을 분석하는 단계.
- [0048] 본 명세서에서 사용되는 용어 “메틸화 수준의 분석”은 분석 대상 유전자의 DNA 내 특정 부위의 CpG 디뉴클레오타이드의 메틸화 상태를 측정하는 분석을 의미한다. 구체적으로, 상기 메틸화 상태는 분석 대상 유전자의 DNA 내 특정 부위에서 하나 이상의 CpG 디뉴클레오타이드에서 5-메틸시토신 (5-methylcytosine)의 존재 또는 부존재 상태를 의미한다.
- [0049] 본 명세서에서 용어 “저메틸화(hypomethylation)”는 테스트되는 DNA 시료의 염기서열 내에서 하나 이상의 CpG 디뉴클레오타이드에서 5-메틸시토신의 양이, 대조군 (정상대조군 또는 예후가 좋다고 알려진 비결핵 항산균 감염 환자군) DNA 시료내에서의 대응하는 CpG 디뉴클레오타이드에서 발견되는 5-메틸시토신의 양과 비교하여 감소되어 있는 메틸화 상태를 의미한다.
- [0050] 본 명세서에서 사용되는 용어 “과메틸화(hypermethylation)”는 테스트되는 DNA 시료의 염기서열 내에서 하나 이상의 CpG 디뉴클레오타이드에서 5-메틸시토신의 양이, 대조군 (정상대조군 또는 예후가 좋다고 알려진 비결핵 항산균 감염 환자군) DNA 시료 내에서의 대응하는 CpG 디뉴클레오타이드에서 발견되는 5-메틸시토신의 양과 비교하여 증가되어 있는 메틸화 상태를 의미한다.
- [0051] 본 발명에서 사용되는 용어, “진단”은 넓은 의미로는 환자의 병의 실태를 모든 면에 걸쳐서 판단하는 것을 의미한다. 판단의 내용은 병명, 병인, 병형, 경중, 병상의 상세한 양태, 및 합병증의 유무 등이다. 본 발명에서 진단은 비결핵 항산균 감염, 바람직하게는 비결핵 항산균 폐질환의 발병 여부 및 진행단계 수준 등을 판단하는

것이다.

- [0052] 본 발명에 있어서, 상기 CpG 부위의 메틸화 수준을 정상대조군의 동일 유전자 내 동일 CpG 부위의 메틸화 수준과 비교할 때, LRP5, ADCY3 및 E2F1으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자가 저메틸화된 경우 비결핵 항산균 감염질환으로 진단할 수 있다.
- [0053] 본 발명에서 사용되는 용어 “비결핵 항산균 감염질환 예후예측을 위한 정보제공방법”은 예후예측을 위한 예비적 단계로써 비결핵 항산균 감염질환의 예후 예측을 위해 필요한 객관적인 기초정보를 제공하는 것을 의미하며, 의사의 임상학적 판단 또는 소견은 제외된다.
- [0054] 본 발명에서 사용되는 용어, “예후”는 비결핵 항산균 감염질환의 재발, 약물 저항성, 생존, 또는 무병생존을 의미하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 본 발명에서, 상기 CpG 부위의 메틸화 수준을 예후가 좋다고 알려진 비결핵 항산균 감염질환 환자의 동일 유전자 내 동일 CpG 부위의 메틸화 수준과 비교할 때, HLA-DRB5 또는 HLA-DRB1 유전자가 과메틸화되거나, 및/또는 TGFBr1 유전자가 저메틸화된 경우 예후가 나쁠 것으로 예측할 수 있다.
- [0056] 상기 생물학적 시료는 비결핵 항산균 감염 환자 또는 감염 의심환자 유래의 조직, 세포, 전혈, 혈액, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 소변 및 대변으로 구성된 군에서 선택되는 것일 수 있으며, 바람직하게는 전혈 또는 혈액일 수 있으나 이것으로 제한되지 않는다.
- [0057] 본 발명에서, 상기 메틸화 수준을 분석하는 단계는 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 (pyrosequencing) 및 바이설파이트 시퀀싱 (bisulfite sequencing)으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 방법을 통해 수행될 수 있으며, 바람직하게는 바이설파이트 시퀀싱을 통해 수행될 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다.
- [0059] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

실시예 1. 실험재료 및 실험방법

1-1. 샘플 모집

[0064] 본 실시예에서는 고려대학교 구로병원 내과의 비결핵 항산균 폐질환 환자 8명을 대상으로 하였으며, 고려대학교 구로병원 기관 심의위원회의 승인 (2017GR0012)을 받은 후 실험을 진행하였다. 또한 상기 환자들로부터 사전 동의를 얻어 혈액 및 임상 데이터를 제공받았으며, 모든 실험은 헬싱키 선언을 준수하여 수행되었다. 본 실험에 사용된 생체시료 및 데이터는 고려대학교 구로병원의 바이오뱅크에서 제공받았다.

[0065] 비결핵 항산균 (NTM) 폐질환의 진단은 공식 ATS/IDSA 성명에 따라 이루어졌다. 또한 NTM-NET 성명서에 따른 치료 결과 정의에 기준하여 상기 질환의 예후를 구분하였다. 예컨대 질환이 완치된 환자는 예후가 좋은 환자로 분류되었고, 치료에 실패한 환자는 예후가 나쁜 환자로 분류되었다.

1-2. DNA 추출 및 메틸화 마이크로어레이

[0068] 상기 실시예 1-1에 기재된 8명의 비결핵 항산균 폐질환 환자유래 8개 샘플로부터 BioRobot EZ1 (Qiagen) 시스템을 이용해 제조사의 지침에 따라 DNA를 분리하였다. 이후 상기 분리된 DNA 1.0 μ g을 마크로젠 (Seoul, South Korea)사에 제공하여 메틸화 마이크로어레이 분석 (methylation microarray analysis)을 실시하였다. DNA 품질 관리는 Infinium FFPE QC Kit (Illumina, USA)를 사용하여 확인하였고, Infinium HD FFPE DNA Restore Kit (Illumina)를 사용하여 분석을 위한 DNA 품질을 확보하였다. 또한 Bisulfite conversion은 EZ-96 DNA Methylation Kit (Zymo Research, USA)를 사용하여 수행하고, 메틸화 마이크로어레이는 Infinium MethylationEPIC BeadChip Kit (Illumina, USA)를 이용하여 실시하였다. iScan System (Illumina)은 BeadChip

을 판독하는데 이용하였다.

[0069] 어레이 데이터의 가공 및 분석은 Illumina GenomeStudio 버전 2011.1 (Methylation Module 버전 1.9.0) 및 R 버전 4.0.3을 이용하여 수행되었고, 각 메틸화 데이터 포인트는 메틸화 (Methylation, M) 및 메틸화되지 않은 (unmethylated, U) 대립 유전자의 형광 신호로 표시되도록 하였다. 두 대립 유전자로부터 $\beta = (\max(M, 0))/(|U| + |M| + 100)$ 으로 형광 신호의 비율을 계산하였고, 원시 β -값은 865,918개 CpG로부터 추출되었다. 배경 연관성 및 편향된 염색의 균등화는 R의 lumi 패키지를 사용하여 수행되었으며, Beta-mixture 사분위수 정규화는 분석 편향성을 줄이기 위해 수행되었으며 R의 BMIQ 패키지를 이용하였다.

[0071] 1-3. Merge public dataset

[0072] 본 발명자들은 한국인유전체역학조사사업-안성안산 지역사회 기반 코호트 (Korean Genome and Epidemiology study-Anseong Ansan; KoGES-ASAS) 연구에서 446명의 사람들에게 대한 Illumina 450k 메틸화 어레이로부터 선공 개된 DNA 메틸화 데이터를 사용하였다. 또한 상기 코호트에서 20명의 정상대조군을 선정하였는데, 이때 성별, 나이 및 BMI는 비결핵 항산균 폐질환의 진단 및 예후에 중요한 영향을 미치는바, 연령, 성별 비율 및 BMI를 일치시키고 호흡기 질환이 없는 건강한 사람을 정상대조군으로 선택하였다. 또한 450k와 EPIC에 공통된 프로브는 R 'merge' 함수를 사용하여 결합되었으며 ComBat 패키지를 적용하여 배치 효과를 보정하였다.

[0074] 1-4. 생물정보학 분석 및 시각화

[0075] 두 그룹 간의 특성을 분석하고 시각화하기 위해 R 버전 4.0.3을 이용하였다. 그룹 간의 차이는 t-검정을 이용하여 확인하고 volcano plot을 이용하여 나타내었다. 이때 $|\log_2 \text{fold change}|$ 및 P-값을 두 그룹 간의 차등적 메틸화 영역 (DMRs) 양상에 의해 조정된 임계값으로 정의하였다. 히트맵 (heatmap) 및 계층적 클러스터링 플롯 (hierarchical clustering plot)은 R의 pheatmap 패키지를 이용하였다. DMRs의 Volcano plots은 R의 플롯 함수를 사용하였고 $\log_2$ 배수 변화로 표시하였으며, 각각 x 및 y축은 각각 변환된 $-\log_{10}(\text{P-값})$ 으로 하였다. R 패키지 'pathfindR'은 DMRs에 의한 enriched terms을 선별하는데 사용되었으며, enriched terms에 의한 upset plots과 네트워크를 도식하였다. 두 그룹의 enriched terms를 기반으로 'Upset_plot' 및 'term_gene_graph' 함수를 사용하여 각각 upset plot과 네트워크를 도식하였다.

[0077] 실시예 2. 비결핵 항산균 폐질환 환자 및 정상대조군의 임상적 특징 분석

[0078] 본 실시예에서 대상으로 한 8명의 비결핵 항산균 (NTM) 폐질환 환자 및 20명의 정상대조군 (HC)에 대한 임상적 특징을 하기 표 1에 정리하여 나타내었다. 구체적으로, 상기 환자들은 42-78세의 연령 분포를 나타내었고 모두 동일한 아형 (Mycobacterium avium complex; MAC)에 감염된 것을 확인하였다. 평균 연령은 두 그룹 모두에서 유사했으며 (환자군 59.1 ± 11.2 , 정상대조군 65.5 ± 5.4), 남성 비율은 환자군에서 62.5%, 정상대조군에서 65%를 차지하였다. 또한 상기 비결핵 항산균 폐질환 환자의 체질량 지수를 측정한 결과 낮은 수치를 나타냈으므로 ($\text{BMI} = 19.7 \pm 3.7 \text{kg/m}^2$), BMI가 비슷한 정상대조군 (평균 $20.5 \pm 1.0 \text{kg/m}^2$)을 선정하여 비교하였다.

표 1

	NTM (n = 8)	HC (n = 20)
Age	59.1 ± 11.2	65.5 ± 5.4
Sex, male	5 (62.5)	13 (65)
BMI (kg/m^2)	19.7 ± 3.7	20.5 ± 1.0
Smoker	2 (25)	8 (40)
Alcohol	2 (25)	3 (15)
Comorbidities		
HTN	1 (12.5)	0 (0)
DM	2 (25)	0 (0)
COPD/Asthma	2 (25)	0 (0)
Heart failure	0 (0)	0 (0)

[0081] 실시예 3. 유의한 예후 차이를 나타내는 비결핵 항산균 폐질환 환자군 간, 및 비결핵 항산균 폐질환 환자군과 정상대조군 간의 DMRs 확인

[0082] 3-1. 예후가 좋은 환자군 vs. 예후가 나쁜 환자군 간의 DMRs 확인

[0083] 본 발명자들은 임계값 $|\text{Log}_2 \text{ fold change}| > 0.1$ 및 $P\text{-값} < 0.03$ 에 기반하여, 'pheatmap' R 패키지로 상이한 예후를 나타내는 비결핵 항산균 폐질환 환자 (4명 양호 및 4명 나쁨) 간의 차등적으로 메틸화된 영역 (differentially methylated regions; DMRs)을 분석하였다. 그 결과, 총 754개의 DMRs이 확인되었고, 예후가 나쁜 환자와 예후가 좋은 환자에서 각각 461개 및 293개의 과메틸화되어 있는 DMRs이 발견되었다. 상기에서 확인된 DMRs을 β -값으로 나열하여 도 1a의 히트맵으로 나타내었으며, 도 2a에서 볼 수 있는 바와 같이 모든 DMRs을 volcano plots으로 나타내었다.

[0085] 3-2. 비결핵 항산균 폐질환 환자군 vs. 정상대조군 간의 DMRs 확인

[0086] 또한, 임계값 $|\text{Log}_2 \text{ fold change}| > 0.08$ 및 $P\text{-값} < 0.001$ 에 기반하여, 비결핵 항산균 폐질환 환자와 정상대조군 사이에 DMRs을 분석한 결과 총 1,108개가 발견되었다. 구체적으로, 상기 8명의 환자군 및 20명의 정상대조군에서 각각 337개와 771개의 과메틸화된 DMRs이 발견되었으며, 비결핵 항산균 폐질환 환자 8명의 β -값 및 배치 효과가 보정된 20명 정상대조군의 β -값을 도 1b의 히트맵으로 나타내었으며, 모든 DMRs을 도 3a의 volcano plots으로 나타내었다.

[0088] 3-3. 확인된 DMRs에서 상위 3 CpGs 규명

[0089] 상기 실시예 3-1 및 3-2의 서로 다른 DMRs 분석에서 얻어진 결과로부터, 본 발명자들은 4명의 예후가 나쁜 환자와 4명의 예후가 좋은 환자 간의 DMRs에 대한 상위 3개 표적 영역 및 8명의 비결핵 항산균 폐질환 환자와 20명의 정상대조군 간의 DMRs에 대한 상위 3개 표적 영역을 하기 표 2 및 각각 도 4a 및 도 4b에 나타내었다.

[0090] 구체적으로, 예후가 상이한 비결핵 항산균 폐질환 환자군 간의 상위 3개 차등 메틸화 CpG 부위 중 2개는 HLA 관련 유전자 즉, *HLA-DRB5* (major histocompatibility complex, class II, DR beta 5) 및 *HLA-DRB1* (major histocompatibility complex, class II, DR beta 1)에 위치했으며 모두 상기 유전자의 인트론 영역에 위치하였다. 나머지 유전자인 *TGFB β 1* (transforming growth factor beta receptor 1) 역시 CpG 부위가 유전자의 인트론 영역에 위치하는 것을 확인하였다.

[0091] 한편, 비결핵 항산균 폐질환 환자군과 정상대조군 사이에서 차등적 메틸화가 확인된 3가지 CpG 부위 중에서, 2개는 *LRP5* (LDL receptor related protein) 및 *E2F1* (E2F transcription factor 1)의 코딩 서열 (CDS)에 위치하는 것을 확인하였다. 또한 나머지 한 가지는 *ADCY3* (adenylate cyclase 3) 유전자의 인트론에 위치하였으며, 상기 3가지 CpG 부위는 모두 정상대조군과 비교하여 비결핵 항산균 폐질환 환자군에서 저메틸화 양상을 나타내었다.

표 2

[0092]

Class	Illumina CpG ID	Gene symbol	Gene description	Acc. No.	Location	Direction	Genomic region	NTM good prognosis	NTM poor prognosis	p-value
NTM prognosis	cg18424635	<i>HLA-DRB5</i>	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 5	NM_002125	chr6:32490421	-	Intron	0.279 ± 0.049	0.664 ± 0.051	0.0001

NTM prognosis	cg05383619	<i>HLA-DRB1</i>	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 1	NM_002124	chr6:32553920	-	Intron	0.322 ± 0.050	0.673 ± 0.060	0.0003
NTM prognosis	cg13431688	<i>TGFB1</i>	Transforming growth factor beta receptor 1	NM_004612	chr9:101869277	+	Intron	0.625 ± 0.160	0.151 ± 0.180	0.0146
Class	Illumina CpG ID	Gene symbol	Gene description	Acc. No.	Location	Direction	Genomic region	NTM eight patients	Healthy 20 controls	p-value
NTM vs HC	cg01666550	<i>LRP5</i>	LDL receptor related protein 5	NM_002335	chr11:68183850	+	CDS	0.416 ± 0.0002	0.891 ± 0.006	7.31E-38
NTM vs HC	cg20227471	<i>ADCY3</i>	Adenylate cyclase 3	NM_004036	chr2:25065550	-	Intron	0.388 ± 0.0001	0.833 ± 0.009	1.09E-33
NTM vs HC	cg19593285	<i>E2F1</i>	E2F transcription factor 1	NM_005225	chr20:32267661	-	CDS	0.361 ± 0.00003	0.772 ± 0.033	2.09E-22

[0093] NTM, nontuberculous mycobacterium; HC, healthy control; Acc. No., accession number; CDS, coding sequence

[0095] 나아가, 본 발명자들은 상기 표 2에 기재된 각 유전자에 대하여, 바이셀파이트 시퀀싱을 통해 혈액 시료로부터 DNA를 분리하여 해당 CpG 부위의 메틸화 여부를 검출하기 위한 특이적 프라이머를 디자인하였다. 각 프라이머 서열 및 프라이머를 통해 분석 가능한 CpG 수를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

유전자 (Illumina CpG ID)	방향	서열(5'-3')	CpG 수	서열번호
LRP5 (cg01666550)	Forward	TGTAGTTTTGTTTTGTTTTTTTAG	7	1
	Reverse	CATCCACCCAATAAAATAACTTATC		2
ADCY3 (cg20227471)	Forward	ATGGTTTTTTAGAGTAATTGAGGG	11	3
	Reverse	TCAAATCAAAACAAAATTTATAAAC		4
E2F1 (cg19593285)	Forward	ATTTTGGTAATGAGTTGGATGTT	11	5
	Reverse	CTAACCACACCCACAAATATA		6
HLA-DRB5 (cg18424635)	Forward	TTTAAAGATAATTTTGTGTTTTTTT	5	7
	Reverse	ATATTTAATTTTAACTCAGTTTACTAC		8
HLA-DRB1 (cg05383619)	Forward	TGTATGAGTAGTATTATTGTATATAGGGG	4	9
	Reverse	TAAAAAACAAATACTAAATTAATAAAAT		10
TGFB1 (cg13431688)	Forward	GATTTGTTTTATGATTGAGTATTAGAT	4	11
	Reverse	TCTATATCTCAACTAAATCCACTACTATT		12

[0098] 실시예 4. DMRs의 기능적 농축 분석 (Functional enrichment analysis)

[0099] 본 발명자들은 먼저 volcano plots, upset plots 및 기능적 농축 네트워크를 이용하여 비결핵 항산균 폐질환 환자와 정상대조군 간의 차이를 나타내었다. 유전자와 enriched terms의 유사한 메틸화 양상은 비결핵 항산균의 병인을 형성할 수 있다. 따라서 본 발명자들은 진단과 예후 모두에 존재하는 동일한 유전자 또는 enriched terms을 확인하였다. 구체적으로 2개의 유전자, 즉 *MAD1L1* (mitotic arrest deficient 1 Like 1) 및 *CTBP2* (C-terminal binding protein 2)가 두 가지 enriched terms에서 저메틸화된 것으로 나타났다. 구체적으로, *MAD1L1*

은 세포주기 (cell cycle)에서 저메틸화되었고 *CTBP2*는 Wnt 신호전달 경로에서 저메틸화된 것을 확인하였다. 다른 유전자 또는 enriched terms 또한 두 조건으로 분류된 두 그룹 간에 다르게 나타났다.

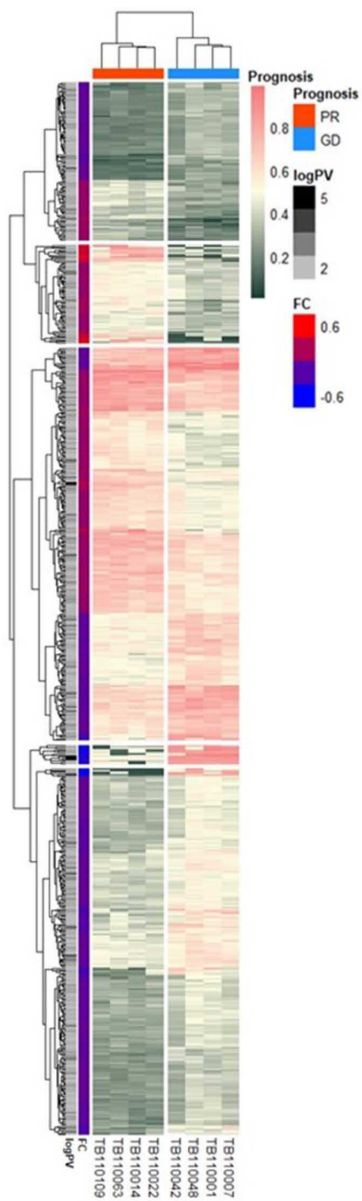
[0100] 예후가 상이한 비결핵 항산균 폐질환 환자군을 비교한 결과, 도 2b 및 도 2c에서 볼 수 있는 바와 같이 HLA 관련 유전자들은 예후가 나쁜 환자군에서 과메틸화되었으며, 이러한 유전자는 Th17 세포 분화 (Th17 cell differentiation)와 관련이 있는 것을 확인하였다. 반면에 Th17 세포의 분화와 관련된 유전자 중 특히 TGFBr1은 예후가 나쁜 환자군에서 저메틸화된 것으로 나타났다. 네트워크 분석에서는 도 2c에서 볼 수 있는 바와 같이 enriched terms의 대부분은 예후가 나쁜 환자군에서 저메틸화된 유전자와 연관되어 있었고, Th17 세포 분화와 같은 일부 enriched terms은 예후가 나쁜 환자군에서 과메틸화된 유전자와 연관이 있었다.

[0101] 또한 8명의 비결핵 항산균 환자군과 20명의 정상대조군을 비교한 결과, 도 3b에 나타낸 바와 같이 LRP5, ADCY3 및 E2F1 유전자가 상기 환자군에서 저메틸화되어 있는 것을 확인하였고, 상기 유방암과 관련이 있는 것을 알 수 있었다. 또한, 도 3b 및 도 3c에서 볼 수 있는 바와 같이 상기 저메틸화된 유전자들은 mTOR 신호전달 경로, AMPK 신호전달 경로 및 Wnt 신호전달 경로를 등과 연관이 있는 것으로 나타났다. 스플라이세오솜 (spliceosome)에 대한 enriched terms 및 이에 연결된 8개의 유전자를 제외하고는 대부분의 enriched terms와 유전자가 연결되어 있는 것으로 나타났다. 또한 Notch 및 AMPK 신호전달 경로는 비결핵 항산균 폐질환 환자의 과메틸화 유전자와 연관되어 있는 것을 알 수 있었다.

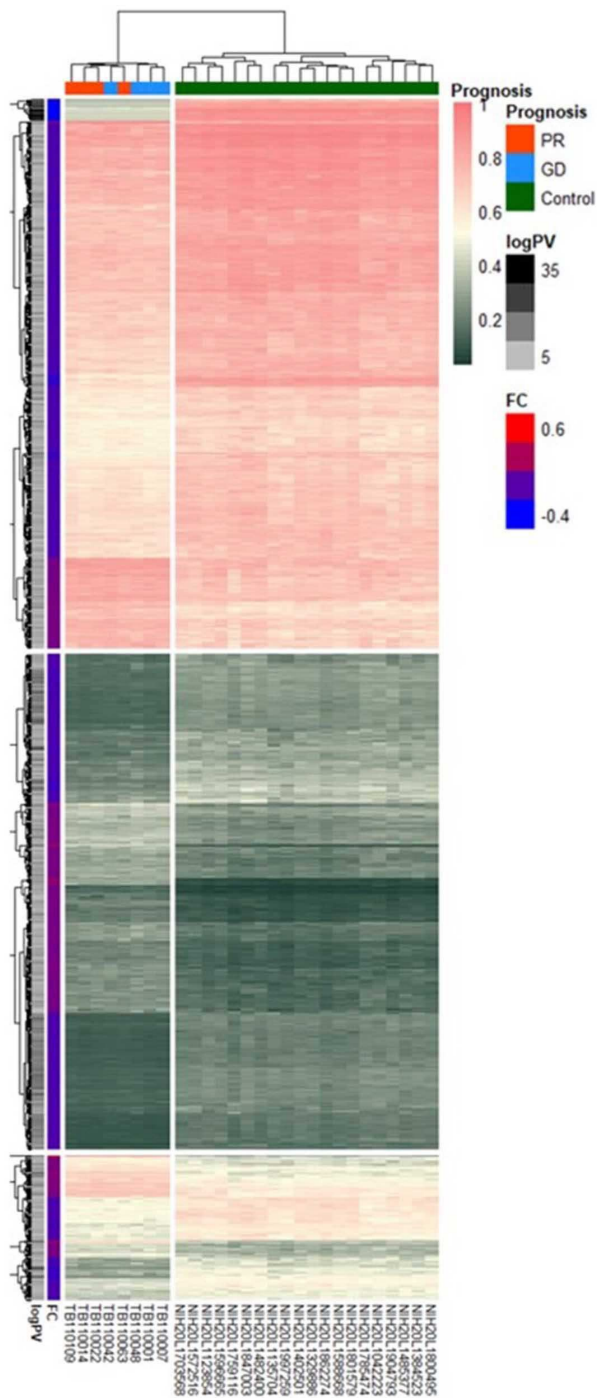
[0103] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

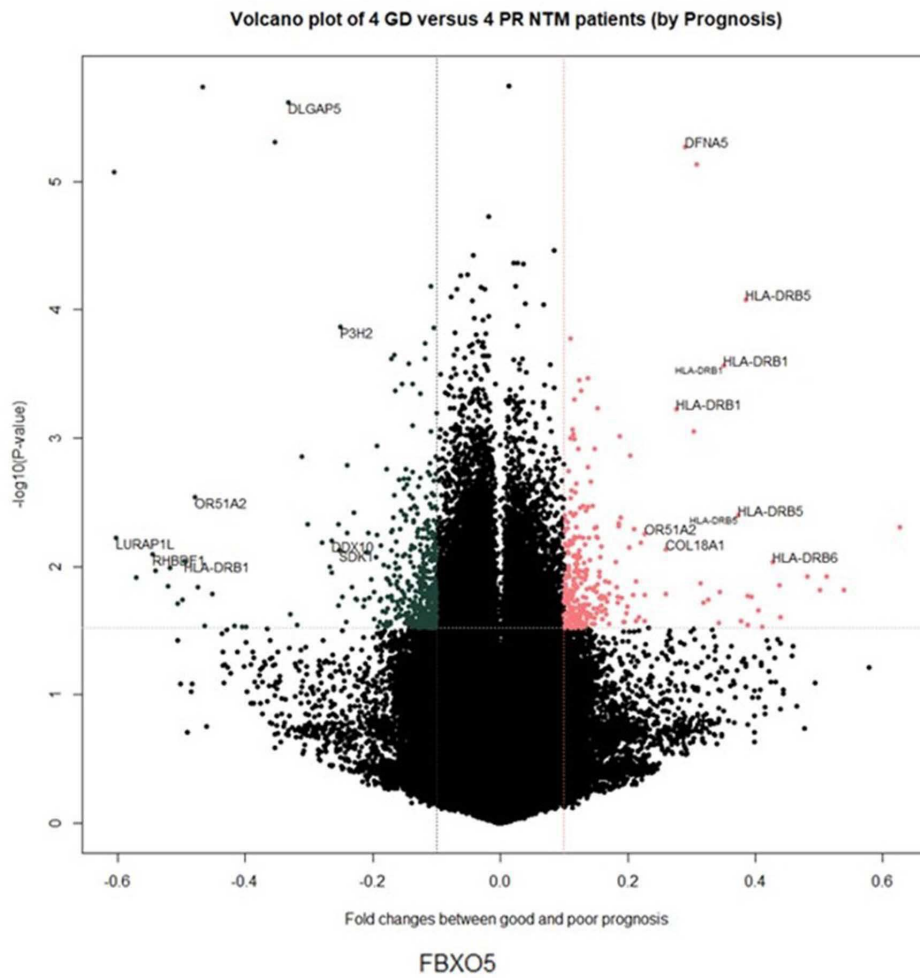
도면1a



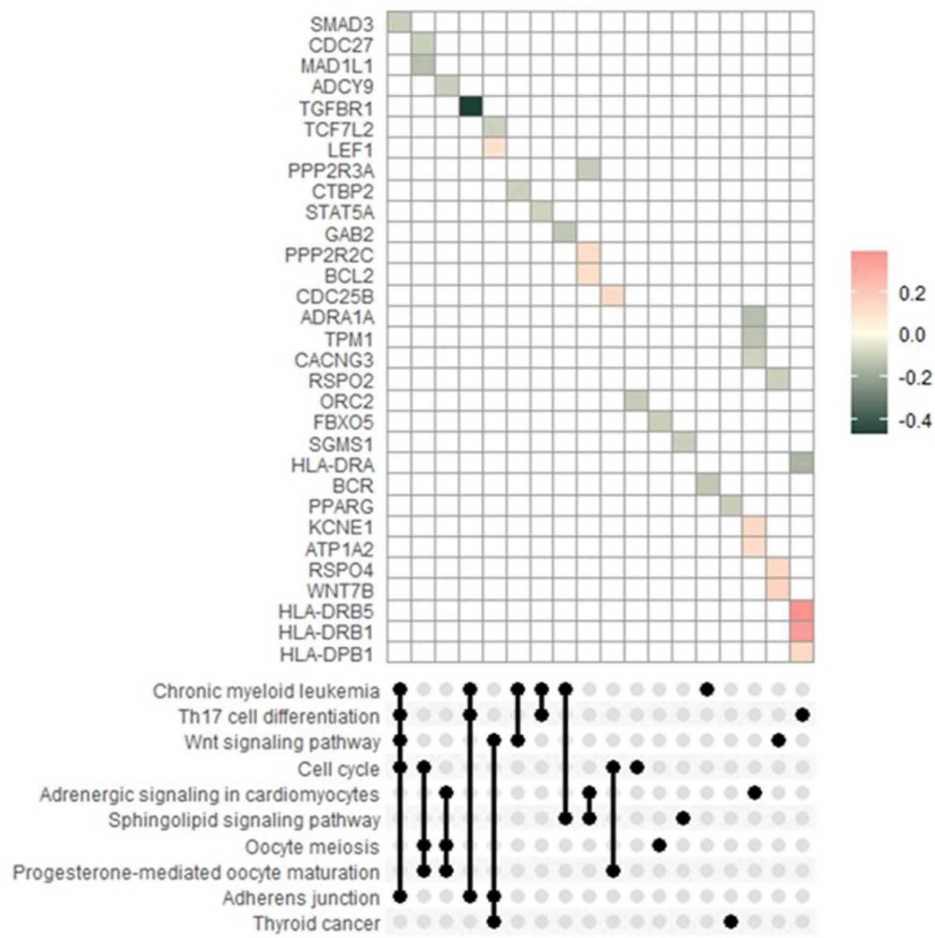
도면 1b



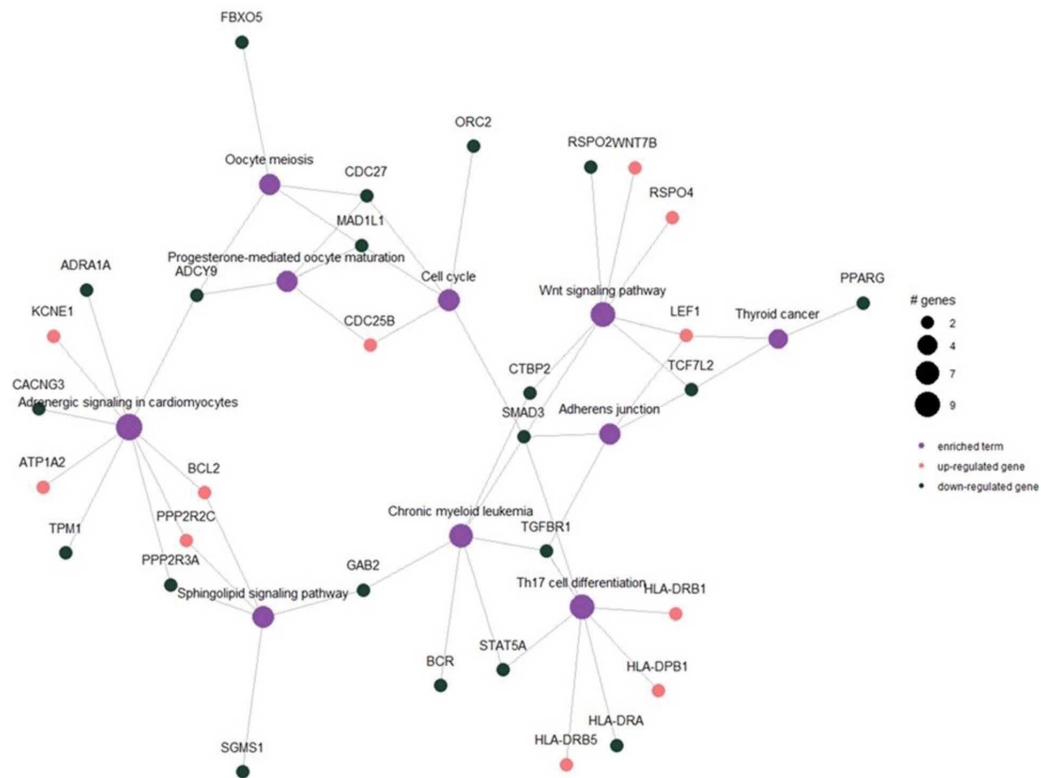
도면2a



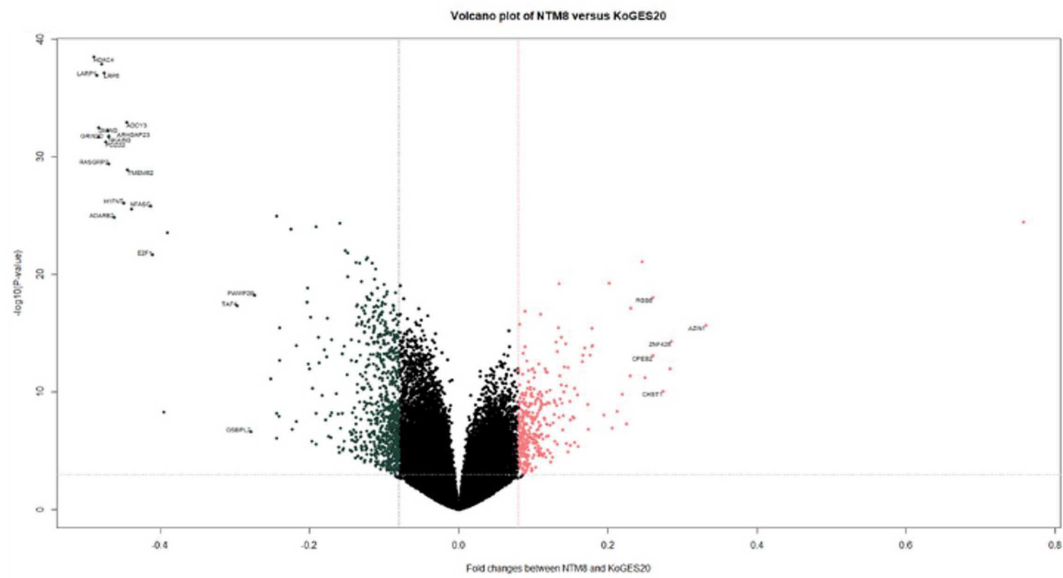
도면2b



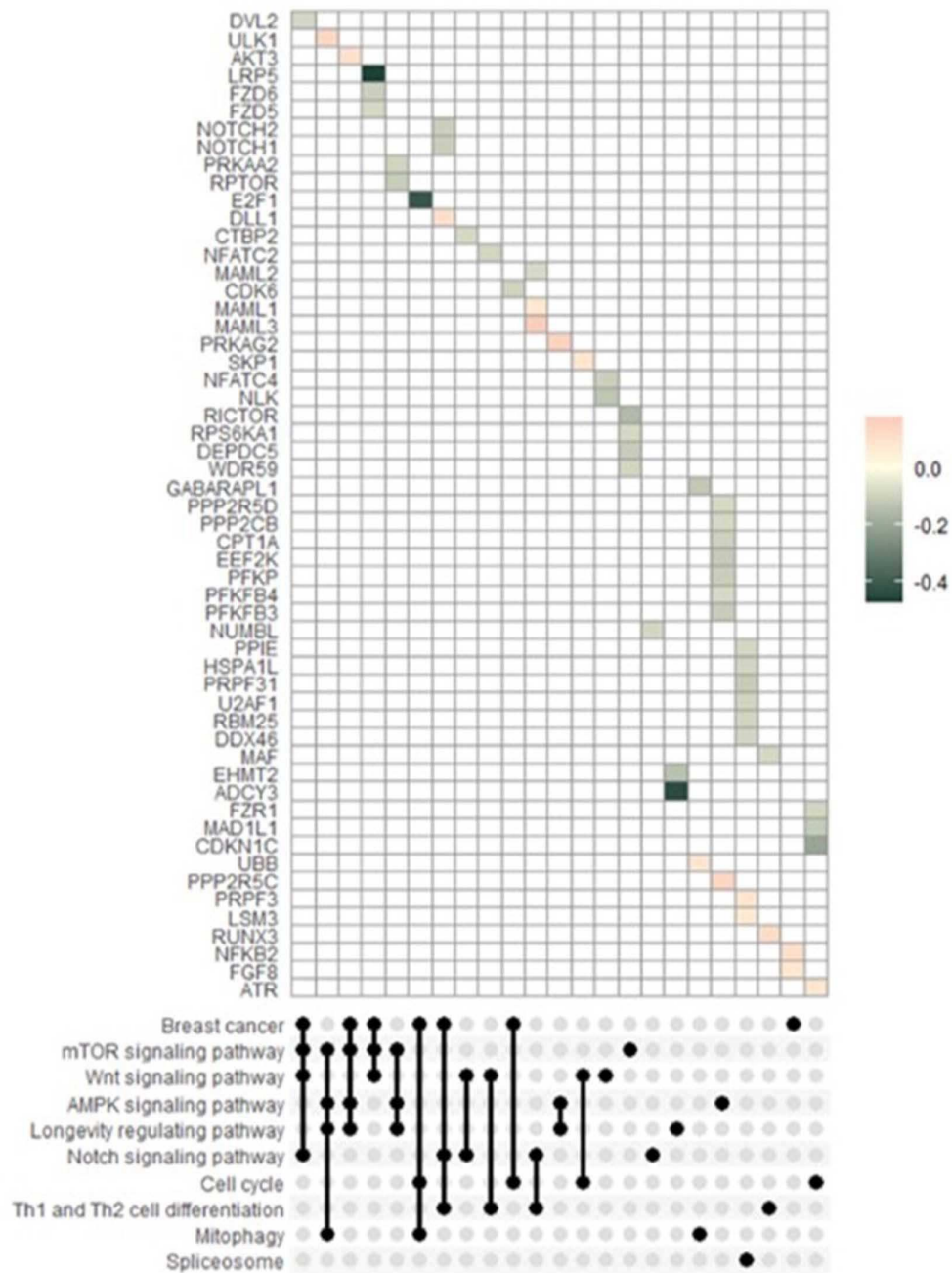
도면2c



도면3a



도면3b

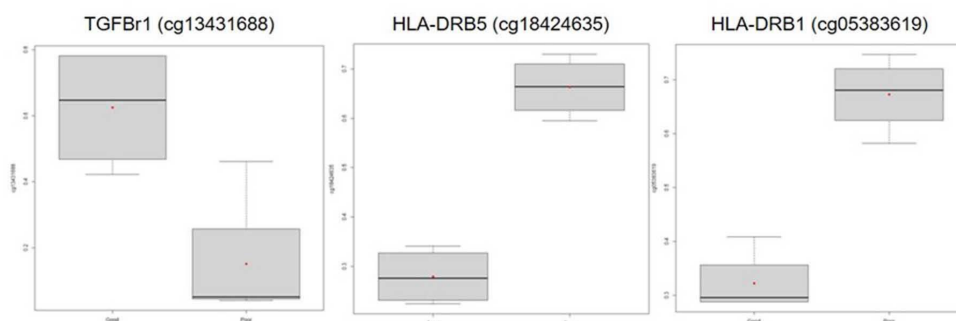


도면3c

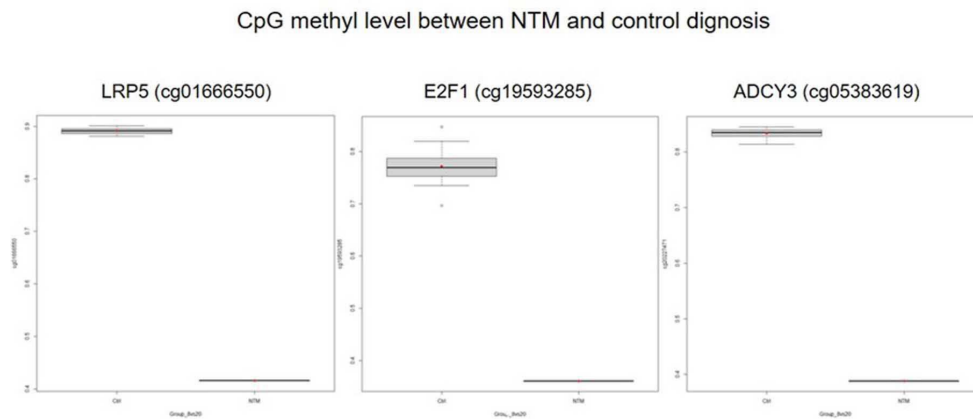


도면4a

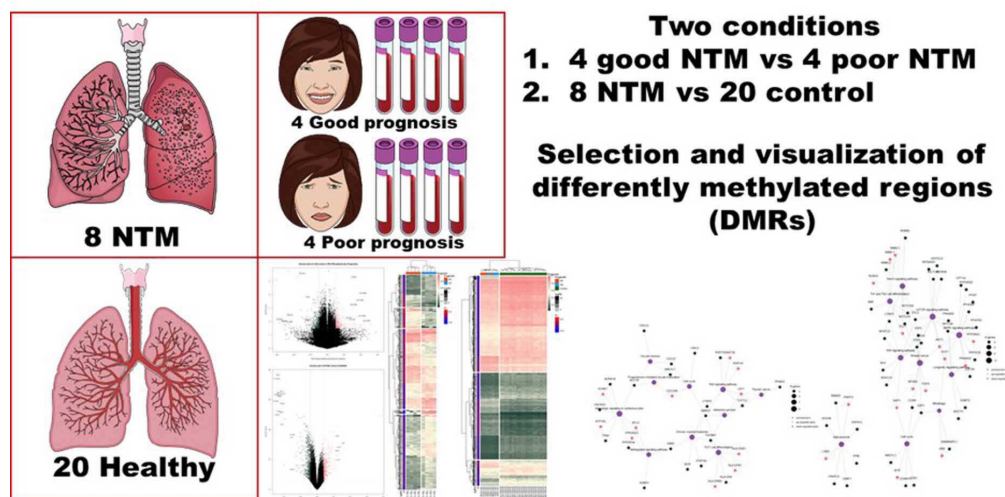
CpG methyl level between good and poor prognosis



도면4b



도면5



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> DNA methylation biomarkers for diagnosis or predicting prognosis of nontuberculous mycobacterium infection and use thereof
- <130> DHP21-K146
- <160> 12
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 26
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> LRP5 (cg01666550)_Forward

<400> 1
 tgtagttttg tttttgtttt ttttag 26

<210> 2
 <211> 25
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> LRP5 (cg01666550)_Reverse
 <400> 2
 catccacca ataaataaac ttatc 25

<210> 3
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ADCY3 (cg20227471)_Forward
 <400> 3
 atggtttttt tagagtaatt gaggg 25

<210> 4
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ADCY3 (cg20227471)_Reverse
 <400> 4
 tcaaatcaaa acaaaatttt ataaac 26

<210> 5
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> E2F1 (cg19593285)_Forward
 <400> 5
 attttttggt aatgagttgg atgtt 25

<210> 6
 <211> 23
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> E2F1 (cg19593285)_Reverse

<400> 6

ctaaccacac cccacaaat ata 23

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HLA-DRB5 (cg18424635)_Forward

<400> 7

ttttaaagat aatttttggt tttttt 26

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HLA-DRB5 (cg18424635)_Reverse

<400> 8

atatttaatt tttaacctca cttttactac 30

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HLA-DRB1 (cg05383619)_Forward

<400> 9

tgtatgagta gttattattg tatatagggg 30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HLA-DRB1 (cg05383619)_Reverse

<400> 10

taaaaaaca aatactaat ttaataaaat 30

<210> 11

<211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TGFBr1 (cg13431688)_Forward
 <400> 11
 gattttgttt ttatgatttg agtattagat 30
 <210> 12
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TGFBr1 (cg13431688)_Reverse
 <400> 12
 tctatatctt caactaaatc cactactatt 30