



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0085533
(43) 공개일자 2018년07월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
C12Y 203/01042 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0009177
(22) 출원일자 2017년01월19일
심사청구일자 2017년11월24일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
고은희
서울특별시 강남구 삼성로 212, 6동 1404호 (대치동, 은마아파트)
이기업
경기도 양평군 양서면 중동길 313-8
(74) 대리인
특허법인태백

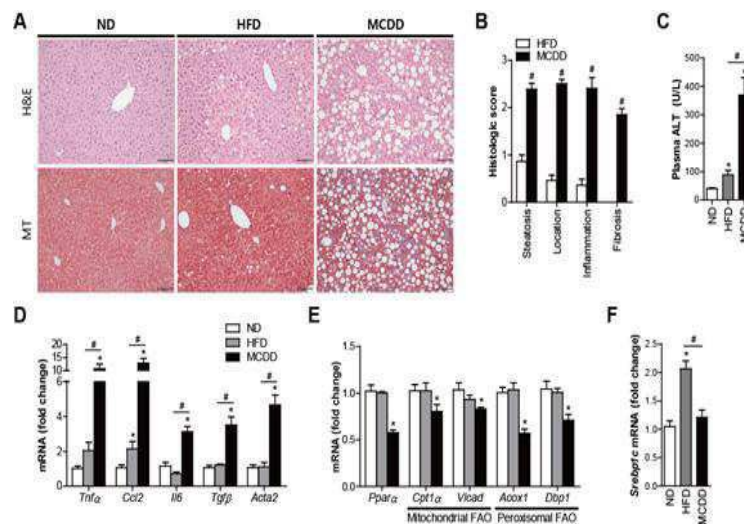
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **Gnpat**을 유효성분으로 포함하는 비알콜성 지방간염 진단용 또는 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물

(57) 요약

본 발명은 글리세론 포스페이트 0-아실트랜스퍼라아제(Glyceronephosphate 0-acyltransferase; Gnpat) 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 비알콜성 지방간염 진단용 또는 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물에 관한 것으로, 상기 Gnpat은 간 질환에서 중요한 표지 인자인 플라즈마로겐의 생합성 과정에서 작용하는 첫 번째 효소인 바, Gnpat의 발현량이 낮으면 플라즈마로겐의 양 또한 감소하여 비알콜성 지방간염의 병증을 나타내는 사실을 확인하여 신규한 비알콜성 지방간염 표적으로서 Gnpat의 가능성을 확인하였다. 따라서 Gnpat의 발현 수준을 이용한 비알콜성 지방간염 진단과 유전자 발현 증진제를 비알콜성 지방간염 치료용 약학 조성물의 유효성분으로 유효하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/91051 (2013.01)
G01N 2500/00 (2013.01)
G01N 2800/085 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2006-2005412
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발사업
연구과제명	당뇨병 노화합병증의 제어 기술 개발
기 여 율	1/1
주관기관	울산대학교
연구기간	2012.09.01 ~ 2015.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

글리세론 포스페이트 0-아실트랜스퍼라아제(Glyceronephosphate 0-acyltransferase; Gnpat) 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 비알콜성 지방간염 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

Gnpat 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 비알콜성 지방간염 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 3

Gnpat의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 비알콜성 지방간염 진단용 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 Gnpat의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 Gnpat 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 상기 Gnpat 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 화합물인 것을 특징으로 하는 비알콜성 지방간염 진단용 조성물.

청구항 5

Gnpat의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 비알콜성 지방간염 치료 예후 예측용 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 Gnpat의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 Gnpat 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 상기 Gnpat 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 화합물인 것을 특징으로 하는 비알콜성 지방간염 치료 예후 예측용 조성물.

청구항 7

제 3 항 또는 제 4 항의 조성물을 포함하는 비알콜성 지방간염 진단용 키트.

청구항 8

제 5 항 또는 제 6 항의 조성물을 포함하는 비알콜성 지방간염 치료 예후 예측용 키트.

청구항 9

(a) 환자에서 분리된 시료로부터 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (c) 상기 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준이 정상 대조군 시료보다 낮을 경우 비알콜성 지방간염이라고 판단하는 단계를 포함하는 비알콜성 지방간염 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

(a) 치료받기 전의 환자에서 분리된 시료로부터 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준을 치료를 시행한 후의 환자에서 분리된 시료의 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준과 비교하는 단계; 및 (c) 상기 치료를 시행한 후의 환자에서 분리된 시료의 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준이 치료를 시행하기 전의 환자에서 분리된 시료의 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질

의 발현 수준보다 높아졌을 경우 비알콜성 지방간염의 치료 효과가 있다고 판단하는 단계를 포함하는 비알콜성 지방간염 치료 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

Gnpat 단백질 발현 또는 활성 촉진제를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 비알콜성 지방간염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 12

Gnpat 단백질 발현 또는 활성 촉진제를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 비알콜성 지방간염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 13

(a) 동물의 간에서 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 동물에 시험 물질을 처리하는 단계; (c) 상기 시험물질을 처리한 동물의 간에서 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (d) 상기 단계 (a)에서 측정한 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준과 비교하여, 상기 단계 (c)에서 측정한 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준이 증가한 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 비알콜성 지방간염 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 치료제는 Gnpat의 유전자의 mRNA 또는 Gnpat 단백질의 발현량을 증가시킴으로써 간에서 플라스마로젠(plasmalogen)의 양을 증가시키는 것을 특징으로 하는 비알콜성 지방간염 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비알콜성 지방간염 진단용 또는 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물, 비알콜성 지방간염 치료제 및 이의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 간은 영양소 대사의 중심 역할을 하는 장기로서, 정상적인 사람의 간은 약 1,500g의 무게를 가지며 간 질환이 발병하여 간 기능 이상이 초래되면 생체의 영양소 대사에 문제가 생기는 바, 구체적으로 포도당을 글리코젠으로 만들거나 또는 단백질을 알부민으로 전환하거나 불필요한 것을 분해하여 쓸개즙으로 전달하는 등의 간 기능에 이상이 생긴다.

[0003] 다양한 간 질환 중 비알콜성 지방간 질환(Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 개발도상국에서 가장 흔하게 나타나는 간질환으로, 술을 마시지 않거나 거의 마시지 않는 사람에게 주로 생기는 지방간을 일컫는다. 비알콜성 지방간의 증상은 간 손상을 일으키지 않는 단순한 지방증에서 비알콜성 지방간염(Nonalcoholic Steatohepatitis, NASH)에 이르기까지 그 정도가 다양한데, 이중 가장 심각한 형태인 비알콜성 지방간염은 간경변 및 간암으로까지 진행할 수 있다. 이러한 비알콜성 지방간 질환의 원인은 비만, 혈중 지방질의 농도가 높은 고지혈증 또는 당뇨병 등의 질병, 약물, 심각한 영양 부족 등으로 추정되고 있다.

[0004] 한편, 플라스마로젠(Plasmalogen)은 퍼록시좀 및 소포체(Endoplasmic Reticulum)에서 합성되는, 비닐 에테르 결합을 포함하는 특수한 인지질의 한 종류로, 세포막의 주요 구조적 구성성분임과 동시에 산화적 스트레스로 유발되는 손상에서 세포를 보호하거나 신호전달 물질로 작용하며 세포의 기능을 유지하는 등, 세포에서 중요한 역할을 하는 물질로 알려져 있다. 특히, 플라스마로젠의 분비의 결함 내지 항상성의 변화는 여러 가지 유전적 질환들과 관련되어 신경성 질환, 다양한 대사 질환, 염증 질환 및 암과도 관련이 있을 것으로 판단되고 있다.

[0005] 이러한 연구를 바탕으로 현재 플라스마로젠을 함유하는 조성물을 이용해 퇴행성 신경질환, 인식장애, 골다공증, 조울증, 혈관 질환과 같은 증가된 막 콜레스테롤과 관련된 노화 질병을 치료 또는 예방하는 기술들이 개발되고 있다. 그러나 아직까지 생체에서 플라스마로젠의 합성 자체를 유도하여 간 질환을 치료하는 기술 개발은 미비한

실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 1. 한국공개특허 제10-2013-0103190호.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 플라스마로겐의 생합성에 필요한 효소의 발현량을 측정함으로써 비알콜성 지방간염을 진단 또는 이의 치료 예후를 예측할 수 있는 바이오마커 조성물, 비알콜성 지방간염 진단용 또는 치료 예후 예측용 조성물, 이를 포함하는 비알콜성 지방간염 진단용 또는 치료 예후 예측용 키트 및 이를 이용한 비알콜성 지방간염 진단 방법 및 치료 예후 예측방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 플라스마로겐의 생합성에 필요한 효소의 발현 또는 활성 촉진제를 포함하는 비알콜성 지방간염 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 플라스마로겐의 생합성에 필요한 효소의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는 비알콜성 지방간염 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 따라서 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 글리세론 포스페이트 0-아실트랜스퍼라아제(Glyceronephosphate 0-acyltransferase; Gnpat) 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 비알콜성 지방간염 진단용 바이오마커로서 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 글리세론 포스페이트 0-아실트랜스퍼라아제(Glyceronephosphate 0-acyltransferase; Gnpat) 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 비알콜성 지방간염 진단용 바이오마커 조성물 및 비알콜성 지방간염 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 Gnpat의 발현수준을 측정할 수 있는 재제를 유효성분으로 포함하는 비알콜성 지방간염 진단용 조성물 및 비알콜성 지방간염 치료 예후 예측용 조성물 및 이를 포함하는 비알콜성 지방간염 진단용 키트 및 치료 예후 예측용 키트를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 (a) 환자에서 분리된 시료로부터 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (c) 상기 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준이 정상 대조군 시료보다 낮을 경우 비알콜성 지방간염이라고 판단하는 단계를 포함하는 비알콜성 지방간염 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 (a) 치료받기 전의 환자에서 분리된 시료로부터 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준을 치료를 시행한 후의 환자에서 분리된 시료의 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준과 비교하는 단계; 및 (c) 상기 치료를 시행한 후의 환자에서 분리된 시료의 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준이 치료를 시행하기 전의 환자에서 분리된 시료의 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준보다 높아졌을 경우 비알콜성 지방간염의 치료 효과가 있다고 판단하는 단계를 포함하는 비알콜성 지방간염 치료 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0014] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Gnpat 단백질 발현 또는 활성 촉진제를 유효성분으로 함유하는 비알콜성 지방간염 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0015] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 동물의 간에서 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 동물에 시험 물질을 처리하는 단계; (c) 상기 시험물질을 처리한 동물의 간에서 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (d)

상기 단계 (a)에서 측정된 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준과 비교하여, 상기 단계 (c)에서 측정된 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준이 증가한 물질을 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 비알콜성 지방간염 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0016]

본 발명의 비알콜성 지방간염 진단용 또는 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물 등은 플라스마로겐의 생합성에서 첫 번째 과정에 관여하는 Gnpat 및 이를 코딩하는 유전자를 포함하기 때문에, 보다 근원적인 간 질환의 치료가 가능하고, Gnpat 및 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 이용하여, 이를 활성화할 수 있는 물질을 스크리닝함으로써 비알콜성 지방간염의 치료제를 유용하게 선별할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017]

도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 비알콜성 지방간 질환(NAFLD) 모델 마우스의 간에서 병증에 따른 특성들을 확인한 것이다.

(A : 8주 간 정상 식이요법, 고지방 식이요법, 메티오닌 콜린 결핍 식이요법을 수행한 마우스의 간 조직의 모습 확인, B : 간 지방증, 염증, 섬유증의 정도 점수, C : 혈장 ALT 레벨 측정, D : 염증 및 섬유증의 원인인 유전자들의 mRNA 발현량 측정, E : 미토콘드리아 및 퍼록시좀 지방산 산화(Fatty Acid Oxidation)와 관련된 유전자 및 *Ppar a*의 mRNA 발현량 측정, F : *Srebp1c*의 mRNA 발현량 측정)

도 2는 도 1의 실시예에 따른 NAFLD 모델 마우스의 간에서 플라스마로겐 관련 특성들을 확인한 결과이다.

(A : *Gnpat* 및 *Agps*의 mRNA 발현량 측정, B : 간 플라스마로겐의 추출 이온 크로마토그램(LC-MS/MS 수행 결과), C : 정상 식이요법, HFD 및 MCDD 마우스에서 간의 PC 함유 또는 PE 함유 플라스마로겐의 레벨 측정)

도 3은 본 발명의 다른 실시예에 따른 NAFLD 모델 마우스의 간에서 *Gnpat*의 *Ppar a* 조절 능력을 확인한 결과이다.

(A : siRNA를 이용한 *Ppar a* 및 *Gnpat* 녹다운 효과 확인, B : siRNA를 처리한 후 미토콘드리아 및 퍼록시좀 FAO과 세포 죽음의 확인, C : *Gnpat* 녹아웃 마우스의 간에서의 *Gnpat* mRNA 발현량 측정, D : *Gnpat* 녹아웃 마우스의 간 조직 관찰, E, F : *Gnpat* 녹아웃 마우스의 식이요법 별 *Gnpat*, *Ppar a* mRNA 발현량 및 PC 함유 또는 PE 함유 플라스마로겐 측정)

도 4는 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 NASH 모델 마우스에서 알킬 글리세롤의 지방증 억제효과를 나타낸 것이다.

(A : 플라스마로겐의 생합성 과정의 도식도, B : MCDD 마우스의 AG 처리 및 미처리시의 간 조직 확인, C : 간 지방증, 염증, 섬유증의 정도 점수 및 관련 mRNA 발현량, 간 중성지방 레벨, 혈장 ALT 레벨, *Tnf a*, *Ccl2*, *Tgf β* mRNA 발현량 측정, D : 정상식이요법 및 MCDD 마우스의 간에서 PC 함유 및 PE 함유 플라스마로겐 측정, E : 미토콘드리아 및 퍼록시좀 FAO 및 관련 유전자 발현량 측정, F : 정상 식이요법 및 MCDD 마우스 간에서 유리 콜레스테롤 레벨 측정)

도 5는 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 고지방 고콜레스테롤 식이요법 마우스의 간에서 나타나는 각종 특성들을 확인한 것이다.

(A : 정상 식이요법 및 MCDD 마우스에서 간의 조직학적 관찰, B : 염증 및 섬유증에 관여하는 mRNA 발현량, 간 중성지방, 혈장 ALT 레벨 측정, C : 상대적인 *Ppar a* mRNA 발현량, 미토콘드리아 및 퍼록시좀 FAO 측정, D : 혈장 총 콜레스테롤 및 간 유리 콜레스테롤 레벨 측정, E : *Gnpat* 및 *Agps*의 상대적인 발현량 및 간의 PC 함유 또는 PE 함유 플라스마로겐의 함량 측정, F : HFHCD 마우스에서 *Fads1* 및 *Fads2*의 mRNA 발현량 및 siRNA 처리 시 *Fads1*, *Fads2*, *Gnpat*, *Ppar a*의 상대적인 발현량 측정)

도 6은 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 MCDD 마우스에서 플루바스타틴(Fluvastatin)의 NASH 억제 효과를 확인한 것이다.

(A : 플루바스타틴 처리에 따른 MCDD 마우스의 간 조직학적 관찰, B : 간 지방증, 염증 및 섬유증의 정도, 간 중성지방, 혈장 ALT 레벨 측정, C : 간의 유리 콜레스테롤 레벨, 염증 및 섬유증에 관여하는 유전자의 발현 레벨 측정, D : 미토콘드리아 및 퍼록시좀 FAO 및 FAO 관련 유전자 발현량 측정, E : *Gnpat* 및 *Agps* mRNA 발현량 및 간의 PC 및 PE 함유 플라스마로겐 레벨의 측정, F : *Fads1* 및 *Fads2* mRNA 발현량 측정 및 간의 AA, EPA,

DHA 함유 폴리불포화지방산(PUFA) 조성물 분석)

도 7은 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 MCDD 마우스에서 비접힘 단백질 반응에 대한 플루바스타틴(A) 및 알킬 글리세롤(B)의 효과를 웨스턴블롯(Western blot)으로 확인한 것이다.

도 8은 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 *Gnpat* 녹아웃 마우스에서 플루바스타틴 및 알킬 글리세롤의 NASH 억제 효과를 확인한 것이다.

(A : MCDD 정상 마우스 및 *Gnpat* 녹아웃 마우스에서 간의 조직학적 관찰, B : 간 지방증, 염증 및 섬유증의 정도 측정, C : 혈장 ALT 레벨 및 *Tnf α*, *Ccl2* mRNA 발현 레벨 측정, D : *Ppar α* mRNA 발현 레벨 측정, E : *Gnpat* mRNA 발현 레벨 및 간의 PC 함유 및 PE 함유 플라스마로겐 레벨의 변화량 비교, F : 간 유리 콜레스테롤 및 DHA-플라스마로겐의 NASH 발병에서의 역할을 나타내는 모식도)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본 발명은 글리세론 포스페이트 0-아실트랜스퍼라아제(Glyceronephosphate O-acyltransferase; *Gnpat*) 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 비알콜성 지방간염 진단용 또는 비알콜성 지방간염 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 명세서에서 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.
- [0020] 본 명세서에서 용어 "예후(prognosis)"는 질병을 진단하여 판단된 장애의 증세 또는 경과에 대한 전망을 말한다. 비알콜성 지방간 질환 환자에 있어서 치료 예후는 통상적으로 플라스마로겐 합성량의 증가량을 뜻한다. 예후의 예측은 향후 비알콜성 지방간 치료의 방향에 대한 단서를 제시하므로 매우 중요한 임상적 과제이다.
- [0021] 또한, 본 발명은 *Gnpat*의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 비알콜성 지방간염 진단용 조성물 또는 비알콜성 지방간염 치료 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [0022] 이때, 상기 *Gnpat*의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 *Gnpat* 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 상기 *Gnpat* 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 화합물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 비알콜성 지방간염 진단용 키트 또는 비알콜성 지방간염 치료 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [0024] 본 명세서에서 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3'-말단 수산화기(free 3'-hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 짧은 핵산 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약 (즉, DNA 폴리머라아제 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지의 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.
- [0025] 본 명세서에서 용어 "프로브"는 mRNA 외 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무, 발현량을 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.
- [0026] 본 명세서에서 용어 "항체"는 당해 기술분야에 공지된 용어로서 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역글로불린을 의미한다. 본 발명에서의 항체는 본 발명의 *Gnpat*에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 당해 기술분야의 통상적인 방법에 따라 항체를 제조할 수 있다. 상기 항체의 형태는 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체를 포함하며, 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태를 의미한다. 또한, 상기 항체는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.
- [0027] 본 명세서에서 용어 "펩타이드"는 표적 물질에 대한 결합력 높은 장점이 있으며, 열/화학 처리시에도 변성이 일어나지 않는다. 또한, 분자 크기가 작기 때문에 다른 단백질에 붙여서 융합 단백질로의 이용이 가능하다. 구체

적으로 고분자 단백질 체인에 붙여서 이용이 가능하므로 진단 키트 및 약물전달 물질로 이용될 수 있다.

- [0028] 본 명세서에서 용어 "애포타머(aptamer)"란, 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 특별한종류의 단일 가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)으로 구성된 폴리뉴클레오티드의 일종을 의미한다. 상술한 바와 같이, 애포타머는 항체와 동일하게 항원성 물질에 특이적으로 결합할 수 있으면서도, 단백질보다 안정성이 높고, 구조가 간단하며, 합성이 용이한 폴리뉴클레오티드로 구성되어 있으므로, 항체를 대체하여 사용될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 키트는 바이오마커 성분에 특이적으로 결합하는 항체, 기질과의 반응에 의해서 발색하는 표지체가 접합된 2차 항체 접합체(conjugate), 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 효소반응 정지용액 등을 포함할 수 있으며, 사용되는 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명은 (a) 환자에서 분리된 시료로부터 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (c) 상기 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준이 정상 대조군 시료보다 낮을 경우 비알콜성 지방간염이라고 판단하는 단계를 포함하는 비알콜성 지방간염 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0031] 또한, 본 발명은 (a) 치료받기 전의 환자에서 분리된 시료로부터 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준을 치료를 시행한 후의 환자에서 분리된 시료의 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준과 비교하는 단계; 및 (c) 상기 치료를 시행한 후의 환자에서 분리된 시료의 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준이 치료를 시행하기 전의 환자에서 분리된 시료의 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준보다 높아졌을 경우 비알콜성 지방간염의 치료 효과가 있다고 판단하는 단계를 포함하는 비알콜성 지방간염 치료 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0032] 구체적으로, 상기 mRNA 발현 수준을 측정하는 방법은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting) 및 DNA 칩을 이용하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0033] 보다 구체적으로, 상기 단백질 발현 수준을 측정하는 방법은 웨스턴 블롯(Western blot), 방사성면역분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법(Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩 및 ELISA 분석을 이용하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 본 명세서에서 용어 "환자에서 분리된 시료"란 바이오마커인 상기 Gnpat 유전자 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준에 있어서 대조군과 차이가 나는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 또는 뇨와 같은 시료를 포함할 수 있고, 보다 상세하게는 간 조직, 간세포일 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0035] 또한, 본 발명은 Gnpat 단백질 발현 또는 활성 촉진제를 유효성분으로 함유하는 비알콜성 지방간염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0036] 이때, 상기 Gnpat 단백질 발현 또는 활성 촉진제는 전체 조성물 100 중량부에 대하여 0.1 내지 50 중량부로 포함될 수 있는 바, 상기 범위보다 너무 적게 포함되는 경우에는 촉진제의 Gnpat 단백질 발현 또는 활성 촉진 효과가 제대로 나타나지 않고, 너무 많이 포함되는 경우에는, 함량 증가량 대비 Gnpat 단백질 발현 또는 활성 촉진 효과의 증가량이 저하되므로 바람직하지 않다.
- [0037] 본 발명의 약학 조성물은 화합물, 뉴클레오타이드, 안티센스, siRNA 올리고 뉴클레오타이드 및 천연물 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물 또는 복합 제제는 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 포함하여 약학 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수

있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

- [0039] 본 발명의 약학 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 증, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 시간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있으며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.
- [0041] 더욱이, 본 발명은 Gnpat 단백질 발현 또는 활성 촉진제를 유효성분으로 함유하는 비알콜성 지방간염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0042] 이때, 상기 Gnpat 단백질 발현 또는 활성 촉진제는 전체 조성물 100 중량부에 대하여 10 내지 90 중량부로 포함될 수 있는 바, 상기 범위에서 촉진제의 Gnpat 단백질 발현 또는 활성 촉진 효과가 가장 뛰어나므로 바람직하다.
- [0043] 상기 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.
- [0044] 또한, 상기 건강기능식품 조성물은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품 안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0045] 상기 "식품첨가물공전"에 기재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산 칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고랭색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명은 (a) 동물의 간에서 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 동물에 시험 물질을 처리하는 단계; (c) 상기 시험물질을 처리한 동물의 간에서 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (d) 상기 단계 (a)에서 측정한 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준과 비교하여, 상기 단계 (c)에서 측정한 Gnpat 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 Gnpat 단백질의 발현 수준이 증가한 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 비알콜성 지방간염 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0047] 이때, 상기 치료제는 Gnpat의 유전자의 mRNA 또는 Gnpat 단백질의 발현량을 증가시킴으로써 간에서 플라스마로겐(plasmalogen)의 양을 증가시킬 수 있는 바, 생체의 생합성 과정 자체에 관여하여 보다 효과적으로 치료할 수 있는 치료제를 선별해낼 수 있다.
- [0049] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 당업계에 있어 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이며, 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐이므로 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0051] <준비예 1> 동물 준비

- [0052] 8주령의 수컷 C57BL/6N 마우스를 실험 대상으로 삼았으며, 모든 동물들의 사용 및 실험 방법은 아산생명과학연구원 동물실험윤리위원회(서울, 한국)에서 승인되었다. 실험 조건에 따라, C57BL/6N 마우스의 식이요법으로 정상 식이요법(ND; 지방에서 12%의 에너지를 얻는 정도), 고지방 식이요법(HFD; 지방에서 60%의 에너지를 얻는

정도), 메티오닌 및 콜린 결핍 식이요법(MCDD; 2.5%의 콜레스테롤을 포함하는 지방에서 60%의 에너지를 얻는 정도, 메티오닌 및 콜린 결핍) 또는 고지방 고콜레스테롤 식이요법(HFCD; 2.5%의 콜레스테롤을 포함하는 지방에서 60%의 에너지를 얻는 정도)을 각각 수행하였다. 이때 MCDD 및 HFCD 식이요법을 수행한 마우스가 비알콜성 지방간 질환의 동물 모델로 사용되었다.

[0054] <준비예 2> 세포배양

[0055] 마우스의 간세포주인 AML12를 변형 이글배지(Eagles Medium) 및 영양 혼합물 F-12(1:1)에 10% 소태아혈청, 5 μ g/ml 인슐린, 5 μ g/ml 의 트랜스페린, 5 ng/ml의 셀레늄 및 40 ng/ml 텍사메타손을 보충물로 투여하고 37°C, 5% CO₂ 및 95%의 공기가 있는 습한 환경에서 배양하였다. 이후, 세포들을 성장 배지에서 배양물이 70-80%의 공간을 차지할 정도로 증식할 때까지 2차 배양하였다.

[0057] <실시에 1> 식이요법에 따른 마우스들의 특성 확인

[0058] 통계학적 분석의 결과들은 평균 $\pm$ s.e.m으로 표시되었다. 실험 그룹들 간의 차이점은 스튜던트의 양측꼬리 t-검정(Student's two-tailed t-test) 또는 일원분산분석과 이에 따른 본페로니 사후검정(one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test)에 의해 측정되었다. P < 0.05일 경우에 통계학적으로 의미가 있다고 보았다.

[0059] (1) 조직학적 분석

[0060] 상기 준비예1에서 준비한 마우스의 간 조직을 조직학적으로 분석하기 위해, 일정 시간동안 서로 다른 식이요법을 수행한 마우스들을 희생하여 간을 추출하였다. 이후, 간 조직 샘플을 4% 파라포름알데히드와 혼합하여 파라핀에 담가둔 후에, 5 μ m 의 두께로 잘라 연속절편을 얻었다. 이후 이 연속 절편들을 헤마톡실린/에오신(H&E) 및 Masson's Trichrom(MT)로 염색하였다.

[0061] 간의 조직학적 변화의 심각도를 측정하기 위해, NASH-Clinical Research Network(CRN)의 점수 시스템을 사용하여, 다음과 같은 평가 기준과 점수를 마련하였다. 지방증 등급은 실질조직 침범(parenchymal involvement)의 정도에 따라 다음과 같은 점수로 평가되었다: 5% 미만일 때 0점, 5%-33%일 때 1점, 33%-66%일 때 2점, 66% 초과일 때 3점. 또한, 지방증의 부위는 다음과 같은 점수로 평가되었다: 두드러진 3구역(zone)일 때 0점, 두드러진 1구역(zone)일 때 1점, 지역으로 나뉘지 않을 때 2점, 범파리형일 때 3점. 소엽성 염증 정도는 x200 현미경 조건에서 염증 병소의 숫자에 따라 다음과 같이 점수를 매겼다: 0개일 때 0점, x200 배율 당 2개 미만일 때 1점, x200 배율 당 2-4개 일 때 2점, x200 배율 당 4개 초과인 경우 3점. 섬유증 단계는 섬유증의 위치와 밀도에 따라 다음과 같이 점수를 매겼다: 0개일 때 0점, 굴맥관주변(perisinusoidal) 또는 문맥 주위 섬유증일 때 1점, 굴맥관주변(perisinusoidal) 섬유증일 때 2점, 가교형 섬유증일 때 3점, 간경변증일 때 4점.

[0062] 그 결과, 도 1의 A 및 B를 참조하면, HFD 식이요법을 8주간 수행한 C57BL/6N 마우스는 큰 염증 반응 없이 약간의 간 지방증을 나타낸 반면에, 8주간 MCDD 식이요법을 수행한 마우스는 비알콜성 지방간염(NASH)과 초기 비알콜성 간 섬유증을 나타냈다.

[0063] (2) 혈장의 알라닌 트랜스아미네이스(Alanine transaminase, ALT) 레벨 측정

[0064] 상기 준비예 1에서 식이요법에 따라 키운 마우스의 혈장을 채취한 후, 혈장의 알라닌 트랜스아미네이스(Alanine transaminase) 레벨을 IDTox™ Alanine Transaminase Endpoint Assay kit(ID Labs™ Inc., ON, Canada)를 사용하여 측정하였다.

[0065] 그 결과, 도 1의 C에 나타난 바와 같이, MCDD 식이요법을 한 마우스에서 ALT 레벨이 현저히 증가하는 것을 알 수 있었다.

[0066] (3) 지방산 산화(Fatty Acid Oxidation, FAO) 관련 효소 유전자의 mRNA 발현 측정

[0067] 상기 준비예 1에서 키운 마우스들에서 간을 적출하였다. 간 조직을 TRIzol 시약(Invitrogen, USA) 1 ml에 넣고 혼합한 다음 클로로포름(Merck, Germany) 200 μ l를 넣고 5 분간 배양했다. 이후, 13,000 rpm에서 20분 간 원심분리하고 상층액을 새로운 튜브에 옮기고 이소프로판올(Sigma, USA) 500 μ l를 넣고 조심스럽게 혼합한 후 30 분 간 -20°C에서 배양했다. 배양된 상층액을 13,500 rpm 30분간 원심분리한 후 에탄올(Merck, Germany)로 세수하고 펠렛을 말려주었다. 이렇게 말린 펠렛을 DEPC-water(Bioneer, Korea)에 녹인 후 cDNA 합성 kit(RevertAid

First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo scientific, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다.

[0068] 실시간 PCR(Real time PCR)은 FastStart Universal SYBR Green Master(Roche, Germany)와 ABI PRISM 7500 Fast real time PCR system(Applied Biosystems Warrington, UK)을 이용하여 수행하였다. 반응 조건은 95℃에서 10분간 반응 시킨 후 95℃에서 10초, 60℃에서 30초가 한 사이클이었고 총 40 사이클로 증폭하였다. Real time PCR의 결과는 역치 주기(CT, Threshold cycle)를 얻은 다음 본 실험의 내부 통제(Internal control)로 사용한 18s rRNA의 발현 정도와 비교하였다. 이러한 모든 계산 과정은 7500 system software를 이용하였고, PCR 수행 시 사용되었던 프라이머 서열은 하기 <표 1>에 나타난 바와 같았다.

표 1

유전자	프라이머 서열		서열번호
<i>Tnf α</i>	정방향	5'-AGCCCCAGTCTGTATCCTT-3'	1
	역방향	5'-CTCCCTTTCAGAACTCAGG-3'	2
<i>Ccl2</i>	정방향	5'-GCATCCACGTGTGGCTCAG-3'	3
	역방향	5'-TGGACCCATTCTTCTTGGG-3'	4
<i>Il6</i>	정방향	5'-ACTCCAGAAGACCAGAGGAAAT-3'	5
	역방향	5'-CCAGAGATACAAAGAAATGATGG-3'	6
<i>Tgf β</i>	정방향	5'-TATAGCAACAATTCCTGGCG-3'	7
	역방향	5'-CCTGTATTCCGTCTCCTTG-3'	8
<i>Acta2</i> (α-SMA)	정방향	5'-ACTGGGACGACATGGAAAAG-3'	9
	역방향	5'-GTTCACTGGTGCCTCTGTCA-3'	10
<i>Cpt1a</i>	정방향	5'-TGGCCGCATGTCAAGCCAGA-3'	11
	역방향	5'-AGGAGAGCAGCACCTTCAGCGA-3'	12
<i>Vl cad</i>	정방향	5'-TGCTCTGTGATAGCTGGTGC-3'	13
	역방향	5'-GGCCTTGGAGATGCTTCTGA-3'	14
<i>Acox1</i>	정방향	5'-CACGCACATCTTGGATGGTAGTCCG-3'	15
	역방향	5'-ACGCTGGCTTCGAGTGAGGAAGTTA-3'	16
<i>Dbp1</i>	정방향	5'-ACGCCCTGGCGTTTCAGAA-3'	17
	역방향	5'-TGGCCACTGCTTTTCCGCT-3'	18
<i>Ppar α</i>	정방향	5'-AGAGCCCATCTGTCTCTC-3'	19
	역방향	5'-ACTGGTAGTCTGCAAAACCAAA-3'	20
<i>Srebp1c</i>	정방향	5'-CTGGGGGTGAGACAGGGGAC-3'	21
	역방향	5'-GATGGTGGAGGGGACAAGGG-3'	22

[0070] 그 결과, 도 1의 D 내지 F에 나타난 바와 같이, MCDD 식이요법을 수행한 마우스에서 미토콘드리아 및 퍼록시좀 FAO와 관련된 효소들, 즉, 카르니틴 팔미토일 전이효소-1(carnitine palmitoyl transferase-1, *Cpt1a*), 초장쇄 acyl-CoA 탈수소효소(very long-chain acyl-CoA dehydronase, *Vl cad*), Acyl-CoA 산화효소-1(Acyl-coA oxidase-1, *Aoox1*) 및 이기능 단백질(D-Bifunctional protein; *Dbp1*) 등의 mRNA 발현 레벨이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 미토콘드리아 및 퍼록시좀 FAO를 촉진하는 핵 수용체인 *Ppar α*의 유전자 발현량 또한 현저히 감소하였다.

[0071] 반면에, HFD 식이요법을 수행한 마우스에서, 지질 합성의 주요 전사인자인 스테롤 규정 성분 결합 단백질(*Srebp1c*)의 발현량을 증가시켰지만 *Ppar α* 및 FAO 관련 효소들의 발현에는 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 *Ppar α* 발현 및 FAO 과정이 비알콜성 지방간염의 병증에 매우 크게 관여한다는 것을 의미한다.

[0072] (4) 플라스마로겐 생합성 효소 유전자의 mRNA 발현 측정

[0073] 플라스마로겐 생합성 효소인 *Gnpat* 및 *Agps*의 mRNA 발현량을 상기 지방산 산화 관련 효소 유전자의 발현 측정 시 수행했던 방법과 동일한 방법으로 측정하였고, 이때 사용한 프라이머는 하기 <표 2>에 나타난 것과 같았다.

표 2

유전자	프라이머 서열		서열번호
<i>Gnpat</i>	정방향	5'-CGGGTTCCTGCTTGGCCTG-3'	23
	역방향	5'-CCGTTGACCACTGTGACCT-3'	24
<i>Agps</i>	정방향	5'-AGGGGAGTTCAGTTCGACC-3'	25
	역방향	5'-CTCTCTAGCAGCTGCCTCAG-3'	26

- [0075] 그 결과, 도 2의 A를 참조하면, MCDD 식이요법을 수행한 마우스에서 플라스마로젠 생합성 효소인 *Gnpat*과 *Agps*의 발현 레벨이 현저히 감소한 반면, HFD 식이요법을 한 마우스에서는 *Gnpat* 및 *Agps*의 발현 레벨에 변화가 없었다.
- [0076] 또한, *Gnpat*과 *Agps*의 발현량 차이를 살펴보면, MCDD 마우스에서 *Gnpat*의 발현량의 감소폭이 *Agps* 발현량의 감소폭보다 현저히 큰 것을 알 수 있었다. 즉, 이러한 사실로부터 같은 생합성 과정에 관여하는 효소이더라도, *Agps*보다 *Gnpat*이 비알콜성 지방간염에 가장 크게 영향을 미치는 생합성 효소임을 알 수 있다.
- [0077] **(5) 플라스마로젠 레벨 측정**
- [0078] 상기 마우스의 간 조직을 채취한 후, 간에서의 플라스마로젠 레벨은 이중질량분석기(tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)와 1290 HPLC(Agilent, Waldbronn, Germany) 및 QTRAP 5500(AB Sciex, Toronto, Canada)를 구비한 액체 크로마토그래피를 이용하여 측정하였다.
- [0079] 대부분의 플라스마로젠은 극성 헤드(head)에 에탄올라민(PE-플라스마로젠) 혹은 콜린(PC-플라스마로젠)을 가지고 있고, $sn-2$ 위치에 DHA(22:6 $n-3$) 또는 아라키돈산(AA; 20:4 $n-6$)과 같은 $n-3$ 또는 $n-6$ 폴리불포화지방산(PUFAs)이 풍부하다.
- [0080] 실제 수행한 LC-MS/MS 결과에서 DHA를 포함하는 PC-플라스마로젠 및 PE-플라스마로젠의 대표적인 피크(peak)가 도 2의 B에 나타난 것과 같았다. 또한, 도 2의 C를 참조하면 MCDD 식이요법을 수행한 경우, AA를 함유한 PC-플라스마로젠의 양이 증가했지만 DHA를 함유한 PC 및 PE-플라스마로젠의 양은 감소하였다. 반면에, HFD 식이요법은 간의 플라스마로젠 레벨에 중요한 변화를 일으키지 않았다.
- [0081] **(6) *Gnpat* 및 *Ppar α* 의 관계 확인**
- [0082] *Ppar α* 는 미토콘드리아와 퍼록시좀 FAO와 관련된 유전자 발현을 조절하는 유전자로, *Gnpat* 등의 유전자 발현 및 세포에 대한 영향력을 확인하기 위해, 상기 준비예 2에서 준비한 AML12 간세포에 $\Delta-5$ 및 $\Delta-6$ 불포화효소($\Delta-5$ and $\Delta-6$ desaturase; 각각 *Fads1* 및 *Fads2*에 의해 코딩), *Gnpat* 및 *Ppara*를 타겟으로 하는 siRNA를 처리하여 진행하였다.
- [0083] 구체적으로, *Fads1*(#M-064722-00-0005), *Fads2*(#M-049816-00-0005), *Gnpat* (#L-040695-01-0005) 및 *Ppar α* (#M-040740-01-0005) siRNAs들은 Dharmacon(Lafayette, CO)에서 구매하고, 각 siRNA를 세포에 처리하고 상기에서 수행한 방법대로 유전자 발현량을 측정하였다.
- [0084] 또한, 세포들의 죽음을 확인하기 위하여, 세포의 세포질에서 히스톤 관련 DNA 조각들을 측정하는 cell death ELISA kit(Roche, IN)을 이용하여 kit에 쓰인 방법대로 세포 죽음률을 측정하였다.
- [0085] 더불어, 지방산 산화 능력(FAO)은 Kim JY et al.,(2002)에 개재된 방법을 따라 ^{14}C 에서 $^{14}\text{CO}_2$ 의 발생 비율을 측정하여 결정되었으며, 특히 Peeters A et al.,(2011)에 개재된 바와 같이 미토콘드리아 산화의 억제제, 즉 안티마이신(antimycin) A와 로테논(rotenone)의 존재 하(최종 농도는 각각 100 μM 및 12.5 μM)에서 결정되었다.
- [0086] 그 결과, 도 3의 A에 나타난 바와 같이, *Ppar α* 을 처리한 경우 *Gnpat* 유전자 발현에 아무 변화가 없었으나, *Gnpat* siRNA(si*Gnpat*)를 처리하자 *Ppar α* 의 발현이 현저히 감소했다. 또한, 도 3의 B를 참조하면, *Gnpat* 및 *Ppar α* siRNA는 *cpt1*, *vlcad*, *Aox1* 및 *dbp1*의 발현량 또한 감소시켰으며, 특별히 si*Gnpat*은 미토콘드리아 및 퍼록시좀 FAO를 감소시키고 세포죽음을 현저히 증가시켰다.
- [0088] **<실시예 2> *Gnpat* 녹아웃(knockout) 마우스에서의 간 대사 확인**
- [0089] **(1) *Gnpat* 녹아웃(Knockout)**
- [0090] 먼저 *Gnpat*이 녹아웃된 마우스는 탈렌(Transcription activator-like effector nuclease, TALEN) 방법을 사용하여, Sung YH et al.,(Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. Nat Biotechnol 2013;31:23-24)에 개시된 절차대로 제조하였다.
- [0091] 본 실험에서 *Gnpat*^(+/-) 마우스는 2주까지밖에 살지 못했기 때문에, *Gnpat*^(+/-) 마우스는 실험용으로만 사용되었다.

탈렌-유도 잠복 돌연변이인 개시 마우스는 정상 마우스와 교배되었고 한배 새끼를 얻었다. 이중 조절($Gnpat^{(+/-)}$) 마우스들과 $Gnpat^{(+/-)}$ 마우스들에 각각 ND, HFD, MCDD 식이요법을 수행하였다.

[0092] (2) 지질 대사량 및 플라스마로겐 레벨 측정

[0093] 상기에서 준비한 마우스들에 실시예 1에서 수행한 방법대로 간에서의 플라스마로겐의 양을 측정하였고, 지질 대사는 다음과 같은 방법으로 측정하였다 : 지방산 메틸 에스터는 Agilent 7890/5975 GCMSD 시스템 및 HP-5 MS 30m x 250 μ m x 0.25 μ m 컬럼(Agilent 19091S-433)으로 분석되었다. 또한 총 콜레스테롤 및 간 자유 콜레스테롤 레벨을 Total Cholesterol and Cholesteryl Ester Colorimetric/Fluorometric Assay Kit(#K603-100; Biovision, CA) 및 tissue free cholesterol assay kit(#E1016; Applygen, Beijing, China)를 이용하여 제조자가 제시한 방법에 따라 효소법으로 측정하고 그 결과를 도 3의 D에 나타내었다.

[0094] 도 3의 D를 참조하면, HFD 식이요법을 수행한 $Gnpat^{(+/-)}$ 마우스는 간에서 정상 마우스보다 높은 지질 축적량을 나타냈으나, MCDD 식이요법을 수행한 $Gnpat^{(+/-)}$ 마우스는 정상 마우스와 별 다른 차이를 나타내지 않았다. 또한, 도 3의 E 및 F를 참조하면, HFD 식이요법을 수행한 $Gnpat^{(+/-)}$ 마우스의 간에서 DHA 함유 플라스마로겐의 레벨은 같은 식이 요법을 수행한 정상 마우스보다 현저히 낮았지만, MCDD 식이요법을 한 $Gnpat^{(+/-)}$ 마우스의 플라스마로겐 레벨은 MCDD 식이요법을 한 정상 마우스와 별다른 차이가 없었다.

[0095] (3) 유전자 발현량 측정

[0096] 상기에서 준비한 마우스들에 실시예 1에서 수행한 방법대로 $Gnpat$ 과 $Ppar \alpha$ 의 발현량을 측정하여 그 결과를 도 3의 C에 나타내었다.

[0097] 도 3의 C를 참조하면, 기본적으로 $Gnpat^{(+/-)}$ 마우스에서 $Gnpat$ 의 발현량은 정상 마우스의 대략 50% 정도였다. 또한, 도 3의 E를 참조하면, HFD 식이요법을 수행한 $Gnpat^{(+/-)}$ 마우스에서 $Gnpat$ 및 $Ppar \alpha$ 발현은 HFD 식이요법을 수행한 정상 마우스에서보다 낮았다. 반면에, 도 3의 F를 참조하면, $Gnpat$ 및 $Ppar \alpha$ 의 발현은 MCDD 식이요법을 수행한 정상마우스에서 현저히 감소하였는데, 이는 MCDD 식이요법을 수행한 $Gnpat^{(+/-)}$ 마우스와 유사한 결과였다.

[0099] <실시예 3> 플라스마로겐 전구체의 효과 확인

[0100] 플라스마로겐 전구체인 알킬 글리세롤(AG)은 퍼옥시좀 대사 중 에테르 지질 합성 대사의 퍼옥시좀의 기능에서 독립적으로 플라스마로겐 전구체로서 작용한다(도 4의 A). 알킬 글리세롤 투여 시의 효과를 확인하기 위하여, 상기 준비예 1에서 준비한 마우스에, 1-O-옥타데실-락-글리세롤(1-O-octadecyl-rac-glycerol; 알킬 글리세롤(AG)의 상업 형태로, 또한 바틸 알콜로 불리기도 함; Sigma-Aldrich, MO)를 MCDD의 보충제로 사용하였다. 8주 또는 12주 후에 마우스는 아침마다 5시간 동안 단식한 후 희생되었다. 주후 실험 과정을 위해 간 조직을 추출하여 70℃에서 보관하였다.

[0101] (1) 조직학적 분석 및 플라스마로겐 레벨 측정

[0102] 알킬 글리세롤 처리 후의 상태를 확인하기 위해, 마우스 간 조직의 샘플을 상기 실시예 1에서 수행한 방법대로 얻고 처리한 후 조직을 관찰하였다. 또한, 플라스마로겐 레벨은 이중질량분석기(tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)와 1290 HPLC(Agilent, Waldbronn, Germany) 및 QTRAP 5500(AB Sciex, Toronto, Canada)가 구비된 액체 크로마토그래피를 이용하여 측정하였다. 상기 준비예에서 준비한 각 식이요법 별 마우스를 대상으로 수행하였다.

[0103] 그 결과, 도 4의 B 내지 D에 나타난 바와 같이, 알킬 글리세롤은 플라스마로겐 결핍 마우스 모델에서 조직 플라스마로겐 레벨을 회복시켰고, 또한, MCDD 식이요법을 한 마우스에서 간 지방증 및 염증을 현저히 억제하였다.

[0104] (2) 지질 레벨 측정

[0105] 알킬 글리세롤 처리에 따른 변화를 확인하기 위해, 상기 실시예 1에서 수행한 방법으로 혈장 유리 콜레스테롤 레벨을 측정하였고, 간 조직 내 중성지방(트리글리세라이드) 측정은 Sigma에서 구입한 triglyceride(GPO-Trinder) kit를 이용하여 측정하였다. 즉, 마취한 간 조직 및 혈장을 상온에서 추출 버퍼(extraction buffer)와

4시간 반응시킨 다음 1 N의 H_2SO_4 을 첨가하여 1000 rpm에서 10분간 원심분리하였고, 상층액 윗부분은 버리고 남은 용액에 $Na_2S_2O_5$ 100 mg을 첨가하여 1000 rpm에서 5분간 다시 원심분리하였다. 이후, 상층액에 규산(silicic acid) 0.5 g을 넣고 상온에서 5분 반응시킨 다음 1000 rpm에서 10분간 원심 분리한 상층액을 N_2 가스로 증발시켜 시료를 얻었고, 이렇게 얻은 시료를 이소프로판올로 녹였다. 이 시료에 트리글리세라이드 시약 A(Triglyceride reagent A)를 넣고 5분간 상온에서 반응시킨 다음 트리글리세라이드 시약 B(Triglyceride reagent B)를 첨가하고 37°C에서 5분간 반응시킨 후 Emax precision microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0106] 그 결과, 도 4의 C 및 F에 나타난 바와 같이, 트리글리세라이드 레벨은 현저히 감소하였으나, 간의 유리 콜레스테롤 레벨에는 큰 영향을 미치지 않았다.

[0107] (3) 혈장의 알라닌 트랜스아미네이스(Alanine transaminase, ALT) 레벨 측정

[0108] 상기 실시예 1에서 수행한 방법대로 혈장의 알라닌 트랜스아미네이스(Alanine transaminase) 레벨을 측정하였다. 그 결과, 도 4의 C에 나타난 바와 같이, ALT 레벨이 현저히 감소하는 것을 알 수 있었다.

[0109] (4) 유전자 발현 측정

[0110] MCDD 식이요법을 수행한 마우스들에 알킬 글리세롤을 처리한 후 상기 실시예 1에서 수행한 방법대로 유전자 발현량을 측정하였다. 그 결과, 도 4의 C에 나타난 바와 같이, 염증 및 섬유증을 야기하는 유전자들의 레벨이 현저히 증가하였다. 반면에 *Ppar a* mRNA와 타겟 유전자들의 발현은 회복되었다.

[0111] (5) 미토콘드리아 및 퍼록시좀 FAO 측정

[0112] MCDD 식이요법을 수행한 마우스들에 알킬 글리세롤을 처리한 후 상기 실시예 1에서 수행한 방법대로 FAO를 측정하였다. 그 결과, 도 4의 E에 나타난 바와 같이 알킬 글리세롤의 처리가 간의 미토콘드리아 및 퍼록시좀 FAO를 회복시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0114] <실시예 4> HFHCD 식이요법 마우스에서의 효과

[0115] 상기 실시예 1 내지 3의 결과에서, 플라스마로젠 레벨, *Gnpat* 발현량이 MCDD 식이요법 마우스에서는 감소했으나 HFCD 식이요법 마우스에서는 변화가 없는 것을 확인하였다. 즉, 이러한 결과로부터 단순한 지방간증은 플라스마로젠 레벨 및 *Gnpat* 발현과 연관이 없음을 알 수 있었다.

[0116] 이에, 비알콜성 지방간염의 또 다른 대표적 모델인 HFHCD 식이요법을 수행한 마우스를 대상으로 실험을 수행하였다.

[0117] (1) 지질 및 플라스마로젠 레벨 측정

[0118] 도 5의 A 및 B에 나타난 바와 같이 비알콜성 지방간염이 유도된 C57BL/6N 마우스에 HFHCD 식이요법을 12주간 실시하고, 이 마우스를 대상으로 실시예 1 및 2에서 수행한 방법대로 플라스마로젠 레벨 및 지질 대사량을 측정하였다.

[0119] 그 결과, 도 5의 D 및 E에 나타난 바와 같이 혈장에서의 콜레스테롤 레벨은 현저히 증가하지는 않았으나, 반대로 간에서 유리 콜레스테롤의 레벨은 매우 증가했다. 또한, DHA를 포함하는 PC- 및 PE-플라스마로젠과 AA를 포함하는 PC-플라스마로젠의 양이 현저히 감소되었다.

[0120] (2) 플라스마로젠 생합성 효소 유전자 발현, 미토콘드리아 및 퍼록시좀 FAO 측정

[0121] 상기에서 준비한 마우스에 실시예 1에서 수행한 방법대로 플라스마로젠 생합성 효소 유전자 발현, 미토콘드리아 및 퍼록시좀 FAO를 측정하였다.

[0122] 그 결과, 도 5의 C에 나타난 바와 같이 HFHCD 식이요법을 수행한 마우스에서 *Ppar a*의 발현량이 현저히 감소하였는데, 이는 미토콘드리아 및 퍼록시좀 FAO의 감소와 관련이 되어 있다. 또한, 도 5의 E에 나타난 바와 같이, *Agps* 발현량은 큰 차이가 없었으나 *Gnpat* 발현량이 현저히 감소하였다.

[0123] 한편, 고지방-콜레스테롤 식이요법이 간의 Δ -5 불포화효소 및 Δ -6 불포화효소(각각 *Fads1* 및 *Fads2*에 의해 코딩됨)의 활성을 감소시키고, 이러한 감소는 총량 및 마이크로솜 간 지질의 AA와 DHA의 퍼센테이지가 감소되는

것과 관련이 있음이 알려져 있다. 즉, 플라스마로겐에서 폴리불포화지방산(PUFA) 조성물이 Δ -5 불포화효소 및 Δ -6 불포화효소의 활성에 의해 영향을 받으므로, 이 효소들의 발현을 상기 실시예 1에 나타난 방법으로, 하기 표 3의 프라이머를 사용하여 측정하였다.

표 3

유전자	종류	프라이머 서열	서열번호
<i>Fads1</i> (Δ 5-불포화효소)	정방향	5'-CATCAGCCACTACGCGGGTC-3'	27
	역방향	5'-CGGAGCCAGCTCTCCAATCA-3'	28
<i>Fads2</i> (Δ 6-불포화효소)	정방향	5'-CAATGACTGGTTCAGCGGGC-3'	29
	역방향	5'-TCAGCAACGGCTTCTCCTGG-3'	30

그 결과, 도 5의 F에 나타난 바와 같이, HFHCD 식이요법 마우스에서 *Fads1* 및 *Fads2*의 발현이 현저히 감소하였다.

상기 결과들을 토대로, Δ -5 불포화효소, Δ -6 불포화효소, *Gnpar* 및 *PPAR α* 사이의 분자적 체계를 확인하기 위해, 상기 실시예 1에서 사용한 AML12 간세포에서 *Fads1* 및 *Fads2* siRNA를 세포에 처리하고 발현량을 분석하였다.

그 결과, 도 5의 F에 나타난 바와 같이, *Fads2* siRNA 처리 시 *Gnpat*과 *Ppar α* 의 발현 레벨이 현저히 감소하였다.

즉, 이러한 결과로부터 HFHCD 마우스의 비알콜성 지방간염 모델에서 플라스마로겐의 생합성이 *Agps*와는 상관없이, *Gnpat*의 영향으로 현저하게 감소하였음을 알 수 있다.

<실시예 5> 플루바스타틴의 효과 확인

스타틴 중에서 선택된 플루바스타틴의 마우스에 대한 효과를 알아보기 위해, 상기 준비예 1에서 준비된 MCDD 식이요법 마우스에 플루바스타틴(15 mg/kg/day)을 MCDD의 보충제로 사용하였다. 8주 또는 12주 후에 마우스는 아침마다 5시간 동안 단식한 후 희생되었다. 추후 실험 과정을 위해 간 조직을 추출하여 70℃에서 보관하였다.

(1) 조직학적 관찰, 혈장 ALT 및 트리글리세라이드 측정

상기 실시예 1 및 3에서 실시한 바대로 MCDD 식이요법 마우스의 간 조직을 관찰했고, 혈장 ALT 및 트리글리세라이드를 측정하였다.

그 결과, 도 6의 A 및 B에 나타난 바와 같이, 플루바스타틴은 MCDD 식이요법에서 유도된 간 지방증과 NASH를 거의 완전히 억제하였고, 혈장 ATL 및 간에서의 트리글리세라이드의 양이 감소하였다.

(2) 플라스마로겐 및 콜레스테롤 레벨 측정

상기 실시예 1 및 2에서 실시한 바대로 MCDD 식이요법 마우스의 간에서 유리 콜레스테롤 및 플라스마로겐 레벨을 측정한 결과, 도 6의 C 및 E에 나타난 바와 같이, 자유 콜레스테롤 레벨이 현저히 감소한 반면 플라스마로겐은 증가하였다. 특히, AA 및 DHA 함유 플라스마로겐의 양이 증가하였다.

(3) 유전자 발현 측정

상기 실시예 1에서 실시한 바대로 MCDD 식이요법 마우스의 간에서 유전자들의 발현을 측정하여 도 6의 C, D 및 E에 나타내었다. 그 결과, 염증 및 섬유증 마커를 코딩하는 유전자의 발현은 약화되었고, *Gnpat*, *Agps*, *Ppar α* , *Cpt-1 α* , *Acox1*, *Dbp1* 등의 유전자 발현은 증가하였다. 특히, *Agps*에 비해 *Gnpat*의 유전자 발현 회복량이 현저히 증가한 바, 이는 비알콜성 지방간염의 치료 효과에 *Agps*보다 *Gnpat*의 역할이 더 큰 것임을 의미한다.

또한, 도 6의 F에 나타난 바와 같이, 정상 식이요법을 한 마우스에서보다 MCDD 식이요법을 한 마우스에서, 지방질 생합성의 억제에 대한 적응 반응으로 Δ -5 및 Δ -6 불포화효소의 발현이 증가하였다. 반면에, 간의 폴리불포화지방산 조성물을 가스크로마토그래피/질량분석기(GC/MS)로 측정한 결과, MCDD 식이요법이 에이코사펜타엔산(eicosapentaenoic acid, EPA) 및 DHA의 레벨을 현저히 감소시킨 것을 확인할 수 있었다. 플루바스타틴을 처리한 MCDD 식이요법 마우스에서는 Δ -5 및 Δ -6 불포화효소의 발현이 더 증가하였고, AA, EPA 및 DHA 함량이 현저

히 증가하였다.

[0140] 이러한 결과를 HFHCD 식이요법 마우스에서 Δ -5 및 Δ -6 불포화효소의 발현이 감소된 결과와 함께 고려해보면, 간의 유리 콜레스테롤은 세포의 폴리불포화 지방산 조성물과 관련이 있고, 이것이 변경된 플라스마로젠 대사로 이끈다는 것을 알 수 있다.

[0141] (4) 미토콘드리아 및 퍼옥시좀 FAO 측정

[0142] 상기 실시예 1에서 실시한 바대로 MCDD 식이요법 마우스의 간에서 미토콘드리아 및 퍼옥시좀 FAO를 측정한 결과, 도 6의 D에 나타난 바와 같이 현저히 증가되었다.

[0144] <실시예 6> 비접힘단백질 반응에 대한 효과

[0145] 소포체(ER)에서의 약간의 변화는 항상성을 깨뜨리고 비접힘 단백질 반응(unfolded protein response, UPR)이라고 불리는 ER 스트레스 상태를 초래하는데, 이 상태는 복합 신호 캐스케이드(cascade)를 활성화하여 비정상적인 단백질 축적을 감지하고 항상성을 회복시키거나, 세포죽음이나 염증을 일으켜 알콜성 또는 비알콜성 간 손상을 야기한다. 특히, 간에서 유리 콜레스테롤의 축적 또는 Ppar α 신호과정의 결핍은 미토콘드리아 손상 및 ER 스트레스를 유발한다. 이에, 플루바스타틴 또는 알킬 글리세롤이 UPR을 완화시킬 수 있는지 여부를 확인하였다.

[0146] 구체적으로 상기 준비예 1에서 MCDD 식이요법을 수행한 마우스에 플루바스타틴 또는 알킬 글리세롤(15 mg/kg/day)을 MCDD의 보충제로 사용하였다. 8주 또는 12주 후에 마우스는 아침마다 5시간 동안 단식한 후 희생되었다. 이후, 단백질의 양 및 단백질의 인산화 정도를 측정하기 위하여, 웨스턴 블롯을 다음과 같은 방법으로 수행하였다: 용해 버퍼(Lysis buffer; 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2% SDS, 0.1 mM 페닐 메틸설포닐 플루오라이드(phenylmethylsulfonyl fluoride), 2 μ g/ml 류펩틴(leupeptin))를 이용하여 세포 용해액을 만들고, 조직을 넣고 4°C에서 1시간 용해한 다음 4°C, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질을 Bio-RAD kit(Bio-Rad, Richmond, CA)를 이용한 Bradford 방법으로 정량한 후 SDS와 β -머캅토에탄올이 포함된 샘플 버퍼(sample buffer)와 혼합하여 95°C에서 5분간 끓였고, 12% 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 겔(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel)에서 전기영동한 후, 니트로셀룰로오스 막으로 전이시켰다. 각각의 일차 항체로 3시간 동안 실온에서 반응시키고 세척한 후, 이차항체로 1시간 반응시킨 다음 다시 세척하였고, ECL 시약(Amersham Kife Science, Little Chalfont, UK)으로 반응시킨 후 방사선 자동 사진법(autoradiography)을 시행하였다.

[0147] 그 결과, 도 7의 A(플루바스타틴 처리) 및 B(알킬 글리세롤 처리)에 나타난 바와 같이, 상기 마우스의 간에서 활성화 전사인자 6, CHOP 단백질의 레벨 및 진행성 번역 개시 인자 2 α 의 인산화가 감소하였다. 즉, 이러한 결과로부터 알킬 글리세롤 또는 플루바스타틴을 처리할 경우 간의 UPR 및 ER 스트레스를 완화할 수 있다는 것을 의미한다.

[0149] <실시예 7> Gnpat 녹아웃(knockout) 마우스에서의 플루바스타틴의 효과

[0150] 플루바스타틴의 효과를 매개하는 데에 내재 플라스마로젠의 역할을 확인하기 위해, 상기 실시예 2에서 준비된 Gnpat^(+/-) 마우스에 플루바스타틴을 실시예 5에서 수행한 것과 같은 방법으로 처리하였다. 이후, 상기 실시예 1에서 수행한 방법대로 유전자 발현량 및 플라스마로젠 레벨을 측정하고 조직학적 관찰을 수행하였다.

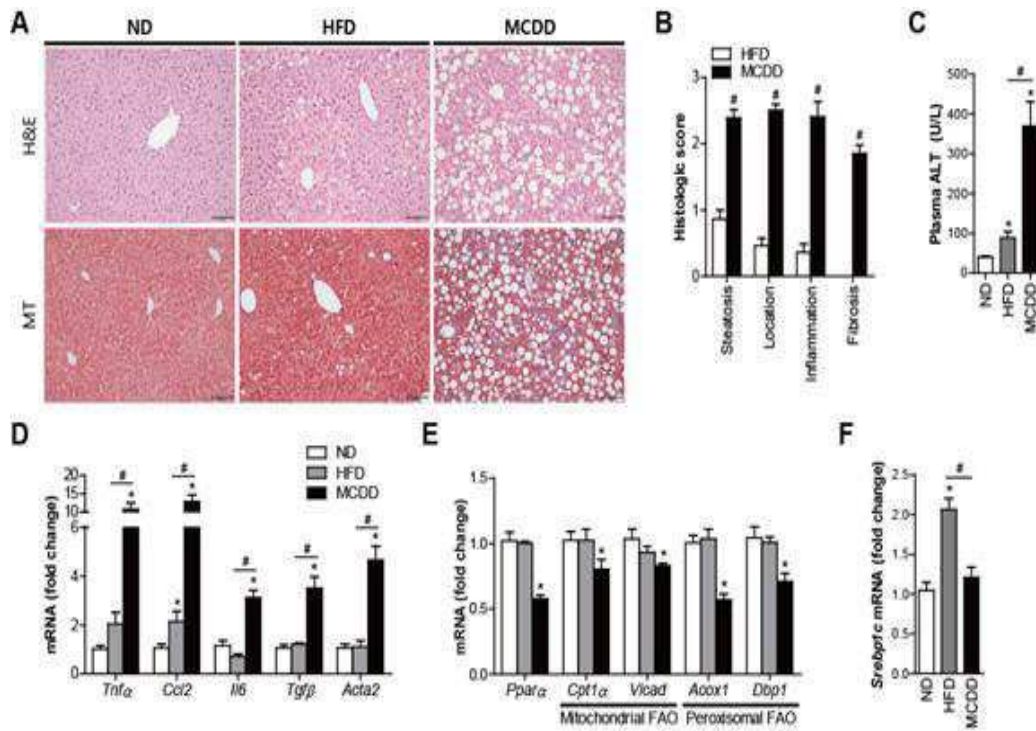
[0151] 그 결과, 도 8의 A 내지 C에 나타난 바와 같이 비알콜성 지방간염의 발달 억제 효과가 감소되었고, 도 8의 D 내지 E에 나타난 바와 같이, Gnpat, Ppar α 유전자 발현 증가 효과 및 플라스마로젠 레벨의 증가 효과도 일부 감소하였다.

[0152] 따라서 상기 실험들의 결과를 종합해보면, 도 8의 F에 나타난 바와 같이, 간의 플라스마로젠은 PPAR α 에 의존적인 지방산 산화활성 및 소포체 스트레스 완화를 통해 간을 지방간 및 NASH로부터 보호하는 것을 알 수 있다.

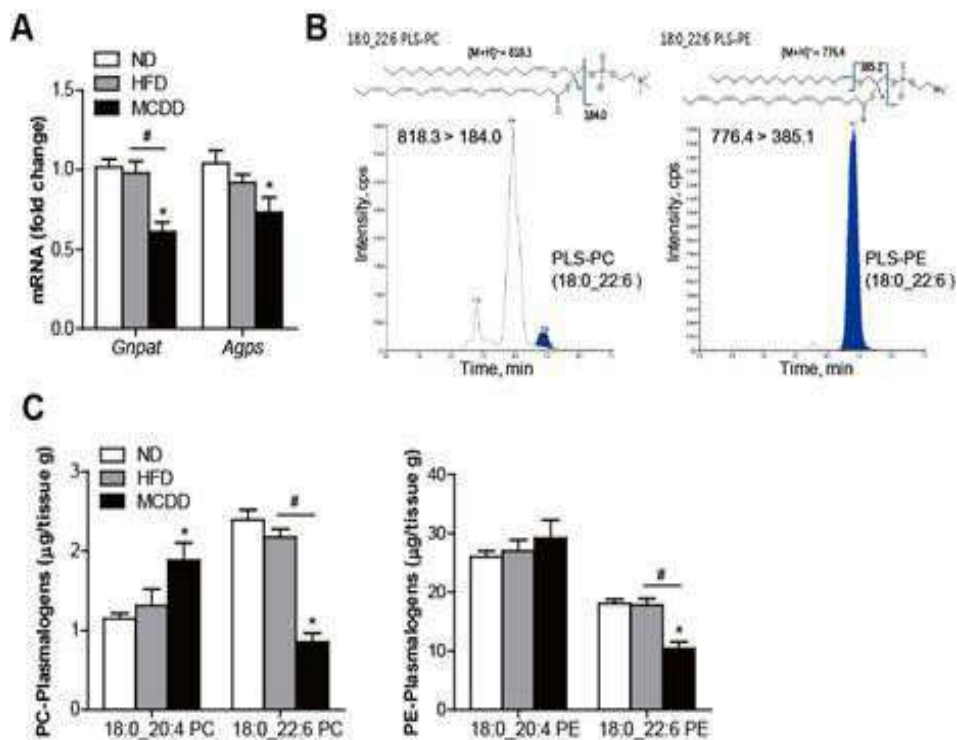
[0154] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아님은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

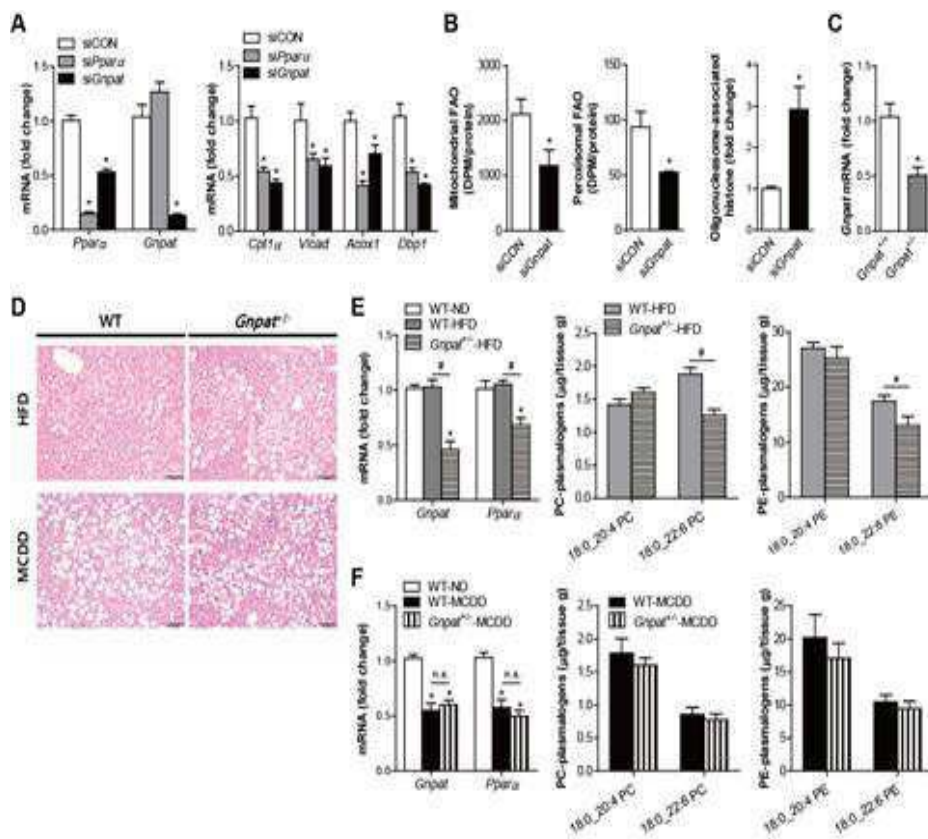
도면1



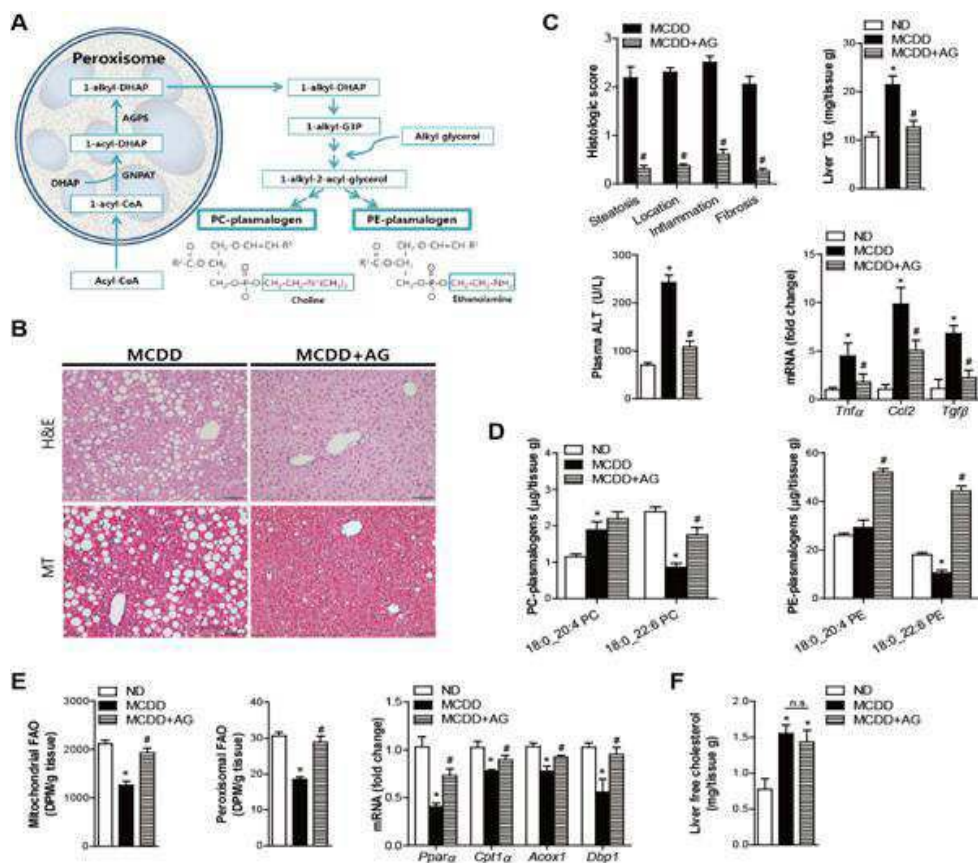
도면2



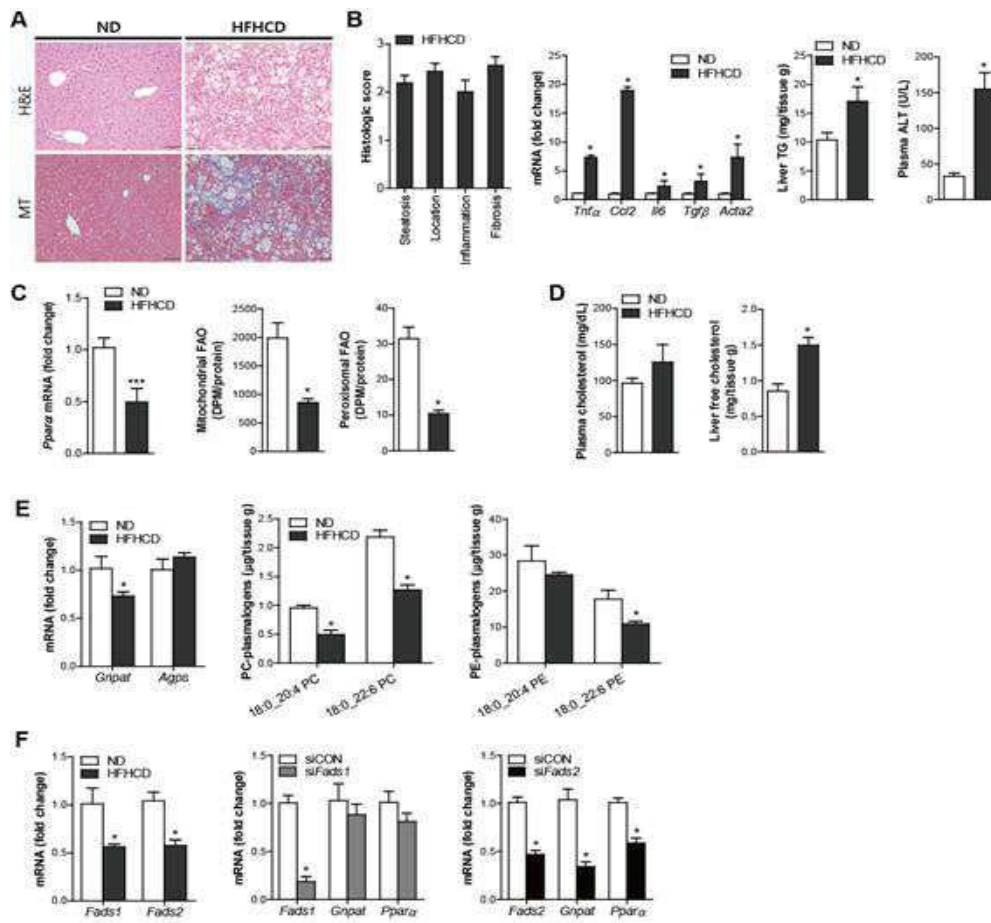
도면3



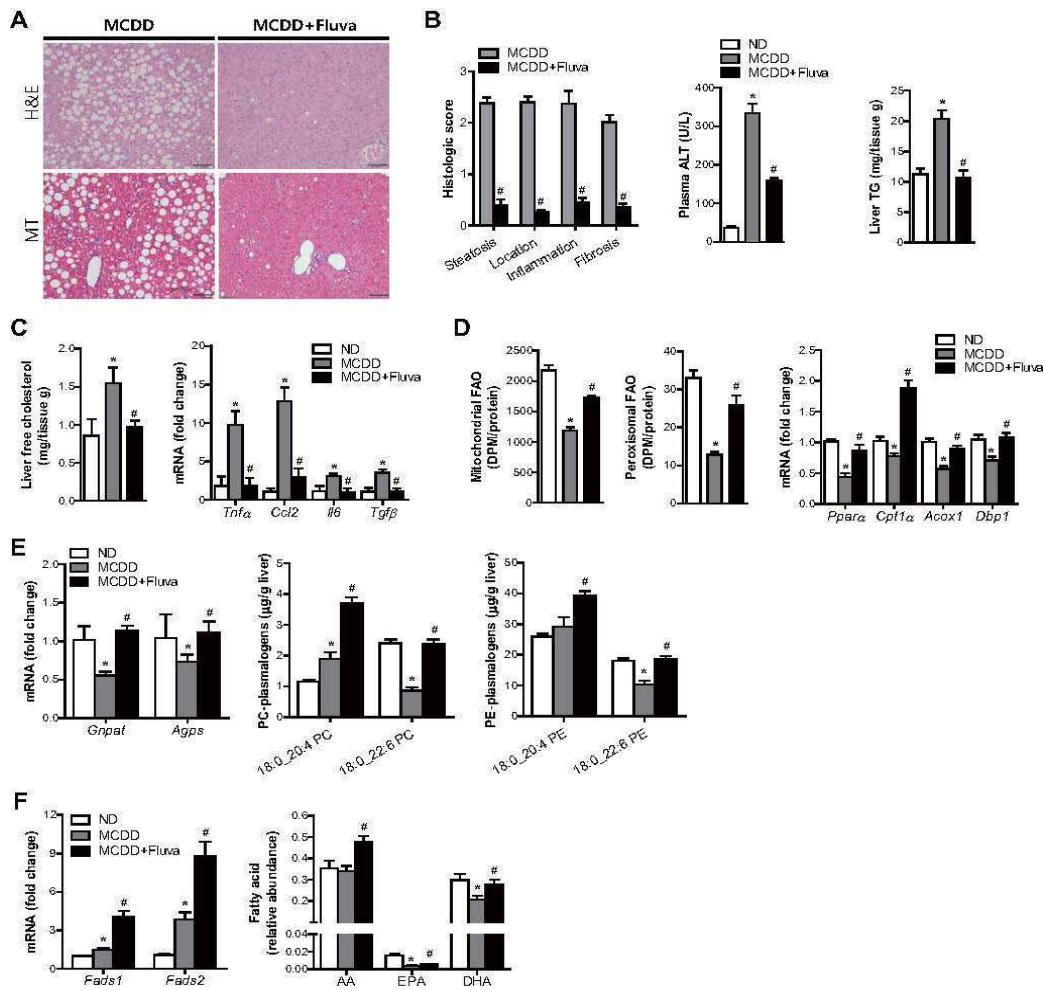
도면4



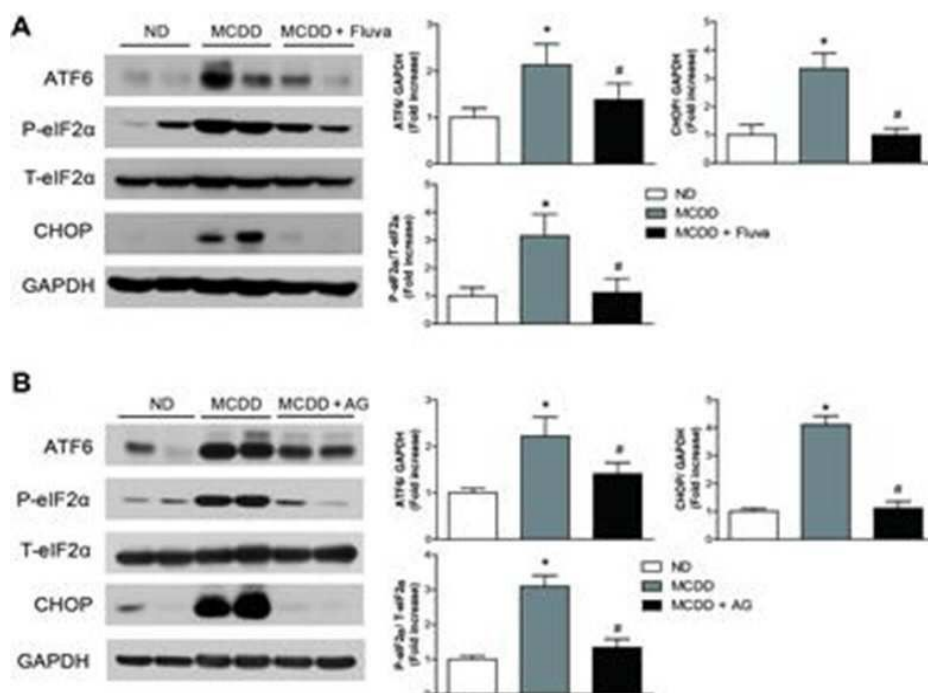
도면5



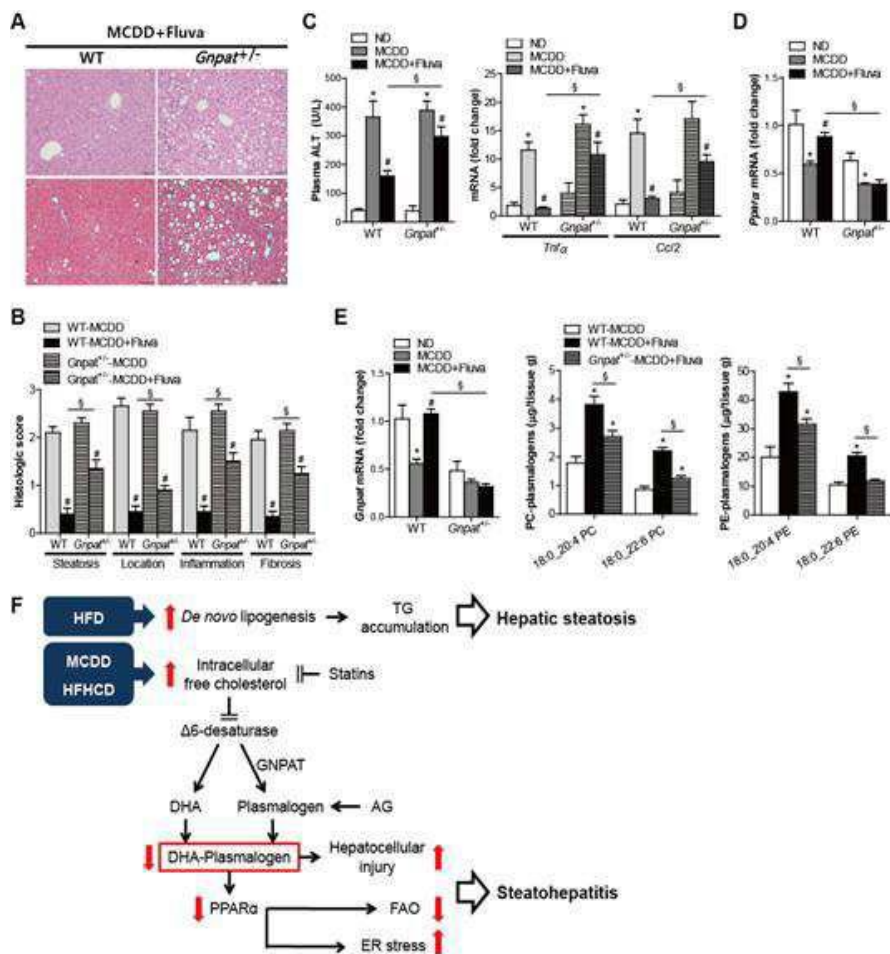
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
- <120> Biomarker Composition for Diagnosing Nonalcoholic Steatohepatitis or Prognosing Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis
- Comprising *Gnpat*
- <130> ADP-2016-0410
- <160> 30
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer
- <400> 1
- agcccccagt ctgtatcctt
- <210> 2

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	2	
ctccctttgc agaactcagg		20
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	3	
gcatccacgt gttggctcag		20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	4	
tggaccatt ccttcttggg		20
<210>	5	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	5	
actccagaag accagaggaa at		22
<210>	6	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	6	

ccagagatac aaagaaatga tgg	23
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 7	
tatagcaaca attcctggcg	20
<210> 8	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 8	
cctgtattcc gtctccttg	19
<210> 9	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 9	
actgggacga catggaaaag	20
<210> 10	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 10	
gttcagtggg gcctctgtca	20
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> primer
 <400> 11
 tggccgcatg tcaagccaga 20
 <210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 12
 aggagagcag caccttcagc ga 22
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 13
 tgctctgtga tagctggtgc 20

 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 14
 ggccttgag atgcttctga 20
 <210> 15
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 15
 cagcacatc ttggatggta gtccg 25
 <210> 16
 <211> 25
 <212> DNA

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	16	
acgctggcctt cgagtgagga agtta		25
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	17	
acgccctggc gtttgcagaa		20
<210>	18	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	18	
tggccactgc tttccgcct		20
<210>	19	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	19	
agagcccat ctgtctctc		20
<210>	20	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	20	
actggtagtc tgcaaaacca aa		22
<210>	21	

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 21
 ctgggggtga gacaggggac 20
 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 22
 gatggtggag gggacaaggg 20

 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 23
 cgggttctctg ctttggcctg 20
 <210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 24
 ccgttgacca cttgtgacct 20
 <210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 25

aggggagttc agttcgacc	20
<210> 26	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 26	
ctctctagca gctgcctcag	20
<210> 27	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 27	
catcagccac tacgcgggtc	20
<210> 28	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 28	
cggagccagc tctccaatca	20
<210> 29	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 29	
caatgactgg ttcagcgggc	20
<210> 30	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> primer

<400> 30

tcagcaacgg cttctcctgg

20