



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0032510

(43) 공개일자 2016년03월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/15 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0122740

(22) 출원일자 2014년09월16일

심사청구일자 2014년09월16일

(71) 출원인

건국대학교 글로벌산학협력단

충청북도 충주시 충원대로 268 (단월동, 건국대학교글로벌캠퍼스)

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김균환

서울특별시 송파구 중대로 24 올림픽헤미리아파트 232동 1501호

김광표

서울특별시 노원구 초안산로5길 22 대우아파트 106동 402호

박은숙

서울특별시 강동구 동남로79길 26 고덕I-PARK아파트 102동 305호

(74) 대리인

한양특허법인

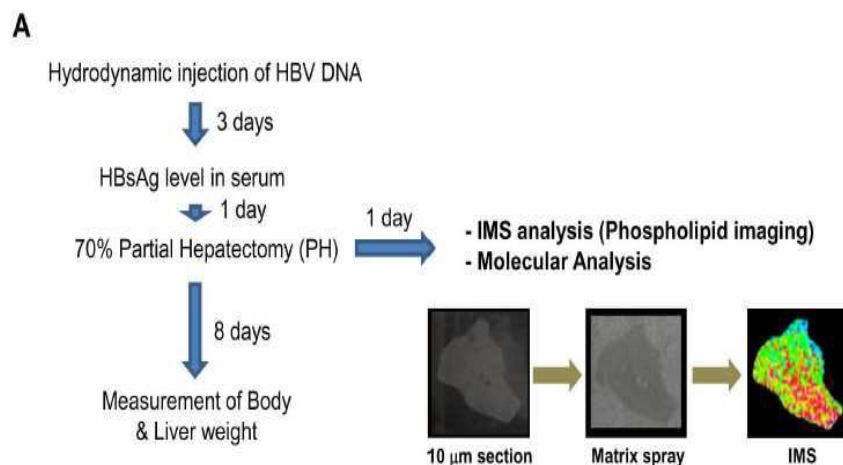
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 인지질의 분포와 효소 변화를 이용한 간질환 진단 및 간 재생 촉진용 신약 후보 물질 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 B형 간염 바이러스의 감염 전후 간 인지질의 조성 변화 및 효소 발현을 확인함으로써 HBV 감염 진단 및 간 재생 촉진용 신약 후보 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것으로, 본 발명을 통하여 HBV 감염 진단 및 신규한 간 재생 촉진용 신약 후보 물질을 간편하고 신속하게 스크리닝할 수 있게 됨에 따라 간 재생 촉진 의약품 개발에 매우 유용한 측정방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014A4190044

부처명 교육부(4)

연구관리전문기관 한국연구재단1

연구사업명 여성과학자지원사업

연구과제명 [글로벌회계](박은숙_2차)B형 간염바이러스에 의한 간재생 저해와 지질대사 이상과의 상관
성에 관한 기전 연구

기 여 율 1/1

주관기관 건국대학교 산학협력단

연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 간의 재생 촉진용 신약 후보 물질 스크리닝 방법.

- a) 실험 대상에 HBV(B형 간염 바이러스)를 감염시키는 단계;
- b) 상기 실험 대상에 신약 후보물질을 처리하는 단계;
- c) 상기 실험 대상의 간 조직을 절제(hepatectomy)하는 단계;
- d) 신약 후보물질 처리 전후에 절단된 간 조직에서 인지질의 분포 변화를 확인하는 단계; 및
- e) 상기 인지질의 분포 변화를 나타내는 물질을 신약후보물질로 선택하는 단계;

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 d)단계의 인지질은 포스파티딜콜린인 것을 특징으로 하는 신약 후보 물질 스크리닝 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 d)단계는 칼륨염 포스파티딜콜린의 이온강도가 양자화된 포스파티딜콜린의 이온강도보다 강한 것을 특징으로 하는 신약 후보 물질 스크리닝 방법.

청구항 4

대상에서 간 조직을 절제(hepatectomy)하여, 상기 절제된 간 조직을 이용하여 절제 이후 콜린-포스페이트 사이티딜트랜스퍼라제 A(PCYT1A) 또는 N-메틸트랜스퍼라제(PGMT)의 mRNA 발현 수준을 확인하여 상기 효소의 mRNA 수준이 정상 간의 수준에 비해 감소한 경우에 상기 대상은 B형 간염 바이러스에 감염되었다고 판단하는 것을 특징으로 하는 B형 간염 바이러스 감염에 대한 정보제공방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 방법은 절제 이후 6시간이 되는 시점에서 mRNA 발현 수준을 확인하는 것을 특징으로 하는 B형 간염 바이러스 감염에 대한 정보제공방법.

청구항 6

대상에서 간 조직을 절제(hepatectomy)하여 상기 절제된 간 조직을 이용하여 포스파티딜콜린의 함량을 측정하여 상기 포스파티딜콜린의 함량이 정상 간에 비하여 감소한 경우에 상기 대상은 B형 간염 바이러스에 감염되었다고 판단하는 것을 특징으로 하는 B형 간염 바이러스 감염에 대한 정보제공방법.

청구항 7

대상에서 간 조직을 또는 간 세포를 얻어서 인지질의 분포 변화를 확인하여 라이소-포스파티딜콜린의 양이 정상 간에 비하여 증가한 경우에 상기 대상은 B형 간염 바이러스에 감염되었다고 판단하는 것을 특징으로 하는 B형 간염 바이러스 감염에 대한 정보제공방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 라이소-포스파티딜콜린은 라이소-포스파티딜콜린(22:2)인 것을 특징으로 하는 정보제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 B형 간염 바이러스의 감염 전후 간 인지질의 조성 변화 및 효소 발현을 확인함으로써 HBV 감염 진단 및 간 재생 촉진용 신약 후보 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 지질 대사는 필수적인 간 기능 중 하나이며 간의 대사 이상은 염증 및 피사 등의 간 질환을 유발한다고 알려져 있다. B형 간염 바이러스(이하 HBV라 한다.) 만성 감염자는 전세계적으로 5억 명 이상이라고 알려져 있으며, HBV는 만성 염증, 간경변 및 간세포암종(HCC) 등을 포함하는 다양한 간 질환을 유발한다. HBV 감염은 지질 대사의 저해를 유발한다고 알려져 있으나 바이러스를 매개로 한 지질 변화에 대해서는 거의 알려져 있지 않다.

[0003] 간은 손상 또는 부분 간 절제 이후에 동적인 과정을 통하여 재생되는 독특한 능력을 가지고 있다. 이러한 재생 능력은 급성 또는 만성 간 손상 이후에 매우 필수적이다. 간 재생은 아주 복잡한 과정으로, 간세포 성장 인자(HGF), 인터루킨(IL)-6, 종양괴사인자(TNF)- α 및 트랜스포밍 성장 인자(TGF)- β 등과 같은 다양한 성장 인자와 관련이 있다. 이러한 다양한 인자들이 간세포 증식에 있어서 촉진 또는 저해 신호를 제공함으로써 재생 과정에 영향을 미친다.

[0004] 식이독 등의 hepatotoxic, 병원균 감염, 외과적 절단 등의 간 손상이 있는 이후의 간 재생은 간의 항상성 유지를 위해 중요하다. 인지질이 세포막의 주요 구성성분이기 때문에, 인지질은 간 재생 및 간 대사에 있어서 매우 중요한 역할을 수행한다. 이러한 관점에서, 지질 및 트리글리세라이드의 이상 축적이 부분 간 절제 이후 간 재생 도중에 관찰된다. 간 재생 도중에 축적되는 지질은 에너지 및 세포 분열에 필요한 막 구성성분을 공급함으로써 간의 나머지 부분에 대한 어떤 트랜지언트한 역할을 수행하는 것으로 여겨진다. 더욱이, 지방산 조성물은 부분 간 절제 이후에 변화하며 특히 인지질의 양이 증가한다. 이러한 결과는 인지질 대사가 간 재생과 매우 밀접하게 연관이 있음을 시사한다.

[0005] 최근에 HBV 감염이 HBV X 단백질(HBx)을 통하여 간의 재생 능력을 손상시킬 수 있음이 보고되었고, 이는 인지질의 생합성의 변화가 HBV 감염에 의한 간 손상 이후에 간 재생 과정과 연관이 있다는 것을 시사한다. 그러나, 감염 또는 간 재생 도중에 인지질 변화에 대한 HBV의 영향에 대해 확인한 연구는 아직까지 없었다.

[0006] MALDI(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization)-IMS(Imaging Mass Spectrometry)가 약물 및 그들의 대사체, 단백질, 펩타이드 및 인지질을 포함하는 다양한 내인성 분자의 탐지 및 위치화에 대한 접근 방법으로 확립되었다. 지방, 폐, 난소 및 간장 내 담관암종 뿐 아니라 초점성 뇌허혈을 포함하는 외과적 조직에서 질병 부위 및 인접한 정상 조직 부위에서 인지질의 다른 분포를 시각화하는데 MALDI-IMS를 사용한다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) 1. Klin Lab Diagn. 2009 Jun;(6):43-5., Impact of HBV infection and alcohol surrogates on the lipid composition of lymphocytic membranes., Makarov VK, RiasenskiDS;

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고 상기의 필요성에 의해 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 신규한 HBV 진단 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 간 재생 촉진용 신약 후보 물질 스크리닝 방법을 제공함으로써 간 재생 촉진 의약품 개발에 매우 유용한 측정방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 다음 단계를 포함하는 간의 재생 촉진용 신약 후보 물질 스크리닝 방법을 제공한다. a) 실험 대상에 HBV(B형 간염 바이러스)를 감염시키는 단계; b) 상기 실험 대상에 신약 후보물

질을 처리하는 단계; c) 상기 실험 대상의 간 조직을 절제(hepatectomy)하는 단계; d) 신약 후보물질 처리 전후에 절단된 간 조직에서 인지질의 분포 변화를 확인하는 단계; 및 e) 상기 인지질의 분포 변화를 나타내는 물질을 신약후보물질로 선택하는 단계.

[0011] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 d)단계의 인지질은 포스파티딜콜린인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0012] 본 발명의 다른 일 구현예에 있어서, 상기 d)단계는 칼륨염 포스파티딜콜린의 이온강도가 양자화된 포스파티딜콜린의 이온강도보다 강한 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0013] 또 본 발명은 대상에서 간 조직을 절제(hepatectomy)하여, 상기 절제된 간 조직을 이용하여 절제 이후 콜린-포스페이트 사이티딜트랜스퍼라제 A(PCYT1A) 또는 N-메틸트랜스퍼라제(PENT)의 mRNA 발현 수준을 확인하여 상기 효소의 mRNA 수준이 정상 간의 수준에 비해 감소한 경우에 상기 대상은 B형 간염 바이러스에 감염되었다고 판단하는 것을 특징으로 하는 B형 간염 바이러스 감염에 대한 정보제공방법을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 절제 이후 6시간이 되는 시점에서 mRNA 발현 수준을 확인하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0015] 또한 본 발명은 대상에서 간 조직을 절제(hepatectomy)하여 상기 절제된 간 조직을 이용하여 포스파티딜콜린의 함량을 측정하여 상기 포스파티딜콜린의 함량이 정상 간에 비하여 감소한 경우에 상기 대상은 B형 간염 바이러스에 감염되었다고 판단하는 것을 특징으로 하는 B형 간염 바이러스 감염에 대한 정보제공방법을 제공한다.

[0016] 또 본 발명은 대상에서 간 조직을 또는 간 세포를 얻어서 인지질의 분포 변화를 확인하여 라이소-포스파티딜콜린의 양이 정상 간에 비하여 증가한 경우에 상기 대상은 B형 간염 바이러스에 감염되었다고 판단하는 것을 특징으로 하는 B형 간염 바이러스 감염에 대한 정보제공방법을 제공한다.

[0017] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 라이소-포스파티딜콜린은 LPC(22:2)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0018] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0019] HBV 감염 마우스의 특징과 바이러스로 유도된 간 재생 저해

[0020] HBV 감염 여부가 간 재생 시에 인지질의 분포 또는 조성을 변화시킬 수 있는지 MALDI-IMS를 사용하여 확인하기 위하여, 본 발명자들은 유체역학적으로 HBV 계통을 주사함으로써 HBV에 감염시킨 마우스 모델을 생성하였다. 본 발명에서 사용한 전체적인 실험 과정은 도 1a에 나타내었다. HBV 마우스가 바이러스성 단백질을 발현하는지 확인하기 위하여, 바이러스 표면 단백질(HBsAg)을 유체역학적 주사 후 3일 후에 마우스 혈청을 사용하여 ELISA에 의해 분석하였다. 도 1b에서 보듯이, 복제-경쟁 wt HBV(HBV1.2(wt))와 HBx-null HBV(HBV1.2(HBx-)) 둘 다 HBV 감염 혈청에서 HBsAg 단백질을 비슷한 수준으로 발현하였다.

[0021] 본 발명에서, HBV-유도 간 재생 결함과 인지질 대사 변화와의 관계를 연관시키기 위하여 본 발명자들은 wt HBV 및 HBx-음성 HBV의 유체역학적 주사 이후에 부분 간절제를 수행한 실험 동물 모델을 사용하여 MALDI-MS 및 MALDI-IMS 분석방법에 의하여 인지질 프로파일링 및 이미징을 수행하였다. 부분 간 절제 이후 8일 후에 눈에 띄는 간 재생 저해가 wt HBV 감염 모델에서만 관찰되었다.(도 1c, 1d) 본 발명자들은 또한 면역조직화학 염색분석으로 Ki67-양성 세포(세포 증식의 마커)를 계수함으로써 간세포 증식에 대해 확인하였다. 간세포의 증식은 대조군 또는 HBx-null 간 조직과 비교하여 wt HBV-발현 마우스의 간 조직에서 눈에 띄게 감소하였다.(도 1e) 이러한 결과는 본 발명의 실험 동물 모델이 MALDI-IMS를 통한 인지질 이미징 분석을 하기 위해 잘 확립되었다는 것을 시사한다.

[0022] PCA에 의한 IMS로부터 질량 분석 및 대조군과 HBV 마우스 간의 간 재생에 있어서 인지질 이미징의 비교

[0023] 본 발명자들은 HBV 감염이 MALDI-IMS 분석을 통한 간 재생에 있어서 인지질의 분포를 변화시킬 수 있는지 여부를 확인하였다. 부분 간 절제 이후에 간 재생 마우스로부터 추출된 간 샘플(그룹당 n=2)을 가지고 양성 및 음성 모델 모두에서 MALDI-IMS 분석을 수행하였다. 도 2a는 양성 이온 모드에서 전체 마우스 간 조직 부위로부터 얻은 평균 질량 분석 결과를 나타낸다. 스펙트럼은 다른 실험조건(Mock, HBV1.2(HBx-) 및 HBV1.2(wt)) 하에서 다른 간 조직으로부터의 다른 상대적인 강도와 함께 특정한 m/z 값을 갖는 80개 이상의 피크를 보여준다. 얻어진 질량 분석 데이터의 분포는 또한 PCA(Principal component analysis)와 분류법(classification method)에 의해 통계학적으로 분석하였다. 총 질량 분석에 대한 PCA는 ClinProTools v2.2(Bruker Daltonics)를 사용하여 각 그

로부터 수행하였다. 결과적으로 PCA는 3가지 다른 실험 그룹에 따라 탐지된 이온에 기초하여 시각적 특징을 제공하였다.(도 2b) 흥미롭게도 음이온 모드에서 얻어진 평균 질량분석에 대한 PCA분석은 55개 이상의 피크 ($S/N > 6$)가 탐지됐음에도 불구하고 어떠한 유의미한 변화도 보이지 않았다.(도 5)

MALDI-IMS를 사용하여 얻어진 다수의 이미징 데이터 중에서, 본 발명자들은 3개의 다른 그룹의 간 조직 부위의 이온 이미지에 있어서 그 양(존재비, abundance)의 유의미한 차이를 보이는 양이온 모드에서 얻어진 17개의 이온 이미지를 선택하였다.(도 2c, 도 2d) 생물학적 복체체로부터 얻어진 이온 이미지는 도 6에 나열하였다. 음이온 모드에서는 이온 이미지에 어떠한 변화도 없었다.(데이터도시 안함)

도 2c 및 2d에서 선택된 17개의 이온을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 MS/MS 분석을 수행하였다.(도 7) 스펙트럼으로부터 이러한 이온들은 3개의 다른 부가물 형태(H^+ , Na^+ 및 K^+)를 갖는 7개의 포스파티딜콜린, 2개의 스핑고미엘린(SMs) 및 2개의 라이소-포스파티딜콜린(LPCs)으로 확인되었다.(표 1)

[표 1]

Table 1. Phospholipids showing the alteration in regenerating liver tissue

Group	<i>m/z</i>	Phospholipid Class	FA (Cn: Un)	Adduct
A	851.8	SM	42:2	K
	853.6	SM	42:1	K
	796.6	PC	34:2	K
	798.6	PC	34:1	K
	824.7	PC	36:2	K
B	748.5	PC	32:4	Na
	750.5	PC	32:3	Na
	776.6	-	-	-
C	772.7	PC	32:0	K
	780.6	PC	34:2	Na
D	614.2	LPC	22:2	K
	616.2	LPC	22:1	K
E	758.7	PC	34:2	H
	760.6	PC	34:1	H
	786.7	PC	36:2	H
	806.6	PC	38:6	H
	834.7	PC	40:6	H

Cn, total chain length; Un, total degree of unsaturation; SM, sphingomyelin; PC, phosphatidylcholine; LPC, lyso-phosphatidylcholine

표 1은 재생 중인 간 조직에서 변화를 보이는 인지질을 나타냄. Cn은 총 사슬 길이; Un은 총불포화도; SM은 스핑고미엘린; PC는 포스파티딜콜린; LPC는 라이소-포스파티딜콜린.

m/z 776.6 이온의 낮은 강도 때문에, 본 실험에서 구조는 규명할 수 없었다. 17개의 이온 이미지로 보여지는 인지질은 그들의 수준 변화 패턴에 따라서 5개의 그룹으로 분류하였다. A, B 및 C 그룹에 속하는 인지질은 일반적으로 대조군과 비교했을 때 HBV1.2(HBx-) 및 HBV1.2(wt)에서 상대적으로 비율이 감소한 반면에, D 및 E 그룹에 속하는 인지질에 대한 이온 농도는 대조군과 비교하였을 때 HBV1.2(HBx-) 및 HBV1.2(wt)에서 상대적 비율이 증

가하였다. 그룹 A에 속하는 인지질은 SM(42:2)[M+K]⁺(m/z 851.8), SM(42:1)[M+K]⁺(m/z 853.6), PC(34:2)[M+K]⁺(m/z 796.6), PC(34:1)[M+K]⁺(m/z 798.6) 및 PC(36:2)[M+K]⁺(m/z 824.7)인데, 대조군과 비교했을 때 HBV1.2(HBx-) 및 HBV1.2(wt)에서 이온 강도가 감소하였다. 그룹 B에 속하는 인지질은 PC(32:4)[M+Na]⁺(m/z 748.5), PC(32:3)[M+Na]⁺(m/z 750.5) 및 m/z 776.6(구조 미상)인데, 이들의 이온 농도는 대조군, HBV1.2(HBx-) 및 HBV1.2(wt) 순서대로 점차적으로 감소하였다. 그러나, 그룹 D의 인지질은 LPC(22:2)[M+K]⁺(m/z 614.2) 및 LPC(22:2)[M+K]⁺(m/z 616.2)인데, 이들은 대조군과 비교하여 HBV1.2(HBx-) 및 HBV1.2(wt)에서 더 높은 이온 강도를 보였다. 그룹 E는 PC(34:2)[M+H]⁺(m/z 758.7), PC(34:1)[M+H]⁺(m/z 760.6), PC(36:2)[M+H]⁺(m/z 786.7) 및 PC(38:6)[M+H]⁺(m/z 806.6)인데, 이들 인지질의 이온 강도는 대조군, HBV1.2(HBx-) 및 HBV1.2(wt) 순서대로 점차적으로 증가하였다. 흥미롭게도, 그룹 C의 인지질, PC(32:0)[M+K]⁺(m/z 772.7) 및 PC(34:2)[M+Na]⁺(m/z 780.6)은 대조군 및 HBV1.2(HBx-) 사이에서 비슷한 이온 강도를 보였으며, 대조군 및 HBV1.2(HBx-)에 비하여 HBV1.2(wt)에서 눈에 띄게 더 낮은 이온 강도를 보였다.

[0030] 3개의 그룹에서 H&E 염색에 의해 분석한 간 조직학에서는 눈에 띄는 차이점은 없었다.(도 2e) 조직에 있어서 지질 변화 뿐 아니라 각 이온의 분포를 확인하기 위하여 IMS 데이터틀 적용하였다.

[0031] 재생 중인 간에서 IMS에 의해 선택된 인지질에 대한 칼륨으로 양이온화된 부가물 형성 분석

[0032] 흥미롭게도, 본 발명자들은 가장 존재 비율이 높은 PC 중, PC(34:2), PC(34:1), 및 PC(36:2)에 대해 특징적인 부가물 형성을 관찰하였다. 이러한 PCs의 부가물 형성은 대조군 및 HBx 발현 또는 미발현 HBV 감염에 따라 달랐다(도 3). 대조군의 간에서 PC의 칼륨(K) 양이온화된 부가물은 양성자화된 형태보다 더 높은 이온강도를 보였으며, HBV 간에서보다 간 재생이 더 활발하였다. 그러나, HBV1.2(HBx-) 및 HBV1.2(wt) 간 샘플에서, 부가물 형성에 있어서 눈에 띄는 차이점은 없었다. HBV1.2(HBx-)의 경우에, PC의 칼륨 양이온화된 형태(34:2)(m/z 796.6) 및 PC(36:2)(m/z 824.7)은 양성자화된 형태에서보다 조금 더 높은 강도를 보였다. 특히, HBV1.2(wt)의 간에서 칼륨 양이온화된 형태의 PC(34:1)(m/z 798.6)는 양성자화된 형태보다 더 낮은 강도를 보였다(도 3a). MS/MS 분석은 PC(34:2), PC(34:1) 및 PC(36:2)의 양성자화된 형태 및 칼륨 양이온화된 형태의 형성을 정하기 위하여 적용되었다. PCs의 MS/MS 데이터에서, m/z 184 이온은 주로 양성자화된 형태로 탐지된 반면에 m/z 86, m/z 163 및 m/z 194는 주로 칼륨 양이온화된 형태로 탐지되었다. 스펙트럼으로부터 전구체 이온의 양성자화 및 칼륨 양이온화된 PC 형태([M+H]⁺ 및 [M+K]⁺이온) 및 조각 이온은 주로 C₃H₁₀N(50 Da)의 중립 손실을 보였다(도 3b).

[0033] 이전에 (Na⁺+K⁺)-자극 ATPase 활성이 부분적으로 간 절제된 랫트의 간 플라즈마 막에서 증가된 것으로 보고되었다. 본 발명에서, PCs에서 높은 수준의 칼륨 양이온화된 형태가 부분 간 절제 이후 활성화된 간 재생에서 관찰되었다. 그러나 HBV-감염 간에서, PCs의 칼륨 양이온화된 형태의 수준이 간 재생에서는 반대였다.

[0034] 재생 중인 간에서 PC 합성과 연관된 주요 유전자의 운동 분석

[0035] 상기 결과는 PCs가 간 재생 도중에 HBV 감염에 의해 주로 다르게 조절됨을 시사한다. 그래서 본 발명자들은 PC 생합성과 연관된다고 알려진 유전자 발현이 HBV 감염에 의해 변화하는지 조사하였다. PC 생합성은 일반적으로 2가지 기전에 의해 조절된다고 알려져있는데, 이는 CDP-콜린 및 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제(PEMT) 기전이다. 이 2가지 기전을 조절하는 주요 효소는 각각 콜린-포스페이트 사이티딜트랜스퍼라제 A(PCYT1A) 및 PEMT이다(도 4a).

[0036] 간 재생에 있어서 이러한 유전자들의 운동학적 변화에 대해 조사하기 위하여, 본 발명자들은 Pcyt1a 및 Pemt의 mRNA 발현 수준을 부분 간 절제 이후 몇몇 시점에서 확인하였다. 도 4b와 4c에서 보듯이, Pcyt1a의 발현은 대조군 및 HBx-음성 HBV 마우스의 간에서 부분 간 절제 후 6시간에 강하게 유도되었다. 그러나, wt HBV 감염 간에서, Pcyt1a의 발현 수준은 눈에 띄게 억제되었다. 흥미롭게도, 발현은 부분 간 절제 후 다소 늦게 유도되었다(24h). Pcyt1a 단백질의 발현 수준은 wt HBV 감염된 재생 중인 간에서 또한 지연되었다(도 4d) Pcyt1a 효소의 변화된 발현 결과를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 부분 간 절제 이후에 초기 시점과 늦은 시점에서 간 PCs의 총량을 측정하였다. 도 4e에서 보듯이, 총 PCs의 수준은 부분 간 절제 후 48시간에 wt HBV 감염 마우스 간에서만 눈에 띄게 감소하였다. 이러한 데이터는 PC 생합성이 간 재생에서 wt HBV 감염에 의해 방해되며, 이는 마우스 간에서 HBx에 의한 Pcyt1a 발현의 조절이 HBV 감염과 바이러스 매개 간 재생 결함과 관련이 있음을 시사한다.

[0037]

결론적으로, 본 발명자들은 HBV 마우스 모델에서 재생 중인 간에 있어서 MALDI-IMS를 사용하여 변화된 인지질을 분석하였다. 본 발명자들은 HBV 감염된 간 및 HBV 매개 간 재생 결함에 있어서 중요한 발현 변화를 보이는 몇 가지 PCs와 관련된 효소를 확인하였다. 이러한 결과는 HBV 감염이 특히 PC 발현의 변화를 유도하는 HBx 단백질을 통하여 일어나며, 이들은 HBV-매개 간 재생 결함 및 간 질병과 잠재적으로 관련이 있음을 시사한다.

발명의 효과

[0038]

본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이, B형 간염 바이러스 감염 전후에 간 인지질의 조성 변화 및 효소 발현 변화를 통한 간 재생 촉진용 신약 후보 물질의 스크리닝 및 HBV 진단이 가능해짐으로써 HBV 감염 진단 및 간 재생 촉진용 의약품 개발에 있어 신속성과 정확성 측면에서 매우 유용한 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0039]

도 1은 HBV 마우스 모델의 특징과 바이러스-매개 간 재생 저해에 대한 그림. a. 발명과 관련된 실험의 전반적 실험 과정을 나타낸 그림. b-e. 본 발명에서 사용한 HBV 감염 마우스 모델의 확인과 특징을 나타낸 그림. b. 유체역학적 주사 후 3일 후에 마우스 혈청에서 HBsAg 수준을 나타낸 그림. c. HBV 마우스 모델에서 HBx에 의한 간 재생 저해를 나타낸 것으로, 부분 간 절제 후 8일 후에 HBV 또는 HBx 마우스 모델의 재생 중인 간을 육안으로 확인한 결과를 나타낸 그림. d. 부분 간 절제 후 8일 후에 간 중량/체중의 박스 플롯을 나타낸 그림. e. 부분 간 절제 후 48시간 후에 얻어진 포르말린으로 고정된 간 조직에서 Ki 67(세포 증식의 마커) 발현을 나타낸 그림. 데이터는 평균±표준편차로 나타내었으며 3개의 독립적 실험의 대푯값임, ***, 대조군 벡터 및 HBV1.2(HBx-)와 비교하여 $P<0.001$ (그룹 당 $n=5-6$ 마우스)

도 2는 양성 이온화 모드의 3가지 다른 조건에서 얻어진 간 조직 부위로부터의 인지질의 평균 MS 스펙트럼의 PCA 분석 결과 및 부분 간 절제 이후 재생 중인 간 조직에서 인지질의 MALDI 이미지를 비교한 그림. a. 이미징 질량 분석으로부터 얻어진 3가지 다른 조건에서의 간 조직 부위의 통상적인 MS 스펙트럼을 나타낸 그림. b. 양성 이온화 모드에서 얻어진 IMS 데이터의 PCA 분석 결과를 나타낸 그림. c, d. HBx 발현 여부에 따른 HBV 감염에 따른 수준의 변화를 보이는 분자 이온의 대표적 MALDI 이미지 분석을 나타낸 그림. e. 부분 간 절제 이후 24시간 후에 관찰한 H&E 염색된 간 조직을 나타낸 그림.

도 3은 재생 중인 간 조직에서 선택된 인지질에 대한 IMS 및 MS/MS 분석 결과를 나타낸 그림. a. 재생 중인 간 조직에서 3가지 포스파티딜콜린의 H^+ 및 K^+ 부가물의 이미지를 비교한 그림. b. MS/MS 분석에 의한 선택된 $PCs[M+H]^+$ 및 $[M+K]^+$ 이온의 확인 결과를 나타낸 그림.

도 4는 포스파티딜콜린(PCs) 합성-관련 유전자의 운동학적 분석 및 부분 간 절제 이후 재생되는 간 조직에서 총 PCs의 측정 결과를 나타낸 그림. a. PC 생합성의 기전을 나타낸 그림. PCYT1A, 콜린-포스페이트 사이티딜트랜스퍼라제 A; PE, 포스파티딜에탄올아민; PMME, 트리올레인-포스파티딜 N-모노메틸 에탄올아민; PDME, 트리올레인-포스파티딜-N,N-디메틸에탄올아민; PEMT, 포스파티딜에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제. b-d. 부분 간절제 이후 간 조직에서 Pcyt1a 및 Pemt 발현의 운동학적 분석 결과 및 간 절제 이후 특정 시간 간격에서, 반정량 RT-PCR을 사용하여 분석한 특정 유전자의 mRNA 수준(b), real-time PCR 결과(c) 및 웨스턴 블랏 분석 결과(d)를 나타낸 그림. e. 부분 간 절제 이후 간 PCs 수준의 정량 분석 결과를 나타낸 그림. 데이터는 평균±표준편차로 나타냈으며, 3번의 독립적 실험의 대푯값이다. **, $P<0.01$; ***, 대조군 벡터와 HBV1.2(HBx-)와 비교하여 $P<0.001$ (각 그룹 당 $n=3-4$ 마우스)

도 5. 음이온 모드에서 3가지 다른 조건으로부터 얻어진 간 조직 부위로부터의 인지질의 평균 MS 스펙트럼의 PCA 분석 결과를 나타낸 그림. a. 이미징 질량 분석으로부터 얻어진 3가지 다른 조건에서 간 조직 부위의 통상적인 MS 스펙트럼을 나타낸 그림. b. 양성 이온화 모드에서 얻어진 IMS 데이터의 PCA 분석 결과를 나타낸 그림.

도 6. 부분 간 절제 이후에 재생 중인 간 조직에서 생물학적 동등체로부터의 인지질의 MALDI 이미지 분석 결과를 나타낸 그림.

도 7. 표 1에 나열된 17가지 인지질 이온의 MS/MS 데이터를 나타낸 그림.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040]

이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상

의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0041] 실시예 1. HBV 감염에 대한 마우스 모델

[0042] 급성 HBV 감염에 대한 마우스 모델은 이전에 설명한 대로 사용되었다.(Park ES, Ahn SH et al., 2013) 간단히, 6주에서 7주의 수컷 BALB/c 마우스(그룹당 n=3)은 유체역학적으로 25 μ g의 플라스미드 DNA(pGEM-4z, pHBV1.2(wt), pHBV1.2(HBx-))를 마우스 체중의 10%와 동량의 PBS(phosphate-buffered saline)의 부피로 꼬리 정맥에 주사하였다. DNA 총 부피는 4-6초 내에 고압으로 정맥으로 주입되었다.(유체역학적 인 비보 트랜스팩션) 실험 동물을 포함하는 모든 과정은 건국대학교 동물 보호 위원회에 의해 승인되었다.

[0043] 실시예 2. 부분 간 절제술

[0044] 마우스에서 생리학적 간 재생을 유도하기 위하여, 70% 부분 간절제 모델이 이전에 설명한 대로 사용되었다.(Park ES, Ahn SH et al., 2013; Mitchell C, Willenbring H., 2008) 간단히 말해서, DNA를 유체역학적으로 주사한 후 4일 제에, 자일라진(xylazine, 10 μ g/kg) 및 졸레틸(zoletil, 10mg/kg)의 복강 내 주사 후에 총 간 중량의 약 70%를 절제하였다. 마취 후에, 각 마우스 간의 좌엽과 중엽 부분이 복부 중앙 절개를 통하여 제거되었다. 복부를 봉합한 후에 실험동물은 케이지로 돌려보낸 후에 임의로 먹이를 먹도록 허락하였다. 간 재생의 정도는 부분 간 절제 후 8일째 되는 날에 체중과 간 중량의 비율로 평가하였다.

[0045] 실시예 3. 마우스 간세포의 증식 분석

[0046] 부분 간 절제 후에 마우스 간세포의 증식 상태를 평가하기 위하여, 증식 마커로써 Ki67-라벨링 지수를 관찰하였다. Ki67-염색된 간세포는 제조자의 지시에 따라서 파라핀에 끼워넣은 간 샘플의 4 μ m 조직 부분에서 확인하였다.(세포 증식 키트, Amersham Life Science, Amersham, UK)

[0047] 실시예 4. MALDI 분석을 위한 조직 프로세싱

[0048] 시험 마우스로부터 얻은 간 조직(n=2)은 액체 질소에서 급속 냉각한 후에 사용할 때까지 -80 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 10 μ m 두께의 조직 부위는 크리오스타트(cryostat, Leica CM-1850, Leica Microsystems Inc., Solms, Germany)를 사용하여 -20 $^{\circ}$ C~-25 $^{\circ}$ C의 온도 범위에서 절단하였다. MALDI-IMS 분석을 위하여, 조직 부위는 인듐-주석-산소(ITO)로 코팅된 유리 슬라이드(HST Global, Inc., Hampton, VA, USA)에서 녹이기 시작하였다. 조직은 그리고 나서 동결시키고 4 $^{\circ}$ C와 실온에서 배양하였다. 마지막으로 조직은 데시케이터에서 건조되었다. MALDI-MS 프로파일링 분석을 하기 위해서, 0.1% TFA를 포함하는 70% 메탄올 1ml에 DHB와 CHCA 각각 3.5mg을 용해시켜서 바이너리(binary) 매트릭스 용액을 준비하였고, 이미징 실험을 위하여 ImagePrep(Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA)를 사용하여 동일한 매트릭스를 첨가하였다. 그룹마다 임의적으로 선택된 마우스 2마리로부터 생물학적 복제체가 생산되었다.

[0049] 실시예 5. MALDI 이미징 질량 분석법

[0050] 질량 분석 실험은 스마트 빔레이저 기술이 장착된 Autoflex III 질량 분석기(Nd:YAG, 355nm; Bruker Daltonics Inc.)를 사용하여 수행하였다. 이미징 실험은 단일 조직 부위로부터 양이온 및 음이온 모두를 사용하여 수행하였고 200Hz 레이저 진동수(3,000 연속 레이저 샷)에서 질량 대 전하(m/z) 비율이 500-1200 범위 내에 있는 모든 이온이 리플렉트론 모드에서 탐지되었다. 이미지 분석을 위하여, Flex Software suite(FlexControl 3.0, FlexImaging 2.1, FlexAnalysis 3.3, Bruker Daltonics)의 통제 하에서 픽셀 당 500 연속 레이저 샷으로 150 μ m의 공간 해상도를 사용하여 데이터를 얻었다(각 픽셀 내에서 임의적 움직임의 워크 당 50 레이저 샷). 각 데이터 수집 전에, 질량 범위 674-834 Da(양이온 모드) 및 564-906 Da(음이온 모드)로 인지질-혼합 보정 표준을 사용하여 외부 보정을 수행하였다. MALDI LIFT(MS/MS) 분석은 MALDI MS 이후에 조직에 직접 수행하였다. 다른 인지질 종류를 LIFT 데이터 및 지질 데이터베이스(www.lipidmaps.org)를 사용함으로써 확인하였다.

[0051] Clinpro Tools(version 2.2, Bruker Daltonics) 및 flexImaging software가 MALDI 이미징 데이터 프로세싱을 위해 사용되었으며, 얻어진 총 이온 숫자값에 의해 모든 파장 강도(spectral intensities)를 분리하였다. 이온 강도는 표준화 이후에 다른 실험군의 간 부위와 이온쌍 비교를 통하여 평가하였다. 10% 최소 기준선 너비와 함께 Top Hat 기준선이 기준선 감산(subtraction)을 위해 사용되었다. 데이터 감소는 4의 인수(factor)로 수행하였다.

[0052] 실시예 6. Real-time-PCR(RT-PCR)

[0053] 전체 마우스 간 조직은 Trizol 시약(Invitrogen/Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 제조자의 지시에

따라 용해하였고, 토탈 RNA를 분리하였다. 역전사 반응은 2 μ g의 토탈 RNA와 M-MLV 역전사효소(iNtRON, Seoul, Korea)를 사용하여 최종 농도 20 μ l에서 수행하였다. 결과물 cDNA는 하기 조건으로 PCR-증폭하였다: 초기 변성은 5분간 94 $^{\circ}$ C에서 수행했으며, 94 $^{\circ}$ C(30초), 58 $^{\circ}$ C(30초), 72 $^{\circ}$ C(30초)로 25-30 사이클 진행하고, 5분간 72 $^{\circ}$ C에서 최종 신장(extention)하였다. 증폭을 위한 프라이머 서열은 하기와 같다: 인산 사이티딜트랜스퍼라제 1, 콜린, 알파 아이소폼(Pcyl1a), 포워드 5' -AGGCTACTGTGACCGAGGTA-3'. 리버스 5' -AGTCACCCTGACATAGGGCT-3'; 포스파티딜 에탄올아민 N-메틸트랜스퍼라제(Pemt), 포워드 5' -GAGAACTCGGAAGCTGAGCA-3', 리버스 5' -CAGCACAACACGAATCCCC-3'. 정량적 real-time PCR은 SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 수행하였고 PCR 증폭은 Applied Biosystems(ABI7500) real-time PCR 기계를 사용하여 수행하였다. 상대적 정량 분석은 비교 $\Delta\Delta C_t$ 방법을 사용하여 수행하였다. 결과는 캘리브레이터에 대하여 n-배 차이로써 나타내었다. ($RQ=2^{-\Delta\Delta C_t}$)

[0054]

실시예 7. 웨스턴 블랏 분석

[0055]

각 간 조직은 RIPA 완충용액에서 균질화되었다. 단백질 50 μ g이 10-12% SDS-PAGE 겔에서 분리되었으며 웨스턴 블랏 분석에 적용되었다. 사용된 일차 항체는 항-Pcyl1a(N-20, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 및 항- β -액틴(Sigma Aldrich)이다. 2차 항체로서, 2차 항체와 컨주게이트된 적절한 퍼옥시다제(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)가 사용되었다. 화학 발광 탐지 분석이 ECL Detection Reagent(GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)로 수행되었고 LAS-4000 Luminescent Image 분석기(LAS-4000, Fuji, Tokyo, Japan)로 가시화시켰다.

[0056]

실시예 8. 총 PC양의 정량 분석

[0057]

마우스는 부분 간 절제 이후 특정 시점에 희생시켰다. 총 PC의 양은 제조자의 지시에 따라 포스파티딜콜린 분석 키트(Cell biolabs Inc, San Diego, CA)를 사용하여 측정하였다. 최소 3마리의 마우스가 각 그룹별로 분석을 위해 사용하였다.

[0058]

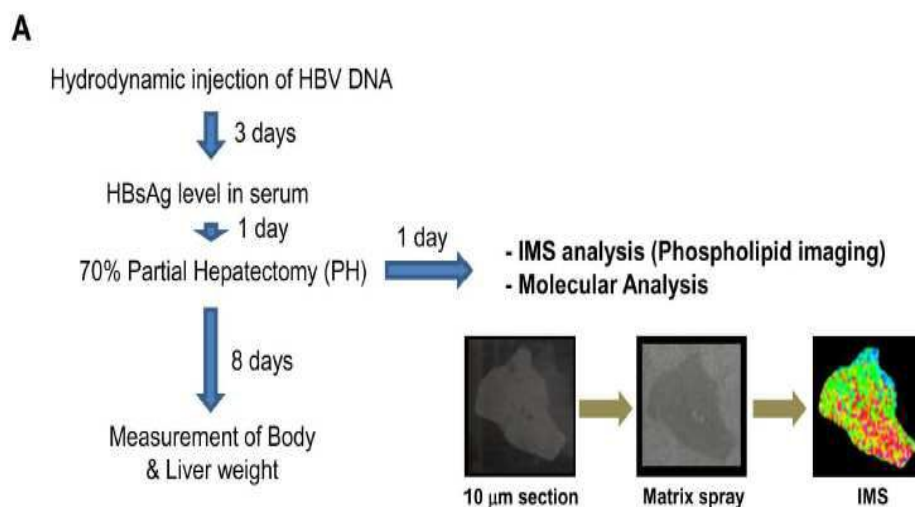
실시예 9. 데이터 분석

[0059]

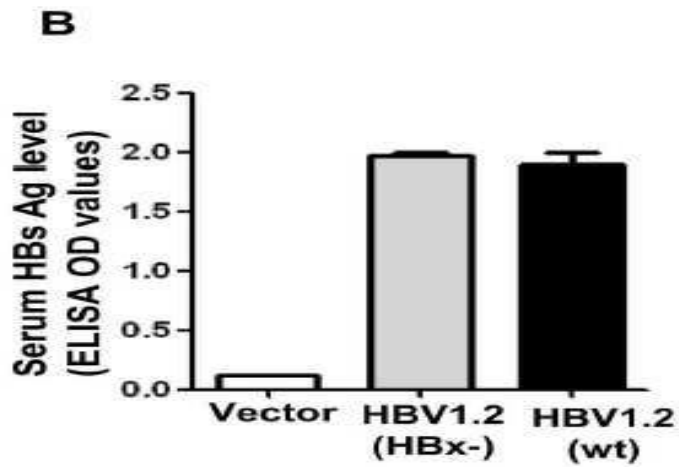
데이터는 적어도 3번의 독립적 실험에 의해 얻어졌으며 수치는 평균 $\pm$ 표준편차(SD)에 의해 나타내었다. MALDI-IMS 분석에 있어서, 그룹당 2개의 간 조직 샘플을 독립적으로 분석하였다. 그룹 간 차이는 Student's t-테스트 또는 분산 분석을 사용하여 통계학적 유의미성을 시험하였다. 통계학적 유의미성은 $p<0.05$ 로 설정하였다.

도면

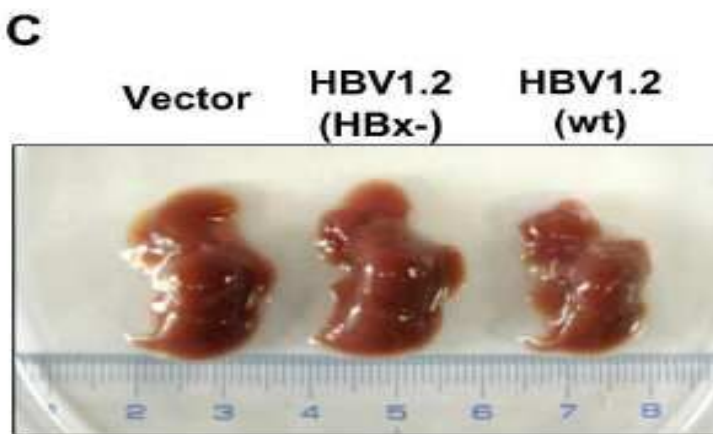
도면1a



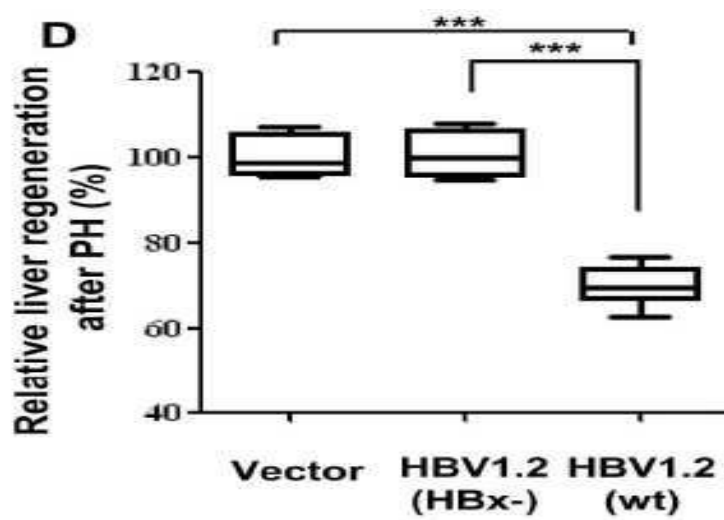
도면1b



도면1c

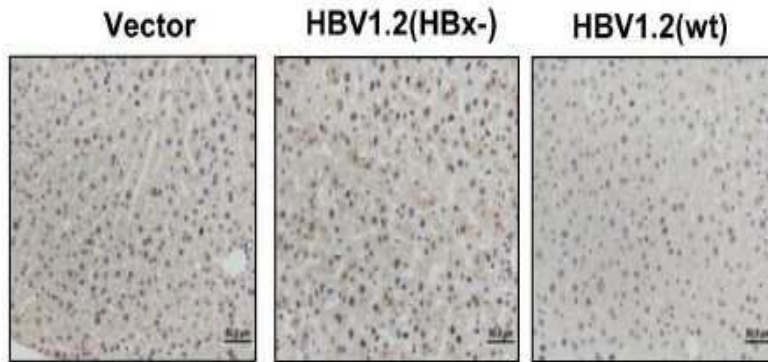


도면1d



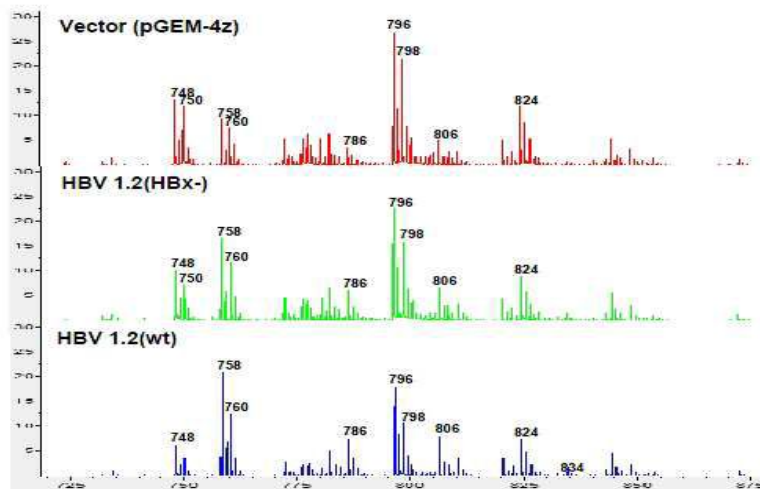
도면1e

E

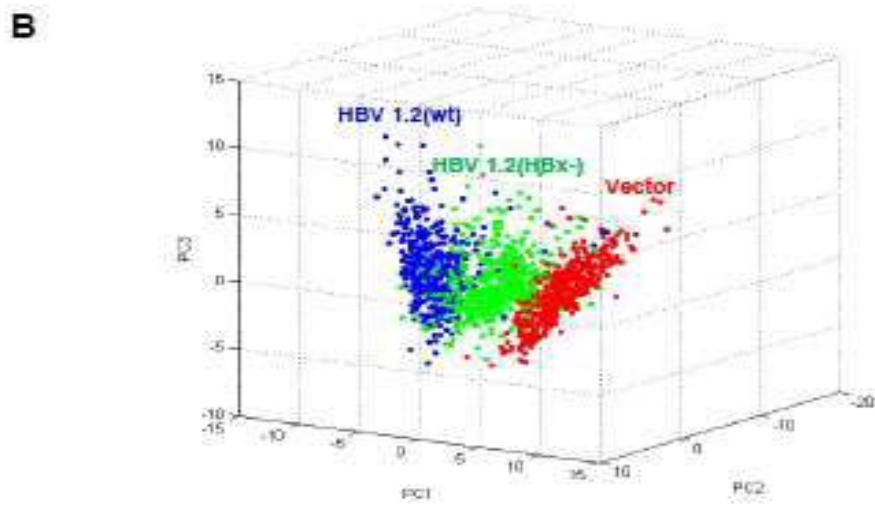


도면2a

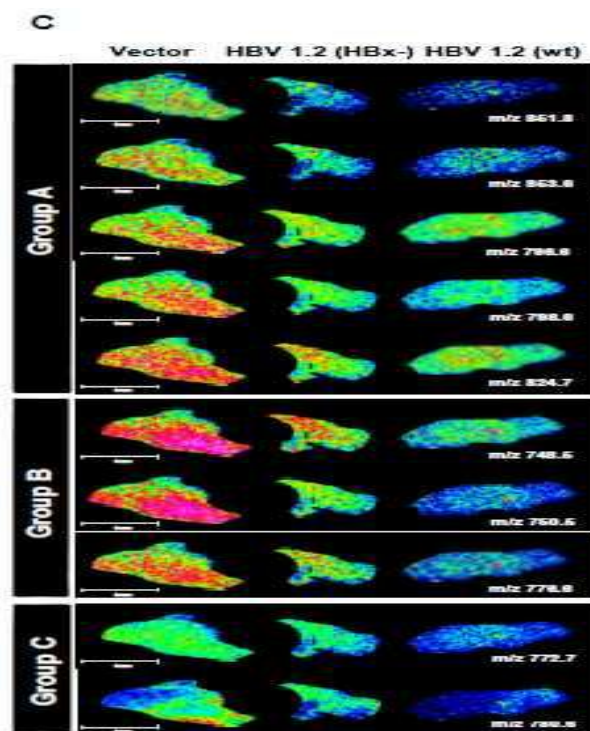
A



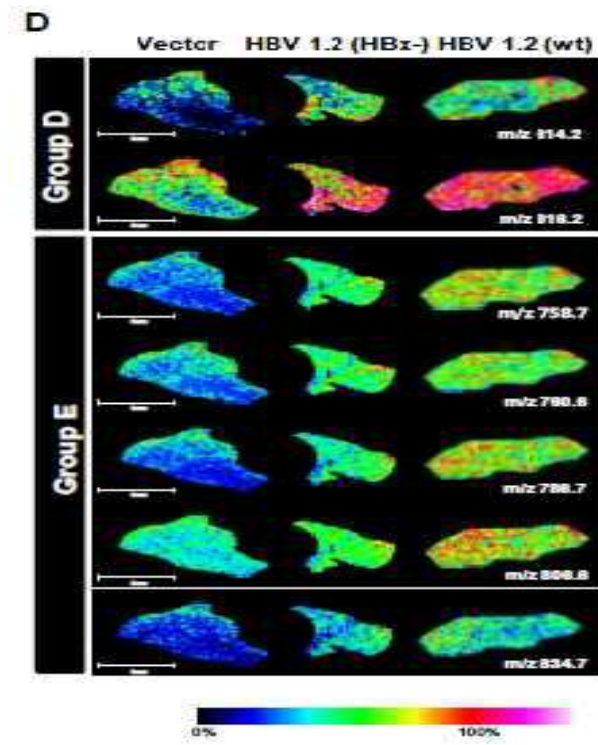
도면2b



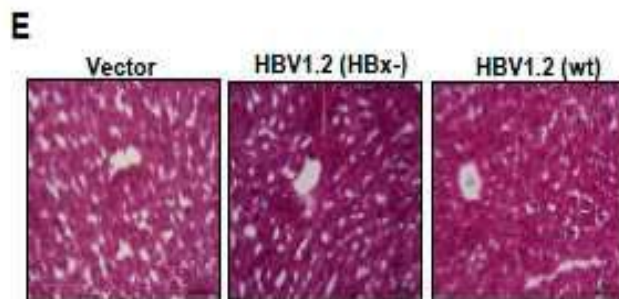
도면2c



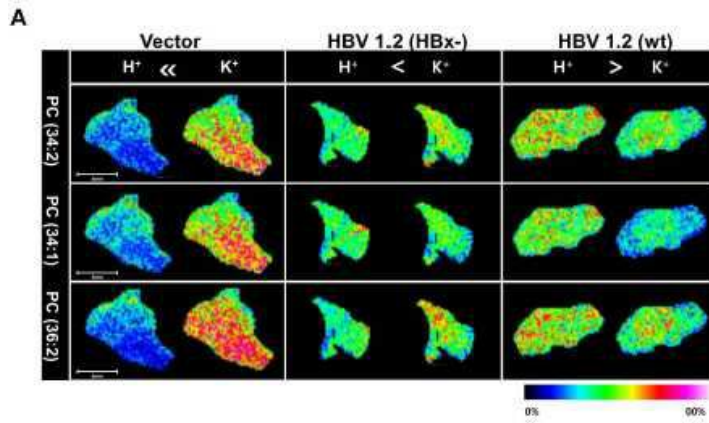
도면2d



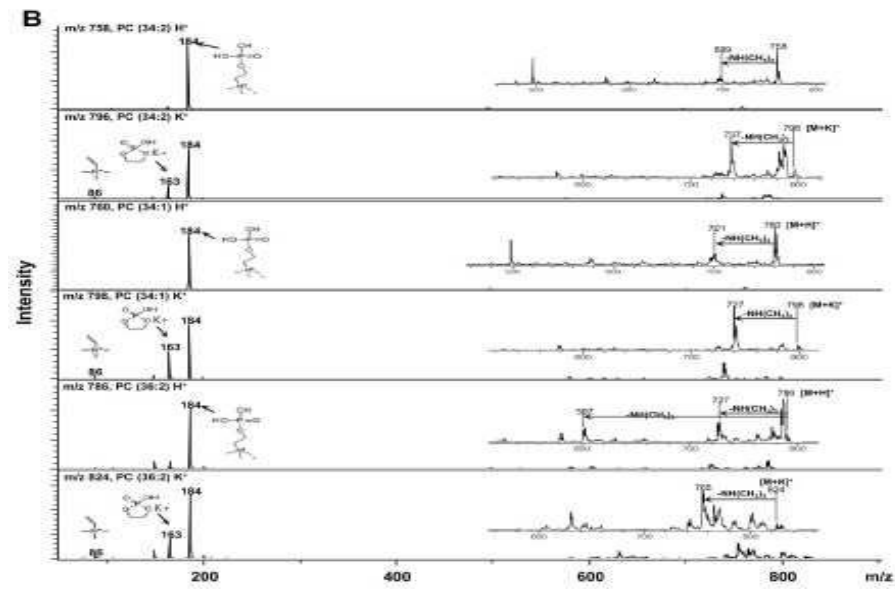
도면2e



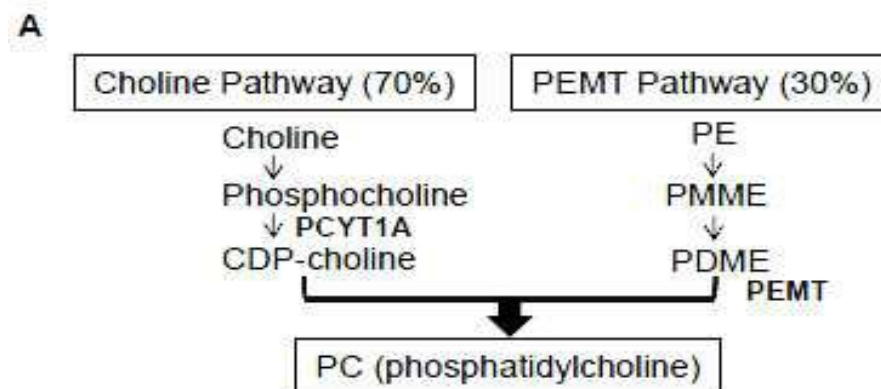
도면3a



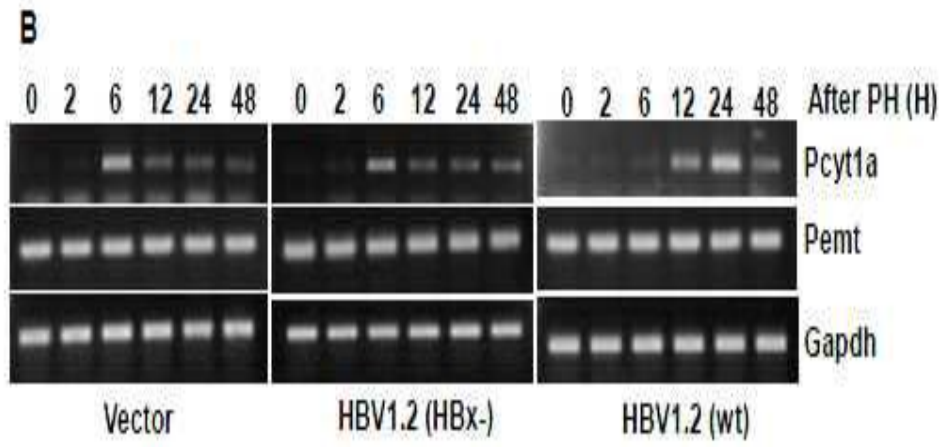
도면3b



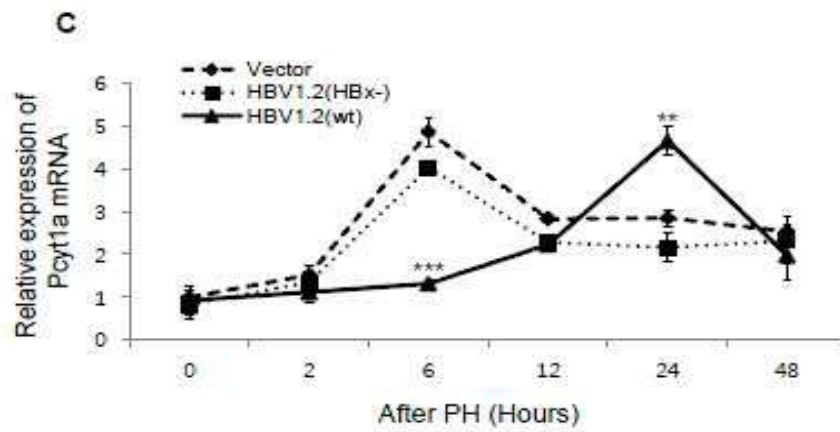
도면4a



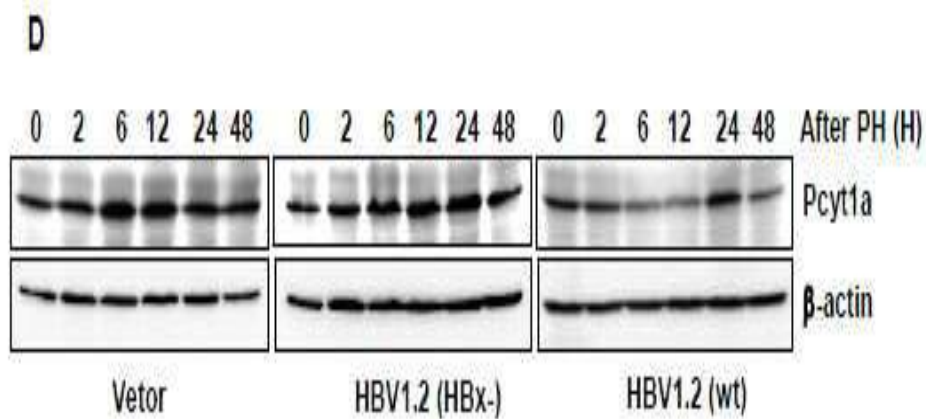
도면4b



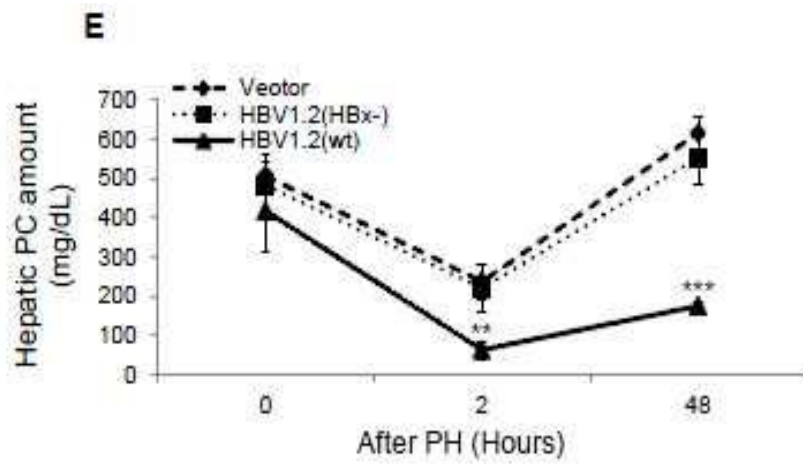
도면4c



도면4d

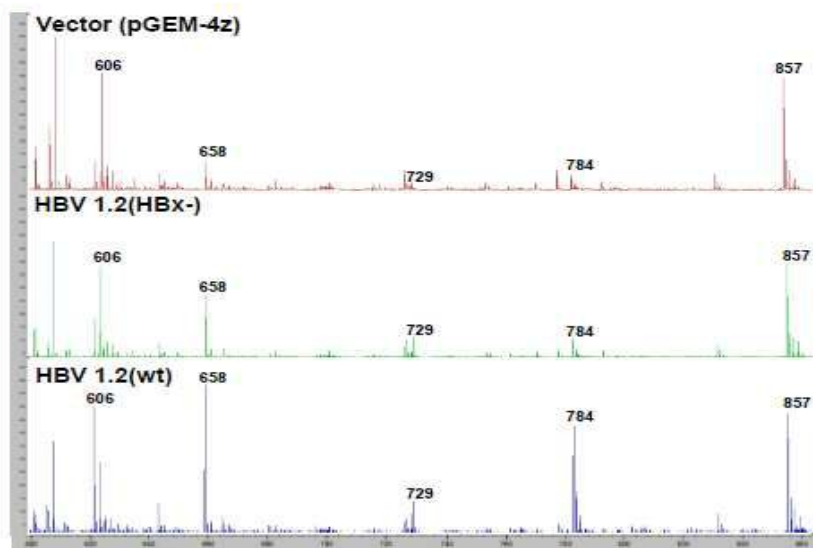


도면4e

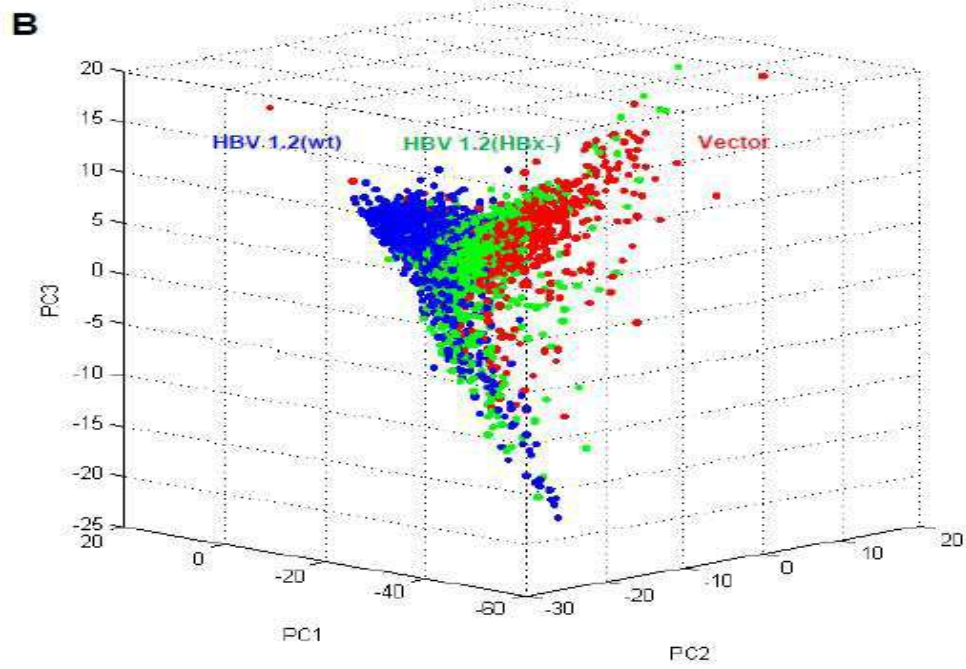


도면5a

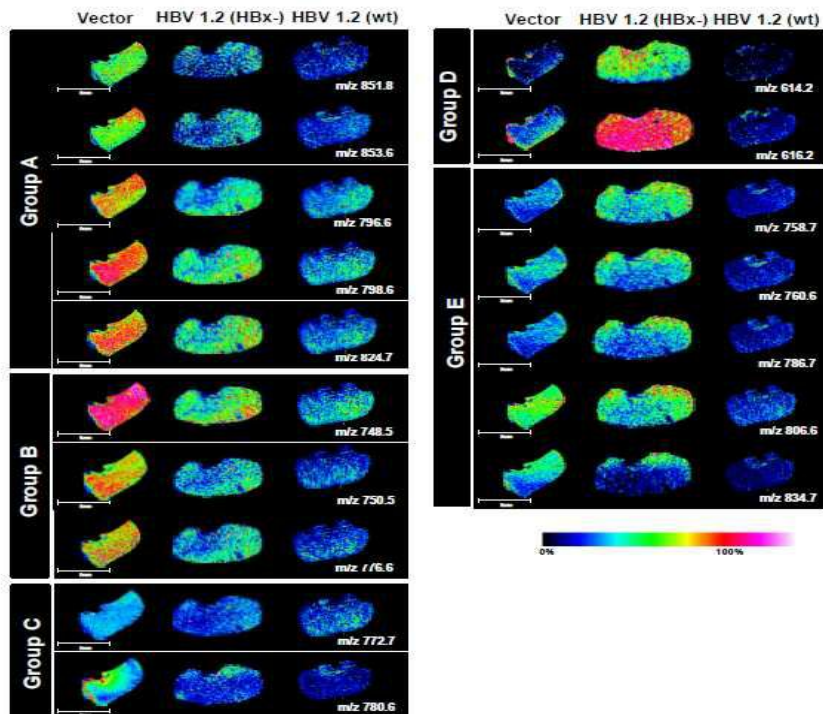
A



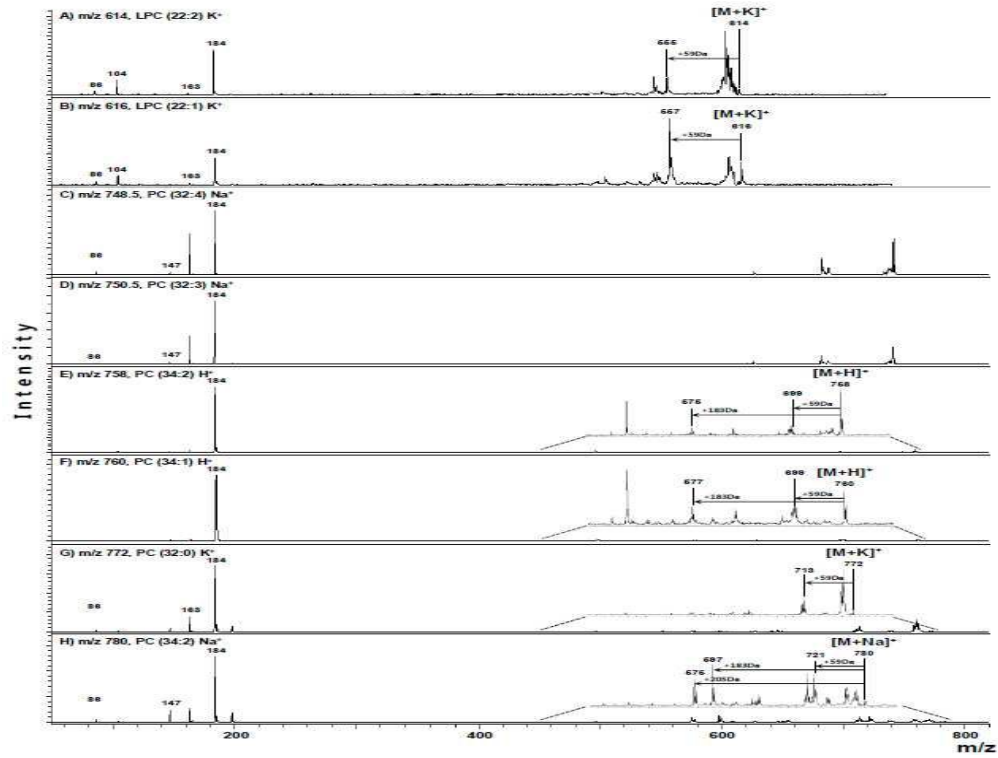
도면5b



도면6



도면7a



도면7b

