(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0006745
(43) 공개일자 2024년01월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0083123
(22) 출원일자 2022년07월06일
심사청구일자 2022년07월06일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
남덕우
울산 울주군 언양읍 유니스트길 50
최장현
울산 울주군 언양읍 유니스트길 50
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김종석

전체 청구항 수 : 총 9 항

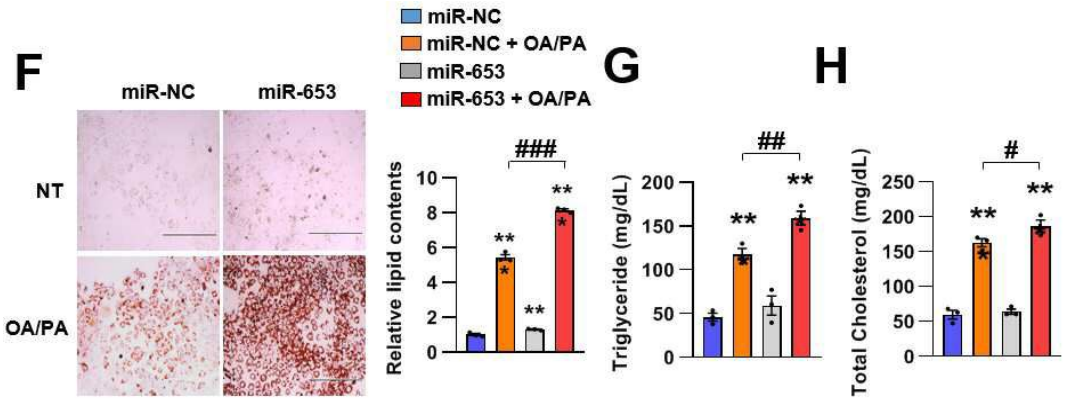
(54) 발명의 명칭 **지방간 질환 진단용 바이오마커 조성물 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 지방간 질환 진단용 바이오마커 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 miR-653 및 miR-493으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 miRNA를 유효성분으로 포함하는, 지방간 질환 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

상기 조성물을 이용하여 지방간 질환을 보다 용이하게 진단할 수 있고, 그에 따른 적절한 치료를 통해 증상 악화 및 이에 따른 합병증 등을 최소화하여 보다 효과적으로 지방간 질환을 치료할 수 있다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/178 (2013.01)
(72) 발명자
백부경
울산 울주군 언양읍 유니스트길 50
이요한
울산 울주군 언양읍 유니스트길 50

명 세 서

청구범위

청구항 1

miR-653 및 miR-493으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 miRNA를 유효성분으로 포함하는, 지방간 질환 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 miRNA는,

정상 대조군과 비교하여 발현이 증가하는 것을 특징으로 하는, 지방간 질환 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은,

SIRT1, STAT5B, PPARGC1A, IRS1, INSR, FOXO3, NR2C2, EGFR, 및 PRKCA 로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 지방간 질환 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 지방간 질환은,

비알코올성 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)인 것을 특징으로 하는, 지방간 질환 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 5

miR-653 및 miR-493으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 miRNA의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는, 지방간 질환 진단용 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 miRNA의 발현수준을 측정할 수 있는 제제는,

상기 miRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 지방간 질환 진단용 조성물.

청구항 7

제 5 항 또는 제 6 항의 조성물을 포함하는, 지방간 질환 진단용 키트.

청구항 8

환자로부터 분리된 시료로부터 miR-653 및 miR-493으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 miRNA의 발현수준을 측정하는 단계; 및

상기 miRNA의 발현수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계;를 포함하는, 지방간 질환 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 시료는,

조직, 세포, 전혈, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨인 것을 특징으로 하는, 지방간 질환 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 지방간 질환 진단을 위한 마이크로 RNA (microRNA) 바이오마커 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 비만(Obesity)은 비알코올성 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)과 같은 다양한 대사 장애로부터 생겨난다. 많은 보고서에 따르면, 미국 비만 환자의 90%가 간 지방증(hepatic steatosis)에서 훨씬 더 심각한 형태의 비알코올성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)에 이르는 비알코올성 지방간 질환이 있으며, 이는 섬유증(fibrosis), 간경변(cirrhosis) 및 간세포 암종(hepatocellular carcinoma, HCC)을 유발할 수 있다. 비알코올성 지방간 질환은 간 대사 리프로그래밍과 관련되어 과도한 지질 축적 및 간에서 지질 대사의 불균형을 초래한다. 비알코올성 지방간 질환의 발병기전은 수년 동안 널리 연구되어 왔지만, 복잡한 장애의 기저에 깔린 분자 메커니즘은 여전히 조사되고 있다.

[0004] 간 조직검사는 비용이 비싸고, 해석하는데 있어서 전문가가 필요하며 합병증의 위험이 있기 때문에, 2018년 미국간학회 가이드라인에서는 비알코올성 지방간 질환의 선별검사로서 간 조직검사를 권고하지 않고, 지방간염이나 진행된 간 섬유화증이 의심되는 경우 또는 다른 질환의 배제가 필요한 경우에만 권고하고 있다. 하지만, 비알코올성 지방간 질환 환자군은 정상 대조군에 비해 전체 사망률이 높고, 특히 지방간염으로 진행한 경우 심혈관 질환 사망률이 증가한다. 비음주자들의 건강검진에서 복부 영상검사상 지방간 질환이 관찰되고 간 기능 검사가 이상을 보이는 경우가 많으므로 비알코올성 지방간 질환의 가능성을 염두에 두고 진단과 치료법에 대해 생각해 볼 필요가 있다.

[0005] 한편, 마이크로 RNA (microRNA; miRNA; miR)는 동·식물 모두의 게놈에 존재하는 비암호화의 작은 RNA로 생물의 전반적인 모든 과정에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 최근 이러한 miRNA를 질병 진단용 바이오마커로 사용하기 위한 연구들이 진행되고 있다. 현재 임상에서 사용되는 대부분의 바이오마커는 체액에 순환하는 단백질이나, 불행히도 새로운 단백질 기반의 바이오마커 개발은 시료 내 표적 단백질의 낮은 친화도로 인하여 상당한 기술적 어려움에 직면해 있는 바, miRNA를 이용한 바이오마커의 개발은 단백질 바이오마커의 한계점을 극복할 수 있는 하나의 대안이 될 수 있다.

[0006] 이에, 종래의 비침습적인 진단 방법들의 한계점을 극복하고 보다 효과적인 지방간 질환의 진단을 위한 새로운 기술이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1544531호 (2015.08.17 공고)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 지방간 질환을 효과적으로 진단할 수 있는 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 지방간 질환에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 miR-653 및 miR-493으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 miRNA를 유효성분으로 포함하는, 지방간 질환 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0013] 상기 miRNA는, 정상 대조군과 비교하여 발현이 증가하는 것일 수 있다.

[0014] 상기 조성물은, SIRT1, STAT5B, PPARGC1A, IRS1, INSR, FOXO3, NR2C2, EGFR, 및 PRKCA로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자를 더 포함할 수 있다.

[0015] 상기 지방간 질환은, 비알코올성 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 일 수 있다.

[0016] 본 발명은 miR-653 및 miR-493으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 miRNA의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는, 지방간 질환 진단용 조성물을 제공한다.

[0017] 상기 miRNA의 발현수준을 측정할 수 있는 제제는, 상기 miRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있다.

[0018] 본 발명은 상기 지방간 질환 진단용 조성물을 포함하는, 지방간 질환 진단용 키트를 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 환자로부터 분리된 시료로부터 miR-653 및 miR-493으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 miRNA의 발현수준을 측정하는 단계; 및 상기 miRNA의 발현수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계;를 포함하는, 지방간 질환 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0020] 상기 시료는, 조직, 세포, 전혈, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨일 수 있다.

발명의 효과

[0022] 본 발명은 지방간 질환 유전자 발현 데이터로부터 주요 miRNA, 타겟이 되는 pathway 및 타겟 유전자들의 통합 분석을 통해 지방간 질환과 관련된 miRNA를 발굴하였고, 이를 이용하여 지방간 질환을 보다 용이하게 진단할 수 있다.

[0023] 또한, 상기의 miRNA를 이용하여 지방간 질환을 조기 진단함으로써, 그에 따른 적절한 치료를 통해 증상 악화 및 이에 따른 합병증 등을 최소화하여 보다 효과적으로 지방간 질환을 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 질병 전사체 데이터에서 miRNA 발굴을 위한 새로운 접근 방법을 개략적으로 나타낸 것이다.

도 2는 도 1의 방법에 따라, miRNA 타겟, pathway 정보, RNA-seq 발현 데이터, 질병유전자 정보의 통합 분석을

통해 간 질환 miRNA 조절 네트워크를 도출하는 과정을 나타낸 것이다.

도 3은 도 2에 따라 지방간 데이터에서 도출된 miRNA-pathway 조절 네트워크 일부 이다.

도 4는 조건부 초기하분포를 이용한 miRNA 조절 패턴을 분석한 것이다.

도 5는 비알코올성 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 유전자 발현 데이터를 결합하여 NAFLD와 통계적 유의성을 갖는 miRNA 조절 관계를 도출한 것 중 상위 20개의 리스트이다.

도 6은 도 5에서 도출된 miR-653의 다양한 지방간 세포 또는 마우스 모델에서의 발현 양상을 확인한 것이다.

도 7은 miR-653 과발현에 대한 지질 반응을 확인한 것이다.

도 8은 miR-653의 타겟 유전자를 확인한 것이다.

도 9는 miR-653의 타겟 유전자로 SIRT1에 대해 확인한 것이다.

도 10은 miR-653 과발현에 따른 지질 대사와 관련된 유전자들의 발현을 확인한 것이다.

도 11은 도 5에서 도출된 miR-493의 다양한 지방간 세포 또는 마우스 모델에서의 발현 양상을 확인한 것이다.

도 12는 miR-493 과발현에 대한 지질 반응을 확인한 것이다.

도 13은 miR-493의 타겟 유전자를 확인한 것이다.

도 14는 miR-493의 타겟 유전자로 STAT5B에 대해 확인한 것이다.

도 15는 miR-493 과발현에 따른 지질 대사와 관련된 유전자들의 발현을 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 본 발명을 상세하게 설명하기로 한다.

[0028] 본 발명자는 종래와는 달리, pathway 정보를 매개로 활용하여 질병 RNA-seq 데이터를 결합하여 분석하는 새로운 방식 (도 1)으로 지방간 질환의 전사체 데이터에서 지방간 질환과 관련된 miRNA를 발굴하였고, 상기 miRNA의 발현이 지방간 질환에서 유의한 변화를 나타냄을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0030] 본 발명은 miR-653 및 miR-493으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 miRNA를 유효성분으로 포함하는, 지방간 질환 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0031] 본 명세서에서, "지방간(fatty liver)"이란, 정상 간의 경우 지방이 차지하는 비율은 5% 이내인데, 이보다 많은 지방이 축적된 상태를 의미하며, 지방간은 크게 과도한 음주로 인한 알코올성 지방간과 비만, 당뇨병, 고지혈증, 약물과 관련된 비알코올성 지방간으로 나눌 수 있다. 바람직하게는, 상기 지방간 질환은 간 지방증(hepatic steatosis)에서 비알코올성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)에 이르는 비알코올성 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 본 명세서에서, "진단(diagnosis)"이란, 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것으로, 본 발명의 목적상 지방간 질환의 발병 여부 또는 발명 가능성을 확인하는 것을 의미하며, 지방간 질환 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상에 대한 대상의 감수성을 판정하는 것, 테라메트릭스(therametrics)(예를 들어, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것) 등을 포함한다. 또한, 임상 상태의 일차 진단 또는 재발한 질병의 진단을 포함한다.

[0033] 본 명세서에서, "바이오마커(biomarker)"란, 몸 안의 변화를 알아낼 수 있는 지표로서, 생명체의 정상 또는 병리적인 상태, 이의 변화 여부 등을 확인할 수 있는 물질로, 폴리펩타이드, 핵산, 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함할 수 있고, 이를 이용하여 본 발명과 같이 지방간 질환 여부를 진단할 수 있다.

[0035] 상기 바이오마커 조성물에 있어서, 상기 miR-653은 miR-653-5p 일 수 있고, 상기 miR-493은 miR-493-5p 일 수

있으며, 이는 하기와 같이 각각 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있다.

[0036] - miR-653-5p : 5'-GUGUUGAAACAAUCUCUACUG-3' (서열번호 1)

[0037] - miR-493-5p : 5'-UUGUACAUGGUAGGCUUUCAUU-3' (서열번호 2)

[0039] 상기 miRNA는 SIRT1, STAT5(STAT5B), PPARGC1A, IRS1, INSR, FOXO3, NR2C2, EGFR, 및 PRKCA로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자를 타겟할 수 있다. 보다 상세하게는, 상기 miR-653은 SIRT1, PPARGC1A, IRS1, FOXO3, 또는 NR2C2를, 상기 miR-493은 STAT5B, PPARGC1A, INSR, EGFR, 또는 PRKCA를 직접 타겟할 수 있는 바, 상기 바이오마커 조성물은 SIRT1, STAT5(STAT5B), PPARGC1A, IRS1, INSR, FOXO3, NR2C2, EGFR, 및 PRKCA로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자를 더 포함할 수 있다.

[0040] 하기 표 1은 상기 유전자의 프라이머 서열정보이다.

표 1

[0041]

유전자	프라이머 서열		서열번호
SIRT1	Forward (F)	CCCTCAAAGTAAGACCAGTAGC	3
	Reverse (R)	CACAGTCTCCAAGAAGCTCTAC	4
STAT5B	F	AGTGACTCAGAAATTGGCGG	5
	R	AGGTAATTCAAGTCTCCCAAGC	6
PPARGC1A	F	ACCAAACCCACAGAGAACAG	7
	R	GGGTCAGAGGAAGAGATAAAGTTG	8
IRS1	F	AAGTGATCCTGAAGCCCAAG	9
	R	TCACGAAGCTGATGGTCTTG	10
INSR	F	GGAAGTTACGTCTGATTCGAGG	11
	R	TGAGTGATGGTGAGGTTGTG	12
FOXO3	F	CAGATCTACGAGTGGATGGTG	13
	R	TCTTGCCAGTTCCCTCATTC	14
NR2C2	F	GTAACACGTACACAGACCTCTC	15
	R	GTGAAAACACTCAATGGGCC	16
EGFR	F	AAGCCATATGACGGAATCCC	17
	R	GGAACTTTGGGCGACTATCTG	18
PRKCA	F	CGGAATGGATCACACTGAGAAG	19
	R	ACATAAGGATCTGAAAGCCCG	20

[0043] 상기 miRNA는 정상 대조군과 비교하여 지방간 질환 환자군에서 발현이 유의적으로 변화될 수 있고, 바람직하게는 상기 miRNA는 정상 대조군에 비해 지방간 질환 환자군에서 발현이 증가될 수 있다.

[0044] 본 발명에 따른 바이오마커는 반복된 실험에도 동일한 결과를 나타내고, 이의 발현량의 변화가 유의성 있는 결과를 보이므로 신뢰도가 높은 마커로 볼 수 있으며, 이에 따라 예측된 결과는 타당하게 신뢰될 수 있다.

[0046] 본 발명은 miR-653 및 miR-493으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 miRNA의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는, 지방간 질환 진단용 조성물을 제공한다.

[0047] 상기 miRNA의 발현수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 miRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 명세서에서, "프라이머(primer)"는 짧은 자유 3말단 수산화기(free 3' hydroxl group)를 가지는 핵산 서열로, 상보적인 주형과 염기쌍을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 시점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA polymerase 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트(nucleotide triphosphate)의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.

[0049] 본 명세서에서, "프로브(probe)"는 miRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 수 개 내지 수백 개의 염기서열의 단편을 의미하며, 라벨링 되어있어서 상기 miRNA의 존재 유무, 발현량을 확인할 수 있다. 적절한 프로브 및 혼성화 조건은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.

[0051] 본 발명은 상기의 지방간 질환 진단용 조성물을 포함하는 지방간 질환 진단용 키트를 제공한다. 상기 키트는 지방간 질환이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에서 상기 miRNA의 발현수준을 측정하여 지방간 질환 발병 여부를 진단하는 데 사용될 수 있다.

[0052] 상기 지방간 질환 진단용 키트는 상기 miRNA 발현수준을 측정하는 제제 뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액, 또는 장치를 포함할 수 있다.

[0053] 예를 들어, 본 발명에 따른 키트는 PCR을 수행하기 위해 분석하고자 하는 시료로부터 유래된 게놈 DNA, 본 발명의 마커 유전자에 대해 특이적인 프라이머 세트, 적당량의 DNA 중합 효소, dNTP 혼합물, PCR 완충용액 및 물을 포함하는 키트일 수 있다. 상기 PCR 완충용액은 KCl, Tris-HCl 및 $MgCl_2$를 함유할 수 있다. 이외에 PCR 산물의 증폭 여부를 확인할 수 있는 전기영동 수행에 필요한 구성 성분들이 본 발명의 키트에 추가로 포함될 수 있다.

[0054] 또한, 본 발명에 따른 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오티드(dNTPs), Taq-폴리머레이즈 및 역전사 효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.

[0056] 또한, 본 발명은 환자로부터 분리된 시료로부터 miR-653 및 miR-493으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 miRNA의 발현수준을 측정하는 단계; 및 상기 miRNA의 발현수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계;를 포함하는 지방간 질환 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0057] 상기 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058] 상기 miRNA의 발현수준이 정상 대조군 시료의 발현수준보다 증가한 경우 지방간 질환일 가능성이 높은 것으로 판단할 수 있다.

[0059] 상기 miRNA의 발현수준은 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA: RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 마이크로어레이(microarray) 칩으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 방법으로 측정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0061] 또한, 본 발명은 miR-653 및 miR-493으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 miRNA를 유효성분으로 포함하는, 지방간 질환 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0062] 상기 miRNA는 지질 생성(lipogenesis)에 관여하는 유전자의 발현을 감소시켜 지방간 질환을 치료할 수 있다.

[0063] 보다 상세한 것은 하기 실험예에 의해 후술될 것이다.

[0065] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0067] **<실시예 1> 경로(pathway) 정보를 매개로 질병 RNA-seq 데이터를 결합하여 질병 전사체 데이터로부터 miRNA 타겟 발굴**

[0068] 종래 질병 전사체 데이터에서 miRNA 타겟 발굴을 위한 기존의 접근 방식에 따른 한계점을 극복하기 위해, miRNA 타겟, pathway 정보, RNA-seq 발현 데이터 및 질병유전자 정보의 통합 분석을 통해 특정 질병의 miRNA 조절 네트워크를 도출하는 3 단계의 새로운 접근 방식을 제시하였다 (도 2). 상세하게는 하기와 같으며, 지방간 질환을 대상 질병으로하여 관련 유전자를 직접 조절하는 최종 miRNA - 타겟 pathway 도출을 진행하였다.

[0070] 1 단계 : 통계적으로 유의한 miRNA - 타겟 pathway 선별

[0071] miRNA 타겟 정보 (DB : TargetScan, TargetRank, miRDB, miRanda, mirSVR 등) 및 pathway 정보 (DB : WikiPathway, Reactome, Biocarta, KEGG, Gene Ontology 등) 로부터 초기하분포(hypergeometric distribution)를 이용하여, 전체 370,000 여개의 유의한 중첩도를 갖는 miRNA - 타겟 pathway 조합을 선별하였다 (도 3).

[0073] 2 단계 : NAFLD에 특이적인 miRNA - pathway 타겟 유전자 선별

[0074] 상기 1 단계에서 선별된 miRNA - 타겟 pathway 조합과 비알코올성 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 유전자 발현 데이터 (RNA-seq)를 활용하여 NAFLD에 특이적인 miRNA - pathway 타겟 유전자를 선별하였다.

[0075] 하기 식 1과 같이 나타나는 조건부 초기하분포를 이용하여 교집합 영역에서 하향(down) 조절된 유전자 (RNA-seq)의 과포집 여부를 평가함으로써, 해당 miRNA가 교집합에 포함된 하향 조절 유전자들을 조절하는 것으로 예측할 수 있다 (도 4). 이 때, 하기의 조건부 초기하분포의 우측 꼬리를 이용해서 과포집 여부의 p-value를 평가할 수 있다.

[0076] <식 1>

$$\mathrm{P}(i \text{ overlap}) = \frac{\binom{O}{i}\sum_j \binom{O-i}{j}\binom{n_1-O}{k_1-i-j}\binom{n_2-i-j}{k_2-i}}{\binom{n_1}{k_1}\binom{n_2}{k_2}}$$

[0077]

[0078] 상기 식에서, n_1은 miRNA 타겟 유전자 수를, k_1은 상기 n_1 중 NAFLD 데이터에 의해 하향 조절된 유전자수를 의미하고, n_2는 pathway 타겟 유전자 수를, k_2는 상기 n_2 중 NAFLD 데이터에 의해 하향 조절된 유전자수를 의미한다.

[0079] O는 상기 miRNA 타겟 유전자 및 pathway 타겟 유전자의 중첩된 유전자 수를 나타내며, i는 그 중 NAFLD 데이터에 의해 하향 조절된 유전자수를 의미하며, j는 합계를 위한 인덱스이다.

[0080] 이 때, 상기 P 값이 0.05 이하인 결과를 사용하여 평가할 수 있다.

[0082] 3 단계 : 간 질환 유전자들을 직접 조절하는 miRNA 선별

[0083] 질병 유전자 데이터베이스 (DB : DisGeNet, CTD 등)에서 알려진 질병 관련 유전자들을 수집하고, 초기하분포를 이용하여 상기 2단계에서 선별한 타겟 유전자들 (도 4의 교집합 부분에서 하향 조절된 유전자들)과의 교집합을 평가하여, NAFLD에서 잘 알려진 유전자들을 직접 조절하는 miRNA들을 심화 선별하였다.

[0084] 본 실시예에서는 NAFLD 관련 miRNA 타겟 (TargetScan), pathway (WikiPathway), NASH 환자 샘플의 RNA-seq *(Hoang et al. 2019)* 를 분석한 결과, 500개의 유의한 miRNA가 도출되었고, 그 중 상위 20개의 리스트를 도 5에 나타내었다.

[0086] **<실시예 2> 선별된 miRNA에 의한 NAFLD 발병 기전 규명**

[0087] 상기 실시예 1에서 선별된 miRNA (miR-653, miR-493)와 NAFLD와의 관련성을 실험 검증하였다.

[0088] 선별된 miRNA의 서열정보는 하기와 같다.

[0089] - miR-653-5p : 5'-GUGUUGAAACAAUCUCUACUG-3'

[0090] - miR-493-5p : 5'-UUGUACAUGGUAGGCUUUCAUU-3'

[0092] 더불어, 하기 실험에 사용된 관련 유전자의 프라이머 서열정보는 표 2와 같다.

표 2

[0093]

유전자	프라이머(primer) 서열	
SIRT1	Forward (F)	CCCTCAAAGTAAGACCAGTAGC
	Reverse (R)	CACAGTCTCCAAGAAGCTCTAC
STAT5B	F	AGTGACTCAGAAATTGGCGG
	R	AGGTAATTCAAGTCTCCCAAGC
PPARGC1A	F	ACCAAACCCACAGAGAACAG
	R	GGGTCAGAGGAAGAGATAAAGTTG
IRS1	F	AAGTGATCCTGAAGCCCAAG
	R	TCACGAAGCTGATGGTCTTG
INSR	F	GGAAGTTACGTCTGATTCGAGG
	R	TGAGTGATGGTGAGGTTGTG
FOXO3	F	CAGATCTACGAGTGGATGGTG
	R	TCTTGCCAGTTCCCTCATTC
NR2C2	F	GTAACACGTACACAGACCTCTC
	R	GTGAAAACACTCAATGGGCC
EGFR	F	AAGCCATATGACGGAATCCC
	R	GGAACTTTGGGCGACTATCTG
PRKCA	F	CGGAATGGATCACACTGAGAAG
	R	ACATAAGGATCTGAAAGCCCG

[0095] 1. 세포 실험방법

[0096] HepG2 간 세포에 유리지방산 (free fatty acid, FFA)의 혼합물인 올레산(Oleic acid)/팔미트산(Palmitic acid) 혼합물(OA/PA mixture)를 처리하여, 생체 외 지방간 모델 (*in vitro* fatty liver)을 유도하였다. 유도된 지방간 모델에서 miR-653 및 miR-493에 의한 각각의 간 세포 내 지방 축적의 양상을 대조군과 비교하는 Oil-Red O 염색과 트리글리세라이드 및 콜레스테롤과 같은 대사 지표를 분석하였으며, 이러한 차이 양상을 규명하고자 SIRT1, STAT5B 및 이에 의한 지방 대사 관련 하위 신호전달과 유전자 발현을 비교 분석하였다. 또한, miR-653과 SIRT1, miR-493과 STAT5B 간의 직접적인 유전자 발현 조절 여부를 파악하기 위해 SIRT1과 STAT5B의 3 '-비번역 부위(UTR)를 각각 루시퍼레이즈 벡터에 클로닝하여 루시퍼레이즈 어세이를 진행하였다.

[0098] 2. 동물 모델 실험방법

[0099] 동물 모델의 경우, 마우스에 다양한 식이 방법 및 유전자 변형을 통해 비만에 의한 비 알코올성 지방간이 유도된 마우스 모델을 활용하였다.

[0100] 먼저, 가장 많이 활용되는 비만 유도 식이 방식인 고지방식이 (High-fat diet, HFD)의 경우, 12주간의 식이 섭취를 진행한 마우스 모델로부터 간 조직을 확보하였다.

[0101] 메티오닌(Methionine)/콜린(Choline) 결핍 식이(MCD)는 간에서 VLDL의 합성이 진행되지 못해 주변조직으로 지방을 전달하지 못하여 지속적으로 간에 지방이 축적되는 형태로인해 유도되는 비 알코올성 지방간 모델로, 6주간의 식이 섭취를 진행한 마우스 모델로부터 간 조직을 확보하였다.

[0102] 또한, 렙틴(Leptin)을 생성하지 못하는 유전자 변이 모델인 ob/ob 마우스 모델로부터 5주간의 정상 식이를 진행한 후, 간 조직을 확보하였다. 각각의 비만에 의해 유도된 비 알코올성 지방간 마우스 모델의 간 조직으로부터 RNA 레벨에서 대조군 대비 miR-653과 miR-493의 유전자 발현 레벨을 각각 파악하였다.

[0104] 3. 실험결과

[0105] miR-653의 경우, 도 6을 참조하면, 지방증(steatosis), 또는 비알코올성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 판정을 받은 환자 샘플 (A), 유리지방산(free fatty acid, FFA) 혼합물인 올레산(Oleic acid)/팔미트산(Palmitic acid) 혼합물(OA/PA mixture) 처리에 따른 간 세포 지방간 유도 모델 (B), 고지방식이(High-fat diet, HFD) 마우스 모델 (C), 메티오닌(Methionine)/콜린(Choline) 결핍 식이(MCD) 마우스 모델 (D), 유전자 변형에 의해 비만이 유도되는 ob/ob 마우스 모델 (E)에서 miR-653의 발현 양상을 확인한 결과, (E)의 ob/ob 마우스 모델 외 모두 miR-653의 발현이 유의적으로 크게 증가하는 것으로 나타났다.

[0106] 도 7을 참조하면, miR-653을 과발현 시킨 후 Oil Red O staining을 진행한 결과 (F), 세포에 FFA 혼합물(OA/PA)을 처리하여 *in vitro* 지방간을 유도한 경우 (miR-653 + OA/PA), 지질 축적이 더욱 증가함을 확인할 수 있었고, 이는 트리글리세라이드(Triglyceride) (G) 및 총 콜레스테롤(Total cholesterol) (H)을 측정하였을 때도 모두 유의성있게 증가하는 것으로 확인되었다.

[0107] 도 8을 참조하면, miR-653의 직접 타겟 유전자를 확인한 것으로, 대표적으로 SIRT1를 선정할 수 있다.

[0108] 도 9를 참조하면, SIRT1의 3' UTR 내에 miR-653과 상보적 서열이 있음을 확인 (K)하였고, 이를 바탕으로 타겟 분석을 진행하였다.

[0109] 그 결과, (L)에 나타난 바와 같이, WT(wild type)의 경우에는 miR-653 과발현에 의해 감소함을 확인할 수 있고, miR-653과 SIRT1의 3' UTR 내의 상보적 서열의 돌연변이 유발(mutagenesis)를 통해 MUT(mutant)를 제작하여 추가적으로 확인하였을 때, 이러한 변화가 약화(blunt)되는 것을 확인할 수 있었다.

[0110] 즉, 이를 통해 miR-653이 SIRT1을 직접적으로 조절함을 판단할 수 있다.

[0111] 더불어, 도 10을 참조하면, 지질 대사와 관련된 유전자들의 발현을 qPCR 기법을 통해 확인하였을 때, 지질생성(Lipogenesis)에 관여하는 SREBF1 및 FASN이 miR-NC (negative control) + OA/PA에 비해 miR-653 + OA/PA에서 유의성 있게 증가하는 것을 확인할 수 있다.

[0112] 이를 토대로 miR-653이 NAFLD 상태에서 증가하며, 지질생성에 관여하여 NAFLD를 조절할 것으로 예상된다.

[0114] miR-493의 경우, 도 11을 참조하면, 지방증(steatosis), 또는 비알코올성 지방간염(NASH) 판정을 받은 환자 샘플 (A), 유리지방산(FFA) 혼합물인 올레산/팔미트산(OA/PA) 혼합물 처리에 따른 간 세포 지방간 유도 모델 (B), 고지방식이(HFD) 마우스 모델 (C), 메티오닌/콜린 결핍 식이(MCD) 마우스 모델 (D), 유전자 변형에 의해 비만이 유도되는 ob/ob 마우스 모델 (E)에서 miR-493의 발현 양상을 확인한 결과, (A), (B), 및 (D)에서 miR-493의 발현이 유의적으로 크게 증가하는 것으로 나타났으며, (A)에서 지방증과 비알코올성 지방간염 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

[0115] 도 12를 참조하면, miR-493을 과발현 시킨 후 Oil Red O staining을 진행한 결과 (F), 세포에 FFA 혼합물(OA/PA)을 처리하여 *in vitro* 지방간을 유도한 경우 (miR-653 + OA/PA), 지질 축적이 더욱 증가함을 확인할 수 있었고, 이는 트리글리세라이드(Triglyceride) (G) 및 총 콜레스테롤(Total cholesterol) (H)을 측정하였을 때도 모두 유의성있게 증가하는 것으로 확인되었다.

[0116] 도 13을 참조하면, miR-493의 직접 타겟 유전자를 확인한 것으로, 대표적으로 STAT5B를 선정할 수 있다.

[0117] 도 14를 참조하면, STAT5B 의 3' UTR 내에 miR-493과 상보적 서열이 있음을 확인 (K)하였고, 이를 바탕으로 타겟 분석을 진행하였다.

[0118] 그 결과, (L)에 나타난 바와 같이, WT의 경우에는 miR-493 과발현에 의해 감소함을 확인할 수 있고, miR-493과 STAT5B의 3' UTR 내의 상보적 서열의 돌연변이 유발(mutagenesis)를 통해 MUT(mutant)를 제작하여 추가적으로 확인하였을 때, 이러한 변화가 약화되는 것을 확인할 수 있었다.

[0119] 즉, 이를 통해 miR-493이 STAT5B를 직접적으로 조절함을 판단할 수 있다.

[0120] 더불어, 도 15를 참조하면, 지질 대사와 관련된 유전자들의 발현을 qPCR 기법을 통해 확인하였을 때, 지질생성에 관여하는 SREBF1 및 FASN이 miR-NC + OA/PA에 비해 miR-493 + OA/PA에서 유의성 있게 증가하는 것을 확인할

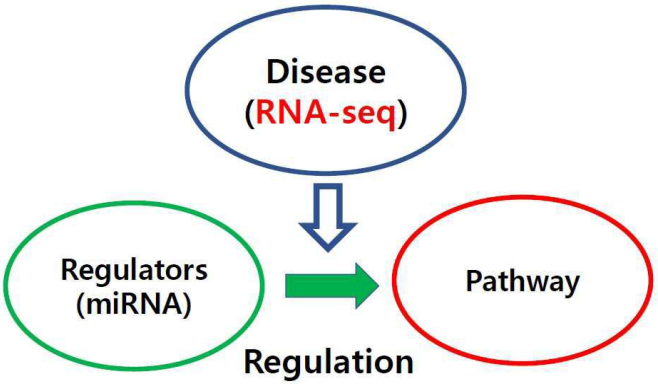
수 있다.

[0121] 이를 토대로 miR-493이 NAFLD 상태에서 증가하며, 지질생성에 관여하여 NAFLD를 조절할 것으로 예상된다.

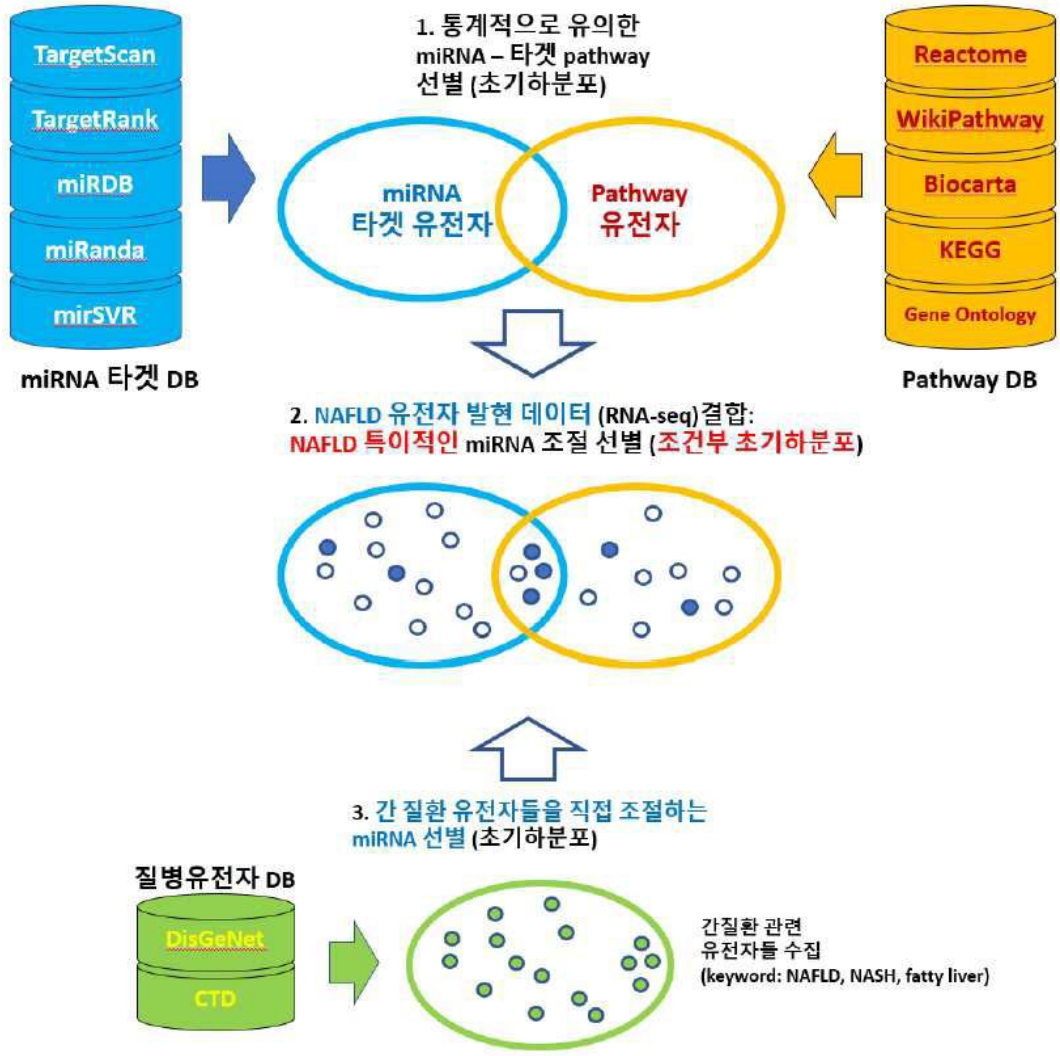
[0123] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며,이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다. 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

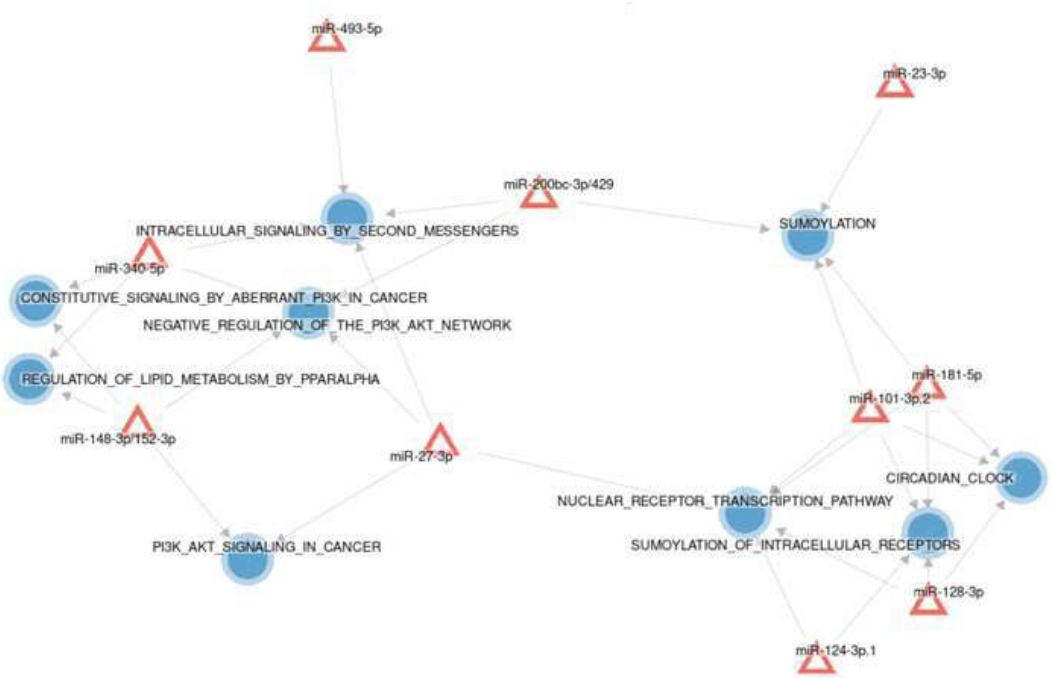
도면1



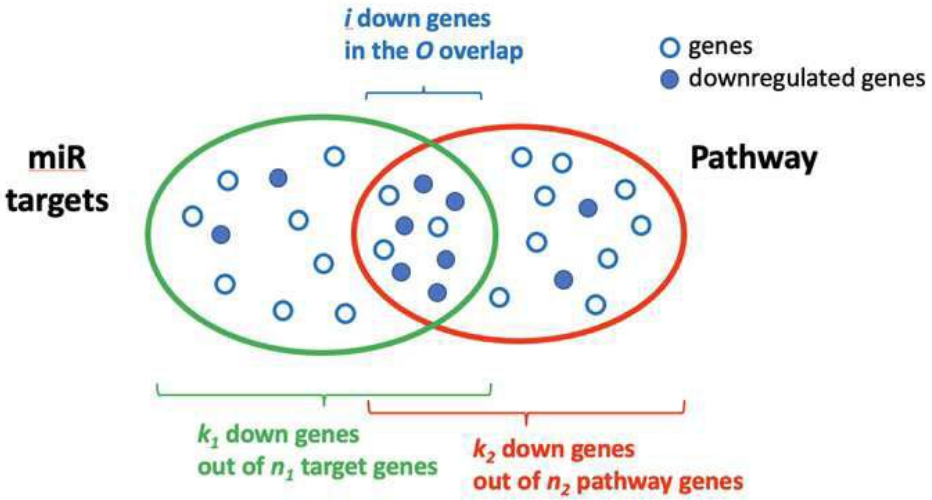
도면2


TargetScan
TargetRank
miRDB
miRanda
mirSVR
miRNA 타겟 DB
1. 통계적으로 유의한
miRNA – 타겟 pathway
선별 (초기하분포)
miRNA
타겟 유전자
Pathway
유전자
Reactome
WikiPathway
Biocarta
KEGG
Gene Ontology
Pathway DB
2. NAFLD 유전자 발현 데이터 (RNA-seq)결합:
NAFLD 특이적인 miRNA 조절 선별 (조건부 초기하분포)
3. 간 질환 유전자들을 직접 조절하는
miRNA 선별 (초기하분포)
질병유전자 DB
DisGeNet
CTD
간질환 관련
유전자들 수집
(keyword: NAFLD, NASH, fatty liver)

도면3



도면4

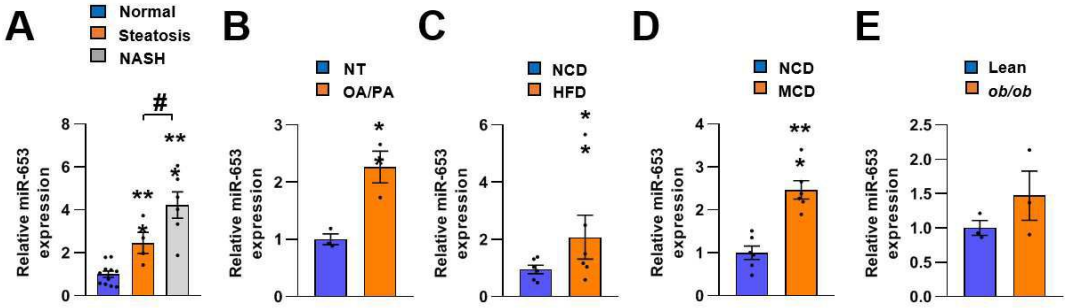


$$\mathrm{P}(i \text{ overlap}) = \frac{\binom{O}{i}\sum_j \binom{O-i}{j}\binom{n_1-O}{k_1-i-j}\binom{n_2-i-j}{k_2-i}}{\binom{n_1}{k_1}\binom{n_2}{k_2}}$$

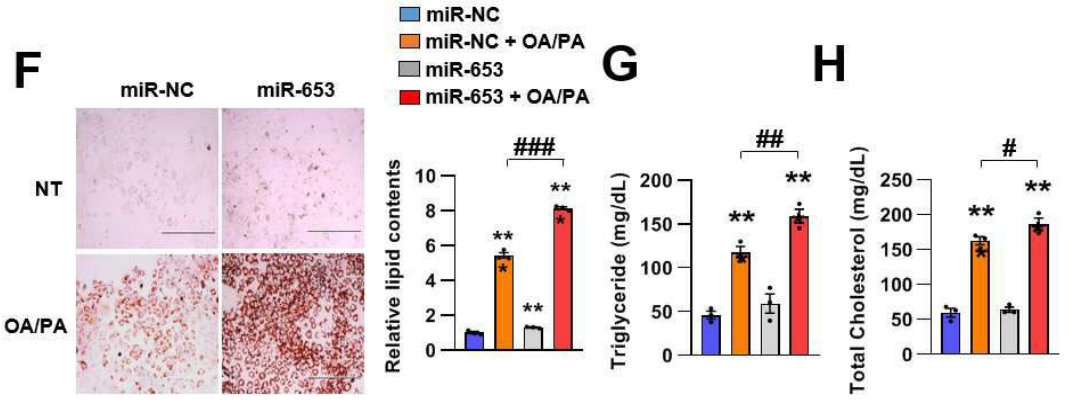
도면5

		1단계 초기하 p-value	2단계 조건부 초기하 p-value	3단계 질병유전자들과 초기하 p-value	
miR-23-3p	WP_ADIPOGENESIS	0.029666	1.05E-05	0.000448	CELF1 ,EPAS1 ,MEF2A ,NCOA1 ,NCOA2 ,PCK2 ,PPARGC1A
miR-219-5p	WP_NUCLEAR_RECEPTORS	0.00325	0.002285	0.000448	ESR1 ,NR2C2 ,NR5A2 ,RORA ,THRB
miR-129-5p	WP_NUCLEAR_RECEPTORS	0.022692	0.002296	0.000448	ESR2 ,HNF4A ,NR2C2 ,RORA ,THRB
miR-653-5p	WP_ADIPOGENESIS	0.216497	0.002753	0.000448	CELF1 ,IGF1 ,IRS1 ,NCOA2 ,PPARGC1A
miR-181-5p	WP_NUCLEAR_RECEPTORS	0.094161	0.003872	0.000448	ESR1 ,NR2C2 ,PPARA ,RORA ,THRB
miR-19-3p	WP_NUCLEAR_RECEPTORS	0.086435	0.004103	0.000448	AR ,ESR1 ,PPARA ,RORA ,THRB
miR-27-3p	WP_ADIPOGENESIS	0.001919	0.000992	0.000552	BMP3 ,CELF1 ,EPAS1 ,IGF1 ,IRS1 ,LPIN1 ,NCOA1 ,RORA
miR-148-3p/152-3p	WP_FOCAL_ADHESIONPI3KAKTMTORSIGNALING_PATHW	0.010919	0.001146	0.000552	CDKN1B ,EGFR ,EPAS1 ,IGF1 ,ITGB8 ,MET ,PPARGC1A ,PRK
miR-340-5p	WP_ADIPOGENESIS	0.156731	2.37E-05	0.001401	CYP26B1 ,EPAS1 ,IGF1 ,IRS1 ,NCOA1 ,NCOA2 ,RBL2 ,SREBI
miR-200bc-3p/429	WP_INSULIN_SIGNALING	0.002885	0.000256	0.001401	AKT2 ,GAB1 ,IKBKB ,IRS1 ,MAP3K5 ,PDPK1 ,PRKCA ,PTPN1
miR-17-5p/20-5p/93-5p/106	WP_NUCLEAR_RECEPTORS	0.047231	0.000729	0.001576	ESR1 ,NR2C2 ,PPARA ,RORA ,RORC ,THRB
miR-653-5p	WP_FACTORS_AND_PATHWAYS_AFFECTING_INSULINLIK	0.097216	0.004743	0.001772	ACVR2B ,IGF1 ,IRS1 ,PPARGC1A
miR-101-3p.2	WP_SREBF_AND_MIR33_IN_CHOLESTEROL_AND_LIPID_	0.04511	0.005967	0.001772	ABCA1 ,PPARA ,PPARGC1A ,PRKAA1
miR-493-5p	WP_AGERAGE_PATHWAY	0.066347	0.006326	0.001772	EGFR ,INSR ,PRKCA ,STAT5B
miR-340-5p	WP_ONCOSTATIN_M_SIGNALING_PATHWAY	0.227754	0.008886	0.001772	IRS1 ,MAPK14 ,PRKCA ,STAT5B
miR-219-5p	WP_SUDDEN_INFANT_DEATH_SYNDROME_SIDS_SUSCEI	0.209883	0.010026	0.001772	PKNOX1 ,PPARGC1A ,RORA ,THRB
miR-29-3p	WP_FACTORS_AND_PATHWAYS_AFFECTING_INSULINLIK	0.069608	0.013964	0.001772	IGF1 ,IRS1 ,MSTN ,PPARGC1A
miR-103-3p/107	WP_NUCLEAR_RECEPTORS	0.035817	0.014091	0.001772	ESR1 ,NR2C2 ,RORA ,THRB
miR-9-5p	WP_NUCLEAR_RECEPTORS	0.189837	0.014287	0.001772	AR ,NR5A2 ,PPARA ,RORA
miR-124-3p.1	WP_NUCLEAR_RECEPTORS	0.250174	0.014878	0.001772	AR ,NR2C2 ,NR5A2 ,THRB

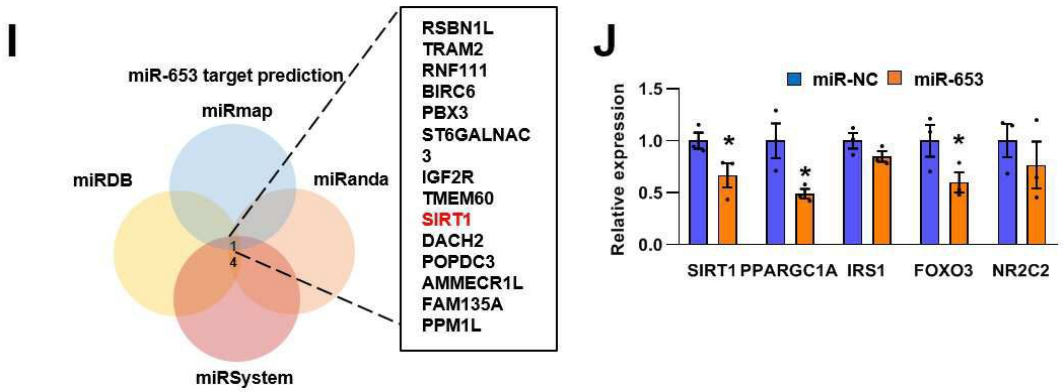
도면6



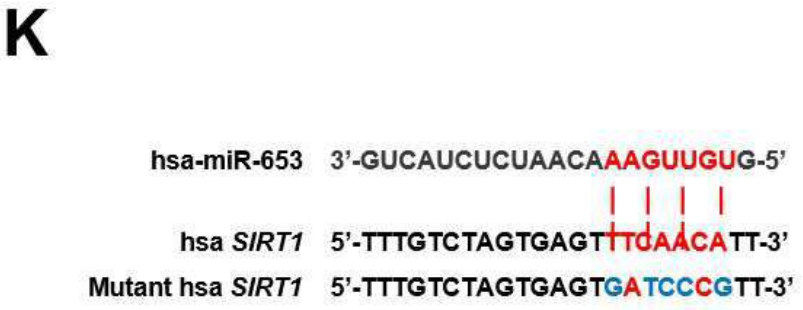
도면7

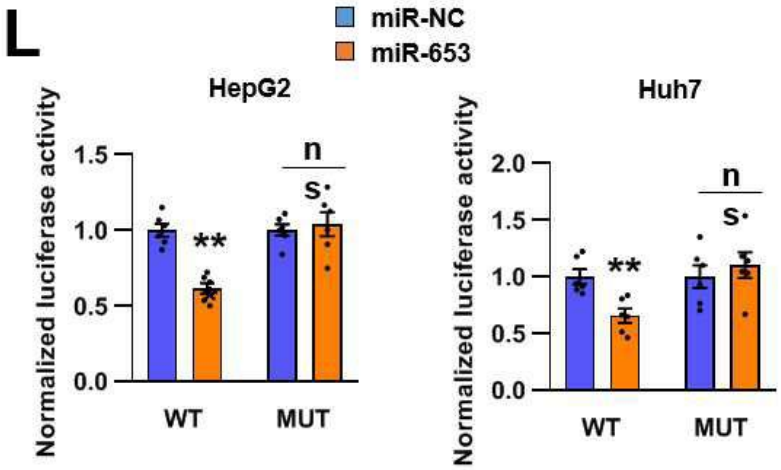


도면8

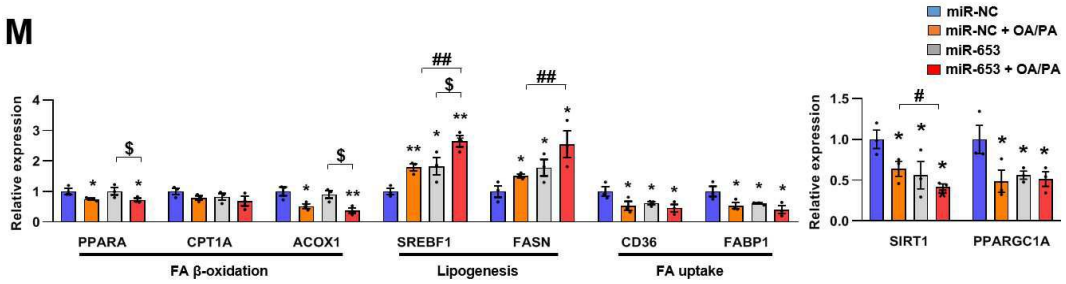

I
miR-653 target prediction
miRmap
miRDB
miRanda
miRSystem
RSBN1L
TRAM2
RNF111
BIRC6
PBX3
ST6GALNAC 3
IGF2R
TMEM60
SIRT1
DACH2
POPDC3
AMMECR1L
FAM135A
PPM1L
J
miR-NC
miR-653
Relative expression
SIRT1
PPARGC1A
IRS1
FOXO3
NR2C2

도면9

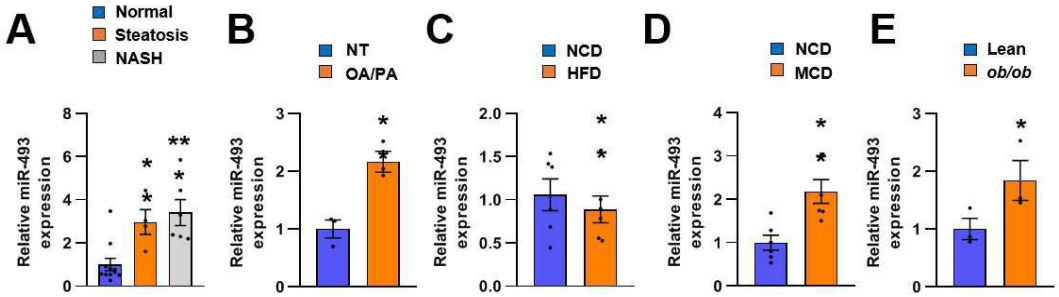

K
hsa-miR-653 3'-GUCAUCUCUAACAAAGUUGUG-5'
hsa SIRT1 5'-TTTGTCTAGTGAGTTTCAACATT-3'
Mutant hsa SIRT1 5'-TTTGTCTAGTGAGTGATCCCGTT-3'


L
miR-NC
miR-653
HepG2
Huh7
Normalized luciferase activity
WT
MUT
ns

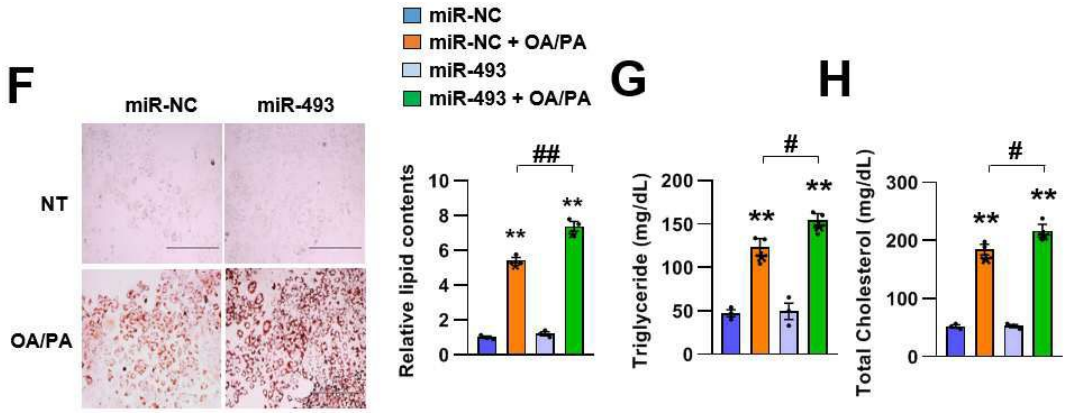
도면10



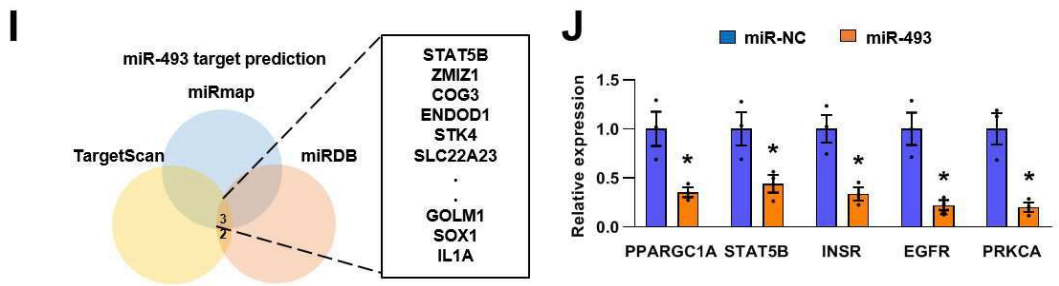
도면11



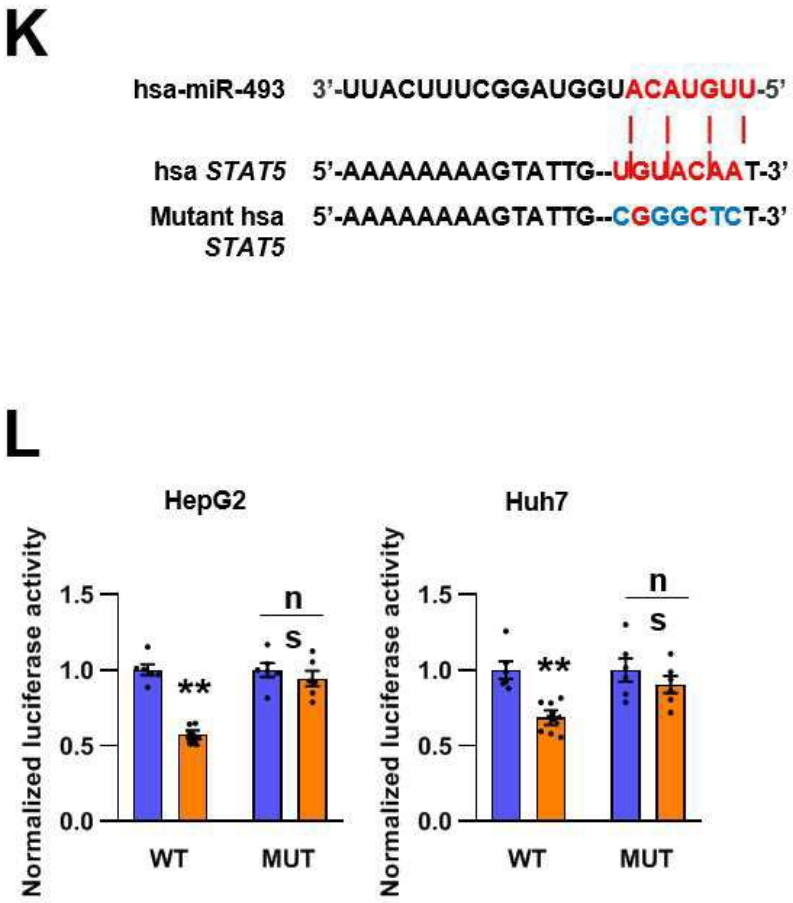
도면12



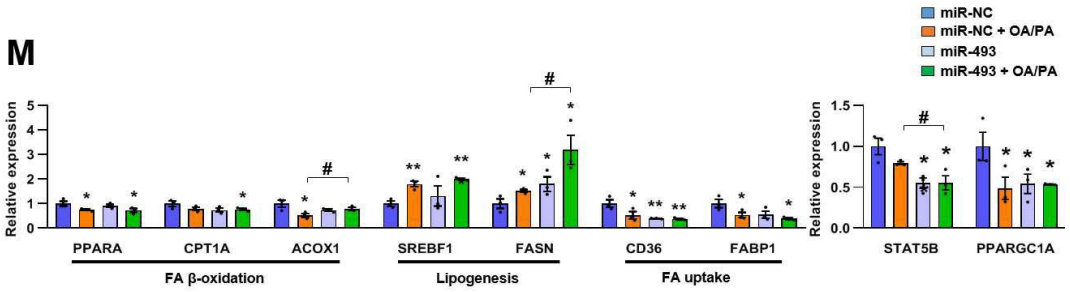
도면13



도면14


K
hsa-miR-493 3'-UUACUUUCGGAUGGUACAUGUU-5'
hsa STAT5 5'-AAAAAAAAGTATTG--UGUACAAT-3'
Mutant hsa STAT5 5'-AAAAAAAAGTATTG--CGGGCTCT-3'
L
HepG2
Huh7
Normalized luciferase activity
1.5
1.0
0.5
0.0
**
n
s
WT
MUT

도면15


M
miR-NC
miR-NC + OA/PA
miR-493
miR-493 + OA/PA
Relative expression
PPARA
CPT1A
ACOX1
SREBF1
FASN
CD36
FABP1
STAT5B
PPARGC1A
FA β-oxidation
Lipogenesis
FA uptake
#

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.