



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0125582
(43) 공개일자 2022년09월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6883 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6883 (2022.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0029603

(22) 출원일자 2021년03월05일

심사청구일자 2021년03월05일

(71) 출원인

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자

김태범

서울특별시 서초구 잠원로8길 35, 101동 3202호(잠원동, 래미안 신반포 팰리스)

(74) 대리인

이명진

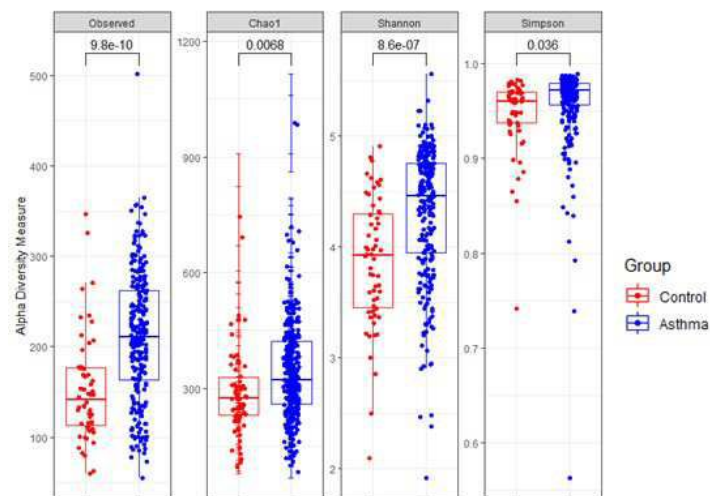
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 호기 응축물 시료를 이용한 세균 메타게놈 분석 방법

(57) 요약

본 발명은 호기 응축물 시료를 이용한 세균 메타게놈 분석 방법 등에 관한 것으로, 본 발명의 호기 응축물을 시료로 하여 세균 메타게놈 분석을 수행하는 경우, 비침습적 진단이 가능함에 따라, 간단, 신속, 경제적으로 세균 메타게놈 분석 및 질환의 진단이 가능할 것으로 기대된다.

대표도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711117337
과제번호	2019M3E5D3073367
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	오믹스기반정밀의료기술개발사업(R&D)
연구과제명	COREA 천식 코호트기반 정밀의료 실현
기 여 율	1/1
과제수행기관명	서울아산병원
연구기간	2019.09.01 ~ 2024.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

하기의 단계를 포함하는, 천식 진단을 위한 정보제공방법:

- (a) 정상인 및 피검자의 호기 응축물(EBC) 시료에서 분리한 세포막 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;
- (b) 상기 추출한 DNA에 대하여 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하는 단계; 및
- (c) 상기 PCR 산물의 서열분석을 통하여 정상인 유래 샘플과 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 비교하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 (c) 단계에서 스펅고모나스(Sphingomonas), 아커만시아(Akkermansia), 메틸로파가(Methylophaga), 아시도셀라(Acidocella), 마리노박터(Marinobacter), 아시네토박터(Acinetobacter), 스태필로코커스(Staphylococcus), 비피도박테리움(Bifidobacterium), 블루티아(Blutia), 콜린셀라(Collinsella), 로티아(Rothia), 래크노스피라세아 UCG-008(Lachnospiraceae UCG-008), 및 유박테리움 할리([Eubacterium] hallii)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 속(genus) 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 비교하는 것을 특징으로 하는, 천식 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 (c) 단계에서, 정상인 유래 샘플과 비교하여,

스펜고모나스(Sphingomonas), 아커만시아(Akkermansia), 메틸로파가(Methylophaga), 아시도셀라(Acidocella), 및 마리노박터(Marinobacter)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 속(genus) 세균 유래 세포막 소포의 함량이 증가되어 있는 경우 천식으로 진단하는 것을 특징으로 하는, 천식 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 (c) 단계에서, 정상인 유래 샘플과 비교하여,

아시네토박터(Acinetobacter), 스태필로코커스(Staphylococcus), 비피도박테리움(Bifidobacterium), 블루티아(Blutia), 콜린셀라(Collinsella), 로티아(Rothia), 래크노스피라세아 UCG-008(Lachnospiraceae UCG-008), 및 유박테리움 할리([Eubacterium] hallii)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 속(genus) 세균 유래 세포막 소포의 함량이 감소되어 있는 경우 천식으로 진단하는 것을 특징으로 하는, 천식 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 5

하기의 단계를 포함하는, 세균 메타게놈 분석 방법:

- (a) 정상인 및 피검자의 호기 응축물(EBC) 시료에서 분리한 세포막 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;

- (b) 상기 추출한 DNA에 대하여 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하는 단계; 및
- (c) 상기 PCR 산물의 서열분석을 통하여 정상인 유래 샘플과 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 비교하는 단계.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 (c) 단계에서 스펅고모나스(Sphingomonas), 아커만시아(Akkermansia), 메틸로파가(Methylophaga), 아시도셀라(Acidocella), 마리노박터(Marinobacter), 아시네토박터(Acinetobacter), 스태필로코커스(Staphylococcus), 비피도박테리움(Bifidobacterium), 블루티아(Blutia), 콜린셀라(Collinsella), 로티아(Rothia), 락크노스피라세아 UCG-008(Lachnospiraceae UCG-008), 및 유박테리움 할리([Eubacterium] hallii)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 속(genus) 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 비교하는 것을 특징으로 하는, 세균 메타게놈 분석 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 세균 메타게놈 분석 방법은 질환의 진단을 위한 정보 제공에 사용되는 것을 특징으로 하는, 세균 메타게놈 분석 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 호기 응축물 시료를 이용한 세균 메타게놈 분석 방법 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 미생물총(microbiota 혹은 microbiome)은 주어진 거주지에 존재하는 세균(bacteria), 고세균(archaea), 진핵생물(eukarya)을 포함한 미생물 군집(microbial community)을 말하고, 장내 미생물총은 사람의 생리현상에 중요한 역할을 하며, 인체 세포와 상호작용을 통해 인간의 건강과 질병에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 우리 몸에 공생하는 세균은 다른 세포로의 유전자, 단백질 등의 정보를 교환하기 위하여 나노미터 크기의 소포(vesicle)를 분비한다. 점막은 200 나노미터(nm) 크기 이상의 입자는 통과할 수 없는 물리적인 방어막을 형성하여 점막에 공생하는 세균인 경우에는 점막을 통과하지 못하지만, 세균 유래 소포는 크기가 대개 100 나노미터 크기 이하라서 비교적 자유롭게 점막을 통과하여 우리 몸에 흡수된다.

[0004] 환경 유전체학이라고도 불리는 메타게놈학은 환경에서 채취한 샘플에서 얻은 메타게놈 자료에 대한 분석학이라고 할 수 있다. 최근 16s 리보솜 RNA(16s rRNA) 염기서열을 기반으로 한 방법으로 인간의 미생물총의 세균 구성을 목록화하는 것이 가능해졌으며, 16s 리보솜 RNA의 유전자인 16s rDNA 염기서열을 차세대 염기서열분석(next generation sequencing, NGS) 플랫폼을 이용하여 분석한다.

[0005] 한편, 호기 응축물은 기체의 형태로 배출되는 것이다 보니, 그 응축액에서 얼마나 많은 연구 분석이 가능할지에 대해 연구자들의 의문이 존재하였다. 특히 세포막 소포를 이용한 메타게놈 분석은 최근 시도되기 시작한 연구 방법으로, 호기 응축물을 세균 메타게놈 분석의 시료로 적용한 예시는 찾아보기 어려웠다.

[0006] 또한, 호기 응축물을 시료로 하여 세균 유래 소포에 존재하는 메타게놈 분석을 통해 질환의 원인인자를 동정하고 질환을 예측하는 방법에 대해서는 보고된 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 국내공개특허 제10-2019-0041899호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 호기 응축물을 시료로 하여 세균 메타게놈 분석을 수행하고, 호기 응축물 시료로 사용하여 간단하면서도 비침습적으로 세균 메타게놈 분석을 수행함으로써, 질환을 진단할 수 있음을 확인하였는 바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0010] 이에, 본 발명은 호기 응축물을 시료로 하는 세균 메타게놈 분석 방법 등을 제공하는 것을 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

[0013] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 세균 메타게놈 분석 방법을 제공한다.

[0014] (a) 정상인 및 피검자의 호기 응축물(EBC) 시료에서 분리한 세포막 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;

[0015] (b) 상기 추출한 DNA에 대하여 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하는 단계; 및

[0016] (c) 상기 PCR 산물의 서열분석을 통하여 정상인 유래 샘플과 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 비교하는 단계.

[0017] 또한, 하기의 단계를 포함하는, 천식 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0018] (a) 정상인 및 피검자의 호기 응축물(EBC) 시료에서 분리한 세포막 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;

[0019] (b) 상기 추출한 DNA에 대하여 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하는 단계; 및

[0020] (c) 상기 PCR 산물의 서열분석을 통하여 정상인 유래 샘플과 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 비교하는 단계.

[0021] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 천식의 발병 위험도 예측방법을 제공한다:

[0022] (a) 정상인 및 피검자의 호기 응축물(EBC) 시료에서 분리한 세포막 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;

[0023] (b) 상기 추출한 DNA에 대하여 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및

[0024] (c) 상기 PCR 산물의 서열분석을 통하여 정상인 유래 샘플과 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 비교하는 단계.

[0025] 본 발명의 일 구현예로, 상기 (c) 단계에서 스펅고모나스(Sphingomonas), 아커만시아(Akkermansia), 메틸로파가(Methylophaga), 아시도셀라(Acidocella), 마리노박터(Marinobacter), 아시네토박터(Acinetobacter), 스태필로코커스(Staphylococcus), 비피도박테리움(Bifidobacterium), 블루티아(Blutia), 콜린셀라(Collinsella), 로티아(Rothia), 락크노스피라세에 UCG-008(Lachnospiraceae UCG-008), 및 유박테리움 할리([Eubacterium] hallii)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 속(genus) 세균 유래 세포막 소포의 함량 증감을 비교할 수 있는

나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0026] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 세균 메타게놈 분석 방법은 질환의 진단을 위한 정보 제공에 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 (c) 단계에서, 정상인 유래 샘플과 비교하여, 스팅고모나스(*Sphingomonas*), 아커만시아(*Akkermansia*), 메틸로파가(*Methylophaga*), 아시도셀라(*Acidocella*), 및 마리노박터(*Marinobacter*)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 속(genus) 세균 유래 세포막 소포의 함량이 증가되어 있는 경우 천식으로 진단할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 (c) 단계에서, 정상인 유래 샘플과 비교하여, 아시네토박터(*Acinetobacter*), 스타필로코커스(*Staphylococcus*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 블루티아(*Blutia*), 콜린셀라(*Collinsella*), 로티아(*Rothia*), 래크노스피라세아 UCG-008(*Lachnospiraceae* UCG-008), 및 유박테리움 할리([*Eubacterium*] *hallii*)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 속(genus) 세균 유래 세포막 소포의 함량이 감소되어 있는 경우 천식으로 진단할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0030] 본 발명자들은 비침습적으로 질환을 진단할 수 있는 호기 응축물을 사용하여, 세균 메타게놈을 수행하였다. 이에, 본 발명에 따른 호기 응축물 샘플을 이용한 세균 유래 세포막 소포의 메타게놈 분석을 통해 질환(특히, 천식) 발병의 위험도를 미리 진단함으로써 질환 위험군을 조기에 진단 및 예측 가능하며, 또한 적절한 관리를 통해 발병 시기를 늦추거나 발병을 예방할 수 있다. 이에 더하여, 발병 후에도 조기진단 할 수 있어 질환의 발병률을 낮추고 치료 효과를 높일 수 있을 것으로 기대된다. 즉, 본 발명의 호기 응축물을 시료로 하여 세균 메타게놈 분석을 수행하는 경우, 비침습적 진단이 가능함에 따라, 간단, 신속, 경제적으로 세균 메타게놈 분석 및 질환의 진단이 가능할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1a는 정상 대조군 및 천식 호기 응축물(EBC) 샘플의 알파 다양성을 OTU, Chao1, Shnnon 및 Simpson 다양성 지수를 기반으로 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- 도 1b는 정상 대조군 및 천식군 EBC 샘플 간 Bray-Curtis 거리를 측정하고, 샘플 간 차이를 PCoA 플롯으로 시각화한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2a는 호산구성 천식 및 비호산구성 천식 EBC 샘플의 알파 다양성을 OTU, Chao1, Shnnon 및 Simpson 다양성 지수를 기반으로 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2b는 호산구성 천식 및 비호산구성 천식 EBC 샘플 간 Bray-Curtis 거리를 측정하고, 샘플 간 차이를 PCoA 플롯으로 시각화한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3a는 정상 대조군 및 천식군에서 미생물 EV의 평균 속 수준의 구성을 나타낸 것이다.
- 도 3b는 대조군 및 천식군의 각 EBC 샘플에서 속의 차등 상대적 존재비 값을 나타낸 히트맵이다.
- 도 3c는 대조군 및 천식군의 EBC 샘플 내 속 수준에서의 유의한 차이를 나타내는 미생물을 상대적 존재비로 나타낸 것이다 (* $P < 0.05$ 및 ** $P < 0.01$).
- 도 4a는 호산구성 천식 및 비호산구성 천식 환자의 EBC 샘플 내 미생물 EV의 문(Phylum) 수준의 평균 상대적 풍부도를 나타낸 것이다.
- 도 4b는 호산구성 천식 및 비호산구성 천식 환자의 EBC 샘플 내 문(Phylum)수준의 차등 상대적 존재비 값을 나타낸 히트맵이다.
- 도 5a는 호산구성 천식 및 비호산구성 천식 환자의 EBC 샘플 내 미생물 EV의 속 수준의 평균 상대적 풍부도를 나타낸 것이다.
- 도 5b는 호산구성 천식 및 비호산구성 천식 환자의 EBC 샘플 내 속 수준의 차등 상대적 존재비 값을 나타낸 히

트랩이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0036] 본 발명은 호기 응축물을 시료로 하는 세균 메타게놈 분석 방법 및 상기 방법을 이용한 질환을 진단하는 방법과 관련한 것으로서, 본 발명자들은 정상인 및 피검자 유래 호기 응축물 시료를 이용해 세균 유래 세포밖 소포로부터 유전자를 추출하고 이에 대하여 메타게놈 분석을 수행하였으며, 질환의 원인인자로 작용할 수 있는 세균 유래 세포밖 소포를 동정하였다.
- [0037] 이에, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 세균 메타게놈 분석 방법을 제공한다.
- [0038] (a) 정상인 및 피검자의 호기 응축물(EBC) 시료에서 분리한 세포밖 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;
- [0039] (b) 상기 추출한 DNA에 대하여 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하는 단계; 및
- [0040] (c) 상기 PCR 산물의 서열분석을 통하여 정상인 유래 샘플과 세균 유래 세포밖 소포의 함량 증감을 비교하는 단계.
- [0041] 본 발명에서, 상기 (c) 단계에서 스펡고모나스(*Sphingomonas*), 아커만시아(*Akkermansia*), 메틸로파가(*Methylophaga*), 아시도셀라(*Acidocella*), 마리노박터(*Marinobacter*), 아시네토박터(*Acinetobacter*), 스태필로코커스(*Staphylococcus*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 블루티아(*Blutia*), 콜린셀라(*Collinsella*), 로티아(*Rothia*), 래크노스피라세에 UCG-008(*Lachnospiraceae* UCG-008), 및 유박테리움 할리(*[Eubacterium] hallii*)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 속(genus) 세균 유래 세포밖 소포의 함량 증감을 비교할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명에서, 상기 세균 메타게놈 분석 방법은 질환의 진단을 위한 정보 제공에 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명에서, 상기 (c) 단계에서, 정상인 유래 샘플과 비교하여, 스펡고모나스(*Sphingomonas*), 아커만시아(*Akkermansia*), 메틸로파가(*Methylophaga*), 아시도셀라(*Acidocella*), 및 마리노박터(*Marinobacter*)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 속(genus) 세균 유래 세포밖 소포의 함량이 증가되어 있는 경우 천식으로 진단할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 (c) 단계에서, 정상인 유래 샘플과 비교하여, 아시네토박터(*Acinetobacter*), 스태필로코커스(*Staphylococcus*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 블루티아(*Blutia*), 콜린셀라(*Collinsella*), 로티아(*Rothia*), 래크노스피라세에 UCG-008(*Lachnospiraceae* UCG-008), 및 유박테리움 할리(*[Eubacterium] hallii*)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 속(genus) 세균 유래 세포밖 소포의 함량이 감소되어 있는 경우 천식으로 진단할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명에서 사용되는 용어, “호기 응축물(Exhaled breath condensate, EBC)”이란 수집 장치(보통 냉장 장치를 사용하며, 4℃ 또는 영하의 온도를 유지)를 이용한 냉각을 통해 응축된 날숨을 통한 배출물을 의미하는 것일 수 있으나, 인간의 기도를 통해 배출된 호기를 포함하는 경우 이에 제한되지 않는다. EBC는 저렴한 비용으로 얻을 수 있는 비침습적 시료로 알려져 있으나, EBC를 세균 메타게놈 분석에 사용하거나, 기타 질환을 선별 또는 진단하는 데 이용할 수 있다는 효과가 아직 완전히 입증된 바 없다.
- [0046] 본 발명서에서 사용된 용어, “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)(예컨대, 전-전이성 또는 전이성 암 상태의 동정, 암의 단계 결정 또는 치료에 대한 암의 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)를 포함한다.
- [0047] 본 발명에서 사용된 용어, “정보제공방법(method for providing information)”이란, 질환의 진단에 관한 정보를 제공하는 방법으로서, 호기 응축물을 시료로 하여 얻은 세포밖 소포 유래 마이크로바이옴을 분석함으로써,

특정 세균 유래 세포밖 소포의 분포 및 증감을 확인함으로써 질환의 발병이나 발병 가능성(위험성)에 대한 정보를 획득하는 방법을 의미한다.

- [0048] 본 발명에서 사용되는 용어, “질환”이란 호기 응축물을 시료로 하여 세균 메타게놈 분석을 수행함으로써 진단할 수 있는 질환이라면 제한되지 않는다. 본 발명의 질환은 질병(disease), 또는 병(sickness)과 혼용될 수 있다. 상기 질환은 예를 들어, 소화기 질환, 호흡기 질환, 신장 질환, 내분비 질환, 알레르기성 질환, 류마티스성 질환, 골 질환, 감염성 질환, 유전성 질환, 대사성 질환, 암, 정신 질환, 안구 질환 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명에서 사용되는 용어, “호흡기 질환”은 천식, 폐기종, 폐렴, 결핵, 폐 고혈압, 폐암, 신생아 기관지폐 형성 장애증, 만성 폐쇄성 폐질환, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 세기관지염, 기관지 확장증, 과민증, 폐실질염, 급성 연기 흡입, 열에 의한 폐 손상, 낭포성 섬유증, 허파파리 단백질증, 알파-1-프로테아제 결핍, 폐 염증성 장애, 급성 호흡 곤란 증후군, 급성 폐 손상, 특발성 호흡 곤란 증후군 및 특발성 폐 섬유증으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명에서 사용되는 용어, “천식 진단”이란 환자에 대하여 천식이 발병할 가능성이 있는지, 천식이 발병할 가능성이 상대적으로 높은지, 또는 천식이 이미 발병하였는지 여부를 판별하는 것을 의미한다. 본 발명의 방법은 임의의 특정 환자에 대한 천식 발병 위험도가 높은 환자로서 특별하고 적절한 관리를 통하여 발병 시기를 늦추거나 발병하지 않도록 하는데 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 천식을 조기에 진단하여 가장 적절한 치료방식을 선택함으로써 치료를 결정하기 위해 임상적으로 사용될 수 있다.
- [0051] 본 발명에서 사용되는 용어, “천식”은 여러가지 자극에 대한 기도의 과민반응성(bronchial hyperresponsiveness)을 특징으로 하는 질환으로 만성 기도 염증(chronic airway inflammation)을 일으키며 기도의 광범위한 협착에 의해 발생하는 천명(喘鳴), 호흡곤란, 기침 등의 임상 증세들이 나타나는 질환이다. 또한, 본 발명의 천식은 호산구성 천식 및 비호산구성 천식을 모두 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 본 발명에서 사용되는 용어, “메타게놈(metagenome)”이란 “군유전체”라고도 하며, 흙, 동물의 장 등 고립된 지역 내의 모든 바이러스, 세균, 곰팡이 등을 포함하는 유전체의 총합을 의미하는 것으로, 주로 배양이 되지 않는 미생물을 분석하기 위해서 서열분석기를 사용하여 한꺼번에 많은 미생물을 동정하는 것을 설명하는 유전체의 개념으로 쓰인다. 특히, 메타게놈은 한 종의 게놈 또는 유전체를 말하는 것이 아니라, 한 환경단위의 모든 종의 유전체로서 일종의 혼합유전체를 말한다. 이는 오믹스적으로 생물학이 발전하는 과정에서 한 종을 정의할 때 기능적으로 기존의 한 종뿐만 아니라, 다양한 종이 서로 상호작용하여 완전한 종을 만든다는 관점에서 나온 용어이다. 기술적으로는 빠른 서열분석법을 이용해서, 종에 관계없이 모든 DNA, RNA를 분석하여, 한 환경 내에서의 모든 종을 동정하고, 상호작용, 대사작용을 규명하는 기법의 대상이다. 본 발명에서는 바람직하게 호기 응축물에서 분리한 세균 유래 세포밖 소포를 이용하여 메타게놈 분석을 실시하였다.
- [0053] 본 발명에서, 상기 세균 메타게놈 분석은 호기 응축물에서 얻은 세포외 소포의 유래 세균의 문(phylum), 강(class), 목(order), 과(family), 및/또는 속(genus) 수준을 분석 및 동정하는 것을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 또한, 하기의 단계를 포함하는, 천식 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0055] (a) 정상인 및 피검자의 호기 응축물(EBC) 시료에서 분리한 세포밖 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;
- [0056] (b) 상기 추출한 DNA에 대하여 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하는 단계; 및
- [0057] (c) 상기 PCR 산물의 서열분석을 통하여 정상인 유래 샘플과 세균 유래 세포밖 소포의 함량 증감을 비교하는 단계.
- [0058] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 천식의 발병 위험도 예측방법을 제공한다:
- [0059] (a) 정상인 및 피검자의 호기 응축물(EBC) 시료에서 분리한 세포밖 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;
- [0060] (b) 상기 추출한 DNA에 대하여 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및
- [0061] (c) 상기 PCR 산물의 서열분석을 통하여 정상인 유래 샘플과 세균 유래 세포밖 소포의 함량 증감을 비교하는 단계.

[0063] 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.

[0065] [실시예]

[0066] **실험예 1. 피험자 및 샘플 수집**

[0067] 호기 응축물(EBC)은 2014년 9월부터 2019년 12월까지 서울아산병원에서 건강한 대조군 58명과 천식 환자 251명을 대상으로 수집하였다. 건강한 대조군은 호흡기 질환 유무로 선별되었으며, 서울아산병원에서 실시하는 정기 건강 검진에서 폐 질환의 현재 또는 이전 병력이 없는 경우 모집되었다. 천식 환자의 자격 기준은 다음과 같다: (1) 18세 이상의 환자; (2) 3개월 이상 호흡 곤란, 천명 또는 기침과 같은 증상; 및 (3) 유발 테스트에서 메타콜린 16mg/mL(PC20)를 사용한 1초 강제 호기량(FEV1)이 20% 감소하거나, 속효성 베타 작용제의 흡입 후 FEV1가 12% 이상 증가하는 (및 최소 200mL) 기도 가역성과 같은 기도 과민 반응 증상을 나타냄. 또한, 심각한 폐 손상, 기관지 확장증 또는 폐 절제 이력이 있는 환자는 제외하였다. 참가자의 EBC 샘플은 RTube™ (Respiratory Research, Austin, USA)를 사용하여 수집하였다. 모든 참가자로부터 사전 동의를 얻었으며 연구 프로토콜은 서울아산병원 기관 심의위원회 (IRB No. 2006-0388)의 승인을 받았다.

[0069] **실험예 2. 샘플 처리 및 16S rDNA 시퀀싱**

[0070] 수집된 EBC 샘플은 메타게놈 시퀀싱을 위한 샘플 처리까지 -20℃에서 R-튜브에 보관하였다. 샘플 부피가 상대적으로 적기 때문에 모든 EBC 샘플에 1x 인산염 완충 식염수 용액(Welgene, 경산, 대한민국)을 첨가하여 각 샘플에 대해 총 1mL의 부피로 만들었다. 그 후 시료를 10분(10,000 × g, 4℃) 동안 원심 분리하고, 상층액을 수집하고 0.22 μm 필터를 통과시켜 세포나 불필요한 입자를 제거하였으며, 용액을 살균하였다. 여과액을 100℃의 온도에서 40분 동안 처리하고 원심분리(13,000 rpm, 4℃)에서 30분 동안 이중막으로 둘러싸인 세포막 소포(EV)에서 DNA를 추출하였다. 수득된 상층액 내의 DNA는 DNeasy PowerSoil 키트 (QIAGEN, Germany) 내 제공된 지침에 따라 추출하고 QIAxpert (QIAGEN, Germany) 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다. 각 샘플에 포함된 16S rDNA의 V3-V4 초가변 영역을 증폭하고 라이브러리를 준비하고 정량화하였다. 생성된 모든 16S rDNA 앰플리콘은 MiSeq (Illumina, USA)를 사용하여 시퀀싱하였다. 하기 표 1에 나타난 16s rDNA primer로 PCR을 수행하여 상기 추출된 유전자에 세균 유래 유전자가 존재하는 것을 확인하였다.

표 1

primer		서열	서열번호
16S rDNA	16S_V3_F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG	1
	16S_V4_R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC	2

[0073] **실험예 3. EBC 샘플의 분류학적 프로파일링**

[0074] 참가자의 EBC 샘플에서 분리된 미생물 EV의 16S 기반 미생물 군집 분류 (Taxonomic assignment)는 프로파일링 프로그램 MDx-Pro ver.2 (MD Healthcare, Korea)로 수행하였다. paired-end 리드를 바코드에 따라 필터링하고, 프라이머 서열을 Cutadapt (버전 1.1.6)를 사용하여 트리밍한 다음, CASPER와 병합하였다. 고품질 시퀀싱 리드를 수득하기 위해, 350 bp 미만 또는 550 bp 초과 리드, 및 20 미만의 Phred 품질 점수를 갖는 서열을 제외하였다. VSEARCH de novo 클러스터링 방법을 사용하여 97 % 유사성 임계값을 기준으로, OTU(Operational Taxonomic Unit)를 속 수준에서 분류하였다. 이어서, 모든 샘플에서 분류학적 할당(taxonomic assignment)에는 Silva 132 database를 사용하였다.

[0076] **실험예 4. 통계 분석**

[0077] 알파 다양성은 관찰된 종 풍부도를 계산하기 위해 phyloseq R 패키지를 사용하였으며, 추정된 종 풍부도에 대해

Chao1을 사용하여 확인하였다. 또한, 샤넨 및 심슨 지수를 이용하여 희귀도를 1091로 설정하여 종 균등성 및 및 풍부도에 대해 확인하였다. 베타 다양성 테스트는 기본 ‘Stats’ R 패키지를 사용하여 건강한 대조군과 천식군 간의 불일치를 결정하기 위해 Principal coordinate analysis (PCoA)를 사용하여 수행하였다. 대조군과 천식군 간의 통계적 차이를 평가하기 위하여 t-검정을 수행하였다. p 값이 0.05 미만 ($p < 0.05$) 일 때 결과가 유의한 것으로 간주하였고, 모든 분석은 R 버전 3.6.3을 사용하여 수행하였다.

실시예 1. 임상적 특성

건강한 대조군 58명과 천식 환자 251명을 포함하여 총 309명의 참가자로부터 EBC 샘플을 얻었다 (표 2). 건강한 대조군과 천식 그룹의 평균 연령은 각각 50.8세 (SD 14.4)와 32.4세 (SD 7.2)였다. 건강한 대조군의 성비 (여성/남성)는 1.6이었고 천식 그룹의 성비는 2.4로 천식 환자는 여성에 더 치우친 것으로 나타났다. 251명의 천식 환자의 임상적 특징은 표 3에 나타내었다.

표 2

그룹	기관	수	성별 (여/남)	나이 [mean (SD)]
건강한 대조군	서울아산병원	58	1.6	50.8 (SD: 14.4)
천식 환자	서울아산병원	251	2.4	32.4 (SD: 7.2)

표 3

	천식 환자군 (n=251)
나이 (years)	49.2 ± 14.1
성별 (여성, %)	61.5
BMI	24.4 ± 3.5
흡연 (%)	
흡연경험 없음	59.0
흡연경험 있으나, 현재 비흡연	24.6
흡연자	16.4
아토피 (%)	
ACT(asthma control test) 점수	16.4 ± 4.5
총 IgE (kU/L)	419.7 ± 599.3
FEV1, pred, pre-BD (%)	71.3 ± 18.4
FEV1/FVC (%)	69.9 ± 12.3
객담 호산구 (%)	17.7 ± 22.4
혈액 호산구, 절대량(/ μ L)	455.1 ± 483.7

실시예 2. 알파 및 베타 다양성

EV 미생물 군집의 기준 차등 특성을 결정하기 위하여, 대조군 및 천식 EBC 샘플에서 종 균등성 뿐만 아니라 종 풍부도를 기반으로 알파 다양성을 평가하였다.

도 1a에 나타난 바와 같이, 천식군은 4가지 검증 모두에서 알파 다양성이 유의하게 더 높은 것으로 나타났다($p < 0.05$). 관찰된 OTU 및 Chao1 추정치는 천식 EBC 샘플에서 더 높은 종 풍부도를 나타내었다. Chao1은 관찰된 OTU 값과 비교하여, 보통 수준의 증가를 나타냈다. 유사하게, 샤넨 및 심슨 다양성 지수에서도 건강한 대조군보다 천식 군에서 더 높은 알파 다양성 측정치를 보여주었으며, 샤넨 다양성 지수에서 천식 환자군의 다양성 수치가 가장 극적으로 증가하였다.

도 1b에 나타난 바와 같이, PCoA(모든 대조군 및 천식 환자 샘플의 Bray-Curtis 거리 기준)는 20.13%의 제1 주요 좌표(PCo1)를 보인 반면, 제2 주요 좌표(PCo2)는 8.1%의 값을 보였다. 일반적으로 건강한 대조군에 속하는

EBC 샘플은 PCo1 축을 따라 0.0 미만으로 클러스터링되었고 PCo2 축을 따라 고르게 분포되었다. 대조군과 동일한 군집에 천식 환자 샘플이 일부 포함되어 있었지만, 대부분의 천식 샘플은 PCo1 축의 0.3 값과 PCo2 축의 0.0 근처에서 밀집되어 군집에 포함된 대조군 샘플은 몇 개뿐이었다.

[0088] 호산구성 및 비호산 구성 천식 환자의 EBC 샘플에 대한 다양성 평가는 4가지 알파 다양성 메트릭 또는 베타 다양성에 대한 PCoA 플롯에서 유의한 차이를 나타내지 않았다($p > 0.05$) (도 2a 및 도 2b).

[0090] **실시예 3. 속(genus) 수준에서 미생물 EV 풍부 및 바이오마커 확인**

[0091] EBC 샘플에서 분리된 미생물 EV의 분류학적 프로파일링을 수행한 결과, 가장 유의한 속을 밝혔다.

[0092] 도 3a에 나타난 바와 같이, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Bacteroides* 및 *Sphingomonas*가 천식 환자의 EBC 샘플에서 가장 흔한 미생물 속임이 밝혀졌다. *Acinetobacter*는 대조군(13.0%)과 천식(5.4%) EBC 샘플에서 가장 흔한 미생물 EV 속이었고, 건강한 대조군에서 *Staphylococcus*(5.2%)와 *Pseudomonas*(5.0%), *Sphingomonas*(5.0%) 및 *Bacteroides*(4.0 %)가 그 뒤를 이었다.

[0093] 또한, 도 3b에 나타난 바와 같이, 히트맵을 사용하여 건강한 대조군과 천식군에서 가장 일반적인 25가지 미생물 EV 속의 평균 상대적 풍부도를 비교한 결과, 각 샘플 내에서 그룹 간에 차이가 있음을 확인하였다.

[0094] 또한, 미생물 EV 속의 평균 상대적 풍부도에 대한 t-테스트 분석을 통해, 대조군과 천식군 간에 유의한 차이를 나타내는 군을 산출하였다.

[0095] 도 3c에 나타난 바와 같이, 건강한 대조군에서 발견된 5개의 가장 흔한 속은 *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Bifidobacterium*, *Blautia* 및 *Collinsella*였으며, *Sphingomonas*, *Akkermansia*, *Methylophaga*, *Acidocella* 및 *Marinobacter*는 천식군과 비교하여 그 수준이 유의하게 낮은 5개 속이었다 ($p < 0.05$).

[0096] 또한, 도 4a, 도 4b, 도 5a 및 도 5b에 나타난 바와 같이, 비호산구성 천식과 호산구성 천식 환자에서 얻은 EBC 샘플의 미생물 EV 프로파일 간의 구성 변화를 평가한 결과, 문(phylum)과 속(genus) 수준에서 뚜렷한 차이가 관찰되지 않았다.

[0098] 하기 표 4에 호기 응축물에서의 세균 유래 EV 분석 결과를 간략히 나타내었다.

표 4

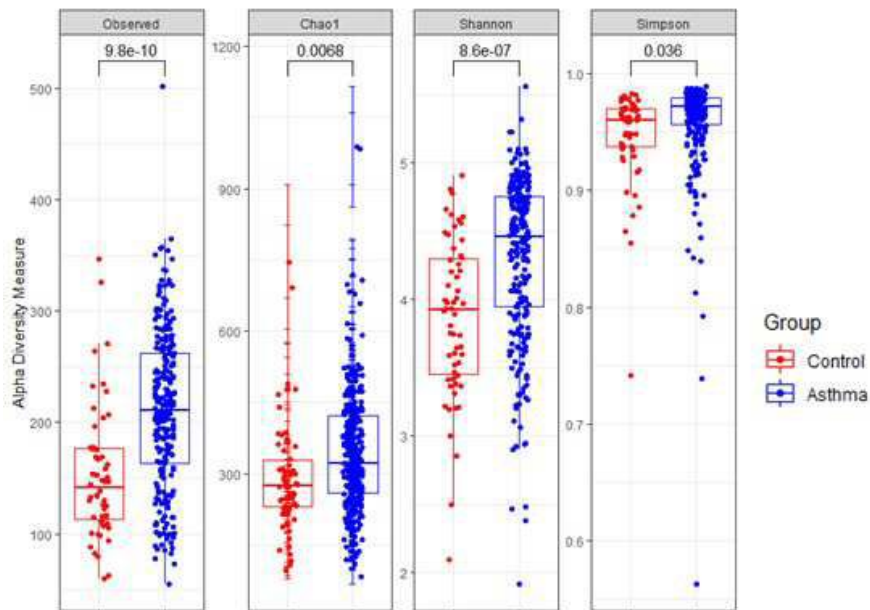
[0099]

정상 대조군 대비 천식 환자에서의 증감		증가	감소
호기 응축물	속 (genus)	<i>Sphingomonas</i> <i>Akkermansia</i> <i>Methylophaga</i> <i>Acidocella</i> <i>Marinobacter</i>	<i>Acinetobacter</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Blautia</i> <i>Collinsella</i> <i>Rothia</i> <i>Lachnospiraceae</i> UCG-008 [<i>Eubacterium</i>] <i>hallii</i>

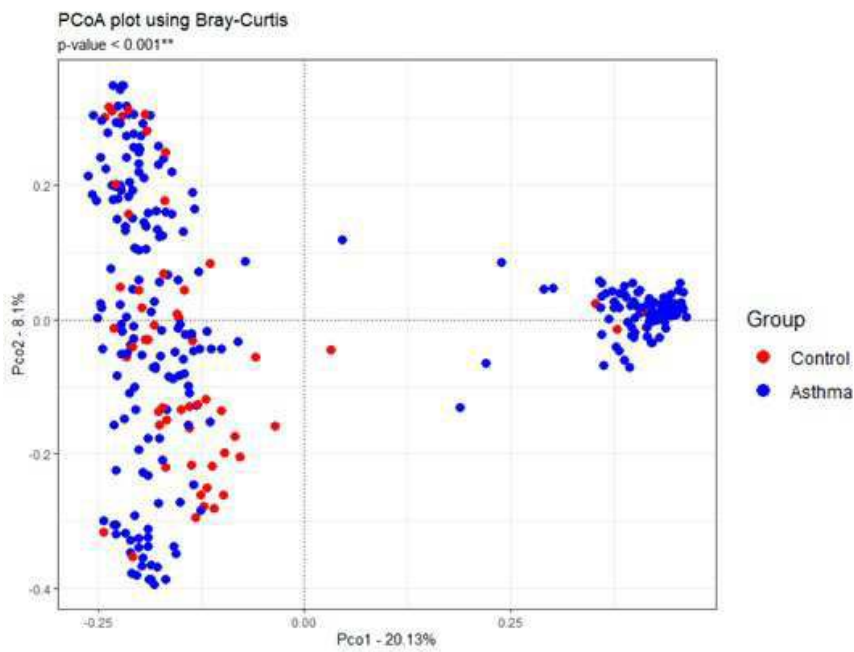
[0101] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

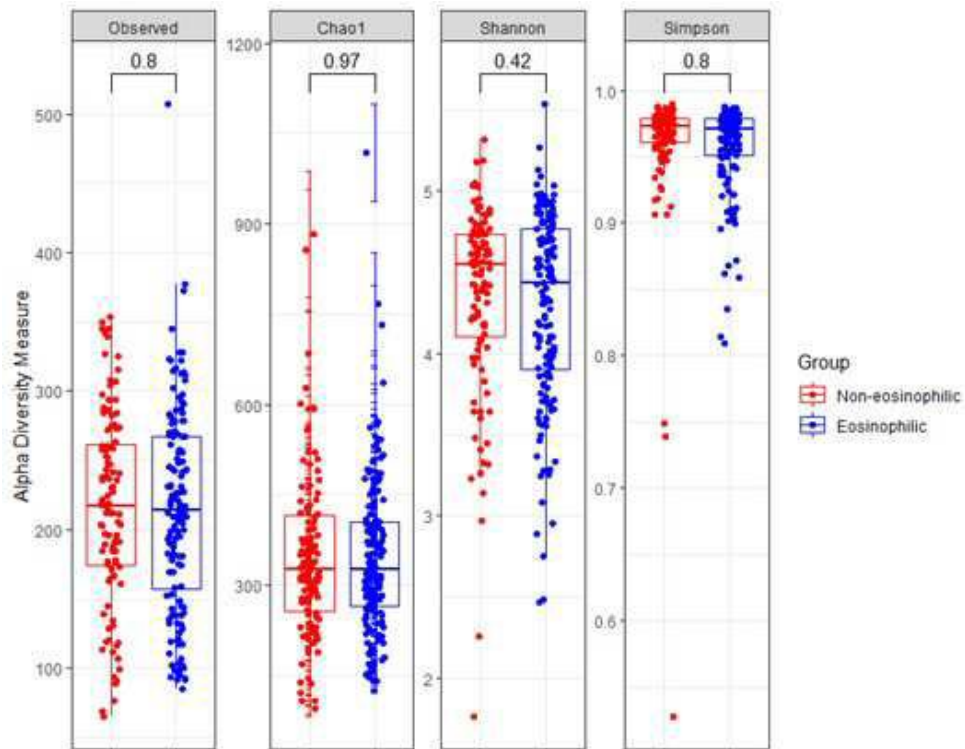
도면1a



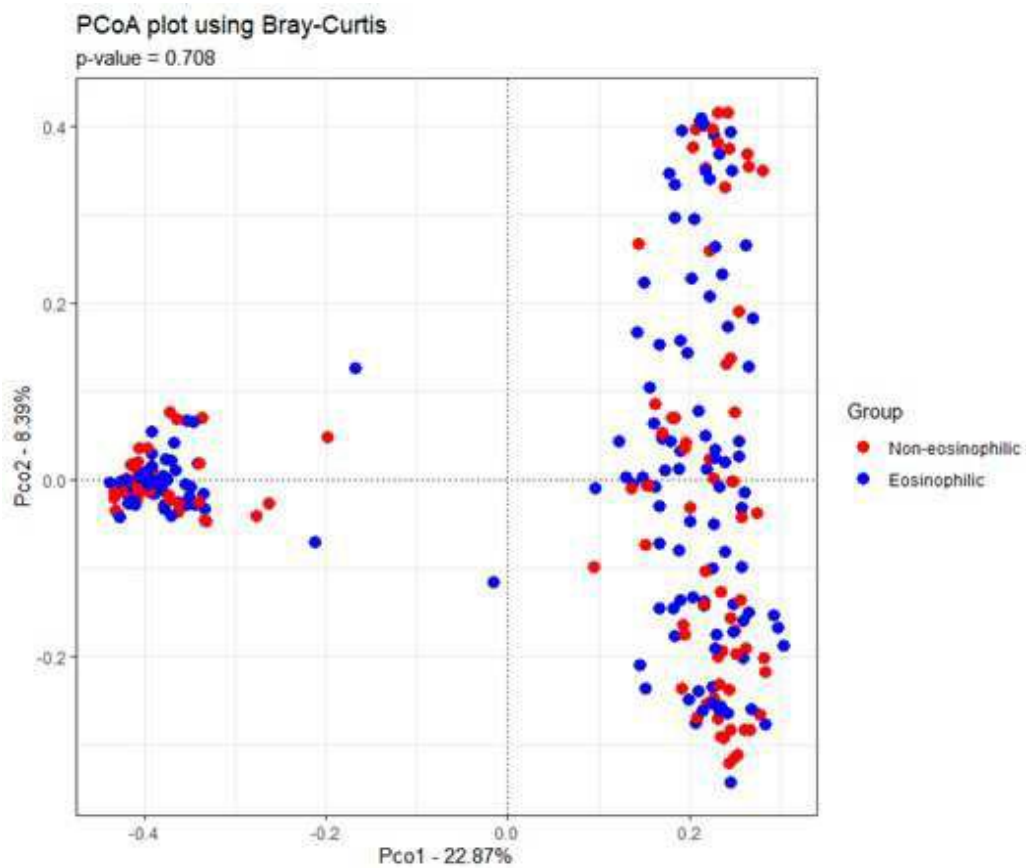
도면1b



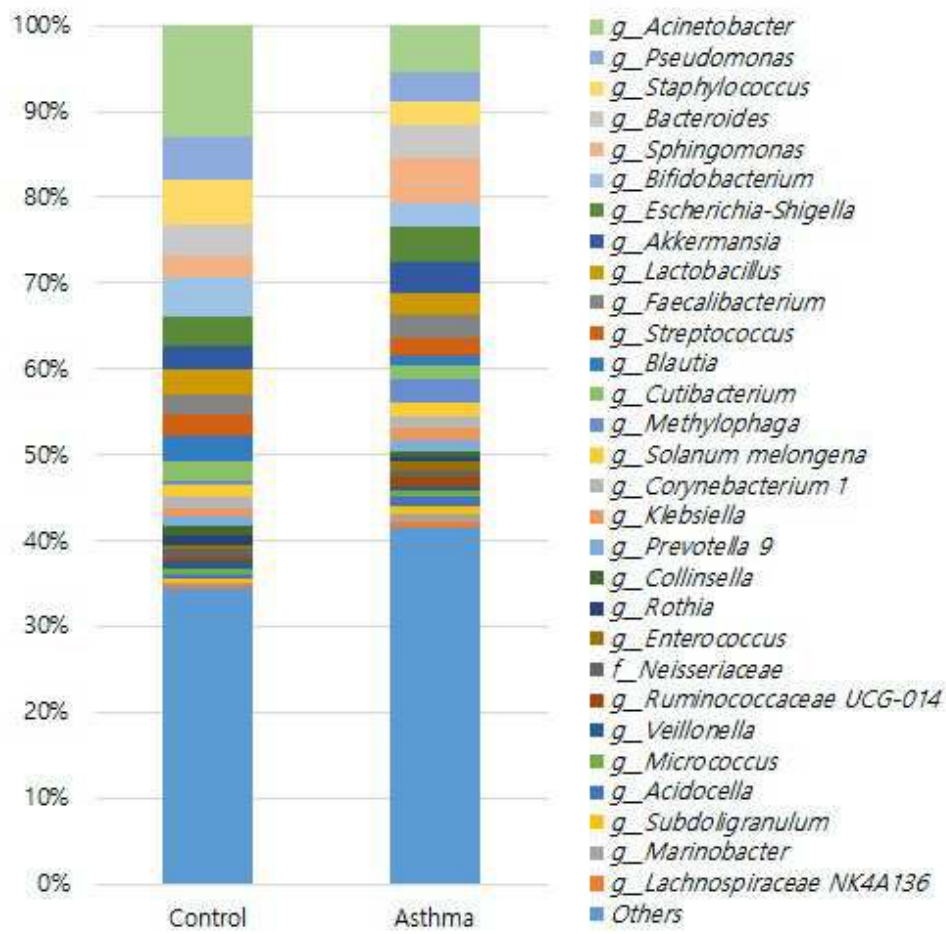
도면2a



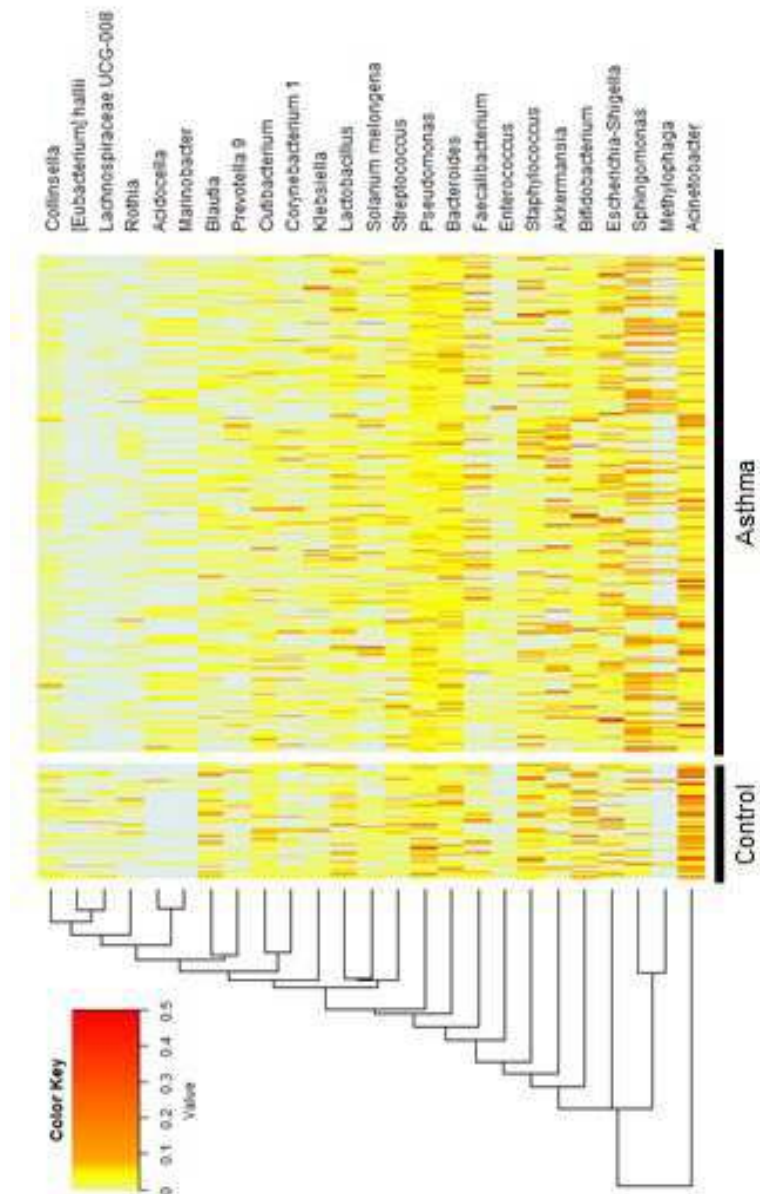
도면2b



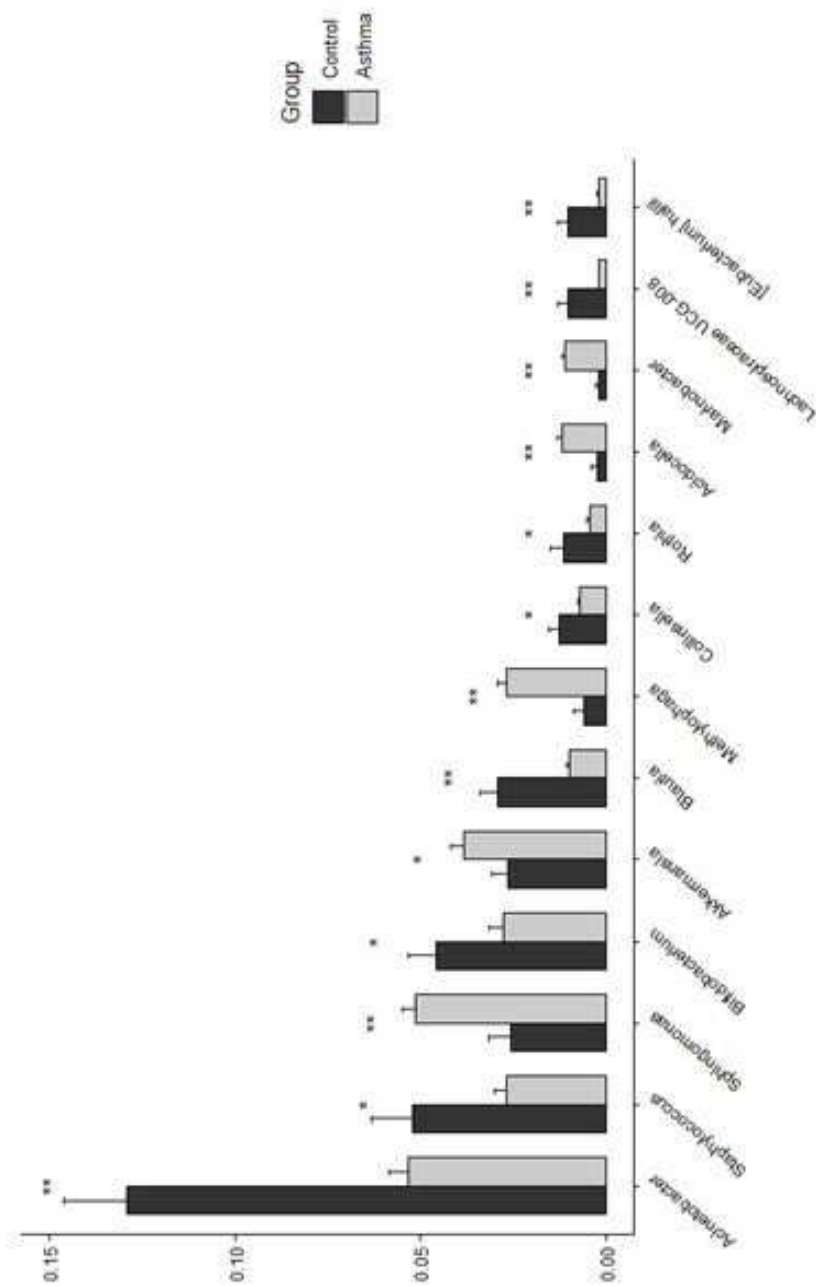
도면3a



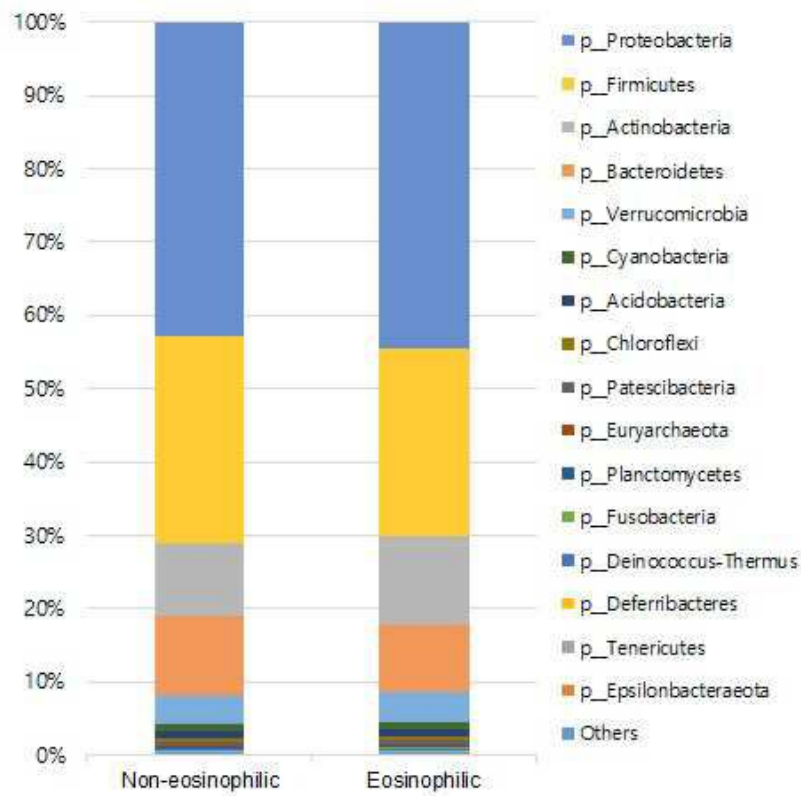
도면3b



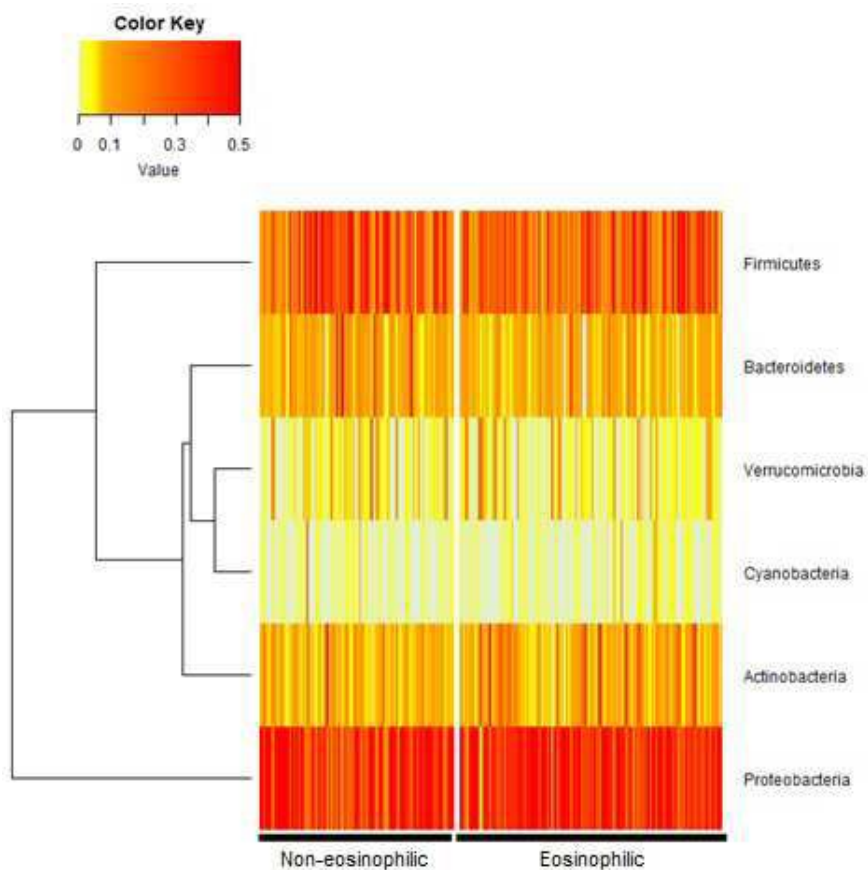
도면3c



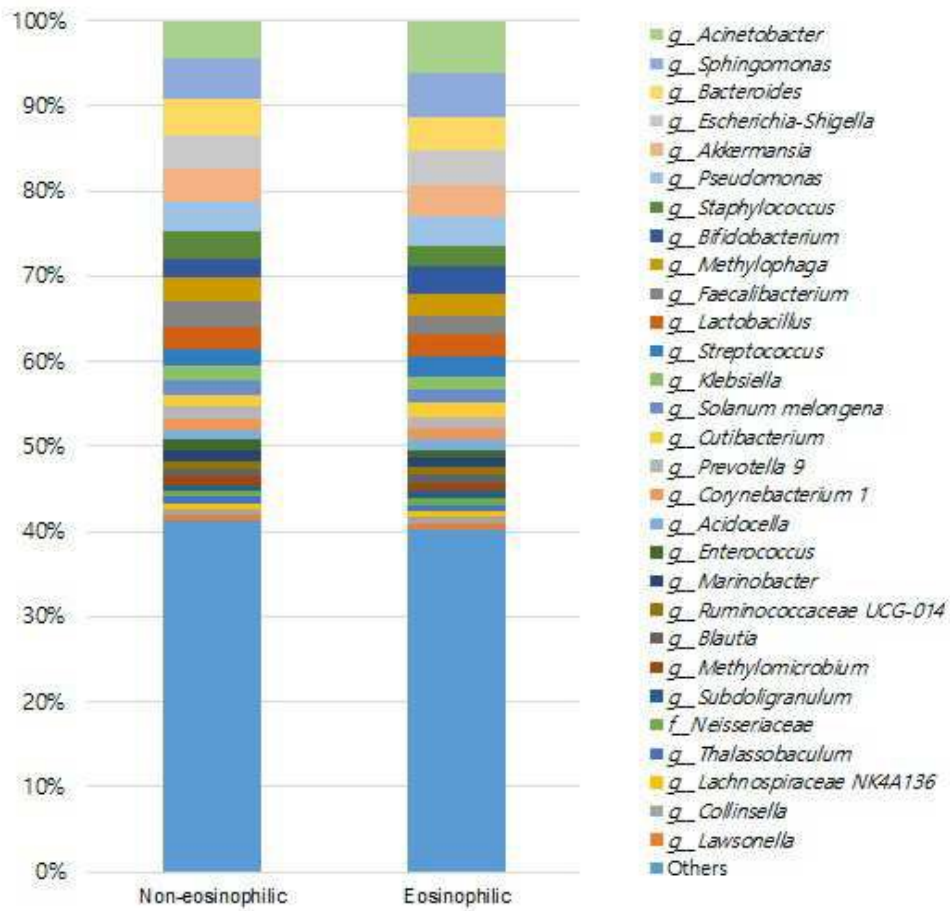
도면4a



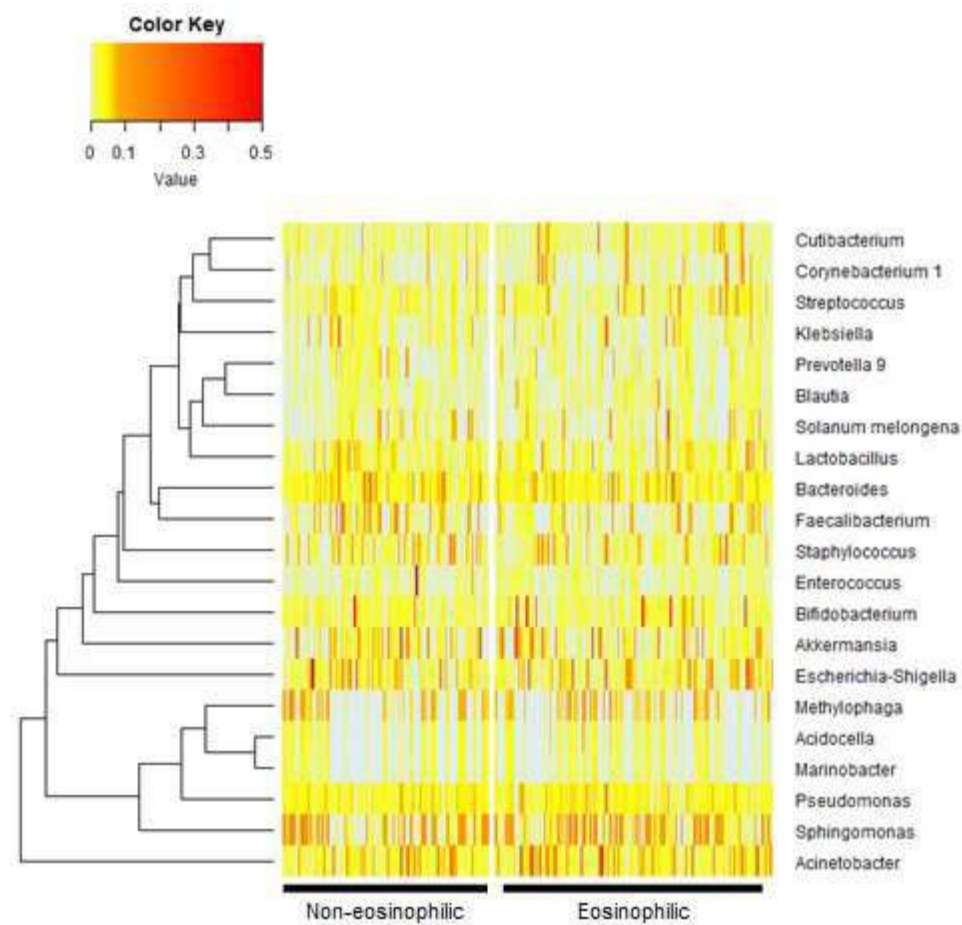
도면4b



도면5a



도면5b



서열 목록

<110> THE ASAN FOUNDATION

University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> Method for analysis of bacteria metagenome using exhaled condensate sample

<130> MP21-010

<160> 2

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16S_V3_F

<400> 1

tcgtcggcag cgtcagatgt gtataagaga cagcctacgg gnggcwgcag

50

<210> 2

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16S_V4_R

<400> 2

gtctcgtggg ctcggagatg tgtataagag acaggactac hvvggtatct aatcc

55