



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0037838
(43) 공개일자 2025년03월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) C12Q 1/689 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
C12Q 1/689 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2023-0120146
(22) 출원일자 2023년09월11일
심사청구일자 2023년09월11일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
홍지영
강원도 춘천시 동내면 외솔길19번길 80-7
이재준
강원도 춘천시 삭주로 77, 춘천성심병원 마취통증
의학과
(74) 대리인
강성혜

전체 청구항 수 : 총 9 항

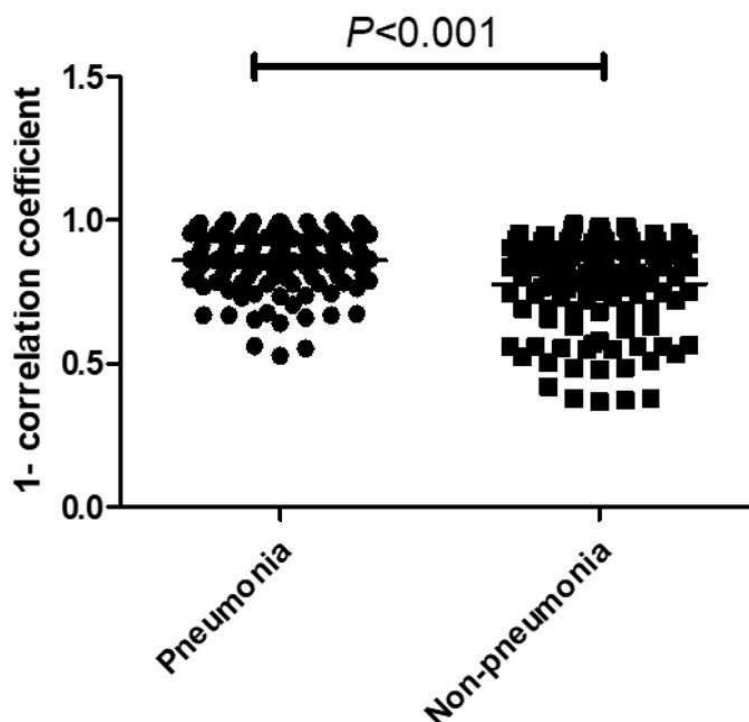
(54) 발명의 명칭 **삼관 환자에서 호흡 미생물과 혈장 미생물 세포의 소포 프로파일링 방법**

(57) 요약

세포외 소포 (EV)는 인간 질병에서 다양한 세포 및 면역학적 기능을 조절한다. 폐렴에서 미생물 EV의 임상적 역할에 대한 관심이 높아지고 있다. 그러나 폐렴에서 폐 마이크로바이옴과 미생물 EVs 및 다른 신체 부위의 마이크로바이옴의 상관관계에 대한 연구는 부족하다. 본 발명자들은 기계 환기 환자 60명 (폐렴 환자 41건 및 비폐렴

(뒷면에 계속)

대표도 - 도4



환자 19건)에서 얻은 111개의 샘플에서 폐 마이크로바이옴과 혈장 미생물 유래 EV (mEV)의 동시 발생을 조사했다. 두 샘플 간의 미생물 상관관계는 폐렴과 비폐렴 사례 사이에서 비교되었다. 혈장 미생물 EVs의 박테리아 구성은 폐 마이크로바이옴의 박테리아 구성과 구별되었다. 폐렴 환자와 비교하여 비폐렴 환자의 폐 미생물 군집과 혈장 mEV 사이에 유의하게 더 높은 상관관계가 있었다. 특히 아시네토박터 (Acinetobacter)와 락토바실러스 (Lactobacillus) 속은 비폐렴 환자에서 높은 상관계수를 보였다. 이것은 EV 구성 요소 전달을 통해 숙주 폐 면역 반응을 조절하는 데 있어 미생물 EV의 유의한 효과를 나타낸다.

(52) CPC특허분류

C12Q 2600/112 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711184692
과제번호	2020R1A2C101145512
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(유형1-1)중견연구
연구과제명	결핵후 섬유화로 인해 변형된 중양미세환경에서 NOX4 매개 기전 연구
기 여 율	7/10
과제수행기관명	한림대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711196002
과제번호	R20200223501
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오 의료기술개발
연구과제명	뇌신경계 임상현장 난제 해결을 위한 융합형 의사과학자 육성 및 현장맞춤형 미래의
료선도기술 실용화 사업	
기 여 율	3/10
과제수행기관명	한림대학교산학협력단
연구기간	2023.04.01 ~ 2026.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

(가) 기계적 인공호흡 환자로부터 삽관 후 1~7일 사이에 분리된 혈장 샘플 및 기관 내 흡인물 ((Endotracheal aspirate) 샘플을 수집하는 단계;

(나) 수집한 혈장 시료로부터 원심분리로 세포의 소포가 포함된 상층액을 분리하는 단계;

(다) 세포의 소포가 포함된 혈장 상층액에서 이물질을 제거하는 단계;

(라) 혈장 세포의 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;

(마) 기관 내 흡인물 샘플로부터 DNA를 추출하는 단계;

(바) 상기 (라) 단계에서 추출한 혈장 세포의 소포 DNA 및 상기 (마) 단계에서 추출한 기관 내 흡인물 DNA를 프라이머를 사용하여 각각 증폭하는 단계;

(사) 증폭된 혈장 세포의 소포 DNA 서열 및 기관 내 흡인물 DNA 서열을 분석하는 단계;

(아) 서열 분석 결과 얻어진 판독값으로부터 알파 다양성 분석 및 베타 다양성 분석을 수행하는 단계; 및

(자) 알파 다양성 분석 및 베타 다양성 분석 결과, 상관 계수가 > 0.5 인 미생물이 있는 경우 폐렴 가능성이 낮은 것으로 예측하는 단계;를 포함하는 세포의 소포 미생물 프로파일링 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 (가) 단계의 시료는 삽관 후 5~7일째에 얻는, 세포의 소포 미생물 프로파일링 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 (아) 단계의 알파 다양성은 Chao1 지수를 사용하여 분석하는, 세포의 소포 미생물 프로파일링 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 (아) 단계의 베타 다양성은 Bray-Curtis 비평 지수를 사용하여 평가되는, 세포의 소포 미생물 프로파일링 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 (자) 단계는 Spearman 서열상관 계수를 사용하여 기관 내 흡인물 미생물과 혈장 세포의 소포 사이의 상관 관계를 평가하는, 세포의 소포 미생물 프로파일링 방법.

청구항 6

- (가) 기계적 인공호흡 환자로부터 삽관 후 1~7일 사이에 분리된 혈장 샘플 및 기관 내 흡인물 ((Endotracheal aspirate) 샘플을 수집하는 단계;
- (나) 수집한 혈장 시료로부터 원심분리로 세포의 소포가 포함된 상층액을 분리하는 단계;
- (다) 세포의 소포가 포함된 혈장 상층액에서 이물질을 제거하는 단계;
- (라) 혈장 세포의 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;
- (마) 기관 내 흡인물 샘플로부터 DNA를 추출하는 단계;
- (바) 상기 (라) 단계에서 추출한 혈장 세포의 소포 DNA 및 상기 (마) 단계에서 추출한 기관 내 흡인물 DNA를 프라이머를 사용하여 각각 증폭하는 단계;
- (사) 증폭된 혈장 세포의 소포 DNA 서열 및 기관 내 흡인물 DNA 서열을 분석하는 단계;
- (아) 서열 분석 결과 얻어진 판독값으로부터 속 (Genus) 수준에서 알파 다양성 분석 및 베타 다양성 분석을 수행하는 단계; 및
- (자) 상기 알파 다양성 분석 및 베타 다양성 분석 단계를 수행한 결과, 아시네토박터 (Acinetobacter) 속 및 락토바실러스 (Lactobacillus) 속 중 1종 이상의 상관 계수가 > 0.5 인 경우 폐렴 가능성이 낮은 것으로 예측하는 단계;를 포함하는 세포의 소포 미생물 프로파일링 방법.

청구항 7

- (가) 기계적 인공호흡 환자로부터 삽관 후 1~7일 사이에 분리된 혈장 샘플 및 기관 내 흡인물 ((Endotracheal aspirate) 샘플을 수집하는 단계;
- (나) 수집한 혈장 시료로부터 원심분리로 세포의 소포가 포함된 상층액을 분리하는 단계;
- (다) 세포의 소포가 포함된 혈장 상층액에서 이물질을 제거하는 단계;
- (라) 혈장 세포의 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;
- (마) 기관 내 흡인물 샘플로부터 DNA를 추출하는 단계;
- (바) 상기 (라) 단계에서 추출한 혈장 세포의 소포 DNA 및 상기 (마) 단계에서 추출한 기관 내 흡인물 DNA를 프라이머를 사용하여 각각 증폭하는 단계;
- (사) 증폭된 혈장 세포의 소포 DNA 서열 및 기관 내 흡인물 DNA 서열을 분석하는 단계;
- (아) 서열 분석 결과 얻어진 판독값으로부터 속 (Genus) 수준에서 알파 다양성 분석 및 베타 다양성 분석을 수행하는 단계; 및
- (자) 상기 알파 다양성 분석 및 베타 다양성 분석 단계를 수행한 결과, 코리네박테리움 (Corynebacterium) 속 및 스테노트로포모나스 (Stenotrophomonas) 속 중 1종 이상이 우세한 경우 폐렴 가능성이 높은 것으로 예측하는 단계;를 포함하는 기관 내 흡인물 미생물 프로파일링 방법.

청구항 8

- (가) 기계적 인공호흡 환자로부터 삽관 후 1~7일 사이에 분리된 혈장 샘플 및 기관 내 흡인물 ((Endotracheal aspirate) 샘플을 수집하는 단계;
- (나) 수집한 혈장 시료로부터 원심분리로 세포의 소포가 포함된 상층액을 분리하는 단계;
- (다) 세포의 소포가 포함된 혈장 상층액에서 이물질을 제거하는 단계;
- (라) 혈장 세포의 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;

- (마) 기관 내 흡인물 샘플로부터 DNA를 추출하는 단계;
- (바) 상기 (라) 단계에서 추출한 혈장 세포의 소포 DNA 및 상기 (마) 단계에서 추출한 기관 내 흡인물 DNA를 프라이머를 사용하여 각각 증폭하는 단계;
- (사) 증폭된 혈장 세포의 소포 DNA 서열 및 기관 내 흡인물 DNA 서열을 분석하는 단계;
- (아) 서열 분석 결과 얻어진 판독값으로부터 속 (Genus) 수준에서 알파 다양성 분석 및 베타 다양성 분석을 수행하는 단계; 및
- (자) 상기 알파 다양성 분석 및 베타 다양성 분석 단계를 수행한 결과, 프리보텔라 (Prevotella) 속 및 알로프리보텔라 (Alloprevotella) 속 중 1종 이상이 우세한 경우 폐렴 가능성이 낮은 것으로 예측하는 단계;를 포함하는 기관 내 흡인물 미생물 프로파일링 방법.

청구항 9

- (가) 기계적 인공호흡 환자로부터 삽관 후 1~7일 사이에 분리된 혈장 샘플 및 기관 내 흡인물 ((Endotracheal aspirate) 샘플을 수집하는 단계;
- (나) 수집한 혈장 시료로부터 원심분리로 세포의 소포가 포함된 상층액을 분리하는 단계;
- (다) 세포의 소포가 포함된 혈장 상층액에서 이물질을 제거하는 단계;
- (라) 혈장 세포의 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;
- (마) 기관 내 흡인물 샘플로부터 DNA를 추출하는 단계;
- (바) 상기 (라) 단계에서 추출한 혈장 세포의 소포 DNA 및 상기 (마) 단계에서 추출한 기관 내 흡인물 DNA를 프라이머를 사용하여 각각 증폭하는 단계;
- (사) 증폭된 혈장 세포의 소포 DNA 서열 및 기관 내 흡인물 DNA 서열을 분석하는 단계;
- (아) 혈장 세포의 소포를 메타지노믹스 (Metagenomics) 분석하는 단계; 및
- (자) 상기 메타지노믹스 분석 결과, 큐티박테리움 (Cutibacterium) 속의 증가가 관찰되는 경우 폐렴 가능성이 낮은 것으로 예측하는 단계;를 포함하는 기관 내 흡인물 미생물 프로파일링 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 삽관 환자에서 호흡 미생물과 혈장 미생물 세포의 소포 프로파일링 방법에 관한 것으로서, 좀 더 자세히는 삽관 환자의 폐 마이크로바이옴과 미생물 EVs 및 다른 신체 부위의 마이크로바이옴 간의 박테리아 구성을 분석하여 폐렴 가능성을 예측하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 세포외 소포 (extracellular vesicles; EV)는 진핵 숙주세포 또는 병원체에서 방출되는 작은 입자이다 (1). 세포외 소포는 숙주의 선천 면역을 조절할 수 있는 박테리아에서 파생된 EV의 전달을 포함하여 세포 간 소통 (2)을 위한 새로운 메커니즘으로 등장했다 (3). 다양한 신체 부위에 걸쳐 마이크로바이옴 EV를 조사하면 질병 메커니즘과 환경 요인의 영향에 대한 포괄적인 통찰력을 제공할 수 있다.

- [0004] 최근 장내 미생물 유래 EV (microbe-derived extracellular vesicles; mEV)의 혈액으로의 이동 증가가 제2형 진성 당뇨병 (T2DM)의 병인과 관련이 있다고 보고되었다 (4). 그러나 특히 폐렴과 같은 호흡기 질환에서 혈장 미생물 유래 EV와 호흡기 미생물 사이의 연관성에 대해서는 알려진 바가 거의 없다. 여러 연구에서 장내 미생물 군이 폐의 면역 반응에 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀졌다. 또한 장내 미생물 유래 EV가 혈류로 들어가 다양한 면역 및 대사 반응을 유발하는 것으로 관찰되었다 (5-8). 그러나 호흡기 마이크로바이옴이 폐포 모세관 장벽을 통과하여 혈액으로 들어가는지 또는 혈장 EV가 폐 마이크로바이옴에 영향을 미치는지 여부는 불분명하다.

호흡기 마이크로바이옴과 혈장 mEV 사이의 관계를 명확히 하기 위해서는 추가 연구가 필요하다. 따라서 본 발명에서는 삽관된 환자의 혈장 mEV와 호흡기 마이크로바이옴을 분석하고 두 샘플 간의 미생물 상관관계를 탐색했다. 호흡기 미생물과 혈장 mEV 사이의 게놈 프로파일링의 연관성과 차이점을 확인하면 폐렴의 병인과 혈장 mEV의 임상적 역할에 대한 통찰력을 제공할 수 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006]

- (비특허문헌 0001) Maas SLN et al., Trends Cell Biol. 2017;27(3):172-88.
- (비특허문헌 0002) Fujita Y et al., Am J Respir Cell Mol Biol. 2018;58(5):560-5.
- (비특허문헌 0003) Schorey JS et al., EMBO Rep. 2015;16(1):24-43.
- (비특허문헌 0004) Nah G et al., Sci Rep. 2019;9(1):20136.
- (비특허문헌 0005) Shukla SD et al., Clin Transl Immunology. 2017;6(3):e133.
- (비특허문헌 0006) Budden KF et al., Nat Rev Microbiol. 2017;15(1):55-63.
- (비특허문헌 0007) Romano M. Front Microbiol. 2017;8:721.
- (비특허문헌 0008) Choi Y et al., Sci Rep. 2015;5:15878.
- (비특허문헌 0009) Kim MR et al., Allergy. 2012;67(10):1271-81.
- (비특허문헌 0010) Choi Y et al., Allergy Asthma Immunol Res. 2017;9(2):101-6.
- (비특허문헌 0011) Zhou Y et al., Nature. 2012;486(7402):207-14.?????
- (비특허문헌 0012) Vishnivetskaya T, et al. Genome Biol. 2013;14(1):R1.
- (비특허문헌 0013) Matthay MA et al., Annu Rev Pathol. 2011;6:147-63.
- (비특허문헌 0014) Muraca M et al., Discov Med. 2015;19(106):343-8.
- (비특허문헌 0015) Daou Y et al., Front Med (Lausanne). 2022;9:985141.
- (비특허문헌 0016) Behrens F et al., Int J Mol Sci. 2021;22(8).
- (비특허문헌 0017) Codemo M et al., mBio. 2018;9(2).
- (비특허문헌 0018) Tiku V et al., Sci Rep. 2021;11(1):618.
- (비특허문헌 0019) Athman JJ et al., J Immunol. 2017;198(5):2028-37.
- (비특허문헌 0020) Vidakovics ML et al., PLoS Pathog. 2010;6(1):e1000724.
- (비특허문헌 0021) Asensio CJ et al., Vaccine. 2011;29(8):1649-56.
- (비특허문헌 0022) Olaya-Abril A et al., J Proteomics. 2014;106:46-60.
- (비특허문헌 0023) Lee WH et al., Exp Mol Med. 2015;47(9):e183.
- (비특허문헌 0024) Huang W et al., Front Microbiol. 2019;10:1379.
- (비특허문헌 0025) Pulido MR et al., Vaccine. 2020;38(4):719-24.
- (비특허문헌 0026) Huang W et al., PLoS One. 2014;9(6):e100727.
- (비특허문헌 0027) McConnell MJ et al., Vaccine. 2011;29(34):5705-10.
- (비특허문헌 0028) Cai W et al., J Immunol Res. 2019;2019:2835256.
- (비특허문헌 0029) Dominguez Rubio AP et al., Front Microbiol. 2022;13:864720.

(비특허문헌 0030) Al-Nedawi K et al., FASEB J. 2015;29(2):684-95.

(비특허문헌 0031) Li M et al., BMC Microbiol. 2017;17(1):66.

(비특허문헌 0032) Seo MK et al., J Dairy Sci. 2018;101(10):8662-71.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 삼관 환자의 폐 마이크로바이옴과 다른 조직, 예컨대 혈장의 미생물 EVs 간의 박테리아 구성을 분석하여 폐렴 가능성을 예측하는 방법을 제공하려는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 박테리아 EV에 의해 매개되는 세포간 소통은 폐 질환의 병인과 관련이 있다 (2, 5). 본 발명자들의 이전 연구에서는 장내 미생물에서 파생된 EV의 먼 곳으로의 이동 및 장 투과성에 미치는 영향을 조사했다 (4, 8, 9). 떠오르는 새로운 증거는 장-폐 축의 존재를 시사하는데, 장내 공생 박테리아에 의해 생성된 EV는 점막 내성에 기여하고 폐 질환으로부터 인체를 보호할 수 있다 (10).
- [0010] 그러나 다른 신체 부위에 걸친 폐 마이크로바이옴 분포와 폐 염증에 대한 다른 기관 유래 EV의 효과에 대한 연구는 부족한 상태이다. 본 발명자들은 폐 및 혈장 미생물 군집이 별개의 구성을 갖고 별도의 클러스터를 형성한다는 것을 발견했으며, 이는 서로 다른 신체 부위에 걸쳐 EV 구성의 약한 상관관계를 입증하는 이전 연구와 일치한다 (11, 12). Nah 등은 제2형 당뇨병 (T2DM) 환자는 장 투과성 기능 장애가 있고, 대변, 혈청 및 소변 샘플 사이에 건강한 개인에 비해 더 높은 상관관계를 나타냄을 입증했다 (4). 급성 호흡곤란 증후군 (Acute respiratory distress syndrome; ARDS)과 같은 급성 폐 손상에서 증가된 폐 투과성을 기반으로 (13) 우리는 폐렴 환자에 비해 건강한 피험자에서 신체 부위 간의 상관 관계가 더 낮을 것이라는 가설을 세웠다. 그러나 우리의 예상과는 달리 폐 미생물 군집과 혈장 mEV 사이의 상관 관계는 폐렴 환자보다 폐렴이 없는 개인에서 더 높았다.
- [0011] 우리는 폐렴에서 폐포-모세혈관 투과성 증가로 인해 호흡기 병원체 유래 EV가 혈장으로 이동하는 것보다 폐렴이 없을 때 보호 박테리아 유래 EV의 이동이 증가할 가능성이 더 높다는 것을 발견했다 (14).
- [0012] Macia 등은 항상성 조건 하에서 공생 미생물군의 EV는 병원성 집락화를 억제하고 내성에 대한 면역 반응을 조절한다고 보고했다 (15). 최근 연구에 따르면 그람 음성균과 그람 양성균의 EV가 폐렴에 유해하고 유익한 효과를 모두 가질 수 있음이 입증되었다 (16).
- [0013] 외부 막 소포 (Outer membrane vesicles; OMVs)는 호흡기 상피와 상호 작용하고 폐렴 동안 선천성 및 후천성 면역 시스템에서 염증 반응을 유발한다 (17-20). 그러나 B. pertussis, S. pneumoniae, K. pneumoniae 및 A. baumannii와 같은 박테리아 유래 OMV도 강력한 항체 반응과 유익한 생화학적 특성을 유도하는 능력을 기반으로 잠재적인 백신 후보로 간주되었다 (21-24).
- [0014] 여러 연구에서 A. baumannii 유래 천연 OMV가 pan-저항성 균주를 포함한 임상 분리주에 대한 보호를 제공하고 사망률을 감소시킨다는 것이 입증되었다 (24-27). Cai 등은 A. baumannii 유래 OMV가 수지상 세포 활성화를 유도하여 Th2 활성화 및 체액성 면역 반응을 촉진할 수 있음을 입증했다 (28). 유사하게, 우리 연구에서 비폐렴 환자에서 아시네토박터 EV의 증가된 세포 간 소통은 EV의 면역원성 및 보호 가능성 측면에서 해석될 수 있다.
- [0015] 우리의 데이터는 또한 폐와 혈장 mEV 사이의 상관 계수가 > 0.5 인 락토바실러스 속이 비폐렴 상태와 관련이 있음을 밝혔다. 전염병에 대한 프로바이오틱스의 유익한 효과는 병원체를 억제하고 장벽 기능을 강화하며 면역을 조절하는 프로바이오틱 유래 EV에 의해 매개되는 것으로 보고되었다 (29). 우리의 발견과 일관되게, 종래 연구들은 락토바실러스의 다른 변종 유래 EV가 숙주에 유익한 항염증 특성을 가지고 있음을 보여주었다 (30-32).
- [0016] 본 발명을 통하여 우리는 인간 샘플을 사용하여 폐 마이크로바이옴과 혈장 미생물 EV를 직접 비교함으로써 마이크로바이옴에 대한 이해 및 EV를 통한 통신에 대한 포괄적인 이해가 가능해졌다.

- [0017] 결론적으로 우리는 폐렴 환자보다 비폐렴 환자에서 폐 마이크로바이옴과 혈장 EV 사이에 유의하게 더 높은 상관 관계를 관찰했다. 이것은 숙주-박테리아 소통을 위한 도구로서 EV의 가능성을 나타낸다.
- [0019] 본 발명은
- [0020] (가) 기계적 인공호흡 환자로부터 삽관 후 1~7일 사이에 분리된 혈장 샘플 및 기관 내 흡인물 ((Endotracheal aspirate) 샘플을 수집하는 단계;
- [0021] (나) 수집한 혈장 시료로부터 원심분리로 세포의 소포가 포함된 상층액을 분리하는 단계;
- [0022] (다) 세포의 소포가 포함된 혈장 상층액에서 이물질을 제거하는 단계;
- [0023] (라) 혈장 세포의 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;
- [0024] (마) 기관 내 흡인물 샘플로부터 DNA를 추출하는 단계;
- [0025] (바) 상기 (라) 단계에서 추출한 혈장 세포의 소포 DNA 및 상기 (마) 단계에서 추출한 기관 내 흡인물 DNA를 프 라이머를 사용하여 각각 증폭하는 단계;
- [0026] (사) 증폭된 혈장 세포의 소포 DNA 서열 및 기관 내 흡인물 DNA 서열을 분석하는 단계;
- [0027] (아) 서열 분석 결과 얻어진 판독값으로부터 알파 다양성 분석 및 베타 다양성 분석을 수행하는 단계; 및
- [0028] (자) 알파 다양성 분석 및 베타 다양성 분석 결과, 상관 계수가 > 0.5인 미생물이 있는 경우 폐렴 가능성이 낮은 것으로 예측하는 단계;를 포함하는 세포의 소포 미생물 프로파일링 방법에 관한 것이다.
- [0029] 또한, 본 발명은 상기 (가) 단계의 시료를 삽관 후 5~7일째에 얻는, 세포의 소포 미생물 프로파일링 방법에 관한 것이다.
- [0030] 또한, 본 발명은 상기 (아) 단계의 알파 다양성을 Chao1 지수를 사용하여 분석하는, 세포의 소포 미생물 프로파일링 방법에 관한 것이다.
- [0031] 또한, 본 발명은 상기 (아) 단계의 베타 다양성을 Bray-Curtis 비평 지수를 사용하여 평가하는, 세포의 소포 미생물 프로파일링 방법에 관한 것이다.
- [0032] 또한, 본 발명의 상기 (자) 단계는 Spearman 서열상관 계수를 사용하여 기관 내 흡인물 미생물과 혈장 세포의 소포 사이의 상관 관계를 평가하는, 세포의 소포 미생물 프로파일링 방법에 관한 것이다.
- [0033] 또한, 본 발명은
- [0034] (가) 기계적 인공호흡 환자로부터 삽관 후 1~7일 사이에 분리된 혈장 샘플 및 기관 내 흡인물 ((Endotracheal aspirate) 샘플을 수집하는 단계;
- [0035] (나) 수집한 혈장 시료로부터 원심분리로 세포의 소포가 포함된 상층액을 분리하는 단계;
- [0036] (다) 세포의 소포가 포함된 혈장 상층액에서 이물질을 제거하는 단계;
- [0037] (라) 혈장 세포의 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;
- [0038] (마) 기관 내 흡인물 샘플로부터 DNA를 추출하는 단계;
- [0039] (바) 상기 (라) 단계에서 추출한 혈장 세포의 소포 DNA 및 상기 (마) 단계에서 추출한 기관 내 흡인물 DNA를 프 라이머를 사용하여 각각 증폭하는 단계;
- [0040] (사) 증폭된 혈장 세포의 소포 DNA 서열 및 기관 내 흡인물 DNA 서열을 분석하는 단계;
- [0041] (아) 서열 분석 결과 얻어진 판독값으로부터 속 (Genus) 수준에서 알파 다양성 분석 및 베타 다양성 분석을 수행하는 단계; 및
- [0042] (자) 상기 알파 다양성 분석 및 베타 다양성 분석 단계를 수행한 결과, 아시네토박터 (Acinetobacter) 속 및 락 토마실러스 (Lactobacillus) 속 중 1종 이상의 상관 계수가 > 0.5인 경우 폐렴 가능성이 낮은 것으로 예측하는 단계;를 포함하는 세포의 소포 미생물 프로파일링 방법에 관한 것이다.

- [0043] 또한, 본 발명은
- [0044] (가) 기계적 인공호흡 환자로부터 삽관 후 1~7일 사이에 분리된 혈장 샘플 및 기관 내 흡인물 ((Endotracheal aspirate) 샘플을 수집하는 단계;
- [0045] (나) 수집한 혈장 시료로부터 원심분리로 세포의 소포가 포함된 상층액을 분리하는 단계;
- [0046] (다) 세포의 소포가 포함된 혈장 상층액에서 이물질을 제거하는 단계;
- [0047] (라) 혈장 세포의 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;
- [0048] (마) 기관 내 흡인물 샘플로부터 DNA를 추출하는 단계;
- [0049] (바) 상기 (라) 단계에서 추출한 혈장 세포의 소포 DNA 및 상기 (마) 단계에서 추출한 기관 내 흡인물 DNA를 프라이머를 사용하여 각각 증폭하는 단계;
- [0050] (사) 증폭된 혈장 세포의 소포 DNA 서열 및 기관 내 흡인물 DNA 서열을 분석하는 단계;
- [0051] (아) 서열 분석 결과 얻어진 판독값으로부터 속 (Genus) 수준에서 알파 다양성 분석 및 베타 다양성 분석을 수행하는 단계; 및
- [0052] (자) 상기 알파 다양성 분석 및 베타 다양성 분석 단계를 수행한 결과, 코리네박테리움 (Corynebacterium) 속 및 스테노트로포모나스 (Stenotrophomonas) 속 중 1종 이상이 우세한 경우 폐렴 가능성이 높은 것으로 예측하는 단계;를 포함하는 기관 내 흡인물 미생물 프로파일링 방법에 관한 것이다.
- [0053] 또한, 본 발명은
- [0054] (가) 기계적 인공호흡 환자로부터 삽관 후 1~7일 사이에 분리된 혈장 샘플 및 기관 내 흡인물 ((Endotracheal aspirate) 샘플을 수집하는 단계;
- [0055] (나) 수집한 혈장 시료로부터 원심분리로 세포의 소포가 포함된 상층액을 분리하는 단계;
- [0056] (다) 세포의 소포가 포함된 혈장 상층액에서 이물질을 제거하는 단계;
- [0057] (라) 혈장 세포의 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;
- [0058] (마) 기관 내 흡인물 샘플로부터 DNA를 추출하는 단계;
- [0059] (바) 상기 (라) 단계에서 추출한 혈장 세포의 소포 DNA 및 상기 (마) 단계에서 추출한 기관 내 흡인물 DNA를 프라이머를 사용하여 각각 증폭하는 단계;
- [0060] (사) 증폭된 혈장 세포의 소포 DNA 서열 및 기관 내 흡인물 DNA 서열을 분석하는 단계;
- [0061] (아) 서열 분석 결과 얻어진 판독값으로부터 속 (Genus) 수준에서 알파 다양성 분석 및 베타 다양성 분석을 수행하는 단계; 및
- [0062] (자) 상기 알파 다양성 분석 및 베타 다양성 분석 단계를 수행한 결과, 프리보텔라 (Prevotella) 속 및 알로프리보텔라 (Alloprevotella) 속 중 1종 이상이 우세한 경우 폐렴 가능성이 낮은 것으로 예측하는 단계;를 포함하는 기관 내 흡인물 미생물 프로파일링 방법에 관한 것이다.
- [0063] 또한, 본 발명은
- [0064] (가) 기계적 인공호흡 환자로부터 삽관 후 1~7일 사이에 분리된 혈장 샘플 및 기관 내 흡인물 ((Endotracheal aspirate) 샘플을 수집하는 단계;
- [0065] (나) 수집한 혈장 시료로부터 원심분리로 세포의 소포가 포함된 상층액을 분리하는 단계;
- [0066] (다) 세포의 소포가 포함된 혈장 상층액에서 이물질을 제거하는 단계;
- [0067] (라) 혈장 세포의 소포로부터 DNA를 추출하는 단계;
- [0068] (마) 기관 내 흡인물 샘플로부터 DNA를 추출하는 단계;
- [0069] (바) 상기 (라) 단계에서 추출한 혈장 세포의 소포 DNA 및 상기 (마) 단계에서 추출한 기관 내 흡인물 DNA를 프라이머를 사용하여 각각 증폭하는 단계;

- [0070] (사) 증폭된 혈장 세포의 소포 DNA 서열 및 기관 내 흡인물 DNA 서열을 분석하는 단계;
- [0071] (아) 혈장 세포의 소포를 메타지노믹스 (Metagenomics) 분석하는 단계; 및
- [0072] (자) 상기 메타지노믹스 분석 결과, 큐티박테리움 (Cutibacterium) 속의 증가가 관찰되는 경우 폐렴 가능성이 낮은 것으로 예측하는 단계;를 포함하는 세포 외 소포 미생물 프로파일링 방법에 관한 것이다.

발명의 효과

- [0074] 본 발명의 방법은 기관 내 흡인물 미생물과 혈장 세포의 소포체 간의 미생물 상관관계 등을 통하여 폐렴 가능성이 높은지 낮은지를 판별할 수 있도록 한다.

도면의 간단한 설명

- [0076] 도 1은 알파 및 베타 다양성 분석 결과이다. (a) 기관 내 흡인물 (Endotracheal aspirate; 이하 본 명세서 및 도면에서 "ETA"와 혼용함)와 혈장 샘플의 비교를 위해 피험자의 관찰된 OTU 및 Chao1 알파 다양성을 분석하였다. (b) ETA와 혈장의 일반적인 문 (phyla)과 속 (genera)을 나타낸다. 벤 다이어그램에서 겹치는 원은 두 사이트에서 공통적인 미생물의 수를 나타낸다. (c) 신체 부위의 베타 다양성에 대한 Bray-Curtis 비평 지수에서 시각화된 PCoA 분석 결과이다.
- 도 2의 a, b는 삽관 환자의 문 (phyla)과 속 (genera)의 미생물 조성을 나타낸다. 숫자는 ETA와 혈장 mEV의 마이크로바이옴의 상대적인 비율을 나타낸다.
- 도 3은 폐렴 환자와 비폐렴 환자의 신체 부위와 미생물 구성 간의 베타 다양성을 나타낸다. (a) 폐렴 및 비폐렴 그룹에서 ETA 마이크로바이옴과 혈장 mEV 간의 Bray-Curtis 비유사성 지수를 사용한 PCoA 분석 결과이다. (b) 폐렴 및 비폐렴 그룹에서 ETA 및 혈장 mEV의 미생물 조성을 나타낸다.
- 도 4는 폐렴 상태에 따른 ETA와 플라스마 mEV 간의 상관 계수를 비교한 것이다. 상관 계수는 폐렴군보다 비폐렴군에서 더 높았다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0077] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0079] 실시예 1: 실험 대상

- [0080] 이 전향적 연구는 춘천성심병원 중환자실에서 수행되었다. 2017년 7월부터 2018년 8월 사이에 중환자실 입원 당시 기계 환기를 받은 60명의 피험자로부터 총 111개의 샘플을 얻었다. 18세 미만, 중환자실 입원 48시간 이후 기계 환기 시작 또는 7일 미만의 기계적 호흡, 근위축성 측삭 경화증과 같은 신경근 질환의 존재 및 (4) 정보에 입각한 동의를 제공할 수 없는 환자는 제외하였다. 기관 내 흡인물 (Endotracheal aspirate; ETA) 및 혈장 샘플은 8시간 이상의 금식 후에 수집되었다. 41명의 피험자가 폐렴으로 진단되었고 국제 지침에 따라 치료를 받았다. 인구 통계학적 특성, 급성 호흡 곤란 증후군 (acute respiratory distress syndrome; ARDS)의 존재, 질병의 중증도 (급성 생리학 및 만성 건강 평가 [APACHE] II 및 순차적 장기 부전 평가 [SOFA] 점수) 및 임상 결과 (28일 내 모든 원인에 의한 사망, 병원 내 사망, 기계적 호흡 기간)를 수집했다. 본 연구는 춘천성심병원 임상시험 심사위원회의 승인을 받았다 (승인번호: 2017-47). 참가자로부터 서면 동의서를 얻었고 승인된 지침에 따라 연구를 수행했다.

[0082] 실시예 2: EV 분리 및 DNA 추출

- [0083] ETA 샘플과 혈장 샘플은 기계적 환기를 시작한 후 7일 이내에 수집되었다. 혈장 시료는 BD Vacutainers (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용하여 얻은 후 4°C에서 15분 동안 2000 g로 원심분리하였다. 혈장 시료에서 EV를 분리하기 위해 마이크로원심분리기 (Labogene 1730R; BMS, Seoul, Korea)를 사용하여 4°C에서 10분 동안

10,000 g로 차등 원심분리를 수행하여 펠릿과 상층액을 분리했다. 이어서 0.22 μ m 필터를 통해 상층액을 여과하여 박테리아 및 이물질을 제거하였다. 그런 다음 EV를 100℃에서 40분 동안 끓이고 13,000 rpm으로 4℃에서 30분 동안 원심 분리했다. EV DNA 추출은 DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 수행되었으며, 정량은 QIAxpert 시스템 (Qiagen)을 사용하여 수행되었다. ETA 샘플의 경우, 시판 미생물 DNA 분리 키트 (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 전체 DNA 추출을 수행했다.

[0084]

실시예 3: 페어드 엔드 리즈 시퀀싱 (Paired-end reads sequencing) 및 데이터 처리

[0085]

[0086]

추출된 DNA는 원핵생물 16S rRNA 유전자의 V3-V4 영역을 표적으로 하도록 설계된 프라이머를 사용하여 증폭되었다. 프라이머는 다음과 같다: 16S_V3_F (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'), 16S_V4_R (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'). amplicon 라이브러리는 제조업체의 지침에 따라 MiSeq 플랫폼 (Illumina, San Diego, CA, USA)을 사용하여 정량화되고 시퀀싱되었다. 쌍방향 판독 (paired-end reads)은 FLASH 소프트웨어를 사용하여 병합되었으며 350 bp보다 짧거나 550 bp보다 긴 리드는 추가 분석에서 제외되었다. VSEARCH 및 SILVA 골드 데이터베이스를 사용하여 키메라 서열 및 싱글톤을 제거했다. SILVA128 데이터베이스를 사용하여 유사성이 97% 이상인 시퀀싱 리드를 운영 분류 단위로 클러스터링했다. PCR에 실패했거나 판독 횟수가 낮은 (<150) 샘플은 품질 관리에서 제외되었다.

[0087]

실시예 4: 통계 분석

[0088]

[0089]

총 60명의 피험자 (여성 17명, 남성 43명)로부터 총 120개의 샘플을 수집했다. 9개의 샘플은 판독 횟수가 적어 제외되어 총 111개의 샘플이 사용되었다. R 소프트웨어 (버전 4.0.4)를 사용하여 생물 다양성 및 커뮤니티 유사성 분석을 수행했다. 알파 및 베타 다양성은 QIIME를 사용하여 계산되었다. 베타 다양성은 Bray-Curtis 비평 지수를 사용하여 평가되었으며 알파 다양성은 Chao1 지수를 사용하여 측정되었다. 상대적 존재비 > 0.5%를 차지하는 분류군이 우세한 것으로 간주되었다. Spearman 상관 관계를 사용하여 폐 미생물과 혈장 mEV 사이의 상관 관계를 평가했다. 순열 기반 p-값은 비정규성과 작은 표본 크기에 대해 견고하기 때문에 100,000개의 순열 복제로부터 계산되었다. 상관 계수가 0.5를 초과하고 허위 발견률이 0.05 미만인 속을 통계학적으로 유의한 것으로 간주했다.

[0091]

결과

[0092]

폐렴이 41건, 비폐렴이 19건이었다. 피험자의 기본 특성은 표 1에 제시되어 있다. 연령, 성별, 찰슨 동반질환지수 (Charlson Comorbidity Index), 질병의 중증도 (SOFA 및 APACHE II 점수), 사망률 및 기계 환기 지속기간을 포함하는 임상 결과 사이에 큰 차이는 없었다. 예상대로, 비폐렴 그룹은 더 높은 PaO₂/FiO₂ 비율을 보인 반면, 폐렴 그룹은 높은 C 반응성 단백질 수치를 보였다. 삼판의 원인으로는 신경외과적 상태와 심폐정지가 비폐렴군에서 더 많이 확인되었다.

[0094]

결과 1: 호흡기 미생물 군집과 혈장 미생물 유래 EV 사이의 미생물 다양성

[0095]

알파 다양성은 혈장 mEV보다 ETA 샘플에서 훨씬 더 높았다 (도 1). PCoA (Principal Coordinate Analysis)를 사용한 베타 다양성 분석은 문 (phylum)과 속 (genus) 수준 모두에서 혈장 mEV와 ETA 미생물 군집 사이에 상당한 차이가 있음을 보여주었다. 문 수준에서 22개의 군주가 ETA 마이크로바이옴과 혈장 mEV 사이에 공통적인 것으로 밝혀졌다. 프로테오박테리아 (Proteobacteria), 페미큐테스 (Firmicutes), 아시네토박테리아 (Actinobacteria), 박테로이디티스 (Bacteroidetes) 및 퓨소박테리아 (Fusobacteria)는 우세한 분류군으로 상대적 존재비의 > 0.5%를 차지했다.

[0096]

속 수준에서 총 898속과 351속이 각각 ETA 미생물군과 혈장 mEVs에서 확인되었다. 이 중 279속이 두 샘플링 위치에서 모두 발견되었다. 미생물 분류학적 프로파일은 ETA 미생물군과 혈장 mEV 사이에 상당한 차이를 보였다 (도 2). ETA 미생물군과 혈장 mEV 모두에서 가장 풍부한 4개의 문은 프로테오박테리아 (Proteobacteria), 페미큐테스 (Firmicutes), 아시네토박테리아 (Actinobacteria) 및 박테로이디티스 (Bacteroidetes)였다. 그러나 스트렙토코커스 (Streptococcus)와 엔테로박터 (Enterobacter)는 혈장 mEV보다 ETA 미생물군에서 훨씬 더

풍부했으며, 스타필로코커스 (Staphylococcus), 에서리치아-쉬겔라 (Escherichia-Shigella) 및 클렙시엘라 (Klebsiella)는 혈장 mEV에서 훨씬 더 풍부했다. 어떤 속 (genus)도 두 부위 간에 유의하게 높은 상관관계를 나타내지 않았다.

결과 2: 16S rRNA 마이크로바이옴

폐렴 및 비폐렴 사례 모두에서 혈장 mEV의 구성은 ETA 마이크로바이옴의 구성과 구별되었으며, 이는 전체 111개의 샘플 결과와 일치한다. PCoA를 사용한 베타-다양성 분석은 폐렴 및 비폐렴 환자 모두에서 혈장 mEV와 ETA 마이크로바이옴 간에 유의한 차이를 나타냈다 (도 3, $P < 0.001$). 폐렴과 비폐렴 환자 사이의 폐 마이크로바이옴과 혈장 mEVs가 다른 분류군이 확인되었다. ETA 마이크로바이옴 분석 시 폐렴군에서는 코리네박테리움 (Corynebacterium)과 스테노트로포모나스 (Stenotrophomonas)가 우세하였고 비폐렴군에서는 프리보텔라 (Prevotella)와 알로프리보텔라 (Alloprevotella)가 우세하였다. 혈장 mEVs의 메타제노믹스 (Metagenomics) 분석은 폐렴 그룹에 비해 비폐렴 그룹에서 큐티박테리움 (Cutibacterium)의 상당한 증가를 보여주었다.

흥미롭게도, 혈장 mEV와 ETA 마이크로바이옴 사이의 상관관계는 폐렴과 비폐렴 환자 간에 크게 달랐다 (도 4). 비폐렴 환자는 폐렴 환자에 비해 혈장 mEV와 ETA 마이크로바이옴 사이에 유의하게 높은 상관관계를 보였다. ETA 마이크로바이옴과 혈장 mEV 사이의 상관관계에 대한 속 수준의 분석은 아시네토박터 (Acinetobacter)와 락토바실러스 (Lactobacillus)가 샘플링 사이트 전체에서 상관 계수가 > 0.5 인 것으로 밝혀졌으며 비폐렴 환자와 관련이 있었다. 그러나 폐렴과 관련된 속은 없었다 (표 2).

표 1

	Pneumonia N = 41	Nonpneumonia N = 19	P value
Age	73 (59.5,80.8)	76 (59,81)	0.732
Male	30 (73.2%)	13 (68.4%)	0.763
ARDS	8 (19.5%)	0 (0%)	0.047
Charlson comorbidity index	3 (1,4)	2 (1,2)	0.051
Reason for intubation			< 0.001
Cardiac arrest	1 (2.4%)	3 (15.8%)	
Neurosurgical conditions	5 (12.2%)	14 (73.7%)	
Postoperative status	0 (0%)	1 (5.3%)	
Respiratory distress	35 (85.4%)	1 (5.3%)	
PaO ₂ /FiO ₂	235.5 (143.8,304.8)	430.8 (321.0,457.5)	< 0.001
Severity			
APACHE score	20 (16,24)	22 (17,25)	0.165
SOFA score	7 (5.8,9.0)	6 (4,9)	0.227
GCS	8 (6,11)	6 (5,9)	0.074
28-day mortality	12 (29.3%)	6 (31.6%)	0.99
In-hospital mortality	19 (46.3%)	6 (31.6%)	0.4
MV duration	12 (7.8,18.0)	10 (7,14)	0.238
CRP (mg/dL)	122.5 (44.0,201.3)	61 (4.6,132.1)	0.012

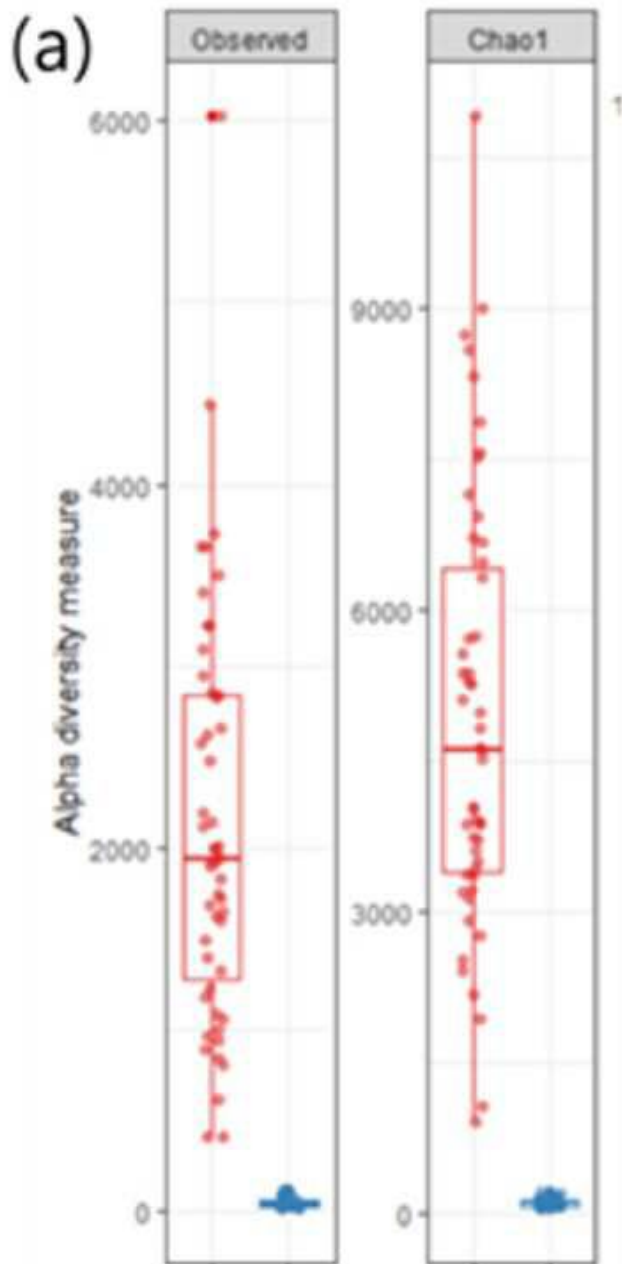
표 2

	Site	Genus	Coefficient	FDR P-value
Total	ETA-serum EV	<i>Acinetobacter</i>	0.368	0.008
		<i>Corynebacterium</i>	0.326	0.019
		<i>Neisseria</i>	0.288	0.041
		<i>Bifidobacterium</i>	0.318	0.023
		<i>Lautropia</i>	0.276	0.049
Pneumonia	ETA-serum EV	<i>Acinetobacter</i>	0.346	0.039
		<i>Corynebacterium</i>	0.358	0.032
		<i>Alloprevotella</i>	-0.033	0.049
Nonpneumonia	ETA-serum EV	<i>Acinetobacter</i>	0.632	0.013
		<i>Lactobacillus</i>	-0.578	0.024

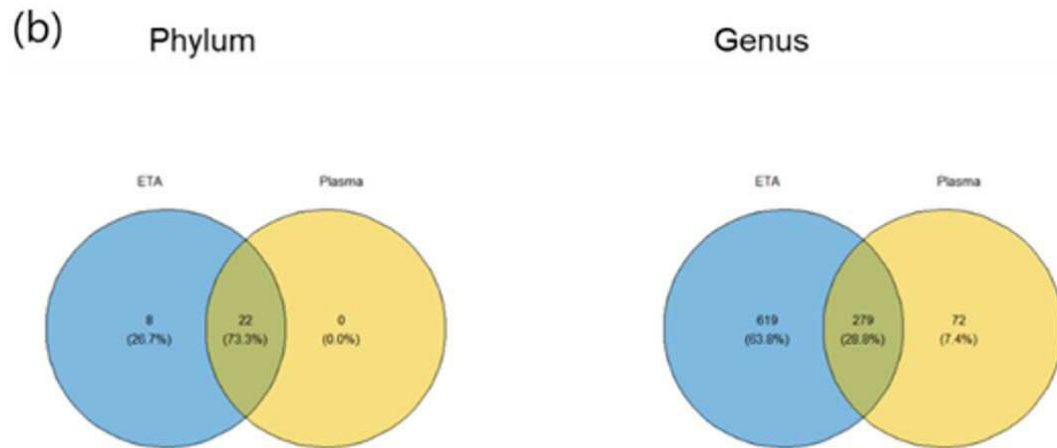
[0102]

도면

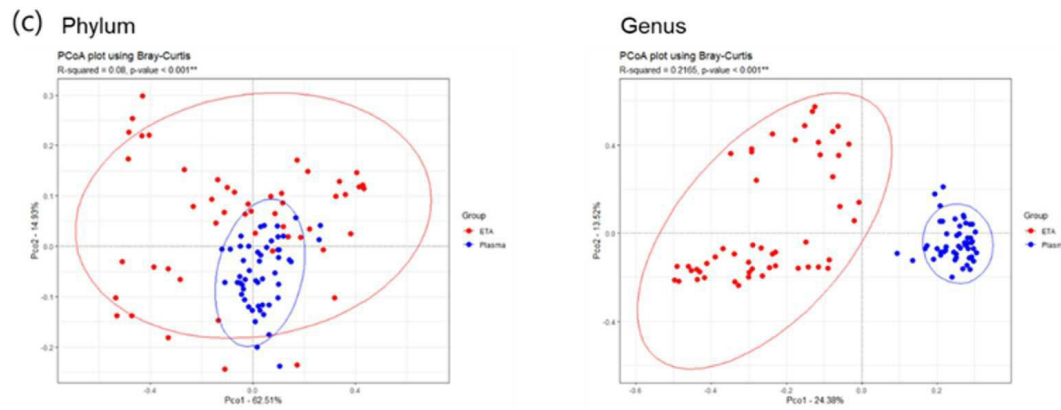
도면1a



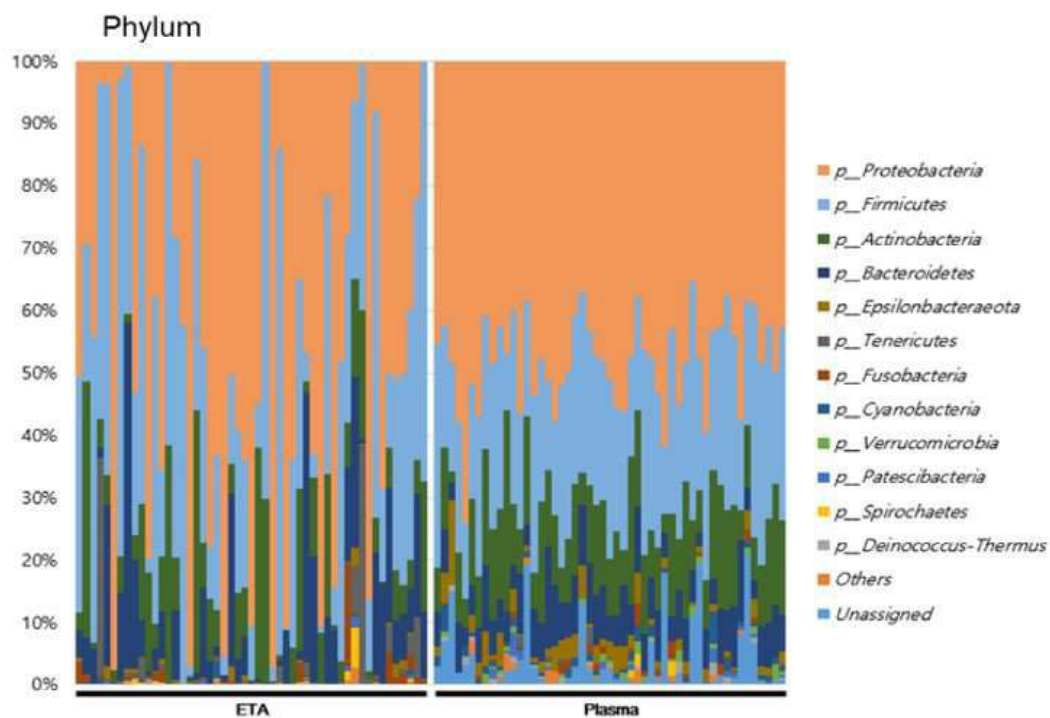
도면1b



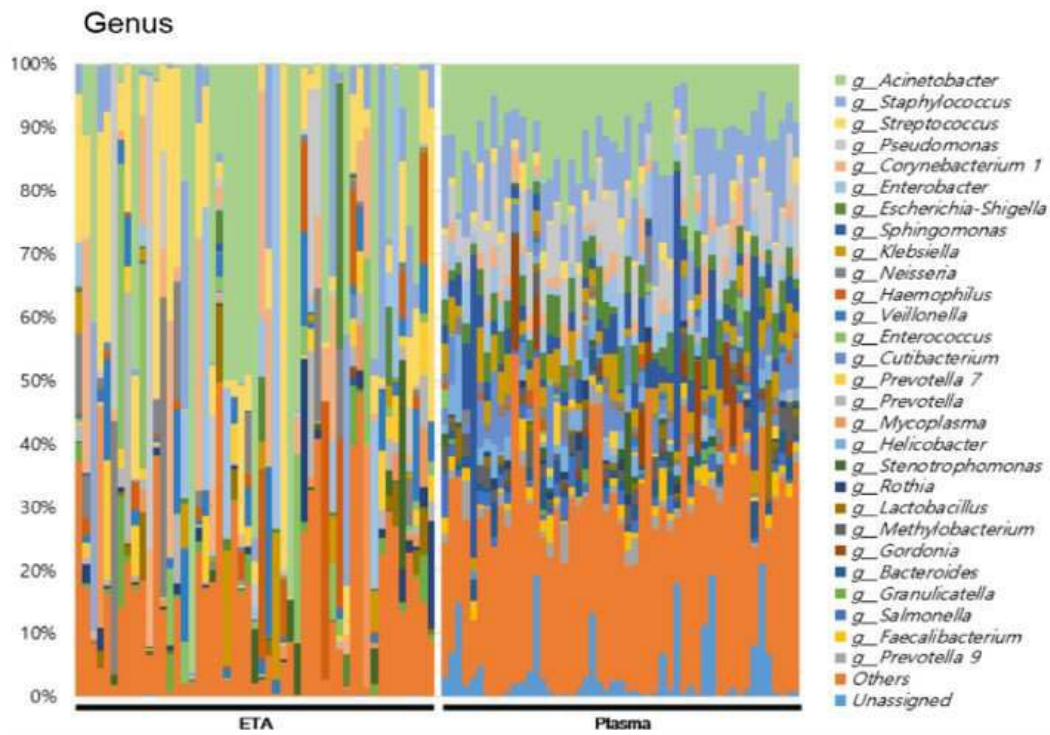
도면1c



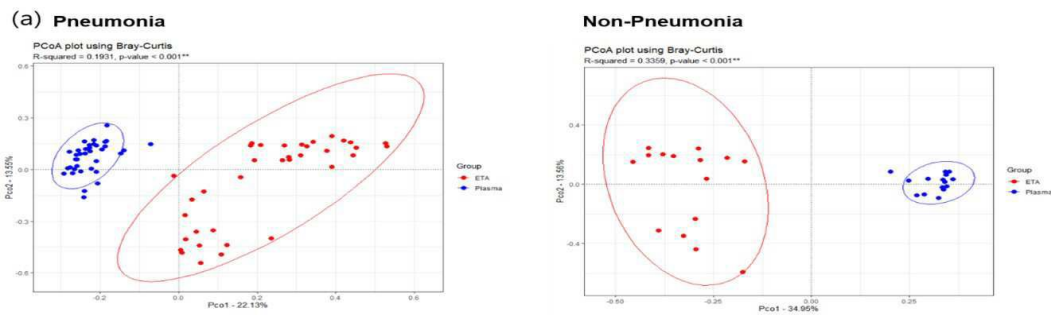
도면2a



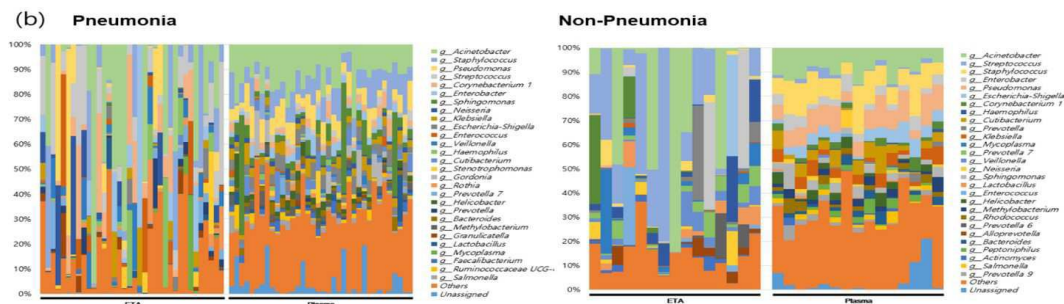
도면2b



도면3a



도면3b



도면4

