(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년07월29일
(11) 등록번호 10-2139315
(24) 등록일자 2020년07월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
C12Q 2600/154 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0024185
(22) 출원일자 2020년02월27일
심사청구일자 2020년02월27일
(56) 선행기술조사문헌
The American Journal of Human Genetics (2006) 78:78-88
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
안정혁
서울특별시 성동구 독서당로 175, 101동 1606호 (옥수동, 극동그린아파트)
이현주
광주광역시 광산구 장덕로 138, 102동 2001호(수완동, 해솔마을 현진에버빌1단지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

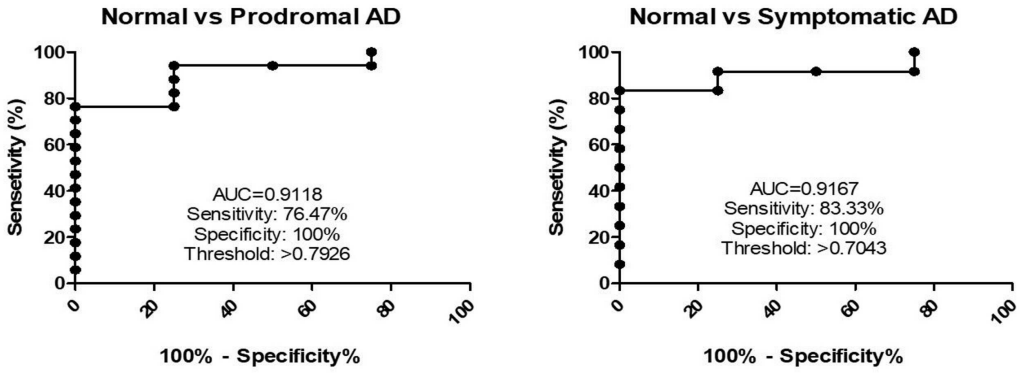
전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 김승범

(54) 발명의 명칭 **TNFRSF19 유전자의 DNA 메틸레이션 변화를 이용한 알츠하이머병 치매 조기진단 마커**

(57) 요 약

본 발명은 유전자 CpG 부위의 메틸화 수준을 검출함으로써, 알츠하이머병 경도인지장애를 진단 또는 알츠하이머병 치매를 조기 진단하기 위한 조성물, 키트 및 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/158 (2013.01)
(72) 발명자
정지향
서울특별시 마포구 양화로 26, 801호(합정동, KCC 엠파이어리버)
박희경
서울특별시 성동구 매봉길 15, 104동 1003호(옥수동, 래미안 옥수 리버젠)
성혜윤
경기도 고양시 일산동구 숲속마을로 68, 608동 301호(풍동, 숲속마을6단지아파트)

(56) 선행기술조사문헌
Brain (2015) 138:616-631
US8592156 B2
KR100171894 B1
JP2017503527 A
KR101543172 B1
KR101008385 B1
US20180258499 A1

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI18C0460
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 보건의료기술연구개발사업-국가치매극복기술개발
연구과제명 피부와 혈액을 이용한 알츠하이머성 치매 조기진단용 바이오마커 개발
기 여 율 1/1
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2018.04.30 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

TNFRSF19 (TNF receptor superfamily member 19) 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머병 경도인지장애의 진단 또는 알츠하이머병 치매의 조기 진단용 조성물로서,

상기 TNFRSF19 유전자 프로모터의 CpG 는 서열번호 1 (13번 염색체의 23578361 내지 23578482 번째)의 염기서열 중에 나타나는 CpG 를 포함하는 것인 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제는, 바이설파이트(bisulfite) 또는 이의 염, 메틸화 민감성 제한효소, 상기 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화된 서열에 특이적인 프라이머, 비메틸화된 서열에 특이적인 프라이머, 메틸화된 CpG 결합 도메인, 또는 메틸사이토신에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 것인 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 메틸화 민감성 제한효소는 *Sma*I, *Sac*II, *Eag*I, *Hpa*II, *Msp*I, *Bss*HII, *Bst*UI 또는 *Not*I인 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 알츠하이머병 경도인지장애의 진단 또는 알츠하이머병 치매의 조기 진단용 키트.

청구항 5

개체의 시료로부터 TNFRSF19 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 경도인지장애의 진단 또는 알츠하이머병 치매의 조기 진단을 위한 정보를 제공하는 방법으로서,

상기 TNFRSF19 유전자 프로모터의 CpG 는 서열번호 1 (13번 염색체의 23578361 내지 23578482 번째)의 염기서열 중에 나타나는 CpG 를 포함하는 것인, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 메틸화 수준을 알츠하이머병이 아닌 대조군 시료의 해당 유전자에서의 메틸화 수준과 비교하는 단계를 더욱 포함하는 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준의 측정 단계는

(a) 수득된 시료 내 게놈 DNA를 바이설파이트(bisulfite) 또는 이의 염, 또는 메틸화 민감성 제한효소로 처리하는 단계; 및

(b) 상기 처리된 DNA를 TNFRSF19 유전자 프로모터의 CpG 부위를 증폭할 수 있는 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 증폭하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 메틸화 수준을 검출하는 방법은 메틸화 특이적 중합효소반응(methylation-specific polymerase chain reaction), 실시간 메틸화 특이적 중합효소반응(real time methylation-specific polymerase chain reaction), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 정량 PCR, 파이로시퀀싱, 바이설파이트 시퀀싱, DNA 메틸레이션 마이크로어레이, 및 메틸화된 CpG 결합 도메인 또는 항-메틸사이토신 항체를 이용한 면

역침강법으로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유전자 CpG 부위의 메틸화 수준을 검출함으로써, 알츠하이머병 경도인지장애를 진단 또는 알츠하이머병 치매를 조기 진단하기 위한 조성물, 키트 및 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 한국의 빠른 경제 성장과 생활 방식의 서구화, 의학의 발전으로 인해 한국 국민의 평균 수명이 연장되는 한편, 한국은 전세계적으로 가장 빠르게 인구의 고령화가 진행되고 있다. 이에 따라 노화와 맞물려 발병하는 신경퇴행성질환 역시 가파르게 증가하고 있다.

[0003] 치매는 사회경제적 부담이 큰 대표적인 질환으로서, 그 중에서 알츠하이머병 치매는 치매의 가장 흔한 종류이다. 알츠하이머병 치매는 기억력 감퇴로 시작하여 시간과 공간의 인지 능력 상실, 망상 및 성격변화, 언어 기능 마비, 및 운동 기능 마비 등의 증상으로 장기간에 걸쳐 점진적으로 진행하여 결국 사망에 이르는 대표적인 신경퇴행성 뇌질환이다.

[0004] 알츠하이머병 치매를 치료하기 위한 연구가 지난 수십년간 지속적으로 진행되어 왔음에도 불구하고 현재까지 근본적인 치료제는 없으며 단지 증상을 완화하거나 병변의 진행을 늦추는 수준의 치료만이 행해지고 있는 실정이다. 따라서, 알츠하이머병 치매는 조기 진단 및 선제적 치료를 통해 치매의 발병시기를 지연시키는 것이 가장 효과적인 관리 방법으로 제시되고 있다.

[0005] 그러나, 현재 알츠하이머병 치매 진단에 사용되고 있는 신경인지검사의 경우 환자의 연령, 교육수준, 또는 의도적 대답 거부 등이 검사 결과의 정확도에 크게 영향을 미치는 단점이 있고, MRI나 PET을 이용한 뇌영상검사의 경우, 고가의 장비를 시용하기 때문에 특별한 증상을 나타내지 않는 초기단계에 검사를 시행하기가 어려운 단점이 있다.

[0006] 이에, 알츠하이머병 치매의 진단을 위한 다른 방법으로, 뇌척수액 또는 혈청에서 베타 아밀로이드 단백질을 검출하는 방법, tau 단백질의 농도를 측정하는 방법, 신경아교원섬유 산성 단백질(glial fibrillary acidic protein, GFAP)-항체를 검출하는 방법 등의 생화학적 방법들이 제안되었으나, 진단 방법의 임상 적용의 효율성과 정확도 등의 문제가 제기되고 있다 (국제공개특허 제92/17152호; 미국특허 제4,666,829호; 국제공개특허 제89/06242호; 미국특허 제5,231,000호 등).

[0007] 따라서, 알츠하이머병 치매의 조기진단을 위해 임상증상을 대변하거나, 증상이 나타나기 이전의 전임상 상태를 측정할 수 있는 새로운 진단 마커가 절실히 요구된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 국제공개특허 WO 1992-017152 (1992.10.15 공개)

(특허문헌 0002) 미국특허등록 US 4,666,829호 (1987.05.19 등록)

(특허문헌 0003) 국제공개특허 WO1989-006242 (1989.07.13 공개)

(특허문헌 0004) 미국특허등록 US 5,231,000호 (1993.07.27 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 TNFRSF19 (TNF receptor superfamily member 19) 유전자가 알츠하이머병, 구체적으로는 알츠하이머병 경도인지장애 및 알츠하이머병 치매에 특이적으로 고메틸화(hypermethylation)되는 것을 확인하고, 이를 바이오마커로 이용하여 TNFRSF19 유전자의 메틸화 정도를 측정함으로써 알츠하이머병 경도인지장애를 진단 또는 알츠하이머병 치매를 조기 진단할 수 있다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0010] 이에, 본 발명의 일예는 TNFRSF19 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는 알츠하이머병 경도인지장애의 진단 또는 알츠하이머병 치매의 조기 진단용 조성물을 제공한다.

[0011] 다른 예는 상기 조성물을 포함하는 알츠하이머병 경도인지장애의 진단 또는 알츠하이머병 치매의 조기 진단용 키트를 제공한다.

[0012] 다른 예는 TNFRSF19 유전자 프로모터의 CpG 부위에서의 메틸화 수준을 측정하여 알츠하이머병 경도인지장애를 진단 또는 알츠하이머병 치매를 조기 진단하는 방법을 제공한다.

[0013] 다른 예는 개체의 시료로부터 TNFRSF19 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 경도인지장애의 진단 또는 알츠하이머병 치매의 조기 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0014] 다른 예는 알츠하이머병 경도인지장애의 진단 또는 알츠하이머병 치매의 조기 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 개체의 시료로부터 TNFRSF19 유전자 프로모터의 CpG 부위에서의 메틸화 수준을 측정하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명은 TNFRSF19 유전자가 알츠하이머병, 구체적으로는 알츠하이머병 경도인지장애 및 알츠하이머병 치매에 특이적으로 고메틸화된다는 발견에 기초한 것으로, TNFRSF19 유전자의 특정 CpG 위치에서 일어나는 특이적인 DNA 고메틸화 정도를 측정하여 알츠하이머병을 진단하는 분자생물학적 진단 기술을 제공한다.

[0016] DNA 메틸화 변화는 DNA에 존재하기 때문에 검출이 용이하고, 단백질이나 RNA 마커들에 비해 안정적이며, 한 유전자의 특정 위치에서 일어나므로 분석이 손쉬운 장점을 가진다.

[0017] 구체적으로, 본원의 일실시예에서는, 정상 대조군 (아밀로이드 병리소견이 없는 정상인지기능군)과 알츠하이머병 경도인지장애 환자군 및 알츠하이머병 치매 환자군의 시료로부터 게놈 DNA를 추출하고, DNA 메틸화 변이 분석을 통해 DNA 메틸화 프로파일을 분석하였고, 정상 대조군과 비교하여 알츠하이머병 경도인지장애 및 알츠하이머병 치매환자의 유전자 프로모터 부위의 CpG 부위에서 30% 이상 DNA 메틸화가 변화한 유전자를 선별하였다. 이 선별된 유전자들 가운데 TNFRSF19 유전자가 정상 대조군에 비해 알츠하이머병 경도인지장애 환자군과 알츠하이머병 치매 환자군에서 프로모터의 CpG 부위의 DNA 메틸화가 각각 약 33% 및 32% 증가되어 있음을 확인하였고 리시버-작동 특징 커브(ROC curve: receiver operating characteristics curve) 분석을 통해 TNFRSF19 유전자 프로모터의 CpG 부위의 고메틸화가 정상 대조군 대비 알츠하이머병 경도인지장애 환자군 및 알츠하이머병 치매 환자군을 높은 정확도 (AUC = 0.9118, 0.9167)로 구분할 수 있음을 확인하였다.

[0018] 이러한 결과는 TNFRSF19 유전자의 질환 특이적 고메틸화가, 비침습적인 방법으로 알츠하이머병 경도인지장애를 진단하거나, 알츠하이머병 치매를 경도인지장애 단계부터 조기에 진단하기 위한 바이오마커로 활용할 수 있음을 나타낸다.

[0019] 따라서, 일 구체예는 TNFRSF19 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제를 포함하는 알츠하이머병 경도인지장애의 진단 또는 알츠하이머병 치매의 조기 진단용 조성물을 제공한다.

[0020] 다른 구체예는 상기 조성물을 포함하는 알츠하이머병 경도인지장애의 진단 또는 알츠하이머병 치매의 조기 진단용 키트를 제공한다.

[0021] 다른 구체예는 개체의 시료로부터 TNFRSF19 유전자 프로모터의 CpG 부위에서의 메틸화 수준을 측정하여 알츠하이머병 경도인지장애를 진단 또는 알츠하이머병 치매를 조기 진단하는 방법을 제공한다.

[0022] 다른 구체예는 개체의 시료로부터 TNFRSF19 유전자 프로모터의 CpG 부위에서의 메틸화 수준을 측정하는 단계를

포함하는, 알츠하이머병 경도인지장애의 진단 또는 알츠하이머병 치매의 조기 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0023] 다른 구체예는 알츠하이머병 경도인지장애의 진단 또는 알츠하이머병 치매의 조기 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 개체의 시료로부터 TNFRSF19 유전자 프로모터의 CpG 부위에서의 메틸화 수준을 측정하는 방법을 제공한다.

[0024] 본 발명에서 용어, "메틸화" 또는 "메틸레이션"은 DNA를 구성하는 염기에 메틸기가 부착되는 것을 말한다. 바람직하게, 본 발명에서 메틸화 여부는 특정 유전자 프로모터의 CpG 부위의 사이토신에서 일어나는 메틸화 여부를 의미한다. 메틸화가 일어난 경우 그로 인하여 전사인자의 결합이 방해를 받게 되어 특정 유전자의 발현이 억제되며, 반대로, 비메틸화 또는 저메틸화가 일어나는 경우 특정 유전자의 발현이 증가하게 된다.

[0025] 포유동물 세포의 게놈 DNA 에는 A, C, G 및 T 에 더하여, 사이토신 링의 다섯번째 탄소에 메틸 그룹이 부착된 5-메틸사이토신(5-methylcytosine, 5-mC)이라는 5번째 염기가 존재한다. 5-메틸사이토신의 메틸화는 CpG라고 불리는 CG 디뉴클레오티드(5'-mCG-3')의 C에서만 일어나고, CpG의 메틸화는 alu 또는 트랜스포존과 게놈의 반복서열이 발현되는 것을 억제한다. 또한, 상기 CpG의 5-mC가 자연적으로 탈아미노화하여 티민(T)이 되기 쉽기 때문에, CpG는 포유동물 세포에서 대부분의 후생유전학적 변화가 자주 일어나는 부위이다.

[0026] 본 발명에서 용어, "메틸화 수준의 측정"은 유전자 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것으로서, 메틸화 특이적인 PCR, 예를 들어 메틸화 특이적 PCR(methylation-specific polymerase chain reaction, MSP), 실시간 메틸화 특이적 PCR(real time methylation-specific polymerase chain reaction), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 또는 정량 PCR 등을 통해 측정할 수 있다. 또는, 파이로시퀀싱 또는 바이설파이트 시퀀싱과 같은 자동염기분석 등의 방법으로 측정하거나, DNA 메틸레이션 마이크로어레이, 또는 메틸화된 CpG 결합 도메인 또는 항-메틸사이토신 항체를 이용한 면역침강법 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 알츠하이머병이 아닌 사람의 시료에 비하여 또는 미리 결정된 임계값(cut-off)과 비교하여, 환자의 시료에서는 TNFRSF19 유전자에서의 고메틸화가 특이적으로 나타나는 것을 통해서, 알츠하이머병 경도인지장애를 진단하거나 알츠하이머병 치매를 조기 진단할 수 있다.

[0027] 인간 TNFRSF19 유전자는 13번 염색체에 위치하며, NCBI Entrez database 에 Gene ID: 55504 로 등록되어 있다.

[0028] 본 발명에서, 유전자의 CpG 부위란, 유전자의 DNA 상에 존재하는 CpG 부위를 말한다. 유전자의 DNA 는, 유전자가 발현하는데 필요하며 서로 작동가능하게 연결되어 있는 일련의 구성 단위를 모두 포함하는 개념으로, 예를 들어, 프로모터 영역, 단백질 코딩 영역(open reading frame, ORF) 및 터미네이터 영역을 포함한다. 따라서, 유전자의 CpG 부위는 해당 유전자의 프로모터 영역, 단백질 코딩 영역(open reading frame, ORF) 또는 터미네이터 영역 등에 존재할 수 있다. 바람직하게, TNFRSF19 유전자에서 질환 특이적 고메틸화가 일어나는 CpG 부위는 유전자의 프로모터에 존재할 수 있다.

[0029] 일예로, 본 발명에서 TNFRSF19 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 것은, TNFRSF19 유전자의 프로모터 CpG 부위, 보다 상세하게는 13 번 염색체의 23578361 내지 23578482 번째 염기서열(서열번호 1) 중에 나타나는 CpG 부위의 사이토신의 메틸화 수준을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 13 번 염색체의 23578421 번째 염기(서열번호 1의 61번째 염기)에 위치한 사이토신의 메틸화를 측정하는 것을 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명에서는 상기 인간 게놈 염색체 부위의 염기서열은 최신 버전인 GRCh38 Genome Reference Consortium Human Reference 38 (GRCh38/hg38) 에 따라 표현하였지만 상기 인간 게놈 염색체 부위의 구체적 서열은 게놈 서열 연구 결과가 업데이트됨에 따라서 그 표현이 다소 변경될 수 있으며, 이러한 변경에 따라 본 발명의 상기 인간 게놈 염색체 부위의 표현이 상이해질 수 있다. 따라서, 본 발명의 GRCh38 Genome Reference Consortium Human Reference 38 (GRCh38/hg38) 에 따라 표현된 인간 게놈 염색체 부위는 본 발명의 출원일 이후 인간 표준 염기서열(human reference sequence)이 업데이트되어 상기 인간 게놈 염색체 부위의 표현이 지금과 다르게 변경된다고 하여도, 본 발명의 범위가 상기 변경된 인간 게놈 염색체 부위에 미치게 됨은 자명하다고 할 것이다. 이러한 변경 내용은 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자라면 누구라도 용이하게 알 수 있는 사항이다.

[0031] 본 발명에서 용어, "알츠하이머병 (Alzheimer's disease, AD)"은 신경 퇴행성 뇌질환의 대표적인 질환으로 기억력저하를 초기 증상으로 하고, 이후 전반적인 인지기능의 저하를 보이는 병이다. 종래에는 알츠하이머병을 임상증상에 기반하여 정의하고, 뇌의 부검을 통해 확진하였으나, 최근에는 알츠하이머병과 관련된 신경병리학적

변화들이 밝혀지고 이를 임상검사로 활용할 수 있게 되면서, 이러한 변화를 생체 내(in vivo) 생물표지자를 통하여 확인함으로써 알츠하이머병을 정의할 수 있게 되었다. 현재도, 알츠하이머병의 확진은 사후 뇌의 부검소견이긴 하지만, 뇌의 부검소견의 대표적인 특징으로 알려져 있는 아밀로이드 단백 및 타우 단백의 병적인 축적을 PET 영상 또는 뇌척수액검사를 간접적으로 확인할 수 있게 되면서, 임상양상만으로 진단하던 시대에 비해 진단의 정확성이 획기적으로 발전하게 되었다.

[0032] 알츠하이머병을 정의하기 위한 생물표지자로는, 베타아밀로이드 관련 지표(예를 들어, 뇌피질의 amyloid-PET 리간드의 결합이나 뇌척수액에서의 $A\beta_{42}$ 의 감소), 신경원섬유매듭 형태의 타우 관련 지표 (예를 들어, 뇌척수액에서의 인산화 타우의 증가나 뇌피질의 tau-PET 리간드의 결합), 또는 신경퇴행의 지표 (예를 들어, 뇌척수액 총 타우의 증가 또는 MRI에서의 뇌위축과 FDG-PET에서의 뇌 대사저하) 등을 들 수 있다.

[0033] 미국 국립노화연구소(National Institute of Ageing, NIA)와 알츠하이머협회(Alzheimer Association, AA)가 2011년에 발표한 NIA-AA 알츠하이머병의 진단기준을 업데이트한, 2018년 알츠하이머병의 연구용 진단기준(Jack CR, et al., NIA-AA Research Framework: toward a biological definition of Alzheimer's disease. Alzheimers Dement 2018;14:535-562)에 따르면, 알츠하이머병은 치매의 임상증상이 나타나기 전이라도 알츠하이머병의 병리적 특성(상술한 바와 같은 알츠하이머병 생물표지자)이 관찰된다면 알츠하이머병의 진단기준에 포함된다. 구체적으로, 생물표지자와 인지 단계의 조합을 통하여 알츠하이머병을 크게 알츠하이머병 정상인지기능(preclinical Alzheimer's disease, AD), 알츠하이머병 경도인지장애 (prodromal Alzheimer's disease) 및 알츠하이머병 치매 (Symptomatic Alzheimer's disease)로 세분화하여 하나의 연속체(continuum) 개념으로 설명한다.

[0034] 알츠하이머병 정상인지기능은 생물학적 표지자검사에서 알츠하이머병의 병리 소견을 보이나, 임상증상은 없는 임상전(preclinical) 단계에 해당한다. 다음 단계인 알츠하이머병 경도인지장애는 생물학적 표지자검사에서 알츠하이머병의 병리 소견을 보이나, 경도의 객관적 인지저하가 있고, 독립적인 일상생활 수행능력은 유지되는 단계로서, "경도인지장애 단계의 알츠하이머병(AD with mild cognitive impairment)" 또는 "알츠하이머병 전구단계(prodromal AD)라는 용어도 병기된다. 알츠하이머병 치매는 생물학적 표지자 검사에서 알츠하이머병의 병리 소견을 보이고, 치매 증상이 발현되어, 객관적인 인지기능의 저하로 인해 독립적인 일상생활능력이 손상된다. "치매 단계의 알츠하이머병(AD with dementia)" 또는 "증상이 있는 알츠하이머병(Symptomatic AD)라는 용어도 병기된다.

[0035] 이에 따라, 본 발명에서 용어, "알츠하이머병 경도인지장애"는 알츠하이머병의 병리적 특성(생물표지자)을 나타내는 것을 전제로 하되, 객관적 인지저하가 있으나 일상생활수행능력은 보존되어 있어 치매가 아닌 상태로, 알츠하이머병 치매 발병 전의 단계를 말한다.

[0036] 이와 대비하여, 일반적인 "경도인지장애(mild cognitive impairment, MCI)"는 알츠하이머병뿐만 아니라, 다른 신경퇴행성질환 또는 다양한 요인으로 인하여 임상적으로 판단할 때, 인지능력이 감퇴되는 경우를 포함한다. 매년 일반 노인 인구의 1~2%에서 치매로 진행하는데 비하여, 경도인지장애 노인의 경우 1년에 5-20%에서 치매로 진행하는 것으로 알려져 있어, 경도인지장애는 치매의 고위험군으로 여겨진다. 그러나 경도인지장애는 알츠하이머병 치매가 아닌, 이마관자엽 치매나 혈관성 치매와 같은 다른 치매질환으로 진행되는 경우도 있고, 20~30%는 정상으로 회복되거나 치매로 진행되지 않고 경도인지장애 상태로 비슷하게 유지되는 것으로 알려져 있다.

[0037] 그러나, 본원에서 진단 대상이 되는 "알츠하이머병 경도인지장애"는 알츠하이머병으로 인한 경도인지장애, 즉 알츠하이머병의 병리적 특성(생물표지자)을 나타내는 경도인지장애를 말하는 것으로, 일반적인 경도인지장애에 비하여 알츠하이머병 치매로 진행될 가능성이 월등히 높다. 종래 보고에 따르면, 알츠하이머병에 의한 것이 아닌 경도인지장애의 경우 3년내 알츠하이머병 치매로 진행하는 비율이 약 5%에 불과하였으나, NIA-AA 진단기준에 따른 알츠하이머병 경도인지장애의 경우 3년내 알츠하이머병 치매로 진행하는 비율이 약 59%로서 월등히 높았다(Brain 2015: 138; 1327-1338).

[0038] 이에, 본원 발명의 메틸화 마커는, 정상 대조군 대비 알츠하이머병 경도인지장애 환자군 및 알츠하이머병 치매 환자군에 특이적으로 고메틸화되며, ROC 커브 분석을 통해 정상군과 상기 환자군을 구별하는 유효성이 확인되었으므로, 알츠하이머병 경도인지장애를 진단할 수 있을 뿐만 아니라, 알츠하이머병 경도인지장애에서 알츠하이머병 치매로 진행되는 환자를 정확하게 예측함으로써 알츠하이머 치매를 경도인지장애 단계부터 조기에 진단할 수 있는 마커로 활용될 수 있다.

[0039] 또한 본 발명의 조성물, 키트 및 방법은 알츠하이머성 치매를 조기 진단함으로써, 알츠하이머병 치매로의 진행

가능성이 높은 환자를 선별하여 적극적인 예방관리 및 조기치료를 통해 질병의 악화를 지연시킬 수 있다. 또한 추후 임상적으로 활용될 경우, 조기 발견으로 인해 치매의 발병지연 및 유병률 감소 효과를 거둘 수 있으며, 궁극적으로 환자와 가족의 삶의 질을 향상시키고 나아가 국가가 부담하게 되는 사회경제적 비용을 크게 줄일 수 있다.

[0040] 본 발명에서 "진단"이란 질환의 존재, 질환 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 포괄적으로, 진단은 특정 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 확인하거나, 증상이 나타나기 이전의 상태를 측정하거나, 질환의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 나아가 질환의 진행 여부 또는 심화 여부를 확인하는 것을 포함할 수 있다.

[0041] 본 발명에서 "조기 진단"은 질환의 존재, 질환 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하거나, 질환의 발병 여부, 진행 여부 또는 심화 여부를 증상이 나타나기 이전의 상태부터 예측하는 것을 의미한다.

[0042] 본 발명에서, CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 제제는 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소, 유전자의 메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머, 비메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머, 메틸화된 CpG 결합 도메인, 또는 메틸화 DNA에 특이적으로 결합하는 메틸화 DNA항체 (예를 들어, 메틸사이토신에 특이적으로 결합하는 항체) 등을 포함할 수 있다.

[0043] 상기 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 바이설파이트(bisulfite) 또는 이의 염일 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 바람직하게는 소듐 바이설파이트일 수 있다. 바이설파이트 변형된 DNA 는 서열분석 또는 메틸화 특이적 PCR 등 다양한 방법을 통하여 메틸화를 검출할 수 있으며, 이러한 바이설파이트를 이용하여 비메틸화 사이토신 잔기를 변형시켜 유전자의 메틸화 여부를 검출하는 방법은 당 업계에 널리 공지되어 있다(예를 들어, WO01/26536; US2003/0148326A1).

[0044] 또한, 상기 메틸화 민감성 제한효소는 CpG 부위의 메틸화를 특이적으로 검출할 수 있는 제한효소로서 제한효소의 인식부위로 CG를 함유하는 제한효소일 수 있다. 예를 들면, *Sma*I, *Sac*II, *Eag*I, *Hpa*II, *Msp*I, *Bss*HII, *Bst*UI, *Not*I 등이 있으며 이에 제한되지 않는다. 상기 제한효소 인식부위의 C에서의 메틸화 또는 비메틸화에 따라 제한효소에 의한 절단 여부가 달라지고 이를 PCR 또는 서던블롯(Southern Blot) 분석을 통해 검출할 수 있게 된다. 상기 제한효소 이외의 다른 메틸화 민감성 제한효소는 당 업계에 잘 알려져 있다.

[0045] 개체의 유전자의 특정 CpG 부위에서의 메틸화 수준을 측정하는 대표적인 일예로서, 환자의 시료에서 게놈 DNA를 수득하고, 수득한 DNA에 메틸화되지 않은 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소를 처리한 후, 상기 처리된 DNA를 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 증폭시키고 그 증폭된 결과물의 존부를 확인하는 것을 통해 측정할 수 있다.

[0046] 따라서, 본 발명의 제제는 유전자의 메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머 및 비메틸화된 대립형질 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 본 발명에서, 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3 말단 수산화기를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 또한, 프라이머는, 7개 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 센스 및 안티센스 핵산으로서, DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다.

[0047] 본 발명의 프라이머는 메틸화 여부를 분석하는 대상이 되는 특정 CpG 부위의 서열에 따라 바람직하게 디자인될 수 있으며, 각각 메틸화되어 바이설파이트에 의해 변형되지 않았던 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍, 및 메틸화되지 않아 바이설파이트에 의해 변형된 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍일 수 있다.

[0048] 한편, 메틸화 DNA 항체란, DNA 중의 메틸화된 염기에 특이적으로 결합하는 항체를 말한다. 구체적으로는, 메틸사이토신에 대한 항체와 같이, DNA 사슬 중 메틸화된 사이토신을 인식하여 결합하는 성질을 가진 항체를 들 수 있다. 또한, 시판되고 있는 메틸화 DNA 항체 중에서, 본원에 기재된 메틸화 상태의 DNA를 특이적으로 인식하여 특이적으로 결합할 수 있는 항체일 수 있다.

[0049] 메틸화 DNA 항체는 메틸화된 염기, 메틸화 DNA 등을 항원으로 하여 통상의 방법에 의해 제작할 수 있다. 예를 들어, 메틸사이토신 항체를 제조하기 위해서는, 5-메틸사이티딘, 5-메틸사이토신, 또는 5-메틸사이토신을 포함하는 DNA 등을 항원으로 하여 항체를 제조한 후 DNA 중의 메틸사이토신으로의 특이적인 결합을 지표로서 선별

할 수 있다.

[0050] 또한, 메틸화된 CpG 결합 도메인(CpG binding domain: MBD) 또는 메틸화 DNA 항체를 이용하여 메틸화 수준을 측정하는 경우, 이들을 이용하여 메틸화된 DNA 를 면역침강시킨 후, 서던블롯, PCR, 마이크로어레이, 또는 서열분석(sequencing) 등을 통해 특정 CpG 부위를 확인할 수 있다. 또한, 항체의 면역학적 검출 또는 정량을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질 표지, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 및 발색 기질 등을 사용할 수 있다. 상기에서 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스틸렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드 글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(peroxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase) 등이 사용될 수 있고, 형광 물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있고, 발색기질액은 ABTS(2,2'-아지노-비스-(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘)가 사용될 수 있고, 그 외 방사성 동위원소 표지, 라텍스 비드 표지, 콜로이드 표지, 비오틴 표지 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0051] 상기 조성물 및 키트에는 상기 제제 이외에도, 중합효소 아가로스, 전기영동에 필요한 완충용액 등이 추가로 포함될 수 있다. 또한, 상기 키트는 DNA 메틸화 마이크로어레이 형태로 구현될 수 있다.

[0052] 다른 구체예로, 본 발명은 TNFRSF19 유전자 프로모터의 CpG 부위에서의 메틸화 수준을 측정하여 알츠하이머병 경도인지장애를 진단 또는 알츠하이머병 치매를 조기 진단하는 방법에 관한 것이다.

[0053] 또한, 본 발명은 알츠하이머병 경도인지장애의 진단 또는 알츠하이머병 치매의 조기 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 개체의 시료로부터 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0054] 또한, 본 발명은 개체의 시료로부터 TNFRSF19 유전자 프로모터의 CpG 부위에서의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 경도인지장애의 진단 또는 알츠하이머병 치매의 조기 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

[0055] 이를 위한 일 구현예로, 본 발명은 개체의 시료로부터 TNFRSF19 유전자 프로모터의 CpG 부위의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 상기 메틸화 수준을 알츠하이머병이 아닌 대조군 시료의 해당 유전자의 메틸화 수준과 비교하거나 미리 결정된 임계값(cut-off)과 비교하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 경도인지장애의 진단 또는 알츠하이머병 치매의 조기 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0056] 본 발명에서 용어 "시료"란 알츠하이머병에 의해 유전자의 메틸화 수준이 차이 나는 세포, 조직, 전혈, 혈청, 혈장, 뇌척수액, 타액, 객담 또는 뇨와 같은 시료를 포함하나, 상기 예시에 제한되지 않고 DNA 추출이 가능한 모든 시료를 사용할 수 있다. 바람직한 구체예로는, 피부 조직 또는 피부 세포를 포함하고, 예를 들어 피부 섬유아세포 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0057] 먼저, 개체의 시료로부터 게놈 DNA를 수득하여 메틸화 수준을 검출하기 위하여, 게놈 DNA의 수득은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 페놀/클로로포름 추출법, SDS 추출법(Tai et al., Plant Mol. Biol. Reporter, 8: 297-303, 1990), CTAB 분리법(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide; Murray et al., Nuc. Res., 4321-4325, 1980) 또는 상업적으로 판매되는 DNA 추출 키트를 이용하여 수행할 수 있다.

[0058] 상기 유전자의 특정 CpG 부위의 메틸화 수준을 검출하는 단계는, 메틸화된 염기와 메틸화되지 않은 염기의 차이를 이용한, 제한효소 또는 바이설파이트를 이용하는 방법, 메틸화된 CpG 결합 도메인 또는 항-메틸사이토신 항체를 이용한 면역침강방법(예, MIRA, MeDIP), DNA 메틸레이션 마이크로어레이를 이용한 방법 등을 통해 수행될 수 있다. 예를 들어, 메틸화 특이적 중합효소반응(methylation-specific polymerase chain reaction), 실시간 메틸화 특이적 중합효소반응(real time methylation-specific polymerase chain reaction), 메틸화 DNA 특이적 결합 단백질을 이용한 PCR, 정량 PCR, 파이로시퀀싱, 바이설파이트 시퀀싱, DNA 메틸레이션 마이크로어레이, 또는 메틸화된 CpG 결합 도메인 또는 항-메틸사이토신 항체를 이용한 면역침강법 등을 사용하여 메틸화 수준을 측정 내지 검출할 수 있다.

[0059] 일예로, 본원의 방법은 (a) 수득된 시료 내 게놈 DNA를 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물 또는 메틸화 민감성 제한효소로 처리하는 단계; 및 (b) 상기 처리된 DNA를 해당 유전자의 특정 CpG 부위를 증폭할 수 있는 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 증폭하는 단계를 포함할 수 있다.

[0060] 상기 (a) 단계에서 비메틸화 사이토신 염기를 변형시키는 화합물은 바이설파이트일 수 있으며, 바람직하게는 소듐 바이설파이트일 수 있다. 이러한 바이설파이트를 이용하여 비메틸화 사이토신 잔기를 변형시켜 유전자의 메틸화 여부를 검출하는 방법은 당 업계에 널리 공지되어 있다.

[0061] 또한, 상기 (a) 단계에서 메틸화 민감성 제한효소는 상기에서 설명한 바와 같이, 특정 CpG 부위의 메틸화를 특이적으로 검출할 수 있는 제한효소로서 제한효소의 인식부위로 CG를 함유하는 제한효소일 수 있으며, 예를 들면, *Sma*I, *Sac*II, *Eag*I, *Hpa*II, *Msp*I, *Bss*HII, *Bst*UI, *Not*I 등이 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0062] 상기 (b) 단계에서 증폭은 통상적인 PCR 방법에 의해 수행될 수 있다. 이때 사용되는 프라이머는 상기에서 설명한 바와 같이, 메틸화 여부를 분석하는 대상이 되는 특정 CpG 부위의 서열에 따라 바람직하게 디자인될 수 있으며, 각각 메틸화되어 바이설파이트에 의해 변형되지 않았던 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍 및 메틸화되지 않아 바이설파이트에 의해 변형된 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 쌍일 수 있다.

[0063] 상기 유전자의 특정 CpG 부위의 메틸화 수준을 검출하는 단계는, (c) 상기 (b) 단계에서 증폭된 결과물의 존부를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 (c) 단계에서 증폭된 결과물의 존부는 당 업계에 공지된 방법, 예를 들면 전기영동을 수행하여 원하는 위치의 밴드의 검출 여부에 따라서 수행될 수 있다. 예를 들면, 비메틸화 사이토신 잔기를 변형시키는 화합물을 사용한 경우 상기 (a) 단계에서 사용한 두 종류의 프라이머쌍, 즉 메틸화되어 바이설파이트에 의해 변형되지 않았던 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍 및 메틸화되지 않아 바이설파이트에 의해 변형된 사이토신을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머쌍에 의해 각각 증폭된 PCR 결과물의 존부에 따라 메틸화 정도를 판단할 수 있다. 바람직하게, 샘플 게놈 DNA를 바이설파이트로 처리하고, 해당 유전자의 CpG 부위를 PCR로 증폭하고, 증폭된 부위의 염기서열을 분석하는 바이설파이트 게놈 시퀀싱 방법을 사용하여 메틸화 여부를 판단할 수 있다.

[0064] 또한, 제한효소를 이용한 경우에도 당 업계에 공지된 방법, 예를 들어 mock DNA에서 PCR 결과물이 나타난 상태에서, 제한효소로 처리된 DNA에서 PCR 결과물이 있는 경우는 CpG가 메틸화된 것으로 판단하고, 제한효소로 처리된 DNA에서 PCR 결과물이 없는 경우는 CpG가 비메틸화 한 것으로 판단하는 것에 따라 그 메틸화 여부를 판단할 수 있으며, 이는 당업자에게 자명하다. 상기에서 mock DNA란 시료에서 분리되고 아무런 처리를 하지 않은 상태의 시료 DNA를 의미한다.

[0065] 유전자의 특정 CpG 부위의 메틸화 수준을 검출하는 다른 예로, 메틸화 DNA 항체, 예를 들어 메틸화된 CpG 결합 도메인(CpG binding domain: MBD) 또는 메틸사이토신에 대한 항체를 이용한 면역침강방법을 예시할 수 있다. 예를 들어, 메틸화된 CpG 결합 도메인 또는 5-메틸사이토신을 특이적으로 인지하는 항체를 이용하여 면역침강한 후 서던블롯, PCR, 마이크로어레이, 또는 서열분석(sequencing)등을 통해 특정 CpG 부위를 확인할 수 있다.

[0066] 이와 같은 방법에 따라, 대상 시료 내 TNFRSF19 유전자 프로모터의 CpG 부위가 고메틸화 상태로 검출되는 경우, 알츠하이머병 경도인지장애를 진단 또는 알츠하이머병 치매를 조기 진단 또는 예측할 수 있는 것이다.

[0067] 따라서, 상기 본 발명에 따를 경우, 유전자의 특정 CpG 부위의 메틸화 변화는 개체의 시료에서 특이적으로 나타나므로, 유전자의 메틸화 변화를 바이오마커로 사용하여 알츠하이머병의 진단 또는 조기 진단에 유용하게 사용될 수 있다. 예를 들어, TNFRSF19 유전자의 특정 CpG 부위의 고메틸화를 바이오마커로 사용하여 알츠하이머병 경도인지장애의 진단 또는 알츠하이머병 치매의 조기 진단에 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0068] 본 발명은 환자의 시료에서 채취한 게놈 DNA의 특정 유전자 CpG 부위의 메틸화 정도를 측정하여 알츠하이머병 경도인지장애 또는 알츠하이머병 치매를 진단 또는 조기 진단하는 분자생물학적 진단법을 제공하며, 이는 간편하고 비침습적이며 경제적인 장점이 있다. 또한, DNA 메틸화 변화는 검출이 용이하고, 종래 단백질이나 RNA 마커들에 비해 안정적이며 분석이 쉬운 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0069] 도 1은 정상 대조군과 알츠하이머병 경도인지장애 환자군에서 TNFRSF19 유전자의 DNA 메틸화 정도의 차이를 나타낸 것이다.

도 2는 정상 대조군과 알츠하이머병 치매 환자군에서 TNFRSF19 유전자의 DNA 메틸화 정도의 차이를 나타낸 것이다.

도 3의 왼쪽 그림은 TNFRSF19 유전자의 DNA 메틸화 변화를 이용하여 알츠하이머병 경도인지장애 환자군과 정상 대조군을 구별할 수 있는 유효성을 평가하기 위한 리시버-작동 특징 커브(ROC curve: receiver operating characteristics curve) 분석 결과를 나타낸 것이고, 오른쪽 그림은 TNFRSF19 유전자의 DNA 메틸화 변화를 이

용하여 알츠하이머병 치매 환자군과 정상 대조군을 구별할 수 있는 유효성을 평가하기 위한 ROC 커브 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0070] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0072] **실시예 1. 연구대상**

[0073] 알츠하이머병 환자군은 알츠하이머병 정상인지기능군 (preclinical Alzheimer's disease, AD), 알츠하이머병 경도인지장애군 (prodromal Alzheimer's disease), 알츠하이머병 치매군 (Symptomatic Alzheimer's disease)의 세 군을 포함한다. 대조군으로는 정상 대조군 (정상인지기능이고, 아밀로이드 병리 소견이 없는 그룹), 알츠하이머병에 의한 것이 아닌 경도인지장애군 (mild cognitive impairment due to non-AD), 알츠하이머병에 의한 것이 아닌 치매군 (dementia due to non-AD)의 세 군으로 구성된다.

[0074] 상기 6군의 연구대상자의 진단 및 분류는 다음과 같은 네 단계에 따라 수행되었다:

[0075] 첫 번째 단계로, 2018년부터 2019년까지 이화여대 목동병원에 내원한 환자를 대상으로, 연구대상자와 대상자의 보호자와 함께, 신경과 의사의 구조화된 면담을 통해 병력을 청취하였다.

[0076] 두 번째 단계로, 신경심리검사를 통해 현재 인지 기능의 저하된 정도 및 일상생활능력의 저하 여부를 판단하였다. 이 두 단계를 거치면서 인지기능 저하의 세 단계, 즉, 정상인지기능, 경도인지장애, 치매의 세 단계를 판단하였다. 정상인지기능군의 경우, 주관적 인지 저하의 호소와 별개로, 객관적인 신경심리검사의 모든 항목에서 표준 점수 (z score ≥-1.5) 이상의 검사 결과를 보여, 인지 저하의 객관적 소견이 없고, 일상생활능력의 손상이 없는 상태이다. 경도인지장애의 경우, 환자 또는 정보제공자의 기억력저하에 대한 호소가 있으며, 신경심리검사에서 표준점수에서 1.5 이하 (z score <-1.5)의 결과를 보여, 객관적인 기억력 저하가 있으나, 전반적인 인지기능과 일상생활능력이 유지되는 군이다. 치매군은 두 가지 이상의 인지영역에서 객관적인 저하 (표준점수 1.5 이하)의 소견을 보이고, 서서히 진행하는 임상양상과 함께, 일상생활능력의 손상으로 인해, 다른 사람의 보살핌이 필요한 군이다.

[0077] 세 번째 단계로, 혈액 검사 및 뇌의 구조적 영상 (computed tomography, CT 또는 magnetic resonance imaging, MRI), 뇌의 기능적 영상 (functional MRI, amyloid positron emission tomography, amyloid PET)을 시행하여, 인지 기능의 저하를 일으킬 수 있는 다른 원인을 배제하고, 뇌 안의 아밀로이드 병리소견의 축적 여부를 확인하였다. 인지 기능의 저하를 유발할 수 있는 다른 원인을 배제하는 것은 알츠하이머병 진단에서 중요한 단계로, 혈액검사에서 갑상선 호르몬의 기능 이상, 비타민 B12 또는 엽산 결핍증, 신경매독 등을 확인해서 이러한 가능성을 배제하는 것이 중요하며, 이외에도, 알코올 중독, 약물 중독, 주요 우울장애, 양극성 장애, 조현병, 경련질환의 경우에도, 인지기능 저하와 연관이 있을 수 있으므로 배제하였다. 또한 뇌영상검사상, 구조적 뇌 이상, 예를 들면, 정상압수두증, 뇌졸중, 뇌종양 등의 이상을 배제하였고, 파킨슨병, 루이소체치매, 혈관성 치매와 같은 다른 신경퇴행성질환의 경우에도 배제하였다. 2018년 알츠하이머병의 연구용 진단기준에 따라, 아밀로이드 PET에서 양성인 경우 (Brain amyloid Plaque load, BAPL 2 or 3)의 경우, 알츠하이머병이 있다고 판단하였고, 임상 증상에 따라 preclinical, prodromal, and symptomatic AD 중 한 군으로 판단하였다. 아밀로이드 PET에서 음성 (BAPL 1)은 대조군으로 판단하고 임상 증상에 따라, 정상 대조군 (정상인지기능이고, 아밀로이드 병리 소견이 없는 그룹), 알츠하이머병에 의한 것이 아닌 경도인지장애군 (mild cognitive impairment due to non-AD), 알츠하이머병에 의한 것이 아닌 치매군 (dementia due to non-AD) 중 한 군으로 결정였다. 네 번째로, 이 세 단계의 임상 정보들을 종합하여, 6개의 군으로 최종적인 판단을 내렸다.

[0079] **실시예 2. 피부생검 채취 및 피부 섬유아세포 배양**

[0080] 환자의 허벅지 안쪽에서 2 mm지름의 원통모양의 칼날을 이용하여 피부 생검을 채취하였다. 채취한 피부 생검을 6등분하여 피부 생검 조각이 잠길 정도의 배지 (DMEM/20% FBS)를 0.1% 젤라틴으로 코팅된 24웰 세포 배양 플레이트에 넣고 7일 동안 피부 생검 조각 모서리에서 세포가 뻗어 나오는 것을 관찰하였다. 피부 생검 조각이 건조되는 것을 방지하기 위해 2-3일 간격으로 배지를 보충하였다. 7일 후 배지의 양을 500 μL로 늘리고 2-3일 간격으로 배지를 갈아주었고 14일 후 피부 생검 조각 주변으로 세포가 자라서 배양 웰의 외각까지 세포가 채워지면 35 mm 배양 디쉬로 옮겨서 배지의 우태아혈청(FBS)의 농도를 20%에서 10%로 낮춘 후 세포배양을 계속하였다. 세포가 35 mm 배양 디쉬의 80-90% 정도 채워지면 계대배양을 실시하였다. 계대배양을 2-3번 반복 실시하여 피부섬

유아세포만 선택배양되면 SERPHINH1 항체를 이용하여 섬유아세포 마커인 SERPHINH1을 발현을 확인하였다.

[0082] **실시예 3. Genomic DNA추출**

[0083] 실시예 2에서 배양한 피부 섬유아세포에서 genomic DNA는 QIAmp DNA mini kit (Qiagen)를 이용하여 추출하였다. 추출방법은 제조사의 매뉴얼을 따라 실시하였다. 추출된 genomic DNA는 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 정량하였으며, DNA 상태는 1% 아가로스 젤에서 전기영동하여 degradation 여부를 확인하였다.

[0085] **실시예 4. DNA 메틸레이션 변이 분석**

[0086] DNA 메틸레이션 변이 분석은 환자군과 대조군의 피부섬유아세포에서 DNA를 추출한 후 바이설파이트 전환(Bisulfite conversion)을 수행하여 비메틸화된 사이토신을 우라실로 바꾼 후, Infinium MethylationEPIC bead chip (illumina)을 사용하여 약 850,000 개의 CpG 부위에 대하여 메틸화 정도를 측정하였다. DNA 메틸화 정도는 0~1 값을 갖는 β 값으로 표시되며 β값 0은 해당 CpG 부위가 완전히 비메틸화된 것을 의미하며, 1은 완전히 메틸화된 것을 의미한다.

[0087] 환자군과 대조군에서 차별적으로 메틸화되어 있는 유전자 (Differentially methylated genes, DMGs)를 확인하기 위하여 independent t-test 방법을 사용하였다. 최종적으로 p value<0.05이면서 절대값 β 차이≥0.3 인 프로모터 CpG 부위를 차별적으로 메틸화되어 있는 CpG 부위(differentially methylated CpG site)로 선정하고, 이 중에서 CpG 부위의 메틸화 정도가 변한 유전자를 DMG로 선정하였다.

[0089] **실험결과**

[0090] **1. 알츠하이머병 경도인지장애 환자군에서 질환 특이적 DNA 메틸화의 변화 확인**

[0091] 4명의 정상 대조군(아밀로이드 병리소견이 없는 정상인지기능군)과 17명의 알츠하이머병 경도인지장애 환자군의 DNA 메틸화 변화를 분석한 결과, 알츠하이머병 경도인지장애 환자군에서 차별적으로 DNA 메틸화 수준이 변화되어 있는 12종의 DMG를 선별하였으며, 그 중 TNFRSF19의 결과는 다음 표 1에 기술하였다.

표 1

[0092]

유전자	Target ID	β 값 (difference)[1)]	메틸화 상태	p 값
TNFRSF19	cg03258760	0.3333664	고메틸화	0.0051145
1) 환자군 세포의 β 값에서 정상대조군 세포의 β값을 뺀 값				

[0093] 정상 대조군과 알츠하이머병 경도인지장애 환자군에서 선정된 유전자의 DNA 메틸화 정도의 차이를 도 1에 scatter dot plot으로 나타냈으며, 평균 ± 표준오차 (mean ± SEM) 값을 표시하였다.

[0095] **2. 알츠하이머병 치매 환자군에서 질환 특이적 DNA 메틸화 변화 확인**

[0096] 4명의 정상 대조군(아밀로이드 병리소견이 없는 정상인지기능군)과 12명의 알츠하이머병 치매 환자군의 DNA 메틸화 변화를 분석한 결과, 알츠하이머병 치매 환자군에서 차별적으로 DNA 메틸화 수준이 변화되어 있는 23종의 DMG를 선별하였으며, 그 중 TNFRSF19의 결과는 다음 표 2에 기술하였다.

표 2

[0097]

유전자	Target ID	β 값 (difference)[1)]	메틸화 상태	p 값
TNFRSF19	cg03258760	0.3198737	고메틸화	0.0087497
1) 환자군 세포의 β 값에서 정상대조군 세포의 β값을 뺀 값				

[0098] 정상 대조군과 알츠하이머병 치매 환자군에서 선정된 유전자의 DNA 메틸화 정도의 차이를 도 2에 scatter dot plot으로 나타냈으며, 평균 ± 표준오차 (mean ± SEM) 값을 표시하였다.

[0100] **3. DNA 메틸화 변화를 이용한 알츠하이머병 치매 조기진단 마커의 선정**

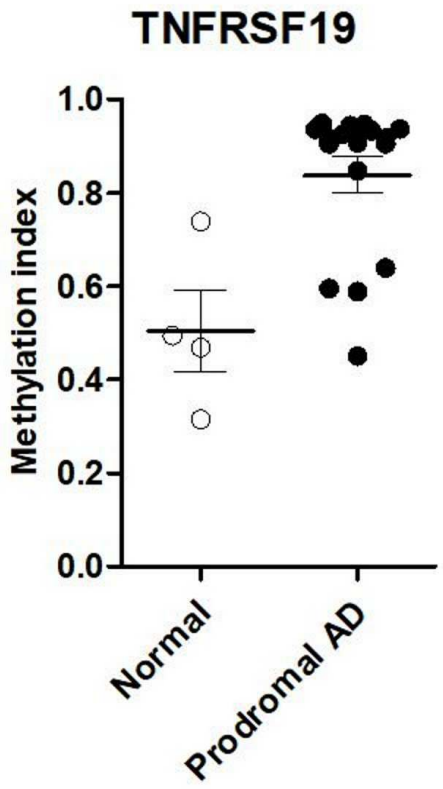
[0101] 알츠하이머병 경도인지장애 환자군에서 차별적으로 DNA 메틸화 수준이 변화되어 있는 12종의 DMG와 알츠하이머병 치매 환자군에서 차별적으로 DNA 메틸화 수준이 변화되어 있는 23종의 DMG를 대상으로, 리시버-작동 특징 커브(ROC curve: receiver operating characteristics curve) 를 이용하여 환자군과 정상 대조군을 구별할 수 있는지 확인하였다. 일반적으로 ROC 커브의 곡선하 면적(AUC; Area under the curve) 수치에 따라 비정보적(AUC=0.5), 덜 정확한(0.5<AUC≤0.7), 중등도의 정확한(0.7<AUC≤0.9), 매우 정확한(0.9<AUC<1.0) 그리고 완벽한 검사(AUC=1.0)로 분류한다.

[0102] TNFRSF19의 경우 알츠하이머병 경도인지장애 환자군과 알츠하이머병 치매 환자군에서 고메틸화되어 있었으며 이 고메틸화 정도는 정상 대조군 대비 알츠하이머병 경도인지장애 환자군 및 알츠하이머병 치매 환자군을 높은 정확도 (AUC = 0.9118, 0.9167)로 구분할 수 있음을 확인하였다 (도 3). 이러한 결과는 알츠하이머병 치매 환자의 피부 섬유아세포에서 나타나는 TNFRSF19 유전자의 질환 특이적 고메틸화가, 비침습적인 방법으로 알츠하이머병 경도인지장애를 진단하거나, 알츠하이머병 치매를 경도인지장애 단계부터 조기에 진단하는 알츠하이머병 치매 조기 진단마커로 유효하다는 것을 나타낸다.

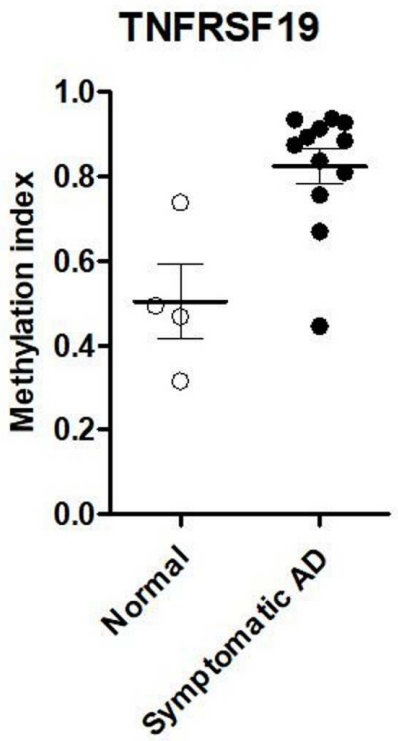
[0103] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

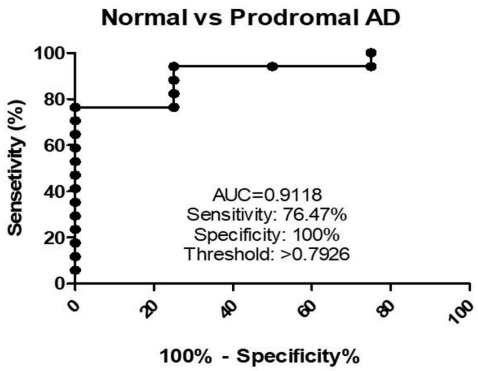
도면1

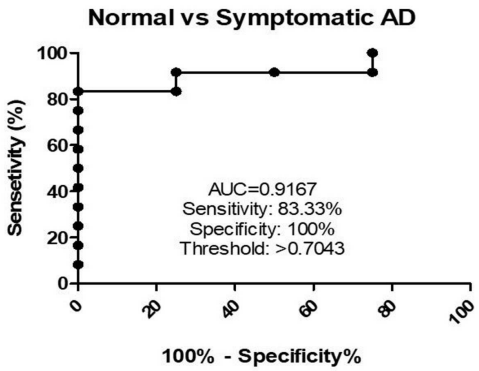


도면2



도면3





서 열 목 록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Early diagnostic biomarker for Alzheimer's dementia using alteration in DNA methylation of TNFRSF19 gene

<130> DPP20200597KR

<160> 1

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> promoter

<222> (1)..(122)

<223> ch13: 23578361-23578482

<400> 1

aaggtgtgac atcgggaata atatttttaa cattgttcac aagtacctag tatagtgcta 60

cgccgttgga agcctgggat cacaagctgt gcttttgggc aattaaatac aacaacctat 120

tc 122