



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0104668
(43) 공개일자 2025년07월08일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>C12Q 1/6883</i> (2018.01) <i>G01N 33/50</i> (2017.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
<i>C12Q 1/6883</i> (2022.01)
<i>G01N 33/5067</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2023-0197310</p> <p>(22) 출원일자 2023년12월29일
심사청구일자 2023년12월29일</p> | <p>(71) 출원인
울산과학기술원</p> <p>(72) 발명자
최장현
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50</p> <p>이요한
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50</p> <p>(74) 대리인
특허법인 무한</p> |
|---|--|

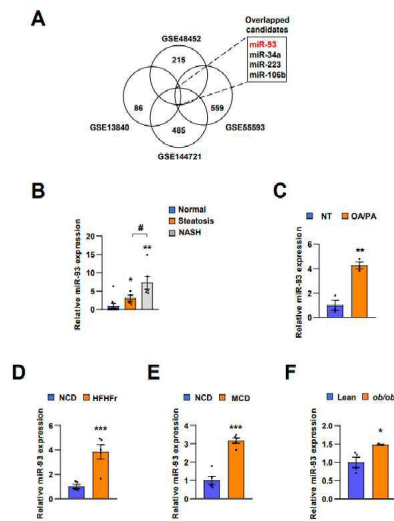
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 비알코올 지방간 질환 진단용 바이오마커 miR-93

(57) 요약

본 발명은 비침습적 체외 진단을 위한 비알코올 지방간 질환 진단용 바이오마커 조성물 등에 관한 것으로서, 본 발명은 환자의 혈청에서 miRNA-93의 수준을 측정함으로써 비알코올 지방간 질환의 정확한 진단 결과를 제공하는 바 종래 침습적 검사방법에 의한 부작용을 배제할 수 있고 간단하고 경제적으로 비알코올 지방간 질환의 조기 진단과 적절한 치료가 가능하게 한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/136 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

C12Q 2600/178 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345362691
과제번호	2021R1I1A2041463
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	지방-간 대사축 규명을 통한 비알코올성 지방간 및 간암 유발기전 연구
기 여 율	40/100
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345370986
과제번호	00249887
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	miRNA 제어를 통한 비 알코올성 지방간의 치료 기술 개발
기 여 율	30/100
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2023.06.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711180283
과제번호	2018R1A5A1024340
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	대사스트레스 세포대응 연구센터
기 여 율	30/100
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

miRNA-93를 포함하는 비알코올 지방간 질환 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 miRNA-93는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 3

miRNA-93의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 비알코올 지방간 질환 진단용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 miRNA-93의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 miRNA-93에 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드, 프라이머, 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 5

제3항의 조성물을 포함하는, 비알코올 지방간 질환 진단용 키트.

청구항 6

환자의 생물학적 시료로부터 miRNA-93 발현 수준을 측정하는 단계;를 포함하는 비알코올 지방간 질환을 진단하기 위한 정보제공방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 환자로부터 분리된 간 조직 또는 간 세포 샘플인 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 측정하는 단계 이후에 정상인의 miRNA-93 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 정보제공방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 비교하는 단계 이후에 정상인보다 miRNA-93 발현 수준이 1.5 배 이상인 경우 상기 환자는 비알코올 지방간 질환으로 판별하는 단계를 포함하는, 정보제공방법.

청구항 10

miRNA-93를 포함하는, 비알코올 지방간 질환 중 단순 지방증과 지방간염 감별 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 miRNA-93는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 12

miRNA-93의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 비알코올 지방간 질환 중 단순 지방증과 지방간염 감별용 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 miRNA-93의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 miRNA-93에 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드, 프라이머, 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 14

제12항의 조성물을 포함하는, 비알코올 지방간 질환 중 단순 지방증과 지방간염 감별용 키트,

청구항 15

환자의 생물학적 시료로부터 miRNA-93 발현 수준을 측정하는 단계;를 포함하는 단순 지방증과 비알코올 지방간염을 감별하여 진단하기 위한 정보제공방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 환자는 비알코올 지방간 질환으로 진단받은 환자이고,

상기 생물학적 시료는 환자로부터 분리된 간 조직 또는 간 세포 샘플인 것인, 정보제공방법.

청구항 17

제15항에 있어서,

상기 측정하는 단계 이후에 단순 지방증 환자의 miRNA-93 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 정보제공방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 비교하는 단계 이후에 단순 지방증 환자보다 miRNA-93 발현 수준이 1.5 배 이상인 경우 비알코올 지방간염으로 판별하는 단계를 포함하는, 정보제공방법.

청구항 19

miRNA-93의 발현을 억제하는 제제를 포함하는, 비알코올 지방간염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 제제는 siRNA, 앵타머(aptamer), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 및 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 21

하기 단계를 포함하는, 비알코올 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약제의 스크리닝 방법:

(1) 간 세포에 후보물질을 처리하고 miRNA-93의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(2) miRNA-93의 발현 수준이 감소한 경우 상기 후보물질을 비알코올 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약제로 선정하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비침습적 체외 진단을 위한 비알코올 지방간 질환 진단용 바이오마커 조성물 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 비알코올 지방간 질환(Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 영상의학 검사나 간 조직검사에서 간 조직에 지방 침착이 나타나는 경우, 이러한 지방간의 원인으로서 알코올, 약물 및 다른 요인들이 배제되었을 때 진단할 수 있는 질환이다. 병리 기전상 단순 지방증 (steatosis)에서 비알코올 지방간염(Nonalcoholic steatohepatitis, NASH)을 거쳐 비알코올 지방간 연관 간경변증으로 진행할 수 있는데 비알코올 지방간 질환은 이러한 일련의 질환을 모두 포괄하는 용어이다. 국내 연구에서의 비알코올 지방간 질환 유병률은 진단 방법에 따라 큰 차이가 있다. 비알코올 지방간질환을 간 조직검사로 확진할 때 유병률은 51.4%라는 연구 결과가 있으며 초음파검사로 진단한 경우 그보다 낮은 16~33%정도로 나타난 바 있다.

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

[0005] 비알코올 지방간 질환은 조직학적인 염증이나 섬유화 여부가 예후에 큰 영향을 주기 때문에 아직까지는 간 조직검사가 기준 진단 검사이다. 그러나, 간 조직검사가 갖고 있는 고비용, 침습성 및 합병증 발생의 위험 때문에 일차 의료에서 이용하기에는 무리가 있다. 또한, 적은 간 조직으로 전체 간 상태를 반영할 수 없고 아직까지 단일 병리 진단 기준이 없으며 병리 검사자 간의 진단 일치도가 낮을 수 있다. 그러므로 간 조직검사 대신 영상의학 검사와 생화학 검사를 통해 비알코올 지방간 질환의 조직학적 중증도를 평가하려는 노력이 많이 진행되어 왔다.

[0006] 이에, 비알코올 지방간 질환의 진단과 중증도 구분을 위한 비침습적인 방법에 대한 관심이 증가하고 있으나, miRNA를 이용한 연구는 아직도 많이 부족한 실정이다. 종래 PCR을 이용하여 miRNA 분석을 하고, 이를 진단에 이용하고자 하는 시도가 있었으나, 수 천개의 miRNA 중 일부를 선택하여 PCR을 통하여 분석한 결과라는 한계가 있다. 또한, 국내 연구진에 의하여 비알코올 지방간염 진단을 위한 특허가 출원되어 있으나, 이는 동물실험을 통한 결과라는 한계가 있다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 현장에서 즉시 적용 가능한 진단방법으로서 비알코올 지방간 질환 환자를 구분하기 위한 비침습적 진단방법에 대해 예의연구하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) KR 10-2013-0070347

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 비알코올 지방간 질환 진단 및 이의 중증도 진단을위한 바이오마커로서 miRNA-93를 제공하는 것이다.

- [0011] 또한, 본 발명은 비알코올 지방간 질환의 진단과 이의 중증도 진단용 조성물 및 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 miRNA-93의 발현 또는 활성을 저해하는 물질을 포함하는 비알코올 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 제공을 목적으로 한다.
- [0013] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 비알코올 지방간 질환 진단용 바이오마커로서 miRNA-93을 제공한다.
- [0016] 또한, miRNA-93의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 비알코올 지방간 질환 진단용 조성물을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 miRNA-93의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 비알코올 지방간 질환 진단용 키트를 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 miRNA-93은 서열번호 1의 염기서열을 포함하거나 이로 이루어진 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 miRNA-93의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 miRNA-93와 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드, 프라이머, 또는 프로브일 수 있다.
- [0020] 한편, 본 발명은 상기 비알코올 지방간 질환 환자 중에서 단순 지방증 환자와 비교하여 비알코올 지방간염 환자에서 miRNA-93의 발현 수준이 현저하게 증가됨을 확인하였다.
- [0021] 따라서, 본 발명의 바이오마커는 비알코올 지방간 질환 환자에 있어서 단순 지방증 환자와 비알코올 지방간염 환자를 감별 진단하는 용도에 이용될 수 있다.
- [0022] 이에, 본 발명은 상기 miRNA-93의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 비알코올 지방간 질환 중 단순 지방간과 지방간염 감별 진단용 조성물은 제공한다.
- [0023] 또한, 본 발명은 피검체의 생물학적 시료로부터 miRNA-93의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 비알코올 지방간 질환을 진단하기 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 생물학적 시료는 피검체로부터 분리된 간 조직 또는 간 세포 샘플일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 방법은 상기 측정하는 단계 이후에 정상인의 miRNA-93 발현 수준과 비교하여 피검체의 miRNA-93의 발현 수준이 높은 경우 상기 피검체는 비알코올 지방간 질환으로 판정하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 비알코올 지방간 질환으로 판정을 위한 miRNA-93의 발현 수준은 정상인과 비교하여 1.5배 이상인 것일 수 있고, 바람직하게는 3배 이상인 것일 수 있다. 한편, 피검체의 miRNA-93의 발현 수준이 정상인의 그것과 비교하여 7배 이상인 경우 피검체는 비알코올 지방간염으로 판정할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 방법은 상기 측정하는 단계 이후에 단순 지방증 환자의 miRNA-93 발현 수준과 비교하여 단순 지방증 환자보다 피검체의 miRNA-93의 발현 수준이 높은 경우 비알코올 지방간염으로 판정하는 단계를 포함할 수 있으며, 비알코올 지방간염으로 판정을 위한 miRNA-93의 발현 수준은 단순 지방증 환자와 비교하여 2배 이상인 것일 수 있고, 바람직하게는 3배 이상인 것일 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명은 비알코올 지방간 질환 진단이 필요한 환자의 생물학적 시료에서 miRNA-93의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 miRNA-93의 발현 수준과 정상인의 miRNA-93 발현 수준을 비교하여 단순 지방증 환자보다 상기 환자의 miRNA-93의 발현량이 높은 경우 상기 환자는 비알코올 지방간 질환 환자인 것으로 판정하는 단계;를 포함하는 비알코올 지방간 질환 진단방법을 제공한다.
- [0028] 또한, 본 발명은 비알코올 지방간 질환 진단이 필요한 환자의 생물학적 시료에서 miRNA-93의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 miRNA-93의 발현 수준과 단순 지방증 환자의 miRNA-93 발현 수준을 비교하여 단순 지방증 환자보다 miRNA-93의 발현량이 높은 경우 지방간염으로 판정하는 단계;를 포함하는 비알코올 지방간 환자 중 단순 지방증과 지방간염을 감별하여 진단하는 방법을 제공한다.

- [0029] 또한 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 비알코올 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약제의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0030] (1) 간 세포에 후보물질을 처리하고 miRNA-93의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (2) miRNA-93의 발현 수준이 감소한 경우 상기 후보물질을 비알코올 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약제로 선정하는 단계.
- [0031] 한편, 본 발명자들은 miR-93의 타겟 유전자로 Sirt1을 확인하고, miR-93이 상호작용하는 타겟 영역을 확인하였다. 상기 타겟 영역에 돌연변이를 유도하는 경우 miR-93의 발현 수준과 무관하게 SIRT1의 발현 수준을 유지할 수 있음을 확인하였다.
- [0032] 따라서, 본 발명은 miR-93이 상호작용하는 타겟 영역에 돌연변이가 있는 has SIRT1을 비알코올 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 제공한다.

발명의 효과

- [0034] 본 발명은 환자의 간 조직에서 miRNA-93의 수준을 측정함으로써 비알코올 지방간 질환의 정확한 진단 결과를 제공하는바 종래 침습적 검사방법에 의한 부작용을 배제할 수 있고 간단하고 경제적으로 비알코올 지방간 질환의 조기 진단과 적절한 치료가 가능하게 한다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1은 비알코올 지방간 질환 진단을 위한 바이오마커로서 miR-93을 확인한 결과이다:
- A: GSE48452, GSE13840, GSE55593, 및 GSE144721 분석을 통한 비알코올 지방간 질환 후보 마커 도출 결과,
 B: 정상, 단순 지방증, 및 비알코올 지방간염 환자의 간 조직에서 miR-93 발현 수준을 확인한 결과
 C: OA/PA(oleic acid/palmitic acid) 유도의 NAFLD 세포 모델에서 miR-93의 발현 증가를 확인한 결과
 D: HFHFr (high-fat high-fructose) 식이 유도의 NAFLD 모델에서 miR-93의 발현 증가를 확인한 결과
 E: MCD (methionine and choline deficient) 식이 유도의 NAFLD 모델에서 miR-93의 발현 증가를 확인한 결과
 F: 렙틴(leptin) 결핍 모델(*ob/ob*)에서 miR-93의 발현 수준을 확인한 결과.
- 도 2는 GSE 데이터 기반으로 도출된 비알코올 지방간 질환 후보 마커의 정상, 단순 지방증, 및 비알코올 지방간염 환자에서 발현 수준을 비교확인한 결과와 다양한 NAFLD 모델에서 이의 발현 수준을 비교확인한 결과이다.
- 도 3은 miR-93의 타겟 분자 후보 도출과 miR-93과 상호작용하는 분자로서 SIRT1을 검증한 결과이다:
- A: 3가지 대표 데이터베이스에서 분석을 통해 miR-93 타겟의 후보 분자들을 도출한 결과
 B: 마우스로부터 분리한 간세포 세포에서 miR-93 과발현 처리 농도를 달리함에 따른 SIRT1의 발현 수준 변화를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과
 C: 마우스로부터 분리한 간세포 세포에서 miR-93 과발현 처리 농도를 달리함에 따른 SIRT1의 발현 수준 변화를 RT-qPCR으로 확인한 결과
 D: SIRT1 gene의 3'UTR 염기서열 상에서 miR-93과 상호작용하는 타겟 사이트 분석 및 상기 타겟 사이트를 변이시킨 Mutant has (homo sapiens) SIRT1 luciferase vector 설계
 E: Wild-type과 mutant hsa SIRT1로 형질전환한 HepG2 및 Huh-7 세포에서 miR-93 과발현 처리에 따른 SIRT1 발현 수준을 luciferase assay로 분석한 결과
- 도 4는 정상 또는 OA/PA 유도 NAFLD 마우스 간세포모델에 AAV-miR-93 (과발현)을 감염시키고 miR-93의 발현 증가에 따른 변화를 확인한 것이다:
- A: AAV-miR-93 감염 마우스 간세포의 Oil Red O staining 이미지
 B: RT-qPCR을 이용하여 miR-93 발현 수준 측정을 통한 AAV 감염 확인

- C: 각 실험세포군에서 Sirt1, Ppara, Cpt1a, Acox1, Cd36, Fabp1, Srebf1, 및 Fasn의 발현 수준 측정 결과
- D: 각 실험 간세포군에서 방사성 동위원소로 표지된 palmitic acid를 이용하여 fatty acid oxidation (지방산 산화)의 변화를 분석한 결과
- E: 각 실험 간세포군에서 방사성 동위원소로 표지된 palmitic acid를 이용하여 fatty acid uptake (지방산 흡수)의 변화를 분석한 결과
- G: 각 실험 간세포군에서 Oxygen consumption rate (OCR, 산소 소비 속도)을 측정하여 미토콘드리아의 활성을 분석한 결과
- H: 각 실험 간세포군 간의 OCR 측정을 통해 산소 소비 기본량과 최대량을 막대 그래프로 표현한 결과
- I: 각 실험 간세포군에서 OCR 측정을 통해 ATP (아데노신 삼인산)의 생성량을 막대 그래프로 표현한 결과
- 도 5는 정상 또는 HFHFr 유도 NAFLD 마우스 동물모델에 AAV-miR-93을 감염시키고 miR-93의 발현 증가에 따른 변화를 확인한 것이다:
- A: 각 실험동물군의 간 조직에서 miR-93 발현 수준 측정 결과
- B: 실험기간 동안 각 실험동물군의 체중 변화
- C: 실험기간 종료 후 각 실험동물군의 간의 상태와무게를 측정한 결과
- D: 공복 상태의 각 실험동물군의 포도당 투여에 의한 시간 경과에 따른 혈당 변화 (당 부하 검사)
- E: 공복 상태의 각 실험동물군의 인슐린 투여에 의한 시간 경과에 따른 혈당 변화(인슐린 부하 검사)
- F: 각 실험동물군의 공복 혈당 측정 결과
- G: 각 실험동물군의 공복 혈중 인슐린 농도 측정 결과
- H: 각 실험동물군의 인슐린 저항성 분석 (HOMA-IR)을 측정한 결과
- I: 각 실험동물군의 간 조직에서 중성지방(Triglyceride: TG) 수준 측정 결과
- J: 각 실험동물군의 혈청 아스파라긴산 분해효소 (aspartate aminotransferase: AST) 수준 측정 결과
- K: 각 실험동물군의 혈청 알라닌아미노 분해효소 (alanine aminotransferase: ALT) 수준 측정 결과
- L: 각 실험동물군의 간 조직에서 Sirt1의 발현 수준 측정 결과
- M: 각 실험동물군에서 Ppara, Cpt1a, Acox1, Srebf1, Fasn, Cd36, 및 Fabp1의 발현 수준 측정 결과.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 본 발명자들은 간 조직검사를 대체할 수 있는 비알코올 지방간 질환의 진단을 위한 비침습적 검사방법에 대해 예의 연구한 결과 정상인과 비교하여 비알코올 지방간 질환 환자에서 miRNA-93의 과발현을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0038] 이에, 본 발명은 비알코올 지방간 질환 진단을 위한 바이오마커로서 miRNA-93를 제공한다.
- [0039] 또한, 본 발명은 환자의 생물학적 시료로부터 miRNA-93의 발현 수준을 측정할 수 있는 체제를 포함하여 비알코올 지방간 질환을 진단할 수 있는 조성물을 제공한다.
- [0040] 보다 구체적으로, 본 발명은 시료 내 존재하는 miRNA-93의 발현 수준을 측정하여, miRNA-93가 상대적으로 과발현된 경우 해당 시료의 환자가 비알코올 지방간 질환인 것으로 감별하는 기술을 제공한다. 본 발명에서 miRNA-93가 상대적으로 과발현된 경우란 정상인의 miRNA-93 발현량을 기준으로 하며, 해당 시료의 환자가 비알코올성 지방간 질환인 것으로 판정된 경우, 정상인의 miRNA-93 발현량 보다 약 3배 이상의 miRNA-93 발현 수준을 나타내고 있으며, 비알코올성 지방간염의 경우 7배까지 과발현 것이 확인된다.
- [0041] 본 발명의 진단대상 질병인 비알코올 지방간 질환(Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 단순 지방증, 비알코올 지방간염, 및 간경변증을 모두 포괄하는 용어이다. 단순 지방증은 간 내에 중성지방이 축적되는 단순 양성 질환을 의미하나, 비알코올 지방간염은 지방간과 함께 염증 또는 섬유화를 동반하는 것을 특징으로 하는 진행성 간질환을 말하는 것으로, 양 질환의 예후와 치료 요법의 적용 등이 상이하기 때문에, 단순 지방증인지

비알코올 지방간염인 지를 구분하는 것이 중요하다.

- [0042] 본 발명자들은 비알코올 지방간 질환에 있어서, 정상인과 비교하여 단순 지방증 환자에서 miR-93 발현 수준에 유의한 증가를 확인하였으며, 나아가 단순 지방증 환자와 비교하여 NASH 환자에서 miR-93 발현 수준에 유의한 증가를 확인할 수 있었다.
- [0043] 따라서, 본 발명의 상기 비알코올 지방간 질환을 진단용 조성물을 지방간 질환 환자 중에서 단순 지방증과 지방간염을 감별 진단을 위한 용도에 이용될 수 있다.
- [0044] 본원에서 용어, "감별"이란, 특정 질환 상태를 진단, 판단 또는 판별하는 것을 말하며, 특히 임상적으로 유사한 특징을 일부 공유하는 질환들 가운데 어떤 질환인지를 정확하게 구별해낸다는 의미에서, 본 발명에서는 "질환을 감별한다"는 용어를 사용하였다. 그러나, 특정 질환을 확인한다는 측면에서, 상기 용어는 진단, 판단, 판별, 식별 등의 용어와 혼용될 수도 있다.
- [0045] 보다 바람직하게, 본 발명에서 감별이란, 비알코올 지방간 질환 환자를 대상으로 하여 단순 지방증 상태에 머물러 있는지 아니면 비알코올 지방간염으로 발전했는지를 확인하는 것, 즉, 단순 지방증으로부터 비알코올 지방간염을 구별하는 것을 의미할 수 있다.
- [0046] 본 발명에서는 단순 지방증으로부터 비알코올 지방간염을 감별하기 위하여, 비침습적인 도구로서 마이크로RNA 바이오마커를 사용함을 특징으로 한다.
- [0047] 보다 구체적으로, 본 발명은 시료 내 존재하는 miRNA-93의 발현 수준을 측정하여, miRNA-93가 상대적으로 과발현된 경우 해당 시료의 환자가 비알코올 지방간염인 것으로 감별하는 기술을 제공한다. 본 발명에서 miRNA-93가 상대적으로 과발현된 경우란 단순 지방증 환자의 miRNA-93 발현량을 기준으로 하며, 해당 시료의 환자가 비알코올 지방간염인 것으로 판정하기 위해서는 단순 지방증 환자의 miRNA-93 발현량 보다 약 1.5 배 이상의 miRNA-93 발현 수준을 나타내야 하며, 바람직하게는 약 2배 이상의 과발현을 확인하여야 한다.
- [0048] 시료 내 존재하는 miRNA-93의 발현 수준의 측정하기 위해서 마이크로RNA를 검출할 수 있는 각종 제제들을 사용할 수 있다.
- [0049] 본 발명에서 "진단"이란 특정 질병 또는 질환에 대한 한 개체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 개체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 개체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다.
- [0050] 본 발명에서 "감별"이란 비알코올 지방간 질환 환자를 대상으로 하여 단순 지방증 상태에 머물러 있는지 아니면 지방간염으로 발전했는지를 확인하는 것, 즉, 단순 지방증과 비알코올 지방간염을 구별하는 것을 의미할 수 있다.
- [0051] 또한, 본 발명의 비알코올 지방간 질환 진단용 키트 및 단순 지방증과 비알코올 지방간염 감별 진단용 키트는 생물학적 시료로부터 miRNA-93를 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함할 수 있으며, 상기 제제란 miRNA-93의 발현 수준을 확인함으로써 본 발명의 바이오마커 검출에 사용될 수 있는 분자를 의미한다.
- [0052] 본 발명에서 miRNA-93 발현 수준 측정 제제로서 miRNA-93에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 프라이머, 프로브, 및/또는 항체를 사용할 수 있으며, 유전자 발현 정도를 측정하는데 이용되는 공지의 방법, 예를 들면 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하거나, 프로브를 이용한 혼성화 반응을 통하여 실시하여 miRNA-93의 발현 수준을 측정할 수 있다. 또한, 상기 키트에는 상기 측정 제제 이외에도 검출을 용이하게 하는 당업계에 공지된 여러 도구, 시약, 예를 들어 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 안정화제 등이 포함될 수 있다.
- [0053] 본 발명에서 miRNA-93는 이를 구성하는 올리고뉴클레오타이드의 작용성 등가물, 예를 들어, miRNA-93 올리고뉴클레오타이드의 일부 염기서열이 결실(deletion), 치환(substitution) 또는 삽입(insertion)에 의해 변형되었지만, 마이크로RNA-93 핵산분자와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체(variants) 및 모방체(mimic)를 포함하는 개념이다.
- [0054] 본 발명에서 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"는 상기 miRNA에 상보적으로 결합하여 발현을 억제하는 염기서열로서, 이에 제한되지는 않으나 antisenseRNA, antagonist miRNA를 포함한다.
- [0055] 본 발명에서 "프라이머"는 짧은 자유 수산화기를 가지는 핵산서열로서 상보적인 템플레이트와 염기쌍을 형성

할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능하는 짧은 핵산서열을 말한다. 본 발명의 프라이머는 예를 들면, 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법과 같은 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다.

[0056] 본 발명에서 “프로브”는 miRNA와 특이적으로 결합할 수 있는 수개 내지 수백개의 염기로 이루어진 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어 특정 miRNA의 존재유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드 프로브, 단쇄 DNA 프로브, 이중쇄 DNA 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있고 비오틴, FITC, 로다민, DIG 등으로 표지되거나 방사선 동위 원소 등으로 표지될 수 있다.

[0057] 본 발명에서 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일 예로서 RT-PCR 키트의 경우, 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-중합효소 및 역전사효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-물(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0058] 또한, 본 발명은 환자의 생물학적 시료에서 miRNA-93의 발현 수준을 측정하는 단계;를 포함하는 비알코올 지방간 질환 중 단순 지방증과 지방간염을 감별하여 진단하기 위한 정보제공방법을 제공할 수 있으며, 상기 정보제공방법은 상기 측정된 miRNA-93의 발현 수준을 단순 지방증 환자의 발현 수준과 비교하여 이보다 높은 경우 지방간염으로 판정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0059] 상기 miRNA 발현 수준 측정은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), 정량적 중합효소반응(quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting), 또는 DNA 칩 방식으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 본 발명에 있어서 상기 miRNA의 발현 억제제는 miRNA-93에 특이적인 억제제를 사용하는 것을 특징으로 하며, 상기 발현 억제제는 miRNA-93의 발현량을 감소시키거나 분해를 촉진함으로써 세포 내 miRNA-93의 수준을 감소시키거나 miRNA-93와 특이적으로 결합하여 그 활성을 감소시키는 것일 수 있으며, siRNA, 앵타머(aptamer), 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 화합물로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다. 상기 화합물은 항산화제, 세포 성장에 영향을 미치는 물질 및 세포신호전달물질 중 miRNA의 발현을 억제시키는 화합물이라면 어느 것이든지 사용할 수 있다. 하지만 이에 한정되지 않으며 miRNA-93의 발현을 억제하는 물질이라면 어느 것이든지 사용할 수 있다.

[0061] 본 발명에서 “siRNA”는 이중가닥의 RNA가 다이에 의해 절단되어 생성되는 21-25 뉴클레오타이드 크기의 작은 RNA 조각으로 상보적인 서열을 갖는 miRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 억제하는 것을 말한다. 본 발명의 목적상 miRNA-93에 특이적으로 결합하여 상기 miRNA의 발현을 억제하는 것을 의미한다. siRNA는 화학적으로 또는 효소학적으로 합성될 수 있다. siRNA의 제조방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, siRNA를 직접 화학적으로 합성하는 방법, 시험관 내(in vitro) 전사를 이용한 siRNA의 합성법, 시험관 내(in vitro) 전사에 의해 합성된 긴 이중-가닥 RNA를 효소를 이용하여 절단하는 방법, shRNA 발현 플라스미드나 바이러스성 벡터의 세포내 전달을 통한 발현법 및 PCR(polymerase chain reaction) 유도 siRNA 발현 카세트(cassette)의 세포 내 전달을 통한 발현법 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0062] 본 발명에 있어서, 상기 miRNA 억제제의 세포 내로의 도입은 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 공동-침전법, 전기천공법 및 리포좀 이용법 등을 이용하여 실시할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0063] 본 발명에서 예방이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 간 조직에 지방축적, 염증반응 및 섬유화 또는 그에 따른 이상을 지연시키는 모든 행위를 의미하고, 치료란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 간 조직의 염증반응 또는 섬유화와 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명의 비알코올 지방간 질환 또는 비알코올 지방간염 치료용 약학적 조성물의 투여 대상 개체는 포유류라면 제한되지 아니하나, 바람직하게는 인간일 수 있고, 보다 구체적으로 비알코올 지방간질환의 발병이 의심되거나 발병한 환자일 수 있다.

[0064] 본 발명에서 약학적 조성물(pharmaceutical composition)은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제, 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0065] 본 발명에서 “담체(carrier)”란 비이클(vehicle)이라고도 불리며, 세포 또는 조직 내로의 단백질 또는 펩타이드의 부가를 용이하게 하는 화합물을 의미하는 것으로서, 예를 들어 디메틸설폭사이드(DMSO)는 생물체의 세포 또는 조직 내로의 많은 유기물의 투입을 용이하게 하는 통상 사용되는 담체이다.

- [0066] 본 발명에서 "희석제(diluent)"란 대상 단백질 또는 펩타이드의 생물학적 활성 형태를 안정화시킬 뿐만 아니라, 단백질 또는 펩타이드를 용해시키게 되는 물에서 희석되는 화합물로 정의된다. 버퍼 용액에 용해되어 있는 염은 당해 분야에서 희석제로 사용된다. 통상 사용되는 버퍼 용액은 포스페이트 버퍼 식염수이며, 이는 인간 용액의 염 상태를 모방하고 있기 때문이다. 버퍼 염은 낮은 농도에서 용액의 pH를 제어할 수 있기 때문에, 버퍼 희석제가 화합물의 생물학적 활성을 변형하는 일은 드물다. 여기에 사용된 아젤라산을 함유하는 화합물들은 인간 환자에게 그 자체로서, 또는 결합 요법에서와 같이 다른 성분들과 함께 또는 적당한 담체나 부형제와 함께 혼합된 약학적 조성물로서, 투여될 수 있다.
- [0067] 또한, 본 발명에 따른 비알코올 지방간 질환 특히, 비알코올 지방간염 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 분해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용액, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용액, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0068] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구, 바람직하게는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 근육 주입, 정맥내 주입, 피하 주입, 복강 주입, 국소 투여, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0069] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.
- [0070] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 대용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0072] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0073] **[실시예]**
- [0074] **1. GSE 데이터 기반의 비알코올 지방간 질환 진단을 위한 후보 마커 도출**
- [0075] NCBI에 공식 등록된 각각의 GSE48452, GSE13840, GSE55593, GSE144721에 해당하는 비 알코올성 지방간 샘플에서 정상 샘플에 비교하여 유의성 있게 증가한 microRNA들의 발현량을 분석하였다. 4가지의 GSE 데이터베이스에서 공통적으로 유의성있게 증가한 microRNA 후보군을 도출하였다.
- [0077] **2. 다양한 비알코올 지방간 질환 모델에서 miR-93 발현 수준 확인**

[0078] RT-qPCR을 통하여 정상, 단순 지방증, 및 비알코올 지방간염 환자의 간 조직을 비롯하여, 마우스의 간 세포에 OA/PA(oleic acid/palmitic acid) 지방산 처리에 의한 비 알코올성 지방간 세포 모델에서 miR-93의 발현량이 주요하게 증가한 것을 확인하였다. 또한, 고지방 고당 식이, 메티오닌-콜린 결핍 식이 및 렙틴 결핍 마우스 모델의 간 조직으로부터 RNA를 추출하여 miR-93의 발현을 확인하였을 때, 대조군의 간 조직에 비해 miR-93의 발현이 두드러지게 증가한 것을 확인하였다.

[0080] 3. 비알코올 지방간 질환의 바이오마커로서 miR-93 검증

[0081] 도 1에 해당하는 GSE 데이터베이스의 분석을 통해 도출한 microRNA 후보군들을 근거로 실제 비알코올성 지방간 환자의 간조직 샘플에서 추출한 RNA 및 간 세포에 비알코올성 지방간을 유도한 모델에서 추출한 RNA에서 후보군들의 발현량을 RT-qPCR을 통해 확인하였을 때, 공통적으로 miR-93이 가장 주요하게 증가한 것을 확인하였다(도 2).

[0083] 4. 타겟 예측 데이터베이스로부터 miR-93의 직접적인 타겟 유전자 후보군 도출

[0084] 다수의 논문에서 활용되는 microRNA의 타겟 유전자 예측 데이터베이스인 RNA22, TargetMiner, 및 miRmap 세가지의 데이터베이스로부터 miR-93의 잠재적인 타겟 유전자 후보군으로 RNA22는 233개, TargetMiner는 242개 그리고 miRmap은 1498개가 확인되었으며, 이 데이터베이스들로부터 공통적으로 교집합에 해당하는 타겟 후보 유전자들(ARID4A, CYB5B, FRS2, PLCB1, PPARA, SIRT1)을 도출하였다 (도 3에 A).

[0086] 5. miR-93 과발현에 의한 SIRT1의 발현 변화 확인

[0087] 간 세포에 miR-93을 30pmol과 50pmol로 transfection을 통해 과발현하여, 후보군 중 SIRT1의 단백질 레벨이 대조군에 비해 주요하게 감소한 것을 western blot을 통해 확인하였다. 또한, 동일 조건으로 miR-93을 과발현하였을 때, RT-qPCR 실험을 통해 SIRT1의 mRNA 발현량이 대조군에 비해 감소하였으며, 이는 miR-93이 고농도일수록 두드러지게 나타났다. (도 3에 B 및 C)

[0089] 6. SIRT1이 miR-93의 직접적인 타겟 유전자 여부 검증

[0090] 타겟 유전자 예측 데이터베이스 상에서 도출한 SIRT1의 mRNA 서열 상 miR-93의 염기서열과 상보적으로 인식하여 결합하는 3'UTR 염기서열을 마우스(mmu), 쥐(rno), 인간(hsa)에서 모두 확인하였다(도 3에 D). 이를 토대로, 간 세포에서 genomic DNA를 추출하여 해당 염기서열을 포함하는 primer를 forward와 reverse로 제작하여 PCR을 통해 해당 template을 amplify하였다. 추가적으로, psi luciferase vector에 해당 template을 ligation하여 cloning plasmid를 제작하였다.

[0091] miR-93의 농도별로 과발현시켰을 때, luciferase 활성이 대조군에 비해 농도 의존적으로 주요하게 감소하는 것을 HepG2 및 Huh-7의 인간 간세포에서 확인하였다. 또한, 이러한 결과가 miR-93에 의한 효과임을 분명하게 확인하기 위하여 miR-93 염기서열과 SIRT1의 3'UTR의 상보적인 염기서열에 mutagenesis를 유도하여 상기한 방식으로 PCR을 통해 luciferase vector에 cloning하였다. 그 결과, Wildtype에서 miR-93 과발현에 의해 감소했었던 양상이 mutant에서 miR-93 과발현에 의한 해당 효과가 나타나지 않는 것을 확인하였으며, 이를 토대로 miR-93이 SIRT1을 직접적으로 조절하는 것을 최종 확인하였다(도 3에 E) .

[0093] 7. in vitro에서 miR-93 과발현에 따른 변화 확인

[0094] 마우스의 간 세포 및 조직단위에서 효과적이고 안정적인 miR-93의 과발현을 위하여, AAV-viral vector에 miR-93을 cloning하여 과발현 vector를 제작하였다. 또한 숙주세포에 대조군 viral vector와 실험군 AAV-miR-93을 각각 transfect하여 간 세포에 대조군인 AAV-control 및 실험군 AAV-miR-93을 AAV-Helper plasmid와 함께 transfection하여 바이러스를 제작하였다. 제작된 바이러스를 간 세포 주에 감염시켜, OA/PA 지방산 처리를 통해 비 알코올성 지방간 모델을 유도하였을 때, miR-93 과발현에 의해 간 세포에 지방 축적이 두드러지게 증가하였음을 확인하였다 (도 4에 A).

[0095] 또한, 간 세포로부터 RNA를 추출하여 AAV-miR-93 감염에 따른 miR-93 과발현이 정상적으로 진행되었음을 RT-qPCR을 통해 확인하였다. (도 4에 B) 상기 동일한 샘플 상에서 SIRT1의 직접적인 타겟 유전자들이면서 간 세포의 지방 대사에 주요한 경로로 확인된 지방산 산화 (PPARA, CPT1A, Acox1)와 지방산 흡수 (CD36, FABP1) 및 지방 합성 (SREBF1, FASN)의 유전자 발현 양상을 RT-qPCR을 통해 검증하였다. 그 결과, 지방산 미처리(NT) 조건에서도 miR-93 과발현에 의해 지방산 산화 관련 유전자들은 유의적으로 감소하며, 지방 합성 관련 유전자들은 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. 이는, OA/PA 지방산 처리 샘플 군에서 더욱 더 두드러지게 변화하는 것이 확인되었다 (도 4에 C).

[0096] miR-93 과발현에 의한 간 지방 대사 조절을 추가적으로 확인하기 위하여, ¹³C 방사성 palmitic acid를 tracer로 이용하여, miR-93 과발현 유무에 따른 간 세포에서의 fatty acid oxidation과 fatty acid uptake를 각각 측정하였다. 그 결과, 상기 RT-qPCR을 통해 진행한 지방대사 관련 유전자들의 발현 변화와 같은 양상으로 miR-93 과발현에 의해 감소해있는 것이 확인되었다. (도 4에 D 및 E).

[0097] 간에서의 miR-93에 의해 조절되는 지방산 산화 및 합성과 같은 지방 대사를 관장하는 핵심 세포 소기관 미토콘드리아에서의 활성을 간 세포 단위에서 확인하였다. Seahorse XF24 장비를 활용하여 간 세포에 miR-93 과발현 및 OA/PA 지방산 처리를 하여 Oxygen consumption rate (OCR, 산소 소비 속도)를 측정하였다. 그 결과, miR-93 과발현에 의해 미토콘드리아의 활성이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였으며, 이는 OA/PA 지방산 처리에 의한 비 알코올성 지방간 유도 모델에서 더 유의미하게 나타났다. 또한, basal(억제제 처리 전)과 maximal(FCCP 억제제 처리 이후)에서의 차이를 통해 미토콘드리아의 ATP 생성을 측정하였을 때, miR-93 과발현에 의해 주요하게 감소하는 것을 확인하였다(도 4에 F 내지 H). 이 결과를 토대로, miR-93의 과발현에 의해 비 알코올성 지방간의 진행이 촉진되며, 이는 지방을 소모시키는 지방산 산화의 감소 및 지방 축적을 발생시키는 지방 생성의 증가 및 미토콘드리아의 활성 감소에 의해 발생하는 것을 확인하였다.

[0099] 8. in vivo에서 miR-93 과발현에 따른 변화 확인

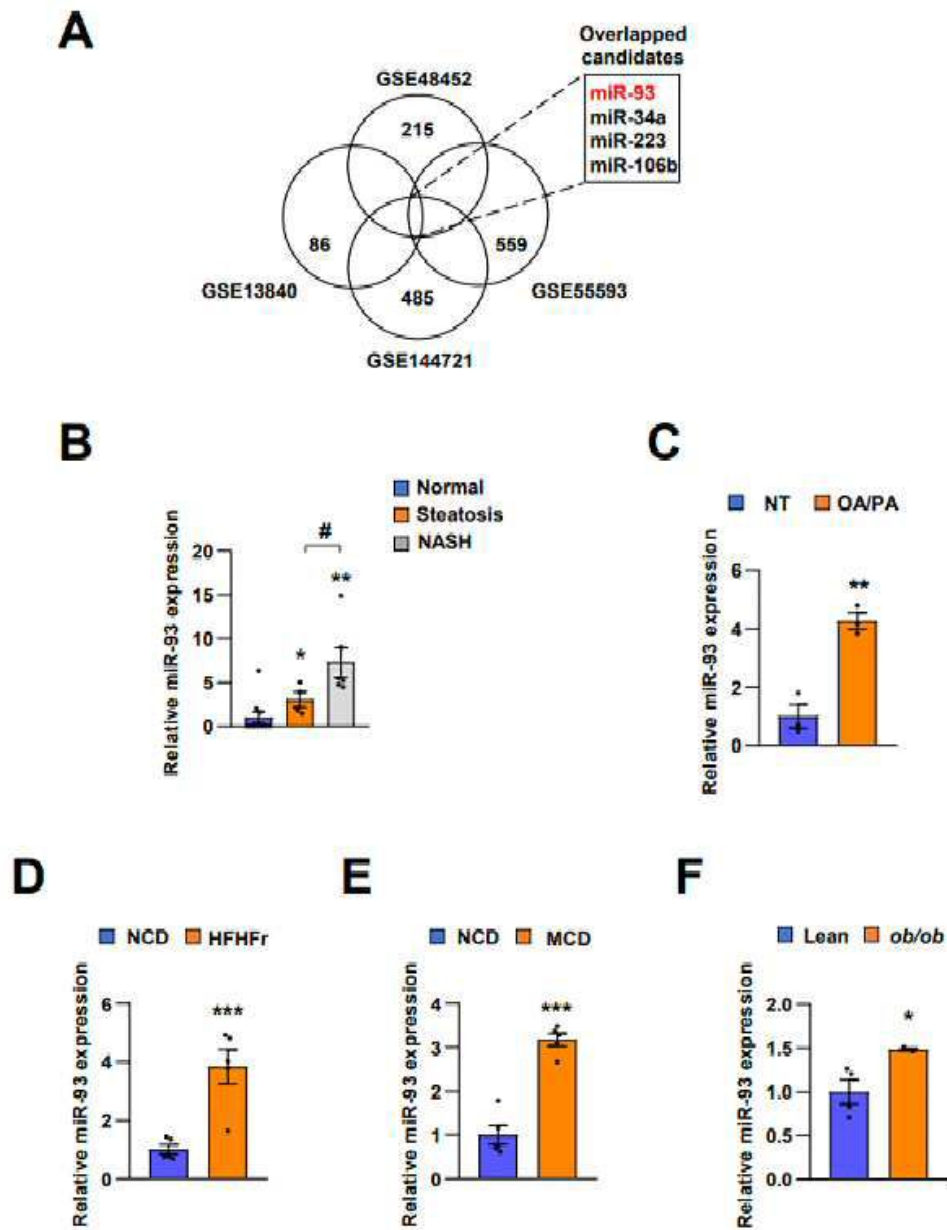
[0100] C57BL6/J Wildtype 마우스에 AAV-miR-93을 과발현시키기 위하여, 마우스 꼬리 정맥혈에 1×10^{11} PFU/ml의 바이러스 농도로 투여를 하였다. 그 결과, 정상적으로 마우스 간 조직에 miR-93이 과발현되었음을 확인하였다. (5A) 또한, AAV-miR-93 투여 후, 정상 식이 (normal chow diet)와 비 알코올성 지방간 유도를 위하여 고지방고당식이 (High fat high fructose diet)를 섭취시켰다. 주 별 마우스의 몸무게 측정을 통해 고지방고당식에 의해 증가하는 마우스 몸무게가 miR-93 과발현에 의해 주요하게 더욱 증가하는 것을 확인하였으며, 간 조직 상태 및 간 무게를 측정한 결과, 비 알코올성 지방간이 miR-93 과발현에 의해 더욱 증가한 것을 확인하였다. (5B,5C) 이러한 양상은 공복 상태의 각 실험동물군에 포도당 투여 (Glucose 2g/kg)하여 시간 경과에 따른 혈당 변화를 2시간 동안 측정하는 당 부하 검사 및 인슐린 투여 (Insulin 1.5Unit)하여 시간 경과에 따른 혈당 변화를 확인하는 인슐린 부하 검사를 통해 miR-93 과발현에 의해 인슐린 저항성이 더욱 크게 증가하였음을 확인하였다. (5D-5F) 또한, 공복 상태의 각 실험 동물군으로부터 혈액을 채취하여, 분리한 혈청에서의 인슐린 양을 측정함으로써, 인슐린 저항성이 miR-93 과발현에 의해 증가해있음을 추가적으로 확인하였다. (5G-5H) 각 실험동물군의 간 조직 및 혈청에서 지방이 조직에 축적되는 형태인 TG (트리아실글리세라이드) 및 간 질환을 확인할 수 있는 지표인 AST 및 ALT에서 miR-93의 과발현에 의해 두드러지게 모두 증가한 것을 확인하였다. (5I-5K) 각 실험동물군의 간 조직으로부터 RNA를 추출하여 상기 도면에서 확인했었던 miR-93의 과발현에 의해 SIRT1이 유의적으로 감소하였으며, 지방산 산화와 관련된 PPARA, CPT1A, ACOX1의 유전자 발현이 감소하고 지방생성 경로와 관련된 SREBF1 및 FASN의 유전자 발현이 증가한 것을 확인하였다. (5L-5M) 이 결과를 토대로, miR-93 과발현에 의해 고지방고당식에 따른 비 알코올성 지방간의 진행이 더욱 악화되는 것을 확인하였다.

[0102] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

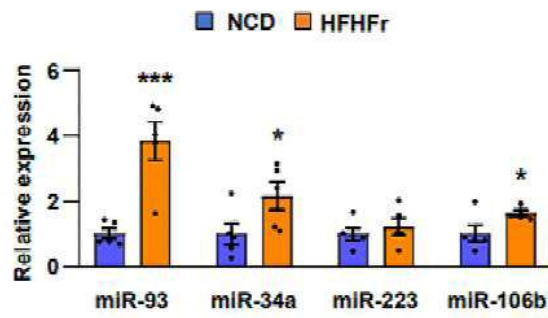
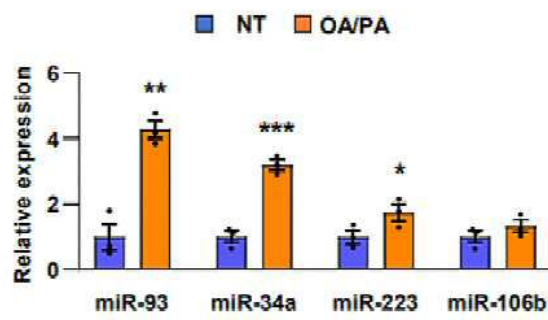
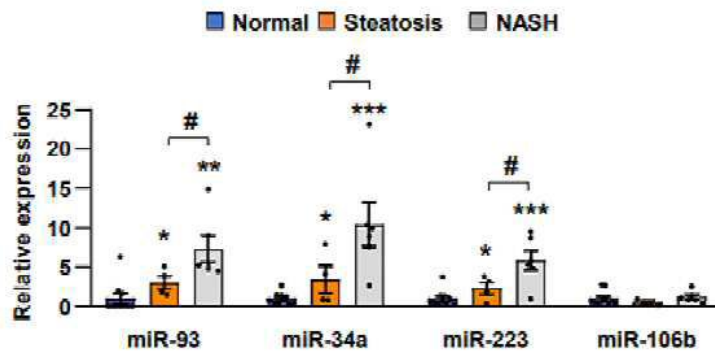
[0103] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

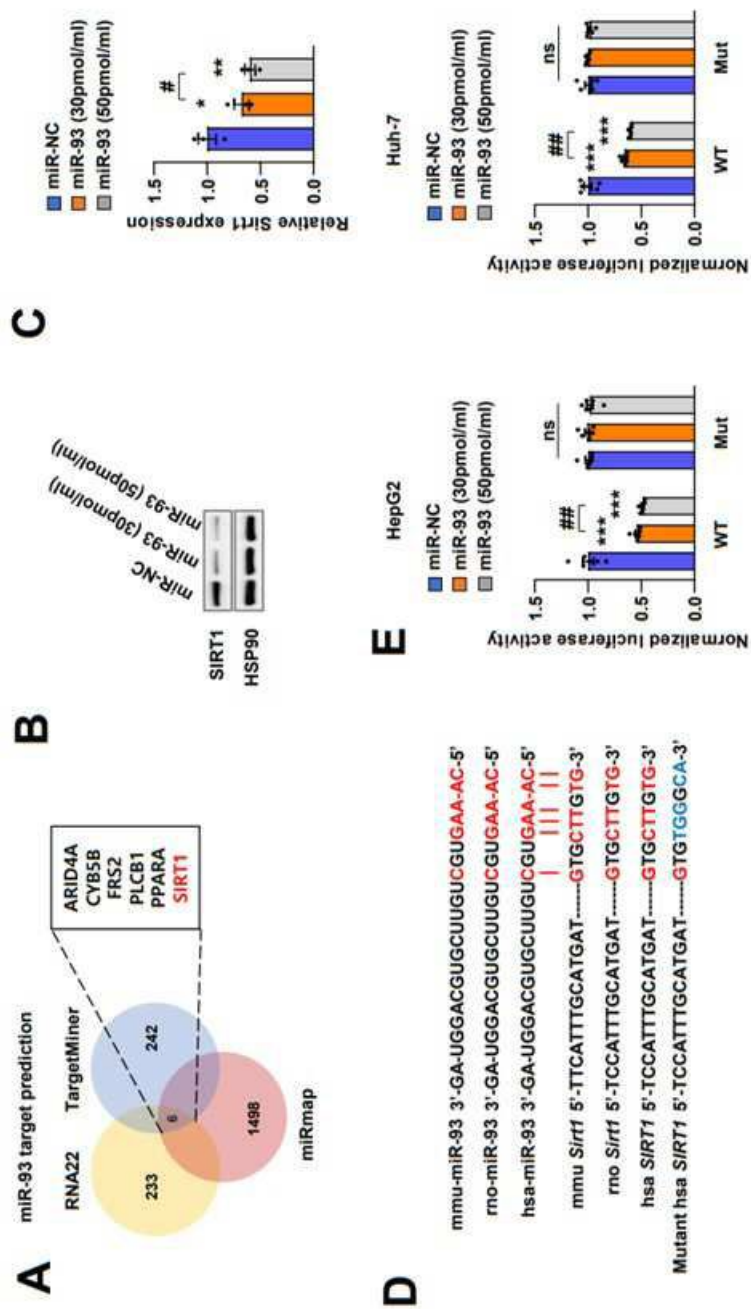
도면1



도면2



도면3



도면5

