



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0080835
(43) 공개일자 2019년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/487 (2006.01) G01N 15/14 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/48721 (2013.01)
G01N 15/14 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0073836(분할)
(22) 출원일자 2019년06월21일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2017-0059303
원출원일자 2017년05월12일
심사청구일자 2017년05월12일

(71) 출원인
한국과학기술원
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
신의철
경기도 성남시 분당구 운중로166번길 20-3
유희태
서울특별시 서초구 서초대로1길 34, 205동 104호
(방배동, 방배2차현대홈타운)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이재영

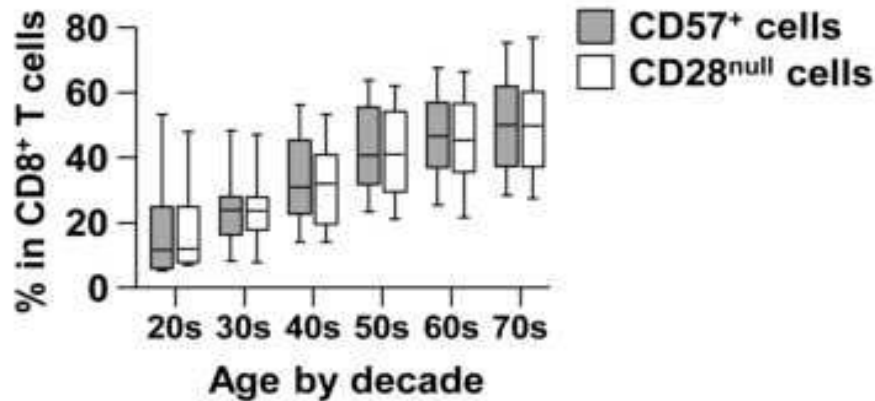
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 T 림프구 계군을 이용한 면역 나이 측정 방법 및 장치

(57) 요약

본 발명은 T 림프구 계군(subpopulation)의 빈도를 이용하여 면역 노화 지수를 측정하는 방법 및 장치에 관한 것으로, 면역 노화 관련된 지표인 CD57+CD8+ T 림프구의 빈도로 면역 노화 지수를 예측하는 경우에는 다른 T 림프구 계군의 빈도, 특히 CD28nullCD8+ T 림프구 빈도를 측정하는 것에 비해 노화 관련 질환의 발병 여부의 예측 정확도를 높일 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 2015/1486 (2013.01)
 G01N 2015/1488 (2013.01)
 G01N 2333/70517 (2013.01)
 G01N 2333/70596 (2013.01)
 G01N 2800/7042 (2013.01)

윤종찬

서울특별시 서대문구 이화여대길 50-12, 103동 904호(대현동, 럭키대현아파트)

(72) 발명자

박성하

서울특별시 강남구 압구정로29길 69, 202동 1208호(압구정동, 현대아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI13C0715
부처명	보건복지부
연구관리전문기관	보건산업진흥원
연구사업명	질환극복기술개발
연구과제명	심뇌혈관 및 대사질환 원인연구센터
기 여 율	1/1
주관기관	연세대학교
연구기간	2013.07.01 ~ 2018.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 림프구(lymphocyte)를 수득하는 단계;
- b) 상기 a) 단계의 림프구 내에서 T 림프구 계군(subpopulation)의 빈도를 측정하는 단계; 및
- c) 상기 b) 단계의 T 림프구 계군의 빈도(Frequency)로 하기 식 1을 이용하여 면역 노화 지수를 예측하는 단계를 포함하는, 면역 노화 지수 측정방법:

[식 1]

면역 노화 지수(Immune Senescence Index; ISI)= $46.374 + 0.291 \times (\text{T 림프구 계군(subpopulation)의 빈도})$

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 T 림프구의 계군(subpopulation)의 빈도는 CD8+CD57+ T 림프구 빈도인 것인, 면역 노화 지수 측정방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 b) 단계는 유세포 분석기(flow cytometry)를 통해 측정되는 것인, 면역 노화 지수 측정방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 c) 단계 후, 목적하는 개체의 출생 나이와 대비하여 실제 나이에 비해 면역 노화 지수가 높은 경우 노화 관련 질환의 발병 가능성이 높을 것으로 예측하는 단계를 더 포함하는 것인, 면역 노화 지수 측정방법.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 노화 관련 질환은 심혈관 질환, 염증성 또는 자가면역성 질환, 신경 퇴행성 질환, 대사 질환, 폐 질환, 눈 질환, 가령성 장애 및 피부과적 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 면역 노화 지수 측정방법.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 심혈관 질환은 동맥 경화, 죽상동맥경화증, 협심증, 부정맥, 심근증, 울혈성 심부전, 관상 동맥 질환, 경동맥 질환, 심내막염, 관상 동맥 혈전증, 심근경색증, 고혈압, 대동맥류, 심장 이완 기능장애, 고콜레스테롤혈증, 고지질혈증, 승모판 탈출증, 말초 혈관 질환, 심장 부하 저항, 심장 섬유증, 뇌동맥류, 및 뇌졸중으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 면역 노화 지수 측정방법.

청구항 7

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 림프구(lymphocyte)를 분리하는 분리부;

상기 분리된 림프구(lymphocyte) 내에서 T 림프구 계군(subpopulation)의 빈도를 측정하는 측정부; 및

상기 T 림프구 계군(subpopulation)의 빈도를 하기 식 1을 이용하여 면역 노화 지수로 환산하는 환산부를 포함

하는 면역 노화 지수 측정 장치:

[식 1]

면역 노화 지수(Immune Senescence Index; ISI) = $46.374 + 0.291 \times (\text{T 세포 계군(subpopulation)의 빈도})$

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 T 림프구의 계군(subpopulation)의 빈도는 CD8+ T 세포 내 CD57+ 세포의 빈도인 것인, 면역 노화 지수 측정 장치.

청구항 9

제 7항에 있어서,

상기 환산부에서 환산된 면역 노화 지수와 목적하는 개체의 출생 나이와 대비하여, 면역 노화 지수가 높은 경우 노화 관련 질환 발병 가능성이 높을 것으로 예측하는 것인, 면역 노화 지수 측정 장치.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 노화 관련 질환은 심혈관 질환, 염증성 또는 자가면역성 질환, 신경 퇴행성 질환, 대사 질환, 폐 질환, 눈 질환, 가령성 장애 및 피부과적 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 면역 노화 지수 측정 장치.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 심혈관 질환은 동맥 경화, 죽상동맥경화증, 협심증, 부정맥, 심근증, 울혈성 심부전, 관상 동맥 질환, 경동맥 질환, 심내막염, 관상 동맥 혈전증, 심근경색증, 고혈압, 대동맥류, 심장 이완 기능장애, 고콜레스테롤혈증, 고지질혈증, 승모판 탈출증, 말초 혈관 질환, 심장 부하 저항, 심장 섬유증, 뇌동맥류, 및 뇌졸중으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 면역 노화 지수 측정 장치.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 T 림프구 계군(subpopulation)을 이용한 면역 나이, 즉 면역 노화 지수를 측정하는 방법 및 장치에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생리적 측면에서 노화란 수정에서 시작되어 사망할 때까지 계속되는 과정이며, 세포와 신체 조직 전 기관에 걸쳐 일어나는 기능적, 구조적, 생화학적 변화에 해당한다. 노화는 신체의 성장과 발달이 중지되면서 나타나는 피할 수 없는 과정으로서 체성분 및 신체 각 기관의 기능에 변화가 생기는 것을 의미한다. 특히, 기초 대사를 감소, 체성분의 변화, 체내 대사의 변화, 감각의 변화, 위장 기능의 변화, 면역 기능의 변화 등으로 인해 타 연령층에 비하여 상대적으로 질병에 걸릴 확률도 높아진다.

[0003] 상기 노화 과정에서 두드러지게 나타나는 변화 중 하나는 면역계의 변화이다. 특히, 노화와 관련된 면역능의 감소는 20대 초반부터 시작되고, 자가면역(autoimmunity) 현상이 발생하여 노인의 혈청에서 자가 생성한 항체와 자가 반응한 T 림프구를 관찰할 수 있다. 25세 이하 젊은이들과 60세 이상의 노인을 비교 연구한 결과에서, 노인들에게서 T 림프구 반응과 지연성 피부 과민 반응이 저하되어 있고, 면역 노화(Immunosenescence)가 일어나 있는 것으로 보고되어 있다.

[0004] 상기 면역 노화는 노화가 진행됨에 따라 면역 기능이 변화하는 것으로, T 세포의 수, 아형 비율, 표현형의 변화

(Miller RA. Science 1996;273,70) 및 기능의 변화 (Won DI et al., Korean J Lab Med 2003; 23, 205; Ben-Yehunda et al., Cancer Invest 1992; 10, 525) 현상이 관찰된다.

[0005] 면역 노화가 일어나는 하나의 현상으로, 전체 T 림프구에서 미 접촉 T 림프구의 빈도수가 노화가 진행되면서 점점 감소하는 것을 들 수 있다(Martinez et al., AGE, 2011; 33, 197). 상기 미경험 T 림프구(Naive T lymphocyte)는 분화와 성숙을 거쳤지만 아직 말초에서 항원을 만나지 못한 T 림프구로서, 항원전달세포에 제시된 MHC: 항원 복합체를 만나면 T 림프구 항원 수용체 신호 전달 과정(T-Cell Receptor signaling pathway)을 통해 항원을 인식하고 효과 T세포로 활성화되어 적응 면역이 시작된다.

[0006] 또한, 면역 노화가 진행되면서 T 림프구의 아형 비율 및 표현형의 변화와 T 림프구의 기능의 변화로서, CD28nullCD8+T 세포군이 늘어나게 된다. 이에 따라, 공통 자극 신호 전달이 감소하여 활성화가 약해지고, 사이토카인의 생산 불균형으로 항원 자극 시 T 림프구 의존성 항체 생산의 결함이 발생하게 된다(Sakata-Kaneko S, Wakatsuki Y, Matsunaga Y, Usui T, Kita T. Altered Th1/Th2 commitment in human CD4+ T cells with ageing. Clin Exp Immunol 2000; 120: 267-73).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 일 목적은 T 림프구 계군(subpopulation)의 빈도(Frequency)를 측정하여 면역 노화 지수를 측정하는 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 T 림프구 계군(subpopulation)의 빈도(Frequency)를 측정하여 면역 노화 지수를 측정하는 장치를 제공하는 것이다.

[0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] T 림프구의 표현형의 변화는 면역 노화의 주 원인 중 하나이므로, T 림프구의 수 및 아형 분포에 관한 지표들이 면역 노화 지수를 측정하는 지표가 될 수 있다. 따라서, 본 발명자들은 면역 노화와 관련된 지표인 T 림프구의 계군(subpopulation), 특히 림프구 내에서 CD8+CD57+ T 림프구와 같은, 특정 T 림프구 계군(subpopulation)의 빈도(Frequency)를 측정하여 면역 노화 지수를 예측하고, 상기 면역 노화의 지수를 통해 노화 관련 질환의 발병 여부를 예측할 수 있음을 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011] 본 발명의 일 구현 예에서는 a) 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 림프구(lymphocyte)를 수득하는 단계; b) 상기 a) 단계의 림프구 내에서 T 림프구 계군(subpopulation)의 빈도를 측정하는 단계; 및 c) 상기 b) 단계의 T 림프구 계군의 빈도(Frequency)로 하기 식 1을 이용하여 면역 노화 지수를 예측하는 단계를 포함하는, 면역 노화 지수 측정방법을 제공한다.

[0013] [식 1]

[0014] 면역 노화 지수(Immune Senescence Index; ISI)= 46.374+0.291 X (T 림프구 계군(subpopulation)의 빈도)

[0016] 본 발명에서 상기 목적하는 개체로부터 분리된 “생물학적 시료”란, 본 발명에 따른 상기 림프구가 존재할 수 있는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 뇌척수액, 분변 또는 소변과 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 본 발명에서, 상기 “면역 노화 지수(Immune Senescence Index; ISI)”란, 노화가 진행됨에 따라 면역 기능이 변화하는 정도, 즉 면역 노화(immunosenescence)가 진행된 정도를 나타내는 것으로, T 세포의 수, 아형 비율 및 표현형의 변화(Miller RA. Science 1996;273,70) 및 기능의 변화 (Won DI et al., Korean J Lab Med 2003; 23, 205; Ben-Yehunda et al., Cancer Invest 1992; 10, 525)를 나타내는 것을 의미한다.

[0018] 본 발명에서 상기 “림프구(lymphocyte)”란, 조혈 과정을 통해 조상 세포인 조혈모세포가 림프구계 조혈 모세포로 분화, 성숙하여 만들어지게 되는 백혈구의 한 종류로, 성숙된 림프구는 크게 골수에서 유래하는 B 림프구,

및 흉선에서 유래하는 T 림프구와 자연살상세포로 나눌 수 있다. 본 발명의 목적상 상기 면역 노화 지수의 측정 은 림프구 내의 T 림프구의 계군(subpopulation)의 빈도에 따라 측정될 수 있다.

- [0019] 본 발명에서 상기 “T 림프구”란, 세포 표면에 있는 단백질 분자 및 기능에 의해 살해 T 세포, 도움 T 세포, 조절 T 세포 및 기억 T 세포로 나뉜다. 본 발명의 목적상 상기 T 림프구는 세포 표면에 CD8이 발현되어 있는 살해 T 세포일 수 있다.
- [0020] 본 발명에서, 상기 “T 림프구 계군(subpopulation)”이란, 림프구 내에 있는 T 림프구 아형의 군집으로, 본 발명의 목적상 CD8와, CD28, CD57, CD5, CD45RA, CD45RO, PD-1 및 CD62L 중 어느 하나가 발현되는 아형의 군집일 수 있다. 바람직하게는 시험관 내에서 세포 노화로 인한 증식 능력의 손실, 텔로미어 감소, 사이클린 의존성 키나아제(kinase)의 발현 증가와 같은 현상에 연관성이 있는 CD28 또는 CD57일 수 있고(Onyema et al. BMC Cancer (2015) 15:1016, Blood. 2003;101(7):2711-20, Biogerontology. 2012;13(2):169-81, J Comp Pathol. 2010;142 Suppl 1:S39-44), 더욱 바람직하게는 CD57 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명에서, 상기 b) 단계는 유세포 분석기(flow cytometry)를 통해 측정되는 것일 수 있다.
- [0022] 단, 본 발명에서 상기 “유세포 분석기(flow cytometry)”란, 유액 상태의 세포가 일정 감지 지역을 통과할 때 각각의 입자나 세포를 신속하게 측정하여 세포의 크기, 세포 내부 조성 정도, 세포 기능 인지 등의 세포 고유의 특성을 측정하고 이를 통해 특정 세포만을 분리(sorting)할 수 있는 장비를 의미한다. 본 발명의 목적상, 상기 유세포 분석기는 T 림프구의 표면에 발현되는 단백질을 선택적으로 감별하여, 전체 T 림프구 내에서 존재하는 특정 계군의 존재 비율 즉, T 림프구 계군(subpopulation)의 빈도를 측정할 수 있다. 또한, 본 발명에서 상기 T 림프구 계군의 빈도를 측정하기 위하여, T 세포의 표면에 발현되는 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 포함할 수 있다. 상기 항체는 상업적으로 판매하는 것을 사용할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니지만 예를 들면, Biolegend(San Diego, CA, USA) 사의 항체일 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 상기 면역 노화 지수는 노화 관련 질환 발병 여부를 예측할 수 있다. 구체적으로, 상기 c) 단계 후, 목적하는 개체의 출생 나이에 비해 면역 노화 지수가 높은 경우 노화 관련 질환의 발병 가능성이 높을 것으로 예측하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0024] 단, 본 발명에서 상기 “출생 나이”란, 모체로부터 출생된 날을 기준으로 하여, 면역 노화 지수의 검진을 받은 날까지 목적하는 개체가 생존한 년수를 의미할 수 있다. 본 발명의 목적상 본 발명에 따른 목적하는 개체는 출생 나이가 50세 이상인 개체에서 상기 노화 관련 질환의 발병 가능성의 예측 정확도가 높을 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명에서 상기 노화 관련 질환은 심혈관 질환, 염증성 또는 자가면역성 질환, 신경 퇴행성 질환, 대사 질환, 폐 질환, 눈질환, 가령성 장애 및 피부과적 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명에서 상기 심혈관 질환은 동맥 경화, 죽상동맥경화증, 협심증, 부정맥, 심근증, 울혈성 심부전, 관상 동맥 질환, 경동맥 질환, 심내막염, 관상 동맥 혈전증, 심근경색증, 고혈압, 대동맥류, 심장 이완 기능장애, 고콜레스테롤혈증, 고지질혈증, 승모판 탈출증, 말초 혈관 질환, 심장 부하 저항, 심장 섬유증, 뇌동맥류, 및 뇌졸중으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는 상기 노화 관련 질환은 심혈관 질환일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 또한, 본 발명에서, 상기 염증성 또는 자가 면역성 질환은 골관절염, 골다공증, 구강 점막염, 염증성 장 질환, 척추후만증, 및 추간판 탈출증으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 또한, 본 발명에서, 상기 신경 퇴행성 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 치매, 경도 인지 장애 및 운동 뉴런 기능장애로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 또한, 본 발명에서, 상기 대사 질환은 당뇨병, 당뇨병성 케양, 대사 증후군 및 비만으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 또한, 본 발명에서 상기 폐 질환은 폐 섬유증, 만성 폐쇄성 폐질환, 천식, 낭포성 섬유증, 기종, 기관지 확장증 및 가령성 폐 기능 손실로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 또한, 본 발명에서 상기 눈 질환은 황반 변성, 녹내장, 백내장, 노안, 및 시력 상실로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0032] 또한, 본 발명에서 상기 가령성 장애는 신장 질환, 신부전증, 쇠약, 청력 상실, 근육 피로, 피부 병태, 피부 상처 치유, 간 섬유증, 췌장 섬유증, 구강 점막하 섬유증, 및 근감소증으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명의 다른 구현 예에서는 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 림프구를 분리하는 분리부; 상기 분리된 림프구내에서 T 림프구 계군(subpopulation)의 빈도를 측정하는 측정부; 및 상기 T 림프구 계군(subpopulation)의 빈도를 하기 식 1을 이용하여 면역 노화 지수로 환산하는 환산부를 포함하는 면역 노화 지수 측정 장치일 수 있다.
- [0035] [식 1]
- [0036] 면역 노화 지수(Immune Senescence Index; ISI)= $46.374+0.291 \times (\text{T 림프구 계군(subpopulation)의 빈도})$
- [0038] 본 발명에서, 상기 “면역 노화 지수(Immune Senescence Index; ISI)”란, 노화가 진행됨에 따라 면역 기능이 변화하는 정도, 즉 면역 노화(immunosenescence)가 진행된 정도를 나타내는 것으로, T 림프구의 수, 아형 비율 및 표현형의 변화(Miller RA. Science 1996;273,70) 및 기능의 변화 (Won DI et al., Korean J Lab Med 2003; 23, 205; Ben-Yehunda et al., Cancer Invest 1992; 10, 525)를 나타내는 것을 의미한다.
- [0039] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른, 면역 노화 지수 측정 장치를 개략적으로 도시한 것으로, 이하 각 구성을 상세히 설명한다.
- [0040] 분리부: 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 림프구(lymphocyte)를 분리하는 구성에 해당한다.
- [0041] 단, 본 발명에서 상기 목적하는 개체로부터 분리된 “생물학적 시료”란, 본 발명에 따른 상기 림프구가 존재할 수 있는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 뇌척수액, 분변 또는 소변과 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 측정부: 상기 분리된 림프구(lymphocyte) 내에서 T 림프구 계군(subpopulation)의 빈도를 측정하는 구성에 해당한다.
- [0043] 본 발명에서 상기 “림프구(lymphocyte)”란, 조혈 과정을 통해 조상 세포인 조혈모세포가 림프구계 조혈 모세포로 분화, 성숙하여 만들어지게 되는 백혈구의 한 종류로, 성숙된 림프구는 크게 골수에서 유래하는 B 림프구, 및 흉선에서 유래하는 T 림프구와 자연살상세포로 나눌 수 있다. 본 발명의 목적상 상기 면역 노화 지수의 측정은 림프구 내의 T 림프구의 계군(subpopulation)의 빈도에 따라 측정될 수 있다.
- [0044] 본 발명에서 상기 “T 림프구”란, 세포 표면에 있는 단백질 분자 및 기능에 의해 살해 T 세포, 도움 T 세포, 조절 T 세포 및 기억 T 세포로 나뉜다. 본 발명의 목적상 상기 T 림프구는 세포 표면에 CD8이 발현되어 있는 살해 T 세포일 수 있다.
- [0045] 본 발명에서, 상기 “T 림프구 계군(subpopulation)”이란, 림프구 내에 있는 T 림프구 아형의 군집으로, 본 발명의 목적상 CD8와, CD28, CD57, CD5, CD45RA, CD45RO, PD-1 및 CD62L 중 어느 하나가 발현되는 아형의 군집일 수 있다. 바람직하게는 시험관 내에서 세포 노화로 인한 증식 능력의 손실, 텔로미어 감소, 사이클린 의존성 키나아제(kinase)의 발현 증가와 같은 현상에 연관성이 있는 CD28 또는 CD57일 수 있고(Onyema et al. BMC Cancer (2015) 15:1016, Blood. 2003;101(7):2711-20, Biogerontology. 2012;13(2):169-81, J Comp Pathol. 2010;142 Suppl 1:S39-44), 더욱 바람직하게는 CD57 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명에서 상기 T 림프구 계군의 빈도는 유세포 분석기(flow cytometry)의 원리에 의해 측정되는 장치일 수 있다.
- [0047] 단, 본 발명에서 상기 “유세포 분석기(flow cytometry)”란, 유액 상태의 세포가 일정 감지 영역을 통과할 때 각각의 입자나 세포를 신속하게 측정하여 세포의 크기, 세포 내부 조성 정도, 세포 기능 인지 등의 세포 고유의 특성을 측정하고 이를 통해 특정 세포만을 분리(sorting)할 수 있는 원리를 이용한 장비를 의미한다. 본 발명의 목적상, 상기 유세포 분석기는 T 림프구의 표면에 발현되는 단백질을 선택적으로 감별하여, 전체 T 림프구 내에서 존재하는 특정 계군의 존재 비율 즉, T 림프구 계군(subpopulation)의 빈도를 측정할 수 있다.
- [0048] 또한, 본 발명에서 상기 T 세포 계군의 빈도를 측정하기 위하여, T 세포의 표면에 발현되는 단백질에 특이적으

로 결합할 수 있는 항체를 포함할 수 있다. 상기 항체는 상업적으로 판매하는 것을 사용할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니지만 예를 들면, Biolegend(San Diego, CA, USA) 사의 항체일 수 있다.

- [0049] 환산부: 림프구(lymphocyte) 내에서 T 림프구 계군(subpopulation)의 빈도를 상기 식 1을 이용하여 면역 노화 지수로 환산하는 구성에 해당한다.
- [0050] 본 발명에서 상기 면역 노화 지수를 측정하는 장치를 이용하는 경우 노화 관련 질환 발병 여부를 예측할 수 있다. 구체적으로, 목적하는 개체의 출생 나이 에 비해 상기 환산부에서 환산된 면역 노화 지수가 높은 경우 노화 관련 질환의 발병 가능성이 높을 것으로 예측하는 구성을 더 포함할 수 있다.
- [0051] 단, 본 발명에서 상기 “출생 나이”란, 모체로부터 출생된 날을 기준으로 하여, 면역 노화 지수의 검진을 받은 날 까지 목적하는 개체가 생존한 년수를 의미할 수 있다. 본 발명의 목적상 본 발명에 따른 목적하는 개체는 출생 나이가 50세 이상인 개체에서 상기 노화 관련 질환의 발병 가능성의 예측 정확도가 높을 수 있다.
- [0052] 단, 본 발명에서 상기 노화 관련 질환은 심혈관 질환, 염증성 또는 자가면역성 질환, 신경 퇴행성 질환, 대사 질환, 폐 질환, 눈질환, 가령성 장애 및 피부과적 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.
- [0053] 또한, 본 발명에서 상기 심혈관 질환은 동맥 경화, 죽상동맥경화증, 협심증, 부정맥, 심근증, 울혈성 심부전, 관상 동맥 질환, 경동맥 질환, 심내막염, 관상 동맥 혈전증, 심근경색증, 고혈압, 대동맥류, 심장 이완 기능장애, 고콜레스테롤혈증, 고지질혈증, 승모판 탈출증, 말초 혈관 질환, 심장 부하 저항, 심장 섬유증, 뇌동맥류, 및 뇌졸중으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는 상기 노화 관련 질환은 심혈관 질환일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 또한, 본 발명에서, 상기 염증성 또는 자가 면역성 질환은 골관절염, 골다공증, 구강 점막염, 염증성 장 질환, 척추후만증, 및 추간판 탈출증으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 또한, 본 발명에서, 상기 신경 퇴행성 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 치매, 경도 인지 장애 및 운동 뉴런 기능장애로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0056] 또한, 본 발명에서, 상기 대사 질환은 당뇨병, 당뇨병성 케양, 대사 증후군 및 비만으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0057] 또한, 본 발명에서 상기 폐 질환은 폐 섬유증, 만성 폐쇄성 폐질환, 천식, 낭포성 섬유증, 기종, 기관지 확장증 및 가령성 폐 기능 손실로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0058] 또한, 본 발명에서 상기 눈 질환은 황반 변성, 녹내장, 백내장, 노안, 및 시력 상실로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0059] 또한, 본 발명에서 상기 가령성 장애는 신장 질환, 신부전증, 쇠약, 청력 상실, 근육 피로, 피부 병태, 피부 상처 치유, 간 섬유증, 췌장 섬유증, 구강 점막하 섬유증, 및 근감소증으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0060] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 노화 지수 측정 장치에 대한 것으로, 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 림프구를 분리하는 분리부; 상기 분리된 림프구 내에서 CD8+ CD57+ T 림프구의 빈도를 측정하는 측정부; 및 상기 CD8+ CD57+ T 림프구의 빈도를 상기 식 1을 이용하여 면역 노화 지수 환산하는 환산부를 포함하는 면역 노화 지수 측정 장치일 수 있다.

발명의 효과

- [0061] 본 발명에 따른 면역 노화 관련된 지표인 T 림프구의 계군(subpopulation)의 빈도를 측정하여 면역이 노화된 정도인 면역 노화 정도를 예측하는 경우, 노화 관련 질환의 발병 여부의 예측 정확도를 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0062] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 그래프를 나타낸 것이다.
도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 그래프를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 그래프를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 그래프를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 노화 지수 측정 방법의 단계의 모식도를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 노화 지수 측정 장치의 모식도를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 노화 지수 측정 장치의 모식도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예

[준비에 1] 측정 대상 선별

본 발명에 따른 연구 대상자는 총 415명의 한국인으로, 고혈압, 관상 동맥 질환, 당뇨병 및 건강한 사람을 모두 포함한다. 상기 실험군(cohort)은 평균 연령 59.4 ± 11.7 세 (20 ~ 82 세)에 해당하도록 하였다.

상기 고혈압이 있는 환자는 고혈압 치료제를 사용하기 전 수축기 혈압이 140mmHg 이상이거나 이완기 혈압이 90mmHg 이상인 것으로 정의하여 선별하였다.

또한, 상기 당뇨병 환자는 공복 혈장 포도당 수치가 26mg / dL 이상, HbA1c가 6.5 % 이상이거나 당뇨병 치료 경력이 있는 것으로 정의하여 선별하였다.

또한, 상기 관상 동맥 질환은 침습적 관상 동맥 혈관 조영술 또는 CT 관상 동맥 조영술에 의해 직경이 50% 이상 감소된 하나 이상의 병변으로 정의하여 선별하였다.

또한, 중증 전신 질환, 악성 쇠약 질환, 중증 고혈압 ($> 200 / 140$ mmHg), 명백한 만성 염증성 질환의 병력 및 / 또는 항 염증제를 투여 받고있는 환자는 다음 조건 중 하나에 해당하는 경우에는 본 실험군에서 제외시켰다.

상기 실험군 내 상기 조건에 해당하는 개체 수를 측정하여 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

내용	단위	실험군 수
나이	(년)	59.4 ± 11.7
남성 성별	수(비율)	273 (65.8%)
CAD	수(비율)	281 (67.7%)
고혈압	수(비율)	247 (59.5%)
DM	수(비율)	148 (35.7%)
고지혈증	수(비율)	179 (43.1%)
흡연자	수(비율)	51 (12.3%)
BMI	(kg/m ²)	25.2 ± 3.1
SBP	(mmHg)	131.3 ± 17.1
DBP	(mmHg)	80.8 ± 11.0
크레아티닌(Creatinine)	(mg/dL)	1.0 ± 0.7
전체 콜레스테롤	(mg/dL)	163.1 ± 41.1
HDL-콜레스테롤	(mg/dL)	48.2 ± 11.9
LDL-콜레스테롤	(mg/dL)	88.1 ± 34.7
트리글리세리드(triglyceride)	(mg/dL)	135.8 ± 122.2
hsCRP	(mg/dL)	1.5 ± 3.1
hfpPWV	(cm/s)	$1,016.6 \pm 234.6$

[0077] * CAD (coronary artery disease): 관상동맥 질환, DM(Diabetes mellitus): 당뇨병, BMI(body mass index): 체질량 지수, hsCRP(high-sensitivity C-reactive protein): 고감도 C 반응성 단백 시험, hFPWV(heart-femoral pulsewave velocity): 맥파속도

[0079] **[준비에 2] 말초 혈액 단핵 세포 분리**

[0080] 본 발명에 따른 T 림프구의 계군(subpopulation)의 빈도 확인을 위하여, 상기 준비에 1의 실험군의 혈액을 항 응고 처리한 뒤, 상기 항 응고 처리된 혈액으로부터 말초 혈액 단핵 세포(Peripheral blood mononuclear cells; PBMCs)를 Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)의 밀도 구배 원심 분리 방법을 통해 분리 하였다. 상기 말초 혈액 단핵 세포는 하기 실험예에서 사용되기 전까지 -70℃에서 보관하였다.

[0082] **[실험예 1] 말초 혈액 단핵 세포 내 T 림프구 계군(subpopulation) 분석**

[0083] 본 발명에 따른 T 림프구의 계군(subpopulation)의 빈도를 분석하기 위하여 상기 준비에 2에서 분리된 말초 혈액 단핵 세포(PBMCs)의 표면을 각각의 T 림프구의 계군(subpopulation)을 나타내는 단일클론 항체와 4℃ 에서 20 분 동안 직접 배양시켜 염색하였다.

[0084] 상기 항체는 항-CD3 (horizon V500), 항-CD4 (PE-Cy7), 항-CD8 (APC-H7), 항-CD19 (PerCP-Cy5.5), 항-CD28 (APC) (all from BD Biosciences, San Jose, CA, USA), 및 항-CD57 (eFluor 450) (Biolegend, San Diego, CA, USA)를 사용하였다.

[0085] 상기 염색이 완료된 말초 혈액 단핵 세포는 LSR II 기기 (BD Biosciences)를 사용하여 유동 세포 계측법을 수행 하고, 데이터는 FlowJo 소프트웨어 (Treestar, San Carlos, CA, SA)를 통해 분석하여, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

T 림프구 종류	T 림프구 계군 종류	T 림프구 계군의 빈도(%)
CD4+ T 림프구	CD57+ 아형	6.1±6.0
CD4+ T 림프구	CD28null 아형	4.4±5.7
CD8+ T 림프구	CD57+ 아형	43.0±17.1
CD8+ T 림프구	CD28null 아형	41.9±17.6

[0089] 상기 표 2에서 보는 바와 같이, 평균 연령 59.4 ± 11.7 세 (20 ~ 82 세)에 해당하는 실험군에서 CD4+CD57+ T 림프구 및 CD4+CD28null 세포의 존재 비율이 4.4 내지 6.1 %에 해당하였지만, CD8+CD57+ T 림프구 및 CD8+CD28null T 림프구의 존재 비율은 41.9 내지 43.0%로 현저하게 높은 비율로 존재하였다.

[0090] 상기 결과를 통해 20 내지 82세에 해당하는 연령에서는 CD8+CD57+ T 림프구 및 CD8+CD28null T 림프구의 빈도가 CD4+CD57+ T 림프구 및 CD4+CD28null 림프구 의 빈도에 비해 높은 것을 알 수 있다.

[0092] **[실험예 2] T 림프구 계군 및 나이 상관관계 분석**

[0093] 상기 실험예 1에서 분석한 T 림프구의 계군(subpopulation)과 실험군 간의 나이와의 실제 상관관계를 분석하였다.

[0094] 상기 준비에 1의 실험군 각각에 대하여 상기 실험예 1에서 얻은 T 세포의 계군과 그 나이를 변수로 설정하여 하기 분석 과정을 수행하였다. 평균±표준 편차로 표시되는 연속 변수 및 그룹 합계의 백분율에 해당하는 범주형

변수에 대하여, 상기 연속 변수는 student's t-test 및 ANOVA를 사용하여 비교하였고, 그룹 내 비교는 paired t-test를 사용하여 합산하고, Wilcoxon signed-rank test를 사용하여 결과를 검증하였다.

[0095] 또한, 상기 연속 변수 사이의 나이 및 T 세포의 계군과의 상관 관계를 분석하기 위하여 피어슨의 상관 분석을 사용하였다. 모든 p- 값은 양면으로 0.05 수준에서 유의한 것으로 보았고, 모든 통계 분석은 SPSS 13.0을 사용하여 수행되었다(SPSS Inc., Chicago, IL, USA). 상기 나이 및 T 세포의 아형 사이의 상관관계 분석 결과를 도 1에 나타내었다.

[0096] 도 1에서 보는 바와 같이, 실험군의 나이가 20대에서 70대로 증가함에 따라 CD8+CD57+ T 림프구 및 CD8+CD28null T 림프구의 빈도가 약 10%에서 약 50%까지 증가하였다.

[0097] 상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 CD8+CD57+ T 림프구 및 CD8+CD28null T 림프구의 빈도는 세포의 공여자 즉, 실험군의 출생 나이가 증가하는 것에 비례하여 증가하는 것을 알 수 있다.

[0099] [실험예 3] T 림프구 계군(subpopulation) 및 맥파속도 상관관계 분석

[0100] 본 발명에 따른 T 세포의 계군(subpopulation)과 실험군의 맥파속도와의 상관관계를 분석하였다.

[0101] 상기 준비예 1의 실험군 각각에 대하여 상기 표 1의 맥파속도와 상기 실험예 1에서 얻은 T 세포의 계군을 변수로 설정하여, 상기 실험예 2에서와 동일한 방법으로 상관관계 분석을 수행하여, 그 결과를 도 2 및 3에 나타내었다.

[0102] 도 2 및 도 3에서 보는 바와 같이, CD8+CD57+ T 림프구 및 CD8+CD28null T 림프구의 빈도가 증가하는 것과 비례하여 맥파속도 역시 약 600cm/s에서 약 1300cm/s로 증가하였다.

[0103] 상기 결과를 통해, CD8+CD57+ T 림프구 및 CD8+CD28null T 림프구 빈도의 증가는 노화 관련 질환인 동맥 경화를 나타내는 지표인 맥파속도의 증가와 비례하는 것을 알 수 있다.

[0105] [실험예 4] CD57+CD8+ T 림프구 및 CD28nullCD8+ T 림프구 면역 나이 예측 정확도 비교

[0106] 본 발명에 따른 상기 실험예 2에서 도출한 T 림프구 계군(subpopulation) 각각에 따른 면역 노화 지수 예측 공식의 정확도를 비교하였다.

[0107] 우선, T 림프구의 계군별로 존재 비율과 나이의 관련성을 확인하고, 도 4와 같이 회귀선을 그린 뒤, 하기 식 1 및 2를 이용하여 면역 노화 지수를 측정하였다. 단, 상기 실험예 3에서 도출된 T 림프구 계군의 CD8+CD57+ T 림프구 빈도 값은 하기 식 1에 대입하였고, T 림프구 계군의 CD8+CD28null T 림프구 빈도 값은 하기 식 2에 대입하였다.

[0109] [식 1]

[0110] 면역 노화 지수= $46.374 + 0.291 \times (\text{T 림프구 계군(subpopulation)의 빈도})$

[0112] [식 2]

[0113] 면역 노화 지수= $47.374 + 0.271 \times (\text{T 림프구 계군(subpopulation)의 빈도})$

[0115] 또한, 하기 식 3 내지 7의 y는 실제 나이 값에 해당하고, \hat{y} 는 상기 실시예 2에서 도출한 면역 노화 지수 값으로, 이 둘의 차이를 잔차로 지칭하여 AE(Average Error), MAE(Mean absolute error), MAPE(Mean absolute percentage error), MSE(Mean squared error) 및 RMSE(root MSE) 값을 추산하고, 이를 하기 표 3에 나타내었다.

[0117] [식 3]

$$AE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y - \hat{y})$$

[0118]

[0119] [식 4]

$$MAE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y - \hat{y}|$$

[0120]

[0121] [식 5]

$$MAPE = 100\% \times \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|y - \hat{y}|}{|y|}$$

[0122]

[0123] [식 6]

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y - \hat{y})^2$$

[0124]

[0125] [식 7]

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y - \hat{y})^2}$$

[0126]

표 3

[0128]

	CD8+ CD57+ T 림프구 빈도	CD8+ CD28null T 림프구 빈도
AE	-0.0000000000000008	-0.0000000000000004
MAE	8.26894	8.33812
MAPE	16.53212918	16.77421876
MAE	110.99533	113.12224
RMSE	10.53543	10.63589

[0130] 상기 표 3에서 보는 바와 같이, 각각의 잔차의 값을 확인한 결과 림프구 내 CD8+CD57+ T 림프구 빈도에 의한 상기 식 1이 CD8+CD28null T 림프구 빈도에 의한 상기 식 2에 비하여 면역 노화를 예측하는 정확도가 높았다.

[0131] 상기 결과를 통해, 면역 노화 지수는 CD8+CD57+ T 림프구 빈도에 의한 상기 식 1에 의해 보다 정확하게 예측할 수 있음을 알 수 있다.

[0132] 이상에서 본 발명에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고, 청구범위

에 기재된 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능하다는 것은 당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게는 자명할 것이다.

부호의 설명

100 : 분리부

200 : 환산부

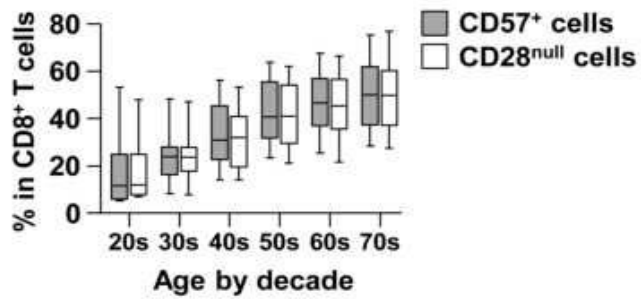
210 : 분리부

300 : 측정부

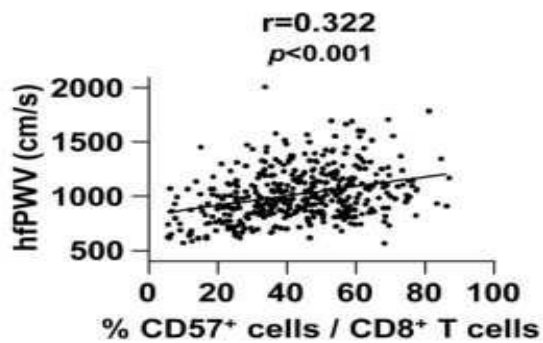
310 : 환산부

도면

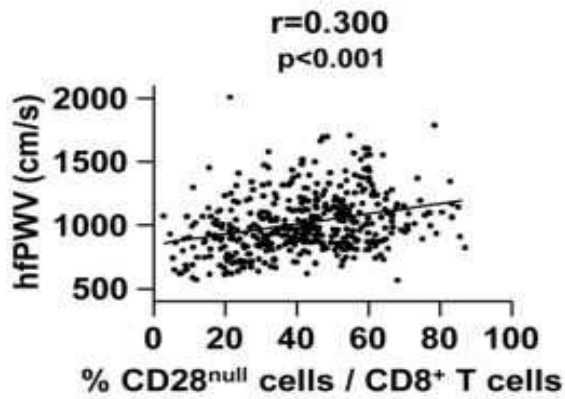
도면1



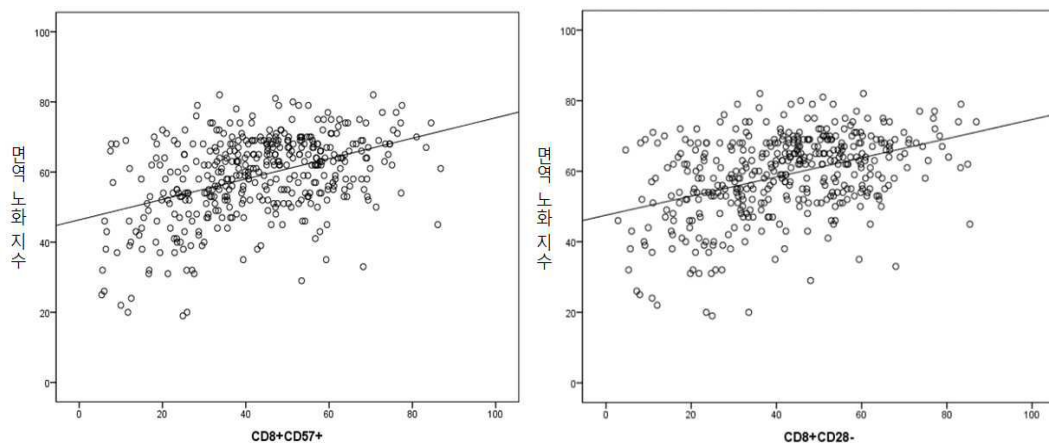
도면2



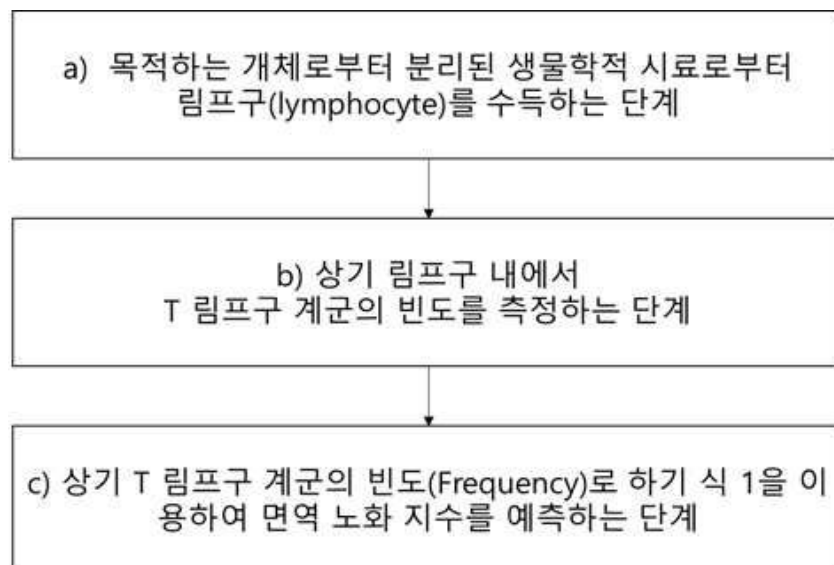
도면3



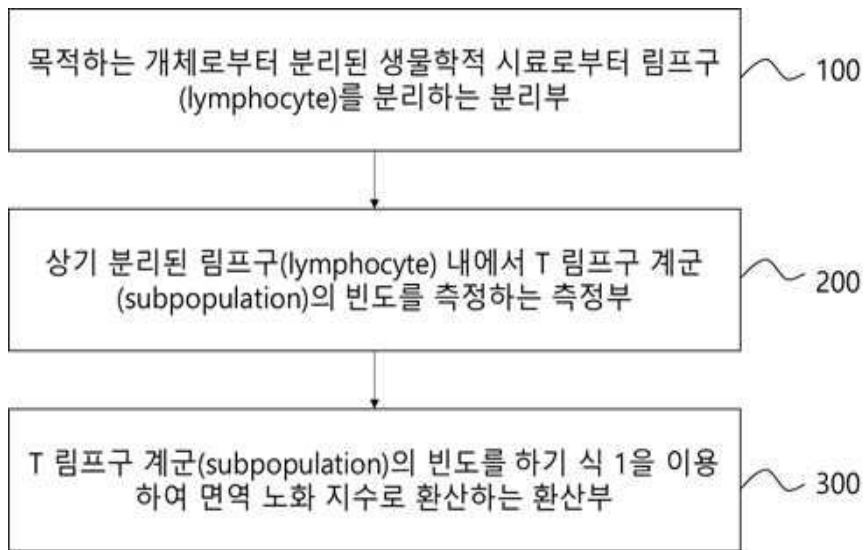
도면4



도면5



도면6



도면7

