



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0122258
(43) 공개일자 2020년10월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
G01N 33/6893 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0046472
(22) 출원일자 2020년04월17일
심사청구일자 2020년04월17일
(30) 우선권주장
1020190044669 2019년04월17일 대한민국(KR)

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
이형근
서울특별시 강남구 도곡로78길 22, 109동 203호 (대치동, 대치삼성아파트)
지용우
서울특별시 서초구 신반포로 267 신반포21차아파트 340동 601호
정재훈
경기도 용인시 기흥구 서천서로20번길 8-7, 203호(서천동)
(74) 대리인
이재영

전체 청구항 수 : 총 24 항

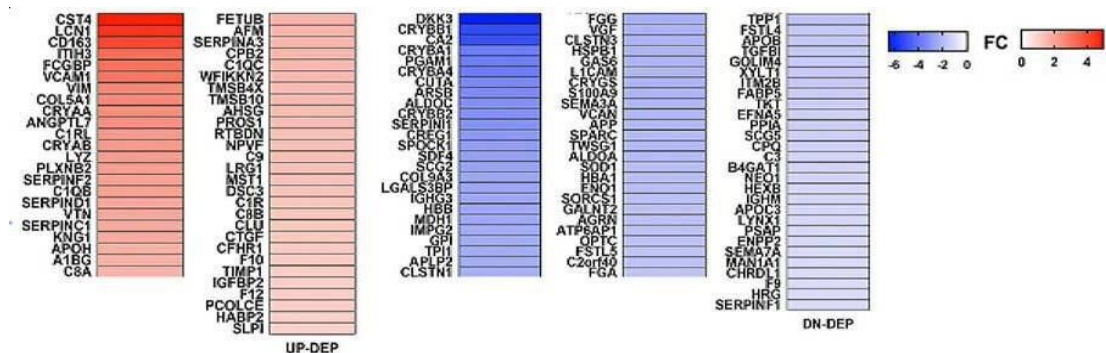
(54) 발명의 명칭 각막 내피 세포의 기능 부전 진단용 바이오마커

(57) 요약

본 발명은 각막 내피 세포의 기능 부전을 진단할 수 있는 바이오마커 용 바이오마커 및 이를 이용하여 각막 내피 세포의 기능 부전 정도와 이와 관련된 다양한 질환을 진단하기 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

본 발명은 안구의 방수에 있어서 본 발명의 바이오마커 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정함으로써 각막 내피 세포의 기능 부전 여부 혹은 그 정도를 빠르고 용이하지만 정확하게 진단할 수 있고, 이를 통하여 상기 각막 내피 세포의 기능 부전으로 인하여 유발될 수 있는 폭스각막이영양증, 외상, 인공수정체 수포각막병증, 각막 내피염 또는 시력 손실 등의 질환을 조기에 진단하거나, 상기 질환의 경과, 예후 또는 치료 효과에 대하여도 추적이 가능하다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/136 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2500/00 (2013.01)

G01N 2800/16 (2013.01)

G01N 2800/60 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711083106

과제번호 2018R1A2B3001110

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 동계(syngeneic), 이종(Xenogeneic) 이식 거부반응과의 비교를 통한

동종이식(allograft) 특이 표지자 도출과 이식 거부면역반응에서의 역할 탐색

기 여 율 1/1

과제수행기관명 연세대학교

연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

TIMP1, FCGBP 및 ANGPTL7로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 각막 내피 세포의 기능 부전 진단용 바이오마커.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 바이오마커는 안구의 방수(aqueous humor) 내에 존재하는 것인, 각막 내피 세포의 기능 부전 진단용 바이오마커.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 바이오마커는 CST4, LCN1, CD163, ITIH3, VCAM1, VIM, COL5A1, CRYAA, C1RL, CRYAB, LYZ, PLXNB2, SERPINF2, C1QB, SERPIND1, VTN, SERPINC1, KNG1, APOH, A1BG, C8A, FETUB, AFM, SERPINA3, CPB2, C1QC, WFIKKN2, TMSB4X, TMSB10, AHSG, PROS1, RTBDN, NPVF, C9, LRG1, MST1, DSC3, C1R, C8B, CLU, CTGF, CFHR1, F10, IGFBP2, F12, PCOLCE, HABP2, SLPI, DKK3, CRYBB1, CA2, CRYBA1, PGAM1, CRYBA4, CUTA, ARSB, ALDOC, CRYBB2, SERPINI1, CREG1, SPOCK1, SDF4, SCG2, COL9A3, LGALS3BP, IGHG3, HBB, MDH1, IMPG2, GPI, TPI1, APLP2, CLSTN1, FGG, VGF, CLSTN3, HSPB1, GAS6, L1CAM, CRYGS, S100A9, SEMA3A, VCAN, APP, SPARC, TWSG1, ALDOA, SOD1, HBA1, ENO1, SORCS1, GALNT2, AGRN, ATP6AP1, OPTC, FSTL5, C2orf40, FGA, TPP1, FSTL4, APOB, TGFBI, GOLIM4, XYLT1, ITM2B, FABP5, TKT, EFNA5, PPIA, SCG5, CPQ, C3, B4GAT1, NEO1, HEXB, IGHM, APOC3, LYNX1, PSAP, ENPP2, SEMA7A, MAN1A1, CHRDL1, F9, HRG 및 SERPINF1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자를 더 포함하는, 각막 내피 세포의 기능 부전 진단용 바이오마커.

청구항 4

TIMP1, FCGBP 및 ANGPTL7로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 각막 내피 세포의 기능 부전의 진단용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 조성물은 CST4, LCN1, CD163, ITIH3, VCAM1, VIM, COL5A1, CRYAA, C1RL, CRYAB, LYZ, PLXNB2, SERPINF2, C1QB, SERPIND1, VTN, SERPINC1, KNG1, APOH, A1BG, C8A, FETUB, AFM, SERPINA3, CPB2, C1QC, WFIKKN2, TMSB4X, TMSB10, AHSG, PROS1, RTBDN, NPVF, C9, LRG1, MST1, DSC3, C1R, C8B, CLU, CTGF, CFHR1, F10, IGFBP2, F12, PCOLCE, HABP2, SLPI, DKK3, CRYBB1, CA2, CRYBA1, PGAM1, CRYBA4, CUTA, ARSB, ALDOC, CRYBB2, SERPINI1, CREG1, SPOCK1, SDF4, SCG2, COL9A3, LGALS3BP, IGHG3, HBB, MDH1, IMPG2, GPI, TPI1, APLP2, CLSTN1, FGG, VGF, CLSTN3, HSPB1, GAS6, L1CAM, CRYGS, S100A9, SEMA3A, VCAN, APP, SPARC, TWSG1, ALDOA, SOD1, HBA1, ENO1, SORCS1, GALNT2, AGRN, ATP6AP1, OPTC, FSTL5, C2orf40, FGA, TPP1, FSTL4, APOB, TGFBI, GOLIM4, XYLT1, ITM2B, FABP5, TKT, EFNA5, PPIA, SCG5, CPQ, C3, B4GAT1, NEO1, HEXB, IGHM, APOC3, LYNX1, PSAP, ENPP2, SEMA7A, MAN1A1, CHRDL1, F9, HRG 및 SERPINF1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 더 포함하는, 각막 내피 세포의 기능 부전의 진단용 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고핵타이드,

리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 각막 내피 세포의 기능 부전의 진단용 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 각막 내피 세포의 기능 부전의 진단용 조성물.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 단백질 또는 상기 유전자의 발현 수준은 안구의 방수(aqueous humor)에 대하여 측정되는 것인, 각막 내피 세포의 기능 부전의 진단용 조성물.

청구항 9

제4항 내지 제8항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 각막 내피 세포의 기능 부전의 진단용 키트.

청구항 10

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 TIMP1, FCGBP 및 ANGPTL7로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 각막 내피 세포의 기능 부전을 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 안구의 방수(aqueous humor)인, 각막 내피 세포의 기능 부전을 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 발현 수준을 측정하는 단계는, CST4, LCN1, CD163, ITIH3, VCAM1, VIM, COL5A1, CRYAA, C1RL, CRYAB, LYZ, PLXNB2, SERPINF2, C1QB, SERPIND1, VTN, SERPINC1, KNG1, APOH, A1BG, C8A, FETUB, AFM, SERPINA3, CPB2, C1QC, WF1KKN2, TMSB4X, TMSB10, AHSG, PROS1, RTBDN, NPVF, C9, LRG1, MST1, DSC3, C1R, C8B, CLU, CTGF, CFHR1, F10, IGFBP2, F12, PCOLCE, HABP2, SLPI, DKK3, CRYBB1, CA2, CRYBA1, PGAM1, CRYBA4, CUTA, ARSB, ALDOC, CRYBB2, SERPINI1, CREG1, SPOCK1, SDF4, SCG2, COL9A3, LGALS3BP, IGHG3, HBB, MDH1, IMPG2, GPI, TPI1, APLP2, CLSTN1, FGG, VGF, CLSTN3, HSPB1, GAS6, L1CAM, CRYGS, S100A9, SEMA3A, VCAN, APP, SPARC, TWSG1, ALDOA, SOD1, HBA1, ENO1, SORCS1, GALNT2, AGRN, ATP6AP1, OPTC, FSTL5, C2orf40, FGA, TPP1, FSTL4, APOB, TGFB1, GOLIM4, XYLT1, ITM2B, FABP5, TKT, EFNA5, PPIA, SCG5, CPQ, C3, B4GAT1, NEO1, HEXB, IGHM, APOC3, LYNX1, PSAP, ENPP2, SEMA7A, MAN1A1, CHRDL1, F9, HRG 및 SERPINF1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 더 포함하는, 각막 내피 세포의 기능 부전을 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 단백질의 발현 수준은, 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 이용하여 측정되는, 각막 내피 세포의 기능 부전을 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 14

제10항에 있어서,

상기 유전자의 발현 수준은, 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로

이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 이용하여 측정되는, 각막 내피 세포의 기능 부전을 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 15

제10항에 있어서,

상기 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 증가 또는 감소된 경우, 각막 내피 세포의 기능 부전의 가능성이 높은 것으로 예측하는 단계를 포함하는, 각막 내피 세포의 기능 부전을 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 16

제12항에 있어서,

상기 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 CST4, LCN1, CD163, ITIH3, FCGBP, VCAM1, VIM, COL5A1, CRYAA, ANGPTL7, C1RL, CRYAB, LYZ, PLXNB2, SERPINF2, C1QB, SERPIND1, VTN, SERPINC1, KNG1, APOH, A1BG, C8A, FETUB, AFM, SERPINA3, CPB2, C1QC, WFIKK2, TMSB4X, TMSB10, AHSB, PROS1, RTBDN, NPVF, C9, LRG1, MST1, DSC3, C1R, C8B, CLU, CTGF, CFHR1, F10, TIMP1, IGFBP2, F12, PCOLCE, HABP2 및 SLPI로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 증가된 경우, 각막 내피 세포의 기능 부전의 가능성이 높은 것으로 예측하는, 각막 내피 세포의 기능 부전을 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 17

제12항에 있어서,

상기 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 DKK3, CRYBB1, CA2, CRYBA1, PGAM1, CRYBA4, CUTA, ARSB, ALDOC, CRYBB2, SERPINI1, CREG1, SPOCK1, SDF4, SCG2, COL9A3, LGALS3BP, IGHG3, HBB, MDH1, IMPG2, GPI, TP11, APLP2, CLSTN1, FGG, VGF, CLSTN3, HSPB1, GAS6, L1CAM, CRYGS, S100A9, SEMA3A, VCAN, APP, SPARC, TWSG1, ALDOA, SOD1, HBA1, ENO1, SORCS1, GALNT2, AGRN, ATP6AP1, OPTC, FSTL5, C2orf40, FGA, TPP1, FSTL4, APOB, TGFBI, GOLIM4, XYLT1, ITM2B, FABP5, TKT, EFNA5, PPIA, SCG5, CPQ, C3, B4GAT1, NEO1, HEXB, IGHM, APOC3, LYNX1, PSAP, ENPP2, SEMA7A, MAN1A1, CHRDL1, F9, HRG 및 SERPINF1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 감소된 경우, 각막 내피 세포의 기능 부전의 가능성이 높은 것으로 예측하는, 각막 내피 세포의 기능 부전을 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 18

제10항에 있어서,

상기 각막 내피 세포의 기능 부전의 진단은 상기 각막 내피 세포의 기능 부전으로 인해 유도되는 질환의 발병 여부, 발병 가능성을 진단하거나, 질환의 경과, 예후 또는 치료 효과에 대한 추적을 포함하는, 각막 내피 세포의 기능 부전을 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 각막 내피 세포의 기능 부전으로 인해 유도되는 질환은 폭스각막이영양증, 외상, 인공수정체 수포각막병증, 각막 내피염 또는 시력 손실인, 각막 내피 세포의 기능 부전을 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 20

분리된 생물학적 시료에 각막 내피 세포의 기능 부전을 유도할 것으로 예상되는 후보 물질을 처리하는 단계; 및 상기 후보 물질이 처리된 생물학적 시료에서 TIMP1, FCGBP 및 ANGPTL7로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 각막 내피 세포의 기능 부전을 유도하는 약물을 스크리닝하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 안구의 방수(aqueous humor)인, 각막 내피 세포의 기능 부전을 유도하는 약물을 스크리닝하는 방법.

청구항 22

제20항에 있어서,

상기 발현 수준을 측정하는 단계는 CST4, LCN1, CD163, ITIH3, VCAM1, VIM, COL5A1, CRYAA, C1RL, CRYAB, LYZ, PLXNB2, SERPINF2, C1QB, SERPIND1, VTN, SERPINC1, KNG1, APOH, A1BG, C8A, FETUB, AFM, SERPINA3, CPB2, C1QC, WFIKN2, TMSB4X, TMSB10, AHSG, PROS1, RTBDN, NPVF, C9, LRG1, MST1, DSC3, C1R, C8B, CLU, CTGF, CFHR1, F10, IGFBP2, F12, PCOLCE, HABP2, SLPI, DKK3, CRYBB1, CA2, CRYBA1, PGAM1, CRYBA4, CUTA, ARSB, ALDOC, CRYBB2, SERPINI1, CREG1, SPOCK1, SDF4, SCG2, COL9A3, LGALS3BP, IGHG3, HBB, MDH1, IMPG2, GPI, TPI1, APLP2, CLSTN1, FGG, VGF, CLSTN3, HSPB1, GAS6, L1CAM, CRYGS, S100A9, SEMA3A, VCAN, APP, SPARC, TWSG1, ALDOA, SOD1, HBA1, ENO1, SORCS1, GALNT2, AGRN, ATP6AP1, OPTC, FSTL5, C2orf40, FGA, TPP1, FSTL4, APOB, TGFBI, GOLIM4, XYLT1, ITM2B, FABP5, TKT, EFNA5, PPIA, SCG5, CPQ, C3, B4GAT1, NEO1, HEXB, IGHM, APOC3, LYNX1, PSAP, ENPP2, SEMA7A, MAN1A1, CHRDL1, F9, HRG 및 SERPINF1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 더 포함하는, 각막 내피 세포의 기능 부전을 유도하는 약물을 스크리닝하는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서,

상기 후보 물질의 처리 후 상기 생물학적 시료에서 측정된 CST4, LCN1, CD163, ITIH3, FCGBP, VCAM1, VIM, COL5A1, CRYAA, ANGPTL7, C1RL, CRYAB, LYZ, PLXNB2, SERPINF2, C1QB, SERPIND1, VTN, SERPINC1, KNG1, APOH, A1BG, C8A, FETUB, AFM, SERPINA3, CPB2, C1QC, WFIKN2, TMSB4X, TMSB10, AHSG, PROS1, RTBDN, NPVF, C9, LRG1, MST1, DSC3, C1R, C8B, CLU, CTGF, CFHR1, F10, TIMP1, IGFBP2, F12, PCOLCE, HABP2 및 SLPI로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 처리 전에 비하여 증가된 경우, 상기 후보 물질을 각막 내피 세포의 기능 부전의 유도제로 판별하는, 각막 내피 세포의 기능 부전을 유도하는 약물을 스크리닝하는 방법.

청구항 24

제22항에 있어서,

상기 후보 물질의 처리 후 상기 생물학적 시료에서 측정된 DKK3, CRYBB1, CA2, CRYBA1, PGAM1, CRYBA4, CUTA, ARSB, ALDOC, CRYBB2, SERPINI1, CREG1, SPOCK1, SDF4, SCG2, COL9A3, LGALS3BP, IGHG3, HBB, MDH1, IMPG2, GPI, TPI1, APLP2, CLSTN1, FGG, VGF, CLSTN3, HSPB1, GAS6, L1CAM, CRYGS, S100A9, SEMA3A, VCAN, APP, SPARC, TWSG1, ALDOA, SOD1, HBA1, ENO1, SORCS1, GALNT2, AGRN, ATP6AP1, OPTC, FSTL5, C2orf40, FGA, TPP1, FSTL4, APOB, TGFBI, GOLIM4, XYLT1, ITM2B, FABP5, TKT, EFNA5, PPIA, SCG5, CPQ, C3, B4GAT1, NEO1, HEXB, IGHM, APOC3, LYNX1, PSAP, ENPP2, SEMA7A, MAN1A1, CHRDL1, F9, HRG 및 SERPINF1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 처리 전에 비하여 감소된 경우, 상기 후보 물질을 각막 내피 세포의 기능 부전의 유도제로 판별하는, 각막 내피 세포의 기능 부전을 유도하는 약물을 스크리닝하는 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 각막 내피 세포의 기능 부전을 진단할 수 있는 바이오마커 및 이를 이용하여 각막 내피 세포의 기능 부전 정도와 이와 관련된 다양한 질환을 진단하기 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 각막은 안구의 표면에 위치하는 투명한 조직으로, 표면으로부터 순서대로 각막 상피층, 보먼막, 각막 실질층, 데스메막 및 각막 내피층이 존재한다. 각막 상피층은, 각막의 가장 바깥층에 있는 층으로, 외부로부터의 먼지나 세균 등으로부터 각막을 보호하는 배리어(barrier)로서 기능한다. 보먼막은, 각막 상피층의 베이스로서 기능하는 것으로 생각된다. 각막 실질층은, 세 개의 층 중에서 가장 두껍고, 각막의 강도를 유지하는 역할을 담당한다. 데스메막은, 각막 실질층의 아래에 있는 얇은 막으로, 각막 실질층과 각막 내피층을 연결하는 기능을 한다. 각막 내피층은, 육각형의 형상을 갖는 각막 내피 세포가 포석상(數石狀)으로 규칙적으로 배열된 단층의 세포층이고, 배리어 기능 및 펌프 기능으로 인해, 전방(前房)의 수분이 각막 실질에 침투하는 것을 방지함과 동시에 각막의 수분을 전방측으로 배출함으로써 함수율을 일정하게 유지하여, 각막의 투명성을 유지하는 중요한 역할을 담당한다.
- [0003] 유전적 요인이나 외적 요인 등에 의해 각막 내피 세포가 손상되어, 각막 내피 세포수가 현저히 저하되면 상기의 기능이 저해되어, 각막 부종을 초래한다. 중증의 각막 내피 장애에 의해 각막의 투명성을 유지할 수 없게 되어, 수포성 각막증이 발병하면 현저한 시력 저하를 초래한다.
- [0004] 각막 내피 세포는 인간의 생체 내에서는 증식능이 극히 떨어진다. 따라서, 중증의 각막 내피 장애에 대한 근본적 치료로는, 현시점에서는 각막 이식이 가장 유효한 수단이다. 실제로 수포성 각막증은 각막 이식의 적응 질환의 제 1위이다. 종래, 각막 내피 장애에 관해서는, 전층 각막 이식술이 실시되어 왔지만, 만성적인 공여자 부족과 이식 후의 거절 반응이 문제가 되고 있다. 거절 반응을 경감시키기 위해서, 각막 내피를 포함하는 일부 조직만을 질환안(疾患眼)에 이식하는 방법 (Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty; DSAEK) 이 개발되었지만, DSAEK 역시 공여자 부족의 문제를 극복할 수는 없다. 또한, 각막 내피 세포를 시험관 내에서 증식시켜, 이를 치료에 이용하는 방법도 시도되었으나, 계대를 반복하면 형질 전환을 일으켜, 기능을 소실해 버린다.
- [0005] 이에 따라 각막 내피 세포의 기능 평가가 중요함에도 불구하고, 각막 내피 세포의 손상 정도, 잔여 기능 등을 평가할 수 있는 현존하는 검사법은 실로 매우 미비한 수준이다. 종래의 각막 내피 세포의 기능 부전을 위한 검사는 경면현미경 촬영 검사를 통하여 세포의 변이계수 및 평균밀도를 계산한 후, 세포의 기능을 간접적으로 유추해보는 정도에 머물러 있다. 뿐만 아니라, 300 μ m x 400 μ m의 국소 면적만 검사하여 11000 μ m x 12000 μ m의 각막 전체를 예측하는 식의 검사법으로, 매우 부정확한 단점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 일 목적은 각막 내피 세포의 기능 부전을 진단할 수 있는 조성물 또는 키트를 제공하고자 한다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 각막 내피 세포의 기능 부전을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하고자 한다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 각막 내피 세포의 기능 부전을 유도하는 물질을 스크리닝하는 방법을 제공하고자 한다.
- [0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, CST4(Cystatin 4), LCN1(Lipocalin-1), CD163(Cluster of Differentiation 163), ITIH3(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3), FCGBP(Fc fragment of IgG binding protein), VCAM1(Vascular cell adhesion protein 1), VIM(Vimentin), COL5A1(collagen type V alpha 1 chain), CRYAA(Alpha-crystallin A chain), ANGPTL7(Angiopoietin-related protein 7), C1RL(complement C1r subcomponent like), CRYAB(crystallin alpha B), LYZ(Lysozyme), PLXNB2(Plexin B2), SERPINF2(Alpha-2-antiplasmin), C1QB(Complement C1q subcomponent subunit B), SERPIND1(Serpin family D member 1), VTN(Vitronectin), SERPINC1(Serpin family C member 1), KNG1(Kininogen 1), APOH(Apolipoprotein H), A1BG(Alpha-1-B glycoprotein), C8A(Complement C8 alpha chain), FETUB(Fetuin B), AFM(Afamin), SERPINA3(Serpin family A member 3), CPB2(carboxypeptidase B2), C1QC(complement C1q C chain), WFIKN2(WAP, follistatin/kazal, immunoglobulin, kunitz and netrin domain containing 2), TMSB4X(Thymosin beta 4 X-linked), TMSB10(Thymosin beta 10), AHS(Alpha 2-HS glycoprotein),

PROS1(Protein S), RTBDN(Retbindin), NPVF(Neuropeptide VF precursor), C9(Complement C9), LRG1(Leucine rich alpha-2-glycoprotein 1), MST1(Macrophage stimulating 1), DSC3(Desmocollin 3), C1R(Complement C1r), C8B(Complement C8 beta chain), CLU(Clusterin), CTGF(Connective tissue growth factor), CFHR1(Complement Factor H Related 1), F10(Coagulation factor X), TIMP1(TIMP metalloproteinase inhibitor 1), IGFBP2(Insulin like growth factor binding protein 2), F12(Coagulation factor XII), PCOLCE(Procollagen C-endopeptidase enhancer), HABP2(Hyaluronan binding protein 2), SLPI(Secretory leukocyte peptidase inhibitor), DKK3(Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 3), CRYBB1(Crystallin beta B1), CA2(Carbonic anhydrase 2), CRYBA1(Crystallin beta A1), PGAM1(Phosphoglycerate mutase 1), CRYBA4(Crystallin beta A4), CUTA(CutA divalent cation tolerance homolog), ARSB(Arylsulfatase B), ALDOC(Aldolase, fructose-bisphosphate C), CRYBB2(Crystallin beta B2), SERPINI1(Serpin family I member 1), CREG1(cellular repressor of E1A stimulated genes 1), SPOCK1(SPARC (osteonectin), cwc and kazal like domains proteoglycan 1), SDF4(Stromal cell derived factor 4), SCG2(Secretogranin II), COL9A3(Collagen type IX alpha 3 chain), LGALS3BP(Galectin 3 binding protein), IGHG3(Immunoglobulin heavy constant gamma 3), HBB(Hemoglobin subunit beta), MDH1(Malate dehydrogenase 1), IMPG2(Interphotoreceptor matrix proteoglycan 2), GPI(Glucose-6-phosphate isomerase), TPI1(Triosephosphate isomerase 1), APLP2(Amyloid beta precursor like protein 2), CLSTN1(Calsyntenin 1), FGG(Fibrinogen gamma chain), VGF(VGF nerve growth factor inducible), CLSTN3(Calsyntenin 3), HSPB1(Heat shock protein family B (small) member 1), GAS6(Growth arrest specific 6), L1CAM(L1 cell adhesion molecule), CRYGS(Crystallin gamma S), S100A9(S100 calcium binding protein A9), SEMA3A(Semaphorin 3A), VCAN(Versican), APP(Amyloid beta precursor protein), SPARC(Secreted protein acidic and cysteine rich), TWSG1(Twisted gastrulation BMP signaling modulator 1), ALDOA(Aldolase, fructose-bisphosphate A), SOD1(Superoxide dismutase 1), HBA1(Hemoglobin subunit alpha 1), ENO1(Enolase 1), SORCS1(Sortilin related VPS10 domain containing receptor 1), GALNT2(Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2), AGRN(Agrin), ATP6AP1(ATPase H⁺ transporting accessory protein 1), OPTC(Opticin), FSTL5(Follistatin like 5), C2orf40(Chromosome 2 open reading frame 40), FGA(Fibrinogen alpha chain), TPP1(Tripeptidyl peptidase 1), FSTL4(Follistatin-like 4), APOB(Apolipoprotein B), TGFBI(Transforming growth factor beta induced), GOLIM4(Golgi integral membrane protein 4), XYLT1(Xylosyltransferase 1), ITM2B(Integral membrane protein 2B), FABP5(Fatty acid binding protein 5), TKT(Transketolase), EFNA5(Ephrin A5), PPIA(Peptidylprolyl isomerase A), SCG5(Secretogranin V), CPQ(Carboxypeptidase Q), C3(Complement C3), B4GAT1(Beta-1,4-glucuronyltransferase 1), NEO1(Neogenin 1), HEXB(Hexosaminidase subunit beta), IGHM(Immunoglobulin heavy constant mu), APOC3(Apolipoprotein C3), LYNX1(Ly6/neurotoxin 1), PSAP(Prosaposin), ENPP2(Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2), SEMA7A(semaphorin 7A (John Milton Hagen blood group)), MAN1A1(Mannosidase alpha class 1A member 1), CHRDL1(Chordin like 1), F9(Coagulation factor IX), HRG(Histidine rich glycoprotein) 및 SERPINF1(Serpin family F member 1)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 각막 내피 세포의 기능 부전 진단용 바이오마커에 관한 것이다.

[0011] 본 발명에서 상기 "각막 내피 세포"는 누출성 장벽 기능 및 능동적 펌프 작용의 동적 평형을 통해 수분 이동을 조절함으로써 각막의 투명성을 유지하는데 있어 생리적으로 가장 중요한 단일 세포층이다. 하지만 생체 내에서 손상된 각막 내피 세포의 재생은 극히 제한적이어서, 폭스각막이영양증, 외상, 인공수정체 수포각막병증 등의 여러 질환들에서와 같이 내피 세포가 손상되는 경우 각막의 부종 및 혼탁을 유발하여 심각한 시력의 소실을 초래하기도 한다.

[0012] 본 발명에서 상기 "각막 내피 세포의 기능 부전"은 안구외상, 안구수술(예, 백내장 수술 또는 안 내 렌즈 삽입술 등), 바이러스 감염, 안구 염증, 노화, 당뇨, 산화스트레스, 콘택트 렌즈 착용으로 인한 산소 부족, 안압 증가 등의 다양한 원인으로 각막 내피 세포가 제 기능을 하지 못하게 됨에 따라 누출성 장벽 기능 및 능동적 펌프 작용의 동적 평형을 이루지 못해 수분의 이동이 제대로 조절되지 못하는 것을 의미한다. 본 발명에서 상기 각막 내피 세포의 기능 부전으로 인하여 폭스각막이영양증, 외상, 인공수정체 수포각막병증, 각막 내피염 또는 시력 손실 등의 질환이 초래될 수 있다.

[0013] 본 발명에서 상기 바이오마커는 각막 내피 세포 또는 안구의 방수(aqueous humor), 바람직하게는 안구의 방수 내에 존재하는 것이 각막 내피 세포의 기능 부전 정도를 진단함에 있어 정확도를 높일 수 있다.

- [0014] 본 발명에서 상기 "방수(aqueous humor)"는 물처럼 투명한 액체, 수정체와 각막에 영양을 공급하며 눈을 구조적으로 지지해 주며, 전안방(anterior chamber)과 후안방(posterior chamber)을 채우고 있다.
- [0015] 본 발명의 바람직한 일 예시로, 상기 바이오마커는 ANGPTL7, FCGBP, SERPINF2, F10, PROS1, SERPIND1, HABP2, TMSB10, TIMP1, LYZ, SLPI, TMSB4X, C1R, MDH1, MAN1A, B4GAT1, GPI, ENO1, ALDOA, PGAM1, TPI1, GALNT2, TKT, TGFBI, LYNX1, PSAP, CPQ, SERPINI1, COL9A3, APP, CLSTN1, LGALS3BP, CA2, ATP6AP1 및 APLP2로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자일 수 있다. 여기서, 상기 ANGPTL7, FCGBP, SERPINF2, F10, PROS1, SERPIND1, HABP2, TMSB10, TIMP1, LYZ, SLPI, TMSB4X 또는 C1R의 단백질이나 이를 코딩하는 유전자는 면역 반응(immune response) 이전에 관여하는 것일 수 있고, 상기 MDH1, MAN1A, B4GAT1, GPI, ENO1, ALDOA, PGAM1, TPI1, GALNT2, TKT, TGFBI, LYNX1, PSAP, CPQ, SERPINI1, COL9A3, APP, CLSTN1, LGALS3BP, CA2, ATP6AP1 또는 APLP2의 단백질이나 이를 코딩하는 유전자는 탄수화물 대사 과정(carbohydrate metabolic process), 발달 과정(developmental process) 또는 이온 수송(ion transport)에 관여하는 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 바람직한 일 예시로, 상기 바이오마커는 TIMP1, FCGBP 및 ANGPTL7 중 적어도 하나의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자일 수 있다.
- [0017] 본 발명에서 상기 "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 상기 진단은 각막 내피 세포의 기능 부전 여부 혹은 그 정도를 확인하는 것으로서, 이를 통해 각막 내피 세포의 기능 부전으로 인한 다양한 안질환의 발병 여부를 조기에 예측할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, CST4, LCN1, CD163, ITIH3, FCGBP, VCAM1, VIM, COL5A1, CRYAA, ANGPTL7, C1RL, CRYAB, LYZ, PLXNB2, SERPINF2, C1QB, SERPIND1, VTN, SERPINC1, KNG1, APOH, A1BG, C8A, FETUB, AFM, SERPINA3, CPB2, C1QC, WFIKN2, TMSB4X, TMSB10, AHSB, PROS1, RTBDN, NPVF, C9, LRG1, MST1, DSC3, C1R, C8B, CLU, CTGF, CFHR1, F10, TIMP1, IGFBP2, F12, PCOLCE, HABP2, SLPI, DKK3, CRYBB1, CA2, CRYBA1, PGAM1, CRYBA4, CUTA, ARSB, ALDOC, CRYBB2, SERPINI1, CREG1, SPOCK1, SDF4, SCG2, COL9A3, LGALS3BP, IGHG3, HBB, MDH1, IMPG2, GPI, TPI1, APLP2, CLSTN1, FGG, VGF, CLSTN3, HSPB1, GAS6, L1CAM, CRYGS, S100A9, SEMA3A, VCAN, APP, SPARC, TWSG1, ALDOA, SOD1, HBA1, ENO1, SORCS1, GALNT2, AGRN, ATP6AP1, OPTC, FSTL5, C2orf40, FGA, TPP1, FSTL4, APOB, TGFBI, GOLIM4, XYLT1, ITM2B, FABP5, TKT, EFNA5, PPIA, SCG5, CPQ, C3, B4GAT1, NEO1, HEXB, IGHM, APOC3, LYNX1, PSAP, ENPP2, SEMA7A, MAN1A1, CHRDL1, F9, HRG 및 SERPINF1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 각막 내피 세포의 기능 부전의 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 일 예시로, 상기 발현 수준의 측정의 대상이 되는 바이오마커는 ANGPTL7, FCGBP, SERPINF2, F10, PROS1, SERPIND1, HABP2, TMSB10, TIMP1, LYZ, SLPI, TMSB4X, C1R, MDH1, MAN1A, B4GAT1, GPI, ENO1, ALDOA, PGAM1, TPI1, GALNT2, TKT, TGFBI, LYNX1, PSAP, CPQ, SERPINI1, COL9A3, APP, CLSTN1, LGALS3BP, CA2, ATP6AP1 및 APLP2로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 바람직한 일 예시로, 상기 발현 수준의 측정의 대상이 되는 바이오마커는 TIMP1, FCGBP 및 ANGPTL7 중 적어도 하나의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자일 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 상기 바이오마커 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 특별히 제한하지는 않으나, 예를 들면 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명에 상기 "항체"는 항원과 특이적으로 결합하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질을 가리킨다. 본 발명의 목적상, 항체는 상기 바이오마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 본 발명의 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 상기 항체는 당업계에서 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 다클론 항체는 상기 바이오마커 단백질의 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 과정을 포함하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산될 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물로부터 제조될 수 있다. 또한, 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method; Kohler 및 Milstein (1976) European Journal of Immunology 6:511-519 참조), 또는 파지 항체 라이브러리 기술(Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991 참조)을 이용하여 제조될 수

있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 2개의 전장의 경쇄 및 2개의 전장의 중쇄를 갖는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.

[0024] 본 발명에 상기 "PNA(Peptide Nucleic Acid)"는 인공적으로 합성된, DNA 또는 RNA와 비슷한 중합체를 가리키며, 1991년 덴마크 코펜하겐 대학교의 Nielsen, Egholm, Berg와 Buchardt 교수에 의해 처음으로 소개되었다. DNA는 인산-리보스당 골격을 갖는데 반해, PNA는 펩타이드 결합에 의해 연결된 반복된 N-(2-아미노에틸)-글리신 골격을 가지며, 이로 인해 DNA 또는 RNA에 대한 결합력과 안정성이 크게 증가되어 분자 생물학, 진단 분석 및 안티센스 치료법에 사용되고 있다. PNA는 문헌[Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O (December 1991). "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide". Science 254 (5037): 1497-1500]에 상세하게 개시되어 있다.

[0025] 본 발명에서 상기 "애타머"는 올리고핵산 또는 펩타이드 분자이며, 애타머의 일반적인 내용은 문헌[Bock LC et al., Nature 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". J Mol Med. 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". Proc Natl Acad Sci USA. 95(24): 142727(1998)]에 상세하게 개시되어 있다.

[0026] 본 발명에서 상기 바이오마커 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 바이오마커 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명에서 상기 "프라이머"는 표적 유전자 서열을 인지하는 단편으로서, 정방향 및 역방향의 프라이머 쌍을 포함하나, 바람직하게는, 특이성 및 민감성을 가지는 분석 결과를 제공하는 프라이머 쌍이다. 프라이머의 핵산 서열이 시료 내 존재하는 비-표적 서열과 불일치하는 서열이어서, 상보적인 프라이머 결합 부위를 함유하는 표적 유전자 서열만 증폭하고 비특이적 증폭을 유발하지 않는 프라이머일 때, 높은 특이성이 부여될 수 있다.

[0028] 본 발명에서 상기 "프로브"란 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다. 프로브의 종류는 당업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 제한은 없으나, 바람직하게는 PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid), 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, RNA 또는 DNA일 수 있으며, 가장 바람직하게는 PNA이다. 보다 구체적으로, 상기 프로브는 바이오 물질로서 생물에서 유래되거나 이와 유사한 것 또는 생체 외에서 제조된 것을 포함하는 것으로, 예를 들어, 효소, 단백질, 항체, 미생물, 동식물 세포 및 기관, 신경세포, DNA, 및 RNA일 수 있으며, DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, RNA는 게놈 RNA, mRNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 단백질의 예로는 항체, 항원, 효소, 펩타이드 등을 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명에서 상기 "LNA(Locked nucleic acids)"란, 2'-O, 4'-C 메틸렌 브릿지를 포함하는 핵산 아날로그를 의미한다 [J Weiler, J Hunziker and J Hall Gene Therapy (2006) 13, 496.502]. LNA 뉴클레오타이드는 DNA와 RNA의 일반적 핵산 염기를 포함하며, Watson-Crick 염기 쌍 규칙에 따라 염기 쌍을 형성할 수 있다. 하지만, 메틸렌 브릿지로 인한 분자의 'locking'으로 인해, LNA는 Watson-Crick 결합에서 이상적 형상을 형성하지 못하게 된다. LNA가 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오타이드에 포함되면, LNA는 보다 빠르게 상보적 뉴클레오타이드 사슬과 쌍을 이루어 이중 나선의 안정성을 높일 수 있다.

[0030] 본 발명에서 상기 "안티센스"는 안티센스 올리고머가 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 의해 RNA 내의 표적 서열과 혼성화되어, 표적서열 내에서 전형적으로 mRNA와 RNA:올리고머 헤테로이중체의 형성을 허용하는, 뉴클레오타이드 염기의 서열 및 서브유닛간 백본을 갖는 올리고머를 의미한다. 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다.

[0031] 본 발명에 따른 바이오마커 단백질이나, 이를 코딩하는 유전자의 정보는 알려져 있으므로, 당업자라면 이를 바탕으로 상기 단백질을 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오타이드를 용이하게 디자인할 수 있을 것이다.

[0032] 본 발명에서 상기 바이오마커 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준은 각막 내피 세포 또는 안구의 방수(aqueous humor), 바람직하게는 안구의 방수에 대하여 측정하는 것이 각막 내피 세포의 기능 부전 정도를 진단함에 있어 정확도를 높일 수 있어 바람직하다.

- [0033] 각막 내피 세포는 인간의 생체 내에서는 증식능이 극히 떨어지므로, 그 기능 부전이 발생하는 경우 다양한 안질환을 유발하거나 시력 손실까지 초래할 수 있다. 그런데 종래에는 상기한 각막 내피 세포의 기능 부전을 직접적으로 측정할 수 있는 방법이 없었고, 각막 내피 세포 경면현미경촬영 검사를 통해 세포의 모양과 밀도만으로 간접적으로 기능을 유추해보는 수준에 불과하여 정확도가 현저히 떨어지는 단점이 있었다.
- [0034] 하지만 본 발명의 조성물을 이용하여 각막 내피 세포 또는 안구의 방수, 바람직하게는 안구의 방수에 있어서 본 발명의 바이오마커 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정함으로써 각막 내피 세포의 기능 부전 여부 혹은 그 정도를 빠르고 용이하지만 정확하게 진단할 수 있고, 이를 통하여 상기 각막 내피 세포의 기능 부전으로 인하여 유발될 수 있는 폭스각막이영양증, 외상, 인공수정체 수포각막병증, 각막 내피염 또는 시력 손실 등의 질환을 조기에 진단하거나, 상기 질환의 경과, 예후 또는 치료 효과에 대하여도 추적이 가능하다.
- [0036] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에 따른 각막 내피 세포의 기능 부전의 진단용 조성물을 포함하는 각막 내피 세포의 기능 부전의 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0037] 본 발명에서는 상기 진단용 키트를 이용하여 각막 내피 세포의 기능 부전의 여부 또는 정도를 진단할 수 있고, 상기 각막 내피 세포의 기능 부전으로 인해 유도될 수 있는 다양한 질환의 발병 여부, 발병 가능성을 진단하거나, 질환의 경과, 예후 또는 치료 효과에 대하여도 진단할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 진단용 조성물과, 각막 내피 세포의 기능 부전 및 이로 인해 유발되는 질환에 관한 정의는 상기 본 발명의 진단용 조성물에 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 혼잡을 피하기 위해 이하 그 기재를 생략한다.
- [0039] 본 발명에서 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명의 진단용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있다.
- [0041] 예를 들면, 본 발명의 진단용 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 더 포함할 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 마커 단백질을 코딩하는 유전자에 대해 특이적인 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 상기 유전자의 핵산서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로서, 약 7 bp 내지 50 bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10 bp 내지 30 bp의 길이를 가질 수 있다. 또한 대조군 유전자의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그 외 역전사 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 용기, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0042] 또한, 본 발명의 진단용 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기판, 및 형광표지 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기판은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0043] 또한, 본 발명의 진단용 키트는 ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. ELISA 키트는 상기 단백질에 대해 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 ELISA 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 컨주게이트됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 CST4, LCN1, CD163, ITIH3, FCGBP, VCAM1, VIM, COL5A1, CRYAA, ANGPTL7, C1RL, CRYAB, LYZ, PLXNB2, SERPINF2, C1QB, SERPIND1, VTN, SERPINC1, KNG1, APOH, A1BG, C8A, FETUB, AFM, SERPINA3, CPB2, C1QC, WFIKKN2, TMSB4X, TMSB10, AHSG, PROS1, RTBDN, NPVF, C9, LRG1, MST1, DSC3, C1R, C8B, CLU, CTGF, CFHR1, F10, TIMP1, IGFBP2, F12, PCOLCE, HABP2, SLPI, DKK3, CRYBB1, CA2, CRYBA1, PGAM1, CRYBA4, CUTA, ARSB, ALDOC, CRYBB2, SERPINI1, CREG1, SPOCK1, SDF4, SCG2, COL9A3, LGALS3BP, IGHG3, HBB, MDH1, IMPG2, GPI, TPI1, APLP2, CLSTN1, FGG, VGF, CLSTN3, HSPB1, GAS6, L1CAM, CRYGS, S100A9, SEMA3A, VCAN, APP, SPARC, TWSG1, ALDOA, SOD1, HBA1, ENO1,

SORCS1, GALNT2, AGRN, ATP6AP1, OPTC, FSTL5, C2orf40, FGA, TPP1, FSTL4, APOB, TGFBI, GOLIM4, XYLT1, ITM2B, FABP5, TKT, EFNA5, PPIA, SCG5, CPQ, C3, B4GAT1, NEO1, HEXB, IGHM, APOC3, LYNX1, PSAP, ENPP2, SEMA7A, MAN1A1, CHRDL1, F9, HRG 및 SERPINF1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 각막 내피 세포의 기능 부전을 진단하기 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

- [0046] 본 발명에서 상기 "목적하는 개체"란 각막 내피 세포의 기능 부전 여부가 불확실한 개체로, 기능 부전의 가능성이 높은 개체를 의미한다.
- [0047] 본 발명에서 상기 "생물학적 시료"는 개체로부터 얻어지거나 개체로부터 유래된 임의의 물질, 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것으로, 바람직하게는 각막 내피 세포 또는 안구 내 방수(aqueous humor), 보다 바람직하게는 안구 내 방수인 것이 각막 내피 세포의 기능 부전을 진단하는데 정확도를 높일 수 있어 바람직하다.
- [0048] 본 발명에서는 상기와 같이 분리된 생물학적 시료에서 상기 열거된 바이오마커 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 바람직한 일 예시로, 상기 발현 수준의 측정의 대상이 되는 바이오마커는 ANGPTL7, FCGBP, SERPINF2, F10, PROS1, SERPIND1, HABP2, TMSB10, TIMP1, LYZ, SLPI, TMSB4X, C1R, MDH1, MAN1A, B4GAT1, GPI, ENO1, ALDOA, PGAM1, TP11, GALNT2, TKT, TGFBI, LYNX1, PSAP, CPQ, SERPINI1, COL9A3, APP, CLSTN1, LGALS3BP, CA2, ATP6AP1 및 APLP2로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자일 수 있다.
- [0050] 본 발명의 바람직한 일 예시로, 상기 발현 수준의 측정의 대상이 되는 바이오마커는 TIMP1, FCGBP 및 ANGPTL7 중 적어도 하나의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자일 수 있다.
- [0051] 본 발명에서 상기 바이오마커 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 특별히 제한하지는 않으나, 바람직하게는 상기 바이오마커 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0052] 본 발명에 상기 바이오마커 단백질의 발현 수준을 측정 또는 비교 분석 방법으로는 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, 방사선 면역 분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏팅 또는 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0053] 본 발명에서 상기 바이오마커 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 바이오마커 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0054] 본 발명에 상기 바이오마커 단백질을 코딩하는 유전자의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 또는 DNA 칩 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 본 발명에서 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 상기 바이오마커 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 증가 또는 감소된 경우, 각막 내피 세포의 기능 부전의 가능성이 높은 것으로 예측하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0056] 보다 구체적으로, 본 발명에서 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 CST4, LCN1, CD163, ITIH3, FCGBP, VCAM1, VIM, COL5A1, CRYAA, ANGPTL7, C1RL, CRYAB, LYZ, PLXNB2, SERPINF2, C1QB, SERPIND1, VTN, SERPINC1, KNG1, APOH, A1BG, C8A, FETUB, AFM, SERPINA3, CPB2, C1QC, WFIKK2, TMSB4X, TMSB10, AHSG, PROS1, RTBDN, NPVF, C9, LRG1, MST1, DSC3, C1R, C8B, CLU, CTGF, CFHR1, F10, TIMP1, IGFBP2, F12, PCOLCE, HABP2 및 SLPI로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 증가된 경우, 각막 내피 세포의 기능 부전의 가능성이 높은 것으로 예측할 수 있다.
- [0057] 본 발명의 바람직한 일 예시로, 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 ANGPTL7, FCGBP, SERPINF2,

F10, PROS1, SERPIND1, HABP2, TMSB10, TIMP1, LYZ, SLPI, TMSB4X 및 C1R로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 증가된 경우, 각막 내피 세포의 기능 부전의 가능성이 높은 것으로 예측할 수 있다.

[0058] 본 발명의 바람직한 일 예시로, 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 TIMP1, FCGBP 및 ANGPTL7 중 적어도 하나의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 증가된 경우, 각막 내피 세포의 기능 부전의 가능성이 높은 것으로 예측할 수 있다.

[0059] 또한, 본 발명에서 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 DKK3, CRYBB1, CA2, CRYBA1, PGAM1, CRYBA4, CUTA, ARSB, ALDOC, CRYBB2, SERPINI1, CREG1, SPOCK1, SDF4, SCG2, COL9A3, LGALS3BP, IGHG3, HBB, MDH1, IMPG2, GPI, TPI1, APLP2, CLSTN1, FGG, VGF, CLSTN3, HSPB1, GAS6, L1CAM, CRYGS, S100A9, SEMA3A, VCAN, APP, SPARC, TWSG1, ALDOA, SOD1, HBA1, ENO1, SORCS1, GALNT2, AGRN, ATP6AP1, OPTC, FSTL5, C2orf40, FGA, TPP1, FSTL4, APOB, TGFBI, GOLIM4, XYLT1, ITM2B, FABP5, TKT, EFNA5, PPIA, SCG5, CPQ, C3, B4GAT1, NEO1, HEXB, IGHM, APOC3, LYNX1, PSAP, ENPP2, SEMA7A, MAN1A1, CHRDL1, F9, HRG 및 SERPINF1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 감소된 경우, 각막 내피 세포의 기능 부전의 가능성이 높은 것으로 예측할 수 있다.

[0060] 본 발명의 바람직한 일 예시로, 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 MDH1, MAN1A, B4GAT1, GPI, ENO1, ALDOA, PGAM1, TPI1, GALNT2, TKT, TGFBI, LYNX1, PSAP, CPQ, SERPINI1, COL9A3, APP, CLSTN1, LGALS3BP, CA2, ATP6AP1 및 APLP2로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 감소된 경우, 각막 내피 세포의 기능 부전의 가능성이 높은 것으로 예측할 수 있다.

[0061] 더 나아가, 본 발명에서 상기와 같이 각막 내피 세포의 기능 부전의 가능성이 높은 것으로 예측 또는 진단하는 경우, 상기 목적하는 개체에 대하여 그 질환에 대한 억제 투여 등 적절한 치료를 수행하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0062] 본 발명의 방법을 이용하는 경우 이용하여 각막 내피 세포의 기능 부전의 여부 또는 정도를 진단할 수 있고, 상기 각막 내피 세포의 기능 부전으로 인해 유도될 수 있는 다양한 질환의 발병 여부, 발병 가능성을 진단하거나, 질환의 경과, 예후 또는 치료 효과에 대하여도 추적할 수 있다.

[0063] 본 발명의 각막 내피 세포의 기능 부전 및 이로 인해 유발되는 질환에 관한 정의는 상기 본 발명의 진단용 조성물에 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 혼잡을 피하기 위해 이하 그 기재를 생략한다.

[0065] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 분리된 생물학적 시료에 각막 내피 세포의 기능 부전을 유도할 것으로 예상되는 후보 물질을 처리하는 단계; 및

[0066] 상기 후보 물질이 처리된 생물학적 시료에서 CST4, LCN1, CD163, ITIH3, FCGBP, VCAM1, VIM, COL5A1, CRYAA, ANGPTL7, C1RL, CRYAB, LYZ, PLXNB2, SERPINF2, C1QB, SERPIND1, VTN, SERPINC1, KNG1, APOH, A1BG, C8A, FETUB, AFM, SERPINA3, CPB2, C1QC, WFIKN2, TMSB4X, TMSB10, AHSG, PROS1, RTBDN, NPVF, C9, LRG1, MST1, DSC3, C1R, C8B, CLU, CTGF, CFHR1, F10, TIMP1, IGFBP2, F12, PCOLCE, HABP2, SLPI, DKK3, CRYBB1, CA2, CRYBA1, PGAM1, CRYBA4, CUTA, ARSB, ALDOC, CRYBB2, SERPINI1, CREG1, SPOCK1, SDF4, SCG2, COL9A3, LGALS3BP, IGHG3, HBB, MDH1, IMPG2, GPI, TPI1, APLP2, CLSTN1, FGG, VGF, CLSTN3, HSPB1, GAS6, L1CAM, CRYGS, S100A9, SEMA3A, VCAN, APP, SPARC, TWSG1, ALDOA, SOD1, HBA1, ENO1, SORCS1, GALNT2, AGRN, ATP6AP1, OPTC, FSTL5, C2orf40, FGA, TPP1, FSTL4, APOB, TGFBI, GOLIM4, XYLT1, ITM2B, FABP5, TKT, EFNA5, PPIA, SCG5, CPQ, C3, B4GAT1, NEO1, HEXB, IGHM, APOC3, LYNX1, PSAP, ENPP2, SEMA7A, MAN1A1, CHRDL1, F9, HRG 및 SERPINF1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 각막 내피 세포의 기능 부전을 유도하는 약물을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

[0067] 본 발명에서 상기 분리된 생물학적 시료는 각막 내피 세포의 기능 부전이 유발되었거나 유발되지 않은 개체로부터 분리된 생물학적 시료일 수 있으며, 구체적으로 각막 내피 세포 또는 안구의 방수(aqueous humor)인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 안구의 방수일 수 있다.

[0068] 또한, 본 발명에서 상기 후보 물질은 임의의 물질(substance), 분자(molecule), 원소(element), 화합물(compound), 실체물(entity) 또는 이들의 조합을 포함한다. 예를 들어, 이들로 한정되지는 않으나, 단백질, 폴

리펩티드, 소 유기분자(small organic molecule), 다당류(polysaccharide), 폴리뉴클레오티드 등을 포함한다. 또한, 천연 산물(natural product), 합성 화합물 또는 2개 이상의 물질의 조합일 수도 있다.

- [0069] 본 발명의 바람직한 일 예시로, 상기 발현 수준의 측정의 대상이 되는 바이오마커는 ANGPTL7, FCGBP, SERPINF2, F10, PROS1, SERPIND1, HABP2, TMSB10, TIMP1, LYZ, SLPI, TMSB4X, C1R, MDH1, MAN1A, B4GAT1, GPI, ENO1, ALDOA, PGAM1, TPI1, GALNT2, TKT, TGFBI, LYNX1, PSAP, CPQ, SERPINI1, COL9A3, APP, CLSTN1, LGALS3BP, CA2, ATP6AP1 및 APLP2로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자일 수 있다.
- [0070] 본 발명의 바람직한 일 예시로, 상기 발현 수준의 측정의 대상이 되는 바이오마커는 TIMP1, FCGBP 및 ANGPTL7 중 적어도 하나의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자일 수 있다.
- [0071] 본 발명에서 상기 바이오마커 단백질과 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 방법은 상기 본 발명의 정보 제공 방법에 기재된 바와 중복되어 이하 자세한 기재를 생략한다.
- [0072] 본 발명에서 상기 후보 물질의 처리 후 상기 생물학적 시료에서 상기 바이오마커 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이, 상기 후보 물질의 처리 전에 비하여 증가 또는 감소된 경우, 상기 후보 물질을 각막 내피 세포의 기능 부전 유발제로 판별하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0073] 보다 구체적으로, 본 발명에서 상기 후보 물질의 처리 후 상기 생물학적 시료에서 측정된 CST4, LCN1, CD163, ITIH3, FCGBP, VCAM1, VIM, COL5A1, CRYAA, ANGPTL7, C1RL, CRYAB, LYZ, PLXNB2, SERPINF2, C1QB, SERPIND1, VTN, SERPINC1, KNG1, APOH, A1BG, C8A, FETUB, AFM, SERPINA3, CPB2, C1QC, WFIKKN2, TMSB4X, TMSB10, AHSG, PROS1, RTBDN, NPVF, C9, LRG1, MST1, DSC3, C1R, C8B, CLU, CTGF, CFHR1, F10, TIMP1, IGFBP2, F12, PCOLCE, HABP2 및 SLPI로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 처리 전에 비하여 증가된 경우, 상기 후보 물질을 각막 내피 세포의 기능 부전의 유도제로 판별할 수 있다.
- [0074] 본 발명의 바람직한 일 예시로, 상기 후보 물질의 처리 후 상기 생물학적 시료에서 측정된 ANGPTL7, FCGBP, SERPINF2, F10, PROS1, SERPIND1, HABP2, TMSB10, TIMP1, LYZ, SLPI, TMSB4X 및 C1R로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 처리 전에 비하여 증가된 경우, 상기 후보 물질을 각막 내피 세포의 기능 부전의 유도제로 판별할 수 있다.
- [0075] 본 발명의 바람직한 일 예시로, 상기 후보 물질의 처리 후 상기 생물학적 시료에서 측정된 ANGPTL7, FCGBP 및 TIMP1 중 적어도 하나의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 처리 전에 비하여 증가된 경우, 상기 후보 물질을 각막 내피 세포의 기능 부전의 유도제로 판별할 수 있다.
- [0076] 또한, 본 발명에서 상기 후보 물질의 처리 후 상기 생물학적 시료에서 측정된 DKK3, CRYBB1, CA2, CRYBA1, PGAM1, CRYBA4, CUTA, ARSB, ALDOC, CRYBB2, SERPINI1, CREG1, SPOCK1, SDF4, SCG2, COL9A3, LGALS3BP, IGHG3, HBB, MDH1, IMPG2, GPI, TPI1, APLP2, CLSTN1, FGG, VGF, CLSTN3, HSPB1, GAS6, L1CAM, CRYGS, S100A9, SEMA3A, VCAN, APP, SPARC, TWSG1, ALDOA, SOD1, HBA1, ENO1, SORCS1, GALNT2, AGRN, ATP6AP1, OPTC, FSTL5, C2orf40, FGA, TPP1, FSTL4, APOB, TGFBI, GOLIM4, XYLT1, ITM2B, FABP5, TKT, EFNA5, PPIA, SCG5, CPQ, C3, B4GAT1, NEO1, HEXB, IGHM, APOC3, LYNX1, PSAP, ENPP2, SEMA7A, MAN1A1, CHRDL1, F9, HRG 및 SERPINF1로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 처리 전에 비하여 감소된 경우, 상기 후보 물질을 각막 내피 세포의 기능 부전의 유도제로 판별할 수 있다.
- [0077] 본 발명의 바람직한 일 예시로, 상기 후보 물질의 처리 후 상기 생물학적 시료에서 측정된 MDH1, MAN1A, B4GAT1, GPI, ENO1, ALDOA, PGAM1, TPI1, GALNT2, TKT, TGFBI, LYNX1, PSAP, CPQ, SERPINI1, COL9A3, APP, CLSTN1, LGALS3BP, CA2, ATP6AP1 및 APLP2로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 처리 전에 비하여 감소된 경우, 상기 후보 물질을 각막 내피 세포의 기능 부전의 유도제로 판별할 수 있다.

발명의 효과

- [0078] 본 발명은 안구의 방수에 있어서 본 발명의 바이오마커 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정함으로써 각막 내피 세포의 기능 부전 여부 혹은 그 정도를 빠르고 용이하지만 정확하게 진단할 수 있고, 이를 통하여 상기 각막 내피 세포의 기능 부전으로 인하여 유발될 수 있는 폭스각막이영양증, 외상, 인공수정체 수포 각막병증, 각막 내피염 또는 시력 손실 등의 질환을 조기에 진단하거나, 상기 질환의 경과, 예후 또는 치료 효과에 대하여도 추적이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0079]

도 1은 본 발명의 일 실시예에서 각막 내피 세포 부전 환자군과 정상 대조군에서 분리한 방수에서 풍부 단백질의 제거 후 각 군별 동정한 단백질의 분포를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에서 글로벌 프로테옴 프로파일링(global proteome profiling)을 통하여 정상 대조군 대비 각막 내피 세포 부전 환자군에서 유의적으로 발현이 증가 또는 감소된 단백질의 종류와 발현 수준의 변화를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에서 유전자 온톨로지 생물학적 대사 분석(gene ontology biological process; GO-BP)을 통해 정상 대조군 대비 각막 내피 세포 부전 환자군에서 유의적으로 발현이 증가 또는 감소된 단백질의 기능군의 종류와 발현 수준의 변화를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에서 유전자 온톨로지 분자적 기능(gene ontology molecular function; GO-MF)을 통해 정상 대조군 대비 각막 내피 세포 부전 환자군에서 유의적으로 발현이 증가 또는 감소된 단백질의 기능군의 종류와 발현 수준의 변화를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에서 유전자 온톨로지 분류와 단백질-단백질 상호작용 네트워크(protein-protein interaction network; PPI network)를 통해 정상 대조군 대비 각막 내피 세포 부전 환자군에서 유의적으로 발현이 증가 또는 감소된 각 기능별 단백질의 단백질-단백질 상호작용 네트워크 맵을 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 실험예 2의 실험 설계도를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 실험예 2에서 각막 내피 세포 부전 환자군과 정상 대조군에서 분리한 각막 내피 세포에서 발현되는 전사체의 분포를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 실험예 2에서 각막 내피 세포 부전 환자군과 정상 대조군에서 분리한 각막 내피 세포에서 발현되는 전사체의 분포를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 실험예 2에서 정상 대조군 대비 각막 내피 세포 부전 환자군의 각막 내피 세포에서 유의한 증가 또는 감소를 보이는 전사체를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 실험예 2에서 정상 대조군 대비 각막 내피 세포 부전 환자군의 각막 내피 세포에서 유의한 증가를 보이는 전사체의 기전을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 실험예 2에서 정상 대조군 대비 각막 내피 세포 부전 환자군의 각막 내피 세포에서 유의한 감소를 보이는 전사체의 기전을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명의 실험예 2에서 각막 내피 세포 부전 환자군과 정상 대조군에서 분리한 방수에서 발현되는 단백질의 분포를 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명의 실험예 2에서 각막 내피 세포 부전 환자군과 정상 대조군에서 분리한 방수에서 발현되는 단백질의 분포를 나타낸 것이다.

도 14는 본 발명의 실험예 2에서 정상 대조군 대비 각막 내피 세포 부전 환자군의 방수에서 유의한 증가 또는 감소를 보이는 단백질을 나타낸 것이다.

도 15는 본 발명의 실험예 2에서 정상 대조군 대비 각막 내피 세포 부전 환자군의 방수에서 유의한 증가를 보이는 단백질의 기전을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 16은 본 발명의 실험예 2에서 정상 대조군 대비 각막 내피 세포 부전 환자군의 방수에서 유의한 감소를 보이는 단백질의 기전을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 17은 본 발명의 실험예 2에서 각막 내피 세포 부전 환자군의 각막 내피 세포에서 발현되는 전사체(DEG)와 방수에서 발현되는 단백질(DEP) 사이의 상관 관계를 나타낸 것이다.

도 18은 본 발명의 실험예 2에서 각막 내피 세포 부전 환자군의 각막 내피 세포와 방수에서 동일하게 발현이 증가하는 전사체(DEG) 및 단백질(DEP)의 종류를 나타낸 것이다.

도 19는 본 발명의 실험예 2에서 각막 내피 세포 부전 환자군의 각막 내피 세포와 방수에서 동일하게 발현이 감소하는 전사체(DEG) 및 단백질(DEP)의 종류를 나타낸 것이다.

도 20은 본 발명의 실험예 2에서 각막 내피 세포 부전 환자군의 각막 내피 세포와 방수에서 발현되는 전사체 (DEG) 및 단백질(DEP)의 종류 및 그 발현 양상과 기전을 분석한 결과를 나타낸 것이다. 여기서 왼쪽 열에서 붉은 색은 발현이 정상 대조군 대비 증가한 양상, 녹색은 감소한 양상을 보이는 것을 의미한다.

도 21은 본 발명의 실험예 2에서 각막 내피 세포 부전 환자군의 각막 내피 세포와 방수에서 유의적으로 발현이 증가 또는 감소된 각 기능별 전사체 및 단백질의 상호작용 네트워크 맵을 나타낸 것이다.

도 22는 본 발명의 실험예 2에서 각막 내피 세포 부전을 감지할 수 있는 방수 바이오마커 단백질을 규명하기 위한 방수 단백질 분석의 실험 설계도를 나타낸 것이다.

도 23은 본 발명의 실험예 2에서 정상 대조군과 각막 내피 세포 부전 환자군의 방수에서 발현되는 단백질의 발현 양상을 나타낸 것이다.

도 24는 본 발명의 실험예 2에서 정상 대조군 대비 각막 내피 세포 부전 환자군의 방수에서 유의한 증가 또는 감소를 보이는 단백질을 나타낸 것이다.

도 25는 본 발명의 실험예 2에서 정상 대조군과 각막 내피 세포 부전 환자군의 방수에서 TIMP1 단백질의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 26은 본 발명의 실험예 2에서 정상 대조군과 각막 내피 세포 부전 환자군의 방수에서 FCGBP 단백질의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 27은 본 발명의 실험예 2에서 정상 대조군과 각막 내피 세포 부전 환자군의 방수에서 ANGPTL7 단백질의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예

[실험예 1]

1. 실험 방법

(1) 환자 모집 및 임상적 검사

본 연구는 강남세브란스병원 임상연구윤리심의위원회의 심의를 거친 후 전향적 연구로서 허가를 받았으며, 모든 환자들은 충분한 연구 설명을 들은 후 이에 동의한 자에 한하여 연구에 포함하였다. 하기 표 1과 같이 총 10명의 환자를 모집하였으며, 이는 5명의 각막 내피 세포 부전 환자군과 5명의 정상 대조군으로 이루어졌다. 각막 내피 세포 부전 환자군은 모두 각막 내피 세포 이식수술을 시행받게 된 환자들을 그 대상으로 하였고, 정상 대조군은 일반적인 백내장 수술을 시행받게 된 환자들을 대상으로 하였다. 모든 환자들은 고혈압, 당뇨, 면역 질환 등을 포함한 특이 전신 과거력은 없었으며, 안구외상, 포도막염 등 안과적 특이과거력 또한 없었다. 모든 환자에서 좌, 우안을 구분하지 않고 질환이 있는 눈을 연구 대상에 포함하되, 성별비, 연령 등은 두 군에서 차이가 없도록 모집하였다.

세극등현미경 검사를 통하여 환자군의 각막흔탁 및 부종을 확인 후, 경면현미경세포계 (SP-3000P, Topcon, Tokyo, Japan) 및 초음파각막두께계 (SP-3000, Tpocon)를 이용하여 각막의 이상 및 각막 내피 세포 부전을 확인하였다. 임상 데이터에 대한 통계 분석은 SPSS v.21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 사용하였다. Kolmogorov-Smirnov 테스트를 사용하여 데이터의 정상성을 확인한 후, 비정형 분포 데이터에 대해 Mann-Whitney U 테스트 또는 Wilcoxon signed rank 테스트를 사용하였다. 모든 통계 시험에서 0.05 미만의 P 값은 통계적으로 유의하다고 간주되었다.

표 1

[0089]

구분	정상 대조군	각막 내피 세포 부전 환자군
나이(년)	64.54±9.22	61.32±14.56
여성:남성	2:3	2:3
각막 내피 세포 밀도(/mm ² , 평균±표준편차)	2523±534	423(오직 2명에서만 확인 가능)
각막 두께(μm)	546±33	1028

[0091]

(2) 방수 채취

[0092]

백내장 수술, 각막 내피 세포 이식수술 등을 포함한 안구 내 안과 수술을 시행 시, 수술을 위한 완벽한 소독 후 일반적 수술 과정과 동일하게, 제일 먼저 안구의 각막 주변부로 0.5mm 크기의 일차 절개를 시행하였다. 이때 눈 속을 채우고 있는 방수가 안구 외부로 흘러나오게 되는데, 26-게이지(gauge) 시린지(syringe)를 이용하여 일차 절개창 부분에서 안구의 전방으로부터 방수를 채취한 후 원래 계획되어 있던 통상적인 안구 수술을 진행하였다. 이 때 채취하는 양은 0.05 ~ 0.15cc 정도였으며, 채취된 방수는 1.5 ml 크기의 에펜도르프 튜브(Eppendorf tube)에 담아서 분석을 수행할 때까지 -80 °C 초저온 냉동고에 보관하였다.

[0094]

(3) 방수 분석

[0095]

각 군에 대해 5 개의 풀링된 방수 단백질을 아래와 같은 방법으로 펩티드로 분해시켰다. 100 mM 중탄산 암모늄(Sigma, St. Louis, MO, USA) 중 8 M 우레아(urea)를 최종 농도가 6 M 이상이 되도록 1:3 (샘플:urea) 비율로 혼합하고, 실온에서 20 분간 보관하였다. 그 다음, 환원을 위한 10 mM DTT (Dithiothreitol, Sigma) 및 30 mM IAA (Iodoacetamide, Sigma)를 사용하여 단백질을 알킬화하였다. 트립신(trypsin)을 샘플 (1:50=trypsin:샘플)에 첨가하고 37 °C에서 밤새 보관하였다. 활성화된 트립신 반응을 0.4 % TFA로 켄칭시키고, 펩타이드를 C18 하버드 매크로 스핀 컬럼으로 탈염시켰다. 생성된 펩티드를 건조시키고 -80 °C에서 저장하였다.

[0096]

펩타이드를 0.1 % 포르산에 재현탁하고 Nanoacquity UPLC (Waters, Manchester, UK)와 결합된 Q Exactive TM orbitrap 하이브리드 질량 분석기를 사용하여 분석하였다. 프로테오 프로파일링(proteome profiling) 분석을 위해, 펩타이드는 2.0 V의 전위에서, 2 μm C18 입자로 채워진 내부 컬럼 (100 cm x 75 μm ID)으로 결합된 NSI 시스템을 사용하여 이온화된 트랩 컬럼을 통해 용리되었다. 전체 질량분석기 데이터는 400 ~ 1,600 m/z의 스캔 범위에서 70,000의 분해능으로 획득되었으며 계인 제어값은 1.0×10^6 이고 최대 이온 주입량은 20 ms였다. 최대 이온 주입 시간은 60 밀리초로 설정하였으며, 동적 제외시간은 30초로 하였다.

[0097]

획득된 최초데이터들은 Uniprot 휴먼 데이터베이스에 대해 MaxQuant (v. 1.5.1.2) 소프트웨어로 검색되었다. 고정 변형체로서 시스테인의 카바미도메틸화 및 다양한 변형으로서의 N-아세틸화 및 메티오닌 산화가 각각의 탐색에 사용되었다. 펩티드 스펙트럼 일치는 단백질 수준에서 1 %의 오류 발견 컷오프 비율(false discovery cutoff rate)이 적용되었다. 초기 전구체 질량 편차는 4.5 ppm까지, 단편 질량 편차는 20 ppm까지 허용되었다. 단백질 확인을 위해서는 MaxQuant에서 '레이저 플러스 유니크 펩타이드(razor plus unique peptides)' 설정을 사용하였다. MaxQuant에서 XIC 기반 LFQ (label-free quantification) 알고리즘을 사용하여 단백질을 정량화했다. '런 사이의 매치(Match between runs)' 설정은 비선형 유지 시간 정렬을 위해 사용되었다. 오염 물질 데이터의 영향을 막기 위해, 역데이터베이스를 확인하였고, 현장에서 확인된 오염 단백질 등을 제거하였다.

[0098]

프로테오믹스 데이터의 통계 분석을 위해 Perseus 소프트웨어 (v.1.5.0.31)가 사용되었다. 각 군의 데이터는 MaxQuant에서 'LFQ intensity'를 내보내고 모든 LFQ 강도는 로그2 값으로 변환하였다. 3회의 측정에서 모두 값을 표시하지 않은 단백질들은 제외하였다. 검출된 총 단백질 중 2배(FC, fold change)의 증가 혹은 감소의 변화를 보이고, LFQ 강도 발현이 t-test 통계분석 상 0.05 미만의 P 값을 보이는 단백질들은 DEP (differentially expressed proteins)로 분류하였다.

[0099]

Database for Annotation, Visualization 및 Integrated Discovery (DAVID) 생물정보학 데이터베이스를 사용하여 DEP와 관련된 유전자 온톨로지 생물학적 프로세스 (gene ontology biological process, GO-BP) 및 분자기능 (gene ontology molecular function, GO-MF) 용어를 분석했다. 기능적 클러스터링 및 교토 유전자게놈백과사전

(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 경로 매핑 분석도 수행하였다. 각 생물정보학 기반의 기능 분류는 $P < 0.05$ 인 것으로 수행하였다. DEP의 네트워크 모델을 구성하기 위해 STRING 9.1 공개 데이터베이스에서 단백질-단백질 상호 작용 (protein-protein interaction, PPI) 정보를 수집했다. 네트워크 모델은 Cytoscape 소프트웨어를 사용하여 정렬된 단백질과 상호작용 데이터로 구축되었다.

2. 실험 결과

방수는 단백질 조성이 혈액과 매우 유사하며 혈청 알부민(serum albumin) 등의 풍부 단백질(abundant Protein)의 제거가 필수적인데, 본 연구진은 동결건조를 이용한 통류식(Flow-Through) 농축법을 확립하여 단백질 손실이 없으며 펩티드화가 가능한 전처리법을 완성하였다. 확립된 방법을 통해 혈청 알부민, 트랜스페린(transferrin), 이뮤노글로불린(immunoglobulin) 등 풍부 단백질을 제거한 후 이를 전기 영동 및 질량분석기 분석을 통해 검증하였다. 그 결과, 약 800 μ g의 방수 시료로부터 약 90%의 풍부 단백질을 제거하였고, 이를 통해 기존 보고들(기존보고 최대 636개) 보다 더 많은 1021개의 단백질 동정률을 보였다(도 1). 그 중 정상 대조군에 비해 각막 내피 세포 부전 환자 실험군에서 유의하게 증가한 단백질(UP- Differentially expressed proteins; UP-DEP)은 총 51개, 감소한 단백질(DN-DEP)은 총 78개가 확인되었다.

도 2 내지 4에서는 정상 대조군에 비해 각막 내피 세포 부전 환자 실험군에서 유의하게 증가 또는 감소한 단백질의 프로파일링을 확인해 보았다. 그 결과 하기 표 2 및 4에 나타난 단백질은 정상 대조군에 비해 각막 내피 세포 부전 환자 실험군에서 유의하게 발현이 감소하였고, 하기 표 3 및 4에 나타난 정상 대조군에 비해 각막 내피 세포 부전 환자 실험군에서 유의하게 발현이 증가하였다. 특히 더 많은 수의 변화를 보인 DN-DEP를 살펴보면, 인체 각막 내피 세포의 기능에 중요한 탄산탈수소효소 2(Carbonyl anhydrase 2; CA2)의 발현 수준이 대략 5배 감소되어 있음을 알 수 있었다.

표 2

DN-DEPs
DKK3, CRYBB1, CA2, CRYBA1, PGAM1, CRYBA4, CUTA, ARSB, ALDOC, CRYBB2, SERPINI1, CREG1, SPOCK1, SDF4, SCG2, COL9A3, LGALS3BP, IGHG3, HBB, MDH1, IMPG2, GPI, TPI1, APLP2, CLSTN1, FGG, VGF, CLSTN3, HSPB1, GAS6, L1CAM, CRYGS, S100A9, SEMA3A, VCAN, APP, SPARC, TWSG1, ALDOA, SOD1, HBA1, ENO1, SORCS1, GALNT2, AGRN, ATP6AP1, OPTC, FSTL5, C2orf40, FGA, TPP1, FSTL4, APOB, TGFB1, GOLIM4, XYLT1, ITM2B, FABP5, TKT, EFNA5, PPIA, SCG5, CPQ, C3, B4GAT1, NEO1, HEXB, IGHM, APOC3, LYNX1, PSAP, ENPP2, SEMA7A, MAN1A1, CHRDL1, F9, HRG 및 SERPINF1

표 3

UP-DEPs
CST4, LCN1, CD163, ITIH3, FCGBP, VCAM1, VIM, COL5A1, CRYAA, ANGPTL7, C1RL, CRYAB, LYZ, PLXNB2, SERPINF2, C1QB, SERPIND1, VTN, SERPINC1, KNG1, APOH, A1BG, C8A, FETUB, AFM, SERPINA3, CPB2, C1QC, WFIKK2, TMSB4X, TMSB10, AHSB, PROS1, RTBDN, NPVF, C9, LRG1, MST1, DSC3, C1R, C8B, CLU, CTGF, CFHR1, F10, TIMP1, IGFBP2, F12, PCOLCE, HABP2 및 SLPI

표 4

Differentially expressed proteins (DEP)					
UP-DEP (51)			DOWN-DEP (78)		
유전자명	Log ₂ (Fold Change)	P-value	유전자명	Log ₂ (Fold Change)	P-value
CST4	4.994	0.000	DKK3	-6.432	0.000
LCN1	4.485	0.004	CRYBB1	-5.232	0.000
CD163	4.080	0.036	CA2	-5.055	0.000
ITIH3	3.258	0.047	CRYBA1	-3.784	0.000
FCGBP	3.177	0.005	PGAM1	-3.764	0.001
VCAM1	3.058	0.005	CRYBA4	-3.763	0.003
VIM	2.634	0.049	CUTA	-3.425	0.020
COL5A1	2.613	0.025	ARSB	-3.372	0.034
CRYAA	2.548	0.004	ALDOC	-3.216	0.019

ANGPTL7	2.495	0.032	CRYBB2	-3.188	0.000
C1RL	2.285	0.000	SERPINI1	-3.163	0.006
CRYAB	2.232	0.003	CREG1	-2.949	0.022
LYZ	2.182	0.042	SPOCK1	-2.881	0.001
PLXNB2	2.138	0.027	SDF4	-2.743	0.001
SERPINF2	2.113	0.000	SCG2	-2.723	0.001
C1QB	2.108	0.024	COL9A3	-2.609	0.006
SERPIND1	1.971	0.018	LGALS3BP	-2.608	0.002
VTN	1.966	0.001	IGHG3	-2.586	0.004
SERPINC1	1.917	0.000	HBB	-2.559	0.000
KNG1	1.881	0.008	MDH1	-2.496	0.006
APOH	1.724	0.006	IMPG2	-2.434	0.005
A1BG	1.711	0.005	GPI	-2.430	0.008
C8A	1.685	0.007	TPI1	-2.401	0.001
FETUB	1.665	0.011	APLP2	-2.376	0.000
AFM	1.658	0.006	CLSTN1	-2.318	0.008
SERPINA3	1.610	0.002	FGG	-2.306	0.010
CPB2	1.601	0.044	VGF	-2.253	0.014
C1QC	1.579	0.002	CLSTN3	-2.207	0.014
WFIKKN2	1.546	0.008	HSPB1	-2.203	0.043
TMSB4X	1.513	0.003	GAS6	-2.200	0.001
TMSB10	1.512	0.020	L1CAM	-2.173	0.001
AHSG	1.476	0.006	CRYGS	-2.163	0.005
PROS1	1.471	0.003	S100A9	-2.160	0.044
RTBDN	1.432	0.003	SEMA3A	-2.094	0.012
NPVF	1.402	0.013	VCAN	-2.076	0.013
C9	1.393	0.000	APP	-2.057	0.011
LRG1	1.352	0.002	SPARC	-2.047	0.001
MST1	1.325	0.008	TWSG1	-2.035	0.014
DSC3	1.308	0.042	ALDOA	-1.972	0.000
C1R	1.274	0.001	SOD1	-1.929	0.041
C8B	1.246	0.001	HBA1	-1.885	0.023
CLU	1.240	0.005	ENO1	-1.885	0.018
CTGF	1.186	0.040	SORCS1	-1.846	0.006
CFHR1	1.179	0.007	GALNT2	-1.839	0.039
F10	1.142	0.020	AGRN	-1.836	0.000
TIMP1	1.087	0.018	ATP6AP1	-1.804	0.049
IGFBP2	1.087	0.028	OPTC	-1.788	0.005
F12	1.075	0.042	FSTL5	-1.782	0.019
PCOLCE	1.075	0.016	C2orf40	-1.773	0.015
HABP2	1.055	0.018	FGA	-1.759	0.000
SLPI	1.028	0.010	TPP1	-1.735	0.023
			FSTL4	-1.661	0.007
			APOB	-1.650	0.011
			TGFB1	-1.597	0.020
			GOLIM4	-1.578	0.002
			XYLT1	-1.576	0.004
			ITM2B	-1.560	0.002
			FABP5	-1.507	0.008
			TKT	-1.474	0.049
			EFNA5	-1.424	0.030
			PPIA	-1.419	0.040
			SCG5	-1.381	0.005
			CPQ	-1.331	0.017
			C3	-1.229	0.008
			B4GAT1	-1.222	0.001

[0107] 도 3의 유전자 온톨로지 생물학적 대사(gene ontology biological process; GO-BP) 분석을 보면 정상 대조군에 비해 각막 내피 세포 부전 환자 실험군에서 유의하게 증가 또는 감소한 단백질(DEP)들의 생물학적 프로세스를 확인할 수 있다. 먼저 DN-DEP를 보면 중탄산염 수송을 통한 수분이동과정의 저하뿐만 아니라, 세포대사작용, 세포외기질형성 및 신경계발달 등의 프로세스가 저하되어 있음을 알 수 있었다. 또한, 도 4의 유전자 온톨로지 분자적 기능(gene ontology molecular function; GO-MF) 분석에서도 역시 칼슘이온결합을 비롯한 다양한 이온결합기능 및 면역조절활성 등의 분자적 기능이 저하되었음을 확인할 수 있었다. 반면, UP-DEP에서는 GO-BP 상에서도 면역반응 및 노화 관련된 프로세스들이 증가되어 있었고, GO-MF에서 역시 면역반응활성과 관련된 분자적 기능이 증가되어 있었다.

[0108] 보다 구체적으로, 도 5에 따르면 정상 대조군에 비해 각막 내피 세포 부전 환자 실험군에서 유의하게 증가 또는 감소한 단백질(DEP)들의 기능 및 상호작용을 직관적으로 확인해 볼 수 있다. 각막 내피 세포 부전 환자 실험군에서는, 능동적 펌프 작용의 동적 평형을 통해 수분이동을 조절함으로써 각막의 투명성을 유지해주는 것으로 잘 알려져 있는 CA2를 포함하여 세포대사에 관여하는 물질(ALDOA, ENO1, ALDOC, GPI, HEXB, TPI1, ARSB, FABP5, PGAM1, MDH1, APOC3)들의 발현 수준이 모두 감소되어 있을 뿐만 아니라, 세포기질형성에 관여하는 다양한 인자들(FGG, FGA, HRG)의 발현도 감소되어 있었다. 또한, 신경계통의 발달에 관계되어 있는 단백질들(SEMA3A, EFNA5, APOB, APP, VCAN, CHRDL1, ITM2B, SPOCK1)의 발현도 유의하게 감소되어 있었다. 그리고, DKK3, TGFBI, C3, SEMA7A, S100A9와 같이 면역조절기능이 있는 단백질들의 발현 또한 감소되어 있었다. 반면, 대식세포 마커인 CD163을 비롯하여 보체인자 등 다양한 염증인자나 면역 관련인자(C1R, AHSR, FETUB, PCOLCE, CST4, VCAM1, SLPI, VTN, C1QB, C1QC, C1RL, C8A, C8B, C9, CFHR1)들의 발현은 증가되어 있었고, 세포 접착과 관련된 다양한 단백질(CRYAB, PLXNB2, KNG1, COL5A1, TIMP1, CLU)의 발현 또한 증가되어 있었다.

[0110] [실험예 2]

[0111] 1. 실험 방법

[0112] (1) 환자모집 및 임상적 검사

[0113] 본 연구는 강남세브란스병원 임상연구윤리심의위원회의 심의를 거친 후 전향적 연구로서 허가를 받았으며, 모든 환자들은 충분한 연구 설명을 들은 후 이에 동의한 자에 한하여 연구에 포함하였다. 각막 내피 세포 (corneal endothelial cell, CEnC)의 전사체 (transcriptome) 뿐만 아니라 방수 (aqueous humor, AH)의 단백질체 (proteome)를 프로파일링 분석하기 위하여 5명의 각막 내피 세포 부전 (corneal endothelial cell dysfunction, CECD) 환자군을 우선적으로 모집하였고, 이들은 모두 각막이식수술을 시행 받게 된 환자들을 그 대상으로 하였다. 위의 두가지 분석의 실험군에 대한 정상대조군은 인체의 조직과 체액을 대상으로 하기 위하여 불가피하게 각각 따로 구성하였다. 첫번째로 각막 내피 세포의 전사체 분석을 위한 경우는 정상 사람 기증 각막들의 남은 부분을 이용하였고, 인체 방수의 단백질체 분석을 위한 경우는 일반적인 노년성 백내장 수술을 시행 받는 환자들을 대상으로 하였다. 그 후 검출한 방수 마커 후보물질들에 대한 검증 단계 개별 분석에서는 정상대조군 및 각막 내피 세포부전 환자군을 각각 7명씩 추가적으로 모집하여 연구에 포함하였다.

[0114] 모든 대상자들은 고혈압, 당뇨, 면역질환 등을 포함한 특이 전신 과거력은 없었으며, 안구외상, 포도막염 등 안과적 특이과거력 또한 없었다. 모든 환자에서 좌, 우안을 구분하지 않고 질환이 있는 눈을 연구 대상에 포함하되, 성별비, 연령 등은 군 별 차이가 없도록 모집하였다.

[0115] 각막 내피 세포부전 실험군은 세극등현미경 검사를 통하여 환자군의 각막 혼탁 및 부종을 확인 후, 경면현미경 세포계 (SP-3000P, Topcon, Tokyo, Japan) 및 초음파각막두께계 (SP-3000, Tpocon)를 이용하여 각막 내피 세포부전을 확진하였다.

[0116] 임상 데이터에 대한 통계 분석은 SPSS v.21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 사용하였다. Kolmogorov-Smirnov 테스트를 사용하여 데이터의 정상성을 확인한 후, 비정형 분포 데이터에 대해 Mann-Whitney U 테스트 또는 Wilcoxon signed rank 테스트를 사용하였다. 모든 통계 시험에서 0.05 미만의 P 값은 통계적으로 유의하다고 간주되었다.

[0118] (2) 실험 요약

[0119] 본 발명자들은 인체의 각막 내피 세포의 상태를 반영할 수 있는 방수 단백질 마커를 도출하기 위하여 독자적인

연구 방법을 고안하였다(도 6). 각막 내피 세포부전 환자들을 치료하기 위해서는 필연적으로 각막이식술을 하게 되는데, 우선적으로 손상되어 있는 각막 내피 세포는 제거하는 과정을 거친 후 (Stripping the CECs) 기증자의 각막 내피 세포층을 이식하게 된다. 이 때, 분리된 환자 (수혜자)의 각막 내피 세포를 수집한 후 이들의 전사체 분석을 수행하였고, 상기 각막 내피 세포 부전 환자들 각막 이식술을 받게 될 때 가장 먼저 안구 전방에 있는 방수를 채취하였다. 방수는 단백질 조성이 혈액과 매우 유사하며 혈청 알부민 등의 풍부 단백질(abundant protein)의 제거가 필수적인데, 본 발명자들은 동결 건조를 이용한 플로우-쓰로우(Flow-Through) 농축법을 확립하여 단백질 손실이 없으며 펩티드화가 가능한 전처리법을 완성하였다. 확립된 방법을 통해 혈청 알부민, 트랜스페린(transferrin) 및 면역 글로불린(Immunoglobulin) 등 풍부 단백질을 제거한 후 이를 전기영동 및 질량분석기 분석을 통해 검증하였다.

[0121] (3) 각막 내피 세포층 분리 및 채취

[0122] 각막 내피 세포부전 환자들의 각막이식 수술 시 제일 먼저 방수를 채취한 후, 안구의 전방에 멸균 공기를 주입하였다. 각막 주변부로 0.5mm 크기의 보조 절개창을 만든 후 각막 주변부의 데스메막분리용 수술 도구를 삽입하여 각막 중심부를 포함한 직경 8mm 가량의 내피 세포층을 분리하였다. 각막 주변부에 3.2mm 주 절개창을 추가로 만든 후 이를 꺼내어 Trizol 이 담긴 Eppendorf tube에 담아서 분석을 수행할 때까지 영하 80 °C 초저온 냉동고에 각각 보관하였다. 정상 대조군의 경우, 사람 기증 각막 중 각막 내피 세포부전 환자들의 각막이식 수술을 시행하고 남은 부분에서 분리하였으며, 동일하게 Trizol 이 담긴 Eppendorf tube에 담아서 분석을 수행할 때까지 영하 80 °C 초저온 냉동고에 각각 보관하였다.

[0124] (4) 방수 채취

[0125] 백내장 수술, 각막 내피 세포 이식 수술 등을 포함한 안구 내 안과 수술을 시행 시, 수술을 위한 완벽한 소독 후 일반적 수술과정과 동일하게, 제일 먼저 안구의 각막 주변부로 0.5mm 크기의 보조 절개를 시행하였다. 이때 눈 속을 채우고 있는 방수가 안구 외부로 흘러나오게 되는데, 26-게이지 시린즈(26-gauge syringe)를 이용하여 일차 절개창 부분에서 안구의 전방으로부터 방수를 채취한 후 원래 계획되어 있던 통상적인 안구 수술을 진행하였다. 이 때 채취하는 양은 0.05 ~ 0.15cc 정도였으며, 채취된 방수는 1.5 ml 크기의 Eppendorf 튜브에 담아서 분석을 수행할 때까지 영하 80 °C 초저온 냉동고에 각각 보관하였다.

[0127] (5) 각막 내피 세포의 전사체 분석

[0128] 각막 내피 세포로부터 Total RNA를 분리(isolation) 한 후, DNase를 이용하여 DNA 오염을 제거하였다. mRNA 정제 키트를 이용하여 RNA를 정제하고 이를 쇼트 리드(short read)로 시퀀싱을 하기 위해 임의로 절편화(fragmentation) 시켰다. 잘게 쪼개진 RNA 조각(fragment)에 대해 역전사(reverse transcription) 과정을 통해 cDNA로 만든 후 양 쪽 끝에 서로 다른 어댑터(adapter)를 붙이고 이를 연결(ligation)하였다. 시퀀싱(sequencing)이 가능한 정도의 양으로 PCR 증폭시킨 후 크기 선별(size selection) 과정을 통해 200-400 bp의 인서트 사이즈(insert size)를 확보하였다. cDNA 절편의 양쪽 말단으로부터 리드의 길이만큼 시퀀싱이 되면, 얻어진 로우 리드(raw reads)의 품질 관리(quality control) 분석을 진행하였다. 분석 결과의 편차(bias)를 줄이기 위해 로우-퀄리티(low-quality)를 가지거나 어댑터 시퀀스(adaptor sequence), 오염된 DNA(contaminant DNA), PCR 듀플리케이트(PCR duplicates)와 같은 artifacts를 제거하는 전처리 과정을 거친 후, 스플라이스(splice)를 고려한 HISAT2 프로그램을 이용하여 레퍼런스 게놈(reference genome)에 맵핑(mapping)한 후, 얼라인 리드(aligned reads)를 생성하였다. 레퍼런스 기반한 얼라인 리드의 정보를 이용하여 StringTie 프로그램을 통한 트랜스크립트(transcript) 어셈블리를 시행하였다. 각 샘플의 전사물 정량(transcript quantification)을 통해 얻은 발현량을 리드 카운트(read count)와 전사 길이(transcript length) 및 커버리지 정도(depth of coverage)를 고려한 정규화(normalization) 값인 FPKM(Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads) 값으로 발현 프로파일(expression profile)을 추출하였다. Log2 로 변환한 후 TMM 정규화를 시행하였으며 edgeR exactTest 프로그램을 이용하여 P 값을 계산하였다. 3회의 측정에서 모두 값을 표시하지 않은 유전자들은 제외하였다. 검출된 총 유전자 중, 2배 (FC, fold change)의 증가 혹은 감소의 변화를 보이고, 발현량이 t-test 통계분석 상 0.05 미만의 P 값을 보이는 유전자들은 DEG (differentially expressed genes)로 분류하였다.

[0130] (6) 방수의 단백질 분석

[0131] 먼저 프로파일링을 위하여, 각 군의 방수 샘플에 포함되어 있는 단백질들을 아래와 같은 방법으로 펩티드로 분해시켰다. 100 mM 중탄산 암모늄 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 중 8 M 우레아(urea)를 최종 농도가 6 M 이상이 되도록 1:3 (샘플:urea) 비율로 혼합하고, 실온에서 20 분간 보관하였다. 그 다음, 환원을 위한 10 mM DTT (Dithiothreitol, Sigma) 및 30 mM IAA (Iodoacetamide, Sigma)를 사용하여 단백질을 알킬화하였다. 트립신 (trypsin)을 샘플 (1:50=trypsin:샘플)에 첨가 하고 37 °C에서 밤새 보관하였다. 활성화된 트립신 반응을 0.4 % TFA로 쉼시시키고, 펩타이드를 C18 하버드 매크로 스핀 컬럼으로 탈염시켰다. 생성된 펩티드를 건조시키고 -80 °C에서 저장하였다. 펩타이드를 0.1 % 포름산에 재현 탁하고 Nanoacquity UPLC (Waters, Manchester, UK) 와 결합된 Q Exactive TM orbitrap 하이브리드 질량 분석기를 사용하여 분석하였다. 단백질 확인을 위해서는 MaxQuant에서 'razor plus unique peptides' 설정을 사용하였다. MaxQuant에서 XIC 기반 LFQ (label-free quantification) 알고리즘을 사용하여 단백질을 정량화했다. 각 군의 데이터는 MaxQuant에서 'LFQ intensity' 를 내보내고 모든 LFQ 강도는 로그2 값으로 변환하였다. 3회의 측정에서 모두 값을 표시하지 않은 단백질들은 제외하였다. 검출된 총 단백질 중, 2배 (FC, fold change)의 증가 혹은 감소의 변화를 보이고, LFQ 강도 발현이 t -test 통계분석 상 0.05 미만의 P 값을 보이는 단백질들은 DEP (differentially expressed proteins)로 분류 하였다. 검증 단계 개별분석에서는 펩티드 시료 중 2 ug을 사용하여 프로파일링 실험과 동일한 전처리 과정을 거친 후, Q-Exactive plus interfaced with an EASY-nLC 1000 UHPLC System으로 질량 분석을 수행하였다. 선별 된 DEP 들을 대상으로 정량화한 후 XXX spectral library를 사용하는 Spectronaut Pulsar에서 타겟 분석을 하였다. 통계 분석을 위해 Perseus 소프트웨어 (v.1.5.0.31)가 사용되었다.

[0133] (7) 전사체 및 단백질의 생물정보학적 분석

[0134] Database for Annotation, Visualization 및 Integrated Discovery (DAVID) 생물정보학 데이터베이스를 사용하여 DEP와 관련된 유전자 온톨로지 생물학적 프로세스 (gene ontology biological process, GOBP) 및 분자기능 (gene ontology molecular function, GOMF) 용어를 분석했다. 기능적 클러스터링 및 교토 유전자게놈백과사전 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 경로 매핑 분석도 수행하였다. 각 생물정보학 기반의 기능 분류는 P <0.05 인 것으로 수행하였다. DEG와 DEP 각각의 네트워크 모델을 구성하기 위해 STRING 9.1 공개 데이터베이스에서 상호 작용 정보를 수집했다. 네트워크 모델은 Cytoscape 소프트웨어를 사용하여 구축되었다.

[0136] 2. 실험 결과

[0137] 본 실험의 대상이 된 각막 내피 세포 부전 환자군과 정상 대조군의 인구통계학적 차이는 없었으며, 경면현미경 상 각막 내피 세포 부전 환자군의 CEC 밀도는 매우 낮아져 있었고 초음파 각막 두께 검사 상 각막부종이 심하여 두껍게 측정되었다.

[0139] (1) 각막 내피 세포 부전 환자의 각막 내피 세포를 직접 이용하여 전사체 분석

[0140] 본 연구자들의 전사체 분석 연구를 통하여 각막 내피 세포에서 총 25,888 개의 mRNA의 발현을 확인할 수 있었으며 이들은 세포체, 세포 내 물질, 세포막 물질 등에서 기인함을 알 수 있었다(도 7 및 8). 정상 각막 내피 세포 대비 각막 내피 세포 기능 부전 환자에서의 각막 내피 세포에서 유의한 증가 (UP-DEG) 또는 감소 (DN-DEG)를 보이는 DEG는 각각 2658개, 1832개로 확인되었다 (도 9). 생물정보학 기법을 이용하여 이들의 기전을 분석한 결과 (도 10 및 11), UP-DEG는 크게 발달(development), 세포 외 배출(exocytosis), 생물학적 부착(biological adhesion), 이온 수송(ion transport) 및 사이토카인 신호 경로(cytokine signaling pathway) 등의 5개 클러스터로 기전을 이루고 있었으며, DN-DEG 들은 탄수화물 대사 과정(carbohydrate metabolic process), 세포 내 위치(localization), 세포 구성 조직(cellular component organization), 세포 사멸(cell death) 및 자극에 대한 반응(response to stimulus) 등의 기전들을 만들어내는 네트워크를 이루고 있었다.

[0142] (2) 각막 내피 세포 부전 환자의 방수를 검체로써 이용한 프로테오믹스(proteomics) 분석

[0143] 약 800ug의 방수 시료로부터 약 90%의 풍부 단백질을 제거하였고, 이를 통해 기존 보고들 보다 더 많은 1021개의 단백질이 동정되었으며 (도 12), 이들은 세포물질수송체, 분비 과립, 세포 표면 등에서 기인하였다 (도 13). 정상 대조군에 비해 각막 내피 세포 부전 환자의 방수에서 유의하게 증가한 DEP (UP-DEP)는 총 51개, 감소한 DEP (DN-DEP)는 총 78개가 확인되었다 (도 14). 생물정보학 기법을 이용하여 이들의 기전을 분석한 결과(도 15), UP-DEP 들은 크게 3개 클러스터로 기전을 이루고 있었는데, 이 중 대부분은 면역 반응이었고, 그 외에 단백질 대사 및 가수분해(protein metabolism and proteolysis)와, 세포 외 배출(exocytosis) 등을 포함하였다. 또한, DN-DEP 들은 탄수화물 대사 과정(carbohydrate metabolic process), 발달 과정(developmental process) 및 세포 부착(cell adhesion) 등의 기전들을 만들어내는 네트워크를 이루고 있었다.

[0145] (3) 각막 내피 세포 부전 상태를 반영할 수 있는 방수 단백질 탐색 및 방수 내 기전 탐구

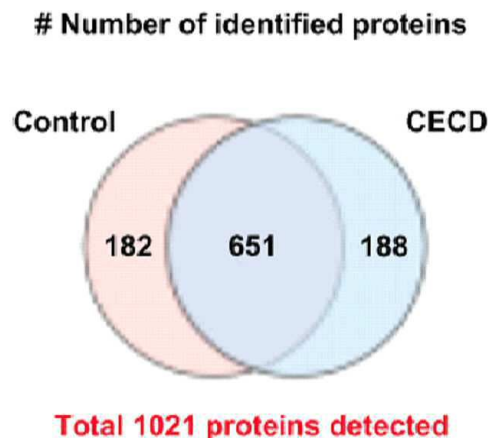
[0146] '방수'라는 인체 검체는 각막 내피 세포의 전체와 지속적으로 맞닿아 있으므로, 각막 내피 세포의 분자생물학적 상태를 직접 반영할 수 있다. 따라서, 각막 내피 세포 부전 환자 눈 속의 각막 내피 세포가 발현하는 DEG와 이들의 방수 내 발현 DEP가 관련이 있는 지 확인한 결과, 각막 내피 세포의 DEG 발현과 방수 내 DEP 발현과는 매우 밀접한 양의 상관 관계가 있음을 확인할 수 있었다 (도 17). 각막 내피 세포의 DEG와 방수의 DEP에서 동일하게 증가하는 13개 물질은 ANGPTL7, FCGBP, SERPINF2, F10, PROS1, SERPIND1, HABP2, TMSB10, TIMP1, LYZ, SLPI, TMSB4X 및 C1R 등인데, 이들은 모두 면역 반응 기전에 관여한다 (도 18 및 20). 각막 내피 세포의 DEG와 방수의 DEP에서 동일하게 감소하는 22개 물질은 MDH1, MAN1A, B4GAT1, GPI, ENO1, ALDOA, PGAM1, TPI1, GALNT2, TKT, TGFBI, LYNX1, PSAP, CPQ, SERPINI1, COL9A3, APP, CLSTN1, LGALS3BP, CA2, ATP6AP1, APLP2 등인데, 이들은 탄수화물 대사 과정, 발달 과정 및 이온 수송 기전과 관계가 있다(도 19 및 20). 각막 내피 세포의 DEG와 방수의 DEP 발현이 음의 상관 관계를 갖는 경우는 매우 드물었다(도 20). 따라서, 도 21과 같이 각막 내피 세포 부전 환자의 방수는 각막 내피 세포의 생물학적 변화를 잘 반영해주는 훌륭한 인체 검체임을 알 수 있었다.

[0148] (4) 방수를 이용하여 각막 내피 세포 부전을 감지할 수 있는 바이오마커 물질 도출

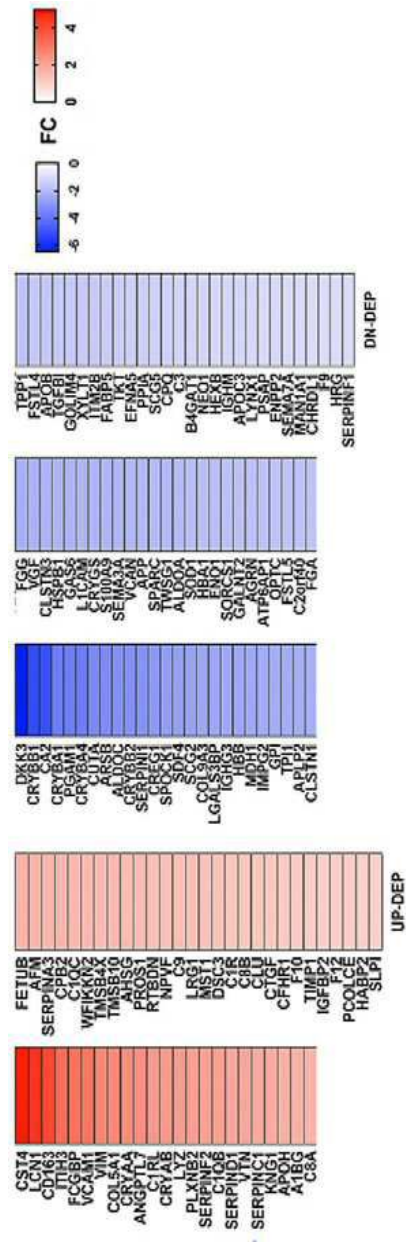
[0149] 각막 내피 세포 부전을 감지할 수 있는 방수 바이오마커 단백질을 규명하기 위하여, 각막 내피 세포 부전 환자 7명과 정상대조군 7명을 추가로 모집한 후 개별 환자마다 방수 단백질 분석 (DIA analysis)을 수행하였다(도 22). 각각의 각막 내피 세포 환자들의 방수 내 단백질 발현을 확인한 결과, 정상 대조군과 실험군이 잘 구분되는 발현 양상을 보였고 주로 증가하는 DEP 들을 포함하였다(도 23 및 24). LFQ AH 프로파일링 시의 UP-DEP 와 DIA 방수 개별 분석 시의 UP-DEP 중, 각막 내피 세포의 전사체 발현까지 (UP-DEG) 고려한 결과, 각막 내피 세포 부전의 질환에서 유의적으로 증가하는 방수 내 바이오마커로서 TIMP1, FCGBP 및 ANGPTL7 등을 도출할 수 있었다 (도 25 내지 27).

도면

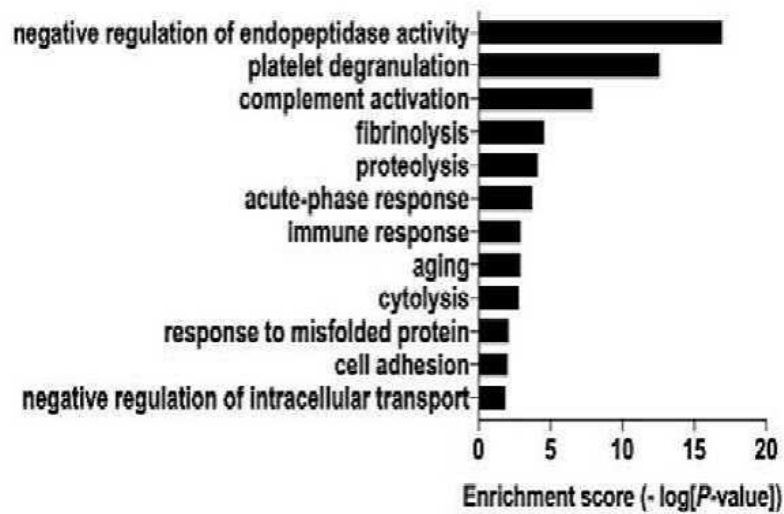
도면1



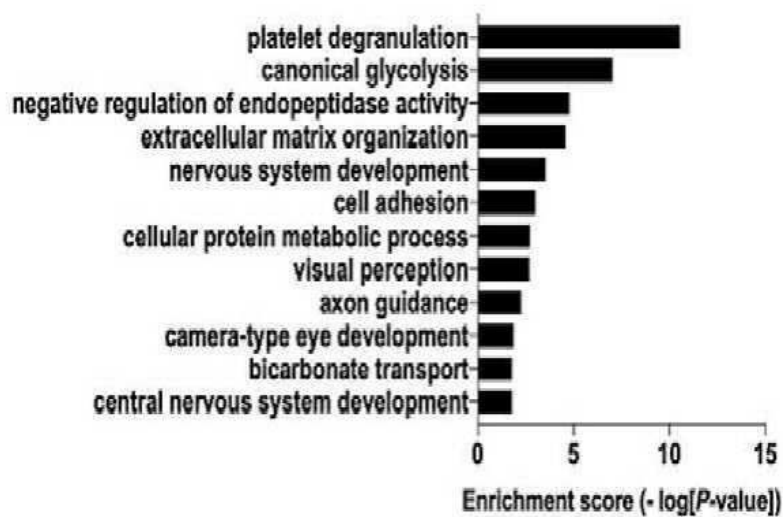
도면2



도면3

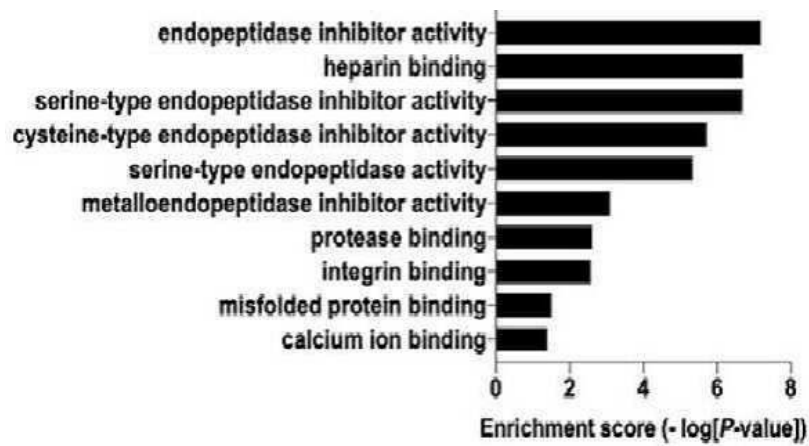


<Gene Ontology Biological Process of UP-DEP>

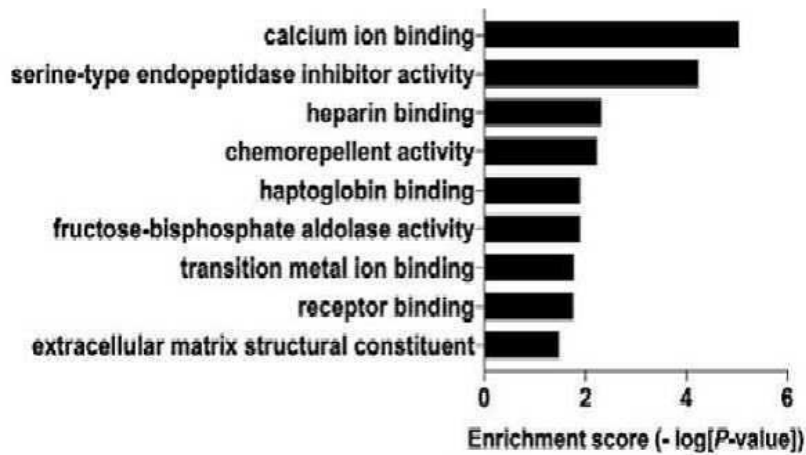


<Gene Ontology Biological Process of DN-DEP>

도면4

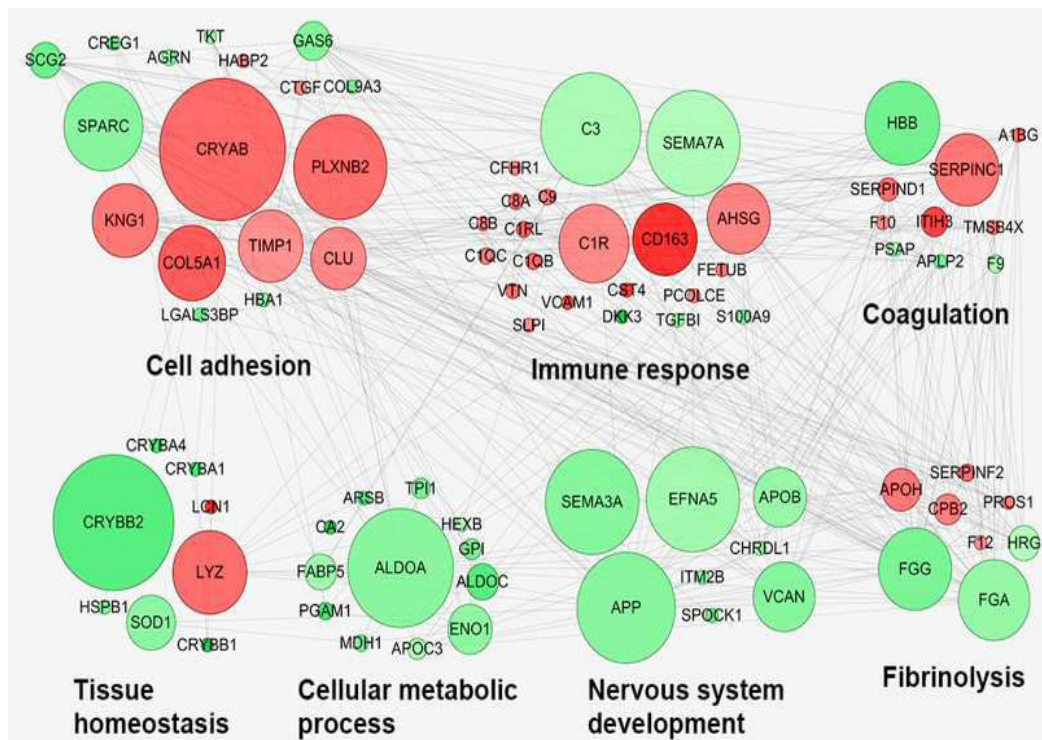


<Gene Ontology Molecular Function of UP-DEP>

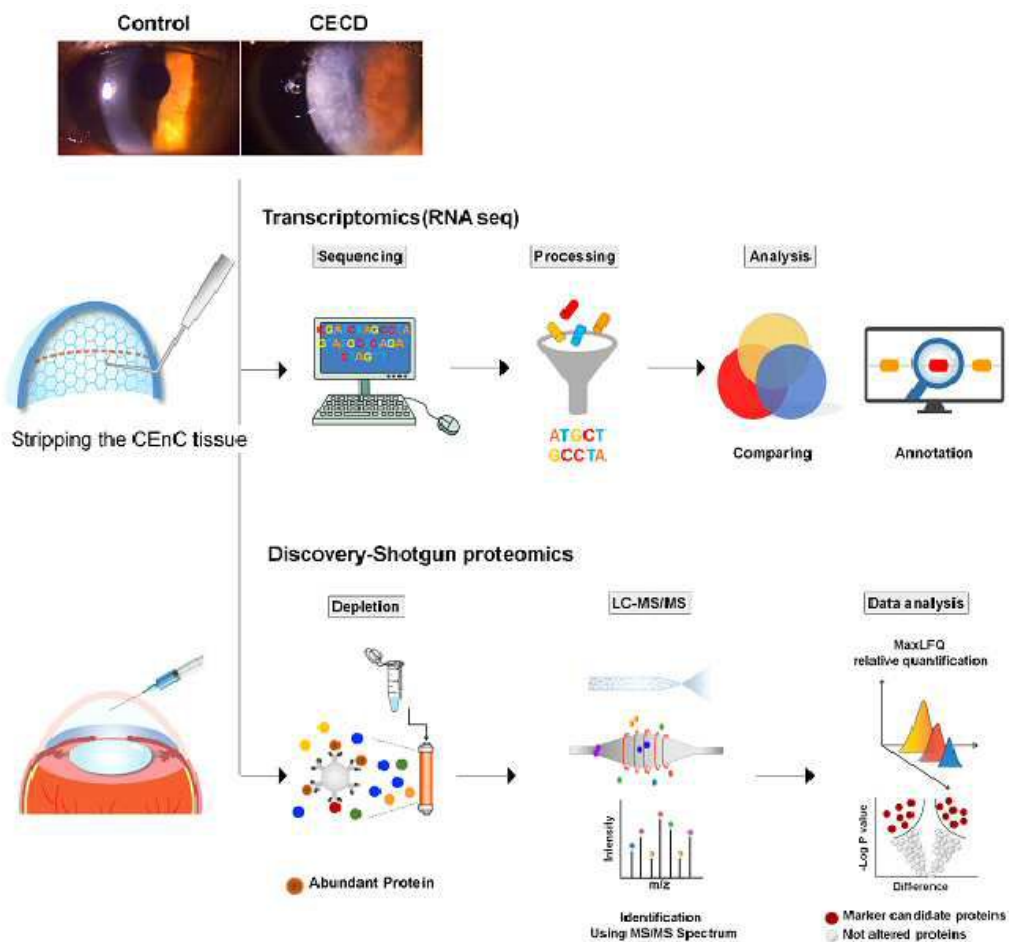


<Gene Ontology Molecular Function of DN-DEP>

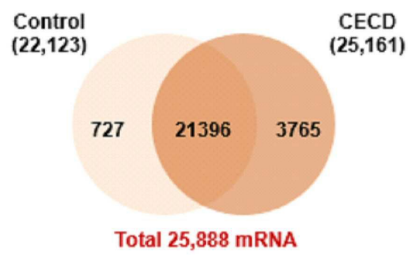
도면5



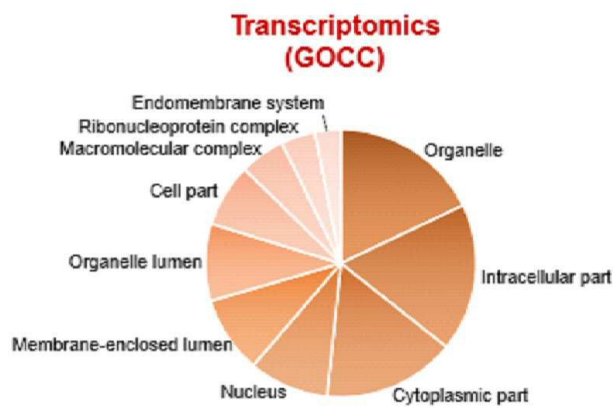
도면6



도면7

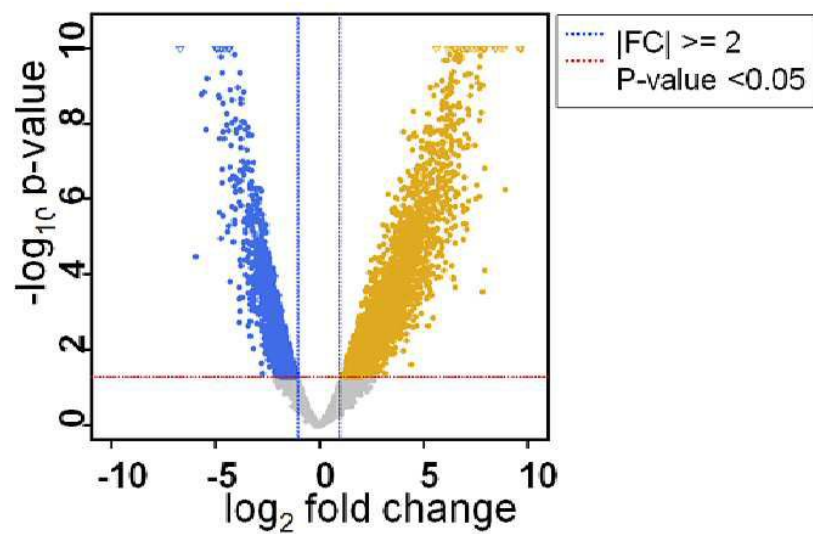


도면8

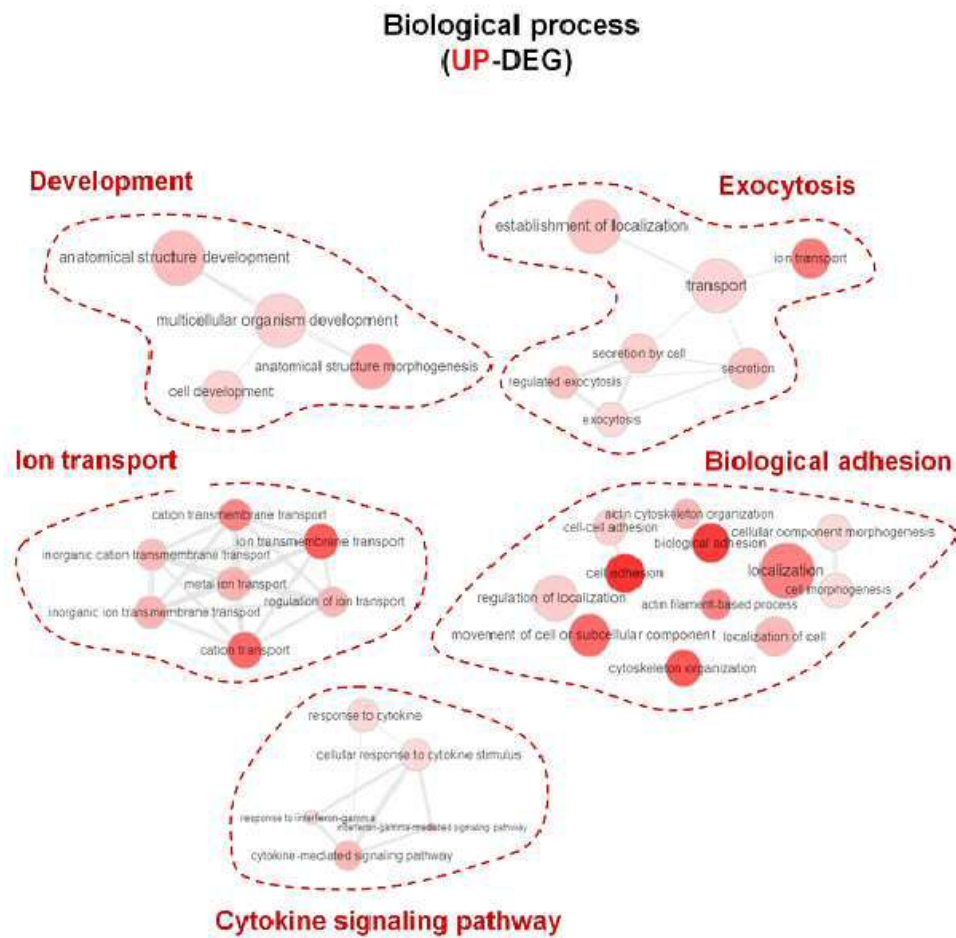


도면9

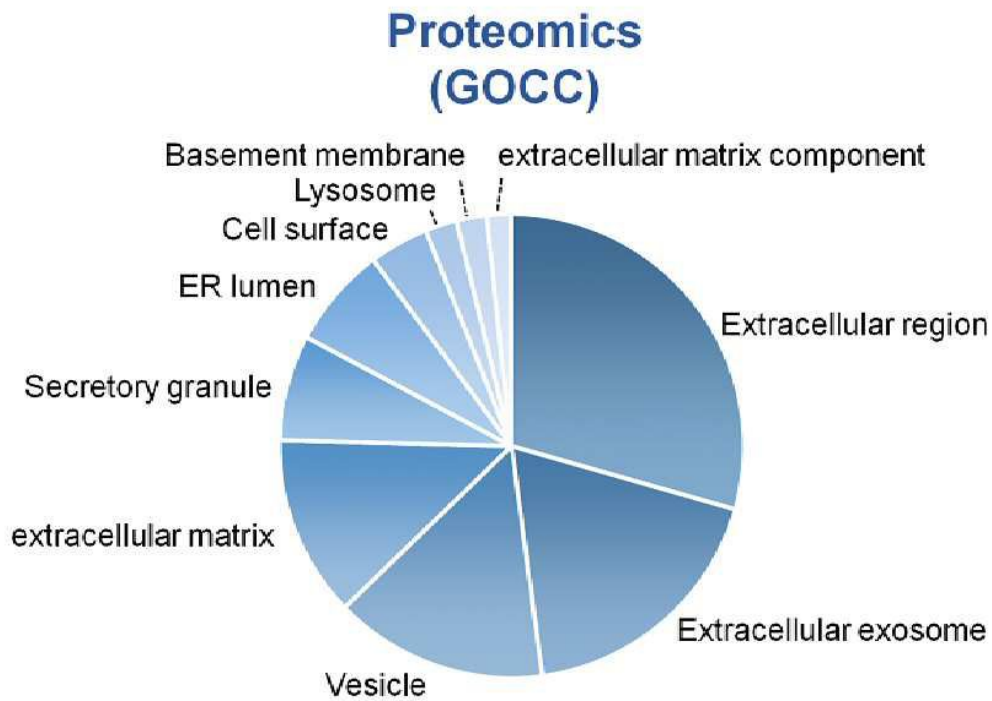
Transcriptome_Volcano plot (CECD/Control)



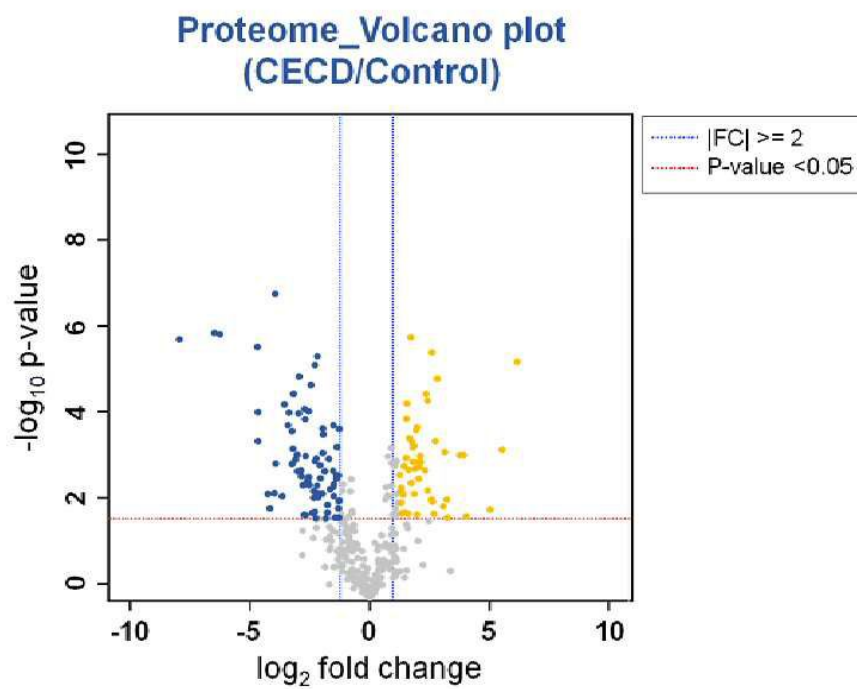
도면10



도면13

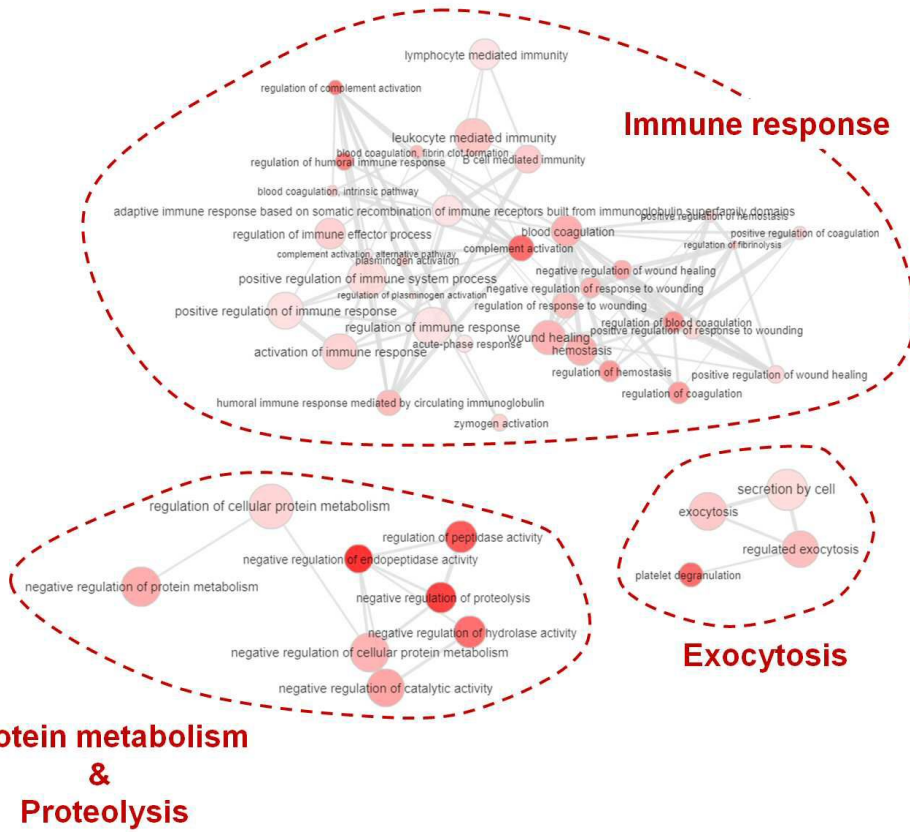


도면14



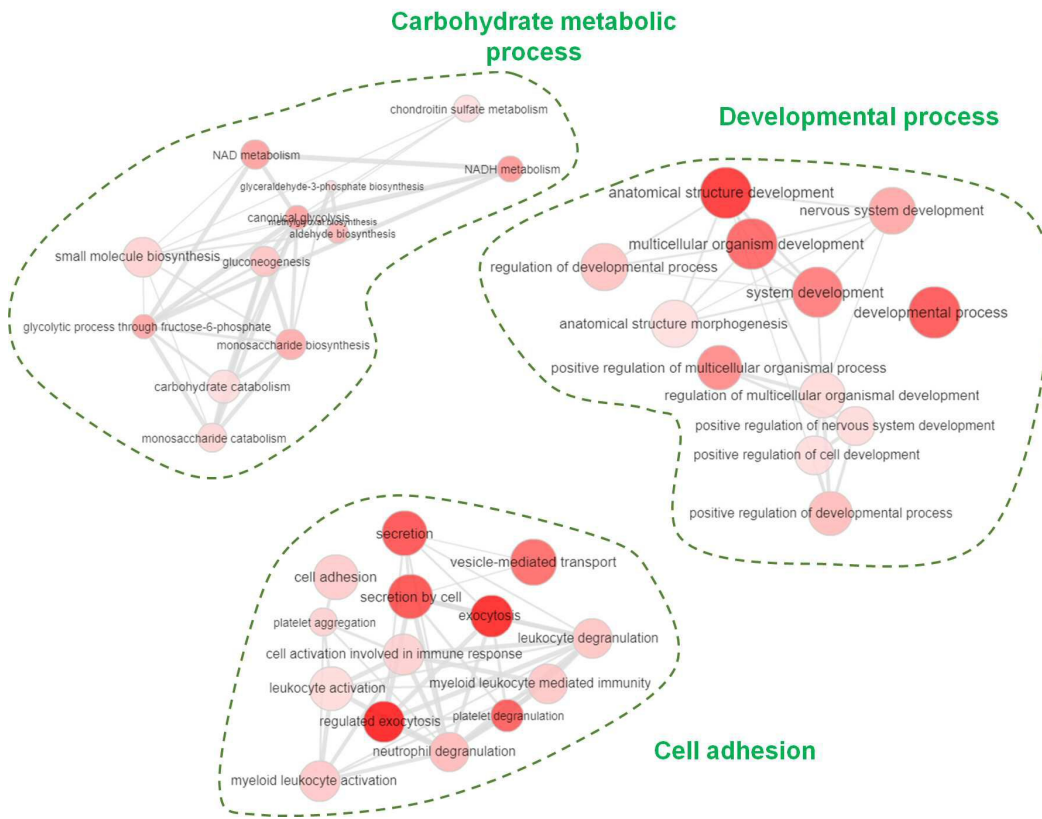
도면15

Biological process (UP-DEP)

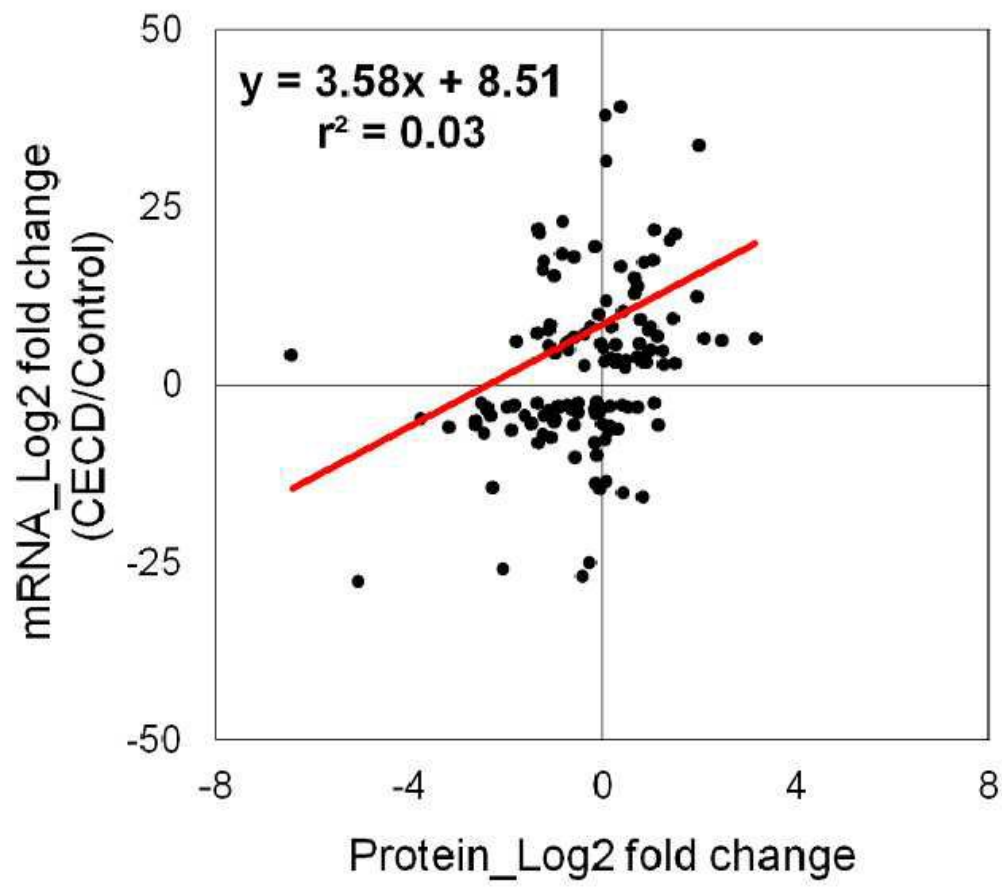


도면16

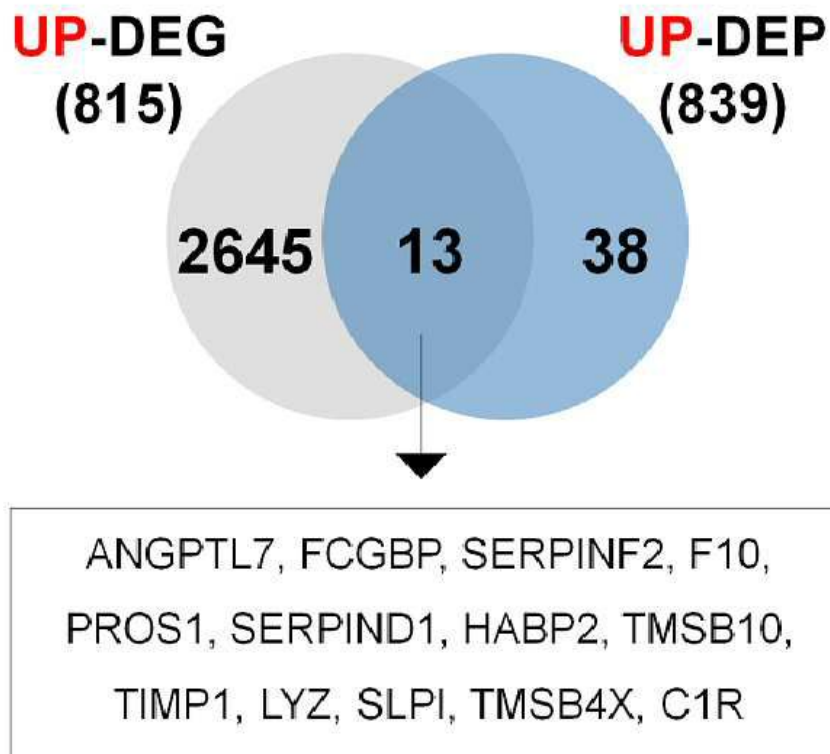
Biological process (DOWN-DEP)



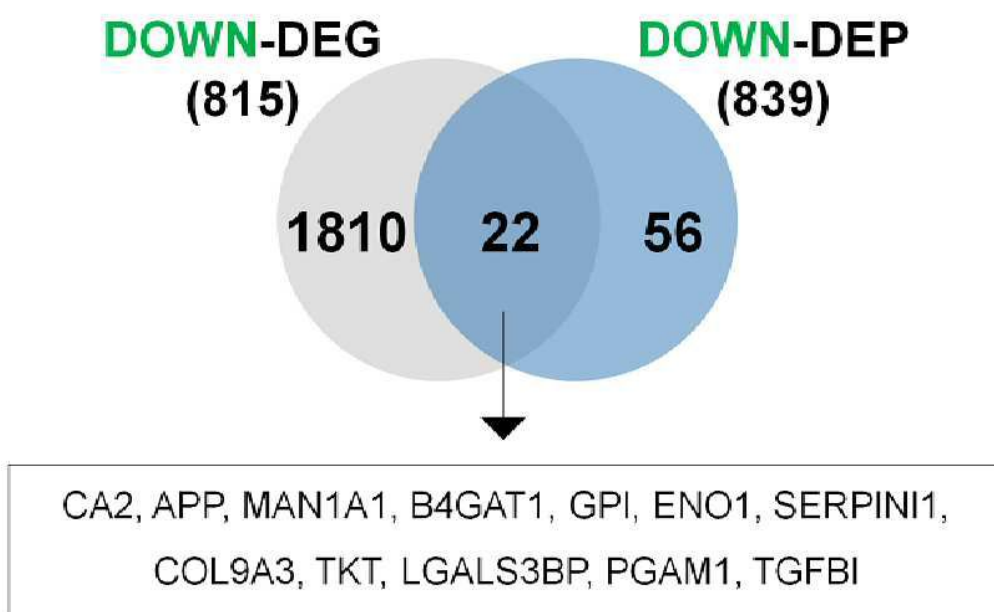
도면17



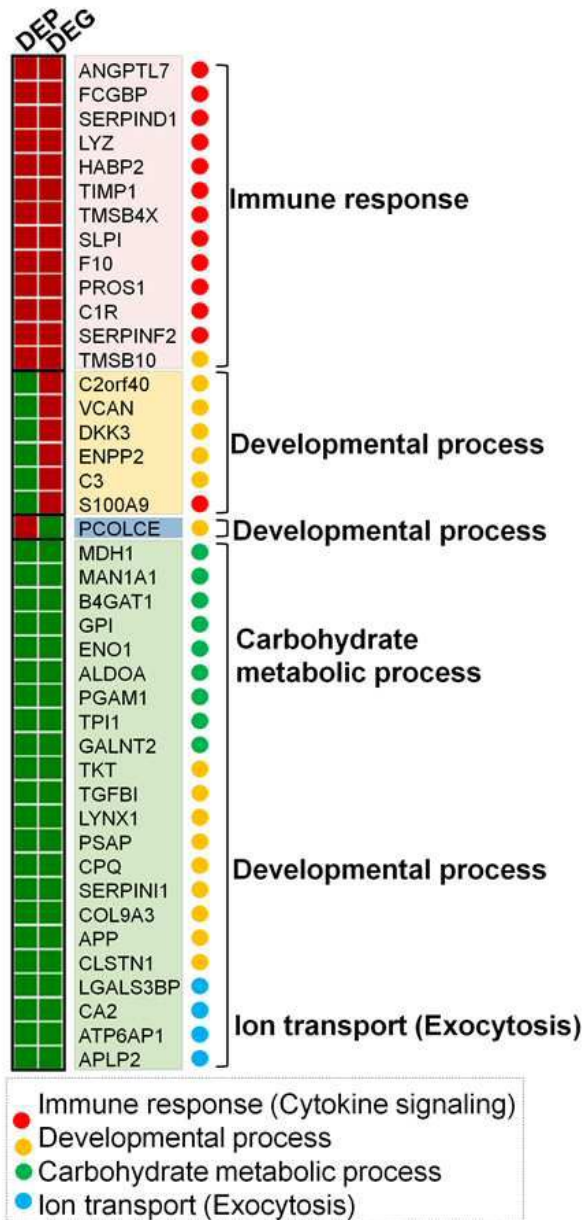
도면18



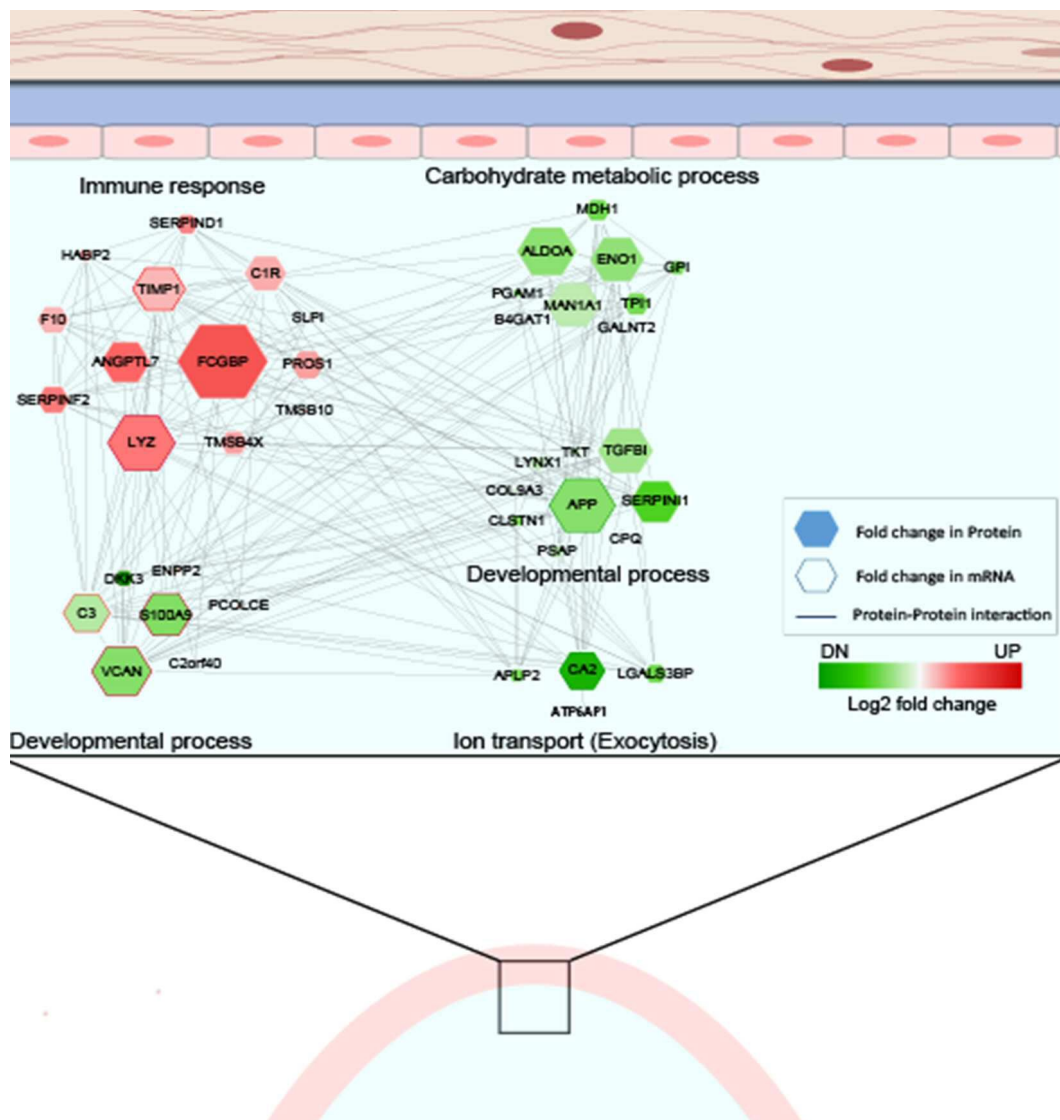
도면19



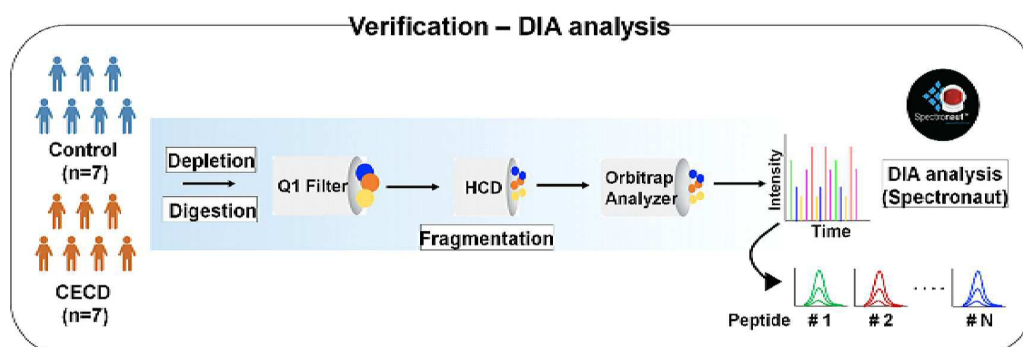
도면20



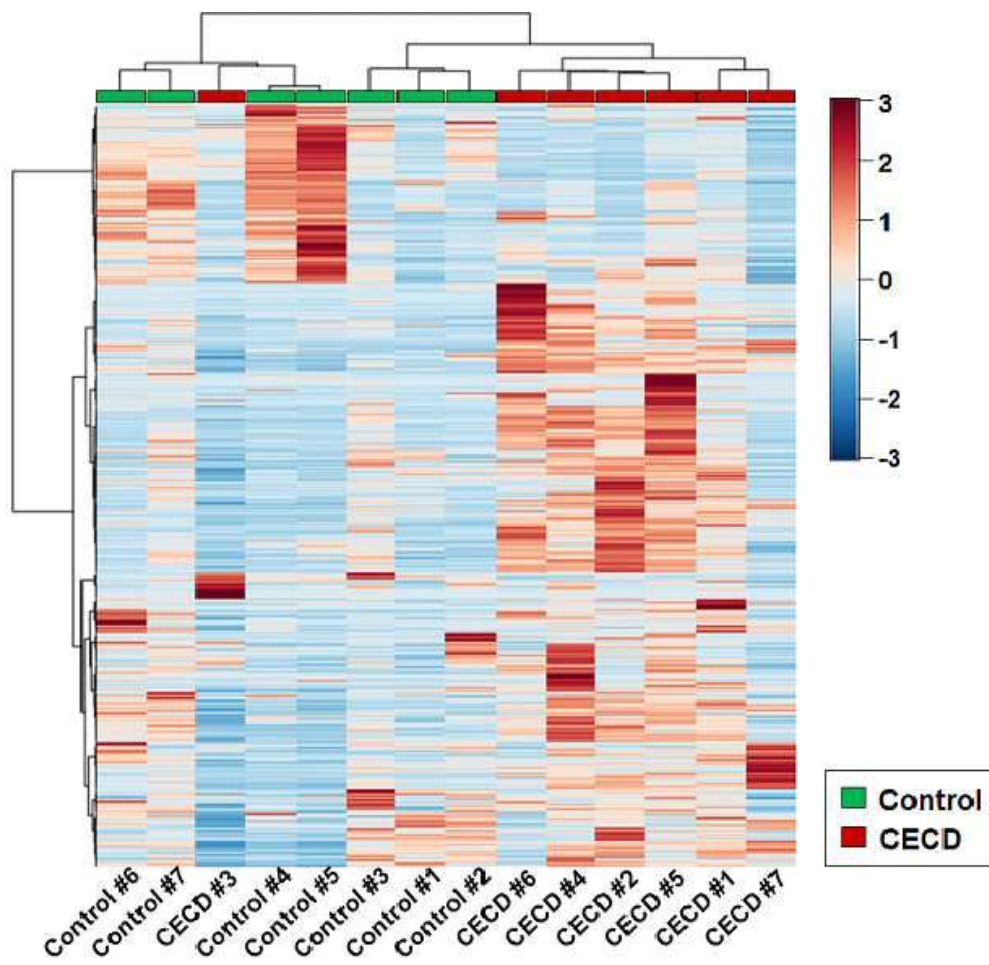
도면21



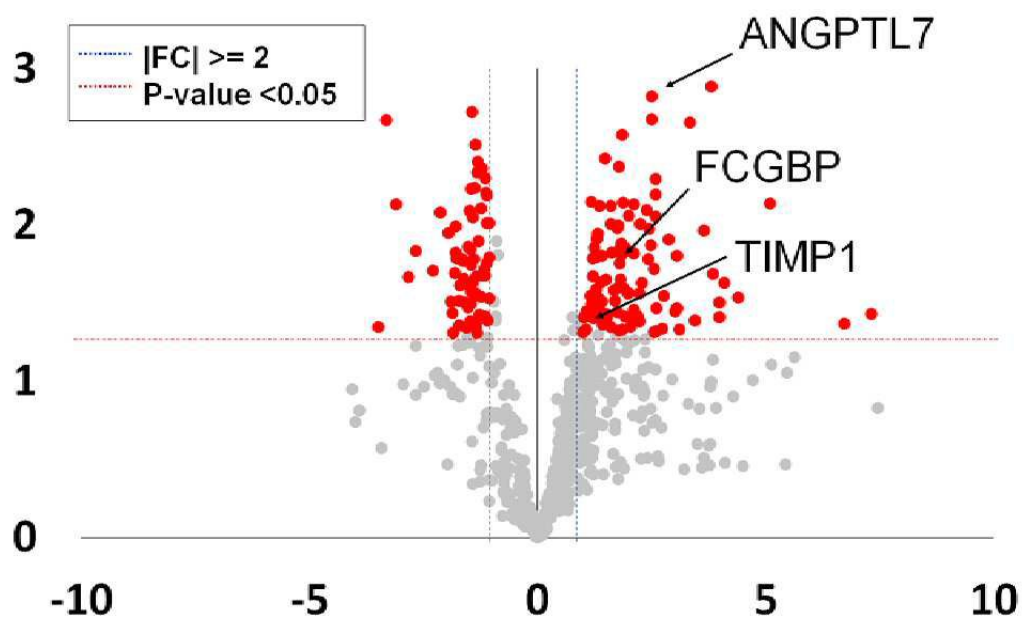
도면22



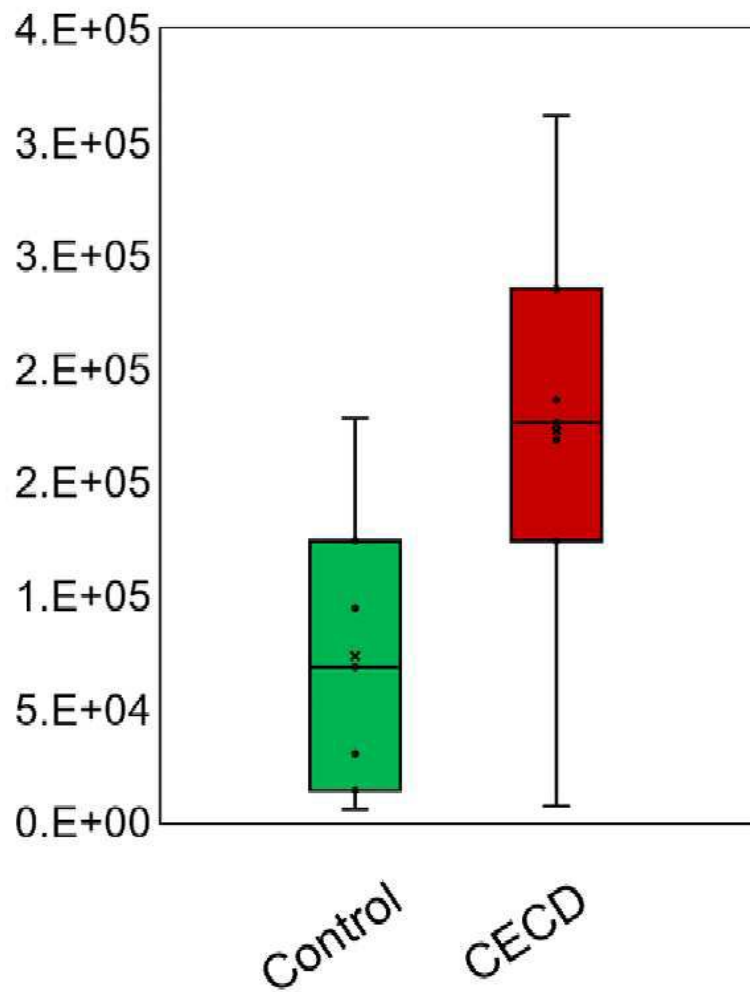
도면23



도면24



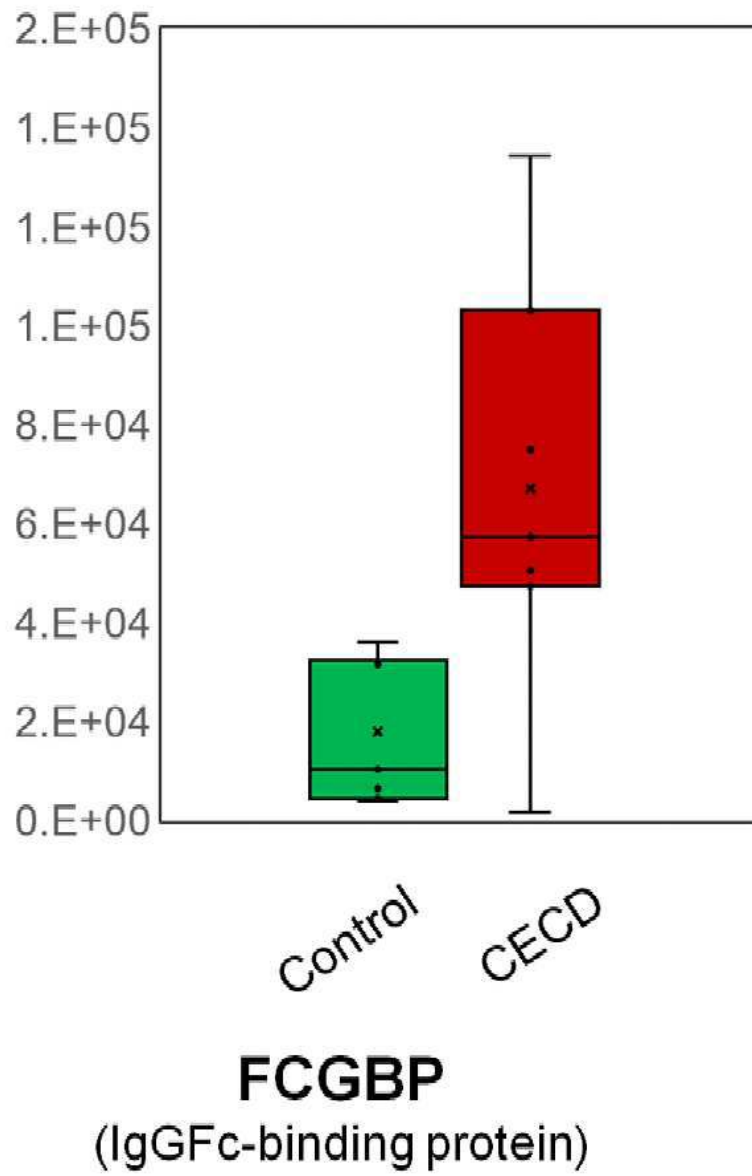
도면25



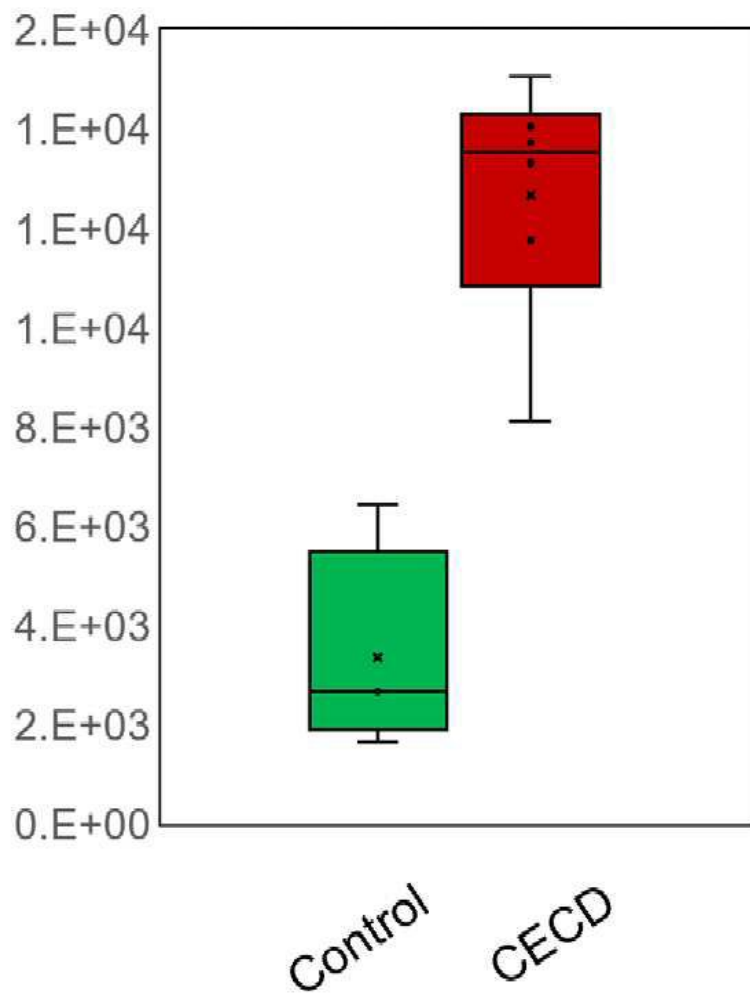
TIMP1

(metallopeptidase inhibitor 1)

도면26



도면27



ANGPTL7

(Angiopoietin-related protein 7)