(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0048794
(43) 공개일자 2021년05월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6876 (2018.01) *C12Q 1/689* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6876 (2018.05)
C12Q 1/689 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2019-0132918
(22) 출원일자 2019년10월24일
심사청구일자 2019년12월23일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
사회복지법인 삼성생명공익재단
서울특별시 용산구 이태원로55길 48 (한남동)
성균관대학교산학협력단
경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)
(72) 발명자
신성재
서울특별시 서대문구 연세로 50
고원중
서울특별시 강남구 일원로 81
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이재영

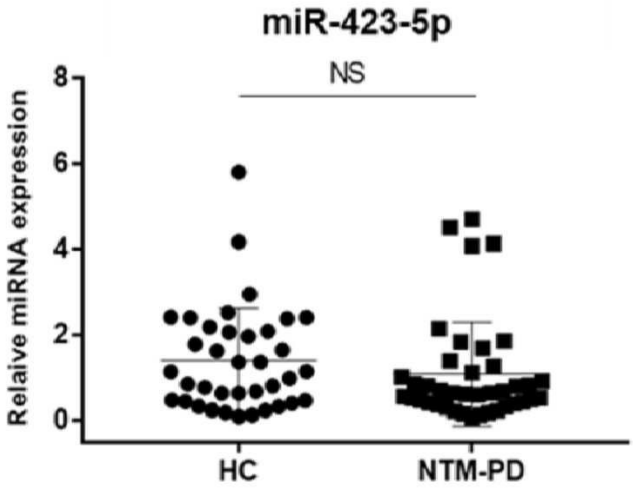
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **비결핵 항산균에 의한 감염 또는 감염 질환의 진단용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 비결핵 항산균에 의한 감염 또는 감염 질환을 진단하기 위한 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도14



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/158 (2013.01)
C12Q 2600/178 (2013.01)
(72) 발명자
한선애
서울특별시 강남구 일원로 81
전병우
서울특별시 강남구 일원로 81
김수영
서울특별시 강남구 일원로 81

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2018R1A2A1A05018309
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 유전자 분석기반 비결핵항산균 폐질환의 항생제 내성기전연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 성균관대학교
연구기간 2018.03.01 ~ 2019.08.21
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016R1A6A3A11932695
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 학문후속세대양성
연구과제명 비-결핵 항산균 폐질환의 숙주감수성 인자 발굴을 위한 T세포 분화 조절 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 성균관대학교
연구기간 2016.11.01 ~ 2019.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

hsa-miR-484, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-625-3p 및 hsa-miR-4732-5p로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환의 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 비결핵 항산균은 마이코박테리움 아비움(M. avium), 마이코박테리움 압세수스(M. abscessus), 마이코박테리움 플라베센스(M. flavescence), 마이코박테리움 아프리카눔(M. africanum), 마이코박테리움 보비스(M. bovis), 마이코박테리움 첼로네(M. chelonae), 마이코박테리움 셀라툼(M. celatum), 마이코박테리움 포르투이툼(M. fortuitum), 마이코박테리움 고르도네(M. gordonae), 마이코박테리움 가스트리(M. gastri), 마이코박테리움 헤모필룸(M. haemophilum), 마이코박테리움 인트라셀루라레(M. intracellulare), 마이코박테리움 칸사시이(M. kansasii), 마이코박테리움 말모엔스(M. malmoense), 마이코박테리움 마리눔(M. marinum), 마이코박테리움 스줄가이(M. szulgai), 마이코박테리움 테레(M. terrae), 마이코박테리움 스크로풀라세움(M. scrofulaceum), 마이코박테리움 울서란스(M. ulcerans), 마이코박테리움 시미애(M. simiae) 및 마이코박테리움 제노피(M. xenopi)로 구성된 군으로부터 선택되는, 바이오마커 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 비결핵 항산균 감염 질환은 비결핵 항산균 감염에 의한 폐 질환, 림프절염, 피부·연조직·골감염증 또는 파종성 질환인, 바이오마커 조성물.

청구항 4

hsa-miR-484, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-625-3p 및 hsa-miR-4732-5p로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환의 진단용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 hsa-miR-484, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-625-3p 및 hsa-miR-4732-5p로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 진단용 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 비결핵 항산균은 마이코박테리움 아비움(M. avium), 마이코박테리움 압세수스(M. abscessus), 마이코박테리움 플라베센스(M. flavescence), 마이코박테리움 아프리카눔(M. africanum), 마이코박테리움 보비스(M. bovis), 마이코박테리움 첼로네(M. chelonae), 마이코박테리움 셀라툼(M. celatum), 마이코박테리움 포르투이툼(M. fortuitum), 마이코박테리움 고르도네(M. gordonae), 마이코박테리움 가스트리(M. gastri), 마이코박테리움 헤모필룸(M. haemophilum), 마이코박테리움 인트라셀루라레(M. intracellulare), 마이코박테리움 칸사시이(M. kansasii), 마이코박테리움 말모엔스(M. malmoense), 마이코박테리움 마리눔(M. marinum), 마이코박테리움 스줄가이(M. szulgai), 마이코박테리움 테레(M. terrae), 마이코박테리움 스크로풀라세움(M. scrofulaceum), 마이코박테리움 울서란스(M. ulcerans), 마이코박테리움 시미애(M. simiae) 및 마이코박테리움 제노피(M. xenopi)로 구성된 군으로부터 선택되는, 진단용 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 비결핵 항산균 감염 질환은 비결핵 항산균 감염에 의한 폐 질환, 림프절염, 피부·연조직·골감염증 또는 파종성 질환인, 진단용 조성물.

청구항 8

제4항 내지 제7항 중 어느 한 항의 진단용 조성물을 포함하는 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환의 진단용 키트.

청구항 9

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 hsa-miR-484, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-625-3p 및 hsa-miR-4732-5p로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환을 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 및 뇌척수액(cerebrospinal fluid) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 정보 제공 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 발현 수준을 측정하는 단계는 상기 hsa-miR-484, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-625-3p 및 hsa-miR-4732-5p로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 사용하여 수행되는, 정보 제공 방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 발현 수준을 측정하는 단계는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR (competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법 (RPA: RNase protection assay), 노던 블랏팅 (Northern blotting), DNA를 포함한 핵산 마이크로어레이 또는 그 조합을 이용하여 수행되는, 정보 제공 방법.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 상기 hsa-miR-484, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-625-3p 및 hsa-miR-4732-5p로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 증가된 경우, 비결핵 항산균에 의해 감염되었거나 감염 가능성이 높거나, 또는 감염 질환이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는 단계를 더 포함하는, 정보 제공 방법.

청구항 14

제9항에 있어서,

상기 비결핵 항산균은 마이코박테리움 아비움(M. avium), 마이코박테리움 압세수스(M. abscessus), 마이코박테

리움 플라베센스(M. flavescence), 마이코박테리움 아프리카눔(M. africanum), 마이코박테리움 보비스(M. bovis), 마이코박테리움 첼로네(M. chelonae), 마이코박테리움 셀라툼(M. celatum), 마이코박테리움 포르투이툼(M. fortuitum), 마이코박테리움 고르도네(M. gordonae), 마이코박테리움 가스트리(M. gastri), 마이코박테리움 헤모필룸(M. haemophilum), 마이코박테리움 인트라셀루라레(M. intracellulare), 마이코박테리움 칸사시이(M. kansasii), 마이코박테리움 말모엔스(M. malmoense), 마이코박테리움 마리눔(M. marinum), 마이코박테리움 스줄가이(M. szulgai), 마이코박테리움 테레(M. terrae), 마이코박테리움 스크로풀라세움(M. scrofulaceum), 마이코박테리움 울서란스(M. ulcerans), 마이코박테리움 시미애(M. simiae) 및 마이코박테리움 제노피(M. xenopi)로 구성된 군으로부터 선택되는, 정보 제공 방법.

청구항 15

제9항에 있어서,

상기 비결핵 항산균 감염 질환은 비결핵 항산균 감염에 의한 폐 질환, 림프절염, 피부·연조직·골감염증 또는 파종성 질환인, 정보 제공 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 비결핵 항산균에 의한 감염 또는 감염 질환을 진단하기 위한 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 마이코박테리움 (Mycobacterium) 속(屬)에는 결핵, 우형결핵 (牛形結核), 나병 (癩病)과 같이 사람과 동물에 심각한 질병을 일으키는 균 종 (species)뿐 아니라, 기회 감염균으로 일컬어지는 균 종, 그리고 자연환경에서 볼 수 있는 사물 (死物) 기생의 균 종 (saprophytic species) 등 현재까지 약 72 종(species)이 알려져 있으며, 그 중 인체 질환과 관련된 것이 25종에 이르는 것으로 알려져 있다. 이러한 마이코박테리움 속은 일반적으로 사용되는 염색액으로는 용이하게 염색되지 않지만 일단 염색되면 알코올이나 염산 등으로 처리시에도 용이하게 탈색되지 않기 때문에 항산균이라고도 불린다.

[0003] 비결핵 항산균(Nontuberculous mycobacteria; NTM)은 결핵균(Mycobacterium tuberculosis complex) 및 나균(Mycobacterium leprae)을 제외한 항산균을 의미한다. 한편, 마이코박테리움 아비움 복합체(Mycobacterium avium complex; MAC)에 속하는 비결핵 항산균주 중 흔히 인간에게서 폐 질환을 일으키는 균주로는 공식적으로 대략 180 종 이상이 규명되었다. MAC는 주로 M. 아비움(M. avium)과 M. 인트라셀룰라(M. intracellulare)를 포함하고, 마이코박테리움 압세수스(Mycobacterium abscessus; MAB)는 주로 M. 압세수스 아종인 압세수스(M. abscessus subspecies abscessus)와 M. 압세수스 아종인 마실리엔스(M. abscessus subspecies massiliense)를 포함한다. 최근 전세계적으로 비결핵 항산균에 기인한 폐 감염 보고가 증가하고 있지만, 건강한 개체군으로부터 비결핵 항산균 폐 감염 질환자를 구별하기 위한 바이오마커나, 질환에 대한 병태 생리의 연구가 부족한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 일 목적은 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환을 진단하기 위한 바이오마커 조성물을 제공하고자 한다.

[0005] 본 발명의 다른 목적은 일 목적은 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환을 진단하기 위한 조성물을 제공하고자 한다.

[0006] 본 발명의 또 다른 목적은 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환을 진단하기 위한 키트를 제공하고자 한다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환을 진단하기 위한 정보 제공 방법을 제공하고자 한다.

[0008] 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

[0009] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, hsa-miR-484, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-625-3p 및 hsa-miR-4732-5p로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환의 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

[0010] 본 발명의 명세서에서 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체 즉 검사 대상자의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.

[0011] 본 발명에 따른 진단용 바이오마커는 비결핵 항산균의 감염자 또는 감염 후 질환이 발병한 자를 건강한 정상 대조군과 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상 대조군에 비하여 비결핵 항산균에 의해 감염된 대상체 유래의 생물학적 시료에서 증가 또는 감소 양상을 보이는 핵산, 특히 miRNA, 또는 cRNA 또는 cDNA를 포함한다.

[0012] 본원에 사용된 용어 "miR", "miRNA" 또는 "마이크로 RNA" 또는 "마이크로알엔에이"는 표적 RNA의 분해(degradation)를 촉진시키거나 또는 그들의 번역을 억제시킴으로써 유전자 발현을 전사 후에 조절하는 21 내지 23개의 비코딩 RNA를 말한다. 본원에 사용된 miRNA의 성숙 서열은 miRNA 데이터베이스(http://www.mirbase.org)에서 얻을 수 있다. 2016년 10월 현재 miRNA 데이터베이스(21판, miRBase)에 의하면 223개 종에서 유래한 35,828개의 성숙 miRNA가 등록되어 있다. 일반적으로 마이크로 RNA는 pre-miRNA라 불리는 헤어핀 구조를 갖는 약 70-80 nt (nucleotide) 길이의 전구체로 전사된 후, RNAse III 효소인 Dicer에 의해 잘려 성숙된 형태로 생성된다. 마이크로 RNA는 miRNP라 불리는 리보뉴클레오복합체를 형성하여 표적 부위에 상보적 결합을 통해 표적 유전자를 절단하거나, 번역을 억제한다. 30% 이상의 인간 miRNA는 클러스터로 존재하며, 하나의 전구체로 전사된 후, 절단과정을 거쳐 최종 성숙 miRNA가 형성된다.

[0013] 본 발명에서 상기 본 발명에서 상기 hsa-miR-484, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-625-3p 및 hsa-miR-4732-5p miRNA는 인간 유래로 각각 하기 표 1에 나타낸 바와 같은 성숙 서열을 가지며, 이의 전구 서열 역시 포함하는 것이며, 또는 이들 서열의 cRNA 또는 cDNA를 포함한다.

표 1

[0014]

miRNA	서열 정보
hsa-miR-484	UCAGGCUCAGUCCCCUCCCGAU(서열번호 1)
hsa-miR-584-5p	UUAUGGUUUGCCUGGGACUGAG(서열번호 2)
hsa-miR-625-3p	AGGGGGAAAGUUCUAUAGUCC(서열번호 3)
hsa-miR-4732-5p	UGUAGAGCAGGGAGCAGGAAGCU(서열번호 4)

[0015] 본 발명에서 상기 비결핵 항산균은 마이코박테리움 아비움(M. avium), 마이코박테리움 압세수스(M. abscessus), 마이코박테리움 플라베센스(M. flavescence), 마이코박테리움 아프리카눔(M. africanum), 마이코박테리움 보비스(M. bovis), 마이코박테리움 첼로네(M. chelonae), 마이코박테리움 셀라툼(M. celatum), 마이코박테리움 포르투이툼(M. fortuitum), 마이코박테리움 고르도네(M. gordonae), 마이코박테리움 가스트리(M. gastri), 마이코박테리움 헤모필룸(M. haemophilum), 마이코박테리움 인트라셀루라레(M. intracellulare), 마이코박테리움 칸사시이(M. kansasii), 마이코박테리움 말모엔스(M. malmoense), 마이코박테리움 마리눔(M. marinum), 마이코박테리움 스줄가이(M. szulgai), 마이코박테리움 테레(M. terrae), 마이코박테리움 스크로풀라세움(M. scrofulaceum), 마이코박테리움 울서란스(M. ulcerans), 마이코박테리움 시미애(M. simiae) 및 마이코박테리움 제노피(M. xenopi)로 구성된 군으로부터 선택된 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0016] 본 발명에서 상기 비결핵 항산균 감염 질환은 상기 비결핵 항산균의 감염에 의해 나타나는 모든 임상적 증상을 포함하는 것으로, 상기 감염 질환은 폐 질환, 림프절염, 피부·연조직·골감염증 또는 파종성 질환 등을 포함할 수 있다.

[0017] 본 발명에서 상기 비결핵 항산균에 의한 감염성 폐 질환은 섬유공동형 (fibrocavitary form), 기관지 확장증형(nodular bronchiectatic form), 또는 이들의 조합인 것일 수 있다. 또한, 상기 감염성 폐 질환은 기침, 객담, 혈담, 발열, 호흡곤란, 흉통 또는 이들의 조합을 동반하는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명에서 상기 비결핵 항산균에 의한 감염성 폐 질환은 감염성 폐 질환을 일으키는 균으로, 예를 들면, 마이

코박테리움 아비움 복합체(M. avium complex), 마이코박테리움 칸사시이(M. kansasii), 마이코박테리움 압세수스(M. abscessus), 마이코박테리움 제노피(M. xenopi), 마이코박테리움 말모엔스(M. malmoense), 마이코박테리움 포르투이툼(M. fortuitum), 마이코박테리움 마리눔(M. marinum), 마이코박테리움 첼로네(M. chelonae), 마이코박테리움 고르도네(M. gordonae), 마이코박테리움 스줄가이(M. szulgai), 마이코박테리움 셀라툼(M. celatum), 마이코박테리움 스크로풀라세움(M. scrofulaceum), 마이코박테리움 테레(M. terrae) 또는 마이코박테리움 시미애(M. simiae)에 의한 감염성 폐 질환인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, hsa-miR-484, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-625-3p 및 hsa-miR-4732-5p로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환의 진단용 조성물에 관한 것이다.

[0021] 본 발명에서 상기 hsa-miR-484, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-625-3p 또는 hsa-miR-4732-5p의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 miRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0022] 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.

[0023] 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.

[0024] 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 뉴클레오사이드는 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 올리고뉴클레오티드에 포함되면, LNA는 보다 빠르게 상보적 뉴클레오티드 사슬과 쌍을 이루어 이중 나선의 안정성을 높일 수 있다.

[0025] 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, 뉴클레오티드 염기의 서열 및 서브유닛간 백본을 갖는 올리고머를 의미한다. 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다.

[0026] 본 발명에 따른 상기 hsa-miR-484, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-625-3p 및 hsa-miR-4732-5p의 정보는 알려져 있으므로, 당업자라면 이를 바탕으로 상기 단백질을 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드를 용이하게 디자인할 수 있을 것이다.

[0027] 본 발명에서 상기 비결핵 항산균은 마이코박테리움 아비움(M. avium), 마이코박테리움 압세수스(M. abscessus), 마이코박테리움 플라베센스(M. flavescence), 마이코박테리움 아프리카눔(M. africanum), 마이코박테리움 보비스(M. bovis), 마이코박테리움 첼로네(M. chelonae), 마이코박테리움 셀라툼(M. celatum), 마이코박테리움 포르투이툼(M. fortuitum), 마이코박테리움 고르도네(M. gordonae), 마이코박테리움 가스트리(M. gastri), 마이코박테리움 헤모필룸(M. haemophilum), 마이코박테리움 인트라셀루라레(M. intracellulare), 마이코박테리움 칸사시이(M. kansasii), 마이코박테리움 말모엔스(M. malmoense), 마이코박테리움 마리눔(M. marinum), 마이코박테리움 스줄가이(M. szulgai), 마이코박테리움 테레(M. terrae), 마이코박테리움 스크로풀라세움(M. scrofulaceum), 마이코박테리움 울서란스(M. ulcerans), 마이코박테리움 시미애(M. simiae) 및 마이코박테리움 제노피(M. xenopi)로 구성된 군으로부터 선택된 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명에서 상기 비결핵 항산균 감염 질환은 상기 비결핵 항산균의 감염에 의해 나타나는 모든 임상적 증상을 포함하는 것으로, 상기 감염 질환은 폐 질환, 림프절염, 피부·연조직·골감염증 또는 파종성 질환 등을 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명에서 상기 비결핵 항산균에 의한 감염성 폐 질환은 섬유공동형 (fibrocavitary form), 기관지 확장증형 (nodular bronchiectatic form), 또는 이들의 조합인 것일 수 있다. 또한, 상기 감염성 폐 질환은 기침, 객담, 혈담, 발열, 호흡곤란, 흉통 또는 이들의 조합을 동반하는 것일 수 있다.

[0030] 본 발명에서 상기 비결핵 항산균에 의한 감염성 폐 질환은 감염성 폐 질환을 일으키는 균으로, 예를 들면, 마이코박테리움 아비움 복합체(M. avium complex), 마이코박테리움 칸사시이(M. kansasii), 마이코박테리움 압세수스(M. abscessus), 마이코박테리움 제노피(M. xenopi), 마이코박테리움 말모엔스(M. malmoense), 마이코박테리움 포르투이툼(M. fortuitum), 마이코박테리움 마리눔(M. marinum), 마이코박테리움 첼로네(M. chelonae), 마이코박테리움 고르도네(M. gordonae), 마이코박테리움 스줄가이(M. szulgai), 마이코박테리움 셀라툼(M. celatum), 마이코박테리움 스크로풀라세움(M. scrofulaceum), 마이코박테리움 테레(M. terrae) 또는 마이코박테리움 시미애(M. simiae)에 의한 감염성 폐 질환인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에 따른 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환의 진단용 조성물을 포함하는 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환의 진단용 키트에 관한 것이다.

[0033] 본 발명에서는 상기 진단용 키트를 이용하여 비결핵 항산균의 감염 여부 또는 감염 가능성이나, 감염 질환의 발병 여부 또는 발병 가능성을 예측할 수 있고, 더 나아가서는 상기 비결핵 항산균의 감염 질환의 경과, 예후 또는 치료 효과에 대하여도 진단할 수 있다.

[0034] 본 발명의 진단용 조성물과, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환에 관한 정의는 상기 본 발명의 진단용 조성물에 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 혼잡을 피하기 위해 이하 그 기재를 생략한다.

[0035] 본 발명에서 상기 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다.

[0036] 본 발명의 진단용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있다.

[0037] 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 뉴클레오티드로서, 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.

[0039] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 hsa-miR-484, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-625-3p 및 hsa-miR-4732-5p로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 비결핵 항산균의 감염 질환을 진단하기 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

[0040] 본 발명에서 상기 "목적하는 개체"란 비결핵 항산균에 의한 감염 여부가 불확실한 개체로, 감염 가능성이 높은 개체를 의미한다.

[0041] 본 발명에서 상기 "생물학적 시료"는 개체로부터 얻어지거나 개체로부터 유래된 임의의 물질, 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것으로, 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물

(cell extract) 및 뇌척수액(cerebrospinal fluid) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 혈청일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0042] 본 발명에서 상기 발현 수준을 측정하는 단계는 비결핵 항산균에 의한 감염 또는 감염 질환의 발병 여부를 진단하기 위하여 목적하는 개체에서 상기 miRNA로, hsa-miR-484, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-625-3p 및 hsa-miR-4732-5p로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 존재 여부와 수준을 확인하는 과정으로써 miRNA 양의 측정일 수 있다. 이를 위하여, 본 발명에서는 상기 miRNA를 직접 분리하거나, 상기 miRNA에 대한 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 이용하여 측정할 수 있다.

[0043] 또한, 본 발명에서 상기 발현 수준을 측정하는 단계 시 miRNA 양의 분석 방법은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR (competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법 (RPA: RNase protection assay), 노던 블랏팅 (Northern blotting), DNA를 포함한 핵산 마이크로어레이 또는 그 조합을 이용하는 것을 포함할 수 있다. RT-PCR은 RNA를 분석하는 방법으로, miRNA를 역전사하여 얻어진 cDNA를 PCR로 증폭하여 분석하는 방법이다. 상기 RT-PCR 중 증폭 단계에서 상기 유전자에 특이적으로 제조된 프라이머 쌍을 사용하며, RT-PCR 후 전기영동하여 밴드 패턴과 밴드의 두께를 확인함으로써 상기 유전자의 miRNA 발현 여부와 발현 수준을 확인할 수 있고 이를 정상 대조군과 비교함으로써, 개체의 뇌졸중의 유무 또는 그 발병 정도를 간편하게 판단할 수 있다.

[0044] 이러한 방법은 예를 들면 핵산 교잡, 중합, 증폭 방법 및 교잡기반 라이게이션 등을 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다.

[0045] 본 발명에서 상기 핵산 교잡은 핵산이 고상의 지지체, 예를 들면 비드, 나노입자 또는 바이오칩 어레이(마이크로에레이)에 결합된 형태로 또는 인시츄 교잡을 이용하여 수행될 수 있다. miRNA 마이크로어레이 기술은 동시에 다수의 miRNA의 분석을 가능하게 한다. 본 발명에 따른 miRNA에 상보적인 뉴클레오타이드는 코팅된 고상 지지체에 스폿팅되거나 또는 인시츄 합성 방법으로 고상지지체에 스폿팅 될 수 있다. 실시예에서 생물학적 시료로부터 분리된 miRNA는 상기 고상지지체 상의 상보적인 서열, 예를 들면 프로브와의 교잡 후에 효소반응에 의해 검출되는 표지(예를 들면 바이오틴, 형광염료)의 혼입에 의해 검출될 수 있다. 다른 실시예에서, 생물학적 시료에서 분리된 miRNA는 형광물질로 표지되어, 상응하는 서열과 결합하고, 그 결과 방출된 형광 신호는 특정 miRNA의 존재를 나타낸다. 마이크로어레이 제조 기술은 예를 들면 Schena et al., 1996, Proc Natl Acad Sci USA.93(20):10614-9; Schena et al., 1995, Science 270(5235):467-70; 및 U.S. Pat. Nos. 5,599,695, 5,556,752 또는 5,631,734를 참조할 수 있다. 이런 경우, 검출용 물질 또는 시약은 고상의 지지체에 결합된 형태로 제공될 수 있다. 검출시약은 검출을 위해 직접적 또는 샌드위치 형태로 간접적으로 표지될 수 있으며, 후술하는 바를 참조할 수 있다.

[0046] 본 발명에서 상기 miRNA의 검출에는 핵산 중합 또는 증폭 방법이 또한 사용될 수 있으며, 특히 미량으로 존재하는 miRNA 검출에 적합하다. 공지된 다양한 핵산 증폭 또는 합성 방법이 사용될 수 있으며, 예를 들면 역전사 반응, 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 RT-PCR, PCR, 실시간 PCR, 정량 RT-PCR, 정량 PCR, NASBA(Nucleic Acid Sequence-Base Amplification), LCR(Ligase Chain Reaction), 다중 연결 프로브 증폭(Multiple ligatable probe amplification), Invader 기술(Third Wave), SDA(Strand Displacement Amplification), TMA(Transcription Mediated Amplification) 또는 Eberwine RNA 증폭 등을 포함할 수 있으나 이로 제한하는 것은 아니다.

[0047] 전형적인 PCR 방법은 특정 표적 서열의 증폭을 위해, 주형의 변성, 포워드 및 리버스 프라이머가 표적 서열에 결합하는 어닐링 및 열안정 중합효소에 의한 신장의 단계로 구성되는 3 단계가 여러 주기, 예를 들면 통상 20회 이상이 수행된다. 대안적으로 어닐링 및 신장은 동일한 단계에서 수행되기도 한다. 성숙한 miRNA는 단일가닥이기 때문에, PCR 전에 역전사 반응이 먼저 수행될 수 있다. 역전사 반응에는 프라이머와 역전사 효소의 사용을 필요로 한다.

[0048] PCR 및 정량 PCR에서는 포워드 및 리버스의 한 세트의 프라이머 또는 상기 프라이머와 함께 프로브가 사용될 수 있다. 프로브 및 프라이머의 길이는 교잡온도, 표적 서열의 구성, 표적 서열의 복잡성 등과 같은 다양한 요소에 따라 결정된다. 예를 들면 프로브는 7 뉴클레오타이드 이상, 프라이머의 길이는 약 10 내지 35 뉴클레오타이드, 예를 들면 15, 20, 25, 30 또는 35 뉴클레오타이드이다. 포워드 프라이머는 바이오마커 miRNA에 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 하나의 서열을 포함하며, 5'쪽에 비상보적 서열을 추가로 포함할 수 있다. 리버스 프라이머의 서열은 바이오마커의 서열과는 독립적일 수 있으며, 다수의 miRNA 바이오마커가 한 종류의 리버스 프라이머로 증폭될 수 있거나, 또는 바이오마커에 특이적인 하나 이상의 서열을 포함할 수 있다.

[0049] 증폭 산물은 증폭 과정에서 또는 증폭 후에 당업계에 공지된 다양한 방법으로 분석될 수 있다. 이러한 방법은 당업계에 공지된 것으로서 예를 들면 젤 전기영동, 실시간 PCR 분석, SSCP(single strand conformational polymorphism), RFLP(restriction fragment length polymorphism), CZE(capillary zone electrophoresis), WAVE(HPLC-based nucleic acid analyzing technology), 마이크로칩을 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다.

[0050] 본 발명에서는 역전사 반응 후에 실시간 정량 PCR 방법, 즉 RT-PCR이 사용되며, 이는 검체의 RNA를 분리한 후, 이로부터 프라이머, 예를 들면 stem-loop를 형성할 수 있는 stem-loop 프라이머를 이용하여 cDNA를 합성한 후, 이를 주형으로 하여, 여기에, 포워드 및 리버스 프라이머, 또는 포워드 및 리버스 프라이머와 프로브의 조합을 사용하여 end-point로 또는 SYBR과 같은 핵산에 결합하는 염료를 사용하여 실시간으로, 또는 형광물질로 표지된 TaqMan 방식의 프로브를 사용한 stem-loop RT 기반의 핵산증폭방법이 사용된다. 이러한 방법은 예를 들면 Schmittgen, T.D. et al(2008) Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. Methods 44, 31.8.; 및 Chen et al., Nucleic Acids Research, 33(20):e179, 2005 등을 참조할 수 있다.

[0051] 또한 교잡에 기반한 라이게이션 기술이 miRNA의 정량 분석에 사용될 수 있다.

[0052] 이러한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들면 OLA(oligonucleotide ligation) 및 예를 들면 미국공개공보 2006-0078894에 기재된 HARP-유사 프로브를 사용한 방법과 같은 표적 핵산 서열에 결합한 검출가능한 프로브를 결합하지 않은 프로브로부터 분리해 내는 방법 등을 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 라이게이션을 이용한 다른 기술은 MLPA(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)(Schouten et al., Nucleic Acids Research 30:e57 (2002))을 들 수 있다. 상기 기술은 한 쌍의 프로브가 표적서열에 나란히 결합한 경우에만 라이게이션이 일어나는 방식으로 결합하며, 라이게이션된 프로브는 PCR에 의해 증폭될 수 있도록 프라이머 결합부위를 포함한다.

[0053] 상술한 바와 같은 교잡, 증폭 및/또는 교잡 기반 라이게이션 반응에서 표적의 염색 또는 표지, 프라이머 또는 프로브의 염색 또는 표지를 통해 교잡 또는 증폭된 miRNA 산물을 검출할 수 있다. 검출에는 당업계의 공지의 기술이 사용될 수 있으며, 당업자라면 검출의 민감도 및/또는 표적의 양을 고려하여 적절한 방법을 선택할 수 있을 것이다. 검출 방법의 민감도 및/또는 표적의 양에 따라 검출 전에 증폭이 필요하지 않을 수도 있다.

[0054] 또한 miRNA는 직접적 또는 간접적 방법에 의해 검출될 수 있다. 직접적 방법에서 miRNA는 이에 결합된 검출 가능한 표지로 표지되고 이어 비드와 같은 고상지지체에 연결된 프로브에 결합된 후 표지된 miRNA를 스크리닝하여 검출된다. 대안적으로 직접 검출에 표지된 프로브가 사용될 수 있으며, miRNA와 특이적 결합 후 표지된 프로브의 스크리닝을 통해 검출된다. 실시예에서는 증폭된 miRNA는 목적하는 핵산을 캡쳐할 수 있는 프로브와 컨쥬게이션된 비드를 이용하여 검출된다. 다른 실시예에서 프로브는 형광물질로 표지될 수 있다.

[0055] 본 발명에서는 간접적 검출 방법이 또한 사용될 수 있다. 예를 들면 바이오티닐화 프로브를 스트렙타비딘 컨쥬게이트된 염료를 사용하여 결합된 핵산을 검출할 수 있다. 스트렙타비딘 분자는 증폭된 miRNA의 바이오틴 표지에 결합하며, 결합된 miRNA는 스트렙타비딘에 컨쥬게이트된 염료에 의해 검출된다. 이러한 스트렙타비딘에 컨쥬게이트된 염료는 당업계에 공지되어 있으며 예를 들면 Phycolink(R) Streptavidin R-Phycoerythrin (PROzyme)이 사용될 수 있다.

[0056] 본 발명에서 검출을 위한 표지자(label)는 이로 제한하는 것은 아니나, 광방출, 광산란, 광흡수 물질과 같은 검출가능한 형광, 화학발광 또는 생발광 신호를 생성 또는 소거할 수 있는 화합물을 포함하며, 예를 들면 Garman A., Non-Radioactive Labeling, Academic Press 1997을 참조할 수 있다. 형광 물질은 예를 들면 이로 제한하는 것은 아니나, 플루오레신(예를 들면 미국특허 6,020,481), 로다민(예를 들면 미국 특허 6,191,278), 벤조페녹사진(예를 들면 미국특허 6,140,500), 공여체와 수용체를 포함하는 에너지 전이 형광 염료(예를 들면 미국특허 공개특허 10-2016-0022017 5,945,526) 및 사이아나인(예를 들면 WO1997-45539), 리사민, 파이코에리쓰린, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, FluorX (Amersham), Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPYR6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade Blue, 6-FAM, Fluorescein Isothiocyanate, HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, REG, Rhodamine Green, Rhodamine Red, Renographin, ROX, SYPRO, TAMRA, Tetramethylrhodamine, 및/또는 Texas Red는 물론 기타 검출가능한 신호를 생성할 수 있는 임의의 형광 모이어티를 포함한다. 형광염료는 6-carboxyfluorescein; 2',4',1,4,-tetrachlorofluorescein; 및 2',4',5',7',1,4-hexachlorofluorescein를 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 실시예에서는 형광 표지로 SYBR-Green, 6-carboxyfluorescein ("FAM"), TET, ROX, VICTM, 또는 JOE가 사용된다. 실시예에서는 리포터 형광물질과 소거형광물질의 두 개의 형광물질로 표지된

프로브가 사용되며, 이 경우 형광물질은 구분이 가능한 파장이 스펙트럼을 방출하는 형광물질이 사용된다.

[0057] 또한 본 발명에서 표지자는 핵산의 결합을 향상, 안정화 또는 핵산의 결합에 영향을 미칠 수 있는 화합물 예를 들면 에씨디움 브로마이드 및 SYBR-Green을 포함하는 인터칼레이터, 마이너그루브 결합체 및 가교가능한 작용기가 사용될 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니며, Blackburn et al., eds. "DNA and RNA Structure" in Nucleic Acids in Chemistry and Biology (1996)을 참조할 수 있다.

[0058] 본 발명에서 상기 miRNA 정량은 또한 다음의 문헌을 참조하여 수행될 수 있으며, 예를 들면 miRNA microarrays (Calin, G.A. et al.(2004) Proc Natl Acad Sci USA 101,11755.60.), SYBR-based miRNA RT-qPCR assays (Sharbati-Tehrani et al.(2008) miR-Q: a novel quantitative RT-PCR approach for the expression profiling of small RNA molecules such as miRNAs in a complexsample. BMC Mol Biol 9, 34.), BeadArray (Chen, J. et al. (2008) Highly sensitive and specific microRNA expression profiling using BeadArray technology. Nucleic Acids Res 36, e87.), Invader Assays (Allawi, H.T. et al.(2004) Quantitationof microRNAs using a modified Invader assay. RNA 10, 1153.61.), 및 Padlock probe-based assays (Jonstrup, S.P. et al.(2006) A microRNA detection system based on padlockprobes and rolling circle amplification. RNA 12, 1747.52.)를 참조할 수 있다.

[0059] 본 발명에서 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 상기 hsa-miR-484, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-625-3p 및 hsa-miR-4732-5p로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 증가된 경우, 비결핵 항산균에 의해 감염되었거나 감염 가능성이 높거나, 또는 감염 질환이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0060] 본 발명의 정보 제공 방법에서 비결핵 항산균의 감염 질환에 관한 정의는 상기 본 발명의 진단용 조성물에 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 혼잡을 피하기 위해 이하 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

[0061] 본 발명에서는 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 hsa-miR-484, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-625-3p 또는 hsa-miR-4732-5p의 발현 수준을 측정함으로써 비결핵 항산균에 의한 감염 또는 감염 질환의 발병 유무 또는 발병 가능성을 간단하고 용이하면서도 정확하게 예측할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1은 본 발명의 일 실시예에서 비결핵 항산균에 의한 폐 질환의 마커로 사용될 수 있는 혈청 내 miRNA를 규명하기 위한 실험 설계도를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에서 건강한 대조군의 혈청 샘플 내 RNA 길이 별 분포 빈도를 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움(M. avium) 감염성 폐 질환 환자의 혈청 샘플 내 RNA 길이 별 분포 빈도를 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 인트라셀루라레(M. intracellulare) 감염성 폐 질환 환자의 혈청 샘플 내 RNA 길이 별 분포 빈도를 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 압세수스 아종 압세수스(M. abscessus subspecies abscessus) 감염성 폐 질환 환자의 혈청 샘플 내 RNA 길이 별 분포 빈도를 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 압세수스 아종 마실리엔스(M. abscessus subspecies massiliense) 감염성 폐 질환 환자의 혈청 샘플 내 RNA 길이 별 분포 빈도를 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에서 건강한 대조군 대비 비결핵 항산균 감염성 폐 질환 환자의 혈청에서 다르게 발현되는 miRNA 프로파일을 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에서 건강한 대조군 대비 마이코박테리움 아비움(M. avium) 감염성 폐 질환 환자에서 다르게 발현되는 miRNA 분포를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에서 건강한 대조군 대비 마이코박테리움 인트라셀루라레(M. intracellulare) 감염

성 폐 질환 환자에서 다르게 발현되는 miRNA 분포를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에서 건강한 대조군 대비 마이코박테리움 압세수스 아종 압세수스(M. abscessus subspecies abscessus) 감염성 폐 질환 환자에서 다르게 발현되는 miRNA 분포를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에서 건강한 대조군 대비 마이코박테리움 압세수스 아종 마실리엔스(M. abscessus subspecies massiliense) 감염성 폐 질환 환자에서 다르게 발현되는 miRNA 분포를 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에서 건강한 대조군 대비 각 비결핵 항산균 감염성 폐 질환 환자에게서 다르게 발현되는 miRNA의 수를 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에서 건강한 대조군 대비 비결핵 항산균 감염성 폐 질환 환자에게서 다르게 발현되는 miRNA의 발현 배수를 나타낸 것이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에서 건강한 대조군과 비결핵 항산균 감염성 폐 질환 환자의 혈청에서 hsa-miR-423-5p의 발현 수준을 비교한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에서 건강한 대조군과 비결핵 항산균 감염성 폐 질환 환자의 혈청에서 hsa-miR-484의 발현 수준을 비교한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 16은 본 발명의 일 실시예에서 건강한 대조군과 비결핵 항산균 감염성 폐 질환 환자의 혈청에서 hsa-miR-584-5p의 발현 수준을 비교한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에서 건강한 대조군과 비결핵 항산균 감염성 폐 질환 환자의 혈청에서 hsa-miR-625-3p의 발현 수준을 비교한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 18은 본 발명의 일 실시예에서 건강한 대조군과 비결핵 항산균 감염성 폐 질환 환자의 혈청에서 hsa-miR-4732-5p의 발현 수준을 비교한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 19는 본 발명의 일 실시예에서 비결핵 항산균 감염성 폐 질환의 진단에 있어서 hsa-miR-484 바이오마커에 대한 ROC 곡선 분석을 나타낸 것이다.

도 20은 본 발명의 일 실시예에서 비결핵 항산균 감염성 폐 질환의 진단에 있어서 hsa-miR-584-5p 바이오마커에 대한 ROC 곡선 분석을 나타낸 것이다.

도 21은 본 발명의 일 실시예에서 비결핵 항산균 감염성 폐 질환의 진단에 있어서 hsa-miR-625-3p 바이오마커에 대한 ROC 곡선 분석을 나타낸 것이다.

도 22는 본 발명의 일 실시예에서 비결핵 항산균 감염성 폐 질환의 진단에 있어서 hsa-miR-4732-5p 바이오마커에 대한 ROC 곡선 분석을 나타낸 것이다.

도 23은 본 발명의 일 실시예에서 hsa-miR-484, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-625-3p, 및 hsa-miR-4732-5p의 miRNA-유전자 네트워크를 나타낸 것이다.

도 24는 본 발명의 일 실시예에서 hsa-miR-484, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-625-3p, 및 hsa-miR-4732-5p의 miRNA-유전자 네트워크를 나타낸 것이다.

도 25는 본 발명의 일 실시예에서 hsa-miR-484, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-625-3p, 및 hsa-miR-4732-5p의 miRNA-유전자 네트워크를 나타낸 것이다.

도 26은 본 발명의 일 실시예에서 유전자 온톨로지(Gene Ontology; GO)를 사용하여 hsa-miR-484, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-625-3p, 및 hsa-miR-4732-5p 관련 유전자의 분자 기능을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 27은 본 발명의 일 실시예에서 KEGG를 사용하여 hsa-miR-484, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-625-3p, 및 hsa-miR-4732-5p 관련 조절 경로를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 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.

[0065] **실시예**

[0067] 조사 모집단(Study population)

[0068] 삼성서울병원(ClinicalTrials.gov identifier: NCT00970801)에서 비결핵 항산균에 의한 폐 질환으로 새롭게 진단받은 환자의 혈청을 스크리닝하였다. 비결핵 항산균에 의한 폐 질환 특이적 miRNA를 규명하기 위하여, miRNA 발현에 영향을 미칠 수 있는 다른 질환으로 만성 내과 질환 또는 암이 발병한 환자는 본 실험에서 제외하였다. 이에 따라 마이코박테리움 아비움(M. avium), 마이코박테리움 인트라셀루라레(M. intracellulare), 마이코박테리움 압세수스 아종 압세수스(M. abscessus subspecies abscessus) 및 마이코박테리움 압세수스 아종 마실리엔스(M. abscessus subspecies massiliense) 각각에 감염된 13명 환자씩, 비결핵 항산균에 의한 폐 질환 진단 기준에 부합하는 총 52명의 환자군을 선별하였다. 건강한 대조군으로는 동반 질병(comorbidity)이 없는 43명의 병원 근무자를 선별하였다. 각 개체군에서 수득한 혈청은 원심분리하여 -80 ℃에서 보관하였다. 본 실험에서는 비결핵 항산균에 의한 폐 질환의 마커로 사용될 수 있는 혈청 내 miRNA를 규명하기 위하여 도 1에 나타낸 바와 같이 4단계로 실험을 수행하였다. 가장 먼저, 발견 단계(discovery phase)에서는, 비결핵 항산균 폐 질환이 발병한 환자와 건강한 대조군에서 다른 양상으로 발현되는 miRNA를 선별하기 위하여 Illumina 소형 RNA 시퀀싱을 이용해 스크리닝을 수행하였다. 본 단계에서는 miRNA 프로파일을 얻기 위하여 각 균주 별 3명의 감염 환자 샘플과 건강한 대조군 3명 샘플을 합쳐서 총 15개의 혈청 시료를 테스트하였다. 비결핵 항산균 폐 질환이 발병한 환자에게서 다른 발현을 보이는 miRNA와 4가지 균주에 의해 유발되는 폐 질환에서 공통적으로 발현되는 miRNA의 패널을 이용하여 이후의 qRT-PCR을 수행하였다.

[0070] RNA 추출

[0071] miRNeasy Mini 키트(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 혈청 샘플로부터 총 RNA를 분리하고, 각 샘플은 RNase-free water로 녹여 분리하였다. NanoDrop™ ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 RNA 정량 및 순도를 측정하고, Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 RNA 완전도(integrity)를 측정하였다. RNA 샘플은 -80 ℃에서 보관하였다.

[0073] Illumina 고처리량 시퀀싱(Illumina high-throughput sequencing)

[0074] NEXTFlex Small RNA Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA)를 사용하여 small RNA 라이브러리를 설계하였다. 간단히, RNA 시퀀싱 라이브러리는 cDNA 증폭(cDNA amplification), 말단-수선(end-repair), 3' 말단의 아데닐화(adenylylation of 3' ends), 어뎁터 라이게이션(adapter ligation) 및 증폭(amplification)에 의해 준비하였다. 50-염기 쌍 싱글 리드(50-base pair single reads)로 HiSeq 2500 system (Illumina)를 사용하여 라이브러리를 시퀀싱하였다.

[0076] 소형 RNA 시퀀싱 데이터 분석

[0077] FastQC (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc)를 이용하여 리드 데이터를 평가하고 전-작업을 수행하였으며, 3' 말단으로부터 낮은 품질의 염기를 잘라내었다. 어뎁터 시퀀스를 잘라내었고, 17개의 핵산 보다 작은 리드는 제거하였다. Bowtie를 이용하여 잘라낸 리드는 레퍼런스 게놈(GRCH38/hg19)에 맵핑되었다. 맵핑된 리드의 분포를 miRBase (http://www.mirbase.org/), Ensembl 주석(annotations) 및 Rfam 데이터베이스 (http://rfam.xfam.org/)로 분석하였다. 모든 샘플에서 신규한 miRNA를 예측하고 각 miRNA의 리드 카운트를 요약하기 위하여 miRDeep2 프로그램 (https://www.mdc-berlin.de/content/mirdeep2-documentation)를 이용해 알려진 miRNA를 규명하였다. 역치 배수가 2배 이상이고, p-value가 0.05 미만인 경우 miRNA가 다르게 발현된다고 판단하였다. 단, p-value는 R 패키지(package)에서 DESeq 알고리즘(algorithm)을 사용하여 계산하였다.

[0079] qRT-PCR을 이용한 miRNA의 정량화

[0080] Taq-Man miRNA 역전사 키트(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 및 miRNA-특이 스템-루프 프라이머

(miRNA-specific stem-loop primers)를 이용하여 역전사 반응을 수행하였다. qRT-PCR을 위한 각 반응 혼합물은, AmpErase UNG가 없는 2X TaqMan Universal PCR Master Mix 2.5 μL, miRNA-특이 프라이머/프로브 혼합물 0.25 μL, 및 희석된 RT 산물 2.25 μL을 포함하였다. 반응은 95 ℃에서 10분, 95 ℃에서 15 초 동안 40 사이클, 60 ℃에서 1분 동안 수행한 뒤, 4 ℃에서 유지하였다. SDS 상대적 정량 소프트웨어 버전 2.2.3 (Applied Biosystems)을 이용하여 로우 데이터를 분석하였다. 각 타겟 miRNA의 발현 수준은 miR-16 (internal control)로 표준화하였다.

[0082] miRNA-유전자 네트워크 설계

[0083] 얻어진 miRNA에 의해 타겟 설정된 유전자를 예측하기 위하여 TargetScan (http://genes.mit.edu/targetscan/index.ht ml)을 사용하였다. NCBI 데이터베이스 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) 및 Cytoscape (Cytoscape Software, Version 2.8.2, Seattle, WA, USA)를 사용하여 비결핵 항산균 감염 폐 질환과 관련된 타겟 유전자를 스크리닝하였다. Cytoscape를 사용하여 miRNA 유전자 네트워크를 설계하고 miRNA-miRNA 사이 상관 관계를 분석하였다. 타겟 유전자의 분자적 기능은 Gene Ontology (http://www.geneontology.org/) 및 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (http://www.genome.jp/kegg/)을 이용하여 예측하였다.

[0085] 통계적 분석

[0086] 데이터는 범주 변수(categorical variables)에 대하여는 수(%)로 나타내었고, 연속 변수(continuous variables)에 대하여는 중앙값(사분 범위)로 나타내었다. 데이터는 SPSS 소프트웨어, 버전 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) 또는 그 내부에 세워진 프로그램을 이용하여 통계적으로 분석하였다. 각 군 간의 비교를 위해서 양쪽 꼬리 비대응 t-검정(two-tailed unpaired t-tests)을 수행하였고, 다군 간의 비교를 위해서 일원 분산 분석(one-way analysis of variance)을 수행하였다. miRNA의 구별 요소를 평가하기 위하여 ROC(Receiver operating characteristic) 커브 분석을 수행하였다. Prism Graph 소프트웨어, 버전 5.01 (GraphPad, Inc., La Jolla, CA, USA) 내 통계적 테스트를 사용하여 특이도 및 민감도를 결정하기 위해 95% CI(confidence interval)로, AUC(areas under the curves)를 계산하였다. SPSS 소프트웨어를 이용하여 이원 논리주의적 회귀 분석(binary logistic regression analyses)을 수행하였다. $p < 0.05$인 경우 통계적 유의성이 있다고 보았다.

[0088] 환자

[0089] 본 실험을 위하여, 하기 표 2와 같이 비결핵 항산균 감염성 폐 질환 환자 52명과 건강한 정상 대조군 43명으로, 총 95명이 참가하였다. 환자의 중앙 나이는 56세이고, 45명(87%)가 여성이었다. 52명 환자군의 중앙 체질량 지수는 20.8 kg/m^2이고, 46명의 환자군(89%)가 흡연한 경험이 없었다. 비결핵 항산균 폐 질환 환자 사이에서 가장 흔한 호흡기 질환은 기관지 확장증(n = 48, 92%)이고, 다음으로 과거 결핵 치료 경험(n = 17, 33%)이었다. 43명의 건강한 대조군에서 중앙 나이는 48세이고, 29명(67%)이 여성이었다.

표 2

[0091]

특징	NTM-PD (n = 52)	건강한 대조군 (n = 43)
나이 (years)	56 (50-62)	48 (40-56)
여성	45 (87)	29 (67)
체질량 지수 (kg/m^2)	20.8 (19.0-22.5)	NA
흡연 경험 없음	46 (89)	INA
병인체(Etiologic organism)		INA
M. avium	13 (25)	-
M. intracellulare	14 (27)	-
M. abscessus	13 (25)	-
M. massiliense	12 (23)	-

수반 질환		
기관지 확장증	48 (92)	-
과거 결핵 치료	17 (33)	-
과거 흉부 수술	1 (2)	-
만성 심장 질환	1 (2)	-
만성 간 질환	1 (2)	-
데이터는 수(%) 또는 중앙값(사분범위)로 나타내었다. NTM-PD는 비결핵 항산균 폐 질환 환자를 의미하고, INA는 정보 없음을 의미한다.		

[0093] Illumina-기반 혈청 miRNA의 소형 RNA 시퀀싱

[0094] 마이코박테리움 아비움(M. avium), 마이코박테리움 인트라셀루라레(M. intracellulare), 마이코박테리움 압세수스 아종 압세수스(M. abscessus subspecies abscessus) 및 마이코박테리움 압세수스 아종 마실리엔스(M. abscessus subspecies massiliense) 각각에 감염된 환자 3명씩 총 12명의 환자와 3명의 건강한 대조군으로부터 발견 단계(discovery phase)에서 Illumina 소형 RNA 시퀀싱을 이용하여 miRNA의 혈청 수준을 확인하였다. 비결핵 항산균 폐 질환 환자와 건강한 대조군의 혈청 샘플로부터 18개 내지 30개 핵산 범위의 RNA로, 각각 11,217,363 및 18,556,427 리드 평균을 얻었다. 레퍼런스 게놈에서 서열(clean sequences)의 길이 분포를 결정하였다. 비결핵 항산균 감염성 폐 질환 환자와 건강한 대조군의 혈청 샘플의 길이 분포 분석에 따라 대부분의 리드는, 보통의 miRNA 길이에 해당하는 18개 내지 24개의 핵산 길이를 나타내었다. 비결핵 항산균 감염성 폐 질환 환자와 건강한 대조군의 혈청 샘플은 다양한 길이의 소형 RNA를 포함하고 있었다(도 2 내지 6). 이에 따라 소형 RNA의 종류와 시퀀싱 빈도(sequencing frequencies)를 확인하기 위하여 생물정보학 분석(bioinformatics analysis)을 수행하였다.

[0095] 그 결과, 비결핵 항산균 감염성 폐 질환 환자와 건강한 대조군의 혈청 샘플에는, miRNA, 긴 유전자간 넌코딩 RNA(long intergenic noncoding RNA), 리보솜 RNA, 소핵소체 RNA(small nucleolar RNA) 및 소핵 RNA(small nuclear RNA) 등 다양한 소형 RNA 종류가 확인되었다(표 3). 비결핵 항산균 감염성 폐 질환 환자와 건강한 대조군의 혈청 샘플에서 총 소형 RNA(시퀀싱 리드) 중 miRNAs는 각각 39.7% 및 44.5%로 계산되었고, 두 군 간의 유의적 차이점을 발견할 수 없었다. 이에 따라, mirDeep 소프트웨어를 이용하여 모든 리드를 분석하여 알려졌거나 신규한 miRNA가 존재하는 지 확인하였다. 비결핵 항산균 감염성 폐 질환 환자와 건강한 대조군으로부터 각각 467개 및 407개의 알려진 miRNA가 확인되었다(표 3). 신규한 miRNA 전구체의 경우 비결핵 항산균 폐 질환 환자에서 대략 262개, 건강한 대조군에서 193개 확인되었다(표 2).

[0096] 또한, 건강한 대조군 대비 비결핵 항산균 감염성 폐 질환 환자의 혈청 miRNA 프로파일에서 다르게 발현되는 miRNA를 확인하였고(도 7), 특히 발현 수준이 2배 이상 차이나며 p-values가 0.5 미만으로 확인된 miRNA는 총 148개 확인되었다. 148개의 miRNA 중 70개의 miRNA는 건강한 대조군 대비 마이코박테리움 아비움(M. avium) 감염성 폐 질환 환자에서 유의적 발현 수준의 차이를 보였고, 56개의 miRNA는 마이코박테리움 인트라셀루라레(M. intracellulare) 감염성 폐 질환 환자에서 유의적 발현 수준의 차이를 보였으며, 46개의 miRNA는 마이코박테리움 압세수스 아종 압세수스(M. abscessus subspecies abscessus) 감염성 폐 질환 환자에게서 유의적 발현 수준의 차이를 보였고, 32개의 miRNA는 마이코박테리움 압세수스 아종 마실리엔스(M. abscessus subspecies massiliense) 감염성 폐 질환 환자에게서 유의적 발현 수준의 차이를 보였다(도 8 내지 11). 하지만, 14개의 miRNA 만이 상기 4개 균주 감염성 폐 질환 환자에게서 공통적으로 건강한 대조군 대비 유의적 발현 수준의 차이를 보였다(도 12 및 13).

표 3

[0098]

구분	NTM-PD	건강한 대조군
총 리드(total reads)	11,217,363	18,556,427
전구체 miRNA 리드(precursor miRNA reads)	3,445	8,444
성숙된 miRNA 리드(mature miRNA reads)	7,250,677	5,265,841
알려진 miRNA의 수	467	407
신규한 miRNA의 수	262	193

게놈-맵핑된 시퀀스 리드의 분포		
miRNA	3,517,419 (39.7)	3,083,932 (44.5)
lincRNA	2,397,431 (27.0)	1,655,179 (23.9)
rRNA	10,857 (0.1)	6,326 (0.1)
snoRNA	8,987 (0.1)	5,626 (0.1)
snRNA	25,265 (0.3)	20,821 (0.3)
기타	2,924,390 (32.8)	2,164,554 (31.2)
데이터는 수(%)로 나타내었고, NTM-PD는 비결핵 항산균 감염 폐질환 환자를 의미하며, miRNA는 microRNA, lincRNA는 long intergenic noncoding RNA, rRNA는 ribosomal RNA, snoRNA는 small nucleolar RNA, snRNA는 small nuclear RNA를 의미한다.		

[0100] qRT-PCR 분석을 통한 miRNA의 다른 발현 확인

[0101] 건강한 대조군 대비 4개 균주 감염성 폐 질환 환자에게서 다른 발현 패턴을 보이는 14개의 miRNA를 잠재적 바이오마커로 간주하고, 그 발현 수준을 qRT-PCR로 확인하였다. 선별 단계(selection phase)에 있어, 4개 균주 별 감염된 폐 질환 환자 12명과 건강한 대조군 3명의 각 혈청 샘플로부터 14개의 miRNA의 발현 수준을 확인하였다. 건강한 대조군 대비 비결핵 항산균 감염성 폐 질환 환자의 샘플에서 평균 발현 수준이 2배 이상 증가하고, p-values가 0.05 미만인 miRNA를 선별하였다. 그 결과, 14개의 miRNA 후보군 중에서 hsa-miR-423-5p, hsa-miR-484, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-625-3p 및 hsa-miR-4732-5p의 5개의 miRNA가 비결핵 항산균 감염성 폐 질환 환자와 건강한 대조군 사이 발현 수준에 유의적으로 차이가 있는 것을 확인할 수 있었다(도 14 내지 18). 이후, 비결핵 항산균 감염성 폐 질환 환자 40명(각 균주 별 10명씩)과 건강한 대조군 40명에 대하여 상기 5개의 miRNA의 발현 수준의 차이를 정량하기 위하여 qRT-PCR 기반 검증을 수행하였다. hsa-miR-423-5p ($p = 0.116$)를 제외하고, hsa-miR-484($p = 0.015$), hsa-miR-584-5p($p = 0.001$), hsa-miR-625-3p($p = 0.002$), 및 hsa-miR-4732-5p($p = 0.014$) 4개의 miRNA에 있어서 건강한 대조군 대비 비결핵 항산균 감염성 폐 질환 환자의 혈청에서 유의적으로 높은 발현 수준을 보였다(도 14 내지 18).

[0103] 5개의 miRNA에 대한 ROC 커브 분석

[0104] 비결핵 항산균 감염 폐 질환 환자 40명과 건강한 대조군 40명으로부터 얻은 검증 데이터를 사용하여 ROC 커브 분석을 수행하였다. ROC 커브는 두 군 간의 5개의 miRNA의 상대적 발현 수준을 비교할 수 있도록 설계하였고, AUC 값은 다음과 같이 확인되었다: hsa-miR-423-5p, 0.589 ($p = 0.188$, 95% CI = 0.457-0.720); hsa-miR-484, 0.741 ($p = 0.0002$, 95% CI = 0.628-0.855); hsa-miR-584-5p, 0.712 ($p = 0.002$, 95% CI = 0.593-0.830); hsa-miR-625-3p, 0.773 ($p < 0.0001$, 95% CI = 0.666-0.880); 및 hsa-miR-4732-5p, 0.892 ($p < 0.0001$, 95% CI = 0.812-0.973) (도 19 내지 22). 이를 통해 hsa-miR-484, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-625-3p 및 hsa-miR-4732-5p는 건강한 대조군 대비 비결핵 항산균 감염 폐 질환 환자를 구분하는 바이오마커로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0106] miRNA-유전자 네트워크의 설계

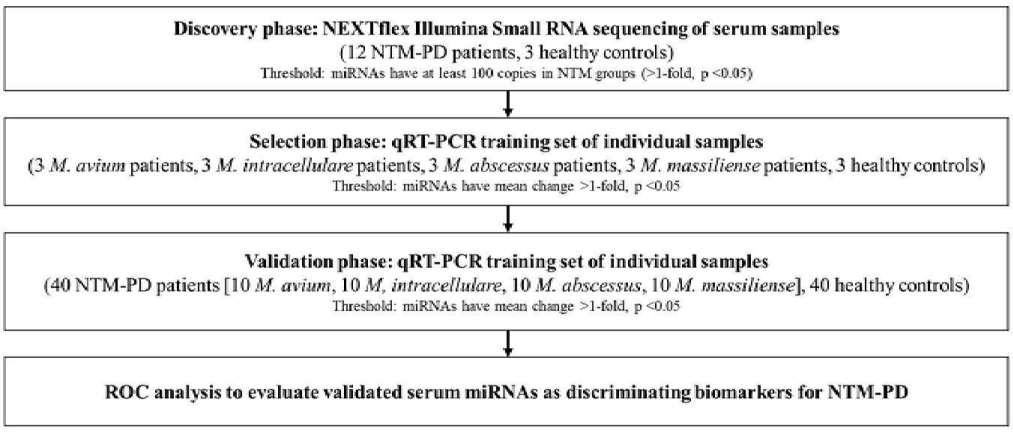
[0107] 상기 miRNA의 추정적 기능을 조사하기 위하여, TargetScan 데이터베이스 (http://targetscan.org)를 사용하였다. 또한, Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (http://david.abcc.ncifcrf.gov/)를 사용하여 보존된 타겟과 관련된 생화학적 경로를 확인하였다. 도 19 내지 23은 hsa-miR-484, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-625-3p, 및 hsa-miR-4732-5p의 miRNA-유전자 네트워크를 나타낸 것으로, 이들 4개의 miRNA는 TargetScan 데이터베이스에서 각각 4231, 2268, 2475, 및 2242 타겟 mRNA와 연관성이 있었다. 이러한 유전자 중에서, 결핵과 관련된 9개의 유전자를 포함하여 총 125개의 유전자가 4개의 miRNA에 의해 공통적으로 타겟이 되는 것을 알 수 있었다(도 23 내지 25). 예를 들어, hsa-miR-484, hsa-miR-584-5p, hsa-miR-625-3p, 및 hsa-miR-4732-5p 모두 NFAT5(nuclear factor of activated T cells 5) 및 TLR4(Toll-like receptor 4)를 타겟으로 하였으며, hsa-miR-484, hsa-miR-584-5p, 및 hsa-miR-4732-5p는 인터루킨 6(interleukin 6; IL-6)를 타겟으로 하였고, hsa-miR-484 및 hsa-miR-625-3p는 인터루킨 17(interleukin 17; IL-17)을 타겟으로 하였다. 또한, hsa-miR-484는 CD40 및 CD40 리간드를 타겟으로 하였고, hsa-miR-625-3p는 T

세포 활성화를 중재하는 코리셉터(coreceptor)인 CD28을 타겟으로 하였다.

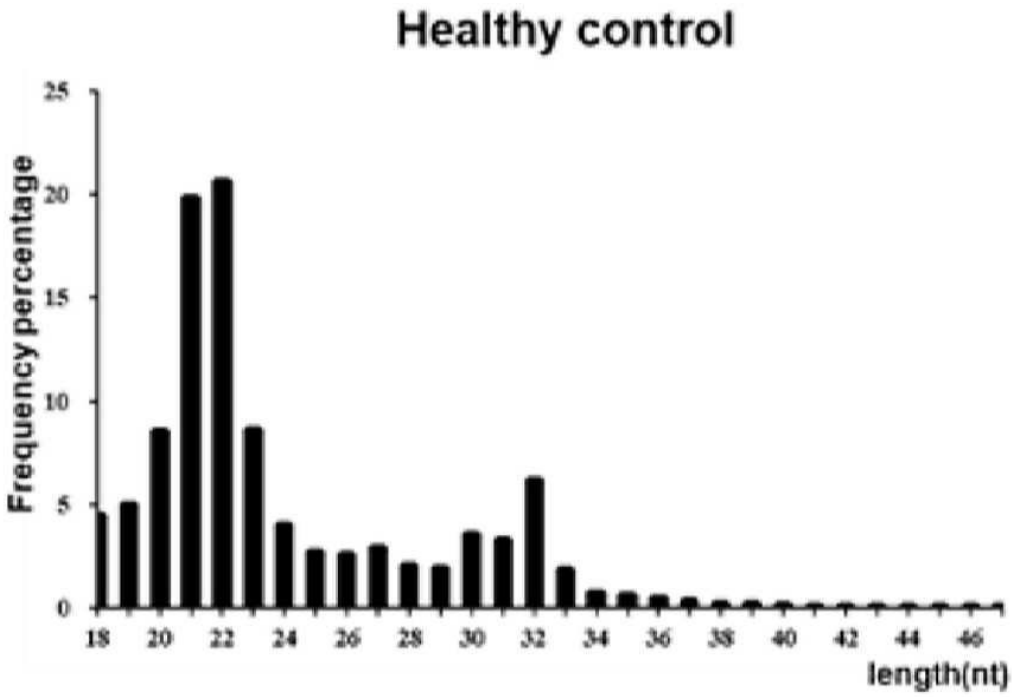
[0108] 유전자 온톨로지(Gene Ontology; GO)를 사용하여 125개의 유전자를 분석하였고, 분자 기능에 기반한 데이터베이스(도 26), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), 조절 경로 데이터베이스(도 27)는 대부분의 전사 조절자 활성과 단백질 결합 기능으로 코딩된 단백질은 세포 성장, 이동 증식, Hippo 신호, Wnt 신호, p53 신호 및 TGF-β(transforming growth factor β) 신호와 연관성이 있는 것을 볼 수 있었다.

도면

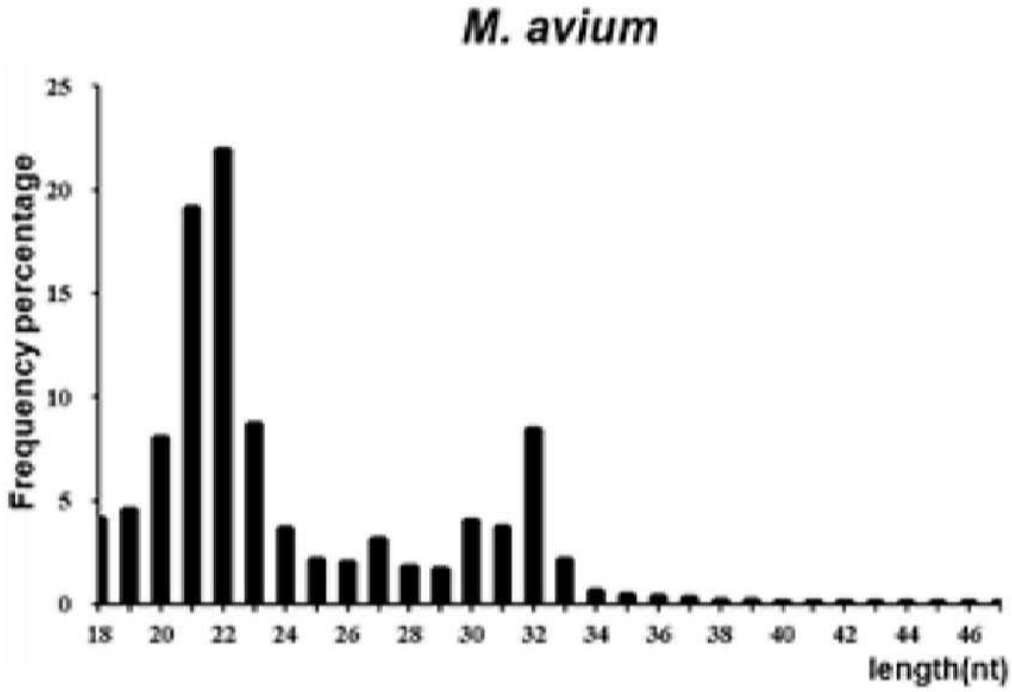
도면1



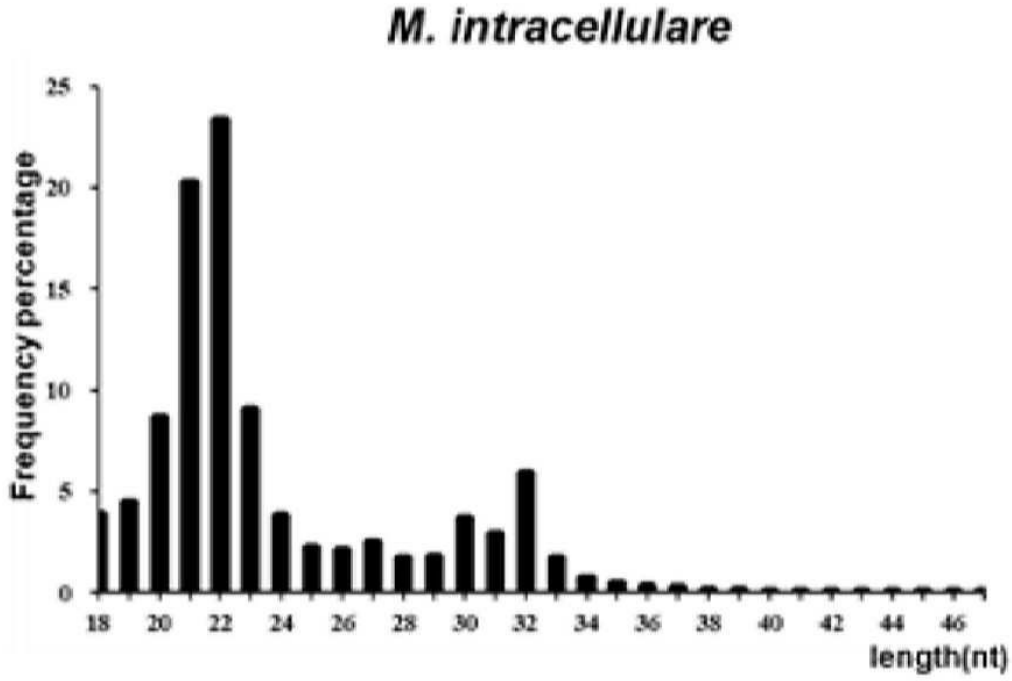
도면2



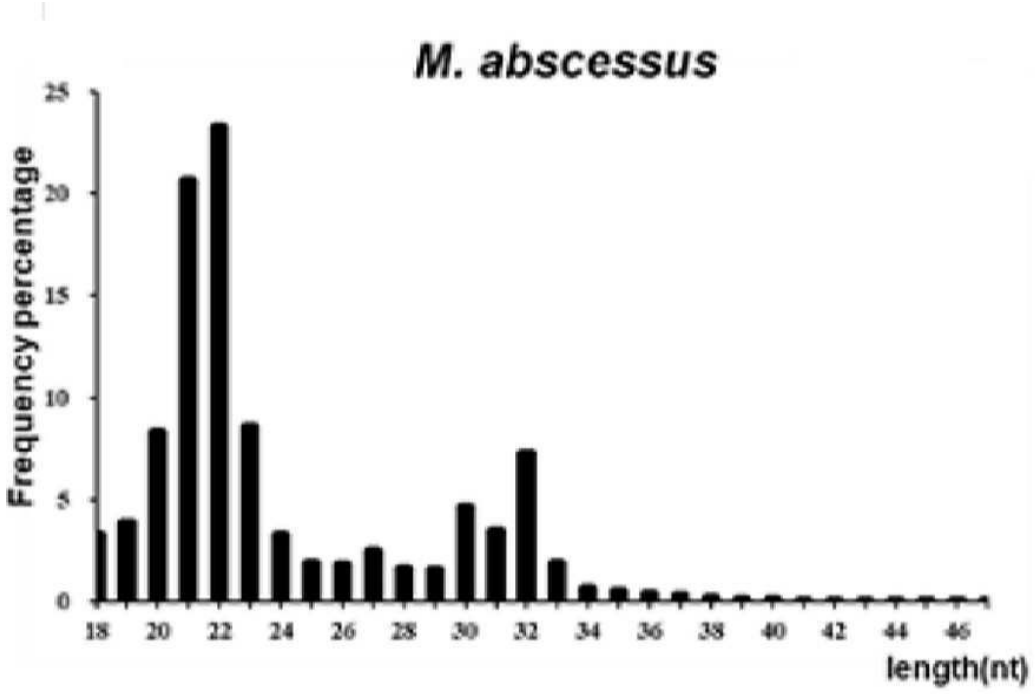
도면3


M. avium
Frequency percentage
0
5
10
15
20
25
18
20
22
24
26
28
30
32
34
36
38
40
42
44
46
length(nt)

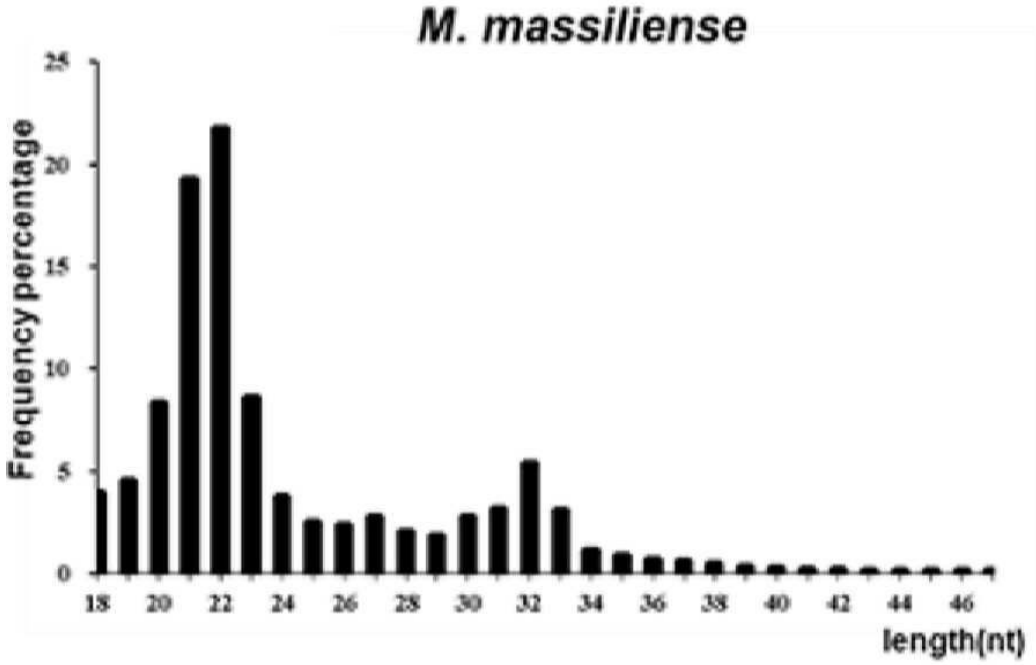
도면4


M. intracellulare
Frequency percentage
0
5
10
15
20
25
18
20
22
24
26
28
30
32
34
36
38
40
42
44
46
length(nt)

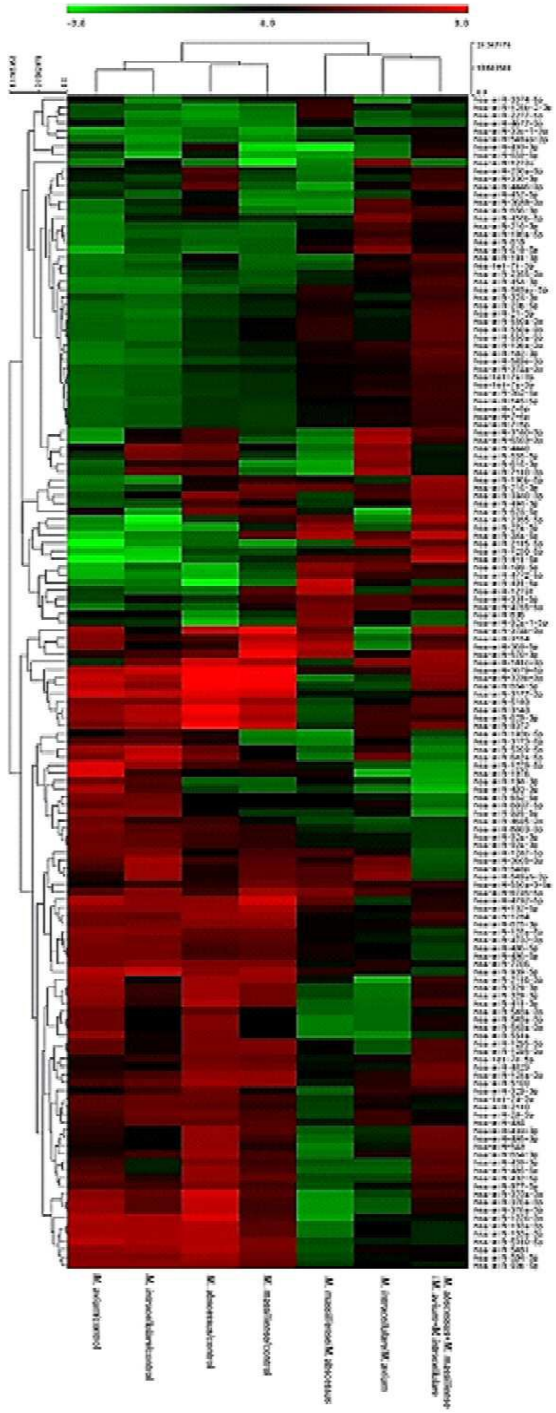
도면5


M. abscessus
Frequency percentage
0
5
10
15
20
25
18
20
22
24
26
28
30
32
34
36
38
40
42
44
46
length(nt)

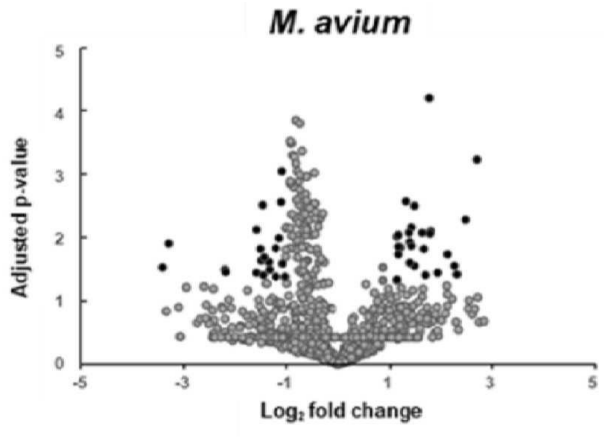
도면6


M. massiliense
Frequency percentage
0
5
10
15
20
25
18
20
22
24
26
28
30
32
34
36
38
40
42
44
46
length(nt)

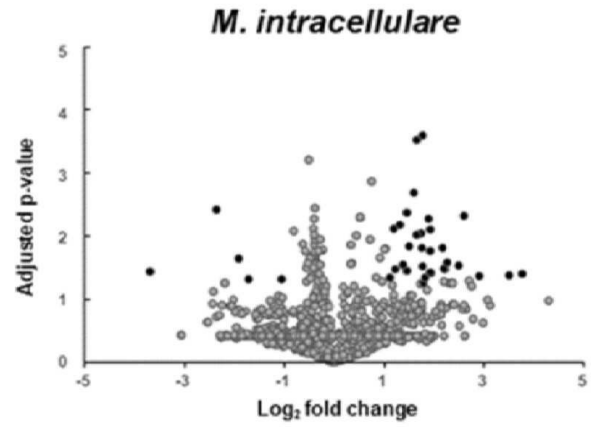
도면7



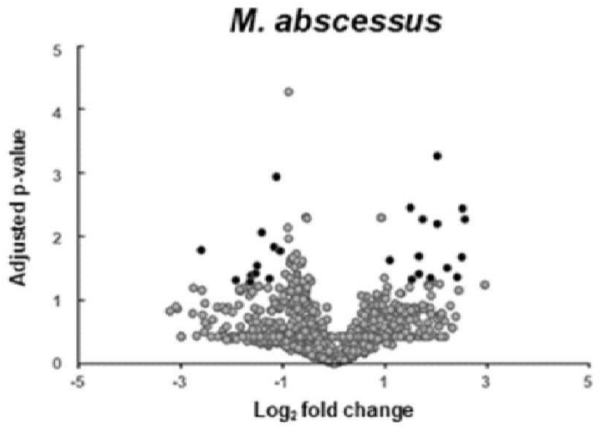
도면8


M. avium
Adjusted p-value
Log2 fold change

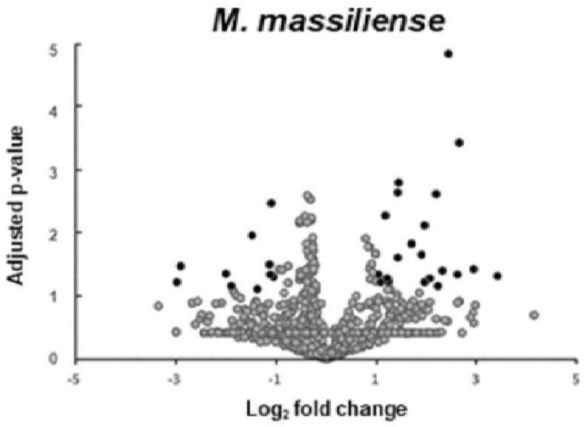
도면9


M. intracellulare
Adjusted p-value
Log2 fold change

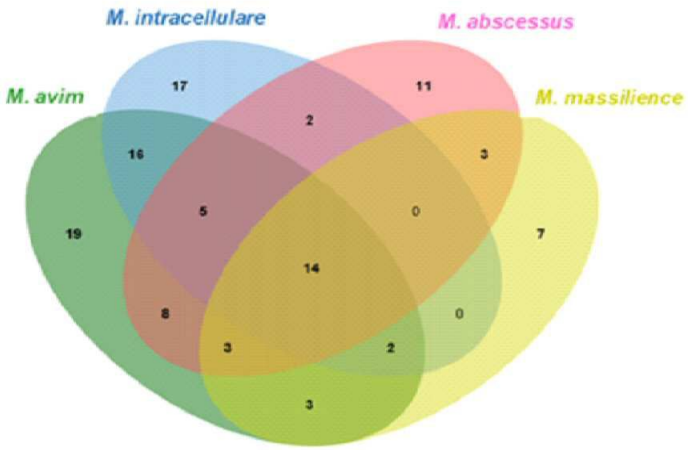
도면10


M. abscessus
Adjusted p-value
Log2 fold change

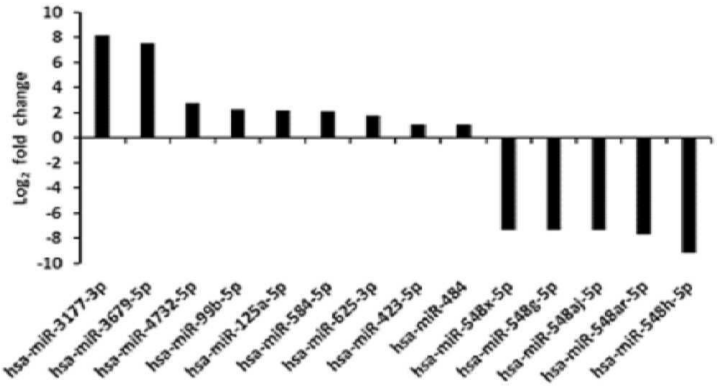
도면11



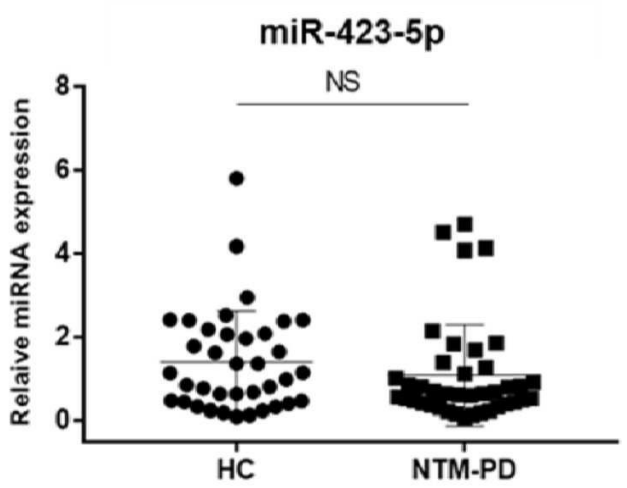
도면12



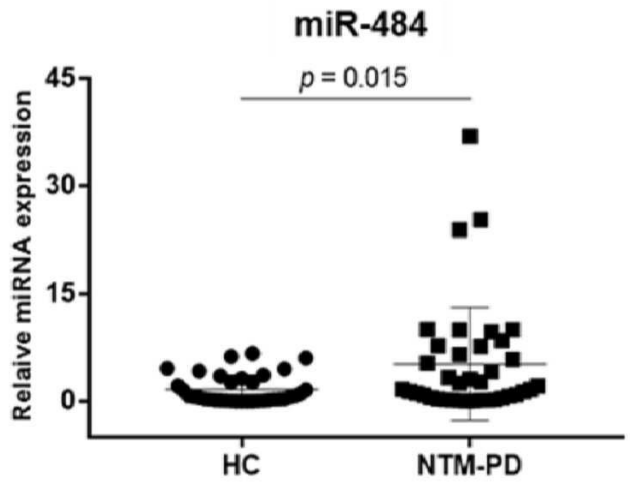
도면13



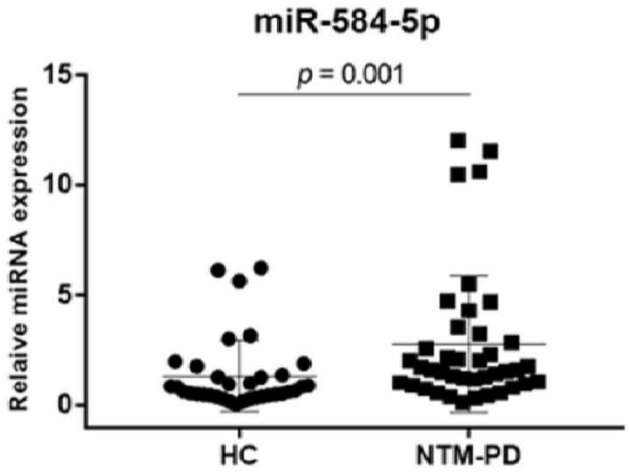
도면14



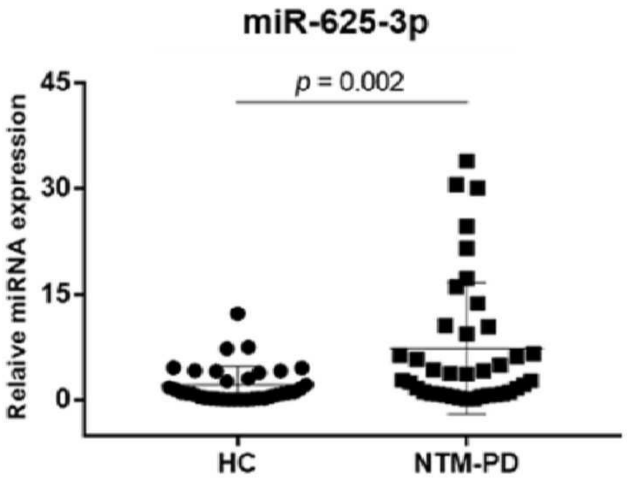
도면15



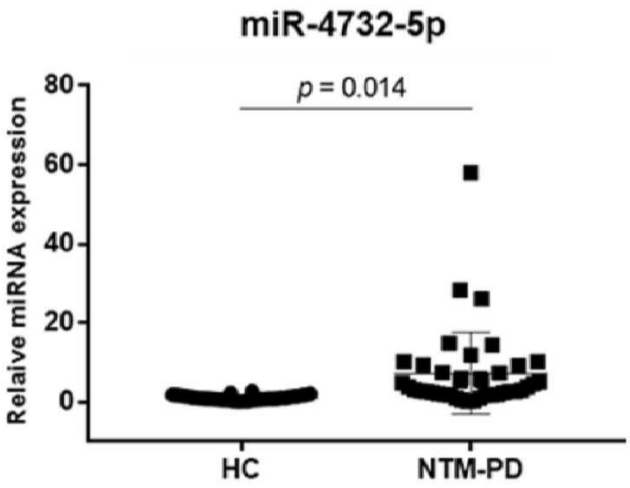
도면16



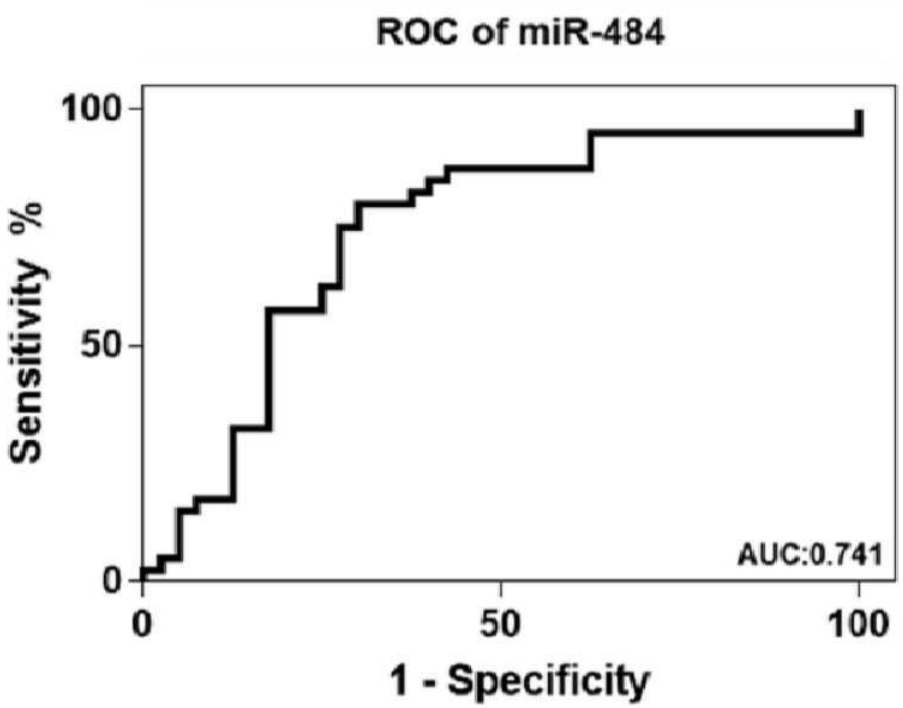
도면17


miR-625-3p
p = 0.002
Relaive miRNA expression
45
30
15
0
HC
NTM-PD

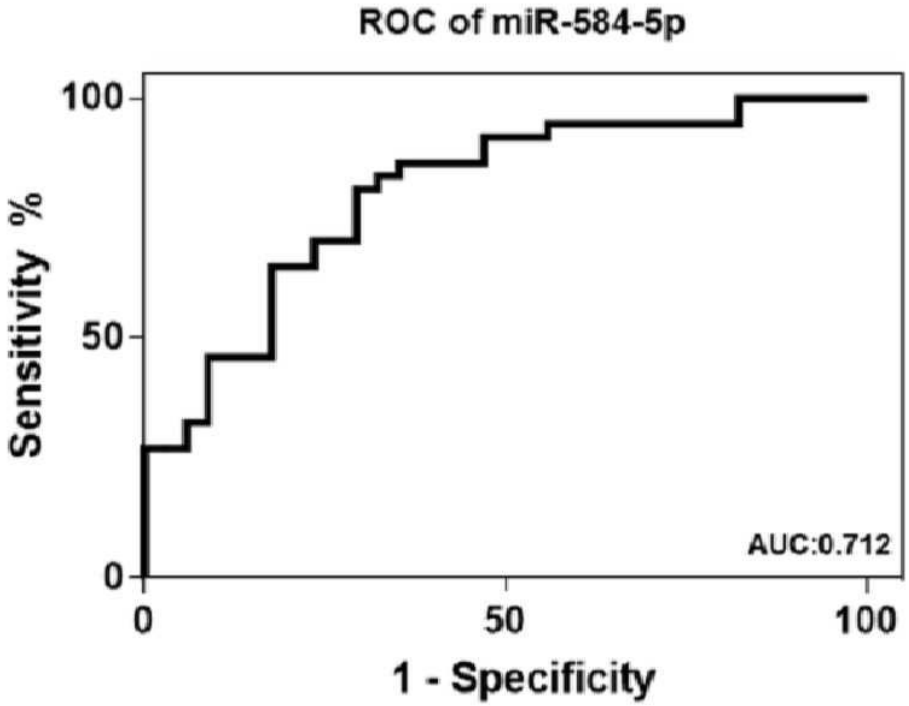
도면18


miR-4732-5p
p = 0.014
Relaive miRNA expression
80
60
40
20
0
HC
NTM-PD

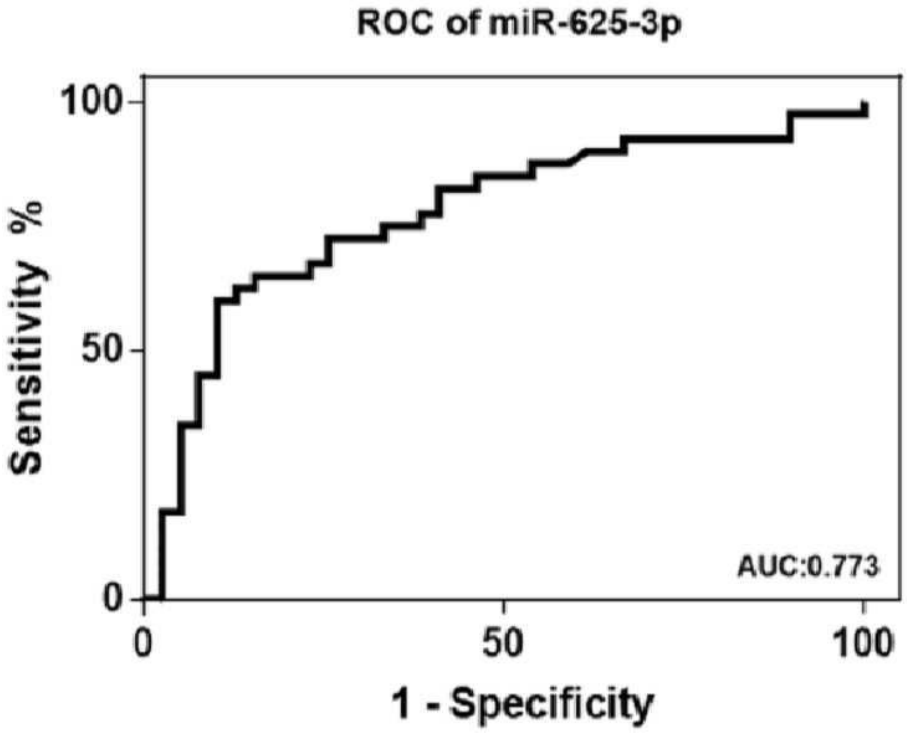
도면19


ROC of miR-484
100
50
0
Sensitivity %
AUC:0.741
0
50
100
1 - Specificity

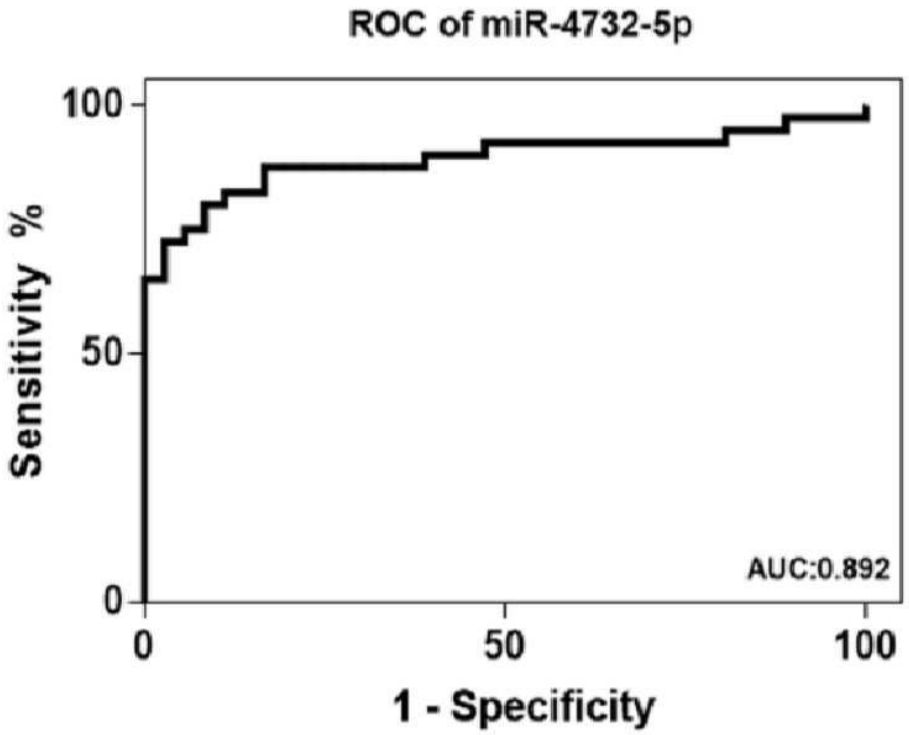
도면20


ROC of miR-584-5p
100
50
0
Sensitivity %
AUC:0.712
0
50
100
1 - Specificity

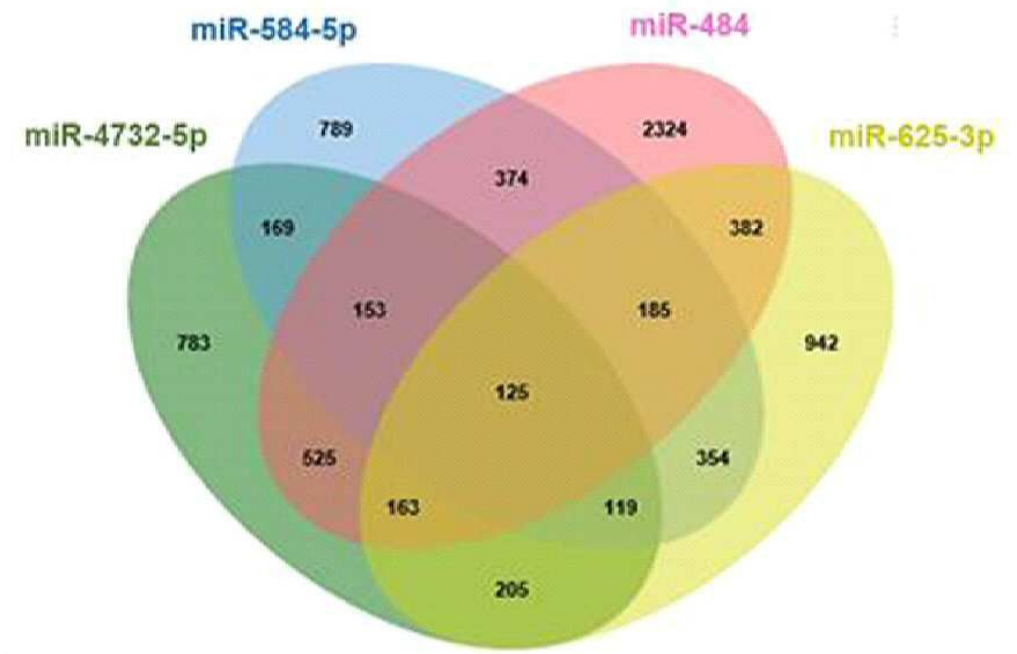
도면21


ROC of miR-625-3p
Sensitivity %
100
50
0
0
50
100
1 - Specificity
AUC:0.773

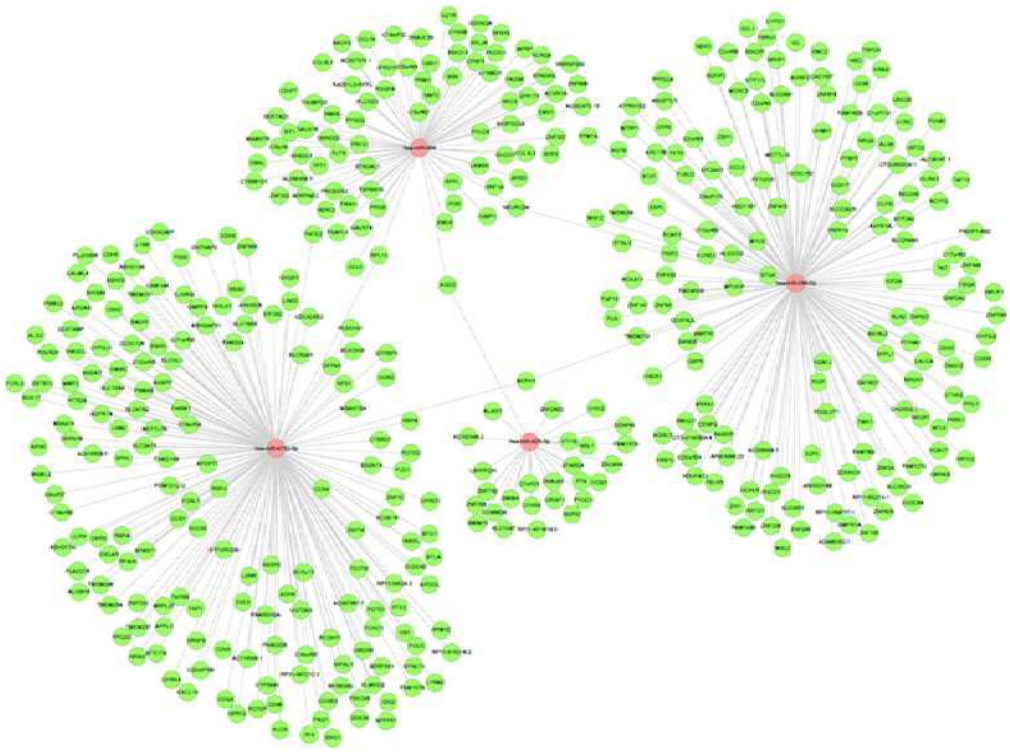
도면22


ROC of miR-4732-5p
Sensitivity %
100
50
0
0
50
100
1 - Specificity
AUC:0.892

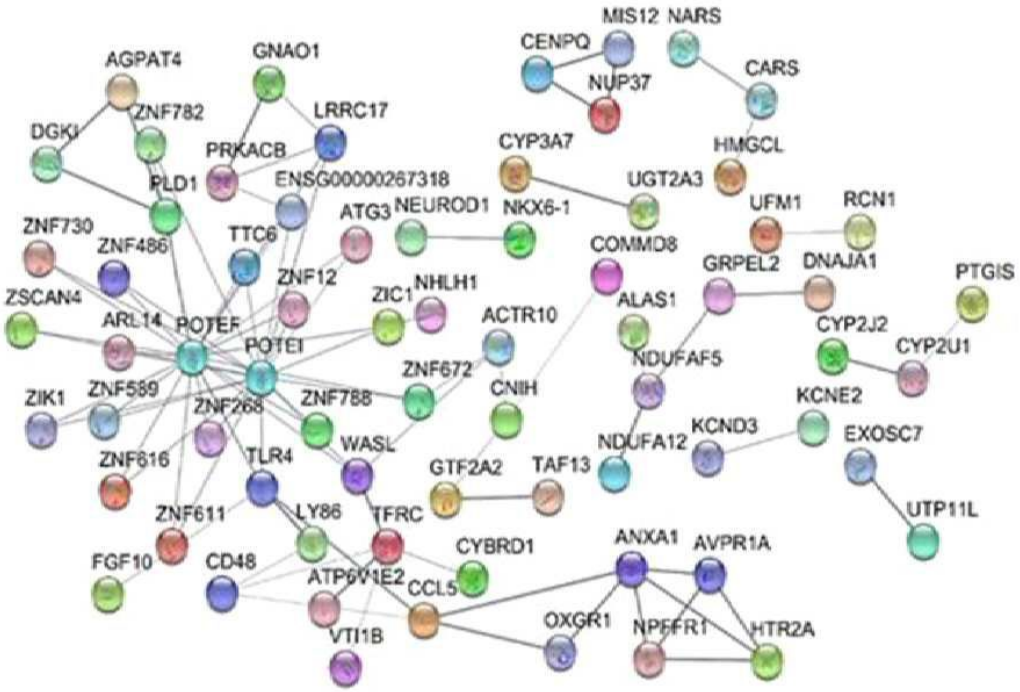
도면23


miR-584-5p
miR-484
miR-4732-5p
miR-625-3p
789
2324
374
169
382
153
185
783
942
125
625
354
163
119
205

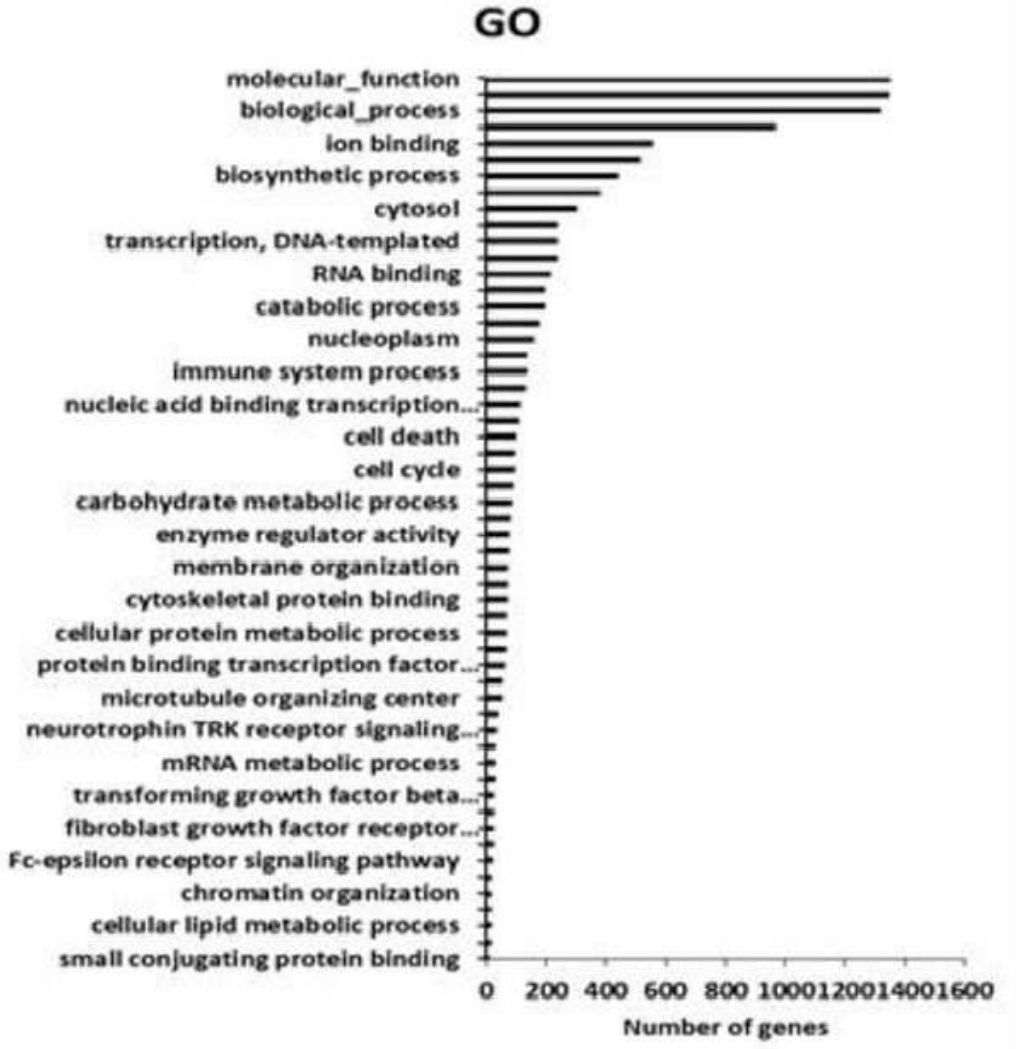
도면24



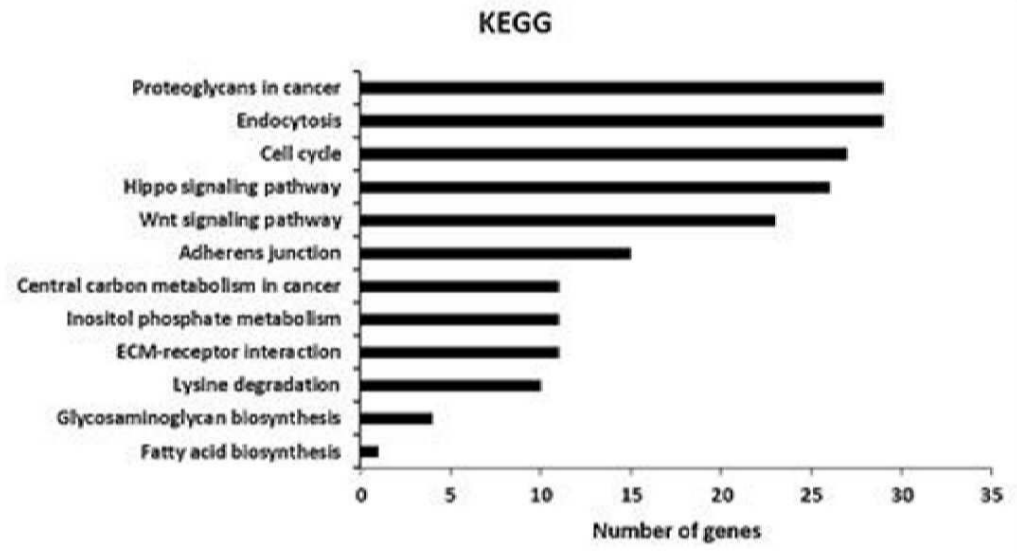
도면25


MIS12
NARS
CENPQ
CARS
NUP37
AGPAT4
GNAO1
ZNF782
LRRC17
DGKI
PRKACB
CYP3A7
HMGCL
PLD1
ENSG00000267318
UGT2A3
UFM1
RCN1
ATG3
NEUROD1
NKX6-1
ZNF730
ZNF486
TTC6
COMMD8
GRPEL2
DNAJA1
PTGIS
ZNF12
ZIC1
NHLH1
ZSCAN4
ALAS1
ACTR10
CYP2J2
CYP2U1
ARL14
POTEF
POTEI
NDUFAF5
ZNF672
ZIK1
ZNF589
CNIH
KCNE2
ZNF268
ZNF788
KCND3
EXOSC7
WASL
NDUFA12
ZNF616
TLR4
GTF2A2
TAF13
UTP11L
ZNF611
LY86
TFRC
ANXA1
AVPR1A
CYBRD1
FGF10
CD48
ATP6V1E2
CCL5
OXGR1
NPFFR1
HTR2A
VTI1B

도면26



도면27



서 열 목 록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION

<120> Composition for diagnosing nontuberculous mycobacterial infection or infection disease

<130> PDPB194304

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ucaggcucag uccccucccg au 22

<210> 2

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

uuaugguuug ccugggacug ag 22

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

aggggggaaag uucuauaguc c 21

<210> 4

<211> 23

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

uguagagcag ggagcaggaa gcu 23