



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년05월17일
(11) 등록번호 10-2252167
(24) 등록일자 2021년05월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/92 (2006.01) G01N 30/72 (2006.01)
G01N 30/88 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/92 (2013.01)
G01N 30/7233 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0151453
(22) 출원일자 2019년11월22일
심사청구일자 2019년11월22일
(65) 공개번호 10-2020-0060289
(43) 공개일자 2020년05월29일
(30) 우선권주장
1020180145320 2018년11월22일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
ASHEUER, MURIEL et al., 'Decreased expression of ABCD4 and BGL genes early in the pathogenesis of X-linked adrenoleukodystrophy', Human molecular genetics, 2015, Vol. 14, pp 1293-1303. 1부.*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
서울대학교 산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
장지호
서울특별시 용산구 효창원로 17, 104동 1301호 (산천동, 리버힐삼성아파트)
권성원
경기도 수원시 장안구 화산로 85, 116동 502호 (천천동, 천천 푸르지오)
이동규
서울특별시 강동구 풍성로52길 49, 401호
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 14 항

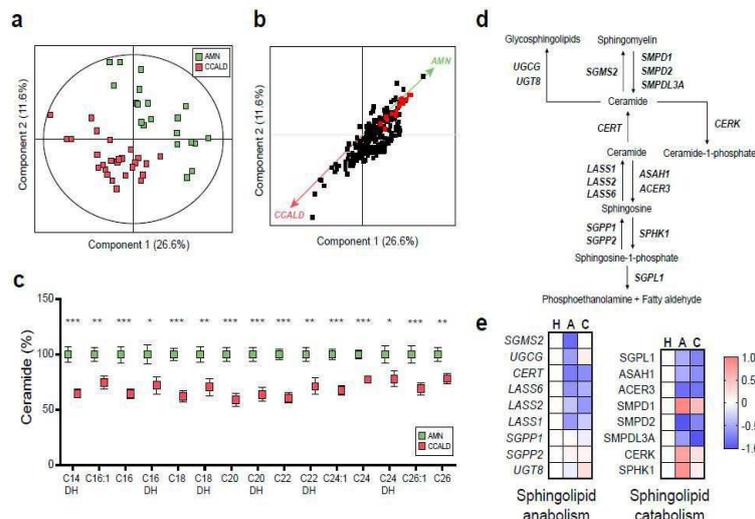
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 X-연관 부신백질이영양증 진단용 바이오마커 조성물

(57) 요약

본 발명은 X-연관 부신백질이영양증 (X-linked adrenoleukodystrophy, X-ALD) 진단용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 X-연관 부신백질이영양증 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것으로, 성인에게서 나타나는 부신척수신경병증 (AMN)과 소아에게서 나타나는 소아기 대뇌부신백질이영양증 (CCALD)의 지질대사 중 스핑고리피드 (sphingolipid)와 트리아실글리세롤(triacylglycerol) 대사에 관련된 유전자 발현 차이를 확인함에 따라, 상기 지질 대사를 조절하는 유전자를 X-연관 부신백질이영양증 진단용 바이오마커로 제공할 수 있으며, 이들의 발현 수준 차이를 이용하여 X-연관 부신백질이영양증을 정확하게 구별하는 진단방법을 제공할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류
 G01N 2030/8813 (2013.01)
 G01N 2800/28 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
 PEREIRA, FERNANDA DOS SANTOS, 'Aspectos moleculares da adrenoleucodistrofia ligada ao X: epidemiologia, paradigmas diagnosticos e potenciais genes modificadores', 2012, pp 1-134. https://www.lume.ufrg*
 KR1020180044617 A
 KR1020180030074 A
 KR1020120130525 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345282414
과제번호	2018R1D1A1B07046207
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	Lipidomics 기반 CALD 임상타입을 구분짓는 타겟 발굴 및 임상타입 전환 치료제 개발
기여율	35/100
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2018.06.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711074086
과제번호	2017M3A9F8072353
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오. 의료기술개발(R&D)
연구과제명	중배엽 및 외배엽 표지인자 도입 연구용 인간배아줄기세포주 확립 및 세포주분양과
기여율	30/100
과제수행기관명	서울대학교
연구기간	2018.06.01 ~ 2019.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711105213
과제번호	2012M3A9C4048796
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오. 의료기술개발(R&D)
연구과제명	대사체학 기반 전통 천연물 Profiling DB 구축
기여율	35/100
과제수행기관명	서울대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

ELOVL6 (NCBI NO.79071), HSD17B12 (NCBI NO.51144), PECR (NCBI NO.55825), ELOVL2 (NCBI NO.54898), ELOVL5 (NCBI NO.60481), SCD (NCBI NO.6319), FADS2 (NCBI NO.9415), ACAA1 (NCBI NO.30), HADHA (NCBI NO.3030), SGMS2 (NCBI NO.166929), UGCG (NCBI NO.7357), CERT (NCBI NO.10087), LASS6 (NCBI NO.253782), LASS2 (NCBI NO.29956), LASS1 (NCBI NO.2657), SGPP1 (NCBI NO.81537), SGPP2 (NCBI NO.130367), UGT8 (NCBI NO.7368), SGPL1 (NCBI NO.8879), ASAH1 (NCBI NO.427), ACER3 (NCBI NO.55331), SMPD1 (NCBI NO.6609), SMPD2 (NCBI NO.6610), SMPDL3A (NCBI NO.10924), CERK (NCBI NO.64781), SPHK1 (NCBI NO.8877), GK (NCBI NO.2710), GPAM (NCBI NO.57678), GPAT2 (NCBI NO.150763), GPAT3 (NCBI NO.84803), GPAT4 (NCBI NO.137964), LCLAT1 (NCBI NO.253558), MBOAT1 (NCBI NO.154141), MBOAT2 (NCBI NO.129642), AGPAT1 (NCBI NO.10554), AGPAT2 (NCBI NO.10555), AGPAT3 (NCBI NO.56894), AGPAT4 (NCBI NO.56895), AGPAT5 (NCBI NO.55326), LPIN1 (NCBI NO.23175), LPIN2 (NCBI NO.9663), LPIN3 (NCBI NO.64900), DGAT1 (NCBI NO.8694), DGAT2 (NCBI NO.84649), MOGAT1 (NCBI NO.116255), MOGAT2 (NCBI NO.80168), MOGAT3 (NCBI NO.346606), CEL (NCBI NO.1056), PNPLA2 (NCBI NO.57104), PNPLA3 (NCBI NO.80339), PNLIP (NCBI NO.5406), PLRP1 (NCBI NO.5407), PLRP2 (NCBI NO.5408), PLRP3 (NCBI NO.119548), LPL (NCBI NO.4023), DGKA (NCBI NO.1606), DGKB (NCBI NO.1607), DGKE (NCBI NO.8526), DGKG (NCBI NO.1608), DGKH (NCBI NO.160851), DGKI (NCBI NO.9162), DGKQ (NCBI NO.1609), DGKZ (NCBI NO.8525) 및 AGK (NCBI NO.55750) 유전자를 모두 포함하는 X-연관 부신백질이영양증 (X-linked adrenoleukodystrophy, X-ALD) 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 X-연관 부신백질이영양증 (X-ALD)은 소아기 대뇌부신백질이영양증 (Childhood cerebral adrenoleukodystrophy, CCALD) 및 부신척수신경병증 (Adrenomyeloneuropathy, AMN)을 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 바이오마커 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 바이오마커 조성물은 정상 대조군과 비교하여 발현 수준 변화가 나타내는 것을 특징으로 하는 X-연관 부신백질이영양증 (X-linked adrenoleukodystrophy, X-ALD) 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 4

개체로부터 분리된 세포에서 ELOVL6, HSD17B12, PECR, ELOVL2, ELOVL5, SCD, FADS2, ACAA1, HADHA, SGMS2, UGCG, CERT, LASS6, LASS2, LASS1, SGPP1, SGPP2, UGT8, SGPL1, ASAH1, ACER3, SMPD1, SMPD2, SMPDL3A, CERK, SPHK1, GK, GPAM, GPAT2, GPAT3, GPAT4, LCLAT1, MBOAT1, MBOAT2, AGPAT1, AGPAT2, AGPAT3, AGPAT4, AGPAT5, LPIN1, LPIN2, LPIN3, DGAT1, DGAT2, MOGAT1, MOGAT2, MOGAT3, CEL, PNPLA2, PNPLA3, PNLIP, PLRP1, PLRP2, PLRP3, LPL, DGKA, DGKB, DGKE, DGKG, DGKH, DGKI, DGKQ, DGKZ 및 AGK 유전자 발현 수준을 확인하는 단계; 및 상기 유전자 발현 수준을 정상 대조군과 비교하여 발현 변화를 확인하는 단계를 포함하는 X-연관 부신백질이영양증 (X-ALD) 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 유전자 발현 수준은 정상 대조군과 비교하여 발현이 감소 또는 증가되는 것을 특징으로 하는 X-연관 부신백질이영양증 (X-ALD) 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 세포는 인간으로부터 분리된 섬유아세포인 것을 특징으로 하는 X-연관 부신백질이영양증 (X-ALD) 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

개체로부터 분리된 세포에서 SGMS2, UGCG, CERT, LASS6, LASS1, UGT8, SMPD1, CREK, SPHK1, GPAM, GPAT2, LCLAT1, MBOAT1, MBOAT2, AGPAT2, AGPAT3, AGPAT4, MOGAT2, MOGAT3, DGAT2 및 LPIN1 유전자 발현 수준을 확인하는 단계; 및

상기 유전자 발현 수준을 소아기 대뇌부신백질이영양증 (CCALD) 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 X-연관 부신백질이영양증 (X-ALD) 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 SGMS2, UGCG, CERT, LASS6, LASS1 및 UGT8은 소아기 대뇌부신백질이영양증 (CCALD) 대조군보다 부신척수신경병증 (AMN)에서 발현이 감소된 것을 특징으로 하는 X-연관 부신백질이영양증 (X-ALD) 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 상기 SMPD1, CREK, SPHK1, GPAM, GPAT2, LCLAT1, MBOAT1, MBOAT2, AGPAT2, AGPAT3, AGPAT4, MOGAT2, MOGAT3, DGAT2 및 LPIN1은 소아기 대뇌부신백질이영양증 (CCALD) 대조군보다 부신척수신경병증 (AMN)에서 발현이 증가된 것을 특징으로 하는 X-연관 부신백질이영양증 (X-ALD) 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

청구항 7에 있어서, 상기 세포는 인간으로부터 분리된 섬유아세포인 것을 특징으로 하는 X-연관 부신백질이영양증 (X-ALD) 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

청구항 7에 있어서, 상기 X-연관 부신백질이영양증 (X-ALD)은 부신척수신경병증 (AMN)인 것을 특징으로 하는 X-연관 부신백질이영양증 (X-ALD) 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 12

ELOVL6, HSD17B12, PECR, ELOVL2, ELOVL5, SCD, FADS2, ACAA1, HADHA, SGMS2, UGCG, CERT, LASS6, LASS2, LASS1, SGPP1, SGPP2, UGT8, SGPL1, ASAH1, ACER3, SMPD1, SMPD2, SMPDL3A, CERK, SPHK1, GK, GPAM, GPAT2, GPAT3, GPAT4, LCLAT1, MBOAT1, MBOAT2, AGPAT1, AGPAT2, AGPAT3, AGPAT4, AGPAT5, LPIN1, LPIN2, LPIN3, DGAT1, DGAT2, MOGAT1, MOGAT2, MOGAT3, CEL, PNPLA2, PNPLA3, PNLIP, PLRP1, PLRP2, PLRP3, LPL, DGKA, DGKB, DGKE, DGKG, DGKH, DGKI, DGKQ, DGKZ 및 AGK 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 X-연관 부신백질이영양증 (X-ALD) 진단용 키트.

청구항 13

SGMS2, UGCG, CERT, LASS6, LASS1, UGT8, SMPD1, CREK, SPHK1, GPAM, GPAT2, LCLAT1, MBOAT1, MBOAT2, AGPAT2, AGPAT3, AGPAT4, MOGAT2, MOGAT3, DGAT2 및 LPIN1 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 X-연관 부신백질이영양증 (X-ALD) 질환 구별용 키트.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 X-연관 부신백질이영양증 (X-ALD) 질환은 소아기 대뇌부신백질이영양증 (CCALD) 또는 부신척수신경병증 (AMN)인 것을 특징으로 하는 X-연관 부신백질이영양증 (X-ALD) 질환 구별용 키트.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 X-연관 부신백질이영양증 (X-linked adrenoleukodystrophy, X-ALD) 진단용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 X-연관 부신백질이영양증 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] X-연관 부신백질이영양증 (X-ALD)는 포화 상태인 장쇄 지방산 (VLCFA)이 뇌, 부신 피질, 고환 및 피부 섬유아세포와 같은 모든 조직에 축적되는 파괴적인 대사장애이다. VLCFA 축적은 ATP 결합상자 (ATP-binding cassette, ABC) 전달체 서브 패밀리 D 구성원 1 (ABCD1)에 의해 암호화되는 페록시좀 수송체의 유전적 결함에 기인한다. 상기 ABCD1 수송체는 VLCFA가 분해되어 페록시좀에 들어가는 중요한 역할을 한다.
- [0003] 다양한 표현형 중 두 가지 유행하는 표현형은 어린 소년 또는 드물게 성인에게서 나타나는 급성 염증성 대뇌 탈수초화 형태인 X-ALD (Childhood cerebral adrenoleukodystrophy, CCALD)와 20-30세 사이에 척수에서 비염증성 말초 축삭병증이 서서히 나타나는 부신척수신경병증 (Adrenomyeloneuropathy, AMN)이다.
- [0004] AMN과 CCALD 사이의 주요 차이점인 대뇌 염증 반응은 VLCFA 대사 산물의 비정상적인 축적 이후에 시작되는 것으로 보고되어졌다. 이에 따라 콜레스테롤 에스테르, 강글리오사이드, 인지질 또는 프로테오리피드의 대량 축적은 CCALD 환자의 뇌에서 염증 반응의 생화학적 유발 인자로 오랫동안 고려되어왔다.
- [0005] 그러나 VLCFA의 축적에 따른 ABCD1 결함만으로 X-ALD의 표현형 가변성 뒤에 있는 분자 기반을 적절히 설명할 수 없으며, 이 질환의 유전자형-표현형 상관 관계는 현재까지 확인되지 않았다. X-ALD에 대한 많은 병리 생리학적인 연구는 VLCFA, 특히 포화 및 단일 불포화 종과 이와 관련된 생화학적 경로에 국한되었다. 콜레스테롤 에스테르와 인지질에 대한 연구는 거의 없었지만, 상기 연구 결과들은 각 종에서 VLCFA의 축적에 관한 것으로, 궁극적으로 이전 연구가 X-ALD의 유전적 및 대사성 기능 장애에 대한 전체적인 영향을 적절히 다루지 못했기 때문에 뇌 조직에서 태아의 진행성 염증성 탈수초화를 유도하는 생화학적 불균형의 기본 메커니즘이 아직까지 밝혀지지 않고 있다.
- [0006] 복잡한 지질, 이에 상응하는 효소 및 지질 대사 경로의 다른 조절 인자는 다른 변화에 상호 작용함으로써 병리학적인 요인에 대한 유연성을 제공한다. 따라서 X-ALD의 병리학적인 기전을 설명하고 보다 정확한 질환의 진단을 위해서는 전체 지질 변화와 관련된 조절 인자들을 특성화할 수 있는 보다 집중적이고 포괄적인 방법이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2018-0044617호 (2018.05.03. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 X-ALD 질환 중 성인에게서 나타나는 부신척수신경병증 (AMN)과 소아에게서 나타나는 소아기 대뇌부신백질이영양증 (CCALD)의 지질대사와 관련된 유전자의 발현 수준이 상이한 것을 확인함에 따라, 발현 차이를 나타내는 유전자를 이용하여 AMN와 CCALD 질환을 구별하여 진단하기 위한 바이오마커 조성물 및 이를 이용하여 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명은 ELOVL6, HSD17B12, PECR, ELOVL2, ELOVL5, SCD, FADS2, ACAA1, HADHA, SGMS2, UGCG, CERT, LASS6, LASS2, LASS1, SGPP1, SGPP2, UGT8, SGPL1, ASAH1, ACER3, SMPD1, SMPD2, SMPDL3A, CERK, SPHK1, GK, GPAM, GPAT2, GPAT3, GPAT4, LCLAT1, MBOAT1, MBOAT2, AGPAT1, AGPAT2, AGPAT3, AGPAT4, AGPAT5, LPIN1, LPIN2, LPIN3, DGAT1, DGAT2, MOGAT1, MOGAT2, MOGAT3, CEL, PNPLA2, PNPLA3, PNLIP, PLRP1, PLRP2, PLRP3, LPL, DGKA, DGKB, DGKE, DGKG, DGKH, DGKI, DGKQ, DGKZ 및 AGK으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 유전자를 포함하는 X-연관 부신백질이영양증 (X-linked adrenoleukodystrophy, X-ALD) 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0010] 본 발명은 개체로부터 분리된 세포에서 ELOVL6, HSD17B12, PECR, ELOVL2, ELOVL5, SCD, FADS2, ACAA1, HADHA, SGMS2, UGCG, CERT, LASS6, LASS2, LASS1, SGPP1, SGPP2, UGT8, SGPL1, ASAH1, ACER3, SMPD1, SMPD2, SMPDL3A, CERK, SPHK1, GK, GPAM, GPAT2, GPAT3, GPAT4, LCLAT1, MBOAT1, MBOAT2, AGPAT1, AGPAT2, AGPAT3,

AGPAT4, AGPAT5, LPIN1, LPIN2, LPIN3, DGAT1, DGAT2, MOGAT1, MOGAT2, MOGAT3, CEL, PNPLA2, PNPLA3, PNLIP, PLRP1, PLRP2, PLRP3, LPL, DGKA, DGKB, DGKE, DGKG, DGKH, DGKI, DGKQ, DGKZ 및 AGK로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자 발현 수준을 확인하는 단계; 및 상기 유전자 발현 수준을 정상 대조군과 비교하여 발현 변화를 확인하는 단계를 포함하는 X-연관 부신백질이영양증 (X-ALD) 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명은 개체로부터 분리된 세포에서 SGMS2, UGCG, CERT, LASS6, LASS1, UGT8, LCLAT1, MBOAT1, MBOAT2, AGPAT2, AGPAT3, AGPAT4, MOGAT2, MOGAT3, DGAT2 및 LPIN1로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자 발현 수준을 확인하는 단계; 및 상기 유전자 발현 수준을 소아기 대뇌부신백질이영양증 (CCALD) 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 X-연관 부신백질이영양증 (X-ALD) 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명은 ELOVL6, HSD17B12, PECR, ELOVL2, ELOVL5, SCD, FADS2, ACAA1, HADHA, SGMS2, UGCG, CERT, LASS6, LASS2, LASS1, SGPP1, SGPP2, UGT8, SGPL1, ASAH1, ACER3, SMPD1, SMPD2, SMPDL3A, CERK, SPHK1, GK, GPAM, GPAT2, GPAT3, GPAT4, LCLAT1, MBOAT1, MBOAT2, AGPAT1, AGPAT2, AGPAT3, AGPAT4, AGPAT5, LPIN1, LPIN2, LPIN3, DGAT1, DGAT2, MOGAT1, MOGAT2, MOGAT3, CEL, PNPLA2, PNPLA3, PNLIP, PLRP1, PLRP2, PLRP3, LPL, DGKA, DGKB, DGKE, DGKG, DGKH, DGKI, DGKQ, DGKZ 및 AGK으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 X-연관 부신백질이영양증 (X-ALD) 진단용 키트를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 SGMS2, UGCG, CERT, LASS6, LASS1, UGT8, SMPD1, CREK, SPHK1, GPAM, GPAT2, LCLAT1, MBOAT1, MBOAT2, AGPAT2, AGPAT3, AGPAT4, MOGAT2, MOGAT3, DGAT2 및 LPIN1로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 X-연관 부신백질이영양증 (X-ALD) 질환 구별용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따르면, 성인에게서 나타나는 부신척수신경병증 (AMN)과 소아에게서 나타나는 소아기 대뇌부신백질이영양증 (CCALD)의 지질대사 중 스핑고리피드(sphingolipid)와 트리아실글리세롤(triacylglycerol) 대사에 관련된 유전자 발현 차이를 확인함에 따라, 상기 지질 대사를 조절하는 유전자를 X-연관 부신백질이영양증 진단용 바이오마커로 제공할 수 있으며, 이들의 발현 수준 차이를 이용하여 X-연관 부신백질이영양증을 정확하게 구별하는 진단방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 대조군 (HDF) 및 2 종류의 X-ALD 질환 (AMN 및 CCALD)에서 10개의 지질 종의 지질체 변형을 확인한 것으로, 도 1a는 모든 지질 종의 발현을 확인한 적외선 열지도 결과로, HDF (n = 14), AMN (n = 21) 및 CCALD (n = 26)에서 각 지질의 표준화된 발현을 녹색에서 적색까지의 스케일 범위로 나타낸 것이다. 도 1b는 전체 지질체 데이터의 PLS-DA 점수를 플롯으로 나타낸 결과로, HDF, AMN 및 CCALD의 관측치를 각각 회색, 녹색 및 빨간색으로 표시하였다. 도 1c는 특이적인 지질 종 (PE, SM, TG, CER, LPC 및 PC)의 상대적 변화를 확인한 결과로, 배수 변화도 (fold change)는 평균값으로 나타내었다.

도 2는 X-ALD에서 과불포화지방산 (polyunsaturated fatty acids, PUFA) 및 이와 관련된 조절자의 발현 수준을 확인한 것으로, 도 2a는 관련된 지질의 PLS-DA (Partial least square-discriminant analysis)의 로딩 플롯을 나타낸 결과로, 박스는 불포화지방산이 포함될 가능성이 있는 지질 ($U_n \geq 4$, red) 및 과불포화된 지질 ($U_n \leq 3$, black)로 분류된 다른 종의 지질을 나타내며, 각 화살표는 높은 발현을 갖는 그룹으로 향하는 지질을 나타낸다. 도 2b는 PLS-DA 플롯에서 열거된 지질의 열지도이다. 도 2c는 불포화 지방산의 합성 경로 및 관련된 조절자를 개시한 모식도이다. 도 2d는 상기 경로의 각 효소 및 대사 조절자의 유전자 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 3은 AMN 및 CCALD 사이의 독특한 마커로서 세라마이드 (Ceramide) 및 스핑고리피드 경로에서 전사체의 발현 변화를 확인한 것으로, 도 3a는 X-ALD 질환의 두 표현형의 상대적으로 명확한 분리를 확인한 PLS-DA 점수 플롯으로, AMN (n = 21) 및 CCALD (n = 26)의 관측치는 각각 녹색과 적색으로 표시되었다. 도 3b는 두 그룹의 PLS-DA 로딩 플롯을 나타낸 결과로, 세라마이드를 적색으로 나타내었다. 도 3c는 AMN 및 CCALD에서 모든 세라마이드의 상대적 풍부도를 확인한 결과로, 데이터는 평균값으로 나타내었다 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 및 *** $p < 0.001$). 도 3d는 스핑고리피드 경로 및 이에 상응되는 조절자를 개시한 모식도이다. 도 3e는 스핑고리피드 경로의 효소 및 대사 조절자의 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 4는 AMN 및 CCALD에서 차별화되는 트리아실글리세롤의 변화를 확인한 것으로, 도 4a는 PLS-DA 모델의 로딩 플롯으로, 트리아실글리세롤을 적색 (C48) 내지 노란색 (C64)으로 표시된 박스로 나타내었다. 도 4b는 AMN 및 CCALD에서 모든 트리아실글리세롤의 상대적 풍부도 (HDF as 100%)를 확인한 결과로, 데이터는 평균값으로 나타내었다 (*p<0.05, **p<0.01, 및 ***p<0.001). 도 4c는 트리아실글리세롤 대사 및 이에 상응하는 조절자를 개시한 모식도이다. 도 4d는 트리아실글리세롤 대사의 효소 및 대사 조절자의 발현 수준을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0017] 본 발명은 X-ALD 질환 중 성인에게서 나타나는 부신척수신경병증 (Adrenomyeloneuropathy, AMN)과 소아에게서 나타나는 소아기 대뇌부신백질이영양증 (Childhood cerebral adrenoleukodystrophy, CCALD)의 지질대사와 관련된 유전자의 발현 수준이 상이한 것을 확인함에 따라, 발현 차이를 나타내는 유전자를 이용하여 AMN와 CCALD 질환을 구별하여 진단하기 위한 기술로, 본 발명의 발명자들은 AMN와 CCALD의 지질대사 중 스핑고리피드 (sphingolipid)와 트리아실글리세롤(triacylglycerol) 대사에 관련된 유전자 발현 차이를 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0019] 본 발명은 ELOVL6 (NCBI NO.79071), HSD17B12 (NCBI NO.51144), PECR (NCBI NO.55825), ELOVL2 (NCBI NO.54898), ELOVL5 (NCBI NO.60481), SCD (NCBI NO.6319), FADS2 (NCBI NO.9415), ACAA1 (NCBI NO.30), HADHA (NCBI NO.3030), SGMS2 (NCBI NO.166929), UGCG (NCBI NO.7357), CERT (NCBI NO.10087), LASS6 (NCBI NO.253782), LASS2 (NCBI NO.29956), LASS1 (NCBI NO.2657), SGPP1 (NCBI NO.81537), SGPP2 (NCBI NO.130367), UGT8 (NCBI NO.7368), SGPL1 (NCBI NO.8879), ASAH1 (NCBI NO.427), ACER3 (NCBI NO.55331), SMPD1 (NCBI NO.6609), SMPD2 (NCBI NO.6610), SMPDL3A (NCBI NO.10924), CERK (NCBI NO.64781), SPHK1 (NCBI NO.8877), GK (NCBI NO.2710), GPAM (NCBI NO.57678), GPAT2 (NCBI NO.150763), GPAT3 (NCBI NO.84803), GPAT4 (NCBI NO.137964), LCLAT1 (NCBI NO.253558), MBOAT1 (NCBI NO.154141), MBOAT2 (NCBI NO.129642), AGPAT1 (NCBI NO.10554), AGPAT2 (NCBI NO.10555), AGPAT3 (NCBI NO.56894), AGPAT4 (NCBI NO.56895), AGPAT5 (NCBI NO.55326), LPIN1 (NCBI NO.23175), LPIN2 (NCBI NO.9663), LPIN3 (NCBI NO.64900), DGAT1 (NCBI NO.8694), DGAT2 (NCBI NO.84649), MOGAT1 (NCBI NO.116255), MOGAT2 (NCBI NO.80168), MOGAT3 (NCBI NO.346606), CEL (NCBI NO.1056), PNPLA2 (NCBI NO.57104), PNPLA3 (NCBI NO.80339), PNLIP (NCBI NO.5406), PLRP1 (NCBI NO.5407), PLRP2 (NCBI NO.5408), PLRP3 (NCBI NO.119548), LPL (NCBI NO.4023), DGKA (NCBI NO.1606), DGKB (NCBI NO.1607), DGKE (NCBI NO.8526), DGKG (NCBI NO.1608), DGKH (NCBI NO.160851), DGKI (NCBI NO.9162), DGKQ (NCBI NO.1609), DGKZ (NCBI NO.8525) 및 AGK (NCBI NO.55750)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 유전자를 포함하는 X-연관 부신백질이영양증 (X-linked adrenoleukodystrophy, X-ALD) 진단용 바이오마커 조성물을 제공할 수 있다.
- [0020] 상기 X-연관 부신백질이영양증 (X-ALD)은 소아기 대뇌부신백질이영양증 (Childhood cerebral adrenoleukodystrophy, CCALD) 및 부신척수신경병증 (Adrenomyeloneuropathy, AMN)을 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0021] 상기 바이오마커 조성물은 정상 대조군과 비교하여 발현 수준 변화가 나타내는 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명은 개체로부터 분리된 세포에서 ELOVL6, HSD17B12, PECR, ELOVL2, ELOVL5, SCD, FADS2, ACAA1, HADHA, SGMS2, UGCG, CERT, LASS6, LASS2, LASS1, SGPP1, SGPP2, UGT8, SGPL1, ASAH1, ACER3, SMPD1, SMPD2, SMPDL3A, CERK, SPHK1, GK, GPAM, GPAT2, GPAT3, GPAT4, LCLAT1, MBOAT1, MBOAT2, AGPAT1, AGPAT2, AGPAT3, AGPAT4, AGPAT5, LPIN1, LPIN2, LPIN3, DGAT1, DGAT2, MOGAT1, MOGAT2, MOGAT3, CEL, PNPLA2, PNPLA3, PNLIP, PLRP1, PLRP2, PLRP3, LPL, DGKA, DGKB, DGKE, DGKG, DGKH, DGKI, DGKQ, DGKZ 및 AGK로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자 발현 수준을 확인하는 단계; 및 상기 유전자 발현 수준을 정상 대조군과 비교하여 발현 변화를 확인하는 단계를 포함하는 X-연관 부신백질이영양증 (X-ALD) 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공할 수 있다.
- [0023] 상기 유전자 발현 수준은 정상 대조군과 비교하여 발현이 감소 또는 증가되는 것일 수 있다.
- [0024] 상기 세포는 인간으로부터 분리된 섬유아세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 본 발명은 개체로부터 분리된 세포에서 SGMS2, UGCG, CERT, LASS6, LASS1, UGT8, SMPD1, CREK, SPHK1, GPAM, GPAT2, LCLAT1, MBOAT1, MBOAT2, AGPAT2, AGPAT3, AGPAT4, MOGAT2, MOGAT3, DGAT2 및 LPIN1로 이루어진 군에

서 선택된 어느 하나 이상의 유전자 발현 수준을 확인하는 단계; 및 상기 유전자 발현 수준을 소아기 대뇌부신백질이영양증 (CCALD) 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 X-연관 부신백질이영양증 (X-ALD) 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공할 수 있으며, 보다 바람직하게는 부신척수신경병증 (AMN) 진단을 위한 정보를 제공하는 것일 수 있다.

- [0026] 상기 SGMS2, UGCG, CERT, LASS6, LASS1 및 UGT8은 소아기 대뇌부신백질이영양증 (CCALD) 대조군보다 부신척수신경병증 (AMN)에서 발현이 감소될 수 있다.
- [0027] 상기 SMPD1, CREK, SPHK1, GPAM, GPAT2, LCLAT1, MBOAT1, MBOAT2, AGPAT2, AGPAT3, AGPAT4, MOGAT2, MOGAT3, DGAT2 및 LPIN1은 소아기 대뇌부신백질이영양증 (CCALD) 대조군보다 부신척수신경병증 (AMN)에서 발현이 증가될 수 있다.
- [0028] 상기 세포는 인간으로부터 분리된 섬유아세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 상기 유전자의 발현 수준을 확인하는 방법은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR (Competitive RT-PCR), 실시간 RTPCR (Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법 (RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅 (Northern blotting) 및 마이크로어레이 (microarray)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 이용할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명은 ELOVL6, HSD17B12, PECR, ELOVL2, ELOVL5, SCD, FADS2, ACAA1, HADHA, SGMS2, UGCG, CERT, LASS6, LASS2, LASS1, SGPP1, SGPP2, UGT8, SGPL1, ASAH1, ACER3, SMPD1, SMPD2, SMPDL3A, CERK, SPHK1, GK, GPAM, GPAT2, GPAT3, GPAT4, LCLAT1, MBOAT1, MBOAT2, AGPAT1, AGPAT2, AGPAT3, AGPAT4, AGPAT5, LPIN1, LPIN2, LPIN3, DGAT1, DGAT2, MOGAT1, MOGAT2, MOGAT3, CEL, PNPLA2, PNPLA3, PNLIP, PLRP1, PLRP2, PLRP3, LPL, DGKA, DGKB, DGKE, DGKG, DGKH, DGKI, DGKQ, DGKZ 및 AGK으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 X-연관 부신백질이영양증 (X-ALD) 진단용 키트를 제공할 수 있다.
- [0031] 또한, 본 발명은 SGMS2, UGCG, CERT, LASS6, LASS1, UGT8, SMPD1, CREK, SPHK1, GPAM, GPAT2, LCLAT1, MBOAT1, MBOAT2, AGPAT2, AGPAT3, AGPAT4, MOGAT2, MOGAT3, DGAT2 및 LPIN1로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 X-연관 부신백질이영양증 (X-ALD) 질환 구별용 키트를 제공할 수 있다.
- [0032] 보다 상세하게 상기 구별용 키트는 X-연관 부신백질이영양증 (X-ALD) 질환은 소아기 대뇌부신백질이영양증 (CCALD) 또는 부신척수신경병증 (AMN)으로 구별하여 진단하는 키트일 수 있다.
- [0033] 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 상기 "프라이머"는 짧은 자유 3'-말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 짧은 핵산 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 증합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머라제 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지의 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에서 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.
- [0035] 상기 "프로브"는 mRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무, 발현양을 확인할 수 있다.
- [0036] 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA)프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.
- [0038] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0040] <실험예>
- [0041] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.
- [0043] 1. 화합물 및 시약

- [0044] HPLC (High performance liquid chromatography) 등급의 클로포름 (chloroform), 메탄올 (methanol), 2-프로판올 (2-propanol), 아세토나이트릴 (acetonitrile) 및 물을 J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였다.
- [0045] 용리 완충액, 암모늄 아세테이트 및 포름산은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 디아실글리세롤 (Diacylglycerol, DG, 12:0/12:0), 트리아실글리세롤 (triacylglycerol, TG, 17:0/17:0/17:0), 포스파티딜콜린 (phosphatidylcholine, PC, 10:0/10:0), 포스파티딜에탄올아민 (phosphatidylethanolamine, PE, 10:0/10:0), 스피고미엘린 (sphingomyelin, SM, 18:1d/17:0) 및 내부표준으로 세라마이드 (ceramide, CER, C17)를 Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)에서 구입하였다.
- [0047] 2. X-ALD 환자 유래 세포 확립
- [0048] 사람 X-ALD 섬유아세포 GM04496 (CCALD), GM04934 (CCALD), GM07530 (AMN) 및 GM17819 (AMN)와 대조군 사람 피부 섬유아세포 (신생아 HDF 및 성인 HDF)를 Coriell Institute (Camden, NJ, USA) 및 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)에서 각각 구입하였다.
- [0049] 사람 X-ALD 섬유아세포는 앞서 보고된 바와 같이 환자 임상 정보와 함께 두 명의 한국 CCALD 환자 및 한국 AMN 환자로 부터 얻은 피부 편지 생검에서 유래되고 확립되었다.
- [0050] 섬유아세포를 10% 태아소혈청 (FBS; GIBCO, Grand Island, NY, USA), 1 mM 글루타민 (GIBCO), 1% 비필수 아미노산 (Invitrogen), 및 페닐실린/스트렙토마이신 (Invitrogen)이 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 섬유아배지에서 배양하였다.
- [0052] 3. RNA 분리 및 유전자 발현 프로파일
- [0053] Affymetrix GeneChip® HT HG-U133+ PM Array를 이용하여 전체적인 유전자 발현 분석을 수행하였다 (DNA Link, Seoul, Korea). 제조사의 설명서 및 추천 방법에 따라 시료를 준비하였다.
- [0054] RNeasy Mini Kit columns (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 전체 RNA를 분리하고 RNA 6000 Nano Chip (Agilent Technologies, Amstelveen, The Netherlands)을 이용하여 Agilent 2100 Bioanalyzer로 RNAN 품질을 확인하였으며, ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA)로 정량하였다.
- [0055] 프로토콜에서 추천된 바와 같이 RNA 시료 (300 ng)를 Affymetrix 절차에 따라 주입하여 진행하였다.
- [0056] 간략하게 각 시료의 전체 RNA 300 ng을 T7 프로모터에 결합하는 올리고 (dT) 프라이머를 이용하여 이중 주형 cDNA로 전환시켰다.
- [0057] IVT (in-vitro transcription) 반응 및 Affymetrix sample cleanup module를 이용한 정제를 통하여 이중 가닥 cDNA 주형으로부터 비오틴 변형된 증폭 RNA (cRNA)를 합성하였으며, 유전자 칩 발현 분석 기술 안내서 (Affymetrix)에 기재된 바와 같이 어레이를 위한 하이브리드화를 위해 표지된 증폭 RNA를 단편화하였다.
- [0058] GeneTitan® MC Instrument (Affymetrix)를 이용하여 자동 하이브리드화, 세척, 염색 및 스캔을 수행하였다.
- [0060] 4. 마이크로어레이 결과 획득, 처리 및 분석
- [0061] Affymetrix Command Console software 1.1.로 부터 스캔된 이미지 결과를 추출하였다. 상기 과정을 통하여 생성된 가공되지 않는 데이터는 발현 강도 데이터를 의미하고 다음 단계에 사용되었다.
- [0062] 표준화를 위해, Affymetrix Expression Console software (version 1.1)로 구현된 Affymetrix microarray suite 5 (MAS5) algorithm을 사용하였다.
- [0063] 중요한 유전자 검색에 있어서 노이즈를 제거하기 위해, MAS5 detection call이 present call로 판정되지 않는 시료를 분석에서 제외하였다.
- [0064] 대조군과 실험군의 신호값을 비교하여 높게 발현된 유전자를 선택하여 추가 실험을 진행하였다. 지질 대사와 관련된 유전자를 HUGO에 따라 명명하였으며, Gene ontology 및 KEGG pathway database에 포함된 각 유전자기능 정보에 따라 분류하였다.
- [0066] 5. 지질 추출
- [0067] 앞서 보고된 방법(Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. Journal of

Lipid Research 50, S9-S14, 2009)을 약간 변형시킨 냉동-해동 방법 (freeze-thaw method)를 이용하여 초대 세포에서 지질을 추출하였다.

- [0068] 내부 표준으로, 1 μg 의 diacylglycerol (DG, 12:0/12:0), triacylglycerol (TG, 17:0/17:0/17:0), phosphatidylcholine (PC, 10:0/10:0), phosphatidylethanolamine (PE, 10:0/10:0), sphingomyelin (SM, 18:1d/17:0), 및 ceramide (CER, C17)를 어름처럼 차가운 chloroform/methanol/water (2:5:2, v/v/v) 용액에 침지시킨 각 분취액에 첨가하였다. 다음으로 각각의 분취액 튜브를 3 주기의 냉동/해동 (액체 질소 / 얼음 챔버)을 수행하였다.
- [0069] 이후 1 mL의 클로로포름을 첨가하여 액체-액체 추출(LLE)을 수행하였다. 저농도 유기층을 유리 바이알로 옮겼으며, 상기 과정을 3회 반복하였다.
- [0070] 모든 지질 추출물을 막 필터(0.2 μm , hydrophobic PTFE, Advantec, Japan)를 통과시켜 여과하고, 질소 가스 하에서 증발 건조시킨 후 여과물을 HPLC 등급의 이소프로판올 100 μL 로 환원시켰다.
- [0071] 정량 표준화 및 세포 계수를 위해 BCA 분석 (BCA assay kit, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)을 수행하였다.
- [0073] 6. 지질 확인을 위한 LC-MS 및 표적 MS/MS 조건
- [0074] ACQUITY BEH C18 column (2.1 \times 100 mm, 1.7 μm , Waters, Milford, MA, USA) 을 갖춘 1260 HPLC system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 장비에 지질 추출물을 주입하여 분리하였다.
- [0075] 40 $^{\circ}\text{C}$, 0.15 mL/min 유속으로 이중 기울기 용리하에서 분리를 수행하였다.
- [0076] 이동상 A는 아세트나이트릴/물 (1:9, v/v)이며, 이동상 B는 이소프로판올/아세트나이트릴 (3:1, v/v)로 상기 이동상 모두 10 mM 암모늄 아세테이트 및 0.1% 포름산을 포함하였다. 용액 기울기 조건은 다음과 같다: 0 min, 40% B; 5 min, 70% B; 20 min, 90% B; 25 min, 100% B; 38 min 100% B; 40 min, 40% B; 50 min, 40% B.
- [0077] 분리된 지질을 Agilent 6530 QTOF-MS로 검출하였다. 양성 모드 이온 검출은 다음과 같은 파라미터로 수행되었다: sheath gas temperature, 350 $^{\circ}\text{C}$; sheath gas flow, 12 L/min; nebulizer, 40 psi; dry gas temperature, 325 $^{\circ}\text{C}$; dry gas flow 11 L/min; capillary voltage, 4000 V; nozzle voltage, 500 V; fragmentor, 100 V.
- [0078] 스캔 모드로 비표적화된 LC-MS 분석을 통하여 크로마토그램을 얻은 후 상기 동일한 파라미터를 갖는 표적화된 MS/MS 데이터베이스에서 단편 패턴과 스펙트럼을 맞추어 확인하였다.
- [0079] 첫번로, MZmine (버전 2.30)을 적용하여 다음과 같은 파라미터로 각 m/z의 크로마토그램을 추출하였다: peak detection (intensity threshold, 5,000), chromatogram builder (minimum time, 0.1 min; height threshold, 30,000; m/z threshold 0.05 m/z), chromatogram deconvolution (Savitzky-Golay algorithm, height threshold 20,000; peak duration, 0.05 to 2 min; derivative threshold, 80%), 및 isotopic peak grouper (m/z threshold, 0.01; retention time tolerance, 0.05 min).
- [0080] 추출된 모든 이온 크로마토그래피 중 모든 지질은 IHL (in-house library)를 사용하여 확인되었다.
- [0081] 마지막으로 각 지질의 단편 패턴을 MassHunter software (Agilent)를 이용한 표적화된 MS/MS로 확인하였다. LIPID MAPS Lipidomics Gateway (<http://www.lipidmaps.org/>)에 언급된 지질 명명법과 지질의 전체 구성에 대한 약어를 사용하였으며, 사용된 숫자는 모두 총 탄소 수와 모든 아실 사슬의 이중 결합을 나타내었다(22).
- [0083] 7. 지질체학 (Lipidomics) 데이터 분석
- [0084] MZmine (version 2.30) 데이터 정렬을 이용하여 모든 지질의 정량적 결과를 추출하였다. 앞선 실험에서 각 지질에 대한 피크가 추출된 후 최소제곱오차법 (random sample consensus, RANSAC) 알고리즘을 이용한 피크 정렬을 다음과 같은 파라미터로 수행하였다: m/z threshold 0.02 m/z; retention time tolerance, 0.3 min; retention time tolerance after correction, 0.2 min; iteration, 50,000; minimum time points, 0.2%.
- [0085] 또한, 정렬되지 않은 피크는 10% 임계값 강도, 0.02 m/z 오차 및 0.3 분 머무름 시간의 피크 파인더 기능을 이용하여 발견하였다.
- [0086] 정렬된 데이터는 SIMCA-P⁺ (version 11.0, Umetrics, Umea Sweden) 및 MetaboAnalyst (version 3.0,

http://www.metaboanalyst.ca)를 이용하여 다변량 통계분석을 위해 사용되었다.

- [0087] PLS-DA 및 적외선 열지도(heatmap) 분석을 위해, 각 지질 중에 대한 내부 표준 영역, 로그 변환 및 파레토 스케일을 통하여 데이터를 표준화하였다.
- [0088] GraphPad Prism (version 7.00, GraphPad software, USA)를 이용하여 HDF, AMN 및 CCALD의 Holm-Sidak 다중 비교를 수행하였으며, Adobe Illustrator CS6 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA)를 이용하여 데이터를 시각화하였다.
- [0090] **<실시예 1> 특정 지질중에서 매우 긴 사슬 지방산의 축적 확인**
- [0091] HDF (healthy control), AMN 및 CCALD 중 변경된 지질을 확인하기 위해 고처리량 지질학 접근법으로 전체 61 시료 (14 HDF, 21 AMN 및 26 CCALD)를 최종적으로 분석하였다.
- [0092] 첫번째로, 다양한 종류의 지질 중에서 가능성 있는 지질을 머무름 시간 및 전구체 이온의 m/z의 in-house library에 나열하였다.
- [0093] 다음으로, 잠정적인 지질의 동일성은 표적화된 MS/MS 분석을 통한 상응하는 단편 패턴을 이용하여 확인하였다.
- [0094] 마지막으로, 단계적 지질 확인을 이용한 고처리량 프로파일링은 통하여 68 트리아실글리세롤 (triacylglycerol, TG), 18 디아실글리세롤 (diacylglycerol, DG), 17 스프링고미엘린 (sphingomyelin, SM), 26 포스파티딜에탄올아민 (phosphatidylethanolamine, PE), 54 포스파티딜콜린 (phosphatidylcholine, PC), 5 리소포스파티딜에탄올아민 (lysophosphatidylethanolamine, LPE), 13 리소포스파티딜콜린 (lysophosphatidylcholine, LPC), 13 PlsPE (Plasmenylethanolamine), 및 13 PlsPC (Plasmenylcholine)를 포함하는 227개의 지질을 프로파일링하였다.
- [0095] 데이터 정렬을 이용하여 확인된 모든 지질을 정량한 후 유도된 정량적 표를 데이터 시각화 및 다변량 통계분석에 이용하였다.
- [0096] 데이터 탐색을 위해, 모든 지질 중의 적외선 열지도를 이용하여 HDF, AMN, 및 CCALD의 지질 프로파일을 시각화하였다.
- [0097] 그 결과, 도 1a와 같이 TG, SM, PE, PC, LPC 및 CER의 긴 아실 사슬이 대조군과 X-ALD 군 사이에서 매우 큰 차이를 나타내었다. 특히, TG 및 CER 종은 CCALD가 아닌 AMN에서 매우 풍부한 것을 확인할 수 있었다.
- [0098] 또한, 도 1b와 같이 전체 지질 프로파일에 기초하여 3개 그룹을 구별하기 위해 부분적인 PLS-DA (least square-discriminant analysis)을 적용하였다. 점수 산점도에서 성분 1 (26.8 % 변수)은 다른 그룹으로부터 HDF를 분리한 반면, 구성 2 (17.3% 변수)는 AMN과 CCALD를 분리하였다. QC 시료는 플롯의 중심에서 정확히 무리를 이루었으며, 상기 결과로부터 본 발명의 분석이 정확하게 이루어졌음이 확인되었다.
- [0099] PLS-DA 모델의 적합도(R^2)는 0.77이고, 예측도(Q^2)는 0.58로 확인되었으며, p-값이 0.001 미만인 100회 순열 테스트와 함께 자체 견고성이 확인되었다.
- [0100] 도 1c를 참고하면 3개 그룹의 적외선 열지도 분석에서 뚜렷한 차이를 나타낸 TG, SM, PE, PC, LPC 및 CER 종은 다른 아실 사슬 길이 및 불포화 결합의 수와 함께 각 지질의 특이적으로 변형된 패턴을 나타내었다.
- [0101] VLCFA로 구성된 지질 종은 HDF와 두개의 X-ALD 군 사이에서 극도의 배수 변화를 나타내었다. 3개의 지방산을 제공하는 TG는 탄소수가 C58 보다 증가될 경우 현저한 차이를 나타내었다. 단일불포화된 TG의 경우, TG58:1은 2.4배 변화하였으며, TG60:1은 4.5배 변화 및 TG62:1은 5.6배 변화하였다. 2개의 지방산을 가진 PC 및 PE는 C42 이상일 때 유사한 패턴을 나타내었으며, 하나의 지방산을 가진 SM, CER 및 LPC는 C26:0이 포함된 지질에서 동일한 패턴을 나타내었다.
- [0102] 다른 지질들과 다르게, VLCFA를 포함하는 지질의 피옥시좀 분해대사에 의한 생산물인 PlsPC 및 PlsPE은 어떠한 변화도 나타나지 않았다.
- [0103] 상기 대조군과 X-ALD군 사이의 지질 차이는 진피 섬유아세포에서 ABCD1 결핍과 VLCFA 축적이 다양한 종류의 지질 종으로부터 VLCFA의 합성을 유도하는 것으로 제안될 수 있다.
- [0105] **<실시예 2> AMN 및 CCALD에서 불포화 지방산 합성 확인**
- [0106] 본 발명은 다양한 지질 마커 중에서 VLCFAs보다 다른 복합지질의 유의미한 변형에 초점을 맞추었으며, X-ALD의

중증도와 이들의 상관관계는 밝혀지지 않았다.

- [0107] 구체적으로 도 2를 참고하면, 불포화된 지방산은 AMN 및 CCALD와 비교하여 HDF에서 높은 발현이 확인되었다.
- [0108] 도 1b의 관측치(개별 시료)의 군집화에 기여하는 변수(개별 지질)의 발현 수준이 도 2a에 나타나있다. 지방산은 컷 오프가 3인 불포화 결합의 수에 따라 두 개의 다른 색상으로 나타내었다. 적색으로 표시된 박스는 HDF 면에 집중되었으며, 상기 결과는 많은 불포화 결합 수를 가진 지방산이 HDF에서 발현되는 것을 암시한다. 또한, 도 2b와 같은 TG, DG, PC, PE, SM, P1sPC, P1sPE, LPC, 및 LPE를 포함하는 지질 중 혼합물의 열지도에서 불포화 지방산이 포함된 것을 확인할 수 있었다.
- [0109] 도 2b의 Un 1, 2 및 3을 참고하면 1 내지 3개의 불포화 결합을 갖는 포화 지질 및 불포화 지질은 두 개의 X-ALD 군과 비교하여 HDF에서 높게 발현되는 것이 확인되었다.
- [0110] 4개 이상의 불포화된 결합을 갖는 불포화 지질의 경우, 27개의 지질 중 7개(P1sPE36:4, P1sPE38:4, DG36:4, PE44:4, PC34:4, PC36:4, 및 LPE 20:4)가 두 실험군에서 하향 조절되었다. 또한, 두 개의 지질 (PE40:4 및 LPC22:4) 및 한 개의 지질 (TG52:4)은 각각 AMN 또는 CCALD에서 하향 조절되었다.
- [0111] 뿐만 아니라, 불포화도 5 (Un 5, AMN 21.1% and CCALD 57.9%), 불포화도 6 (Un 6, AMN 31.3% and CCALD 56.3%) 및 불포화도 7 내지 12 (Un 7-12, AMN 31.3% and CCALD 68.8%)의 수준을 나타내는 불포화 지질에서는 하향 조절된 지질의 비율이 매우 높았다.
- [0112] 또한, 많은 수의 지질이 AMN 군에서는 감소하지 않고, CCALD 군에서만 감소됨에 따라, 불포화된 지질 또는 이의 지방산 합성은 CCALD에서 부정적인 조절을 유도할 수 있음이 확인되었다.
- [0113] 상기 결과에 대한 추가적인 확인을 위해, 불포화된 지방산 생합성 경로, 즉 리놀레산 (C18 : 2) 또는 이중 결합이 2개 이상인 다중 불포화 지방산의 전사체 분석을 수행하였다.
- [0114] 불포화 지방산 합성과 관련된 조절 인자를 암호화한 유전자가 도 2c와 같이 확인되었으며, 상기 유전자의 발현 수준을 열지도로 확인하였다.
- [0115] 그 결과, 도 2d와 같이 포화 지방산 또는 특히 매우 긴 사슬 지방산의 합성을 위한 기질 C18:0을 경쟁적으로 공유하는 ELOVL6이 CCALD 군에서 뚜렷하게 상향 조절된 반면, AMN 군에서는 어떠한 변화도 나타나지 않았다.
- [0116] 상기 결과로부터 매우 많은 수의 불포화된 지질이 AMN보다 CCALD에서 감소되는 것이 확인되었다.
- [0117] 아실 사슬의 연장과 관련된 기능을 나타내는 HSD17B12 및 PECR은 각각 약간 증가 및 감소하였다.
- [0118] 또한, 불포화 지방산의 합성에 특이적으로 관여하는 다른 대사 효소가 AMN 및 CCALD 군에서 매우 하향 조절된 것을 확인할 수 있었다. 상세하게 ELOVL2, SCD 및 FADS2는 두 그룹에서 명확하게 하향조절되었으며, ELOVL5, HADHA (AMN) 및 ACAA1 (CCALD)은 각 그룹에서 약간 감소한 것을 확인하였다.
- [0120] **<실시에 3> AMN 및 CCALD에서 지질 대사 확인**
- [0121] AMN 및 CCALD 사이의 지질 수준의 다변량 분석을 수행하여 CCALD의 태아 진행성 염증 탈수초화를 야기하거나 AMN의 생화학적 결합 완화를 유도하는 기저 지질체 매커니즘에 대하여 중요한 역할을 수행하는 지질 분자의 구성을 확인하였다.
- [0122] 그 결과, 도 3a와 같이 구성 1 (26.6% 변수) 및 구성 2 (11.6% 변수)가 비교적 잘 분리된 두 그룹을 나타낸 PLS-DA 점수 플롯을 얻었다. 상기 결과는 0.96의 적합도(R²) 및 0.89의 예측도(Q²)를 나타낸 모델과 p-값이 0.001 미만인 1000 번의 순열 테스트를 통하여 분석의 정확성이 확인되었다.
- [0123] 주목할만한 것은 15개의 세라마이드 (CERs) 중 13개가 2가지 표현형을 구별하는 것으로 확인되었으며, 1을 넘는 변수중요도척도 (variable importance for projection; VIP) 값을 가지는 것을 확인하였다.
- [0124] 도 3b와 같이 PLS-DA의 로딩 플롯에서 CERs는 AMN 실험군을 향해 매우 높게 나타났다. 상기 결과로부터 CERs가 AMN에서 매우 많이 발현되는 것이 확인되었으며, 이러한 결과는 도 3c와 같은 단변량 분석에서 의해 다시 한번 확인되었다.
- [0125] 한편, C24DH CER (dihydroceramide C24) 및 C26 CER (Ceramide C26)은 1 이상의 VIP 값을 나타내지 않았지만, 발현에서 차이가 나타났다 (adjusted p-value < 0.05).
- [0126] 상기 결과들로부터 CER 및 이와 관련된 스핑고리피드 (sphingolipid) 대사가 매우 관련성있는 신호일 수

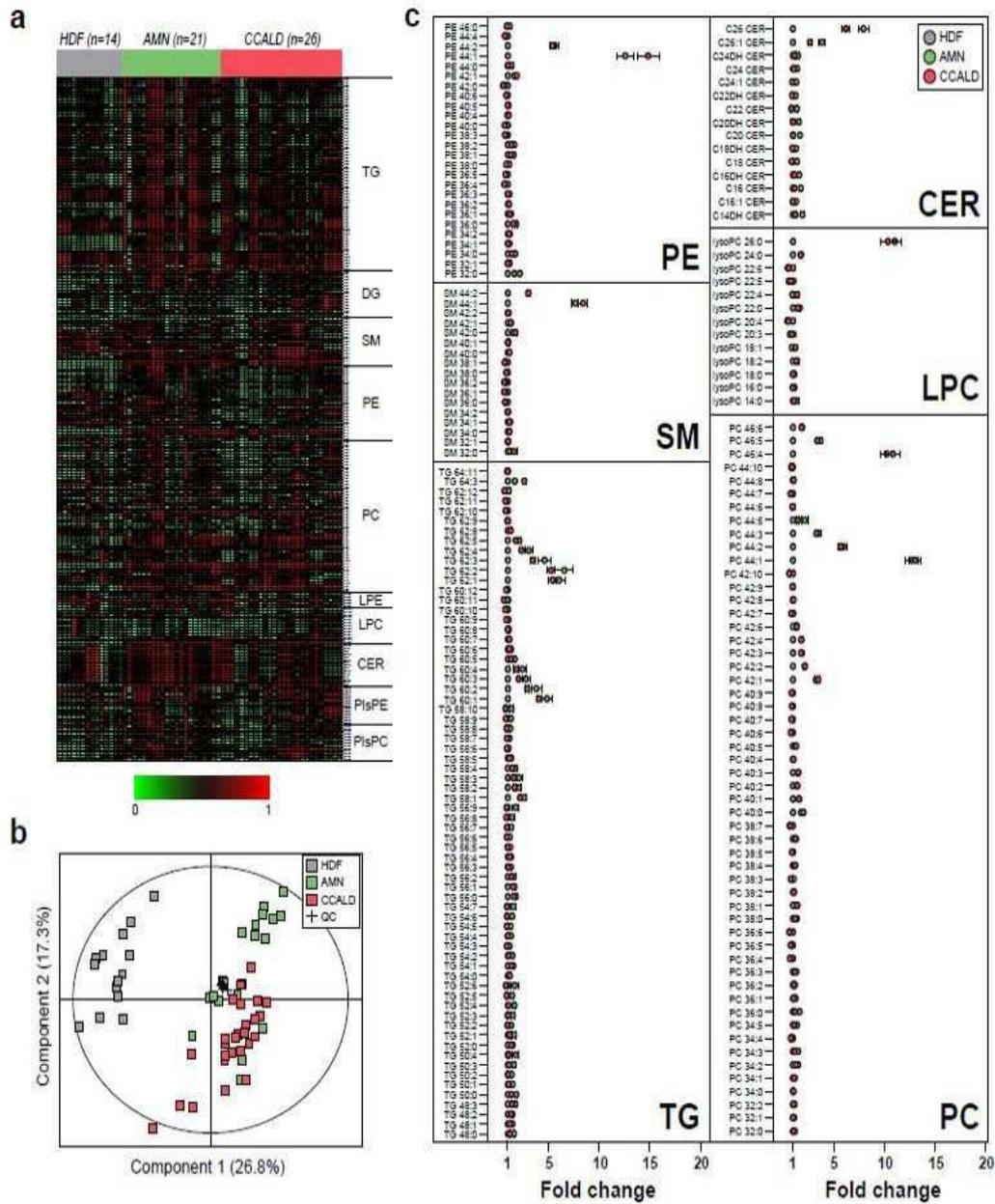
있으며, X-ALD 표현형 변이의 주된 원인일 것으로 제안될 수 있다.

- [0127] 이에 따라, 스펅고리피드 대사에 책임이 있는 대사 조절자를 도 3d와 같이 확인하고, 전사체 분석을 수행하였다.
- [0128] 상기 조절자들은 도 3e와 같은 두 개의 카테고리 분류되었다: 스펅고신-1-포스페이트 (sphingosine-1-phosphate; 스펅고리피드 이화작용)와 같은 원래의 골격으로부터 복합 구조의 합성과 관련된 조절자, 글리코스핑고리피드와 SM의 골격에 대한 대사 (스핑고리피드-1-포스페이트에 대한 스펅고리피드 동화작용)와 관련된 조절자.
- [0129] 동화작용에 있어서, SGMS2, UGCG, CERT, LASS6, LASS1 및 UGT8는 CCALD보다 AMN에서 더 많은 하향 조절이 나타났으며, 특히 SM과 글리코스핑고리피드 합성을 위한 CER의 이용에 관여하는 SGMS2, UGCG 및 UGT8은 엄청난 차이를 나타내었다.
- [0130] 상기 결과로부터 AMN에서 더 높은 수준을 나타내는 CER은 두 개의 이화작용 조절자들의 완화된 발현 수준으로부터 유도될 수 있을 것으로 제안될 수 있다. 이와 대조적으로 SM의 가수분해로 CER을 생성하는 SMPD1 및 SMPDL3A는 CCALD와 비교하여 AMN에서 상대적으로 낮게 나타났다. 또한, 이화작용에 속하는 다른 대사 조절자들은 HDF에 비해 상향 또는 하향 조절 여부에 따라, CCALD 보다 매우 높은 수준으로 발현되었다.
- [0131] 상기 결과들로부터 스펅고리피드의 단순-복합 구조에서 전사체 발현은 AMN에서 매우 감소하였으며, 특히 SGMS2, UGCG 및 UGT8은 CER 축적을 야기할 수 있음이 확인되었다.
- [0133] <실시예 4> AMN에서 상향 조절된 트리글리세롤(TG) 대사 확인
- [0134] 스펅고리피드 경로 (스핑고신-1-포스페이트에서 스펅고미엘링까지)의 이화작용에 대한 상향 조절과 반대로, CCALD는 TG 중의 이화작용에서 상당한 결핍이 나타났다. 실제로 도 4a를 참고하면, 앞서 확인된 도 3a의 PLS-DA 로딩 플롯과 같이 짧은 FA 사슬이 AMN을 향하는 것으로 나타났다.
- [0135] 건강한 사람 세포에서 전형적으로 존재하고 이용되는 TGs와 짧은 사슬 FAs는 X-ALD의 완화된 표현형에서 높게 발현된다. 이러한 통계적으로 유의미한 변형은 도 4b와 같이 C48 내지 C58 TG 중에서 선택적으로 확인되었으며, TG의 발현 수준은 CCALD 보다 AMN에서 일반적으로 더 높았다.
- [0136] 또한, VLCFA 축적으로 인한 X-ALD 그룹의 상당한 변화는 C60로부터 시작하는 것으로 고려될 때, 상기 관찰된 패턴을 통하여 전형적인 TGs의 발현이 X-ALD의 심각한 표현형인 CCALD에서 특히 손상되었음을 확인할 수 있다.
- [0137] TG 동화작용 및 이화작용에 대한 조절 매커니즘을 추가로 확인하기 위해, 도 4c와 같이 대사 효소 및 TG 경로의 다른 조절자들을 확인하였으며, 상기 전사체의 발현 수준을 도 4d와 같이 각각 동화작용 및 이화작용으로 분류하였다.
- [0138] TG 합성에 관여하는 대부분의 유전자들은 CCALD에서 HDF의 유전자와 비교하여 상향 또는 하향 조절과는 상관없이 상대적으로 낮은 발현을 나타내었다. 포스페이트기와 글리세롤이 결합하는 데 필수적인 역할을 하는 GK는 AMN에서 CCALD보다 상대적으로 적은 감소를 나타내었으며, 글리세롤-3-포스페이트 상의 한 개의 아실 사슬과 결합하는 GPAM, GPAT2 및 GPAT4는 AMN에서 높은 발현을 나타내었다.
- [0139] 1-아실-sn-글리세롤-3-포스페이트 상의 많은 아실 사슬을 부착시키는 것을 돕는 LCLAT1, MBOAT1, MBOAT2, AGPAT2, AGPAT3 및 AGPAT4는 AMN에서 상향 조절되었다. DG 합성에 관여하는 상기 6 유전자 중 세 유전자인 MOGAT2, MOGAT3 및 LPIN1의 유전자 발현 수준이 증가하였으며, TG에서 DG를 발생시키는 DGAT2 및 MOGAT3은 AMN에서 상당히 상향 조절되었다.
- [0140] 상기 결과들로부터 AMN은 TG 동화작용 경로에 있어서, 주요 대사 조절자의 발현이 높게 나타나는 반면, CCALD는 TG 합성에서 명확한 결함이 나타나는 것이 확인되었다. 그럼에도 불구하고, TG 이화작용에 있어서, TG로부터 이의 골격까지의 경로에서 조절자들은 약간의 변형이 나타났으며, 이들 중 일부 (CEL, PNPLA2, PNLIP, PLRP1, PLRP2, DGKA, DGKB, DGKG, DGKQ 및 AGK)는 상대적으로 낮은 발현이 확인되었다.
- [0141] 상기 결과로부터 TG 합성에 있어서, 전사체의 하향 조절된 발현에 의해 유발된 CCALD는 TG 동화작용의 손상이 확인되었으며, 전형적인 TG의 손상은 CCALD 환자의 중증도와 생화학적으로 관련성을 나타낼 수 있음이 확인되었다.
- [0143] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서,

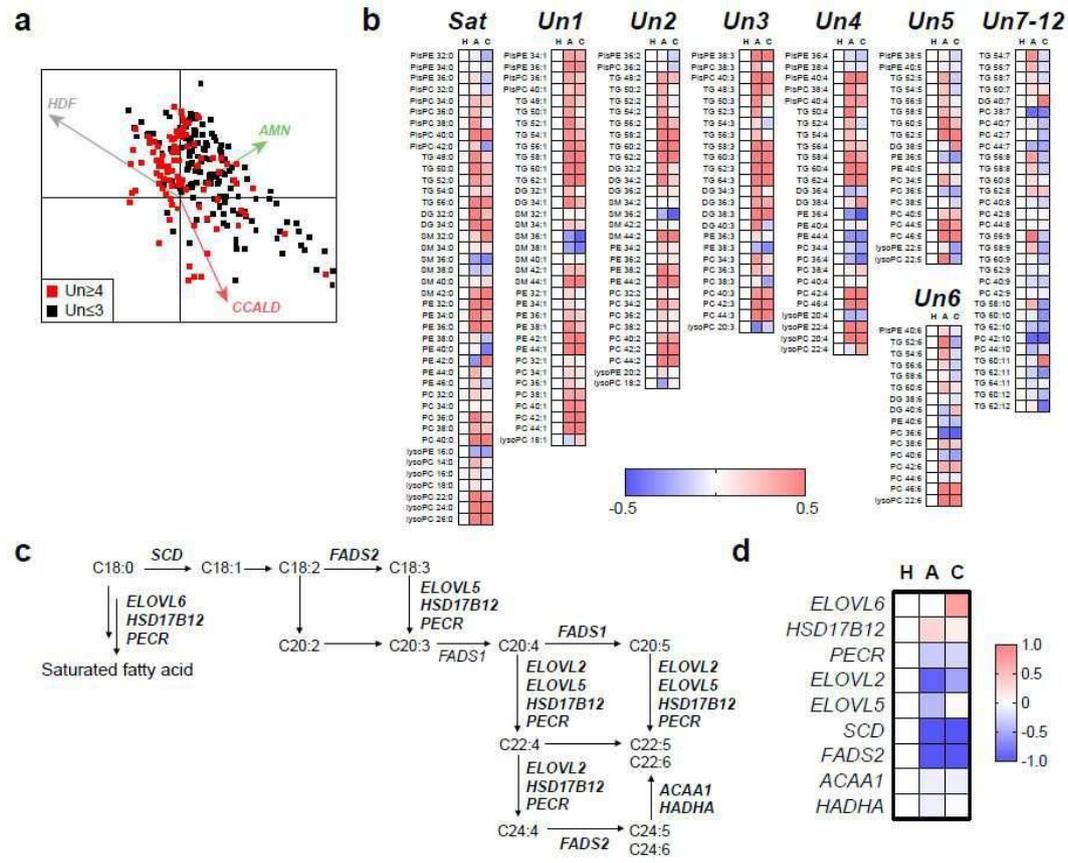
이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

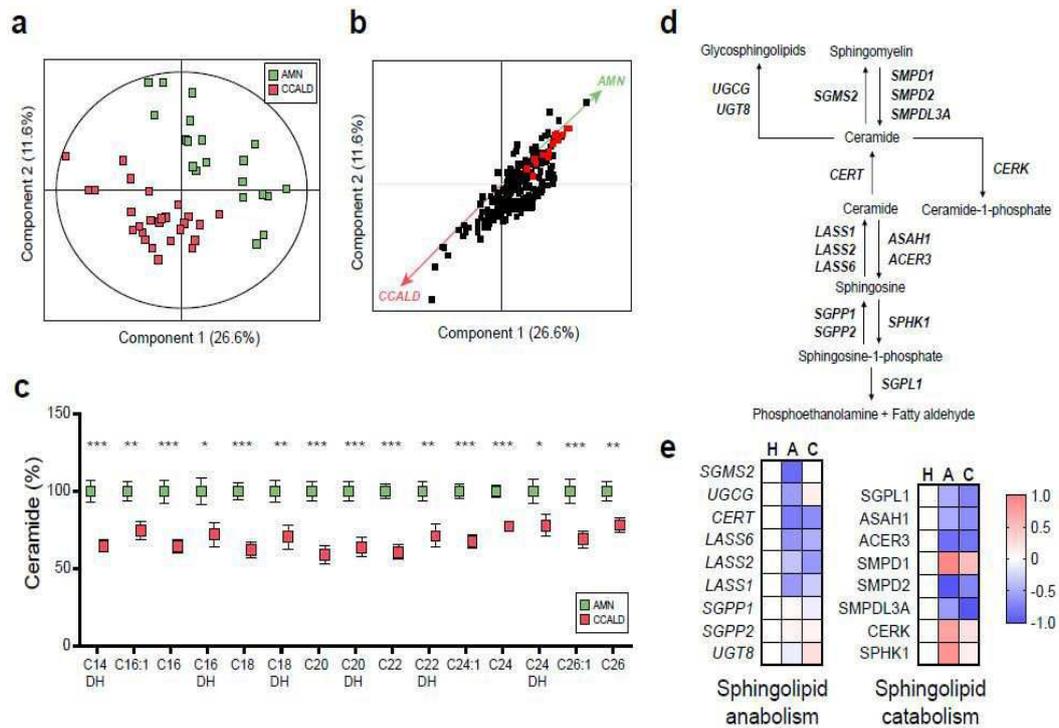
도면1



도면2



도면3



도면4

