



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년06월18일

(11) 등록번호 10-2266963

(24) 등록일자 2021년06월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 30/88 (2006.01) G01N 30/72 (2006.01)

(52) CPC특허분류
G01N 30/88 (2020.05)
G01N 30/72 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0166040

(22) 출원일자 2019년12월12일

심사청구일자 2019년12월12일

(56) 선행기술조사문헌

KR101759786 B1

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

김민주

서울특별시 마포구 월드컵북로 481, 2동 635호 (상암동)

이중호

서울특별시 용산구 대사관로11길 8-7(한남동)

한영민

서울특별시 서대문구 연희로 82, B동 209호 (연희동)

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 5 항

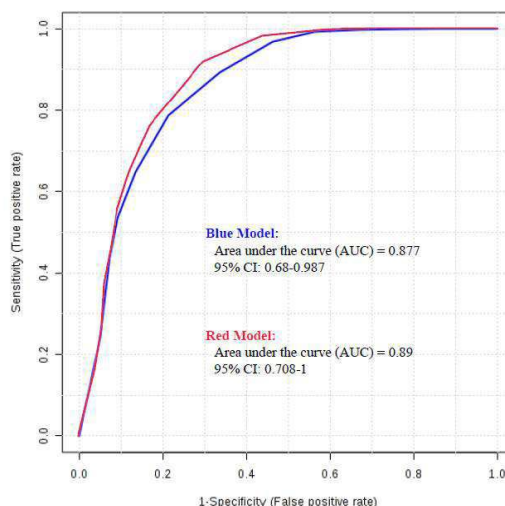
심사관 : 박성철

(54) 발명의 명칭 렙틴 및 카로티노이드 관련 대사체, 및 피하지방면적을 이용한 식이 제한 후 비만의 대사적 상태를 예측하는 방법

(57) 요약

본 발명은 렙틴 및 카로티노이드 관련 대사체, 및 피하지방면적을 이용한 식이 제한 후 비만의 대사적 상태를 예측하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 본 발명은 렙틴 관련 대사체, 아포카로티노이드 대사체, 피하지방 분포 등이 대사 상태에 따른 비만과 밀접하게 연관되어 식이 제한 후 비만의 대사적 상태를 예측할 수 있는 바이오마커로 활용될 수 있는 효과를 제공한다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

G01N 2030/8813 (2013.01)

G01N 2800/044 (2013.01)

G01N 2800/52 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR101835813 B1

EP01930046 A1

KR1020170132476 A

US20120165312 A1

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1C1B2007195

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 신진연구자지원사업

연구과제명 과체중 및 비만인에서 비만 관련 유전자, 주요 지질 대사물질, 체지방 및 염증/면역
지표 조절 생리활성물질을 포함하는 맞춤형 프로그램 개발 기술 확보 및 가이드라인 제시(3/3)

기 여 율 1/2

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2019R1I1A2A01061731

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공학개인지초연구지원사업

연구과제명 한국인 특이 유전자 기반 유전위험점수와 산화스트레스점수를 이용한 대사성질환 발
병 예측 모델개발 및 한국인 맞춤 예방 가이드라인 제시(1/6)

기 여 율 1/2

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2019.06.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

식이 제한 전 대사적으로 건강하지 않은 비만 대조군의 혈장 시료에서 4-아미노부티르알데히드 (4-aminobutyraldehyde) 및 4'-아포-β-카로테날 (4'-apo-β-carotenal)을 포함하는 대사체의 농도를 측정하는 단계; 및

식이 제한을 받는 대상으로부터 채취한 혈장 시료 중 4-아미노부티르알데히드 (4-aminobutyraldehyde) 및 4'-아포-β-카로테날 (4'-apo-β-carotenal)을 포함하는 대사체의 농도를 측정하는 단계를 포함하는 식이 제한 후 비만의 대사적 상태를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

혈장 시료는 대사적으로 건강하지 않은 비만의 식이 제한 후 대사적 상태를 예측하고자 하는 대상에서 분리된 시료인, 식이 제한 후 비만의 대사적 상태를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

비만의 대사적 상태는 대사적으로 건강하지 않은 상태가 유지된 비만 및 대사적으로 건강한 상태로 개선된 비만인, 식이 제한 후 비만의 대사적 상태를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 방법은

4-아미노부티르알데히드의 발현 수준이 대조군 시료에서의 발현 수준보다 감소하고, 4'-아포-β-카로테날의 발현 수준이 대조군 시료에서의 발현 수준보다 증가하는 경우 대사적으로 건강한 상태로 개선된 비만일 것으로 예측하고,

4-아미노부티르알데히드 발현 수준이 대조군 시료에서의 발현 수준보다 증가하고, 4'-아포-β-카로테날의 발현 수준이 대조군 시료에서의 발현 수준보다 감소하는 경우 대사적으로 건강하지 않은 상태가 유지된 비만일 것으로 예측하는, 식이 제한 후 비만의 대사적 상태를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 6

혈장 내 4-아미노부티르알데히드 (4-aminobutyraldehyde) 및 4'-아포-β-카로테날 (4'-apo-β-carotenal)로 이루어진 대사체에 대한 정량장치를 포함하는 식이 제한 후 비만의 대사적 상태 예측용 키트.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 렙틴 및 카로티노이드 관련 대사체, 및 피하지방면적을 이용한 식이 제한 후 비만의 대사적 상태를 예측하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 대사적으로 건강하지 않은 비만 (Metabolically Unhealthy Obesity, MUO)을 가진 개인의 인구는 대사적으로 건강한 비만 (Metabolically Healthy Obesity, MHO)을 가진 개인보다 심혈관 질환 (CVD), 당뇨병 및 사망률의 발생이 더 높으므로, 이 두 가지 하위 유형의 비만을 구별하는 조절 메커니즘을 밝히는 데 상당한 관심이 집중되어 있다. 최근에, 광범위한 대사체학적 접근법을 사용하여 내장 지방 조직 (VAT)의 대사 프로파일과 관련하여 MUO 및 MHO를 가진 개인과 건강하고 마른 (healthy lean) 대조군 간의 차이를 조사하였다. 산화 스트레스와 포도당 대사 마커의 실질적인 변화를 확인하는 것 외에도 많은 연구에서 MUO를 갖는 개인에서 유래한 VAT는 몇몇 지질-관련 대사 경로의 상당한 조절 장애를 특징으로 함이 밝혀졌다. 최근 연구에서 MHO를 갖는 개인과 MUO를 갖는 개인을 분별할 수 있는 중요한 대사체의 혈장 패널이 보고되었다. 이들 대사체는 글리콜산, 리소포스파티딜에탄올아민 및 리소포스파티딜콜린을 포함한다. 또한, 특정 대사적 상태에 따른 혈장 내 스핑고지질 프로파일이 확인되었다. 그러나, 아직까지 혈장 스핑고지질의 임상적 연관성은 밝혀지지 않은 상태이다. MUO와 MHO 개인 간의 여러 건의 사례-대조 연구가 수행되었지만, MUO를 가진 개인의 대사체 프로파일에 대한 식이 제한의 효과가 완전히 밝혀지지는 않았다.

[0004] 이전 연구에 따르면, 일반적인 비만과 상관없이 국소적 체지방 분포는 대사 증후군 (MetS)에서 중요한 역할을 할 수 있다. 그러나 MetS에 대한 VAT 및 피하 지방 조직 (SAT) 면적의 영향에 대해서는 논란이 있었다. 널리 보고된 바와 같이 대부분의 연구에 따르면 VAT 면적은 MetS의 발생 위험 증가와 관련이 있으며 SAT는 개별 MetS 구성 성분의 발생률에 영향을 줄 수 있다. 대조적으로, Jiala와 Devaraj은 MetS를 갖는 환자가 상당히 높은 수준의 대식세포, SAT 및 몇몇 아디포카인을 가짐을 보여주었다.

[0005] 따라서, 본 발명자들은 대사체 프로파일에 대한 식이 제한의 영향을 조사하는 것을 목표로 하고, 12주의 식이 제한 후 대사적 차이에 초점을 맞췄다. 또한, 내장 지방 면적 (VFA), 피하 지방 면적 (SFA) 및 아디포카인과 특징적인 혈장 대사체의 연관성을 평가하고, 대사적 상태를 분별하기 위한 바이오마커의 조합을 갖는 모델을 제시함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) 1. Hamer M et al., J Clin Endocrinol Metab 2012;97:2482-8.
 (비특허문헌 0002) 2. Appleton SL et al., Diabetes Care 2013;36:2388-2394.
 (비특허문헌 0003) 3. Candi E et al., Biochem J 2018;475:1019-1035.
 (비특허문헌 0004) 4. Kim M et al., Clin Nutr 2019 Apr 25. Epub ahead of print.
 (비특허문헌 0005) 5. Marinou K et al., Diabetes Care 2014;37:821-829.
 (비특허문헌 0006) 6. Kwon H et al., Sci Rep 2017;7:10955.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 대사체 프로파일에 대한 식이 제한의 영향을 조사하여 식이 제한 후 비만의 대사적 상태를 예측하는 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 대사체 프로파일에 대한 식이 제한의 영향을 조사하여 식이 제한 후 비만의 대사적 상태를 예측하기 위한 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 대상으로부터 생물학적 시료를 채취하는 단계; 및 상기 시료 중 4-아미노부티르알데히드 (4-aminobutyraldehyde) 및 4'-아포-β-카로테날 (4'-apo-β-carotenal)을 포함하는 대사체의 농도를 측정하는 단계를 포함하는 식이 제한 후 비만의 대사적 상태를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한 4-아미노부티르알데히드 (4-aminobutyraldehyde) 및 4'-아포-β-카로테날 (4'-apo-β-carotenal)로 이루어진 대사체에 대한 정량장치를 포함하는 식이 제한 후 비만의 대사적 상태 예측용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명은 대사체 프로파일에 대한 식이 제한의 영향을 조사하여 렙틴 관련 대사체, 아포카로티노이드 대사체, 피하지방 분포 등이 대사 상태에 따른 비만과 밀접하게 연관되어 있음을 확인하였고, 이들은 식이 제한 후 비만의 대사적 상태를 예측할 수 있는 바이오마커로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명의 실험 과정을 도시한 것이다.

도 2는 식이 제한 12주 시점에서 MUO 유지 그룹 및 MHO로 개선된 그룹 간의 혈장 대사체 비교 결과이다(A, 양이온 모드에서의 OPLS-DA 모델 스코어 플롯 ($Q^2=0.593$, $R^2Y=0.796$). B, 양이온 모드에서 OPLS-DA 모델의 공분산(p) 및 신뢰도 상관관계 [$p(corr)$]에 대한 S-플롯).

도 3은 식이 제한 12주 시점에서 MUO 유지 그룹 및 MHO로 개선된 그룹 간의 확인된 9개 대사체의 비교 결과이다. Mann-Whitney U test에서 분석된 $*p<0.01$ 및 $**p<0.05$.

도 4는 체형 특성, 생화학 및 대사체 데이터 시각화를 위한 히트맵을 도시한 것이다. 각 행은 특징을 나타내고, 각 열은 샘플을 나타낸다. 두 그룹의 모든 특징은 히트맵에 투영되고 샘플 클러스터링에 사용된다. 각 특징의 Z -점수 또는 표현값의 비율은 적색-청색 눈금으로 표시된다. 타일의 적색은 높은 풍부도, 청색은 낮은 풍부도를 나타낸다. 거리는 $Euclidean$ 를 사용하여 측정하였고, 클러스터링 알고리즘은 $Ward's$ 법을 사용하여 수행되었다.

도 5는 본 발명의 바이오마커 모델에 대한 ROC 곡선의 플롯을 나타낸다. 청색 모델(blue model)은 BMI, 트리글리세라이드, HDL 콜레스테롤, 감마-GT, 렙틴, 체지방률, L1 척추 위치의 내장지방 면적(WFA) 및 L1 척추 위치의 피하지방 면적(SFA)으로 구성된다. 적색 모델(red model)은 BMI, 트리글리세라이드, HDL 콜레스테롤, 감마-GT, 렙틴, 체지방률, L1 척추 위치의 내장지방 면적(WFA), L1 척추 위치의 피하지방 면적(SFA), 4-아미노부티르알데히드 및 4'-아포-β-카로테날로 구성된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0018] 본 발명은 대상으로부터 생물학적 시료를 채취하는 단계; 및 상기 시료 중 4-아미노부티르알데히드 (4-aminobutyraldehyde) 및 4'-아포-β-카로테날 (4'-apo-β-carotenal)을 포함하는 대사체의 농도를 측정하는 단계를 포함하는 식이 제한 후 비만의 대사적 상태를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0019] 본 발명은 단기적 식이 제한 효과를 통해 렙틴 관련 대사체인 4-아미노부티르알데히드 (4-aminobutyraldehyde), 아포카로티노이드 대사체인 4'-아포-β-카로테날 (4'-apo-β-carotenal)의 농도가 대사적 상태와 매우 밀접한 관련이 있음을 확인함으로써 이들을 식이 제한 후 비만의 대사적 상태를 예측하기 위한 바이오마커로 활용하는 것을 특징으로 한다.

[0020] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 대사적으로 건강하지 않은 비만 그룹에 대해 12주 식이 제한 시, 대사적으로 건강하지 않은 상태가 유지된 비만 그룹에서, 4-아미노부티르알데히드의 농도는 증가하고, 4'-아포-β-카로테날의 농도는 감소하며, 대사적으로 건강한 상태로 개선된 비만 그룹에서, 4-아미노부티르알데히드의 농도는 감소하고, 4'-아포-β-카로테날의 농도는 증가하였다.

[0021] 따라서, 4-아미노부티르알데히드 및 4'-아포-β-카로테날의 농도 변화는 식이 제한 후 비만의 대사적 상태를 예

측할 수 있는 바이오마커로 활용될 수 있다.

- [0022] 뿐만 아니라, 8종의 임상 지표들, 즉, BMI (Body Mass Index, 체질량지수), 트리글리세라이드, 감마-글루타미트랜스퍼레이즈, HDL 콜레스테롤, 렘틴, 체지방률, L1 척추 위치의 내장지방 면적(WFA) 및 L1 척추 위치의 피하지방 면적(SFA) 역시 대사적으로 건강하지 않은 비만 그룹에 대해 12주 식이 제한을 통해 대사적 상태에 따라 변화함을 확인할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 대사적으로 건강하지 않은 상태가 유지된 비만 그룹에서, BMI (Body Mass Index), 트리글리세라이드, 감마-글루타미트랜스퍼레이즈, 렘틴, 체지방률, L1 척추 위치의 내장지방 면적(WFA) 및 L1 척추 위치의 피하지방 면적(SFA)이 증가하고, HDL 콜레스테롤이 감소하며, 대사적으로 건강한 상태로 개선된 비만 그룹에서, BMI (Body Mass Index), 트리글리세라이드, 감마-글루타미트랜스퍼레이즈, 렘틴, 체지방률, L1 척추 위치의 내장지방 면적(WFA) 및 L1 척추 위치의 피하지방 면적(SFA)이 감소하고, HDL 콜레스테롤이 증가하였다.
- [0024] 따라서, 상술한 4-아미노부티르알데히드 및 4'-아포-β-카로테날과 함께 8종의 임상 지표 (BMI, 트리글리세라이드, 감마-글루타미트랜스퍼레이즈, HDL 콜레스테롤, 렘틴, 체지방률, L1 척추 위치의 내장지방 면적(WFA) 및 L1 척추 위치의 피하지방 면적(SFA))는 식이 제한 후 비만의 대사적 상태를 예측하는 바이오마커로 활용될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 식이 제한 후 비만의 대사적 상태를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법에서, 상기 대상(subject)은 식이 제한을 받는 인간일 수 있고, 구체적으로 체질량지수(BMI)가 25kg/m² 이상, 30kg/m² 미만인 과체중 환자일 수 있으며, 더 구체적으로는 식이 제한을 받는 대사적으로 건강하지 않은(metabolically unhealthy) 과체중(비만) 환자일 수 있다. 상기 "대사적으로 건강하지 않은 과체중 환자"는 4번 요추(L4)의 내장지방면적(VFA; visceral fat area)이 100cm² 이상인 비만 환자, 예컨대 내장지방비만 환자를 의미한다.
- [0026] 상기 생물학적 시료는 식이 제한을 받는 비만의 대사적 상태를 예측하고자 하는 대상에서 분리된 시료로써, 조직, 세포, 혈액, 혈장, 복막액, 활막액, 타액, 소변, 대변 등을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게 상기 생물학적 시료는 혈액일 수 있으며, 구체적으로 혈액에서 분리된 혈장일 수 있다.
- [0027] 비만의 대사적 상태를 예측하고자 하는 대상, 예컨대 내장지방비만 환자는 당뇨, 심혈관계 질환 등의 대사질환으로 발전할 가능성이 높다는 것은 널리 알려진 바 있다. 이에 따라, 상기 대상의 생물학적 시료에 포함된 대사체를 분석하여 과체중 환자의 식이 제한 후 대사적 상태를 예측하여 적절한 조치를 취함으로써 대사질환 발병률을 감소시킬 수 있다.
- [0028] 본 발명의 식이 제한 후 비만의 대사적 상태를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법에서, 채취한 생물학적 시료를 분석하고, 상기 시료 내에 포함된 대사체의 농도를 측정할 수 있다. 구체적으로, 각 대사체의 농도를 측정 한 후, 이를 기준 시료(식이 제한 전 대사적으로 건강하지 않은 비만 대조군)의 대사체 농도와 비교할 수 있다.
- [0029] 한편, 상기 대사체는 혈장 대사체일 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "혈장 대사체"는 혈액 유래의 액상 시료로부터 수득한 대사물질을 의미한다. 상기 혈장 대사체를 검출하기 위해 혈액을 전처리할 수 있다. 상기 전처리는 예를 들어, 여과, 증류, 추출, 분리, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다. 상기 대사체는 대사 및 대사 과정에 따라 생산된 물질, 또는 생물학적 효소 및 분자에 의한 화학적 대사작용으로 발생한 물질 등을 포함할 수 있다.
- [0030] 상기 시료, 구체적으로 혈장 시료는 4-아미노부티르알데히드 (4-aminobutyraldehyde) 및 4'-아포-β-카로테날 (4'-apo-β-carotenal)을 포함할 수 있다.
- [0031] 상기 대사체 각각을 개별적으로 분석하여 식이 제한 후 비만의 대사적 상태를 예측할 수 있으나, 관련 대사체 수준을 전체적으로 분석함으로써 예측력(신뢰도)을 향상시킬 수 있다. 아울러, 대사체 외에 8종의 임상 지표들의 식이 제한 후 변화를 전체적으로 분석함으로써 예측력(신뢰도)을 향상시킬 수 있다.
- [0032] 상기 식이 제한 후 비만의 대사적 상태는 대사적으로 건강하지 않은 상태가 유지된 비만 및 대사적으로 건강한 상태로 개선된 비만을 예측하는 것일 수 있다.
- [0033] 따라서, 본 발명의 식이 제한 후 비만의 대사적 상태를 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법에서는, 4-아미노부티르알데히드의 발현 수준이 대조군 시료에서의 발현 수준보다 감소하고, 4'-아포-β-카로테날의 발현 수준이 대조군 시료에서의 발현 수준보다 증가하는 경우 대사적으로 건강한 상태로 개선된 비만일 것으로 예측하고, 4-아미노부티르알데히드 발현 수준이 대조군 시료에서의 발현 수준보다 증가하고, 4'-아포-β-카로테날의 발현 수

준이 대조군 시료에서의 발현 수준보다 감소하는 경우 대사적으로 건강하지 않은 상태가 유지된 비만일 것으로 예측할 수 있다.

- [0034] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 대사적으로 건강하지 않은 비만 그룹에 대해 12주 식이 제한을 통해 얻은 대사적 변화를 로지스틱 회귀분석 모델에서 ROC (Receiver Operating Characteristic) 그래프를 얻고 ROC로부터 계산된 AUC (Area Under the Curve) 값을 보면 8종의 임상 지표들만으로 만들어진 ROC 그래프의 AUC는 0.845, 4-아미노부티르알데히드와 4'-아포-β-카로테날을 추가한 ROC 그래프의 AUC는 0.885로 두 가지 대사체가 모델에 추가되면 예측력이 상승함을 확인하였다.
- [0036] 또한, 본 발명은 4-아미노부티르알데히드 (4-aminobutyraldehyde) 및 4'-아포-β-카로테날 (4'-apo-β-carotenal)로 이루어진 대사체에 대한 정량장치를 포함하는 식이 제한 후 비만의 대사적 상태 예측용 키트를 제공할 수 있다.
- [0037] 상기 정량장치는 상기 각 대사체의 농도를 측정하기 위한 것으로, 크로마토그래피, 질량분석기 등을 예시할 수 있다.
- [0038] 상기 크로마토그래피는 액체 크로마토그래피(LC), 액체-고체 크로마토그래피(LSC), 종이 크로마토그래피(PC), 박층 크로마토그래피(TLC), 기체-고체 크로마토그래피(GSC), 액체-액체 크로마토그래피(LLC), 포말 크로마토그래피(FC), 유화 크로마토그래피(EC), 기체-액체 크로마토그래피(GLC), 이온 크로마토그래피(IC), 겔 여과 크로마토그래피(GFC) 또는 겔 투과 크로마토그래피(GPC)일 수 있고, 바람직하게는 액체 크로마토그래피, 더 바람직하게는 초고성능 액체 크로마토그래피(UPLC, ultra-performance liquid chromatography)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0039] 또한, 상기 질량분석기는 푸리에 변환 질량분석기(FTMS, Fourier transform mass spectrometer)를 사용할 수 있고, 구체적으로 LTQ-Orbitrap-XL 질량분석기를 사용할 수 있다.
- [0040] 상기 크로마토그래피는 분자마다 상이한 이동성을 이용하여 각 대사체를 분리할 수 있고, 상기 질량분석기는 상기 분석 대상의 분자량 정보뿐만 아니라 구조 정보를 통해 대사체를 식별할 수 있다.
- [0041] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0042] <실시예 1> 체형 분석과 생화학 지표 분석
- [0043] 본 실험의 기본 틀은 이전 연구 (Kang M et al. Lipids Health Dis 2018; 17:237)를 기반으로 하였으며 이전 연구 데이터 (ClinicalTrials.gov; NCT03135132)를 사용하여 하위 분석을 수행하였다 (도 1). 대상자는 12주 식이 제한 프로토콜을 따랐다. 일반적인 칼로리 섭취량을 300 kcal/day로 구성하였다. 밥 한 그릇에 300 kcal이므로, 참가자들은 하루에 밥 한 그릇의 1/3을 제거하여 100 kcal 부족분을 쉽게 달성하도록 권장하였다. 일반적인 식이 섭취량은 대조군으로 제시하였다. 영양 섭취량은 CAN-pro 3.0 (한국 영양 학회, 서울)을 사용하여 3일 간의 식이 기록으로부터 평균값으로 결정되고 계산되었다. 또한, 활동 패턴을 사용하여 신체 활동을 평가하고, 총 에너지 소비량을 Harris-Benedict 방정식을 사용하여 계산하였다. 최종 연구 대상자는 MUO를 가진 29명의 대상자를 포함하였고, 그들을 두 그룹으로 분류하였다: MUO 유지 그룹 (n = 17, 대조군) 및 MUO로 개선된 그룹 (n = 12, 시험).
- [0044] 모든 대상자들의 몸무게, 신장, 허리 둘레, 엉덩이 둘레, 수축기 혈압과 이완기 혈압이 측정되었다. 또한 체지방 분석을 위해 척추 L1과 L4 위치의 복부 지방 분포가 computed tomography (CT; GE Medical System HiSpeed Advantage® system, Milwaukee, WI, USA)로 측정되었으며, 체지방량, 체지방량, 그리고 체지방률을 포함한 신체 조성이 dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA; Discovery A, Hologic Inc., Bedford, MA, USA)로 분석되었다.
- [0045] 생화학 지표에 대한 분석도 이루어졌다. 수정된 Sanz 방법으로 지질, 유리 지방산, 혈당 관련 지표, 그리고 혈청 감마-글루타미르랜스퍼레이즈 (gamma-glutamyltransferase)가, 히타치 7600 자동 분석기 (Hitachi 7600 autoanalyzer; Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하는 라텍스-응집 비탁 면역 검정법 (latex-agglutination turbidimetric immunoassay)으로 혈청 급성 C-단백질의 농도가 분석되었으며, 혈장 아디포넥틴 농도는 효소 면역 검정법 (enzyme immunoassay), 그리고 렙틴 농도는 인간 렙틴 엘라이자 키트 (human leptin ELISA kit; Millipore, Darmstadt, Germany)와 SpectraMax190 (Molecular Devices, Shanghai, China)으로 분석되었다.
- [0046] 체형 분석과 생화학 지표 분석 결과는 다음과 같다. 표 1에 나타난 바와 같이, 연구 시작 시점 (baseline)에는,

대사적으로 건강하지 않은 상태가 지속된 비만 대상자(MUO) 그룹과, 초기엔 대사적으로 건강하지 않았지만 12주 간의 식이 제한으로 대사적으로 건강한 상태로 개선된 비만 대상자(Improved-to-MHO) 그룹 사이에 유의적인 차이가 없었다. 그러나 12주 후에는 대사적으로 건강한 상태로 개선된 비만 대상자 그룹에서 중성지방, 감마-글루타밀트랜스퍼레이즈, 그리고 렙틴 농도가 대사적으로 건강하지 않은 상태가 지속된 비만 대상자 그룹에 비해 유의적으로 감소했고, HDL 콜레스테롤은 유의적으로 증가했다. 또한, CT와 DEXA 결과를 보면, 대사적으로 건강한 상태로 개선된 비만 대상자 그룹에서 L1 척추 위치의 전체 지방 면적과 피하지방 면적이 대사적으로 건강하지 않은 상태가 지속된 비만 대상자 그룹에 비해 유의적으로 감소했다. 추가적으로 대사적으로 건강한 상태로 개선된 비만 대상자들의 경우, 12주간의 식이 제한으로 수축기 혈압 ($p = 0.049$), 중성지방 ($p = 0.034$), HDL 콜레스테롤 ($p = 0.012$), 렙틴 ($p = 0.002$) 그리고 체지방률 ($p = 0.002$), 제지방량 ($p = 0.002$), L1 척추 위치의 총 지방 면적 ($p = 0.008$), L1 척추 위치의 피하 지방 면적 ($p = 0.002$), L1 척추 위치의 내장지방/피하지방 면적 비 ($p = 0.002$)가 유의하게 변했음을 확인할 수 있었다.

표 1

12주 간 식이제한 후 MUO 유지군과 MHO로 개선된 군 간의 임상적 특성의 차이

	MUO maintenance (n=17)		Improved-to-MHO (n=12)		P	P [†]
	0-week	12-week	0-week	12-week		
Age (yr)	42.3±2.25		40.8±2.90		0.744	
Weight (kg)	80.5±2.27	79.9±2.18	85.8±4.17	84.2±3.69	0.263	0.263
BMI (kg/m ²)	27.7±0.37	27.5±0.36	27.8±0.48	27.5±0.36	0.845	0.879
Waist circumference (cm)	96.8±1.31	96.2±1.26	96.6±1.76	95.9±1.45	0.679	0.983
WHR	0.93±0.01	0.93±0.01	0.92±0.01	0.93±0.01	0.811	1.000
Systolic BP	129.4±2.78	127.5±2.97	124.7±4.61	120.6±4.12*	0.616	0.195
Diastolic BP	78.4±1.88	79.5±1.96	75.8±2.81	74.5±2.38	0.679	0.152
Triglycerides (mg/dL) [†]	218.1±8.73	245.3±27.0	225.2±32.8	138.6±16.6*	0.616	0.001
Total cholesterol (mg/dL) [†]	207.5±9.98	208.1±9.56	214.2±11.5	208.6±12.2	1.000	0.811
HDL cholesterol (mg/dL) [†]	43.1±2.68	43.4±2.79	43.8±2.75	52.8±3.53*	0.913	0.014
LDL cholesterol (mg/dL) [†]	120.9±9.04	115.6±9.33	125.4±10.4	128.1±9.30	0.879	0.527
Free fatty acids (nEq/L) [†]	604.3±65.1	619.9±70.8	525.8±60.0	630.9±150.8	0.499	0.394
Glucose (mg/dL) [†]	91.8±2.76	91.7±3.00	89.7±3.36	89.0±4.24	0.556	0.711
Insulin (μIU/dL) [†]	14.5±1.75	14.9±1.40	14.7±1.99	12.8±1.72	0.913	0.245
HOMA-IR [†]	3.31±0.42	3.39±0.34	3.26±0.44	2.82±0.37	0.913	0.227
C-peptide (ng/mL) [†]	2.36±0.24	2.37±0.22	2.43±0.27	2.10±0.20	0.777	0.444
Gamma-GT (U/L) [†]	31.9±3.05	32.2±4.12	31.8±11.9	20.3±6.26	0.128	0.048
Hs-CRP (mg/L) [†]	1.25±0.26	1.43±0.29	1.22±0.33	1.12±0.33	0.616	0.419
Adiponectin (ng/mL) [†]	3.55±0.35	3.56±0.32	4.05±0.69	3.51±0.56	0.845	0.616
Leptin (ng/mL) [†]	16.2±2.86	16.9±2.64	16.6±1.61	8.72±1.02*	0.744	0.012
Measurements from DEXA and CT						
Fat percentage (%) [†]	29.3±1.43	29.2±1.23	29.1±1.72	23.4±1.71**	0.879	0.018
Fat mass (g) [†]	22162.6±968.8	22065.4±850.6	20796.4±1649.4	19810.4±1449.4	0.471	0.211
Lean body mass (g) [†]	51905.2±2385.7	51907.2±2170.8	53402.5±3365.7	57030.1±3287.7*	0.444	0.097
L1 vertebra						
Whole fat area (cm ²) [†]	27334.9±1007.3	27680.2±1130.6	26398.8±1727.1	22986.0±1521.6*	0.845	0.027
Visceral fat area (cm ²) [†]	12292.0±965.0	12603.7±975.2	12153.4±1043.4	12221.4±1046.7	0.913	0.913
Subcutaneous fat area (cm ²) [†]	15042.9±1151.0	15076.5±1081.3	14245.4±1332.9	10764.6±1199.0*	0.777	0.021
VSR [†]	0.94±0.13	0.93±0.12	0.93±0.11	1.31±0.19*	0.744	0.128
L4 vertebra						
Whole fat area (cm ²) [†]	32172.2±1023.8	31634.2±1135.9	29139.8±1677.8	28609.4±1594.9	0.195	0.325
Visceral fat area (cm ²) [†]	10174.7±564.0	10114.0±601.3	9735.7±877.5	9504.6±836.5	0.586	0.394
Subcutaneous fat area (cm ²) [†]	21997.5±984.7	21520.2±1153.2	19404.1±1915.2	19104.8±1646.9	0.263	0.245
VSR [†]	0.46±0.04	0.50±0.05	0.59±0.09	0.58±0.09	0.616	0.616

Mean ± S.E. *Tested following logarithmic transformation. VSR, visceral fat to subcutaneous fat ratio. P-values derived from the Mann-Whitney U test at 0 weeks. P[†]-values derived from the Mann-Whitney U test at 12 weeks. P-values derived from Wilcoxon signed-rank test within the group.

[0047]

[0048]

<실시예 2> 대사체 분석

[0049]

(간접 요인을 제거하고, 분석 물질을 농축해 시료의 분리도 및 감도를 향상하기 위한 전처리 과정)

[0050]

150 L의 혈장에 차가운 아세트나이트릴 (Wako Pure Chemical Industries, Chuo-ku, Osaka, Japan) 800 L을 넣어 30초간 고르게 볼텍싱 해준 뒤, 4 °C에서 10분간 방치하였다 (incubation). 뒤이어 10,000 rpm, 5 분, 4 °C 조건으로 원심 분리를 거치면, 단백질, 염분, 인지질 등 분석에 방해가 되는 물질들이 포함된 침전물과, 대사체가 포함된 상층액을 분리할 수 있다. 이 상층액을 새로운 1.5 mL 마이크로 튜브로 옮겨 질소로 말린 뒤, 잔여물 (residue)을 차가운 메탄올 (J.T. Baker® Chemicals, Avantor Performance Materials, Inc., PA, USA) 100 L에 재용해시켰다.

[0051]

(Ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS)를 이용한 대사체 분석)

[0052]

전처리가 완료된 각각의 샘플은 5 μL씩 Thermo UPLC system (Ultimate 3000 BioRS, Dionex-Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) 속 Acquity UPLC-BEH-C18 컬럼 (Waters, Milford, MA, USA)으로 주입되었다. 본 실험은 양이온 모드로 UPLC-MS 분석이 진행되었는데, LC-MS-등급 워터 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ,

USA)에 용해된 0.1% 포름산과, LC-MS-등급 메탄올 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA)에 용해된 0.1% 포름산이 각각 이동상 A와 B로 사용되었다. 이동상 A와 B의 흐름 속도는 0.4 mL/분으로 일정했지만, 이동상 B의 용량 농도는 다음과 같이 변화했다: 0.0-1.0분, 0%; 1.0-16.0분, 0%에서 100%로 증가; 16.0-20.0분, 100%로 유지; 20.0-22.0분, 칼럼 안정화를 위해 다시 0%로 감소 (한 샘플의 분석 실행 시간은 22분). 추가적으로, 기기 안정화가 잘 이루어지고 있는지 확인할 수 있는 참고 기준을 마련하고, multi-batch set 분석 사이의 재현성을 검사하기 위해, 모든 비만 대상자의 혈장을 일정량씩 모아 앞서 설명한 혈장 전처리 방법과 동일하게 처리한 웰리티 컨트롤 (quality control, 정도관리) 샘플을 준비했다. 이 웰리티 컨트롤 샘플은 10개 샘플 당 한번씩 주입되어 분석되었다.

[0053] MS로는 Q-Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 기기가 사용되었고, 양이온 모드에서의 electrospray ionization (ESI) source를 통해 LC에서 분리된 물질들이 이온화 되었다. MS 세팅 조건은 다음과 같다: 스프레이 전압, 3.5 kV; 질소 sheath 가스 흐름 속도, 40 (arbitrary units); 보조 가스, 10 (arbitrary units); 모세관 온도, 320 °C; S-렌즈 무선 주파수, 50; 튜브-렌즈 전압, 80 V; 보조 가스 히터 온도, 300 °C. 이와 같은 조건에서 질량 대 전하비 (m/z) 80-1000 범위의 값들이 모두 스캔 (full scan)되었다.

[0054] (데이터 처리 및 결과)

[0055] 얻어진 미가공 데이터 (raw data)는 SIEVE 2.2 (Thermo Fisher Scientific)라는 데이터 분석 소프트웨어를 사용해 표준화 (normalization)되었다. 웰리티 컨트롤 샘플을 참고로, 질량 대 전하비 오차 5 ppm, 머무름 시간 오차 2.5 분의 조건에 맞춰 정규화된 데이터는, 온라인 데이터 베이스 (Human Metabolome, Lipid MAPS, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, MassBank와 ChemSpider)에서 검색되어 대사체 규명 작업이 이루어졌다. 그 결과 총 1,703개의 물질이 검출되었다.

[0056] 두 그룹 (대사적으로 건강하지 않은 상태가 유지된 비만인 그룹 대 대사적으로 건강한 상태로 개선된 비만인 그룹)에서 대사체 분석 결과에 유의한 차이가 있는지 알아보기 위해 orthogonal projections to latent structures discriminant analysis (OPLS-DA) 분석을 실시하였다.

[0057] 그 결과, 두 그룹 사이엔 확연히 차이가 있었으며 ($Q^2 = 0.593$, $R^2Y = 0.796$), 총 20개의 물질 (mass feature)이 12주 식이 제한 프로토콜에 따른 두 그룹의 대사체 양상 차이에 큰 영향을 주는 것으로 확인되었다 (variable importance in projection (VIP) > 1.0)(도 2).

[0058] 20개의 물질 중에서 미검출율 (missing rate)이 큰 11개 화학 물질을 제외하고 남은 9개의 대사체 중 4-아미노부티르알데히드 (4-aminobutyraldehyde)와 4'-아포-β-카로테날 (4'-apo-β-carotenal)이 대사적으로 건강한 상태로 개선된 비만인 그룹에서 각각 통계적으로 유의하게 감소 ($p = 0.005$), 증가 ($p = 0.024$)한 것을 확인할 수 있었다(도 3).

[0060] <실시예 3> 대사체 평가 및 임상 지표와의 연관성 평가

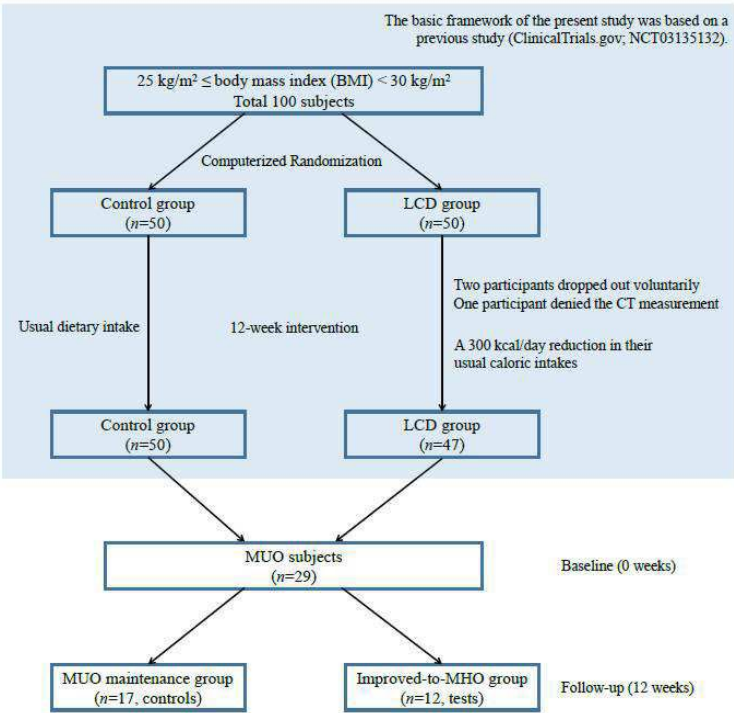
[0061] 두 그룹의 대사적 변화를 명확히 시각화하기 위해, 대사체 데이터는 중위수로 표준화된 Z-점수로, 체형 분석 지표는 미가공 데이터로, 생화학 지표는 로그-변환되어 히트맵 (heatmap)으로 그려졌다. 히트맵은 HDL 콜레스테롤을 제외한 다른 모든 임상 지표들이 대사적으로 건강하지 않은 상태가 유지된 그룹에서 더 높다는 것을 가시적으로 잘 보여주며, 12주 시점에서 4-아미노부티르알데히드와 4'-아포-β-카로테날은 다른 대사체들보다 두 그룹 사이에 더 확연한 차이를 보였다(도 4).

[0062] 위의 2가지 대사체와 Mann-Whitney U test에서 유의하게 분석된 8가지의 임상 지표들로 만들어진 로지스틱 회귀 분석 모델에서 receiver operating characteristic (ROC) 그래프가 얻어졌다. ROC로부터 계산된 area under the curve (AUC) 값을 보면, 8가지의 임상 지표들 만으로 만들어진 ROC 그래프의 AUC는 0.845, 4-아미노부티르알데히드와 4'-아포-β-카로테날을 추가한 ROC 그래프의 AUC는 0.885로 두 가지 대사체가 모델에 추가되면 예측력이 상승한다는 사실을 확인할 수 있었다(도 5).

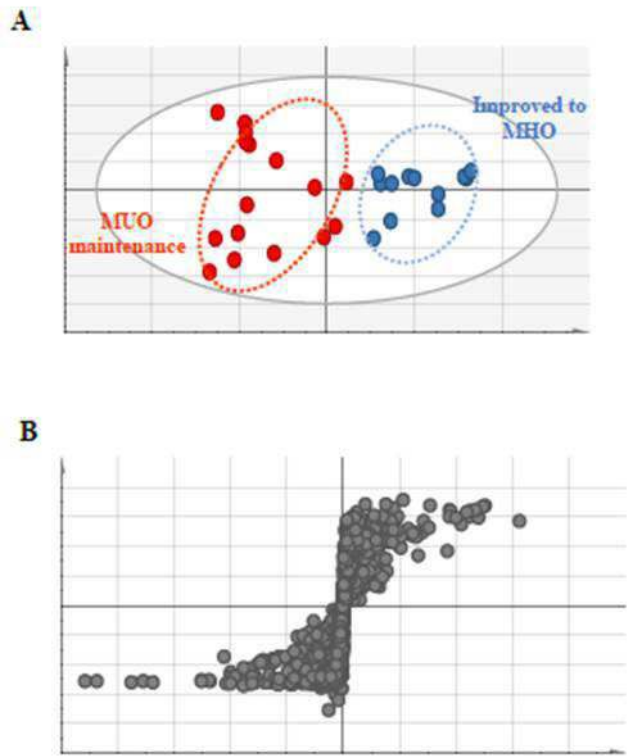
[0063] 결론적으로, 렙틴 관련 대사체 (4-아미노부티르알데히드), 아포카로티노이드 대사체 (4'-아포-β-카로테날) 그리고 피하지방 분포는 대사 상태에 따른 비만과 매우 밀접한 관련이 있으며, 이들은 단기적 (12주) 식이 제한 효과를 확인하고 결과를 예측할 수 있는 바이오마커로 활용될 수 있다는 사실이 입증되었다.

도면

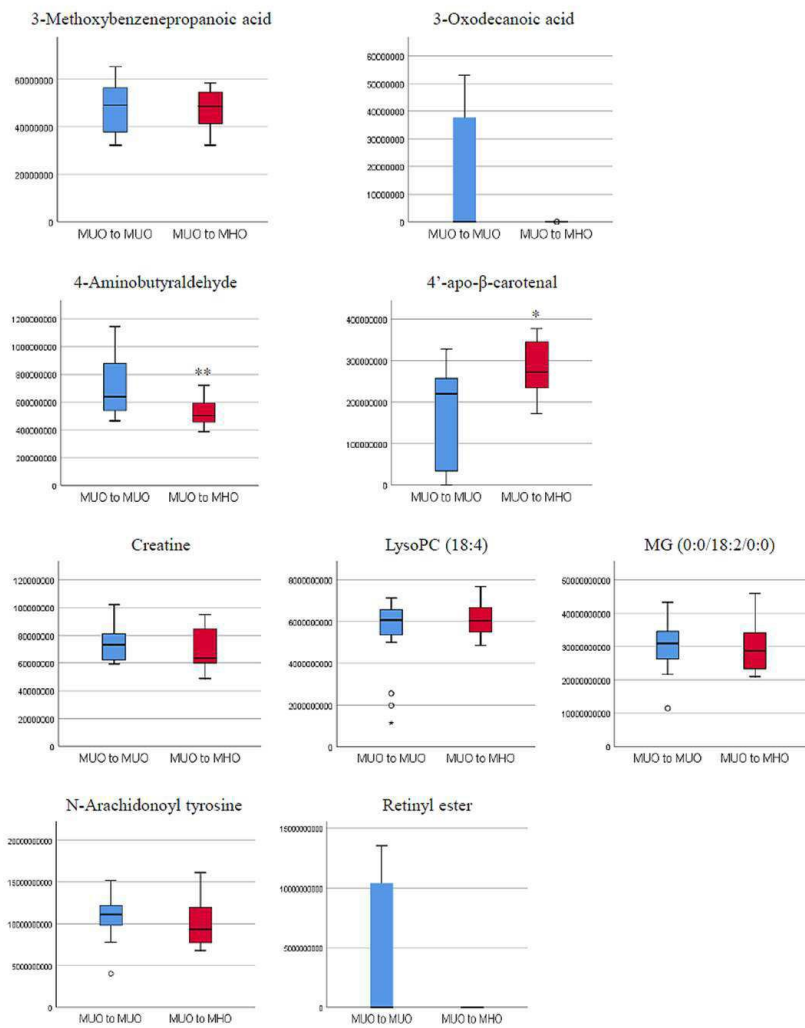
도면1



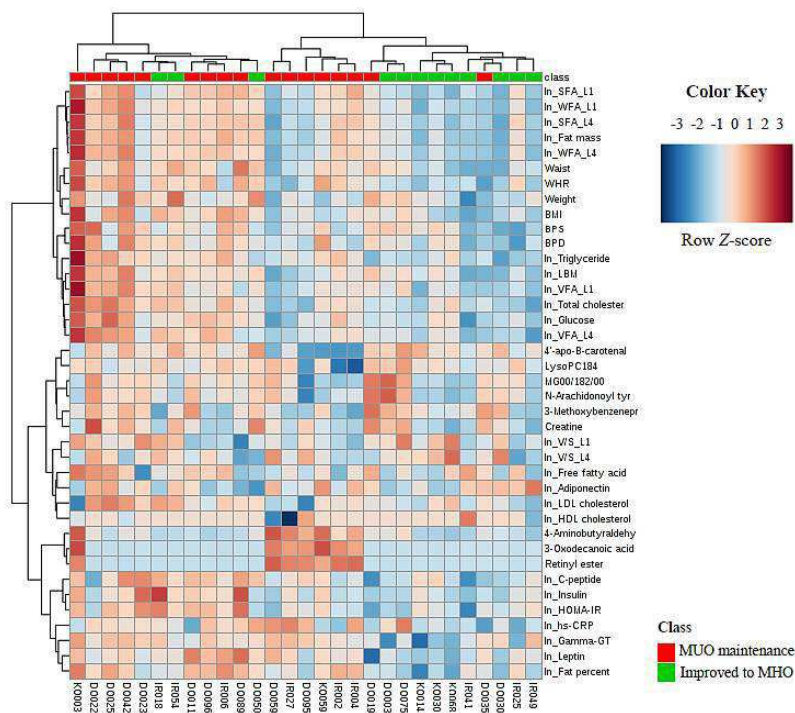
도면2



도면3



도면4



도면5

