



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0053260
(43) 공개일자 2017년05월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2013.01)
G01N 33/5308 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0155528
(22) 출원일자 2015년11월06일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
권호정
서울특별시 서초구 신반포로 45, 110동 302호 (반포동, 반포주공아파트)
김정은
서울특별시 서대문구 연세로 50, 공학2호관 501호 (신촌동, 연세대학교)
(74) 대리인
특허법인 하나

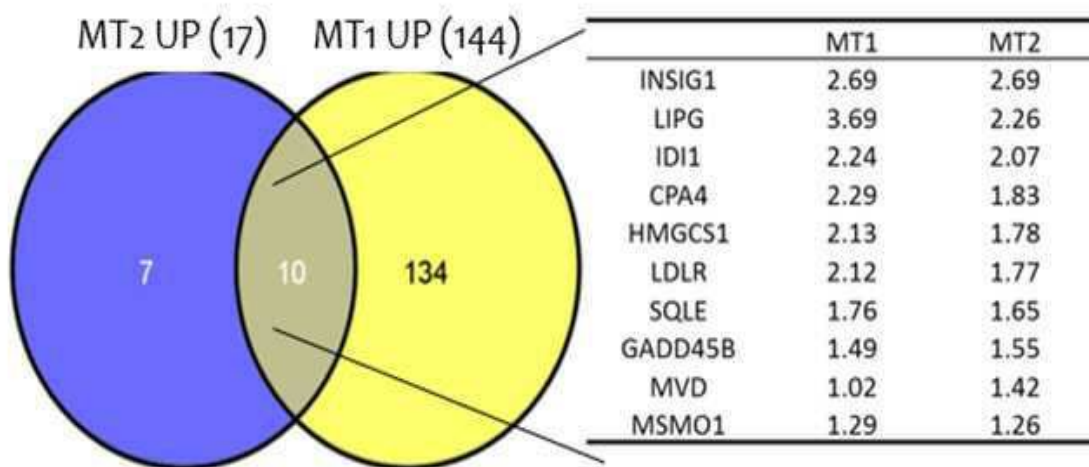
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 miRNA 발현 수준으로부터 UQCRB 관련 질병을 진단하는 방법

(57) 요약

본 발명은 miRNA 발현 수준으로부터 UQCRB 관련 질병을 진단하는 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 miRNA 발현 수준을 측정하는 것만으로 UQCRB 관련 질병 및 콜레스테롤 생합성과 관련된 질병의 진단 뿐만 아니라 추후 발병 위험성을 예측할 수 있는 방법, 이를 위한 바이오 마커 조성물 및 키트에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)

C12Q 2600/178 (2013.01)

G01N 2800/044 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012M3A9D1054520

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 포스트게놈 다부처유전체 사업

연구과제명 질환 유전자 모델 세포를 이용한 질환 관련 microRNAs 대량 발굴 및 검증

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교

연구기간 2014.11.30 ~ 2015.11.29이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2009-0083522

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터지원사업

연구과제명 ERC/2-1세부/단백질기능제어이행연구센터/세포 기반 물질 검색 시스템을 이용한 저분자 활

성 화합물 확보 (1/3,2단계)(2009.9.1~2016.2.29)

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교

연구기간 2013.03.01 ~ 2014.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 샘플에서 hsa-miR-1323, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-10a-5p 로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA의 발현 수준을 측정하는 단계,
- b) 단계 a)에서 측정된 발현 수준(들)의 패턴을 발현 수준의 하나 또는 수개의 참조 패턴과 비교하는 단계, 및
- c) 단계 b)에서의 비교 결과로부터 UQCRB 관련 질병을 진단하거나, UQCRB 관련 질병이 발병할 위험성을 예측하거나 또는 다발성 경화증의 결과를 예측하는 단계;를 포함하는,

miRNA 발현 수준으로부터 UQCRB 관련 질병을 진단하거나, 발병할 위험성을 예측하는 방법

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 a)단계에서 상기 샘플이 혈액 샘플, 혈청 샘플, 혈장 샘플, 소변 샘플 및 타액으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 a)단계에서 hsa-miR-1323 의 발현 수준을 측정하는 것을 특징으로 하는 방법

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 a)단계에서 hsa-miR-512-3p 의 발현 수준을 측정하는 것을 특징으로 하는 방법

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 a)단계에서 hsa-miR-10a-5p 의 발현 수준을 측정하는 것을 특징으로 하는 방법

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 a)단계에서 발현 수준의 측정이 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블롯, 노던 블롯, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion) 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 방법으로 달성되는 것인 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서,
상기 UQCRB 관련 질병은 콜레스테롤 합성과 관련되는 것인 방법.

청구항 8

hsa-miR-1323, hsa-miR-512-3p, 및 hsa-miR-10a-5p 로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA 를 검출할 수 있는 제제를 포함하는
UQCRB 관련 질병의 바이오 마커 조성물

청구항 9

제 8 항에 있어서,
상기 제제는 상기 hsa-miR-1323, hsa-miR-512-3p, 및 hsa-miR-10a-5p 로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA 의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 가지는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는
UQCRB 관련 질병의 바이오 마커 조성물

청구항 10

샘플에서 hsa-miR-1323, hsa-miR-512-3p, 및 hsa-miR-10a-5p 로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA의 발현 수준을 측정하는 수단;,
상기 샘플로부터 측정된 miRNA의 발현 수준과 비교하기 위한 발현 수준을 포함하는 적어도 하나의 참조 패턴;
을 포함하는 miRNA 발현 수준으로부터 UQCRB 관련 질병을 진단하거나, 발병할 위험성을 예측하기 위한 키트

청구항 11

제 10 항에 있어서,
상기 키트는 hsa-miR-1323, hsa-miR-512-3p, 및 hsa-miR-10a-5p 로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA에 상보적이고, 상기 miRNA 를 증폭할 수 있는 프라이머를 포함하는 것인
키트

청구항 12

제 8 항에 있어서,
상기 키트는 hsa-miR-1323, hsa-miR-512-3p, 및 hsa-miR-10a-5p 로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA에 대한 프로브 또는 항체를 포함하는 것인
키트

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 miRNA 발현 수준으로부터 UQCRB 관련 질병을 진단하는 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 miRNA 발현 수준을 측정하는 것만으로 UQCRB 관련 질병 및 콜레스테롤 생합성과 관련된 질병의 진단 뿐만 아니라 추후 발병 위험성을 예측할 수 있는 방법, 이를 위한 바이오 마커 조성물 및 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 미토콘드리아 복합체 III의 구성요소 중 하나인 UQCRB(Ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein)은 혈관신생을 저해하는 저분자 화합물인 터페스타신(terpestacin)의 표적 단백질로 알려져 있다. 구체적으로, UQCRB는 핵 내에 인코딩되어 있으며, 미토콘드리아 복합체 III 구조를 조립하고 이를 유지하는데 중요한 역할을 한다. 또한, UQCRB는 간암 및 위암에서 과발현되며, 저혈당증, 락트산 산성증 및 근질환과 같은 여러 질병과 관련이 있다고 알려져 있다.

[0003] 본 발명자들은 도 1에서 보는 바와 같이 UQCRB의 세포내 도입이 미토콘드리아 내 활성산소종 발생을 유도하고 HIF-1 α 를 안정화시켜서 신생혈관을 유도시킨다는 것을 밝혀낸 바 있다(Jung *et al.*, Mol. Biosyst., 2013).

[0004] 그외 여러 보고에 의하면, 미토콘드리아 호흡 체인의 복합체 III는 세포 내 산소 감지를 통해 활성산소종(ROS: reactive oxygen species)을 생성하여, 저산소-유도성 혈관신생 조절에 있어 중요한 역할을 수행한다. 저산소-유도인자(HIF)는 저산소 상태에서 세포 생존 및 혈관신생 개시에 중요한 역할을 하는 점에서 주목 되어왔다. 저산소 상태에서 미토콘드리아 복합체 III에 의해 생성된 ROS는 혈관신생의 주 조절자인 저산소유도인자-1 α (HIF-1 α ; hypoxia-inducible factor 1- α) 단백질을 안정화시킨다. HIF는 HIF-1 α 및 HIF-1 β 의 헤테로 다이머 복합체로 구성되는데, 특히 HIF-1 α 단백질은 혈관 내피세포 증식인자(VEGF)와 같은 호-혈관신생 인자 발현의 개시를 일으킨다.

[0005] 마이크로RNA(miRNA)는 18-25개의 뉴클레오티드(nucleotide, nt)로 구성된 작은 비-암호화 RNA로서, 표적 유전자의 3'-비번역 부위(untranslated region, UTR)에 결합하여 유전자 발현을 조절하고(Bartel DP, *et al.*, Cell 116: 281-297, 2004; Lewis BP, *et al.*, Cell 120: 15-20, 2005) 인트론(intron), 엑손(exon) 또는 유전자 간 부위(intergenic region)로부터 공정된다(Rodriguez A, *et al.*, Genome Res 14: 1902-1910, 2004).

[0006] miRNA는 암세포의 증식 및 침윤을 포함하는 암 발달과 관련된 다양한 생물학적 공정과 관련되고, miRNA 발현은 많은 유형의 암에서 양 방향으로 조절된다(Esquela-Kerscher A, *et al.*, Nat Rev Cancer 6: 259-269, 2006)고 알려져 있다.

[0007] 그러나, 이러한 마이크로RNA(miRNA)가 UQCRB 및 UQCRB가 관련된 질병과 연관되어 있다는 것에 대해서는 종래 알려진 바가 없었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 특정 마이크로RNA(miRNA)의 발현 수준을 측정함으로써 UQCRB 및 UQCRB가 관련된 질병의 진단, 질병 발병의 위험성을 예측할 수 있는 새로운 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 또한, UQCRB 및 UQCRB가 관련된 질병의 진단, 질병 발병의 위험성을 예측할 수 있는 바이오 마커 조성물 및 이를 포함하는 UQCRB 및 UQCRB가 관련된 질병의 진단, 질병 발병의 위험성을 예측할 수 있는 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여

[0011] a) 샘플에서 hsa-miR-1323, hsa-miR-512-3p, 및 hsa-miR-10a-5p 로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA의 발현 수준을 측정하는 단계,

[0012] b) 단계 a)에서 측정된 발현 수준(들)의 패턴을 발현 수준의 하나 또는 수개의 참조 패턴(들)과 비교하는 단계, 및

[0013] c) 단계 b)에서의 비교 결과로부터 UQCRB 관련 질병을 진단하거나, UQCRB 관련 질병이 발병할 위험성을 예측하

거나 또는 결과를 예측하는 단계를 포함하는,

- [0014] miRNA 발현 수준으로부터 UQCRB 관련 질병을 진단하거나, 발병할 위험성을 예측하는 방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명에 의한 방법에 있어서, 상기 샘플이 혈액 샘플, 혈청 샘플, 혈장 샘플, 소변 샘플 및 타액으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0016] 본 발명에 의한 방법에 있어서, 상기 a)단계에서 hsa-miR-1323 의 발현 수준을 측정하는 것을 특징으로 한다.
- [0017] 본 발명에 의한 방법에 있어서, 상기 a)단계에서 hsa-miR-512-3p 의 발현 수준을 측정하는 것을 특징으로 한다.
- [0018] 본 발명에 의한 방법에 있어서, 상기 a)단계에서 hsa-miR-10a-5p 의 발현 수준을 측정하는 것을 것을 특징으로 한다.
- [0019] 본 발명에서 상기 “miRNA의 발현 수준”은, miRNA 유전자 자체, 또는 상기 유전자가 발현된 miRNA 수준, 즉, miRNA 유전자에 의해 코딩 되는 단백질의 발현 수준을 확인함으로써 알 수 있다. 상기 수준을 측정할 수 있는 물질로는 상기 miRNA 유전자에 특이적인 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있다. 본 발명에서 상기 miRNA 유전자에 특이적인 프라이머 또는 프로브는 상기 3개의 miRNA 각각의 유전자 전체 또는 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 프로브일 수 있으며, 상기 프라이머 또는 프로브는 당업계에 알려진 방법을 통해 디자인할 수 있다.
- [0020] 본 발명에서 상기 “프라이머”는 적합한 온도 및 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있을 수 있다. 또한, 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 또한, 본 발명에 따른 프라이머는 유전자 증폭 반응에 이용될 수 있는 것이 바람직하다.
- [0021] 본 발명에 의한 방법에 있어서, 상기 a)단계에서 발현 수준의 측정은 miRNA 의 발현량을 측정하기 위한 방법이라면 제한되지 않고 사용될 수 있으며, 바람직하게는 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블롯, 노던 블롯, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion) 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 방법으로 달성되는 것을 특징으로 한다.
- [0022] 본 발명에서, 상기 “프로브”는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타겟 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화 할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것을 말한다. 본 발명에 따른 프로브는 단일쇄일 수 있으며, 바람직하게는 올리고디옥시리보뉴클레오타이드일 수 있다. 본 발명의 프로브는 자연 dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 프로브는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명에 의한 UQCRB 관련 질병을 진단하거나, 발병할 위험성을 예측하기 위한 방법에 있어서, 상기 발현 수준의 측정을 위한 단백질 수준의 측정은 항체를 이용할 수 있는데, 이러한 경우, 생물학적 시료 내의 상기 마커 단백질과 이에 특이적인 항체는 결합물, 즉, 항원-항체 복합체를 형성하며, 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정할 수 있다. 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명에 의한 방법에 있어서, 상기 UQCRB 관련 질병은 콜레스테롤과 관련되는 것을 특징으로 한다. 본 발명에 의한 방법에 있어서, 상기 UQCRB 관련 질병은 기존 UQCRB 가 관여하는 것으로 알려진 유방암, 대장암, 간암, 뇌졸중 등의 암 뿐만 아니라, 콜레스테롤 생합성과 관련되어 혈청 콜레스테롤 수준을 낮추거나 LDL, HDL 콜레스테롤 수준을 높이거나 낮추거나, 이상지혈증, 고지혈증, 고콜레스테롤혈증 등의 질병과 이러한 콜레스테롤과 관련되어 발생하는 급성 혈관 증후군, 미세혈관 질병등을 진단하거나, 예방하는 것이 가능하다.
- [0025] 본 발명은 또한, hsa-miR-1323, hsa-miR-512-3p, 및 hsa-miR-10a-5p 로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하

나의 miRNA 를 검출할 수 있는 제제를 포함하는 UQCRB 관련 질병의 바이오 마커 조성물을 제공한다.

- [0026] 본 발명에서 용어, miRNA 를 검출할 수 있는 제제란 상기와 같이 UQCRB 와 관련되어 발현이 영향을 받는 마커인 miRNA의 발현 수준을 확인함으로써 마커의 검출에 사용될 수 있는 분자를 의미하며 바람직하게는 마커에 특이적인 항체, 프라이머 또는 프로브를 말한다. 즉, 본 발명에 의한 UQCRB 관련 질병의 바이오 마커 조성물에 있어서, 상기 제제는 상기 hsa-miR-1323, hsa-miR-512-3p, 및 hsa-miR-10a-5p 로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA 의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 가지는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0027] 본 발명은 또한,
- [0028] 샘플에서 hsa-miR-1323, hsa-miR-512-3p, 및 hsa-miR-10a-5p 로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA의 발현 수준을 측정하는 수단; 및
- [0029] 상기 샘플로부터 측정된 miRNA의 발현 수준과 비교하기 위한 발현 수준을 포함하는 적어도 하나의 참조 패턴;을 포함하는
- [0030] miRNA 발현 수준으로부터 UQCRB 관련 질병을 진단하거나, 발병할 위험성을 예측하기 위한 키트를 제공한다.
- [0031] 본 발명의 miRNA 발현 수준으로부터 UQCRB 관련 질병을 진단하거나, 발병할 위험성을 예측하기 위한 키트가 만일 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* 또는 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있으며, 본 발명의 키트가 면역 분석에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, 이차항체 및 표지의 기질을 포함할 수 있다. 나아가, 본 발명에 따른 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0032] 본 발명에 의한 UQCRB 관련 질병을 진단하거나, 발병할 위험성을 예측하기 위한 키트는 hsa-miR-1323, hsa-miR-512-3p, 및 hsa-miR-10a-5p 로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA에 상보적이고, 상기 miRNA 를 증폭할 수 있는 프라이머를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0033] 본 발명에 의한 UQCRB 관련 질병을 진단하거나, 발병할 위험성을 예측하기 위한 키트는 상기 키트는 hsa-miR-1323, hsa-miR-512-3p, 및 hsa-miR-10a-5p 로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 miRNA에 대한 프로브 또는 항체를 포함하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0034] 본 발명에 의한 방법은 특정 miRNA 발현 수준을 측정하는 것만으로 UQCRB 관련 질병 및 UQCRB이 관련된 콜레스테롤 생합성과 관련된 질병의 진단 뿐만 아니라 추후 발병 위험성을 예측할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1은 UQCRB의 세포내 도입이 미토콘드리아 내 활성산소종 발생을 유도하고 HIF-1 α 를 안정화시켜서 신생혈관을 유도하는 과정을 나타낸다.
- 도 2 는 UQCRB 변이 세포주에서 발현 양상 비교를 통한 miRNA 선정하는 과정을 나타낸다.
- 도 3 내지 도 5는 콜레스테롤 합성 경로 선정 과정을 나타낸다.
- 도 6 내지 도 9 는 콜레스테롤 합성 경로와 관련된 3가지 효소의 발현 정도를 측정한 결과를 나타낸다.
- 도 10 내지 도 12는 콜레스테롤 합성 저해인자가 UQCRB 변이세포주의 성장에 미치는 영향을 측정한 결과를 나타낸다.
- 도 13 내지 도 17은 3개의 miRNA 의 발현 정도 및 콜레스테롤 합성 경로 관련 효소의 발현 정도를 측정한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0036] 이하에서는 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명이 이하의 실시예에 의하여 한

정되는 것은 아니다.

- [0037] <제조예> 세포주 제조
- [0038] HEK 293 과 UQCRB 변이 세포주 MT1, MT2 및 HepG2 를 FBS가 첨가된 DMEM 미디엄에서 배양하였다. UQCRB 변이 세포주 MT1, MT2 는 본 발명자가 종래 발표한 Chang *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2014 에 기재된 방법에 따라 준비되었다.
- [0039] <실시예 1> UQCRB 관련 miRNA 선정
- [0040] <실시예 1-1> miRNA 분리 및 sequencing
- [0041] 대조군으로 사용된 HEK 293 대비하여 상기 UQCRB 변이 세포주 MT1, MT2 에서 발현 양상이 다른 miRNA 를 동정 하기 위하여 상기 UQCRB 변이 세포주 MT1, MT2 에서 total RNA 를 분리한 후 sequencing 하였다.
- [0042] 상기 HEK 293 과 UQCRB 변이 세포주 MT1, MT2 및 HepG2 로부터 PureLink RNA isolation kit 를 사용하여 total RNA 를 분리하고, 분리된 total RNA 를 마크로젠 주식회사에서 miRNA sequencing 하고 sequencing data 를 얻 었다.
- [0043] <실시예 1-2> 발현 양상 비교를 통한 miRNA 선정
- [0044] 상기 UQCRB 변이 세포주 MT1, MT2 에서 total RNA 를 분리한 결과 1255개의 miRNA 가 분리되었으며, 도 2에서 보는 바와 같이 아래 3가지 조건을 만족하는 10개의 miRNA 를 선정하였다.
- [0045] $|\log_2FC| > 1$, $|\log_2CPM| > 2$, $FDR < 0.05$
- [0046] FC : 발현 정도의 차이
- [0047] CPM : the own expression of the factor in each cells
- [0048] 선정된 10개의 miRNA 의 발현 양상을 RT-PCR 로 측정하고, UQCRB 변이 세포주에서의 발현 양상과 대비하여 hsa-miR-1323, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-10a-5p 의 3개의 miRNA 를 선택하였다.
- [0049] 도 2 에서 hsa-miR-1323, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-10a-5p 의 3개의 miRNA 는 정상세포인 HEK 293 에서보다 UQCRB 변이 세포주에서 발현이 감소하는 것을 알 수 있다.
- [0050] <실시예 2> UQCRB 관련 pathway 선정
- [0051] <실시예 2-1> mRNA 분리 및 cholesterol metabolic process 선정
- [0052] UQCRB 가 관여하는 pathway 를 선정하기 위하여 UQCRB 변이 세포주 MT1, MT2 에 대해서 mRNA 분리 및 sequencing 을 수행하였다.
- [0053] 도 3 내지 도 5 에서 보는 바와 같이 8개의 oncology (sterol metabolic process, cholesterol metabolic process, steroid metabolic process, sterol biosynthetic process, steroid biosynthetic process, terpenoid backbone biosynthesis, isoprenoid biosynthetic process, cholesterol biosynthetic process) 들이 UQCRB 변이 세포주 MT1, MT2 에서 과발현 되었으며, 이중 가장 크게 과발현되는 콜레스테롤 합성 경로 (cholesterol metabolic process)를 선정하였다.
- [0054] <실시예 2-2> 콜레스테롤 합성 경로(cholesterol metabolic process) 선정의 타당성 검증
- [0055] UQCRB 가 관여하는 pathway 로 콜레스테롤 합성 경로(cholesterol metabolic process)를 선정한 것에 대한 타 당성을 검증하기 위해, UQCRB 변이 세포주 MT1, MT2 에서 콜레스테롤 합성 경로와 관련된 3가지 효소(HMGCR (HMG-CoA reductase), MVD (Pyrophosphomevalnote decarboxylase), LSS (Lanosterol synthase))의 발현 정도 를 측정하고 그 결과를 각각 도 6 내지 도 9에 나타내었다.
- [0056] <실시예 2-3> 콜레스테롤 합성 경로 선정의 타당성 검증
- [0057] UQCRB 가 관여하는 pathway 로 콜레스테롤 합성 경로(cholesterol metabolic process)를 선정한 것에 대한 타 당성을 검증하기 위해 콜레스테롤 합성 저해인자를 UQCRB 변이세포주에 처리하고 콜레스테롤 합성 저해인자가 UQCRB 변이세포주의 성장에 미치는 영향을 측정하고 그 결과를 도 10 내지 도 12 에 나타내었다.
- [0058] 콜레스테롤 합성 저해인자로 Fatostatin (sterol regulatory element-binding protein:SREBP 저해제),

Mevastatin (HMG-CoA reductase:HMGCR 저해제) 및 YM-53601 (squalene synthase:FDFT1 저해제) 를 UQCRB 변이세포주 MT1, MT2에 처리한 후 UQCRB 변이세포주 MT1, MT2의 성장 정도를 측정한 결과 콜레스테롤 합성 저해인자 Fatostatin 처리시 UQCRB 변이세포주 MT1, MT2 의 성장이 저해되는 것을 확인할 수 있다.

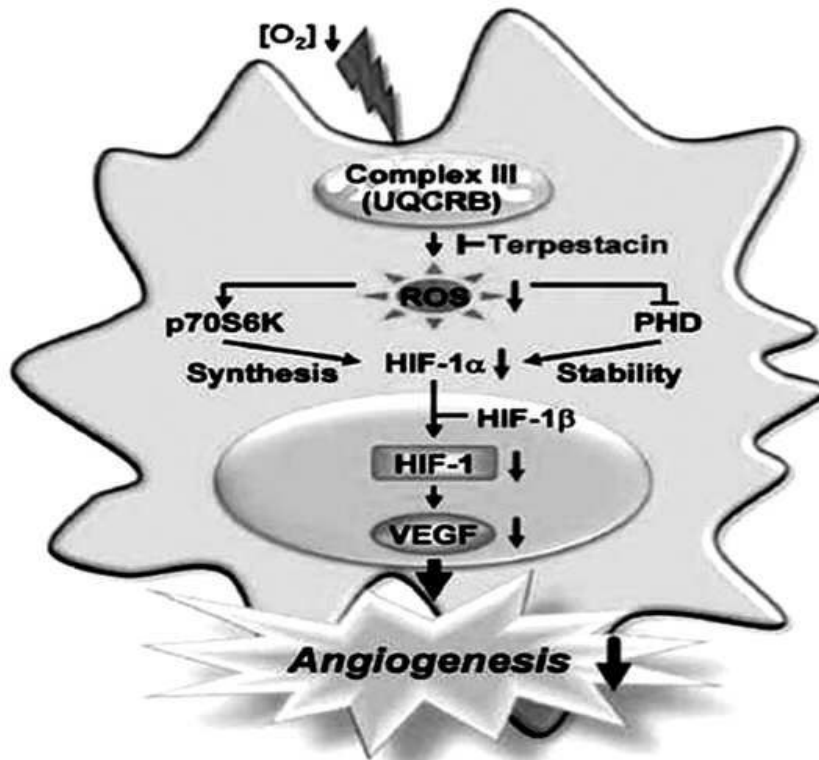
[0059] <실시예 3> miRNA 와 콜레스테롤 합성 경로(cholesterol metabolic process) mRNA 관련성 검토

[0060] UQCRB가 과발현되는 것으로 알려진 3개의 암 세포주 에서 상기 실시예 1에서 선정된 hsa-miR-1323, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-10a-5p 의 3개의 miRNA 의 발현 정도 및 콜레스테롤 합성 경로(cholesterol metabolic process) 효소의 발현 정도를 동시에 측정하고 그 결과를 도 13 내지 도 17에 나타내었다.

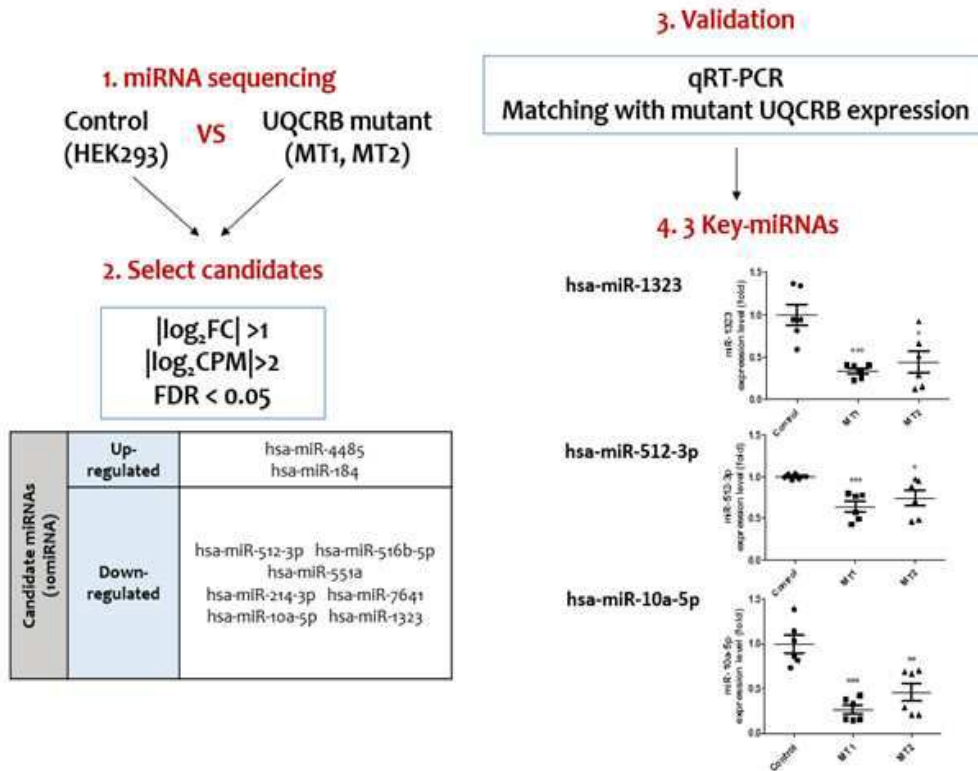
[0061] 도 13 내지 도 17에서 콜레스테롤 합성 효소들은 UQCRB가 과발현되는 것으로 알려진 3개의 암 세포주 에서 발현 양이 증가하는데 비해, 3개의 miRNA의 발현은 감소하여, 본 발명에 의한 3개의 miRNA 가 UQCRB 및 이와 연관된 콜레스테롤 합성 경로와 관련된 질병의 진단에 사용되는 바이오마커가 될 수 있다는 것을 알 수 있다.

도면

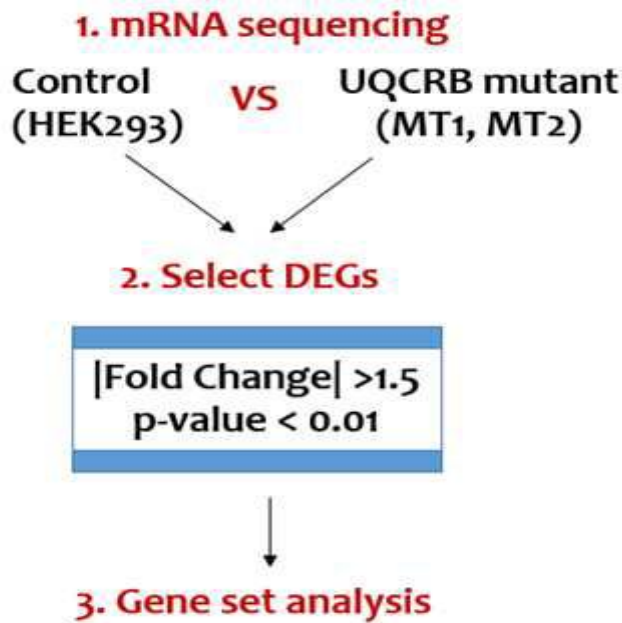
도면1



도면2



도면3



도면4

• Mutant1

Tool: DAVID, Cutoff: Benjamini < 0.05

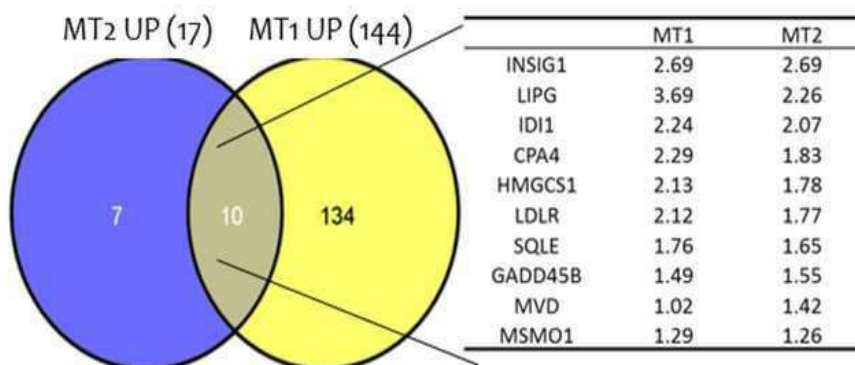
Term	Count	List Total	Pop Hits	Pop Total	Benjamini
GO:0016126~sterol biosynthetic process	10	118	35	13528	1.86 E-08
GO:0016125~sterol metabolic process	12	118	101	13528	6.10 E-07
GO:0006695~cholesterol biosynthetic process	8	118	26	13528	6.78 E-07
GO:0006694~steroid biosynthetic process	11	118	85	13528	8.45 E-07
GO:0008203~cholesterol metabolic process	11	118	92	13528	1.48 E-06
GO:0008610~lipid biosynthetic process	16	118	323	13528	2.81 E-05
GO:0008202~steroid metabolic process	13	118	202	13528	2.89 E-05
hsa00100:Steroid biosynthesis	6	55	17	5085	5.72 E-05
GO:0008299~isoprenoid biosynthetic process	5	118	20	13528	3.39 E-05
hsa00900:Terpenoid backbone biosynthesis	4	55	15	5085	2.12 E-02
hsa04010:MAPK signaling pathway	10	55	267	5085	3.92 E-02
hsa01040:Biosynthesis of unsaturated fatty acids	4	55	22	5085	4.48 E-02

• Mutant2

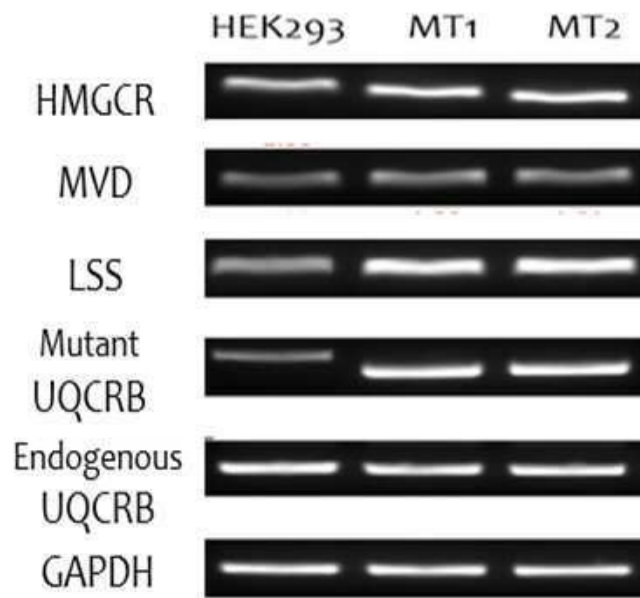
Tool: DAVID, Cutoff: Benjamini < 0.05

Term	Count	List Total	Pop Hits	Pop Total	Benjamini
GO:0016125~sterol metabolic process	6	15	101	13528	3.64 E-08
GO:0008203~cholesterol metabolic process	6	15	92	13528	7.04 E-06
GO:0008202~steroid metabolic process	6	15	202	13528	1.00 E-04
GO:0016126~sterol biosynthetic process	4	15	35	13528	4.71 E-04
GO:0006694~steroid biosynthetic process	4	15	85	13528	4.68 E-03
hsa00900:Terpenoid backbone biosynthesis	3	11	15	5085	6.47 E-03
GO:0008299~isoprenoid biosynthetic process	3	15	20	13528	8.78 E-03
GO:0006695~cholesterol biosynthetic process	3	15	26	13528	1.28 E-02
GO:0006720~isoprenoid metabolic process	3	15	44	13528	3.20 E-02

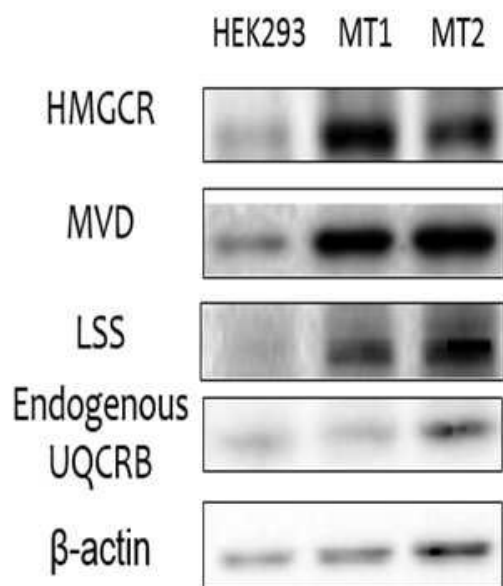
도면5



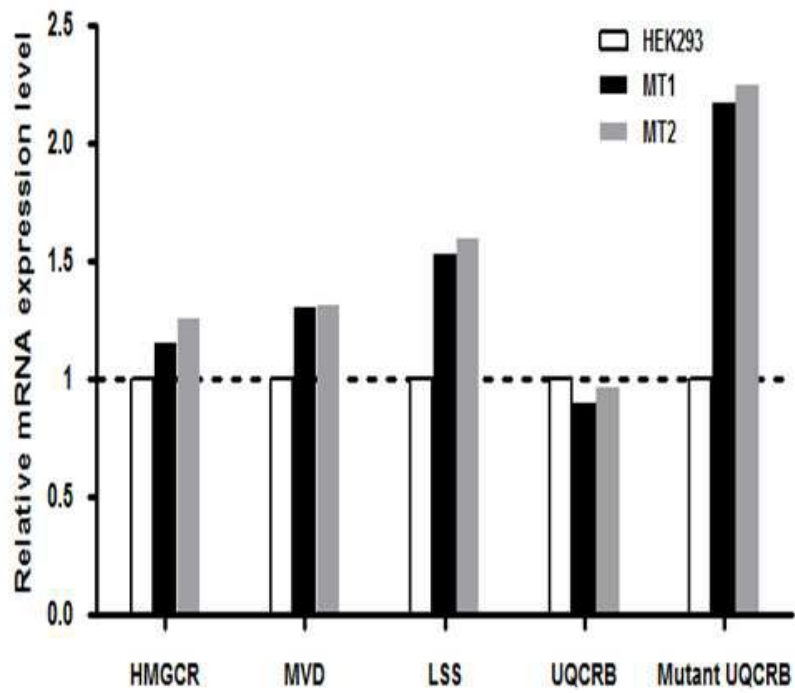
도면6



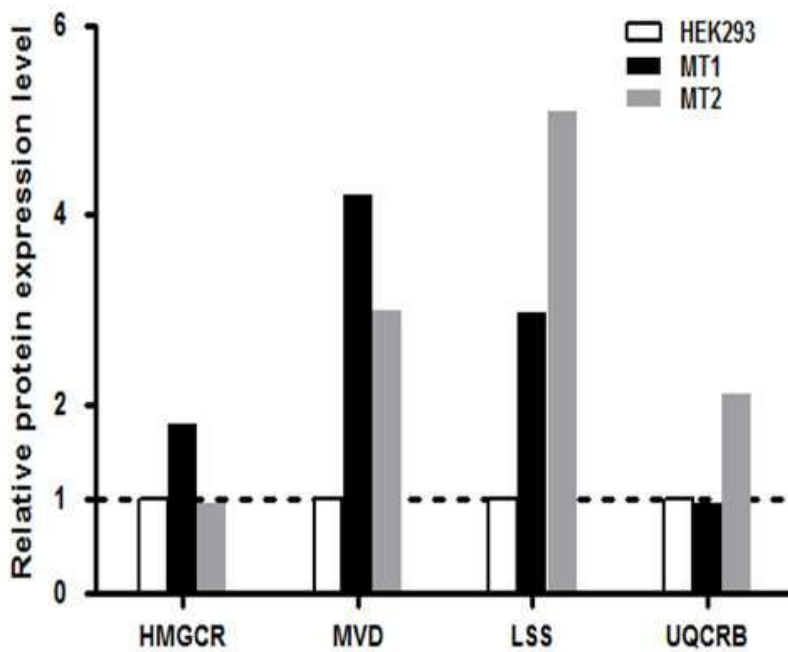
도면7



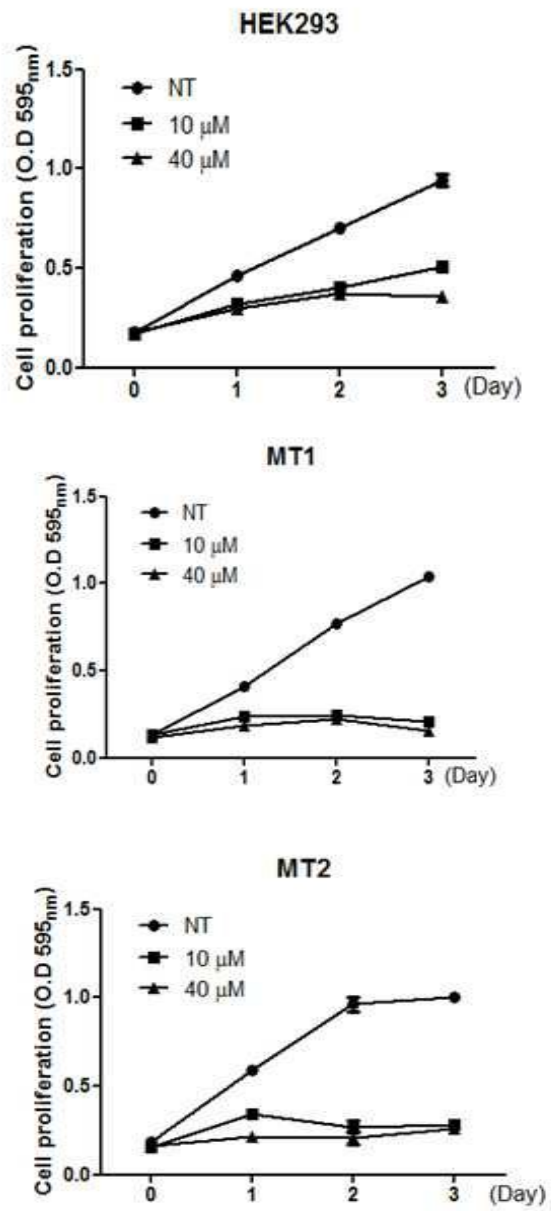
도면8



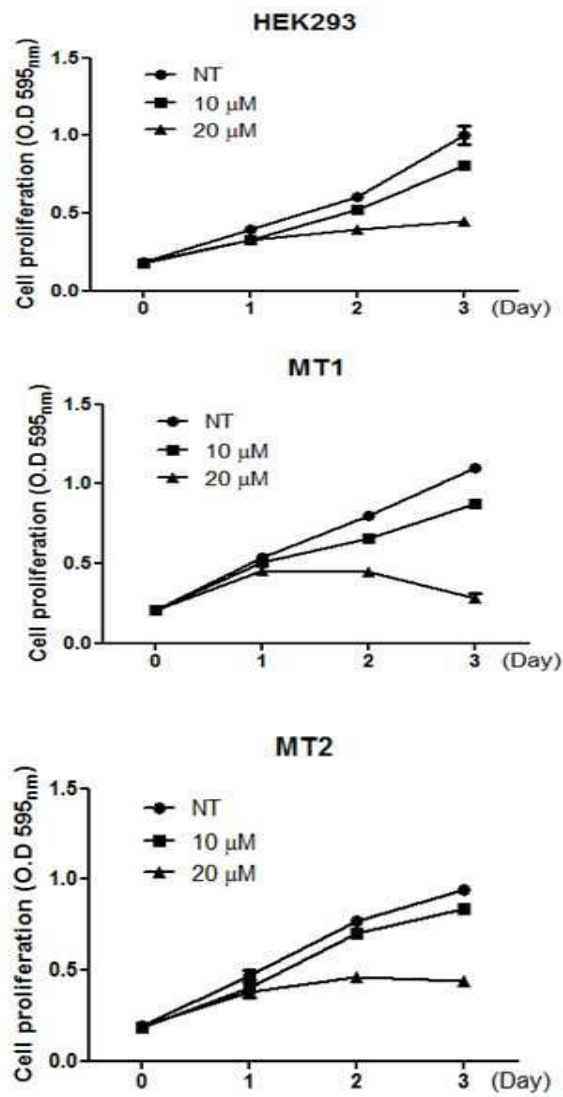
도면9



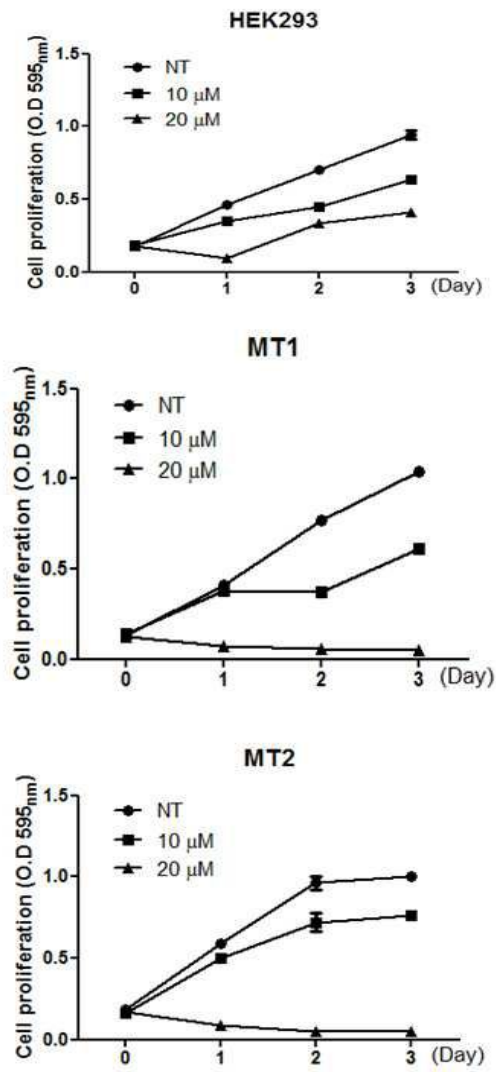
도면10



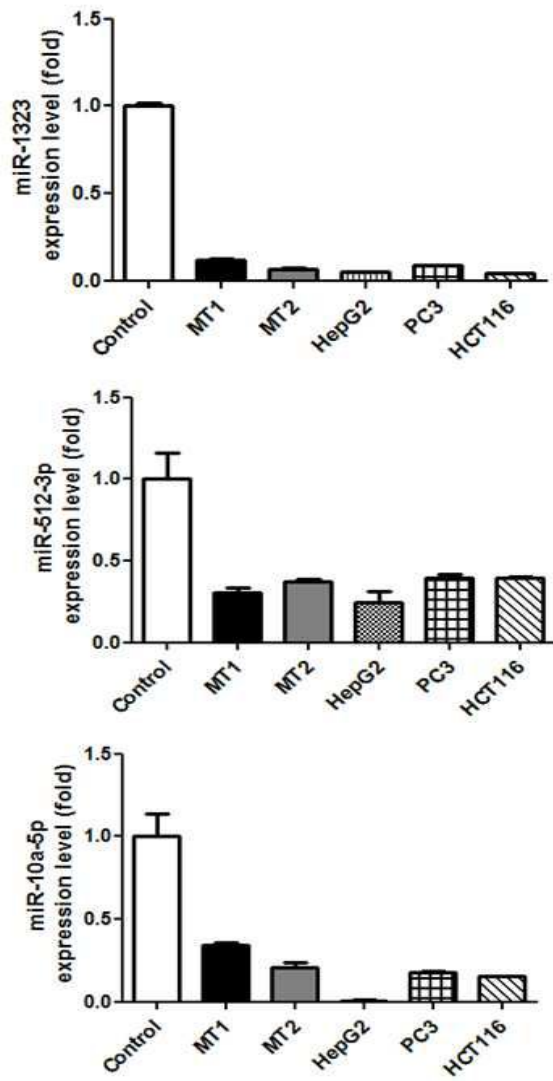
도면11



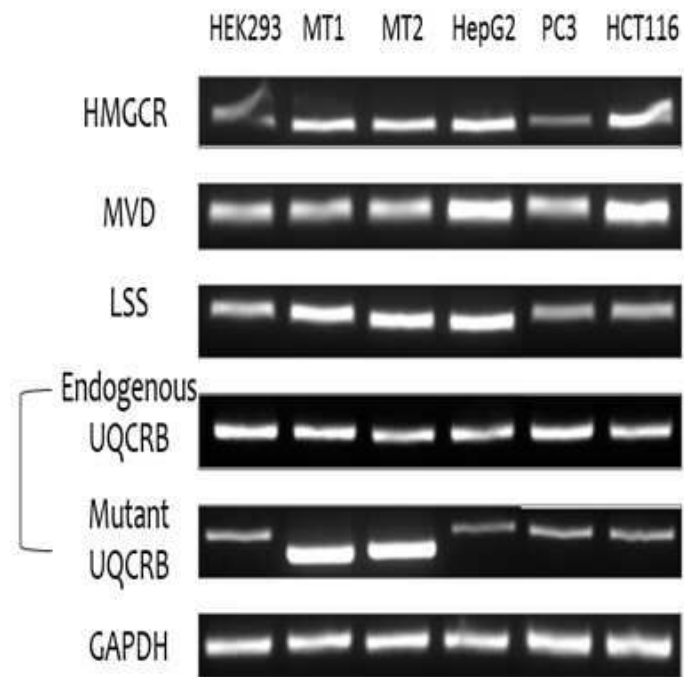
도면12



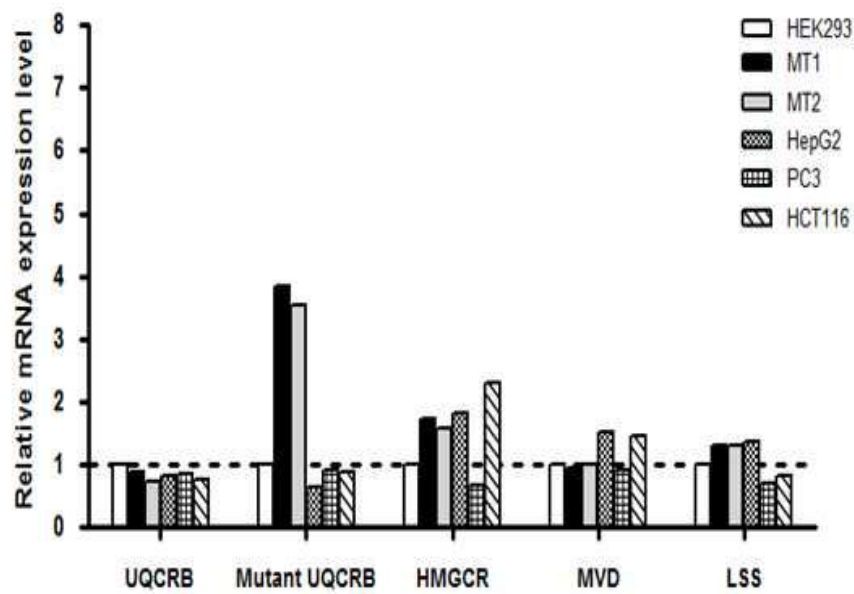
도면13



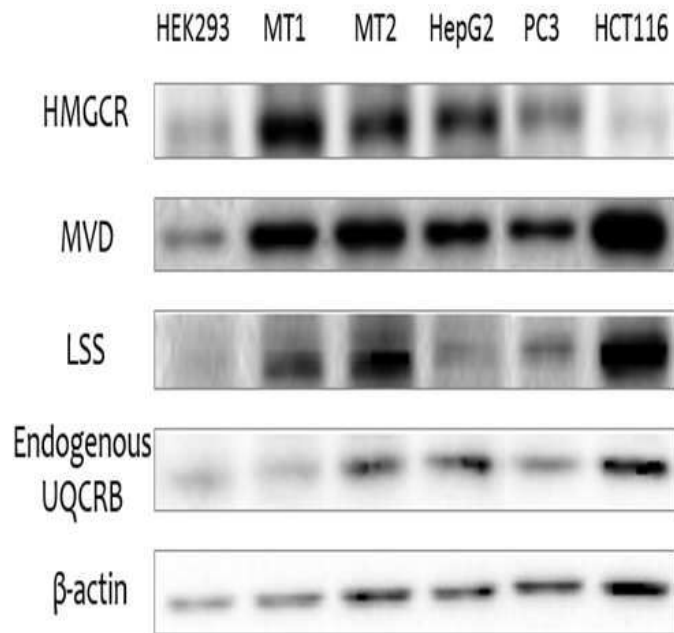
도면14



도면15



도면16



도면17

