



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년11월04일
(11) 등록번호 10-0991468
(24) 등록일자 2010년10월27일

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0067675(분할)
(22) 출원일자 2010년07월14일
심사청구일자 2010년07월14일
(65) 공개번호 10-2010-0082822
(43) 공개일자 2010년07월20일
(62) 원출원 특허 10-2008-0033768
원출원일자 2008년04월11일
심사청구일자 2008년04월11일
(56) 선행기술조사문헌
Molecular Human Reproduction, Vol. 13:8,
pp.527-535 (2007.06.07.)
J. Korean Med. Sci., Vol. 20, pp.456-460
(2005.)
J Clin Endocrinol Metab, Vol. 87:8,
3971-3976(2002.08.)

(73) 특허권자
차의과학대학교 산학협력단
포천시 동교동 198-1 차의과학대학교내
(72) 발명자
백광현
서울 동작구 흑석동 28번지 한강현대아파트 111동
703호
김명선
서울 강남구 논현1동 136-8번지 201호
김용수
경기 성남시 분당구 구미동 무지개마을 대림아파
트 105동 301호
(74) 대리인
오국진

전체 청구항 수 : 총 9 항

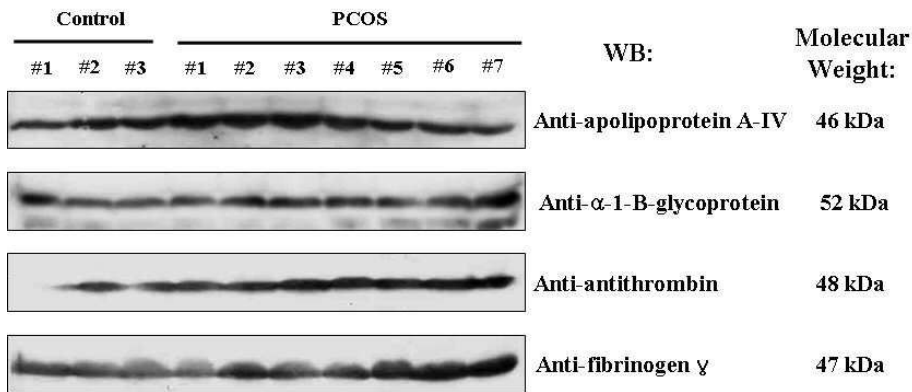
심사관 : 노은주

(54) 다낭성 난소 증후군 진단을 위한 분석방법 및 키트

(57) 요약

본 발명은 다낭성 난소 증후군(polycystic ovary syndrome) 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 환자의 시료 중, 서열번호 1 내지 4의 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 코딩하는 유전자의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는 분석방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 4의 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 코딩하는 유전자의 발현량을 측정할 수 있는 분자를 포함하는 다낭성 난소 증후군 진단용 키트를 제공한다.

대표도 - 도6



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A010382

부처명 보건복지부

연구관리전문기관

연구사업명 보건의료바이오기술개발사업

연구과제명 다낭성 난소증후군 병인유전체 규명

기여율

주관기관 차의과학대학교 산학협력단

연구기간 2001년 12월 01일 ~ 2010년 11월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

다낭성 난소 증후군 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 환자의 시료 중, 서열번호 4의 단백질을 코딩하는 유전자의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는 분석방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 환자의 시료가 혈액인 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 환자의 시료가 분리된 여포액(follicular fluid)인 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자의 발현량의 측정이 mRNA 또는 단백질의 양을 측정하는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 단백질의 양의 측정이 웨스턴 블롯팅에 의하여 수행되는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 mRNA 양의 측정이 RT-PCR 또는 실시간-PCR을 수행하여 측정하는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 7

서열번호 4의 단백질을 코딩하는 유전자의 발현량을 측정할 수 있는 분자를 포함하는 다낭성 난소 증후군 (polycystic ovary syndrome) 진단용 키트로서,

상기 분자가 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 기질, 리간드, 또는 보조인자(cofactor); 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적인 상보적 서열을 갖는 프라이머인, 다낭성 난소 증후군 진단용 키트.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 분자는 검출가능한 표지로 표지된 것임을 특징으로 하는 다낭성 난소 증후군 진단용 키트.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 프라이머가 기관상에 고정화되어 있는 마이크로어레이 형태인 것을 특징으로 하는 다낭성 난소 증후군 진단용 키트.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 다낭성 난소 증후군(polycystic ovary syndrome) 진단에 필요한 정보를 제공하기 위한 분석방법 및 다낭성 난소 증후군 진단용 키트에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 다낭성 난소 증후군은 가입 여성의 4-12%가 영향을 받고 있는 내분비대사 질환이다(Sheehan MT. 2004. Polycystic ovarian syndrome: diagnosis and management. Clinical medicine and research 2:13-27). 2003년 로테르담 협의회(Rotterdam Consensus)에서는 다음 진단 기준 중 두 가지 이상의 자궁 이상 증후가 있는 경우가

다낭성 난소 증후군인 것으로 결론짓고 있다: (1) 희발월경(oligomenorrhea)이나 무월경(amenorrhea), (2) 안드로겐과다혈증(hyperandrogenism) 및/또는 남성호르몬과다증 (hyperandrogenemia) (3) 형태학적인 다낭(polycystic ovary morphology). 이외에도 나이와 몸무게를 대상으로 한 조사를 토대로 살펴보면 대조군과 비교해서 약 50%의 다낭성 난소 증후군 여성에게서 혈청 내 황체형성 호르몬의 과분비(luteinizing hormone (LH) hypersecretion), 인슐린 저항성(insulin resistance), 및 보상적 고인슐린혈증 (compensatory hyperinsulinemia) 등의 생화학적 특징이 공통적으로 나타난다(Pasquali R, Gambineri A. 2006. Insulin-sensitizing agents in polycystic ovary syndrome. European journal of endocrinology 154:763-775).

[0003] 다낭성 난소 증후군의 유전학적 원인을 규명하기 위하여 가계학적 분류((familial clustering)가 제시되고 있으나(Legro RS, Spielman R, Urbanek M, Driscoll D, Strauss JF, Dunaif A. 1998. Phenotype and genotype in polycystic ovary syndrome. Recent progress in hormone research 53:217-256), 그 유전학적 원인은 여전히 불분명하다. 또한, 단일 상염색체상의 우성에 의한 전이(a single autosomal-dominant pattern transmission)가 제시된 바 있으나, 최근 연구에 의하면 더욱 복잡한 유전학적 규명이 필요한 것으로 나타나고 있다(Luque-Ramirez M, San Millan JL, Escobar-Morreale HF. 2006. Genomic variants in polycystic ovary syndrome. Clinica chimica acta 366:14-26; Crosignani PG, Nicolosi AE. 2001. Polycystic ovarian disease: heritability and heterogeneity. Human reproduction update 7:3-7; Legro RS, Strauss JE. 2002. Molecular progress in infertility: polycystic ovary syndrome. Fertility and sterility 78:569-576).

[0004] 다낭성 난소 증후군 환자의 유전학적 표현형에 있어서의 불균일성(heterogeneity)에 기인하여, 이에 대한 유전학 연구가 매우 곤란하다. 더구나, 매우 적은 sibpair의 획득과 적당한 동물 모델이 없는 가운데 형태학적으로 아주 모호한 수컷(male)의 부족은 다낭성 난소 증후군의 유전학적 규명을 더욱 어렵게 한다. 대부분의 유전학 연구는 myeloid cell leukemia-1(Hartley PS, et al., 2002, The Journal of clinical endocrinology and metabolism 87:3417-3727), growth differentiation factor-9(Teixeira Filho FL, et al, 2002, The Journal of clinical endocrinology and metabolism 87:1337-1344), 또는 plasma protein-A(Hourvitz A, et al., 2002, Endocrinology 143:1833-1844)과 같은 난포 발달 (folliculogenesis)에 관련된 유전자 및 steroid acute regulatory protein (StAR)(Jakimiuk AJ, et al., The Journal of clinical endocrinology and metabolism 86:1318-1323) 또는 CYP17(Munir I, et. al, 2005, The Journal of clinical endocrinology and metabolism 90:4852-4857)를 포함하는 스테로이드 합성(steroidogenesis)에 관련된 유전자를 중심으로 분리된 세포 배양으로 후보 유전자를 찾거나 수행되고 있다. 또한, 인슐린 신호전달에 관련된 유전자에 대하여도 연구가 진행되고 있다(Corbould A, et al., 2005, American journal of physiology. Endocrinology and metabolism 288:E1047-E1054; Corbould A, et al., 2006, Diabetes 55:751-759).

[0005] 상기한 연구들은 다낭성 난소 증후군이 매우 다양한 원인에 의해 유발되고, 질환으로부터 발생하는 소수의 샘플 크기나 통계학상의 오류 및 진단 기준의 어려움에 의해 일관된 결과를 보이지 못하고 있어, 이러한 연구들을 기초로 다낭성 난소 증후군을 조기에 진단할 수 있는 방법을 개발하는 것은 한계가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 다낭성 난소 증후군 진단 방법을 개발하기 위하여 프로테오믹스(proteomics) 분석을 통하여 다낭성 난소 증후군을 분자생물학적 수준에서 진단할 수 있는 마커 단백질을 다양한 방법으로 검색하였다. 본 발명자들은 정상인과 다낭성 난소 증후군 환자로부터 얻은 시료를 대상으로 2차원 전기영동(2-dimensional electrophoresis), MALDLI TOF-MS, 및 단백질 서열분석 등을 수행한 결과, 다낭성 난소 증후군 환자에서만 특이적으로 과발현되는 단백질을 발견하였다.

[0007] 따라서, 본 발명은 다낭성 난소 증후군 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 다낭성 난소 증후군 환자에서만 특이적으로 과발현되는 단백질을 이용한 분석방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현량을 측정할 수 있는 분자를 포함하는 다낭성 난소 증후군의 진단용 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 태양에 따라, 다낭성 난소 증후군 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 환자의 시료 중, 서열번호 1 내지 4의 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 코딩하는 유전자의 발현량을 측정

하는 단계를 포함하는 분석방법이 제공된다.

- [0010] 본 발명의 분석방법에 있어서, 상기 환자의 시료는 혈액 또는 여포액(follicular fluid)일 수 있다. 또한, 상기 환자의 시료가 분리된 여포액인 경우, 상기 단백질은 서열번호 3 및 4의 단백질로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택될 수 있다.
- [0011] 상기 유전자의 발현량의 측정은 mRNA 또는 단백질의 양을 측정함으로써 수행될 수 있으며, 상기 단백질의 양의 측정은 웨스턴 블롯팅에 의하여 측정할 수 있고, 상기 mRNA 양의 측정은 RT-PCR 또는 실시간-PCR을 수행하여 측정할 수 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 태양에 따라, 서열번호 1 내지 4의 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 코딩하는 유전자의 발현량을 측정할 수 있는 분자를 포함하는 다낭성 난소 증후군(polycystic ovary syndrome) 진단용 키트로서, 상기 분자가 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 기질, 리간드, 또는 보조인자(cofactor); 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적인 상보적 서열을 갖는 프라이머인, 다낭성 난소 증후군 진단용 키트가 제공된다.
- [0013] 상기 분자는 검출가능한 표지로 표지될 수 있으며, 상기 키트는 상기 프라이머가 기관상에 고정화되어 있는 마이크로어레이 형태일 수 있다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명에 따라, 특정 단백질 즉 서열번호 1 내지 4의 단백질이 다낭성 난소 증후군 환자에서 특이적으로 과발현되는 것이 밝혀졌다. 따라서, 본 발명에 따른 분석방법 및 진단용 키트는 다낭성 난소 증후군 환자를 조기에 진단하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 여포액의 2-DE 분석 결과를 나타낸다. A 및 B는 정제 전(A)과 정제 후(B)의 여포액의 2-DE 이미지를 각각 나타낸다.
 도 2는 쿠마시 블루 G-250(Coomassie blue G-250)으로 염색된 2-DE 분석 결과를 나타낸다. 1 mg의 여포액 단백질들은 18 cm pH 3-10 IPG 스트립과 9-16%의 구배 (gradient) SDS-PAGE 상에서 분리하였다. 도 2의 A는 대조군 정상 여성의 2-DE 이미지를 나타내고, 도 2의 B는 다낭성 난소 증후군 환자의 2-DE 이미지를 나타낸다. 다낭성 난소 증후군 환자의 여포액에서 볼륨 측정을 통해 상대적인 증가를 보이는 과발현된 6개의 스팟이 2-DE로부터 선택되었다(C, D, 및 E) .
 도 3은 다낭성 난소 증후군 환자의 여포액에서 과발현된 단백질들의 2-DE 분석 결과를 나타낸다. 도 3에서, 3246번은 안티트롬빈 III 체인 B(antithrombin III Chain B); 3528번은 피브리노겐 γ (fibrinogen γ); 4093번은 아포리포프로틴 A-IV 전구체(apolipoprotein A-IV precursor); 및 6603번은 α -1-B-글라이코프로틴(α -1-B-glycoprotein)을 각각 나타낸다.
 도 4는 아포리포프로틴 A-IV 전구체의 웨스턴 블롯 분석 결과이다. 도 4의 A는 웨스턴 블롯 분석 결과이고, 도 4의 B는 아포리포프로틴 A-IV 전구체(45 kDa)의 겔 밴드에 대한 상대적 밀도를 나타낸다. 막대는 다낭성 난소 증후군 환자와 정상 대조군의 겔 밴드상의 밀도의 평균 \pm SEM을 나타낸다.
 도 5는 웨스턴 블롯에 의한 α -1-B-글라이코프로틴의 발현을 측정된 결과이다. 다낭성 난소 증후군 환자와 정상 여성의 여포액 단백질에 대하여 웨스턴 블롯을 실행하였다. 도 5의 A는 웨스턴 블롯 분석 결과이고, 도 5의 B는 α -1-B-글라이코프로틴(52 kDa)의 겔 밴드에 대한 상대적 밀도를 나타낸다. 막대는 다낭성 난소 증후군 환자와 정상 대조군의 겔 밴드상의 밀도의 평균 \pm SEM을 나타낸다.
 도 6은 다낭성 난소 증후군과 정상 환자의 혈장에서 아포리포프로틴 A-IV 전구체(45 kDa), 안티트롬빈 III 체인 B(48 kDa)와 피브리노겐 γ (49 kDa)의 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명자들은 다낭성 난소 증후군 환자에서 특이적으로 과발현되는 유전자를 찾기 위해 정상인과 다낭성 난소 증후군 환자로부터 얻은 여포액(follicular fluid)을 대상으로 분석을 수행하였다.
- [0017] 여포액은 여포 성장, 난포 성숙과 배란(ovulation) 등의 현상에서 중요한 역할을 한다. 많은 연구들을 통해, 여

여포액이 투명대 경화 현상(zona hardening)을 억제하고, 정자의 과흥분(hyperactivation)과 첨체 반응(acrosome reaction)을 촉진하고, 수정률을 증가시키며, 전 착상 단계에서의 배아 발달을 증가한다고 보고되고 있다. 또한 여포액은 난모 성숙과 배아 발달과 관련된 고나도트로핀(생식샘 자극 호르몬; gonadotropin)과 성장 요인들을 높은 수준으로 유지하는 것으로 보고되고 있으며, 여성 모낭 (follicles)들의 여포 내 화학적 구성물은 모낭의 질을 조절하는 모낭 세포의 분비 활성화와 대사과정의 지표로서 사용될 수 있다고 보고되고 있다. 이는 여포액과 혈액의 단백질 구성물이 발달 과정 동안 세포와 난모의 성장 및 성숙을 위해 유용한 지표임을 시사한다.

[0018] 본 발명자들은 다낭성 난소 증후군 환자로부터 얻은 여포액의 2차원 전기영동(2-dimensional electrophoresis, 2-DE), MALDI-TOF-MS, 및 nano-LC MS/MS을 통하여 폴리펩타이드 수준에서 정상인과의 비교에서 다낭성 난소 증후군 환자에서 발현의 차이를 보이는 인자들, 즉 키니노젠 1(kininogen 1), 시토케라틴 9(cytokeratin 9), 안티 트롬빈 III 체인 B(antithrombin III Chain B), 피브리노겐 γ (fibrinogen γ), 아포리포프로틴 A-IV 전구체 (apolipoprotein A-IV precursor), 및 α -1-B-글라이코프로틴 (α -1-B-glycoprotein)을 동정하였고, 웨스턴 블롯팅(Western blotting) 등의 생화학적 분석을 통하여 상기 4개의 단백질들이 다낭성 난소 증후군 환자에서 비정상적으로 과발현됨을 확인하였다. 상기와 같이 얻어진 단백질들은 서열번호 1 내지 4의 단백질로서, 하기 표1 과 같다.

표 1

서열번호	단백질 명
1	안티트롬빈 III 체인 B(antithrombin III Chain B)
2	피브리노겐 γ (fibrinogen γ)
3	아포리포프로틴 A-IV 전구체 (apolipoprotein A-IV precursor)
4	α -1-B-글라이코프로틴 (α -1-B-glycoprotein)

[0020] 따라서, 본 발명의 일 태양에 따라, 본 발명은 다낭성 난소 증후군 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 환자의 시료 중, 서열번호 1 내지 4의 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 코딩하는 유전자의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는 분석방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 분석방법에 있어서, 상기 환자의 시료는 예를 들어, 임신부로부터 분리된 혈액, 뇨, 여포액 등을 포함하며, 바람직하게는 혈액 또는 여포액을 사용할 수 있다. 통상적으로 임신부는 임신 사실을 알게 되거나 통보 받은 때부터 산부인과 병원에서 정기적 또는 비정기적 검사를 받게 되며, 임상의는 각종 검사를 위해 혈액, 뇨, 여포액 등의 시료를 채취하게 된다. 산부인과 병원에서는 예를 들어 채취된 혈액, 여포액 등의 시료를 가지고 유전적 질환 검사 등의 검사를 수행하게 되는데, 본 발명의 분석방법은 상기 채취·분리된 시료를 대상으로 다낭성 난소 증후군 여부를 판정하는데 사용될 수 있다. 상기 환자의 시료가 분리된 여포액인 경우, 상기 단백질은 서열번호 3 및 4의 단백질로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택될 수 있다.

[0022] 본 발명의 분석방법은 서열번호 1 내지 4의 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 코딩하는 유전자의 발현량을 측정하는 단계를 포함한다. 상기 서열번호 1 내지 4의 단백질 및 그 유전자 서열은 이미 진 बैं크 등에 공지되어 있다.

[0023] 상기 유전자의 발현량의 측정은 해당 유전자의 mRNA 또는 단백질(즉, 서열번호 1 내지 4의 단백질)의 수준(level)을 생명공학 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 측정함으로써 수행될 수 있다. 서열번호 1 내지 4의 단백질 양의 측정은 웨스턴 블롯팅 등의 방법에 의해 측정할 수 있다. 웨스턴 블롯팅 방법으로 단백질의 양을 측정하는 경우, 측정된 단백질 발현량이 정상인의 단백질 발현량에 비하여 적어도 2 배 이상인 경우 다낭성 난소 증후군으로 판정할 수 있다. 또한, 서열번호 1 내지 4의 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA 양의 측정은 역전사-PCR(Reverse Transcription PCR) 또는 실시간-PCR (Real Time PCR) 등의 방법에 의해 측정할 수 있다.

[0024] 본 발명의 다른 태양에 따라, 서열번호 1 내지 4의 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 코딩하는 유전자의 발현량을 측정할 수 있는 분자를 포함하는 다낭성 난소 증후군 진단용 키트로서, 상기 분자가 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 기질, 리간드, 또는 보조인자(cofactor); 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적인 상보적 서열을 갖는 프라이머인, 다낭성 난소 증후군 진단용 키트가 제공된다.

[0025] 본 발명에 따라 밝혀진 상기 단백질(즉, 서열번호 1 내지 4의 단백질)을 코딩하는 유전자의 발현량을 측정할 수 있는 분자로는, 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 기질, 리간드, 또는 보조인자(cofactor); 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적인 상보적 서열을 갖는 프라이머일 수 있다.

- [0026] 서열번호 1 내지 4의 단백질은 생명공학 분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 따라 폴리클론 항체 또는 단일클론 항체를 제조할 수 있으며, 해당 항체를 포함하는 진단용 키트를 제조할 수 있다. 또한, 서열번호 1 내지 4의 단백질은 각각 그 기능이 밝혀져 있으므로, 각각의 단백질에 대한 기질, 리간드, 또는 보조인자를 포함하도록 본 발명의 키트를 제작할 수도 있다. 또한, 서열번호 1 내지 4의 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적인 상보적 서열을 갖는 프라이머를 생명공학 분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 따라 제조할 수 있으며, 해당 프라이머를 포함한 진단용 키트를 제조할 수도 있다.
- [0027] 본 발명의 진단용 키트에 있어서, 상기 서열번호 1 내지 4의 단백질을 코딩하는 유전자의 발현량을 측정할 수 있는 분자는 검출가능한 표지(예를 들어, 발색단 등)로 표지될 수 있다. 또한, 본 발명의 진단용 키트는 상기 프라이머가 기관상에 고정화되어 있는 마이크로어레이 형태를 가짐으로써 DNA 칩 또는 단백질 칩 등의 칩(chip) 형태일 수도 있다.
- [0028] 본 발명에 따라 새롭게 밝혀진 상기 서열번호 1 내지 4의 단백질 과발현과 다낭성 난소 증후군과의 관련성에 대한 구체적인 메커니즘에 관해서는 아직 확실치 밝혀진 것은 아니나, 다음과 같이 추정할 수 있다.
- [0029] 인간 아포리포프로틴 A-IV(apolipoprotein A-IV, apoA-IV)는 45 kDa의 글라이코프로틴 트리글리세라이드-풍부 글라이코프로틴(glycoprotein triglyceride-rich glycoprotein)이며, 소장에서 발현되고 합성과 분비는 육류와의 반응에서 증가한다. apoA-IV는 지방 수송(lipid transport), 지방산 대사과정(lipoprotein metabolism), 음식물 섭취와 장 기능 조절 등의 여러 역할들이 보고된 바 있다. 최근 apoA-IV가 동맥내의 아테롬 발생을 억제하는 것으로 보여지며 항산화 활성을 지속시킨다는 증거가 보고된 바 있다. 이와 같은 apoA-IV의 항-아테롬 반응(antiatherogenic action)의 두 가지 기작은 세포내 지질 유입의 증가(예: "콜레스테롤의 역수송")와 항산화 활성이며, 본 발명에 의해 apoA-IV의 발현이 다낭성 난소 증후군의 여포액에서 유의성 있게 발현이 증가한다는 것이 새롭게 밝혀졌다. 이러한 결과는 다낭성 난소의 발생을 야기하는 지질 단백질 대사와 수송의 이상에 의한 것으로 추정된다.
- [0030] 본 발명에 의해 다낭성 난소 증후군 환자에서 과발현되는 것으로 밝혀진 α -1B-글라이코프로틴(α -1B-glycoprotein, A1BG)은 면역글로불린의 일종으로서, 아직 그 기능이 명확히 규명되지 않은 혈청 단백질이다.
- [0031] 또한, 본 발명에 의해 다낭성 난소 증후군 환자에서 안티트롬빈 III 체인 B 및 피브리노오겐 γ 가 과발현되는 것이 밝혀졌다. 안티트롬빈의 경우, Tsanadis 등은 농도 차이가 다낭성 난소 증후군과 대조군 여성 사이에 유의성 있는 차이가 없다고 보고한 바 있다(Tsanadis G, Vartholomatos G, Korkontzelos I, Avgoustatos F, Kakosimos G, Sotiriadis A, Tatsioni A, Eleftheriou A, Lolis D. 2002. Polycystic ovarian syndrome and thrombophilia Human reproduction 17:314-319). Atiomo 등은 정상 대조군 여성보다 다낭성 난소 증후군 여성에서 피브리노오겐이 더 강하게 나타난다고 보고한 바 있으나(Atiomo WU, Bates SA, Condon JE, Shaw S, West JH, Prentice AG. 1998. The plasminogen activator system in women with polycystic ovary syndrome. Fertility and sterility 69:236-241), Dahlgren 등은 다낭성 난소 증후군 여성에서 피브리노오겐의 농도가 더 낮다고 보고하고 있고(Dahlgren E, Janson PO, Johansson S, Lapidus L, Lindstedt G, Tengborn L. 1994. Hemostatic and metabolic variables in women with polycystic ovary syndrome. Fertility and sterility 61:455-460), Nasiek M 등은 두 그룹 사이에 통계학적으로 유의성 있는 차이를 발견하지 못했다고 보고하고 있다(Nasiek M, Kos-Kudla B, Ostrowska Z, Marek B, Kudla M, Sieminska L, Kajdaniuk D, Foltyn W, Zemczak A. 2006. Acute phase proteins: C-reactive protein and fibrinogen in young women with polycystic ovary syndrome. Pathophysiology 14:23-28). 이러한 불일치하는 보고에도 불구하고, 본 발명에 의해 한국인에 있어서는 다낭성 난소 증후군 환자에서 안티트롬빈 III 체인 B 및 피브리노오겐 γ 가 과발현되는 것이 명확히 밝혀졌다는 것은 놀라운 것이다.
- [0032] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명이 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 실시예
- [0034] 1. 시험방법
- [0035] (1) 환자 선택
- [0036] 12 명의 다낭성 난소 증후군 여성을 차병원 불임 센터에서 선정하였다. 다낭성 난소 증후군의 진단 기준은 임상

증상, 초음파 검사와 생화학 결과를 종합해서 사용하였다. 기본적으로 안드로겐 과다혈증(다모증, 여드름이나 혈청 내 증가된 테스토스테론), 배란 이상 증후(무월경이나 희발월경)를 보이는 환자로부터 초음파 진단을 통해 다낭성 난소를 관찰하였다. 기록된 다른 8 명의 건강한 여성이 지원해서 대조군으로 사용되었다. 그들의 건강 상태는 병력, 골반 검사와 종합적인 혈액 검사로 검사되었다. 그들의 정상 배란 상태는 항체기 동안 초음파와 혈중 프로게스테론 분석을 통해 확인하였다. 표 2는 모든 임상적 특징을 나타내며 모든 참여 환자들은 동의서를 작성하였다.

표 2

[0037] 정상인 및 다낭성 난소 증후군 환자의 여포액[혈장]에 대한 임상적 특징

	정상	다낭성 난소 증후군
환자수	5 [3]	5 [7]
나이 (년)	31 (29-39) [27 (25-33)]	33 (26-39) [33 (27-37)]
신체 용적 지수 (Body mass index, kg/m ²)	20.94 (19.78-22.38) [21.36]	23.07 (19.97-26.35) [22.37 (18.02-25.24)]
난포 자극 호르몬 (FSH, IU/liter)	6.1 (3.7-8.2) [6.4 (5.0-7.5)]	5.74 (2.9-8.2) [5.8 (3.1-8.5)]
황체 형성 호르몬 (LH, IU/liter)	4.98 (2.3-6.7) [2.49 (1.5-4.0)]	10.46 (8.0-13.0) [7.28 (0.4-24.1)]
E2 (pmol/liter)	27.86 (9.3-49.0) [17 (11.76-25.13)]	32.6 (19.0-61.0) [27 (7.81-52.66)]

[0038] (2) 여포액 및 혈액(혈장)의 준비

[0039] 10 명의 다낭성 난소 증후군 환자와 정상 대조군 여성의 여포액은 차병원 불임센터에서 인간 체외수정 시술시 모았다. 체외수정 과정 중 난모 세포를 흡인하는 동안, 인간 여포액은 HIV 감염, 매독과 B형 간염 등에 감염되지 않은 환자를 대상으로 하고, 환자 나이, 불임 원인, 여포 크기, 난모 세포의 성숙 정도와 여포액의 혈액 염색 등도 고려하여 모았다. 이와 같이 얻어진 다양한 크기의 여포들을 적정량의 K-EDTA나 헤파린 소염염을 처리한 멸균 튜브를 사용하여 여포액을 얻는데 사용하였다. 체액은 30분 동안 3,000 rpm에서 원심분리한 후 상층액을 취하여 35분간 59 °C로 가온하였다. 가온된 체액을 다시 식힌 후에 필터 (0.22-µm-pore-size filters, Millex-GV; Millipore, Bedford, MA, USA)를 사용하여 걸렸으며 모든 샘플은 -80 °C에서 사용 전까지 보관하였다.

[0040] 혈액 샘플은 여포 흡입 과정 이전에 얻었으며, 항응고제인 EDTA가 처리된 플라스틱 튜브에 모아 즉시 원심분리하였고 사용 전까지 -80 °C에서 사용 전까지 보관하였다.

[0041] (3) 면역-친화적 컬럼(immunoaffinity column)을 통한 주요 다량의 단백질 제거

[0042] 여포액에 가장 많이 존재하는 6개의 단백질인 알부민 (albumin), 트랜스페린 (transferrin), 면역글로불린 G와 A (IgG and IgA), 헵토글로빈 (haptoglobin)과 항-트립신 (antitrypsin)은 Multiple Affinity Removal Column (MARC) (Agilent, Wilmington, DE, USA)을 사용하여 제거하였다. MARC는 여포액 20 µL의 결합능을 가지며 4.6 × 50 mm의 크기의 컬럼을 사용하였다. MARC에 의한 풍부한 단백질의 크로마토그래피 분리는 사용법을 따라 a mobile phase reagent kit를 사용하여 실행하였다. 즉, 정제되지 않은 여포액은 프로테아제 억제제(Complete™, Roche, Mannheim, Germany)를 포함한 버퍼 A로 5회 희석시킨 후, 0.22-µm 스핀 필터를 사용하여 상온에서 1-2 분간 16,000g로 원심분리하여 정제하였다. 샘플을 분획 별로 모은 후에 사용 전까지 -20 °C에 보관하였다. 이렇게 농축된 여포액을 2-DE 겔에서 분리하기 위해서 냉각된 10% TCA 용액을 이용하여 -20 °C에서 1시간 동안 침전시켰다. 냉각 아세톤으로 세척한 후에 펠렛은 2-DE를 위해 샘플 버퍼로 다시 녹였다.

[0043] (4) 웨스턴 분석

[0044] PBS로 10분의 1로 희석된 여포액과 혈액(혈장)에 대하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 아포리포프로틴 A-IV 전구체 (apolipoprotein A-IV precursor), α-1-B-글라이코프로틴 (α-1-B-glycoprotein), 피브리노겐 γ (fibrinogen

γ), 및 안티트롬빈 III 체인 B(antithrombin III Chain B)를 검출하기 위해 단백질은 나이트로셀룰로오즈 멤브레인 위로 이동시켰으며, 멤브레인은 1대 500으로 희석된 항-아포리포프로틴 A-IV 전구체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 항- α -1-B-글라이코프로틴 (Aviva Systems Biology, San Diego, CA, USA), 및 항-피브리노겐 γ 항체와 1대 1000으로 희석된 안티트롬빈 항체(Abcam, Cambridge, UK)를 포함한 블로킹 용액과 반응시켰으며 이후 서양고추냉이 퍼옥시다제(horseradish peroxidase)-결합 2차 항체로 반응시켰으며 최종적으로 ECL system (Elpis Biotech, Taejeon, Korea)을 사용하여 검출하였다. 웨스턴 블롯으로 얻어진 밴드들은 스캔하여, Fluor-STM MultiImager (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 수치화하였다. 측정된 수치는 평균값 (mean \pm standard error of the mean; SEM)으로 표시하였다.

[0045] 2. 시험결과

[0046] (1) 여포액 준비, 풍부 단백질의 제거와 2-DE 분석

[0047] 다낭성 난소 증후군에서 비정상적으로 발현하는 단백질들을 분리하기 위해 다낭성 난소 증후군과 정상 여성의 여포액으로부터 추출된 단백질들을 2-DE로 pH 3-10 범위에서 분리하였다. 여포액에 대량으로 존재하는 주요 풍부 단백질을 제거하기 위해, 면역친화력 컬럼(immunoaffinity column: MARC)를 통해 걸러진 분획 (flow-through fraction)만을 모았다 (도 1 참조). 여포액은 다낭성 난소 증후군 환자와 뇌하수체 저하 조절을 위해서 GnRH agonist의 처리를 통한 남성 불임 요소를 지닌 불임 대조군 여성 환자에서 인간 체외수정 시술시 모았다. 환자들의 치료 및 생화학적 프로파일은 상기 표 2에 나타낸 바와 같다. 정상인과 다낭성 난소 증후군 환자 사이에서 단백질 발현의 변화를 differential-display proteomic analysis을 이용한 아이소일렉트릭 포커싱 (isoelectric focusing) 방법으로 측정하였다. 면역친화력 컬럼에 의해 정제된 여포액은 2-DE에서 더욱 분명한 스팟들을 보였다 (도 1B). 또한 동일한 방법으로, 다낭성 난소 증후군 환자와 정상 여성 환자의 여포액에서 다낭성 난소 증후군 환자에서 비정상적으로 발현하는 단백질들을 동정하였으며, 그 결과는 도 2와 같다.

[0048] (2) 다낭성 난소 증후군 환자의 여포액에서 단백질들의 발현의 차이

[0049] 다낭성 난소 증후군 환자와 대조군인 정상 여성의 여포액에서 단백질 발현을 비교함으로써, 다낭성 난소 증후군 환자에서 과발현하는 6개의 스팟을 선택하였으며, 발현 정도는 겔에서 단백질의 상대적 스팟 볼륨을 측정하여 결정하였다 (도 2의 C, D, 및 E). 발현 정도는 겔에서 상대적인 단백질 양을 측정하여 조사하였다 (도 3). 발현이 차이 나는 단백질들을 MALDI-TOF-MS와 nano-LC MS/MS으로 분석하였으며, 이를 통해 안티트롬빈 III 체인 B(antithrombin III Chain B), 피브리노겐 γ (fibrinogen γ), 아포리포프로틴 A-IV 전구체(apolipoprotein A-IV precursor), 및 α -1-B-글라이코프로틴(α -1-B-glycoprotein)을 동정하였다 (하기 표 3 참조).

표 3

스팟 ID	Accession Number	단백질명	스코어 ¹⁾	매칭된 펩타이드 수 (Number)	Sequence Coverage (%)	매칭 시퀀스	이론적 MW / pI
3246	gi999514	Chain B, Antithrombin Iii	68	17/184(9%)	53	HGSPVDICTAKPRDIFMNFMCJAR, RVWELSKANSRFATTFYQHLADSK, TSDQIHFFFAK, LQPLDFKENAEQSR, SKFS PENTR, VABGTQVLELPFKGDDITMVLILPKPEK, VEKELTPEVLQEWLDELEEMMLVVHMPFRFRIEDGFSLKEQLQDMGL VDLFSPEK, LPGIVABGRDDLYVSDAFHKAFLEVNEEGSEAAASTAVVIAGR, ANRPFLLVFIREVPLNTIIFMGR, NLILYFYALLFLSSTCVAYVATRDNCCILDER, TSEVKQLIKAIQLTYNPFDESSKPNMIDAATLK, YEASILTHDSSIRYLQEIYNSNNQK, EKVAQLEAQCQEPCKDTVQIHDITGK, NWIQYKEGPGHLSPTGTT EFWLGNEK, VELEDWNGRTSTADYAMFKVGPPEADKYR, TRWYSMK, TTMKIIPFNRLTI GEGQQHHLGG AK	48916/5.95
3528	gi182489	fibrinogen gamma chain	68	16/165(10%)	45	SELTQQLNALFQDKLGEVNTYAGDLQKKLVPFATELHER, LLPHANEVSQK, LEFYADQLRTQVSTQABQLRRQLTPYAQR, ENADSLQASLRPHADELK, IDQNVVELKGRLLTPYADEFKVKIDQTVELRRSLAPYAQDTQEKLNH QLEGLTFQMK, LAPLAEDVRGNLR, SLAELGGHLDQQVEEFRRRVPEYGENFNKALVQQMEQLR, LGPHAGDVEGHLSFLEK, DKVNSFFSTFK	49450/5.61
4093	gi17173110	apolipoprotein A-IV precursor	277	25/50 (50%)	50	RLETPDFQLFKNGVAQEPVHLDSPAIKHQFLLTGDTQGR, SGLSTGWTQLSKLLELTGPK, GVTFLRR, GEKELLVPRSTSPDRIFPHLNAVALGDGGHYTCR, LHDNQNGWSDSAPVELLSDETLPAPFSPFESGR, FALVREDR, LELHVDGPPRPQLRATWSGAVLAGR, TPGAAANLELIFVGPQHAGNYR, SWVPHTFE SELSDPVELLVAES	45344/5.28
6603	gi69990	alpha-1-B-glycoprotein	82	16/135(12%)	45		51908/5.65

[0050]

[0051]

1) 스코어는 $-10 \times \log(P)$ 이고, P 는 관찰된 매칭이 무작위(random event)일 확률(probability)이다. 이는 MS/MS 데이터로서 MASCOT 검색 프로그램을 사용하여 NCBInr 데이터베이스에 근거한다.

[0052]

(3) 다낭성 난소 증후군 환자의 여포액에서의 웨스턴 블롯 분석

[0053]

분석된 스팟들을 확인하기 위해서, 여포액에서 각각의 해당 항체들을 이용하여 그들의 발현 정도를 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 도 4의 A에 나타난 바와 같이, 아포리포프로틴 A-IV 전구체(apolipoprotein A-IV precursor)는 다낭성 난소 증후군과 대조군 그룹에서 모두 검출되었으나, 대조군에서보다 다낭성 난소 증후군 환자에서 아포리포프로틴 A-IV 전구체(45 kDa)가 유의성 있게 높게 발현되었다 (1.00 대 3.21 ± 0.89 , * $p < 0.005$, 도 4의 B). 도 5의 A는 α -1-B-글라이코프로틴(α -1-B-glycoprotein, 54 kDa)가 다낭성 난소 증후군과 대조군에서 웨스턴 블롯을 통해 검출된 것을 나타낸다. 다낭성 난소 증후군에서 α -1-B-글라이코프로틴 발현은 대조군보다 다낭성 난소 증후군에서 대략 3배 정도 높게 발현되었다(1.00 대 2.70 ± 0.31 , * $p < 0.005$, 도 5B).

[0054]

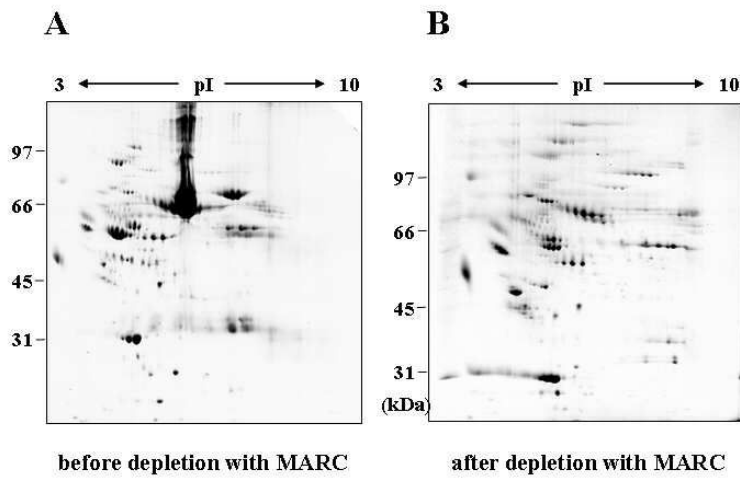
(4) 다낭성 난소 증후군 환자의 혈액(혈장)의 웨스턴 블롯 분석

[0055]

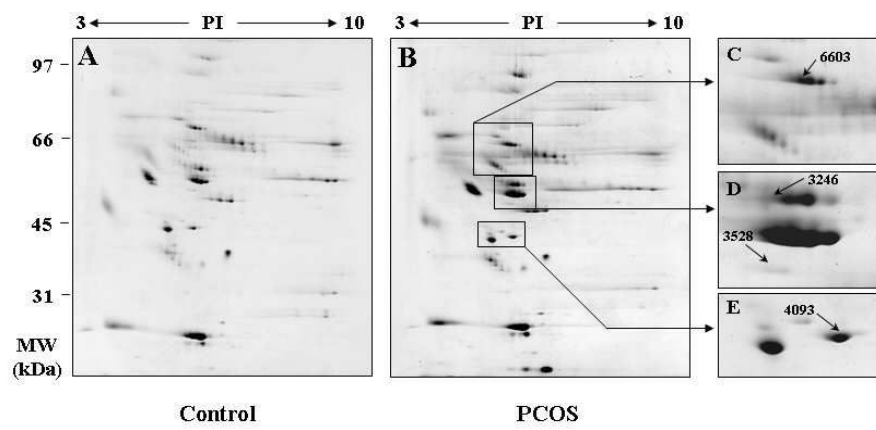
대조군과 다낭성 난소 증후군 환자로부터 얻은 혈액(혈장)을 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행한 결과는 도 6과 같다. 도 6으로부터 알 수 있는 바와 같이, 다낭성 난소 증후군 환자의 혈청에서, 아포리포프로틴 A-IV 전구체, α -1-B-글라이코프로틴, 안티트롬빈 III 체인 B, 및 피브리노겐 γ 가 높게 발현되었으며, 환자들 간에 다양성을 나타내었다.

도면

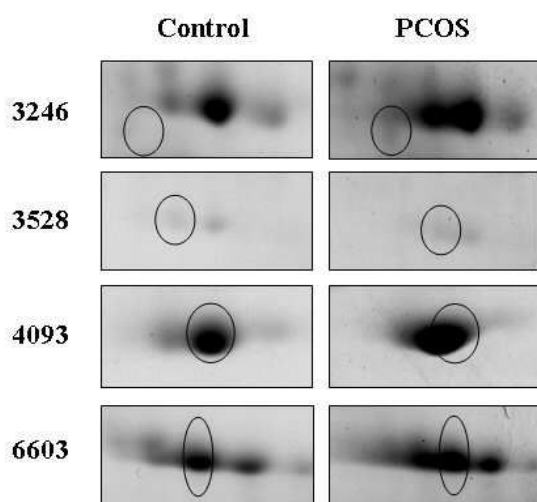
도면1



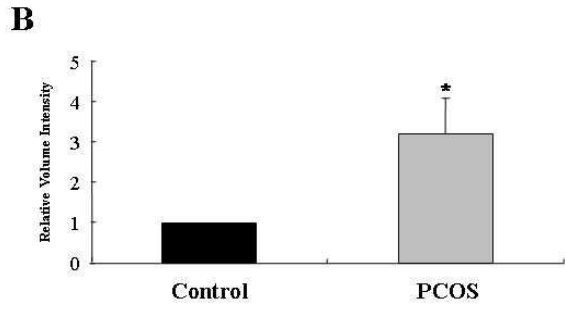
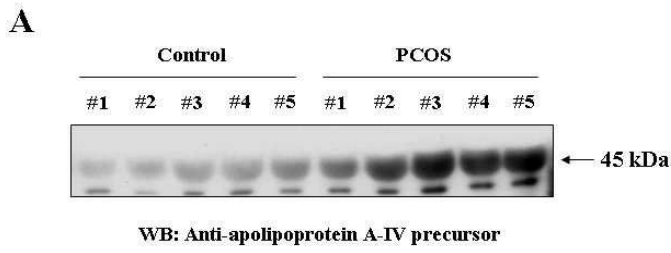
도면2



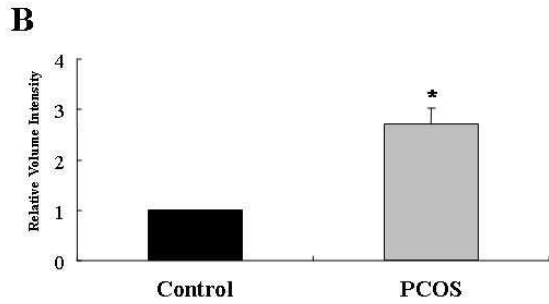
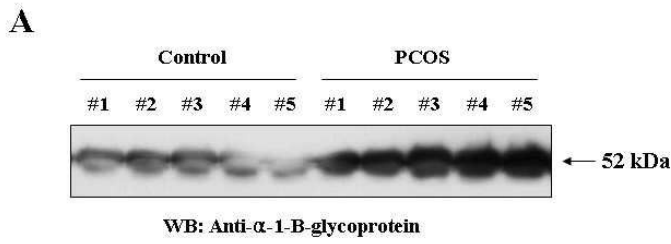
도면3



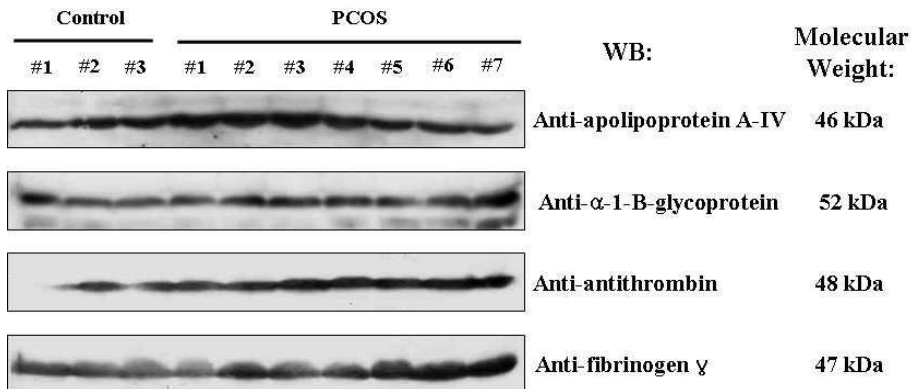
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부