(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0057295
(43) 공개일자 2018년05월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
G01N 33/6893 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0155758
(22) 출원일자 2016년11월22일
심사청구일자 2016년11월22일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
최혜선
울산광역시 남구 북부순환도로 35, 108동 1005호 (무거동, 무거위브자이)
최은경
울산광역시 중구 옥교7길 36, 로얄아파트 301호
(74) 대리인
특허법인태백

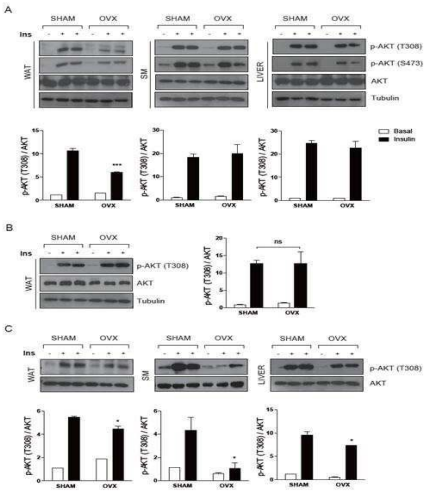
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **TTP를 유효성분으로 포함하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 진단용 또는 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 트리스테트라프롤린(Tristetraprolin; TTP) 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 진단용 또는 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물에 관한 것으로, 상기 TTP는 특히 폐경기로 유도된 인슐린 저항성을 나타내는 환자에서 그 발현량이 현저히 감소하는 사실을 확인하여 신규한 폐경기 유도 인슐린 저항성의 표적으로서 TTP의 가능성을 입증하였다. 따라서 TTP의 발현 수준을 이용해 용이하게 폐경기 유도 인슐린 저항성을 진단 또는 이의 치료 예후를 예측할 수 있고, TTP 유전자 내지 단백질 발현 증진제를 폐경기 유도 인슐린 저항성 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/118 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/4703 (2013.01)
G01N 2500/00 (2013.01)
G01N 2800/362 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 Basic Science Research Program (2015R1A2A2A010024
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단(NRF)
연구사업명 핵심개인연구
연구과제명 염증성 골소실에서 TNFRSF14에 의한 autophagy 조절
기 여 율 1/2
주관기관 울산대학교
연구기간 2015.05.01 ~ 2018.04.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 Basic Science Research Program (2014R1A6A1030318)
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단(NRF)
연구사업명 중점연구소지원사업
연구과제명 고령질환 제어 메타염증 연구
기 여 율 1/2
주관기관 울산대학교
연구기간 2014.09.01 ~ 2023.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

트리스테트라프롤린(Tristetraprolin; TTP) 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

트리스테트라프롤린(Tristetraprolin; TTP) 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 3

TTP의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 진단용 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 TTP의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 TTP 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 상기 TTP 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앱타머 또는 화합물인 것을 특징으로 하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 진단용 조성물.

청구항 5

제 3 항 또는 제 4 항의 조성물을 포함하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 진단용 키트.

청구항 6

TTP의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 치료 예후 예측용 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 TTP의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 TTP 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 상기 TTP 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앱타머 또는 화합물인 것을 특징으로 하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 치료 예후 예측용 조성물.

청구항 8

제 6 항 또는 제 7 항의 조성물을 포함하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 예후 예측용 키트.

청구항 9

(a) 환자에서 분리된 시료로부터 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (c) TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준이 정상 대조군 시료보다 낮을 경우 폐경기로 유도된 인슐린 저항성이라고 판단하는 단계;를 포함하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

(a) 치료받기 전의 환자에서 분리된 시료로부터 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준을 치료를 시행한 후의 환자에서 분리된 시료와 비교하는 단계; 및 (c) 치료를 시행한 후의 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준이 치료를 시행하기 전의 환자에서 분리된 시료보다 높아졌을 경우 폐경기 유도 인슐린 저항성의 치료 효과가 있다고 판단하는 단계;를 포함하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 치료 예후 예측에 필요한 정보를 제

공하는 방법.

청구항 11

TTP 단백질 발현 또는 활성 촉진제를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 12

TTP 단백질 발현 또는 활성 촉진제를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 13

(a) 동물의 지방세포에서 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 동물에 시험 물질을 처리하는 단계; (c) 상기 시험물질을 처리한 동물의 지방세포에서 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (d) 상기 단계 (a)에서 측정한 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준과 비교하여, 단계 (c)에서 측정한 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준이 증가한 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 치료제는 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준을 회복시킴으로써 케라틴세포 유래 케모카인(Keratinocyte-derived chemokine, KC), 단핵구 화학유인물질 단백질-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 및 대식세포 염증 단백질 1알파(Macrophage inflammatory protein 1 alpha, MIP-1α)에서 선택되는 어느 하나 이상의 케모카인 mRNA의 반감기를 감소시키는 것을 특징으로 하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 폐경기 유도 인슐린 저항성 진단용 또는 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물, 폐경기 유도 인슐린 저항성 치료제 및 이의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 일반적으로 여성은 50세를 전후로 하여 폐경이라는 급격한 대사적 변화를 겪게 된다. 이러한 폐경기의 여성들은 인슐린 저항성(Insulin Resistance, IR)과 같은 대사 증후군에 걸릴 확률이 높아지는데, 자궁 기능의 상실은 식이 때문에 생긴 비만의 결과로 나타나는 결과보다는 그 정도가 약하지만 유사한 형태의 내장 지방 및 만성 염증의 증가로 이어지기 때문이다. 식이로 유도된 비만은 지방 조직(adipose tissue, AT)에 지방을 축적하고 세포 스트레스 및 염증을 유발하여 인슐린 저항성을 초래하는 원인으로 생각되고 있다. 즉, 증가된 지방은 지방 조직 대식세포(adipose tissue macrophages, ATMs)에서의 축적을 일으키고 이는 만성적인 염증과 인슐린 저항성의 발달에 중요한 역할을 하게 된다. 그러나 아직까지는 자궁 기능의 상실에서 인슐린 저항성으로 이어지는 분자적인 기작이 무엇인지 명확하게 연구된 바가 없다.

[0003] 한편, 트리스테트라프롤린/징크 핑거 단백질 36(Tristetraprolin/zinc finger protein 36, TTP)은 염증과 관련된 특정 유전자의 아데닐산 유리딜산-풍부 요소(adenylate uridylate-rich element)가 포함된 mRNA에 결합하여 불안정화시키는 항염증 단백질로 잘 알려져 있다. TTP의 기능은 TTP 발현 억제(TTP-knockout, KO) 마우스를 이용하여 연구되었다.

[0004] 이와 관련하여, 최근의 여러 연구들은 TTP가 비만과 관련이 되어 있다는 사실을 제기하고 있다. 구체적으로, TTP의 전사 및 단백질은 지방세포 분화 과정에서 유도되는데, 대사 증후군에 걸린 비만 환자들에서는 TTP mRNA의 양이 그러한 질병이 없는 비만 환자들보다 더 낮았다. 즉, TTP mRNA는 인슐린 저항성 내지는 인슐린 레벨을 나타내는 표지로 작용할 수 있는 바, 이러한 사실들은 TTP가 인슐린 민감성에 매우 중요한 역할을 할 수 있음을 나타낸다.

[0005] 전술한 바와 같이, TTP가 비만으로 유도된 인슐린 저항성과 관련이 있다는 사실에 대한 연구는 계속해서 진행되어 오고 있다. 그러나 아직까지 TTP와 폐경기로 유도된 인슐린 저항성과의 관계 내지 TTP의 효과에 대해서는 연구된 바가 없는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 1. 한국공개특허 제10-2016-0032257호.

(특허문헌 0002) 2. 한국공개특허 제10-2013-0037788호.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 폐경기에 의해 유도된 인슐린 저항성을 나타내는 환자에서 감소되는 단백질의 발현량을 측정함으로써 폐경기 유도 인슐린 저항성을 진단 또는 이의 치료 예후를 예측할 수 있는 바이오마커 조성물, 폐경기 유도 인슐린 저항성 진단용 또는 치료 예후 예측용 조성물, 이를 포함하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 진단용 또는 치료 예후 예측용 키트 및 이를 이용한 폐경기 유도 인슐린 저항성 진단 방법 및 치료 예후 예측방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 폐경기에 의해 유도된 인슐린 저항성을 나타내는 환자에서 감소된 단백질의 발현 내지 활성 촉진제를 포함하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 예방 또는 치료용 약학 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 폐경기에 의해 유도된 인슐린 저항성을 나타내는 표지 단백질의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 따라서 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 트리스테트라프롤린(Tristetraprolin; TTP) 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 진단용 바이오마커 조성물 또는 폐경기 유도 인슐린 저항성 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 TTP의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 진단용 조성물 또는 폐경기 유도 인슐린 저항성 치료 예후 예측용 조성물 또는 이를 포함하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 진단용 키트 내지 치료 예후 예측용 키트를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 (a) 환자에서 분리된 시료로부터 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (c) TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준이 정상 대조군 시료보다 낮을 경우 폐경기로 유도된 인슐린 저항성이라고 판단하는 단계;를 포함하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 (a) 치료받기 전의 환자에서 분리된 시료로부터 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준을 치료를 시행한 후의 환자에서 분리된 시료와 비교하는 단계; 및 (c) 치료를 시행한 후의 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준이 치료를 시행하기 전의 환자에서 분리된 시료보다 높아졌을 경우 폐경기 유도 인슐린 저항성의 치료 효과가 있다고 판단하는 단계;를 포함하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 치료 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0014] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 TTP 단백질 발현 또는 활성 촉진제를 유효성분으로 함유하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 예방 또는 치료용 약학 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0015] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 동물의 지방세포에서 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 동물에 시험 물질을 처리하는 단계; (c) 상기 시험물질을

처리한 동물의 지방세포에서 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (d) 상기 단계 (a)에서 측정한 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준과 비교하여, 단계 (c)에서 측정한 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준이 증가한 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 폐경기 유도 인슐린 저항성 진단용 또는 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물 등은 폐경기 여성들 중 특히 인슐린 저항성을 나타내는 환자들에서 저하되어 있는 TTP mRNA 또는 단백질을 포함하고 있기 때문에, TTP mRNA 또는 단백질의 발현 수준을 이용하여 이를 활성화할 수 있는 물질을 스크리닝함으로써 혈당강하제를 투여하는 것보다 근원적인 인슐린 저항성의 치료가 가능한 폐경기 유도 인슐린 저항성의 치료제를 유용하게 선별할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 본 발명의 하나의 실시예에 따른 자궁 절제술을 수행한 마우스와 모의절제술을 수행한 대조군 마우스에서의 인슐린 저항성 관련 특성을 나타낸 것이다.

(A 내지 C : 자궁 절제 마우스 및 대조군 마우스의 지방 세포, 근육 또는 간에서의 인슐린 자극에 의한 Akt 활성 측정)

도 2는 본 발명의 다른 하나의 실시예에 따른 자궁 절제 마우스와 대조군 마우스에서의 케모카인 발현, 활성산소 및 지방세포에 대한 효과를 나타낸 것이다.

(A : 자궁 절제 마우스 및 대조군 마우스의 케모카인 발현 레벨 측정, B : 자궁 절제 마우스와 대조군 마우스의 활성 산소 측정, C 및 D : 자궁 절제 마우스와 대조군 마우스의 지방 세포 증가 효과 확인)

도 3은 본 발명의 또 다른 하나의 실시예에 따른 TTP 넉아웃(knock out) 마우스에서의 인슐린 저항성 관련 특성을 확인한 결과이다.

(A : TTP 정상 마우스 및 넉아웃 마우스의 인슐린 자극에 의한 Akt 활성 측정, B 및 C : TTP 정상 마우스 및 넉아웃 마우스의 케모카인 발현량 측정, D : TTP 정상 마우스 및 넉아웃 마우스에서 지방 세포의 증가 효과 확인, E : TTP 정상 마우스 및 넉아웃 마우스의 활성 산소 측정)

도 4는 본 발명의 또 다른 하나의 실시예에 따른 자궁 절제 마우스 및 대조군 마우스에서의 TTP 발현량을 확인한 결과이다.

(A 및 B : 자궁 절제 마우스 및 대조군 마우스에서의 TTP 발현량 측정, C : 골수 유래 대식세포에서 액티노마이신 D 처리(새로운 mRNA 합성 차단) 후 케모카인 mRNA의 반감기 측정, D : 지방전구세포에서 액티노마이신 D 처리 후 케모카인 mRNA의 반감기 측정)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

[0019] 본 발명은 트리스테트라프롤린(Tristetraprolin; TTP) 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 진단용 또는 폐경기 유도 인슐린 저항성 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0020] 본 명세서에서 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 개체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 개체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 개체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다.

[0021] 본 명세서에서 용어 "예후(prognosis)"는 질병을 진단하여 판단된 장래의 증세 또는 경과에 대한 전망을 말한다. 폐경기 유도 인슐린 저항성 환자에 있어서 치료 예후는 통상적으로 TTP 단백질 발현 증가량 또는 mRNA의 발현 증가량을 뜻한다. 예후의 예측은 향후 폐경기 유도 인슐린 저항성 치료의 방향에 대한 단서를 제시하므로 매우 중요한 임상적 과제이다.

[0022] 또한, 본 발명은 TTP의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 폐경기 유도 인슐린 저항성

진단용 조성물 또는 폐경기 유도 인슐린 저항성 치료 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[0023] 이때, 상기 TTP의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 TTP 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 상기 TTP 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앱타머 또는 화합물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 본 명세서에서 용어 "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 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머라제 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지의 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.

[0025] 본 명세서에서 용어 "프로브"는 mRNA 외 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무, 발현량을 확인할 수 있다. 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.

[0026] 본 명세서에서 용어 "항체"는 당해 기술 분야에 공지된 용어로서 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역글로불린을 의미한다. 본 발명에서의 항체는 본 발명의 TTP에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 당해 기술 분야의 통상적인 방법에 따라 항체를 제조할 수 있다. 상기 항체의 형태는 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체를 포함하며, 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태를 의미한다. 또한, 상기 항체는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.

[0027] 본 명세서에서 용어 "펩타이드"는 표적 물질에 대한 결합력 높은 장점이 있으며, 열/화학 처리 시에도 변성이 일어나지 않는다. 또한, 분자 크기가 작기 때문에 다른 단백질에 붙여서 융합 단백질로의 이용이 가능하다. 구체적으로 고분자 단백질 체인에 붙여서 이용이 가능하므로 진단 키트 및 약물전달 물질로도 이용될 수 있다.

[0028] 본 명세서에서 용어 "앱타머(aptamer)"란, 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 특별한 종류의 단일 가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)으로 구성된 폴리뉴클레오티드의 일종을 의미한다. 상술한 바와 같이, 앱타머는 항체와 동일하게 항원성 물질에 특이적으로 결합할 수 있으면서도, 단백질보다 안정성이 높고, 구조가 간단하며, 합성이 용이한 폴리뉴클레오티드로 구성되어 있으므로, 항체를 대체하여 사용될 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 진단용 키트 또는 폐경기 유도 인슐린 저항성 치료 예후 예측용 키트를 제공한다. 본 발명의 키트는 바이오마커 성분에 특이적으로 결합하는 항체, 기질과의 반응에 의해서 발색하는 표지체가 접합된 2차 항체 접합체(conjugate), 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 효소반응 정지용액 등을 포함할 수 있으며, 사용되는 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

[0030] 더욱이, 본 발명은 환자에서 분리된 시료로부터 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (c) TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준이 정상 대조군 시료보다 낮을 경우 폐경기로 유도된 인슐린 저항성이라고 판단하는 단계;를 포함하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0031] 또한, 본 발명은 (a) 치료받기 전의 환자에서 분리된 시료로부터 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준을 치료를 시행한 후의 환자에서 분리된 시료와 비교하는 단계; 및 (c) 치료를 시행한 후의 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준이 치료를 시행하기 전의 환자에서 분리된 시료보다 높아졌을 경우 폐경기 유도 인슐린 저항성의 치료 효과가 있다고 판단하는 단계;를 포함하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 치료 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0032] 구체적으로, 상기 mRNA 발현 수준을 측정하는 방법은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting) 및 DNA 칩을 이용하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 보다 구체적으로, 상기 단백질 발현 수준을 측정하는 방법은 웨스턴 블롯(Wetsern blot), 방사성면역분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법(Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩을 이용하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 본 명세서에서 용어 "환자에서 분리된 시료"란 바이오마커인 상기 TTP 유전자 또는 TTP 단백질의 발현 수준에 있어서 대조군과 차이가 나는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 또는 뇨와 같은 시료를 포함할 수 있고, 보다 상세하게는 지방 조직, 지방 세포 또는 골수 유래 대식세포일 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 더불어, 본 발명은 TTP 단백질 발현 또는 활성 촉진제를 유효성분으로 함유하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0036] 이때, 상기 TTP 단백질 발현 또는 활성 촉진제는 전체 조성물 100 중량부에 대하여 0.1 내지 50 중량부로 포함될 수 있는 바, 상기 범위보다 적게 포함되는 경우에는 촉진제의 TTP 단백질 발현 또는 활성 촉진 효과가 제대로 나타나지 않고, 너무 많이 포함되는 경우에는 함량 증가량 대비 TTP 단백질 발현 또는 활성 촉진 효과의 증가량이 저하되므로 바람직하지 않다.

[0037] 본 발명의 약학 조성물은 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스, siRNA 올리고 뉴클레오타이드 및 천연물 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물 또는 복합 제제는 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다.

[0038] 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 포함하여 약학 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[0039] 본 발명의 약학 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0040] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 시간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있으며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0041] 또한, 본 발명은 TTP 단백질 발현 또는 활성 촉진제를 유효성분으로 함유하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0042] 이때, 상기 TTP 단백질 발현 또는 활성 촉진제는 전체 조성물 100 중량부에 대하여 10 내지 90 중량부로 포함될 수 있는 바, 상기 범위에서 촉진제의 TTP 단백질 발현 또는 활성 촉진 효과가 가장 뛰어나므로 바람직하다.

[0043] 상기 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.

[0044] 또한, 상기 건강기능식품 조성물은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품 안정청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0045] 상기 "식품첨가물공전"에 수재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산 칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화

학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고랭색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.

[0046] 또한, 본 발명은 (a) 동물의 지방세포에서 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (b) 상기 동물에 시험 물질을 처리하는 단계; (c) 상기 시험물질을 처리한 동물의 지방세포에서 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (d) 상기 단계 (a)에서 측정한 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준과 비교하여, 단계 (c)에서 측정한 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준이 증가한 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 폐경기 유도 인슐린 저항성 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0047] 이때, 상기 동물은 토끼, 돼지, 개, 마우스, 랫트, 메추리 및 닭으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 인간을 제외한 동물이면 이에 제한되 지는 않는다.

[0048] 또한, 상기 치료제는 TTP 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 TTP 단백질의 발현 수준을 회복시킴으로써 케라틴세포 유래 케모카인(Keratinocyte-derived chemokine, KC), 단핵구 화학유인물질 단백질-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 및 대식세포 염증 단백질 1알파(Macrophage inflammatory protein 1 alpha, MIP-1α)에서 선택되는 어느 하나 이상의 케모카인 mRNA의 반감기를 감소시킬 수 있어, 보다 효과적으로 폐경기 유도 인슐린 저항성을 치료할 수 있다.

[0050] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이며, 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐이므로 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0052] **<준비예 1> 실험 동물 및 실험 디자인 준비**

[0053] 12주령의 암컷 C57BL/6J 마우스를 마취시키고 2', 2', 2'-트리프로모에탄올(250 mg/kg, Sigma chemical)로 난소 절제술을 수행하거나 모의절제술(난소 절제 없이 수술)을 수행하였다. $TTP^{-/-}$(TTP(트리스테트라프롤린/징크 핑거 단백질 36, Tristetraprolin/zinc finger protein 36) 넉아웃; KO) 마우스는 Dr. Perry J. Blackshear(National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC)에게서 분양받았다. 상기 마우스들은 울산대학의 동물 생육 시설에서 사육되었고, 무특이 병원체 조건의 같은 방에서 새로 태어나거나 사육되었다. 모든 실험동물의 관리나 실험 과정들은 울산대학의 실험동물윤리위원회(Animal Care and Use Committee)의 승인을 받은 프로토콜과 가이드라인에 따라 수행되었다. 모든 실험에서, 성과 나이가 맞는 한배새끼들이 대조군으로 사용되었고, 음식 섭취량과 체중은 매일 또는 매 주마다 측정되었다. 일정 시간이 지나면 마우스들은 CO_2 기절상태에서 희생되었다. 이후, 혈액을 심장천차(cardiac puncture)에서 채취하였고, 즉시 조직을 획득하였다.

[0054] 모든 실험값은 평균값±SEM의 형태로 표현되었다. 스튜던트의 t-test가 관심있는 샘플과 그에 대응되는 대조군들 사이의 차이점을 확인하기 위해 사용되었다. 각 그룹들 간의 차이점은 일원분산분석 및 본페로니 사후검정법으로 평가되었다. P 값이 0.05보다 작으면 통계학적으로 유의미하다고 간주되었다.

[0056] **<실시예 1> 자궁 절제술의 인슐린 저항성 유도 기전**

[0057] 자궁 절제술이 수술 12주 후 온 몸에 인슐린 저항성을 일으킨다는 사실을 확인한 연구 결과(Choi EK et al., 2014; Choi EK et la., 2015; Kim WK et al., 2013)를 토대로, 자궁 절제술이 인슐린 저항성을 유도하는 기작을 확인하기 위해, 어떤 조직에서 손상된 인슐린 신호를 나타내기 시작하는지를 우선 확인했다.

[0058] 포스포이노시톨 3-키나아제(PI3K)-Akt 신호경로가 인슐린의 대사 효과에 주요한 영향을 미치므로(Xue P, Hou Y, Chen Y, Yang B, Fu J, Zheng H, Yarborough K, Woods CG, Liu D, Yamamoto M, Zhang Q, Andersen ME, and Pi J. Adipose deficiency of Nrf2 in ob/ob mice results in severe metabolic syndrome. *Diabetes* 62: 845-854, 2013.), 상기 준비예 1에서 자궁 절제술을 수행한 마우스의 지방조직, 근육 및 간에 인슐린 신호로서 인슐린을 주입하고 5분 후에 Akt 활성을 위한 Akt의 308번 트레오닌(Thr)의 인산화를 관찰하였다. 구체적으로, 모의대조군, 즉 모의절제술을 받은 마우스 또는 자궁절제 마우스를 4 unit/kg 인슐린(Lilly)를 투여하기에 앞서 16

시간 동안 절식시키고 상기 인슐린을 투여하였다. 5분 후에 마우스들을 마취하고 간과 골격계 근육 및 백색 지방 조직(WAT, 생식샘 근처(perigonadal) 지방 조직)을 추출하고 액체질소에 보관하였다. 단백질 분리를 위해, 백색 지방 조직을 1 x RIPA 용혈 버퍼(50 mM Tris-Cl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 1% Nonidet P-40; 10.5% sodium deoxycholate; 0.1% SDS)로 균질화하였고 10% SDS-PAGE로 분획화하였다. 이어서 전기영동으로 인산화된(308번째 트레오닌) Akt(Cell Signaling, Beverly, MA, USA) 및 Akt의 모든 종류(Cell Signaling)를 시각화하였다. 로딩 대조군으로는 튜불린(Tubulin, Sigma Aldrich)를 사용하였고, 인슐린에 의해 유도된 인산화-Akt는 Image J software를 이용하여 총 Akt 신호를 표준화함으로써 측정되었다.

[0059] 그 결과, 도 1A에 나타난 바와 같이, 수술 후 4주가 경과한 뒤에 자궁이 절제된 마우스의 내장 지방에서 모의대조군과 비교했을 때 Akt의 활성이 현저하게 감소하였다. 그러나 모의대조군과 자궁 절제 마우스의 근육이나 간에서는 큰 차이점을 나타내지 않았다.

[0060] 그 후, 본 발명자는 마우스의 지방 조직에서의 인슐린 신호의 민감성을 상기와 동일한 방법으로 Akt 활성을 측정함으로써 확인하였다. 즉, 시간이 지남에 따라 각 조직에서 인슐린 신호가 나타나는 정점을 비교하였다.

[0061] 그 결과, 도 1B 및 도 1C에 나타난 바와 같이, 자궁 절제술 실시 2주 후일 때는 아무 변화가 없었지만, 4주가 지나자 지방 조직에서 손상된 인슐린 신호가 관찰되었고, 12주까지 상기 신호가 유지되었다. 또한, 자궁 절제 후 12주 경과하여 전신의 인슐린 저항성을 나타낼 때 근육 및 간에서 Akt 활성이 감소했다.

[0063] **<실시예 2> 자궁 절제술에 의해 유도된 인슐린 저항성의 영향**

[0064] **(1) 케모카인 분비량에 대한 영향**

[0065] 종래에 알려진 문헌들(Choi EK at el., 2014; Datta S et al., 2008; ,Choi EK et al., 2015; Kim WK et al., 2013;, Vieira Potter VJ et al., 2006, Weisberg SP et al., 2006)에 따르면, 비만 외에도 면역 세포의 침입을 통한 지방 조직의 염증이 자궁 절제 마우스에서 인슐린 저항성을 나타내는 데에 큰 역할을 하는 것으로 보인다. 이에, 전염증성 케모카인이 지방 조직에서 면역 세포의 침입을 촉진할 것이라고 가정하고, 이를 확인하기 위해, 여러 후보 케모카인들을 Real time quantitative PCR(qPCR)을 이용하여 분석하였다. 구체적으로, 총 RNA는 시료를 QIAzol lysis reagent에 넣어 피펫팅으로 분쇄한 후 클로로포름을 넣어 유기 용매층을 얻었고, 이소프로판올을 이용하여 침전 시켰다. 침전물을 에탄올로 씻어주고 말려 멸균수에 녹여내어 추출하였다. 이후 상기 총 RNA를 무작위적 프라이머 및 M-MLV 역전사효소(Promega, Madison, USA)로 역전사시켰다. qPCR은 SYBR Green 1 Taq 폴리머라아제(Qiagen, Hilden, Germany) 및 하기 <표 1>에 개시되어 있는 프라이머들을 사용하여 StepOnePlus™ Real Time System(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에서 수행하였다.

표 1

[0066]

유전자	종류	서열	서열번호
TTP	정방향	5'-ctctgccatctacgagagcc-3'	1
	역방향	5'-gatggagtccgagtttatgttcc-3'	2
MCP-1	정방향	5'-gaaggaatgggtccagacat-3'	3
	역방향	5'-acgggtcaacttcacattca-3'	4
KC	정방향	5'-ccgaagtcatagccacactcaa-3'	5
	역방향	5'-gcagtctgtcttctttctccgttac-3'	6
MIP-1α	정방향	5'-ttctctgtaccatgacactctgc-3'	7
	역방향	5'-cgtggaatcttccggctgtag-3'	8
TNF-α	정방향	5'-aagcctgtagcccacgtcgta-3'	9
	역방향	5'- ggcaccactagttggttgtctttg-3'	10
F4/80	정방향	5'-ctttggctatgggcttccagtc-3'	11
	역방향	5'-gcaaggaggacagagtttatcgtg-3'	12
RANTES	정방향	5' -ggtaccatgaagatctctgca-3'	13
	역방향	5' -aaaccctctatcctagctcat-3'	14
RPS	정방향	5'-atcagagagttgaccgcagttg-3'	15
	역방향	5'-aatgaaccgaagcacaccatag-3'	16

[0068] 각 프라이머 쌍의 특이성은 융해곡선분석법과 아가로오스 겔 전기영동을 통해 확인하였다. 항존(housekeeping) 유전자인 작은 소단위의 리보솜 단백질(ribosomal protein of the small subunit, RPS)을 관찰하려고 하는 유전자와 동시에 증폭하였고, RPS와 비교된 관찰하려는 유전자의 상대적인 복제 수를 $2^{-\triangle\triangle Ct}$를 이용하여 정량하였다.

[0069] 그 결과, 도 2A에 나타난 바와 같이, KC, MCP-1, MIP-1α가 자궁 절제 4주 후에 현저하게 나타났지만, 도시되어 있지는 않으나 자궁 절제 2주 후에는 차이가 보이지 않았다. 이후로도 KC는 12주가 될 때까지 계속해서 증가했다. 다만 RANTES의 증가는 관찰되지 않았다. 이러한 실험 결과는 대식 세포를 불러일으키는 데에 중요한 역할을 하는, 증가된 케모카인이 인슐린 저항성의 초기 단계에서 일어나는 것을 의미한다. 이와 비슷하게, 각각 대식세포 및 그 활성의 마커인 F4/80 및 TNF-α의 증가가 자궁 절제 8주 후에 관찰되었다.

[0070] **(2) 활성산소(Reactive oxygen species, ROS)와의 관계**

[0071] ROS가 인슐린 저항성의 다양한 형태에서 중요한 역할을 한다는 연구 결과(Kim WK et al., 2013)를 토대로, 지방조직에서 ROS가 인슐린 저항성과 동반되는지를 확인하였다. 구체적으로, 누적된 산화 스트레스의 마커인 단백질 카보닐(protein carbonyl) 레벨을 측정하기 위해, OxyBlot protein oxidation detection kit(Chemicon International, Temecula, CA, USA)를 이용하여 'Sun M et al., 2013(Nandrolone attenuates aortic adaptation to exercise in rats. *Cardiovasc Res* 97: 686-695)'에 개시된 방법대로 어세이를 수행하였다. 즉, 상기 백색 지방조직을 용혈 동안 단백질의 산화를 막기 위해 50 mM DTT 1X RIPA 버퍼로 균질화하였다. 세포 용혈물(Cell lysates) 5 ㎍/lane을 1X DNPH 용액을 첨가하여 변형하고 중성화시킨다음 12% SDS-PAGE 겔에 로딩하였다. 추출된 단백질 중 동량의 단백질을 겔의 쿠마시 블루로 염색하고 Image J software를 이용하여 덴시토메트리(densitometry) 측정을 수행하였다.

[0072] 그 결과, 도 2B에 나타난 바와 같이, 누적된 산화 스트레스의 마커인 단백질 카보닐 레벨이 자궁 절제 4주 내지 8주 후에 현저하게 증가하였다.

[0073] **(3) 지방세포와의 관계**

[0074] 다음으로, 상기 실험 결과를 바탕으로, 증가된 지방 덩어리가 지방 세포의 부피가 증가되는 것을 반영하는지 여부를 확인하였다. 먼저, 지방 세포를 얻기 위해 생식샘의 지방 조직 데포(depot; Vieira Potter VJ et al., 2012)에서 얻었다. 이후 상기 조직의 무게를 달고 인산완충버퍼(phosphate-buffered saline, PBS)로 세 번 헹군 후, FACS 버퍼(1% BSA가 포함된 PBS)로 갈았다. 이후 조직 균질액을 500 Xg에서 5분 동안 원심분리하고, 타입 2 콜라제네이즈(type 2 collagenase; Sigma Chemical)를 90분 동안 37℃에서 흔들면서 1 mg/ml로 처리하였다. 이렇게 얻은 세포 균질액을 100 ㎛ 필터를 통해 필터한 후 500 Xg으로 5분간 원심분리하였다. 기질혈관세포군(Stromal vascular cells, SVC) 펠렛은 RBC 용혈 버퍼(eBioscience, San Diego, CA)에서 5분간 배양하고 300 xG에서 5분간 원심분리하였으며, 추가 분석을 위해 재현탁하였다.

[0075] 지방세포로의 분화를 위해, 상기 SVC를 PBS로 세척하고 10% FBS가 보충된 DMEM으로 재현탁하였다. 배지는 세포들이 배지를 많이 채울 때까지 2-3일 간 바꿔주었다. 세포가 배지의 80-90% 정도까지 자랐을 때 이소뷰틸메틸잔틴(isobutylmethylxanthine) 0.5 mM, 인도메타신(indomethacin) 0.125 mM, 덱사메타손(dexamethasone) 0.5 ㎛ 및 인슐린 0.5㎛로 보충된 배양 배지를 첨가하여 지방 선구 세포로의 분화를 유도하였다.

[0076] 또한 지방의 크기를 측정하기 위해, 지방 조직(adipose tissue)을 24시간동안 10% 포르말린 용액에서 고정하고, 파라핀을 장입하고 5 ㎜ 두께로 잘라 단편을 획득하였다. 이후 헤마톡실린-에오신(H&E)으로 염색하였다. 결과 이미지는 Axio-Star Plus 현미경(Carl Zeiss, Cottingen, Germany)을 사용하여 획득하였고, 추가적인 분석은 Image J software를 사용하여 수행되었다.

[0077] 그 결과, 도 2C에 나타난 바와 같이, 자궁 절제로 유도된 지방 덩어리의 증가 또한 자궁 절제 4주 후에 관찰되었고 12주가 될 때까지 계속해서 증가하였다. 또한, 도 2D에 나타난 바와 같이, 지방 세포의 평균 부피가 모의 대조군에 비해 자궁 절제 마우스에서 현저히 증가하였다. 이러한 증가는 자궁 절제 2주 후부터 관찰될 만큼 매우 빠른 시기에 관찰되었고, 12주까지 계속해서 증가하였다.

[0079] **<실시예 3> TTP 결함과 인슐린 저항성과의 관계**

[0080] **(1) TTP 넉아웃 마우스에서의 인슐린 저항성 및 시토카인 분석**

[0081] TTP는 다양한 염증 관련 단백질의 ARE-포함 mRNA를 파괴하는 항염증 단백질로 알려져 있고(Brooks SA et al., 2004, Carballo E et al., 1998) 이러한 사실은 비만에 의해 유도되는 인슐린 저항성과 연관이 있을 것임을 의미한다. 이러한 사실들을 토대로, TTP가 자궁 절제 마우스에서 증가된 모든 케모카인 또는 일부 케모카인을 조절한다고 가설을 세우고, TTP가 지방 조직에서 인슐린 저항성을 나타내도록 하는지를 확인하기 위해, in vivo에서 TTP를 넉아웃 시킨 마우스의 지방 조직에서 인슐린 신호를 측정하였다. 구체적으로, 상기 실시예 1 및 2에서 수행한 방법대로 지방조직의 Akt 활성 및 지방조직의 KC, MCP-1, MIP-1α 레벨을 측정하였고, MCP-1 및 KC의 혈청 레벨은 공급자가 제시한 방법대로(R&D systems, Minneapolis, MN) 항-MCP-1 항체 또는 항-KC 항체와 바이오틴화된 항-MCP-1 항체 또는 항-KC 항체로 코팅된 샌드위치 ELISA를 이용하여 특정되었다.

[0082] 그 결과, 도 3A에 나타난 바와 같이, Akt의 인산화된 트레오닌에 의해 증가되었던 Akt 활성이 한배 새끼 대조군과 비교했을 때 TTP-KO 마우스에서 자궁 절제술 없이도 현저하게 감소하는 것을 볼 수 있었다. 또한, 도 3B에 나타난 바와 같이, TTP-결함은 지방 조직에서 F4/80 뿐만 아니라 KC, MCP-1 및 MIP-1α의 전사를 증가시켰다. 또한, 도 3C에 나타난 바와 같이, 정상 마우스(대조군)와 비교했을 때 TTP-KO 마우스에서 KC 및 MCP-1의 혈청 레벨이 매우 중대하게 증가하였다.

[0083] **(2) TTP 넉아웃 마우스에서의 지방세포 및 활성산소 측정**

[0084] 또한, TTP 넉아웃 마우스에서 어떤 변화가 있는지를 확인하기 위해, 상기 실시예 1에서 수행한 ROS 측정 실험, 및 실시예 2에서 수행한 방법과 같이 TTP 넉아웃 마우스에서 지방 덩어리 및 지방 세포와의 관계를 알아보기 위한 실험을 수행하였다. 그 결과, 도 3D 및 3E에 나타난 바와 같이, TTP 결함은 지방조직에서 지방 덩어리와 지방 세포의 사이즈 및 단백질 카보닐 레벨을 증가시키지는 않았다.

[0085] 즉, 이러한 결과는 TTP의 발현 자체는 지방 세포의 크기 내지는 지방 조직에서의 활성산소에 영향을 주지 않는다는 것을 의미한다.

[0087] **<실시예 4> 자궁 절제로 유도된 인슐린 저항성의 TTP에 대한 의존성 확인**

[0088] **(1) TTP 발현량 측정**

[0089] TTP가 자궁 절제 유도 인슐린 저항성 마우스에서 어떤 역할을 하는지 확인하기 위해, 자궁 절제 이후 지방 조직에서 TTP의 발현량을 측정하였다. 구체적으로, 지방조직을 매우 차가운 PBS로 세척한 후 추출 버퍼(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 0.01% 프로테아제 저해제 혼합물)로 용해하였다. 이후 세포질 추출물로 실시예 2에서 수행한 방법대로 SDS-PAGE를 수행하고 또한 니트로셀룰로즈 종이에 옮겨 항체를 이용한 웨스턴 블롯을 수행하였다. 1차 항체로 TTP 및 β-actin 항체(Sigma Chemical)를 사용했고, HRP와 콘쥬게이트된 2차 항체(BD Biosciences)를 프로브로 사용하였다.

[0090] 그 결과, 도 4A 및 4B에 나타난 바와 같이, 자궁 절제 마우스의 지방 조직에서 TTP의 단백질 레벨은 모의대조군에 비해 감소했으나 전사량은 큰 차이가 없었다.

[0091] **(2) 케모카인과 TTP와의 관계 확인**

[0092] TTP의 감소는 지방선구세포, 대식세포 및 다양한 전구 세포를 포함하는 기질 혈관 세포군에서 두드러지게 나타났다. 따라서 자궁 절제가 TTP의 단백질 레벨의 감소를 유도한 결과를 바탕으로 이러한 결과가 지방 조직에서 증가된 케모카인의 전사 분해(transcript degradation)를 지연시키는지를 확인하였다. 즉, 이러한 mRNA들의 반감기를 계산하여 모의대조군과 비교함으로써, 자궁 절제가 케모카인의 mRNA 안정성을 감소시키는지 여부를 확인하였다. TTP가 대식세포뿐만 아니라 지방선구세포에서도 발현된다고 보고된 바 있으므로(Carballo E et al., 1998; Lin NY et al., 2007) 자궁 절제 마우스에서 골수 유래 대식세포(bone marrow-derived macrophages, BMMs)와 지방세포에서 상기 mRNA들의 반감기를 측정하였다.

[0093] 구체적으로, 자궁 절제 마우스 및 모의대조군 마우스에서 대퇴골과 정강이뼈를 무균성으로 제거하고 접착된 부드러운 자유 조직으로 분리하였다. 뼈끝을 자른 후에, 골수강을 뼈의 한쪽 끝에서부터 살균한 21-게이지의 바늘을 이용해 DMEM으로 씻어내었다. 이후, 단일 세포 현탁액을 얻기 위해 파스퇴르 피펫을 이용해 골수를 휘저었다. 이때 단일 세포 현탁액을 두 번 세척한 후 M-CSF(30 ng/ml)가 있는 플레이트에서 16시간 동안 배양하였다. 그리고나서 비접착 세포들을 획득한 후, Ficoll-Hypaque gradient에 층층이 쌓았고, 접착성 단핵구/대식세포 유사 세포들의 많은 개체가 플레이트 바닥에 형성될 때까지 2일 동안 배양하였다. 이후, 비접착 세포들은 PBS가 담긴 디쉬로 세척하여 제거하였고 접착성 세포(골수 유래 대식세포)들을 수확하고 플레이트에

균주하였다. 이후, FACS를 통해 상기 세포들을 분석하였고, CD3 및 CD45R이 음성이고 CD11b가 양성임을 확인하였다. 오염된 기질 세포의 부재는 M-CSF의 부재에서 세포 성장이 이루어지지 않는 것을 보고 확인하였다. 이후, M-CSF가 첨가된 추가 배지를 첨가하고 3일 후에 새롭게 갈아주었다.

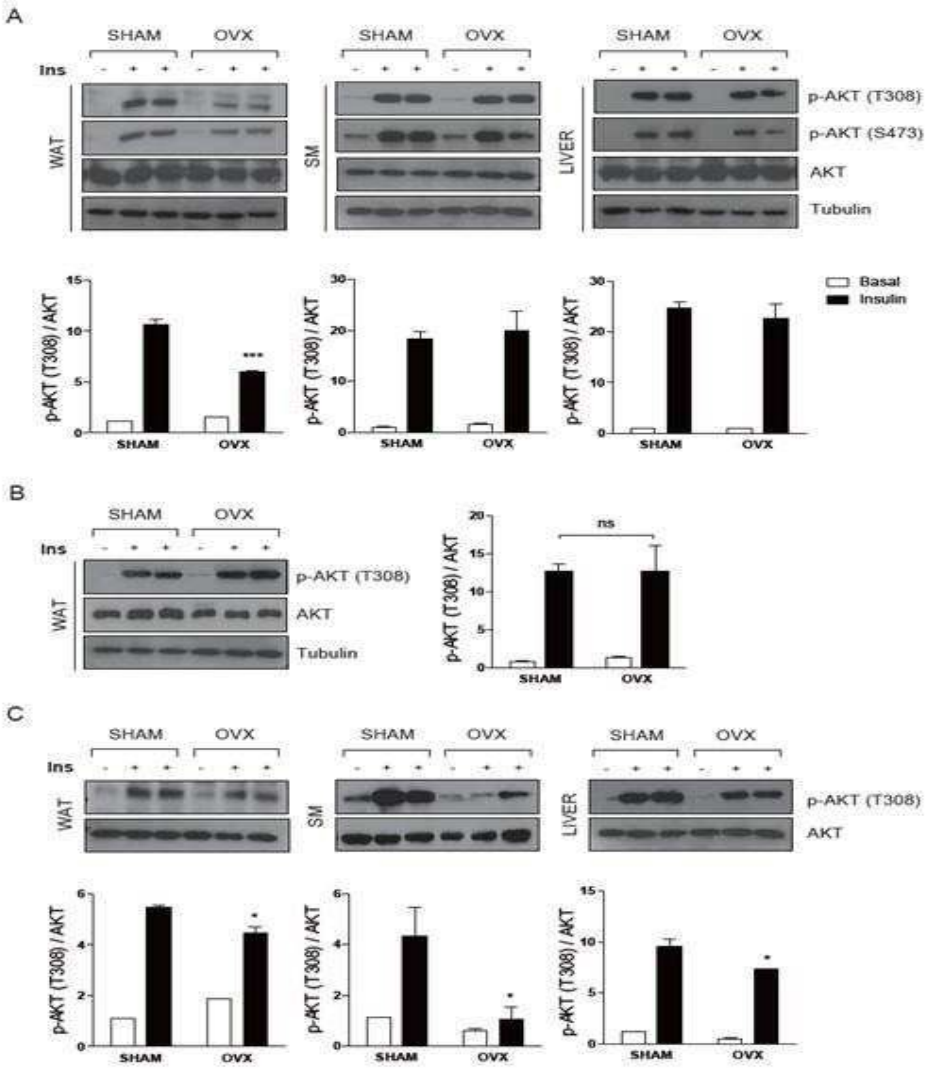
[0094] 다음으로, 정상 마우스(자궁 절제 마우스 및 모의 대조군 마우스) 및 TTP가 넉다운 된 마우스 및 그 한배 새끼 마우스에서 얻은 1차 지방세포 및 BMMs를 상기와 같은 방법을 동일하게 얻었다. 이후 지방 세포와 BMM을 지방세포화 유도 배지 및 M-CSF를 각각 처리하여 2시간 동안 자극하였다. 이후 세포들에 5 ㎍/ml의 액티노마이신 D(Sigma Aldrich)를 처리하여 전사를 정지시키고, 0, 15, 30, 45, 60, 120분 후에 세포들을 수확했고, 상기 실시예 2에서 수행한 방법대로 qPCR을 진행하여 KC, MCP-1, MIP-1α를 분석하였다.

[0095] 그 결과, 도 4C에 나타난 바와 같이, 대조군 마우스의 BMM에 액티노마이신 D를 처리한 후의 KC, MCP-1 및 MIP-1α의 반감기는 각각 26.4, 48.2, 43.3분이었다. 반면에, 자궁 절제 마우스에서는 47.8, 105.4 및 110.6분으로 증가하였다. 이러한 비슷한 패턴이 지방선구세포에서도 관찰되었다. 즉, 도 4D에 나타난 바와 같이, KC, MCP-1 및 MIP-1α의 반감기가 대조군에서 각각 39.4, 43.2, 40.1분 및 자궁 절제 마우스에서 각각 78.2, 72.4, 91.4분으로 또한 반감기가 증가되었다. 즉, 이러한 결과는 TTP가 없으면 BMM 및 지방선구세포에서 KC, MCP-1 및 MIP-1α의 분해가 지연되어 염증 상태가 되고, 이로 인해 폐경기 유도 인슐린 저항성이 촉발된다는 것을 의미한다.

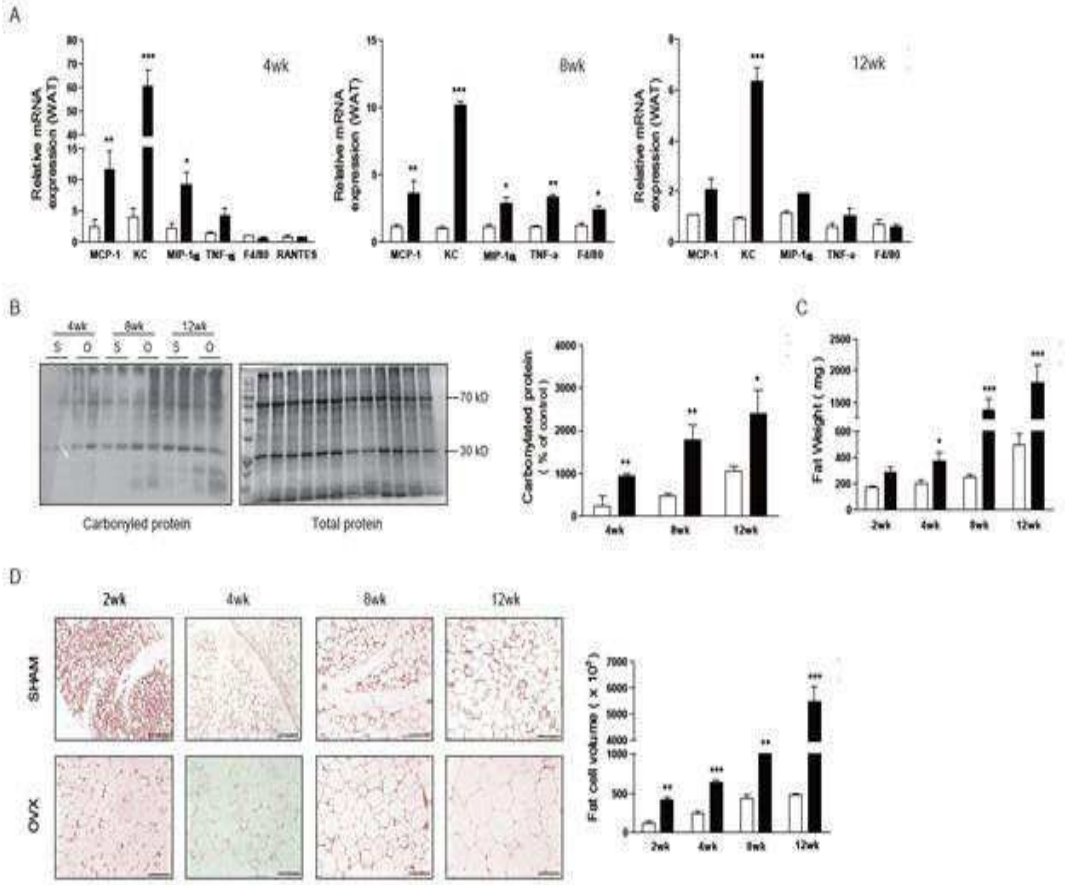
[0097] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

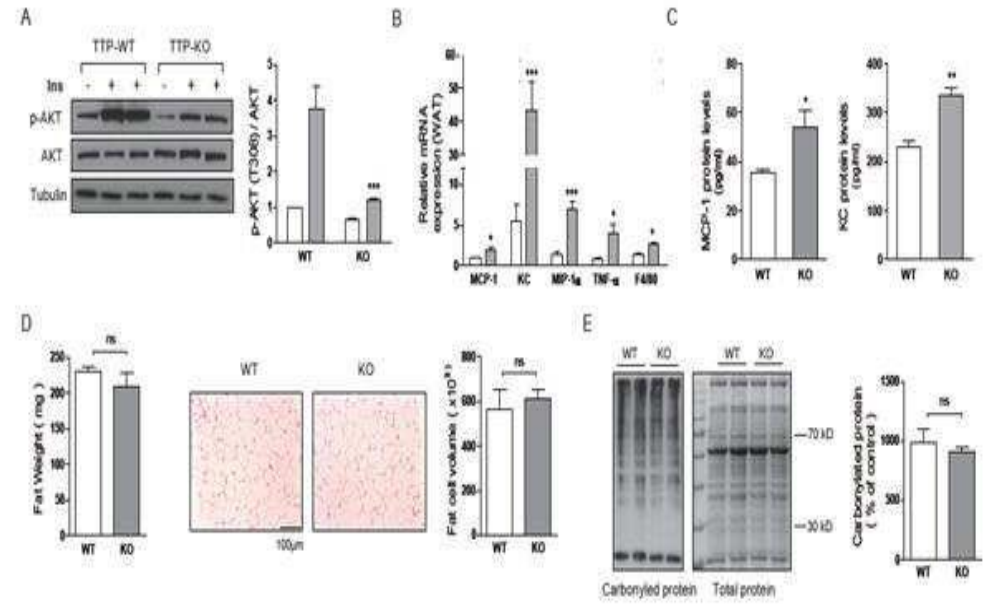
도면1


A
SHAM
OVX
Ins
WAT
SM
LIVER
p-AKT (T308)
p-AKT (S473)
AKT
Tubulin
p-AKT (T308) / AKT
Basal
Insulin
***
B
ns
C
*

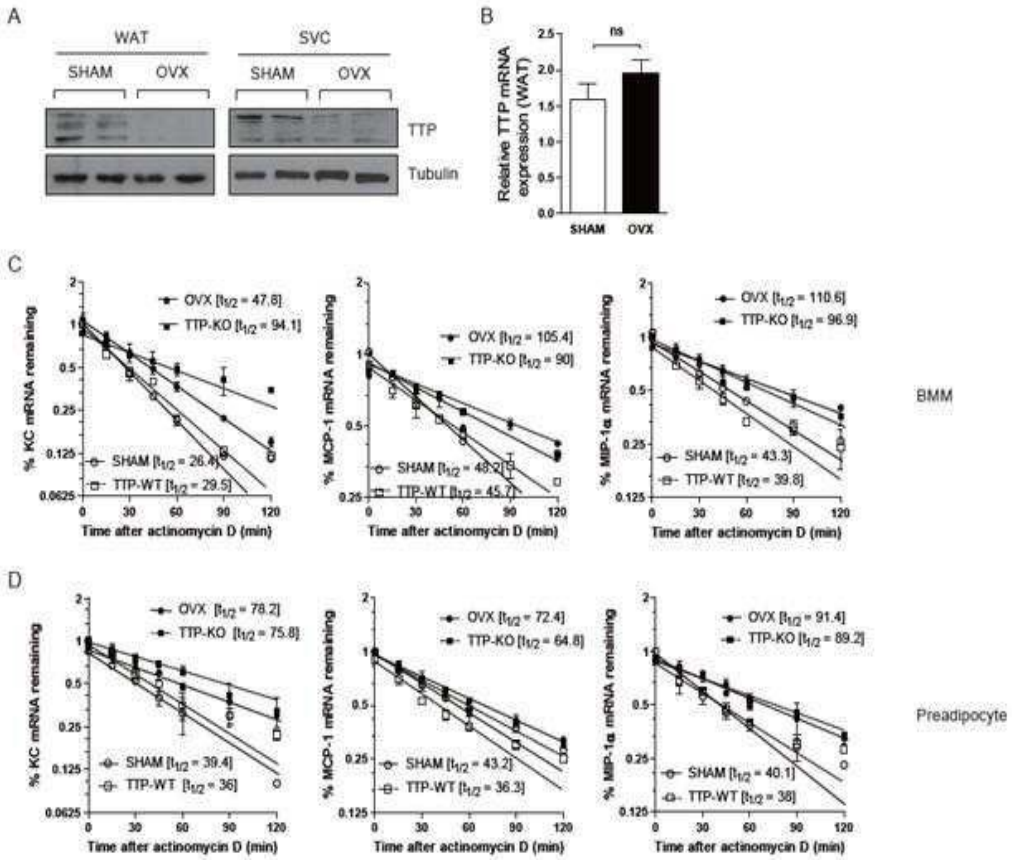
도면2


A
4wk
8wk
12wk
Relative mRNA expression (WAT)
MCP-1
KC
MIP-1α
TNF-α
F4/80
RANTES
B
4wk
8wk
12wk
S
O
70 kD
30 kD
Carbonyled protein
Total protein
Carbonylated protein (% of control)
C
Fat Weight (mg)
D
2wk
4wk
8wk
12wk
SHAM
OVX
Fat cell volume (x 10³)

도면3


A
TTP-WT
TTP-KO
Ins
p-AKT
AKT
Tubulin
p-AKT (T308) / AKT
WT
KO
B
Relative mRNA expression (WAT)
MCP-1
KC
MIP-1α
TNF-α
F4/80
C
MCP-1 protein levels (pg/ml)
KC protein levels (pg/ml)
D
Fat Weight (mg)
ns
100μm
Fat cell volume (x10³)
E
70 kD
30 kD
Carbonyled protein
Total protein
Carbonylated protein (% of control)

도면4



서 열 목 록

<110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> Biomarker Composition for Diagnosing Menopause-Inducing Insulin Resistance or Prognosing Treatment of Menopause-Inducing Insulin Resistance Comprising TTP

<130> ADP-2016-0430

<160> 16

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

ctctgccatc tacgagagcc 20

<210>

2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

gatggagtcc gagtttatgt tcc 23

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

gaaggaatgg gtccagacat 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

acgggtcaac ttcacattca 20

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

ccgaagtcat agccacactc aa 22

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

gcagtctgtc ttctttctcc gttac 25

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

ttctctgtac catgacactc tgc 23

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

cgtggaatct tccggctgta g 21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

aagcctgtag cccacgtcgt a 21

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

ggcaccacta gttggttgtc tttg 24

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

ctttggctat gggcttccag tc 22

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

gcaaggagga cagagtttat cgtg 24

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

ggtaccatga agatctctgc a 21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

aaaccctcta tcctagctca t 21

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

atcagagagt tgaccgcagt tg 22

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

aatgaaccga agcacaccat ag 22