



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0035654
(43) 공개일자 2022년03월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/17 (2006.01) A23L 33/17 (2016.01)
A61K 31/05 (2006.01) A61P 1/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/1783 (2013.01)
A23L 33/17 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2020-0117666

(22) 출원일자 2020년09월14일

심사청구일자 2020년09월14일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

충남대학교병원

대전광역시 중구 문화로 282 (대사동)

(72) 발명자

김섭

대전광역시 중구 문화로 282 방사선종양학과(대사동)

조은경

대전광역시 중구 계백로1716번길 87, 301동 2302호(문화동, 센트럴파크3단지아파트)

송규용

대전광역시 중구 태평로 55, 412동 101호 (태평동, 삼부아파트4단지)

(74) 대리인

김원준

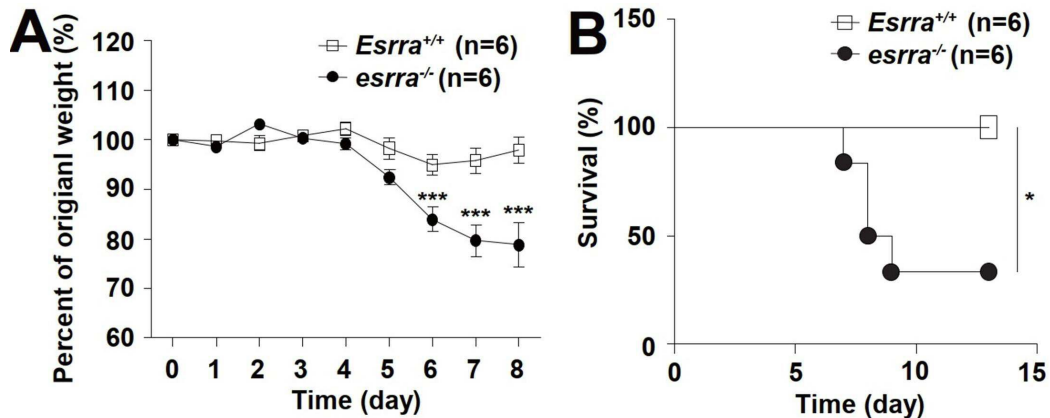
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 ESRRA 단백질을 유효성분으로 포함하는 염증성 대장질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 염증성 사이토카인의 발현을 억제할 뿐 아니라, 장 상피세포의 밀착연접 형성을 유지하고 장내 균총을 개선하여 장의 항상성을 유지하여 염증성 대장질환의 예방 또는 치료에 효과적인 조성물에 관한 것으로 보다 상세하게는, ESRRA(Estrogen related receptor- α)를 유효성분으로 포함하는 염증성 대장질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 31/05 (2013.01)
A61P 1/00 (2018.01)
A61P 29/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/32 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711111501
과제번호	2017R1A5A2015385
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	선도연구센터사업
연구과제명	감염 제어 컨버전스 연구센터
기 여 율	1/2
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2017.06.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711103979
과제번호	2019M3E5D1A02068546
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	혁신형의사과학자공동연구사업(R&D)
연구과제명	유전체 분석 기반 급성 방사선 위장관 증후군 핵심 제어인자 발굴을 통한 치료 기술

개발

기 여 율	1/2
과제수행기관명	충남대학교병원
연구기간	2019.07.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

ESRRA(Estrogen related receptor- α)를 유효성분으로 포함하는 염증성 대장질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 ESRRA는 ESRRA를 코딩하는 유전자의 형태로 제공되는 것을 특징으로 하는 염증성 대장질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 유전자는 발현벡터 내에 포함된 형태로 제공되는 것을 특징으로 하는 염증성 대장질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 ESSRA 단백질은 체내에서 ESSRA의 발현을 증가시키는 AICAR 또는 레스베라트롤의 형태로 제공되는 것을 특징으로 하는 염증성 대장질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 장 상피세포의 밀착연접 형성을 유도하는 것을 특징으로 하는 염증성 대장질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 장내 균총을 개선하는 것을 특징으로 하는 염증성 대장질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,

상기 염증성 대장질환은 궤양성 대장염, 크론병, 방사선 대장염 또는 과민성 대장염인 것을 특징으로 하는 염증성 대장질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

ESRRA(Estrogen related receptor- α)를 유효성분으로 포함하는 장건강 또는 장기능 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 조성물은 장내 균총을 개선하는 것을 특징으로 하는 장건강 또는 장기능 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 염증성 사이토카인의 발현을 억제할 뿐 아니라, 장 상피세포의 밀착연접 형성을 유지하고 장내 균총을 개선하여 장의 항상성을 유지하여 염증성 대장질환의 예방 또는 치료에 효과적인 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 궤양성 대장염(UC, ulcerative colitis), 크론병(CD, Crohn's disease), 방사선 장염(RE, Radiation Enteritis)을 포함하는 염증성 대장 질환(IBD, inflammatory bowel disease)은 유전, 환경, 장내 세균 불균형과 같은 여러 병인을 포함하는 복잡한 다인성 질환이다.

[0003] 궤양성 대장염은 대장 점막에 염증 또는 궤양이 생기는 만성 재발성 질환으로, 원인은 아직 정확히 알려지지 않았으나 환경적 요인, 유전적 요인과 함께 장 내에 정상적으로 존재하는 세균에 대한 우리 몸의 과도한 면역반응이 중요한 발병 요인으로 여겨지고 있다. 궤양성 대장염을 완치할 수 있는 수술 방법은 워낙 복잡하고 수술로 인한 후유증이 크기 때문에 가능한 한 수술을 하지 않고 약물요법만으로 치료하는 것을 원칙으로 한다. 그러나 궤양성 대장염을 완치할 수 있는 약물 치료법은 아직 없으며, 설파살라진(sulfasalazine), 메살라민(mesalamine)과 같은 항염증제와 부신피질 호르몬제 등의 치료제가 가장 흔하게 사용되며, 환자의 상태에 따라 면역억제제, 항생제 등의 약물을 적절히 선택하여 사용한다. 이 중 설파살라진은 수십년간 궤양성 대장염의 표준적인 치료방법으로 사용되어 왔으나 고용량 및 장기 복용에 의해 산화 스트레스를 유발하고 구역질, 속쓰림, 두통, 어지러움, 빈혈, 피부발진 등의 부작용을 일으킬 수 있으며, 드물게는 이들 약물로 인해 간염, 췌장염, 폐렴 등이 유발되기도 한다. 더구나 직장에만 병적인 변화가 나타나는 궤양성 대장염은 일시적인 약물치료만으로도 완치될 수 있으나, 직장 이상의 부위에서 병적인 변화가 발생한 궤양성 대장염은 재발빈도가 높으며 장천공, 독성 거대결장과 같은 합병증이나 대장암으로 진행되기도 한다.

[0004] 크론병은 염증이 대장 점막에 발생하는 궤양성 대장염과 달리 장의 모든 층을 침범하여 염증이 발생한다. 원인은 아직 정확하게 알려져 있지 않으나 감염성 요인이나 소화관 내에 정상적으로 존재하는 세균에 대한 과도한 면역반응과 유전적 요인 및 환경적 영향이 원인인 것으로 여겨지고 있다. 설파살라진이나 메살라민과 같은 항염증제, 부신피질 호르몬 제제, 면역억제제, 항생제, 철분제와 같은 약물치료를 원칙으로 하고, 3개월 정도 약물치료를 반응이 없거나 장협착, 심한 출혈, 누공과 같은 합병증이 발생하면 수술적 처치를 한다. 치료 도중 수술을 받게되는 환자는 전체의 약 50% 정도로 수술을 하여도 나머지 장에 재발할 가능성이 높다.

[0005] 최근 보고들은 장내 균총이 장의 병리에 밀접히 연관되어 있음을 시사한다. 예를 들면, *Fusobacterium nucleatum*는 대장암 환자의 장에서 증가하며, 화학요법에 대한 화학내성과 연관되어 있다. 인간 공생균인 *Bacteriodes fragilis*은 외막 소포(vesicle)을 분비하여 대장암 예방을 위한 자가포식을 활성화시킨다. 그러나 장의 항상성의 관점에서 장내 균총과 염증성 대장질환의 인과관계가 존재하는 지에 대해서는 명확히 알려져 있지 않다.

[0006] 이에 염증성 대장질환에 대해 단순히 염증에 대한 대증치료에 그치지 않고 장의 항상성을 복원하여 보다 근원적으로 염증성 대장질환을 예방 및 치료할 수 있는 방법이 요구된다.

[0007] 핵 수용체는 다양한 호르몬과 리간드에 결합하며, 다양한 생리 과정에 관여하는 유전자의 전사 조절에 중요한

역할을 한다. 핵 수용체 중 특이적으로 결합하는 내인성 리간드가 밝혀지지 않은 수용체 그룹을 고아핵수용체(orphan nuclear receptors)로 분류하며, 이들은 세포 내 존재하는 다른 핵 수용체 및 전사 인자들과의 상호작용을 통해서 타겟 DNA에 결합 후, 전사효능의 조절을 통해서 다양한 기능을 수행한다. 에스트로겐 관련 수용체- α (ESRRA, Estrogen related receptor- α)는 ESRRA(NR3B1), ESRRB(NR3B2) 및 ESRRG(NR3B3)로 구성된 ESRR군에 속하는 고아핵수용체 중 하나이다. ESRRA는 DNA 결합 영역이 인간 에스트로겐 수용체 α 와 구조적으로 유사하다는 것에 기반하여 처음으로 확인되었지만, 천연 에스트로겐이나 에스트로겐 유사 분자에는 결합하지 않는다.

- [0008] ESRRA는 ESRRB나 ESRRG와 같은 다른 ESRRs와 마찬가지로 다양한 생리작용에 필요한 에너지 수요를 충족시키기 위하여 다양한 호르몬과 대사 신호를 특정 유전자의 발현 프로파일로 해석하는 공-조절단백질이다. 최근 ESRRs가 대사질환과 암의 잠재적인 치료제가 될 수 있다는 증거들이 제시되고 있다. ESRRA는 효과 T 세포(effector T cell) 활성화와 분화에 필수적인 대사 조절에 관여한다. 최근의 연구는 ESRRA가 NF- κ B 활성화와 염증 반응을 활성화시키는 것에 의해 간세포암종(hepatocellular carcinoma)을 촉진시킴을 보고하기도 하였다. 본 발명자들은 ESRRA가 장 조직에서 다량 발현되는 것을 확인하고 ESRRA가 장 기능 조절에 주요한 역할을 수 있을 것으로 기대하였으나, 아직까지 이에 대한 연구는 이루어진 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 등록특허 제10-1363311호
(특허문헌 0002) 등록특허 제10-0767393호

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) Front Immunol. 2017; 7: 695.
(비특허문헌 0002) Front Immunol. 2019; 10: 1091.
(비특허문헌 0003) Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2019; 16(6): 331-345.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 단순히 염증에 대한 대증치료에 한정되지 않고, 항염증 효능과 더불어 장 기능 개선 효과에 의해 염증성 대장질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0012] 또한 본 발명은 장내 균총을 개선하고 장내 항상성을 유지하여 장건강 및 장기능 개선에 우수한 효능을 나타내는 조성물을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0013] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 ESRRA(Estrogen related receptor- α)를 유효성분으로 포함하는 염증성 대장질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0014] 본 발명에서 상기 ESRRA는 ESRRA를 코딩하는 유전자의 형태로 제공될 수 있다. 상기 유전자는 DNA, RNA 또는 PNA를 포함한다. 상기 유전자는 발현벡터 내에 포함된 형태로 상기 발현벡터를 당업계에서 공지된 다양한 방법으로 감염 또는 형질도입하여 발현형으로 표적 세포 내에 도입시킬 수 있다.
- [0015] 또는 본 발명에서 상기 ESRRA는 체내에서 ESRRA의 발현을 증가시키는 약물의 형태로 제공될 수 있다. ESRRA의 발현을 증가시키는 약물로는 ESRRA의 작용제(agonist)로 알려진 AICAR(5-아미노이미다졸-4-카복사마이드 리보뉴클레오타이드)나 레스베라트롤을 예로 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0016] 염증성 대장질환의 실험모델 동물실험에서 대장염의 유발은 장 조직에서 ESRRA의 발현을 감소시키며, ESRRA가

결핍된 동물모델은 대장염 유발 시 체중 및 생존율에 영향을 미쳐 대조군에 비해 체중감소와 생존율 저하가 현저하였다. 장 조직에서도 ESRRA의 결핍은 대장염 유발에 의한 장 길이의 변화나 장 부종 현상을 심화시키며, 미소용모의 소실, 점막염증 심화와 같은 병리현상을 증가시킨다. 특히 ESRRA는 장 상피세포에서 밀착연접의 형성에 중요한 역할을 담당하는 것을 확인할 수 있었다. 밀착연접은 장 내 투과도를 감소시켜 미생물이나 독소와 같은 병원 인자의 유출을 억제하는 효과를 나타낸다. 염증성 대장질환은 장 상피세포에서 밀착연접을 손상시키며, ESRRA가 결핍된 마우스에서 그 정도가 더욱 심각하였다.

[0017] 본 발명의 조성물은 또한 장내 균총의 조성에도 영향을 미친다. 실험모델 동물실험에서 대장염의 유발은 장내 균총의 분포에 영향을 미칠 뿐 아니라, ESRRA가 결핍된 마우스는 야생형 마우스와는 차별화된 균총 분포를 나타내었다. 또한 ESRRA가 결핍된 마우스에 야생형 마우스의 분변을 이식하거나 야생형 마우스와 공동사육하는 것에 의해 장내 균총을 조절하는 경우 질병의 진행에 영향을 미치는 것으로부터 장내 균총이 ESRRA에 의해 매개되는 장의 항상성 유지와 밀접하게 연관되어 있음을 확인할 수 있었다.

[0018] 본 발명에서 염증성 대장질환은 양성 대장염, 크론병, 방사선 대장염 또는 과민성 대장염을 포함한다.

[0019] 상기 약학 조성물은 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의하여, 그 자체 또는 약학적으로 허용되는 담체(carrier), 부형제(forming agent), 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다.

[0020] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 본 발명에서 상기 '약제학적으로 유효한 양'이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 유효 용량 수준은 환자의 질병 종류, 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 단독 또는 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있을 것이다.

[0021] 본 발명은 또한 ESRRA(Estrogen related receptor- α)를 유효성분으로 포함하는 장건강 또는 장기능 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 장내 균총을 개선하여 장의 항상성을 유지하는 것에 의해 장건강 또는 장기능을 개선할 수 있다. 본 발명의 조성물은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태로 가공될 수 있으며, 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능식품류 등이 있다.

발명의 효과

[0022] 이상과 같이 본 발명의 조성물은 염증성 사이토카인의 발현을 억제할 뿐 아니라, 궤양성 대장염에 의한 대장 길이의 감소나 밀착연접과 같은 조직학적 변화를 효과적으로 억제하여 궤양성 대장염의 예방 또는 치료에 효과적으로 사용될 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 장내 균총을 개선하여 장의 항상성을 유지할 수 있도록 하므로 장건강 또는 장기능 개선에도 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 장 조직에서 ESRRA의 발현을 보여주는 이미지 및 그래프.

도 2는 염증성 대장질환 실험모델에서 ESRRA가 체중 및 생존율에 미치는 영향을 보여주는 그래프.

도 3은 염증성 대장질환 실험모델에서 ESRRA가 장 조직의 병리에 미치는 영향을 보여주는 이미지 및 그래프.

도 4는 염증성 대장질환 실험모델에서 ESRRA가 장 장벽 기능에 미치는 영향을 보여주는 이미지 및 그래프.

도 5는 염증성 대장질환 실험모델에서 ESRRA가 염증반응에 미치는 영향을 보여주는 이미지 및 그래프.

도 6은 장조직 특이적으로 ESRRA를 녹다운 시킨 실험모델에서 ESRRA의 영향을 보여주는 그래프.

도 7은 염증성 대장질환 실험모델에서 장내 균총의 다양성에 ESRRA가 미치는 영향을 보여주는 그래프.

도 8은 염증성 대장질환 실험모델에서 장내 균총의 분포에 ESRRA가 미치는 영향을 보여주는 그래프.

도 9는 염증성 대장질환 실험모델에서 장내 세균총의 영향을 나타내는 그래프.

도 10은 염증성 대장질환 실험모델에서 장내 세균총과 염증반응 및 밀착연접의 상관관계를 보여주는 그래프.

도 11은 방사선 장염에서 ESRRA 작용제의 영향을 보여주는 그래프.

도 12는 인간 궤양성 대장염에서 ESRRA의 영향을 보여주는 이미지 및 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0025] [실시예]

[0026] 실시예 1 : 실험동물의 준비

[0027] Luo 등(Mol. Cell. Biol. 23, 7947-7956, 2003)의 방법에 따라 야생형(ESRRA^{+/+}) C57BL/6 마우스(Koatech, Korea)로부터 Esrra 유전자를 표적 절단시킨 ESRRA 결핍마우스(ESRRA^{-/-})를 제작하였다.

[0028] ESRRA 결핍마우스(ESRRA^{-/-})와 야생형 마우스(ESRRA^{+/+})는 8~10주령으로 성별을 매치시켜 실험하였으며, 특정 무병소 조건(specific pathogen-free condition)에서 유지하였다. 하기, 모든 동물실험은 충남대학교 의과대학 동물실험윤리위원회에 의해 감독 및 승인되었다.

[0029] 실시예 2 : 궤양성 대장염 실험모델에서 ESRRA의 영향 평가

[0030] 궤양성 대장염의 실험모델인 마우스의 DSS(dextran sodium sulfate) 유도 대장염을 사용하여 ESRRA의 영향을 평가하였다.

[0031] 1) 장 조직에서의 ESRRA의 발현 확인

[0032] 먼저, ESRRA가 장 조직에서 발현되는 것을 확인하기 위하여 면역조직화학염색을 실시하였다. 이를 위하여 3 μ m 두께의 대장 조직 절편을 ESRRA에 특이적인 단클론 항체(Cell signaling technologies; 13826S)를 사용하여 면역 염색하고, 공촛점 현미경으로 관측하였다. 도 1의 A는 그 결과를 보여주는 이미지로 장 점막 조직의 상피세포에서 다량의 ESRRA가 관측되는 것을 알 수 있다. 이에 더하여 염증성 장질환의 실험모델에서 ESRRA의 발현 패턴을 qPCR과 웨스턴 블랏으로 확인하고, 그 결과를 도 1의 B와 C에 각각 나타내었다. ESRRA의 qPCR에 사용된 서열은 하기 표 1과 같다. 도 1의 B와 C에서 DSS의 처리에 의해 장 조직에서 ESRRA의 발현이 크게 감소함을 확인할 수 있다.

표 1

Foward	5'-CAAACGCCTCTGCCTGGTCT-3'	서열번호 1
Reverse	5'-ACTCGATGCTCCCCTGGATG-3'	서열번호 2

[0033]

[0034] 2) 염증성 대장질환 실험모델의 준비

[0035] ESRRA의 발현이 염증성 대장질환의 진행에 미치는 영향을 확인하기 위하여 음용수에 1.5% 또는 2%(w/v) DSS(Mw 36,000~50,000, 0216011001, MP Biomedical)를 혼합하여 ESRRA^{-/-} 및 ESRRA^{+/+} 마우스에게 5일간 무제한 공급하고, 이후 5일간 정상 음용수를 공급하였다. 대조군에는 정상 음용수만을 공급하였다.

[0036] 3) 실험모델에서 체중 및 생존율에 대한 ESRRA의 영향 평가

[0037] 도 2는 1.5% DSS 처리 시 일간 체중의 변화(A)와 생존율(B)을 도시한 그래프로, ESRRA^{-/-} 마우스는 ESRRA^{+/+} 마우스에 비해 실험 6일째부터 체중과 생존율이 현저하게 감소하였으며, 9일째에는 반 이상의 마우스가 폐사하였다. 체중, 직장출혈 및 배변 일관성의 각 항목 당 1~4점으로, 최대 총점은 12점으로 Gut. 2007; 56(6): 855-62에 기

제된 방법에 따라 결정한 질병 활성 지수(DAI, disease activity index) 역시 실험 5~6일째 ESRRA^{+/+} 마우스는 2~3점이었으나, ESRRA^{-/-} 마우스는 6~8점으로 질병 활성 지수가 높았다. 2% DSS 처리 시에는 7일째에 대부분의 ESRRA^{-/-} 마우스가 폐사하고, 10일째에는 모든 마우스가 폐사하였다. 반면 ESRRA^{+/+} 마우스는 7일째에는 70% 이상이 생존하였으며, 10일 이후에도 20% 이상의 마우스가 생존하였다(그래프 미도시).

[0038] 4) 실험모델에서 장 조직의 병리에 대한 ESRRA의 영향 평가

[0039] 염증성 대장질환의 진행을 장 조직에서 직접적으로 확인하기 위하여 1.5% DSS 처리 5일째의 마우스를 희생하고 대장(colon)을 적출하였다. 도 3의 A는 각 실험군별 적출된 대장의 길이를 보여주는 대표적인 이미지로, DSS에 의해 유발된 염증에 의해 대장의 길이가 현저하게 감소하며, 특히 ESRRA^{-/-} 마우스에서의 감소가 더욱 현저함을 나타낸다. 장의 무게/길이는 장 부종의 지표가 되는 것으로 도 3의 B로부터 ESRRA^{-/-} 마우스에서의 차이가 뚜렷함을 알 수 있다. 도 3의 C는 장 조직을 H&E 염색한 현미경 이미지로 ESRRA^{+/+} 마우스와 비교하여 ESRRA^{-/-} 마우스에서 미소용모의 소실, 점막염증의 확대 및 수종의 점막하조직이 관측된다. 상피의 손상이나 염증은 ESRRA^{+/+} 마우스와 ESRRA^{-/-} 마우스 모두에서 관측되지 않았다. 도 3의 D는 J Clin Invest. 1996; 98(4): 1010-20의 방법에 따라 결정한 조직학적 손상 점수(histologic score)를 나타낸 것으로, ESRRA^{-/-} 마우스에서 조직 손상이 큰 것을 보여주는 상기 데이터들과 일치하는 결과이다.

[0040] 5) 실험모델에서 장 장벽 기능에 대한 ESRRA의 영향 평가

[0041] ESRRA^{+/+} 마우스와 ESRRA^{-/-} 마우스 간의 장 장벽 기능의 차를 평가하기 위하여, FITC(Fluorescein isothiocyanate)-텍스트란을 사용하여 장 투과성 평가(intestinal permeability assay)를 실시하였다. 상세하게는, 대사되지 않는 고분자인 FITC-텍스트란 4000을 상기 실험동물을 희생시키기 4시간 전에 40 mg/100 g 체중의 용량으로 경구 위관영양 공급하였다. 희생 시 심장천자에 의해 전혈을 수득하고, 485 nm 여기파장, 528 nm 발광파장에서 형광으로 혈장 내 FITC-텍스트란의 농도를 정량하였다. 도 4의 B는 그 결과를 보여주는 것으로, DSS 처리에 의해 ESRRA^{-/-} 마우스에서 혈장 내 FITC-텍스트란의 레벨이 현저하게 상승함을 알 수 있다. 이는 ESRRA^{-/-} 마우스에서 장벽 기능이 감소하였음을 시사한다. 이를 추가적으로 확인하기 위하여 장 점막을 TEM으로 관측하였다. 도 4의 A의 TEM 이미지 역시 DSS 처리된 ESRRA^{-/-} 마우스의 장조직 상피세포에서 밀착연접(tight junction)이 심각하게 파손되었음을 보여준다. 이에 비해 ESRRA^{+/+} 마우스에서는 DSS 처리 후에도 상대적으로 선와(crypt)와 밀착연접이 유지되고 있음을 보여준다.

[0042] 밀착연접과 관련된 유전자들의 발현수준을 확인하기 위하여 RNA-seq 분석을 실시하고, RNA-seq 데이터를 사용하여 각 실험군에서의 밀착연접 관련 유전자에 대한 히트맵을 작성하였다(도 4의 C). 또한 장 균질액을 사용한 qPCR에 의해 상기 유전자 중 *Cldn 3*, *Cldn 7*, *Cldn 8* 및 *Ocln* 유전자의 발현량을 하기 표 2에 기재된 서열의 프라이머를 사용하여 정량하여 도 4의 D에 도시하였다. 도 4의 C와 D는 모두 전술한 데이터들과 마찬가지로 ESRRA^{-/-} 마우스에서 밀착연접과 관련된 유전자의 발현이 크게 감소함을 보여준다. 이로부터 ESRRA가 장 장벽 기능과 장 상피세포에서의 연접복합체의 보존에 중요한 역할을 담당함을 확인할 수 있다.

표 2

<i>Cldn 3</i>	Foward	5'-GTACAAGACGAGACGGCCAA-3'	서열번호 3
	Reverse	5'-CGTACAACCCAGCTCCCATC-3'	서열번호 4
<i>Cldn 7</i>	Foward	5'-TGTGGGGGAGATGACAAAGC-3'	서열번호 5
	Reverse	5'-CATGGGCGTCAAGGGGTAT-3'	서열번호 6
<i>Cldn 8</i>	Foward	5'-GGAGGACGATGGCAACCTAC-3'	서열번호 7
	Reverse	5'-AGCGGTTCTCAAACACCACA-3'	서열번호 8
<i>Ocln</i>	Foward	5'-ATGGCAAGCGATCATACCCAGAGT-3'	서열번호 9
	Reverse	5'-AGGTTACCATTGCTGCTGTACCGA-3'	서열번호 10

6) 실험모델에서 염증반응에 대한 ESRRA의 영향 평가

ESRRA^{+/+} 마우스와 ESRRA^{-/-} 마우스의 장 점막에서 염증 매개자의 발현에 차이가 있는 지 확인하였다. 도 5의 A는 RNA-seq 데이터로부터 얻은 염증관련 유전자의 히트맵을 나타낸 것이며, B는 장균질액으로부터 염증관련 유전자를 qPCR로 분석한 결과이다. qPCR에 사용한 프라이머 서열은 표 3과 같다. 도 5의 A와 B는 모두 DSS의 철이에 의해 염증성 사이토카인/케모카인의 발현이 증가하며, ESRRA^{+/+} 마우스에 비해 ESRRA^{-/-} 마우스에서 증가의 정도가 더욱 현저함을 보여준다.

표 3

<i>Tnf</i>	Foward	5'-CCCACGTCGTAGCAAACCAC-3'	서열번호 11
	Reverse	5'-GCAGCCTTGCCCTTGAAGA-3'	서열번호 12
<i>Il6</i>	Foward	5'-ACAAAGCCAGAGTCCTTCAGA-3'	서열번호 13
	Reverse	5'-TGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3'	서열번호 14
<i>Il1b</i>	Foward	5'-TGACGGACCCCAAAAGATGA-3'	서열번호 15
	Reverse	5'-AAAGACACAGGTAGCTGCCA-3'	서열번호 16
<i>s100a9</i>	Foward	5'-ACCACCATCATCGACACCTTC-3'	서열번호 17
	Reverse	5'-AAAGGTTGCCAACTGTGCTTC-3'	서열번호 18
<i>Lcn2</i>	Foward	5'-TGAGTGTCATGTGTCTGGGC-3'	서열번호 19
	Reverse	5'-AACTGATCGCTCCGGAAGTC-3'	서열번호 20
<i>Ccl2</i>	Foward	5'-ACTCAAGCCAGCTCTCTCTT-3'	서열번호 21
	Reverse	5'-TTCCTTCTTGGGGTCAGCAC-3'	서열번호 22
<i>Esrra</i>	Foward	5'-CAAACGCCTCTGCCTGGTCT-3'	서열번호 23
	Reverse	5'-ACTCGATGCTCCCCTGGATG-3'	서열번호 24

이에 더하여, 면역 형광 측정에 의해 조직 내 TNF-α 단백질 및 F4/80 단백질의 발현을 정량하였다. 도 5의 C는 면역형광 이미지이며, D는 이를 정량한 그래프로, DSS를 처리한 ESRRA^{-/-} 마우스의 대장에서 TNF-α 단백질의 발현과 대식세포의 침윤이 현저하게 증가하였음을 확인할 수 있다.

이상의 결과들은 ESRRA가 실험모델 장 조직의 상피세포에서 과도한 대장 염증의 개선에 필수적으로 필요함을 의미한다.

실시예 3 : *Esrra* cKO 마우스를 이용한 궤양성 대장염 실험모델에서 ESRRA의 영향 평가

[0050] ESRRA의 발현은 장 점막 조직의 상피세포에서 주로 발현되기 때문에 *Esrra* cWT(조건부 야생형 마우스; *Esrra*^{F/F})와 *Vill/villin-Cre* 마우스를 교배하여 장 상피세포에서만 특이적으로 ESRRA를 녹아웃시킨 *Esrra* cKO 마우스를 제작하였다.

[0051] 구체적으로, C57BL/6 MEF(mouse embryonic fibroblasts)로부터 KOD FX NEO(Toyobo)를 사용하여 매뉴얼에 따라 PCR로 DNA를 분리하였다. ESRRA 플록스드 대립유전자의(floxed allele) 타겟 단편은 pBluescript에서 제한 효소를 사용하여 exon 2를 포함하는 ESRRA genomic DNA 0.5 kb 단편과 0.5 kb 서브단편을 포함하는 loxP로 구성하였다. in vitro 전사에서 gRNA를 위한 *Esrraflox 1*과 *Esrraflox 2*의 주형은 다음 표 4의 프라이머를 사용하여 생성하였다.

표 4

<i>Esrraflox 1</i>	TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGc tgt cag tta	서열번호 25
	ctg gcc tca gGT TTT AGA GCT AGA AAT	
	AGC AAG TTA AAA T	
<i>Esrraflox 2</i>	TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGa gaa tgc ttg	서열번호 26
	cct agt tta cGT TTT AGA GCT AGA AAT AGC	
	AAG TTA AAA T	

[0052]

[0053] gRNA PCR 산물은 겔 정제하였으며, 이후 gRNA의 생성에 사용하였다. MEGashortscript T7 (Life Technologies)가 gRNA의 생성에 사용되었다. Cas9 mRNA는 IVT(in vitro transcription)에 의해 생성되었으며, 주형은 PCR로 증폭하고 gel-정제하였다. 합성된 gRNA와 Cas9 mRNA는 MEGAclear kit (Life technologies)를 사용하여 정제하였으며, RNase-free water(Nacalai tesque)를 사용하여 용리시켰다. 6주령의 C57BL/6 자성 마우스의 과배란을 유도하여 C57BL/6 웅성 마우스와 교배시켰다. *Esrra*^{F/F} floxed 자손을 얻기 위하여 타겟 벡터를 Cas9 mRNA 및 *Esrraflox 1/Esrraflox 2* gRNA와 함께 배아에 주입하였다. 수정된 단일 세포 단계의 배아를 난관으로부터 수집하고, Cas9 mRNA (100 ng/ μ l) 및 gRNA (50 ng/ μ l)와 함께 세포질에 주사하였다. 주사된 살아있는 배아는 0.5 dpc(day per coitus) 가임신상태의 ICR 자성 마우스의 난관에 이식하였다. 원하는 돌연변이를 갖는 웅성 자손을 자성 C57BL/6 마우스와 교배하고 생식선 전달을 시험하였다. 동형접합 *Esrra*^{F/F} floxed 마우스를 얻기 위하여 이형접합 마우스를 교잡수정시켰다. *Esrra* cKO 마우스를 얻기 위하여 *Esrra*^{F/F} 마우스를 장 상피세포에 특이적인 Cre recombinase를 발현하는 *Vill/villin-Cre* 마우스와 교배하였다.

[0054] *Esrra* cWT 마우스와 *Esrra* cKO 마우스에 대해 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 1.5% DSS를 처리하면서 체중을 측정하여 도 6에 도시하였다. 도 6으로부터 특히 장 상피세포에서 ESRRA의 결핍이 염증성 대장질환의 악화에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있다.

[0055] 실시예 4 : 장내 균총에 대한 ESRRA의 영향 평가

[0056] 장내 균총의 변화와 염증성 대장질환의 관련성을 확인하기 위하여 DSS 유도 대장염에서 *ESRRA*^{+/+} 마우스와 *ESRRA*^{-/-} 마우스에서 장내 균총 조성을 비교하였다.

[0057] 이를 위하여 DSS의 처리 4일 전과 4일 후에 각 실험군의 마우스로부터 분변시료를 채취하고, 분변시료로부터 QIAamp DNA Stool Mini Kit(Qiagen; 51604)를 사용하여 박테리아의 genomic DNA를 추출하였다. 16S rRNA gene의 초 가변영역인 V5 - V6을 하기 표 5의 프라이머를 사용하여 PCR로 추출하였다.

표 5

Foward	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGC CTACGGGNGGCWGCAG-3'	서열번호 27
Reverse	5'-GTC-CGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'	서열번호 28

[0058]

- [0059] PCR은 C1000 thermal cycler(Bio-Rad)에서 수행하였으며, PCR 조건은 하기와 같다: 초기 변성 95℃ 3분; 95℃ 30초 변성 24 사이클; 55℃ 30초 열처리; 72℃ 30초 신장; 72℃ 5분 최종 신장. PCR 산물은 QIAquick PCR purification kit(Qiagen, 28106)을 사용하여 정제하였다. 정제된 앰플리콘으로 sequencing library를 만들고, Macrogen(Seoul, Korea)에서 서열분석하였다.
- [0060] 얻어진 미생물 서열에서 USEARCH v.6.1.544를 사용하여 chimeric 서열을 제외하고, QIIME 1.91 소프트웨어에 포함된 UCLUST ref를 사용하여 97% 서열 유사성으로 OTU(operational taxonomic units)를 클러스터링하였다. 특정 박테리아 문(phylum)에 속하지 않거나 하나의 시료만이 존재하는 단일개체군의 OTU는 분석에서 제외하였다. 분류는 RDP classifier를 사용하여 최소 신뢰성 70%로 RDP(Ribosomal Database Project) v11.5에서 수행하였다. 각 시료의 알파 다양성은 Choi1 지수, Shannon 다양성 지수, 관측된 OTU 수 및 PD(phylogenetic diversity) whole tree로 계산하였다. 베타-다양성은 PCoA(principal coordinates analysis)를 통해 비가중 UniFrac distance와 가중 UniFrac distance로 결정하였다. LEfSe(Linear discriminant analysis effect size)는 ESRRA^{+/+} 마우스와 ESRRA^{-/-} 마우스를 구분하는 속 수준의 박테리아 분류를 결정하는 데 사용되었다.
- [0061] 도 7의 A는 비가중 UniFrac distance에 기반한 PCoA 결과를 나타내는 것으로 DSS를 처리하지 않은 마우스의 세균총이 분리된 클러스터를 형성하는 것을 명확하게 보여준다. DSS에 의해 대장염이 유도되면 그룹 사이에 세균총 조성이 명확하게 분리되는 것을 보여준다. 네 개의 실험군 간의 분리는 도 7의 B에 도시된 가중 UniFrac distance에 따른 PCoA plot에서 확인할 수 있다. 도 7의 C는 알파 다양성을 나타내는 각 지수에 대한 그래프이다. DSS를 처리하지 않은 ESRRA^{-/-} 마우스는 ESRRA^{+/+} 마우스에 비해 다양성 지수가 더 높게 나타났으나, 통계적 유의성은 Shannon 다양성에서만 나타났다. DSS 처리에 의해 ESRRA^{+/+} 마우스의 장내 균총의 풍부성과 다양성은 차이가 없었으나, ESRRA^{-/-} 마우스에서는 DSS 처리에 의해 감소하였다. 그러나 통계적 유의성은 없었다.
- [0062] 평균함량 0.5% 이상인 주된 분류군의 상대적 양을 과(family) 수준에서 비교하였다. 도 8의 A는 그 결과를 보여주는 것으로, ESRRA^{-/-} 마우스에서는 DSS 처리와 상관없이 *Prevotellaceae*와 *Lactobacillaceae*가 감소하였으며, *Lachnospiraceae*는 증가하였다. DSS가 처리되지 않은 ESRRA^{+/+} 마우스에서는 처리하지 않은 ESRRA^{-/-} 마우스에 비해 *Bacteroidaceae*가 높은 비율로 존재하며, DSS가 처리된 ESRRA^{-/-} 마우스에 비해 DSS가 처리된 ESRRA^{+/+} 마우스에서 *Erysipelotrichaceae*가 감소하였다. 이러한 박테리아 분류군의 차이가 유전형 및 DSS 처리와 관련성이 있는 것인 지 확인하기 위한 LEfSe 분석 결과를 도 8의 B에 도시하였다. 도 8의 B로부터 *Alloprevotella*, *Bacteroides* 및 미분류 *Bacteroidales*가 ESRRA^{+/+} 마우스에 풍부하게 존재하며, ESRRA^{-/-} 마우스에는 *Atopostipes*, *Acetatifactor*, *Desulfovibrio* 및 미분류 *Clostridiales*이 풍부하게 존재하였다(LDA score > 3.0, p < 0.05). DSS 처리 후에는, ESRRA^{+/+} 마우스에는 *Alloprevotella*, *Gemella*, *Barnesiella*, *Dorea* 및 미분류 *Bacteroidales*가 ESRRA^{-/-} 마우스에는 *Anaerotruncus*, *Odoribacter*, *Mucispirillum*, *Ruminococcus*, *Desulfovibrio*, *Bifidobacterium*, 미분류 *Lachnospiraceae* 및 미분류 *Erysipelotrichaceae*가 다량 함유되었다(LDA score > 3.0, p < 0.05). DSS 처리가 장내 균총에 미치는 영향을 확인하기 위하여, DSS 처리 전과 처리 후의 그룹을 비교하였다. ESRRA^{+/+} 마우스에서는 DSS 처리 전에는 *Barnesiella*, *Anaerotruncus* 및 *Anaerofustis* 속이 풍부하지만, 처리 후에는 *Bacteroides*, *Vampirovibrio*, *Acetatifactor*, *Streptococcus* 및 미분류 *Clostridiales* 속이 풍부하였다. ESRRA^{-/-} 마우스에서는 DSS 처리 전에는 *Barnesiella*, *Anaerofustis*, 미분류 *Ruminococcaceae* 및 미분류 TM7 속이, 처리 후에는 *Bacteroides*, *Helicobacter* 및 *Vampirovibrio*가 풍부하였다.
- [0063] 도 8의 C는 LDS score 3.0에 기반하여 LEfSe에 의해 분류된 특정 분류군의 상대적 풍부성을 그래프로 나타낸 것으로, 유전자 형 또는 DSS 처리에 의해 장내 균총의 분류군 분포에 차이가 있음을 보여준다. 이러한 관측은 장내 세균 군집의 항상성이 ESRRA에 의해 조절되며, ESRRA^{-/-} 마우스에서 장내 균총의 변화는 DSS 유발 대장염의 진행과 그 심각성에 관련되어 있음을 나타낸다.
- [0064] 염증성 대장질환의 실험모델에서, ESRRA 결핍에 따른 대장염의 심각성을 조절하는데 장내 균총의 역할을 확인하

기 위하여, 광범위 항생제(ABX)를 DSS에 의한 대장염의 유발 전에 투여하였다. 구체적으로 장내 세균의 제거를 위하여, 암피실린 소듐염, 네오마이신 설페이트 및 메트로니다졸 각 1 g/L과 반코마이신 염산염 0.5 g/L를 포함하는 항생제 혼합물을 음용수에 첨가하여 4주간 제공하였으며, 음용수는 삼일에 한번씩 교체하였다. 이후 실시예 2의 방법에 따라 1.5% DSS를 처리하여 대장염을 유발하였다. ABX의 처리에 의해 ESRRA^{-/-} 마우스는 DSS-유발 대장염에 대해 현저한 보호 효과를 나타내어 ABX를 처리한 ESRRA^{+/+}마우스에서의 심각도와 상응하게 됨을 도 9의 A에서 확인할 수 있다.

[0065] 더 나아가 ESRRA^{+/+} 마우스와 ESRRA^{-/-} 마우스를 50:50의 비율로 섞어 고립된 케이지에서 동일한 식이를 공급하며 4주간 사육하고, 이후 실시예 2의 방법에 따라 1.5% DSS를 처리하였다. 도 9의 B는 공동 사육이 대장염에 의한 생존율에 미치는 영향을 보여주는 그래프로, ABX-처리에 따른 도 9의 A와 마찬가지로 공동사육 시 ESRRA^{+/+} 마우스와 ESRRA^{-/-} 마우스군은 생존율의 유의적인 차이가 없었다.

[0066] 추가적으로 이형접합 부모와 동배자(littermate)에서 DSS 유발 대장염의 진행을 확인하기 위하여 ESRRA^{+/+} 마우스와 ESRRA^{-/-} 마우스의 이형접합 교배에 의해 ESRRA^{+/+}, ESRRA^{+/-} 및 ESRRA^{-/-} 마우스를 생산하고 동일 케이지에서 사육하였다. 8주령에 실시예 2의 방법에 따라 DSS를 처리하였다. 그 결과 생존율은 유전형간 차이를 나타내지 않아(도 9의 C), ESRRA에 의해 유도된 장내 항상성에 세균총의 전달이 포함된 것을 확인할 수 있었다.

[0067] 이를 더욱 명확하게 확인하기 위하여 ESRRA^{-/-} 마우스에 ESRRA^{+/+} 마우스의 분변을 이식하여 장내 병리현상에 긍정적인 영향을 미치는 지 확인하였다. 즉, ESRRA^{+/+} 마우스의 분변으로부터 제조한 신선한 상등액 200 μ l를 ESRRA^{-/-} 마우스에 주당 1회씩 4주간 위관영양 투여하였다. 분변 이식 1주 후 실시예 2의 방법에 따른 DSS 처리를 실시하였다. 도 9의 D는 분변 이식에 따른 생존율의 차이를 보여주는 것으로, 분변이식을 하지 않은 군에 비해 분변이식을 받은 군에서 생존율이 유의적으로 증가하는 것을 보여준다. 이는 ESRRA가 장내 균총을 조절하는 것에 의해 질병에 활성을 나타내는데 결정적인 영향을 하는 것을 의미한다.

[0068] 도 10은 도 9의 B의 공동사육 마우스의 희생 후, 실시예 2와 동일한 방법에 의해 염증 관련 mRNA와 밀착연접 관련 mRNA를 qPCR로 정량한 결과를 보여주는 것이다. 도 5의 B와 도 4의 D에서, ESRRA^{-/-} 마우스는 DSS 처리에 의해 밀착연접 관련 mRNA의 발현이 크게 감소하고 염증 관련 mRNA의 발현은 크게 증가한 것에 비해, 도 10은 공동 사육에 의해 DSS 처리 후 ESRRA^{+/+} 마우스와 ESRRA^{-/-} 마우스에서 이들 mRNA의 발현이 유의적인 차이가 없음을 보여준다. 이는 장내 균총이 ESRRA에 의해 매개된 장의 항상성과 결정적으로 연관되어 있음을 나타낸다.

[0069] 실시예 5 : 방사선 장염에 대한 ESRRA의 영향 평가

[0070] 방사선 장염에서 ESRRA의 영향을 확인하기 위하여 ESRRA^{-/-} 및 ESRRA^{+/+}(WT) 마우스에게 16 Gray X선 방사선을 복부에 1회 조사하며 매일 체중과 생존율을 관측하였다. 도 11의 A는 그 결과를 나타내는 그래프로, 야생형인 ESRRA^{+/+} 마우스에 비해 ESRRA^{-/-} 마우스에서 체중의 감소율이 높고, 생존율은 크게 저하되는 것을 알 수 있다.

[0071] ESRRA 작용제(agonist)인 레스베라트롤을 투여하여 체내 ESRRA의 발현수준을 증가시키는 경우, 방사선 장염의 진행에 미치는 영향을 파악하기 위하여 방사선 조사 30분 전 ESRRA^{+/+} 마우스에 레스베라트롤을 50 mg/kg의 농도로 경구 위관영양 공급하였다. 이후 17 Gray X선 방사선을 복부에 1회 조사하여 방사선 장염을 유발하고 체중과 생존율을 매일 관측하여 도 11의 B에 도시하였다. ESRRA 작용제의 투여는 방사선 장염에 의한 체중 감소를 완화하였으며, 생존율에도 현저한 영향을 나타내었다.

[0072] 실시예 6 : 궤양성 대장염에 대한 ESRRA의 영향 평가

[0073] 상기 궤양성 대장염 실험모델인 DSS 유발 대장염의 결과를 고려하여, 염증성 대장질환 샘플의 공개 유전자 데이터 세트 GSE9452 및 GSE11223에 대해 Front Immunol. 2018; 9: 987에 기재된 방법에 따라 분석을 실시하였다.

[0074] 구체적으로 각 데이터 세트에서 단변량의 차등 유전자 발현을 비교하기 위하여, Benjamini-Hochberg FDR 보정과 함께 Wilcoxon-Mann-Whitney 테스트를 사용하여 RNA 데이터를 분석하였다($P < 0.05$, $q < 0.25$). 도 12의 A는 그 결과를 보여주는 것으로 정상인의 대장 조직 시료에 비해 궤양성 대장염 환자의 대장 시료에서 ESRRA의 발현

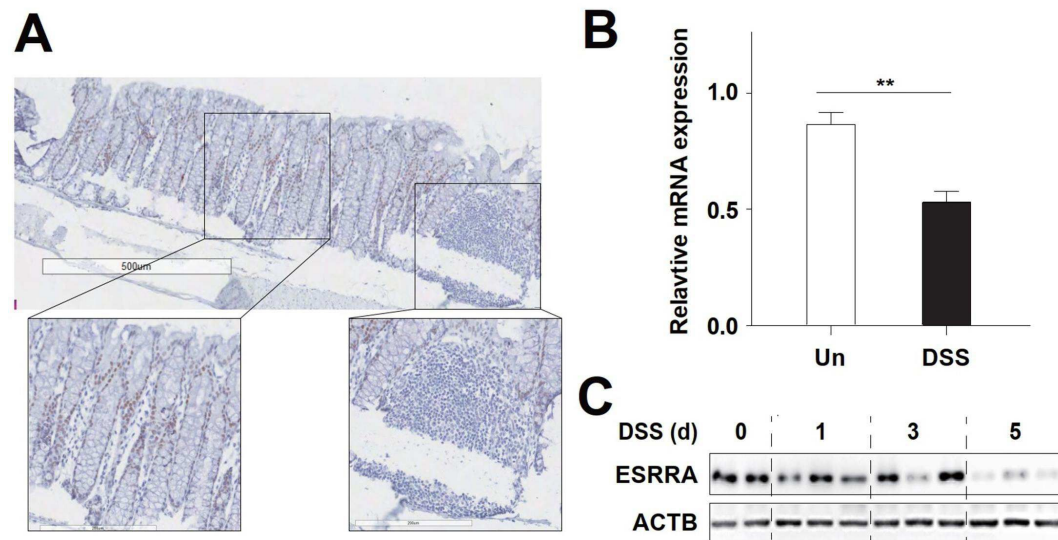
이 감소하는 것을 보여준다. 장 조직의 면역조직화학 이미지를 보여주는 도 12의 B에서도 궤양성 대장염 환자에서 ESRRA 발현이 감소함을 알 수 있다. 도 12의 C는 GSE11223 데이터 세트에서 ESRRA의 발현이 궤양성 대장염의 상태에 의존적으로 감소함을 나타낸다. 상기 데이터들로부터 궤양성 대장염에서 ESRRA의 발현이 감소하며 특히 활성 궤양성 대장염에서 유의적으로 감소함을 알 수 있다.

[0075] 실험모델에서의 결과를 추가로 확인하기 위하여, GSE11223 데이터 세트에 대해 GSEA(Gene Set Enrichment Analysis)를 사용하여 시그널 경로분석을 실시하였다. GSEA는 MSigDB로부터 가중 $\log_2$ 비율 랭킹과 1000 유전자 세트 순열과 함께 KEGG_TIGHT_JUNCTION, HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE, HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING 및 HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB를 사용하여 수행하였다. 도 12의 D와 E에서 ESRRA의 발현과 밀착연접은 양의 상관관계를 가지며, 염증 관련 경로는 음의 상관관계를 갖는 것을 보여준다.

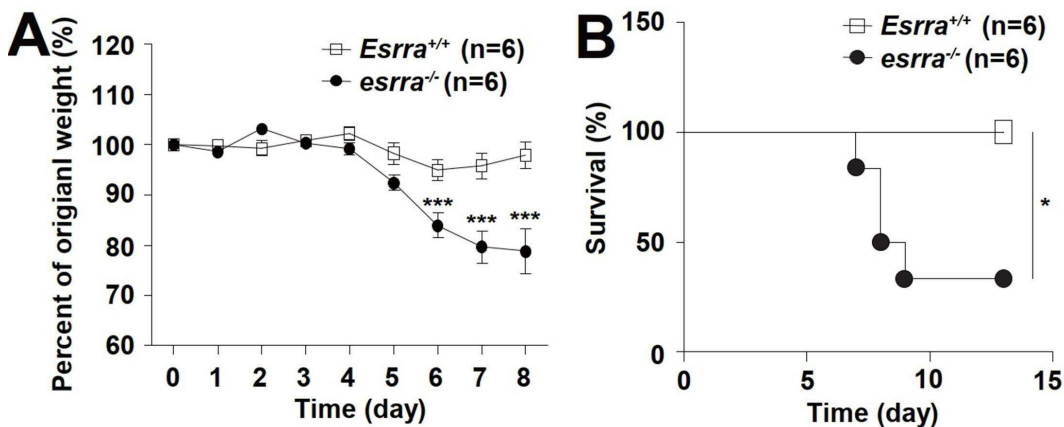
[0076] 이상의 결과로부터 DSS에 의해 유도된 대장염에서와 마찬가지로, 인간 궤양성 대장염에서도 ESRRA가 장의 항상성에 주요 조절자로 작용하는 것을 확인할 수 있다.

도면

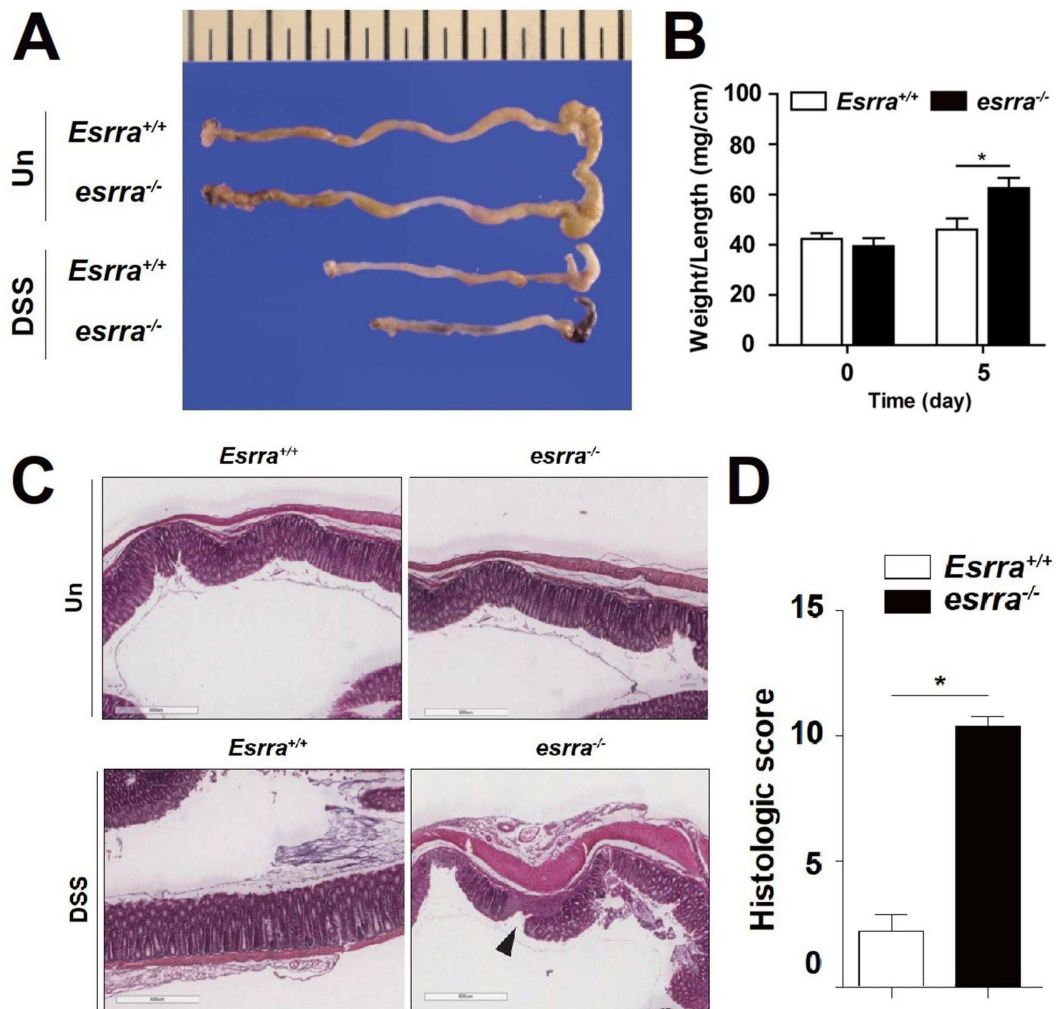
도면1



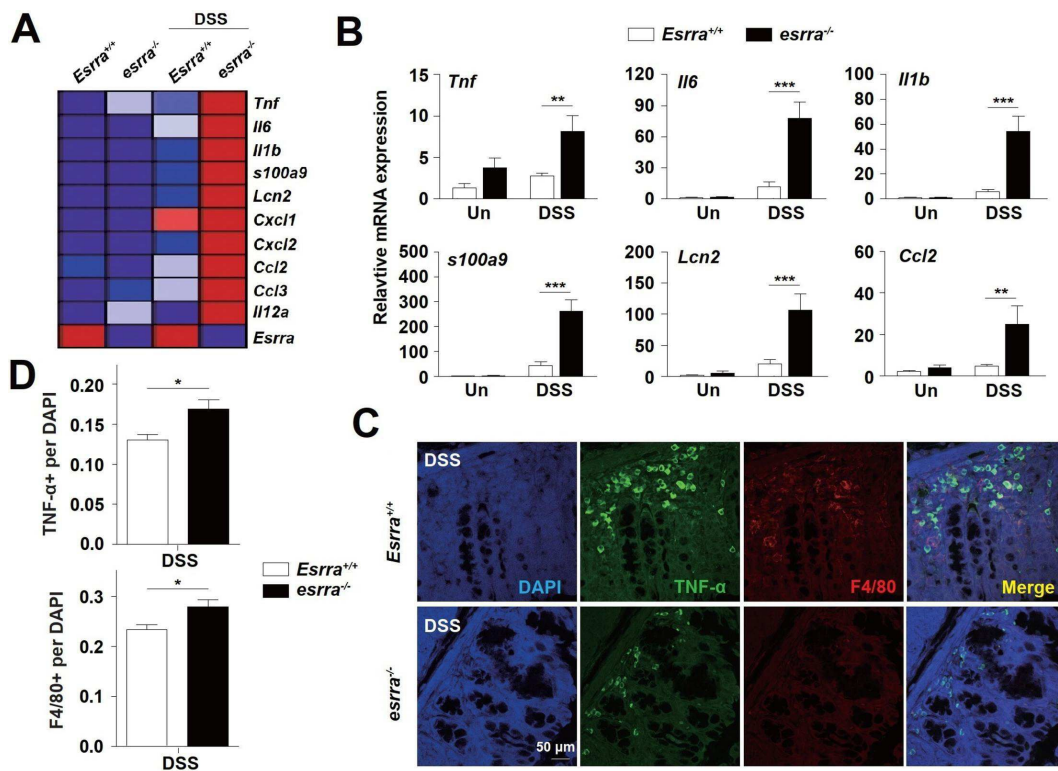
도면2



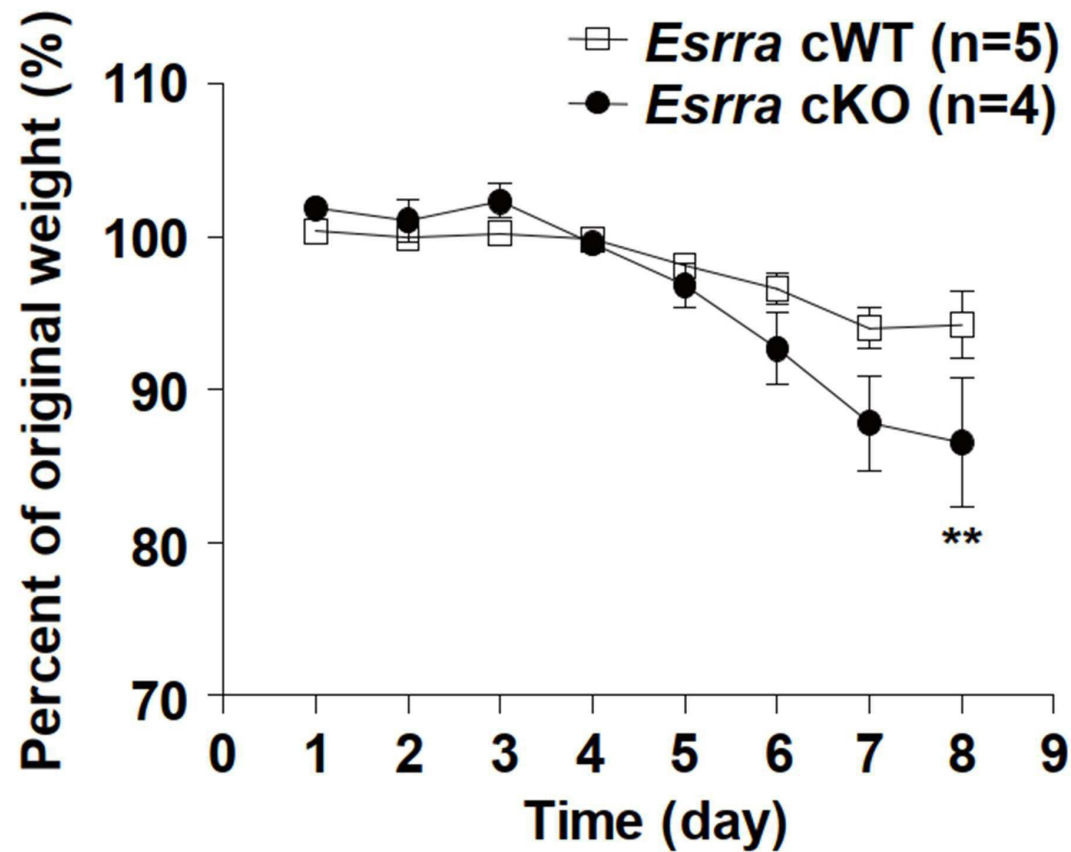
도면3



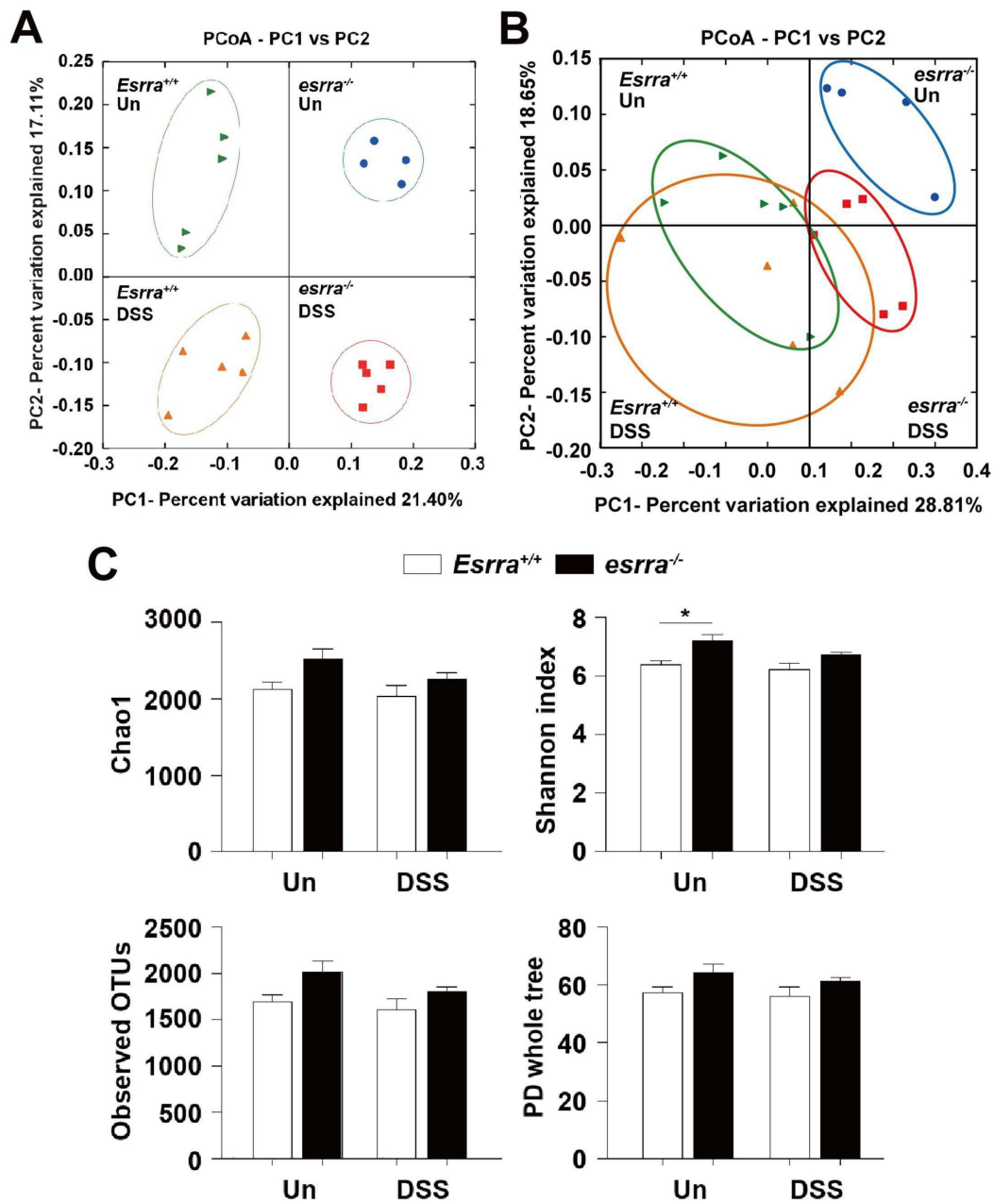
도면5



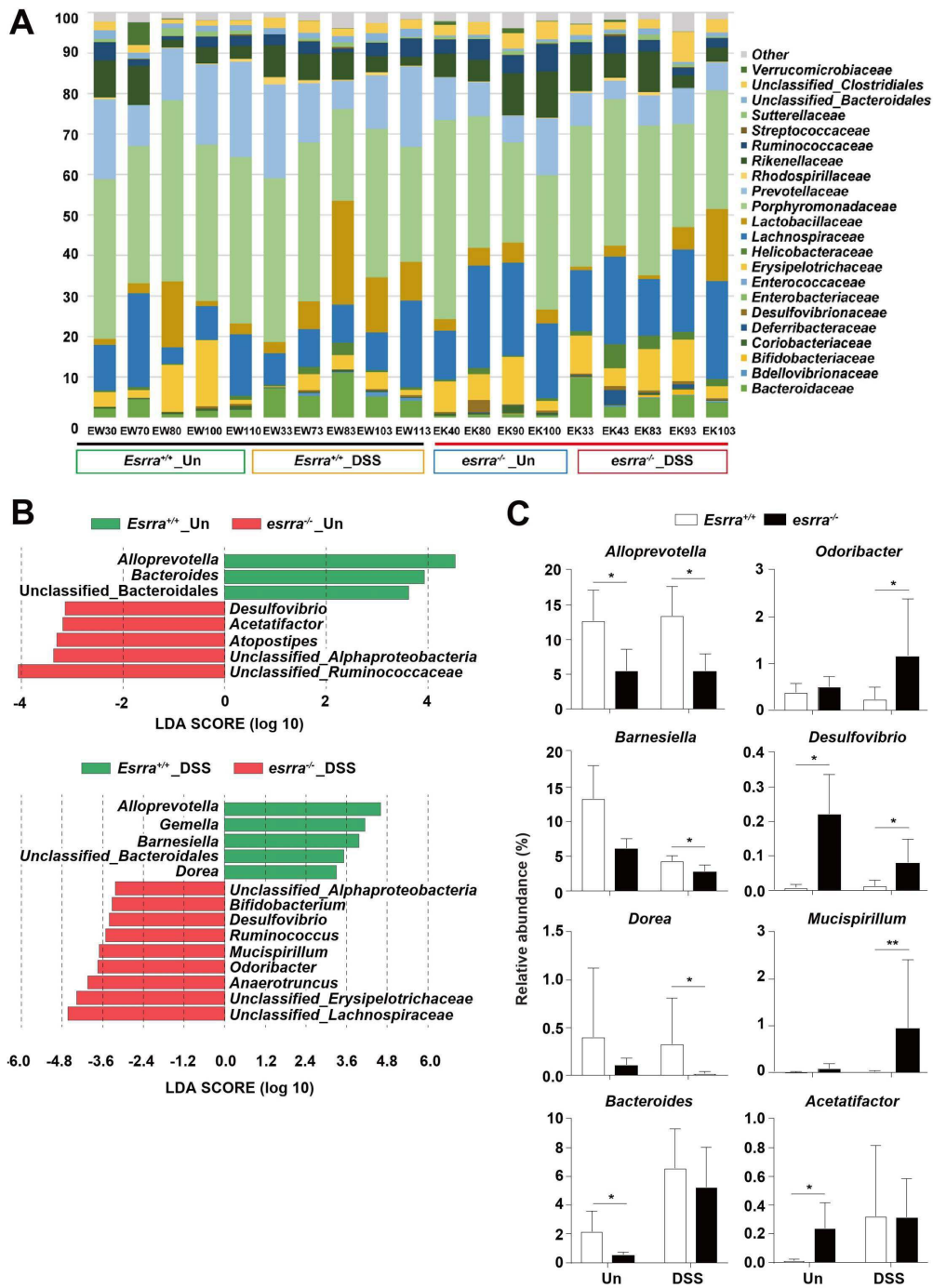
도면6



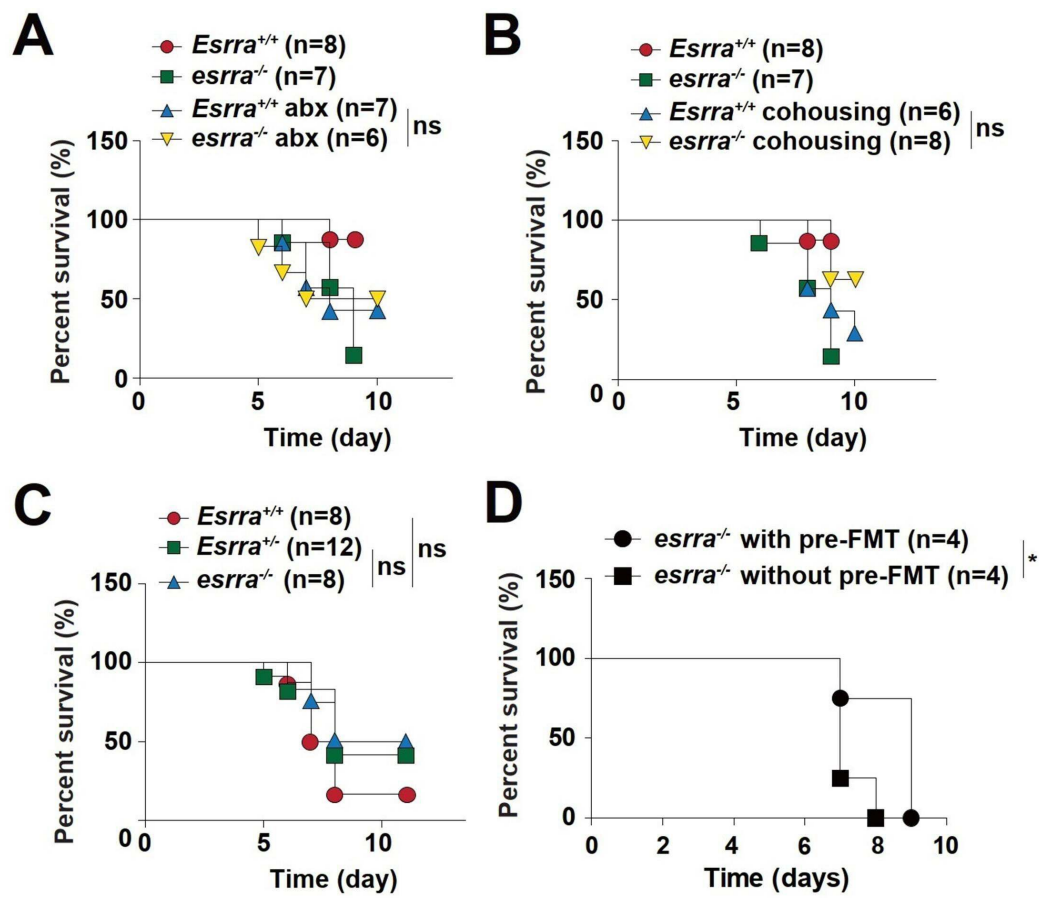
도면7



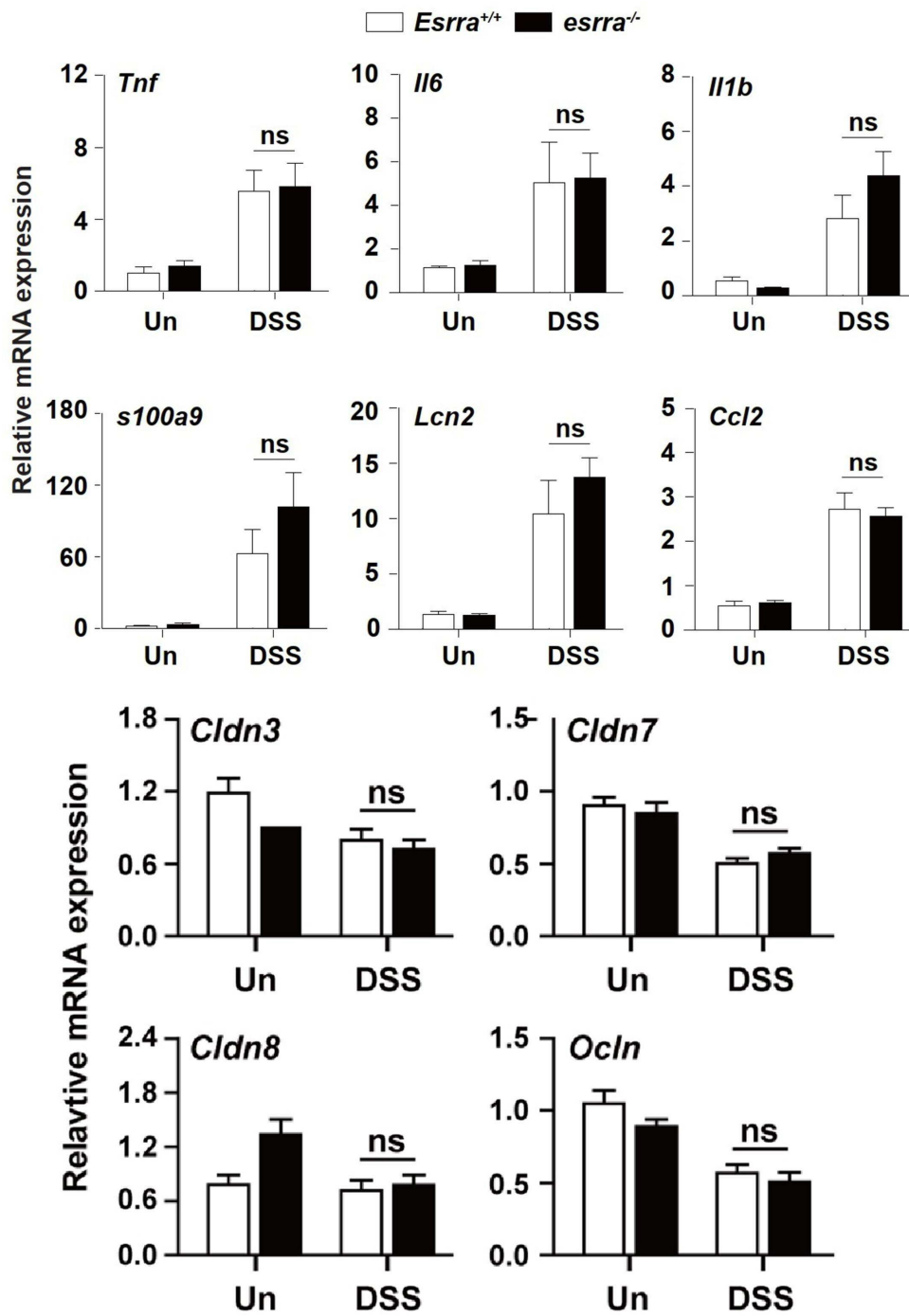
도면8



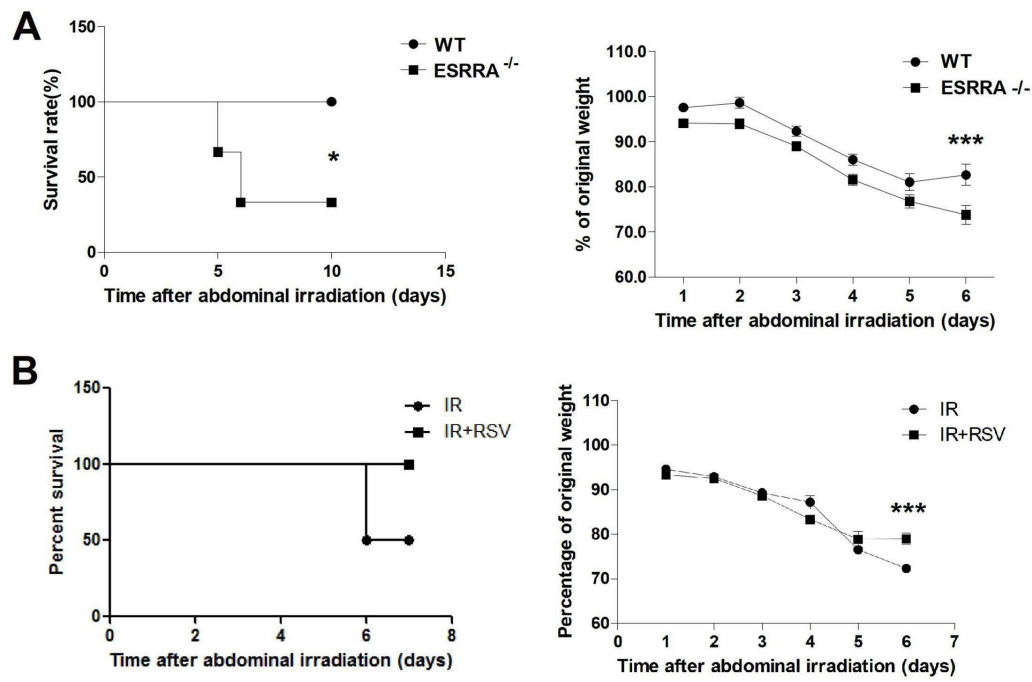
도면9



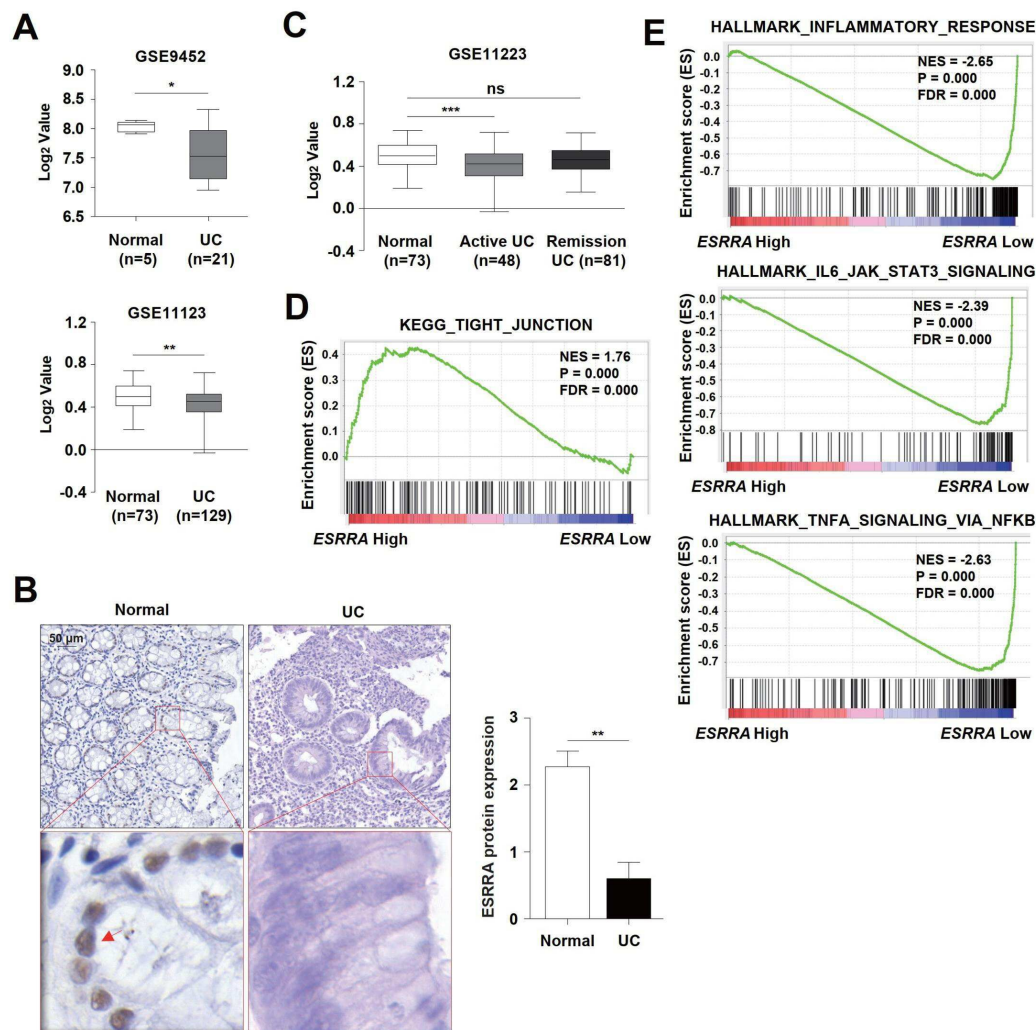
도면10



도면11



도면12



서열목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
Chungnam National university Hospital
- <120> Composition for Prophylaxis or Treatment of Inflammatory Bowel
Disease Comprising ESRRA
- <130> P0920-323
- <160> 28
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer
- <400> 1

caaacgcctc tgcctggtct	20
<210> 2	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 2	
actcgatgct cccctggatg	20
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 3	
gtacaagacg agacggccaa	20
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 4	
cgtacaaccc agctcccatc	20
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 5	
tgtgggggag atgacaaagc	20
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	primer	
<400>	6	
catgggcgtc	aaggggttat	20
<210>	7	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	7	
ggaggacgat	ggcaacctac	20
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	8	
agcggttctc	aaacaccaca	20
<210>	9	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	9	
atggcaagcg	atcataccca gagt	24
<210>	10	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	10	
aggttaccat	tgctgctgta ccga	24
<210>	11	
<211>	20	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 11
 cccacgtcgt agcaaaccac 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 12
 gcagccttgt cccttgaaga 20
 <210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 13
 acaaagccag agtccttcag a 21

 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 14
 tggtccttag ccactccttc 20
 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 15
 tgacggaccc caaaagatga 20
 <210> 16

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 16
 aaagacacag gtagctgcc 20

<210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 17
 accaccatca tcgacacctt c 21

<210> 18
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 18
 aaaggttgcc aactgtgctt c 21

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 19
 tgagtgtcat gtgtctgggc 20

<210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 20

aactgatcgc tccggaagtc	20
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 21	
actcaagcca gctctctctt	20
<210> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 22	
ttccttcttg gggtcagcac	20
<210> 23	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 23	
caaacgcctc tgcctggtct	20
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 24	
actcgatgct cccctggatg	20
<210> 25	
<211> 70	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	

<400> 25
ttaaatacgac tcactatagg ctgtcagtta ctggcctcag gtttagagc tagaaatagc 60

aagttaaaat 70
<210> 26
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 26
ttaaatacgac tcactatagg agaatgcttg cctagtttac gtttagagc tagaaatagc 60
aagttaaaat 70
<210> 27
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 27
tcgtcggcag cgtcagatgt gtataagaga cagcctacgg gnggcwgcag 50

<210> 28
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 28
gtccgtgggc tcggagatgt gtataagaga caggactach vgggtatcta atcc 54