



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0151900
(43) 공개일자 2024년10월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) C12Q 1/689 (2018.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
C12Q 1/689 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2023-0047837
(22) 출원일자 2023년04월11일
심사청구일자 2023년04월11일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
최인걸
서울특별시 송파구 잠실로 62(잠실동) 트리지움 아파트 326동 1704호
박병혁
서울특별시 성북구 안암동2가 94-17 반석빌딩 201호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

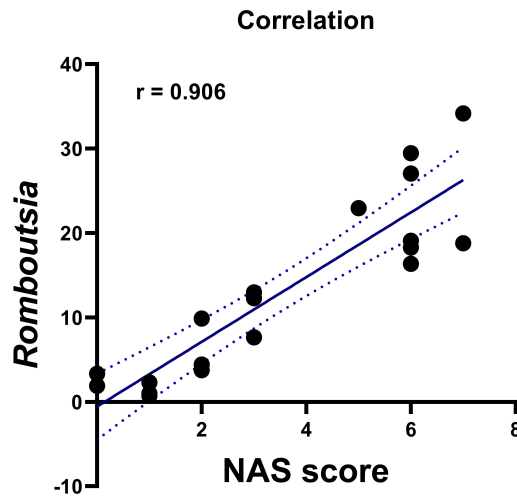
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 장내 균총을 이용한 비알코올성 지방간염 진단용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 장내 균총의 변화, 구체적으로는 롬버스티아 일레알리스의 균총 내 변화를 탐지하는 검출 수단을 포함하는 비알코올성 지방간염 진단용 조성물 및 이를 이용한 비알코올성 지방간염 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것으로 비알코올성 지방간염 발생 시에 장내 균총에서 롬버스티아 일레알리스가 우점종이 되므로 이를 바이오마커로 사용할 수 있다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

G01N 33/6893 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2800/085 (2013.01)

(72) 발명자

최용순

서울특별시 성북구 지봉로23길 5-15(보문동2가)
203호

황광연

서울특별시 성동호구 매봉길 17 (옥수동, 래미안
옥수 리버젠) 108동 204호

박민진

서울특별시 관악구 신림동 1465-19 301호

명세서

청구범위

청구항 1

장내 균총에서 롬버스티아 일레알리스(*Romboutsia ilealis*) 균주의 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 비알코올성 지방간염 진단 또는 위험도 예측용 조성물.

청구항 2

제1항의 조성물을 포함하는 비알코올성 지방간염 진단 또는 위험도 예측용 키트.

청구항 3

피검체로부터 제공된 분변 시료에서 롬버스티아 일레알리스 균주의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 비알코올성 지방간염의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 방법은 피검체로부터 제공된 생물학적 시료에서 중성지방, 총콜레스테롤, HDL (high density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein) 및 VLDL (very low density lipoprotein)로 이루어진 군에서 선택되는 지방 대사 관련 마커의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는, 비알코올성 지방간염의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 방법은 피검체로부터 제공된 생물학적 시료에서 GOT (glutamic oxalacetic transaminase), GPT (glutamic pyruvate transaminase) 및 GOT/GTP로 이루어진 군에서 선택되는 간 독성 마커의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는, 비알코올성 지방간염의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 방법은 피검체로부터 제공된 생물학적 시료에서 포도당, 인슐린, TyG 인덱스 (Triglyceride and Glucose index) 및 HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance)로 이루어진 군에서 선택되는 탄수화물 대사 관련 마커의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는, 비알코올성 지방간염의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 7

제3항에 있어서, 상기 방법은 피검체로부터 제공된 분변 시료에서 롬버스티아 일레알리스 균주의 수준을 측정 한 후 이를 정상 대조군으로부터 제공된 분변 시료에서 측정한 롬버스티아 일레알리스 균주의 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함하는, 비알코올성 지방간염의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 8

비알코올성 지방간을 앓는 피검체로부터 제공된 분변 시료에서 롬버스티아 일레알리스의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 비알코올성 지방간의 비알코올성 지방간염으로의 이행 가능성을 판단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 방법은 피검체로부터 제공된 생물학적 시료에서 중성지방, 총콜레스테롤, HDL, LDL 및 VLDL로 이루어진 군에서 지방 대사 관련 마커의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는, 비알코올성 지방간의 비알코올성 지방간염으로의 이행 가능성을 판단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 방법은 피검체로부터 제공된 생물학적 시료에서 GOT, GPT 및 GOT/GTP로 이루어진 군에서

선택되는 간 독성 마커의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는, 비알코올성 지방간의 비알코올성 지방간염으로의 이행 가능성을 판단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 방법은 피검체로부터 제공된 생물학적 시료에서 포도당, 인슐린, TyG index 및 HOMA-IR로 이루어진 군에서 선택되는 탄수화물 대사 관련 마커의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는, 비알코올성 지방간의 비알코올성 지방간염으로의 이행 가능성을 판단하기 위한 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 장내 균총의 변화, 구체적으로는 롬버스티아 일레알리스(*Romboutsia ilealis*)의 균총 내 변화를 탐지하는 검출 수단을 포함하는 비알코올성 지방간염 진단용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 비알코올성 지방성 간질환(Non-Alcoholic Fatty Liver Disease; NAFLD)은 지방간을 기본 병변으로 하면서, 술을 잘 마시지 않음에도 불구하고 알코올성 간 장애와 유사한 간 실질의 염증·괴사, 섬유화(線維化) 등의 조직 변화를 나타내는 병태이다. NAFLD는 병태의 진행에 따라 지방간으로부터 지방성 간염, 이후 간경변을 거쳐 간암까지 이행한다. NAFLD에서의 지방성 간염을 비알코올성 지방간염(Non-Alcoholic SteatoHepatitis; NASH)이라고 칭한다.

[0004] NAFLD는 기본적으로 무증상이기 때문에 우연히 시행한 검사에서 간 기능이 나쁜 것을 알게 되는 경우가 많다. 비만, 당뇨와 같은 대사질환을 앓고 있는 환자는 지방간의 발생률이 높다고 알려져 있으므로 대사 증후군을 앓고 있는 사람은 간 기능 검사를 하는 것이 좋다. 특히, NASH는 향후 간경변 및 간암으로 진행될 가능성이 있으므로 조기에 진단하여 관리하는 것이 필요하며, 진단에는 간이 나빠질 수 있는 다른 원인이 없는지 확인하기 위한 혈액검사, 간 조직 검사 또는 간의 모양을 보는 초음파 검사, 컴퓨터 단층촬영(CT) 또는 자기공명영상(MRI)이 필요하다. 그러나 컴퓨터 단층촬영(CT) 또는 자기공명영상(MRI)은 고가여서 접근성이 떨어진다. 이에 비알코올성 지방간염의 정확한 진단을 위한 다른 방법의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 공개특허 제10-2018-0132092호 (2018.12.11 공개)

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) 1. Zobair Younossi et al., Hepatology, Vol. 69, No. 6, 2019, Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 상기와 같은 상황에서 본 발명자들은 비알코올성 지방간염의 정확한 진단을 위한 새로운 방법을 연구하였고, 장내 균총에서 롬버스티아 일레알리스(*Romboutsia ilealis*)의 변화를 탐지하여 비알코올성 지방간염을 진단할 수 있음을 확인하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 장내 균총에서 롬버스티아 일레알리스의 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 비

알코올성 지방간염 진단용 조성물 및 이를 이용한 비알코올성 지방간염 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 양상은 장내 균총에서 롬버스티아 일레알리스 균주의 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 비알코올성 지방간염 진단용 조성물을 제공한다.
- [0012] 본 발명에서, "비알코올성 지방간염 (Non-alcoholic steatohepatitis; NASH)"이란 비알코올성 지방간질환의 하나로 지방간과 함께 염증 또는 섬유화를 동반하는 것을 특징으로 하는 진행성 간질환을 말한다. 단순 지방간은 간 내에 중성지방이 축적되는 단순 양성 질환을 의미하며, 단순 지방간과 비알코올성 지방간염은 질환의 예후와 치료 요법의 적용 등이 상이하기 때문에, 단순 지방간인지 비알코올 지방간염인지 정확히 진단하는 것이 중요하다. 특히, 비알코올성 지방간염은 간경변이나 암으로 진행될 수 있어 조기 진단이 중요하다.
- [0013] 본 발명에서, "장내 균총에서 롬버스티아 일레알리스 균주의 수준을 측정할 수 있는 제제"란 시료 내에서 비알코올성 지방간염의 진단 마커인 롬버스티아 일레알리스 균주의 존재를 검출하기 위하여 사용될 수 있는 물질을 의미한다. 예를 들어, 롬버스티아 일레알리스 균주에 특이적으로 존재하는 단백질, 핵산, 지질, 당지질, 당단백질 또는 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자를 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머, 프로브, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 압타머 및 항체로 이루어진 군에서 선택된 1 이상일 수 있다.
- [0014] 본 발명에서 롬버스티아 일레알리스 균주의 검출 제제는 항체일 수 있으며, 항원-항체 반응을 기반으로 한 면역학적 방법을 사용하여 해당 미생물을 검출할 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석 (Radioimmunoassay, RIA), 방사면역확산법 (radioimmunodiffusion), 오우크 테로니 (Ouchterlony) 면역 확산법, 로케이트 (rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법 (Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법 (Complement Fixation Assay), FACS (Fluorescence activated cell sorter), 단백질 칩 (protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0015] 본 발명에서, 상기 조성물은 중성지방, 총콜레스테롤, HDL (high density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein) 및 VLDL (very low density lipoprotein)로 이루어진 군에서 선택되는 지방 대사 관련 마커의 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0016] 또한, 상기 조성물은 지방 대사 관련 마커의 수준을 측정할 수 있는 제제 이외에도 GOT (glutamic oxalacetic transaminase), GPT (glutamic pyruvate transaminase) 및 GOT/GTP로 이루어진 군에서 선택되는 간 독성 마커의 수준을 측정할 수 있는 제제; 및 포도당, 인슐린, TyG 인덱스 (Triglyceride and Glucose index) 및 HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance)로 이루어진 군에서 선택되는 탄수화물 대사 관련 마커의 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0017] 상기 비알코올성 지방간염 진단용 조성물은 비알코올성 지방간염 발병의 위험도 예측에도 사용될 수 있다. 상기 "위험도 예측"이란 피시험자가 알코올성 지방간염의 발병 가능성이 있는지를 판별하는 것을 말한다. 위험도 예측은 알코올성 지방간염의 발병 위험성이 높은 피시험자를 선별하고 적절한 관리를 통하여 발병 시기를 늦추거나 발병하지 않도록 하거나, 가장 적절한 치료 방식을 선택함으로써 치료 결정을 하기 위해 임상적으로 사용될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 다른 일 양상으로서, 상기 비알코올성 지방간염 진단용 조성물은, 비알코올성 지방간염의 위험도 예측 또는 진단용 키트 형태로 구현되어 제공될 수 있다. 본 발명의 키트에는 해당 미생물들을 검출하기 위한 프라이머, 프로브, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 압타머 및/또는 항체의 검출 제제를 포함할 뿐만 아니라, 분석 방법에 적합한 1종 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액, 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [0020] 구체적인 일례로, 본 발명에서 해당 미생물에 특이적인 프라이머를 포함하는 키트는, PCR 및 등의 증폭 반응을 수행하기 위한 필수 요소들을 포함하는 키트일 수 있다. 예를 들어, 상기 PCR용 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드 (dNTPs), Taq-폴리머라아제 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수 (DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0021] 상기 키트는 분변의 채취를 위한 포집 기구를 포함하며, 상기 포집 기구는 핀셋, 흡수성 패드, 면봉, 스포이드,

스왑 및 주사기로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 시료 채취용 포집 기구를 추가로 포함할 수 있으나, 생물학적 시료를 포집할 수 있는 것이라면 이에 한정되지 않는다.

[0022] 또한 상기 키트는 알코올성 지방간염의 위험도 예측 또는 진단을 위하여 피시험자의 시료를 채취할 것을 요구하는 설명서를 추가로 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명자들은 동물 모델에 비알코올성 지방간염 유도 사료를 먹임에 따라 특수한 장내 균총 커뮤니티가 형성되고, 비알코올성 지방간염 유도된 이후에는 장내 균총에서 롬버스티아 일레알리스가 우점 균주인 것을 확인하였다 (도 7).

[0025] 따라서, 본 발명의 또 다른 양상은 피검체 또는 개체로부터 제공된 분변 시료에서 롬버스티아 일레알리스 균주의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 비알코올성 지방간염의 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0026] 상기 비알코올성 지방간염의 진단 또는 위험도 예측용 조성물에 관한 사항은 상기 비알코올성 지방간염의 진단을 위한 정보 제공 방법에도 동일하게 적용될 수 있다.

[0027] 본 명세서 상의 용어 "개체"는 비알코올성 지방간염이 발병되었거나 발병할 가능성이 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다. 동물은 인간뿐만 아니라 이와 유사한 증상의 치료를 필요로 하는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0028] 상기 비알코올성 지방간염의 진단을 위한 정보 제공 방법은 피검체의 분변 시료에서 롬버스티아 일레알리스 균주의 수준을 측정한 후 이를 정상 대조군과 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 피검체에서 측정한 롬버스티아 일레알리스 균주의 수준이 정상 대조군에서 측정한 수준보다 높다면 비알코올성 지방간염이 발병한 것으로 진단할 수 있다.

[0029] 본 명세서 상의 용어 "정상 대조군"이란, 비알코올성 지방간염이 발병되지 않거나, 발병이 의심되지 않는 개체를 의미한다.

[0030] 상기 비알코올성 지방간염의 진단을 위한 정보 제공 방법은 진단의 정확도를 높이기 위해 피검체로부터 제공된 생물학적 시료에서 지방 대사 관련 마커, 간 독성 마커 및 탄수화물 대사 관련 마커의 수준을 추가로 측정할 수 있다. 지방 대사 관련 마커, 간 독성 마커 및 탄수화물 대사 관련 마커는 상기 비알코올성 지방간염의 진단 또는 위험도 예측용 조성물에 기재한 것과 동일하다.

[0032] 본 발명의 또 다른 양상은 비알코올성 지방간을 앓는 피검체로부터 제공된 분변 시료에서 롬버스티아 일레알리스 균주의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 비알코올성 지방간의 비알코올성 지방간염으로의 이행 가능성을 판단하기 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0033] 상기 비알코올성 지방간염의 진단 또는 위험도 예측용 조성물, 비알코올성 지방간염의 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 사항은 상기 비알코올성 지방간의 비알코올성 지방간염으로의 이행 가능성을 판단하기 위한 정보 제공 방법에도 동일하게 적용될 수 있다.

[0034] 상기 비알코올성 지방간의 비알코올성 지방간염으로의 이행 가능성을 판단하기 위한 정보 제공 방법은 피검체의 분변 시료에서 롬버스티아 일레알리스 균주의 수준을 측정한 후 이를 정상 대조군 또는 비알코올성 지방간 관련 질환 환자와 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 피검체에서 측정한 롬버스티아 일레알리스 균주의 수준이 정상 대조군 또는 비알코올성 지방간 관련 질환 환자에서 측정한 수준보다 높다면 비알코올성 지방간이 비알코올성 지방간염으로 이행할 가능성이 높은 것으로 판단할 수 있다.

[0035] 또한, 상기 비알코올성 지방간의 비알코올성 지방간염으로의 이행 가능성을 판단하기 위한 정보 제공 방법은 일정 시간 간격으로 피검체의 분변 시료에서 롬버스티아 일레알리스 균주의 수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0036] 측정한 롬버스티아 일레알리스 균주의 수준이 시간에 따라 증가한다면 비알코올성 지방간이 비알코올성 지방간염으로 이행할 가능성이 높은 것으로 판단할 수 있다.

[0037] 상기 정보 제공 방법은 진단의 정확도를 높이기 위해 피검체로부터 제공된 생물학적 시료에서 지방 대사 관련 마커, 간 독성 마커 및 탄수화물 대사 관련 마커의 수준을 추가로 측정할 수 있다. 지방 대사 관련 마커, 간

독성 마커 및 탄수화물 대사 관련 마커는 상기 비알코올성 지방간염의 진단 또는 위험도 예측용 조성물에 기재한 것과 동일하다.

발명의 효과

[0039] 본 발명에 따르면 장내 균총에서 롬버스티아 일레알리스 균주의 수준을 측정하여 비알코올성 지방간염을 진단할 수 있으며, 다른 바이오마커와 조합하면 비알코올성 지방간염 진단의 정확도를 현저히 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 랫트에 비알코올성 지방간염 유도 사료를 공급하면서 20일 간격으로 랫트를 희생시킨 후 간 조직을 시리우스 레드로 염색한 결과이다: CON=일반 사료 공급군; H=고지방 사료 공급군; HC=고지방 및 콜린 결핍 사료 공급군; HM=고지방 및 콜린&메치오닌 결핍 사료 공급군.

도 2는 랫트에 비알코올성 지방간염 유도 사료를 공급하면서 20일 간격으로 랫트를 희생시킨 후 간 내 총 지방량(total lipid), 중성지방(triglyceride), 총 콜레스테롤(total cholesterol) 및 저밀도 지질단백질(low-density lipoprotein)의 수준을 확인한 결과이다.

도 3은 랫트에 비알코올성 지방간염 유도 사료를 공급하면서 20일 간격으로 랫트를 희생시킨 후 혈액에서 중성지방, 총 콜레스테롤, 포도당, 저밀도 지질단백질, 아스파르트산 아미노전이효소 및 알라닌 아미노전이효소의 수준을 확인한 결과이다.

도 4는 비알코올성 지방간염 유도 사료를 60일 및 100일 동안 공급한 랫트에서 장내 균총을 구성하는 미생물을 확인한 결과이다: CN060, HC060, HF060 및 HM060-각각 일반 사료, 고지방 및 콜린 결핍 사료, 고지방 사료, 고지방 및 콜린&메치오닌 결핍 사료를 60일 동안 공급; 및 CN100, HC100, HF100 및 HM100-각각 일반 사료, 고지방 및 콜린 결핍 사료, 고지방 사료, 고지방 및 콜린&메치오닌 결핍 사료를 100일 동안 공급.

도 5는 비알코올성 지방간염 유도 사료를 60일 및 100일 동안 공급한 랫트에서 장내 균총을 구성하는 미생물의 상관 관계를 파악하기 위해 Principal coordinates analysis(PCoA)를 수행한 결과이다: CN60, HC60, HF60 및 HM60-각각 일반 사료, 고지방 및 콜린 결핍 사료, 고지방 사료, 고지방 및 콜린&메치오닌 결핍 사료를 60일 동안 공급; 및 CN100, HC100, HF100 및 HM100-각각 일반 사료, 고지방 및 콜린 결핍 사료, 고지방 사료, 고지방 및 콜린&메치오닌 결핍 사료를 100일 동안 공급.

도 6은 랫트에 비알코올성 지방간염 유도 사료를 공급하면서 장내 균총을 확인하고, 이를 유사도에 따라 그룹화한 결과이다: 20, 40, 60, 80 및 100은 사료 공급 기간을 의미한다.

도 7은 비알코올성 지방간염 유도 사료를 공급한 랫트의 장내 균총을 유사도에 따라 그룹화한 후 그룹을 구성하는 미생물을 확인한 결과이다.

도 8은 혈중 지방 대사 관련 마커, 비알코올성 지방간염 장내 균총 마커 및 마커의 조합을 이용했을 때 비알코올성 지방간염 진단의 정확도를 확인한 결과이다.

도 9는 장내 균총 내 롬버스티아 일레알리스의 비중과 NASH 스코어와의 상관 관계를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 실시예 1: 비알코올성 지방간염 동물모델 구축

[0045] 8주령의 랫(rat)에 비알코올성 지방간염 유도 사료인 고지방 사료, 콜린 결핍 사료 또는 고지방 및 콜린&메치오닌 결핍 사료를 100일 동안 급여하였다. 매 20일마다 무작위로 선정된 랫을 희생시키고, 혈중 지방 대사 관련 마커 (중성지방, 총 콜레스테롤, 저밀도 지질단백질, 포도당)와 간독성 관련 마커 (AST, ALT)의 수준을 확인하였다. 또한 간을 직접 샘플링한 후 간내 지방 관련 마커 (총 지방량, 중성지방, 총 콜레스테롤 및 저밀도 지질

단백질)의 양을 측정하여 비알코올성 지방간염의 유도 여부를 확인하였다. 또한 간 단면을 헤마토실린&에오신(H&E)으로 염색하여 지방 침착 정도를 평가하고, 시리우스 레드(Sirius red) 염색법을 이용하여 간경화 발생 정도를 평가하였다.

[0046] 시리우스 레드 염색 결과, 사료 공급 60일차에 이르러서 비알코올성 지방간염이 유도됨을 알 수 있었고, 그 정도가 사료 공급 80일 차까지 계속 심해지다가 사료 공급 100일을 넘어서면서 간경화로 진행되는 것을 확인할 수 있었다 (도 1; CON=일반 사료 공급군; H=고지방 사료 공급군; HC=고지방 및 콜린 결핍 사료 공급군; HM=고지방 및 콜린&메치오닌 결핍 사료 공급군).

[0047] 또한, 사료 공급 60일 차에 간내 지방 관련 마커의 농도를 측정한 결과 총 지방량(total lipid)이 비알코올성 지방간염 유도 사료에 의해 증가하고, 간내 중성지방(triglyceride), 총 콜레스테롤(total cholesterol), 저밀도 지질단백질(low-density lipoprotein)은 고지방, 콜린&메치오닌 결핍사료에 의해 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (도 2). 혈중 간독성 관련 마커 역시 고지방, 콜린 & 메치오닌 결핍사료에 의해 유의적으로 증가하였다 (도 3).

[0049] 실시예 2: 장내 균총 변화

[0050] 매 20일마다 무작위로 선정된 랫을 희생시킨 후 장내 균총의 구성을 분석하였다.

[0051] 분석 결과, 비알코올성 지방간염 유도 사료를 먹임에 따라 특수한 장내 균총 커뮤니티가 형성되는 것을 알 수 있었으며, 장내 균총 중에서 박테로이데스(*Bacteroides*)는 유의미하게 증가하고, 아커만시아(*Akkermansia*)의 비율은 감소하는 것을 확인하였다 (도 4 및 도 5; CN060과 CN100은 각각 사료 공급 60 및 100일 차 자료임을 의미하며, 나머지 실험군도 동일한 의미이다).

[0052] 또한, 장내 균총을 유사도에 따라 그룹화를 시켰을 때, 비알코올성 지방간염이 유도된 랫트(사료 공급 80일차)의 균총이 주로 클러스터 E에 속하는 것을 알 수 있었다. 또한, 각 클러스터에 속하는 미생물 속을 확인했을 때 다른 클러스터와 달리 클러스터 E에서는 롬버스티아(*Romboutsia*)의 비중이 높은 것을 알 수 있었다 (도 6 및 도 7). 이 결과는 비알코올성 지방간염이 유도되면서 장내 균총의 우점종이 롬버스티아로 변한다는 것을 의미한다.

[0053] 우점종인 롬버스티아의 세부 분류를 확인하기 위해 long-read 시퀀싱 기술인 Nanopore MinION을 이용해 종 수준으로 확인한 결과 롬버스티아 속의 다른 종 미생물도 존재하나 롬버스티아 일레알리스(*Romboutsia ilealis*)가 우점 균주인 것을 확인하였다 (도 7).

[0055] 실시예 3: 장내 균총 확인

[0056] 장내 균총의 우점종을 비알코올성 지방간염 마커로 사용할 수 있는지 평가하기 위해 혈중 생화학적 영양 지표 관련 마커 (P.SER), 생화학적 침습적 마커 (P.INV), 장내 균총 마커 및 이들의 조합에 따른 진단의 정확도를 확인하였다. 혈중 생화학적 영양 지표 관련 마커에는 지방 대사 관련 마커인 중성지방, 총콜레스테롤, HDL (high density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein) 및 VLDL (very low density lipoprotein), 탄수화물 대사 관련 마커인 포도당, 인슐린, TyG 인덱스 (Triglyceride and Glucose index) 및 HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance)이 포함되고, 간독성 지표인 GOT (glutamic oxalacetic transaminase), GPT (glutamic pyruvate transaminase) 및 GOT/GTP가 포함된다. 또한, 생화학적 침습적 마커는 간 무게, 비장 무게, 간 내 총 지방량, 간 내 중성지방 수준, 간 내 총 콜레스테롤, 간 내 HDL, 간 내 LDL 및 간 내 VLDL이다.

[0057] 확인 결과, 정확도가 혈중 혈중 지방 대사 관련 마커만 사용했을 때는 81.6%, 장내 균총 마커만 사용했을 때는 79.8%로 나타났으나, 두 마커들을 동시에 사용하면 89.8%까지 정확도가 개선되는 것을 확인할 수 있었다 (도 8; P.INV=침습적 마커 ; P.SER=혈중 생화학적 영양 지표 마커; MICRO=장내 균총 마커).

[0058] 또한, 장내 균총 내 롬버스티아 일레알리스의 비중과 NASH 스코어와의 상관 관계를 다음과 같이 확인하였다.

[0059] 비알코올성 지방간염 진단 모델은 Support Vector Machine (SVM)을 기반으로 하는 구축하였으며, 여러 마커의 데이터를 기반으로 시료가 지방간염 위험군 (NAS 스코어 5 이상)에 해당하는지 여부를 판단하는 분류기(classifier)로 제작하였다. 마커는 침습적 방법으로 획득되는 P.INV (physiological marker), 혈중지방대사

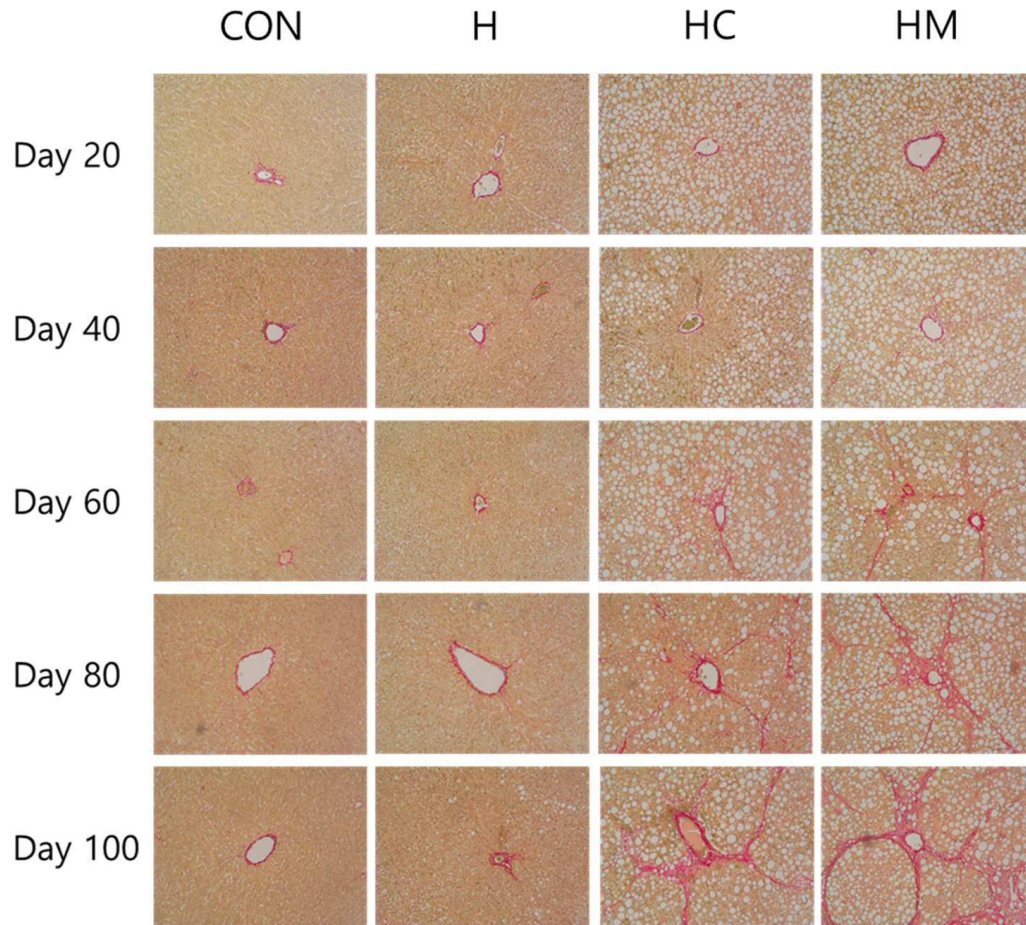
관련 마커 (P.SER) 및 장내 균총마커 (MICRO)의 세 그룹으로 분류하였다. 분류기의 학습은 전체 시료 중 무작위로 선택된 80%의 데이터를 기반으로 수행되었으며, 나머지 20%의 시료는 검증(test) 데이터셋으로 이용하였다. 각각의 학습 및 검증은 5차례 반복하였으며, 결과는 5차례 반복 시행된 검증 결과에 기반하여 계산하였다.

[0060]

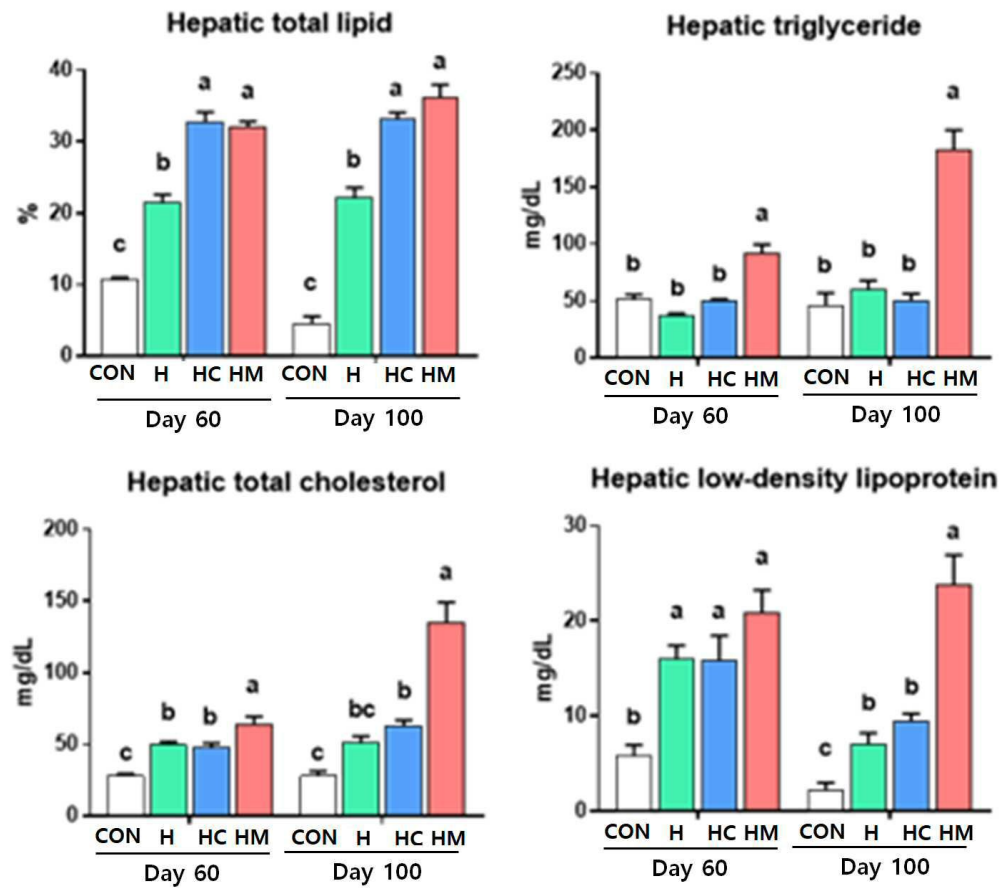
상관 관계 확인 결과, 장내 균총 내 롬버스티아 일레알리스의 비중과 NASH 스코어가 양의 상관 관계를 갖는 것을 알 수 있었다 (도 9).

도면

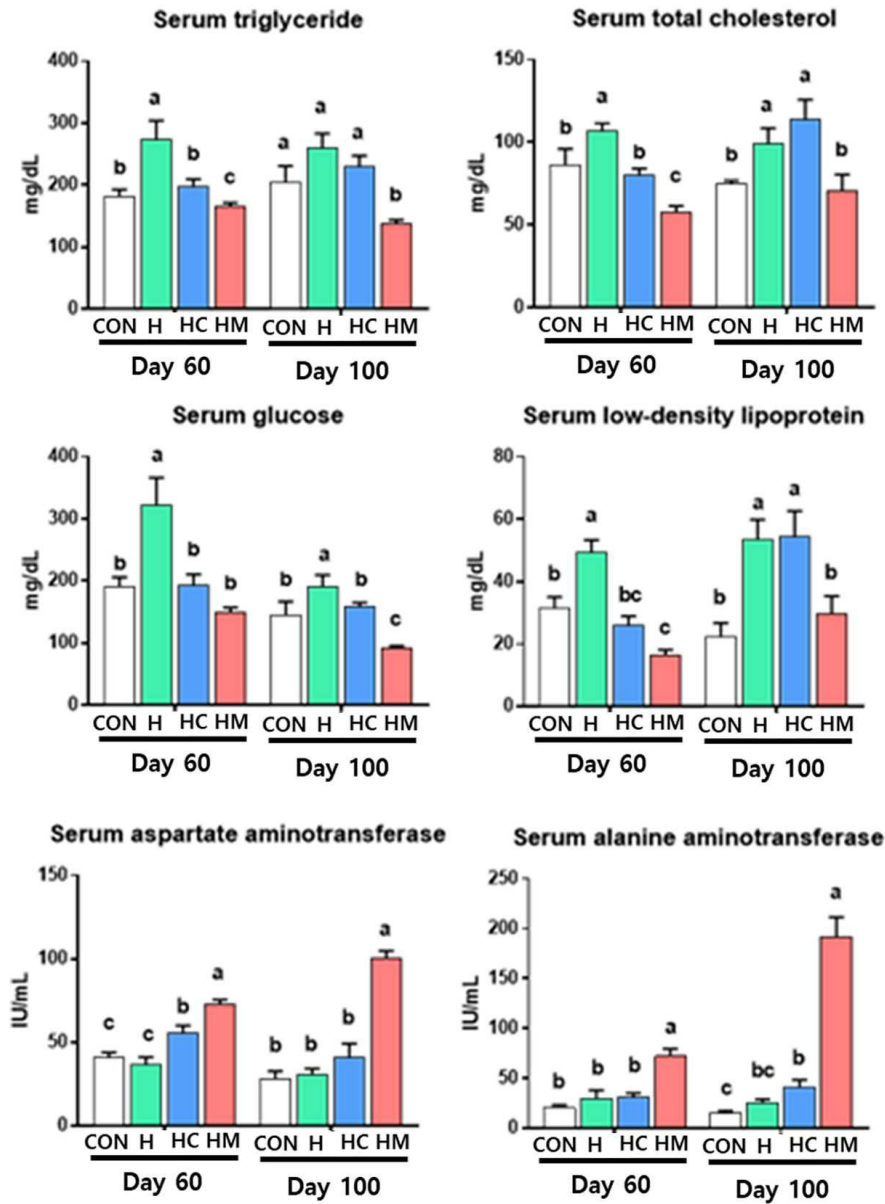
도면1



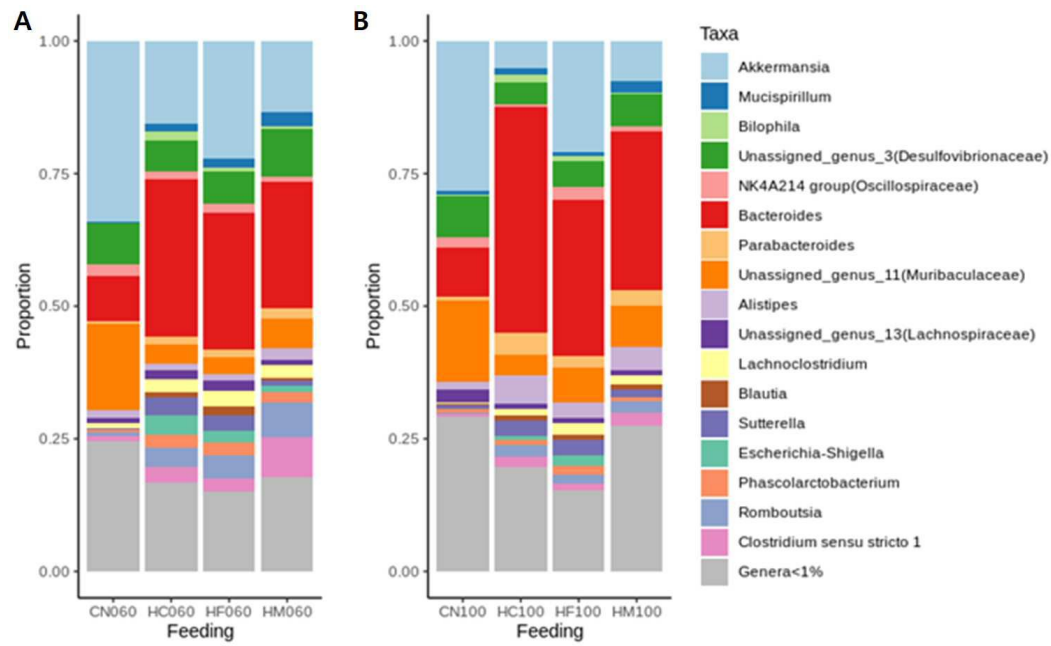
도면2



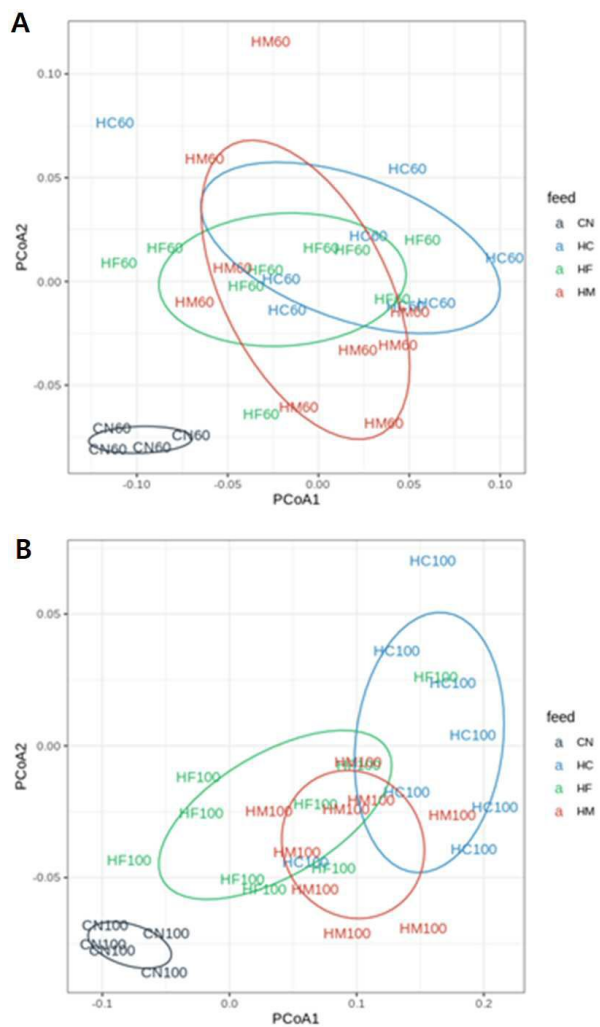
도면3



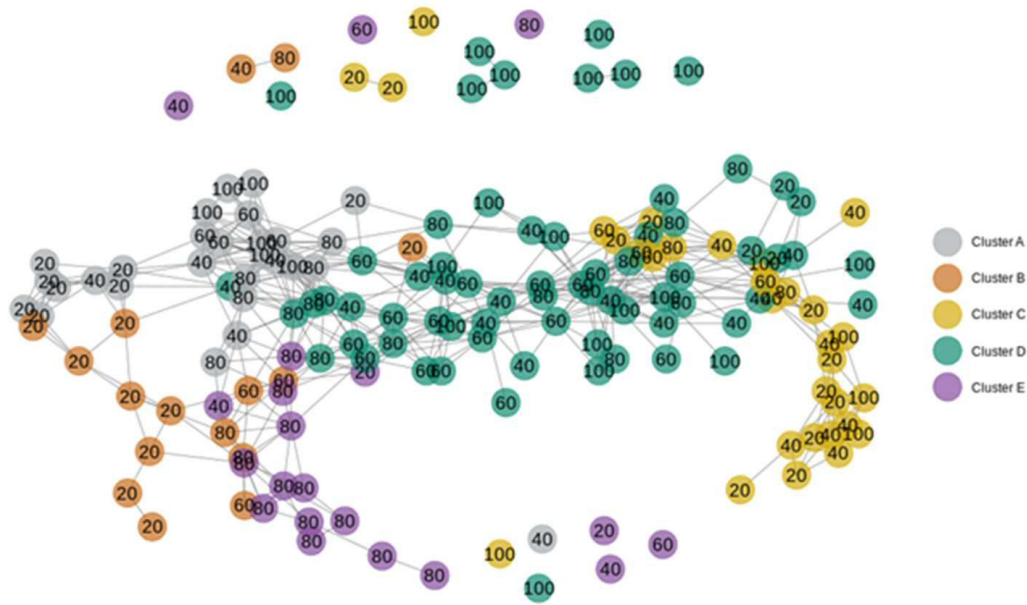
도면4



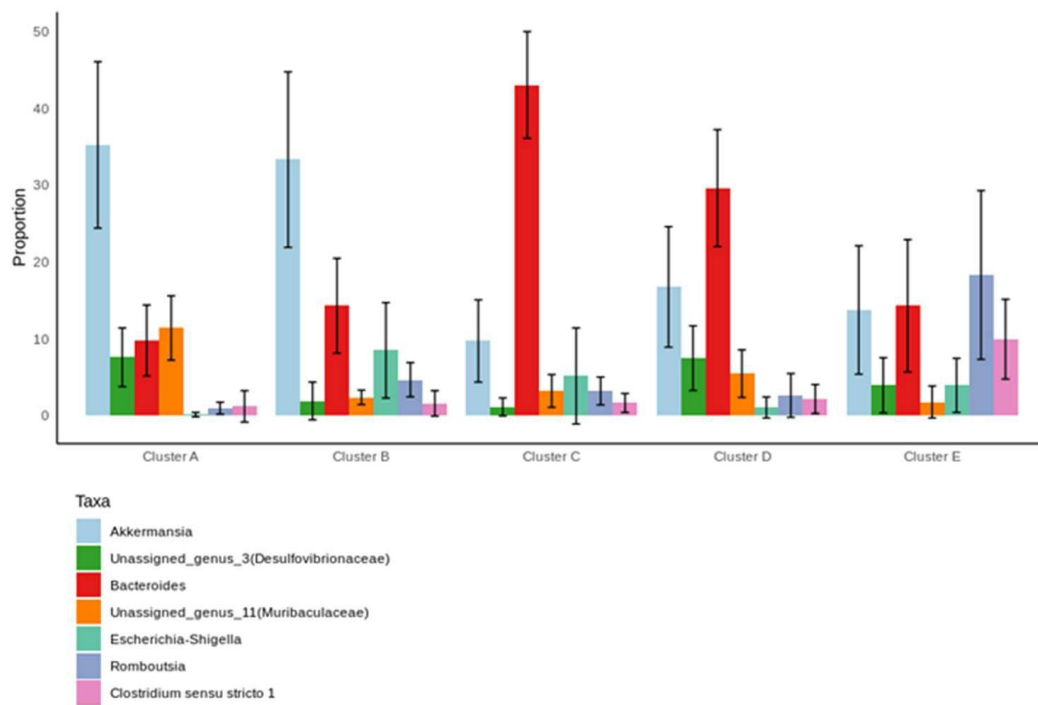
도면5



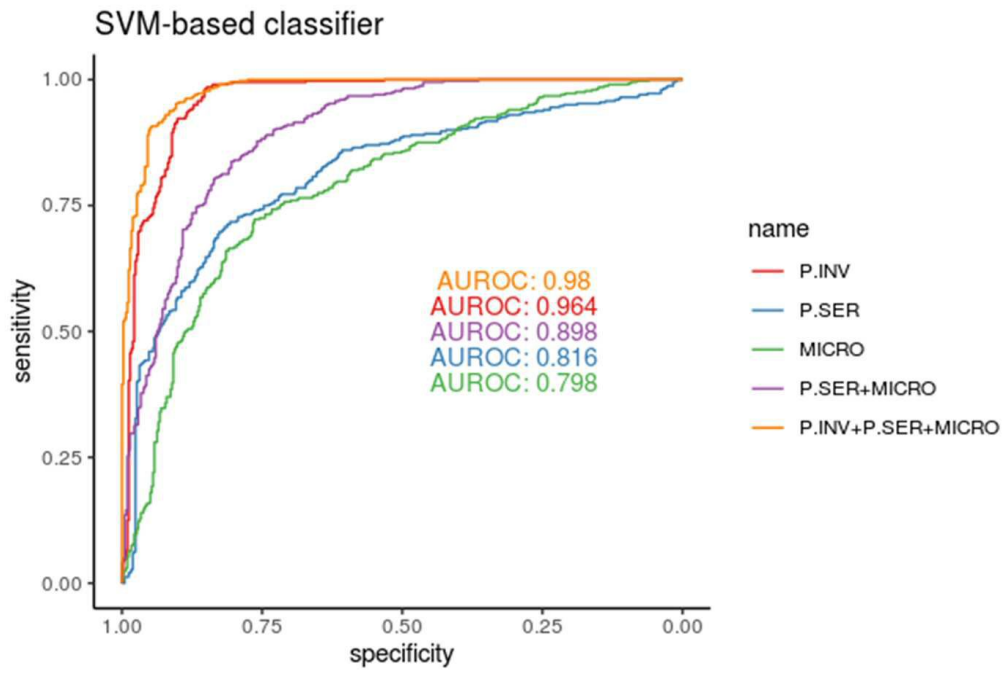
도면6



도면7



도면8



도면9

