



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0070441
(43) 공개일자 2025년05월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/741 (2015.01) A23L 33/135 (2016.01)
A61P 1/00 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 35/741 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2023-0156650
(22) 출원일자 2023년11월13일
심사청구일자 2023년11월13일
- (71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
- (72) 발명자
석기태
강원특별자치도 원주시 늘품로 199, 109동 1032호
(반곡동, 원주반곡아이파크)
- 윤상준
강원특별자치도 춘천시 전원안길33번길 11, 401호
(교동)
- 김동준
강원특별자치도 춘천시 후석로 325, 102동 2408호
(후평동, 춘천더샵아파트)
- (74) 대리인
특허법인본

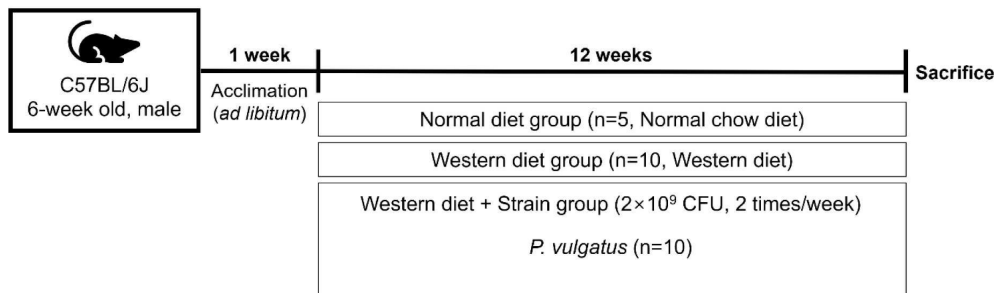
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 포카이콜라 불가투스를 포함하는 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 포카이콜라 불가투스를 포함하는 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에서 19-HETE의 섭취가 고지방식으로 유도된 비 알코올성 지방간 마우스의 간 조직에서 지방 축적을 감소시키고 병리학적으로 지방대사 개선 및 염증 억제 효과 확인하였다. 그 결과 비 알코올성 지방간에 대한 치료를 위한 건강기능식품 및 의약품 등에 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 1/00 (2018.01)

A61P 1/16 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2200/32 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345366507
과제번호	2020R1A6A1A03043026
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	장내 마이크로바이옴을 이용한 간질환 진단 및 치료기술 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	한림대학교
연구기간	2020.06.01 ~ 2029.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711159001
과제번호	2018M3A9F3020956
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발
연구과제명	장내 마이크로바이옴을 활용한 만성간질환 치료용 파마바이오틱스 후보제 발굴 및
효능검증	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	한림대학교
연구기간	2018.04.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 균주를 포함하는, 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 지방간 질환은 비알코올성 지방간 질환인, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 균주는 염증성 사이토카인 유전자인 $Tnf-\alpha$, $Il-6$ 의 mRNA 발현 수준을 감소시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 균주는 지질 대사 관련 유전자인 *Srebp-1c*, *FAS*, *CD36*의 mRNA 발현 수준을 감소시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 균주는 *ZO-1*, *Occludin* 및 *Claudin-1*의 유전자 발현 수준을 증가시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 균주는 박테리오테테스(*Bacteroidetes*) 미생물에 대한 피르미큐테스(*Firmicutes*) 미생물의 비율을 감소시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 7

포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 균주를 포함하는, 지방간 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 지방간 질환은 비알코올성 지방간 질환인, 식품 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 균주는 염증성 사이토카인 유전자인 $Tnf-\alpha$, $Il-6$ 의 mRNA 발현 수준을 감소시키는 것인, 식품 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 균주는 지질 대사 관련 유전자인 Srebp-1c, FAS, CD36의 mRNA 발현 수준을 감소시키는 것인, 식품 조성물.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 균주는 지질 대사 관련 유전자인 Srebp-1c, FAS, CD36의 mRNA 발현 수준을 감소시키는 것인, 식품 조성물.

청구항 12

포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 균주를 포함하는, 장 장벽의 손상 개선용 약학적 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 균주는 ZO-1, Occludin 및 Claudin-1의 유전자 발현 수준을 증가시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 균주는 박테리오테테스(*Bacteroidetes*) 미생물에 대한 피르미큐테스(*Firmicutes*) 미생물의 비율을 감소시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 15

포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 균주를 포함하는, 장 장벽의 손상 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 균주는 ZO-1, Occludin 및 Claudin-1의 유전자 발현 수준을 증가시키는 것인, 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 포카이콜라 불가투스를 포함하는 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 대사관련 지방간 질환(Metabolic associated fatty liver disease, MAFLD)은 전 세계적으로 약 10억명의 사람들에게 미치는 광범위한 질병 스펙트럼으로, 기존의 단순한 비알코올성 지방간질환(NAFLD)과 더불어 고위험 요인인 대사 기능 장애를 포함한다. MAFLD는 간의 기능 저하 및 염증, 활성산소 생성 등을 통해 간 세포의 손상이 나타난다. 이로 인해 지방간 및 간염 등으로 진행되면 결국 간경변, 간암 및 간 질환 악화 및 만성 간질환이 발생한다.

[0003] 간과 장 사이에는 밀접한 관계성이 존재한다. 간문맥계(hepatic portal system)를 통한 장과 간 사이의 해부학적 연결고리는 장-간 축(gut-liver axis)이라고 불리며 장과 간 사이의 연결에 기반하여 영양소뿐만 아니라 장내 미생물총의 대사 부산물이 전달되어 간 병리 및 상태에 영향을 줄 수 있다. 이러한 시스템은 장에서부터 혈액을 받아 간으로 전달되어 간에 영향을 미칠 수 있고 반대로 간에서 장 내강으로 담즙 분비를 통해 장 기능에도 영향을 미칠 수 있다.

[0004] 우리 몸에 존재하는 수십억 개의 세균을 미생물총(microbiome)이라고 하며, 특히 장 내 서식하는 장내 미생물총은 사람의 대사, 면역, 영양 등의 기능과 관련이 있고, 유입된 외부 인자 및 환경과 상호작용을 포함하여 다양

하고 중요한 역할을 한다. 최근에는 장-뇌 축(Gut-brain axis) 및 장-간 축 과도 연관이 있다고 알려져 있다. 이러한 장내 미생물의 조성은 개인, 가족, 인종, 성별, 나이, 식습관, 지역, 생활방식 등 다양한 원인 및 환경 요인에 의하여 역동적으로 변화한다[Minyu Song et al. A Review on Bifidobacterium for human health. Journal of Dairy Science and Biotechnology 2017; 35(2):73-83].

[0005] 프로바이오틱스(Probiotics)는 미생물총 조절 및 숙주에 이점을 제공하는 살아있는 미생물군으로, 2001년 유엔 식량 농업기구(FAO)와 세계 보건기구(WHO)가 소집한 전문가 패널이 '적정 양 투여 시 숙주에게 건강상의 이점을 부여하는 살아있는 미생물'로 정의하였다. 프로바이오틱스는 병원성 세균과 영양소 및 부착 부위 경쟁을 통한 증식 억제와 박테리오킨(bacteriocin), 단쇄지방산(short chain fatty acid; SCFA)과 같은 항균물질 분비, 장 상피 내막의 장벽 기능 개선, 면역 반응 조절 및 면역 체계와 신경 전달 물질 생산을 통해 신체의 다른 기관에 영향을 주는 등의 메커니즘을 통하여 유익한 효과를 발현한다. 프로바이오틱스는 장 상피세포에 대한 높은 부착 능력을 가지며, 숙주 세포 표면에 존재하는 표적 분자에 대한 장 병원성 물질의 접근을 제한한다. 또한 장내 미생물군과 일부 프로바이오틱스는 복잡한 탄수화물이나 비타민 및 기타 필수 화합물 생산 및 분해와 같이 인간 숙주에 존재하지 않는 생화학적 경로 및 메커니즘을 담당하는 단백질을 암호화하는 유전자를 가지고 있다. 현재에도 MAFLD에 유의미하게 적용되는 프로바이오틱스는 크게 알려지지 않았으며, 이를 이용하여 질환 억제 및 예방의 기전을 규명하기 위해 더욱 많은 연구가 필요하다.

[0006] 포카이콜라 불가투스(P. vulgatus)는 박테로이드과(Bacteroidaceae)에서 우세한 종 중 하나다. 주로 사람의 분변에서 분리하여 사용되어지는 상호적 혐기성 그람 음성 간균으로, 소화와 미생물 균형에 기여하는 유익균으로 알려져있다. P.vulgatus의 다양한 유용성과 활성을 이용하여 지질 대사 질환 및 심장질환을 완화할 수 있다는 연구 결과가 있고[Mingchao Xu et al. Bacteroides vulgatus Ameliorates Lipid Metabolic Disorders and Modulates Gut Microbial Composition in Hyperlipidemic Rats. Jan 2023. Applied and Industrial Microbiology.], 이는 P.vulgatus가 대사 질환 억제에 효과가 있음을 암시한다.

[0007] 본 발명에서는 대사질환의 일종인 비알코올성 지방간(NAFLD)을 유도한 마우스 모델에서 P.vulgatus 균주 투여로 인해 장내 미생물총이 조절되어 지방간염 정도를 개선시킴을 확인하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 포카이콜라 불가투스(Phocaeicola vulgatus) 균주를 포함하는, 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 또한, 포카이콜라 불가투스(Phocaeicola vulgatus) 균주를 포함하는, 지방간 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명은 또한, 포카이콜라 불가투스(Phocaeicola vulgatus) 균주를 포함하는, 장 장벽의 손상 개선용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명은 또한, 포카이콜라 불가투스(Phocaeicola vulgatus) 균주를 포함하는, 장 장벽의 손상 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 본 개시의 목적들은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 본 개시의 다른 목적 및 장점들은 하기의 설명에 의해서 이해될 수 있고, 본 개시의 실시 예에 의해 보다 분명하게 이해될 것이다. 또한, 본 개시의 목적 및 장점들은 특허 청구 범위에 나타난 수단 및 그 조합에 의해 실현될 수 있음을 쉽게 알 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 포카이콜라 불가투스(Phocaeicola vulgatus) 균주를 포함하는, 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 포카이콜라 불가투스(Phocaeicola vulgatus) 균주를 포함하는, 지방간 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한, 포카이콜라 불가투스(Phocaeicola vulgatus) 균주를 포함하는, 장 장벽의 손상 개선용 약학적 조성물을 제공한다.

- [0016] 본 발명은 또한, 포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 균주를 포함하는, 장 장벽의 손상 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0017] 상기 지방간 질환은 비알코올성 지방간 질환일 수 있다.
- [0018] 상기 비알코올성 지방간 질환은 비알코올성 단순 지방간, 영양성 지방간, 기아성 지방간, 비만성 지방간, 당뇨병성 지방간, 비알코올성 지방간염, 간섬유화 및 간경화로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [0019] 상기 포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 균주는 염증성 사이토카인 유전자인 $Tnf-\alpha$, $Il-6$ 의 mRNA 발현 수준을 감소시키는 것일 수 있다.
- [0020] 상기 포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 균주는 지질 대사 관련 유전자인 *Srebp-1c*, *FAS*, *CD36*의 mRNA 발현 수준을 감소시키는 것일 수 있다.
- [0021] 상기 포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 균주는 ZO-1, Occludin 및 Claudin-1의 유전자 발현 수준을 증가시키는 것일 수 있다.
- [0022] 상기 포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 균주는 박테리오테테스(*Bacteroidetes*) 미생물에 대한 피르미큐테스(*Firmicutes*) 미생물의 비율을 감소시키는 것일 수 있다.
- [0023] 상기 포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 균주는 비 알코올성 지방간의 정도를 진단하기 위해 사용되는 NAS 수준을 낮추는 것일 수 있다.
- [0024] 상기 포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 균주는 CD68 염증 수치를 낮추는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0026] 본 발명은 포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 균주를 포함하는, 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명은 또한, 포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 균주를 포함하는, 지방간 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0028] 본 발명은 또한, 포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 균주를 포함하는, 장 장벽의 손상 개선용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0029] 본 발명은 또한, 포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 균주를 포함하는, 장 장벽의 손상 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0030] 본 발명에 따르면, 사람의 분변에서 유래된 균주 포카이콜라 불가투스(*P. vulgatus*) 균주는 유해균 억제 효능이 있다. 또한, 본 발명에 따른 포카이콜라 불가투스(*P. vulgatus*) 균주를 고지방 고탄수화물 식이 섭취를 통한 비알코올성 지방간 질환 유도 마우스에 투여하였을 경우 간 지방증으로부터 보호 및 억제시키는 효과를 가지므로 대사 질환의 일종인 비알코올성 지방간질환에 대한 예방 및 치료에 이용될 수 있으며, 더 나아가 다른 대사 질환에서도 긍정적인 효과를 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0031] 도 1은 Western diet 식이 섭취로 유도한 비알코올성 지방간 마우스 모델을 이용한 실험 방법의 흐름도를 나타낸다.
- 도 2는 Western diet 모델에서 *P. vulgatus* 균주 투여를 통한 간 조직 병리학적 스코어, CD68 염증 반응, 총콜레스테롤 분석 결과를 나타낸 결과이다.
- 도 3은 Western diet 모델에서 *P. vulgatus* 균주 투여 시의 염증 인자 및 간내 지질 대사 인자를 비교한 결과이다.
- 도 4는 Western diet 모델에서 *P. vulgatus* 균주 투여를 통한 장내 접합 유전자 및 단백질 수준의 변화를 비교한 결과이다.
- 도 5는 Western diet 모델에서 *P. vulgatus* 투여로 인한 장내미생물총 변화, 분포 비교도 및 다양성, 기능적 바

이오 마커를 분석한 결과이다.

도 6은 간 조직 microarray 분석과 KEGG 기반의 Jak-STAT 연관 기전 확인 및 *P. vulgatus* 투여를 통한 발현을 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 본 발명에서 상기 "지방간 질환"은 정상 간의 경우 지방이 차지하는 비율은 5 % 이내인데, 이보다 많은 지방(주로 중성지방)이 간 내에 축적되어 발생하는 질환을 말한다. 지방간은 크게 과도한 음주로 인한 알코올성 지방간과 비만, 당뇨병, 고지혈증, 약물과 관련된 비알코올성 지방간으로 나눌 수 있다. 알코올성 지방간의 경우 알코올을 많이 섭취하게 되면 간에서 지방 합성이 촉진되고 정상적인 에너지 대사가 이루어지지 않아 발생하게 된다. 한편, 술을 마시지 않는 비알코올성 지방간 환자 중 간염이 관찰되는 경우가 있는데, 이러한 경우를 지방간과 구별하여 지방간염이라고 한다. 지방간염은 간에 지방이 축적될 뿐 아니라 간세포가 괴사되는 염증 징후가 동반된 경우를 말한다. 지방간과 지방간염이 진행되는 원인에 대하여는 밝혀진 바가 없다. 본 발명에서 지방간 질환은 알코올성 지방간 질환 또는 비알코올성 지방간 질환을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명에서 상기 "비알코올성 지방간 질환(Nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD)"은 음주나 지방간을 초래할 수 있는 다른 원인이 없음에도 알코올 간 질환과 유사한 조직학적 소견을 보이는 질환으로 단순 지방간(simple steatosis), 비알코올성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis; NASH), 간 섬유화와 최종적인 간경변증을 포함하는 일련의 질환 군에 해당한다. 비알코올성 지방간은 비만, 성인형 당뇨병, 고지혈증 등의 대사증후군과 연관되어 나타나는데 과도한 열량을 계속 섭취하게 되면 체내 지방세포 및 간에 지방이 축적되고 증가된 지방에서 간에 해로운 여러 가지 물질(사이토카인)이 분비되어 지방간염과 간경변증으로 진행하게 된다. 그 외에도 스테로이드, 소염진통제, 심장약 등의 약물이나 일부 한약 혹은 여러 가지 민간요법으로도 지방간이 될 수 있다. 지방간 질환의 진단에 조직검사가 반드시 필요한 것은 아니나, 지방간염으로 진행되었는지를 확인하기 위해서는 조직검사가 현재로서는 가장 정확한 검사이나 침습적인 검사에 해당하므로 개선된 진단 방법이 요구되는 실정이다. 본 발명에서 비알코올성 지방간 질환은 비알코올성 단순 지방간, 영양성 지방간, 기아성 지방간, 비만성 지방간, 당뇨병성 지방간, 비알코올성 지방간염, 간섬유화 및 간경화 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명에서 사용된 용어 "치료"는 유익하거나 바람직한 임상 결과를 얻기 위한 접근법으로서, 본 발명의 목적을 위해 유익하거나 바람직한 임상적 결과를 감지 가능하거나 가능하지 않거나를 불문하고, 또한 부분적이든 전체적이든 상관없이 증상의 완화, 질환 정도의 감소, 질환의 안정화된(즉, 더 나빠지지 않는) 상태, 질환 진행의 지연 또는 속도감소, 질환 상태의 개선 또는 일시적 완화 및 경감을 포함한다.
- [0035] 본 발명에서 사용된 용어 "예방"은 상기 약학적 조성물을 이용하여 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 따라서, 본 발명은 치료법적 치료 및 예방적인 차원의 것들 모두를 가리킨다.
- [0036] 본 발명의 약학적 조성물은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양, 즉 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양인 치료상 유효량으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 대한 치료상 유효투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 통상의 기술자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 통상의 기술자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 용어, "식품 조성물"은 그를 섭취하는 대상체에 제공되는 영양소에 관계없이, 그 생물의 하나 이상의 기능에 유리하게 작용하여 보다 나은 건강 상태를 제공하는 식품을 의미한다. 결과적으로, 상기 식품 조성물은 질병 또는 질병-유발 인자의 예방, 개선 또는 치료를 위해 사용될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 식품 조성물은 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 식품학적으로 허용 가능하거나 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 식품 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0039] 포카이콜라 불가투스 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 변경될 수 있음은 물론이며, 상기 포카이콜라 불가투스는 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01~95중량%로 포함되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 1~80중량%로 포함되는 것이다. 그 함량이 0.01중량% 미만일 경우에는 복용 효용성이 떨어질

수 있으며, 95중량%를 초과할 경우에는 제형화의 어려움이 있을 수 있다.

- [0040] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명의 포카이콜라 불가투스를 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농 제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료, 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강 식품 및 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [0041] 여기서, "건강기능식품"이란, 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 포함하며, 영양 공급 외에도 본 발명의 목적상 지방간 질환의 개선, 예방, 생체 방어, 면역, 회복 등의 생체 조절 기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료 효과가 높은 식품을 의미한다.
- [0043] 이하 본원을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본원의 범위가 이들 실시예 및 시험예에 한정되는 것은 아니다.
- [0045] 실시예 1. 포카이콜라 불가투스(*Phocaeicola vulgatus*) 조성물의 준비
- [0046] 포카이콜라 불가투스(*P. vulgatus*) 균주는 CJ 바이오사이언스(구 천랩)에서 제공받았다. *P. vulgatus* 균주는 동결보존상태(vial)로 전달받았다. *P. vulgatus*는 혐기성 조건 하에서 RCM 고체배지에 도말 및 배양하였으며, 마우스에게 급여 시 마리 당 2×10^9 CFU/100 μ l의 농도로 PBS에 현탁 하여 주 2회 경구투여 하였다.
- [0048] 실시예 2. 비알코올성 지방간염증 마우스 모델 유도 및 분석방법
- [0049] 동물모델 평가를 위해 특정 병원체가 없는 6주령의 C57BL/6J 수컷 마우스를 두얼바이오텍(서울, 한국)에서 구매하였다. 모든 마우스들은 12/12시간 명/암 주기로 $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 온도에서 전용 케이지에 개별적으로 수용하였다. 실험 진행동안 모든 마우스들은 물과 음식에 자유롭게 접근할 수 있도록 하였다. 실험은 모든 그룹에 대한 적응기간을 포함하였고, 적응기간 동안에는 일반 사료(Normal chow diet)를 제공하였으며, 적응기간 이후 지방간질환 유도 마우스는 Western diet를 제공하였다. 실험동물들은 인도주의적 치료를 받았으며 모든 절차는 실험실 동물의 관리 및 사용을 위한 국립보건원 지침을 따랐으며 한림대학교 의과대학 동물실험 및 사용위원회(Hallym 2019-73)의 승인을 받았다.
- [0050] 식이 섭취로 비알코올성 지방간 모델을 유도하기 위해 고지방 고탄수화물 식이인 Western diet(WD)를 두얼바이오텍에서 제조하여 적응기간 이후 12주간 자유롭게 섭취하도록 하였다. *P. vulgatus*는 2×10^9 CFU/100 μ l의 농도로 PBS에 현탁 후 경구투여하였다. 비알코올성 지방간 모델 마우스 실험은 3개의 그룹: 정상식이 대조군(NC, n=10), 비알코올성 지방간질환 유도 그룹(WD, n=10), 비알코올성 지방간 질환 유도와 함께 *P. vulgatus*를 투여한 그룹(PV, n=10)으로 분류하였다(도 1).
- [0051] WD 급여 및 *P. vulgatus* 투여 12주 후, 이소플루란(하나제약, 한국) 흡입 마취를 통해 동물을 희생시켜 체중 및 간 무게 측정, 혈액, 간, 장 조직 등의 샘플들을 분리했다. 전혈(800 μ L~1mL) 샘플은 원심 분리(13,500g, 5분) 후 혈청을 분리하여 혈액생화학분석을 진행했다. 간, 장 조직 및 대변은 빠르게 분리하여 -80°C 에 보관 및 검진, 실험 등에 이용했다.
- [0053] 1) 간 조직의 병리학적 분석 및 혈중 콜레스테롤 분석
- [0054] 분리된 간조직을 10% 포르말린으로 고정 후 파라핀에 매립시키고, 조직 섹션을 hematoxylin & eosin (H&E) CD68 Immunohistochemistry (IHC) 염색을 하였다. H&E 염색에서는 비알코올성 지방간질환의 정도를 진단하기 위해 사용되는 병리학적 분석인 NAS (비 알코올성 지방간 질환 활성 스코어(Non-alcoholic fatty liver disease Activity Score)를 지방증(Steatosis), 소엽 염증(lobular inflammation), 풍선 변형(ballooning) 세 항목을 평가하여 합산하였다. 총 점수 0~2: not NASH, 3~4: NASH borderline, >5: NASH])를 확인 및 평가하였다. CD68 IHC 염색에서는 대식세포 및 면역세포 등을 비교하여 염증 및 면역 반응 상태를 확인하였다. 상기와 같이 제시된 병리학적 분석법에 따라 정상식이를 섭취한 대조군에 비해 WD를 섭취한 실험군에서 높은 수치의 NAS와 CD68

염증 반응을 기록하였고, *P. vulgatus* 투여군에서는 NAS와 CD68 염증 반응이 감소하였다(도 2).

[0055] 채취한 전혈 샘플은 원심분리하여 혈청을 분리하였고, 분리한 혈청은 총 콜레스테롤 양(total cholesterol; CHOL)을 혈액생화학분석기(KoneLab 20, Thermo Fisher Scientific, Finland)를 이용하여 측정하였다. 도 2에서 같이 일반식을 먹은 대조군인 NC군에 비해 Western diet를 섭취한 NAFLD 유도군에서는 CHOL의 수치가 증가하였고, Western diet와 더불어 *P. vulgatus*를 섭취한 실험군에서는 CHOL 수치가 감소하였다. 간 무게 대비 몸무게 비율(L/B ratio)또한 Western diet를 섭취한 그룹보다 *P. vulgatus*를 투여한 그룹에서 유의적으로 감소함을 보였다. 상기 결과로부터 *P. vulgatus* 군주가 Western diet에 의해 유도되는 지질 대사 악화를 개선하는데 유용함을 입증할 수 있다.

[0056] 2) 간 조직 분석

[0057] 간 조직으로부터의 total mRNA 분리는 제조사의 지시에 따라 Trizol (Invitrogen, 미국)를 사용하여 수행했다. cDNA 합성 키트(applied biosystems, 미국)를 사용하여 mRNA (2 µg)를 cDNA로 합성했다. cDNA는 SYBR green kit (applied biosystems, 미국) 및 각 표적의 프라이머를 사용하여 실시간 정량적 PCR (real time PCR, qPCR)을 수행하였다.

[0058] qPCR 방법을 이용하여 *P. vulgatus*가 면역 기전에 유용성을 보이는지에 대하여 염증성 사이토카인 유전자인 *Tnf-α*, *Il-6*, 지질 대사 관련 유전자인 *Srebp-1c*, *Ppar α*, *FAS*, *CD36*의 mRNA level을 분석하였다. 추가로 ELISA를 수행하여 혈액 내독소 수준을 분석하였다. Western diet 급여군에서는 염증성 사이토카인, 지질 유입 및 대사 관련 유전자, 혈액 내독소 수준이 증가하였고, *P. vulgatus* 군주 투여군에서는 해당 인자 및 혈액 내독소 수준이 저하됨을 확인하였다(도 3). 상기 결과들은 *P. vulgatus*의 섭취는 NAFLD로 인한 간 염증 및 간 내 지방 생성과 대사를 개선시킬 수 있음을 보여준다.

[0059] 3) 장 장벽 조직 비교분석

[0060] 소장 및 대장 조직으로부터 mRNA 분리 및 분석은 상기 방법과 동일하게 진행하였으며, 장 장벽 및 세포 접합 지표인 ZO-1과 Occludin을 확인하였다. 추가로, Pro-prep (Intronbio, 한국)를 사용하여 단백질 분리 및 정량 후 western blot을 진행하여, 장 장벽 단백질(Occludin, Claudin-1) 수준을 정량 비교하였다.

[0061] qPCR 결과, *P. vulgatus* 투여군의 소장 및 대장에서 ZO-1과 Occludin의 유전자량 증가를 확인하였으며, western blot 결과에서도 장 장벽 유전자 Occludin과 Claudin-1의 발현 정도가 증가한 것을 확인하였다(도 4). 장-간 축의 기전 및 시점에서 해당 결과들은 지방간 및 간 질환에 장 장벽 및 장 상태가 영향을 줄 수 있으며, *P. vulgatus*의 섭취는 장내 환경 및 장 장벽을 안정적으로 유지할 수 있음을 보여준다.

[0062] 4) 장내 미생물 구성 및 다양성, 기능 분석

[0063] 장내 미생물 군집 분석은 특정 샘플 및 환경의 미생물의 군집을 16S rRNA를 NGS로 sequencing하여 전체 미생물의 분포를 살펴보는 분석으로 장내 미생물의 분포 및 상태에 따라 비만 및 아토피, 대장염 및 대장암 등 다양한 질병과 관련이 있다는 연구가 보고됨에 따라 활발히 연구가 이루어지고 있는 추세이다. [Pooja M et al. Probiotics: An approach towards health and disease. Trends in Biosciences. 7 (20), 2014.]

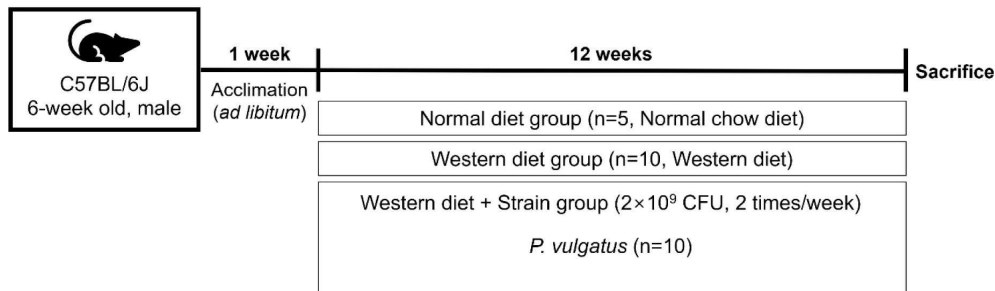
[0064] 대변으로부터의 DNA 분리는 QIAamp fast stool kit (Qiagen, 미국)를 사용하여 수행했다. 추출한 DNA는 미생물 군유전체 프로파일링을 위해 천랩에 의뢰하여 16S rRNA 기반의 Microbial Taxonomic Profiling 플랫폼을 사용하였고, 유전자 분석 및 장내 미생물을 분석하였으며, 이를 통해 장내 미생물의 분포 및 구성, Firmicutes to Bacteroidetes ratio (F/B ratio), 알파-다양성 지수와 베타-다양성, 바이오마커 등을 평가하였다(도 5).

[0065] 미생물 군집내 다양성을 나타내는 알파 다양성은 ACE와 Shannon 분석으로 차이를 확인하였고, 미생물 군집 간의 다양성 차이를 나타내는 베타 다양성 또한 그룹 간의 차이를 보였다. 문(phylum)계열 분포에서 Western diet 섭취 시 Bacteroidetes가 감소하고 Firmicutes와 Proteobacteria가 증가하지만 *P. vulgatus*를 함께 섭취한 그룹에서는 Bacteroidetes가 증가하고 Proteobacteria가 감소하여 분포가 회복되는 양상을 보인다. 이를 통하여 박테리오테테스(Bacteroidetes) 미생물에 대한 피르미쿠테스(Firmicutes) 미생물의 비율(F/B ratio)를 확인하였을 때, Western diet 섭취군보다 *P. vulgatus* 섭취군에서 감소함을 보였다. 속(Genus)계열 분포에서 비교하였을 때, *P. vulgatus*에서는 Bacteroides 속 (Phocaeicola의 이전 이름)이 증가하여 장내 정착을 확인하였으며, Western diet 섭취군에서 증가하는 추세를 보인 Helicobacter 속이 *P. vulgatus* 섭취군에서 감소세를 보였다. Functional biomarker 비교분석에서도 cell motility 및 에너지 및 지질 대사(metabolism) 관련 기능에서 차이를 보여주었다.

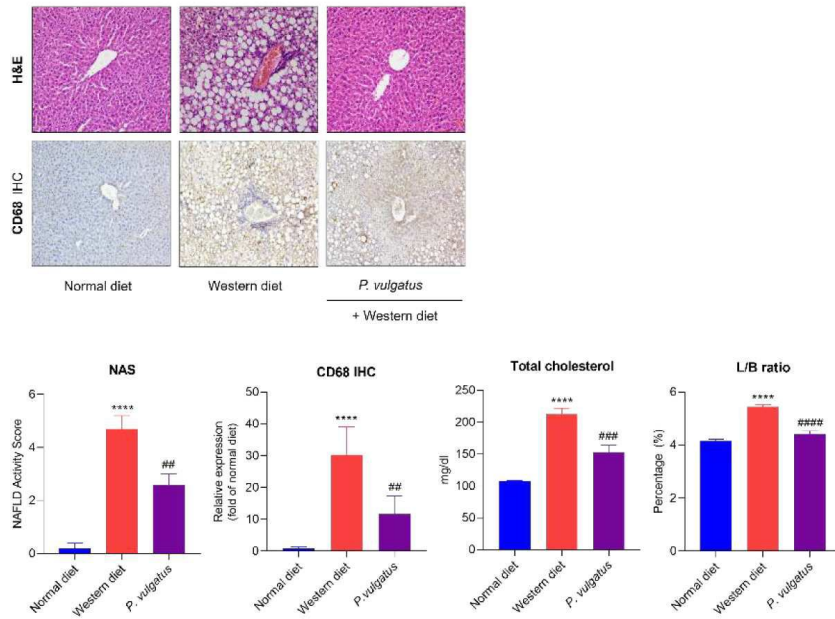
- [0066] 5) 간 조직 microarray 분석
- [0067] 실험동물의 간 조직에서 mRNA를 추출하여 microarray를 통해 분석을 진행하였으며, microarray는 이바이오젠(서울, 한국)에 의뢰하여 분석하였다(도 6).
- [0068] Microarray 비교는 Western diet 섭취군과 *P. vulgatus* 투여군을 비교분석 하였으며, 베타 다양성의 차이와 유전자 온톨로지 분석(Gene Ontology Biological Processes)으로 상향 조절 및 하향 조절되는 기능을 비교하였다.
- [0069] KEGG를 통해 Jak-STAT signaling pathway 및 관련 signal이 유의미한 차이가 있음을 확인하여 추가적으로 분석하기 위해 qPCR과 western blot으로 Jak-STAT signaling을 확인하였다. 추가로 대사 조절 및 세포 기능에 영향을 미치는 ERK, JNK도 분석하였으며, Western diet 섭취군과 *P. vulgatus* 투여군에서의 차이를 확인하였다.
- [0070] 6) 데이터 분석
- [0071] 연속 변수는 평균 및 표준편차로 분석하였다. 체중, 섬유화인자 및 조직학 분석을 위해 One-way ANOVA, the Kruskal-Wallis test, 그리고 independent sample T-test를 수행했다. 유의확률 $P < 0.05$ 는 통계적 유의성을 나타내는 것으로 간주된다. 모든 통계 분석은 SPSS 소프트웨어(ver. 19, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 수행하였다. *은 Normal chow diet를 먹은 대조군과 Western diet를 먹여 NAFLD를 유도한 그룹을, #은 Western diet를 먹인 그룹과 *P. vulgatus*를 투여한 실험군을 비교한 것이다.

도면

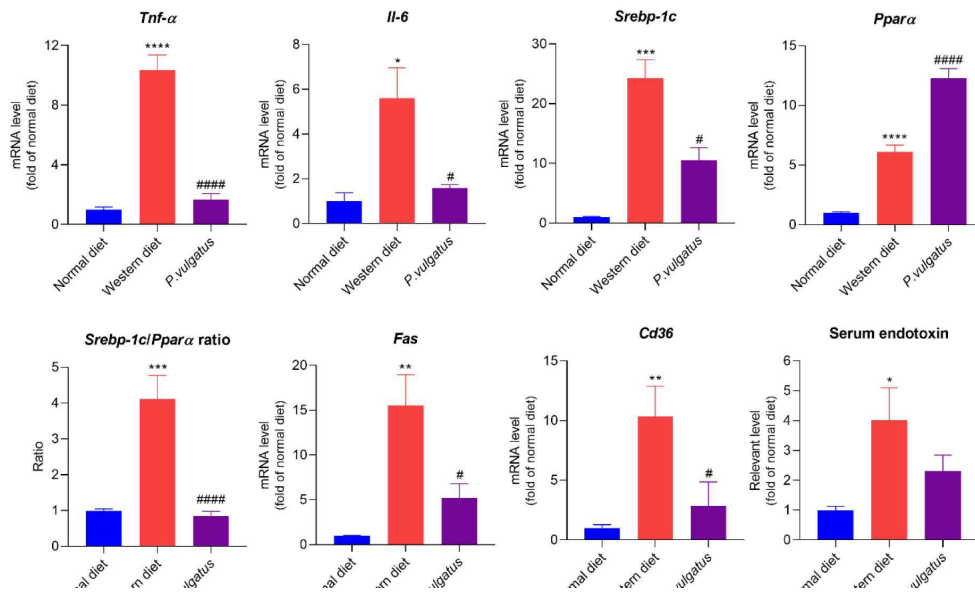
도면1



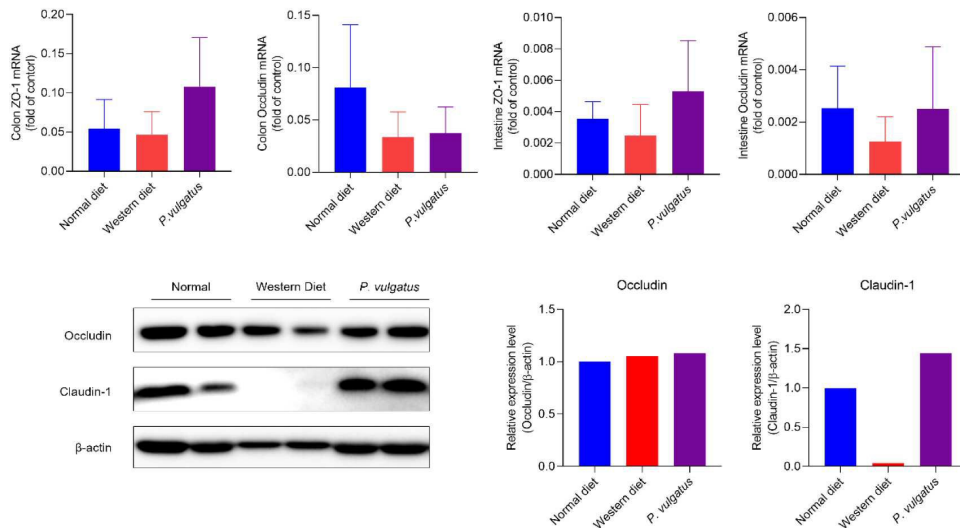
도면2



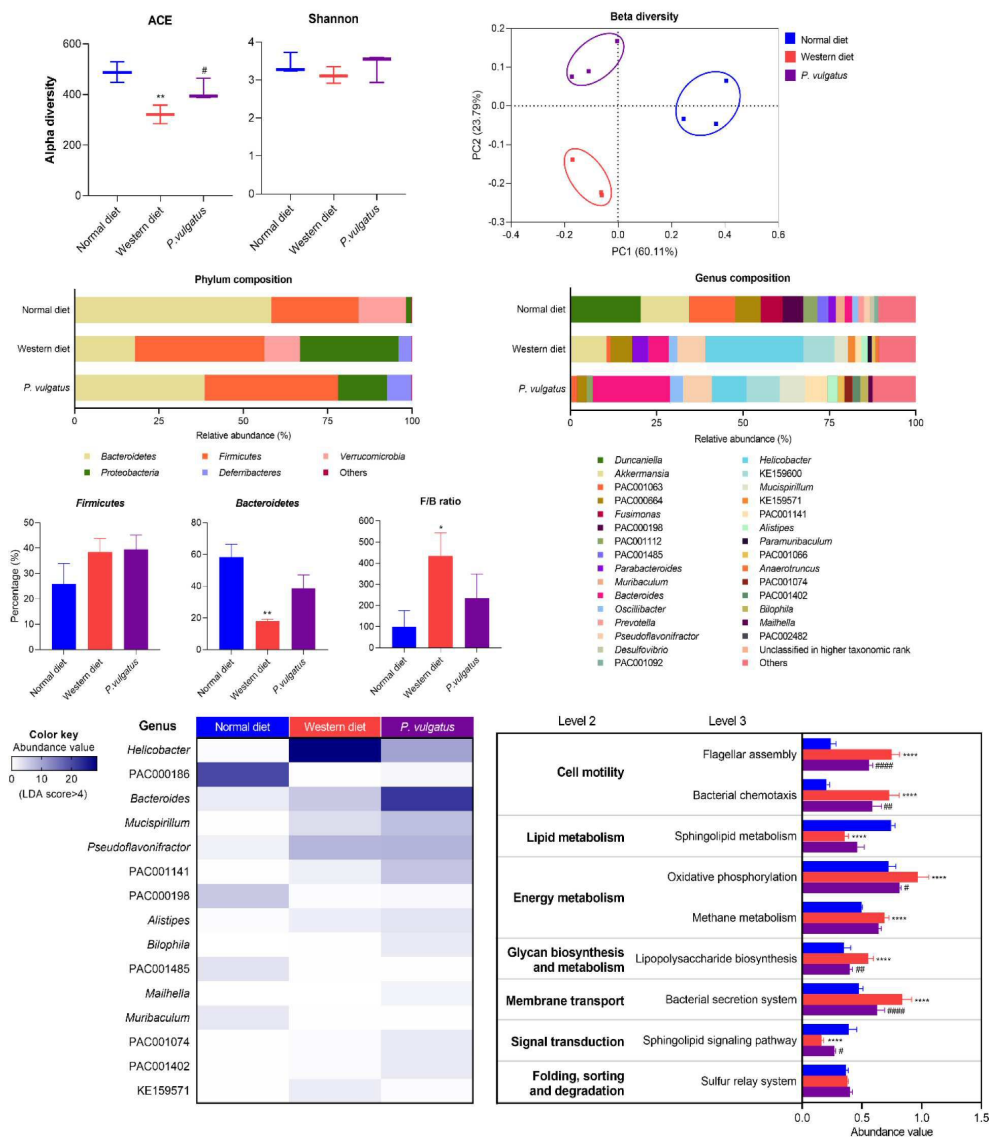
도면3



도면4



도면5



도면6

