



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0028009
(43) 공개일자 2024년03월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/405 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/405 (2013.01)
A61P 1/16 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-0105983
(22) 출원일자 2022년08월24일
심사청구일자 2022년08월24일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
석기태
강원도 원주시 늘품로 199, 109동 1032호(반곡동,
원주반곡아이파크)
민병현
경기도 남양주시 진접읍 내각1로89번길 2-19
김동준
강원도 춘천시 후석로 325, 102동 2408호(후평동,
춘천더샵아파트)
(74) 대리인
특허법인본

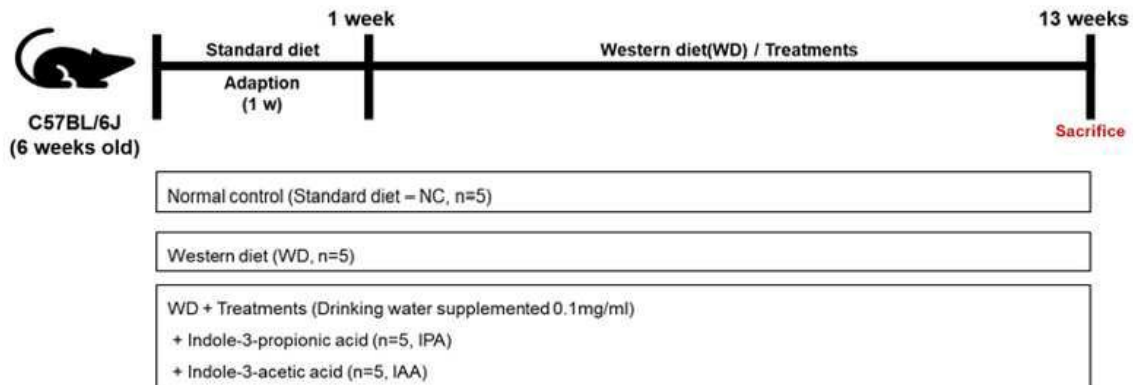
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 인돌-3-프로피온산 및 인돌-3-아세트산을 함유하는 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 억제
위한 조성물

(57) 요약

본 발명에 따르면, 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 예방 또는 억제하기 위한, 인돌-3-프로피온산(Indole-3-propionic acid, "IPA") 및 인돌-3-아세트산(Indole-3-acetic acid, "IAA")을 함유하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이 제공된다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345321142
과제번호	2020R1A6A1A03043026
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
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	1711071501
과제번호	2018M3A9F3020956
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발(R&D)
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

대상체의 비알코올성 지방간 질환을 예방 또는 억제하기 위한, 인돌-3-프로피온산(Indole-3-propionic acid, "IPA") 및 인돌-3-아세트산(Indole-3-acetic acid, "IAA")을 함유하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 IPA의 함량은 증류수 100ml를 기준으로 0.1mg/ml인, 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 예방 또는 억제하기 위한 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 IAA의 함량은 증류수 100ml를 기준으로 0.1mg/ml인, 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 예방 또는 억제하기 위한 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 4

대상체의 비알코올성 지방간 질환을 예방 또는 억제하기 위한, IPA 및 IAA를 함유하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염으로서, 상기 IPA 및 상기 IAA의 함량은 증류수 100ml를 기준으로 각각 0.1mg/ml인, 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 5

대상체의 비알코올성 지방간 질환을 예방 또는 억제하기 위한, IPA 및 IAA를 함유하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염으로서, 상기 예방 또는 억제는 상기 조성물 100ml를 주 3회씩 12주 동안 제공하는, 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 IPA의 함량은 증류수 100ml를 기준으로 0.1mg/ml인, 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 IAA의 함량은 증류수 100ml를 기준으로 0.1mg/ml인, 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 8

대상체의 비알코올성 지방간 질환을 예방 또는 억제하기 위한, IPA 및 IAA를 함유하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염으로서, 상기 예방 또는 억제는 상기 조성물 100ml를 주 3회씩 12주 동안 제공하고, 상기 IPA 및 상기 IAA의 함량은 증류수 100ml를 기준으로 각각 0.1mg/ml인, 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 9

대상체의 비알코올성 지방간 질환을 예방 또는 억제하기 위한, IPA 및 IAA를 함유하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염으로서, 상기 예방 또는 억제는 상기 조성물 100ml를 12주 동안 매주 월, 화, 수요일마다 제공하는, 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 트립토판의 대사산물인 인돌-3-프로피온산(Indole-3-propionic acid, "IPA")와 인돌-3-아세트산(Indole-3-acetic acid, "IAA")을 함유하는 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 IPA 및 IAA를 함유하는 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 억제를 위한 조성물에 관한 것이며, 더욱 구체적으로는 지방간 억제 효과, 간염 억제 효과 및 장내 미생물 조절 효과를 통해 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 억제를 달성하는 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 비알코올성 지방간 질환(Nonalcoholic fatty liver disease, "NAFLD")은 만성 간질환 중 가장 흔한 질환으로 알려져 있으며, 전세계적인 당뇨병과 대사증후군의 증가 추세를 바탕으로, 최근 아시아태평양 지역에서 NAFLD의 유병률 또한 점점 증가하고 있다. NAFLD는 시간이 지남에 따라 다른 지속성 NAFLD와 함께 비알코올성 지방간염(Nonalcoholic Steatohepatitis, "NASH")을 유발시켜 결과적으로 간경변 및 간암을 유발시킬 수 있는 것으로 알려져 있다(Friedman, S. L., Neuschwander-Tetri, B. A., Rinella, M., & Sanyal, A. J. (2018). Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nature medicine*, 24(7), 908-922.). NAFLD를 유발시키는 주된 원인 중 하나는 열량의 과잉 공급 및 이와 동시에 지방, 곡물, 과일, 야채, 단백질 및 오메가-3 지방산의 낮은 섭취와 같은 부적절한 식이 요법으로 알려져 있으며, NAFLD는 또한 장내 미생물 구성 및 대사 활동의 변화와 연관이 있는 것으로도 알려져 있다(Buzzetti, E., Pinzani, M., & Tsochatzis, E. A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*, 65(8), 1038-1048.).

[0003] 장내에는 수조 개의 미생물군이 있으며, 이는 "장내 미생물군"으로 통칭되고, 그 중 대부분은 장내 미생물총으로 불리는 공생 박테리아이다. 장내 미생물총은 건강에 매우 중요하며, 발달, 면역 반응 및 신진대사를 포함한 여러 생리학적 과정에 관여한다. 장내 미생물의 구성과 기능은 연령, 성별, 유전적 요인, 생활양식, 약물 또는 식이의 차이 등 다양한 요인에 의해 영향을 받을 수 있으며, 장내 미생물총은 위장관에 존재하는 모든 유기체로 구성된다(Zhao, Z. H., Xin, F. Z., Xue, Y., Hu, Z., Han, Y., Ma, F., & Fan, J. G. (2019). Indole-3-propionic acid inhibits gut dysbiosis and endotoxin leakage to attenuate steatohepatitis in rats. *Experimental & Molecular Medicine*, 51(9), 1-14).

[0004] 건강한 성인의 장내 미생물은 1,000여 종이 있으며, 소화관의 각 부분은 고유한 생리기능을 가지고 있기 때문에 각 부분에 존재하는 다양한 미생물과 화학적 환경이 존재한다(Valdes, A.M.; Walter, J.; Segal, E.; Spector, T.D. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *Bmj* 2018, 361.). 장내 미생물총이 영양소 처리 및 신호 전달에 기여하고, 짧은 사슬 지방산, 인돌 및 그 유도체, 2차 담즙산 및 트리메틸아민과 같은 박테리아 대사산물을 생성함으로써 NAFLD 조절에 중요한 역할을 한다는 많은 증거가 알려져 있다.

[0005] 식이 트립토판에는 인돌-3-프로피온산(Indole-3-propionic acid, "IPA")와 인돌-3-아세트산(Indole-3-acetic acid, "IAA")이 포함된다. 이들 IPA 및 IAA는 체내에서 장내 미생물총에 영향을 미치고 다양한 방식으로 숙주의 생리에 영향을 미칠 수 있음이 알려져 있다(Mouzaki, M., & Allard, J. P. (2012). The role of nutrients in the development, progression, and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of clinical gastroenterology*, 46(6), 457-467.). 최근의 연구에 따르면 인돌의 대사 산물은 장 및 간 보호에 효과적인 것으로 알려졌으며, 따라서 트립토판의 가용성은 단백질의 생합성을 제어하는 중요한 요소이고, 이는 면역계가 트립토판을 사용하여 병원체와 악성 세포의 증식을 제한하는 중요한 이유 중 하나일 수 있다(Parry, S. A., & Hodson, L. (2017). Influence of dietary macronutrients on liver fat accumulation and metabolism. *Journal of Investigative Medicine*, 65(8), 1102-1115.). 트립토판, 페닐알라닌 및 티로신에서 발생하는 박테리아 대사 산물은 NAFLD의 발병기전에 관여하는 것으로 알려져 있고, 이와 같이 아미노산 및 장내 미생물총의 대사산물은 간에 다양한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Bruzzese, E., Volpicelli, M., Squaglia, M., Tartaglione, A., & Guarino, A. (2006). Impact of prebiotics on human health. *Digestive and Liver Disease*, 38, S283-S287).

[0006] 상기와 같은 연구 및 그 결과에도 불구하고, NAFLD의 예방 및 치료에 관하여는 충분히 연구가 이루어지지 않은 실정이고, 특히, NAFLD에 대한 IPA 및 IAA의 구체적인 기전 또한 잘 알려져 있지 않은 실정이며, 미생물 군집의 변화에 따른 특정 대사체의 동정에 관하여도 충분한 연구가 이루어지지 않고 있다. 이에 NAFLD의 예방 또는 억제에 관한 IPA 및 IAA의 효능 및 기능성에 관한 연구가 절실히 요구되는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 IPA 및 IAA를 함유하는 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 억제를 위한 조성물을 제공하고자 하는 목적을 가지며, 특히 IPA 및 IAA를 함유하는 것을 통해 비알코올성 지방간 질환을 개선하고 장내 미생물총을 조절하여 지방 생성인자 감소 및 면역 증진 효과를 가지는 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 억제를 위한 조성물을 제공하고자 하는 목적을 가진다.
- [0008] 본 발명이 해결하고자 하는 과제들은 이상에서 언급된 과제로 제한되는 것은 아니며, 언급되지 않은 본 발명이 해결하고자 하는 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술분야에서 보통의 지식을 가진 자("통상의 기술자")에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 전술한 기술적 과제를 달성하기 위하여 제공되는 본 발명에 따른 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 예방 또는 억제하기 위한 조성물은,
- [0010] 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 예방 또는 억제하기 위한, 인돌-3-프로피온산(Indole-3-propionic acid, "IPA") 및 인돌-3-아세트산(Indole-3-acetic acid, "IAA")을 함유하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염일 수 있다.
- [0011] 또한 본 발명에 따른 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 예방 또는 억제하기 위한 조성물은,
- [0012] 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 예방 또는 억제하기 위한, IPA 및 IAA를 함유하는 조성물로서, 상기 IPA 및 IAA의 함량은 증류수 100ml를 기준으로 각각 0.1mg/ml인, 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염일 수 있다.
- [0013] 또한 본 발명에 따른 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 예방 또는 억제하기 위한 조성물은,
- [0014] 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 예방 또는 억제하기 위한, IPA 및 IAA를 함유하는 조성물로서, 상기 예방 또는 억제는 상기 조성물 100ml를 주 3회씩 12주 동안 제공하는, 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염일 수 있다.
- [0015] 또한 본 발명에 따른 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 예방 또는 억제하기 위한 조성물은,
- [0016] 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 예방 또는 억제하기 위한, IPA 및 IAA를 함유하는 조성물로서, 상기 IPA 및 IAA의 함량은 증류수 100ml를 기준으로 각각 0.1mg/ml이고, 상기 예방 또는 억제는 상기 조성물 100ml를 주 3회씩 12주 동안 제공하는, 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염일 수 있다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명에 의하면 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 예방 또는 억제하는 조성물을 제공할 수 있고, 상기 조성물이 제공됨에 따라 간 조직에서 지방간 및 염증 생성 유전자의 발현을 저하시키고 병리학적으로도 간 조직의 지방간 및 염증으로부터 보호 및 상기 현상이 억제되는 효과를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은, 웨스턴 식이(Western diet) 섭취로 유도한 비알코올성 지방간 질환 마우스 모델의 모식도이다.
- 도 2는, 웨스턴 식이 유도 마우스 모델에서 IPA 및 IAA의 비알코올성 지방간 질환 억제의 병리학적 비교도이다.
- 도 3은, 웨스턴 식이 유도 마우스 모델의 혈액에서의 IPA 및 IAA의 간 기능 지표 비교도이다.
- 도 4는, 웨스턴 식이 유도 마우스 모델의 간에서의 IPA 및 IAA의 염증성 사이토카인 및 케모카인 유전자 발현 억제 측정도이다.
- 도 5는, 웨스턴 식이 유도 마우스 모델의 간에서의 IPA 및 IAA 지방 생성에 관여하는 유전자 발현 억제 측정도이다.
- 도 6은, 웨스턴 식이 유도 마우스 모델의 대변에서의 IPA 및 IAA에 의해 변화된 장내 미생물 구성 및 다양성의

분석이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.
- [0020] 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통용되는 사전적 의미로 한정하여 해석되도록 의도된 것이 아니며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 보통의 지식을 가진 자(이하 '통상의 기술자')는 상기 용어 또는 단어를 본 명세서 및 특허청구범위가 자명하게 전달하고자 하는 관념을 표현하는 범위 내에서 본 발명이 의미하는 바를 전달하기 위한 범위의 의미로 사용된 것으로 명확하게 이해할 수 있을 것이다.
- [0021] 또한, 본 명세서에 기재된 실시예 및 상기 실시예에 기재된 구성들은 통상의 기술자에게 본 발명이 이해되고 또 이를 재현할 수 있도록 하기 위해 단지 예시로 제시된 바람직한 실시예에 불과할 뿐이고, 본 발명을 이에 한정시키고자 하는 의도가 아님을 통상의 기술자는 명확하게 이해할 수 있을 것이다.
- [0022] 또한, 본 명세서에서 기술되는 각각의 구성에 관한 설명 및 구체적인 실시 양태는 각각의 다른 설명 및 실시 양태에도 자명하게 적용될 수 있다. 즉, 본 명세서에서 개시되는 다양한 구성과 구체적인 실시 양태의 모든 조합은 본 발명이 개시하는 범위에 속하는 것으로 통상의 기술자는 명확하게 이해할 수 있을 것이다.
- [0023] 본 명세서에서 사용되는 용어 '및/또는'은, 언급된 항목들의 각각 및 하나 이상의 모든 조합을 포함하는 용어이다. 또한, 단수형 용어는 별도로 언급되지 않는 한 복수형도 포함한다.
- [0024] 본 명세서에서 사용하는 '포함한다(comprising)' 및/또는 '포함하는(comprising)'의 용어는 언급된 항목들 외의 다른 항목의 존재 또는 추가를 배제하지 않는 용어이다.
- [0025] 본 명세서에서 용어 '내지'를 사용하여 나타낸 수치 범위는, 상기 용어의 앞과 뒤에 기재된 값을 각각 하한 값과 상한 값으로써 포함하는 수치의 범위를 나타낸다. 임의의 수치 범위의 상한과 하한으로서의 수치 값이 각각 복수 개로 개시된 경우, 본 명세서에서 개시하는 수치의 범위는 복수의 하한 값 중 임의의 하나의 값 및 복수의 상한 값 중 임의의 하나의 값을 각각 하한 값 및 상한 값으로 하는 임의의 수치의 범위로 이해될 수 있다.
- [0026] 본 명세서에서 사용되는 용어 '약' 또는 '대략'은, 사용되는 경우, 상기 용어의 뒤에 기재된 값 또는 수치 범위의 10% 이내의 값 또는 수치 범위를 의미한다.
- [0027] 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적인 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 안 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예에 기재된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고, 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.
- [0028] 한편, 본 명세서에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 명세서에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속하고, 일 구현예에서 생략된 기재는 다른 구현예에서 기재된 바와 같은 방식으로 해석될 수 있다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0029] 본 발명의 일 실시 양태에 의하면, 본 발명에 따른 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 예방 또는 억제하기 위한 조성물은,
- [0030] 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 예방 또는 억제하기 위한, 인돌-3-프로피온산(Indole-3-propionic acid, "IPA") 및 인돌-3-아세트산(Indole-3-acetic acid, "IAA")을 함유하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 일 실시 양태에 의하면, 본 발명에 따른 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 예방 또는 억제하기 위한 조성물은,
- [0032] 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 예방 또는 억제하기 위한, IPA 및 IAA를 함유하는 조성물로서, 상기 IPA 및 IAA의 함량은 증류수 100ml를 기준으로 각각 0.1mg/ml인, 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 일 실시 양태에 의하면, 본 발명에 따른 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 예방 또는 억제

하기 위한 조성물은,

[0034] 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 예방 또는 억제하기 위한, IPA 및 IAA를 함유하는 조성물로서, 상기 예방 또는 억제는 상기 조성물 100ml를 주 3회씩 12주 동안 제공하는, 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염일 수 있다.

[0035] 본 발명의 또 다른 일 실시 양태에 의하면, 본 발명에 따른 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 예방 또는 억제 하기 위한 조성물은,

[0036] 대상체의 비알코올성 지방간 질환을 예방 또는 억제하기 위한, IPA 및 IAA를 함유하는 조성물로서, 상기 IPA 및 IAA의 함량은 증류수 100ml를 기준으로 각각 0.1mg/ml이고, 상기 예방 또는 억제는 상기 조성물 100ml를 주 3회 씩 12주 동안 제공하는, 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염일 수 있다.

[0037] 본 발명에서는 아미노산인 트립토판에서 유래된 IPA와 IAA가 유효성분으로서, 증류수 1밀리리터(ml) 당 0.1밀리 그램(mg)의 유효량으로 제공되며, 본 발명의 상기 IPA와 IAA는 웨스턴 식이로 유도된 마우스 모델에서 비알코올 성 지방간질환을 개선하는데 사용되었다.

[0038] **실시예 1: IPA와 IAA 조성물의 준비**

[0039] IPA와 IAA는 Sigma Aldrich사로부터 제품으로 공급받았다. 정제된 IPA와 IAA는 미세분말 형태로 전달받았다. 상기 각각의 제품은 IPA는 99% 이상, IAA는 98% 이상 함유하였다. IPA와 IAA는 각각의 제품을 증류수 100ml에 0.1mg/ml의 농도로 현탁하여 주 3회, 월, 화 및 수요일 공급하였다.

[0040] **실시예 2: 비알코올성 지방간 질환 유도 마우스 모델 유도 및 분석방법**

[0041] 동물모델 평가를 위해 특정 병원체가 없는 7주령의 C57BL/6J 수컷 마우스를 두얼바이오텍(서울, 한국)에서 구매 하였다. 모든 마우스들은 12/12시간 명/암 주기로 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 온도에서 전용 케이지에 개별적으로 수용하였다. 실험 진행동안 모든 마우스들은 물과 음식에 자유롭게 접근할 수 있도록 하였다. 실험은 모든 그룹에 대한 적 응기간을 포함하였고 이 기간 동안에는 1주일 동안 정상적인 사료를 제공하였다. 실험동물들은 인도주의적 처 료를 받았으며 모든 절차는 실험실 동물의 관리 및 사용을 위한 국립보건원 지침을 따랐으며 한림대학교 의과대 학 동물실험 및 위원회의 승인 하에 진행되었다.

[0042] 식이 섭취로 비알코올성 지방간질환 모델을 유도하기 웨스턴 식이를 제조하여 마우스가 이를 12주간 자유롭게 섭취하도록 하였다. 알코올성 간질환 모델 마우스는 정상대조군(NC, n=5), 비알코올성 지방간질환 유도 식이군 (웨스턴 식이, n=10), 그리고 비알코올성 간질환 유도 식이와 함께 IPA 섭취군(IPA, n=5)과 IAA 섭취군(IAA, n=5)으로 분류하였다 (도 1 참조).

[0043] 웨스턴 식이를 12주동안 섭취시킨 후 흡입 마취제 투여(에어라인액, 미국)를 통해 마우스를 희생시켰다. 체중 과 간 무게를 측정하고 혈액 및 간 조직을 분리하였다. 전혈 샘플을 원심 분리(2,000g, 20분)하여 혈청을 분리 하였다. 간 조직은 빠르게 분리하여 80°C 에 보관했다.

[0044] **실시예 3: 간 조직의 병리학적 분석**

[0045] 분리된 간조직을 10% 포르말린으로 고정시키고 파라핀으로 블록을 제작하였고, 조직 섹션을 헤마톡실린에오신 (H&E) 염색하였다. 비알코올성 지방간염의 병리학적 분석은 지방증(Steatosis, 지방증에 의한 실질 조직 침범 정도 평가[등급0: <5%, 1: 5~33%, 2: >33~66%, 3: >66%]), 염증(Inflammation, 모든 염증 병소(foci)의 전반적 평가[등급0: <No foci, 1: <2 foci per 200x field, 2: 2~4 foci per 200x field, 3: >4 foci per 200x field]), 풍선변형(ballooning, 팽윤이 발생한 세포 비율[등급0: None, 1: Few ballooning cells, 2: Many cells/prominent]), 그리고 NAS score를 Non-alcoholic steatohepatitis Clinical Research Network에서 비알 콜성 지방간염의 병리소견에 따른 scoring system을 고안하여 사용하는데 지방증 정도에 따라 0~3점, 소염 내 염증 정도에 따라 0~2점, 간세포 풍선 변형 정도에 따라 0~2점씩 주어 평가[등급 0~2: Not NASH, 3~4: Borderline, 5~8: NASH] 방법으로 분석하였다. 이와 같이 제시된 병리학적 분석법에 따라 정상식이를 섭취한 정상대조군에 비해 웨스턴 식이를 섭취한 군에서 지방증, 염증 및 풍선변형이 발생하였고, B. longum 섭취에 의해 지방증, 염증 및 풍선변형이 감소하였다 (도 2). [Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 2005;41:1313-21.]

[0046] **실시예 4: 간 기능 지표 측정 및 분석**

[0047] 채취한 혈액을 19,000g에서 5분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청으로 Aspartate Aminotransferase ("AST") 및 Alanine Aminotransferase ("ALT")을 혈액생화학분석기(KoneLab 20, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Finland)를 이용하여 측정하였다. 도 3을 통해 확인되는 바와 같이 정상 대조군을 나타내는 Normal Control ("NC")군에 비해 웨스턴 식이를 섭취한 질병 유도군에서 간기능 지표인자인 AST 그리고 ALT의 수치가 증가하였고 웨스턴 식이를 섭취한 질병 유도군에 비해 IPA, IAA를 처리한 군에서는 AST 그리고 ALT의 값이 유의적으로 감소하였다. IPA와 IAA는 웨스턴 식이에 의해 유도된 비알코올성 지방간 질환을 효과적으로 개선하는 결과를 보였다. 상기 결과로부터 IPA와 IAA가 웨스턴 식이에 의해 유도되는 지방간질환을 개선하는데 유용한 소재임이 확인되었다 (도 3).

[0048] 실시예 5: 간 조직 분석

[0049] 간 조직에서 total RNA의 분리는 제조사의 지시에 따라 트리졸 시약 키트(인비트로젠, 미국)를 사용하여 수행하였다. cDNA 합성 키트(어플라이드 바이오시스템즈, 미국)를 사용하여 total RNA (2 µg)를 cDNA로 합성했다. cDNA는 루나 유니버설 마스터 믹스(뉴잉글랜드바이오랩, 미국) 및 각 표적-특이적 프로브-프라이머를 사용하여 정량적 PCR(qPCR)을 수행하였다.

[0050] qPCR 방법을 이용하여 IPA와 IAA가 면역 기전에 미치는 영향을 알아보기 위해 염증성 사이토카인 및 케모카인 유전자인 Tnf-, Ccl2, Ccl15, Cxcl10의 mRNA level을 분석하였다. 웨스턴 식이로 인해 증가한 Tnf-, Ccl2, Ccl15, Cxcl10의 유전자 레벨이 IPA와 IAA에 의해 줄어들었다. 이 결과로 웨스턴 식이섭취로 인해 유도되는 염증 발생을 IPA와 IAA가 개선하는 소재임이 확인되었다 (도 3).

[0051] IPA와 IAA가 새로운 지방 생성(de novo lipogenesis) 및 트리글리세리드(TG) 합성에 관여하는 유전자 지방 생성, 지질 합성 및 지질 흡수에 관여하는 유전자인 Acc1, Fas, Cd36의 mRNA level을 분석하였다. 실험 동물의 간 조직에서 웨스턴 식이를 섭취해 비알코올성 지방간질환이 유도된 군에서 Acc1, Fas, Cd36 mRNA level은 정상 대조군에 비해 증가하였고, IPA와 IAA를 처리한 군에서 유의적으로 감소하였다. 이 결과로 IPA와 IAA가 지방 생성, 합성 및 흡수의 신호전달 과정에 영향을 주어 비알코올성 지방간질환을 개선하는 효과적인 물질임을 유전자 수준에서 확인되었다 (도 4).

[0052] 실시예 6: 장내 미생물 구성 및 다양성을 분석

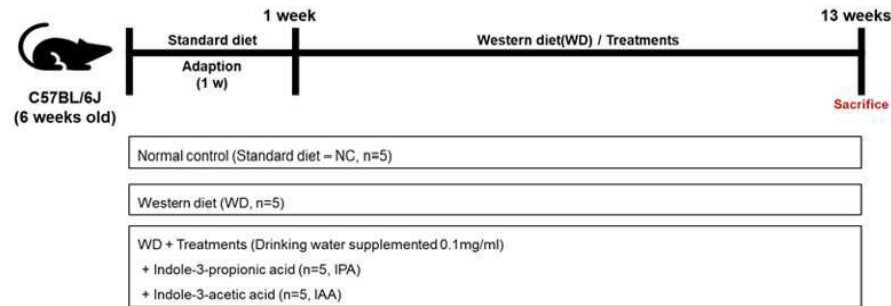
[0053] QIAamp stool kit을 사용하여 메타게놈 DNA를 추출하고 16S rRNA 유전자를 증폭 후 대량으로 병렬식으로 서열을 분석하여 장내 미생물 구성 및 다양성을 분석하였다. 16S rRNA 유전자의 증폭 및 서열분석은 454 GS FLX Titanium Sequencing System (Roche, 미국)을 사용하여 ChunLab Inc. (서울, 대한민국)에 의뢰하여 수행되었다 (도 6). 장내미생물총 조성이 세균의 문 (phylum) 단계에서 비만인 사람을 대상으로 한 연구 또는 비만모델 마우스 실험에서 Bacteroidetes: Firmicutes 비율이 낮다는 결과를 보고한 연구 결과들을 추가로 확인하였다. [Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature 2006;444:1027- 1031.]

[0054] 실시예 7: 데이터 분석

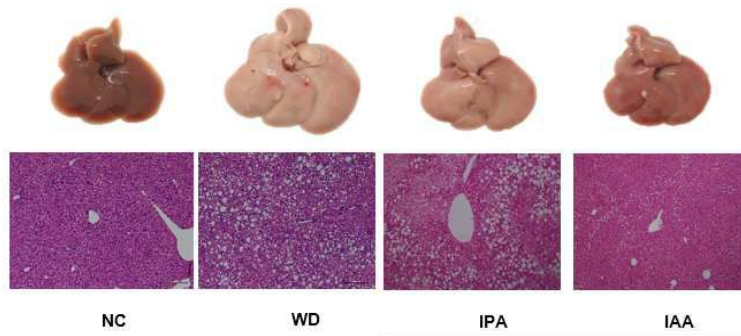
[0055] 연속 변수는 평균 및 표준편차로 분석하였다. 조직학 분석과 간기능 분석 및 분류학적 바이오마커 발견을 위해 One-way ANOVA를 수행했다. 유의확률 P값 <0.05는 통계적 유의성을 나타내는 것으로 간주하였다. 모든 통계 분석은 GraphPad Prism(ver. 8.0.2, GraphPad Software, LLC, San Diego, CA 92108 USA)를 사용하여 수행하였다. 실험 결과 본 발명에 따른 조성물이 비알코올성 지방간 질환의 예방 또는 억제에 우수한 효과를 나타냄을 확인하였다.

도면

도면1

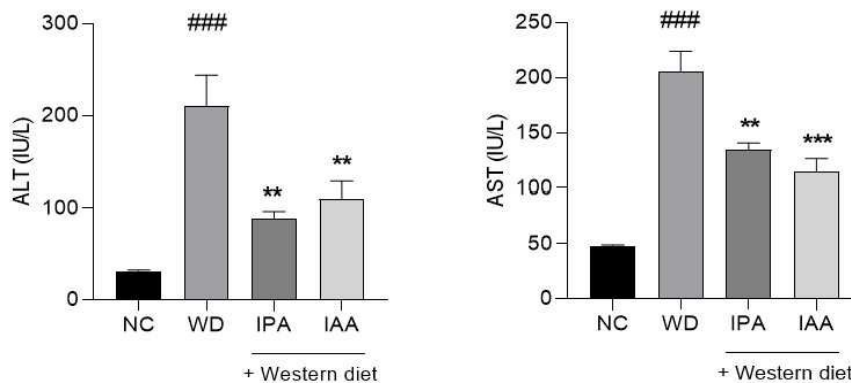


도면2

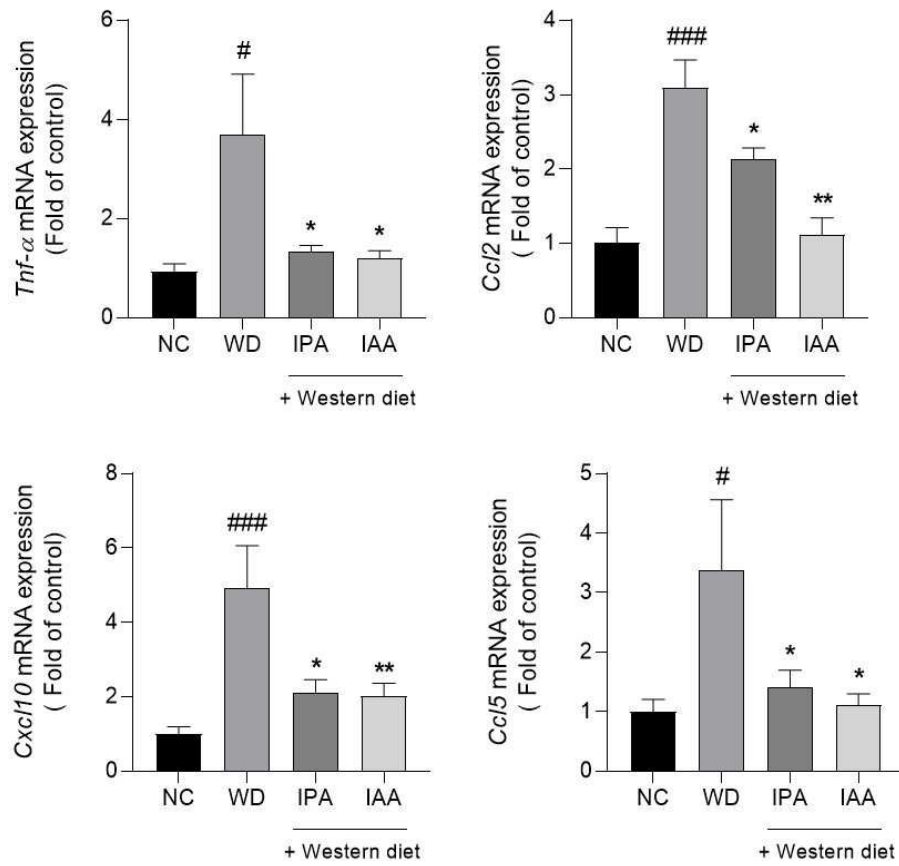


+ Western diet				
Group	Steatosis	Inflammation	Ballooning	NAS score
Normal control (NC)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Western diet (WD)	2.25 (0.25)	2.25 (0.25)	1.5 (0.29)	6.0 (0.71)
WD + IPA	2.2 (0.20)	1.2 (0.2)	1.2 (0.2)	4.6 (0.6)
WD + IAA	1.4 (0.40)	0.8 (0.2)	0.6 (0.24)	2.8 (0.8)

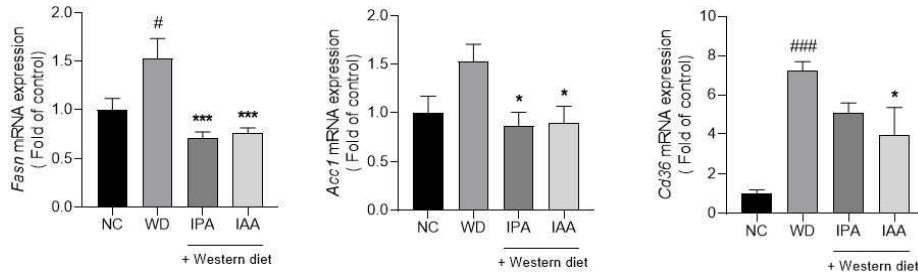
도면3



도면4



도면5



도면6

