



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0109291
(43) 공개일자 2022년08월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6869 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6869 (2018.05)
C12Q 2600/136 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0109743(분할)
(22) 출원일자 2021년08월19일
심사청구일자 2021년08월19일
(62) 원출원 특허 10-2021-0012305
원출원일자 2021년01월28일
심사청구일자 2021년01월28일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
권재열
대전광역시 중구 문화로 266, 감염생물학 123호(문화동)
허부연
경상북도 포항시 북구 이동로 48-11, 102동 1304호(득량동, 이동삼성아파트)
(74) 대리인
김원준

전체 청구항 수 : 총 7 항

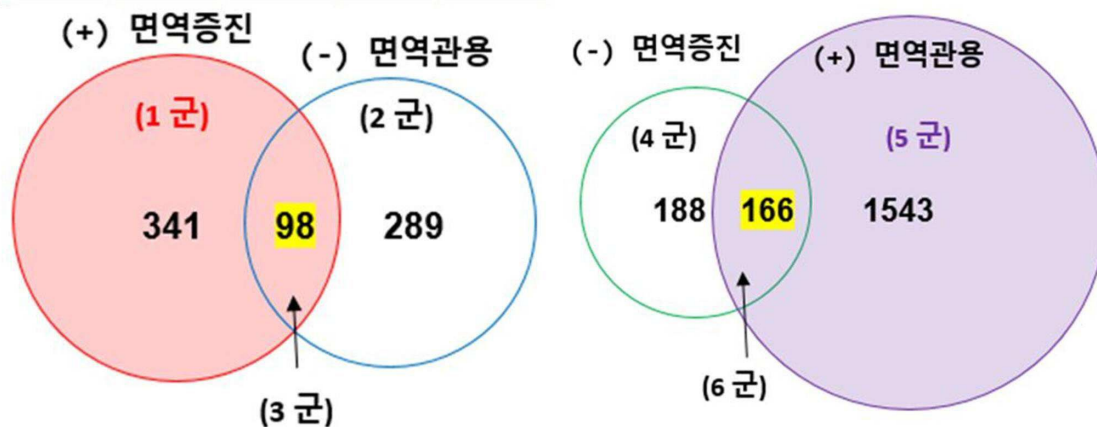
(54) 발명의 명칭 면역기능 예측을 위한 바이오마커 및 이를 활용한 면역기능 예측방법

(57) 요약

본 발명은 식약품 소재의 면역효과의 특성과 강도를 정확하고 간편하게 예측할 수 있도록 하는 바이오마커 및 이를 활용한 면역기능 예측방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 하기 표에 제시된 1군~6군에 속하는 유전자 중 어느 하나 또는 둘 이상 유전자의 mRNA 또는 단백질인 것을 특징으로 하는 식약품 소재의 면역기능 예측을 위한

(뒷면에 계속)

대표도 - 도5



바이오마커에 관한 것이다.

유전자군	유전자
1군	<i>Rsad2, Snhg11, Emp1, Ifi203, Bnip3, Gbp5, Plekhn1, EglN3, NdrG1, Rasa4, H2-Q4, Casp4, Slamf7, Pgm2, Tnfrsf23, Cd274, Attf3, C3ar1, Maged1, Ppp1r3b, Tpi1, Il15ra, Slc16a3, Gpr65, Tnfrsf26, Rgl1, Hist1h1c</i>
2군	<i>Car13, Ccl2, Ccl5, Ccnd2, Ccr12, Cd200, Cxcl2, Il12b, Il6, Isg15, Mt2, Oas1, Pdzk1ip1, Pla1a, Ppap2b, Ptges, Ptgs2, Serpinb2, Serpinb9b, Syt7, Tnfsf15</i>
3군	<i>Nos2, Ifi205, Timp1, Slamf1, Hilpda, Rgs1, Tnfrsf9, Sema7a, Il2ra, Il1rn, Pvr, SocS3, Rnf19b, Ddit4, Traf1, Ccr7, Basp1, Gadd45b, Smox, Mucl1, Dusp1, Cd83, Srgn, Abtb2, Net1, Stx11, Nfkb1a, Smim3, Ppp1r15a, Csrnp1, Fkbp1a, Junb, Nfkb1e</i>
4군	<i>Arl11, Bop1, Cd93, Heatr1, Pdxk, Tbrg4, Wfdc21</i>
5군	<i>Asgr2, Hr, Plet1, RetnlG, Ppbp, Mrc1, Rab3il1, Ccdc80, Tns1, Pald1, F2rl2, Mpo, Ceacam10, Daglb, S100a4, Plau, Naaa, Cd200r1, Adam11, Mmp9, Cdh1, Ank, Ccnb2, Cd200r4, Sulf2, Ccnb1, Adpgk, Nov, Cd177, Tifab, Cdca3, Itgb2l, Arhgap19</i>
6군	<i>Cd300lb, Nfam1, Atp1a3, Myo7a, Incenp, Hmgn2, Colgalt1, Aldh2, Mvb12b, Comt, Mlec, Tfec, Grk6, Slc43a2, Ptpn7, Gtf2i, Slc25a5, Zfp703, Cpsf1, Manba, Cd84, Hsd17b4, Wdr5, Emilin1, Ubl3, Ncf2</i>

(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)

(72) 발명자

최수영

세종특별자치시 조치원읍 산막2길 7, 102동 1203호(신동아아파트)

송익찬

대전광역시 중구 문화로 282, 충남대학교병원 혈액종양내과(대사동)

최인옥

대전광역시 중구 문화로 266, 감염생물학 123호(문화동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545019792
과제번호	819021011SB010
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	농식품연구성과후속지원(R&D)
연구과제명	면역능 평가를 위한 영양유전체적 유전자 모듈 바이오마커 발굴
기 여 율	1/1
과제수행기관명	개인
연구기간	2019.05.10 ~ 2020.05.09

명세서

청구범위

청구항 1

하기 표에 제시된 1군~6군에 속하는 유전자 중 어느 하나 또는 둘 이상 유전자의 mRNA 또는 단백질인 것을 특징으로 하는 식약품 소재의 면역기능 예측을 위한 바이오마커.

유전자군	유전자
1군	<i>Rsad2, Snhg11, Emp1, Ifi203, Bnip3, Gbp5, Plekhn1, Egl3, Ndr1, Rasa4, H2-Q4, Casp4, Slamf7, Pgm2, Tnfrsf23, Cd274, Atf3, C3ar1, Maged1, Ppp1r3b, Tpi1, Il15ra, Slc16a3, Gpr65, Tnfrsf26, Rgl1, Hist1h1c</i>
2군	<i>Car13, Ccl2, Ccl5, Ccnd2, Ccl2, Cd200, Cxcl2, Il12b, Il6, Isg15, Mt2, Oasl1, Pdzk1ip1, Pla1a, Ppap2b, Ptges, Ptgs2, Serpinb2, Serpinb9b, Syt7, Tnfrsf15</i>
3군	<i>Nos2, Ifi205, Timp1, Slamf1, Hspda, Rgs1, Tnfrsf9, Sema7a, Il2ra, Il1rn, Pvr, Socs3, Rnf19b, Ddit4, Traf1, Ccr7, Basp1, Gadd45b, Smox, Mucl1, Dusp1, Cd83, Srgn, Abtb2, Net1, Stx11, Nfkb1a, Smim3, Ppp1r15a, Csrnp1, Fkbp1a, Junb, Nfkb1e</i>
4군	<i>Arl11, Bop1, Cd93, Heatr1, Pdxk, Tbrg4, Wfdc21</i>
5군	<i>Asgr2, Hr, Plet1, Retnl, Ppbp, Mrc1, Rab3il1, Ccdc80, Tns1, Pald1, F2rl2, Mpo, Ceacam10, Daglb, S100a4, Plau, Naaa, Cd200r1, Adam11, Mmp9, Cdh1, Ank, Ccnb2, Cd200r4, Sulf2, Ccnb1, Adpgk, Nov, Cd177, Tifab, Cdca3, Itgb2l, Arhgap19</i>
6군	<i>Cd300lb, Nfam1, Atp1a3, Myo7a, Incenp, Hmgn2, Colgalt1, Aldh2, Mvb12b, Comt, Mlec, Tfec, Grk6, Slc43a2, Ptpn7, Gtf2i, Slc25a5, Zfp703, Cpsf1, Manba, Cd84, Hsd17b4, Wdr5, Emilin1, Ubl3, Ncf2</i>

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 유전자는 1군 또는 4군에 속하며, 상기 면역기능은 면역증진인 것을 특징으로 하는 식약품 소재의 면역기능 예측을 위한 바이오마커.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 유전자는 2군 또는 5군에 속하며, 상기 면역기능은 면역관용인 것을 특징으로 하는 식약품 소재의 면역기능 예측을 위한 바이오마커.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 유전자는 3군 또는 6군에 속하며, 상기 면역기능은 면역증진 또는 면역관용인 것을 특징으로 하는 식약품 소재의 면역기능 예측을 위한 바이오마커.

청구항 5

(A) 수지상세포에 대상 소재 추출물을 처리한 처리구와, 블랭크를 처리한 대조구를 배양하는 단계;

(B) 상기 처리구와 대조구 배양물에서 청구항 1에 의한 바이오마커의 농도비를 분석하는 단계;

(C) 상기 바이오마커 농도비에 따라 상기 식약품 소재의 면역기능을 예측하는 단계;를 포함하는 식약품 소재의 면역기능 예측방법.

청구항 6

청구항 1에 의한 바이오마커를 활용한 면역기능 소재의 스크리닝 방법.

청구항 7

(A) 피측정자로부터 유래된 수지상세포에 대상 소재 추출물을 처리한 처리구와, 블랭크를 처리한 대조구를 배양하는 단계;

(B) 상기 처리구와 대조구 배양물에서 청구항 1에 의한 바이오마커의 농도비를 분석하는 단계;

(C) 상기 바이오마커 농도비에 따라 상기 피측정자에 대한 상기 식약품 소재의 면역기능을 예측하는 단계;를 포함하는 개인 맞춤형 면역기능 소재의 선별방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식약품 소재의 면역효과의 특성과 강도를 정확하고 간편하게 예측할 수 있도록 하는 바이오마커 및 이를 활용한 면역기능 예측방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 건강에 대한 관심이 고조되면서 면역과 관련한 각종 질환으로 고생하는 환자 뿐만 아니라 건강에 큰 이상이 없는 사람들도 면역에 관련된 여러 가지 대체요법에 따른 식품이나 건강보조식품을 섭취하는 사례가 늘고 있다.

[0003] 면역기능은 크게 ① 저하된 면역의 증강을 목적으로 하는 것과 ② 민감해진 면역반응(알레르기)을 조절해주는 것 등 두 가지로 분류된다. 즉, 면역관련 각종 식약품들은 면역증진(Immunity; 면역능, 면역항원, 항감염, 면역증강)용과 면역관용(Tolerance; 알레르기개선, 항염증, 과대면역개선, 과민면역개선)용으로 구분된다. 면역증진과 면역관용은 상호 상반된 기능이다. 정상적인 면역기능 수행을 통해 건강함을 유지하기 위해서는 면역증진과 면역관용이 잘 조정된 균형이 필요하다. 위험한 병원체들과 암화된 세포(transformed cell)들을 특이적으로 공격하여 잘 제거하지만, 해 없는 자가조직, commensal microorganisms, food antigens, 그리고 environmental antigens에는 관용성을 나타내야 한다. 그러한 면에서 이러한 두 가지 면역기능에 대해 식약품 소재가 미치는 효과를 효과적으로 조사할 수 있는 평가방법이 필요하다.

[0004] 그런데 종래 면역관련 식약품으로 가능성이 있는 소재의 발굴과 개발은 개별적, 단편적으로 이루어지고 있다. 예컨대, 어떤 소재의 면역관련 특성이 발견되면 이를 확인하기 위해 동물실험으로 직행할 수밖에 없어 시간과 비용이 많이 소요되는 단점이 있었다. 이에 본 발명자들은 식품소재의 면역능(면역증진, 면역관용)을 지수화/표

준화하는 방법(수지상세포 기반 면역능평가법)을 개발하여 다수의 특허등록(10-1981146, 10-1981147)을 받은 바 있다.

[0005] 그러나 이러한 종래기술에 의하면, 식약품 소재의 면역능을 객관적으로 수치화하는 것이 가능하지만, 많은 종류의 항체와 비교적 고가이고 다루기 어려운 유세포분석장치를 필요로 하여 시간과 비용이 적지 않게 소요되며 실험결과 데이터를 해석하는 것이 다소 복잡하여 이를 활용하기 위하여 다소 전문적인 훈련이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 등록특허 10-1981146

(특허문헌 0002) 등록특허 10-1981147

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 이상과 같은 문제를 해결하기 위해 제안된 것으로, 보다 경제적이고 단순하면서도 숙련도와 관계없이 정확한 식품소재의 면역증진 또는 면역관용 기능의 특성과 강도를 객관화, 수치화할 수 있는 바이오마커를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커를 활용하여 면역증진 소재를 스크리닝하는 방법 및 개인 맞춤형 면역증진 소재 선별방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은

[0010] 하기 표 1에 제시된 1군~6군에 속하는 유전자 중 어느 하나 또는 둘 이상 유전자의 mRNA 또는 단백질인 것을 특징으로 하는 식약품 소재의 면역기능 예측을 위한 바이오마커에 관한 것이다.

표 1

유전자군	유전자
1군 (27개)	<i>Rsad2, Snhg11, Emp1, Ifi203, Bnip3, Gbp5, Plekhn1, Egl3, Ndr1, Rasa4, H2-Q4, Casp4, Slamf7, Pgm2, Tnfrsf23, Cd274, Atf3, C3ar1, Maged1, Ppp1r3b, Tpi1, Il15ra, Slc16a3, Gpr65, Tnfrsf26, Rgl1, Hist1h1c</i>
2군 (21개)	<i>Car13, Ccl2, Ccl5, Ccnd2, Ccrl2, Cd200, Cxcl2, Il12b, Il6, Isg15, Mt2, Oasl1, Pdzk1ip1, Pla1a, Ppap2b, Ptges, Ptgs2, Serpinb2, Serpinb9b, Syt7, Tnfsf15</i>
3군 (33개)	<i>Nos2, Ifi205, Timp1, Slamf1, Hlplda, Rgs1, Tnfrsf9, Sema7a, Il2ra, Il1rn, Pvr, Socs3, Rnf19b, Ddit4, Traf1, Ccr7, Basp1, Gadd45b, Smox, Mucl1, Dusp1, Cd83, Srgn, Abtb2, Net1, Stx11, Nfkb1a, Smim3, Ppp1r15a, Csrnp1, Fkbp1a, Junb, Nfkb1e</i>
4군 (7개)	<i>Arl11, Bop1, Cd93, Heatr1, Pdxk, Tbrg4, Wfdc21</i>
5군 (33개)	<i>Asgr2, Hr, Plet1, Retnlg, Ppbp, Mrc1, Rab3il1, Ccdc80, Tns1, Pald1, F2rl2, Mpo, Ceacam10, Daglb, S100a4, Plau, Naaa, Cd200r1, Adam11, Mmp9, Cdh1, Ank, Ccnb2, Cd200r4, Sulf2, Ccnb1, Adpgk, Nov, Cd177, Tifab, Cdca3, Itgb2l, Arhgap19, Cd300lb, Nfam1, Atp1a3, Myo7a, Incenp, Hmgn2, Colgalt1, Aldh2, Mvb12b, Comt, Mlec, Tfec, Grk6, Slc43a2, Ptpn7, Gtf2i, Slc25a5, Zfp703, Cpsf1, Manba, Cd84, Hsd17b4, Wdr5, Emilin1, Ubl3, Ncf2</i>

[0011]

[0012]

상기 표에 제시된 유전자들은 종래 알려진 것들로서, 예를 들면 <https://www.uniprot.org/uniprot/>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> 등과 같이 공개된 사이트에서 유전자의 기능, 서열 등 특성에 대한 정보를 얻을 수 있다.

[0013]

이때 상기 유전자는 1군 또는 4군에 속하는 유전자로서 식약품 소재의 면역증진 기능 예측을 위한 바이오마커일 수 있다.

[0014]

또한 상기 유전자는 2군 또는 5군에 속하는 유전자로서 식약품 소재의 면역관용 기능 예측을 위한 바이오마커일 수 있다.

[0015]

또한 상기 유전자는 3군 또는 6군에 속하는 유전자로서 식약품 소재의 면역증진 또는 면역관용 기능 예측을 위한 바이오마커일 수 있다.

[0016]

또한 본 발명은 상기 바이오마커의 수준을 측정하기 위한 제제를 포함하는 바이오마커 측정용 조성물일 수 있다.

[0017]

또 다른 본 발명은, 전술한 바이오마커를 이용한 식약품 소재의 면역기능 예측방법으로서, (A) 수지상세포에 대상 소재 추출물을 처리한 처리구와, 블랭크를 처리한 대조구를 배양하는 단계; (B) 상기 처리구와 대조구 배양물에서 전술한 바이오마커의 농도비를 분석하는 단계; (C) 상기 바이오마커 농도비에 따라 상기 식약품 소재의 면역기능을 예측하는 단계;를 포함하는 식약품 소재의 면역기능 예측방법에 관한 것이다.

[0018]

이상과 같은 본 발명에 의한 식약품 소재의 면역기능 예측방법은, 면역기능이 알려지지 않은 식약품 소재의 면역증진 또는 면역관용 기능이 있는지를 확인하는 소재 스크리닝 방법으로 활용될 수 있다.

[0019] 또한 피측정자로부터 유래된 단구세포를 통해 얻은 수지상세포를 적용하는 경우에는 개인 맞춤형 면역증진 또는 면역관용 소재의 선별방법으로도 활용될 수 있을 것이다.

발명의 효과

[0020] 이상과 같은 본 발명에 의하면, 상기 선정된 유전자의 발현량 변화를 측정함으로써 특정 식약품 소재가 면역증진이나 면역관용 기능을 가지는지, 가진다면 그 기능의 수준은 어느 정도인지를 객관적으로 예측할 수 있게 된다.

[0021] 제안발명에 의하면, 통상의 바이오 실험실에서도 예를 들면 PCR을 활용하여 비교적 단순하게 새로운 식약품 후보의 면역증진 또는 면역관용 효과의 유무 및 그 정도를 객관적으로 측정할 수 있게 된다.

[0022] 이에 따라 천연복합물 면역식품소재 면역능 평가의 과학적 기반을 확보하여 식품소재의 작용기전에 대한 과학적이고 표준적인 평가가 가능하게 되므로 객관적인 식품개발 및 품질관리가 가능하게 되고, 나아가 면역관련 식약품소재 개발의 신속화 및 가속화가 이루어질 수 있게 된다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명에 사용된 표준면역소재의 면역능 수치를 보여주는 도표.

도 2는 본 발명에서 실시예의 과정을 보여주는 개념적 흐름도.

도 3은 본 발명에서 표준면역소재의 처리에 따른 DEG 양상을 보여주는 도표.

도 4a는 본 발명에서 표준면역소재와 유의미한 상관관계를 보이는 네 유전자의 발현수준을 보여주는 그래프.

도 4b는 본 발명에서 예시적인 두 유전자의 표준면역소재의 면역지수와 상관관계를 보여주는 그래프.

도 5는 면역지수와 관련된 유전자군과 유전자 수를 보여주는 벤다이어그램.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명의 발명자가 속하는 연구그룹에서는 오랫동안 면역소재의 면역증진 또는 면역개선 효과 평가방법 및 면역기능 소재의 스크리닝 방법에 대해 연구한 결과, 면역증강 또는 면역관용 기능이 확인된 식약품 소재로 처리된 수지상세포의 표면에 발현되는 몇몇 특징적 유전자들의 발현양상에 일정한 패턴이 있음을 발견하였다. 또한 이러한 패턴들은 처리된 식약품 소재의 면역증강 기능 혹은 면역관용 기능 특성에 대응하며, 그 면역기능의 강도와도 관련이 있음을 확인하였다. 이에 본 발명자는 이러한 패턴을 지수화하고 면역증강 또는 면역관용 기능이 확인된 식약품 소재를 대상으로 그 유효성을 검증하여 면역증진지수 및 면역관용지수를 개발한 바 있다(전술한 선행등록특허 참조).

[0025] 본 발명은 이러한 면역증진지수 및 면역관용지수에 따라 면역관련 지수가 결정된 식품소재를 수지상 세포에 처리했을 때 상당히 높은 상관관계를 보이면서 특정 유전자들의 발현이 증대되거나 감소된다는 사실의 발견에 기초한 것이다.

[0026] 이하 첨부된 도면과 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면과 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.

[실시예]

1. 면역능이 확인된 식품소재의 선정과 추출물의 준비

[0029] 전술한 본 발명자의 선행등록특허에 기재된 방법에 따라 면역능이 지수화된 표준면역소재 9종을 선정하였다. 선정된 식품소재와 그의 처리농도, 면역지수 등을 하기 표 2에 제시하였는데, 면역조절효과를 수치화 하였고, R language의 scale 함수로 normalize 한 후 지수 I 과 II 의 평균값을 상관관계 분석에 사용하였다.

[0030] 표준면역소재의 면역능 수치를 도 1에 그래프로 표현하였다.

표 2

면역식품소재	처리 농도 (μg/ml)	면역증진 지수 I	면역증진 지수 II	면역관용 지수 I	면역관용 지수 II	normalize 된 면역증진지수	normalize 된 면역관용지수
LPS	0.1	4.99	5.26	0.65	0.34	0.64	-0.85
홍삼농축분말	800	0.83	1.51	1.00	1.08	-0.83	0.50
홍삼농축액	800	3.27	7.24	0.69	0.65	0.64	-0.49
구아바일 추출물	20	1.51	1.39	1.09	1.01	-0.72	0.62
스피루리나	20	1.10	0.99	0.96	0.90	-0.87	0.26
후코이단	400	7.34	8.74	0.69	0.78	1.71	-0.38
차가버섯	400	3.07	2.92	0.65	0.34	-0.14	-0.84
청균 다당	50	6.44	3.35	0.66	0.26	0.60	-0.90
복강완	100	0.52	0.71	1.37	2.05	-1.03	2.10

대상 소재 추출물은 농축액 또는 분말형태로 한국한의학연구원(대전, 한국)과 (주)비케이바이오(제주, 한국)에서 공급받았다. 소재 추출용액(에탄올 또는 물)에 대한 정보를 표시하였다.

추출물을 10% DMSO in PBS 용액으로 40 또는 200 mg/ml의 보관액을 제조하여 -20℃에 보관하였다.

2. 수지상세포의 준비 및 시료 처리(도 2 참조)

다물사이언스(한국)에서 구매하여 일반적 조건의 충남대학교 의과대학 실험동물 관리 사육실에서 멸균된 사료와 물을 자유롭게 섭취시키며 사육한 6~10주령의 암컷 C57BL/6 마우스의 대퇴골로부터 통상의 방법에 따라 골수세포를 획득하였다.

획득된 골수세포를 표 3와 같은 조성의 배지에 혼합하고, 37℃, 5% CO₂ 조건에서 6일 배양하여 수지상세포로 분화를 유도하였다.

표 3

성분	함량
RPMI 1640	444.5 ml
Fetal Bovine Serum (FBS)	50 ml
Penicillin/streptomycin	5 ml
β-mercaptoethanol	0.5 ml
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)	20 ng/ml
Total	500 ml

배양 3일째 배지를 보충해 주고, 6일째 부착되지 않은 분화된 수지상세포를 회수하고 원심분리하였다(1500rpm, 5분). 분리된 세포를 동일 배지에 현탁하고 48-well plate에 5×10^5 개가 되도록 분주하였다.

이어서 준비된 표준면역소재 추출물을 표 2에 제시된 농도로 처리하고 동일한 조건에서 24시간 배양한 다음 아래와 같이 RNA 분석을 진행하였다.

3. 유전자 발현의 분석

- [0041] 수지상세포로부터 total RNA를 Trizol 추출법으로 분리하고 RNA 시료의 정량적, 정성적 품질 검증(QC)을 위해 BioAnalyzer로 RNA 농도와 28S, 18S RNA integrity를 측정하였다.
- [0042] RNA-seq 및 상관관계 분석은 본 발명이 속하는 분야에서 널리 알려진 프로토콜(예, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6096346/>)에 따라 이루어졌는데, 이하 진행 과정을 간단히 설명한다.
- [0043] TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit 사용하여 cDNA library를 만든 다음 Illumina NGS sequencer (Next Generation Sequencing, HiSeq X Ten 혹은 NovaSeq 6000) 로 염기서열을 읽었다.
- [0044] 생성된 raw data (fastq 파일)의 퀄리티를 체크하고, Trim galore! program으로 adapter 시퀀스, low quality base 등을 제거(trimming)하고 전체적인 데이터의 품질을 확인한 후, 정리된 sequencing data를 STAR 프로그램을 이용하여 마우스 표준 genome mm10에 배열하여 매핑하였다. 매핑 결과를 아래 표 4에 기재하였다.

표 4

Sample ID	Sample Name	Replicate	Number of Reads	Uniquely Mapped Reads %
LPS	LPS 100ng/ml	#1	25916344	94.64%
LPS	LPS 100ng/ml	#2	26652994	94.65%
LPS	LPS 100ng/ml	#3	34158841	94.73%
Fuco	후코이단	#1	27645255	94.73%
Fuco	후코이단	#2	27288108	94.80%
Fuco	후코이단	#3	41084394	94.04%
Gins_CL	홍삼농축액	#1	24985718	94.17%
Gins_CL	홍삼농축액	#2	30948888	94.56%
Gins_CL	홍삼농축액	#3	41808632	93.39%
GreT	청굴다당	#1	30947741	92.61%
GreT	청굴다당	#2	32484184	93.94%
GreT	청굴다당	#3	37843738	93.87%
ChaM	차가버섯	#1	23940416	94.48%
ChaM	차가버섯	#2	27496594	94.61%
ChaM	차가버섯	#3	42393705	94.71%
Guav	구아바잎추출물	#1	23842737	91.19%
Guav	구아바잎추출물	#2	26387252	91.89%
Guav	구아바잎추출물	#3	38003803	93.35%
Gins_CP	홍삼농축분말	#1	22424237	93.94%
Gins_CP	홍삼농축분말	#2	24785895	94.00%
Gins_CP	홍삼농축분말	#3	36049864	93.64%
Spir	스피루리나	#1	23113778	94.49%
Spir	스피루리나	#2	26177941	94.58%
Spir	스피루리나	#3	38238705	94.22%
OstR	복강활 (에탄올)	#1	25575805	94.44%
OstR	복강활 (에탄올)	#2	25355388	93.58%
OstR	복강활 (에탄올)	#3	39370959	94.03%
DMSO_004	DMSO 0.04%	#1	32980845	93.81%
DMSO_004	DMSO 0.04%	#2	44176174	93.72%
DMSO_004	DMSO 0.04%	#3	37911061	93.92%

- [0045]
- [0046] 표준면역소재를 처리한 세 세트의 수지상세포 (n=3) 유전자 변화를 DMSO 그룹을 대조군으로 하여 Differentially Expressed Genes (DEG) 양상을 분석하였다. 각 표준면역소재의 DEG 양상을 보여주는 volcano plot. Fold change와 FDR (false discovery rate)을 도 3에 도시하였는데, 도면에서 볼 수 있듯이 시료들의 RNA 분석이 통계적으로 믿을 만한 수준으로 잘 이루어졌으며 각 면역소재에 특이적인 유전자 발현 패턴을 볼 수 있었다.
- [0047] 4. 면역능 지수와 유전자 발현 변화 상관관계 분석
- [0048] 식품소재의 면역능지수와 RNA-seq 데이터(n=3)를 R package로 비교 분석, 면역증진지수 및 면역관용지수와의 연

관성을 나타내는 유전자들의 Pearson correlation r 값과 p .value를 구하고, 이 중 통계적으로 유의미하게 ($p < 0.01$) 양 (+)의 상관관계 ($r > 0.8$), 또는 음 (-)의 상관관계 ($r < -0.8$)를 보이는 유전자 군을 선별하였다. 표준면역소재와 유의미한 상관관계를 보이는 유전자 중 예시적으로 네 유전자의 발현수준을 도 4a에, 두 유전자의 면역지수와 상관관계도를 도 4b에 각각 예시적으로 도시하였는데, 이러한 방식으로 유전자의 mRNA 발현수준을 측정하였다. 도 4b에서 x 축은 유전자 발현 양, y 축은 면역지수를 나타내고 각 점들은 면역소재를 처리했을 때의 유전자 발현 양과 증진지수(빨간점), 관용지수(파란점)를 의미한다. 모든 면역소재의 명칭을 기재하면 그래프가 너무 복잡해지기에 주요 소재만 화살표로 표시하였다.

[0049] 그 결과, 793 유전자가 면역증진지수와 양(+) 또는 음(-)의 상관관계를, 2096 유전자가 면역관용지수와 양(+) 또는 음(-)의 상관관계를 나타내었다. 이들 중 면역증진지수와는 양(+)의 관계, 면역관용지수와는 음(-)의 관계인 유전자가 98개, 반대로 면역증진지수와는 음(-)의 관계, 면역관용지수와는 양(+)의 관계인 유전자가 166개였다. 면역증진지수와 면역관용지수 모두에 대해 변화가 없거나 같은 방향으로 반응하는 유전자는 통계적 의미가 없는 것으로 판단하였다.

[0050] 이렇게 통계적 의미 없는 것을 제외하면 도 5에 벤다이어그램으로 표현한 것처럼 면역지수와 관련된 유전자는 6개의 군으로 구분될 수 있는데, 이를 아래 표로 정리하여 나타내었다.

표 5

유전자 유형	처리 소재 유형		유전자 특성
	면역증진	면역관용	
1군	+		면역증진지수 소재에 발현 증가(+)
2군		-	면역관용지수 소재에 발현 감소(-)
3군	+	-	면역증진지수 소재에 발현 증가(+)하고 면역관용지수 소재에 발현 감소(-)
4군	-		면역증진지수 소재에 발현 감소(-)하지만
5군		+	면역관용지수 소재에는 발현 증가(+)
6군	-	+	면역증진지수 소재에 발현 감소(-)하고 면역관용지수 소재에 발현 증가(+)

[0051]

[0052] 5. 바이오마커의 선별

[0053] 이렇게 1차로 선별된 2625개의 연관성 있는 유전자들 중 절대 발현 양이 높으면서도 면역소재 처리에 의한 증감폭 (fold change)이 확인한 총 147개의 유전자(표 1)들을 식약품 소재의 면역기능 예측을 위한 바이오마커로 선정하였다.

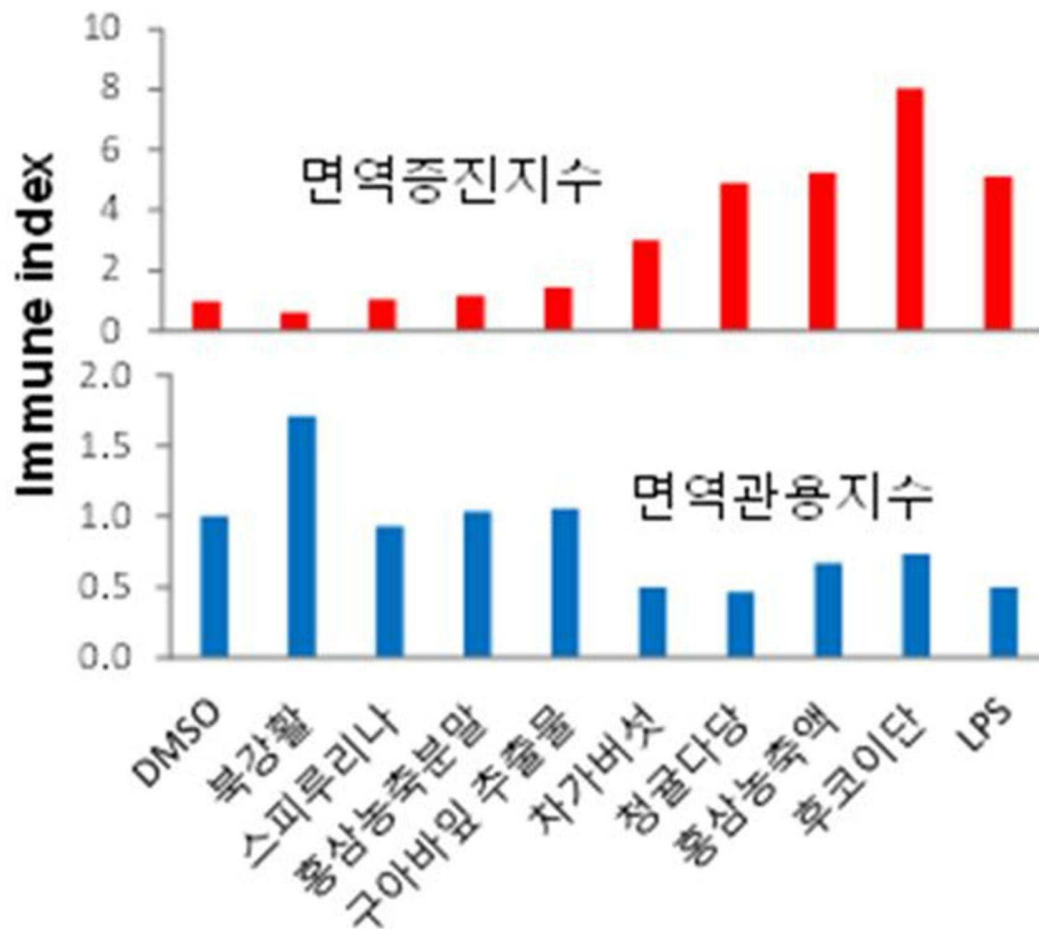
[0054] 이들 최종 선정된 유전자들은 그 특성(유전자군)에 따라 면역증강소재 또는 면역관용소재에 대하여, 또는 면역증강소재와 면역관용소재에 대하여 매우 높은 상관관계를 가지고 있다.

[0055] 따라서 이들 중 어느 하나 또는 둘 이상 유전자의 mRNA 또는 단백질을 식약품 소재의 면역기능 예측을 위한 바이오마커로 활용하기에 충분하다.

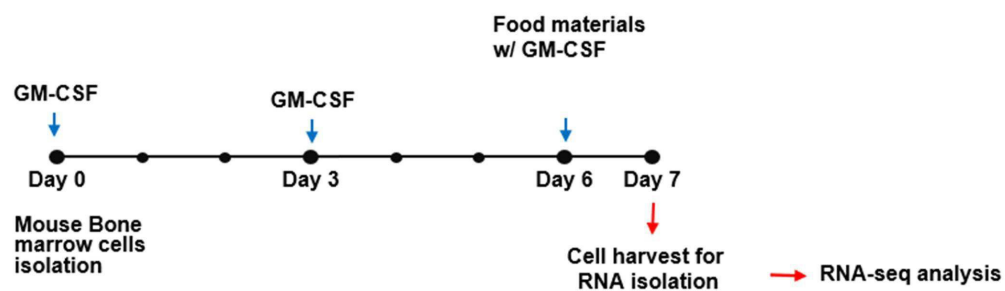
[0056] 이에 의해 종래 알려진 면역소재의 면역학적 특성을 정확하게 파악할 수 있어 면역소재의 품질 표준화가 가능하게 된다. 또한 본 발명에 의하면 새로운 소재가 면역기능을 가지는지, 그렇다면 면역증진인지 면역관용인지 그 효과의 정도가 어떤지를 빠르고 정확하게 평가할 수 있으므로 신소재 탐색이 용이해지고, 동물모델에 대한 가이드라인을 제시할 수 있어 새로운 면역기능 소재의 탐색과 검증을 효율적으로 할 수 있게 된다.

도면

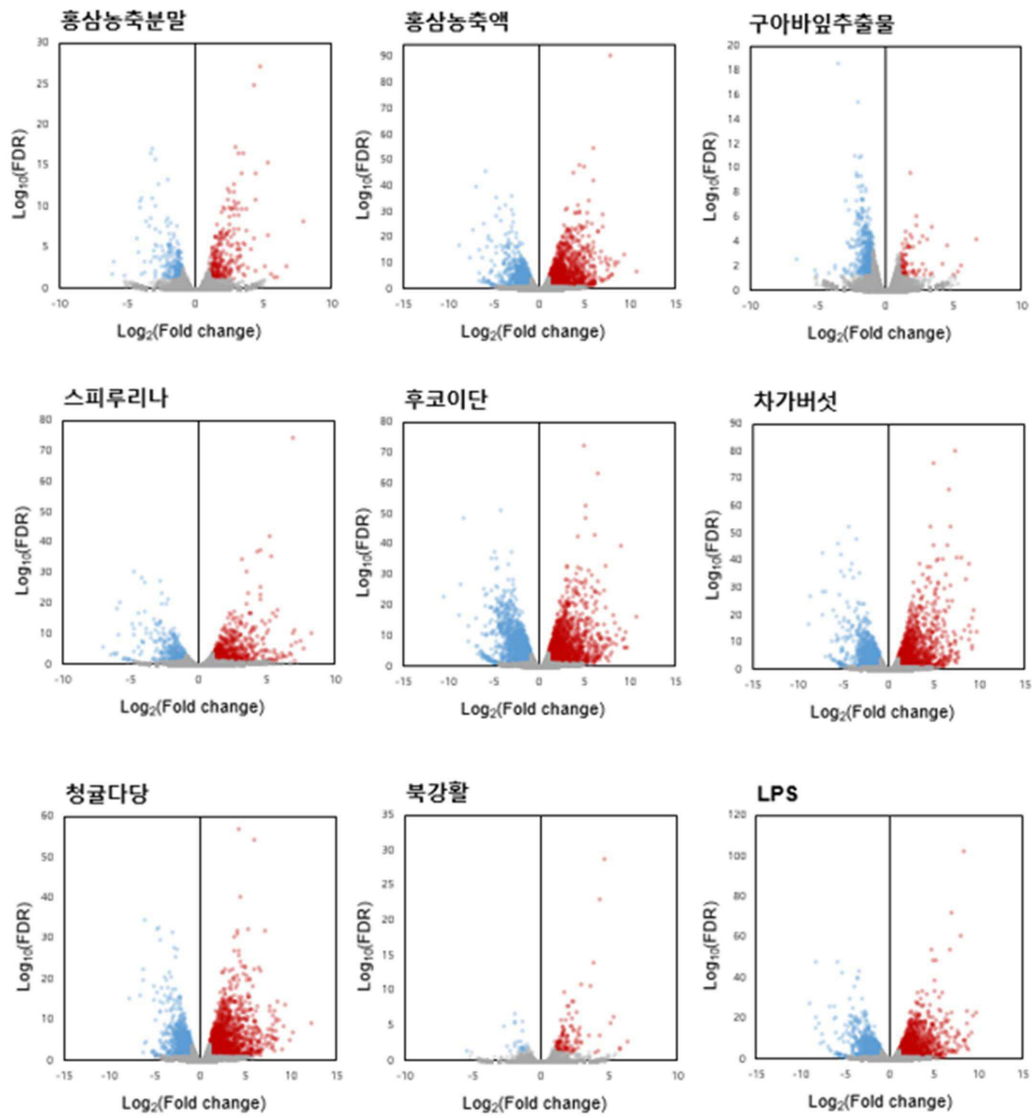
도면1



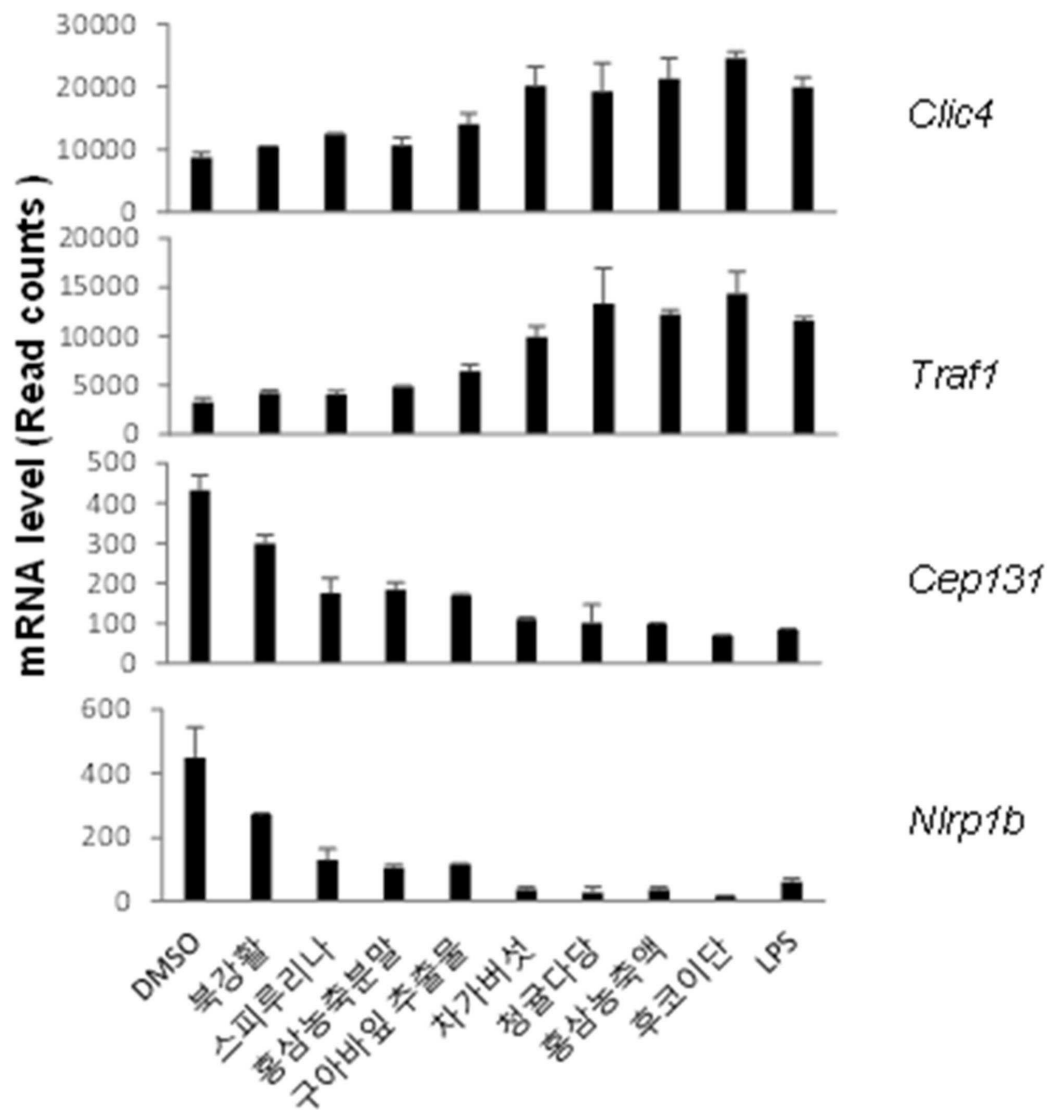
도면2



도면3

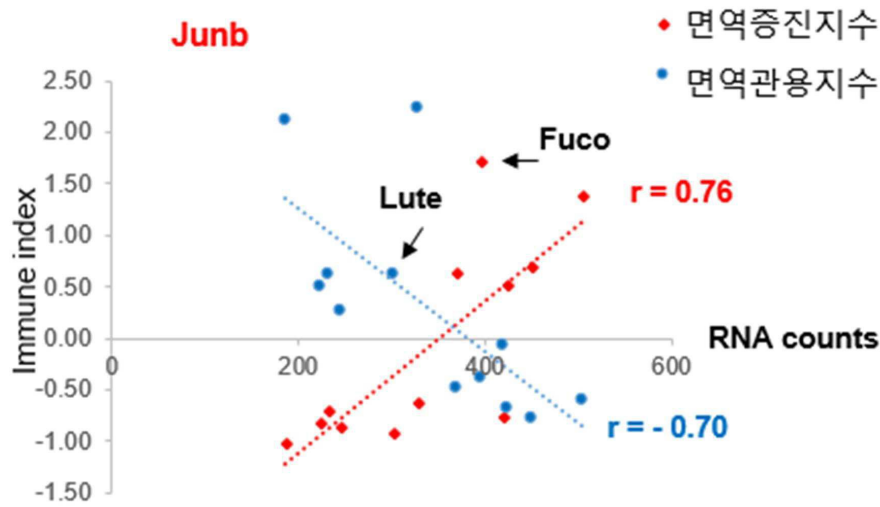


도면4a

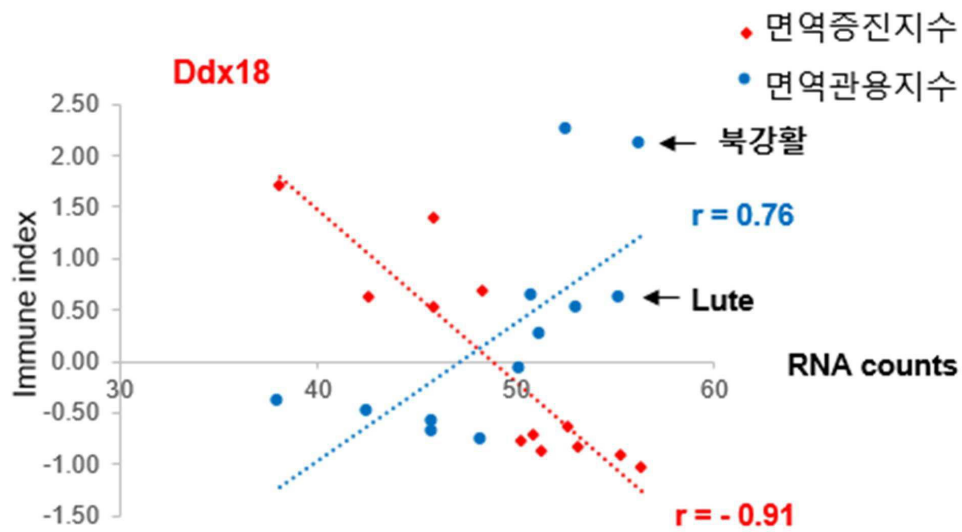


도면4b

(A) 면역증진 유전자 마커



(B) 면역관용 유전자 마커



도면5

