

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0061423

(43) 공개일자 2025년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/74 (2015.01) A23L 33/135 (2016.01)

A61K 35/745 (2015.01) A61P 1/00 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01) A61P 29/00 (2023.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/74 (2013.01)

A23L 33/135 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2023-0145831

(22) 출원일자 2023년10월27일

심사청구일자 2023년10월27일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

이근욱

강원도 춘천시 스포츠타운길 460, 105동 2605호

김봉수

강원특별자치도 춘천시 안마산로 133, 113동 2105호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

구현서

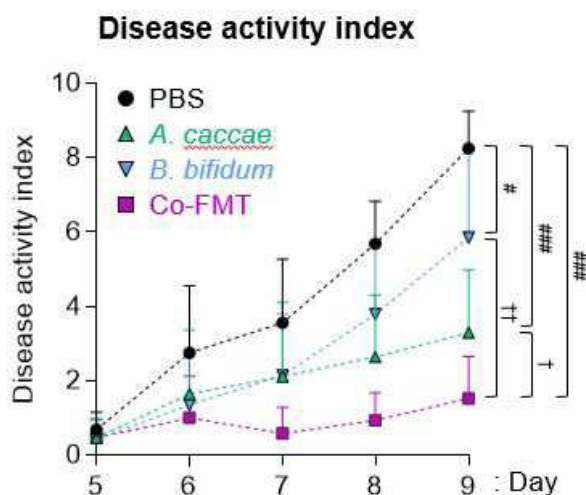
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 Anaerostipes caccae와 Bifidobacterium bifidum 균주를 유효성분으로 포함하는 대장염 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 *Anaerostipes caccae*와 *Bifidobacterium bifidum* 혼합 균주로 구성된 프로바이오틱스 미생물들을 유효성분으로 포함하는 궤양성 대장염 예방 또는 치료를 위한 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 *A. caccae*와 *B. bifidum* 균주를 1:1의 비율로 혼합한 프로바이오틱스 조성물은 궤양성 대장염 동물 모델에서 장 단축, 체중 손실, 설사, 혈변 등의 감소를 포함한 대장염의 증상을 개선하였고, 대장 점막조직 손상 및 염증에 관한 조직학 병리학적 보호 효능을 나타내었다.

대표도 - 도1c



(52) CPC특허분류

A61K 35/745 (2013.01)

A61P 1/00 (2018.01)

A61P 1/04 (2018.01)

A61P 29/00 (2023.02)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/32 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

A23V 2400/517 (2023.08)

A61K 2300/00 (2023.05)

(72) 발명자

박성원

강원도 속초시 청대로232번길 13-9

김민영

경기도 남양주시 진접읍 부평로 32 진접센트레빌시
티1단지 104동 1202호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711134181
과제번호	2021M3A9I4023974
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	차세대바이오 유망범용기술연구지원
연구과제명	장 모사 숙주세포-장내미생물 공배양시스템 기반 마이크로바이옴 기능 검증 플랫폼
기술 개발	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2021.04.01 ~ 2025.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

Anaerostipes caccae와 Bifidobacterium bifidum 균주를 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 Anaerostipes caccae와 Bifidobacterium bifidum 균주의 조합비는 1:1인 것을 특징으로 하는 염증성 장질환 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 염증성 장질환은 만성 장염, 크론병, 궤양성 대장염, 베체트 장염, 과민성 장 증후군, 장상피세포 이형성증, 장상피화생 또는 분비성 설사인 것을 특징으로 하는 염증성 장질환 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 염증성 장질환은 궤양성 대장염인 것을 특징으로 하는 염증성 장질환 치료용 약학 조성물.

청구항 5

Anaerostipes caccae와 Bifidobacterium bifidum 균주를 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 Anaerostipes caccae와 Bifidobacterium bifidum 균주의 조합비는 1:1인 것을 특징으로 하는 염증성 장질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 염증성 장질환은 만성 장염, 크론병, 궤양성 대장염, 베체트 장염, 과민성 장 증후군, 장상피세포 이형성증, 장상피화생 또는 분비성 설사인 것을 특징으로 하는 염증성 장질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 염증성 장질환은 궤양성 대장염인 것을 특징으로 하는 염증성 장질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

Anaerostipes caccae와 Bifidobacterium bifidum으로 구성된 혼합 균주 조성물을 인 비트로에서 대장 점막 조직 세포에 처리하여 상기 세포에서 IFN- γ , GM-CSF, IL-17A, IL-1 β , IL-23, IL-6, IL-12, IL-1 α , MCP-1의 생산을 억제하고, IL-22 생산을 증가시키는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 Anaerostipes caccae와 Bifidobacterium bifidum 균주의 조합비는 1:1인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

Anaerostipes caccae와 Bifidobacterium bifidum 균주를 유효성분으로 포함하는 선천성 면역세포 호중구(neutrophil), 단핵구(monocyte), 및 대식세포(macrophage)의 대장 점막조직 유입 억제용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 Anaerostipes caccae와 Bifidobacterium bifidum 균주의 조합비는 1:1인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

Anaerostipes caccae와 Bifidobacterium bifidum 균주를 유효성분으로 포함하는 타입 1 CD4 T 세포 활성 억제 및 IL-22 발현 CD4 T 세포 증가용 조성물.

청구항 14

Anaerostipes caccae와 Bifidobacterium bifidum 균주를 유효성분으로 포함하는 SCFA(Short chain fatty acid) 생산 증진용 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 SCFA는 초산(acetate), 프로피온산(propionate), 부틸레이트(butyrate) 및 발레르산(valerate)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 산인 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 Anaerostipes caccae와 Bifidobacterium bifidum 균주를 유효성분으로 포함하는 대장염 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 A. caccae와 B. bifidum 각각의 균주 단독 조성물에 비해 매우 우수한 궤양성 대장염 개선 효능을 Anaerostipes caccae와 Bifidobacterium bifidum 균주를 유효성분으로 포함하는 대장염 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 염증성 장질환(Inflammatory bowel disease)은 위 장관(gastrointestinal tract)에 나타나는 난치성 만성 염증질환으로서, 일반적으로 크론병(Crohn disease)과 궤양성 대장염(ulcerative colitis) 두 종류의 질환으로 구분된다.
- [0003] 염증성 장질환은 대한민국을 포함해 전세계적으로 계속 증가하는 추세에 있고, 심한 경우 대장암의 발병 원인으로 보고되고 있다. 염증성 장질환의 발병 원인은 주로 유전적 요인과 면역학적 요인, 장내 미생물 불균형 등이 있고, 이러한 다양한 요인들 간의 밀접한 상호작용이 염증성 장질환을 가속화한다고 알려져있다.
- [0004] 염증성 장질환을 치료 또는 제어하기 위한 방법으로 최근 프로바이오틱스(probiotics; 유용 미생물)를 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다. 프로바이오틱스는 인체에 투여하였을 때 생리적 문제를 야기하지 않고, 건강을 개선시킬 수 있는 살아있는 미생물을 의미한다.
- [0005] 현재 개발된 프로바이오틱스는 주로 락토바실러스 유산균(Lactobacillus)과 비피도박테리아(Bifidobacterium)가 주를 이루며, 이러한 프로바이오틱스는 대장염 개선 효능을 보인다는 결과가 발표된 바 있다.
- [0006] 염증성 장질환 환자는 유용 미생물의 군집이 건강한 사람보다 상대적으로 적게 존재하고, 유용 미생물에서 유래한 대사체 short chain fatty acids(SCFAs)의 체내 수치가 낮은 것으로 알려져 있다. 대표적으로 acetate, propionate, butyrate 등 SCFAs의 수치 및 대사과정을 통해 SCFAs를 생산할 수 있는 장내 미생물들이 염증성 장질환 환자의 경우 정상인에 비해 낮다는 연구 결과들이 다수 보고되었다. Butyrate를 포함하는 SCFAs는 장내 pH를 낮춰 혐기성 유익균들이 성장에 도움을 주고, 장점막 상피세포들의 에너지원으로 활용되어 뮤신 등의 분비를 촉진하고, 면역세포에 작용하여 항염증 활성을 발휘하는 등 다양한 생리적 중요성이 부각되고 있다.
- [0007] SCFAs는 장내 미생물들의 탄수화물 대사과정에서 만들어지는 최종 대사체들로서, 그 중 butyrate는 사람의 장 내에서 주로 Firmicutes 문의 일부 Clostridium 계열의 혐기성 장내 미생물들에 의해 생산되는 것으로 보고되었다. 예를 들어 Faecalibacterium prausnitzii는 분변 시료에서 가장 많이 존재하는 butyrate 생산 미생물로서

탄수화물 대사과정 중 주로 butyryl-CoA: acetate CoA-transferase 경로를 통해 butyrate 또는 acetate를 합성한다. 또한, 미생물 중에 따라 탄수화물 대사 과정의 butyrate kinase 경로 및 lysine, glutamate 등 단백질 대사과정을 통해 butyrate를 합성할 수도 있다.

[0008] 이에, SCFA 생산을 증가시킬 수 있는 대사경로를 갖는 프로바이오틱스를 투여하거나 식이 요법으로 미생물 대사과정 조절을 통해 SCFA 생산을 증가시키고자 하는 노력이 시도되고 있다. 하지만, 후보 프로바이오틱스 미생물의 낮은 장내 생착 효율과 장내 환경에서 SCFA 생산 미생물 대사과정 제어의 한계점 등으로 인해 아직까지 SCFAs에 기반한 연구의 실용화 단계진입은 어려운 상황이다.

[0009] 장내 미생물은 각각 독립적으로 존재하는 것보다는 장 생태계 내에서 공생 관계의 다른 유기체와 상호 작용적으로 영향을 주고 성장 및 대사 활동을 조절한다. 특히, 장내 미생물들 사이의 자연스러운 “cross-feeding” 관계는 서로 다른 미생물에게 선호하는 에너지원 또는 필수 영양소를 전달해 주는 방식의 미생물간 상호작용을 통해 특정 미생물 군의 성장과 적절한 미생물 군집 형성에 필요한 환경을 조성한다. 이러한 cross-feeding 관계는 SCFAs를 생산할 수 있는 프로바이오틱스 미생물의 장내 생착과 SCFAs 대사체 생산의 효율을 높이는 전략으로 활용될 수 있다.

[0010] 또한 대장 점막 조직내 과도한 염증성 면역세포의 유입과 무분별한 염증 반응은 대장염의 개시와 진행 과정에 기여한다. 주로 염증 초기부터 지속적으로 호중구 (neutrophil)과 단핵구 (monocyte)가 유입되고, 단핵구에서 분화된 염증성 대식세포 (macrophage)와 활성화된 type 1 및 type 17 염증성 CD4 T 세포 등에 의한 지속적인 염증 반응은 대장 점막 조직의 손상을 유발한다.

[0011] 한편, 정상적인 면역 시스템은 염증 반응의 항상성 (homeostasis) 조절을 위해 항염증성 regulatory T 세포, 항염증성/조절성 대식세포 등의 기능을 통해 과도한 염증 반응을 억제하고 조직 재생을 촉진할 수 있다. 특히, 인터루킨 22 (IL-22)는 점막 조직의 면역세포에서 분비되는 사이토카인으로서 상피세포에 작용하여 점막조직의 재생, 뮤신 분비 증진 및 항균펩타이드 생산 등을 통한 barrier 기능 강화 등의 역할이 보고되고 있다.

[0012] [선행 특허 문헌]

[0013] 대한민국 특허 공개번호 제10-2020-0053531호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 신규한 대장염 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 장 내 면역조절제로서, 호중구 및 단핵구의 유입을 억제하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 장 내 면역조절제로서 염증성 대식세포의 분화를 억제하고, 항염증성/조절성 대식세포의 분화를 촉진하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 장 내 면역조절제로서, CD4 T 세포의 IFN- γ 의 억제 및 IL-22 발현 및 생산을 유도하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 유용 장내 미생물 대사체인 short chain fatty acids (SCFAs) 생산을 증진시키는 조성물을 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 또 다른 목적은 대장염의 원인 또는 대장염에 의해 유발되는 dysbiosis를 억제하고 건강한 장 생태계를 유도하는 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0020] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 *Anaerostipes caccae*와 *Bifidobacterium bifidum* 균주를 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 *Anaerostipes caccae*와 *Bifidobacterium bifidum* 균주의 조합비는 1:1인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0022] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 염증성 장질환은 만성 장염, 크론병, 궤양성 대장염, 베체트 장염, 과

민성 장 증후군, 장상피세포 이형성증, 장상피화생 또는 분비성 설사인 것이 바람직하고,

[0023] 상기 염증성 장질환은 궤양성 대장염인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0024] 본 발명에서, 본 발명에서, 상기 조성물의 유산균 혼합 프로바이오틱스는 상술한 2종의 유산균으로부터 얻은 분말로 함유할 수 있다.

[0025] 본 발명의 조성물에 포함되는 상기 유산균 분말은 당업계에서 사용되는 통상적인 유산균 코팅제를 첨가하여 제조할 수 있다.

[0026] 본 발명에서 사용가능한 코팅제로는 키토산(chitosan), 말토덱스트린(malto-dextrin), 난소화성 덱스트린(indigestible dextrin), 잔탄검(xanthan gum, XG), 구아검(guar gum, GG), 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethyl cellulose, CMC), 하이드록시에틸셀룰로오스(hydroxyethylcellulose, HEC), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone, PVP), 카보폴(carbopol), 소듐알기네이트(sodium alginate), 프로필렌글리콜 알기네이트(propylene glycol alginate), 알지네이트(alginate), 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol, PEG), 트리아세틴(triacetin), 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 아세틸트리에틸 시트레이트(acetyl triethyl citrate) 및 트리에틸 시트레이트(triethyl citrate)를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 구체적으로 유산균 배양 후 균체를 회수하고, 코팅제 또는 동결보호제로서 말토덱스트린, 트레할로오스, 셀룰로오스 및 프롤린을 추가적으로 첨가한 다음, 동결건조 후 분쇄하여 유산균 분말을 수득할 수 있다.

[0027] 본 발명에서, 상기 프리바이오틱스는 갈락토올리고당(Galacto-oligosaccharide), 프락토올리고당(Fructooligosaccharide), 마이크로바이옴 X, 락티톨 및 카무트(Kamut) 추출물로 이루어진 군으로부터 선택된 3종 이상일 수 있고, 보다 구체적으로 갈락토올리고당(Galacto-oligosaccharide), 프락토올리고당(Fructooligosaccharide), 마이크로바이옴 X, 락티톨 및 카무트(Kamut)로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 여기서 카무트는 카무트 분말, 증숙물 또는 추출물일 수 있고, 구체적으로 카무트 증숙물일 수 있다. 또한, 카무트 추출물은 카무트의 추출처리에 의하여 얻어지는 추출액, 상기 추출액의 희석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 조정제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함한다.

[0029] 본 발명에서, 상기 염증성 장 질환은 만성 장염, 크론병, 궤양성 대장염, 베체트 장염, 과민성 장 증후군, 장상피세포 이형성증, 장상피화생 또는 분비성 설사일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 이에, 본 발명의 조성물은 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물의 유효성분으로 유용하게 이용될 수 있다.

[0031] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제와 병용하여 사용될 수 있고, 상기 제제와 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0032] 구체적으로, 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성율, 배설 속도, 질병 종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.1 mg 내지 100 mg, 바람직하게는 0.3 mg 내지 80 mg을 매일 또는 격일로 투여하거나 1일 1회 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 근육 내, 정맥 내, 복강 내, 피하, 피내, 또는 국소에 적용) 할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명의 조성물은 콜로이드 현탁액, 분말, 식염수, 지질, 리포솜, 미소구체(microspheres), 또는 나노구형입자와 같은 약학적으로 허용될 수 있는 담체를 사용하여 운반될 수 있다. 이들은 운반 수단과 복합체를 형

성하거나 서로 연결 또는 담체 중에 포함될 수 있고, 지질, 리포솜, 미세입자, 금, 나노입자, 폴리머, 촉합 반응제, 다당류, 폴리아미노산, 덴드리머, 사포닌, 흡착 증진 물질 또는 지방산과 같은 당업계에 공지된 운반 시스템을 사용하여 생체 내로/내에서 운반될 수 있다. 이 외에도, 약학적으로 허용되는 담체는 제제시 통상적으로 이용되는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아, 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세 결정성 셀룰로스, 폴리비닐 피로리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명의 조성물을 제제화할 경우, 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제제화 될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되고, 이러한 고형 제제는 본 발명의 모링가 추출물, 천연초 추출물 또는 이들의 혼합물에 적어도 하나 이상의 부형제(전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose) 또는 젤라틴) 및 윤활제(마그네슘 스테레이트 탈크) 등을 섞어 제조할 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 포함되고, 이러한 액상 제제는 적어도 하나 이상의 희석제(물, 리퀴드 파라핀), 부형제, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 섞어 제조할 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함되고, 상기 비수용용제 및 현탁용제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있으며, 상기 좌제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0036] 또 본 발명은 *Anaerostipes caccae*와 *Bifidobacterium bifidum* 균주를 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0037] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 *Anaerostipes caccae*와 *Bifidobacterium bifidum* 균주의 조합비는 1:1인 것인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0038] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 염증성 장질환은 만성 장염, 크론병, 궤양성 대장염, 베체트 장염, 과민성 장 증후군, 장상피세포 이형성증, 장상피화생 또는 분비성 설사인 것이 바람직하고,

[0039] 상기 염증성 장질환은 궤양성 대장염인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0040] 본 발명의 조성물은 건강기능식품 또는 식품 조성물로 제조될 수 있다.

[0041] 본 발명에서 사용되는 용어, "식품 조성물"은 각각의 조성물을 먹거나 마시는 데에 독성증상을 유발함이 없이 먹고/먹거나 마실 수 있는 임의 종류의 조성물을 지칭한다.

[0042] 본 발명에서 사용되는 용어, "건강기능식품(functional food)"은 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)와 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료 효과가 높은 식품이다.

[0043] 본 발명에서, 상기 식품 조성물은 음료, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품, 통상적인 의미에서의 가공 식품 및 건강기능식품일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 음료 조성물은 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제(천연 향미제, 예를 들어 타우마틴, 스테비아추출물, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등; 및 합성 향미제, 예를 들어 사카린, 아스파르탐 등) 또는 천연 탄수화물(모노사카라이드, 예를들어, 포도당, 과당등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜) 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100g 당 일반적으로 약 1 g 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 g 내지 10 g이다.

[0044] 또한, 상기 외에 본 발명의 식품은 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제, 천연 풍미제, 착색제, 충전제, 펙트산, 펙트산 염, 알긴산, 알긴산염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산화제 및 과육 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 도합하여 사용할 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다. 상기 첨가제의 비율은 본 발명의 조성물 100g 당 일반적으로 약 0.1 g 내지 20 g, 바람직하게는 약 1 g 내지 20 g일 수 있다.

- [0045] 또한, 상기 건강기능식품은 유효성분을 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 건강기능식품은 원료에 대하여 바람직하게 15 중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있다.
- [0046] 또한 본 발명은 *Anaerostipes caccae*와 *Bifidobacterium bifidum*으로 구성된 혼합 균주 조성물을 인 비트로에서 대장 점막 조직 세포에 처리하여 상기 세포에서 IFN- γ , GM-CSF, IL-17A, IL-1 β , IL-23, IL-6, IL-12, IL-1 α , MCP-1의 생산을 억제하고, IL-22 생산을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0047] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 *Anaerostipes caccae*와 *Bifidobacterium bifidum* 균주의 조합비는 1:1인 것인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0048] 또한 본 발명은 *Anaerostipes caccae*와 *Bifidobacterium bifidum* 균주를 유효성분으로 포함하는 선천성 면역세포 호중구 (neutrophil), 단핵구 (monocyte), 및 대식세포 (macrophage)의 대장 점막조직 유입 억제용 조성물을 제공한다.
- [0049] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 *Anaerostipes caccae*와 *Bifidobacterium bifidum* 균주의 조합비는 1:1인 것인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0050] 또 본 발명은 *Anaerostipes caccae*와 *Bifidobacterium bifidum* 균주를 유효성분으로 포함하는 타입 1 CD4 T 세포 활성 억제 및 CD4 T 세포 증가용 조성물을 제공한다.
- [0051] 또한 본 발명은 *Anaerostipes caccae*와 *Bifidobacterium bifidum* 균주를 유효성분으로 포함하는 SCFA(Short chain fatty acid) 생산 증진용 조성물을 제공한다.
- [0052] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 SCFA는 초산(acetate), 프로피온산(propionate), 부틸레이트(butyrate) 및 발레르산(valerate)으로 구성된 균으로부터 선택된 하나 이상의 산인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0053] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0054] 본 발명에서 프로바이오틱스는 *Anaerostipes caccae*를 유효성분으로 포함하는 단일 균주 조성물과 *Anaerostipes caccae*와 *Bifidobacterium bifidum*을 유효성분으로 포함하는 1:1 조합 혼합 균주 조성물을 지칭한다.
- [0055] *Anaerostipes caccae* 단일 균주와 *Anaerostipes caccae* 와 *Bifidobacterium bifidum* 혼합 균주를 유효성분으로 포함하는 대장염 질환에 대한 증상을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공한다.
- [0056] *Anaerostipes caccae* 단일 균주와 *Anaerostipes caccae* 와 *Bifidobacterium bifidum* 혼합 균주를 유효성분으로 포함하는 대장염 질환에 대한 증상을 예방 또는 치료하기 위한 개선용 건강기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [0058] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0059] 본 발명에서는 두 종류의 혐기성 미생물 *Bifidobacterium bifidum*과 *Anaerostipes caccae*의 cross-feeder 관계를 검증하고자 하였다. 선행 연구에 기초하여 프로바이오틱스로 알려진 *B. bifidum*은 탄수화물 대사과정에서 주로 최종 대사체로서 lactate와 acetate를 생산하고, *A. caccae*는 중간 대사체로서 lactate와 acetate를 이용하여 butyryl-CoA: acetate CoA-transferase 경로를 통해 최종 대사체 butyrate 생산하는 SCFA cross-feeder 관계일 것이라는 가설을 수립하였다.
- [0060] 이러한 *B. bifidum*과 *A. caccae* 간의 SCFA cross-feeding 관계를 검증하기 위해 케양성 대장염 동물 모델을 적용하여 두 미생물간의 상호작용이 염증성 장질환에 미치는 효과와 염증 제어 메커니즘을 분석하였다.
- [0061] 또한 본 발명에서는 *B. bifidum*과 *A. caccae* 간의 SCFA cross-feeding 관계에 의한 대장 점막 조직내 염증 세포의 활성 분석 뿐만 아니라, 항염증/조절성 면역세포와 IL-22 생산에 미치는 영향을 평가하였다.
- [0062] 본 발명은 *Anaerostipes caccae*와 *Bifidobacterium bifidum* 혼합 균주로 구성된 프로바이오틱스 미생물들을 유효성분으로 포함하는 케양성 대장염 예방 또는 치료를 위한 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 *A. caccae*와 *B.*

bifidum 균주를 1:1의 비율로 혼합한 프로바이오틱스 조성물은 궤양성 대장염 동물 모델에서 장 단축, 체중 손실, 설사, 혈변 등의 감소를 포함한 대장염의 증상을 개선하였고, 대장 점막조직 손상 및 염증에 관한 조직학병리학적 보호 효능을 나타내었다.

[0063] 특히, *A. caccae*와 *B. bifidum* 각각의 균주 단독 조성물에 비해 매우 우수한 궤양성 대장염 개선 효능을 발휘하였다. 면역학적 측면에서 본 발명의 혼합 균주 조성물은 대장염 마우스의 대장 점막 조직내 호중구와 단핵구의 유입을 억제하였고, 인터페론 감마 (IFN- γ)를 생산하는 염증성 CD4 T 세포의 활성을 억제하는 반면, 인터루킨 22 (IL-22)를 생산하는 CD4 T 세포의 활성을 증가시켰다.

[0064] 또한 본 발명의 혼합 균주 조성물은 장내 short chain fatty acids (SCFAs) 생산을 증진시켰으며, 대장염으로 유도되는 장내 세균 불균형 (dysbiosis)을 개선하였다.

발명의 효과

[0066] 본 발명을 통해서 알 수 있는 바와 같이 본 발명의 *Anaerostipes caccae*와 *Bifidobacterium bifidum* 균주를 포함하는 조성물은 대장염을 억제하는 효과가 탁월하다. 또한, 염증 반응을 억제하는 효과 및 항염증 반응 효과를 증대시키는 효과가 우수하여 장염 관련 질환의 치료 또는 증상 개선을 위하여 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0068] 도 1a-도 1e는 *Anaerostipes caccae*와 *Bifidobacterium bifidum*은 협력작용 (synergistic effects)으로 대장염 증상을 개선한다는 것을 보여주는 그림으로,

(a) 실험 모식도: 6주령 C57BL/6J 수컷 마우스에게 amoxicillin을 포함하는 음용수를 1주일간 공급하여 항생제 처리 후, 단일 균주 조성물로 1×10^9 colony forming unit (CFU)의 *A. caccae* 또는 1×10^9 CFU의 *B. bifidum*, 그리고 혼합 균주 조성물로 5×10^8 CFU의 *A. caccae*와 5×10^8 CFU의 *B. bifidum* (Co-FMT)를 2회 위내 투여하였다. 미생물 투여 후 2.5%의 dextran sodium sulfate (DSS)를 포함하는 음용수를 7일간 공급하여 궤양성 대장염을 유도하였다.

(b) 궤양성 대장염 유도에 따른 마우스의 체중 감소를 9일간 측정된 결과 두 종류의 미생물을 동시 투여한 (Co-FMT) 실험군의 체중 감소가 각각의 미생물을 단독 투여한 실험군들에 비해 유의하게 개선되었고,

(c) 체중감소와 분변 상태 검사 결과를 점수화한 대장염 중증도 (disease activity index) 측면에서도 탁월한 증상 개선 효능이 관찰되었다.

(d, e) 대장염 유도에 따른 대장의 길이 측정을 통해 Co-FMT 실험군은 각각의 미생물을 단독 투여한 실험군들에 비해 우수한 대장 길이 감소에 대한 보호 효과를 확인할 수 있었다.

도 2a-도 2g는 *Anaerostipes caccae*와 *Bifidobacterium bifidum*은 협력작용 (synergistic effects)으로 대장 점막 조직 손상과 염증을 억제한다는 것을 보여주는 그림으로,

(a) 대장 distal colon 부위의 점막 조직을 분리하여 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색과 Periodic Acid Schiff-Alcian Blue (PAS-AB) 염색 기법으로 조직병리 분석을 수행하였다.

(a)의 H&E 염색 분석을 통해 (b) 대장 상피조직 구조의 손상 (epithelial damage)과 (c) 점막 (mucosal) 및 점막하 (submucosal) 조직내 염증세포의 유입 정도 측면에서 Co-FMT 실험군에서 유의한 병리학적 개선 효능을 관찰하였다.

(a)의 PAS-AB 염색 분석을 통해 뮤신을 분비하는 (d) 배상세포 (goblet cell)의 갯수를 정량한 결과 Co-FMT 실험군은 건강한 대조군 수준으로 대장 점막 배상세포의 수를 유지하였다.

(e-g) 대장 상피조직에서 단백질을 분리하여 tight junction 단백질 ZO-1과 Occludin의 양을 Western blotting 기법으로 분석하였고, β -actin에 대한 상대적인 각각의 단백질 발현 정도를 비교하였다. Co-FMT 실험군은 대조군 수준 이상으로 ZO-1 단백질 발현을 유지하였고, 대조군보다는 낮지만 대장염 유도에 따른 Occludin 단백질 손실을 유의하게 개선하는 결과를 확인하였다.

도 3은 *Anaerostipes caccae*와 *Bifidobacterium bifidum*으로 구성된 혼합 균주 조성물은 대장 점막조직의 염증 사이토카인의 생산을 감소시키고, IL-22 생산을 증가시킨다는 것을 나타낸 그림으로,

대장 distal colon 분리하여, *Ex vivo* organ culture 방식으로 24 시간 배양후 배양액에 분비된 사이토카인을 Cytokine Bead Array (CBA) 기법으로 정량한 결과, Co-FMT 실험군은 PBS 투여 대조군에 비해 대장염 유도에 따라 증가된 사이토카인 IFN- γ , GM-CSF, IL-17A, IL-1 β , MCP-1의 생산을 억제하고, 조절성 사이토카인 IL-22 생산을 유의하게 증가시킴을 확인하였다.

도 4a-도 4d는 *Anaerostipes caccae*와 *Bifidobacterium bifidum*으로 구성된 혼합 균주 조성물은 대장염 유발에 따른 선천성 면역세포 호중구 (neutrophil), 단핵구 (monocyte), 대식세포 (macrophage) 대장 점막조직 유입을 억제한다는 것을 나타낸 그림으로,

(a-b) 대장 조직의 lamina propria로부터 면역세포를 분리한 후, 형광 표지된 항체 조합을 사용하여 면역세포를 염색하고 유세포분석기를 사용하여 호중구 (CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁺ 세포군)와 단핵구/대식세포 (CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁻ CD64⁺ 세포군)의 대장 점막 조직내 유입을 평가하였다. Co-FMT 실험군과 각각의 미생물 단독 투여군 모두 PBS 투여 대조군에 비해 유의하게 호중구와 단핵구/대식세포의 장점막 유입을 억제하였다.

(c) class II MHC와 Ly6C 발현에 따른 대장 점막내 단핵구/대식세포의 분화 정도를 측정한 결과 Co-FMT 실험군은 각각의 미생물 단독 투여군에 비해 유의하게 단핵구 (Ly6C⁺ MHCII⁻) 세포의 분율이 감소하였고, 반면 분화된 성숙 대식세포 (Ly6C⁻ MHCII⁺)의 분율이 증가하였다,

(d) 세포내 사이토카인 염색 기법을 통해 Co-FMT 실험군은 IL-10을 발현하는 항염증성/조절성 대식세포의 활성을 증가시키고, TNF- α 를 발현하는 염증성 대식세포의 활성을 억제함을 입증하였다.

도 5a-도 5b는 *Anaerostipes caccae*와 *Bifidobacterium bifidum*으로 구성된 혼합 균주 조성물은 interferon- γ (IFN- γ) 생산하는 type 1 CD4 T 세포의 활성을 억제하고, interleukin 22 (IL-22)를 생산하는 CD4 T 세포를 증가시킨다는 것을 보여주는 그림으로,

(a) 대장 조직의 lamina propria로부터 면역세포를 분리한 후, CD4 T 세포 (CD45⁺ TCR- β ⁺ CD4⁺ 세포군)의 세포내 사이토카인 염색 기법을 통해 IFN- γ 를 발현하는 type 1 helper T (Th1) 세포와 IL-17을 발현하는 type 17 helper T (Th17) 세포의 활성을 분석하였다. Co-FMT 실험군과 각각의 미생물 단독 투여군 모두 PBS 투여 대조군에 비해 유의하게 IFN- γ 를 발현하는 Th1 세포의 활성을 억제하였지만, IL-17을 발현하는 Th17 세포의 활성을 억제하지는 못하였다.

(b) 세포내 사이토카인 IL-22와 IL-17A 염색 기법을 통해 IL-22와 IL-17을 동시에 생산하는 Th17 세포와 IL-22만 생산하는 CD4 T 세포 (Th22)의 활성을 분석한 결과, Co-FMT 실험군은 IL-22를 생산하는 Th17 세포 (IL-22⁺ IL-17⁻ CD4 T 세포)와 IL-22만을 생산하는 Th22 세포 (IL-22⁺ IL-17⁺ CD4 T 세포)의 분율을 유의하게 증가시켰다. 본 결과는 도 3의 대장 조직배양에서 관찰된 IL-22 정량 결과와 일치하는 결과이다.

도 6a-도 6b는 *Anaerostipes caccae*와 *Bifidobacterium bifidum*으로 구성된 혼합 균주 투여는 Short chain fatty acid (SCFA) 생산을 증진시킨다는 것을 나타낸 그림으로,

(a) 분변 내 4종의 SCFA acetate, propionate, butyrate, valerate를 질량분석기를 사용하여 정량하였다. 대조군의 경우 대장염 유도 후 (4일) 분변내 4종의 SCFA들이 모두 감소되는 현상이 관찰되었지만, Co-FMT 실험군은 분변 내 acetate, propionate, butyrate, valerate의 양이 건강한 대조군 수준으로 유지되었다. 특히, 분변 내 butyrate를 제외한 3종의 SCFA acetate, propionate, valerate의 양이 각각의 미생물 단독 투여군에 비해 유의하게 증가된 것으로 측정되었다.

(b) 4종의 SCFAs의 비율 측면에서는 각 군당 유의한 차이점이 확인되지 않았지만, Co-FMT 실험군은 PBS 투여 대조군 뿐만 아니라 건강한 대조군에 비해 유의하게 증가된 SCFAs의 총량 (acetate, propionate, butyrate, valerate의 총량)을 확인할 수 있었다.

도 7은 *Anaerostipes caccae*와 *Bifidobacterium bifidum*으로 구성된 혼합 균주 투여는 대장염 유발에 의한 장내미생물 군총의 변화 (dysbiosis)를 감소시킨다는 것을 보여주는 그림으로,

실험 전 (-14일), 항생제 처리 직후 (-7일), 대장염 유발 직전 (0일), 대장염 유발 후 (4일, 9일) 수집한 마우

스 분변으로부터 DNA를 분리하여 whole metagenome sequencing과 생물정보학 분석을 수행하였다. 케양성 대장염 유발에 따른 미생물 군총의 변화를 추적 분석한 결과, 대장염이 유발된 시점 (4일, 9일)의 마이크로바이옴 조성 과 실험 전 (-14일) 건강한 상태의 마이크로바이옴 조성간의 상이성이 Co-FMT 실험군에서 가장 유의하게 감소하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0069] 이하 비 한정적인 실시예 및/또는 실험예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.
- [0070] 실시예 1: 본 발명에서 균주 조성물 제조
- [0071] 본 발명에서는 *Anaerostipes caccae* 단일 균주 조성물과 *Anaerostipes caccae* 와 *Bifidobacterium bifidum*의 1:1 혼합 균주 조성물을 사용하였다.
- [0072] 사용된 각 균주는 *Anaerostipes caccae* KCTC 15019, *Bifidobacterium bifidum* YF217이다.
- [0073] 본 발명의 *A. caccae*의 경우 KCTC(Korean Collection for Type Cultures) 생물자원센터로 부터 구입하였고, *B. bifidum*의 경우 UC 환자로 부터 분리 및 동정하여 자원화하였다.
- [0074] *A. caccae* 균주와 *B. bifidum* 균주는 TSB 배지에서 약 9시간 배양한 후, PBS로 resuspension하였다. *A. caccae* 또는 *b. bifidum* 단일 균주 조성물은 1×10^9 CFU/200 ul의 세포 밀도 (cell density)로 제조하였으며, *A. caccae*와 *b. bifidum* 혼합 균주 조성물은 각기 5×10^8 CFU/100 ul 의 세포 밀도로 제조한 것을 1:1 비율로 혼합하여 사용하였다.
- [0076] 실시예 2: 대장염 마우스 모델에서 본 발명의 단일 균주 및 혼합 균주 조성물의 적용 및 케양성 대장염 평가
- [0077] C57BL/6J mice는 DBL (Seoul, Korea)로부터 구입하여 한림대학교 실험동물센터에서 SPF (Specific pathogen free) 시설에서 유지하였다. 모든 동물 실험은 한국 식약처 가이드라인에 준하여 수행하였다. 실험 프로토콜은 한림대 동물 실험 윤리위원회의 승인을 받았다.
- [0078] 단일 균주 및 혼합 균주를 투여하고 장내 정착 (colonization)을 증진시키기 위해 1g/L의 amoxicillin 함유하는 음용수를 6주령의 수컷 C57BL/6J 마우스에게 6일 동안 공급하고, 2일의 휴지기를 준 후, 두 차례에 걸쳐 2일 간격으로 각각 1×10^9 CFU의 미생물을 마우스에 위내 투여하였다. 미생물 투여 후 3일 후, 2.5%의 dextran sodium sulfate (DSS)를 함유하는 음용수를 7일간 마우스에게 공급하여 케양성 대장염을 유발하였고, 대장염 유발 9일 후 마우스를 안락사하고 부검하였다.
- [0079] 장염 평가 지표로 몸무게 변화, 대장염 중증도 (disease activity index), 장 길이 측정하였다.
- [0080] 장염 유도에 따른 몸무게 변화는 각 개체마다 매일 1회 측정하였으며, 체중 감소 변화를 장염 개시일 (day 0) 대비 percent body weight으로 나타내었다.
- [0081] 대장염 중증도는 다음과 같이 점수화 하였다. 체중 감소 ('0': 변화 없음; '1': 1-5% 감소; '2': 5 -10% 감소; '3': 10-15 감소; '4': 15-20% 감소); 혈변 ('0': 정상; '1': hemocult; '2': hemocult with visual pellet bleeding; '4': gross bleeding, blood around anus), 그리고 대변 굳기 ('0': 정상; '2': 묽은 변; '4': 설사). 총 점수는 각 지표를 더하여, 최대 점수 12점을 주었다.
- [0082] 장 길이는, 마우스 맹장 아래 proximal colon에서부터 distal colon에 이르는 총 길이를 측정하였다.
- [0084] 실시예 3: 대장 조직병리학적 평가
- [0085] 장 조직병리학적 평가는 hematoxylin & eosin (H&E) 염색과 periodic acid-Schiff stain-alcian blue (PAS-AB) 염색 기법을 통해 수행하였다.
- [0086] 대장 조직을 4% paraformaldehyde로 고정한 뒤, paraffin embedding 후, 5 μ m 절편으로 slicing 하였다. H&E 염색 조직 절편은 병리학적 상태에 따라 다음과 같이 점수화 하였다. 장 상피세포 손상 ('0': 정상; '1': hyper-

proliferative, '2': 50% 이하 장 crypt 손상; '3': 50% 이상 장 crypt 손상; '4': 100% 장 crypt 손상; '5': 궤양 발생), 점막 염증 정도 ('0': 정상; '1': 경증; '2': 중등증; '3': 중증), 점막하 염증 정도('0': 정상; '1': 경증; '2': 중등증; '3': 중증)으로 평가하였다. PAS-AB 염색 조직 절편은 Crypt 당 배상세포 (goblet cell)를 계수하여 평가하였다.

[0088] 실시예 4: 대장 밀착연접 (tight junction) 단백질 측정

[0089] 밀착연접 단백질의 발현을 정량하기 위해 PBS로 세척한 대장 조직을 단백질 추출 용액 (LIPA buffer supplemented with protease inhibitor and phosphatase inhibitor cocktail)에 담그고 10분간 sonication 하여 대장 조직을 용해하였다. 용해된 대장 조직 시료를 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 획득하여 단백질 정량 후 SDS-PAGE와 Western blotting을 수행하였다. Immunoblotting은 anti-ZO-1 (clone Z01-1A12), anti-Occludin (clone EPR8208), anti-β (clone 8H10D10) 항체를 사용하였고, enhanced chemiluminescence (ECL) kit를 이용하여 X-ray film에 감광하였다.

[0091] 실시예 5: 대장 조직 사이토카인 측정

[0092] 마우스 distal colon에 해당하는 부분을 10 mm의 길이로 절단하여, PBS washing 후 24시간 동안 조직 배양하였다. 이후, 조직 배양액을 수거하여 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 획득하여 함유된 사이토카인을 정량하였다. Biolegend사 LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel과 Mouse T Helper Cytokine Panel을 이용하여 IFN-γ, GM-CSF, IL-17A, IL-1β α, MCP-1, IFN-β, IL-10, IL-22를 형광 염색하여 BD사의 FACScalibur 유세포 분석기를 사용하여 측정하였고, FlowJo 소프트웨어를 통해 정량분석하였다.

[0094] 실시예 6: 장 면역세포의 분리 및 유세포 분석

[0095] 대장 점막 조직내 면역세포를 분리하기 위해 PBS로 세척된 대장을 Miltenyi biotec사의 Lamina propria dissociation kit와 gentleMACS Octo Dissociator 기기를 사용하여 분쇄하였다. Lamina propria에서 분리된 세포를 70 μm Cell strainer로 거른 후, ACK lysis buffer를 이용하여 적혈구를 제거하였다. 이후, 세포를 계수하고 형광 항체 염색을 진행하였다.

[0096] 사용된 항체는 다음과 같다: CD45 (clone 30-F11), CD11b (clone M1/70), Ly6G (clone 1A8), CD64 (clone X54-5/7.1), Ly6C (clone HK1.4), MHCII (clone M5/114.15.2), CD4 (clone RM4-5), TCR-b (clone H57-597). 세포 내 사이토카인을 염색하기 위해 분리한 면역세포를 50 ng/ml PMA와 1 μg/ml ionomycin으로 6시간 동안 재활성화시키는 동시에 Golgi-Stop과 Golgi-plug를 처리하여 합성된 사이토카인의 세포내 분비를 억제하였다. 4% paraformaldehyde 처리하여 세포를 고정시키고, 0.1% saponin 함유 염색 용액을 처리하여 세포를 permeabilization 시켰다. 이후, 세포내 사이토카인에 대한 형광 항체 염색을 진행하였고 사용된 항체는 다음과 같다: IL-10 (clone : JES5-16E3), TNF-α (clone : MP6-XT22), IL-17A (clone : eBio17B7), IL-22 (clone : IL22JOP), IFN-γ (clone : XMGI.2). 형광 염색된 면역세포들은 BD사의 FACS CantoII 유세포분석기로 측정하였고, FlowJo 소프트웨어를 통해 분석하였다.

[0097]

[0098] 실시예 7: 분변 내 SCFAs 분석

[0099] 10 mg 중량의 마우스 분변을 안정 동위원소 Standard(¹³C2 acetic acid, ¹³C2 propionic acid, ¹³C2 butyric acid, and ¹³C2 succinic acid), 10 μL 의 200 mM 3-nitrophenylhydrazine hydrochloride (3NPH) 그리고 10 μL 의 120 mM N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC)가 포함된 100 μL 의 증류수로 용해시켰다. 이후, 37℃에서 45분간 배양한 후, 200 mM의 Quinic acid 10 μL를 첨가하여 유도체화 반응을 중단시켰다. 유도체화 시료를 실온에서 10분간 vortexing한 후 10% 메탄올 900 μL를 첨가하여 혼합한 후 4℃, 14,000rpm에서 10분간 원심분리하였다.

[0100] 이동상 A(물) 및 이동상 B(아세트오닐트릴)의 이원 구배를 사용하여 분취량을 역상 컬럼(Waters Hss C18 column, length 100 mm, particle size 1.8 μm, inner diameter 2.1 mm) (Waters Corp, Milford, MA, USA)에 주입했다.

[0101] 각 SCFA는 다음과 같이 0.5mL/분의 유속으로 구배 단계를 통해 용출되었다: 0-1분, 5% B; 1-2.7분, 27% B로 구배; 2.7-3.5분, 40% B; 3.5-5.0분, 40% B로의 구배; 5.0-5.1분, 5% B, 5% B로 구배; 5.1-6.0분. 컬럼의 유출물을 음성 모드의 ESI 및 다중 반응 모니터링(MRM)이 장착된 하이브리드 사중극자 선형 이온 트랩 탠덤 질량 분석기(API5500 QTRAP, AB/SCIEX, Framingham, MA, USA)에 직접 도입했다. 유량 주입 분석(FIA)은 장비의 터보 V 소스를 최적화하기 위해 수행되었다. 여기서 커튼 가스는 30psig, 분무기 가스(Gas1) 50psig, 히터 가스(Gas2) 50psig, 온도는 500℃로 설정되었다. 이온화 스프레이는 -4500eV에서 작동하고 충돌 가스는 높음으로 설정되었다. 모든 SCFA에 대해 entrance potential는 -10.5V로 설정되었고 MRM 스캔 시간은 100msec로 설정되었다.

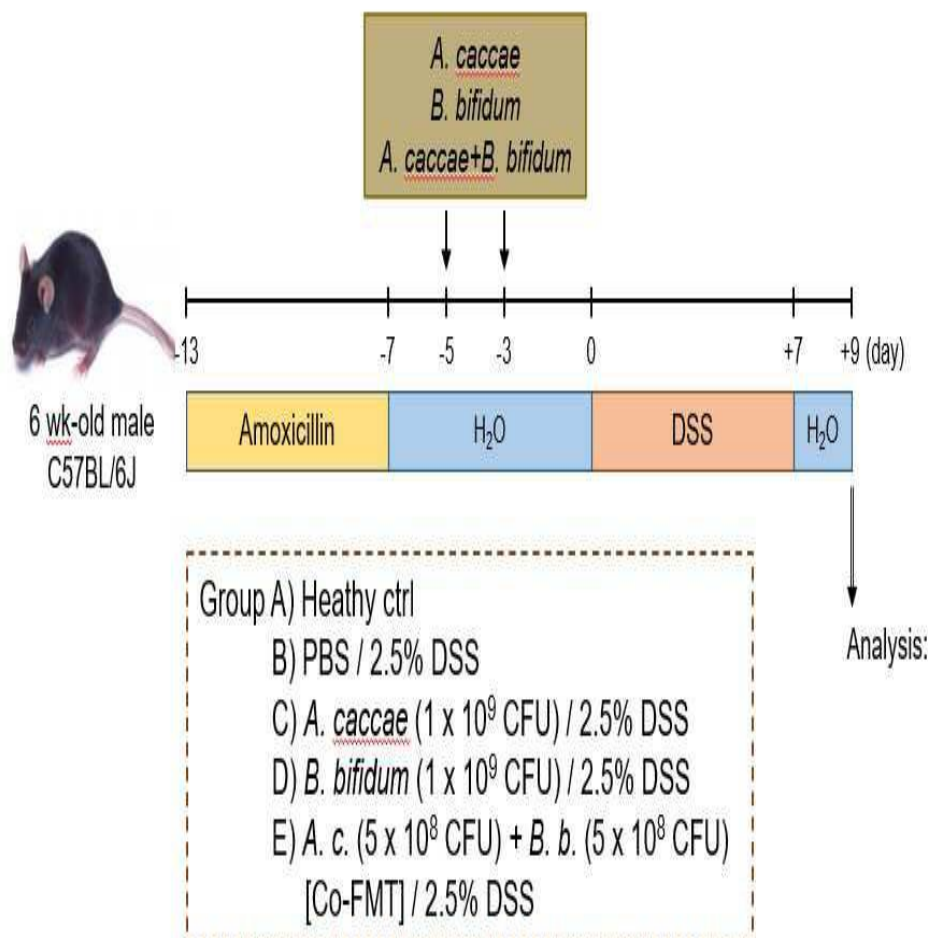
[0102] 데이터 분석에는 Analyst 1.7.1 소프트웨어 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA)가 사용되었다. SCFA 수준은 $\mu\text{mol/g}$ 중량으로 표시되었다.

[0104] 실시예 8: 장 내 마이크로바이옴 비교 분석

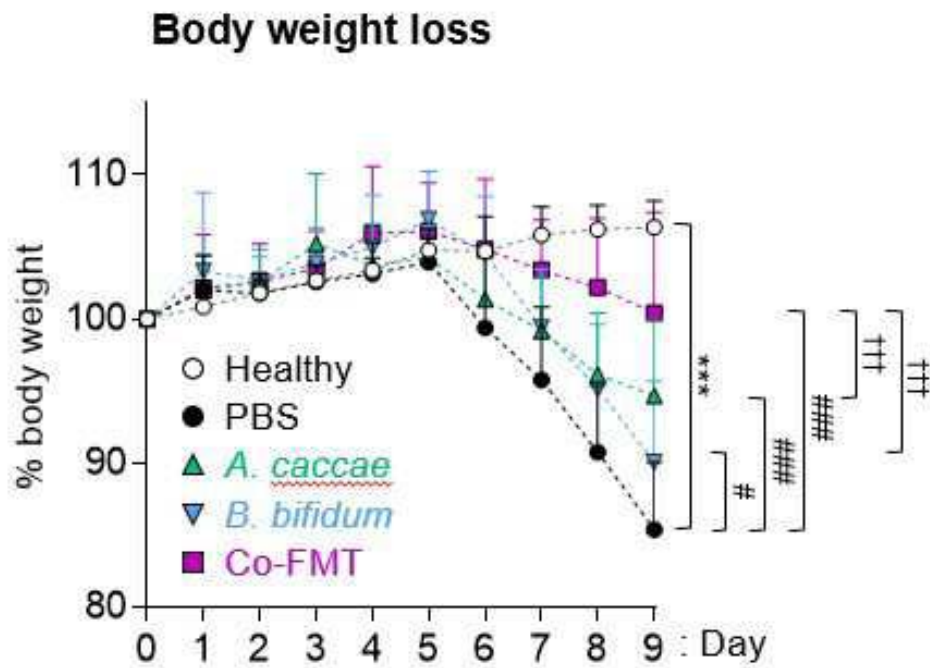
[0105] 마이크로바이옴 변화 분석을 위해 확보한 분변 시료에서 추출한 metagenome DNA를 fragmentation을 한 후 whole metagenome sequence 분석을 위한 library를 제작한 후 Illumina NovaSeq을 이용하여 시퀀싱을 수행하였다. 확보한 raw sequence들을 quality check을 수행하고, low quality sequence들을 제거해준 후에 human genome을 reference로 human gene들을 제거해주었다. Human gene이 제거된 sequence들은 Metaphlan 3와 HUMAnN3를 이용하여 taxonomy와 functional gene분석을 수행하였다. 각 실험군당 장내 마이크로바이옴 변화를 비교하기 위해 diversity 비교와 군집 구성 비교를 수행하였다.

도면

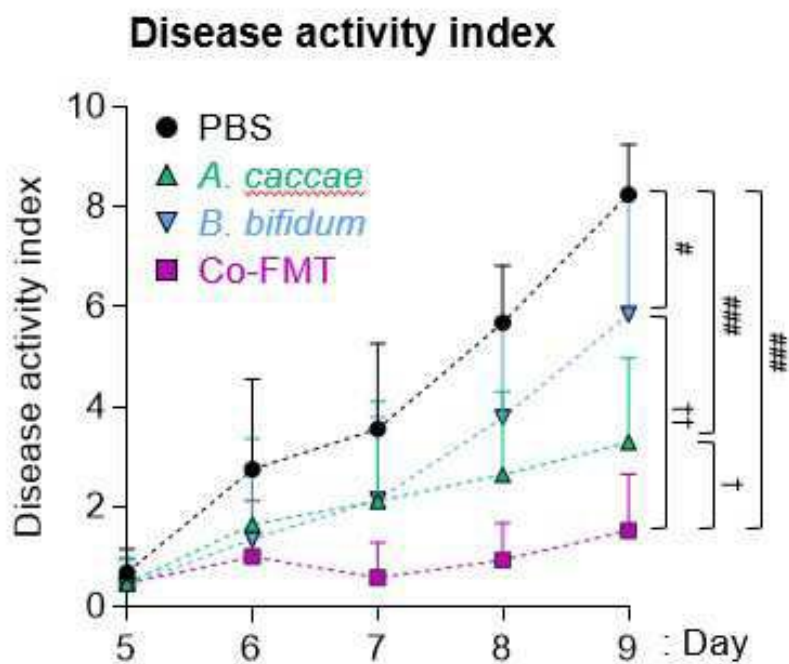
도면1a



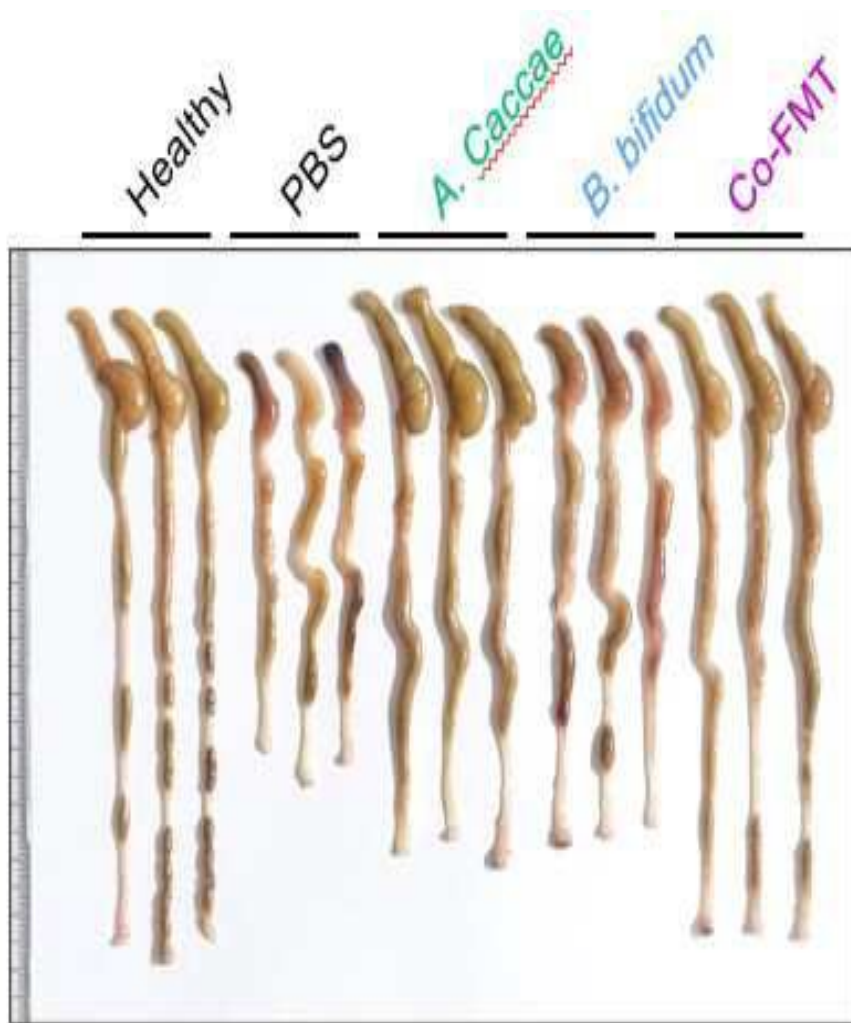
도면1b



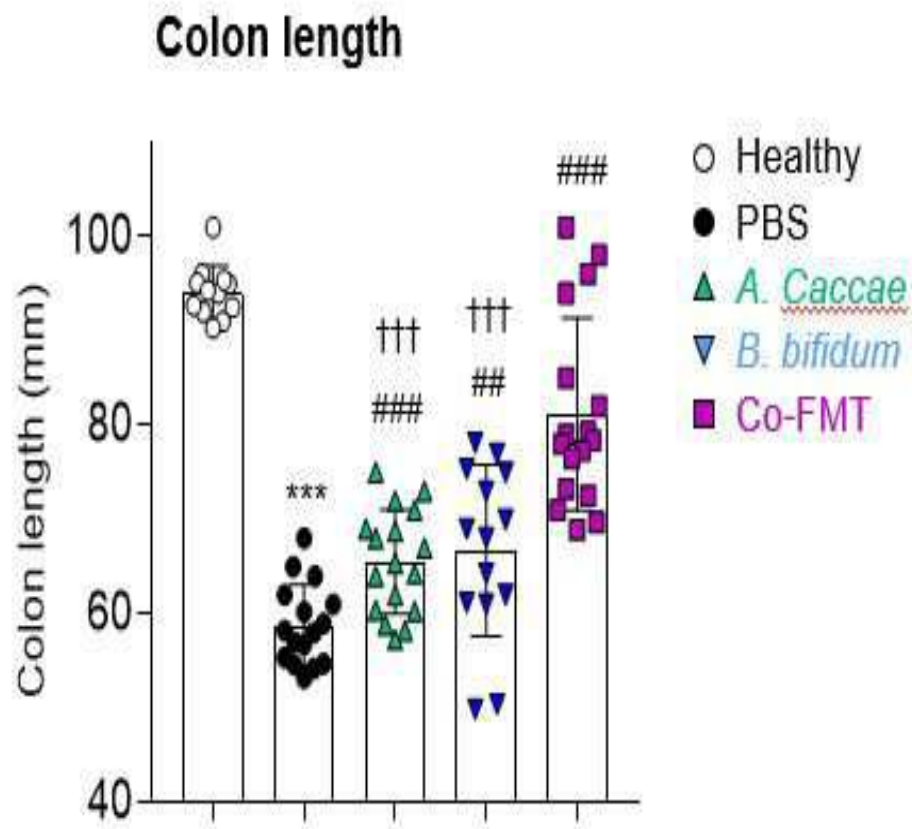
도면1c



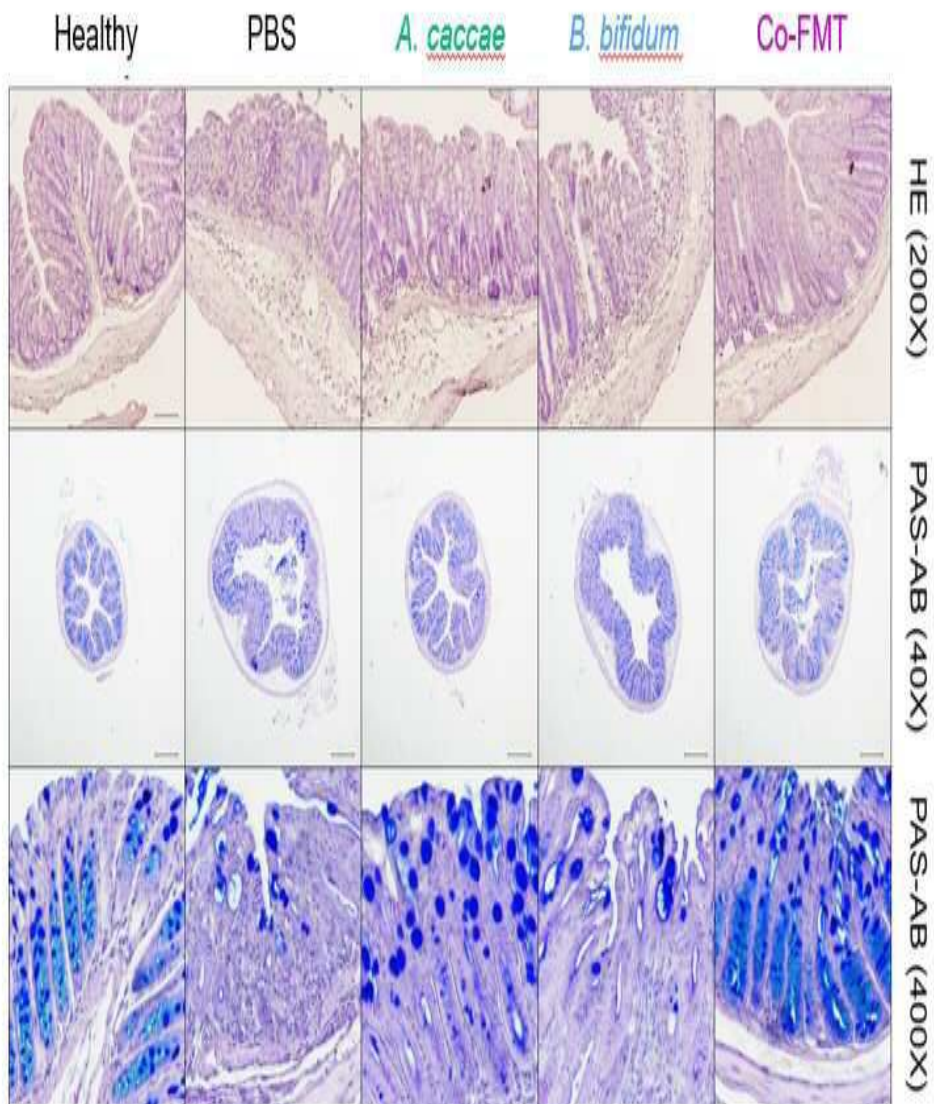
도면1d



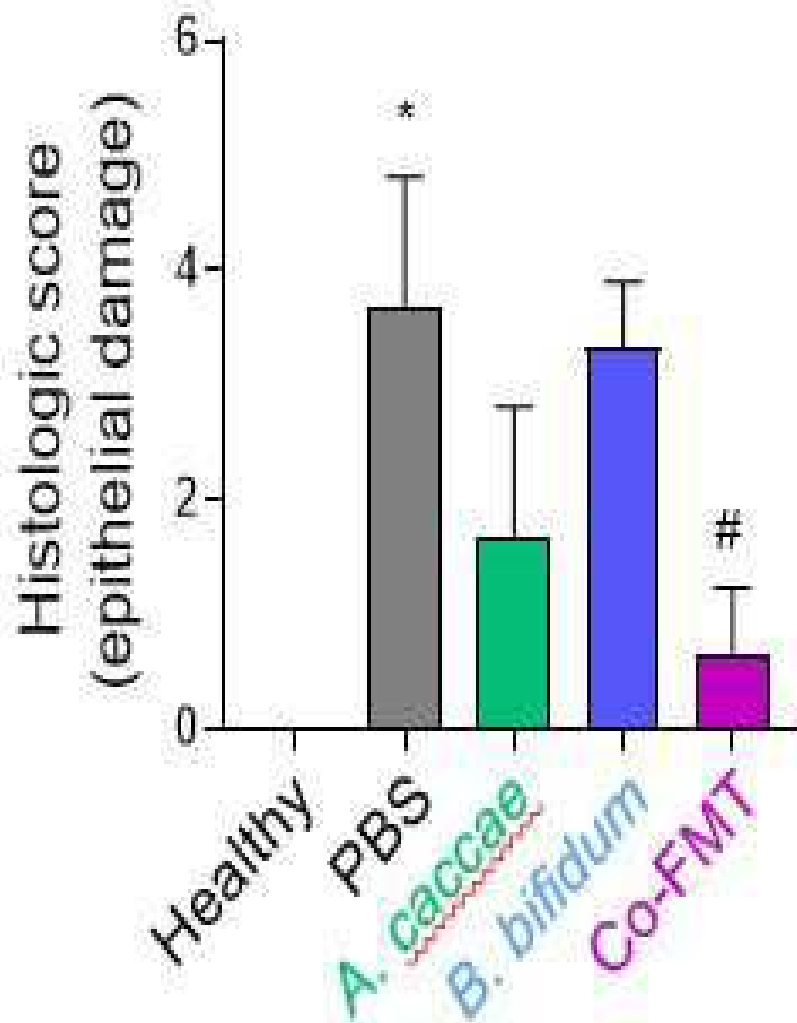
도면1e



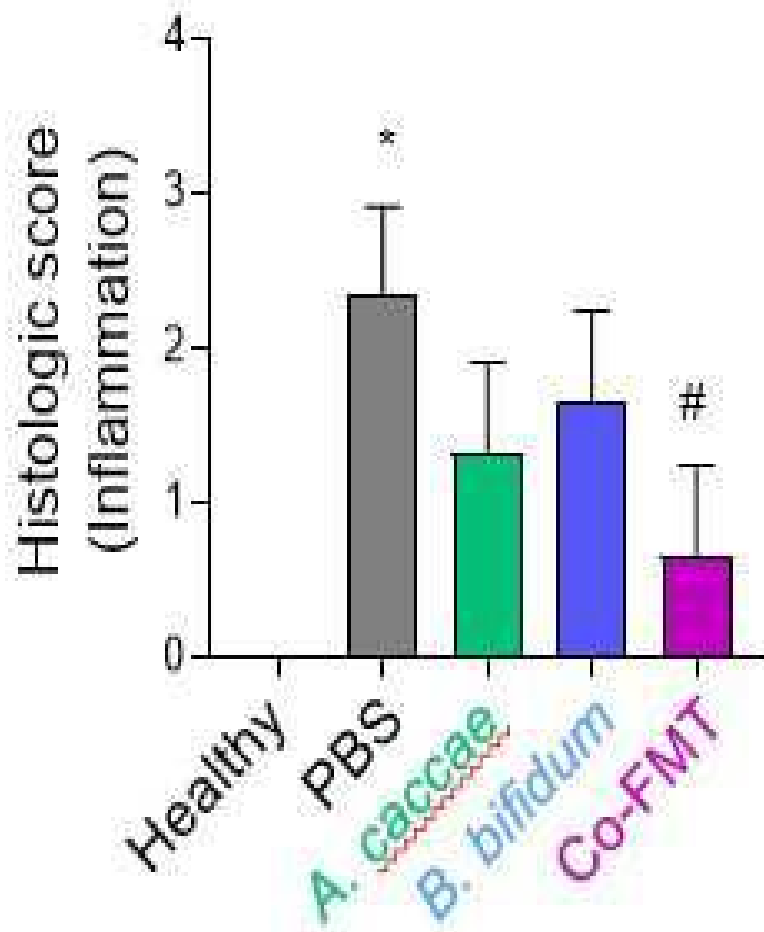
도면2a



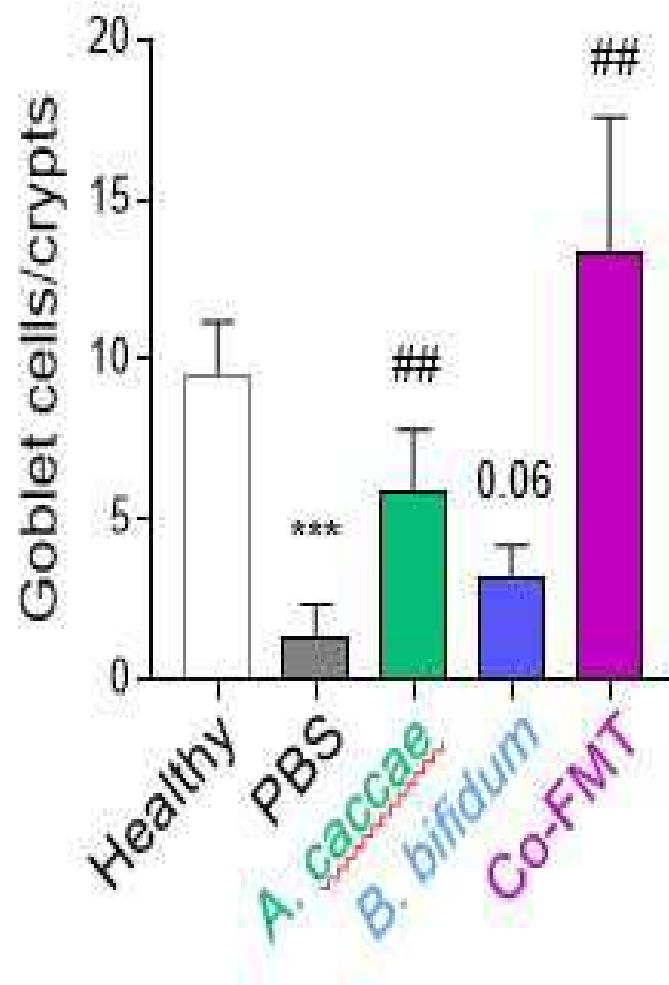
도면2b



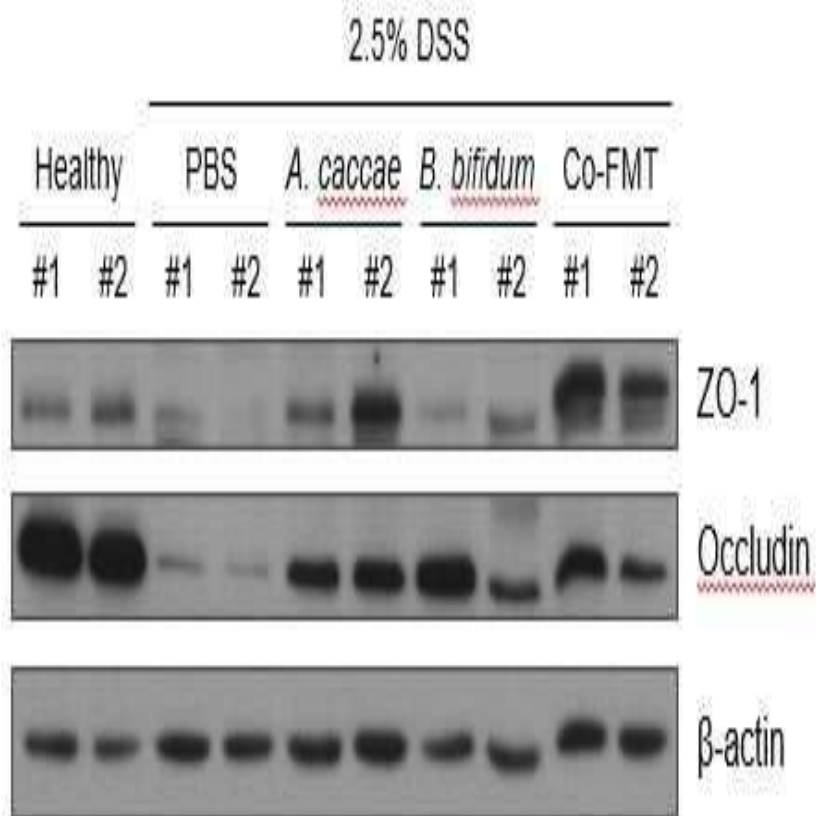
도면2c



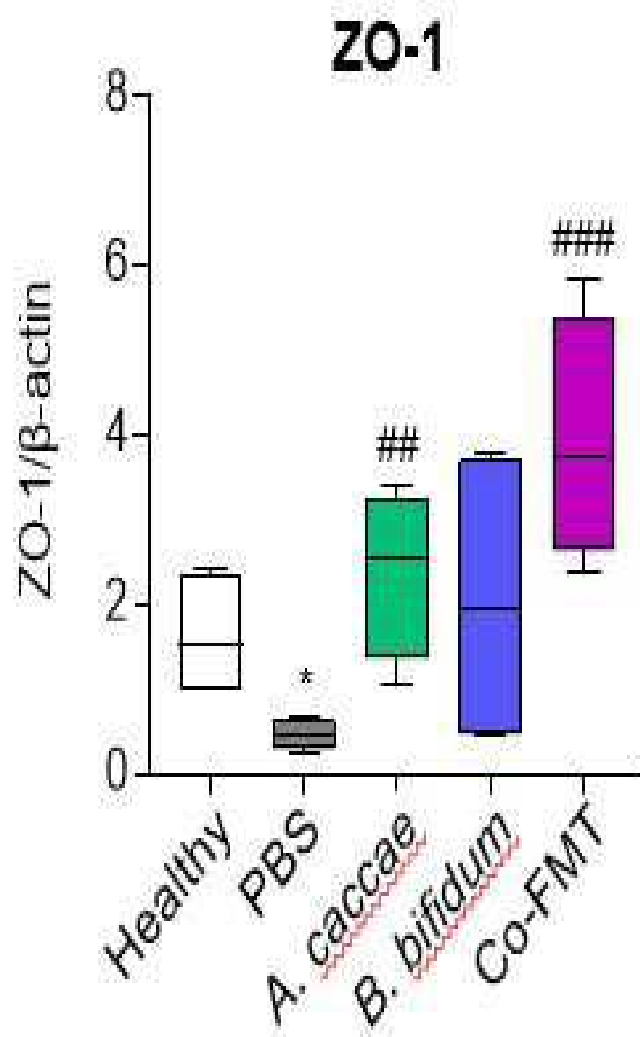
도면2d



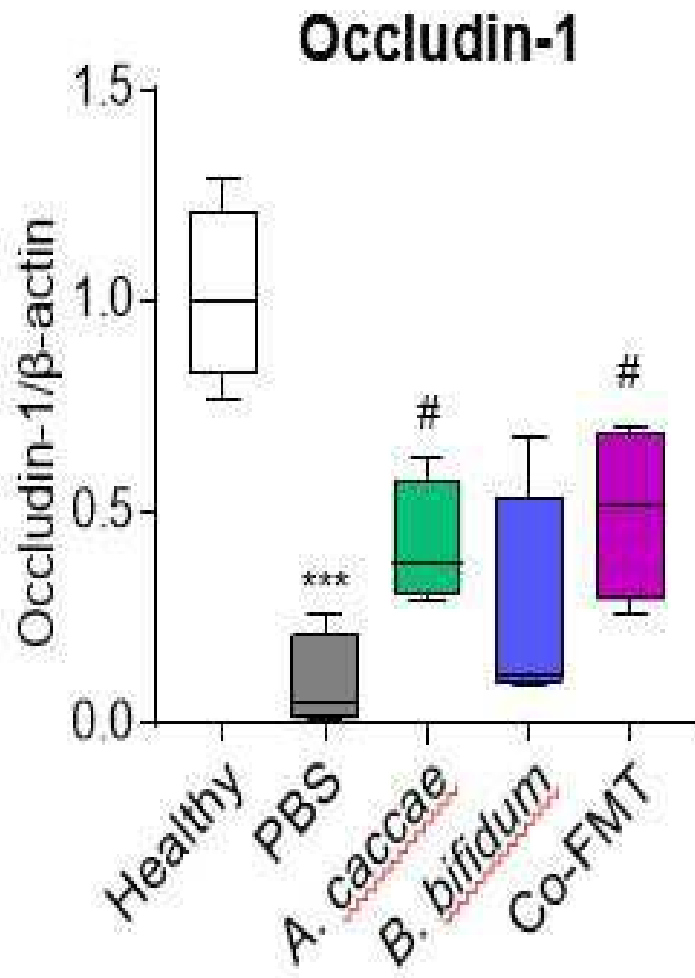
도면2e



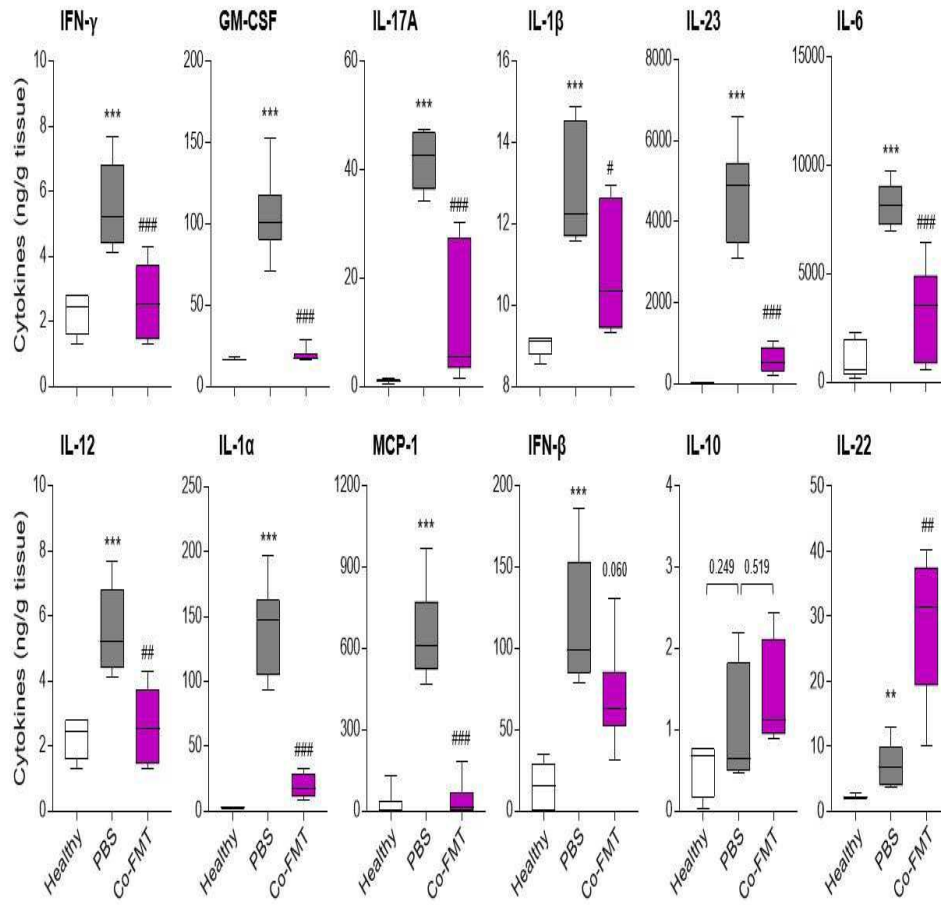
도면2f



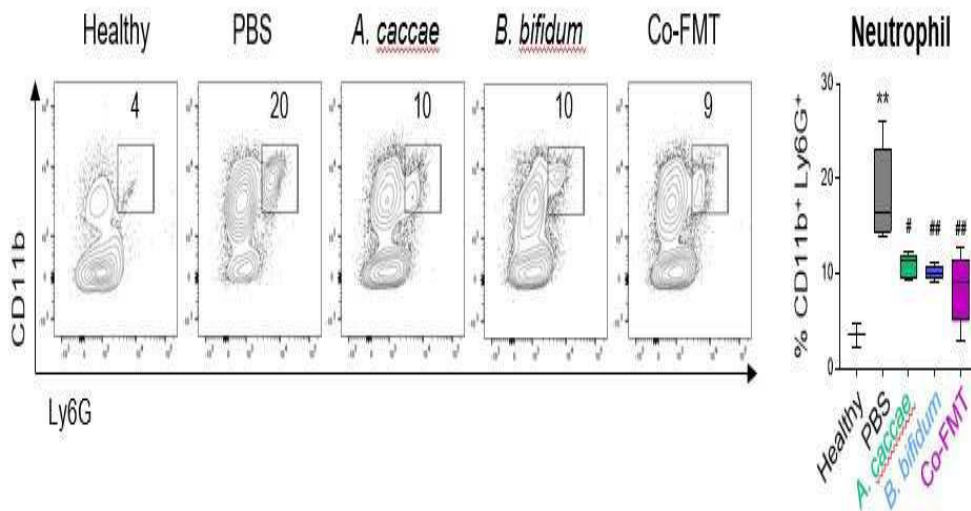
도면2g



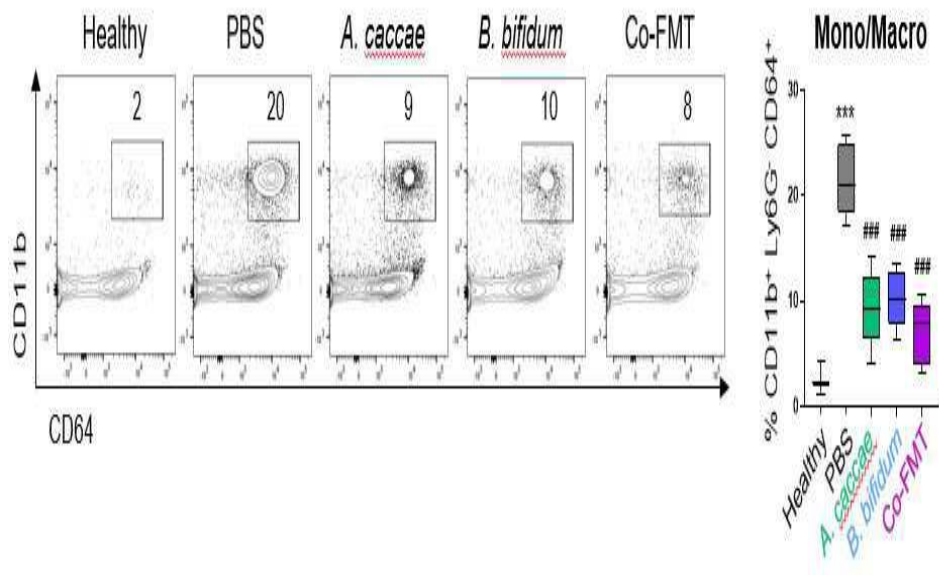
도면3



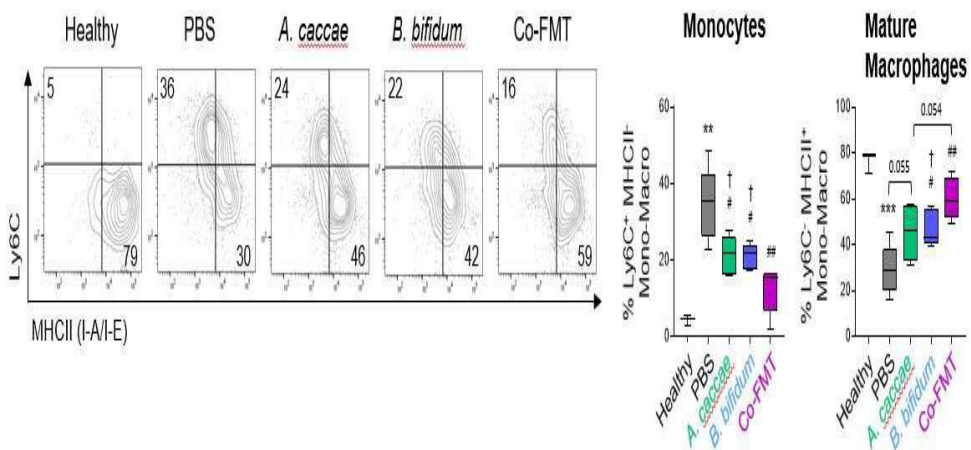
도면4a



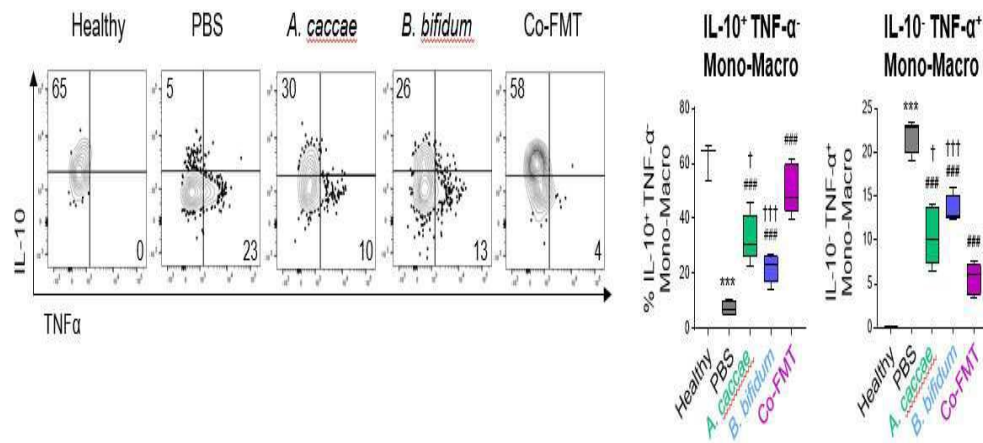
도면4b



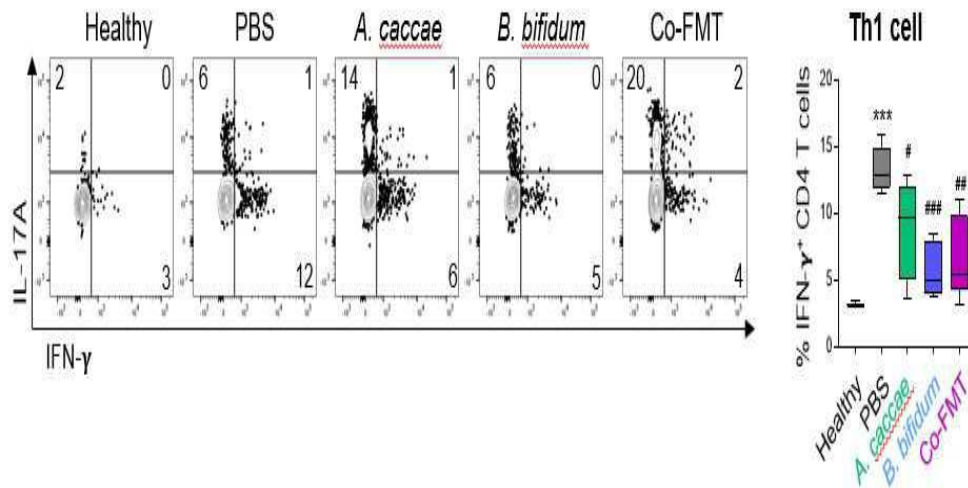
도면4c



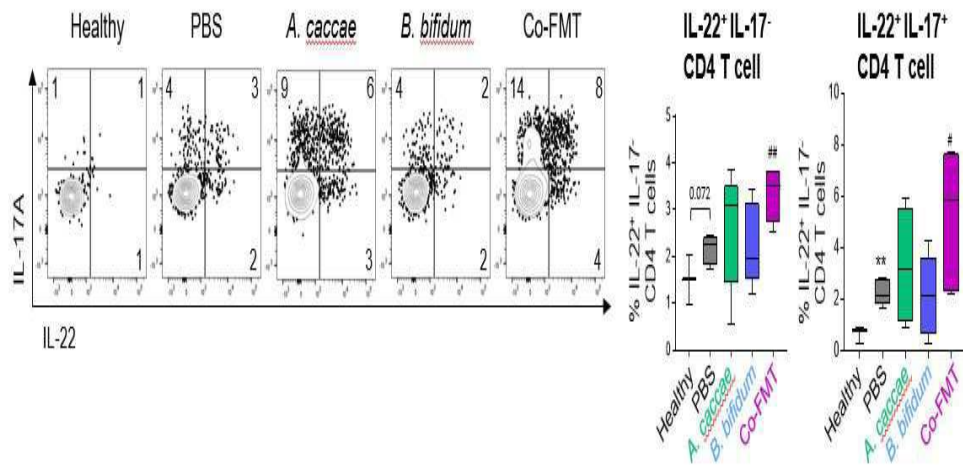
도면4d



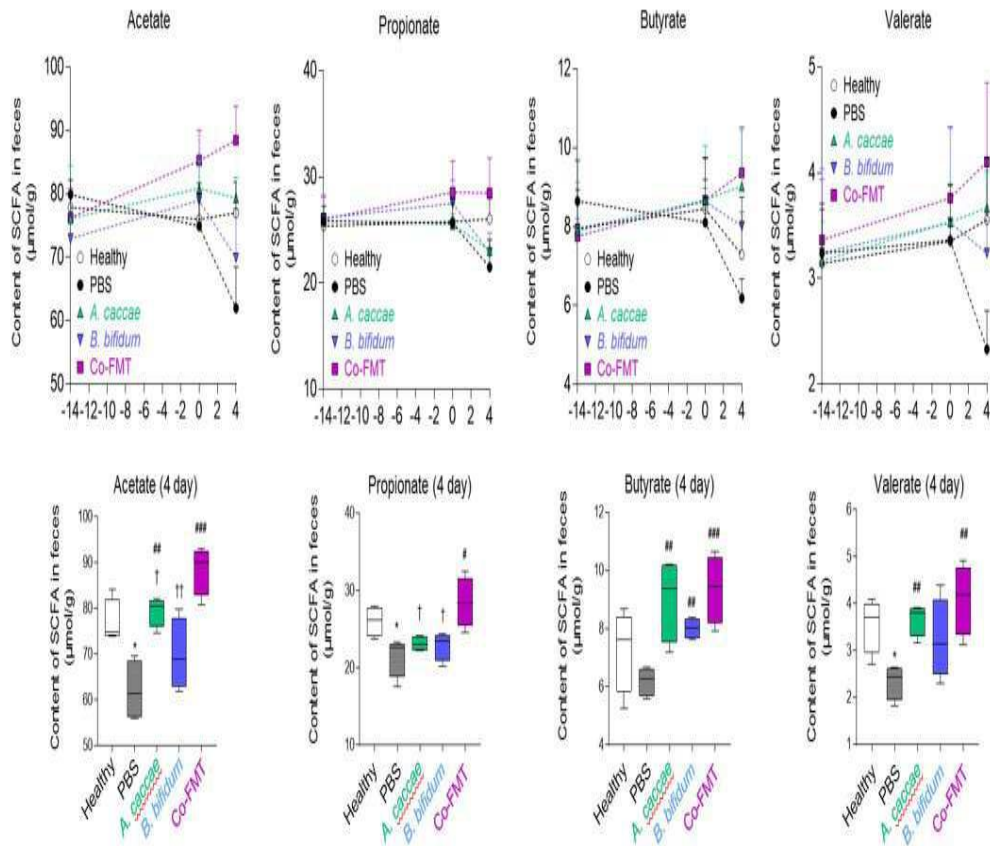
도면5a



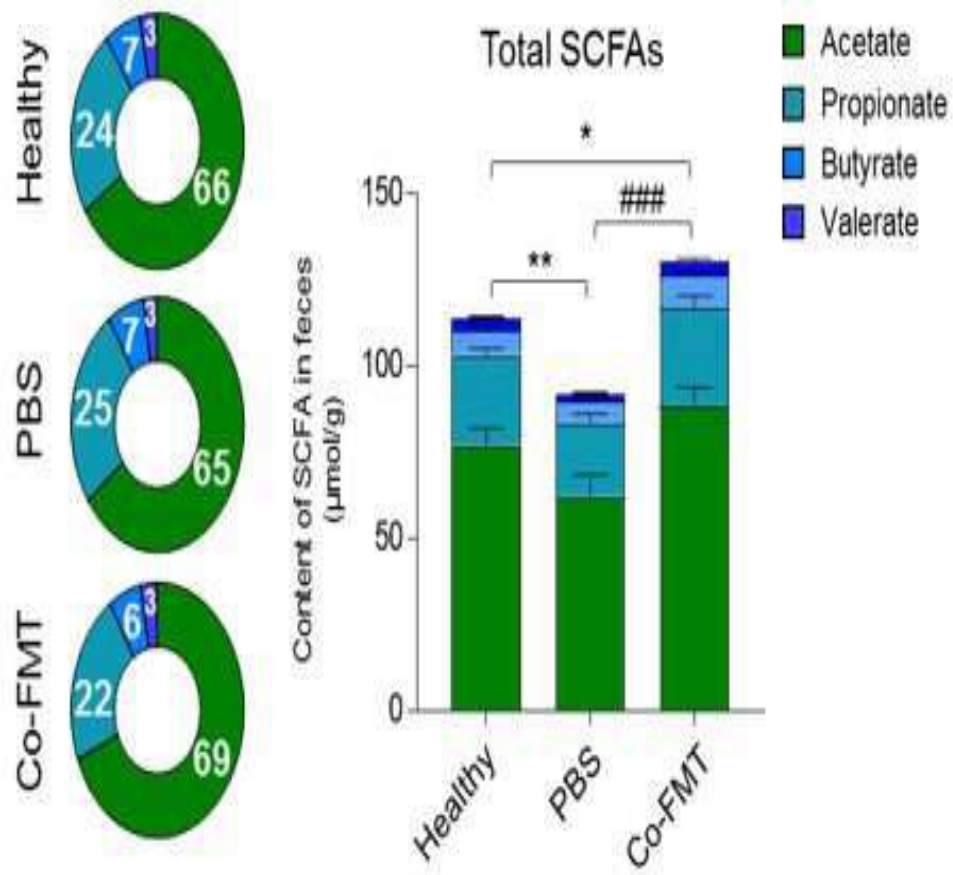
도면5b



도면6a



도면6b



도면7

