



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0069057
(43) 공개일자 2025년05월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/744 (2015.01) A23L 33/135 (2016.01)
A61P 1/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/744 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2023-0155295
(22) 출원일자 2023년11월10일
심사청구일자 2023년11월10일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
씨제이바이오사이언스 주식회사
서울특별시 중구 세종대로 14, 비동 7층(
남대문로5가, 그랜드센트럴타워)
(72) 발명자
석기태
강원특별자치도 원주시 늘품로 199, 109동 1032호
(반곡동, 원주반곡아이파크)
원성민
강원특별자치도 춘천시 후석로 325, 110동 1405호
(후평동, 춘천더샵아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인본

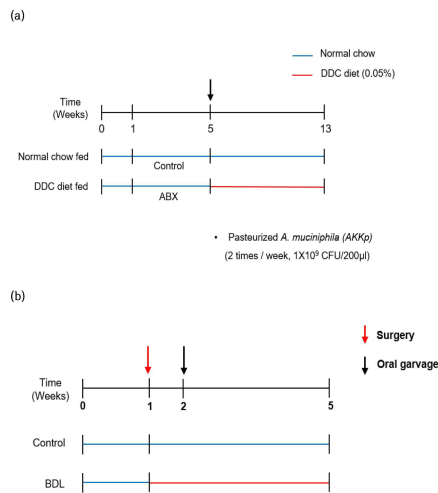
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 아커만시아 무시니필라를 포함하는 간섬유증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주는 섬유증이 유도된 마우스에 투여하였을 경우 혈액 생화학적으로 ALT, AST, Total bilirubin을 감소시킬 뿐만 아니라 병리학적으로 간 섬유증과 간세포 손상을 억제하는 효과를 가지고 간조직에서 염증과 섬유화 관련 유전자의 발현을 유의미하게 저하시키기 때문에 간 섬유증의 예방과 치료를 위한 의약품, 건강기능식품에 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 1/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/30 (2013.01)

(72) 발명자

권구현

강원특별자치도 춘천시 삭주로108번길 29 (후평동), 401호

차민기

강원특별자치도 춘천시 교동길 8-1, 204호 (교동)

이제희

서울특별시 성동구 뚝섬로 51, 102동 702호(옥수동, 옥수강변풍림아이원)

양승조

경기도 수원시 영통구 에듀타운로 101, 103동 317호 (이의동)

차인성

서울특별시 구로구 구로동로47길 24-44, 406호 (구로동)

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	한림대학교산학협력단
연구기간	2020.06.01 ~ 2029.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415185372
과제번호	20018494
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술기획평가원
연구사업명	바이오산업기술개발
연구과제명	비알콜성간질환 극복을 위한 마이크로바이옴 기반 장간축조질 바이오신소재 발굴 및
상용화 기술 개발	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	한림대학교산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2025.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

아커만시아 무시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 균주를 포함하는, 간섬유증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 아커만시아 무시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 균주는 50~90° C의 온도에서 살균된 것인, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 아커만시아 무시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 균주는 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(aspartate aminotransferase (AST)), 알라닌 아미노트랜스퍼라제(alanine aminotransferase (ALT)), 총 빌리루빈(total bilirubin (T-BIL))의 수준을 감소시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 아커만시아 무시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 균주는 Colla, Timpl, α -sma 유전자의 발현 수준을 감소시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 아커만시아 무시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 균주는 Tnf α 유전자의 발현 수준을 감소시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 아커만시아 무시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 균주는 Zo-1 및 Occludin의 유전자 발현 수준을 증가시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 7

아커만시아 무시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 균주를 포함하는, 간섬유증 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 아커만시아 무시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 균주는 50~90° C의 온도에서 살균된 것인, 식품 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 아커만시아 무시니필라(*Akkermansia muciniphila*) 균주는 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(aspartate

aminotransferase (AST)), 알라닌 아미노트랜스퍼라제(alanine aminotransferase (ALT)), 총 빌리루빈(total bilirubin (T-BIL))의 수준을 감소시키는 것인, 식품 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주는 Colla, Timp1, α-sma 유전자의 발현 수준을 감소시키는 것인, 식품 조성물.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주는 Tnf α 유전자의 발현 수준을 감소시키는 것인, 식품 조성물.

청구항 12

아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주를 포함하는, 장 장벽의 손상 개선용 약학적 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주는 50~90° C의 온도에서 살균된 것인, 약학적 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주는 Zo-1 및 Occludin의 유전자 발현 수준을 증가시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 15

아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주를 포함하는, 장 장벽의 손상 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주는 Zo-1 및 Occludin의 유전자 발현 수준을 증가시키는 것인, 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아커만시아 무시니필라를 포함하는 간섬유증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 간 섬유화는 만성 간질환에서 발생하는 콜라겐을 포함하는 세포외 기질 단백질의 과도한 축적으로 발생하며 이후 재생되는 간세포의 결절이 발달하여 간경변증으로 진행된다. 현재까지의 간섬유증 치료는 원인물질을 제거하는 하는 방식으로 아직까지 명확한 치료법이 기술되지 않았다. [Kisseleva, T. & Brenner, D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 18, 151-166 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00372-7>]

[0003] 인간의 장내 미생물총(마이크로바이옴: microbiome)은 박테리아, 고세균 및 진핵 미생물과 바이러스로 구성되며

약 1014 개의 미생물이 있다. 인간 건강과 장내 미생물총 사이의 관계는 지난 수십년 동안 많은 연구를 통해 중요성이 인식되었다. 장내 세균의 교란이 발생할 경우 다양한 질병이 발병되거나 진행될 수 있다. [DeGruttola, A. K., Low, D., Mizoguchi, A. & Mizoguchi, E. Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models. Inflamm Bowel Dis 22, 1137-1150 (2016). <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000750>]

[0004] 간과 장 사이에는 간문맥계(hepatic portal system)를 통한 해부학적 연결을 통한 밀접한 관계성이 존재한다. 간은 문맥을 통해 장에서 혈액 공급 의 75%를 받고 간은 담즙산을 담도계로 방출한다. 박테리아, 내독소 및 대사 산물은 장 장벽을 통해 간문맥으로 이동한 다음 간으로 이동한다. 장내 미생물총의 불균형은 박테리아의 장 투과성을 증가시키고 간의 염증과 섬유화를 증가시키는 유해 물질에 대한 노출을 증가시킨다. [Leung, C., Rivera, L., Furness, J. B. & Angus, P. W. The role of the gut microbiota in NAFLD. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 13, 412-425 (2016). <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.85>]

[0005] 프로바이오틱스(probiotics)는 적당량을 섭취했을 때 인체에 이로움을 주는 살아있는 미생물을 총칭하는 말로 대부분 유산균에 속한다. 프로바이오틱스는 장내 미생물총의 균형을 조절하여 인체의 건강에 유익한 효과가 있기 때문에 부작용이 많은 항생제를 대신하여 생물 치료제로 적용될 수 있다. [O'Toole, P. W., Marchesi, J. R. & Hill, C. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. Nat Microbiol 2, 17057 (2017). <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.57>]

[0006] 최근에는 새로운 범주의 정의로 박테리아와 같은 살아있는 유기체를 포함하는 생물학적 제품인면서 인간의 질병을 예방 또는 치료에 적용 가능한 백신이 아닌 제품으로 생균 치료제(live biotherapeutic product)라는 용어가 사용되고 있다. 생균 치료제는 마이크로바이옴 기반으로 현재 비만, 당뇨병 및 염증성 장질환과 같은 대사질환에 효과가 증명되고 있으나 정확한 메커니즘에 대한 이해와 추가적인 연구가 필요하다. [Cordailat-Simmons, M., Rouanet, A. & Pot, B. Live biotherapeutic products: the importance of a defined regulatory framework. Exp Mol Med 52, 1397-1406 (2020). <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0437-6>]

[0007] 본 발명에서는 간섬유증 유도 마우스 모델에서 저온살균 A. muciniphila의 섭취로 인해 장 장벽이 회복되고 간 섬유화 면적이 감소되어 간섬유증을 개선시킴을 확인하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주를 포함하는, 간섬유증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 또한, 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주를 포함하는, 간섬유증 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명은 또한, 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주를 포함하는, 장 장벽의 손상 개선용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명은 또한, 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 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 나타낸 수단 및 그 조합에 의해 실현될 수 있음을 쉽게 알 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주를 포함하는, 간섬유증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주를 포함하는, 간섬유증 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

- [0015] 본 발명은 또한, 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주를 포함하는, 장 장벽의 손상 개선용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한, 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주를 포함하는, 장 장벽의 손상 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0017] 상기 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주는 50~90° C의 온도에서 살균된 것이다.
- [0018] 상기 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주는 인간의 분변에서 분리된 것일 수 있다.
- [0019] 상기 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주는 시중에서 구매하여 수득한 것일 수 있다.
- [0020] 상기 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주는 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(aspartate aminotransferase (AST)), 알라닌 아미노트랜스퍼라제(alanine aminotransferase (ALT)), 총 빌리루빈(total bilirubin (T-BIL))의 수준을 감소시킨다.
- [0021] 상기 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주는 Colla, Timp1, α -sma 유전자의 발현 수준을 감소시킨다.
- [0022] 상기 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주는 Tnf α 유전자의 발현 수준을 감소시킨다.
- [0023] 상기 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주는 Zo-1 및 Occludin의 유전자 발현 수준을 증가시킨다.

발명의 효과

- [0024] 본 발명은 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주를 포함하는, 간섬유증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0025] 본 발명은 또한, 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주를 포함하는, 간섬유증 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명은 또한, 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주를 포함하는, 장 장벽의 손상 개선용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명은 또한, 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주를 포함하는, 장 장벽의 손상 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주는 섬유증이 유도된 마우스에 투여하였을 경우 혈액 생화학적으로 ALT, AST, Total bilirubin을 감소시킬 뿐만 아니라 병리학적으로 간 섬유증과 간세포 손상을 억제하는 효과를 가지고 간조직에서 염증과 섬유화 관련 유전자의 발현을 유의미하게 저하시키기 때문에 간 섬유증에 대한 치료에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-Dihydrocollidine (DDC) diet 식이와 Bile duct ligation surgery로 유도한 간 섬유증 유도 마우스 모델 제조 흐름도이다.
- 도 2는 간 섬유증 유도 마우스 모델에서 저온살균 A.muciniphila의 섬유화 면적 억제 병리학적 비교한 결과이다.
- 도 3은 간 섬유증 유도 마우스 모델에서 저온살균 A.muciniphila의 간 기능 지표를 비교한 결과이다.
- 도 4는 간 섬유증 유도 마우스 모델의 간에서 저온살균 A.muciniphila의 섬유화 관련 인자 발현 및 염증 인자 억제 정도를 측정된 결과이다.
- 도 5. 간 섬유증 유도 마우스 모델의 장에서 저온살균 A.muciniphila의 장 손상 및 장투과 억제 정도를 측정된 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 본 발명에서 용어 “간섬유증(hepatic fibrosis)”은 간내 만성 염증으로 인해 세포외 기질(extracellular

matrix)이 과다하게 침착되어 간 조직 내 과도한 섬유성 연결조직이 형성됨으로써 간의 정상적인 구조와 기능이 손상되는 질환을 의미한다.

[0031] 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. 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.

[0032] 본 발명의 약학적 조성물은 연구자, 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 유효 투여량 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 유효 성분 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.

[0033] 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.

[0034] 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.

[0035] 아커만시아 무시니필라 혼합액은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 변경될 수 있음은 물론이며, 상기 아커만시아 무시니필라 균주는 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 효율성이 떨어질 수 있으며, 95중량%를 초과할 경우에는 제형화의 어려움이 있을 수 있다.

[0036] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명의 아커만시아 무시니필라 균주를 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료, 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품 및 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0037] 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 장 장벽 손상의 개선 또는 간염유증의 예방, 생체 방어, 면역, 회복 등의 생체 조절 기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료 효과가 높은 식품을 의미한다.

[0039] 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.

[0041] 실시예 1. 저온살균 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila)의 준비

[0042] 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주는 시중에서 구매한 것을 사용할 수 있다. 본 실험에서 아커만시아 무시니필라(Akkermansia muciniphila) 균주는 (쥬제이바이오사이언스에서 공급받았다. 혐기성 균배양을 위한 혐기성 배양기(Vinyl Anaerobic Chambers; Coy Laboratory Products, MI, USA)에서 BHI(Difco Brain Heart Infusion medium; Becton-Dickinson and Company, MD, USA)에 0.5% mucin을 첨가한 배지를 사용하였다. A. muciniphila를 고체 0.5% mucin 첨가 BHI 배지에 도말하여 37° C에서 120시간 배양한다. 이후 배양한 A. muciniphila를 0.5% mucin 첨가 BHI 액체 배지에 접종하였고 37도에서 120시간 배양한다. 배양한 A. muciniphila를 1*10⁹ CFU/ml의 농도로 준비하였다. A. muciniphila를 1*10⁹ CFU/ml의 농도로 70° C에 30분 동안 처리하여 저온살균하여 주 3회 공급하였다.

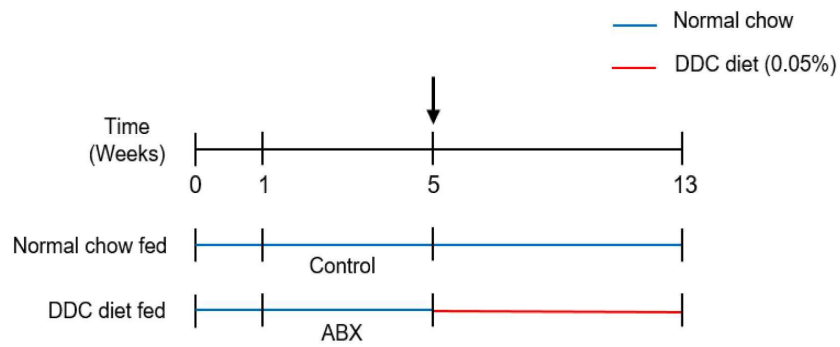
- [0043] 실시예 2. 간 섬유증 유도 마우스 모델의 유도 및 분석
- [0044] 동물모델 평가를 위해 특정 병원체가 없는 5주령의 C57BL/6J 수컷 마우스를 두엘바이오텍(서울, 한국)에서 구매하였다. 모든 마우스들은 12/12시간 명/암 주기로 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 온도에서 전용 케이지에 개별적으로 수용하였다. 실험 진행동안 모든 마우스들은 물과 음식에 자유롭게 접근할 수 있도록 하였다. 실험은 모든 그룹에 대한 적응 기간을 포함하였고 이 기간 동안에는 1주일 동안 정상적인 사료를 제공하였다. 실험동물들은 인도주의적 치료를 받았으며 모든 절차는 실험실 동물의 관리 및 사용을 위한 국립보건원 지침을 따랐으며 한림대학교 의과대학 동물실험 및 사용위원회의 승인을 받았다.
- [0045] (1) 3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-Dihydrocollidine (DDC) diet 식이와 Bile Duct Ligation 수술을 통한 간 섬유증 유도 마우스 모델
- [0046] 식이 섭취로 간 섬유증 모델을 유도하기 위해 3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-Dihydrocollidine (DDC) diet를 두엘바이오텍(서울, 한국)에서 제조하여 8주간 자유롭게 섭취하도록 하였다. 그와 동시에 8주간 저온살균 *A. muciniphila*를 1×10^9 CFU/ml의 농도로 증류수에 현탁 하여 주 3회 공급하였다. 식이 유도 간 섬유증 모델 마우스 실험은 3개의 그룹으로 분류하였다(도 1 (a)): 정상식이(Normal diet group, n=6), 질병유도식이 그룹(DDC diet group, n=10), 질병유도식이와 저온살균 *A. muciniphila* 섭취(Akkp, n=10)으로 분류.
- [0047] 외과적 수술에 의해 간과 쓸개를 이어주는 담관을 결찰하는 Bile Duct Ligation (BDL)을 진행하였다. 5주령의 C57BL/6J 수컷 마우스를 마취 시킨 뒤 개복 한 뒤 복막을 잘라 담관 주위에 5-0 봉합사를 놓고 수술 매듭으로 두번 고정하였다. 그 후 복강을 생리 식염수로 씻어 생리학적 위치로 복부 장기를 고정 한 뒤 복부를 봉합하였다. 1주일 간 진통 치료를 수행 뒤 저온살균 *A. muciniphila*를 증류수에 현탁 하여 주 3회 공급하였다. 수술 유도 간 섬유증 모델 마우스 실험은 3개의 실험으로 분류 하였다(도 1 (b)): 정상그룹(Control, n=4), BDL 수술 진행 그룹(BDL, n=3), BDL 수술 진행과 저온살균 *A. muciniphila* 섭취(Akkp, n=3)으로 분류 하였다.
- [0048] (2) 처리방법
- [0049] 1주의 적응기간 후 DDC diet 식이 급여 8주와 동시에 저온살균 *A. muciniphila*를 투여하였다. BDL 수술 이 후 1주의 회복기간 후 저온살균 *A. muciniphila*를 투여하였다. 이 후 흡입 마취제 투여(이소플루란)를 통해 동물을 희생시켰다. 체중과 간 무게를 측정하고 혈액 및 간조직을 분리했다. 전혈 샘플은 항응고제 처리 후 원심 분리(2000g, 20분)하여 혈장을 분리하였다. 간 조직은 빠르게 분리하여 80°C 에 보관했다.
- [0050] (3) 간 조직의 병리학분석
- [0051] 분리된 간조직을 10% 포르말린으로 고정시키고 파라핀에 매립시키고, 조직 섹션을 헤마톡실린에오신(H&E) 염색과 masson's trichrome 염색을 하였다. 간 섬유증 정도를 진단하기 위해 사용되는 병리학적 분석인 lobular inflammation 항목을 평가하였고 Fibrosis measured area를 비교하였다.
- [0052] 상기와 같이 제시된 병리학적 분석법에 따라 정상식이를 섭취한 대조군에 비해 DDC diet를 섭취한 실험군에서 염증과 섬유증이 발생하였고 저온살균 *A. muciniphila* 섭취로 인하여 간의 염증과 섬유증 등이 감소함을 보였다(도 2).
- [0053] BDL 수술을 진행한 실험군에서 염증, 조직 괴사, 섬유증이 발생하였고 저온살균 *A. muciniphila* 섭취로 인하여 염증, 조직 괴사, 섬유증 등이 감소함을 보였다(도 2).
- [0054] (4) 간 기능 지표 측정 및 분석
- [0055] plasma separation syringe with lithium heparin (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)을 이용해 채취한 전혈 샘플은 원심 분리(2000G 15분 4°C)하여 혈장을 분리하였다. 분리한 혈장으로 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(aspartate aminotransferase (AST)), 알라닌 아미노트랜스퍼라제(alanine aminotransferase (ALT)), 총 빌리루빈(total bilirubin (T-BIL))을 혈액생화학분석기(KoneLab 20, Thermo Fisher Scientific, Finland)를 이용하여 측정하였다. 정상식이를 먹은 대조군인 Normal에 비해 DDC 식이를 섭취한 DDC 그룹에서 간 기능 지표인 AST, ALT, T-BIL 수치가 증가하였고 저온살균 *A. muciniphila* 섭취로 실험군에서는 AST, ALT, T-BIL 수치가 감소하였다. 상기 결과로 저온살균 *A. muciniphila*는 간 기능을 개선하는데 유용함을 입증할 수 있다(도 3).
- [0056] (5) 섬유화 및 염증 인자에 대한 간 조직 분석

- [0057] 간 조직으로부터의 mRNA의 분리는 제조사의 지시에 따라 트리졸 시약 키트 (인비트로젠, 미국)를 사용하여 수행했다. cDNA 합성 키트 (어플라이드 바이오시스템즈, 미국)를 사용하여 mRNA (2 μ g)를 cDNA로 합성했다. cDNA는 루나 유니버설 마스터 믹스(뉴잉글랜드바이오랩, 미국) 및 각 표적-특이적 프로브-프라이머를 사용하여 정량적 PCR (qPCR)을 수행하였다.
- [0058] 간 섬유증은 콜라겐을 포함하는 세포의 기질 단백질의 과도한 축적으로 발생한다. qPCR을 수행하여 섬유화 관련 유전자 (Colla, Tgf β , Timp1, α -sma)의 mRNA 발현 정도를 확인하였다. DDC diet와 BDL 수술로 인해 증가된 Colla, Timp1, α -sma 유전자 발현이 저온살균 *A. muciniphila*를 투여하였을 때 유의미하게 줄어들었다(도 4). 이는 저온살균 *A. muciniphila*가 간 섬유화 생성에 대하여 억제 효과가 우수하다는 것을 보여준다. 간 섬유증 질환에서는 매우 심각한 염증반응이 일어난다. 장내세균의 불균형(dysbiosis)으로 인해 생성된 내독소(endotoxin)와 같은 염증유도 인자들이 장 장벽을 투과하여 간에 직접적인 염증을 유도한다고 밝혀졌다. 염증성 사이토카인 Tnf α 유전자의 간 조직내 mRNA발현과 혈장내 사이토카인 Tnf α 농도를 분석하였다. 마찬가지로 섬유화가 유도된 마우스 모델에서 대조군에 비해 Tnf α 의 유전자 발현과 혈장내 농도가 증가하였고 저온살균 *A. muciniphila*를 섭취함에 따라 유전자 발현과 농도가 감소함을 보여주었다(도 4). 이는 저온살균 *A. muciniphila*가 간 섬유증 질환에 대하여 염증반응 억제 효과가 우수하다는 것을 보여준다.
- [0059] (6) 장 장벽 및 장 투과도 인자에 대한 장 조직 분석
- [0060] 장 조직으로부터의 mRNA의 분리는 제조사의 지시에 따라 트리졸 시약 키트 (인비트로젠, 미국)를 사용하여 수행했다. cDNA 합성 키트 (어플라이드 바이오시스템즈, 미국)를 사용하여 mRNA (2 μ g)를 cDNA로 합성했다. cDNA는 루나 유니버설 마스터 믹스(뉴잉글랜드바이오랩, 미국) 및 각 표적-특이적 프로브-프라이머를 사용하여 정량적 PCR (qPCR)을 수행하였다. 장 장벽은 접합 단백질 (Tight junction protein)에 의해 세포 사이가 연결된다. qPCR을 수행하여 접합 단백질 관련 유전자 (Zo-1, Occludin)의 mRNA 발현 정도를 확인하였다. 섬유화가 유도된 마우스의 장에서 Zo-1 및 Occludin의 유전자 발현이 감소하였으나 저온살균 *A. muciniphila*를 투여하였을 때 유의하게 증가하였다(도 5). 이는 저온살균 *A. muciniphila*가 장 장벽의 손상에 대하여 회복 효과가 우수하다는 것을 보여준다.
- [0061] 장 투과도 분석을 위해 플루오레세인 이소티오시아네이트-텍스트란(FD4)(4kDa; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 마우스 안락사 4시간 전에 200 μ l 경구투여하였다. 안락사 후 채취한 혈장에서 형광분석기 광도 측정에 의해 평가되었다. 추가적으로 장 장벽을 투과한 내독소 및 내독소 결합단백질 농도 측정을 위해 Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (써모사이언티픽, 미국) 및 Mouse LBP ELISA Kit (앱캠, 영국)을 사용하여 혈장을 분석하였다. 장투과도는 장 장벽이 손상을 받으면 증가하여 박테리아 및 내독소의 유입을 증가시킨다. 형광 텍스트란을 경구투여하여 장에서 혈장으로 얼마나 유입되는지 확인하였다. 섬유화가 유도된 마우스의 혈장에서 형광 텍스트란의 검출이 유의하게 증가되었으나 저온살균 *A. muciniphila*를 투여하였을 때 유의하게 형광 텍스트란의 검출이 감소하였다. 이는 저온살균 *A. muciniphila*가 증가한 장투과도에 대한 물질 유입의 차단 효과가 우수하다는 것을 보여준다. 혈장 내 내독소 (Lipopolysaccharide; LPS) 및 내독소 결합단백질 (LPS binding protein; LBP)의 농도를 측정하였다. 섬유화가 유도된 마우스의 혈장에서 내독소 및 내독소 결합단백질의 농도가 증가하였고 저온살균 *A. muciniphila*를 투여하였을 때 감소되었다. 이는 저온살균 *A. muciniphila*가 증가한 장투과도에 대한 내독소 유입의 차단 효과가 우수하다는 것을 보여준다.
- [0062] (7) 데이터 분석
- [0063] 연속 변수는 평균 및 평균의 표준오차로 분석하였다. 조직학 분석, 간기능 분석 및 유전자 바이오마커 발견을 위해 One-way ANOVA 그리고 independent sample T-test를 수행했다. 유의확률 $P < 0.05$ 는 통계적 유의성을 나타내는 것으로 간주하였다. 모든 통계 분석은 GraphPad Prism(ver. 8.0.2, GraphPad Software, LLC, San Diego, CA 92108 USA)와 SPSS 소프트웨어(ver. 19, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 수행하였다.

도면

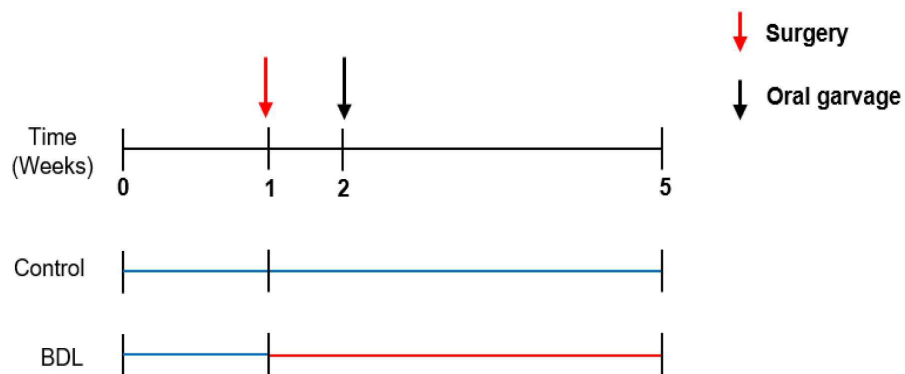
도면1

(a)

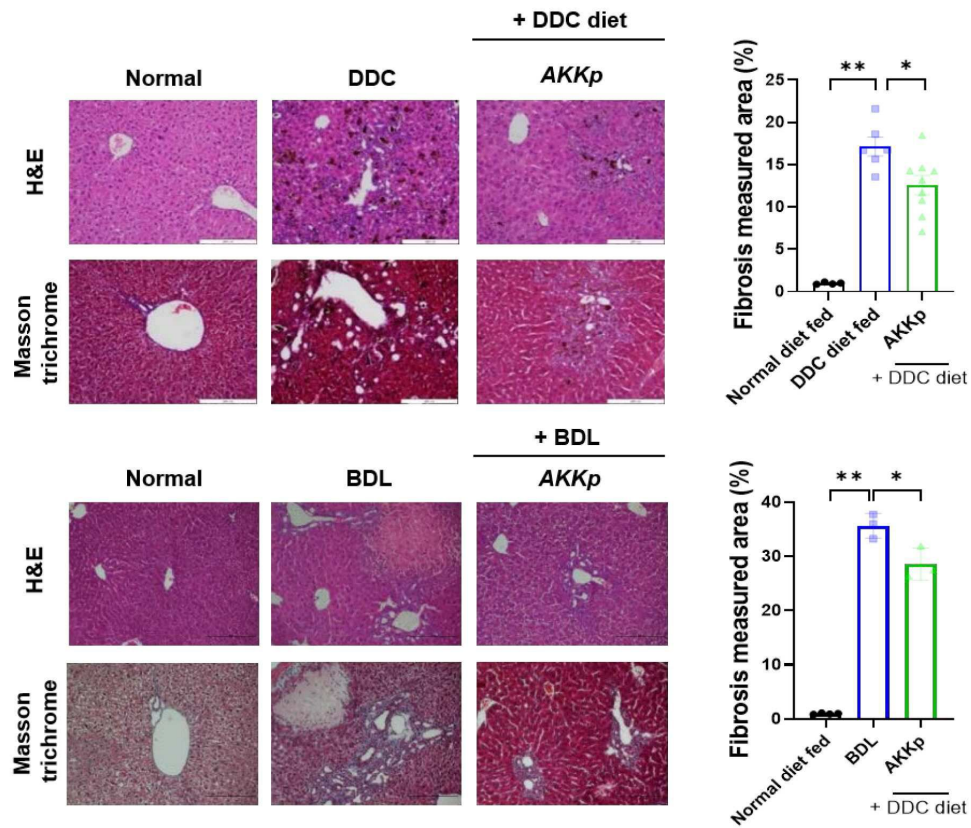


- Pasteurized *A. muciniphila* (AKKp)
(2 times / week, 1×10^9 CFU/200μl)

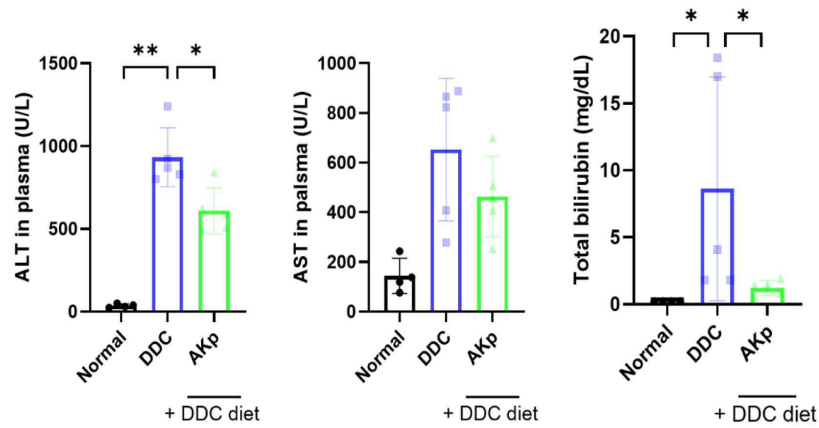
(b)



도면2

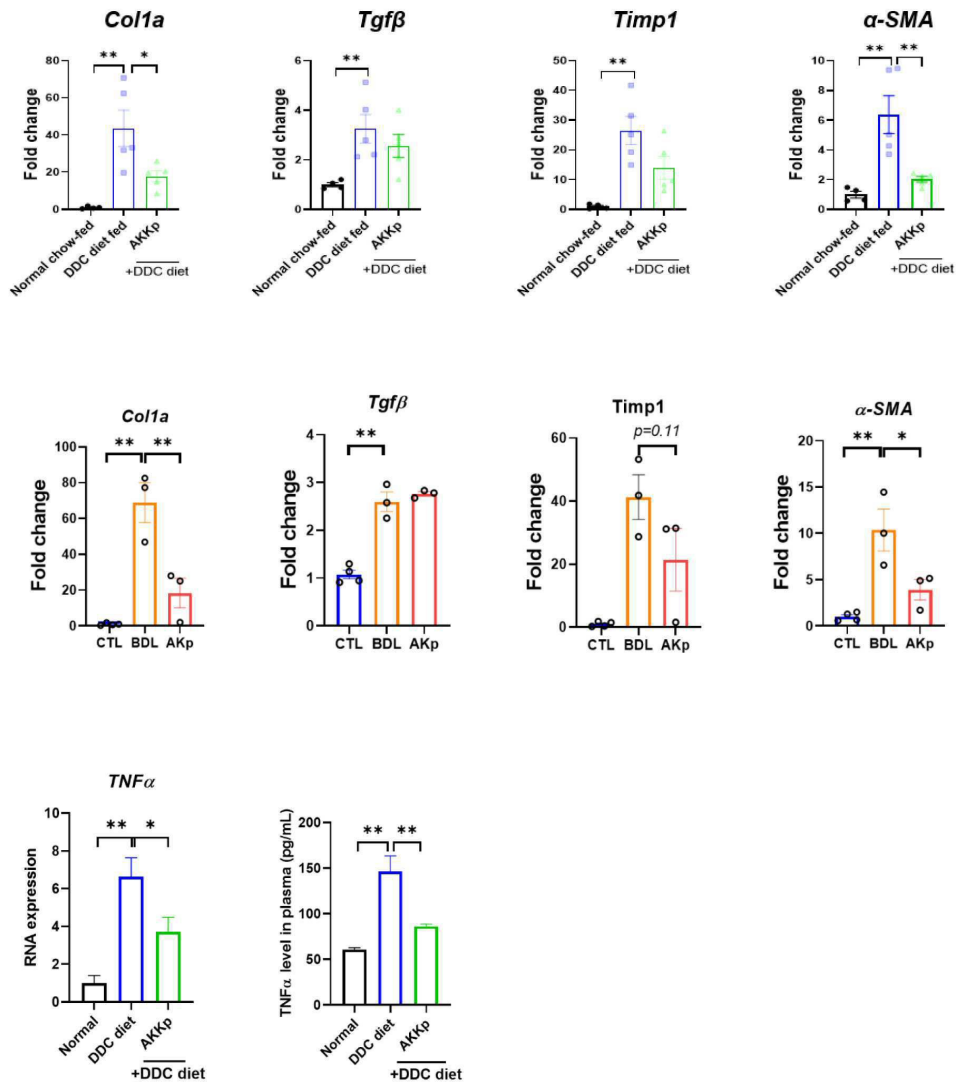


도면3



Group	ALT (U/L)	AST (U/L)	Total bilirubin (mg/dL)
Normal diet	35.75 (5.66)	144.00 (35.46)	0.20 (0)
DDC diet	932.20 (79.67)	652.40 (128.40)	8.62 (3.74)
Pasteurized <i>A. muciniphila</i>	609.40 (62.86)	463.60 (72.55)	1.20 (0.25)

도면4



도면5

