(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년03월07일
(11) 등록번호 10-2371436
(24) 등록일자 2022년03월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) *A61K 31/166* (2006.01)
A61K 31/18 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
A61K 31/166 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0140915
(22) 출원일자 2019년11월06일
심사청구일자 2019년11월06일
(65) 공개번호 10-2021-0054802
(43) 공개일자 2021년05월14일
(56) 선행기술조사문헌
Frontiers in Immunology (2019.05.14.) 10:1070
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
아주대학교산학협력단
경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)
(72) 발명자
백성희
서울특별시 강남구 선릉로 221
김동하
경기도 김포시 걸포1로 11
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
박원미

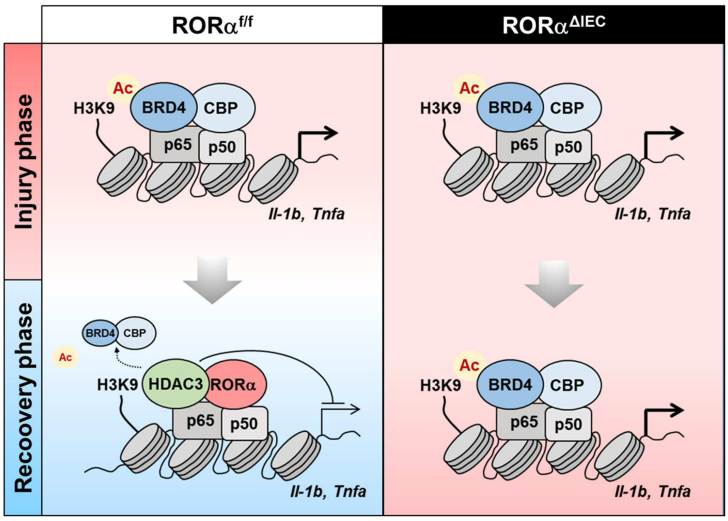
전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 **RORα를 표적으로 하는 염증성 장질환 치료제 스크리닝 방법**

(57) 요 약

본원은 RORα가 장에서 NF-κB 전사 활성을 억제하여 염증성 유전자의 발현을 억제하고 그 결과 염증 반응을 조절할 수 있는 기전에 근거한 염증성 장 질환 치료제 스크르닝 방법을 개시한다. 본원에 따른 스크리닝 방법에 의해 발굴된 후보물질은 염증 반응의 균형 유지를 통해 염증성 장 질환을 포함하는 염증성 질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
A61K 31/18 (2013.01)
A61K 38/1783 (2013.01)
A61P 1/00 (2018.01)
A61P 29/00 (2018.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)

(72) 발명자
오세규
서울특별시 관악구 관악로 1
황성순
경기도 용인시 기흥구 보정로 30
박대찬
서울특별시 관악구 관악로30길 27

(56) 선행기술조사문헌
Gastroenterology (2011) 140:1756-1767
KR1020130105545 A*
WO2011115892 A1*
Inflammatory Bowel Disease (2016) 22(9):2265-2279
Journal of Internal Medicine (2008) 263(6):591-596*
Science Immunology (2016) 1:eaaf8864(1-8)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711090071
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공분야기초연구사업
연구과제명 후성유전 코드 및 질환 연구
기 여 율 6/10
과제수행기관명 서울대학교
연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711081831
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오의료기술개발사업
연구과제명 비만억제 프로바이오틱스 발굴을 위한 스크리닝 플랫폼 구축
기 여 율 1/10
과제수행기관명 연세대학교
연구기간 2017.05.25 ~ 2019.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711097550
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명 마우스 표현형서비스 구축 및 대사 운동 표현형 분석
기 여 율 1/10
과제수행기관명 재단법인 국가마우스표현형분석사업단
연구기간 2013.11.20 ~ 2020.03.19
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711087336
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 신진연구
연구과제명 암 침습 면역 레퍼토리 분석 기반 개인 맞춤형 항암 항체 치료제 개발
기 여 율 2/10
과제수행기관명 아주대학교
연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

RORα(RAR related orphan receptor alpha), HDAC(Histone deacetylase) 및 NF (Nuclear Factor)-κB를 발현하는 분리된 장상피세포를 제공하는 단계;

상기 세포에 상기 NF-κB의 표적 유전자 전사 활성에 대한 상기 RORα의 억제 효과를 증가시킬 것으로 기대되는 시험물질을 처리하는 단계; 및

상기 처리 결과, 상기 시험물질로 처리되지 않은 대조군과 비교하여 상기 시험물질로 처리된 세포에서, 상기 RORα와 HDAC3의 결합 증가, 상기 RORα와 NF-κB의 결합 증가, 상기 RORα, HDAC3, 및 NF-κB의 복합체 형성 증가 또는 상기 RORα의 IL-1β 또는 TNF-α 프로모터에의 결합이 증가되는 경우, 상기 시험물질을 염증성 장 질환 치료제로 선별하는 단계를 포함하는, 염증성 장 질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 세포는 NF-κB 반응성 엘리먼트(Response Element)에 리포터 유전자가 작동가능하게 연결된 플라스미드를 추가로 포함하며,

상기 선별하는 단계에서, 상기 처리 결과, 상기 시험물질로 처리되지 않은 대조군과 비교하여 상기 시험물질로 처리된 세포에서 상기 리포터 유전자의 발현이 감소되는 경우, 상기 시험물질을 염증성 장 질환 치료제로 선별하는 단계를 추가로 포함하는, 염증성 장 질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 선별하는 단계에서,

상기 처리 결과, 상기 시험물질로 처리되지 않은 대조군과 비교하여 상기 시험물질로 처리된 세포에서 상기 세포의 세포재생능이 증가되는 경우, 상기 시험물질을 염증성 장 질환 치료제로 선별하는 단계를 추가로 포함하는 염증성 장 질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 분리된 장상피세포는 확립된 세포주로서, 인간 장 유래의 DLD-1 또는 SW620 세포주인, 염증성 장 질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 분리된 장상피세포는 오가노이드 또는 인간을 제외한 동물모델로서 제공되는 것인, 염증성 장 질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본원은 RORα단백질을 표적으로 하는 염증성 장질환 치료제와 관련된 기술이다.

배 경 기 술

[0003] 염증성 장질환과 같은 위장관계의 만성 염증성 질환의 발생은 급격하게 증가하는 추세이다. 이러한 질환은 미생물총, 식생활 환경 및 면역반응 외에도 유전적 소인이 중요한 위험 인자로 알려져 있다.

[0004] 유전적 소인은 인간에서 염증성 장질환 발병의 잘 알려진 요인 중 하나이다. 게놈 수준의 연관 분석 연구(GWAS)는 인간에서 염증성장질환의 발병에 대한 주요 감수성 유전자로서 *Nod2*, *Il23r* 및 *Atg16l1*과 같은 유전자에서 신규 단일 뉴클레오티드 다형성(SNP)를 확인하였다.

[0005] 한편 장상피 세포(intestinal epithelial cells, IEC)는 장내 거대한 미생물 집단을 전체 면역 시스템으로부터 분리하고, 잔류 면역 세포들과 함께 염증성 사이토카인을 분비함으로써 병원체의 유입을 효과적으로 제거한다. 이러한 장 상피 세포의 다양한 기능은 장 항상성을 유지하는 물리적 장벽으로 작용한다.

[0006] IEC가 염증을 포함하여 역동적인 생리적인 스트레스를 겪는다는 점을 고려하면, IEC 내에서 균형 잡힌 염증 반응의 제어는 조직 손상 및 미생물 침입을 방지하는데 중요하다. 조직 내 과도한 염증은 상피 세포의 물리적 장벽의 재구성 및 재생을 억제하여 심각한 조직 손상을 초래하기 때문에, 염증의 약화는 상피 조직의 재구성에 중요하다.

[0007] 그러나, IEC에서 분자수준, 특히 전사 수준에서 염증의 감쇄가 어떻게 조절되는지에 대한 분자 기작은 여전히 불분명하다. 따라서 근본적인 장내 염증 조절을 위한 효과적 치료제 개발을 위해 염증 발생의 분자생물학적 기전에 근거한 신규 표적 개발이 필요하다.

[0008] 대한민국 공개특허 공보 제2013-0105545호는 Th17세포 관련 면역질환 치료를 위한 RORα의 용도에 관한 것으로 RORα-Th17 간의 상호작용 및 이와 관련된 분자적 메커니즘을 이용한 면역 조절 방법 및 이를 이용한 세포치료제 개발에 관한 것이다. 장의 항상성 유지를 위해 RORα 및 그 다운스트림에서 상호작용하는 기전 및 기능에 대해서는 전혀 개시하고 있지 않다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본원은 RORα/HDAC3을 매개한 NF-kB 신호전달 경로 억제를 표적으로 하는 새로운 기전에 근거한 염증성 장 질환을 포함하는 만성 염증 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 한 양태에서 본원은 RORα(RAR related orphan receptor alpha)가 NF-κB의 전사 활성의 억제를 통해 NF-κB

신호 및 염증성 유전자의 전사 억제자로서 기능하여 손상된 장 조직의 재생 및 항상성 유지에 필수적이라는 기전에 근거한 염증성 장 질환 치료제, 특히 만성 염증성 장 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0013] 일 구현예에서 본원은 RORα, HDAC(Histone deacetylase) 및 NF-κB을 발현하는 장상피세포를 제공하는 단계; 상기 세포에 상기 RORα의 전사 활성을 억제 시킬 것으로 기대되는 시험물질을 처리하는 단계; 및 상기 처리 결과, 상기 시험물질로 처리되지 않은 대조군과 비교하여 상기 시험물질로 처리된 세포에서 RORα의 전사 활성이 억제된 경우, 상기 시험물질을 염증성 장 질환 치료제로 선별하는 단계를 포함하며,상기 RORα의 전사 활성의 억제는 상기 HDAC와 RORα의 결합 감소, 또는 상기 NF-κB에 의해 전사가 조절되는 염증성 유전자의 발현 감소로 측정된다.

[0014] 일 구현예에서 염증성 유전자는 그 발현이, RORα 의존적인 NF-κB 표적 유전자로서, 본원에 따른 분석에서 군집 1에 속하는 IL(Interleukin)-1β, IL-1α, TNF(Tumor necrosis factor)α, Iκbα(nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha), 또는 IL-6를 포함한다.

[0015] 일 구현예에서 본원에 따른 방법에 사용되는 세포는 NF-κB 반응성 엘리먼트(Response Element) 예를 들면 5'-GGGAATTTCC-3' 는 프로모터 서열과 함께, 한 개 또는 그 이상이 리포터 유전자에 작동가능하게 연결된 플라스미드를 추가로 포함하며, 이 경우, 상기 RORα의 전사 활성의 억제는, 상기 HDAC와 RORα의 결합 감소, 또는 상기 NF-κB 전사 인자에 의해 전사가 조절되는 염증성 유전자의 발현 감소 측정에 추가하여, 또는 이에 대신하여, 상기 리포터 유전자의 발현 감소로 측정된다.

[0016] 일 구현예에서, 상기 RORα의 전사 활성의 억제 여부는 상기 세포 또는 오가노이드의 세포재생능 증가 또는 활성산소 농도 감소의 측정을 추가로 포함 할 수 있다.

[0017] 일 구현예에서, 상기 장상피세포는 확립된 세포주로서, 인간 장 유래의 DLD-1 또는 SW620 세포주를 포함하나 이로 제한하는 것은 아니며, 본원에 따른 목적을 달성할 수 있는 다양한 세포가 사용될 수 있다.

[0018] 일 구현예에서 본원의 방법에 사용되는 상기 장상피세포는 오가노이드 또는 인간을 제외한 동물모델로서 제공될 수 있다.

[0019] 다른 양태에서 본원은 RORα 단백질 또는 유전자를 포함하는 염증성 장 질환, 특히 만성 염증성 장질환 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0020] 또 다른 양태에서 본원은 장상피세포에서 RORα의 전사 활성을 억제시키는 RORα 작용제(agonist), 예를 들면 N-(4-(2,2,2-트리플루오-1-하이드록시-1-(트리플루오로메틸)에틸)페닐)-2-씨오펜설폰아마이드 또는 N-(4-(1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-하이드록시프로판-2-일)페닐)-4-(트리플루오로메틸)벤즈아마이드를 포함하는, 염증성 장 질환 치료용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0022] RORα가 장에서 NF-κB 전사 활성을 억제하여 염증성 유전자의 발현을 억제하고 그 결과 염증 반응을 조절할 수 있는 기전에 근거한 본원에 따른 염증성 장 질환 치료제 스크르닝 방법에 의해 발굴된 후보 물질은 장의 염증반응의 균형 유지를 통해 염증성 장 질환을 포함하는 염증성 질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 RORα는 DSS로 인한 대장염 동안 장내 항상성을 유지하기 위해 장 염증을 약화 시킨다. (*A*) $ROR\alpha^{f/f}$ 와 $ROR\alpha^{\Delta IEC}$ 마우스로부터 IECs에서의 *RORα* mRNA 발현 수준. mRNA 수준을 β-actin 발현으로 표준화함. (*B*) $ROR\alpha^{f/f}$ 와 $ROR\alpha^{\Delta IEC}$ 마우스로부터의 IECs에서의 RORα의 단백질 수준. β-actin은 로딩 대조군으로 사용하였다. (*C*) $ROR\alpha^{f/f}$ 와 $ROR\alpha^{\Delta IEC}$ 마우스의 평균 체중. 8주령 암컷. (n = 8~10 그룹당). (*D*) $ROR\alpha^{f/f}$ 와 $ROR\alpha^{\Delta IEC}$ 마우스에 2% DSS를 7일간 제공하고 정상 식수로 7일간 추가로 제공하였다. 이 실험은 비슷한 결과로 두 번 반복되었다 (n = 8~10 그룹당). (*E*) 대장 길이는 DSS 처리 후 $ROR\alpha^{f/f}$ 와 $ROR\alpha^{\Delta IEC}$ 마우스에서 0일 (n = 3 그룹당), 14일 (n = 7~10 그룹당)에 측정되었다. (*F*) 게놈 DNA 장간막 림프절에서 분리한 뒤 박테리아 함량을 16s rDNA 정량적실시간 PCR(qRT-PCR)로 측정하였다 (n= 6~7 그룹당). 16s rDNA 수준은 마우스 게놈 L32 발현으로 표준화 하였다. (*G*) $ROR\alpha^{f/f}$ 와 $ROR\alpha^{\Delta IEC}$ 마우스에 2% DSS 5일간 제공하고 (Day 5) 정상 식수로 3일 추가 공급하였다

(Day 8). RORα$^{f/f}$ 와 RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스의 2% DSS처리 0, 5, 8일의 대장 H&E 염색의 대표적인 이미지. 스케일 바, 100μm. (*H*) 2% DSS 처리 후 8일째 RORα$^{f/f}$ 와 RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스의 대장 섹션의 대표적인 면역 조직 염색 공초점 이미지. Ki-67 양성의 IECs의 비율은 이미지 분석에서 결정되었으며 광학 밀도로 표시되었다. Ki-67 (적색); DAPI (청색). 스케일 바, 100μm. (*I*) 면역 조직 염색법은 RORα$^{f/f}$ 와 RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스에 8일 간의 2% DSS처리 후에 대장 섹션에서 수행되었다. 대장의 대표적인 F4/80 (대식세포 마커), Gr-1 (호증구 마커), CD4 (T 세포 마커) 염색 섹션을 (녹색) 도시하였다. DAPI (청색). 스케일 바, 100μm. (*J*) 염증 사이토카인 유전자 발현 프로파일은 2% DSS 8일 후에 RORα$^{f/f}$ 와 RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스 결장에서 qRT-PCR로 측정하였다. mRNA 수준은 L32 발현으로 표준화 하였다 (n = 5~8 그룹당). (*K*) 7일 동안 배양된 장 오가노이드의 대표적 광학 이미지. 스케일 바, 200μm. (*L*) 면역 조직 염색법을 14일 동안 배양된 오가노이드에서 수행하였고 대표적인 Ki-67 이미지를 도시하였다. Ki-67 (녹색); DAPI (청색). 스케일 바, 100μm. (*M*) 2% DSS 8일 후 RORα$^{f/f}$와 RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스 IECs 장내 줄기 세포 마커 유전자 mRNA 수준 (n = 4 그룹당). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. 통계학적 분석은 unpaired *t*-test를 이용하였다. 데이터는 세 번의 독립적 실험이다 (*A*, *D*, *E*, *F*, *H*, *J* 와 *H*; 평균 ± SEM). 또는 유사한 결과를 가지는 세 번의 독립적인 실험의 대표값이다 (*G*, *I*, *K* 와 *L*).

도 2는 IECs 내 RORα 결핍에 영향을 받는 유전자 게놈 전체 전사체 분석. (*A*) RNA-시퀀싱(RNA-seq) 분석 전략을 보여주는 순서도. (*B*) 가변적으로 발현된 상위 5% 유전자의 비지도 계층적 군집 (유클리드 거리 측정법). 덴드로그램은 각 전사체 간의 유사성을 보여준다. (*C*) 상위 5% 가변적으로 발현된 유전자의 k-평균 군집의 히트맵 (n = 2,668). 유전자는 발현 유사성에 기초하여 8개의 군집으로 분류되었다. (*D*) 군집 1의 바이올린 박스 플롯. 박스 플롯은 군집 1-3의 각 그룹으로부터 z-점수의 분포를 나타낸다. (*E*) 군집 1의 기능적 유전자 온톨로지. 면역성 및 염증 반응은 군집 1-3에서 가장 풍부한 용어이다. 면역계 과정과 면역 반응 유전자는 군집 1에서 가장 유의미하게 농축된 용어이다. 일주기 리듬 유전자는 군집 2에서 가장 풍부한 용어이다. 세포 분열은 군집 3에서 크게 풍부한 용어이다.

도 3은 RORα는 DSS로 유발된 대장염에서 염증성 유전자의 전사 억제 인자로서 기능한다. (*A*) 대표적인 유전자 세트 농축 분석(GSEA) 결과 (군집 1에 기초한 표현형 표지와 Pearson 상관에 의한 측정으로 순위를 결정함). (*B*) 각 용어의 농축에 기여하는 유전자들. (*C*) UCSC 게놈 브라우저(GB)의 스크린 샷. GB는 *Il-1b*와 *Tnfa*에 대한 RNA-seq 적용 범위와 개별 판독값을 보여준다. (*D*) 군집 1에서의 전사 인자 농축 분석. 초기하 *p*-값으로 계산됨. 막대는 농축 점수, -log10(*p*-값)을 나타낸다.

도 4는 NF-kB 표적 프로모터로의 RORα 모집은 DSS에 의한 장 염증 악화에 필수적이다. (*A*) RORα와 p65의 면역 침강법이 2% DSS 처리 8일 후 RORα$^{f/f}$ 마우스 IECs의 핵 분획에서 수행되었다 (n = 5 그룹당). (*B* 와 *C*) RORα 과발현 (*B*)과 RORα 녹다운(*C*)의 3x κB-RE-루시퍼라제 활성에 미치는 효과. (*D*) NF-κB 표적 유전자들에 대한 qRT-PCR이 RORα$^{f/f}$와 RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스에서 유래한 오가노이드에 TNFα와 SR3335를 표기된 방법으로 처리한 뒤에 시행되었다. (*E*) 2% DSS 처리 8일째 RORα$^{f/f}$ 와 RORα$^{\Delta IEC}$ IECs에서 RORα-의존적, RORα-독립적 NF-κB 표적 유전자들 (2% DSS 처리 후 상향 유도된)들의 수준을 측정하기 위해 qRT-PCR을 시행하였다 (n = 4 그룹당). mRNA 수준은 L32 발현으로 표준화함. (*F* 와 *G*) 2% DSS 처리 8일째 RORα$^{f/f}$ 와 RORα$^{\Delta IEC}$ IECs에서 RORα-의존적 (*F*) or RORα-독립적 (*G*) 표적 프로모터에서 ChIP 분석 (n = 5 그룹당). RORα-의존적 or -독립적 표적 프로모터에서 도식 모델. **P<0.01, ***P< 0.001. 통계학적 분석은 upaired t-test를 이용하였다. 데이터는 3번의 독립적인 실험에서 유래하였다 (C, D, E, F 와 G; 평균 ± SEM).

도 5는 RORα/HDAC3는 장 염증의 약화를 위해 NF-kB 표적 프로모터에서 BRD4/CBP를 제거한다. (*A*) HDAC3, p65, RORα의 면역 침강 분석은 2% DSS 8일째, RORα$^{f/f}$ 와 RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스로부터 IECs의 핵 분획에서 수행하였다 (n = 5 그룹당). (*B* 와 *C*) p65를 이용한 3x κB-RE-루시퍼라제 활성에 대한 RORα 과발현과 HDAC3 녹다운 (*B*) 또는 HDAC3 과발현과 RORα 녹다운 효과 (*C*). (*D*) p65와 CBP, BRD4의 면역 침강 분석이 2% DSS 8일째 RORα$^{f/f}$ 와 RORα$^{\Delta IEC}$ IECs 핵 분획에서 시행되었다 (n = 5 그룹당). (*E*) RORα와 CBP, BRD4의 면역 침강 분석이 2% DSS 8일째 RORα$^{f/f}$ 와 RORα$^{\Delta IEC}$ IECs 핵 분획에서 시행되었다 (n = 5 그룹당). (*F*) p65와 BRD4를 이용한 3x κB-RE-루시퍼라제 리포터 활성에 대한 RORα의 효과. (*G*) 2% DSS 처리 8일째 RORα$^{f/f}$ 와 RORα$^{\Delta IEC}$ IECs에서 *Il-1b* 와 *Tnfa* 프로모터에 대해 ChIP 분석을 수행하였다 (n = 5 그룹당). p65, RORα, HDAC3, CBP, BRD4 와 H3K9Ac의 프

로모터 점유율을 상대적으로 분석하였다. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. 통계학적 분석은 upaired t-test를 이용하였다. 데이터는 3번의 독립적인 실험에서 유래하였다 (B, C, F 와 G; 평균 ± SEM).

도 6은 DSS에 의해 유도된 대장염에서 염증 유전자의 전사 억제 인자로서 RORα의 기능을 나타내는 개략도. 조직 손상 후 IECs에서 RORα의 역할에 대한 이미지. RORα는 NF-κB 표적 프로모터에서 HDAC3 모집과 BRD4/CBP 제거를 통해 NF-κB 신호를 약화하고 장 염증 약화와 상피 장벽 재생을 달성한다. RORα/HDAC3 모집의 결핍은 NF-κB 표적 프로모터에서 BRD4/CBP 점유율 증가를 야기하며, 장내 과도한 염증과 조직 재생 과정의 붕괴를 야기한다.

도 7은 DSS 처리를 한 $ROR\alpha^{*?*IEC}$ 마우스에서 대장염 심각도를 나타내는 결과이다. (A) RORα 항체를 사용한 $ROR\alpha^{f/f}$ 및 $ROR\alpha^{*?*IEC}$ 마우스로부터 결장 섹션의 면역 조직 화학. 스케일 바, 50μm. (B) 기술된 기간 동안 $ROR\alpha^{f/f}$ 및 $ROR\alpha^{*?*IEC}$ 마우스의 질병 활성 지수 (DAI) 점수. (n = 8~10 그룹당) (C) 8일의 2% DSS 처리 후 $ROR\alpha^{f/f}$ 및 $ROR\alpha^{*?*IEC}$ 마우스로부터 결장 섹션의 조직 학적 점수. (n = 5-6, 그룹당) (D) DSS 처리된 $ROR\alpha^{f/f}$ 및 $ROR\alpha^{*?*IEC}$ 마우스의 생존 곡선. $ROR\alpha^{f/f}$ 및 $ROR\alpha^{*?*IEC}$ 마우스에 7일 동안 식수에 2.5% DSS를 제공한 후, 추가 7일 동안 규칙적인 식수를 제공하였다. 생존력은 매일 모니터링했다. 생존의 차이는 Kaplan-Meier 분석으로 결정되었다. (n = 12-13, 그룹당); * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001. 비대응 t-검정을 사용하여 통계 분석을 수행하였다. (B 및 C; 평균 ± SEM) 데이터는 3회의 독립적인 실험으로부터 얻은 것이다.

도 8은 RORα 결핍 오가노이드의 재생 능력을 야생형 오가노이드의 재생 능력과 비교한 결과 큰 차이를 보이지 않는다는 것을 나타내는 결과이다. (A) $ROR\alpha^{f/f}$ 및 $ROR\alpha^{*?*IEC}$ 마우스로부터의 장 오가노이드 형성 효율. 1000개의 창자움을 매립하고, 배양 4일째 생존한 오가노이드를 현미경을 사용하여 계수하였다. (B) $ROR\alpha^{f/f}$ 및 $ROR\alpha^{*?*IEC}$ 마우스로부터의 결장 오가노이드에서 장 줄기 세포 마커 및 분화 마커의 mRNA 수준. (C) $ROR\alpha^{f/f}$ 및 $ROR\alpha^{*?*IEC}$ 마우스로부터의 결장 오가노이드에서 역분화 줄기 세포 마커의 mRNA 발현 수준. 비대응 t-검정을 사용하여 통계 분석을 수행하였다. (A, B 및 C; 평균 ± SEM) 데이터는 3회의 독립적인 실험으로부터 얻은 것이다.

도 9는 $ROR\alpha^{f/f}$ 및 $ROR\alpha^{*?*IEC}$ IECs의 RNA 시퀀싱 분석에서 나온 DEGs 수를 나타내며, DEGs는 두 유전자형 또는 DSS 처리일 간의 유전자 발현을 비교함으로써 확인하였다. (조정된 p-값 ≤ 0.05 및 |log2FC| ≥ 1) (A) 0일 및 8일에 각각 $ROR\alpha^{f/f}$ 및 $ROR\alpha^{*?*IEC}$ IECs 전사체를 비교하여 생성된 DEGs 수. (B) 0일의 유전자 발현과 각 유전자형에서 8일의 유전자 발현을 각각 비교하여 생성된 DEGs의 수.

도 10은 대표적인 유전자 세트 농축 분석(GSEA) 결과로, 염증 반응, 사이토카인에 대한 반응 및 사이토카인 생산의 조절에 관여하는 유전자 세트는 표현형 라벨에 따라 상당히 풍부한 용어로 검출된다.

도 11은 대표적인 유전자 세트 농축 분석(GSEA) 결과로 염증 반응, 사이토카인에 대한 반응 및 사이토카인 생산의 조절에 관여하는 유전자 세트는 표현형 라벨에 따라 상당히 풍부한 용어로 검출된다.

도 12는 RORα KO 오가노이드는 TNFα 처리에 대한 민감성이 매우 높은 것을 나타내는 결과이다. (A) $ROR\alpha^{f/f}$ 및 $ROR\alpha^{*?*IEC}$ 마우스의 결장 오가노이드에서 측정된 상대적인 mRNA 수준. 결장 오가노이드를 3시간 동안 TNFα (100ng/ml)로 처리하였다. (B) 24시간 동안 TNFα (100ng /ml)로 처리된 결장 오가노이드를 나타내는 대표적인 현미경 이미지. 처리 후 살아있는 오가노이드의 수를 세었다. (n = 그룹당 2개). * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001. 비대응 t-검정을 사용하여 통계 분석을 수행하였다. (A 및 B; 평균 ± SEM) 데이터는 3회의 독립적인 실험으로부터 얻은 것이다.

도 13은 RORα는 LPS 처리 후 결장 직장암 세포주에서 NF-κB 표적 유전자의 전사를 억제하는 것을 나타내는 결과이다. (A) 지시된 시간 동안 LPS (1μg/ml) 처리 후 DLD-1 세포에서 염증성 유전자의 qRT-PCR 분석. (B 및 C) DLD-1 및 SW620을 포함하는 결장 직장암 세포주는 지시된 시간 동안 LPS (1μg/ml)로 처리되었다. SR3335 (5μM) 또는 DMSO는 동일한 시점에서 LPS로 처리되었다. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001. 비대응 t-검정을 사용하여 통계 분석을 수행 하였다. (A, B 및 C; 평균 ± SEM) 데이터는 3회의 독립적인 실험으로부터 얻은 것이다.

도 14는 RORα 및 HDAC3 DSS 유도 손상 하에서 공통 표적 유전자를 공유하는 것을 나타내는 결과이다. “RORα

$^{f/f}$ DEGs" 는 DSS처리 후 0일과 8일을 비교함으로써 RORα$^{f/f}$ 마우스로부터 IECs에서 확인된 DEGs를 나타낸다. 4개의 DEG 세트들(RORα$^{f/f}$ DEGs, RORα$^{*?*IEC}$ DEGs, Day 0 DEGs, Day 8 DEGs)을 HDAC3$^{*?*IEC}$ DEGs 세트와 누적비교하였다. "HDAC3$^{*?*IEC}$ DEGs" 는HDAC3$^{f/f}$ IECs 와 HDAC3$^{*?*IEC}$ IECs 사이의 유전자 프로파일을 비교하여 얻은 결과이다. 4개의 DEGs 세트는 DSS 처리 및 유전자형을 포함한 모든 가능한 인자 조합으로 유전자 발현을 비교함으로써 구성되었다. 따라서 각 라인은 HDAC3$^{*?*IEC}$ DEGs로 설정된 DEGs들의 겹침을 나타낸다. 초기하 테스트에 따르면 DSS 손상과 함께 RORα 결핍된 세트에서 HDAC3$^{*?*IEC}$ DEGs 세트와 가장 많이 중복되는 것으로 나타났다.

도 15는 RORα 및 HDAC3는 DSS 유도 손상 하에서 일반적인 염증성 표적 유전자를 공유하는 것을 나타내는 결과이다. (A) 벤 다이어그램으로 표시된 DEGs의 세 가지 다른 비교. (B) DSS 처리시 HDAC3 및 RORα의 공유된 표적에 대한 GO 용어 분석 (n= 148).

도 16은 2% DSS (그룹당 n = 5) 처리 후 8일째의 RORα$^{f/f}$ 및 RORα$^{*?*IEC}$ 마우스로부터 분리한 IECs의 *Il-1b* 프로모터(ROR-반응 요소)에 대해 ChIP 분석을 수행하여 RORα에 의한 프로모터 점유를 분석한 결과이다. 비대응 t-검정을 사용하여 통계 분석을 수행하였다. (평균 ± SEM) 데이터는 3회의 독립적인 실험으로부터 얻은 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본원은 RORα(RAR related orphan receptor alpha)가 NF (Nulcar Factor)-κB의 전사 활성의 억제를 통해 NF-κB 신호 및 염증성 유전자의 전사 억제자로서 기능하여 손상된 장 조직의 재생 및 항상성 유지에 필수적이라는 발견에 근거한 것이다. 구체적으로 장 특이적 RORα 결핍 마우스(RORα$^{\Delta IEC}$)는 과도한 염증 및 심각한 조직 손상을 보이며, 야생형(RORα$^{f/f}$) 마우스와 비교하여 조직이 재구성이 현저히 저해되었으며, RORα는 장상피세포(IEC) 내 염증 반응의 균형을 유지하기 위한 중요한 에피제네틱 조절자 역할을 하는 것을 발견하였다.

[0026] 이에 한 양태에서 본원은 본원에서 규명된 기전을 근거로한 염증성 장 질환 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0027] 일 구현예에서 본원의 스크리닝 방법은 RORα(RAR related orphan receptor alpha), HDAC(Histone deacetylase) 및 NF-κB을 발현하는 장상피세포를 제공하는 단계; 상기 세포에 상기 RORα의 전사 활성을 억제시킬 것으로 기대되는 시험물질을 처리하는 단계; 상기 처리 결과, 상기 시험물질로 처리되지 않은 대조군과 비교하여 상기 시험물질로 처리된 세포에서 RORα의 전사 활성이 억제된 경우, 상기 시험물질을 염증성 장 질환 치료제로 선별하는 단계를 포함하며, 상기 RORα의 전사 활성의 억제는 상기 HDAC와 RORα의 결합 감소, 또는 상기 NF-κB에 의해 전사가 조절되는 염증성 유전자의 발현 감소로 측정된다.

[0028] 본원에 따른 스크리닝 방법은 상술한 바와 같은 본원에서 규명된 기전을 표적으로 한 것으로, 이러한 기전에 영향을 미치는 물질은 장의 염증 조절 물질로서, 만성 염증, 특히 염증성 장질환의 치료제 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

[0029] 본원에 따른 방법에 사용되는 RORα는 고아(orphan) 핵 수용체 계열의 멤버로서 배아 발생, 세포 분화, 대사 경로 및 암과 같은 다양한 생리 기능에서 전사의 활성 또는 억제를 통해 중요한 역할을 한다. 기존에 장상피세포에서 RORα가 NF-κB 신호 전달을 조절하는 기작은 아직 밝혀지지 않았다. ROR alpha 유전자 또는 단백질의 서열은 공지된 것으로, 예를 들면 각 유전자의 핵산 및 단백질 서열의 예는 각각 NM_134261.2 및 NP_599023.1로 공지되어 있다.

[0030] 본원에서는 덱스트란 설페이트 나트륨(DSS)를 이용한 마우스 대장염 실험 모델에서 RORα 결핍 마우스는 심각한 장 염증 병변을 보인다는 것을 발견하였다. 또한 RORα 유전자의 결핍은 장상피 세포 내에서 염증성 유전자와 같은 NF-kB 표적 유전자들의 과발현을 야기하는 것을 규명하였다.

[0031] 본원에 따른 방법에서 상기 RORα은 HDAC3와 상호작용하며, RORα의 전사 억제 활성을 위해 HDAC3와의 결합이 필요하다. HDAC3(Histon Deacetylase)는 아세틸화된 핵산의 아세틸기를 제거하는 탈아세틸화 효소로서 작용한다. HDAC의 유전자 또는 단백질의 서열은 공지된 것으로, 예를 들면 인간 유전자의 핵산 및 단백질 서열의 예는 다음과 같다: NCBI 데이터베이스의 NM_003883.3 / NP_003874.2.

[0032] NF-κB는 p65/Rel A, p50/NF-κB1, p52, Rel B, 및 c-Rel이 속한 패밀리로, p50-p65 이종 이량체가 가장 풍부한 형태이다. p50-p65는 면역세포에서 뿐만 아니라 IECs의 면역 반응을 유지하기 위한 핵심적인 조절자 역할을

한다. NF-κB 전사 활성은 다양한 번역 후 변형에 의해 엄격하게 제어되며, 이는 공동 인자를 위한 결합 플랫폼을 제공하고 NF-κB의 활성 및 표적 특이성을 조절한다. CREB 결합 단백질(CBP)/p300을 포함하는 히스톤 아세틸화 효소들은 p50-p65에서 아세틸화 및 NF-κB 표적 유전자의 전사 활성화를 위한 히스톤 변형을 유도한다. 브로모 도메인-함유 단백질(BRD4) 계열 구성원들은 아세틸화된 기질을 인식하고 히스톤 아세틸화 효소들의 추가적인 도입을 유도하여 염증성 사이토카인 유전자들의 발현을 증가시킨다.

[0033] 본원에 따른 방법에서 RORα 단백질은 HDAC3와 함께 NF-kB 표적 유전자들의 프로모터에 공동 모집 되고, 이는 CREB 결합 단백질(CBP) 및 브로모 도메인-함유 단백질 4(BRD4)들이 표적 유전자들의 프로모터에 결합하는 것을 억제하여, NF-kB 표적 유전자의 전사를 억제하게 된다. 본원에 따른 방법에서 상기 ROR alpha 및 HDAC3은 상호작용하며, 표적유전자 프로모터의 NF-κB 반응성 엘리먼트 또는 요소(Response element)에 결합하고, 이러한 결합에 의해 이에 의해 조절되는 유전자의 발현이 억제된다. 이런 방식으로 본원에서 개발된 후보물질은 염증성 물질의 발현을 억제할 수 있어 장의 염증을 완화하고 항상성을 유지할 수 있다. 본원에 따른 방법에 사용되는 NF-κB(p65)는 유전자 및 단백질 서열은 공지된 것으로 예를 들면 인간 단백질 서열은 NP_068810.3로 공지되어 있다. 단백질 서열이 알려지면, 핵산 서열은 이로부터 용이하게 도출될 수 있음은 당업자에게 자명한 것이다. NF-κB가 결합하는 반응성 엘리먼트의 서열은 공지되어 있으며, 일 구현예에서 서열은 5 '-GGGAATTTCC-3' 로 표시된다.

[0034] 이에 본원에 따른 방법에서 RORα 전사 활성을 억제 시킬 것으로 기대되는 후보물질은 RORα 단백질과 HDAC3의 상호작용 또는 결합 억제, 그리고 염증유전자와 같은 NF-kB 표적 유전자의 전사 활성을 억제하여, 장에서 염증을 억제할 수 있다.

[0035] 본원에서는 군집 1에 속하는 NF-κB 표적 유전자에 대한 RORα에 의한 전사 활성 억제가 장 상피 조직의 복원에 필수적임을 규명하였다. 이들은 RORα 의존적 NF-κB 표적 염증성 유전자는 염증 상황에서 발현이 어느정도 증가되지만, RORα가 없는 경우에 과도하게 많이 발현되는 패턴을 가진 유전자들이 모여있는 것을 군집 1이라고 정의하였다. 이에 일 구현예에서 본원에 방법에서 시험물질을 선별하기 위해 그 발현이 측정되는 염증성 유전자는 군집 1에 속하는 염증성 유전자로서, IL(Interleukin)-1β, IL-1α, TNF(Tumor necrosis factor)α, Iκbα (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha), 및 IL-6 등을 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다.

[0036] 일 구현예에서 본원에 방법에서 시험물질을 선별하기 위해 RORα 단백질과 HDAC3의 상호작용 또는 결합 억제 및 염증성 유전자의 발현 억제에 추가하여, 본원이 방법에 사용되는 세포의 세포재생능 또는 활성산소 생산능이 측정된다. RORα이 결핍된 경우 염증 및 심각한 조직 손상을 보이며, 야생형($ROR\alpha^{f/f}$) 마우스와 비교하여 조직이 재구성이 현저히 저해되었기 때문에, 시험물질로 처리되지 않은 대조군과 비교하여 상기 처리된 세포에서 조직의 재구성이 향상되고, 이는 세포재생이 증가. 활성산소 농도가 감소 등으로 측정될 수 있으며, 본원 실시예에 기재된 방법을 참조할 수 있다.

[0037] 본원에 따른 방법에 사용되는 세포는 이러한 세포를 포함하는 오가노이드 또는 인간을 제외한 동물모델로서 제공될 수 있다. 이러한 오가노이드 및 동물모델은 당업계 공지된 방법을 이용하여 제조될 수 있으며, 예를 들면 본원의 실시예에 기재된 방법을 참조할 수 있다.

[0038] 본원에 따른 일 구현예에서는 세포로서 장의 상피세포가 사용되며, 예를 들면 확립된 세포주로서 인간 장 유래의 DLD-1 (예를 들면 ATCC® CCL-221™) 또는 SW620 (예를 들면 ATCC® CCL-227™)가 사용될 수 있다.

[0039] 본원에 따른 다른 구현예에서는 오가노이드가 사용된다. 본원에서 오가노이드란 실제 장기의 미세구조를 나타내는 3차원 환경의 인비트로에서 생산된 미니 장기이다. 이는 자가 재생 및 분화 능을 갖는 세포가 3차원 배양 환경에서 만들어진다. 오가노이드를 제조하는 방법은 공지(Organoid Culture handbook, Ambiso) 된 것을 참고할 수 있으며, 또한 본원 실시예에 기재된 방법을 참고할 수 있다. 본원에 따른 일 구현예에서는 장(intestine) 오가노이드가 사용된다.

[0040] 본원에 따른 일 구현예에서 상기 세포 및 상기 오가노이드는 NF-kb 반응성 엘리먼트에 리포터 유전자가 작동가능하게 연결된 플라스미드를 추가로 포함하며, 이 경우, RORα 단백질과 HDAC3의 상호작용 또는 결합 억제 및 염증성 유전자의 발현 억제 측정 대신에, 또는 이에 추가하여 상기 시험물질로 처리된 세포에서 상기 리포터 유전자의 발현을 검출하며 상기 측정 결과, 시험물질로 처리되지 않은 대조군과 비교하여 상기 처리된 세포에서 상기 리포터 유전자의 발현이 감소한 경우, 상기 시험물질을 염증성 장 질환 치료제 후보물질로 선별할 수

있다.

[0041] 본원에 따른 스크리닝 방법에서 NF-κb 반응성 엘리먼트 예를 들면 5‘-GGGAATTTCC-3’ 는 프로모터 서열과 함께, 한 개 또는 그 이상이 리포터 유전자에 작동가능하게 연결된다. 리포터 유전자는 상술한 바와 같은 조절서열에 작동가능하게 연결되어 조절서열에 의해 발현이 조절되는 단백질로 특정한 효소기능 등에 의해 조절서열의 작용을 간접적으로 측정할 수 있는 유전자이다. 이러한 유전자는 예를 들면 LacZ, CAT, GFP(Green Flourescent Protein) 및 RFP(Red Fluorescent protein) 등을 포함하며, 이는 각각 베타갈락토시다제, 클로로암페니콜아세틸트랜스페라제, 녹색형광단백질 및 적색형광단백질을 코딩한다. 각 리포터 단백질을 분석하는 방법은 화학적, 면역적 및 조직학적 방법이 공지되어 있으며, 당업자라면 적절한 물질 및 방법을 선택할 수 있을 것이다.

[0042] 본원에 따른 NF-κb 반응성 엘리먼트는 리포터 유전자에 작동가능하게 연결되는데, 이는 NF-κb 반응성 엘리먼트가 그 하방에 있는 유전자의 발현을 조절할 수 있는 방식으로 연결된다는 의미이고, 이러한 NF-κb 반응성 엘리먼트 및 리포터 유전자는 공지된 다양한 플라스미드에 포함될 수 있으며, 특히 진핵세포에서의 복제, 전사 및 발현을 가능하게 하는 공지된 다양한 플라스미드가 사용될 수 있으며, 시중에서 구입할 수 있으며, 당업자라면 본원 실시예에 기재된 것을 참조해서 적절한 것을 선택할 수 있을 것이다.

[0043] 이러한 시험물질은 저분자량 화합물, 고분자량 화합물, 핵산분자(예컨대, DNA, RNA, PNA 및 앱타머), 단백질, 당 및 지질 등을 포함하나 이로 한정하는 것은 아니다. 상기 시험물질은 2개 이상의 아미노산 잔기, 예컨대 6개, 10개, 12개, 20개 이하 또는 20개 초과 예컨대 50개 아미노산 잔기를 갖는 폴리펩타이드일 수 있다.

[0044] 또한 본원에 따른 약물의 스크리닝 목적을 위해서는 화합물은 저분자량의 치료효과를 갖는 것이 사용될 수 있다. 예를 들면 중량이 400 Da, 600 Da 또는 800 Da과 같은 약 1000 Da 내외의 화합물이 사용될 수 있다. 목적에 따라 이러한 화합물은 화합물 라이브러리의 일부를 구성할 수 있으며, 라이브러리를 구성하는 화합물의 숫자도 수십개부터 수백만개까지 다양하다. 이러한 화합물 라이브러리는 펩타이드, 펩토이드 및 기타 환형 또는 선형의 올리고머성 화합물, 및 주형을 기본으로 하는 저분자 화합물, 예컨대 벤조디아제핀, 하이단토인, 바이아릴, 카보사이클 및 폴리사이클 화합물(예컨대 나프탈렌, 페노티아진, 아크리딘, 스테로이드 등), 카보하이드레이트 및 아미노산 유도체, 디하이드로피리딘, 벤즈하이드릴 및 헤테로사이클(예컨대 트리아진, 인돌, 티아졸리딘 등)을 포함하는 것일 수 있으나, 이는 단지 예시적인 것으로 이로 한정되는 것은 아니다. 시험물질의 양은 사용하는 구체적인 실험방법 및 시험물질의 종류에 따라 달라지며, 당업자라면 적절한 양을 선택할 수 있을 것이다.

[0045] 본원에 따른 방법에서 실험결과 시험물질과 접촉되지 않은 대조군과 비교하여 시험물질의 존재하에서 대조군과 비교 약 10% 이상 감소, 약 20% 이상 감소, 약 30% 이상 감소, 약 40% 이상 감소, 약 50% 이상 감소, 약 60% 이상 감소, 약 70% 이상 감소, 약 80% 이상 감소, 약 80% 이상 감소, 약 100% 감소 또는 그 사이의 범위를 포함하나, 상기를 벗어나는 범위를 제외하는 것은 아니다.

[0046] 본원에서 상세히 기재된 바와 같이, 본원에서는 RORα가 DSS에 의한 대장염에서 염증성 유전자의 전사 억제 인자로서 장 항상성 유지를 위하여 과도한 장 염증을 개선시키는 것을 발견하였다.

[0047] 또한 RORα의 합성 역작용제가 NF-kB의 전사 조절을 받는 활성화된 염증 유전자들의 발현을 현저히 억제하는 것을 규명하였다.

[0048] 이에 다른 양태에서 본원은 RORα 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 염증성 장 질환 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0049] 또한 다른 양태에서 본원은 RORα의 전사 활성을 억제시키는 작용제를 포함하는 염증성 장질환 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0050] 본원에 따른 조성물에 포함되는 RORα 단백질 및 그 핵산 서열은 공지된 것이며, 또한 앞서 언급한 바와 같으나, 이로 한정하는 것은 아니며, 이의 기능적 동등체를 포함하는 것이다.

[0051] RORα의 전사 활성을 억제시키는 작용제는 공지된 것이 사용될 수 있으며, 예를 들면 SR3335 N-(4-(2,2,2-트리플루오-1-하이드록시-1-(트리플루오로메틸)에틸)페닐)-2-씨오펜설폰아마이드 (CAS No. 293753-05-6) 또는 SR1078 N-(4-(1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-하이드록시프로판-2-일)페닐)-4-(트리플루오로메틸)벤즈아마이드(CAS No. 1246525-60-9)를 포함하나, 동일 또는 유사한 작용 효과를 가지는 다른 물질을 제외하는 것은 아니다.

[0052] 본원에서 염증성 장질환이란 호전과 재발을 반복하면서 장내 만성적인 염증과 궤양을 일으키는 특히 만성 염증

성 장 질환으로, 궤양성 대장염, 크론병, 또는 베체트 장염을 포함한다.

[0053] 본원에서 사용된 용어 "치료" 이란 질환, 또는 질환으로 인한 증상 또는 상태의 억제, 제거, 경감, 완화, 개선, 및/또는 예방을 포함하는 개념이다.

[0054] 본원의 조성물은 RORα 이외에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 또는 유효성분의 용해성 및/또는 흡수성을 유지/증가시키는 화합물을 추가로 함유할 수 있다. 또한 본원의 약학 조성물은 신장암의 치료 또는 예방을 위하여 단독으로, 또는 수술, 약물치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0055] 본원의 조성물은 상기 언급한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로스 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 씨딩 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있으며, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다. 더 나아가 당해 기술분야의 적정한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제형화할 수 있다.

[0056] 본원의 조성물의 투여방법은 특별히 이에 제한되는 것은 아니며, 공지된 투여방법을 적용할 수 있으며, 목적하는 방법에 따라 비경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여의 경우 피부에 붙이는 패치형, 코/호흡기를 통해 투여할 수 있으며, 신속한 치료효과를 얻기 위해서는 정맥내 주사에 의한 투여가 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여 시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 매우 다양할 수 있다. RORα 유전자 또는 폴리펩타이드를 포함한 단백질 제제의 경우 비경구 투여가 선호될 수 있으나 다른 경로 및 수단을 배제하는 것은 아니다. 전형적인 약물의 경우 투약단위체는, 예를 들어 약 0.01 mg 내지 100 mg를 포함하나 상기 범위의 이하 및 이상의 범위를 배제하는 것은 아니다. 일일 투여량은 약 1μg 내지 10g 일 수 있으며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다.

[0058] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해서 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0060] **실시예**

[0061] **재료 및 방법**

[0062] **마우스**

[0063] 이전에 기재된 $ROR\alpha^{f/f}$ 마우스를 빌린 프로모터(Jackson Laboratory에서 유래)의 제어 하에 Cre 리콤비나제를 발현시켜 $ROR\alpha^{\Delta IEC}$ 마우스를 제작하였다. 실험에 사용된 모든 마우스는 8-10주령 이었다. 모든 동물 연구의 샘플 크기는 각 그림 범례에 표시되어 있다. 마우스를 온도(25℃) 및 빛(12시간 및 12시간 어둡게, 빛은 오전 7:00에 켜짐)의 통제된 조건에서 실험실 동물 관리의 평가 및 인증을 위한 특정 병원체가 없는 환경에서 사육하였다. 음식과 물은 자유롭게 이용할 수 있게 하였다. 이들 실험에 사용된 모든 마우스를 C57BL/6에 8세대 이상 역교배 시켰다. 각 실험 그룹에 대한 동물은 무작위로 선택 되었다. 유전자형 결정에 대한 PCR 분석에 사용되는 프라이머는 다음과 같다: Forward 5'-GCTTGTGGGTTTCTCCTACA-3', Reverse 5'-GCAGCAAGTGTTGTGTCCCA-3'.

[0064] 모든 동물 연구 및 절차는 국립 암센터 연구소의 기관 동물 관리 및 사용 위원회(IACUC)에 의해 승인 되었다.

[0065] **항체 및 시약**

[0066] 다음의 시판되는 항체가 사용되었다: anti-RORα (PA5-11224) 항체는 Thermo Fisher Scientific에서, anti-HDAC3 (ab7030)와 anti-H3K9Ac (ab4441) 항체는 Abcam; anti-p65 (#8242) 항체는 Cell Signaling technology; anti-lamin A/C (sc-6215)과 anti-CBP (sc-583) 항체는 Santa Cruz biotechnology; anti-b-actin (A1978) 항체는 Sigma; anti-tubulin (LF-PA0146A) 항체는 Abfrontier; anti-BRD4 (A301-985A) 항체는 Bethyl Laboratories에서 구매함.

[0067] **마우스 대장염 모델**

[0068] 덱스트란 설페이트 나트륨(Dextran Sulfate Sodium, DSS) (MP Biomedicals; 상대 분자 질량 36,000-50,000, 카탈로그 번호 #160110)을 5% 또는 2% (질량/부피)의 농도로 식수에 첨가한 다음 범례에 표기한 기간동안 제공함.

[0069] **RNA-seq 분석**

[0070] DSS 처리 0일 및 8일에 RORα$^{\Delta IEC}$ 와 RORα$^{f/f}$ IECs로부터 Qiagen RNeasy 키트를 사용하여 전체 RNA를 추출하고, mRNA-seq 라이브러리를 Illumina TruSeq RNA Library를 사용하여 제작하였다. Illumina HiSeq200을 사용하여 100bp 페어드 엔드 판독을 생성하였다. 어댑터 서열은 Trimmomatic v0.36을 사용하여 미가공 데이터로부터 트리밍 되었다. 트리밍된 판독은 GENCODE M16 주석과 함께 STAR v2.5.3a를 사용하여 mm10 게놈 어셈블리 및 전사체에 정렬시켰다. RSEM v1.3.0을 사용하여 해당 bam 파일에서 각 샘플의 예상 읽기 수와 TPM을 계산하였다. 판독 카운트는 DESeq2 v1.18.1 사용하여 처리되어 차별적으로 발현된 유전자를 식별하고, 유전자 온톨로지 분석은 DAVID v6.8을 사용하여 수행하였다. TPM 값을 로그 변환하고 계층적 군집화, k-평균 군집화 및 GSEA(버전 2.0)와 같은 하위 단계 분석에 사용했다. GSEA에 대한 표현형 라벨을 0일에 RORα$^{f/f}$: 8일에 RORα$^{f/f}$: 0일에 RORα$^{\Delta IEC}$: 8일에 RORα$^{\Delta IEC}$ = 1 : 2 : 1 : 3을 설정한 다음 , Pearson 상관 순위별로 유전자 당 계수를 계산하였다. 마지막으로 분자 특징 데이터베이스(MSigDB) v6.2의 C2 및 C5 유전자 세트를 농축 점수에 사용하였다.

[0071] **통계 분석**

[0072] 동물 실험의 경우 적절한 통계적 검정력을 보장하기 위해 실험의 표본 크기를 이전 연구들을 기반으로 실험적으로 결정했다. 각 실험 그룹에 대한 동물은 무작위로 선택되었다. 통계 분석에서 임의로 동물을 배제하지 않았으며, 연구자들은 블라인드 테스트로 연구 결과를 해석하였다. Student's unpaired *t*-test를 사용하여 서로 다른 그룹의 통계 분석을 시행하였다. 그래프의 막대는 평균±SEM을 나타낸다. GraphPad Prism 5는 모든 분석에서 사용되었다.

[0073] **대장 염증 및 조직 병리의 평가**

[0074] 질병 활성 지수(DAI)는 체중 손실 및 대변 일관성에 기초하여 계산되었다. 동물에게 7일 동안 2% DSS를 제공한 후, 추가로 7일 동안 식수로 회복시켰다. 점수는 체중 손실: 0 (손실 없음), 1 (1-5 %), 2 (5-10 %), 3 (10-20 %) 및 4 (> 20 %); 대변 일관성: 0 (정상), 1 (부드럽지만 여전히 형성됨), 2 (매우 부드러움, 대변에 혈액 흔적) 및 3 (설사 직장 출혈). 대장염의 조직학적 스코어링은 염증 및 선와 손상에 기초한 맹검 평가를 통해 병리학자에 의해 수행되었다. 마우스에게 5일 동안 2% DSS를 제공한 후, 추가 3일 동안 식수로 회복할 수 있었다. 조직 병리학적 평가는 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색된 파라핀 포매된 5㎛ 두께 결장 섹션에서 수행되었다. 염증 및 선와 손상의 등급은 다음 척도를 사용하여 점수를 부여 하였다. : 염증: 0 (없음), 1 (가벼움), 2 (보통), 3 (심하게); 선와 손상: 0 (없음), 1 (기본 1/3 손상), 2 (기본 2/3 손상), 3 (창자움 손실, 표면 상피 존재) 및 4 (창자움 및 표면 상피 소실). 염증 및 창자움 손상의 등급을 합산하여 총 조직 병리학적 등급을 측정하였다.

[0075] **IECs 분리**

[0076] 해부 후, 원위 결장을 개별적으로 절제하고, 차가운 인산염 완충 식염수(PBS)를 함유 한 페트리 접시에 넣었다. 혈관 및 관련 지방을 제거하고, 장을 세로로 열고 1 mM DTT로 PBS에서 얼음 위에서 활발하게 세척하여 점액을 제거하였다. 이어서, 결장을 작은 조각으로 절단하고 5 mM EDTA와 함께 신선한 PBS에 넣고, 150 rpm (37℃에서 15분)으로 진탕시켰다. 상층액을 새로운 튜브로 옮기고 원심 분리 (500g, 4℃에서 5분)하고 빙냉 PBS로 2회 세척하였다. 세포 펠릿은 후속 분석을 위해 즉시 처리되거나 급속 냉동되어 추후 사용을 위해 -70℃에서 보관되었다.

[0077] **조직학, 면역 조직 화학 염색, 면역 형광 염색**

[0078] CO2 노출에 의해 마우스가 희생 되었을때, 결장은 실온에서 밤새 10% 포르말린(Sigma)에 즉시 고정되었다. 고정 후, 조직을 50% 내지 100% 범위의 증가하는 농도의 에탄올에서 순차적으로 탈수시켰다. 장 부분은 해마톡실린 및 에오신(H&E) 또는 아래의 항체를 이용하여 조직 형광 염색을 수행하였다. Ki-67 (Abcam, ab15580), F4/80 (Serotech, #MCA497GA), Gr-1 (Serotech, #MCA2387GA), CD4 (BD Biosciences, #553047). H&E 용 ScanScope XT 시스템 (Aperio) 또는 면역 형광 용 Zeiss LSM700 공초점 현미경을 사용하여 이미지를 획득하였다. 조직 화학 염색은 RORα (PA5-11224) 항체로 수행하였다. 염색은 DAB(갈색 침전물)로 발색하였고, 헤마톡실린이 공동 염색

에 사용되었다. ScanScope XT 시스템을 사용하여 이미지를 획득하였다.

[0079] **마우스 대장 오가노이드 배양**

[0080] 원위 대장 선와의 격리는 이전에 보고된 연구에서 약간 수정하여 수행되었다. 간략히 설명하여, 원위 결장 조각을 상층액이 충분히 투명해질 때까지 차가운 PBS로 여러번 세척 하였다. 창자움을 5mM EDTA와 함께 PBS에 넣고, 150rpm (37℃에서 15분)으로 진탕시켰다. 상층액을 제거한 후, 선와를 차가운 PBS로 10초 동안 격렬하게 진탕시켜 단리하고 원심 분리(290g, 4℃에서 5분)에 의해 상층액을 수집 하였다. 현미경을 사용하여 상층액에서 농축된 선와가 관찰 될 때까지 이 단계를 반복하였다. 창자움 펠릿을 차가운 PBS로 재현탁시키고 70㎛ 세포 스트레이너를 통해 여과 하였다. 분리된 선와를 Matrigel (Corning, 356231)과 IntestiCult Organoid Growth Medium (STEMCELL Technologies, # 06005) 혼합물에 1:1의 비율로 300-창자움 현탁액을 매립하고, 마트리겔을 37℃에서 20분 동안 고형화시킨 후, 500㎕ 배지를 각 웰에 첨가하였다. 배지는 2일마다 교체되었다. 오가노이드 형성 효율은 0일에 매립된 선와의 수로부터 4일에 구형 구조 형성 선와의 수의 비로서 계산되었다. 재조합 마우스 TNFα 단백질(R & D system) 또는 SR3335 (APExBIO)로 오가노이드의 자극 후 안정적인 성장이 가능한 오가노이드를 수확하여 추가 실험에 사용하였다. 오가노이드는 14일 배양에서 TNFα 단백질 또는 SR3335로 동시에 처리되었다. 지시된 시간 후에, 생존력 시험 및 qRT-PCR 분석을 수행 하였다. 웰당 최소 100개의 선와를 계산하고 명 시야 현미경(EVOS)에서의 형태학적 외관에 의해 생존 또는 파괴된 것으로 정의하였다.

[0081] **세포 배양**

[0082] HEK293T, DLD-1 및 SW620을 5% CO2를 갖는 가습 인큐베이터에서 10% 소 태아 혈청(FBS) 및 ZellShield(Minerva biolabs)를 함유하는 DMEM 또는 RPMI1640 (Welgene)에서 37℃에서 배양 하였다. 연구에 사용 된 모든 세포주는 정기적으로 마이코플라즈마 오염에 대해 테스트 되었다. 세포를 12시간 동안 혈청 고갈시키고, 지정된 시간 동안 대장균 0127: B8 (L3129)로부터의 정제된 지질 다당류(LPS)를 처리 하였다. 정량적 RT-PCR 분석을 위한 실험 방법에 따라 세포를 용해시켰다. 녹다운 세포주를 제작하기 위해, pLKO.1-대조군 벡터 또는 pLKO.1-shRORα를 바이러스성 포장 플라스미드(psPAX2 및 pMD2.G)와 함께 HEK293T 세포로 형질 감염시켰다. 형질 감염 3일 후, 바이러스 상층액을 0.45μm 필터를 통해 여과하고 DLD-1 세포에 감염시켰다. 이어서 감염된 세포를 5 ㎍/ml 퓨로마이신으로 선택 하였다. shRNA의 표적화 서열은 다음과 같다:

[0083] shRORα Forward 5'-CCGTCCAGCAGATAACGTGGCAGACTCGAGTCTGCCACGTTATC TGCTGGATTTTTG-3', shRORα Reverse 5'-AATTCAAAAATCCAGCAGATAACGTGGCA GACTCGAGT CTGCCACGTTATCTGCTGGA-3'.

[0084] **루시퍼라제 리포터 분석**

[0085] American Type Culture Collection (ATCC) 유래의 HEK293T 세포를 폴리에틸레니민(PEI)으로 형질 감염시켰다. 연구에 사용된 세포주는 마이코플라즈마 오염에 대해 정기적으로 테스트되었다. 루시퍼라제 리포터 분석을 위해, 1 x 10^5개의 세포를 10% FBS 및 1% ZellShield (Minerva biolabs)가 보충된 DME에 접종하였다. 세포를 3xkB-RE-루시퍼 라제 리포터 플라스미드와 β-갈락토시다제 발현 플라스미드를 함께 형질 감염시키고 각각의 도면에 나타내었다. 루시퍼라제 분석 시스템(Promega)을 사용하여, 루시퍼라제 활성을 48시간의 형질 감염 후 마이크로플레이트 루미노미터 DE/LB 96V (Berthold Technologies)로 측정 하였다. 형질 감염 효율은 β-갈락토시다제 발현에 의해 정량화되었다. 결과는 3회 이상의 독립적인 실험으로부터 얻어졌다.

[0086] **ChIP 분석**

[0087] 세포를 1% 포름알데히드에서 10분 동안 고정시키고 빙냉 PBS로 2회 세척하였다. 세포를 1ml의 수확완충액(0.1M Tris-HCl [pH 9.4]에 수집하고 10mM DTT를 새로 첨가)에 수집하고 30℃에서 15분 동안 배양하고 6000 rpm에서 3분 동안 원심분리 하였다. 세포팔레트를 1ml의 빙냉 PBS, 완충액 I(0.25% Triton X-100, 10 mM EDTA, 10 mM HEPES [pH 6.5] 및 0.5 mM EGTA) 및 완충제 II(200 mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM HEPES [pH 6.5] 및 0.5mM EGTA)로 6000rpm에서 3분간 원심 분리 하였다. 크로마틴 단편화는 ChIP 용해 완충제(50 mM Tris-HCl [pH 8.1], 1% SDS, 10mM EDTA [pH 7.6] 및 프로테아제 억제제 칵테일)에서 초음파 처리하여 수행하였다. 이어서 평균 250bp의 DNA 단편을 함유하는 크로마틴 추출물을 희석 완충액(1% Triton X-100, 2mM EDTA, 150mM NaCl, 20mM Tris-HCl [pH 8.1]) 및 프로테아제 억제제 칵테일)으로 1/10 희석 후 4℃에서 밤새 면역 침전시켰다. 40℃의 단백질 A/G-세파로스를 4℃에서 2시간 동안 인큐베이션함으로써 비특이적 면역 복합체를 포획하였다. 비드를 TSE I 완충액(0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl [pH 8.1] 및 150mM NaCl), TSE II 완충액(0.1 % SDS, 1 % Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl [pH 8.1] 및 500mM NaCl), 버퍼 III(0.25 M LiCl, 1% NP-40, 1% 데옥시콜레이트, 10mM Tris-HCl [pH 8.1] 및 1 mM EDTA), TE 완충액(10mM Tris-HCl [pH 8.0] 및 1mM EDTA) 순

서로 각 3회 세척을 수행하고, 용리 완충액(1% SDS 및 0.1 M NaHCO3)에서 용리시켰다. 용리 완충제에서 65℃에서 밤새 가교를 역전시키고, QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)로 DNA를 정제 하였다. 침전된 DNA를 정량적 RT-PCR로 분석 하였다. 정량적 실시간 PCR 분석을 위해, 50ml DNA 추출로부터 2ml를 사용 하였다. 사용된 마우스 프라이머는 다음과 같다:

[0088] *Tnfa* Forward 5'-CACCCCATTACATCTCTTCCCC-3',

[0089] *Tnfa* Reverse 5'-TGTTTCCCTCTCACTTCACTCTGTC-3',

[0090] *Il-1b* Forward 5'-AGCTACAGACATCCCCAGTCTC-3',

[0091] *Il-1b* Reverse 5'-TGTGTGTCGTCTGTCATGCG-3',

[0092] *Il-18* Forward 5'-TGTGGTTCCATGCTTTCTGGA-3',

[0093] *Il-18* Reverse 5'-TCTGTGATCACCGTCACGC-3',

[0094] *Fzd4* Forward 5'-AACGGCGTTCATTTGCT TAG-3',

[0095] *Fzd4* Reverse 5'-GGGCACAAGGAATTTGAAGA-3'.

[0096] ROR 결합 요소에 대한 *Il-1b*의 프로모터 ChIP 프라이머는 다음과 같다:

[0097] Forward 5'-GGATGGTGCTTCTGTGCTCT-3',

[0098] Reverse 5'-GCTTGCTTCCAGAGTTCCCT-3'.

[0099] **전세포 용해물 제조 및 세포 분획 분별**

[0100] 수집하기 전에 모든 세포를 빙냉 PBS로 간단히 헹구었다. 세포질 및 핵 분획의 경우, 세포를 수확 완충액(10mM HEPES [pH 7.9], 50mM NaCl, 0.5M 슈크로스, 0.1mM EDTA, 0.5% Triton X-100 및 DTT, PMSF 및 프로테아제 억제제)에 용해시키고, 얼음 상에서 5분 동안 인큐베이션하고 4℃에서 10분 동안 1,000rpm으로 회전시켰다. 상층액(세포질 분획)을 별도의 튜브로 제거하였다. 핵 펠렛을 500㎕의 완충제 A(10mM HEPES [pH 7.9], 10mM KCl, 0.1mM EDTA 및 0.1mM EGTA)로 2회 세정하고, 4℃에서 10분 동안 1,000rpm으로 회전시켰다. 상층액을 버리고 펠릿(핵 분획)을 RIPA 완충액에 재현탁시키고 전세포 용 해물에 대해 초음파 처리하였다. 모든 용해물을 브래드포드 방법으로 정량하고 SDS-PAGE로 분석하였다.

[0101] **공동 면역 침전 분석**

[0102] IECs로부터의 핵 분획을 용해 완충액(200mM NaCl, 50mM Tris-HCl [pH 8.0] 및 0.5% NP40)으로 용해시켰다. 약 20mg의 세포 추출물을 각각의 5㎍의 RORα 항체로 밤새 면역 침전시킨 다음, 45㎕ (50% 슬러리)의 단백질 A/G 아가로스 비드와 함께 2시간 동안 인큐베이션 하였다. 면역 침전된 물질을 1000㎕의 세척 완충액 (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl [pH 8.0] 및 0.5% NP40)으로 4회 세척하고 100㎕의 샘플링 완충액(2% β-머캅토에탄올, 5% 글리세롤, 1% SDS 및 60mM Tris-HCl [pH 6.8])에서 비등시켜 결합된 물질을 용출하고 면역 블롯 분석을 수행 하였다. 단백질 샘플은 SDS-PAGE에 의해 분석되었다. 면역 블롯의 이미지를 LAS 4000-미니 시스템(Fujifilm)을 사용하여 시각화하고 기록 하였다.

[0103] **정량적 RT-PCR**

[0104] 총 RNA를 Trizol (Invitrogen)을 사용하여 추출하고 M-MLV cDNA Synthesis kit (Enzynomics)를 사용하여 2㎍ 총 RNA로부터 역전사를 수행하였다. mRNA의 수준 측정은 SYBR TOPreal qPCR 2x PreMix (효소)를 갖는 ABI prism 7500 system (Applied Biosystems) 또는 CFX384 (BioRad)에 의해 검출되었다. mRNA의 양을 ddCt 방법을 사용하여 계산하고 L32 및 β-actin을 대조군으로 사용하였다. 모든 반응을 3회 수행 하였다. 아래의 마우스 프라이머를 사용 하였다:

[0105] *L32* Forward 5' - GAAACTGGCGGAAACCCA-3',

[0106] *L32* Reverse 5'-GGATCTGGCCCTTGAACCTT-3'

[0107] *β-actin* Forward 5'-TAGCCATCCAGGCTGTGCTG-3',

[0108] *β-actin* Reverse 5'-CAGGATCTTCATGAGGTAGTC-3',

[0109] *Il-1b* Forward 5'-CGGCACACCCACCCTG-3',

[0110] *Il-1b* Reverse 5'- AAACCGCTTTTCCATCTTCTTCT-3',

[0111] *Tnfa* Forward 5'-CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA-3',

[0112] *Tnfa* Reverse 5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3',

[0113] *Il-18* Forward 5'-CAGGCCTGACATCTTCTGCAA-3',

[0114] *Il-18* Reverse 5'-TCTGACATGGCAGCCATTGT -3',

[0115] *Fzd4* Forward 5'-CTTTGTTCGGTTTATGTGCCAAT-3',

[0116] *Fzd4* Reverse 5'-CATGTGGTTGTGGTCGTTCTG-3',

[0117] *Olfm4* Forward 5'-ACACAGCTCACATCCTTTCTC-3',

[0118] *Olfm4* Reverse 5'-GATGCTGTCCTTCTCCATGAC-3',

[0119] *Ephb2* Forward 5'-GCGGCTACGACGAGAACAT-3',

[0120] *Ephb2* Reverse 5'-GGCTAAGTCAAAATCAGCCTCA-3',

[0121] *Muc2* Forward 5'-ACAAAAACCCCAGCAACAAG-3',

[0122] *Muc2* Reverse 5'-GAAGTCGGGACAGGTGATGT-3',

[0123] *Anpep* Forward 5'-CTCCTACCGGGTGATCCTGAG-3',

[0124] *Anpep* Reverse 5'-GTTGCAGGTAAAGCGAACAGT-3',

[0125] *Lyz1* Forward 5'-AGACCGAAGCACCGACTATG-3',

[0126] *Lyz1* Reverse 5'-CACTGCAATTGATCCCACAG-3',

[0127] *Chga* Forward 5'-ACAACAGGATGGCTTTGAGG-3',

[0128] *Chga* Reverse 5'-GGTTGGTGATTGGGTATTGG-3',

[0129] *Sca-1* Forward 5'-GATGGACACTTCTCACACTACA-3',

[0130] *Sca-1* Reverse 5'-GCAGGTAATTGATGGGCAAGA-3'.

[0131] 사용된 사람 유전자 프라이머는 아래와 같다:

[0132] *HPRT* Forward 5'-TGACACTGGCAAAACAATGCA-3',

[0133] *HPRT* Reverse 5'-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3',

[0134] *RORA* Forward 5'-CGGTGCGCAGACAGAGCTAT-3',

[0135] *RORA* Reverse 5'-CCACAGATCTTGCATGGAATAATT-3',

[0136] *IL1B* Forward 5'-GAATCTCCGACCACCACTACAG-3',

[0137] *IL1B* Reverse 5'-GGTGGAGAGCTTTCAGTTCATATG-3',

[0138] *TNFA* Forward 5'-CCTCTCTCTAATCAGCCCTCTG-3',

[0139] *TNFA* Reverse 5'-GAGGACCTGGGAGTAGATGA G-3',

[0140] *IL6* Forward 5'-ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG-3',

[0141] *IL6* Reverse 5'-CCATCTTTGGAAGGTTCAGGTTG-3',

[0142] *IKBA* Forward 5'-CTCATCGCAGGGAGTTTCT-3',

[0143] *IKBA* Reverse 5'-ACTGCTGTGGGCTCTGCA-3',

[0144] *IL1A* Forward 5'-AGGAGAGCATGGTGGTAGTAGC-3',

[0145] *IL1A* Reverse 5’-TAGTGCCGTGAGTTTCCCAGAAG-3’,

[0146] *IL18* Forward 5’-CAGGCCTGACATCTTCTGCAA-3’,

[0147] *IL18* Reverse 5’-TCTGACATGGCAGCCATTGT-3’.

[0148] **16S rDNA 분석**

[0149] 박테리아 게놈 DNA는 제조사의 지시에 따라 QIAamp DNA 미니 키트(Qiagen)를 사용하여 단리되었다. 범용 16S 프라이머를 조직 당 박테리아의 표준화에 사용하였고, 마우스 게놈 DNA의 수준을 결정하기 위해 Rpl32 리보솜 단백질(L32) 프라이머를 사용 하였다. 아래의 프라이머를 사용 하였다:

[0150] 16S rDNA Forward 5’-GTGGTGCATGGTTGTCGTCA-3’,

[0151] 16S rDNA Reverse 5’-ACGTCGTCCCCAC CTTCCTC-3’.

[0153] **실시예 1. RORα에 의한 장 항상성 유지를 위한 과도한 장 염증을 약화 효과 분석**

[0154] IECs 항상성 및 장 염증에서 RORα의 기능을 탐색하기 위하여, $ROR\alpha^{\Delta IEC}$ 마우스를 제작하고 RORα 유전자의 발현을 비교했다. RORα의 mRNA 및 단백질 수준은 $ROR\alpha^{f/f}$ 대조군 마우스와 비교하면, $ROR\alpha^{\Delta IEC}$ 마우스에서 현저하게 감소되어 있다 (도 1*A*, *B* 와 도 7*A*). 정상적인 사육을 하였을 경우, $ROR\alpha^{\Delta IEC}$ 마우스는 체중을 포함한 유의미한 표현형의 차이를 보이지는 않았다 (도 1*C*).

[0155] 대장염 병변 발생에서 상피RORα의 생리적 역할을 평가하기 위해 $ROR\alpha^{\Delta IEC}$ 마우스는 궤양성 대장염의 병리와 유사한 마우스 실험 모델인 DSS-유도 장 염증 실험 에 적용되었다. 마우스들은 식수 중 2% DSS로 7일간(손상 단계) 투여한 후, 추가의 7일 동안 DSS가 없는 식수(회복 단계)를 투여하여 장 상피의 재생을 허용하였다 (도 1*D*). DSS를 투여한 후, $ROR\alpha^{\Delta IEC}$ 10일 째부터 체중이 꾸준히 감소하였고, 초기 체중의 20% 이상이 감소 되었다. 반면에 대조군 $ROR\alpha^{f/f}$ 마우스의 체중은 미세한 체중 감소를 보이고, 정상적인 식수를 공급할 때 체중이 빠르게 회복되었다 (도 1*D*). 정상상태에서 유전자형 사이 대장의 길이가 차이가 나지 않았지만, DSS에 의해 손상된 $ROR\alpha^{\Delta IEC}$ 마우스의 대장은 현저한 길이의 감소가 나타났다 (도 1*E*). 상피 장벽 무결성을 평가하기 위해 장간 림프절에서 박테리아 16S rDNA 유전자 검출을 위한 실시간 PCR을 시행하였고, 이를 통해 장 투과성을 조사했다. 그 결과, 박테리아의16S rDNA의 유의미한 증가가 DSS에 의해 손상된 $ROR\alpha^{\Delta IEC}$ 마우스의 림프절에서 관찰되었으며 (도 1*F*), 이는 $ROR\alpha^{\Delta IEC}$ 마우스 장 상피 조직의 심각한 붕괴를 나타낸다.

[0156] 다음으로 헤마톡실린 & 에오신(H&E) 염색으로 대장 조직의 조직학적 특징을 조사했다. DSS 손상 단계의 첫 5일 동안 조직학적 특징이 관찰되지 않았지만, 회복단계에서 $ROR\alpha^{\Delta IEC}$ 마우스는 대조군 $ROR\alpha^{f/f}$ 마우스와 비교하여 심각한 대장 궤양 및 상피 조직 파괴가 관찰되었다 (도 1*G*). 이는 장 염증 발병 상황에서 RORα가 장 항상성 유지에 중추적인 역할을 한다는 것을 시사한다. 상기 언급된 실험 결과와 일치하게, 조직학적 손상 점수, 질병 활성 지수 및 생존률 평가 결과들 또한 $ROR\alpha^{\Delta IEC}$ 마우스가 DSS에 의해 유도된 장 염증에 더욱 민감하다는 것을 보여준다 (도 7*B*, *C* 와 *D*). 파괴된 상피 조직의 내재적 재생 능력을 평가하기 위해서 세포 분열 표지인 $Ki67^{+}$염색을 시행하였다. $ROR\alpha^{f/f}$ 와 $ROR\alpha^{\Delta IEC}$ 마우스는 정상 상태에서 동일한 강도의 형광을 보였으나, DSS에 의해 손상된 조직에서는 $ROR\alpha^{\Delta IEC}$ 마우스가 현저하게 적은Ki67 양성 신호를 나타내었다. 이는 $ROR\alpha^{f/f}$ 와 비교하여 $ROR\alpha^{\Delta IEC}$ 마우스 장 상피 재생 능력이 DSS 손상 후에 특이적으로 현저하게 떨어짐을 나타낸다 (도 1*H*).

[0157] 장 염증의 중증도를 확인하기 위해 대식세포(F4/80), 호중구(Gr-1), 및 T 림프구(CD4) 침윤을 확인하기 위한 조직 염색을 시행하였다. 정상 상태에서는 관찰된 차이가 전혀 없는 것에 비해, DSS회복 단계에서 $ROR\alpha^{\Delta IEC}$ 마우스는 대장 조직 내에서 증가된 면역 세포 침윤을 보였다 (도 1*I*). 이는 $ROR\alpha^{\Delta IEC}$ 마우스가 회복 단계 동안 염증 병변이 지속되고 있음을 보여준다. 이 결과와 일치하여, 대장 조직 내 *Il-1b* 와 *Tnfa*를 포함한 염증성 사이토카인 유전자의 mRNA 수준이 $ROR\alpha^{\Delta IEC}$ 마우스에서 급격하게 증가되어 있음이 관찰되었다 (도 1*J*). 이러한 데이터는 RORα가 DSS에 의해 유도된 대장 염증 과정 동안 장 상피를 회복시키기 위해 염증을 약화시키는 기능을 한다는

것을 보여준다.

[0158] 다음으로 RORα의 조직 재생 능력을 정밀하고 확인하기 위하여 생체 외 조건에서 RORα$^{f/f}$ 및 RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스로부터 원위 대장 선와를 분리한 후, 오가노이드 배양 실험을 수행하였다. 마우스 개체 수준에서 RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스는 IECs 재생 능력에 심각한 결함이 있었음에도 불구하고, RORα-결핍 오가노이드는 미세한 외관, 증식 능력 및 오가노이드 형성 효율에서 유의미한 차이를 보이지 않았다 (도 1*K*, *L* 와 도 8*A*).

[0159] RORα에 의한 마우스 장내 줄기세포 활성 변화를 확인하기 위해 대표 유전자 발현 수준을 확인해보았다. RORα$^{f/f}$ 및 RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스 IECs에서 DSS 처리 0일째, 8일째 시점에서 마커 유전자 발현을 비교하였다. 장 줄기 세포 마커 유전자 *Lgr5, Tert* 및 *Lrig1*의 발현은 유의미한 차이를 보이지 않았다 (도 1*M*). IECs에서의 실험 결과와 같이 RORα$^{f/f}$ 및 RORα$^{\Delta IEC}$ 오가노이드 사이에서도 장 줄기 세포 유전자 발현 패턴이 매우 유사하게 나타났다 (도 8*B* 와 *C*). 이는 RORα의 결핍이 장 줄기 세포의 기능에 거의 영향을 미치지 않는 것을 나타낸다.

[0161] **실시예 2. 장 상피 세포에서 RORα 결핍에 영향을 받는 유전자의 전사체 분석**

[0162] 장상피세포(IEC) 전사 조절 단계에서 RORα의 역할을 밝히기 위해 정상 상태와 회복 단계의 IECs를 RORα$^{f/f}$ 및 RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스로부터 분리하였다 (도 2 *A*). 마우스 표현형과 일치하게 차별적으로 발현된 유전자(DEGs)를 분석한 결과 ((|log2FC| ≥ 1, adjusted p-value ≤ 0.05), RORα$^{f/f}$ 와 RORα$^{\Delta IEC}$ IECs의 전사체는 회복 단계에서 보다 큰 차이를 보였다 (도 7*A-C*). 이는 RORα의 기능이 교란된 조건에서 더욱 중요하다는 것을 시사한다 (도 9*A* 와 *B*). 전사체의 유사성을 확인하기 위하여 비지도 계층적 군집화 분석 방법을 시행하였다. 흥미롭게도, DSS 처리된 RORα$^{\Delta IEC}$ IECs의 유전자 발현 프로파일은 다른 어떤 프로파일과 밀접하게 군집화 되지 않았으며, 다소 뚜렷한 전사체 특징을 가지고 있다는 것이 나타났다 (도 2*B*). 이 결과는 전사 네트워크에 대한 RORα의 결핍의 효과가 DSS에 의한 대장염에서 특별히 극대화 된다는 것을 나타낸다.

[0163] 유전자형 및 실험 조건에 따른 4가지 전사체 프로파일들 (RORα$^{f/f}$ /day 0, RORα$^{f/f}$ /day 8, RORα$^{\Delta IEC}$ /day 0, RORα$^{\Delta IEC}$ /day 8)의 면밀한 비교 분석을 위하여 비지도 *k*-평균 군집화 분석을 시행하였다. 군집 1과 3은 DSS 처리를 통해RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스에서 특이적으로 상향된 유전자 군집을 나타낸다 (도 2*C*). 군집 1의 상대적 유전자 발현 수준은 박스 플롯에서 나타나는 것들과 같이 RORα$^{f/f}$ 마우스에서는 미미한 증가를 보였지만, RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스에서는 현저하게 증폭된 상향 조절이었다 (도 2*D*). 이는 체중 및 대장 길이의 변화와 같은 마우스 표현형 관찰 결과와 일치한다. 대조적으로 군집 3의 상대적 유전자 발현 수준은 DSS 처리 후, RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스에서만 단독 상향 조절을 보인다 (도 2*D*). 흥미롭게도 기능적 유전자 온톨로지 (GO) 분석 결과 군집 1에서 면역 및 염증 반응이 가장 풍부한 용어인 반면, 군집 3은 세포주기 관련 용어가 가장 풍부한 용어로 나타났다. 이는 RORα가 DSS 처리 시 염증 관련 유전자들의 중요 전사 억제인자임을 시사한다 (도 2*E*).

[0165] **실시예 3. RORα는 DSS에 의한 대장염에서 염증성 유전자의 전사 억제 인자로서 기능함을 규명**

[0166] 전사 억제 인자로서 RORα의 기능을 검증하고 그의 직접적 또는 간접적 표적 유전자를 확인하기 위해, 우리는 군집 1에 기초한 표현형 라벨을 통하여 Pearson 상관관계에 의한 유전자 세트 농축 분석(GSEA)을 시행하였다 (도 3*A*). GSEA 분석 결과 면역 반응 및 사이토카인 생성에 관여하는 유전자 세트가 DSS를 처리한 RORα$^{\Delta IEC}$ 전사체에서 가장 풍부하다는 것이 명백히 나타났다 (도 10). 또한 농축에 기여하는 유전자들은 DSS 처리 하에서 RORα에 의해 조절되는 직접적 및 간접적 표적일 가능성이 있다 (도 3*B*). RORα$^{\Delta IEC}$ IECs에서 *Il-1b* 및 *Tnfa*의 높은 발현에도 불구하고, *Il-1b* 및 *Tnfa* 는 DSS-유도 대장염에서 RORα에 의해 억제된 대표적인 표적 유전자인 것으로 밝혀졌다 (도 3*C*). 전사체 분석 결과와 일관되게, 전사 인자 농축 분석을 시행한 결과 p50/NF-κB1이 군집 1 유전자들의 주요 잠재 전사 인자인 것으로 나타났으며, 이는 RORα가 NF-κB 전사 활성을 조절하는데 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다 (도 3*D*). 종합하면, 유전자 발현 프로파일 내 표현형 시그너처의 분석은 RORα가 DSS에 의한 대장염에서 염증성 유전자들의 전사를 억제한다는 것을 입증한다.

[0168] **실시예 4. RORα의 하위 단계 신호 전달에 관여하는 인자 규명**

[0169] 본 실시예에서는 NF-κB 표적 프로모터에서 RORα의 모집은 염증성 유전자의 전사 약화에 중요하다는 것을 규명

하였다.

[0170] RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스에서 과도한 NF-κB 신호 활성이 일어난 기작을 알아보기 위해, RORα$^{f/f}$ 및 RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스로부터 IECs를 분석하고 면역 블롯 분석을 수행하였다. p65 및 IκB 단백질의 수준을 정상 상태와 DSS 처리 후 마우스 샘플에서 비교 분석하였다. 그 결과 DSS처리 후 NF-κB의 주요 서브 유닛인 p65 단백질은 핵에서 존재하며, 세포질에 존재하는 IκB protein 수준은 현저하게 감소하였다. 이러한 결과는 RORα$^{f/f}$ 및 RORα$^{\Delta IEC}$ IECs에서 동일한 수준으로 나타났다 (도 11). 또한 RORα$^{f/f}$ IECs에서 RORα 단백질 수준은 DSS 처리에 의해 변화되지 않았다 (도 11). 흥미롭게도 RORα는 IECs에서 p65 단백질과 DSS 처리된 상황에서 특이적으로 상호작용했다 (도 4*A*). DSS 처리 8일 째가 유도된 대장염의 회복 단계라는 점을 감안할 때, 이러한 실험 결과는 p65와 RORα의 상호 작용이 조직 재생을 위해 중요할 수 있다는 것을 시사한다.

[0171] RORα에 의한 NF-κB 신호 조절의 기본 분자 기작을 밝혀내기 위해 프로모터에서 3x NF-κB 응답 요소(response element, RE)를 함유하는 루시퍼라제 플라스미드를 사용하여 리포터 분석을 수행하였다. RORα의 과발현은 루시퍼라제 활성을 실질적으로 억제하는 반면 (도 4*B*), RORα의 녹다운은 루시퍼라제 활성을 추가로 향상 시켰다 (도 4*C*). 흥미롭게도, TNFα의 처리는 야생형 오가노이드와 비교하여 RORα 결핍 오가노이드에서 염증성 사이토카인 관련 유전자들의 발현이 현저하게 증가되었다 (도 12*A*). 일관되게 RORα 결핍 오가노이드가 TNFα에 의한 오가노이드 붕괴에 더욱 민감하다는 것을 관찰했다 (도 12*B*). 또한 대장암 세포 DLD-1에서도 NF-κB 표적 유전자인 TNFα 및 IL-6의 발현 증가가 RORα 결핍 세포주에서 더욱 두드러지게 관찰되었다 (도 13*A*). RORα의 합성 역작용제가 NF-κB의 전사 활성을 억제할 수 있는지를 조사하기 위해서 우리는 TNF*α*를 처리한 오가노이드에 SR3335를 첨가하였다. *Il-1b, Il-1a, Tnfa, Ikba, 와 Il-6*와 같은 다수의 NF-κB 표적 유전자 발현은 TNF*α* 또는 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)에 의해 마우스 오가노이드와 DLD-1 및 SW620과 같은 인간 대장암 세포주들에서 증가되었으나, SR3335는 활성화된 염증 유전자들의 발현을 현저히 억제하였다 (도 4*D* 와 도 13*B* 와 *C*). RORα가 NF-κB 전사 활성 억제에 결정적인지 여부를 확인하기 위해 전사체 분석 결과의 군집 1과 5에서 표적 유전자들의 발현을 조사하였다. 군집 1에 속하는 *Il-1b* 및 *Tnfa* 표적들은(RORα 의존적 유전자군) DSS 처리한 RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스에서 크게 증가하였고, 군집 5에 포함된 NF-κB 표적 유전자인 *Il-18* 및 *Fzd4* (RORα 독립적 유전자군)는 RORα$^{f/f}$ 와 RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스 모두에서 증가하지 않았다 (도 4*E*). 따라서 우리는 군집 1에 속하는 NF-κB 표적 유전자에 대한 RORα에 의한 전사 활성 억제가 장 상피 조직의 복원에 필수적이라고 제안한다.

[0172] RORα에 조직 재생을 촉진하기 위해 NF-κB 신호의 감쇠에 중요한지 여부를 평가하기 위해 IECs 조직의 염색질 면역 침전(chromatin immunoprecipitation, ChIP) 분석을 p65, RORα, 및 아세틸화된 히스톤3 라이신9번 잔기(H3K9Ac)에 대한 항체들로 진행하였다. ChIP 분석 결과 *Il-1b* 와 *Tnfa*와 같은 NF-κB 표적 유전자 프로모터에 p65의 모집은 변경되지 않았다는 것이 밝혀졌다 (도 4*F*). 반면, DSS 8일째 NF-κB 표적 유전자 프로모터에 RORα의 모집은 DSS 처리 RORα$^{f/f}$ 마우스에서 현저하게 증가하였으나 RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스에서는 전혀 관찰되지 않았다 (도 4*F*). 이는 RORα에 의한 NF-κB 표적 유전자의 전사 억제가 조직 재생에 중요할 수 있다는 점을 시사한다. RORα 결핍은 DSS 8일째 *Il-1b* 및 *Tnfa* (RORα 의존성 프로모터) 유전자 프로모터에서 H3K9의 아세틸화 수준의 현저한 증가를 야기했다 (도 4*F*). 대조적으로 p65 및 H3K9 아세틸화 수준이 군집 5에 속한 *Il-18* 및 *Fzd4* 유전자 (RORα 독립적 프로모터) 프로모터에서는 변하지 않았다 (도 4*G*). 이러한 데이터들은 RORα을 매개한 NF-κB 표적 유전자 발현 억제가 장 상피 복원에 중요하다는 것을 보여준다.

[0174] **실시예 5. RORα/HDAC3는 장 염증 약화(attenuation)를 위해 NF-κB 표적 프로모터에서 BRD4/CBP의 모집을 억제함을 규명**

[0175] 기존 본 발명자는 RORα가 간 지질 항상성을 제어하기 위해 HDAC3와 상호작용하여 PPARγ의 전사 활성을 억제한다는 것을 보고 하였다. 흥미롭게도, RORα와 HDAC3는 DSS 처리된 IECs에서 p65와의 전사 억제자 복합체를 구성하였고, 이 복합체의 형성은 RORα의 존재에 크게 의존적이었다 (도 5*A*). HDAC3가 RORα에 의한 NF-κB 활성 억제에 필수적인지 확인하기 위하여 우리는 3xNF-κB RE-루시퍼라제 활성을 측정하였다. HDAC3의 녹다운은 루시퍼라제 활성을 실질적으로 증가시켰다 (도 5*B*). 일관되게 RORα의 녹다운은 HDAC3에 의한 루시퍼라제 활성 억제 현상을 크게 역전시켰다 (도 5*C*). 이들 데이터는 HDAC3이 RORα의 존재 하에서 NF-κB 전사 활성 억제 기능을 발휘했음을 나타낸다.

[0176] RORα에 의한 NF-κB 신호 억제가 HDAC3에 의존적인지 확인하기 위하여, 우리는 이번 연구에서 분석한 4개의

DEG 세트를 HDAC3 장 특이적 결핍(HDAC3$^{\Delta IEC}$) 마우스 실험 결과와 비교하였다. 우리는 RORα와 HDAC3가 염증 조건 하에서 몇 가지 표적 유전자를 공유한다는 추가 증거를 발견했다 (도 14). HDAC3$^{\Delta IEC}$ 마우스와 RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스의 유전자 발현 프로파일을 측정하는 플랫폼이 다르기 때문에 (마이크로어레이 vs NGS) 동일한 p-값 컷오프를 적용하여 DEG를 식별하는 것은 불공평하다. 따라서 HDAC3$^{\Delta IEC}$ 마우스 연구의 DEG를 정의하고 고정한 다음 (n=1,418), 통계적으로 가장 중요한 유전자로부터 DEG를 누적하여 HDAC3$^{\Delta IEC}$ 마우스의 DEG와 비교하였다. 중복에 대한 초지형 테스트의 p-값이 과장되는 경향이 있지만, DSS 처리와 함께 RORα 결핍은 HDAC3$^{\Delta IEC}$ 마우스에서의 DEG와 중복을 증가시키며, 이는 RORα가 DSS 처리한 상황 하에서 HDAC3와 공유 표적유전자를 조절함을 나타낸다. 흥미롭게도 DSS 처리시 RORα$^{\Delta IEC}$ 및 HDAC3$^{\Delta IEC}$ 마우스의 새로 출현한 공통 DEG는 면역반응과 관련된 GO 항목의 유의미한 농축을 보여주었다. 이 분석 결과는 RORα와 HDAC3가 DSS에 의해 유도된 대장염에서 염증성 유전자와 같은 동일한 표적유전자를 협력적으로 조절한다는 것을 분명히 뒷받침한다 (도 15*A* 와 *B*).

[0177] 다음으로 RORα이 NF-κB 표적 유전자의 발현 증가에 필요한 활성화 복합체의 형성을 방해하는지 여부를 조사하였다. BRD4는 아세틸화된 라이신 잔기를 인식하는 BET 패밀리의 구성원이다. BRD4/CBP와 p65의 상호작용이 NF-κB 표적 유전자 발현을 유도하기 위해 요구된다는 것은 보고 되었다. 놀랍게도 DSS 처리 후 RORα$^{f/f}$ 마우스와 비교하여 RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스로부터 분리된 IECs에서 BRD4/CBP와 p65의 복합체 형성이 크게 향상되었으며 (도 5*D*), 이는 DSS 처리한 RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스의 IECs에서 특이적으로 NF-κB 활성이 향상되었다는 것을 의미한다. RORα가 IECs에서 BRD4 또는 CBP 상호작용하지 않다는 것을 고려하면 (도 5*E*), RORα는 BRD4/CBP와 경쟁적으로 p65와 상호작용함으로써 NF-κB 표적 유전자 발현을 저해할 수 있다. 3xNF-κB RE-루시퍼라제 리포터 실험에서 BRD4는 p65-루시퍼라제 활성을 향상시킨다 (도 5*F*). 반면에 RORα 도입은 p65/BRD4에 의한 리포터 활성을 억제하고, RORα의 녹다운은 p65/BRD4에 의한 리포터 활성을 향상시켰다 (도 5*F*). 이 결과는 RORα가 p65/BRD4/CBP 활성화 복합체 형성의 조립을 방해하며, 이를 통해 NF-κB 전사 활성을 억제함을 나타낸다. 종합적으로 RORα는 BRD4/CBP와 경쟁하여 p65와 상호작용하며 NF-κB 전사 활성 약화를 위해서는 HDAC3를 필요로 한다는 것을 보여준다.

[0178] RORα/HDAC3의 표적 유전자 프로모터로의 모집이 BRD4/CBP의 모집 저해에 중요한지 여부를 평가하기 위해 우리는 ChIP 분석을 수행하였다. 실질적으로 p65의 모집은 표적 프로모터에서 변경되지 않았으며 RORα/HDAC3의 점유율이 DSS 처리한 RORα$^{f/f}$ 마우스의 회복 단계에서 증가하였다 (도 5*G*). 대조적으로 BRD4/CBP 활성화제의 표적 프로모터 상의 점유율은 RORα 결핍 마우스에서 현저하게 증가하였다 (도 5*G*). DSS를 처리한 뒤, RORα$^{f/f}$ 마우스는 장에서 조직 재생을 허용하기 위해 염증성 신호 전달을 약화시켰지만 RORα/HDAC3의 모집의 실패는 표적 프로모터 상에서 BRD4/CBP 점유율 증가를 추가적으로 허용하며, 그 결과 RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스의 회복 단계에서의 과도한 염증을 야기한다.

[0180] 본원에서는 RORα를 장 염증의 음성(negative) 조절 인자로 규명했다. 장 특이적 RORα결핍 마우스는 비정상적으로 활성화된 염증 반응 및 악화된 대장염을 발생시켰다. RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스에서 손상된 대장의 조직 재생은 현저하게 조절되지 않았다. RORα는 염증 신호 전달 경로에서 p65 전사 활성을 특이적으로 억제하는 체크 포인트 역할을 하며, 이는 손상된 조직에서 IECs의 재생에 필수적이다 (도 6). 우리의 연구는 장 상피의 재생을 제어하는데 중요한 염증 반응의 전사 수준에서 자세한 기작을 제공한다. 조직 재생의 성공 또는 실패는 줄기 세포의 활성화의 조절과 복잡한 염증 반응의 균형에 달려 있다. 상피 세포 내 RORα는 NF-κB 활성화의 약화를 통해 성공적인 조직 재생에 기여하는 것으로 보인다. 우리의 결과는 DSS에 의한 장 염증의 제어에 RORα의 독특한 면역 조절 역할을 제안한다.

[0181] 유전적 감수성은 인간에서 염증창자질환 발병의 잘 알려진 요인 중 하나이다. 지난 수십 년간 놀라운 성과는 염증창자질환에 대한 유전적 영향에 대한 이해를 넓혔다. 게놈 수준의 연관 분석 연구(GWAS)는 인간에서 염증창자질환의 발병에 대한 주요 감수성 유전자로서 *Nod2*, *Il23r* 및 *Atg16l1*과 같은 유전자에서 신규 단일 뉴클레오티드 다형성(SNP)를 확인하였다. GWAS 연구에 따르면 RORα는 천식을 포함한 자가 면역 질환의 발병에 대한 잠재적 후보 유전 인자이다. 따라서 *RORa* 유전자 변이가 인간에서 염증창자질환 병인에 대한 유전적 감수성을 부여할 수 있다. 또한 크론병 및 궤양성 대장염 환자의 게놈 전체 cDNA 마이크로어레이를 이용한 일주기 유전자의 체계적인 분석에 따르면 RORα가 염증창자질환 치료를 위한 새로운 치료제 연구 목표임을 나타낸다.

[0182] DSS에 의해 손상된 RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스에서 특이적으로 상향 조절된 DEG의 분석은 세포 분열 및 세포 주기뿐만 아니라 염증에서 현저한 수치를 보여주다. 그러나 세포 분열 및 세포 주기의 상향 조절된 유전자 발현 프로파일은 마우스 표현형과 유의미한 상관 관계가 없음이 관찰되었다. DSS 처리 후 RORα$^{\Delta IEC}$ IECs는 회복 단계에서 느린 세포 분열을 나타낸다 (도 *2D* 와 *E*). DSS에 손상된 RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스는 심각하고 지속되는 염증이 세포 증식 능력을 압도하고 상처 치유의 기능적 단계적 과정을 방해하는 것으로 예상된다. 효과적인 상처 치유는 염증, 증식 및 리모델링의 순차적 단계를 따라야 한다. RORα$^{f/f}$ 마우스와는 달리, RORα$^{\Delta IEC}$ IECs의 전사체는 상처 치유 단계에서 비정상적 염증과 증식의 특징을 나타냈다. 따라서, 세포주기 및 분열에 관여하는 유전자의 높은 발현은 중증의 염증 하에서 상피 세포 증식과 양성적인 상관 관계가 없을 것이다.

[0183] 우리는 HDAC3를 RORα에 의한IECs 내 NF-κB 신호 감쇠에 필수적인 전사 억제 인자로 규명했다. 우리의 관찰과 일치하게 최근 연구에 발표된 장 특이적 HDAC3 결핍 마우스는 항균 방어와 관련된 유전자의 기저 발현 감소를 포함하여 IECs 고유 유전자 발현의 광범위한 조절 이상을 나타냈다. 특히 HDAC3 결핍은 공생 박테리아의 조성에서 파네스 세포의 상실, IECs 기능 장애 및 미생물 군집의 붕괴를 초래하였다. IECs 내재적 RORα의 발현이 공생 박테리아 유래 신호를 조절하여 IECs의 면역 반응을 유지하는 특정 기작이 규명되어야 하지만, 이들 데이터는 RORα가 항균성 펩타이드를 포함한 유잔자군의 발현을 조절하고 균형을 유지하는데 중요한 역할을 할 수 있음을 암시한다.

[0184] RORα가 직접적으로 NF-κB 표적 유전자들의 발현을 조절할 수 있는지 설명하기 위해, *IL-1b* 프로모터에 추정적인 RORE 모티프에서 ChIP 분석을 수행하였다. 우리는 RORα가 추정적인 RORE에 RORα$^{f/f}$ 와 RORα$^{\Delta IEC}$ 마우스 모두에서 모집하지 못한 것을 관찰하였다 (도 16). 이는 RORα가 NF-κB 표적 유전자들에 대해서 p65 전사 활성 억제를 위해 p65에 직접 결합하고 HDAC3와 같은 수많은 전사 억제 복합체를 동원함으로써 트랜스 기작으로 작동하고 있음을 암시한다.

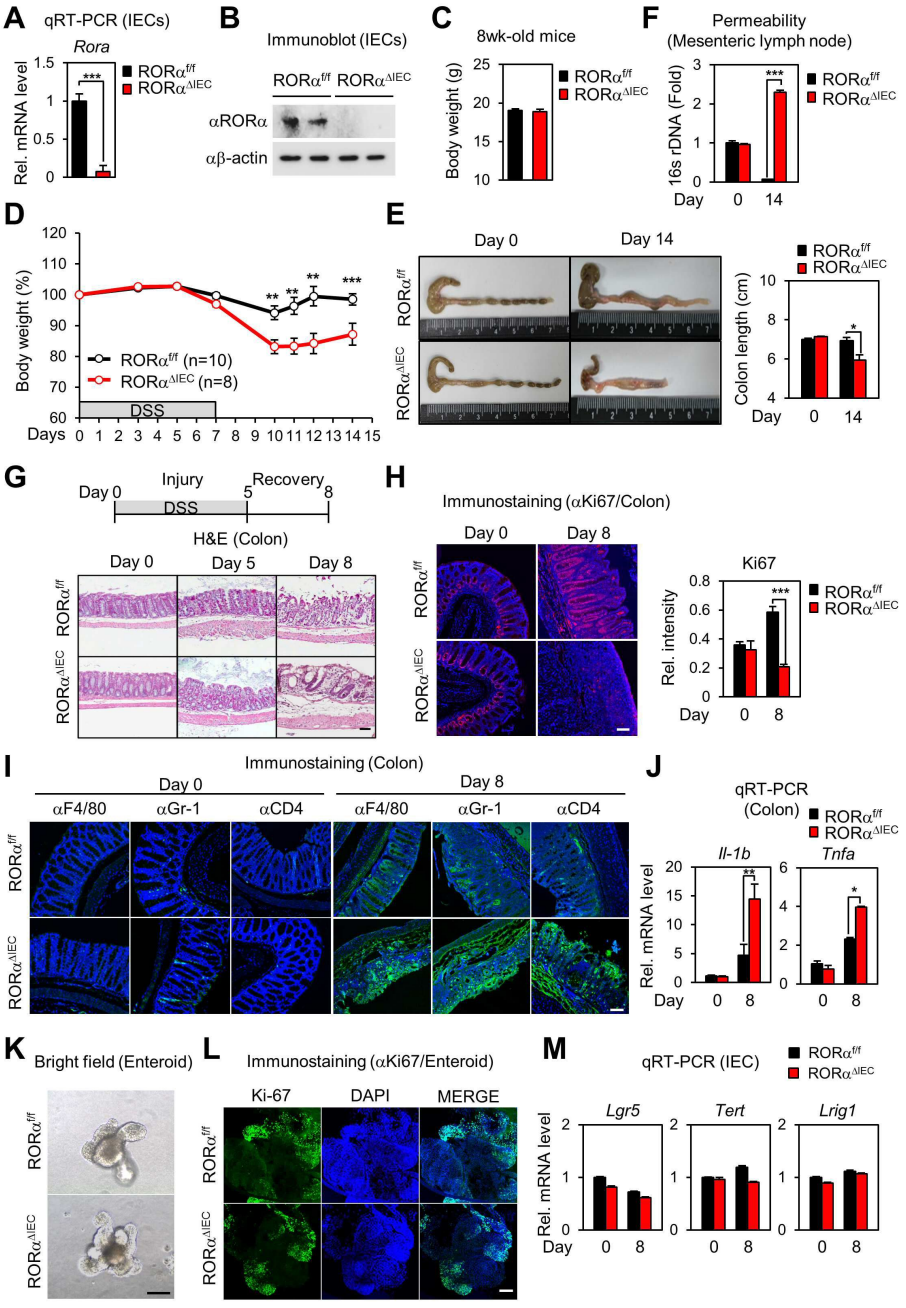
[0185] 결론적으로, 우리의 데이터는 RORα가 NF-κB 신호 전달을 약화 시키기 위해 HDAC3를 필요로 하며, 이는 DSS에 유도된 대장염 병증 동안 장 항상성 및 조직 재생을 유지하기 위한 기작임을 보여준다. 우리의 발견은다양한 환경 스트레스 하에서 장 항상성을 유지하기 위해 RORα와 HDAC3 사이의 기능상의 직접적인 연결 고리를 제공한다. 따라서 RORα의 기능을 조절하도록 설계된 치료 전략은 궤양성 대장염과 같은 장 염증의 치료에 유리할 것이다.

[0187] 이상에서 본원의 예시적인 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본원의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본원의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본원의 권리범위에 속하는 것이다.

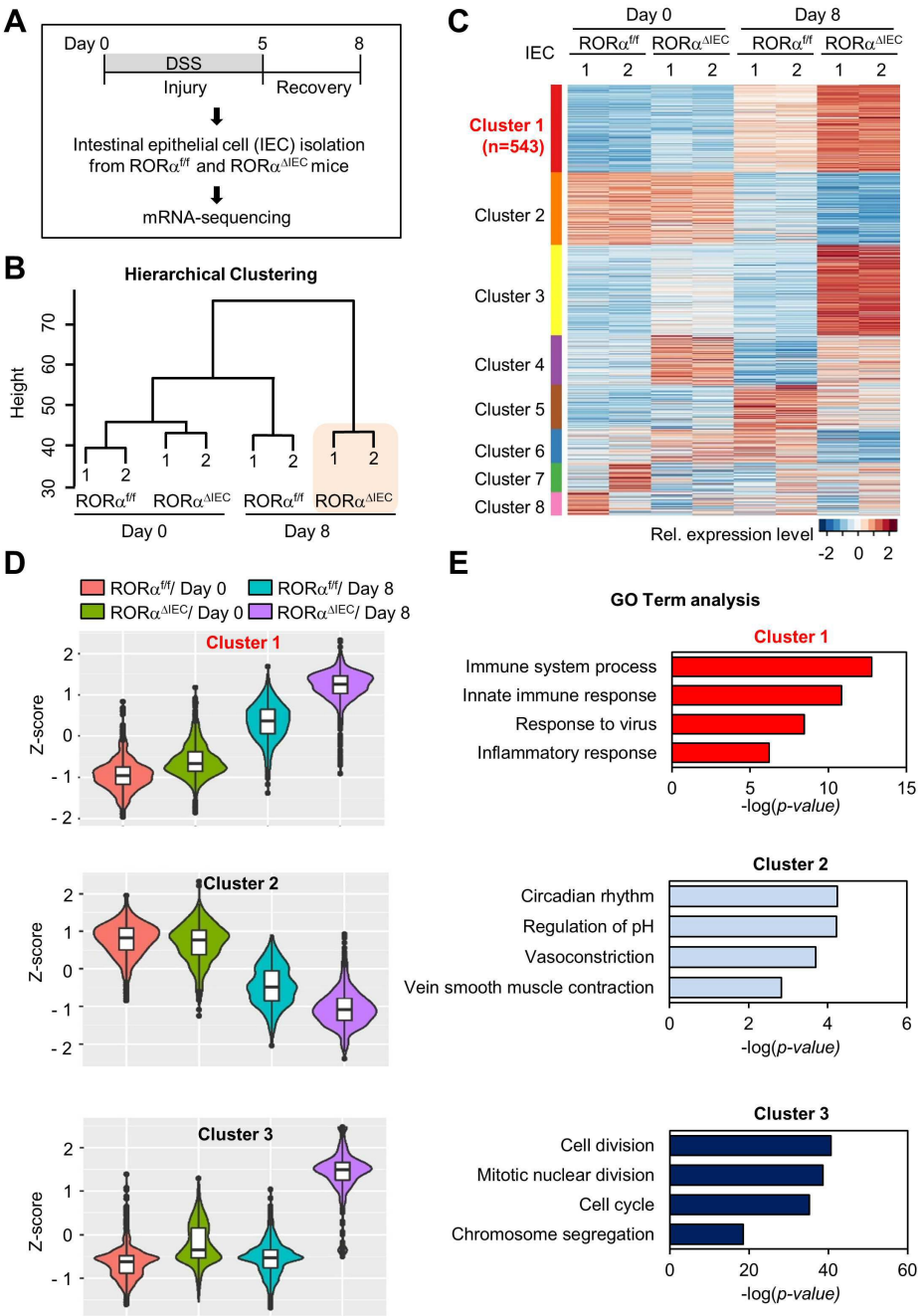
[0188] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

도면

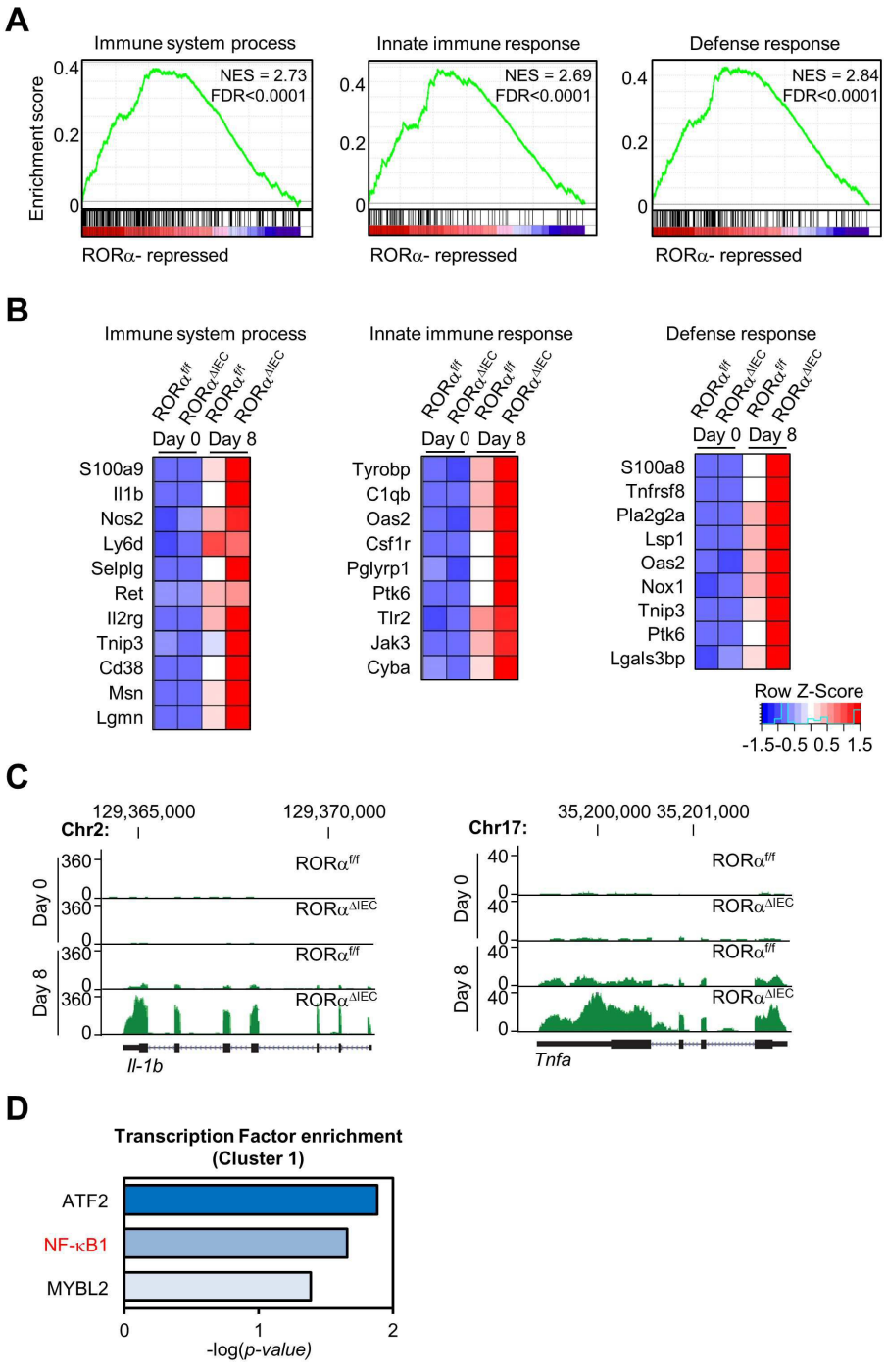
도면1


A
qRT-PCR (IECs)
Rora
Rel. mRNA level
RORα f/f
RORα ΔIEC
B
Immunoblot (IECs)
αRORα
αβ-actin
C
8wk-old mice
Body weight (g)
F
Permeability
(Mesenteric lymph node)
16s rDNA (Fold)
Day
D
Body weight (%)
RORα f/f (n=10)
RORα ΔIEC (n=8)
DSS
Days
E
Day 0
Day 14
Colon length (cm)
G
Day 0
Injury
Recovery
DSS
H&E (Colon)
Day 5
Day 8
H
Immunostaining (αKi67/Colon)
Ki67
Rel. intensity
I
Immunostaining (Colon)
αF4/80
αGr-1
αCD4
J
qRT-PCR
(Colon)
Il-1b
Tnfa
K
Bright field (Enteroid)
L
Immunostaining (αKi67/Enteroid)
Ki-67
DAPI
MERGE
M
qRT-PCR (IEC)
Lgr5
Tert
Lrig1

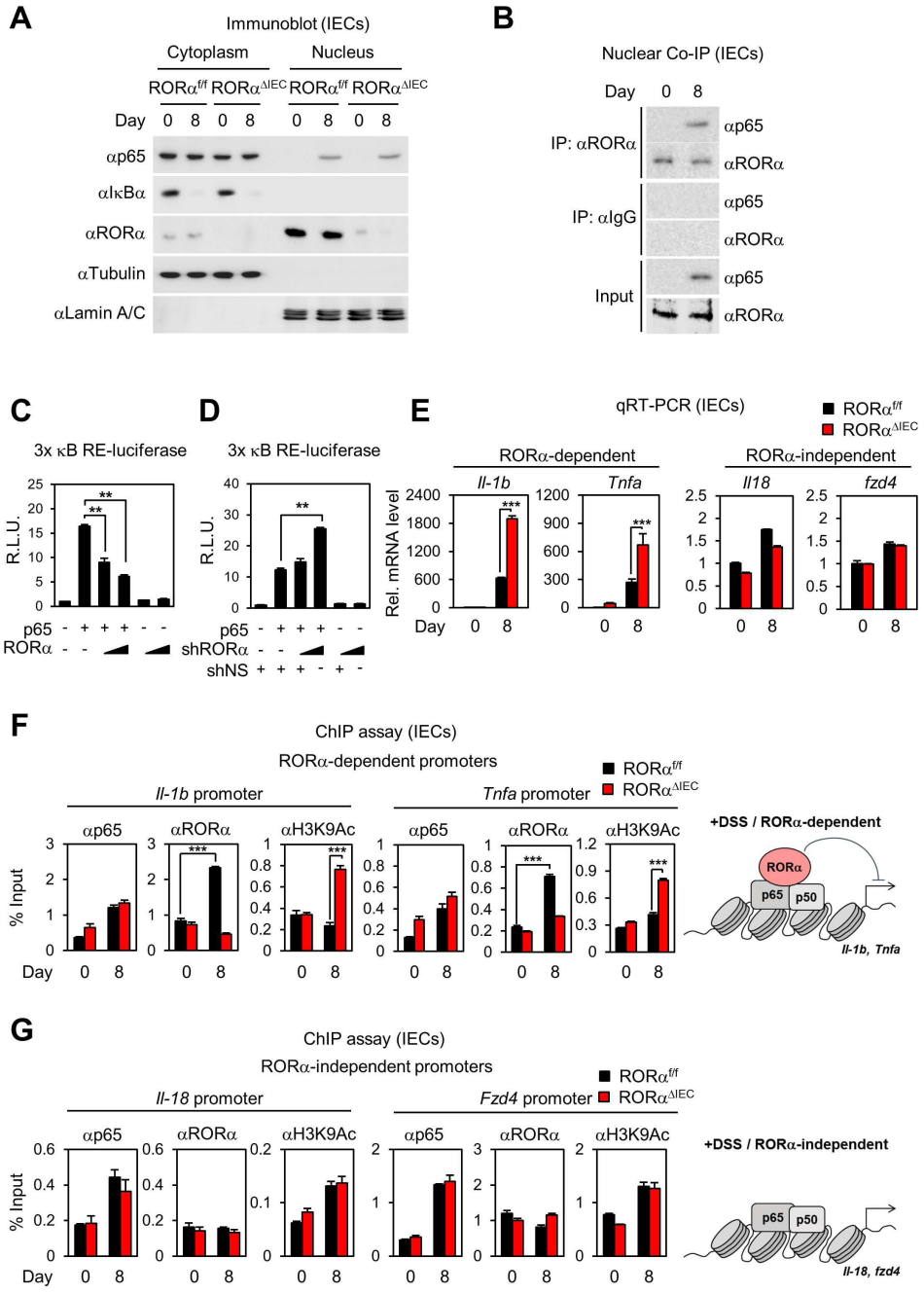
도면2


A
Day 0
5
8
DSS
Injury
Recovery
Intestinal epithelial cell (IEC) isolation
from RORα^f/f and RORα^ΔIEC mice
mRNA-sequencing
B
Hierarchical Clustering
Height
70
60
50
40
30
RORα^f/f
RORα^ΔIEC
RORα^f/f
RORα^ΔIEC
Day 0
Day 8
C
Day 0
Day 8
IEC
RORα^f/f
RORα^ΔIEC
RORα^f/f
RORα^ΔIEC
Cluster 1 (n=543)
Cluster 2
Cluster 3
Cluster 4
Cluster 5
Cluster 6
Cluster 7
Cluster 8
Rel. expression level
-2
0
2
D
RORα^f/f/ Day 0
RORα^f/f/ Day 8
RORα^ΔIEC/ Day 0
RORα^ΔIEC/ Day 8
Cluster 1
Cluster 2
Cluster 3
Z-score
E
GO Term analysis
Cluster 1
Immune system process
Innate immune response
Response to virus
Inflammatory response
-log(p-value)
Cluster 2
Circadian rhythm
Regulation of pH
Vasoconstriction
Vein smooth muscle contraction
-log(p-value)
Cluster 3
Cell division
Mitotic nuclear division
Cell cycle
Chromosome segregation
-log(p-value)

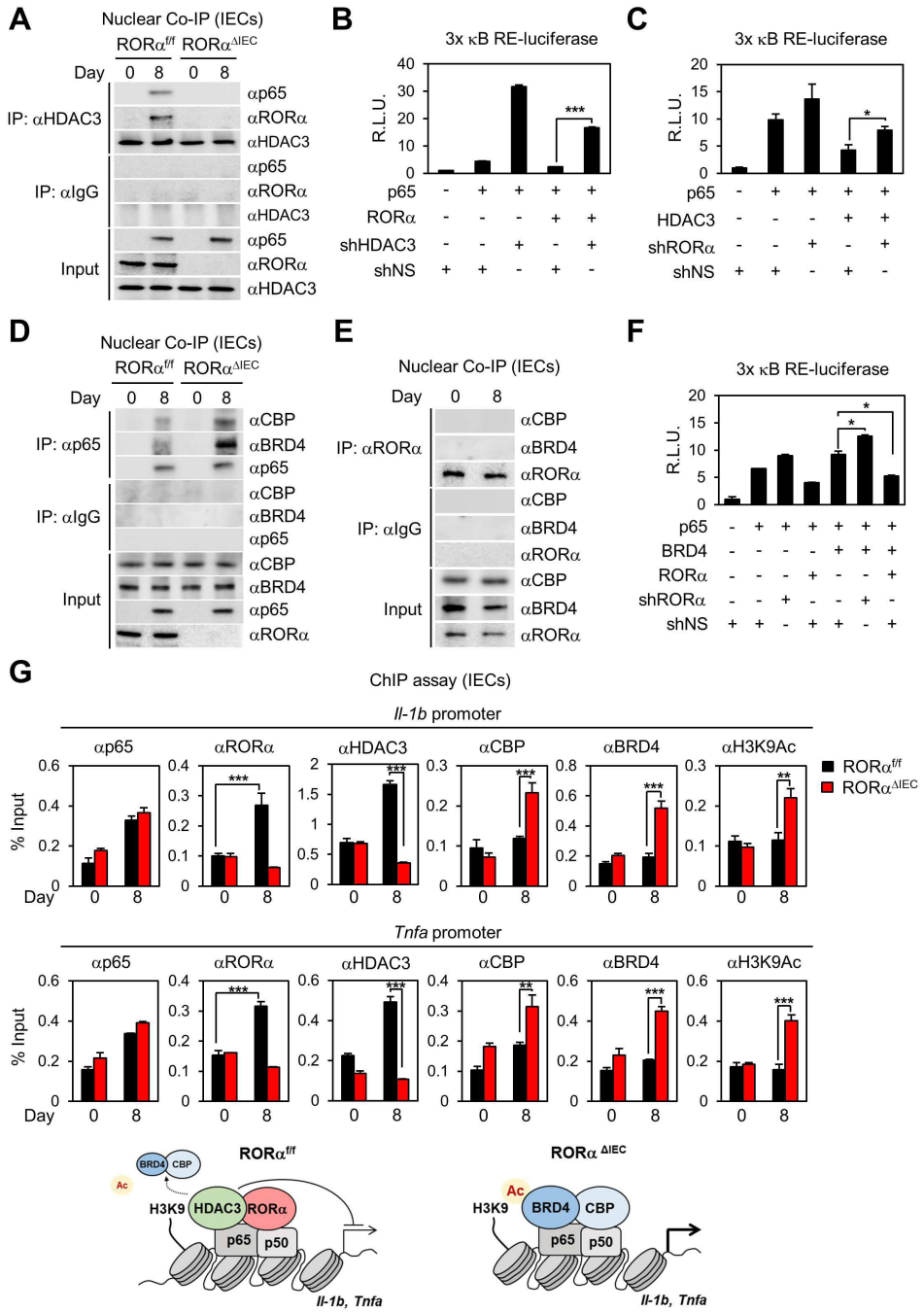
도면3


A
Immune system process
Innate immune response
Defense response
Enrichment score
NES = 2.73
FDR<0.0001
NES = 2.69
FDR<0.0001
NES = 2.84
FDR<0.0001
RORα- repressed
B
Immune system process
Innate immune response
Defense response
Day 0 Day 8
S100a9
Il1b
Nos2
Ly6d
Selplg
Ret
Il2rg
Tnip3
Cd38
Msn
Lgmn
Tyrobp
C1qb
Oas2
Csf1r
Pglyrp1
Ptk6
Tlr2
Jak3
Cyba
S100a8
Tnfrsf8
Pla2g2a
Lsp1
Oas2
Nox1
Tnip3
Ptk6
Lgals3bp
Row Z-Score
-1.5 -0.5 0.5 1.5
C
Chr2:
129,365,000
129,370,000
Chr17:
35,200,000 35,201,000
Day 0
Day 8
Il-1b
Tnfa
D
Transcription Factor enrichment
(Cluster 1)
ATF2
NF-κB1
MYBL2
-log(p-value)

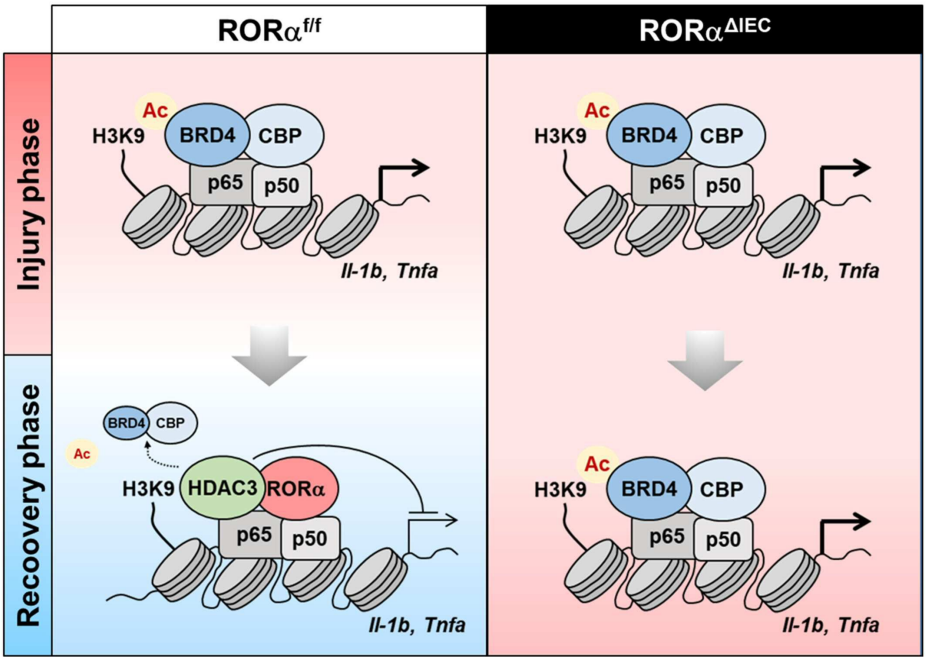
도면4


A
Immunoblot (IECs)
Cytoplasm
Nucleus
RORα f/f
RORα ΔIEC
RORα f/f
RORα ΔIEC
Day 0 8 0 8 0 8 0 8
αp65
αIκBα
αRORα
αTubulin
αLamin A/C
B
Nuclear Co-IP (IECs)
Day 0 8
IP: αRORα
IP: αIgG
Input
αp65
αRORα
C
3x κB RE-luciferase
R.L.U.
p65
RORα
D
3x κB RE-luciferase
R.L.U.
p65
shRORα
shNS
E
qRT-PCR (IECs)
RORα f/f
RORα ΔIEC
RORα-dependent
RORα-independent
Il-1b
Tnfa
Il18
fzd4
Rel. mRNA level
Day 0 8
F
ChIP assay (IECs)
RORα-dependent promoters
RORα f/f
RORα ΔIEC
Il-1b promoter
Tnfa promoter
αp65
αRORα
αH3K9Ac
% Input
Day 0 8
+DSS / RORα-dependent
RORα
p65
p50
Il-1b, Tnfa
G
ChIP assay (IECs)
RORα-independent promoters
RORα f/f
RORα ΔIEC
Il-18 promoter
Fzd4 promoter
αp65
αRORα
αH3K9Ac
% Input
Day 0 8
+DSS / RORα-independent
p65
p50
Il-18, fzd4

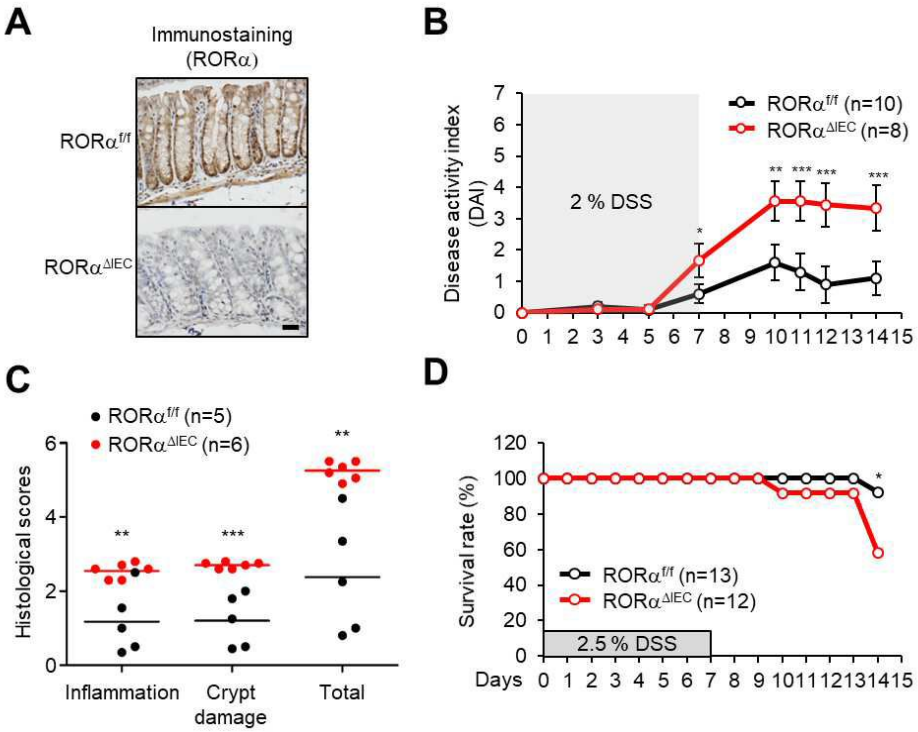
도면5


A
Nuclear Co-IP (IECs)
RORα^f/f RORα^ΔIEC
Day 0 8 0 8
IP: αHDAC3
IP: αIgG
Input
αp65
αRORα
αHDAC3
B
3x κB RE-luciferase
R.L.U.
p65
RORα
shHDAC3
shNS
C
3x κB RE-luciferase
R.L.U.
p65
HDAC3
shRORα
shNS
D
Nuclear Co-IP (IECs)
RORα^f/f RORα^ΔIEC
Day 0 8 0 8
IP: αp65
IP: αIgG
Input
αCBP
αBRD4
αp65
αRORα
E
Nuclear Co-IP (IECs)
Day 0 8
IP: αRORα
IP: αIgG
Input
αCBP
αBRD4
αRORα
F
3x κB RE-luciferase
R.L.U.
p65
BRD4
RORα
shRORα
shNS
G
ChIP assay (IECs)
Il-1b promoter
Tnfa promoter
αp65
αRORα
αHDAC3
αCBP
αBRD4
αH3K9Ac
% Input
Day 0 8
RORα^f/f
RORα^ΔIEC
RORα^f/f
RORα ΔIEC
BRD4
CBP
Ac
H3K9
HDAC3
RORα
p65
p50
Il-1b, Tnfa

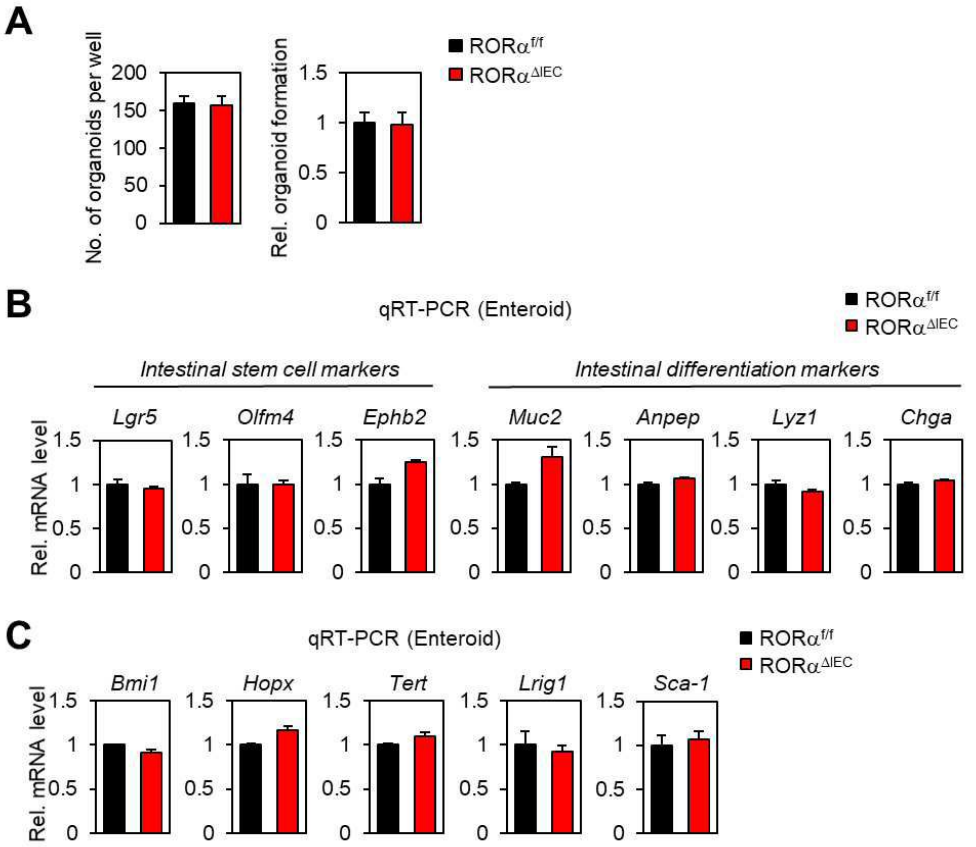
도면6


RORα f/f
RORα ΔIEC
Injury phase
Recoovery phase
Ac
H3K9
BRD4
CBP
p65
p50
Il-1b, Tnfa
HDAC3
RORα

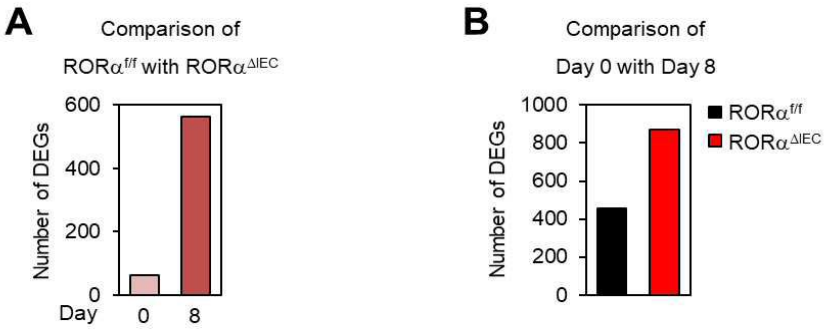
도면7


A
Immunostaining (RORα)
RORα f/f
RORα ΔIEC
B
Disease activity index (DAI)
2 % DSS
RORα f/f (n=10)
RORα ΔIEC (n=8)
C
RORα f/f (n=5)
RORα ΔIEC (n=6)
Histological scores
Inflammation
Crypt damage
Total
D
Survival rate (%)
RORα f/f (n=13)
RORα ΔIEC (n=12)
2.5 % DSS
Days

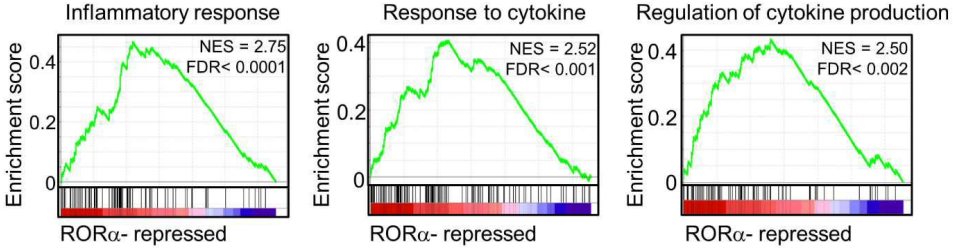
도면8


A
No. of organoids per well
Rel. organoid formation
RORα f/f
RORα ΔIEC
B
qRT-PCR (Enteroid)
Intestinal stem cell markers
Intestinal differentiation markers
Lgr5
Olfm4
Ephb2
Muc2
Anpep
Lyz1
Chga
Rel. mRNA level
C
qRT-PCR (Enteroid)
Bmi1
Hopx
Tert
Lrig1
Sca-1

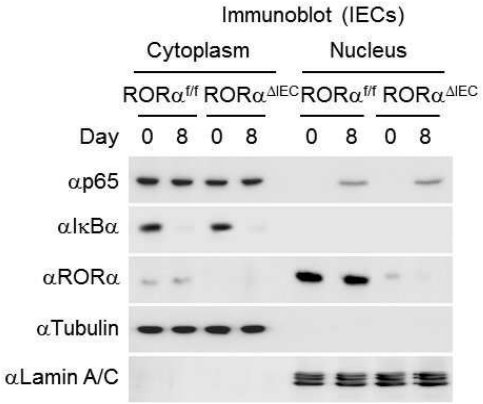
도면9


A
Comparison of
RORα f/f with RORα ΔIEC
Number of DEGs
Day
B
Comparison of
Day 0 with Day 8
RORα f/f
RORα ΔIEC
Number of DEGs

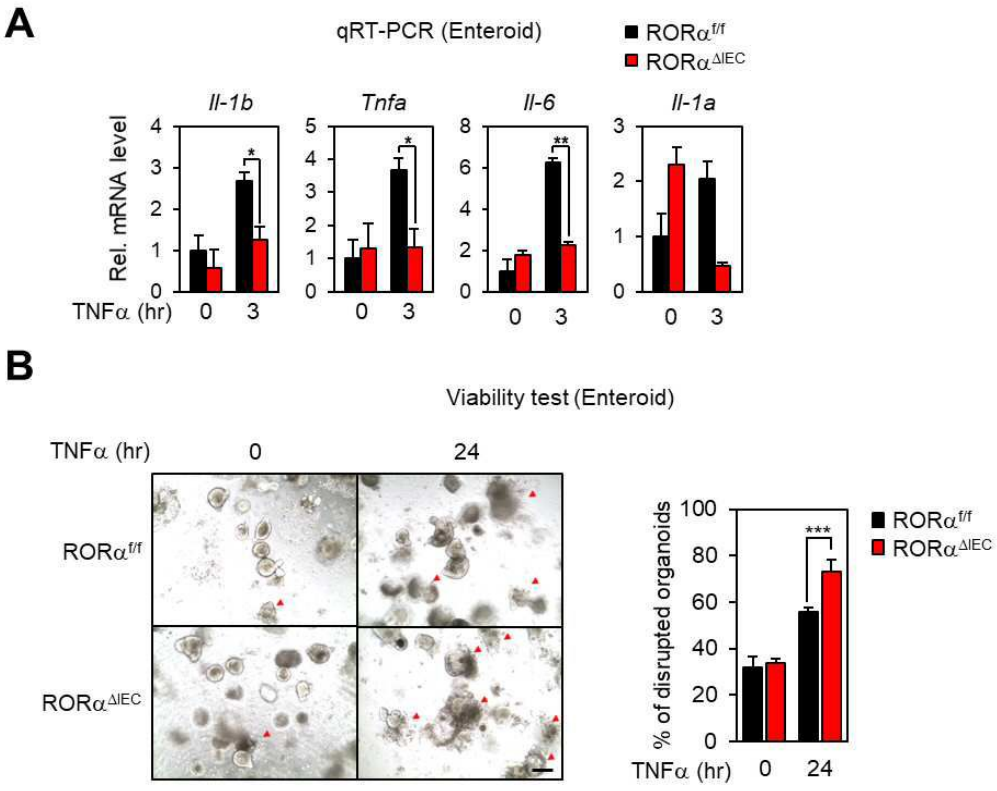
도면10


Inflammatory response
NES = 2.75
FDR< 0.0001
Response to cytokine
NES = 2.52
FDR< 0.001
Regulation of cytokine production
NES = 2.50
FDR< 0.002
Enrichment score
RORα- repressed

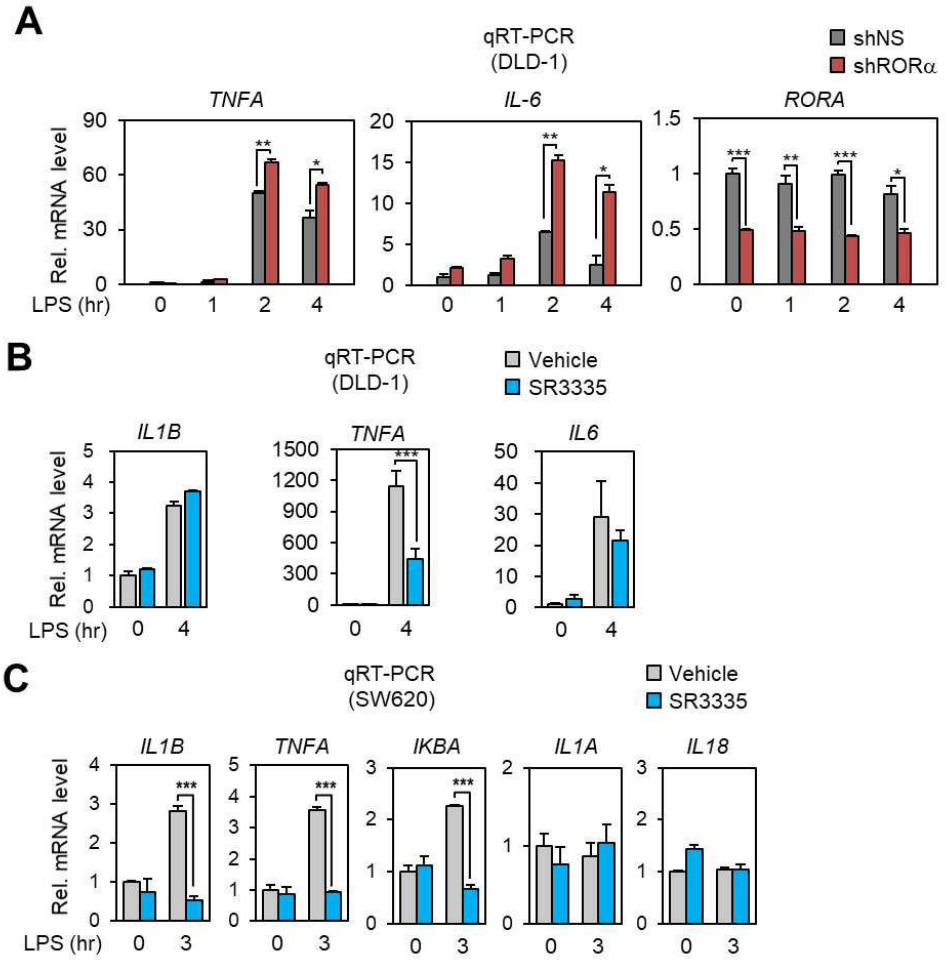
도면11


Immunoblot (IECs)
Cytoplasm
Nucleus
RORα f/f
RORα ΔIEC
RORα f/f
RORα ΔIEC
Day 0 8 0 8 0 8 0 8
αp65
αIκBα
αRORα
αTubulin
αLamin A/C

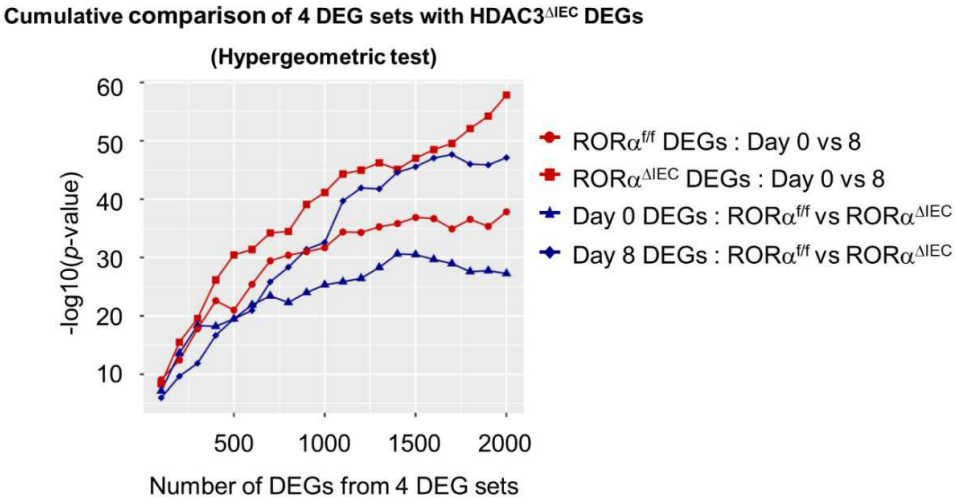
도면12


A
qRT-PCR (Enteroid)
RORα f/f
RORα ΔIEC
Il-1b
Tnfa
Il-6
Il-1a
Rel. mRNA level
TNFα (hr) 0 3
B
Viability test (Enteroid)
TNFα (hr) 0 24
RORα f/f
RORα ΔIEC
% of disrupted organoids
TNFα (hr) 0 24

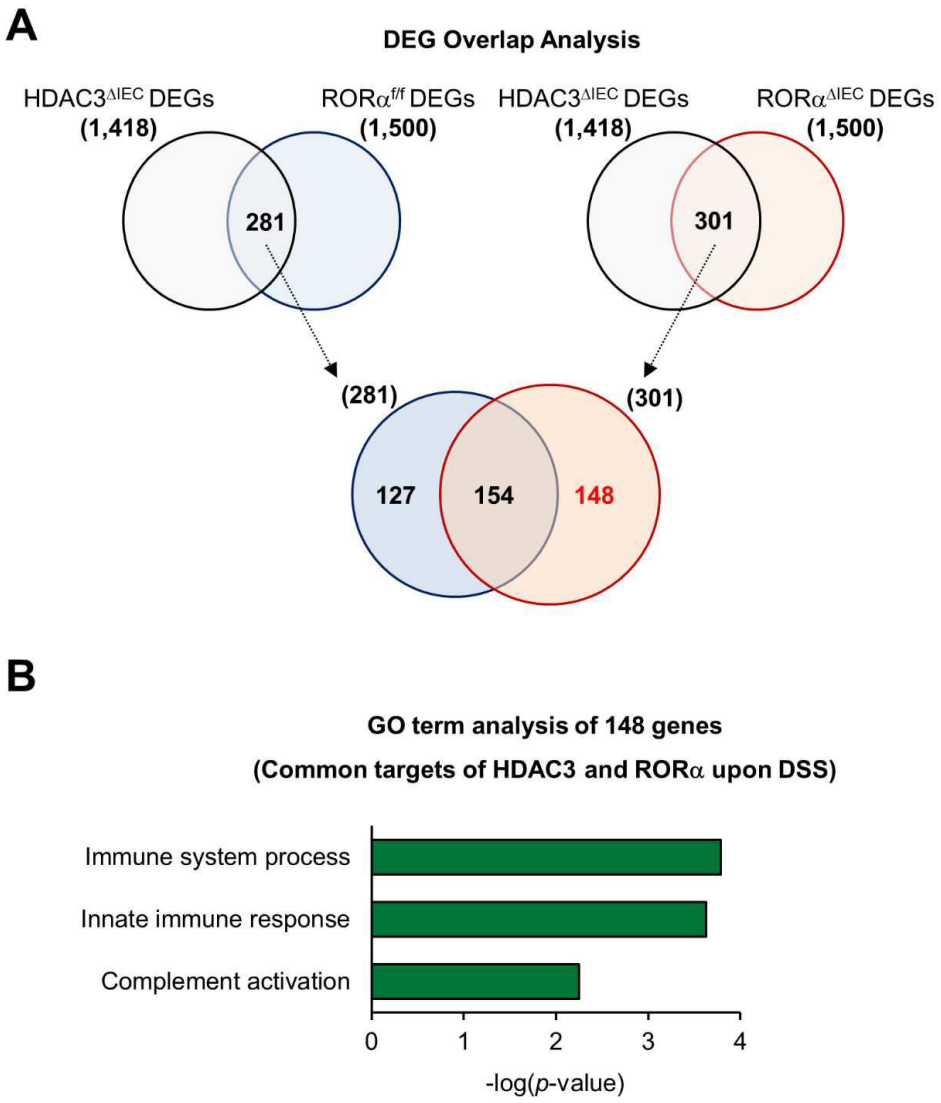
도면13


A
qRT-PCR
(DLD-1)
shNS
shRORα
TNFA
IL-6
RORA
Rel. mRNA level
LPS (hr)
B
qRT-PCR
(DLD-1)
Vehicle
SR3335
IL1B
TNFA
IL6
C
qRT-PCR
(SW620)
IL1B
TNFA
IKBA
IL1A
IL18

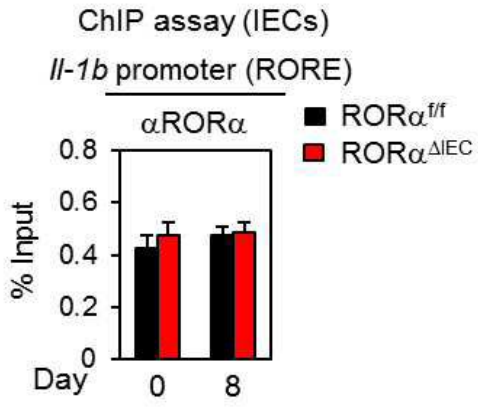
도면14


Cumulative comparison of 4 DEG sets with HDAC3ΔIEC DEGs
(Hypergeometric test)
-log10(p-value)
Number of DEGs from 4 DEG sets
RORαf/f DEGs : Day 0 vs 8
RORαΔIEC DEGs : Day 0 vs 8
Day 0 DEGs : RORαf/f vs RORαΔIEC
Day 8 DEGs : RORαf/f vs RORαΔIEC

도면15


A
DEG Overlap Analysis
HDAC3ΔIEC DEGs
(1,418)
RORαf/f DEGs
(1,500)
281
HDAC3ΔIEC DEGs
(1,418)
RORαΔIEC DEGs
(1,500)
301
(281)
(301)
127
154
148
B
GO term analysis of 148 genes
(Common targets of HDAC3 and RORα upon DSS)
Immune system process
Innate immune response
Complement activation
0
1
2
3
4
-log(p-value)

도면16


ChIP assay (IECs)
Il-1b promoter (RORE)
αRORα
RORαf/f
RORαΔIEC
% Input
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Day
0
8