



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0104834
(43) 공개일자 2018년09월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/027 (2013.01)
G01N 33/5088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0031618
(22) 출원일자 2017년03월14일
심사청구일자 2017년03월14일

(71) 출원인
연세대학교 원주산학협력단
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
(72) 발명자
이기중
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 원주캠퍼스 미래관 211호
황순재
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 원주캠퍼스 미래관 214호 면역 및 조직병리학 연구실
(74) 대리인
남연정

전체 청구항 수 : 총 10 항

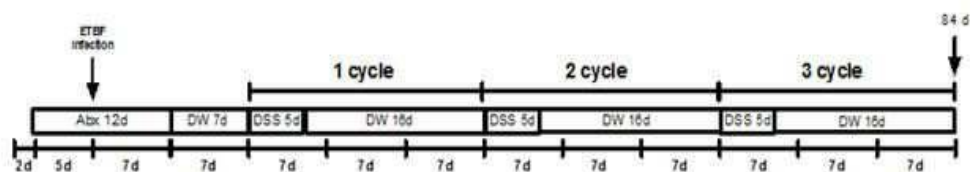
(54) 발명의 명칭 아족시메탄 없이 유도된 대장암 동물모델의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 대장암 동물모델의 제조에 필수적으로 사용되었던 아족시메탄(azoxymethane) 화합물을 처리하지 않고, 인간의 장내 상재균인 엔테로톡시제닉 박테로이데스 프라길리스(*Enterotoxigenic Bacteroides fragilis*) 균주 및 덱스트란 황산 나트륨(Dextran sulfate sodium)을 이용하여 대장암 동물모델을 제조하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1

Experimental protocol (12주)



• ETBF infection:
1 x 10⁸⁻⁹ CFU/ml 농도로 균액 (200ul) 구강 내 감염
사용한 ETBF 균주: *B. fragilis* 86-5443-2-2

• Dextran sulfate sodium (DSS):
1% (w/v) 농도로 autoclaved 1' DW를 용매로 DSS 용액을 만든 다음 protocol에 명시된 대로 처리
(MP biochemical회사 제품 사용)

• 사용된 마우스 strain 타입:
Balb/c female (8~10주령) 사용

D; day, DW; distilled water
Abx: clindamycin and gentamicin가 포함된 항생제 물; clindamycin (100 mg/liter) and gentamicin (300 mg/liter)

*다른 비교그룹은 위 방법에 들어가는 성분 (WT-ETBF, DSS)중 1개만 위와 같이 처리해주고 나머지는 동일함. Sham group은 아무것도 처리해 주지 않은 그룹을 지칭함.

(52) CPC특허분류

A01K 2207/00 (2013.01)

A01K 2207/20 (2013.01)

A01K 2227/105 (2013.01)

A01K 2267/0331 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 엔테로톡시제닉 박테로이데스 프라길리스(Enterotoxigenic Bacteroides fragilis, ETBF) 균주를 동물에 감염시키는 단계; 및
- 2) 상기 1) 단계의 동물에 텍스트란 황산 나트륨(Dextran sulfate sodium, DSS)을 투여하는 단계; 를 포함하는 아족시메탄(azoxymethane) 없이 유도된 대장암 동물모델의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 1) 단계 이후 동물에 클린다마이신(clindamycin) 및 겐타마이신(gentamicin)을 용해시킨 항생제가 포함된 정제수를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 아족시메탄 없이 유도된 대장암 동물모델의 제조방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 항생제가 포함된 정제수를 투여하는 단계는 10일 내지 12일 동안 투여하는 것을 특징으로 하고;

상기 항생제가 포함된 정제수를 투여하는 단계를 마친 후에 5일 내지 7일 동안 정제수를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 아족시메탄 없이 유도된 대장암 동물모델의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 1) 단계는 $1 \times 10^{6-9}$ CFU(colony forming unit)/ml 농도의 ETBF 균주의 균액을 동물에 투여하여 감염시키는 것을 특징으로 하는 아족시메탄 없이 유도된 대장암 동물모델의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 1) 단계는 $1 \times 10^{8-9}$ CFU(colony forming unit)/ml 농도의 ETBF 균주의 균액을 동물에 투여하여 감염시키는 것을 특징으로 하는 아족시메탄 없이 유도된 대장암 동물모델의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 2) 단계는 동물에 1 내지 2% (w/v) 농도의 DSS 용액을 투여하는 것을 특징으로 하는 아족시메탄 없이 유도된 대장암 동물모델의 제조방법.

청구항 7

제3항에 있어서,

상기 정제수를 투여하는 단계를 마친 후에 상기 2) 단계를 5일 동안 실시하는 것을 특징으로 하고;

상기 2) 단계를 마친 후에 정제수를 16일 동안 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 아족시메탄 없이 유도된 대장암 동물모델의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 동물은 Balb/c 마우스인 것을 특징으로 하는 아족시메탄 없이 유도된 대장암 동물모델의 제조방법.

청구항 9

엔테로톡시제닉 박테로이데스 프라길리스(*Enterotoxigenic Bacteroides fragilis*, ETBF) 균주 및 텍스트란 황산 나트륨(Dextran sulfate sodium, DSS)에 의해 유도된 대장암 마우스 동물 모델.

청구항 10

1) 제9항에 따른 동물모델에 후보물질을 투여하는 단계; 및

2) 상기 1) 단계의 동물모델의 대장용종을 확인하는 단계;를 포함하는 대장암 치료용 약물 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아족시메탄 화합물의 투여 없이 유도된 대장암 동물모델 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 일반적으로 결장암과 직장암을 통틀어 일컫는 대장암(Colorectal cancer, CRC)은 전 세계적으로 가장 흔한 암들 중 하나이면서 악성종양에 의한 주요 사망원인 4위에 해당하는 암으로, 높은 열량의 섭취, 동물성 지방 섭취, 섬유소 섭취 부족, 비만 등이 원인이 되어 발생하는 것으로 알려져있다.

[0004] 대부분의 대장암은 이미 존재하고 있던 대장 안의 조직인 용종(Polyp)에서 발생된다고 할 수 있어, 대장용종과 매우 밀접한 관련이 있다.

[0005] 대장 용종(Colonic polyp)이란 대장 점막이 비정상적으로 자라 사마귀 모양의 혹으로 보이는 조직이 되어 장의 안쪽으로 돌출되어 있는 상태를 말한다. 흔히 암으로 발전할 가능성이 있는 종양성 용종과 암으로 발전할 가능성이 없는 비종양성 용종으로 나뉘는데, 종양성 용종에는 선종성 용종, 유암종, 악성용종 등이 있고, 대부분이 대장암과 아무 관련이 없는 비종양성 용종에는 과형성 용종, 용종양 점막, 과오종, 염증성 용종, 지방종 등이 있다. 그 중 선종성 용종은 시간이 지나면 암으로 진행할 가능성이 높아 반드시 제거해야 한다. 선종성 용종의 위험한 정도는 그 크기와 현미경적 조직 소견에 따라 차이가 있는데 크기가 1 cm 이상이거나, 현미경 소견에서 용모형태의 세포를 많이 포함하는 경우, 세포가 덜 분화된 경우는 진행성 선종이라 부르고, 암으로 발전할 가능성이 매우 높다. 유암종은 주로 직장에서 발견되며 크기가 커지면 다른 장기로 전이될 수 있어 악성종양으로 분류된다. 이러한 용종의 경우 제거하지 않으면 결국 악성으로 변할 수 있고, 결장과 직장의 벽을 뚫고 다른 곳으로 전이될 수 있다.

[0006] 과거 대장암은 보통 서양에서 많이 발생했고 우리나라에서는 비교적 발생빈도가 낮은 암이었지만, 최근 우리나라의 식습관도 서구화됨에 따라 발생률이 두배 이상 높아졌다. 대장암은 모든 연령에서 발생할 수 있지만 대부

분이 40대 이상의 중년에게 나타나고 연령이 증가할수록 위험이 높아진다는 점에서 노령인구가 폭발적으로 증가하고 있는 우리나라의 경우 대장암에 대한 관심이 날로 증가하고 있다.

[0007] 이에, 대장암 치료제나 발병 매커니즘에 관한 연구가 활발하게 이뤄지고 있으며, 그에 따라 대장용종이나 대장암이 유도된 동물모델에 대한 활용도도 크게 증가하고 있다. 현재 보편적으로 사용되고 있는 대장암 동물모델로, 대장암 발암물질인 널리 알려진 아зок시메탄(Azoxymethane)을 단독으로 처리하거나, 대장염 유발 물질인 텍스트란 황산 나트륨(Dextran sulfate sodium)를 추가로 처리하여 대장암을 유발한 AOM/DSS 마우스가 사용되고 있고(Tanaka T 등, Cancer Sci. 94 (11): 965-73, 2003), 관련 있는 선행기술로 DSS으로 유도한 대장염 동물모델이 존재하는 실정이다(한국등록특허 제0996056호).

[0008] 그러나, 현재까지 상기 AOM 화합물을 처리하지 않고 대장암 동물모델을 제조하려는 시도는 보고된 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제0996056호

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) Tanaka T 등, Cancer Sci. 94 (11): 965-73, 2003

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 이에 본 발명자들은 기존의 아зок시메탄(azoxymethane, AOM) 화합물을 처리하지 않고 새로운 방법으로 제조할 수 있는 유용한 대장암 동물모델에 대한 개발 노력을 계속한 결과, 인간의 장내 상재균인 엔테로톡시제닉 박테로이데스 프라길리스(Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, ETBF) 균주와 텍스트란 황산 나트륨(Dextran sulfate sodium, DSS)를 이용하는 경우, 대장암 동물모델 유도가 가능함을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.

[0013] 따라서 본 발명의 목적은 AOM 처리 없이 ETBF 균주 및 DSS 만으로 유도된 대장암 동물 모델 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명에 따른 대장암 동물모델에 후보물질을 투여하여 대장암 치료용 약물을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명에서는 ETBF 균주를 동물에 감염시키는 단계; 및 상기 동물에 DDS를 처리하는 단계를 포함하는 대장암 동물모델의 제조방법을 제공함으로써 상기 과제를 해결하였다.

[0017] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 동물모델에 후보물질을 투여하는 단계; 및 상기 단계의 동물모델의 대장을 적출하여 대장 내 용종을 확인하는 단계를 포함하는 대장암 치료용 약물 스크리닝 방법을 제공함으로써 상기 과제를 해결하였다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따른 대장암 동물모델 제조방법은 기존의 대장암 유발 물질인 아зок시메탄의 투여 없이도, 관련 연구에 유용하게 사용할 수 있는 대장암 동물모델을 제조할 수 있다는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 실시예 2에 따른 실험 프로토콜을 나타낸 그림이다.
- 도 2는 실시예 2에 따라 제조된 본 발명에 따른 마우스(WT-ETBF+DSS mouse)의 대장 사진이다.
- 도 3은 실시예 2에 따라 제조된 실험 대조군(sham, DSS 단독처리 그룹, ETBF 단독감염 그룹) 마우스 각각의 대장 사진으로, 하얀색 화살표가 가리키는 것이 대장용종이다.
- 도 4는 실시예 2에 따라 제조된 본 발명에 따른 마우스(WT-ETBF+DSS mouse)와 실험 대조군(sham, DSS 단독처리 그룹, ETBF 단독감염 그룹)들의 대장 내 용종의 수(A)와 발생율(B)를 비교한 그래프이다.
- 도 5은 실시예 2에 따라 제조된 본 발명에 따른 마우스(WT-ETBF+DSS mouse)의 대장 용종의 H&E 염색법을 통한 조직학적 모습이다.
- 도 6는 실시예 2에 따라 제조된 실험 대조군(sham, DSS 단독처리 그룹, ETBF 단독감염 그룹) 마우스들의 대장 단면의 H&E 염색법을 통한 조직학적 모습이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 본 발명은 대장암 유발물질인 아зок시메탄(azoxymethane, AOM) 화합물의 투여 없이 유도된 대장암 동물모델 및 이의 제조방법을 제공한다.
- [0023] 즉 본 발명은 인간의 장내 상재균인 엔테로톡시제닉 박테로이데스 프라길리스(*Enterotoxigenic Bacteroides fragilis*, ETBF) 균주와 텍스트란 황산 나트륨(DSS)에 의하여 유도된 대장암 동물모델과 그 제조방법을 제공한다.
- [0024] 인간의 장내 상재균총(intestinal bacterial flora)에 속하는 박테로이데스(*Bacteroides*) 균속은 무산소성 그람음성 막대균으로서 탄수화물을 분해하고, 담즙에 내성이 있으며 주로 장에서 분리된다. 20종 이상의 균종이 있는데, 이 중에서 *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* 및 *B. ovatus*는 사람에서 주로 감염을 일으킨다. 그 중 박테로이데스 프라길리스(*B. fragilis*) 중에는 장독소(*Bacteroides fragilis* enterotoxin, BFT)를 생성하는 세균이 있는데, 그 세균이 바로 본 발명에서 사용하는 장내 독소형 박테로이데스 프라길리스(*Enterotoxigenic Bacteroides fragilis*, ETBF)이다. ETBF는 설사질환 환자의 변에서 처음 분리되었는데, 염증성 대장질환(inflammatory bowel disease, IBD) 환자의 변에서 정상인보다 더 높은 빈도로 검출됨이 보고된 바 있다(Basset C, Holton J, Bazeos A, Vaira D, Bloom S. Dig Dis Sci. 2004;49:1425-1432).
- [0025] 한편, 아зок시메탄 화합물은 대장암 유발물질로 대장암 동물모델 제조에 거의 필수적으로 사용되며, 텍스트란 황산 나트륨(DSS) 화합물은 AOM을 처리한 동물에 여러번 투여할 경우 대장용종을 발생시킨다고 알려져 있어, AOM/DSS-유도된 대장암 마우스가 대장암 동물모델로서 보편적으로 널리 사용되고 있다.
- [0026] 하지만, 본 발명자들은 AOM 대신 인간의 장내 상재균인 ETBF 균주를 동물에 감염시켜주고 DSS를 처리하여, 대장용종을 발생시키고 나아가 대장암 병변을 가진 대장암 동물모델을 새롭게 개발하였다. 무엇보다 본 발명은 기존의 동물모델 제조방법과는 달리, ETBF 균주를 감염시키는 단계를 비롯한 여러 단계를 특이적으로 조합하여 특유한 대장암 동물모델의 제조방법을 제공한다.
- [0027] 따라서 본 발명은 새로운 대장암 동물모델로서 유용하게 사용될 수 있을 뿐만 아니라 ETBF로 인하여 유발되는 대장질환의 발병 메커니즘 및 치료제 연구를 위한 동물모델로도 이용할 수 있다.
- [0028] 본 발명은 구체적으로 1) 엔테로톡시제닉 박테로이데스 프라길리스(*Enterotoxigenic Bacteroides fragilis*, ETBF) 균주를 동물에 감염시키는 단계 및 2) 상기 1) 단계의 동물에 텍스트란 황산 나트륨(Dextran sulfate sodium, DSS)을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0029] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 상기 1) 단계 이후 2) 단계를 실시하기 전에 1) 단계의 동물에 클린다마이신(clindamycin) 및 겐타마이신(gentamicin)과 같은 항생제를 포함한 정제수를 마우스에 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 이때 클린다마이신은 100 mg/L 용량으로, 겐타마이신은 300 mg/L 용량으로 정제수에 포함시킬 수 있다.
- [0030] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 상기 항생제가 포함된 정제수를 동물에 투여하는 단계는 10일 내지 12일 동안

투여할 수 있다.

- [0031] ETBF를 감염시키기 5일 전부터는 최소한 투여를 해야 안정적으로 ETBF를 콜로니화(colonization)시킬 수 있으며, 감염 후 최소 5일은 유지해주는 것이 바람직하다. 항생제 투여를 최소화할 수 있어 경제적으로 유리하며, 항생제를 더 장기간 투여하는 경우 DSS 처리시 마우스가 사망할 위험이 있어 바람직하지 않다.
- [0032] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 항생제가 포함된 정제수를 투여하는 단계를 마친 후에는 5일 내지 7일 동안 아무것도 포함되어 있지 않은 순수한 정제수를 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 정제수를 동물에 응용하게 하는 방법으로 투여할 수 있다. 약 5일 내지 7일간 순수 정제수를 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 과정없이 DSS를 바로 처리할 수도 있으나 ETBF에 대한 충분한 적응 시간을 마우스에 주지 않는 경우 DSS로 인해 마우스가 사망할 위험이 있는바, 순수 정제수 투여 단계를 추가로 포함하는 것이 바람직하다.
- [0033] 그리고, 상기 1) 단계는 $1 \times 10^{6-9}$ CFU(colony forming unit)/ml 농도의 ETBF 균주의 균액, 보다 구체적으로 $1 \times 10^{8-9}$ CFU(colony forming unit)/ml 농도의 ETBF 균주의 균액을 동물에 구강접종 등의 방법으로 투여하여 감염시킬 수 있다.
- [0034] 상기 $1 \times 10^{6-9}$ 또는 $1 \times 10^{8-9}$ CFU(colony forming unit)/ml 농도의 ETBF 균주의 균액은 본 발명의 일실시예에 따라 제조할 수 있다(실시예 1 참조).
- [0035] 또한, 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 정제수를 투여하는 단계를 마친 후에 상기 2) 단계(DSS 투여)를 실시하게 되는데, DSS 투여는 5일간 실시하며, DSS는 멸균된 1차 증류수를 용매로 하여 1 내지 2% (w/v) 농도의 DSS 용액으로 만들어 투여시킨다. 이때 2.5% (w/v) 이상인 경우 DSS로 인해 유발되는 대장염으로 마우스가 사망할 가능성이 높은바, 1 내지 2% (w/v), 보다 구체적으로 약 1% (w/v)가 바람직하다.
- [0036] 이후 아무것도 용해되지 않은 멸균된 1차 증류수를 16일 동안 투여한다. 이렇게 DSS 투여 및 이후 멸균된 1차 증류수의 투여 단계는 총 21일로 구성되며, 이를 1 사이클로 하여, 3번 연이어 반복할 수 있다(63일 소요).
- [0037] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 1 사이클을 3번 반복하여, 실험 시작일로부터 총 84일(12주)에 걸쳐 본 발명에 따른 대장암 동물모델을 제조하였다(도 1 및 실시예 2-1 참조).
- [0038] 본 발명의 일실시예에 따라, 상기 과정을 통하여 제조된 본 발명에 따른 동물모델인 마우스 및 대조군 마우스들의 대장을 적출하여 대장용종의 형성 모습을 살펴본 결과, 아무것도 처리하지 않은 Balb/c 마우스, DSS 단독처리 마우스, ETBF 단독감염 마우스의 대장에서는 용종이 전혀 형성되지 않은 반면에, 본 발명에 따라 ETBF 균주 및 DSS를 함께 처리한 마우스에서는 대장 내 용종이 형성된 것을 발견할 수 있었으며 용종 형성 비율이 72%에 달하는 것을 확인할 수 있었다(도 3 내지 5 참조).
- [0039] 또한, 상기 적출한 마우스 대장들의 조직학적 모습을 좀 더 정확하게 살펴보기 위하여 헤마토실린(hematoxylin)과 에오신(eosin)을 이용한 H&E 염색법을 실시한 후 조직단면을 현미경을 통해 관찰한 결과(도 5 및 6 참조), 본 발명에 따른 마우스의 대장에 형성된 용종은 만성 염증성 장질환(IBD) 환자에게서 나타나는 염증성 용종(inflammatory polyp) 이거나 대장암으로 발전하기 전 단계인 선종성 용종(adenomatous polyp) 이라는 사실을 확인할 수 있었다.
- [0040] 반면에 대조군인 아무것도 처리하지 않은 Balb/c 마우스에서는 당연히 아무런 병변이 발견되지 않았고, ETBF 단독감염 마우스에서는 염증은 발견되었으나 염증성 장 질환 환자의 대장 조직에서 나타나는 염증 병변에 비해서는 약한 수준의 염증 상태임을 확인할 수 있었고 종양 병변은 발견되지 않았다. DSS 단독처리 마우스에서는 간헐적으로 염증 병변이 관찰될 뿐 종양 병변은 전혀 발견할 수 없었다. 이를 통해 DSS 만으로는 염증만이 유도될 뿐이어서, 대장암 동물모델의 유도를 위해서는 AOM 화학물질의 처리가 필수적으로 요구됨을 확인할 수 있었다.
- [0041] 그럼에도 불구하고, 본 발명은 AOM 화학물질의 처리 대신 ETBF 균주 감염을 통해 대장암 종양 병변을 보이는 동물모델의 제조를 실현하였는바, 본 발명은 일실시예에 따라 엔테로톡시제닉 박테로이데스 프라길리스(ETBF) 균주 및 텍스트란 황산 나트륨(DSS)에 의해 유도된 대장암 마우스 동물모델을 제공한다.
- [0042] 또한, 본 발명은 대장암의 치료용 약물 스크리닝 방법을 제공할 수 있다. 구체적으로 본 발명에 따른 동물모델에 후보물질을 투여하는 단계 및 상기 단계를 거친 동물모델의 대장 내 용종을 확인하는 단계를 포함하는 대장암 치료용 약물 스크리닝 방법을 제공한다. 상기 방법에서 후보물질을 처리한 동물모델은 이후 대장을 적출하여 대조군 동물모델과 대장용종의 형태, 수와 크기 등을 비교하여 후보물질의 치료 효과 여부를 확인할 수 있으며,

이를 통해 대장암 치료용 약물을 스크리닝할 수 있다.

[0043] 또한, 본 발명에서 상기 동물은 마우스, 래트, 햄스터, 토끼, 기니피그 등 일 수 있으나, 마우스(Mus musculus)가 바람직하며, C57BL/6 등과 같은 마우스를 사용할 수도 있으나, Balb/c 마우스가 더욱 바람직하다. 무엇보다 C57BL/6 마우스의 경우 외부 스트레스로 인한 종양 형성에 대하여 저항성이 강하다고 알려져 있는바, 외부 스트레스와 같은 인자에 대한 종양 형성과 관련한 보다 정확한 생체 반응을 확인할 수 있는 동물모델로서 Balb/c 마우스가 바람직하다.

[0045] 이하, 본 발명에 따르는 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 다만 상기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것이고 본 발명의 권리범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것을 의미하는 것은 아니다.

[0047] <실시예 1>

[0048] ETBF 균주 용액의 제조

[0049] 마우스를 ETBF 균주로 감염시키기 위한 균액을 제조하기 위하여, 우선 WT(Wild type)-ETBF 균주를 Ca^{2+} , Mg^{2+} 이 없는 PBS 용매로 용해시켜 200 μ l 용량의 배양용액으로 만들었다. WT-ETBF 배양용액을 동결 튜브(cryotube) 안에 담아 초저온 냉장고(deep freezer)에서 얼렸다. 이후, 목면봉(Wood applicator)으로 표면을 긁은 다음, 면봉(applicator) 끝에 묻은 균액 고체 덩어리를 미리 만들어둔 BHIA(Brain heart infusion agar)에 배지에 발라 주었다. BHIA는 BHIA 1 L를 기준으로 아가(Agar) 15 g/L, BHI 배지(media) 37 g, 효모 추출물(Yeast extract) 5 g, 시스테인(Cysteine) 0.5 g, 헤민(Hemin) 1 ml (final 농도: 5 μ g/ml)와 항생제(Gentamicin sulfate, 50 mg/ml; Clindamycin, 6 mg/ml)를 포함한다.

[0050] 항생제가 포함된 BHIA에 얼려진 WT-ETBF 균액을 스트리킹(streaking) 해준 다음에 혐기성 챔버(Anaerobic chamber)에 넣었다. 혐기성 팩(Anaerobic pack)(Mitsubishi) 봉지를 뜯어 챔버에 넣어 상태에서 뚜껑을 닫고, 배양기(37 $^{\circ}$ C)에 넣어준 후 2일 동안 기다렸다. 2일의 배양기간이 끝난 뒤, 배양기에 균을 접종한 BHIA를 꺼내서 단일 콜로니(mono-colony)를 형성한 것을 확인한 후, 플라스틱 루프(plastic loop)를 이용하여 단일 콜로니를 취한 후에, BHIB(Brain heart infusion broth)에 접종시켰다. BHIB는 BHIB 1 L를 기준으로 BHI 배지(media) 37 g, 효모 추출물(Yeast extract) 5 g, 시스테인(Cysteine) 0.5 g, 헤민(Hemin) 1 ml (final 농도: 5 μ g/ml)와 항생제(Gentamicin sulfate, 50 mg/ml; Clindamycin, 6 mg/ml)로 구성된다.

[0051] 즉, BHIA에서 자란 WT-ETBF 단일 콜로니를 BHIB에 접종시킨 후, 혐기성 챔버에 넣고 이틀 동안 배양기에 넣어두었다. WT-ETBF가 자란 BHIB는 broth가 탁해진 것을 확인하고 꺼냈다.

[0052] 24개의 미량 원심분리기 튜브에 균이 자란 broth를 1.5 ml씩 피펫(pipet)으로 분주한 다음에 튜브의 뚜껑을 닫아주고, 원심분리기 장비에 넣어 원심분리를 시켜주었다(12000 g, 30min, 20 $^{\circ}$ C). 원심 분리가 끝난 뒤 튜브를 장비로부터 꺼내고 미생물을 다룰 수 있는 벤치(bench) 안에 튜브를 넣고, 생성된 펠렛(pellet) 이외에 상층액을 빈 코니칼 튜브(conical tube)에 덜었다.

[0053] 고착화된 펠렛은 쉽게 바닥에서 떨어지지 않으므로, 500 μ l 용량의 Ca^{2+} , Mg^{2+} 이 없는 PBS를 피펫팅(pipetting)하여 2개의 튜브 안에 존재하는 2개의 펠렛을 1개의 튜브로 농축하였다. 농축된 12개의 미량 원심분리기 튜브 안에 담긴 총 6 ml WT-ETBF 균 농축액을 50 ml 코니칼 튜브 안으로 옮긴 다음에 뚜껑을 닫아주고, 이렇게 균액을 완성하면, 3시간 안에 동물에 감염시켜 주었다. 위 방법으로 ETBF 균액을 만들면, 균의 농도는 평균적으로 $1 \times 10^{8-9}$ CFU(colony forming unit)/ml 농도로 만들어졌다.

[0055] <실시예 2>

[0056] AOM 없이 ETBF 및 DSS로 유도된 대장암 동물모델의 제조와 효과 확인

[0057] <2-1> AOM 없이 ETBF 및 DSS로 유도된 대장암 동물모델의 제조

[0058] 기존에 대장암 동물모델 제조시 필수적으로 사용되는 아зок시메탄(Azoxymethane) 없이 장내 세균인 ETBF와 DSS(Dextran sulfate sodium) 만으로 대장용종 및 종양이 온전히 형성될 수 있는지 실험해보기 위하여, 본 발명

에 따른 동물모델(실험군)로 마우스에 ETBF와 DSS를 처리하였고, 대조군으로 DSS 단독처리한 그룹, 장내 세균 단독감염 그룹으로 나누어 실험을 진행하였다.

[0059] 본 발명에 따른 실험군의 제조는 하기의 방법으로 진행하였고, 대조군 중 DSS 단독처리 그룹은 하기의 방법에서 DSS 처리 과정만, 장내 세균 단독 감염그룹은 하기의 방법에서 장내 상재균인 ETBF 감염 과정만을 제외하고 나머지 과정은 동일하게 진행하였다.

[0060] 8~10주령 Female Balb/c 마우스를 동물 시설에서 1주 동안 유지시켜 준 후, 실험 시작일로부터 2일 뒤에 기존의 음수였던 멸균된 1차 증류수(autoclaved 1' DW를 항생제(Gentamicin sulfate, 300 mg/liter; Clindamycin, 100 mg/liter)가 포함된 멸균된 1차 증류수로 교체해 주어 12일간 음용하게 하였다. 그리고 그 이후에는 아무것도 포함되지 않은 순수한 멸균된 1차 증류수를 7일간 음용시켰다.

[0061] 실험 시작일로부터 7일 뒤에 상기 실시예 1에서 제조한 $1 \times 10^{8-9}$ CFU(colony forming unit)/ml 농도의 WT-ETBF 균주(*B. fragilis* 86-5443-2-2)의 균액 200 μ l를 존대(Inoculation needle)를 이용하여 구강접종 하였다. 위 방법에서 사용된 WT-ETBF 균주는 항생제인 클린다마이신(clindamycin) (HOSPIRA) 및 젠타마이신(gentamicin) (Cellgro)에 자연 내성 성질을 가지고 있다.

[0062] 상기 순수한 멸균된 1차 증류수를 7일간 음용시킨 후, 즉 실험 시작일로부터 21일이 지난 후에, 하기 사이클(cycle)을 3번 반복한다. 마우스에게 사료는 Harlan 2018s 사료로 처음부터 끝까지 부족하지 않도록 충분히 공급해주었다.

[0063] ● 1 사이클(cycle): 텍스트란 설페이트 소듐(Dextran sulfate sodium, DSS)(MP biochemical)을 멸균된 1차 증류수를 용매로 하여 1% (w/v) 농도의 DSS 용액으로 만든 다음 이를 5일간 투여하였다. 이후 아무것도 용해되지 않은 멸균된 1차 증류수를 16일 동안 투여하였다. 1 사이클은 총 21일로 구성된다.

[0064] 마지막 3번째 사이클이 끝나는 날, 즉 실험 시작일로부터 84일째 되는 날에 마우스를 CO₂를 이용하여 안락사시켜 주고 마우스 대장을 적출하여 대장에 생성된 용종을 확인하였다.

[0066] <2-2> AOM 없이 ETBF 및 DSS로 유도된 대장암 동물모델의 대장용종 확인

[0067] 상기 <2-1>에서 제조한 실험군 및 대조군 마우스들에서 적출한 대장에서 형성된 대장용종의 수와 크기를 관찰하였다. 그 결과는 실험군으로서 본 발명에 따라 장내 상재균인 ETBF 균주와 DSS를 처리한 마우스의 경우, 도 2에서와 같이, 대장 내 용종이 형성되었음을 확인할 수 있었다. 그러나 대조군으로서 아무것도 처리하지 않은 마우스(sham), DSS만 단독처리한 마우스, ETBF 균주만 단독감염시킨 마우스에서는 도 3에서와 같이, 대장 내 용종이 발생하지 않았다.

[0068] 또한, 각 마우스 대장에 존재하는 용종의 수(A)와 발생률(B)을 구체적으로 기록한 결과, 도 4에서와 같이, 본 발명에 따라 ETBF와 DSS를 함께 처리한 마우스에서는 1~2개 정도의 대장용종이 발생했으며 용종 형성 비율은 72%에 달하였다. 그러나 3개의 대조군에서는 모두 용종이 발생하지 않아 발생율은 0%였다.

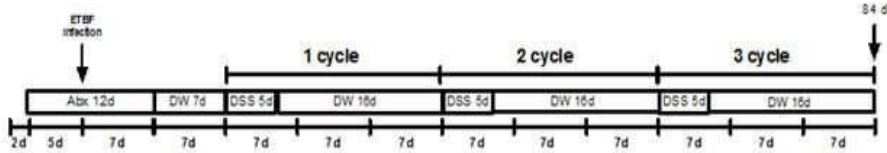
[0069] 또한, 본 발명자들은 좀 더 정확하게 본 발명이 대장 조직에 어떠한 변화를 유도하는지 확인하기 위하여, 실험군 및 대조군 마우스의 대장을 절단하고, 그 단면을 H&E(hematoxylin & eosin) 염색법으로 염색한 후 조직학적 모습을 현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 실험군(WT-ETBF+DSS) 마우스의 대장 내 형성된 대장용종의 모습을 살펴보면, 도 5에서와 같이, 대장 점막 조직 내 심한 궤양과 장 상피세포의 구조적 변형, 면역세포들의 침윤 현상을 보이는 염증성 용종 병변이 관찰되었고, 무엇보다 대장암으로 진행할 가능성이 높아 반드시 제거해야 하는 용종인 선종성 용종 병변이 관찰되었다. 즉, ETBF 감염 및 DDS 처리를 통해 대장염은 물론 대장암 병변을 보이는 대장용종의 발생이 유도됨을 확인할 수 있었다.

[0070] 반면에, 대조군들의 경우는 도 6에서와 같이, 아무것도 처리하지 않은 그룹에서는 어떠한 염증이나 병변이 발견되지 않았고, ETBF 단독감염 그룹에서는 염증성 병변은 발견되었으나 종양 병변은 발견되지 않았으며, DSS 단독처리 그룹에서도 간헐적으로 염증 병변이 관찰되나 역시 종양 병변은 발견되지 않았다.

도면

도면1

Experimental protocol (12주)



- 사용된 마우스 strain 타입:
Balb/c female (8~10주령) 사용

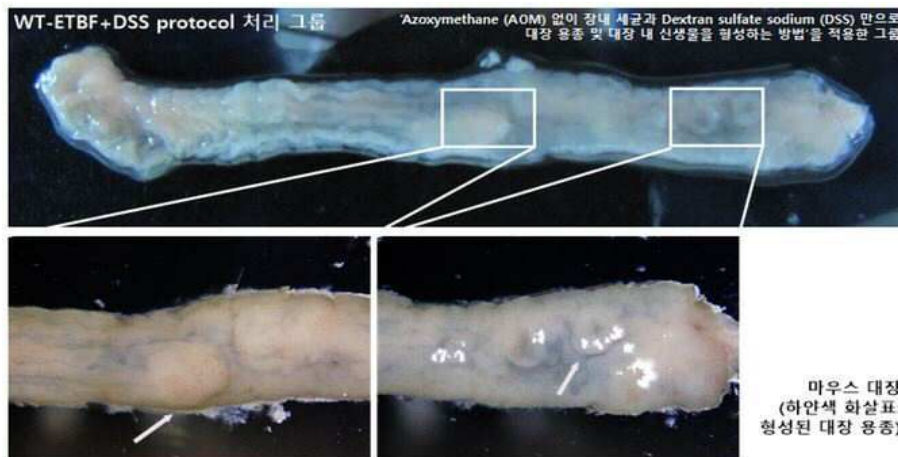
D; day, DW; distilled water
Abx: clindamycin and gentamicin가 포함된 항생제 물; clindamycin (100 mg/liter) and gentamicin (300 mg/liter)

- ETBF infection:
1 x 10⁸~9 CFU/ml 농도로 균액 (200ul) 구강 내 감염
사용한 ETBF 균주; *B. fragilis* 86-5443-2-2

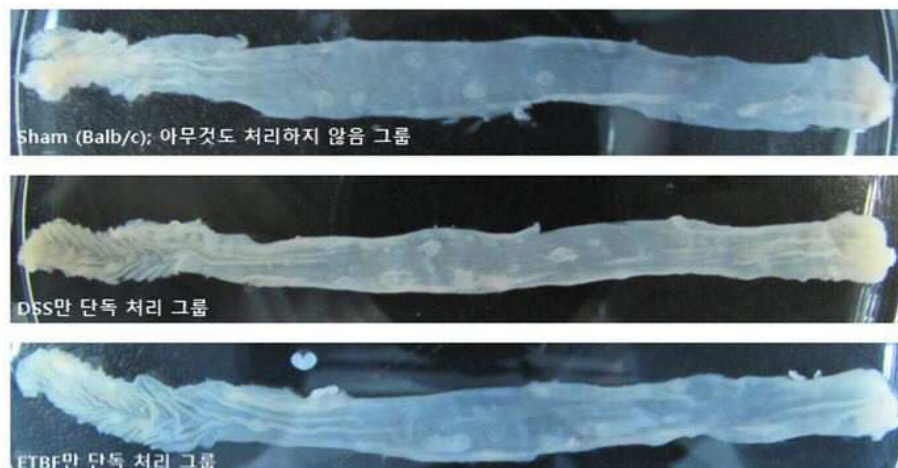
- Dextran sulfate sodium (DSS):
1% (w/v) 농도로 autoclaved 1' DW를 용매로 DSS 용액을 만든 다음 protocol에 명시된 대로 처리
(MP biochemical회사 제품 사용)

*다른 비교그룹은 위 방법에 들어가는 성분 (WT, ETBF, DSS)중 1개만 위와 같이 처리해주고 나머지는 동일함. Sham group은 아무것도 처리해 주지 않은 그룹을 지칭함.

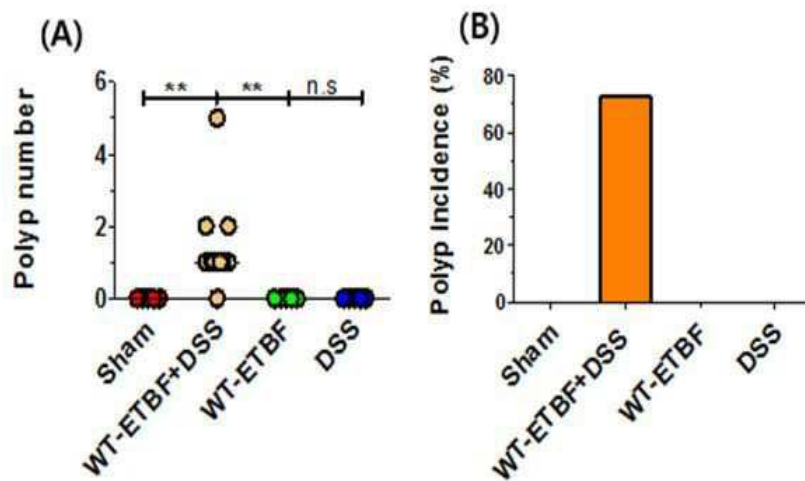
도면2



도면3



도면4



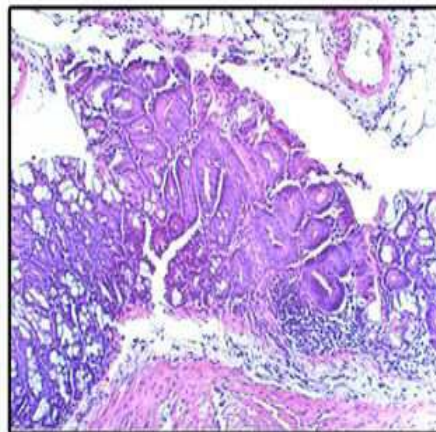
도면5

* WT-ETBF+DSS protocol 처리 그룹

Inflammatory polyp (염증성 용종)



Adenomatous polyp (선종성 용종)



도면6

