

8190201-01

면역능 평가를 위한 영양유전체적
유전자 모듈 바이오마커 발굴

2020

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)

농식품연구성과후속지원사업 2020년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003
254-01

면역능 평가를 위한 영양유전체적 유전자 모듈 바이오마커 발굴

2020.09.04

주관연구책임자 / 권재열

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “**농식품연구성과후속지원사업**”(개발기간 : 2019. 05. 10 - 2020. 05. 09)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 09. 04.

주관연구책임자 : 권재열(개인)



국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의
합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	819021-01	해 당 단 계 연 구 기 간	2019. 05. 10 - 2020. 05. 09 (12개월)	단 계 구 분	2019. 05. 10 - 2020. 05. 09 (1차년도)/2019. 05. 10 - 2020. 05. 09 (1차년도)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농식품연구성과후속지원사업			
연구과제명	대 과 제 명	면역능 평가를 위한 영양유전체적 유전자 모듈 바이오마커 발굴			
	세부 과제명	면역능 평가를 위한 영양유전체적 유전자 모듈 바이오마커 발굴			
연구책임자	권재열	해당단계 참여연구원 수	총: 3명 내부: 3명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부:70,000천원 민간: 천원 계:70,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 3명 내부: 3명 외부: 명	총 연구개발비	정부:70,000천원 민간: 천원 계:70,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(개인)권재열			참여기업명:	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: 충남대학교 산학협력단			연구책임자: 송익찬	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	보안, 1) 특허등록이 아직 이루어지지 않음
-------------------------	--------------------------

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

보고서 면수

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p><연구목적></p> <ul style="list-style-type: none"> ■ 천연복합물의 성격을 가진 면역식품소재의 면역조절기능 평가 유전자 모듈 확인 ■ 수지상세포기반 면역식품소재 면역능 평가 시스템의 영양유전체학적 근거 확립 ■ 표준면역식품소재 면역능지수의 영양유전체학적 근거 규명 <p><연구내용></p> <ul style="list-style-type: none"> ■ 면역능지수 평가법에 기반하여 표준 면역식품소재 선정 ■ 면역능지수 기반 면역식품소재의 면역능 평가 프로그램 개발 ■ 전사체오믹스를 통해 표준면역식품소재에 의한 수지상세포 유전자발현대용량 정보 확보 ■ 표준면역소재에 의한 유전자발현에 대한 시스템 생물학적 분석 ■ 면역식품소재의 면역능과 상관관계를 보이는 유전자 모듈 분석 및 확인 																																						
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 천연복합물의 성격을 가진 면역식품소재의 면역조절기능 평가 유전자 모듈 발굴 ■ 면역식품소재에 대한 영양유전체학적 면역능 평가법 개발을 위한 면역유전자 정보 확보 ■ 면역능지수 기반 면역식품소재의 면역능 평가 프로그램 개발 <p><예상되는 연구개발성과 유형></p> <table border="1" data-bbox="416 965 1406 1227"> <thead> <tr> <th rowspan="2">구분</th> <th rowspan="2">논문</th> <th rowspan="2">특허</th> <th rowspan="2">보고서 원문</th> <th rowspan="2">연구 시설 · 장비</th> <th rowspan="2">기술 요약 정보</th> <th rowspan="2">소프트 웨어</th> <th rowspan="2">화합물</th> <th colspan="2">생명자원</th> <th colspan="2">신품종</th> </tr> <tr> <th>생명 정보</th> <th>생물 자원</th> <th>정보</th> <th>실물</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>예상성과 (N/Y)</td> <td>Y</td> <td>Y</td> <td>Y</td> <td>N</td> <td>N</td> <td>Y</td> <td>N</td> <td>N</td> <td>N</td> <td>N</td> <td>N</td> </tr> </tbody> </table>											구분	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 · 장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종		생명 정보	생물 자원	정보	실물	예상성과 (N/Y)	Y	Y	Y	N	N	Y	N	N	N	N	N
구분	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 · 장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종																													
								생명 정보	생물 자원	정보	실물																												
예상성과 (N/Y)	Y	Y	Y	N	N	Y	N	N	N	N	N																												
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 천연복합물 면역식품소재의 면역조절기능 평가 유전자 모듈 정보를 바탕으로 새로운 버전의 영양유전체학적 면역능 평가법을 개발한다 ■ 천연복합물 면역식품소재 면역능 평가의 과학적 기반을 확보하여 식품소재의 기능 평가에 대한 과학적 이해를 제공할 수 있다 ■ 면역능지수 기반 면역식품소재의 면역능 평가 프로그램 개발을 통해 면역식품소재 면역능 라이브러리를 구축한다 ■ 개발한 면역능 평가 시스템을 웹페이지 및 앱 개발을 통한 민간보급 구축 ■ 새로운 면역식품소재 개발 활성화 ■ 면역식품소재의 면역능의 특성과 강도를 객관화, 수치화하여 각 소재들에 대한 면역능을 데이터베이스화하여 식품개발자와 소비자, 정책실행자가 함께 활용하는 면역식품소재 평가 및 개발 플랫폼 개발 																																						
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	영양유전체학	유전자 모듈	면역능 지수	면역식품소재	면역능 평가																																		
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	Nutrigenomics	Gene Module	Immunity Index	Immunity-food	Immunity evaluation																																		

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< 목 차 >

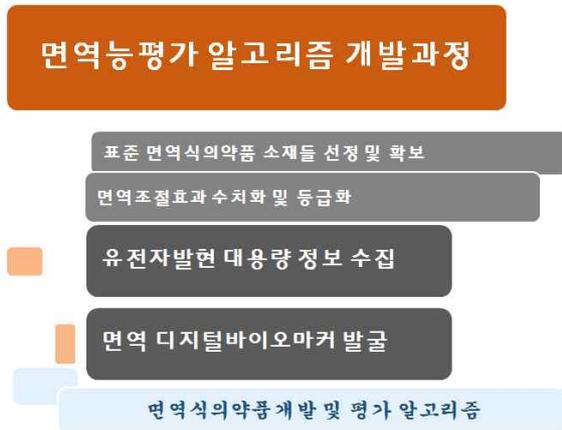
1. 연구개발과제의 개요	1
1-1. 연구개발 목적	
1-2. 연구개발의 필요성	
1-3. 연구개발 범위	
2. 연구수행 내용 및 결과	7
2-1. 연구개발의 추진전략·방법, 추진체계 및 일정	
2-2. 연구 결과	
2-2A 표준면역소재 선정 및 면역지수 산출	
2-2B 표준면역식품소재에 의한 수지상세포 유전자발현대용량 정보 확보	
2-2C 면역억유전자 발굴	
2-2D 면역유전자 모듈 발굴	
2-2E 면역식품소재 면역능 평가 및 비교 소프트웨어 개발	
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	39
4. 연구결과의 활용 계획 등	42

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

□ 최종목표 :

천연복합물의 성격을 가진 면역식품소재의 면역조절기능 평가 유전자 모듈 확인



□ 연구개발내용:

- 1) 국가기관 인증절차를 통해 공인된 면역식품소재들을 천연복합물 표준면역식품소재들로 선정
- 2) 전통적인 면역학적 방법론에 바탕을 둔 시험관내 수치상세포 기반 면역능평가법을 통해서 각 표준면역소재들의 면역조절효과 수치화 및 등급화
- 3) 전사체 오믹스를 통해 각 표준면역소재들에 의한 유전자발현 대용량 정보 수집
- 4) 시스템 생물학적 접근법에 의거하여 면역조절효과를 가리키는 유전자발현 네트워크를 면역 디지털 바이오마커로 발굴
- 5) 전통적 면역학적 방법론과 시스템 생물학적 기법에 의거한 면역식의약품 면역능평가 알고리즘 확립 및 새로운 면역식의약품 개발 기반 확보

□ 연구개발의 독창성:

다중요소 다중타겟 원리로 작용하는 천연복합물 성격의 면역식품소재 작용기전에 기초하여 면역능평가 바이오마커로 면역유전자 모듈을 발굴하여 시스템생물학적 방법론에 기반한 과학적인 근거 확보

□ 연구개발의 과학·기술적 의미:

면역기능성식품 작용기전에 대한 과학적 근거에 기반한 평가법 개발하여 객관적인 식품개발 및 품질관리 가능성

□ 연구개발의 영향:

면역식품소재 개발의 신속화 및 가속화

1-2. 연구개발의 필요성

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

1) 신규 기능성식품소재 개발연구에 영양유전체 활용의 필요성 : 2008년 생명공학기본계획 총괄 추진위원회의 보고에 의하면 국내 식품 관련기술은 다음과 같은 단계에 있음

- . 기술 격차: 5년,
- . 기술 수준: 70%,
- . 강점: 식품 제조 가공 공정기, 제형화 기술, 소재탐색기술, 전통발효식품가공기술,
- . 약점: 기능성평가모델개발기술, 안전성평가기술, 영양유전체기술, 인체효능 평가기술,
- . 주요 연구 분야: 건강기능식품개발, 전통발효식품의 고기능화, 식품안전성 관련 기술,
- . 신기술유망분야 : 신규 기능성식품소재 개발연구, 영양유전체 활용 및 개인맞춤형 식품 개발 연구, 식품나노기술개발

2) 면역기능성식품에 대한 영양유전체학적 평가법은 아직 개발되지 않음

3) (본 연구팀 선행 연구개발과제) 면역능 평가법 개발 : 농림축산식품부의 고부가가치 식품 기술 개발 사업(2015~2018)을 통해 건강 기능식품의 면역식품(소재)에 대한 표준화된 면역능 평가 시스템이 개발됨.

본 연구팀 선행사업 결과 외에 면역식품소재들의 면역효과를 수치화 및 등급화하고 데이터 베이스화할 수 있는 기초 기술 없음

연구제목	본 연구팀 선행연구결과
①시험관내 면역능 검사법 개발	<ul style="list-style-type: none"> •주위 환경으로부터 항원들을 포획하고 위험신호들을 항상적으로 수집하고 통합하여 후천면역과 선천면역을 연결시키면서 강력하게 Immunity와 Tolerance 유도하는 핵심적인 역할을 하는 수지상세포 기반 시험관내 검사법 개발 •면역식품소재가 미치는 효과를 크게 두 과정으로 검사한다. 첫째는, 그 효과가 Immunogenic인지 Tolerogenic인지 조사한다. 두 번째는 수지상세포를 통한 T helper 발달의 방향이 어떤 방향성을 갖는지 그 정도가 얼마인지 조사 •수지상세포의 성숙화과정에 면역식품소재가 미치는 효과 측정 •수지상세포의 활성화 표지 분자들 발현 측정
②동물시험에 대한 면역지표 설정 및 설계법 도출	<ul style="list-style-type: none"> •감염저항성, 과민면역조절, 만성염증조절에 관한 동물실험모델을 설계하여 모델을 세팅하였음. •감염저항성모델은 2가지 동물실험법을 설계하여 첫 번째는 cyclophosphamide모델, 두 번째는 인플루엔자바이러스 감염모델을 설계하여 세팅하였음. 과민면역조절모델로는 대표적인 과민성 기관지염 모델을 세팅하여 기능성소재를 평가하였음. 만성염증조절모델로 자가면역성 류마티스 관절염 모델을 세팅하여 평가하였음. •각 모델에서의 바이오마커는 시험관내 시험법의 결과를 직접적으로 검증할 수 있는 마커를 선정하였으며 이에 따라서 시험관내 시험법의 타당성을 검증하는데 활용하였음.
③면역능 우수 식품소재 수집 (연구팀에서 기 확보 및 수집된 우수 소재	<ul style="list-style-type: none"> •식약처 고시된 기준규격형, 개별인정형, 사업화를 위한 비케이바이오 제안에 따른 면역조절 기능성 소재에 대한 조사 및 수집된 정보로부터 기능성분, 지표성 분, 바이오마커를 중심으로 최종 검토 후보 30종 선정함

DB 활용)	
④표준화된 시험관내 면역능 검사법 확립	<ul style="list-style-type: none"> •BMDC 유도 및 배양과정 표준화 •면역식품소재 처리과정 표준화 •Flow cytometer 방법론에 기초한 수지상세포 성숙화 정도 및 방향 측정 및 분석과정 표준화 •혼합림프구 반응과정 표준화 •Cytokine Beads Array 방법에 의한 여러 싸이토카인 측정 및 분석과정 표준화
⑤동물시험을 통해 시험관내 검사법의 타당성 검증	<ul style="list-style-type: none"> •감염저항성모델을 활용해서 6종의 기능성소재에 대한 평가를 수행하였고 5종의 결과가 시험관내 면역능 평가와 일치하여 시험관내 시험법의 타당성이 매우 높다고 판단됨. •과민면역조절모델을 활용해서 17종의 기능성소재에 대한 평가를 수행하였고 13종의 결과가 시험관내 면역능 평가와 일치하여 시험관내 시험법의 타당성이 매우 높다고 판단됨. •만성염증조절모델을 활용해서 5종의 기능성소재에 대한 평가를 수행하였고 2종의 결과가 시험관내 면역능 평가와 일치하여 시험관내 시험법의 타당성이 상대적으로 낮은 것으로 판단됨.
⑥우수 면역식품(소재) 선정 가이드라인 설계	<ul style="list-style-type: none"> •개발된 시험관 시험법에 의해 도출된 immunogenic한 경향과 tolerogenic한 경향의 기준으로 등급화 하여 우수 면역식품(소재) 선정 및 대표적인 기능성 원료의 기능성분의 종류에 따른 면역능 구분과 등급화를 위한 가이드 제시함
⑦면역능 평가 시스템 구축	<ul style="list-style-type: none"> •면역지수들을 정의하고 측정하여 수량화 및 등급화의 기준으로 확립 •면역능 평가 지수 확립 (면역증진지수 I, II & 면역관용지수 I, II) •각 면역시료들의 면역지수들 값 산출 및 등급화 •표준면역식품소재의 등급화 •개발 면역식품소재의 등급화 및 우수 면역식품소재 선정 •시장에서 유통되는 기능성 면역식품소재 품질 평가 •면역식품소재의 혼합림프구 반응을 통한 T helper 세포 분화 조절 능력 측정 •대식세포 싸이토카인 생성능과 비교 분석 •민간보급 프로세스 구축을 위한 면역능 평가 시스템을 소개하는 웹페이지 및 앱 개발
⑧동물시험을 통한 우수 면역식품(소재) 선정	<ul style="list-style-type: none"> •감염저항성 모델을 통하여 청귤다당의 유효성이 세포와 동물실험을 통해서 검증되었으므로 우수면역능 소재로 판단됨. •과민면역조절 모델을 통하여 더덕, 아삼, 은시호(효소처리포함), 강활의 유효성이 세포와 동물실험을 통해서 검증되었으므로 우수 면역능소재로 판단됨. •만성염증조절 모델을 통하여 아삼, 구아바의 유효성이 세포와 동물실험을 통해서 검증되었으므로 우수 면역능소재로 판단됨.
⑨사례적용을 통한 면역능 평가시스템의 재현성 확인 및 BC 도출	<ul style="list-style-type: none"> •식약처에서 가이드 면역 평가법과 비교를 통한 BC (Benefit-Cost analysis) 도출 하였으며 분석 비용, 시간, 타당성 등 비교를 통한 개발 면역능 평가법 우수성 확인함
⑩ 개발 면역능 평가시스템 민간보급 구축을 위한 초기형 웹기반 프로그램과 스마트폰 앱 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 면역능 평가시스템 소개-시험관내 검사법 및 동물모델 • 건강기능식품 현황 소개 • 면역능 평가시스템을 위한 데이터베이스 구축 • 면역능 평가시스템에 의해 분류한 기능성소재 라이브러리 구축 • 후보 소재의 면역능 평가 프로그램 구축

○ 시장현황

- 1) 자연친화적 웰빙 트렌드에 따른 소비자의 니즈 증가 및 고령화의 가속화 등의 이유로 건강기능성 식품에 대한 수요는 지속적으로 증가하고 있으며, 이에 따라 건강기능성 식품 및 식품소재 산업은 성장 잠재력이 풍부한 시장으로 인식되고 있음.
- 2) 국내 건강기능식품 시장은 선진국보다는 뒤처지기는 하였으나, 평균수명연장 및 생활수준의 향상 등에 따른 삶의 질에 대한 의식향상으로 인한 웰빙 트렌드 형성, 생활습관의 서구화에 따른 질병증가로 인해 건강기능식품에 대한 관심과 수요가 증가하고 있어 관련산업은 지속적으로 발전할 것으로 전망됨.

2) 예상 시장규모

구 분	전전년도	전년도 (2019)
국내(단위: 억원)	건강기능식품 23,500	건강기능식품 25,800
해외(단위: 미화 백만달러)	건강기능식품 145,600	건강기능식품 156,200

○ 지식재산권현황

- 본 연구팀 선행연구결과 지적재산권

구분	출원번호 (등록번호)	출원일자 (등록일자)	출원명칭 (등록명칭)	권리자
등록	10-2018-0034625 (10-1981146)	2018.03.26 (2019.05.16)	수지상 세포를 이용한 면역 소재의 면역증진 효과 평가방법 및 면역 소재스크리닝 방법	권재열 김예은 고은별 선푸름 이재형 최인욱 강성욱 한복경
등록	10-2018-0040319 (10-19157150000)	2018.04.06. (2018.10.31.)	면역기능 증진 활성이 있는 당근박 유래 다당 분획물 및 이의 제조방법	최혁준, 한복경, 박용운, 권재열, 김예은, 선푸름
등록	10-2018-0049329 (10-19050090000)	2018.04.06. (2018.9.28.)	면역기능 증진 활성이 있는 케일박 유래 다당 분획물 및 이의 제조방법	최혁준, 한복경, 박용운, 권재열, 김예은, 선푸름
출원	10-2018-0125684	2018.10.22	수지상세포를 이용한 면역 소재의 면역증진 효과 평가방법 및 면역소재 스크리닝 방법	권재열 김예은 고은별 선푸름 강성욱 이영하
등록	10-2018-0114899 (10-1981147)	2018.09.27 (2019.05.16)	수지상세포를 이용한 면역 소재의 면역증진 효과 평가방법 및 면역소재 스크리닝 방법	권재열 김예은 고은별 선푸름 강성욱 이영하
PCT출원	PCT/KR2019/010689	2019.08.22	수지상세포를 이용한 면역 소재의 면역증진 효과 평가방법 및 면역소재 스크리닝 방법	권재열 김예은 고은별 선푸름 강성욱 이영하

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- 1) 면역기능성식품에 대한 영양유전체학적 평가법은 아직 개발되지 않음
- 2) 본 연구팀 선행사업 결과 외에 면역식품소재들의 면역효과를 수치화 및 등급화하고 데이터 베

이산화하여 소재간 면역능 평가 및 비교할 수 있는 기초 기술 없음

○ 시장현황

1) 건강기능식품 예상 시장규모

구 분	전전년도	전년도 (2019)
국내(단위: 억원)	건강기능식품 23,500	건강기능식품 25,800
해외(단위: 미화 백만달러)	건강기능식품 145,600	건강기능식품 156,200

1-3. 연구개발 범위

□ 연구개발의 목표 및 내용

가. 최종목표

- 천연복합물의 성격을 가진 면역식품소재의 면역조절기능 평가 유전자 모듈 확인

나. 세부목표

- 국가기관 인증절차를 통해 공인된 면역식품소재들을 천연복합물 표준면역식품소재들로 선정
- 전통적인 면역학적 방법론에 바탕을 둔 시험관내 수지상세포 기반 면역능평가법을 통해서 각 표준면역소재들의 면역조절효과 수치화 및 등급화
- 면역식품소재 면역능 평가 및 비교 소프트웨어 개발
- 전사체 오믹스를 통해 각 표준면역소재들에 의한 유전자발현 대용량 정보 수집
- 시스템 생물학적 접근법에 의거하여 면역조절효과를 가리키는 유전자발현 네트워크를 면역 디지털 바이오마커로 발굴
- 유전자 발현 측정을 통해 면역식품소재 면역능을 평가하는데 지표로 사용될 유전자 모듈 확인

다. 연차별 개발목표 및 내용

<1차년도>

□ 연구개발 목표

- 주관연구기관(예비창업자) :
- 위탁연구기관(충남대학교 산학협력단) :
- 국가기관 인증절차를 통해 공인된 면역식품소재들을 천연복합물 표준면역식품소재들로 선정
- 전통적인 면역학적 방법론에 바탕을 둔 시험관내 수지상세포 기반 면역능평가법을 통해서 각 표준면역소재들의 면역조절효과 수치화 및 등급화
- 유전자 발현 측정을 통해 면역식품소재 면역능 평가 지표로 사용될 유전자 모듈 확인

□ 개발내용 및 범위

- 주관연구기관(예비창업자) :

- 위탁연구기관(충남대학교 산학협력단) :

- 면역식품소재 면역능 평가 및 비교 소프트웨어 개발
- 전사체 오믹스를 통해 각 표준면역소재들에 의한 유전자발현 대용량 정보 수집
- 시스템 생물학적 접근법에 의거하여 면역조절효과를 가리키는 유전자발현 네트워크를 면역 디지털 바이오마커로 발굴

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 연구개발의 추진전략·방법, 추진체계 및 일정

□ 연구 추진전략

- 위탁기관(책임자: 송익찬 교수)을 통해 아래 연구내용을 수행함

1. 표준 면역식품 소재를 통한 면역능 바이오마커 탐색 연구

1) 표준 면역식품 소재 선정 기준

- 면역기능을 통해 특허등록이나 기능성 개별인증 등 공인된 기관의 인증을 받음
- 수지상세포 기반 면역능 검사법을 통해 면역증진 혹은 면역관용 효과가 분명하고 동물모델로 그 유효성이 검증됨
- 면역능에 대한 수치화 및 등급화가 진행되어 소재 간 면역능에 대한 객관적인 비교 근거 데이터가 확보 됨

2) 표준면역소재에 대한 수지상세포 전사체오믹스 수행 및 시스템 생물학적 분석

3) 표준면역소재에 기반하여 면역능 측정을 위한 영양유전체적 유전자 모듈 바이오마커 발굴

4) 수지상세포 전사체오믹스 분석을 통해 면역관용 유전자 모듈 확인

2. 면역식품소재 면역능 라이브러리 구축을 위한 면역능지수 기반 면역능 평가 프로그램 개발

□ 연구 방법

1. RNA-seq을 이용한 전사체 정보 생산

- 수지상세포로부터 total RNA (혹은 mRNA) 분리
- RNA 시료의 정량적, 정성적 품질 검증(QC): 농도, BioAnalyzer를 이용한 28S, 18S integrity 등

Illumina TruSeq mRNA sample kit를 이용하여 RNA-Seq 라이브러리 제작

- 시료 당 2 Gb 정도로 RNA-seq 데이터 생산(시료 당 30만원 이내의 비용으로 정보 생산)

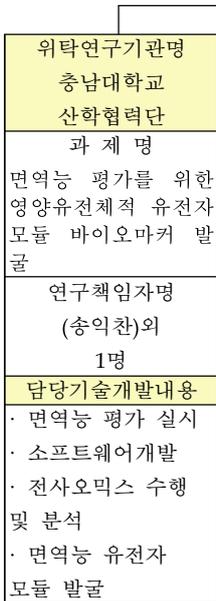
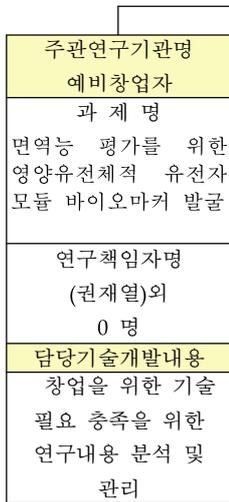
2. 표준분석 과정을 이용한 전사체 정보 분석

- 전사체 정보의 품질 관리: FastQC, Trimmomatic과 같은 분석 프로그램을 사용하여 전체적인 데이터의 품질을 확인하고 low quality base들을 제거함
- STAR (혹은 hisat2) 프로그램을 이용하여 mm10 mouse genome에 mapping
- HTSeq-count 혹은 cufflinks 등의 프로그램을 이용하여 전사체 정량화

□ 연구개발 추진체계

연구개발과제		총 참여 연구원
과제명	면역능 평가를 위한 영양유전체적 유전자 모듈 바이오마커 발굴	주관연구책임자 (권재열)외 총 2명

기관별 참여 현황		
구분	연구기관수	참여연구원수
대기업		
중견기업		
중소기업		
대학	1	2
국공립(연)		
출연(연)		
기타	1	1



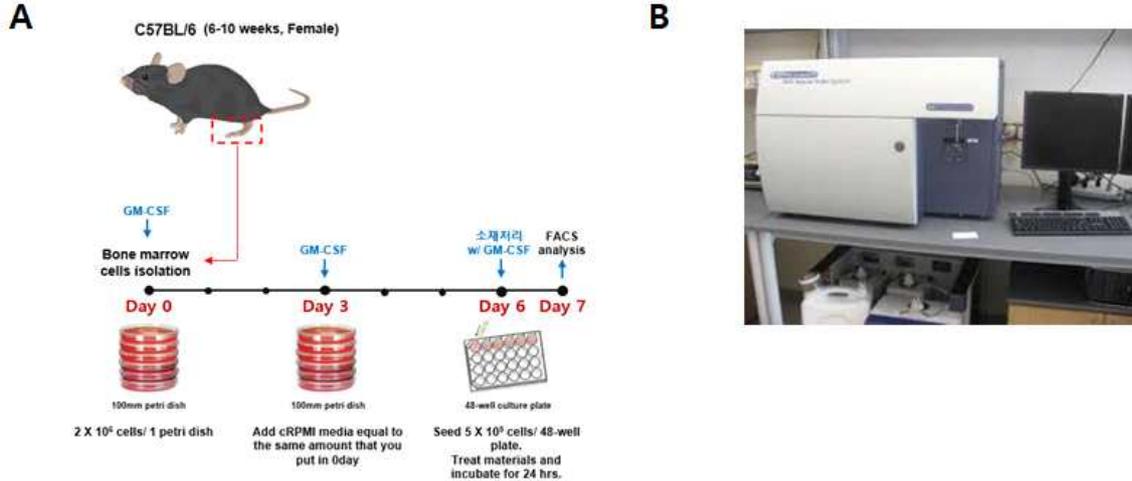
□ 연구개발 추진일정

구분	세부 연구목표	세부 연구개발 내용	평가목표 및 착안점 가중치 (연구비)	추진일정				
				1분기 (1/4)	2분기 (2/4)	3분기 (3/4)	4분기 (4/4)	
1차년도 (2019)	수지상세포기반 면역식품소재 면역능 평가 시스템의 영양유전체학적 근거 확립	(2.1) 면역능지수 평가법에 기반하여 표준 면역식품소재 선정	수지상세포 기반 시험관내 면역능 평가법 실시를 통한 표준면역식품소재 확보	면역증진 혹은 면역관용효과로 인증된 잘 알려진 표준면역소재 10종 이상 선정 및 확보				
		(2.4) 면역능 평가 및 비교 소 프트웨어 개발	면역능지수 평가법에 기반하여 면역능 평가 및 비교 소프트웨어 개발	면역능 라이브러리 구축 및 면역식품소재 비교 평가결과				
		(2.2) 표준면역식품소재에 의한 수지상세포 유전자발현대용량 정보 확보	시험관내 수지상세포에 표준면역소재 처리 전사체오믹스를 통해 표준면역소재에 의한 유전자변화 정보 확보	표준면역식품소재 전사체오믹스 결과				
		(2.3) 표준면역식품소재 면역능지수의 영양유전체학적 근거 규명	유전자발현에 대한 시스템 생물학적 분석 면역 식품소재의 면역능과 상관관계를 보이는 유전자 모듈 분석 면역 유전자 모듈 평가 적용	전사체오믹스 대용량 정보 시스템생물학적 분석 전사체오믹스 대용량 정보 시스템생물학적 분석에 의거한 면역능 유전자 모듈 확인 신면역식품소재 스크리닝				

2-2. 연구 결과

2-2A 표준면역소재 선정 및 면역지수 산출

그림 A. 수지상세포의 준비 및 면역식품소재 처리



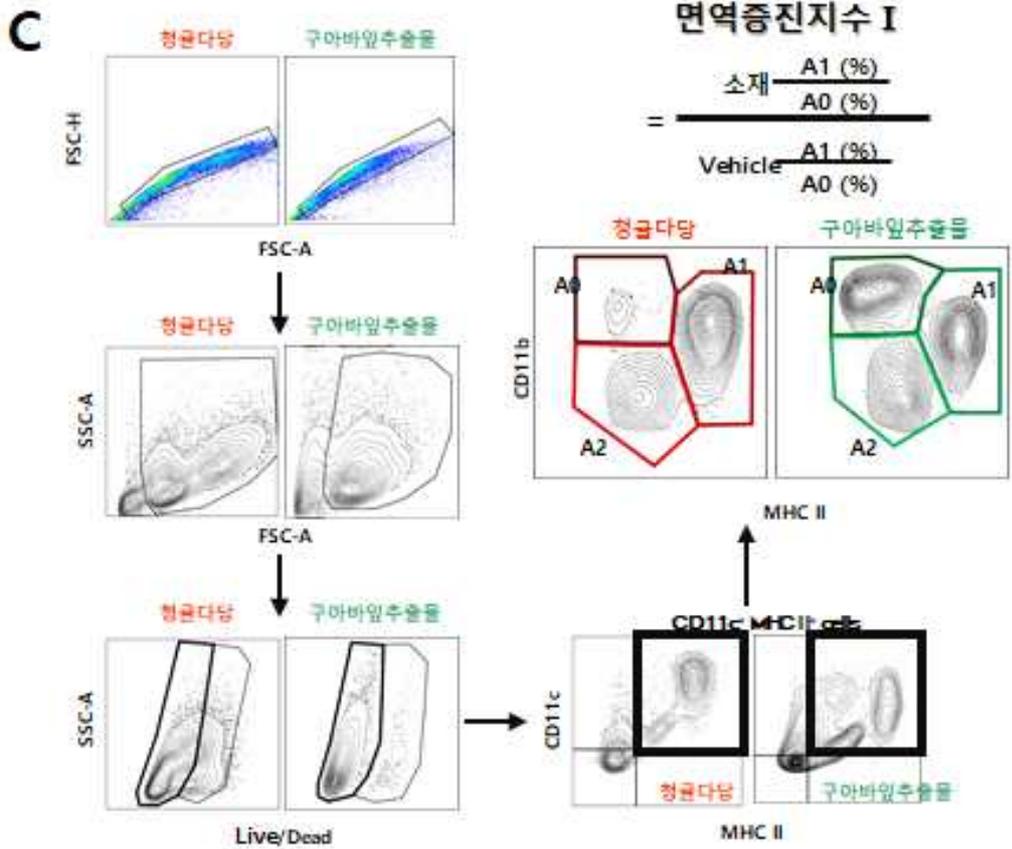
6~10주령의 암컷 C57BL/6 마우스의 대퇴골로부터 통상의 방법에 따라 골수세포를 획득하였다. 획득된 골수세포를 논문에 상술된 조성의 배지에 혼합하고, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 6일 배양하여 수지상세포로 분화를 유도하였다. 배양 3일째 배지를 보충해 주고, 6일째 부착되지 않은 분화된 수지상세포를 회수하고 원심분리하였다(1500rpm, 5분). 분리된 세포를 동일 배지에 현탁하고 48-well plate에 5×10⁵개가 되도록 분주하였다.

이때 상기 대상 소재 추출물의 보관액을 상기 배지로 최종농도가 100~1000 µg/ml가 되도록 희석하여 농도별로 처리하고 동일한 조건에서 24시간 배양한 후 부착되지 않은 세포를 수거하여 유세포분석을 수행하였다. 세포독성이 심한 소재의 경우에는 최종농도를 낮추어가며 실험을 진행하였다.

그림 B. 유세포분석

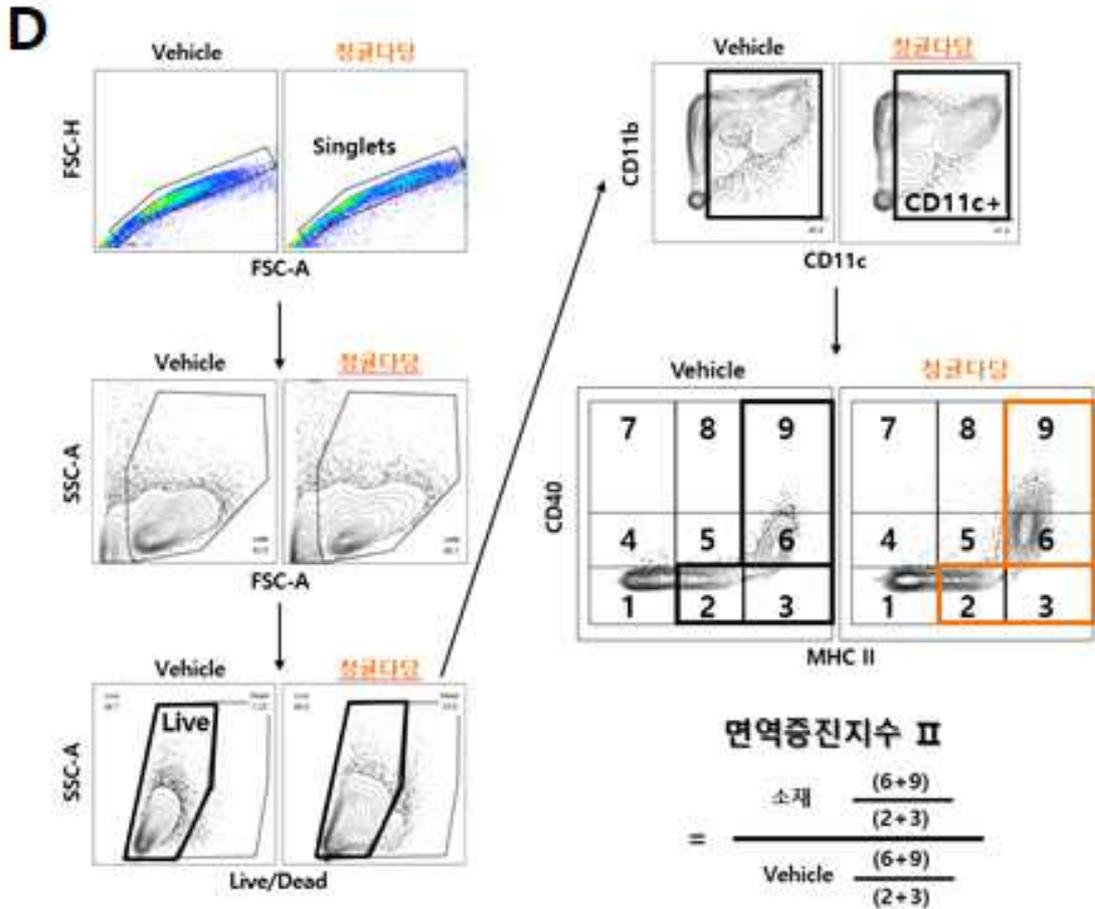
Live/Dead staining을 통해 수지상세포의 생존률을 확인하고, 수지상세포의 positive marker인 MHCII와 CD11c, 수지상세포 표면에 발현하는 공동활성인자 CD40, CD80 및 억제인자 PD-L1, PD-L2 안티바디를 사용하여 세포를 염색한 후 유세포분석장치 (FACS Canto II, BD bioscience, 미국)를 이용하여 분석하였다.

그림 C. 면역증진지수 I 의 정의 및 수치화



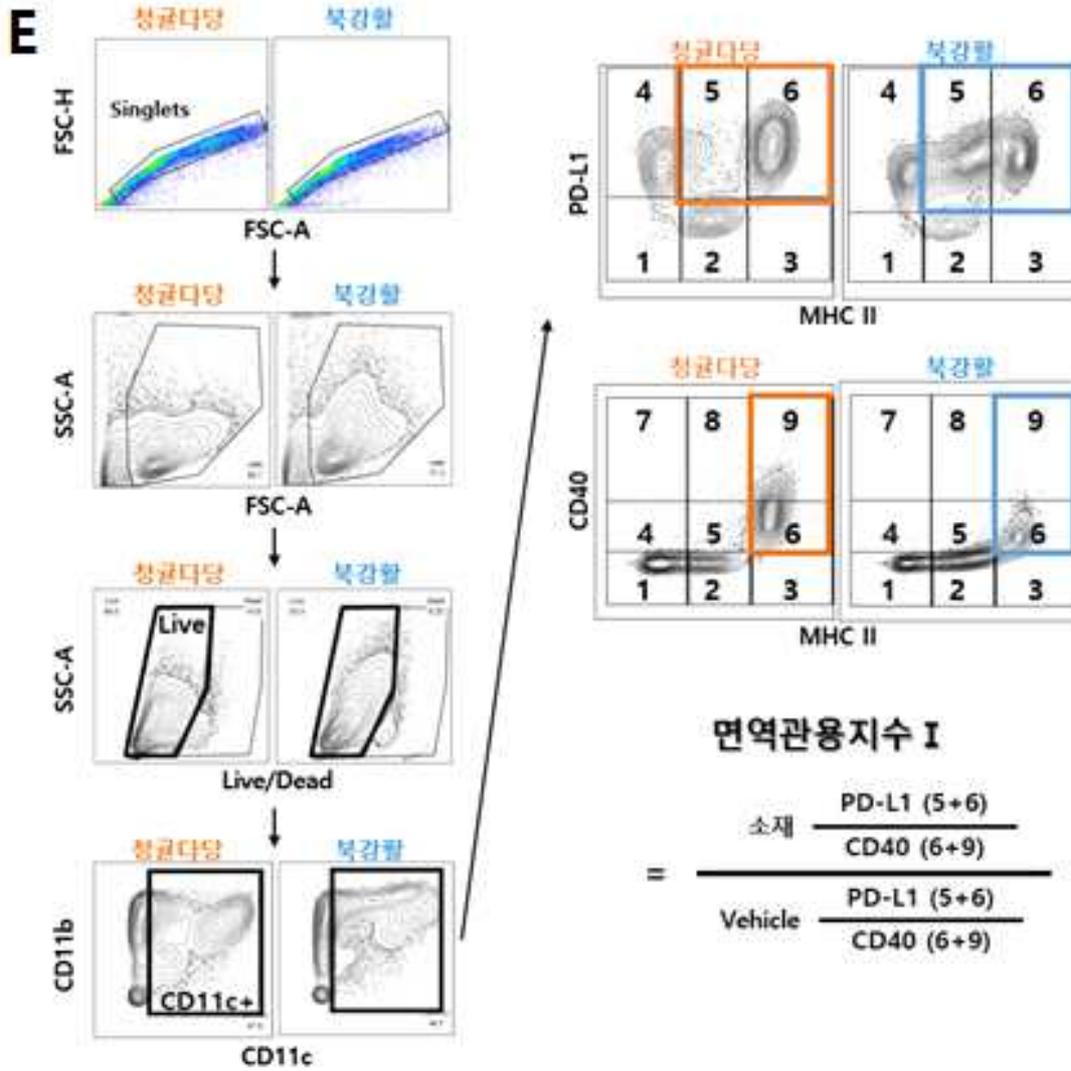
살아있는 MHCII⁺ CD11c⁺ 수지상 세포에서 MHCII 대비 CD11b의 발현을 확인하여 구획(A0, A1, A2)나누기를 실시한 후 소재와 vehicle 처리에 의한 각 A0와 A1의 비율 (A1/A0)을 얻고, vehicle에 의한 A1/A0에 대한 소재처리에 의한 A1/A0를 면역증진지수 I (The Immunogenic Index I)로 정의하고 각 소재처리농도에 따른 면역증진지수I를 수치화하여 그래프로 나타내었다.

그림 D. 면역증진지수II의 정의 및 수치화



항원특이적인 수지상세포의 기능을 수행하기 위해서는 MHC II의 발현이 있어야하는데, 미성숙수지상세포의 경우에는 이 발현이 낮고 성숙세포의 경우에는 그 발현이 증가한다는 사실에 근거하여 살아있는 CD11c+ 수지상세포를 CD40와 MHC II의 발현양태에 기초하여 여러 그룹으로 나누었다. MHC II발현은 있으나 T cell activation 촉진 신호로 작용하는 CD40분자의 발현이 없는 그룹 (그림12, 2+3 그룹)과 MHC II가 강하게 발현되어 있으면서 CD40의 발현도 강한 그룹 (그림12, 6+9 그룹)을 나누어 각각 미성숙수지상세포와 성숙수지상 세포군으로 잠정 나누고 그들 간의 비율을 면역증진지수II (The Immunogenic Index II)로 정의하고, 각 소재처리농도에 따른 면역증진지수II를 수치화하여 그래프로 나타내었다.

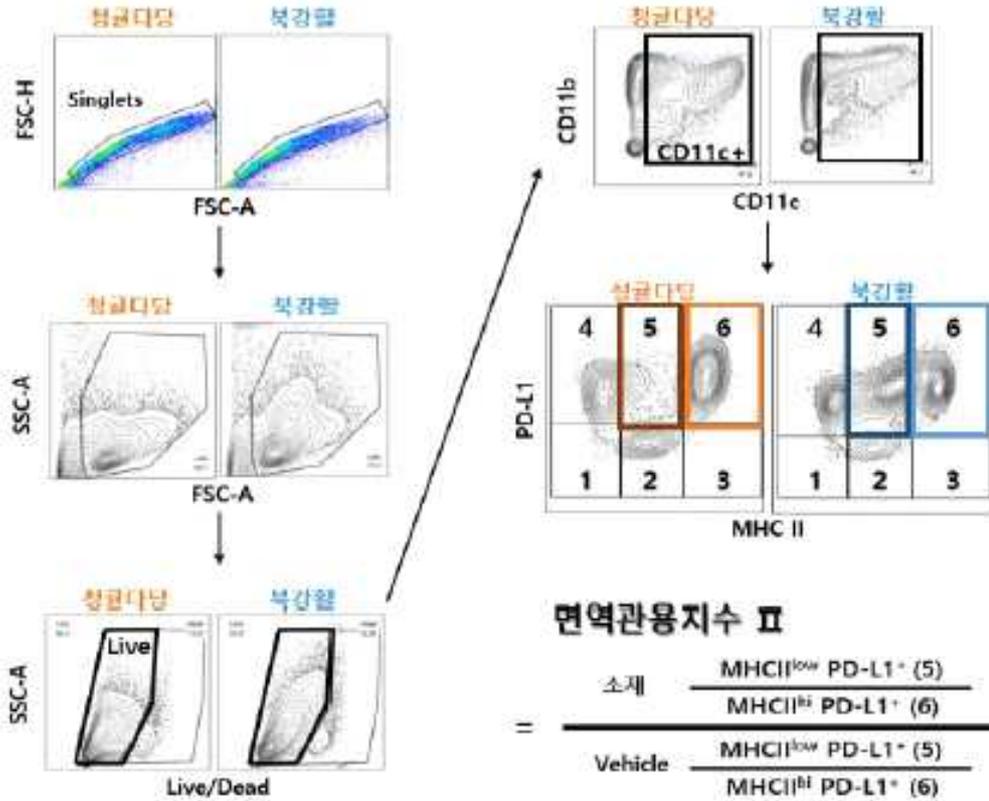
그림 E. 면역관용지수I의 정의 및 수치화



항원특이적 항원제시기능에 의존한 수지상세포의 면역기능을 검사하기 위해 면역증진분자 CD40과 면역억제분자 PD-L1발현과 MHCII발현에 기초하여 각각 CD11c+ 수지상세포를 분획하였다. 면역증강기능의 MHCIIhiCD40+세포군(6, 9 그룹)에 대한 면역억제기능의 MHCII+PD-L1세포군(5, 6 그룹)의 비율을 vehicle에 의한 비율로 나누어 면역관용지수I (The Tolerogenic Index I)로 정의하고, 각 소재처리농도에 따른 면역증진지수II을 수치화하여 그래프로 나타내었다.

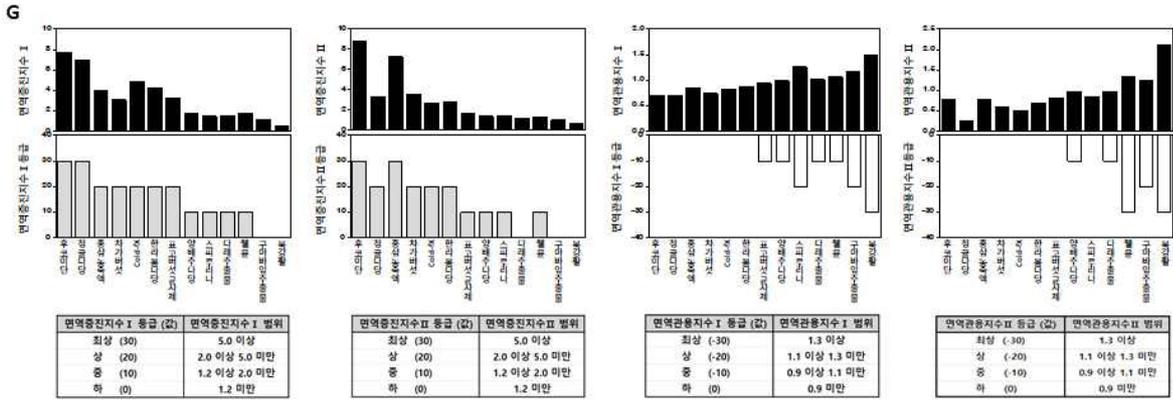
그림 F. 면역관용지수I의 정의 및 수치화

F



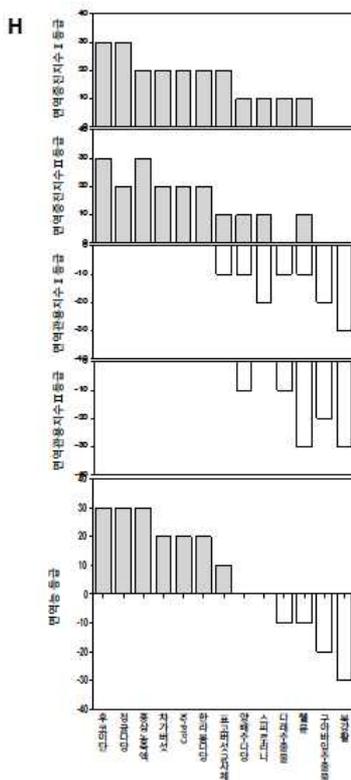
항원특이적 항원제시기능에 의존한 수지상세포의 면역기능을 검사하기 위해 면역억제분자 PD-L1발현과 MHCII발현에 기초하여 각각 CD11c+ 수지상세포를 분획하였다. MHCIIhiPD-L1+세포군(6 그룹)에 대한 MHCIIloPD-L1+세포군(5 그룹)의 비율을 vehicle에 의한 비율로 나누어 면역관용지수II (The Tolerogenic Index II)로 정의하고, 각 소재처리농도에 따른 면역관용지수II를 수치화하여 그래프로 나타내었다.

그림 G. 표준 면역식품소재들의 면역증진지수 및 면역관용지수 등급화



표준 면역식품소재들 면역증진지수와 면역관용지수값을 얻어 표에 표기된 것처럼 각각 4등급(최상, 상, 중, 하)으로 나누고, 최상, 상, 중, 하 각 등급에 대해 면역증진지수에는 30, 20, 10, 0 각각 그래프값을 부여하고, 면역관용지수에는 -30, -20, -10, 0 각각 부여하여 그래프로 나타내었다. (위 : 각 소재의 면역증진지수 또는 면역관용지수를 나타낸 그래프, 아래 : 면역증진지수 및 면역관용지수의 등급 그래프).

그림 H. 표준 면역식품소재들의 면역능 등급 산출



각 표준 면역식품소재들의 면역증진지수값과 (모두 더하여 2로 나누고 반올림하여 10단위로 만들어) 면역관용지수값을 합하여 각 소재들의 면역능 등급을 얻었다.

2-2B 표준면역식품소재에 의한 수지상세포 유전자발현대용량 정보 확보

<연구 방법>

1. 수지상 세포 배양과 면역식품소재 처리

C57BL/6 마우스의 대퇴골로부터 획득된 골수세포를 RPMI 에GM-CSF가 첨가된 배지에서 6일 배양하여 수지상세포 (BMDC) 로 분화를 유도하였다. 배양 3일째 배지를 보충해 주고, 6 일째 부착되지 않은 분화된 수지상세포를 회수하여 면역소재 추출물을 적정 농도로 처리하였다. 24시간 배양한 후 수지상세포를 수거하였다.

2. RNA-seq을 이용한 전사체 정보 생산

수지상세포로부터 total RNA를 Trizol 추출법으로 분리하고 RNA 시료의 정량적, 정성적 품질 검증(QC)을 위해 BioAnalyzer로 RNA 농도와 28S, 18S RNA integrity를 측정하였다. TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit 사용하여cDNA library를 만든 다음 Illumina NGS sequencer (Next Generation Sequencing, HiSeq X Ten 혹은 NovaSeq 6000) 로 염기서열을 읽었다. 생성된 raw data (fastq 파일)의 퀄리티를 체크하고, Trim galore! program으로 adapter 시퀀스, low quality base 등을 제거(trimming)하고 전체적인 데이터의 품질을 확인한 후, 정리된 sequencing data를 STAR 프로그램을 이용하여 마우스 표준 genome mm10에 배열하여mapping하였다. 면역식품소재를 처리한 두 세트의 수지상세포 (n = 2) 유전자 변화를 DMSO 그룹을 대조군으로 하여Differentially Expressed Genes (DEG) 양상을 분석하였다.

3. 면역능 지수와 유전자 발현 변화 상관관계 및 대사경로 분석

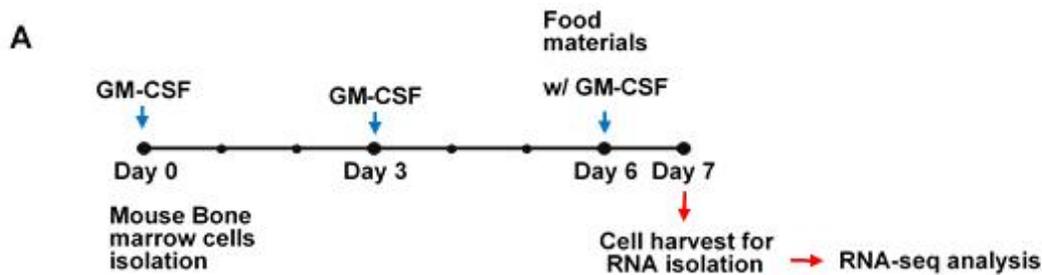
유세포 계측기(Flow cytometry)를 사용한 면역능 평가법 선행연구를 통해서 표준면역소재들의 면역조절효과를 수치화 하였고, R language의scale 함수로 normalize 한 후 지수 I 과 II 의 평균값을 상관관계 분석에 사용하였다. 식품소재의 면역능 지수와 RNA-seq 데이터를 R package로 비교 분석, 면역증진지수 및 면역관용지수와의 연관성을 나타내는 Pearson correlation r값과 p.value를 구하였다. 면역증진과 면역 용 모두에서 $p < 0.01$ 을 만족하는 유전자들을 선별하여 Enrich 프로그램 (<https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>)과 Pathview 프로그램(<https://pathview.uncc.edu/>)으로 Gene ontology 혹은 pathway를 예측 분석 하였다.

<연구결과>

C57BL/6 마우스의 대퇴골로부터 획득된 골수세포를 RPMI에 GM-CSF가 첨가된 배지에서 6일 배양하여 수지상세포(BMDC)로 분화를 유도하였다. 배양 3일째 배지를 보충해 주고, 6일째 부착되지 않은 분화된 수지상세포를 회수하여 면역소재 추출물을 각각 적정한 농도로 처리하였다. 24시간 배양한 후 수지상세포를 수거하여 Trizol 용액으로 RNA를 분리, RNA-seq으로 유전자 발현을 분석하였다 (그림 1).

면역식품소재를 처리한 수지상세포에서 분리한 RNA로부터 cDNA library를 만든 다음 (TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit 사용), Illumina NGS (Next Generation Sequencing, HiSeq X Ten 혹은 NovaSeq 6000)로 염기서열을 읽었다 (그림 2). 생성된 raw data (fastq 파일)의 퀄리티를 체크하고, adapter 시퀀스 등을 제거(trimming)한 정리된 sequencing data를 마우스 표준 genome mm10에 배열하여 그 시퀀스가 어떤 유전자에 해당하는지 mapping하였다 (그림 3A).

정보 생산 결과 평균적으로 22M - 31M reads 정도의 데이터를 얻었고, 91.6 - 93.1% 정도의 reads가 mouse reference genome에 mapping되는 결과를 얻었다 (그림 3B).



B

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

그림 1. 표준면역식품소재들의 면역지수 결정

(A) 배양 6일째의 마우스 골수세포유래 수지상세포 (BMDC)에 면역식품소재를 24시간 처리한 후 세포를 수거, RNA를 추출, RNA-seq으로 유전자 발현분석

(B) 표준면역소재와 처리농도. 유세포 계측기(Flow cytometry)를 사용한 선행연구에서 확립한 시험관내 수지상세포 기반 면역능 평가법을 통해서 선별된 표준면역소재들의 면역조절효과를 면역증진지수 I, II, 면역관용지수 I, II로 수치화하였다. R의 scale 함수로 normalize한 후 면역지수 I 과 II의 평균값을 향후 상관관계 분석에 사용함

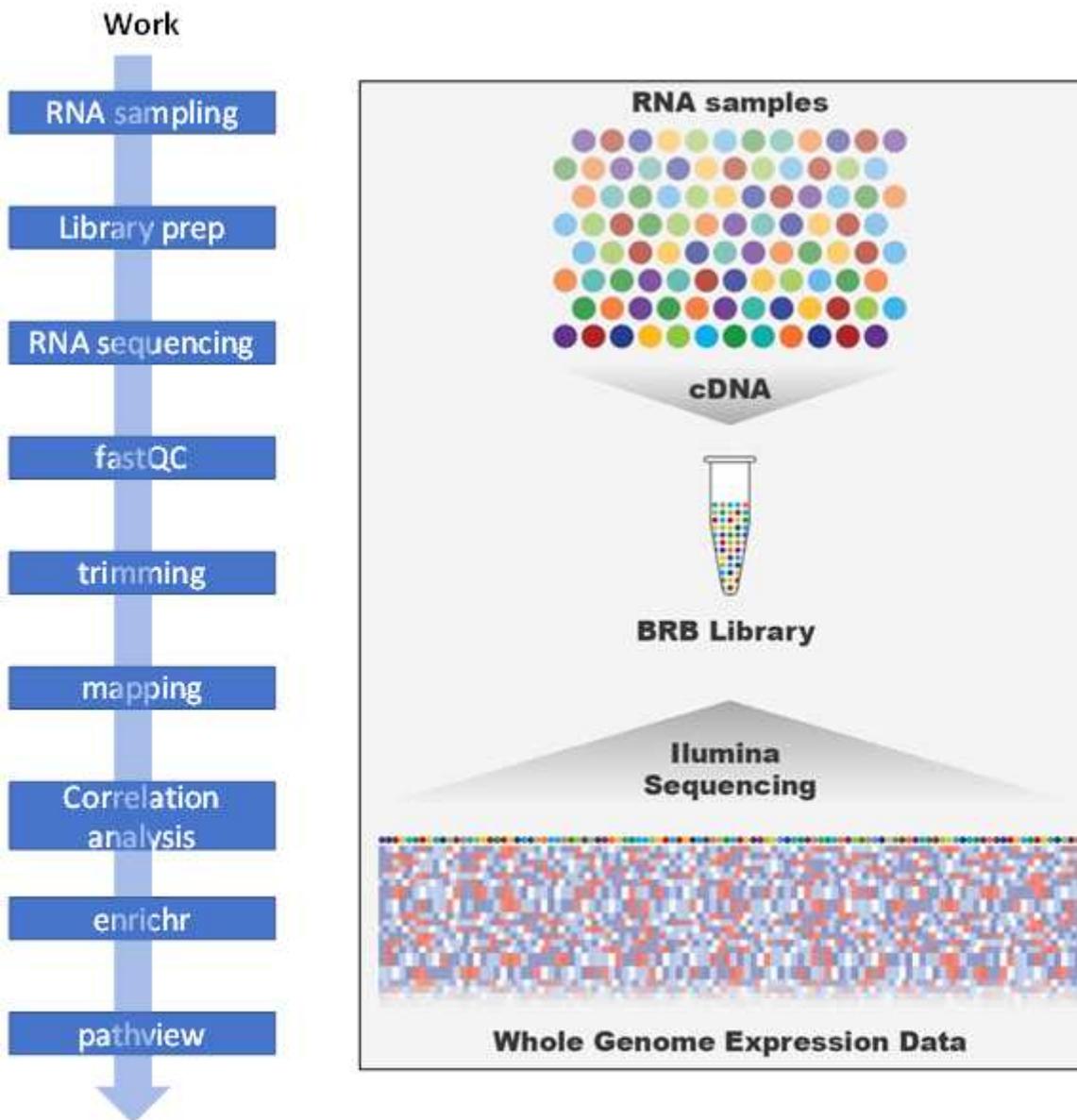
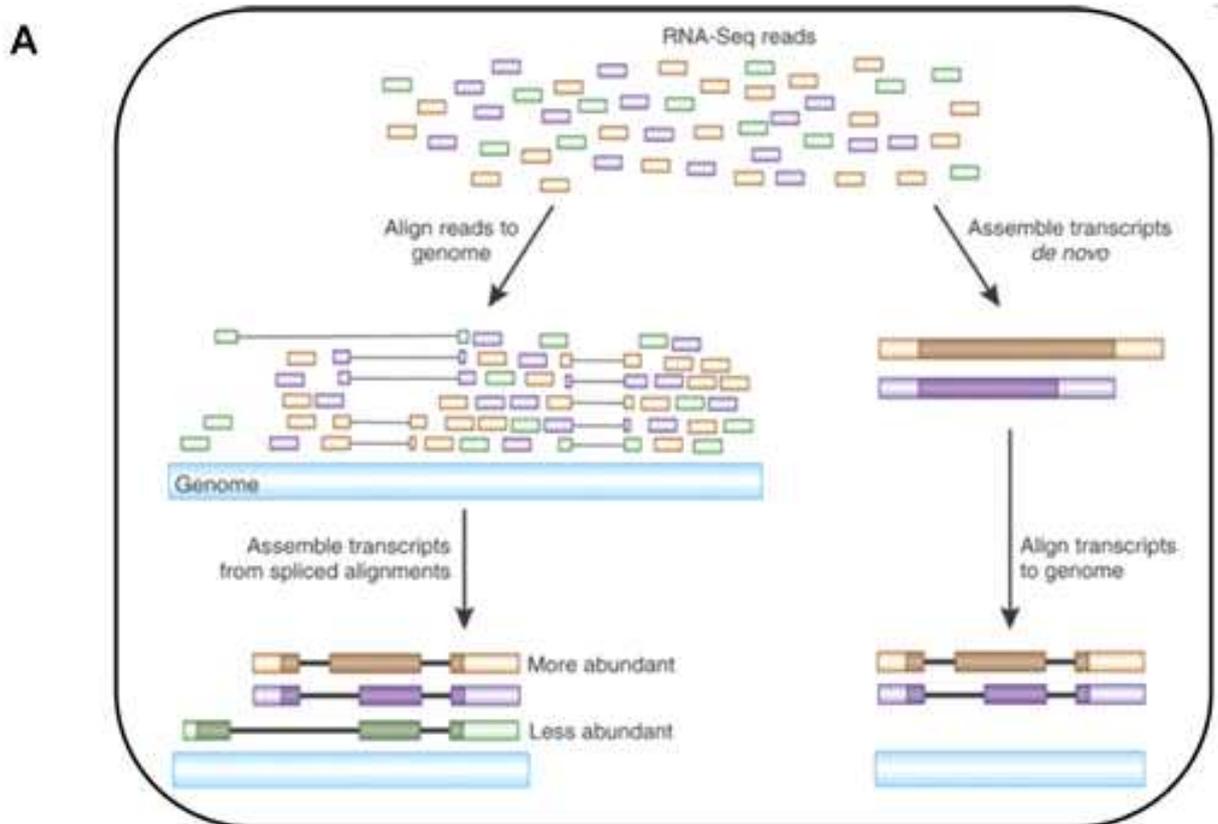


그림2. RNA-seq 유전자 분석법의 개요.



B

sample ID	sample name	replicate	number of reads	uniquely mapped reads %
1-1-1	홍삼농축분말	#1	22,846,988	92.48%
1-1-1	홍삼농축분말	#2	25,281,853	92.56%
1-1-2	홍삼농축액	#1	25,363,939	91.78%
1-1-2	홍삼농축액	#2	31,227,137	92.67%
1-12	스피루리나	#1	23,424,189	91.61%
1-12	스피루리나	#2	26,581,972	92.76%
1-4	구아바일 추출물	#1	24,926,733	89.04%
1-4	구아바일 추출물	#2	26,808,406	90.21%
2-17	후코이단	#1	28,109,206	92.97%
2-17	후코이단	#2	27,794,891	93.15%
3-1'	차가버섯	#1	24,278,126	92.23%
3-1'	차가버섯	#2	27,912,569	92.55%
3-12	복강황(에탄올추출)	#1	25,947,315	92.30%
3-12	복강황(에탄올추출)	#2	25,786,690	91.89%
3-9	청굴다당	#1	31,800,619	90.56%
3-9	청굴다당	#2	32,915,435	91.63%
D	DMSO	#1	25,417,248	92.51%
D	DMSO	#2	24,773,630	92.16%
L	LPS	#1	26,503,260	93.13%
L	LPS	#2	27,060,100	92.90%

그림3. sequencing data를 마우스 genome에 mapping

(A) 시퀀스 데이터 처리 과정을 도식화한 것으로, 기본 데이터를 정리한 후 Star 프로그램으로 mouse reference genome mm10에 배열함

(B) 각 RNA 샘플의 sequence reads와 mapping rate (n = 2)

2-2C 면역유전자 발굴

면역식품소재를 처리한 수지상세포의 유전자 발현을 DMSO 그룹을 대조군으로 하여 Differentially Expressed Genes (DEG) 양상을 분석하였다 (그림 4).

본 연구개발팀은 선행사업에서 유세포 계측기(Flow cytometry)를 이용하여 시험관내 수지상세포 기반 면역능 평가법을 개발하여 면역소재들의 면역증진 혹은 면역관용 효과를 지수화하였다. (특허등록번호 10-1981146, 10-1981147, PCT출원번호 PCT/KR2019/010689)

유전자기반 면역능 평가법 개발을 위해서는 면역증진효과와 면역관용효과와 깊은 상관관계를 보이는 유전자들의 발굴이 가장 중요한 과정이다. 이러한 유전자들을 “면역유전자”라고 잠정적으로 이름 붙이고 이러한 면역유전자들 발굴을 위한 분석과정을 시작한다. 본 사업팀이 고전적인 면역학적인 방법을 통해 개발한 수지상세포기반 시험관내 면역능 평가법에서 정의된 표준면역식품소재의 면역증진지수 I 과 II, 면역관용지수 I 과 II 와 상관관계를 보이는 유전자들 선별 과정을 실시한다, 먼저 식품소재의 면역능 지수와 RNA-seq 데이터를 R package로 비교 분석, 면역 증진 및 면역 관용과 연관성 (Pearson correlation)이 높은 유전자들을 선별하였다.

분석결과 2057 개의 유전자가 면역 증진 지수와 통계적으로 의미 있는 ($p < 0.01$) 상관관계를 보였고 (900 gene (+), 1157 gene (-) correlation), 1034 유전자가 면역 관용 지수와 유의미한 상관관계(401 gene (+), 633 gene (-) correlation)을 보였다 (그림 5A). 그 중 393개의 유전자들은 면역 증진, 면역관용 지수 양쪽 모두와 통계적으로 유의미한 ($p < 0.01$) correlation을 보이므로, 이 유전자 군이 새로운 면역능 지표로 유용하게 쓰일 수 있는 가능성을 시사한다 (그림 5B).

예를 들어 393 개 유전자 중 *Clic4*, *Traf1* 등의 선별 유전자들은 면역증진지수와 양의 상관관계, 면역관용지수와는 음의 상관관계를 보이는 반면 *Cep131*, *Nlrp1b* 등의 유전자들은 면역관용지수와 양의 상관관계를 보였다 (그림 6). 이와 같이 면역지수와 높은 상관관계를 보인 주요 유전자들의 발현 양상으로 식품소재의 면역능을 효과적으로 예측할 수 있을 것이다.

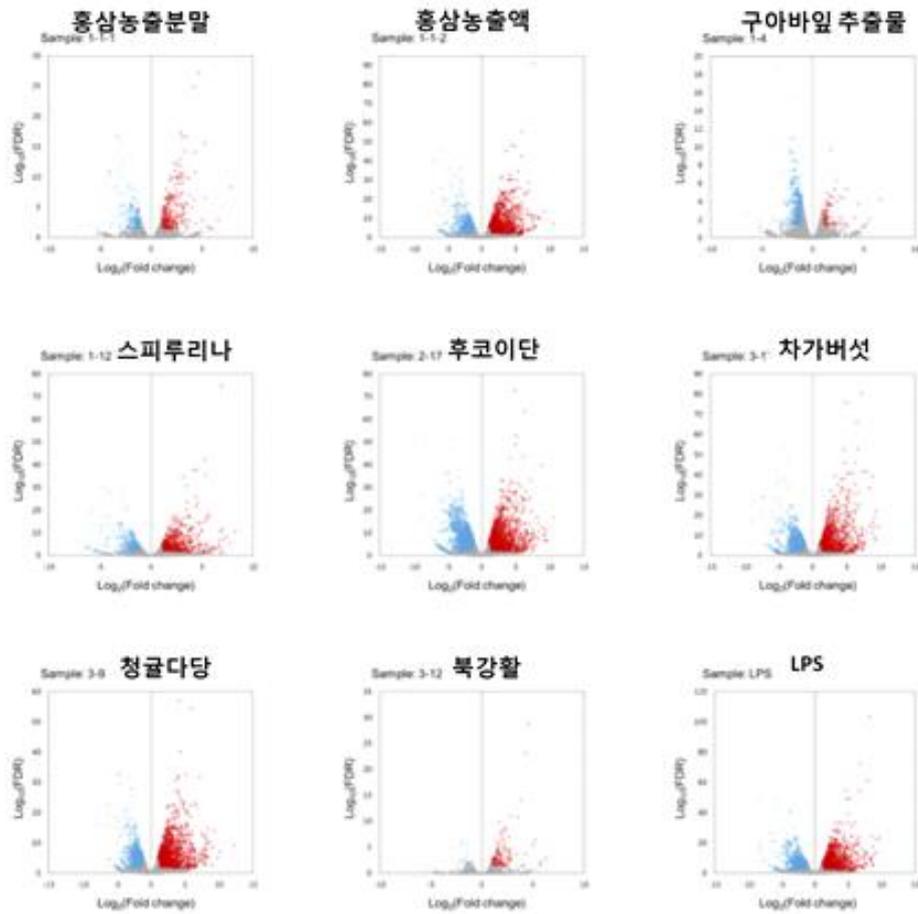


그림4. RNA-seq 전사체 정보 Differentially Expressed Genes (DEG) 분석. 면역식품소재를 처리한 dendritic cell gene expression을 DMSO 그룹을 대조군으로 하여, 각 조건별 DEG 양상을 보여주는 volcano plot. Fold change 와 FDR (false discovery rate)을 로그 변환하여 분석.

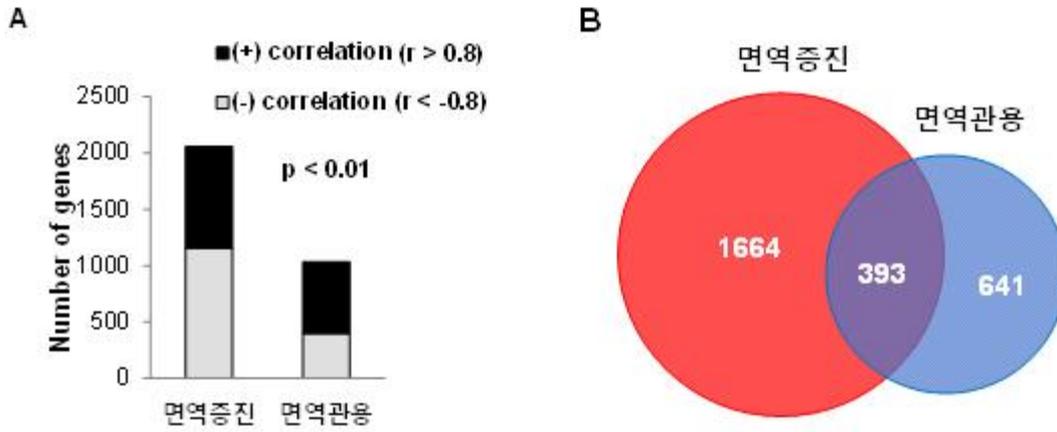


그림5. 식품소재의 면역능 지수와 RNA-seq 전사체의 correlation analysis.

(A) 면역능 지수와 $p < 0.01$ 의 통계적으로 유의미한 correlation을 보인 유전자의 수, $r =$ Pearson correlation coefficient (B) 393개의 유전자가 두 영역에서 겹침을 보여주는 벤다이어그램

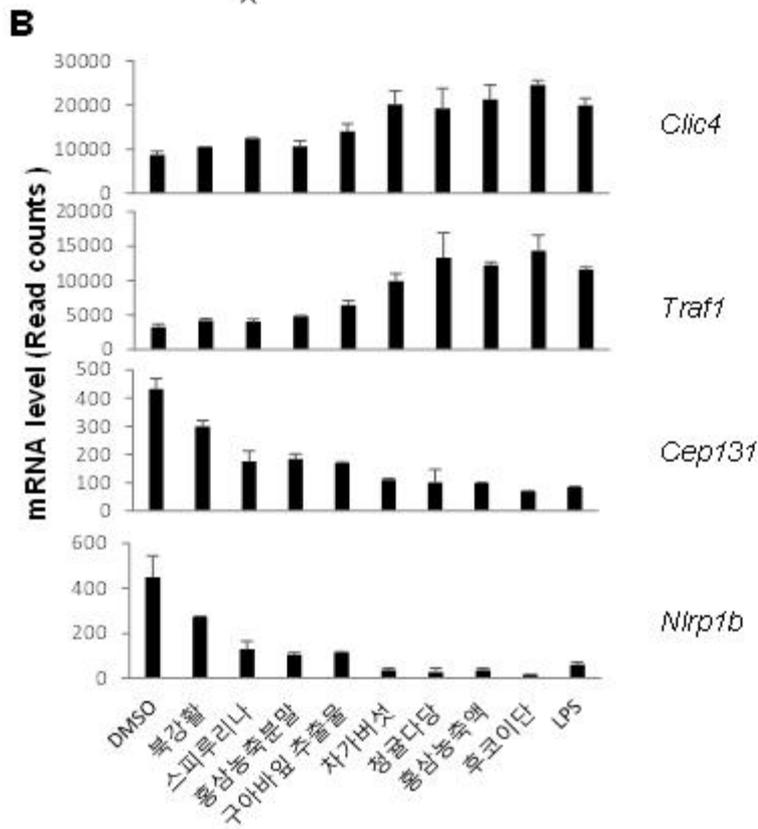
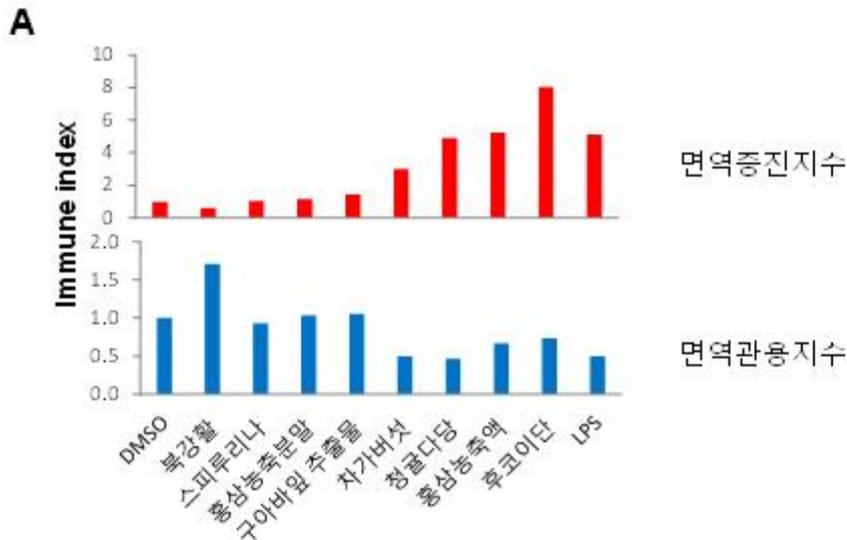


그림6. 면역능 수치와의 correlation analysis로 선별된 유전자들의 발현 양상.

(A) 유세포 계측기(Flow cytometry)를 사용한 표준면역소재의 면역능수치 (B) 각 조건에서의 유전자 발현 양상 (RNA-seq read counts).

2-2D 면역유전자 모듈 발굴

면역능과의 연관성이 높은 유전자들이 어떠한 생물학적 기능을 담당하는 유전자들인지 예측하기 위하여 Enrich 프로그램 (<https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>) 으로 pathway 분석을 시행한 결과, AGE-RAGE 신호전달 회로, Thelper cell 분화 경로에 해당하는 유전자들이 유의미하게 증가 (enriched) 됨을 발견하였다 (그림 7).

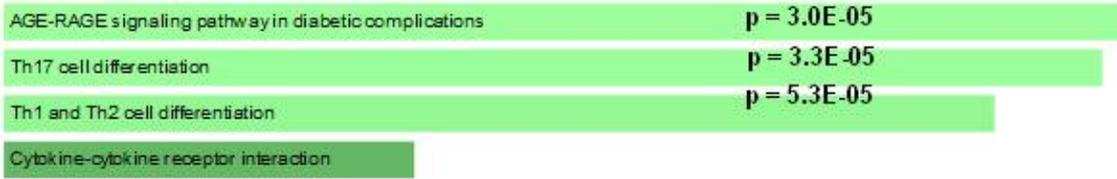
흥미롭게도 393 유전자의 절반 정도는 면역관용과 비례 (양의 상관관계), 면역증진과 반비례 (음의 상관관계)의 상관관계를 보였고, 유의미하게 집중된 (enriched) pathway 는 없었다. $p < 0.02$ 로 유전자들의 범위를 넓혔을 때 면역관용에 양의, 면역증진에 음의 상관관계를 갖는 유전자 군이 DNA대사, cell cycle 등 대사 경로에 많이 분포하는 것으로 예측된다 (그림 8).

반면 176 개의 유전자는 면역증진과 비례, 면역관용 과 반비례($p < 0.01$) 를 보였는데, cytokine 과 관련된 여러 대사 과정과 면역반응에 크게 관여하는 유전자들이 드러났다 (그림9, 표1)

이와 같이 선발된 유전자들이 많이 관여할 것으로 예측되는 대사 경로를 Enrich 프로그램으로 찾을 수 있었는데, 그 중 면역반응에 중요한 Cytokine-Cytokine receptor interaction pathway (KEGG ID 04060) 대사 경로에서 다른 유전자들이 면역지수와 어떤 관련을 보일지를 또다른 생물정보학 도구인 Pathview 프로그램 (<https://pathview.uncc.edu/>)으로 분석하였다. RNA-seq 결과로 얻은 모든 유전자들과 그 유전자의 면역지수와 상관관계 수치 r (correlation coefficient) 값으로 Pathview analysis를 실행한 결과, 대다수의 유전자가 면역증진지수와 양의 상관관계를, 면역관용 지수와는 음의 상관관계를 보이는 것으로 미루어 선발된 유전자가 global gene expression을 대표하는 immune index로 쓰일 수 있을 것으로 예측된다 (그림10).

A

KEGG pathway



B

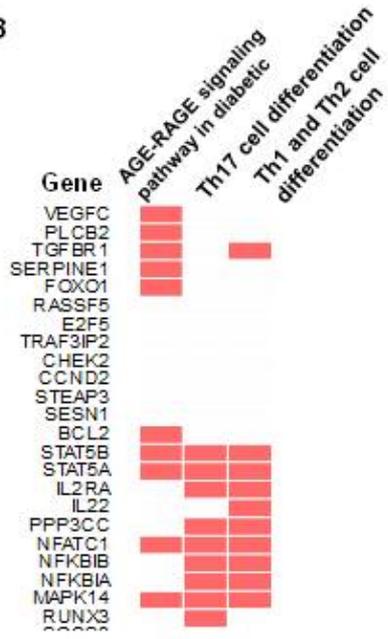


그림7. Pathway analysis with the overlapping 393 genes.
 (A) KEGG pathway 분석 (B) 각 Pathway에 해당하는 input genes

KEGG pathway



GO biological process

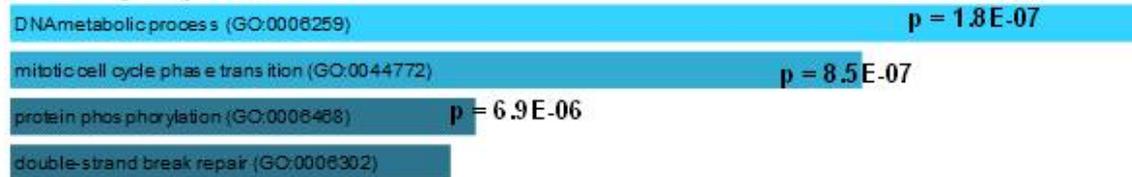


그림8. 면역관용지수와 양의 상관관계를 보이는 유전자들이 관여하는 Pathway와 gene ontology (GO) biological process

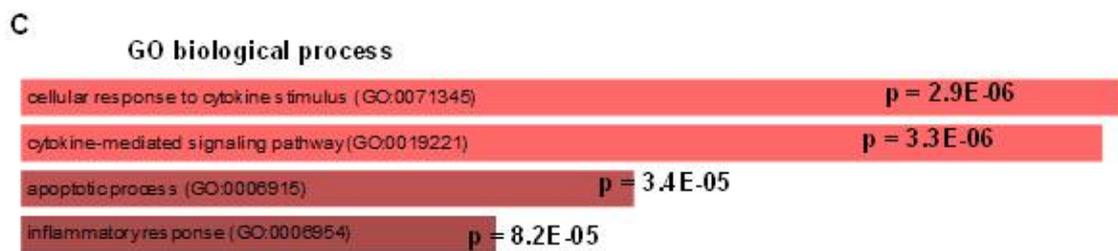
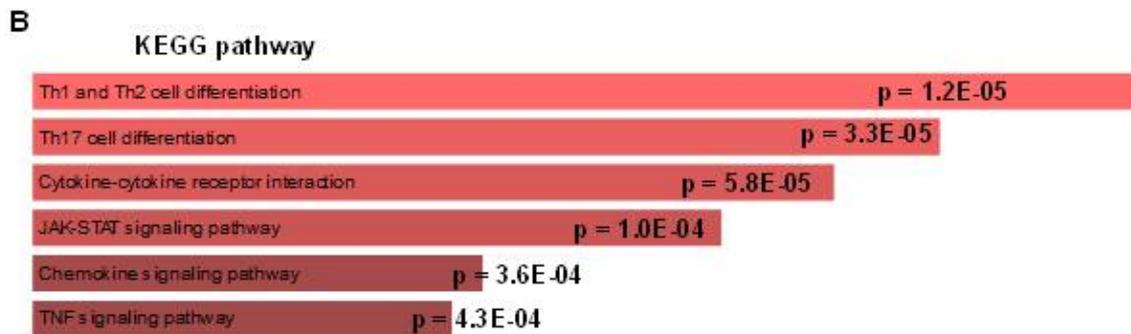
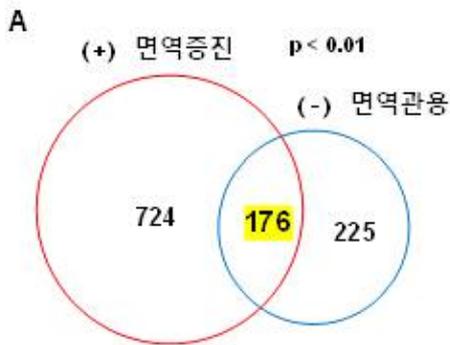


그림9. Pathway and gene ontology analysis with the 176 gene subset.

(A) 면역증진지수와 양(+)의 상관관계, 면역관용지수와 음(-)의 상관관계를 보이는 176 개의 유전자들

(B) 선별된 176 gene 으로 KEGG pathway 분석을 수행함

(C) 선별된 176 gene 으로 Gene ontology (GO) 분석을 수행함.

표 1. Gene Ontology (GO) biological process and KEGG pathway analysis with 176 genes

면역증진지수와 양(+)의 상관관계, 면역관용지수와 음(-)의 통계적으로 유의미한 ($p < 0.01$) 상관관계를 보이는 176개의 유전자들로 GO and Pathway analysis

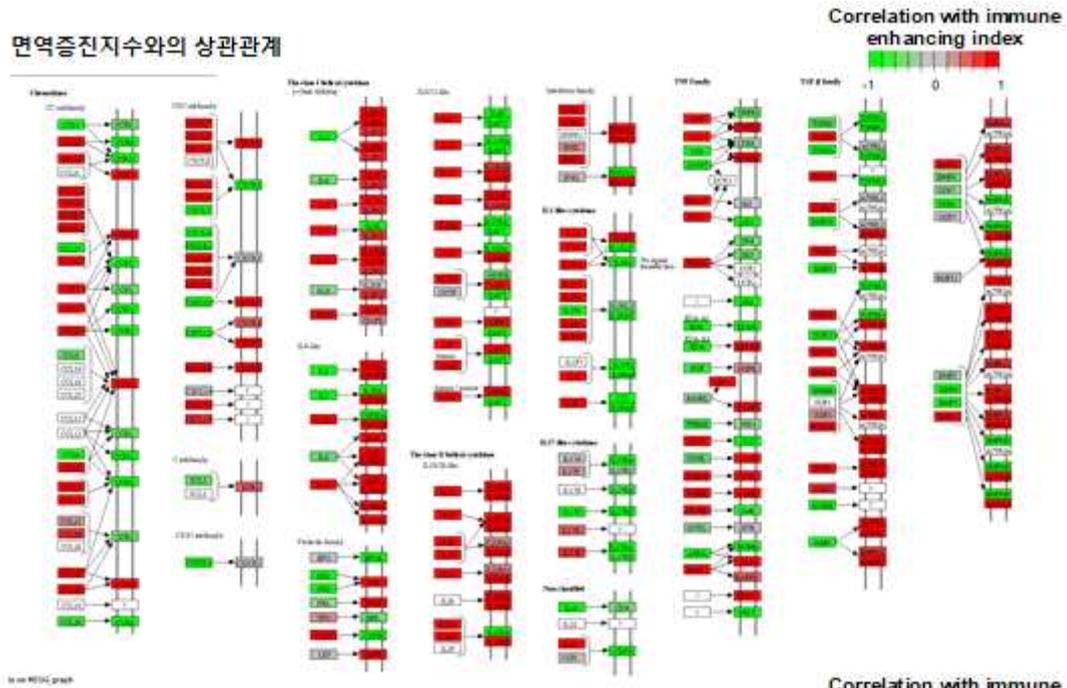
GO Biological Process

Term	Count	P-value	Genes
cellular response to cytokine stimulus	16/456	2.9E-06	STAT5A;IL10;STAT5B;IL22;IL1RN;CD80;LIF;NPNT;FOXO1;SOCS3;HAX1;CCL7;IL2RA;IRF8;CCR7;TIMP1
cytokine-mediated signaling pathway	19/633	3.3E-06	STAT5A;IL10;STAT5B;IL22;IL1RN;CD70;CD80;TNFRSF9;EBI3;LIF;MIF;FOXO1;NFKBIA;SOCS3;CCL7;IL2RA;TNFSF9;IRF8;TIMP1
apoptotic process	10/231	4.0E-05	NFKBIA;ADORA2A;TNFRSF9;IL2RA;DLC1;KREMEN1;TNFSF9;PLAGL2;CFLAR;IER3
inflammatory response	10/252	8.2E-05	IL10;IL22;ADORA2A;CCL7;TNFRSF9;IL2RA;DLC1;CCRL2;C3ARR1;CCR7

KEGG pathway

Term	Count	P-value	Genes
Th1 and Th2 cell differentiation	7/87	1.2E-05	STAT5A;NFKBIA;STAT5B;PPP3CC;IL2RA;RUNX3;NFKBIB
Th17 cell differentiation	7/102	3.3E-05	STAT5A;NFKBIA;STAT5B;IL22;PPP3CC;IL2RA;NFKBIB
Cytokine-cytokine receptor interaction	11/292	5.8E-05	IL10;IL22;IL1RN;CCL7;CD70;TNFRSF9;IL2RA;LIF;CXCR5;TNFSF9;CCR7
JAK-STAT signaling pathway	8/164	1.0E-04	STAT5A;IL10;SOCS3;STAT5B;IL22;CCND2;IL2RA;LIF
Chemokine signaling pathway	8/197	3.6E-04	NFKBIA;STAT5B;CCL7;GNG4;CXCR5;RAC3;CCR7;NFKBIB
TNF signaling pathway	6/110	4.3E-04	NFKBIA;SOCS3;BCL3;LIF;TRAF1;CFLAR

A 면역증진지수와의 상관관계



B 면역관용지수와의 상관관계

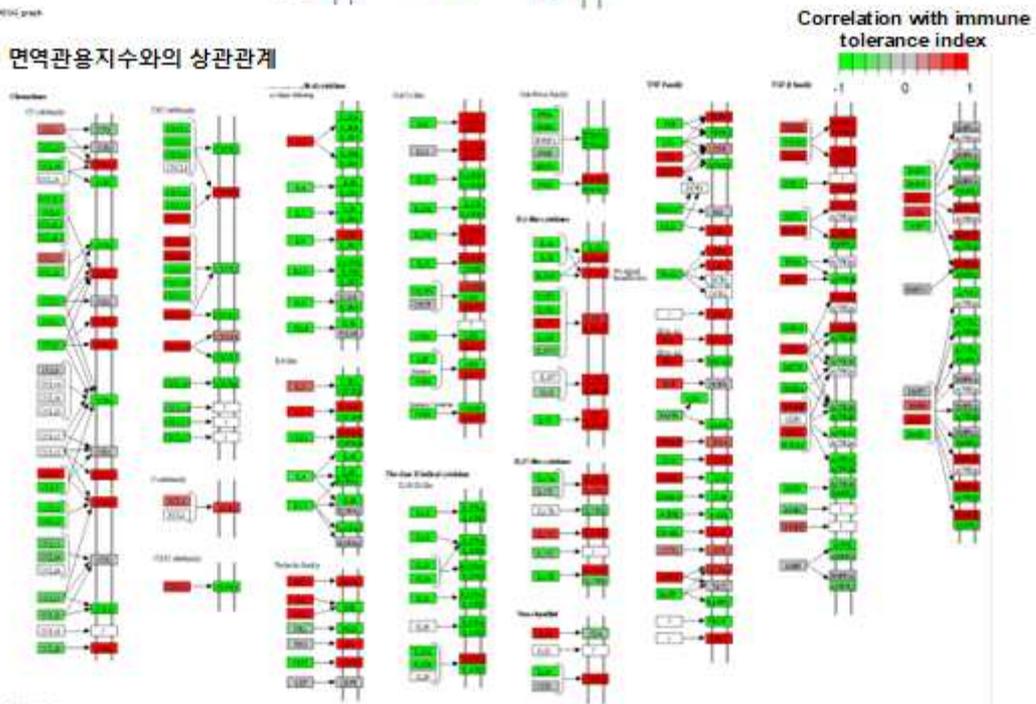


그림 10. Cytokine-Cytokine receptor interaction pathway (KEGG ID 04060)에 속하는 유전자들의 면역증진지수와의 상관관계(A) 및 면역관용지수와의 상관관계(B) RNA-seq결과로 얻은 모든 유전자들과 면역지수와의 상관관계 수치 r(correlation coefficient) 값으로 Pathview analysis를 실행하였다. 양의 상관관계는 빨간색, 음의 상관관계는 녹색으로 표시.

2-2E 면역식품소재 면역능 평가 및 비교 소프트웨어 개발

<목표>

- 면역식품소재 면역능 평가 및 비교 소프트웨어 개발

<내용>

1. 면역식품소재 면역능 평가 서비스 사업화를 위한 면역소재 평가결과치 관리 및 결과 보고서 작성
2. 면역소재 평가의뢰 회원 관리
3. 면역소재 평가치 데이터 추적-빅데이터 사업화
4. 새로운 후보 면역소재 평가를 기존의 인증된 소재들과 비교한 상대적 면역능 평가 가능
5. 입력값-수지상기반 시험관내 면역능평가법 (본 사업팀 개발)을 통해 얻은 각 면역소재의 면역증진지수 I, II 및 면역관용지수 I, II , 생존율, CD11c+(%)
6. 출력형태- 인증받아 시장에서 유통되는 면역소재들(상대적인 평가에 사용될 면역소재들을 개발후보소재의 성격에 맞추어 연구개발자가 지정할 수 있음)에서 얻는 면역지수값들과 함께 후보 면역소재 X의 값을 그래프, 히트맵, 테이블 등의 형태로 결과보고서 출력함

<개발수행>

면역식품소재 등급관리 프로그램 개발 완료

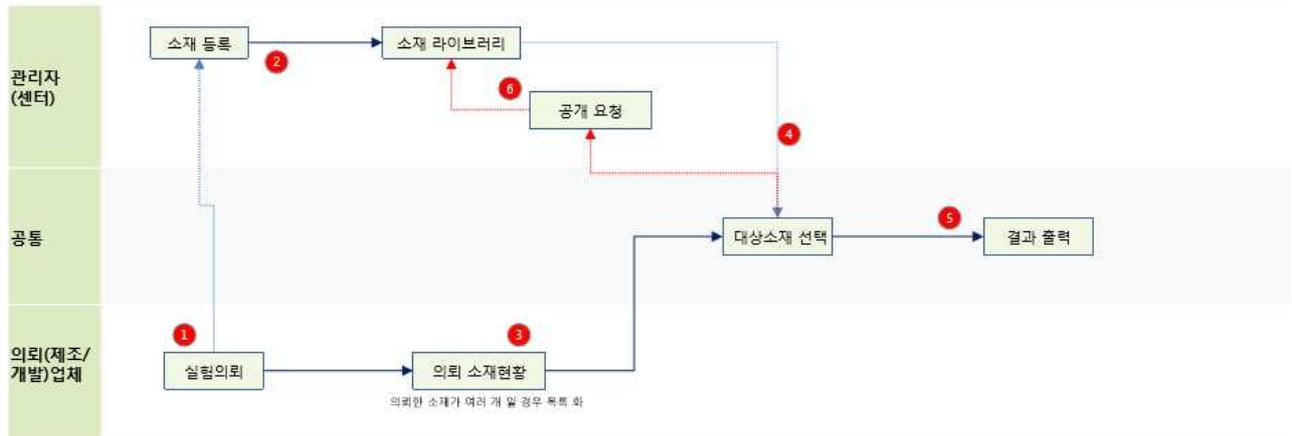
<결과제시>

1. 작업지시 다이어그램
2. 면역식품소재 등급관리 시스템 메뉴얼

면역식품소재 등급 관리시스템

사용자	기능	기능상세	비고
관리자(센터)	- 소재정보 등록	- 센터에서 보유한 소재 정보 등록 - 입력데이터(면적증진지수 I, II, 면역관용지수 I, II, 생존율, CDc+값) - 업체에서 의뢰한 소재의 경우 업체정보 등록	
	- 그래프 출력	- 여러 개의 소재를 선택 - 선택된 소재별 그래프 출력(지수그래프, 등급 그래프, 지수와 등급의 종합 그래프, Heat Map) - 소재별 그래프 출력시 옵션으로 각지수에 대하여 크기가 큰것에서 작은순으로 정렬 - 생존율과 CDc+그래프는 여러능도가 있는 소재의 경우 무음으로 표시 - PDF로 출력	
	- 업체정보 관리	- 시험 의뢰한 업체정보	
의뢰(제조/개발)업체	- 제조사 소재 정보 현황	- 제조사가 의뢰한 소재 목록 - 소재에 대한 라이브러리 등록 (공개) 여부 관리 - 의뢰한 소재중 비교대상 소재를 선택하여 비교 그래프 출력	

면역식품소재 등급 관리시스템 흐름도



⑥ 의뢰한 소재가 라이브러리에 등록되어 다른의뢰인이 비교할 수 있는 대상으로 공개할 수 있음

면역식품소재 등급관리 시스템 메뉴얼



면역식품소재 등급관리 시스템

• 목차

- 로그인
- 소재관리
 - 소재 목록
 - 소재 등록 및 수정
- 소재비교
 - 소재 비교 선택
 - 소재 비교 결과
- 업체관리
 - 업체 목록
 - 업체 등록 및 수정
- 회원관리
 - 회원 목록
 - 회원 등록 및 수정

진인포텍

소재관리 > 등록 및 수정

회원 ID	MATERIAL_ADD
1	구분: 엔터 또는 업체를 선택
2	업체명: (구분)에서 업체를 선택한 경우 업체를 선택함
3	소재명: 소재 시험 의뢰일
4	소재명: 소재 시험 완료일
5	소재관련 정보 입력
6	공기유무: 업체의 소재공기 유무로 공기를 선택하면 소재비교시에 비교대상 소재리스트에 표시됨
7	[연입]: 저장처리를 함 [등록]: 소재관리 리스트로 이동

소재비교 > 소재비교선택

회원 ID	MATERIAL_COMP
1	내소재 선택: 엔터 또는 업체를 선택하고 소재명을 입력하고 검색을 함 검색결과에서 라디오버튼을 클릭하여 내 소재를 선택하면 목록 내소재에 표시됨
2	비교대상소재 선택: 소재명으로 검색한 결과에서 체크박스 소호 선택하여 비교대상으로 여러 소재를 추가할 수 있음. 검색시 검색 후고 리고 입력하면 중앙단위에 들어간 소재와 후고 단어가 포함된 소재 모두를 검색 함. 비교대상 소재는 우측 비교대상소재 칸에 추가되어 표시됨
3	내소재: 내소재 선택에서 선택한 소재를 표시
4	비교대상소재: 비교대상소재선택에서 선택한 소재를 표시 (이물질이면 비교대상에서 제거 소재명 우측의 위아래 화살표로 비교대상소재의 순서를 변경할 수 있음)
5	[비교분석]: 비교분석 페이지로 이동

면역식품소재 등급관리 시스템

관리자로 로그인 중 | 로그인

소재관리 | 소재배급 | 업체관리 | 회원관리

회원 관리

1

구분: * 일반회원 | * 최고관리자 | * 관리자

아이디: admin * (관리자의 권한과 동일한 권한으로 부여됩니다.)

비밀번호: * * (관리자의 권한과 동일한 권한으로 부여됩니다.)

비밀번호 확인: * * (비밀번호 확인을 위해 다시 한번 입력해주세요.)

이름: * * (필수로 입력해 주세요.)

이메일: * *

성별: 남자 여자

연락처:

2 사이트 이용가능 여부: * 예 아니요

3

회원 ID	COMPANY_ADD
1	회원관리 정보를 입력
2	사이트 이용가능 여부: 로그인여부를 선택
3	[관리]: 회원정보를 저장할 [등록]: 회원 등록으로 이동

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

가. 최종목표

- 천연복합물의 성격을 가진 면역식품소재의 면역조절기능 평가 유전자 모듈 확인

나. 세부목표

- 국가기관 인증절차를 통해 공인된 면역식품소재들을 천연복합물 표준면역식품소재들로 선정
- 전통적인 면역학적 방법론에 바탕을 둔 시험관내 수지상세포 기반 면역능평가법을 통해서 각 표준면역소재들의 면역조절효과 수치화 및 등급화
- 면역식품소재 면역능 평가 및 비교 소프트웨어 개발
- 전사체 오믹스를 통해 각 표준면역소재들에 의한 유전자발현 대용량 정보 수집
- 시스템 생물학적 접근법에 의거하여 면역조절효과를 가리키는 유전자발현 네트워크를 면역 디지털 바이오마커로 발굴
- 유전자 발현 측정을 통해 면역식품소재 면역능을 평가하는데 지표로 사용될 유전자 모듈 확인

3-2. 목표 달성여부

가. 최종목표 <달성>

- 천연복합물의 성격을 가진 면역식품소재의 면역조절기능 평가 유전자 모듈 확인

나. 세부목표 <달성>

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
○ 국가기관 인증절차를 통해 공인된 면역식품소재들을 천연복합물 표준면역식품소재들로 선정	5	5	홍삼농축분말, 홍삼농축액, 스피루리나, 구아바잎추출물, 후토이단, 차가버섯, 청굴다당, 북강활, LPS(비교단일물질), DMSO 용액(용매)
○ 전통적인 면역학적 방법론에 바탕을 둔 시험관내 수지상세포 기반 면역능평가법을 통해서 각 표준면역소재들의 면역조절효과 수치화 및 등급화	10	10	본 사업팀 개발 면역능 평가법 기반하여 표준면역식품소재 면역능 수치화 및 등급화 수행
○ 면역식품소재 면역능 평가 및 비교 소프트웨어 개발	20	20	면역식품소재 면역능 평가 지수 입력 및 출력 프로그램 개발 및 구축
○ 전사체 오믹스를 통해 각 표준면역소재들에 의한 유전자발현 대용량 정보 수집	35	35	RNA-SEQ을 통해 표준면역소재들에 의한 유전자발현 대용량 정보 수집
○ 시스템 생물학적 접근법에 의거하여 면역조절효과를 가리키는 유전자발현 네트워크를 면역 디지털 바이오마커로 발굴	20	20	면역지수와 통계적으로 유의미한 상관관계를 보이는 유전자 세트 확보-면역 디지털 바이오마커 발굴
○ 유전자 발현 측정을 통해 면역식품소재 면역능을 평가하는데 지표로 사용될 유전자 모듈 확인	10	10	면역지수와 통계적으로 유의미한 상관관계를 보이는 유전자들이 포함된 pathway 발굴
합계	100점	100	

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

1) 당해연도 성과인 특허출원 1건을 이루지 못함

<사유>

본 사업의 핵심결과는 면역능평가법에 적용되기 위하여 기존 평가법에서 얻은 면역지수와 깊은 연관관계를 보이는 면역유전 세트 및 유전자 모듈을 발굴하는 것이다. 그리고 이 유전자 세트와 모듈이 특허출원을 위한 핵심결과이다. 그런데 이러한 유전자 세트 및 모듈 발굴과정에 필수적인 전공지식 습득 및 분석과정에 시간이 걸려서 당해년 성과목표 1건 특허출원을 달성하지 못했음

<추후대책>

사업종료후 1년내에 특허출원 1건을 완료함

2) 후속연구의 필요성

- ① 발굴된 면역유전자 세트 및 모듈만으로 특허출원이 미흡하여 이들을 이용한 실험적인 결과 도출이 필요함
- ② 발굴된 유전자들의 primer제작 및 RT-qPCR 실행을 통해 유전자기반 면역능 평가법 개발
- ③ 후보 면역소재 적용을 통해 유효성이 평가되는 유전자기반 면역능 평가법 개발 (제2세대 면역능평가법) 특허출원이 용이할 것으로 예상됨
- ④ 면역유전자패널을 이용한 유전자기반 면역능평가키트 시제품 제작

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표												연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		논문 평균 IF	학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	20	20				20	10		20	10										
최종목표	1	1				1	60		4	600		1								
1차년도	1																			
소 계	1																			
종료 1차년도		1					10		1			1								
종료 2차년도						1	20		1	200										
종료 3차년도							30		2	400										
종료 4차년도																				
종료 5차년도																				
소 계		1				1	60		4	600		1								
합 계	1	1				1	60		4	600		1								

4. 연구결과의 활용 계획 등

4-1. 연구개발 결과의 활용방안

- 유전자기반 면역능평가법 개발
 - 면역능 우수 식품소재 수집 및 기업의 면역식품 개발영역 연구효율 증대
 - 소비자의 제품 선택과정 신뢰성 향상에 기여
 - 국제 경쟁력 있는 식품소재들의 신속한 탐색이 가능
 - 효능 검증을 위한 투자비용 절감 및 신소재 발굴 시간 단축
- 연구 개발 성과의 현장적용 방안:
 - 발굴된 면역유전자 바이오마커 기반 면역능 평가법 개발 및 서비스 사업화
- 실용화.제품화 방안:
 - 발굴된 면역유전자 바이오마커 기반하여 분자진단 면역능 평가 키트 개발
- 예상 활용분야:
 - 1) 면역식품소재 시험관내 면역능 검사법의 광범위한 활용
 - 면역식품소재 스크리닝, 평가, 품질 관리,
 - 2) 면역기능성식품소재 품질관리, 평가, 개발 알고리즘 개발
- 사업화.기술이전:
 - 면역능 평가 서비스 및 새로운 면역소재 개발을 하는 회사 설립 혹 기술이전

4-2. 기대성과 및 파급효과

- 과학.기술.산업.사회.경제적 성과 및 영향:
 - 1) 면역기능 기능성 식품 작용기전에 대한 과학적 근거에 기반한 평가법 확보를 통한 기능성식품 산업에 대한 인식 제고
 - 2) 면역식품소재 개발의 가속화
 - 3) 면역기능성식품 품질평가 가이드라인 정립
 - 4) 면역식품소재 동물모델이나 임상시험 디자인에 가이드라인을 제공함으로써 개발 시간 단축 및 비용 절감 효과를 통하여 경제적 이익을 기대
 - 5) 창업 혹 기술이전
 - 6) 고용창출
 - 7) 지재권 및 논문 출간

4.3 후속 연구개발사업의 필요성

- 최종목표:

빅데이터기반 AI면역능평가 및 개발 플랫폼 구축

□ 후속연구내용:

- 1) 면역유전자기반 면역능 평가법 개발
- 2) 기능성 신소재 발굴을 위한 면역소재 유전자발현 빅데이터 구축
- 3) 유전자발현 빅데이터를 이용한 AI 면역능 평가 알고리즘 개발
- 4) 유전자기반 면역능평가법을 이용하여 새로운 면역소재 발굴 사업화

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농식품연구성과후속지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농식품연구성과후속지원사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.