



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학박사 학위논문

정보학을 활용한 화합물의  
효능 및 독성 예측 연구

Research on informatics-based  
pharmacological outcome prediction of  
chemicals

2023 년 2 월

서울대학교 대학원  
약학과 천연물과학 전공  
안 승 찬

정보학을 활용한 화합물의  
효능 및 독성 예측 연구

Research on informatics-based  
pharmacological outcome prediction of  
chemicals

지도교수 노 민 수

이 논문을 약학박사 학위논문으로 제출함  
2022 년 11 월

서울대학교 대학원  
약학과 천연물과학 전공  
안 승 찬

안승찬의 약학박사 학위논문을 인준함  
2022 년 12 월

위 원 장 \_\_\_\_\_ 박 성 혁 \_\_\_\_\_ (인)

부위원장 \_\_\_\_\_ 심 상 희 \_\_\_\_\_ (인)

위 원 \_\_\_\_\_ 진 영 원 \_\_\_\_\_ (인)

위 원 \_\_\_\_\_ 임 경 민 \_\_\_\_\_ (인)

위 원 \_\_\_\_\_ 노 민 수 \_\_\_\_\_ (인)

## 국문초록

최근 인공지능 기술은 개발 과정의 효율성을 높이기 위해 신약개발 과정의 다양한 분야에 적용되고 있다. 특히, 화합물의 약물학적 활성을 예측하는 기계학습/인공지능 모델은 신약개발 초기 단계의 신약 후보물질 발굴에 크게 기여하고 있다. 효능 및/또는 독성의 성공적인 예측을 위해서 화학생물정보학 기반의 기계학습 접근법은 화합물의 구조정보와 활성정보 사이의 인과관계를 밝혀야 한다. 현재, 다수의 공공 화학생물정보 빅데이터가 인공지능 기반의 예측 모델에 이용가능하다. 화학생물정보 빅데이터의 생리활성 정보는 크게 두 범주, 직접적인 분자 타겟에 대한 정보와 표현형에 대한 정보로 나눌 수 있다. 표현형 기반 스크리닝은 화합물에 의해 유도된 표현형 변화를 세포 수준에서 질병과 유사한 환경에서 평가한다. 중요하게도, 다수의 퍼스트인클래스 신약이 타겟 기반 보다는 표현형 기반 접근법을 통해 발굴되었다. 대사성질환에 대한 신약개발을 위해 사용되는 표현형 기반 스크리닝 방법 중 하나로 사람 골수유래 중간엽줄기세포(human bone marrow-derived mesenchymal stem cell, hBM-MSC)의 지방분화 모델이 있다. 이 모델에서는 화합물의 지방분화에 대한 영향을 지방세포 유래 사이토카인인 아디포넥틴 생합성 또는 세포내 지질 축적 등 표현형 변화를 측정하여 평가한다. 저아디포넥틴혈증은 비만, 제2형 당뇨병, 비알콜성 지방간염 등 다양한 대사성질환의 공통적인 특징이기 때문에 지방분화 모델을 이러한 대사성질환의 치료 후보물질 발굴에 활용할 수 있다. 한편, 이 모델은 오비소젠이나 내분비교란물질 등 사람 체내에서 대사 독성을 유발하는 물질의 평가에도 활용할 수 있다. 본 학위논문에서는 hBM-MSC의 지방분화 모델을 잠재적인 오비소젠 평가와 오비소젠 예측을 위한 화학생물정보학 기반의 기계학습 모델 검증에 사용하였다. 그리고 천연물과 아디포넥틴 생합성 사이의 상관관계를 화학정보학 기반의 연관형 구조활성상관관계(read-across structure-activity relationship, RASAR)와 생물정보학 기반의 가중치가 반영된 기계학습 모델을 이용하여 규명하였다.

자외선차단제 성분 아보벤존(3-(4-*tert*-butylphenyl)-1-(4-methoxyphenyl)propane-1,3-dione)의 사람 정상 각질형성세포(normal human epidermal keratinocyte, NHEK)에 대한 전사체 수준의 영향을 평가하기 위해 아보벤존을 처리한 NHEK의 마이크로어레이 분석을 수행하였다. 이 분석으로부터 얻은 차등발현유전자의 목록으로부터 유전자 온톨로지 생물학적경로를 이용한 기능적 모듈 분석을 수행하였다. 아보벤존은 NHEK에서 지질 대사와 관련된 유전자의 발현을 유의하게 증가시켰으며, 따라서 아보벤존을 대사교란 오비소젠으로 제안하였다. 아보벤존은 hBM-MSK의 지방분화 모델에서도 다른 오비소젠과 마찬가지로 지방분화를 촉진시킬 수 있음을 통해 아보벤존의 오비소젠 표현형을 검증하였다. 화학정보학 기반의 연관형 접근법은 다른 활성 물질과 비교하여 정량적으로 결정된 화학적유사도를 이용하여 특정 화합물의 효능 및/또는 독성을 예측하는 방법이다. 여러 자외선차단제 성분과 기존에 보고된 오비소젠 사이의 화학적유사도 분석에서 시녹세이트(2-ethoxyethyl (2*E*)-3-(4-methoxy phenyl) prop-2-enoate)가 아보벤존과 가장 구조적으로 유사한 물질로 나타났다. 따라서 시녹세이트의 오비소젠 표현형을 hBM-MSK의 지방분화 모델에서 검증하였다. 이어진 타겟 검증 시험에서 시녹세이트는 지방분화의 핵심적인 조절자인 핵수용체 PPAR $\gamma$ 의 완전효능약으로 나타났다. 이어서 화합물의 구조로부터 오비소젠 가능성을 예측할 수 있는 화학생물정보학 기반의 기계학습 모델을 구축하였다. 화학생물정보 빅데이터에서 오비소젠 연관 화합물의 구조, 물리화학적 특성, 핵수용체에 대한 활성 정보를 수집하였다. 이 모델은 입력 화합물의 핵수용체 타겟에 대한 활성과 함께 오비소젠 가능성을 확률로 제공함으로써 잠재적 환경 오비소젠의 조기 발견에 기여할 수 있다.

다음으로, 화학생물정보 기반의 기계학습 모델을 사용함으로써 아디포넥틴 분비 촉진 천연물을 예측하기 위한 *in silico* 표현형 스크리닝 시스템을 구축하였다. 지방분화 등 표현형에 대한 데이터는 부족하고 복잡하기 때문에, 이러한 모델은 2개의 모델을 연속적으로 사용함으로써 구현할 수 있다. 첫 번째 모델로, 랜덤포레스트 기반의 핵수용체 활성 예

측모델을 화합물의 핵수용체 타겟에 대한 활성 정보를 이용하여 만들 수 있다. 다만, 공공 데이터베이스로부터 얻은 훈련 데이터셋은 다수의 결측치를 포함하고 있어 이를 보완하기 위해 RASAR를 접근법을 도입하였다. RASAR 접근법은 특정 화합물의 특정 타겟에 대한 결측치를 구조적으로 가장 유사한 화합물에 대한 화학적 유사도로 대체하는 방법이다. 이 접근법을 적용함으로써 핵수용체 활성 예측모델의 예측 성능을 크게 개선할 수 있었다. 두 번째 모델로, 위 모델에서 예측된 핵수용체 활성으로부터 상대적 아디포넥틴 점수(relative adiponectin score, RAS)를 계산하는 모델을 만들었다. 예측된 핵수용체 활성에 아디포넥틴 생합성에 대한 각 핵수용체의 정량화된 상대적 기여도를 반영하여 구현할 수 있었는데, 이를 위해 분화된 지방세포의 단일세포 전사체 분석 결과를 이용하였다. 이 모델에서는 각 세포의 핵수용체 활성 수준과 아디포넥틴 유전자 발현의 상관관계를 다중선형회귀 방법을 이용하여 해석하였다. RAS 모델은 화합물의 구조로부터 아디포넥틴 분비 촉진 활성 정보를 제공할 수 있었으며, 그 예측 성능은 황금(*Scutellaria baicalensis*)에서 분리된 천연 플라보노이드 화합물에 대하여 실험적으로 검증하였다.

결론적으로, 본 학위논문은 화학생물정보학 기반의 기계학습 모델이 화합물의 사람 지질대사에 대한 표현형 수준의 효능 및/또는 독성을 성공적으로 예측할 수 있다는 개념을 제시하였다. 더욱이 기존 공공 화학생물정보 빅데이터에서 생리활성 정보가 부족하다는 한계점을 극복하기 위해 RASAR 접근법을 적용하였고, 그 결과, 모델의 활성 예측 성능을 크게 개선시킬 수 있었다. 추후에는 더욱 복잡한 화합물에 대해서도 그 화학형에 관계없이 생리활성 표현형을 예측할 수 있는 기계학습 모델을 만들기 위해 화학생물정보학 기반의 모델을 개선하는 연구를 진행하고자 한다.

**주요어** : 화학생물정보학, 기계학습, 지방세포 분화, 오비소젠, 아디포넥틴 생합성, 구조활성 상관관계

**학 번** : 2019-20082

# 목 차

제 1 장 서론 .....	1
제 1 절 신약개발을 위한 화학생물정보학의 응용 .....	1
제 2 절 표현형 기반 스크리닝을 이용한 신약개발 .....	6
제 3 절 지방분화 모델을 이용한 활성 평가 .....	10
제 2 장 결과 및 고찰 .....	20
제 1 절 화학생물정보학을 활용한 오비소젠의 동정 .....	20
2.1.1. 전사체 분석을 통한 아보벤존 유도 대사교란 표현형 탐색 .....	20
2.1.2. 화학정보학 분석을 통해 제시된 시녹사이트의 오비소젠 특성 규명 .....	30
2.1.3. 오비소젠 예측을 위한 기계학습 모델 구축 .....	40
제 2 절 화합물의 효능 예측을 위한 인공지능 .....	43
2.2.1. 천연물의 대사 표현형 예측 기계학습 모델 개발 .....	43
제 3 장 결론 .....	62
제 1 절 화학생물정보학을 활용한 오비소젠의 동정 .....	62
제 2 절 화합물의 효능 예측을 위한 인공지능 .....	64
제 4 장 연구방법 .....	65
참 고 문 헌 .....	74
Abstract .....	84

## 표 목 차

[Table 1] TaqMan expression primer sets used .....	71
[Table 2] Sequence of peptides used for nuclear receptor coactivator assays .....	72

## 그 립 목 차

[Figure 1-1] Application of AI/ML in drug development process .....	1
[Figure 1-2] ML models used for pharmacological outcome prediction of chemicals .....	2
[Figure 1-3] Bioinformatics in pharmacology .....	3
[Figure 1-4] Cheminformatics in pharmacology .....	4
[Figure 1-5] Chembioinformatics for predictive pharmacology	5
[Figure 1-6] Two strategies for chemical library screening: target-based and phenotype-based screening .....	6
[Figure 1-7] Source of drugs by screening strategies .....	7
[Figure 1-8] Overview of phenotype-based screening .....	8
[Figure 1-9] Adipogenesis model of hBM-MSCs .....	8
[Figure 1-10] Biosynthesis, roles and functions of adiponectin .....	9
[Figure 1-11] Representative adiponectin secretion-inducing compounds .....	11



[Figure 1-12] Nuclear hormone receptor modulators regulating adipogenesis and adiponectin biosynthesis .....	12
[Figure 1-13] Definition of obesogen .....	14
[Figure 1-14] Representative obesogens among industrial chemicals and cosmetic ingredients .....	15
[Figure 1-15] Representative adiponectin secretion-inducing natural products .....	18
[Figure 2-1] Avobenzene-induced transcriptional changes in NHEKs .....	21
[Figure 2-2] Enriched GO BP modules in the DEGs of avobenzene-treated NHEKs .....	22
[Figure 2-3] Validation of the DEGs of avobenzene-treated NHEKs .....	23
[Figure 2-4] Effects of avobenzene on obesogenic phenotype during adipogenesis in hBM-MSCs .....	24
[Figure 2-5] Effects of avobenzene on adipogenesis-related cytokine production and gene transcription during adipogenesis in hBM-MSCs .....	26
[Figure 2-6] Effects of avobenzene on the gene transcription of PPARs in avobenzene-treated NHEKs .....	27
[Figure 2-7] Effects of avobezone on PPAR $\gamma$ -mediated adipogenesis .....	28
[Figure 2-8] Chemical structures of methoxy cinnamate esters used as sunscreen ingredients .....	30
[Figure 2-9] Chemical similarity analysis of methoxy cinnamate esters and known obesogens .....	31
[Figure 2-10] Effects of methoxy cinnamate esters on	

obesogenic phenotype during adipogenesis in hBM-MSCs .....	32
[Figure 2-11] Effects of cinoxate on adiponectin production and transcription of adipogenesis-related genes .....	33
[Figure 2-12] Effects of cinoxate on nuclear receptors .....	35
[Figure 2-13] SRC3-mediated PPAR $\gamma$ coactivation of cinoxate .....	36
[Figure 2-14] PPAR $\gamma$ full agonism of cinoxate .....	38
[Figure 2-15] Effects of cinoxate on transcription of lipid metabolism-associated genes in NHEKs .....	39
[Figure 2-16] Collection of obesogen dataset for obesogen prediction .....	41
[Figure 2-17] Collection of non-obesogen dataset for obesogen prediction .....	42
[Figure 2-18] Overview of machine learning model to predict adiponectin secretion-inducing activity of flavonoids .....	44
[Figure 2-19] Chemical and biological data collection process for FAPs .....	45
[Figure 2-20] Summary of collected bioactivity results .....	46
[Figure 2-21] Decision algorithm to remove duplicate results .....	48
[Figure 2-22] Summary of collected BTOs .....	48
[Figure 2-23] Validation of training dataset .....	49
[Figure 2-24] Read-across approach to compensate missing values .....	50
[Figure 2-25] Improvement in model performance by applying read-across approach .....	51
[Figure 2-26] Model performance by nuclear receptors .....	52
[Figure 2-27] Predicted nuclear receptor activity .....	52

[Figure 2-28] Transcriptional profile used to determine relative contribution of nuclear receptors in adipogenesis .....	54
[Figure 2-29] Nuclear receptor target genes correlated with adiponectin transcription .....	55
[Figure 2-30] Normalization of expression level with eCDF ..	56
[Figure 2-31] Relative adiponectin score (RAS) model .....	57
[Figure 2-32] <i>S. baicalensis</i> -isolated flavonoids for experimental validation of RAS model .....	59
[Figure 2-33] Effects of <i>S. baicalensis</i> -isolated flavonoids on adiponectin production during adipogenesis in hBM-MSCs ....	60
[Figure 2-34] Experimental validation of RAS model .....	61

# 제 1 장 서론

## 제 1 절 신약개발을 위한 정보학의 응용

### 1.1.1. 인공지능을 활용한 신약개발

기존 신약개발은 평균 10년 정도의 시간이 소요되며, 성공률이 0.1% 수준으로 매우 낮고 많은 비용이 소모된다[Schneider et al., 2020]. 이러한 신약개발 과정의 효율성을 높이기 위해 최근에는 인공지능(artificial intelligence, AI) 또는 기계학습(machine learning, ML) 접근법이 도입되고 있다. 신약개발 단계 중, 새로운 질병 타겟 발굴 및 검증[Jumper et al., 2021], 약물 설계를 통한 선도물질 도출 및 최적화[Schneider & Clark, 2019; Zhavoronkov et al., 2019], 그리고 임상시험[Topol, 2019]에 이르기 까지 전 과정에 AI 또는 ML이 적용되고 있다(Figure 1-1). 특히, 구조-활성 상관관계를 훈련하여 화합물의 생리활성 또는 독성을 예측하는 ML 모델이 선도물질 도출과 최적화 과정에 성공적으로 적용되었다[Keiser et al., 2009; Besnard et al., 2012; Lounkine et al., 2012; Hartung 2019].

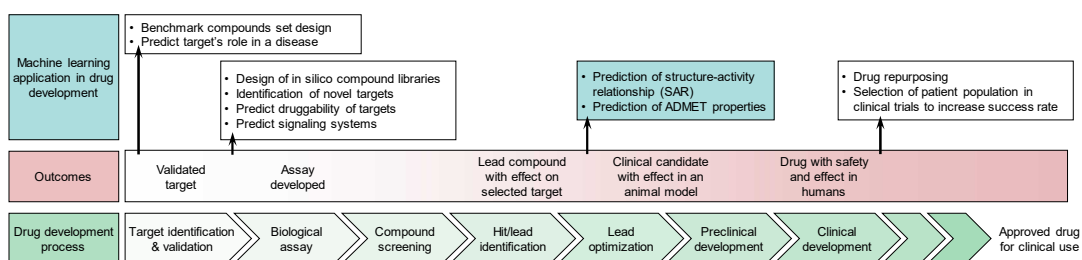


Figure 1-1. Application of AI/ML in drug development process [Modified from Mak & Pichika, 2019]

화합물 효능 예측의 한 예로, 화합물의 구조와 2,560개 화합물의 항균 활성을 훈련한 심층학습(deep learning, DL) 모델을 이용하여 할리신(halicin)이라는 새로운 항생제를 성공적으로 개발하였다[Stokes et al., 2020]. 화합물의 구조적 유사도를 ML 모델에 학습하여 화합물의 급성 독성과 피부감작성 등을 예측하도록 고안한 모델은 동물시험의 재현성보다 더 높은 수준의 성능을 나타내기도 하였다[Luechtefeld et al., 2018] (Figure 1-2).

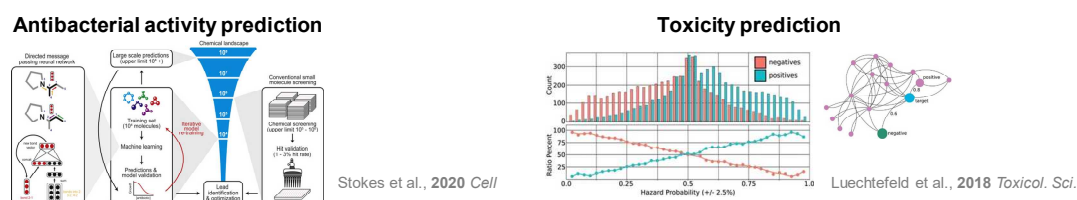


Figure 1-2. ML models used for pharmacological outcome prediction of chemicals

### 1.1.2. 예측 약물학을 위한 생물정보학과 화학정보학

신약개발을 위한 AI 및 ML 모델의 적용에는 모델을 학습하기 위한 기계가 읽을 수 있는 형태(machine-readable)의 방대한 양의 데이터가 필수적이다. 따라서, 예측 약물학(predictive pharmacology)을 위하여 생물정보학(bioinformatics)과 화학정보학(cheminformatics)이 함께 발전해 왔다. 생물정보학에는 마이크로어레이(microarray)와 RNA 시퀀싱(RNA sequencing, RNA-seq)을 이용한 전사체 분석이 포함되며 새로운 질병 치료 타겟을 발굴하기 위해 이용된다[Wang, C. et al., 2014]. 전사체 결과로부터 차등 발현 유전자(differentially expressed gene, DEG)를 선정하고 기능적 모듈 분석(functional module analysis)을 통해 질병 상황에서 변화하는 생물학적 경로에 대한 정보를 얻을 수 있다(Figure 1-3).

더욱이, 생물정보학은 약물의 전사체 수준의 영향을 평가하는 유용한 접근법이다.

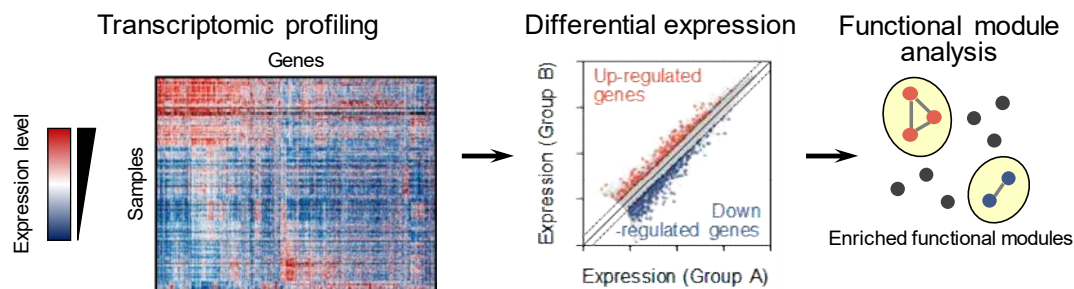


Figure 1-3. Bioinformatics in pharmacology

화합물의 생리 활성 정보와 구조 사이의 상관관계, 즉 구조-활성 상관관계를 수식화하기 위해서는 화합물의 구조를 기계가 읽을 수 있는 형태로 표현하기 위한 화학정보학 역시 필요하다(Figure 1-4). 화학정보학에서는 화합물의 구조를 3차원 좌표, 가중치가 반영된 그래프 등의 형태로 표현한다[Sanchez-Lengeling et al., 2019]. 특히, 화합물의 구조를 문자열로 표현할 수 있는 SMILES (simplified molecular-input line-entry system), 그리고 특정 원자나 결합, 작용기의 유무에 따라 1과 0으로 구성된 숫자의 배열로 나타내는 화합물 지문(chemical fingerprint)이 흔히 사용된다. 화합물의 분자량, 분배계수, 극성표면적, 수소결합에 참여하는 원자의 수 등 물리화학적 특성도 화합물을 기계가 읽을 수 있는 형태로 표현하는 방법 중 하나이다.

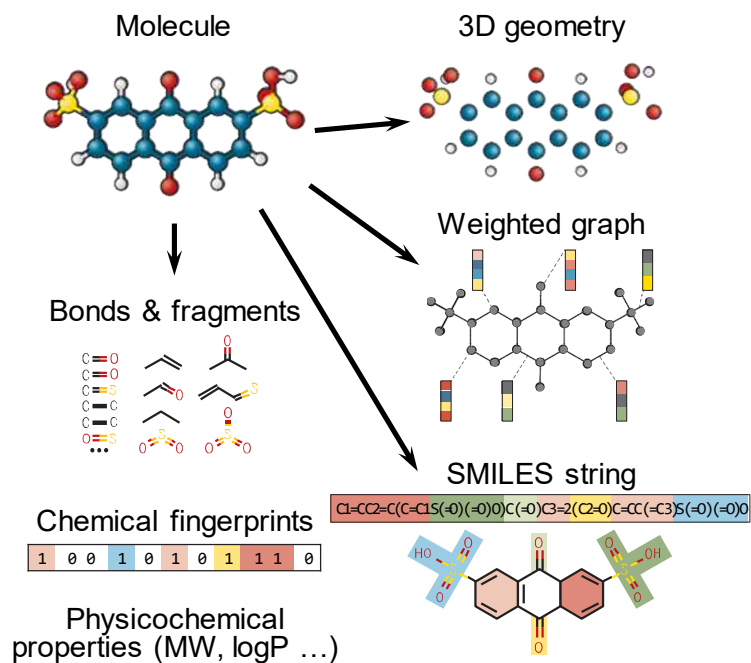


Figure 1-4. Cheminformatics in pharmacology [Modified from Sanchez-Lengeling et al., 2019]

1.1.3. 화합물 효능 및 독성 예측을 위한 화학생물정보학의 중요성

화합물의 생리활성과 구조 정보를 모두 기계가 읽을 수 있는 형태로 나타내었을 때 비로소 ML 모델의 적용이 가능하다. 기계가 읽을 수 있는 형태로 표현되어 활성 정보화 화합물 구조 정보가 연계된 화학생물정보학(chembioinformatics)은 예측 약물학을 위한 필수적인 정보이다. 대표적인 화학생물 정보로는 화합물 라이브러리를 이용하여 분자 타겟에 대하여 고효율 스크리닝(high-throughput screening, HTS)을 수행하여 얻은 활성 정보가 있다. 다수의 HTS 결과를 모아놓은 PubChem, ChEMBL, Tox21, NCATS 등의 데이터베이스 역시 화학생물정보로써 화합물의 활성 및 독성 예측을 위해 유용하게 사용될 수 있다(Figure 1-5).

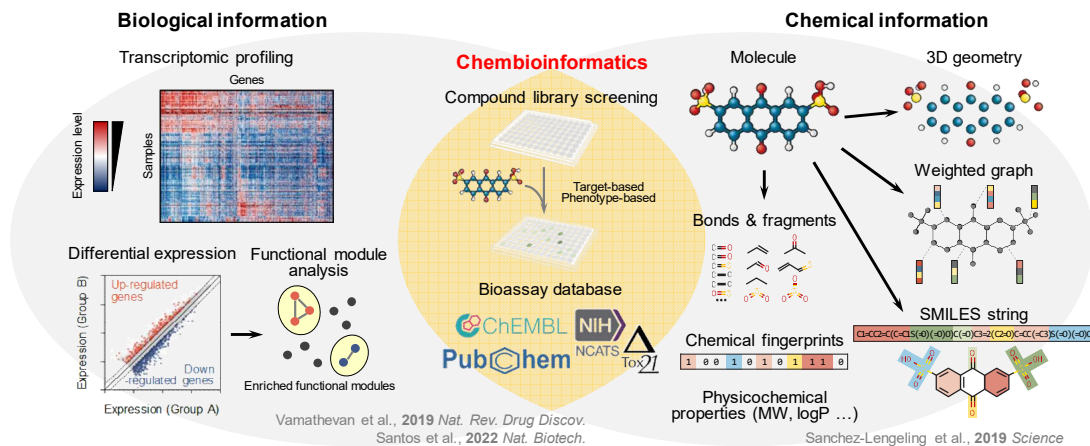


Figure 1-5. Cheminformatics for predictive pharmacology



## 제 2 절 표현형 기반 스크리닝을 이용한 신약개발

### 1.2.1. 표현형 기반 약물 스크리닝의 중요성

화학생물정보학의 중심인 화합물 라이브러리 스크리닝은 크게 두 가지, 타겟 기반 스크리닝과 표현형 기반 스크리닝으로 나눌 수 있다(Figure 1-6). 그 중 표현형 기반 스크리닝은 질병 타겟에 대한 가설 없이 질병과 유사한 환경에서 세포 수준의 표현형 변화를 관찰하는 접근법이다 [Schenone et al., 2013; Moffat et al., 2017; Ursu et al., 2017]. 따라서, 2000년대 전후로 개발된 신약들 중 퍼스트인클래스(first-in-class) 신약의 다수가 타겟 기반 스크리닝 보다는 표현형 기반 스크리닝을 통해 발굴되었다(Figure 1-7).

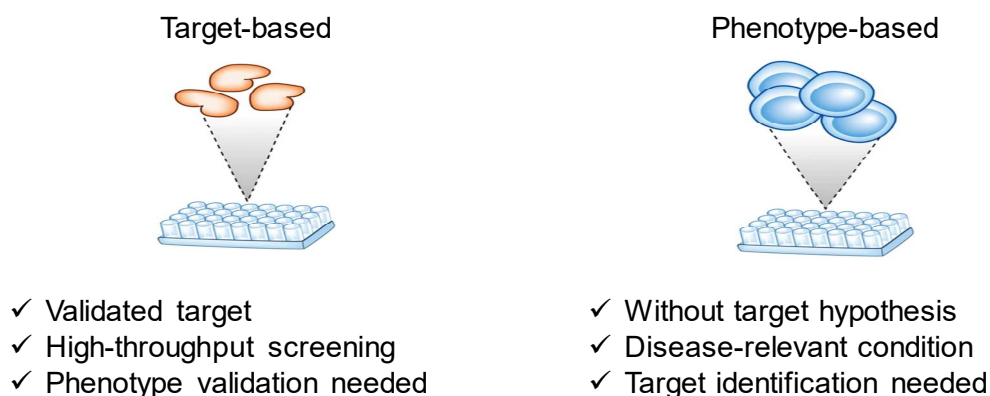
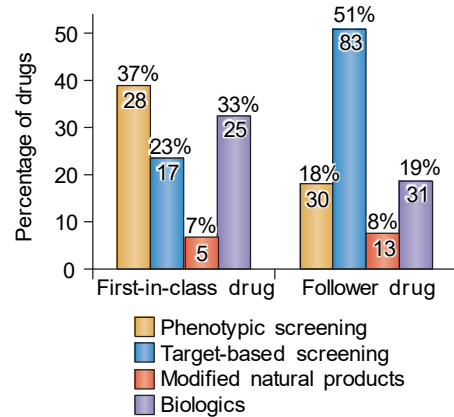


Figure 1-6. Two strategies for chemical library screening: target-based and phenotype-based screening



**Figure 1-7. Source of drugs by screening strategies** [Modified from Swinney & Anthony, 2011]

표현형 기반 스크리닝은 유용한 접근법이지만, ML을 이용하여 표현형을 예측할 수 있는 *in silico* 예측 모델을 구축하는 데에는 어려움이 있다. 현재 기계학습에 이용가능한 데이터베이스의 활성 스크리닝 결과는 대부분 타겟 기반 스크리닝 결과이다[Chen et al., 2016; Agamah et al., 2020]. 타겟 기반 스크리닝에서는 검증된 타겟에 대하여 표현형 기반 스크리닝에 비해서 비교적 간단한 실험법을 이용해 고효율 스크리닝이 가능하기 때문이다. 하지만 기계학습을 활용하여 표현형을 성공적으로 예측할 수 있다면 기존의 신약개발 과정에서와 마찬가지로 좋은 성능을 보여줄 수 있을 것으로 기대된다. 특히, 표현형 기반 스크리닝을 통해 발굴된 후보물질은 타겟 동정 및 검증(target deconvolution)과 후속 기전 연구 추가적으로 필요한데, ML 모델은 단일 타겟에 대한 예측에 있어서는 좋은 성능을 보여주고 있기 때문에 후속 타겟 검증 연구의 효율성을 높일 수 있을 것이다.



Figure 1-8. Overview of phenotype-based screening

### 1.2.2. 골수유래 중간엽줄기세포의 지방분화 모델

표현형 기반 스크리닝 방법의 하나로서 사람 골수유래 중간엽줄기세포 (human bone marrow mesenchymal stem cell, hBM-MSC)의 지방분화 모델이 유용하게 사용되고 있다[Shin et al., 2009; Yu et al., 2017; An et al., 2020]. 이 모델에서는 hBM-MSC의 지방분화 과정 중 평가 대상 화합물을 함께 처리하여 아디포넥틴(adiponectin), 렙틴(leptin) 등 아디포카인(adipocytokine, adipocyte-derived cytokine)의 분비 변화나 지방축적 등 세포 표현형을 조사하여 화합물의 지방분화에 대한 영향을 평가할 수 있다(Figure 1-9).

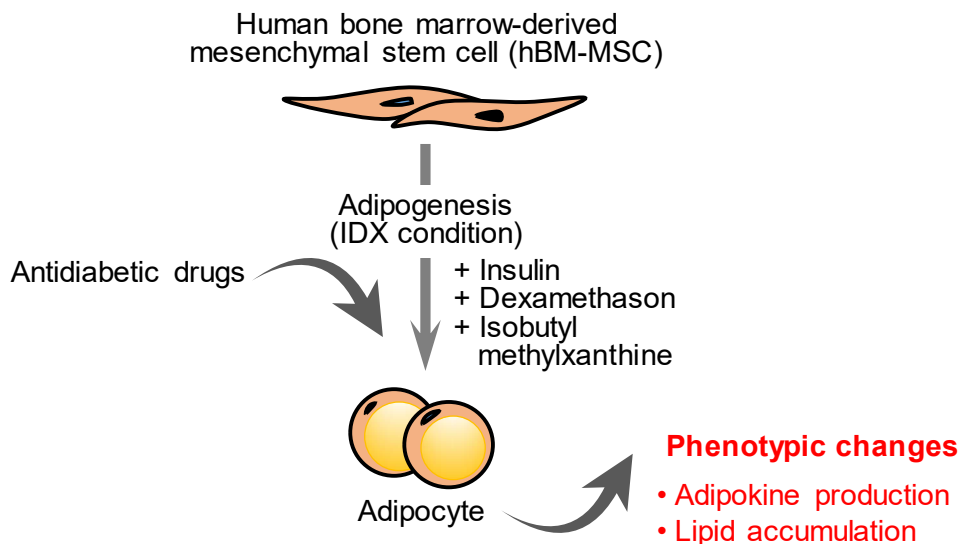


Figure 1-9. Adipogenesis model of hBM-MSCs

아디포카인 중 아디포넥틴은 지방세포 내에서 지방분화에서 중심적인 역할을 하는 전사인자인 퍼옥시좀 증식체-활성화 수용체(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)와 레티노이드 X 수용체(retinoid X receptor, RXR)가 리간드 결합에 의해 활성화되어 생성된다(Figure 1-10) [Straub & Scherer, 2019]. 이 때, 아디포넥틴은 PPAR의 다른 하위 타겟 유전자와 함께 지방분화뿐만 아니라 다양한 조직에서 포도당과 지질대사를 조절하여 대사 항상성 유지에 기여한다[Straub & Scherer, 2019]. 특히, 아디포넥틴은 비만, 2형 당뇨병, 비알콜성 지방간염 등 대사성 질환이나 유방암, 결장직장암 등에서 그 혈중 농도가 감소하는 것이 알려져 있으므로, 이들 질환에 대한 치료 후보물질 발굴에 유용한 지표로 기능할 수 있다[Li et al., 2009; Polyzos et al., 2010; Murphy et al., 2018].

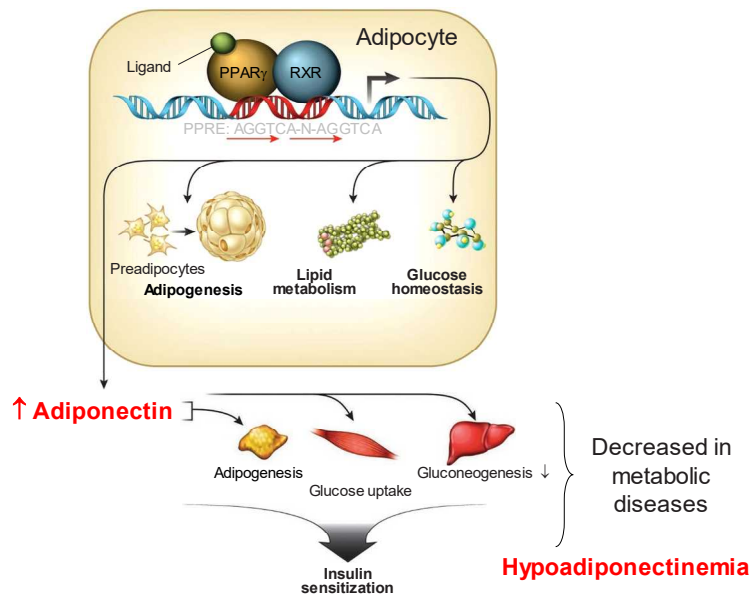


Figure 1-10. Biosynthesis, roles and functions of adiponectin [Modified from Ahmadian et al., 2013]

지방분화는 인슐린, 텍사메타손, 아이소뷰틸메틸잔틴을 포함하는 조건 (IDX 조건)에서 배양하여 유도한다. 다만, 설치류 3T3-L1 지방전구세포를 IDX 조건에서 배양하면 거의 모든 세포가 지방세포의 표현형을 나타내는 반면, hBM-MSC를 같은 수준으로 분화시키는 데에 IDX 조건은 충분하지 않다[Yu et al., 2017]. 지방분화를 최대화하기 위해서는 PPAR  $\gamma$  효능약을 추가할 수 있는데, 특히, 파라벤류, 프탈레이트류, 폴리염화바이페닐류, 유기주석 화합물 등은 핵수용체의 활성화를 유도하여 hBM-MSC의 지방분화에 기여할 수 있기 때문에, 이 모델을 오비소젠의 지질 대사에 대한 영향을 평가하는 데에 사용하기 적합하다[Ahn et al., 2019a; Ko et al., 2022a].

### 제 3 절 지방분화 모델을 이용한 활성 평가

#### 1.3.1. 아디포넥틴 분비 촉진 화합물

hBM-MSK의 지방분화 모델에서 아디포넥틴의 분비를 촉진할 수 있는 화합물로 티아졸리딘다이온계 항당뇨약 피오글리타존(pioglitazone)과 설폰닐우레아계 항당뇨약인 글리벤클라마이드(glibenclamide)가 알려져 있다(Figure 1-11) [Yu et al., 2017; An et al., 2020]. 이들은 PPAR $\gamma$  효능약(agonist)으로 보고되었다. 한편, 의약품이 아니고 페인트, 가소제 등 산업적인 목적으로 사용되는 화합물 중에서도 아디포넥틴의 분비를 촉진하는 PPAR $\gamma$  효능약 삼부틸화주석(tributyl tin, TBT)이나 벤질부틸프탈레이트(benzyl butyl phthalate, BBP)가 대사교란물질로 평가되었다. 즉, hBM-MSK의 지방분화 모델은 신약 후보물질 탐색뿐만 아니라 대사교란물질(metabolic disruptor)의 평가를 위한 동물대체 시험법으로 활용될 수 있다.

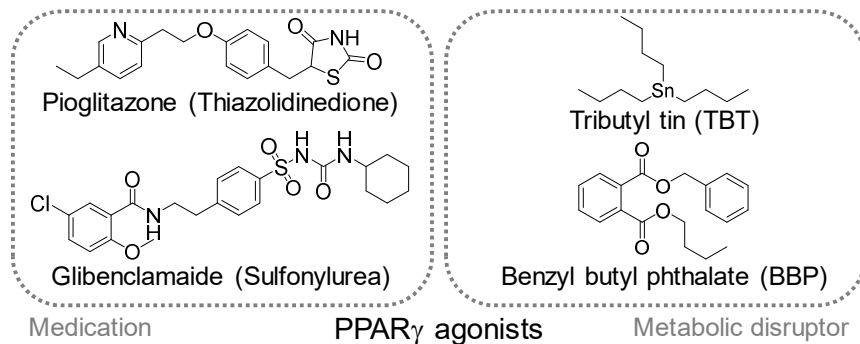


Figure 1-11. Representative adiponectin secretion-inducing compounds

아디포넥틴 분비 촉진 화합물은 PPAR $\gamma$  수용체 뿐만 아니라, PPAR의

다른 아형, 그리고 에스트로젠 수용체(estrogen receptor, ER) 등 다른 핵수용체를 함께 조절함으로써 그 영향을 나타내는 것으로 알려져 있다 (Figure 1-12).

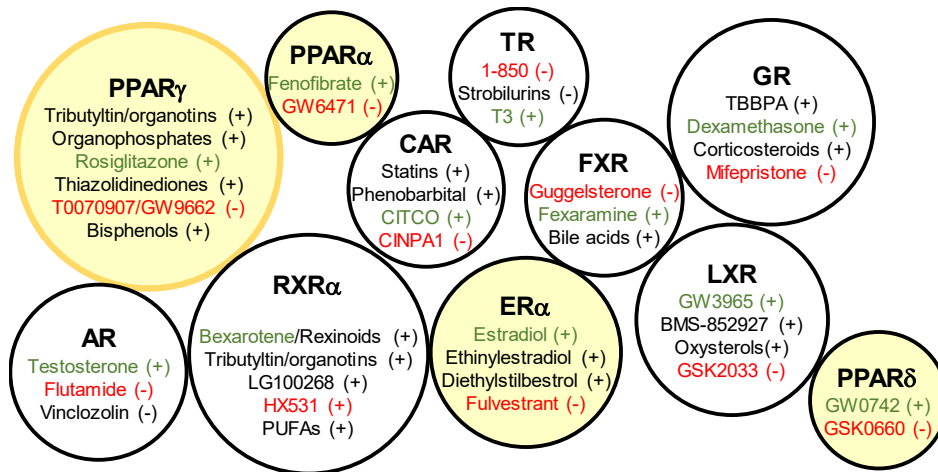
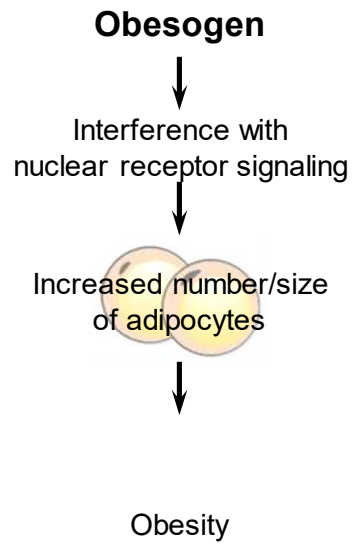


Figure 1-12. Nuclear hormone receptor modulators regulating adipogenesis and adiponectin biosynthesis [Modified from Kassotis & Stapleton, 2019]

### 1.3.2. 지방분화 모델을 이용한 잠재적 대사교란 물질 탐색

반면, 치료 후보물질이 아니고, 환경적으로 의도치 않게 노출되거나 관련 질환의 치료 목적으로 사용되지 않으면서 노출되는 화장품 원료 등에 대하여서는 지질 대사의 발달이나 항상성 유지를 해치는 잠재적 오비소젠(obesogen, 비만유발물질) 화합물을 평가하는데 활용할 수 있다 [Holtcamp, 2012; Ahn et al., 2019a; Heindel & Blumberg, 2019; Shin et al., 2020; Ko et al., 2022a]. 이들 화합물들은 주로 여러 조직에서 콜레스테롤과 지질 대사를 담당하는 퍼옥시좀 증식체-활성화 수용체(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)를 비롯한 핵수용체에 결합하여 지방분화 과정에 영향을 미치게 된다 (Figure 1-13) [Harmon et al., 2011]. 대표적인 오비소젠으로 TBT, 비스페놀 A (bisphenol A, BPA), 프탈레이트류(phthalates)와 파라벤류(parabens) 등이 알려져 있다(Figure 1-14) [Holtcamp, 2012; Heindel et al., 2022]. 산업적 목적으로 사용되는 화합물 뿐만 아니라 화장품 원료, 그 중에서도 특히 다수의 자외선 차단제 성분이 오비소젠으로 작용할 가능성을 보고하였다[Shin et al., 2020; Ko et al., 2022a]. 본 연구에서는 아보벤존과 시녹세이트의 오비소젠 가능성을 다루고자 한다.





**Figure 1-13.** Definition of obesogen [Modified from Heindel et al., 2022]

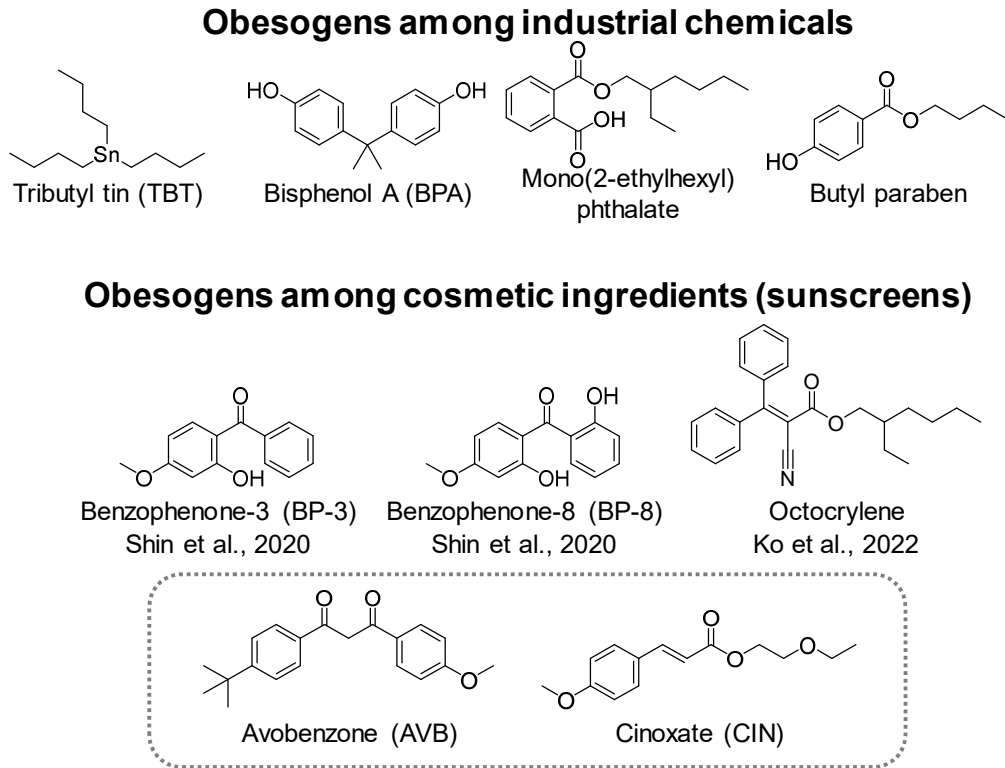


Figure 1-14. Representative obesogens among industrial chemicals and cosmetic ingredients

### 1.3.2.1. 아보벤존

아보벤존(부틸 메톡시다이벤조일메테인)은 자외선 A (UVA)로 인한 피부의 손상을 예방하기 위한 UVA 자외선차단제 성분으로 광범위하게 사용된다[Uter et al., 2014]. 미국 FDA의 자외선차단제 규제에 따르면, 일반의약품으로 판매되는 자외선차단제 제제에 최대 3% 농도의 아보벤존을 사용할 수 있다[Wang & Lim, 2011]. 아보벤존의 많은 사용으로 강이나 호수의 담수를 통해 수생환경으로 다량이 유입된다[Poiger et al., 2004]. 따라서, 아보벤존은 직접 피부에 사용하여 사람의 피부에 영향을 미칠 뿐만 아니라, 간접적으로 사람과 수생동물에게 영향을 미칠 수 있다. 아보벤존은 접촉성 피부염을 유발할 수 있는 것으로 보고되었지만

[Motley & Reynolds, 1989], 상대적으로 안전하게 사용할 수 있는 것으로 알려져 있다. 아보벤존은 UV에 의해 분해되어 대사될 수 있는데, 아보벤존의 광분해 대사산물은 자외선차단제 유도 피부 독성의 주요 원인으로 여겨진다[Jansen et al., 2013]. 유럽화학물질청(European Chemicals Agency, ECHA)의 자료에 따르면, 토끼에 대한 21일의 반복투여 피부 독성 시험에서 최대무독성용량(no observed adverse effect level, NOAEL)이 360 mg/kg/day 수준으로 나타났는데, 사람 피부에 대한 아보벤존의 최소 독성 용량은 평가되지 않았다. 따라서, 본 연구에서는 사람 각질형성세포(NHEK)에 대한 아보벤존의 전사체 수준의 영향을 평가하기 위해 마이크로어레이(microarray) 연구를 수행하였다.

### 1.3.2.2. 시녹세이트

현재 UVB 자외선 차단제의 오비소젠 가능성은 잘 알려져 있지 않다. 시녹세이트(2-에톡시에틸 4-메톡시 신남산)과 옥티노세이트(2-에틸헥실 4-메톡시 신남산)은 메톡시 신남산 유도체로서 UVB 차단제로 사용되고 있다[Wang & Lim, 2011]. 미국 21CFR Part 352.50의 규제에 따르면 시녹세이트와 옥티노세이트는 자외선차단제 제제에서 각각 최대 3%와 7.5% 용량으로 사용할 수 있다. ECHA의 자료에 따르면, 옥티노세이트는 유럽에서 연간 1,000-10,000 톤 정도가 제조 또는 수입되고 있다. 시녹세이트에 대한 정보는 잘 알려져 있지 않다. 광노화(photoaging)과 흑색종의 발달을 막기 위해 자외선차단제를 사용하는 것이 추천되지만, 아보벤존과 마찬가지로 생태계 유입을 통한 사람에 대한 간접적인 노출이 우려된다[Chen et al., 2014]. 특히 시녹세이트와 옥티노세이트는 잠재적인 내분비교란물질이며[Lichtensteiger et al., 2015], UN 환경 프로그램에 의해 CAT1 (내분비교란의 증거가 있는 물질)으로 분류된다. 다만, 이

들 메톡시신남산 유도체의 잠재적인 오비소젠 특성은 조사되지 않았다. 화학정보학적 접근으로부터 메톡시신남산 유도체는 알려진 오비소젠인 벤조페논류 및 프탈레이트류와 구조적으로 유사한 것으로 나타나 이들의 잠재적인 오비소젠 특성을 검증하였다.

### 1.3.3. 아디포넥틴 분비 촉진 천연물

중간엽 줄기세포의 지방분화 모델을 이용하여 천연물로부터 다수의 아디포넥틴 분비 촉진 약리단이 확인된 바 있다[Ahn et al., 2018; Ahn et al., 2019c] (Figure 1-15). 특히 다수의 플라보노이드 골격 화합물이 아디포넥틴 분비를 촉진시킬 수 있었다[Ahn et al., 2019b; Ko et al., 2022b; Ko et al., 2022c]. 본 연구에서는 플라보노이드를 중심으로 하여 생물화학정보의 통합적 분석을 통해 아디포넥틴 분비 촉진 활성을 예측하기 위한 기계학습 모델을 구축하고자 하였다.

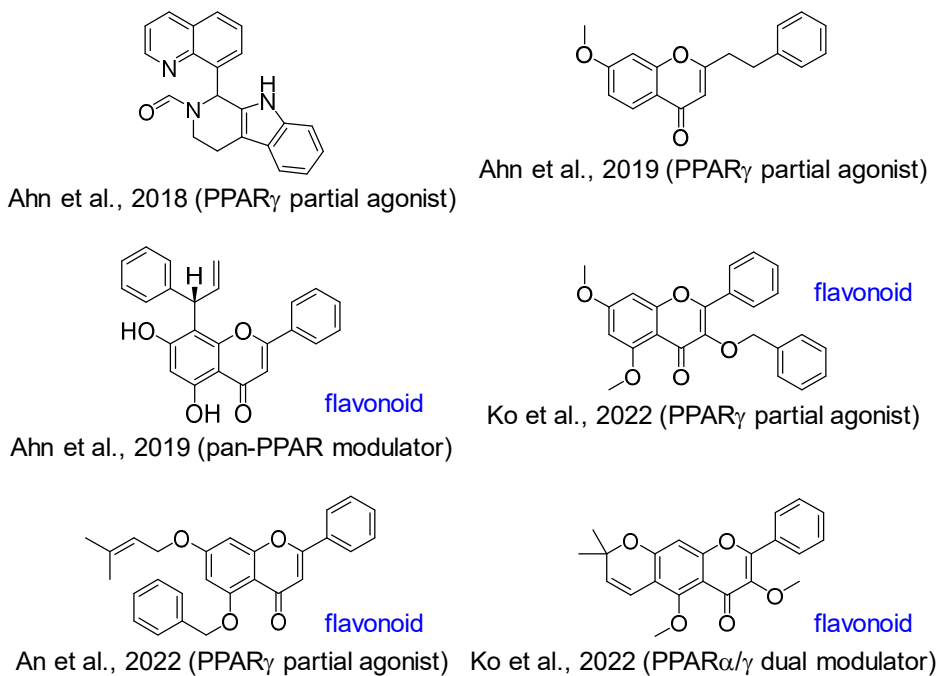


Figure 1-15. Representative adiponectin secretion-inducing natural products

#### 1.3.2.1. 플라보노이드

다양한 구조의 플라보노이드 및 관련 천연물의 아디포넥틴 분비 촉진 화합물로 나타났다. 플라보노이드는 폴리페놀 화합물로 다양한 식물과 미

생물에서 발견되며, 세포분화 및 증식, 염증, 대사 등 여러 생물학적 과정에 영향을 미치는 것으로 나타났다[Babu et al., 2013; Raffa et al., 2017; Ren et al., 2019]. 플라보노이드의 분자 타겟은 아디포넥틴의 생합성과 지방세포 분화와 관련된 여러 핵수용체와 lipoxygenase, cyclooxygenase, xanthine oxidase를 포함한다[Avior et al., 2013; Ribeiro et al., 2014; Lin et al., 2015]. 플라보노이드의 대사 관련 영향은 주로 에스트로젠 수용체(estrogen receptor, ER), PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , 및 간 X 수용체 (liver X receptor, LXR) 등 핵수용체에 작용함으로써 나타난다. 특히, 플라보노이드 화합물은 공공 데이터베이스로부터 이용 가능한 화학생물학적 데이터가 가장 풍부한 천연물군 중 하나이기 때문에 본 연구에서는 화합물의 아디포넥틴 분비 촉진 표현형을 예측하기 위한 기계학습 모델을 플라보노이드에 적용하였다.

본 연구에서는 이러한 아디포넥틴 분비 촉진 화합물이 핵수용체 또는 지방분화 표현형에 미치는 영향을 생물화학정보학적 접근법을 통해 평가 또는 예측한 결과들을 다룬다. 생물화학정보학 접근을 기반으로 제안된 두 가지 오비소젠, 아보벤존과 시녹세이트의 오비소젠 표현형에 대한 실험적 검증 과정을 다룬다. 그리고 생물화학정보학이 연계된 기계학습을 표현형 기반 스크리닝 방법에 적용하여 화합물의 효능 및 독성 예측을 위한 분석 접근법을 제시한다.

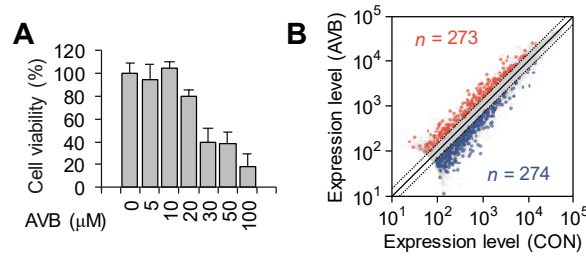
## 제 2 장 결과 및 고찰

### 제 1 절 화학생물정보학을 활용한 오비소젠의 동정

#### 2.1.1. 전사체 분석을 통한 아보벤존 유도 오비소젠 대사교란 표현형 탐색

##### 2.1.1.1. 피부각질형성세포에 대한 아보벤존의 전사체 수준 영향 평가

아보벤존(avobenzene, AVB)은 장파장의 자외선(ultraviolet, UV) A 차단제로써 선크림 등 화장품의 원료로 사용된다. 일상생활 중에서 노출되는 수준의 아보벤존은 각질형성세포의 세포사를 유발하지 않기 때문에, 아보벤존을 정상 사람 각질형성세포(normal human epidermal keratinocyte, NHEK)에 처리하여 세포독성이 나타나지 않는 농도를 결정하였다(Figure 2-1A). 아보벤존은 최대 34.9  $\mu\text{M}$  농도까지 세포독성을 나타내지 않았다. 따라서, 10  $\mu\text{M}$  농도의 아보벤존을 NHEK에 24시간 동안 처리한 후 마이크로어레이를 이용한 전사체 분석을 수행하였다(NCBI GEO, GSE122901). 전체 54,000개 프로브로부터 검출할 수 있는 22,482개의 유전자 중 아보벤존 처리로 인해 발현이 유의하게 변화한 차등발현유전자(differentially expressed genes, DEGs)를 선정하였을 때, 273개의 상향조절 DEGs와 274개의 하향조절 DEGs를 얻을 수 있었다(Figure 2-1B).

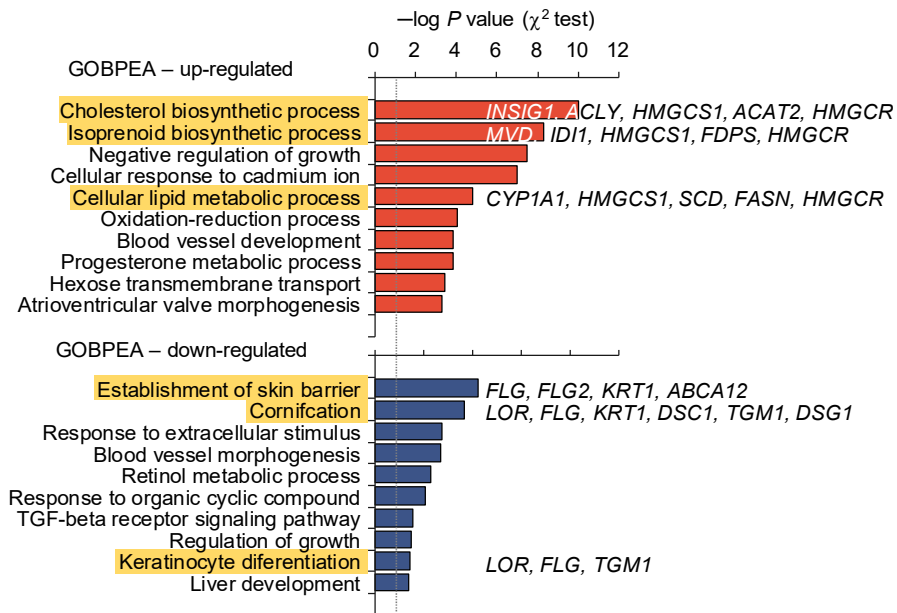


**Figure 2-1. Avobenzon-induced transcriptional changes in NHEKs.** (A) 아보벤존의 NHEK에 대한 세포 독성을 평가함(평균±표준 편차). (B) 아보벤존을 처리한 NHEK에서 대조군(CON)과 아보벤존 처리군(AVB)의 발현 수준을 도시함. 선정된 DEG의 개수를 표시함.

아보벤존에 의해 유도된 생물학적 변화를 이해하기 위해 유전자 온톨로지 생물 경로(Gene Ontology biological process, GO BP) 기반의 기능적 모듈 분석을 수행하였다. 총 12,297개의 GO BP 모듈 중 DEGs가 포함된 2,998개의 GO BP 모듈의 유전자들과 DEG를 비교하여 피셔 정확 검정(Fisher's exact test) 또는 카이제곱 검정( $\chi^2$  test) 결과로부터 유의하게 변화한 기능적 모듈을 도출할 수 있었다. 아보벤존을 처리한 NHEK에서 변화한 상향조절 DEG는 콜레스테롤 생합성(cholesterol biosynthetic process) 등 지질대사 연관 경로와 가장 큰 관련이 있는 것으로 나타났다( $P < 10^{-10}$ , Figure 2-2). 아보벤존에 의해 하향조절된 274개의 DEG 중에는 필라그린(*FLG*), 로리크린(*LOR*), 케라틴 1 (*KRT1*), 트랜스글루타미네이즈 1 (*TGMI*) 등의 각질형성세포 분화와 관련된 유전자가 포함되어 있었다. 따라서, 기능적 모듈 분석 결과, 피부장벽 구축(establishment of skin barrier, GO:0061436), 각질화(cornification, GO:0070268), 각질형성세포 분화(keratinocyte differentiation, GO:0030216)와 같은 GO BP 모듈이 유의하게 영향을 받은 것으로 나타



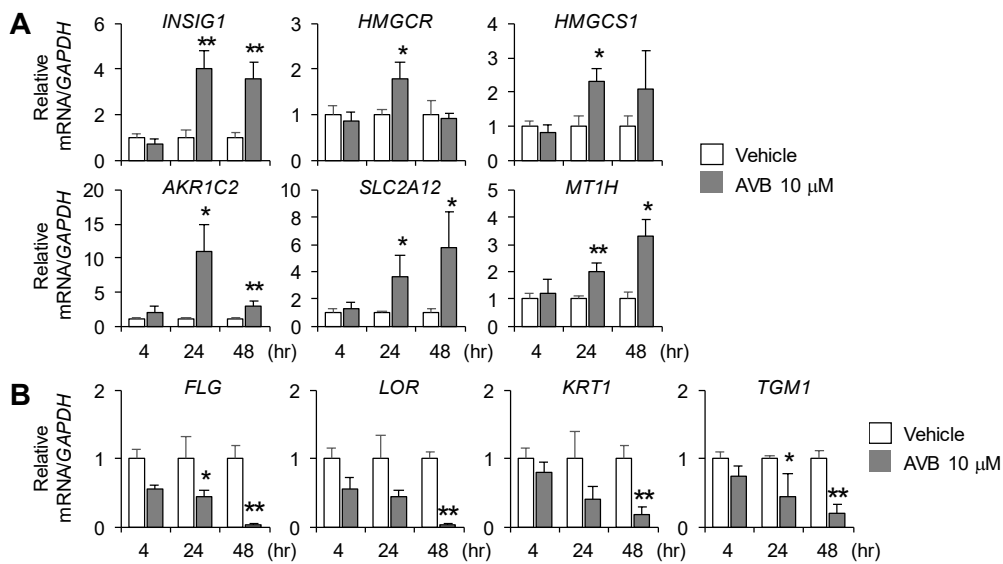
났다. 즉, 아보벤존이 피부 투과성이나 피부장벽 구조의 항상성에 영향을 미칠 가능성을 보여주었다.



**Figure 2-2. Enriched GO BP modules in the DEGs of avobenzone-treated NHEKs.** 선정된 DEG를 이용한 기능적 모듈 분석 결과. 상향조절 또는 하향조절 DEG에 의해 통계적으로 유의하게 기능이 변화한 생물학적 경로(모듈)를 각 모듈에 포함된 유전자와 함께 표시함.

이어서, 기능적 모듈 분석으로부터 제안된 콜레스테롤 및 지질 대사 조절 관련 DEG를 실험적으로 검증하기 위하여 Q-RT-PCR 분석을 수행하였다. NHEK에 아보벤존 처리 4, 24, 48시간 후 콜레스테롤 대사와 관련된 유전자 *INSIG1*, *HMGCR*, *HMGCS1* 등의 발현량 변화를 측정하였을 때, 마이크로어레이 결과와 일관성 있게 이들 유전자의 mRNA 수준이 아보벤존 24시간 처리 후 크게 증가하였다(Figure 2-3A). 다만, 48

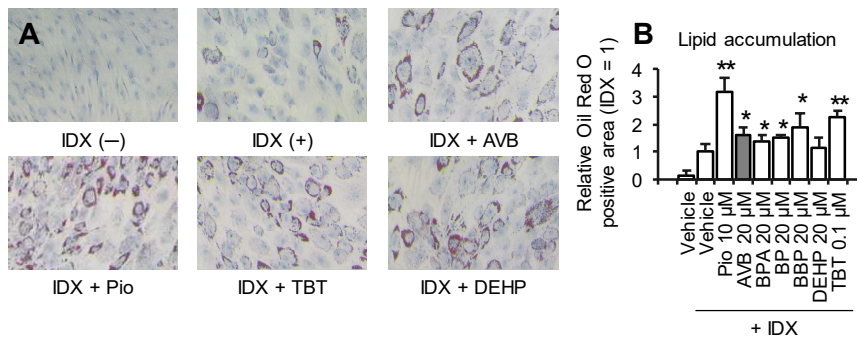
시간 후에 *INSIG1*과 *HMGCS1* 유전자의 발현 증가 상태는 유지되었지만 *HMGCR*은 그렇지 않았다. 아보벤존 처리에 의한 *AKR1C2*, *SLC2A12*, *MT1H* 유전자의 발현 증가도 추가적으로 검증하였다. 한편, 아보벤존에 의해 하향조절된 DEG는 피부장벽의 기능과 관련이 있는 것으로 나타났는데, mRNA 정량 분석에서 아보벤존에 의해 *FLG*, *LOR*, *KRT1*, *TGM1*의 mRNA 수준이 실제로 감소하는 것이 확인되었다 (Figure 2-3B). 따라서, GO BP 기능적 모듈 분석으로부터 확인된 특징적인 변화는 독립적인 실험으로부터 검증되었다.



**Figure 2-3. Validation of the DEGs of avobenzone-treated NHEKs.** 마이크로어레이 분석결과의 검증. 각 유전자의 mRNA 수준을 Q-RT-PCR을 통해 평가함(평균±표준편차). (A) 상향조절 DEG에 포함되어 지질대사 연관 유전자의 mRNA 수준. (B) 하향조절 DEG에 포함되어 피부장벽 기능 유지와 관련된 유전자의 mRNA 수준. 통계적 유의성: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

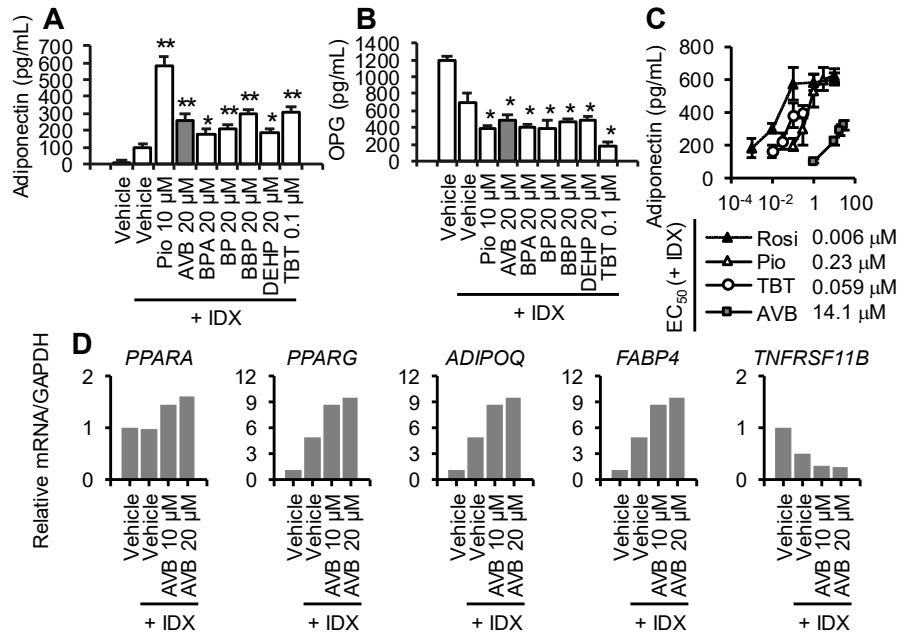
### 2.1.1.2. 지방분화 표현형에 대한 아보벤존의 영향

아보벤존의 지질 대사 및 지방분화 표현형에 대한 영향을 조사하기 위해 hBM-MSCs의 지방분화 모델을 사용하였다. 아보벤존과 함께, 지방분화를 촉진시킬 수 있는 항당뇨약 피오글리타존, 그리고 BPA, 뷰틸파라벤 (butyl paraben, BP), BBP, TBT 등 알려진 오비소젠의 지방분화에 대한 영향을 평가하였다. 오일레드오를 이용한 지질 염색 결과, 아보벤존과 다른 오비소젠은 hBM-MSC의 지방분화 중 분화된 지방세포의 지질액적의 수와 크기를 증가시켰다(Figure 2-4A). 그 정도를 정량하였을 때, 20  $\mu$ M 농도의 아보벤존은 알려진 오비소젠인 BPA, BP, BBP와 마찬가지로 유의하게 50% 이상 지방축적을 증가시킨 것으로 나타났다(Figure 2-4B).



**Figure 2-4. Effects of avobenzon on obesogenic phenotype during adipogenesis in hBM-MSCs.** 아보벤존의 지방분화 연관 오비소젠 표현형 평가. (A) hBM-MSC의 지방분화 중 아보벤존 또는 알려진 오비소젠을 함께 처리한 후 오일레드오 염색을 통해 지방의 축적을 관찰함. (B) 지방의 축적 수준을 정량화함(평균±표준편차). 통계적 유의성: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

분화된 지방세포에서 분비되는 아디포넥틴은 IDX 대조군과 비교하였을 때 아보벤존에 의해 2배 가까이 증가하였다(Figure 2-5A). 한편, 골분화 중에 분비가 증가하고 지방분화 중에 감소하는 오스테오프로테제린 (osteoprotegerin, OPG)의 생성은 유의하게 감소하였다(Figure 2-5B). PPAR $\gamma$  효능약 피오글리타존의 아디포넥틴 분비 촉진능을 100% 반응으로 하였을 때, EC<sub>50</sub>로 평가된 아보벤존의 농도의존적 아디포넥틴 분비 촉진 활성은 14.1  $\mu$ M 로 나타났다(Figure 2-5C). 아보벤존에 의해 유도된 지방분화를 재확인하기 위하여 각각 PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , 아디포넥틴, 지방산 결합 단백질 4 (FABP4), 오스테오프로테제린의 유전자인 *PPARA*, *PPARG*, *ADIPOQ*, *FABP4*, *TNFRSF11B*의 mRNA 수준을 측정하였을 때 아보벤존은 *PPARA*, *PPARG*, *ADIPOQ*, *FABP4*의 발현을 증가시키고 *TNFRSF11B*의 발현을 감소시켰다(Figure 2-5D). 종합하면, 아보벤존은 다른 오비소젠과 유사하게 지방분화 표현형을 유도하는 것으로 나타났다.

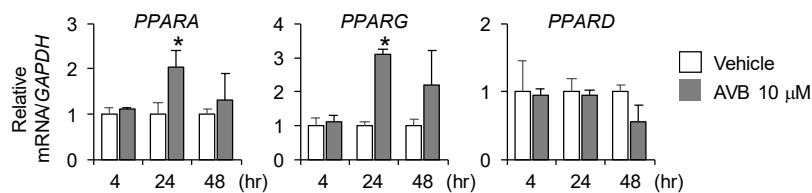


**Figure 2-5. Effects of avobenzon on adipogenesis-related cytokine production and gene transcription during adipogenesis in hBM-MSCs.** 아보벤존의 지방분화 연관 오비소젠 표현형 평가. (A) 지방분화 유도 후 상층액 중의 아디포넥틴 수준을 ELISA를 이용해 정량함(평균±표준편차). (B) 지방분화 유도 후 상층액 중의 오스테오프로테제린(OPG) 수준을 ELISA를 이용해 정량함(평균±표준편차). (C) 아디포넥틴 분비 수준을 농도의존적으로 평가하여 EC<sub>50</sub> 값을 산출함. (D) 지방분화 연관 지표 유전자의 mRNA 수준을 Q-RT-PCR을 이용해 평가함(평균±표준편차). 통계적 유의성: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

### 2.1.1.3. PPAR 수용체에 대한 아보벤존의 영향

PPAR의 세 가지 아형,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 는 모두 NHEK를 포함한 다양한 조직에서 콜레스테롤과 지질 대사의 조절에 중심적인 역할을 담당한다. 비록 이들 수용체의 유전자가 아보벤존 유도 DEG에 선정되지는 않았지만

PPARA와 PPARG의 발현이 각각 63%, 72% 증가한 것으로 나타났다. PPAR의 발현량 변화를 검출하기에 마이크로어레이 프로브의 민감도가 충분하지 않았을 수 있으므로 PPAR의 mRNA 수준을 측정하기 위한 Q-RT-PCR을 수행하였다. 아보벤존 처리 24시간 후, NHEK에서 *PPARA*와 *PPARG*의 발현이 대조군과 비교하여 유의하게 증가하였다 (Figure 2-6). 다만, 마이크로어레이 결과와 일관성 있게 *PPARD*의 발현은 영향을 받지 않았다. 따라서, 이 결과는 아보벤존이 NHEK에서 PPAR 수용체를 통해 지질대사 경로에 영향을 미칠 잠재적인 가능성을 보여주었다.

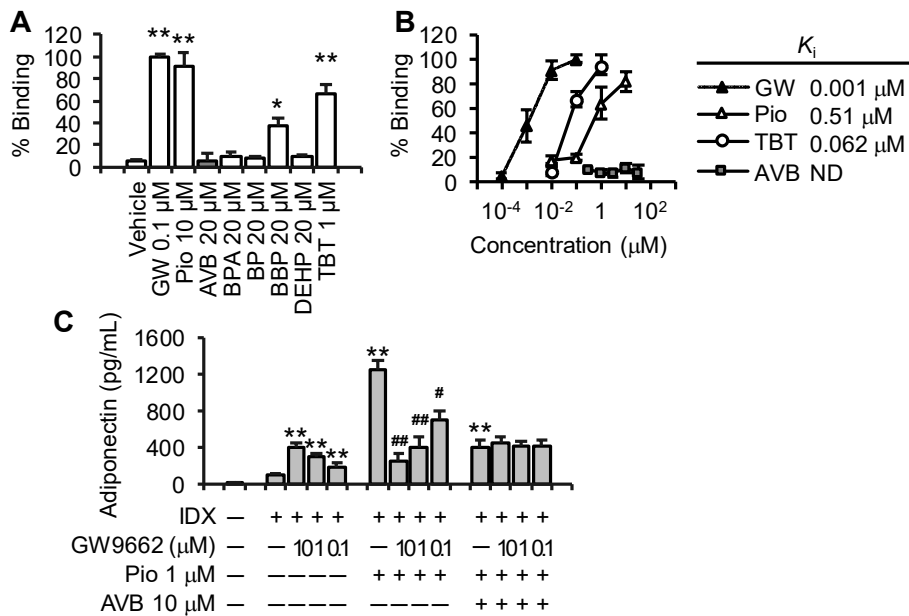


**Figure 2-6. Effects of avobenzonone on the gene transcription of PPARs in avobenzonone-treated NHEKs.** PPAR 수용체 유전자 (*PPARA*, *PPARG*, *PPARD*)의 mRNA 수준을 Q-RT-PCR을 이용하여 평가함(평균±표준편차). 통계적 유의성: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

#### 2.1.1.4. 아보벤존의 PPAR $\gamma$ 비의존적 오비소젠 표현형

다수의 오비소젠은 지방분화 핵심적인 조절자인 PPAR $\gamma$  수용체에 직접 결합하여 지방분화에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 아보벤존이 PPAR $\gamma$  경로에 미치는 영향을 평가하기 위하여 TR-FRET 기반의 PPAR $\gamma$  결합 시험을 수행하였다. BBP와 TBT는 20  $\mu$ M 농도에서 각각 36.6% 및 68.0% 수준으로 결합한 반면, 아보벤존과 BPA, BP은 PPAR $\gamma$

에 결합하지 않았다(Figure 2-7A). 아보벤존의 오비소젠 활성화는 실제로 PPAR $\gamma$ 와 독립적으로 나타났는지 재확인하기 위하여 아보벤존에 의해 유도된 아디포넥틴 생성의 증가에 대한 PPAR $\gamma$  길항약인 GW9662의 영향을 조사하였다(Figure 2-7C). GW9662를 단독 처리하였을 때, PPAR $\gamma$  부분효능약의 특성을 나타내며 지방분화를 촉진하였지만, PPAR $\gamma$  효능약인 피오글리타존에 의한 지방분화는 유의하게 억제할 수 있었다. 반면, GW9662는 아보벤존 유도 지방분화를 억제할 수 없었다. 따라서 아보벤존에 의해 유도된 오비소젠 표현형은 PPAR $\gamma$ 에 비의존적인 기전으로 일어남을 알 수 있었다.



**Figure 2-7. Effects of avobezone on PPAR $\gamma$ -mediated adipogenesis.** 아보벤존의 PPAR $\gamma$  경로에 대한 영향 평가. (A) 아보벤존 또는 기보고된 오비소젠의 PPAR $\gamma$  결합 활성을 TR-FRET 기반의 방법으로 평가함(평균 $\pm$ 표준편차). (B) 평가된 결합 활성으로부터 Cheng-Prusoff 분석을 통해 저해상수( $K_i$ ) 값을 결정함. (C) hBM-MS

의 지방분화 중 아보벤존 및/또는 PPAR $\gamma$  효능약 피오글리타존(Pio), PPAR $\gamma$  길항약 GW9662을 처리한 후 ELISA를 이용하여 상층액의 아디포넥틴 수준을 정량함(평균 $\pm$ 표준편차). 통계적 유의성: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .



## 2.1.2. 화학정보학 분석을 통해 제시된 시녹세이트의 오비소젠 특성 규명

### 2.1.2.1. 화학적유사도 분석을 통한 잠재적 오비소젠 탐색

화학정보학 기반의 연관형(read-across) 접근법은 다른 활성 물질과 비교하여 정량적으로 결정된 화학적유사도를 이용하여 특정 화합물의 효능 및/또는 독성을 예측하는 방법이다[Schultz et al., 2015]. 대사교란 특성이 알려져 있지 않은 UVB 자외선 차단제 메톡시 신남산 유도체(Figure 2-8), 즉, 시녹세이트(cinoxate, CIN)와 옥티노세이트(octinoxate, OCT)의 화학적유사도를 36종의 알려진 오비소젠의 구조와 비교하여 결정하였다 [Veiga-Lopez et al., 2018]. 화학적유사도를 이용하여 2차원 상에 구조가 서로 비슷할 경우 가까이 위치하도록 오비소젠과 메톡시 신남산 유도체를 도시화하고 5개의 집단으로 군집화 하였다(Figure 2-9A). 이 때, 메톡시 신남산 유도체들은 벤조페논류, 파라벤류 및 프탈레이트류와 구조적으로 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났다. 특히, 앞서 보고한 오비소젠 아보벤존과 가장 구조적으로 유사한 것으로 나타나 메톡시 신남산 유도체들의 지방분화 표현형에 대해 평가하였다(Figure 2-9B).

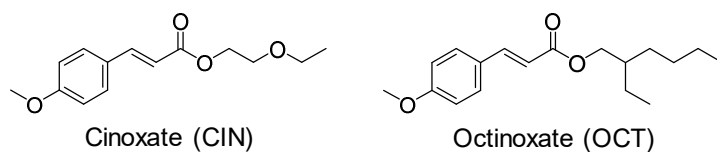
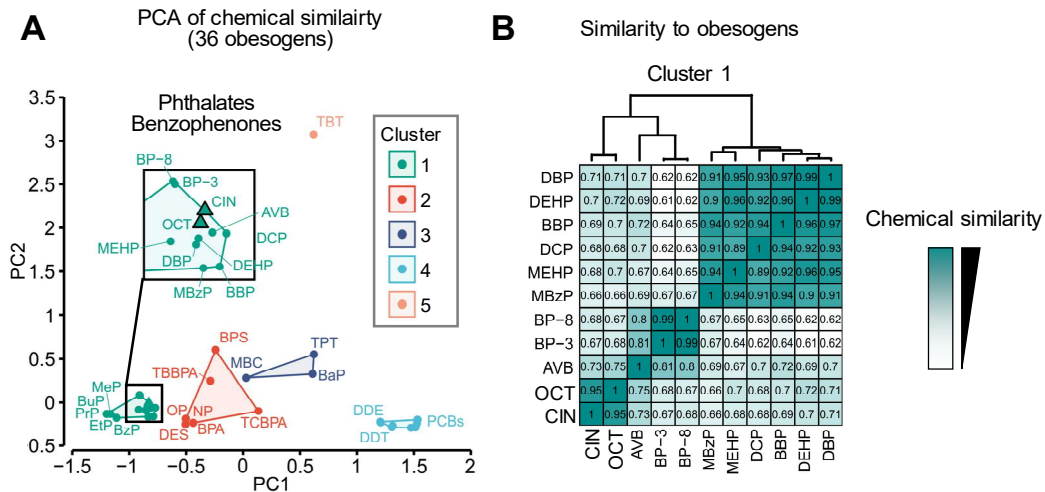


Figure 2-8. Chemical structures of methoxy cinnamate esters used as sunscreen ingredients

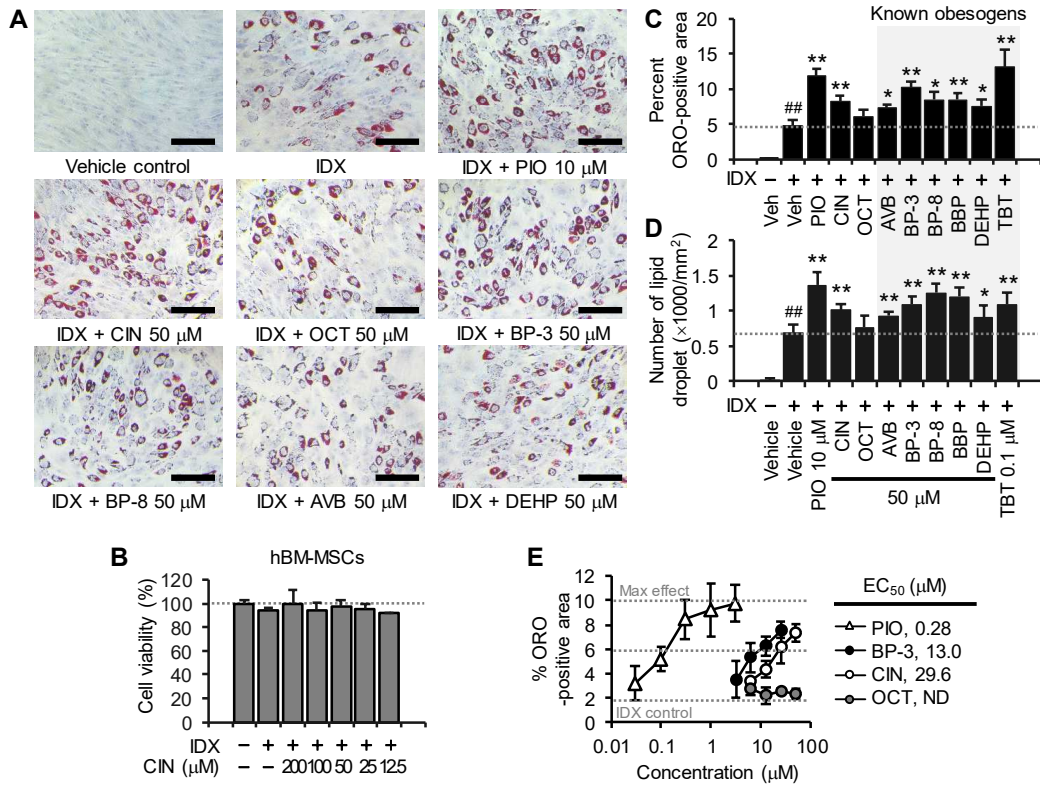


**Figure 2-9. Chemical similarity analysis of methoxy cinnamate esters and known obesogens.** 메톡시 신남산 유도체와 오비소겐의 화학정보학 분석. (A) 메톡시 신남산 유도체와 알려진 오비소겐의 군집화 결과. 각 화합물의 화학적 유사도를 기반으로 주성분분석(principal component analysis, PCA)를 수행하여 최상위 2개의 주성분(PC)을 2차원상 도시에 사용함. (B) 메톡시 신남산 유도체와 프탈레이트류, 벤조페논류 화합물의 화학적 유사도 비교. 유사도를 기반으로 계층적 군집화를 수행함.

### 2.1.2.2. 시녹세이트의 오비소겐 특성 검증

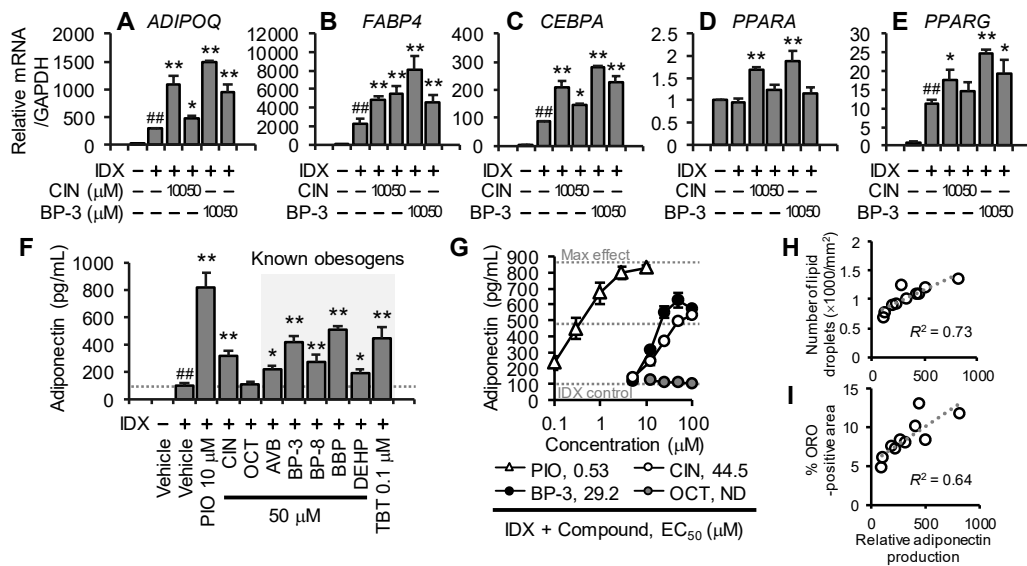
hBM-MSCs의 지방분화 모델에서 메톡시 신남산 유도체의 잠재적 오비소겐 가능성을 평가하였다. 오일레드오 염색을 통해 지방분화 표현형에 미치는 영향을 평가하였을 때, 5일 동안의 지방분화 후 세포독성이 나타나지 않는 농도의 시녹세이트는 지방 축적 수준을 다른 알려진 오비소겐인 벤조페논류, BBP, TBT와 마찬가지로 유의하게 증가시켰다(Figure 2-10A-D). 지방 축적 수준을 이미지 기반으로 정량하여 처방되는 항당뇨 약물 피오글리타존의 효과를 최대 효과로 하였을 때 시녹세이트에 의

한 지방 축적에 대한  $EC_{50}$ 는  $29.6 \mu\text{M}$  수준으로 나타났다(Figure 2-10E). 한편, 옥티노세이트는 지방 분화 표현형에 대한 유의한 영향이 없는 것으로 나타났다.



**Figure 2-10. Effects of methoxy cinnamate esters on obesogenic phenotype during adipogenesis in hBM-MSCs.** 시녹세이트의 지방분화 연관 오비소젠 표현형 평가. (A) hBM-MSC의 지방분화 중 시녹세이트 또는 알려진 오비소젠을 처리한 후 오일레드오 염색을 통해 지방의 축적을 관찰함. (B) 시녹세이트의 hBM-MSC에 대한 세포독성 평가 결과. (C-D) 지방의 축적 수준을 정량화하여 지방 축적 면적(C) 및 지방 액적의 수(D)로 나타냄(평균 $\pm$ 표준편차). (E) 지방 축적 수준을 농도의존적으로 평가하여  $EC_{50}$  값을 산출함. 통계적 유의성: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

다음으로, 시녹세이트를 비롯한 알려진 오비소젠의 아디포넥틴 생합성이 나 지질대사 연관 유전자의 전사에 대한 영향을 평가하였다. 시녹세이트는 *ADIPOQ*, *FABP4*, *CEBPA*, *PPARA*, *PPARG* 등 지방분화 지표 유전자들의 mRNA 수준을 유의하게 증가시킬 수 있었다(Figure 2-11A-E). 아보벤존과 벤조페논류와 마찬가지로 시녹세이트는 농도에서 아디포넥틴의 분비를 3배 이상 유의하게 촉진시켰다(Figure 2-11F). 아디포넥틴 분비 촉진에 대한 농도의존적 분석에서 EC<sub>50</sub>는 44.5 μM으로 나타났다(Figure 2-11G). 앞서 평가된 지방축적은 아디포넥틴 생성과 유의한 상관관계를 보였다(Figure 2-11H,I). 이러한 결과는 시녹세이트가 오비소젠 표현형에 미치는 영향을 뒷받침하며, 잠재적인 오비소젠으로 기능할 가능성을 보여주었다.

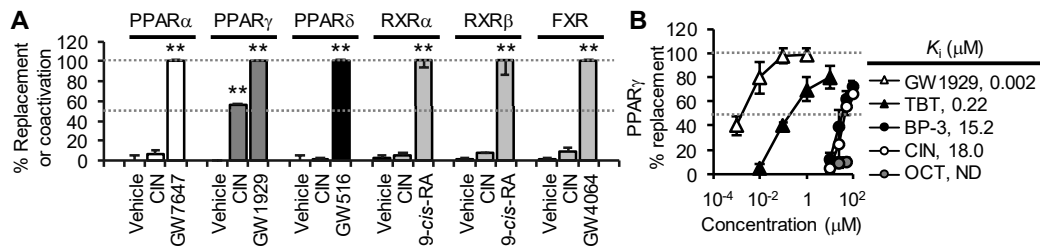


**Figure 2-11. Effects of cinoxate on adiponectin production and transcription of adipogenesis-related genes.** 시녹세이트의 지방분화 지표에 대한 영향 평가. (A-E) hBM-MSC의 지방분화 중 시녹세이트 또는 벤조페논-3을 처리한 후 Q-RT-PCR을 이용하여 지방분화 지표 유

전자의 mRNA 수준을 정량함(평균±표준편차). (F) 지방분화 후 상층액 중의 아디포넥틴 수준을 ELISA를 이용하여 정량함(평균±표준편차). (G) 아디포넥틴 수준을 농도의존적으로 평가하여 EC<sub>50</sub> 값을 산출함. (H-I) 지방분화 표현형과 아디포넥틴 농도의 상관분석 결과. 통계적 유의성: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

### 2.1.2.3. 시녹세이트의 PPAR $\gamma$ 효능약 특성 확인

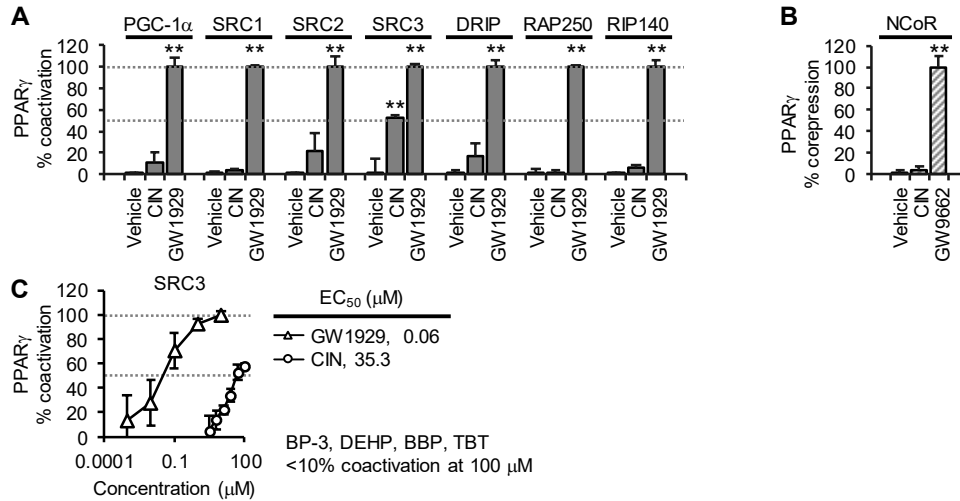
다양한 대사 관련 핵호르몬수용체, PPAR, RXR, 파네소이드 X 수용체 (farnesoid X receptor, FXR) 등이 오비소젠에 의해 활성화될 수 있다. hBM-MSK의 지방분화 모델에서 나타난 시녹세이트의 오비소젠 표현형이 이러한 핵수용체 경로과 직접적인 관련이 있는지 평가하기 위하여 TR-FRET 기반의 핵수용체 결합 시험을 수행하였다. PPAR 경쟁적 결합 시험에서, 시녹세이트는 50  $\mu$ M 농도에서 PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$ 에는 영향이 없으면서 PPAR $\gamma$ 에 대해 50% 이상의 결합력으로 선택적으로 결합할 수 있는 것으로 나타났다(Figure 2-12A). 시녹세이트는 또한 RXR $\alpha$ 와 RXR $\beta$ , FXR에 영향을 미치지 않았다. 시녹세이트의 PPAR $\gamma$ 에 대한 저해상수( $K_i$ ) 값은 18.0  $\mu$ M 수준으로, 기존에 보고된 오비소젠인 벤조페논-3 (benzophenone-3, BP-3)의 결합력과 유사한 수준으로 나타났다(Figure 2-12B).



**Figure 2-12. Effects of cinoxate on nuclear receptors.** (A) 시녹세이트의 PPAR 결합 또는 RXR 및 FXR 공활성화에 대한 영향을 TR-FRET 방법으로 평가함(평균±표준편차). (B) PPAR $\gamma$  결합에 대한 농도의존적 영향 평가를 수행함. 평가된 결합 활성으로부터 Cheng-Prusoff 분석을 통해 저해상수( $K_i$ ) 값을 결정함. 통계적 유의성: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

다른 핵수용체와 마찬가지로 PPAR은 리간드 결합 시 전사의 진행을 돕는 공조절자 단백질과 상호작용 할 수 있고, 그 결과 전사로 이어진다. 따라서, 시녹세이트가 결합한 PPAR $\gamma$  수용체에 어떤 공조절자가 상호작용하여 하위 신호전달 체계를 활성화하는지 평가하였다. 시녹세이트 처리는 PPAR $\gamma$ 의 PGC-1 $\alpha$ , SRC1, SRC2, DRIP, RAP250 등의 공활성자와의 상호작용에는 영향을 미치지 않았으며, 선택적으로 스테로이드 수용체 공활성자 3 (steroid receptor coactivator 3, SRC3)과 PPAR $\gamma$  사이의 상호작용을 촉진시켰다(Figure 2-13A). 백색지방세포의 발달에 중요한 조절자 중 하나로서 SRC3는 SRC2와 함께 PPAR $\gamma$ 의 인산화를 지연시키는 기능을 한다[Hartig et al., 2011]. 반면, 시녹세이트는 PPAR $\gamma$ 의 공억제자 NCoR의 모집을 촉진시키지 않아 시녹세이트가 PPAR $\gamma$  효능약으로 기능함을 알 수 있었다(Figure 2-13B). PPAR $\gamma$ -SRC3 상호작용 촉진에 대한 시녹세이트의  $EC_{50}$ 는 35.3  $\mu\text{M}$ 으로 결정되었다(Figure 2-13C). 흥미롭게도, 다른 오비소젠 BP-3, 비스(2-에틸헥실)프탈레이트

(bis(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP), BBP, TBT 등은 SRC3를 공활성화하지 않아 이러한 기전이 시녹세이트가 갖는 특징적인 경로임을 알 수 있었다.



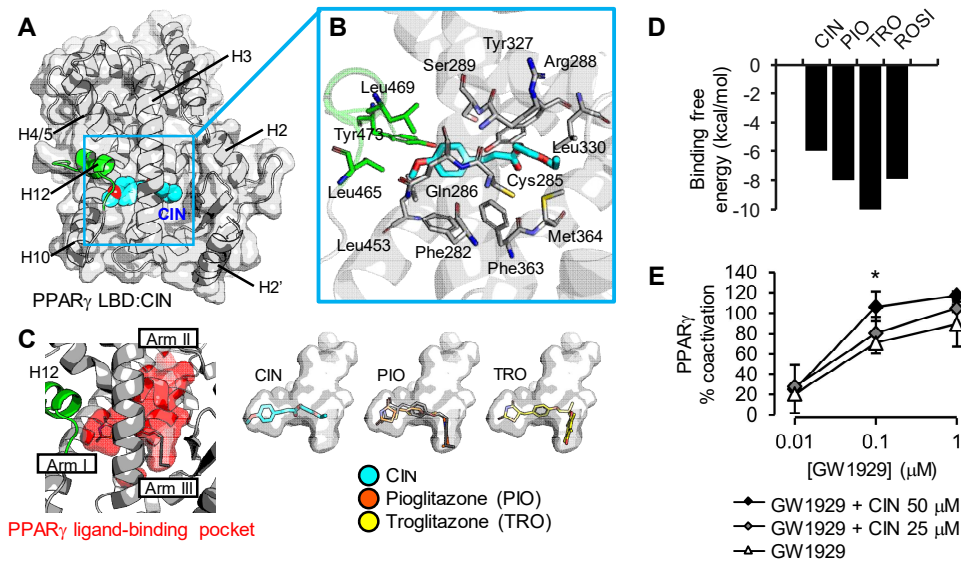
**Figure 2-13. SRC3-mediated PPAR $\gamma$  coactivation of cinoxate.** (A) 공활성자 PGC-1 $\alpha$ , SRC1, SRC2, SRC3, DRIP, RAP250, RIP140에 대하여 리간드 유도 PPAR $\gamma$  공활성화를 평가함(평균±표준편차). (B) 공억제자 NCoR에 대하여 리간드 유도 PPAR $\gamma$  공억제를 평가함(평균±표준편차). (C) SRC 매개 PPAR $\gamma$  공활성화를 농도의존적으로 평가함(평균±표준편차). 통계적 유의성: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

#### 2.1.2.4. 시녹세이트의 PPAR $\gamma$ 완전효능약 특성 확인

시녹세이트에 의한 PPAR $\gamma$  공활성화의 구조적 배경을 밝히기 위해 분자 모델링 연구를 수행하였다. PPAR $\gamma$  효능약 피오글리타존과 공결정화된 PPAR $\gamma$  리간드 결합 도메인(ligand binding domain, LBD)의 3차원 구조를 사용하였다(PDB ID: 5Y2O; Figure 2-14A). 에너지 안정화 결합 모델에서 시녹세이트는 PPAR $\gamma$  LBD의 helix 12 근처에 위치하며, Tyr473

간기와 상호작용할 수 있었다(Figure 2-14B). 이는 PPAR $\gamma$  완전효능약의 특징적인 결합 양상으로써, 시녹세이트가 PPAR $\gamma$  완전효능약으로 기능할 가능성을 제시하였다. 다만, 시녹세이트가 다른 PPAR $\gamma$  완전효능약에 비해 약한 효능을 보였기 때문에, 다른 티아졸리딘다이온계열 PPAR $\gamma$  완전효능약의 에너지 안정화 모델과 비교하였다(Figure 2-14C). PPAR $\gamma$  LBD의 결합 공극은 3개의 arm으로 이루어져 있는데, PPAR $\gamma$  완전효능약 피오글리타존, 트로글리타존, 로지글리타존은 arm I, arm III를 모두 차지할 수 있었지만, 상대적으로 표면적이 작은 시녹세이트는 arm I에만 한정적으로 위치하였다. 그 결과, 시녹세이트의 결합 자유에너지는 다른 완전효능약에 비해 약한 것으로 나타났고, 이러한 결합 양상이 시녹세이트의 효능을 제한하였을 것으로 보인다(Figure 2-14D). 다음으로, 시녹세이트가 실제로 PPAR $\gamma$ 의 완전효능약으로 기능하는지 실험적으로 확인하였을 때, PPAR $\gamma$  완전효능약에 의한 공활성화에 대해 가산적 영향을 보여 PPAR $\gamma$  완전효능약으로 나타났다(Figure 2-14E).



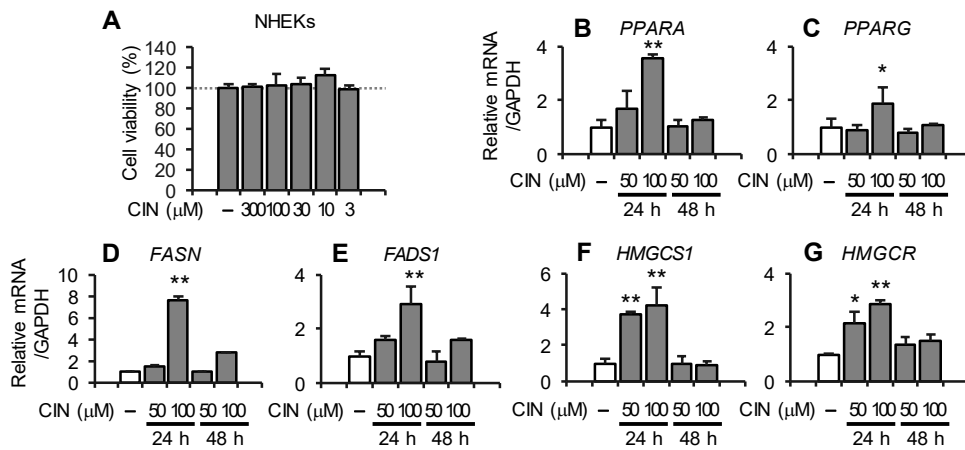


**Figure 2-14. PPAR $\gamma$  full agonism of cinoxate.** 시녹세이트의 PPAR $\gamma$  결합에 대한 분자 모델링 연구 결과. (A) PPAR $\gamma$  LBD (PDB ID: 5Y2O) 내에서 시녹세이트의 에너지 안전화 구조. 분자모델링 연구는 AutoDock Vina 소프트웨어를 활용하여 수행함. (B) 시녹세이트와 PPAR $\gamma$  LBD 내 잔기의 상호작용 양상. (C) 시녹세이트와 PPAR $\gamma$  완전 효능약의 결합양상 비교. (D) 시녹세이트와 PPAR $\gamma$  효능약의 결합자유 에너지 비교. (E) SRC 매개 PPAR $\gamma$  공활성화 시험에서 시녹세이트와 PPAR $\gamma$  완전효능약 GW1929를 함께 처리하여 부분효능약로 기능하는지 여부를 평가함(평균 $\pm$ 표준편차). 통계적 유의성: \* $P < 0.05$ .

### 2.1.2.5. 피부각질형성세포에 대한 시녹세이트의 영향

사람이 자외선차단제에 일차적으로 노출되는 경로에 있는 세포인 NHEK에 대한 시녹세이트의 영향을 평가하였다. 세포독성이 나타나지 않는 농도의 시녹세이트를 NHEK에 처리하여 지질대사 연관 유전자의 전사에 대한 영향을 평가하였다(Figure 2-15A). 그 결과 시녹세이트는

지방산 대사 또는 콜레스테롤 생합성에 관여하는 유전자들인, *FADS1*, *FASN*, *HMGCR*, *HMGCS1*, *PPARA*, *PPARG*의 mRNA 수준을 증가시킬 수 있었다(Figure 2-15B-G). 따라서, 화학적유사도를 통해 오비소젠으로 기능할 가능성을 제안하였던 시녹세이트가 사람 피부의 주요 세포에서도 직접 대사교란 표현형을 유도할 수 있음을 보여주었다.



**Figure 2-15. Effects of cinoxate on transcription of lipid metabolism-associated genes in NHEKs.** 시녹세이트 처리가 NHEK의 지질대사 유전자 전사에 미치는 영향. (A) 시녹세이트의 NHEK에 대한 세포 독성을 평가함(평균±표준편차). (B-G) 각 유전자의 mRNA 수준을 Q-RT-PCR을 이용하여 평가함. 통계적 유의성: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

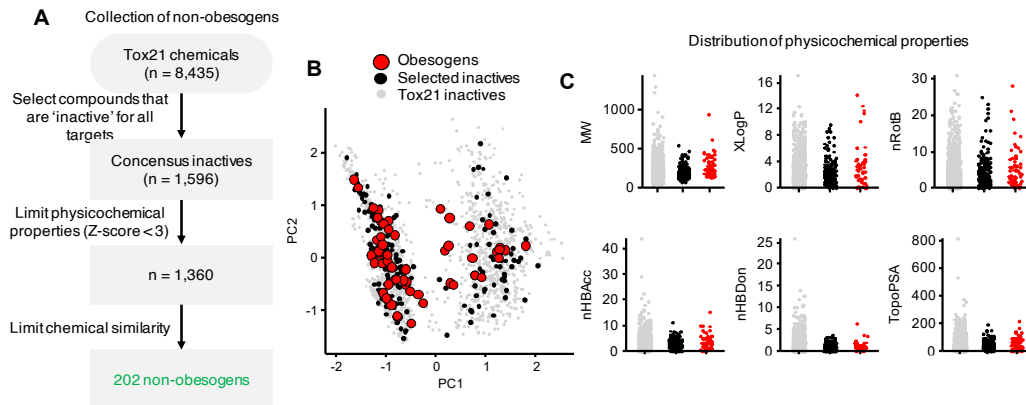
### 2.1.3. 오비소젠 예측을 위한 기계학습 모델 구축

#### 2.1.3.1. 기계학습 모델 구축을 위한 오비소젠 학습 데이터셋 수집

앞서 사용한 화학생물정보학적 접근법을 적용하여 화합물의 오비소젠 표현형 예측을 위한 인공지능/기계학습 모델을 구축을 진행 중이다. 새롭게 구축된 모델에서는 오비소젠과 논오비소젠(non-obesogen)의 데이터셋을 훈련하여 오비소젠 여부에 대한 정보를 제공하고 동시에 각 수용체에 대한 활성 여부 정보를 함께 제시하는 설명가능 인공지능(explainable AI) 모델을 제시하고자 한다.

오비소젠의 목록은 PubMed에서 추출한 오비소젠 관련 300여 개의 논문을 검토하여 확립하였고, 총 67개의 오비소젠으로 구성되었다(Figure 2-16A). 수집된 오비소젠 중에서 TBT와 BPA의 오비소젠 특성이 가장 많이 보고되어 있었다(Figure 2-16B). 비지도 학습을 통한 군집화를 수행하여 오비소젠의 종류를 탐색하였을 때, 프탈레이트류, 유기주석화합물(organotins), 알킬페놀류(alkylphenols) 등을 포함하고 있었다(Figure 2-16C).





**Figure 2-17. Collection of non-obesogen dataset for obesogen prediction.** 기계학습 모델 구축을 위한 논오비소젠 훈련 데이터셋 수집 과정. (A) 논오비소젠 수집 과정. (B) 오비소젠과 논오비소젠의 화학구조 분포. 각 화합물을 화합물지문으로 표현한 후 PCA를 수행하여 2차원 상에 도시화함. (C) 오비소젠과 논오비소젠의 물리화학적 성질 분포.

이와 같이 확립된 오비소젠과 논오비소젠의 데이터셋에 화학생물정보학적 접근법을 적용하고 기계학습 모델을 훈련하여 입력 화합물의 핵수용체 타겟에 대한 활성과 함께 오비소젠 가능성을 확률로 제공할 수 있는 모델을 구축하고자 한다. 이렇게 훈련된 모델은 잠재적 환경 오비소젠의 조기 발견에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

## 제 2 절 화합물의 효능 예측을 위한 인공지능

### 2.2.1. 천연물의 대사 표현형 예측 기계학습 모델 개발

기계학습을 표현형 기반 스크리닝에 적용하는 것은 기계가 읽을 수 있는 질병 표현형과 관련된 데이터의 부족으로 대단히 제한적이다. 플라보노이드 및 관련된 다양한 천연물이 아디포넥틴 분비를 촉진시킬 수 있는 것으로 알려져 있고, 그 중 플라보노이드 화합물은 다수의 핵수용체에 직접 작용하여 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다[Avior et al., 2014; Wang, L. et al., 2014; Ko et al., 2022b; Ko et al., 2022c]. 따라서, 본 연구에서는 비교적 이용가능한 데이터가 많은 플라보노이드를 중심으로, 화학생물정보학적 접근법을 적용하여 아디포넥틴 분비 촉진 활성을 예측하기 위한 기계학습 모델을 구축하고자 하였다. 이를 위해 먼저 플라보노이드 연관 식물유래화합물(flavonoid-associated phytochemical, FAP)을 수집하였다. 지방세포에서 아디포넥틴 생산에 대한 FAP의 영향은 핵수용체의 약물학적 상호작용 네트워크로서 해석할 수 있으므로, FAP의 PPAR 및 ER 등 핵수용체에 대한 구조-활성 상관관계를 계산하였다. 이후, 핵수용체 활성화에 대한 확률을 랜덤포레스트 기반의 모델을 활용하여 도출하였다. 이 모델에서 얻은 확률은 단일세포 전사체 기반의 다중선형회귀 모델에 대입하여 아디포넥틴 분비 촉진 가능성을 상대적 아디포넥틴 점수(relative adiponectin score, RAS)로 수치화하였다(Figure 2-18).

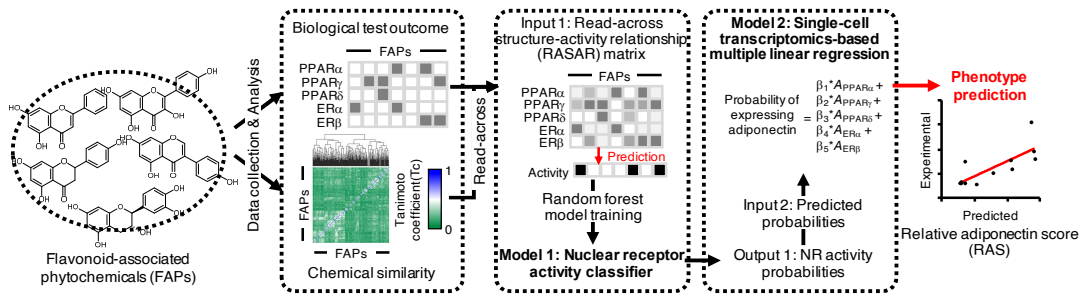
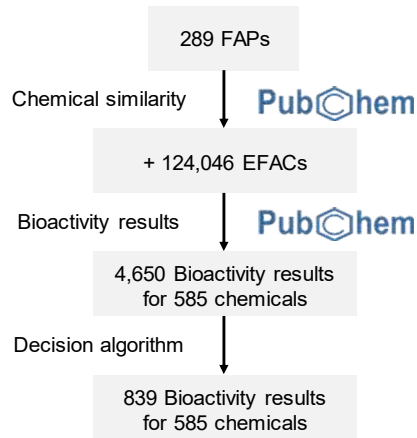


Figure 2-18. Overview of machine learning model to predict adiponectin secretion-inducing activity of flavonoids

### 2.2.1.1. 기계학습 모델 구축을 위한 훈련데이터셋 수집

플라보노이드의 핵수용체 결합 활성을 구조화하기 위해 공공 화합물 및 생물정보 데이터베이스를 활용하였다. 우선 천연 플라보노이드의 목록은 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) BRITE의 화합물 모음으로부터 얻었다. 그 결과, 478개의 FAP에 대한 정보를 수집할 수 있었고, 여기에는 187개의 플라보노이드, 102개의 아이소플라보노이드, 189개의 복합 플라보노이드가 포함되어 있었다. 폴리플라보노이드, 디스-알더 부가물, 당체(glycone)가 복합 플라보노이드에 해당하는데, 주로 당이 절제된 플라보노이드가 생물학적 기능을 나타내므로 이들을 제외하였다. 따라서, 289개의 FAP가 초기 FAP 데이터셋 구축에 활용되었다 (Figure 2-19).



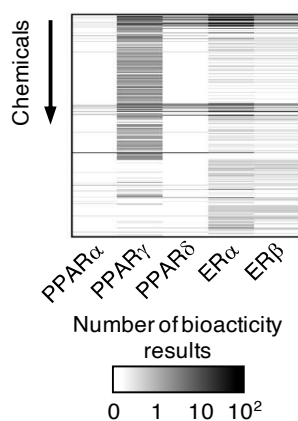
**Figure 2-19. Chemical and biological data collection process for FAPs.** FAP 및 관련 활성 평가 정보 수집 과정 모식도. 화합물 구조 정보와 활성 정보 수집을 위해 PubChem 데이터베이스를 활용함.

화합물의 훈련 데이터셋이 활성 또는 비활성 화합물로 편향되어 있을 때, 기계학습 모델은 과적합에 취약하다. 이러한 현상을 예방하고, 추가적인 KEGG에서 수집된 FAP 데이터셋을 보완하기 위하여 PubChem 데이터베이스를 활용해 훈련데이터셋의 화학적 공간을 확장하였다(Figure 2-19). 먼저, 화학적유사도를 기반으로 0.9 이상의 화합물을 수집하여 79,457개의 화합물을 추가로 얻을 수 있었다. 그리고, 플라보노이드를 하부구조로 갖는 화합물 128,459개의 화합물을 추가로 확보하였다. 다만, 이들 중 화학적으로 FAP와 유사한 화합물들을 선정하기 위해 분자량과 분배계수가 FAP와 비슷한 화합물들만 포함하였다. 그 결과, 총 124,046개의 확장된 플라보노이드 연관 화합물(extended flavonoid-associated chemical, EFAC)의 목록을 확보할 수 있었다.

다음으로, 124,335개의 FAP와 EFAC의 핵수용체에 대한 활성 시험 결과를 PubChem에서 수집하였다(Figure 2-19). 활성 정보 수집을 위한 핵수용체는 지방분화에 관여하는 것이 잘 알려져 있고, 플라보노이드 화합물



의 주요한 수용체 타겟인 PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , PPAR $\delta$ , ER $\alpha$ , ER $\beta$ 으로 선정하였다[Shin et al., 2009; Barros & Gustafsson, 2011; Wang, L. et al., 2014; Straub & Scherer, 2019; Naimo et al., 2020]. PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , PPAR $\delta$ , ER $\alpha$ , ER $\beta$ 에 대하여 총 4,650개의 활성 시험 결과를 확인할 수 있었다(Figure 2-19). 여기서 585개의 화합물에 대해서만 최소 1개 이상의 활성 시험 결과가 이용 가능하였고, 나머지 123,750개의 화합물에 대해서는 이용가능한 결과가 존재하지 않았다. 수집된 결과는 시험 결과의 출처, 그리고 시험법의 유형에 따라 분류하였다. 수집된 결과의 75.8%에 해당하는 대다수가 Tox21, NCATS와 가능 대량 고속 스크리닝 프로젝트의 결과물로 나타났고, 나머지는 동료 검토를 거친 문헌으로부터 얻은 결과였다. 활성 시험 결과를 핵수용체의 약물학적 특성을 고려하여 시험법에 따라 수용체 조절 유형과 수용체 단순 결합 유형으로 구분하였다. 여기서, 수용체 조절 유형은 화합물의 효능약 또는 길항약 활성을 판단할 수 있는 시험 결과에 해당한다.



**Figure 2-20. Summary of collected bioactivity results.** 수집된 활성 데이터 요약. 각 화합물/타겟에 대하여 수집된 활성 평가 결과의 양이 많을수록 진한 색을 나타내도록 표시함.

수집된 활성 시험 결과는 하나의 화합물이 하나에 타겟에 대해서 여러 번 시험된 중복 결과도 존재한다(Figure 2-20). 중복된 데이터를 해석하기 위해 결정 알고리즘을 수립하였다(Figure 2-21). 활성 평가 결과를 시험법에 따라 효능약/길항약 여부를 판별할 수 있는 조절시험과 결합시험으로, 결과의 출처에 따라 문헌 기반 결과와 스크리닝 기반 결과로 분류하였다[Szymański et al., 2012]. 결정 알고리즘에서는 수용체 조절 유형과 문헌 기반 결과를 가장 우선시 하였다. 그 결과, 각 화합물들의 활성(biological test outcome, BTO)을 활성, 미결정, 또는 비활성으로 표현할 수 있었다. 여기서 활성은 효능약 활성(agonistic activity)가 있을 경우를 말하며, 585개 화합물의 BTO를 도출하였을 때 839개의 BTO를 결정할 수 있었다(Figure 2-22).

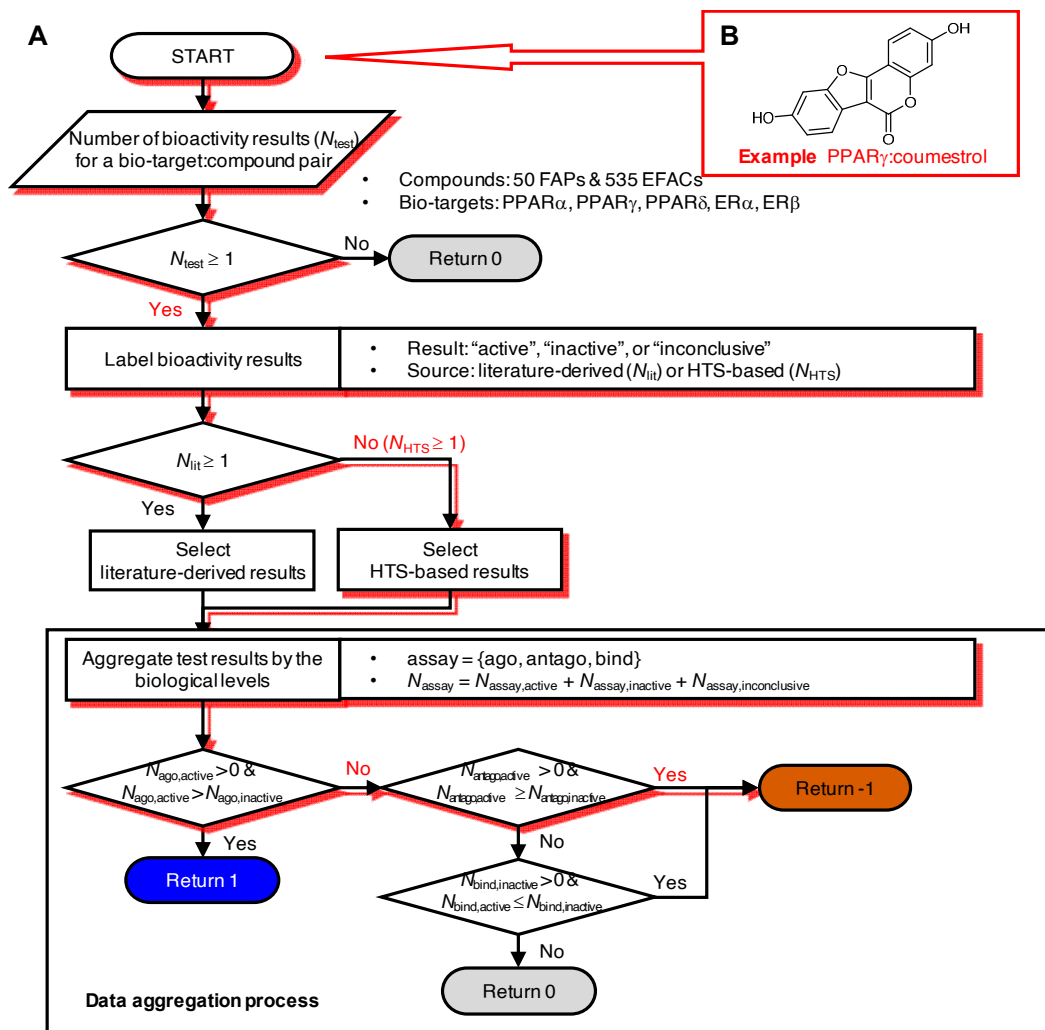


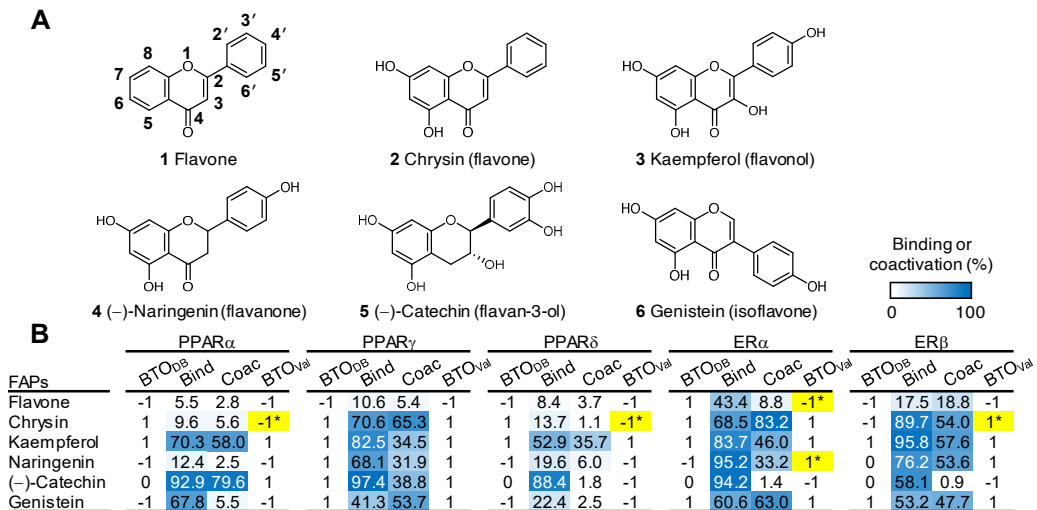
Figure 2-21. Decision algorithm to remove duplicate results

839 BTOs (1 or -1) Target	# of actives (BTO = 1)			# of inactives (BTO = -1)		
	Total	FAP	EFAC	Total	FAP	EFAC
PPAR $\alpha$	22	10	12	32	7	25
PPAR $\gamma$	46	17	29	323	19	304
PPAR $\delta$	24	12	12	39	8	31
ER $\alpha$	55	15	40	185	10	175
ER $\beta$	35	8	27	78	10	68

Figure 2-22. Summary of collected BTOs

### 2.2.1.2. 수집된 훈련데이터셋 검증

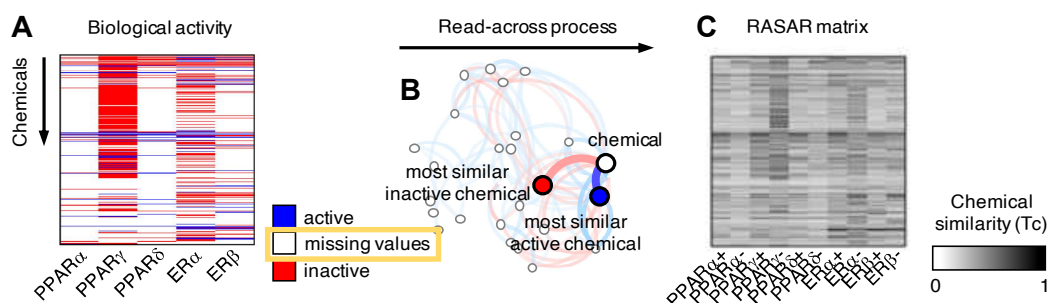
최적의 기계학습 모델을 만들기 위해서는 훈련 데이터셋의 정확도가 가장 중요하다. 따라서, FAP의 대표적인 5개 하위분류, 플라본, 플라보놀, 플라바논, 플라반-3-올, 아이소플라본에 대하여 대표적인 FAP를 선정하고 PubChem 데이터베이스로부터 얻은 BTO (BTO<sub>DB</sub>)를 검증하였다. 실험적으로 결정한 BTO<sub>Val</sub>을 BTO<sub>DB</sub>와 비교하였을 때 최소 80%의 결과가 서로 일치함을 확인하여 확보한 훈련 데이터셋을 기계학습에 적용하기 적합함을 알 수 있었다(Figure 2-23).



**Figure 2-23. Validation of training dataset.** 훈련데이터셋의 검증. 훈련데이터셋의 검증을 위하여 대표적인 FAP (A)에 대하여 TR-FRET 기반 경쟁적 억제 시험 및 공활성화 시험 결과를 확보함(B). 수집된 활성과 실험적으로 결정된 활성이 일치하지 않는 경우 노란색으로 강조함.

### 2.2.1.3. 모델 1: 핵수용체 활성 예측 모델

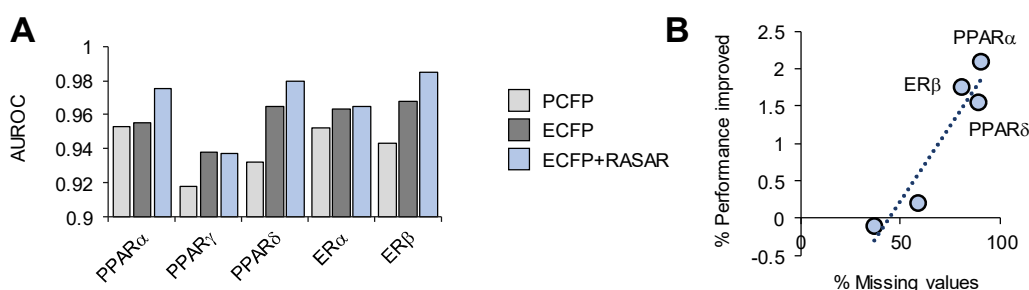
수집된 훈련데이터셋을 이용하여 핵수용체 활성 예측 모델을 수립하고자 하였다. 다만, 훈련 데이터셋에 여전히 결측값이 다수 존재하는 문제가 있었다(Figure 2-24A). 따라서, 화학적 유사도 기반의 read-across 접근법, 연관형 구조활성 상관관계(read-across structure-activity relationship)를 활용하여 특성 벡터를 보완하였다[Schultz et al., 2015; Luechtefeld et al., 2018]. 각 화합물의 특정 핵수용체에 대한 특성 벡터를 다음 2개의 화학적 유사도(Tc) 값으로 표현하였다(Figure 2-24B): BTO가 활성으로 나타난 화합물 중 가장 유사한 화합물에 대한 Tc ( $T_{CBTO=1}$ ), BTO가 비활성으로 나타난 화합물 중 가장 유사한 화합물에 대한 Tc ( $T_{CBTO=-1}$ ). 이렇게 구축한 화학적 유사도 매트릭스는 5개의 타겟에 대한 585개 화합물의 정보를 결측값 없이 담겨있다(Figure 2-24C).



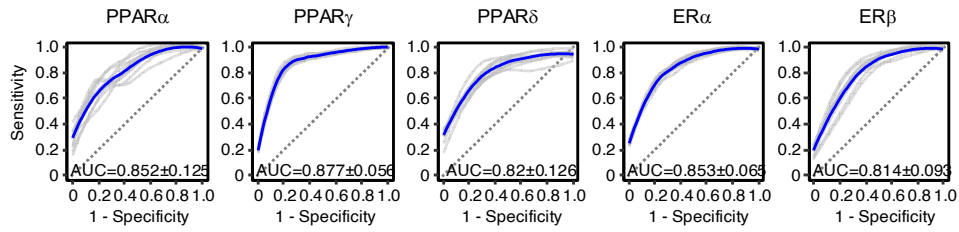
**Figure 2-24. Read-across approach to compensate missing values.** (A) 수집된 BTO 요약. (B) RASAR 매트릭스 도출을 위한 read-across 과정의 화학적 유사도 비교 과정 모식도. (C) RASAR 매트릭스.

이 매트릭스 또는 read-across를 적용하기 전 화합물지문을 입력값으로 하여 5개의 핵수용체 타겟에 대하여 활성을 예측할 수 있는 랜덤포레스

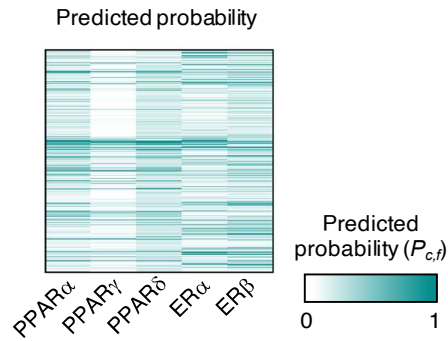
트 모델을 학습하였고, 그 성능을 수신자 조작 특성 곡선하면적(area under receiver operating characteristic curve, AUROC)을 이용하여 평가하였다(Figure 2-25A). 그 결과, 모델의 예측 성능은 read-across 접근법 적용에 의해 개선됨을 확인할 수 있었다. 특히, PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$ , ER $\beta$ 의 3개 타겟에 대한 결측치의 비율은 80-90%에 달할 정도로 높았는데(Figure 2-24A), 이들 결측치가 많은 타겟에 대한 예측 성능은 더욱 크게 개선되었다(Figure 2-25B). 각 타겟에 대한 모델의 성능을 5-겹 교차검증을 통해 평가하였을 때, AUROC는 PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , PPAR $\delta$ , ER $\alpha$ , ER $\beta$ 에 대해 각각 0.852, 0.877, 0.82, 0.853, 0.814 수준으로 나타났다(Figure 2-26). 그 결과, read-across 접근법이 적용된 핵수용체 활성 예측 모델을 이용하여 FAP의 각 핵수용체 타겟에 대한 효능약 활성을 확률( $P_{c,i}$ )로 표현할 수 있었다(Figure 2-27).



**Figure 2-25. Improvement in model performance by applying read-across approach.** Read-across 접근법을 통한 예측 성능 개선 확인. (A) 화합물지문 또는 read-across 접근법이 적용된 입력값을 통해 랜던포레스트 모델을 학습하여 핵수용체 활성을 예측한 결과. PCFP, PubChem 화합물지문; ECFP, 확장 연결성 화합물지문 (extended-connectivity fingerprint). (B) 각 타겟에 대한 데이터셋 결측치와 read-across 접근법을 통한 예측 성능 개선 정도의 비교. 모델의 성능은 AUROC 값으로 평가함.



**Figure 2-26. Model performance by nuclear receptors.** RASAR 매트릭스를 이용하여 핵수용체 활성을 예측하기 위한 랜덤포레스트 모델을 학습하였음. 모델의 성능은 AUROC 값으로 평가함.



**Figure 2-27. Predicted nuclear receptor activity.** RASAR 매트릭스를 활용한 핵수용체 활성 예측 모델에서 도출한 각 핵수용체 타겟에 대한 효능약 활성을 확률( $P_{c,f}$ )로 표현함.

#### 2.2.1.4. 모델 2: 아디포넥틴 분비 촉진 활성 예측 모델

다음으로 아디포넥틴 분비 촉진 활성의 상대적인 수준을 예측하기 위해 랜덤포레스트 모델이 제시한 확률을 입력값으로 하는 다중선형회귀 모델을 구축하였다. PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , PPAR $\delta$ , ER $\alpha$ , ER $\beta$  등 핵수용체는 모두 아디포넥틴 생합성에 관여함이 알려져 있지만, 이들의 정량적인 기여도는 잘 연구되어 있지 않다. 따라서, 지방전구세포에 대하여 수행된 최신의 단일세포 전사체 연구 결과(NCBI GEO GSE134570)를 활용하여 이들의 상호조절 네트워크를 수치화하였다[Min et al., 2019]. 지방분화가 유도된 전구세포들은 다양한 수준으로 아디포넥틴 유전자를 발현하고 있었고(Figure 2-28A), 아디포넥틴의 발현과 핵수용체 활성 사이의 상관관계를 모델로 나타내고자 하였다. 핵수용체는 전사인자로 작용하여 세포의 표현형 변화에 이르는 다양한 유전자들의 전사를 촉진하므로, 5개 핵수용체의 타겟에 대한 타겟 유전자를 수집하였다(Figure 2-28B, 2-29). 핵수용체 타겟 유전자의 발현량이 많을 경우 핵수용체가 더욱 많이 활성화된 것으로 해석하였다.



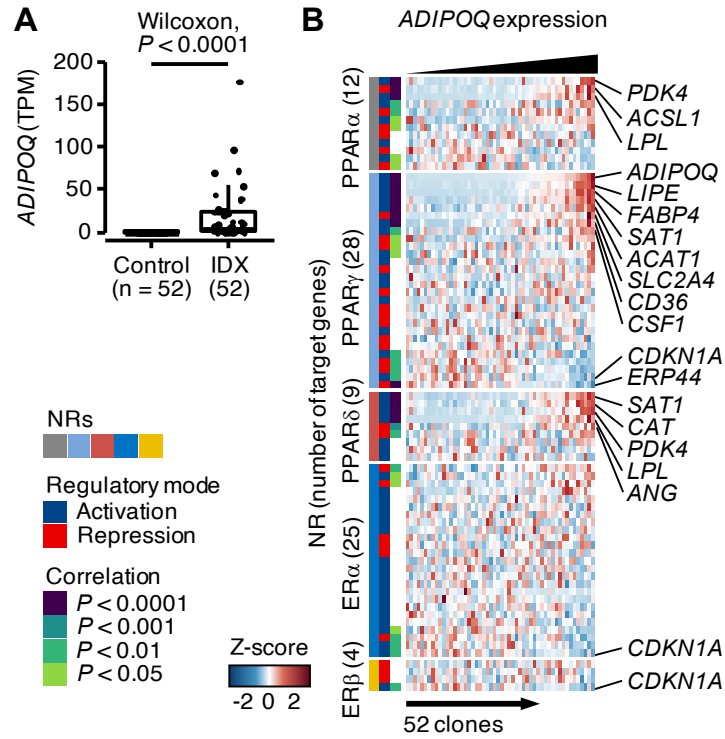
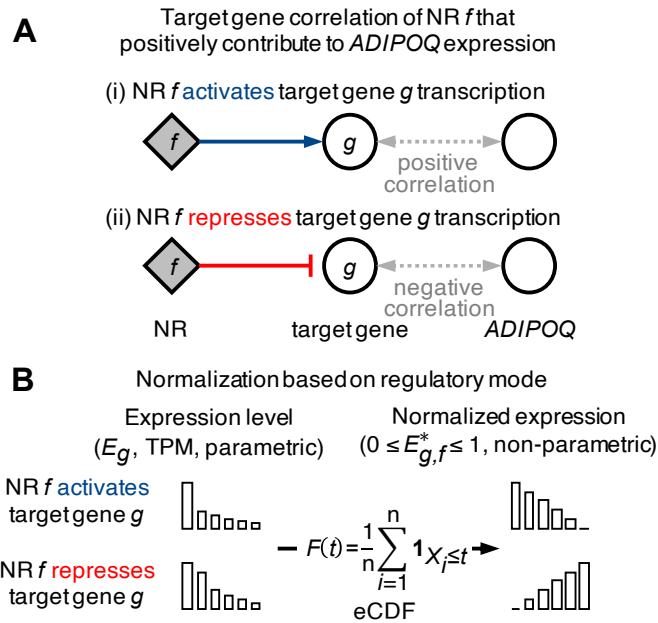


Figure 2-28. Transcriptional profile used to determine relative contribution of nuclear receptors in adipogenesis. (A) 지방전구세포에 대하여 수행된 단일세포 전사체 연구 결과(NCBI GEO GSE134570)에는 52개의 서로 다른 정도로 분화된 중간엽줄기세포 클론을 포함하고 있음. 대조군과 IDX 조건으로 분화된 클론의 아디포넥틴 유전자 *ADIPOQ* 발현량을 비교함. (B) 각 클론에서 *ADIPOQ* 발현량과 각 핵수용체 타겟 유전자의 발현량을 비교함.

	Number of correlated NR target genes			
	Total	Correlated with <i>ADIPOQ</i>		
		Significant	Positive	Negative
PPAR $\alpha$	12	9	7 (4/3)	2 (1/1)
PPAR $\gamma$	28	16	11 (8/3)	5 (2/3)
PPAR $\delta$	9	6	6 (4/2)	0
ER $\alpha$	25	7	3 (1/2)	4 (3/1)
ER $\beta$	4	1	0	1 (1/0)

**Figure 2-29. Nuclear receptor target genes correlated with adiponectin transcription.** 각 핵수용체의 타겟 유전자 중 아디포넥틴의 전사와 높은 상관성을 보이는 유전자의 수를 표시함.

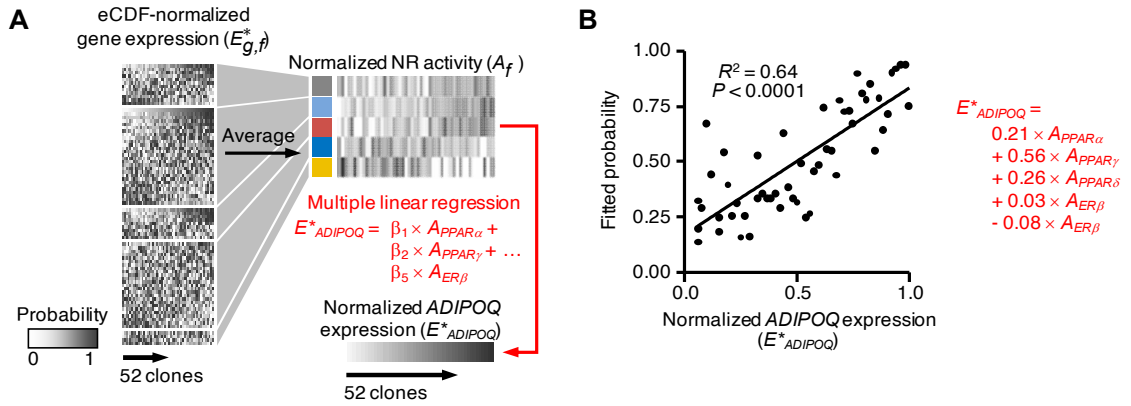
PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , PPAR $\delta$ , ER $\alpha$ , ER $\beta$ 에 대해 각각 12, 28, 9, 25, 4개 타겟 유전자를 확보하였고, 이들 각 유전자의 발현량을 경험적 누적분포함수(empirical cumulative distribution function, eCDF)로 나타내었다(Figure 2-30). 이때, 각 유전자가 해당 핵수용체에 의해 전사가 활성화되는지 또는 억제되는지를 반영할 수 있도록 변형된 eCDF (modified eCDF, meCDF)를 사용하였다(Figure 2-30A). meCDF를 이용하여 핵수용체 타겟 유전자의 발현량을 정규화 하면 계산이 용이하도록 발현량을 확률적으로, 비모수적으로 표현할 수 있을 뿐만 아니라, 전사 조절 양상(활성화 또는 억제)를 반영하여 정규화된 발현량의 평균값을 계산하면 상대적인 핵수용체 활성 정도를 결정할 수 있도록 하였다(Figure 2-30B).



**Figure 2-30. Normalization of expression level with eCDF.** (A) 핵수용체(NR)에 의한 타겟 유전자 조절 양상(활성화 또는 억제). (B) meCDF를 이용한 발현량의 정규화.

각 클론의 핵수용체 타겟 유전자 발현량을 meCDF를 이용하여 정규화하였고, 그 결과, 정규화된 발현량의 평균값을 바탕으로 핵수용체 활성 정도( $A_f$ )를 추정할 수 있었다(Figure 2-31A). 다중 선형회귀 분석을 이용하여  $A_f$ 와 아디포넥틴 유전자 발현량 사이의 상관관계를 계산하였다.  $A_f$ 와 아디포넥틴 유전자 발현량 사이의 다중 선형회귀 방정식의 기울기는 PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , PPAR $\delta$ , ER $\alpha$ , ER $\beta$ 에 대하여 각각 0.21, 0.56, 0.26, 0.03, -0.08으로 나타났다(Figure 2-31B). 여기에  $A_f$  대신 랜덤포레스트를 통해 예측된 활성  $P_{c,f}$ 을 대입하여 다음과 같이 상대적 아디포넥틴 점수 (relative adiponectin score, RAS) 값을 도출을 위한 식을 결정할 수 있었다.

$$RAS_c = 0.21 \times P_{c,PPAR\alpha} + 0.56 \times P_{c,PPAR\gamma} + 0.26 \times P_{c,PPAR\delta} + 0.03 \times P_{c,ER\alpha} - 0.08 \times P_{c,ER\beta}$$

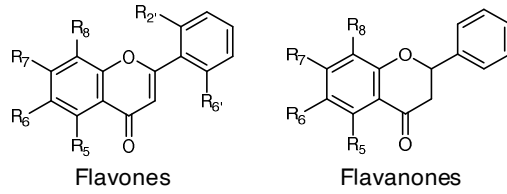


**Figure 2-31. Relative adiponectin score (RAS) model.** (A) RAS 모델에서 아디포넥틴 분비에 대한 각 핵수용체의 기여도를 결정하기 위해 핵수용체 활성화 정도와 아디포넥틴 유전자 발현량 사이의 다중 선형 회귀 분석을 수행함. (B) 다중 선형회귀 분석 결과.

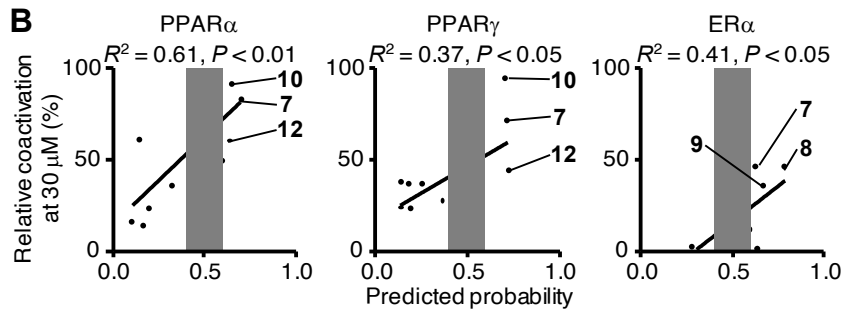
#### 2.2.1.5. 아디포넥틴 분비 촉진 활성 예측 모델의 검증

수립된 아디포넥틴 분비 촉진 활성 예측 모델을 검증하기 위해, 핵수용체 활성 예측 모델과 RAS 모델을 황금(*Scutellaria baicalensis*)에서 분리한 11개의 FAP에 대해서 적용하였다(Figure 2-32A) [Nhoek et al., 2018]. 먼저 이들의 핵수용체 활성을 랜덤포레스트 모델로 예측하였을 때, PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , ER $\alpha$ 의 3개 핵수용체에 대하여 실험적으로 결정된 공활성화 수준과 유의한 상관관계를 나타냈다(Figure 2-32B). 나머지 핵수용체에 대하여서는 11개 FAP의 활성이 없었기 때문에 정량적인 검증이 어려웠다.

**A** Eleven FAPs isolated from root of *S. baicalensis*



Flavones	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>2'</sub>	R <sub>6'</sub>	RAS value	Adiponectin
<b>7</b> Norwogonin	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-H	0.83	317
<b>8</b> Wogonin	-OH	-H	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H	0.65	234
<b>9</b> Moslosooflavone	-OH	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H	0.65	312
<b>10</b> Oroxylin A	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-H	-H	-H	0.80	624
<b>11</b> 5,7,8-trihydroxy-6-methoxyflavone	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OH	-H	-H	0.40	110
<b>12</b> Mosloflavone	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H	-H	0.82	385
<b>13</b> Alnetin	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H	0.52	209
<b>14</b> Viscidulin II	-OH	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OH	0.32	119
<b>15</b> Skullcapflavone II	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OH	0.29	131
Flavanones	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>				
<b>16</b> Dihydrobaicalein	-OH	-OH	-OH	-H			0.28	121
<b>17</b> Dihydrooroxylin A	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-H			0.31	300



**Figure 2-32.** *S. baicalensis*-isolated flavonoids for experimental validation of RAS model. 모델 검증을 위한 황금 유래 FAP의 활용. (A) 검증에 사용된 황금 유래 FAP의 목록. (B) 핵수용체 활성 예측 모델 검증을 위한 TR-FRET 기반 공활성화 시험 결과.

마지막으로, 이들 예측된 핵수용체 활성을 RAS 모델에 대입하여 각 FAP의 RAS 값을 얻었고, 그 결과 FAP 중 하나인 오록실린 A (화합물 10)가 0.80의 값으로 가장 높았다(Figure 2-32A). 11개 FAP에 대해 hBM-MSC의 지방분화 모델에서 아디포넥틴 분비 촉진 활성을 평가하였을 때(Figure 2-33), 예측된 RAS 값과 유의한 상관관계를 나타내었다 ( $R^2 = 0.58$ ,  $P < 0.01$ ; Figure 2-34). 따라서, 화학생물정보학 접근법을 기계학습에 적용하여 아디포넥틴 분비 촉진 활성에 대한 표현형 기반 스크리닝 방법 *in silico* 상에서 재구성할 수 있었다.

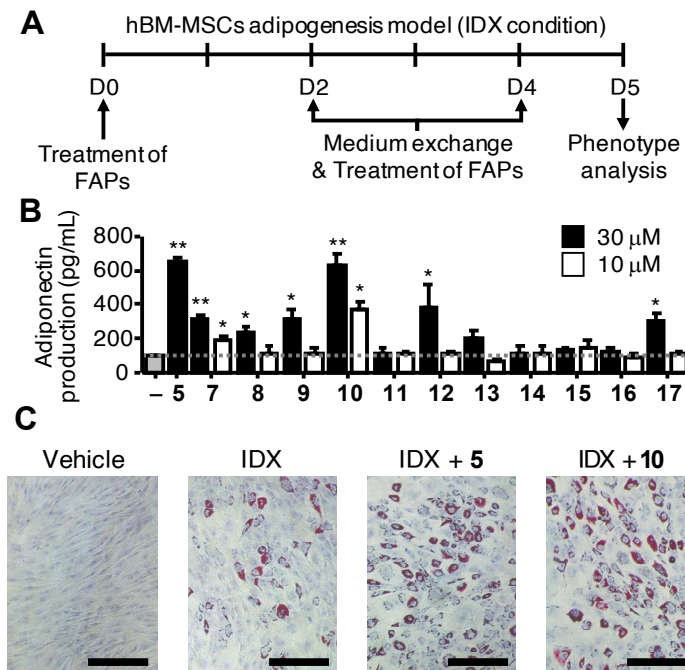


Figure 2-33. Effects of *S. baicalensis*-isolated flavonoids on adiponectin production during adipogenesis in hBM-MSCs. 황금 유래 FAP의 아디포넥틴 분비 촉진 활성 평가. (A) 중간엽 줄기세포의 지방분화 모델 실험 디자인. (B) RAS 모델 검증을 위한 황금 유래의 FAP의 아디포넥틴 분비 촉진 시험 결과. hBM-MSC의 지방분화 조건에

서 황금 유래 FAP를 함께 처리한 후 상층액 중의 아디포넥틴 수준을 ELISA를 이용하여 정량함(평균±표준편차). 양성 대조군으로 (-)-카테킨(화합물 5)을 사용함. 통계적 유의성: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

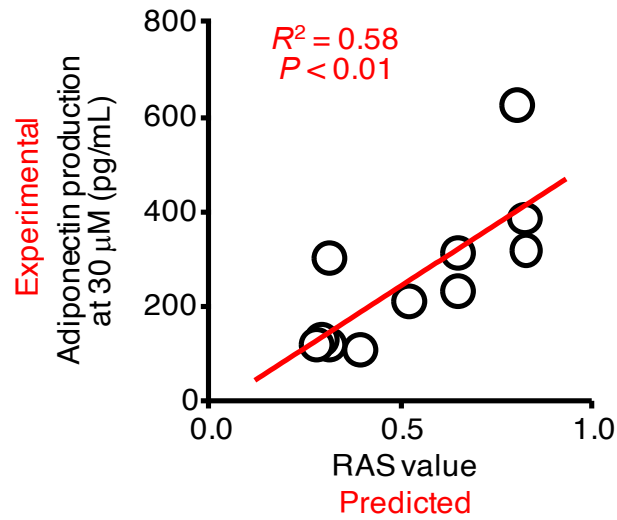


Figure 2-34. Experimental validation of RAS model. 11종의 황금 유래 플라보노이드에 대하여, RAS 모델 도출 RAS 값과 실험적으로 결정된 아디포넥틴 분비 촉진 활성 사이의 상관분석 결과.



## 제 3 장 결론

### 제 1 절 생물정보학과 화학정보학을 활용한 오비소젠의 동정

본 연구에서는 전사체 분석 및 화학적유사도를 기반으로 두 가지 오비소젠, 아보벤존과 시녹세이트를 제시하였다.

사람 각질형성세포에 대한 아보벤존의 전사체 수준 영향을 평가하기 위한 마이크로어레이 분석을 수행하였다. 약 500개의 DEG를 선정하여 GOBPEA 기능적 모듈 분석을 수행하였고, 그 결과, 아보벤존이 콜레스테롤 생합성 및 지질 대사 관련 유전자 발현의 유의한 변화를 유도함을 확인하였다. 이렇게 제시된 아보벤존의 대사교란 특성을 hBM-MSC의 지방분화 모델에서 확인하였을 때, 아디포넥틴의 분비나 지방분화 연관 지표유전자의 발현을 촉진하여 지방분화 표현형을 유도하는 것으로 나타나 오비소젠 표현형을 검증할 수 있었다. 지방분화의 핵심적인 조절자인 PPAR 수용체에 대해서 아보벤존은 직접 결합하거나 그 활성이 영향을 받지 않음으로부터 아보벤존의 오비소젠 표현형은 PPAR $\gamma$  비의존적인 기전을 통해 나타났음을 알 수 있었다.

한편, 화학정보학 분석을 통해 메톡신 신남산 유도체인 시녹세이트의 화학적유사도가 오비소젠인 아보벤존과 유사함을 확인하였다. 따라서, 시녹세이트의 오비소젠 표현형을 hBM-MSC의 지방분화 모델에서 확인해보게 되었고, 시녹세이트는 아디포넥틴의 분비, 지방분화 지표유전자의 발현 등 지방분화 표현형을 다른 오비소젠과 마찬가지로 유도할 수 있었

다. TR-FRET 기반 수용체 결합시험 및 공활성화 시험에서 시녹세이트의 PPAR $\gamma$  완전효능약으로 기능함을 밝혔다. 특히, 시녹세이트는 기존 보고된 오비소젠과 차별화된 기전인 SRC3 매개 PPAR $\gamma$  활성화를 통해 오비소젠 표현형을 나타낸다는 것을 제시하였다.

## 제 2 절 화합물의 대사 효능 예측을 위한 기계학습 모델 개발

화학생물정보학 접근법을 기계학습에 적용하여 아디포넥틴 분비 촉진 화합물 도출을 위한 표현형 기반 스크리닝 방법을 *in silico* 상에서 재구성하였다. 이 모델은 다음의 두 가지 모델을 연속적으로 사용함으로써 구현할 수 있었다. 첫 번째 모델로, 화학적유사도를 활성 평가 결과에 반영하는 read-across 접근법을 적용한 화합물의 핵수용체 활성 예측 모델을 구현하였다. 학습데이터셋 수집 과정에서 데이터 부족을 해소하기 위해 화학적유사도를 이용하여 데이터셋을 확장하였고, 중복된 활성 데이터를 정리하기 위해 활성 결정 알고리즘을 고안하였다. 또한, 결측 데이터 보안을 위해 적용한 read-across 접근법은 핵수용체 활성 예측 모델의 예측 성능을 크게 개선시킬 수 있었다. 두 번째 모델로, 모델에서 예측한 활성에 가중치를 적용하여 아디포넥틴 분비 촉진 활성을 예측할 수 있는 RAS 모델을 제시하였다. 이를 위해 지방세포의 단일세포 전사체 분석 결과에서 얻은 각 핵수용체의 아디포넥틴 발현에 대한 기여도를 반영해 해석하였다. 황금에서 분리한 11종의 플라보노이드 화합물에 대하여 그 예측력을 실험적으로 검증하였다. 이로써, 상대적으로 데이터가 적고 복잡하여 해석이 어려웠던 표현형 예측에 대해 기계학습의 적용 가능성을 확인하였다. 추후에는 이 모델을 확장하고 발전시켜 화합물의 화학형에 관계없이 적용할 수 있는 표현형 예측을 위한 인공지능 모델을 구축하고자 한다. 이러한 모델은 대사성질환의 치료 후보물질 발굴이나 사람 체내에서 대사 독성을 유발하는 오비소젠 및 내분비교란물질의 평가에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

## 제 4 장 연구방법

### 제 1 절 *In silico* 방법

#### 4.1.1. 생물정보학 분석

아보벤존의 NHEK에 대한 전사체 수준의 영향을 평가하기 위한 마이크로어레이 시험을 수행하였다. 그 결과는 NCBI GEO GSE122901에 저장되어 있다. 실험은 2반복으로 수행하였으며, 대조군과 비교하여 발현변화량과 통계적유의성을 고려하여 DEG를 선정하였다. 선정된 DEG에 대하여 GOBPEA를 이용한 기능적 모듈 분석을 수행하였다. 아디포넥틴 생합성에 대한 각 핵수용체의 기여도를 분석하기 위한 단일세포 전사체 데이터는 NCBI GEO GSE134570를 이용하였다. 각 핵수용체의 활성 정도를 결정하기 위해 발현량을 meCDF를 이용하여 정규화한 뒤 평균값을 구하였다. 각 핵수용체 활성화 정도와 아디포넥틴 유전자 발현량 사이의 다중선형회귀 분석을 통해 각 핵수용체의 기여도를 결정하였다.

#### 4.1.2. 화학정보학 분석

화학적유사도 비교를 위한 화합물의 구조는 SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System)를 이용하여 문자열 형태로 표현하였다. SMILES로 표현된 화합물의 구조는 "rdck" 패키지의 get.fingerprint 함수를 이용하여 PubChem 화합물지문이나 ECFP로 변환하였다[Rogers & Hahn, 2010; Cereto-Massagué et al., 2015]. 화학적유사도를 결정하기 위해 화합물지문으로 표현된 두 화합물의 구조 사이의 타니모토 계수(Tanimoto coefficient, Tc)를 계산하였다. 타니모토 계수는

두 집합의 교집합의 크기를 합집합의 크기로 나눈 수이다. 따라서, Tc는 화합물의 유사도를 0과 1사이의 수치로 표현할 수 있고, 서로 비슷한 화합물일 수록 높은 Tc 값을 갖게 된다.

#### 4.1.3. 훈련데이터셋 수집 및 전처리

훈련데이터셋 수집에는 KEGG 및 PubChem 데이터베이스를 활용하였다 [Kanehisa et al., 2017; Kim et al., 2019]. 초기 289종 천연 플라보노이드 화합물의 구조는 KEGG BRITE로부터 수집하였다. 여기서 289종 플라보노이드와 비교하여 화학적유사도가 높거나(PCFP,  $Tc > 0.9$ ), 플라보노이드의 골격을 갖고 있는 화합물들을 PubChem 데이터베이스로부터 추가로 수집하였다. 이 화합물들에 대한 핵수용체 활성 역시 PubChem 데이터베이스로부터 추출하였다. 각 시험법의 특성을 반영하여 중복 데이터를 제거할 수 있도록 결정 알고리즘을 고안 및 적용하였다. 화합물의 결측치는 RASAR 접근법을 이용하여 보완하였다.

#### 4.1.4. 기계학습 알고리즘

화학적유사도를 시각화하기 위해 주성분분석(principal component analysis, PCA; prcomp 함수)를 이용하여 화학적유사도를 차원축소한 뒤 상위 2개의 주성분을 이용하여 2차원 상에 표시하였다. 이어서 k-means 알고리즘(kmeans 함수)을 이용한 비지도학습을 수행하여 화합물을 군집화하였다. 화합물지문 또는 RASAR 매트릭스로 표현된 화합물의 특성은 랜덤포레스트(randomForest 함수)를 이용하여 지도학습을 수행하였다.

#### 4.1.5. 분자모델링

도킹 분석은 AutoDock Vina 1.1.2 (Scripps Research Institute, La Jolla,

CA, USA) 소프트웨어를 이용하여 수행하였다. PPAR $\gamma$ -LBD의 3차원 구조를 Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Database (PDB: 5Y2O) [Lee et al., 2017]에서 얻었다. 도킹 위치는 기존에 공결정화된 리간드인 피오글리타존의 3차원 좌표의 무게중심으로 정하였고, 범위는 이를 중심으로 30 Å<sup>3</sup> 격자 이내로 설정하였다. 에너지최적화 결합 모델을 결합 양상과 근접한 아미노산 잔기를 분석하기 위해 선정하였다. 모든 그래픽은 PyMOL (Schrödinger, LCC, New York, NY, USA) 소프트웨어를 이용하여 시각화하였다.

## 제 2 절 *In vitro* 실험법

### 4.2.1. 화합물

아보벤존(CAS 70356-09-1), 시녹세이트(104-28-9), 옥티노세이트(5466-77-3), 벤조페논-3 (BP-3, 131-57-7), 벤조페논-8 (BP-8, 131-53-3), 비스(2-에틸헥실)프탈레이트(DEHP, 117-81-7), 벤질뷰틸프탈레이트(BBP, 85-68-7), 비스페놀 A (BPA, 80-05-7) 및 삼뷰틸화주석(TBT, 688-73-3)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구매하였다. 모든 화합물은 다이메틸설폭사이드(DMSO, Sigma-Aldrich)에 녹여 준비하였으며 사용 전까지 냉장보관하였다. 인슐린, 덱사메타손, 아이소뷰틸메틸잔틴과 피오글리타존은 Sigma-Aldrich로부터 구매하였다. GW7647, GW1929, GW501516은 Tocris Bioscience (Bristol, U.K.)로부터 구매하였다.

### 4.2.2. 세포배양 및 지방분화

hBM-MSc는 Lonza (Walkersville, MD, USA)로부터 구매하여 저농도 글루코스(1 g/L), 10% fetal bovine serum (FBS), 1% 페니실린-스트렙토마이신, 1% 클루타맥스 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 포함한 배지에서 배양하였다. 지방분화 유도를 위해 배지를 고농도 글루코스(4.5 g/L), 10% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신과 함께 10 µg/mL 인슐린, 0.5 µM 덱사메타손, 0.5 mM IBMX를 첨가한 배지로 교체하였다. 신생아 포피에서 배양된 NHEK는 Lonza로부터 구매하여 표피세포성장인자, 인슐린, bovine pituitary extract, 에피네프린, 하이드로코티손, 트랜스페린, gentamicin/amphotericin B (Lonza)를 첨가한 Keratinocyte Basal Medium (KBM) 배지에서 배양하였다.

#### 4.2.3. 세포독성시험

세포독성시험은 Cell Counting Kit-8 assay (CCK-8, Dojindo, Kumamoto, Japan)을 이용하여 수행하였다.

#### 4.2.4. 오일레드오 염색 및 정량화

오일레드오(Oil Red O, ORO) 염색을 지방분화 후 세포내 지질축적을 평가하기 위해 수행하였다. 세포를 phosphate-buffered saline (PBS)를 이용하여 2회 세척한 후, 10% 포르말린을 이용하여 1시간 동안 고정하였다. 이후, 60% 아이소프로판올을 이용하여 세척한 뒤, 상온에서 완전히 건조하였다. 지질액적은 사용 직전 준비한 0.2% ORO 용액을 이용하여 상온에서 20분동안 염색한 뒤, 상수로 3회 세척하였다. 핵 염색을 위해서 30% Mayer's 헤마톡실린 용액(Dako, Carpinteria, CA, USA)으로 1분간 염색한 뒤, 상수로 3회 세척하였다. 지방분화 정도는 도립현미경 Eclipse TS100 (Nikon Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하고 촬영하였다. 지질 축적을 정량화하기 위해 촬영된 사진을 ImageJ [Rueden et al., 2017] 소프트웨어를 이용하여 전처리 한 뒤 분석하였다.

#### 4.2.5. 효소면역측정법

효소면역측정법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)은 세포 배양 상층액의 아디포넥틴 농도를 측정하기 위해 수행하였다. 아디포넥틴 Quantikine™ immunoassay kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 제조사의 프로토콜에 따라 사용하였다.

#### 4.2.6. 마이크로어레이

세포 배양 후 RNA는 Trizol (Invitrogen)을 이용하여 전체 RNA를 추출



하였다. 마이크로어레이 분석에 이용하기 위한 전체 RNA (2  $\mu$ g)는 SuperScript<sup>TM</sup> reverse transcriptase (Invitrogen)을 이용하여 역전사하였다. 준비된 cDNA에 대하여 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChip array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 마이크로어레이 시험을 수행하였다.

#### 4.2.7. 정량적 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응

정량적 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction, Q-RT-PCR)을 위해 세포 배양 후 RNA는 Trizol (Invitrogen)을 이용하여 전체 RNA를 추출하였다. RNA 농도는 Epoch microplate spectrophotometer (BioTeK)를 이용하여 정량하였다. 전체 RNA (2  $\mu$ g)를 Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific)를 사용하여 역전사하였다. mRNA의 발현량을 정량하기 위해 AB7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 Q-RT-PCR을 수행하였다. 이를 위해 사용된 TaqMan expression primer set은 다음과 같다 (Table 1).

**Table 1. TaqMan expression primer sets used**

Gene symbol	Assay ID
<i>PPARA</i>	Hs00231882_m1
<i>PPARG</i>	Hs00234592_m1
<i>PPARD</i>	Hs04187066_g1
<i>HMGCR</i> (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase)	Hs00168352_m1
<i>HMGCS1</i> (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1)	Hs00940429_m1
<i>FABP4</i> (fatty acid binding protein 4)	Hs00609791_m1
<i>ADIPOQ</i>	Hs00605917_m1
<i>INSIG1</i> (insulin-induced gene 1)	Hs00356479_g1
<i>AKRIC2</i> (aldo-keto reductase family 1 member C2)	Hs04194036_gH
<i>SLC2A12</i> (solute carrier family 2 member 12)	Hs00376943_m1
<i>MT1H</i> (metallothionein 1H)	Hs00823168_g1
<i>FLG</i>	Hs00856927_g1
<i>LOR</i> (loricrin)	Hs01894962_s1
<i>KRT1</i> (keratin 1)	Hs00196158_m1
<i>TGM1</i> (transglutaminase 1)	Hs00165929_m1
<i>GAPDH</i> (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)	Hs02786624_g1

GAPDH를 대조군 으로 사용하였으며, 상대적인 발현량의 정량은 수학적 모델을 이용해 수행하였다[Pfaffl, 2001].

#### 4.2.7. 핵수용체 결합 및 공활성화 시험

시간분해 형광분광법(시간분해 형광 공명에너지 전이, time-resolved fluorescence resonance energy transfer, TR-FRET) 기반의 수용체 결합 시험을 Lanthascreen<sup>TM</sup> competitive binding assay kit (Invitrogen)을 이용하여 수행하였다. 핵수용체 PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , PPAR $\delta$ , ER $\alpha$ , ER $\beta$ 에 대한 결합력을 평가하였다. 520 nm 및 495 nm 파장의 신호를 1-4시간 배양 후 CLARIOstar (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany)를 이용하여 측정하였다. 모든 기기 설정은 제조사의 지침을 따랐다.

실험군, 음성대조군(수용체 없음), 양성대조군(각 수용체의 효능약)의 520 nm/495 nm TR-FRET 비율을 각각  $R_{exp}$ ,  $R_{neg}$ ,  $R_{max}$ 로 하였을 때, 상대적인 결합력은 다음과 같이 계산하였다

$$\text{핵수용체 결합력 (\%)} = (R_{exp} - R_{neg}) / (R_{max} - R_{exp}) \times 100$$

수용체 공활성화 시험은 Lanthascreen<sup>TM</sup> coactivator assay kit (Invitrogen)를 이용하여 수행하였다. 핵수용체 PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , PPAR $\delta$ , ER $\alpha$ , ER $\beta$ , RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , FXR에 대하여 화합물에 의한 공활성화 정도를 측정하였다. 다음의 fluorescein 표지 공활성화 펩타이드를 사용하였다(Table 2).

**Table 2. Sequence of peptides used for nuclear receptor coactivator assays**

Nuclear receptor	Peptide from	Sequence	Gene symbol
PPAR $\gamma$	PGC-1 $\alpha$	EAEPSLLKLLAPANTQ	<i>PPARGC1A</i>
PPAR $\gamma$	SRC1	KYSQTSHKLVQLLTTTAEQQL	<i>NCOA1</i>
PPAR $\gamma$	SRC2	DSKGQTKLLQLLTTKSDQM	<i>NCOA2</i>
PPAR $\gamma$	SRC3	ESKGHKLLQLLTCSSDDR	<i>NCOA3</i>
PPAR $\gamma$	DRIP	KVSQNPILTSLQITGNGG	<i>MED1</i>
PPAR $\gamma$	RAP250	VTLTSPLLVNLLQSDISAG	<i>NCOA6</i>
PPAR $\gamma$	RIP140	SHQKVTLQLLLGHKNEEN	<i>NRIP1</i>
PPAR $\gamma$	NCoR	RTHLITLADHICQIITQDFARN	<i>NCOR1</i>
RXR $\alpha$	PGC-1 $\alpha$	EAEPSLLKLLAPANTQ	<i>PPARGC1A</i>
RXR $\beta$	D22	LPYEGSLLLKLLRAPVEEV	-
FXR	SRC2	LKEKHKILHRLQLDSSSPV	<i>NCOA2</i>

실험군, 음성대조군(수용체 없음), 양성대조군(각 수용체의 효능약)의 520 nm/495 nm TR-FRET 비율을 각각  $R_{exp}$ ,  $R_{neg}$ ,  $R_{max}$ 로 하였을 때, 상대적인 결합력은 다음과 같이 계산하였다

$$\text{핵수용체 공활성화 정도 (\%)} = (R_{exp} - R_{neg}) / (R_{max} - R_{exp}) \times 100$$

#### 4.2.8. 통계분석

모든 *in vitro* 실험은 독립적으로 3회 반복수행하였다. 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 통계적 유의성을 검정하기 위해 Student's t-test를 수행하였다. 통계적 유의성은  $P<0.05$  또는  $P<0.01$ 인 경우 각각 \*, \*\*로 표시하였다.

## 참 고 문 헌

- Agamah, F. E., Mazandu, G. K., Hassan, R., Bope, C. D., Thomford, N. E., Ghansah, A., & Chimusa, E. R. (2020). Computational/in silico methods in drug target and lead prediction. *Briefings in Bioinformatics*, *21*(5), 1663 - 1675.
- Ahmadian, M., Suh, J. M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A. R., Downes, M., & Evans, R. M. (2013). PPAR $\gamma$  signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nature Medicine*, *19*(5), 557 - 566.
- Ahn, S., Lee, M., An, S., Hyun, S., Hwang, J., Lee, J., & Noh, M. (2018). 2-Formyl-komarovicine promotes adiponectin production in human mesenchymal stem cells through PPAR $\gamma$  partial agonism. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *26*(5), 1069 - 1075.
- Ahn, S., An, S., Lee, M., Lee, E., Pyo, J. J., Kim, J. H., ... Noh, M. (2019a). A long-wave UVA filter avobenzene induces obesogenic phenotypes in normal human epidermal keratinocytes and mesenchymal stem cells. *Archives of Toxicology*, *93*(7), 1903 - 1915.
- Ahn, S., Kim, J., An, S., Pyo, J. J., Jung, D., Lee, J., ... Noh, M. (2019b). 2-Phenyl-8-(1-phenylallyl)-chromenone compounds have a pan-PPAR modulator pharmacophore. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *27*(13), 2948 - 2958.
- Ahn, S., Ma, C. T., Choi, J. M., An, S., Lee, M., Van Le, T. H., ... Noh, M. (2019c). Adiponectin-secretion-promoting phenylethylchromones from the agarwood of *Aquilaria malaccensis*. *Journal of Natural Products*, *82*(2), 259 - 264.
- An, S., Kim, G., Kim, H. J., Ahn, S., Kim, H. Y., Ko, H., ... Jeong, L.

- S. (2020). Discovery and structure–activity relationships of novel template, truncated 1′-homologated adenosine derivatives as pure dual PPAR $\gamma$ / $\delta$  modulators. *Journal of Medicinal Chemistry*, *63*(24), 16012 - 16027.
- Avior, Y., Bomze, D., Ramon, O., & Nahmias, Y. (2013). Flavonoids as dietary regulators of nuclear receptor activity. *Food & Function*, *4*(6), 831 - 844. doi:10.1039/c3fo60063g
- Babu, P. V. A., Liu, D., & Gilbert, E. R. (2013). Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *24*(11), 1777 - 1789.
- Barros, R. P. A., & Gustafsson, J.-Å. (2011). Estrogen receptors and the metabolic network. *Cell Metabolism*, *14*(3), 289 - 299.
- Besnard, J., Ruda, G. F., Setola, V., Abecassis, K., Rodriguiz, R. M., Huang, X.-P., ... Hopkins, A. L. (2012). Automated design of ligands to polypharmacological profiles. *Nature*, *492*(7428), 215 - 220.
- Cereto–Massagué, A., Ojeda, M. J., Valls, C., Mulero, M., Garcia–Vallvé, S., & Pujadas, G. (2015). Molecular fingerprint similarity search in virtual screening. *Methods (San Diego, Calif)*, *71*, 58 - 63.
- Chen, H., Weng, Q. Y., & Fisher, D. E. (2014). UV signaling pathways within the skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, *134*(8), 2080 - 2085.
- Chen, X., Yan, C. C., Zhang, X., Zhang, X., Dai, F., Yin, J., & Zhang, Y. (2016). Drug–target interaction prediction: databases, web servers and computational models. *Briefings in Bioinformatics*, *17*(4), 696 - 712.
- Harmon, G. S., Lam, M. T., & Glass, C. K. (2011). PPARs and lipid

- ligands in inflammation and metabolism. *Chemical Reviews*, *111*(10), 6321 - 6340.
- Hartig, S. M., He, B., Long, W., Buehrer, B. M., & Mancini, M. A. (2011). Homeostatic levels of SRC-2 and SRC-3 promote early human adipogenesis. *The Journal of Cell Biology*, *192*(1), 55 - 67.
- Heindel, J. J., & Blumberg, B. (2019). Environmental obesogens: Mechanisms and controversies. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *59*(1), 89 - 106.
- Heindel, J. J., Howard, S., Agay-Shay, K., Arrebola, J. P., Audouze, K., Babin, P. J., ... Blumberg, B. (2022). Obesity II: Establishing causal links between chemical exposures and obesity. *Biochemical Pharmacology*, *199*(115015), 115015.
- Holtcamp, W. (2012). Obesogens: an environmental link to obesity. *Environmental Health Perspectives*, *120*(2), a62-8.
- Jansen, R., Osterwalder, U., Wang, S. Q., Burnett, M., & Lim, H. W. (2013). Photoprotection: part II. Sunscreen: development, efficacy, and controversies. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *69*(6), 867.e1-14; quiz 881 - 882.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, *596*(7873), 583 - 589.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2017). KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Research*, *45*(D1), D353 - D361.
- Kassotis, C. D., & Stapleton, H. M. (2019). Endocrine-mediated mechanisms of metabolic disruption and new approaches to examine the public health threat. *Frontiers in Endocrinology*, *10*, 39.

- Keiser, M. J., Setola, V., Irwin, J. J., Laggner, C., Abbas, A. I., Hufeisen, S. J., ... Roth, B. L. (2009). Predicting new molecular targets for known drugs. *Nature*, *462*(7270), 175 - 181.
- Kim, S. O., Han, Y., Ahn, S., An, S., Shin, J. C., Choi, H., ... Noh, M. (2018). Kojyl cinnamate esters are peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha/\gamma$  dual agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *26*(21), 5654 - 5663.
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., ... Bolton, E. E. (2019). PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D1102 - D1109.
- Ko, H., An, S., Ahn, S., Park, I. G., Gong, J., Hwang, S. Y., ... Noh, M. (2022a). Sunscreen filter octocrylene is a potential obesogen by acting as a PPAR $\gamma$  partial agonist. *Toxicology Letters*, *355*, 141 - 149.
- Ko, H., An, S., Jang, H., Ahn, S., Park, I. G., Hwang, S. Y., ... Noh, M. (2022b). Macakurzin C derivatives as a novel pharmacophore for pan-peroxisome proliferator-activated receptor modulator. *Biomolecules & Therapeutics*. doi:10.4062/biomolther.2022.097
- Ko, H., Jang, H., An, S., Park, I. G., Ahn, S., Gong, J., ... Noh, M. (2022c). Galangin 3-benzyl-5-methylether derivatives function as an adiponectin synthesis-promoting peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  partial agonist. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *54*(116564), 116564.
- Lee, M. A., Tan, L., Yang, H., Im, Y.-G., & Im, Y. J. (2017). Structures of PPAR $\gamma$  complexed with lobeglitazone and pioglitazone reveal key determinants for the recognition of antidiabetic drugs. *Scientific Reports*, *7*(1), 16837.
- Li, S., Shin, H. J., Ding, E. L., & van Dam, R. M. (2009). Adiponectin



- levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 302(2), 179 - 188.
- Lichtensteiger, W., Bassetti-Gaille, C., Faass, O., Axelstad, M., Boberg, J., Christiansen, S., ... Schlumpf, M. (2015). Differential gene expression patterns in developing sexually dimorphic rat brain regions exposed to antiandrogenic, estrogenic, or complex endocrine disruptor mixtures: glutamatergic synapses as target. *Endocrinology*, 156(4), 1477 - 1493.
- Lin, S., Zhang, G., Liao, Y., Pan, J., & Gong, D. (2015). Dietary flavonoids as xanthine oxidase inhibitors: Structure-affinity and structure-activity relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(35), 7784 - 7794.
- Lounkine, E., Keiser, M. J., Whitebread, S., Mikhailov, D., Hamon, J., Jenkins, J. L., ... Urban, L. (2012). Large-scale prediction and testing of drug activity on side-effect targets. *Nature*, 486(7403), 361 - 367.
- Luechtefeld, T., Marsh, D., Rowlands, C., & Hartung, T. (2018). Machine learning of toxicological big data enables read-across structure activity relationships (RASAR) outperforming animal test reproducibility. *Toxicological Sciences*, 165(1), 198 - 212.
- Mak, K.-K., & Pichika, M. R. (2019). Artificial intelligence in drug development: present status and future prospects. *Drug Discovery Today*, 24(3), 773 - 780.
- Min, S. Y., Desai, A., Yang, Z., Sharma, A., DeSouza, T., Genga, R. M. J., ... Corvera, S. (2019). Diverse repertoire of human adipocyte subtypes develops from transcriptionally distinct mesenchymal progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(36),

17970 - 17979.

- Moffat, J. G., Vincent, F., Lee, J. A., Eder, J., & Prunotto, M. (2017). Opportunities and challenges in phenotypic drug discovery: an industry perspective. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *16*(8), 531 - 543.
- Motley, R. J., & Reynolds, A. J. (1989). Photocontact dermatitis due to isopropyl and butyl methoxy dibenzoylmethanes (Eusolex 8020 and Parsol 1789). *Contact Dermatitis*, *21*(2), 109 - 110.
- Murphy, N., Jenab, M., & Gunter, M. J. (2018). Adiposity and gastrointestinal cancers: epidemiology, mechanisms and future directions. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, *15*(11), 659 - 670.
- Naimo, G. D., Gelsomino, L., Catalano, S., Mauro, L., & Andò, S. (2020). Interfering role of ER $\alpha$  on adiponectin action in breast cancer. *Frontiers in Endocrinology*, *11*, 66.
- Nhoek, P., Chae, H.-S., Masagalli, J. N., Mailar, K., Pel, P., Kim, Y.-M., ... Chin, Y.-W. (2018). Discovery of flavonoids from *Scutellaria baicalensis* with inhibitory activity against PCSK 9 expression: Isolation, synthesis and their biological evaluation. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *23*(2).
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, *29*(9), e45.
- Poiger, T., Buser, H.-R., Balmer, M. E., Bergqvist, P.-A., & Müller, M. D. (2004). Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes. *Chemosphere*, *55*(7), 951 - 963.
- Raffa, D., Maggio, B., Raimondi, M. V., Plescia, F., & Daidone, G.

- (2017). Recent discoveries of anticancer flavonoids. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *142*, 213 - 228.
- Ren, N., Kim, E., Li, B., Pan, H., Tong, T., Yang, C. S., & Tu, Y. (2019). Flavonoids alleviating insulin resistance through inhibition of inflammatory signaling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(19), 5361 - 5373.
- Ribeiro, D., Freitas, M., Tomé, S. M., Silva, A. M. S., Porto, G., Cabrita, E. J., ... Fernandes, E. (2014). Inhibition of LOX by flavonoids: a structure-activity relationship study. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *72*, 137 - 145.
- Rogers, D., & Hahn, M. (2010). Extended-connectivity fingerprints. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *50*(5), 742 - 754.
- Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., & Eliceiri, K. W. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, *18*(1), 529.
- Sanchez-Lengeling, B., & Aspuru-Guzik, A. (2018). Inverse molecular design using machine learning: Generative models for matter engineering. *Science (New York, N.Y.)*, *361*(6400), 360 - 365.
- Schenone, M., Dančik, V., Wagner, B. K., & Clemons, P. A. (2013). Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. *Nature Chemical Biology*, *9*(4), 232 - 240.
- Schneider, G., & Clark, D. E. (2019). Automated De Novo drug design: Are we nearly there yet? *Angewandte Chemie International Ed.*, *58*(32), 10792 - 10803.
- Schneider, P., Walters, W. P., Plowright, A. T., Sieroka, N., Listgarten, J., Goodnow, R. A., Jr, ... Schneider, G. (2020).

- Rethinking drug design in the artificial intelligence era. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 19(5), 353 - 364.
- Schultz, T. W., Amcoff, P., Berggren, E., Gautier, F., Klaric, M., Knight, D. J., ... Cronin, M. T. D. (2015). A strategy for structuring and reporting a read-across prediction of toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 72(3), 586 - 601.
- Shabalala, S. C., Dlodla, P. V., Mabasa, L., Kappo, A. P., Basson, A. K., Pfeiffer, C., & Johnson, R. (2020). The effect of adiponectin in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and the potential role of polyphenols in the modulation of adiponectin signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131(110785), 110785.
- Shin, D. W., Kim, S. N., Lee, S. M., Lee, W., Song, M. J., Park, S. M., ... Noh, M. (2009). (-)-Catechin promotes adipocyte differentiation in human bone marrow mesenchymal stem cells through PPAR gamma transactivation. *Biochemical Pharmacology*, 77(1), 125 - 133.
- Shin, J. C., Lee, E., An, S., Jin, S. H., Ha, J., Choi, W. J., & Noh, M. (2020). Benzophenone-3 and benzophenone-8 exhibit obesogenic activity via peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  pathway. *Toxicology in Vitro*, 67(104886), 104886.
- Stokes, J. M., Yang, K., Swanson, K., Jin, W., Cubillos-Ruiz, A., Donghia, N. M., ... Collins, J. J. (2020). A deep learning approach to antibiotic discovery. *Cell*, 180(4), 688-702.e13.
- Straub, L. G., & Scherer, P. E. (2019). Metabolic messengers: Adiponectin. *Nature Metabolism*, 1(3), 334 - 339.
- Swinney, D. C., & Anthony, J. (2011). How were new medicines discovered? *Nature Reviews. Drug Discovery*, 10(7), 507 - 519.

- Topol, E. J. (2019). High-performance medicine: the convergence of human and artificial intelligence. *Nature Medicine*, 25(1), 44 - 56.
- Ursu, A., Schöler, H. R., & Waldmann, H. (2017). Small-molecule phenotypic screening with stem cells. *Nature Chemical Biology*, 13(6), 560 - 563.
- Uter, W., Gonçalo, M., Yazar, K., Kratz, E.-M., Mildau, G., & Lidén, C. (2014). Coupled exposure to ingredients of cosmetic products: III. Ultraviolet filters. *Contact Dermatitis*, 71(3), 162 - 169.
- Veiga-Lopez, A., Pu, Y., Gingrich, J., & Padmanabhan, V. (2018). Obesogenic endocrine disrupting chemicals: Identifying knowledge gaps. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 29(9), 607 - 625.
- Wang, S. Q., Burnett, M. E., & Lim, H. W. (2011). Safety of oxybenzone: putting numbers into perspective. *Archives of Dermatology*, 147(7), 865 - 866.
- Wang, S. Q., & Lim, H. W. (2011). Current status of the sunscreen regulation in the United States: 2011 Food and Drug Administration's final rule on labeling and effectiveness testing. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 65(4), 863 - 869.
- Wang, C., Gong, B., Bushel, P. R., Thierry-Mieg, J., Thierry-Mieg, D., Xu, J., ... Tong, W. (2014). The concordance between RNA-seq and microarray data depends on chemical treatment and transcript abundance. *Nature Biotechnology*, 32(9), 926 - 932.
- Wang, L., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.-M., Blunder, M., Liu, X., Malainer, C., ... Atanasov, A. G. (2014). Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ): a review. *Biochemical Pharmacology*, 92(1), 73 - 89.

Yu, J., Ahn, S., Kim, H. J., Lee, M., Ahn, S., Kim, J., ... Noh, M. (2017). Polypharmacology of N6-(3-iodobenzyl)adenosine-5'-N-methyluronamide (IB-MECA) and related A3 adenosine receptor ligands: Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)  $\gamma$  partial agonist and PPAR $\delta$  antagonist activity suggests their antidiabetic potential. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(17), 7459 - 7475.

Zhavoronkov, A., Ivanenkov, Y. A., Aliper, A., Veselov, M. S., Aladinskiy, V. A., Aladinskaya, A. V., ... Aspuru-Guzik, A. (2019). Deep learning enables rapid identification of potent DDR1 kinase inhibitors. *Nature Biotechnology*, 37(9), 1038 - 1040.

## Abstract

# Research on informatics-based pharmacological outcome prediction of chemicals

Seungchan An

Natural Product Science, College of Pharmacy

The Graduate School

Seoul National University

Recently, the artificial intelligence technology has been applied to diverse fields in a new drug development process to improve the overall efficiency of drug development programs. In particular, the machine learning/artificial intelligence models for predicting the pharmacological outcomes of chemicals significantly contribute to the discovery of drug candidates at the early stage of drug discovery. For the successful prediction of biological and/or toxicological activities, chembioinformatics-based machine learning approaches should elucidate a causal relationship between the biological activity of a chemical and its structural information. Currently, there are publicly available chembio-big data, which can be used in artificial intelligence-based predictive models. Biological activities in public

chembio-big databases can be classified into two categories, molecular target-directed data and phenotypic ones. Phenotype-based screening evaluates chemical-induced phenotypic changes at the cellular level in the disease-relevant contexts. Importantly, phenotype-based approaches have served as a major source of first-in-class new drugs. As one of the phenotype-based screening systems for the new drug discovery against human metabolic diseases, the adipogenesis model of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hBM-MSCs) has been used. In this model, the effect of compounds on adipogenesis is evaluated by measuring changes in adiponectin biosynthesis or cellular lipid accumulation. Hypoadiponectinemia is a common feature of diverse metabolic diseases, including obesity, type 2 diabetes, and non-alcoholic steatohepatitis and therefore, the adipogenesis model can be used to discover therapeutic candidates for these metabolic diseases. Alternatively, the model can also be used to evaluate potential metabolic adverse outcomes in human such as obesogens and endocrine disrupting chemicals. In this thesis research, the adipogenesis model of hBM-MSCs was used in the evaluation of potential obesogens and applied to validate a chembioinformatics-based machine learning model of human obesogens. Additionally, the elucidation of the read-across structure-activity relationship (RASAR) between phytochemicals and adiponectin biosynthesis-associated nuclear hormone receptors was performed to overcome the limitation of deficient dataset in chembioinformatics-based predictive machine learning models.

To investigate the transcriptome-level effect of sunscreen ingredient avobenzone (3-(4-*tert*-butylphenyl)-1-(4-methoxyphenyl)propane-1,3-dione) in normal human epidermal keratinocytes



(NHEKs), the transcriptomic profiling of avobenzene-treated NHEKs was performed using microarray. Functional module analysis using Gene Ontology biological process enrichment analysis (GOBPEA) on the identified differentially expressed genes revealed that avobenzene significantly increased the lipid metabolism-associated genes in NHEKs, suggesting that avobenzene is one of metabolic disrupting obesogens. Avobenzene significantly promoted adipogenesis in hBM-MSCs as the other obesogenic chemicals, validating its obesogenic phenotype. Read-across approach predicts adverse outcomes of chemicals based on the quantitatively determined chemical similarities to other toxic substances. In the chemical similarity analysis against previously reported obesogens and ultraviolet filters, cinoxate (2-ethoxyethyl (2*E*)-3-(4-methoxyphenyl) prop-2-enoate) was a compound most structurally similar to avobenzene. The obesogenic phenotype of cinoxate was also validated in the adipogenesis model of hBM-MSCs. In the subsequent target identification study, cinoxate was found to function as a full agonist of PPAR $\gamma$ , a central nuclear receptor that regulates adipogenesis. Finally, the first chembioinformatics-based machine learning model to predict obesogenic potential from chemical structure was constructed. Chembio-big database was extracted to prepare the training dataset, which includes chemical structures, physicochemical properties, and biological activities against nuclear receptors of obesogen-associated chemicals. This model can be used for early detection of potential environmental obesogens, providing information on the obesogenic possibility of the compound as well as its nuclear receptor target.

Next, the phenotype-based screening system was constructed *in silico* by applying a chembioinformatic approach to machine

learning model for adiponectin secretion-inducing natural products. The amount of data that directly describe the adipogenic phenotype is insufficient and complicated, thus the two models were sequentially implemented to predict adiponectin secretion-inducing activity. First, the random forest-based nuclear receptor activity classifier was constructed with molecular target-directed data. To supplement missing values in the training dataset, the RASAR approach, where the missing values were replaced with the chemical similarity to the most similar biologically active chemical, was introduced. The RASAR approach significantly improved the prediction performance of the nuclear receptor activity classifier. Second, a relative adiponectin score (RAS) model that can predict the adiponectin secretion-inducing activity from the model-predicted nuclear receptor activity was designed. The relative contributions of each nuclear receptor that modulates adiponectin biosynthesis were determined from single-cell transcriptomic profiles of the differentiated adipocytes. In the model, nuclear receptor activity level and the adiponectin gene expression was correlated using multiple linear regression. The RAS model provided adiponectin secretion-inducing activity from the chemical structure, and its performance was experimentally validated using flavonoids isolated from *Scutellaria baicalensis*.

In conclusion, this thesis study provides the proof of scientific concept that chembioinformatics-based machine learning models successfully predict beneficial or adverse outcomes of chemicals in human metabolism at the phenotypic level rather than the molecular target level. Notably, RASAR approaches improved predictive power of biological outcomes for chemicals lacking their biological activity information. Future studies will be directed to construct a general machine learning model to predict biological phenotypes of more

complex chemicals, regardless of their chemotype, by improving the chembioinformatics-based model.

**keywords : chembioinformatics, machine learning, adipogenesis, obesogen, adiponectin biosynthesis, read-across structure-activity relationship**

*Student Number : 2019-20082*

## Appendix (List of Publications)

\* (Co-)first authored publications

1. Ahn S#, An S#, Lee M, Lee E, Pyo JJ, Kim JH, Ki MW, Jin SH, Ha J, Noh M\*. A long-wave UVA filter avobenzone induces obesogenic phenotypes in normal human epidermal keratinocytes and mesenchymal stem cells. *Arch Toxicol.* 2019 Jul;93(7):1903–1915.
2. An S#, Yu J#, Choi H, Ko H, Ahn S, Shin JC, Pyo JJ, JeongLS, Noh M\*. Selenium bioisosteric replacement of adenosine derivatives promoting adiponectin secretion increases the binding affinity to peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$ . *Bioorg Med Chem.* 2020 Jan;28(1):115226.
3. An S#, Kim G#, Kim HJ, Ahn S, Kim HY, Ko H, Hyun YE, Nguyen M, Jeong J, Liu Z, Han J, Choi H, Yu J, Kim JW, Lee HW, Jacobson KA, Cho WJ, Kim YM, Kang KW, Noh M\*, Jeong LS\*. Discovery and Structure-Activity Relationships of Novel Template, Truncated 1'-Homologated Adenosine Derivatives as Pure Dual PPAR $\gamma$ / $\delta$  Modulators. *J Med Chem.* 2020 Dec;63(24):16012–16027.
4. Choi C#, Saha A#, An S#, Cho YK, Kim H, Noh M, Lee YH\*. Macrophage-Specific Connexin43 Knockout Protects Mice from Obesity-Induced Inflammation and Metabolic Dysfunction. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Jun;10:925971.
5. Nguyen M#, An S#, Nguyen Y, Hyun YE, Choi H, Pham L, Kim JA, Noh M, Kim G\*, Jeong LS\*. Design, Synthesis, and Biological Activity of 1-1' -Homologated Adenosine Derivatives. *ACS Med Chem Lett.* 2022 Jun;13(7):1131–1136.
6. Ko H#, An S#, Jang H, Ahn S, Park IG, Hwang SY, Gong J, Oh

S, Kwak SY, Choi WJ, Kim H\*, Noh M\*. Macakurzin C Derivatives as a Novel Pharmacophore for Pan-Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Modulator. *Biomol Ther.* 2022 Nov; 10.4062/biomolther.2022.097.

7. Lee KJ#, An S#, Kim MY, Kim SM, Jeong WI, Ko HJ, Yang YM, Noh M, Han YH\*. Hepatic TREM2<sup>+</sup> macrophages express matrix metalloproteinases to control fibrotic scar formation. *Immunol Cell Biol.* 2022 Dec; 10.1111/imcb.12616.

8. An S, Hwang SY, Gong J, Ahn S, Park IG, Oh S, Chin YW, Noh M\*. Computational Prediction of the Phenotypic Effect of Flavonoids on Adiponectin Biosynthesis. *J Chem Inf Model.* 2023 Jan; 10.1021/acs.jcim.3c00033.

\* Co-authored publications

9. Ahn S#, Lee M#, An S, Hyun S, Hwang J, Lee J\*, Noh M\*. 2-Formyl-komarovicine promotes adiponectin production in human mesenchymal stem cells through PPAR $\gamma$  partial agonism. *Bioorg Med Chem.* 2018 Mar;26(5):1069-1075.

10. Kim SO#, Han Y#, Ahn S, An S, Shin JC, Choi H, Kim HJ, Park NH, Kim YJ, Jin SH, Rho HS\*, Noh M\*. Kojyl cinnamate esters are peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha/\gamma$  dual agonists. *Bioorg Med Chem.* 2018 Nov;26(21):5654-5663.

11. Ahn S#, Ma CT#, Choi JM, An S, Lee M, Le THV, Pyo JJ, Lee J, Choi MS, Kwon SW, Park JH, Noh M\*. Adiponectin-Secretion-Promoting Phenylethylchromones from the Agarwood of *Aquilaria malaccensis*. *J Nat Prod.* 2019

Feb;82(2):259-264.

12. Ahn S#, Kim J#, **An S**, Pyo JJ, Jung D, Lee J, Hwang SY, Gong J, Shin I, Kim HP, Kim H\*, Noh M\*.

2-Phenyl-8-(1-phenylallyl)-chromenone compounds have a pan-PPAR modulator pharmacophore. *Bioorg Med Chem*. 2019 Jul;27(13):2948-2958.

13. Pyo JJ#, Ahn S#, Jin SH, **An S**, Lee E, Choi J, Shin JC, Choi H, Kim HJ, Choi D, Noh M\*. Keratinocyte-derived IL-36 $\gamma$  plays a role in hydroquinone-induced chemical leukoderma through inhibition of melanogenesis in human epidermal melanocytes. *Arch Toxicol*. 2019 Aug;93(8):2307-2320.

14. Lee E, Ahn S, Jin SH, Lee M, Pyo JJ, Shin JC, **An S**, Ha J, Noh M\*. CXCL14 downregulation in human keratinocytes is a potential biomarker for a novel in vitro skin sensitization test. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2020 Jan;386:114828.

15. Ahn S#, Jang DM#, Park SC, **An S**, Shin J, Han BW\*, Noh M\*. Cyclin-Dependent Kinase 5 Inhibitor Butyrolactone I Elicits a Partial Agonist Activity of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ . *Biomolecules*. 2020 Feb;10(2):275.

16. Shin JC#, Lee E#, **An S**, Jin SH, Ha J, Choi WJ, Noh M\*. Benzophenone-3 and benzophenone-8 exhibit obesogenic activity via peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  pathway. *Toxicol In Vitro*. 2020 Sep;67:104886.

17. Han Y#, Liu J#, Ahn S, **An S**, Ko H, Shin JC, Jin SH, Ki MW, Lee SH, Lee KH, Shin SS, Choi WJ, Noh M\*. Diallyl Biphenyl-Type Neolignans Have a Pharmacophore of PPAR $\alpha$ / $\gamma$  Dual Modulators. *Biomol Ther*. 2020 Sep;28(5):397-404.

18. Lee JE, Ahn S, Jeong H, An S, Myung CH, LeeJA, Hong SC, Kim YJ, Kim JY, Ryu JH, Noh M, Nam KT, Hwang JS\*. Olig2 regulates p53-mediated apoptosis, migration and invasion of melanoma cells. *Sci Rep.*2021 Apr;11(1):7778.
19. Mashelkar KK, Byun WS, Ko H, Sung K, Tripathi SK, An S, Yum YA, Kwon JY, Kim M, Kim G, Kwon EJ, Lee HW, Noh M, Lee SK, Jeong LS\*. Discovery of a Novel Template, 7-Substituted 7-Deaza-4'-Thioadenosine Derivatives as Multi-Kinase Inhibitors. *Pharmaceuticals.* 2021 Dec;14(12):1290.
20. Ko H, Jang H, An S, Park IG, Ahn S, Gong J, Hwang SY, Oh S, Kwak SY, Choi WJ, Kim H\*, Noh M\*. Galangin 3-benzyl-5-methylether derivatives function as an adiponectin synthesis-promoting peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  partial agonist. *Bioorg Med Chem.* 2022 Jan;54:116564.
21. Ko H, An S, Ahn S, Park IG, Gong J, Hwang SY, Oh S, Ki MW, Jin SH, Choi WJ, Noh M\*. Sunscreen filter octocrylene is a potential obesogen by acting as a PPAR $\gamma$  partial agonist. *Toxicol Lett.* 2022 Feb;355:141-149.
22. Lee C#, Gong J#, Kim J, Ko H, An S, Bang S, Deyrup ST, Noh M\*, Shim SH\*. Adiponectin-Secretion-Promoting Cyclic Peptide-Polyketide Hybrids from a Halophyte-Associated Fungus, *Colletotrichum gloeosporioides* JS0417. *J Nat Prod.* 2022 Mar;85(3):501-510.
23. Ko H#, Choi H#, Han Y, An S, Min D, Park WS, Jin SH, Kim HJ\*, Noh M\*. 3,4,5-Trimethoxycinnamate thymol ester inhibits melanogenesis in normal human melanocytes and 3D human epidermal equivalents via the PGC-1 $\alpha$ -independent PPAR $\gamma$  partial agonism. *J*

*Dermatol Sci.* 2022 Apr;106(1):12-20.

24. Kim J#, Hwang SY#, Kim D#, Kim M, Baek K, Kang M, **An S**, Gong J, Park S, Kandeel M, Lee Y, Noh M\*, Kwon HJ\*. Abiraterone Acetate Attenuates SARS-CoV-2 Replication by Interfering with the Structural Nucleocapsid Protein. *Biomol Ther.* 2022 Sep;30(5):427-434.

25. Kim J#, Ko H#, Hur JS, **An S**, Lee JW, Deyrup ST, Noh M\*, Shim SH\*. Discovery of Pan-peroxisome Proliferator-Activated Receptor Modulators from an Endolichenic Fungus, *Daldinia childiae*. *J Nat Prod.* 2022 Dec;85(12):2804-2816.

26. Ahn S, Ahn M, Park S, **An S**, Park IG, Hwang SY, Gong J, Oh S, Jin SH, Kim HJ, Cheong JH, Byun Y, Noh M. Discovery of PPAR $\gamma$  and glucocorticoid receptor dual agonists to promote the adiponectin and leptin biosynthesis in human bone marrow mesenchymal stem cells. *Eur J Med Chem.* 2022 Nov;245(Pt 1):114927.



## Appendix (Permission for Republication)

This Ph.D. Dissertation was partially reproduced from the published articles.

– Reproduced from [Ahn S, **An S**, Lee M, Lee E, Pyo JJ, Kim JH, Ki MW, Jin SH, Ha J, Noh M. A long-wave UVA filter avobenzone induces obesogenic phenotypes in normal human epidermal keratinocytes and mesenchymal stem cells. *Arch Toxicol.* 2019;93(7):1903–1915.]


### SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Dec 21, 2022


This Agreement between Mr. Seungchan An ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	5453900733749
License date	Dec 21, 2022
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Archives of Toxicology
Licensed Content Title	A long-wave UVA filter avobenzone induces obesogenic phenotypes in normal human epidermal keratinocytes and mesenchymal stem cells
Licensed Content Author	Sungjin Ahn et al
Licensed Content Date	Apr 23, 2019
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	full article/chapter
Will you be translating?	yes, including original language
Number of languages	1
Circulation/distribution	30 - 99
Author of this Springer Nature content	yes
Title	Research on informatics-based pharmacological outcome prediction of chemicals
Institution name	Seoul National University
Expected presentation date	Jan 2023
Order reference number	1
Specific Languages	Korean
Requestor Location	Mr. Seungchan An Seoul 08826
	Seoul, other Korea, Republic Of Attn: Mr. Seungchan An

- Reproduced from [An S, Hwang SY, Gong J, Ahn S, Park IG, Oh S, Chin YW, Noh M. Computational Prediction of the Phenotypic Effect of Flavonoids on Adiponectin Biosynthesis. *J Chem Inf Model*. 2023; 10.1021/acs.jcim.3c00033.]

 Home Help Live Chat Sign in Create Account

**Computational Prediction of the Phenotypic Effect of Flavonoids on Adiponectin Biosynthesis**

 Author: Seungchan An, Seok Young Hwang, Junpyo Gong, et al  
Publication: Journal of Chemical Information and Modeling  
Publisher: American Chemical Society  
Date: Jan 1, 2023  
Copyright © 2023, American Chemical Society

**PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE**

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

[BACK](#) [CLOSE WINDOW](#)

© 2023 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Data Security and Privacy | For California Residents | Terms and Conditions  
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com)

## 감사의 글

학위과정을 시작하기 전 학부 시절부터, 이렇게 박사학위를 무사히 마치기까지 지도해주신 노민수 교수님께 진심으로 감사의 말씀드립니다. 학생을 항상 먼저 생각해주시고, 아낌없는 지원과 가르침을 주신 덕분에 이제 독립적인 연구자로 나아갈 기회를 얻었습니다. 앞으로도 그 가르침대로 소명 의식을 갖고 연구에 정진하여 더욱 성장하고 발전하는 연구자가 되겠습니다. 그리고, 바쁘신 와중에도 본 박사학위논문을 심사해주시어 학위논문을 개선하고 발전시킬 수 있도록 도와주신 박성혁 교수님, 심상희 교수님, 진영원 교수님, 임경민 교수님께도 감사의 말씀 올립니다.

지금은 먼저 졸업했지만, 연구실 생활을 함께했던 우리 선배님들에게도 감사의 말 전합니다. 덕분에 어려움이 있어도 항상 즐겁게 연구할 수 있었습니다. 그리고, 지금 연구실 생활을 함께하는 우리 후배 동료들도 고맙다는 말 전하고 싶습니다.

항상 저를 지지해주는 우리 가족, 부모님 감사합니다. 표현을 잘하지 못하는 아들이지만 긴 학위 기간 동안, 끝까지 믿고 응원해 주어서 고맙고, 사랑한다는 말 전하고 싶습니다. 마지막으로, 갑작스럽게 곁을 떠난 우리 할머니, 밤낮으로 기도로 응원해 주셔서 제가 이만큼 할 수 있었다고 생각합니다. 직접 이 학위논문을 보여드리지 못해 너무나도 아쉽지만, 천국에서 저를 지켜보실 것을 생각하며 앞으로도 더욱 열심히 하겠습니다.