(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0113430
(43) 공개일자 2018년10월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *C12Q 1/68* (2018.01)
G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/39558 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0044986
(22) 출원일자 2017년04월06일
심사청구일자 2017년06월05일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
김유리
서울특별시 종로구 통일로18길 9, 113동 603호 (무악동, 인왕산아이파크아파트)
서유나
서울특별시 구로구 가마산로27길 11-15, 301호 (구로동)
(74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 15 항

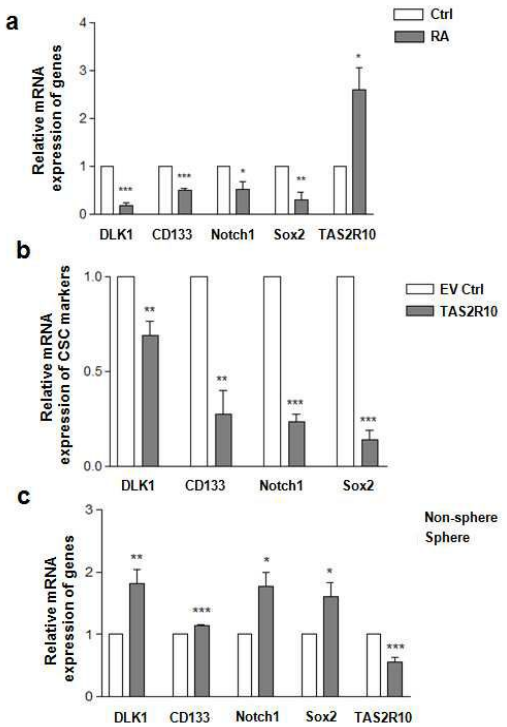
(54) 발명의 명칭 **암의 진단 및 치료를 위한 인간 쓴맛 수용체 TAS2R10의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 인간 쓴맛 수용체인 TAS2R10의 암 진단 및 치료를 위한 용도에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명은 TAS2R10의 발현을 촉진하는 제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, TAS2R10의 발현 수준 측정을 이용한 암 치료제의 스크리닝 방법, TAS2R10의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도4



하는 암의 진단 또는 예후 분석용 바이오마커 조성물 및 키트, 그리고 TAS2R10의 발현 수준 측정을 이용한 암의 진단 또는 예후 분석에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 인간 쓴맛 수용체 TAS2R10은 암세포의 암줄기세포성 및 자가 재생 능력을 효과적으로 억제하며, 종양 형성을 억제하고 암세포의 전이 및 침윤을 억제하는 효능이 탁월하여, 이의 발현을 촉진함으로써 암을 예방하고 치료하는 효과가 우수하다. 또한, 본 발명의 TAS2R10은 암세포의 발달 단계, 분화 정도에 따라 발현 수준이 변화되는 특성이 있어 암의 진단과 예후 분석에 효과적으로 이용될 수 있다.

(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
C12Q 1/6886 (2018.05)
G01N 33/574 (2013.01)
C12Q 2600/118 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/705 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 쓴맛 수용체 TAS2R10의 발현을 촉진하는 제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 인간 쓴만 수용체 TAS2R10의 발현을 촉진하는 제제는 화합물, 탄수화물, 펩티드, 앱타머 및 항체를 포함하는 군에서 선택된 어느 하나인 것인, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 암세포의 암줄기세포성을 억제하는 효능을 갖는 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 암세포의 자가 재생 능력(self-renewal capacity)을 억제하는 효능을 갖는 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 종양의 발생을 억제하는 효능을 갖는 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 암세포의 전이 또는 침윤을 억제하는 효능을 갖는 것인, 약학적 조성물.

청구항 7

인간 쓴맛 수용체 TAS2R10을 발현하는 시료에 암 치료용 후보물질을 처리하고 TAS2R10의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 암 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 발현 수준의 측정은 TAS2R10의 단백질 발현 수준 또는 TAS2R10의 mRNA 발현 수준을 측정하는 것인, 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 시료에 후보물질을 처리하기 전과 비교하여 TAS2R10의 발현 수준이 증가한 후보물질을 선별하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 10

인간 쓴맛 수용체 TAS2R10의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 암의 진단 또는 예후 분석용 바이오마커 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 TAS2R10의 발현 수준은 TAS2R10의 단백질의 발현 수준 또는 TAS2R10의 mRNA의 발현 수준인 것인, 바이오마커 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 TAS2R10의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 항체, 앱타머, 안타고니스트 및 이들

의 조합을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나이고, 상기 TAS2R10의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 안티센스 올리고뉴크레오티드, 프라이머 쌍, 프로브 및 이들의 조합을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나인 것인, 바이오마커 조성물.

청구항 13

인간 쓴맛 수용체 TAS2R10의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 암의 진단 또는 예후 분석용 키트.

청구항 14

암이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에서 인간 쓴맛 수용체 TAS2R10의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 암의 진단 또는 예후 분석에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 측정된 TAS2R10의 발현 수준을 정상 대조군과 비교하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 인간 쓴맛 수용체인 TAS2R10의 암 진단 및 치료를 위한 용도에 관한 것이다.

[0002] 구체적으로 본 발명은 TAS2R10의 발현을 촉진하는 제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, TAS2R10의 발현 수준 측정을 이용한 암 치료제의 스크리닝 방법, TAS2R10의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 암의 진단 또는 예후 분석용 바이오마커 조성물 및 키트, 그리고 TAS2R10의 발현 수준 측정을 이용한 암의 진단 또는 예후 분석에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 암세포의 아형집단(sub-population)은 분화, 자가-재생 잠재력(self-renewal potential) 및 종양 형성을 포함하는 암줄기세포(cancer stem cell; CSC)의 대표적인 특징을 나타내는 것으로 증명되었으며, 이에 CSC는 종양의 성장, 전이 및 화학요법과 방사선 요법에 대한 저항성의 원인이 되는 것으로 나타났다(Clarke MF, et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. Cancer Res. 2006;66(19):9339-9344). 따라서 CSC를 표적으로 하는 암 치료 전략은 악성 암에 대한 효과적인 치료법이 될 것으로 기대되고 있다.

[0004] 또한, 상당수의 암이 원발성 종양 자체가 아닌, 암세포의 전이에 의해 암환자의 사망률에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 이러한 암세포의 전이에 있어서 세포 침윤과 이동은 암세포 전이의 두 가지 기본 과정이 된다. 따라서 암세포의 세포 침윤과 이동을 억제하여 암세포의 전이를 억제하는 치료 전략 역시 악성 암에 대한 효과적인 치료법이 될 것으로 기대되고 있다.

[0005] 신경모세포종(neuroblastoma; NB)은 배아 또는 태아의 초기 단계에서 발생하며 미성숙한 신경 세포에서 유래된 암의 한 유형이다. NB의 발병의 대부분은 유년기와 10세 미만의 소아에서 발생하며, 실제로 NB는 1세 미만의 영아에서 가장 흔하게 진단되는 암 유형으로 알려져 있다. NB 세포주는 표현형 및 유전자 발현 패턴에 기초하여 신경세포/신경 내분비 전구체(N-type), 기질-부착성/Schwannian (S-type) 및 중간(I-type) 타입과 같은 세 가지의 세포 유형으로 나타나는 것으로 확인되었다. 그 중 I형 세포는 NB 세포 중 가장 미성숙하고 악성인 집단을 나타내며, 이들은 N형 및 S형 세포의 중간적인 특성을 나타낸다. 악성 NB의 유전자 발현 프로파일에서 I형 세포는 NB의 잠재적 치료 표적, 특히 CSC의 연구를 위한 in vitro 모델로서 사용되어왔다.

[0006] 미각은 일반적으로 혀의 돌기에 위치한 미뢰의 향미-의존성 화학 감각 시스템으로 알려져 있다. 또한 단맛, 우마미, 신맛, 짠맛 및 쓴맛을 포함하는 5가지 기본 맛은 혀에 국한된 특수 감각 세포에 의해 감지되는 것으로 알려져 있다. 이러한 세포들 중에서 단맛, 우마미 및 쓴맛에 의한 메커니즘은 특정 유형의 G-단백질 결합 수용체(G-protein-coupled receptor; GPCR)와 작은 분자간의 상호 작용을 포함하는 것으로 밝혀졌다. GPCR은 신경 전달 물질, 빛, 맛 및 냄새와 같은 다양한 세포외 자극에 반응하는 트랜스 멤브레인 수용체의 수퍼 패밀리에 속한다.

[0007] TAS2R로 불리는 인간의 쓴맛 수용체는 쓴 물질에 반응하는 약 25개의 화학 감각 수용체 그룹을 말한다. 최근의

연구에 따르면 TAS2R은 위장관, 심혈관, 폐, 생식기, 면역계 및 중추 신경계 조직을 비롯한 비-미각성 조직에서도 발현된다는 사실이 입증되었다. 이러한 결과는 TAS2R이 맛을 감지하는 역할과 구별되는 기능을 매개함을 시사한다. 지금까지 쓴맛 수용체에 대한 연구는 제한적이었으나, 쓴맛의 감지는 인간이 잠재적으로 해롭고 위험한 독성 물질의 섭취로부터 자신을 보호할 수 있는 자기 방어 시스템과 관련이 있다고 일반적으로 받아들여지고 있다(Singh N, et al. Functional bitter taste receptors are expressed in brain cells. Biochem Biophys Res Commun. 2011;406(1):146-151).

[0008] TAS2R이 위장관, 심혈관, 폐, 생식기, 면역계 및 중추 신경계 조직을 비롯한 비-미각성 조직에서도 발현된다는 것에 기초하여, 이와 관련한 천식, 위장관 질병 등의 다양한 질병과 관련이 있을 것으로 추정되고 있으나, 아직까지 TAS2R의 항-암줄기세포성 및 항-전이 효과 등에 대하여는 알려진 바가 없으며 이에 따른 암 치료 가능성에 대하여도 규명된 바가 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Clarke MF, et al., Cancer Res. 2006;66(19):9339-9344

(비특허문헌 0002) Singh N, et al., Biochem Biophys Res Commun. 2011;406(1):146-151

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 인간 쓴맛 수용체인 TAS2R10의 암 진단 및 치료를 위한 용도를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 구체적으로 본 발명은 TAS2R10의 발현을 촉진하는 제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, TAS2R10의 발현 수준 측정을 이용한 암 치료제의 스크리닝 방법, TAS2R10의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 암의 진단 또는 예후 분석용 바이오마커 조성물 및 키트, 그리고 TAS2R10의 발현 수준 측정을 이용한 암의 진단 또는 예후 분석에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 인간 쓴맛 수용체 TAS2R10의 발현을 촉진하는 제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 인간 쓴맛 수용체 TAS2R10은 단맛, 우마미, 신맛, 짠맛 및 쓴맛을 포함하는 인간의 5가지 기본 맛 수용체의 하나로서, 그 중 쓴맛을 나타내는 물질에 대한 수용체로, G-단백질 결합 수용체(G-protein coupled receptor) 군에 속하는 것으로 알려져 있다.

[0014] 본 발명자들은 암세포에서 TAS2R10의 발현이 촉진되는 경우, 암세포의 암줄기세포성(cancer stem cell; CSC) 및 자가 재생 능력(self-renewal capacity)이 억제되고, 종양 형성이 억제되며, 암세포의 전이 및 침윤(invasion)이 억제되어 암을 예방하고 치료하는 효과가 있음을 최초로 규명하였다.

[0015] 구체적으로 본 발명의 실시예에서 신경모세포종 세포주인 SK-N-BE(2)C (이하, "BE(2)C")를 재조합 플라스미드인 pcDNA+TAS2R10로 형질 감염시켜 TAS2R10의 과발현을 유도한 결과, 대표적인 암줄기세포 마커인 DLK1, CD133, Notch1 및 Sox2의 발현이 유의하게 감소되었으며, 이로써 TAS2R10의 발현 촉진에 따른 암세포의 암줄기세포성 억제를 확인하였다(도 4a, 4b).

[0016] 또한, 본 발명의 다른 실시예에서, BE(2)C를 재조합 플라스미드인 pcDNA+TAS2R10로 형질 감염시켜 TAS2R10의 과발현을 유도한 후 집락 형성 분석(clonogenic assay) 및 구 형성 분석(sphere formation assay)을 수행한 결과, BE(2)C의 집락 형성 및 구 형성이 모두 유의하게 억제되었으며, 이로써 TAS2R10의 발현 촉진에 따른 암세포의 자가 재생 잠재력 억제를 확인하였다(도 5, 도 6).

[0017] 또한, 본 발명의 다른 실시예에서, BE(2)C를 재조합 플라스미드인 pcDNA+TAS2R10로 형질 감염시켜 TAS2R10의 과발현을 유도한 후, 이를 마우스 모델에 피하 주사하여 종양의 형성여부를 관찰한 결과, 대조군에 비해 약 80%의 수준으로 종양 형성이 억제됨을 확인하였다(표 1).

[0018] 또한, 본 발명의 다른 실시예에서, pcDNA+TAS2R10로 형질 감염시켜 TAS2R10의 과발현이 유도된 BE(2)C를 이용하여 상처 치유 분석(wound-healing assay)을 수행한 결과, 대조군과 비교하여 약 30% 정도 느린 속도로 세포 이동이 이루어졌으며, 이로써 TAS2R10의 발현 촉진에 따른 암세포의 전이 억제를 확인하였다(도 7).

[0019] 또한, 본 발명의 다른 실시예에서, pcDNA+TAS2R10로 형질 감염시켜 TAS2R10의 과발현이 유도된 BE(2)C를 이용하여 트랜스웰 침윤 분석(transwell invasion assay)을 수행한 결과, 대조군과 비교하여 암세포의 침윤성이 유의하게 감소된 것으로 확인되었다(도 8).

[0020] 또한, 본 발명의 다른 실시예에서, BE(2)C를 재조합 플라스미드인 pcDNA+TAS2R10로 형질 감염시켜 TAS2R10의 과발현을 유도한 후 젤라틴 자이모그라피 분석(gelatin zympgraphy assay)을 수행한 결과, 세포외 기질(ECM)의 거대 분자를 분해하여 암세포의 이동과 침윤을 촉진하는 것으로 알려진 MMP-2 및 MMP-9의 발현이 억제되는 것으로 확인되었다(도 9).

[0021] 또한, 본 발명의 다른 실시예에서, pcDNA+TAS2R10로 형질 감염시켜 TAS2R10의 과발현이 유도된 BE(2)C를 이용하여 qRT-PCR 분석 및 웨스턴 블랏 분석을 수행한 결과, 저산소 상태에서 특히 암세포의 전이를 유도하는 것으로 알려진 HIF-1a의 발현이 유의하게 억제되는 것으로 확인되었다(도 10).

[0022] 본 발명에서 사용되는 용어, "TAS2R10의 발현을 촉진하는 제제"는 TAS2R10의 발현을 촉진시키는 모든 제제를 포함하며, 예를 들어 TAS2R10의 유전자 발현 조절 부위에 특이적으로 결합하여 TAS2R10의 발현 촉진을 유도하는 모든 화합물, 탄수화물, 펩티드, 앱타머, 항체 등 일 수 있다.

[0023] 본 발명의 약학적 조성물은 TAS2R10의 발현을 촉진하는 제제를 유효 성분으로 포함하는 것 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명에서 사용될 수 있는 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 말토덱스트린, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 필요한 경우, 부형제, 희석제, 항산화제, 완충액 또는 정균제 등 기타 약학적으로 허용 가능한 첨가제들을 첨가하여 사용할 수 있으며, 충진제, 증량제, 습윤제, 붕해제, 분산제, 계면 활성제, 결합제 또는 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 사용할 수 있다.

[0026] 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, TAS2R10의 발현을 촉진하는 제제는 약학적 조성물의 전체의 중량을 기준으로 0.00001 중량% 내지 99.99 중량%로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 0.1 중량% 내지 90 중량%, 보다 바람직하게는 0.1 중량% 내지 70 중량%, 더욱 바람직하게는 0.1 중량% 내지 50중량%로 포함될 수 있으나, 이에 한정되지 않으며 투여 대상의 상태, 구체적인 병증의 종류, 진행 정도 등에 따라 다양하게 변경될 수 있다. 필요한 경우, 약학적 조성물의 전체 함량으로도 포함될 수 있다.

[0027] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여를 위한 적합하고 다양한 제형으로 제제화되어 사용될 수 있다.

[0028] 본 발명의 약학적 조성물을 이용한 경구 투여용 제제의 비제한적인 예로는, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 정제, 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀젼, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제 등을 들 수 있다.

[0029] 본 발명의 약학적 조성물을 경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴 등과 같은 결합제; 디칼슘 포스페이트 등과 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분 등과 같은 붕해제; 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴 푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌 글리콜 왁스 등과 같은 윤활유 등을 사용할 수 있으며, 감미제, 방향제, 시럽제 등도 사용할 수 있다. 나아가 캡슐제의 경우에는 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체 등을 추가로 사용할 수 있다.

[0030] 본 발명의 약학적 조성물을 이용한 비경구용 제제의 비제한적인 예로는, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등을 들 수 있다.

[0031] 본 발명의 약학적 조성물을 비경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조 제제, 외용제 등을 사용할 수 있으며, 상기 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리

콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0032] 본 발명의 약학적 조성물을 주사액으로 제제화하는 경우, 본 발명의 약학적 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플(ampoule) 또는 바이알(vial)의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다.

[0033] 본 발명의 약학적 조성물을 에어로졸제로 제제화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합할 수 있다.

[0034] 본 발명의 약학적 조성물을 연고, 크림, 도포용 파우더, 오일, 피부 외용제 등으로 제제화하는 경우에는, 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등을 담체로 사용하여 제제화할 수 있다.

[0035] 본 발명의 약학적 조성물의 약학적 유효량, 유효 투여량은 약학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 약학 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의약 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다.

[0036] 본 발명의 약학적 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수도 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양으로 투여할 수 있으며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0037] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 목적하는 해당 부위에 상기 약학적 조성물이 도달할 수 있는 한, 특별한 제한 없이 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다. 상기 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다.

[0038] 본 발명의 약학적 조성물의 비경구 투여 방법으로는, 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 경피 투여 또는 피하 투여 등을 이용할 수 있으며, 상기 조성물을 질환 부위에 도포하거나 분무, 흡입하는 방법 또한 이용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0039] 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로 사용할 수 있으나, 치료 효율을 증가시키기 위하여 추가적으로 방사선 요법, 화학 요법 등의 다양한 암 치료 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0040] 본 발명은 인간 쓴맛 수용체 TAS2R10을 발현하는 시료에 암 치료용 후보물질을 처리하고 TAS2R10의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0041] 본 발명은 암 치료용 후보물질의 존재 및 부재 하에서 TAS2R10의 발현 수준의 변화를 비교하는 방법으로 암 치료제를 스크리닝하는데 유용하게 사용될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 암 치료제 스크리닝 방법은 암 치료용 후보물질의 부재 하에 시료에서의 TAS2R10의 발현 수준을 측정하고, 또한 암 치료용 후보물질의 존재 하에 TAS2R10의 발현 수준을 측정하여 양자를 비교한 결과, 상기 후보물질이 존재할 때의 TAS2R10의 발현 수준이 상기 후보물질의 부재 하에서의 발현 수준보다 증가된 경우, 그 후보물질을 암의 예방 또는 치료용 제제로 예측할 수 있다.

[0042] 본 발명에서 사용되는 용어, "TAS2R10의 발현 수준"의 측정은 TAS2R10의 단백질의 발현 수준 또는 TAS2R10의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 방식으로 수행될 수 있다.

[0043] 구체적으로 TAS2R10의 단백질 발현 수준을 측정하는 것은, 예를 들어 TAS2R10 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 앱타머, 안타고니스트 또는 이들의 조합을 이용하여, 웨스턴 블랏팅, ELISA, 방사선면역분석법, 방사선면역확산법, 오우크테를로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케트 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전분석, 보체고정분석, FACS, 단백질 칩 등의 분석법을 통해 수행될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0044] 또한, TAS2R10의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 것은, 예를 들어 TAS2R10의 mRNA에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴크레오티드, 프라이머 쌍, 프로브 또는 이들의 조합을 이용하여, 역전사 중합효소 연쇄반응, 경쟁적 역전사 중합효소 연쇄반응, 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응, RNasa 보호 분석법, 노던 블랏팅, DNA 마이크로어레이 칩 등의 분석법을 통해 수행될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0045] 본 발명은 인간 쓴맛 수용체 TAS2R10의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 암의 진단 또는 예후 분석용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0046] 또한, 본 발명은 인간 쓴맛 수용체 TAS2R10의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 암의 진단 또는 예후 분석용 키트를 제공한다.

[0047] 본 발명에서 사용되는 용어, "TAS2R10의 발현 수준을 측정하는 제제"는 TAS2R10의 단백질의 발현 수준 또는 TAS2R10의 mRNA의 발현 수준을 측정하는데 이용될 수 있는 모든 제제를 의미한다. 구체적으로 TAS2R10의 단백질 발현 수준을 측정하기 위한 제제로는 예를 들어 TAS2R10 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 앱타머, 안타고니스트 또는 이들의 조합일 수 있고, TAS2R10의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제로는 예를 들어 TAS2R10의 mRNA에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴크레오티드, 프라이머 쌍, 프로브 또는 이들의 조합일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0048] 본 발명에서 사용되는 용어, "진단"은 일반적으로 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미하며, "예후"는 일반적으로 병세의 진행, 회복에 대한 예측을 의미한다.

[0049] 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용설명서를 추가로 포함할 수 있다. 상기 사용설명서는 예를 들어, 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨, 키트를 포함하는 패키지 표면상의 설명 등의 형태일 수 있으며, 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함할 수 있다.

[0050] 본 발명의 키트는 RT-PCR 키트, DNA 분석용(예를 들어, DNA 칩) 키트 또는 단백질 분석용(예를 들어, 단백질 칩) 키트일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0051] 구체적으로, 본 발명의 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. 예를 들어, RT-PCR 키트는 TAS2R10의 유전자에 대한 특이적인 프라이머 쌍, 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제, 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNAse 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.

[0052] 또한, 구체적으로 본 발명의 키트는 DNA 분석을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. DNA 분석 키트(DNA 칩 키트)는 일반적으로 편평한 고체 지지판, 전형적으로는 현미경용 슬라이드보다 크지 않은 유리 표면에 핵산 종을 격자형 배열(gridded array)로 부착한 것으로, 칩 표면에 핵산이 일정하게 배열되어, DNA 칩 상의 핵산과 칩 표면에 처리된 용액 내에 포함된 상보적인 핵산 간에 다중 혼성화(hybridization) 반응이 일어나 대량 병렬 분석이 가능하도록 하는 도구를 의미한다.

[0053] 또한, 구체적으로 본 발명의 키트는 단백질 분석을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. 단백질 분석 키트(단백질 칩 키트)는 마커에 대한 하나 이상의 항체가 기판 위의 정해진 위치에 배열되어 고밀도로 고정화되어 있는 키트일 수 있다. 단백질 칩을 이용하는 방법은 시료에서 단백질을 분리하고, 분리한 단백질을 단백질 칩과 혼성화시켜서 항원-항체 복합체를 형성하고 이를 판독하는 방식으로 단백질의 존재 또는 발현 수준을 확인할 수 있다.

[0054] 본 발명의 키트는 마커 성분에 특이적으로 결합하는 항체, 기질과의 반응에 의해서 발색하는 표지체가 접합된 2차 항체 접합체(conjugate), 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 효소반응 정지용액 등을 포함할 수 있으며, 사용되는 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

[0055] 상기 2차 항체 접합체의 표지체는 발색반응을 하는 통상의 발색제가 바람직하며, HRP(horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(alkaline phosphatase), 콜로이드 골드(coloid gold), FITC(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate), RITC(rhodamine-B-isothiocyanate) 등의 형광물질(fluorescein), 및 색소(dye) 등이 사용될 수 있다.

[0056] 본 발명은 암이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에서 인간 쓴맛 수용체 TAS2R10의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 암의 진단 또는 예후 분석에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0057] 본 발명은 암이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에서 TAS2R10의 발현 수준을 측정하는 방법으로 암의 진단 또는 예후 분석에 필요한 정보를 제공하는데 유용하게 사용될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 정보제공방법은 암이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에서 TAS2R10의 발현 수준을 측정하고, 또한 정상 대조군의 TAS2R10의 발현 수준을 측정하여 양자를 비교한 결과, 암 의심 개체로부터 분리된 시료에서의 TAS2R10의 발현 수준이 정상 대조

군에서보다 증가된 경우, 암으로 예측할 수 있다.

[0058] 본 발명에서 "개체"는 암이 발병되거나 발병될 수 있는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0059] 본 발명에서 "암이 의심되는 개체로부터 분리된 시료"는 암이 의심되는 개체로부터 분리된 것으로서, TAS2R10의 단백질 또는 유전자를 포함하여 이의 발현 수분을 측정할 수 있는 모든 시료를 의미하며, 예를 들어 개체로부터 분리한 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇌척수액, 소변 등일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

[0060] 본 발명의 인간 쓴맛 수용체 TAS2R10은 암세포의 암줄기세포성 및 자가 재생 능력을 효과적으로 억제하며, 종양 형성을 억제하고 암세포의 전이 및 침윤을 억제하는 효능이 탁월하여, 이의 발현을 촉진함으로써 암을 예방하고 치료하는 효과가 우수하다.

[0061] 또한, 본 발명의 TAS2R10은 암세포의 발달 단계, 분화 정도에 따라 발현 수준이 변화되는 특성이 있어 암의 진단과 예후 분석에 효과적으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1은 동물의 조직 및 암세포에서의 TAS2R10의 발현 수준을 측정한 그래프로서, (a)는 마우스의 혀 및 간 조직에서의 TAS2R10의 발현 수준을 측정한 그래프, (b)는 신경모세포종 세포주인 BE(2)C 및 SY5Y 세포에서의 TAS2R10의 발현 수준을 측정한 그래프이다.

도 2는 칼슘 이동 분석 그래프로서, (a)는 pcDNA+TAS2R10으로 형질 감염된 HEK293 세포에서의 칼슘 이동 분석 그래프, (b)는 BE(2)C 세포에서의 칼슘 이동 분석 그래프이다. 도면에서 lm1은 Ca^{2+}-결합된 Fura-2 염료의 형광 데이터이고, lm2는 Ca^{2+}-결합되지 않은 염료의 형광 데이터이다.

도 3은 BE(2)C 세포의 신경 돌기 신장 및 신경 분화 관련 표지자의 발현 수준을 측정한 그래프로서, (a)는 BE(2)C 세포에 올-트랜스 레티노산(RA)을 처리한 경우, (b)는 BE(2)C 세포를 pcDNA+TAS2R10으로 형질 감염시킨 경우의 신경 돌기 신장 사진 및 신경 분화 관련 표지자의 발현 수준 측정 그래프이다.

도 4는 BE(2)C 세포에서의 암줄기세포(CSC) 마커의 발현 수준을 측정한 그래프로서, (a)는 BE(2)C 세포에 RA를 처리한 경우의 CSC 마커 발현 수준을 측정한 그래프, (b)는 BE(2)C 세포를 pcDNA+TAS2R10으로 형질 감염시킨 경우의 CSC 마커 발현 수준을 측정한 그래프이며, (c)는 구 형성 분석에서 구를 형성한 BE(2)C 세포에서의 CSC 마커 및 TAS2R10의 발현 수준을 측정한 그래프이다.

도 5는 pcDNA+TAS2R10으로 형질 감염된 BE(2)C 세포의 집락 형성 분석 결과를 나타낸 사진 및 그래프이다.

도 6은 pcDNA+TAS2R10으로 형질 감염된 BE(2)C 세포의 구 형성 분석 결과를 나타낸 사진 및 그래프이다.

도 7은 pcDNA+TAS2R10으로 형질 감염된 BE(2)C 세포의 상처 치유 분석 결과를 나타낸 사진 및 그래프이다.

도 8은 pcDNA+TAS2R10으로 형질 감염된 BE(2)C 세포의 트랜스웰 침윤 분석 결과를 나타낸 사진 및 그래프이다.

도 9는 pcDNA+TAS2R10으로 형질 감염된 BE(2)C 세포의 젤라틴 자이모그라피 분석 결과를 나타낸 사진 및 그래프로서, (a)는 MMP-2의 활성을 측정한 사진, (b)는 MMP-2 및 MMP-9의 유전자 발현 수준을 측정한 그래프이다.

도 10은 pcDNA+TAS2R10으로 형질 감염된 BE(2)C 세포의 HIF-1a의 발현 수준을 확인하기 위한 웨스턴 블랏 분석을 수행한 사진 및 그래프로서, (a)는 HIF-1a의 발현 수준을 측정한 사진 및 그래프이고, (b)는 HIF-1a의 다운스트림 유전자인 VEGF 및 GLUT1의 발현 수준을 측정한 그래프이다.

(본 발명의 그래프의 유의성 표시는 다음을 의미한다: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0064] 통계 분석

[0065] 실시예의 모든 실험 결과는 최소 세 번의 독립적인 실험으로부터 평균±평균의 표준 오차(SEM)로 나타내었으며, GraphPad PRISM (GraphPad Software, SanDiego, CA, USA)을 사용하여 통계적 유의성 분석을 수행하였다. 쌍을 이루지 않은 양측 t- 테스트(unpaired two-tailed *t*-test)를 사용하여 두 군의 데이터를 비교 하였다. 종양 발병률을 비교하기 위해 Pearson의 Chi-suqare 검사를 수행하였다. 0.05 미만의 P 값은 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

[0066] **실시예 1: 세포 배양**

[0067] 2개의 인간 신경모세포종(Neuroblastoma; NB) 세포주인 SK-N-BE(2)C (BE(2)C) 및 SH-SY5Y (SY5Y)는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)으로부터 구입하였다. 인간 배아 신장 세포주인 HEK293은 서울대학교의 박태현 박사로부터 얻었다.

[0068] BE(2)C 세포 및 SY5Y 세포는 MEM (Minimum Essential Medium)과 Ham 's F-12 (Welgene, Daegu, Korea)의 1:1 혼합 배지에서 배양하였다. HEK293 세포는 MEM과 고-포도당 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Welgene)의 1:1 혼합 배지에서 배양하였다.

[0069] 모든 배지에 10% 소 태아 혈청(FBS, Hyclone, Logan, UT, USA)과 1% 페니실린(100U/mL) 및 100㎍/mL 스트렙토마이신(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 보충하였다. 저산소 조건을 유도하기 위해 pH 7.4의 표준 성장 배지에 1mM sodium pyruvate (Junsei Chemical, Tokyo, Japan)와 25mM HEPES (Biosesang, Seongnam, Korea)를 첨가하였다. 세포 배양은 5% CO_2 및 37℃ 조건의 배양기에서 유지하였다.

[0070] 올-트랜스 레티노산(all-*trans*-retinoic acid, RA)과 염화 코발트(II)육수화물($CoCl_2.6H_2O$)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. RA (1㎛M)를 사용하여 NB 세포의 신경 분화를 유도하였고, $CoCl_2.6H_2O$ (100㎛M)를 사용하여 21% O_2에서 저산소 상태처럼 만들었다. 상기 시약들은 어두운 조명 아래에서 각 분석을 수행하기 바로 직전에 세포 배양 배지에 첨가하였다. 칼슘 이동 분석(calcium mobilization assay)에서 TAS2R10을 활성화시키기 위해 데나토늄 벤조에이트(denatonium benzoate, Sigma-Aldrich)를 사용하였다.

[0071] **실시예 2: TAS2R10 플라스미드 벡터의 제조 및 형질 감염**

[0072] pcDNA3+TAS2R10은 서울대학고 박태현 박사로부터 얻었다. 간략하게, TAS2R10에 대한 cDNA PCR 산물을 TAS2R10에 대한 제한효소로서 EcoRI 및 XhoI를 이용하여 분해하였다(Takara Bio, Mountain View, CA, USA). FLAG-표지된 pcDNA3 벡터를 TAS2R10에 대한 제한효소로서 EcoRI 및 XhoI를 이용하여 분해하였다.

[0073] 분해된 PCR 산물을 전기영동으로 분리하고 pcDNA3 벡터에 결합시키기 위해 아가로스겔로부터 추출 및 정제하였다. 이들 재조합 플라스미드는 dh5-α 대장균 수용세포(competent cells)를 형질전환시켜 증폭하였다. 앰피실린(Amresco, Solon, OH, USA)이 보충된 고체 LB 배지(BD Bioscience, San Jose, CA, USA)에서 형질전환된 세포를 선별한 후, 플라스미드 DNA를 시퀀싱을 위해 콜로니의 일부로부터 회수하였다.

[0074] BE(2)C 세포를 6-웰 플레이트에 분주하고, 세포 밀집도가 70%~80%에 도달할 때까지 48시간 동안 pcDNA3(빈 벡터; EV) 및 pcDNA3+TAS2R10 재조합 플라스미드로 형질 감염시켰다.

[0075] **실시예 3: 정량적 실시간 PCR 분석**

[0076] 본 발명의 실시예들에서 수행되는 PCR 분석은 하기의 방식으로 수행하였다.

[0077] TRizol 시약(Invitrogen)을 사용하여 RNA를 분리하고 RevertAid 역전사 효소(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용한 역전사에 의해 첫 번째 가닥 cDNA를 합성하였다. cDNA 샘플을 2X SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen)와 결합시키고, 다음과 같은 조건에서 Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 정량적 실시간 PCR을 수행하였다 : 95℃에서 개시(5분), 95℃에서 변성(15초), 60℃에서 어닐링 및 신장 (10초).

[0078] PCR에서 사용된 프라이머 서열은 하기 표 1과 같으며, 내부 대조군으로서 GAPDH를 측정하여 모든 qRT-PCR 데이터를 일반화시켰다.

종류		서열 (5' - 3')
Human DLK1	Forward(서열번호 1)	CTG AAG GTG TCC ATG AAA GAG
	Reverse(서열번호 2)	GCT GAA GGT GGT CAT GTC GAT
Human CD133	Forward(서열번호 3)	TGG ATG CAG AAC GGT ACA AC
	Reverse(서열번호 4)	ATA CCT GCT ACG ACA GTC GT
Human Notch1	Forward(서열번호 5)	GAG GCG TGG CAG ACT ATG C
	Reverse(서열번호 6)	CTT GTA CTC CGT CAG CGT GA
Human Sox2	Forward(서열번호 7)	CAA GAT GCA CAA CTC GGA GA
	Reverse(서열번호 8)	GCT TAG CCT CGT CGA TGA AC
Human TAS2R10	Forward(서열번호 9)	TGA AAT AGC TAA GCC GGT GAG
	Reverse(서열번호 10)	ACG TGT AGT GGA AGG CAT CT
Mouse TAS2R103	Forward(서열번호 11)	TCC AAG AAT CAGTAC ACA GGA GT
	Reverse(서열번호 12)	AAA GGC TTG CAA ACT GTG GT
Human MMP-2	Forward(서열번호 13)	CTT CCA AGT CTG GAG CGA TGT
	Reverse(서열번호 14)	TAC CGT CAA AGG GGT ATC CAT
Human MMP-9	Forward(서열번호 15)	CAC TGT CCA CCC CTC AGA GC
	Reverse(서열번호 16)	GCC ACT TGT CGG CGA TAA GG
Human VEGF	Forward(서열번호 17)	GCA CCC ATG GCA GAA GG
	Reverse(서열번호 18)	CTC GAT TGG ATG GCA GTA GCT
Human GLUT1	Forward(서열번호 19)	GAT TGG CTC CTT CTC TGT GG
	Reverse(서열번호 20)	TCA AAG GAC TTG CCC AGT TT
Human GAPDH	Forward(서열번호 21)	AGA AGG CTG GGG CTC ATT TG
	Reverse(서열번호 22)	AGG GGC CAT CCA CAG TGT TC
Mouse GAPDH	Forward(서열번호 23)	GCC TTC CGT GTT CCT ACC C
	Reverse(서열번호 24)	TGC CTG CTT CAC CAC CTT C

[0079]

[0080] **실시예 4: 웨스턴 블랏 분석**

[0081] 본 발명의 실시예들에서 수행되는 웨스턴 블랏 분석은 하기의 방식으로 수행하였다.

[0082] 웨스턴 블랏 분석은 종래 알려진 방식대로 수행하였다(Lim JY 외, Biochem Biophys Res Commun. 2014;450(4):1475-1480). 간략하게, 세포 단백질 추출물을 RIPA 용해 버퍼로 수집하고, 동량의 각 추출물 샘플을 8% 또는 10% 소듐 도데실 설페이트(SDS) 폴리아크릴아마이드 겔에서 분리하였다. 상기 샘플을 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF) 막(Millipore, Billerica, MA, USA)에 옮긴 후, 이를 Tris-buffered saline/Tween 20 (TBS-T)에서 5% 소 혈청 알부민(BSA) 또는 탈지유로 블로킹하였다.

[0083] 상기 블로킹된 막을 Flag(DYKDDDK)tag, 포스포-ERK, 총 ERK (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), β-튜불린 III (Sigma-Aldrich), HIF-1α (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) 및 α-튜불린 (Sigma-Aldrich)을 인식하는 1차 항체와 함께 4℃에서 밤새 배양하였다. 막을 여러 번 세척한 다음, 항-마우스 또는 항-토끼 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 적절하게 첨가하였다. 1시간 후, 결합된 항체를 시각화하기 위해 ECL 검출 시스템을 이용 하였다.

[0084] **실시예 5: 칼슘 이동 분석을 통한 TAS2R10의 기능적 발현 확인**

[0085] **실시예 5-1: 동물의 혀 및 간 조직 실험**

[0086] 5주령의 수컷 C57BL/6 마우스(Central Lab Animal Inc, Seoul, Korea)를 이용하여 마우스 조직 실험을 수행하였다. 마우스의 혀와 간 조직을 추출하여 mRNA를 분리하였다. 마우스 TAS2R108(인간 TAS2R10) mRNA의 발현 수준을 혀 및 간 조직 모두에서 분석하였으며, 로딩 대조군으로 GAPDH를 사용하였다. 또한, 실시예 1에서 배양한 두 가지 NB 세포주인 BE(2)C 세포 및 SY5Y 세포에서의 TAS2R10의 mRNA 발현 수준을 분석하였다.

[0087] 상기 실험 결과, TAS2R10의 발현 수준은 간 조직에서보다 혀 조직에서 훨씬 더 높은 것으로 확인되었다(도 1a). 아울러, TAS2R10은 2개의 NB 세포주인 BE(2)C 및 SY5Y에서 높은 수준으로 발현되었으며, 특히 TAS2R10은 더 분화된 N형 세포주인 SY5Y 세포와 비교하여, 보다 악성이고 덜 분화된 I형 세포주인 BE(2)C 세포에서 유의하게 낮은 수준으로 발현되었다(도 1b). 이러한 결과로부터 TAS2R10의 발현 수준이 세포의 분화 상태에 의존적임을 확인할 수 있었다.

[0088] **실시예 5-2: 칼슘 이동 분석(Calcium mobilization assay)**

[0089] HEK293 세포에서 TAS2R10의 이소성 발현 및 BE(2)C 세포에서의 TAS2R10의 내인성 발현이 기능적인지를 평가하기 위하여, 다음과 같은 방법으로 칼슘 이동 분석을 수행하였다.

[0090] Fura-2 QBT™칼슘 키트(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 제조사의 지시에 따라 사용하였다. 간략하게, HEK293 세포($8x10^4$) 및 BE(2)C 세포 ($5x10^4$)를 96-웰 투명 바닥 블랙 플레이트(Corning Inc., Corning, NY, USA)에 분주하였다. 다음날, 상기 HEK293 세포와 BE(2)C 세포를 pcDNA+TAS2R10으로 형질 감염시키고 48시간 동안 유지하였다. 각 세포주에서 각 수용체의 활성화를 측정하기 위하여 쓴 맛 수용체의 일반적인 작용제인 데나토늄 벤조에이트(denatonium benzoate)를 사용하였으며, 수용체의 활성화는 상기 데나토늄 벤조에이트의 적용 직후, 형광 강도의 비율을 측정하여 검출하였다. 신호는 Ca^{2+}-결합된 Fura-2 염료에 대해서는 340nm, Ca^{2+}-비결합된 염료에 대해서는 380nm의 자극 후에, 510nm에서 Flex Station III 형광 플레이트 판독기(Molecular Devices)를 사용하여 측정하였다.

[0091] 상기 실험 결과, BE(2)C세포와 TAS2R10 형질감염된 HEK293 세포에서 칼슘 이동이 검출되었다(도 2a, 2b). 칼슘 이동 정도는 다양하였으나, TAS2R10 활성화가 일어나고 칼슘이 세포내로 방출되는 시점에서 이동 패턴이 유사하였다. 이러한 결과를 바탕으로, 외인성 및 내인성으로 발현된 TAS2R10가 기능적으로 발현되는 것으로 확인되었다.

[0092] **실시예 6: 신경분화 유도 및 암줄기세포성 억제에 대한 TAS2R10의 효능**

[0093] **실시예 6-1: 신경세포 분화**

[0094] TAS2R10의 발현이 신경세포 분화에 영향을 받는지 검사하기 위해, BE(2)C 세포를 5일 동안 RA (1μM)로 처리하였다. 처리 결과, 신경 돌기 신장이 관찰되었으며, 신경 분화 관련 표지자인 β-튜불린 III 및 포스포-ERK의 발현이 상향 조절되는 것으로 확인되었다(도 3a). 이와 유사하게, BE(2)C 세포에서 TAS2R10의 과발현 후, 신경 돌기의 신장이 관찰되었고 β-튜불린 III 및 포스포-ERK1/2의 발현 수준이 유의하게 증가되었다(도 3b). 이는 TAS2R10의 과발현이 신경세포 분화를 유도함을 확인할 수 있었다.

[0095] **실시예 6-2: 암줄기세포 마커의 발현**

[0096] 대표적인 암줄기세포(cancer stem cell; CSC) 마커의 발현에 대한 TAS2R10의 영향을 확인하기 위하여, BE(2)C 세포에 RA를 처리한 결과, DLK1, CD133, Notch1 및 Sox2의 발현은 유의하게 하향 조절된 반면, TAS2R10의 발현 수준은 상향 조절된 것으로 확인되었다(도 4a). 또한, 상기 TAS2R10가 BE(2)C 세포에서 과발현되었을 때, 몇 가지 대표적인 암줄기세포 마커 역시 유의하게 하향 조절되었다(도 4b). 이는 TAS2R10의 과발현이 CSC 마커의 발현을 억제함을 입증하는 것이다.

[0097] **실시예 6-3: 구 형성 분석(Sphere formation assay)**

[0098] 구 형성을 촉진하기 위해 1.2% poly-HEMA (Sigma-Aldrich)로 미리 코팅한 세포 배양 플레이트에 BE(2)C 세포 ($3x10^4$/well)를 접종하고, 20ng/mL의 표피 성장 인자(EGF; PepTech, Rocky Hill, NJ, USA), 40ng/mL의 섬유아세포 성장 인자(FGF, PeproTech), 2% B-27 (Invitrogen), 1 % BSA (Rdtech Technology) 및 2% 페니실린-스트렙토 마이신(Invitrogen)을 첨가한 DMEM 및 F-12(Welgene)의 1:1 혼합 배지에 유지하였다. 다음날 세포를 실시예 2에서 제조한 각 플라스미드로 형질 감염시켰다. 48시간 후, 상기 세포를 10일~14일 동안 추가로 배양하고 50개 이상의 세포를 함유하는 구의 수를 세고 사진 촬영을 하였다(Nikon Instruments Co. Ltd, Tokyo, Japan).

[0099] 상기 실험 결과, 형성된 구에서 TAS2R10의 유전자 발현이 유의적으로 하향 조절되는 것으로 확인되었다(도 4c). 이는 TAS2R10의 과발현이 CSC 마커의 발현을 억제함을 입증하는 것이다.

[0100] **실시예 7: 암세포의 자가 재생 능력 억제에 대한 TAS2R10의 효능**

[0101] 자가 재생 능력(self-renewal capacity)은 CSC의 특성 중 하나이며, 암줄기세포의 생리학적 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. TAS2R10의 이소성 과발현에 따른 암세포의 자가 재생 능력을 측정하기 위하여 실시예 6-3과 같은 방법으로 구 형성 분석을 수행하였으며, 또한 다음과 같은 방법으로 집락 형성 분석을 수행하였다.

[0102] 집락 형성 분석(Clonogenic assay)은 종래 알려진 방식대로 수행하였다(Lee HA 외, Oncol Rep. 2013;30(4):1869-1877). 간략하게, BE(2)C 세포(800 cell/웰)를 6-웰 플레이트에 도말하였다. 다음 날, 상기 세포를 각각 pcDNA(빈 벡터; EV) 및 pcDNA+TAS2R10을 이용하여 제조사의 지시에 따라 형질 감염시켰다. 48시간

후, 형질 감염된 세포를 7일~10일 동안 추가로 유지하였다. 그 다음, 콜로니를 크리스탈 바이올렛(Sigma-Aldrich)으로 염색하였다. 플레이팅 효율(PE, %)은 다음과 같이 계산하였다: 염색된 콜로니의 수/분주된 세포의 수×100%.

[0103] 상기 실험 결과, 집락 형성(도 5) 및 구 형성(도 6) 모두 유의하게 억제된 것으로 확인되었다. 이는 TAS2R10이 암세포의 자가 재생 잠재력을 억제하고 암줄기 유사 세포를 제거하는데 중요한 역할을 한다는 것을 입증하는 것이다.

[0104] **실시예 8: 이종이식 모델에서의 종양형성 억제에 대한 TAS2R10의 효능**

[0105] BE(2)C 세포를 pcDNA3(빈 벡터; EV) 및 pcDNA3+TAS2R10 플라스미드로 형질 감염시켰다. 48시간 후, 배지를 G418 (Invitrogen)을 함유하는 성장 배지로 교체하였다. 2주 후, 안정하게 확립된 하나의 세포주를 선택하여 면역 결핍된 5 주령의 수컷 BALB/c 누드 마우스(Central Lab Animal Inc, Seoul, Korea)의 옆구리에 피하 주사하였다($4x10^5$cells/injection).

[0106] 종양이 확립된 후, 종양 크기를 디지털 캘리퍼스를 사용하여 일주일에 두 번 모니터 하였다. 종양 부피는 길이(mm)x폭^2(mm^2)x0.5로 계산하였다. 본 실험을 위한 동물보호 및 실험 프로토콜은 이화여자대학교 동물관리 및 사용위원회의 승인을 받아 수행하였다(IACUC 승인 번호: 16-046).

[0107] 상기 실험 결과, 하기 표 1에 나타낸 바와 같이, 마우스의 희생의 시점에서, 10마리의 EV 대조군 마우스 중 10마리에서 종양이 발생된 반면, 10마리의 TAS2R10 마우스 중 7마리에서 종양이 발생되었다. 이로써 TAS2R10의 과발현이 대조군 EV군에 비해 종양 발생을 30% 수준으로 억제한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0108] [표 1]

[0109]

실험군	종양 발생(마리/마리)	최종 종양 부피(mm^3)	최종 종양 무게(mg)
EV 대조군	10/10	598.1±330.2	278±138.7
TAS2R10	7/10	173.8±69.7	171.0±144.9

[0110] (표 1의 데이터에 있어서, 실험군들 간의 종양 발생 비교는 chi-square test($P<0.05$)를 이용해 수행하였다. 최종 종양 부피 및 무게는 평균±SEM으로 나타내었다. 빈 벡터 대조군(EV)과의 비교를 위하여 쌍을 이루지 않은 양측 t- 테스트(unpaired two-tailed *t*-test)를 수행하였다.)

[0111] **실시예 9: 암세포 전이 및 침윤 억제에 대한 TAS2R10의 효능**

[0112] **실시예 9-1: 상처 치유 분석(Wound-healing assay)**

[0113] 세포 이동을 조사하기 위해, 종래 알려진 방식대로 상처 치유 분석을 수행하였다(Park S 외, Biosci Biotechnol Biochem. 2013;77(4):722-728). 간략히, BE(2)C 세포를 밀집도가 80%~90%가 될 때까지 단층으로 6-웰 플레이트에 성장시켰다. 그 다음, 멸균 된 200μL 피펫 팁으로 각 단층을 긁어 각각 폭 약 1mm의 줄을 4~6줄 형성하였다. 이탈된 세포를 새로운 배지로 세척하여 제거하고, 나머지 세포를 pcDNA3(빈 벡터; EV) 및 pcDNA3+TAS2R10으로 형질감염시켰다. 24시간 및 48시간 후에 세포 이동을 촬영하여 세포가 이동한 거리를 측정하였다.

[0114] 상기 실험 결과, EV 대조군과 비교하여, TAS2R10으로 형질 감염된 BE(2)C 세포 모두 약 30% 정도 느린 속도로 세포 이동이 이루어진 것으로 확인되었다(도 7).

[0115] **실시예 9-2: 트랜스웰 침윤 분석(Transwell invasion assay)**

[0116] 종래 알려진 방식대로 24웰 마트리겔 침윤 챔버(Becton Dickinson, Bedford, MA, USA)를 이용한 트랜스웰 침윤 분석을 통해 세포 침윤 정도를 검사하였다(Park S 외, Biosci Biotechnol Biochem. 2013;77(4):722-728). 간략히, $3x10^5$ BE(2)C 세포를 무혈청 배지를 포함하는 재수화(rehydration)된 상부 웰에 분주하고, 하부 챔버는 5% FBS를 함유하는 성장 배지로 채웠다. 그 다음, 상부 웰에 분주한 세포를 실시예 2에서 제조한 각 플라스미드로 형질 감염시켰다. 48시간 후, 상부 웰의 멤브레인 공극을 통과하지 못한 세포는 면봉으로 조심스럽게 제거하고, 하부 웰에 위치한 세포는 메탄올로 고정시킨 후, 크리스탈 바이올렛(Sigma-Aldrich)으로 염색 하였다. 각 웰에 대해 무작위로 선택한 5개의 필드에서 침윤된 세포의 수를 측정하였다.

[0117] 상기 실험 결과, TAS2R10의 침윤성 잠재력은 EV 대조군에 비해 유의하게 감소된 것으로 확인되었다(도 8). 이를

통해, TAS2R10의 과발현이 암세포의 이동 및 침윤 능력을 억제함으로써 BE(2)C 세포의 전이 가능성을 억제함을 확인할 수 있었다.

[0118] **실시예 9-3: 젤라틴 자이모그라피 분석(Gelatin zymography assay)**

[0119] MMP는 ECM의 거대 분자를 분해하여 암세포의 이동과 침윤을 촉진하는 것으로 알려져 있다. MMP-2의 효소 활성을 분석하기 위하여, 종래 알려진 방식대로 젤라틴 자이모그라피 분석을 수행하였다(Park S 외, Biosci Biotechnol Biochem. 2013;77(4):722-728). 간략하게, BE(2)C 세포를 무혈청 배지에서 성장시키고 실시예 2에서 제조한 각 플라스미드로 형질 감염시켰다. 48시간 후, 각 배지를 수집하고 0.1mg/mL 젤라틴을 함유하는 10% SDS-PAGE 겔에서 분리하였다. 전기영동은 4℃에서 수행되었다.

[0120] 그 다음, 상기 겔을 2.5% Triton X-100 변성 버퍼로 세척하여 SDS를 제거하고, 50mM Tris-Cl (pH 7.5), 10mM $CaCl_2$,15mM NaCl, 및 0.2mM $ZnCl_2$를 함유하는 반응 버퍼에서 37℃에서 밤새 배양하였다. 상기 겔을 실온에서 진탕기로 1시간 동안 0.5% 쿠마시 브릴리언트 블루 R-250 (Amresco, Solon, OH, USA)로 염색한 후, 탈염 용액 [MeOH:H_2O:아세트산(40:50:10)]을 사용하여 MMP-2의 투명한 밴드가 보일 때까지 씻어내었다.

[0121] 상기 실험 결과, TAS2R10의 과발현에 따라 MMP-2의 활성뿐만 아니라, MMP-2 및 MMP-9의 발현 역시 감소하는 것으로 확인되었다(도 9a, 9b). 이를 통해, TAS2R10 의 과발현은 MMP의 활성 및 발현을 억제함으로써 전이 잠재성을 억제함을 확인할 수 있었다.

[0122] **실시예 10: 저산소 조건하에 HIF-1α의 발현 조절 대한 TAS2R10의 효능**

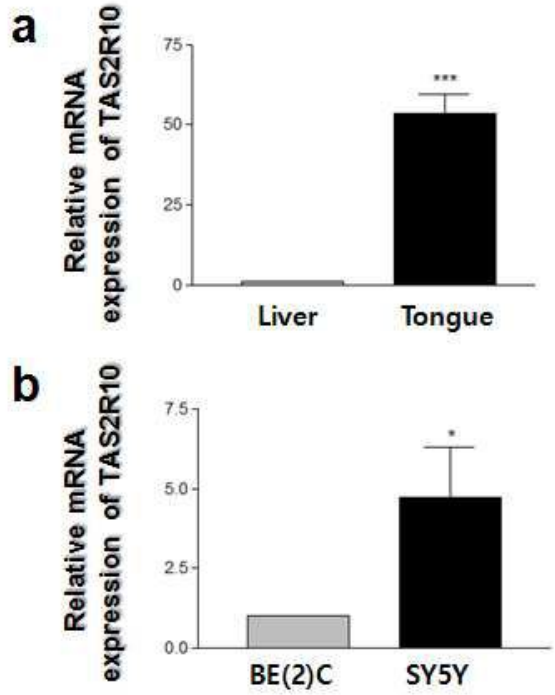
[0123] 저산소 상태에서 종양 세포의 전이 가능성이 증가되는 것으로 알려져 있다. HIF-1α는 VEGF 및 GLUT1과 같은 다운스트림 유전자를 조절함으로써 종양의 전이 과정을 조절하고 중재하는 것으로 알려진 전사 인자이다. TAS2R10이 HIF-1α 및 이와 관련된 유전자의 발현을 조절할 수 있는지를 확인하기 위하여, 실시예 3 및 4와 같은 방법으로 qRT-PCR 분석 및 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다.

[0124] 상기 실험 결과, HIF-1α 발현은 $CoCl_2$에 의해 저산소 상태가 유도된 후에 강하게 검출되었으나, 정상 산소 상태에서는 검출되지 않았다. 또한, TAS2R10의 과발현은 $CoCl_2$에 의해 유도된 저산소 조건하에서 EV 대조군과 비교하여 HIF-1α 발현을 유의하게 하향 조절하는 것으로 확인되었다(도 10a). 나아가, $CoCl_2$에 의해 유도된 저산소 조건하에서 VEGF 및 GLUT1이 상향 조절되고, TAS2R10의 과발현에 따라 HIF-1α의 다운스트림 유전자가 하향 조절되는 방식으로 HIF-1α의 다운스트림 유전자의 발현이 영향을 받는 것으로 확인되었다(도 10b). 이는, TAS2R10이 저산소 관련 유전자의 발현 조절에 기여하는 바가 있음을 입증하는 것이다.

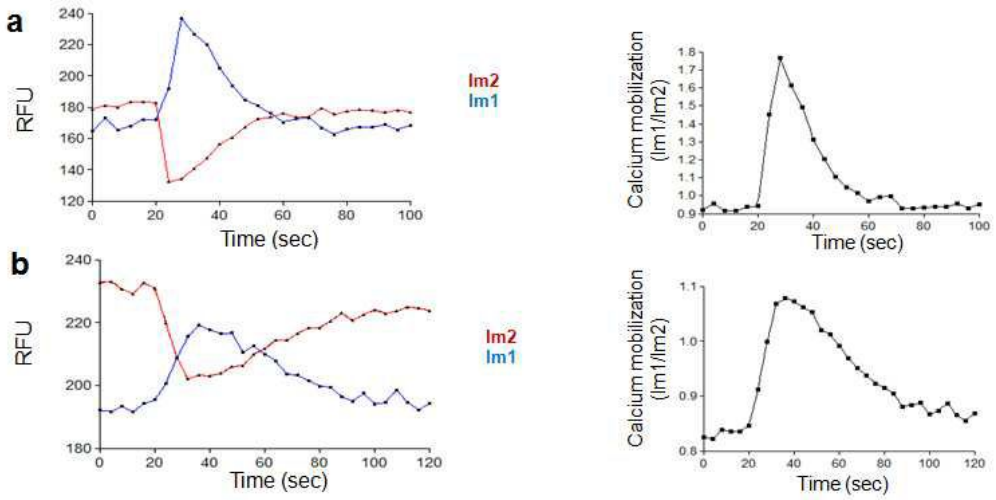
[0125] 본 명세서는 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 내용은 그 상세한 기재를 생략하였으며, 본 명세서에 기재된 구체적인 예시들 이외에 본 발명의 기술적 사상이나 필수적 구성을 변경하지 않는 범위 내에서 보다 다양한 변형이 가능하다. 따라서 본 발명은 본 명세서에서 구체적으로 설명하고 예시한 것과 다른 방식으로도 실시될 수 있으며, 이는 본 발명의 기술 분야에 통상의 지식을 가진 자이면 이해할 수 있는 사항이다.

도면

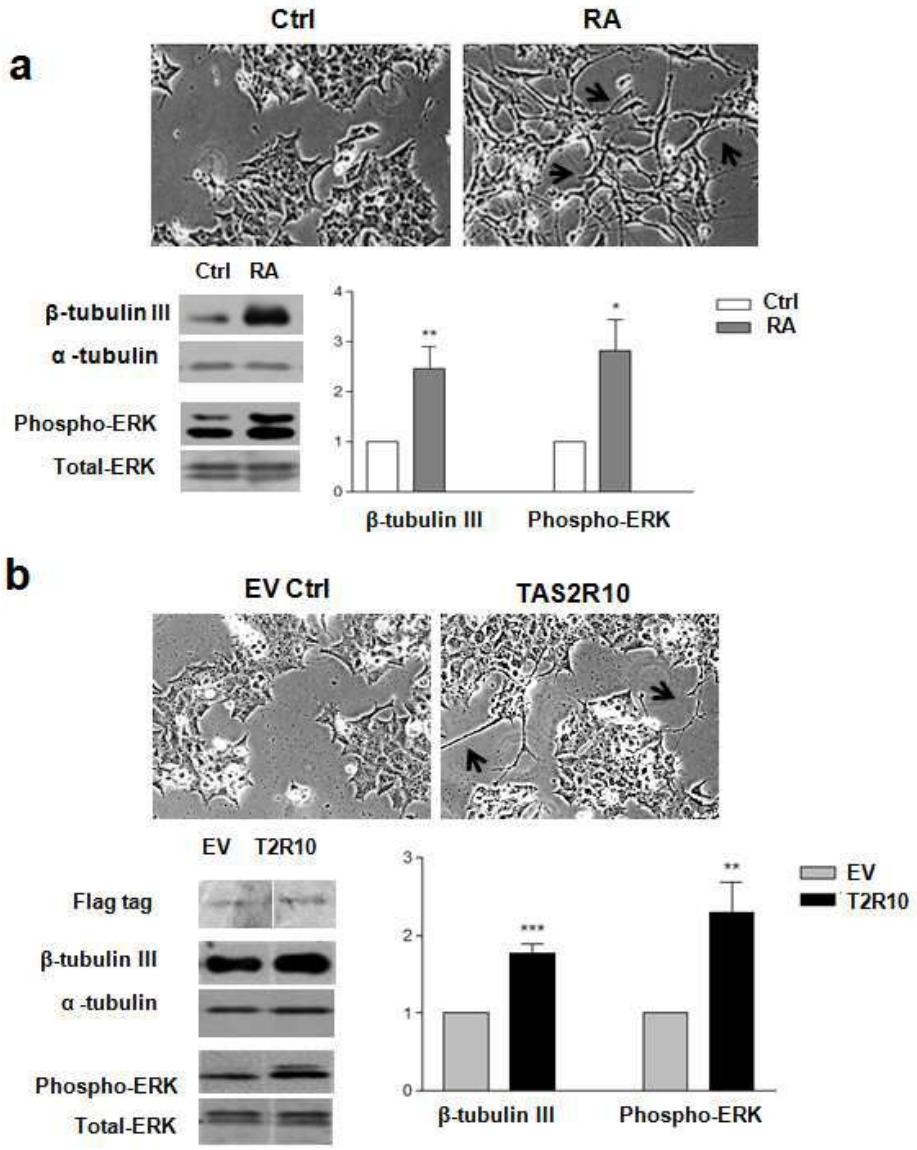
도면1


a
Relative mRNA expression of TAS2R10
75
50
25
0
***
Liver
Tongue
b
Relative mRNA expression of TAS2R10
7.5
5.0
2.5
0.0
*
BE(2)C
SY5Y

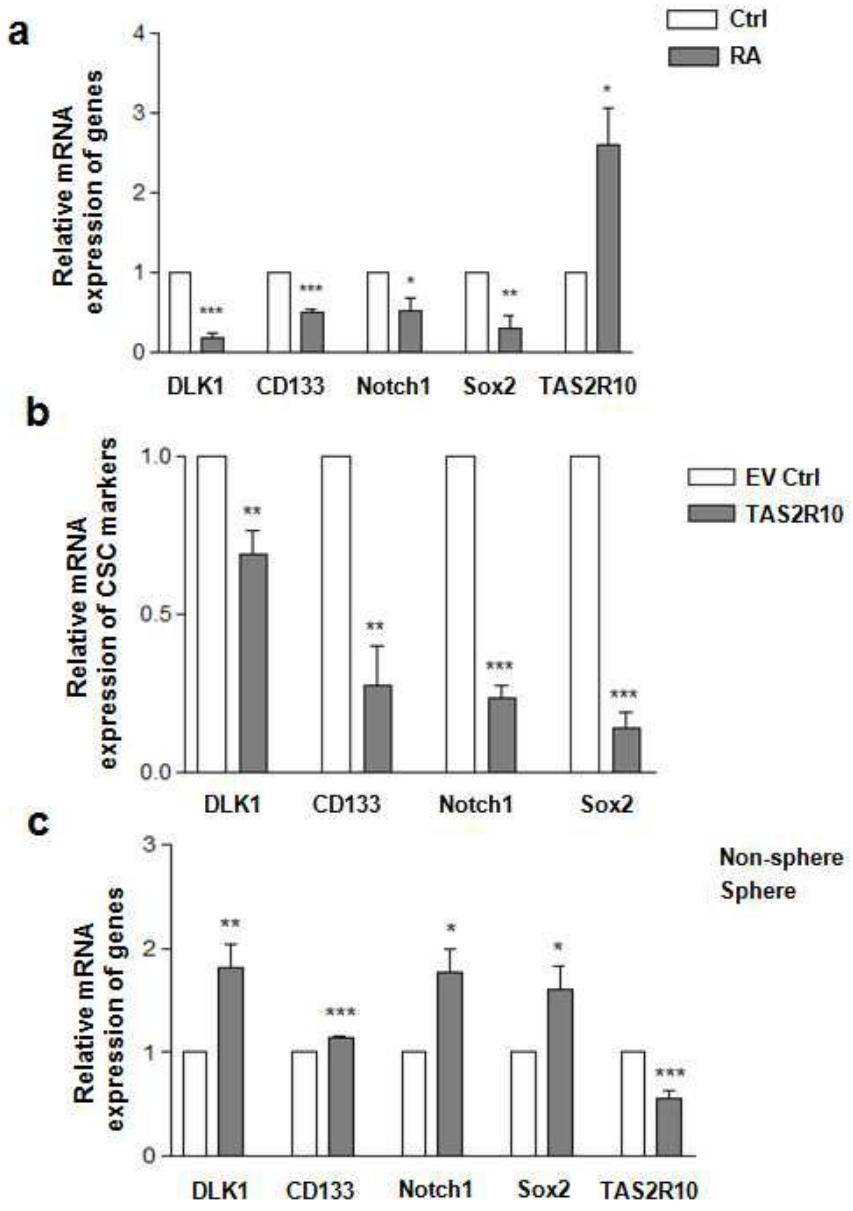
도면2


a
RFU
240
220
200
180
160
140
120
0
20
40
60
80
100
Time (sec)
Im2
Im1
b
RFU
240
220
200
180
0
20
40
60
80
100
120
Time (sec)
Im2
Im1
Calcium mobilization (Im1/Im2)
1.8
1.7
1.6
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
0
20
40
60
80
100
Time (sec)
Calcium mobilization (Im1/Im2)
1.1
1.0
0.9
0.8
0
20
40
60
80
100
120
Time (sec)

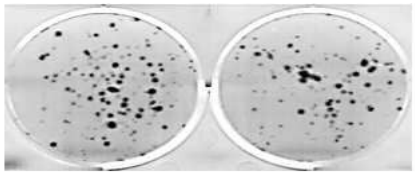
도면3

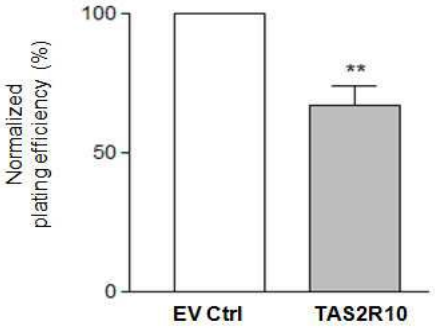

a
Ctrl
RA
Ctrl RA
β-tubulin III
α -tubulin
Phospho-ERK
Total-ERK
Ctrl
RA
β-tubulin III
Phospho-ERK
b
EV Ctrl
TAS2R10
EV T2R10
Flag tag
β-tubulin III
α -tubulin
Phospho-ERK
Total-ERK
EV
T2R10
β-tubulin III
Phospho-ERK

도면4

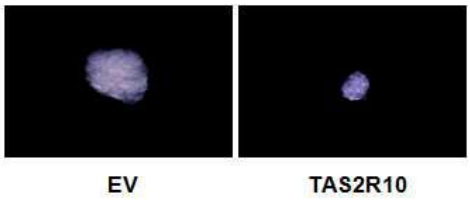

a
Ctrl
RA
Relative mRNA expression of genes
4
3
2
1
0
***
***
*
**
*
DLK1
CD133
Notch1
Sox2
TAS2R10
b
EV Ctrl
TAS2R10
Relative mRNA expression of CSC markers
1.0
0.5
0.0
**
**
***
***
DLK1
CD133
Notch1
Sox2
c
Non-sphere
Sphere
Relative mRNA expression of genes
3
2
1
0
**
***
*
*
***
DLK1
CD133
Notch1
Sox2
TAS2R10

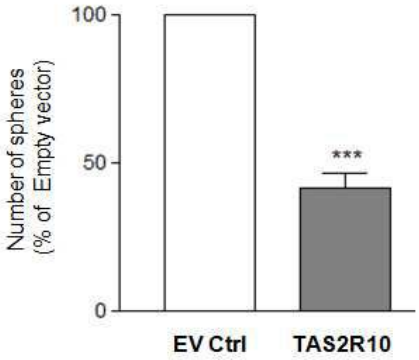
도면5


EV Ctrl
TAS2R10

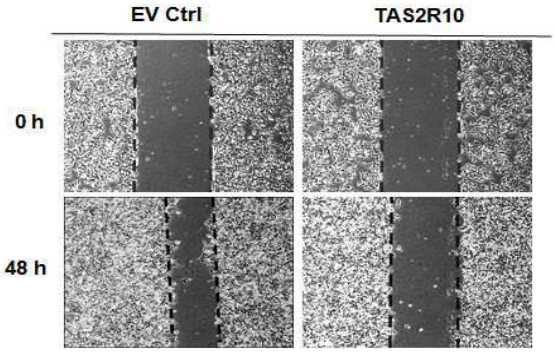

Normalized plating efficiency (%)
100
50
0
**
EV Ctrl
TAS2R10

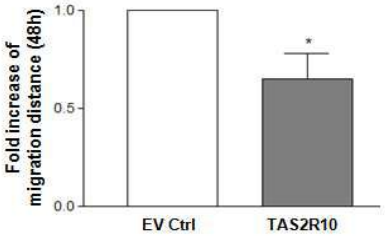
도면6


EV
TAS2R10

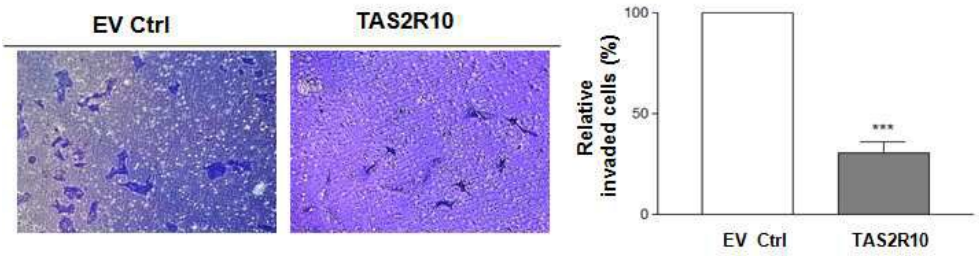

Number of spheres (% of Empty vector)
100
50
0
***
EV Ctrl
TAS2R10

도면7

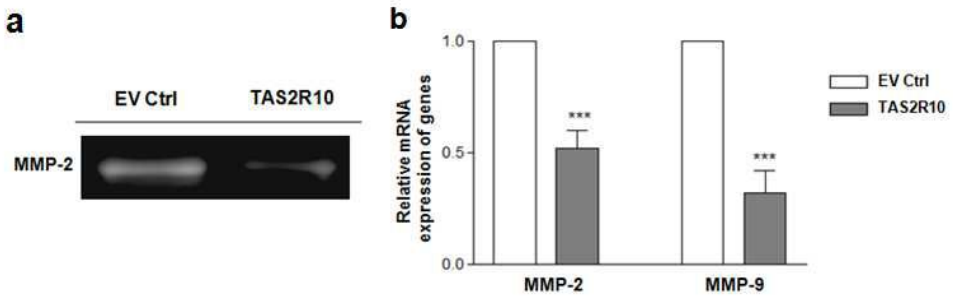

EV Ctrl
TAS2R10
0 h
48 h


Fold increase of migration distance (48h)
1.0
0.5
0.0
*
EV Ctrl
TAS2R10

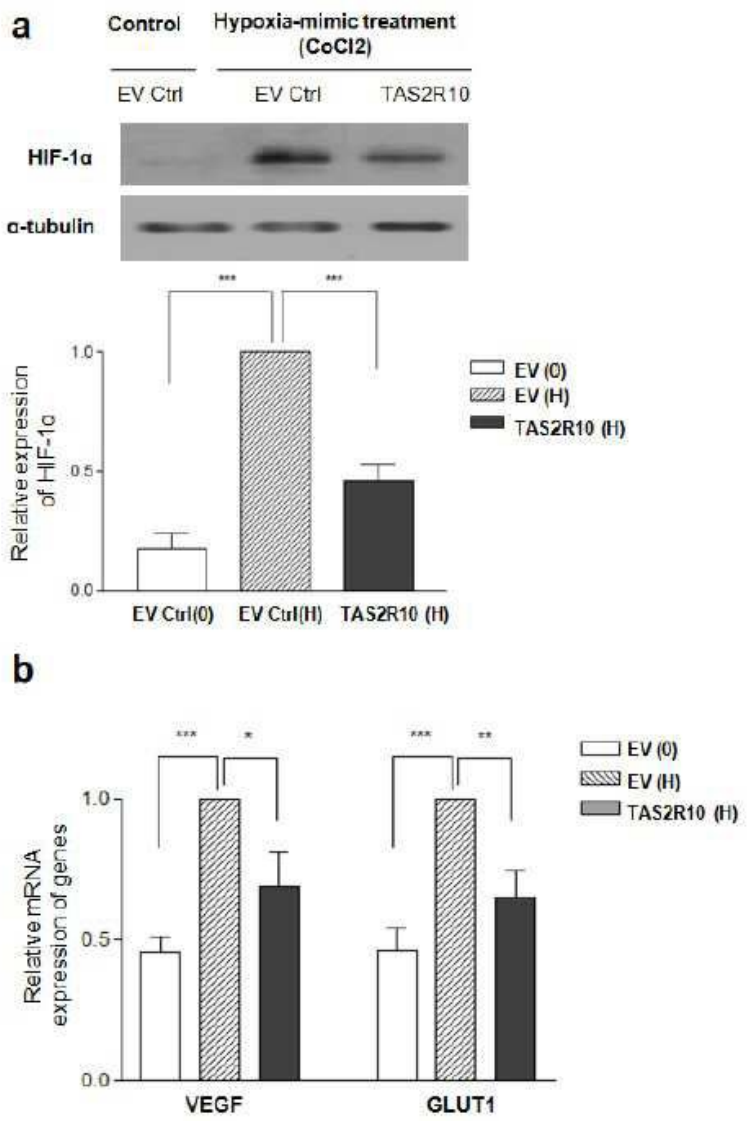
도면8


EV Ctrl
TAS2R10
Relative invaded cells (%)
100
50
0
***
EV Ctrl
TAS2R10

도면9


a
EV Ctrl
TAS2R10
MMP-2
b
Relative mRNA expression of genes
1.0
0.5
0.0
***
***
EV Ctrl
TAS2R10
MMP-2
MMP-9

도면10



서 열 목 록

<110> EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION

<120> Use of human bitter taste receptor TAS2R10 for the diagnosis and treatment of cancer

<130> P17-033-EWHA

<160> 24

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human DLK1 Forward

<400> 1

ctgaaggtgt ccatgaaaga g 21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Human DLK1 Reverse

<400> 2

gctgaaggtg gtcatgtcga t 21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human CD133 Forward

<400> 3

tggatgcaga acggtacaac 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human CD133 Reverse

<400> 4

atacctgcta cgacagtcgt 20

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human Notch1 Forward

<400> 5

gaggcgtggc agactatgc 19

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human Notch1 Reverse

<400> 6

cttgtactcc gtcagcgtga 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human Sox2 Forward

<

400> 7

caagatgcac aactcggaga 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human Sox2 Reverse

<400> 8

gcttagcctc gtcgatgaac 20

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human TAS2R10 Forward

<400> 9

tgaaatagct aagccggtga g 21

<210> 10

<211>

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human TAS2R10 Reverse

<400> 10

acgtgtagtg gaaggcatct 20

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse TAS2R103 Forward

<400> 11

tccaagaatc agtacacagg agt 23

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse TAS2R103 Reverse

<400> 12

aaaggcttgc aaactgtggt 20

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human MMP-2 Forward

<400> 13

cttccaagtc tggagcgatg t 21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human MMP-2 Reverse

<400> 14

taccgtcaaa ggggtatcca t 21

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human MMP-9 Forward

<400> 15

cactgtccac ccctcagagc 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human MMP-9 Reverse

<400> 16

gccacttgtc ggcgataagg 20

<210> 17

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human VEGF Forward

<400> 17

gcacccatgg cagaagg 17

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human VEGF Reverse

<400> 18

ctcgattgga tggcagtagc t 21

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human GLUT1 Forward

<400> 19

gattggctcc ttctctgtgg 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human GLUT1 Reverse

<400> 20

tcaaaggact tgcccagttt 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human GAPDH Forward

<400> 21

agaaggctgg ggctcatttg 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human GAPDH Reverse

<400> 22

aggggccatc cacagtgttc 20

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse GAPDH Forward

<400> 23

gccttccgtg ttcctaccc 19

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse GAPDH Reverse

<400> 24

tgcctgcttc accaccttc 19