(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016 년 10 월 20 일 (20.10.2016)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2016/167605 A2

(51) 국제특허분류:
A61K 31/167 (2006.01) *A61K 31/4184* (2006.01)
A61K 31/165 (2006.01) *A61K 31/41* (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2016/003957

(22) 국제출원일: 2016 년 4 월 15 일 (15.04.2016)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2015-0053921 2015 년 4 월 16 일 (16.04.2015) KR
10-2016-0045773 2016 년 4 월 14 일 (14.04.2016) KR

(71) 출원인: **서울대학교 산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R & DB FOUNDATION)** [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1 (신림동), Seoul (KR).

(72) 발명자: **이호영 (LEE, Ho-Young)**; 08826 서울시 관악구 관악로 1, 서울대학교 교수아파트 122H 동 207 호 (신림동), Seoul (KR). **민혜영 (MIN, Hye-Young)**; 04167 서울시 마포구 마포대로 33, 3005 호 (도화동, 한화오벨리스크), Seoul (KR). **부혜진 (BOO, Hye-Jin)**; 08786 서울시 관악구 남부순환로 214 길 28-6, 애플빌 604 호 (봉천동), Seoul (KR). **장현지 (JANG, Hyun-Ji)**; 36119 경상북도 영주시 꽃동산로 7 번길 30-12 (휴천동), Gyeongsangbuk-do (KR).

(74) 대리인: **이명진 (LEE, Myoung-Jin)**; 06180 서울시 강남구 영동대로 85 길 28, 6 층 (대치동), Seoul (KR).

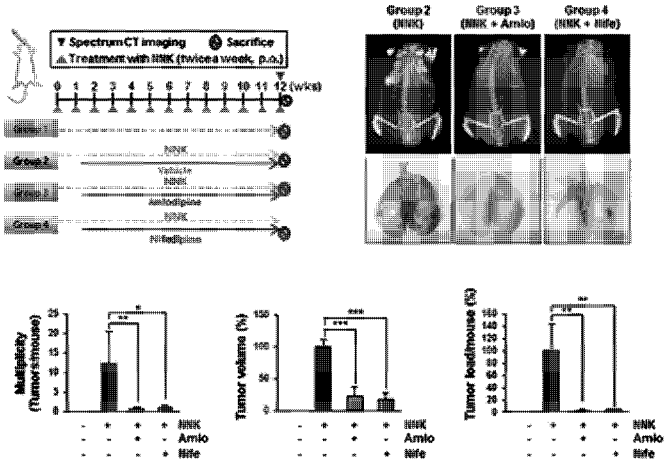
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: METHOD FOR INHIBITING LUNG CANCER OF SMOKERS AND NON-SMOKERS USING HYPERTENSION MEDICINE

(54) **발명의 명칭** : 고혈압 치료제를 이용한 흡연 및 비흡연자의 폐암 억제 방법



(57) **Abstract**: The present invention relates to a method for inhibiting lung cancer of smokers and non-smokers by blocking the signaling of growth factors through the use of a hypertension medicine and, more specifically, to a pharmaceutical composition for preventing or treating lung cancer, containing a hypertension medicine as an active ingredient. The present invention suggests a novel use of a hypertension medicine, currently in clinical use, for preventing lung cancer, and can be directly applied to an early-stage lung cancer or lung cancer high-risk group. Especially, the present invention can exclude the worry of safety, involved in the clinical application of new drugs, thereby increasing the possibility of the clinical application, and significantly reduce enormous costs and time consumed from the development to the clinical application of new drugs.

(57) **요약서**:

[다음 쪽 계속]

WO 2016/167605 A2

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

본 발명은, 고혈압 치료제를 이용하여 성장인자 신호전달을 차단함으로써, 흡연 및 비흡연자의 폐암을 억제하는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 고혈압 치료제를 유효성분으로 함유하는 폐암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명은, 임상에 사용 중인 고혈압 약물의 폐암 예방이라는 새로운 용도를 제시한 것으로서, 초기 폐암 또는 폐암 고위험군에 곧바로 적용할 수 있고, 특히 신약의 임상 적용에 수반되는 안전성의 우려를 배제할 수 있어 임상 활용 가능성을 높일 수 있을 뿐 아니라, 신약을 개발하여 임상에 적용되기까지 소요되는 막대한 비용 및 시간을 획기적으로 단축시킬 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 고혈압 치료제를 이용한 흡연 및 비흡연자의 폐암 억제 방법

기술분야

[1] 본 발명은, 고혈압 치료제를 이용하여 성장인자 신호전달을 차단함으로써, 흡연 및 비흡연자의 폐암을 억제하는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 고혈압 치료제를 유효성분으로 함유하는 폐암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 폐암은 전 세계적으로 암 사망률 1위를 기록하고 있다. 조기 진단 및 치료 기술의 발달에도 불구하고 폐암의 5년 생존율은 20% 이내로 다른 암에 비하여 현저히 낮고, 전이암의 경우에는 5%에 불과한 것으로 알려지고 있다. 따라서, 효과적인 폐암 치료제의 개발과 더불어 독성이 없는 물질을 이용하여 폐암의 발생을 억제하거나 폐암의 진행을 차단하는 화학적 폐암 예방제의 개발이 필수적이다.

[3] 85-90%의 폐암은 흡연이 원인으로 알려져 있고, 그 외 스트레스, 대기 오염, 염증 등이 비흡연자들의 폐암의 원인으로 여겨지고 있다.

[4] 현재까지 curcumin, resveratrol, diallyl disulfide, retinoid, aspirin, celecoxib, pigallocatechin gallate (EGCG), isothiocyanate, selenium, β-carotene, N-acetyl-L-cysteine 등이 암예방 효능 물질로 알려져 있는데, 대부분 전임상 단계에 그치고 있고, 임상 시험을 실시한 일부 물질들도 유의적인 효과를 나타내지 못하여 암예방제로서 임상에 적용되지 못하고 있다.

[5] 한편, 현재 고혈압 치료제로는 칼슘이온 채널 차단제, 베타-아드레날린 수용체 차단제, 안지오텐신 전환 효소 억제제 및 안지오텐신 수용체 길항제 등이 알려져 있다. 또한, 칼슘이온 채널 조절제로서 유효한 6-피라졸일아미도-3-치환된 아자바이사이클로[3.1.0]헥산 유도체 화합물을 칼슘이온 채널 억제 효과에 의한 질환 치료제로 이용한 예가 보고된 바 있다(한국특허공개 10-2014-0134904호).

[6] 그러나, 수용체 길항제 등 고혈압 유발 기전을 차단하는 물질의 항암 활성 및 역학 조사를 이용한 고혈압 치료제 복용 환자들의 대장암 또는 신장암 발생률 변화 등이 제시된 바는 있으나, 이들의 예방제로서의 실질적인 연구 결과를 제시한 사례는 없고 특히 폐암의 예방 효과와 관련된 보고는 알려진 바 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 현재 고혈압 치료제로 사용되고 있는 칼슘이온 채널 차단제, 베타-아드레날린 수용체 차단제, 안지오텐신 전환 효소 억제제 및 안지오텐신 수용체 길항제를

이용하여 이들의 인슐린유사 성장인자 2의 분비를 통한 인슐린유사 성장인자 신호전달 활성화를 차단하여 폐 상피세포의 형질전환, 폐암세포의 성장 및 폐암 생성을 억제함으로서, 흡연 또는 비흡연자의 폐암을 예방 및 치료하는 방법을 제시함을 목적으로 한다.

[8] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

[9] 본 발명은 담배 선택적 발암원인인 4-(methylnitro-samino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone(NNK) 및 비흡연자의 폐암 발암원으로 여겨지고 있는 스트레스에 의해 증가되는 신경전달물질인 노르에피네프린 (norepinephrine; NE)에 의하여 성장인자 매개 신호전달 중 하나인 인슐린유사성장인자 수용체 (type 1 insulin-like growth factor receptor; IGF-1R) 신호전달의 활성화 작용을 제시한다.

[10] 본 발명은 스트레스를 유발시킨 실험동물에서 발암원에 의한 종양 생성이 촉진됨을 제시한다.

[11] 본 발명은 고혈압 치료제, 즉 칼슘이온 채널 차단제, 베타-아드레날린 수용체 차단제, 안지오텐신 전환 효소 억제제 및 안지오텐신 수용체 길항제들이 NNK 및 NE가 매개하는 인슐린유사성장인자 2 (insulin-like growth factor 2; IGF2)의 생성/분비 또는 안지오텐신 (angiotensin)의 전구체인 안지오텐시노젠 (angiotensinogen; AGT) 생성 유도의 억제를 통한 IGF-1R 신호전달의 활성화를 억제함을 제시한다.

[12] 본 발명은 고혈압 치료제, 즉 칼슘이온 채널 차단제, 베타-아드레날린 수용체 차단제, 안지오텐신 전환 효소 억제제 및 안지오텐신 수용체 길항제들이 NNK 및 NE가 매개하는 폐상피세포의 세포형질전환, 폐암 세포의 성장 또는 폐암 발암 유도 실험동물 모델에서의 폐암 생성을 억제함을 제시함으로서, 고혈압 치료제의 폐암 치료 및 예방 방법을 제공한다.

[13] 본 발명에서 고혈압 치료제, 즉 칼슘이온 채널 차단제, 베타-아드레날린 수용체 차단제, 안지오텐신 전환 효소 억제제 및 안지오텐신 수용체 길항제는 성장인자 매개 신호전달 중 하나인 인슐린유사성장인자 수용체 및 그 하위 신호전달을 차단함으로써 폐 상피세포의 형질전환 및 폐암 생성을 억제하는 작용을 한다.

발명의 효과

[14] 본 발명은 흡연 및 비흡연인자에 의한 폐암 발암 기전을 기반으로, 현재 임상에서 사용 중인 고혈압 치료제를 활용하여 폐암 발암기전을 매개하는 성장인자 신호전달을 차단하고 이를 통하여 폐암의 암화 및 암 진행을 차단함으로써 궁극적으로 폐암의 발생 또는 진행을 억제할 수 있는 치료/예방 방법을 제공할 수 있다.

[15] 본 발명은 임상에 사용 중인 고혈압 약물의 폐암 예방이라는 새로운 용도를 제시한 것으로서, 초기 폐암 또는 폐암 고위험군에 곧바로 적용할 수 있는 방법이며, 특히 신약의 임상 적용에 수반되는 안전성의 우려를 배제할 수 있어 임상 활용 가능성을 높일 수 있을 뿐 아니라, 신약을 개발하여 임상에 적용되기까지 소요되는 막대한 비용 및 시간을 획기적으로 단축시킬 수 있다.

[16] 본 발명은 흡연 및 비흡연인자의 폐암 암화를 매개하는 신호전달 조절과 관련된 기전 연구를 기반으로 하고 있어, 인슐린유사성장인자 수용체 매개 신호전달 등 폐암 암화를 매개하는 기전을 조절할 수 있는 다른 약물, 일례로 다른 칼슘 길항제, G 단백질 연결 수용체 길항제들에 대해서도 적용 가능하다.

도면의 간단한 설명

[17] 도 1은 흡연 경력이 있는 사람의 폐암 전구 단계 폐 조직에서 IGF-1R 신호전달의 인산화가 증가되어 있고, IGF-1R 신호전달의 활성화는 리간드인 IGF1 및 IGF2의 발현과 유의적인 정의 상관관계를 나타냄을 제시한 것이다.

[18] 도 2는 담배 유래 발암원인 NNK의 처리 시간 또는 농도가 증가함에 따라 여러 폐 상피세포에서 IGF-1R 및 그 하위 신호전달인 Akt, mTOR, S6의 활성화가 증가됨을 나타낸 것이다.

[19] 도 3은 유전형을 달리하는 여러 폐암 세포에서 NNK에 의하여 IGF-1R이 활성화됨을 나타낸 것이다.

[20] 도 4는 NNK를 처리한 A/J 마우스로부터 적출한 폐 조직에서 IGF-1R 및 그 하위 신호전달인 IRS의 활성화가 증가됨을 나타낸 것이다.

[21] 도 5는 NNK에 의한 IGF-1R 인산화의 증가가 구조적으로 유사한 IR이 아닌 IGF-1R에 대하여 선택적으로 나타남을 제시한 것이다.

[22] 도 6은 NNK의 처리 시간 및 농도 의존적인 IGF-1R 인산화 증가 작용이 IGF-1R 과발현 섬유아세포인 R+에서 뚜렷하게 나타남을 확인함으로써 도 5의 결과와 마찬가지로 NNK에 의한 IGF-1R 선택적 인산화 유도 작용을 제시한 것이다.

[23] 도 7은 NNK 처리에 의하여 IGF2 생성이 증가됨을 제시한 것이다.

[24] 도 8은 도 7의 결과를 바탕으로 IGF2 발현벡터를 도입하였을 때 NNK에 의한 IGF-1R 인산화 증가 작용이 강화된 반면 siRNA 혹은 중화 항체를 이용하여 IGF2의 발현을 억제하거나 분비된 IGF2를 소거하였을 경우 NNK에 의한 IGF-1R 인산화 증가 작용이 약화됨을 제시함으로서, NNK에 의한 IGF-1R 인산화 증가 작용이 IGF2의 생성 혹은 분비 촉진에 의한 것임을 제시한 것이다.

[25] 도 9는 wild type 마우스와 비교하여 IGF2 형질전환 마우스에서 NNK를 처리한 뒤 적출한 폐 조직에서 IGF-1R 인산화가 증가됨을 나타낸 것이다.

[26] 도 10은 IGF2 발현 저하에 의하여 NNK가 유도하는 폐 상피세포의 생존 및 콜로니 생성 증가 작용이 억제됨을 확인함으로써 NNK에 의한 폐 상피세포의 형질전환 (transformation)의 유도 작용에서 IGF2 및 이에 의한 IGF-1R 활성화가 관련됨을 제시한 것이다.

[27] 도 11은 베타-아드레날린 수용체 효현제에 의하여 폐 상피세포인 BEAS-2B 및 HBE/p53i와 IGF-1R이 과발현된 R+ 세포에서 IGF-1R 인산화가 증가됨을 나타냄으로서, 베타-아드레날린 수용체의 활성화가 IGF-1R 활성화 유도와 관련됨을 제시한 것이다.

[28] 도 12는 베타-아드레날린 수용체 차단제에 의하여 NNK에 의한 IGF-1R 활성화가 차단됨을 나타낸 것으로, 베타-아드레날린 수용체의 활성화가 NNK 매개 IGF-1R 활성화 유도와 관련됨을 제시한 것이다.

[29] 도 13은 칼슘의 농도 혹은 처리 시간을 증가시키거나 세포 내외부에서 칼슘의 세포질로의 유리를 촉진함으로써 세포 내 칼슘 농도를 증가시켰을 경우 IGF-1R 인산화가 증가됨을 제시한 것이다.

[30] 도 14는 칼슘 킬레이터인 EGTA 또는 BAPTA-AM으로 세포 내외부에서 칼슘을 소거하였을 때 IGF-1R 인산화가 억제되며 칼슘이온 채널 차단제인 nifedipine에 의하여 암세포 성장이 저해됨을 나타낸 것이다.

[31] 도 15는 NNK에 의하여 세포 내 칼슘이 증가되고, 고혈압 치료제인 칼슘이온 채널 차단제 및 베타-아드레날린 수용체 차단제에 의하여 이러한 작용이 억제됨을 제시한 것이다.

[32] 도 16은 NNK에 의하여 IGF2 분비가 증가되고, 이러한 작용이 칼슘 킬레이터인 EGTA 또는 BAPTA-AM, 칼슘이온 채널 차단제 및 베타-아드레날린 수용체 차단제에 의하여 억제됨을 제시한 것이다.

[33] 도 17은 칼슘이온 채널 차단제에 의하여 NNK에 의한 IGF-1R 활성화가 억제됨을 제시한 것이다.

[34] 도 18은 베타-아드레날린 수용체 차단제에 의하여 NNK가 유도하는 폐 상피세포의 생존, 콜로니 생성 및 foci 생성 증가 작용이 억제됨을 확인함으로써 NNK에 의한 폐 상피세포의 형질전환이 차단됨을 제시한 것이다.

[35] 도 19는 칼슘이온 채널 차단제에 의하여 NNK가 유도하는 폐 상피세포의 생존 및 콜로니 생성 증가 작용이 억제됨을 확인함으로써 NNK에 의한 폐 상피세포의 형질전환이 차단됨을 제시한 것이다.

[36] 도 20은 베타-아드레날린 수용체 차단제에 의하여 NNK가 유도하는 종양 생성을 억제함을 나타낸 것으로 베타-아드레날린 수용체 차단제의 흡연에 의한 폐암 발암에 대한 예방 효과를 제시한 것이다.

[37] 도 21은 칼슘이온 채널 차단제에 의하여 NNK가 유도하는 종양 생성을 억제함을 나타낸 것으로 칼슘이온 채널 차단제의 흡연에 의한 폐암 발암에 대한 예방 효과를 제시한 것이다.

[38] 도 22는 담배 발암원을 6개월 동안 처리한 뒤 발생된 종양에서 유래된 폐암 전구 단계의 폐상피세포 (1198) 및 악성화된 폐상피세포 (1170)와 NNK를 120일 동안 처리한 폐상피세포에서 안지오텐신의 전구체인 AGT의 발현이 증가되어 있음을 나타낸 것이다.

[39] 도 23은 NNK처리 시간 및 농도가 증가함에 따라 AGT의 발현 또는 분비가

증가됨을 나타낸 것이다.

[40] 도 24는 NNK 처리에 의하여 AGT의 프로모터가 활성화됨을 나타낸 것이다.

[41] 도 25는 안지오텐신에 의하여 처리 농도 및 시간 의존적으로 IGF-1R 및 그 하위 신호전달인 Akt 및 ERK가 활성화됨을 나타낸 것이다.

[42] 도 26은 siRNA를 이용하여 안지오텐신 수용체의 발현을 저해하였을 때 NNK에 의한 IGF-1R의 활성화가 저해됨을 나타낸 것이다.

[43] 도 27은 고혈압 치료제로 쓰이는 안지오텐신 전환 효소 억제제인 captopril 및 안지오텐신 수용체 길항제인 losartan의 처리에 의하여 NNK에 의한 IGF-1R 활성화가 억제됨을 나타낸 것이다.

[44] 도 28은 안지오텐신 전환 효소 억제제 및 안지오텐신 수용체 길항제에 의하여 NNK에 의한 세포 생존, 콜로니 생성 및 foci 생성 촉진 작용이 저해됨을 나타낸 것이다.

[45] 도 29는 shRNA transfection을 통해 안지오텐신 수용체의 발현을 저해하였을 때 NNK에 의한 세포 생존, 콜로니 생성 및 foci 생성 촉진 작용이 저해됨을 나타낸 것이다.

[46] 도 30은 안지오텐신 전환 효소 억제제 또는 안지오텐신 수용체 길항제에 의하여 NNK가 유도하는 종양 생성이 억제됨을 나타낸 것으로 이들 약물의 흡연에 의한 폐암 발암에 대한 예방 효과를 제시한 것이다.

[47] 도 31은 스트레스에 의한 폐암 발암 모델에서 스트레스 노출에 의하여 우레탄이 개시한 폐암 발암 작용이 유의적으로 증가됨을 나타낸 것이다.

[48] 도 32는 스트레스 노출에 의하여 스트레스 호르몬인 NE의 혈중 농도가 증가되며, NE의 지속적인 노출에 의해서도 동일하게 우레탄이 개시한 폐암 발암 작용이 유의적으로 증가됨을 나타낸 것이다.

[49] 도 33은 NE를 시간 또는 농도별로 처리한 여러 폐 상피세포 및 스트레스에 노출된 마우스 폐 조직에서 IGF-1R의 인산화가 증가됨을 나타낸 것이다.

[50] 도 34는 NE에 의하여 폐 상피세포의 형질전환 즉 생존, 콜로니 생성 및 foci 생성 증가 작용이 유의적으로 증가됨을 나타낸 것이다.

[51] 도 35는 NE와 유사한 스트레스 호르몬인 에피네프린 (epinephrine; Epi)에 의해서는 폐 상피세포의 형질전환이 유도되나 코르티솔 (cortisol; Cor)에 의해서는 그러한 작용이 유도되지 않음을 나타낸 것이다.

[52] 도 36은 NE에 의하여 유도된 폐 상피세포의 생존 및 콜로니 생성 증가 작용이 IGF-1R 억제제인 린시티닙 (linsitinib; Linsi)에 의하여 유의적으로 억제됨을 나타낸 것으로, NE에 의한 폐 상피세포 형질전환 유도 작용에서 IGF-1R의 활성화가 관련됨을 제시한 것이다.

[53] 도 37은 NE에 의하여 IGF2의 분비가 증가됨을 제시한 것이다.

[54] 도 38은 siRNA 혹은 중화 항체를 이용하여 IGF2의 발현을 억제하거나 분비된 IGF2를 소거하였을 경우 NE에 의한 IGF-1R 인산화 증가 작용이 억제됨을 제시함으로서, NNK에 의한 IGF-1R 인산화 증가 작용이 IGF2의 생성 혹은 분비

촉진에 의한 것임을 제시한 것이다.

[55] 도 39는 IGF2 발현 저하에 의하여 NE가 유도하는 폐 상피세포의 생존 및 콜로니 생성 증가 작용이 억제되며, IGF2의 기본 발현이 높은 폐 상피세포에서 NE에 의한 IGF-1R 인산화 및 폐 상피세포의 형질전환이 뚜렷하게 증가됨을 확인함으로써 NE에 의한 폐 상피세포의 형질전환 유도 작용에서 IGF2 및 이에 의한 IGF-1R 활성화가 관련됨을 제시한 것이다.

[56] 도 40은 wild type 마우스보다 폐 선택적으로 IGF-1R이 과발현되는 IGF-1R 형질전환 마우스에서 스트레스 노출에 의하여 IGF-1R의 인산화가 증가되고 폐암 생성 촉진 작용이 유의적으로 강화됨을 제시한 것이다.

[57] 도 41은 wild type 마우스보다 폐 선택적으로 IGF-1R이 과발현되는 IGF-1R 형질전환 마우스에서 NE의 지속적인 노출에 의하여 IGF-1R의 인산화가 증가되고 폐암 생성 촉진 작용이 유의적으로 강화됨을 제시한 것이다.

[58] 도 42는 베타-아드레날린 수용체 차단제 및 칼슘길항제에 의하여 NE에 의한 IGF-1R 활성화 및 IGF2 분비가 차단됨을 제시한 것이다.

[59] 도 43은 칼슘이온 채널 차단제에 의하여 NE에 의한 IGF-1R 활성화 및 IGF2 분비가 차단됨을 제시한 것이다.

[60] 도 44는 베타-아드레날린 수용체 차단제 및 칼슘이온 채널 차단제에 의하여 NE에 의한 IGF2 분비가 억제됨을 제시한 것이다.

[61] 도 45는 스트레스에 노출된 마우스 폐 중에서 IGF2 분비가 증가되며, 베타-아드레날린 수용체 차단제 및 칼슘이온 채널 차단제에 의하여 IGF2 분비가 억제됨을 bronchoalvolar lavage fluid (BALF) 분석으로 확인한 것이다.

[62] 도 46은 베타-아드레날린 수용체 차단제에 의하여 NE가 유도하는 폐 상피세포의 생존 및 콜로니 생성 증가 작용이 억제됨을 확인함으로써 NE에 의한 폐 상피세포의 형질전환이 차단됨을 제시한 것이다.

[63] 도 47은 칼슘이온 채널 차단제에 의하여 NE가 유도하는 폐 상피세포의 생존 및 콜로니 생성 증가 작용이 억제됨을 확인함으로써 NE에 의한 폐 상피세포의 형질전환이 차단됨을 제시한 것이다.

[64] 도 48은 베타-아드레날린 수용체 차단제 및 칼슘이온 채널 차단제에 의하여 NE가 유도하는 종양 생성을 억제함을 나타낸 것으로 베타-아드레날린 수용체 차단제 및 칼슘이온 채널 차단제의 스트레스가 유도하는 폐암에 대한 예방 효과를 제시한 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[65] 본 발명은 고혈압 치료제의 폐암 치료라는 신규용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 담배 유래 발암원 또는 비흡연 폐암 발암 인자로서의 스트레스가 유도하는 폐암의 암화 과정에서 성장인자 매개 신호전달의 활성화를 확인하고 임상에서 사용 중인 고혈압 치료제인 칼슘이온 채널 차단제, 베타-아드레날린 수용체 차단제, 안지오텐신 전환 효소 억제제 및 안지오텐신 수용체 길항제를

이용하여 이들의 성장인자 신호전달 활성화의 차단을 통한 폐 상피세포의 형질전환, 폐암 세포의 성장 및 폐암 생성 억제 효과를 제시함으로서, 고혈압 치료제의 폐암 예방제로서의 새로운 적응증을 제시한 것이다.

[66]

[67] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[68]

[69] 본 발명은 고혈압 치료제인 베타-아드레날린 수용체 차단제, 칼슘이온 채널 차단제, 안지오텐신 전환 효소 억제제 및 안지오텐신 수용체 길항제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 유효성분으로 포함하는, 폐암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

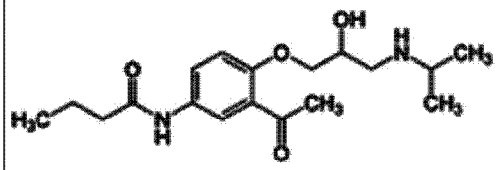
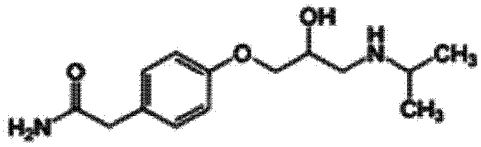
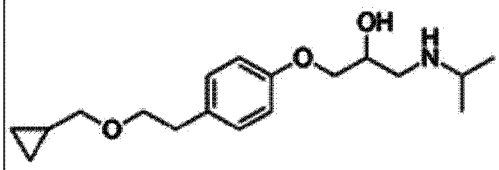
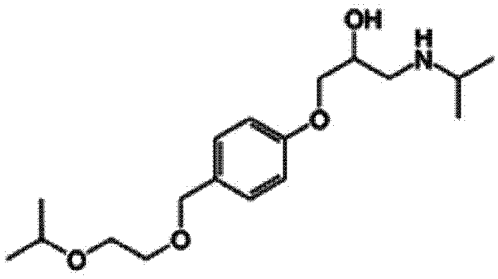
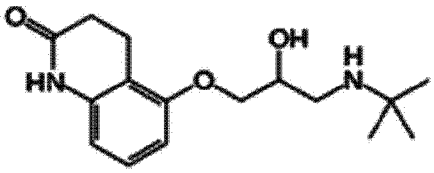
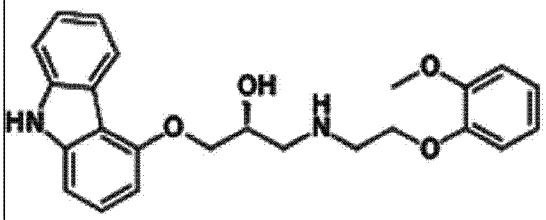
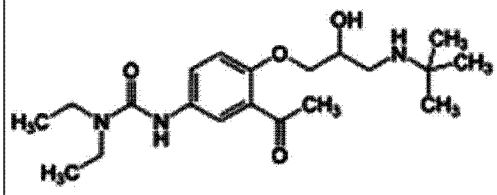
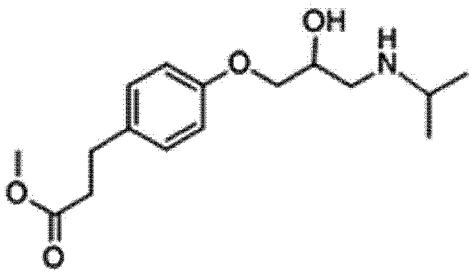
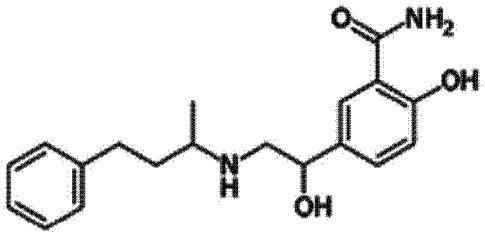
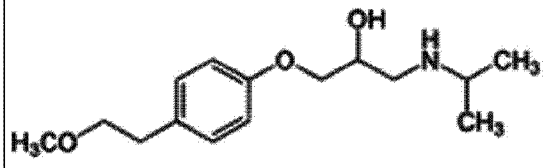
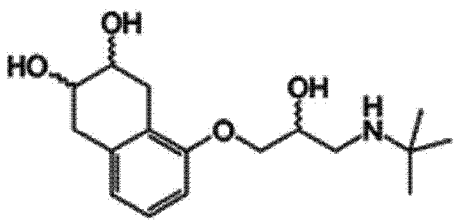
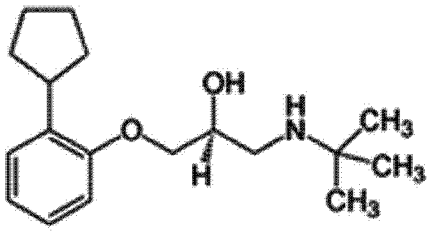
[70] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 폐암을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[71] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 폐암에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

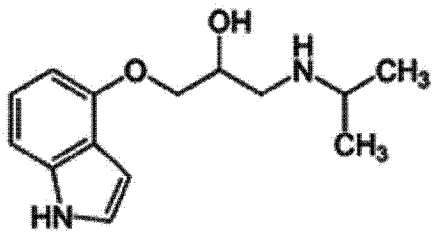
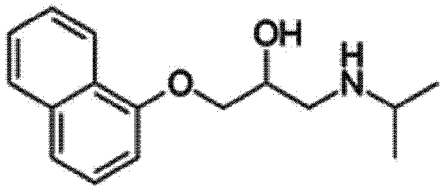
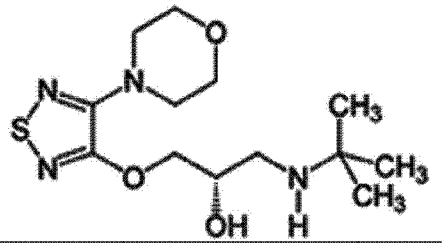
[72] 본 발명에서 예방 또는 치료 대상이 되는 "폐암"은 폐에 발생하는 악성종양을 의미하며 흡연 또는 스트레스 등에 의하여 유발될 수 있다.

[73] 본 발명에서 "베타-아드레날린 수용체 차단제"란 교감신경 수용체중 베타-아드레날린 수용체에 결합하여 수용체 작용을 차단, 저해 또는 억제하는 기능을 하는 작용제를 의미한다. 이때, 사용할 수 있는 베타-아드레날린 수용체 차단제의 종류로는 아세부톨롤(Acebutolol), 아테놀롤(Atenolol), 베탁소롤(Betaxolol), 비소프롤롤(Bisoprolol), 카르테올롤(Carteolol), 칼베디롤(Carvedilol), 셀리프롤롤(Celiprolol), 에스몰롤(Esmolol), 라베타롤(Labetalol), 메토프롤롤(Metoprolol), 나돌롤(Nadolol), 펜부토롤(Penbutolol), 핀돌롤(Pindolol), 프로프라놀롤(propranolol), 티몰롤(Timolol) 등과 이들의 염이 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니며, 상기 차단제의 구체적인 화학구조를 하기 표 1에 나타내었다.

[74] [표1]

아세부톨롤(Acebutolol) 	아테놀롤(Atenolol) 
베탁소롤(Betaxolol) 	비소프롤롤(Bisoprolol) 
카르테올롤(Carteolol) 	칼베디롤(Carvedilol) 
셀리프롤롤(Celiprolol) 	에스몰롤(Esmolol) 
라베타롤(Labetalol) 	메토프롤롤(Metoprolol) 
나돌롤(Nadolol) 	펜부토롤 (Penbutolol) 

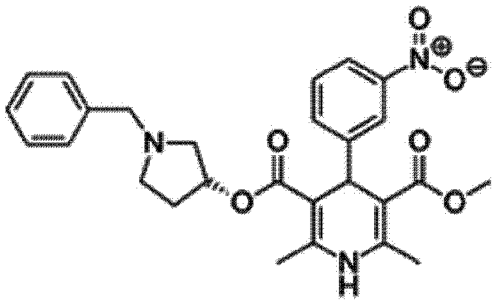
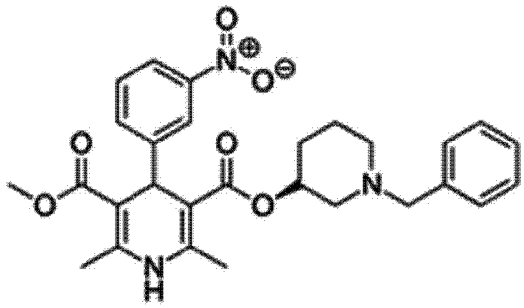
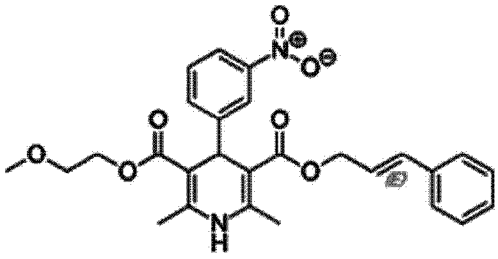
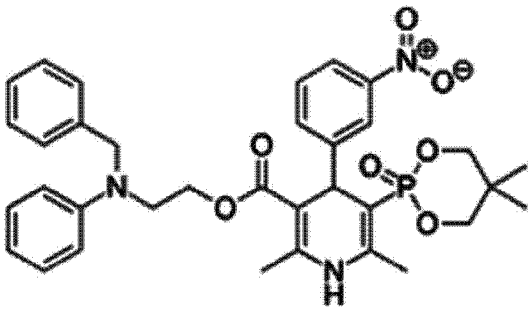
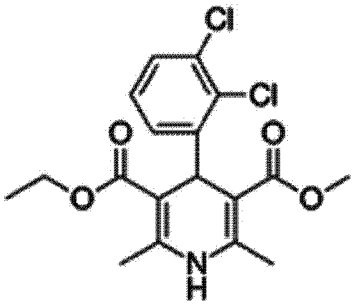
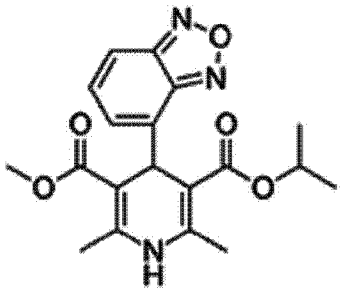
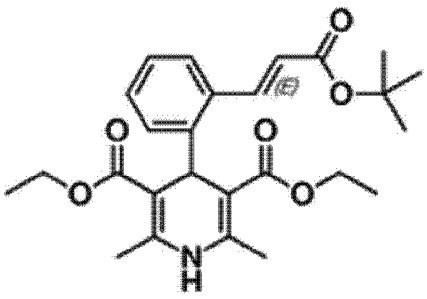
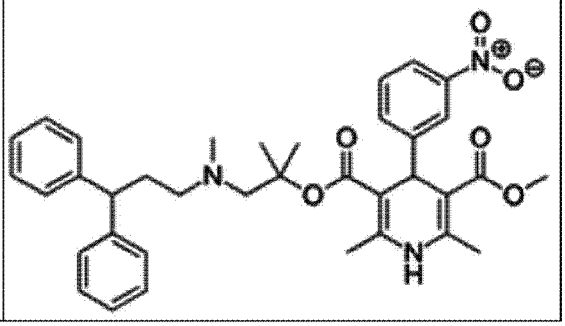
[75]

핀돌롤(Pindolol) 	프로프라놀롤(Propranolol) 
티몰롤(Timolol) 	

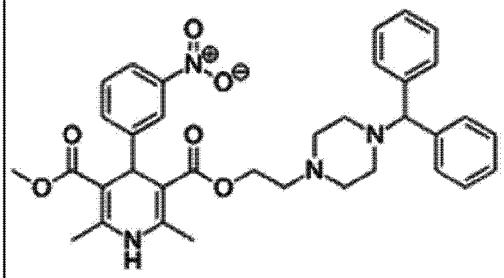
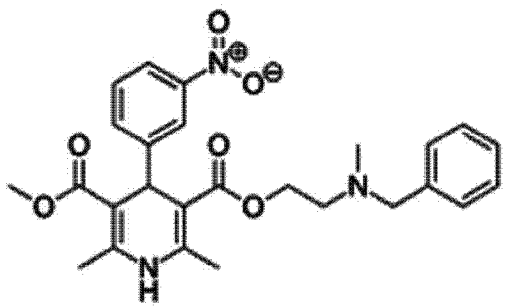
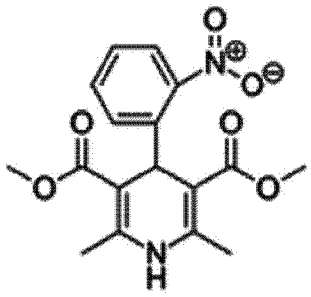
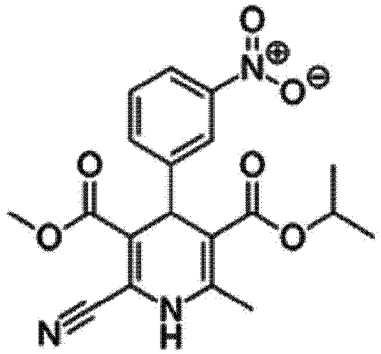
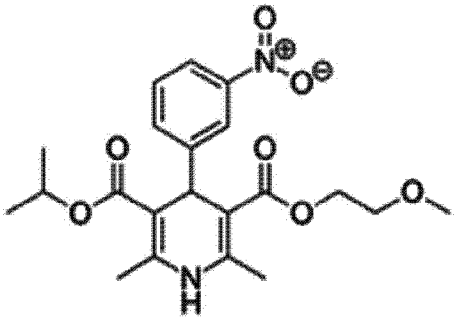
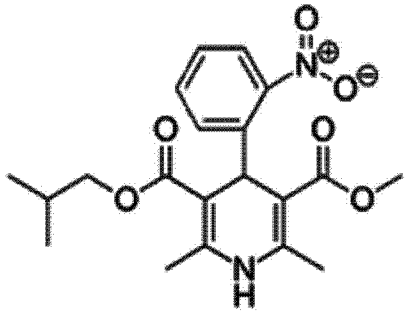
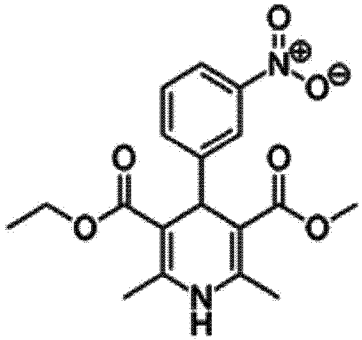
[76]

[77] 본 발명에서 "칼슘이온 채널 차단제"란 세포 밖 칼슘이온이 심근과 혈관의 평활근 세포로 유입되는 것을 차단하는 기능을 하는 작용제를 의미한다. 이때 사용할 수 있는 칼슘이온 채널 차단제의 종류로는 디하이드로피리딘(dihydropyridine)계 약물인 암로디핀(Amlodipine), 바니디핀(Barnidipine), 베니디핀(Benidipine), 실니디핀(Cilnidipine), 에포니디핀(Efonidipine), 펠로디핀(Felodipine), 이스라디핀(Isradipine), 라시디핀(Lacidipine), 레르카니디핀(Lercanidipine), 마니디핀(Manidipine), 니카르디핀(Nicardipine), 니페디핀(Nifedipine), 닐바디핀(Nilvadipine), 니모디핀(Nimodipine), 니솔디핀(Nisoldipine), 니트레디핀(Nitrendipine) 등과 비디하이드로피리딘계 약물인 베라파밀(Verapamil), 딜티아젬(Diltiazem) 등과 이들의 염이 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니며, 상기 차단제의 구체적인 화학구조를 하기 표 2에 나타내었다.

[78] [표2]

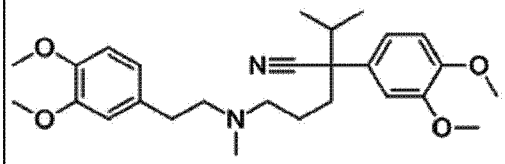
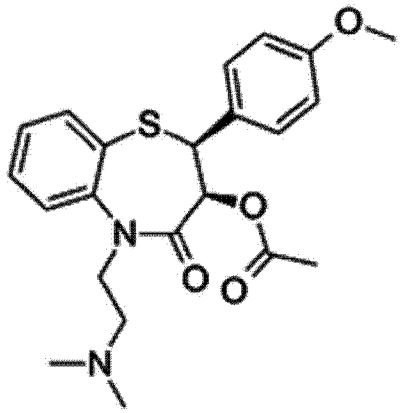
디하이드로피리딘계	
바니디핀(Barnidipine) 	베니디핀(Benidipine) 
실니디핀(Cilnidipine) 	에포니디핀(Efonidipine) 
펠로디핀(Felodipine) 	이스라디핀(Isradipine) 
라시디핀(Lacidipine) 	레르카니디핀(Lercanidipine) 

[79]

마니디핀(Manidipine) 	니카르디핀(Nicardipine) 
니페디핀(Nifedipine) 	닐바디핀(Nilvadipine) 
니모디핀(Nimodipine) 	니솔디핀(Nisoldipine) 
니트렌디핀(Nitrendipine) 	

비 디하이드로피리딘계

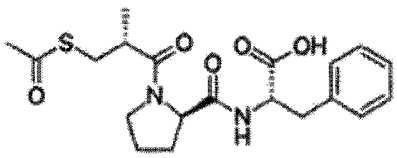
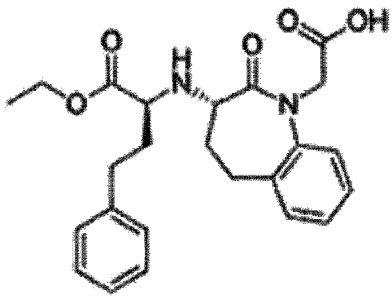
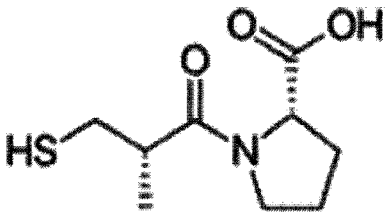
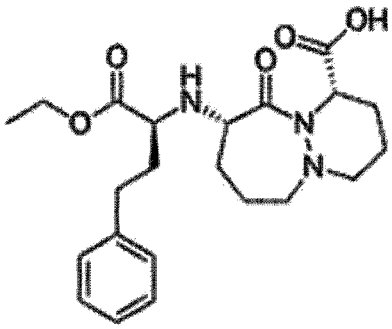
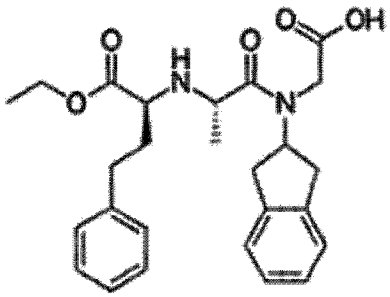
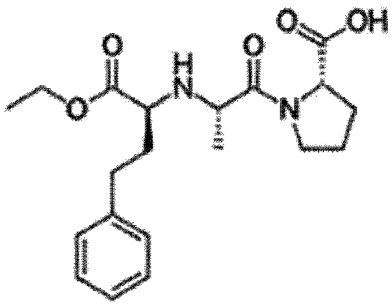
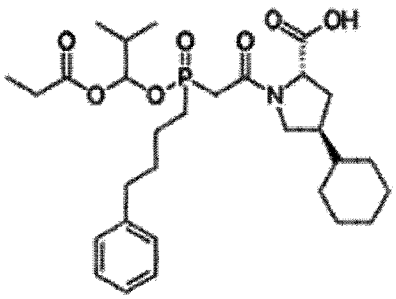
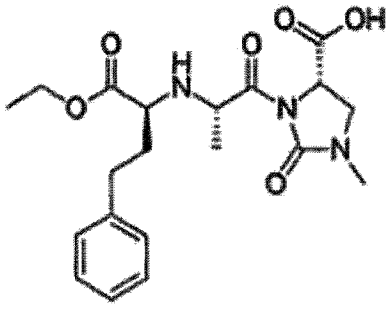
[80]

베라파밀(Verapamil)	딜티아젬(Diltiazem)
	

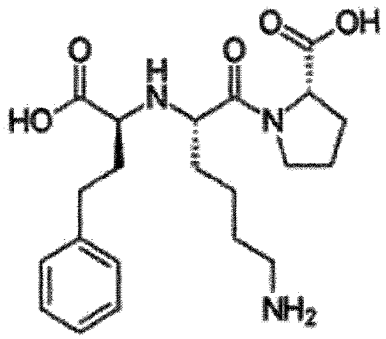
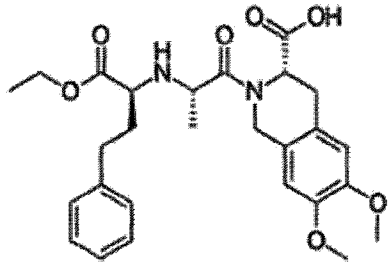
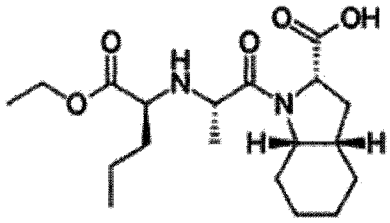
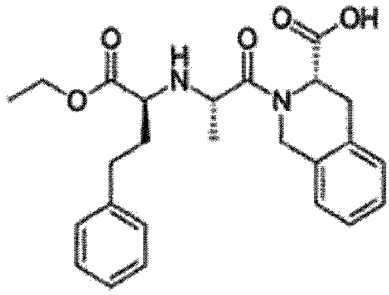
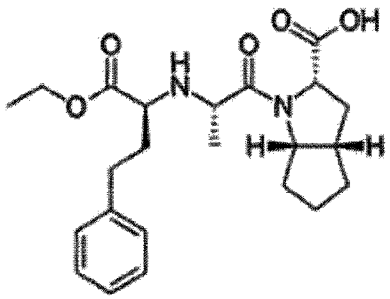
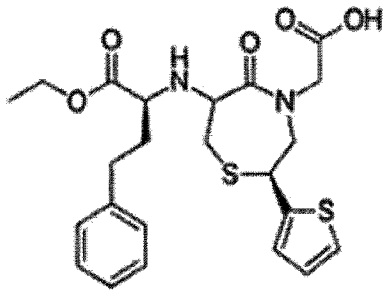
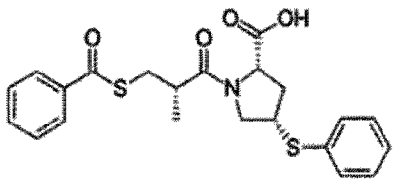
[81]

[82] 본 발명에서 "안지오텐신 전환 효소 억제제"란 데카펩타이드(decapeptide)인 안지오텐신 I으로부터 다이펩타이드(dipeptide, His-Leu)를 절단함으로써 혈관 수축 작용을 갖는 안지오텐신 II로 전환시키는 역할을 하는 안지오텐신 전환효소(angiotensin converting enzyme, ACE)의 작용을 억제하는 기능을 하는 작용제를 의미한다. 이때 사용할 수 있는 안지오텐신 전환 효소 억제제의 종류로는 알라세프릴(Alacepril), 베나제프릴(Benazepril), 캡토프릴(Captopril), 실라자프릴(Cilazapril), 델라프릴(Delapril), 에날라프릴(Enalapril), 포시노프릴(Fosinopril), 이미다프릴(Imidapril), 리시노프릴(Lisinopril), 모엑시프릴(Moexipril), 페린도프릴(Perindopril), 퀴나프릴(Quinapril), 라미프릴(Ramipril), 테모카프릴(Temocapril), 조페노프릴(Zofenopril) 등과 이들의 염이 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니며, 상기 억제제의 구체적인 화학구조를 하기 표 3에 나타내었다.

[83] [표3]

알라세프릴(Alacepril) 	베나제프릴(Benazepril) 
캅토프릴(Captopril) 	실라자프릴(Cilazapril) 
델라프릴(Delapril) 	에날라프릴(Enalapril) 
포시노프릴(Fosinopril) 	이미다프릴(Imidapril) 

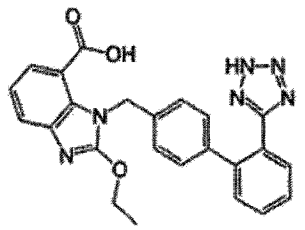
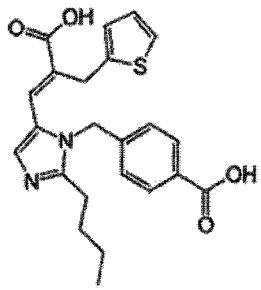
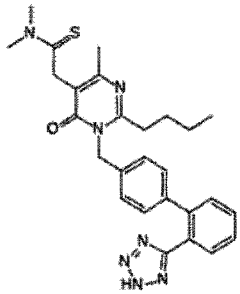
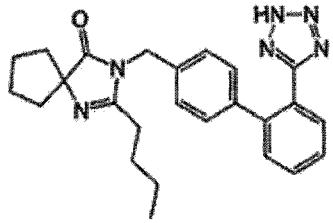
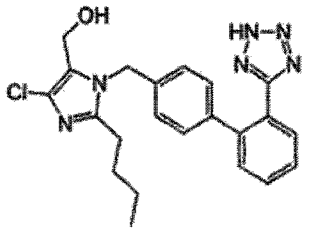
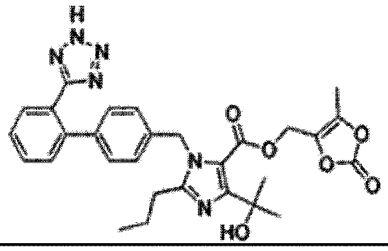
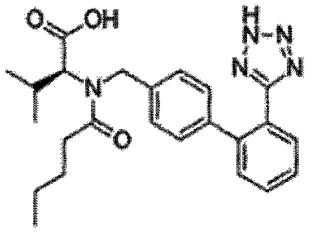
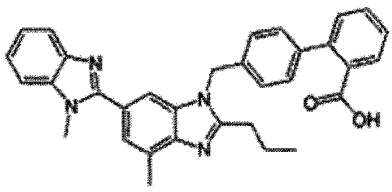
[84]

리시노프릴(Lisinopril) 	모엑시프릴(Moexipril) 
페린도프릴(Perindopril) 	퀴나프릴(Quinapril) 
라미프릴(Ramipril) 	테모카프릴(Temocapril) 
조페노프릴(Zofenopril) 	

[85] 본 발명에서 "안지오텐신 수용체 길항제"란 안지오텐신 II가 혈관 벽에 있는 이의 수용체에 결합하는 것을 방지함으로써 혈압을 강하시키는 기능을 하는

작용제를 의미한다. 이때 사용할 수 있는 안지오텐신 수용체 길항제의 종류로는 칸데사르탄(Candesartan), 에프로사르탄(Eprosartan), 피마살탄(Fimasartan), 이르베사르탄(Irbesartan), 로사르탄(Losartan), 올메사르탄(Olmesartan), 발사르탄(Valsartan), 텔미사르탄(Telmisartan) 등과 이들의 염이 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니며, 상기 길항제의 구체적인 화학구조를 하기 표 4에 나타내었다.

[86] [표4]

칸데사르탄(Candesartan) 	에프로사르탄(Eprosartan) 
피마살탄(Fimasartan) 	이르베사르탄(Irbesartan) 
로사르탄(Losartan) 	올메사르탄(Olmesartan) 
발사르탄(Valsartan) 	텔미사르탄(Telmisartan) 

[87] 본 발명자들은 폐암의 암화 과정에서 인슐린 유사 성장인자 매개 신호전달의 활성화를 확인하고 고혈압 치료제로 알려진 칼슘이온 채널 차단제, 베타-아드레날린 수용체 차단제, 안지오텐신 전환 효소 억제제 및 안지오텐신

수용체 길항제의 성장인자 신호전달 활성화의 차단을 통한 폐 상피세포의 형질전환 및 폐암 생성 억제 효과를 확인하였다.

[88] 따라서, 상기 베타-아드레날린 수용체 차단제, 칼슘이온 채널 차단제, 안지오텐신 전환 효소 억제제 및 안지오텐신 수용체 길항제는 폐암을 개선, 예방, 억제 또는 치료하는 조성물의 유효성분으로 이용될 수 있다.

[89] 본 발명의 조성물은 상기 베타-아드레날린 수용체 차단제, 칼슘이온 채널 차단제, 안지오텐신 전환 효소 억제제 및 안지오텐신 수용체 길항제와 함께 폐암 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.

[90] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[91] 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물류 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[92] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 또한, 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[93] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[94] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 베타-아드레날린 수용체

차단제, 칼슘이온 채널 차단제, 안지오텐신 전환 효소 억제제 및 안지오텐신 수용체 길항제는 1일 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 1 내지 30 mg/kg의 양으로 투여할 수 있으며, 하루에 한번 또는 수 회 나누어 투여할 수도 있다.

[95] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.

[96]

[97] 아울러, 본 발명의 약학적 조성물은 폐암의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[98] 또한, 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 고혈압 치료제인 베타-아드레날린 수용체 차단제, 칼슘이온 채널 차단제, 안지오텐신 전환 효소 억제제 및 안지오텐신 수용체 길항제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 폐암 예방 또는 치료 방법을 제공한다. 상기 개체는 인간 또는 비-인간을 포함하는 포유류이며, 비-인간 포유류는 마우스, 랫트, 개, 고양이, 말, 소, 양, 염소, 돼지, 토끼 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[99]

[100] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[101]

[102] [실시예]

[103] <u>실시예 1 : 실험준비 및 실험방법</u>

[104] 1-1. 세포 배양

[105] 본 발명에서는 폐 상피세포 (NHBE), 소기도 상피세포 (SAEC)와 더불어 폐암화 과정에서 p53의 mutation이 빈번히 관찰되는 점에 착안, 사람의 폐상피세포에 siRNA의 transfection으로 p53를 knock-down시켜 폐암의 전암 단계 (premalignant)의 특성을 확립시킨 human bronchial epithelial cell line (HBEC3), SV40를 이용하여 immortalization한 BEAS-2B cell lines, 자발적으로 immortalization된 HB56B 세포 및 폐암세포를 사용하였다. 또한, BEAS-2B를 beeswax 또는 담배 연기 응축물이 포함된 beeswax에 6개월 동안 노출시킨 후 확립한 세포주인 1799, 1198, 1170을 사용하였으며, IGF-1R과 인슐린 수용체 (IR) 간의 구조적 유사성으로 인해 현재 시판 중인 인산화된 IGF-1R을 검출하는 항체가 인산화된 IR도 검출할 수 있음을 고려하여 NNK에 의한 IGF-1R 인산화

증가가 IGF-1R에 선택적인지를 검증하기 위하여 대조군 및 IGF-1R 또는 IR이 과발현된 섬유아세포 (R-, R+, IR+)를 적용하였다. 폐상피세포 (NHBE, SAEC, HBEC3, HB56B, BEAS-2B 및 1799 세포)는 keratinocyte SFM (KSFM)에 supplement (EGF와 pituitary extract)를 첨가한 배지를 사용하여 배양하였고, 1198 및 1170은 3% FBS가 함유된 KSFM을 사용하여 배양하였다. R-, R+, IR+ 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하였고, 폐암세포들은 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지를 사용하였다. 세포들은 37℃, 5% CO_2 조건에서 일주일에 1-2회 계대 배양하였다.

[106]

[107] 1-2. 발암원

[108] 흡연 유도 발암 과정 평가를 위하여 담배 중 주요 발암성 nitrosamine류인 4-(methylnitro-samino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)를 이용하였고, 비흡연자의 폐암 발암원으로 여겨지고 있는 스트레스와의 관련성을 확인하기 위하여 스트레스시 증가되는 신경전달물질인 노르에피네프린 (NE)을 사용하였다. NNK는 DMSO에, NE는 PBS에 녹여 사용하였다. Vehicle은 최종 농도가 0.1% 이하가 되도록 처리하여 vehicle에 의한 영향을 최소화하여 실험하였다. *In* vivo 실험에서는 NNK를 PBS에 녹여 경구 또는 복강 투여를 실시하였다.

[109]

[110] 1-3. 세포 성장에 대한 영향 확인

[111] 세포를 well당 2-3 × 10^3 cells의 개수로 96 well plate에 부착시킨 후, 배지에 희석한 시험 약물을 처리하고 3일 동안 배양하였다. 배양 후 최종 농도가 200-500 μg/ml이 되도록 MTT 용액을 처리하여 2-4시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고, 생성된 formazan을 DMSO에 녹인 뒤, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또는 세포를 12 또는 24well plate에 부착시킨 후 시험 약물을 처리하고 일정 시간이 지난 후 세포를 떼어낸 뒤 hemocytometer로 세포 수를 측정하였다.

[112]

[113] 1-4. Anchorage-dependent colony formation assay

[114] 100-300개의 세포를 6 또는 12 well에 seeding하고 NNK 또는 NNK와 시험 약물을 처리한 뒤 2~3주 후 crystal violet으로 염색하여 colony 생성을 관찰하고 계수하였다.

[115]

[116] 1-5. Anchorage-independent colony formation assay

[117] 실험 전 low-melting agar를 1%가 되도록 배지에 희석한 뒤 24 well plate에 1 ml씩 넣어 bottom agar를 만들어 굳힌다. 2,000-5,000개의 세포를 low melting agar (최종 0.35-0.4%)에 섞어 bottom agar에 500 μl씩 넣어 굳힌 다음, 배지에 희석한 NNK 또는 시험 약물을 넣어 처리한다. 처리 후 2~4주 후 colony를 MTT 용액으로 염색하여 colony 생성을 관찰하고 계수하였다.

[118]

[119] 1-6. Foci formation assay

[120] 폐 상피세포가 90~95% confluent한 상태에서 growth factor가 없는 배지에 희석한 발암원 또는 발암원과 시험 약물을 처리한 뒤 2-3주 후 생성된 foci를 관찰하였다.

[121]

[122] 1-7. Transfection

[123] 폐 상피세포 및 폐암세포를 multiwell plate에 부착시킨 후 Lipofectamine RNAiMAX를 이용하여 siRNA (20~100 pmol)를 24~48시간 동안 transfection하였다. 또는 부착시킨 세포에 Lipofectamine 2000을 이용하여 IGF2 발현 벡터 (200 ng)를 24시간 동안 transfection 하였다. 세포를 바로 harvest 하거나 NNK 등을 처리한 후 일정 시간이 지난 후 harvest하여 Western blot analysis를 수행하였다.

[124]

[125] 1-8. 안지오텐신 수용체 또는 IGF2 발현 저해 세포주 구축

[126] 안지오텐신 수용체 또는 IGF2 발현을 저해할 수 있는 shRNA 벡터를 Sigma-Aldrich 사에서 구입한 뒤, 이를 HEK293T 세포에 viral packaging vector와 함께 transfection하여 lentiviral particle을 생성시켰다. 사람 폐 상피세포주에 lentiviral particle을 transduction한 다음 puromycin으로 2-3주 이상 selection하여 stable cell line을 구축하였다. 구축된 세포주는 Western blot analysis를 이용하여 안지오텐신 수용체 또는 IGF2의 발현 저해 여부를 확인하였다.

[127]

[128] 1-9. 면역 침강법 (Immunoprecipitation)

[129] 세포에서 분리한 단백질을 antibody 및 protein A/G agarose와 배양하여 해당 antibody에 결합하는 단백질을 분리하였다. 특정 단백질과 상호작용할 수 있는 다른 단백질의 존재 여부를 Western blot analysis로 검색하였다.

[130]

[131] 1-10. Western blot analysis

[132] 세포를 ice-cold PBS로 2회 세척한 뒤, modified RIPA buffer [50 mM TrisHCl (pH 7.4), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0.25% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100, protease inhibitor cocktail, 100mM NaF, 1mM Na3VO4]로 lysis하였다. Lysate를 13,000 rpm에서 15-20분간 원심분리하여 상층액을 회수하였고, 회수된 단백질은 BCA 법을 이용하여 정량하였다. 동일한 양의 단백질을 8-15% SDS-PAGE로 전기영동한 후, PVDF 멤브레인으로 이동시켰다. 멤브레인을 TBST (0.01% Tween-20을 함유한 Tris-buffered saline)로 세척한 후 blocking buffer (skim milk를 5%가 되도록 TBST에 희석)에 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 멤브레인을 3% BSA가 함유된 TBST에 희석된 1차 항체와 4℃에서 12시간 이상 배양한 후, TBST로 1시간 이상 세척하였다. 멤브레인을 3% skim milk가 함유된 TBST에 희석된 2차 항체와 실온에서 1-2시간 동안 배양한 후, TBST로 1시간 이상

세척하였다. 멤브레인을 ECL 용액에 반응시킨 뒤 X-ray film에 노출시켜 밴드를 확인하였다.

[133]

[134] 1-11. RT-PCR

[135] 폐 상피세포에서 다음의 방법으로 RNA를 분리하였다. Trizol Reagent를 첨가하여 세포를 균질화 한 후, 여기에 chloroform을 첨가하여 13,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상층액을 회수하여 동량의 isopropanol을 첨가하여 13,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 침전된 RNA는 75% 에탄올로 세척한 후, 건조시켜 nuclease free water에 용해시켰다. 260 nm의 흡광도를 측정하여 RNA를 정량하였고, A260/A280 nm의 비율이 1.8~2.0 범위 내의 값을 갖는 RNA를 실험에 사용하였다. 모든 실험은 RNase-free한 조건하에서 이루어졌다.

[136] cDNA는 PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit를 이용하여 2 ㎍의 total RNA, oligo dT primer (50 μM), dNTP mixture, 그리고 RNase free dH_2O로 65℃ 5분간 반응하였고, 그 후 Template RNA primer mixture에 5×PrimeScript Buffer, RNase inhibitor, PrimeScript RTase, 그리고 RNase free dH_2O를 넣어 42 ℃ 1시간, 그리고 95℃에서 5분간 heating 시킴으로써 반응을 중지시켜 합성하였다.

[137] Polymerase chain reaction (PCR)은 2 μL cDNA, 4 μM primer sets, EconoTaq 10 μL, 그리고 증류수를 가하여 반응액을 20 μL로 맞춘 다음 PCR 기기를 이용하여 수행하였다. PCR 조건은 95℃/10초, 55~58℃/30초, 72℃/1분으로 하여 25~33회 증폭하였다. PCR 산물은 2% agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide (EtBr)로 염색하여 UV transilluminator에서 특정 밴드를 관찰하였다.

[138]

[139] 1-12. 세포 내 칼슘 생성 확인

[140] 폐 상피세포를 커버슬립에 부착시킨 후 고혈압 치료제 또는 칼슘 길항제를 처리하고 칼슘을 감지하는 약물인 Fluo-4 AM을 37℃에서 15분간 처리한 뒤 NE를 5분간 처리하였다. 세포를 PBS로 3회 세척 후 mounting medium에 봉입한 다음 PerkinElmer사의 Nuance multispectral imaging system을 이용하여 측정하였다.

[141] NNK에 의한 세포 내 칼슘 변화를 실시간으로 모니터링하기 위하여, 세포를 PerkinElmer사의 96-well cell carrier microplate에 부착시킨 다음 고혈압 치료제를 처리하고 Fluo-4 AM을 37℃에서 15분간 처리한 뒤 NNK를 처리하였다. 형광 변화를 Operetta high content screening system을 이용하여 모니터링한 뒤, PerkinElmer사의 Harmony software를 이용하여 결과를 분석하였다.

[142]

[143] 1-13. 형광 염색법

[144] 세포를 커버슬립에 부착 후 약물을 전처리하고 NNK 또는 NE를 처리하였다. 세포를 PBS로 3회 세척 후 4% paraformaldehyde로 실온에서 30분간 고정하였다.

이후 0.1% Triron X-100으로 permeabilization 시키고, blocking solution에 배양하였다. 1차 항체를 4℃에서 12시간 이상 처리한 후 PBS로 수회 세척하고, 형광이 결합된 2차 항체를 처리하였다. PBS로 수 회 세척 후 DAPI가 포함된 mounting solution으로 봉입하고 confocal microscope를 이용하여 사진 촬영하였다.

[145]

[146] 1-14. 실시간 세포 관찰

[147] 실시간 세포 관찰은 PerkinElmer사의 Operetta high content screening system을 이용하여 수행하였다.

[148]

[149] 1-15. ELISA

[150] IGF1, IGF2 및 NE에 대한 ELISA는 R&D System 사, DSL사 또는 Abnova사에서 판매하는 ELISA kit을 이용하여 제조사에서 추천하는 시험방법에 따라 수행하였다.

[151]

[152] 1-16. 스트레스 유도 폐암 발암 모델

[153] 마우스에 스트레스를 적용한 뒤 발암원인 우레탄 (urethane)이 매개하는 발암 작용의 촉진 여부를 관찰하였다. 스트레스는 마우스를 restrainer에 가두거나, 물에 빠뜨리거나, shaking 하거나, 밤/낮 주기를 변경하는 등의 방법을 번갈아가며 4개월 간 실시하여 마우스가 적응되지 못하도록 하였고, 스트레스 적용 1개월 후 일부 마우스에 대하여 발암원인 우레탄을 처리하여 스트레스에 의한 직접적인 발암 증가 여부 및 스트레스에 의한 우레탄 유도 발암 과정 촉진 여부를 평가하였다.

[154] 스트레스 호르몬인 NE의 발암 촉진 작용을 확인하기 위하여, Alzet사의 micro-osmotic pump에 NE (50.1 mM) 또는 vehicle인 PBS를 주입한 뒤 마우스 등에 이식하였다. 6주 후 기존 pump를 제거하고 NE 또는 PBS를 주입한 새로운 pump를 주입하여 총 12주 동안 NE에 지속적으로 (마우스 100g 당 1 μmol의 용량으로 매일 노출시킴) 노출시켰다. 종양 생성을 촉진하기 위하여 pump 이식 3일 후 우레탄을 1 g/kg의 용량으로 투여하였다.

[155] 부검 전 종양의 생성을 비침습적으로 관찰하기 위하여 MMPSense 680 probe를 주입한 뒤 PerkinElmer사의 IVIS Spectrum microCT에서 촬영하였다. 마우스를 부검한 뒤 폐를 적출하여 생성된 종양을 계수하였고, 파라핀 블록을 제작한 뒤 일정 간격으로 4개 이상의 절편을 만들고 하기 H&E 염색법에 따라 염색한 다음 종양의 개수 및 크기를 측정하여 종양의 부피를 계산하였다. 종양의 부피는 $(\text{단축})^2 \times \text{장축} \times 0.5$로 계산하였다.

[156]

[157] 1-17. 폐암 발암 모델 및 고혈압 치료제의 발암 억제 효능 평가

[158] A/J 마우스에 NNK (3 μmol)를 일주일에 2회 경구 투여한 뒤, 시험 약물을 주

6회, 총 20주 동안 경구 투여로 처리하였다. 이후 마우스를 희생하고 폐를 적출하여 생성된 종양을 계수하였고, 폐 파라핀 블록을 제작한 뒤 일정 간격으로 4개 이상의 절편을 만들고 하기 H&E 염색법에 따라 염색한 다음 종양의 개수 및 크기를 측정하여 종양의 부피를 계산하였다.

[159]

[160] 1-18. H&E 염색

[161] 파라핀 블록은 4 μm의 두께로 박절하고 silane coating 슬라이드에 부착 후 건조하였다. 말린 slide glass를 65℃ dry-oven에 넣어 overnight으로 탈파라핀을 진행하였다. 그 후 slide glass를 xylene에 5분씩 2회 넣어두었다. 탈파라핀시킨 후, 100%, 95%, 70%, 50% 단계별 에탄올로 함수시키고 Harris hematoxylin 용액에 1분 30초간 염색한 뒤 1% HCl alcohol 용액과 ammonia로 침적시킨 다음, eosin 용액으로 30초간 염색하였다. 그 후 95%, 100% 에탄올을 이용하여 순차적으로 탈수시킨 후 xylene으로 투명화한 뒤 봉입하여 현미경으로 관찰하고 사진을 촬영하였다.

[162]

[163] 1-19. 면역화학 염색 (Immunohistochemistry)

[164] 파라핀 블록은 4 μm의 두께로 박절하고 silane coating 슬라이드에 부착 후 건조하였다. 말린 slide glass를 65℃ dry-oven에 넣어 overnight으로 탈파라핀을 진행하였다. 그 후 slide glass를 xylene에 5분씩 2회 넣어두었다. 탈파라핀시킨 후, 100%, 95%, 70%, 50% 단계별 에탄올로 함수시킨 뒤 과산화수소수를 처리하였다. PBS로 세척 후 0.4% Triron X-100을 처리한 뒤, Dako사에서 구입한 blocking solution에 배양하였다. 1차 항체를 4℃에서 12시간 이상 처리한 후 PBS로 수회 세척하고, biotin이 결합된 2차 항체를 처리하였다. PBS로 수 회 세척 후 Vector Laboratories 사의 ABC solution을 처리한 후 diaminobenzidine (DAB) 용액을 처리한 다음 mounting solution으로 봉입하고 사진 촬영하였다.

[165]

[166] 1-20. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) 회수 및 분석

[167] 스트레스에 4주간 노출시키고 스트레스 노출 3일 후부터 고혈압치료제를 투여한 마우스로부터 폐를 적출한 뒤, 폐 내부를 PBS로 3회 세척하고 세척액 (BALF)을 회수하였다. BALF를 EMD Millipore사의 Amicon Ultra로 농축한 뒤 Western blot analysis를 이용하여 IGF2를 검출하였다. 별도로 gel을 Coomassie brillant blue로 염색하여 동일한 농축액이 분석되었는지 확인하였고, Image J를 이용하여 IGF2 블롯을 정량화한 후 그래프화하였다.

[168]

[169] 1-21. SPC-IGF2 transgene의 발현벡터 제작

[170] 형질전환 마우스 제작을 위한 유전자 변형 벡터인 SPC-kbpA는 Dr. DeMayo (Baylor Medical School)로부터 분양받은 것을 이용하였다. 600 bp 길이의 인간 IGF2 cDNA를 PC-kbpA 벡터의 EcoRI 위치에 subcloning 하여 SPC-IGF2

plasmid를 제작하였다. 그러므로 IGF2 유전자 발현은 surfactant protein C (SPC) promoter의 조절 하에 있도록 제작되었다.

[171]

[172] 1-22. 유전자 변형 마우스 제작

[173] SPC-IGF2 plasmid를 restriction enzyme인 NdeI 및 NotI을 처리하여 SPC/IGF2 transgene을 절단하였다. 6 kb의 insert를 gel electrophoresis를 통해 분리한 후 transgene을 hybrid C3H/C57B6 fertilized mouse egg에 microinjection하였다.

[174] 사람 IGF2 transgene을 포함하는 마우스는 PCR analysis로 확인하였다. 마우스 꼬리 일부를 절단한 후 genomic DNA를 분리한 다음 SPC promoter/IGF2 연결 부위 700 bp에 대한 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. 이때 사용한 primer 서열은 forward primer 5'-AGACACCAATGGGAATCC-3', reverse primer 5'-TGCTCACTTCCGATTGCTG-3'이다. PCR은 95℃, 5분에서 initial denaturation을 실시한 뒤 95℃, 45초, 58℃, 45초, 72℃, 45초씩 총 35 cycles을 수행하였고, 72℃에서 7분간 final extension 반응을 실시하였다. 생성된 PCR product는 RedSafe dye가 포함된 2% agarose gel로 전기영동하여 분리하였고, UV transilluminator에서 관찰하여 IGF2 포함 여부를 확인하였다.

[175]

[176] 1-23. SPC-IGF-1R transgene의 발현벡터 제작

[177] 형질전환 마우스 제작을 위한 유전자 변형 벡터인 SPC-kbpA는 Dr. DeMayo (Baylor Medical School)로부터 분양받은 것을 이용하였다. IGF-1R cDNA를 PC-kbpA 벡터에 subcloning 하여 SPC-IGF-1R plasmid를 제작하였다. 그러므로 IGF-1R 유전자 발현은 surfactant protein C (SPC) promoter의 조절하에 있도록 제작되었다.

[178]

[179] 1-24. 유전자 변형 마우스 제작

[180] SPC-IGF-1R plasmid construct를 hybrid C3H/C57B6 fertilized mouse egg에 microinjection하였다. 사람 IGF-1R transgene을 포함하는 마우스는 PCR analysis로 확인하였다. 마우스 꼬리 일부를 절단한 후 genomic DNA를 분리한 다음 SPC promoter/IGF-1R 연결 부위에 대한 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. 이때 사용한 primer 서열은 forward primer 5'-CTGGCTGGCGTGGAAATATTC-3', reverse primer 5'-CCACTCGGAACAGCAGCAAG-3'이다. PCR은 95℃, 5분에서 initial denaturation을 실시한 뒤 95℃, 45초, 58℃, 45초, 72℃, 45초씩 총 35 cycles을 수행하였고, 72℃에서 7분간 final extension 반응을 실시하였다. 생성된 PCR product는 RedSafe dye가 포함된 2% agarose gel로 전기영동하여 분리하였고, UV transilluminator에서 관찰하여 IGF1R 포함 여부를 확인하였다. 마우스는 FVB/N background로 8세대 이상 backcrossing 하여 사용하였다.

[181]

[182] <u>실시예 2: 폐 상피세포, 및 담배 유래 발암원을 처리한 마우스 폐 조직에서</u>

인슐린유사성장인자 수용체 (insulin-like growth factor receptor; IGF-1R) 신호전달의 선택적 활성화 확인

[183] 먼저, 흡연 경력이 있는 사람의 폐암 전구 단계 폐 조직에서 IGF-1R 신호전달의 인산화 증가여부를 확인하였다. 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 흡연 경력이 있는 사람의 폐암 전구 단계 폐 조직에서 IGF-1R 신호전달의 인산화가 증가되어 있음을 확인하였다. 또한, 이러한 IGF-1R 신호전달의 활성화와 리간드와의 상관관계를 확인한 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, IGF-1R 신호전달의 활성화는 리간드인 IGF1 및 IGF2의 발현과 유의적인 정의 상관관계를 나타냄을 확인하였다.

[184]

[185] 다음으로, 다양한 폐 상피세포(NHBE, SAEC, HBE/p53i, HB56B, BEAS-2B)에 담배 유래 발암원인 NNK를 각각 다양한 농도 및 시간으로 처리하면서 IGF-1R 및 그 하위 신호전달의 활성화 변화를 상기 실시예 1-10에 기재된 방법을 통해 확인하였다. 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, NNK의 처리 시간 또는 농도가 증가함에 따라 여러 폐 상피세포에서 IGF-1R 및 그 하위 신호전달인 Akt, mTOR, S6의 활성화가 증가됨을 확인하였다.

[186]

[187] 다음으로, 유전형을 달리하는 여러 폐암세포에서 NNK(10μM)를 처리하고 IGF-1R 활성화 변화를 상기 실시예 1-10에 기재된 방법을 통해 확인한 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, NNK에 의하여 IGF-1R이 활성화됨을 확인하였다.

[188]

[189] 다음으로, A/J 마우스에 NNK (3 μmol)를 처리한 후, 마우스를 희생하고 폐 조직을 적출하여 IGF-1R 활성화 변화를 상기 실시예 1-10에 기재된 방법을 통해 확인한 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, IGF-1R 및 그 하위 신호전달인 IRS의 활성화가 증가됨을 확인하였다.

[190]

[191] 다음으로, NNK에 의한 IGF-1R 인산화 증가가 IGF-1R에 선택적인지를 확인하기 위하여, IGF-1R 또는 IR이 과발현된 섬유아세포 (R-, R+, IR+)에 NNK (10μM)를 시간별로 처리하면서 상기 실시예 1-9에 기재된 방법에 따라 단백질 밴드를 확인하였다. 그 결과, 도 5 및 도 6에 나타낸 바와 같이, IGF-1R 인산화 증가 작용이 IGF-1R 과발현 섬유아세포인 R+에서 뚜렷하게 나타남을 확인하였는바, 이로부터 NNK에 의한 IGF-1R 인산화의 증가가 구조적으로 유사한 IR이 아닌 IGF-1R에 대하여 선택적으로 나타남을 알 수 있었다.

[192]

[193] 실시예 3: 폐 상피세포에서 담배 발암원 NNK 유도 IGF-1R 신호전달 활성화 및 폐 상피세포 형질전환 유도 작용에 있어 IGF2 생성/분비 증가의 관련성 확인

[194] 먼저, 폐상피세포에 NNK (1 또는 10μM)를 처리한 후, IGF1 및 IGF2의 생성을 상기 실시예 1-11에 기재된 방법을 통해 비교하였다. 그 결과, 도 7에 나타낸 바와

같이, NNK 처리에 의하여 IGF2 생성이 증가됨을 확인하였다.

[195]

[196] 다음으로, 상기 결과를 바탕으로, 상기 실시예 1-7에 기재된 방법에 따라 IGF2 발현벡터를 도입하거나 siRNA 혹은 중화 항체를 도입하면서 IGF-1R 인산화 증가 여부를 확인하였다. 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, IGF2 발현벡터를 도입하였을 때 NNK에 의한 IGF-1R 인산화 증가 작용이 강화되는 반면 siRNA 혹은 중화 항체를 이용하여 IGF2의 발현을 억제하거나 분비된 IGF2를 소거하였을 경우 NNK에 의한 IGF-1R 인산화 증가 작용이 약화됨을 확인하였다. 상기 결과로부터, NNK에 의한 IGF-1R 인산화 증가 작용이 IGF2의 생성 혹은 분비 촉진에 의한 것임을 알 수 있었다.

[197]

[198] 다음으로, 실시예 1-22에 기재된 방법에 따라 IGF2 형질전환 마우스를 제작하고, 상기 IGF2 형질전환 마우스와 Wild type 마우스 각각에 NNK (3 μmol)를 처리한 뒤 폐 조직을 적출하여 상기 실시예 1-10에 기재된 방법을 통해 IGF-1R 인산화 증감을 확인하였다. 그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, wild type 마우스에 비하여 IGF2 형질전환 마우스에서 NNK 처리에 따른 IGF-1R 인산화가 증가됨을 확인하였다.

[199]

[200] 다음으로, 상기 실시예 1-8에 기재된 방법을 통해 구축된 IGF2 발현 저해 세포주를 이용하여 NNK 처리 또는 비처리에 따른 폐 상피세포의 생존 및 콜로니 생성 증감을 확인하였다. 그 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이, IGF2 발현 저하에 의하여 NNK가 유도하는 폐 상피세포의 생존 및 콜로니 생성 증가 작용이 억제됨을 확인하였다. 상기 결과로부터, NNK에 의한 폐 상피세포의 형질전환 (transformation)의 유도 작용에서 IGF2 및 이에 의한 IGF-1R 활성화가 관련된다는 것을 알 수 있었다.

[201]

[202] <u>실시예 4: 베타-아드레날린 수용체 차단제 및 칼슘이온 채널 차단제 등 고혈압 치료제의 NNK가 매개하는 IGF-1R 신호전달의 활성화 및 세포 형질전환 억제 작용 확인</u>

[203] 4-1. 베타-아드레날린 수용체 차단제의 NNK가 매개하는 IGF-1R 신호전달의 활성화 및 세포 형질전환 억제 작용 확인

[204] 먼저, 다양한 폐 상피세포(BEAS-2B, HBE/p53i 및 IGF-1R이 과발현된 R+ 세포)에 베타-아드레날린 수용체 효현제[에피네프린(Epinephrine), 이소프로테레놀(Isoproterenol), 도부타민(Dobutamine), 메타프로테레놀(Metaproterenol)]를 처리한 후, 상기 실시예 1-10에 기재된 방법을 통해 IGF-1R 인산화 증감을 확인하였다. 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이, 베타-아드레날린 수용체 효현제에 의하여 IGF-1R 인산화가 증가됨을 확인하였다.

[205]

[206] 다음으로, 폐 상피세포에(BEAS-2B) NNK (10μM)를 처리하고, 베타-아드레날린 수용체 차단제[프로프라놀올(propranolol), 아테놀롤(Atenolol), ICI-118,551] 처리에 따른 IGF-1R 활성화 변화를 상기 실시예 1-10에 기재된 방법을 통해 확인하였다. 그 결과, 도 12에 나타낸 바와 같이, 베타-아드레날린 수용체 차단제 처리에 의하여 NNK에 의한 IGF-1R 활성화가 차단됨을 확인하였다. 상기 결과로부터, 베타-아드레날린 수용체의 활성화가 NNK 매개 IGF-1R 활성화 유도와 관련됨을 알 수 있었다.

[207]

[208] 4-2. 칼슘이온 채널 차단제의 NNK가 매개하는 IGF-1R 신호전달의 활성화 및 세포 형질전환 억제 작용 확인

[209] 먼저, 세포(HBE/p53i)에 다양한 농도의 칼슘을 처리하거나 ionomycin 또는 thapsigargin을 처리하여 세포 내외부에서 칼슘의 세포질로의 유리를 시킨 후, IGF-1R 인산화 증감을 상기 실시예 1-10에 기재된 방법을 통해 확인하였다. 그 결과, 도 13에 나타낸 바와 같이, 세포 내 칼슘 농도를 증가시켰을 경우 IGF-1R 인산화가 증가됨을 확인하였다.

[210]

[211] 다음으로, 칼슘 킬레이터인 EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid) 또는 BAPTA-AM [1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester)]를 처리한 후 IGF-1R 인산화 증감을 상기 실시예 1-10에 기재된 방법을 통해 확인하였다. 그 결과, 도 14에 나타낸 바와 같이, 칼슘 킬레이터를 사용하여 세포 내외부에서 칼슘을 소거하였을 때 IGF-1R 인산화가 억제됨을 확인하였다. 또한, 칼슘이온 채널 차단제인 니페디핀(nifedipine)(50μM) 처리에 따른 암세포 성장 변화를 상기 실시예 1-3에 기재된 방법을 통해 확인하였다. 그 결과, 도 14에 나타낸 바와 같이, 니페디핀 처리에 따라 암세포 성장이 유의적으로 억제됨을 확인하였다.

[212]

[213] 다음으로, 상기 실시예 1-12에 기재된 방법을 따라 세포에 NNK 및/또는 베타-아드레날린 수용체 차단제와 칼슘이온 채널 차단제를 처리하고, 세포 내 칼슘 생성 변화를 확인하였다. 그 결과, 도 15에 나타낸 바와 같이, NNK에 의하여 세포 내 칼슘이 증가되고, 고혈압 치료제인 칼슘이온 채널 차단제 및 베타-아드레날린 수용체 차단제에 의하여 이러한 작용이 억제됨을 확인하였다.

[214]

[215] 다음으로, 세포(GFP-IGF2가 과발현되어 있는 BEAS-2B)에 NNK 및/또는 베타-아드레날린 수용체 차단제와 칼슘이온 채널 차단제를 처리하고, IGF2 분비 변화를 상기 실시예 1-10에 기재된 방법을 통해 확인하였다. 그 결과, 도 16에 나타낸 바와 같이, NNK에 의하여 IGF2 분비가 증가되고, 이러한 작용이 칼슘 킬레이터인 EGTA 또는 BAPTA-AM나 칼슘이온 채널 차단제 및

베타-아드레날린 수용체 차단제에 의하여 억제됨을 확인하였다.

[216]

[217] 다음으로, 세포(HBE/p53i)에 NNK 및/또는 다양한 칼슘이온 채널 차단제를 농도별로 처리하고, IGF-1R 활성화 변화를 상기 실시예 1-10에 기재된 방법을 통해 확인하였다. 그 결과, 도 17에 나타낸 바와 같이, 칼슘이온 채널 차단제에 의하여 NNK에 의한 IGF-1R 활성화가 억제됨을 확인하였다.

[218]

[219] 실시예 5: 베타-아드레날린 수용체 차단제 및 칼슘이온 채널 차단제 등 고혈압 치료제의 NNK의 의한 종양 형성 억제 작용 확인

[220] 먼저, 상기 실시예 1-4, 1-5 및 1-6에 기재된 방법을 통해 베타-아드레날린 수용체 차단제 및 칼슘이온 채널 차단제에 의하여 NNK가 유도하는 폐 상피세포의 생존, 콜로니 생성 및 foci 생성 증가 작용 변화를 확인하였다. 그 결과, 도 18 및 도 19에 나타낸 바와 같이, 베타-아드레날린 수용체 차단제 및 칼슘이온 채널 차단제에 의하여 NNK가 유도하는 폐 상피세포의 생존, 콜로니 생성 및 foci 생성 증가 작용이 억제됨을 확인하였는바, 상기 결과로부터, 베타-아드레날린 수용체 차단제 및 칼슘이온 채널 차단제가 NNK에 의한 폐 상피세포의 형질전환이 차단함을 알 수 있었다.

[221]

[222] 다음으로, 상기 실시예 1-17에 기재된 방법을 통해 폐암 발암 동물모델에서 고혈압 치료제(베타-아드레날린 수용체 차단제 및 칼슘이온 채널 차단제)의 종양 생성 억제효과를 확인하였다. 그 결과, 도 20 및 도 21에 나타낸 바와 같이, 고혈압 치료제(베타-아드레날린 수용체 차단제 및 칼슘이온 채널 차단제)에 의하여 NNK가 유도하는 종양 생성이 유의적으로 억제됨을 확인하였다.

[223]

[224] 실시예 6: 폐 상피세포에서 담배 유래 발암원에 의하여 angiotensinogen(AGT)의 발현 증가를 매개로 한 IGF-1R 신호전달의 활성화 확인

[225] 먼저, 담배 발암원을 6개월 동안 처리한 뒤 발생된 종양에서 유래된 폐암 전구단계의 폐상피세포 (1198) 및 악성화된 폐상피세포 (1170)와 NNK를 120일 동안 처리한 폐상피세포에서 안지오텐신의 전구체인 AGT의 발현 변화를 상기 실시예 1-10에 기재된 방법을 통해 확인하였다. 그 결과, 도 22에 나타낸 바와 같이, 담배 발암원인 NNK 처리에 의해 AGT의 발현이 증가되어 있음을 확인하였다.

[226]

[227] 다음으로, NNK 처리 시간 및 농도에 따른 AGT의 발현 또는 분비 변화를 상기 실시예 1-10에 기재된 방법을 통해 확인하였다. 그 결과, 도 23 및 도 24에 나타낸 바와 같이, NNK 처리 시간 및 농도가 증가함에 따라 AGT의 발현 또는 분비가 증가되고, AGT의 프로모터가 활성화됨을 확인하였다.

[228]

[229] 다음으로, 폐 상피세포(BEAS-2B)에 안지오텐신을 처리하고 상기 실시예 1-10에 기재된 방법을 통해 IGF-1R 및 그 하위 신호전달 활성화 변화를 확인하였다. 그 결과, 도 25에 나타낸 바와 같이, 안지오텐신에 의하여 처리 농도 및 시간 의존적으로 IGF-1R 및 그 하위 신호전달인 Akt 및 ERK가 활성화됨을 확인하였다.

[230]

[231] 실시예 7: 고혈압 치료제로 이용되는 안지오텐신 전환 효소 억제제 및 안지오텐신 수용체 길항제의 NNK가 매개하는 IGF-1R 신호전달의 활성화, 세포 형질전환 및 폐암 발암 억제 작용 확인

[232] 먼저, 안지오텐신 수용체의 발현의 저해에 따른 IGF-1R의 활성화 변화를 확인하기 위해, NNK가 처리된 세포(BEAS-2B)에 siRNA를 이용하여 안지오텐신 수용체의 발현을 저해시키고 상기 실시예 1-10에 기재된 방법을 통해 IGF-1R의 활성화 변화를 확인하였다. 그 결과, 도 26에 나타낸 바와 같이, 안지오텐신 수용체의 발현을 저해하였을 때 NNK에 의한 IGF-1R의 활성화가 저해됨을 확인하였다.

[233]

[234] 다음으로, NNK가 처리된 세포(BEAS-2B)에 안지오텐신 전환 효소 억제제인 캅토프릴(captopril) 및 안지오텐신 수용체 길항제인 로사르탄(losartan)을 처리하고, 상기 실시예 1-10에 기재된 방법을 통해 IGF-1R의 활성화 변화를 확인하였다. 그 결과, 도 27에 나타낸 바와 같이, 안지오텐신 전환 효소 억제제(캅토프릴) 및 안지오텐신 수용체 길항제(로사르탄)의 처리에 의하여 NNK에 의한 IGF-1R 활성화가 억제됨을 확인하였다.

[235]

[236] 다음으로, 상기 실시예 1-4, 1-5 및 1-6에 기재된 방법을 통해 안지오텐신 전환 효소 억제제(캅토프릴) 및 안지오텐신 수용체 길항제(로사르탄)를 처리하거나 shRNA transfection을 통해 안지오텐신 수용체의 발현을 저해하고, NNK에 의한 세포 생존, 콜로니 생성 및 foci 생성 촉진작용 변화를 확인하였다. 그 결과, 도 28 및 도 29에 나타낸 바와 같이, 안지오텐신 전환 효소 억제제(캅토프릴)나 안지오텐신 수용체 길항제(로사르탄)를 처리하거나 안지오텐신 수용체의 발현을 저해하였을 때 NNK에 의한 세포 생존, 콜로니 생성 및 foci 생성 촉진 작용이 저해됨을 확인하였다.

[237]

[238] 다음으로, 상기 실시예 1-17에 기재된 방법을 통해 폐암 발암 동물모델에서 안지오텐신 전환 효소 억제제(캅토프릴)나 안지오텐신 수용체 길항제(로사르탄)의 종양 생성 억제효과를 확인하였다. 그 결과, 도 30에 나타낸 바와 같이, 고혈압 치료제(안지오텐신 전환 효소 억제제 및 안지오텐신 수용체 길항제)에 의하여 NNK가 유도하는 종양 생성이 유의적으로 억제됨을 확인하였다.

[239]

[240] 실시예 8: 스트레스 및 스트레스 매개인자에 의한 세포 형질전환 촉진, 발암원 유도 종양 생성 촉진 및 IGF-1R 신호전달의 활성화 확인

[241] 먼저, 상기 실시예 1-16에 기재된 방법을 통해 스트레스에 의한 폐암 발암 모델에서 스트레스 노출에 의한 직접적인 발암 증가 및 스트레스에 의한 우레탄 유도 발암 촉진 여부를 평가하였다. 그 결과, 도 31에 나타낸 바와 같이, 우레탄이 개시한 폐암 발암 작용이 유의적으로 증가됨을 확인하였다. 또한, 스트레스 호르몬인 NE의 혈중 농도를 확인한 결과, 도 32에 나타낸 바와 같이, 스트레스 노출에 의하여 스트레스 호르몬인 NE의 혈중 농도가 증가되며, NE의 지속적인 노출에 의해서도 동일하게 우레탄이 개시한 폐암 발암 작용이 유의적으로 증가됨을 확인하였다.

[242]

[243] 다음으로, 폐 상피세포(BEAS-2B, HBE/p53i, NHBE 및 HB56B)에 NE를 시간 또는 농도별로 처리하고, 상기 실시예 1-10에 기재된 방법을 통해 IGF-1R의 인산화 증감을 확인하였다. 그 결과, 도 33에 나타낸 바와 같이, NE 처리에 따라 IGF-1R의 인산화가 증가됨을 확인하였다. 또한, 상기 실시예 1-16에 기재된 방법을 통해 스트레스에 노출된 마우스 폐 조직에서 IGF-1R의 인산화 증감을 상기 실시예 1-18에 기재된 방법을 통해 확인하였다. 그 결과, 도 33에 나타낸 바와 같이, 스트레스에 노출된 마우스 폐 조직에서도 IGF-1R의 인산화가 증가됨을 확인하였다.

[244]

[245] 다음으로, 상기 실시예 1-4, 1-5 및 1-6에 기재된 방법을 통해 NE 처리에 의한 폐 상피세포의 형질전환 변화를 확인하였다. 그 결과, 도 34에 나타낸 바와 같이, NE에 의하여 폐 상피세포의 형질전환 즉 생존, 콜로니 생성 및 foci 생성 증가 작용이 유의적으로 증가됨을 확인하였다.

[246]

[247] 다음으로, NE와 유사한 스트레스 호르몬인 에피네프린 (epinephrine; Epi) 또는 코르티솔 (cortisol; Cor) 처리에 의해서도 폐 상피세포의 형질전환이 유도되는지를 확인하였다. 그 결과, 도 35에 나타낸 바와 같이, 에피네프린에 의해서는 폐 상피세포의 형질전환이 유도되는 반면, 코르티솔에 의해서는 그러한 작용이 유도되지 않음을 확인하였다.

[248]

[249] 다음으로, NE를 처리한 폐 상피세포에 IGF-1R 억제제인 린시티닙(linsitinib; Linsi)을 처리하고 폐 상피세포의 형질전환 변화를 확인하였다. 그 결과, 도 36에 나타낸 바와 같이, NE에 의하여 유도된 폐 상피세포의 생존 및 콜로니 생성 증가 작용이 린시티닙에 의하여 유의적으로 억제됨을 확인하였다. 상기 결과로부터, NE에 의한 폐 상피세포 형질전환 유도 작용에서 IGF-1R의 활성화가 관련됨을 알 수 있었다.

[250]

[251] 다음으로, 폐 상피세포에 NE를 처리하고 IGF2의 분비 변화를 확인하였다. 그 결과, 도 37에 나타낸 바와 같이, NE에 처리에 의하여 IGF2 분비가 증가됨을 확인하였다.

[252]

[253] 다음으로, 상기 실시예 1-7에 기재된 방법에 따라 siRNA 혹은 중화 항체를 이용하여 IGF2의 발현을 억제하거나 분비된 IGF2를 소거하면서 IGF-1R 인산화 증가 여부를 확인하였다. 그 결과, 도 38에 나타낸 바와 같이, IGF2의 발현을 억제하거나 분비된 IGF2를 소거하였을 경우, NE에 의한 IGF-1R 인산화 증가 작용이 억제됨을 확인하였다.

[254]

[255] 다음으로, IGF2 발현 저하된 세포에서의 NE 처리에 의한 폐 상피세포의 형질전환 변화를 확인하였다. 그 결과, 도 39에 나타낸 바와 같이, IGF2 발현 저하에 의하여 NE가 유도하는 폐 상피세포의 생존 및 콜로니 생성 증가 작용이 억제됨을 확인하였다. 한편, IGF2의 기본 발현이 높은 폐 상피세포에서는 NE에 의한 IGF-1R 인산화 및 폐 상피세포의 형질전환이 뚜렷하게 증가됨을 확인하였다. 상기 결과로부터, NE에 의한 폐 상피세포의 형질전환 유도 작용에서 IGF2 및 이에 의한 IGF-1R 활성화가 관련됨을 알 수 있었다.

[256]

[257] 다음으로, 실시예 1-24에 기재된 방법에 따라 폐 선택적으로 IGF-1R이 과발현되는 IGF-1R 형질전환 마우스를 제작하고 상기 형질전환 마우스와 Wild type 마우스 각각에 스트레스를 노출시키거나 또는 NE를 지속적으로 노출시킨 후, IGF-1R의 인산화 증감 및 폐암 생성 여부를 확인하였다. 그 결과, 도 40 및 도 41에 나타낸 바와 같이, wild type 마우스보다 형질전환 마우스에서 스트레스 또는 NE의 노출에 의하여 IGF-1R의 인산화가 증가되고 폐암 생성 촉진 작용이 유의적으로 강화됨을 확인하였다.

[258]

[259] <u>실시예 9: 칼슘이온 채널 차단제 및 베타-아드레날린 수용체 차단제에 의한 NE가 매개하는 IGF-1R 신호전달의 활성화, 세포 형질전환 및 폐암 발암 억제 작용 확인</u>

[260] 먼저, NE를 처리한 폐 상피세포에 베타-아드레날린 수용체 차단제, 칼슘길항제(EGTA 및 BAPTA) 및 칼슘이온 채널 차단제(니페디핀 및 암로디핀)를 처리하고 IGF-1R 활성화 및 IGF2 분비 변화를 확인하였다. 그 결과, 도 42 내지 도 44에 나타낸 바와 같이, 베타-아드레날린 수용체 차단제, 칼슘길항제 및 칼슘이온 채널 차단제에 의하여 NE에 의한 IGF-1R 활성화 및 IGF2 분비가 억제됨을 확인하였다.

[261]

[262] 다음으로, 상기 실시예 1-20에 기재된 방법을 통해 스트레스에 노출된 마우스

폐 중에서 베타-아드레날린 수용체 차단제 및 칼슘이온 채널 차단제 처리에 따른 IGF2 분비 변화를 확인하였다. 그 결과, 도 45에 나타낸 바와 같이, 스트레스에 노출된 마우스 폐 중에서 IGF2 분비가 증가되며, 베타-아드레날린 수용체 차단제 및 칼슘이온 채널 차단제에 의하여 IGF2 분비가 억제됨을 확인하였다.

[263]

[264] 다음으로, NE가 처리된 폐 상피세포에서 베타-아드레날린 수용체 차단제 및 칼슘이온 채널 차단제를 처리하여 NE 처리에 의한 폐 상피세포의 형질전환 변화를 확인하였다. 그 결과, 도 46 및 도 47에 나타낸 바와 같이, 베타-아드레날린 수용체 차단제 및 칼슘이온 채널 차단제에 의하여 NE가 유도하는 폐 상피세포의 생존 및 콜로니 생성 증가 작용이 억제됨을 확인하였다.

[265]

[266] 다음으로, NE 유도 폐암 발암 동물모델에서 베타-아드레날린 수용체 차단제 및 칼슘이온 채널 차단제 처리에 따른 종양 생성 억제효과를 확인하였다. 그 결과, 도 48에 나타낸 바와 같이, 고혈압 치료제(베타-아드레날린 수용체 차단제 및 칼슘이온 채널 차단제)에 의하여 NE가 유도하는 종양 생성이 유의적으로 억제됨을 확인하였다.

[267]

[268] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

청구범위

[청구항 1] 고혈압 치료제인 베타-아드레날린 수용체 차단제, 칼슘이온 채널 차단제, 안지오텐신 전환 효소 억제제 및 안지오텐신 수용체 길항제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 유효성분으로 포함하는, 폐암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 폐암은 흡연 또는 스트레스에 의하여 유도되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 베타-아드레날린 수용체 차단제는 아세부톨롤(Acebutolol), 아테놀롤(Atenolol), 베탁소롤(Betaxolol), 비소프롤롤(Bisoprolol), 카르테올롤(Carteolol), 칼베디롤(Carvedilol), 셀리프롤롤(Celiprolol), 에스몰롤(Esmolol), 라베타롤(Labetalol), 메토프롤롤(Metoprolol), 나돌롤(Nadolol), 펜부토롤(Penbutolol), 핀돌롤(Pindolol), 프로프라놀롤(propranolol) 및 티몰롤(Timolol)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 칼슘이온 채널 차단제는 암로디핀(Amlodipine), 바니디핀(Barnidipine), 베니디핀(Benidipine), 실니디핀(Cilnidipine), 에포니디핀(Efonidipine), 펠로디핀(Felodipine), 이스라디핀(Isradipine), 라시디핀(Lacidipine), 레르카니디핀(Lercanidipine), 마니디핀(Manidipine), 니카르디핀(Nicardipine), 니페디핀(Nifedipine), 닐바디핀(Nilvadipine), 니모디핀(Nimodipine), 니솔디핀(Nisoldipine), 니트레디핀(Nitrendipine), 베라파밀(Verapamil) 및 딜티아젬(Diltiazem)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 안지오텐신 전환 효소 억제제는 알라세프릴(Alacepril), 베나제프릴(Benazepril), 캅토프릴(Captopril), 실라자프릴(Cilazapril), 델라프릴(Delapril), 에날라프릴(Enalapril), 포시노프릴(Fosinopril), 이미다프릴(Imidapril), 리시노프릴(Lisinopril), 모엑시프릴(Moexipril), 페린도프릴(Perindopril), 퀴나프릴(Quinapril), 라미프릴(Ramipril), 테모카프릴(Temocapril) 및 조페노프릴(Zofenopril)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 안지오텐신 수용체 길항제는 칸데사르탄(Candesartan), 에프로사르탄(Eprosartan), 피마살탄(Fimasartan), 이르베사르탄(Irbesartan), 로사르탄(Losartan), 올메사르탄(Olmesartan), 발사르탄(Valsartan) 및 텔미사르탄(Telmisartan)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 인슐린유사성장인자 2의 생성 또는 분비를 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

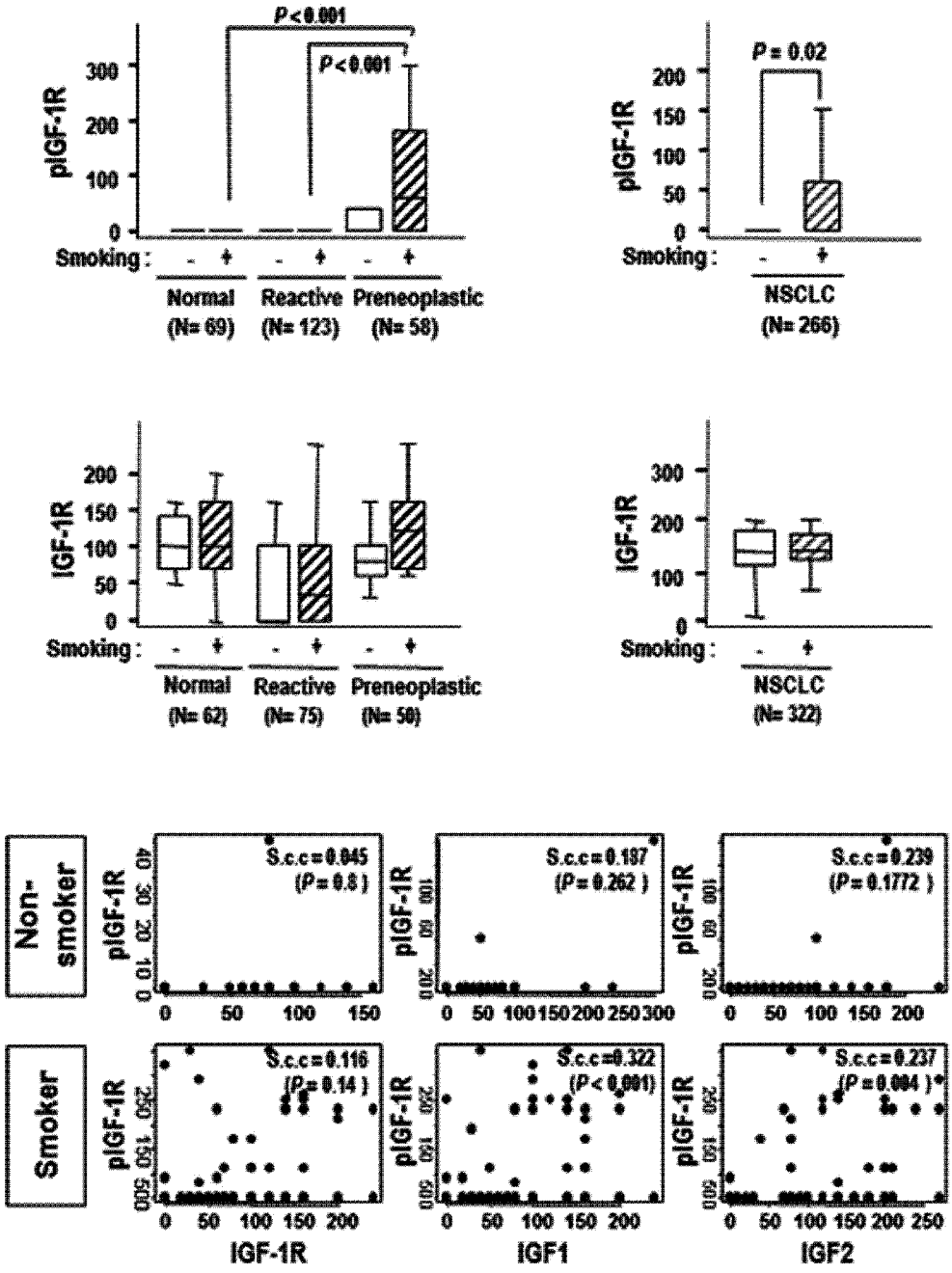
[청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 인슐린유사성장인자 수용체 신호전달의

활성화를 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

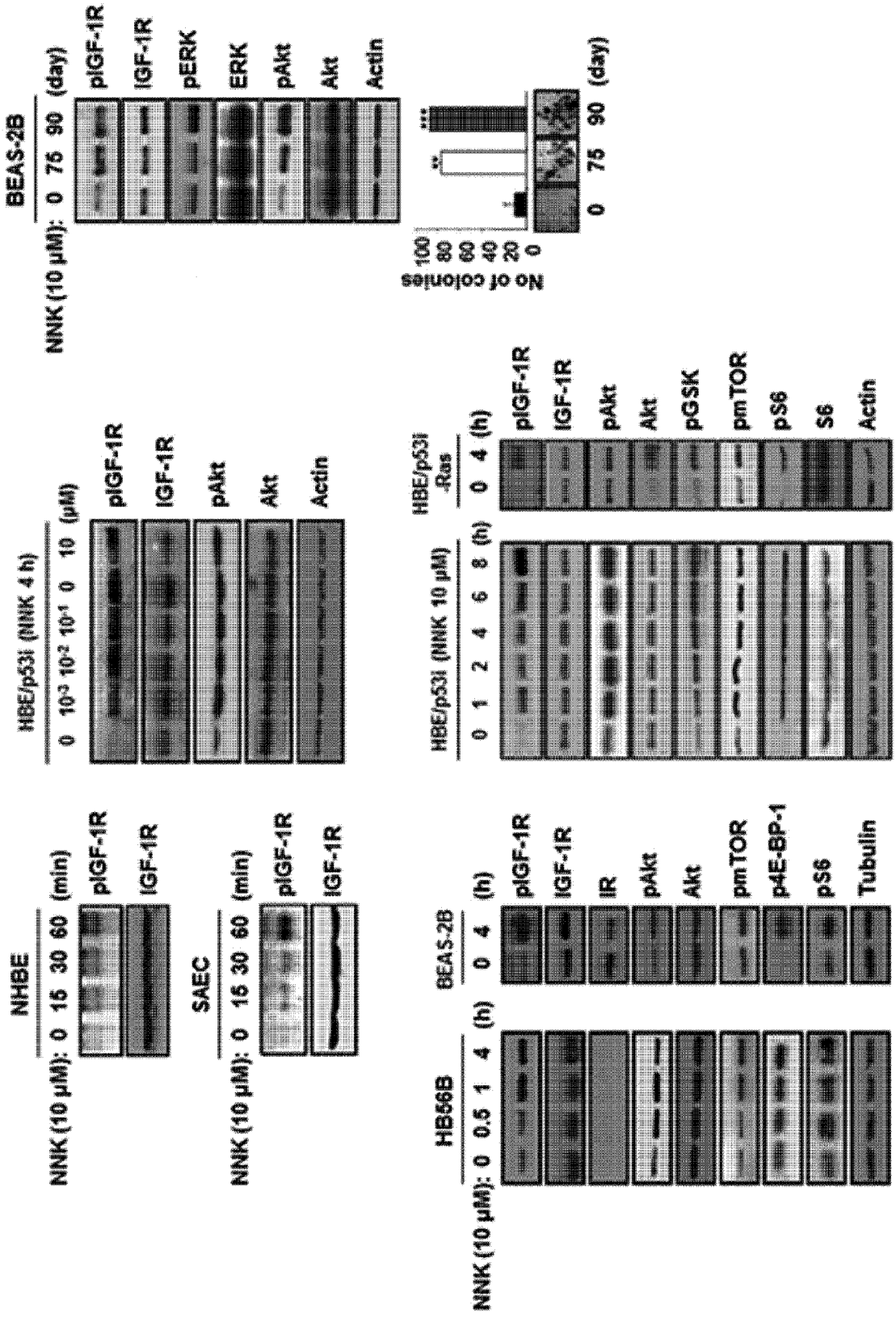
[청구항 9] 고혈압 치료제인 베타-아드레날린 수용체 차단제, 칼슘이온 채널 차단제, 안지오텐신 전환 효소 억제제 및 안지오텐신 수용체 길항제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 폐암 예방 또는 치료방법.

[청구항 10] 고혈압 치료제인 베타-아드레날린 수용체 차단제, 칼슘이온 채널 차단제, 안지오텐신 전환 효소 억제제 및 안지오텐신 수용체 길항제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의, 폐암 예방 또는 치료용도.

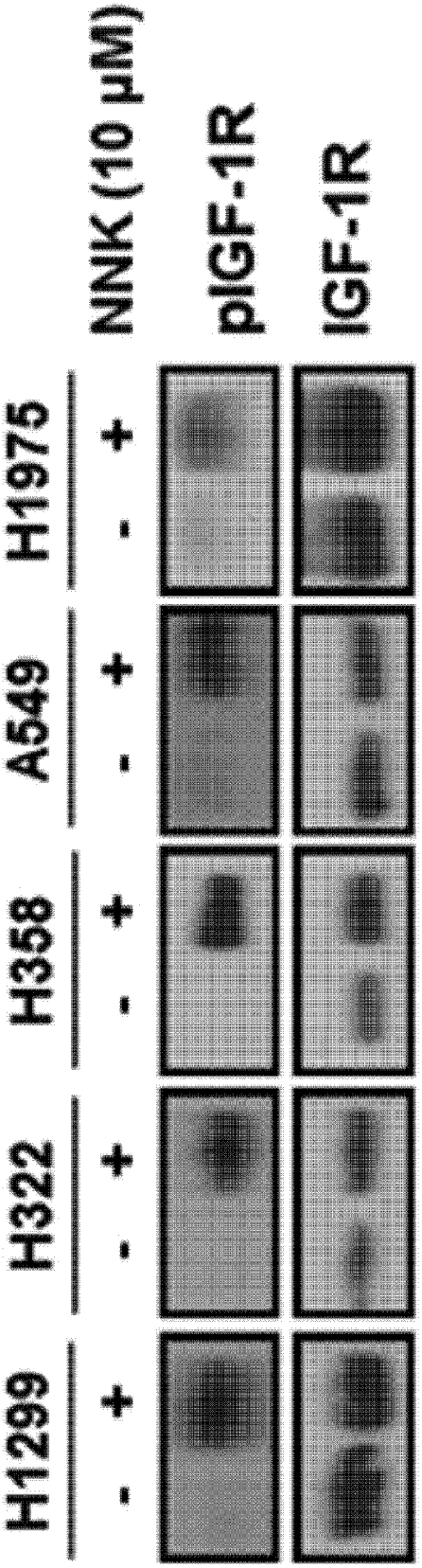
[도1]


P<0.001
P<0.001
pIGF-1R
Smoking : - + - + - +
Normal (N= 69)
Reactive (N= 123)
Preneoplastic (N= 58)
P = 0.02
NSCLC (N= 266)
IGF-1R
Normal (N= 62)
Reactive (N= 75)
Preneoplastic (N= 58)
NSCLC (N= 322)
Non-smoker
Smoker
S.c.c=0.045 (P= 0.8)
S.c.c=0.187 (P= 0.262)
S.c.c=0.239 (P= 0.1772)
S.c.c=0.116 (P= 0.14)
S.c.c=0.322 (P< 0.001)
S.c.c=0.237 (P= 0.004)
IGF-1R
IGF1
IGF2

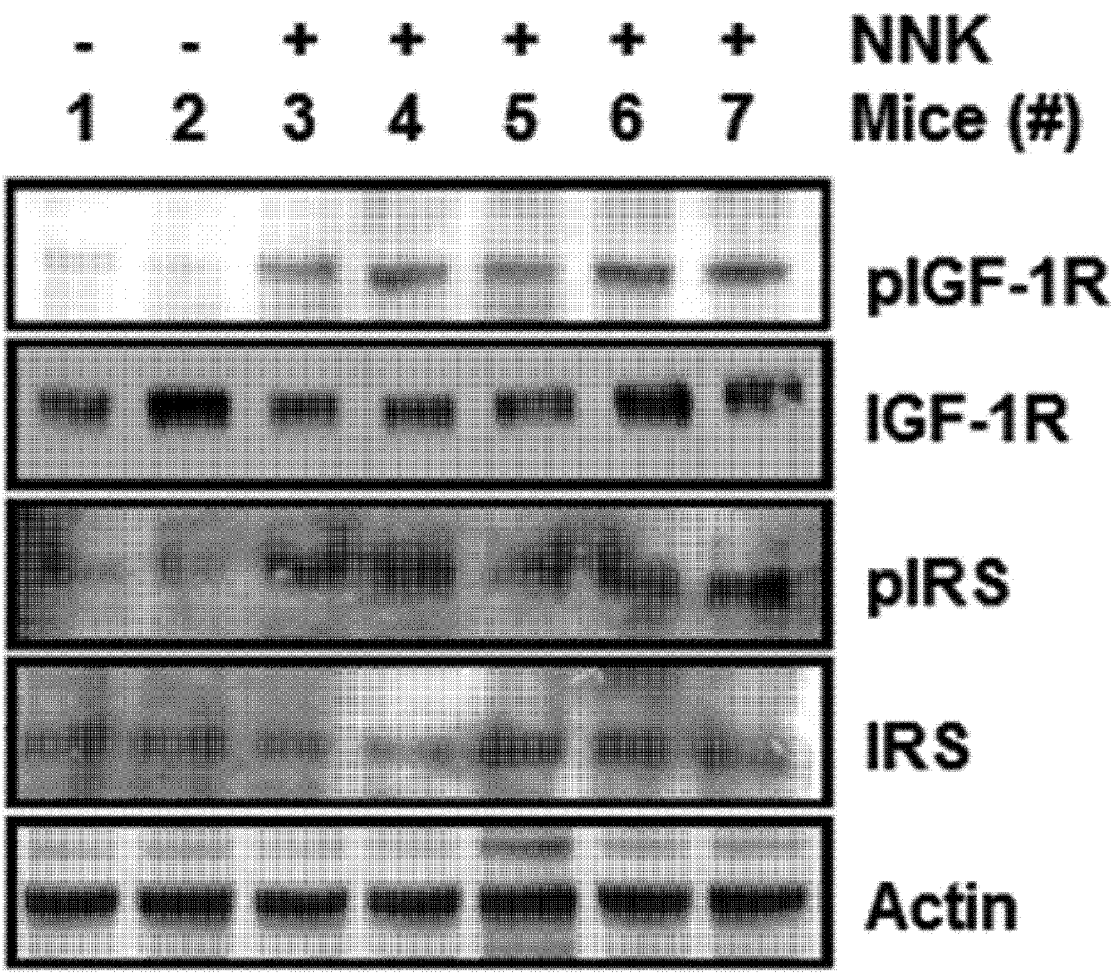
[도2]


BEAS-2B
NNK (10 μM): 0 75 90 (day)
pIGF-1R
IGF-1R
pERK
ERK
pAkt
Akt
Actin
No of colonies
100
80
60
40
20
0
0 75 90 (day)
HBE/p53i (NNK 4 h)
0 10-3 10-2 10-1 0 10 (μM)
pIGF-1R
IGF-1R
pAkt
Akt
Actin
HBE/p53i (NNK 10 μM)
0 1 2 4 6 8 (h)
HBE/p53i -Ras
0 4 (h)
pIGF-1R
IGF-1R
pAkt
Akt
pGSK
pmTOR
pS6
S6
Actin
NHBE
NNK (10 μM): 0 15 30 60 (min)
pIGF-1R
IGF-1R
SAEC
NNK (10 μM): 0 15 30 60 (min)
pIGF-1R
IGF-1R
HB56B
NNK (10 μM): 0 0.5 1 4 (h)
BEAS-2B
0 4 (h)
pIGF-1R
IGF-1R
IR
pAkt
Akt
pmTOR
p4E-BP-1
pS6
Tubulin

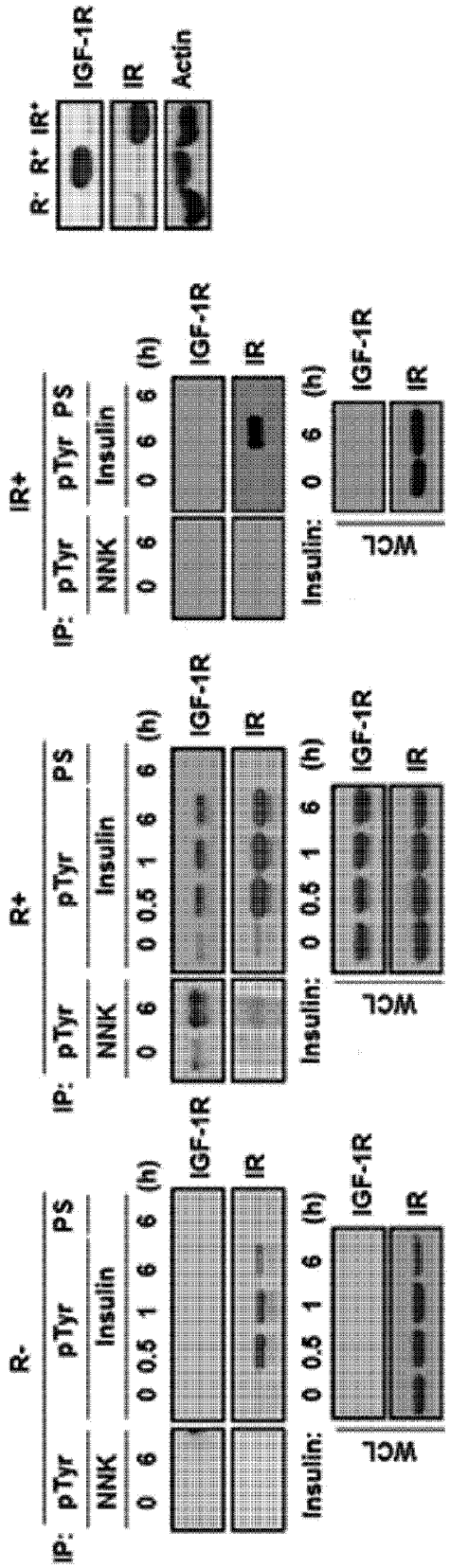
[도3]



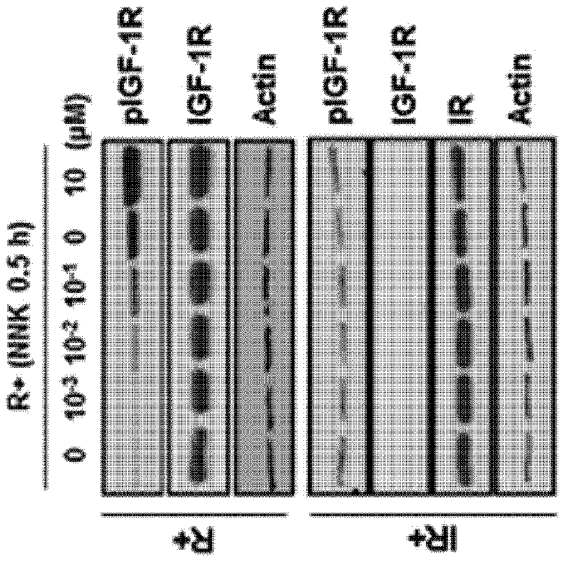
[도4]

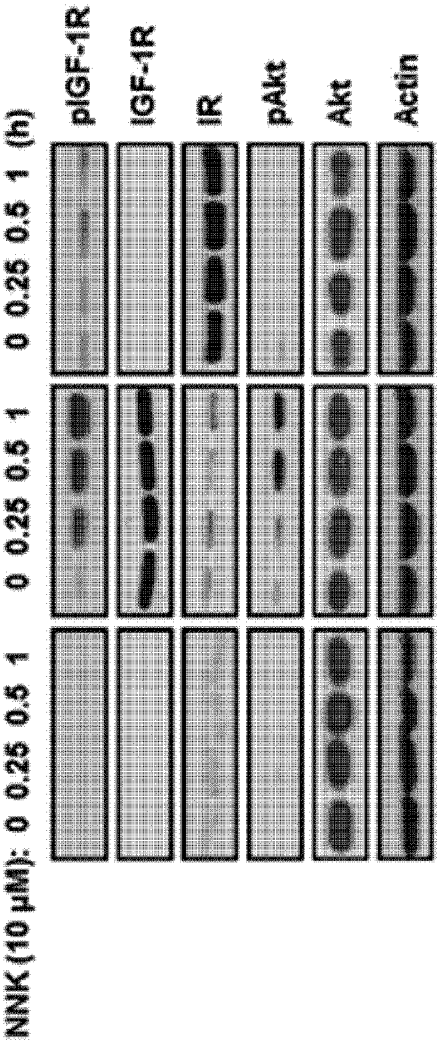


[도5]

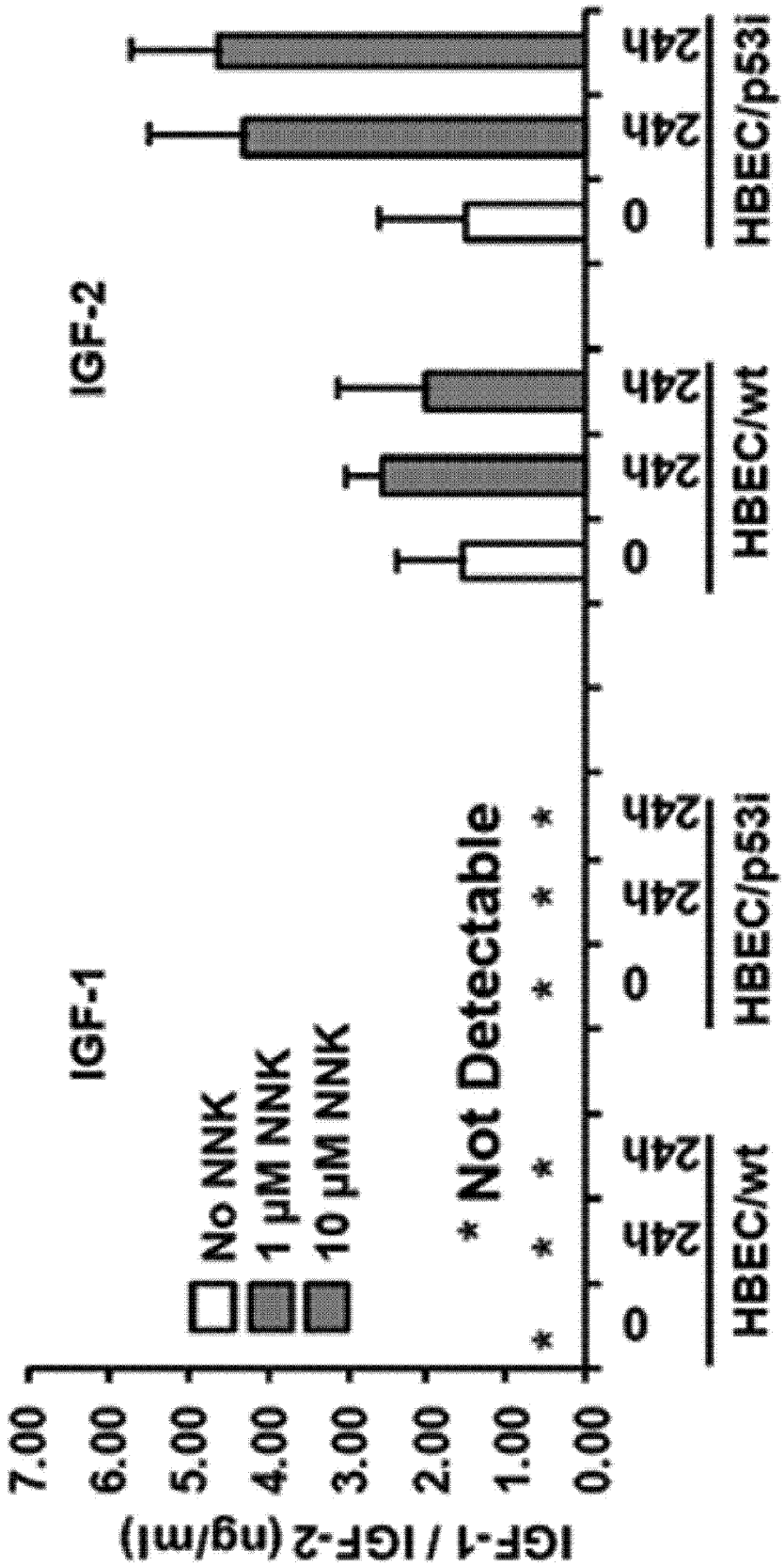

R- R+ IR+
IGF-1R
IR
Actin
R-
IP: pTyr pTyr PS
NNK Insulin
0 6 0 0.5 1 6 6 (h)
IGF-1R
IR
Insulin: 0 0.5 1 6 (h)
WCL
R+
IP: pTyr pTyr PS
NNK Insulin
0 6 0 0.5 1 6 6 (h)
IGF-1R
IR
Insulin: 0 0.5 1 6 (h)
WCL
IR+
IP: pTyr pTyr PS
NNK Insulin
0 6 0 6 6 (h)
IGF-1R
IR
Insulin: 0 6 (h)
WCL

[도6]

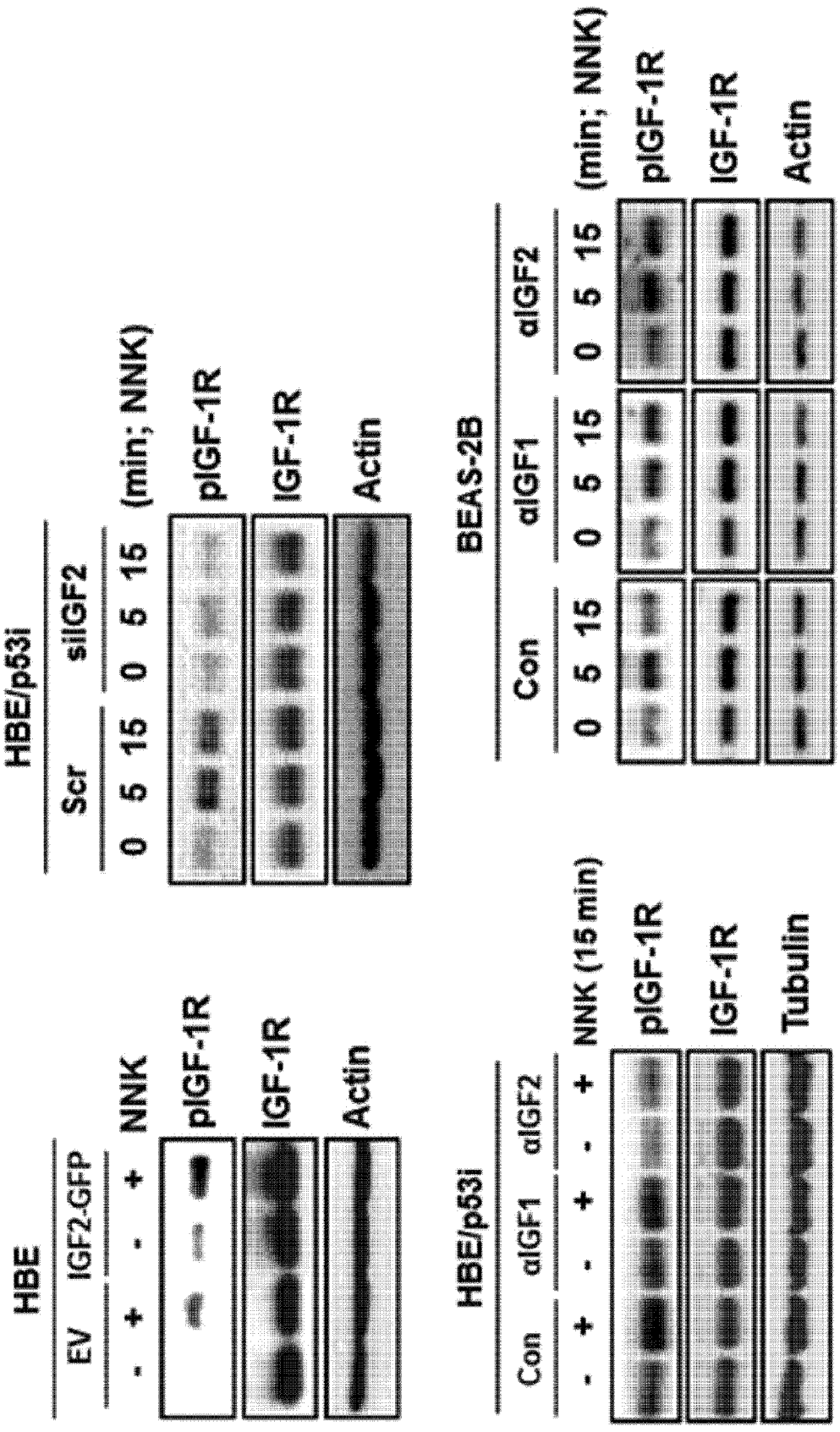

R+ (NNK 0.5 h)
0 10-3 10-2 10-1 0 10 (μM)
pIGF-1R
IGF-1R
Actin
pIGF-1R
IGF-1R
IR
Actin
R+
IR+


NNK (10 μM): 0 0.25 0.5 1
R-
0 0.25 0.5 1
R+
0 0.25 0.5 1 (h)
IR+
pIGF-1R
IGF-1R
IR
pAkt
Akt
Actin

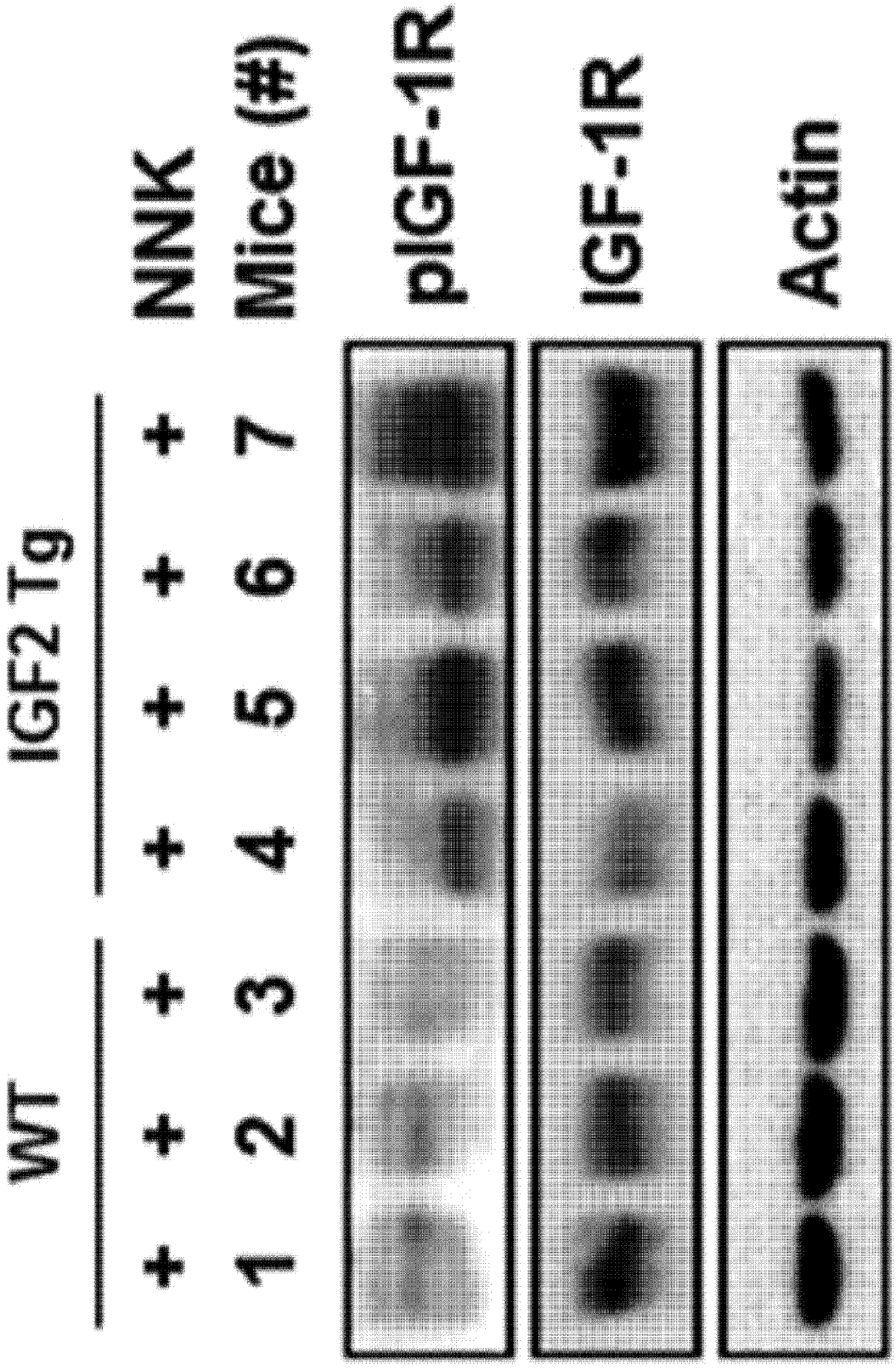
[도7]


IGF-1 / IGF-2 (ng/ml)
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
IGF-1
IGF-2
No NNK
1 μM NNK
10 μM NNK
* Not Detectable
0
24h
HBEC/wt
HBEC/p53i

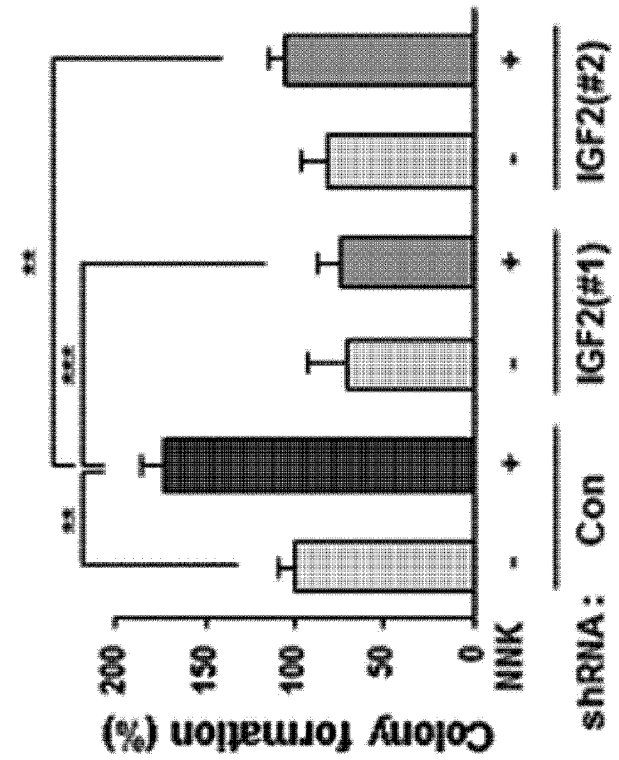
[도8]

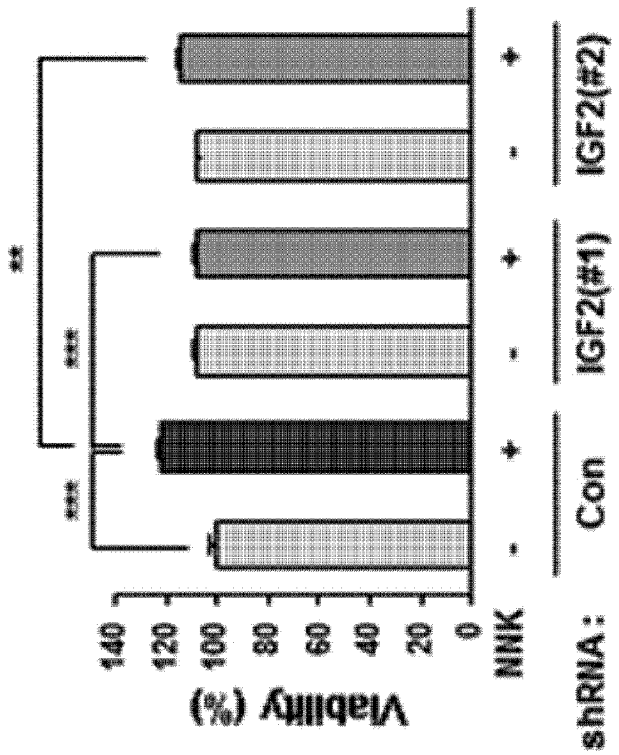

HBE
EV IGF2-GFP
- + - + NNK
pIGF-1R
IGF-1R
Actin
HBE/p53i
Scr siIGF2
0 5 15 0 5 15 (min; NNK)
pIGF-1R
IGF-1R
Actin
HBE/p53i
Con αIGF1 αIGF2
- + - + - + NNK (15 min)
pIGF-1R
IGF-1R
Tubulin
BEAS-2B
Con αIGF1 αIGF2
0 5 15 0 5 15 0 5 15 (min; NNK)
pIGF-1R
IGF-1R
Actin

[도9]

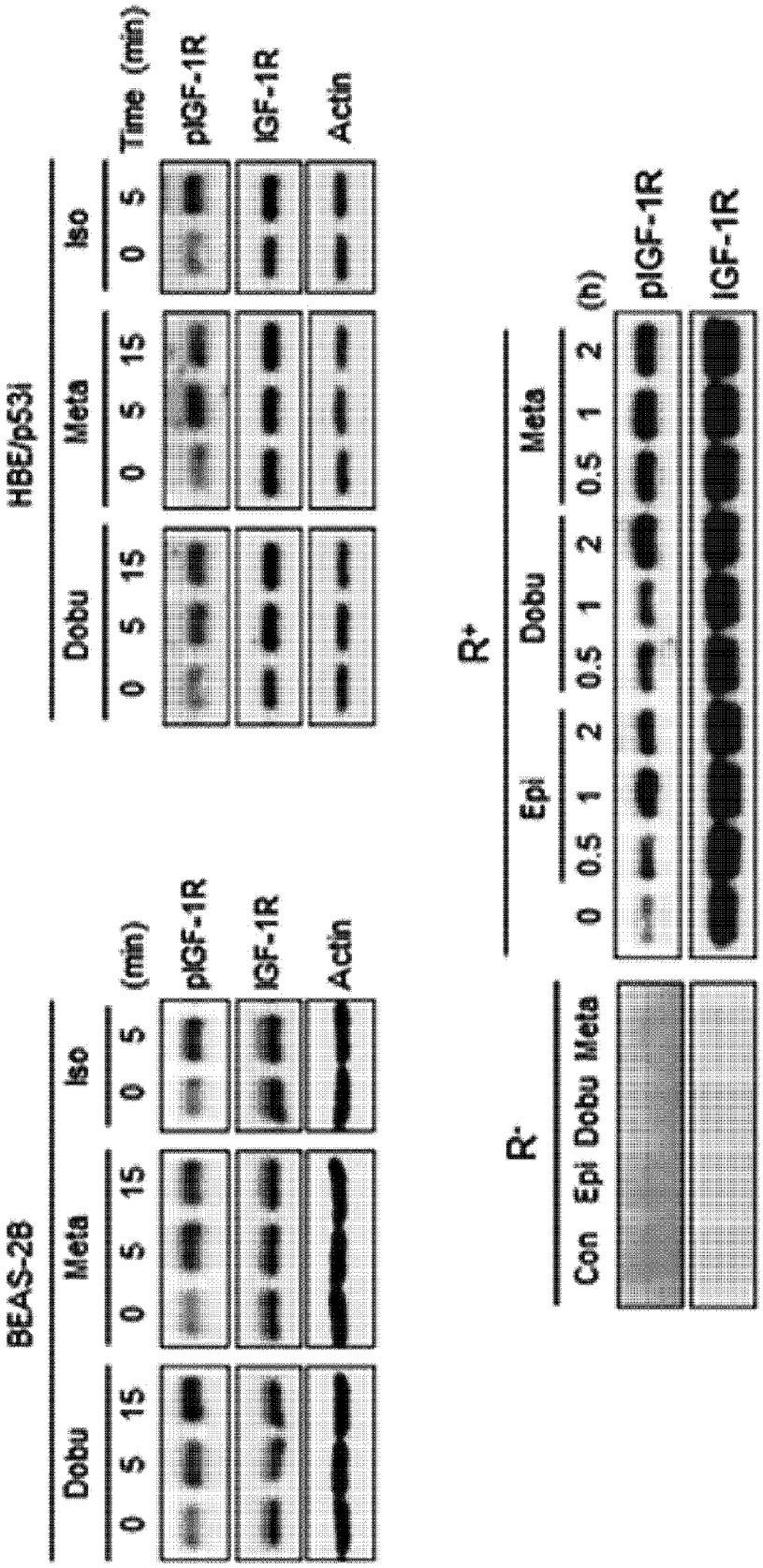


[도10]

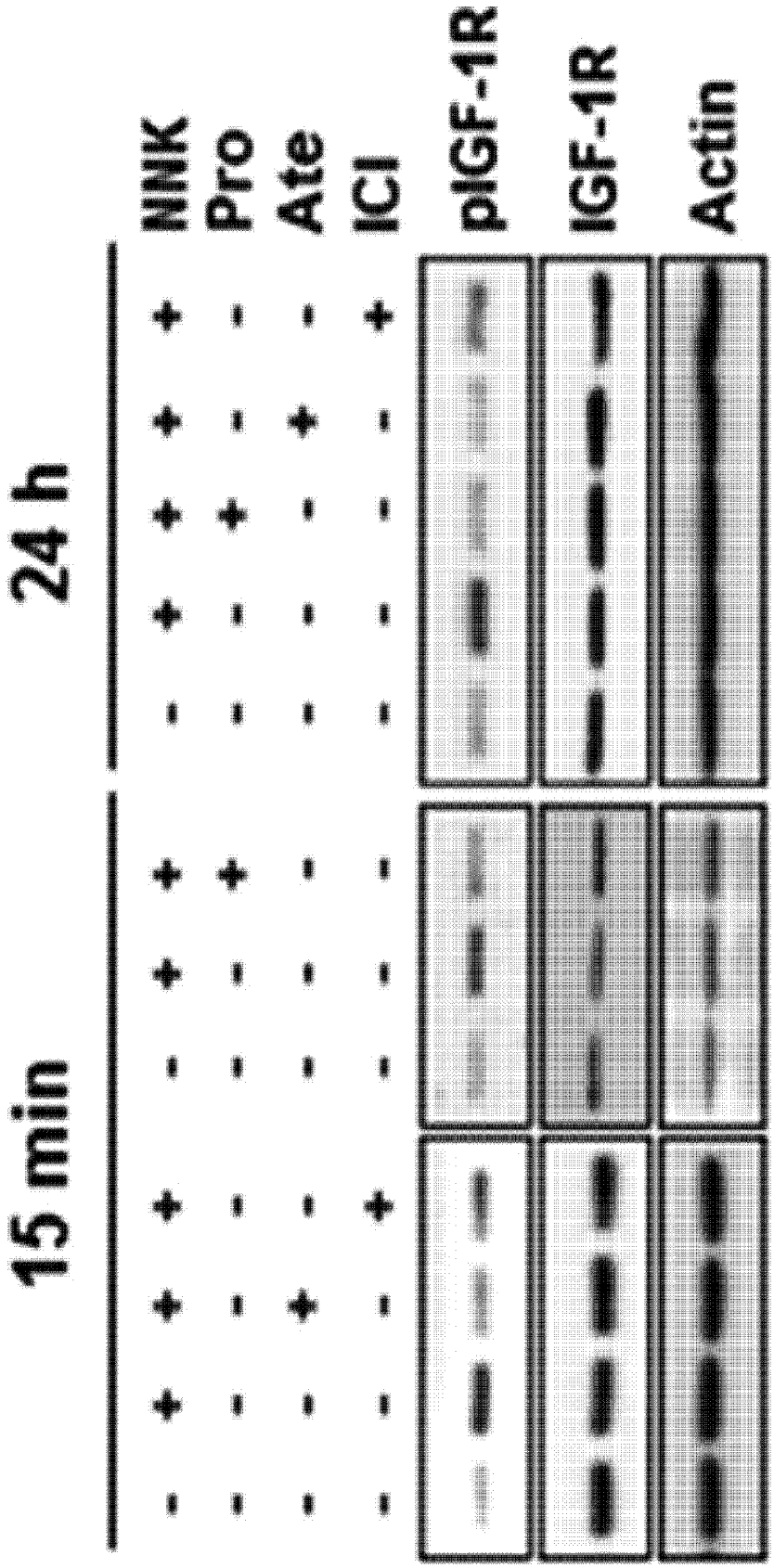

Colony formation (%)
200
150
100
50
0
NINK
-
+
-
+
-
+
shRNA : Con IGF2(#1) IGF2(#2)
**
***
**


Viability (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
NINK
-
+
-
+
-
+
shRNA : Con IGF2(#1) IGF2(#2)
***
***
**

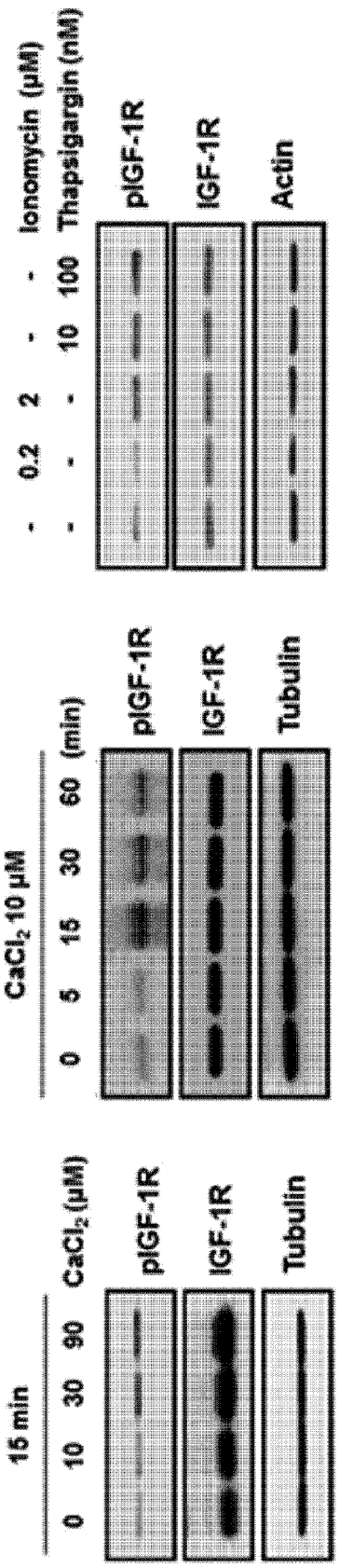
[도11]


HBE/p53i
Dobu
Meta
Iso
0 5 15 0 5 15 0 5
Time (min)
pIGF-1R
IGF-1R
Actin
BEAS-2B
Dobu
Meta
Iso
0 5 15 0 5 15 0 5
(min)
pIGF-1R
IGF-1R
Actin
R+
Epi
Dobu
Meta
0 0.5 1 2 0.5 1 2 0.5 1 2
(h)
pIGF-1R
IGF-1R
R-
Con Epi Dobu Meta

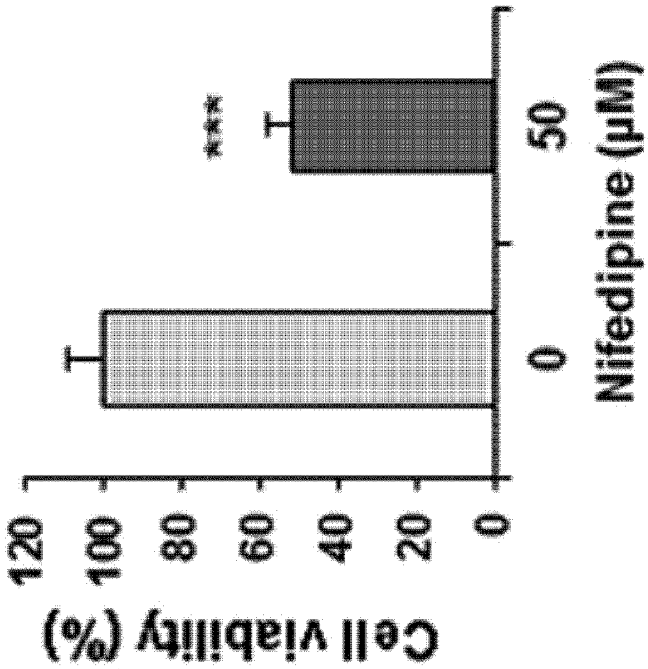
[도12]

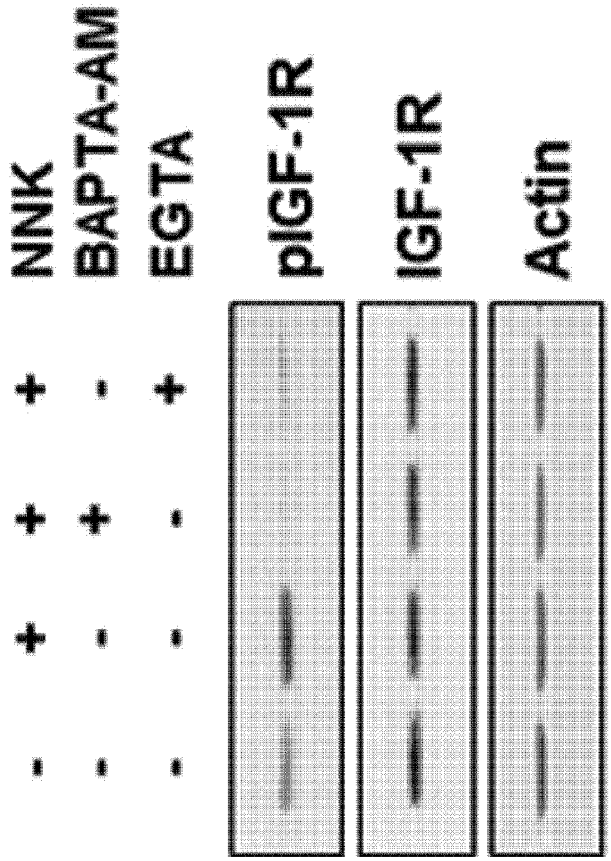


[도13]

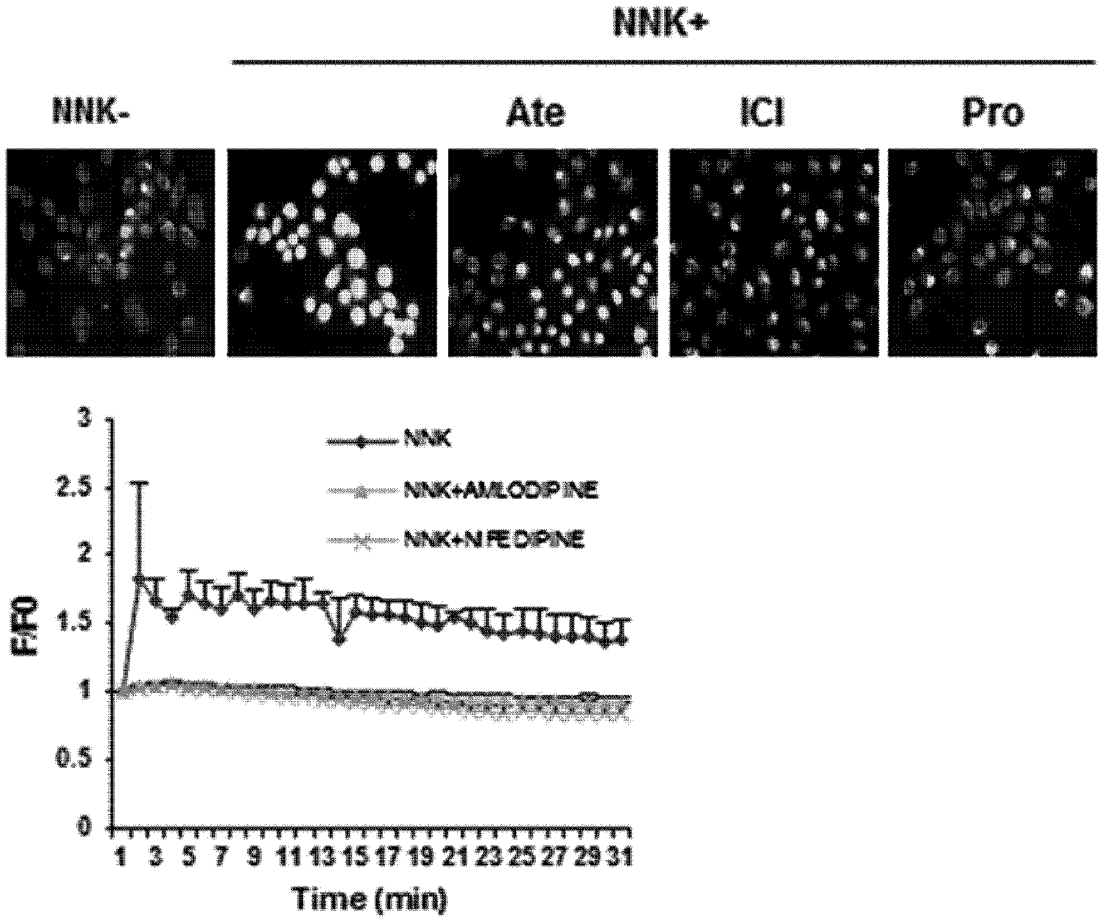

15 min
0 10 30 90
CaCl2 (μM)
pIGF-1R
IGF-1R
Tubulin
CaCl2 10 μM
0 5 15 30 60 (min)
pIGF-1R
IGF-1R
Tubulin
- 0.2 2 - - - Ionomycin (μM)
- - - - 10 100 Thapsigargin (nM)
pIGF-1R
IGF-1R
Actin

[도14]

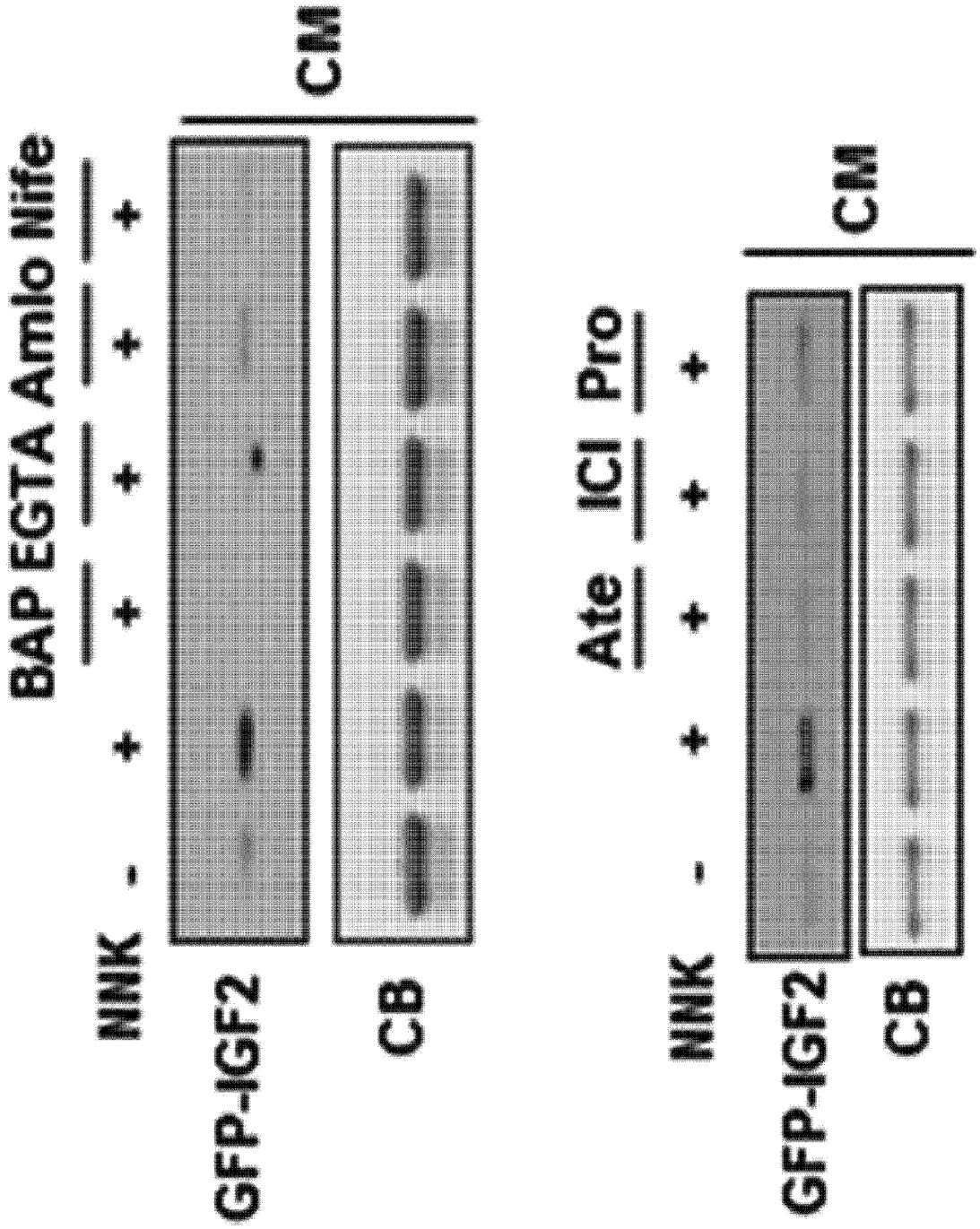

Cell viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
50
Nifedipine (μM)


NNK
BAPTA-AM
EGTA
pIGF-1R
IGF-1R
Actin

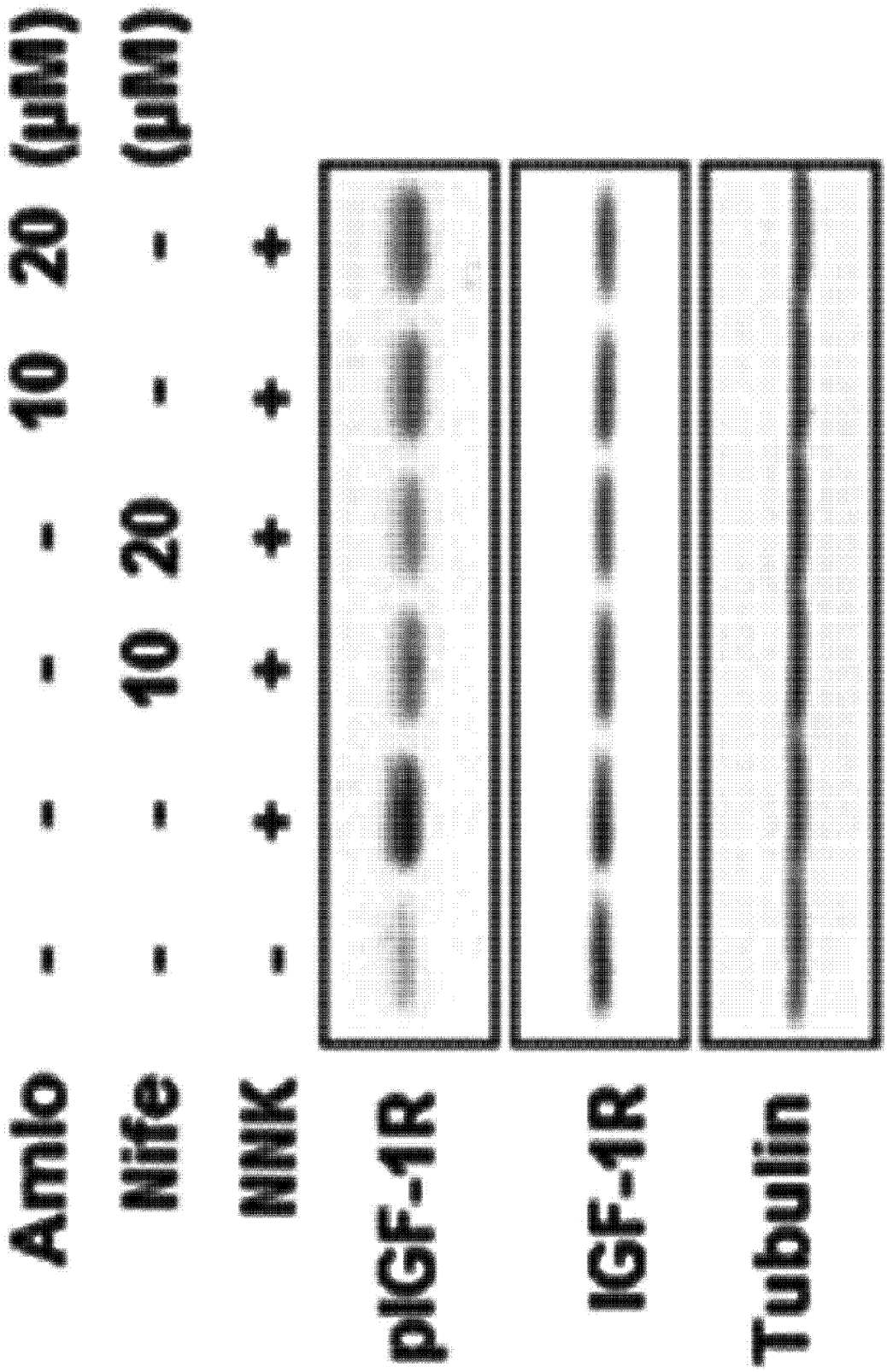
[도15]


NNK+
NNK-
Ate
ICI
Pro
NNK
NNK+AMLODIPINE
NNK+NIFEDIPINE
F/F0
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31
Time (min)

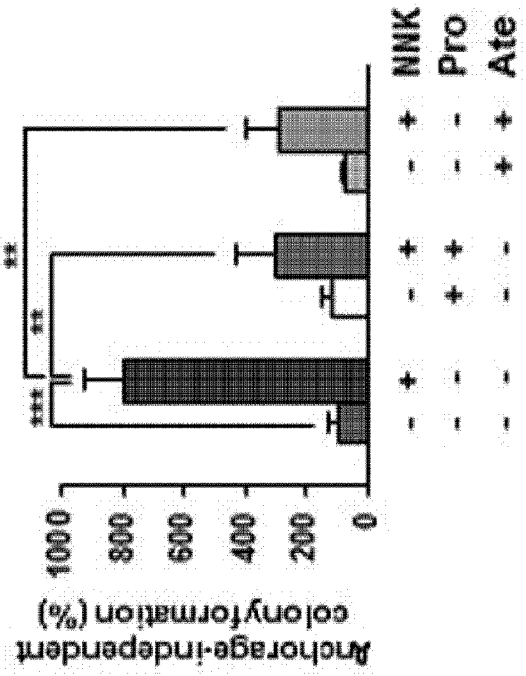
[도16]

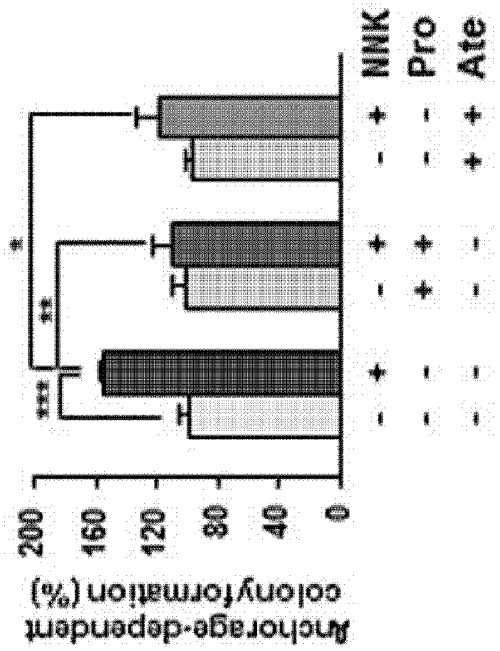

CM
BAP EGTA Amlo Nife
NNK - + + + + +
GFP-IGF2
CB
CM
Ate ICI Pro
NNK - + + + +
GFP-IGF2
CB

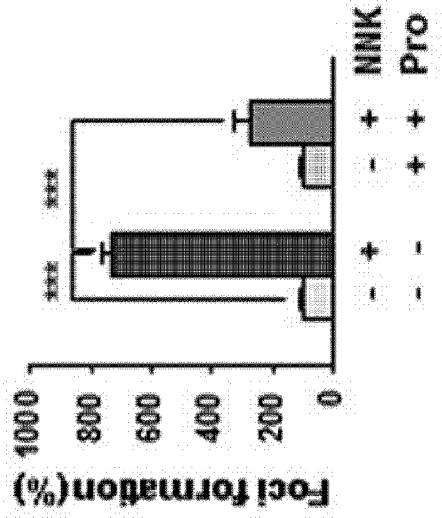
[도17]



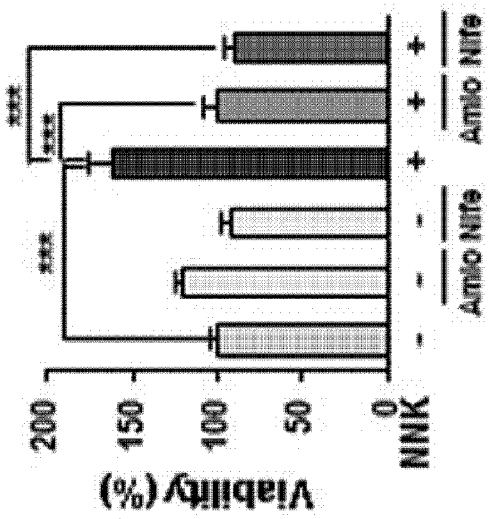
[도18]

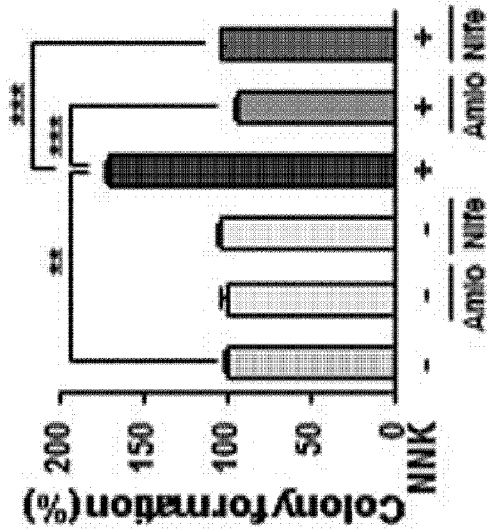

Anchorage-independent colony formation (%)
1000
800
600
400
200
0
***
**
**
NNK
Pro
Ate

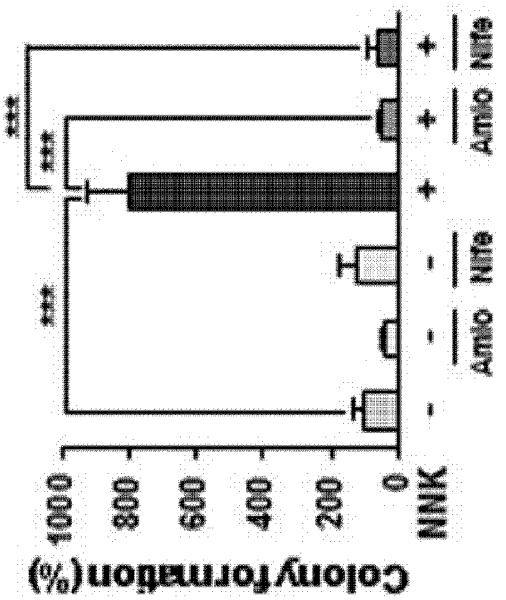

Anchorage-dependent colony formation (%)
200
160
120
80
40
0
***
**
*
NNK
Pro
Ate


Foci formation (%)
1000
800
600
400
200
0
***
***
NNK
Pro

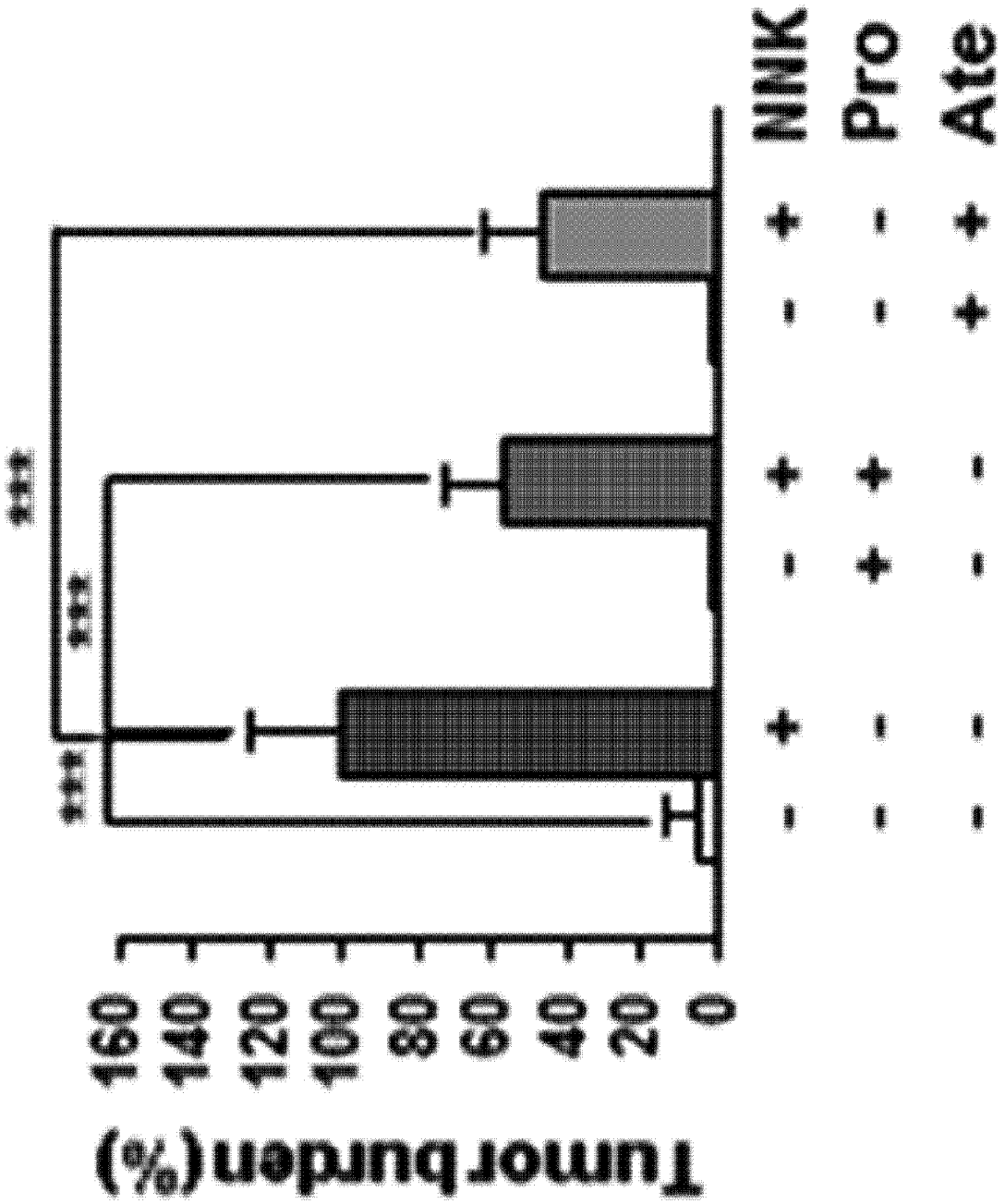
[도19]


Viability (%)
200
150
100
50
0
NNK
Amio Nitfe
-
-
+
+
-
-
+
+
***
***
***

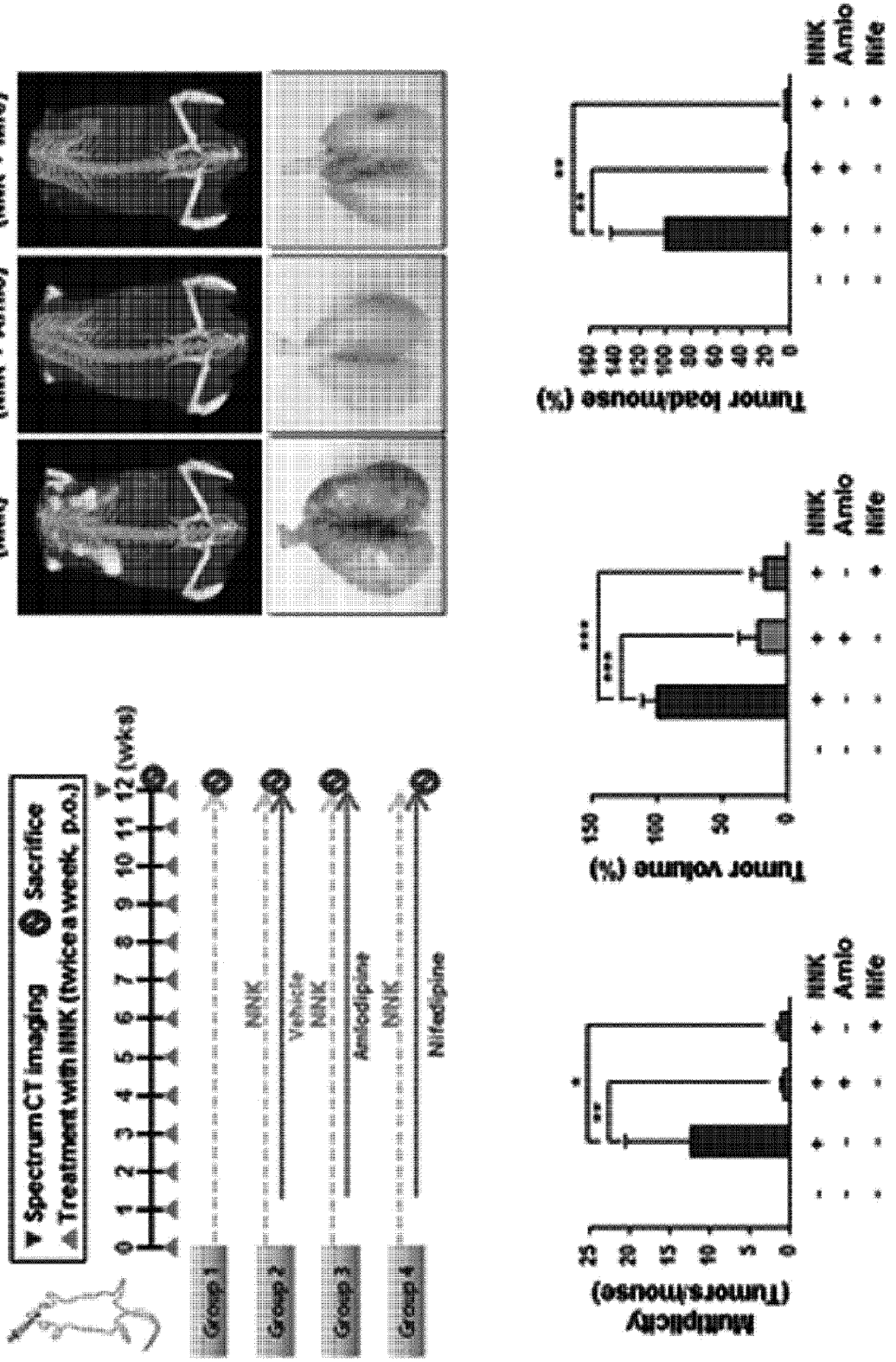

Colony formation (%)
200
150
100
50
0
NNK
Amio Nitfe
-
-
+
+
-
-
+
+
**
***
***


Colony formation (%)
1000
800
600
400
200
0
NNK
Amio Nitfe
-
-
+
+
-
-
+
+
***
***
***

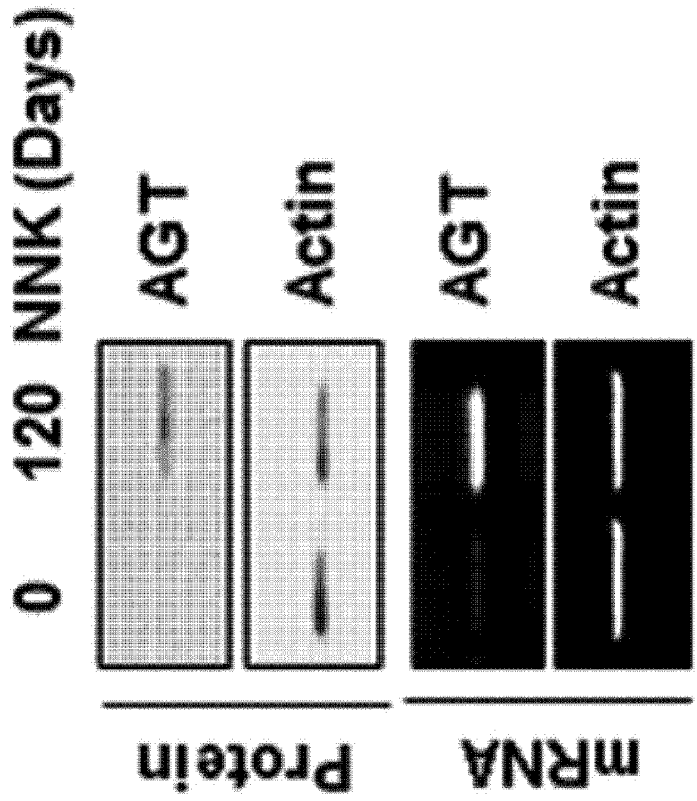
[도20]

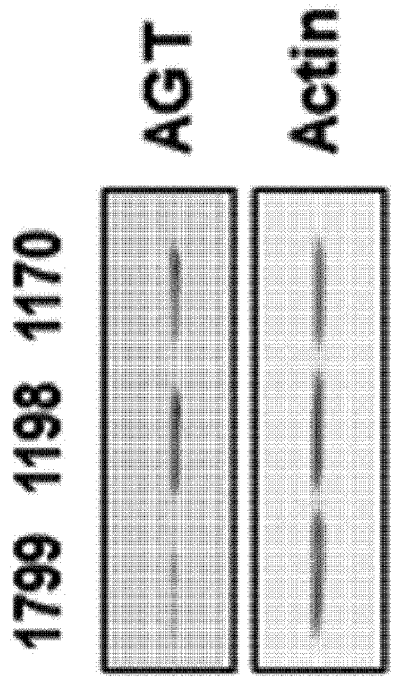


[도21]

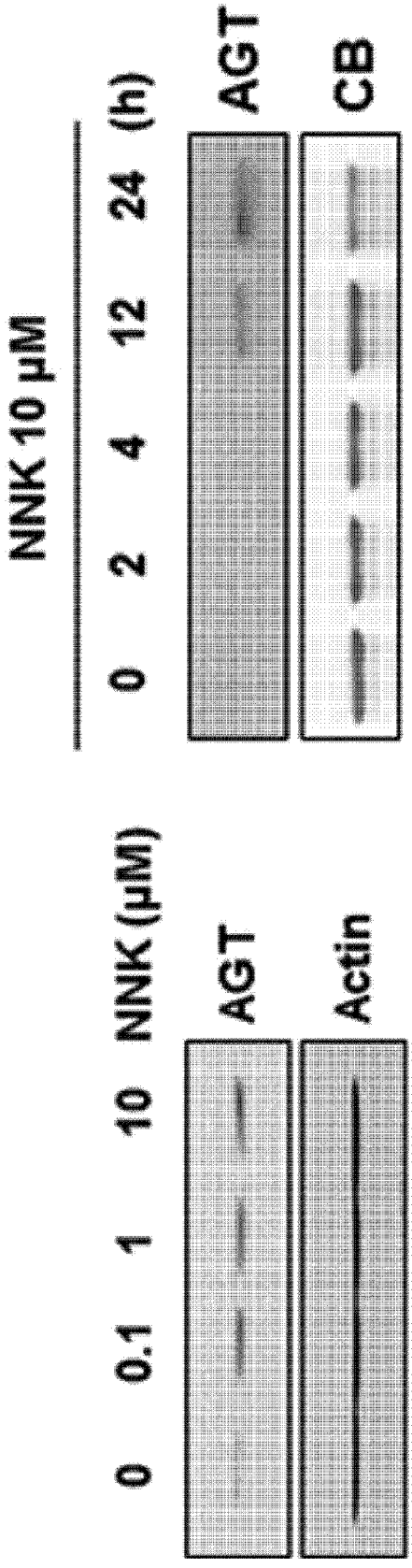

Group 4 (NNK + Nife)
Group 3 (NNK + Amlo)
Group 2 (NNK)
Spectrum CT imaging
Sacrifice
Treatment with NNK (twice a week, p.o.)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 (wks)
Group 1
Group 2
Group 3
Group 4
NNK
Vehicle
NNK
Amlodipine
NNK
Nifedipine
Multiplicity (Tumors/mouse)
Tumor volume (%)
Tumor load/mouse (%)
NNK
Amlo
Nife

[도22]

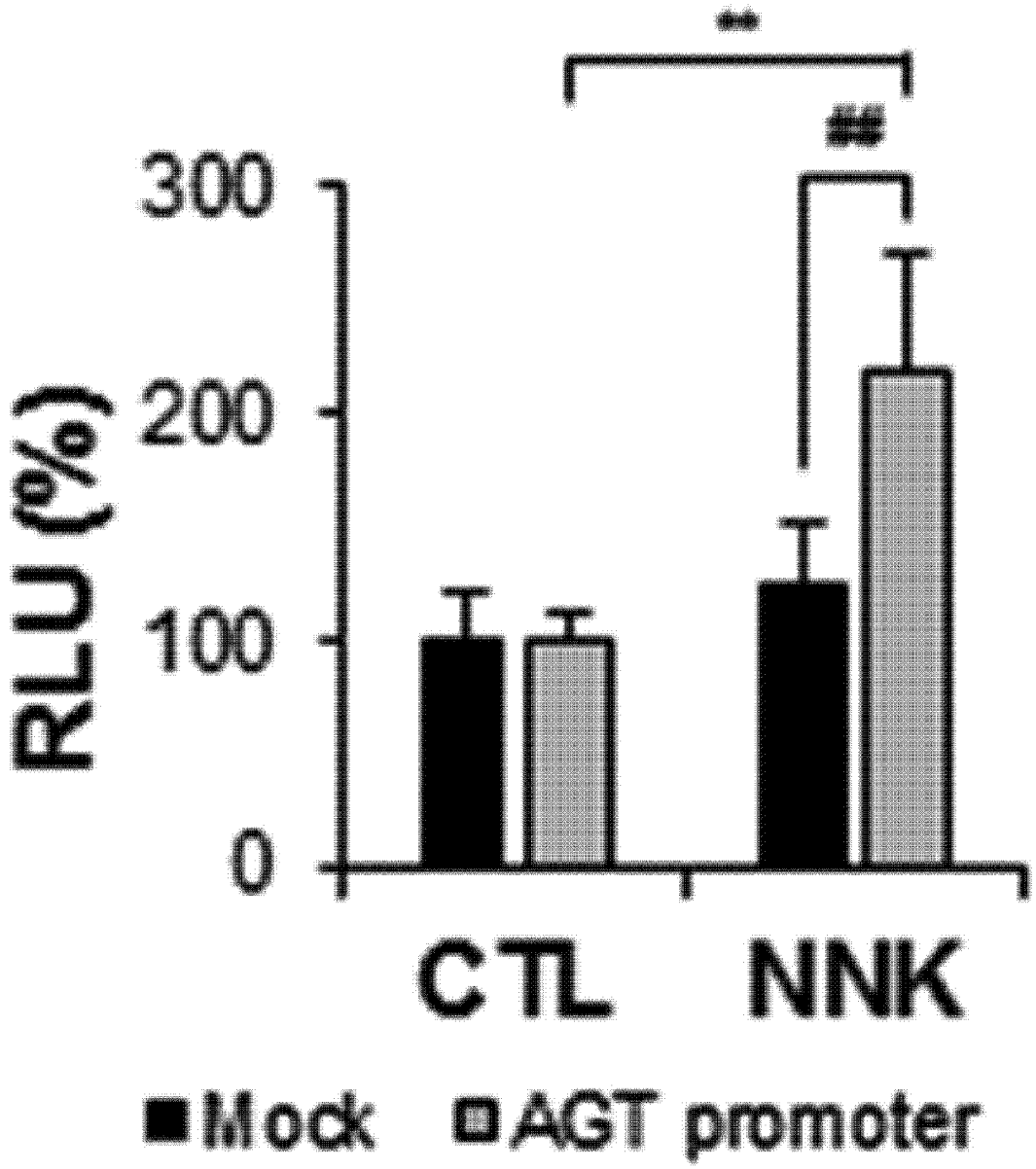

0
120
NNK (Days)
AGT
Actin
AGT
Actin
Protein
mRNA


1799
1198
1170
AGT
Actin

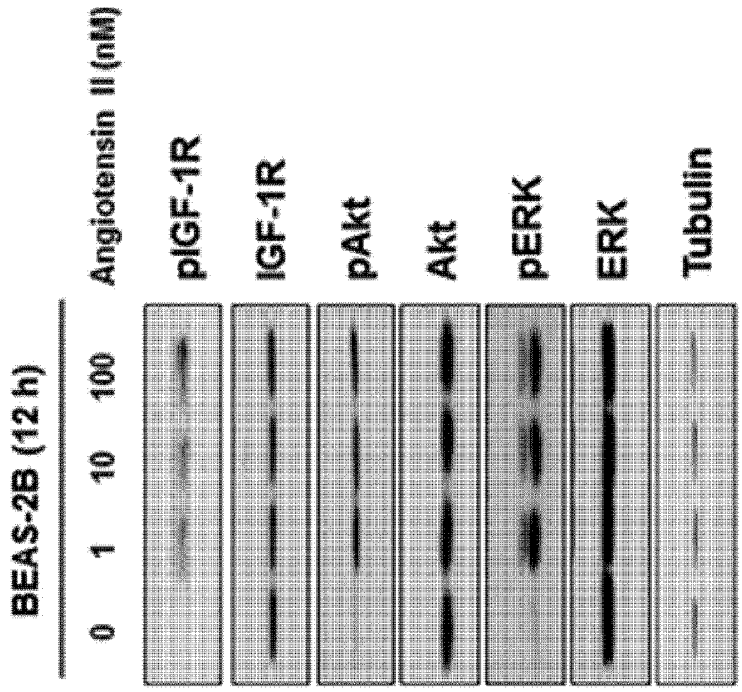
[도23]

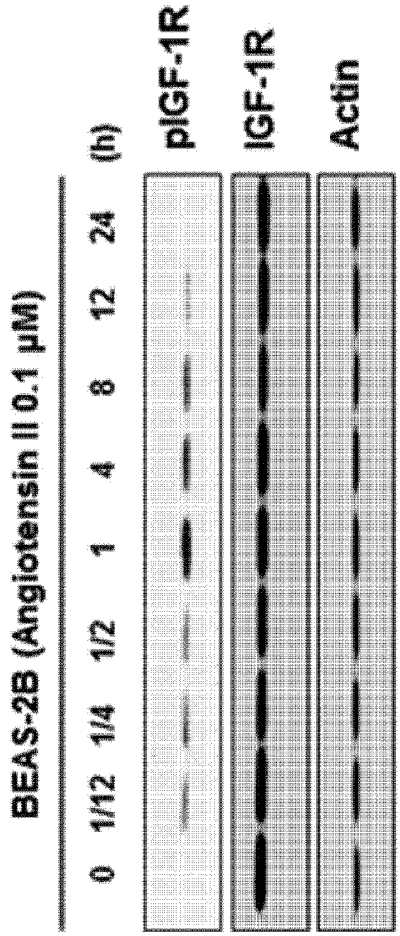


[도24]

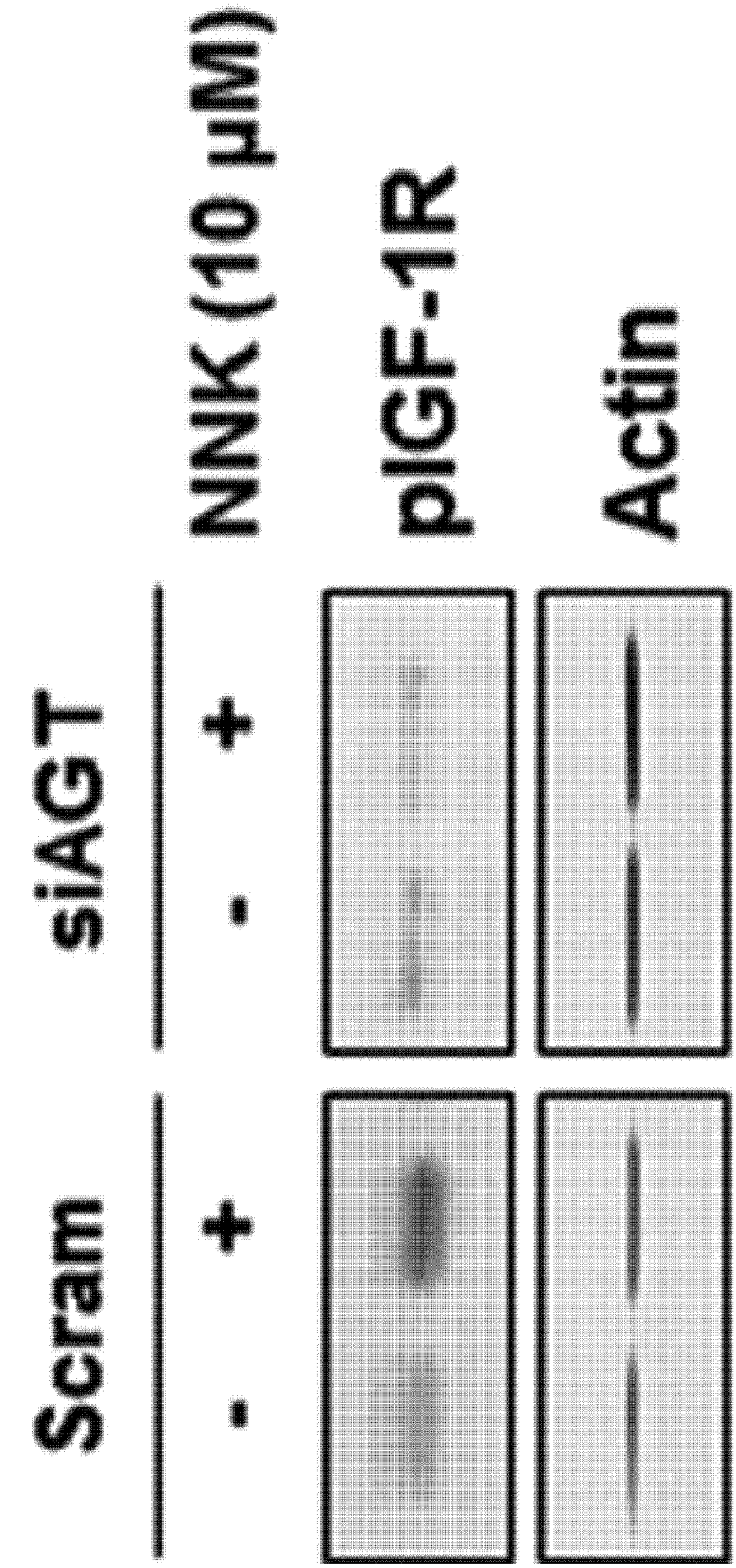


[도25]

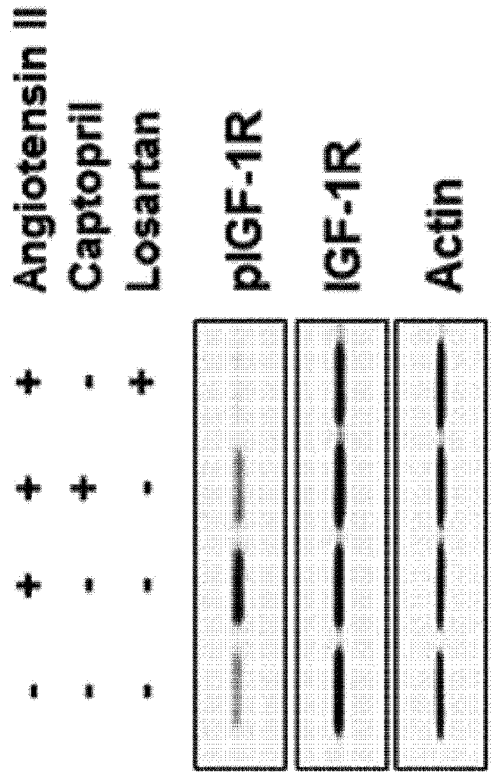

BEAS-2B (12 h)
Angiotensin II (nM)
0
1
10
100
pIGF-1R
IGF-1R
pAkt
Akt
pERK
ERK
Tubulin

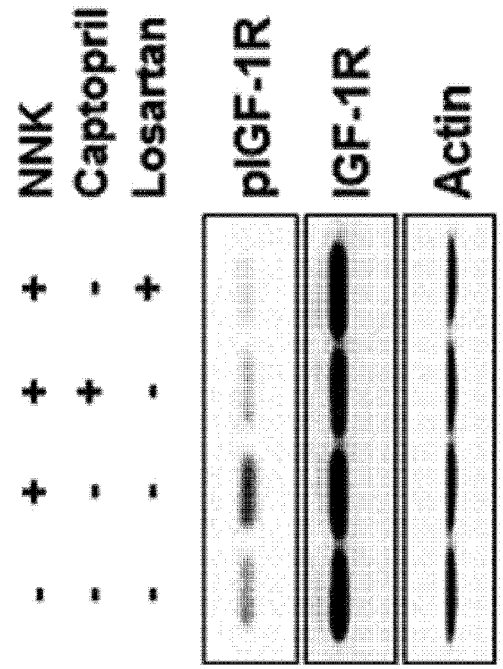

BEAS-2B (Angiotensin II 0.1 μM)
(h)
0
1/12
1/4
1/2
1
4
8
12
24
pIGF-1R
IGF-1R
Actin

[도26]

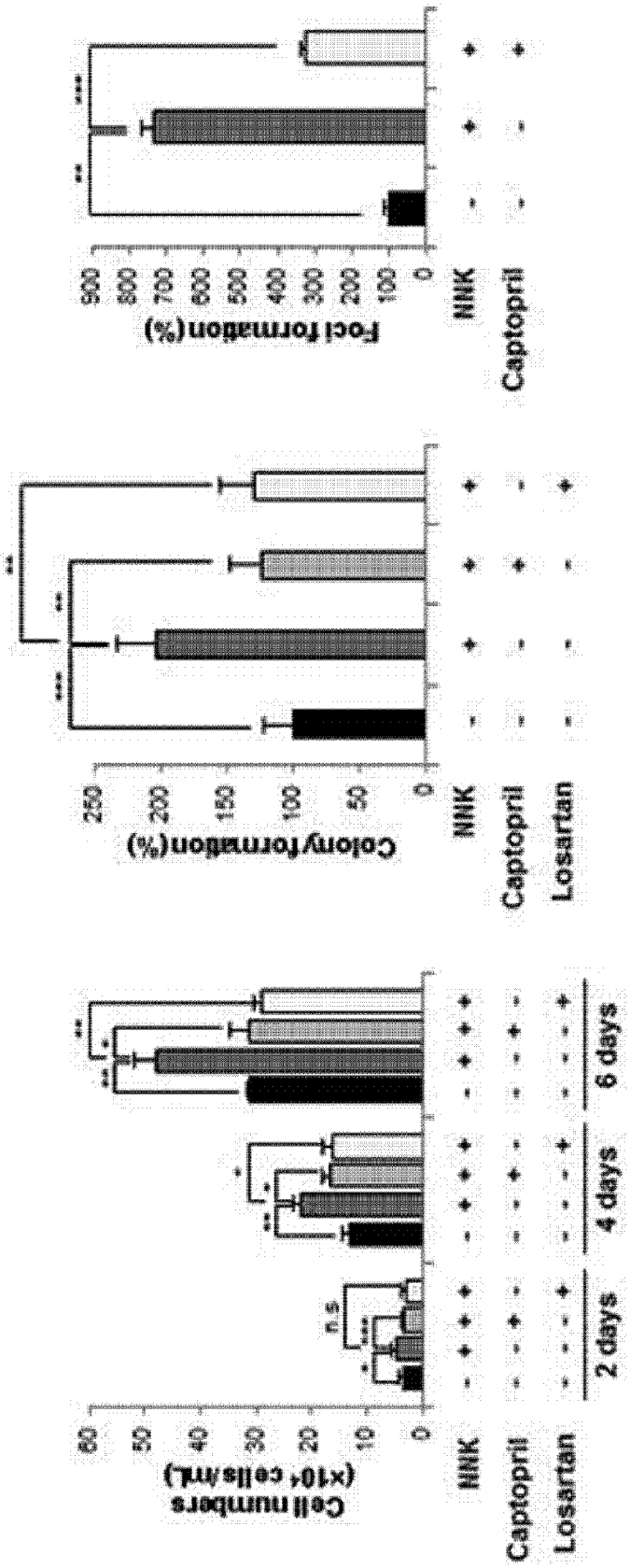


[도27]

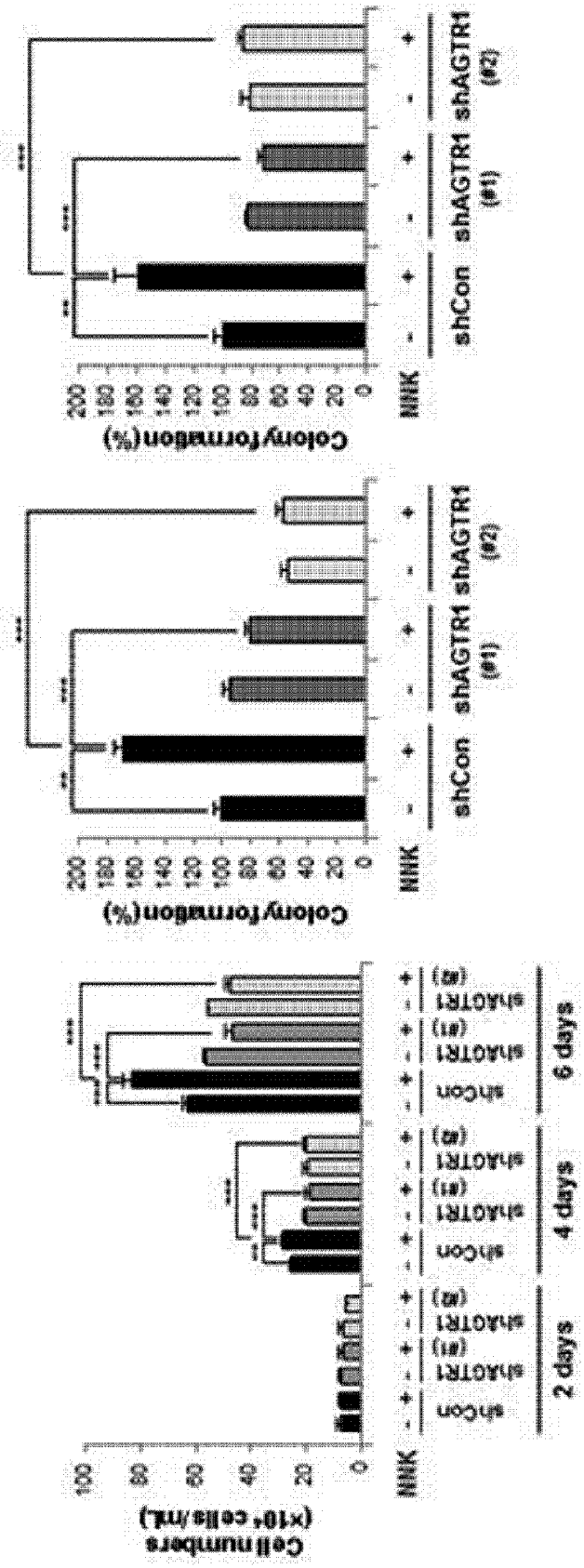

Angiotensin II
Captopril
Losartan
pIGF-1R
IGF-1R
Actin


NNK
Captopril
Losartan
pIGF-1R
IGF-1R
Actin

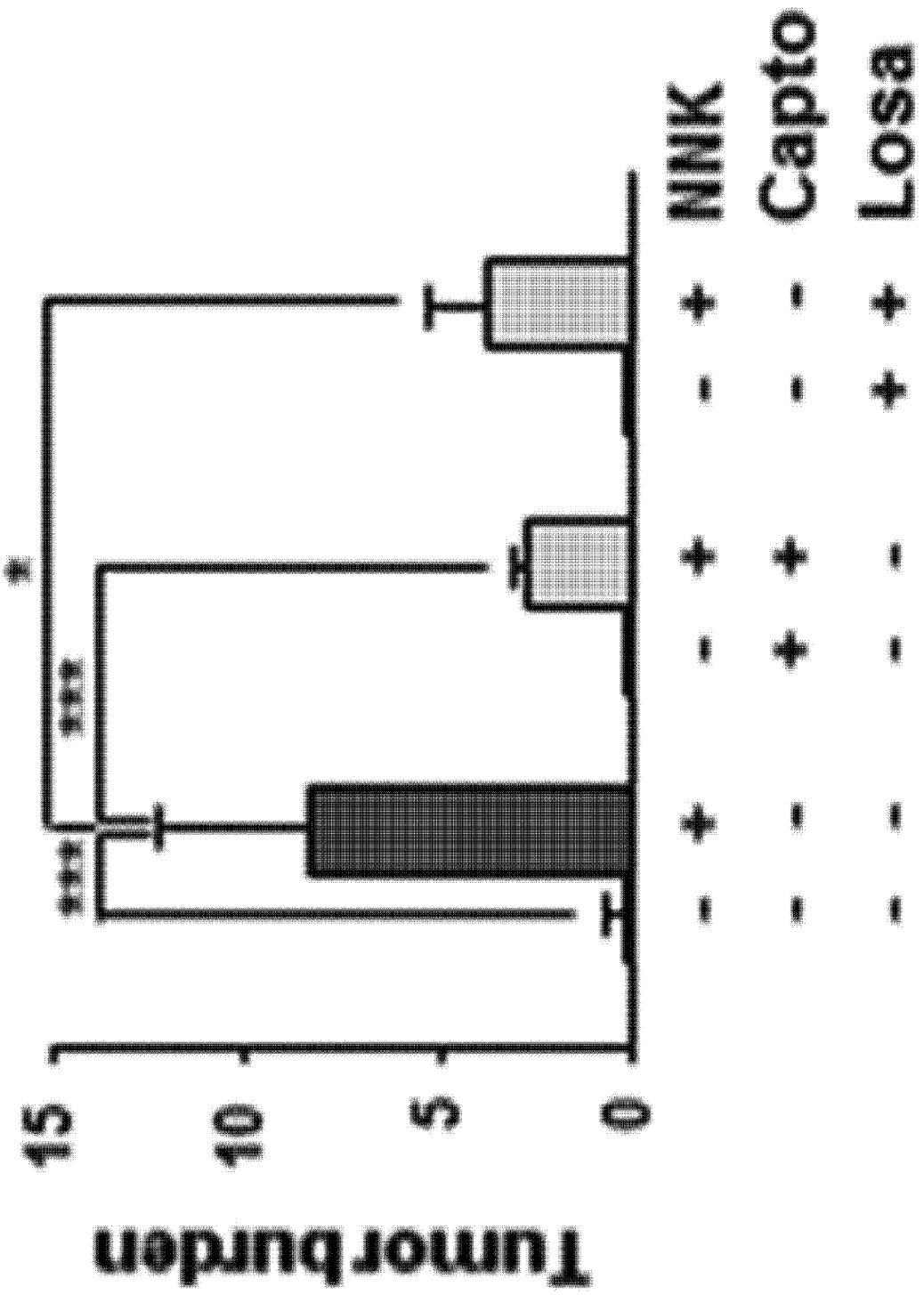
[도28]


Cell numbers
(x10⁴ cells/mL)
NNK
Captopril
Losartan
2 days
4 days
6 days
Colony formation(%)
Foci formation(%)

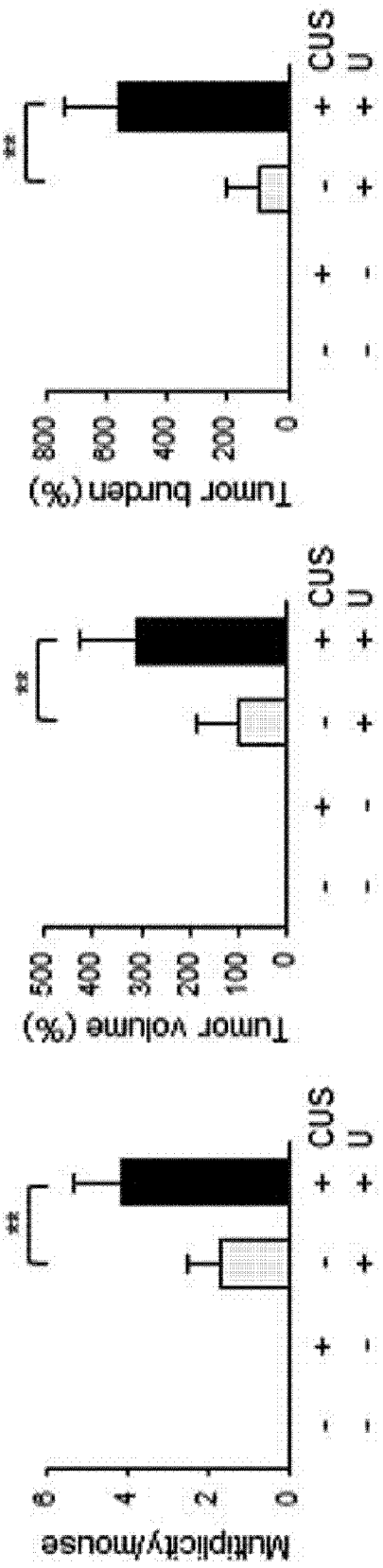
[도29]


Colony formation (%)
NHK
shCon
shAGTR1 (#1)
shAGTR1 (#2)
Cell numbers (×10⁴ cells/mL)
2 days
4 days
6 days

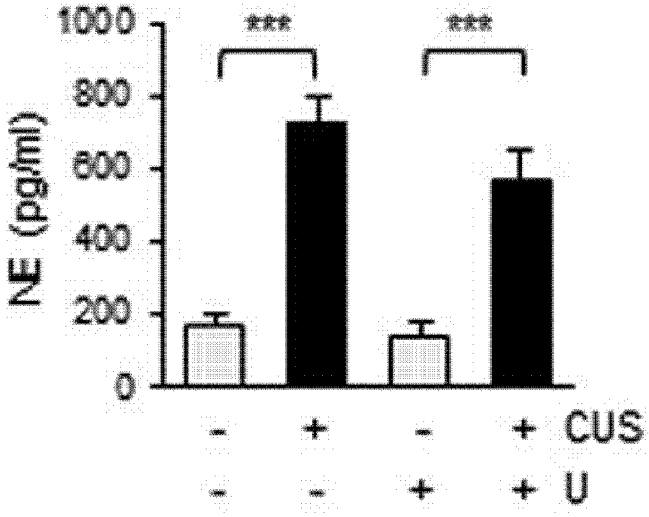
[도30]

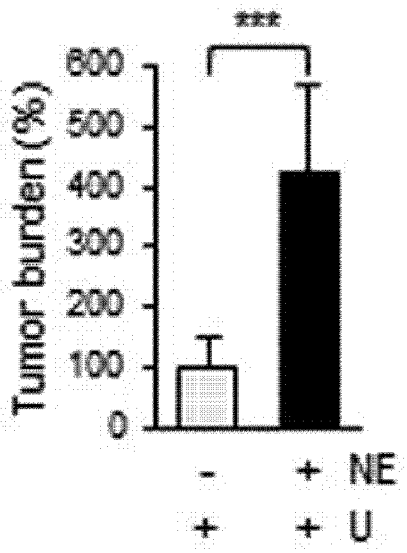


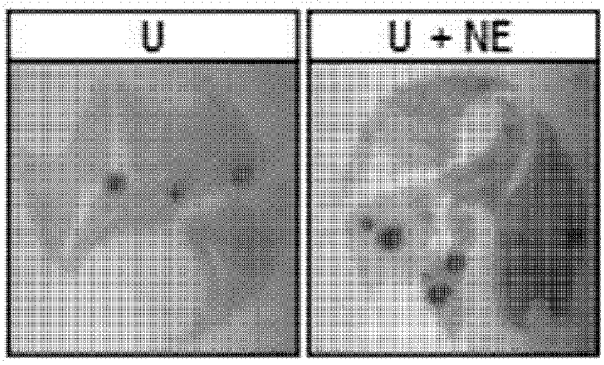
[도31]


Tumor burden (%)
800
600
400
200
0
**
CUS
U
Tumor volume (%)
500
400
300
200
100
0
**
CUS
U
Multiplicity/mouse
8
6
4
2
0
**
CUS
U

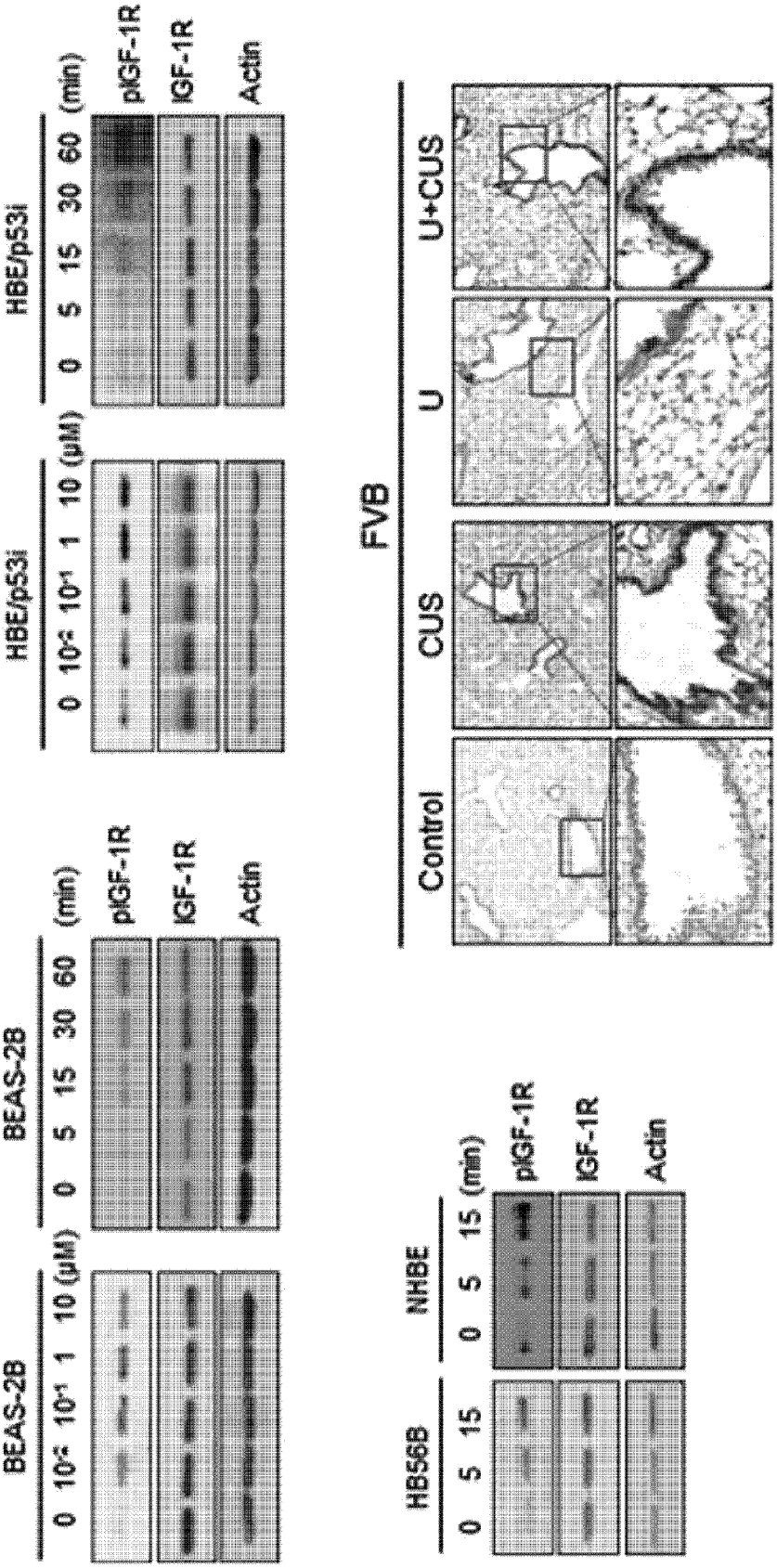
[도32]


1000
800
600
400
200
0
NE (pg/ml)
***
***
- + - + CUS
- - + + U

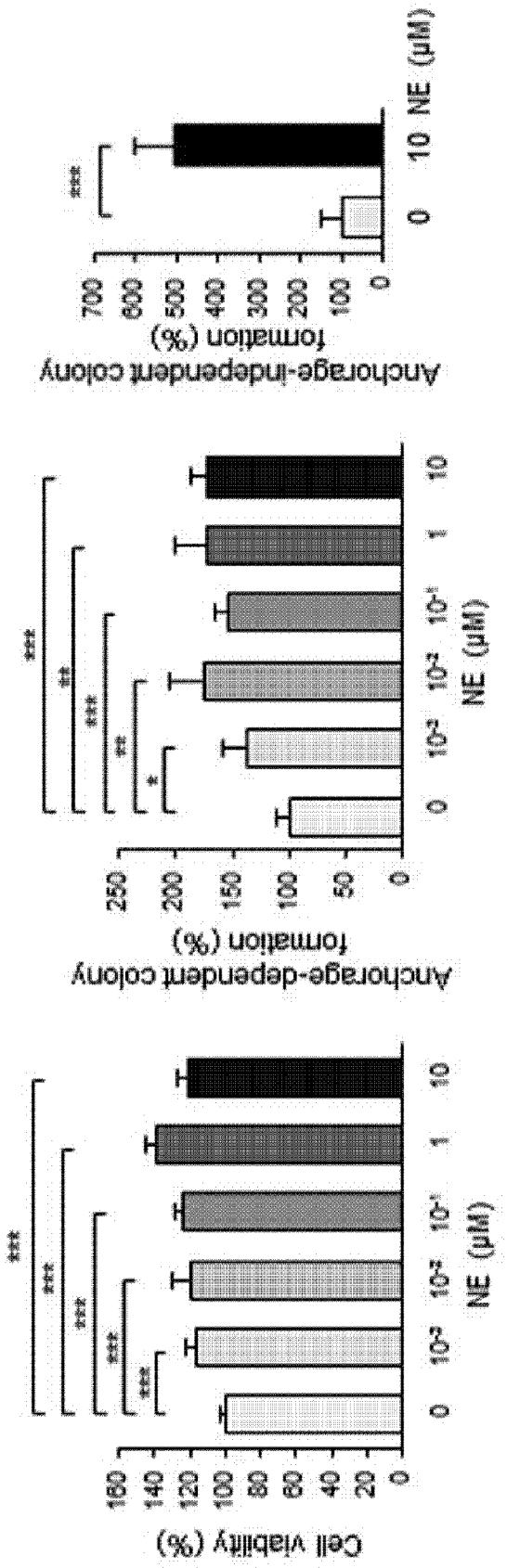

600
500
400
300
200
100
0
Tumor burden (%)
***
- + NE
+ + U


U
U + NE

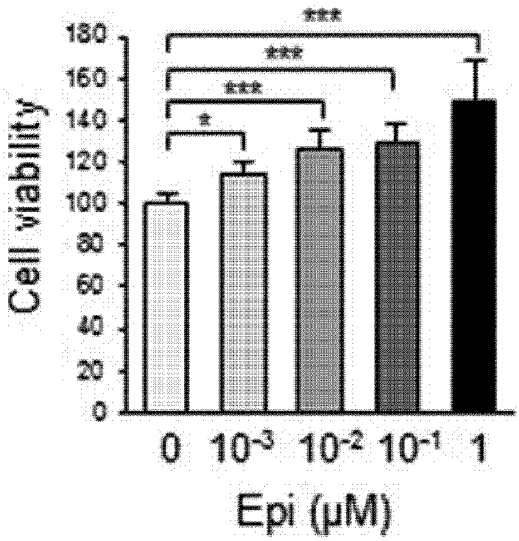
[도33]

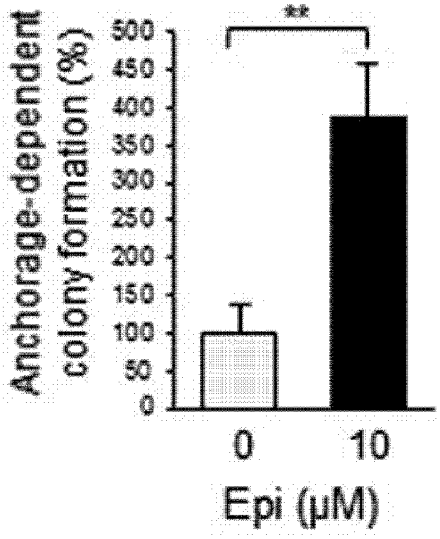

BEAS-2B
0 10⁻² 10⁻¹ 1 10 (μM)
BEAS-2B
0 5 15 30 60 (min)
pIGF-1R
IGF-1R
Actin
HBE/p53i
0 10⁻² 10⁻¹ 1 10 (μM)
HBE/p53i
0 5 15 30 60 (min)
pIGF-1R
IGF-1R
Actin
FVB
Control
CUS
U
U+CUS
HB56B
NHBE
0 5 15 0 5 15 (min)
pIGF-1R
IGF-1R
Actin

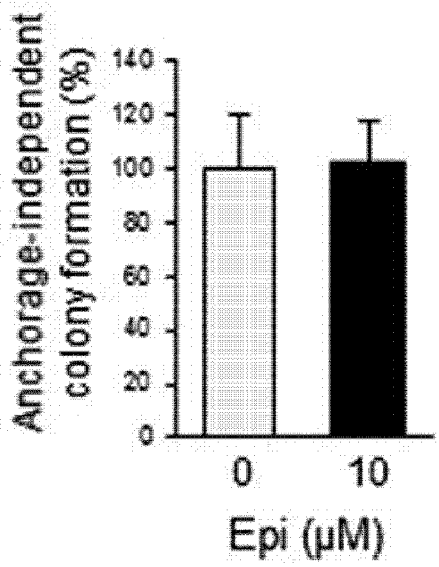
[도34]

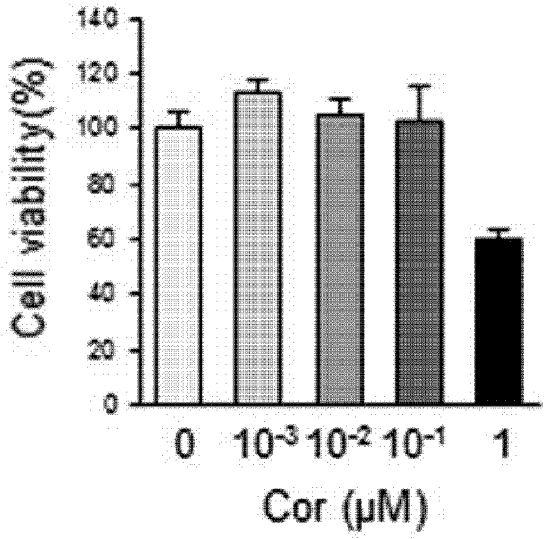

Anchorage-independent colony formation (%)
0
100
200
300
400
500
600
700
***
0
10
NE (μM)
Anchorage-dependent colony formation (%)
0
50
100
150
200
250
*
**
***
**
***
0
10-3
10-2
10-1
1
10
NE (μM)
Cell viability (%)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
***
***
***
***
***
0
10-3
10-2
10-1
1
10
NE (μM)

[도35]

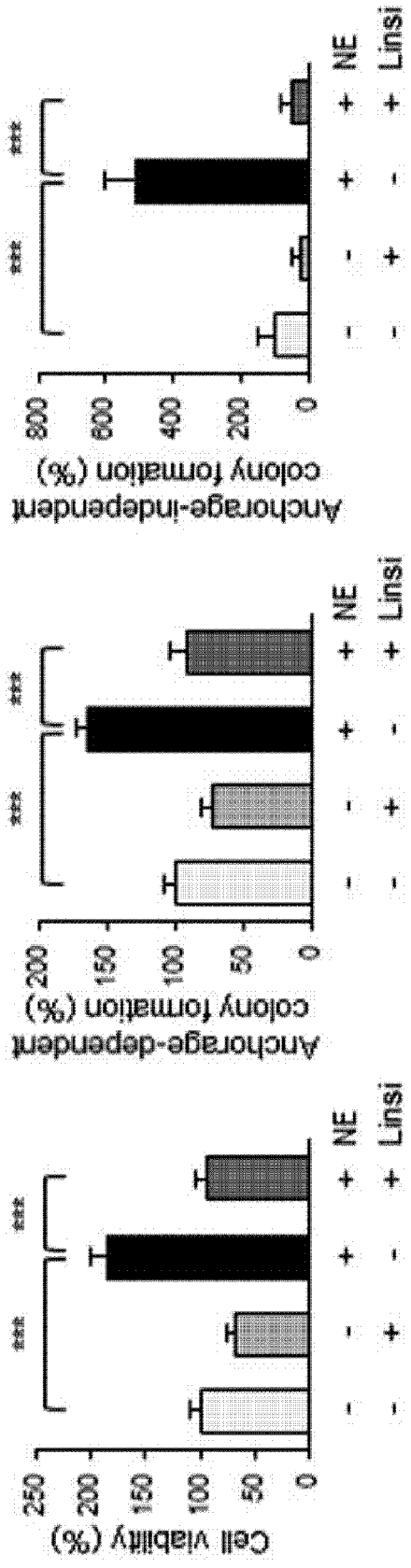

Cell viability
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
***
***
***
*
0
10-3
10-2
10-1
1
Epi (μM)


Anchorage-dependent colony formation (%)
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
**
0
10
Epi (μM)

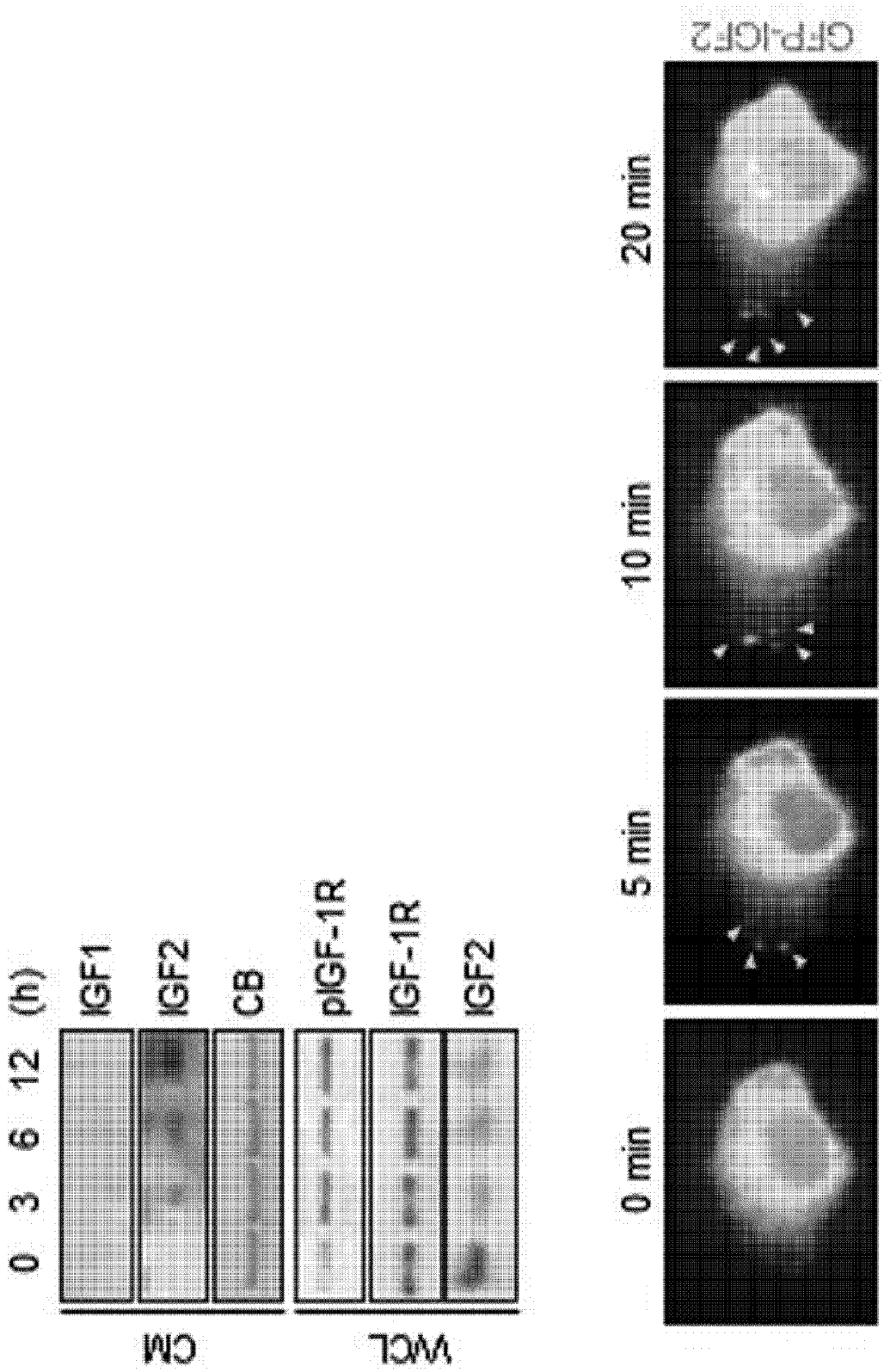

Anchorage-independent colony formation (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
0
10
Epi (μM)


Cell viability(%)
140
120
100
80
60
40
20
0
0
10-3
10-2
10-1
1
Cor (μM)

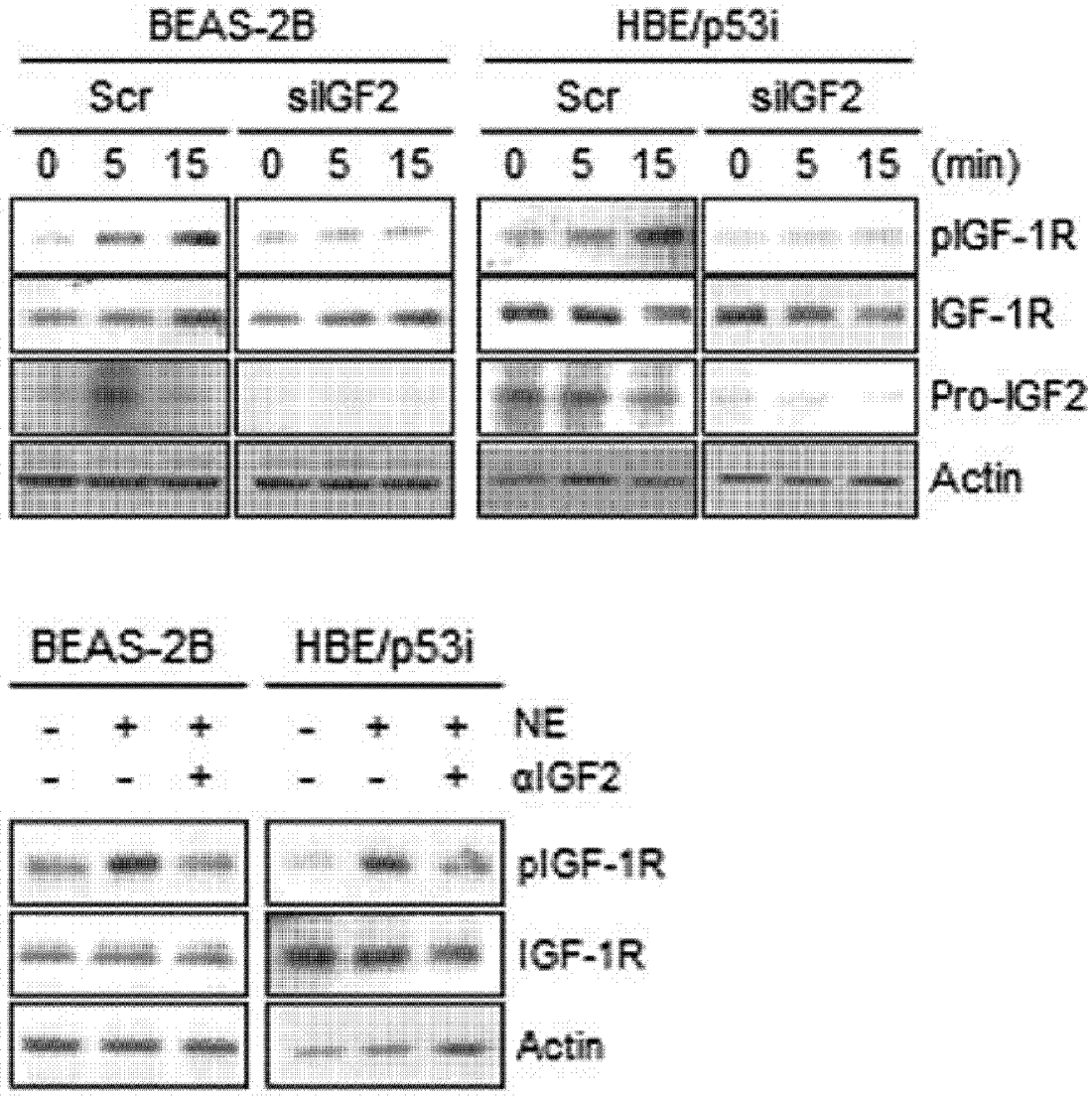
[도36]


Cell viability (%)
250
200
150
100
50
0
***
***
NE
Linsi
Anchorage-dependent
colony formation (%)
200
150
100
50
0
***
***
NE
Linsi
Anchorage-independent
colony formation (%)
800
600
400
200
0
***
***
NE
Linsi

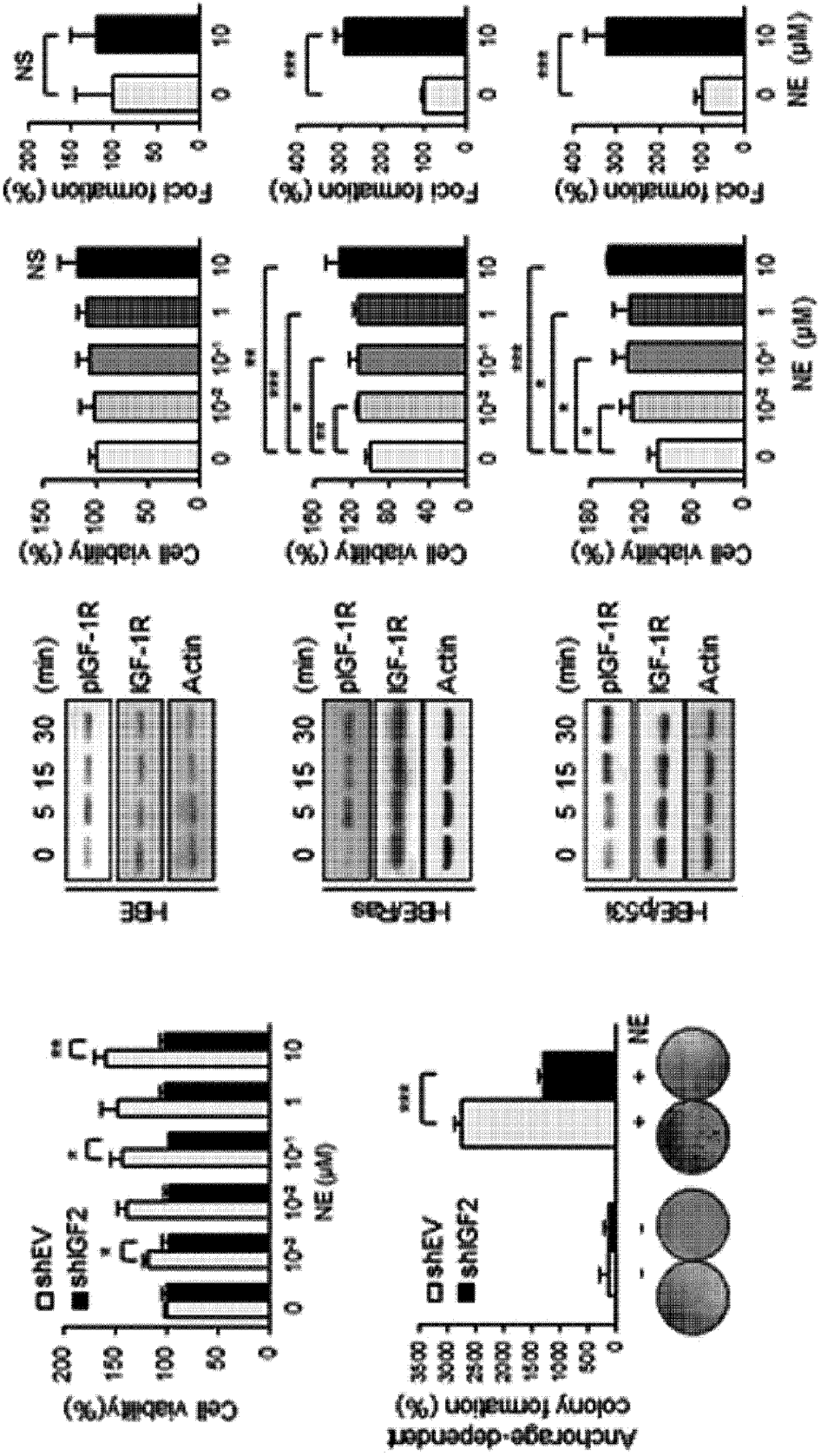
[도37]


0 min
5 min
10 min
20 min
GFP-IGF2
CM
WCL
0
3
6
12
(h)
IGF1
IGF2
CB
pIGF-1R
IGF-1R
IGF2

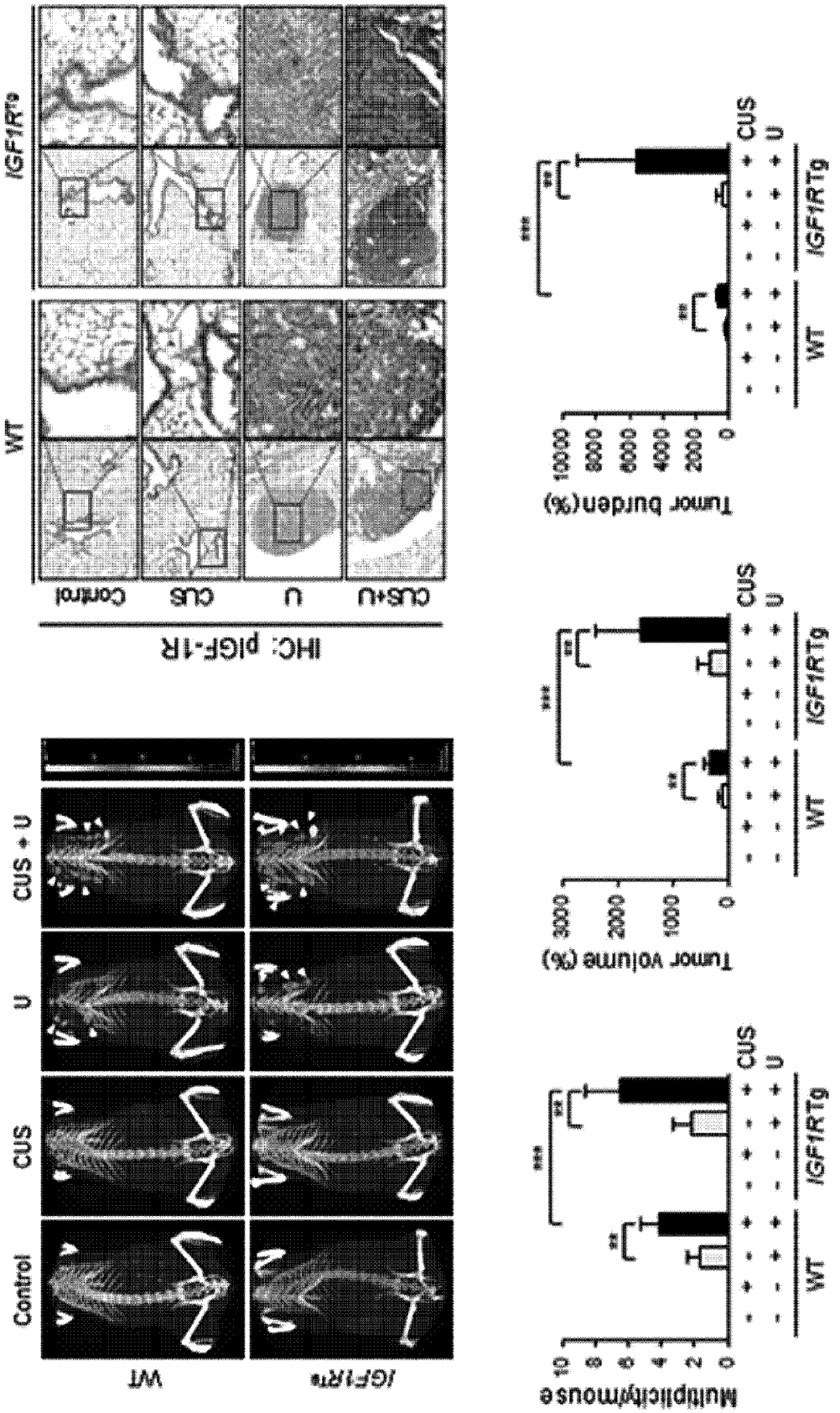
[도38]


BEAS-2B
HBE/p53i
Scr
siIGF2
Scr
siIGF2
0 5 15 0 5 15 0 5 15 0 5 15 (min)
pIGF-1R
IGF-1R
Pro-IGF2
Actin
BEAS-2B
HBE/p53i
- + + - + + NE
- - + - - + αIGF2
pIGF-1R
IGF-1R
Actin

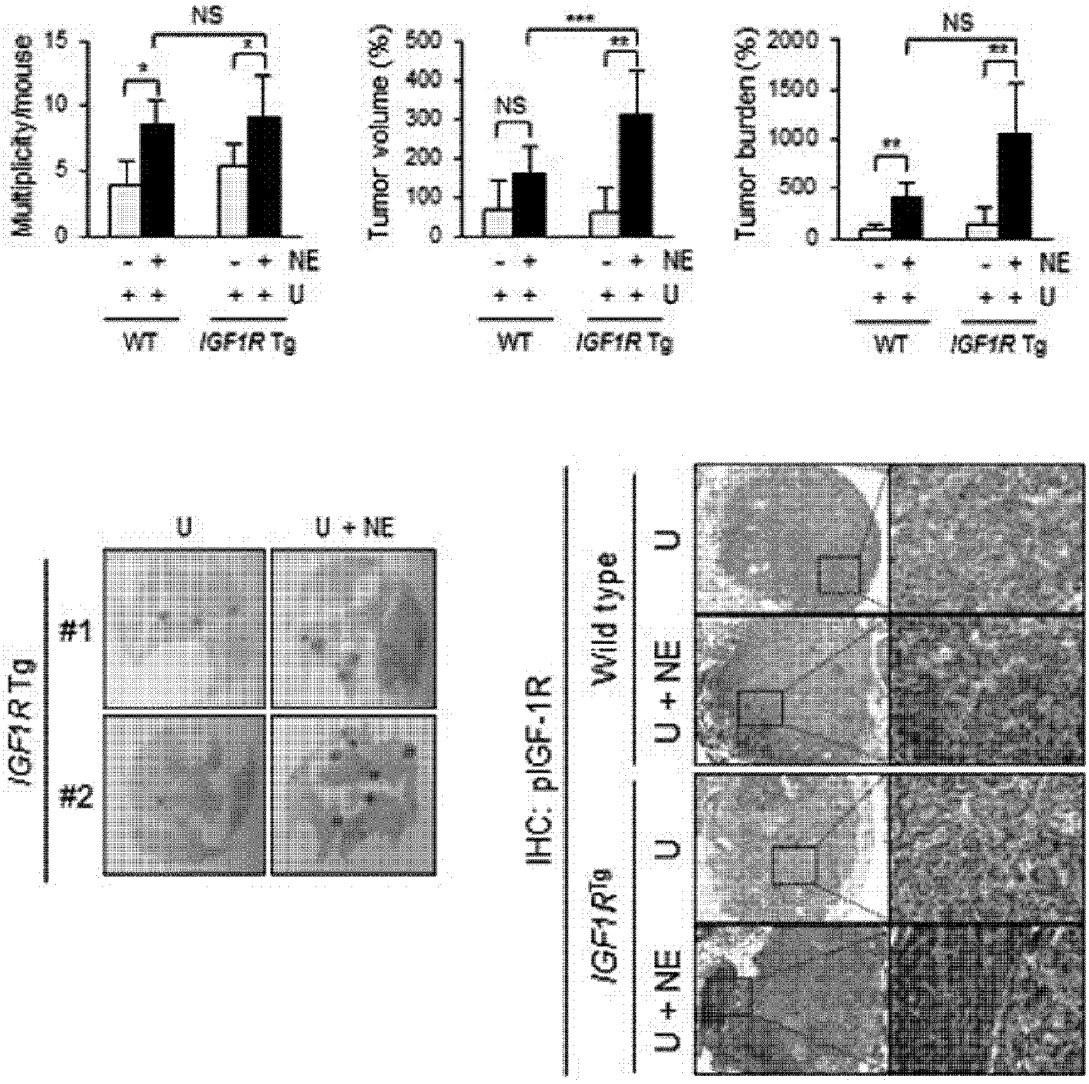
[도39]


Anchorage-dependent colony formation (%)
shEV
shIGF2
NE
Cell viability(%)
NE (μM)
H-BE
H-BEp53
H-BERas
pIGF-1R
IGF-1R
Actin
(min)
0 5 15 30
Cell viability (%)
Foci formation (%)
NS

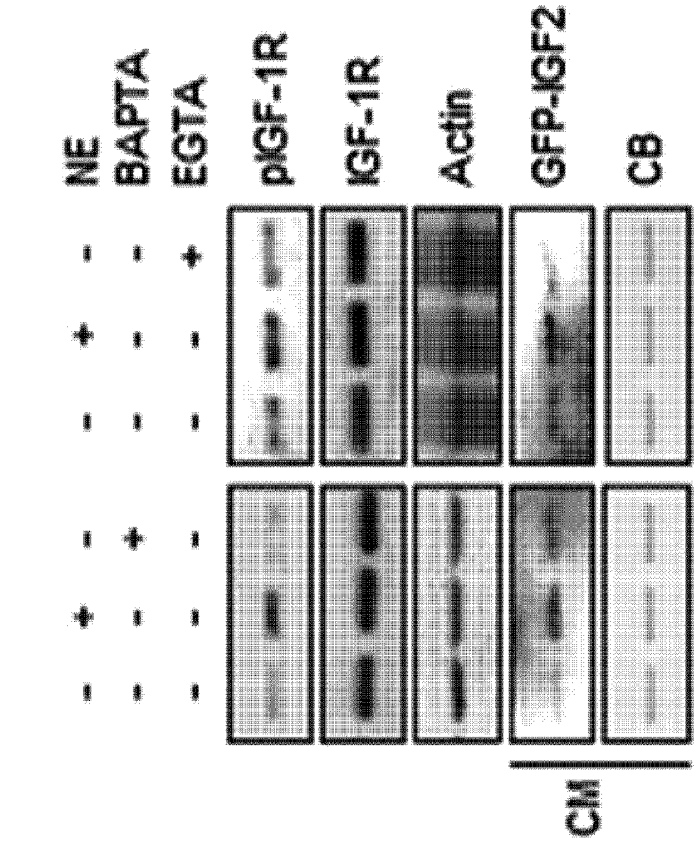
[도40]

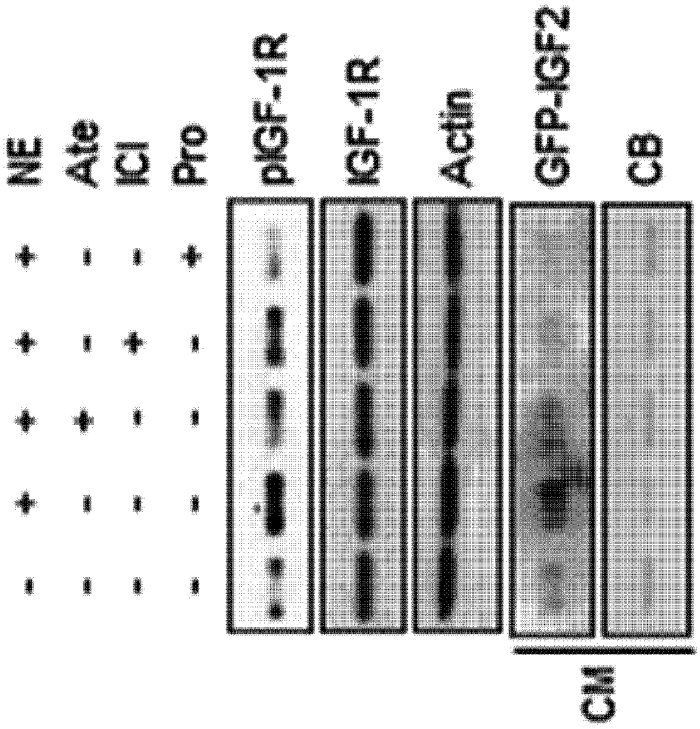

IGF1R
WT
IHC: pIGF-1R
Control
CUS
U
CUS+U
WT
IGF1R
CUS
U
IGF1RTg
Multiplicity/mouse
Tumor volume (%)
Tumor burden(%)

[도41]

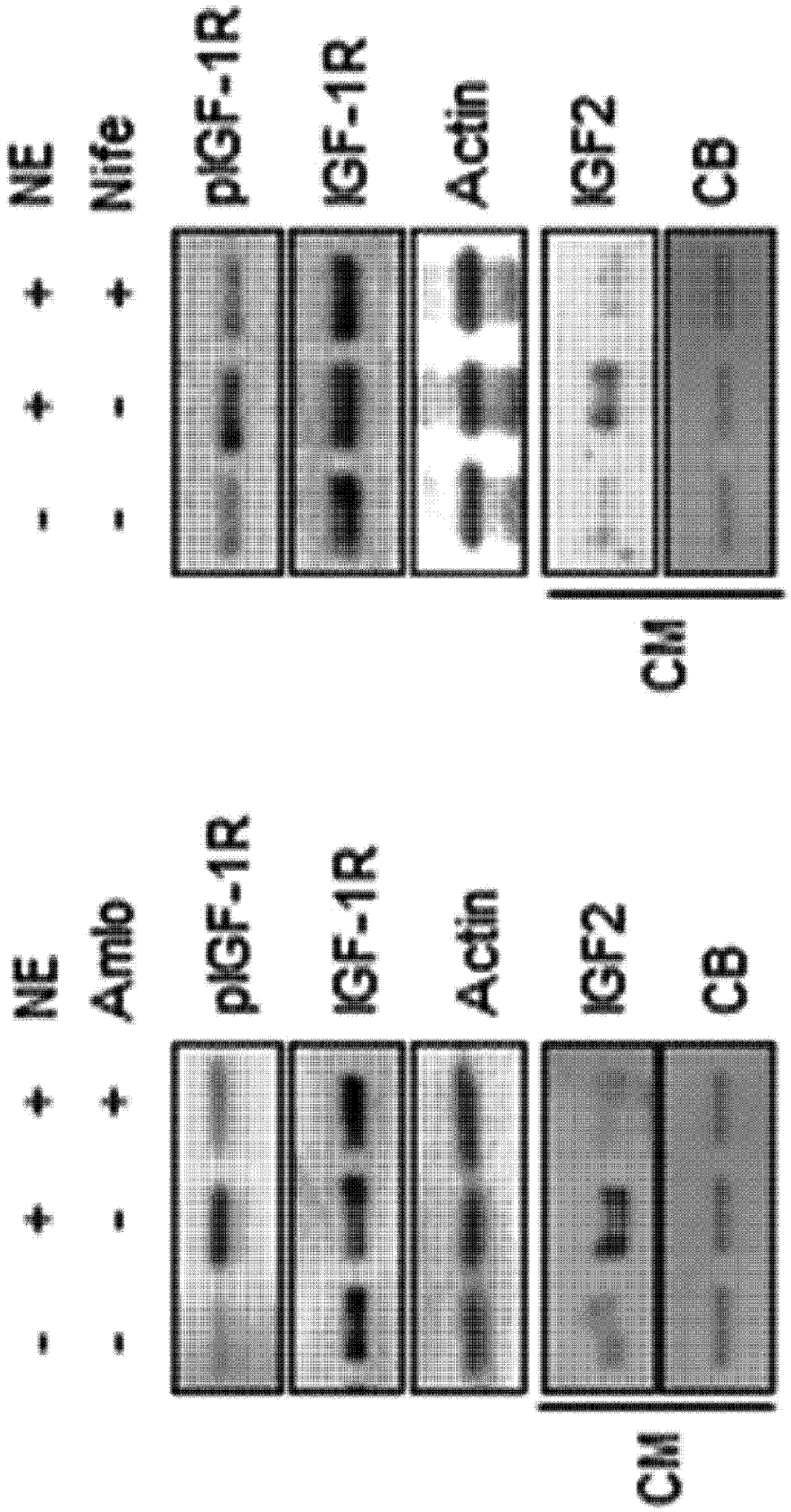

Multiplicity/mouse
Tumor volume (%)
Tumor burden (%)
NS
*
**
***
NE
U
WT
IGF1R Tg
U
U + NE
#1
#2
IGF1R Tg
IHC: pIGF-1R
Wild type
IGF1R Tg

[도42]

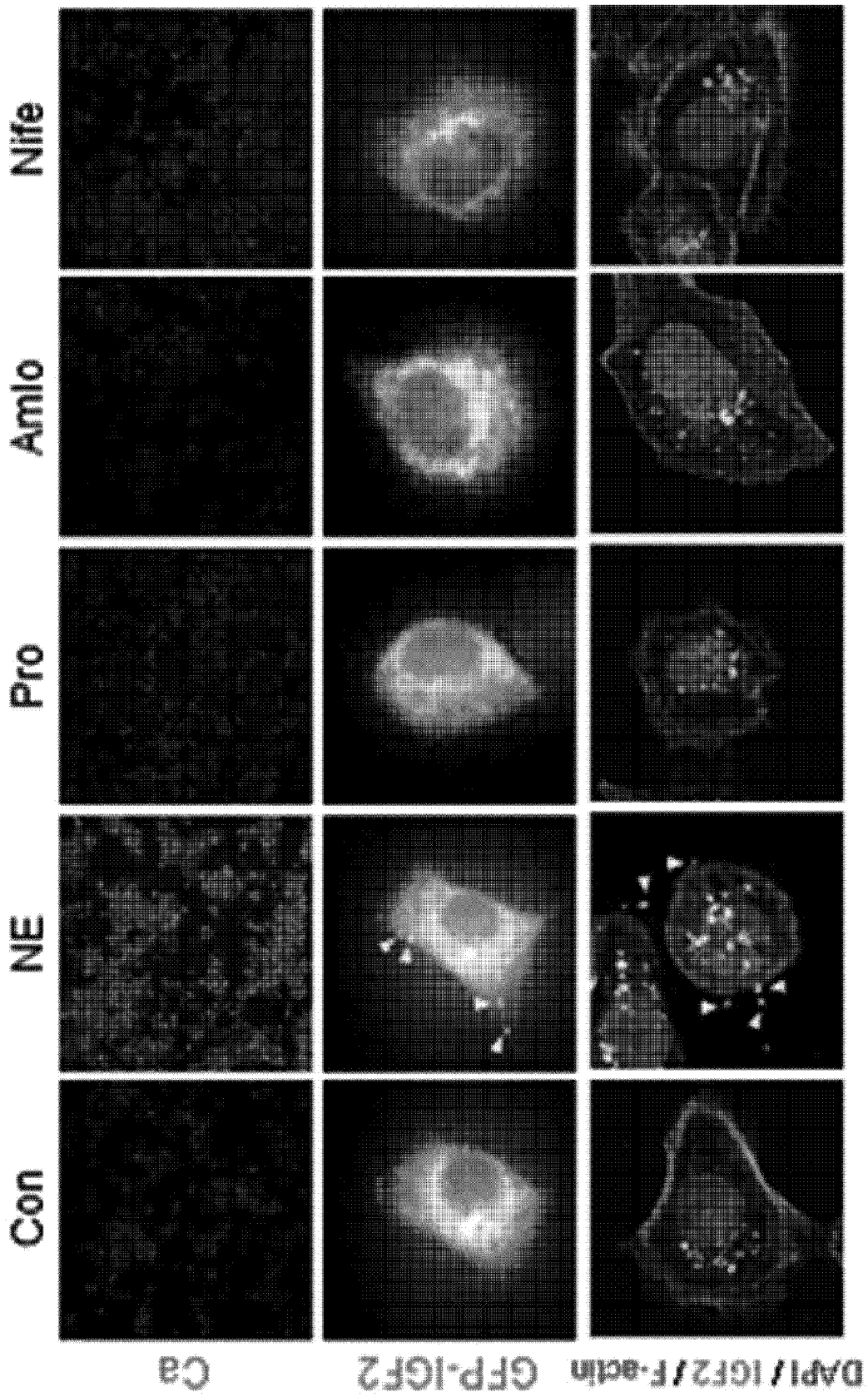

NE
BAPTA
EGTA
pIGF-1R
IGF-1R
Actin
GFP-IGF2
CB
CM


NE
Ate
ICI
Pro
pIGF-1R
IGF-1R
Actin
GFP-IGF2
CB
CM

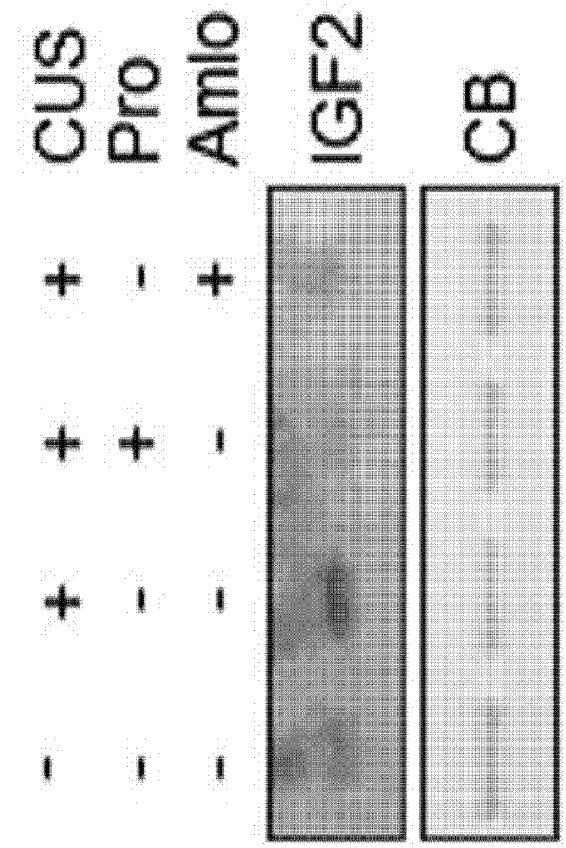
[도43]

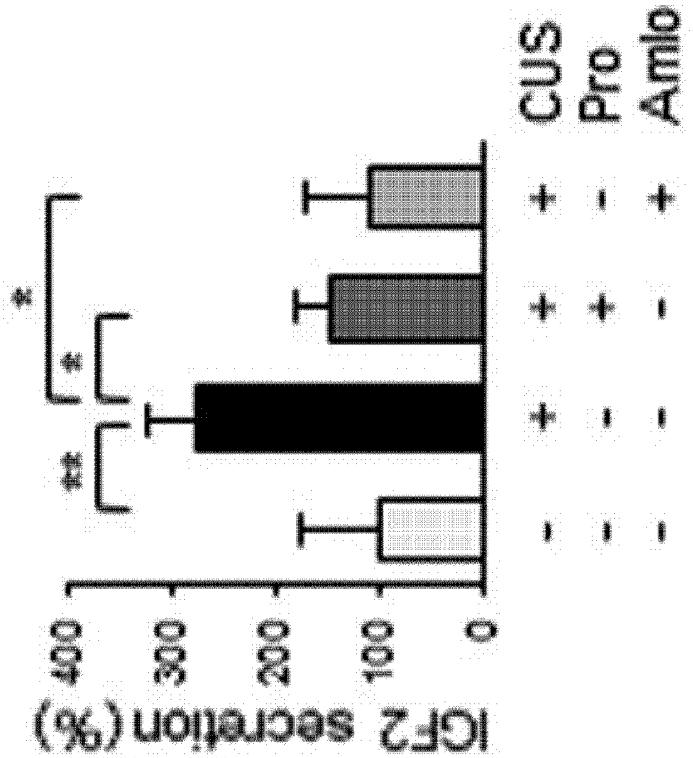

NE
Nife
pIGF-1R
IGF-1R
Actin
IGF2
CB
CM
NE
Amlo
pIGF-1R
IGF-1R
Actin
IGF2
CB
CM

[도44]

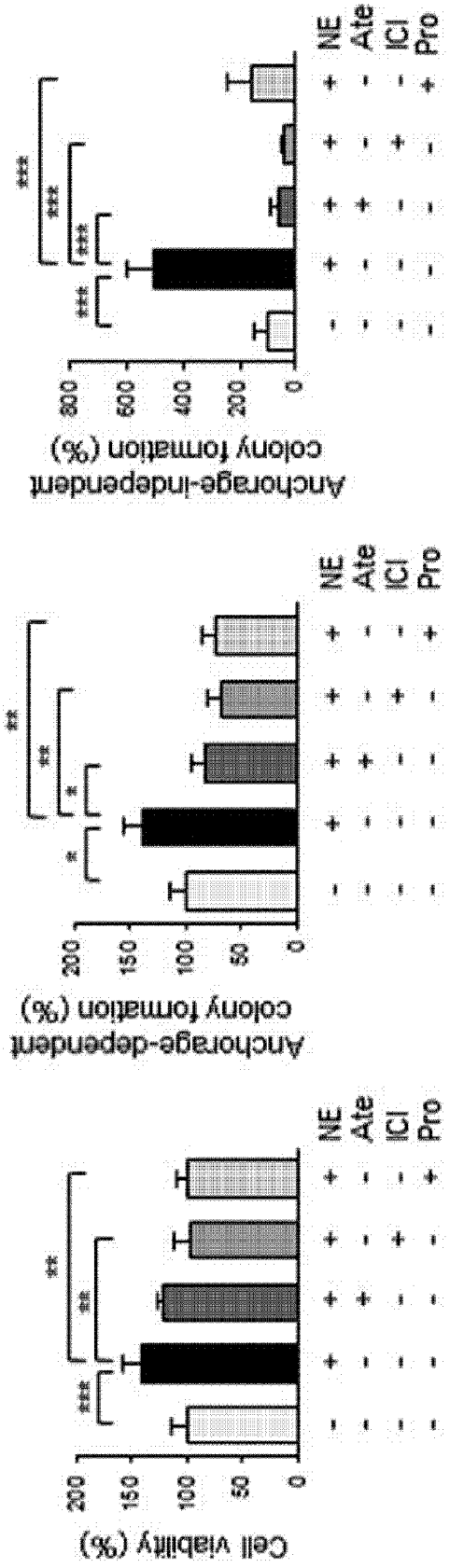


[도45]

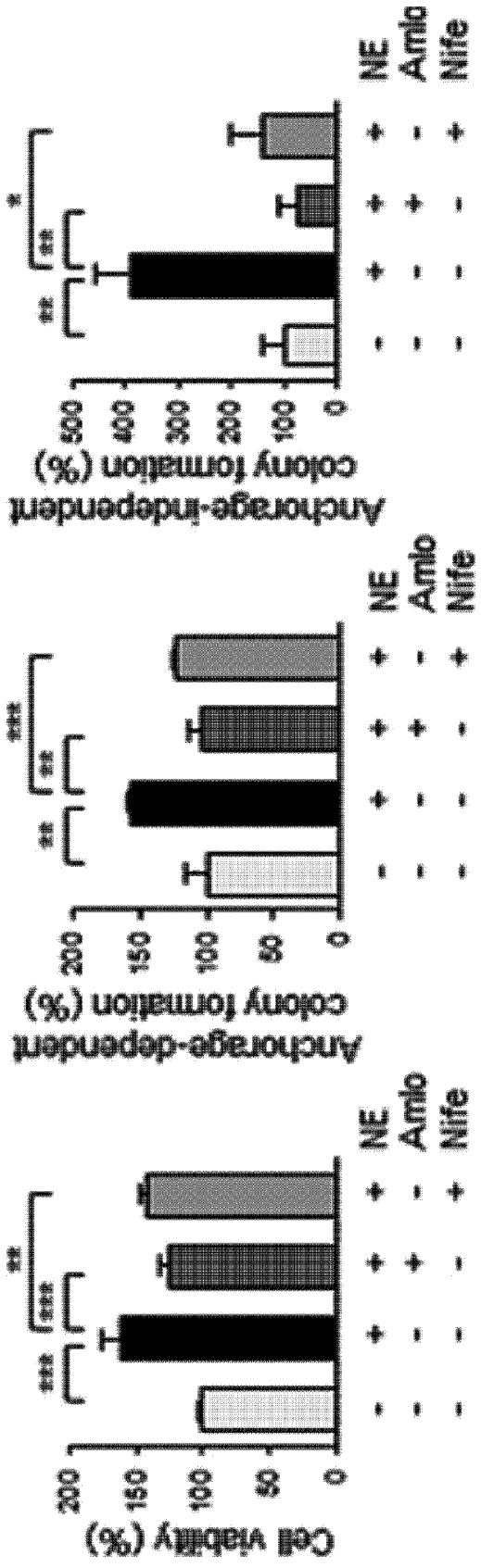

CUS
Pro
Amlo
IGF2
CB


CUS
Pro
Amlo
*
**
***
400
300
200
100
0
IGF2 secretion (%)

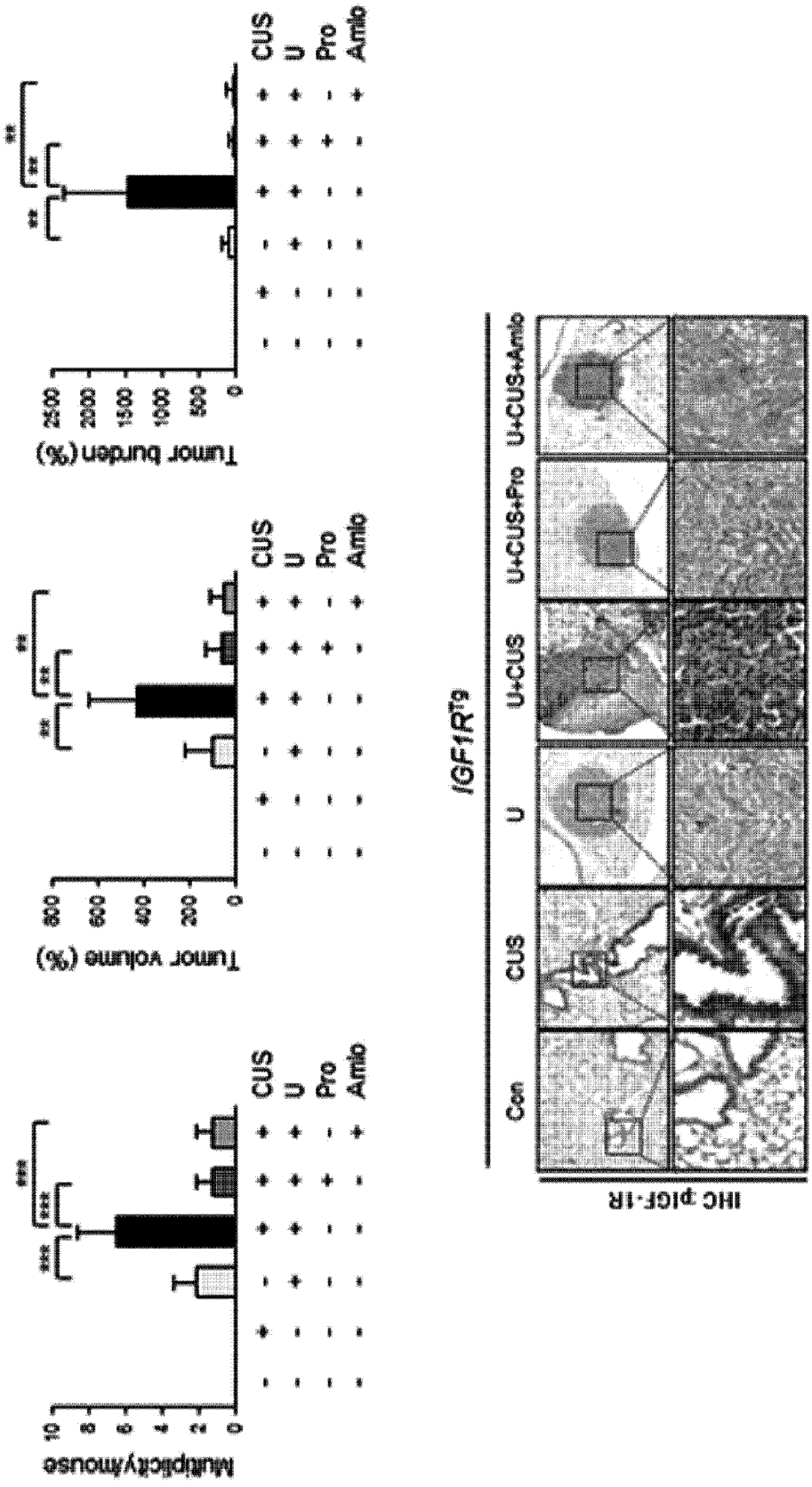
[도46]


Anchorage-independent colony formation (%)
800
600
400
200
0
***
***
***
***
NE
Ate
ICI
Pro
Anchorage-dependent colony formation (%)
200
150
100
50
0
*
*
**
**
NE
Ate
ICI
Pro
Cell viability (%)
200
150
100
50
0
***
**
**
NE
Ate
ICI
Pro

[도47]


Anchorage-independent colony formation (%)
500
400
300
200
100
0
NE
Amlo
Nife
*
**
**
Anchorage-dependent colony formation (%)
200
150
100
50
0
NE
Amlo
Nife
**
***
***
Cell viability (%)
200
150
100
50
0
NE
Amlo
Nife
**
***
***

[도48]


IGF1R^Tg
Con
CUS
U
U+CUS
U+CUS+Pro
U+CUS+Amlo
IHC pIGF-1R
CUS
U
Pro
Amlo
Tumor burden (%)
Tumor volume (%)
Multiplicity/mouse