



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0092095
(43) 공개일자 2017년08월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/15 (2014.01) *A23L 33/10* (2016.01)

A61K 35/12 (2015.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/15 (2013.01)

A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2016-0162871

(22) 출원일자 2016년12월01일

심사청구일자 2016년12월01일

(30) 우선권주장

1020160012493 2016년02월01일 대한민국(KR)

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

이지희

서울특별시 양천구 목동중앙로7길 32 102동 302호 (목동, 대림E-편한세상아파트)

김용배

서울특별시 강서구 양천로 67길 32 신동아아파트 102동 1002호

안영호

서울특별시 영등포구 버드나루로 142 한산오피스텔 303호

(74) 대리인

이원희

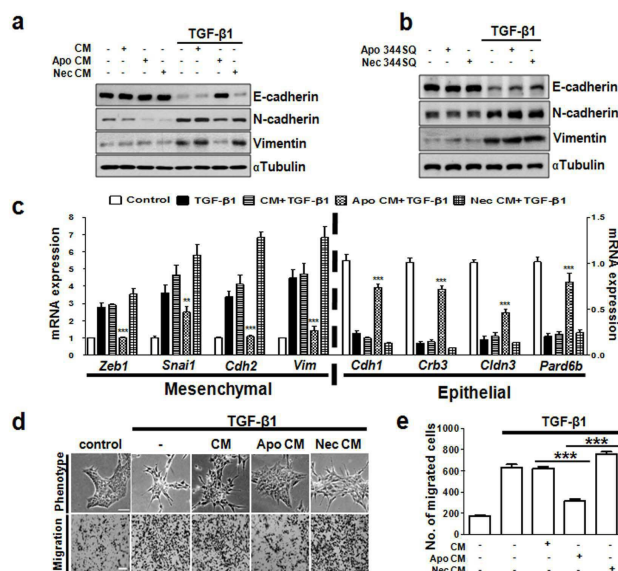
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 사멸화된 세포를 이용한 암 전이 억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 사멸화된 세포(apoptotic cell)를 이용한 암 전이 억제용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 매크로파지(macrophages)와 사멸화된 세포를 공동 배양하여 조건화된 배양액(conditioned medium)을 제조하였으며, 이를 TGF- β 1으로 EMT를 유도한 마우스 폐선암세포 344SQ에 처리한 결과, 344SQ 세포의 EMT, 이동 및 침투가 억제됨을 (뒷면에 계속)

대표도 - 도1



확인하였으며, 인간 비-소세포 폐암(NSCLS) 세포주인 A549 세포에서도 EMT, 이동 및 침투 억제 효과를 확인하였고, 이러한 결과가 세포 증식 활성에는 영향을 미치지 않는 결과이며, 유방암, 결장암 및 전립선암 등 다양한 인간 암세포주에서 상기 결과와 동일하게 암 전이 및 침윤이 억제됨을 확인하였다. 또한, 다양한 마크로파지(macrophages)로 조건화된 배양액에서도 EMT의 억제 효과를 확인하였고, 상기의 메커니즘이 Smad에 독립적(independent)으로 작동함을 확인하였다. 또한, 사멸화된 암세포에 의해 자극된 마크로파지에서 PPAR γ -의존적 PTEN 발현이 엑소솜(exosomes) 형태로 분비되는 것을 확인하였고, 분비된 PTEN이 344SQ 암 상피 세포에 도입되어 세포 극성 유지, 항-EMT, 암 세포 이동 및 침윤 억제 메커니즘에 관여함을 확인하였다. 더욱이 사멸화된 암세포에 의해 자극된 대식세포에서 PPAR γ 리간드인 15-HETE, lipoxin A4 및 15d-PGJ₂ 분비가 증가됨을 확인하였으며 이들 리간드 생성을 억제시, TGF- β 1 유도 PPAR γ 발현 및 활성도 그리고 PTEN 발현 억제 및 EMT 작용에 대한 조건화된 배양액의 역전 효과가 축소됨을 확인하였다. 이들 리간드를 직접 344SQ 암세포에 처리시 TGF- β 1 유도 PPAR γ 발현 및 활성화 그리고 PTEN 발현 억제가 회복되고, EMT의 억제 효과가 있음을 확인하였다. 아울러, 마우스 동물모델에서 일차 종양 조직과 종양 침윤 대식세포에서 PPAR γ 및 PTEN 발현의 증가를 확인하였고, 종양의 폐전이를 억제하는 효과를 확인함으로써, 본 발명의 조건화된 배양액은 암 전이의 근간이 되는 EMT, 이동, 줄기 세포 전환 및 침투 억제용 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 35/12 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0027945

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업-선도연구센터육성사업-기초의과학분야(MRC)

연구과제명 조직손상 방어 연구센터

기 여 율 40/100

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2016.09.01 ~ 2017.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A2A1A15053112

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업(학술진흥)-중견연구자지원사업-도약연구지원사업(전략)(성과확산)

연구과제명 암세포의 간엽전환, 침윤 및 전이에 미치는 사멸화 암세포 인식 및 포식작용의 억제효과
및 기전 규명

기 여 율 60/100

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

마크로파지(macrophages) 및 사멸화된 세포(apoptotic cell)를 공동 배양한 배양액을 함유하는 암세포 간엽전환(EMT), 이동(migration) 및 침투(invasion) 억제용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 사멸화된 세포는 암세포를 자외선 조사하여 제조한 것을 특징으로 하는 암세포 간엽전환, 이동 및 침투 억제용 약학적 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 사멸화된 세포는 상피 암세포(epithelial cancer cells)를 100 내지 400 nm 파장으로 5 내지 30분 동안 자외선을 조사한 후 1 내지 5시간 동안 배양하여 제조한 것을 특징으로 하는 암세포 간엽전환, 이동 및 침투 억제용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 사멸화된 세포는 344SQ 및 A549 세포인 것을 특징으로 하는 암세포 간엽전환, 이동 및 침투 억제용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 배양은 34 내지 38℃ 온도에서, 15 내지 25시간 배양하는 것을 특징으로 하는 암세포 간엽전환, 이동 및 침투 억제용 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 배양액은 암세포의 전이를 유발하는 전단계인 EMT(epithelial-mesenchymal transition)를 억제하는 것을 특징으로 하는 암세포 간엽전환, 이동 및 침투 억제용 약학적 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 배양액은 암세포의 전이 및 침윤 초기 단계를 억제하는 것을 특징으로 하는 암세포 간엽전환, 이동 및 침투 억제용 약학적 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 암은 폐암, 유방암, 결장암 및 전립선암으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 암세포 간엽전환, 이동 및 침투 억제용 약학적 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 폐암은 비소세포 폐암(non-small cell lung cancer)인 것을 특징으로 하는 암세포 간엽 전환, 이동 및 침투 억제용 약학적 조성물.

청구항 10

마크로파지(macrophages) 및 사멸화된 세포(apoptotic cell)를 공동 배양하는 단계를 포함하는 마크로파지로부터 암세포의 EMT(epithelial-mesenchymal transition)를 억제시키는 물질을 분비시키는 방법.

청구항 11

마크로파지(macrophages) 및 사멸화된 세포(apoptotic cell)를 공동 배양하는 단계를 포함하는 암 이동 및 침투 억제용 조성물의 제조방법.

청구항 12

마크로파지(macrophages) 및 사멸화된 세포(apoptotic cell)를 공동 배양한 배양액을 암세포에 처리하여 암세포의 EMT(epithelial-mesenchymal transition)를 억제하는 방법.

청구항 13

마크로파지(macrophages) 및 사멸화된 세포(apoptotic cell)를 공동 배양한 배양액을 유효성분으로 함유하는 암세포 이동 및 침투 억제용 건강기능식품.

청구항 14

마크로파지(macrophages) 및 사멸화된 세포(apoptotic cell)를 공동 배양한 배양액을 유효성분으로 함유하는 암세포 간엽전환, 이동 및 침투 억제용 항암보조제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암 전이 억제용 조성물에 관한 것으로, 마크로파지(macrophages)와 사멸화된 세포(apoptotic cell)를 공동 배양한 배양액이 초기단계에 발견된 암의 전이를 억제하여 암 전이 억제제로 유용하게 이용될 수 있다.

배경 기술

[0002] 암이란 다양한 원인에 의해 세포의 분열과 사멸 간의 균형이 파괴됨으로써 지속적인 분열과 증식에 의해 발생한 비정상적인 세포의 집단을 의미하며, 종양이라고도 한다. 일반적으로 장기, 백혈구, 뼈, 림프절 등을 포함한 100가지 이상의 신체의 여러 부분에 발병하며, 주변조직으로 침윤하는 현상 및 다른 기관으로 이동하는 전이를 통해 심각한 증상으로 발전한다(WHO, 2006).

[0003] EMT(epithelial-mesenchymal transition, 상피세포의 간엽화 현상)는 상피세포가 간엽세포로 바뀌는 것으로 한 종류의 세포가 다른 종류의 세포로 분화하는 세포 형성성(cell plasticity)의 한 가지 형태이다(Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. J Clin Invest 2009;119:1429-1437). 최근에 EMT가 태생기의 조직 형성과 분화 외에도 조직의 재생과 섬유화, 암의 발생과 전이 과정에 다양한 역할을

한다는 사실이 밝혀지고 있다.

[0004] 암의 진행과정에서는 종양세포의 국소적 침습(local invasion)과 전이가 일어나는데 이 과정에서 상피성 종양세포의 상피세포의 간엽전환(epithelial-mesenchymal transition, EMT)이 동반된다. 이 과정에서 간엽성 표현형을 나타내기 위해 특정 유전자의 전사 프로그램이 변화하며, 세포의 이동성이 증가하고, 세포-세포 사이, 혹은 세포-세포외기질 사이 상호작용이 변화한다고 알려져 있다.

[0005] 암 형성 과정에서는 상피성 종양세포의 E-cadherin 등의 세포 접착물질이 소실되면서 상피성 종양세포가 형태학적 변화를 일으켜 섬유모세포와 비슷한 형태로 변화하며 납작해지는 등의 변화를 유발한다. 상피세포의 간엽화 현상은 암 발생 과정의 중요한 초기 기전 중의 하나로 알려져 있으며, 상피성 종양세포는 탈분화하며 세포와 세포, 세포와 기저막간 결합이 소실되어 이동성을 얻게 된다. 또한 기저막을 파괴하며 침윤성 성장을 시작하고 종양세포가 림프관이나 혈관으로 전이하는 과정에서도 관여하는 것으로 알려져있다(유미현, et al., Kor J Oral Maxillofac Pathol 2009;33(1):37-46).

[0006] 사실상 암이 생명에 위협이 되는 가장 큰 원인은 암세포의 전이성에 있으며, 암으로 인한 사망의 대부분은 암 전이로 설명된다. 현재 임상적으로 입증된 보편적인 암 치료 방법이 외과 수술이지만, 원인이 되는 암이 제거되더라도 다른 조직으로 전이된 암세포에 의해 환자의 치료가 어렵게 된다. 따라서 암 정복은 실질적으로는 암 전이와의 싸움이라 볼 수 있으며, 현재 암 전이 기전에 관해 많은 연구가 진행되고 있으나, 이렇다할 치료제 개발로 이어지지는 못하고 있는 실정이다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 초기 암 진단 과정에서 암 전이를 유용하게 억제할 수 있는 방법을 찾기 위해 연구하던 중, 마크로파지와 사멸화된 세포를 공동 배양한 배지에서 암세포 간엽전환, 이동 및 침투 억제 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 사멸화된 세포(apoptotic cells)를 이용한 암 전이 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 마크로파지(macrophages) 및 사멸화된 세포(apoptotic cell)를 공동 배양한 배양액을 함유하는 암세포 간엽전환(EMT), 이동(migration) 및 침투(invasion) 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 마크로파지(macrophages) 및 사멸화된 세포(apoptotic cell)를 공동 배양하는 단계를 포함하는 마크로파지로부터 암세포의 EMT(epithelial-mesenchymal transition)를 억제시키는 물질을 분비시키는 방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 마크로파지(macrophages) 및 사멸화된 세포(apoptotic cell)를 공동 배양하는 단계를 포함하는 암 이동 및 침투 억제용 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 마크로파지(macrophages) 및 사멸화된 세포(apoptotic cell)를 공동 배양한 배양액을 암세포에 처리하여 암세포의 EMT(epithelial-mesenchymal transition)를 억제하는 방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 마크로파지(macrophages) 및 사멸화된 세포(apoptotic cell)를 공동 배양한 배양액을 유효성분으로 함유하는 암 이동 및 침투 억제용 건강기능식품을 제공한다.

[0014]

아울러, 본 발명은 마크로파지(macrophages) 및 사멸화된 세포(apoptotic cell)를 공동 배양한 배양액을 유효성분으로 함유하는 암세포 간염전환, 이동 및 침투 억제용 항암 보조제를 제공한다.

발명의 효과

[0015]

본 발명은 사멸화된 세포(apoptotic cell)를 이용한 암 전이 억제용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 마크로파지(macrophages)와 사멸화된 세포를 공동 배양하여 조건화된 배양액(conditioned meium)을 제조하였으며, 이를 TGF- β 1으로 EMT를 유도한 마우스 폐선암세포 344SQ에 처리한 결과, 암세포의 EMT, 이동 및 침투가 억제됨을 확인하였으며, 인간 비-소세포 폐암(NSCLS)에서도 EMT에 의한 암세포의 EMT, 이동 및 침투 억제 효과를 확인하였고, 이러한 결과가 세포 증식 활성에는 영향을 미치지 않는 결과이며, 유방암, 결장암 및 전립선암 등 다양한 인간 암세포주에서 상기 결과와 동일하게 암 전이 및 침윤이 억제됨을 확인하였다. 또한, 다양한 마크로파지(macrophages)로 조건화된 배양액에서도 EMT의 억제 효과를 확인하였고, 상기의 메커니즘이 Smad에 독립적(independent)으로 작동함을 확인하였다. 또한, 사멸화된 암세포에 의해 자극된 마크로파지에서 PPAR γ -의존적 PTEN 발현이 분비되는 것을 확인하였고, 분비된 PPAR γ 이 항-EMT 메커니즘 및 세포 극성 유지에 관여함을 확인하였으며, PPAR γ 리간드를 세포에 처리하였을 때, EMT의 억제 효과가 있음을 확인하였다. 아울러, 마우스 동물 모델에서 PPAR γ 및 PTEN 발현의 증가를 확인하였고, 종양의 항전이 효과를 확인함으로써, 본 발명의 조건화된 배양액은 암 전이의 근간이 되는 EMT, 이동, 줄기세포 전환 및 침투 억제용 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016]

도 1은 사멸화된 344SQ 세포에 노출된 마크로파지 RAW 264.7로부터 유래된 조건화된 배양액(apoptotic conditioned medium; Apo CM)을 344SQ 암 상피세포에 투여시 TGF- β 1로 유도한 EMT 및 암세포 이동이 감소됨을 확인한 도이다.

도 a 및 도 c 내지 도 e에서는 RAW 264.7 세포가 사멸(apoptotic; Apo) 또는 세포 괴사(necrotic; Nec)된 344SQ 암 상피 세포에 의해 24시간 동안 자극되었고, 이렇게 조건화된 배양액(conditioned medium; CM)을 TGF- β 1 10 ng/ml이 존재 또는 부재하는 조건으로 344SQ 암 상피세포에 48시간 동안 처리하였다.

도 b에서는 TGF- β 1 10 ng/ml이 존재 또는 부재하는 조건에서 사멸 또는 세포 괴사된 344SQ 암 상피세포를 344SQ 암 상피세포에 직접 처리하였다.

도 a 및 도 b는 항-E-cadherin, 항-N-cadherin, 및 항-vimentin 항체를 이용하여 총 세포 용해물의 면역학적 블롯팅을 수행하여 나타낸 결과이다.

도 c는 간엽(mesenchymal) 세포 마커로써 Zeb1, Snail, Cdh2 및 Vim, 상피(epithelial) 세포 마커로써 Cdh1, Crb3, Cldn3 및 Pard6a를 이용하여 상기 조건에서 qPCR을 수행하여 나타낸 결과이다.

결과는 대조군(흰색막대)를 기준으로 표현하고, 각각의 막대는 평균 $\pm$ SEM(n=3)로 나타내었다. P 값은 2-tailed Student's t test에 의해 결정되었다.

도 d는 세포의 이동성 표현형(migratory phenotypes)을 분석하기 위해 위상차 현미경을 이용하여 시각화하여 나타내고(위), 피브로넥틴-코팅 트랜스 웰을 이용하여 평가하였다(아래). 모든 스케일 바는 100 마이크론(micron)이다.

도 e는 도 d(아래)에서 시각화된 이동된 세포의 정량화를 상부 챔버의 바닥 표면에 접촉된 세포의 수를 계수함으로써 결정하였다. 각각의 바는 반복된 웰로부터 3 개의 부위를 계수하여 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었다.

도 2는 사멸 조건화된 배양액이 344SQ 암 상피세포의 줄기형상(stem-likeness) 및 침투(invasiveness)를 억제함을 나타낸 도이다. RAW 264.7 세포는 사멸 또는 세포 괴사된 344SQ 암 상피 세포에 의해 24시간 동안 자극되었고, 조건화된 배양액을 TGF- β 1 10 ng/ml이 존재 또는 부재하는 조건으로 344SQ 암 상피세포에 48시간 동안 처리하였다.

도 a는 줄기 세포 마커 CD90, Oct4, CD44 및 CD133을 이용하여 상기 조건에서 qPCR을 수행하여 나타낸 결과이다.

결과는 대조군(흰색 막대)를 기준으로 표현하고, 각각의 막대는 평균±SEM(n=3)로 나타내었다. P 값은 2-tailed Student's t test에 의해 결정되었다.

도 b는 매트릭겔(matrigel) 코팅 트랜스 웰을 이용한 침투 능력 분석을 위해 위상차 현미경을 이용해 세포를 시각화하여 나타낸 도이다(왼쪽). 침투된 세포의 정량은 상부 챔버의 바닥 표면에 접촉된 세포의 수를 계수함으로써 결정하였다(오른쪽). 각각의 바는 반복된 웰로부터 3 개의 부위를 계수하여 평균±SEM으로 나타내었다.

도 c는 사멸 조건화된 배양액(apoptotic conditioned medium)에 의해 세포 극성(polarity)의 붕괴가 억제됨을 나타낸 도이다. 344SQ 암 상피세포는 <실시예>에 기술된 조건으로 3D 매트릭겔(matrigel)에서 사진과 같이 배양되었다. 모든 스케일 바는 100 마이크로미터(micron)이다.

도 3은 인간 비-소세포 폐암(NSCLS)에서 사멸 조건화된 배양액(apoptotic conditioned medium)이 EMT 및 암세포 이동을 억제함을 나타낸 도이다.

도 a 및 도 c 내지 도 e에서는 마크로파지 RAW 264.7가 사멸 또는 세포 괴사된 A549 암 상피 세포로 24시간 동안 자극된 후 조건화된 배양액을 TGF-β1이 존재 또는 부재하는 조건으로 A549 암 상피세포에 48시간 동안 처리하였다.

도 b에서는 TGF-β1 10 ng/ml이 존재 또는 부재하는 조건에서 사멸 또는 세포 괴사된 344SQ 암 상피세포를 344SQ 암 상피세포에 직접 처리하였다.

도 a 및 도 b는 항-E-cadherin, 항-N-cadherin, 및 항-vimentin 항체를 이용하여 총 세포 용해물의 면역학적 블롯팅을 수행하여 나타낸 결과이다.

도 c는 간엽(mesenchymal) 세포 마커로 Snail, Cdh2 및 Vim, 상피(epithelial) 세포 마커로 Cdh1, Pard6b 및 OCLN를 이용하여 상기 조건에서 qPCR을 수행하여 나타낸 결과이다.

결과는 대조군(흰색막대)를 기준으로 표현하고, 각각의 막대는 평균±SEM(n=3)로 나타내었다. P 값은 2-tailed Student's t test에 의해 결정되었다.

도 d에서는 세포의 이동성 표현형(migratory phenotypes)을 분석하기 위해 위상차 현미경을 이용하여 시각화하여 나타내고(위), 피브로넥틴-코팅 트랜스 웰을 이용하여 평가하였다(아래). 모든 스케일 바는 100 마이크로미터(micron)이다.

도 e에서는 이동된 세포(도 d 아래)의 정량화를 상부 챔버의 바닥 표면에 접촉된 세포의 수를 계수함으로써 결정하였다. 각각의 바는 반복된 웰로부터 3 개의 부위를 계수하여 평균±SEM으로 나타내었다.

도 4는 사멸 조건화된 배양액(apoptotic conditioned medium)이 세포의 암줄기세포화 및 침투를 억제함을 나타낸 도이다. RAW 264.7 세포는 사멸 또는 세포 괴사된 A549 암 상피 세포에 의해 24시간 동안 자극된 후 생성된, 조건화된 배양액을 TGF-β1 10 ng/ml이 존재 또는 부재하는 조건으로 A549 암 상피세포에 48시간 동안 첨가되었다.

도 a는 암 줄기 세포(stem cell) 마커로 ALDH1A, CD44 및 CD90을 이용하여 상기 조건에서 qPCR을 수행하여 나타낸 결과이다.

결과는 대조군(흰색막대)를 기준으로 표현하고, 각각의 막대는 평균±SEM(n=3)로 나타내었다. P 값은 2-tailed Student's t test에 의해 결정되었다.

도 b는 매트릭겔(matrigel) 코팅 트랜스 웰을 이용한 침투 능력 분석을 위해 위상차 현미경을 이용해 세포를 시각화하여 나타낸 도이다(왼쪽). 침투된 세포의 정량은 상부 챔버의 바닥 표면에 접촉된 세포의 수를 계수함으로써 결정하였다(오른쪽). 각각의 바는 반복된 웰로부터 3 개의 부위를 계수하여 평균±SEM으로 나타내었다. 스케일 바는 100 마이크로미터(micron)을 나타낸다.

도 5는 폐암세포에서 조건화된 배양액(conditioned medium)이 세포 증식 활성(cellular proliferative activity)에 영향을 미치지 않음을 확인한 도이다. 폐암세포(344SQ 및 A549, 1×10^4 cells/well)를 96-웰 배양 플레이트에 3 세트씩 분주한 후, 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지에서 밤 동안 배양하였다. 그런 다음, 상기 배양 배지는 본 발명의 조건화된 배지로 교체하고 48시간 동안 배양한 후, 37°C에서 4시간 동안 MTT 분석을 수행하였다. dimethyl sulfoxide(100 μ l/well)에서 용해시킨 후, 진탕기(orbital shaker)에서 세포를 30분 동안 어둠 상태로 실온 배양한 다음 마이크로 플레이트 리더기를 사용하여 흡광도 570 nm에서 세포 증식을 측정하

였다.

도 6은 TGF- β 1을 처리한 다양한 인간 암세포주에서 사멸 조건화된 배양액(apoptotic conditioned medium)의 항-EMT 효과를 확인한 도이다.

RAW 264.7/사멸화된 암세포(MDA-MB-231, COLO320HSR 또는 PC3; Apo CM) 또는 RAW 264.7/괴사된 각각의 암세포(Nec CM)에서 얻어진 조건화된 배양액을 TGF- β 1(10 ng/ml)이 존재 또는 부재하는 조건으로 48시간 동안 처리한 암세포에서의 면역학적 블랏팅을 수행하였다. 전체 세포 용해물은 EMT 마커(E-cadherin, N-cadherin, vimentin) 및 α -튜블린(tubulin) 항체를 이용하여 면역학적 블랏팅을 수행하였고, 각각의 패널은 MDA-MB-231(유방암, 왼쪽), COLO320HSR(결장암, 가운데) 및 PC3(전립선암, 오른쪽) 세포 주에서 사멸 조건화된 배양액의 항-EMT 효과를 나타낸다.

도 7은 마우스 BMDMs(bone marrow-derived macrophages) 또는 M2-like BMDMs로부터 유래된 사멸 조건화된 배양액(apoptotic conditioned medium)에 노출된 344SQ 암 상피세포에서 TGF- β 1로 유도한 EMT가 억제됨을 확인한 도이다.

도 a 및 도 b에서는 마우스 BMDMs(bone marrow-derived macrophages) 또는 M2-like BMDMs가 사멸화된 344SQ 암 상피 세포에 의해 24시간 동안 자극되었다. 이후 생성된 사멸 조건화된 배양액은 TGF- β 1 10 ng/ml이 존재 또는 부재하는 344SQ 암 상피세포에 48시간 동안 첨가되었다.

도 a 및 도 b는 항-E-cadherin, 항-N-cadherin, 및 항-vimentin 항체를 이용하여 총 세포 용해물의 면역학적 블랏팅을 수행하여 나타난 결과이다.

도 8은 사멸(apoptotic) 또는 괴사(necrotic)된 A549 암 상피세포로 자극된, 건강한 공여자로부터 획득한 혈액의 단핵구에서 유래된 대식세포(blood monocyte-derived macrophages; MDMs) 또는 폐암 환자로부터 획득한 혈액의 단핵구에서 유래된 대식세포로부터(MDMs) 얻어진 배양액을 A549 암 상피세포에 처리하여 TGF- β 1로 유도한 EMT가 억제됨을 확인한 도이다.

도 a 및 b에서는 사멸(apoptotic) 또는 괴사(necrotic)된 A549 암 상피세포로 자극된, 건강한 공여자 유래의 인간 혈액세포 마크로파지(macrophage)(도 a) 또는 폐암 환자 유래의 인간 혈액세포 마크로파지(macrophage)(도 b)로부터 얻어진 배양액(conditioned medium)에 TGF- β 1 10 ng/ml을 넣거나 또는 넣지 않은 조건으로 A549 암 상피세포에 처리하여 상기 도 7과 같은 조건으로 실험하였다.

도 a 및 도 b는 항-E-cadherin, 항-N-cadherin, 및 항-vimentin 항체를 이용하여 총 세포 용해물의 면역학적 블랏팅을 수행하여 나타난 결과이다.

도 9는 사멸 조건화된 배양액(apoptotic conditioned medium)에서의 EMT 억제효과는 Smad 신호전달에 비의존적(independent)임을 확인한 도이다.

도 a는 344SQ 암 상피세포에 TGF- β 1 10 ng/ml을 각각 다양한 시간별로 처리한 후 TGF- β 1에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있는 신호전달 단백질들인 Smad2, Smad3, ERK1/2, p38 및 AKT에 대한 면역학적 블랏팅 분석을 수행하여 나타난 결과이다.

도 b, c, d, e 및 f는 사멸화(apoptotic)된 344SQ 암 상피세포로 자극된 RAW 264.7 세포로부터 얻어진 조건화된 배양액(conditioned medium)에 TGF- β 1 10 ng/ml을 첨가하여 344SQ 암 상피세포에 처리한 후, 상기와 같은 조건으로 신호전달 단백질들인 Smad2, Smad3, ERK1/2, p38 및 AKT에 대한 면역학적 블랏팅 분석을 수행하여 나타난 결과이다.

도 10은 사멸화된 암세포에 의해 자극된 마크로파지에서 PPAR γ 및 PTEN의 mRNA 및 단백질의 발현이 증가되는 것을 확인한 도이다.

도 a, b, c, d 및 e는 사멸화된 344SQ 암세포(ApoSQ)에 의해 자극된 마크로파지에서 PPAR γ 및 PTEN의 mRNA 및 단백질의 발현을 qPCR 및 면역학적 블랏팅 분석을 수행하여 나타난 결과이다.

도 f는 정상 또는 폐암환자 혈액에서 획득한 혈액의 단핵구에서 유래된 대식세포(blood monocyte-derived macrophages; MDMs) 또는 폐암 환자로부터 획득한 혈액의 단핵구에서 유래된 대식세포로부터(MDMs)을 사멸화된 A549 암 상피세포(ApoA)로 자극하였을 때의 PTEN의 mRNA 발현을 qPCR 분석으로 나타난 결과이다.

도 11은 사멸화된 344SQ 암 상피세포(ApoSQ)로 자극된 마크로파지에서, PPAR γ 및 PTEN의 mRNA 및 단백질의 발

현의 증가가 PPAR γ 의 억제제인 GW9662 또는 PPAR γ siRNA에 의해 억제되는 것을 확인한 도이다.

도 a 및 b는 사멸화된 344SQ 암 상피세포로 자극된 RAW 264.7 세포에서 GW9662에 의한, PPAR γ 및 PTEN의 mRNA 및 단백질의 발현 변화를 qPCR 및 면역학적 블랏팅 분석을, 그리고 도 c는 핵 추출물을 이용하여 PPAR γ 활성화 측정을 수행하여 나타낸 결과이다.

도 d는 사멸화된 344SQ 암 상피세포로 자극된 조건에서 PPAR γ siRNA를 도입하였을 때 증가되었던 PPAR γ 및 PTEN 단백질의 발현의 변화를 RAW 264.7 세포에서 면역학적 블랏팅 분석을 수행하여 나타낸 결과이다.

도 e 및 f는 사멸화된 344SQ 암 상피세포로 자극된 BMDMs(mouse bone marrow-derived macrophages) 및 M2-like BMDMs에서 GW9662에 의한, PPAR γ 및 PTEN의 단백질의 발현 변화를 면역학적 블랏팅 분석을 수행하여 나타낸 결과이다.

도 12는 사멸화된 344SQ 암세포(ApoSQ)에 의해 자극된 RAW 264.7 세포에서 PPAR γ 의 억제제인 GW9662를 처리하여 비활성 PPAR γ 에 의해 사멸 조건화된 배양액의 항-EMT 작용이 억제됨을 확인한 도이다.

도 a는 항-EMT 억제 효과 여부를 확인하기 위해, 위상차 현미경으로 세포의 모양변화를 나타낸 결과이다.

도 b는 항-EMT 억제 효과 여부를 확인하기 위해 항-E-cadherin, 항-N-cadherin, 및 항-vimentin 항체를 이용하여 총 세포 용해물의 면역학적 블랏팅을 수행하여 나타낸 결과이다.

도 c는 전사인자인 *Snail* 및 *Zeb1*의 mRNA의 발현 변화를 qPCR을 수행하여 나타낸 결과이다.

도 d는 매트릭셀(matrigel) 코팅 트랜스 웰을 이용한 침투 능력 분석을 위해 위상차 현미경을 이용해 세포를 시각화하여 나타낸 도이다(왼쪽). 침투된 세포의 정량은 상부 챔버의 바닥 표면에 접촉된 세포의 수를 계수함으로써 결정하였다(오른 쪽). 각각의 바는 반복된 웰로부터 3 개의 부위를 계수하여 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었다. 스케일 바는 100 미크론(micron)을 나타낸다.

도 13은 사멸화된 암세포에 의해 자극된 마크로파지에서 PPAR γ -의존적 PTEN이 분비됨을 확인한 도이다.

도 a는 사멸화된 344SQ 암 상피세포로 자극된 RAW 264.7 세포의 엑소좀(exosome) 분비상태를 투과전자현미경(TEM)으로 관찰한 결과이다.

도 b는 또한, 사멸화된 344SQ 암 상피세포에 의해 PTEN의 발현이 유도된 BMDM 세포의 분쇄물과 조건화된 배양액에서 면역침강(immunoprecipitation)실험을 이용하여, PTEN의 발현 및 분비의 변화를 면역학적 블랏팅을 수행하여 나타낸 결과이다.

도 c는 순차적 초 원심분리(ultracentrifugation)를 통해 엑소좀(exosome)을 분리한 후, PTEN 항체 및 엑소좀 마커인 CD63 항체를 활용하여 면역학적 블랏팅 및 면역침강(immunoprecipitation) 실험을 수행하여 나타낸 결과이다.

도 14는 PTEN이 도입된 344SQ 암 상피세포에서의 Akt 인산화와 PTEN 발현 변화를 확인한 도이다.

도 a는 조건화된 배양액을 처리하였을 때 PTEN 단백질의 발현 및 AKT의 인산화의 변화를 시간별로 비교하기 위해 면역학적 블랏팅을 수행하여 나타낸 결과이다.

도 b 및 c는 조건화된 배양액의 희석비율에 따른 PTEN 단백질의 발현 변화와 시간별 PTEN의 mRNA의 발현 변화를 확인하기 위해 면역학적 블랏팅과 qPCR을 수행하여 나타낸 결과이다.

도 d는 TGF- β 1 자체가 PTEN 단백질 발현에 주는 영향을 확인하기 위해 면역학적 블랏팅을 수행하여 나타낸 결과이다.

도 15는 사멸 조건화 배양액을 344SQ 암 상피세포에 투여시 Akt와 p38 MAP kinase 인산화 억제가 도입된 PTEN의 존적임을 확인한 도이다.

도 a는 조건화된 배양액을 TGF- β 1 10 ng/ml와 함께 처리하였을 때, PTEN 단백질의 발현 및 AKT의 인산화의 변화를 시간별로 비교하기 위해 면역학적 블랏팅을 수행하여 나타낸 결과이다.

도 b, c 및 d는 PTEN siRNA가 도입된 RAW 264.7 세포로부터 얻어진 조건화된 배양액을 처리한 344SQ 암 상피세포에서 TGF- β 1의 처리로 유도된 AKT와 p38 인산화 억제가 다시 회복되는지 확인하기 위해 면역학적 블랏팅을 수행하여 나타낸 결과이다.

도 16은 PTEN이 도입된 344SQ 암 상피세포에서의 세포 극성의 감소 억제를 확인한 도이다.

도 a는 344SQ 암 상피세포에 조건화된 배양액을 처리하였을 때, Na^+/K^+ ATPase가 풍부하게 포함되어 있는 세포막 부위에서의 PTEN 단백질의 발현 변화 및 AKT의 인산화 변화를 확인하기 위해 면역학적 블랏팅을 수행하여 나타낸 결과이다.

도 b는 control siRNA 또는 PTEN siRNA를 도입한 RAW 264.7 세포로부터 얻어진 사멸 조건화된 배양액을 처리한 344SQ 암 상피세포에서 TGF- β 1가 유도하는 세포 극성의 붕괴(disruption)현상 변화를 확인하기 위해 공초점 현미경을 통해 세포를 관찰한 결과이다.

도 c는 control siRNA 또는 PTEN siRNA를 도입한 RAW 264.7 세포로부터 얻어진 조건화된 사멸 조건화 배양액을 처리한 세포에서 TGF- β 1가 유도하는 세포 사이에서의 연결성(contact) 붕괴 변화를 확인하기 위해 공초점 현미경을 통해 세포를 관찰한 결과이다.

도 d 및 e는 SF1670를 처리하였을 때, 3D 매트릭젤에서 배양된 세포의 극성 및 세포 사이의 연결성 변화를 확인하기 위해 위상차 현미경을, 또는 세포극성의 붕괴현상을 확인하기 위해 공초점 현미경을 통해 세포를 관찰한 결과이다.

도 17은 344SQ 암 상피세포에서 사멸 조건화된 배양액에 의한 항-EMT 및 항-침투 작용이 도입된 PTEN 의존적임을 입증하는 도이다.

도 a는 control siRNA 또는 PTEN siRNA를 도입한 RAW 264.7 세포로부터 얻어진 사멸 조건화된 배양액을 처리한 344SQ 암 상피세포에서 항-EMT 효과 관련 여부를 확인하기 위해 항-E-cadherin, 항-N-cadherin, 및 항-vimentin 항체를 이용하여 총 세포 용해물의 면역학적 블랏팅을 수행하여 나타낸 결과이다.

도 b 및 c는 관련 전사인자인 *Snail* 및 *Zeb1* 의 mRNA의 발현 변화 및 침입 세포의 수 변화를 qPCR 및 매트릭젤(matrigel) 코팅 트랜스웰을 이용한 침투능력 분석을 수행하여 나타낸 결과이다.

도 18은 사멸 조건화 배양액이 처리된 344SQ 암 상피세포에서 PTEN 활동도에 의한 항-EMT 억제를 확인한 도이다.

도 a, b, c 및 d는 PTEN의 선택적 억제제인 SF1670을 344SQ 암 상피세포에 전처리한 후 사멸 조건화 배양액을 TGF- β 1과 함께 투여시 항-EMT 및 항-침투 작용이 억제됨을 확인하기 위해 위상차 현미경 세포관찰, 면역학적 블로팅, qPCR 및 트랜스웰 실험을 수행하여 나타낸 결과이다.

도 19는 사멸화된 암세포에 의해 자극된 마크로파지에서 PPAR γ 리간드가 생성됨을 확인한 도이다.

도 a, b 및 c는 사멸 조건화된 배양액 및 괴사 조건화된 배양액에서 15(S)-HETE, lipoxin A4 및 15d-PGJ₂의 함량 차이를 나타낸 결과이다.

도 d, e, f 및 g는 분비된 PPAR γ 리간드가 PPAR γ 의 활성 증가에 관여하는지 알아보기 위해, 15-lipoxygenase의 선택적 억제제인 PD146176과 lipocalin-type PGDS에 대한 siRNA를 실험에 사용하여 조건화된 배양액을 처리하였을 때, PPAR γ 리간드 함량의 변화를 나타낸 결과이다.

도 20은 사멸화된 암세포에 의해 자극된 마크로파지에서 분비되는 PPAR γ 리간드 생성을 억제시 TGF- β 1-유도 PPAR γ mRNA 발현, 활동도 그리고 PTEN mRNA 및 단백질 발현억제에 대한 사멸 조건화 배양액의 반전 효과가 감소함을 확인한 도이다.

도 a, b, c, d, e, f, g 및 h는 PD146176 또는 siL-PGDS 도입된 마크로파지로부터 생성된 PPAR γ 리간드가 감소되어 있는 배양액에서, TGF- β 1가 유도하는 PPAR γ mRNA 및 활성의 억제 그리고 PTEN mRNA 및 단백질의 억제 효과가 다시 역전되는지의 여부를 알아보기 위해 qPCR, PPAR γ 활성화 측정 및 면역학적 블로팅을 수행하여 나타낸 결과이다.

도 21은 사멸화된 암세포에 의해 자극된 마크로파지에서 분비된 PPAR γ 리간드가 사멸 조건화된 배양액에 의한 항-EMT 메커니즘에 관여함을 확인한 도이다.

도 a, b, c 및 d는 마크로파지에 PD146176 또는 siL-PGDS 도입으로 생성된 PPAR γ 리간드가 감소되어 있는 배양액에서 항-EMT 효과가 작동하는지 여부를 알아보기 위해 *Snail* 및 *Zeb1* 의 mRNA의 발현 변화를 qPCR을 수행하여 분석하고, 또한항-E-cadherin, 항-N-cadherin, 및 항-vimentin 항체를 이용하여 총 세포 용해물의 면역학적 블

롯팅을 수행하여 이들 EMT 마커의 단백질 발현 정도를 나타낸 결과이다.

도 22는 PPAR γ 리간드를 처리한 암세포에서의 항-EMT 효과를 확인한 도이다.

도 a 및 b는 기초농도의 PPAR γ 리간드 및 자극 농도의 PPAR γ 리간드에서의 TGF- β 1 유도성 EMT 억제 여부를 확인하기 위해 면역학적 블롯팅 및 qPCR을 수행하여 나타낸 결과이다.

도 c, d, e 및 f는 기초농도의 PPAR γ 리간드에서 TGF- β 1이 유도하는 PPAR γ mRNA 및 활성의 억제 그리고 PTEN mRNA 및 단백질의 억제효과가 역전되는지의 여부를 확인하기 위해 qPCR, PPAR γ 활성측정 및 면역학적 블롯팅을 수행하여 나타낸 결과이다.

도 23은 사멸화된 암세포에 의한 마우스 종양에서의 항전이 효과(in vivo)를 확인한 도이다.

도 a, b, c, d 및 e는 344SQ 암 상피세포를 마우스에 주입한 뒤, 2일 후에 사멸화(apoptotic)된 344SQ 암 상피세포를 마우스의 피하로 주입하고 6주 후에 원발 종양(primary tumor)의 생성, 무게 및 폐 전이변화를 분석하여 나타낸 결과이다.

도 24는 사멸화된 암세포에 의한 마우스 일차 종양에서의 항 전이기전 관련 분자들의 발현의 증가를 확인한 도이다.

도 a, b, c, d 및 e는 사멸화된 344SQ 암 상피세포를 주입한 마우스의 종양에서 PPAR γ , PTEN, CD36, *Snail* 및 *Zeb1*의 mRNA 변화를 qPCR을 수행하여 나타낸 결과이다.

도 f는 PTEN 단백질의 발현 및 AKT의 인산화의 변화를 면역학적 블롯팅을 수행하여 나타낸 결과이다.

도 25는 사멸화된 암세포 투여 후 마우스 일차 종양과 종양 침윤 마크로파지에서 PPAR γ 발현의 증가를 면역조직염색으로 확인한 도이다.

도 a, b, c 및 d는 조직을 면역염색하여, PPAR γ , F4/80의 발현 변화를 나타낸 결과이다.

도 26는 사멸화된 암세포 투여 후 마우스 일차 종양과 종양 침윤 마크로파지에서 PTEN 및 CD36 발현증가를 면역조직염색으로 확인한 도이다.

도 a, b, c, d, e 및 f는 조직을 면역염색하여, PTEN, CD36, F4/80의 발현 변화를 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

- [0017] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0018] 본 발명은 마크로파지(macrophages) 및 사멸화된 세포(apoptotic cell)를 공동 배양한 배양액을 함유하는 암세포 간엽전환(EMT), 이동(migration) 및 침투(invasion) 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0019] 상기 마크로파지는 마우스 및 인간 유래 어느 것이든 가능하며, 소교세포(microglia), 조직구(histiocytes), 호프바우어세포(Hofbauer cells), 혈관사이세포(mesangial cells), 쿠퍼세포(Kupffer cells), 복강 마크로파지(peritoneal macrophages), 폐포 마크로파지(alveolar macrophage), 표피 또는 진피 마크로파지(epidermal or dermal macrophages), 가장자리구역 마크로파지(marginal zone macrophages), 금속친화성 마크로파지(metallophilic macrophages), 적수 마크로파지(Red pulp macrophages), 백수 마크로파지(white pulp macrophages) 및 파골세포(osteoclasts)로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0020] 상기 사멸화된 세포는 상피 암세포(epithelial cancer cells)를 이용하는 것이 바람직하며, 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면 상피 암세포인 것이 가장 바람직하다.
- [0021] 상기 사멸화된 세포는 상피 암세포를 100 내지 400 nm 파장으로 5 내지 30분 동안 자외선을 조사하는 것이 바람직하며, 150 내지 350 nm 파장으로 5 내지 20분 동안 자외선을 조사하는 것이 더욱 바람직하며, 200 내지 300 nm 파장으로 10 내지 15분 동안 자외선을 조사하는 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0022] 상기 상피 암세포는 자외선 조사된 후, 10% FBS가 첨가된 RPMI 1604 배지에서 1 내지 10% CO₂ 조건하에서 30 내지 40℃ 온도로 1 내지 5시간 동안 배양할 수 있다.
- [0023] 상기 배양은 사멸화된 세포로 마크로파지를 자극 시키기 전, 20 내지 30시간 동안 X-VIVO 또는 무혈청 DMEM 배

지에서 배양하는 것이 바람직하며, 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면 X-VIVO 배지에서 24시간 동안 배양하여 혈청-결핍 상태로 만드는 것이 가장 바람직하다. 상기 사멸화된 세포를 자극하기 위해, 배양 배지를 사멸화된 세포가 포함된 X-VIVO 또는 무혈청 DMEM 배지로 교체할 수 있으며, 배지 교체 후 10 내지 30시간 동안 배양하는 것이 바람직하며, 15 내지 25시간 동안 배양하는 것이 더욱 바람직하며, 18 내지 24시간 동안 배양하는 것이 가장 바람직하다.

[0024] 상기 배양액은 암 전이 병리현상의 전단계로 알려진 EMT(epithelial-mesenchymal transition)를 억제하는 것을 특징으로 하며, EMT 억제작용으로 인한 암세포 이동 및 침투 등 암 전이 초기 단계를 억제하는 것을 특징으로 한다. EMT는 상피세포가 간엽세포로 바뀌는 현상으로, 암 형성 및 전이 과정에서 E-cadherin 등의 세포 접착 물질이 소실되고 형태학적 변화가 유발되어 상피성 종양세포의 변화를 유발시켜 EMT가 암의 진행 및 전이 과정에 다양한 역할을 한다고 알려져 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 TGF- β 1을 처리하여 세포의 EMT를 유발하였다.

[0025] 상기 암은 폐암, 유방암, 결장암 및 전립선암으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하며, 상기 폐암은 비소세포 폐암(non-small cell lung cancer)인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 마크로파지(macrophage)와 사멸화(macrophage)된 세포를 공동 배양하여 조건화된 배양액(conditioned meium)을 제조하였으며, 이를 TGF- β 1으로 EMT를 유도한 마우스 폐선암 세포 344SQ에 처리한 결과, 암 상피세포의 간엽 전환, 이동 전이 및 침투가 억제됨을 단백질 발현 및 mRNA 발현 검증, 위상차 현미경을 통한 표현형 검증, 피브로넥틴(fibronectin)이 처리된 트랜스웰(transwell)을 사용하여 확인하였으며(도 1 및 도 2 참조), 인간 비-소세포 폐암(NSCLS)에서도 암세포의 EMT, 이동 및 침투 억제 효과를 확인하였고(도 3 및 도 4 참조), 이러한 결과가 세포 증식 활성에는 영향을 미치지 않는 결과이며(도 5 참조), 유방암, 결장암 및 전립선암 등 다양한 인간 암세포주에서 상기 결과와 동일하게 암세포의 EMT, 이동 및 침투의 억제 효과를 확인하였다(도 6 참조). 또한, 다양한 마크로파지(macrophages)로 조건화된 배양액에서도 EMT의 억제 효과를 확인하였고(도 7 및 도 8 참조), 상기의 메커니즘이 Smad에 독립적으로 작동함을 확인하였으며(도 9 참조), 사멸화된 암세포에 의해 자극된 마크로파지에서 PPAR γ 및 PTEN의 mRNA 및 단백질의 발현이 증가되는 것을 확인한 후(도 10 참조), PPAR γ 의 억제제에 의해, PPAR γ 및 PTEN의 mRNA 발현이 억제되는 것을 확인하였고(도 11), 사멸화된 암세포에 의해 자극된 마크로파지에서 분비된 PPAR γ 이 항-EMT 메커니즘 관여함을 확인하였으며, 상기 마크로파지에서 PPAR γ -의존적 PTEN이 분비됨을 확인하였다(도 12 및 13 참조). 또한, PTEN이 도입된 344SQ 암 상피세포에서의 세포 신호 전달 메커니즘 및 세포 극성의 감소가 억제되는 것을 확인하였고(도 14 내지 16 참조), 상기 세포에서 항-EMT 억제를 확인하였으며(도 17 및 18 참조), 사멸화된 암세포에 의해 자극된 마크로파지에서 분비된 PPAR γ 리간드 및 처리된 PPAR γ 리간드가 항-EMT 메커니즘에 관여함을 확인하였다(도 19 내지 22 참조). 이에, 사멸화된 암세포에 의한 실제 마우스 종양에서의 항전이 효과(*in vivo*)를 확인한 후, 종양에서의 PPAR γ 및 PTEN 발현이 실제로 증가되어 있음을 최종적으로 확인하였다(도 23 및 26 참조),

[0027] 따라서, 본 발명의 조건화된 배양액(conditioned meium)은 암세포의 EMT, 이동 및 침투 억제, 더 나아가 이러한 작용을 통한 암 전이 억제용 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

[0028] 본 발명의 약학적 조성물은 통상적으로 사용되는 부형제, 붕해제, 감미제, 활택제, 향미제 등을 추가로 포함할 수 있으며, 통상적인 방법에 의해 정제, 캡슐제, 산제, 과립제, 현탁제, 유제, 시럽제, 기타 액제로 제형화 될 수 있다.

[0029] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물은 경구 투여용 제형, 예를 들면 정제, 트로치제(troches), 로젠제(lozenge), 수용성 또는 우성현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀전, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제(elixirs)로 제제화된다. 정제 및 캡슐 등의 제형으로 제제하기 위해 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제, 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 붕해제, 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌 글리콜 왁스와 같은 윤활유가 함유된다. 캡슐제형의 경우는 상기에서 언급한 물질 이외에도 지방유와 같은 액체 담체를 함유한다.

[0030] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피하주사, 정맥주사, 근

육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위해서는 본 발명의 혼합 추출물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 현탁액으로 제조하고 이를 앰플 또는 바이알(vial)의 단위 투여형으로 제제하며, 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

- [0031] 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 불활성화를 및 배성속도, 환자의 연령, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증 정도에 따라 적절히 선택된다.
- [0032] 또한, 본 발명은 매크로파지(macrophages) 및 사멸화된 세포(apoptotic cell)를 공동 배양하는 단계를 포함하는 매크로파지로부터 암세포의 EMT(epithelial-mesenchymal transition)를 억제시키는 물질을 분비시키는 방법을 제공한다.
- [0033] 또한, 본 발명은 매크로파지(macrophages) 및 사멸화된 세포(apoptotic cell)를 공동 배양하는 단계를 포함하는 암 이동 및 침투 억제용 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0034] 또한, 본 발명은 매크로파지(macrophages) 및 사멸화된 세포(apoptotic cell)를 공동 배양한 배양액을 암세포에 처리하여 암세포의 EMT(epithelial-mesenchymal transition)를 억제하는 방법을 제공한다.
- [0035] 상기 사멸화된 세포는 상피 암세포(epithelial cancer cells)를 이용하는 것이 바람직하며, 상기 사멸화된 세포는 상피 암세포를 100 내지 400 nm 파장으로 5 내지 30분 동안 자외선을 조사하는 것이 바람직하며, 150 내지 350 nm 파장으로 5 내지 20분 동안 자외선을 조사하는 것이 더욱 바람직하며, 200 내지 300 nm 파장으로 10 내지 15분 동안 자외선을 조사하는 것이 가장 바람직하다.
- [0036] 상기 상피 암세포는 자외선 조사된 후, 10% FBS가 첨가된 RPMI 1604 배지에서 1 내지 10% CO₂ 조건하에서 30 내지 40℃ 온도로 1 내지 5시간 동안 배양할 수 있다.
- [0037] 상기 배양은 사멸화된 세포로 매크로파지를 자극 시키기 전, 20 내지 30시간 동안 X-VIVO 또는 무혈청 DMEM 배지에서 배양하는 것이 바람직하며, 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면 X-VIVO 배지에서 24시간 동안 배양하여 혈청-결핍 상태로 만드는 것이 가장 바람직하다. 상기 사멸화된 세포를 자극하기 위해, 배양 배지를 사멸화된 세포가 포함된 X-VIVO 또는 무혈청 DMEM 배지로 교체할 수 있으며, 배지 교체 후 10 내지 30시간 동안 배양하는 것이 바람직하며, 15 내지 25시간 동안 배양하는 것이 더욱 바람직하며, 18 내지 24시간 동안 배양하는 것이 가장 바람직하다.
- [0038] 또한, 본 발명은 매크로파지(macrophages) 및 사멸화된 세포(apoptotic cell)를 공동 배양한 배양액을 유효성분으로 함유하는 암세포 간섭전환, 이동 및 침투 억제용 건강기능식품을 제공한다.
- [0039] 또한, 본 발명은 매크로파지(macrophages) 및 사멸화된 세포(apoptotic cell)를 공동 배양한 배양액을 유효성분으로 함유하는 암세포 간섭전환, 이동 및 침투 억제용 항암 보조제를 제공한다.
- [0040] 상기 사멸화된 세포는 상피 암세포(epithelial cancer cells)를 이용하는 것이 바람직하며, 상기 사멸화된 세포는 상피 암세포를 100 내지 400 nm 파장으로 5 내지 30분 동안 자외선을 조사하는 것이 바람직하며, 150 내지 350 nm 파장으로 5 내지 20분 동안 자외선을 조사하는 것이 더욱 바람직하며, 200 내지 300 nm 파장으로 10 내지 15분 동안 자외선을 조사하는 것이 가장 바람직하다.
- [0041] 상기 상피 암세포는 자외선 조사된 후, 10% FBS가 첨가된 RPMI 1604 배지에서 1 내지 10% CO₂ 조건하에서 30 내지 40℃ 온도로 1 내지 5시간 동안 배양할 수 있다.
- [0042] 상기 배양은 사멸화된 세포로 매크로파지를 자극 시키기 전, 20 내지 30시간 동안 X-VIVO 또는 무혈청 DMEM 배지에서 배양하는 것이 바람직하며, 상기 사멸화된 세포를 자극하기 위해, 배양 배지를 사멸화된 세포가 포함된 X-VIVO 또는 무혈청 DMEM 배지로 교체할 수 있으며, 배지 교체 후 10 내지 30시간 동안 배양하는 것이 바람직하며, 15 내지 25시간 동안 배양하는 것이 더욱 바람직하며, 18 내지 24시간 동안 배양하는 것이 가장 바람직하다.
- [0043] 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한

천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강기능식품 100 중량부당 0.01 ~ 0.04 중량부, 구체적으로는 약 0.02 ~ 0.03 중량부 범위에서 선택할 수 있다.

[0044] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강식품 100 중량부 당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0045] 상기 항암 보조제는 마크로파지(macrophages) 및 사멸화된 세포(apoptotic cell)를 공동 배양한 배양액에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상을 함유할 수 있다. 상기 항암 보조제는 임상 투여시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 비경구 투여시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사, 자궁내 경막주사, 뇌혈관내 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

[0046] 상기 항암 보조제는 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다. 상기 항암 보조제의 일일 투여량은 약 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 하루 1회 내지 수회 나누어 투여하는 것이 바람직하나 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여 방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

[0047] 본 발명의 항암 보조제는 실제 임상 투여 시에 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0048] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해서 상세히 설명한다.

[0049] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해서 한정되는 것은 아니다.

[0050] <실시예 1> 세포의 배양

[0051] 마우스의 폐 선암세포 344SQ(Murine lung adenocarcinoma 344SQ)와 인간 암세포주인 344SQ(폐), MDA-MB-231(유방암), COLO320HSR(결장암, colon) 및 PC3 (전립선암, prostate)의 세포를 10% 소태아 혈청(FBS, fetal bovine serum) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 첨가된 RPMI 1640(Media Tech Inc.) 배지에서 인큐베이터를 이용하여 37℃, 5% CO₂ 조건하에 배양하였으며, 모든 암세포와 RAW 264.7 세포는 American Type Culture Collection (ATCC), (Manassas, VA)에서 구입하였다. 마우스 RAW 264.7 마크로파지(macrophages)(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)는 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 첨가된 DMEM 배지에서 배양하였다. 또한, BMDM(mouse bone marrow-derived macrophages) 또는 TAM(M2-like tumor-associated macrophage) 세포를 얻기 위하여, C57BL 마우스의 골수를 분리하여 BMDM용 배지에 10%의 FBS 및 20%의 L292 첨가물을 추가하여 7일간 배양하였으며, 각각의 분화를 위하여 IL 50ng/ml가 포함되어 있는 BMDM용 배지에서 다시 3일간 배양하였다.

[0052] <실시예 2> Conditioned medium(CM) 제조

[0053] 마우스 마크로파지(RAW 264.7)를 5×10^5 cells/ml로 맞추어 플레이트에 옮긴 후, DMEM 배지(Media Tech Inc., Washington, DC, USA)에서 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 밤새 배양한 후, 상기 세포를 자극시키기 전, 24시간 동안 X-VIVO 10 배지에서 혈청-결핍 상태를 유도하였다. 상기 세포를 자극하기 위하여, 배양 배지를 사멸(apoptotic) 또는 괴사(necrotic)된 세포(1.5×10^6 cells/ml)를 포함하는 X-VIVO 10 배지로 교체하였다. 24시간 후, 상층액(supernatant)을 원심분리기를 이용하여 모은 다음, 표적 상피 세포(epithelial cells)를 자극시키는 조건화된 배양액(conditioned medium)으로 이용하였다.

[0054] 사멸화된 세포를 제조하기 위해, 상피 암세포(epithelial cancer cells)는 254 nm 파장으로 10분 동안 자외선 조사된 후, 10% FBS가 첨가된 RPMI-1640 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 2시간 동안 배양하였다. Wright-Giemsa 염색 시료와 현미경을 이용한 세포 핵 형태 평가에서 대략 70 내지 80%의 세포 사멸이 자외선 조사 세포에서 나타남을 확인하였다. 용해된 괴사(necrotic) 상피 암세포는 여러 번의 동결-해동 사이클로 수득하였다. 세포의 사멸 및 괴사는 아넥신 V-FITC/요오드화프로피디움(Annexin V-FITC/propidium iodide)(BD Biosciences, San Jose, CA)으로 염색한 후, FACSCalibur system(BD Biosciences)을 이용한 유세포 분석(flow cytometric analysis)을 수행하여 확인하였다.

[0055] <실시예 3> 환자의 혈액샘플 채취

[0056] 폐암 환자 및 건강한 대조군은 이화 여자 대학교 의과 대학의 임상 시험 심사위원회(Institutional Review Board of Ewha Womans University, School of Medicine)의 승인 및 절차에 따라 동의 후 실험에 참여하였다. 세 명의 건강한 대조군(남성 1명, 여성 2명) 및 항암제 없이 비소세포 폐암(non-small cell lung cancer)을 가진 환자(남성 1명, 여성 2명)가 실험에 참여하였다. 이들의 20 ml 혈액으로부터 밀도구배 원심분리 방법으로 말초혈액 단핵세포(PBMC; peripheral blood mononuclear cell)를 분리하였으며, 정제된 단핵세포는 10% 인간 AB 혈청을 함유하는 RPMI에서 8일간 배양되었다. 또한, 단핵세포의 마크로파지(macrophage)로의 분화 확인은 anti-F4 / 80 및 공초점 현미경(confocal microscopy)을 통해 수행되었다.

[0057]

[0058] <실시예 4> 마우스 실험

[0059] 이화 의학 연구소(Ewha Medical Research Institute)의 동물 관리위원회(Animal Care Committee)가 본 실험의 절차를 승인했으며, 실험 동물의 관리 및 사용에 있어서 National Institute of Health(NIH)의 가이드(Care and Use of Laboratory Animals)의 지침을 따랐다. 본 실험에서는 최소 8주령의 마우스를 사용하였으며, 각 그룹(조건)당 15 마리의 마우스를 사용하였다.

[0060] <실험예 1> 조건화된 배양액(Conditioned medium)의 암세포의 EMT 및 이동을 억제하는 효과 확인

[0061] 사멸화(apoptotic)된 344SQ 암 상피세포로 자극된 RAW 264.7 세포로부터 얻어진 조건화된 배양액(conditioned medium)의 암세포 EMT 및 이동의 억제 효과를 확인하였다.

[0062] 구체적으로, 상기 <실시예 2>의 방법에 따라 RAW 264.7 세포를 사멸(apoptotic) 또는 괴사(necrotic)된 344SQ 암 상피 세포로 24시간 동안 자극시켰다. 그런 다음, 얻어진 조건화된 배양액(conditioned medium)에 TGF- β 1 10 ng/ml를 처리하여 EMT(epithelial-mesenchymal transition)를 유도한 조건과 TGF- β 1을 처리하지 않은 조건으로 각각 344SQ 암 상피세포에 처리하였다. 이후, 상기 마우스 폐선암세포 344SQ의 암 전이 변화를 면역학적 블랏팅 분석, qPCR(Real-Time quantitative PCR) 및 위상차 현미경(phase-contrast microscopy)을 이용하여 확인하였다.

[0063] <1-1> 면역학적 블랏팅 분석

[0064] 면역학적 블랏팅 분석기법으로 상기 <실험예 1>의 344SQ 암 상피세포에서 상피(epithelial) 및 간엽(mesenchymal) 세포 마커의 발현을 확인하기 위해, 세포를 0.5% 트리톤 X-100을 함유하는 용해 버퍼에 용해시키고, 10% SDS-PAGE 겔을 이용하여 확인한 후, 니트로 셀룰로오스(nitrocellulose) 멤브레인으로 이동시켰다. 상

기 멤브레인은 상온에서 3% BAS를 포함하는 Tris 버퍼로 블라킹시킨 다음 상온에서 하기 표 1에 나타난 1차 항체로 반응시킨 후, 2차 HRP-컨쥬게이트 항체를 반응시켜 확인하였다.

표 1

항체	제조사
anti-E-cadherin	ab133597, Abcam, Cambridge, MA, USA
N-cadherin	061, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
vimentin	NB100-74564, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA
tubulin	T5168, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Anti-mouse IgG-HRP	sc-2005, Santa Cruz Biotechnology Inc, Finnell Street Dallas, TX, USA
Anti-rabbit IgG-HRP	sc-2004, Santa Cruz Biotechnology Inc, Finnell Street Dallas, TX, USA

그 결과, 도 1a에 나타난 바와 같이, TGF- β 1로 EMT를 유도한 세포에 사멸(apoptotic) 조건화된 배양액(apoptotic conditioned medium)을 처리하였을 때, TGF- β 1에 의한 E-cadherin 발현 감소, N-cadherin, vimentin의 발현증가 작용이 억제됨을 확인하였다(도 1a). 그러나 괴사(necrotic) 조건화된 배양액(necrotic conditioned medium)을 처리하였을 때, 이러한 TGF- β 1의 EMT 작용을 억제하지 못하였으며, 더불어, 사멸화(apoptotic)된 344SQ 암 상피세포를 직접 344SQ 암 상피세포에 투여하였을 때에도 TGF- β 1의 EMT 작용을 억제하지 못하는 것을 확인하였다(도 1b).

<1-2> qPCR 분석

qPCR(Real-Time quantitative PCR) 분석은 상기 <실험예 1>의 344SQ 암 상피세포에서 간엽(mesenchymal) 세포 마커로써, *Zeb1*, *Snai1*, *Cdh2* 및 *Vim*를 이용하였으며, 상피(epithelial) 세포 마커로써, *Cdh1*, *Crb3*, *Cldn3* 및 *Pard6a*를 이용하여 확인하였다.

구체적으로, qPCR(Real-Time quantitative PCR)을 수행하기 위해, 조건화된 배양액(conditioned medium)에서 배양한 세포가 6-웰 플레이트에서 80%정도까지 자라도록 배양한 후, 차가운 PBS로 두 차례 세척한 다음, Isol-RNA Lysis Reagent(5PRIME)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 RNA를 추출하였다. mRNA는 iScriptTM cDNA Synthesis Kit(BioRad)를 이용하여 역전사반응 시켰다. 정량적 PCR 반응을 위해, cDNA 생성물을 1:5로 희석하여 SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems)를 이용하여 증폭하였고, Real-Time PCR System(Applied Biosystems, Step One Plus)을 이용하여 분석하였다. mRNA 수치는 마우스 HPRT mRNA 및 인간 GAPDH mRNA를 기준으로 표준화하였다. 상기 qPCR에 사용된 프라이머는 하기 표 2와 같다. 실험 결과는 도면 상에 대조군(흰색 막대)를 기준으로 나타내었고, 각각의 바는 평균 $\pm$ SEM(n=3)을 나타낸다. P 값은 2회 수행한 실험 결과에 의해 결정되었다.

표 2

murine gene	forward (5' $\rightarrow$ 3')	reverse (5' $\rightarrow$ 3')
Zeb1	ATTGCTACTGTGAGCCCTGC (서열번호 1)	CATTCTGGTCTCCACAGTGGA (서열번호 2)
Cdh2	CCTCCAGAGTTTACTGCCATGAC (서열번호 3)	CCACCACTGATTCTGTATGCCG (서열번호 4)
Vim	GCGTGGGCTGCTCAAGAC (서열번호 5)	ATGGCGTCGGCCAGCGAGAA (서열번호 6)
Cdh1	TACGGCGGTGGTGAGGACGA (서열번호 7)	GCCACACGGGGGAGACTTGC (서열번호 8)
Crb3	CGGACCCCTTACAAATAGCA (서열번호 9)	CGTTGGACTCATCACCTGGG (서열번호 10)
Cldn3	CACCTGACTACGGGCCTAG (서열번호 11)	GGTTTCTTTGTCCATTGGCT (서열번호 12)

Par6b	TTTCCACCGCCAATCCACTGCT (서열번호 13)	GCTGATGACGATGTGAGGCTTC (서열번호 14)
-------	-------------------------------------	-------------------------------------

[0071] 그 결과 도 1c에 나타난 바와 같이, TGF- β 1로 EMT를 유도한 세포에 사멸 조건화된 배양액(apoptotic conditioned medium)을 처리하였을 때, EMT 신호 전달을 조절하는 마커로 알려진 전사인자의 mRNAs 발현이 현저하게 감소함을 확인하였다. 그러나 괴사 조건화된 배양액(necrotic conditioned medium)을 처리하였을 때, 이러한 TGF- β 에 의한 전사인자의 mRNAs 발현 증가작용을 억제하지 못하는 것을 확인하였다(도 1).

[0072] <1-3> 암 이동 분석

[0073] 상기 <실험예 1>의 344SQ 암 상피세포에서 암세포 이동(migration)을 실험하기 위해 10 μ g/ml 피브로넥틴(fibronectin)이 코팅된 트랜스웰 챔버(Transwell chambers)(Corning Inc)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 실험을 수행하였다. 간략하게, 상기 <실시예 1>에서 제조된 조건화된 배양액(conditioned medium)배지에서 5×10^4 cells/well로 배양된 전이 분석용 세포를 세럼-프리(serum free) RPMI 배지 상태로 상위 챔버(upper chambers) 웰 및 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지가 담긴 하위 웰(bottom wells)에 옮긴 후 37°C에서 16시간 전이 이동 시간으로 배양하였다. 그리고 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 고정시킨 후, 멤브레인 상위 표면의 비이동(nonmigrated) 세포를 긁어내었다. 하위 표면의 세포는 0.05% crystal violet을 이용하여 염색하고, 증류수로 세척하였다. 임의의 현미경 필드(10X 배율) 세 곳을 사진화 하고 각 챔버 당 세포수를 계수한 후, replicate wells로부터 바닥의 세포는 평균 $\pm$ SEM으로 표현하였으며, 세포는 위상차 현미경을 이용하여 전이 형태를 시각화하여 나타내었다.

[0074] 그 결과, 도 1d 및 1e에 나타난 바와 같이 사멸화(apoptotic)된 344SQ 암 상피 세포의 조건화된 배양액(conditioned medium)에서 이동성을 갖는 암세포의 표현형 보유 및 이동이 억제됨을 확인하였다(도 1).

[0075] <실험예 2> 조건화된 배양액(Conditioned medium)의 암 침투 억제 효과 확인

[0076] 사멸화(apoptotic)된 344SQ 암 상피세포로 자극된 RAW 264.7 세포로부터 얻어진 조건화된 배양액(conditioned medium)의 암 침투 억제 효과를 확인하였다.

[0077] 구체적으로, 암 줄기 세포(stem cell) 마커를 이용한 qPCR을 통해 암 침투 능력을 확인하였으며, 위상차 현미경 및 3D 매트릭젤(Matrigel) 배양을 통해서도 확인하였다. 먼저, 암 줄기 세포 마커를 이용한 qPCR은 상기 실험예 <1-2>와 동일한 방법으로 수행하였으며 사용된 프라이머는 하기 표 3과 같다.

표 3

마커	forward (5' $\rightarrow$ 3')	reverse (5' $\rightarrow$ 3')
CD90	GTCAGGCTGGTCACCTTCTG (서열번호 15)	AACTCTGGCACCATGAACC (서열번호 16)
Oct4	TCTTCTGCTTCAGCAGCTTG (서열번호 17)	GTTGGAGAAGGTGGAACCAA (서열번호 18)
CD44	AGAAATGGGTTCACTGTGGC (서열번호 19)	TTGCTACCACATCAAGCTGC (서열번호 20)
CD133	TAGAGGGAAGTCATTCGGCT (서열번호 21)	CCCAAGATACCTTCAATGCTG (서열번호 22)

[0079] 또한, 위상차 현미경을 이용한 암세포의 침투분석은 상기 실험예 <1-3>과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0080] 344SQ 암 상피세포에서 암세포 침투(invasion)는 200 μ g/ml 매트릭젤(matrigel)이 코팅된 트랜스웰 챔버(Transwell chambers)(Corning Inc)와 2×10^5 cells/well로 배양된 침투 분석용 세포를 이용하여 제조사의 프로토콜을 따라 수행하였다. 구체적으로, 기본 3D 매트릭젤(matrigel) 배양은 344SQ 암 상피세포(5000 세포/웰)를 고체화된 Growth Factor Reduced Matrigel (Corning Inc)에 깔고 10% FBS, 2% 매트릭젤(matrigel)이 포함된 RPMI1640에 배양한 후, 1주 동안 2 또는 3일 마다 배양액을 교체하였다. 1주 후 10 ng/ml TGF β 1과 2% 매트릭젤(matrigel)과 사멸 조건화된 배양액(apoptotic conditioned medium)을 암세포에 투여한 후 3일 동안 배양하였다. Eclipse TE-300 microscope (Nikon)을 사용하여 위상차 세포 이미지를 분석하였다.

[0081] 그 결과 도 2에 나타난 바와 같이, TGF-β1로 EMT를 유도한 세포에 사멸 조건화된 배양액(apoptotic conditioned medium)을 처리하였을 때, 암 줄기 세포 마커인 CD90, Oct4, CD44 및 CD133의 mRNA 발현이 현저하게 감소됨을 확인하였으며(도 2a), 위상차 현미경을 통해 관찰한 결과, 침투된 세포의 수가 대조군에 비해 현저하게 감소됨을 확인하였다(도 2b). 또한, 마트리젤(matrigel)에서 344SQ 암 상피세포를 배양시 세포의 극성화(polarity)가 강화되었음을 확인하였다(도 2c).

[0082] <실험예 3> 인간 비-소세포 폐암(NSCLS) 세포주(A549 세포주)에서 조건화된 배양액(conditioned medium)의 EMT에 의한 암 전이 및 침윤 억제 효과 확인

[0083] 인간 A549 세포주에서 사멸 조건화된 배양액(apoptotic conditioned medium)의 암세포 간엽전환, 이동 및 침투 억제 효과를 확인하였다.

[0084] 구체적으로, 상기 <실험예 1>와 동일한 방법으로 암세포 간엽전환, 이동 및 침투 변화를 면역학적 블랏팅 분석, qPCR(Real-Time quantitative PCR) 및 위상차 현미경(phase-contrast microscopy)을 이용하여 확인하였다. qPCR에 사용한 프라이머는 하기 표 4와 같다.

표 4

human gene	forward (5' → 3')	reverse (5' → 3')
Snail	TGCCCTCAAGATGCACATCCGA (서열번호 23)	GGGACAGGAGAAGGGCTTCTC (서열번호 24)
Cdh2	CCTCCAGAGTTTACTGCCATGAC (서열번호 25)	CCTCCAGAGTTTACTGCCATGAC (서열번호 26)
Vim	AGGCAAAGCAGGAGTCCACTGA (서열번호 27)	ATCTGGCGTTCAGGGACTCAT (서열번호 28)
Cdh1	GCCTCCTGAAAAGAGAGTGGAAAG (서열번호 29)	TGGCAGTGTCTCTCCAAATCCG (서열번호 30)
Par6b	GTTTCAACGGCCAATCCACTGC (서열번호 31)	CTATGGTTGTCAGGACGCAATAC (서열번호 32)
OCLN	ATGGCAAAGTGAATGACAAGCGG (서열번호 33)	CTGTAACGAGGCTGCCTGAAGT (서열번호 34)
ALDH1A	CCACTCACTGAATCATGCCA (서열번호 35)	GCACGCCAGACTTACCTGTC (서열번호 36)
CD44	CACGTGGAATACACCTGCAA (서열번호 37)	GACAAGTTTGGTGGCAGC (서열번호 38)
CD90	GGGAGACCTGCAAGACTGTT (서열번호 39)	CGGAAGACCCAGTCCA (서열번호 40)

[0086] 그 결과, 도 3 및 4에 나타난 바와 같이, TGF-β1로 EMT를 유도한 세포에 사멸 조건화된 배양액(apoptotic conditioned medium)을 처리하였을 때, E-cadherin 발현 감소, N-cadherin, vimentin의 발현증가 작용이 억제됨을 확인하였으며(도 3a), 간엽 세포 마커 mRNA의 발현 증가 및 상피 세포 마커 mRNA의 발현 감소를 확인하였다(도 3c). 또한, 도 3c에 나타난 바와 같이, TGF-β1로 EMT를 유도한 세포에 사멸 조건화된 배양액(apoptotic conditioned medium)을 처리하였을 때, EMT 신호 전달을 조절하는 마커로 알려진 전사인자의 mRNAs 발현이 현저하게 감소함을 확인하였다(도 3). 또한, 도 3d 및 3e에 나타난 바와 같이 사멸(apoptotic) A549 암 상피 세포의 조건화된 배양액(conditioned medium)에서 이동성을 갖는 암세포의 표현형 보유 및 이동이 억제됨을 확인하였다(도 3). 그리고 도 4에 나타난 바와 같이, TGF-β1로 EMT를 유도한 세포에 사멸 조건화된 배양액(apoptotic conditioned medium)을 처리하였을 때, 암 줄기 세포 마커인 ALDH1A, CD44 및 CD90의 mRNA 발현이 현저하게 감소됨을 확인하였으며(도 4a), 위상차 현미경을 통해 관찰한 결과에서도 침투된 세포의 수가 대조군에 비해 현저하게 감소되었음을 확인하였다(도 4b).

[0087] <실험예 4> 폐암세포에서 조건화된 배양액(conditioned medium)이 세포 증식 활성(cellular proliferative

activity)에 미치는 영향 확인

- [0088] 상기 <실험예 1> 내지 <실험예 3>에서 조건화된 배양액(conditioned medium)의 암세포의 간엽세포 전환, 이동 및 침투를 억제하는 효과를 확인한 바, 이에 상기와 같은 효과가 세포 증식 활성화에 미치는 영향을 확인하였다.
- [0089] 구체적으로, 폐암세포(344Q 및 A549, 1×10^4 cell/well)를 96웰 배양 플레이트에 옮긴 후, 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지에서 하루 동안 배양하였다. 상기 배양 배지는 TGF- β 1 첨가되거나 또는 첨가되지 않은 조건화된 배양액(conditioned medium) 배지로 교체한 후 48시간 동안 배양하였다. 그런 다음 세포는 37℃ 온도에서 4시간 동안 3-(4,5-dimethylthiazol-2-thiazolyl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay(Sigma-Aldrich, M5655)를 수행하였다. 상기 세포를 dimethyl sulfoxide(100 μ l/웰)을 용해시킨 후, 진탕기에서 상온으로 30분 동안 어둠에서 배양한 후, 마이크로 플레이트 리더(microplate reader)(Molecular devices, Versa max)를 이용하여 흡광도 570 nm에서 세포 증식을 확인하였다.
- [0090] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 사멸 조건화된 배양액(apoptotic conditioned medium)은 폐암세포의 세포 증식에 어떠한 영향도 주지 않음을 확인하였다(도 5).
- [0091] <실험예 5> 다양한 인간 암세포주에서 조건화된 배양액(conditioned medium)의 항-EMT 효과 확인
- [0092] 상기 조건화된 배양액(conditioned medium)을 다양한 암세포에 처리하였을 때의 영향을 알아보기 위하여 다음과 같이 실험하였다.
- [0093] 구체적으로 MDA-MB-231(유방암), COLO320HSR(결장암, colon) 및 PC3 (전립선암, prostate)세포를 TGF- β 1을 넣거나 또는 넣지 않은 RAW264.7 사멸(apoptotic) 조건화된 배양액(apoptotic conditioned medium)(Apo CM) 또는 RAW264.7 괴사 조건화(necrotic)된 배양액(necrotic conditioned medium)(Nec CM)으로 처리한 후, 실시예 <1-1>과 동일한 방법으로 면역학적 블랏팅 분석실험을 수행하였다.
- [0094] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 유방암세포, 결장암세포 및 전립선암세포 모두에서 TGF- β 1로 EMT를 유도한 세포에 사멸 조건화된 배양액(apoptotic conditioned medium)을 처리하였을 때, TGF- β 1에 의한 E-cadherin 발현 감소, N-cadherin, vimentin의 발현 증가 작용이 억제됨을 확인하였다(도 6). 그러나 괴사 조건화된 배양액(necrotic conditioned medium)을 처리하였을 때, 이러한 TGF- β 1의 EMT 작용을 억제하지 못함을 확인하였다(도 6).
- [0095] <실험예 6> 다양한 마크로파지(macrophages)로 조건화된 배양액(conditioned medium)의 항-EMT 효과 확인
- [0096] 마크로파지(macrophages) RAW 264.7 세포주 외에, 기원이 상이한 다른 마크로파지로 조건화(conditioned medium)된 배양액의 EMT 억제효과를 확인하였다.
- [0097] 구체적으로, 사멸화(apoptotic)된 344SQ 암 상피세포로 자극된 BMDM(mouse bone marrow-derived macrophages) 또는 TAM(M2-like tumor-associated macrophage)으로부터 얻어진 조건화된 배양액을 344SQ 암 상피세포에 48시간 동안 처리하고 TGF- β 1 유무에 따른 cadherin 및 vimentin의 변화를 면역학적 블랏팅 분석을 이용하여 확인하였다.
- [0098] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, TGF- β 1로 EMT를 유도한 세포에 BMDM 또는 TAM으로부터 얻어진 사멸 조건화된 배양액을 처리하였을 때, 각각 TGF- β 1에 의한 E-cadherin 발현 감소 및 N-cadherin, vimentin의 발현 증가 작용이 모두 억제됨을 확인하였다(도 7a 및 b).
- [0099] 또한, 사멸(apoptotic) 및 괴사(necrotic)된 A549 암 상피세포로 자극된, 건강한 공여자 유래의 인간 혈액세포 마크로파지(macrophage) 또는 폐암 환자 유래의 인간 혈액세포 마크로파지(macrophage)로부터 얻어진 배양액(conditioned medium)(<실험예 3> 참조)에 TGF- β 1 10 ng/ml를 넣거나 또는 넣지 않은 배양액으로 A549 암 상피세포에 처리하여 동일한 조건으로 실험하였다.
- [0100] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, TGF- β 1로 EMT를 유도한 세포에 사멸(apoptotic) 또는 괴사(necrotic)된 A549 암 상피세포로 자극된, 건강한 공여자 유래의 인간 혈액세포 마크로파지(macrophage) 또는 폐암 환자 유래의 인간 혈액세포 마크로파지(macrophage)로부터 얻어진 배양액을 처리하였을 때, 사멸(apoptotic) 조건화된 배양액(necrotic conditioned medium)에서 TGF- β 1에 의한 E-cadherin 발현 감소 및 N-cadherin, vimentin의 발

현 증가 작용이 모두 억제됨을 확인하였다. 그러나, 괴사(necrotic) 조건화된 배양액에서는 이러한 TGF- β 1의 EMT 작용을 억제하지 못하는 것을 확인하였다(도 8a 및 b).

[0101] <실험예 7> 조건화된 배양액(conditioned medium)의 항-EMT 효과 메커니즘의 확인

[0102] 조건화된 배양액(conditioned medium)에서의 EMT 억제효과 메커니즘을 알아보기 위해, 다음과 같이 실험하였다.

[0103] 우선, 344SQ 암 상피세포에 TGF- β 1 10 ng/ml을 다양한 시간별로 처리하여 TGF- β 1에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있는 신호전달 단백질들인 Smad2, Smad3, ERK1/2, p38 및 AKT에 대한 면역학적 블랏팅 분석을 수행하였다.

[0104] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, TGF- β 1에 의해, Smad2, Smad3, ERK1/2, p38 및 AKT의 인산화가 유발되는 것을 확인하였다(도 9a).

[0105] 다음으로, 사멸화(apoptotic)된 344SQ 암 상피세포로 자극된 RAW 264.7 세포주로부터 얻어진 조건화된 배양액(conditioned medium) 및 TGF- β 1을 10 ng/ml의 농도로 344SQ 암 상피세포에 처리한 후, 유의적 효과를 보였던 시간대에 세포들의 용해물을 얻어 상기의 신호전달 단백질의 면역학적 블랏팅 분석을 수행하였다.

[0106] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 사멸 조건화된 배양액(apoptotic conditioned medium)을 처리하였을 때, TGF- β 1에 의해 유도된 Smad2, Smad3 및 ERK1/2 인산화는 차이가 없음을 확인하였고, p38 및 AKT의 인산화는 장 시간 처리시 효율적으로 억제됨을 확인하였다(도 9b, c, d, e 및 f). 이 결과는 본 발명의 사멸 조건화된 배양액(apoptotic conditioned medium)은 이 TGF- β 1에 의해 유도되는 Smad에 독립적으로 EMT를 억제함을 제시한다.

[0107] <실험예 8> 사멸화된 암세포에 의해 자극된 매크로파지에서 PPAR γ -의존적 PTEN 발현의 증가 확인

[0108] 사멸 또는 괴사된 344SQ 암 상피세포로 자극된 RAW 264.7 세포에서 PPAR γ 또는 PTEN의 mRNA 발현이 증가되는지 여부를 상기 실험예 <1-1> 및 <1-2>에 기재된 바와 같이, qPCR 및 면역학적 블랏팅 분석을 수행하여 확인하였다.

[0109] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 사멸화된 344SQ 암 상피세포로 자극된 RAW 264.7 세포에서 PPAR γ 및 PTEN의 mRNA 및 단백질의 발현이 증가하였다(도 10a 내지 e). 또한, 정상 또는 폐암환자의 혈액에서 획득한 단핵구 유래 대식세포(monocyte-derived macrophages)를 사멸화된 A549 암 상피세포로 자극하여도 PTEN의 mRNA 발현이 증가되었다(도 10f).

[0110] 또한, 도 11에 나타난 바와 같이, 사멸화된 344SQ 암 상피세포 자극 1시간 전에 PPAR γ 의 억제제인 GW9662를 첨가하면, 사멸화된 344SQ 암 상피세포 자극에 의해 유도되는 PTEN의 mRNA 및 단백질 발현의 증가가 억제되었으며(도 11a 내지 c), GW9662 첨가로 사멸화된 344SQ 암 상피세포 자극에 의해 증가된 PPAR γ 활동도가 억제됨이 확인되었다(도 11c). 아울러, PPAR γ 의 siRNA를 도입하여 실험을 수행하였을 때, 사멸화된 344SQ 암 상피세포로 자극하였을 때 증가되었던 PPAR γ 및 PTEN 단백질의 발현이 다시 억제되는 것을 RAW 264.7 세포에서 확인하였다(도 11d). 또한 마우스 골수-유래 대식세포(BMDM(mouse bone marrow-derived macrophages) 및 M2 유형의 BMDM에서 GW9662 첨가시 사멸화된 344SQ 세포 자극으로 유도되는 PTEN 단백질 발현증가가 억제됨을 확인하였다(도 11e 및 f).

표 5

[0111]

siRNA	sense(5' → 3')	antisense(5' → 3')
PPAR γ	AGUAUGGUGUCCAUGAGAU (서열번호 41)	AUCUCAUGGACACCAUACU (서열번호 42)
PTEN	CAGGAAUGAACCAUCUACA (서열번호 43)	UGUAGAUGGUUCAUCCUG (서열번호 44)
L-PGDS	CAACUAUGACGAGUACGCUCUGCUA (서열번호 45)	GACUUCGCAUGGCCACCCUCUACA (서열번호 46)

[0112] <실험예 9> PPAR γ 의 항-EMT 메커니즘 관여 확인

[0113] 대식세포에서 사멸화된 암상피세포 자극에 의해 증가된 PPAR γ 신호가 암상피세포에서 항-EMT 작용 기전에 관여하는지의 여부를 알아보기 위해, 다음과 같이 실험하였다.

[0114] PPAR γ 의 억제제인 GW9662를 RAW 264.7 세포에 전 처리하고 사멸화된 344SQ 세포로 자극한 후 얻어진 조건화된 배양액(conditioned medium)을 TGF- β 1 10 ng/ml과 함께 344SQ 암 상피세포에 투여하고 배양하였다. 48시간 배양 후 세포 모양의 변화를 위상차 현미경을 통해 확인하였으며, 이와 함께, 면역학적 블랏팅 분석실험을 수행하였다.

[0115] 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이, 방추형의 세포가 감소하여 기존 항-EMT 효과와(도 12a), E-cadherin 발현 감소 및 N-cadherin, vimentin의 발현 증가를 억제하였던 현상이 다시 역전되었다(도 12a 및 b). 또한, 관련 전사인자인 *Snail* 및 *Zeb1*의 mRNA가 발현이 감소되다가 GW9662를 RAW 264.7 세포에 전 처리한 경우 다시 증가하였다(도 12c). 한편, 감소하였던 침입 세포의 수 역시 GW9662를 RAW 264.7 세포에 전 처리한 경우 다시 증가하였다(도 12d).

[0116] <실험예 10> 사멸화된 암세포에 의해 자극된 마크로파지에서 PPAR γ -의존적 PTEN의 분비 확인

[0117] 사멸화된 암세포에 의해 자극된 마크로파지로부터 PPAR γ -의존적 PTEN의 분비가 엑소좀 형태로 일어나는지의 여부를 확인하기 위해, 다음과 같이 실험하였다.

[0118] 투과전자현미경(TEM)분석 실험을 위해, 사멸화된 344SQ 암 상피세포로 자극된 RAW 264.7 세포를 2.5% glutaraldehyde (in 0.1M phosphate)로 2시간 동안 고정한 뒤, PBS로 10분씩 세번 세척하고 미리 준비해둔 블럭을 1%의 osmium tetroxide에서 추가 고정하였다. 10분씩 두번 세척할 때마다 각 농도별(60, 70, 80, 90, 95 및 100) 에탄올을 이용하여 연속적으로 건조시켰다. 샘플은 15분당 2회씩 교환하기 위해 propylene oxide에 두었는데, propylene oxide와 Epoxy resin(Polysciences Inc)의 비율을 2:1, 1:1 및 1:2로 한 혼합물에 각각 1시간 동안 두었다. 한시간 후, 1:2 혼합물은 100% Epon 침윤성 배지(medium)로 30분 동안 교체되었다. 관찰하고자 하는 구역은 toluidine blue로 염색된 약 1 μ m 두께의 부분에서 선택되었고, 약 60 내지 70 nm의 구역은 다이아몬드 칼을 사용하는 ultramicrotome(Reichert-Jung USA)을 사용하여 생성하였다. 샘플은 약 20분간 건조시켜 수분성 uranyl acetate 및 시트르산 납(lead citrate)으로 염색시켰으며, 시료의 관찰은 투과전자현미경(TEM, H-7650; Hitachi)을 사용하였다. 이때, 사용한 가속 전류는 80 kV였으며, 결과는 iTEM 소프트웨어(Olympus)를 사용하여 분석하였다.

[0119] 또한, PTEN의 검출을 위한 면역침강(immunoprecipitation) 실험을 위해, 배지를 2X exosome lysis buffer(4% SDS, 2% Triton X100, 0.1M Tris pH 7.4 및 2X 프로테아제 억제제)에 1:1의 부피비로 희석하여 사용하였으며, 4℃에서 한시간 동안 녹여 사용하였다. 배지(medium) 용해 버퍼 혼합물을 0.22 micron filter로 여과하여 15 ml 튜브에 나누어 담고, 여기에 25 μ l의 anti-PTEN(138G6, Cell Signaling)을 추가하여 4℃에서 4시간 동안 회전시켰다. 반응물을 100 μ l(50% slurry)의 Protein A/G Sepharose(Bio Vision Inc)를 사용하여 가라앉혔으며, pull-down bead가 붙어있는 혼합물을 새로운 튜브로 옮긴 후 IP 세척용 버퍼(25 ml HEPES pH 7.4, 1M NaCl, 1 ml EDTA, 0.5% Triton X-100)를 사용하여 수 회 세척하여 실험하였다.

[0120] 아울러, 원심분리를 통한 엑소좀(exosome)의 분리를 위해, 사멸화된 344SQ 암 상피세포로 자극된 RAW 264.7 세포의 조건화 된 배양액 (conditioned medium)를 획득한 후, 초원심분리기(Optima L-100K, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)기를 사용하여 200 g, 20,000 g 및 100,000 g로 순차적 원심분리하였다. 엑소좀 펠렛(pellet)을 프로테아제 억제제가 첨가되어 있는 차가운 PBS로 세척한 후, 다시 100,000 g에서 70분 동안 원심분리하였다. 또한, 면역학적 블랏팅 실험을 위해, 엑소좀 펠렛을 프로테아제 억제제가 첨가되어 있는 RIPA 버퍼에 재부유(resuspended)시켜 실험에 사용하였다.

[0121] 그 결과, 도 13에 나타난 바와 같이, 사멸화된 344SQ 암 상피세포로 자극된 RAW 264.7 세포에서 미세소포(microvesicle)를 발견하였다(도 13a).

[0122] 또한, 사멸화된 344SQ 세포에 의해 PTEN의 발현이 유도된 BMDM 세포의 분쇄물에서 PTEN이 뚜렷하게 발현하였음을 western blot을 이용하여 다시 확인하였으며(도 13b 왼쪽, 더욱이 조건화된 배양액에서 면역침강(immunoprecipitation) 후 non-reducing 조건에서 SDS-PAGE 이용하여 PTEN 단백질 발현을 확인하였다(도 13b 오른쪽, 아래 화살표). 조건화된 배양액에서 순차적 초 원심분리(ultracentrifugation)를 통해 엑소좀(exosome

e)을 분리한 후, PTEN 항체 및 엑소좀 마커인 CD63 항체를 활용하여 면역학적 블랏팅 실험을 수행하였다. 전체 조건에서 CD63의 변화 없이 PTEN 단백질이 사멸 조건화된 배양액내에 증가하였으나, GW9662 전 처리한 경우 PTEN 발현이 억제되었다(도 13c). 이는 마크로파지에서 사멸화 된 344SQ 세포 자극으로 유도된 PPAR γ 활성화에 의해 증가된 PTEN 단백질이 엑소좀으로 삼입 된 후 분비되었음을 의미한다.

[0123] <실험예 11> PTEN이 도입된 세포에서의 시그널, 세포극성 및 EMT 변화 확인

[0124] PTEN이 도입된 344SQ 암 상피세포에서의 세포 시그널, 세포 극성 및 EMT에 미치는 영향을 알아보기 위해, 조건화된 배양액(conditioned medium)과 TGF- β 1 10 ng/ml를 344SQ 암 상피세포에 함께 첨가한 후 qPCR 및 면역학적 블랏팅 분석실험을 수행하였다.

[0125] 그 결과, 도 14 및 15에 나타난 바와 같이, 조건화된 배양액에 의해 PTEN 단백질의 발현이 빠르게 증가하여 약 24시간이 지난 후에도 여전히 높게 발현되었다. 그러나 기초 AKT의 인산화(basal Akt phosphorylation)는 약 6시간이 지나면서 감소하였다(도 14a). 또한, TGF- β 1 첨가 유무에 따라 PTEN mRNA 발현은 변화가 없으나, 조건화된 배양액의 희석비율이 증가함에 따라서 PTEN 단백질의 발현양도 감소하였다(도 14b 및 c). 아울러, TGF- β 1는 PTEN 단백질 발현에 24 시간 동안 영향을 주지 않았으며, 이후에는 감소되었다(도 14d). 또한, TGF- β 1 유도성 AKT의 인산화가 조건화된 배양액을 TGF- β 1과 함께 첨가시 24시간까지 억제되었다(도 14a). PTEN siRNA를 처리하여 PTEN의 발현이 저해된 RAW 264.7 세포(도 15b)로부터 얻어진 조건화된 배양액을 처리한 세포에서는 TGF- β 1 유도성 AKT 또는 p38 MAP kinase 인산화가 감소되지 않았다(도 15c 및 d). 이는 세포에 도입된 PTEN이 기초 AKT 인산화 및 TGF- β 1 유도성 non-Smad 시그널에 영향을 주는 것을 의미한다.

[0126] <실험예 12> PTEN이 도입된 세포에서의 세포 극성 유지 효과 확인

[0127] 조건화된 배양액(conditioned medium)을 세포에 처리하면 세포의 극성(cell polarity)을 유지하기 위해 PTEN이 세포막 쪽으로 모이는 지의 여부를 다음과 같은 방법으로 확인하였다.

[0128] 세포막의 분별(fractionation)실험은 MemperTM Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit를 이용하여 제조사의 지침에 따라 수행하였다.

[0129] 또한, 면역 형광(immonofluorescence) 실험을 위해, 상기 처리한 344SQ 암 상피세포를 차가운 PBS를 이용해서 두 번 세척한 후, 상온에서 4%의 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 8분간 고정하였다. 이를 PBS에서 다시 세번씩 5분간 세척하고 상온에서 0.5 %의 트리톤 X-100(in PBS)로 5분간 처리하였다. 다음으로, 5%의 BSA 및 5%의 염소혈청을 포함하는 블라킹 용액을 세포에 첨가하여 상온에서 반응시키고, 여기에 1차 항체를 1:500의 비율로 첨가하였다. 이를 하룻밤 동안 4℃에서 반응시키고, PBS로 세척한 뒤, 다시 2차 항체를 넣어 상온에서 한시간 동안 반응시켰다. 그리고 반응이 끝난 세포를 PBS로 세번씩 5분간 세척하였다. 또한, 3D 매트릭젤(matrigel) 상에서의 344SQ 암 상피세포 염색을 위해, 상온에서 30분간 세포를 고정하였다. 고정된 세포를 IF-Wash 버퍼(buffer)(0.05% NaN₃, 0.1% BSA, 0.2% Triton X-100 및 0.05% Tween-20 in PBS)를 사용하여 세척하고, 5% BSA를 포함하는 블라킹 용액을 첨가하여 상온에서 전처리하였다. 여기에 블라킹 용액에 1:500으로 희석한 1차 항체를 하룻밤 동안 4℃에서 반응시키고, 이를 세척한 후, 블라킹 용액에 1:500으로 희석한 2차 항체를 첨가하였다. 세포를 상온에서 1시간 동안 반응시킨 뒤, PBS로 세번씩 5분간 세척하고 VECTASHIELD Mounting Medium을 처리한 후, 공초점 현미경(confocal microscope)(Carl Zeiss LSM 800)을 처리하여 관찰하였다.

[0130] 그 결과, 도 16에 나타난 바와 같이, 344SQ 암 상피세포에 조건화된 배양액을 12시간 처리하였을 때, Na⁺/K⁺ ATPase가 풍부하게 포함되어 있는 세포막 부위에서 PTEN 단백질의 발현이 증가하는 것을 통해 PTEN이 세포막 쪽으로 모임을 확인하였다. 또한, PTEN의 선택적 억제제인 SF1670을 처리하면, 세포막에서 감소되어 있던 AKT의 인산화가 다시 증가함을 확인하였다(도 16a). 이는 모여진 PTEN이 AKT의 활성화를 억제하는 방식으로 작동하고 있음을 나타낸다.

[0131] 또한, 공초점 현미경을 통해 세포 극성을 확인하였을 때, control siRNA을 도입한 RAW 264.7 세포로부터 얻어진 조건화된 배양액을 처리한 344SQ 암 상피세포에서, TGF- β 1에 의해 유도되는 세포 극성의 붕괴(disruption)현상이 억제되었다. 그러나, PTEN siRNA을 도입한 RAW 264.7 세포로부터 얻어진 조건화된 배양액을 처리한 세포에서는 이러한 억제 현상 없이 세포의 극성이 붕괴되었다(도 16b). 아울러, control siRNA을 도입한 RAW 264.7 세포

로부터 얻어진 조건화된 배양액을 처리한 세포에서는, TGF- β 1가 유도하는 세포 사이에서의 연결성(contact) 붕괴가 일어나지 않았다. 그러나 PTEN siRNA를 도입한 RAW 264.7 세포로부터 얻어진 조건화된 배양액을 처리한 세포에서는 세포 사이에서의 연결성이 붕괴되는 것을 확인하였다(도 16c). 유사하게, SF1670을 344SQ 세포에 처리하면, 조건화된 배양액 투여로 세포의 극성 유지 및 세포 사이 연결성 붕괴를 억제하는 효과가 역전되는 것을 3D 매트릭스에서 배양된 세포의 위상 차 이미지 및 세포 군집의 염색 사진을 통해서 확인하였다(도 16d 및 e). 이는 세포에 도입된 PTEN이 세포와 세포 사이에서의 연결이 붕괴되는 것을 억제함으로써, 상피성 암세포의 극성 및 세포 보전성(cell integrity)의 유지에 관여할 수 있음을 의미한다.

[0132] <실험예 13> PTEN이 도입된 세포에서의 항-EMT 억제 확인

[0133] 조건화된 배양액(conditioned medium)을 처리하였을 때 세포 도입 PTEN이 항-EMT 및 항 전이 효과에 관여하는지 알아보기 위해, PTEN siRNA를 도입한 RAW 264.7 세포로부터 얻어진 조건화된 배양액과 TGF- β 1 10 ng/ml를 함께 344SQ 암 상피세포에 처리한 후, qPCR 및 면역학적 블랏팅 분석실험을 수행하였다.

[0134] 그 결과, 도 17 및 18에 나타난 바와 같이, 기존의 항-EMT 효과였던 E-cadherin 발현 감소 및 N-cadherin, vimentin의 발현 증가의 억제 현상이 다시 역전되어 EMT가 유도되었다(도 17a). 또한, 관련 전사인자인 *Snail* 및 *Zeb1*의 mRNA의 발현이 다시 증가하며, 침입 세포의 수 역시 증가하였다(도 17b 및 c). 또한, PTEN의 선택적 억제제인 SF1670을 344SQ 암세포에 처리하였을 때에도 상기와 같은 결과가 나타나는 것을 확인하였다(도 18 a 내지 d). 이는 세포 도입 PTEN 또는 PTEN 시그널이 항-EMT에 관여함을 나타낸다.

[0135] <실험예 14> 사멸화된 암세포에 의해 자극된 마크로파지에서 분비된 PPAR γ 리간드의 항-EMT 메커니즘 관여 확인

[0136] 사멸화된 세포는 PPAR γ 리간드로 알려져 있는 15-lipoxygenase-dependent 15-hydroxyeicosatetraenoic acid(HETE), lipoxin A4 및 PGD₂ synthase-dependent 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J₂(15d-PGJ₂)의 생산을 자극하는 것으로 알려져 있으므로, 이에, 조건화된 배양액(conditioned medium)내에 상기 PPAR γ 리간드들이 존재하는지의 여부를 실험을 통해 확인하였다.

[0137] 그 결과, 도 19에 나타난 바와 같이, 사멸 조건화된 배양액에서 15-HETE, lipoxin A4 및 15d-PGJ₂의 함량이 증가되어 있는 것을 확인하였으며, 피사 조건화된 배양액에서는 상기 리간드가 증가되어 있지 않음을 확인하였다(도 19 a 내지 c). 이는 근거리 분비방법(paracrine manner)으로 세포 도입되는 상기 리간드가 PTEN 프로모터 상의 PPAR γ 의 전사활성을 촉진시킴을 의미한다.

[0138] 또한, 분비된 PPAR γ 리간드가 344SQ 암세포에서 PPAR γ 의 활성 증가에 관여하는지 알아보기 위해, 15-lipoxygenase의 선택적 억제제인 PD146176과 lipocalin-type PGDS에 대한 siRNA를 RAW 264.7 세포에 사용하여 실험하였다. 그 결과, 이러한 조건에서, 사멸화된 344SQ 세포를 자극시 15-HETE, lipoxin A4, PGD₂ 및 15d-PGJ₂의 함량이 크게 감소하였다(도 19 d 내지 g). 특히, PPAR γ 리간드가 감소되어 있는 상기의 조건화된 배양액을 344SQ 암 세포에 처리시 TGF- β 1이 유도하는 PPAR γ mRNA 및 활성의 억제 그리고 PTEN mRNA 및 단백질의 억제에 대한 역전 효과가 축소됨을 확인하였고(도 20 a 내지 h), 이와 같은 맥락으로 항-EMT 효과 역시 효과적으로 작동하지 않음을 확인하였다(도 21 a 내지 d). 이는 마크로파지에서 분비되는 이러한 리간드들이 마크로파지에 영향을 미치지 않은 상태로 344SQ 암세포에 도입된 후 PPAR γ 및 PTEN 시그널의 활성화를 통해 항-EMT 메커니즘에 관여함을 의미한다.

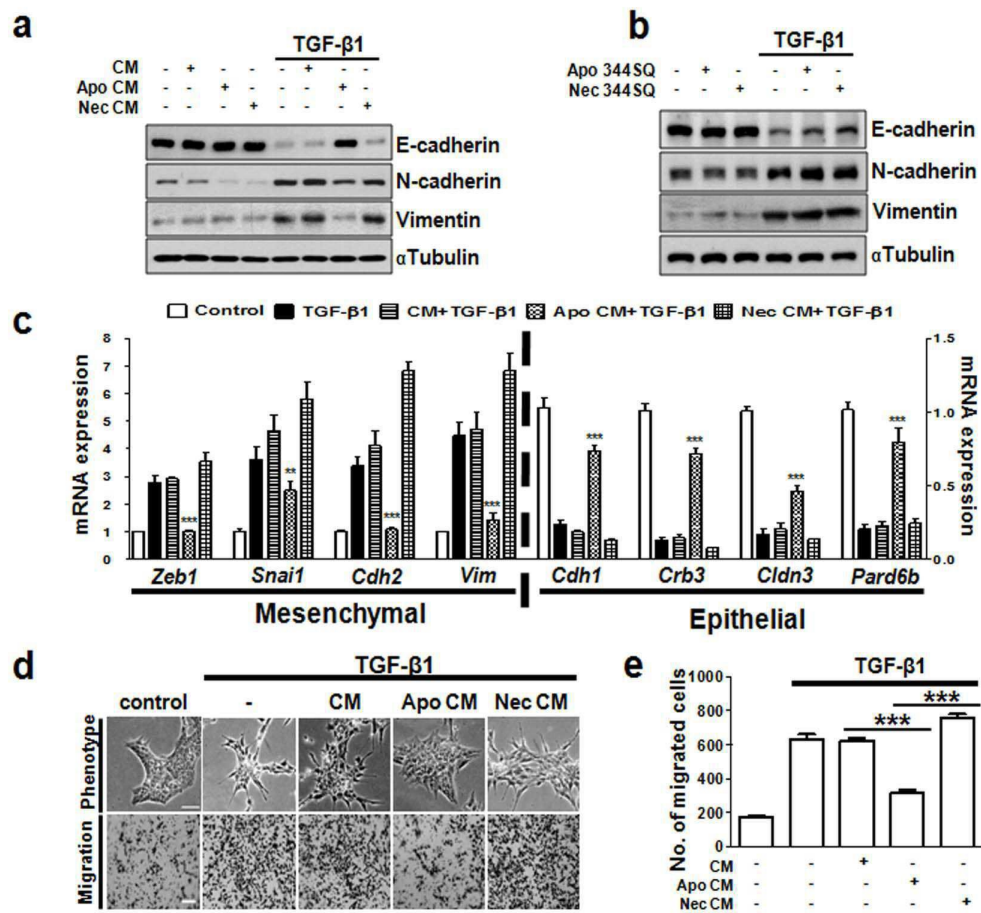
[0139] <실험예 15> PPAR γ 리간드를 처리한 암세포에서 항-EMT 효과 확인

[0140] 상기 <실험예 14>에서의 PPAR γ 리간드인 15-HETE, lipoxin A4 및 15d-PGJ₂가 PPAR γ 및 PTEN 메커니즘의 활성화를 통해 항-EMT 메커니즘에 관여하는지의 여부를 확인하기 위해 상기 리간드의 기초농도(80, 73 및 73 pg/ml) 및 자극농도(258, 442 및 226 pg/ml)를 TGF- β 1과 함께 344SQ 암 상피세포에 직접 첨가한 후, qPCR 및 면역학적 블랏팅 분석실험을 수행하였다.

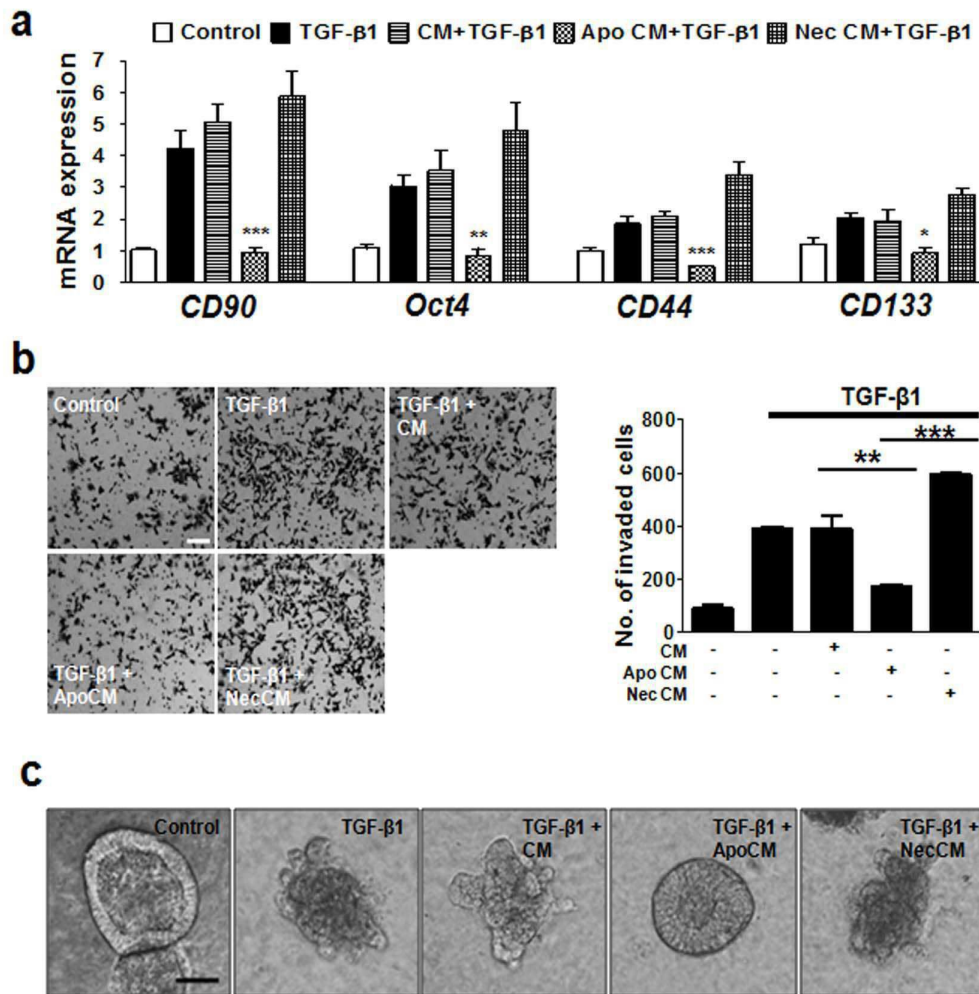
- [0141] 그 결과, 도 22에 나타난 바와 같이, 기초농도의 PPAR γ 리간드에서는 효과가 없었으나, 자극 농도에서의 PPAR γ 리간드에서는 TGF- β 1 유도성 EMT를 억제하였고(도 22a 및 b), TGF- β 1이 유도하는 PPAR γ mRNA 및 활성의 억제 그리고 PTEN mRNA 및 단백질의 억제효과 역시 기초농도의 PPAR γ 리간드에서 다시 역전되는 것을 확인하였다(도 22 c 내지 f).
- [0142] <실험예 16> 사멸화된 암세포에 의한 마우스에서의 항전이 효과(*in vivo*) 확인
- [0143] 사멸화된 344SQ 암 상피세포가 실제 동물(*in vivo*)에서 종양 전이에 미치는 영향을 알아보기 위해 다음과 같이 실험하였다.
- [0144] 우선, 344SQ 암 상피세포(세포 수 약 1×10^6)를 마우스(syngeneic (129/Sn), immunocompetent 마우스)의 우측 복부 측방에 피하 주입(injection)하고 2일 후에, 상기 <실시예 2>에서 제조한 사멸화된 344SQ 세포(세포 수 약 1×10^7) 및 PBS(대조군, 100 μ l)를 마우스의 피부 병변에 피하로 주입하였다(각각 n= 15). 그리고 6주 동안 종양의 성장을 매일 모니터링(*monitoring*)한 뒤, 각 마우스를 부검하여 원발 종양(primary tumor)의 변화를 분석하였다(도 23a).
- [0145] 그 결과, 도 23에 나타난 바와 같이, 사멸화된 344SQ 암 상피세포를 주입한 마우스 군의 종양 무게 및 관찰된 폐에서 결절(nodules) 수의 의미 있는 감소는 관찰되지 않았으나(도 23b 및 c), 육안으로 확인가능한 폐전이(metastasis, Met)의 비율이 감소하였다(도 23d). 또한, 도 23e는 대조군 마우스의 폐에서 관찰된 종양 결절이 사멸화된 344SQ 세포를 처리한 마우스 군에서는 관찰되지 않음을 보여주고있다(도 23e).
- [0146] <실험예 17> 사멸화된 암세포에 의한 마우스에서의 PPAR γ 및 PTEN 발현 증가 확인
- [0147] 사멸화된 344SQ 암 상피세포를 주입한 실제 동물의 일차 종양에서 PPAR γ 및 PTEN 발현의 변화를 확인하고자 다음과 같이 실험을 수행하였다.
- [0148] 상기 <실험예 16>의 조건과 같이, 344SQ 암 상피세포를 마우스에 피하 주입하고 2일 후에, 사멸화된 344SQ 암 상피세포 또는 PBS를 마우스의 피하로 주입하였다(각각 n= 15). 그리고 6주 후에 마우스를 부검하여 qPCR, 면역학적 블랏팅 및 면역조직염색(immunohistochemistry)실험을 수행하였다.
- [0149] 면역조직염색(immunohistochemistry)실험을 위해서는, 파라핀으로 고정된 종양조직 또는 냉동된 피부 조직을 상온에서 30분간 해동시킨 샘플을 이용하였으며, IF-Wash 버퍼(buffer)(0.05% NaN₃, 0.1% BSA, 0.2% Triton X-100 및 0.05% Tween-20 in PBS)를 사용하여 세척하였다. 다음으로, 5% BSA 및 마우스 IgG Blocking Reagent(MKB-2213)을 포함하는 블라킹 용액으로 상온 처리한 후, 블라킹 용액에 1:100으로 희석한 1차 항체를 하룻밤 동안 4℃에서 반응시켰다. 다시 세척한 후, 블라킹 용액에 1:100으로 희석한 2차 항체를 상온에서 1시간 동안 반응시킨 다음, PBS로 세번씩 5분간 세척하였다. VECTASHIELD Mounting Medium을 처리한 후, 공초점 현미경(confocal microscope)(Carl Zeiss LSM 800)을 사용하여 조직을 관찰하였다.
- [0150] 그 결과, 도 24에 나타난 바와 같이, 사멸화된 344SQ 암 상피세포를 주입한 마우스의 일차 종양에서 PPAR γ , PTEN 및 CD36의 mRNA가 증가되어 있었으며, *Snail* 및 *Zeb1*의 mRNA는 감소되어 있었다(도 24 a 내지 e). 또한, PTEN 단백질의 발현은 증가된 반면, AKT의 인산화는 감소하였다(도 24f).
- [0151] 또한, 상기 종양을 면역조직염색 하였을 때, PPAR γ (도 25a 및 b, 녹색), PTEN(도 26a 및 b, 녹색) 및 CD36(도 26d 및 e, 붉은색)의 발현이 증가되고, 아울러, F4/80 양성세포(적색)에서 사멸화된 암세포의 주입 후, 적색 형광이 변화 없으며(도 25c), 또한 PPAR γ , PTEN 및 CD36의 발현이 두드러지게 증가된 현상을 통해(도 25d 및 도 26c, f), 사멸세포에 의해 종양 침윤성 마크로파지에서 PPAR γ , PTEN 및 CD36가 유도될 수 있음을 확인하였다.
- [0152]

도면

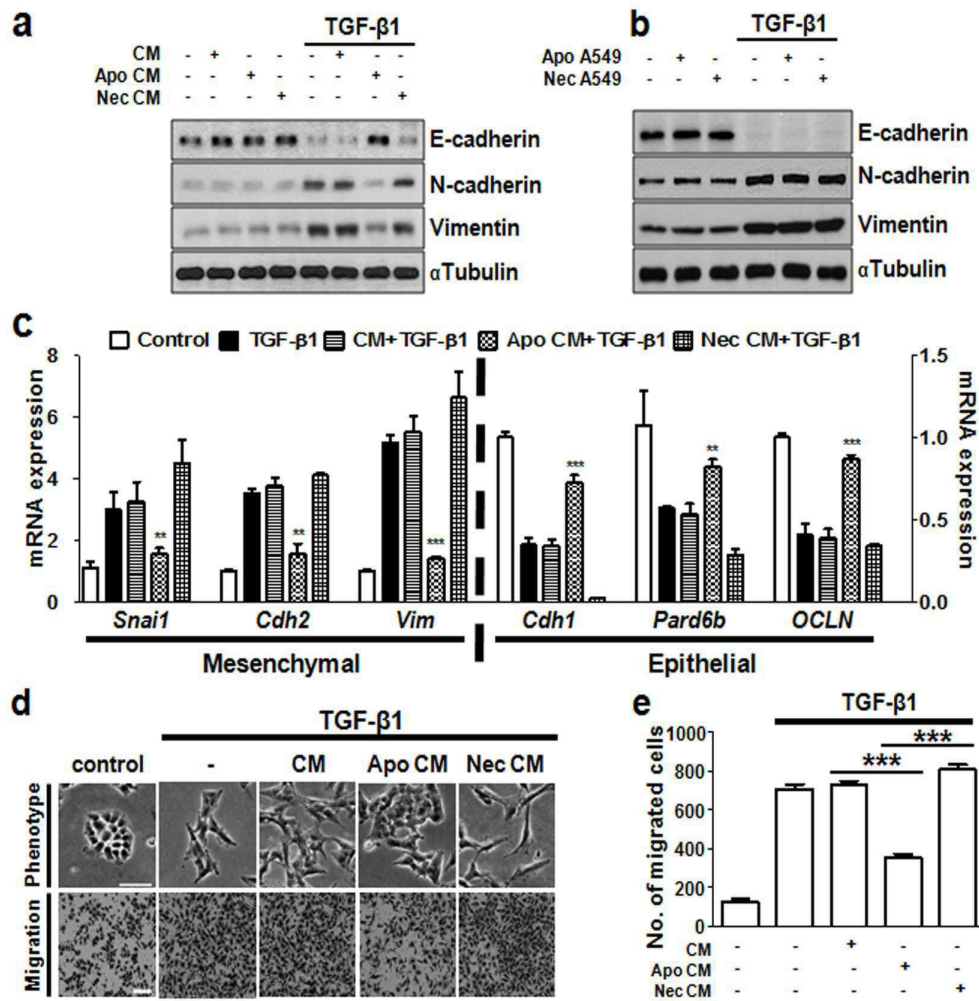
도면1



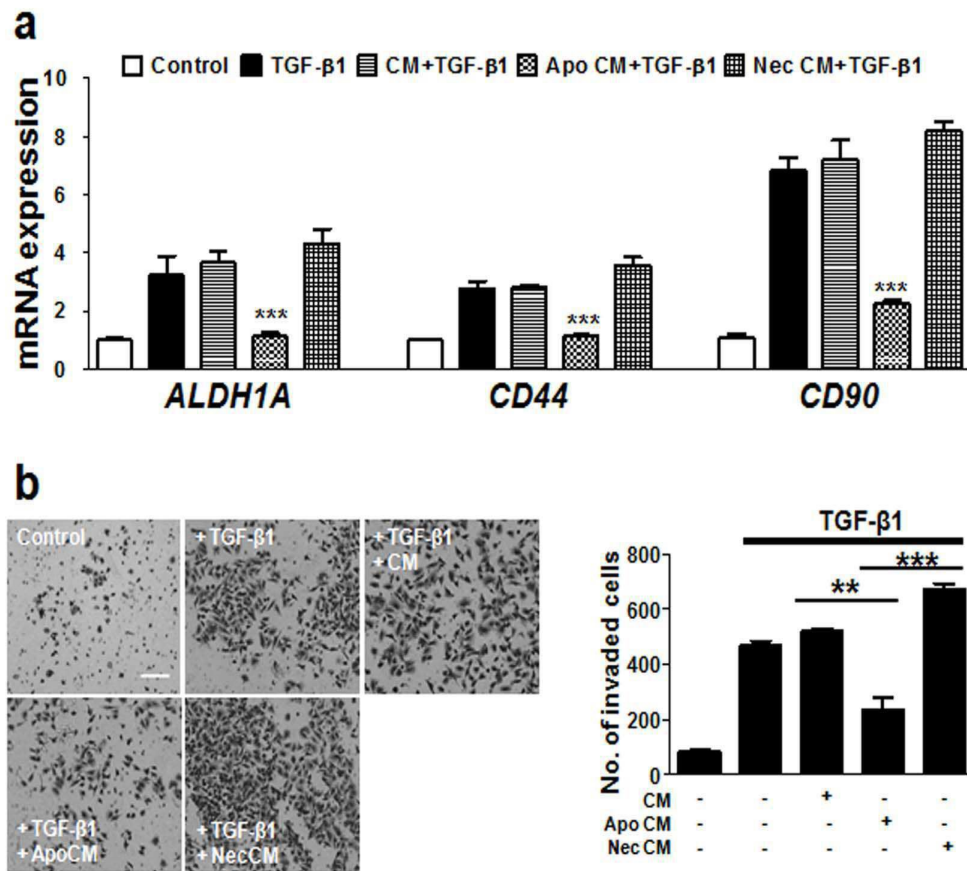
도면2



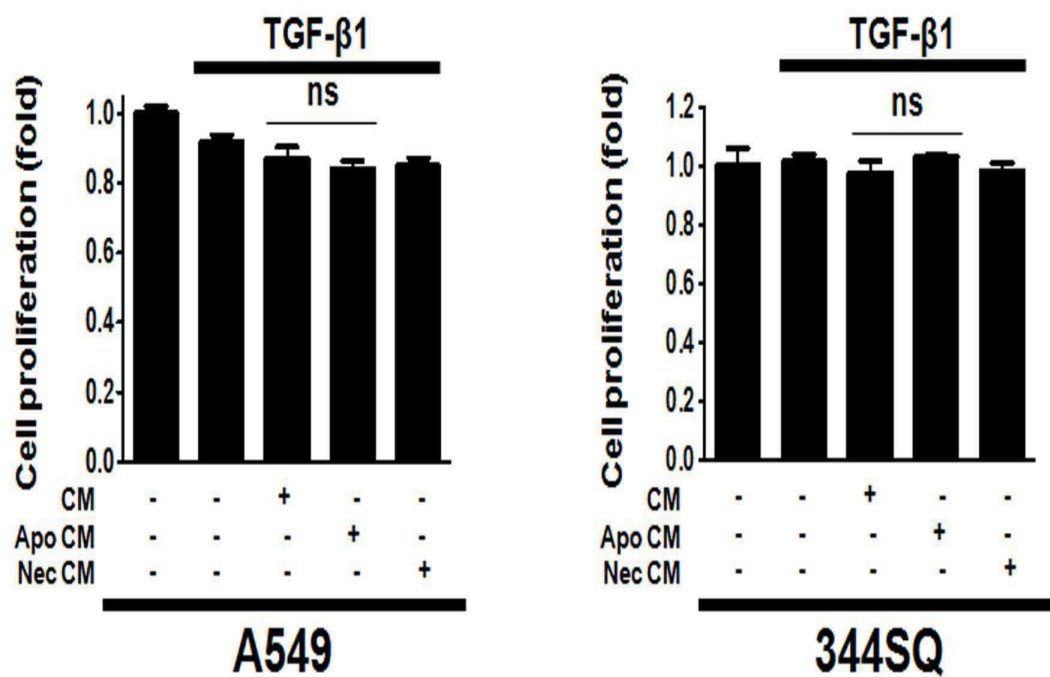
도면3



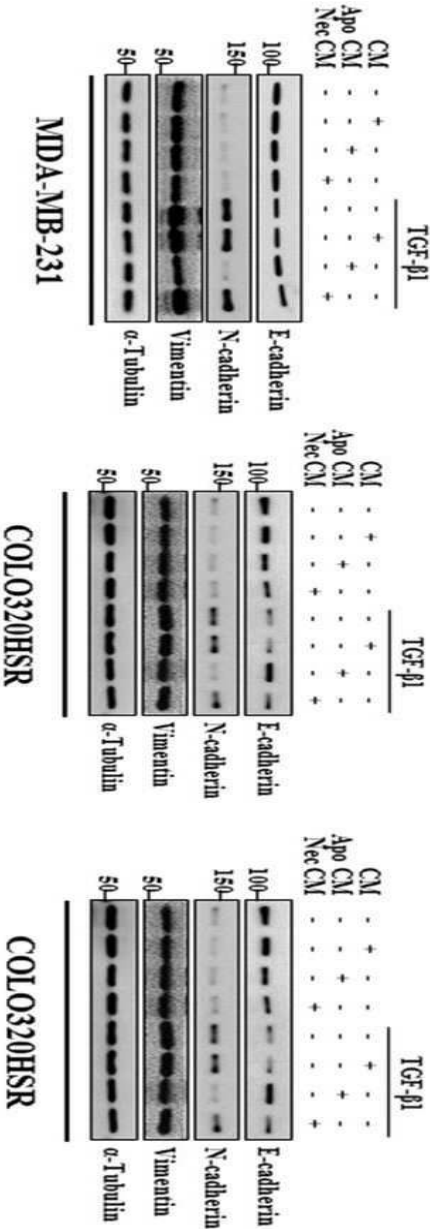
도면4



도면5



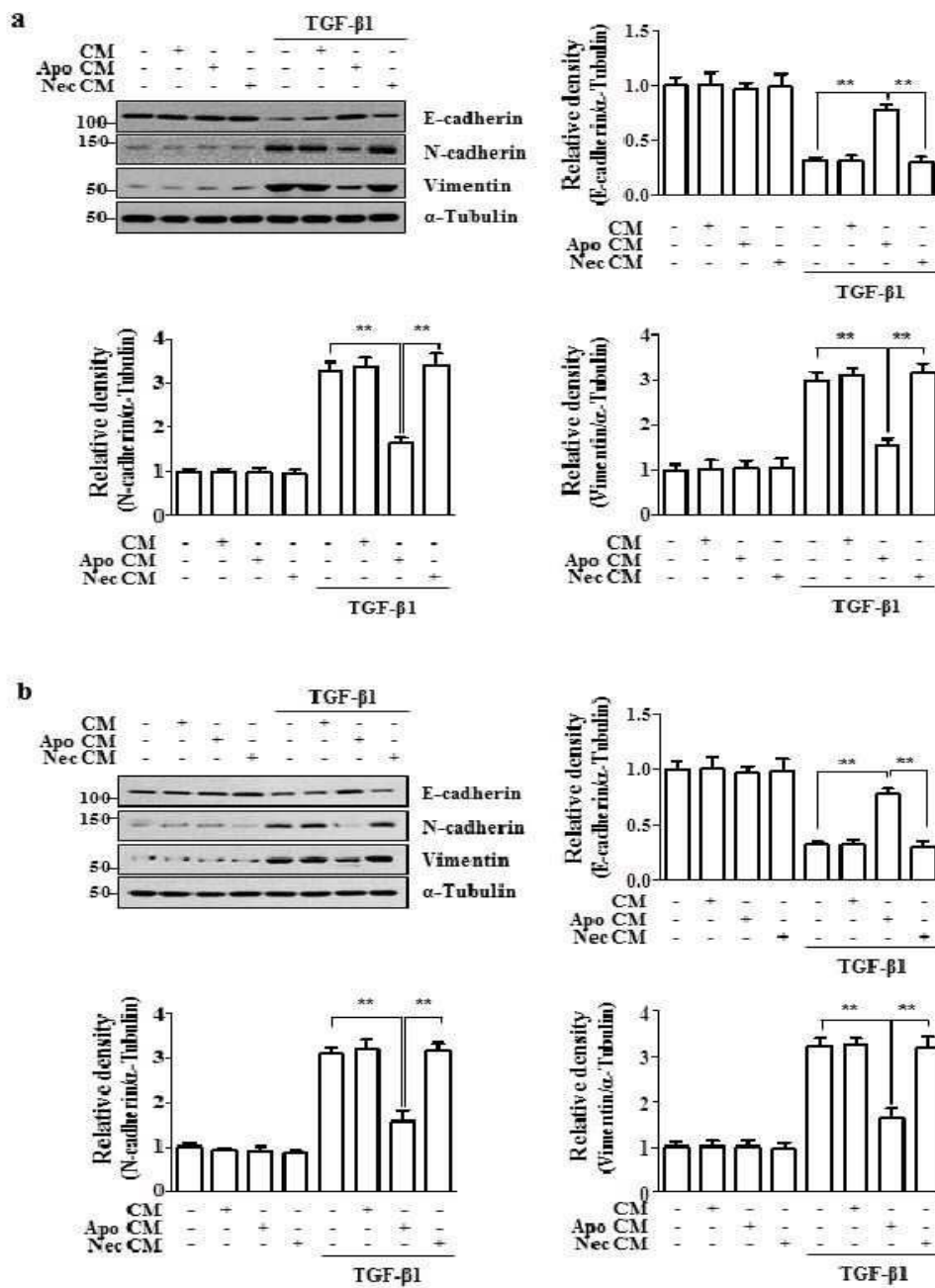
도면6



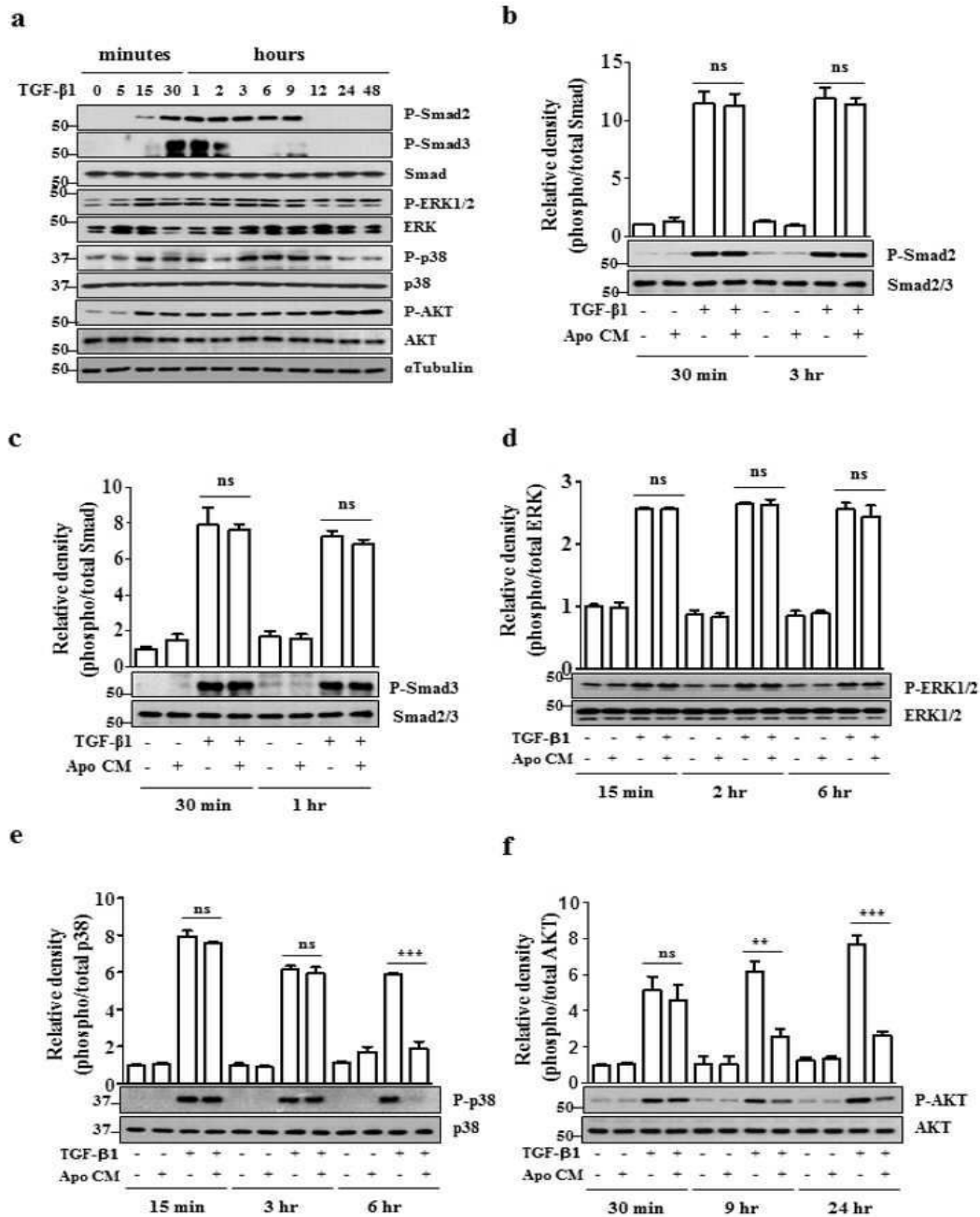
도면7



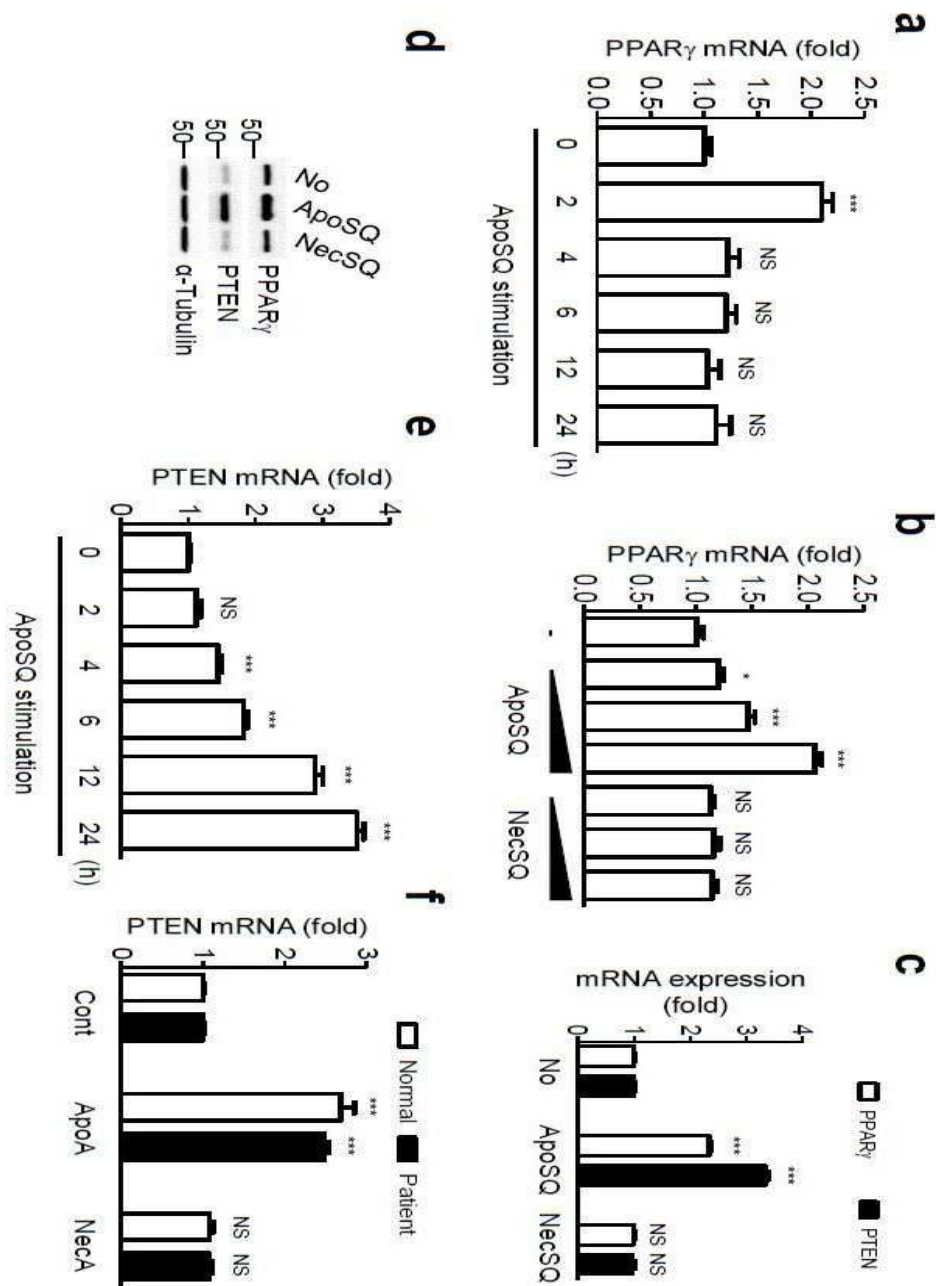
도면8



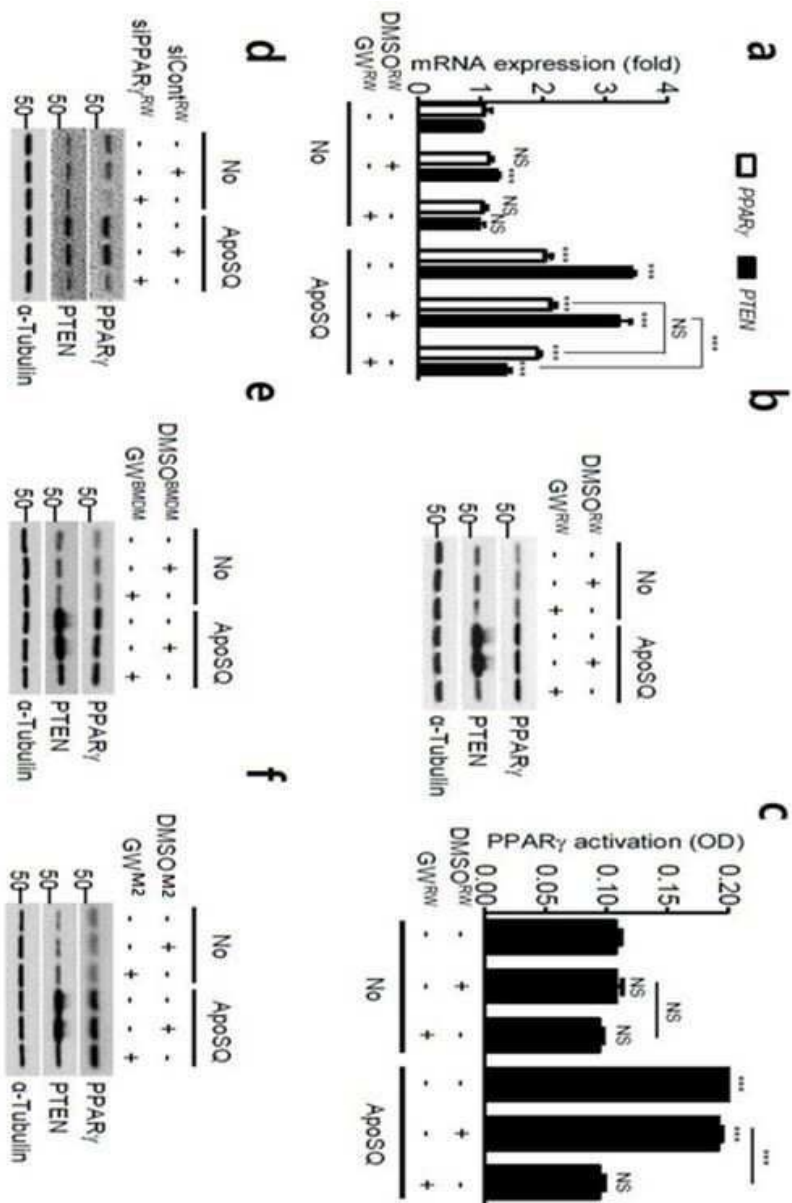
도면9



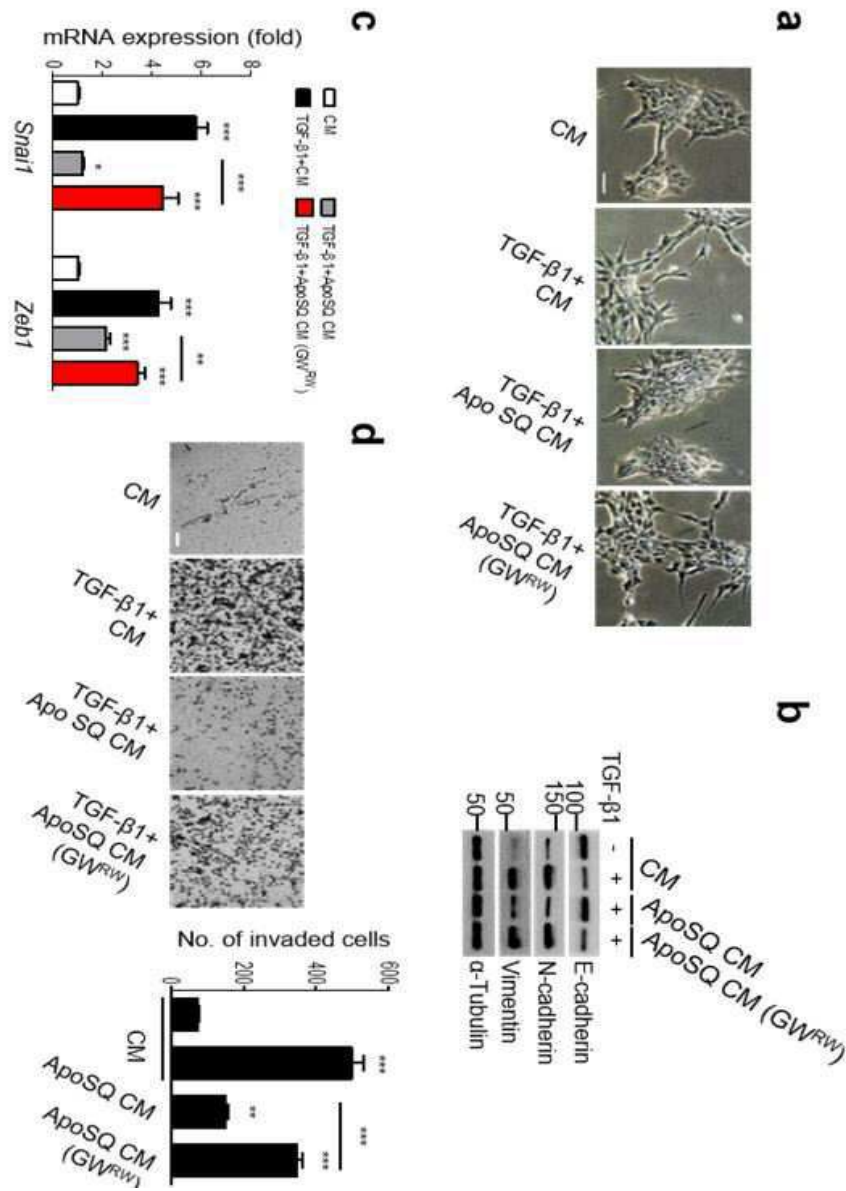
도면10



도면11

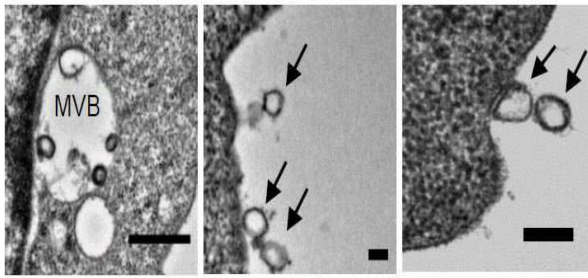


도면12

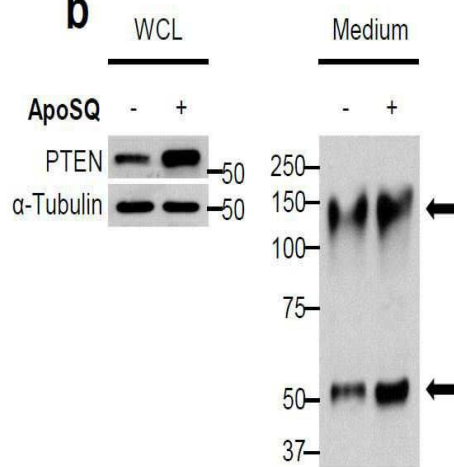


도면13

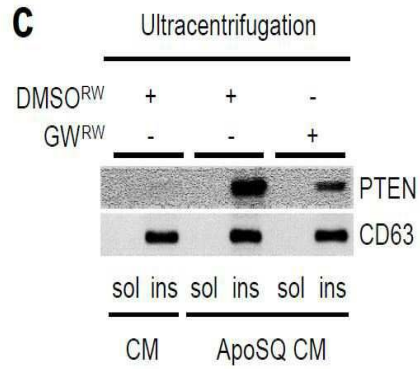
a

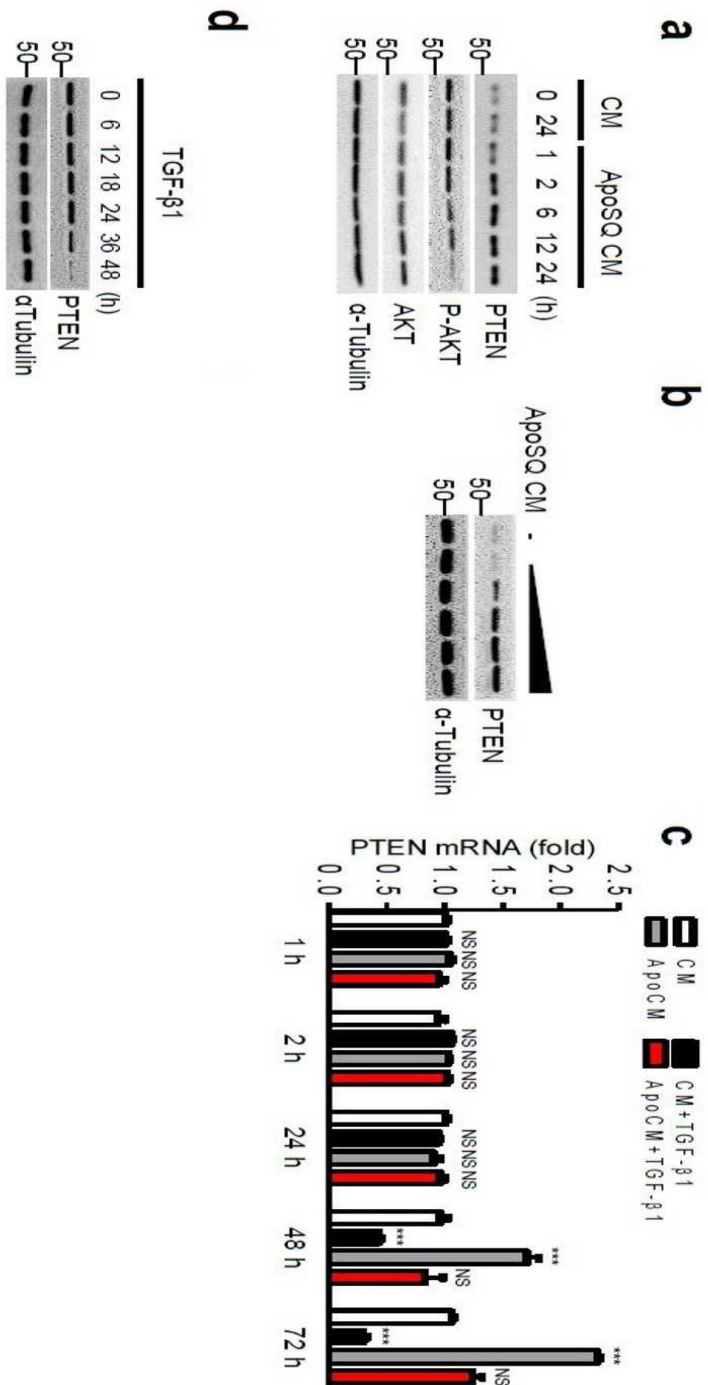


b



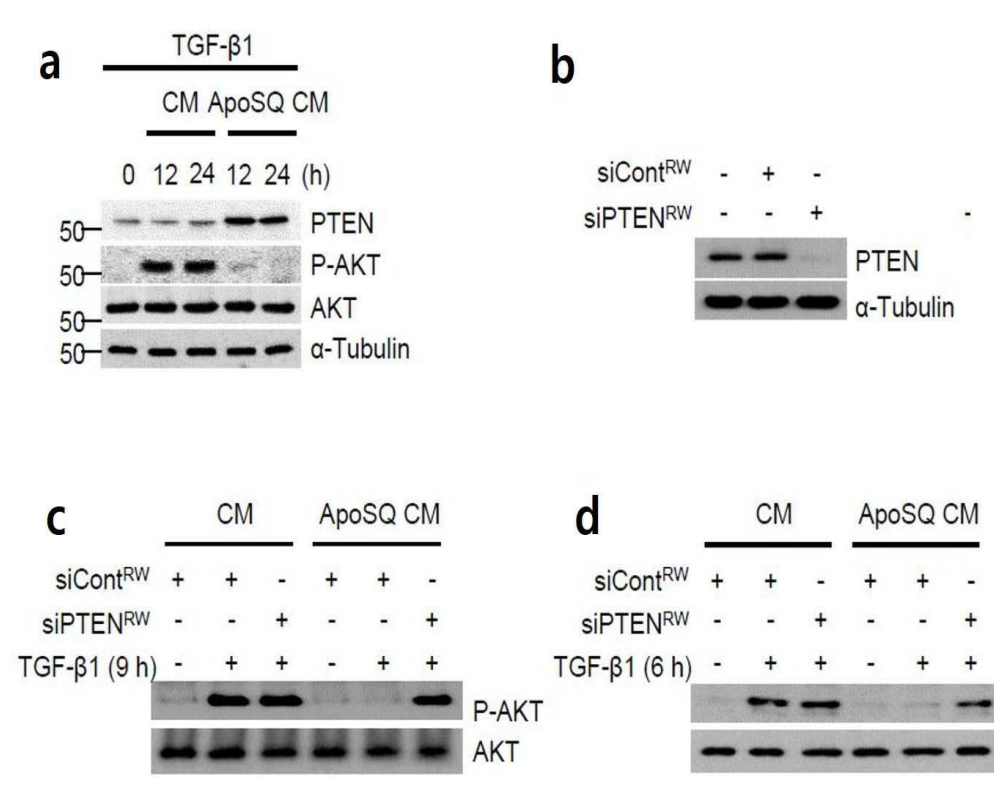
c



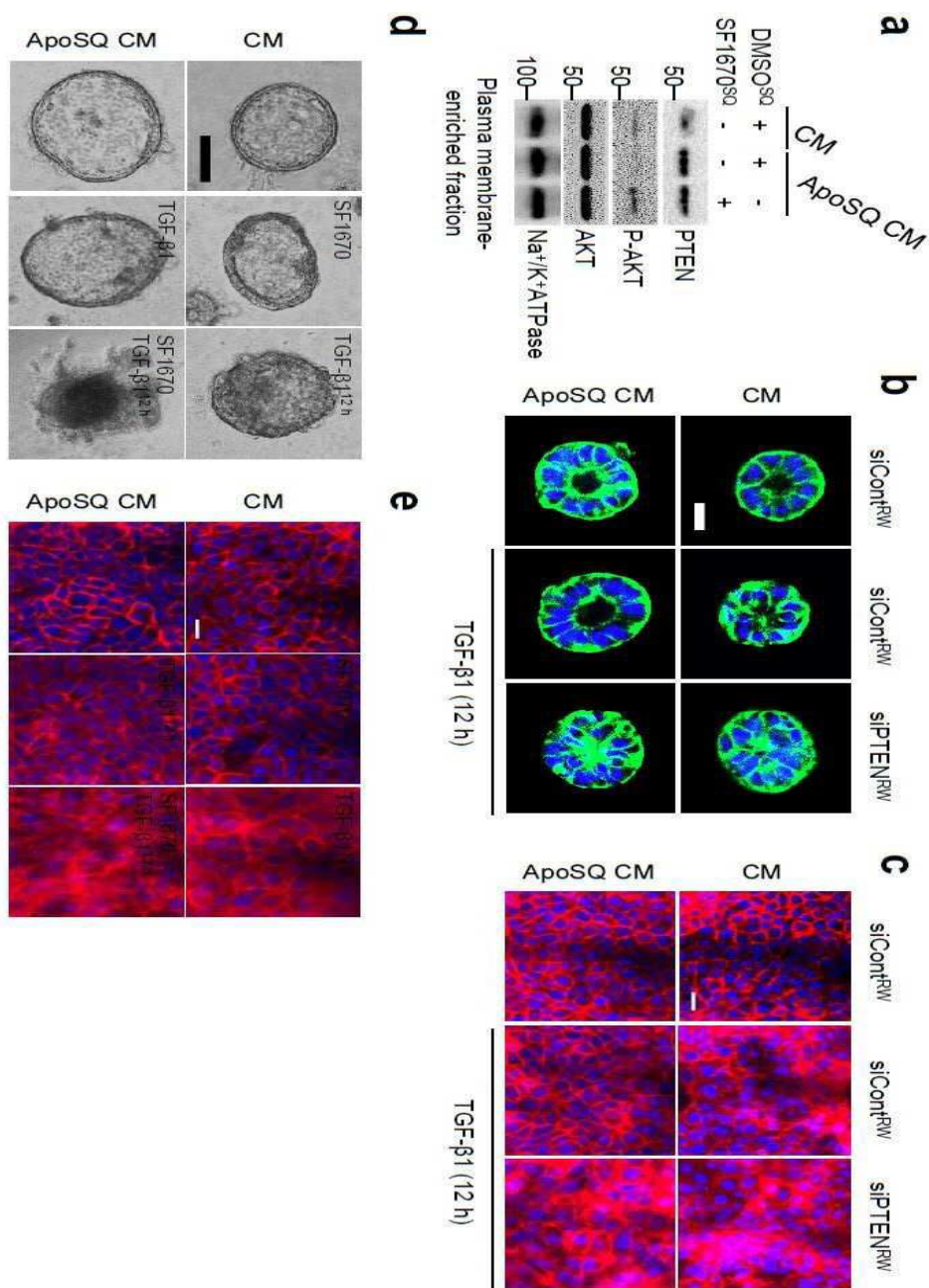


도면14

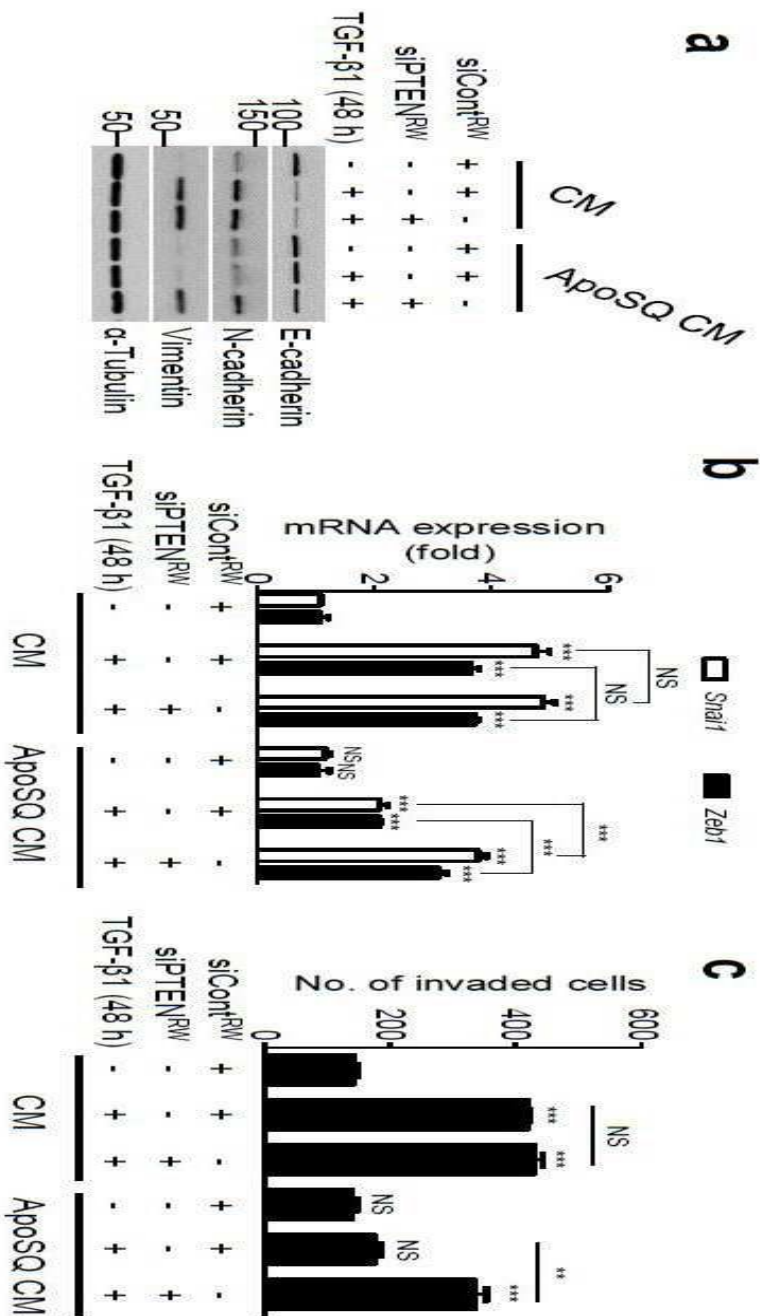
도면15



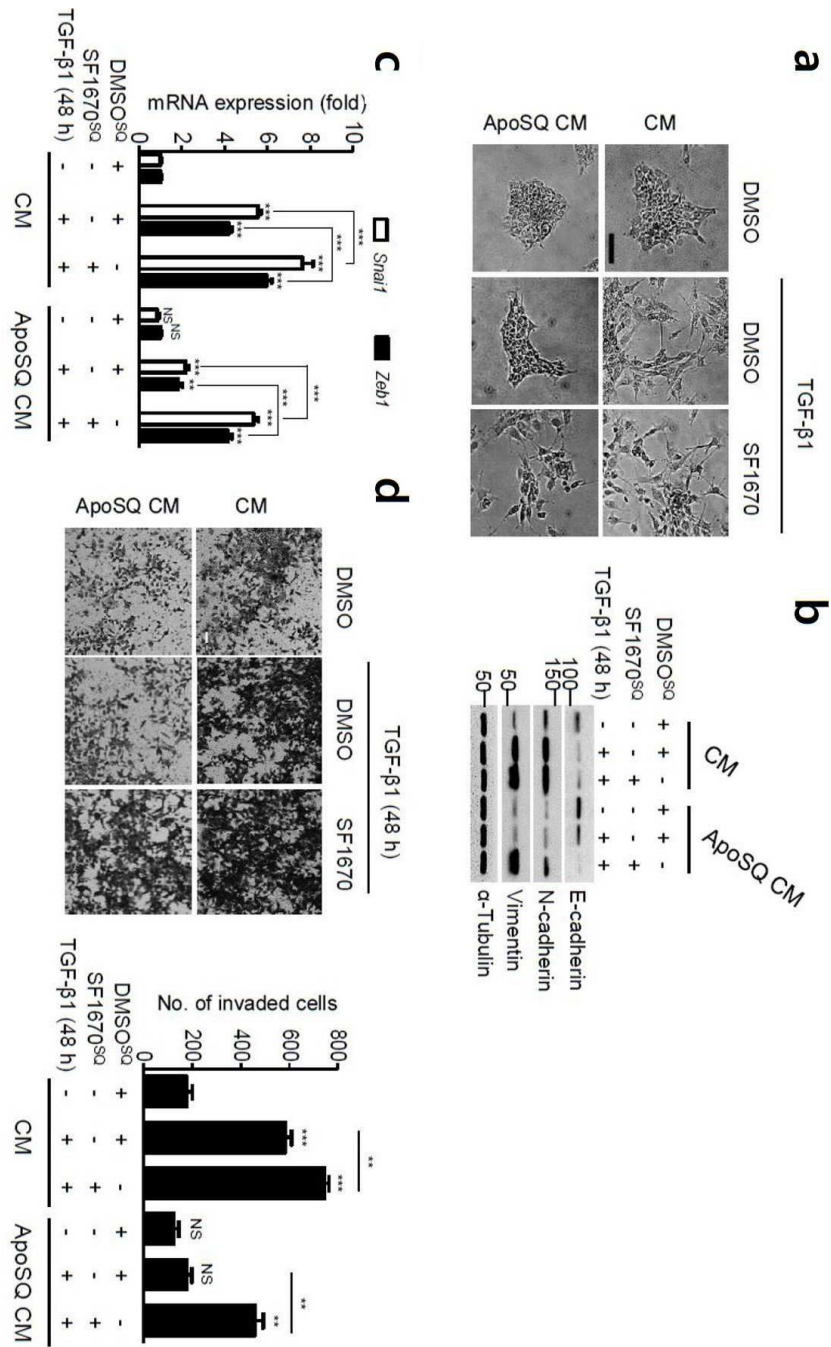
도면16



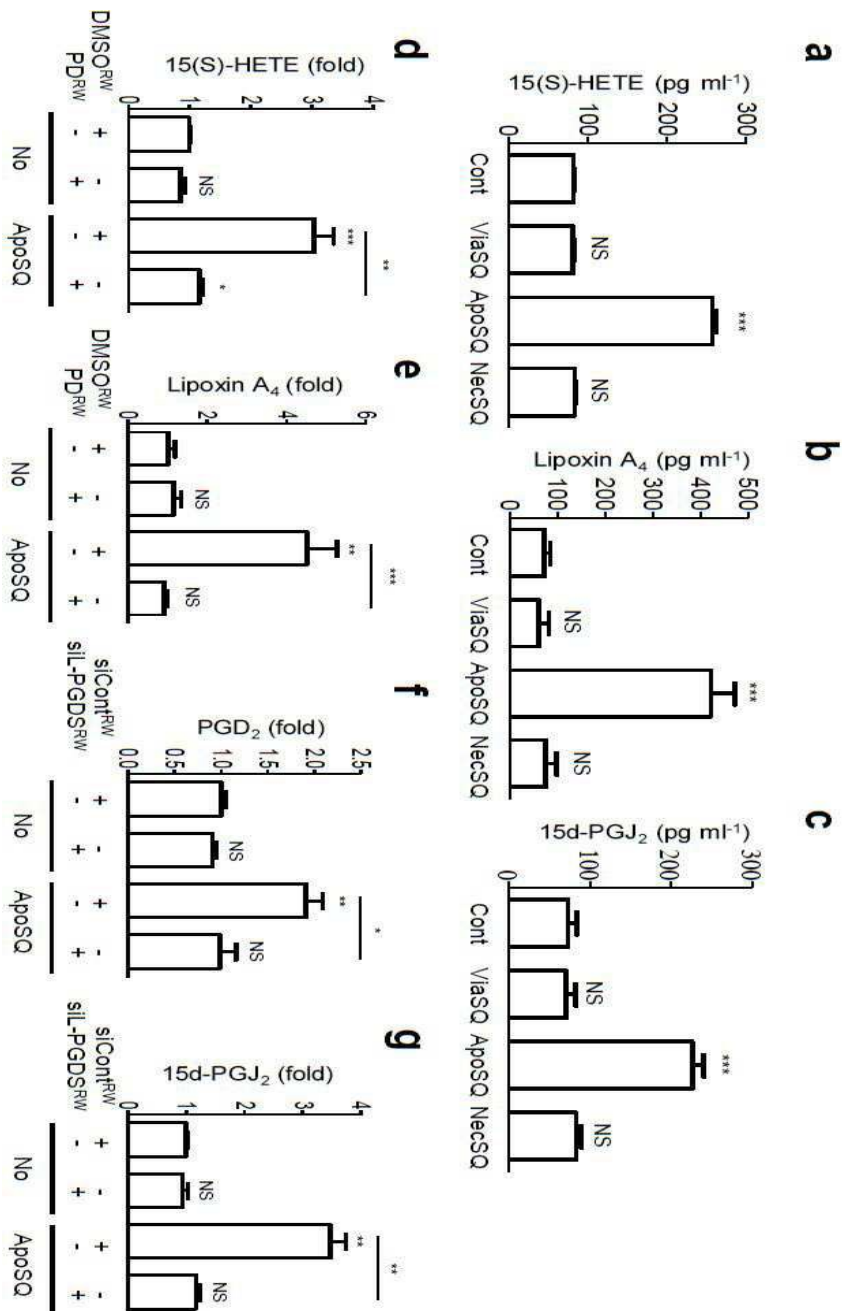
도면17



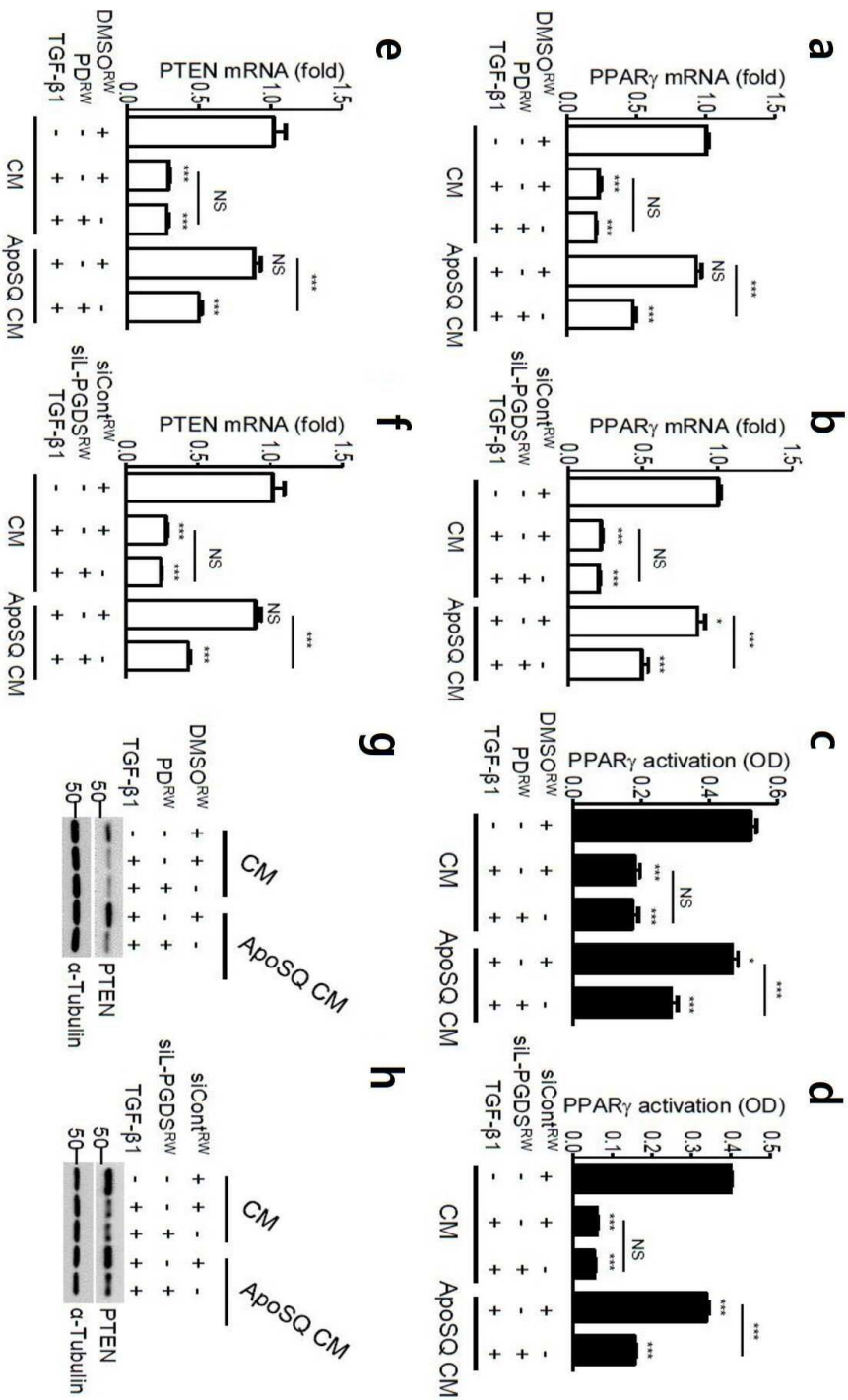
도면18



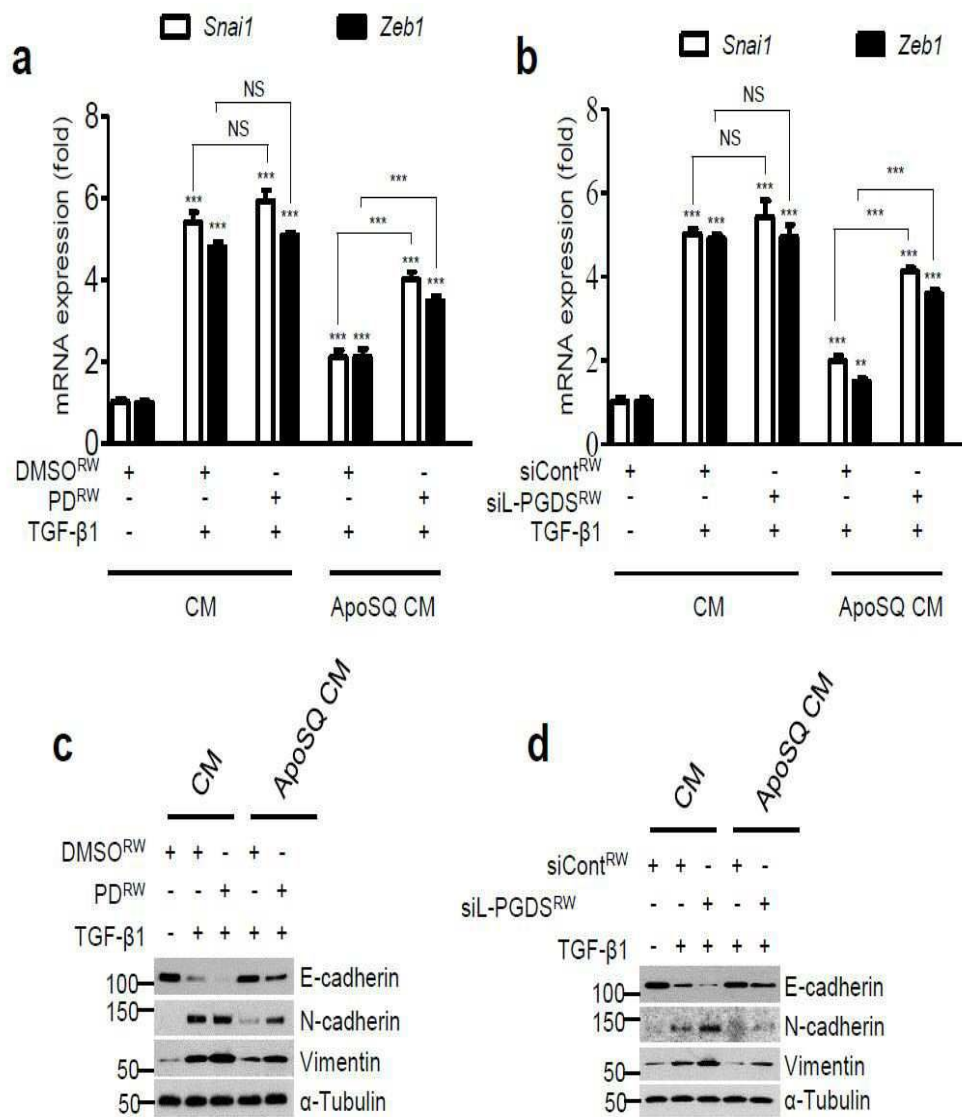
도면19



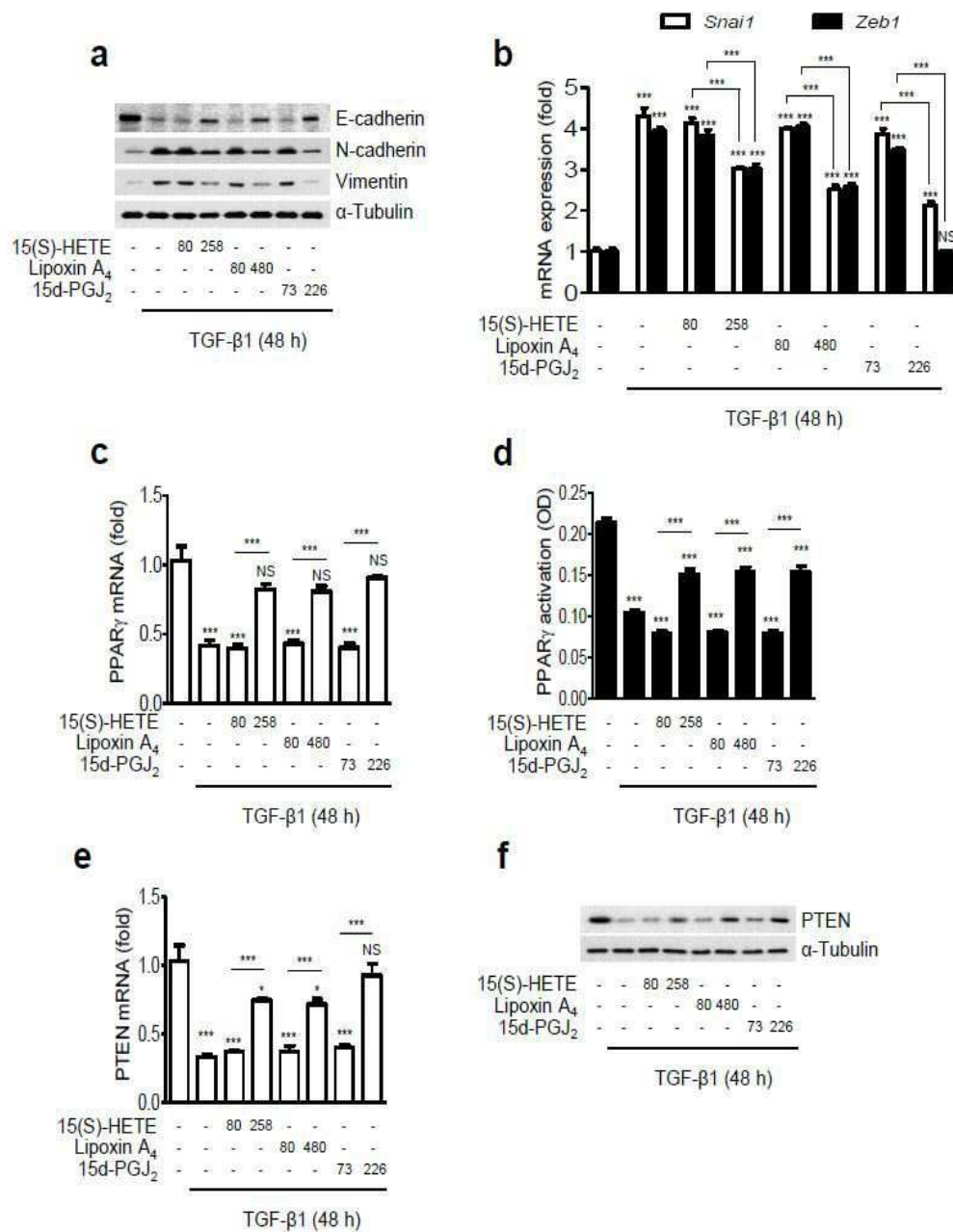
도면20



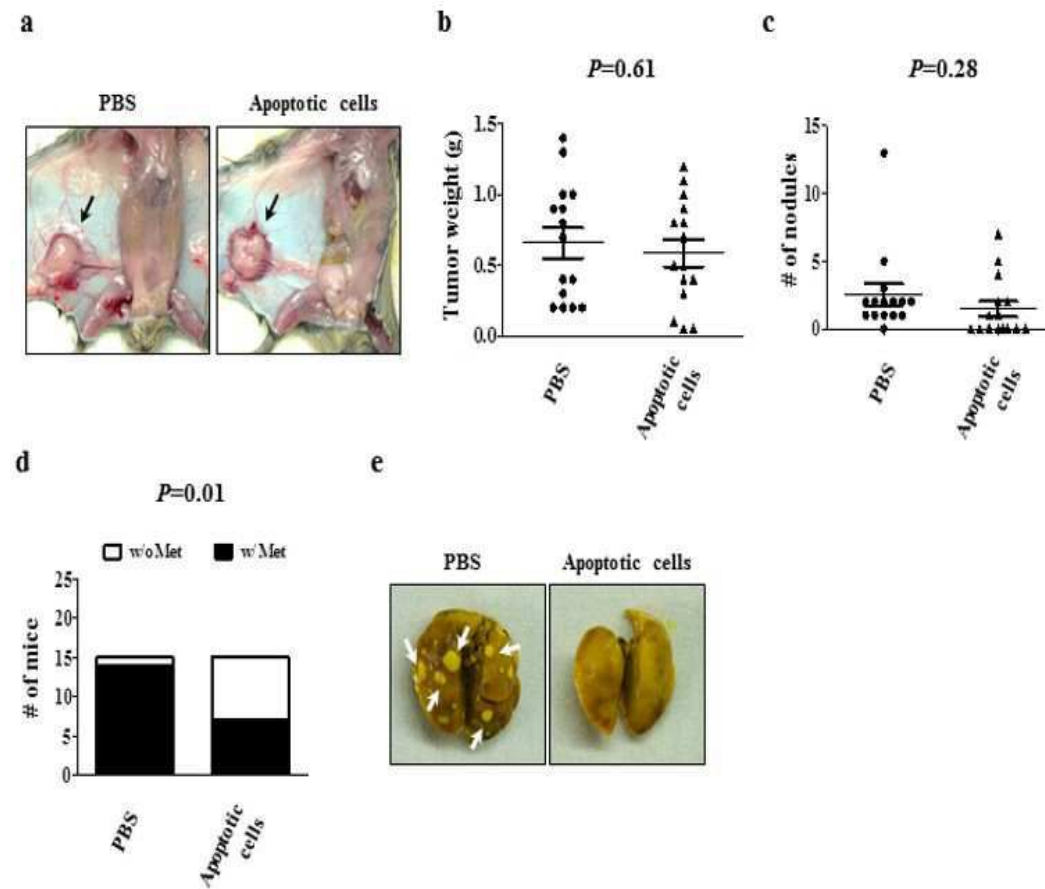
도면21



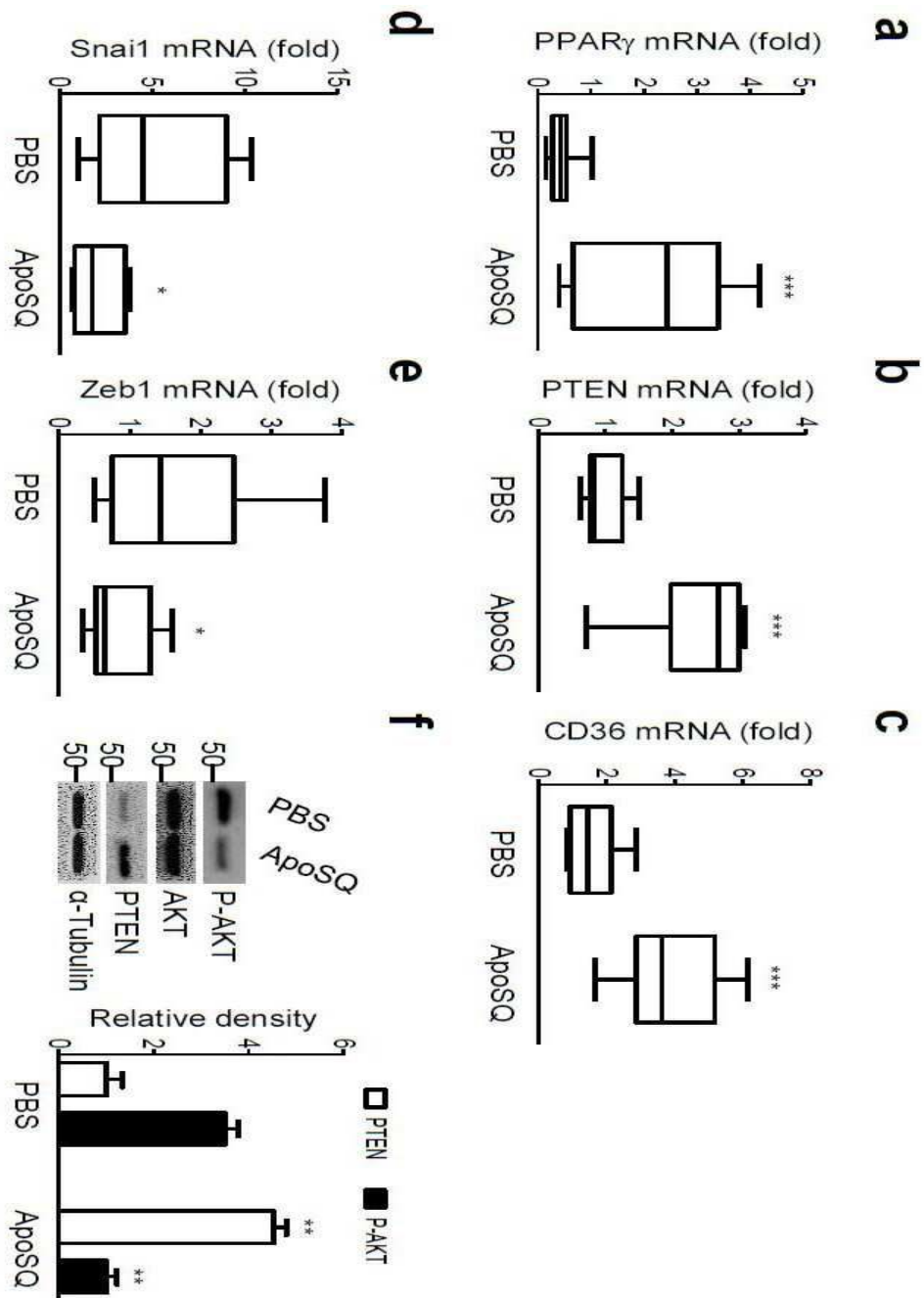
도면22



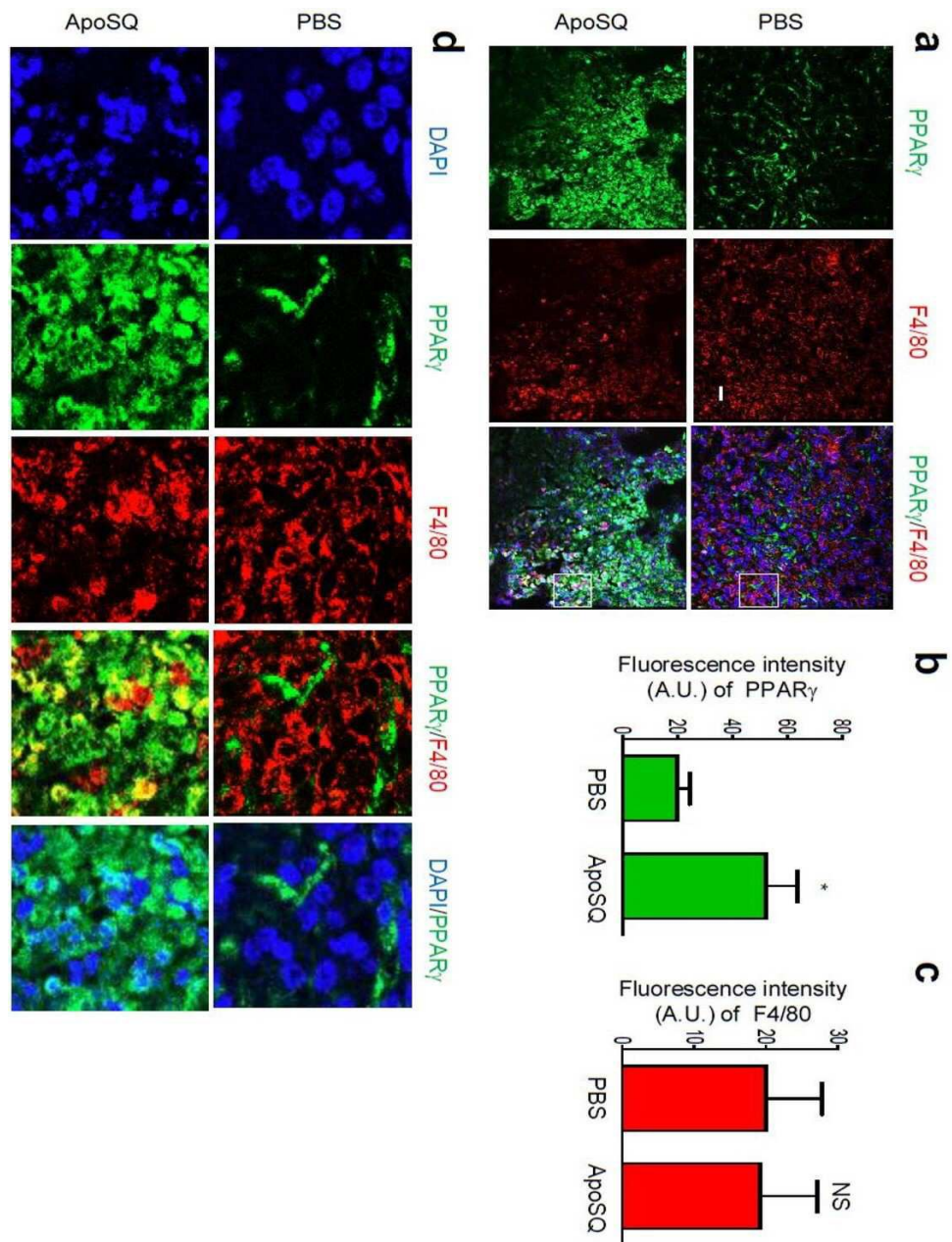
도면23



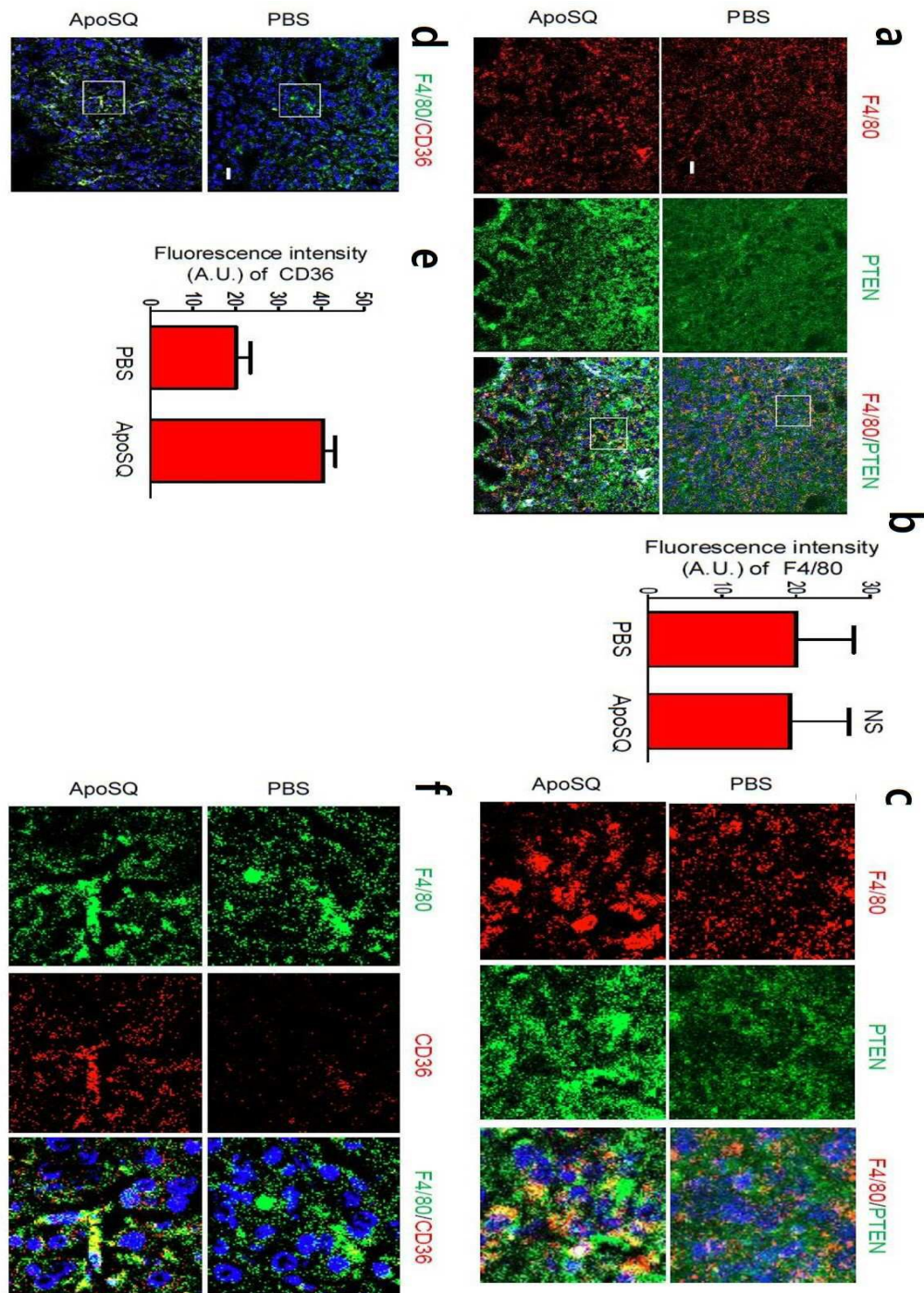
도면24



도면25



도면26



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> The composition for inhibiting cancer metastasis using apoptotic cells
- <130> 2016P-10-018
- <150> KR 10-2016-0012493
- <151> 2016-02-01

<160> 46
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Zeb1 forward primer
 <400> 1
 attcagctac tgtgagccct gc 22
 <210> 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Zeb1 reverse primer
 <400> 2
 cattctggtc ctccacagtg ga 22
 <210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cdh2 forward primer
 <400> 3
 cctccagagt ttactgccat gac 23
 <210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cdh2 reverse primer
 <400> 4
 ccaccactga ttctgtatgc cg 22
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Vim forward primer

<400> 5

gcgtgcggct gcttcaagac 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Vim reverse primer

<400> 6

atggcgtcgg ccagcgagaa 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cdh1 forward primer

<400>

> 7

tacggcgggtg gtgaggacga 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cdh1 reverse primer

<400> 8

gccacacggg ggagacttgc 20

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Crb3 forward primer

<400> 9

cggacccttt cacaatagc a 21

<210> 10

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Crb3 reverse primer	
<400>	10	
	cgttggactc atcacctggg	20
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Cldn3 forward primer	
<400>	11	
	cacctgacta ccgggcctag	20
<210>	12	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Cldn3 reverse primer	
<400>	12	
	ggttttctttg tccattcggc t	21
<210>	13	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Par6b forward primer	
<400>	13	
	tttcaccgc caatccactg ct	22
<210>	14	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Par6b reverse primer	
<400>	14	

gctgatgacg atgtgaggct tc	22
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CD90 forward primer	
<400> 15	
gtcaggtctgg tcaccttctg	20
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CD90 reverse primer	
<400> 16	
aactcttggc accatgaacc	20
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oct4 forward primer	
<400> 17	
tcttctgctt cagcagcttg	20
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oct4 reverse primer	
<400> 18	
gttgagaag gtggaaccaa	20
<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> CD44 forward primer
 <400> 19
 agaaatgggt tcagtgtggc 20
 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD44 reverse primer
 <400> 20
 ttgctaccac atcaagctgc 20
 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD133 forward primer
 <400> 21
 tagaggaag tcattcggt 20
 <210> 22
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD133 reverse primer
 <400> 22
 cccaagatac cttcaatgct g 21
 <210> 23
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Snail forward primer
 <400> 23
 tgccctcaag atgcacatcc ga 22
 <210> 24
 <211> 21

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Snail reverse primer	
<400>	24	
	gggacaggag aagggttct c	21
<210>	25	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Cdh2 forward primer	
<400>	25	
	cctccagagt ttactgcat gac	23
<210>	26	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Cdh2 reverse primer	
<400>	26	
	cctccagagt ttactgcat gac	23
<210>	27	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Vim forward primer	
<400>	27	
	aggcaaagca ggagtcact ga	22
<210>	28	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Vim reverse primer	
<400>	28	
	atctggcgtt ccagggactc at	22

<210>	29	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Cdh1 forward primer	
<400>	29	
	gcctcctgaa aagagagtgg aag	23
<210>	30	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Cdh1 reverse primer	
<400>	30	
	tggcagtgtc tctccaaatc cg	22
<210>	31	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Par6b forward primer	
<400>	31	
	gtttcaacgg ccaatccact gc	22
<210>	32	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Par6b reverse primer	
<400>	32	
	ctatggttgt caggacgcaa tac	23
<210>	33	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	OCLN forward primer	

<400>	33	
atggcaaagt gaatgacaag cgg		23
<210>	34	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	OCN reverse primer	
<400>	34	
ctgtaacgag gctgcctgaa gt		22
<210>	35	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ALDH1A forward primer	
<400>	35	
ccactcactg aatcatgcca		20
<210>	36	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ALDH1A reverse primer	
<400>	36	
gcacgccaga cttacctgtc		20
<210>	37	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CD44 forward primer	
<400>	37	
cacgtggaat acacctgcaa		20
<210>	38	
<211>	19	
<212>	DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CD44 reverse primer	
<400>	38	
	gacaagtttt ggtggcacg	19
<210>	39	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CD90 forward primer	
<400>	39	
	gggagacctg caagactgtt	20
<210>	40	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CD90 reverse primer	
<400>	40	
	cggaagaccc cagtcca	17
<210>	41	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PPAR gamma sense	
<400>	41	
	aguauggugu ccaugagau	19
<210>	42	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PPAR gamma antisense	
<400>	42	
	aucucaugga caccauacu	19
<210>	43	

<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PTEN sense	
<400>	43	
caggaaugaa ccaucuaca		19
<210>	44	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PTEN antisense	
<400>	44	
uguagauggu ucauuccug		19
<210>	45	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	L-PGDS sense	
<400>	45	
caacuaugac gaguacgcuc ugcua		25
<210>	46	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	L-PGDS antisense	
<400>	46	
gacuuccgca ugcccacccu cuaca		25