



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0160900
(43) 공개일자 2022년12월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/575 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 31/575 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2021-0069122

(22) 출원일자 2021년05월28일
 심사청구일자 2021년05월28일

(71) 출원인
국민대학교산학협력단
 서울특별시 성북구 정릉로 77 (정릉동, 국민대학교)
고려대학교 산학협력단
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자
임화선
 서울특별시 영등포구 63로 45, 9동 61호(여의도동, 여의도시범아파트)

송권하
 충청남도 천안시 서북구 충무로 124-24, 114동 803호(쌍용동, 현대아이파크홈타운)

(74) 대리인
특허법인대백

전체 청구항 수 : 총 10 항

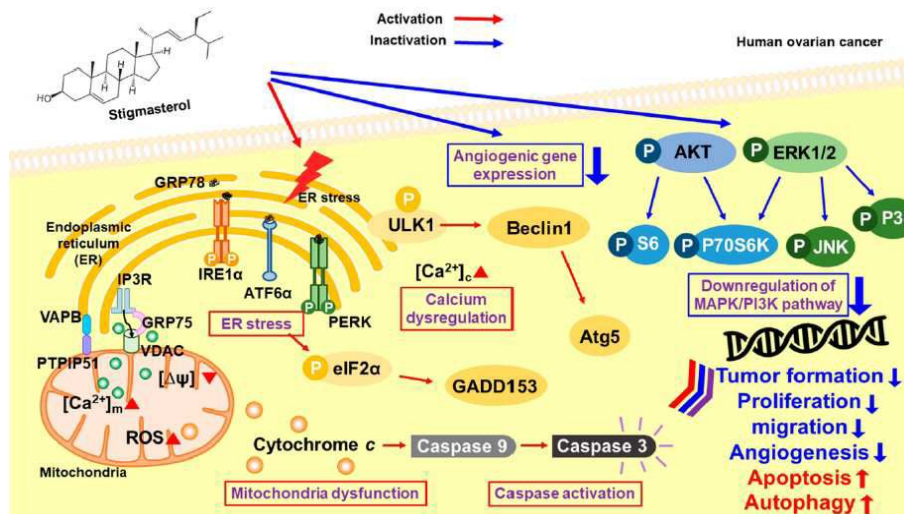
(54) 발명의 명칭 **스티그마스테롤을 유효성분으로 함유하는 난소암 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 스티그마스테롤(stigmasterol)을 유효성분으로 함유하는 난소암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 스티그마스테롤을 유효성분으로 함유하는, 난소암 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품 조성물을 제공한다.

상기 스티그마스테롤을 포함하는 조성물은 난소암 세포주의 세포 증식을 억제하고 세포 사멸을 유도하는 바, 이를 이용하여 난소암을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711129209
과제번호	2021R1C1C1009807
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	멜라토닌에 의한 엑소좀 유래 운반 RNA 소편 기반 자궁내막증 개선 메커니즘 규명
기 여 율	50/100
과제수행기관명	국민대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711133414
과제번호	2021R1A2C2005841
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	멜라토닌을 이용한 모돈-태아 간 상호작용 증진 기술 개발 및 번식능력 예측 조기
지표 개발	
기 여 율	50/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

스티그마스테롤(stigmasterol)을 유효성분으로 함유하는, 난소암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은,

난소암 세포의 미토콘드리아의 막 전위 탈분극을 유도하고, 활성산소종(ROS) 생성을 증가시키며, 세포질(cytosol) 및 미토콘드리아의 칼슘이온 농도를 증가시키는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은,

난소암 세포 내 소포체 스트레스를 증가시키고, 소포체-미토콘드리아 축을 조절하며, 오토파고솜(autophagosome) 형성을 유도하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은,

난소암 세포 증식과 관련된 PI3K 또는 MAPK 신호전달기전을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 5

스티그마스테롤(stigmasterol); 및

PI3K 또는 MAPK 신호전달기전 억제제;를 포함하는, 난소암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 억제제는,

LY294002, Wortmanin, LY3023414, ME401 및 GSK1059615로 이루어진 군에서 선택되는 PI3K 억제제; U0126, FR180204, SCH772984 및 PD98059로 이루어진 군에서 선택되는 ERK1/2 억제제; SP600125, AEG3482, CEP1347 및 BI78D3로 이루어진 군에서 선택되는 JNK 억제제; 및 SB203580, SB202190, BIRB796 및 JX-401로 이루어진 군에서 선택되는 P38 억제제;로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 7

스티그마스테롤(stigmasterol)을 유효성분으로 함유하는, 난소암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

스티그마스테롤(stigmasterol); 및

PI3K 또는 MAPK 신호전달기전 억제제;를 포함하는, 난소암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

스티그마스테롤(stigmasterol)을 유효성분으로 함유하는, 난소암 세포 내 칼슘이온 농도 증진용 시약 조성물.

청구항 10

시험관 내(*in vitro*)에서 난소암 세포에 스티그마스테롤(stigmasterol)을 처리하는 단계를 포함하는, 난소암 세포 내 칼슘이온 증진 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 스티그마스테롤을 유효성분으로 함유하는 난소암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 난소암은 부인과 질병으로 인한 사망 사례들 중에서 주요한 여성 사망 원인으로 손꼽힌다. 미국에서는 2018년에 대략 22,240명의 새로운 난소암 환자가 발생하였으며, 14,070명이 난소암으로 인해 사망하였다. 암으로 인한 사망률 중 난소암으로 인한 사망 사례는 5위에 달한다.

[0003] 난소암의 예후가 좋지 않은 이유는 난소암 발병 초기에 증상이 거의 없기 때문에 조기 진단이 어렵고 진행성 난소암의 경우 항암제 내성을 가지고 있기 때문이다. 난소암이 초기에 진단되었을 때 5년 생존율이 90% 이상에 달하지만, 후기에 발견되어 전이가 진행된 상태라면 5년 생존율이 30% 이하로 급감하게 된다.

[0004] 하지만, 난소암을 진단받은 환자들의 75% 이상이 난소 근처 또는 복강으로 전이가 일어난 뒤에야 난소암을 진단 받고 있고, 난소암 치료 후 약 70% 정도의 환자들은 항암제 내성과 함께 재발을 나타낸다. 파클리탁셀과 시스플라틴 병용 화학 요법은 1996년 난소암 환자 치료의 표준으로 도입된 이래 지속적으로 사용되며, 개선된 수술, 보조 치료 및 화학 요법 약물의 조합에도 불구하고 난소암은 지속적으로 재발하고 있다.

[0005] 스티그마스테롤(stigmasterol)은 파이토스테롤(phytosterol)의 일종으로 채소, 견과류, 씨앗, 허브, 가식성 오일 등에 함유되어 있으며 LDL 콜레스테롤 감소를 통한 심혈관 질환 개선, 피부암, 위암, 유방암, 전립선암 등에서의 항암 효과가 있다고 보고되었다.

[0006] 하지만, 스티그마스테롤이 난소암 발병 및 진행에 대해 어떠한 치료 및 예방적 효과를 가지는지에 대한 연구는 알려진 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1404948호 (2014년06월10일 공고)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 안전하고 부작용이 적은 천연물 유래 물질을 포함하는 난소암 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 스티그마스테롤(stigmasterol)을 유효성분으로 함유하는 난소암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 스티그마스테롤(stigmasterol); 및 PI3K 또는 MAPK 신호전달기전 억제제;를 포함하는 난소암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명은 스티그마스테롤(stigmasterol)을 유효성분으로 함유하는 난소암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

- [0012] 본 발명은 스티그마스테롤(stigmasterol); 및 PI3K 또는 MAPK 신호전달기전 억제제;를 포함하는 난소암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 스티그마스테롤(stigmasterol)을 유효성분으로 함유하는 난소암 세포 내 칼슘이온 농도 증진용 시약 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 시험관 내(*in vitro*)에서 난소암 세포에 스티그마스테롤(stigmasterol)을 처리하는 단계를 포함하는 난소암 세포 내 칼슘이온 증진 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명에 따른 스티그마스테롤은 난소암 세포주에서 세포사멸 신호를 유도하고, 미토콘드리아 탈분극과 활성산소(ROS) 생성을 증가시키며, 세포질과 미토콘드리아 내 칼슘이온 농도를 비정상적으로 증가시킴으로써, 난소암 세포주의 세포사멸을 일으킬 수 있다.
- [0016] 또한, 상기 스티그마스테롤은 난소암 세포주의 세포 증식과 세포 주기를 조절하여 세포 성장을 억제하며, 세포 이동을 감소시키고 세포 성장과 관련된 신호전달기전을 억제할 수 있는 바, 이러한 스티그마스테롤을 이용하여 난소암을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

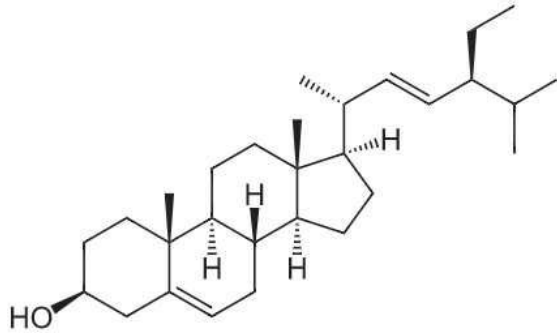
- [0017] 도 1은 스티그마스테롤 처리에 따른 난소암 세포의 세포 사멸 양상을 분석한 것이다.
- 도 2는 스티그마스테롤 처리에 따른 난소암 세포의 미토콘드리아 막 전위 및 활성산소종(ROS) 생성 변화를 나타낸 것이다.
- 도 3은 스티그마스테롤 처리에 따른 난소암 세포 내 칼슘이온 변화를 분석한 것이다.
- 도 4는 스티그마스테롤 처리에 따른 난소암 세포의 소포체 스트레스, 소포체-미토콘드리아 축 및 자가포식 조절 변화를 나타낸 것이다.
- 도 5는 스티그마스테롤 처리에 따른 난소암 세포의 세포 증식 변화 및 이와 관련된 신호전달기전을 분석한 것이다.
- 도 6은 스티그마스테롤 및 신호전달기전 억제제 병용처리에 따른 단백질 인산화 효소 양상을 분석한 것이다.
- 도 7은 스티그마스테롤 및 칼슘 조절 물질인 루테늄 레드(ruthenium red)의 병용처리에 따른 세포 사멸 양상을 분석한 것이다.
- 도 8은 스티그마스테롤에 의한 이주성 양상을 분석한 것이다.
- 도 9는 스티그마스테롤이 난소암 세포주에서의 매커니즘을 개략적으로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 이하, 본 발명을 상세하게 설명하기로 한다.
- [0020] 본 발명은 스티그마스테롤(stigmasterol)을 유효성분으로 함유하는, 난소암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 명세서에서, "스티그마스테롤(stigmasterol)"은 하기 화학식 1로 표시되는 식물성 스테롤(phytosterol) 중 하나로, 세포막의 구조와 생리를 유지하는 주요 기능을 가지고 있으며, 앞서 상술한 바와 같이, LDL 콜레스테롤 감소를 통한 심혈관 질환 개선 효과와 피부암, 위암, 유방암, 전립선암 등에서의 항암 효과가 있다고 보고되었으나, 난소암에서의 항암 효과는 아직 알려진 바 없다.

[0022] <화학식 1>

[0023]



[0025] 상기 스티그마스테롤은 이와 동일한 효능을 갖는 범위 내에서 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용할 수 있다.

[0026] 본 명세서에서, "약학적 또는 식품학적으로 허용가능한"이란, 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 것을 의미한다.

[0027] 상기 염은 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염기성 염 또는 산성염 중 어느 하나의 형태로 사용할 수 있다. 염기성염은 유기 염기염, 무기 염기염 중 어느 하나의 형태로 사용할 수 있으며, 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 리튬염, 마그네슘염, 세슘염, 아미늄(aminium)염, 암모늄염, 트리에틸아미늄염 및 피리디늄염으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0028] 산성염은 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 아황산, 인산, 이중 인산, 질산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레산, 말산, 푸마르산, 글루코산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산, 캄페설폰산, 옥살산, 말론산, 글루타릭산, 아세트산, 글리콜산, 석신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 시트르산, 아스파르탄산, 스테아르산 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에서 통상적으로 사용되는 다양한 무기산 및 유기산을 이용하여 형성되는 염이 모두 포함될 수 있다.

[0029] 또한, 상기 스티그마스테롤은 약학적 또는 식품학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물, 용매화물, 유도체 등을 모두 포함할 수 있다. 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있고, 수혼화성 유기용매, 예를 들면 아세톤, 메탄올, 에탄올, 또는 아세토니트릴 등에 녹여 과량의 유기염기를 가하거나 무기염기의 염기 수용액을 가한 후 침전시키거나 결정화시켜서 제조할 수 있다. 또는 이 혼합물에서 용매나 과량의 염기를 증발시킨 후 건조시켜서 부가염을 얻거나 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 난소암 세포의 증식을 억제하고, 세포 사멸을 유도할 수 있다.

[0032] 보다 상세하게는, 상기 조성물은 난소암 세포의 미토콘드리아의 막 전위 탈분극을 유도하고, 활성산소종(ROS) 생성을 증가시키며, 세포질(cytosol) 및 미토콘드리아의 칼슘이온 농도를 증가시킴으로써 세포 사멸을 유도할 수 있다.

[0033] 상기 조성물은 난소암 세포 내 소포체 스트레스를 증가시키고, 소포체-미토콘드리아 축을 조절하며, 오토파고솜(autophagosome) 형성을 유도할 수 있다.

[0034] 또한, 상기 조성물은 난소암 세포 증식과 관련된 PI3K(phosphatidylinositol-3-kinase) 또는 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 신호전달기전을 억제할 수 있다.

[0035] 상기 조성물은 이러한 효과를 가진 스티그마스테롤을 유효성분으로 함유함으로써, 난소암 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물로 활용할 수 있다.

[0037] 본 발명은 스티그마스테롤(stigmasterol); 및 PI3K 또는 MAPK 신호전달기전 억제제;를 포함하는 난소암 예방 또

는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

- [0038] 상기 신호전달기전 억제제는 PI3K 억제제, ERK1/2(extracellular signal-regulated kinase) 억제제, JNK(c-Jun NH2-terminal kinase) 억제제 및 P38 억제제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있고, 보다 상세하게는, PI3K 억제제는 LY294002, Wortmmanin, LY3023414, ME401, GSK1059615 등일 수 있고, ERK1/2 억제제는 U0126, FR180204, SCH772984, PD98059 등일 수 있으며, JNK 억제제는 SP600125, AEG3482, CEP1347, BI78D3 등일 수 있고, P38 억제제는 SB203580, SB202190, BIRB796, JX-401 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 상기 조성물은 난소암 세포 증식 억제 및 세포 사멸 효과를 가진 스티그마스테롤과 상기 PI3K 또는 MAPK 신호전달기전 억제제를 병용함으로써 난소암 치료의 시너지 효과를 나타낼 수 있고, 이에 보다 효과적으로 난소암을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0041] 본 명세서에서, "예방"이란, 본 발명에 따른 약학 조성물 또는 건강기능식품 조성물의 투여에 의해 난소암, 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상의 발생을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 재발을 예방하거나 방지하기 위해 상기 질병에 차도가 있는 대상의 치료를 포함한다.
- [0042] 본 명세서에서, "치료"란, 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 난소암, 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상을 완화, 감소, 또는 소멸시키는 등 그 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0043] 본 명세서에서, "약학 조성물"이란, 특정한 목적을 위해 투여되는 조성물로, 본 발명의 목적상 난소암, 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상을 예방하거나 또는 치료하기 위해 투여되는 것을 의미한다.
- [0045] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 약학 조성물은 제형에 따라 약학적으로 허용가능한 적절한 담체와 배합될 수 있고, 필요에 따라, 부형제, 희석제, 분산제, 유화제, 완충제, 안정제, 결합제, 봉해제, 용제 등을 더 포함하여 제조될 수 있다. 상기 적절한 담체 등은 본 발명에 따른 스티그마스테롤의 활성 및 특성을 저해하지 않는 것으로, 투여 형태 및 제형에 따라 달리 선택될 수 있다.
- [0046] 상기 약학 조성물은 어떠한 제형으로도 적용될 수 있고, 보다 상세하게는 통상의 방법에 따라 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 비경구형 제형으로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0047] 상기 경구형 제형 중 고형 제형은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등의 형태로, 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스, 락토오스, 솔비톨, 만니톨, 셀룰로오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있고, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 포함될 수 있다. 또한, 캡슐제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 더 포함할 수 있다.
- [0048] 상기 경구형 제형 중 액상 제형은 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.
- [0049] 상기 비경구 제형은 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 이에 제한되지 않고, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제를 모두 사용 가능하다.
- [0050] 또한, 상기 약학 조성물은 치료 효능의 증진을 위해 칼슘이나 비타민 등을 더 첨가할 수 있다.
- [0052] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다.
- [0053] 본 명세서에서, "약학적으로 유효한 양"이란, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수해/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미한다.
- [0054] 상기 약학 조성물의 유효 용량 수준은 사용 목적, 환자의 연령, 성별, 체중 및 건강 상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 달리 결정될 수 있다. 예를

들어, 일정하지는 않지만 일반적으로 0.001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.01 내지 10mg/kg을 일일 1회 내지 수회 투여될 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

- [0055] 상기 약학 조성물은 난소암이 발생할 수 있는 임의의 동물에 투여할 수 있고, 상기 동물은 예를 들어, 인간 및 영장류뿐만 아니라 소, 돼지, 말, 개 등의 가축 등을 포함할 수 있다.
- [0056] 상기 약학 조성물은 제제 형태에 따른 적당한 투여 경로로 투여될 수 있고, 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다. 투여 방법은 특히 한정할 필요 없이, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피부 도포, 호흡기내 흡입, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사 등의 통상적인 방법으로 투여될 수 있다.
- [0057] 상기 약학 조성물은 난소암의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로 사용될 수 있고, 수술 또는 다른 약물치료 등과 병용하여 사용될 수 있다.
- [0059] 본 발명은 스티그마스테롤(stigmasterol)을 유효성분으로 함유하는 난소암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0060] 상술한 바와 같이, 상기 조성물은 난소암 세포의 증식을 억제하고, 세포 사멸을 유도할 수 있다. 보다 상세하게는, 상기 조성물은 난소암 세포의 미토콘드리아의 막 전위 탈분극을 유도하고, 활성산소종(ROS) 생성을 증가시키며, 세포질(cytosol) 및 미토콘드리아의 칼슘이온 농도를 증가시킴으로써 세포 사멸을 유도할 수 있다. 상기 조성물은 난소암 세포 내 소포체 스트레스를 증가시키고, 소포체-미토콘드리아 축을 조절하며, 오토파고솜(autophagosome) 형성을 유도할 수 있다.
- [0061] 또한, 상기 조성물은 난소암 세포 증식과 관련된 PI3K(phosphatidylinositol-3-kinase) 또는 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 신호전달기전을 억제할 수 있다.
- [0062] 상기 조성물은 이러한 효과를 가진 스티그마스테롤을 유효성분으로 함유함으로써, 난소암 예방 또는 개선을 위한 건강기능식품 조성물로 활용될 수 있다.
- [0064] 본 발명은 스티그마스테롤(stigmasterol); 및 PI3K 또는 MAPK 신호전달기전 억제제;를 포함하는 난소암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0065] 상기 신호전달기전 억제제는 PI3K 억제제, ERK1/2(extracellular signal-regulated kinase) 억제제, JNK(c-Jun NH2-terminal kinase) 억제제 및 P38 억제제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있고, 보다 상세하게는, PI3K 억제제는 LY294002, Wortmanin, LY3023414, ME401, GSK1059615 등일 수 있고, ERK1/2 억제제는 U0126, FR180204, SCH772984, PD98059 등일 수 있으며, JNK 억제제는 SP600125, AEG3482, CEP1347, BI78D3 등일 수 있고, P38 억제제는 SB203580, SB202190, BIRB796, JX-401 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0066] 상기 조성물은 난소암 세포 증식 억제 및 세포 사멸 효과를 가진 스티그마스테롤과 상기 PI3K 또는 MAPK 신호전달기전 억제제를 병용함으로써 난소암 예방 또는 개선의 시너지 효과를 나타낼 수 있고, 이에 보다 효과적으로 난소암을 예방 또는 개선할 수 있다. 이에 상응하는 특징들은 상술된 부분에서 대신할 수 있다.
- [0068] 본 명세서에서, "개선"이란, 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물의 섭취에 의해 난소암, 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상을 완화, 감소, 또는 소멸시키는 등 그 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0069] 본 명세서에서, "건강기능식품"이란, 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 포함하며, 영양 공급 외에도 본 발명의 목적상 난소암의 예방, 생체 방어, 면역, 회복 등의 생체 조절 기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료 효과가 높은 식품을 의미한다.
- [0071] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 건강기능식품은 난소암의 예방 또는 개선 목적으로, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료 등으로 제조될 수 있다. 상기 건강기능식품이 취할 수 있는 형태에는 제한이

없으며, 상기 약학 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가될 수 있다.

[0072] 상기 건강기능식품은 통상적인 의미의 식품을 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, 음료 및 각종 드링크, 과일 및 그 가공식품(과일통조림, 잼 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(햄, 베이컨 등), 빵류 및 면류, 쿠키 및 스낵류, 유제품(버터, 치즈 등) 등이 가능하며, 통상적인 의미에서의 기능성 식품을 모두 포함할 수 있다. 또한 동물을 위한 사료로 이용되는 식품도 포함할 수 있다.

[0074] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물은 당업계에서 통상적으로 사용되는 식품학적으로 허용 가능한 식품 첨가제(식품 첨가물) 및 적절한 기타 보조 성분을 더 포함하여 제조될 수 있다. 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정할 수 있다. 상기 '식품첨가물공전'에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료 제제, 타르색소제제 등의 혼합 제제 등을 들 수 있다.

[0075] 상기 기타 보조 성분은 예를 들어, 향미제, 천연 탄수화물, 감미제, 비타민, 전해질, 착색제, 펙트산, 알긴산, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다. 특히, 상기 천연 탄수화물로는 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜을 사용할 수 있으며, 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[0077] 본 발명에 따른 건강기능식품에 함유된 상기 스티그마스테롤, 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염의 유효 용량은 난소암 예방 또는 개선 등 그 사용 목적에 따라 적절하게 조절될 수 있다.

[0078] 상기 건강기능식품 조성물은 식품을 원료로 하여 일반 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 난소암 예방 또는 개선을 위한 보조제로 섭취될 수 있다.

[0080] 본 발명은 스티그마스테롤(stigmasterol)을 유효성분으로 함유하는, 난소암 세포 내 칼슘이온 농도 증진용 시약 조성물을 제공한다.

[0082] 또한, 본 발명은 시험관 내(*in vitro*)에서 난소암 세포에 스티그마스테롤(stigmasterol)을 처리하는 단계를 포함하는, 난소암 세포 내 칼슘이온 증진 방법을 제공한다.

[0083] 이에 상응하는 특징들은 상술된 부분에서 대신할 수 있다.

[0085] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0087] <실험예 1> 난소암 세포주에서의 스티그마스테롤의 영향 확인

[0088] <실험방법>

[0089] 1. 세포배양

[0090] 난소암 세포주인 ES2, OV90 세포는 American Type Culture Collection에서 구매하여 사용하였으며, 세포의 단층 배양을 위해서 MACOY's 배지에 10% 소태아혈청 (Fetal bovine serum, FBS)을 함께 혼합하여 사용하였다.

[0092] 2. 실험 재료

[0093] 후보 조성물질인 스티그마스테롤(stigmasterol)은 Sigma에서 합성된 제품(cat number: S2424)으로, 처리 전 디메틸 설펍사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)로 희석하였다. 조성물에 의한 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 사용된 항체들은 Cell Signaling Technology, Santa Cruz Biotechnology 사로부터 구매하였다.

[0095] 3. BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석

[0096] 난소암 세포의 증식 능력에 스티그마스테롤이 미치는 영향을 확인하기 위하여 배양한 5×10^3 개의 세포와 배지 100 μ L을 96 well에 분주하고 스티그마스테롤을 용량 의존적(0, 5, 10, 20 μ g/mL)으로 처리하여 48시간 동안 배양한 다음, BrdU 키트 (Cat No: 1167229001, Roche)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다.

[0097] 48시간 인큐베이션 이 후, 10 μ M BrdU를 각 well에 추가적으로 넣어 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 2시간 동안 배양하였다. ES2, OV90 세포에 BrdU를 라벨링(labeling) 하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 상온에서 90분 인큐베이션 시킨 이 후 3차례 세척하였다. 마지막으로 100 μ L의 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) 기질(substrate)로 세포를 반응시켜 ELISA 리더기를 사용하여 370nm, 492nm 내 흡광도를 측정하여 세포 증식 능력을 분석하였다.

[0099] 4. 스페로이드 분석(Spheroid Assay)

[0100] ES2 및 OV90 세포를 배양 접시(3×10^3 cells)의 커버에 떨어뜨리고, 비히클(vehicle) 또는 스티그마스테롤 처리하여 72시간 동안 배양하였다.

[0101] 암 형태(cancer morphology)는 DM3000 현미경 (Leica, Wetzlar, Germany)으로 관찰하고, 종양 면적(tumor area)은 ImageJ 소프트웨어 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/index.html>)를 사용하여 계산하였으며, 3D 밀도는 ReViSP 소프트웨어 (<https://sourceforge.net/projects/revisp/>)를 사용하여 추정하였다.

[0103] 5. 프로피디움 요오드화물(Propidium iodide; PI) 염색을 이용한 세포 주기 분석

[0104] 스티그마스테롤에 의한 난소암 세포의 세포주기 변화를 확인하기 위하여 5×10^5 세포를 6 well에 70~80% 세포가 찰 때까지 배양하였다. 이 후, 스티그마스테롤을 용량 의존적(0, 5, 10, 20 μ g/mL)으로 처리하여 48시간 동안 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이 후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 워싱을 진행하고 1mL의 1× 바인딩 버퍼(binding buffer)를 사용하여 세포를 천천히 혼합하고 원심분리하여 세포 펠렛(pellet)을 얻었다.

[0105] 다음, 200 μ L의 1× binding buffer로 세포 현탁배양하여 브라운 1.5mL 튜브에 100 μ L 넣고 RNase 5 μ L, PI 5 μ L을 함께 혼합하여 세포를 1시간 동안 실온에 두어 염색하였다. 이 후 1× binding buffer를 400 μ L 추가하여 5mL FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하여 각 세포 주기에 해당하는 세포의 수를 측정하였다.

[0107] 6. 아넥신 V(Annexin V)와 프로피디움 요오드화물(Propidium iodide; PI) 염색을 통한 세포사멸 분석

[0108] 스티그마스테롤에 의한 난소암 세포의 사멸 효과를 확인하기 위하여 FITC Annexin V 세포 사멸 진단 키트 I (BD Biosciences)를 사용하여 실험을 진행하였다.

[0109] 먼저, 5×10^5 세포를 6 well에 배양한 후, 스티그마스테롤을 용량의존적(0, 5, 10, 20 μ g/mL)으로 처리하여 48시간 동안 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이 후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 워싱을 진행하고 1mL의 1× binding buffer를 사용하여 세포를 천천히 혼합하고 원심분리하여 세포 pellet을 얻었다. 다음, 200 μ L의 1× binding buffer로 세포 현탁배양하여 브라운 1.5mL 튜브에 100 μ L 넣고

Annexin V 5 μ L, PI 5 μ L을 함께 혼합하여 세포를 15분 동안 실온에 두어 염색하였다. 이 후 1 $\times$ binding buffer를 400 μ L 추가하여 5mL FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하여 사멸된 세포의 수를 측정하였다.

[0111] 7. Fluo-4와 rhod-2 염색을 통한 세포(cytosolic) 및 미토콘드리아 내부 칼슘 농도 분석

[0112] 스티그마스테롤에 의한 난소암 세포의 세포질 또는 미토콘드리아 내 칼슘 농도를 확인하기 위하여 3 μ M의 fluo-4-아세톡시메틸 에스터(acetoxymethyl ester; AM) (Invitrogen)와 3 μ M rhod-2를 사용하여 실험을 진행하였다.

[0113] 먼저, 5 $\times$ 10⁵ 세포를 6 well에 배양하였다. 이 후, 스티그마스테롤을 용량의존적 또는 칼슘이온 조절 물질(ruthenium red)과 병용으로 처리하여 48시간 동안 37 $^{\circ}$ C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이 후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 워싱을 진행하고 3 μ M의 fluo-4 또는 3 μ M rhod-2를 37 $^{\circ}$ C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 20분간 염색하여 PBS로 워싱을 진행한 다음, FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하여 사멸된 세포의 수를 측정하였다.

[0115] 8. JC-1 염색을 통한 미토콘드리아 막 전위 측정

[0116] JC-1 미토콘드리아 막 전위 (MMP) 변화는 mitochondria staining kit (Cat No: CS0390, Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정하였다.

[0117] 5 $\times$ 10⁵ 개의 ES2, OV90 세포를 6 well에 배양하고 배양 접시의 70~80% 세포가 찰 때까지 배양한 후, 스티그마스테롤을 용량의존적(0, 5, 10, 20 μ g/mL) 또는 칼슘이온 조절 물질(ruthenium red)과 병용으로 처리하여 48시간 동안 37 $^{\circ}$ C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이 후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 원심분리하여 세포 pellet을 얻었고, 세포는 JC-1 staining solution에 풀어준 후 37 $^{\circ}$ C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 20분 간 인큐베이션 하였다. 염색된 세포는 다시 원심분리하여 1 $\times$ JC-1 staining buffer로 워싱한 후 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0119] 9. DCFH-DA를 이용한 세포 내 ROS(Reactive oxygen species) 측정

[0120] 난소암 세포주 내 ROS 생성에 스티그마스테롤이 미치는 영향을 확인하기 위하여 페록사이드(peroxide) 존재 하에 2' ,7' -디클로로플루오레신(2' ,7' -dichlorofluorescein; DCF)으로 변환되어 형광을 띠는 2' ,7' -디클로로플루오레신 디아세테이트(2' ,7' -dichlorofluorescein diacetate; DCFH-DA, Sigma)를 사용하였다.

[0121] ES2, OV90 세포를 트립신을 통해 떼어내고 원심분리를 통해 세포 pellet을 얻은 다음, PBS로 한번 워싱하고 10 μ M의 DCFH-DA를 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터 내에서 30분 동안 인큐베이션 하였다. 이 후 세포를 PBS에 의해 두 번 워싱하고 스티그마스테롤을 용량의존적으로 1시간 동안 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터 내에서 인큐베이션 하였다. 처리된 세포는 PBS로 다시 워싱하고 유세포 분석기를 사용하여 DCF 형광강도를 분석하였다.

[0123] 10. 단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)

[0124] ES2, OV90 세포에 스티그마스테롤을 용량 의존적 또는 신호전달기전 억제제와 병용 처리한 다음 ES2, OV90 세포로부터 전체 단백질을 추출하여 Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 단백질을 정량하였다. 이 후, 추출한 단백질을 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성하였으며 10% SDS/PAGE 젤을 이용하여 전기영동 수행한 뒤, 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)으로 옮겨주고, 1차 항체와 2차 항체를 차례로 인큐베이션 시킨 다음 chemiluminescence detection (SuperSignal West Pico, Pierce, Rockford, IL, USA) 시약을 사용하여 ChemiDoc EQ system과 Quantity One software (Bio-Rad) 기기를 사용하여 타겟 단백질의 발현을 분석하였다.

[0125] 하기 표 1은 본 실험에 사용된 항체를 나타낸 것이다.

표 1

Primary Antibodies	Dilution	Supplier	Catalog Number
Cleaved caspase-3	1:1000	Cell Signaling	9664
Cleaved caspase-9	1:1000	Cell Signaling	9501
Cytochrome c	1:1000	Cell Signaling	11940
BAK	1:1000	Cell Signaling	12105
BAX	1:1000	Cell Signaling	2774
Phospho-PERK (Thr ⁹⁸¹)	1:1000	Santa Cruz	sc-32577
Phospho-eIF2 α (Ser ⁵¹)	1:1000	Cell Signaling	3398
IRE1 α	1:1000	Cell Signaling	3294
GADD153	1:1000	Santa Cruz	sc-7351
ATF6 α	1:1000	Santa Cruz	sc-166659
GRP78	1:1000	Santa Cruz	sc-13968
TUBA	1:1000	Santa Cruz	sc-5286
VDAC	1:1000	Cell Signaling	4661
IP3R1	1:1000	Invitrogen	PA1-901
IP3R2	1:1000	Santacruz	sc-398434
VAPB	1:1000	Invitrogen	PA5-53023
FAM82A2	1:1000	Abcam	ab182105
Phospho-ULK1 (SER ⁵⁵⁵)	1:1000	Cell Signaling	5869
ULK1	1:1000	Cell Signaling	8054
BECN1	1:1000	Cell Signaling	3495
ATG5	1:1000	Cell Signaling	12994
Phospho-AKT (SER ⁴⁷³)	1:1000	Cell Signaling	4060
AKT	1:1000	Cell Signaling	9272
Phospho-P70S6K (Thr ⁴²¹ /Ser ⁴²⁴)	1:1000	Cell Signaling	9204
P70S6K	1:1000	Cell Signaling	9202
Phospho-S6 (Ser ^{235/236})	1:1000	Cell Signaling	2211
S6	1:1000	Cell Signaling	2217
Phospho-ERK1/2(Thr ²⁰² /Tyr ²⁰⁴)	1:1000	Cell Signaling	9101
ERK1/2	1:1000	Cell Signaling	4695
Phospho-JNK (Thr ¹⁸³ /Tyr ¹⁸⁵)	1:1000	Cell Signaling	4668
JNK	1:1000	Cell Signaling	9252
Phospho-P38 (Thr ¹⁸⁰ /Tyr ¹⁸²)	1:1000	Cell Signaling	4511
P38	1:1000	Cell Signaling	9212

[0126]

[0128]

11. Quantitative RT-PCR

[0129]

난소암 세포 내 스티그마스테롤을 처리한 후 합성한 cDNA를 대상으로 quantitative RT-PCR을 수행하였다.

[0130]

프라이머는 Primer 3 프로그램을 이용하여 약 80-150 bp로 디자인하였으며, SYBR green (Sigma-Aldrich)을 이용한 real-time PCR 검출 시스템 (Applied Biosystems)을 실시하였다. 각 유전자 및 GAPDH 유전자의 분석은 세 번에 걸쳐서 반복 수행되었으며 발현량을 확인하기 위해 표준 곡선 및 Ct 값을 GAPDH 유전자의 발현량으로 표준화시켜 분석하였다.

[0131]

* PCR 조건: 94℃, 3분 (변성 단계) 및 40 사이클 (94℃, 20초-변성; 60℃, 40초-어닐링; 72℃, 1분-연장하는 것으로 구성된 사이클)을 실시하는 단계.

[0133]

온도가 10초당 0.5℃의 속도로 55℃에서 95℃까지 증가시켜 연속적인 형광 측정을 획득함으로써 용해곡선 프로그램 분석을 실시하였다. Ct 값에 의해 얻어진 용해곡선에 따라 quantitative RT-PCR 산물을 동정하였고 상대적인 유전자 발현양상을 2-ΔΔCt 방법에 따라 분석하였다.

- [0135] 12. 통계분석
- [0136] 본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.
- [0138] <실험결과>
- [0139] 1. 스티그마스테롤에 의한 난소암 세포사멸 양상 분석
- [0140] 스티그마스테롤에 의해 난소암 세포주 ES2, OV90 세포의 변화양상을 분석하기 위하여 먼저 스티그마스테롤을 용량 의존적(0, 5, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$)으로 처리하여 세포사멸 연관 단백질의 발현을 확인한 결과, 도 1A 및 1B에 나타난 바와 같이, caspase-3, caspase-9의 cleavage가 유도되었으며 세포사멸 단백질 BAK(BCL-2 antagonist/killer), BAX(BCL-2-associated X protein)의 발현도 증가하는 것으로 나타났다 (TUBA(alpha-tubulin): control).
- [0141] 또한, 난소암 3D 배양세포를 통하여 스티그마스테롤의 효과를 검증한 결과 3D 스페로이드 배양세포의 크기가 감소하는 것으로 나타났으며 (도 1C 및 1D), 아넥신 V(annexin V)와 프로피디움 요오드화물(propidium iodide; PI) 염색으로 세포 사멸 양상을 확인한 결과, 스티그마스테롤 농도가 증가할수록, 사멸 세포도 증가하는 것으로 나타남을 확인할 수 있다 (도 1E 및 1F). 이러한 결과는 세포주기 확인 시 sub-G1기의 증가시킴에 따라 세포 증식을 억제하고 세포 사멸을 유도하는 양상을 나타내었다 (도 1G-1H).
- [0143] 2. 스티그마스테롤에 의한 미토콘드리아 막 전위 변화, 활성산소, 칼슘이온 조절 분석
- [0144] JC-1 염료를 사용하여 스티그마스테롤에 의한 미토콘드리아 막 전위 변화를 조사한 결과, 도 2A 및 2B에 나타난 바와 같이, 스티그마스테롤을 처리한 경우 난소암 ES2, OV90 세포 내 용량의존적으로 미토콘드리아 막 전위 탈분극이 유도됨을 확인하였다.
- [0145] 또한, 스티그마스테롤에 의한 세포 내 ROS 변화를 확인하기 위해 DCF 형광강도를 분석한 결과, 도 2C 및 2D에 나타난 바와 같이, 스티그마스테롤을 처리한 경우 난소암 ES2, OV90 세포 내 용량의존적으로 ROS 생성이 증가됨을 확인하였다.
- [0147] 스티그마스테롤에 의한 난소암 ES2, OV90 세포의 세포질(cytosol)과 미토콘드리아의 칼슘이온 변화를 Fluo-4-AM 및 Rhod-2 염색으로 확인한 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 스티그마스테롤이 세포질 내 칼슘이온과 미토콘드리아의 칼슘이온을 증가시키며 세포 사멸을 유도함을 확인할 수 있다.
- [0149] 3. 스티그마스테롤에 의한 난소암 세포 내 소포체-미토콘드리아 축 조절 및 자가포식 분석
- [0150] 스티그마스테롤의 용량의존적 처리(0, 5, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$)을 통해 ES2, OV90 세포 주 내 소포체 스트레스 변화 양상을 확인하기 위해 소포체 스트레스 반응 인자인 IRE1 α (inositol-requiring enzyme 1 α), ATF6 α (activating transcription factor 6 α), PERK(PKR-like ER resident kinase), GADD153(growth arrest and DNA damage-induced-153), eIF2 α (eukaryotic translation-initiation factor 2 α), 및 GRP78(glucose-regulated protein 78) 단백질의 인산화 또는 활성을 웨스턴블롯을 통해 분석한 결과, 도 4A 및 4B에 나타난 바와 같이, 스티그마스테롤이 용량의존적으로 난소암 세포주 내에 소포체 스트레스를 증가시키는 것을 확인하였다.
- [0152] 이 후, 스티그마스테롤에 의하여 소포체-미토콘드리아 축을 조절하는 단백질 VDAC(voltage-dependent anion channel), IP3R1(inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1), IP3R2, VAPB(vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C), 및 FAM82A2(family with sequence similarity 82, member a2)의 발현을 확인하였다. 그 결과, 도 4C 및 4D에 나타난 바와 같이, 소포체와 미토콘드리아 표면에 존재하는 단백질들의 발현

이 증가함에 따라 소포체-미토콘드리아 접촉 현상이 증가하고 이에 따라 소포체로부터 칼슘이온 분비가 일어나며, 이는 미토콘드리아 내 칼슘이온 농도 증가로 이어지는 양상을 야기하는 원인이 됨을 확인할 수 있다.

[0153]

[0154] 또한, 스티그마스테롤에 의해 난소암 세포 내 자가포식(autophagy) 양상을 확인하기 위하여 자가포식을 검증할 수 있는 단백질, ULK1(UNC-51-like kinase 1), beclin-1 (BECN1), 및 ATG5(autophagy-related 5)의 발현을 스티그마스테롤 용량의존적 처리 시 웨스턴블롯을 통하여 확인하였다. 그 결과, 도 4E 및 4F에 나타난 바와 같이, 난소암 세포 내 스티그마스테롤의 처리는 소포체-미토콘드리아 접촉을 통하여 과도한 칼슘이온 분비를 야기시키고 이는 곧 오토파고솜(autophagosome) 형성을 유도하는 양상을 나타냄을 확인할 수 있다.

[0156] 4. 스티그마스테롤에 의한 난소암 세포 증식 억제 및 신호전달기전 분석

[0157] 스티그마스테롤에 의한 난소암 세포 증식을 분석하기 위하여 BrdU를 사용하여 세포 증식 양상을 확인한 결과, 도 5A 및 5B에 나타난 바와 같이, 스티그마스테롤의 용량이 증가할수록 난소암 세포주의 사멸이 유도됨을 확인할 수 있다.

[0158] 또한, 세포의 증식과 연관된 PI3K 및 MAPK 신호전달기전 구성 단백질 인산화효소들의 인산화 양상을 웨스턴 블롯을 통해 분석한 결과, 도 5C 및 5D에 나타난 바와 같이, AKT, P70S6K, S6, ERK1/2, JNK 및 P38 단백질의 인산화가 감소함을 확인할 수 있다. 이를 통해, 스티그마스테롤이 PI3K 및 MAPK 신호전달기전 불활성화를 통하여 난소암 세포의 증식을 억제시킴을 확인할 수 있다.

[0160] 더불어, 난소암 세포 내 PI3K 억제제 (LY294002; 20 μ M), ERK1/2 억제제 (U0126; 20 μ M), JNK 억제제 (SP600125; 20 μ M), P38 억제제 (SB203580; 20 μ M)를 스티그마스테롤과 병용 처리한 경우, 도 6에 나타난 바와 같이, 앞서 확인한 단백질 인산화 양상이 스티그마스테롤 단독 처리 시보다 각 신호전달기전 억제제와 병용 처리하였을 때 더욱 감소함을 확인할 수 있다. 즉, 스티그마스테롤과 PI3K 및 MAPK 억제를 병용하여 난소암 세포 증식을 더욱 효율적으로 억제할 수 있음을 알 수 있다.

[0161]

[0162] 5. 스티그마스테롤과 칼슘이온 조절 간 상관관계 분석

[0163] 세포 내 칼슘이온을 조절하는 루테늄 레드(ruthenium red)를 스티그마스테롤과 병용 처리한 경우, 도 7에 나타난 바와 같이, 스티그마스테롤에 의해 증가하였던 세포사멸 (도 7A 및 7B), 미토콘드리아 막 전위 탈분극 (도 7C 및 7D) 및 미토콘드리아 칼슘이온 수치 (도 7E 및 7F)가 기저레벨을 향하여 감소하였다. 이를 통해, 스티그마스테롤에 의한 난소암 세포 사멸양상은 세포 내 칼슘이온을 조절함에 따라 야기됨을 검증할 수 있다.

[0165] 6. 스티그마스테롤 의한 난소암 세포주 이주성 억제 양상 분석

[0166] 난소암 세포주 전이와 관련하여 세포의 이주성과 관련 유전자들의 발현을 스티그마스테롤 적용에 따라 분석한 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 스티그마스테롤을 난소암 세포주에 적용 시 난소암 세포주의 이주성이 현저하게 감소하였으며 (도 8A 및 8B), 이주성 및 혈관형성에 관련된 유전자인 VEGFA, PLAU, MMP2, MMP9, MMP14가 모두 감소하는 것으로 확인되었다 (도 8C 및 8D). 이를 통해, 스티그마스테롤이 난소암 세포주의 이주성을 억제시킴을 확인할 수 있다.

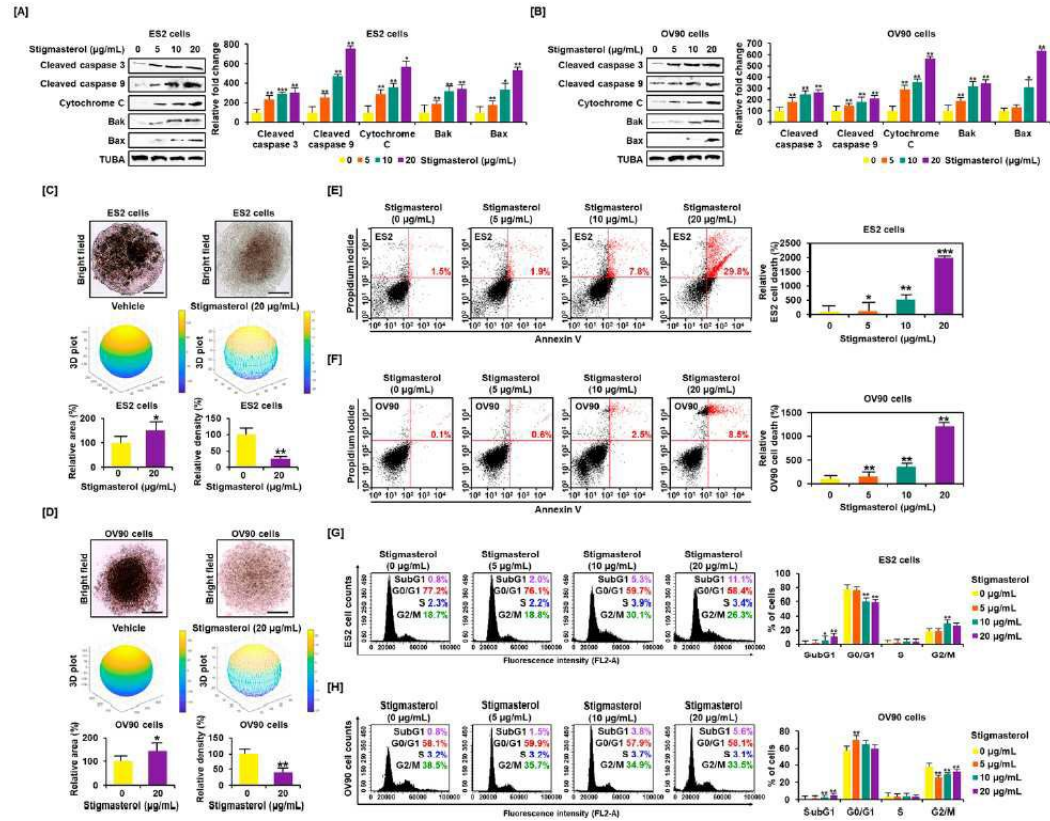
[0168] 종합하여 보면, 스티그마스테롤은 ES2 및 OV90 난소암 세포주에서 용도 의존적으로 세포 사멸 신호(apoptotic signals)를 유도하고, 미토콘드리아 탈 분극과 ROS 생성을 증가시키며, 세포질과 미토콘드리아에서 칼슘 수치를 비정상적으로 증가시킴으로써, 난소암 세포주의 세포 사멸을 일으켰다. 또한, 스티그마스테롤은 난소암 세포주의 세포 증식과 세포 주기를 조절하여 세포 성장을 억제하였으며, 세포 이동을 감소시키고 세포 성장과 관련된 신호 전달 단계를 억제한 바, 스티그마스테롤은 난소암의 신규한 치료 전략이 될 수 있음을 보여준다 (도 9).

[0170]

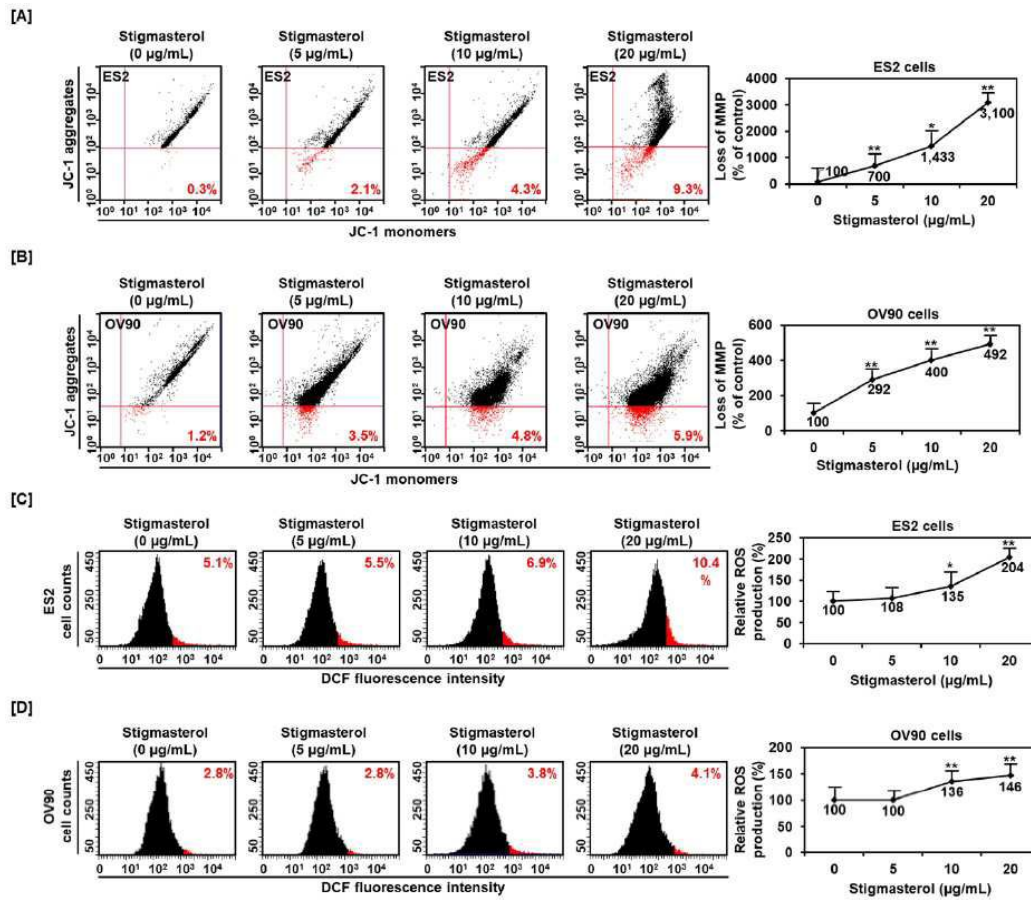
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

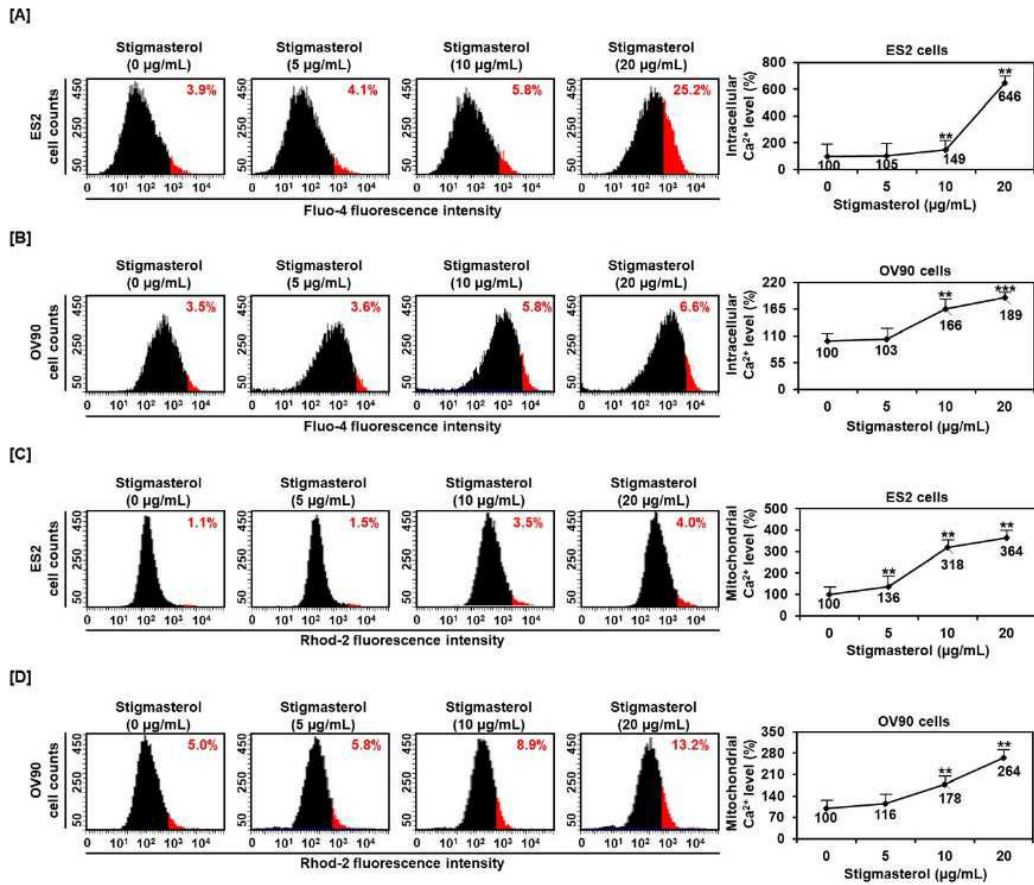
도면1



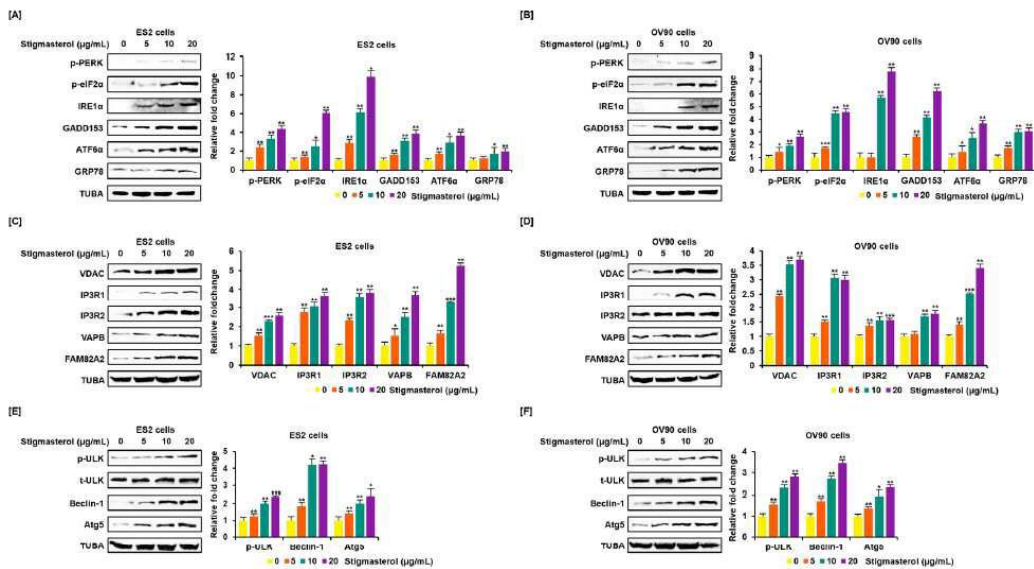
도면2



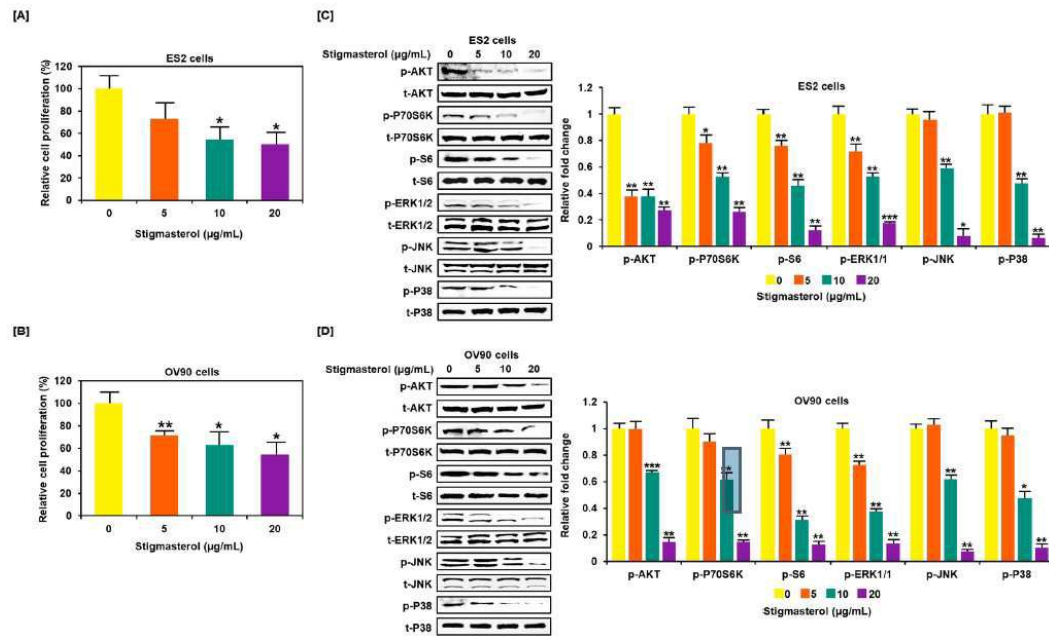
도면3



도면4

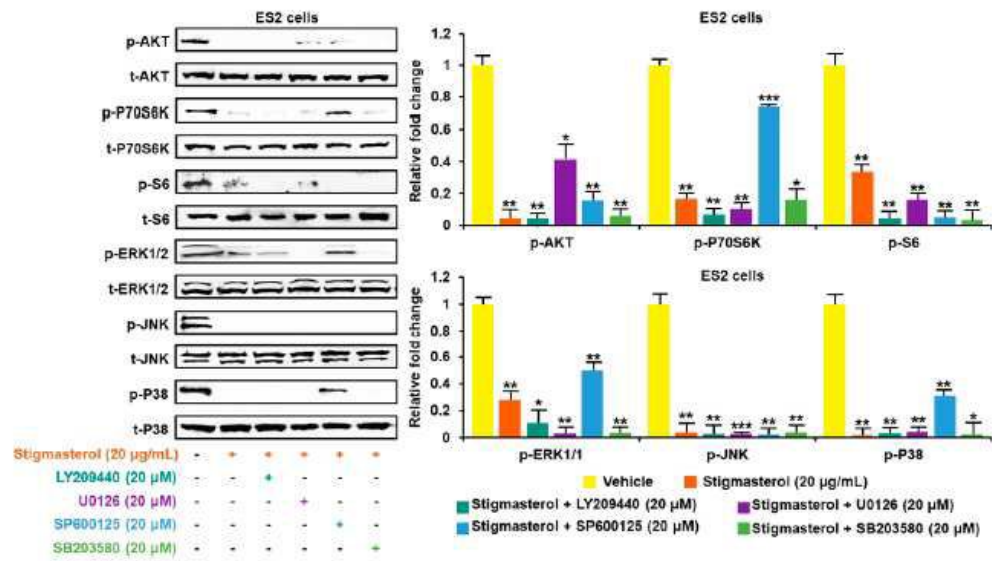


도면5

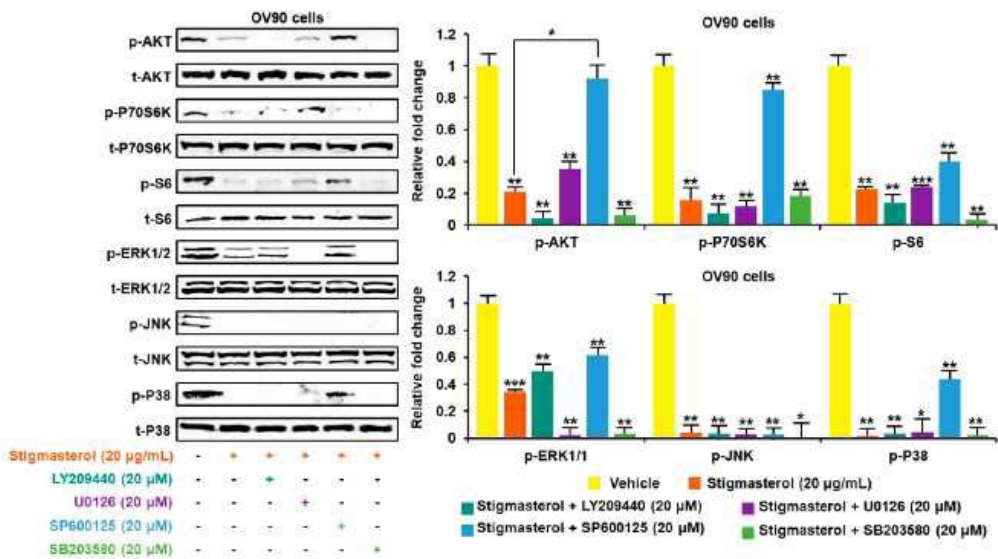


도면6

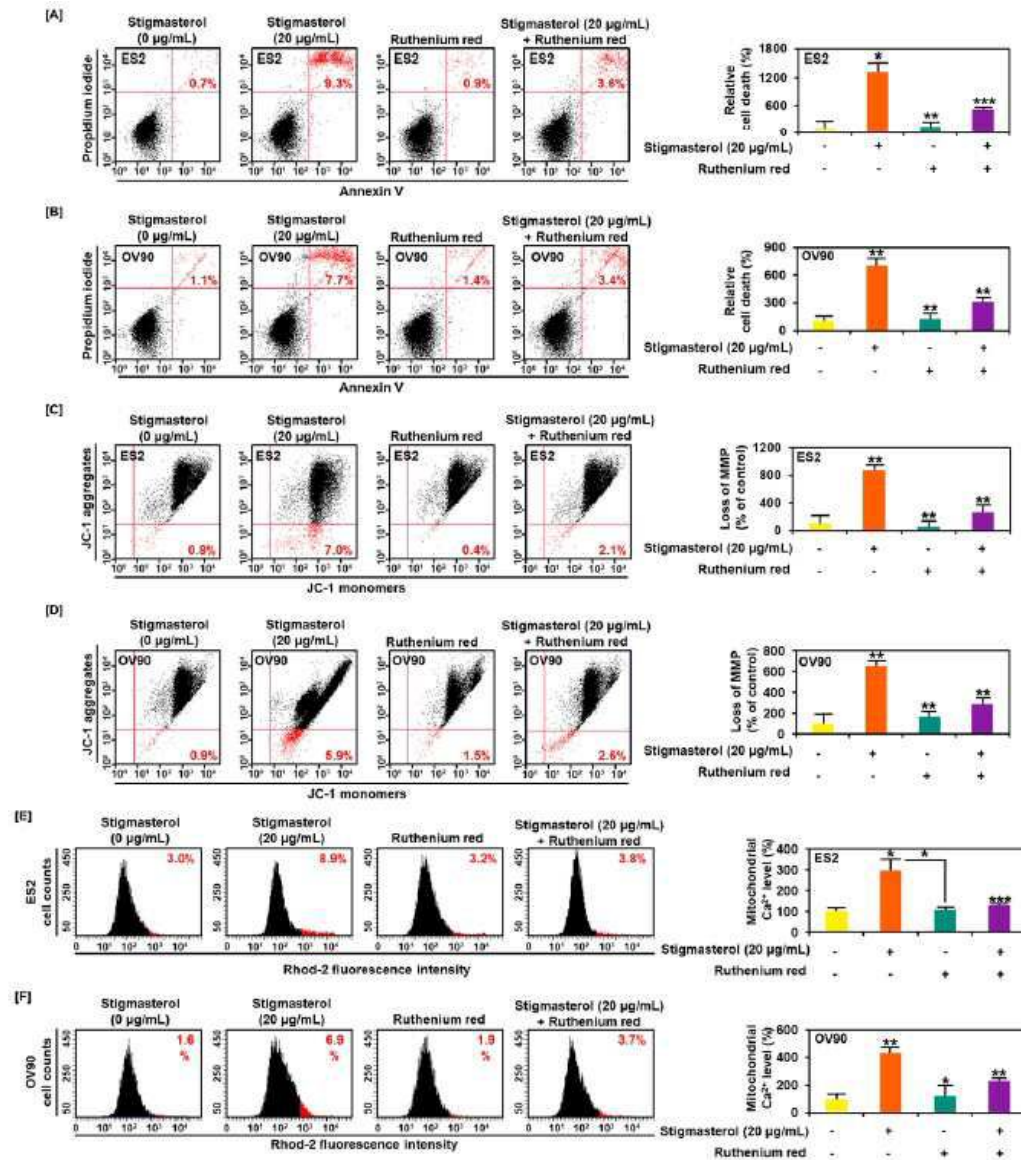
[A]



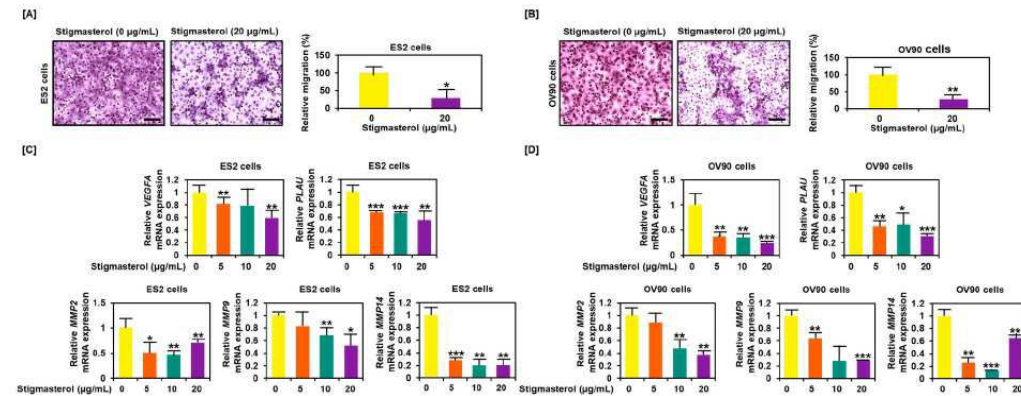
[B]



도면7



도면8



도면9

