



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0141504
(43) 공개일자 2023년10월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/33 (2015.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61K 31/4409 (2006.01) *A61K 31/713* (2006.01)
A61K 35/13 (2015.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 5/077* (2010.01)
C12N 5/09 (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/33 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2023-0036937

(22) 출원일자 2023년03월21일

심사청구일자 2023년03월21일

(30) 우선권주장

1020220036971 2022년03월24일 대한민국(KR)

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

이지희

서울특별시 양천구 목동중앙로7길 32, 102동 302호(목동, 이편한세상)

(74) 대리인

특허법인(유한)아이스

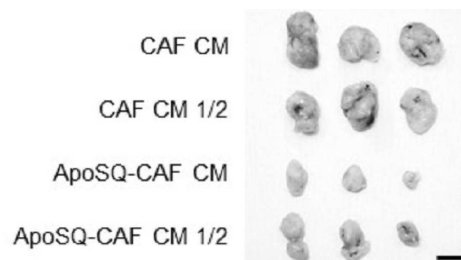
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 암 성장 억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은, 암 관련 섬유아세포(Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs) 및 사멸화된 암세포(Apoptotic cancer cells)를 공동 배양한 배양액을 함유하는 암 성장 억제용 약학적 조성물, 이를 이용한 암 성장 억제 방법 및 상기 약학적 조성물의 용도에 관한 것이다. 본 발명에서는, CAFs와 사멸화된 암세포를 공동 배양할 경우, Notch1 신호체계를 통해 WISP-1이 생성됨으로써, 세포 수준뿐만 아니라 in vivo 에서도 암 세포의 성장이 억제된다는 것을 확인하였고, RhoA 및 Rho kinase를 억제할 경우 암 세포 성장이 더욱 억제됨을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 배양액, 배양액의 주요 성분(WISP-1), 사멸화된 암 세포에 노출된 CAFs 또는 사멸화된 암 세포와 RhoA 및 Rho kinase 억제제에 함께 노출된 CAFs는 암 성장 억제제로서 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도30d



(52) CPC특허분류

A61K 31/4409 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)
A61K 35/13 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C12N 5/0656 (2013.01)
C12N 5/0693 (2013.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A61K 2300/00 (2023.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711135282
과제번호	2020R1A5A2019210
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	염증-암 미세환경 연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2021.06.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

암 관련 섬유아세포(Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs) 및 사멸화된 암 세포(apoptotic cancer cells)를 공동 배양한 배양액을 함유하는, 암 성장 억제용 약학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 암 관련 섬유아세포는 섬유육종, 악성섬유성조직구종, 지방육종, 횡문 근육종, 평활근육종, 혈관육종, 악성피부암, 림프혈관육종, 활막육종, 연골육종, 골육종, 폐암, 위암, 유방암, 대장암 및 전립선암으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 암과 관련된 섬유아세포인 것인, 약학적 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 사멸화된 암 세포는 자외선(Ultra-violet ray, UV) 조사에 의해 사멸된 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 사멸화된 암 세포의 암종은 유방암, 자궁암, 식도암, 위암, 뇌암, 직장암, 대장암, 폐암, 피부암, 난소암, 자궁경부암, 혈액암, 췌장암, 전립선암, 고환암, 후두암, 구강암, 두경부암, 갑상선암, 간암, 방광암, 골육종, 림프종 및 백혈병으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 암종은 폐암, 유방암, 위암, 대장암 및 전립선암으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 배양액은 WISP-1(Wnt-induced signaling protein-1)을 함유하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 WISP-1은 Notch1 시그널링에 의해 생성되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 Notch1 시그널링은 RhoA 및 Rho kinase의 억제에 의해 강화되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 암 관련 섬유아세포에서 Notch1 관련 분자를 증가시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 Notch1 관련 분자는 NICD1, Hes1 및 WISP-1으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 암 관련 섬유아세포에서 세포 증식 마커의 발현을 감소시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 세포 증식 마커는 Ki67 및 PCNA로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 13

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 암 세포의 세포 사멸(apoptosis)을 증가시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 14

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 암 관련 섬유아세포에서 세포 사멸 촉진 인자의 발현을 증가시키고, 항-세포 사멸 인자의 발현을 감소시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 세포 사멸 촉진 인자는 절단된 caspase 3, 절단된 PARP 및 Bax로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상이고, 상기 항-세포 사멸 인자는 Bcl-2, Mcl-1 및 Bcl-xL로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 16

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 RhoA 및 Rho kinase 억제제를 더 함유하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 17

청구항 1에 있어서, 상기 RhoA 및 Rho kinase 억제제는 화합물, shRNA, miRNA, siRNA, 항체 및 앵타머로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 화합물은 Y-27632인, 약학적 조성물.

청구항 19

청구항 17에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호 19 및 20의 염기 서열 중 어느 하나의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드인, 약학적 조성물.

청구항 20

사멸화된 암 세포(apoptotic cancer cells)에 노출된 암 관련 섬유아세포(Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs)를 함유하는, 암 성장 억제용 약학적 조성물.

청구항 21

암 관련 섬유아세포(Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs) 및 사멸화된 암 세포(apoptotic cancer cells)를 공동 배양한 배양액을 함유하는, 암 성장 억제용 건강기능식품.

청구항 22

암 관련 섬유아세포(Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs) 및 사멸화된 암 세포(apoptotic cancer cells)를 공동 배양하는 단계를 포함하는, 암 성장 억제용 조성물의 제조방법.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 상기 공동 배양을 통해 WISP-1을 분비시키는 단계를 더 포함하는, 암 성장 억제용 조성물의 제조방법.

청구항 24

암 관련 섬유아세포(Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs) 및 사멸화된 암 세포(apoptotic cancer cells)를 공동 배양한 배양액을 개체에 처리하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 개체의 암 성장 억제방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 암 관련 섬유아세포(Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs) 및 사멸화된 암 세포(Apoptotic cancer cells)를 공동 배양한 배양액을 함유하는 암 성장 억제용 약학적 조성물, 이를 이용한 암 성장 억제 방법 및 상기 약학적 조성물의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 폐암(소세포암 및 비소세포암 모두)은 남성 및 여성 모두에서 전세 계적으로 가장 흔한 암으로서, 암-관련 사망의 주요 원인이다(총 암 사망의 18.0%). 폐암 환자의 약 75%는 진단시에 국소 진행성 또는 전이성 질환이 존재하는 것으로 확인되며, 이때 전이란 암세포의 이동 및 침윤을 포함하는 다단계 과정으로, 악성 종양의 마커가 된다.

- [0004] 다양한 기원을 갖는 암관련 섬유아세포(Cancer-associated fibroblasts, CAFs)는 종양-관련 기질 내에 존재하는 주된 세포 유형 중 하나이다. CAFs와 암 세포 사이의 측분비 교신(paracrine communication)은 악성 종양으로의 진행 및 전이 확산을 촉진할 수 있는 암 세포 이동 및 침윤과 같은 기저 과정을 촉진한다는 것이 알려져 있다. CAFs는 종양 기질에서 매트릭스를 물리적으로 리모델링하여, 암 세포가 여전히 상피 특성을 유지하면서 침윤하도록 한다. 그러나, 종양 진행에 있어서, CAFs-매개된 조절의 근본적인 분자 메커니즘은 여전히 불분명하다.
- [0005] 종양미세환경(TME)에서 섬유아세포 활성화를 조절하는 데 있어서 Notch 신호전달(Notch signaling)의 중요성은 잘 확립되어 있다. Notch 신호전달의 활성화는 일반적으로 리간드-발현 세포와의 직접적인 상호작용에 의해 엄격하게 조절되고, Notch 신호전달의 조절에 문제가 생기면 발달 이상이나 암이 생긴다. 흥미롭게도, Notch 활성화는 종양원성(oncogenic) 및 종양-억제성 기능 둘 모두와 관련되며, 이는 Notch가 유도하는 세포반응의 복잡한 미세환경에 달려있다. 활성화된 Notch 경로를 갖는 기질 섬유아세포는 부분적으로 WISP-1(Wnt-induced signaling protein-1)의 상향 조절을 통해 흑색종 성장을 약화시키고 종양 혈관신생을 억제할 수 있다. 이러한 발견은 다른 암 유형에 있어서도, CAF에서 Notch1 의존적인 종양-조절 역할에 대한 분자 메커니즘을 밝히는데 도움을 줄 것이다.
- [0006] 종양 환경 내에서 높은 수준의 세포 사멸 및 종양 세포를 사멸시키기 위한 제거 기전은 종양-특이적 면역에 크게 영향을 미칠 수 있다. 종양 미세환경(TME)에서, 식세포 매개 제거의 면역억제 효과는 항종양 면역 반응을 억제하는 것으로 보고된 바 있다. 반대로, 종양은 또한 사멸세포 제거과정(efferocytosis)을 위한 인식을 억제함으로써 면역감시를 회피할 수 있다.
- [0007] 또한, 항염증 및 용해 지질 오토키이드(autacoid)는 다중 종양 유형에서 대식세포 탐식작용을 통해 세포 파편의 제거를 촉진시킴으로써 파편-자극된 암 진행을 특이적으로 억제한다. 더욱이, 본 발명자들의 이전 연구에서는, UV-조사된 사멸화(apoptotic) 폐암 세포에 노출된 대식세포가, 엑소좀 포스파타제 및 tensin homolog(PTEN) 및 퍼옥시좀 증식자-활성화 수용체-감마(PPAR γ) 리간드, 예컨대 15-하이드록시메이코사테트라엔산(HETE), 리폭신 A4 및 15d-프로스타글란딘 J2의 분비를 통해, 세포 극성 파괴, 암세포의 EMT 및 침윤을 억제한다는 것을 입증한 바 있다(특허등록 10-1804852). 또한, 본 발명자들은 이전 연구에서 UV에 조사된 사멸화된 폐암 세포가 CAFs 내에서 Notch1 신호를 통해 WISP-1을 상향 조절함으로써 암세포의 이동 및 침윤을 억제한다는 사실을 밝혀냈다. 그러나, 종양미세환경(TME)에서 사멸화된 암 세포와 CAFs 간 상호작용이 종양 성장을 억제하는지 여부는 아직 연구된 바가 없다.
- [0008] 이에, 본 발명자들은 CAFs와 사멸화(apoptotic) 암 세포의 상호작용이 암 세포 성장을 어떻게 조절하는지 연구한 결과, 사멸화된 암 세포에 CAFs를 노출시키면 Notch1 신호전달-의존적인 WISP-1 생성을 유도하여, 암 세포의 증식을 억제하고, 세포 사멸을 유도함을 확인하였다. 또한 RhoA/Rho kinase 신호전달 경로의 억제는 CAFs의 사멸암세포 탐식능력(efferocytosis)을 촉진하고 사멸화 암 세포 자극으로 인한 Notch1-WISP-1 신호 전달을 강화하여 암 세포 성장 억제 효과가 증진됨을 확인하였다. 더 나아가 CAFs와 사멸화된 암 세포 공동 배양 조정배지가 생쥐의 종양 성장을 억제하였으며, 이러한 암 성장 억제 효과는 WISP-1 의존적임을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 일 양상은 암 관련 섬유아세포(Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs) 및 사멸화된 암 세포(apoptotic cancer cells)를 공동 배양한 배양액을 함유하는, 암 성장 억제용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 다른 양상은 사멸화된 암 세포(apoptotic cancer cells)에 노출된 암 관련 섬유아세포(Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs)를 함유하는, 암 성장 억제용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 또 다른 양상은 암 관련 섬유아세포(Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs) 및 사멸화된 암 세포(apoptotic cancer cells)를 공동 배양한 배양액을 함유하는, 암 성장 억제용 건강기능식품을 제공하는 것이다.
- [0013] 또 다른 양상은 암 관련 섬유아세포(Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs) 및 사멸화된 암 세포(apoptotic cancer cells)를 공동 배양하는 단계를 포함하는, 암 성장 억제용 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0014] 또 다른 양상은 암 관련 섬유아세포(Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs) 및 사멸화된 암 세포(apoptotic cancer cells)를 공동 배양한 배양액을 개체에 처리하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 개체의 암 성장 억제 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명은 암 관련 섬유아세포(Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs) 및 사멸화된 암 세포(apoptotic cancer cells)를 공동 배양한 배양액을 함유하는, 암 성장 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명에서 상기 CAFs와 사멸화된 암 세포를 공동 배양한 배양액은 WISP-1을 함유하고 있어, 암 세포의 성장을 억제하는 효과가 있다.

[0018] 본 발명에서 "암 관련 섬유아세포(Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs)"란 암 병변의 내부 및/또는 주변에 존재하는 α -SMA(α -평활근액틴) 양성 섬유아세포를 의미하며, 상기 CAFs는 대장암, 폐암, 전립선암, 유방암, 위암, 담관암, 기저세포암 등의 다양한 암에서 그 존재가 확인되고 있다.

[0019] 본 발명에서 상기 CAFs와 관련된 암은 뇌종양, 두경부암, 유방암, 폐암, 식도암, 위암, 십이지장암, 충수암, 대장암, 직장암, 간암, 췌장암, 담낭암, 담관암, 항문암, 신암, 수뇨관암, 방광암, 전립선 암, 음경암, 정소암, 자궁암, 난소암, 외음암, 질암, 피부암 등의 고형암일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 CAFs는 암에 관련된 것으로서 악성고형종양과 관련된 섬유아세포일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 CAF는 섬유육종, 악성섬유성조직구종, 지방육종, 횡문 근육종, 평활근육종, 혈관육종, 악성피부암, 림프혈관육종, 활막육종, 연골육종, 골육종 등의 육종에 관련된 것일 수 있으며, 폐암, 위암, 유방암, 대장암 또는 전립선암과 관련된 섬유아세포일 수 있다.

[0021] 본 발명에서 "사멸화된 암 세포(apoptotic cancer cells)"는 암 세포에 특정 파장의 빛을 조사하여 사멸화를 유도한 것일 수 있다. 상기 특정 파장의 빛의 조사는 자외선(Ultra-violet ray, UV) 조사일 수 있다. 일 실시예에서, 상기 파장은 100 내지 400 nm 파장으로 5 내지 30분 동안 조사될 수 있다. 일 구체예에서 상기 UV 조사는 150 내지 350 nm 파장으로 내지 20분 동안 또는 200 내지 300 nm 파장으로 10 내지 15분 동안 수행될 수 있다.

[0022] 본 발명에서 "공동 배양"은 CAFs와 사멸화된 암 세포를 함께 배양하여 이루어질 수 있다. 일 실시예에서, CAFs를 20 내지 30 시간 동안 X-VIVO 또는 무혈청 DMEM 배지에서 사멸화된 암 세포와 함께 배양할 수 있다.

[0023] 본 발명에서 "배양액"이란 CAFs와 사멸화된 암세포의 공동 배양을 통해 얻어진 배양 결과물을 의미한다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 배양액은 액체배지, 고체배지 또는 반고체배지일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 배양액은 조정배지(Conditioned medium)일 수 있다.

[0024] 본 발명에서 "암 성장"이란 통제 불가능한 종양 세포의 증식 과정으로, 타 조직으로의 전이와는 구분된다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 종양 세포의 증식은 부피, 중량 및 직경 생장 및 콜로니 형성을 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명에서 "암 성장 억제"란 세포 수준에서 암세포 및 콜로니의 증식 억제 또는 생체 내에서 종양의 성장 억제를 의미한다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 사멸화된 암 세포의 암종은 유방암, 자궁암, 식도암, 위암, 뇌암, 직장암, 대장암, 폐암, 피부암, 난소암, 자궁경부암, 혈액암, 췌장암, 전립선암, 고환암, 후두암, 구강암, 두경부암, 갑상선암, 간암, 방광암, 골육종, 림프종 및 백혈병으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다. 일 구체예에서 상기 암종은 폐암, 유방암, 위암, 대장암 및 전립선암으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으며, 상기 폐암은 폐선암 또는 비소세포폐암일 수 있다.

[0027] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 폐선암 세포는 344SQ 세포주, 비소세포폐암 세포는 A549 세포주, 대장암 세포는 HCT116 세포주, 유방암 세포는 MCF-7 세포주일 수 있다.

[0028] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 배양액은 유효성분으로서 WISP-1(Wnt-induced signaling protein-1)을 함유할 수 있다. WISP-1은 WNT 시그널링 경로의 표적 단백질이며, WNT 시그널링은 자가분비(autocrine) 및 주변분비(paracrine) 신호를 통해 상피(epithelial) 및 중간엽(mesenchymal) 발달 모두를 조절하면서, 폐 발달에서 역할을 한다.

[0029] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 WISP-1은 Notch1 시그널링에 의해 생성될 수 있다. Notch1 시그널링은 Notch 수

용체를 매개체로 하여 세포접촉의존적으로 이루어지며, 발생, 재생, 항상성 유지 등에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 Notch 시그널링의 활성화는 종양원성(oncogenic) 및 종양-억제성 기능 둘 모두와 연관이 있다.

- [0030] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 Notch1 시그널링은 RhoA 및 Rho kinase의 억제에 의해 강화될 수 있다. RhoA는 Rho-GTPase 중 하나로, 세포 골격 및 세포 분열을 조절하며, RhoA 활성화의 증가는 세포 증식과 연관되는 것으로 알려져 있다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 조성물은 암 관련 섬유아세포에서 Notch1 관련 분자를 증가시킬 수 있다. 일 구체예에서, 상기 Notch1 관련 분자는 WISP-1, NICD1 및 Hes1으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 조성물은 암 관련 섬유아세포에서 세포 증식 마커의 발현을 감소시킬 수 있다. 일 구체예에서, 상기 세포 증식 마커는 Ki67 및 PCNA로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 조성물은 암 세포의 세포 사멸(apoptosis)을 증가시킬 수 있다. 또한, 상기 조성물은 암 관련 섬유아세포에서 세포 사멸 촉진 인자의 발현을 증가시키고, 항-세포 사멸 인자의 발현을 감소시킬 수 있다. 일 구체예에서, 상기 세포 사멸 촉진 인자는 절단된 caspase 3, 절단된 PARP 및 Bax로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상이고, 상기 항-세포 사멸 인자는 Bcl-2, Mcl-1 및 Bcl-xL로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 조성물은 RhoA 및 Rho kinase 억제제를 더 함유할 수 있다. 일 구체예에서, 상기 RhoA 및 Rho kinase 억제제는 화합물, shRNA, miRNA, siRNA, 항체 및 앵타머로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0035] 상기 siRNA는 자연에 존재하는(변형되지 않은) 리보뉴클레오타이드 단위구조를 가질 수 있으며, 하나 이상의 화학적 변형(modification)을 가지도록 합성되는 등 화학적으로 변형된 것일 수도 있다. 상기 화학적 변형을 통해 뉴클레아제(nuclease)에 대한 저항성 증진, 세포내 흡수(uptake) 증가, 세포 표적화(타겟 특이성) 향상, 안정성 증가, 또는 인터페론 활성화 감소, 면역 반응 및 센스(sense) 효과와 같은 타겟 이외 효과(off-target effect) 감소, RISC 로딩(loading) 증가(RNAi 활성화 증가) 등의 효과를 얻을 수 있다.
- [0036] 상기 siRNA의 화학적 변형 방법은 특별히 제한되지 않으며, 예컨대 하나 이상의 리보뉴클레오타이드의 당 구조, 또는 염기 구조, 또는 상기 리보핵산 간의 결합 부위가 화학적으로 변형(modification)된 것일 수 있으며, 당해 기술 분야의 통상의 지식을 가진 당업자라면 당해 기술 분야에 공지된 방법을 이용하여 원하는 방식으로 상기 siRNA 분자를 합성하고 변형시킬 수 있다.
- [0037] 예를 들어, 상기 화학적 변형은 핵염기-변형된 리보뉴클레오타이드, 즉, 5번-위치에서 변형된 우리딘 또는 시티딘(5-(2-아미노)프로필 우리딘, 5-브로모 우리딘 등), 8번 위치에서 변형된 아데노신 및 구아노신(8-브로모 구아노신 등), 데아자(deaza) 뉴클레오타이드(7-데아자-아데노신 등), 0- 및 N-알킬화된 뉴클레오타이드(N6-메틸 아데노신 등)와 같이 천연 핵염기(nucleobase) 대신 비천연 핵염기를 포함하는 리보뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0038] 또한, 당-변형된 리보뉴클레오타이드에 있어서, 2' OH 기는 H, OR, R, 할로젠(F, Cl, Br 또는 I), SH, SR, NH2, NHR, NR2 및 CN으로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기(R은 C1-C6 알킬, 알케닐, 또는 알키닐)에 의하여 치환될 수 있고, 리보뉴클레오타이드에 있어서, 백본의 포스포디에스테르 결합은 보라노포스페이트(boranophosphate) 또는 포스포로티오에이트(phosphorothioate)로 치환될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 RhoA 및 Rho kinase 억제제가 화합물인 경우, 상기 화합물은 Y-27632일 수 있다. 또한, 상기 RhoA 및 Rho kinase 억제제가 siRNA인 경우, 상기 siRNA는 서열번호 19 및 20의 염기 서열 중 어느 하나의 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0040] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 "약학적으로 허용 가능한 담체"를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리조핀 등을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립, 또는 정제로 제제화할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제화에 관해서는 레밍턴의 문헌에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제 화할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 제형에 특

별한 제한은 없으나 주사제, 흡입제, 피부 외용제, 또는 경구 섭취제 등으로 제제화할 수 있다.

- [0041] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 피부, 비강, 기도에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0042] 본 발명에 따른 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0043] 구체적으로, 본 발명에 따른 조성물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.001 내지 150 mg, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명은 사멸화된 암 세포(apoptotic cancer cells)에 노출된 암 관련 섬유아세포(Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs)를 함유하는, 암 성장 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0047] 본 발명은 암 관련 섬유아세포(Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs) 및 사멸화된 암 세포(apoptotic cancer cells)를 공동 배양한 배양액을 함유하는, 암 성장 억제용 건강기능식품을 제공한다.
- [0048] 본 발명의 건강기능식품은 담체, 희석제, 부형제 및 첨가제 중 하나 이상을 더 포함하여 정제, 환제, 산제, 과립제, 분말제, 캡슐제 및 액제 제형으로 이루어진 군에서 선택된 하나로 제형될 수 있다. 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽제, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 식품류 등이 있다.
- [0049] 상기 본 발명에 더 포함될 수 있는 첨가제로는, 천연 탄수화물, 향미제, 영양제, 비타민, 광물(전해질), 풍미제(합성 풍미제, 천연 풍미제 등), 착색제, 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH조절제, 안정화제, 방부제, 산화 방지제, 글리세린, 알콜, 탄산화제 및 과육으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 성분을 사용할 수 있다.
- [0050] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0051] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명에 따른 조성물은 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0052] 상기 담체, 부형제, 희석제 및 첨가제의 구체적인 예로는 이에 한정하는 것은 아니나, 락토즈, 텍스트로즈, 슈크로즈, 솔비톨, 만니톨, 에리스리톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 미세결정성 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸셀룰로즈, 물, 설탕시럽, 메틸셀룰로즈, 메틸 하이드록시 벤조에이트, 프로필하이드록시 벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1종 이상이 사용되는 것이 바람직하다.
- [0053] 본 발명의 건강기능식품을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활

성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

- [0055] 또한, 본 발명은 암 관련 섬유아세포(Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs) 및 사멸화된 암 세포(apoptotic cancer cells)를 공동 배양하는 단계를 포함하는, 암 성장 억제용 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0056] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 배양하는 단계는 X-VIVO 배지에서 24시간 동안 배양하여 혈청결핍(serum-starved) 상태로 만드는 것 일 수 있다. 일 구체예에서, 배양 배지를 사멸화된 암 세포가 포함된 X-VIVO 또는 무혈청 DMEM 배지로 교체할 수 있다.
- [0057] 또한 일 구체예에서, 상기 공동 배양은 배지 교체 후 10 내지 30시간, 15 내지 25시간 또는 18내지 24시간 동안 이루어질 수 있다.
- [0058] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 제조방법은 상기 공동 배양을 통해 WISP-1을 분비시키는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0060] 본 발명은 암 관련 섬유아세포(Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs) 및 사멸화된 암 세포(apoptotic cancer cells)를 공동 배양한 배양액을 개체에 처리하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 개체의 암 성장 억제방법을 제공한다.
- [0061] 본 발명에서, "처리"란 실험 요건에 따라 상기 배양액을 개체에 첨가 또는 투여하는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0062] 본 발명에서, "인간을 제외한 개체"는 포유동물을 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 상기 포유동물은 원숭이, 마우스, 소, 개, 말, 돼지 등을 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0064] 본 발명에서는, CAFs와 사멸화된 암 세포의 상호작용이 암 세포 및 CAFs의 성장을 어떻게 조절하는지 연구한 결과, CAFs와 사멸화된 암 세포를 공동 배양할 경우, Notch1 신호체계를 통해 WISP-1이 생성됨으로써, 암 세포의 성장을 억제한다는 것을 확인하였고, RhoA/Rho kinase 신호전달 경로를 억제할 경우 암 세포 성장이 더욱 억제됨을 확인하였다.
- [0065] 또한, CAFs와 사멸화된 암 세포를 공동 배양한 배양액이 세포 수준에서 암 세포의 성장을 억제함을 확인하였을 뿐만 아니라, 동계(syngeneic) 전이성 폐암 마우스 모델(*in vivo*)에서도 상기 배양액이 종양의 성장을 억제함을 확인하였고, 상기 배양액의 암 성장 억제 효과는 WISP-1 의존적임을 확인하였다.
- [0066] 따라서, 본 발명은 암 세포의 성장 억제 전략에 유용하게 이용될 수 있으며, 특히 본 발명의 배양액 및 조건배지는 암 성장 억제제로서 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0068] 도 1은 사멸화된 암 세포와 공동 배양된 암 관련 섬유아세포(Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs)의 배양액을 함유하는 조정배지(Conditioned medium, CM)가 암 세포의 성장을 억제함을 나타낸 도이다. 도 1a는 생쥐 폐선암종(adenocarcinoma) 세포주인 344SQ를 각각 대조군, CAF 조정배지(CAF CM), CAFs와 사멸화된 344SQ 공동 배양 조정배지(ApoSQ-CAF CM), CAFs와 괴사된 344SQ 공동 배양 조정배지(NecSQ-CAF CM)에 처리하여 세포 생존을 측정한 도이다. 도 1b는 인간 비소세포폐암 세포주인 A549를 각각 대조군, CAF CM, CAFs와 사멸화된 A549 공동 배양 조정배지(ApoA-CAF CM), CAFs와 괴사된 A549 공동 배양 조정배지(NecA-CAF CM)에 처리하여 세포 생존을 측정한 도이다. 도 1c는 인간 대장암 세포주인 HCT116를 각각 대조군, CAF CM, CAFs와 사멸화된 HCT116 공동 배양 조정배지(ApoH-CAF CM), CAFs와 괴사된 HCT116 공동 배양 조정배지(NecH-CAF CM)에 처리하여 세포 생존을 측정한 도이다. 도 1d는 인간 대장암 세포주인 LoVo를 각각 대조군, CAF CM, CAFs와 사멸화된 LoVo 공동 배양 조정배지(ApoL-CAF CM), CAFs와 괴사된 LoVo 공동 배양 조정배지(NecL-CAF CM)에 처리하여 세포 생존을 측정한 도이다.

도 2는 사멸화된 암 세포 단독 배양액은 암세포의 성장 억제 효과가 없음을 확인한 도이다. 도 2a는 344SQ 세포를 각각 대조군, CAF CM, ApoSQ CM, NecSQ CM에 처리하여 세포 생존을 측정한 도이다. 도 2b는 A549 세포를 각각 대조군, CAF CM, ApoA CM, NecA CM에 처리하여 세포 생존을 측정한 도이다. 도 2c는 HCT116 세포를 각각 대조군, CAF CM, ApoH CM, NecH CM에 처리하여 세포 생존을 측정한 도이다. 도 2d는 LoVo 세포를 각각 대조군, CAF CM, ApoL CM, NecL CM에 처리하여 세포 생존을 측정한 도이다.

도 3은 사멸화된 암 세포에 노출된 CAF CM이 폐암 세포의 콜로니 형성을 억제함을 나타낸 도이다. 도 3a는 344SQ 세포를 각각 CAF CM, ApoSQ-CAF CM, NecSQ-CAF CM으로 8일간 처리한 후 확인한 콜로니 이미지 및 콜로니 수를 측정한 도이다. 도 3b는 A549 세포를 각각 CAF CM, ApoA-CAF CM, NecA-CAF CM으로 9일간 처리한 후 확인한 콜로니 이미지 및 콜로니 수를 측정한 도이다.

도 4는 사멸화된 암 세포에 노출된 CAF CM이 폐암 세포에서 세포 증식 마커 발현을 억제함을 나타낸 도이다. 도 4a는 344SQ 세포를 CAF CM, ApoSQ-CAF CM, NecSQ-CAF CM으로 3일간 처리한 후 qRT-PCR로 측정한 Ki67 및 PCNA의 mRNA의 양을 나타낸 도이다. 도 4b는 344SQ 세포를 CAF CM, ApoSQ-CAF CM으로 3일간 처리한 후 면역블랏분석으로 측정한 Ki67 및 PCNA의 단백질 양을 나타낸 도이다. 도 4c는 A549 세포를 CAF CM, ApoA-CAF CM, NecA-CAF CM으로 3일간 처리한 후 qRT-PCR로 측정한 Ki67 및 PCNA의 mRNA의 양을 나타낸 도이다.

도 5는 사멸화된 암 세포에 노출된 CAF CM이 세포 사멸을 촉진함을 유세포 분석으로 확인한 도이다. 도 5a는 344SQ 세포를 CAF CM, ApoSQ-CAF CM, NecSQ-CAF CM으로 처리한 후, Annexin V-FICT/PI 이중 염색을 이용한 유세포 분석으로 측정한 세포 사멸 정도를 나타낸 도이다. 도 5b는 A549 세포를 CAF CM, ApoA-CAF CM, NecA-CAF CM으로 처리한 후, Annexin V-FICT/PI 이중 염색을 이용한 유세포 분석으로 측정한 세포 사멸 정도를 나타낸 도이다.

도 6은 사멸화된 암 세포에 노출된 CAF CM이 세포 사멸을 촉진함을 TUNEL 분석으로 확인한 도이다. 도 6a는 344SQ 세포를 CAF CM, ApoSQ-CAF CM, NecSQ-CAF CM으로 처리한 후, TUNEL 분석으로 확인한 세포 사멸 이미지 및 DAPI 염색으로 확인한 TUNEL 양성 세포 수를 나타낸 도이다. 도 6b는 A549 세포를 CAF CM, ApoA-CAF CM, NecA-CAF CM으로 처리한 후, TUNEL 분석으로 확인한 세포 사멸 이미지 및 DAPI 염색으로 확인한 TUNEL 양성 세포 수를 나타낸 도이다.

도 7은 사멸화된 암 세포에 노출된 CAF CM이 세포 사멸을 촉진함을 세포 사멸 촉진 단백질 및 항-세포 사멸 단백질에 대한 면역블랏분석으로 확인한 도이다. 도 7a는 344SQ 세포를 CAF CM, ApoSQ-CAF CM으로 처리한 후, 세포 사멸 촉진 단백질(절단된 caspase 3, 절단된 PARP 및 Bax)의 발현 및 항-세포 사멸 단백질(Bcl-2, Mcl-1 및 Bcl-xL)의 발현을 면역블랏분석으로 나타낸 도이다. 도 7b는 A549 세포를 CAF CM, ApoA-CAF CM으로 처리한 후, 세포 사멸 촉진 단백질(절단된 caspase 3, 절단된 PARP 및 Bax)의 발현 및 항-세포 사멸 단백질(Bcl-2, Mcl-1 및 Bcl-xL)의 발현을 면역블랏분석으로 나타낸 도이다.

도 8은 CAFs에서 Notch1를 억제할 경우 항증식작용이 역전됨을 나타낸 도이다. 도 8a는 두 종류의 siRNA(#1 siNotch1 및 #2 siNotch2)로 CAFs를 형질감염시킨 뒤 면역블랏분석으로 측정한 Notch1의 발현 정도를 나타낸다. 도 8b는 344SQ 세포를 CAF CM, ApoSQ-CAF CM으로 처리한 후, #1 siNotch1 또는 #2 siNotch2의 유무에 따른 세포 생존을 측정한 도이다. 도 8c는 344SQ 세포를 CAF CM, ApoSQ-CAF CM으로 처리한 후, #1 siNotch1 또는 #2 siNotch2의 유무에 따른 콜로니 이미지 및 콜로니 수를 측정한 도이다.

도 9는 CAFs에서 Notch1를 억제할 경우 세포 증식 마커 발현 억제 효과가 역전됨을 나타낸 도이다. 도 9a는 344SQ 세포를 CAF CM, ApoSQ-CAF CM으로 처리한 후, #1 siNotch1 또는 #2 siNotch2의 유무에 따른 Ki67 및 PCNA의 mRNA의 양을 나타낸 도이다. 도 9b는 344SQ 세포를 CAF CM, ApoSQ-CAF CM으로 처리한 후, #1 siNotch1 또는 #2 siNotch2의 유무에 따른 Ki67 및 PCNA의 단백질의 양을 나타낸 도이다.

도 10은 CAFs에서 Notch1 신호 전달 경로를 약물로 억제할 경우 항증식작용이 역전됨을 나타낸 도이다. 도 10a는 344SQ 세포 또는 A549 세포를 각각 CAF CM, ApoSQ-CAF CM 또는 CAF CM, ApoA-CAF CM으로 처리한 후, Notch1의 선택적 억제제인 LY3039478(10 μ M) 유무에 따른 세포 생존을 측정한 도이다. 도 10b는 344SQ 세포 또는 A549 세포를 각각 CAF CM, ApoSQ-CAF CM 또는 CAF CM, ApoA-CAF CM으로 처리한 후, Notch1의 선택적 억제제인 LY3039478(10 μ M) 유무에 따른 콜로니 이미지 및 콜로니 수를 측정한 도이다.

도 11은 Notch1 신호 전달 경로를 약물로 억제할 경우 세포 증식 마커 발현 억제 효과가 역전됨을 나타낸 도이다. 도 11a는 344SQ 세포 또는 A549 세포를 각각 CAF CM, ApoSQ-CAF CM 또는 CAF CM, ApoA-CAF CM으로 처리한 후, Notch1의 선택적 억제제인 LY3039478(10 μ M) 유무에 따른 Ki67 및 PCNA의 mRNA의 양을 나타낸 도이다. 도

11b는 344SQ 세포를 CAF CM, ApoSQ-CAF CM으로 처리한 후, Notch1의 선택적 억제제인 LY3039478(10 μ M) 유무에 따른 Ki67 및 PCNA의 단백질의 양을 나타낸 도이다.

도 12는 CAFs에서 WISP-1을 억제할 경우 항증식작용이 역전됨을 나타낸 도이다. 도 12a는 두 종류의 siRNA(#1 siWISP-1 및 #2 siWISP-2)로 CAFs를 형질감염시킨 뒤 면역블롯분석으로 측정된 WISP-1의 발현 정도를 나타낸다. 도 12b는 344SQ 세포를 CAF CM, ApoSQ-CAF CM으로 처리한 후, #1 siWISP-1 또는 #2 siWISP-2의 유무에 따른 세포 생존을 측정한 도이다. 도 12c는 344SQ 세포를 CAF CM, ApoSQ-CAF CM으로 처리한 후, #1 siWISP-1 또는 #2 siWISP-2의 유무에 따른 콜로니 이미지 및 콜로니 수를 측정한 도이다.

도 13은 CAFs에서 WISP-1을 억제할 경우 세포 증식 마커 발현 억제 효과가 역전됨을 나타낸 도이다. 도 13a는 344SQ 세포를 CAF CM, ApoSQ-CAF CM으로 처리한 후, #1 siWISP-1 또는 #2 siWISP-2의 유무에 따른 Ki67 및 PCNA의 mRNA의 양을 나타낸 도이다. 도 13b는 344SQ 세포를 CAF CM, ApoSQ-CAF CM으로 처리한 후, #1 siWISP-1 또는 #2 siWISP-2의 유무에 따른 Ki67 및 PCNA의 단백질의 양을 나타낸 도이다.

도 14는 항-WISP-1 항체를 통해 WISP-1을 중화할 경우 항증식작용이 역전됨을 확인한 도이다. CAF CM, ApoSQ-CAF CM에 대조군(이소타입 IgG) 또는 항-WISP-1 항체 10 μ g/mL를 처리한 후, 세포 생존을 비교하였다.

도 15는 항-WISP-1 항체를 통해 WISP-1을 중화할 경우 세포 증식 마커 발현 억제 효과가 역전됨을 나타낸 도이다. 도 15a는 344SQ 세포를 CAF CM, ApoSQ-CAF CM으로 처리한 후, 대조군(이소타입 IgG) 또는 항-WISP-1 항체 10 μ g/mL를 더 처리하였을 때, Ki67 및 PCNA의 mRNA의 양을 나타낸 도이다. 도 15b는 344SQ 세포를 CAF CM, ApoSQ-CAF CM으로 처리한 후, 대조군(이소타입 IgG) 또는 항-WISP-1 항체 10 μ g/mL를 더 처리하였을 때, Ki67 및 PCNA의 단백질의 양을 나타낸 도이다.

도 16은 CAFs에서 Notch1-WISP-1 신호가 세포 사멸을 촉진함을 유세포 분석으로 확인한 도이다. 도 16a는 344SQ 세포 또는 A549 세포를 각각 CAF CM, ApoSQ-CAF CM 또는 CAF CM, ApoA-CAF CM으로 처리한 후, siNotch1 유무에 따른 세포 사멸 정도를 Annexin V-FICT/PI 이중 염색을 이용한 유세포 분석으로 나타낸 도이다. 도 16b는 344SQ 세포 또는 A549 세포를 각각 CAF CM, ApoSQ-CAF CM 또는 CAF CM, ApoA-CAF CM으로 처리한 후, siWISP-1 유무에 따른 세포 사멸 정도를 Annexin V-FICT/PI 이중 염색을 이용한 유세포 분석으로 나타낸 도이다.

도 17은 재조합 WISP-1이 암 세포의 증식을 억제함을 확인한 도이다. 도 17a는 344SQ 세포 또는 A549 세포에 rWISP-1을 20, 50 또는 100 ng/mL로 처리하였을 때 세포 생존을 나타낸 도이다. 도 17b는 344SQ 세포 또는 A549 세포에 rWISP-1을 20, 50 또는 100 ng/mL로 처리하였을 때 콜로니 이미지 및 콜로니 수를 나타낸 도이다.

도 18은 재조합 WISP-1이 세포 증식 마커의 발현을 억제함을 확인한 도이다. 도 18a는 344SQ 세포 또는 A549 세포에 rWISP-1을 20, 50 또는 100 ng/mL로 처리하였을 때 Ki67 및 PCNA의 mRNA의 양을 나타낸 도이다. 도 18b는 344SQ 세포에 rWISP-1을 20, 50 또는 100 ng/mL로 처리하였을 때 Ki67 및 PCNA의 단백질의 양을 나타낸 도이다.

도 19는 재조합 WISP-1이 암 세포의 세포 사멸을 촉진함을 유세포 분석으로 확인한 도이다. 도 19a는 344SQ 세포에 rWISP-1을 20, 50 또는 100 ng/mL로 처리한 후, 세포 사멸 정도를 Annexin V-FICT/PI 이중 염색을 이용한 유세포 분석으로 나타낸 도이다. 도 19b는 A549 세포에 rWISP-1을 20, 50 또는 100 ng/mL로 처리한 후, 세포 사멸 정도를 Annexin V-FICT/PI 이중 염색을 이용한 유세포 분석으로 나타낸 도이다.

도 20은 재조합 WISP-1이 암 세포의 세포 사멸을 촉진함을 TUNEL 분석으로 확인한 도이다. 도 20a는 344SQ 세포에 rWISP-1을 20, 50 또는 100 ng/mL로 처리한 후, TUNEL 분석으로 확인한 세포 사멸 이미지 및 DAPI 염색으로 확인한 TUNEL 양성 세포 수를 나타낸 도이다. 도 20b는 A549 세포에 rWISP-1을 20, 50 또는 100 ng/mL로 처리한 후, TUNEL 분석으로 확인한 세포 사멸 이미지 및 DAPI 염색으로 확인한 TUNEL 양성 세포 수를 나타낸 도이다.

도 21은 재조합 WISP-1이 암 세포의 세포 사멸을 촉진함을 세포 사멸 촉진 단백질 및 항-세포 사멸 단백질에 대한 면역블롯분석으로 확인한 도이다. 도 21a는 344SQ 세포에 rWISP-1을 20, 50 또는 100 ng/mL로 처리한 후, 세포 사멸 촉진 단백질(절단된 caspase 3, 절단된 PARP 및 Bax)의 발현 및 항-세포 사멸 단백질(Bcl-2, Mcl-1 및 Bcl-xL)의 발현을 면역블롯분석으로 나타낸 도이다. 도 21b는 A549 세포에 rWISP-1을 20, 50 또는 100 ng/mL로 처리한 후, 세포 사멸 촉진 단백질(절단된 caspase 3, 절단된 PARP 및 Bax)의 발현 및 항-세포 사멸 단백질(Bcl-2, Mcl-1 및 Bcl-xL)의 발현을 면역블롯분석으로 나타낸 도이다.

도 22는 CAFs에서 Rho kinase를 억제할 경우, 탐식 작용(efferocytosis)이 촉진됨을 확인한 도이다. Rho

kinase 억제제인 Ripasudil 30 μ M을 처리한 후, CAFs의 ApoSQ에 대한 식세포 작용을 유세포 분석으로 분석하였다.

도 23은 CAFs에서 Rho kinase를 억제할 경우, 탐식 작용(efferocytosis)이 촉진됨을 확인한 도이다. Ripasudil 유무에 따른 CAFs의 식세포 작용을 분석하였으며, CAFs의 핵 및 액틴 세포골격은 각각 DAPI(청색) 및 TRITC-conjugated phalloidin(적색)으로 염색하였다.

도 24는 CAFs에서 Rho kinase를 억제할 경우, Notch1 신호 단백질(NICD1, Hes1 및 WISP-1) 발현 및 WISP-1 분비가 촉진됨을 확인한 도이다. 도 24a는 ApoSQ에 노출된 CAFs에서 Ripasudil 유무에 따른 Notch1 신호 단백질(NICD1, Hes1 및 WISP-1)의 발현을 나타낸 도이다. 도 24b는 ApoSQ에 노출된 CAFs에서 Ripasudil 유무에 따른 WISP-1의 분비량을 나타낸 도이다.

도 25는 CAFs에서 RhoA를 억제할 경우 항증식작용이 강화됨을 나타낸 도이다. 도 25a는 siRhoA로 CAFs를 형질감염시킨 뒤 면역블롯분석으로 측정된 RhoA의 발현 정도를 나타낸다. 도 25b는 344SQ 세포 또는 A549 세포를 각각 CAF CM, ApoSQ-CAF CM 또는 CAF CM, ApoA-CAF CM으로 처리한 후, siRhoA 유무에 따른 세포 생존을 나타낸 도이다. 도 25c는 344SQ 세포 또는 A549 세포를 각각 CAF CM, ApoSQ-CAF CM 또는 CAF CM, ApoA-CAF CM으로 처리한 후, siRhoA 유무에 따른 콜로니 이미지 및 콜로니 수를 나타낸 도이다.

도 26은 CAFs에서 RhoA를 억제할 경우 세포 증식 마커 발현 억제 효과가 강화됨을 나타낸 도이다. 도 26a는 344SQ 세포 또는 A549 세포를 각각 CAF CM, ApoSQ-CAF CM 또는 CAF CM, ApoA-CAF CM으로 처리한 후, siRhoA 유무에 따른 Ki67 및 PCNA의 mRNA의 양을 나타낸 도이다. 도 26b는 344SQ 세포를 CAF CM, ApoSQ-CAF CM으로 처리한 후, siRhoA 유무에 따른 Ki67 및 PCNA의 단백질의 양을 나타낸 도이다.

도 27은 Rho kinase를 약물로 억제할 경우 항증식작용이 강화됨을 나타낸 도이다. 도 27a는 344SQ 세포 또는 A549 세포를 각각 CAF CM, ApoSQ-CAF CM 또는 CAF CM, ApoA-CAF CM으로 처리한 후, Rho kinase 억제제인 Y-27632(30 μ M) 유무에 따른 세포 생존을 측정하는 도이다. 도 27b는 344SQ 세포 또는 A549 세포를 각각 CAF CM, ApoSQ-CAF CM 또는 CAF CM, ApoA-CAF CM으로 처리한 후, Rho kinase 억제제인 Y-27632(30 μ M) 유무에 따른 콜로니 이미지 및 콜로니 수를 측정하는 도이다.

도 28은 Rho kinase를 약물로 억제할 경우 세포 증식 마커 발현 억제 효과가 강화됨을 나타낸 도이다. 도 28a는 344SQ 세포 또는 A549 세포를 각각 CAF CM, ApoSQ-CAF CM 또는 CAF CM, ApoA-CAF CM으로 처리한 후, Rho kinase 억제제인 Y-27632(30 μ M) 유무에 따른 Ki67 및 PCNA의 mRNA의 양을 나타낸 도이다. 도 28b는 344SQ 세포를 CAF CM, ApoSQ-CAF CM으로 처리한 후, Rho kinase 억제제인 Y-27632(30 μ M) 유무에 따른 Ki67 및 PCNA의 단백질의 양을 나타낸 도이다.

도 29는 CAFs에서 RhoA를 억제할 경우 세포 사멸이 촉진됨을 확인한 도이다. 도 29a는 344SQ 세포 또는 A549 세포에서 siRhoA 유무에 따른 세포 사멸 정도를 Annexin V-FITC/PI 이중 염색을 이용한 유세포 분석으로 나타낸 도이다. 도 29b는 344SQ 세포에서 siRhoA 유무에 따라 TUNEL 분석으로 확인한 세포 사멸 이미지 및 DAPI 염색으로 확인한 TUNEL 양성 세포 수를 나타낸 도이다.

도 30은 ApoSQ-CAF CM이 *in vivo*에서 마우스 종양의 성장을 억제함을 확인한 도이다. 도 30a는 실험을 도식화한 것으로, 344SQ를 주사한 동계 마우스에 CAF CM, 50% 희석 CAF CM, ApoSQ-CAF CM 또는 50% 희석 ApoSQ-CAF CM을 주사하여 총 4가지 그룹으로 구성하였다. 도 30b는 4가지 그룹의 마우스 체중을 나타낸 도이다. 도 30c는 4가지 그룹에서의 종양의 중량을 나타낸 도이다. 도 30d는 4가지 그룹에서의 1차 종양의 사진을 나타낸 도이다. 도 30e는 4가지 그룹에서의 종양의 부피를 나타낸 도이다.

도 31은 ApoSQ-CAF CM이 *in vivo*에서 WISP-1을 통해 마우스 종양의 성장을 억제함을 확인한 도이다. 도 31a는 실험을 도식화한 것으로, 344SQ를 주사한 동계 마우스에 CAF CM, ApoSQ-CAF CM, ApoSQ-CAF CM과 항-WISP-1 항체 또는 ApoSQ-CAF CM과 IgG를 주사하여 총 4가지 그룹으로 구성하였다. 도 31b는 4가지 그룹의 마우스 체중을 나타낸 도이다. 도 31c는 4가지 그룹에서의 종양의 중량을 나타낸 도이다. 도 31d는 4가지 그룹에서의 1차 종양의 사진을 나타낸 도이다. 도 31e는 4가지 그룹에서의 종양의 부피를 나타낸 도이다.

도 32는 rWISP-1이 *in vivo*에서 마우스 종양의 성장을 억제함을 확인한 도이다. 도 32a는 실험을 도식화한 것으로, 344SQ를 주사한 동계 마우스에 rWISP-1을 12.5 μ g/kg 또는 25 μ g/kg으로 주사하여 대조군 포함 총 3가지 그룹으로 구성하였다. 도 32b는 4가지 그룹의 마우스 체중을 나타낸 도이다. 도 32c는 4가지 그룹에서의 종양의 중량을 나타낸 도이다. 도 32d는 4가지 그룹에서의 1차 종양의 사진을 나타낸 도이다. 도 32e는 4가지 그룹에

서의 종양의 부피를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

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

실험예 1: 재료 및 방법

1-1. 시약

LY3039478(HY-12449)는 MedChemExpress(Monmouth Junction, NJ 08852, USA)사로부터 구입하였다. 마우스 재조합 WISP-1 단백질(1680-WS)은 R&D Systems(Minneapolis, MN, USA)사로부터 구입하였다. Ripasudil(K-115)은 Selleck Chemicals(Houston, TX, USA)에서 구입하였으며, Y-27632(Y0503)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 한편, 웨스턴 블랏팅에 사용된 항체 목록은 하기 표 1과 같다.

표 1

Antigen	Vendor	Cat.No	Source	Species cross-reactivity	Application	Dilution
Bax	GeneTex	GTX109683	Rabbit polyclonal	H,M,R	IB	1:1000
Bcl-2	Cell signaling	3498	Rabbit polyclonal	H,M	IB	1:1000
Mcl-1	GeneTex	GTX102026	Rabbit polyclonal	H,M	IB	1:1000
Bcl-xL	GeneTex	GTX01535	Rabbit polyclonal	H,M,R	IB	1:1000
Cleaved Caspase-3	Cell Signaling	9661	Rabbit polyclonal	H,M,R,Mk	IB	1:1000
Cleaved PARP	Cell Signaling	9544	Rabbit polyclonal	H,M	IB	1:1000
PCNA	Abcam	ab29	Mouse monoclonal	H,M,R	IB	1:1000
Ki67	Abcam	ab16667	Mouse monoclonal	H,M,R	IB	1:1000
Notch1	Abcam	ab52627	Rabbit monoclonal	H,M	IB	1:1000
RhoA	Cytoskeleton	ARH04	Mouse monoclonal	Broad species	IB	1:1000
β -actin	Santa Cruz	sc-69879	Mouse monoclonal	Broad species	IB	1:1000
WISP-1	Abcam	ab178547	Rabbit polyclonal	H,M,R	IB	1:1000
NICD1	Cell Signaling	#4147	Rabbit monoclonal	H,M,R	IB	1:1000
Hes1	Abcam	ab71559	Rabbit polyclonal	H,M,R	IB	1:1000
WISP-1	R&D Systems	MAB1680	Rat monoclonal	M	Neutralizing	10 μ g/ml
IgG	R&D Systems	MAB0061	Rat monoclonal	M	Neutralizing	10 μ g/ml
Mouse IgG (HRP)	GeneTex	GTX213111	Goat	Not applicable	IB	1:5000
Rabbit IgG (HRP)	GeneTex	GTX213110	Goat	Not applicable	IB	1:5000

Abbreviation: IB-Immunoblot, H-human, M-mouse, R-rat, Rb-rabbit, Mk-monkey

1-2. 암 관련 섬유아세포(Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs)의 분리 및 세포 배양

Kras-돌연변이체(Kras^{LA1}) 마우스의 폐 종양으로부터, 섬유아세포-특이적 마커인 Thy1로 자기(magnetic)-활성화된 세포 분류를 사용하여, CAFs를 분리하였다. 이어서, CAFs를 10% 소 태아 혈청(FBS), 페니실린/스트렙토마이신(100 U/100 μ g, Welgene), 2 mM L-글루타민(Welgene), 및 1mM sodium pyruvate(Welgene)가 보충된 알파-MEM(Welgene, Gyeongsan, Korea)에서 배양하였다. 불멸화를 위해, CAFs를 리포펙터-EXT (AptaBio, Yongin, Korea)를 사용하여 TERT 플라스미드 (pCDH-3xFLAG-TERT, Addgene 51 플라스미드 # 51631)로 안정하게 형질감염시켰다. 실험에 사용된 1차 세포는 6회 미만으로 계대배양되었다. 인간 암 세포주는 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA)로부터 얻었다. 344SQ 세포(폐선암 세포주) 및 다양한 인간 암 세포주 [A549(비소세포폐암 세포주), HCT116 및 LoVo(대장암 세포주)]를 10% FBS 및 페니실린/스트렙토마이신(100U/100 μ g)이 보충된 RPMI 1640 (HyCloneTM, GE Healthcare, Boston, MA)에서 유지시켰다.

[0079] 1-3. 세포 사멸 유도

[0080] 암 상피 세포주를 15분 동안 254 nm에서 자외선 조사에 노출시킨 후, RPMI-1640(10% FBS와 함께)로 37℃ 및 5% CO₂에서 2시간 동안 배양하였다. Wright-Giemsa-염색된 샘플에 광 현미경을 사용하여 핵 형태를 평가한 결과, 조사된 세포가 세포사멸되었음을 확인하였다. 수회의 동결-해동 주기에 의해 용해(괴사) 암세포를 얻었다. 세포사멸 및 괴사는 annexin V-FITC/propidium iodide(BD Biosciences, San Jose, CA) 염색에 이어서 FACSCalibur 시스템(BD Bioscience)에서 flow cytometric 분석에 의해 확인되었다.

[0082] 1-4. CAFs의 배양 및 CAFs 조정배지의 제조

[0083] CAFs를 3×10^5 세포/ml로 플레이팅하고, 37℃ 및 5% CO₂에서 적합한 배지로 배양시켰다. 밤새 인큐베이션한 후, 세포 자극 전에 24시간 동안 X-VIVO 10 배지 (04-380Q, Lonza)로 혈청-제거하였다. 자극을 위해, 배양 배지를 사멸화된 또는 괴사된 암 세포(9×10^5 세포/ml)를 함유하는 X-VIVO 10으로 대체하였다. 20시간 후, 상청액을 원심분리에 의해 수확하여, 표적 암 상피 세포(5×10^3 세포/ml)의 자극을 위한 조정배지(CM)로 사용하였다.

[0085] 1-5. 세포 생존 분석

[0086] 세포 증식 분석을 위해, 암 세포(5×10^3)를 RPMI-1640 배지와 함께 96-웰 플레이트(SPL, Pocheon, Korea)에 플레이팅하였다. 세포를 X-VIVO 10 배지(Lonza, Basel)에서 6시간 동안 배양시켰다. 조정배지는 각 그룹에 추가되었다. 플레이트를 인큐베이터에서 37℃ 및 5% CO₂에서 1-5일간 인큐베이션하였다. 그 후, 세포 계수(計數) 키트-8(CCK-8) 용액(Dojindo Molecular Technologies, Rockville, MD)을 웰에 첨가하고, 플레이트를 인큐베이터에서 37℃ 및 5% CO₂에서 30분간 인큐베이션하였다. 흡광도는 450 nm에서 마이크로플레이트 리더를 이용하여 측정하였다.

[0088] 1-6. 콜로니 형성 분석

[0089] 암 세포를 6-웰 플레이트(SPL, Pocheon, Korea)에 X-VIVO 10(대조군)과 조정배지와 함께 웰 당 500개씩 플레이팅하였다. 플레이트를 37℃ 및 5% CO₂에서 8일 혹은 9일동안 인큐베이션하였다. 배지는 4일마다 한 번씩 교체하였다. 형성된 콜로니를 95% 에탄올과 함께 4℃에서 밤새 고정시키고 0.1% crystal violet(Sigma-Aldrich)으로 염색한 뒤 20% 메탄올로 상온에서 밤새 희석하였다. 플레이트를 세정한 뒤, 50개 이상의 세포를 포함하는 눈에 보이는 콜로니를 입체현미경으로 5개의 구역에서 계수하였다. 대표적인 콜로니를 촬영하였고 3번의 독립적인 실험을 수행하였다.

[0091] 1-7. 세포 사멸 분석

[0092] 세포 사멸은 annexin V-FITC/propidium iodide(PI) 염색 키트(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 검출하였다. 폐암 세포는 CM 또는 rWISP-1으로 처리한 후, 1 내지 3일 후 수확하였고, 150 mL의 결합 버퍼에 재현탁하였으며, 5 µL FITC-conjugated Annexin V 및 5 µL PI로 암실에서 15분간 실온에서 염색하였다. 이후, FITC-conjugated Annexin V에 양성인 세포를 유세포 측정기(ACEA NovoCyte, San Diego, CA, USA)로 검출하였고, 데이터는 NovoExpress 소프트웨어 1.5를 사용하여 분석하였다.

[0093] 또한, 폐암 세포를 TUNEL 키트(Roche, Basel, Switzerland)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 염색하였다. 사멸된 세포는 488 및 543 nm에서 여기(excitation)되는 필터 세트가 장착된 공초점 현미경(LSM5 PASCAL; Carl Zeiss, Jena, Germany)으로 관찰하였다. TUNEL 양성 세포의 정량화는 맹검 방식(blinded fashion)으로 슬라이드당 무작위로 선택된 10개의 HPF(high-power fields)당 TUNEL 양성 세포의 수를 수동으로 계수하여 수행하였다.

[0095] 1-8. 면역블랏팅 분석

[0096] 전체 세포 추출물을 사용하여 표준 웨스턴 블랏을 수행하였으며, 사용한 항체의 정보는 상기 표 1과 같다. 전체 세포 추출물은 세포 사멸 세포 또는 CM에 노출된 CAFs 또는 암 세포로부터 추출하였다. 세포를 수확하고, 차가운 PBS(phosphate-buffered saline)로 세척한 후, 프로테아제 억제제가 첨가된 방사면역침전 (radioimmunoprecipitation) 분석 버퍼[10 mM Tris(pH 7.2), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1.0% Triton X-100 및 5 mM EDTA]로 30분간 얼음 위에서 용해시켰다. 이후, 동일한 양의 단백질을 SDS-PAGE 젤(#161-0158, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에 용해시킨 후, wet 이송 시스템(Bio-Rad Laboratories)을 사용하여 니트로셀룰로스 막(10600001, GE Healthcare Life Science, Piscataway, NJ, USA)으로 전송하였다. 막을 5% 소 혈청 알부민(BSA)-TBST 또는 5% 우유-TBST로 1시간 동안 차단한 후, 표지된 1차 항체와 밤새 배양한 다음 표지된 2차 항체와 함께 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 정량화를 위해 Odyssey 이미지 분석 시스템(Licor Biosciences, Lincoln, NE, USA)을 사용하였다.

[0098] 1-9. 정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응(qRT-PCR)

[0099] 총 RNA는 암세포로부터 RNAiso Plus reagent(Takara, Tokyo)를 이용해 추출하였고, cDNA는 AccuPower RT Premix(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용해 제조자의 프로토콜에 따라 합성하였다. qRT-PCR은 StepOnePlus system with TB Green Premix Ex Taq II(Takara)를 통해 수행하였다. mRNA 수준은 *Hprt* mRNA 수준으로 정규화하였고, 대조군과 비교한 발현의 배수 변화로 나타내었다. 표적 유전자의 증폭에 사용한 프라이머 서열은 하기 표 2와 같다.

표 2

[0100]

		Forward	Reverse
HPRT		CCAGTGTC AATTATATCTTCAAC (서열번호 1)	CAGACTGAAGAGCTACTGTAATG (서열번호 2)
Ki67	Mouse	AATCCAAC TCAAGTAAACGGGG (서열번호 3)	TTGGCTTGCTTCCATCCTCA (서열번호 4)
	Human	AAGCCCTC CAGTCCTAGTC (서열번호 5)	GCAGGTTGCCACTCTTTCTC (서열번호 6)
PCNA	Mouse	GGCGTGA ACCTCACCAGTAT(서열번호 7)	TTCTCCTGGTTTGGTGCTTC (서열번호 8)
	Human	CCTGCTGGGATATTAGCTCCA(서열번호 9)	CAGCGGTAGGTGTCGAAGC (서열번호 10)

[0102] 1-10. 일시적 형질감염

[0103] CAFs를 Notch1을 특이적으로 타겟팅하는 두 종류의 siRNA(#1 Bioneer Inc, Daejeon, Korea; #2 Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA), WISP-1(WNT1-inducible-signaling pathway protein 1)을 특이적으로 타겟팅하는 두 종류의 siRNA(#1 Bioneer Inc, Daejeon, Korea; #2 Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA), RhoA를 특이적으로 타겟팅하는 siRNA (Bioneer Inc, Daejeon, Korea) 또는 대조군 siRNA(SN-1003 AccuTarget™ Negative Control; Bioneer)와 함께 50 nM의 최종 농도의 형질감염 시약(리포펙타민 RNAi MAX; Invitrogen)을 사용하여 제조자의 지시에 따라 일시적으로 형질감염시켰다. 밤새 형질감염 후, 세포를 적합한 배지에서 24시간 동안 배양하고 ApoSQ 또는 ApoA 세포로 자극하였다. 유전자를 타겟팅하는데 사용된 siRNA 서열은 하기 표 3과 같다.

표 3

[0104]

	Sense	Antisense
Notch1 #1	5'-CCCUUUGAGUCUUAUACA-3' (서열번호 11)	5'-UGUAUGAAGACUCAAAGGG-3' (서열번호 12)

Notch1 #2	5'-GACGACAAUCAGAACGAG-3' (서열번호 13)	5'-AUGCGUGAUUGUCGU-3' (서열번호 14)
WISP-1 #1	5'-GGAAUCCUAAACGAUAUCUU-3' (서열번호 15)	5'-AAGAUUUCGUUAGGAUUC-3' (서열번호 16)
WISP-1 #2	5'-GTACCTCAGAACGUGGACUATT-3' (서열번호 17)	5'-UAUCCACCCUGAAGACCTT-3' (서열번호 18)
RhoA	5'-GUCUCAUGUAGUACCUU-3' (서열번호 19)	5'-AAGGUAUACAACUGAGAC-3' (서열번호 20)

1-11. 조정배지에서의 WISP-1 중화

CAFs로부터의 조정배지를 마우스의 항-마우스 WISP-1 중화 항체(R&D Systems) 10 μ g/ml 또는 IgG 이소타입 대조군(R&D Systems) 10 μ g/ml과 함께 2시간 동안 인큐베이션하였다. 항-WISP-1 항체 중화 효과는 사용 전 WISP-1 ELISA를 이용해 검사하였다.

1-12. 식세포 작용(phagocytosis) 분석

사멸화된 암 세포의 식세포 작용은 유세포 분석 및 면역형광분석법을 이용하여 평가하였다. CAFs를 PKH67(녹색)로 표지된 사멸화된 344SQ 세포와 1:3 비율로 24시간 동안 공동배양하기 전에, PKH26(적색)으로 염색하였고, 식세포 작용의 비율은 2색 유세포 분석으로 평가하였다. 또한, 면역형광분석을 위해 PKH67로 표지된 사멸화된 344SQ 세포를 CAFs와 24시간 동안 공동배양하였다. CAFs를 세척한 후, 3.7% w/v 파라포름알데히드로 고정하였고, 투과성을 위해 15분 동안 0.1% Triton X-100으로 처리하였다. F-액틴은 로다민 팔로이딘(rhodamine phalloidin; Invitrogen)으로 제조업체에 지침에 따라 염색하였다. 이미지는 공초점 현미경(LSM5 PASCAL; Carl Zeiss, Jena, Germany)으로 획득하였으며, 식세포 작용 지수는 (세포 사멸 수/총 200개의 CAFs) X 100 의 수학적 식으로 계산하였다.

1-13. 마우스 실험

Ewha Medical Research Institute의 동물 케어 위원회로부터 하기 실험 프로토콜을 승인받았다(EUM19-0437). 마우스는 연구소 동물의 관리 및 사용을 위한 국립 보건원(National Institute of Health; NIH) 가이드에 따라 관리 및 취급되었다. 동계(syngeneic) 종양 실험을 이용한 폐암 전이 연구를 공지의 방법으로 수행하였다. 요약하면, 344SQ 세포(마우스 당 PBS 100 μ l 중 1×10^6 세포)를 우측 후방 측면에서 동계(syngeneic)(129/Sv) 마우스 내로 피하 주사하였다.

조정배지 실험을 위해, 2일 후에 시작하여, 중화 항-WISP-1 항체 또는 이소타입 IgG의 존재 또는 부재하에 CAFs로부터 유래된 조정 배지(마우스당 100 μ l; 무혈청 배지로 희석하지 않거나 50% 희석)를 1주 3회 종양내 주사를 통해 투여하였다. 또한, rWISP-1(12.5 μ g/kg 또는 25 μ g/kg)을 344SQ 주사 2일 후, 1주 3회 종양내 주사를 통해 투여하였다. 마우스의 종양 성장을 매일 모니터링하고, 주사 6주 후에 희생시켰다. 이후, 부검을 수행하여, 피하 종양 덩어리의 직경 및 중량을 조사하였다. 모든 동물 실험 및 연구는 연령이 동일한 수컷 마우스로 수행하였다.

1-14. 종양 부피

종양의 부피는 (L x W x W)/2의 방식으로 계산하였으며, L은 종양의 긴 부분이고 W는 종양의 짧은 부분을 의미한다.

1-15. 통계

짝(pairwise) 비교는 two-tailed Student's t-테스트를 사용하여 수행하였고, 다중(multiple) 비교는 Kruskal-

Wallis 테스트에 이어 Dunn's post hoc 테스트를 사용하여 수행하였다. 0.05 이하의 P 값은 통계적으로 유의한 것으로 간주하였고, 모든 데이터는 Prism 5 소프트웨어(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 분석하였다.

실험예 2: 실험결과

2-1. CAFs와 사멸화된 암 세포의 상호작용이 암 세포 증식을 억제함을 확인

CAFs는 종양 생성, 성장 및 전이에 관련된 여러 요소를 분비하는 것으로 알려져 있기 때문에, 본 실험에서는 UV-조사되어 사멸화된 344SQ 암 세포와 CAFs를 공동 배양할 때, 생물활성 매개체 분비를 통하여 폐암 세포 성장이 억제되는지 여부를 조사하였다.

섬유아세포-특이적 마커인 Thy1을 사용하여 Kras-돌연변이체(Kras^{LA1}) 마우스의 폐 종양으로부터 CAFs를 분리한 후, 사멸화된 344SQ 세포주(ApoSQ) 또는 괴사된 344SQ 세포주(NecSQ)로 처리하였으며, 이때 상기 세포주는 20시간 동안 Kras^{LA1} 및 53^{R172H} 대립유전자를 동시발현하는 마우스로부터 유래된 고침윤성 및 전이성 폐 선암종(adenocarcinoma) 세포주를 이용하였다.

344SQ 세포는 CAFs와 사멸화된 344SQ 공동 배양 조정배지(ApoSQ-CAF CM) 또는 CAFs와 괴사된 344SQ 공동 배양 조정배지(NecSQ-CAF CM)로 1 내지 5일간 처리하였다. 세포 증식 분석은 세포 계수 키트-8(Dojindo)을 사용하여 진행하였다.

그 결과, ApoSQ-CAF CM이 3 내지 5일에서 암 세포의 생존을 상당히 억제한 반면, 대조군(CAF CM) 및 NecSQ-CAF CM은 그렇지 않았음을 확인하였다(도 1a). 또한, 비소세포 폐암 세포주 A549 및 대장암 세포주 HCT116 및 LoVo와 같은 다른 유형의 인간 암 세포주에서도 CAFs와 사멸화된 암 세포의 공동 배양 조정배지(ApoA-CAF CM, ApoH-CAF CM 및 ApoL-CAF CM)의 항증식효과를 확인할 수 있었다(도 1b 내지 1d). 또한, 사멸화된 암 세포 또는 괴사된 암 세포 단독의 CM(ApoSQ CM, NecSQ CM, ApoA CM, NecA CM, ApoH CM, NecH CM, ApoL CM 및 NecL CM)은 암 세포의 성장에 영향을 주지 못함을 확인할 수 있었다(도 2a 내지 2d).

CAFs 조정배지의 암 세포 성장에 대한 효과를 보다 상세하게 규명하기 위해 콜로니 형성을 조사하였다. 예상된 바와 같이, ApoSQ-CAF CM 및 ApoA-CAF CM은 344SQ 및 A549 폐암 세포의 콜로니 형성을 상당히 억제한 반면, CAF CM, NecSQ-CAF CM 및 NecA-CAF CM은 그렇지 않았음을 확인할 수 있었다(도 3a 및 3b).

또한, ApoSQ-CAF CM 및 ApoA-CAF CM은 Ki67 및 PCNA와 같은 세포 증식 마커의 mRNA 및/또는 단백질의 발현 수준을 상당히 억제하는 것을 확인할 수 있었다(도 4a 내지 4c). 그러나, CAF CM, NecSQ-CAF CM 및 NecA-CAF CM은 세포 증식 마커에 대한 mRNA 및/또는 단백질의 발현 억제 효과가 없음을 확인하였다.

상기 실험 결과들을 통해, CAFs와 사멸화된 암 세포의 상호작용이 주변분비(paracrine) 작용을 통해 암 세포의 증식을 억제함을 입증하였다.

2-2. CAFs와 사멸화된 암 세포의 상호작용이 암 세포의 세포 사멸을 촉진함을 확인

상기 실시예 2-1에서 확인한 CAFs와 사멸화된 암 세포의 공동 배양 조정배지의 암 세포 증식 억제 효과가 암 세포 사멸의 촉진으로 인한 것인지 확인하기 위하여, Annexin V/PI 이중 염색 분석, TUNEL 분석 및 웨스턴 블랏팅 분석을 수행하여 암 세포의 세포 사멸 정도를 평가하였다.

유세포 분석 결과, 폐암 세포를 CAFs와 사멸화된 암 세포의 공동 배양 조정배지(ApoSQ-CAF CM 및 ApoA-CAF CM)로 처리할 경우, 대조군(CAF CM) 또는 CAFs와 괴사된 암 세포의 공동 배양 조정배지(NecSQ-CAF CM 및 NecA-CM)로 처리할 경우보다 1 내지 3일에 폐암 세포의 세포 사멸이 증가하는 것으로 나타났다(도 5a 및 5b).

또한, TUNEL 분석 결과, ApoSQ-CAF CM 및 ApoA-CAF CM은 처리 2일 후 TUNEL 양성 세포의 수가 증가하는 것으로 나타났으나, CAF CM, NecSQ-CM 및 NecA-CM의 경우 아무런 효과가 나타나지 않았다(도 6a 및 6b).

암 세포의 세포 사멸 정도에 대한 추가적인 분석을 위해, 웨스턴 블랏팅을 수행하여 344SQ 및 A549 세포에서 세포 사멸 관련 단백질(활성화된 caspase 3 및 PARP, 및 Bcl-2 패밀리의 발현 수준을 측정하였다. 그 결과, 폐암 세포를 ApoSQ-CAF CM 또는 ApoA-CAF CM으로 처리할 경우, CAF CM으로 처리할 경우보다 절단된 caspase 3, 절단

된 PARP 및 Bax의 단백질 발현 수준이 증가하나, 항-세포 사멸 단백질인 Bcl-2, Mcl-1 및 Bcl-xL의 발현 수준은 감소함을 확인하였다(도 7a 및 7b).

[0137] 상기 실험 결과들은, CAFs와 사멸화된 암 세포의 공동 배양 조정배지가 세포 사멸을 촉진하여 암 세포의 증식을 억제함을 의미한다.

[0139] 2-3. NOTCH1/WISP-1 신호의 암 세포에 대한 항증식효과 및 세포 사멸 촉진 효과 확인

[0140] 본 발명자들의 이전 연구 결과로 WISP-1(WNT1-inducible-signaling pathway protein 1)이 Notch1 신호를 통해 사멸화된 암 세포와 공동 배양된 CAFs에서 분비된다는 것이 증명되었기 때문에, 본 실험에서는 Notch1-WISP-1 신호 체계가 암 세포의 항증식효과 및 세포 사멸 촉진 효과에 중요한 역할을 하는지 여부를 조사하였다.

[0141] 우선, Notch1에 대한 두 종류의 siRNA를 설계하여 Notch1의 발현을 침묵시킨 결과, ApoSQ-CAF CM의 344SQ 세포 생존 억제 효과 및 콜로니 형성 억제 효과가 역전되었다(도 8a 내지 8c). 또한, CAFs에서 siRNA를 이용하여 Notch1을 낮추는 경우, ApoSQ-CAF CM에 의한 344SQ 세포에서의 Ki67 및 PCNA의 mRNA 및 단백질 발현 감소 효과 역시 역전됨을 확인하였다(도 9a 및 9b).

[0142] 또한, CAFs를 ApoSQ 또는 ApoA에 노출시키기 전에, Notch1의 선택적 억제제인 LY3039478(10 μ M)로 전처리한 경우에도, ApoSQ-CAF CM 또는 ApoA-CAF CM의 344SQ 세포 또는 A549 세포 생존 억제 효과 및 콜로니 형성 억제 효과가 각각 역전되었고(도 10a 및 10b), 344SQ 세포 또는 A549 세포에서의 Ki67 및 PCNA의 mRNA 및/또는 단백질 발현 감소 효과 역시 역전됨을 확인하였다(도 11a 및 11b).

[0143] Notch1에 대한 상기 실험과 유사하게, WISP-1에 대해서도 두 종류의 siRNA를 설계하여 CAFs에서 WISP-1을 낮추는 결과, ApoSQ-CAF CM의 344SQ 세포 생존 억제 효과 및 콜로니 형성 억제 효과가 역전되었고(도 12a 내지 12c), ApoSQ-CAF CM에 의한 344SQ 세포에서의 Ki67 및 PCNA의 mRNA 및 단백질 발현 감소 효과 역시 역전되었다(도 13a 및 13b).

[0144] 또한, ApoSQ-CAF CM을 중화 항-WISP-1 항체의 존재 하에 344SQ 세포에 처리할 경우에도, 344SQ 세포 생존 억제 효과가 역전되었고(도 14), Ki67 및 PCNA의 mRNA 및 단백질 발현 감소 효과 역시 역전되었다(도 15a 및 15b).

[0145] 추가적으로, CAFs와 사멸화된 암 세포의 공동 배양 조정배지의 세포 사멸 촉진 효과에 Notch1-WISP-1 신호 전달이 필요한지 여부를 확인하기 위해 유세포 분석을 수행하였다. 그 결과, siRNA로 Notch1 및 WISP-1을 낮추는 경우, ApoSQ-CAF CM 또는 ApoA-CAF CM의 344SQ 세포 또는 A549 세포에서의 세포 사멸 촉진 효과가 역전되는 것으로 확인되었다(도 16a 및 16b).

[0146] 또한, WISP-1이 주변분비(paracrine) 방식으로 작용하여 항증식효과 및 세포 사멸 촉진 효과를 나타내는지 확인하기 위해, 344SQ 세포 및 A549 세포를 마우스 재조합 WISP-1(rWISP-1, 20 내지 100 ng/ml)으로 처리한 후, 세포 생존력, 콜로니 형성 정도, 세포 증식 마커의 발현 정도 및 세포 사멸 마커의 발현 정도를 분석하였다.

[0147] 그 결과, rWISP-1이 344SQ 세포 및 A549 세포에서 세포 생존 및 콜로니 형성을 농도 의존적으로 억제하고(도 17a 및 17b), Ki67 및 PCNA의 mRNA 및/또는 단백질 발현 또한 농도 의존적으로 감소시킴을 확인하였다(도 18a 및 18b). 또한, 유세포 분석 및 TUNEL 분석 결과, rWISP-1이 농도 의존적으로 암 세포의 세포 사멸을 촉진하는 것으로 나타났다(도 19a 내지 20b). 뿐만 아니라, rWISP-1을 폐암 세포에 처리할 경우, 농도 의존적으로 세포 사멸 촉진 단백질(절단된 caspase 3, 절단된 PARP, 및 Bax)의 발현 수준은 증가하며, 항-세포 사멸 단백질(Bcl-2, Mcl-1 및 Bcl-xL)의 발현 수준은 감소함을 확인하였다(도 21a 및 21b).

[0148] 상기 실험들을 통해, CAFs와 사멸화된 암 세포의 공동 배양 조정배지의 항증식효과 및 세포 사멸 촉진 효과가 CAFs에서 분비되는 Notch1-의존성-WISP-1에 의해 매개되는 것임을 입증하였다.

[0150] 2-4. CAFs에서 RhoA/Rho kinase 신호 경로의 억제가 Notch1/WISP-1 신호, 항증식효과 및 세포 사멸 촉진 효과를 강화시킴을 확인

[0151] RhoA/Rho kinase 신호 전달을 억제할 경우, CAFs의 탐식 작용(efferocytosis), Notch1 신호 전달 및 WISP-1 분비에 미치는 영향을 분석하기 위해 하기 실험을 수행하였다.

[0152] 우선, 정량적 유세포 분석으로, 공동 배양 24시간 후 PKH67로 염색된 ApoSQ를 삼킨 PKH26-염색 CAFs의 비율을

측정하였다. 그 결과, Rho kinase 억제제인 ripasudil 30 μ M을 처리할 경우, CAFs의 ApoSQ에 대한 식세포 작용이 향상됨을 확인하였다(도 22).

[0153] 유세포 분석 결과와 유사하게, 공초점 현미경 분석 결과 ripasudil의 처리에 따라 CAFs의 식세포 작용이 향상됨을 확인하였다(도 23). 또한, ripasudil 처리에 따라 CAFs에서 ApoSQ에 의해 유도되는 Notch1 신호 단백질(NICD1, Hes1 및 WISP-1) 발현 및 WISP-1의 분비 또한 유의하게 증가하는 것으로 나타났다(도 24a 및 24b).

[0154] 또한, CAFs를 ApoSQ 또는 ApoA에 노출시키기 전에, RhoA siRNA로 형질감염시켜 RhoA/Rho kinase 신호 전달을 억제한 후, 세포 생존력, 콜로니 형성 정도 및 세포 증식 마커의 발현 정도를 측정하였다. 그 결과, RhoA siRNA로 전처리할 경우, 세포 생존 및 콜로니 형성이 더욱 억제되었으며(도 25a 내지 25c), Ki67 및 PCNA의 mRNA 및/또는 단백질 발현 또한 더욱 억제되었다(도 26a 및 26b).

[0155] 이와 유사하게, CAFs를 ApoSQ 또는 ApoA에 노출시키기 전에, Rho kinase 억제제인 Y-27632 30 μ M을 처리할 경우에도, 세포 생존 및 콜로니 형성이 더욱 억제되며(도 27a 및 27b), Ki67 및 PCNA의 mRNA 및/또는 단백질 발현 또한 더욱 억제됨을 확인하였다(도 28a 및 28b).

[0156] 반면에, 유세포 분석 및 TUNEL 분석 결과, RhoA를 억제시킨 CAFs를 ApoSQ 또는 ApoA와 공동 배양할 경우, 344SQ 세포 및 A549 세포에서의 세포 사멸 효과는 더욱 향상되는 것으로 나타났다(도 29a 및 29b).

[0157] 상기 실험들을 통해, RhoA/Rho kinase 신호 전달을 억제할 경우, CAFs에 의한 암 세포 사멸이 향상되고, Notch1-WISP-1 신호 전달 경로가 강화되어, CAFs와 사멸화된 암 세포의 공동 배양 조정배지의 항증식효과 및 세포 사멸 촉진 효과가 더욱 강화됨을 증명하였다.

[0159] 2-5. *in vivo*에서 ApoSQ-CAF CM의 종양 성장 억제 효과 확인

[0160] 본 발명자들의 이전 연구에서 동계(syngeneic)(129/Sv) 면역적격 마우스에서 ApoSQ 세포의 단일 주입이 폐 전이를 억제함을 확인하였는 바, 본 실험에서는 이 동계 마우스를 통해 ApoSQ-CAF CM의 종양 성장에 대한 생체 내 효과를 조사하였다. 344SQ 세포 주사 이틀 후, 동계 마우스에 1주 3회 종양내 주사를 통하여 회식하지 않은 CAF CM, 50% 회식 CAF CM, 회식하지 않은 ApoSQ-CAF CM 또는 50% 회식 ApoSQ-CAF CM을 주사하였다(도 30a).

[0161] 그 결과, 마우스 그룹 간 체중의 차이는 크지 않았으나(도 30b), ApoSQ-CAF CM 주사 그룹의 경우 대조군(CAF CM 처리 그룹)에 비하여 1차 종양의 중량이 상당히 감소하였고, 종양의 성장 또한 상당히 억제된 것으로 나타났다(도 30c 및 30d). 이와 유사하게, ApoSQ-CAF CM 주사 그룹의 경우 대조군에 비해 종양의 부피가 상당히 감소하였다(도 30e). 특히, 50% 회식 ApoSQ-CAF CM의 경우, 주사 41일차에 있어서 종양 부피가 약 54% 억제되었으나, 회식하지 않은 ApoSQ-CAF CM의 경우 주사 41일차에 종양 부피가 약 86% 억제되는 것으로 나타나, 회식하지 않은 ApoSQ-CAF CM의 종양 부피 억제 효과가 보다 우수함을 확인하였다.

[0162] 이후, 생체 내 ApoSQ-CAF CM에서 WISP-1이 가지는 항종양 효과를 확인하기 위해, 조정배지에 항-WISP-1 중화 항체 또는 IgG 이소타입을 마우스 주사 2시간 전 첨가하였다(도 31a).

[0163] 그 결과, 항-WISP-1 중화 항체 또는 IgG 이소타입의 처리에 따라 마우스 체중에는 유의한 변화가 나타나지 않았다(도 31b). 한편, 항-WISP-1 중화 항체가 투여되어 WISP-1이 면역제거된 ApoSQ-CAF CM의 경우 종양의 중량 및 부피가 변하지 않았고 종양의 성장 또한 억제되지 않았으나, 대조군인 IgG 이소타입을 첨가한 그룹에서는 ApoSQ-CAF CM의 항종양 효과가 남아있음을 확인할 수 있었다(도 31c 내지 31e).

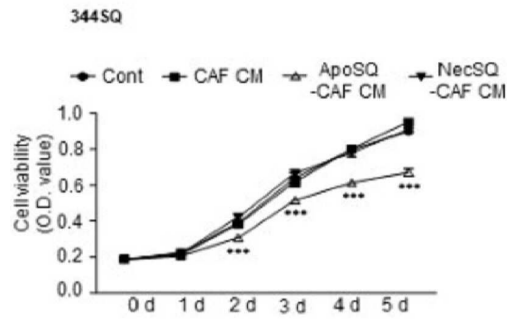
[0164] WISP-1의 항종양 효과를 추가적으로 검증하기 위해, 344SQ 세포 주사 이틀 후, 동계 마우스에 1주 3회 종양내 주사를 통하여 rWISP-1을 12.5 μ g/kg 또는 25 μ g/kg의 농도로 주입한 후, 항종양 효과를 확인하였다(도 32a)).

[0165] 그 결과, ApoSQ-CAF CM의 항종양 효과와 유사하게, rWISP-1을 처리할 경우, 대조군과 마우스 체중에서는 유의한 차이가 나타나지 않았으나(도 32b), 1차 종양의 중량이 유의하게 감소하며, 종양의 성장 또한 상당히 억제되었고(도 32c 및 도 32d), 종양의 부피 또한 유의하게 감소됨을 확인하였다(도 32e).

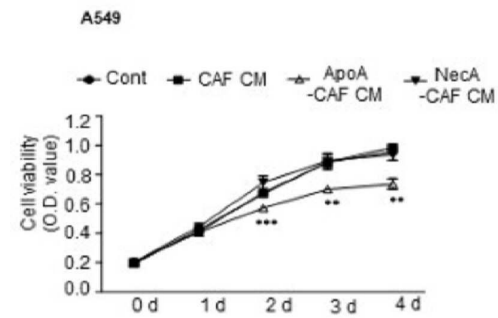
[0166] 상기 실험들을 통해, ApoSQ-CAF CM이 *in vivo*에서도 항종양 효과를 나타내며, ApoSQ-CAF CM이 WISP-1을 통해 항종양 효과를 나타낼 수 있음을 재차 검증하였다. 따라서, 본 발명의 CAFs 및 사멸화된 암 세포의 공동 배양 조정배지는 암의 성장을 억제하는 데에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면

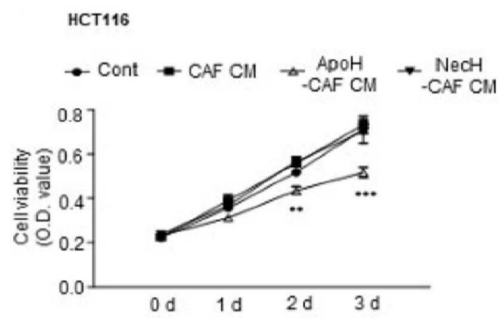
도면1a



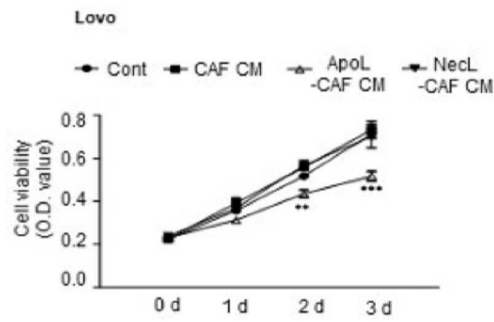
도면1b



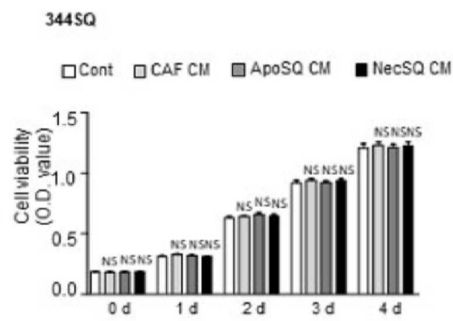
도면1c



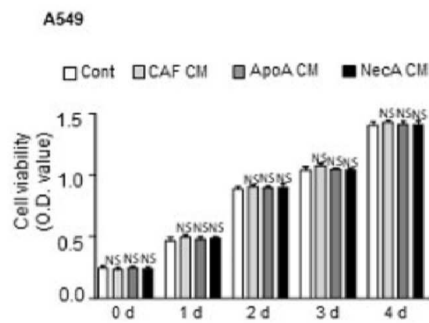
도면1d



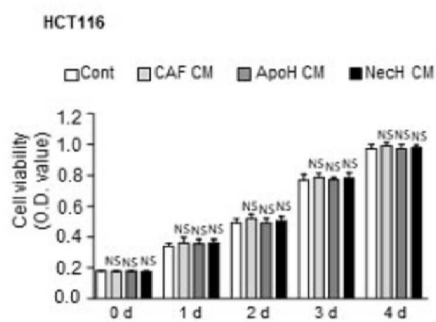
도면2a



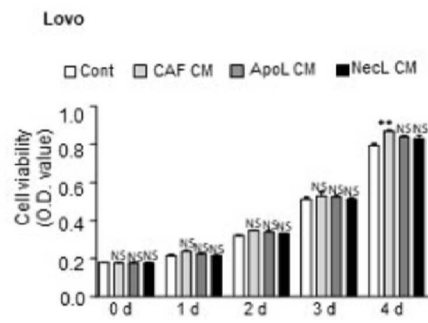
도면2b



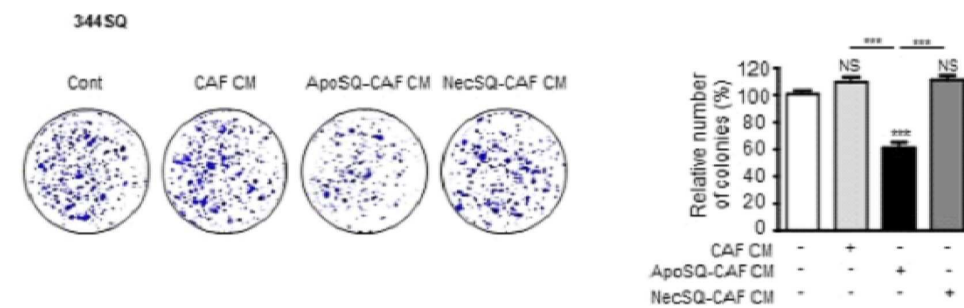
도면2c



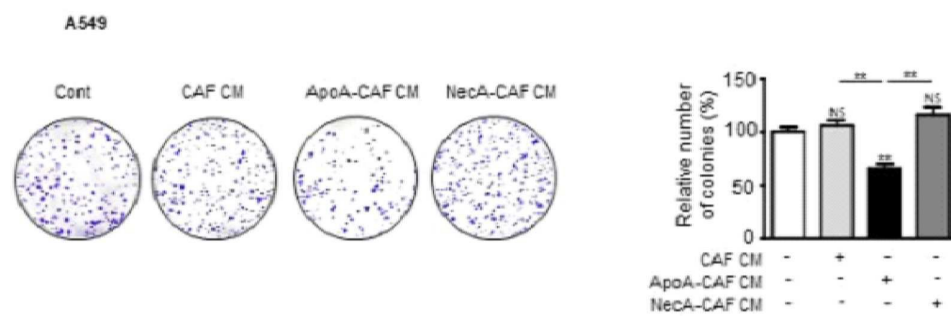
도면2d



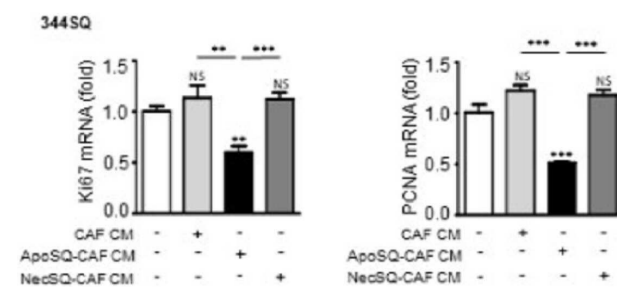
도면3a



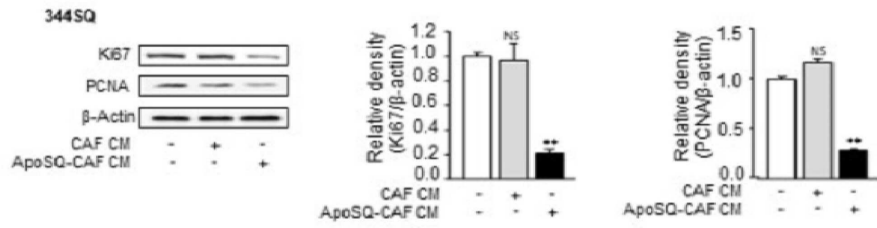
도면3b



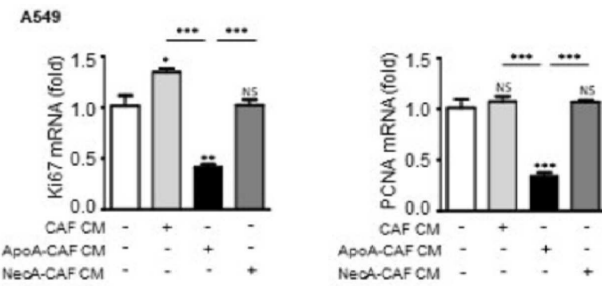
도면4a



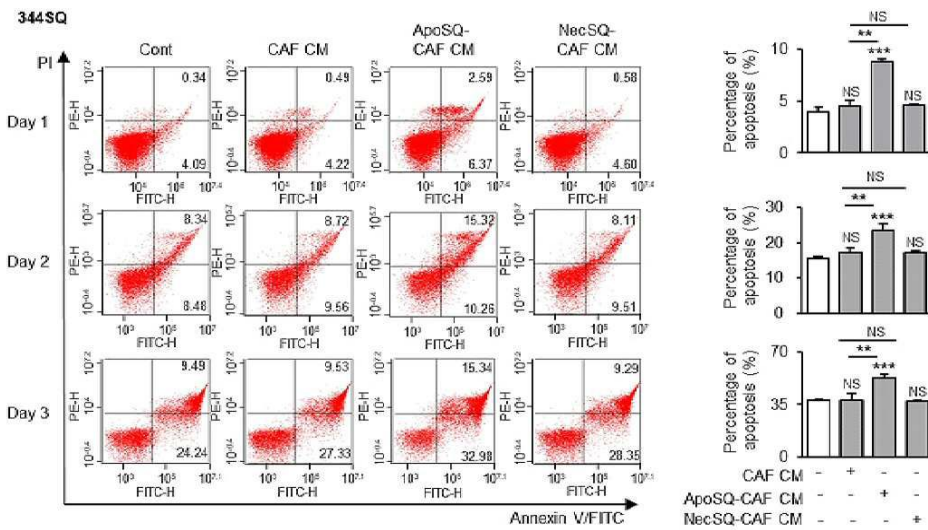
도면4b



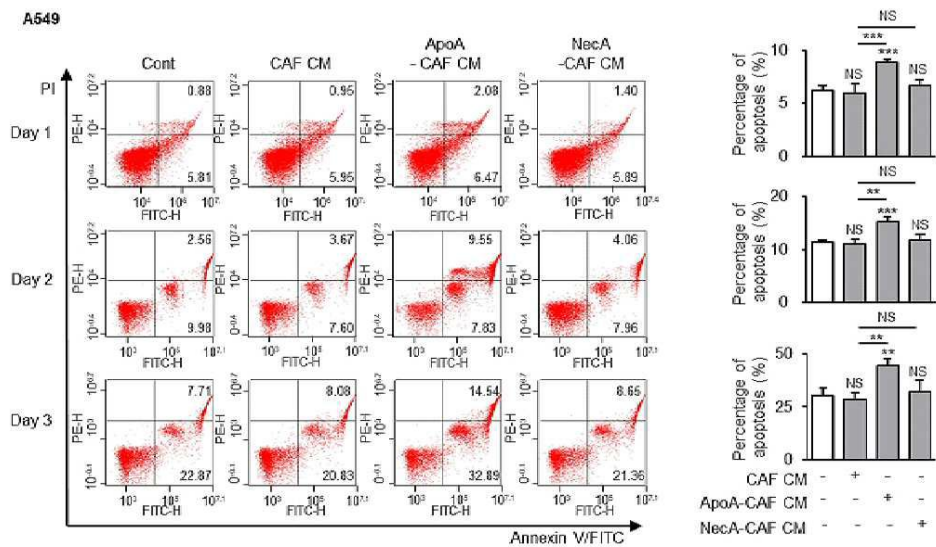
도면4c



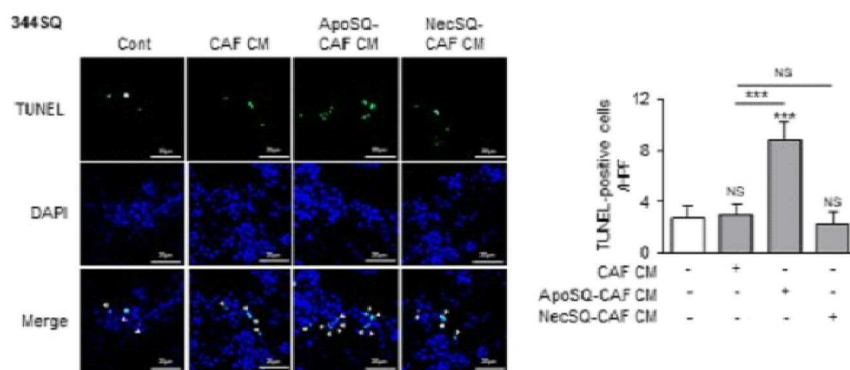
도면5a



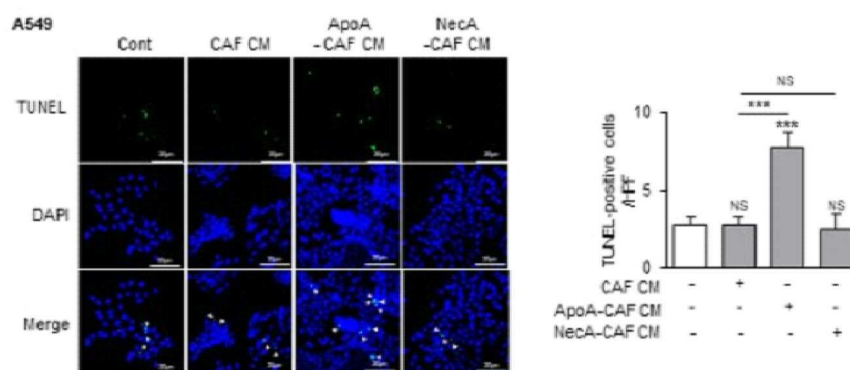
도면5b



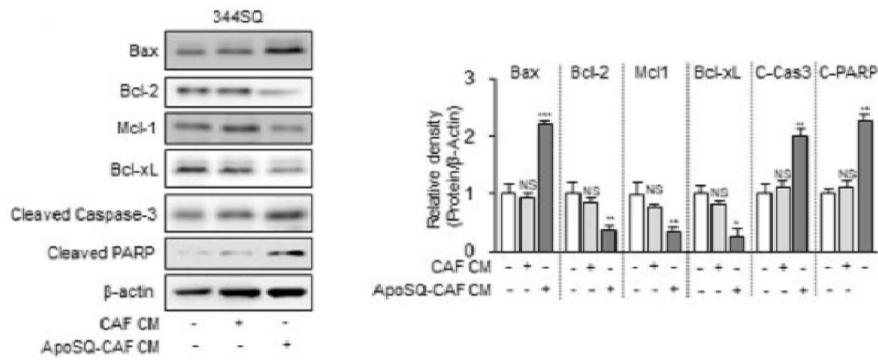
도면6a



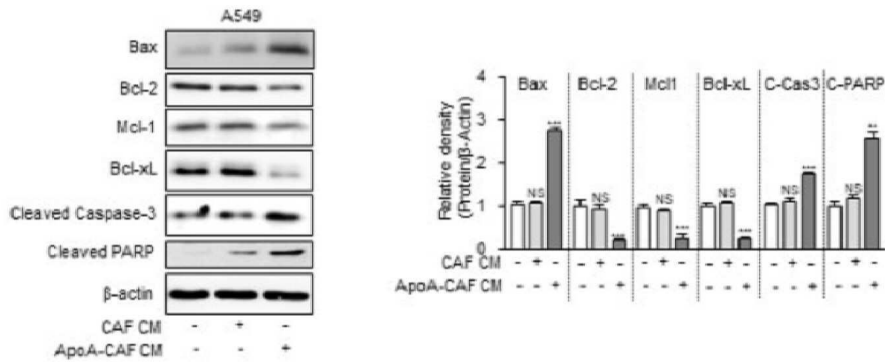
도면6b



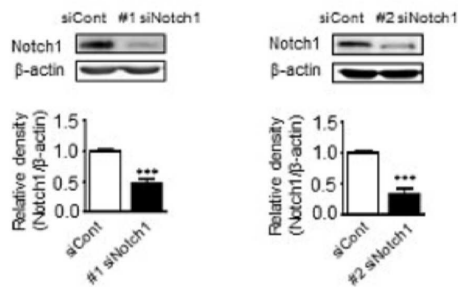
도면7a



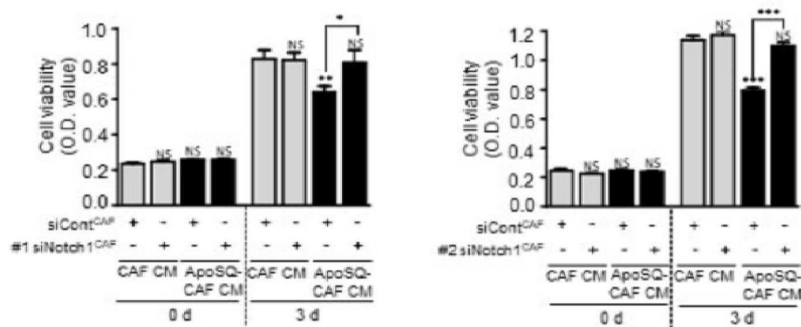
도면7b



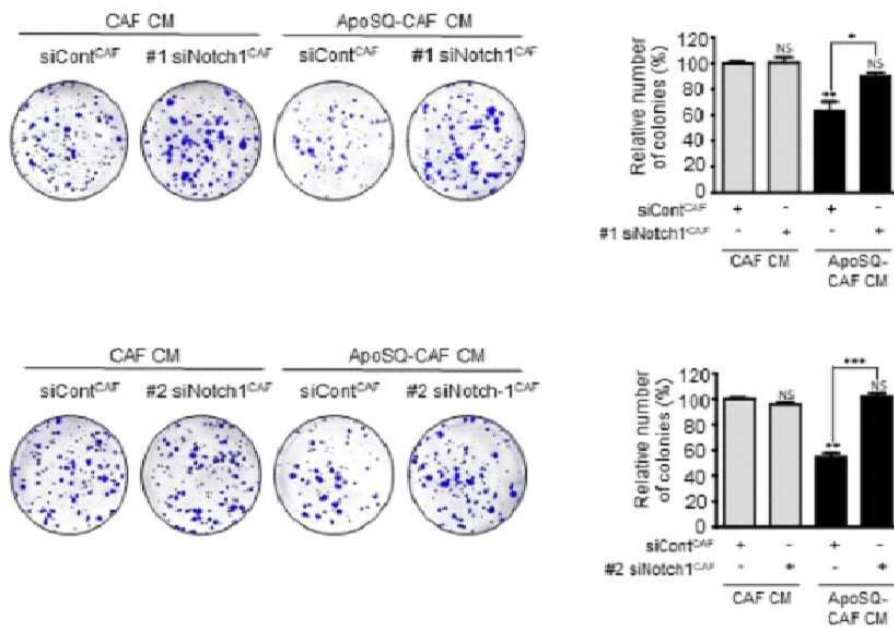
도면8a



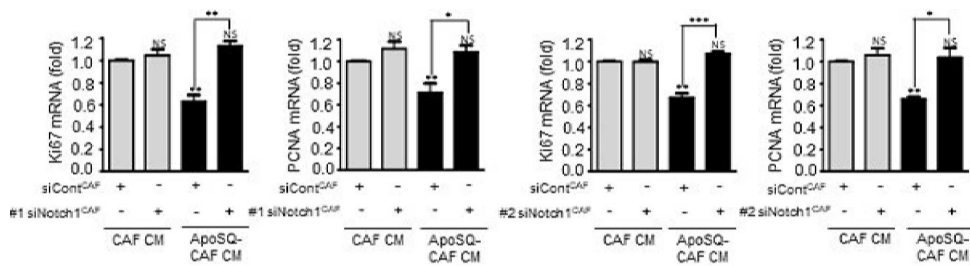
도면8b



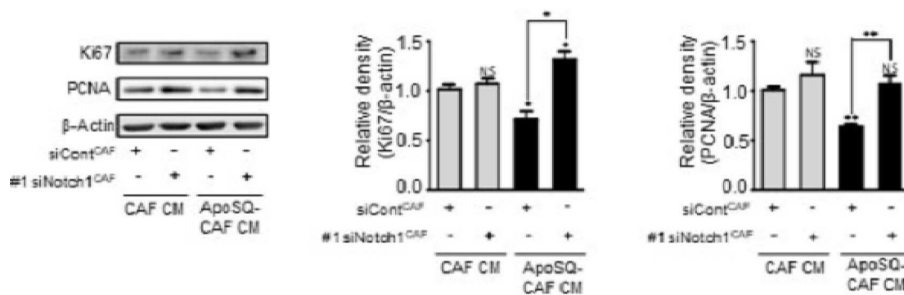
도면8c



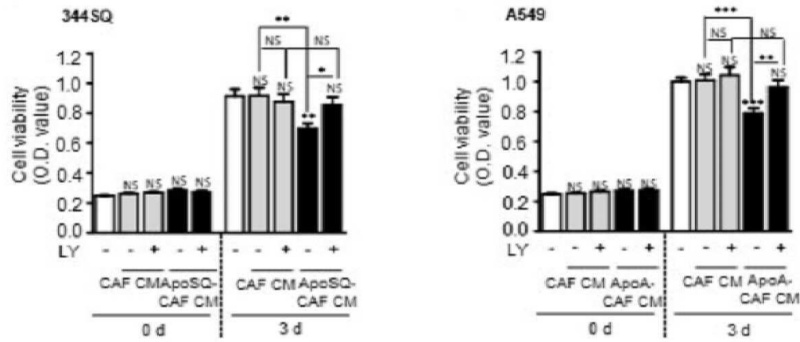
도면9a



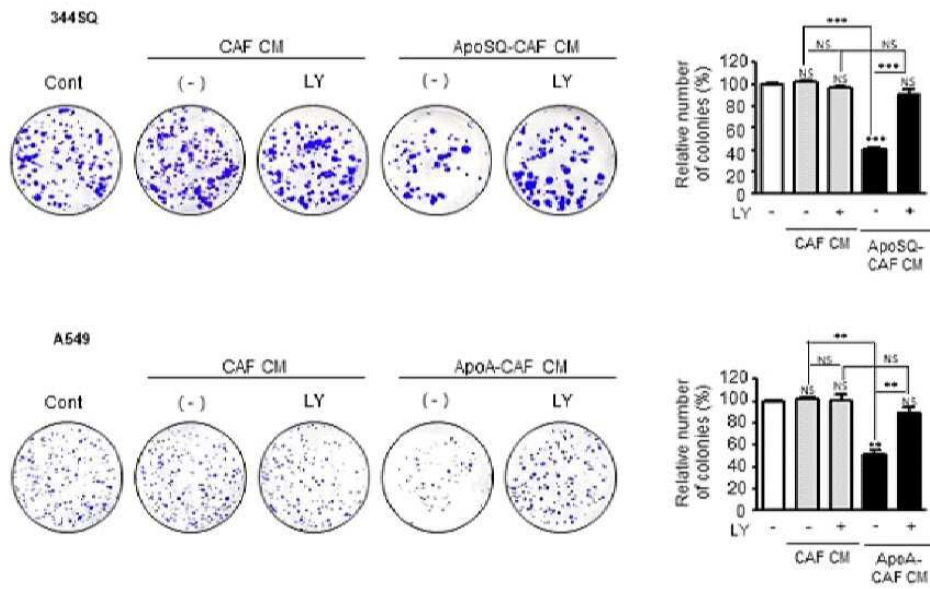
도면9b



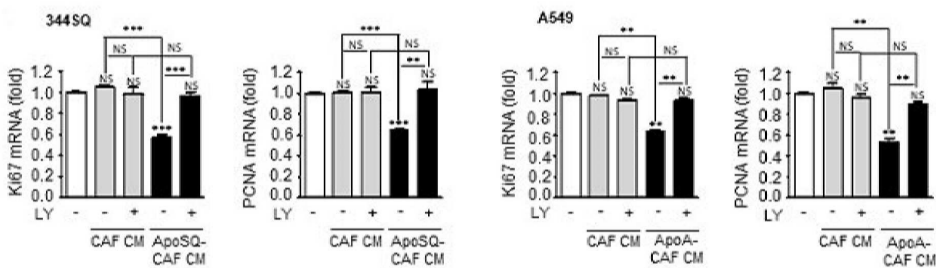
도면10a



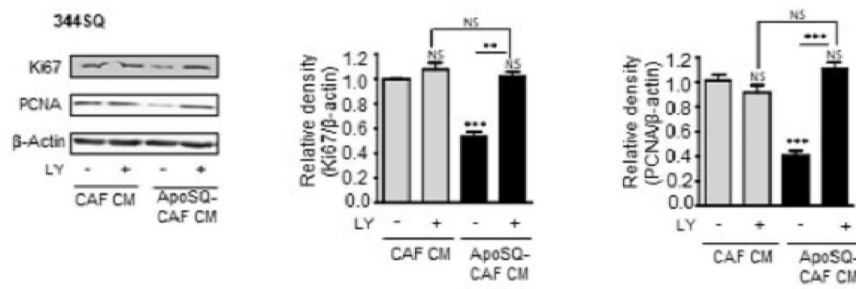
도면10b



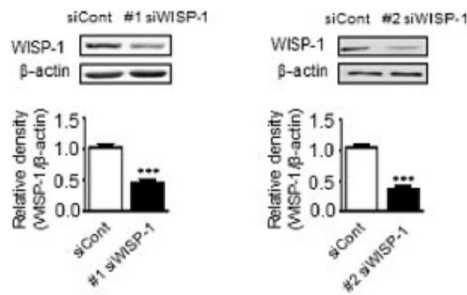
도면11a



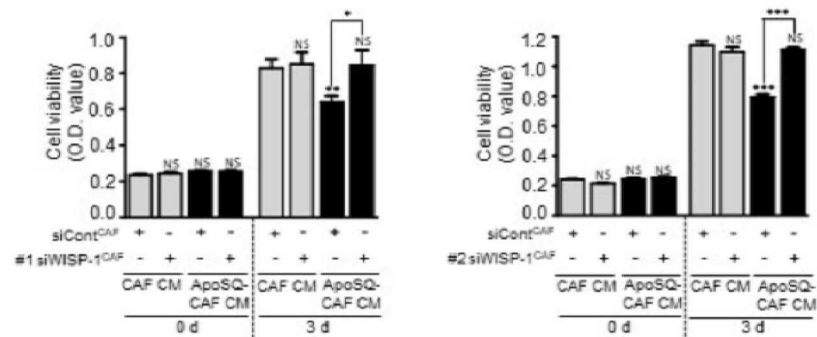
도면11b



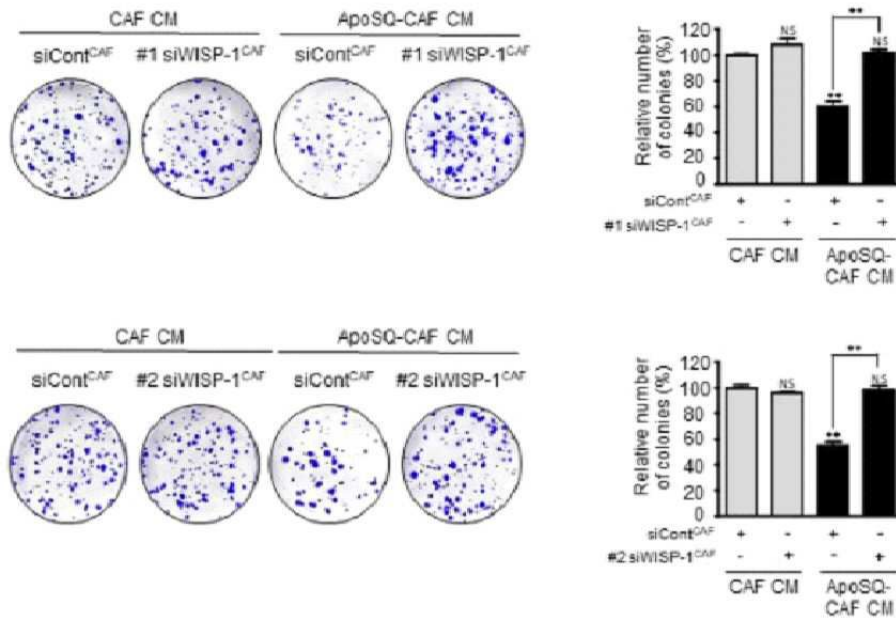
도면12a



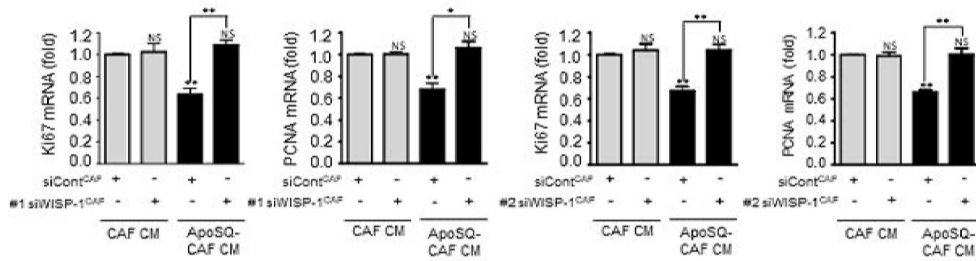
도면12b



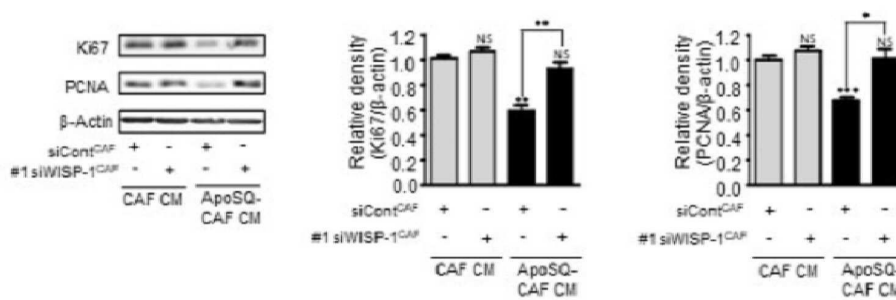
도면12c



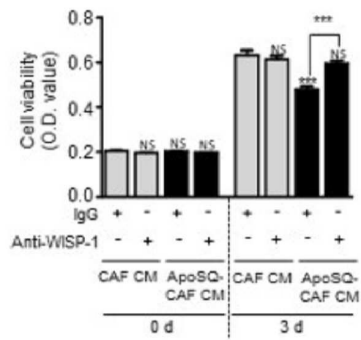
도면13a



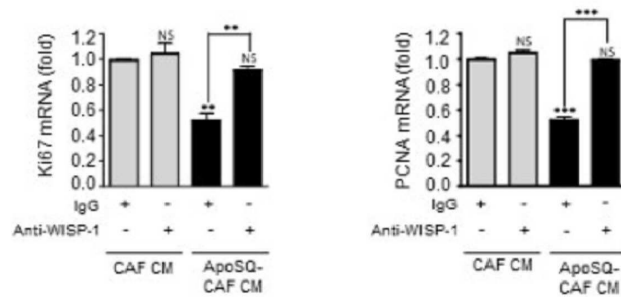
도면13b



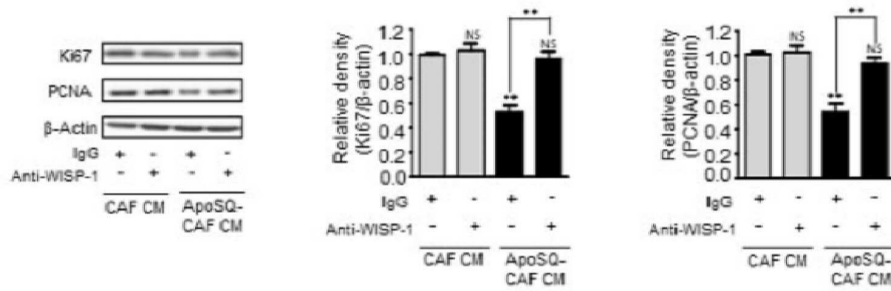
도면14



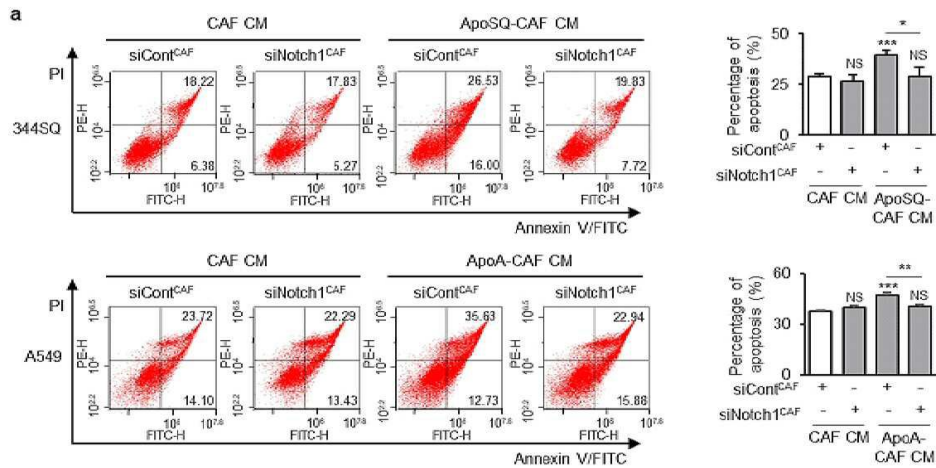
도면15a



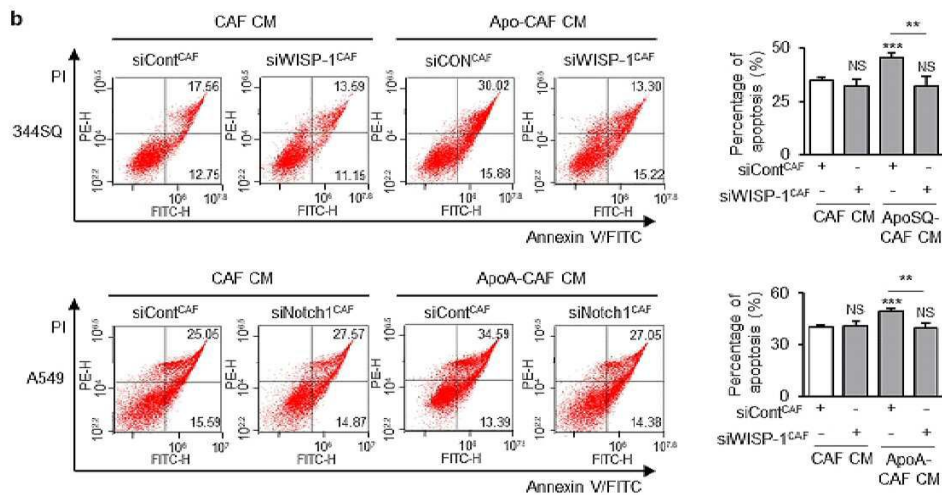
도면15b



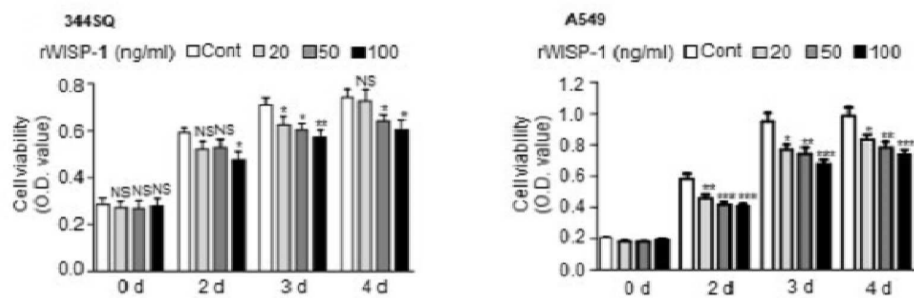
도면16a



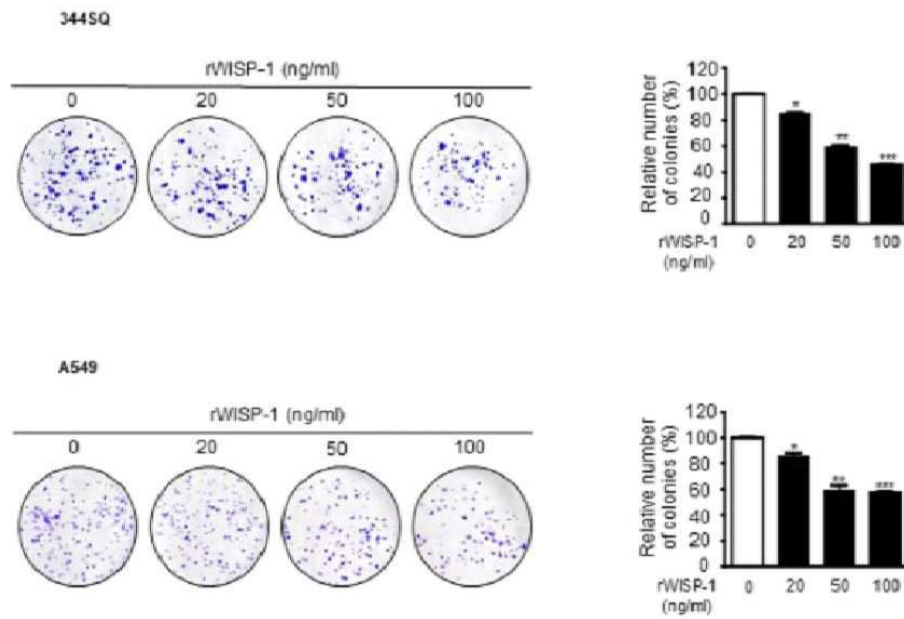
도면16b



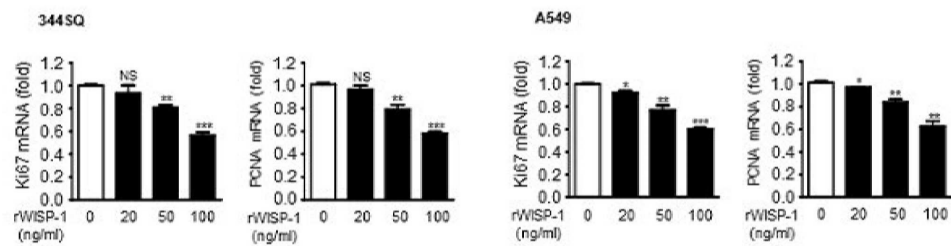
도면17a



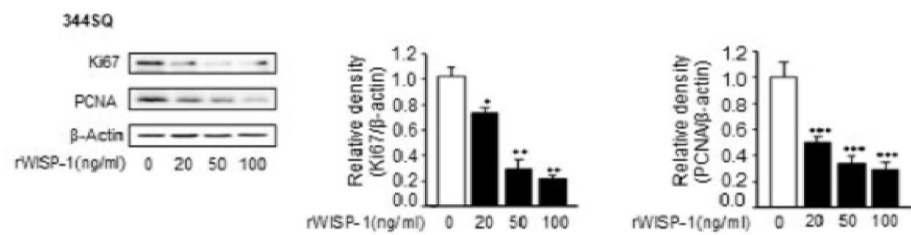
도면17b



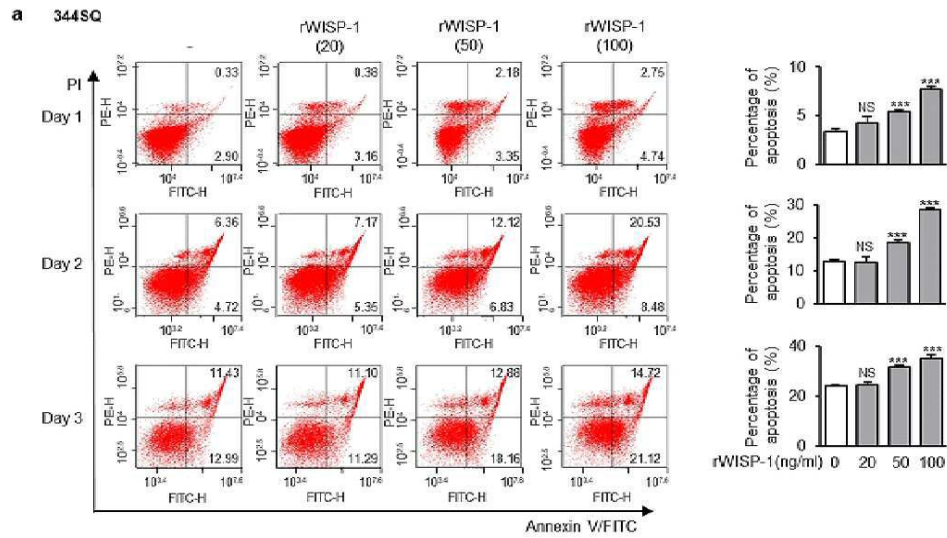
도면18a



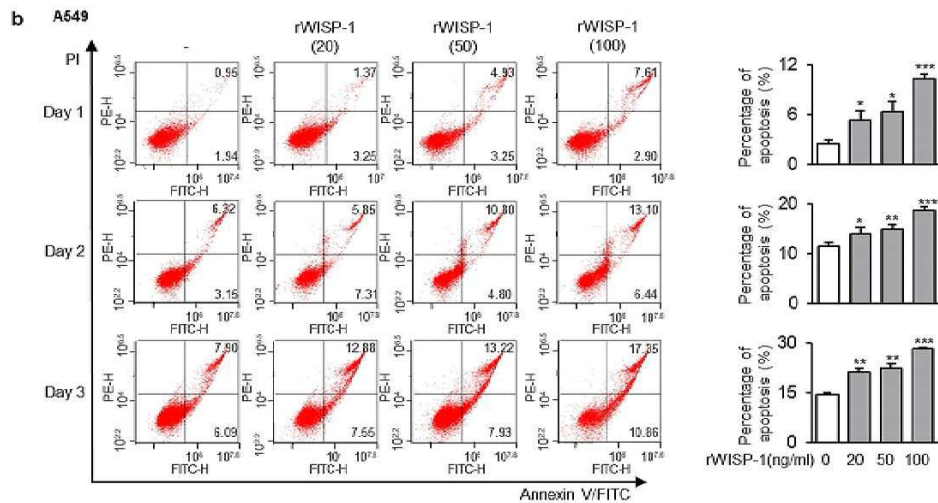
도면18b



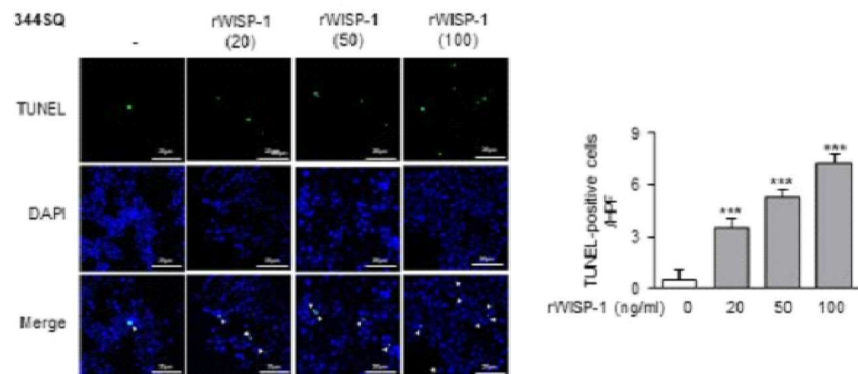
도면19a



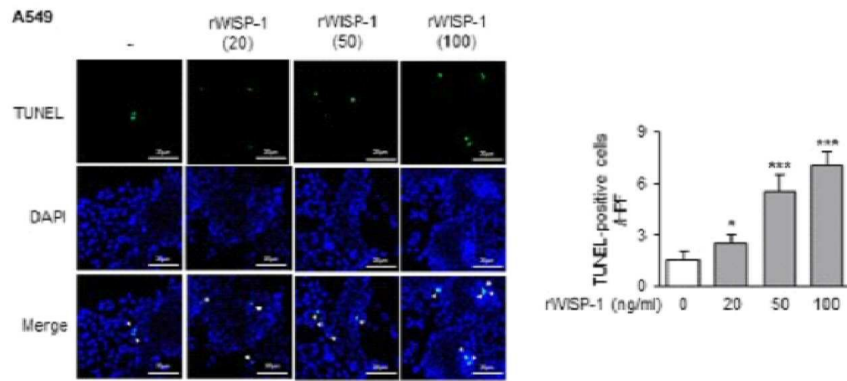
도면19b



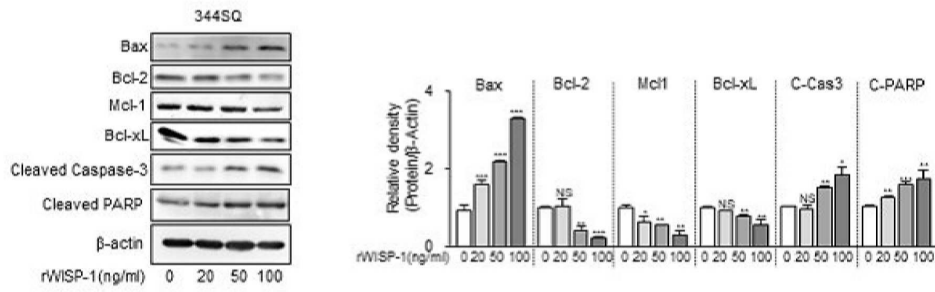
도면20a



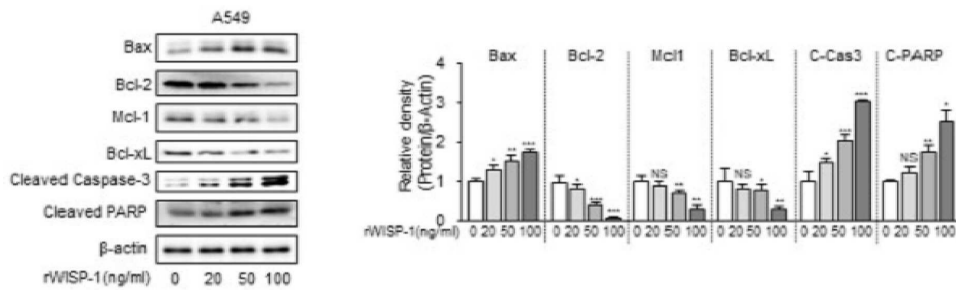
도면20b



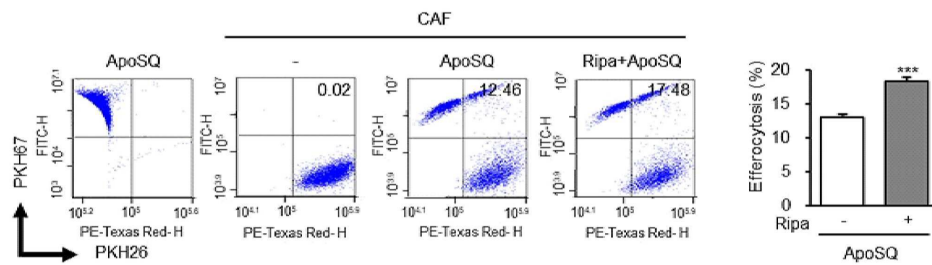
도면21a



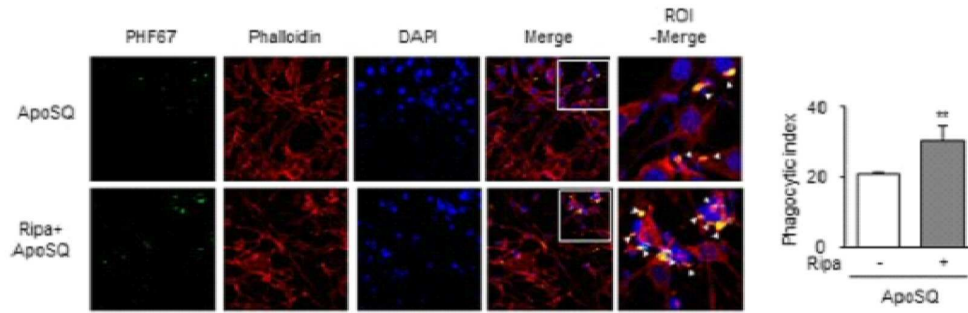
도면21b



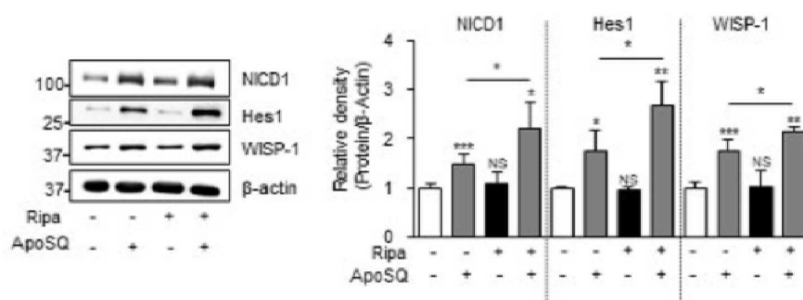
도면22



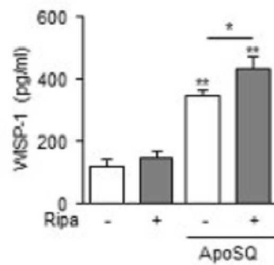
도면23



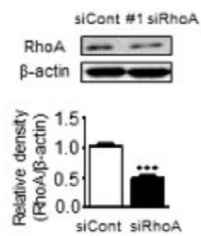
도면24a



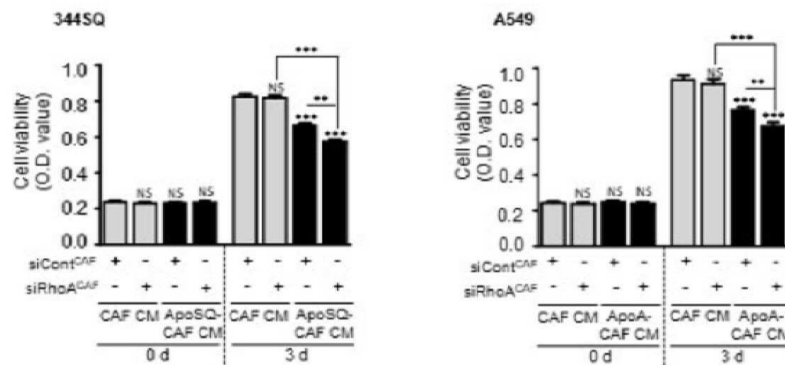
도면24b



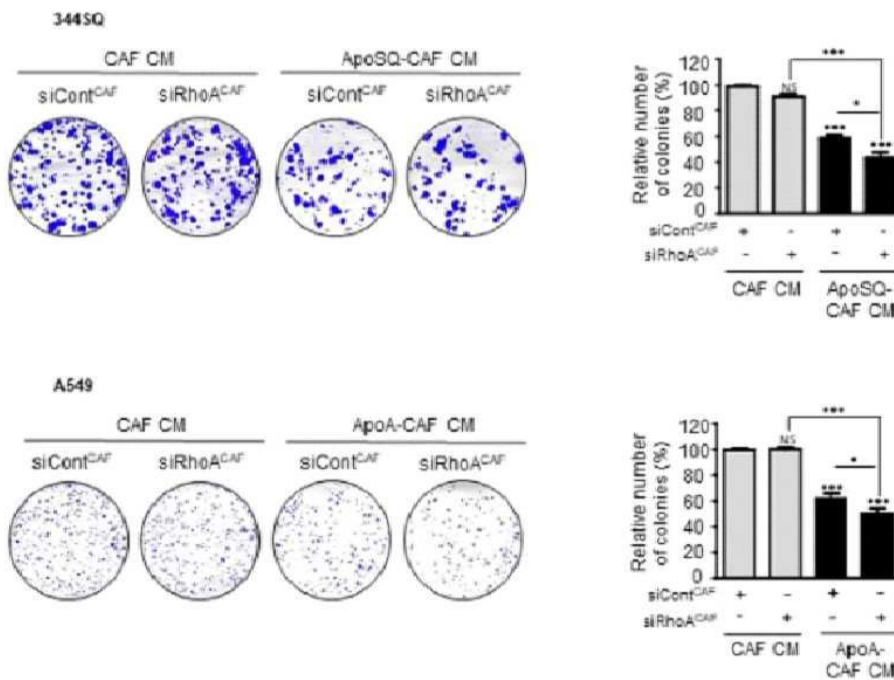
도면25a



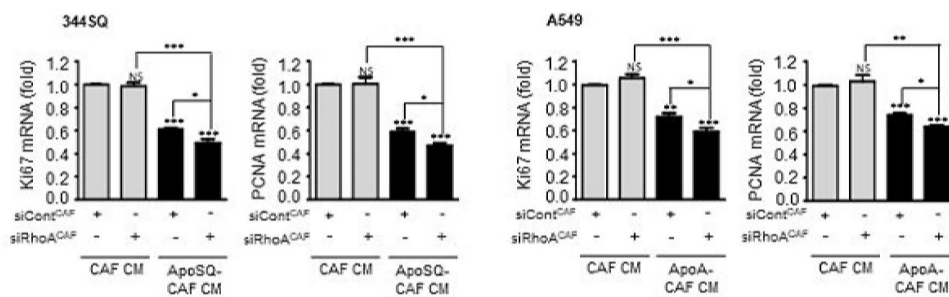
도면25b



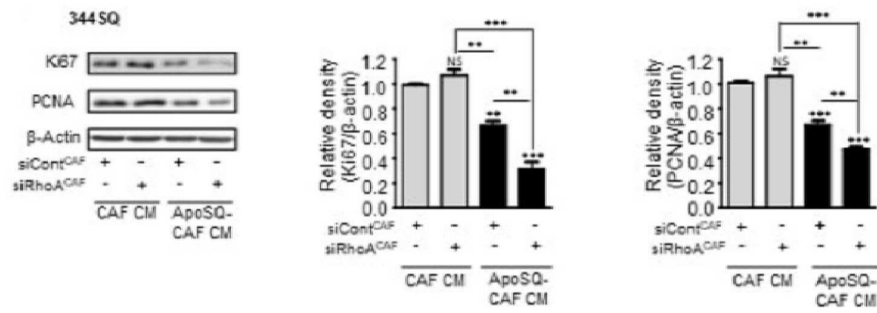
도면25c



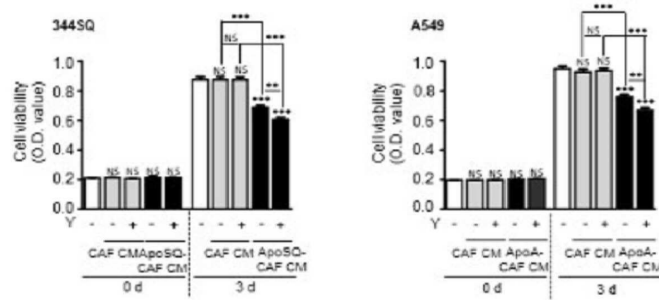
도면26a



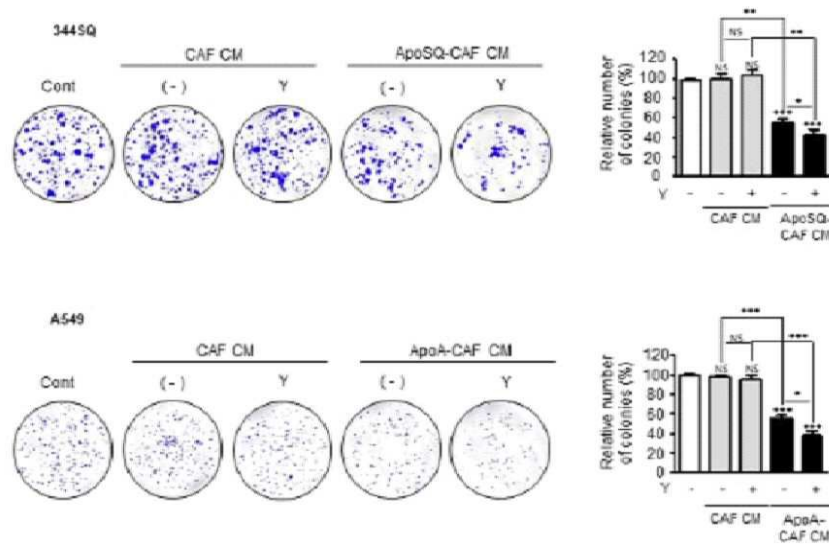
도면26b



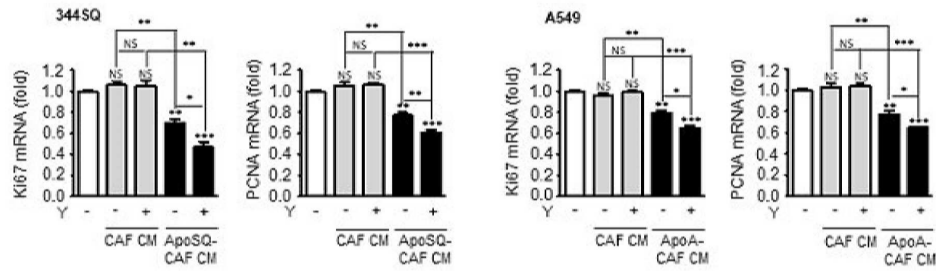
도면27a



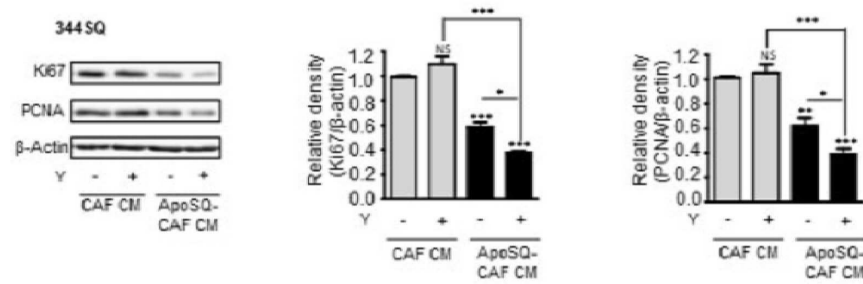
도면27b



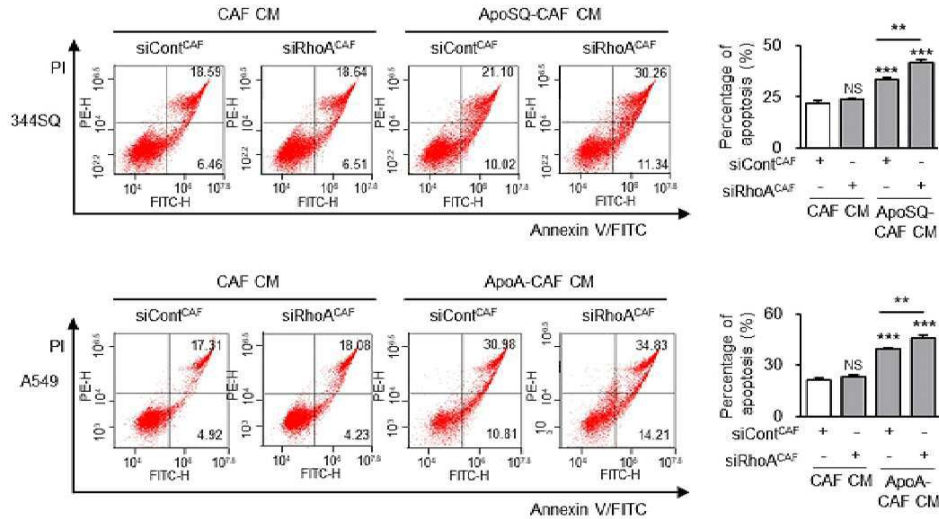
도면28a



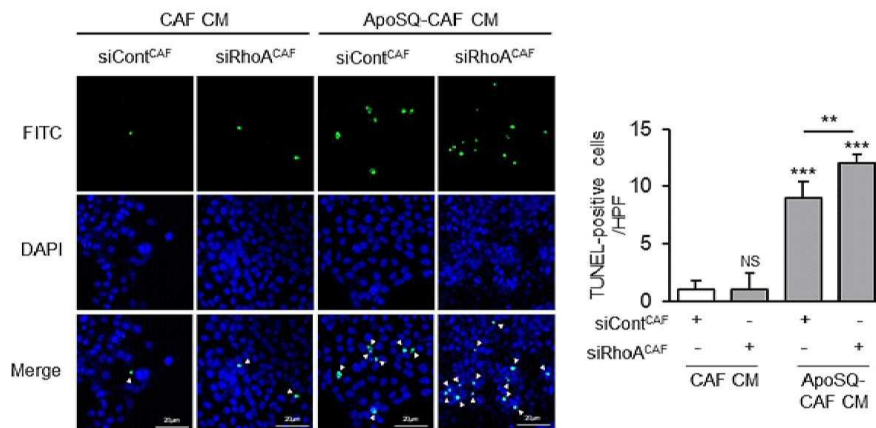
도면28b



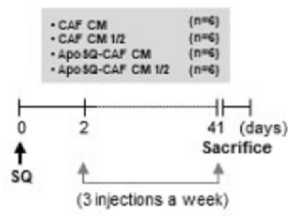
도면29a



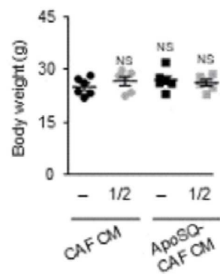
도면29b



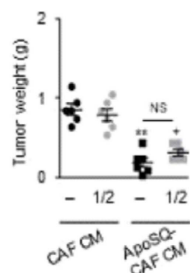
도면30a



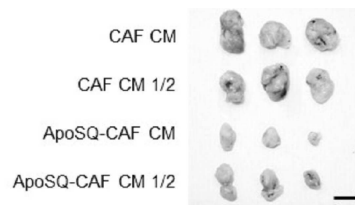
도면30b



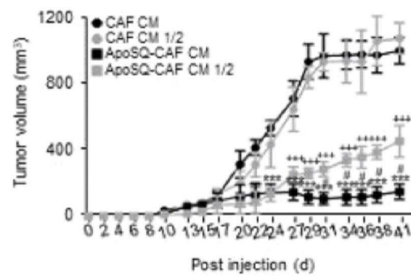
도면30c



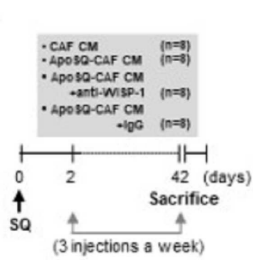
도면30d



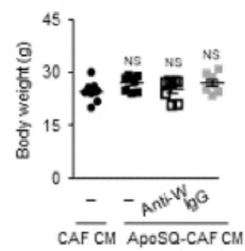
도면30e



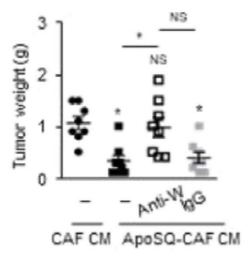
도면31a



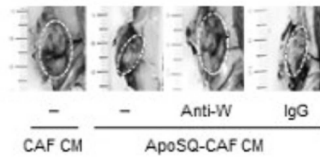
도면31b



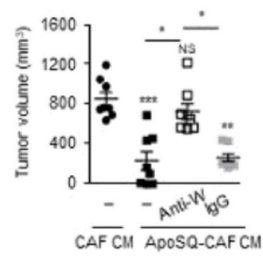
도면31c



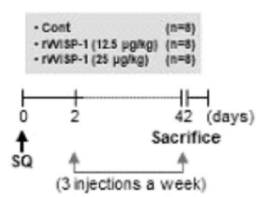
도면31d



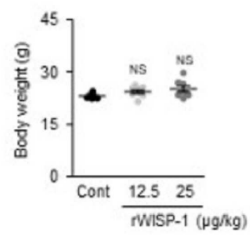
도면31e



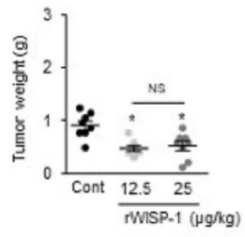
도면32a



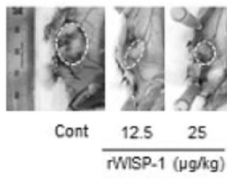
도면32b



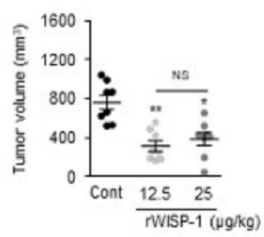
도면32c



도면32d



도면32e



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.