



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0080964
(43) 공개일자 2018년07월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/10 (2016.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 31/704 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/10 (2016.08)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0053708
(22) 출원일자 2017년04월26일
심사청구일자 2017년04월26일
(30) 우선권주장
1020170001813 2017년01월05일 대한민국(KR)

(71) 출원인
부산대학교 산학협력단
부산광역시 금정구 부산대학로63번길 2 (장전동, 부산대학교)
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
박범준
부산광역시 금정구 부산대학로 10, 113동 1103호 (부곡동, 대우아파트)
송규용
대전광역시 서구 둔산중로 20, 아르누보펠리스 A 동 1201호 (탄방동)
(74) 대리인
특허법인태백

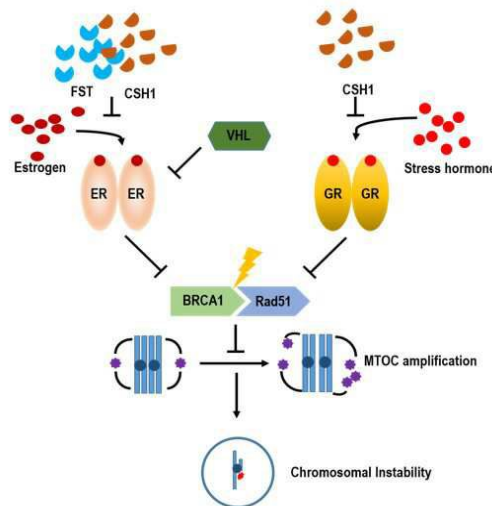
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **회귀 진세노사이드 CSH1(Rg6)을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 억제 또는 스트레스 호르몬 관련 질환 개선용 식품조성물**

(57) 요약

본 발명은 회귀 진세노사이드 CSH1(Rg6)을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 억제 또는 스트레스 호르몬 관련 질환 개선용 식품조성물에 관한 것으로서, CSH1(Rg6)은 BRCA1 및 Rad51의 결합을 촉진하고, 스트레스 호르몬-유도 γ -튜불린 발현을 억제하였으며, 암세포에서 탁솔에 대한 내성을 억제시키는 효과를 확인하였다. 따라서, 상기 CSH1(Rg6)은 항암 치료에 있어서 항암제 내성을 억제하는 식품에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 예상되며, 스트레스 호르몬 관련 질환 개선용 식품에도 적용가능할 것으로 예상된다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

A61K 31/704 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

(72) 발명자

조수현

대전광역시 서구 문예로 174, 116동 105호 (둔산동, 샘머리아파트)

이지현

대전광역시 서구 청사로 281, 201동 506호 (둔산동, 샘머리아파트2단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014063641

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업(기본연구지원사업)

연구과제명 Renal cell carcinoma의 항암제 내성기작 규명

기 여 율 60/100

주관기관 부산대학교 산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2015.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093815

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소 사업

연구과제명 심혈관계 질환 치료제 개발 기반연구

기 여 율 40/100

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2009.09.01 ~ 2018.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

회귀 진세노사이드 CSH1(Rg6)을 유효성분으로 함유하는 항암제인 탁솔(Taxol) 내성 억제용 식품조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항암제인 탁솔(Taxol) 내성은 스트레스 호르몬에 의해 유도되는 것을 특징으로 하는 항암제인 탁솔(Taxol) 내성 억제용 식품조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 회귀 진세노사이드 CSH1(Rg6)은 스트레스 호르몬에 의해 유도되는 γ -튜블린 발현을 억제하고, BRCA1 및 Rad51의 결합을 촉진하며, 미세소관 조직화 중심(microtubule organizing center; MTOC) 증폭을 억제하는 것을 특징으로 하는 항암제인 탁솔(Taxol) 내성 억제용 식품조성물.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 상기 스트레스 호르몬은 코르티손(Cortisone) 또는 코르티솔(Cortisol)인 것을 특징으로 하는 항암제인 탁솔(Taxol) 내성 억제용 식품조성물.

청구항 5

회귀 진세노사이드 CSH1(Rg6)을 유효성분으로 함유하는 스트레스 호르몬 관련 질환 개선용 식품조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 스트레스 호르몬은 코르티손(Cortisone) 또는 코르티솔(Cortisol)인 것을 특징으로 하는 스트레스 호르몬 관련 질환 개선용 식품조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 스트레스 호르몬 관련 질환은 두통, 어지러움, 이명, 소화불량, 위염, 우울증, 불안, 불면증 또는 탈모인 것을 특징으로 하는 스트레스 호르몬 관련 질환 개선용 식품조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 회귀 진세노사이드 CSH1(Rg6)을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 억제 또는 스트레스 호르몬 관련 질환 개선용 식품조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 흔하게 언급되는 가설과는 달리, 정신적 또는 신체적 스트레스가 실제로 암의 개시 또는 진행에 관련되어 있는지 명확히 밝혀져 있지 않다. 즉, 스트레스와 관련된 인간 암의 자세한 분자 기작은 명확하지 않다. 인간의 신체가 스트레스 조건에 직면하면, 뇌하수체 분비 부신피질 자극호르몬(Adrenocorticotrophic hormone; ACTH)에 대한 반응으로 코르티솔(Cortisol) 및 에피네프린(Epinephrine)과 같은 스트레스 호르몬이 부신(adrenal gland)으로부터 방출된다. 코르티솔의 증가는 우울증, 면역체계의 감소 등과 같이 인간 신체에 여러 가지 해로운 반응을 일으킨다. 하지만, 상기 반응들이 암 개시에 직접적으로 연관되지는 않는다.

[0003] 신장 암세포(Renal cell carcinoma; RCC)는 부신 근처에 있는 신장에 발생하는 인간 악성 종양이다. 비록 신장 암은 노화 및 흡연과 같은 여러 가지 이유로 발병한다고 알려졌는데, 스트레스 또한 주요 발병 원인이다. 혈청 코르티솔 수준은 신장암 환자에서 증가되어 있다. 이와 관련하여, 면역 시스템 상에서의 스트레스 호르몬 억제 효과가 일반적으로 알려졌지만, 이는 스트레스-유도된 암에 대한 설명으로는 충분하지 않다. 여러 전염병학

적 분석 결과, 스트레스는 대장암 및 폐암을 포함하는 여러 종류의 인간 암 발생을 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다.

[0004] 이전 보고에 의하면, VHL(von Hippel-Lindau syndrome gene)-결핍 조건하에서, 상승된 에스트로겐 수용체- α (estrogen receptor; ER- α) 또는 에스트로겐의 처리는 미세소관 조직화 중심(microtubule organizing center; MTOC) 증폭을 통한 탁솔(Taxol) 내성을 제공하는 것으로 나타났다. VHL은 ER- α 와 직접적으로 관련되어 있고, MTOC 증폭을 억제한다. VHL-결핍 조건하에서, 상승된 ER- α 는 MTOC 증폭을 억제하는 BRCA1-Rad51 결합을 파괴한다. 타목시펜(tamoxifen) 또는 파슬로텍스(Faslodex)와 같은 ER- α 억제제에 의한 ER- α 의 억제는 VHL-결핍 RCC 세포주에서 중심체 수를 회복시킬 수 있다. 또한, 스트레스 호르몬들은 스테로이드로부터 유래하고, 공통된 화학구조를 공유하기 때문에, 스트레스 호르몬이 MTOC 증폭 및 탁솔 내성을 촉진한다는 가설은 매우 합리적이다.

[0005] 인삼(*Panax Ginseng*)은 오랫동안 암 및 신장 기능 장애를 포함하는 여러 종류의 인간 질병을 치료하기 위해 사용되어 왔다. 최근, 분리된 진세노사이드(ginsenosides)는 면역 시스템에 효과적인 것으로 보고되었다. 하지만, 인간 암에 대한 진세노사이드의 분자생물학적 작용 기작은 현재까지 밝혀지지 않았다. 따라서, 인간 암에 대한 진세노사이드의 작용 기작 및 효과를 밝히는 것은 매우 의미있는 일이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 10-0485936(2005.04.27)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 회귀 진세노사이드 CSH1(Rg6)을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 억제 또는 스트레스 호르몬 관련 질환 개선용 식품조성물에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 회귀 진세노사이드 CSH1(Rg6)을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 억제용 식품조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 회귀 진세노사이드 CSH1(Rg6)을 유효성분으로 함유하는 스트레스 호르몬 관련 질환 개선용 식품조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명은 회귀 진세노사이드 CSH1(Rg6)을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 억제 또는 스트레스 호르몬 관련 질환 개선용 식품조성물에 관한 것으로서, CSH1(Rg6)은 BRCA1 및 Rad51의 결합을 촉진하고, 스트레스 호르몬-유도 γ -튜불린 발현을 억제하였으며, 암세포에서 탁솔에 대한 내성을 억제시키는 효과를 확인하였다. 따라서, 상기 CSH1(Rg6)은 항암 치료에 있어서 항암제 내성을 억제하는 식품에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 예상되며, 스트레스 호르몬 관련 질환 개선용 식품에도 적용가능할 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 스트레스 호르몬(Glucocorticoid hormone)이 탁솔 내성을 유도한다는 결과를 나타낸다. (a) 코르티손(Cortisone) 및 코르티솔(Cortisol)은 탁솔(Taxol; TAX)-유도 세포 사멸을 차단했으나, 알도스테론(alosterone)은 차단하지 못하였다. 알도스테론($5 \mu\text{M}$), 코르티손($5 \mu\text{M}$), 코르티솔($5 \mu\text{M}$) 및 탁솔($3 \mu\text{M}$)을 VHL-양성 C2V 세포에 72시간 동안 처리하였다. 세포 생존능은 MTT 분석을 통해 측정하였다. (b) 코르티손은 에스트로겐과 유사하게 탁솔 내성을 나타낸다. ACHN 세포를 표시된 용량의 스테로이드 호르몬으로 72시간 동안 처리하였다. 세포 생존능은 MTT 분석을 통해 측정하였다. (c) 코르티손 및 코르티솔은 비-신장암 세포주에서도 탁솔-유도 세포 사멸을 차단하였다(폐암 세포주; A549, H1299, 대장암 세포주; HCT116, SW480). 알도스테론($5 \mu\text{M}$), 코르티손($5 \mu\text{M}$), 코르티솔($5 \mu\text{M}$) 및 탁솔($3 \mu\text{M}$)을 각 암세포에 72시간 동안 처리하였다. 세포 생존능은 MTT 분

석을 통해 측정하였다. (d) 탁솔-유도 세포 사멸에 있어 코르티손의 특이적인 효과를 나타낸다. 탁솔과 달리, 코르티손은 아드리아마이신(Adriamycin; Adr) 및 에토포사이드(Etoposide; Etop)와 같은 DNA 손상 제제에 대한 내성을 나타내지는 않는다. 세포들은 표시된 화합물(탁솔 3 μ M; 코르티손 5 μ M; Adr 2 μ g/ml; Etop 10 μ M)과 함께 72시간 동안 배양하였다. 세포 생존능은 MTT 분석을 통해 측정하였다. (e) 파슬로덱스(Faslodex; FST)를 통한 ER- α 억제제가 글루코코르티코이드 호르몬(Glucocorticoid Hormone; GH)-유도된 탁솔 내성을 차단하지 못한다는 결과를 나타낸다. ACHN 세포는 FST(3 μ M), 탁솔(3 μ M), 코르티손(5 μ M) 및 코르티솔(5 μ M)과 함께 72시간 동안 배양하였다. 세포 생존능은 MTT 분석을 통해 측정하였다.

도 2는 스트레스 호르몬이 글루코코르티코이드 수용체(Glucocorticoid Receptor; GR)를 통해 MTOC를 증가시킨다는 것을 나타낸다. (a) 코르티솔은 여러 세포주에서 γ -튜불린을 분명히 유도시켰다. 각 세포를 표시된 용량의 코르티솔로 72시간 동안 처리하였다. γ -튜불린 발현을 측정하기 위해 웨스턴 블랏을 수행하였다. 액틴(Actin)은 로딩(loading) 대조군으로 사용하였다. (b) GHs는 FST와 무관하게 γ -튜불린을 유도한다. A498 (VHL 결핍 세포주)은 FST(3 μ M) 유무에 따라 코르티손(5 μ M) 및 코르티솔(5 μ M)과 함께 24시간 동안 배양하였다. BRCA1 발현은 FST에 의해 증가하였으나, GH에 의한 BRCA1 발현 감소에는 영향을 미치지 않았다. 또한, p53 발현은 FST 또는 GH에 의해 변하지 않았다. 액틴(Actin)은 로딩(loading) 대조군으로 사용하였다. (c 및 d) VHL-손상되지 않은 C2V 세포에서 코르티손 처리(5 μ M)에 의해 MTOC의 수가 증가하였다. 평균 MTOC 수를 확인하기 위해서 각 조건마다 약 50개의 세포를 계수하였고, 그래프로 나타냈다. MTOC를 검출하기 위해서 세포들을 항- γ -튜불린-항체(붉은색)로 염색하였고, DNA를 검출하기 위해 DAPI (파란색)로 염색하였다. (e) GR 및 코르티손이 MTOC 증폭을 유도할 수 있다는 것을 나타낸다. GR 형질감염 또는 코르티손(5 μ M) 처리 후, HEK293 세포를 항- γ -튜불린-항체(붉은색) 및 DAPI (파란색)로 염색하였다. (f) MTOC 증폭에 있어, GH 및 GR의 부가적인 효과를 나타낸다. MTOC 수를 측정하기 위해서 각 조건마다 약 50개의 세포를 계수하였다. (g) VHL-양성 C2V 세포에 있어서, 과발현된 GR은 탁솔에 대한 내성을 나타냈다. GR은 C2V 세포에 형질감염시켰고, 탁솔(3 μ M)을 처리하였다. 72시간 후, 세포 생존능은 MTT 분석을 통해 측정하였다. (h) GR은 Rad51-매개 탁솔-민감성을 차단한다. VHL-결핍 A498에서, Rad51 과발현을 통한 탁솔에 대한 재-민감성은 GR 과발현에 의해 사라졌다. A498 세포는 GR 및/또는 Rad51로 형질감염시켰고, 72시간 동안 탁솔과 함께 배양하였다. 세포 생존능은 MTT 분석을 통해 측정하였다. (i) GR은 Rad51-유도 γ -튜불린 감소를 회복시켰다. 또한, GR 과발현을 통해 Rad51은 명확하게 감소하였다. GFP-표지된 GR 및 HA-표지된 Rad51은 HEK 293 세포에 형질감염시켰다. 72시간 후, 단백질 수준은 항-GFP 및 HA 항체로 검출하였다. (j) GR-형질감염된 HEK 293 세포에서 코르티손 처리에 의한 Rad51 감소를 명백히 확인하였다. GFP-표지된 GR은 HEK 293 세포로 형질감염시켰고, 코르티손(5 μ M)를 처리하였다. 72시간 후, 웨스턴 블랏을 수행하였다. (k) GR 발현은 VHL에 의해 변하지 않았다. GFP-표지된 GR 및 HA-표지된 VHL은 HEK 293 세포에 형질감염시켰고, 코르티손(5 μ M)를 처리하였다. 72시간 후, 웨스턴 블랏을 수행하였다. 액틴(Actin)은 로딩(loading) 대조군으로 사용하였다.

도 3은 GR 억제제가 MTOC 증폭을 차단시킨다는 것을 나타낸다. (a 및 b) ACHN 세포에서 GR 길항제 프로게스테론(Progesterone; PGT)은 MTOC를 차단시켰다. PGT(5 μ M) 처리된 세포는 MTOC 증폭을 차단시켰다. 평균 MTOC 수를 확인하기 위해서 각 조건마다 약 80개의 세포를 계수하였고(b), 사진으로 나타냈다(a). MTOC를 검출하기 위해서 세포들을 항- γ -튜불린-항체(붉은색)로 염색하였고, DNA를 검출하기 위해 DAPI (파란색)로 염색하였다. (c) PGT 처리는 스트레스 호르몬-유도 γ -튜불린 유도를 억제하였다. 표시된 항체로 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다. 액틴(Actin)은 로딩(loading) 대조군으로 사용하였다. (d) GR의 다른 화학적 길항제인 케토코나졸(Ketoconazole; KCZ) 또한, ACHN 세포에서 스트레스 호르몬 효과를 차단하였다. PGT(5 μ M) 및 KCZ(5 μ M)로 72시간 동안 처리하였다. 각 단백질 발현은 웨스턴 블랏으로 측정하였다. 액틴(Actin)은 로딩(loading) 대조군으로 사용하였다. (e) GR 길항제는 코르티솔 유도 탁솔-내성을 극복하였다. ACHN 세포에서 코르티솔(5 μ M) 및 탁솔(3 μ M)을 72시간 동안 처리하였다. PGT(5 μ M) 및 KCZ(5 μ M)은 동일한 시간 동안 처리하였다. 세포 생존능은 MTT 분석을 통해 측정하였다.

도 4는 GR이 Rad51과 결합하고, Rad51-BRCA1 상호작용을 파괴한다는 것을 나타낸다. (a) VHL-양성 ACHN 세포에서 코르티손(5 μ M) 및 코르티솔(5 μ M)은 Rad51-BRCA1 결합 상호작용을 파괴하지만, VHL-음성 A498 세포에서는 약한 효과를 나타냈다. 결합 분석을 위해서, 항-Rad51 항체에 의한 면역침전(immunoprecipitation; IP) 분석을 수행하였다. (a) VHL-손상되지 않은 ACHN 세포에서, Rad51-BRCA1 결합은 코르티손 처리에 의해 감소하였다. 항-BRCA1 항체는 IP 분석에 사용되었다. (c) GR은 오직 Rad51에만 결합하였고, BRCA1에는 결합하지 않았다. (d) GR-Rad51의 결합은 외인성(exogenous) 단백질에 의해 확인되었다. HEK293 세포에서, GFP-표지된 GR 및 HA-표지된 Rad51은 과발현되었고, 상기 세포들의 용해물(lysates)을 IP 분석에 사용하였다. (e) Rad51-GR의 결합 증가는 코르티손(5 μ M) 처리에 의해 검출되었다. IP 분석은 항-GR 항체로 수행하였다. (f) VHL-음성 C2 세포에서,

FST에 의해 유도된 탁술 민감성은 GR 과발현을 통해 차단되었다. (g) 탁술 민감성을 갖는 VHL-손상되지 않은 C2V 세포에 있어서, 코르티손 유도 탁술 내성은 ER- α 억제에 영향을 받지 않았다. GR 과발현을 위한 형질감염 후, 탁술(3 μ M) 및 FST(3 μ M)를 처리하였다. 72시간 후, 세포 생존능을 측정하기 위해 MTT 분석을 수행하였다.

도 5는 희귀 진세노사이드 CSH1 (RG6)과 RG3, 에스트로겐 및 코르티손의 화학 구조를 나타낸다.

도 6은 탁술-유도 세포 사멸에 있어, 희귀 진세노사이드의 효과를 나타낸다. (a) 탁술-유도 세포 사멸에 있어 여러 진세노사이드의 효과를 나타낸다. C2 세포에 있어서, CSH1 (Rg6) 만이 탁술 민감성 효과를 나타낸다. 각각 진세노사이드(5 μ M) 및 탁술(3 μ M)을 처리하였다. 72시간 후, 세포 생존능은 MTT 분석을 통해 측정하였다. (b 및 c) 폐암세포주 A549에서 PGT 및 CSH1은 스트레스 호르몬-유도 γ -튜불린 발현을 억제하였다. PGT(5 μ M), CSH1(5 μ M), 코르티솔(5 μ M) 및 코르티손(5 μ M)을 72시간 동안 처리하였다. γ -튜불린 발현을 측정하기 위해서 웨스턴 블랏을 수행하였다. 액틴(Actin)은 로딩(loading) 대조군으로 사용하였다. 세포를 항- γ -튜불린-항체(붉은색) 및 DAPI (파란색)로 염색하였다. (d) GR 발현은 CSH1에 의해 억제되었다. GR 유도된 Rad51 발현 억제는 CSH1 처리에 의해 회복되었다. (e) CSH1은 BRCA1 및 Rad51의 상호작용을 촉진시켰고, GR에 의해 파괴된 결합을 회복시켰다. HEK293 세포에서 MYC-표지된 BRCA1, HA-표지된 Rad51 및 GFP-표지된 GR은 과발현되었고, 세포 용해물은 결합 분석을 위한 IP 분석에 사용되었다. IP 분석은 항-MYC 항체에 의해 수행되었다. (f 및 g) CSH1은 GR 또는 코르티손 유도된 MTOC 증폭을 차단할 수 있었다. 평균 MTOC 수를 확인하기 위해서 약 50개의 세포를 계수하였고, 사진으로 나타냈다. GFP-표지된 GR은 HEK 293 세포에 형질감염시켰다. CSH1(5 μ M) 및 코르티손(5 μ M)을 처리하였다. 세포를 항- γ -튜불린-항체(붉은색) 및 DAPI (파란색)로 염색하였다.

도 7은 CSH1-관련된 진세노사이드인 CSH2 내지 CSH4의 화학구조를 나타낸다.

도 8은 스트레스 호르몬의 연속적인 처리가 형질전환(transformation)을 유도할 수 있는지 확인하기 위해서, 2 종류의 정상 인간 섬유아세포를 낮은 혈청 농도하에서 코르티솔 및 CSH1의 첨가 유무에 따라 1달 동안 배양한 결과이다.

도 9는 FST와 유사한 효과를 보이는 CSH1에 대한 결과이다. (a) 에스트로겐-유도된 세포 증식에 있어 CSH1의 억제효과를 나타낸다. ER- α 양성 MCF-7 세포의 증식은 에스트로겐-처리에 의해 용량-의존적으로 증가되었다. FST와 유사하게, CSH1은 MCF-7에 있어서 에스트로겐 유도된 증식을 억제하였다. 화합물은 표시된 대로 처리하였다. 72시간 후, 세포 생존능을 측정하기 위해 MTT 분석을 수행하였다. (b) FST에 의한 γ -튜불린 발현 억제는 MCF-7 세포에서만 나타났지만, CSH1은 MCF-7 및 MDA-MB-468 세포 모두에서 γ -튜불린을 감소시켰다. (c) ER- α 형질감염된 HEK293 세포에서, ER- α 매개 전사 활성은 CSH1 및 CSH3에 의해 감소되었다. ERE-루시퍼라제 활성을 측정하기 위해서, ERE-루시퍼라제 벡터 및 ER- α 는 HEK 293 세포에 동시 형질감염되었다. (d) MCF-7 세포에서도 유사한 결과를 얻을 수 있었다. FST와 마찬가지로, CSH1은 ERE 루시퍼라제 활성을 효과적으로 억제하였다. ERE-루시퍼라제 벡터는 ER α -양성 MCF7 세포 및 ER α -음성 MDA-MB-468 세포에 형질감염되었다. ERE-루시퍼라제 분석은 각 화합물 처리 4시간 후에 수행하였다. (e) VHL-음성 C2 세포에서, CSH1에 의한 탁술-유도된 세포 사멸은 FST와 유사하게 농도 의존적으로 민감성을 나타냈다. (f) 웨스턴 블랏 분석 결과, CSH1의 처리에 의해 γ -튜불린 및 ER- α 의 발현은 감소되었으나, Rad51 발현은 증가되었다. (g) CSH1에 의해 ER- α 의 발현은 억제되었다. ER- α 는 VHL-양성 ACHN 세포에 형질감염시켰다. 형질감염 후, CSH1 (5 μ M)을 처리하였다. 72시간 후, 웨스턴 블랏을 수행하였다. (h 및 i) VHL-음성 C2 세포에서, FST와 비슷하게 희귀 진세노사이드들에 의해 MTOC 증폭이 억제되었다. 평균 MTOC 수를 확인하기 위해서 각 표시된 조건마다 약 50개의 세포를 계수하였고, 사진으로 나타냈다. FST (5 μ M), CSH1 (5 μ M) 및 CSH3 (5 μ M)을 VHL-음성 C2 세포에 처리하였다. 72시간 후, IF 염색을 수행하였다. 세포를 항- γ -튜불린-항체(붉은색) 및 DAPI (파란색)로 염색하였다.

도 10은 스트레스 조건하에서, 스트레스 호르몬에 대응하여 GR 경로가 활성화되고, MTOC 증폭 및 염색체 불안정성이 유도되는 것을 나타내는 모식도이다. 스트레스-유도 암에 대해 추정되는 종양 형성 기작 중 하나이다. 하지만, ER- α 경로와 달리, GR은 VHL에 의해 조절되지 않는다. 희귀 진세노사이드인 CSH1은 스테로이드-유사 백분을 가지고 있으므로, ER- α 경로-유도 MTOC 증폭 및 탁술 민감성 뿐만 아니라 GR도 차단시킨다. 이에, 암 예방 전략 및 항암 약물로도 사용될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이에, 본 발명자들은 스트레스 호르몬의 종양 형성 효과, 특히 MTOC 증폭 및 항암제 내성에 대해 초점을 맞추었다. 여러 진세노사이드들이 스트레스 호르몬-관련 화학 구조를 가지고 있으므로, MTOC 증폭 및 탁술 내성에 대한 진세노사이드의 효과를 조사하고 본 발명을 완성하였다.

[0012]

- [0013] 본 발명은 희귀 진세노사이드 CSH1(Rg6)을 유효성분으로 함유하는 항암제 내성 억제용 식품조성물을 제공한다.
- [0014] 상세하게는, 상기 항암제 내성은 스트레스 호르몬에 의해 유도될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0015] 상세하게는, 상기 희귀 진세노사이드 CSH1(Rg6)은 스트레스 호르몬에 의해 유도되는 γ -튜불린 발현을 억제하고, BRCA1 및 Rad51의 결합을 촉진하며, 미세소관 조직화 중심(microtubule organizing center; MTOC) 증폭을 억제할 수 있다.
- [0016] 바람직하게는, 상기 스트레스 호르몬은 코르티손(Cortisone) 또는 코르티솔(Cortisol)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 바람직하게는, 상기 항암제는 탁솔(Taxol)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 또한, 본 발명은 희귀 진세노사이드 CSH1(Rg6)을 유효성분으로 함유하는 스트레스 호르몬 관련 질환 개선용 식품조성물을 제공한다.
- [0019] 바람직하게는, 상기 스트레스 호르몬은 코르티손(Cortisone) 또는 코르티솔(Cortisol)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 바람직하게는, 상기 스트레스 호르몬 관련 질환은 두통, 어지러움, 이명, 소화불량, 위염, 우울증, 불안, 불면증 또는 탈모일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명의 식품조성물이란, 항암제 내성 억제 또는 스트레스 호르몬 관련 질환 개선을 위한 식품조성물로 다양하게 이용되는 것으로서, 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 식품조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다. 본 발명의 식품조성물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다. 본 발명의 조성물이 식품 조성물에 포함될 때 그 양은 전체 중량의 0.1 내지 100%의 비율로 첨가할 수 있다. 여기서, 상기 식품조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품조성물을 함유하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천연탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 즉, 천연탄수화물로서 포도당 등의 모노사카라이드, 과당 등의 디사카라이드, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜 등을 포함할 수 있다. 상기 향미제로서는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 등을 들 수 있다. 그 외 본 발명의 식품조성물은 여러가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성풍미제 및 천연풍미제 등의 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 100 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0022] 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.
- [0023] 하기의 실험예는 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.
- [0024] <실험예>
- [0025] 1. 세포주 및 시약
- [0026] ACHN (VHL+) 및 A498 (VHL-) 세포는 한국 세포주 은행으로부터 구입하였다. A549, HEK293, MCF-7 및 MDA-MB-468은 미국 세포주 은행(ATCC, Manassas, VA)으로부터 구입하였다. 다른 신장암 세포주(UMRC2; C2, UMRC2/VHL; C2V)는 Dr. Jung, YJ(부산대학교)로부터 제공받았다. 인간 섬유아세포는 Coriell Cell Repositories (New Jersey, USA)로부터 구입하였다. ACHN, A498, HEK293, MCF-7 및 MDA-MB-468은 37°C 성장 챔버에서 10% FBS 및 1% 항생제가 포함된 액체 DMEM 배지로 유지시켰다. HCT116 세포주는 Dr. Vogelstein B (Johns Hopkins University)로부터 얻었다. A549, HCT116은 10% FBS 및 항생제가 포함된 RPMI-1640에서 유지되었다. 에스트로겐(Estrogen; 250155), 풀베스트란트(Fulvestrant; I4409), 탁솔(Taxol; T7402), 케토코나졸(Ketoconazole; UC280), 프로게스테론(Progesterone; P0130), 코르티손(Cortisone; C2755) 및 코르티솔(Cortisol; H4001)은 Sigma (Missouri, USA)에서 구입하였다. Actin (sc-1616), ER- α (sc-8002), GFP (sc-7392) 및 HA (sc-

9996)에 대한 항체는 Santa Cruz (California, USA)에서 구입하였다. Anti- γ -tubulin (T6557)은 Sigma (Missouri, USA)로부터 구입하였고, anti-glucocorticoid receptor (GR) Ab (12041)는 Cell signaling (Massachusetts, USA)로부터 구입하였다. Rad51 (05-530), BRCA1 (07-434)은 Millipore (Darmstadt, Germany)로부터 구입하였다.

2. 벡터 및 형질감염

GFP-tagged GR (GR-GFP) 및 HA-tagged Rad51 (Rad51-HA) 벡터는 Addgene으로부터 구입하였다. Myc-tagged wild type BRCA1 (BRCA1-Myc)는 Dr. Livingston, DM (Harvard Medical School)로부터 얻었다. pVHL 동물세포 발현 벡터는 Dr. Jung, YJ (부산대학교)로부터 얻었다. 상기 벡터들의 동물세포 발현을 위한 형질감염(Transfection)은 Jetpei transfection agent (Polyplus New York, USA)를 사용하여 수행하였다. 간단히 설명하면, 상기 벡터(1.5 μ g)는 150 mM NaCl 용액에 녹인 1.5 μ l Jetpei reagent와 혼합하였다. 상기 혼합물은 상온에서 15분 동안 반응시켰다. 상기 반응 후, 혼합물을 세포에 첨가하였다. 3시간 후, 무-혈청 배지는 10% FBS가 포함된 배지로 교체하였다.

3. 웨스턴 블랏 분석 및 단백질 상호작용 연구

단백질은 RIPA 완충액 (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS 및 10% sodium deoxycholate)을 사용하여 세포로부터 추출하였다. 샘플들을 SDS-PAGE에 적용하였고, PVDF 멤브레인으로 옮겼다. 블랏된 멤브레인을 4°C에서 1시간 동안 1차 항체로 반응시켰고, HRP-conjugate species-matched secondary antibodies를 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 퍼옥시다제 활성은 ECL kit (Intron, Seoul, Korea)으로 화학적 발광(chemi-luminescence)을 통해 검출하였다. 면역침전(immunoprecipitation; IP) 분석을 위해, 우선 전체 세포 용해물을 적절한 항체로 4°C에서 4시간 동안 반응시킨 후, protein A/G agarose beads (Invitrogen, California, USA)로 4°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 원심분리하고 RIPA로 씻어낸 후, 침전된 면역-복합체를 SDS-PAGE 및 웨스턴 블랏 분석에 적용하였다.

4. 면역형광 염색

세포들을 커버 글라스에 놓고, 표시된 벡터로 형질감염시키거나, 표시된 화합물로 처리하였다. Me-OH로 30분 동안 고정시킨 후, 세포들을 차단 완충액[PBS + anti-human-Ab (1:500)]으로 1시간 동안 반응시켰다. PBS로 씻어낸 후, 세포들을 차단 완충액에 녹인 Anti- γ -tubulin 항체(1: 100 내지 200)로 4시간 동안 반응시켰고, 차단 완충액에 녹인 FITC-접합된 또는 Rhodamine-접합된 2차 항체(1: 500)로 2시간 동안 반응시켰다. 핵은 DAPI로 염색하였다. PBS로 씻어낸 후, 커버 글라스를 마운팅 용액(Vector Laboratories, Cambridgeshire, UK)에 마운팅하였다. 면역형광 신호는 형광현미경(Zeiss, Jena, Germany)을 통하여 검출하였다.

5. MTT 분석

세포 생존능을 측정하기 위해서, 세포들은 표시된 화합물로 4일 동안 처리하였다. MTT 분석을 위해, 세포들을 0.5 mg/ml MTT 용액 (Calbiochem, Darmstadt, Germany)으로 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 잔여 용액을 제거한 후, 침전물을 200 μ l DMSO에 녹였고, 540 nm 흡광도에서 측정하여 정량하였다.

6. 루시페라제(Luciferase) 분석

ER- α 프로모터 활성을 측정하기 위해서, ERE-Luc 벡터를 세포에 24시간 동안 형질감염시켰고, 세포들을 표시된 화합물로 처리하였다. 세척 완충액 (Promega, Wisconsin, USA)으로 씻어낸 후, 세포들을 용해 완충액 (Promega, Wisconsin, USA)으로 용해시켰다. 루시페라제 활성은 luminometer (MicroDigital, Gyeonggi-do, South Korea)로 측정하였다.

7. 통계 분석

모든 결과는 평균 + s.e.m.으로 표시하였고, 적어도 그룹당 n=4으로 수행하였다. 통계적 유의성을 얻기 위해서, Student's t-test를 수행하였다.

<실시예 1> 탁솔 내성을 유발하는 스트레스 호르몬

스트레스 호르몬인 코르티솔(cortisol) 및 이와 관련된 호르몬들(코르티손 및 알도스테론)은 콜레스테롤로부터 유래하였고, 에스트로겐과 유사한 화학구조를 나타내기 때문에, 탁솔-유도 세포 사멸에 있어서 이들의 생물학적 효과를 시험하였다. 알도스테론은 아니지만, 코르티손 및 코르티솔은 에스트로겐과 유사하게 두 종류의 RCC 세포주에 있어서 탁솔 내성을 나타냈다(도 1a). 이들의 억제 효과는 용량-의존적으로 나타났다(도 1b). 스트레스

호르몬은 여러 종류의 조직 및 세포에 영향을 미칠 수 있는데, 본 발명자들은 폐암 및 대장암 세포주에서 글루코코르티코이드(glucocorticoid) 호르몬들의 효과를 확인하였고, 코르티솔 및 코르티손이 용량-의존적 방법으로 탁솔-유도 세포 사멸을 억제하는 것과 유사한 결과를 얻었다(도 1c). 상기 세포주에서, 알도스테론은 고용량에서도 탁솔-민감성이 바뀌지 않았다. 다음으로, 본 발명자들은 다른 종류의 항암제에 대한 코르티손 및 코르티솔의 효과를 확인하였다. 에스트로겐과 유사하게, 코르티솔 및 코르티손은 아드리아마이신(Adriamycin) 또는 에토포사이드(etoposide)에 대한 민감성이 바뀌지 않았다(도 1d). 코르티솔/코르티손-유도 탁솔 내성은 ER- α /Est 신호전달 기작에 의해 획득된다고 알려졌으므로, 본 발명자들은 ER- α 억제제인 풀베스트란트(Fulvestrant; FST)를 처리하였고, 탁솔-민감성을 측정하였다. 하지만, FST는 코르티손/코르티솔-유도 탁솔 내성을 차단하지 못했고, 이는 탁솔-유도된 세포 사멸에 대한 상기 호르몬들의 효과가 ER- α 독립적인 기작에 의해 일어난다는 것을 나타낸다(도 1e).

[0041] <실시예 2> MTOC 증폭을 촉진하는 스트레스 호르몬

[0042] γ -튜불린(γ -tubulin)의 상승 발현이 탁솔-유도된 세포 사멸을 극복할 수 있으므로, 본 발명자들은 우선 γ -튜불린 발현을 측정하였다. 예상대로, 코르티솔/코르티손은 모든 시험 세포주에서 γ -튜불린을 확실히 유도하였고(도 2a), FST는 γ -튜불린 유도를 차단하지 못했다(도 2b). 또한, 상기 실험에서 본 발명자들은 코르티솔 및 코르티손에 대한 반응에 있어 BRCA1이 감소하는 것을 확인하였다(도 2b). 실제로, BRCA1의 감소는 Est-매개 γ -튜불린 유도된 조건에서 확인되어 왔다. 하지만, ER- α 음성 세포주에서 코르티손은 γ -튜불린을 유도할 수 있었다. 또한, 상기 호르몬은 MTOC 증폭을 촉진할 수 있었다. 실제로, 코르티손-처리하는 유사분열성(mitotic) MTOC의 평균 수를 2에서 3으로 증가시킬 수 있었다(도 2c 및 도 2d).

[0043] <실시예 3> MTOC 증폭을 촉진할 수 있는 글루코코르티코이드 수용체

[0044] 코르티솔 및 코르티손은 글루코코르티코이드 호르몬이고, 이들의 신호전달은 글루코코르티코이드 수용체(glucocorticoid receptor; GR)에 의해 매개되므로, 본 발명자들은 MTOC 증폭에 대한 GR의 연관성을 확인하였다. GR 단독으로 형질감염시키면, 코르티손 처리와 마찬가지로 MTOC 수를 증가시킬 수 있었다(도 2e 및 도 2f). 또한, GR은 탁솔-유도된 세포 사멸을 차단할 수 있다(도 2g). 이에, 본 발명자들은 Rad51-매개 탁솔 민감성에 대한 GR의 효과를 확인하였다. 이전 연구를 통해, Rad51 과발현이 탁솔-내성 ER- α 상승된 세포 및 VHL 결핍 세포주에서 민감성을 다시 회복할 수 있다는 것을 알아냈다. 흥미롭게도, GR 과발현은 Rad51을 감소시켜 Rad51-매개 탁솔 재-민감성을 차단할 수 있었다(도 2h 및 2i). 실제로, GR 과발현 및 코르티손 처리는 내재성 Rad51 발현을 감소시켰다(도 2j). 하지만, ER- α 와는 달리, GR 발현은 VHL 상태에 따라 바뀌지는 않았다. VHL 과발현 또는 녹다운(knock down)은 GR 발현에 영향을 미치지 않았고, FST도 GR 발현에 영향을 미치지 않았다(도 2k). 상기 결과는 스트레스 호르몬이 MTOC 증폭을 유도하고, γ -튜불린 상승은 VHL 독립적 기작을 통해 GR에 의해 일어난다는 것을 나타낸다.

[0045]

[0046] <실시예 4> 스트레스 호르몬-매개 MTOC 조절 억제에 있어 GR 억제제의 선호 효과

[0047] MTOC 증폭에 있어 GR의 연관성을 확인하기 위해서, 본 발명자들은 스트레스 호르몬-유도 MTOC 증폭에 있어서 프로게스테론(progesterone; PGT)의 효과를 시험하였다. PGT는 GR의 길항제(antagonist)로서 잘 알려져 있다. PGT의 처리는 γ -튜불린 유도 뿐만 아니라 스트레스 호르몬-유도 MTOC 증폭도 억제시켰다(도 3a, 도 3b 및 도 3c). PGT 또한 호르몬이므로, 본 발명자들은 GR의 다른 화학적 길항제인 케토코나졸(ketoconazole; KCZ)을 사용하였다. PGT와 일관되게, KCZ 또한 γ -튜불린 유도 및 Rad51과 BRCA1 감소를 억제하였다(도 3d). 또한, 상기 억제제들은 코르티솔 유도된 탁솔-내성을 극복하였다(도 3e).

[0048] <실시예 5> Rad51에 결합하여 BRCA1-Rad51 결합을 파괴하는 GR

[0049] 글루코코르티코이드 호르몬이 어떻게 MTOC 증폭을 촉진하는지 알아보기 위해서, Rad51-BRCA1 결합에 있어 상기 호르몬의 효과를 확인하였다. 실제로, VHL이 손상되지 않은 ACHN 세포에서 BRCA1-Rad51 사이의 결합은 글루코코르티코이드 호르몬에 의해 분명히 감소하였다(도 4a). 대신, VHL-결핍된 A498에서 상기 결합은 약하고, 글루코코르티코이드 호르몬에 의해 약간 감소하는 것으로 나타났다(도 4a). 코르티손에 의한 BRCA1-Rad51의 분리는 BRCA1 Ab를 사용한 IP 분석에 의해 확인되었다(도 4b). BRCA1 및 Rad51 중 하나는 GR의 결합 표적이다. BRCA1 및 Rad51 중 어느 것이 GR의 표적인지 확인하기 위해서, GR을 사용하여 IP 분석을 수행하였다. 상기 두 개의 단백질과 대등하게 관여하는 ER- α 와 다르게, GR은 오직 Rad51에서만 결합 친화도를 나타냈다(도 4c). Rad51 및 GR 사이의 결합은 외인성 단백질에 의해 확인할 수 있었다(도 4d). 비록 Rad51 및 GR의 결합이 코르티손 없이도

검출되었으나 GH는 결합을 촉진시켰는데(도 4e), 이는 아마도 핵으로의 GR 전이 때문인 것으로 보인다. 상기 반응에 있어서 ER- α 의 연관성을 제거하기 위해, FST-처리 조건 하에서 GR-유도 탁솔 내성을 측정하였다. VHL-결핍된 C2에서 FST가 탁솔 민감성을 나타내지만, GR은 FST-유도 민감성을 극복하는 것을 확인할 수 있다(도 4f). 또한, VHL이 손상되지 않은 C2V에서, FST는 GR-유도된 탁솔 내성을 차단하지 않는다(도 4g). 상기 결과는 GR/GH 신호전달이 ER- α 독립적인 기작을 통해 Rad51-BRCA1 결합을 파괴할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0050] <실시예 6> 탁솔-유도 세포 사멸에 민감성을 나타내는 회귀 진세노사이드(ginsenosides)

[0051] 본 발명자들은 스트레스 호르몬 신호전달에 대한 적절한 억제제 MTOC 조절 억제 뿐만 아니라 탁솔에 대한 민감성을 나타낼 수 있다는 것을 확인하였다(도 3). 이에, 본 발명자들은 스트레스 호르몬-GR 네트워크를 억제할 수 있는 후보 화합물을 검색하였다. 한의학에서, 인삼(Panax Ginseng)은 암 및 신장 질환에 사용되고 있다. 실제로, 몇몇 종류의 진세노사이드들, 특히 회귀 진세노사이드 CSH1 (RG6)은 에스트로겐 또는 코르티손과 매우 유사한 화학 구조를 가지고 있다(도 5). 따라서, 탁솔-유도 세포 사멸에 대한 Rg6의 효과를 다른 일반적인 진세노사이드들과 비교하여 시험하였다. 흥미롭게도, CSH1은 C2 세포에서 탁솔에 대한 민감성을 분명히 나타냈다. 하지만, 다른 일반적인 진세노사이드들은 명확한 효과를 나타내지 않았다(도 6a). 또한, A498 세포에서도 CSH1은 유사한 효과를 나타냈다. 이에 대한 좀 더 자세한 정보를 얻기 위해서, CSH1-관련된 진세노사이드(CSH2 내지 CSH4; 도 7)에 대한 효과를 확인하였다. ER- α 상승에 의해 탁솔에 내성을 나타내는 VHL-결핍된 C2 세포에서, CSH1 및 CSH3은 FST와 비슷하게 탁솔 민감성이 증가되었다. 하지만, C2V(탁솔 민감성 세포주)에서는 탁솔에 대한 추가적인 민감성을 나타내지는 않았다. 이에, 본 발명자들은 코르티솔 및 코르티손에 의한 γ -튜불린 유도에 있어서 CSH1의 효과를 확인하였다. PGT와 유사하게, CSH1은 인간 폐암 세포주 A549에서 MTOC 증폭 뿐만 아니라 스트레스 호르몬-유도 γ -튜불린 발현을 억제시켰다(도 6b 및 도 6c). 본 발명자들은 인간 대장암 세포주 HCT116에서도 CSH1의 유익한 효과를 확인하였다. 상기 결과는 CSH1이 암세포 타입과 무관하게 MTOC 증폭을 억제할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0052] <실시예 7> 스트레스 호르몬-유도된 기능 이상을 차단하는 CSH1

[0053] CSH1에 대한 좀 더 자세한 생물학적 효과를 확인하기 위해서, 본 발명자들은 Rad51 및 GR 발현에 있어 CSH1의 효과를 관측하였다. CSH1은 GR 발현을 억제하였고, GR-과발현에 의한 Rad51의 감소를 억제하였다(도 6d). 또한, CSH1은 BRCA1 및 Rad51의 상호작용을 촉진시켰고, GR에 의해 파괴되는 이들의 결합을 극복할 수 있었다(도 6e). 이러한 결과를 토대로, 본 발명자들은 MTOC의 수를 확인하였다. 예상대로, 코르티손 또는 GR 과발현에 의한 MTOC의 증가가 CSH1 처리에 의해 완전히 억제되었다(도 6f 및 도 6g). CSH1이 MTOC 증폭 및 γ -튜불린 조절 억제를 차단하므로, 상기 화합물이 암 예방에도 유용하게 사용될 수 있을 것으로 예상된다. 또한, 스트레스 호르몬의 연속적인 처리가 형질전환(transformation)을 유도할 수 있는지 확인하기 위해서, 2 종류의 정상 인간 섬유아세포를 낮은 혈청 농도하에서 코르티솔 및 CSH1의 첨가 유무에 따라 1달 동안 배양하였다. 1달 후, 세포들을 96 웰 플레이트에 접종시켰고, 혈청 없이 추가로 2주일 동안 배양하였다. 가혹한 조건 하에서, 정상 섬유아세포는 오직 2 웰에서만 살아남았다. 반면, 코르티솔-처리한 세포에서는 대부분 살아남았다(61/96 웰, 85/96 웰). 상기 조건에서 CSH1을 동시 처리하면 생존율은 크게 감소하였다(도 8). 상기 결과, 불리한 조건하에서 코르티솔은 세포 생존을 촉진할 수 있고, CSH1을 통해 GR 경로를 억제하면 스트레스-호르몬 유도로 인한 부적절한 세포 생존을 극복할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0054] <실시예 8> FST와 유사한 효과를 나타내는 CSH1

[0055] FST와 유사하게, CSH1은 C2 세포에서 탁솔에 대한 민감성을 나타내므로, CSH1이 FST를 대체할 수 있는 가능성이 있는지를 확인하였다. 우선, 에스트로겐-유도된 세포 증식을 관측하였다. ER- α 양성 MCF-7 세포주에서 FST와 유사하게, CSH1은 에스트로겐-유도된 세포 증식을 차단할 수 있었다(도 9a). 또한, CSH1은 에스트로겐-유도- γ -튜불린 및 ER- α 를 억제시킬 수 있었다(도 9b). 하지만, 이들은 기본적인 Rad51 발현은 변화시키지 않았다(도 9b). 또한, 외인성 ER- α 형질감염된 293세포에서 ER- α -매개 전사 활성은 CSH1에 의해 감소하였다(도 9c). 또한, MCF-7에서도 CSH1에 의해 ERE-Luc 활성이 FST 만큼 강하게 감소하는 것을 확인하였다(도 9d). 상기 결과는 CSH1이 ER- α 억제제로서 작용할 수도 있다는 것을 나타낸다. 또한, 탁솔-민감성도 확인하였다. FST의 용량-의존성 민감성과 유사하게, CSH1도 C2 세포에서 용량에 따라 탁솔-유도 세포 사멸이 증가하였다(도 9e). 추가로, CSH1은 VHL-결핍 C2 세포에서 FST와 마찬가지로 Rad51 발현도 증가시켰다(도 9f). FST는 ER- α 발현을 억제할 수 있으므로, 이 부분도 또한 시험하였다. 외인성 ER- α 는 CSH1에 의해 명확하게 감소되었는데(도 9g), 이는 CSH1이 FST와 매우 유사한 기능을 할 수 있다는 것을 나타낸다. 최종적으로, MTOC를 회복시킬 수 있는 FST와 비교하여 MTOC 증폭을 관측하였다. CSH3 뿐만 아니라 CSH1도 MTOC를 회복시켰다(도 9h 및 도 9i). 이러한 결과는

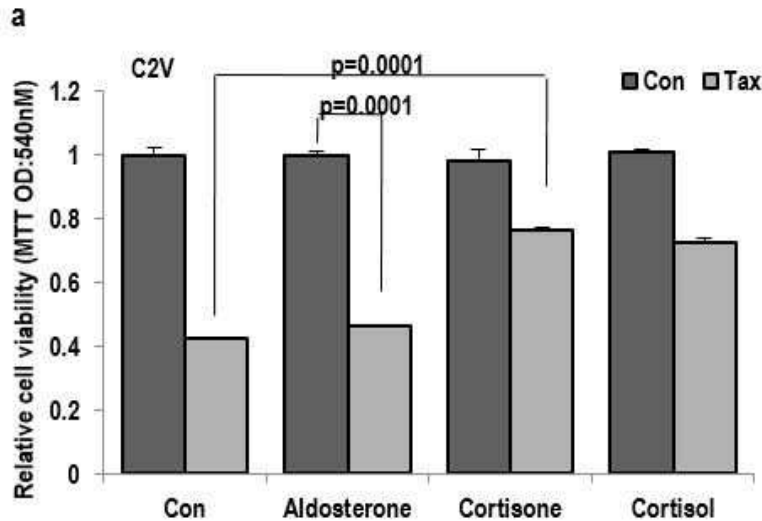
CSH3 뿐만 아니라 CSH1도 FST 대체 화합물의 하나로 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0056]

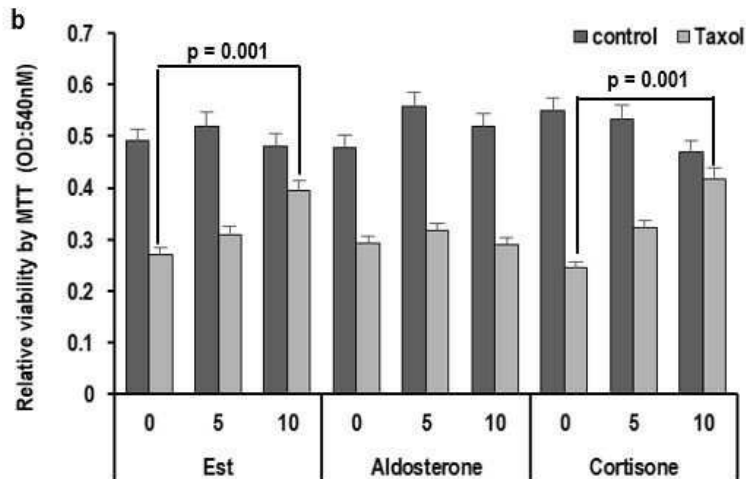
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

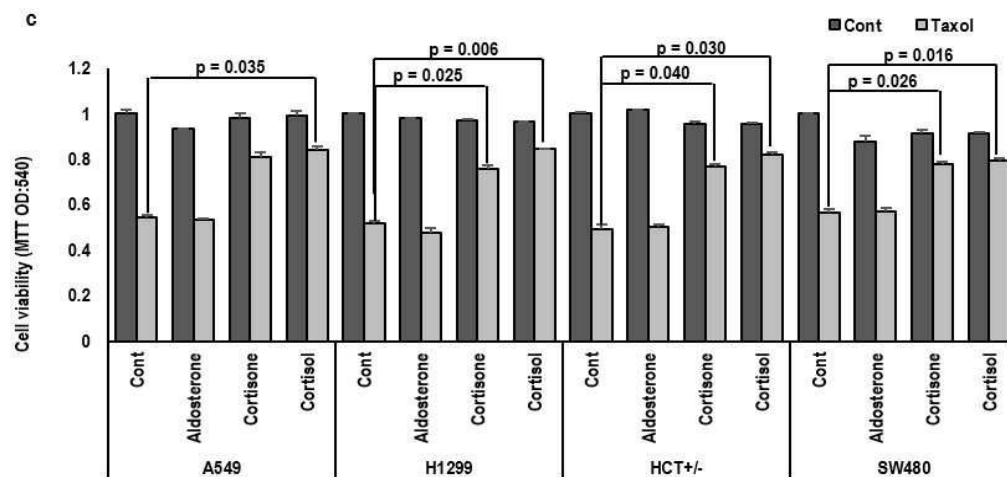
도면1a



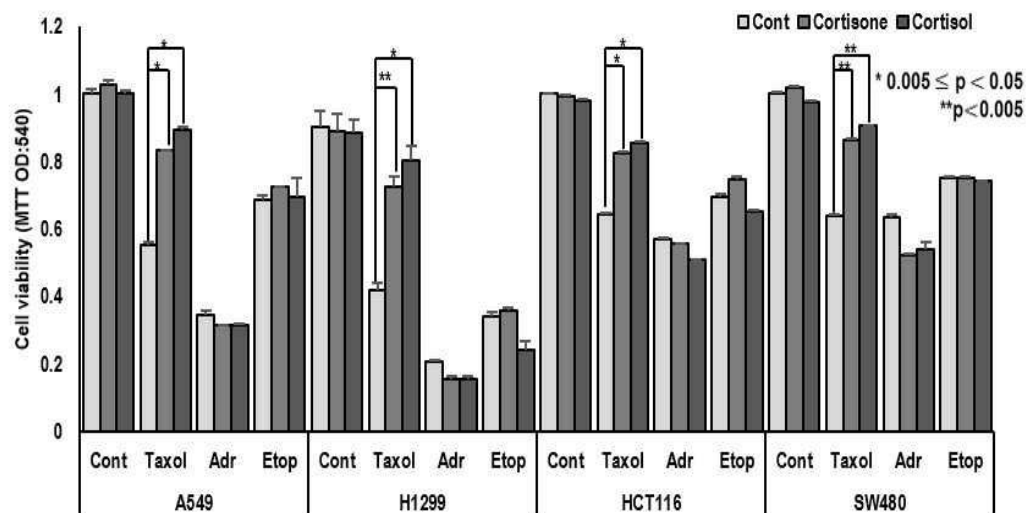
도면1b



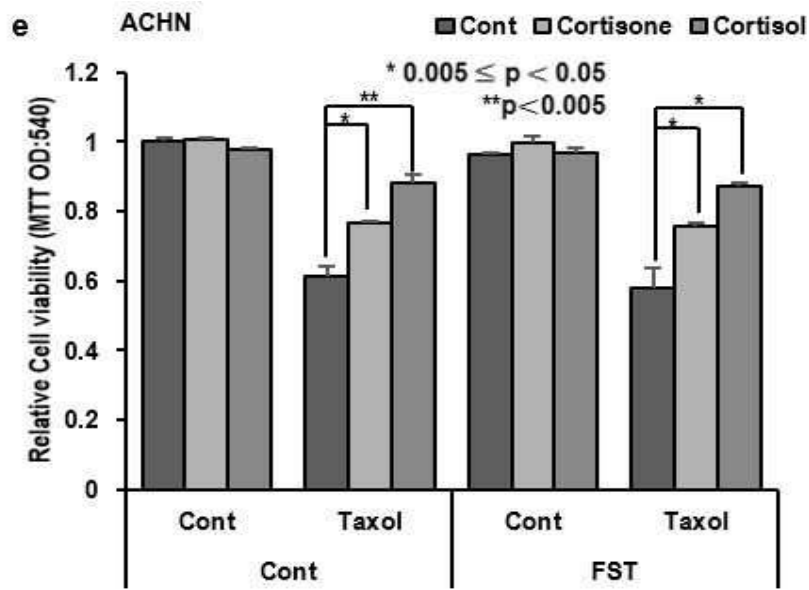
도면1c



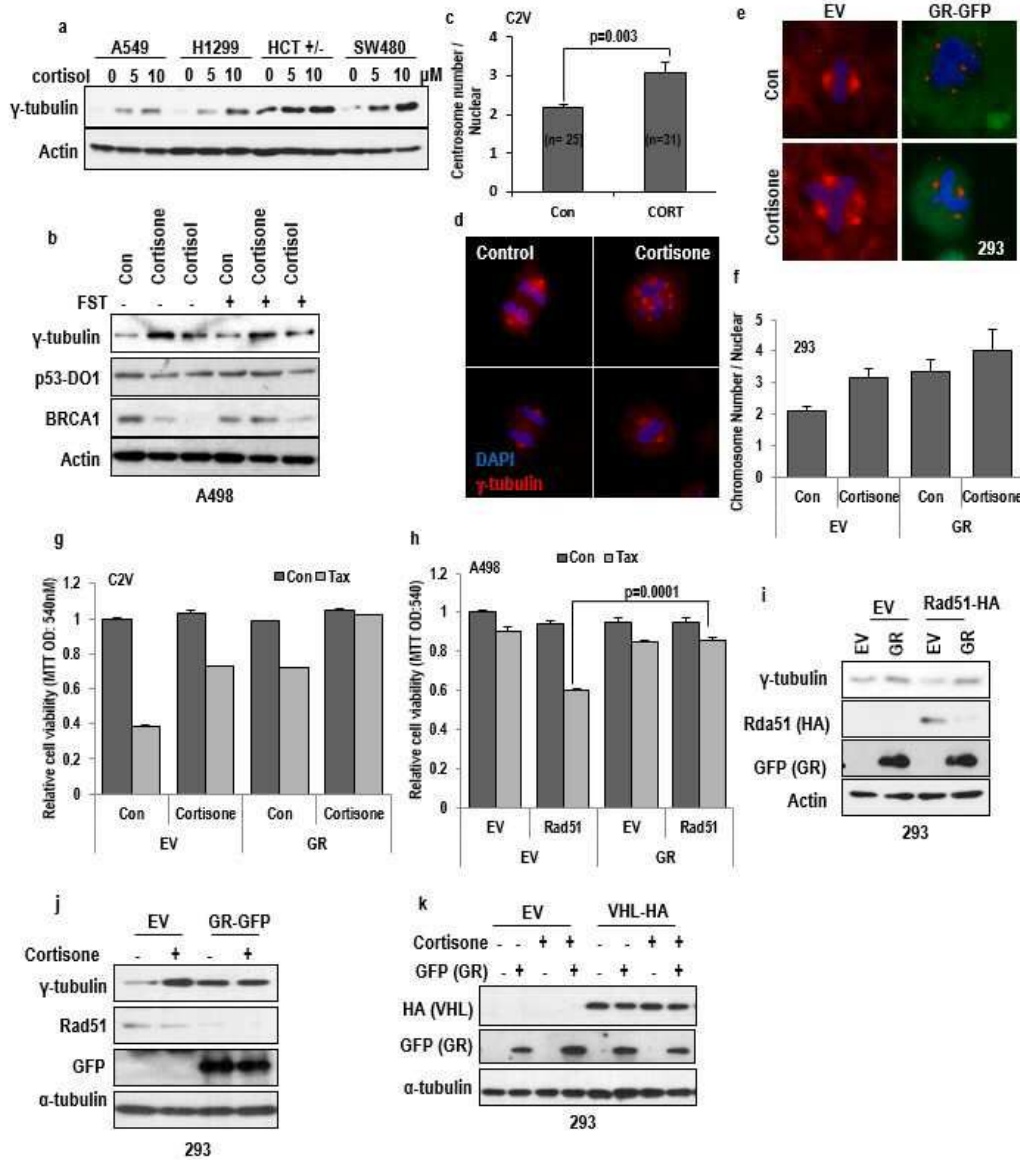
도면1d



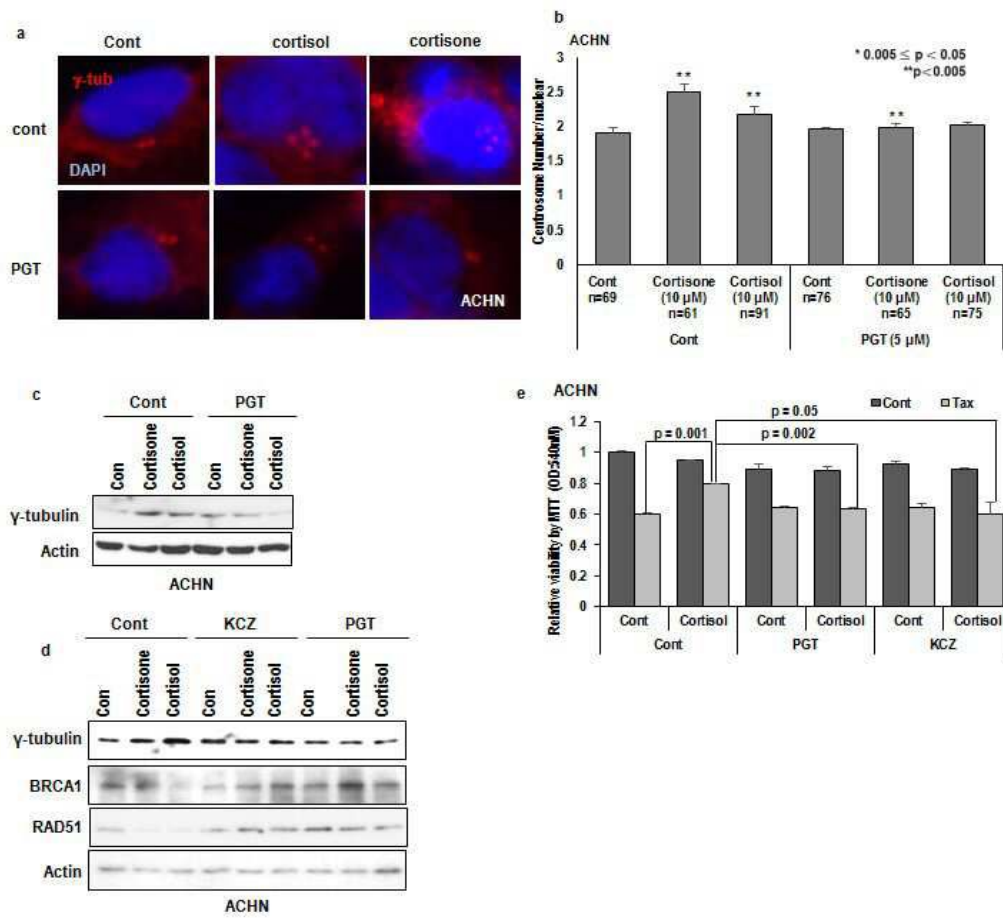
도면1e



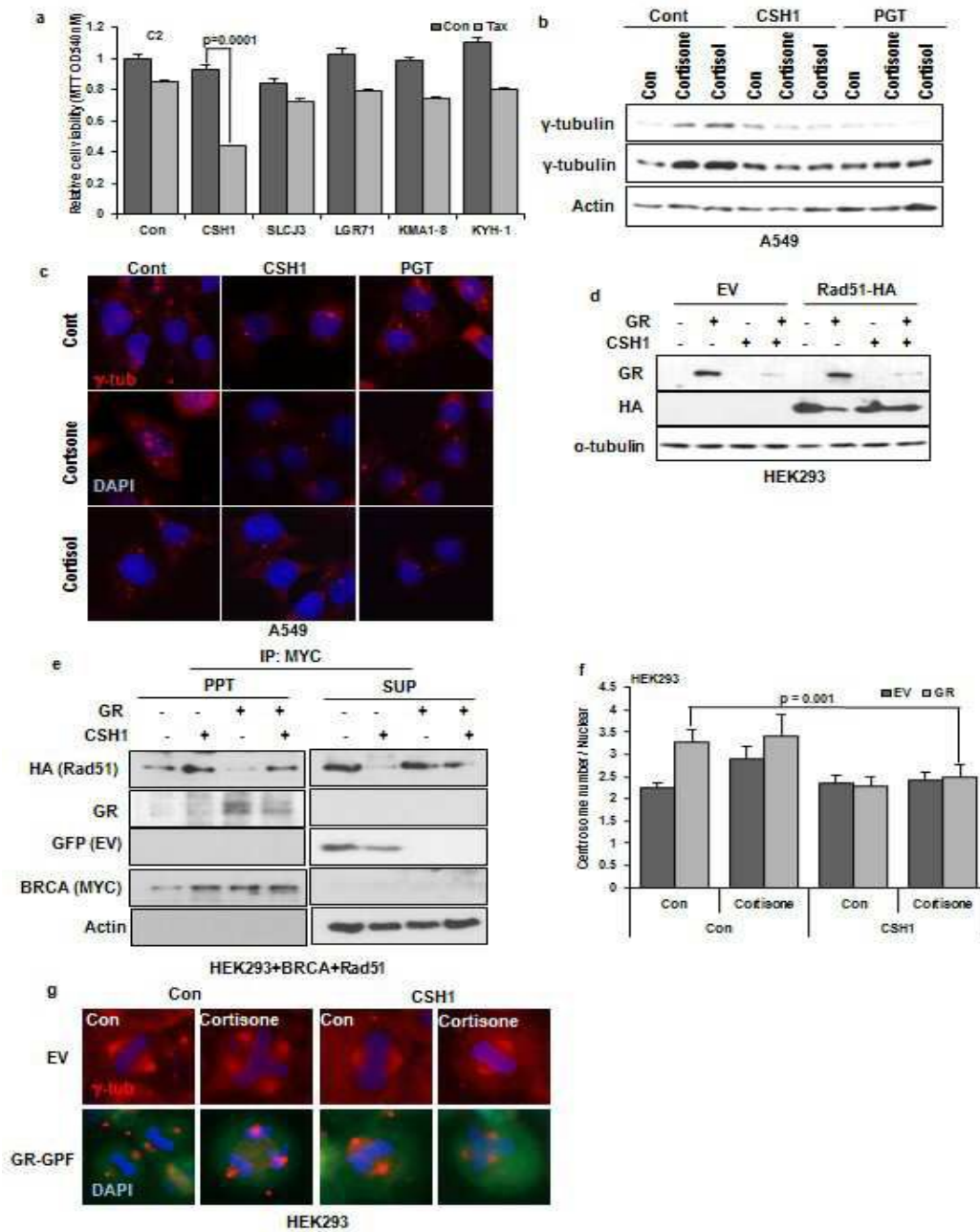
도면2



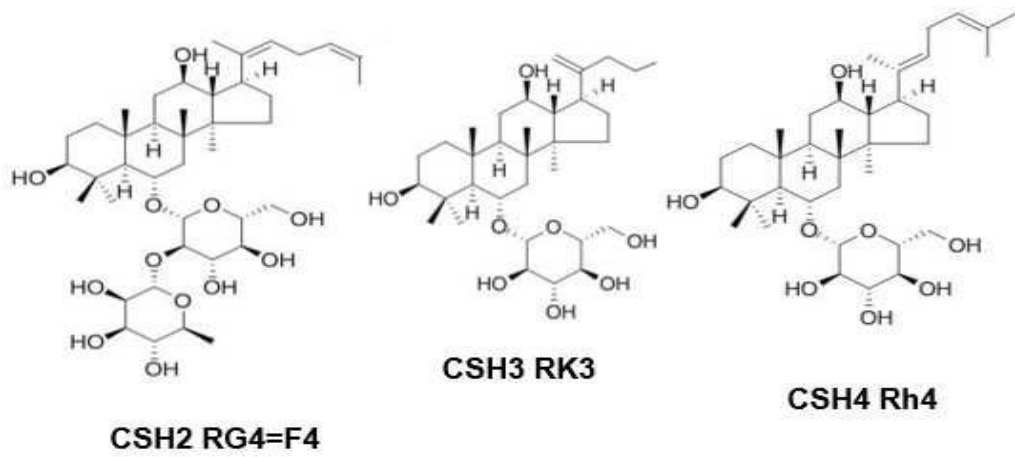
도면3



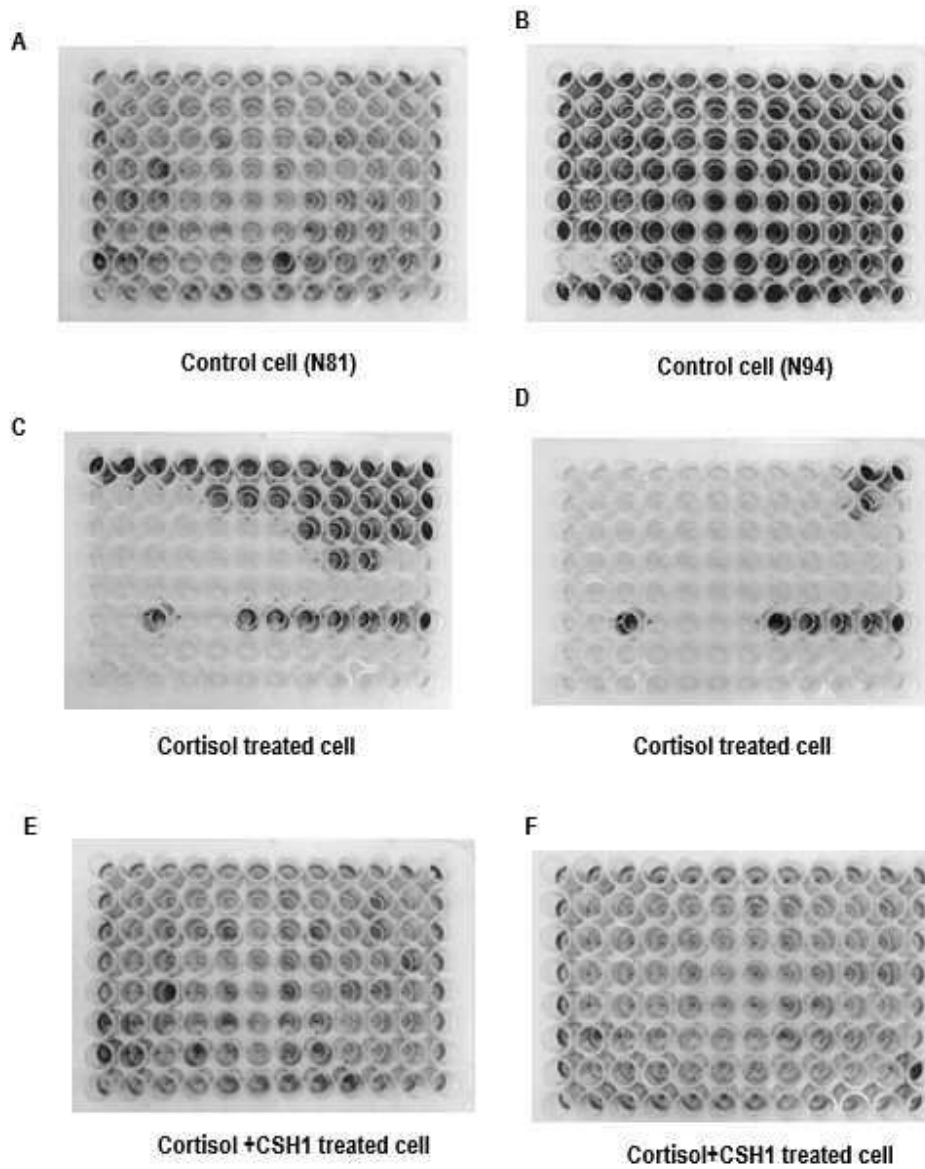
도면6



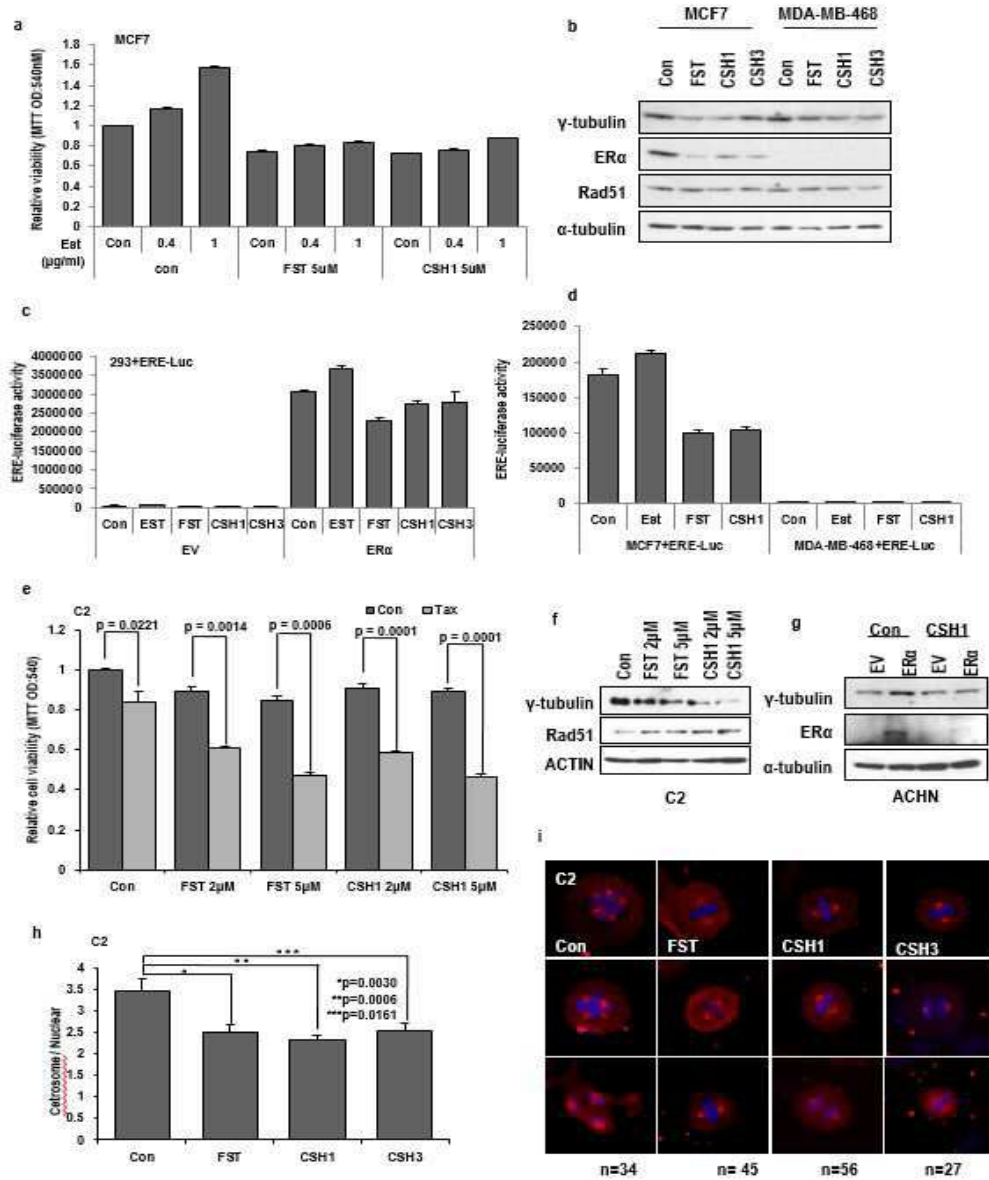
도면7



도면8



도면9



도면10

