(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0008689
(43) 공개일자 2023년01월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4184 (2006.01) *A61K 31/366* (2006.01)
A61P 15/02 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/4184 (2013.01)
A61K 31/366 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0188666(분할)
(22) 출원일자 2022년12월29일
심사청구일자 2022년12월29일
(62) 원출원 특허 10-2020-0013222
원출원일자 2020년02월04일
심사청구일자 2020년02월04일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
송권화
충청남도 천안시 서북구 충무로 124-24, 114동 803호
임화선
경기도 수원시 장안구 화산로 85, 124동 901호
박하현
경기도 수원시 장안구 서부로2106번길 26-92, 201호
(74) 대리인
정은열, 김태훈

전체 청구항 수 : 총 5 항

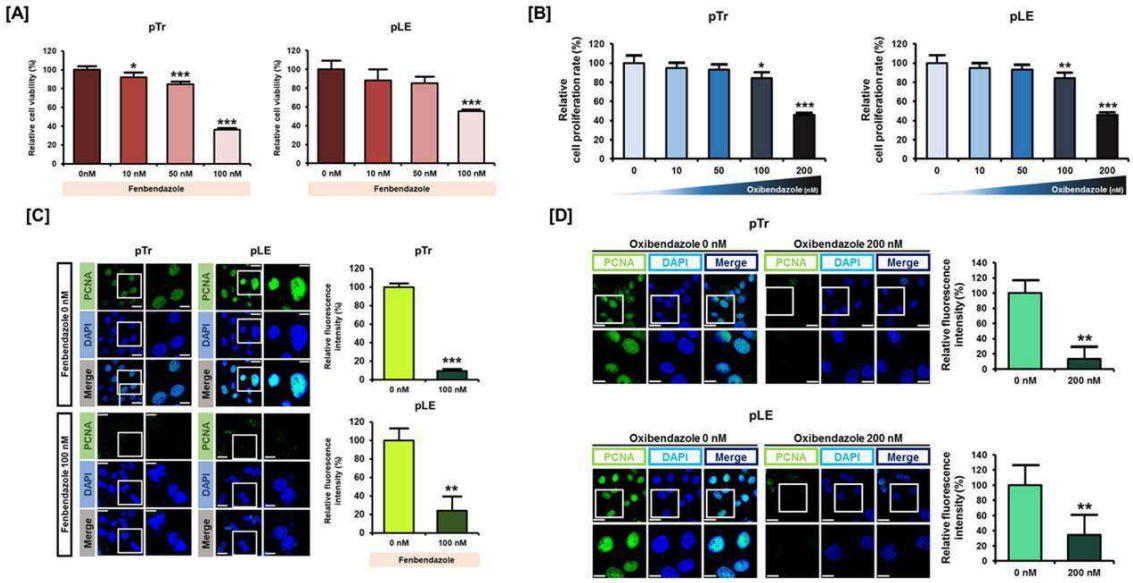
(54) 발명의 명칭 **펜벤다졸, 옥시벤다졸 또는 이들의 혼합물을 포함하는 자궁내막 세포 또는 영양막 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 펜벤다졸, 옥시벤다졸 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 펜벤다졸, 옥시벤다졸 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막 세포 또는 영양막 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 및 펜벤다졸, 옥시벤다졸 또는 이들의 혼합물을 유

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



효성분으로 포함하는 자궁내막 세포 또는 영양막 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 펜벤다졸, 옥시벤다졸 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 임신 초기 단계에서 모체의 자궁 내막으로 침투하여 착상을 유도하는 영양막세포 내 PI3K/AKT, MAPK 세포전달 메커니즘과 그 하위 신호 전달물질의 인산화를 다양하게 조절함으로써 영양막 세포, 상기 영양막 세포와 상호 작용하는 자궁내막 상피세포의 증식을 억제하고, 세포 사멸 효과를 향상시키는 효과가 있는바, 자궁내막 세포 또는 영양막 세포의 비정상적 증식과 관련된 질환을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류
A61P 15/02 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711107883
과제번호 2018R1C1B6009048
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 엑소좀 유래 운반 RNA 소편을 이용하여 모체 영양불량에 의한 태반 형성, 태아 프로그래밍의 후성유전학적 기전 규명 및 임신기 영양 평가를 위한 플랫폼 구축
기 여 율 70/100
과제수행기관명 국민대학교 산학협력단
연구기간 2018.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465028677
과제번호 HI17C0929000019
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 질환극복기술개발(R&D)
연구과제명 액체생체검사 기반 난소암 조기 진단, 재발 예측 및 항암제 내성 관련 엑소좀 바이오마커 발굴 및 검증
기 여 율 30/100
과제수행기관명 국민대학교 산학협력단
연구기간 2017.04.10 ~ 2019.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

펜벤다졸과 옥시벤다졸의 혼합물; 및

PI3K 억제제인 워트마닌(Wortmannin), ERK1/2 억제제인 U0126(1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadiene) 또는 JNK 억제제인 SP600125(Anthra[1,9-cd]pyrazol-6(2H)-one);를 유효성분으로 포함하고,

포상기태(hydatidiform mole) 및 융모선종(villous adenoma)로 이루어진 군에서 선택되는 영양막 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 하는 영양막 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

펜벤다졸과 옥시벤다졸의 혼합물; 및

PI3K 억제제인 워트마닌(Wortmannin), ERK1/2 억제제인 U0126(1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadiene) 또는 JNK 억제제인 SP600125(Anthra[1,9-cd]pyrazol-6(2H)-one);를 유효성분으로 포함하고,

포상기태(hydatidiform mole) 및 융모선종(villous adenoma)로 이루어진 군에서 선택되는 영양막 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 4

제1항의 조성물을 이용하여 영양막 세포의 증식, 이주 및 침투 능력을 억제하는 방법.

청구항 5

제1항의 조성물을 이용하여 영양막 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 펜벤다졸, 옥시벤다졸 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 펜벤다졸, 옥시벤다졸 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막 세포 또는 영양막 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 및 펜벤다졸, 옥시벤다졸 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막 세포 또는 영양막 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 자궁내막증은 가임기 여성의 난소, 난관, 복벽등에 자궁내막 세포가 비정상적으로 증식하여 35-50% 환자에게서 불임을 야기하는 질환으로서(Vigano et al, Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2004; Bulun, N Engl J Med, 2009), 이에 대한 병리학적 기전에 대한 연구가 활발하게 수행되고 있으나, 아직까지 정확한 발병 원인은 밝혀지지 않고 있다. 자궁내막증의 기본적인 치료 방법으로는 수술적 제거와 호르몬치료 방법이 있으며, 자궁내막증은 예후 인자를 기반으로 한 진단이 아닌, 증상 위주의 진단이 이루어지기 때문에 수술적 제거를 진행하여

도 5년 내 재발률이 30-40%에 육박하는 것으로 알려져 있다(Busacca et al., J Obstet Gynecol, 2006: Vignali et al., J Minim Invasive Gynecol, 2005).

[0003] 한편, 융모막암, 포상기태와 같은 임신성 영양막 질환은 영양막 세포의 비정상적인 증식, 과도한 이동성과 침투성으로 인해 발병하는 질병이다. 특히 융모막암은 임신성 영양막 질환중 가장 악성의 질병으로 주로 임신 초기에 포상기태로부터 발병하는 경우가 대다수이며(VCMak et al, Carcinogenesis, 2016; LDuffy et al, Journal of clinical medicine research, 2015), 영양막 조직에서 유래된 악성종양인 융모막암은 임신기에 20,000~40,000 명 당 1명의 비율로 나타나는 것으로 보고된바 있다(Soper et al, Gynecol Oncol, 2004). 또한, 융모막암은 혈관침투성이 매우 높으며 폐나 질 같은 타기관으로의 전이가 빈번하게 일어나는 것으로 알려져있다(Geramizadeh and Rad, Indian J Pathol Microbiol, 2012). 일반적인 융모막암의 치료 방법은 EMA-CO라고 불리는 화학적치료법을 실시하는 것이다. 하지만, 융모막암 환자의 15-25%는 이러한 화학적 치료법에 대해 저항성 및 나쁜 예후를 나타낸다(Powles et al, Br J Cancer, 2007). 따라서 융모막암에 나타나는 항암제 내성을 극복하기 위해 더욱 효과적인 치료제 개발을 통한 접근법이 필요한 실정이다.

[0004] 이처럼 자궁내막 세포 또는 영양막 세포의 비정상적 증식은 다양한 심각한 질환을 야기하며, 이들 질환은 모두 종래 치료법의 한계로 인하여 새로운 치료제의 개발이 요구되고 있다.

[0005] 전술한 기술적 배경하에서, 본 발명자들은 자궁내막 세포 또는 영양막 세포의 비정상적 증식 관련 질환 치료를 위한 새로운 물질을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 펜벤다졸(fenbendazole), 옥시벤다졸(oxibendazole) 또는 이들의 혼합물이 영양막 세포 또는 자궁내막 상피세포 내 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전의 활성을 조절하여 영양막 세포 또는 자궁내막 상피세포의 증식과 이주성 및 침투성을 억제하고, 세포 사멸을 유도한다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 펜벤다졸, 옥시벤다졸 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막 세포 또는 영양막 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 또한, 본 발명은 펜벤다졸, 옥시벤다졸 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막 세포 또는 영양막 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 펜벤다졸, 옥시벤다졸 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 자궁내막 세포 또는 영양막 세포의 증식, 이주 및 침투 능력을 억제하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 펜벤다졸, 옥시벤다졸 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 자궁내막 세포 또는 영양막 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 펜벤다졸, 옥시벤다졸 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막 세포 또는 영양막 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 펜벤다졸, 옥시벤다졸 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막 세포 또는 영양막 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 펜벤다졸, 옥시벤다졸 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 자궁내막 세포 또는 영양막 세포의 증식, 이주 및 침투 능력을 억제하는 방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 펜벤다졸, 옥시벤다졸 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 자궁내막 세포 또는 영양막 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 펜벤다졸, 옥시벤다졸 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 임신 초기 단계에서 모체의 자궁 내막으로 침투하여 착상을 유도하는 영양막세포 내 PI3K/AKT, MAPK 세포전달 메커니즘과 그 하위 신호 전달물질의 인산화를 다양하게 조절함으로써 영양막 세포, 상기 영양막 세포와 상호 작용하는 자궁내막 상피세포의 증식을 억제하고, 세포 사멸 효과를 향상시키는 효과가 있는바, 자궁내막 세포 또는 영양막 세포의

비정상적 증식과 관련된 질환을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 태아 유래 영양막 세포와 자궁내막 상피세포에 펜벤다졸 및 옥시벤다졸 처리가 세포 증식 및 세포 핵 유지 능력에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 펜벤다졸 및 옥시벤다졸에 의한 태아 유래 영양막 세포와 자궁내막 상피세포의 초기 및 후기 세포 사멸 효과를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 옥시벤다졸 처리에 따른 태아 유래 영양막 세포 및 자궁내막 상피세포 내 미토콘드리아 막 투과성 변화를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 펜벤다졸 처리에 따른 태아 유래 영양막 세포 및 자궁내막 상피세포 내 미토콘드리아 막 투과성 붕괴 확인, 세포 사멸 관련 단백질의 패턴 변화 및 염증 유발 인자 활성화를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 태아 유래 영양막 세포와 자궁내막 상피세포에 펜벤다졸 및 옥시벤다졸을 노출시킴에 따른 세포질 내 혹은 미토콘드리아 내 칼슘 이온의 항상성 변화를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 태아 유래 영양막 세포와 자궁내막 상피세포에 펜벤다졸 단독 처리 및 펜벤다졸과 신호전달기전 억제제의 병용처리에 따른 신호전달 분자 인산화 패턴 변화 및 상호연관성 확인 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 옥시벤다졸의 용량의존적 투여에 따른 영양막 세포 및 자궁내막 상피세포 내 신호전달기전 변화 분석, 상기 옥시벤다졸과 신호전달기전 억제제의 병용처리에 따른 신호전달 분자 인산화 패턴 변화 및 상호연관성 확인 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 옥시벤다졸과 펜벤다졸의 병용처리에 따른 세포 증식 억제 및 초기와 후기의 세포 사멸 상승 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 영양막 세포 또는 자궁내막 상피세포 내 펜벤다졸에 의한 세포 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 나타낸 것이다.

도 10은 영양막 세포 또는 자궁내막 상피세포 내 옥시벤다졸에 의한 세포 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0018] 본 발명에서는 펜벤다졸, 옥시벤다졸 또는 이들의 혼합물의 영양막 세포 또는 자궁내막 상피세포의 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 밝혔다(도 9, 도 10).

[0019] 본 발명은 일 관점에서 펜벤다졸, 옥시벤다졸 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막 세포 또는 영양막 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0020] 본 발명은 다른 관점에서 펜벤다졸, 옥시벤다졸 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막 세포 또는 영양막 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[0021] 본 발명에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 영양막 세포 또는 자궁내막 상피세포는 포유동물 유래의 세포일 수 있으며, 상기 포유동물은 설치목(예를 들어, 생쥐, 쥐, 햄스터, 게르빌루스 및 기니피그), 우제목(예를 들어, 소, 양, 돼지, 염소, 사슴, 기린 및 영양), 기제목(예를 들어, 말, 당나귀, 코뿔소 및 맥), 식육목(예를 들어, 개, 고양이, 호랑이, 늑대, 여우, 사자, 치타, 표범, 너구리, 오소리, 퓨마, 재규어 및 삵쾡이), 토끼목(토끼 및 우는 토끼), 식충목(예를 들어, 고슴도치, 두더지 및 솔레노돈) 및 영장목(예를 들어, 침팬지, 오랑우탄, 고릴라, 보노보노,

일본원숭이, 붉은털원숭이)일 수 있다.

[0023] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 함유하는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 담체는 이온 교환 수지, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질, 완충 물질, 물, 염, 전해질, 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0024] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물은 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 구강, 심장내, 골수내, 경막내, 경피, 장관, 피하, 설하 또는 국부 투여용으로 제형화하는 것을 특징으로 할 수 있고, 완충제, 항균성 보존제, 계면활성제, 산화방지제, 긴장성 조정제, 방부제, 증점제 및 점도 개질제로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 보조제를 추가로 함유하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 용액, 현탁액, 에멀젼, 겔 및 분말로 구성된 군에서 선택되는 제형을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0025] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 증상의 경중도, 환자의 체중, 연령, 성, 투여 방식 및 투여시간 등과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정할 수 있다.

[0026] 본 발명에 있어서, 건강기능식품은 건강기능식품에 관한 법률 제6722호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 식품을 의미한다.

[0027] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상적인 건강기능식품의 제형으로 제제화될 수 있고, 과립제, 정제, 환제, 현탁액, 에멀젼, 시럽제, 껌, 차, 젤리, 각종 음료수, 드링크제, 알코올 음료 등으로 제조될 수 있으며, 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한이 없다.

[0028] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 인체를 비롯한 동물 신체에 투여하기 적합한 임의의 생약 형태, 더욱 구체적으로는 경구 투여에 통상적인 임의의 형태, 예를 들어 식품 또는 사료, 식품 또는 사료의 첨가제 및 보조제, 강화된 식품 또는 사료, 정제, 환제, 과립, 캡슐 및 발포 배합물 등과 같은 고체 형태 또는 용액, 현탁액, 유화액, 음료, 페이스트 등과 같은 액체형태 일 수 있고, 영양제, 비타민, 전해질, 감미제, 착색제, 유기산, 방부제 등을 함유할 수 있으며, 이러한 성분들을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0029] 본 발명에 따르면, 상기 펜벤다졸, 옥시벤다졸 또는 이들의 혼합물이 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0030] 본 발명에 따르면, 상기 자궁내막 세포 또는 영양막 세포의 비정상적 증식 관련 질환은 자궁내막 세포 또는 영양막 세포의 비정상적 발달에 의해 유발되는 것이라면 모두 가능하며, 예를 들어 자궁내막 세포의 비정상적 증식 관련 질환은 자궁내막증 또는 자궁내막암일 수 있고, 영양막 세포의 비정상적 증식 관련 질환은 융모막암(choriocarcinoma), 포상기태(hydatidiform mole) 또는 융모선종(villous adenoma)일 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 펜벤다졸, 옥시벤다졸 또는 이들의 혼합물은 영양막 세포 및 자궁 내막 세포주의 세포 활성 억제와 관련된 칼슘이온 변화를 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 펜벤다졸, 옥시벤다졸 또는 이들의 혼합물은 영양막 세포 및 자궁내막 세포주의 미토콘드리아 막 전위 탈분극을 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0033] 본 발명에 있어서, 상기 펜벤다졸은 세포사멸 단백질의 발현 및 염증 유발 유전자의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0034] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0036] 본 발명은 또 다른 관점에서, 펜벤다졸, 옥시벤다졸 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 자궁내막 세포 또는 영양막 세포의 증식, 이주 및 침투 능력을 억제하는 방법에 관한 것이다.

[0037] 본 발명은 또 다른 관점에서, 펜벤다졸, 옥시벤다졸 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 자궁내막 세포 또는 영양막 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법에 관한 것이다.

[0039] [실시예]

[0040] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0042] **실험 방법**

[0043] 세포배양

[0044] 돼지의 자궁 내막 상피 세포주인 pLE 세포와 태아 유래 영양막 세포주인 pTr 세포는 임신돈의 조직에서 분리하여 불멸화과정을 통해 불멸화하여 사용하였다. 세포의 단층배양을 위해서 DMEM/F12 배양 배지에 10%의 소태아혈청(FBS)을 함께 혼합하여 사용하였고, 37℃/5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다.

[0046] 실험 재료

[0047] 후보 조성물질인 펜벤다졸 및 옥시벤다졸은 Sigma로부터 구매하여 사용하였으며, 펜벤다졸 및 옥시벤다졸에 의한 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 phospho-AKT, ERK1/2, P70S6K, P90RSK, S6 단백질 및 total-AKT, ERK1/2, P70S6K, P90RSK, S6 단백질을 Cell Signaling Technology사로부터 구매하였다. 이 외, PCNA 항체는 각각 Santa Cruz Biotechnology 사에서 구매하였다. 또한 타겟 신호전달과정을 억제함에 따른 효과를 규명하기 위하여 PI3K 억제제인 Wortmannin을 Cell Signaling Technology사로부터, ERK1/2 억제제인 U0126과 JNK 억제제인 SP600125를 Enzo Life Science사로부터 구매하여 사용하였다.

[0049] BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석

[0050] 태아 유래 영양막세포와 자궁 내막 상피 세포의 증식 능력에 펜벤다졸 및 옥시벤다졸이 미치는 영향을 확인하기 위하여 FBS 기아 조건으로 배양한 3 × 10^3개의 pLE와 pTr 세포가 포함된 DMEM/F12 배지 100 ㎕를 96 well에 분주하고 펜벤다졸 (0, 10, 50, 100 nM)과 옥시벤다졸을 (0, 10, 50, 100, 200 nM) 용량의존적으로 처리하여 48시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터에서 배양한 다음, BrdU 키트 (Cat No: 1167229001, Roche)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다. 48시간 인큐베이션 후, 10 μM BrdU를 각 well에 추가적으로 넣어 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 2시간 동안 배양하였다. pTr과 pLE 세포에 BrdU를 labeling 하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 상온에서 90분 인큐베이션 시킨 후 3차례 씻어주었다. 마지막으로 100 μl의 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate으로 세포를 반응시키고 ELISA 리더기를 사용하여 370 nm, 492 nm 내 흡광도를 측정하여 세포 증식 능력을 분석하였다.

[0052] 면역형광법

[0053] 3×10^4개의 pTr과 pLE 세포를 각각 10% FBS가 포함된 DMEM/F12 배지 300 μl와 함께 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 24시간 FBS 기아상태로 추가로 배양하여 펜벤다졸은 100 nM을, 옥시벤다졸은 200 nM을 48시간 동안 처리한 뒤 메탄올로 10분간 세포를 고정하고, 2 μg/ml의 PCNA 항체를 처리하였으며 37℃에서 24시간 인큐베이션하였다. 이후, 0.1% BSA (bovine serum albumin)이 포함된 PBS로 2번의 워싱과정을 거쳐 2차 항체로는 goat anti-mouse IgG Alexa 488 (catalog number: A-11001, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 antibody dilution buffer에 1:200으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 배양하였다. pTr과 pLE 세포를 0.1% BSA-PBS로 워싱한 다음 DAPI 염색을 추가적으로 시행하여 두 세포 내 타겟 단백질뿐만 아니라 핵을 동시에 관찰할 수 있도록 하였다. 실험 종료 후 LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영하였다.

[0055] Annexin V 및 propidium iodide 염색을 통한 사멸 세포 분석

[0056] 펜벤다졸 및 옥시벤다졸에 의해 pTr과 pLE 세포에 사멸이 일어난 세포의 수를 확인하기 위하여 fluorescein isothiocyanate (FITC) annexin V apoptosis detection 키트 I (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다. 먼저 2×10^5개의 pTr과 pLE 세포를 6-well plate에 배양한 후 24시간 FBS 기아상태로 추가로 배양하고, 농도의존적으로 펜벤다졸 (0, 10, 50, 100 nM) 및 옥시벤다졸 (0, 50, 100, 200 nM)을 처리하여 48시간 동안 인큐베이션 하였다. 각 농도 별로 상층액을 모으고, 세포를 배양 접시에서 분리한 후 PBS 워싱을 진행하고, 1X binding buffer를 이용하여 세포를 풀어준 다음 FITC annexin V과 propidium iodide (PI)로 염색한 후 어두운 곳에서 15분간 상온에 인큐베이션하였다. 염색된 세포의 형광 발현 정도는 유세포 분석기(BD Biosciences)를 이용하여 분석하였다.

[0058] 세포 주기 분석

[0059] pTr과 pLE 세포를 6-well plate에 배양한 후, 24시간 FBS 기아상태를 거친 후 48시간 동안 농도의존적으로 펜벤다졸 (0, 10, 50, 100 nM) 및 옥시벤다졸 (0, 50, 100, 200 nM)에 노출시켰다. 그 후, 상층액을 포함하여 세포를 모은 후 70% 에탄올을 이용하여 세포를 고정하고 4℃의 환경에서 18시간 이상 인큐베이션 하였다. 다음날, 원심분리를 이용하여 세포를 모아준 후 0.1% BSA-PBS 용액을 이용하여 워싱해준 후 RNase A (Sigma)와 PI를 연속적으로 처리해주어 세포를 염색시켰으며, 염색된 세포의 형광 발현 정도는 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다.

[0061] 세포 내 유리 칼슘 이온의 농도와 미토콘드리아 내 칼슘 이온 농도 분석

[0062] 2×10^5개의 pTr과 pLE 세포를 6-well plate에 배양한 후, 24시간 FBS 기아상태를 거친 후 48시간 동안 농도의존적으로 펜벤다졸 (0, 10, 50, 100 nM) 및 옥시벤다졸 (0, 50, 100, 200 nM)을 처리하였다. 그 후, 상층액을 포함하여 pTr과 pLE 세포를 모아주고 세포 내 유리 칼슘 농도 측정을 위해 3μM fluo-4 AM (Invitrogen) 염색약을 37℃에서 20분간 처리해주고, 마이토콘드리아 내 칼슘 농도 측정을 위해 3μM Rhod-2 염색약을 4℃에서 30분간 처리해주었다. 염색된 세포의 발현 정도는 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다.

[0064] JC-1 이용 미토콘드리아 막 투과성 분석

[0065] 2×10^5개의 pTr과 pLE 세포를 6-well plate에 배양한 후, 24시간 FBS 기아상태를 거친 후 48시간 동안 농도의존적으로 펜벤다졸 (0, 10, 50, 100 nM) 및 옥시벤다졸(0, 50, 100, 200 nM)을 처리하였다. 원심분리를 통하여 세포 상층액과 부착 세포를 모아준 후 200배 농도의 JC-1 염색약을 1배의 염색 희석 버퍼에 녹여 20분간 염색을 진행하였다. 염색된 세포는 JC-1 염색 희석 버퍼로 1회 워싱하고, 최종 1ml의 염색 희석 버퍼에 세포를 풀어주었으며, 형광 발현 정도를 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다.

[0067] 단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)

[0068] pTr과 pLE 세포에 펜벤다졸 및 옥시벤다졸 또는 세포신호전달 억제제와의 혼합물을 처리한 다음 pTr과 pLE 세포로부터 전체 단백질을 추출하여 Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 단백질을 정량하였다. 이후, 추출한 단백질을 95℃에서 5분간 변성하였으며 10% SDS/PAGE 젤을 이용하여 전기영동 수행한 뒤, nitrocellulose membrane으로 옮겨주고, 1차 항체와 2차 항체를 차례로 인큐베이션 시킨 다음 chemiluminescence detection (SuperSignal West Pico, Pierce, Rockford, IL, USA) 시약과 ChemiDoc EQ system과 Quantity One software (Bio-Rad) 기기를 사용하여 타겟 단백질의 발현을 분석하였다.

[0070] 역전사 중합 효소 연쇄 반응

[0071] 배양된 pTr, pLE 세포를 24 시간 FBS 기아 상태로 추가 배양한 후 100nM의 펜벤다졸을 처리해주었다. 펜벤다졸이 처리된 세포는 Trizol reagent를 이용하여 제조사의 매뉴얼 대로 RNA 추출을 진행하였다. 연쇄 반응을 위한 cDNA 합성은 total RNA 1 μg과 AccuPower premix로 합성하였으며, SYBR Green (Sigma)와 StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA)로 각 유전자의 발현을 측정하였다. 실험에 사용된 유전자의 primer set는 Bioneer에서 제조하였다. 타겟 유전자의 발현은 CT값으로 계산하였고, 각 조건의 GAPDH 발현으로 정량 분석하였다. 실험에 진행한 PCR 조건은 95℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 30초 조건을 40회 증폭하였다.

[0073] 통계분석

[0074] 본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

[0076] **결과 및 고찰**

[0077] 펜벤다졸 및 옥시벤다졸이 임신돈 태아 유래 영양막세포와 자궁 내막 상피 세포에 미치는 영향 확인

[0078] 펜벤다졸 및 옥시벤다졸이 태아 유래 영양막 세포 pTr과 자궁내막 상피세포 pLE 세포에 미치는 영향을 확인하기 위하여 펜벤다졸 (0, 10, 50 and 100 nM) 및 옥시벤다졸 (0, 10, 50, 100 and 200 nM)을 용량의존적으로 첨가한 성장배지에 48시간 배양하였으며 이후, BrdU를 사용하여 세포 증식 효과를 측정하였다. 그 결과 적은 농도의 펜벤다졸 0, 10, 50, 100 nM 및 옥시벤다졸 0, 10, 50, 100, 200 nM에 반응하여 pTr과 pLE 세포의 증식 능력이 단계적으로 감소하였다. 펜벤다졸 100 nM 처리 결과 pTr 세포는 대조군에 비해 60% ($p < 0.001$), pLE 세포는 55.5% ($p < 0.001$) 감소하였고, 옥시벤다졸 200 nM 처리 결과 대조군에 비해 pTr 세포는 46 % ($p < 0.001$), pLE 세포는 47% ($p < 0.001$)의 증식능력 유지를 보였다. (도 1a-b). 뿐만 아니라, 100 nM의 펜벤다졸 및 200 nM 옥시벤다졸을 사용하여 면역형광기법을 바탕으로 pTr, pLE 세포의 증식 마커인 PCNA를 세포 염색한 결과, 대조군의 pTr과 pLE 세포주 내에서는 PCNA가 각각 세포의 핵 내에 과다발현을 이루고 있는 것을 확인하였지만 펜벤다졸을 노출시킴에 따라 pTr 세포는 10% ($p < 0.001$), pLE 세포는 24% ($p < 0.01$)의 발현 양상을 보였고, 옥시벤다졸 노출 시에는 pTr 세포가 27% ($p < 0.01$), pLE 세포는 35% ($p < 0.01$)까지 PCNA의 발현이 약화되는 것을 확인할 수 있었다 (도 1c-d). 이를 통해 펜벤다졸 또는 옥시벤다졸이 영양막 세포와 자궁내막 상피세포의 증식력을 유의적으로 감소시킬 수 있음을 확인하였다.

[0080] 펜벤다졸 및 옥시벤다졸 처리에 대한 반응으로 유발되는 pTr 과 pLE 세포 사멸 확인 및 세포 주기 억제 검증

[0081] 이전 실험의 결과를 바탕으로 100 nM의 펜벤다졸 및 200 nM 옥시벤다졸을 pTr, pLE 세포에 처리하였을 때 DNA 분절화가 발생하였고, 이것이 세포 사멸로 이어짐을 확인하기 위해 펜벤다졸 (0, 20, 50, 100 nM) 및 옥시벤다졸 (0, 50, 100, 200 nM)을 용량의존적으로 pTr, pLE 세포에 처리하여 48시간 인큐베이션 시킨 후 Annexin V 및 propidium iodide으로 염색하고, 유세포 분석기를 이용하여 사멸한 세포의 수를 측정하였다 (도 2a-b). 측정 결과, 펜벤다졸 처리 후 pTr 세포에서는 최적 농도인 100 nM에서 160% ($p < 0.01$)까지 세포 사멸이 증가하였고, pLE 세포에서는 50 nM 처리부터 유의적으로 세포 사멸이 증가하여 100 nM에서는 150% ($p < 0.05$)까지 증가된 세포 사멸 양상을 보였다. 옥시벤다졸의 경우 200 nM 농도 처리 시 pTr 세포에서는 212% ($p < 0.001$) 까지, pLE 세포에서는 240% ($p < 0.001$) 까지 세포 사멸이 증가하여 펜벤다졸 및 옥시벤다졸이 용량의존적으로 pTr, pLE 세포의 후기 세포 사멸을 촉진하는 것으로 확인되었다. 이를 뒷받침하기 위하여 세포 주기 변화를 추가로 측정하였고, 펜벤다졸에 대한 노출은 pTr 세포에서 100 nM 처리 시 1%의 비율을 나타낸 대조군에서 6% ($p < 0.001$)까지 sub-G1기 억류가 증가함을 확인하였고, pLE 세포에서는 용량의존적인 결과를 보였으며 sub-G1기가 1% 비율의 대조군에서 20 nM 1.6% ($p < 0.05$), 50 nM 2.1% ($p < 0.01$), 100 nM 8.1% ($p < 0.001$)으로 증가 양상을 보이는 것을 통해 펜벤다졸 및 옥시벤다졸에 대한 용량의존적인 노출은 pTr, pLE 세포주기의 억제를 유도하며 세포 사멸을 일으키는 것을 확인하였다 (도 2c-d). 이러한 결과들을 통해 펜벤다졸 또는 옥시벤다졸이 영양막 세포와 자궁내막 상피세포의 사멸을 유도하고 세포 주기를 조절할 수 있음을 확인하였다.

[0083] 옥시벤다졸 처리에 따른 영양막세포, 자궁 내막 상피 세포 내의 미토콘드리아 막 투과성 변화 확인

[0084] 전술한 옥시벤다졸의 세포 사멸 효과가 pTr, pLE 세포의 미토콘드리아 막 투과성 변화에 의존적으로 발생하는지 확인하기 위해 미토콘드리아 염색 키트를 이용하였다. 옥시벤다졸 0, 50, 100, 200 nM 처리 시 pTr 세포에서는 대조군에 비해 2.2%, 2.9% ($p < 0.01$), 6.2% ($p < 0.001$)의 미토콘드리아 막 투과성 붕괴가 일어났고, pLE 세포에서는 대조군에 비해 2.1%, 3.0% ($p < 0.001$), 5.1% ($p < 0.001$)의 미토콘드리아 막 투과성 감소를 확인하였다. 이를 통해 옥시벤다졸 처리가 미토콘드리아 막에 손상을 일으키며, 이에 따라 효과적인 세포 사멸 효과를 발휘한다는 것을 확인하였다 (도 3).

[0086] 펜벤다졸 처리에 따른 태아 유래 영양막세포, 자궁 내막 상피 세포 내의 미토콘드리아 막 투과성 변화 확인 및 세포 사멸 관여 단백질 발현 및 염증 유발 인자 활성화 검증

[0087] 전술한 펜벤다졸의 세포 사멸 효과가 pTr, pLE 세포의 미토콘드리아 막 투과성 변화에 의존적으로 발생하는지 확인하기 위해 미토콘드리아 염색 키트를 이용하였다. 펜벤다졸 0, 20, 50, 100 nM 처리 시 pTr 세포에서는 대조군에 비해 4.5%, 6.5% ($p < 0.05$), 10.3% ($p < 0.001$)의 미토콘드리아 막 투과성 감소가 일어났고, pLE 세포에서는 대조군에 비해 4.7%, 7.3% ($p < 0.01$), 16.8% ($p < 0.001$)의 미토콘드리아 막 투과성 붕괴 현상이 관찰되었다. 이를 통해 펜벤다졸 처리가 미토콘드리아 막에 손상을 일으키며, 이에 따라 효과적인 세포 사멸 효과를 발휘한다는 것을 확인하였다 (도 4a-b). 이러한 세포 사멸에 관여하는 단백질의 활성화 패턴을 확인하기 위하여 0, 20, 50, 100 nM의 농도의존적으로 펜벤다졸에 노출된 pTr과 pLE 세포에서 단백질을 추출하여 관련 항체를 이용하여 활성화 유무를 확인하였다. 대표적인 세포 사멸의 억제에 관여하는 단백질인 Bcl-Xl, p-Bcl-2의 발현이 pTr과 pLE 세포에서 모두 유의적으로 감소하였고, 세포 사멸 활성화에 관여하는 단백질인 Cytochrome c, Cleaved caspase 9, Cleaved caspase 3가 100 nM의 펜벤다졸 노출의 결과 모두 유의적으로 증가하였다. 이를 통해 펜벤다졸에 의한 세포 사멸에는 다양한 단백질의 발현 유무가 관여하고 있음을 확인하였다. (도 4C-D).

[0088] 추가적으로, 펜벤다졸에 대한 노출이 염증을 유발하여 궁극적으로 세포 사멸로 이어지게 하는지 여부를 확인하기 위해, 염증 유발 관련 유전자의 발현 활성화를 확인하였고, 100 nM의 펜벤다졸에 노출 시 pTr, pLE 세포 모두에서 대표적인 염증 관련 유전자인 *IL-1β*의 활성화를 비롯하여 세포 내에서 염증 유발 시 활성화되는 다양한 유전자들 중 *IL1R1, SMAD2, SMAD4, TNF, FAS* 유전자들의 발현이 증가됨을 확인하였다 (도 4e).

[0090] 펜벤다졸 및 옥시벤다졸의 용량의존적 투여에 따른 영양막세포와 자궁 내막 상피 세포 내 칼슘 항상성 변화 확인

[0091] 펜벤다졸 및 옥시벤다졸 처리에 의한 세포 내 이온 항상성 불균형을 초래하는지 여부를 확인하기 위하여 세포질 내 칼슘 이온을 염색하는 Fluo-4 AM과 미토콘드리아 내 칼슘 이온을 염색하는 Rhod-2 염색약을 활용하여 이온 항상성 변화를 확인하였다. 0, 20, 50, 100 nM을 처리한 펜벤다졸의 경우 pTr 세포에서 세포질 내 칼슘 이온이 대조군 100% 에 비해 146% ($p < 0.01$)으로 상승한 결과를 보였고, pLE 세포의 경우 142% ($p < 0.01$) 까지 상승한 결과를 보였다. 이를 통해 펜벤다졸에 노출된 태아 유래 영양막 세포와 자궁내막 상피세포는 증식이 활발하게 억제됨을 확인하였다 (도 5A). 옥시벤다졸의 처리 또한, pTr과 pLE 세포에서 세포질 내 칼슘 이온의 농도를 증가시켰으며 0, 50, 100, 200 nM 농도의존적인 처리 조건 하에 각각 대조군 (100%)과 비교하여 pTr 세포에서는 110%, 160% ($p < 0.01$), 250% ($p < 0.01$) 증가하였고, pLE 세포에서는 110%, 115%, 141% ($p < 0.05$) 증가하였다 (도 5b). 뿐만 아니라 미토콘드리아 내 칼슘 이온의 농도 증가를 초래함으로써 pTr 세포에서는 대조군 (100%)과 비교했을 때 50, 100, 200 nM에서 163% ($p < 0.01$), 208% ($p < 0.05$), 367% ($p < 0.001$)까지 증가하였고, pLE 세포에서는 동일한 농도조건으로 처리하였을 때 128%, 207% ($p < 0.001$), 223% ($p < 0.001$) 이온 농도 증가를 보였다 (도 5c). 이로써 pTr, pLE 세포에서 세포 활성에 관여하는 이온의 항상성 붕괴를 유도하여 미토콘드리아 막 변화와 세포 사멸을 유도하였음을 확인하였다.

[0093] 태아 유래 영양막세포 및 자궁 내막 상피 세포의 펜벤다졸 용량의존적 투여에 따른 세포 내 신호전달기전 변화 양상 분석 및 동일 세포 신호전달물질의 억제제 병용 처리에 따른 인산화 패턴 상호작용 영향 확인

[0094] 펜벤다졸에 의한 PI3K/AKT, MAPK 신호전달메커니즘 조절양상을 확인하기 위하여 웨스턴 블롯을 통해 펜벤다졸의 용량의존적(0, 20, 50, 100 nM) 투여에 따른 타겟 신호전달분자의 인산화 양상을 분석하였다.

[0095] 분석 결과, pTr 세포에서는 펜벤다졸에 의해 AKT, P70S6K, GSK3β, P90RSK의 인산화가 증가하고 ERK1/2, JNK,

S6의 인산화는 용량의존적으로 감소하였다. 또한, Wortmannin (PI3키나아제 억제제), U0126 (ERK1/2 억제제), SP600125 (JNK 억제제) 혼합물 처리시 pTr 세포에서 각 억제제 처리에 따라 감소 경향을 보였던 ERK1/2, JNK, S6의 경우 인산화가 더 감소하는 양상을 보였고, 증가 양상을 보였던 AKT, GSK3β, P70S6K, P90RSK 단백질 또한 인산화 패턴이 감소하는 양상을 보임을 확인하였다 (도 6a). 이를 통해 펜벤다졸에 노출되면 pTr 세포의 정상 세포 활성 신호전달기전이 관련 단백질들의 인산화 패턴 변화로 인하여 ROS 생성, 세포 주기 억제와 같은 세포 사멸 메커니즘으로 이어질 수 있음을 확인하였다.

[0096] pLE 세포의 경우에는 펜벤다졸의 용량의존적(0, 20, 50, 100 nM) 투여에 따라 AKT, ERK1/2, JNK, P70S6K, GSK3β, PS6의 인산화는 증가 양상을 보였지만 P90RSK의 경우 유일하게 감소하는 양상이 확인되었다. 추가적으로 Wortmannin, U0126, SP600125 혼합물 처리시 pLE 세포에서 신호전달 체계의 상위 조절 인자인 AKT, ERK1/2 및 JNK 단백질의 인산화는 각 억제제에 반응하여 인산화 패턴이 확연히 감소하는 경향을 보였고, 하위 신호전달물질로 기능하는 GSK3β, P70S6K, P90RSK, S6 단백질의 경우 상위 신호전달물질의 억제제와 병용처리 시 발현 양상이 확연히 감소하거나 역으로 증가하는 양상이 확인되었다 (도 6b). 이를 통해 pLE 세포 또한 펜벤다졸에 노출되면 정상 세포 활성 신호전달기전과 관련된 단백질들의 인산화 패턴 변화 및 상호작용 양상을 변화시켜 세포 사멸 기전으로 이어질 수 있음을 확인하였다.

[0098] 옥시벤다졸의 용량의존적 투여에 따른 영양막세포 및 자궁 내막 상피 세포 내 신호전달 기전 변화 분석과 이를 기반으로 하여 신호전달기전 억제제 병용 처리 시 인산화 패턴 상호작용에 미치는 영향 확인

[0099] 태아 유래 영양막 세포 및 자궁내막 상피세포 내 옥시벤다졸에 의한 PI3K/AKT, MAPK 신호전달 메커니즘 조절양상을 확인하기 위하여 웨스턴 블롯을 통해 옥시벤다졸의 용량의존적(0, 50, 100, 200 nM) 투여에 따른 타겟 신호전달분자의 인산화 양상을 분석하였다.

[0100] pTr 세포의 경우 옥시벤다졸에 의해 AKT, P70S6K, JNK의 인산화가 증가되고 ERK1/2 MAP키나아제, P90RSK, S6의 인산화는 용량의존적으로 감소하였으며, pLE 세포의 경우에는 옥시벤다졸에 의해 AKT, P70S6K, JNK, ERK1/2 MAP키나아제, S6, P90RSK 인산화가 용량의존적으로 감소되는 것으로 나타났다 (도 7a). 대조군과 비교하여 보았을 때 옥시벤다졸의 처리에 의해 나타나는 여러 신호전달기전 단백질들의 다양한 인산화 패턴 변화는 정상 세포 활성에 관여하는 인자들을 조절하여 세포 사멸로 이어질 수 있음을 나타냈다.

[0101] 선행 결과를 바탕으로 신호전달기전 억제제와 옥시벤다졸의 연관성 및 이에 따른 pTr과 pLE 세포의 세포 내 인산화 패턴 변화 양상을 확인하기 위하여 옥시벤다졸과 각각의 억제제를 단독 또는 병행 처리하여 기존에 확인한 세포 증식 억제 효과에 미치는 영향과 세포신호전달물질의 인산화 변화를 분석하였다 (도 7b). Wortmannin (PI3키나아제 억제제), U0126 (ERK1/2 억제제), SP600125 (JNK 억제제)를 병용하여 처리하였을 때 단독 처리 효과와 비교시 pTr 세포에서는 옥시벤다졸 단독 처리 시 48% ($p < 0.001$) 까지 감소한 세포 증식 능력이 Wortmannin과의 병행 처리 시 39% ($p < 0.05$) 까지 감소하였고, U0126과의 병행 처리는 19% ($p < 0.001$) 까지, SP600125와의 병행 처리는 26% ($p < 0.001$) 까지 세포 증식을 감소시켰다. pLE 세포에서는 옥시벤다졸 단독 처리 시 48% 까지 감소한 세포 증식 능력이 Wortmannin과의 병행 처리 시 44% ($p < 0.001$) 까지 감소하였고, U0126과의 병행 처리는 27% ($p < 0.01$) 까지, SP600125와의 병행 처리는 35% ($p < 0.05$) 까지 세포 증식을 감소시켰다. 이로써 세포 활성과 관련된 신호전달인자의 억제제와 옥시벤다졸의 병행 처리를 통해 pTr과 pLE 세포에서 추가적인 세포 증식 억제가 확인되었다.

[0102] 인산화 패턴 변화 분석과 관련하여서는 pTr 세포의 경우 옥시벤다졸 단독 처리에 의해 증가된 AKT, P70S6K, JNK의 인산화 패턴은 각각의 억제제인 Wortmannin, SP600125 와의 병용 처리 시 더욱 인산화가 억제되는 양상을 나타내었다. 반면, 감소되었던 세포 신호 전달 물질인 ERK1/2, P90RSK, S6의 인산화는 관련 억제제인 U0126, PI3키나아제 억제제 병용처리에 따라 감소된 인산화 패턴을 보여주었다. 또한, 옥시벤다졸의 단독 처리 시 전체적인 인산화 감소 양상을 보였던 pLE 세포의 경우 관련 신호전달물질에 대한 억제제를 병용 처리한 경우 더욱 인산화가 감소되는 양상을 나타내었다. 옥시벤다졸로 인하여 인산화 패턴이 변화한 세포 활성 관련 인자들의 억제제를 처리하고, 그에 따라 변화하는 단백질의 인산화 정도를 분석하는 것은 옥시벤다졸로 인하여 유도되는 각 신호전달 인자들 간의 상호작용을 나타내주고, 어떤 인자들이 상,하위 조절자로 작용하는지 확인함으로써 옥시벤다졸의 세포 사멸 메커니즘으로 이어지는 경로 분석이 가능하게 하였다.

[0104] 옥시벤다졸과 펜벤다졸의 병용처리에 따른 영양막세포 및 자궁 내막 상피 세포의 세포 증식 억제와 세포 사멸

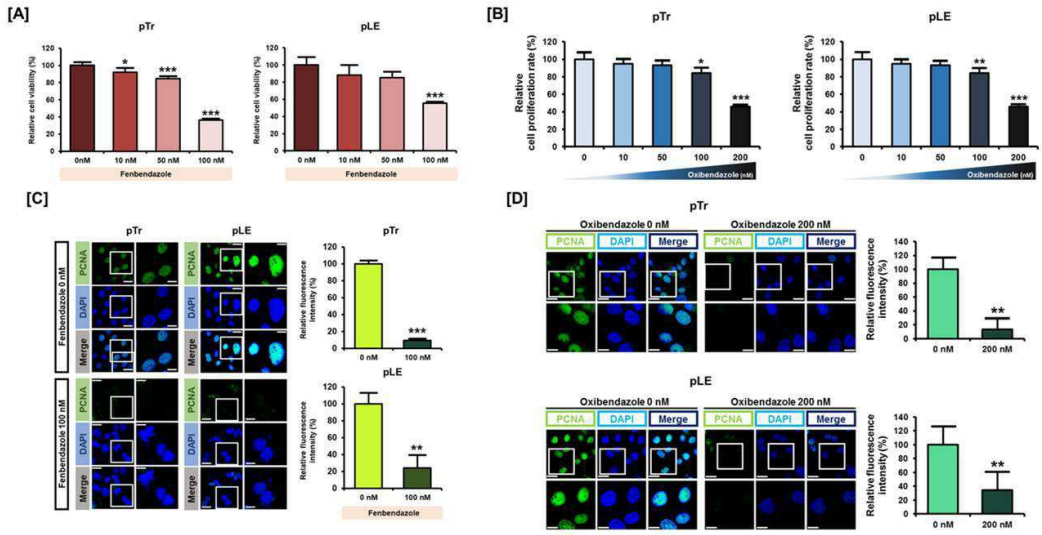
효과 증진

[0105] 옥시벤다졸과 펜벤다졸의 세포 증식 억제 및 세포 사멸 향상 효과가 이들의 병용 처리 시 상승 효과를 나타내는지 여부를 확인하기 위하여 pTr과 pLE 세포에서 약 50%의 세포 증식 감소효과를 나타낸 농도인 100 nM의 펜벤다졸과 200 nM의 옥시벤다졸을 각각의 세포에 병용 처리한 후 48시간 인큐베이션 하였다. 단독 처리 효과와 비교해보았을 때 펜벤다졸과 옥시벤다졸의 병용처리는 pTr 세포의 경우 단독 처리 시 각각 45% ($p < 0.001$)정도 감소된 세포 증식을 20% ($p < 0.001$) 까지 감소시켰고, pLE 세포의 경우 단독 처리 시 각각 49% ($p < 0.001$), 56% ($p < 0.001$) 감소시킨 세포 증식을 19% ($p < 0.001$) 까지 더욱 효과적으로 감소시켰다 (도 8a-b). 또한, 옥시벤다졸과 펜벤다졸의 병용처리 효과가 세포 사멸 증진에도 나타나는지 확인하기 위하여 48시간 동안 옥시벤다졸과 펜벤다졸을 pLE와 pTr 세포에 단독처리 및 병용처리를 하여 Annexin V 및 propidium iodide으로 염색한 후 유세포 분석기를 이용하여 사멸한 세포의 수를 측정하여 효과를 비교한 결과, 옥시벤다졸과 펜벤다졸의 병용처리는 pTr 세포에서 초기 세포 사멸을 1176% ($p < 0.001$) 까지 증가시켰고, 이어진 후기 세포 사멸 또한 516% ($p < 0.001$) 증가시켰으며, pLE 세포에서도 초기 세포 사멸을 950% ($p < 0.001$) 증가시켰고, 후기 세포 사멸은 221% ($p < 0.001$) 증가시킴으로써 초기 및 후기 세포 사멸을 효과적으로 증가시키는 것을 확인하였으며, 특히 pLE와 pTr 세포 모두에서 초기 세포 사멸이 유의미하게 증가하는 양상을 나타냄을 확인하였다 (도 8c-d).

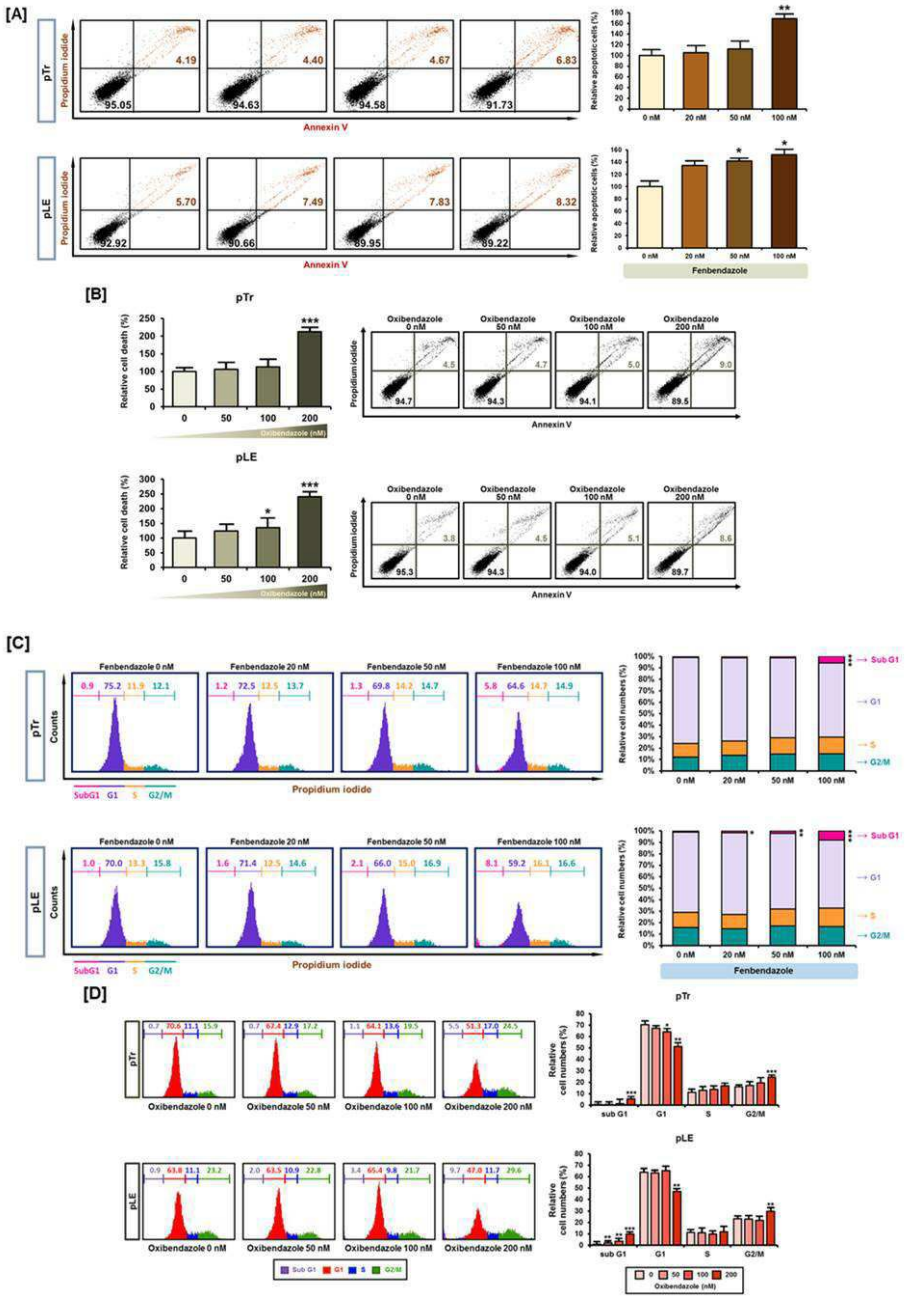
[0107] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

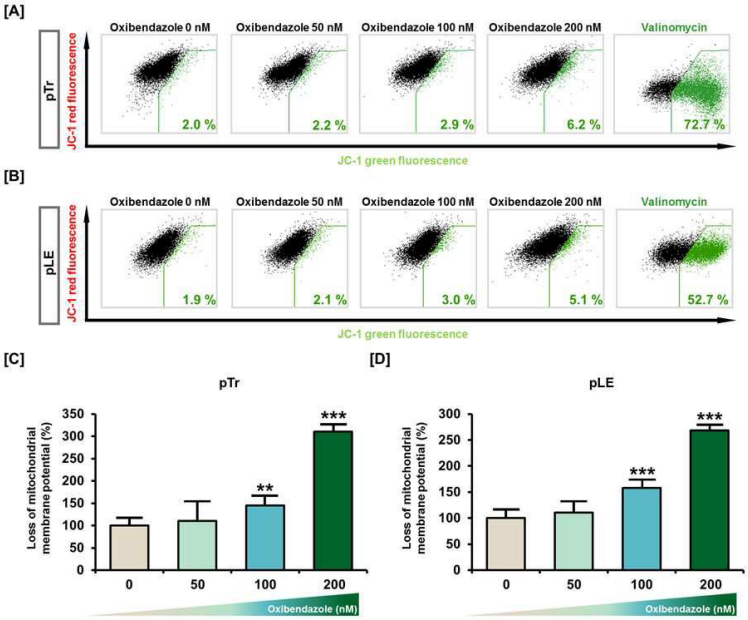
도면1



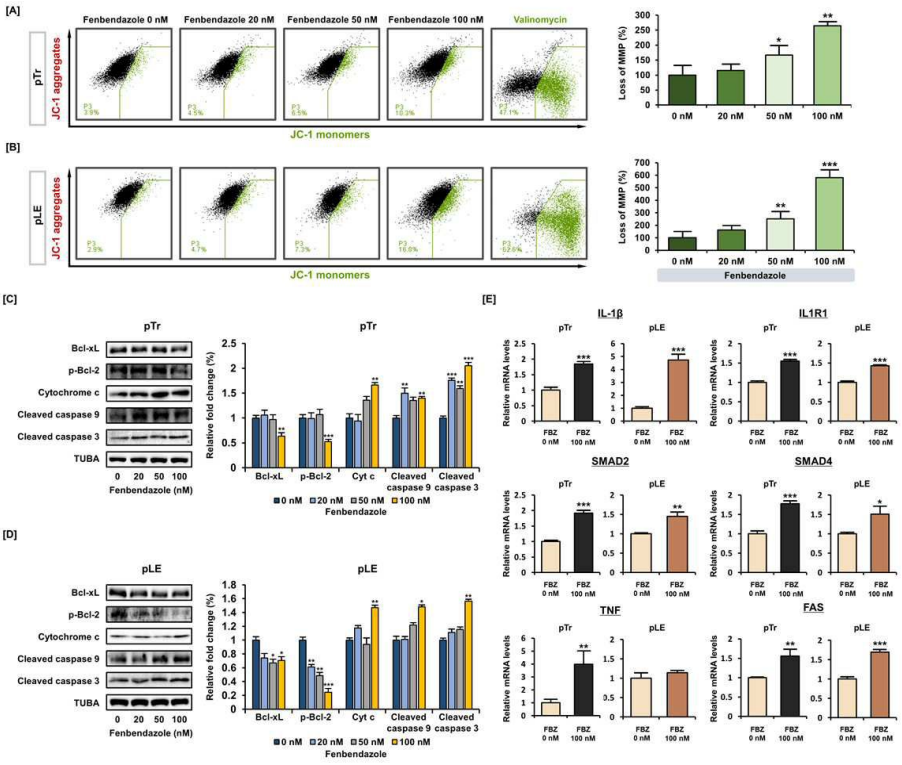
도면2


[A]
pTr
pLE
Propidium iodide
Annexin V
4.19
4.40
4.67
6.83
95.05
94.63
94.58
91.73
5.70
7.49
7.83
8.32
92.92
90.66
89.95
89.22
Relative apoptotic cells (%)
0 nM
20 nM
50 nM
100 nM
Fenbendazole
[B]
pTr
pLE
Relative cell death (%)
Oxibendazole (nM)
Oxibendazole 0 nM
Oxibendazole 50 nM
Oxibendazole 100 nM
Oxibendazole 200 nM
[C]
Fenbendazole 0 nM
Fenbendazole 20 nM
Fenbendazole 50 nM
Fenbendazole 100 nM
Counts
Propidium iodide
SubG1
G1
S
G2/M
Relative cell numbers (%)
Fenbendazole
[D]
Oxibendazole 0 nM
Oxibendazole 50 nM
Oxibendazole 100 nM
Oxibendazole 200 nM
sub G1
G1
S
G2/M

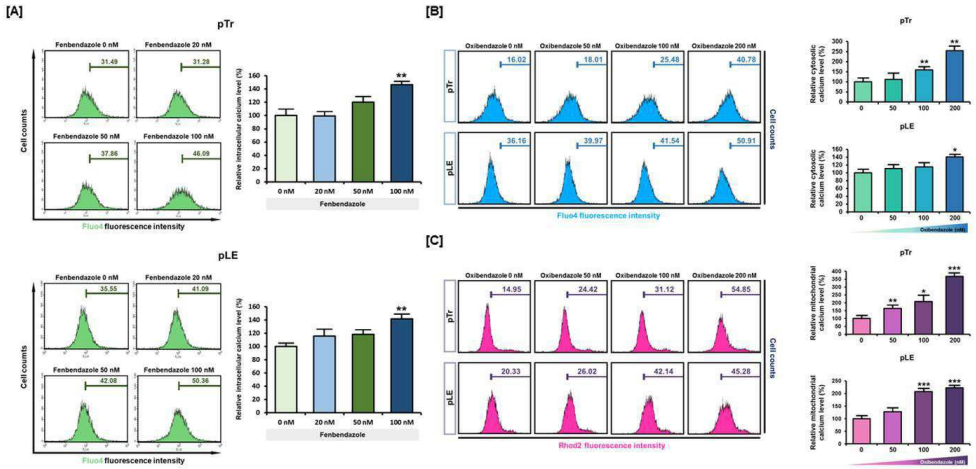
도면3


[A]
Oxibendazole 0 nM
Oxibendazole 50 nM
Oxibendazole 100 nM
Oxibendazole 200 nM
Valinomycin
pTr
JC-1 red fluorescence
2.0 %
2.2 %
2.9 %
6.2 %
72.7 %
JC-1 green fluorescence
[B]
pLE
1.9 %
2.1 %
3.0 %
5.1 %
52.7 %
[C]
pTr
Loss of mitochondrial membrane potential (%)
Oxibendazole (nM)
[D]
pLE

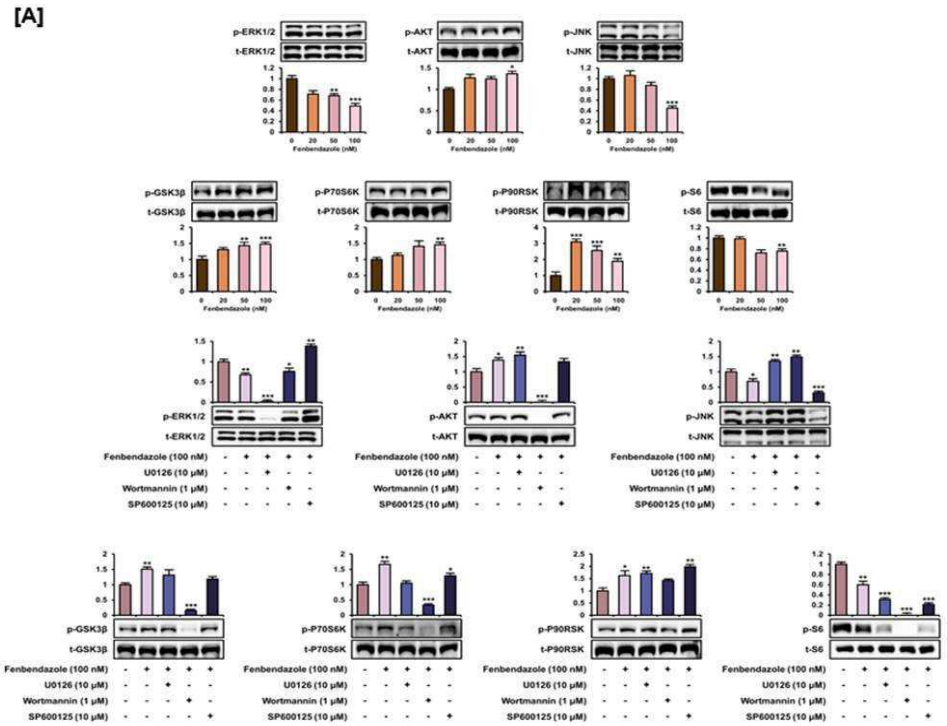
도면4


[A]
Fenbendazole 0 nM
Fenbendazole 20 nM
Fenbendazole 50 nM
Fenbendazole 100 nM
Valinomycin
pTr
JC-1 aggregates
JC-1 monomers
Loss of MMP (%)
[B]
pLE
Fenbendazole
[C]
Bcl-xL
p-Bcl-2
Cytochrome c
Cleaved caspase 9
Cleaved caspase 3
TUBA
Fenbendazole (nM)
Relative fold change (%)
Cyt c
Cleaved caspase 9
Cleaved caspase 3
[D]
[E]
IL-1β
IL1R1
SMAD2
SMAD4
TNF
FAS
Relative mRNA levels
FBZ 0 nM
FBZ 100 nM

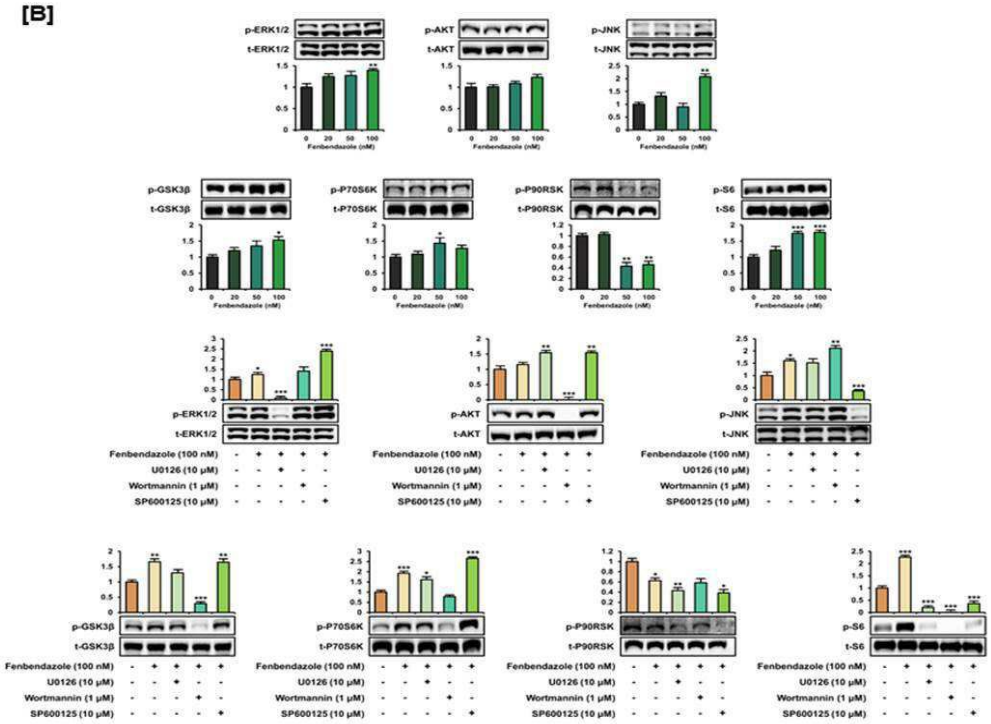
도면5


[A]
pTr
Fenbendazole 0 nM
Fenbendazole 20 nM
Fenbendazole 50 nM
Fenbendazole 100 nM
31.49
31.28
37.86
46.09
Cell counts
Fluo4 fluorescence intensity
Relative intracellular calcium level (%)
0 nM
20 nM
50 nM
100 nM
Fenbendazole
pLE
35.55
41.09
42.08
50.36
[B]
Oxibendazole 0 nM
Oxibendazole 50 nM
Oxibendazole 100 nM
Oxibendazole 200 nM
16.02
18.01
25.48
40.78
36.16
39.97
41.54
50.91
Relative cytosolic calcium level (%)
[C]
14.95
24.42
31.12
54.85
20.33
26.02
42.14
45.28
Rhod2 fluorescence intensity
Relative mitochondrial calcium level (%)

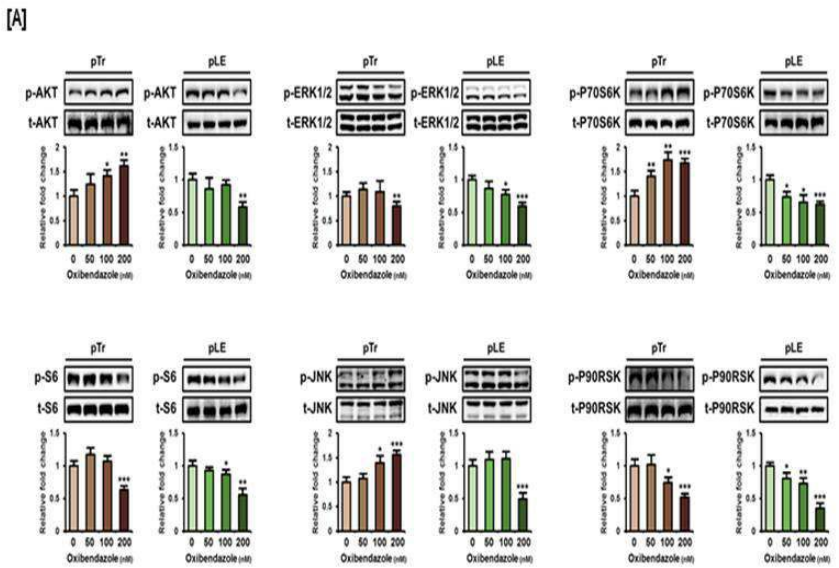
도면6a


[A]
p-ERK1/2
t-ERK1/2
p-AKT
t-AKT
p-JNK
t-JNK
p-GSK3β
t-GSK3β
p-P70S6K
t-P70S6K
p-P90RSK
t-P90RSK
p-S6
t-S6
Fenbendazole (nM)
Fenbendazole (100 nM)
U0126 (10 μM)
Wortmannin (1 μM)
SP600125 (10 μM)

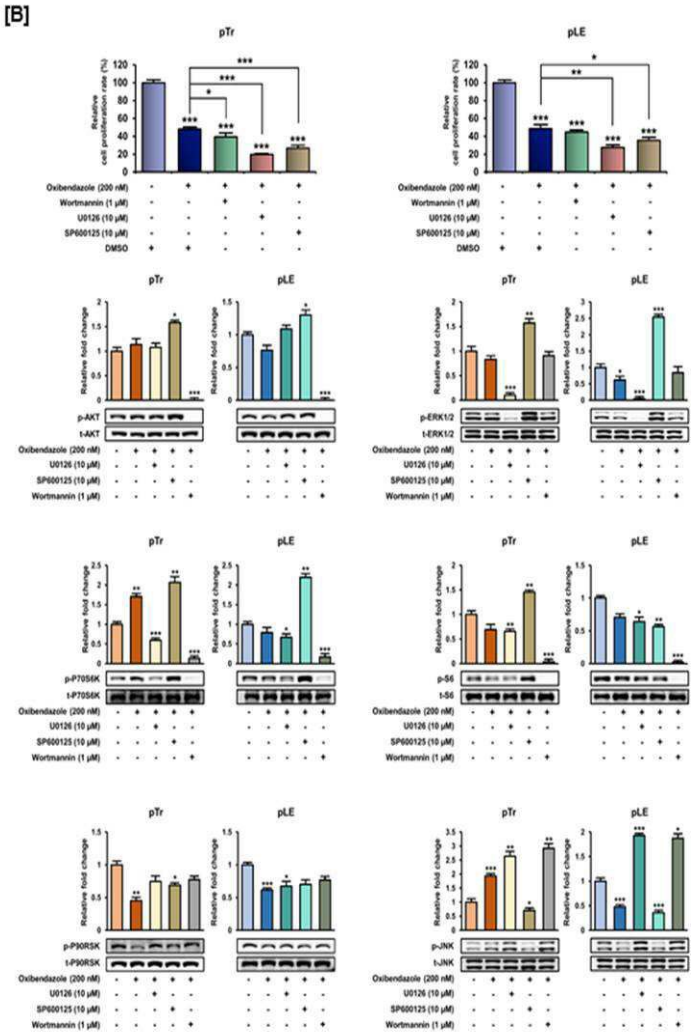
도면6b


[B]
p-ERK1/2
t-ERK1/2
p-AKT
t-AKT
p-JNK
t-JNK
p-GSK3β
t-GSK3β
p-P70S6K
t-P70S6K
p-P90RSK
t-P90RSK
p-S6
t-S6
Fenbendazole (nM)
Fenbendazole (100 nM)
U0126 (10 μM)
Wortmannin (1 μM)
SP600125 (10 μM)

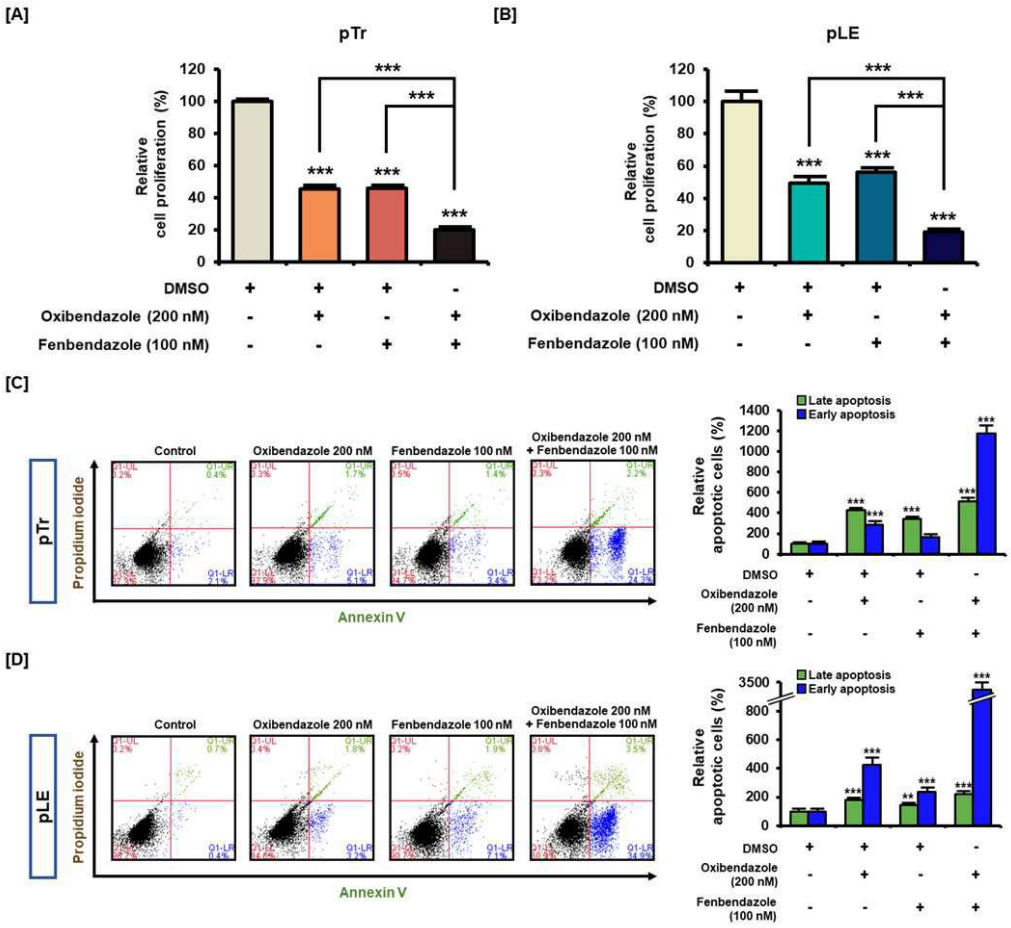
도면7a


[A]
pTr
pLE
p-AKT
t-AKT
p-ERK1/2
t-ERK1/2
p-P70S6K
t-P70S6K
p-S6
t-S6
p-JNK
t-JNK
p-P90RSK
t-P90RSK
Relative fold change
Oxibendazole (nM)

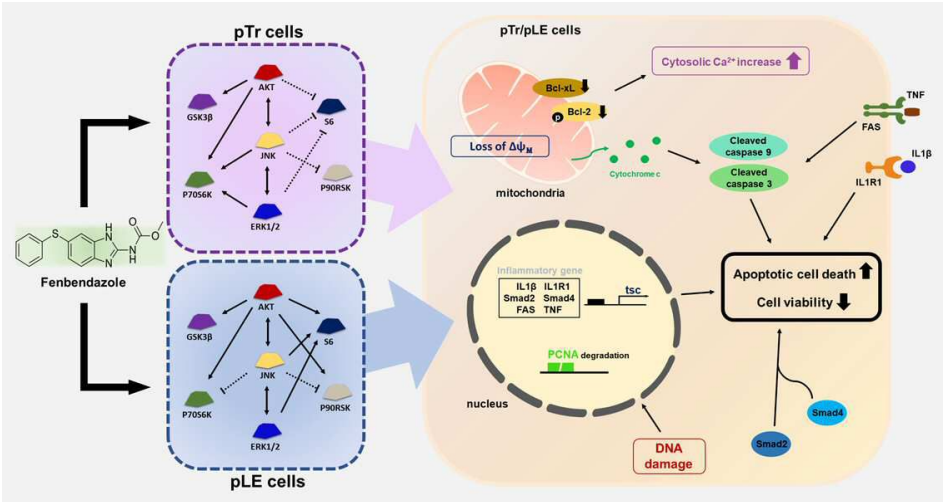
도면7b


[B]
pTr
pLE
Relative cell proliferation rate (%)
Oxibendazole (200 nM)
Wortmannin (1 μM)
U0126 (10 μM)
SP600125 (10 μM)
DMSO
Relative fold change
p-AKT
t-AKT
p-ERK1/2
t-ERK1/2
p-P70S6K
t-P70S6K
p-S6
t-S6
p-P90RSK
t-P90RSK
p-JNK
t-JNK

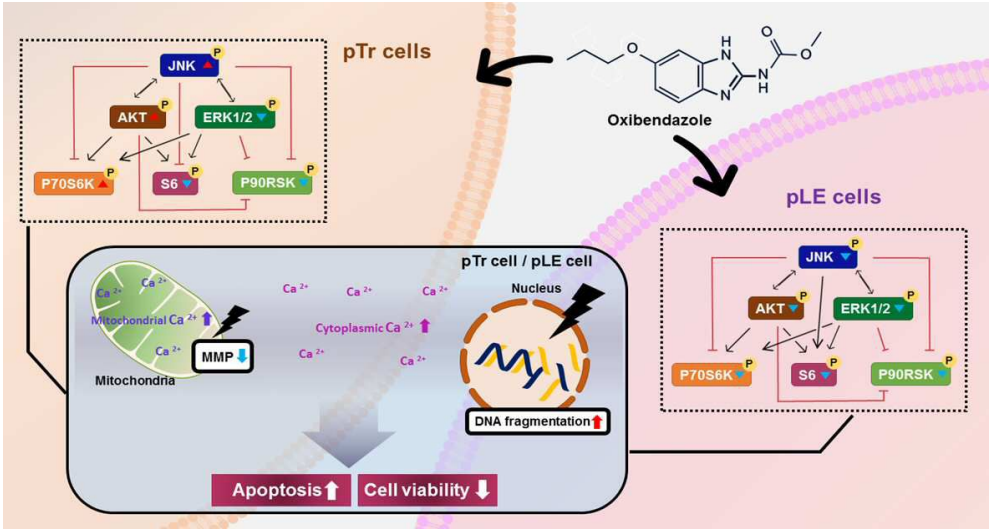
도면8


[A]
pTr
Relative cell proliferation (%)
DMSO
Oxibendazole (200 nM)
Fenbendazole (100 nM)
[B]
pLE
Relative cell proliferation (%)
DMSO
Oxibendazole (200 nM)
Fenbendazole (100 nM)
[C]
pTr
Propidium iodide
Annexin V
Control
Oxibendazole 200 nM
Fenbendazole 100 nM
Oxibendazole 200 nM + Fenbendazole 100 nM
Late apoptosis
Early apoptosis
Relative apoptotic cells (%)
[D]
pLE
Propidium iodide
Annexin V
Control
Oxibendazole 200 nM
Fenbendazole 100 nM
Oxibendazole 200 nM + Fenbendazole 100 nM
Late apoptosis
Early apoptosis
Relative apoptotic cells (%)

도면9


pTr cells
pLE cells
pTr/pLE cells
AKT
GSK3β
S6
JNK
P70S6K
P90RSK
ERK1/2
Fenbendazole
Cytosolic Ca2+ increase
Bcl-xL
Bcl-2
Loss of ΔψM
Cytochrome c
mitochondria
Cleaved caspase 9
Cleaved caspase 3
TNF
FAS
IL1β
IL1R1
Inflammatory gene
IL1β IL1R1
Smad2 Smad4
FAS TNF
tsc
PCNA degradation
nucleus
Apoptotic cell death
Cell viability
Smad4
Smad2
DNA damage

도면10


pTr cells
JNK
AKT
ERK1/2
P70S6K
S6
P90RSK
Oxibendazole
pLE cells
pTr cell / pLE cell
Nucleus
Mitochondrial Ca 2+
Mitochondria
MMP
Cytoplasmic Ca 2+
DNA fragmentation
Apoptosis
Cell viability