(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0138964
(43) 공개일자 2019년12월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/235 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61P 15/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/235 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0065355
(22) 출원일자 2018년06월07일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
가톨릭관동대학교산학협력단
강원도 강릉시 범일로579번길 24(내곡동, 가톨릭관동대학교)
(72) 발명자
송권화
충청남도 천안시 동남구 문암1길 68, 105동 1402호
임화선
서울특별시 영등포구 63로 45, 9동 6층 61호
양창원
광주광역시 북구 설죽로 585, 104동 504호
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 7 항

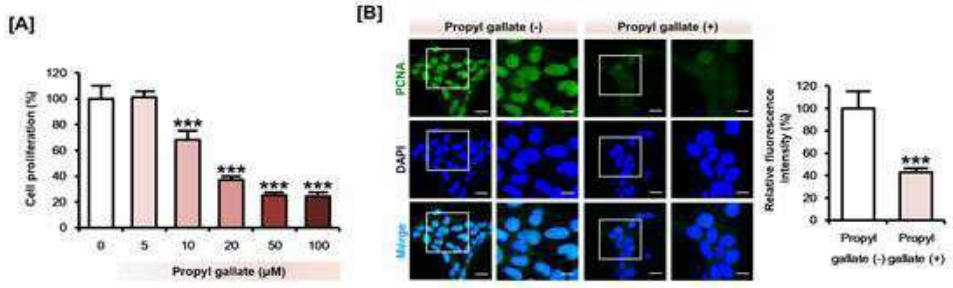
(54) 발명의 명칭 **프로필 갈레이트를 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 조성물은 임신 초기 모체의 자궁내막으로 침투하는 영양막 세포 내 PI3K/AKT, MAPK 신호전달메커니즘을 조절하는 하위 신호전달물질의 인산화를 억제함으로써 영양막 세포의 증식 및 침투성을 억제하고 세포 사멸 효과를 향상시키는 효과가 있는바, 영양막 세포의 비정상적 발달에 의해 발병하는 임신성 영양막 질환을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 15/02 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI15C0810010016
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 보건의료연구개발사업
연구과제명 염증성 조산 치료를 위한 태아 유래 중간엽 줄기세포 치료제 효과 검증
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2017.09.07 ~ 2018.09.06

명 세 서

청구범위

청구항 1

프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 프로필 갈레이트가 PI3K/AKT 및 ERK1/2 MAPK 신호전달기전을 억제하는 것을 특징으로 하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

PI3K/AKT 또는 ERK1/2 MAPK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 임신성 영양막 질환은 융모막암(choriocarcinoma), 포상기태(hydatidiform mole) 및 융모선종(villous adenoma)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제1항에 따른 임신성 영양막 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 이용하여 영양막 세포의 증식, 이주 및 침투 능력을 억제하는 방법.

청구항 7

제1항에 따른 임신성 영양막 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 이용하여 영양막 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 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 악성 종양인 융모막암은 임신기에 20,000~40,000명 당 1명의 비율로 나타나는 것으로 보고된바 있다(Soper et al, Gynecol Oncol, 2004). 또한, 융모막암은 혈

관침투성이 매우 높으며 폐나 질 같은 타기관으로의 전이가 빈번하게 일어나는 것으로 알려져있다 (Geramizadeh and Rad, Indian J Pathol Microbiol, 2012).

[0003] 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] 한편, 프로필 갈레이트는 식품 첨가제, 화장품, 교착제 등에 함유되어 있으며 산화방지 효과를 위해 널리 사용되고 있다. 또한, 프로필 갈레이트는 자연적으로 생성되는 항산화제인 갈산의 합성 에스터 형태로 지방 함유 제품의 산패를 방지하는 역할을 한다. 프로필 갈레이트의 이러한 산화 조건 조절 효과는 다양한 세포의 독성에 대한 민감도에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 화학예방 효과와 세포독성 효과를 모두 지니는 것으로 보고된바 있으며(Wu *et al.*, Biochem, Pharmacol, 1994), 에스트로겐 수용체에 결합하여 에스트라디올의 활성을 억제하는 효과를 지니는 것으로 보고된바 있다(Amadasi *et al.*, Chem. Res. Toxicol, 2009).

[0005] 이처럼, 프로필 갈레이트에 의한 다양한 약리적 효과들이 보고되고 있으나, 현재까지 여성 생식 또는 임신 관련 질환과 관련하여 프로필 갈레이트의 효능에 대해 알려진 바는 전무하며, 특히 영양막 세포의 증식, 이동성, 침투성 등 영양막 세포의 비정상적 발달과 관련된 특성을 조절함으로써 임신성 영양막 질환을 치료하는 효과에 대해서는 알려진바 없다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 임신성 영양막 질환 치료제를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 프로필 갈레이트가 영양막 세포 증식과 이주성 및 침투성 억제, 세포 사멸 유도 효과가 있음을 확인하고, 올레산이 영양막 세포 내 PI3K/AKT 및 ERK1/2 MAPK 신호전달기전을 억제한다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 영양막 세포의 증식, 이주 및 침투 능력을 억제하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 영양막 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 영양막 세포의 증식, 이주 및 침투 능력을 억제하는 방법을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 영양막 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 조성물은 임신 초기 모체의 자궁내막으로 침투하는 영양막 세포 내 PI3K/AKT, MAPK 신호전달메커니즘을 조절하는 하위 신호전달물질의 인산화를 억제함으로써 영양막 세포의 증식 및 침투성을 억제하고 세포 사멸 효과를 향상시키는 효과가 있는바, 영양막 세포의 비정상적 발달에 의해 발병하는 임신성 영양막 질환을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 융모외영양막 세포주 증식에 프로필 갈레이트가 미치는 영향을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 융모외영양막 세포주에 프로필 갈레이트 처리 시 세포사멸 유도 효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 융모외영양막 세포주에 프로필 갈레이트 처리 시 세포 침투성 억제 효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 융모외영양막 세포 내 프로필 갈레이트 처리에 의한 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달 경로 억제 효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 융모외영양막 세포 내 프로필 갈레이트 처리에 의한 미토콘드리아 막 전위 억제 및 칼슘이온 농도 증가 효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 융모외영양막 세포 내 프로필 갈레이트 처리에 의한 소포체 스트레스 및 세포사멸 단백질 발현 조절 효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 영양막 세포 내 프로필 갈레이트에 의한 세포 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 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.

[0019] 본 발명에서는 프로필 갈레이트의 영양막 세포 내 세포 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 밝혔다(도 7).

[0020] 본 발명은 일 관점에서 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0021] 본 발명은 다른 관점에서 프로필 갈레이트를 유효성분으로 포함하는 임신성 영양막 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[0023] 본 발명에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 영양막 세포는 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.

[0025] 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.

[0026] 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, 산화 방지제, 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.

[0027] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 증상의 경중도, 환자의 체중, 연령, 성, 투여 방식 및 투여시간 등

과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정할 수 있다.

[0028] 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.

[0029] 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.

[0030] 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.

[0031] 본 발명에 따르면, 상기 프로필 갈레이트는 PI3K/AKT 및 ERK1/2 MAPK 신호전달기전을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0032] 본 발명에 따르면, PI3K/AKT 또는 ERK1/2 MAPK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0033] 본 발명에 따르면, 상기 상기 임신성 영양막 질환은 융모막암(choriocarcinoma), 포상기태(hydatidiform mole) 및 융모선종(villous adenoma)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 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.

[0035] 본 발명에 있어서, 에토포사이드, 시스플라틴 또는 파클리탁셀을 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니고 융모막암, 포상기태, 융모선종 등을 포함한 임신성 영양막 질환의 치료제로 사용되는 화학치료제를 더 포함할 수 있다.

[0036] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 약학적 조성물을 이용하여 영양막 세포의 증식, 이주 및 침투 능력을 억제하는 방법에 관한 것이다.

[0037] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 약학적 조성물을 이용하여 영양막 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법에 관한 것이다.

[0039] 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.

[0040] **실시예**

[0041] **<실험 방법>**

[0042] 실험동물 및 세포배양

[0043] HTR8/SVneo 세포는 American Type Culture Collection에서 구매하여 사용하였으며, 세포의 단층배양을 위해서 2.05 mM L-Glutaimine이 함유된 RPMI-1640 배지에 5%의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 함께 혼합하여 사용하였다.

[0045] 실험 재료

[0046] 후보 조성물질인 프로필 갈레이트는 Sigma-Aldrich, Inc로부터 구매하여 사용하였으며, 프로필 갈레이트에 의한 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 phospho-AKT, P70S6K, S6, ERK1/2, P90RSK, JNK 단백질 및 total-AKT,

P70S6K, S6, ERK1/2, P90RSK, JNK, IRE1α, Caspase-9에 대한 항체를 Cell Signaling Techonology사로부터 구매하였다. 이 외, PCNA, GRP78, TUBA에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology 사에서 구매하였다.

[0048] BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석

[0049] 영양막 세포의 증식 능력에 프로필 갈레이트가 미치는 영향을 확인하기 위하여 FBS 기아 조건으로 배양한 5×10^3개의 세포와 배지 100 ㎕를 96 well에 분주하고 프로필 갈레이트를 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20, 50, 100 μM) 처리하여 48시간 동안 배양한 다음, BrdU 키트 (Cat No: 1167229001, Roche)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다. 48시간 인큐베이션 이후, 10 μM BrdU를 각 well에 추가적으로 넣어 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 2시간 동안 배양하였다. 융모암 세포에 BrdU를 labeling 하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 상온에서 90분 인큐베이션 시킨 이후 3차례 씻어주었으며, 마지막으로 100 μl의 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate으로 세포를 반응하여 ELISA 리더기를 사용하여 370 nm, 492 nm 내 흡광도를 측정하여 세포 증식 능력을 분석하였다.

[0051] 면역형광법

[0052] 3×10^4개의 영양막 세포를 5% FBS가 포함된 배지 300 μl와 함께 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 24시간 FBS 기아상태로 추가로 배양하여 프로필 갈레이트 20 μM을 24시간 동안 처리한 뒤 메탄올로 10분간 세포를 고정하고, 2 μg/ml로 희석된 PCNA 항체를 처리하였으며 대조군에는 mouse IgG를 처리하여 4℃에서 16시간 인큐베이션 하였다. 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 1 시간동안 배양하였다. HTR8/SVneo 세포를 0.1% BSA-PBS로 워싱한 다음 DAPI 염색을 추가적으로 시행하여 HTR8/SVneo 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.

[0054] Annexin V와 propidium iodide 염색을 통한 세포사멸 분석

[0055] 프로필 갈레이트에 의한 영양막 세포의 사멸 효과를 확인하기 위하여 FITC Annexin V 세포 사멸 진단 키트 I (BD Biosciences)를 사용하여 실험을 진행하였다. 먼저 5×10^5 세포를 6 well에 배양하고 70 ~ 80% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 프로필 갈레이트를 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20 μM) 처리하여 48시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 워싱을 진행하고 1 mL의 1× binding buffer를 사용하여 세포를 천천히 혼합하고 원심분리하여 세포 pellet을 얻었다. 다음으로 200 μL의 1× binding buffer으로 세포현탁배양하여 브라운 1.5 mL 튜브에 100 μL 넣고 Annexin V 5 μL, PI 5 μL를 함께 혼합하여 세포를 15분 동안 실온에 두어 염색하였다. 이후 1× binding buffer를 400 μL 추가하여 5 mL FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하여 사멸된 세포의 수를 측정하였다.

[0057] TUNEL 반응을 통한 세포사멸 분석

[0058] 3×10^4개의 영양막 세포를 5% FBS가 포함 된 배지 300 μl와 함께 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 24시간 FBS 기아상태로 추가로 배양하여 프로필 갈레이트 20 μM을 48시간 동안 처리하였다. 이후, 세포를 에어드라이 시키고 4% paraformaldehyde로 상온에서 1시간 인큐베이션하여 세포를 고정시켰다. 고정된 세포는 PBS로 한번 헹궈내고 0.1% sodium citrate에 0.1% Triton X-100가 함유된 용액을 사용하여 아이스 위에서 2분간 인큐베이션 시켰으며, 다음으로 In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche)에 포함된 TUNEL staining mixture를 사용하여 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 1시간 동안 배양하였다. 마지막으로 PBS로 헹구고 DAPI를 염색한 이후, LSM710 (Carl Zeiss,

Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영하였다.

[0060] 세포 침투성 분석

[0061] 영양막 세포의 세포 침습성에 있어 프로필 갈레이트가 미치는 영향을 확인하기 위하여 Migration culture dish에 Matrigel을 코팅하여 프로필 갈레이트를 24시간 동안 처리하였으며 세포 침투 능력을 광학현미경 DM3000 (Leica)로 관찰 및 촬영, 계산하였다.

[0063] mRNA 발현 분석 (qPCR)

[0064] 영양막 세포에 프로필 갈레이트 20 μM을 처리한 다음 Trizol reagent (Invitrogen)을 이용하여 전체 RNA를 추출하였다. 이후, 1 μg의 RNA를 AccuPower RT PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 유전자 발현은 SYBR Green (Sigma)과 StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 측정하였다. PCR 조건은 95℃에서 3분동안 인큐베이션 후 95℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 3분 조건을 40회 증폭하였으며 *GAPDH* 발현량에 기반하여 정규화하였다.

[0066] 단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)

[0067] 영양막 세포에 프로필 갈레이트를 처리한 다음 영양막 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) 시약을 사용하여 ChemiDoc EQ system과 Quantity One software (Bio-Rad) 기기를 사용하여 타겟 단백질의 발현을 분석하였다.

[0069] JC-1 염색을 통한 미토콘드리아 막전위 측정

[0070] JC-1 미토콘드리아 막 전위 (MMP) 변화는 mitochondria staining kit (Cat No: CS0390, Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정하였다. 5×10^5 개의 영양막 세포를 6 well에 배양하고 70 ~ 80% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 프로필 갈레이트를 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20 μM) 처리하여 48시간 동안 37℃/5% CO2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 원심분리 하여 세포 pellet을 얻었다. 세포는 JC-1 staining solution 에 풀어준 후 37℃/5% CO2 인큐베이터 내에서 20분 간 인큐베이션 하였다. 염색된 세포는 다시 원심분리하여 1x JC-1 staining buffer로 워싱한 후 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0072] 미토콘드리아 칼슘이온 농도 측정

[0073] 미토콘드리아 칼슘이온 농도 변화는 Rhod-2 AM (Cat No: R1244, Invitrogen)을 사용하여 측정하였다. 5×10^5개의 영양막 세포를 6 well에 배양하고 70 ~ 80% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 프로필 갈레이트를 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20 μM) 처리하여 48시간 동안 37℃/5% CO2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 원심분리 하여 세포 pellet을 얻었다. 세포는 3 μM Rhod-2 AM에 풀어준 후 4℃에서 30분 간 인큐베이션 하였다. 염색된 세포는 Hank's balanced salt solution (HBSS)에 워싱한 후 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0075] 통계분석

[0076] 본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

[0078] **결과 및 고찰**

[0079] 영양막 세포의 증식성에 프로필 갈레이트가 미치는 영향 분석

[0080] 프로필 갈레이트에 의한 임신 초기 영양막 세포주(HTR8/SVneo)의 변화양상을 분석하기 위해, 프로필 갈레이트를 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20, 50, 100 μM) 첨가한 배지에 48시간 배양하였으며 이후 세포 증식 양상을 분석한 결과, 영양막 세포의 증식력이 프로필 갈레이트에 의해 단계적으로 감소한다는 것을 확인하였다(도 1A). 이후, DNA 증식에 필수적인 단백질인 PCNA에 대한 항체를 사용하여 면역형광기법을 수행한 결과, 컨트롤 그룹에 비해 20 μM 프로필 갈레이트를 24시간 처리한 영양막 세포의 핵 내에서는 PCNA의 발현이 현저히 감소함을 확인할 수 있었다(도 1B). 이러한 결과를 통해 프로필 갈레이트가 영양막 세포의 증식을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다.

[0082] 영양막 세포의 사멸에 프로필 갈레이트가 미치는 영향 분석

[0083] 프로필 갈레이트의 영양막 세포에 대한 세포사멸 유도 효과를 분석하기 위해, 영양막 세포에 프로필 갈레이트를 용량 의존적 (0, 5, 10, 20 μM)으로 48시간 인큐베이션 후 Annexin V 및 PI 염색을 통해 세포사멸이 일어나는 영양막 세포의 수를 FACS를 사용하여 측정하였다. 측정 결과, 20 μM의 프로필 갈레이트를 처리하였을 때 대조군에 비하여 190% 가량 세포 사멸이 증가함을 확인하였다(도 2A). 또한 20 μM의 프로필 갈레이트를 48시간 인큐베이션 이후 TUNEL assay를 수행하였다. 그 결과 대조군의 영양막 세포 내에서는 DNA 분절화 (DNA fragmentation)가 거의 발생하지 않았지만 프로필 갈레이트 처리에 따라 그 정도가 심화됨을 확인하였다(도 2B). 이러한 결과를 통해 프로필 갈레이트가 영양막 세포 내에 DNA 분절화를 일으킴으로써 세포 사멸을 유도한다는 것을 확인하였다.

[0085] 영양막 세포의 침투성에 프로필 갈레이트가 미치는 영향 분석

[0086] 영양막 세포의 침투성에 프로필 갈레이트가 미치는 영향에 대해 확인해보기 위해 Matrigel을 코팅한 Transwell에 HTR8/SVneo 세포를 분주한 후 프로필 갈레이트 (20 μM)가 함유된 배지에서 24시간 인큐베이션 하였다. 그 결과, 프로필 갈레이트에 의해 영양막 세포의 침투성이 약 87% 감소하였다 (도 3A). 뿐만 아니라 MMP2, MMP9, PLAU, FOXM1 등 세포외기질을 조절함으로써 세포의 침투성을 향상시키는 단백질의 mRNA 수준 발현을 분석한 결과, 프로필 갈레이트 처리 시 대조군에 비해 해당 유전자들의 발현이 확연히 감소함을 확인하였다(도 3B-3E). 이러한 결과를 통해 프로필 갈레이트가 영양막 세포의 과도한 침투성을 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0088] PI3K/AKT와 MAPK 신호전달 경로에 프로필 갈레이트가 미치는 영향 분석

[0089] 영양막 세포 내 프로필 갈레이트에 의해 유도되는 세포의 증식 억제 및 세포 사멸에 영향을 미치는 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 증식과 연관된 ERK1/2 MAPK 및 AKT의 인산화 양상을 프로필 갈레이트 용량의존적(도면 4)으로 웨스턴블롯을 이용하여 분석하였다. 그 결과, 프로필 갈레이트는 영양막 세포 내에서 AKT, P70S6K, S6 등 PI3K/AKT 신호전달 경로에 포함된 단백질의 인산화를 억제할 뿐만 아니라 ERK1/2, P90RSK, JNK 등 MAPK 신호전달 경로의 단백질의 활성도 억제함을 확인하였다.

[0091] 영양막 세포의 미토콘드리아에 프로필 갈레이트가 미치는 영향

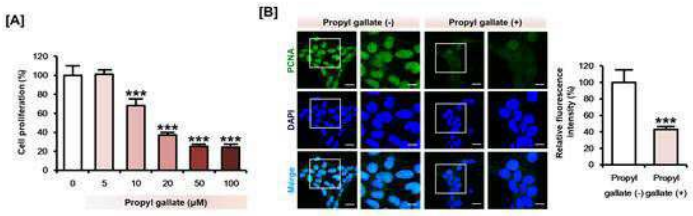
[0092] 영양막 세포에 항증식과 사멸효과를 갖는 프로필 갈레이트의 정확한 세포내 기전을 파악하기 위해 프로필 갈레이트를 용량의존적 (0, 5, 10, 20 μM)으로 48시간 처리한 후 미토콘드리아 막 전위와 미토콘드리아 칼슘이온 농도를 측정하였다. 그 결과, 프로필 갈레이트에 의해 미토콘드리아 막 전위가 급격히 감소함을 확인하였다 (도 5A). 뿐만 아니라 프로필 갈레이트는 미토콘드리아 내 칼슘이온 유입을 용량의존적으로 증가시키는 것으로 나타났다 (도 5B). 또한 소포체 스트레스와 관련된 단백질인 GRP78, IRE1α와 함께 세포사멸 관련 단백질인 Caspase-9의 쪼개진 형태의 발현을 분석하였을 때 영양막 세포 내 프로필 갈레이트에 따라 이들 단백질의 발현이 용량 의존적으로 증가함을 확인할 수 있었다 (도 6A-6D). 이러한 결과를 통해 프로필 갈레이트는 영양막 세

포 내에서 미토콘드리아를 매개로 하여 세포사멸을 유도한다는 것을 확인하였다.

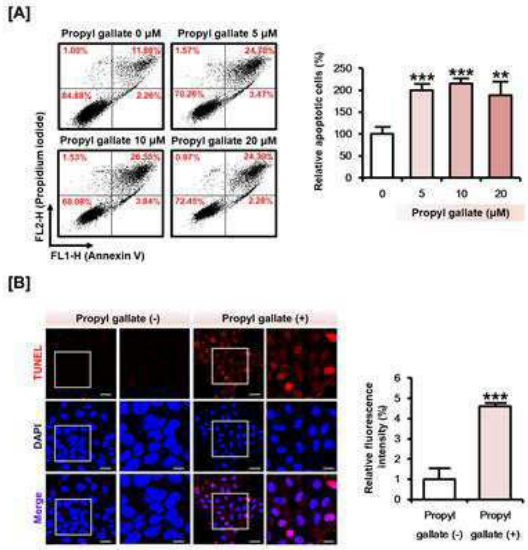
[0094] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

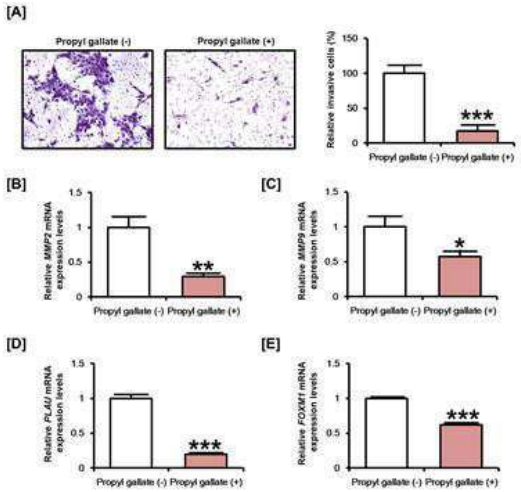
도면1



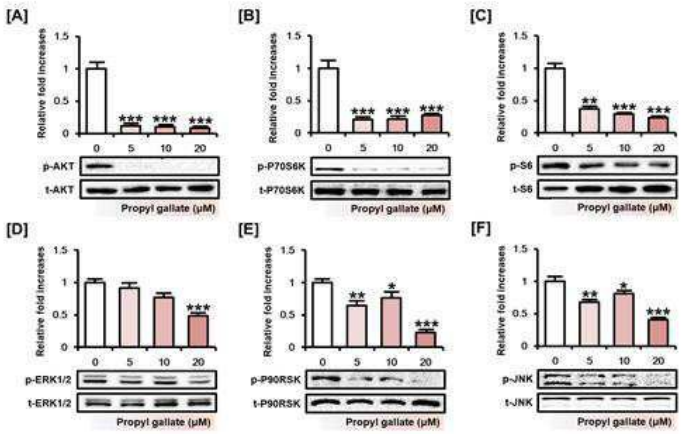
도면2



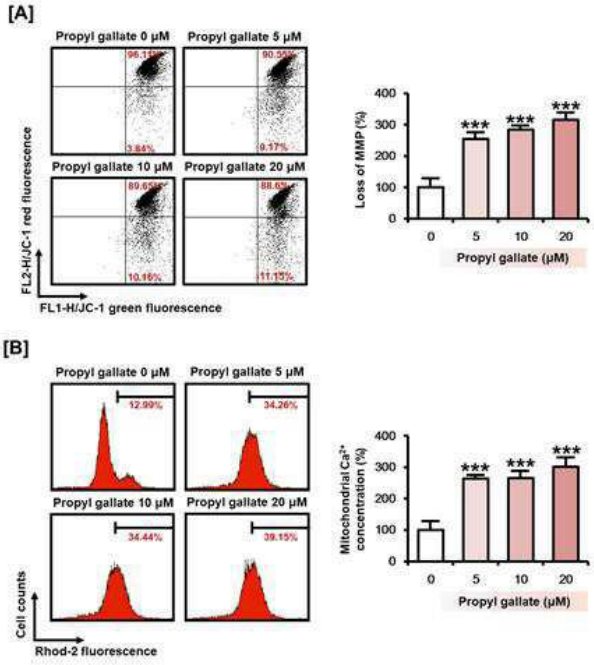
도면3


[A]
Propyl gallate (-)
Propyl gallate (+)
Relative invasive cells (%)
150
100
50
0
***
Propyl gallate (-) Propyl gallate (+)
[B]
Relative MMP2 mRNA expression levels
1.5
1
0.5
0
**
Propyl gallate (-) Propyl gallate (+)
[C]
Relative MMP9 mRNA expression levels
1.5
1
0.5
0
*
Propyl gallate (-) Propyl gallate (+)
[D]
Relative PLAU mRNA expression levels
1.5
1
0.5
0
***
Propyl gallate (-) Propyl gallate (+)
[E]
Relative FOXM1 mRNA expression levels
1.5
1
0.5
0
***
Propyl gallate (-) Propyl gallate (+)

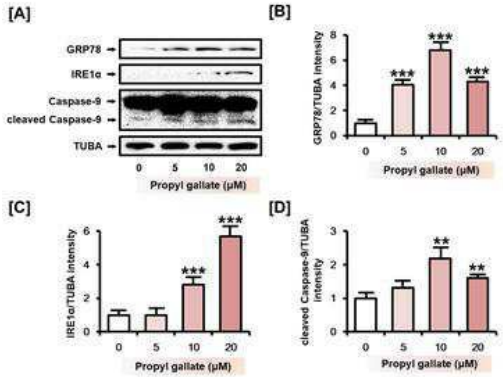
도면4


[A]
Relative fold increases
1.5
1
0.5
0
***
***
***
0
5
10
20
p-AKT
t-AKT
Propyl gallate (μM)
[B]
Relative fold increases
1.5
1
0.5
0
***
***
***
0
5
10
20
p-P70S6K
t-P70S6K
Propyl gallate (μM)
[C]
Relative fold increases
1.5
1
0.5
0
**
***
***
0
5
10
20
p-S6
t-S6
Propyl gallate (μM)
[D]
Relative fold increases
1.5
1
0.5
0
***
0
5
10
20
p-ERK1/2
t-ERK1/2
Propyl gallate (μM)
[E]
Relative fold increases
1.5
1
0.5
0
**
*
***
0
5
10
20
p-P90RSK
t-P90RSK
Propyl gallate (μM)
[F]
Relative fold increases
1.5
1
0.5
0
**
*
***
0
5
10
20
p-JNK
t-JNK
Propyl gallate (μM)

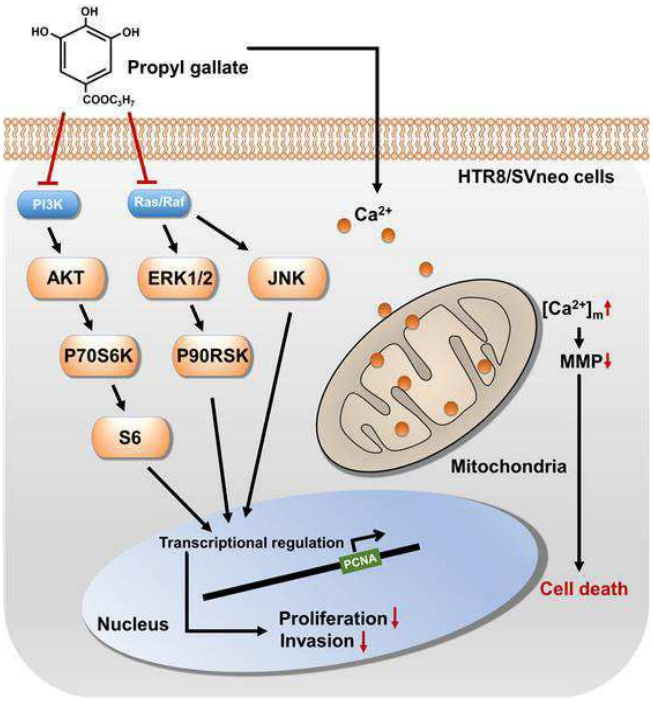
도면5


[A]
Propyl gallate 0 μM
Propyl gallate 5 μM
Propyl gallate 10 μM
Propyl gallate 20 μM
FL2-H/JC-1 red fluorescence
FL1-H/JC-1 green fluorescence
Loss of MMP (%)
Propyl gallate (μM)
[B]
Propyl gallate 0 μM
Propyl gallate 5 μM
Propyl gallate 10 μM
Propyl gallate 20 μM
12.99%
34.26%
34.44%
39.15%
Cell counts
Rhod-2 fluorescence
Mitochondrial Ca2+ concentration (%)
Propyl gallate (μM)

도면6


[A]
GRP78
IRE1α
Caspase-9
cleaved Caspase-9
TUBA
Propyl gallate (μM)
[B]
GRP78/TUBA intensity
Propyl gallate (μM)
[C]
IRE1α/TUBA intensity
Propyl gallate (μM)
[D]
cleaved Caspase-9/TUBA intensity
Propyl gallate (μM)

도면7


OH
HO
OH
COOC3H7
Propyl gallate
HTR8/SVneo cells
PI3K
Ras/Raf
Ca2+
AKT
ERK1/2
JNK
[Ca2+]m
MMP
P70S6K
P90RSK
S6
Mitochondria
Transcriptional regulation
PCNA
Cell death
Nucleus
Proliferation
Invasion