(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0128695
(43) 공개일자 2023년09월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/575 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61K 31/337 (2006.01) *A61K 33/243* (2019.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/575 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2022-0025883
(22) 출원일자 2022년02월28일
심사청구일자 2022년02월28일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
국민대학교산학협력단
서울특별시 성북구 정릉로 77 (정릉동, 국민대학교)
(72) 발명자
송권화
충청남도 천안시 서북구 충무로 124-24, 114동 803호
임화선
서울특별시 영등포구 63로 45, 9동 6층 61호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정은열, 김태훈

전체 청구항 수 : 총 7 항

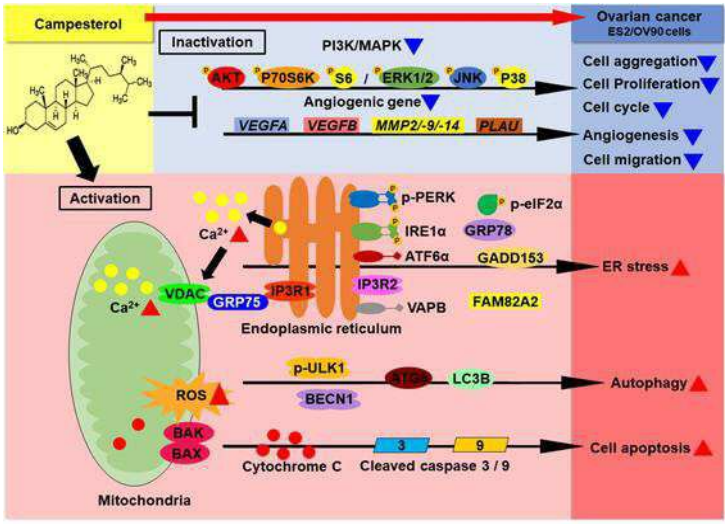
(54) 발명의 명칭 **캄페스테롤을 포함하는 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 캄페스테롤을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 캄페스테롤을 유효성분으로 포함하는 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 캄페스테롤을 유효성분으로 포함하는 난소암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 캄페스테롤을 유효성분으로 포함하는 조성물은 식물에서 추출된 것으로서 화학적 합성물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, 난소암 세포의 증식력을 억제하고 용량 의존적으로 난소암 세포주 내 사멸 세포의 수를 증가시킬 뿐만 아니라, PI3K/AKT, MAPK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제와 병용 처리하는 경우 세포 사멸의 시너지 효과를 얻을 수 있는바, 난소암을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품 관련 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도10



(52) CPC특허분류
A61K 31/337 (2013.01)
A61K 33/243 (2022.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/308 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)
(72) 발명자
양창원
서울특별시 성북구 한천로 713, 501동 1202호

박선우
서울특별시 동대문구 약령시로 25, 105동 903호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345320405
과제번호 2020R1I1A1A01067648
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 꾸지뽕나무의 유효 활성 물질을 이용한 자궁내막증 치료효능 및 분자적 조절 네트워크 규명
기 여 율 50/100
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2020.06.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711133414
과제번호 2021R1A2C2005841
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 멜라토닌을 이용한 모돈-태아 간 상호작용 증진 기술 개발 및 번식능력 예측 조기지표 개발
기 여 율 50/100
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

캄페스테롤을 유효성분으로 포함하는 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 캄페스테롤은 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 하는, 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 난소암 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

시스플라틴 또는 파클리탁셀을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

캄페스테롤을 유효성분으로 포함하는 난소암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

캄페스테롤을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 난소암 세포주의 증식 능력을 억제시키는 방법.

청구항 7

캄페스테롤을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 난소암 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 캄페스테롤을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 캄페스테롤을 유효성분으로 포함하는 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 캄페스테롤을 유효성분으로 포함하는 난소암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 난소암은 초기 증상 및 조기 진단을 위한 효과적인 바이오마커의 부재로 대다수의 난소암 환자들이 병기(stage) III 또는 IV에 진단되며 낮은 5년 생존율을 나타내며, 2016년 통계학적 분석을 통해 미국 내 사망률 5위에 이르는 치명적인 암으로 분류되었다(Siegel RL et al., CA Cancer J Clin, 65:5-29 2016; and Jayson GC et al., Lancet, 384:1376-88, 2014).

[0003] 일반적인 난소암의 치료 방법은 종양감축술(cytoreductive surgery) 이후 항암화학요법 또는 방사선치료를 실시하는 것이다. 하지만, 고등급장액성 난소암과 투명세포암은 백금계, 탁산계 항암제를 동시에 사용하는 표준 항

암화학요법에 저항성을 나타내며 나쁜 예후를 나타낸다 (Tan DS and Kaye S, J Clin Pathol, 60:355-60, 2007; Vaughan S et al., Nat Rev Cancer, 11(10):719-25, 2011). 그러므로 난소암 신호전달과정 내 세포사멸기전을 방해함에 따라 나타나는 항암제 내성을 극복하기 위한 새로운 치료제 개발이 요구되는 실정이다.

[0004] 한편, 캄페스테롤은 타시토스테롤과 스티그마스테롤과 같은 파이토스페롤의 일종으로 식물에서 세포 성장과 식물성 호르몬의 전구체로서 작용하는 천연물로써 다양한 채소 및 과일에 함유되어있으며(Segura, R. et al., Br. J. Nutr. 2006, 96, S36-S44), 백혈병, 간암 및 전립선암 세포의 성장을 저해시키는 것으로 보고된바 있다(O' Callaghan, Y. et al., Biochimie 2013, 95, 496-503; Chuu, C.-P.et al., J. Biomed. Sci. 2007, 14, 543-553; Awad, A.B. et al., Eur. J. Cancer Prev. 2001, 10, 507-513).

[0005] 이처럼, 캄페스테롤의 다양한 기능 및 효과들이 보고되고 있으나, 현재까지 난소암 치료 효과에 대해서는 보고된바 없다.

[0006] 전술한 기술적 배경하에서 본 발명자들은 천연물 유래 물질을 이용한 새로운 난소암 치료제를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 캄페스테롤이 난소암 세포주의 증식을, 세포 사멸 유도 효과가 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 캄페스테롤을 유효성분으로 포함하는 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 본 발명은 또한, 캄페스테롤을 유효성분으로 포함하는 난소암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 또한, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 난소암 세포주의 증식 능력을 억제시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명은 또한, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 난소암 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 캄페스테롤을 유효성분으로 포함하는 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 캄페스테롤을 유효성분으로 포함하는 난소암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 난소암 세포주의 증식 능력을 억제시키는 방법을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 상기 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 이용하여 난소암 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 캄페스테롤을 유효성분으로 포함하는 조성물은 식물에서 추출된 것으로서 화학적 합성물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, 난소암 세포의 증식력을 억제하고 용량 의존적으로 난소암 세포주 내 사멸 세포의 수를 증가시킬 뿐만 아니라, PI3K/AKT, MAPK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제와 병용처리하는 경우 세포 사멸의 시너지 효과를 얻을 수 있는바, 난소암을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품 관련 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 캄페스테롤이 난소암 세포 증식에 미치는 영향을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 캄페스테롤에 의한 난소암 세포 사멸 유도 효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 캄페스테롤에 의한 난소암 세포 미토콘드리아 막전위 변화를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 캄페스테롤에 의한 난소암 세포 내 미토콘드리아 기능장애 유도 효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 캄페스테롤에 의한 난소암 세포 내 산화스트레스 유도 효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 캄페스테롤 처리에 따른 세포 내 소포체 스트레스 및 소포체-미토콘드리아 축 신호 단백질 변화 양상 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 캄페스테롤에 의한 난소암 세포주 내 세포 증식 신호 전달 단백질의 활성 변화를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 캄페스테롤의 난소암 세포 이동 저해 효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 캄페스테롤, 시스플라틴, 파클리탁셀 단독 및 병용처리에 따른 난소암 세포주의 증식력을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 캄페스테롤의 난소암에 대한 항암기전을 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 캄페스테롤의 난소암 세포주의 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 밝혔다(도 10).

[0020] 본 발명은 일 관점에서 캄페스테롤을 유효성분으로 포함하는 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0021] 본 발명은 다른 관점에서 캄페스테롤을 유효성분으로 포함하는 난소암 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 난소암 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, 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.

[0027] 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 용이

하게 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.

[0032] 본 발명에 따르면, 상기 캄페스테롤은 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0033] 또한, 본 발명에 따르면, PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0034] 본 발명에 따르면, 상기 캄페스테롤은 산화스트레스 유도를 통해 난소암을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0035] 본 발명에 따르면, 상기 캄페스테롤은 미토콘드리아 기능장애 유도를 통해 난소암을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0036] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0037] 본 발명에 있어서, 시스플라틴 또는 파클리탁셀을 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니고 난소암 치료제로 사용되는 화학치료제를 더 포함할 수 있다.

[0039] 본 발명은 또 다른 관점에서, 캄페스테롤을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 난소암 세포주의 증식 능력을 억제시키는 방법에 관한 것이다.

[0040] 본 발명은 또 다른 관점에서, 캄페스테롤을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 난소암 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법에 관한 것이다.

[0042] [실시예]

[0043] 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.

[0045] **실험방법**

[0046] 세포배양

[0047] ES2, OV90 세포는 American Type Culture Collection에서 구매하여 사용하였으며, 세포의 단층배양을 위해서 McCoy's 5A 배지에 10%의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 함께 혼합하여 사용하였다.

[0049] 실험 재료

[0050] 후보 조성물질인 캄페스테롤은 ChemFaces로부터 구매하여 사용하였으며, 신호전달 메커니즘을 확인하기 위하여

phospho-AKT, ERK1/2, JNK, P70S6K, P90RSK, S6, P38, JNK, eIF2α 단백질 및 total-AKT, ERK1/2, JNK, P70S6K, P90RSK, S6, P38, JNK과 , IRE1α, VDAC, VAPB, FAM82A2, GRP75, TUBA, PCNA, BAX, BAK, Cleaved caspase 3, Cleaved caspase 9, Cytochrome C에 대한 항체를 Cell Signaling Techonology사로부터 구매하였다. 추가적으로 phspho-PERK 및 GADD153, ATF6α, GRP78는 santa cruz사로부터 구매하였으며, IP3R1과 IP3R2는 Invitrogen에서 구매하였다. 또한 타겟 신호전달과정을 억제함에 따른 효과를 규명하기 위하여 PI3K 억제제인 LY294002를 Cell Signaling Technology사로부터, ERK1/2 억제제인 U0126, P38 억제제인 SB203580 및 JNK 억제제인 SP600125를 Enzo Life Science사로부터 구매하여 사용하였다.

[0052] BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석

[0053] 난소암 세포의 증식 능력에 캄페스테롤이 미치는 영향을 확인하기 위하여 FBS 기아 조건으로 배양한 5×10^3개의 세포와 배지 100 ㎕를 96 well에 분주하고 크리소파놀을 용량의존적으로 처리하여 48시간 동안 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% CO2 인큐베이터 내에서 2시간 동안 배양하였다. 세포에 BrdU를 labeling 하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 상온에서 90분 인큐베이션 시킨 후 3차례 씻어주고, 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.

[0055] Annexin V와 propidium iodide 염색을 통한 세포사멸 분석

[0056] 캄페스테롤에 의한 난소암 세포의 사멸 효과를 확인하기 위하여 FITC Annexin V 세포 사멸 진단 키트 I (BD Biosciences)를 사용하여 실험을 진행하였다. 먼저 5×10^5 개의 세포를 6 well에 배양하고 70 ~ 80% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 캄페스테롤을 용량의존적으로 처리하여 48시간 동안 37℃/5% CO2 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 얻은 다음, 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.

[0058] DCFH-DA을 이용한 활성산소 형성 분석

[0059] 활성산소 형성 분석은 2',7'-dichlorofluorescin diacetate(DCFH-DA, Sigma-Aldrich)을 통해 진행하였다. 100π 배양 접시에 70 ~ 80% 세포가 찼을 때, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 워싱을 진행하고 원심분리 하여 세포 pellet을 얻었다. 세포에 10 μM DCFH-DA을 처리해 37℃/5% CO2 인큐베이터 내에서 30분 동안 배양하였다. 이후, PBS로 워싱을 진행한 뒤 캄페스테롤을 용량의존적으로 처리하여 1시간 동안 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 세포를 다시 원심분리 하여 PBS로 워싱한 후 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0061] Fluo-4와 Rhod-2를 이용한 세포내 Ca^{2+} 농도 측정

[0062] 세포 내 Ca^{2+} 농도에 캄페스테롤이 미치는 영향을 확인하기 위하여 먼저 5×10^5 세포를 6 well에 배양하고 70 ~ 80% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 캄페스테롤을 처리하여 48시간 동안 37℃/5% CO2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 Fluo-4 AM (Invitrogen)을 37℃ 인큐베이터 내에서 20분 동안 인큐베이션 하였다. 염색된 세포를 PBS로 한 번 워싱하고 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다. 미토콘드리아 특이적 Ca^{2+} 농도 측정을 위해 Rhod-2 AM (Invitrogen)을 HBSS에 희석한 후 4℃에서 30분 동안 인큐베이션 하였다. 염색된 세포를 HBSS로 워싱하고 유세

포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0064] JC-1 염색을 통한 미토콘드리아 막전위 측정

[0065] JC-1 미토콘드리아 막 전위 (MMP) 변화는 mitochondria staining kit (Cat No: CS0390, Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정하였다. 5×10^5개의 난소암 세포를 6 well에 배양하고 70 ~ 80% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 캄페스테롤을 용량의존적으로 처리하여 48시간 동안 37℃/5% CO2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 원심분리 하여 세포 pellet을 얻었다. 세포를 JC-1 staining solution 에 풀어준 후 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 20분간 인큐베이션 하였다. 염색된 세포를 다시 원심분리하여 1x JC-1 staining buffer로 워싱한 후 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0067] 단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)

[0068] 난소암 세포에 캄페스테롤을 처리한 다음 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) 시약 및 ChemiDoc EQ system과 Quantity One software (Bio-Rad) 기기를 사용하여 타겟 단백질의 발현을 분석하였다.

[0070] 세포 침습성 분석

[0071] 난소암 세포의 세포 침습성에 있어 캄페스테롤이 미치는 영향을 확인하기 위하여 Migration culture dish에 Matrigel을 코팅한 후 FBS 기아 조건으로 배양한 1×10^5개의 난소암 세포를 8-mm transwell inserts (Corning, Inc., Corning, NY, USA)에 분주하고 캄페스테롤을 처리하여 12시간 동안 배양한 다음, 메탄올로 10분간 trans-membrane을 이동한 세포를 고정하여, 건조 및 헤마톡실린 (Sigma Aldrich, Inc.) 염색을 30분간 수행하고, 씻어주었다. 슬라이드 글라스에 막을 올려주고 퍼마운트 용액(Permount solution)으로 고정하여 세포 이주 능력을 광학현미경 DM3000 (Leica)로 관찰, 촬영, 계산하였다.

[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] 캄페스테롤이 난소암 세포주의 증식에 미치는 영향 분석

[0078] 난소암 세포주 ES2 세포와 OV90 세포의 증식력에 캄페스테롤이 영향을 미치는지 알아보기 위해 캄페스테롤을 용량의존적(0, 25, 62.5, 125 μM)으로 처리한 후 BrdU ELISA assay를 수행하였다. 그 결과, 캄페스테롤을 처리한 실험군은 DMSO를 처리한 대조군에 비해 용량의존적으로 세포 증식이 감소하는 경향을 보였다 (도 1A, 1B). 125 μM의 캄페스테롤은 ES2 세포와 OV90 세포의 증식력을 각각 39% ($p < 0.01$), 46% ($p < 0.001$)씩 감소시켰다. 이러한 결과에 따라 각 세포에서 캄페스테롤 처리에 따른 세포 주기 비율을 확인하였으며, 두 세포주에서 모두 캄페스테롤 처리에 따라 용량의존적으로 subG0/G1 세포의 비율을 증가시켰으며($p < 0.01$), G0/G1기와 G2/M기의 세포 비율을 감소시켜($p < 0.01$) 세포 성장을 억제시킴을 검증하였다 (도 1C, 1D).

[0080] 캄페스테롤에 의한 난소암 세포의 사멸 유도 효과

[0081] 난소암 세포주인 ES2 세포와 OV90 세포의 사멸에 캄페스테롤이 영향을 미치는지 알아보기 위해 캄페스테롤 0 μM 또는 125 μM을 처리한 후 세포를 3D 입체배양을 하여 세포의 면적과 밀도를 비교하였다. 그 결과, 캄페스테롤을 처리한 실험군은 ES2와 OV90 세포주에서 모두 DMSO를 처리한 대조군에 비해 세포 면적이 증가하고, 밀도가 감소하는 경향을 보였다 (도 2A, 2B). 또한, 캄페스테롤이 난소암 세포의 사멸멸을 유도할 수 있는지 알아보기 위해 ES2 세포 및 OV90 세포에 FITC가 결합된 Annexin V 및 PI 염색을 수행하였다. 그 결과, 캄페스테롤은 용량의존적(0, 25, 62.5, 125 μM)으로 ES2와 OV90 세포의 사멸을 유도하였다 (도 2C, 2D). ES2 세포에 125 μM의 캄페스테롤 처리시 Annexin V와 PI가 모두 염색된 세포의 비율은 대조군에 비해 약 7배 ($p < 0.01$) 증가하였다. 마찬가지로 125 μM의 캄페스테롤은 OV90 세포의 사멸을 약 5배 ($p < 0.01$) 증가시켰다. 추가적으로, 캄페스테롤을 ES2와 OV90에 처리시 세포사멸 신호 전달 단백질인 BAX, BAK, Cleaved caspase 3, Cleaved caspase 9, cytochrome c의 발현을 확인하였다 (도 2E). 그 결과, 모든 단백질의 발현은 두 세포에서 용량의존적으로 증가하는 것으로 나타났다 ($p < 0.01$). 같은 맥락에서, 캄페스테롤은 ES2와 OV90에서 autophage 관련 단백질인 BECN1, p-ULK1, ATG5 및 LC3B의 발현을 증가시켰다 (도면 2F, $p < 0.01$). 특이적으로, autophage 관련 단백질은 PI3K 신호전달 억제제인 LY294002와 캄페스테롤 병용처리 시 캄페스테롤 단독처리에 비하여 감소하는 것으로 나타났다 (도 2G). 이러한 결과를 통해, 캄페스테롤이 PI3K 세포 신호전달경로를 통하여 난소암 세포의 사멸을 유도하여 난소암을 치료하는 효과를 가질 수 있음을 확인하였다.

[0083] 캄페스테롤에 의한 난소암 세포 내 미토콘드리아 기능 장애 유도 효과

[0084] 미토콘드리아로의 과도한 칼슘 이온 유입에 따른 기능 장애는 세포 사멸로 이어지는 대표적인 생리학적 기전이다. 먼저, 캄페스테롤에 의해 미토콘드리아의 막전위 변화를 측정하기 위해 캄페스테롤을 용량의존적 (0, 25, 62.5, 125 μM)으로 처리한 후 JC-1 염색을 수행하였다. 그 결과, 캄페스테롤에 의해 난소암 세포주 내 미토콘드리아 막 전위가 감소하는 것으로 나타났다 (도 3A, 3B). 125 μM의 캄페스테롤은 ES2와 OV90 세포 내 미토콘드리아 막전위를 대조군에 비해 각각 8.2배 ($p < 0.01$), 24.6배 ($p < 0.01$) 감소시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 캄페스테롤이 난소암 세포 내에서 미토콘드리아 내 칼슘 이온 유입 증가에 따른 기능 장애를 유발할 수 있음을 암시한다. 또한, 캄페스테롤에 의해 난소암 세포 안과 미토콘드리아 특이적 칼슘 이온 농도 변화를 측정하기 위해 각각 fluo-4와 rhod-2 염색을 수행하였다. 그 결과, 캄페스테롤을 용량의존적 (0, 25, 62.5, 125 μM)으로 처리시 ES2 세포와 OV90 세포질 내 칼슘 이온 농도와 Rhod-2로 염색된 미토콘드리아 특이적 칼슘 이온의 농도는 캄페스테롤 처리에 따라 용량의존적으로 증가하는 것으로 나타났다. 125 μM의 캄페스테롤에 의해 ES2 세포질 내 칼슘은 대조군 4.6%에서 12.4% ($p < 0.01$)까지 증가하였으며, OV90 세포질 내 칼슘 이온은 대조군 4.1%에서 13.3% ($p < 0.01$)까지 증가하였다 (도 4A, 4B). 또한, 125 μM의 캄페스테롤에 의해 ES2 세포 내 미토콘드리아 특이적 칼슘 이온은 DMSO 대조군 4.2%에서 10.1% ($p < 0.01$)까지 증가하였으며, OV90 세포 내 미토콘드리아 특이적 칼슘이온은 DMSO 대조군 3.0%에서 7.8% ($p < 0.01$)까지 증가하였다 (도 4C, 4D).

[0086] 캄페스테롤에 의한 난소암 세포 내 산화 스트레스 유도 효과

[0087] 캄페스테롤이 난소암 세포 내에서 산화스트레스를 유도할 수 있는지 알아보기 위해 DCF 녹색 형광의 강도를 측정하였다 (도 5A, 5B). ES2와 OV90 세포는 캄페스테롤 (0, 25, 62.5, 125 μM)이 포함된 배지에서 1시간 동안 배양되었다. 두 세포 내 ROS의 생성은 캄페스테롤에 의해 용량 의존적으로 증가하였으며, ES2 세포에서는 DMSO 대조군의 2.9%에서 최고 농도(125 μM) 처리 시 7.2% ($p < 0.01$)까지 증가하였으며, OV90 세포에서는 DMSO 대조군 2.6%에서 최고 농도(125 μM) 처리시 7.1% ($p < 0.01$)까지 증가하였다. 이러한 산화스트레스가 캄페스테롤에 의한 것인지 검증하기 위하여 캄페스테롤과 활성산소 억제제인 N-acetylcysteine(NAC) 1mM 을 병용 처리하여 ES2 및 OV90 세포 내 산화스트레스를 측정하였다 (도 5C, 5D). 그 결과, 두 세포에서 모두 캄페스테롤 처리에 따라 증가하였던 산화 스트레스가 NAC 1mM 병용처리로 DMSO 처리군만큼 회복되는 것을 확인하였다.

[0089] 캄페스테롤 처리에 따른 세포 내 소포체 스트레스 및 소포체-미토콘드리아 축 신호 단백질 변화 양상 분석

[0090] 캄페스테롤이 난소암 세포 내 소포체에 관여하는 대표적인 신호전달 단백질들의 활성화에 미치는 영향을 분석하기 위해 칼페스테롤을 용량의존적(0, 25, 62.5, 125 μM)으로 처리한 후 각 단백질의 인산화를 웨스턴블롯을 통해 확인하였다 (도 6). 그 결과, 소포체 스트레스 신호 단백질인 PERK, eIF2α, IRE1α의 인산화 및 GADD153, ATF6α, GRP78의 발현량이 모두 ES2와 OV90 세포주에서 용량의존적으로 증가하였다 ($p < 0.01$ 및 $p < 0.001$).

또한, 소포체-미토콘드리아 축 신호 단백질인 VDAC, IP3R1, IP3R2, VAPB, FAM82A2, GRP75의 발현량도 용량의존적으로 증가하는 양상을 보였다 ($p < 0.01$ 및 $p < 0.001$).

[0092] 캄페스테롤과 신호전달기전 억제제를 통한 난소암 세포의 증식 변화 양상 분석

[0093] 캄페스테롤이 난소암 세포의 생존 및 증식에 관여하는 대표적인 신호전달 경로인 MAPK 및 PI3K/AKT 신호전달경로 활성화에 미치는 영향을 분석하기 위해 캄페스테롤을 용량의존적(0, 25, 62.5, 125 μM)으로 48시간 처리한 후 각 단백질의 인산화를 웨스턴 블롯을 통해 확인하였다 (도 7A, 7B). 그 결과, 두 세포에서 AKT, P70S6K, S6, ERK1/2, JNK. P38 단백질의 인산화가 모두 감소하는 것으로 나타났다 ($p < 0.01$ 및 $p < 0.001$). 이러한 결과를 통해, 난소암 세포 내에서 캄페스테롤이 세포 증식과 관련된 단백질의 활성을 조절하여 세포 증식력을 조절할 수 있음을 확인하였다.

[0095] 캄페스테롤에 의한 난소암 세포의 이주 능력 억제 효과

[0096] 난소암 세포의 이주 및 침습 능력은 난소암의 전이 정도를 결정하는데 중요한 특성이다. 따라서, 캄페스테롤에 의한 난소암 세포의 이주 능력 변화를 측정하기 위해 transwell에 ES2 세포와 OV90 세포를 배양하였다. 그 결과, 캄페스테롤 125 μM 처리 시 transwell을 통과하는 ES2 및 OV90 세포의 수가 각각 84.7% ($p < 0.01$), 69.3% ($p < 0.01$) 감소하는 것으로 나타났다 (도 8A, 8B). 또한, 캄페스테롤을 용량의존적(0, 25, 62.5, 125 μM)으로 처리함에 따라 암세포의 이동 및 혈관 형성에 관여하는 VEGFA, VEGFb, MMP2, MMP9, MMP14 및 PLAU의 mRNA 발현이 ES2와 OV90에서 모두 감소하는 것으로 나타났다 (도 8C, 8D; $p < 0.001$). 이러한 결과를 통해, 캄페스테롤이 난소암 세포의 이주 능력을 현저하게 감소시킬 수 있음을 확인하였다.

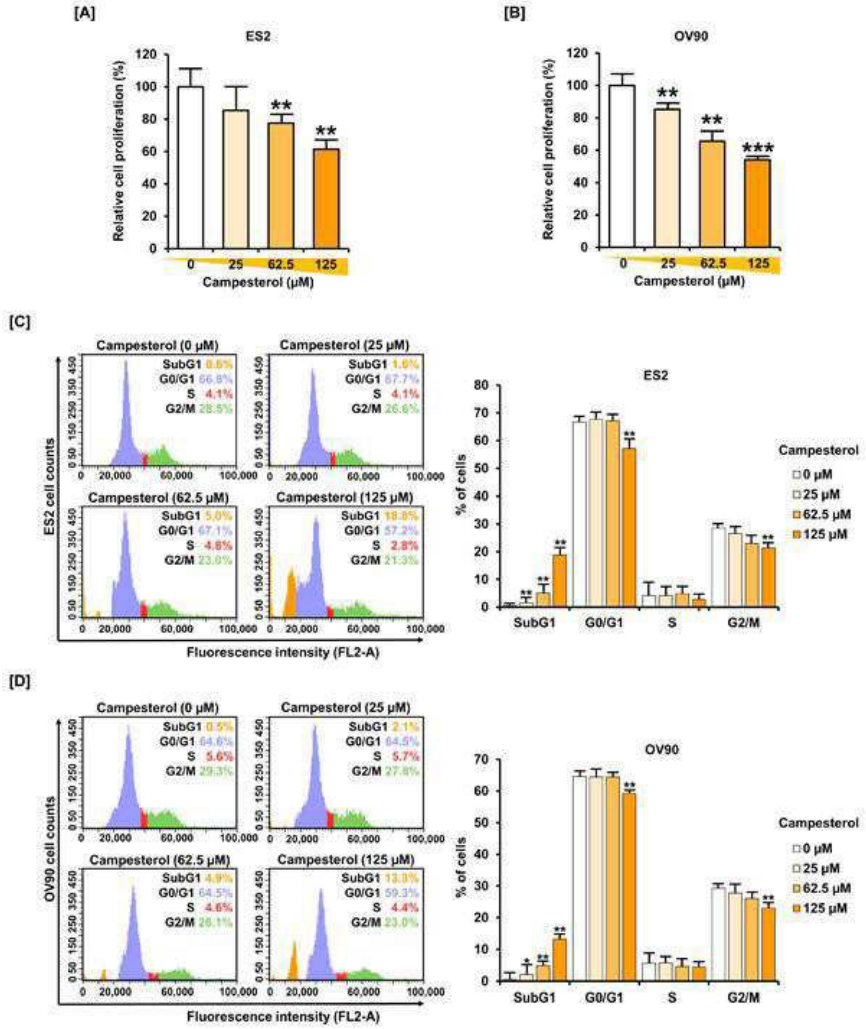
[0098] 캄페스테롤과 기존 항암제의 항암 효과 비교 평가

[0099] 난소암 항암제인 시스플라틴과 파클리탁셀과, 캄페스테롤의 항암 효과를 비교하기 위하여 48시간 단독 및 병용처리 후 세포 증식력을 확인하였다 (도 9). 그 결과, 두 세포주에서 모두 캄페스테롤은 난소암 세포주의 증식을 현저하게 억제하였으며, 캄페스테롤과 시스플라틴 병용처리 ($p < 0.01$), 캄페스테롤과 파클리탁셀 병용처리 ($p < 0.01$) 또는 캄페스테롤과, 시스플라틴 및 파클리탁셀 병용처리 ($p < 0.001$) 시 각각 항암화학치료제에 대한 민감도를 높여 세포의 증식을 더욱이 억제 시키는 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 통해, 캄페스테롤이 난소암 치료제로서 또는 기존 항암제 치료에 있어 보조치료제로서 개발 가능성이 높음을 확인할 수 있었다.

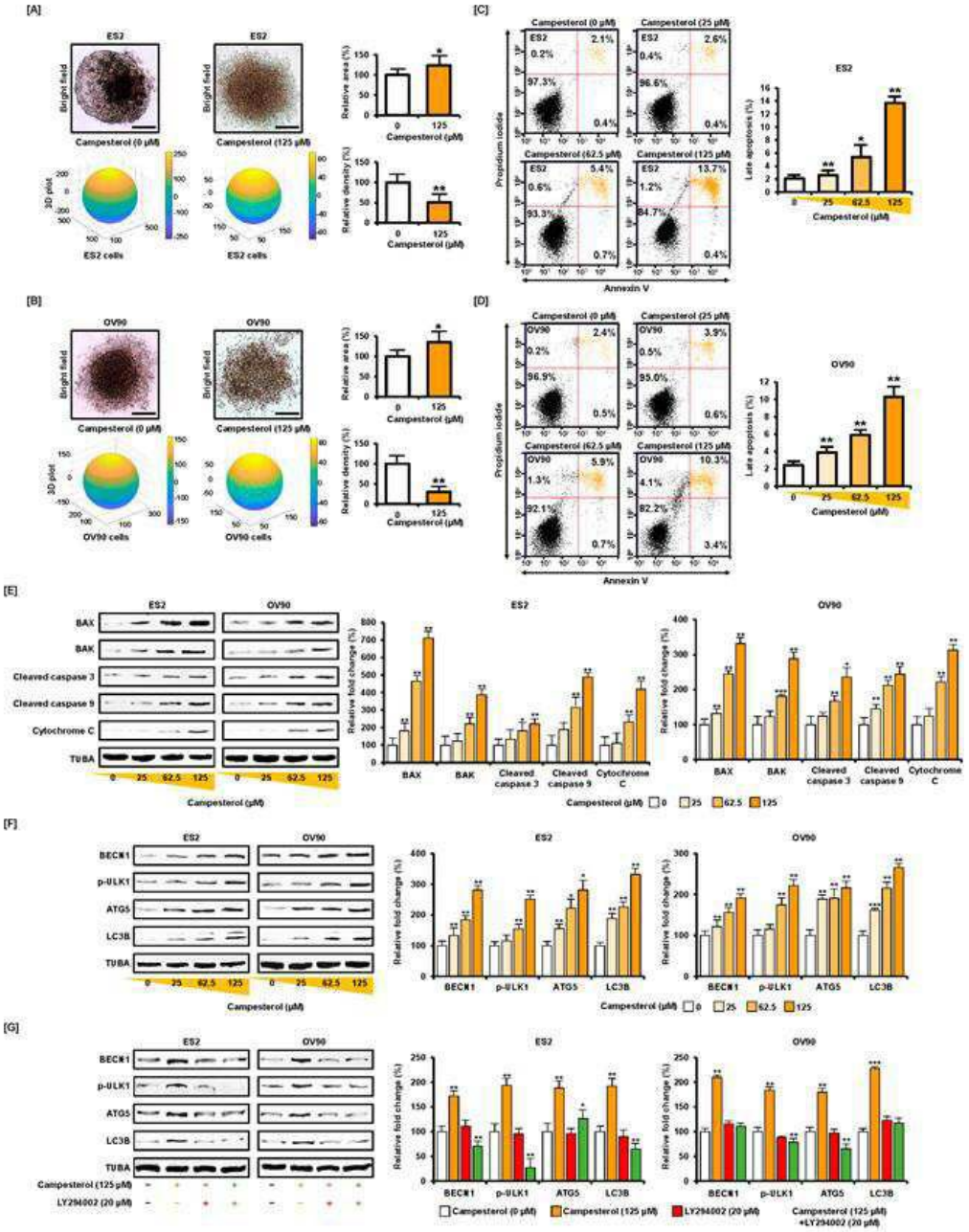
[0101] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

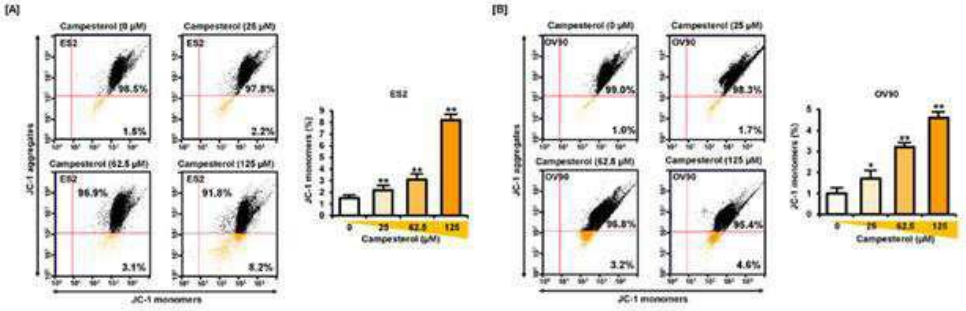
도면1


[A]
ES2
Relative cell proliferation (%)
Campesterol (μM)
[B]
OV90
Relative cell proliferation (%)
Campesterol (μM)
[C]
Campesterol (0 μM)
Campesterol (25 μM)
Campesterol (62.5 μM)
Campesterol (125 μM)
ES2 cell counts
Fluorescence intensity (FL2-A)
ES2
% of cells
Campesterol
0 μM
25 μM
62.5 μM
125 μM
SubG1
G0/G1
S
G2/M
[D]
OV90 cell counts
OV90

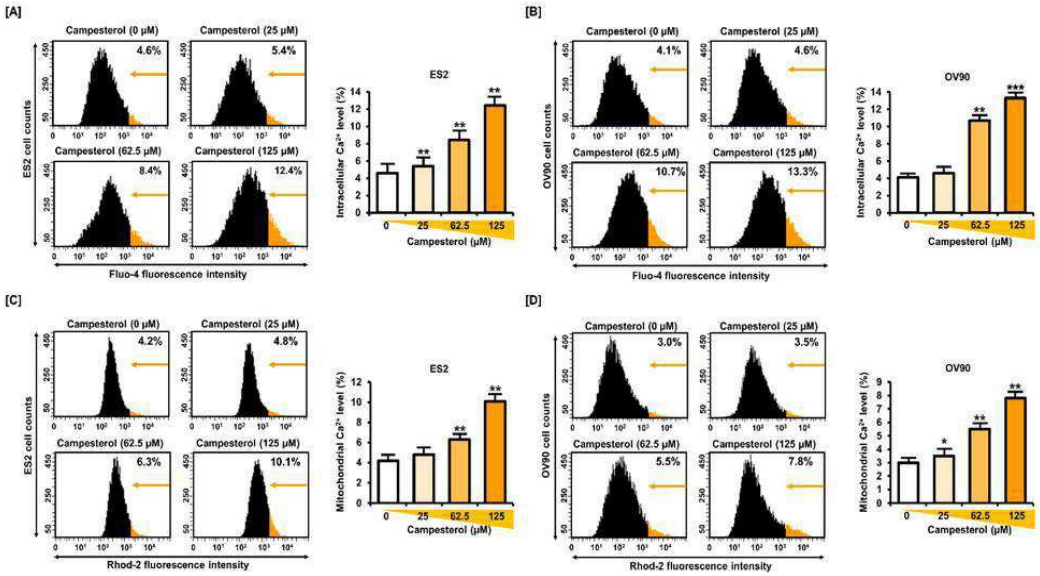
도면2



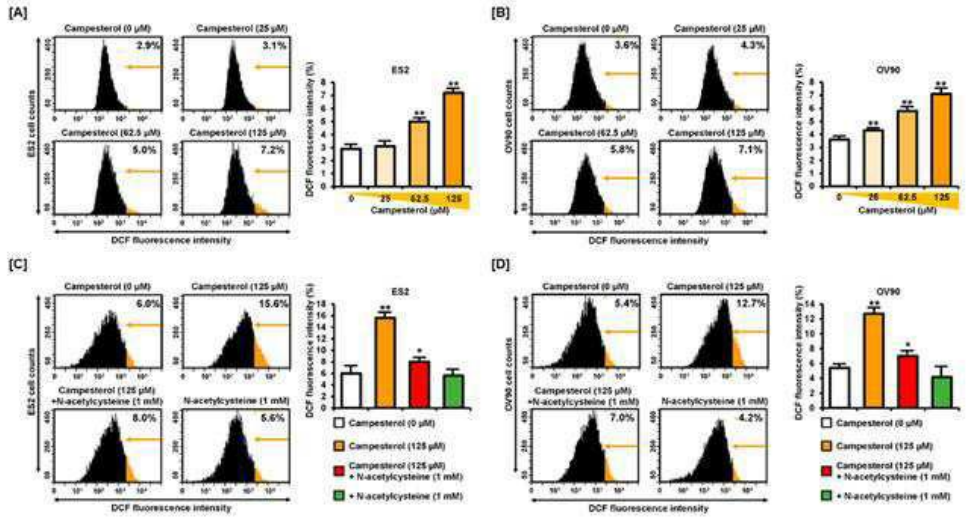
도면3



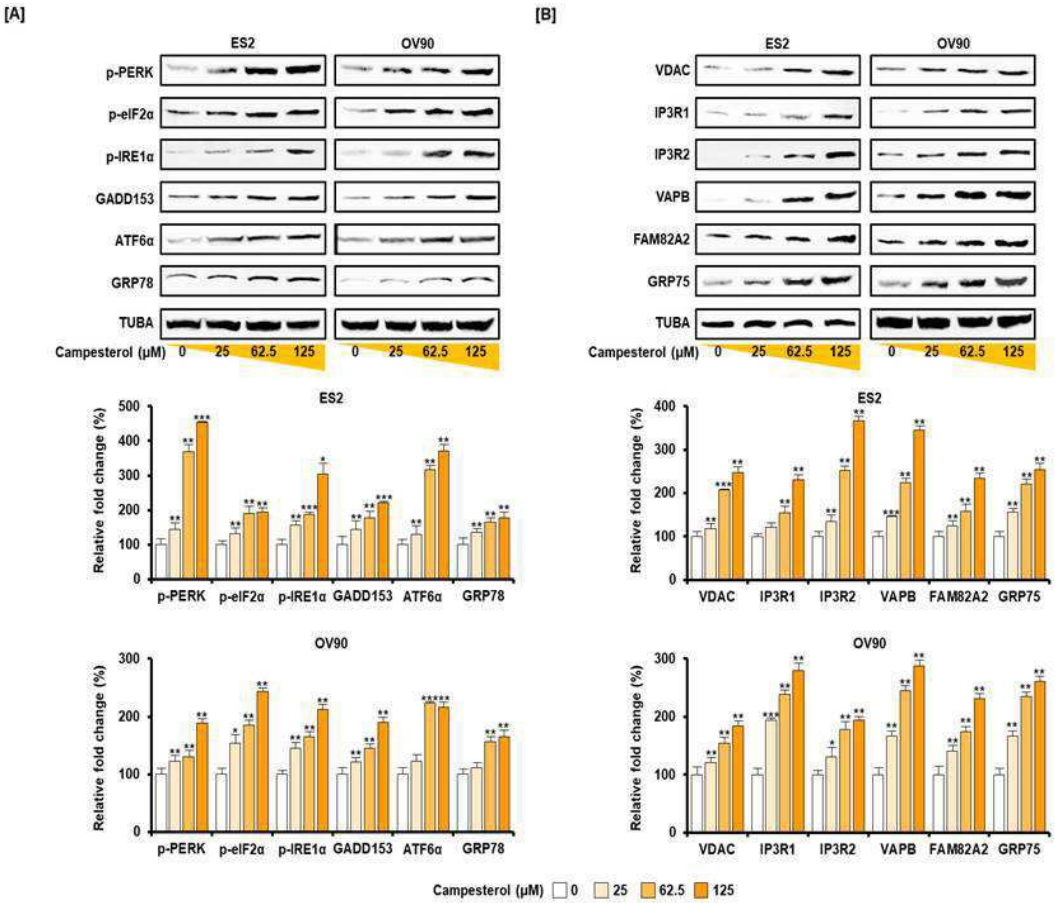
도면4


[A]
Campesterol (0 μM)
Campesterol (25 μM)
Campesterol (62.5 μM)
Campesterol (125 μM)
4.6%
5.4%
8.4%
12.4%
ES2 cell counts
Fluo-4 fluorescence intensity
ES2
Intracellular Ca2+ level (%)
Campesterol (μM)
[B]
4.1%
4.6%
10.7%
13.3%
OV90 cell counts
OV90
[C]
4.2%
4.8%
6.3%
10.1%
Rhod-2 fluorescence intensity
Mitochondrial Ca2+ level (%)
[D]
3.0%
3.5%
5.5%
7.8%

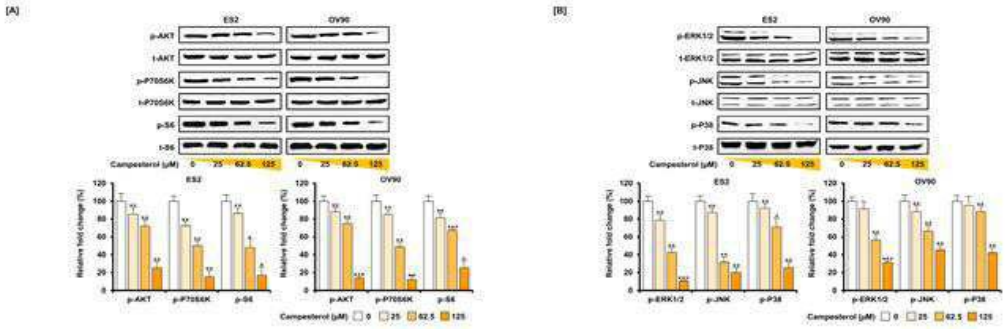
도면5


[A]
Campesterol (0 μM)
Campesterol (25 μM)
Campesterol (62.5 μM)
Campesterol (125 μM)
2.9%
3.1%
5.0%
7.2%
ES2 cell counts
DCF fluorescence intensity
ES2
DCF fluorescence intensity (%)
Campesterol (μM)
[B]
3.6%
4.3%
5.8%
7.1%
OV90 cell counts
OV90
[C]
Campesterol (125 μM) +N-acetylcysteine (1 mM)
N-acetylcysteine (1 mM)
6.0%
15.6%
8.0%
5.6%
Campesterol (0 μM)
Campesterol (125 μM)
Campesterol (125 μM) + N-acetylcysteine (1 mM)
+ N-acetylcysteine (1 mM)
[D]
5.4%
12.7%
7.0%
4.2%

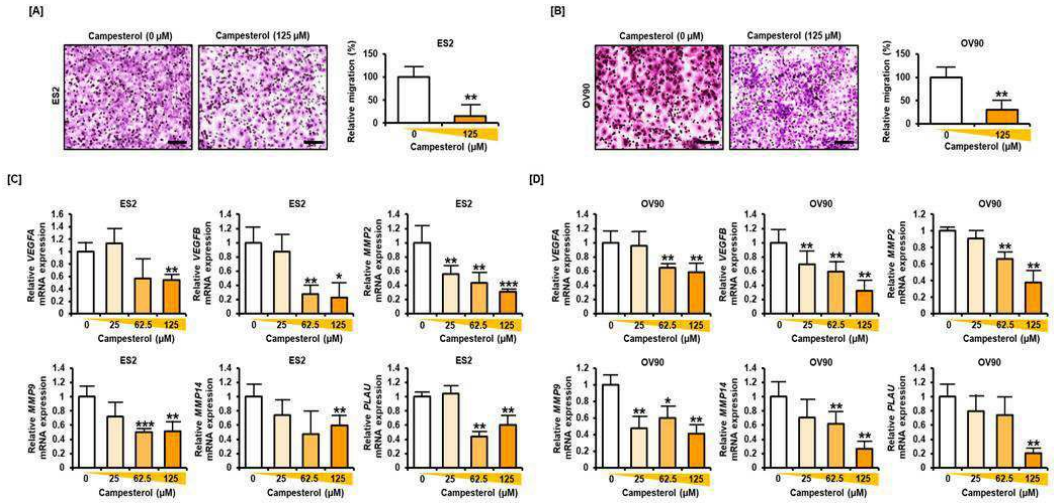
도면6


[A]
[B]
ES2
OV90
p-PERK
p-eIF2α
p-IRE1α
GADD153
ATF6α
GRP78
TUBA
VDAC
IP3R1
IP3R2
VAPB
FAM82A2
GRP75
Campesterol (μM) 0 25 62.5 125
Relative fold change (%)
Campesterol (μM) 0 25 62.5 125

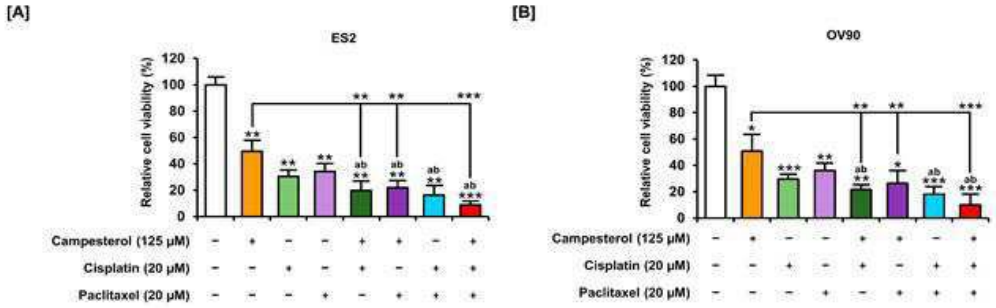
도면7


[A]
[B]
ES2
OV90

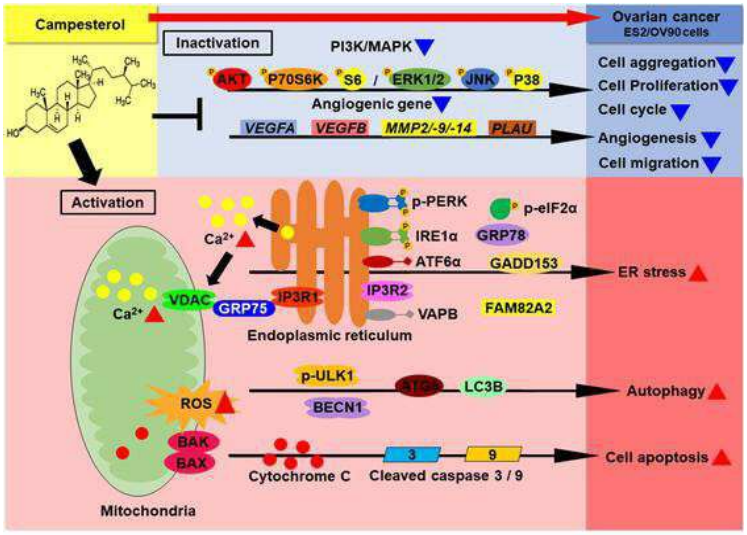
도면8


[A]
Campesterol (0 μM)
Campesterol (125 μM)
ES2
Relative migration (%)
Campesterol (μM)
[B]
OV90
[C]
[D]
Relative VEGFA mRNA expression
Relative VEGFB mRNA expression
Relative MMP2 mRNA expression
Relative MMP9 mRNA expression
Relative MMP14 mRNA expression
Relative PLAU mRNA expression

도면9


[A]
ES2
Relative cell viability (%)
Campesterol (125 μM)
Cisplatin (20 μM)
Paclitaxel (20 μM)
[B]
OV90

도면10


Campesterol
Inactivation
PI3K/MAPK
AKT
P70S6K
S6
ERK1/2
JNK
P38
Angiogenic gene
VEGFA
VEGFB
MMP2/-9/-14
PLAU
Ovarian cancer
ES2/OV90 cells
Cell aggregation
Cell Proliferation
Cell cycle
Angiogenesis
Cell migration
Activation
Ca2+
p-PERK
p-eIF2α
IRE1α
GRP78
ATF6α
GADD153
ER stress
VDAC
GRP75
IP3R1
IP3R2
VAPB
FAM82A2
Endoplasmic reticulum
p-ULK1
ATG5
LC3B
Autophagy
ROS
BECN1
BAK
BAX
Cytochrome C
Cleaved caspase 3 / 9
Cell apoptosis
Mitochondria