



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0137393
(43) 공개일자 2019년12월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/201 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)

A61P 15/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/201 (2013.01)

A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0063511

(22) 출원일자 2018년06월01일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(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 8 항

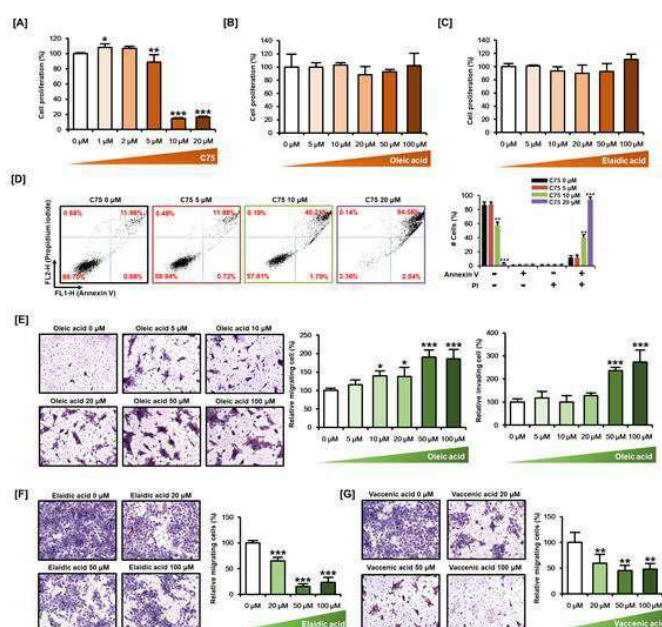
(54) 발명의 명칭 **올레산을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 올레산을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 올레산을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 약학적 조성물 및 식품 조성물, 올레산을 유효성분으로 포함하는 손상된 태반 형성에 따른 임신기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



본 발명에 따른 올레산을 유효성분으로 포함하는 조성물은 다양한 식품에 함유된 불포화지방산을 원료로 하는 화학적 합성물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, PI3K/AKT 및 ERK1/2 MAPK 신호전달경로 내 단백질의 발현 활성화를 통해 영양막 세포의 이주 및 침투 능력을 향상시키며, 세포 내 ROS 생성을 증가시키고 Ca^{2+} 농도를 조절하며 산화 조건을 변화시킴으로써 정상적인 태반을 형성하고, 임신 초기 착상 효율과 임신 유지 능력을 증진시킬 수 있는바, 임신 촉진제, 여성 불임증을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품, 손상된 태반 형성(impaired placentation)에 따른 임신기 질환을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61P 15/08 (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

명세서

청구범위

청구항 1

올레산을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 올레산은 영양막 세포의 이주 및 침투 능력을 향상시키는 것을 특징으로 하는 임신촉진용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 올레산은 PI3K/AKT 및 ERK1/2 MAPK 신호전달기전을 활성화시키는 것을 특징으로 하는 임신촉진용 약학적 조성물

청구항 4

올레산을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 식품 조성물.

청구항 5

올레산을 유효성분으로 포함하는 손상된 태반 형성(impaired placentation)에 따른 임신기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 임신기 질환은 자간전증, 자궁내성장지체, 유산, 조산 및 불임증으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 임신기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

올레산을 유효성분으로 포함하는 손상된 태반 형성(impaired placentation)에 따른 임신기 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제1항에 따른 조성물을 이용하여 영양막 세포의 이주 및 침투 능력을 향상시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 올레산을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 올레산을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 약학적 조성물 및 식품 조성물, 올레산을 유효성분으로 포함하는 손상된 태반 형성에 따른 임신기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 고령화 사회와 함께, 출산을 하는 산모의 나이가 높아지면서 불임이 증가하고 있다. 또한, 산업화로 인한 환경오염과 여성의 사회진출 등으로 인해 여성이 받는 스트레스가 증가하면서, 임신율이 크게 낮아지고 있는 실정이다. 일반적으로 알려진 여성 불임의 원인으로는 배란장애, 수정란의 이송장애 및 착상 장애 등이 있다. 배란장애와 수정란의 이송장애에 의한 불임 문제는 시험관아기시술법(IVF)을 통해 대부분 해결되고 있으나, 착상

장애에 의한 불임은 아직까지 명확한 해결 방법이 없는 실정이다.

- [0003] 성공적인 임신을 유지시키기 위해서는 배아의 발달, 착상, 태반형성, 호르몬 조절, 모체와 태아 간 영양소 및 가스의 교환이 필요시 된다(Spencer TE et al, Reproduction, 128(6):657-668, 2004).
- [0004] 영양막 세포는 태아와 모체 사이의 영양분 교환에 필수적인 세포로 영양막 세포 발달의 조절은 임신 초기 성공적인 착상과 임신 유지에 매우 중요한 요소이며(Terrade et al., Lab Invest, 2001), 영양막 세포의 정상적인 성장과 침투성 유지는 임신 초기 태반 형성을 위해 매우 중요하고(Armant et al., Placenta, 2015), 특히 융모외영양막 세포는 모체의 탈락막에 침투하고 자궁의 혈관 평활근세포를 대체하여 임신 초기 혈관 생성에 필수적인 것으로 보고된바 있다(Morrish et al., J Reprod Immunol, 1998).
- [0005] 한편, 손상된 태반형성(impaired placentation)을 유발할 수 있는, 영양막 세포의 사멸과 이동성 감소는 자간전증, 자궁내성장지체, 자연유산 등 임신기 질환과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고된바 있다(Wang Y et al., Int J Clin Exp Pathol, 2013).
- [0006] 전술한 기술적 배경하에서, 본 발명자들은 영양막 세포의 이동성과 침투성을 향상시킴으로써 정상적인 태반을 형성하고, 임신 초기 착상 효율과 임신 유지 능력을 증진시킬 수 있는 물질을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 올레산이 영양막 세포의 이동성과 침투성을 향상시키는 효과가 있음을 확인하고, 올레산이 영양막 세포 내 PI3K/AKT와 ERK1/2 MAPK 신호전달경로를 활성화시킨다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 올레산을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 본 발명은 또한, 올레산을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 본 발명은 또한, 올레산을 유효성분으로 포함하는 손상된 태반 형성(impaired placentation)에 따른 임신기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0010] 본 발명은 또한, 올레산을 유효성분으로 포함하는 손상된 태반 형성(impaired placentation)에 따른 임신기 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0011] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 이용하여 영양막 세포의 이주 및 침투 능력을 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 올레산을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한, 올레산을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 식품 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한, 올레산을 유효성분으로 포함하는 손상된 태반 형성(impaired placentation)에 따른 임신기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한, 올레산을 유효성분으로 포함하는 손상된 태반 형성(impaired placentation)에 따른 임신기 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 이용하여 영양막 세포의 이주 및 침투 능력을 향상시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명에 따른 올레산을 유효성분으로 포함하는 조성물은 다양한 식품에 함유된 불포화지방산을 원료로 하는바 화학적 합성물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, PI3K/AKT 및 ERK1/2 MAPK 신호전달경로 내 단백질의 발현 활성화를 통해 영양막 세포의 이주 및 침투 능력을 향상시키며, 세포 내 ROS 생성을 증가시키고 Ca^{2+} 농도를 조절하며 산화 조건을 변화시킴으로써 정상적인 태반을 형성하고, 임신 초기 착상 효율과 임신 유지 능력을 증진시킬 수 있는바, 임신 촉진제, 여성 불임증을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품, 손상된 태반 형성(impaired placentation)에 따른 임신기 질환을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과

관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 용모외영양막 세포의 증식과 이동성에 올레산이 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 용모외영양막 세포의 이동성에 SCD1의 활성이 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 용모외영양막 세포 내 MAPK, PI3K/AKT 신호전달 경로에 올레산과 올레산의 트랜스형인 엘라이드산이 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 P38 단백질 억제에 따른 올레산의 용모외영양막 세포 이동성 조절 효과 변화를 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 PI3K/AKT, ERK1/2 억제제와 올레산을 병용 처리시 세포 내 신호전달물질의 인산화 패턴을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 올레산과 엘라이드산이 용모외영양막 세포 내 산화 조건을 조절하는 효과를 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 포화 지방산이 용모외영양막 세포의 증식성 및 사멸에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 용모외영양막 세포의 이주성 향상 효과와 관련된 올레산의 작용 기전을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 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.
- [0021] 본 발명에서는 용모외영양막 세포의 이주성 향상 효과와 관련된 올레산의 작용 기전을 밝혔다(도 8).
- [0022] 본 발명은 올레산을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 조성물을 제공한다.
- [0023] 상기 조성물은 약학적 조성물 및 식품 조성물을 모두 포함한다.
- [0025] 본 발명에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.
- [0026] 본 발명에 있어서, "임신"은 수정란이 자궁 내벽에 착상하여 모체로부터 영양을 공급받으며 태아로 발육하는 과정으로, 정상적인 임신과정은 수정, 착상 및 태아발달의 순서로 진행된다.
- [0027] 상기 "수정"은 여성의 난소에서 배란된 난자가 수란관의 상부에서 정자와 만나면 수정란이 형성되는 것을 의미한다. 난자는 배란 후 1~2일, 정자는 자궁 내에서 2~3일 동안 살아남아서 수정할 수 있는 능력을 가지며, 정자의 경우 사정된 후 1주일까지 살아 있기도 한다. 정자는 사정된 후 2~3시간이면 수란관을 따라 난소 가까이까지 이르기 때문에, 일반적으로 정자가 먼저 수란관 상부에 도달해 있다가 난소에서 배란된 난자가 이곳에 이르면 여러 정자 중 하나만이 난자와 결합하여 수정란을 형성한다.
- [0028] 상기 "착상"은 수란관 상부에서 정자와 난자가 만나 형성된 수정란이 난할을 거듭하면서 자궁으로 이동하여 포배의 상태로 자궁 내벽에 파묻히는 현상을 의미한다. 수정란이 착상된 이후를 임신이라고 한다. 자궁에 착상한 수정란은 자궁 내벽으로부터 영양을 공급받으면서 약 9개월 동안 자란 후 태어나게 된다.
- [0029] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 올레산은 PI3K/AKT 및 ERK1/2 MAPK 신호전달기전을 활성화시키는 효과를 가지고 있어, 영양막 세포의 이주 및 침투 능력 향상을 통해 착상 효율을 증가시키는 효과를 가진다.
- [0030] 이때, 상기 영양막 세포는 포유동물 유래의 세포일 수 있으며, 상기 포유동물은 설치목(예를 들어, 생쥐, 쥐, 햄스터, 케르빌루스 및 기니피그), 우제목(예를 들어, 소, 양, 돼지, 염소, 사슴, 기린 및 영양), 기체목(예를 들어, 말, 당나귀, 코뿔소 및 맥), 식육목(예를 들어, 개, 고양이, 호랑이, 늑대, 여우, 사자, 치타, 표범, 너구리, 오소리, 퓨마, 재규어 및 샴팬이), 토끼목(토끼 및 우는 토끼), 식충목(예를 들어, 고슴도치, 두더지 및

솔레노돈) 및 영양목(예를 들어, 침팬지, 오랑우탄, 고릴라, 보노보노, 일본원숭이, 붉은털원숭이)일 수 있다.

- [0031] 상기 조성물은 올레산을 단독으로 포함하거나, 임신 촉진에 효과가 있는 물질을 가 있는 물질을 유효성분으로 더 포함할 수 있고, 상기 유효성분 외에도 제형, 사용방법 및 사용목적에 따라 추가성분, 즉, 약제학적으로 허용되거나 영양학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 또는 부성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [0032] 보다 상세하게는 상기 올레산을 포함하는 임신촉진용 약학적 조성물은 상기 유효성분 외에 추가로 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다.
- [0033] 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 통상의 것을 모두 사용 가능하고, 일 예로 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 칼슘카보네이트, 텍스트린, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀 및 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1 이상 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 성분들은 유효성분 즉, 올레산에 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.
- [0034] 본 발명에 따른 조성물은 임신 촉진용으로서 단독으로 사용될 수 있고, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제등과 병용하여 사용될 수 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설물 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 올레산의 일일 투여량은 001 내지 10000 mg/kg 이며, 바람직하게는 1 내지 20mg/kg이고, 하루 1회 내지 3회에 나눠 투여하는 것이 바람직하다.
- [0036] 또한, 본 발명은 올레산을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 식품 조성물을 제공한다.
- [0037] 본 발명에 따른 조성물은 임신 촉진을 목적으로 하는 건강기능식품에 포함될 수 있으며, 본 발명의 유효성분을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 합성 또는 추출물로부터 분리된 것을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 또한 상기 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 조절하여 사용 될 수 있다.
- [0038] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스킥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함하는 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품 또는 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [0039] 본 발명의 식품 보조 첨가제는 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 사용할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로 텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에르트리톨 등의 당알콜이다 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.
- [0040] 상기 외에 본 발명에 따른 조성물은 여러가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명에 따른 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0042] 또한, 본 발명은 올레산을 유효성분으로 포함하는 불임증의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0043] 상기 조성물은 약학적 조성물 또는 식품 조성물을 포함한다.
- [0044] 상기 불임증은 여성 불임증(Female infertility)일 수 있다.
- [0045] 상기 여성 불임증은 난자의 비착상(Nonimplantation of ovum), 무배란과 관련된 여성 불임증(Female infertility associated with anovulation), 자궁관에서 기원한 여성 불임증(Female infertility of tubal origin), 자궁관의 선천 이상과 관련된 경우(Associated with congenital anomaly of tube), 자궁관의 폐쇄

(Tubal block), 자궁관의 폐색(Tubal occlusion), 자궁관의 협착(Tubal stenosis), 자궁에서 기원한 여성 불임증(Female infertility of uterine origin), 자궁의 선천 이상과 관련된 경우(Associated with congenital anomaly of uterus), 자궁목에서 기원한 여성 불임증(Female infertility of cervical origin), 남성 요인과 관련된 여성 불임증(Female infertility associated with male factors), 기타 요인에서 기원한 여성 불임증(Female infertility of other origin) 및 상세불명의 여성 불임증(Female infertility, unspecified)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0046] 본 발명에 있어서, 상기 "난자 비착상(Nonimplantation of ovum)"은 여성 불임증의 대표적인 원인이다. 착상시, 수정란이 세포분열을 하면서 이동하여 자궁속에 들어와 배반포 단계에 이르면 자궁내막에 파묻혀 자리를 잡게 된다 그러나, 배아가 착상할 자궁내막의 두께가 충분치 않거나 손상으로 인해 경직될 경우 착상이 되기가 어려우며 자궁벽의 유착등으로 공간이 부족할 경우 유산되는 경우가 많다. 자연유산, 계류유산, 임신중절수술, 자궁내막염, 골반결핵 및 자궁내 장치등으로 유발된 자궁내 염증에 의해 자궁내막이 유착되거나, 자궁근종 폴립 등으로 자궁형태변형이나 자궁내막에 면역학적 과민반응이 생기거나, 선천적 자궁기형 호르몬 분비이상으로 자궁내막형성이 불완전할 경우 착상에 장애가 발생한다. 난자 비착상은 인공수정, 시험관 시술 실패의 가장 큰 원인으로 지목되고 있다.

[0047] 상기 약학적 조성물 또는 식품 조성물은 상술한 올레산을 유효성분으로 포함하는 약학적 제제 또는 식품 제제를 포함하기 때문에, 상술한 본 발명의 조성물과 중복된 내용은 중복된 내용의 기재에 의한 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[0049] 또한, 본 발명은 올레산을 유효성분으로 포함하는 손상된 태반 형성(impaired placentation)에 따른 임신기 질환의 예방, 치료 또는 개선용 조성물을 제공한다.

[0050] 상기 조성물은 약학적 조성물 또는 식품 조성물을 포함한다.

[0051] 상기 임신기 질환은 자간전증, 자궁내성장지체, 유산, 조산 및 불임증으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0052] 상기 약학적 조성물 또는 식품 조성물은 상술한 올레산을 유효성분으로 포함하는 약학적 제제 또는 식품 제제를 포함하기 때문에, 상술한 본 발명의 조성물과 중복된 내용은 중복된 내용의 기재에 의한 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[0054] 본 발명은 또한, 상기 올레산을 포함하는 조성물을 이용하여 영양막 세포의 이주 및 침투 능력을 향상시키는 방법을 제공한다.

[0056] 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.

[0057] **실시예**

[0058] **<실험 방법>**

[0059] 실험동물 및 세포배양

[0060] HTR8/SVneo, JAR, JEG-3, BeWo 세포는 American Type Culture Collection에서 구매하여 사용하였으며, 세포의 단층배양을 위해서 2.05 mM L-Glutamine이 함유된 RPMI-1640 배지 (HTR8/SVneo, JAR), MEM 배지 (JEG-3) 및 Ham's F-12K 배지 (BeWo)에 10%의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 함께 혼합하여 사용하였다.

[0062] 실험 재료

[0063] 올레산과 올레산의 트랜스형인 엘라이드산, 팔미트산, 스테아르산은 Sigma-Aldrich, Inc로부터 구매하여 사용하

였으며, 올레이드산과 엘라이드산에 의한 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 phospho-ERK1/2, P90RSK, JNK, P38, AKT, P70S6K, S6, GSK3 β 단백질 및 total-ERK1/2, P90RSK, JNK, P38, AKT, P70S6K, S6, GSK3 β 에 대한 항체를 Cell Signaling Technology사로부터 구매하였다. 또한 타겟 신호전달과정을 억제함에 따른 효과를 규명하기 위하여 PI3K 억제제인 LY294002를 Cell Signaling Technology사로부터, ERK1/2 억제제인 U0126을 Enzo Life Science사로부터 구매하여 사용하였다.

[0065] BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석

[0066] 용모외영양막 세포의 증식 능력에 다양한 지방산이 미치는 영향을 확인하기 위하여 FBS 기아 조건으로 배양한 5×10^3 개의 세포와 배지 100 μ l를 96 well에 분주하고 지방산을 용량의존적으로 처리하여 48시간 동안 배양한 다음, BrdU 키트 (Cat No: 1167229001, Roche)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다. 48시간 인큐베이션 이후, 10 μ M BrdU를 각 well에 추가적으로 넣어 37 $^{\circ}$ C/5% CO $_2$ 인큐베이터 내에서 2시간 동안 배양하였다. 용모암 세포에 BrdU를 labeling 하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 상온에서 90분 인큐베이션시킨 이후 3차례 씻어주었다. 마지막으로 100 μ l의 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate으로 세포를 반응시켜 ELISA 리더기를 사용하여 370 nm, 492 nm 내 흡광도를 측정하여 세포 증식 능력을 분석하였다.

[0068] Annexin V와 propidium iodide 염색을 통한 세포사멸 분석

[0069] C75에 의한 용모외영양막 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, C75를 용량의존적으로 처리하여 48시간 동안 37 $^{\circ}$ C/5% CO $_2$ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 워싱을 진행하고 1 mL의 1 $\times$ binding buffer를 사용하여 세포를 천천히 혼합하고 원심분리하여 세포 pellet을 얻었다. 다음으로 200 μ L의 1 $\times$ binding buffer으로 세포현탁배양하여 브라운 1.5 mL 튜브에 100 μ L 넣고 Annexin V 5 μ L, PI 5 μ L를 함께 혼합하여 세포를 15분 동안 실온에 두어 염색하였다. 이후 1 $\times$ binding buffer를 400 μ L 추가하여 5 mL FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하여 사멸된 세포의 수를 측정하였다.

[0071] 세포 침습성 및 이동성 분석

[0072] 용모외영양막 세포의 세포 침습성 및 이동성에 있어 지방산이 미치는 영향을 확인하기 위하여 Migration culture dish에 Matrigel을 코팅하여 다양한 지방산 및 신호전달 선택적 억제제를 함께 16시간 동안 처리하였으며 세포 침습 능력을 광학현미경 DM3000 (Leica)로 관찰 및 촬영, 계산하였다. 세포 이동성은 Matrigel을 코팅하지 않은 것을 제외하고는 세포 침투성과 같은 과정을 수행하였다.

[0074] mRNA 발현 분석 (qPCR)

[0075] 용모외영양막 세포에 올레산을 처리한 다음 Trizol reagent (Invitrogen)을 이용하여 전체 RNA를 추출하였다. 이후, 1 μ g의 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 $^{\circ}$ C에서 3분동안 인큐베이션 후 95 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 3분 조건을 40회 증폭하였으며 GAPDH 발현량에 기반하여 정규화하였다.

[0077] 단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)

[0078] 용모외영양막 세포에 올레산, 엘라이드산 또는 세포신호전달 억제제와의 혼합물을 처리한 다음 용모외영양막 세포로부터 전체 단백질을 추출하여 Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 단백질을 정량하였다. 이후, 추출한 단백질을 95 $^{\circ}$ C에서 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.

[0080] 면역형광법

[0081] 3×10^4 개의 용모외영양막 세포를 10% FBS가 포함된 배지 300 μ l와 함께 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 24시간 FBS 기아상태로 추가로 배양하여 올레산을 48시간 동안 처리한 뒤 메탄올로 10분간 세포를 고정하고, 2 μ g/ml로 희석된 p-P38 항체를 처리하였으며 대조군에는 mouse IgG를 처리하여 4°C에서 16시간 인큐베이션 하였다. 이후, 0.1% BSA (bovine serum albumin)이 포함된 PBS로 2번의 워싱과정을 거쳐 2차 항체로는 goat anti-rabbit IgG Alexa 488 (catalog number: A-11008, 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.

[0083] DCFH-DA를 이용한 세포내 ROS 측정

[0084] HTR8/SVneo 세포 내 ROS 생성에 올레산 및 엘라이드산이 미치는 영향을 확인하기 위하여 peroxide 존재 하에 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)로 변환되어 형광을 띠는 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma)를 사용하였다. HTR8/SVneo 세포를 트립신을 통해 떼어내고 원심분리를 통해 세포 pellet을 얻었다. 이후 PBS로 한번 워싱하고 10 μ M의 DCFH-DA를 37°C 인큐베이터 내에서 30분 동안 인큐베이션 한 이후 세포를 PBS에 의해 두 번 워싱하고 올레산 및 엘라이드산을 용량 의존적으로 1 시간동안 37°C 인큐베이터 내에서 인큐베이션 하였다. 처리된 세포는 PBS로 다시 워싱하고 유세포 분석기를 사용하여 DCF 형광 강도를 분석하였다.

[0086] Fluo-4를 이용한 세포내 Ca^{2+} 농도 측정

[0087] HTR8/SVneo 세포 내 Ca^{2+} 농도에 올레산 및 엘라이드산이 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, 올레산 및 엘라이드산을 처리하여 48시간 동안 37°C/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 Fluo-4 AM (Invitrogen)을 37°C 인큐베이터 내에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 염색된 세포는 PBS로 한 번 워싱하고 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0089] 지질과산화 분석

[0090] 용모외영양막 세포내 지질과산화 정도를 분석하기 위해 Click-iT lipid peroxidation imaging kit (Invitrogen)을 사용하였다. 3×10^4 개의 용모외영양막 세포를 10% FBS가 포함된 배지 300 μ l와 함께 confocal dish 에 분주하여 배양한 뒤, CAY10566, 올레산과 linoleamide alkyne으로 37°C 인큐베이터 내에서 2 시간 동안 인큐베이션 하였다. 3.7% formaldehyde로 세포를 고정하고 0.5% Triton X-100을 이용하여 permeabilization한 후 Alexa Fluor 488 Azide로 상온에서 30분 동안 형광염색하였다. 마지막으로 PBS로 행구고 DAPI를 염색한 이후, LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영하였다.

[0092] TUNEL 반응을 통한 세포사멸 분석

[0093] 3×10^4 개의 용모외영양막 세포를 10% FBS가 포함된 배지 300 μ l와 함께 confocal dish 에 분주하여 배양한 뒤, 24시간 FBS 기아상태로 추가로 배양하여 CAY10566과 올레산을 48시간 동안 처리하였다. 이후, 세포를 에어

드라이 시키고 4% paraformaldehyde로 상온에서 1시간 인큐베이션하여 세포를 고정시켰으며, 고정된 세포는 PBS로 한번 행구내고 0.1% sodium citrate에 0.1% Triton X-100가 함유된 용액을 사용하여 아이스 위에서 2분간 인큐베이션 시켰다. 다음으로 In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche)에 포함된 TUNEL staining mixture를 사용하여 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 1시간 동안 배양하였다. 마지막으로 PBS로 행구고 DAPI를 염색한 이후, LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영하였다.

[0095] 통계분석

[0096] 본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

[0098] <결과 및 고찰>

[0099] 지방산 합성 억제에 따른 옴모외영양막 세포의 증식성 분석

[0100] 지방산 합성이 영양막 세포의 증식을 조절할 수 있는지 확인하기 위해 옴모외영양막 세포주인 HTR8/SVneo 세포주에 지방산 합성 효소인 FASN에 대한 억제제인 C75를 용량 의존적으로 처리하였다. 측정 결과 10 μ M의 C75를 처리함에 따라 HTR8/SVneo 세포의 증식이 50% 미만으로 감소함을 확인하였다(도 1A). 또한 올레산과 엘라이드산을 용량 의존적(0, 5, 10, 20, 50, 100 μ M)으로 처리할 경우 HTR8/SVneo 세포의 증식에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(도 1B, 1C). C75를 HTR8/SVneo 세포에 처리한 후 Annexin V와 PI 염색을 통해 세포 사멸을 분석한 결과 20 μ M의 C75를 처리함에 따라 790% 가량 세포 사멸이 일어나는 것으로 확인되었다(도 1D).

[0102] 올레산과 엘라이드산이 옴모외영양막 세포의 이동성에 미치는 영향 분석

[0103] HTR8/SVneo 세포에 올레산을 처리한 결과 용량 의존적으로 세포의 이동성이 증가함을 확인하였다 (도 1E). 50 μ M의 올레산을 처리함에 따라 HTR8/SVneo 세포의 이동성이 190% 가량 증가하였다. 뿐만 아니라 HTR8/SVneo 세포의 침습성 역시 50 μ M 올레산을 처리함에 따라 236% 가량 증가함을 확인하였다 (도 1F). 반대로, 엘라이드산을 처리할 경우 HTR8/SVneo 세포의 이동성이 감소하였으며, 또 다른 트랜스지방산 계열인 박센산을 처리한 경우에도 세포의 이동성이 감소하는 것으로 확인되었다(도 1F, 1G).

[0105] SCD1 단백질이 올레산의 옴모외영양막 세포 이동성 조절에 미치는 영향 분석

[0106] 다양한 영양막 세포주 (JAR, JEG-3, BeWo, HTR8/SVneo)를 활용하여 지질대사에 관여하는 유전자들의 발현 차이를 확인한 결과 옴모외영양막 세포에서 특이적으로 발현하는 HLA-G의 mRNA 수준에서의 발현이 HTR8/SVneo에서 높게 나타남을 확인하였다. 뿐만 아니라 대부분의 지질대사 관련 유전자들의 발현이 HTR8/SVneo에서 높게 나타남에 따라 옴모외영양막 세포의 특성에 지질대사의 조절이 중요함을 추측할 수 있었다 (도 2A). 이 중 SCD1은 올레산의 합성에 직접적으로 관여하는 효소로서 올레산이 HTR8/SVneo의 이동성을 조절함에 있어 중요하게 작용할 것이라는 가정하에 SCD1의 활성을 특이적으로 억제하는 화합물인 CAY10566을 용량의존적으로 처리한 결과 항증식성이 나타남을 확인하였다 (도 2B). 또한 올레산을 처리할 경우 HTR8/SVneo 세포내 SCD1의 mRNA 발현이 감소되었으며, 엘라이드산을 처리할 경우에는 반대로 SCD1의 발현이 증가됨을 확인하였다 (도 2C). CAY10566과 올레산을 병용처리한 후 HTR8/SVneo의 이동성을 분석한 결과 SCD1의 억제에 따라 올레산에 의해 증가했던 이동성이 감소하는 것으로 나타났다 (도 2D). 뿐만 아니라, CAY10566과 올레산의 병용 처리는 다양한 세포 이동성 조절 인자의 발현을 조절하며, 특히 MMP9의 발현은 CAY10566 병용 처리시 올레산 단독 처리시보다 확연히 감소함을 확인할 수 있었다 (도 2E). 이러한 결과를 통해 SCD1에 의해 세포 내재적으로 생성되는 올레산과 외재적으로 작용하는 올레산 모두 옴모외영양막 세포의 이동성에 영향을 미칠 수 있음을 확인하였다.

[0108] 올레산과 엘라이드산이 옴모외영양막 세포내 MAPK, PI3K/AKT 신호전달경로에 미치는 영향 분석

[0109] HTR8/SVneo 세포내 올레산 또는 엘라이드산을 2시간 처리 후 웨스턴블롯을 수행하여 MAPK 및 PI3K/AKT 신호전달

경로의 인산화를 확인하였다. ERK1/2, P90RSK, JNK의 인산화는 올레산 또는 엘라이드산을 처리할 경우 모두 증가하는 것으로 나타났다 (도 3A-3C). P38의 인산화는 올레산의 농도가 높아짐에 따라 증가하였으나 엘라이드산은 P38의 인산화에 영향을 주지 않았다 (도 3D). 또한, AKT와 AKT의 하위 신호전달 단백질인 P70S6K의 활성화 역시 올레산과 엘라이드산에 의해 인산화가 증가하였다 (도 3E, 3F). S6의 인산화는 올레산과 엘라이드산 처리에 따라 차이를 보였는데, 올레산을 처리할 경우에는 S6의 인산화가 증가한 반면, 엘라이드산을 처리할 경우에는 감소하는 것으로 확인되었다 (도 3G). 마지막으로, PI3K/AKT 신호전달 경로에 속하는 단백질인 GSK3 β 의 인산화는 올레산 또는 엘라이드산 모두에 의해 증가하는 것으로 나타났다 (도 3H). 다음으로, AKT 억제제 (LY294002), ERK1/2 억제제 (U0126), P38 억제제 (SB203580), mTOR 억제제 (Rapamycin) 등 다양한 신호전달 단백질의 선택적 억제제를 올레산과 병용처리할 경우 HTR8/SVneo 세포의 이동성 변화를 분석하였다. 분석 결과, P38에 대한 특이적 억제제인 SB203580 만이 올레산에 의한 이동성 증가를 완화함을 확인하였다 (도 4A). 또한 SB203580과 올레산을 병용처리할 경우 다양한 세포 이동성 관련 유전자의 발현을 확인한 결과 대부분의 유전자들의 발현이 P38의 활성을 억제함에 따라 감소하는 것으로 나타났다 (도 4B). 뿐만 아니라, 세포내 형광편역탐지법을 통해 P38의 인산화 형태의 발현을 확인한 결과 올레산에 의해 약 170% 가량 형광 신호가 증가하는 것으로 나타났다 (도 4C). 이러한 결과를 통해 P38 단백질이 올레산이 매개하는 용모외영양막 세포의 이동에 중요하게 작용한다는 것을 확인하였다.

[0111] 올레산과 AKT, ERK1/2 신호전달기전 억제제 혼합물을 통한 용모외영양막 세포 내 신호전달물질 인산화 패턴 분석

[0112] 용모외영양막 세포 내 이동성 촉진 효과를 갖는 올레산의 정확한 세포내 기전을 파악하기 위해 용모외영양막 세포 내에 LY294002 또는 U0126을 1 시간동안 먼저 인큐베이션 시키며 신호전달기전을 막은 후 올레산을 처리하여 신호전달 단백질의 인산화 양상을 확인하였다. 올레산이 유도하는 ERK1/2의 활성화는 LY294002 또는 U0126을 처리함에 따라 감소하였다 (도 5A). 하지만, P90RSK의 활성화는 LY294002 처리에 의해서는 큰 변화를 보이지 않았다 (도 5B). 또한, 올레산에 의해 증가한 P70S6K와 S6의 인산화는 AKT에 대한 억제제인 LY294002 처리뿐만 아니라 U0126 처리에 의해서도 억제됨을 확인하였다 (도 5C-5E). 하지만, P38의 활성화는 두 선택적 억제제에 의해서 큰 영향을 받지 않았다 (도 5F). 이러한 결과를 통해 올레산에 의해 활성화되는 PI3K/AKT와 ERK1/2 경로가 서로 교차하며 조절 효과를 지니지만, P38의 활성화는 직접적으로 연관되어 있지 않음을 확인하였다.

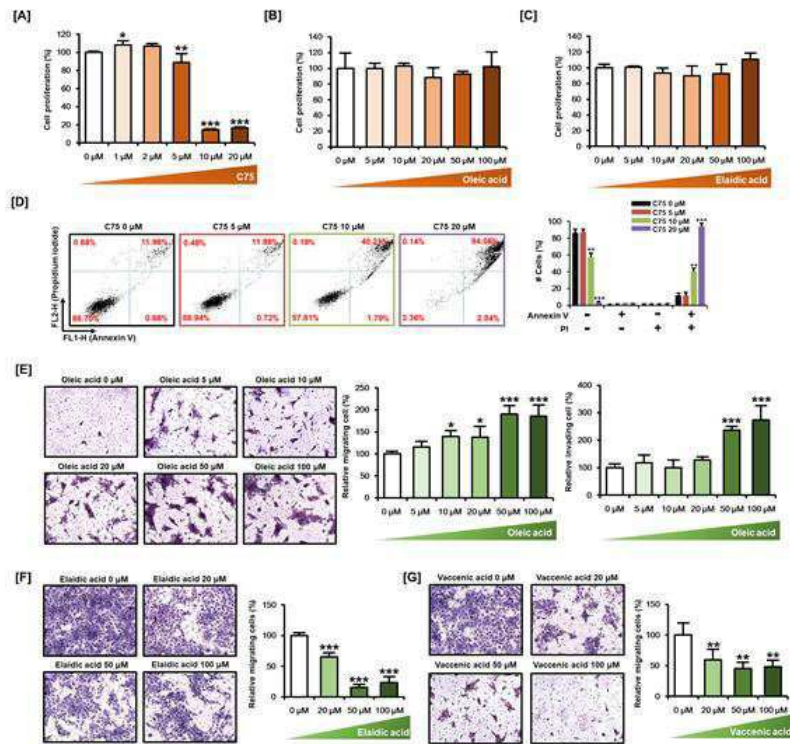
[0114] 올레산과 엘라이드산에 의한 용모외영양막 세포 내 산화 조건 조절 효과 분석

[0115] 올레산과 엘라이드산이 HTR8/SVneo 내 산화 조건을 조절할 수 있는지 확인하기 위해 먼저 ROS 생성을 측정한 결과, 올레산과 엘라이드산 모두 세포내 ROS를 증가시킬 수 있음을 확인하였다 (도 6A, 6B). 세포내 Ca²⁺ 농도를 측정한 결과, 엘라이드산 처리시 Ca²⁺ 농도가 증가한 반면 올레산 처리시 Ca²⁺ 농도가 감소하는 것으로 나타났다 (도 6C, 6D). 또한, 올레산에 의해 감소한 Ca²⁺ 농도는 ERK1/2이 억제(U0126)됨에 따라 회복된 반면, PI3K/AKT이 억제되거나(LY294002) mTOR이 억제될 경우(Rapamycin)에는 더욱 감소하는 것으로 나타났다. 다음으로, 올레산 합성의 원료가 되는 포화지방산인 팔미트산과 스테아르산을 처리할 경우 HTR8/SVneo의 증식성을 분석하였다 (도 7A). 측정 결과 불포화지방산인 올레산 또는 엘라이드산은 SCD1이 억제되어도 HTR8/SVneo의 증식에 큰 영향을 주지 않았으나 포화지방산 계열은 SCD1의 활성화에 따라 다른 세포독성을 나타내는 것으로 나타났다. 또한 CAY10566에 의해 증가한 HTR8/SVneo 세포내 지질과산화 및 DNA 단편은 올레산에 의해 완화됨을 확인하였다 (도 7B, 7C).

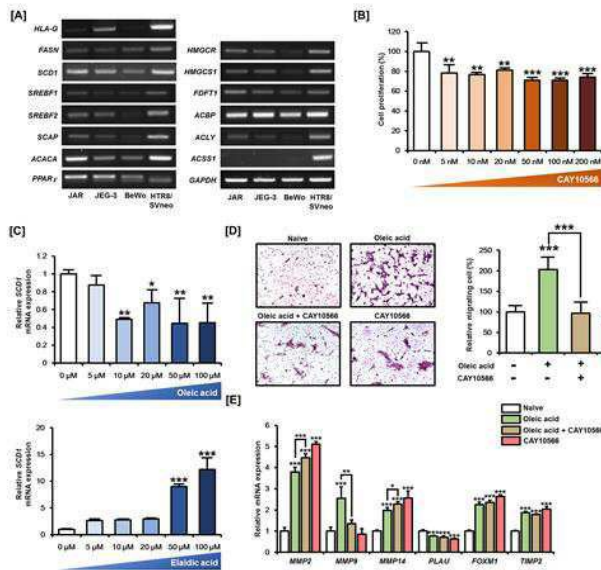
[0117] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시 태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

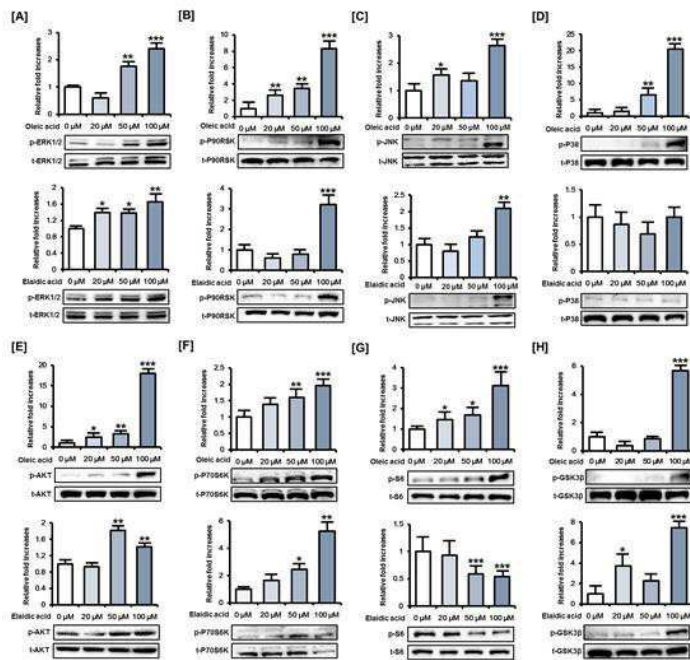
도면1



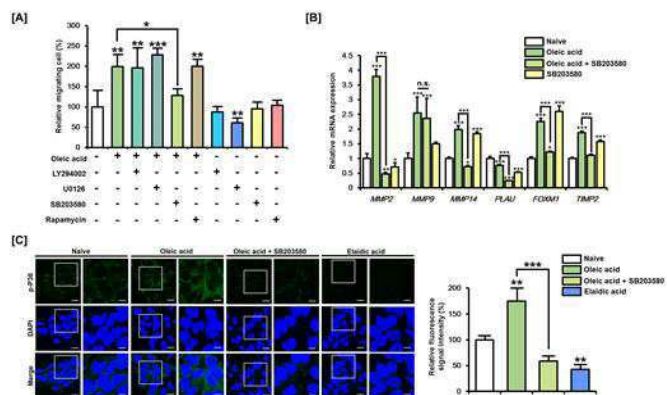
도면2



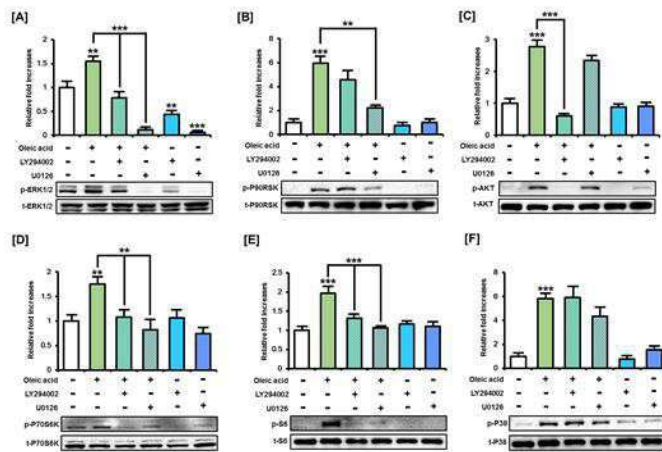
도면3



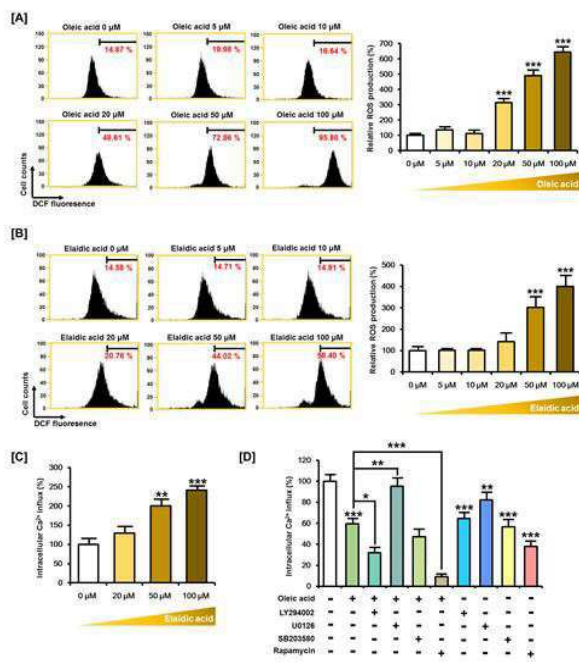
도면4



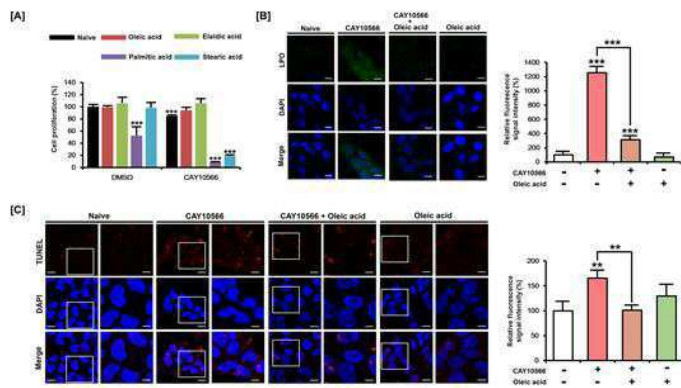
도면5



도면6



도면7



도면8

