



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0150004
(43) 공개일자 2021년12월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/085 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)

A61P 21/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/085 (2013.01)

A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2020-0066844

(22) 출원일자 2020년06월03일

심사청구일자 2020년06월03일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

송권화

충청남도 천안시 서북구 충무로 124-24, 114동 803호

박선우

서울특별시 동대문구 약령시로 25, 105동 903호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

정은열, 김태훈

전체 청구항 수 : 총 7 항

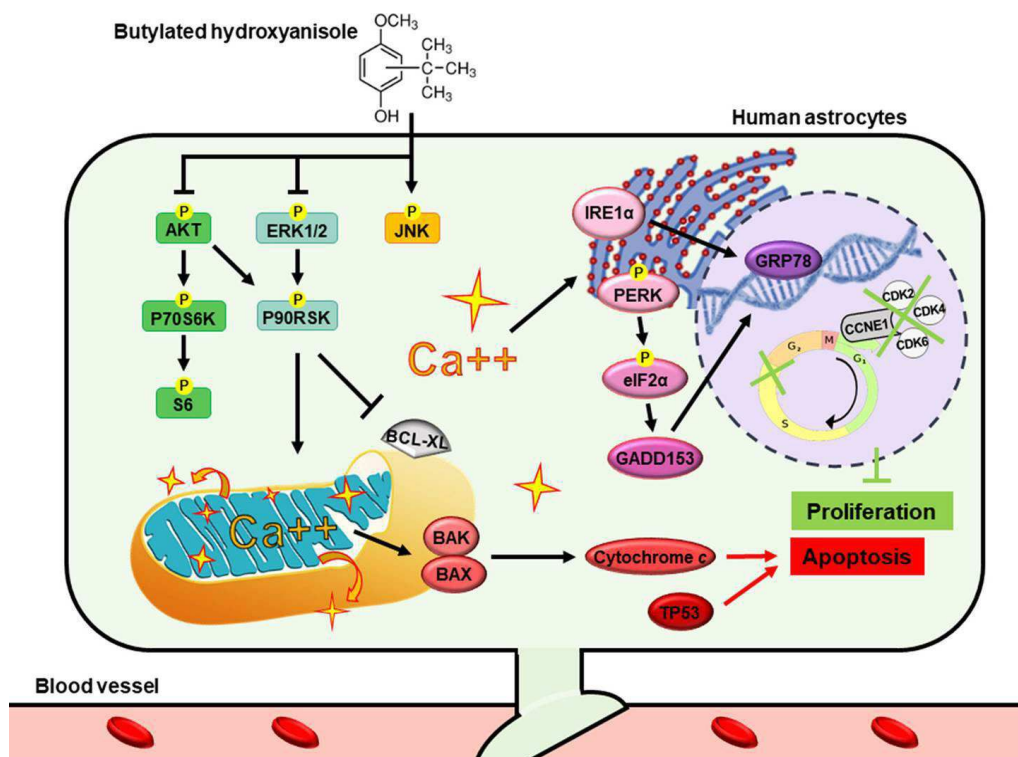
(54) 발명의 명칭 부틸히드록시아니솔을 포함하는 정상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 부틸히드록시아니솔(butylated hydroxyanisole, BHA)을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 부틸히드록시아니솔을 유효성분으로 포함하는 정상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 부틸히드록시아니솔을 유효성분으로 포함하는 정상세포 과증식에 의해 유발되

(뒷면에 계속)

대표도 - 도7



는 신경 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 부틸히드록시아니솔을 유효성분으로 포함하는 조성물은 정상세포 내 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달 메커니즘을 조절하는 세포주기 조절 단백질의 발현을 억제함으로써 정상세포의 증식을 억제하고, Bax, cytochrome x, caspase family와 같은 세포사멸 인자를 증가시켜 세포사멸 효과를 향상시키는 효과를 보이는데, 정상세포의 비정상적 활성화에 의해 발병하는 신경 질환을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61P 21/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

(72) 발명자

박원형

서울특별시 성북구 안암로 145

배효철

서울시 성북구 안암로 145

양창원

서울특별시 성북구 한천로 713, 501동 1202호

명세서

청구범위

청구항 1

부틸히드록시아니솔(butylated hydroxyanisole, BHA)을 유효성분으로 포함하는 정상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 부틸히드록시아니솔이 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 하는 정상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

PI3K/AKT 또는 MAPK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 정상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 정상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환은 정상세포종(Astrocytoma), 신경교식증(Astrogliosis), 뇌허혈(Ischemic stroke) 또는 뇌손상 후 섬유화(Glial scar formation)인 것을 특징으로 하는 정상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

부틸히드록시아니솔(butylated hydroxyanisole, BHA)을 유효성분으로 포함하는 정상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

부틸히드록시아니솔(butylated hydroxyanisole, BHA)을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 정상세포의 증식을 억제하는 방법.

청구항 7

부틸히드록시아니솔(butylated hydroxyanisole, BHA)을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 정상세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 부틸히드록시아니솔(butylated hydroxyanisole, BHA)을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 부틸히드록시아니솔을 유효성분으로 포함하는 정상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 부틸히드록시아니솔을 유효성분으로 포함하는 정상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 중추신경계 중 정상세포는 뇌-혈관 접합부에 주로 존재하며 뇌의 이온 균형, 영양 공급, 시냅스를 통한 정보 전달, 면역 보호, 해독작용 등 전반적인 항상성 유지를 담당하고 있다 (Pan et al., Mol Brain., 2016; Horner

and Palmer, Trends Neurosci. 2003).

- [0003] 뇌 손상이 일어나는 동안 정상세포는 반응성 세포로 변화하며 형태학적 변형뿐만 아니라 유전적, 종양원성, 이주/침투력 등이 증가하는 양상을 보이며, 손상이 회복되는 과정에서 GFAP, MMP2와 같은 지표 인자들이 활성화된다(Burda et al., Exp Neurol, 2016; Hope and Hope, J Environ Public Health, 2012).
- [0004] 기능이 변형되거나 과활성 상태가 된 정상세포는 뇌-혈관 접합부의 기능 상실을 일으키며, 뇌 허혈과 같은 뇌손상을 가속화시키는 문제를 일으킨다(Maurya et al., Pestic Biochem Phys, 2014).
- [0005] 한편, 부틸히드록시아니솔(butylated hydroxyanisole, BHA)은 합성 페놀류 항산화제로서 지방의 산패를 막는 성질이 있어 식품 보존제로서 널리 사용되어 왔다. 이전 연구들에 따르면, 부틸히드록시아니솔은 생식 기관의 미분화를 유도하고, 성호르몬 합성을 저해하는 등 생식 세포에 영향을 주며(Jeong et al., 2005, Toxicology), 설치류의 Steroid 5 Alpha-Reductase 1 (Srd5a1)와 경쟁적 저해제 또는 사람과 쥐 모두에서 Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 2 (HSD11B2)에 대한 선택적 저해제로 작용될 수 있음이 보고된바 있다(Guo et al., Neurosci Lett, 2017; Li et al., Pharmacology 2016).
- [0006] 이처럼, BHA의 다양한 기능 및 효과들이 보고되고 있으나, 현재까지 정상세포 과증식에 의한 신경질환 치료 효과에 대해서는 보고된바 없다.
- [0007] 전술한 기술적 배경하에서, 본 발명자들은 정상세포 과증식에 의한 신경질환 치료 물질을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, BHA가 정상세포의 증식을 억제하고, 세포의 사멸효과를 향상시키는 효과가 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 부틸히드록시아니솔을 유효성분으로 포함하는 정상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 부틸히드록시아니솔을 유효성분으로 포함하는 정상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 부틸히드록시아니솔을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 정상세포의 증식을 억제하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 부틸히드록시아니솔을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 정상세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 부틸히드록시아니솔을 유효성분으로 포함하는 정상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 부틸히드록시아니솔을 유효성분으로 포함하는 정상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 부틸히드록시아니솔을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 정상세포의 증식을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 부틸히드록시아니솔을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 정상세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명에 따른 부틸히드록시아니솔을 유효성분으로 포함하는 조성물은 정상세포 내 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달 메커니즘을 조절하는 세포주기 조절 단백질의 발현을 억제함으로써 정상세포의 증식을 억제하고, Bax, cytochrome x, caspase family와 같은 세포사멸 인자를 증가시켜 세포사멸 효과를 향상시키는 효과를 보이는데, 정상세포의 비정상적 활성화에 의해 발병하는 신경 질환을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과 관련

된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 부틸히드록시아니솔이 성상세포 증식에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 부틸히드록시아니솔의 성상세포 사멸 유도 기전을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 부틸히드록시아니솔이 성상세포의 칼슘 이온 및 소포체 스트레스 조절에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 부틸히드록시아니솔의 성상세포 내 신호단백질 조절 기전을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 부틸히드록시아니솔이 제브라피쉬 치어의 발달에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 부틸히드록시아니솔의 제브라피쉬 치어 신경발달에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 부틸히드록시아니솔의 성상세포 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 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.
- [0020] 본 발명에서는 부틸히드록시아니솔의 성상세포 내 세포 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 밝혔다(도 7).
- [0021] 본 발명은 일 관점에서 부틸히드록시아니솔을 유효성분으로 포함하는 성상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0022] 본 발명은 다른 관점에서 부틸히드록시아니솔을 유효성분으로 포함하는 성상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.
- [0024] 본 발명에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 성상세포는 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 샴팬지), 토끼목(토끼 및 우는 토끼), 식충목(예를 들어, 고슴도치, 두더지 및 슬레노돈) 및 영장목(예를 들어, 침팬지, 오랑우탄, 고릴라, 보노보노, 일본원숭이, 붉은털원숭이)일 수 있다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 함유하는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 담체는 이온 교환 수지, 알루미늄, 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.
- [0027] 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, 에멀전, 겔 및 분말로 구성된 군에서 선택되는 제형을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0028] 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.

- [0029] 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.
- [0030] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상적인 건강기능식품의 제형으로 제제화될 수 있고, 과립제, 정제, 환제, 현탁액, 에멀전, 시럽제, 껌, 차, 젤리, 각종 음료수, 드링크제, 알코올 음료 등으로 제조될 수 있으며, 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한이 없다.
- [0031] 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 부틸히드록시아니솔이 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0033] 본 발명에 따르면, PI3K/AKT 또는 MAPK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0034] 본 발명에 따르면, 상기 정상세포 과증식에 의해 유발되는 신경 질환은 정상세포종(Astrocytoma), 신경교식증(Astrogliosis), 뇌허혈(Ischemic stroke) 또는 뇌손상 후 섬유화(Glial scar formation)인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0035] 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, 부틸히드록시아니솔을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 정상세포의 증식을 억제하는 방법에 관한 것이다.
- [0037] 본 발명은 또 다른 관점에서, 부틸히드록시아니솔을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 정상세포의 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.

[0041] 실시예

[0042] <실험방법>

[0043] 세포배양

[0044] NHA 세포는 Lonza Life Science에서 구매하여 SV40LT로 불멸화 시킨 후 사용하였으며, 세포의 단층배양을 위해 astrocyte medium complete kit (Cat No. #1801) 배지에 풀어, 37℃/5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.

[0046] 실험 재료

[0047] 후보 조성물질인 부틸히드록시아니솔 (Cat No. W218308)은 Sigma-Aldrich, Inc로부터 구매하여 사용하였으며, 신호전달체커니즘을 확인하기 위하여 phospho-AKT (Ser⁴⁷³, catalog number: 4060), P70S6K (Thr⁴²¹/Ser⁴²⁴), S6 (Ser²³⁵/Ser²³⁶, catalog number: 2211), ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴, catalog number: 9101), JNK (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵, catalog number: 4668) 단백질 및 total-AKT (catalog number: 9272), P70S6K (catalog number: 9202), S6

(catalog number: 2217), ERK1/2 (catalog number: 4695), JNK (catalog number: 9252), cytochrome c, BCL-XL, caspase 3, caspase 9, cleaved caspase 3, cleaved caspase 9 IRE1 α 단백질에 대한 항체를 Cell Signaling Technology사로부터 구매하였다. 또한, phosphorylated eIF2 α , total eIF2 α , GRP78, GADD153, PCNA, TUBA 단백질에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology사로부터 구매하였다.

[0049] BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석

[0050] NHA-SV40LT 세포의 증식 능력에 부틸히드록시아니솔이 미치는 영향을 확인하기 위하여 배양한 5×10^3 개의 세포와 배지 100 μ l를 96 well에 분주하고 부틸히드록시아니솔 (0, 25, 50, 75, 100 μ M)를 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% CO₂ 인큐베이터 내에서 2시간 동안 배양하였다. NHA-SV40LT 세포에 BrdU를 labeling 하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 상온에서 90분 인큐베이션 시킨 이후 3차례 씻어주었으며, 마지막으로 100 μ l의 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] 3×10^4 개의 NHA-SV40LT 세포를 배지 300 μ l와 함께 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 부틸히드록시아니솔 100 μ M를 48시간 동안 처리한 뒤 메탄올로 10분간 세포를 고정하고, 2 μ g/ml로 희석된 PCNA 항체를 처리하였으며 대조군에는 mouse IgG를 처리하여 4 $^{\circ}$ C에서 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 1시간 동안 배양하였다. NHA-SV40LT 세포를 0.1% BSA-PBS로 워싱한 다음 DAPI 염색을 추가적으로 시행하여 자궁내막증 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] Propidium iodide 염색을 통한 세포주기 분석

[0056] 세포주기 분석은 Propidium iodide (BD Biosciences) 염색을 통해 실험을 진행하였다. 먼저 5×10^5 개의 세포를 6 well에 배양하고 부틸히드록시아니솔 (0, 25, 50, 100 μ M)를 용량의존적으로 처리하여 48시간 동안 37 $^{\circ}$ C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 워싱을 진행하고, 차가운 70% 에탄올로 18시간 이상 세포를 고정하였다. 원심분리를 이용해 세포를 모아 1 mL의 0.1% BSA-PBS를 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 10 mg/mL RNase A (Sigma-aldrich) 5 μ L, 50 mg/mL PI 5 μ L를 함께 혼합하여 세포를 30분 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 세포주기를 분석하였다.

[0058] Fluo-4를 이용한 세포내 Ca²⁺ 농도 측정

[0059] 세포 내 Ca²⁺ 농도에 부틸히드록시아니솔이 미치는 영향을 확인하기 위하여 먼저 NHA-SV40LT 세포 5×10^5 개를 6 well에 배양하고 부틸히드록시아니솔 (0, 25, 50, 100 μ M)를 용량의존적으로 또는 칼슘킬레이트와 함께 처리하여 48시간 동안 37 $^{\circ}$ C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 Fluo-4 AM (Invitrogen)을 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터 내에서 20분 동안 인큐베이션 하였다. 염색된 세포를 PBS로 한 번 워싱하고 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0061] 단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)

[0062] NHA-SV40LT 세포에 시간에 따라 부틸히드록시아니솔을 처리한 다음 NHA-SV40LT 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) 시약 및 ChemiDoc EQ system과 Quantity One software (Bio-Rad) 기기를 사용하여 타겟 단백질의 발현을 분석하였다.

[0064] 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응

[0065] 5×10^5 개의 세포를 6 well에 배양하고 부틸히드록시아니솔 (0, 25, 50, 100 μ M)을 용량의존적으로 처리하여 48 시간 동안 37℃/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 세포의 RNA는 Trizol reagent를 통해 제조사의 매뉴얼 대로 RNA 추출을 시행하였다. cDNA는 total RNA 1 μ g과 AccuPower premix로 합성하였으며, 유전자 발현은 SYBR Green (Sigma-Aldrich)과 StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA)로 측정하였다. 타겟 유전자의 발현은 C_T값으로 계산하였으며, GAPDH 발현을 기준으로 표준화하였다. PCR 조건은 95℃로 3분 진행한 후, 95℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 30초 조건을 40회 증폭하였다.

[0067] 제브라피쉬 사육 및 실험

[0068] Wild type 제브라피쉬는 질환모델링 제브라피쉬 센터 (KNRRC)에서 분양받았으며, 12시간 광주기와 28.5℃ 수온을 유지하여 사육하였다. 낳은지 9시간이 지난 알을 10개씩 24well plate에 모아 0.003% 페닐티오우레아 (phenylthiourea)에 녹인 부틸히드록시아니솔 2 ml을 농도별로 처리하여 48시간 인큐베이션 하였다. 48시간 후, 각 제브라피쉬 치어의 사망 및 생존은 매일 측정하였으며, 기관 형성은 정립현미경 (LEICA DM 2500, Germany)를 통해 확인하여 각 이미지를 Image J에서 수치화하였다. gfap와 olig2 형질전환 제브라피쉬의 치어는 형광정립현미경 (Zeiss Axio Imager, Germany)를 통해 촬영하였으며, 형광 발현 강도는 Image J를 통해 분석하였다.

[0070] 통계분석

[0071] 본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

[0073] 결과 및 고찰

[0074] 부틸히드록시아니솔에 의한 정상세포의 증식 억제 효과

[0075] 부틸히드록시아니솔을 용량의존적으로 (0, 25, 50, 75, 100 μ M) 사람의 정상세포 (NHA-SV40LT)에 처리한 후 세포 증식력 변화를 확인하였다. 그 결과, NHA-SV40LT 세포의 증식력은 대조군보다 최대 40% ($p < 0.001$)까지 감소하였다 (도 1A). 다음으로 세포 증식에 필수적인 단백질인 PCNA의 단백질 발현 변화를 확인함으로써 부틸히드록시아니솔에 의한 정상세포의 증식력 억제 효과를 검증하였다. 그 결과, PCNA의 발현을 의미하는 녹색 형광 강도가 부틸히드록시아니솔 처리 시 31%로 감소하는 것을 확인하였다 (도 1B). 또한, 세포주기와 관련하여, 부틸히드록시아니솔은 NHA-SV40LT 세포의 증식 억제를 나타내는 Sub-G1기 그룹의 세포 수를 약 2.1배 ($p < 0.01$)까지 증가시키는 모습을 보였다 (도 1C). 이러한 세포주기의 억제는 부틸히드록시아니솔에 의해 유도되는 MYC, CCND1, CCNE1, CDK2, CDK6의 세포주기 조절 단백질 발현을 각각 0.42배, 0.01배, 0.6배, 0.01배로 감소시키는 동시에 P21의 발현을 3.1배 증가시킴으로써 유도되는 것임을 확인하였다 (도 1D-1H). 이러한 결과를 통해 부틸히드록시아니솔은 정상세포에서 세포증식과 DNA복제를 저해함으로써 세포증식을 억제한다는 것을 확인하였다.

[0077] 부틸히드록시아니솔에 의한 정상세포 사멸 유도 및 미토콘드리아 기능 억제 효과

[0078] 부틸히드록시아니솔이 정상세포의 사멸에 미치는 영향을 확인하기 위해 spheroid 세포배양을 진행하였다. 100 μ M의 부틸히드록시아니솔은 NHA-SV40LT 세포의 사멸을 유도하여, 세포의 spheroid 형성을 76% ($p < 0.001$) 감소시켰다 (도 2A). 또한, TP52, BAX와 같은 세포 사멸 촉진 단백질의 발현을 각각 1.85배, 1.59배 증가시키는 동시에 BCL2와 같은 세포 사멸 억제 단백질의 유전자발현은 0.16배로 감소시켰다 (도 2B-2D). 이러한 유전자의 발현은 실제 단백질의 발현으로 이어져, BAK 단백질을 제외한(도 2E) BAX (도 2F), cytochrome c (도 2G), cleaved-caspase 3 (도 2J), cleaved-caspase 9 (도 2L) 등의 미토콘드리아 의존성 세포사멸 유도 단백질이 모두 증가하는 것으로 나타났다. 반면에 세포사멸 억제 단백질인 BCL-XL (도 2H)과 비활성 상태의 caspase 3 (도 2I)와 caspase 9 (도 2K)의 발현은 감소되는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통해, 부틸히드록시아니솔이 사람의 정상세포인 NHA-SV40LT 세포에서 미토콘드리아 의존적 세포사멸 경로를 활성화하여 자멸사를 유도한다는 것을 확인하였다.

[0080] 정상세포에 작용하는 부틸히드록시아니솔의 칼슘 항상성 조절 장애 효과 분석

[0081] 세포 사멸에 관한 작용 외에도 세포 내 칼슘 항상성을 잘 유지하는 것 역시 미토콘드리아의 기능 중 하나이므로, 부틸히드록시아니솔이 세포 내 칼슘 항상성에 미치는 영향에 대해 분석하였다. 먼저, 세포질 내 칼슘 이온의 변화를 Fluo4-AM 염색을 통해 FACS로 측정 및 상대적 농도를 분석하였다. 그 결과, 부틸히드록시아니솔에 의해 NHA-SV40LT 세포질 칼슘이 160% ($p < 0.01$) 증가하는 것으로 나타났다 (도 3A). 이러한 불균형에 의해 소포체 내 스트레스 단백질인 IRE1 α , phosphorylated-eIF2 α , GADD153, GRP78이 모두 증가하는 것으로 나타났다 (도 3B). 이러한 칼슘 불균형이 실제 정상세포의 증식능력에 영향을 미치는지 분석하기 위하여 칼슘킬레이트제인 BAPTA-AM과 2-APB를 이용하여 부틸히드록시아니솔에 의해 유도된 칼슘 불균형을 조절하였으며 (도 3C), 특히 2 μ M BAPTA-AM 처리에 의해 정상세포의 증식력이 일부 회복되는 것을 확인하였다 ($p < 0.05$, 도 3D). 뿐만 아니라, 부틸히드록시아니솔과 BAPTA-AM의 병용처리는, 부틸히드록시아니솔에 의해 증가되었던 소포체스트레스 단백질 IRE1 α , phosphorylated-eIF2 α , GADD153의 발현을 감소시켰고 (도 3E), 세포 사멸 단백질인 cytochrome c, cleaved caspase-3, -9의 발현을 증가시키는 동시에, 비활성 상태의 caspase-3와 -9의 발현은 증가시키는 것으로 나타났다 (도 3F).

[0083] 정상세포에 작용하는 부틸히드록시아니솔의 신호단백질 조절 효과 분석

[0084] 부틸히드록시아니솔에 의한 MAPK 및 PI3K/AKT 신호전달 단백질 변화를 알아보기 위해, 웨스턴 블랏을 수행하였다. NHA-SV40LT에 부틸히드록시아니솔을 처리한 농도에 따라 모든 단백질의 인산화가 변화하였다 (도 4A-4H). 구체적으로, AKT ($p < 0.05$), P70S6K ($p < 0.001$), S6 ($p < 0.001$), ERK1/2 ($p < 0.05$), P90RSK ($p < 0.01$)의 인산화는 감소하였고, JNK ($p < 0.001$)의 인산화는 증가하였다. 각 신호전달 단백질이 정상세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 부틸히드록시아니솔과 신호 단백질 억제제를 각각 병용처리하여, 세포증식의 변화를 확인하였다 (도 4I). 그 결과, LY294002 (AKT 억제제)와 U0126 (ERK1/2 억제제)를 병용처리에 따라 억제제 단독 처리할 때보다 세포 증식률이 증가하는 것을 확인하였다 ($p < 0.05$).

[0086] 부틸히드록시아니솔이 제브라피쉬 치어에 미치는 영향 확인

[0087] 부틸히드록시아니솔이 제브라피쉬 치어에 미치는 영향을 확인하기 위하여 부틸히드록시아니솔을 용량의존적으로 첨가한 배지에 48시간 배양하였으며 이후, 정립현미경을 사용하여 치어 20마리의 발달 상황을 비교하였다 (도 5A). 부틸히드록시아니솔 처리는 치어의 치사율 ($p < 0.001$), 심장독성 ($p < 0.001$), 기관형성이상 ($p < 0.001$)을 촉진하였으며, 뇌 발달을 저해하였다 ($p < 0.001$). 이러한 기관 발달 억제 현상은 부틸히드록시아니솔이 제브라피쉬 치어의 눈과 심장 부위에 세포사멸을 유도함에 의한 것이며 (도 5B), 특히 100 μ M 부틸히드록시아니솔은 제브라피쉬 치어의 체내 세포 사멸 단백질인 tp53의 발현을 약 2.41배 증가시켜서 ($p < 0.001$, 도면 5C) 세포 사멸을 148배 증가시켰다 ($p < 0.05$, 도 5D).

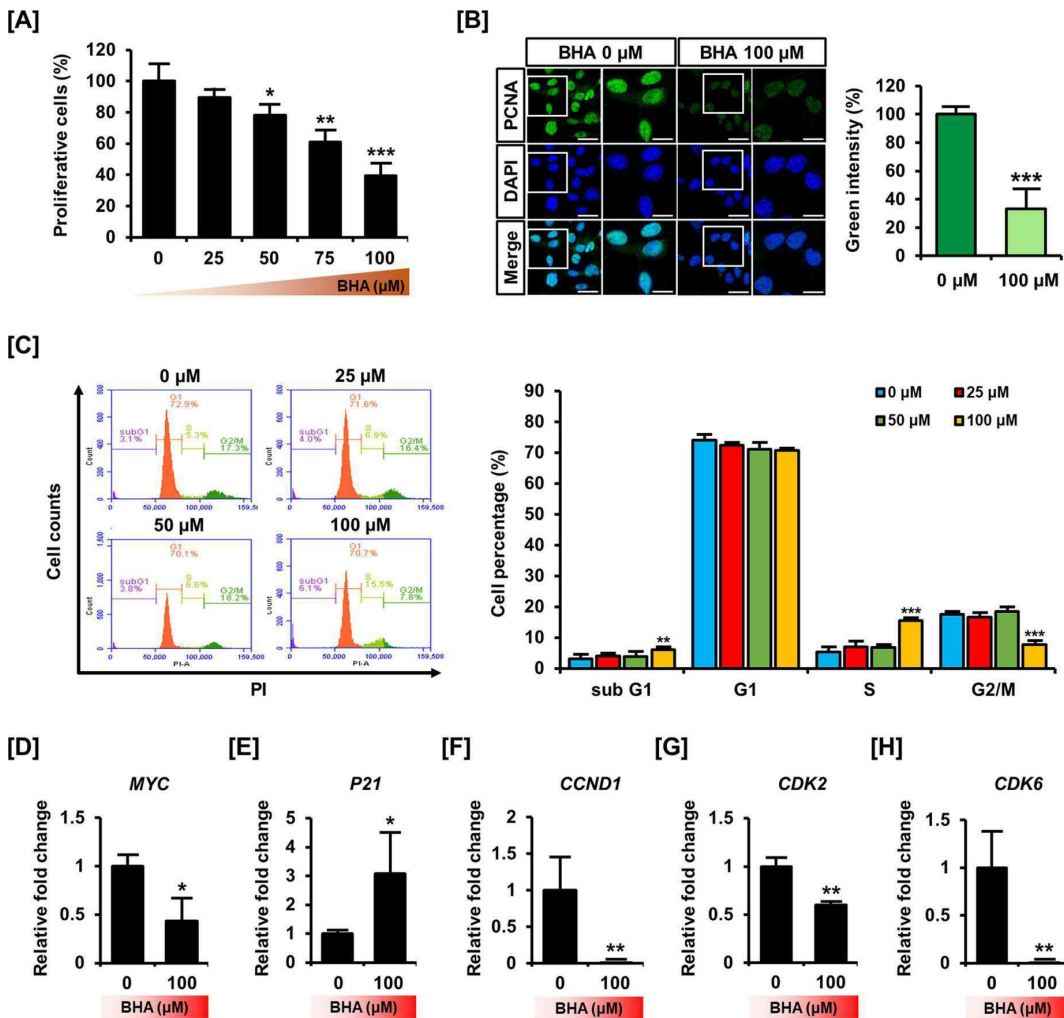
[0089] 부틸히드록시아니솔에 의한 제브라피쉬 치어의 뇌세포 발달 억제 효과

[0090] 부틸히드록시아니솔 처리에 의해 실제 동물에서 뇌세포의 발달이 억제되는지 확인하기 위하여, 정상세포의 마커인 GFAP 단백질에 형광을 발현하는 형질전환 제브라피쉬를 이용하여 그 발현을 확인하였다 (도 6A). 또한, 100 μ M 부틸히드록시아니솔은 제브라피쉬 치어의 GFAP 단백질 발현을 59%로 감소시키는 것을 확인하였다 ($P<0.05$, 도 6B). 뿐만 아니라, 희소돌기교세포의 마커인 olig2 (도 6) 단백질의 발현 역시 부틸히드록시아니솔 처리에 의해 62%로 ($P<0.05$, 도 6D)로 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통해 부틸히드록시아니솔의 정상세포 성장을 억제하고, 사멸을 유도하는 효과가 있음을 확인하였다.

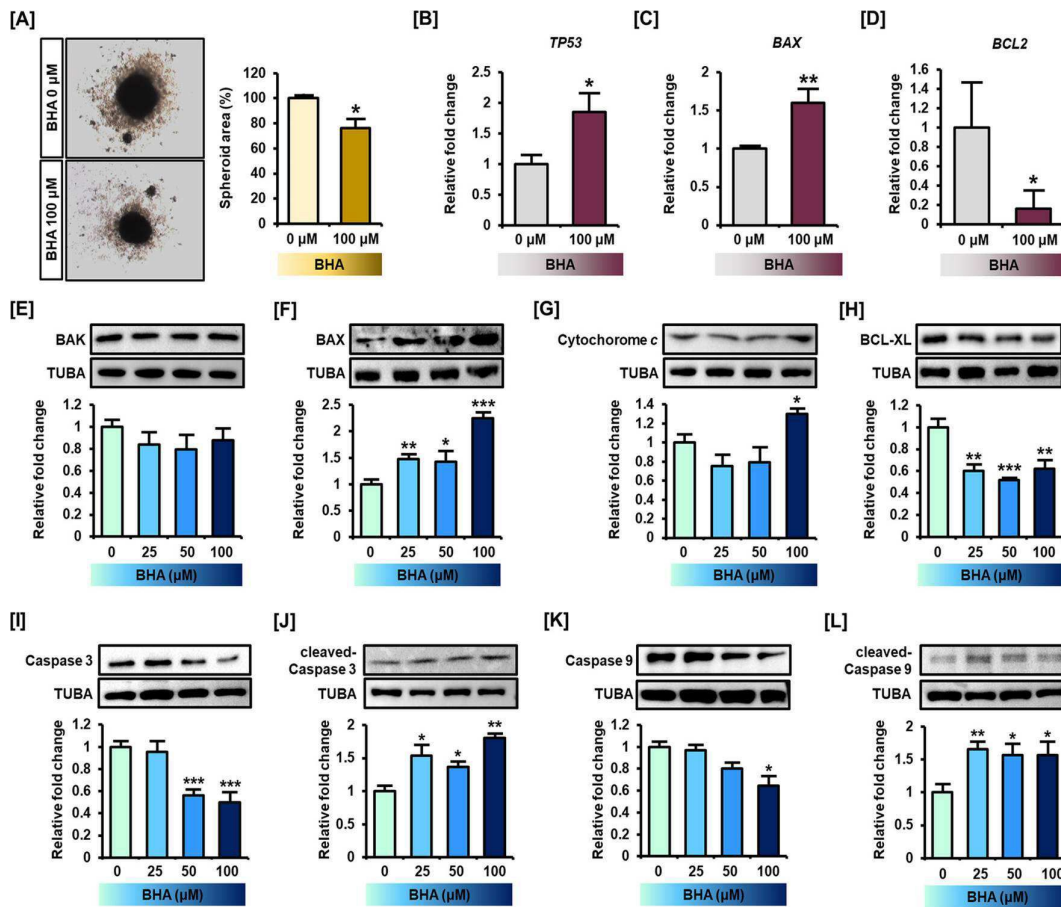
[0092] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

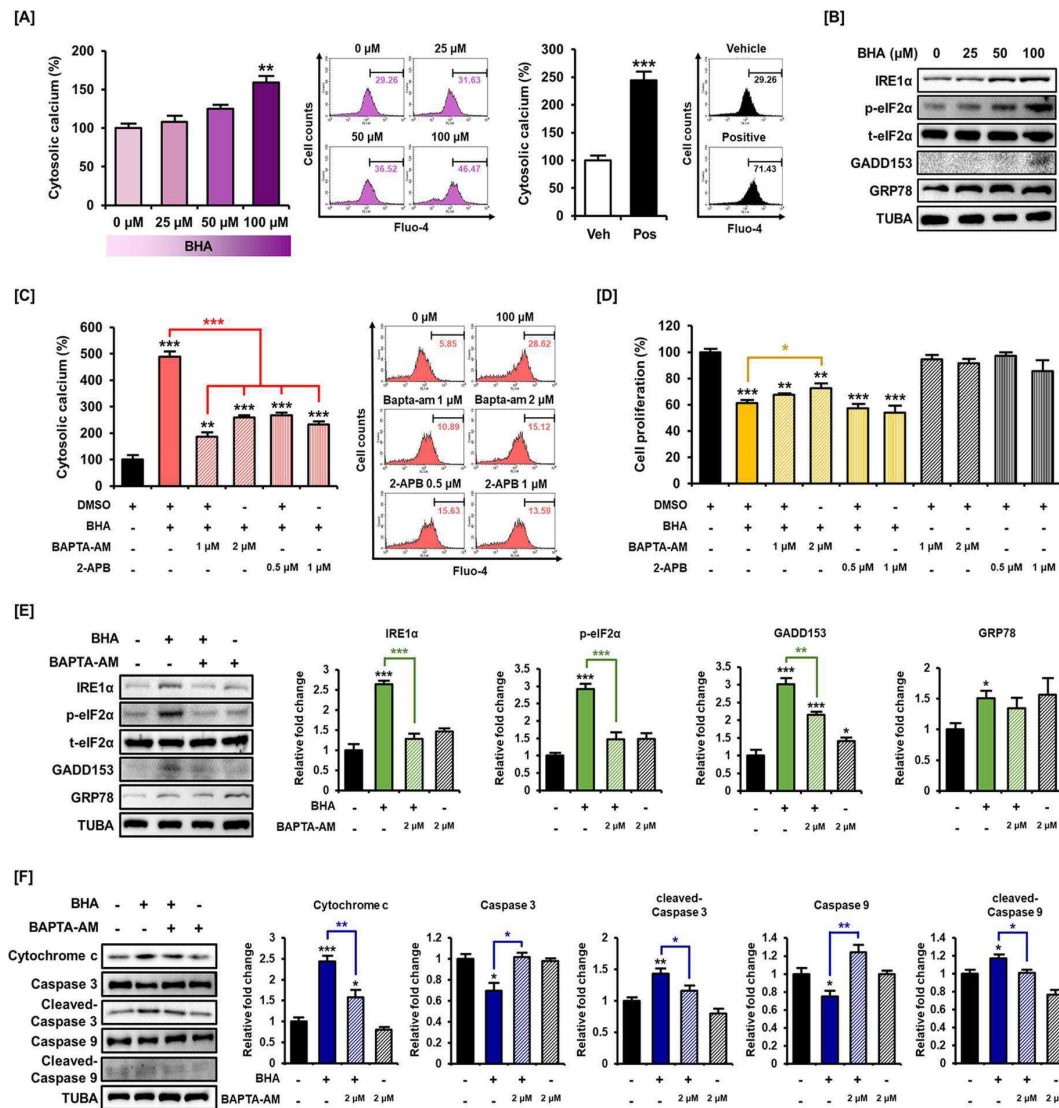
도면1



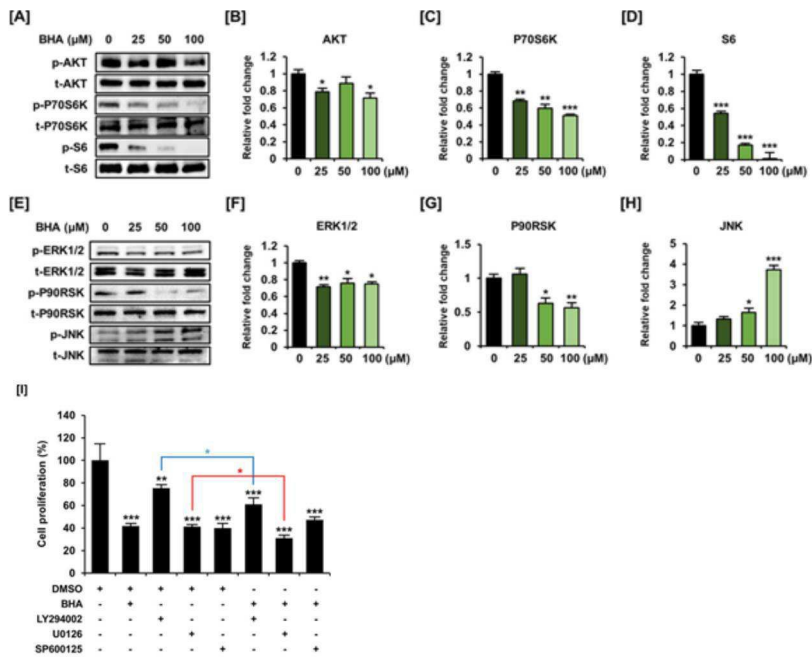
도면2



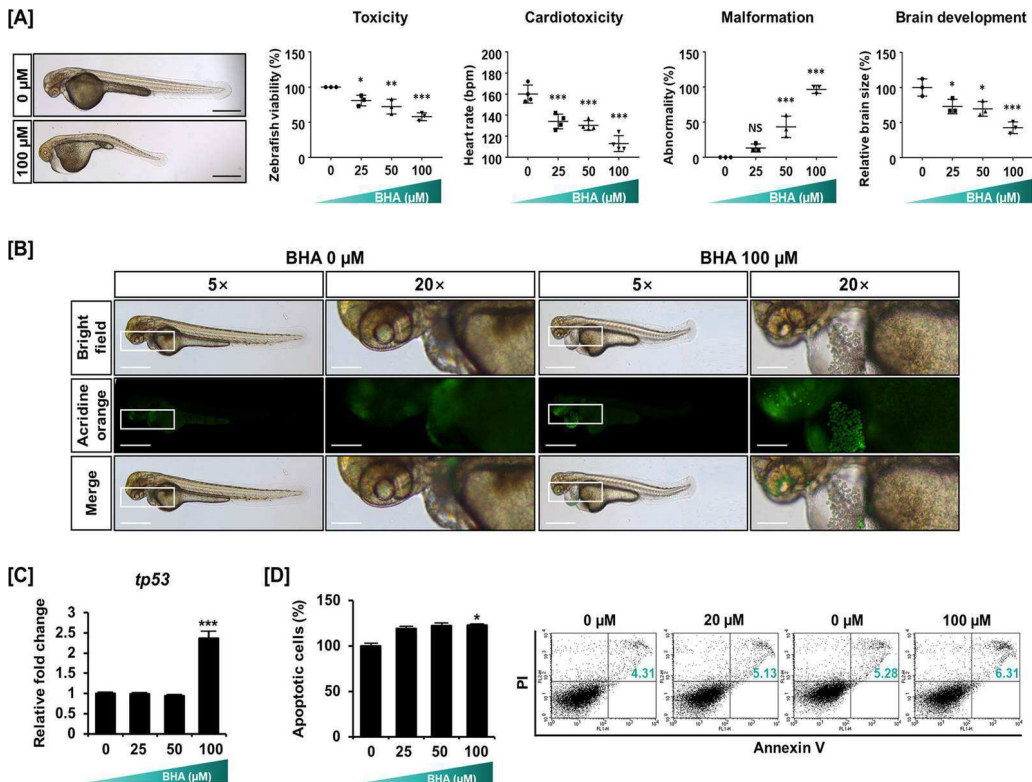
도면3



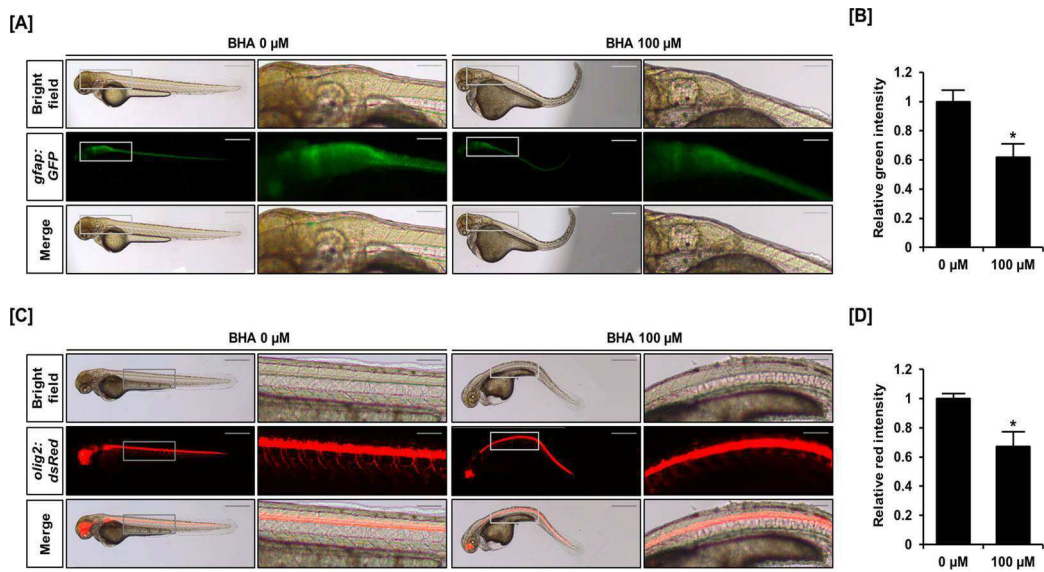
도면4



도면5



도면6



도면7

