

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0040445

(43) 공개일자 2020년04월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/37 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)*A61P 35/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/37 (2013.01)*A23L 33/10* (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0120371

(22) 출원일자 2018년10월10일

심사청구일자 2018년10월10일

(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

(74) 대리인

정은열

전체 청구항 수 : 총 8 항

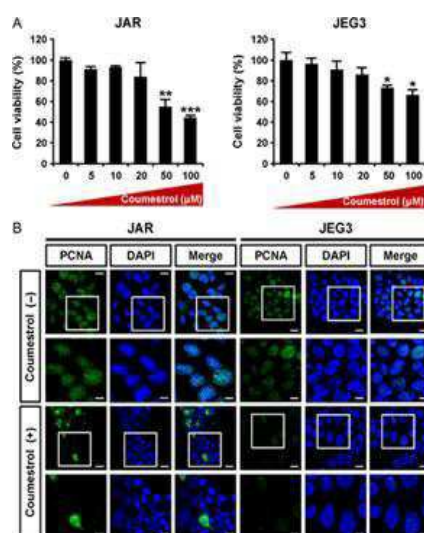
(54) 발명의 명칭 쿠메스트롤을 포함하는 용모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

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

본 발명에 따른 쿠메스트롤을 유효성분으로 포함하는 조성물은 식물에서 추출된 것으로서 화학적 합성물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, 용모막암 세포 내 증식 및 이주성을 억제하고 용량 의존적으로 용모막암 세포주 내 사멸 세포의 수를 증가시킬 뿐만 아니라, ERK1/2 또는 JNK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제와 병용 처리하는 경우 세포 사멸의 시너지 효과를 얻을 수 있는바, 생명과학, 의학 등 다양한 산업 분야에 널리 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C0810

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발사업 (질병중심 중개중점연구)

연구과제명 염증성 조산 치료 및 신생아의 뇌손상 치료를 위한 태아 유래 중간엽 줄기세포 치료제 개

발

기 여 율 50/100

주관기관 고려대학교

연구기간 2015.09.07 ~ 2018.09.06

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI17C0929

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발사업

연구과제명 액체생체검사 기반 난소암 조기 진단, 재발 예측 및 항암제 내성 관련 엑소좀 바이오마커

발굴 및 검증

기 여 율 50/100

주관기관 가톨릭관동대학교

연구기간 2017.04.10 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

쿠메스트롤을 유효성분으로 포함하는 용모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 쿠메스트롤이 ERK1/2 및 JNK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 하는 용모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

ERK1/2 또는 JNK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 용모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

쿠메스트롤을 유효성분으로 포함하는 용모막암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 쿠메스트롤이 ERK1/2 및 JNK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 하는 용모막암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

ERK1/2 또는 JNK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 용모막암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

쿠메스트롤을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 용모막암 세포주의 증식 및 이주 능력을 억제시키는 방법.

청구항 8

쿠메스트롤을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 용모막암 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

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

배경 기술

[0002]

용모막암은 임신성 영양막 질환중 가장 악성의 질병으로 주로 임신 초기에 포상기태로부터 발병하는 경우가 대

다수이며(VCMak et al, Carcinogenesis, 2016; LDuffy et al, Journal of clinical medicine research, 2015), 영양막 조직에서 유래된 악성 종양인 용모암은 임신기에 20,000~40,000 명 당 1명의 비율로 나타나는 것으로 보고된바 있다(Soper et al, Gynecol Oncol, 2004). 또한, 용모암은 혈관침투성이 매우 높으며 폐나 질 같은 타기관으로의 전이가 빈번하게 일어나는 것으로 알려져있다 (Geramizadeh and Rad, Indian J Pathol Microbiol, 2012).

[0003] 일반적인 용모암의 치료 방법은 EMA-CO라고 불리는 화학적치료법을 실시하는 것이다. 하지만, 용모암 환자의 15~25%는 이러한 화학적 치료법에 대해 저항성 및 나쁜 예후를 나타낸다(Powles et al, Br J Cancer, 2007). 따라서 용모암에 나타나는 항암제 내성을 극복하기 위해 더욱 효과적인 치료제 개발을 통한 접근법이 필요한 실정이다.

[0004] 플라보노이드는 다양한 식물에 함유되어 있으며 세포 내 생화학적 메커니즘 및 유전자 발현 조절을 통해 항염증, 항산화 효과를 나타내는 것으로 알려져있다(Russo et al., Biochem Pharmacol, 2012). 쿠메스트롤은 플라보노이드 계열의 천연 식물 추출물로서 콩류에서 주로 발견되며, 신경보호, 항염증, 항비만효과와(Castro CC et al., Neurol Res, 2014; You JS et al., Inflammation, 2017; Jang YJ et al., Food & Function, 2016) 및 난소암, 유방암, 전립선암 등 다양한 암종에서의 항암 효과가 연구된바 있다(Lim W et al., J Endocrinol., 2016; Zafar A et al., J Nutr Biochem., 2016; Lim W et al., J Cell Physiol., 2017).

[0005] 이차림, 쿠메스트롤의 다양한 약리적 효과들이 보고되고 있으나, 현재까지 용모암 내에서 쿠메스트롤을 이용한 치료기전에 대한 연구는 보고된바 없다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 천연물 유래 물질을 이용한 새로운 용모암 치료제를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 용모암 세포주 JAR, JEG-3 세포를 이용하여 쿠메스트롤에 의한 세포 증식과 이주성 억제 및 세포 사멸 유도 효과를 확인하고, 쿠메스트롤이 용모암 세포주 내 ERK1/2 및 JNK 단백질을 중심으로 하는 신호전달체계를 조절한다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

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

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

[0009] 본 발명은 또한, 쿠메스트롤을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 용모암 세포주의 증식 및 이주 능력을 억제시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명은 또한, 쿠메스트롤을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 용모암 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 쿠메스트롤을 유효성분으로 포함하는 용모암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

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

[0013] 본 발명은 또한, 쿠메스트롤을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 용모암 세포주의 증식 및 이주 능력을 억제시키는 방법을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 쿠메스트롤을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 용모암 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 쿠메스트롤을 유효성분으로 포함하는 조성물은 식물에서 추출된 것으로서 화학적 합성물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, 용모암 세포 내 증식 및 이주성을 억제하고 용량 의존적으로

용모막암 세포주 내 사멸 세포의 수를 증가시킬 뿐만 아니라, ERK1/2 또는 JNK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제와 병용 처리하는 경우 세포 사멸의 시너지 효과를 얻을 수 있는바, 생명과학, 의학 등 다양한 산업 분야에 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 용모막암 세포주의 증식에 쿠메스트롤이 미치는 영향을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 용모막암 세포주에 쿠메스트롤 처리시 세포사멸 유도 효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 용모막암 세포주의 이주성에 쿠메스트롤이 미치는 영향을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 용모막암 세포주에서 쿠메스트롤의 용량의존적 및 시간의존적 처리에 의한 신호전달물질의 인산화 양상 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 용모막암 세포주에서 쿠메스트롤과 ERK1/2, JNK 신호전달 단백질 표적 억제제의 병용 처리에 따른 세포 증식 변화 양상 측정 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 용모막암 세포주에서 쿠메스트롤과 ERK1/2, JNK 신호전달 단백질 표적 억제제의 병용 처리에 따른 신호 전달 단백질 인산화 양상 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 쿠메스트롤 처리에 따른 미토콘드리아 막 전위 조절 양상 및 활성산소 생성을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 쿠메스트롤 처리에 따른 용모막암 내 미토콘드리아의 칼슘 농도 변화 양상 측정 결과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 용모막암 세포의 쿠메스트롤에 의한 증식 및 이주 억제, 세포사멸 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 쿠메스트롤의 용모막암 세포 증식 및 이주 억제, 세포 사멸 기전을 밝혔다(도 9).
- [0020] 본 발명은 일 관점에서 쿠메스트롤을 유효성분으로 포함하는 용모막암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0021] 본 발명은 다른 관점에서 쿠메스트롤을 유효성분으로 포함하는 용모막암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.
- [0022] 본 발명에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.
- [0023] 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.
- [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, 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, 에멀전, 젤 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 용이

하게 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, 에멀전, 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.
- [0030] 본 발명에 있어서, 쿠메스트롤이 ERK1/2 및 JNK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 쿠메스트롤이 세포사멸을 유도하는 Bax, Bak 단백질, caspase-3 및 caspase-9를 활성화하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 쿠메스트롤이 활성산소를 과유도하거나, 미토콘드리아로의 칼슘 과유입을 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0033] 본 발명에 있어서, ERK1/2 또는 JNK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 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, 세포내 칼슘의 수송 억제 및 제거하는 화합물을 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0037] 본 발명은 또 다른 관점에서, 쿠메스트롤을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 용모막암 세포주의 증식 및 이주 능력을 억제시키는 방법에 관한 것이다.
- [0038] 본 발명은 또 다른 관점에서, 쿠메스트롤을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 용모막암 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법에 관한 것이다.
- [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.
- [0041] [실시예]
- [0042] **실험방법**
- [0043] 실험동물 및 세포배양
- [0044] 용모막암 세포주인 JAR, JEG-3 세포는 American Type Culture Collection에서 구매하여 사용하였으며, 세포의 단층배양을 위해서 2.05 mM L-Glutamine이 함유된 RPMI-1640 배지 (JAR) 및 MEM 배지 (JEG-3)에 10%의 소태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)을 함께 혼합하여 사용하였다.
- [0046] 실험 재료
- [0047] 후보 조성물질인 쿠메스트롤은 Sigma-Aldrich, Inc로부터 구매하여 사용하였으며, 쿠메스트롤에 의한 신호전달

메커니즘을 확인하기 위하여 phospho-ERK1/2, P90RSK, JNK, c-Jun 단백질 및 total-ERK1/2, P90RSK, JNK, c-Jun 및 Bax, Bak, Bcl-xL, Caspase-9에 대한 항체를 Cell Signaling Technology사로부터 구매하였다. 이외, PCNA, TUBA 항체는 Santa Cruz Biotechnology사에서 구매하였다. 또한 타겟 신호전달과정을 억제함에 따른 효과를 규명하기 위하여 JNK 억제제인 SP600125 및 ERK1/2 억제제인 U0126을 Enzo Life Science사로부터 구매하여 사용하였다. 또한 N-acetyl-L-cysteine (NAC)는 Sigma-Aldrich, Inc로부터, 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB)는 Abcam사로부터 구매하였다.

[0049] BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석

[0050] 용모막암 세포의 증식 능력에 쿠메스트롤이 미치는 영향을 확인하기 위하여 FBS 기아 조건으로 배양한 5×10^3 개의 세포와 배지 100 μ l를 96 well에 분주하고 쿠메스트롤을 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20, 50, 100 μ M) 처리하여 48시간 동안 배양한 다음, BrdU 키트 (Cat No: 1167229001, Roche)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다. 48시간 인큐베이션 후, 10 μ M BrdU를 각 well에 추가적으로 넣어 37 $^{\circ}$ C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 2시간 동안 배양하였다. 용모막암 세포에 BrdU를 labeling 하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 상온에서 90분 인큐베이션 시킨 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.

[0052] 면역형광법

[0053] 3×10^4 개의 JAR, JEG-3 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 쿠메스트롤을 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)가 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. JAR, JEG-3 세포를 0.1% BSA-PBS로 워싱한 다음 DAPI 염색을 추가적으로 시행하여 JAR, JEG-3 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] TUNEL 반응을 통한 세포사멸 분석

[0056] 3×10^4 개의 JAR, JEG-3 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 쿠메스트롤을 48시간 동안 처리하였다. 이후, 세포를 에어드라이 시키고 4% paraformaldehyde로 상온에서 1시간 인큐베이션하여 세포를 고정시켰다. 고정된 세포는 PBS로 한번 헹구내고 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 $^{\circ}$ C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 1시간 동안 배양하였다. 마지막으로 PBS로 헹구고 DAPI를 염색한 이후, LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영하였다.

[0058] Annexin V와 propidium iodide 염색을 통한 세포사멸 분석

[0059] 쿠메스트롤에 의한 용모막암 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, 쿠메스트롤을 용량의존적으로 처리하여 48시간 동안 37 $^{\circ}$ C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 위

싱을 진행하고 1 mL의 1× binding buffer를 사용하여 세포를 천천히 혼합하고 원심분리하여 세포 pellet을 얻었다. 다음으로, 200 μ L의 1× binding buffer으로 세포현탁 배양하여 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× binding buffer를 400 μ L 추가하여 5 mL FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하여 사멸된 세포의 수를 측정하였다.

[0061] 세포 이동성 분석

[0062] 용모막암 세포의 이동성에 쿠메스트롤이 미치는 영향을 확인하기 위하여 Migration culture dish에 쿠메스트롤을 16시간 동안 처리하였으며 세포 이동 능력을 광학현미경 DM3000 (Leica)로 관찰, 촬영 및 계산하였다.

[0064] VEGF 효소면역측정법

[0065] A Qyabtujube gynab VEGF ELISA kit (R&D Systems)를 이용하여 용모막암 세포의 VEGF 분비량을 측정하였다. 2×10^5 세포를 24 well plate에 배양하고 쿠메스트롤을 48시간 동안 37 $^{\circ}$ C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 제조사의 매뉴얼에 따라 배양액을 회수하고, ELISA 리더기를 이용하여 450 nm, 540 nm 내 흡광도를 측정하였다.

[0067] 단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)

[0068] JAR, JEG-3 세포에 쿠메스트롤 또는 쿠메스트롤과 세포신호전달 억제제와의 혼합물을 처리한 다음 JAR, JEG-3 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) 시약 및 ChemiDoc EQ system과 Quantity One software (Bio-Rad) 기기를 사용하여 타겟 단백질의 발현을 분석하였다.

[0070] JC-1 염색을 통한 미토콘드리아 막전위 측정

[0071] JC-1 미토콘드리아 막 전위 (MMP) 변화는 mitochondria staining kit (Cat No: CS0390, Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정하였다. 5×10^5 개의 JAR, JEG-3 세포를 6 well에 배양하고 70 ~ 80% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24 시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 쿠메스트롤을 용량의존적으로 처리하여 48시간 동안 37 $^{\circ}$ C/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 $^{\circ}$ C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 20분 간 인큐베이션 하였다. 염색된 세포를 다시 원심분리하여 1x JC-1 staining buffer로 워싱한 후 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0073] DCFH-DA를 이용한 세포내 ROS 측정

[0074] 용모막암 세포 내 ROS 생성에 쿠메스트롤이 미치는 영향을 확인하기 위하여 peroxide 존재 하에 2', 7' -dichlorofluorescein (DCF)로 변환되어 형광을 띠는 2', 7' -dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma)를 사용하였다. 용모막암 세포를 트립신을 통해 떼어내고 원심분리를 통해 세포 pellet을 얻었다. 이후 PBS로 한번 워싱하고 10 μ M의 DCFH-DA를 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터 내에서 30분 동안 인큐베이션 하였다. 이후 세포를 PBS에 의해 두 번 워싱하고 쿠메스트롤을 용량 의존적으로 1시간 동안 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터 내에서 인큐베이션 하였다. 처리된 세포를 PBS로 다시 워싱하고 유세포 분석기를 사용하여 DCF 형광 강도를 분석하였다.

[0076] 세포내 GSH 측정

[0077] 용모막암 세포 내 GSH의 양은 GSH-GloTM Glutathione Assay (Promega)를 사용하여 제조사의 매뉴얼대로 측정하

였다. 용모막암 세포를 96 well plate에 배양한 후 쿠메스트롤을 용량의존적으로 처리하여 2시간 동안 37 °C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. Luciferin의 발광 정도를 multi-detection microplate reader (HIDEX)를 통해 측정하였다.

[0079] 지질과산화 분석

[0080] 용모막암 세포 내 지질과산화 정도를 분석하기 위해 Click-iT lipid peroxidation imaging kit (Invitrogen)을 사용하였다. 3×10^4 개의 용모막암 세포를 10% FBS가 포함된 배지 300 μ l와 함께 confocal dish 에 분주하여 배양한 뒤, 쿠메스트롤과 함께 37 °C 인큐베이터 내에서 2시간 동안 인큐베이션 하였다. 3.7% formaldehyde로 세포를 고정하고 0.5% Triton X-100을 이용하여 permeabilization한 후 Alexa Fluor 488 Azide로 상온에서 30분 동안 형광염색 하였다. 마지막으로 PBS로 행구고 DAPI를 염색한 이후, LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영하였다.

[0082] Fluo-4와 Rhod-2를 이용한 세포내 칼슘 이온 농도 측정

[0083] 용모막암 세포 내 칼슘 이온(Ca^{2+}) 농도에 쿠메스트롤이 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, 쿠메스트롤을 처리하여 48시간 동안 37 °C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 Fluo-4 AM (Invitrogen)을 37 °C 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 회석한 후 4°C에서 30분 동안 인큐베이션 하였다. 염색된 세포를 HBSS로 워싱하고 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0085] 통계분석

[0086] 본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

[0088] 결과 및 고찰

[0089] 용모막암 세포의 증식, 사멸 및 이주성에 대한 쿠메스트롤의 영향 분석

[0090] 먼저, 쿠메스트롤에 의해 임신성 용모막암 세포주(JAR, JEG-3)의 증식 변화양상을 분석하기 위하여 쿠메스트롤을 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20, 50, 100 μ M) 첨가한 배지에 48시간 배양하였으며 이후 세포 증식 양상을 분석한 결과 용모막암 세포의 증식력이 쿠메스트롤에 의해 용량의존적으로 감소함을 확인하였다. JAR에서는 50 μ M의 쿠메스트롤 처리 시 40% 이상 ($p < 0.01$) 세포 증식력이 감소하였으며 JEG-3 cell 에서는 100 μ M의 쿠메스트롤 처리 시 약 34% ($p < 0.05$) 증식력이 감소하였다. 또한, 면역형광염색법을 통해 세포 증식에 필수적인 단백질인 PCNA의 발현 역시 쿠메스트롤 처리에 따라 감소됨을 확인하였다(도 1).

[0091] 또한, 쿠메스트롤의 용모막암 세포에 대한 세포사멸 유도 효과를 분석하기 위해, 용모막암 세포에 쿠메스트롤을 48시간 인큐베이션 이후 TUNEL assay를 수행하였다. 그 결과, 쿠메스트롤 50 μ M 처리시 용모막암 세포 내 DNA 분절화(DNA fragmentation)가 증가함을 확인하였다. 또한, 용모막암 세포에 Annexin V 및 propidium iodide (PI) 염색을 통해 세포사멸이 일어나는 용모막암 세포의 수를 측정한 결과 쿠메스트롤 처리에 따라 세포 사멸이 증가함을 확인하였다 (도 2). 또한, 100 μ M의 쿠메스트롤 처리 시 대조군과 비교하여 JAR에서는 약 1.9배, JEG-3에서는 약 1.8 배 세포사멸이 증가하는 양상을 보였다.

[0092] 뿐만아니라, 쿠메스트롤을 용모막암 세포에 처리하였을 경우, transwell을 통과하는 세포의 수가 감소되었으며, 이를 통해 쿠메스트롤이 용모막암세포의 이동성을 억제시킨다는 것을 확인하였다. transwell을 통과하는 세포는 헤마톡실린 염색에 의해 보라색 점으로 표현되고 이를 수치화하였을 시 50 μ M의 쿠메스트롤에 의해 대조군에 비해 70% 이상 ($p < 0.001$) transwell을 통과하는 세포의 수가 감소함을 확인하였다. 또한, ELISA 분석을 통해

혈관신생성을 촉진하여 암세포의 성장을 촉진하는 인자인 혈관내피성장인자 (VEGF)의 분비를 측정된 결과, 쿠메스트롤을 처리한 용모막암 세포로부터 VEGF의 분비가 감소됨을 확인하였다(도 3). JAR에서는 쿠메스트롤에 의해 대조군에 비해 약 68% ($p < 0.001$) VEGF 농도가 감소하였으며 JEG-3에서는 약 58% ($p < 0.001$) 감소하였다. 이러한 결과를 통해 쿠메스트롤이 용모막암 세포의 전이 특성을 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0094] 쿠메스트롤에 의한 용모막암 세포 내 신호전달기전 조절 양상 분석

[0095] 용모막암 세포내 쿠메스트롤에 의해 유도되는 세포의 증식 억제 및 세포 사멸에 영향을 미치는 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 쿠메스트롤을 용량의존적, 시간의존적으로 처리 후 전체 단백질을 추출하여 증식과 연관된 ERK1/2, P90RSK, JNK, c-Jun의 인산화 양상을 분석하였다. 그 결과, 쿠메스트롤은 네 가지 단백질의 인산화를 증가시키는 것으로 나타났다 (도 4). 구체적으로 용모막암 세포 내 ERK1/2, P90RSK, JNK, c-Jun의 인산화는 고농도의 쿠메스트롤에 의해 증가하였으며 그 중 ERK1/2와 P90RSK 단백질은 JEG-3에서 15분 내로 빠르게 인산화되었다. 하지만 JAR에서는 ERK1/2와 P90RSK의 인산화가 쿠메스트롤에 의해 조금더 천천히 진행되었다. 또한 JNK의 인산화는 쿠메스트롤 처리 15분 후에 유의적으로 증가하였으며 60분까지 이를 유지하였다. c-Jun의 인산화는 쿠메스트롤 처리 후 시간 변화에 따라 점진적으로 증가하는 양상을 나타내었다. 다음으로, ERK1/2에 대한 표적 억제제인 U0126, JNK에 대한 표적 억제제인 SP600125를 쿠메스트롤과 병용 처리하였다. U0126과 SP600125 단독 처리 시 JAR 세포에서 약 61% ($p < 0.001$)와 46% ($p < 0.001$) 세포 생존력이 감소함을 보였다. 뿐만 아니라 U0126 또는 SP600125와 쿠메스트롤의 병용 처리는 각 억제제의 단독 처리 시와 비교하여 시너지 효과를 확인할 수 있었다. U0126과 병용 처리 시 약 85% ($p < 0.001$), SP600125와 병용처리 시 약 76% ($p < 0.001$) 세포 생존력이 감소하였다. 뿐만 아니라 JEG-3에서는 U0126과 쿠메스트롤의 병용 처리 시 대조군에 비해 약 53% ($p < 0.01$) 세포 증식이 감소하였고 이는 U0126 단독 처리 시 38% ($p < 0.05$) 감소 비율보다 높은 수치였다. 하지만 JEG-3에서는 SP600125와 쿠메스트롤의 병용 처리에 따른 시너지 효과는 확인할 수 없었다. 또한 두 억제제와 쿠메스트롤을 병용 처리한 후 쿠메스트롤에 의해 조절 받는 신호전달 경로의 단백질 인산화 변화 양상을 확인하였다. 쿠메스트롤에 의해 활성이 증가했던 ERK1/2는 U0126 처리에 따라 활성이 감소함을 확인하였다. 또한 JAR에서 U0126 또는 SP600125 처리에 따라 쿠메스트롤에 의해 증가한 P90RSK의 활성이 감소함을 확인하였다. 하지만 JEG-3에서는 쿠메스트롤과 U0126의 병용 처리에 따라 P90RSK의 활성이 조금 감소하였다. 이러한 결과는 쿠메스트롤과 ERK1/2 또는 JNK 억제제의 병용 처리 시 증식 억제에 있어 시너지 효과가 나타났으며 두 가지 신호전달 단백질을 중심으로 하는 경로가 서로 교차효과를 보이는 것을 확인하였다(도 5, 6).

[0097] 쿠메스트롤에 의한 용모막암 세포 내 산화 스트레스 유도 효과

[0098] 쿠메스트롤이 용모막암 세포 내 산화 스트레스 유도를 통해 세포 사멸을 야기할 수 있는지 알아보기 위해 용모막암 세포 내 미토콘드리아의 막전위가 쿠메스트롤 처리에 따라 변화하는지 JC-1 염색법을 통해 분석하였다. 그 결과, 쿠메스트롤 처리에 따라 용량의존적으로 미토콘드리아의 막전위가 감소하는 것을 확인하였으며, 이때 세포사멸 유도 단백질들이 증가함을 확인하였다. 대표적인 세포사멸 유도 단백질인 Bax와 Bak의 발현이 쿠메스트롤 처리에 따라 용모막암 세포 내에서 증가하였다. 또한 cytochrome c 단백질의 발현 역시 쿠메스트롤에 의해 증가하였으며 caspase-9와 caspase-3의 cleaved form의 발현 역시 증가하는 양상을 확인하였다. 이러한 결과는 쿠메스트롤에 의해 유도된 세포사멸이 미토콘드리아 기능 변화와 관련되어있음을 암시한다. 또한 쿠메스트롤은 용모막암 세포 내에서 활성산소 (ROS)의 생성을 촉진하였으며 이는 글루타싸이온 (GSH)의 감소 및 지질과산화 (lipid peroxidation)의 증가와 함께 나타나는 것을 확인하였다(도 7). 이러한 결과를 통해 쿠메스트롤이 용모막암 세포의 사멸로 이어지는 미토콘드리아 기능부전과 활성산소 생성을 유도할 수 있음을 확인하였다.

[0100] 쿠메스트롤에 의한 미토콘드리아 칼슘 농도 조절 효과

[0101] 쿠메스트롤이 용모막암 세포 내에서 미토콘드리아로의 칼슘 과유입을 통해 세포 사멸을 유도하는지 규명하기 위해 용모막암 세포내 쿠메스트롤을 용량의존적 (0, 25, 50, 100 μ M)으로 처리한 후 세포질 및 미토콘드리아 특이적 칼슘 농도를 측정하였다. 그 결과, 용모막암 세포 내에서 세포질 특이적 칼슘 농도가 증가하였으며 미토콘드리아 특이적 칼슘 농도 역시 저농도(JAR: 50 μ M, JEG-3: 20 μ M)의 쿠메스트롤 처리 시에 증가하는 것으로 나타났다. 또한, 소포체에서 세포질로의 칼슘 이동을 막아주는 2-APB와 칼슘에 대한 제거제 역할을 하는 BAPTA-AM과 쿠메스트롤을 병용 처리하였을 경우 쿠메스트롤에 의해 증가한 용모막암 세포내 칼슘 농도가 감소하는 것

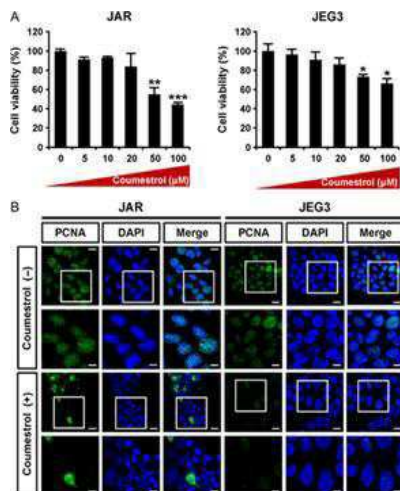
을 확인하였다. 이어서 공초점 현미경을 통해 쿠메스트롤에 의해 증가한 미토콘드리아 특이적 칼슘 농도의 증가를 이미징할 수 있었다 (도 8). 이러한 결과를 통해 쿠메스트롤에 의해 유도된 세포사멸이 세포내 칼슘 농도의 증가와 연관되어 있음을 확인하였다.

[0103]

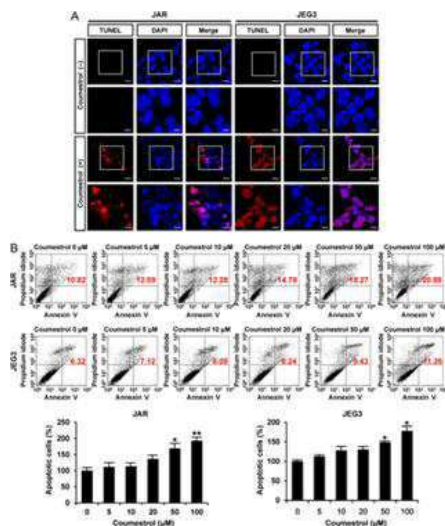
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

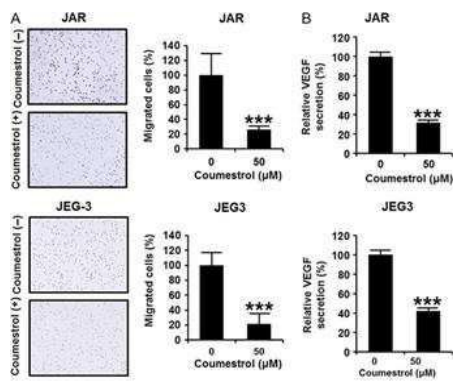
도면1



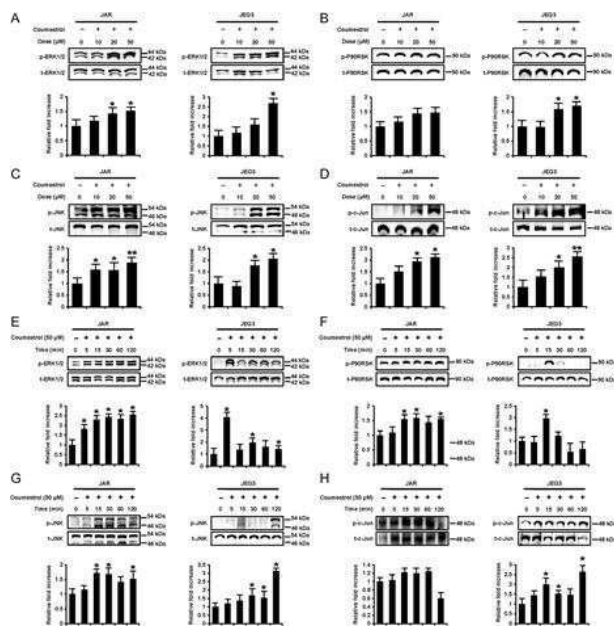
도면2



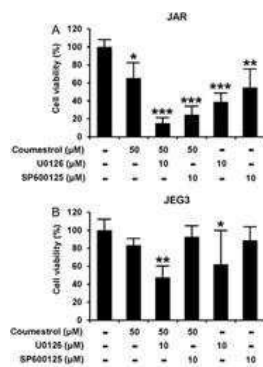
도면3



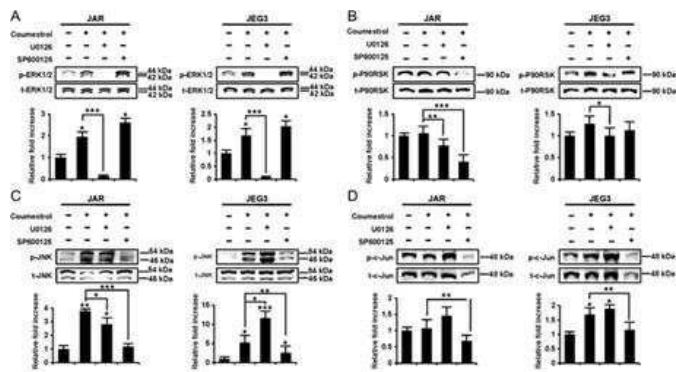
도면4



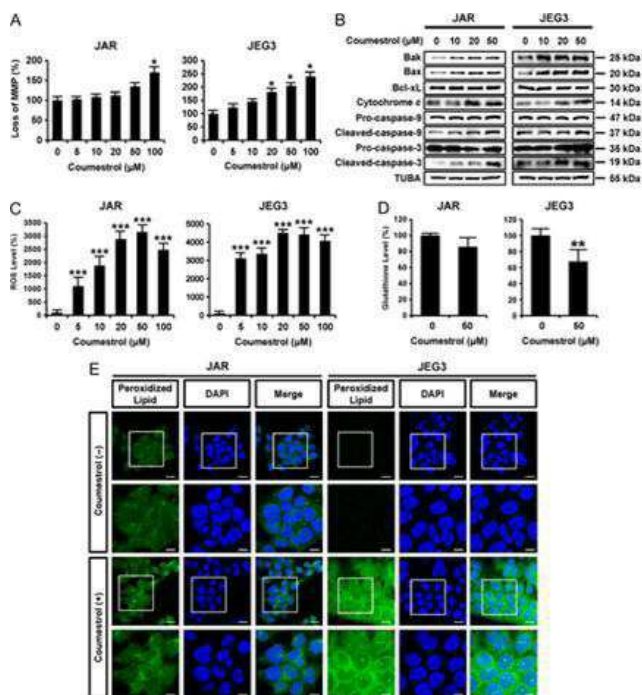
도면5



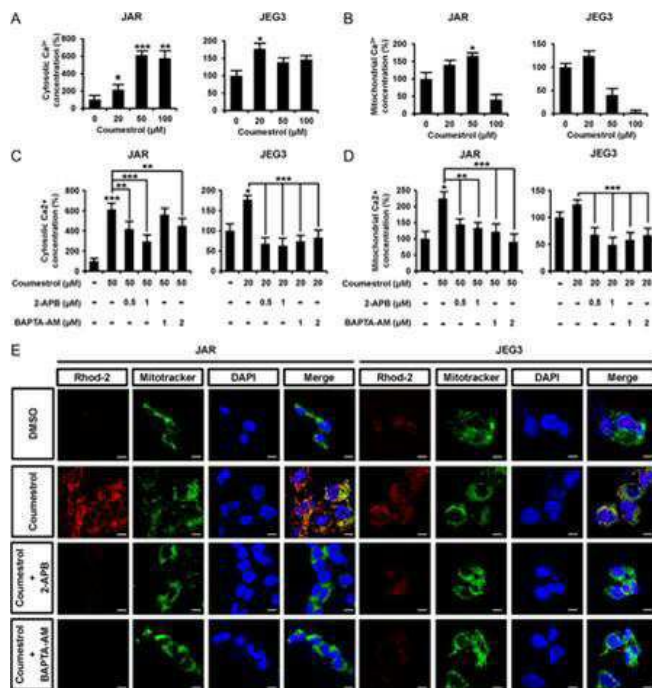
도면6



도면7



도면8



도면9

