



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0112239
(43) 공개일자 2009년10월28일

(51) Int. Cl.

A61K 31/70 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0038010

(22) 출원일자 2008년04월24일

심사청구일자 2008년04월24일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

김명옥

경남 진주시 호탄동 대동아파트 102동 303호

정봉철

서울 성북구 하월곡동 39-1

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

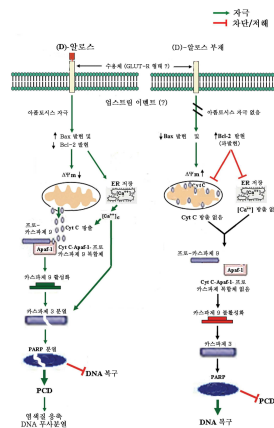
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 호르몬 불감성 전립선암 세포주에 아포토시스를 유도하는알로스

(57) 요약

본 발명은 호르몬 불감성 전립선암 세포주에 아포토시스를 유도하는 알로스(allose)에 관한 것으로 더욱 상세하게는 인간 호르몬 불감성 전립선암 세포주 DU145에 용량-의존적으로 세포 성장을 억제하고 아포토시스를 유도하며 세포주기를 저지하며 카스파제 3 및 폴리(ADP-리보스) 중합효소(PARP) 단백질 발현을 용량-의존적으로 감소시켜 아포토시스를 유도하는 알로스에 관한 것이다.

대표도



(72) 발명자

박문석

경남 진주시 가좌동 900

임란 나사르

대한민국 경남 진주시 가좌동 900

니베디타 나하

대한민국 경남 진주시 가좌동 900

이혜령

경남 진주시 가좌동 900

특허청구의 범위

청구항 1

인간 호르몬 불감성 전립선암 세포주 DU145를 시험관 내 증식 억제 및 아포토시스 유도를 야기하는 (D)-알로스

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 (D)-알로스는 미토콘드리아 $\Delta\psi_m$ 의 수반된 변화, $[Ca^{2+}]_c$ 의 증가, 카스파제 3 및 폴리(ADP-리보스) 중합효소(PARP)의 절단을 통해 미토콘드리아 사이토크롬 C에 의해 유발되는 아포토시스를 유도함을 특징으로 하는 (D)-알로스

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 (D)-알로스는 프로-아포토시스성 멤버인 Bax의 발현 증가 및 항-아포토시스성 멤버인 Bcl-2의 발현 감소를 통한 아포토시스 관련 단백질의 전사 조절을 통해 아포토시스를 유도함을 특징으로 하는 (D)-알로스

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 (D)-알로스의 농도는 인간 호르몬 불감성 전립선암 세포주 DU145 1×10^5 세포에 대해 20 ~ 40 mM임을 특징으로 하는 (D)-알로스

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 호르몬 불감성 전립선암 세포주에 아포토시스를 유도하는 알로스(allose)에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 인간 호르몬 불감성 전립선암 세포주 DU145에 용량-의존적으로 세포 성장을 억제하고 아포토시스를 유도하며 세포주기를 저지하며 카스파제 3 및 폴리(ADP-리보스) 중합효소(PARP) 단백질 발현을 용량-의존적으로 감소시켜 아포토시스를 유도하는 알로스에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 높은 발병률, 사망률 및 현재 이용 가능한 불만족스러운 치료 선택권으로 인해 호르몬 불감성 전립선암(HRPC)은 미국 남성의 암 관련 사망의 두 번째 주요 원인이다. 남성에서 전립선 항상성은 세포 분열을 통한 세포 증식과 아포토시스(세포예정사, PCD)를 통한 세포 소실 사이의 평형에 의존적이다. 아포토시스 신호전달의 결함은 이러한 균형을 방해하여 치사를 유발하는 더욱 공격적인 형태로 종양 발달 및 정낭, 방광, 직장, 골, 혈관을 통한 림프절 및 뇌와 같은 멀리 떨어진 사이트로의 전이를 증가시킨다. 전이성 전립선암은 초기에 호르몬 치료, 방사선치료, 화학치료 및 전립선 절제술과 같은 표준 치료 요법에 반응적이다. 그러나 후기 단계에서 이러한 전이성 질환은 안드로겐 의존성에서 안드로겐 독립성으로 변환되고 이는 안드로겐-절제 치료에 의해 야기된다.

<3> 단백질의 bcl-2 패밀리를 (항- 및 프로-아포토시스 멤버 모두)는 이질이합체화되고 서로의 기능을 적정하여 그의 상대 농도를 통해 세포예정사 신호전달 경로를 제어하기 때문에 이러한 점에서 특별하다. 이들 단백질은 카스파제 상류 체크포인트, 아포토시스의 관리자 및 미토콘드리아 기능 장애로서 작용함으로써 아포토시스 신호전달 경로의 공통 부분에서 기능한다. 또한 아포토시스 신호전달 경로는 미토콘드리아 막전위($\Delta\psi_m$)의 소실 및 사이토크롬 C(cyt C)의 방출로 인한 미토콘드리아 투과성 전환을 세포예정사의 실행을 개시하는 중추 이벤트로 간주한다.

<4> 아포토시스의 미토콘드리아 탈분극은 투과성 변환(PT)과 관련된 것으로 판단되고; 이벤트는 미토콘드리아 멤브레인 내 전압-의존적 음이온 채널(VDAC)의 형성을 포함하고, 이는 Bcl-2에 의해 차단된다. 세포질 내 칼슘 농도($[Ca^{2+}]_c$)는 인간 전립선암 세포주에서 하류 카스파제 및 후속 아포토시스 유도와 관련된 후기 미토콘드리아

이벤트에 대한 필요조건이다. 항-아포토시스성 bcl-2의 발현은 Apaf-1-cyt C 복합체의 상호작용을 방지함으로써 세포 생존을 증진시키는 후기 단계 호르몬 불감성 전립선암에서 증가되고, 이는 카스파제(카스파제 9 내지 카스파제 3) 불활성화를 유발한다. 안드로겐 독립성의 재발로 인한 Bcl-2 과발현은 유전자 변화에 의해 화학 물질 저항성 표현형을 더욱 생성한다. 따라서 호르몬 불감성 전립선암 관리를 위한 새로운 접근법이 현재 요구된다.

<5> 희귀당은 국제희귀당협회(ISRS)에 의해 자연에 희귀하게 분포하는 단당류로서 정의되었다(The 1st International Symposium of ISRS, Takamatsu, Japan, 2002). 희귀성 및 비용으로 인해 희귀당의 생물학적 기능은 저칼로리 탄수화물 감미제 및 충전제로서의 용법을 제외하고는 상세히 조사되지 않았다. 그러나 "이주모링(Izumoring)" 이후 희귀당 특히 (D)-알로스(글루코스의 C-3 에피머)로의 많은 연구가 가능해졌다. (D)-알로스는 분할된 중성구 생성을 저해하고 어떠한 부작용도 없이 혈소판수를 저하시켰고 면역억제제로서 기관 또는 조직 이식에 중요한 역할을 한다. 중성구로부터 활성 산소종(ROS)의 생성 및 다양한 암세포주의 증식 상의 (D)-알로스의 신규한 저해 효과도 보고되었다. 그러나 현재까지 전립선암 치료 특히 후기 단계 호르몬 불감성 전립선암 상의 (D)-알로스의 효과는 보고된 바 없다.

<6> 따라서 본 발명은 높은 발암성 및 화학물 치료-저항성을 지닌 DU145 세포주를 시험관 내에서 호르몬 불감성 전립선암 증식에 있어서 (D)-알로스의 용량- 및 시간-의존적 증식 억제 효과 및 세포사멸 효과를 측정하였으며, 또한 본 발명은 (D)-알로스의 투여에 따른 미토콘드리아 $\Delta \psi_m$ 의 수반된 변화, $[Ca^{2+}]_c$ 의 증가 및 카스파제 3 및 폴리(ADP-리보스) 중합효소(PARP)의 절단과 함께 미토콘드리아 사이토크롬 C에 의해 동반되는 세포예정사의 유도 및 실행을 위한 프로- 및 항-아포토시스성 Bcl-2 패밀리의 멤버인 Bax의 발현 증가 및 Bcl-2의 발현 감소 조절을 통해 DU145 세포주에서 아포토시스를 유도함을 확인하고 본 발명을 완성하게 된 것이다.

발명의 내용

해결 하고자 하는 과제

<7> 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 높은 발암성 및 화학물 치료-저항성을 지닌 DU145 세포주를 시험관 내에서 호르몬 불감성 전립선암 증식에 있어서 (D)-알로스의 용량- 및 시간-의존적 증식 억제 효과 및 세포사멸 효과를 측정하고자 한 것이다. 또한 본 발명은 (D)-알로스의 투여에 따른 미토콘드리아 $\Delta \psi_m$ 의 수반된 변화, $[Ca^{2+}]_c$ 의 증가 및 카스파제 3 및 폴리(ADP-리보스) 중합효소(PARP)의 절단과 함께 미토콘드리아 사이토크롬 C에 의해 동반되는 세포예정사의 유도 및 실행을 위한 프로- 및 항-아포토시스성 Bcl-2 패밀리의 멤버인 Bax의 발현 증가 및 Bcl-2의 발현 감소 조절을 통해 DU145 세포주에서 아포토시스를 유도함을 측정하고자 한 것이다.

과제 해결수단

<8> 본 발명의 목적은 인간 호르몬 불감성 전립선암 세포주 DU145를 시험관 내 증식 억제 및 아포토시스 유도를 야기하는 (D)-알로스를 제공하는 것이다.

<9> 또한 (D)-알로스는 미토콘드리아 $\Delta \psi_m$ 의 수반된 변화, $[Ca^{2+}]_c$ 의 증가, 카스파제 3 및 폴리(ADP-리보스) 중합효소(PARP)의 절단을 통해 미토콘드리아 사이토크롬 C에 의해 유발되는 아포토시스를 유도함을 특징으로 한다.

<10> 또한 상기 (D)-알로스는 프로-아포토시스성 멤버인 Bax의 발현 증가 및 항-아포토시스성 멤버인 Bcl-2의 발현 감소를 통한 아포토시스 관련 단백질의 전사 조절을 통해 아포토시스를 유도함을 특징으로 한다.

<11> 한편 상기 (D)-알로스의 농도는 인간 호르몬 불감성 전립선암 세포주 DU145 1×10^5 세포에 대해 20~40 mM임을 특징으로 한다.

효 과

<12> 본 발명의 효과는 높은 발암성 및 화학물 치료-저항성을 지닌 DU145 세포주를 시험관 내에서 호르몬 불감성 전립선암 증식에 있어서 (D)-알로스의 용량- 및 시간-의존적 증식 억제 효과 및 세포사멸 효과를 제공하는 것이다. 또한 본 발명은 (D)-알로스의 투여에 따른 미토콘드리아 $\Delta \psi_m$ 의 수반된 변화, $[Ca^{2+}]_c$ 의 증가 및 카스파제 3 및 폴리(ADP-리보스) 중합효소(PARP)의 절단과 함께 미토콘드리아 사이토크롬 C에 의해 동반되는 세포

예정사의 유도 및 실행을 위한 프로- 및 항-아포토시스성 Bcl-2 패밀리 멤버인 Bax의 발현 증가 및 Bcl-2의 발현 감소 조절을 통해 DU145 세포주에서 아포토시스를 유도하는 효과를 제공하는 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <13> 호르몬-불감성 전립선암(HRPC)의 효과적인 치료제의 개발은 국가 의학적 우선순위가 되었다. (D)-알로스는 자연에 희귀하게 분포되는 단당류(글루코스의 C-3 에피머)이고; 그의 희귀성 및 비용으로 인해 생물학적 효과가 거의 연구되지 않았다. 본 발명에서는 용량- 및 시간-의존적 방식의 인간 호르몬 불감성 전립선암 세포주 DU145 증식 상의 (D)-알로스의 저해 작용을 입증하였다.
- <14> (D)-알로스의 시험관 내 처리는 DU145 세포에서 아포토시스(세포예정사, PCD)를 위한 Bcl-2/Bax 비율 변화를 유발하였고, 이는 미토콘드리아 막전위($\Delta \Psi_m$)의 저하, 사이토크롬 C(cyt C)의 방출, 카스파제 3 및 폴리(ADP-리보스) 중합효소(PARP)의 절단 및 세포질 내 칼슘 농도($[Ca^{2+}]_c$)의 증가와 관련되었다.
- <15> 또한 (D)-알로스는 DU145 세포주 내 세포주기의 G1기 저지를 유도하였다. 본 발명은 미토콘드리아 매개된 내인성 아포토시스 경로의 조절로 인한 호르몬 불감성 전립선암 DU145 세포주 내 세포예정사의 유도를 통한 (D)-알로스의 항증식 효과를 최초로 나타내었다.
- <16> 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- <17> DU145 세포주 내 (D)-알로스 저해된 세포 성장
- <18> 본 발명의 목적은 희귀당(D)-알로스가 인간 호르몬 불감성 전립선암 세포주에 대해 항증식 효과를 관여하는지 여부를 조사하는 것이다. 따라서 DU145 세포주는 다른 농도의 (D)-알로스로 처리되었고 세포 성장은 MTT 에세이에 의해 분석되었다. 도 1A 및 1B에 나타난 바와 같이 (D)-알로스 처리(0~40 mM)는 대조군과 비교시 세포 성장의 유의적인 용량-의존적 저해를 유발하였고, 이는 대조군 대비 처리 72시간 후에 더욱 명백하였다(도 1A). 또한 본 발명은 인간 정상 전립선 상피 세포주인 PrEC 상의 (D)-알로스의 효과를 조사하였고, 그 결과는 PrEC 세포주 증식 상의 무의미한 (D)-알로스 효과를 나타내었다. 또한 본 발명은 DU145 세포주 증식 상의 (D)-글루코스의 효과를 조사하였고, 이는 용량-의존적 방식으로 세포 성장의 유의적인 증가를 나타내었다.
- <19> DU145 세포주 내 (D)-알로스 유도 세포예정사
- <20> (D)-알로스 유도 세포 저해가 세포예정사에 기인하는지 여부를 측정하기 위해 본 발명자들은 미토콘드리아 분석에 의해 표시된 처리 시간(즉 24, 48 및 72시간)에서의 아포토시스 지수를 조사하였다. 이러한 목적으로 DNA-삽입 염료 DAPI가 인간 호르몬 불감성 전립선암 세포주인 DU145 및 정상 세포주인 PrEC 상에서 사용되었다. 예측된 바와 같이 DU145 세포주와 대조적으로 매우 미약한 효과가 PrEC 세포주에서 관찰되었다(도 1C, D). 도 1C에 나타난 바와 같이 (D)-알로스 처리는 DU145 세포주 내에서 유의적인 용량- 및 시간- 의존적 세포예정사를 유도하였다. 아포토시스 규모는 아넥신-V 및 PI로 표지된 DU145 세포주의 유세포 측정 분석에 의해 정량화되었다. 비처리 대조군 즉 48시간 및 72시간 대조군 내 1.2% 및 2.3% 아포토시스성 세포와 비교시 20 및 40 mM의 (D)-알로스는 48시간 처리군에서 각각 5.1% 및 8.7% 아포토시스성 세포 및 72시간 처리군에서 11.9% 및 23.5% 아포토시스성 세포를 유발하였다(도 1E). 따라서 고용량의 (D)-알로스(40 mM)가 72시간 동안 적용시 아포토시스(세포예정사)의 유도가 현저하게 높았다. 더욱이 본 발명은 DU145 세포주 내 세포예정사 상에 (D)-글루코스의 효과가 존재하지 않음을 나타내었다.
- <21> 세포주기의 G1기 저지를 유도하는 (D)-알로스
- <22> (D)-알로스가 세포주기 내 변화를 통해 성장 저해 및 아포토시스를 유도하는지 여부를 평가하기 위해 본 발명은 48시간 및 72시간 동안 다양한 농도의 (D)-알로스로의 처리 후 DU145 세포주의 세포주기 분석을 수행하였다. 비처리 대조군(G0-G1기 내 31.9% 세포)와 비교시 48시간 동안 (D)-알로스 처리는 세포주기의 G0-G1기에서 유의적인 세포 저지를 나타내었다(40 mM 농도에서 57.5%로 더욱 증가되는 20 mM 농도에서의 48.7% 세포)(도 1F). 더욱이 G0-G1 세포군의 현저한 증가는 세포주기의 G2-Mr1 및 S기의 수반된 세포수 감소와 동반되었다(도 1F). 72시간 동안 (D)-알로스 처리도 유사한 경향을 유지하였다.
- <23> DU145 세포주 내 Bax 및 Bcl-2 단백질 발현을 변화시키는 (D)-알로스
- <24> 프로-아포토시스성 Bax 및 항-아포토시스성 Bcl-2는 아포토시스에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 따라서 DU145 세포주 내 Bax 및 Bcl-2의 단백질 수치 상의 (D)-알로스의 용량-의존적 효과가 측정되었다. Bcl-2

단백질 발현은 72시간 동안 20 mM 및 40 mM 농도의 (D)-알로스 처리에 의해 유의적으로 감소된 반면 Bax 단백질 발현은 동일한 조건 하에서 40 mM 농도의 (D)-알로스에서 현저하게 증가되었다(도 2A, B). 전체적으로 (D)-알로스로의 세포 처리는 Bcl-2/Bax 비율의 유의적인 용량-의존적 변화(즉 0 mM에서 0.896, 20 mM에서 0.335, 40 mM에서 0.126)를 유발하였고, 이는 인간 호르몬 불감성 전립선암 세포주인 DU145 내의 세포예정사의 유도를 나타낸다.

<25> DU145 세포주 내 Bax 및 Bcl-2 mRNA 발현을 변화시키는 (D)-알로스

<26> (D)-알로스에 의한 DU145 세포주 내 Bax 및 Bcl-2 단백질의 상향 조절이 Bax 및 Bcl-2 mRNA 함량의 변화와 연관됨을 입증하기 위해 RT-PCR 분석이 수행되었다. 도 2C 및 D에 나타난 바와 같이 72시간 동안의 (D)-알로스 처리는 용량-의존적 방식으로 Bcl-2 mRNA 발현을 유의적으로 감소시킨 반면 Bax mRNA 발현은 반대 효과를 나타내었다. 또한 프로- 및 항-아포토시스성 mRNA 모두의 발현 패턴은 대응 단백질 수준과 유사한 경향을 나타내었고, 이는 세포예정사-관련 유전자인 Bax 및 Bcl-2의 전사체 수준에서 세포예정사의 유도 동안 (D)-알로스의 역할을 확인시켰다.

<27> 카스파제 3 및 폴리(ADP-리보스) 중합효소(PARP)의 후속 분열과 함께 사이토크롬 C 방출 및 미토콘드리아 $\Delta\Psi_m$ 의 변화를 유도하는 (D)-알로스

<28> 세포예정사 과정은 미토콘드리아로부터 사이토크롬 C의 방출을 통한 미토콘드리아 기능의 붕괴를 포함하고, 이는 카스파제의 활성화 및 폴리(ADP-리보스) 중합효소(PARP)의 후속 분열을 유도하는 Apaf-1과 상호작용하며, 따라서 DU145 세포주 내 카스파제 3 및 폴리(ADP-리보스) 중합효소(PARP) 단백질 수치 상의 (D)-알로스의 용량-의존적 효과가 측정되었다. 도 2A 및 B에 나타난 바와 같이 72시간 동안 다른 농도의 (D)-알로스(0, 20 및 40 mM)는 DU145 세포주 내 절단된 생성물의 동시 증가와 함께 전체 길이 카스파제 3 및 폴리(ADP-리보스) 중합효소(PARP) 단백질 발현의 현저한 용량-의존적 감소를 유발하였다. 또한 72시간 동안 (D)-알로스 처리는 대응 단백질 수준과 비교시(도 2A, B) DU145 세포주 내 카스파제 3 mRNA 발현 상의 유사한 형태의 용량-의존적 효과를 나타내었다(도 2C, D).

<29> DU145 세포주 내 미토콘드리아 및 응축된 염색질로부터 사이토크롬 C의 방출 상의 (D)-알로스의 용량- 및 시간-의존적 효과는 면역형광 기술에 의해 본 발명에서 잘 수립되었다(도 3A, B). 공초점 레이저 현미경은 사이토크롬 C의 방출된 염색을 나타내었고, 이는 48시간 동안 다른 농도의 (D)-알로스로의 처리시 염색질 응축(PI, 적색)과 함께 미토콘드리아로부터의 그의 방출(사이토크롬 C, 녹색)을 나타낸다(도 3A). 병합 이미지(적색 + 녹색 = 황색)는 동일한 DU145 세포주 내 (D)-알로스 처리 결과에 따른 미토콘드리아로부터 세포질로의 사이토크롬 C의 방출 및 염색질 응축을 나타내었다(도 3A). 또한 미토콘드리아가 FITC-표지 사이토크롬 C 항체(녹색)으로 프로브되고 세포핵이 PI(적색)으로 대조염색된 경우 사이토크롬 C의 전위는 72시간 동안 40 mM의 (D)-알로스의 처리 후 이중-염색된 DU145 세포주의 공초점 이미지에서 관찰되었다(도 3B).

<30> Bcl-2가 미토콘드리아 멤브레인 내에 위치하고 PT의 조절 및 사이토크롬 C 방출과 관련되기 때문에 본 발명은 형광 염료 JC-1을 이용하여 24, 48 및 72시간 동안 (D)-알로스 처리 세포 내 미토콘드리아 $\Delta\Psi_m$ 를 조사하였다.

JC-1의 미토콘드리아 내로의 흡수는 유세포측정에 의해 모니터링되었고, 미토콘드리아 $\Delta\Psi_m$ 소실이 FL1 형광 증가와 관련되었다(도 3C). 도 3C 및 D에 나타난 바와 같이 (D)-알로스로의 DU145 세포주의 처리는 용량- 및 시간-의존적 방식으로 낮은 미토콘드리아 $\Delta\Psi_m$ 를 지닌 현저한 세포 부분집단의 출현을 유발하였다. 72시간 동안 (D)-알로스로 처리되거나 비처리된 DU145 세포주 내 JC-1 염색된 미토콘드리아(녹색)의 형광 현미경 사진은 도 3C 및 D에 나타난 유세포측정 데이터를 더욱 지지하였다.

<31> DU145 세포 내 $[Ca^{2+}]_c$ 를 증가시키는 (D)-알로스

<32> $[Ca^{2+}]_c$ 는 인간 전립선암 세포주 내 카스파제 활성화 및 후속 세포예정사를 포함한 후-미토콘드리아 이벤트에 필수적이다. 48 및 72시간 동안 $[Ca^{2+}]_c$ 상의 (D)-알로스의 용량-의존적 효과가 본 발명에서 측정되었다. 도 4에 나타난 바와 같이 $[Ca^{2+}]_c$ 는 48시간 동안 20 및 40 mM 농도의 (D)-알로스에서 DU145 세포주에서 현저하게 증가되었고, 이는 fura-2 표지 세포의 형광 현미경 사진에 의해 더욱 확인되었다. 또한 72시간 동안 (D)-알로스 처리는 유사한 경향을 유지하였다. 전체적으로 (D)-알로스의 용량- 및 시간-의존적 효과는 $[Ca^{2+}]_c$ 증가에 의

해 유발되는 DU145 내 세포예정사의 유도를 나타낸다.

- <33> 암 발병 및 부하를 감소시킬 수 있는 유망한 약제에 대한 조사는 최근 매우 중요하게 되었다. 암 발달 위험의 약독화 역할에 있어서 희귀당 특히 (D)-알로스에 대한 많은 관심이 형성되었다. 전립선암 세포가 초기에 안드로겐 절제에 반응하고 이후 호르몬-저항성 상태로 전환되기 때문에 호르몬 불감성 전립선암 상의 (D)-알로스의 역할은 규명될 필요가 있다. 안드로겐 불감성의 재발은 일부 세포예정사-관련 유전자의 변화를 유발하고; 항-아포토시스 및 화학물질 저항성을 유발한다. 이러한 점에 있어서, DU145 세포는 화학치료제에 대해 매우 저항적인 후기 단계 호르몬 불감성 전립선암의 특정 시험관 내 모델이다. DU145 세포주를 이용함으로써 본 발명은 (D)-알로스가 용량- 및 시간-의존적 방식으로 세포 성장을 저해하는 잠재성을 지님을 나타내었다. 이와 대조적으로 (D)-글루코스는 DU145 세포주에서 세포예정사 상의 어떠한 효과도 없이 세포 성장을 현저하게 증가시킨다. 일부 단당류는 그의 당 구조 때문에 생체 내 또는 시험관 내 조건의 세포 증식 상의 저해를 포함한 많은 세포성 기능을 제어함은 이미 알려져 있다. (D)-알로스는 (D)-글루코스의 C-3 에피머이기 때문에 상기 관찰의 견지에서 DU145 세포주 상의 (D)-알로스의 신규한 항증식 효과가 그의 당 구조와 관련되는 것으로 설명될 수 있다.
- <34> (D)-알로스 유도된 성장 저해가 세포예정사에 기인하는지 여부를 확인하기 위해 본 발명은 DU145 세포주 내 아포토시스를 조사하였다. 아포토시스는 약제가 그의 DNA를 손상시키는 경우 세포가 제거되는 생리적 과정이다. 아포토시스는 괴사와 다른 별개의 방식의 세포예정사이고 손상된 세포를 제거하는 효과적인 방법으로 간주된다. 아포토시스를 조절할 수 있는 약제는 항정-상태 세포군에 영향을 미칠 수 있고, 이는 암 치료에 유용하다. 본 발명의 데이터는 (D)-알로스가 DU145 세포주 내에서 유의적인 용량- 및 시간-의존적 세포예정사를 유도함을 입증하였고, 이는 고용량의 (D)-알로스가 72시간 동안 적용시 현저하게 높아졌다. 이러한 관찰은 염색질 응축, Bcl-2/Bax 비율, 카스파제 3 및 폴리(ADP-리보스) 중합효소(PARP) 분열, 형광 현미경 및 유세포측정에 의해 검증되었다. 아포토시스성반응의 조절이 후기 단계 호르몬 불감성 전립선암의 예방 및 치료에 대한 신규한 메커니즘 기반의 접근법을 나타내기 때문에 이는 중요한 관찰이 될 수 있다.
- <35> 세포주기 조절 및 아포토시스는 밀접하게 관련된 현상이기 때문에 다음 실험으로 본 발명자들은 유세포측정에 의한 DU145 세포주의 세포주기 분포를 분석하였다. 비처리 대조군과 비교시 (D)-알로스 처리는 세포주기의 G2-M기 및 S기 내 세포군의 감소와 동시에 G0-G1기 내 세포수의 현저한 용량- 및 시간-의존적 증가를 유발하였고, 이는 (D)-알로스가 항증식성 효과를 유도하고 DU145 세포주 내 세포예정사가 G1기로의 세포주기 저지와 관련됨을 나타낸다. 사이클린, cdk 및 cdk 저해제의 연속적 발현 및 활성화가 진행세포성 세포주기의 조절에 중요한 역할을 하기 때문에 (D)-알로스에 의한 세포주기 저지 및 세포예정사의 유도 동안 사이클린-ckd 기구의 관련성은 더욱 연구될 필요가 있다.
- <36> Bcl-2 패밀리는 멤버인 프로-아포토시스성 Bax 및 항-아포토시스성 Bcl-2는 아포토시스 경로의 중요한 조절제이다. Bcl-2는 많은 인간 종양 및 암종 세포에서 매우 높은 수치로 발견되었고, 그의 과발현은 화학물질 저항성을 유발하는 아포토시스에 대한 저항성을 유발한다. Bcl-2는 Bax와 이질이형체를 형성하므로 그의 효과를 중화시킨다. 또한 전립선암 마커인 Bcl-2/Bax 비율은 다양한 실험 조건 하에서 세포의 아포토시스 진행 감수성을 지시한다. 본 발명에서 (D)-알로스 처리 후 DU145 세포주 내 Bax 단백질 발현의 증가와 동시에 Bcl-2 단백질의 감소는 세포예정사 유도를 향한 Bcl-2/Bax 비율 내 유의적인 용량-의존적 변화를 유발하였다. 또한 본 발명에서 Bax 및 Bcl-2 mRNA의 발현은 대응 단백질과 유사한 경향을 유지하였고, 이는 Bax 및 Bcl-2 단백질의 상향 조절이 (D)-알로스에 의한 DU145 세포주 내 세포예정사의 유도 동안 전사체 수준에서 발생함을 나타낸다. 알로스 유도된 아포토시스가 Bcl-2 패밀리의 단백질인 Bax 및 Bcl-2를 통해 매개된다는 본 발명의 결과는 종전 연구와 대조적이다. 이러한 불일치는 실험 디자인 및 사용된 암세포주의 차이에 기인한다.
- <37> 종전 연구는 Bcl-2/Bax 비율의 변화가 미토콘드리아로부터의 사이토크롬 C의 방출을 증진시키고, 이는 Apaf-1를 활성화시켜 카스파제 9에 결합하여 활성화시킴을 나타내었다. 이후 카스파제 9는 분열되고 다운스트림 카스파제 3을 활성화시키며 아포토시스를 유발한다. 대안으로 Bcl-2 과발현에 의해 영향을 받는 경우 카스파제 9의 결핍은 Apaf-1-사이토크롬 C 불합체와의 상호작용 실패를 유발할 수 있음이 가능하다. 한편 미토콘드리아 멤브레인 상의 그의 특정한 위치로 인해 Bcl-2는 미토콘드리아 $\Delta\Psi_m$ 를 안정화시키고 세포간 공간으로부터 세포질로의 사이토크롬 C 전위를 저해하여 다운스트림 카스파제 3 활성화 및 후속 세포예정사 과정의 차단을 유발한다.
- <38> 본 발명에서 (D)-알로스 처리 후 DU145 세포주 내 세포예정사의 유도를 향한 Bcl-2/Bax 비율의 용량-의존적 변화는 미토콘드리아 사이토크롬 C 방출 및 $\Delta\Psi_m$ 감소와 관련되고, 이는 미토콘드리아 PT 세공의 개방을

나타낸다. 이들 이벤트는 PT 세공의 구성요소인 VDAC 및 Bax와의 상호작용에 관련된다. Bcl-2는 이질이합체화에 의해 Bax를 기능적으로 불활성화시키기 때문에 (D)-알로스 처리에 의한 DU145 세포주 내 Bcl-2의 발현 감소는 아포토시스 실행이 발생하는 역치를 필연적으로 저하시킨다.

<39> 이러한 전체적인 이벤트는 (D)-알로스 처리된 DU145 세포주 내의 일반적으로 미토콘드리아 이벤트에 후속되는 아포토시스의 특징인 응축된 염색질의 출현과 더욱 관련된다. 일반적으로 PARK와 같은 사멸 기질의 분해와 관련되고 Bcl-2에 의해 제어되는 세포예정사의 실행 시기를 제정하는 카스파제 3 유사 프로테아제의 활성화도 본 발명에서 잘 수립되었다.

<40> 또한 본 발명은 (D)-알로스 처리 DU145 세포주 내 $[Ca^{2+}]_c$ 의 용량-의존적 증가를 나타내었다. 다른 실험의 연구 결과는 Ca^{2+} 항상성의 불충분한 제어가 $[Ca^{2+}]_c$ 의 중간 정도의 증가를 유발하여 아포토시스성 세포 사멸을 유발함을 나타내었다. 인간 전립선암 세포주에서 $[Ca^{2+}]_c$ 의 방출은 사이토크롬 C 분비를 조절하고 이는 세포예정사 유도를 유발하는 다운스트림 카스파제 3 활성화에 관련된 후-미토콘드리아 이벤트에 중요한 역할을 한다. 그러나 항-아포토시스성 단백질 Bcl-2는 소포체 내 그의 저장으로부터 Ca^{2+} 의 누출을 방지하여 $[Ca^{2+}]_c$ 를 조절한다. 따라서 상기 논의된 실험 데이터로부터 미토콘드리아 매개된 사이토크롬 C-카스파제 3-폴리(ADP-리보스) 중합효소(PARP) 경로를 통한 인간 호르몬 불감성 전립선암 DU145 세포주 내 아포토시스성 사멸의 실행이 $[Ca^{2+}]_c$ 의 증가에 의해 유발됨이 나타났다.

<41> 인간 호르몬 불감성 전립선암 세포주 DU145 내의 세포예정사 유도를 통한 (D)-알로스의 항증식 효과를 이해하기 위해 본 발명의 개요가 도 5에 개략적으로 나타나 있다. 따라서 본 발명의 결과는 (D)-알로스가 Bcl-2 패밀리 단백질인 Bax 및 Bcl-2를 통한 세포예정사 유도 및 사이토크롬 C, 카스파제 3 및 폴리(ADP-리보스) 중합효소(PARP)와 같은 미토콘드리아 매개 내인성 아포토시스 경로 멤버에 의해 DU145 세포 성장을 저해함을 나타내었다.

<42> $[Ca^{2+}]_c$ 의 증가는 그의 내인성 아포토시스 경로의 초기 위임 동안 중요한 역할을 한다. 또한 본 발명에서 (D)-알로스는 정상 전립선암 세포주인 PrEC 상에 현저한 효과가 존재하지 않음을 나타내었다. 따라서 본 발명은 정상 전립선 세포 상에 어떠한 부작용 없이 후기 단계 전립선암에 유망한 항증식 작용제로서 (D)-알로스의 역할을 제안한다. 이는 (D)-알로스가 시험관 내 인간 호르몬 불감성 전립선암 세포에서 세포예정사를 유도함을 처음으로 측정하였다. 또한 전립선 생체검사 표본뿐만 아니라 동물 모델 내 (D)-알로스의 항암 활성 상의 메커니즘-기반 연구가 보증된다.

<43> 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

<44> (실시예 1) 세포 배양 및 처리

<45> DU145(인간 호르몬 불감성 전립선암 세포주, 뇌 전이 환자 유래) 및 PrEC(인간 정상 전립선 상피 세포주) 세포주는 한국세포주은행(KCLB, 서울)에서 취득되었다. DU145 및 PrEC 세포주는 각각 RPMI-1640(HyClone, Logan, UT) 및 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(HyClone, Logan, UT)을 함유한 배양 플레이트 내에서 성장되었고 37°C에서 72시간 동안 5% CO₂를 함유한 가습 대기 내에서 유지되었다. 배지는 10% 열-불활성화 우태아 혈청(HyClone, Logan, UT), 10000 유닛/ml의 페니실린 및 10 mg/ml의 스트렙토마이신을 함유한 1% 항생-항진균 용액(HyClone, Logan, UT), HEPES, 중탄산나트륨, p-아미노벤조산 및 인슐린(완전 배양 배지)으로 보충되었다. (D)-알로스는 Sigma(St. Louis, MO)에서 구입되었고 멸균 인산염-완충 식염수(PBS) 내 1 M 농도에서 용해되었고, 여과에 의해 더욱 멸균되었다. 용량- 및 시간- 의존적 효과를 조사하기 위해 세포주(70~80% 융합)는 0~40 mM의 (D)-알로스로 72시간까지 처리된 반면 (D)-알로스가 처리되지 않은 세포주(0 mM)는 대조군으로 간주되었다. 또한 DU145 세포주는 0~40 mM의 (D)-글루코스로도 처리되었다. 본 발명에 사용된 다른 모든 화학물질은 상술하지 않는 한 Sigma(St. Louis, MO)에서 구입되었다.

<46> (실시예 2) 세포 생존

<47> 3-[4,5-디메틸티아졸-2-일]-2,5-디페닐 테트라졸륨 브로마이드(MTT)를 이용한 성장 에세이를 위해 DU145 및 PrEC 세포주의 지수증식기가 취해졌다. 세포주는 0, 1, 5, 10, 20 및 40 mM의 (D)-알로스 및 (D)-글루코스를

함유한 완전 배양 배지 200 μ l 내 1×10^5 세포/웰로 96-웰 플레이트 상에 24, 48 및 72시간 동안 분주되었다. 가습된 5% CO₂ 인큐베이터 내 37°C에서 특정 시간 동안 인큐베이션 후 세포 생존이 측정되었다. MTT(인산염 완충 식염수, PBS 내 5 mg/ml)가 각 웰에 첨가되었고 37°C에서 추가 4시간 동안 인큐베이트되었다. 생존 세포 내에 형성된 포르마잔 결정의 용해를 달성하기 위해 DMSO가 각 웰에 첨가되었고 흡광도는 595 nm 파장에서 미세 플레이트 판독기 상에서 판독되었다. 성장 저해 상의 당의 효과는 백분율 세포 생존으로 평가되었고 대조군은 100% 생존으로 간주되었다.

<48> (실시예 3) 아포토시스의 검출 및 정량화

<49> 아포토시스성 세포의 검출 및 정량화를 위해 아넥신-V-FLUOS 염색 키트(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 독일)가 사용되었다. 이러한 키트는 아포토시스성 세포가 아넥신-V(녹색 형광)으로 염색되고 괴사 세포는 요오드화프로피듐(PI, 적색 형광)으로 염색되는 이중-염색 프로토콜을 이용한다. 간단하게는 DU145 세포주는 3반복 배양 플레이트 내에서 1×10^6 세포 밀도로 성장된 후 48 및 72시간 동안 (D)-알로스(0, 20 및 40 mM)로 처리되었다. 세포는 트립신 처리되고 PBS로 세척되고 제조사 프로토콜에 따라 키트를 이용하여 아넥신-V 및 PI로 표지 처리되었다. 형광은 488 nm 여기 및 형광물질 검출용 515 nm 밴드 통과 필터 및 PI 검출용 >600 nm 필터를 이용한 FACSCalibur(Becton Dickinson, San Jose, Calif.) 상에서 수행된 유세포 분석에 의해 측정되었다 (FL1: Annexin-V-FLUOS; FL2: PI). 또한 아포토시스 지수는 DNA-삽입 염료 4-6-디아미노-2-페닐인돌(DAPI)로 염색된 세포 상에서 공초점 현미경으로 검출 가능한 아포토시스의 엄격한 형태학적 기준으로서 분열되거나 분산된 세포핵 및 응축된 염색체 분석에 의해 측정된다. 이러한 목적으로 DU145 및 PrEC 세포주 모두는 72시간 동안까지 0, 20 및 40 mM의 (D)-알로스에 노출되고 DAPI(메탄올 내 1 μ g/ml)로 염색되고 Prolong Antifade 시약(Molecular Probes, Eugene, OR)으로 봉입되었고, 이미지는 공초점 레이저 주사 현미경(Fluoview FV 1000, Olympus, 일본)을 이용하여 촬영되었다. 100개 세포 당 아포토시스성 세포핵수는 5개의 고자기장/슬라이드 및 아포토시스 지수가 각 세포주 내 비처리 대조군의 백분율로서 표기되었고, 수치는 100%로 간주하였다. 또한 DU145 세포주는 상기 기술된 바와 같이 아포토시스 지수의 측정을 위해 0~40 mM의 (D)-글루코스로 처리되었다.

<50> (실시예 4) 세포주기 분석

<51> DU145 세포주(3반복 배양 플레이트 내 1×10^6 세포)는 (D)-알로스(0, 20 및 40 mM)로 48시간 및 72시간 동안 처리되었다. 이후 세포는 트립신 처리되고 PBS로 세척되고 원심분리되고 48°C에서 1시간 동안 PBS-메탄올 혼합물(1:9) 내 펠렛 내에 재현탁되었다. 세포는 원심분리되었고, 펠렛은 세척되고 다시 PBS에 재현탁되고 37°C에서 30분간 RNase(PBS 내 20 mg/ml)와 함께 인큐베이트되었다. 세포는 얼음 위에서 냉각되었고 PI로 1시간 동안 염색되었고, 488 nm 아르곤 레이저 광원 및 623 nm 밴드 통과 필터가 장착된 형광(FL2-A) 검출기인 FACSCalibur(Becton Dickinson, San Jose, Calif.) 상에서 수행되는 CellQuest 소프트웨어 버전 3.0을 이용하여 유세포 측정에 의해 분석되었다. 총 10000개 세포가 CellQuest 소프트웨어에 의한 분석에 의해 수득되었고 FACS 데이터의 정량화는 ModFit LT 소프트웨어 버전 2.0(Becton Dickinson, San Jose, Calif.)를 이용하여 수행되었다. 세포군은 FACS의 측면 분산 및 전방 분산 강도 특성에 따라 분류되었다. 모든 분류된 생체 세포의 수는 100%로 간주되었고, G0-G1, S 및 M1의 세포 백분율이 계산되고 히스토그램의 우측면에서 나타나 있다.

<52> (실시예 5) 단백질 분리 및 웨스턴 블롯 분석

<53> 72시간 동안 0, 20 및 40 mM의 (D)-알로스 처리 후 DU145 세포주(3반복 배양 플레이트 내 1×10^6 세포)는 1 mM PMSF로 보충된 세포 용해 완충액(Cell Signaling, Danvers, MA) 내로 첨가되었다. 이후 세포는 초음파 분해되고 원심분리되었고 단백질 농도는 표준물질로 소우혈청 알부민(BSA)를 이용하여 Bio-Rad 단백질 에세이 용액으로 Bradford 에세이에 의해 측정되었다. 단백질(30 μ g)은 환원 조건 하에서 12.5% SDS-PAGE 상에서 분리되고 PVDF 멤브레인(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)으로 옮겨졌다. 광범위: 6~175 kDa(Biolabs Inc., New England)의 전염색된 단백질 마커가 단백질 분자량 검출을 위해 병행하여 이동되었다. 비-특이적 결합을 감소시키기 위해 멤브레인은 5%(w/v) 스킵 밀크로 차단되었고 면역블롯팅은 토끼 유래 항-Bcl-2, 항-Bax, 항-카스파제 3 및 항-폴리(ADP-리보스) 중합효소(PARP) 항체(1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)를 이용하여 수행되었다. 항- β -액틴 항체(1:500; Sigma, St. Louis, MO)는 균일한 로딩을 확인하기 위해 대조군으로 선택되었다. 멤브레인은 염소 유래 홍당무 과산화효소-컨쥬게이트된 항-토끼 IgG(1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)로 프로브되었고 단백질은 제조사의 프로토콜(Amersham Biosciences, UK)에 따라 강화된 화학발광(ECL) 검출 시스템에 의해 검출된 후 X-선 노출되었다. 단백질 밴드

의 농도계측 분석은 Sigma Gel 버전 1.0(Jandel Scientific, San Rafeal, CA)에 의해 수행되었다.

<54> (실시예 6) Bcl-2/Bax 비율의 계산

<55> (D)-알로스 처리군의 Bcl-2/Bax 비율은 대응 단백질 밴드의 농도계측 분석을 기반으로 계산되었고 비처리 대조군의 수치와 비교되었다.

<56> (실시예 7) RNA 분리 및 역전사-중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)

<57> 72시간 동안 0, 20 및 40 mM의 (D)-알로스 처리 후 Bcl-2, Bax 및 카스파제 3 mRNA의 상대 발현 수치를 확인하기 위해 RT-PCR이 수행되었다. DU145 세포주(3반복 배양 플레이트 내 1×10^6 세포)는 상기 기술된 바와 같이 채취되었고 전체 RNA는 표준 실험 프로토콜에 따라 TRIzol 시약(Invitrogen, 뉴질랜드)을 이용하여 추출되었다.

RNA 순도 및 농도가 측정되었다. 이후 2 μ g의 전체 RNA는 M-MLV 역전사효소(Promega, USA)로 Oligo(dT)¹²⁻¹⁸ 프라이머(Invitrogen, New Zealand)를 이용하여 단일-나선 cDNA로 전사되었다. PCR 반응을 위해 4 μ l의 cDNA는 각각의 전방 및 역방 프라이머(Bioneer Corporation, 한국) 20 피코몰 및 GoTaq® Green Master Mix 2x 함유 PCR 완충액, 25 mM 염화마그네슘, 10 mM dNTP 믹스 and Taq 효소(Promega, USA)와 함께 반응되었고 증폭되었다. 각각의 전사체의 인간 프라이머는 하기와 같다: Bcl-2[5'-CGACGACTTCTCCCGCTACCGC-3'(전방)(서열번호: 1) 및 5'-CCGCATGCTGGGGCCGTACAGTTCC-3'(역방)(서열번호: 2)], Bax[5'-GTGCACCAAGGTGCCGAAC-3'(전방)(서열번호: 3) 및 5'-TCAGCCCATCTTCTCCAGA-3'(역방)(서열번호: 4)], 카스파제 3 [5'-AGTGCTCGCAGCTCATACCT-3'(전방)(서열번호: 5) 및 5'-GAGTCCATTGATTGCTTCC-3'(역방)(서열번호: 6)], 및 β -액틴(로딩 대조군으로서)[5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'(전방)(서열번호: 7) 및 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'(역방)(서열번호: 8)]. PCR 조건은 하기와 같다: PC-812 Thermal Cycler(Astec, Fukuoka, 일본) 상에서 94°C에서 5분간 초기 변성; 94°C에서 1분간 변성 25 사이클; 1분간 어닐링(Bcl-2: 68°C, Bax: 53°C, 카스파제 3: 55°C, 및 β -액틴: 63°C) 및 72°C에서 1분간 연장; 및 72°C에서 10분간 추가 최종 연장 단계. PCR 생성물은 에티듐브로마이드 (PBS 내 1 μ l/ml)를 함유한 1% 아가로스 겔 내에서 25분간 전기영동되었고 밴드의 촬영을 위해 UV 램프에 노출되었다. 증폭된 생성물의 분자 크기는 PCR 생성물과 함께 병행하여 이동된 분자량 마커(100 bp DNA 래더, Promega, USA)과의 비교에 의해 측정되었다. mRNA 밴드의 농도는 Molecular Analyst™ 버전 1.4.1(Bio-Rad, Hercules, CA)에 의해 분석되었다.

<58> (실시예 8) 미토콘드리아 Cyt C 방출의 가시화 및 세포핵 형태

<59> cyt C의 원위치 분석이 면역형광 기술에 의해 수행되었다. 간단하게는 DU145 세포주(3반복 배양 플레이트 내 1×10^6 세포)는 (D)-알로스(48 및 72시간 동안 0, 20 및 40 mM)로 처리되고 4% 파라포름알데하이드로 고정되고 0.1% 트리톤으로 투수되고 PBS로 세척되었다. cyt C는 마우스 항-cyt C 항체 및 토끼 항-마우스 FITC-표지 항체(각각 1:250 및 1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 이용하여 검출되었다. FITC-표지 2차 항체 단독으로 처리된 DU145 세포주는 음성 대조군으로 간주되었다. 이후 염색질은 PI(PBS 내 1 mg/ml)로 20분간 암조건으로 염색되었고 슬라이드는 Prolong Antifade 시약(Molecular Probes, Eugene, OR)으로 봉입되었다. cyt C(녹색) 및 염색질(적색) 염색 패턴은 공초점 레이저 주사 현미경(Fluoview FV 1000, Olympus, 일본)을 이용하여 획득되었다.

<60> (실시예 9) 미토콘드리아 $\Delta \psi_m$ 의 측정

<61> 미토콘드리아 $\Delta \psi_m$ 는 제조사 프로토콜에 따라 JC-1 미토콘드리아 막전위 검출 키트(Biotium Inc, Hayward, CA)에 의해 측정되었다. 간단하게는 DU145 세포주(3반복 배양 플레이트 내 1×10^6 세포)는 상기 기술된 바와 같이 72시간 동안까지 0, 20 및 40 mM의 (D)-알로스로 처리 후 채취되었고 $1 \times$ JC-1 시약으로 37°C에서 15분간 염색되고 $1 \times$ 에세이 완충액 내에 2회 재현탁되었다. 미토콘드리아 $\Delta \psi_m$ 변화는 하기 조건 하에서 FACSCalibur 유세포계측기(Becton Dickinson, San Jose, Calif.)에 의해 단일 세포 수준에서 측정되었다: FL1, 511 볼트; FL2, 389 볼트; FL1 - 10.5% FL2; FL2 - 25.9% FL1; 488 nm 아르곤 여기 레이저 및 585 nm 밴드 통과 필터. 총 10000개 세포가 CellQuest 소프트웨어 버전 3.0(Becton Dickinson, San Jose, Calif.)에 의한 분석을 위해 획득되었고, 전체 세포군의 백분율로서 낮은 미토콘드리아 $\Delta \psi_m$ 를 지닌 세포의 정량화가 수행되었다. 또한 DU145 세포주는 72시간 동안 0, 20 및 40 mM의 (D)-알로스를 함유한 완전 배양 배지 500 μ l 내에 1×10^5 세포/챔버로 챔버 슬라이드 상에 분주되었고 0.1% 트리톤으로 투수되고 암조건으로 $1 \times$ JC-1 시약으로 염

색되고 Prolong Antifade 시약(Molecular Probes, Eugene, OR)으로 봉입되었고, 이미지(JC-1, 녹색)는 형광 현미경(Axioplan 2, Carl Zeiss, 독일)을 이용하여 획득되었다.

<62> (실시예 10) $[Ca^{2+}]_c$ 의 fura-2 측정

<63> $[Ca^{2+}]_c$ 는 Malgaroli A et al., J Cell Biol 105:2145-2155 (1987)에 기술된 바와 같이 형광 지시약 fura-2 아세톡시메틸에스테르(fura-2 AM)에 의해 측정되었다. 간단하게는 DU145 세포주(3반복 배양 플레이트 내 1×10^6 세포)는 48 및 72시간 동안 0, 20 및 40 mM의 (D)-알로스에 노출된 후 5 μ M의 fura-2 AM을 함유한 무혈청 배양 배지와 함께 암조건 하에서 추가 1시간 동안 인큐베이트되었다. 세포는 Locke 용액(pH 7.4)으로 2회 세척되었고 $[Ca^{2+}]_c$ 의 fura-2 형광 신호는 여기 파장(λ_{ex})으로서 340 및 380 nm 및 방출 파장(λ_{em})으로서 510 nm를 이용하여 발광 분광광도계(LS50B, Perkin Elmer, Boston, MA)에 의해 측정되었다. $[Ca^{2+}]_c$ 농도는 하기 기술된 여기 파장 각각에 대한 형광 강도의 비율 및 하기 Grynkiewicz 방정식으로부터 유래되었다:

<64>
$$[Ca^{2+}]_c = K_d \times \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)} \times \frac{S_{f2}}{S_{b2}}$$

<65> K_d : 세포내 환경 내에서 225 nM이 되는 fura-2- Ca^{2+} 상호작용의 해리 상수; R: 340 및 380 nm에서의 형광 비율; R_{min} : 0의 Ca^{2+} 과의 비율; R_{max} : 포화 Ca^{2+} 과의 비율(염화칼슘 이용); S_{f2} : 0의 Ca^{2+} 과의 380 nm에서의 형광도; S_{b2} : 포화 Ca^{2+} 과의 380 nm에서의 형광도. 또한 DU145 세포주는 48시간 동안 (D)-알로스 처리 또는 비처리되어(0 및 20 mM) $[Ca^{2+}]_c$ 의 fura-2 이미지를 위해 5 μ M의 fura-2 AM을 함유한 무혈청 배양 배지 500 μ l 내에 1×10^5 세포/챔버로 챔버 슬라이드 상에 분주되었다. 슬라이드는 Prolong Antifade 시약(Molecular Probes, Eugene, OR)으로 봉입되었고, 이미지(JC-1, 녹색)는 형광 현미경(Axioplan 2, Carl Zeiss, 독일)을 이용하여 획득되었다.

도면의 간단한 설명

<66> 도 1은 인간 호르몬 불감성 전립선암 세포주인 DU145의 세포 성장, 아포토시스 및 세포주기 분포 상의 (D)-알로스의 효과를 나타낸 것이다. 세포는 72시간 동안까지 0, 1, 5, 10, 20 및 40 mM의 (D)-알로스에 노출된 후 세포 생존(MTT 에세이에 의한), 세포예정사(DAPI/Annexin-V-FLUOS 염색에 의한) 및 세포주기 분포(PI 염색에 의한)에 대해 조사되었다. 상세한 절차는 실시예에 기술되어 있다. 도 1A는 비처리 대조군 대비 24, 48 및 72시간 동안 (D)-알로스에 의해 유도된 세포 성장 저해 백분율로 표기된 성장 저해 효과를 나타낸다. 결과는 3회 독립 실험의 평균 $\pm$ SEM으로 표기되었다. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $^{\dagger}p < 0.001$. 도 1B는 48시간 동안 (D)-알로스 처리되거나 처리되지 않은 배양 배지 내 세포를 나타낸 것이다. $\times 400$. 도 1C는 비처리 대조군 대비 24, 48 및 72시간 동안 (D)-알로스에 의한 최종 아포토시스 유도를 나타낸다. 결과는 3회 독립 실험의 평균 $\pm$ SEM으로 표기되었다. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $^{\dagger}p < 0.001$. 도 1D는 48시간 동안 (D)-알로스 처리되거나 처리되지 않은 DAPI 염색에 의한 아포토시스성 세포를 나타낸다. 공초점 이미지는 도 1C에 기술된 바와 같이 아포토시스 지수의 계산을 기반으로 한다. 도 1E는 48 및 72시간 동안 (D)-알로스 처리시 아넥신-V/PI 염색에 의한 아포토시스성 세포의 유세포측정 분석을 나타낸다. 결과는 3반복 실험을 표시한다. 도 1F는 세포주기의 다른 시기의 48시간 동안 (D)-알로스 처리된 세포의 분포를 나타낸다. G0-G1기, G2-M기 및 S기의 세포 백분율은 ModFit LT 소프트웨어 버전 2.0(Becton Dickinson)으로 계산되고 막대 그래프의 우측에 나타나 있다. 결과는 3반복 실험을 표시한다.

<67> 도 2는 인간 호르몬 불감성 전립선암 세포주인 DU145 내 Bcl-2, Bax, 카스파제 3 및 폴리(ADP-리보스) 중합효소(PARP) 발현 수치 상의 (D)-알로스의 효과를 나타낸 것이다. 세포는 72시간 동안 0, 20 및 40 mM의 (D)-알로스에 노출되었다. 상세한 절차는 실시예에 나타나 있다. 도 2A는 노출 후 세포가 용해되고 웨스턴 블롯 분석에 의해 Bcl-2, Bax, 전체 길이 카스파제 3 및 분열된 카스파제 3, 전체 길이 폴리(ADP-리보스) 중합효소(PARP) 및 분열된 폴리(ADP-리보스) 중합효소(PARP) 단백질에 대해 분석됨을 나타낸다. β -액틴 발현은 각 레인 내 균일한 적가를 나타낸다. 결과는 3반복 실험을 표시한다. 도 2B는 Sigma Gel 버전 1.0(Jandel

Scientific)에 의한 Bcl-2, Bax, 전체 길이 카스파제 3 및 분열된 카스파제 3, 전체 길이 폴리(ADP-리보스) 중합효소(PARP) 및 분열된 폴리(ADP-리보스) 중합효소(PARP) 단백질 밴드의 농도측정 평가를 나타낸다. 결과는 3회 독립 실험의 평균±SEM으로 표기되었다. *p<0.05, **p<0.01, †p<0.001. 도 2C는 (D)-알로스 처리되거나 처리되지 않은 세포가 RT-PCR에 의해 Bcl-2, Bax 및 카스파제 3 mRNA 분석되고, β-액틴은 적가 대조군으로 선택됨을 나타낸다. 결과는 3반복 실험을 표시한다. 도 2D는 Molecular Analyst™ 버전 1.4.1(Bio-Rad)에 의한 Bcl-2, Bax 및 카스파제 3 mRNA 밴드의 농도측정 분석을 나타낸다. 결과는 3회 독립 실험의 평균±SEM으로 표기되었다. *p<0.05, **p<0.01, †p<0.001.

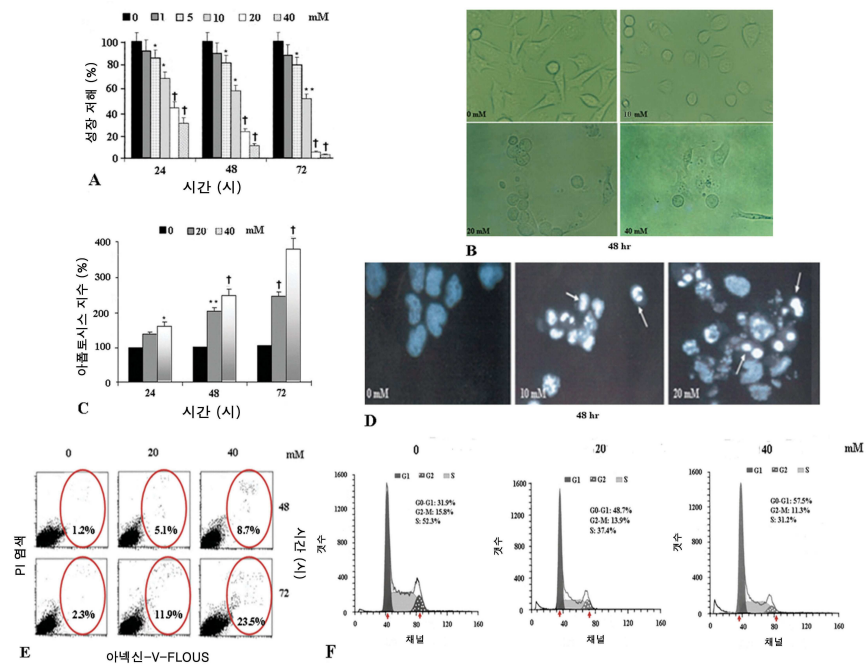
<68> 도 3은 인간 호르몬 불감성 전립선암 세포주인 DU145 내 미토콘드리아 막전위($\Delta \Psi_m$), 사이토크롬 C(cyt C) 발현 및 세포핵 형태 상의 (D)-알로스의 효과를 나타낸 것이다. 세포는 72시간 동안까지 0, 20 및 40 mM (D)-알로스에 노출되었다. 상세한 절차는 실시예에 나타나 있다. 도 3A는 48시간 동안 (D)-알로스로의 처리시 사이토크롬 C(FITC-표지 사이토크롬 C 항체, 녹색) 및 염색질(PI, 적색)에 대한 이중-염색된 DU145 세포주의 면역형광을 나타낸다. 공초점 현미경 ×600(0 mM), ×400(20 mM), ×3500(40 mM)에 의해 검출시 황색(녹색 + 적색; 병합 이미지)은 미토콘드리아로부터 세포질로의 사이토크롬 C의 방출 및 동일한 세포 내의 염색질 응축을 나타낸다. FITC-표지 2차 항체 단독으로 처리된 DU145 세포주는 음성 대조군 ×600으로 간주되었다. 도 3B는 사이토크롬 C의 전위가 72시간 동안 40 mM의 (D)-알로스로 처리 후 이중-염색된 DU145 세포주의 공초점 이미지에서 관찰됨을 나타내었다. 미토콘드리아는 FITC-표지 사이토크롬 C 항체(녹색)로 프로브되었고 세포핵은 PI(적색) ×3000으로 대조염색되었다. . 72시간 ×600(0 mM), ×450(20 및 40 mM) 동안 (D)-알로스로 처리되거나 처리되지 않은 DU145 세포주 내 미토콘드리아의 형광 현미경 사진(JC-1, 녹색). 도 3C는 48 및 72시간 동안 (D)-알로스로 처리시 JC-1 염색에 의해 미토콘드리아 $\Delta \Psi_m$ 의 유세포측정 분석을 나타낸다. 미토콘드리아 $\Delta \Psi_m$ 의 소실은 FL1 형광 증가와 관련된다. 결과는 3반복 실험을 표시한다. 도 3D는 유세포측정에 검출시 24, 48 및 72시간 동안 (D)-알로스에 의해 유도된 낮은 미토콘드리아 $\Delta \Psi_m$ (전체 세포군의 백분율로서)로의 세포 정량화를 나타낸다. 결과는 3회 독립 실험의 평균±SEM으로 표기되었다. *p<0.05, **p<0.01, †p<0.001.

<69> 도 4는 인간 호르몬 불감성 전립선암 세포주인 DU145에서 세포질 내 칼슘 농도($[Ca^{2+}]_c$) 상의 (D)-알로스의 효과를 나타낸 것이다. 세포는 48시간 동안 0, 20 및 40 mM (D)-알로스에 노출된 후 fura-2 AM 표지되었고 $[Ca^{2+}]_c$ 에 대한 형광 스펙트럼은 발광 분광광도계에 의해 측정되었다. 상세한 절차는 실시예에 나타나 있다. 삽입사진은 48시간 동안 (D)-알로스로 처리된(A, 20 mM) 및 처리되지 않은(B, 0 mM) fura-2 AM 표지 DU145 세포주의 형광 현미경 사진이다. ×2500

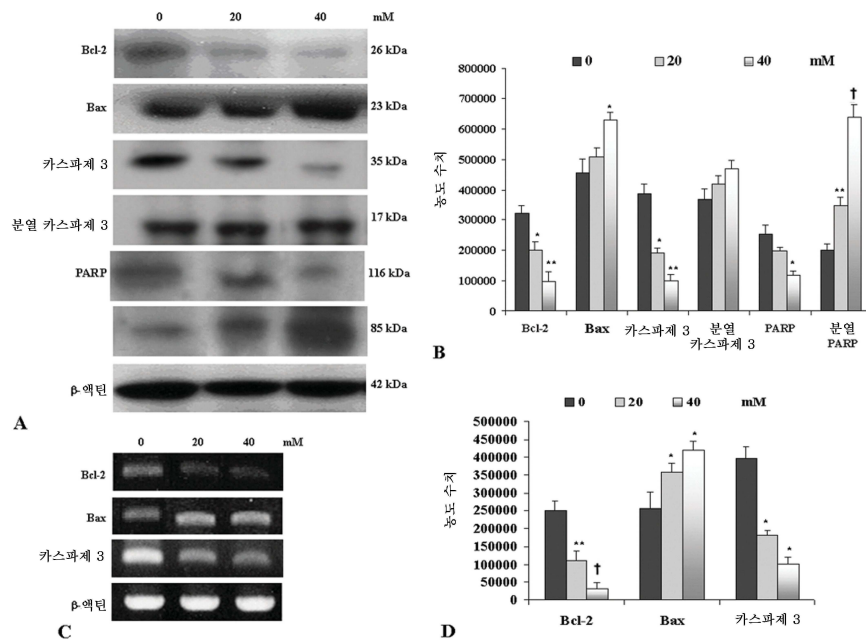
<70> 도 5는 인간 호르몬 불감성 전립선암 세포주인 DU145 내 세포예정사 유도를 통한 (D)-알로스의 항증식 효과를 나타낸 것이다. DU145 세포주의 (D)-알로스 노출은 미토콘드리아 $\Delta \Psi_m$ 을 감소시키고 다운스트림 카스파제 3의 활성화 및 최종적으로 카스파제 3-타겟 단백질 폴리(ADP-리보스) 중합효소(PARP)의 분열을 유발하는 미토콘드리아로부터의 사이토크롬 C 방출을 증진시키는 Bcl-2/Bax 비율을 변화시킬 수 있고, 이는 세포예정사의 특징인 염색질 응축을 유발한다. 높은 $[Ca^{2+}]_c$ 는 미토콘드리아 매개된 아포토시스의 내인성 경로의 초기 생화학적 이벤트이다. 한편 Bcl-2 과발현은 그의 세포 저장으로부터 Ca^{2+} 의 누출 및 세포예정사의 후속 차단이 뒤따르는 미토콘드리아로부터의 사이토크롬 C의 방출을 방지한다. 그러나 (D)-알로스가 호르몬 불감성 전립선암 세포주 DU145에서 아포토시스의 내인성 경로의 높은 업스트림 이벤트에 어떠한 역할을 지니는지 여부는 추후 조사될 필요가 있다.

도면

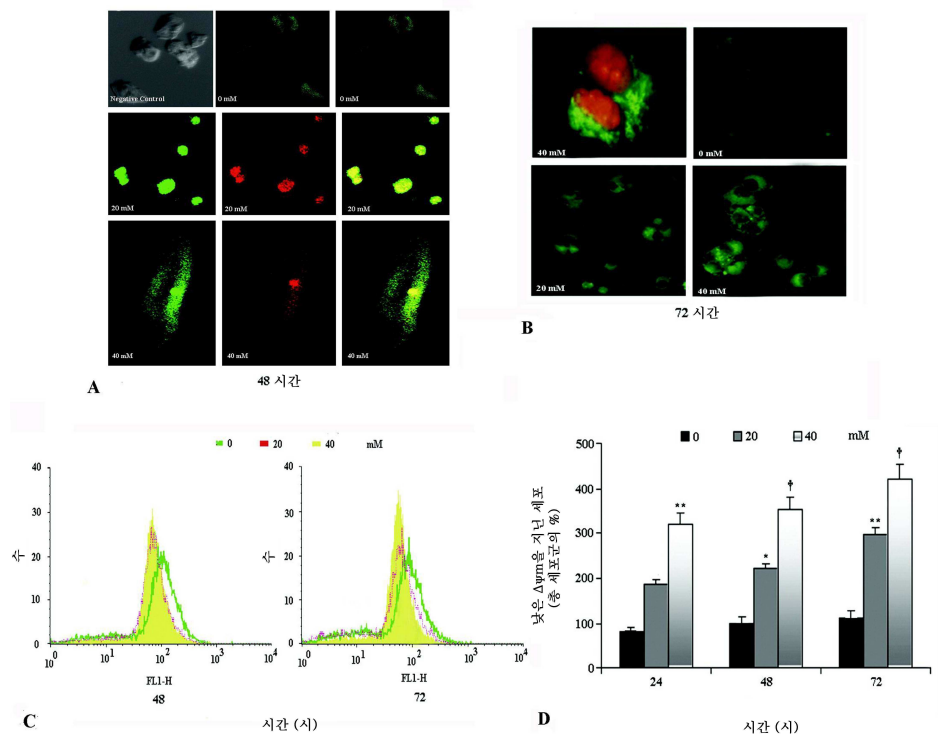
도면1



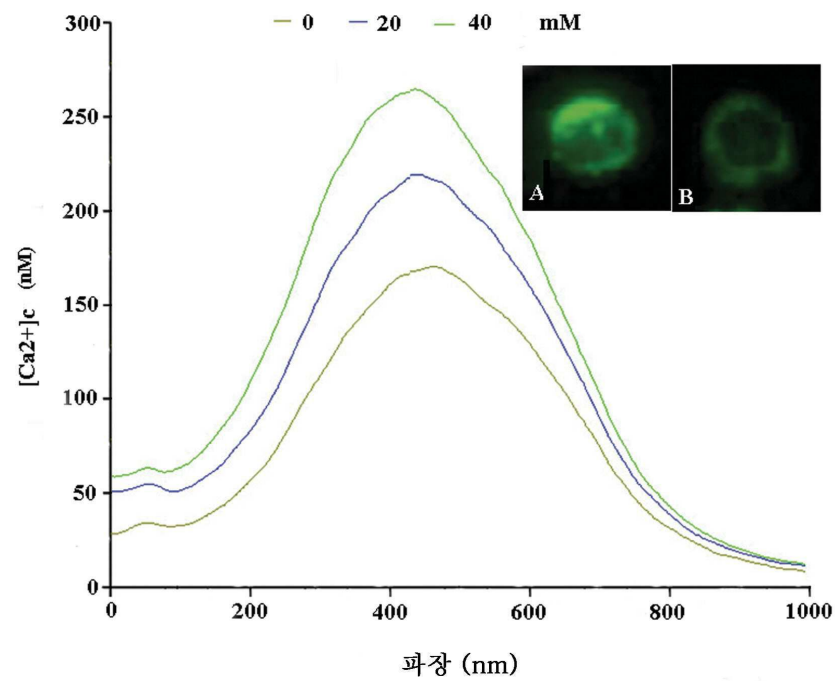
도면2



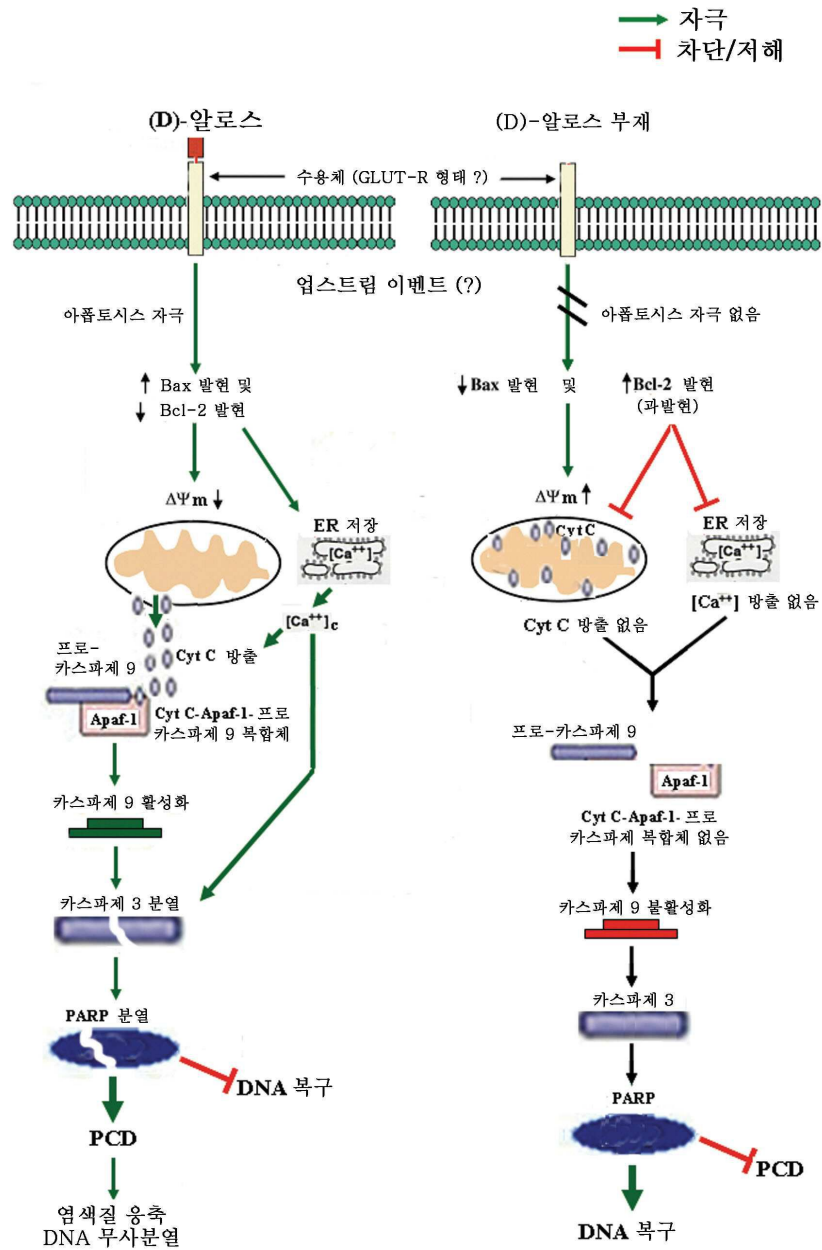
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> (D)-Allose inducing programmed cell death in hormone refractory prostate cancer cell lines
- <160> 8
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 25

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 1
cgacgacttc tcccgccgct accgc 25

<210> 2
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 2
ccgcatgctg gggccgtaca gttcc 25

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 3
gtgcaccaag gtgccggaac 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 4
tcagcccatc ttcttcaga 20

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 5
agtgctcgca gtcatacct 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 6
gagtcattg attcgcttc 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 7
gtggggcgcc ccaggcacca 20

<210> 8
<211> 24
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 8

ctccttaatg tcacgcacga tttc

24