



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0083997
(43) 공개일자 2017년07월19일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 31/70</i> (2006.01) <i>A61K 31/155</i> (2006.01)
 <i>A61K 31/4418</i> (2006.01) <i>A61K 31/4422</i> (2006.01)
 <i>A61K 31/455</i> (2006.01) <i>A61K 31/7004</i> (2006.01)
 <i>A61K 38/08</i> (2006.01)
 (52) CPC특허분류
 <i>A61K 31/70</i> (2013.01)
 <i>A61K 31/155</i> (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2017-0088217(분할)
 (22) 출원일자 2017년07월12일
 심사청구일자 없음
 (62) 원출원 특허 10-2015-0150385
 원출원일자 2015년10월28일
 심사청구일자 2015년10월28일
 (30) 우선권주장
 1020140147972 2014년10월29일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
 연세대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
 (72) 발명자
 정재호
 서울특별시 강남구 삼성로 150, 103동 808호 (대치동, 미도아파트)
 박은성
 서울특별시 서초구 나루터로4길 70-5, 1102호 (잠원동, 한신타운아파트)
 박기청
 경기도 고양시 덕양구 충장로152번길 39, 2006동 702호 (행신동, 햇빛마을20단지아파트)
 (74) 대리인
 특허법인 정안</p> |
|--|---|

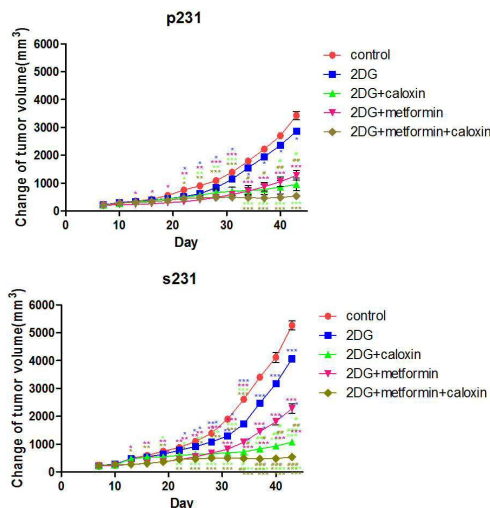
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **암 줄기세포 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 효과적인 암 줄기세포 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 자세하게는 글루코즈 흡수 억제제(glucose uptake inhibitor), 비구아나이드(biguanide) 계열 화합물 및 칼슘 펌프 억제제(calcium pump inhibitor)를 포함하는 암 줄기세포 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 효과적으로 암 줄기세포의 사멸을 유도함으로써 암 줄기세포의 치료제로 사용될 수 있으며, 이를 통하여 다양한 암 줄기세포를 효과적으로 치료하여 암의 재발 및/또는 전이를 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도20



(52) CPC특허분류

A61K 31/4418 (2013.01)

A61K 31/4422 (2013.01)

A61K 31/455 (2013.01)

A61K 31/7004 (2013.01)

A61K 38/08 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

글루코즈 흡수 억제제(glucose uptake inhibitor), 칼슘 펌프 억제제(calcium pump inhibitor) 및 비구아나이드(biguanide) 계열 화합물을 유효성분으로 포함하는, 암 줄기세포 성장 억제용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 글루코즈 흡수 억제제는 2-탈산포도당(2-deoxyglucose, 2DG)인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 칼슘 펌프 억제제는 원형질막 칼슘-에이티피에이지(plasma membrane Ca^{2+} ATPase, PMCA)의 억제제인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 칼슘 펌프 억제제는 칼록신(caloxin) 또는 니페디핀(nifedipine)인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 칼슘 펌프 억제제는 CaMK-2 α (Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase-2 α)의 억제제인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 칼슘 펌프 억제제는 KN62(1-[N, 0-bis(5-isoquinolinesulphonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine) 또는 CaMK-2 α 에 특이적으로 결합하는 siRNA인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 비구아나이드 계열 화합물은 메트포민(metformin), 펜포르민(phenformin), 및 부포르민(buformine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 8

글루코즈 흡수 억제제(glucose uptake inhibitor), 칼슘 펌프 억제제(calcium pump inhibitor), 및 비구아나이드(biguanide) 계열 화합물을 유효성분으로 포함하는, 암 줄기세포 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 글루코즈 흡수 억제제는 2-탈산포도당(2-deoxyglucose, 2DG)인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 10

제 8 항에 있어서,

상기 칼슘 펌프 억제제는 원형질막 칼슘-에이티피에이지(plasma membrane Ca^{2+} ATPase, PMCA)의 억제제인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 칼슘 펌프 억제제는 칼록신(caloxin) 또는 니페디핀(nifedipine)인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 12

제 8 항에 있어서,

상기 칼슘 펌프 억제제는 CaMK-2 α (Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase-2 α)의 억제제인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

상기 칼슘 펌프 억제제는 KN62(1-[N, O-bis(5-isoquinolinesulphonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine) 또는 CaMK-2 α 에 특이적으로 결합하는 siRNA인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 14

제 8 항에 있어서,

상기 비구아나이드 계열 화합물은 메트포민(metformin), 펜포르민(phenformin), 및 부포르민(buformine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 15

제 8 항에 있어서,

상기 암은 유방암, 자궁암, 위암, 뇌암, 직장암, 대장암, 폐암, 피부암, 혈액암 및 간암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 글루코즈 흡수 억제제(glucose uptake inhibitor) 및 칼슘 펌프 억제제(calcium pump inhibitor)를 포함하는 암 줄기세포 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근에 활발히 개발되고 항암치료에 실질적으로 사용되고 있는 항암제들의 대부분은 빠르게 증식하는 암세포를 표적으로 하는 약물들이 대부분이다. 이러한 약물들을 이용한 항암 치료의 경우에는 초기에는 효과적으로 암 세포가 사멸되어 암이 치료되는 것으로 보여지지만, 결국 체내에 남아있는 암 줄기세포(cancer stem cell)는 제거하지 못해 암의 재발 및/또는 전이가 활발히 일어나며, 결국 기존의 항암요법에 대한 내성을 나타내는 문제점들이 종종 발생하고 있기 때문에 최근 암 줄기세포에 대한 관심이 높아지고 있다. 암 줄기세포는 일반적인 줄기세포와 유사하게 무제한의 재생능력을 가진 암세포로서 일반적인 암세포와 상이하게 천천히 증식하며, 줄기세포 특유의 능력인 자가재생이나 분화능력을 가지고 있는 암세포로서 기존에 알려져 있는 암세포들과 다른 기작(mechanism)들을 가지고 있는 것으로 알려져 있지만, 아직 암 줄기세포에 대한 연구는 활발히 이루어지고 있지 않으며, 특별히 암 줄기세포를 표적으로 하는 암 줄기세포 치료용 약물에 대한 연구는 거의 전무한 실정이다(국내출원특허 10-2011-0066035).

[0003] 이와 같이, 암 줄기세포에 효과적인 암 줄기세포 치료용 조성물의 개발은 암의 치료 효과를 높일 수 있을 뿐만 아니라 암의 재발 및/또는 전이를 억제할 수 있는 효과적인 치료 방법이 될 것으로 기대된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 글루코즈 흡수 억제제(glucose uptake inhibitor) 및 칼슘 펌프 억제제(calcium pump inhibitor)를 포함하는 암 줄기세포 치료용 조성물을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

[0005] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물, 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예에는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.

[0008] 본 명세서에 있어서, "암 줄기세포(cancer stem cell)"란 줄기세포 특유의 능력인 자가재생이나 분화능력을 가지고 있는 포괄적인 의미의 암세포를 의미한다. 상기 암 줄기세포는 정상적인 종양의 성장 조건(상기 "정상적인 종양의 성장 조건"이란 세포 성장에 필요한 영양분(포도당)이 충분하고 종양미세환경의 성장 여건이 풍족하여 세포 스트레스가 없는 상태를 지칭한다.)에서 일반적인 암세포와 상이하게 느린 속도로 증식하거나 휴지기(dormant state) 상태를 유지하여 항암제에 대한 저항성을 가지고 있을 수 있으며, 예를 들어, PGC-1 α 등의 전사조절인자의 발현이 정상적인 종양세포와 달리 통제되어 주요 대사조절물질의 기능이 일반 암세포와 비교하여 상이할 수 있다. 이러한 상이한 대사조절 능력과 이에 기전적으로 연계된 세포신호전달계의 조절을 통해 영양 결핍 상태에서 세포 사멸(apoptosis)에 대한 저항성을 획득하고 침윤 및/또는 전이능이 있는 세포를 포괄적으로 지칭한다. 그러나 일반적인 암 세포로 분화할 수 있는 세포라면 이에 제한되지 않는다.

[0010] 본 발명은 글루코즈 흡수 억제제(glucose uptake inhibitor) 및 칼슘 펌프 억제제(calcium pump inhibitor)를 유효성분으로 포함하는, 암 줄기세포 성장 억제용 조성물 또는 암 줄기세포 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 글루코즈 흡수 억제제는 바람직하게는 글루코즈 유도체(glucose derivative)이며, 더욱 바람직하게는 2-탈산포도당(2-deoxyglucose, 2DG)이나, 세포의 에너지원인 당의 흡수를 제한하여 영양 결핍 상태 및/또는 대사에너지 고갈 관련 소포체 스트레스 상태를 유도하여 세포의 성장을 억제하고, 암 줄기세포에서 원형질막 칼슘-에이티피에이지(plasma membrane Ca²⁺ ATPase, PMCA)의 발현을 유도(induction)하는 화합물이라면 이에 제한되지 않는다. 상기 유도체란 글루코즈의 일부를 변화시켜 얻어지는 유사한 화합물로서, 정상 글루코즈와 경쟁적으로 작용하여 당의 흡수를 억제하는 화합물을 의미한다.

[0012] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 칼슘 펌프 억제제는 바람직하게는 원형질막 칼슘-에이티피에이지(plasma membrane Ca²⁺ ATPase, PMCA)의 억제제, CaMK-2 α (Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase-2 α)의 억제제 등이며, 더욱 바람직하게는 칼록신(caloxin), 니페디핀(nifedipine), KN62(1-[N, 0-bis(5-isoquinolinesulphonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine), CaMK-2 α 에 특이적으로 결합하는 siRNA 등일 수 있으나, 암 줄기세포의 세포 내 칼슘 농도를 조절하는 능력을 억제할 수 있는 물질이라면 이에 제한되지 않는다. 상기 PMCA의 억제제란 PMCA의 활성을 억제하여 세포 외부로 칼슘을 방출하는 것을 억제할 수 있는 물질

을 의미한다.

- [0013] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 조성물은 비구아나이드(biguanide) 계열 화합물을 추가로 포함할 수 있다. 상기 비구아나이드 계열 화합물은 바람직하게는 비구아나이드 계열 당뇨병 치료제이며, 더욱 바람직하게는 메트포민(metformin), 페포르민(phenformin), 부포르민(buformine) 등 일 수 있으나, 세포 내 에너지 생성을 방해하여 영양 결핍 유사 상태를 유도하는 비구아나이드 계열 화합물이라면 이에 제한되지 않는다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 암은 바람직하게는 유방암, 자궁암, 위암, 뇌암, 직장암, 대장암, 폐암, 피부암, 난소암, 신장암, 혈액암, 췌장암, 전립선암, 갑상선암, 간암 등 일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 유방암일 수 있으나, 종양의 분화 및/또는 증식 등 암의 진행이 본 발명에서 기술하는 암 줄기세포에 의존적인 암의 종류라면 이에 제한되지 않는다.
- [0015] 상기 암 줄기세포 치료용 약학 조성물은 추가적으로 다른 항암제와 병용투여할 수 있으며, 이를 통해 효과적으로 암 줄기세포 뿐만 아니라 일반적인 암세포까지 치료하는데 사용될 수 있으며, 상기 약학 조성물은 암의 재발 또는 전이 억제용 약학 조성물로도 사용될 수 있다.
- [0016] 본 발명에 있어서 상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 약학 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 약제적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.
- [0017] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0018] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다. 본원에 사용된 용어 "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 약학 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정직, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 증증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형화될 수 있다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명에 따른 글루코즈 흡수 억제제(glucose uptake inhibitor) 및 칼슘 펌프 억제제(calcium pump inhibitor)를 포함하는 암 줄기세포 치료용 조성물은 글루코즈 흡수 억제제와 추가로 비구아나이드 계열 약물을 이용하여 암 줄기세포에 영양 결핍 및 대사에너지 고갈 관련 소포체 스트레스 상태를 유도하고, 이를 통하여 암 줄기세포에서 PMCA의 발현을 유도(induction)시키고, 칼슘 펌프 억제제를 병용 투여함으로써 암 줄기세포가 가지는 Ca^{2+} 연관 세포 사멸에 대한 저항성을 낮추어 암 줄기세포의 사멸을 유도함으로써 효과적인 암 줄기세포의

치료제로 사용할 수 있으며, 이를 통하여 다양한 암 줄기세포를 효과적으로 치료하여 암의 재발 및/또는 전이를 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0021]

도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 s-MDA-MB-231 및 s-MCF-7 세포주의 글루코즈 결핍 상태에서의 생존률을 크리스탈 바이올렛 염색법으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 s-MDA-MB-231 및 s-MCF-7 세포주의 글루코즈 결핍 상태에서의 생존률을 MTT assay로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 TUNEL assay 결과를 나타낸 도면이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 면역학적 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 주기 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포 내부의 Ca^{2+} 양을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 CaMK-2 α 의 발현량을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 CaMK-2 α 의 발현이 억제된 세포주의 세포 내부 Ca^{2+} 양을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 CaMK-2 α 의 발현이 억제된 세포주에서의 TUNEL assay 결과를 나타낸 도면이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 CaMK-2 α 의 발현이 억제된 세포주에서의 면역학적 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 CaMK-2 α 의 발현이 억제된 억제된 세포주에서의 세포 주기 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 PGC-1 α 와 CaMK-2 α 의 연관관계를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 PGC-1 α 의 발현이 억제된 세포주에서의 세포 내부 Ca^{2+} 양을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 PGC-1 α 와 PMCA1과의 결합(binding) 관계를 EMSA로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 PGC-1 α 와 PMCA2와의 결합(binding) 관계를 EMSA로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 영양 결핍 상태에서의 PMCA 발현량을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 CaMK-2 α 의 발현이 억제된 세포주에서의 PMCA 발현량을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 18은 본 발명의 일 실시예에 따른 칼슘 펌프 억제제의 효과를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 19는 본 발명의 일 실시예에 따른 유방암 동물 모델에서의 단백질 발현을 면역화학염색으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 20은 본 발명의 일 실시예에 따른 유방암 동물 모델에서 병용 투여를 통한 항암 효과를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 21은 본 발명의 일 실시예에 따른 암 세포와 암 줄기세포의 유전자 발현의 차이를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 22는 본 발명의 일 실시예에 따른 암 세포와 암 줄기세포의 칼슘 조절 관련 단백질 발현을 웨스턴 블롯팅으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 23은 본 발명의 일 실시예에 따른 암 줄기세포의 칼슘 이온 조절 기작을 간략히 나타낸 모식도이다.

도 24는 본 발명의 일 실시예에 따른 시간에 따른 CaMK-2 α 신호전달 기작의 변화를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 25는 본 발명의 일 실시예에 따른 p NF-kB의 역할을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 26은 본 발명의 일 실시예에 따른 TUNEL assay 결과를 나타낸 도면이다.

도 27은 본 발명의 일 실시예에 따른 웨스턴 블롯팅을 결과를 나타낸 도면이다.

도 28은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포의 생존율을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 29는 본 발명의 일 실시예에 따른 암 줄기세포에 기반한 동물 모델의 암의 성장을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 30은 본 발명의 일 실시예에 따른 암 줄기세포에 기반한 동물 모델의 단백질 발현량을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 31은 본 발명의 일 실시예에 따른 암 줄기세포에 기반한 동물 모델의 단백질 발현량을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0024] 실시예 1: 암 줄기세포의 제작

[0025] 암 줄기세포(cancer stem cell)를 제조하기 위하여, 유방암 세포주인 MDA-MB-231과 MCF-7 세포주의 각각의 모세포(parental cell)인 p-MDA-MB-231과 p-MCF-7을 장기간 영양 결핍 상태를 유도하여 영양 결핍 상태에서 세포사멸을 회피하고 생존한 세포들(s-MDA-MB-231 및 s-MCF-7)을 선별하여 통상의 암 줄기세포 특이적 생물학적 특성 분석을 통해 검증 후 암 줄기세포를 제작하였다. 암 줄기세포의 기전 규명 및 암 줄기세포를 억제할 수 있는 치료제 개발을 위해 s-MDA-MB-231과 s-MCF-7 세포에 각각 shPGC-1 α pGFP-V-RS 벡터(Origene)를 형질주입(transfection)하여 shPGC-1 α 를 안정적으로 발현하는 줄기세포(stem cell)인 sshPGC-1 α -MDA-MB-231과 s-shPGC-1 α -MCF-7를 각각 제작하여 실험에 사용하였다. 각각의 세포주는 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)이 포함된 RPMI-1640 배지에서 배양하였다.

[0027] 실시예 2: 암 줄기세포의 글루코즈 결핍 상태에서의 생존율 확인

[0028] 글루코즈 결핍 상태(glucose deprivation)에서 암세포와 암 줄기세포의 생존율을 비교하기 위하여, 실시예 1과 동일한 방법으로 준비한 p-MDA-MB-231, p-MCF-7, s-MDA-MB-231, 및 s-MCF-7 세포주를 96웰 플레이트에 5×10^3 /100 μ L의 농도가 되도록 각각 첨가하고, 배양용기 면적의 70% 정도가 될 때까지 배양한 후에 글루코즈가 결핍되어 있는 10% FBS가 첨가된 RPMI-1640 배지로 교환하여 3일 동안 추가 배양하였다. 그리고 각각 0, 12, 24, 36, 48, 60, 및 72 시간에 세포의 생존율을 확인하였다. 세포의 생존율은 크리스탈 바이올렛 염색(crystal violet staining) 및 MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 통하여 확인하였다. 크리스탈 바이올렛 염색 결과는 도 1에 나타내었고, MTT assay 결과는 도 2 나타내었다.

[0029] 도 1에 나타난 바와 같이, 크리스탈 바이올렛으로 염색하여 배양용기의 표면에 부착되어 있는 세포의 수를 확인한 결과 암 줄기세포인 s-MDA-MB-231 및 s-MCF-7 세포주의 경우에 모세포인 p-MDA-MB-231 및 p-MCF-7와 비교하여 현저히 높은 생존율을 나타내는 것을 확인하였다.

[0030] 또한 도 2에 나타난 바와 같이, 배양 초기 단계(12시간 배양 후)에서는 암 줄기세포와 일반적인 암세포와의 생존율에는 유의성 있는 차이를 나타내지 않지만, 배양 후기 단계(48시간 배양 후)로 갈수록 암 줄기세포와 일반적인 암세포와의 생존율에는 현저한 차이를 나타내는 것을 확인하였다. 특히, s-MDA-MB231 세포주의 경우에는

암세포와 암 줄기세포 사이의 생존률이 40% 이상 차이가 나는 것을 확인하였다.

[0031] 상기 결과들을 통하여, 암 줄기세포의 경우 글루코즈 부족 상태, 즉, 영양 결핍 상태에서 일반적인 암세포와 비교하여 높은 생존률을 나타내는 것을 확인하였으며, 이를 통하여 암 줄기세포는 영양 결핍 상태, 즉, 에너지 부족 상황에 대한 높은 저항성을 가지고 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0033] 실시예 3: 암 줄기세포의 세포사멸 저항성 확인

[0034] 3.1. TUNEL assay

[0035] 암 줄기세포가 영양 결핍 상태에서 높은 생존률을 나타내는 원인이 세포사멸(apoptosis)에 대한 저항성 때문인지 확인하기 위하여, 실시예 2와 동일한 방법으로 글루코즈 결핍 상태에서 40시간 동안 배양한 p-MDA-MB-231, p-MCF-7, s-MDA-MB-231, 및 s-MCF-7 세포주를 각각 회수하여 TUNEL assay를 실시하였다. TUNEL assay는 회수된 세포를 4% 파라포름알데하이드 용액(paraformaldehyde solution)을 이용하여 48시간 동안 고정시킨 후에 Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling(TUNEL) kit를 이용하여 프로토콜에 따라 염색하고, 형광 현미경을 이용하여 관찰하면서 Zeiss LSM Image Browser software program을 이용하여 형광 이미지를 분석하였다. 그 결과는 도 3에 나타내었다.

[0036] 도 3에 나타난 바와 같이, 일반적인 암세포인 p-MDA-MB-231 및 p-MCF-7 세포주에서는 세포사멸에 의한 DNA의 조각화(DNA fragmentation)가 다수의 세포에서 관찰되었으나, 암 줄기세포인 s-MDA-MB-231 및 s-MCF-7 세포주에서는 DNA 조각화가 일어난 세포의 수가 적은 것을 확인하였다. 이를 통하여, 암 줄기세포는 영양 결핍 상태에서 유발되는 세포사멸(apoptosis)에 대하여 저항성을 가지고 있는 것을 확인할 수 있으며, 이를 통하여 영양 결핍 상태에서도 높은 생존률을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0038] 3.2. 면역학적 분석(Immunoblot analysis, western blotting)

[0039] 암 줄기세포가 영양 결핍 상태에서 높은 생존률을 나타내는 원인인 세포사멸(apoptosis)에 대한 저항성에 세포사멸 관련 단백질들이 관여하는지 확인하기 위하여, 실시예 2와 동일한 방법으로 글루코즈 결핍 상태에서 40시간 동안 배양한 p-MDA-MB-231, p-MCF-7, s-MDA-MB-231, 및 s-MCF-7 세포주를 각각 회수하여 면역학적 분석을 실시하였다. 회수된 세포는 차가운 PBS(phosphate buffered saline) 완충용액을 이용하여 두 번 세척하고, RIPA 완충용액을 이용하여 세포를 용해시켜 단백질을 분리하였으며, 분리된 단백질은 이후 실험을 위하여 BCA assay를 통하여 단백질의 양을 측정하였다. 그리고 각각의 세포주로부터 획득한 단백질 20ug을 8-10% SDS-폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel)을 이용하여 분리하고, 전기를 이용하여 PVDF 막(membrane)으로 이동시켰다. 단백질이 이동된 PVDF 막은 5% 탈지분유를 이용하여 실온에서 1시간 동안 처리한 후에 caspase-3, caspase-7, Bcl-2, 및 beta-actin(대조군, control)에 대한 각각의 1차 항체(primary antibody)와 함께 4℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 항체와 반응시킨 PVDF 막은 TBST 용액을 이용하여 세 번 세척하여 결합하지 않은 1차 항체를 제거하고 HRP가 결합되어 있는 2차 항체(secondary antibody)와 실온에서 1시간 동안 추가 반응시켰다. 반응이 완료된 후에 TBST 용액을 이용하여 세척하여 2차 항체를 모두 제거하고 ECL 용액을 처리하고 3분 동안 반응시킨 후에 Kodak X-OMAT AR Film으로 현상하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.

[0040] 도 4에 나타난 바와 같이, s-MDA-MB231 세포주에서는 활성화된 caspase(cleaved form) 3 및 7의 양이 모두 감소하였으며, s-MCF-7에서는 활성화된 caspase 7 및 9의 양이 모두 감소되는 것을 확인하였으며, 상기 결과를 통하여, 영양 결핍 상태에서의 암 줄기세포는 세포사멸 마커로 알려져 있는 caspase의 발현 및 자가포식 세포사멸(autophagic cell death) 관련 물질인 p62 및 LC3B이 감소되는 것을 확인하였으며, 반대로 항세포사멸 마커(anti-apoptosis marker)로 알려져 있는 Bcl-2의 발현이 증가되어 영양 결핍 상태에서 생존능력이 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

[0042] 3.3. 세포 주기 분석(Cell cycle analysis)

[0043] 암 줄기세포가 영양 결핍 상태에서 세포사멸(apoptosis)이 유발되는지 확인하기 위하여, 실시예 2와 동일한 방법으로 글루코즈 결핍 상태에서 12시간(초기, early phase) 및 40시간(후기, late phase) 동안 배양한 p-MDA-MB-231, p-MCF-7, s-MDA-MB-231, 및 s-MCF-7 세포주를 각각 회수하여 세포 주기 분석을 실시하였다. 회수된 세

포는 70% 에탄올(ethanol)을 이용하여 고정시킨 후에 40ug/mL propidium iodide(PI)와 100ug/mL의 RNase가 혼합되어 있는 PBS 완충용액에서 30분간 반응시켜 total DNA를 모두 염색하였고, 염색된 세포의 세포 주기 분석은 FACS Calibur Flow Cytometer를 이용하여 관찰하였다. G0/G1기, S기, 및 G2/M기에 있는 세포의 비율(proportion)은 FACS 및 DNA software program (FlowJo)를 이용하여 측정하였다. 그 결과는 도 5에 나타내었다.

[0044] 도 5에 나타난 바와 같이, 초기 단계(early phase)에서는 일반 암세포와 암 줄기세포에서 세포주기에 따라 유의성 있는 차이를 나타내지 않는 반면, 후기 단계(late phase)에서는 암 줄기세포에서 sub-G0/G1기의 세포 수가 현저히 감소된 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 영양 결핍 상태의 후기 단계에서 일반 암세포의 경우에는 세포사멸이 증가한 반면, 암 줄기세포의 경우에는 세포사멸이 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0046] 상기 결과들을 통하여, 암 줄기세포는 영양 결핍 상태에서 일반적인 암세포와 비교하여 세포사멸(apoptosis)에 대한 저항성(anti-apoptosis)을 가지고 있어 영양 결핍 상태에서도 높은 생존률을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0048] 실시예 4: 암 줄기세포의 세포사멸 저항성 원인 확인

[0049] 4.1. 세포 내부의 Ca^{2+} 양의 확인

[0050] 세포사멸이 일어나는 많은 세포의 경우, 소포체(endoplasmic reticulum)에서 세포질(cytosol)로 Ca^{2+} 가 분비되거나, 원형질막(plasma membrane)을 통하여 세포 내부로 Ca^{2+} 가 유입되는 현상들이 일어나 세포 내부의 칼슘 농도가 유지되지 않기 때문에 암 줄기세포에서도 Ca^{2+} 이동 현상이 일어나는지 확인하기 위하여, 실시예 3과 동일한 방법으로 영양결핍 상태의 세포주들을 준비한 후에 칼슘 염색제인 fura-2-AM을 이용하여 세포 내부의 Ca^{2+} 의 양을 확인하였다. 그 결과는 도 6에 나타내었다.

[0051] 도 6에 나타난 바와 같이, 초기 단계에서는 일반 암세포와 암 줄기세포의 세포 내부의 Ca^{2+} 의 양은 큰 차이를 보이지 않았지만, 후기 단계에서는 암 줄기세포의 세포 내부 Ca^{2+} 양이 일반 암세포와 비교하여 높은 것을 확인하였다.

[0053] 4.2. CaMK-2 α (Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase-2 α)의 발현량 확인

[0054] 암 줄기세포의 세포 내부 Ca^{2+} 양이 일반 암세포와 비교하여 높은 이유를 확인하기 위하여, CaMK-2 α 의 발현량을 웨스턴 블롯팅(western blotting)을 이용하여 확인하였다. 웨스턴 블롯팅은 실시예 3.2와 동일한 방법으로 실시하였다. 그 결과는 도 7에 나타내었다.

[0055] 도 7에 나타난 바와 같이, 암 줄기세포에서는 초기 및 후기 단계 모두에서 CaMK-2 α 의 발현량이 증가한 것을 확인하였으며, 상기 결과를 통하여 암 줄기세포에서는 CaMK-2 α 의 발현량이 증가하여 영양 결핍 및 대사에너지 스트레스 상태에서 소포체로부터 세포 내부로 유리된 Ca^{2+} 양을 적정수준으로 조절하여 세포 사멸에 대한 저항성을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

[0057] 4.3. CaMK-2 α (Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase-2 α)의 발현 억제 효과 확인

[0058] 암 줄기세포의 CaMK-2 α 발현을 억제할 경우의 효과를 확인하기 위하여, 각각의 세포주에 바이오니아에서 구매한 CaMK-2 α siRNA를 형질주입(transfection)하여 CaMK-2 α 발현이 억제된 암 줄기세포주들을 제작하였다. 그리고 실시예 4.1 및 4.2와 동일한 방법으로 CaMK-2 α 의 발현량 및 세포 내부의 Ca^{2+} 양을 측정하였다. 그 결과는 도 8에 나타내었다.

- [0059] 도 8에 나타난 바와 같이, CaMK-2 α 의 발현이 억제된 암 줄기세포에서는 세포 내부의 Ca^{2+} 양이 감소되지 않는 것을 확인하였으며, 상기 결과를 통하여, 암 줄기세포에서의 CaMK-2 α 발현은 세포 내부의 Ca^{2+} 양을 유지하는데 중요한 역할을 하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0060] 또한, CaMK-2 α 의 발현이 억제된 암 줄기세포주들을 이용하여 실시예 3과 동일한 방법으로 TUNEL assay, 면역학적 분석, 및 세포 주기 분석을 실시하였다. 그 결과는 각각 도 9 내지 11에 나타내었다.
- [0061] 도 9에 나타난 바와 같이, 영양 결핍 상태에서 암 줄기세포는 일반적으로 세포사멸에 대한 저항성을 나타내지만, siRNA를 이용하여 CaMK-2 α 의 발현을 억제시킨 암 줄기세포의 경우에는 일반적인 암세포와 마찬가지로 세포사멸이 유발되어 DNA 조각화가 유발된 것을 확인하였다.
- [0062] 도 10에 나타난 바와 같이, CaMK-2 α 의 발현이 억제된 암 줄기세포의 경우에는 일반 암세포와 동일하게 영양 결핍 상태에서 활성화된 caspase의 양이 다시 증가하고, Bcl-2의 발현량은 감소하는 것을 확인하였다. 또한 인산화된 AKT(pAKT), 인산화된 I κ B(p I κ B), 및 인산화된 NF- κ B(p NF- κ B)의 양은 감소되는 것을 확인하였으며, 칼슘 이온의 분비 통로인 IP3R은 증가되는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 암 줄기세포의 CaMK-2 α 의 발현을 억제시키면 암 줄기세포의 영양 결핍 상태에서의 세포 사멸에 대한 저항성이 감소되어 일반적인 암 세포와 유사한 결과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.
- [0063] 도 11에 나타난 바와 같이, CaMK-2 α 의 발현이 억제된 암 줄기세포의 경우에는 일반 암세포와 동일하게 후기 단계에서 sub-G0/G1기의 세포 비율이 증가된 것을 확인하였으며 이를 통하여 영양 결핍 상태에서 암 줄기세포의 세포사멸이 증가된 것을 확인할 수 있었다.
- [0064] 상기 결과들을 통하여, 암 줄기세포는 영양 결핍 상태에서 CaMK-2 α 의 발현량을 증가시켜 세포 내부의 Ca^{2+} 양을 적정수준으로 조절함으로써 Ca^{2+} 연관 세포 사멸(Ca^{2+} mediated apoptosis)에 대한 저항성을 가지며, 암 줄기세포의 CaMK-2 α 의 발현을 억제하면 저항성을 잃어버리는 것을 확인할 수 있었다.
- [0066] **4.4. PGC-1 α (peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator1)와 CaMK-2 α 의 연관관계 확인**
- [0067] 기존에 영양 결핍 상태에서 발현이 조절되는 것으로 알려져 있는 PGC-1 α 가 Ca^{2+} 연관 세포 사멸에 대한 저항성과 관계가 있는지 확인하기 위하여, s-MDA-MB-231 세포주에 sh-PGC-1 α 벡터(Origene)를 형질주입(transfection)하여 PGC-1 α 의 발현을 억제시킨 암 줄기세포주를 제작하고, 실시예 3.2와 동일한 방법으로 면역학적 분석을 실시하였다. 그 결과는 도 12에 나타내었다.
- [0068] 도 12에 나타난 바와 같이, PGC-1 α 의 발현이 억제된 암 줄기세포에서는 초기 및 후기 단계에서 CaMK-2 α 의 발현도 억제되며, 일반 암세포와 동일하게 영양 결핍 상태에서 Bcl-2의 발현 및 p AKT 및 p NF- κ B의 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 소포체로부터 분비된 Ca^{2+} 를 세포 외부로 배출시키는데 관여하는 것으로 알려져 있는 PMCA(plasma membrane Ca^{2+} ATPase) 단백질의 발현도 감소되는 것을 확인하였다.
- [0069] 상기 결과를 통하여, PGC-1 α 의 발현이 억제된 암 줄기세포에서는 CaMK-2 α 의 발현 및 PMCA의 발현이 억제되는 것을 확인하였기 때문에, 세포 내부의 Ca^{2+} 양에는 어떤 변화가 있는지 확인하기 위하여, 실시예 4.1과 동일한 방법으로 Ca^{2+} 양을 확인하였다. 그 결과는 도 13에 나타내었다.
- [0070] 도 13에 나타난 바와 같이, 영양 결핍 상태의 초기 단계에서는 유의성 있는 차이를 나타내지 않았지만, 후기 단계에서는 PGC-1 α 의 발현이 억제된 암 줄기세포에서는 세포 내부의 Ca^{2+} 양이 증가되며, 세포사멸이 일어나는 것을 확인하였다.
- [0072] 상기 결과들을 통하여, 영양 결핍 상태일 때 암 줄기세포에서는 PGC-1 α 의 발현이 증가하여 CaMK-2 α 의 발현을 유도하며, 이를 통하여 세포 내부의 Ca^{2+} 양을 적정수준으로 유지시킴으로써 Ca^{2+} 연관 세포 사멸(Ca^{2+} mediated apoptosis)에 대한 저항성을 가지는 것을 확인할 수 있었으며, 암 줄기세포가 영양 결핍 상태에서 생존률이 증가하는 데에는 PGC-1 α 가 중요한 역할을 담당하는 것을 확인할 수 있었다.

[0074] **실시예 5: 암 줄기세포에서의 PGC-1 α 의 역할 확인**

[0075] **5.1. PGC-1 α 와 PMCA1과의 결합 관계 확인**

[0076] PGC-1 α 와 PMCA1과의 연관 관계를 확인하기 위하여, EMSA kit을 이용하여 프로토콜에 따라 EMSA assay를 실시하였다. 결합 서열(probe)로는 PMCA1의 프로모터(promoter)의 결합 부위 서열인 "TTGACCTTTGGCCCA"를 사용하였다. 그 결과는 도 14에 나타내었다.

[0077] 도 14에 나타난 바와 같이, 후기 단계의 암 줄기세포에서는 HNF4 α , PGC-1 α , 및 DNA(probe)와의 결합이 증가하는 반면, 일반 암 세포나, PGC-1 α 의 발현이 억제된 암 줄기세포에서는 결합이 감소되는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 영양 결핍 상태에서 PGC-1 α 가 HNF4 α 와 결합하여 PMCA1의 프로모터 부위에 결합하여 PMCA1의 발현을 조절하는 것을 확인할 수 있었다.

[0079] **5.2. PGC-1 α 와 PMCA2와의 결합 관계 확인**

[0080] PGC-1 α 와 PMCA2와의 연관 관계를 확인하기 위하여, EMSA kit을 이용하여 프로토콜에 따라 EMSA assay를 실시하였다. 결합 서열(probe)로는 PMCA2의 프로모터(promoter)의 결합 부위 서열인 "CTGGAAATACCCC"를 사용하였다. 그 결과는 도 15에 나타내었다.

[0081] 도 15에 나타난 바와 같이, 영양 결핍 상태의 암 줄기세포에서는 NF-kB, PGC-1 α , 및 DNA(probe)의 결합이 증가하며, NF-kB에 대한 항체인 anti-p65 또는 anti-p50을 추가적으로 넣어준 경우에는 항체가 추가적으로 결합하여 supershift가 일어나는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 영양 결핍 상태에서 PGC-1 α 가 NF-kB와 결합하여 PMCA2의 프로모터 부위에 결합하여 PMCA2의 발현을 조절하는 것을 확인할 수 있었다.

[0083] **5.3. PMCA와 영양 결핍 상태와의 연관 관계 확인**

[0084] 영양 결핍 상태에서 PMCA의 발현량의 변화를 확인하기 위하여, 실시예 2와 동일한 방법으로 영양 결핍 상태에서 각각의 세포주들을 배양하며, 배양 시간에 따라 qRT-PCR을 실시하였다. 각각의 시간에 회수한 세포는 RNeasy Mini Kit을 이용하여 프로토콜에 따라 RNA를 추출하고, 추출된 RNA 1 μ g을 이용하여 one step RT-PCR kit를 이용하여 qRT-PCR을 실시하였다. 사용한 프라이머 서열을 표 1에 기재하였다. 그 결과는 도 16에 나타내었다. 또한 CaMK-2 α 의 발현을 억제시킨 세포주를 이용하여 동일한 실험을 실시한 결과는 도 17에 나타내었다.

표 1

[0086]

Gene products	Forward primer	Backward primer
PMCA1	TTTCCAAACACTGCTTCTCTTC	GGTCCACAGATGCATTACGA
PMCA2	GTTTATAGGCACTTTGTGGT	CTAATTCCTCCTCAGGTATT
PMCA3	AGGCCTGGCAGACAACACCA	TCCACACCAGCTGCAGGAA
PMCA4	GAGCTTCTGGATACCGATG	CTAGCTTGGCCACACTG
GAPDH	GGTAAGGTCGGAGTCAACGG	GAGGTCAATGAAGGGGTCATTG

[0088] 도 16에 나타난 바와 같이, s-MDA-MB-231 세포주에서는 배양 시간이 증가함에 따라 PMCA1 및 PMCA2의 발현이 증가하고, s-MCF-7 세포주에서는 PMCA1, PMCA2, 및 PMCA4의 발현이 증가되는 것을 확인하였다. 또한 도 17에 나타난 바와 같이, CaMK-2 α 의 발현이 억제된 세포주의 경우에는 암 줄기세포와 상이하게 영양 결핍 상태에서 PMCA의 발현량이 증가되지 않는 것을 확인하였다.

[0090] **5.4. PMCA 억제 효과 확인**

[0091] 영양 결핍 상태에서 PMCA를 억제하였을 때 암 줄기세포의 칼슘 농도 조절 능력이 변화하는지 확인하기 위하여, 원형질막에서 Ca^{2+} -ATP아제(calcium ATPase)로 작용하는 PMCA의 억제제로 칼슘 펌프 억제제(calcium pump inhibitor)인 칼록신(caloxin)을 사용하고, 소포체에서 Ca^{2+} -ATP아제(calcium ATPase)로 작용하는 SERCA(sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase)의 억제제인 탭시가긴(thapsigargin)을 사용하여 PMCA 또는 SERCA의 활성을 억제시킨 후에 암 줄기세포에서의 세포 외 Ca^{2+} 양의 변화를 측정하였다. 그 결과는 도 18에 나타내었다.

[0092] 도 18에 나타난 바와 같이, 칼슘 펌프 억제제인 칼록신을 처리하면 암 줄기세포의 세포 외 칼슘 농도가 낮아지는 것을 확인하였으며, 세포의 생존률도 일반 암세포와 동일하게 감소하는 것을 확인하였다. 반면 SERCA의 억제제인 탭시가긴을 처리한 경우에는 암 줄기세포의 세포 외 칼슘농도가 높게 유지되며, 세포의 생존률 역시 높은 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 칼슘 펌프 억제제를 처리하여 PMCA의 활성을 억제시키면 영양 결핍 상태에서의 암 줄기세포의 생존률을 낮출 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[0094] 상기 결과들을 통하여, 영양 결핍 상태 및 대사에너지 고갈 관련 소포체 스트레스 상태에서 암 줄기세포는 PGC-1 α 의 발현을 증가시켜 CaMK-2 α 의 발현을 촉진하며, 또한 PMCA1 및 PMCA2의 coactivator로 작용하여, PMCA 단백질의 발현을 증가시켜 영양 결핍 상태에서 소포체로부터 세포질로 분비된 Ca^{2+} 를 세포 외부로 배출시키는 작용을 통하여 Ca^{2+} 가 미토콘드리아에 축적되어 세포 사멸이 유도되는 Ca^{2+} 연관 세포 사멸(Ca^{2+} mediated apoptosis)에 대한 저항성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 상기 결과를 통하여 일반적인 암 치료에 사용되는 영양 결핍 상태를 유도하는 방법에 추가적으로 칼슘 펌프 억제제를 조합하면 암 줄기세포 효과적인 치료 방법으로 사용할 수 있을 것을 예상할 수 있었다.

[0096] 실시예 6: 암 줄기세포에 효과적인 치료 방법의 확인

[0097] 6.1. 동물 모델의 제작

[0098] 암 줄기세포에 효과적인 치료 방법을 확인하기 위하여, 유방암 동물 모델을 제작하였다. 유방암 동물 모델 제작을 위하여 유방암 세포인 p-MDA-MB-231과 p-MCF-7 세포주와 유방암 줄기세포인 s-MDA-MB-231과 s-MCF-7 세포주를 in vitro에서 각각 배양한 후에 1.0×10^7 cells/mouse가 되도록 5-6주차 BALB/c nude mice의 upper left flank 부위에 주입하고 7일 동안 물과 사료를 제공하며 22°C에서 12시간 주기로 빛을 조절해주며 유방암 동물 모델을 제작하였다.

[0100] 6.2. 면역화학염색(Immunohistochemistry)

[0101] 실시예 6.1과 동일한 방법으로 제작한 유방암 동물 모델에서 PMCA1, PMCA2, PGC-1 α , 및 CaMK-2 α 의 발현이 증가되는지 확인하기 위하여 면역화학염색법을 이용하여 확인하였다. Standard surgical pathology protocols에 따라 마우스의 암 조직을 회수하여 10% neutral buffered formalin을 이용하여 고정화시키고 다시 파라핀에 고정시켜 5 μm 간격으로 조직을 자른 후 파라핀을 제거하였다. 그리고 pH6의 구연산염 완충용액(citrate buffer) 내에서 항원복구(antigen retrieval)를 실시하고 3% 과산화수소(hydrogen peroxide)를 5분간 처리한 후에 PMCA1, PMCA2 PGC-1 α , 및 CaMK-2 α 에 대한 1:100의 농도로 희석된 각각의 1차 단클론항체(primary monoclonal antibody)를 처리하였다. 그리고 헤마톡실린(haematoxylin)을 이용하여 염색한 후에 건조시켜 관찰하였다. 염색된 부위는 MetaMorph 4.6 software를 이용하여 정량하였다. 그 결과는 도 19에 나타내었다.

[0102] 도 19에 나타난 바와 같이, 암 줄기세포를 주입한 유방암 동물 모델에서 PMCA1, PMCA2 PGC-1 α , 및 CaMK-2 α 가 모두 발현이 증가된 것을 확인하였다.

[0104] 6.3. 암 줄기세포를 위한 치료방법의 확인

[0105] 실시예 6.1과 동일한 방법으로 제작한 유방암 동물 모델을 9마리씩 하나의 실험군으로 분류하고 글루코즈 흡수 억제제(glucose uptake inhibitor)인 2-탈산포도당(2-deoxyglucose, 2DG)을 500mg/kg, 비구아나이드

(biguanide) 계열 약물인 메트포민(metformin)을 250mg/kg, 그리고 칼슘 펌프 억제제인 칼록신 2a1(caloxin 2a1)을 200mg/kg이 되도록 약물을 조합하여 45일간 1일 1회 복강 주사(intraperitoneal injection)하며, 매일 밀립자(calipers)를 이용하여 암의 가로(a) 및 세로(b)의 직경을 측정하고 $4/3 \times \pi \times (a \text{ cm} \times b \text{ cm})^3 \times 1/2$ 식을 이용하여 암의 크기(volume)를 측정하였다. 그 결과는 표 2 및 도 20에 나타내었다.

표 2

Day	P231					S231				
	Control	2DG	2DG+caloxin	2DG+metformin	2DG+metformin+caloxin	Control	2DG	2DG+caloxin	2DG+metformin	2DG+metformin+caloxin
7	210.6 ± 33	219.1 ± 35	210.5 ± 24	210.7 ± 28	213.7 ± 22	210.5 ± 18	228.5 ± 23	218.7 ± 24	221.5 ± 26	222.4 ± 32
10	300.2 ± 38	302 ± 49	267.7 ± 22	224.4 ± 25	281.0 ± 25	277.3 ± 38	277.6 ± 21	248.7 ± 27	239.8 ± 30	261.0 ± 54
13	351.0 ± 28	337.6 ± 47	330.5 ± 39	239.4 ± 17	305.1 ± 25	481.2 ± 21	474.4 ± 31	472.6 ± 35	268.1 ± 34	274.0 ± 56
16	417.1 ± 34	388.6 ± 47	373.1 ± 36	259.0 ± 19	331.6 ± 44	594.6 ± 33	539.2 ± 33	534.0 ± 28	307.0 ± 47	305.5 ± 62
19	559.8 ± 38	440.7 ± 45	442.5 ± 53	296.4 ± 30	375.2 ± 57	743.0 ± 55	638.2 ± 49	544.4 ± 29	360.4 ± 67	361.4 ± 60
22	751.7 ± 60	513.4 ± 46	492.6 ± 59	332.6 ± 44	452.3 ± 64	878.2 ± 80	777.0 ± 35	597.2 ± 73	440.5 ± 85	450.5 ± 57
25	904.1 ± 96	621.4 ± 50	565.3 ± 84	399.2 ± 56	467.6 ± 66	1098.7 ± 98	911.6 ± 35	631.2 ± 93	544.2 ± 103	468.3 ± 60
28	1088.6 ± 87	834.4 ± 48	659.6 ± 126	484.3 ± 75	482.2 ± 74	1393.0 ± 97	1077.4 ± 68	655.6 ± 101	678.2 ± 130	496.3 ± 56
31	1390.7 ± 56	1142.7 ± 50	707.8 ± 145	594.7 ± 102	490.0 ± 62	1896.8 ± 101	1290.6 ± 72	681.4 ± 101	816.5 ± 150	496.7 ± 56
34	1791.3 ± 52	1547.4 ± 57	733.1 ± 177	714.8 ± 129	479.1 ± 57	2609.7 ± 106	1722.1 ± 69	723.6 ± 112	1066.0 ± 179	485.6 ± 54
37	2223.2 ± 85	1944.2 ± 64	767.8 ± 187	865.1 ± 160	463.2 ± 56	3403.7 ± 96	2471.7 ± 81	829.5 ± 70	1448.0 ± 260	468.3 ± 59
40	2704.1 ± 102	2359.0 ± 48	855.1 ± 240	1052.4 ± 169	482.1 ± 60	4118.2 ± 506	3173.2 ± 105	927.2 ± 58	1805.5 ± 363	484.2 ± 57
43	3425.1 ± 152	2866.1 ± 45	953.6 ± 228	1278.8 ± 175	535.2 ± 41	5265.3 ± 445	4065.2 ± 119	1074.7 ± 85	2278.3 ± 527	536.2 ± 38

표 2 및 도 20에 나타난 바와 같이, 일반적인 암세포와 암 줄기세포의 암 크기(volume)를 비교해보면, 암 줄기세포의 경우에 암의 성장이 현저히 빠른 것을 확인하였다. 또한, 암 줄기세포의 경우 2-탈산포도당 만을 처리한 경우에는 대조군과 비교하여 암의 크기가 약간 감소된 것을 확인할 수 있었고, 2-탈산포도당과 메트포민을 병용투여한 경우에도 암의 크기가 약간 감소하나, 2-탈산포도당과 칼록신을 병용투여하는 경우 암의 크기가 5배 이상 감소되는 것을 확인하였다. 또한 2-탈산포도당, 칼록신, 및 메트포민을 병용투여한 경우에는 암 줄기세포가 거의 성장하지 못한 것을 확인하였다.

상기 결과들을 통하여, 글루코즈 흡수 억제제와 비구아나이드 계열 약물을 이용하여 암 줄기세포에 영양 결핍 상태 및 대사에너지 고갈 관련 소포체 스트레스 상태를 유도하고, 이를 통하여 암 줄기세포에서 PMCA의 발현을 유도(induction)시키고, 칼슘 펌프 억제제를 병용 투여함으로써 암 줄기세포가 가지는 Ca^{2+} 연관 세포 사멸에 대한 저항성을 낮추어 암 줄기세포의 사멸을 유도하여 효과적인 암 줄기세포 특이적인 치료방법으로 사용할 수 있다는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통하여 기존의 항암제의 한계인 암 줄기세포로 인한 재발 및/또는 전이를

효과적으로 억제할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[0113] **실시예 7: 암 줄기세포의 생존 기작 확인**

[0114] **7.1. 암 세포와 암 줄기세포의 유전자 발현의 차이 확인**

[0115] 암 줄기세포의 생존 기작을 확인하기 위하여, 실시예 2와 동일한 방법으로 글루코즈 결핍 상태에서 40시간 동안 배양한 p-MDA-MB-231, p-MCF-7, s-MDA-MB-231, 및 s-MCF-7 세포주를 각각 회수하고, 실시예 5.3과 동일한 방법으로 RNA를 추출하여 마이크로어레이(microarray)를 실시하였다. 그 결과는 도 21에 나타내었다.

[0116] 도 21에 나타난 바와 같이, Ca^{2+} -ATP아제(calcium ATPase)로 작용하는 SERCA2 유전자가 암 줄기세포에서 유의성 있게 증가되는 것을 확인하였다. 또한, 칼슘을 조절하는 유전자들의 발현 차이를 확인하기 위하여, 실시예 3.2와 동일한 방법으로 웨스턴 블로팅을 실시하였다. 그 결과는 도 22에 나타내었다.

[0117] 도 22에 나타난 바와 같이, 암 줄기세포에서는 SERCA2의 발현은 증가하고, 반대로 IP3R의 발현은 감소되는 것을 확인하였다. 일반적으로 글루코즈가 부족한 상황이 되면 세포에서는 IP3R이라는 통로를 통하여 칼슘 이온이 세포질로 분비되게 되고, 칼슘의 분비가 급격하게 증가하게 되면 최종적으로는 세포 사멸이 유도되게 되는데, 이때 SERCA2를 통하여 다시 칼슘 이온이 재흡수되어 세포 사멸을 억제시킬 수 있는 것으로 알려져 있다.

[0118] 상기 결과들을 통하여, 암 줄기세포에서는 SERCA2의 발현이 증가되어 칼슘의 재흡수를 촉진시킬 뿐만 아니라, IP3R의 발현을 저해하여 칼슘 이온이 세포질로 분비되는 것을 동시에 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

[0120] 상기 결과들을 통하여 도 23에 나타난 바와 같이, CaMK-2 α 의 조절에 의하여 암 줄기세포는 일차적으로는 IP3R의 발현을 억제하여 칼슘 이온의 분비를 억제하고, 이차적으로는 분비된 칼슘 이온을 SERCA를 통하여 다시 세포 내부로 흡수하여 세포 사멸을 억제하여 영양분이 고갈된 상태에서도 생존 능력이 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

[0122] **7.2. CaMK-2 α 신호전달 기작의 변화 확인**

[0123] 영양 결핍 상태에서 시간에 따른 CaMK-2 α 신호전달 기작의 변화를 확인하기 실시예 3.2와 동일한 방법으로 웨스턴 블로팅을 실시하였으며, p NF-kB를 이용하여 실시예 5.1과 동일한 방법으로 EMSA assay를 실시하였다. 그 결과는 도 24 및 25에 나타내었다.

[0124] 도 24에 나타난 바와 같이, 암 줄기세포에서는 일반적인 암 세포에서와 다르게 영양 결핍 상태가 진행됨에 따라 CaMK-2 α 신호전달 기작의 신호 전달 물질들이 활성화되는 것을 확인하였다.

[0125] 또한 도 25에 나타난 바와 같이, p NF-kB는 IP3R의 억제자인 Bcl-2와 SERCA2의 발현을 증가시키는 전사 인자(transcription factor)로 작용한다는 것을 확인하였다. 상기 결과들을 통하여 CaMK-2 α 신호전달이 활성화되면 NF-kB가 인산화되어 활성화되고, 활성화된 NF-kB로 인하여 Bcl-2 및 CERCA2의 발현이 증가되어 칼슘 이온의 재흡수가 증가될 뿐만 아니라, IP3R의 발현이 억제되어 칼슘 이온의 분비가 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[0127] **7.3. CaMK-2 α 신호전달 기작의 억제 효과 확인**

[0128] CaMK-2 α 신호전달을 억제하였을 때의 효과를 확인하기 위하여, CaMK-2 α 의 억제제로 잘 알려져 있는 KN62(1-[N, 0-bis(5-isoquinolinesulphonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine)를 암 줄기세포에 10 μ M 농도로 처리한 후, 실시예 3.1과 동일한 방법으로 TUNEL assay를 실시하여 세포 사멸 및 DNA 조각화를 확인하였고, 실시예 3.2와 동일한 방법으로 웨스턴 블로팅을 실시하여 유전자의 발현을 확인하였으며, 실시예 2와 동일한 방법으로 세포의 생존률을 확인하였다. 그 결과는 도 26 내지 28에 나타내었다.

[0129] 도 26 내지 28에 나타난 바와 같이, 영양 결핍 상태의 암 줄기세포에서 CaMK-2 α 신호전달이 억제되면 NF-kB의 인산화가 이루어지지 않고 이로 인하여 IP3R 발현이 저해되고, 반대로 SERCA2의 발현은 증가되어 칼슘 이온의 분비가 증가되어 최종적으로는 세포사멸(apoptosis)이 유도된다는 것을 확인하였으며, 상기 결과를 통하여

CaMK-2 α 의 억제제는 암 줄기세포가 가지는 Ca²⁺ 연관 세포 사멸에 대한 저항성을 낮추어 암 줄기세포의 사멸을 유도하여 효과적인 암 줄기세포 특이적인 치료방법으로 사용할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[0131] **실시예 8: 암 줄기세포 동물 모델의 특징 확인**

[0132] 실시예 6과 동일한 방법으로 제작한 동물 모델의 특징을 확인하기 위하여, 생성된 유방암 조직을 추출하여 암의 크기를 측정하였다. 그 결과는 도 29에 나타내었다. 또한, 유방암 조직의 단백질 발현 정도를 웨스턴 블롯팅과 면역화학염색법을 실시하여 확인하였다. 웨스턴 블롯팅은 실시예 3.2와 동일한 방법으로 실시하였으며, 면역화학염색법은 실시예 6.2와 동일한 방법으로 실시하였다. 그 결과는 도 30 및 도 31에 나타내었다.

[0133] 도 29에 나타난 바와 같이, 암 줄기세포를 기반으로 한 동물 모델의 경우 일반 암 세포를 기반으로 한 동물 모델보다 암의 성장 속도가 빠른 것을 확인하였다.

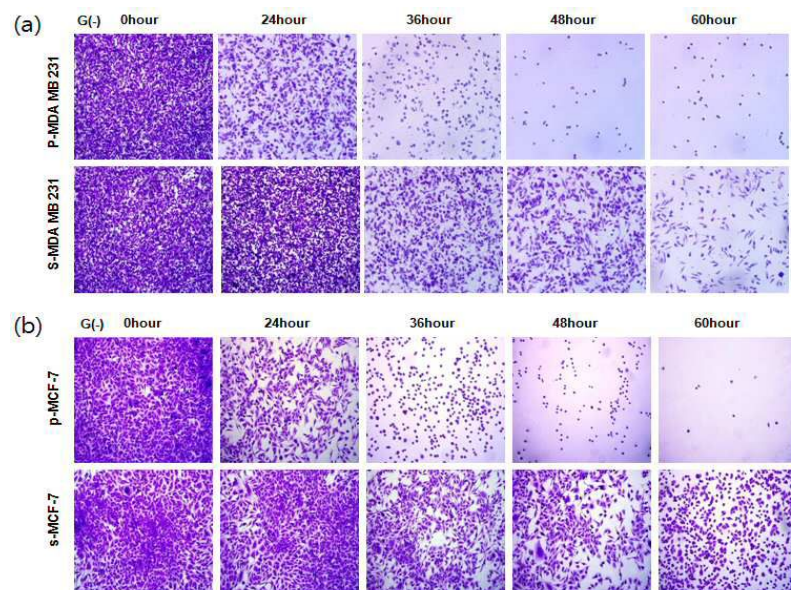
[0134] 또한, 도 30 및 31에 나타난 바와 같이, in vitro 실험과 동일하게 암 줄기세포를 기반으로 한 동물 모델의 경우 일반 암 세포를 기반으로 한 동물 모델과 비교하여 IP3R의 발현은 감소되고, SERCA2의 발현은 증가되어 있는 것을 확인하였다.

[0135] 상기 결과들을 통하여, 암 줄기세포의 경우 체내의 열악한 상황에서 CaMK-2 α 신호전달 기작을 활성화시켜 최종적으로는 IP3R의 발현은 억제하고, SERCA2의 발현은 증가시켜 칼슘 이온의 분비로 인한 세포 사멸을 억제하여 체내에서 암의 생존 능력을 증가시키며, 재발 및/또는 전이를 촉진할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통하여, 암 줄기세포에 효과적인 암 줄기세포 치료용 조성물은 기존 암 치료의 한계를 극복하여 암의 치료 효과를 극대화할 수 있을 뿐만 아니라 암의 재발 및/또는 전이를 억제할 수 있는 효과적인 치료 방법으로 사용가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

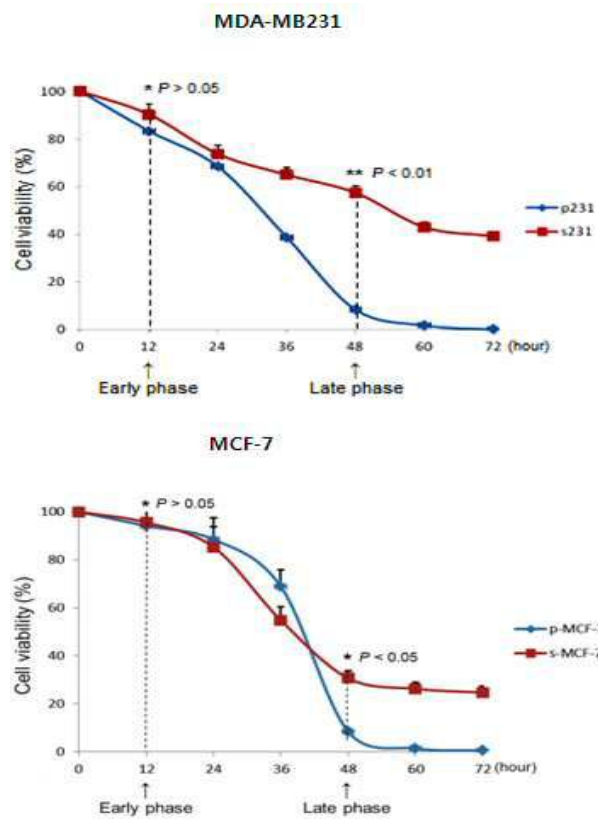
[0137] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

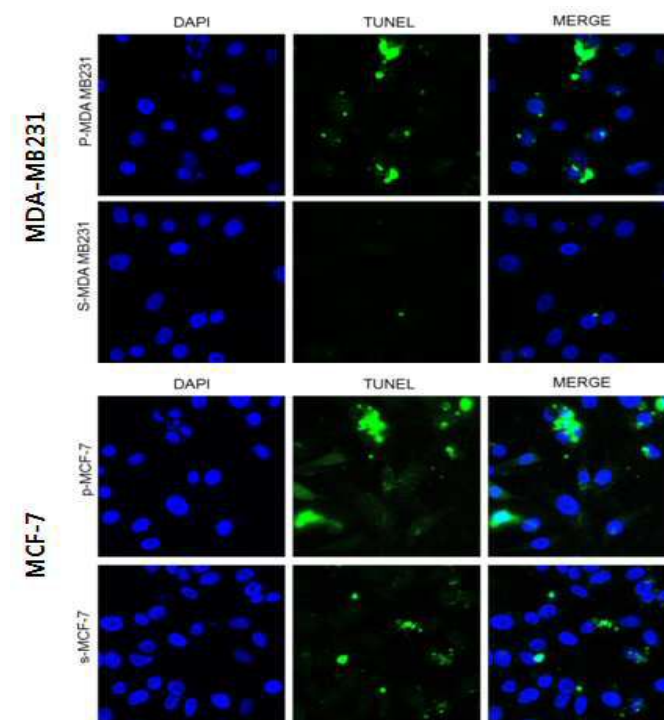
도면1



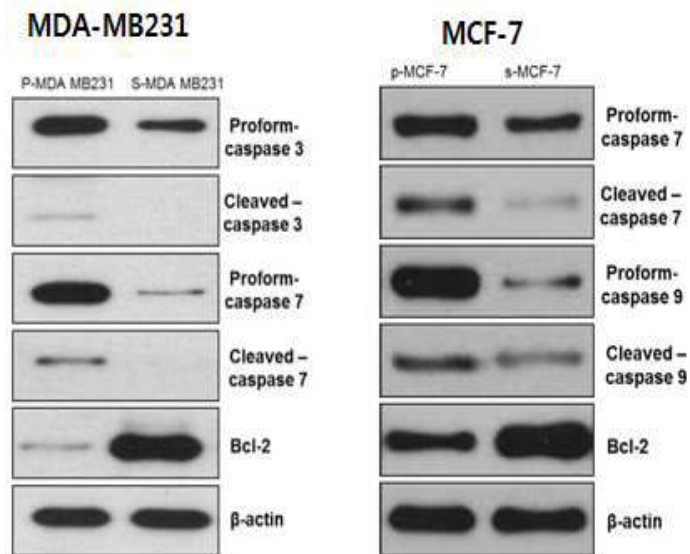
도면2



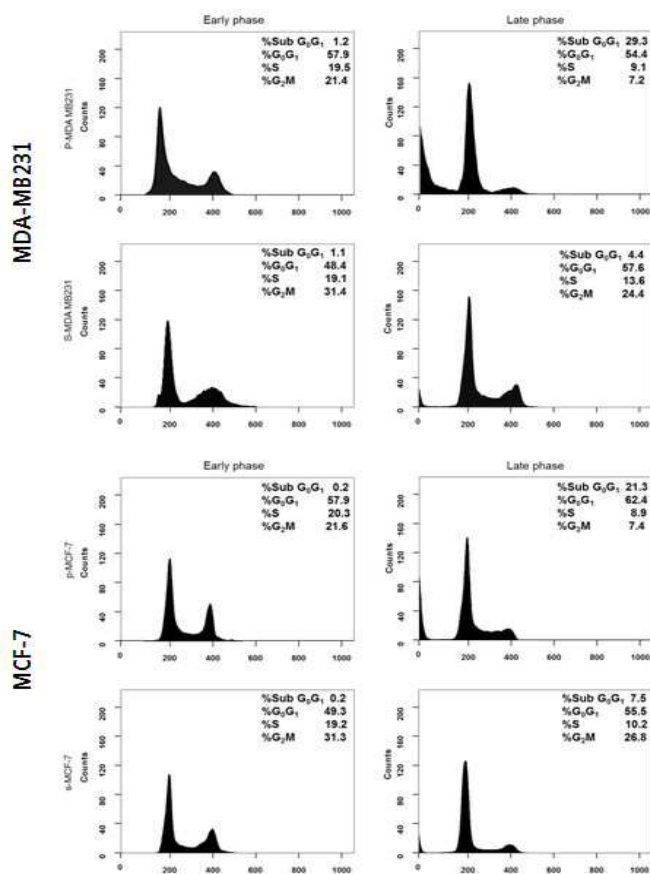
도면3



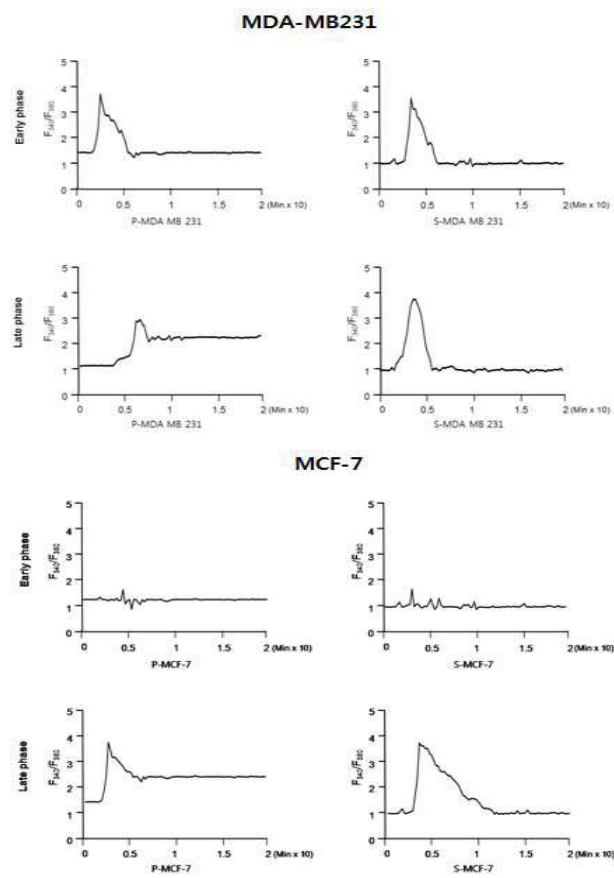
도면4



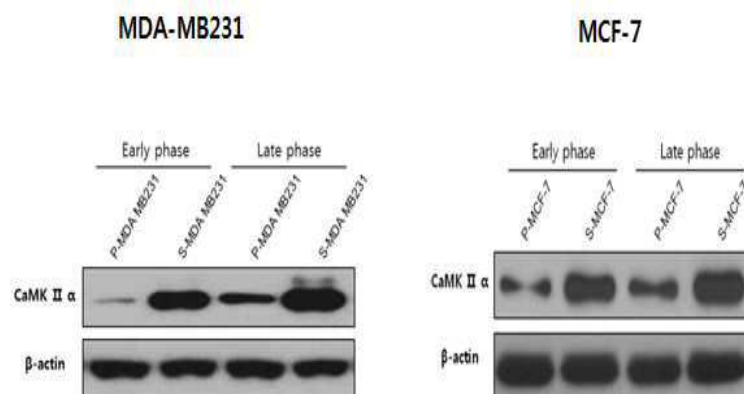
도면5



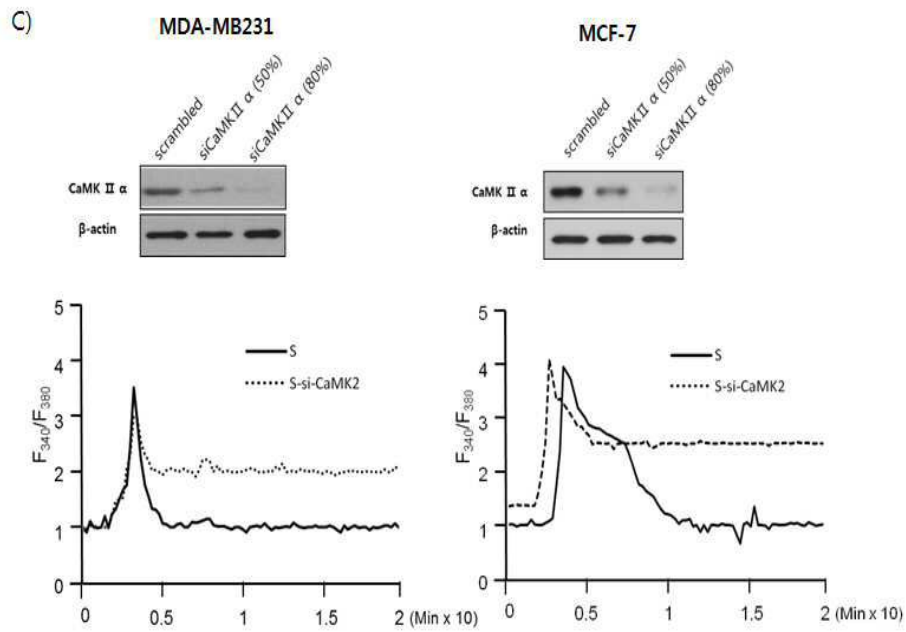
도면6



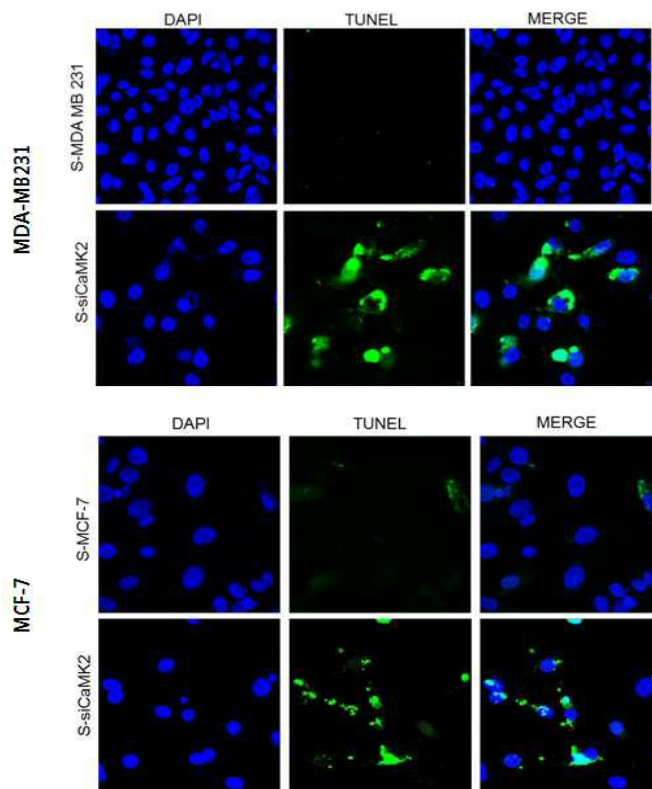
도면7



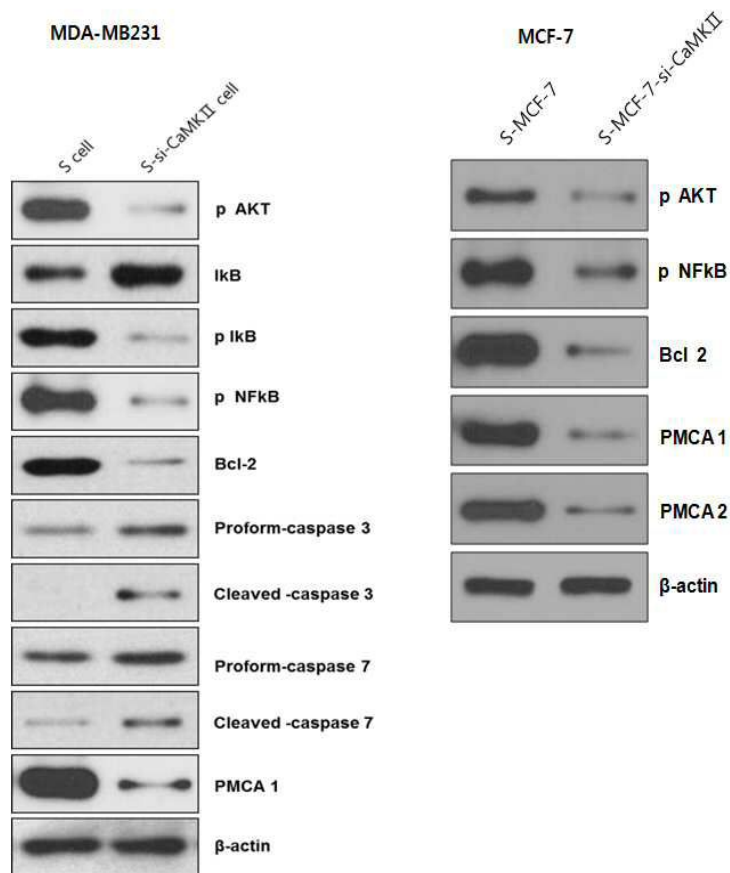
도면8



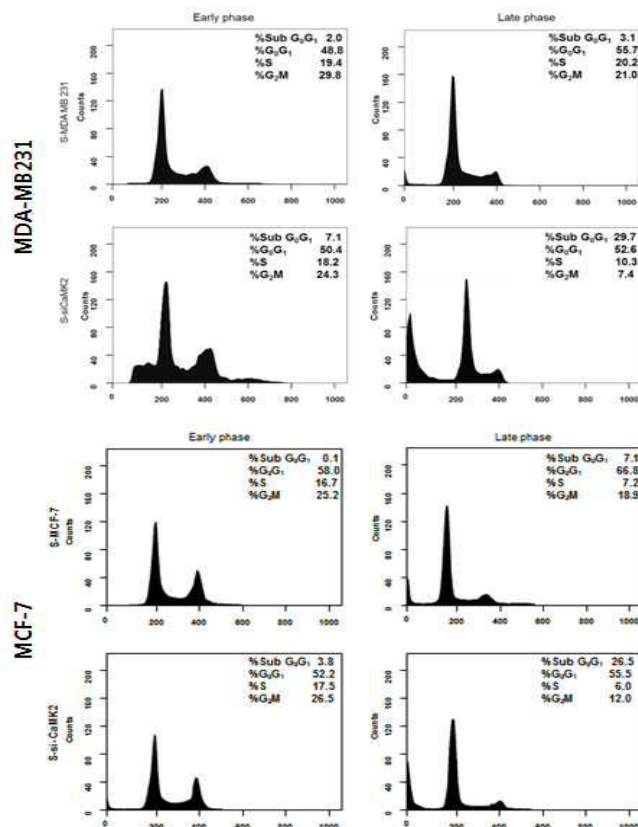
도면9



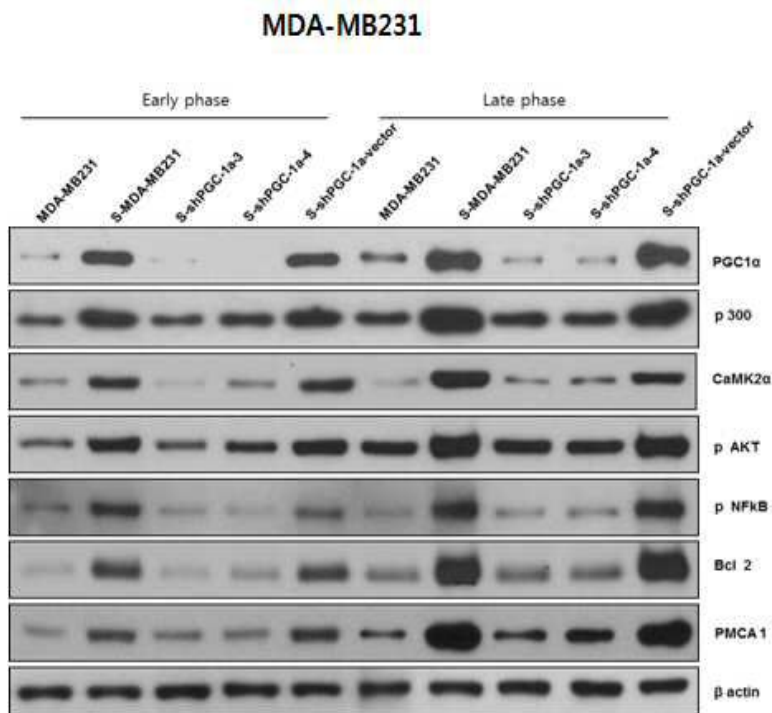
도면10



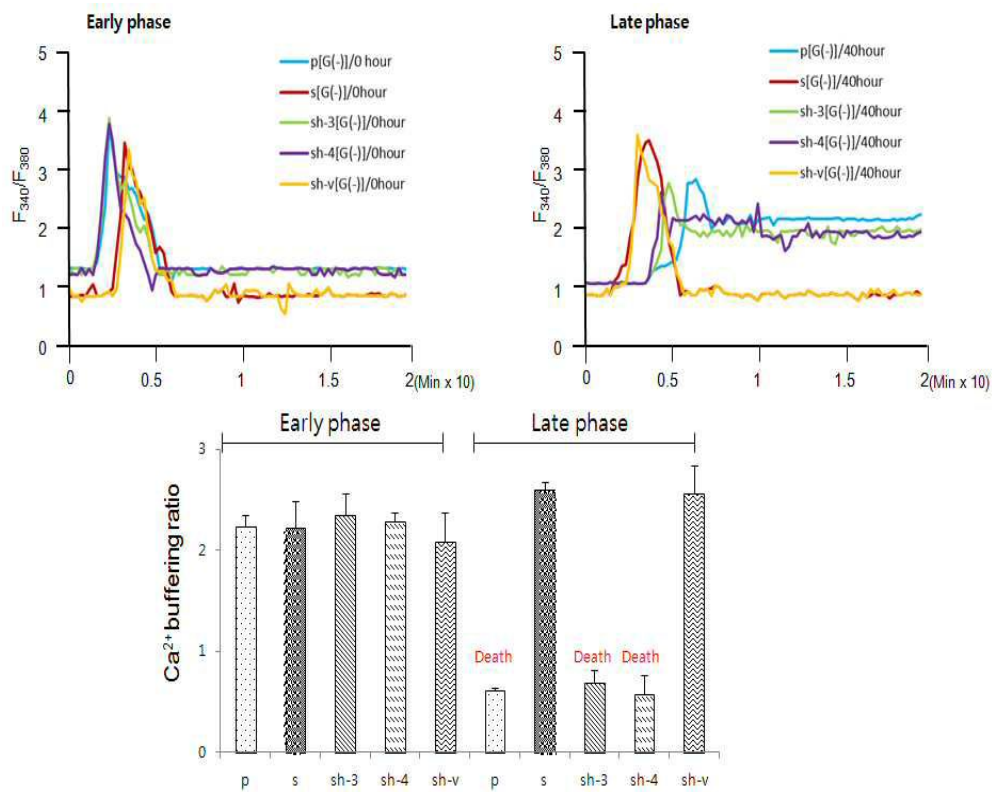
도면11



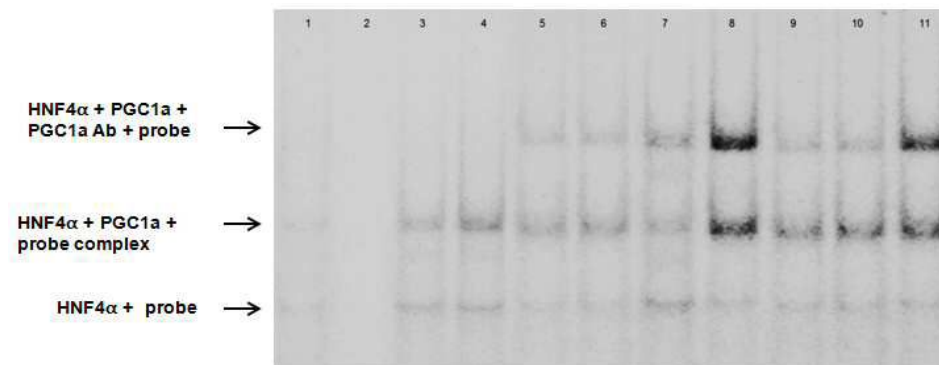
도면12



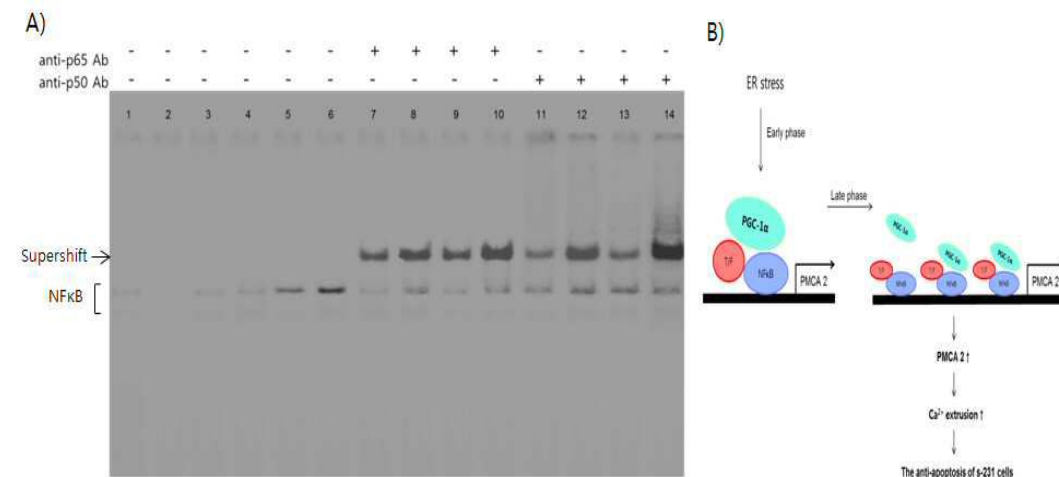
도면13



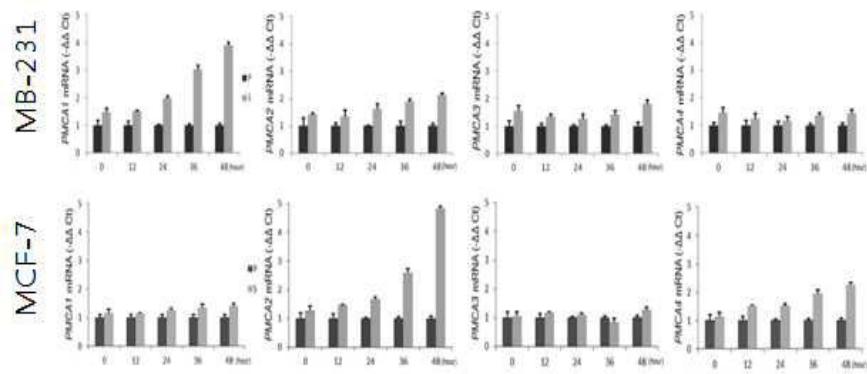
도면14



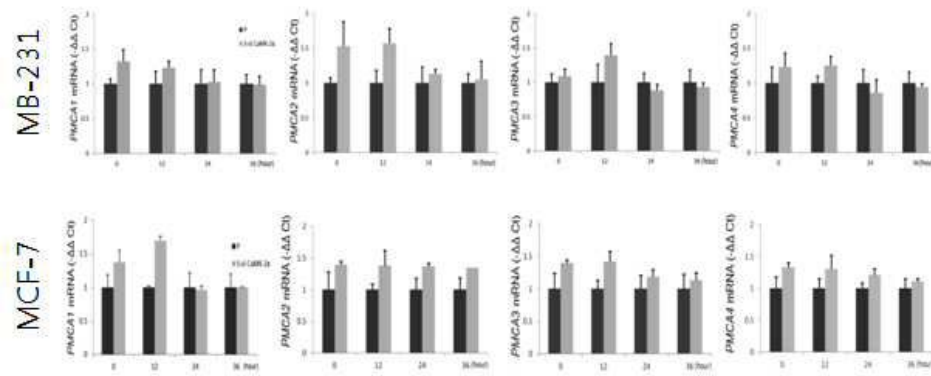
도면15



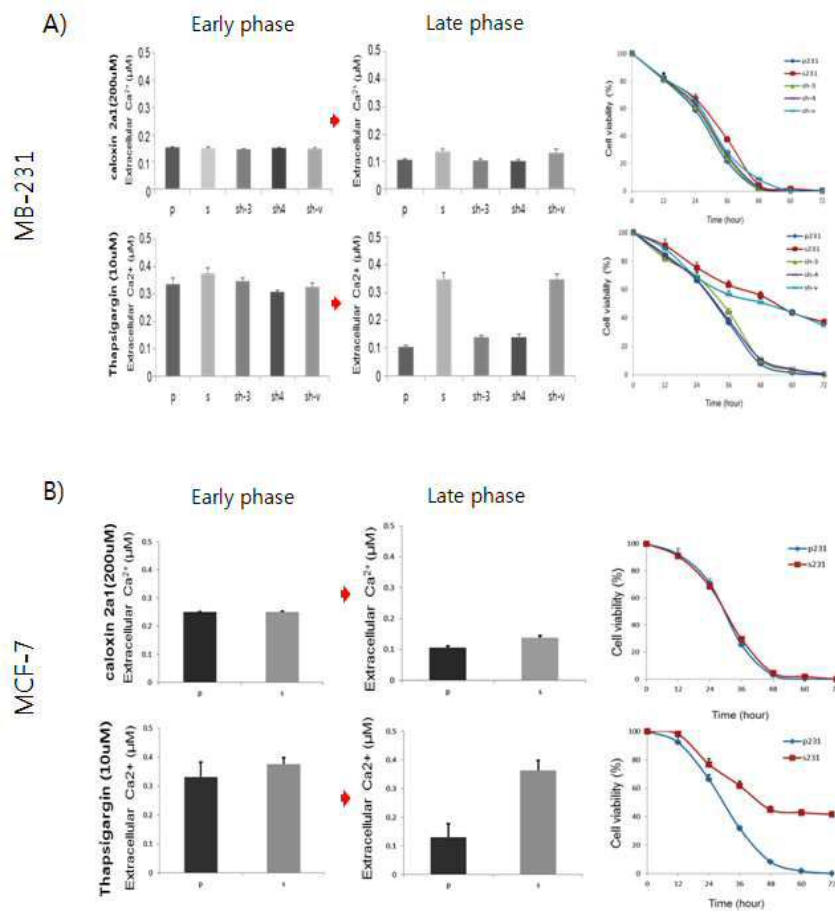
도면16



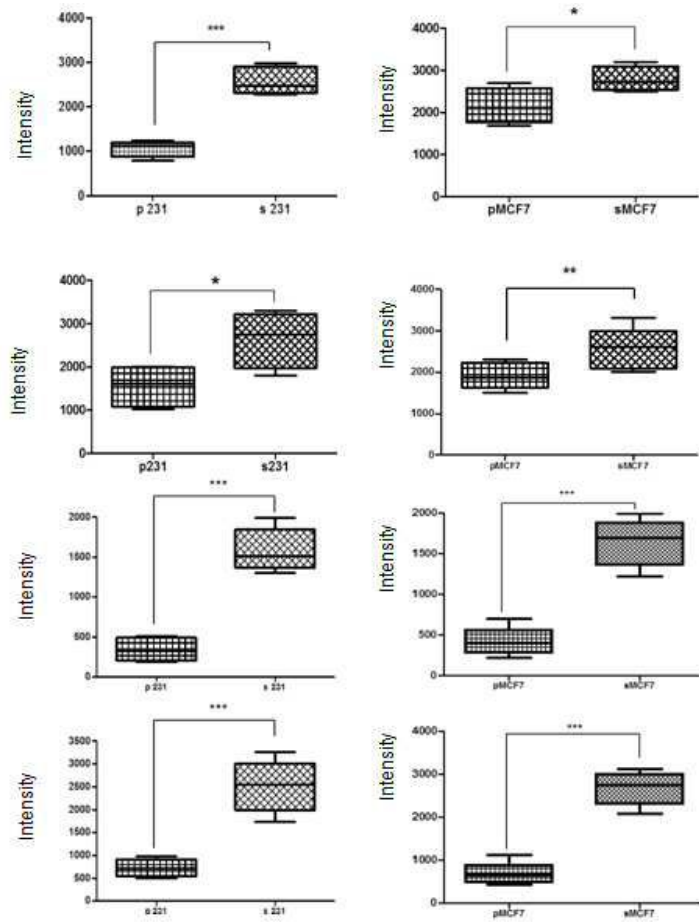
도면17



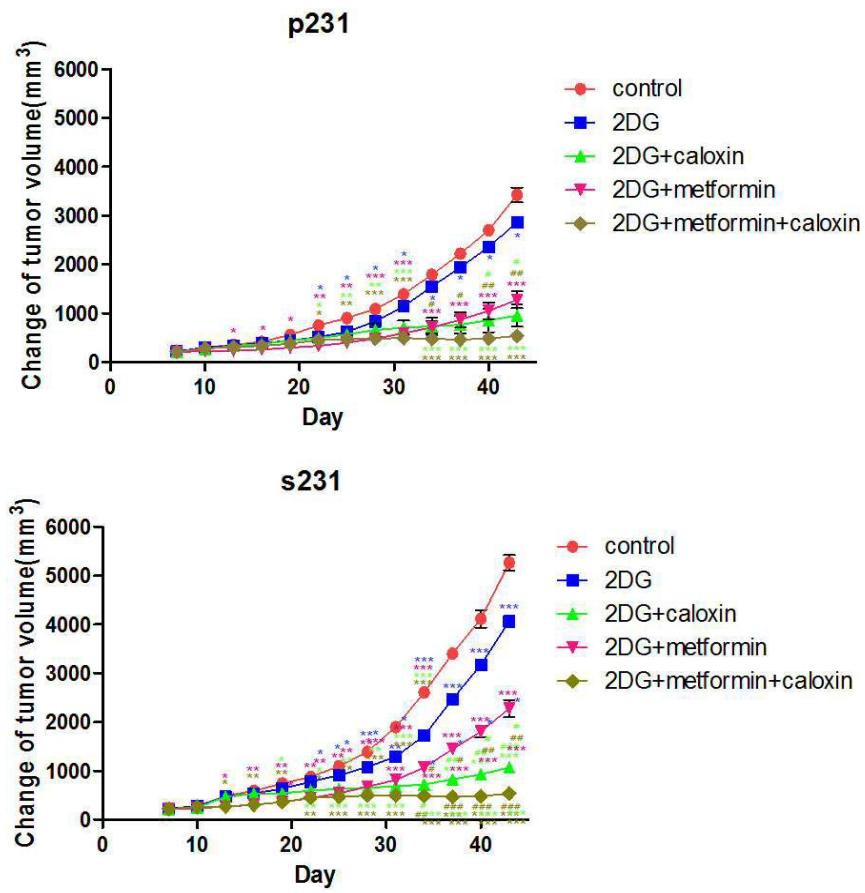
도면18



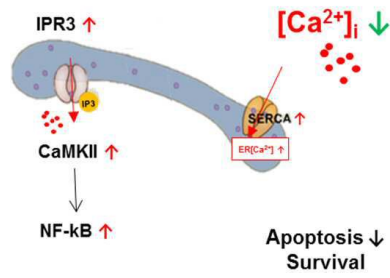
도면19



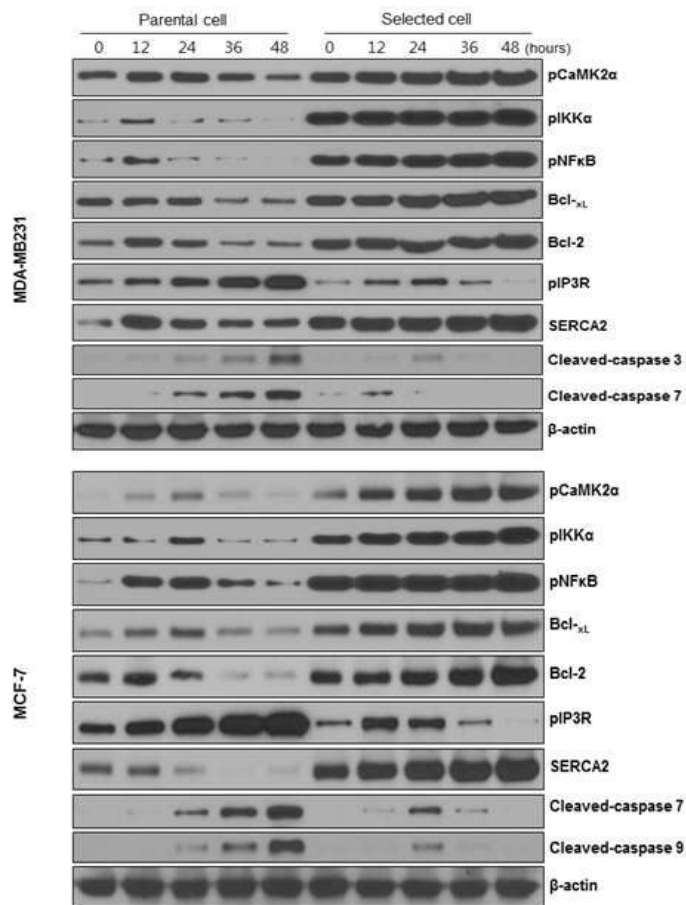
도면20



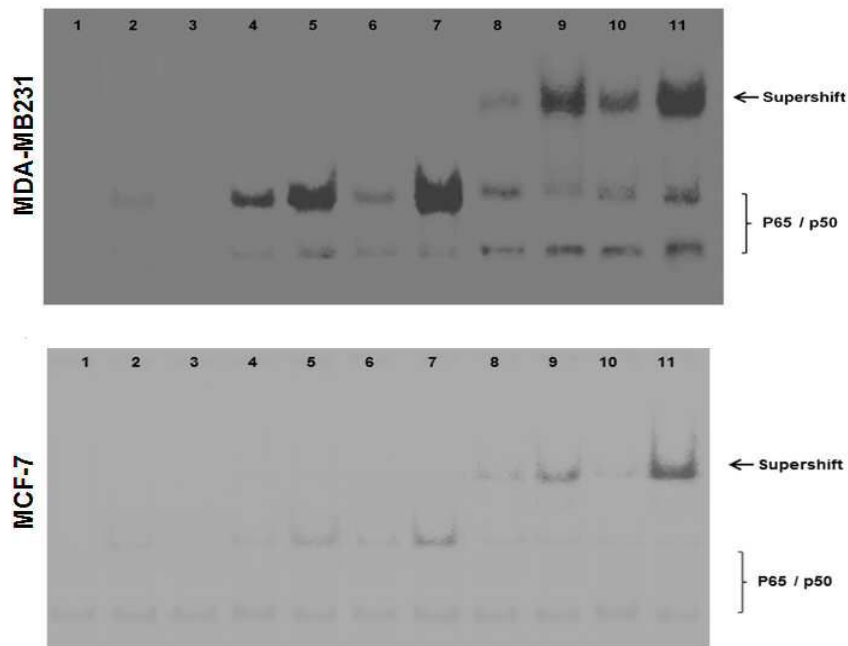
도면23



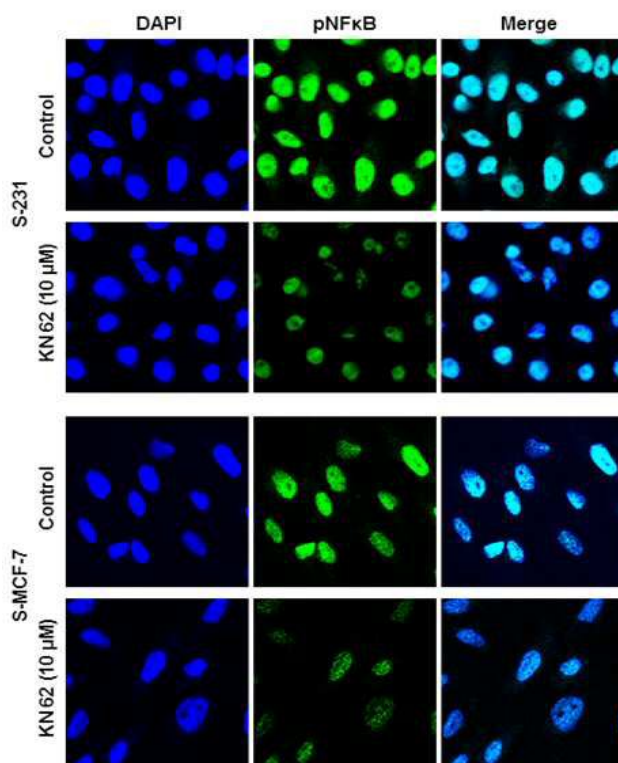
도면24



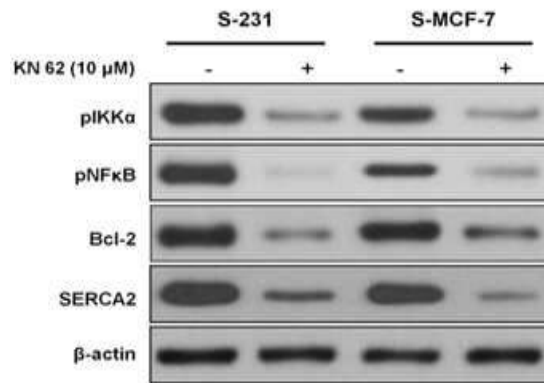
도면25



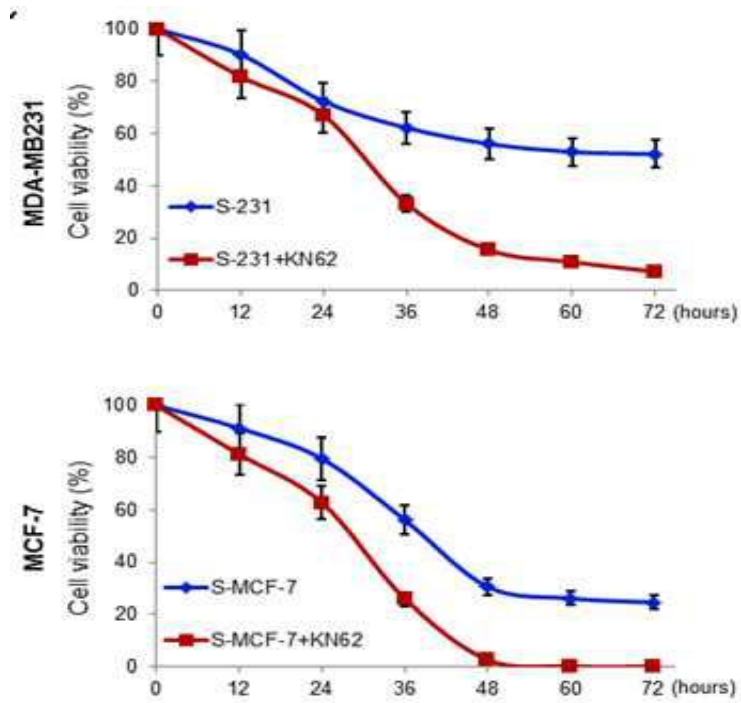
도면26



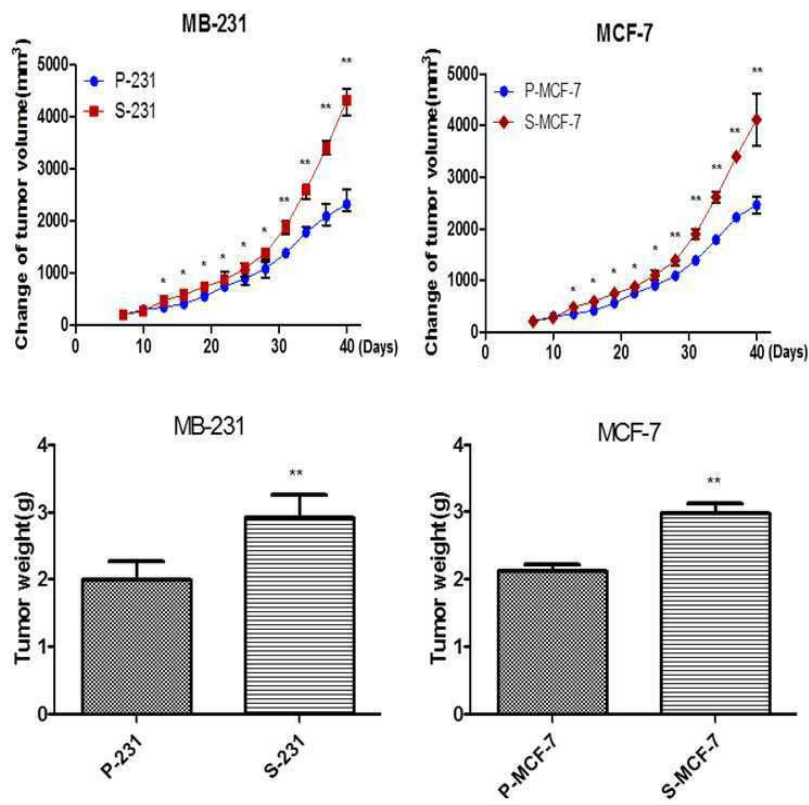
도면27



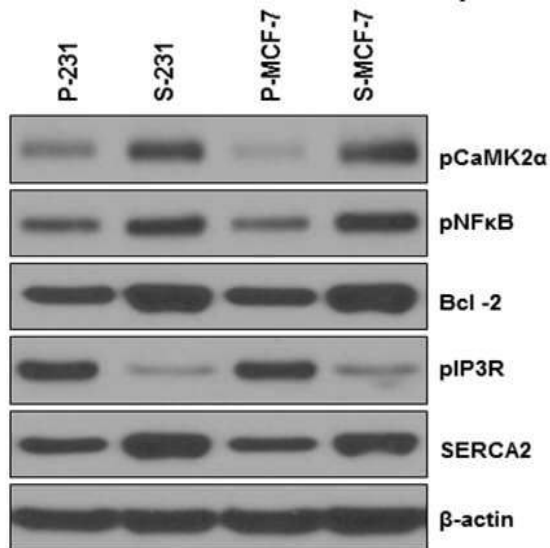
도면28



도면29



도면30



도면31

