

청구항 1.

삭제

청구항 2.

인간 신데칸-1 유전자 발현의 RNA 간섭을 유도하는 핵산 분자 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 자궁 내막암 치료 또는 예방용 조성물로서, 상기 핵산 분자는 서열번호 1 또는 2의 서열을 갖는 RNA 분자인 자궁 내막암 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 3.

인간 신데칸-1 유전자 발현의 RNA 간섭을 유도하는 핵산 분자 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 자궁 내막암 치료 또는 예방용 조성물로서, 상기 핵산 분자는 서열번호 1 또는 2의 서열을 갖는 RNA 분자를 코딩하는 DNA를 포함하는 발현 벡터인 자궁 내막암 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 4.

제2항 또는 제3항에 있어서, 상기 인간 신데칸-1 유전자는 NCBI 허가번호 NM_002977 유전자인 자궁 내막암 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 5.

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 작은 헤어핀 RNA 분자를 포함하는 자궁 내막암 치료 또는 예방용 조성물 및 그를 이용한 자궁 내막암 치료 또는 예방 방법에 관한 것이다.

동물 및 하등 진핵생물에 있어서의 RNA 간섭 (RNAi), 곰팡이의 쿨링(quelling), 및 식물의 전사후 유전자 스플라이싱 (PTGS)은 집합적으로 RNA 침묵화 (silencing)라고 하는 넓은 현상의 패밀리에 예들이다. RNA 침묵 현상의 공동된 특징은 유전자 발현을 하향조절 (downregulation)하기 위한 특이적인 결정인자로서 작용하는 작은 RNA (21-26nt)를 생성하고 Argonaute 패밀리 단백질 (또는 PPD 단백질, 특징적인 PAZ 및 Piwi 도메인을 받아서 작명됨)을 필요로 하는 것이다.

작은 RNA는 dsRNA 특이적 엔도뉴클레아제인 다이서 (Dicer) 패밀리의 구성원에 의하여 동물에서 생성된다. 다이서 (Dicer) 패밀리 구성원은 잠정적인 RNA 헬리카제, PAZ, 2개의 연속 RNaseIII, 및 하나 이상의 dsRNA 결합 도메인을 포함하는 큰 멀티도메인 단백질이다. 상기 이웃하는 RNaseIII 도메인은 dsRNA를 RNAi의 매개자인 작은 간섭 RNA (siRNA)의 내부 절단 (endonucleolytic cleavage)을 매개하는 것으로 여겨진다. 초파리 및 포유동물에서 하나 이상의 Argonaute 패밀리 단백질과 함께, siRNA는 단백질-RNA 복합체인, RNA-유도된 침묵 복합체 (RNA-induced silencing complex: RISC)를 형성하여, 상기 siRNA의 광범위 상동성을 갖는 서열에서 표적 RNA의 절단을 매개한다.

Dicer 및 Argonaute 단백질 외에, RNA-의존성 RNA 중합효소 (RdRP) 유전자가 *Caenorhaptitis elegans*, *Neurospora crassa* 및 *Dictyostelium discoideum*에서 RNA 침묵화에 필요하나, 초파리나 포유동물의 RNAi에는 필요하지 않은 것처럼

럼 보인다. 식물에서, 내재적 mRNA를 과발현하는 트랜스유전자 (transgene)에 의하여 개시된 PTGS가 또한 잠정적인 RdRP, SGS2를 필요로 하나, dsRNA를 생성하도록 고안된 트랜스유전자는 이 요건을 회피할 수도 있다. 비슷하게, dsRNA 중간체를 통한 바이러스 복제에 의하여 유도된 침묵화 (바이러스-유도된 유전자 침묵화, VIGS)는 SGS2를 필요로 하지 않는다.

동물의 Dicer 및 식물의 CARPEL FACTORY (CAF, Dicer 호몰로그)는 또한 내재적 mRNA 발현을 조절하는 것으로 생각되는 20-24nt, 단일가닥 비코딩 RNA인 마이크로RNA (miRNA)를 생성시킨다. miRNA는 스템-루프 전구체 RNA 전사체의 Dicer 절단에 의하여 생성된다. 상기 miRNA는 이중가닥 스템의 5' 또는 3' 어느 쪽에나 위치할 수 있다. 동물에서, 프리-miRNA는 핵에서 조밀하고 (compact), 접힌 구조 (pre-miRNA)로 가공되는 긴 일차 전사체 (pri-RNA)로 전사된 다음, 세포질로 수송되어 Dicer에 의하여 절단되어 성숙된 miRNA를 생성한다. 동물 miRNA는 부분적으로만 표적 mRNA에 상보적이다. 이 부분적 상보성은 miRNA가 RNAi 경로에 의하여 표적을 직접적으로 절단하기 보다는, 표적의 번역을 억제하도록 하는 것으로 해석되고 있다. 식물 miRNA는 세포 mRNA에 더 큰 상보성을 가지고 RNAi-유사 기작을 통하여 표적 RNA 절단을 매개하는 것으로 해석되고 있다.

일반적으로 표적 유전자 발현의 RNA 간섭을 유도하는 핵산 분자를 제작하는 방법은 종래 선행기술에 잘 알려져 있다. 예를 들면, WO03/006477에는 표적 mRNA에 상보적인 18nt 이상의 서열을 포함하는 제1 스템 부분, 상기 제1 스템 부분에 충분하게 상보적이어서 상기 제1 스템 부분과 혼성화되어 이중가닥 스템을 형성하는 18nt 이상의 서열을 포함하는 제2 스템, 및 상기 2개의 스템 부분을 연결하는 루프 부분을 포함하는 RNA 전구체 및 그를 코딩하는 핵산에 연결되어 있는 조절 서열을 포함하는 핵산 분자가 개시되어 있다. 또한, WO 2001/75164에는 상응하는 mRNA의 RNA 간섭을 매개하는 약 21 내지 약 23 nt의 단리된 RNA가 개시되어 있다. 또한, RNA 간섭을 유도하는 핵산 분자는 상업적으로 구입가능한 표적 유전자 발현의 RNA 간섭을 유도하는 핵산 분자의 제작을 위한 키트를 사용하여 제작될 수 있다 (예, Epicentre 사의 MessageMuter™ shRNAi Production Kit).

신데칸은 기질 인지 (matrix recognition) 및 성장인자 결합에 관여하여 세포 조절에 관여하는 것으로 알려져 있는, 세포 표면 프로테오글리칸 (proteoglycan)이다. 신데칸-1은 콜라겐, 피브로넥틴, 및 FGF-2에 결합하고, 또한 세포 부착에도 참여하는 프로테오글리칸이다 (도 1 참조). 도 1은 신데칸-1 단백질의 구조를 모식적으로 나타낸 것으로, 신데칸-1 단백질은 세포질 도메인, 막투과 도메인 및 엑토도메인으로 구성되고, 상기 엑토도메인에는 heparan sulfate (HS)를 포함한다. 배 발생 중, 신데칸-1은 4 세포기에서 처음 검출되고, 고도로 발생학적으로 조절된 방식으로 중간엽 및 상피 기원의 세포에서 발현된다. 나중에, 신데칸-1은 혈장 세포 및 레이디히 세포 (Leydig cell)를 제외하고는, 상피 세포에서 거의 배타적으로 발현된다. 종양 발생은 신데칸-1 발현의 현저한 하향조절 (downregulation)과 연관되어 있다 (Molecular Human Reproduction vol 3. no 4 pp. 299-305, 1997). 또한, 미국특허 제5,422,243호에는 비종양 상태에서 신데칸을 발현하는 인간 세포에서, 신데칸 단백질 또는 mRNA의 부존재 (absence) 또는 발현의 감소를 검출함으로써, 인간 세포의 종양 또는 전종양 상태를 검출하는 방법이 개시되어 있다.

상기한 바와 같이, 종래 기술에 의하면, 신데칸의 과발현이 종양의 발생과 연관이 있는 것으로 알려져 있었다. 본 발명자들은 놀랍게도 이러한 종래 기술의 내용과는 대조적으로, 자궁내막암 세포에서 신데칸-1의 발현을 shRNAi를 통하여 침묵화 시킴으로써 종양의 성장을 억제할 수 있다는 것을 발견하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 인간 신데칸-1 유전자 발현의 RNA 간섭을 유도하는 핵산 분자를 포함하는 자궁내막암 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 또다른 목적은 상기 조성물을 이용하여 자궁내막암 치료 또는 예방 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성

본 발명은 인간 신데칸-1 유전자 발현의 RNA 간섭을 유도하는 핵산 분자 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 자궁 내막암 치료 또는 예방용 조성물을 제공한다.

일반적으로 표적 유전자 발현의 RNA 간섭을 유도하는 핵산 분자를 제작하는 방법은 종래 선행기술에 잘 알려져 있다. 본 발명의 조성물에 사용되는 인간 신데칸-1 유전자 발현의 RNA 간섭을 유도하는 핵산 분자는 이러한 종래 알려진 임의의

방법에 의하여 제조될 수 있다. 예를 들면, WO03/006477에 개시된 방법에 의하여 제조될 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상업적으로 구입가능한 표적 유전자 발현의 RNA 간섭을 유도하는 핵산 분자의 제작을 위한 키트를 사용하여 제작될 수 있다 (예, Epicentre 사의 MessageMuter™ shRNAi Production Kit).

본 발명에 있어서, 상기 "핵산 분자"란 RNA, DNA 및 PNA와 같은 핵산 유사체를 포함하는 의미로 사용된다. 또한, 본 발명에 있어서 "RNA 간섭을 유도하는 핵산 분자"란 인간 신데칸-1 유전자 발현의 RNA 간섭을 유도할 수 있는 것이라면 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면 짧은 간섭 핵산 (siNA), 짧은 간섭 RNAi (siRNAi), 마이크로RNA (miRNA) 및 짧은 헤어핀 RNAi (shRNAi)가 포함된다. 바람직하게는, RNA 간섭을 유도하는 핵산 분자는 shRNAi이다.

본 발명의 일 구체예는 상기 핵산 분자가 서열번호 1 또는 2의 서열을 갖는 RNA 분자인 자궁 내막암 치료 또는 예방용 조성물이다. 본 발명의 서열번호 1 및 2의 RNA 분자는 각각 인간 신데칸-1 유전자 (NCBI 허가번호 NM_002997)의 3'-UTR 영역 (위치 2404-2422) 및 코딩영역 (위치: 459-480)에 상보적인 18개 뉴클레오티드 서열을 가진 shRNAi 분자이다.

본 발명의 일 구체예는 상기 핵산 분자가 서열번호 1 또는 2의 서열을 갖는 RNA 분자를 코딩하는 DNA를 포함하는 발현 벡터인 자궁 내막암 치료 또는 예방용 조성물이다.

본 발명에 있어서, 상기 발현 벡터는 진핵세포에 도입되는 경우 진핵세포 내의 전사 기구에 의하여 서열번호 1 또는 2의 서열을 갖는 RNA 분자를 코딩하는 DNA를 포함한다. 상기 발현 벡터는 상기 서열번호 1 또는 2의 서열을 갖는 RNA 분자를 코딩하는 DNA와 함께 상기 DNA의 전사에 필요한 조절 서열과 작동가능하게 연결되어 있는 것이 바람직하다. 상기 발현 벡터는 종래 알려진 임의의 발현 벡터가 사용될 수 있다. 예를 들면, 상기 발현 벡터는 플라스미드 또는 플라스미드 유래 벡터, 박테리오파지 또는 박테리오파지 유래 벡터, 및 식물 또는 동물 유래 바이러스 벡터가 사용될 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 동물 유래 바이러스 벡터의 예에는 아테노바이러스 연관 바이러스 벡터 및 백시니아 바이러스 유래 벡터가 포함된다.

본 발명에 있어서, 상기 인간 신데칸-1 유전자는 NCBI 허가번호 NM_002997의 유전자일 수 있으나, 여기에 한정되는 것은 아니다. 당업자라면 실질적으로 신데칸-1과 동일한 활성을 가지는 변이체가 존재하는 것을 예측할 수 있으며, 이러한 신데칸-1 변이체는 본 발명의 범위에 속하는 것으로 해석되어야 한다.

종래 신데칸-1은 혈장 세포 및 레이디히 세포 (Leydig cell)을 제외하고는 상피 세포에서 거의 배타적으로 발현되는 것으로 알려져 있었다. 또한, 악성 종양의 발생은 신데칸-1 발현의 현저한 하향조절 (downregulation)과 연관되어 있는 것으로 알려져 있었다 (Molecular Human Reproduction vol 3. no 4 pp. 299-305, 1997). 이러한 선행기술과는 대조적으로, 본 발명자들은 자궁 내막암 세포에 있어서, RNA 간섭에 의하여 신데칸-1 유전자 발현을 하향조절함으로써 종양 세포의 성장을 억제할 수 있다는 놀라운 사실을 발견하였다. 따라서, 본 발명의 상기 조성물은 인간 신데칸-1 유전자 발현의 RNA 간섭을 유도하여 인간 신데칸-1 유전자 발현을 억제함으로써 자궁 내막암의 예방 및/또는 치료용으로 사용될 수 있다.

본 발명에 있어서, "약제학적으로 허용가능한 담체"란 약제학적 투여에 적합한 임의의 용매, 분산매, 코팅제, 항박테리아 및 항균제, 등장액 및 흡수지연제 등을 포함하는 의미로 사용된다. 약제학적 활성물질에 대하여 그러한 약제학적으로 허용가능한 담체를 사용하는 것은 당업계에 잘 알려져 있다.

본 발명의 조성물에서 사용되는 약제학적으로 허용가능한 희석제 또는 담체로는 통상적인 부형제, 붕해제, 결합제, 활택제 등 중에서 1종 또는 2종 이상을 선택적으로 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물을 정제 또는 경질캡셀제 등의 고형제형으로 제조할 경우, 부형제로서 미결정 셀룰로오즈, 유당, 저치환도 히드록시셀룰로오즈 등이 사용될 수 있고, 붕해제로서 전분글리콜산 나트륨, 무수인산일수소 칼슘 등이 사용될 수 있다. 결합제로는 폴리비닐피롤리돈, 저치환도 히드록시프로필셀룰로오즈, 히드록시프로필셀룰로오즈 등이 사용될 수 있고, 활택제로서는 스테아린산 마그네슘, 이산화규소, 탈크 등으로부터 선택하여 사용할 수 있다.

또한, 무수 이염기성 인산칼슘과 같은 정제에 광택을 제공하는 첨가제를 사용할 수 있으며, 수분용성 물질로 피복시킴으로써 공기 중의 수분이 정제내로 침투하는 것을 방지할 수 있다. 이때 피막기제는 분자구조가 치밀해야 하고, 수용액에 쉽게 용해되지 않는 것이 바람직하다. 이러한 피막기제로서 메타크릴산 코폴리머, 히드록시프로필메틸셀룰로오즈프탈레이트, 셀룰로오즈아세테이트프탈레이트, 히드록시프로필메틸셀룰로오즈아세테이트석시네이트, 폴리비닐알코올 등의 고분자물질을 사용할 수 있다. 이들 고분자 물질은 단독, 또는 혼합하여 피복에 사용할 수 있다. 또한, 상기 피막은 당업계에서 통상적으로 피막기제에 첨가할 수 있는 첨가제, 예를 들면 가소제, 방부제, 착색제, 차광제 등을 포함할 수 있다.

단백질, 향체 및 조절 화합물과 같은 보충적 활성물질이 본 발명의 조성물에 또한 포함될 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물은 원하는 투여 경로에 적합하게 제제화될 수 있다. 상기 투여 경로의 예에는, 비경구 투여 예를 들면, 정맥내, 피내, 피하, 복막내, 근육내, 경구 (예, 흡입), 경피 (국소) 및 경점막 투여가 포함된다. 비경구, 피내, 또는 피하 투여에 사용되는 용액제 또는 현탁제는 하기 성분을 포함할 수 있다: 주사용수와 같은 멸균 희석제, 염 용액, 고정 오일 (fixed oil), 폴리에틸렌글리콜, 글리세린, 프로필렌글리콜, 또는 다른 합성 용매; 벤질알콜 또는 메틸 파라벤과 같은 항백테리아제; 아스코르브산 또는 소듐 비설파이트와 같은 항산화제; EDTA와 같은 킬레이트화제; 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트와 같은 버퍼 및 소듐 클로라이드 또는 포도당과 같은 장도 (tonicity) 조절을 위한 제제. pH는 염산 또는 소듐 히드록사이드와 같은 산 또는 염기에 의하여 조절될 수 있다. 비경구 투여 제제는 유리 또는 플라스틱으로 된 앰플, 일회용 주사기 또는 복수 용량 바이알 내에 포장될 수 있다. 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 좌제 (예, 코코아 버퍼 또는 다른 글리세라이드와 같은 통상적인 좌제 염기와 함께)의 형태로 제제화될 수 있다.

투여의 용이성 및 투여량 (dosage)의 균일성을 위하여 경구 또는 비경구 조성물을 단위 투여량 (dosage unit) 형태로 제제화하는 것이 특히 유리하다. 단위 투여량 형태란 치료될 개체에 대하여 단일 투여로서 적합화시킨 물리적으로 구분된 단위를 말한다. 즉, 필요한 약제학적 담체와 연관되어 원하는 약효를 생성하도록 계산된 활성 성분의 미리설정된 양을 포함하는 각 단위체를 말한다.

본 발명의 핵산 분자의 단위 투여량은 예를 들면, LD50 (집단의 50%에 치사적인 용량) 및 ED50 (집단의 50%에 약효가 있는 용량) 결정 위한 과정과 같은 세포 배양 또는 실험 동물에서의 표준 약제학적 과정에 의하여 결정될 수 있다. 독성 효과 및 약효 사이의 용량 비율 (dose ratio)은 약제학적 지수이고 LD50/ED50 비율로 표시될 수 있다. 큰 약제학적 지수를 나타내는 화합물이 바람직하다.

세포 배양 분석 및 동물 연구에서 얻어진 데이터는 인간에의 사용을 위한 투여량의 범위를 제제화하는데 사용될 수 있다. 그러한 화합물의 투여량은 독성이 거의 없이 ED50를 포함하는 순환 농도의 범위 내인 것이 바람직하다. 투여량은 이용되는 투여량 형태 및 이용되는 투여 경로에 따라 이 범위 내에서 다를 수 있다.

본 발명의 조성물에서 사용되는 인간 신데칸-1 유전자의 RNA 침묵을 유도하는 핵산 분자의 치료학적으로 유효한 양은 상기 핵산 분자로서 1일 0.0001 μ g~100mg의 범위, 바람직하게는 0.001 μ g~10mg의 범위, 더욱 바람직하게는 0.01 μ g~1mg의 범위 일 수 있다.

본 발명은 또한, 본 발명에 따른 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 자궁 내막암을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

본 발명에 따른 조성물 및 상기 조성물의 투여방법 및 투여량 등에 대하여는 상기한 바와 같다.

이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예

재료 및 방법

본 실시예에 사용된 재료 및 방법은 다음과 같다.

1. 세포 트랜스펙션

효율적인 세포 트랜스펙션을 위하여, 1,000 내지 10,000 세포를 각 24 웰 및 6웰 플레이트에 접종하였다. 24 시간 후, 세포를 제조사 (Mirus, 미국)의 지침에 따라 트랜스펙션하였다. 간단하게 설명하면, 트랜스펙션 시약 TransIt-TKO (Mirus, 미국)를 지침에 따라 무혈청 RPMI-1640 배지로 15 분 동안 예비혼합하였다. 다음으로, 적당한 양의 shRNAi를 상기 TKO 용액과 혼합하고 15분 더 두었다. 다음으로, 상기 혼합물을 각 웰에 고르게 첨가하여 shRNAi 또는 그의 대조군 shRNAi의 최종 농도가 50 nM이 되도록 하였다.

2. 면역조직 및 면역세포화학 실험

항 인간 신데칸-1 단일클론 항체는 Sanacruz 사 (미국)와 Cymbus Biotechnology (미국)로 구입하였다. 자궁내막암 조직은 1995년 내지 2003년에 걸쳐 수집하였으며, 총 43개의 자궁 내막암 조직을 사용하였다. 4개월 내지 9년 (중간값 48 개월) 동안 추적하여, 실험 결과를 확인하였다. 자궁 내막암 진행 정도는 34 중의 1 단계 (grade 1) 및 9 중의 2 단계 이상의 자궁 내막암 조직을 사용하였다.

얻어진 데이터는 Student t test 및 Mann-Witney U test 법을 사용하여 통계적으로 분석하였다.

구체적인 실험과정은 다음과 같다. 10,000 세포를 24 웰 중에 집중하고 상기한 바와 같이 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 72 시간 후, 세포를 PBS 중의 3.7% 포르말린으로 4°C에서 밤새 고정화하였다. 다음으로, 세포를 5분 동안 3회 세척하였다. 세척 후, -20°C의 냉 메탄올을 상기 세포에 3 분 동안 첨가하고, PBS로 5 분 동안 3회 세척하였다. 세포를 5 분 동안 3% 과산화 수소 용액으로 처리하고, PBS로 3회 세척하였다. 항 인간 신데칸-1 생쥐 단일클론 항체를 1/1,000로 희석하고 상기 세포에 25°C에서 2 시간 동안 세포에 적용하고 상기한 바와 같이 3회 세척하였다. 세척 후, 상기 세포를 제조사의 지침에 따라 2차 항체 접합을 위하여 Histostain-Plus (Zymed, 미국)으로 처리하였다. 마지막으로, 상기 세포를 변색이 감지될 때까지 안정한 DAB (Invitrogen, 미국)로 처리하였다.

3. RT-PCR

100,000 세포를 6웰 플레이트에 집중하고 RT-PCR을 위하여 상기한 바와 같이 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 3일 후, 각 6웰 플레이트 중의 세포를 총 RNA 추출을 위하여 웰 당 1 ml TRIzol 시약 (Invitrogen, 미국)으로 가용화하였다. 상기 RNA 추출은 제조사의 지침서에 따랐다. 모든 RNA는 흡광도 비율 260nm/280nm에 대하여 1.9 이상이었다. 5µg의 각 총 RNA를 MMuLV 역전사 효소 (Bioneer, 한국)를 사용하여 역전사 반응을 수행하였다. 다음으로, 신데칸-1 특이적 프라이머 (서열번호 5 및 6) 및 Taq 프리믹스 (Bioneer, 한국)을 사용하여 PCR을 수행하였다. 베타-액틴에 대한 PCR 결과는 RT-PCR이 온전하게 수행되었음을 나타낸다.

4. shRNAi (small hairpin interference RNA)를 이용한 유전자 녹아웃

가장 좋은 녹아웃 결과를 얻기 위하여 총 6개의 shRNAi를 MessageMuter™ shRNAi Production Kit (Cat No. MM031110, EPICENTRE 사, 미국)를 사용하여 제작하고 그 효과를 시험하였다. 상기 shRNAi는 최종 50 nM로 희석되어 사용하였다. 대조군 shRNAi는 shRNAi의 서열을 스램블링 (scrambling)하여 제작하였다. 그 결과 제작된 모든 shRNAi는 신데칸-1 특이적인 것으로 확인되었다.

제작된 6 개의 shRNAi 중 shRNAi1, shRNAi2, shRNAi1의 대조군 shRNAi, 및 shRNAi2의 대조군 shRNAi2는 각각 서열 번호 1 내지 4에 나타낸 바와 같다.

5. 세포증식 분석법으로 MTT 분석 (Roche, 미국)을 사용하였다. 흡광도는 650nm에 대하여 570nm에서 측정하였다.

6. 침투 분석 (invasion assay)은 12µm 포어를 갖는 매트리지 (matrigel)-코팅된 삽입체 (Millipore, 미국)를 이용하였다.

7. 세포 성장 분석은 96웰 포맷으로 비부착 조건에서 수행되었다. 흡광도는 650nm에 대하여 570nm에서 측정하였다.

실시예 1 : 자궁 내막암 세포에서의 신데칸-1의 과발현의 확인

본 실시예에서는 종래 신데칸-1 발현의 하향조절이 종양 발생과 연관이 있다는 내용을 확인하기 위하여, 자궁 내막암 세포에서의 신데칸-1의 발현 수준을 확인하였다.

신데칸-1 발현의 수준은 과다형성 (hyperlasia) 단계부터 3 단계까지 진행된 각각의 자궁내막암 조직을 환자로 부터 회수하여 항-신데칸-1 항체 (Santacruz, 미국 또는 Cymbus Biotechnology, 미국)로 염색하여 확인하였다. 암의 진행 단계 (grade) 결정은 헤마톡실린 및 이오신 염색을 사용하여 염색된 각 동일한 조직의 동일한 파라핀 절편의 세트에 대하여 수행되었다.

그 결과는 도 2에 나타낸 바와 같다. 도 2에 나타낸 바와 같이, 종래 기술로부터 예상되는 바와는 대조적으로 신데칸-1이 자궁내막암에서 과발현되는 것이 확인되었다. 도 2에서 화살표는 각 암 조직에서 신데칸-1의 양성 염색을 나타낸다.

분석된 통계적 수치는 다음과 같다.

표 1.

변수	P값	분석 방법
종양 단계	0.043	Student t-test
침투 깊이	0.012	
외과 단계	0.039	
조합된 암	0.014	Mann-Whitney U test
림프맥관 공간	0.009	

실시예 2 : 인간 신데칸-1에 대한 shRNA의 제작

NCBI 허가번호 NM_002977의 서열을 갖는 인간 신데칸-1 유전자에 대하여 코딩 영역과 3'-UTR 영역에 대하여 18nt의 상보적인 뉴클레오티드 서열을 갖는 shRNAi를 제작하였다. shRNAi의 제작은 상업적으로 구입가능한 키트 (MessageMuter™ shRNAi Production Kit, Cat No. MM031110, EPICENTRE 사, 미국)를 사용하였다.

구체적으로, 다음과 같은 과정을 거쳐 shRNAi를 제조하였다.

(1) 후보 표적 서열의 선발

shRNAi의 표적 서열은 웹 상의 소프트웨어, *Easy siRNA* (http://www.proteinlounge.com/easysirna_home.asp) 및 *shRNA Sequence Selector* (<http://bioinfo.clontech.com/rnaidesigner/sirnaSequenceDesign.do>)를 사용하여 예측하였다. 예측된 표적 서열로부터, 6개의 표적 후보를 MessageMuter™ shRNAi Production Kit, Cat No. MM031110, EPICENTRE 사, 미국의 매뉴얼에 개시된 지침에 따라 선발하였다. 헤어핀 루프 서열 (CTTGCTTC) 및 그 자체의 상보적 서열을 각각 선발된 서열의 3' 말단에 부착되었다. 또한, T7 프로모터 올리고 서열 (TATAGTGA)이 각 상보적 서열의 3' 말단에 추가되었다. 다음으로, 이들을 shRNAi의 인 비트로 생산을 위한 주형으로 사용하기 위하여 합성하였다 (Genotech, 한국).

(2) 어닐링 반응

상기 주형을 50 µM로 희석한 후, 어닐링 반응을 수행하였다.

각 주형에 대한 반응 혼합물 :

1.5 ml T7 프로모터 올리고 (75 pmole)

1 ml 유저 (user) 설계한 올리고 (50 pmole)

2 ml 5x 어닐링 버퍼

5.5 ml RNase-free 물

상기 혼합물을 75 °C에서 2 분 동안 배양한 다음, 2 분동안 실온으로 냉각하였다.

(3) 채우기 (fill-in) 반응

매뉴얼에 따라 채우기 반응을 수행하였다.

반응 혼합물 :

10 ml 어닐링 반응물

2 ml 10x Klenow Fill-in 버퍼

2 ml dNTP mix (2.5 mM 각 dNTP)

1 ml Exo-Minus Klenow DNA 폴리머라제 (20 Unit/ml)

5 ml RNase-free water

6개의 다른 반응 혼합물을 37 °C에서 30 분 동안 배양하였다. 상기 반응 혼합물을 70 °C에서 10 분 동안 가열하여 효소를 불활성화시킨 다음, 실온으로 냉각하였다.

(4) 인 비트로 전사 반응

shRNAi를 매뉴얼에 따라 6종의 주형으로부터 제작하였다.

반응 혼합물 :

2.8 ml RNase-free water

4 ml Exo-Minus Klenow DNA 폴리머라제 "Fill-in 반응물"

2 ml AmplScribe T7-Flash 10x 반응 버퍼

7.2 ml NTP mix (25 mM 각 dNTP)

2 ml 100 mM DTT

2 ml AmplScribe T7-Flash Enzyme solution

상기 반응 혼합물을 42 °C에서 90 분 동안 배양하여 shRNAi를 생산하였다.

(5) s hRNAi의 정제 및 재현탁

페놀/클로로포름을 사용하여 shRNAi를 정제하고, 100 % 에탄올을 사용하여 침전시켰다. 다음으로, shRNAi 펠렛을 70 % 에탄올로 세척하고 원심분리하였다. 건조한 후, shRNAi를 shRNAi 보호 용액에 재현탁하여 50 μM로 희석하고 사용할 때까지 -80 °C에 보관하였다.

그 결과 6개의 shRNAi 분자를 제작하였다. 이들 중 2개의 shRNAi만이 세포 배양 실험에서 신데칸-1 유전자 발현을 침묵시키는 것으로 나타났으며, 각각 서열번호 1와 2의 뉴클레오티드 서열을 갖는다.

실시예 3 : shRNAi를 사용한 신데칸-1 유전자 발현의 녹아웃

본 실시예에서는 실시예 2에서 제조된 shRNAi를 자궁내막암 조직 세포에 주입하고 인간 신데칸-1 유전자 발현 수준을 확인하였다. 인간 신데칸-1 유전자의 발현 수준은 면역화학적 방법 및 RT-PCR을 통하여 확인하였다.

그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3의 A는 24 웰 플레이트 중의 자궁내막암 세포를 각 shRNAi로 3일 동안 트랜스펙션하고, 얻어진 세포를 항-신데칸-1 생쥐 단일클론 항체로 염색한 결과를 나타내는 도면이다. 도 3의 A에서 대조군1은 "트랜스펙션제만"을 처리한 세포를 말하고, 대조군 2는 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열을 갖는 대조군 shRNAi1를 처리한 세포를 말한다. 이 결과에 의하면 신데칸-1은 shRNAi에 의하여 녹아웃되었음을 나타낸다. 도 3의 B는 각 shRNAi 또는 대조군 RNAi를 가지고 있는 세포로부터 총 RNA를 분리하고, cDNA를 합성하고, 신데칸-1 특이적 프라이머 (서열번호 5 및 6)를 사용하여 RT-PCR을 수행한 결과를 나타내는 것이다. 도 3의 B에서 대조군3은 "트랜스펙션제만"을 처리한 세포를 말하고, 대조군 2와 3은 각각 서열번호 3과 4의 뉴클레오티드 서열을 갖는 대조군 shRNAi1과 shRNAi2를 처리한 세포를 말한다.

실시예 4 : 신데칸-1 유전자에 대한 shRNAi가 종양 세포의 성장에 미치는 영향

본 실시예에서는 상기 실시예 2에서 제조된 각 shRNAi를 자궁내막암 조직 세포에 주입하고, 종양 세포의 성장 정도를 측정하였다.

세포 증식은 MMT 분석법을 사용하여 측정하였다. 먼저, 세포를 96 웰에 성장시키고, shRNAi 및 대조군 shRNAi로 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 24시간 후, 추가의 성장 배지를 각 웰에 첨가하였다. 혈청 결핍 (serum starvation)을 위하여, 성장 배지를 트랜스펙션 1일 후에 무혈청 배지로 바꾸었다. 각 배양 지점 후에, 세포를 4 시간 동안 테트라졸리움 염의 형성 및 계면활성제에 의한 가용화가 되도록 하였다. 각 웰의 흡광도는 650nm에 대하여 570nm에서 측정하였다. 세포 증식 정도의 측정결과를 도 4에 나타내었다. 도 4의 A는 무혈청 조건에서의 MTT 분석 결과를 나타내고, 도 4의 B는 10% FBS를 포함하는 성장 배지에서의 결과를 나타내는 도면이다.

실시예 5 : 신데칸-1 유전자에 대한 shRNAi가 비부착 상태의 종양 세포의 성장에 미치는 영향

본 실시예에서는 상기 실시예 2에서 제조된 각 shRNAi로 트랜스펙션된 자궁내막암 조직 세포를 비부착 상태에서 배양하고 MTT 분석을 수행함으로써, shRNAi가 비부착 상태의 종양 세포의 성장에 미치는 영향을 측정하였다.

먼저, 96웰 디쉬를 수 중의 1% 멸균 아가로 코팅하였다. 다음으로, 트랜스펙션된 2,000 세포를 상기 코팅된 웰의 200 μ l의 성장 배지에 첨가하였다. 세포를 8일 동안 배양하였다. 매 3일 마다 75 μ l의 배지를 새로운 배지로 교환하였다. 배양 후, 밤새 포마젠 (formazen) 염이 형성되도록 한 다음, 650nm에 대한 570nm에서 흡광 측정이 가능하도록 가용화하였다.

그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에 나타낸 바와 같이, shRNAi에 의하여 비부착 상태의 종양 세포도 성장이 현저하게 억제되었다. 이는 자궁내막암 세포는 신데칸-1 유전자 발현에 의하여 세포 성장이 지지되고 있다는 것을 나타내는 것이다.

실시예 6 : 신데칸-1 유전자에 대한 shRNAi가 종양 세포의 침투에 미치는 영향

본 실시예에서는 상기 실시예 2에서 제조된 각 shRNAi로 트랜스펙션된 자궁내막암 조직 세포를 정상 자궁내막 기질세포 (endometrial stromal cell) 층에 전이하고 침투한 종양 세포를 계수함으로써, shRNAi가 종양 세포의 정상 세포에 대한 침투에 미치는 영향을 측정하였다.

먼저, 자궁내막 암세포를 5×10^3 세포의 밀도로 매트릭셀 (matrigel)로 코팅된 배양 삽입물 (culture insert) 상에 접종하였다. 접종 24 시간 후, 세포를 하루 동안 트랜스펙션시켰다. 다음으로, 상기 트랜스펙션된 세포를 12 웰-디쉬 중의 정상 자궁내막기질 세포의 층에 전이하였다. 전이된 종양 세포를 2일 동안 더 배양하고, 침투된 세포의 수를 계수하였다. 계수를 위하여, 상기 배양 삽입물의 바닥층을 이오신으로 염색하였다.

그 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6에 나타낸 바와 같이, shRNAi에 의하여 종양 세포의 정상 세포층에 대한 침투는 현저하게 억제되었다. 이는 자궁내막암 세포는 신데칸-1 유전자 발현에 의하여 정상 세포층에 대한 침투가 지지되고 있다는 것을 나타내는 것이다.

이상과 같은 본 발명의 실시예의 결과로부터, 본 발명의 신데칸-1 유전자 발현에 대하여 RNAi를 유도하는 핵산 분자는 다른 많은 암에서 관찰되는 것과는 달리, 놀랍게도 자궁내막암 세포 중의 신데칸-1의 과발현은 세포 증식 및 침투 (invasion)를 촉진함으로써 부작용을 일으키는 것으로 밝혀졌다.

발명의 효과

본 발명의 자궁내막암 치료 또는 예방용 조성물에 의하면, 종래 다른 암에서 알려진 바와는 달리 인간 신데칸-1 유전자의 발현을 억제함으로써 자궁내막암을 치료 또는 예방할 수 있는 효과가 있다.

본 발명의 자궁 내막암을 치료 또는 예방하는 방법에 의하면, 자궁 내막암을 효과적으로 치료 또는 예방할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 인간 신데칸-1의 분자 구조를 모식적으로 나타낸 도면이다.

도 2는 환자로부터 분리된 자궁내막암 조직의 자궁내막암 세포를 항-신데칸-1 항체 (Santacruz, 미국)로 염색하여 확인한 결과를 나타내는 도면이다.

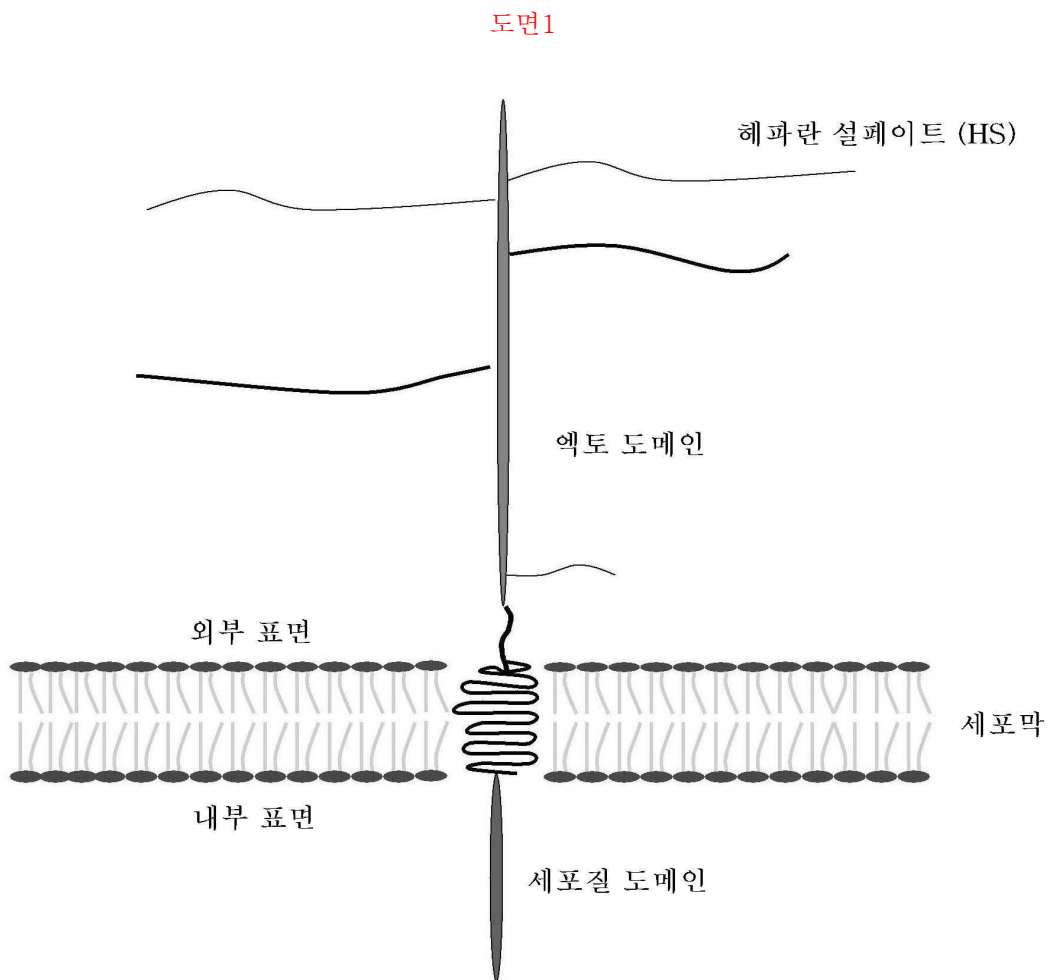
도 3은 자궁내막암 세포를 shRNAi로 트랜스펙션하고, 얻어진 세포를 항-신데칸-1 생쥐 단일클론 항체로 염색한 결과 (A) 및 상기 세포로부터 얻어진 총 RNA에 대하여 신데칸-1 유전자 특이적 프라이머를 사용하여 RT-PCR한 결과 (B)를 나타내는 도면이다.

도 4는 자궁내막암 세포를 shRNAi로 트랜스펙션하고, 얻어진 세포를 무혈청 배지 (A) 및 10% FBS 함유 성장 배지 (B)에서 배양한 후 MTT 분석한 결과를 나타내는 도면이다.

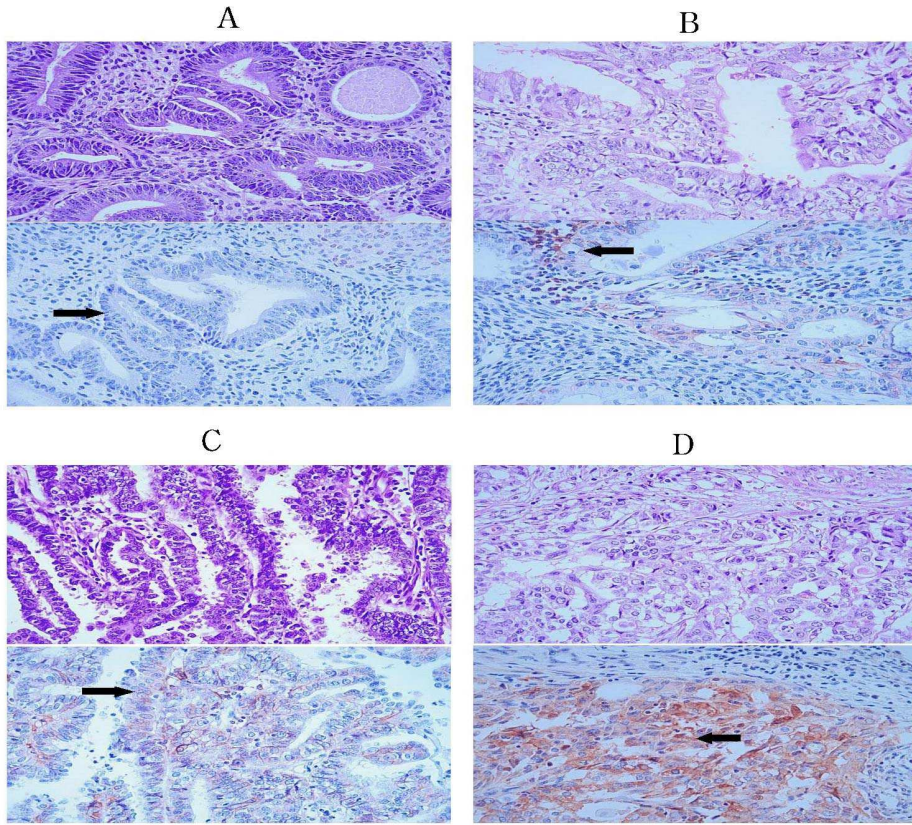
도 5는 자궁내막암 세포를 shRNAi로 트랜스펙션하고, 얻어진 세포를 비부착 상태에서 배양한 후 MTT 분석한 결과를 나타내는 도면이다.

도 6은 자궁내막암 세포를 shRNAi로 트랜스펙션하고, 얻어진 세포를 정상 자궁내막 기질 세포층에 전이하고, 침투된 세포수를 계수한 결과를 나타내는 도면이다.

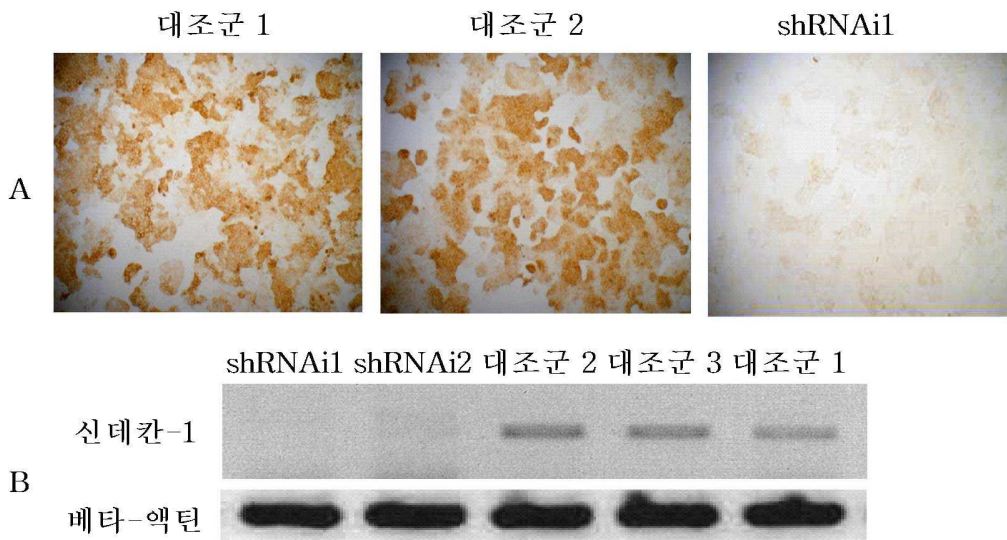
도면



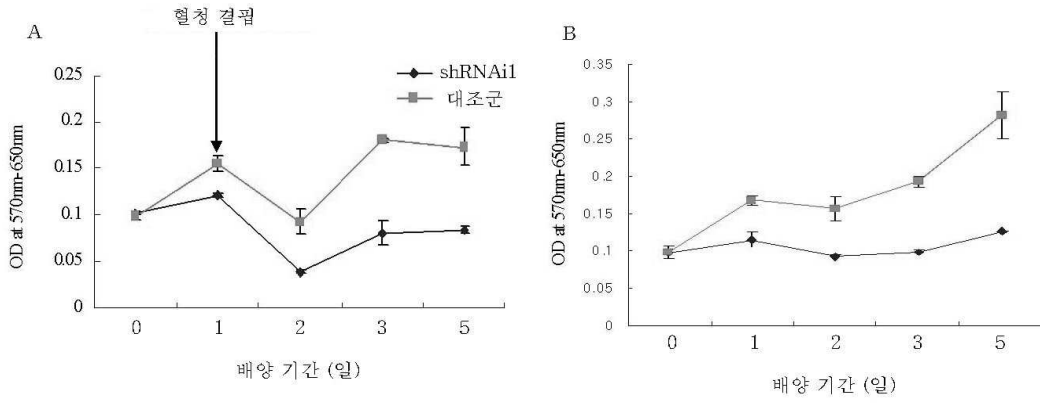
도면2



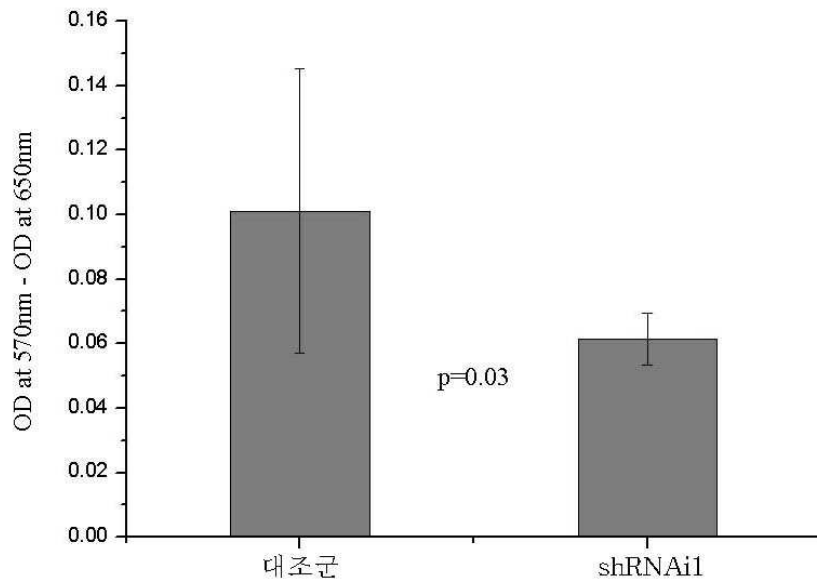
도면3



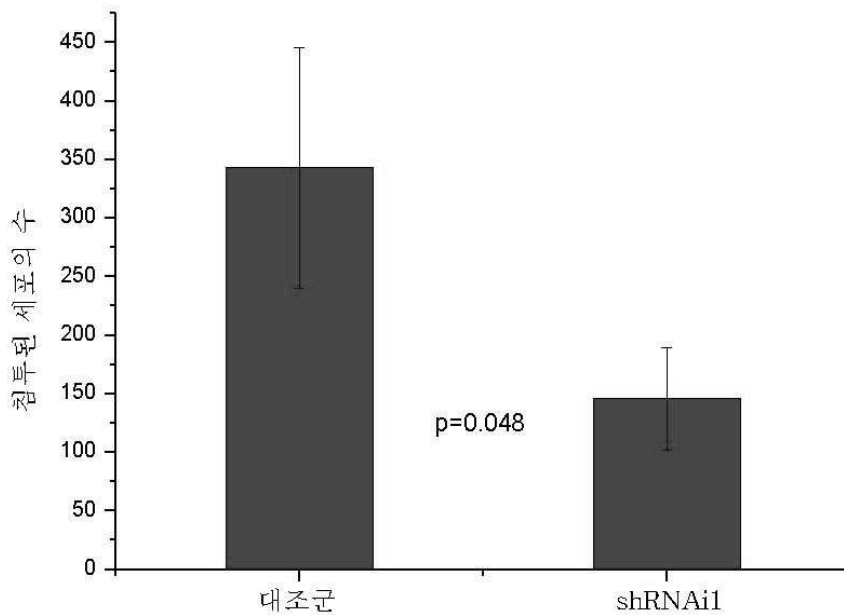
도면4



도면5



도면6



서열목록

서열목록 전자파일 첨부