



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0118840
(43) 공개일자 2013년10월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/352 (2006.01) A61P 9/12 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0111350(분할)
(22) 출원일자 2013년09월16일
심사청구일자 2013년09월16일
(62) 원출원 특허 10-2011-0141698
원출원일자 2011년12월23일
심사청구일자 2011년12월23일

(71) 출원인
건국대학교 산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)
(72) 발명자
배영민
경기도 광주시 오포읍 능평로30번길 39-23 그린헤이븐A-401
박상용
서울특별시 광진구 자양로 138 신도브래뉴오피스텔 611호
(74) 대리인
특허법인 수

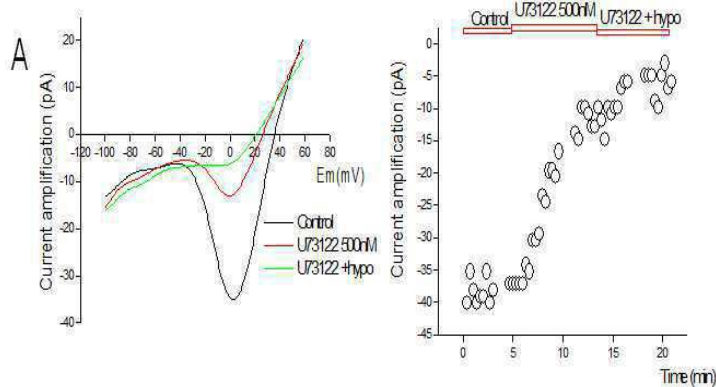
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 포스포리파제 C감마 또는 표피성장인자 수용체 저해제를 유효성분으로 포함하는 고혈압 치료 또는 예방용 조성물

(57) 요약

본 발명은 포스포리파제 C감마 또는 표피성장인자 수용체 저해제를 유효성분으로 포함하는 고혈압 치료 또는 예방용 조성물 또는 혈관 확장제 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도7a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011-0002754
부처명	교육과학기술부
연구사업명	일반연구자지원사업
연구과제명	표면소포가 G-단백 연계 수용체 및 이온통로의 분포와 신호전달에 미치는 영향: 혈관계 질
환 병태 생리를 중심으로 한 구조-기능 연계 연구	
주관기관	건국대학교(글로벌캠퍼스)
연구기간	2011.05.01 ~ 2012.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2011-0027921
부처명	교육과학기술부
연구사업명	파이오니어 사업
연구과제명	레이저 촉감의 생리학적/뇌신경학적 메커니즘 연구
주관기관	고려대학교
연구기간	2011.07.01 ~ 2012.02.29

특허청구의 범위

청구항 1

표피성장인자 수용체(EGFR) 타이로신 인산화 효소 저해제 AG1478, SP600125, 또는 제니스테인을 유효성분으로 포함하는 고혈압 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 2

고혈압 예방 또는 치료제 또는 혈관확장제 화합물을 동정하는 방법에 있어서, 상기 방법은: 표피성장인자 수용체(EGFR) 타이로신 인산화 효소를 적어도 1종의 테스트 화합물과 접촉시키는 단계; 및

상기 표피성장인자 수용체(EGFR) 타이로신 인산화 효소 활성의 감소가 있는지를 측정하여, 활성이 감소한 경우에 고혈압 예방 또는 치료제 또는 혈관확장제 화합물인 것으로 테스트 화합물을 동정하는 단계를 포함하는 고혈압 예방 또는 치료제 또는 혈관확장제 화합물을 동정하는 방법.

청구항 3

표피성장인자 수용체(EGFR) 타이로신 인산화 효소 저해제 AG1478, SP600125, 또는 제니스테인을 유효성분으로 포함하는 혈관 확장제 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 포스포리파제 C감마 또는 표피성장인자 수용체 저해제를 유효성분으로 포함하는 고혈압 치료 또는 예방용 조성물 또는 혈관 확장제 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] PLC는 세포내에서 세포신호를 조절하는 중요한 효소이며 G 단백질, 타이로신 카이네이즈 수용체와 밀접하게 연관되어 있다. 활성화된 PLC는 세포막의 구성성분 중 하나인 PIP2를 분해하여 IP3와 DAG를 만든다. IP3는 ryanodian 수용체를 통한 sarcoplasmic reticulum의 Ca 방출 역할을 하고, DAG는 PKC를 활성화시켜 Ca 채널을 통한 Ca 유입을 조절한다. PLC는 크게 3가지의 subfamily(β , γ , δ)로 구성되어 있는데 PLC β (베타)는 G 단백질로부터 신호를 받고, PLC γ 는 수용체 타이로신 카이네이즈의 신호를 받는다고 알려져 있다.

[0003] 표면소포(Caveolae)는 거의 모든 세포에서 찾을 수 있는 구조로서 세포에서 가장 풍부하며, 원형질 막에 함입된 구조이다. 표면소포는 lift raft부분에 존재하며, 특히 caveoloin 이라는 단백질이 특징적이다. Caveolin은 3가지의 isoform을 갖고 있는데 Cav-1, -2, -3가 있고 세포마다 특징적으로 발현되어 있다. 표면소포는 Caveolin 뿐만 아니라 수용체, 채널, 단백질 및 콜레스테롤이 모여있어서 여러 세포 신호 전달에 중요할 것으로 판단된다. 더욱이 표면소포에는 EGFR 수용체 타이로신이 존재하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 표면소포(caveolae)에는 많은 종류의 이온 채널, 수용체, 신호전달 단백질이 존재한다. 특징적으로, caveolin-1 단백질이 존재하는데 그 기능에 대해 최근 활발히 연구되고 있지만 아직 불분명하다. RMASMC(Rat mesentery artery smooth muscle cell)은 myogenic tone이 존재하는 조직으로 신전(stretch)에 의해 생기는 myogenic tone은 Voltage-activated ca channel(VACC)의 세포내 Ca 조절에 있어서 밀접한 관련이 있다. 본 발명은 신전에 의한 VACC의 변화가 세포내의 어떠한 신호를 경유하는지 밝히고자 하였다.

[0005] 한편, 현재 시판되고 있는 고혈압 치료제는 이뇨제(Diuretics), 알파 또는 베타 차단제, 그리고 칼슘통로차단제 같은 혈관확장제(vasodilator; 혈관확장제에는 칼슘통로차단제 외에 안지오텐신전환효소억제제, 안지오텐신II 수용체차단제 등 있음) 등이 존재한다. 이러한 사실은 칼슘통로차단제보다 상부 단계인 “혈관 신전에 의한 칼슘 전류의 증가 기전”을 매개하는 효소나 단백질 등을 차단하는 것이 유용한 고혈압 치료 표적이 될 수 있음을 시사한다. 적절한 억제제를 한다면 정상적인 조절기전에는 큰 영향없이 고혈압에서 관찰되는 과도한 신전-수축 반응을 선택적으로 억제할 수 있을 것이다.

[0006] 관련 선행특허로 대한민국 특허공개번호 제1020060031614호는 '문맥성 고혈압의 예방 및/또는 치료'에 관한 것

으로, 문맥성 고혈압의 예방 및/또는 치료를 위한, 포스포디에스테라제 타입 5(phosphodiesterase type 5; PDE 5)의 저해제 또는 PDE 5-저해제를 포함하는 약제학적 조성물의 용도가 기재되어 있으며,

[0007] 다른 관련 선행특허로 대한민국 특허공개번호 제10-2008-0075922호는 '칼슘 채널 차단제로서의 디벤젠 유도체에 관한 것으로, VACC 차단 활성을 갖는 화합물 및 이들 화합물들은 일련의 인간 질환들 및 질병들, 특히 인지 또는 신경퇴행성 질환들 또는 질병들의 치료에 유용하다고 기재되어 있으며,

[0008] 또 다른 관련 선행특허로 대한민국 특허공개번호 제10-2010-0014570호는 '1위 치환 테트라히드로이소퀴놀린 화합물'에 관한 것으로, N형 Ca²⁺ 채널 저해제로서 유용한 화합물을 제공하며, N형 Ca²⁺ 채널을 저해하는 작용을 갖는 화합물에 대해 예의 검토한 결과, 1위에 치환기를 갖는 테트라히드로이소퀴놀린 화합물이, N형 Ca²⁺ 채널을 저해하는 작용, 항침해 수용성 동통 작용, 항신경 인성 동통 작용, 복통 억제 작용 및 오피오이드 유발성 변비 개선 작용을 갖는 것을 확인하였으며, 화합물은, 신경 인성 동통이나 침해 수용성 동통을 비롯하는 각종 동통, 편두통이나 군발 두통 등의 두통, 불안이나 우울, 진간, 뇌졸중, 하지불안 증후군 등의 중추신경계 질환, 복통이나 복부 팽만감 등의 복부 증상, 설사나 변비 등의 변통 이상, 과민성장증후군 등의 소화기계 질환, 과활동 방광이나 간질성 방광염 등의 비뇨기계 질환 등의 예방 및/혹은 치료용 의약 조성물로서 사용할 수 있다고 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 신규한 고혈압 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 포스포리파제 C감마 저해제를 유효성분으로 포함하는 고혈압 치료 또는 예방용 또는 혈관확장제 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 포스포리파제 C감마 저해제는 U73122(1-[6-[[[(17β)-3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1H-pyrrole -2,5-dione (C₂₉H₄₀N₂O₃)) 또는 네오마이신(neomycin (C₂₃H₄₆N₆O₁₃·3H₂SO₄)) 인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0012] 또 본 발명은 고혈압 예방 또는 치료제 또는 혈관확장제 화합물을 동정하는 방법에 있어서, 상기 방법은 포스포리파제 C감마를 적어도 1종의 테스트 화합물과 접촉시키는 단계; 및 상기 포스포리파제 C감마 활성의 감소가 있는지를 측정하여, 활성이 감소한 경우에 고혈압 예방 또는 치료제 또는 혈관확장제 화합물인 것으로 테스트 화합물을 동정하는 단계를 포함하는 고혈압 예방 또는 치료제 또는 혈관확장제 화합물을 동정하는 방법을 제공한다.

[0013] 또 본 발명은 표피성장인자 수용체(EGFR) 타이로신 인산화 효소 저해제를 유효성분으로 포함하는 고혈압 치료 또는 예방용 또는 혈관확장제 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 표피성장인자 수용체(EGFR) 타이로신 인산화 효소 저해제는 AG1478 (1-[6-[[[(17β)-3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien -17-yl]amino]hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione), 제니스테인(genistein)(5,7-Dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran -4-one (C₁₅H₁₀O₅)) 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0015] 또 본 발명은 고혈압 예방 또는 치료제 또는 혈관확장제 화합물을 동정하는 방법에 있어서, 상기 방법은 표피성장인자 수용체(EGFR) 타이로신 인산화 효소를 적어도 1종의 테스트 화합물과 접촉시키는 단계; 및 상기 표피성장인자 수용체(EGFR) 타이로신 인산화 효소 활성의 감소가 있는지를 측정하여, 활성이 감소한 경우에 고혈압 예방 또는 치료제 또는 혈관확장제 화합물인 것으로 테스트 화합물을 동정하는 단계를 포함하는 고혈압 예방 또는 치료제 또는 혈관확장제 화합물을 동정하는 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명의 저해제는 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제 및/또는 첨가제와 함께 인간 환자에 투여하기 적절한 제형에 약물로서 함유될 수 있다. 약물 또는 조성물은 고형, 반-고형, 젤라틴 또는 하이드로겔-유사형, 액체 또는 유사한 점도를 가질 수 있고, 예를 들어 액제, 현탁제, 분말, 정제, 환제, 캡슐제, 지속성 방출 제형

등의 형태로 될 수 있다. 조성물은 환자에게 투여하기 적합한 형태를 제공하기 위해, 적절한 양의 담체 또는 운반체와 함께 치료적으로 유효한 양의 포스포리파제 C감마 저해제 또는 표피성장인자 수용체(EGFR) 타이로신 인산화 효소 저해제를 적절히 함유한다.

- [0017] 이 제형은, 예를 들어 단독이거나 다음의 조합일 수 있다: 적절한 약제학적 첨가제로서, 예를 들어 전분, 셀룰로스 및 셀룰로스 유도체, 포도당, 유당, 슈크로스, 젤라틴, 실리카겔, 탄산마그네슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산나트륨, 모노스테아린산글리세롤, 탈크, 염화나트륨, 건조된 저지방 우유, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 물, 에탄올 또는 다른 알콜 등; 멸균 액체로서, 예를 들어 물, 염 용액 및 텍스트로스 수용액 및 글리세롤 용액, 및/또는 낙화생유, 콩기름, 광유, 참기름 등과 같은, 파라핀 오일을 포함하는 동물, 식물 또는 합성 기원의 오일. 투여 형태는 통상의 투여 형태, 예를 들어 경구, 비경구, 특히 주사, 경피 시스템, 경피 또는 흡입의 형태일 수 있다. 급성 출혈에서는, 특히 포스포리파제 C감마 저해제 또는 표피성장인자 수용체(EGFR) 타이로신 인산화 효소 저해제 및 바람직하게는 심장박동수 또는 간을 통한 동맥 혈류를 감소시키는 약물, 예를 들어 β -차단제, 또는 바소프레신, 소마토스타틴이나 이의 유도체와의 조합의 정맥(i.v.) 주사가 의도된다.
- [0018] 포스포리파제 C감마 저해제 또는 표피성장인자 수용체(EGFR) 타이로신 인산화 효소 저해제 및 임의로 상기 조합의 투여를 위해서, 치료제는 상기 조성물, 제형 또는 장치의 하나에 적절히 존재하고 상기 질병 또는 질병 상태의 예방 또는 치료를 위하여 인간에게 유효한 양으로 함유된다. 예를 들어, 적절한 양은 전체 양에 대하여 적어도 0.0001 wt%, 보통 0.01 내지 20 wt%, 바람직하게는 0.01 내지 10 wt%이다. 용량으로서는 치료 환자의 체중당, 적어도 0.0001 mg/kg, 예를 들어 0.0001 내지 1000 mg/kg, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg/kg, 특히 0.1 내지 20mg/kg의 약물 용량이 적절하며, 여기에서 일회 용량이 국소적으로 또는 전신적으로, 1 일 또는 1 주일에 1 회 또는 수 회, 디포 또는 서방성 제형의 경우에는 임의로 더 낮은 빈도로 투여된다.
- [0019] 포스포리파제 C감마 저해제 또는 표피성장인자 수용체(EGFR) 타이로신 인산화 효소 저해제 효과는 투여 형태 및 용량에 따라 다를 수 있다.
- [0020] 본 발명에 따른 조합-약물 또는 -제제에서 대사적으로 분해되는 조합된 치료제 또는 외인성으로 공급된 물질에 대해서, 당업자는 적응증 및 필요에 따라 조합 약물 또는 외인성으로 공급되는 물질에 통상적인 투여 형태, 투여 조성물 및 양을 선택할 수 있다. 따라서, 포스포리파제 C감마 저해제 또는 표피성장인자 수용체(EGFR) 타이로신 인산화 효소 저해제 투여 형태와는 독립적으로, 약제학적으로 허용되는 적절한 담체, 희석제, 첨가제 등, 그리고 조합-약물 또는 조합-제제의 임의로 조합된 약물에 적절한 제형이 예상된다.
- [0021] 약물 또는 조합 약물의 생산 및 예방 및/또는 치료를 위한 의학적 용도는 상기로부터 당업자에게 용이하게 밝혀진다.
- [0022] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0023] 본 발명은 EGFR(Epidermal Growth Factor Receptor) tyrosine 인산화 효소 및 PLC γ (Phospholipase C gamma)가 신전(stretch)에 의한 혈관평활근 칼슘 전류의 증가를 매개함을 요지로 한다.
- [0024] 혈관평활근은 혈관의 중층(T.media)에 존재하여 혈관의 직경을 조절한다. 즉, 혈관평활근의 수축은 혈관직경의 감소로, 혈관평활근의 이완은 혈관직경의 증가로 이어진다. 혈관직경은 프아제유의 법칙에서 예측되는 바 혈류 저항의 가장 중요한 인자이다(Boron & Boulpaep, Medical Physiology, 2nd ed, Saunders Elsevier 2009; p434). 많은 고혈압 환자 및 고혈압 실험동물 모델에서는 혈관 저항이 증가되어 있음이 알려져 있으며, 이들 모델 동물의 혈관은 정상적인 기계적 자극(예, 혈관 신전) 또는 화학적 자극(예, 호르몬, 신경전달물질 자극)에 대해 과도한 수축을 하는 경향이 있다(Enhanced myogenic activation in skeletal muscle arterioles from spontaneously hypertensive rats. Falcone JC, Granger HJ, Meininger GA. Am J Physiol. 1993 Dec;265(6 Pt 2):H1847-55;Alpha-1B adrenoceptors mediate neurogenic constriction in mesenteric arteries of normotensive and DOCA-salt hypertensive mice. PAA, Fink GD, Galligan JJ. Auton Neurosci. 2005 Aug 31;121(1-2):64-73).
- [0025] 혈관수축을 조절하는 생리적 자극 중 하나가 혈관벽의 신전인데, 정상적 혈관은 신전 자극에 대해 수축함으로 과도한 혈류량의 증가를 막고 일정한 혈류량을 유지하는 데 기여한다(TRPCs, GPCRs and the Bayliss effect. EMBO J. Voets T, Nilius B. 2009 Jan 7;28(1):4-5). 이러한 신전 자극에 대한 혈관 수축은 혈관평활근에 존재하는 칼슘 채널을 통한 칼슘 유입을 통해 일어나는데(Vascular smooth muscle contraction evoked by cell volume modulation: role of the cytoskeleton network. Koltsova SV, Gusakova SV, Anfinogenova YJ, Baskakov MB, Orlov SN. Cell Physiol Biochem. 2008;21(1-3):29-36), 신전 자극이 칼슘 전류(칼슘 채널을 통

한 칼슘 유입)를 증가시키는 잘 알려져 있다(Alpha1C) (CaV1.2) L-type calcium channel mediates mechanosensitive calcium regulation. Lyford GL, Strega PR, Shepard A, Ou Y, Ermilov L, Miller SM, Gibbons SJ, Rae JL, Szurszewski JH, Farrugia G. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 Sep;283(3):C1001-8). 하지만, 신전 자극이 어떠한 기전을 통해 칼슘전류를 증가시키는지는 확실치 않다.

[0026] 또한, 위에서 언급한 바와 같이 많은 고혈압 모델 동물을 이용한 실험에서는 고혈압 혈관의 Bayliss 효과가 정상에 그것보다 훨씬 증가되어 있어서 정상적인 혈관 신전 시에 과도한 혈관 수축을 일으키고 혈류저항을 지나치게 증가시킴으로 고혈압의 생성 및 유지에 기여한다고 알려져 있다(Enhanced myogenic activation in skeletal muscle arterioles from spontaneously hypertensive rats. Falcone JC, Granger HJ, Meininger GA. *Am J Physiol*. 1993 Dec;265(6 Pt 2):H1847-55; Increased arterial smooth muscle Ca²⁺ signaling, vasoconstriction and myogenic reactivity in Milan hypertensive rats. Linde CI, Karashima E, Raina H, Zulian A, Wier WG, Hamlyn JM, Ferrari P, Blaustein MP, Golovina VA. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 Dec 2). 이에 본 연구자는 “혈관 신전에 의한 칼슘 전류의 증가 기전”을 명확히 밝히고 그 기전을 일으키는 단계를 차단하는 고혈압 치료제 또는 치료기전을 개발한다는 목표 하에 본 발명을 진행하였다.

[0027] 현재 시판되고 있는 고혈압 치료제는 이뇨제(Diuretics), 알파 또는 베타 차단제, 그리고 칼슘통로차단제 같은 혈관확장제(vasodilator; 혈관확장제에는 칼슘통로차단제 외에 안지오텐신전환효소억제제, 안지오텐신II 수용체 차단제 등 있음) 등이 존재한다. 이러한 사실은 칼슘통로차단제보다 상부 단계인 “혈관 신전에 의한 칼슘 전류의 증가 기전”을 매개하는 효소나 단백질 등을 차단하는 것이 유용한 고혈압 치료 표적이 될 수 있음을 시사한다. 적절한 억제를 한다면 정상적인 조절기전에는 큰 영향없이 고혈압에서 관찰되는 과도한 신전-수축 반응을 선택적으로 억제할 수 있을 것이다.

[0028] 본 발명의 결과를 요약하면, [혈관 신전 --> 혈관평활근의 표면소포(caveolae)구조를 펌 --> 세포막에 존재하는 EGFR tyrosine 인산화 효소의 활성화 --> PLC γ 활성화 --> JNK MAPK 활성화 --> 칼슘 채널 활성화]와 같다. 여기에서 혈관신전이 칼슘통로를 활성화하는데 EGFR tyrosine 인산화 효소와 PLC γ 가 역할을 한다는 것은 기존에 보고되지 않은 새로운 사실이다. 특히, PLC γ 는 혈관평활근에서는 별다른 주목을 받지 못한 효소로서, 기존에는 혈관에서 신전 및 GPCR(G-단백 연계 수용체)의 아래 신호로 PLC beta가 알려져 있다(Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. Mederos y Schnitzler M, Storch U, Meibers S, Nurwakagari P, Breit A, Essin K, Gollasch M, Gudermann T. *EMBO J*. 2008 Dec 3;27(23):3092-103). PLC γ 와 PLC β 는 전혀 다른 효소로서 전자는 tyrosine기의 인산화에 의해 활성화되고, 후자는 serine기의 인산화에 의해 활성화된다.

[0029] 우리는 전기생리(patch-clamp) 및 약리적 차단제 실험을 통해 EGFR tyrosine 인산화의 선택적 차단제 및 PLC γ 의 차단제가 신전에 의한 칼슘 전류 증가 현상을 효과적으로 차단했음을 보였다. 또한, Western blotting 등의 결과를 통해 실제로 세포막 신전이 EGFR 및 PLC γ 의 인산화(활성화)를 일으킴을 보였다. 이에 근거하여 AG1478 같은 선택적 EGFR tyrosine 인산화 효소의 억제제나 neomycins, U73122 등 PLC γ 의 억제제가 신전에 의한 혈관평활근 칼슘 전류증가 단계를 억제함으로써 효과적인 고혈압 치료제(또는 혈관확장제)가 될 가능성이 있음을 밝힌다. Neomycin과 U73122는 선택적 PLC γ 의 차단제는 아니고 PLC베타도 차단하는 것으로 알려져 있다. 향후 혈관 PLC γ 의 선택적 차단제의 개발은 유력한 고혈압 치료의 표적이다. 결론으로, EGFR tyrosine 인산화효소와 PLC γ 억제를 통한 과도한 혈관수축 억제가 가능할 것으로 생각되어지며, 이들은 현재 시판되는 칼슘통로차단제보다 더 우수한 고혈압 치료제(또는 혈관확장제)의 가능성이 있다고 사료된다.

[0030] 본 발명자들은 본 발명에서 나이스타틴 패치 기술(nystatin-perforated patch technique)과 전체 세포 패치 기술(whole-cell patch technique)을 사용하여 연구하였다. 나이스타틴은 Na, Ca을 통해 VACC를 관찰하였으며, 전체 세포는 Ba을 통해 실험하였다. 두 방법 모두 저장 용액(230mosm)에 의해 팽윤(swelling)이 일어나며, VADCC가 증가되었다. 본 발명의 실험에서는 표면소포가 없�지고 더욱이 M β CD에 의해서 같은 효과가 있는 것이 관찰되었고, M β CD처리만으로 VACC가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 공초점 현미경을 통한 caveolin-1의 위치변화에서 신전/M β CD모두 caveolin-1이 세포 내로 들어가는 것을 확인하였다. 신전에 의한 VACC 조절에 있어서 tyrosine, serine/threonine, G 단백질 및 다양한 신호전달 단백질에 대해 연구하였다. 나이스타틴-perforated 패치 기술은 세포외부에서 약물을 주었으며 전체 세포 패치 기술은 피펫에 약물을 넣고 실험하였다. 나이스타틴-perforated 패치 기술과 전체 세포 패치 기술에서 모두 동일한 결과가 나오지 않았지만, PLC 저해제(U73122 5 μ M), JNK 저해제(SP600125 10 μ M)에서 신전에 의한 VACC가 억제되는 것을 관찰할 수 있었고, GDPBS에 의해 억제가 안된 것으로 미루어 볼 때 G 단백질 신호전달과 연관된 PLC β 는 제외하였다. 웨스턴 실험에서 신전에 의해 caveolin, PLC γ , JNK 모두 인산화가 증가되었고 U73122처리 후 신전에 의한 caveolin-1 인산화는 증

가하였지만 JNK의 인산화는 사라지는 것을 확인하였다. 그리고 세포 분획을 통해 Caveolin-1과 PLC γ 의 위치적 변화 관찰에서 caveolin, PLC 모두 세포막과 원형질에 존재하고 phospho type은 원형질 부분에만 존재하는 것으로 확인되었다. 더욱이 면역침전(immunoprecipitation) 실험에서 caveolin-1과 PLC γ 인산화가 신전후 더 증가하는 것이 관찰되었다.

[0031] 본 발명의 실험은 stretch에 의한 myogenic tone, 심 혈관에서 고혈압, 부정맥과 관련한 VACC에 대해 caveolin-1의 역할과 RSMC에서 PLC γ 의 새로운 역할을 밝혀냄으로써 mechanical-stress 연구에 새로운 방향을 제시한다.

[0032] 우리의 결론은 hypotonic에 의한 Ca current의 증가는 Caveolin과 PLC γ 를 통한 endocytosis, 그리고 JNK의 인산화를 통하는 것을 알 수 있으며, RSMC에서 PLC의 새로운 역할을 밝혀냄으로써 의의가 있다고 하겠다.

[0033] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0034] 신전-칼슘 채널

[0035] 우리는 먼저 Na, Ca, Ba를 이용하여 저장 용액에 대한 VACC를 확인해 보았다. Na, Ca은 나이스타틴-perforated 방법을 이용하여 실험을 진행하였고, Ba은 전체 세포 패치 방법을 이용하여 실험하였다. 나이스타틴은 NT에서 시작하고, 등장 용액(320osmol)에서 실험을 진행하였으며 전체 세포는 Ca-free에서 시작하고 등장 용액에서 실험을 진행하였다. Holding potential -70mV를 유지하며 +50mV까지 10mV씩 step pulse를 주었다. Na의 경우 -20mV, Ca의 경우 0mV, Ba의 경우 10mV에서 current가 최대로 커지는 것을 확인하였으며, 제일 커진 점에서 전류 크기를 측정하였다. Na, Ba, Ca 모두 저장 용액에 의해 Ca current가 증가되는 것을 확인할 수 있었다. Na의 경우 평균 300pA 정도가 나오고 신전후 400pA정도의 증가 양상을 보이며, Ca의 경우 20pA에서 40pA의 증가양상을 보였다. Ba의 경우 평균 100pA에서 150pA의 증가를 확인할 수 있었다.

[0036] 전자 현미경, 공초점 데이터

[0037] 우리는 먼저 RSMC에서 신전에 의해 막의 구조가 변하는지 확인하였다. 저장 용액(230mosm)에 10min 처치 후 전자현미경을 통해 관찰하였다. 또한 methyl-beta-cyclodextrin (M β CD; 표면소포를 파괴하기 위함) 10mM 을 처치 후 확인하였다. 등장 용액에서 보이던 표면소포(caveolae) 구조가 신전/M β CD에 의해 퍼지는 것을 확인할 수 있었다. 다음으로, 표면소포에 특징적으로 발현되어 있는 Caveolin-1의 변화를 공초점을 통해 관찰해보았다. 대조군에서 막에 발현되어 있던 caveolin-1이 신전/M β CD후 원형질 내로 들어가는 것을 확인할 수 있었다.

[0038] 나이스타틴

[0039] 세포에서 단백질 사이에 신호를 주고 받을 때 중요한 것은 인산기이다. 인산기의 활성화에 의해 다음 신호를 전달할 수 있는데, 세포신호 단백질은 크게 두 가지로 구분될 수 있다. Tyrosine kinase과 serine/threonin kinase로 나눌 수 있고, 하부 신호로 대표적인 MAPK(ERK, p38, JNK)로 나눌 수 있다. 먼저 PKC 연관에 대해 실험해 보았다. PKC 저해제(GF109203x(Bisindolylmaleimide I (C₂₅H₂₄N₄O₂), CALBIOCHEM Cat. NO. 203290)를 이용하여 실험하였다. GF109203x를 100uM부터 10mM까지 처리하였더니 Ca current가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 신전 후 Ca current가 여전히 증가되는 것을 확인할 수 있었고, 위와 같은 방법으로 ERK 저해제[PD98059(2'-Amino-3'-methoxyflavone (C₁₆H₁₃NO₃) CALBIOCHEM Cat. No. 513000) 10mM], p38 저해제[SB203085(4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole (C₂₁H₁₆N₃OSF) CALBIOCHEM Cat. No. 559389),10mM] 모두 신전후 VACC가 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 다음으로 tyrosine kinase inhibitor(genistein 10uM,)을 이용하여 실험해 보았다. 등장용액에서 감소한 VACC가 신전 후에도 여전히 감소되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 JNK 저해제[SP600125(Anthra[1-9-cd]pyrazol-6(2H)-one (C₁₄H₈N₂O) TOCRIS Cat. No. 1496), 10mM], PLC 저해제(U73122 5uM, neomysine 5uM, 화합물 이름 및 구입처를 기재하여 주세요), protein tyrosine kinase 저해제[pp2,(4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine C₁₅H₁₆ClN₅ CALBIOCHEM Cat. No. 529573), 10uM]에서도 VACC의 감소를 확인할 수 있었다. 더욱이, U73122 negative control인 U73343에서 VACC가 감소되었지만, 저장 용액에 의해 증가되는 것을 확인할 수 있었다. M β CD처치 후 표면소포가 없어지는 것을 확인할 수 있었는데, M β CD처치 후 VACC가 증가되고 신전 후 더 이상 증가되지 않는 것을 확인할 수 있었다.

[0040] 전체 세포 패치

[0041] 전체 세포 패치 방법을 이용하여 앞선 실험에서 효과 있던 약물(genistein, SP600125, pp2, u73122)을 피펫에

넣고 실험해 보았다. 나이스타틴에서 효과를 보였던 약물 중 genistein, pp2에서 신전후 VACC가 여전히 커지는 것을 확인할 수 있었으며, SP600125, U73122에서 커지는 효과가 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 다음으로 G 단백질 연관성에 대해 실험하였다. G 단백질 활성 억제제인 GDPBS를 피펫에 넣고 실험해 보았다. GDPBS역시 신전에 의해 커지는 VACC를 막지 못하였다. 또한, GDPBS에 효과가 없는 것으로 보아서 PLC subtype중 PLC베타가 아니고 PLC감마를 생각할 수 있다.

[0042] 웨스턴 블롯팅

[0043] 앞선 전기생리 실험을 통해 알수 있었던 Caveolin, PLC, JNK를 분자생물학적 방법을 통해 확인해 보았다. 우선 RNASMc를 이용하여 1차 배양을 한 후 6-10 계대되는 세포를 이용하여 실험을 진행하였다. Caveolin, PLC, JNK모두 신전에 의해 증가되어지는 것을 확인할 수 있으며 더욱이 U73122에 의해 JNK의 인산화는 없어지지만 Caveolin의 phosphorylation은 여전히 증가하는 것으로 보아 Caveolin이 PLC upstream일 것으로 생각되어진다. PD98059가 전기 생리 실험에서 효과가 없는 것으로 보아 신전후 VACC에는 관여하지 않는 것으로 보인다.

[0044] sucrose 구배

[0045] 앞선 결과에서 caveolin이 신전 후 세포내로 들어가는 것을 공초점을 통해 확인해 보았다. 이번 실험에서는 신전 후 caveolin의 변화를 웨스턴을 통해 알아보았다. 먼저 sucrose 30, 35, 40%를 만들어 파쇄된 세포를 막과 원형질로 나누어 확인하였다. Caveolin-1 단백질들이 신전 후 원형질에 더욱 증가한 것으로 보이고, 또 재미있는 사실은 pCaveolin은 막에 존재하지 않고 원형질에만 존재하였다. 우리는 여기서 PLC γ -1의 위치도 확인해 보았다. PLC γ -1역시 caveolin-1과 마찬가지로 원형질에 존재하는 것을 확인할 수 있었으며, 실험의 확인을 위해 막에 특징적으로 발현되어 있는 flotlin과 cytosol에 발현되어 있는 actin을 이용해 분리가 잘 되었는지 확인해 보았다.

[0046] 면역침전(IP)

[0047] Caveolin-1과 PLC의 위치만 확인하였지 상관관계에 대해 알지 못하였다. Caveolin-1 저해제가 아직 존재하지 않고 있기 때문인데 우리는 여기서 caveolin과 PLC의 상관관계를 밝히기 위해 항체를 이용해 IP 실험을 진행하였다. 먼저 파쇄된 샘플에 caveolin-1 항체를 넣어준 후 agarose G를 통하여 caveolin-1 항체만 선택적으로 뽑아 내었다. 이렇게 만들어진 샘플을 웨스턴을 통해 pPLC-1의 발현 양상을 확인해 보니 신전 후 점점 증가하는 것을 확인할 수 있었다..

발명의 효과

[0048] 본 발명을 통해서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명자들은 전기생리(patch-clamp) 및 약리적 차단제 실험을 통해 EGFR tyrosine 인산화의 선택적 차단제 및 PLC γ 의 차단제가 신전에 의한 칼슘 전류 증가 현상을 효과적으로 차단했음을 보였다. 또한, Western blotting 등의 결과를 통해 실제로 세포막 신전이 EGFR 및 PLC γ 의 인산화(활성화)를 일으킴을 보였다. 이에 근거하여 AG1478같은 선택적 EGFR tyrosine 인산화 효소의 억제제나 neomycins, U73122 등 PLC γ 의 억제제가 신전에 의한 혈관평활근 칼슘 전류증가 단계를 억제함으로써 효과적인 고혈압 치료제(또는 혈관확장제)가 될 가능성이 있음을 밝혔다. Neomycin과 U73122는 선택적 PLC γ 의 차단제는 아니고 PLC β 도 차단하는 것으로 알려져 있다. 향후 혈관 PLC γ 의 선택적 차단제의 개발은 유력한 고혈압 치료의 표적이다. 따라서 EGFR tyrosine 인산화효소와 PLC γ 억제를 통한 과도한 혈관수축 억제가 가능할 것으로 생각되어지며, 이들은 현재 시판되는 칼슘통로차단제보다 더 우수한 고혈압 치료제(또는 혈관확장제)의 가능성이 있다고 사료된다.

[0049] 또 본 발명은 caveolin과 PLC가 서로 결합되어 있으며 신전에 의해 막에서 원형질로 이동하고 JNK에 신호를 주어 VACC가 증가됨을 확인할 수 있었다.

[0050] 신전에 의한 Ca current의 증가에 대해 본 발명에서는 JNK와 ERK의 phosphorylation이 증가하였지만 p38의 변화는 없었다.

[0051] 또한 Ca current를 3가지 방법을 통하여 확인해 보았고 모두 신전에 의해 VACC가 증가됨을 확인할 수 있었다. 이것으로써 저장 조건에 의한 VACC의 증가는 세포 내 외부 환경이나 이온에 따라 나타나는 것이 아니고 어떤 고유한 signal을 통한 증가임을 확인할 수 있었다.

[0052] 또한 신전후 표면세포 구조가 대부분 없어지는 것을 확인할 수 있었다. 더욱이 confocal을 통한 Caveolin-1의 endocytosis까지 확인할 수 있었다.

- [0053] 또 신전 후 caveolin의 phosphorylation의 증가, sucrose gradiant 실험에서 caveolin-1 phosphotype이 cytosol에 발현되어 있는 것을 미루어 볼 때, caveolin-1은 평소에 membrane에 non-phospho 형태로 있다가 신전과 같은 외부적 자극에 의해 내부로 들어가 phosphorylation 된다는 것을 짐작할 수 있다. 또한, 신전반응 없이 M β CD 처리 후 VACC의 증가는 caveolin이 신전에 의한 신호전달에 중요한 요소임을 더욱 확신할 수 있게 도와준다.
- [0054] 또 나이스타틴 방법에 의해 효과가 있었던 genistein, pp2, AG1478, SP600125, U73122중 전체 세포에서 SP600125와 U73122만 효과가 있는 것으로 나왔다. 나이스타틴 방법이 생리적 상태에 더욱 가까운 상태이므로 아마도 tyrosin kinase가 신전에 연관이 되어 있을 것이라 생각된다. 하지만 whole cell patch 방법에서도 VACC의 증가가 관찰된 것으로 미루어 볼 때 나이스타틴이든 whole cell이든 신전에 의해 공통적으로 존재하는 세포 신호가 있을 것이라 생각되며 이것은 Caveolin-PLC-JNK의 신호를 경유할 것으로 생각된다.
- [0055] 또한 웨스턴 실험에서 U73122에 의해 JNK의 인산화가 억제되고 Caveolin의 인산화는 억제하지 못하였으므로 caveolin이 PLC감마보다 더 상부에서 PLC를 조절하는 것으로 보인다.
- [0056] 본 발명에서는 그 동안 PLC γ 가 RMASMC에서 어떠한 역할을 하는지 알려진 바가 없었고, 또한 PLC와 caveolin에 대해 불분명하였는데, RMASMC에서 PLC 감마의 새로운 기능과 myogenic tone, 고혈압, 동맥경화, 부정맥에 연관된 VACC, 아직 그 기능이 불분명한 caveolin-1의 연관성을 연결하는데도 그 의의가 있다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1은 nystatin-perforated patch-clamp 형태 하에서 전하 담체로 Na⁺에 의하여 기록된 L-타입 전압 의존적인 Ca²⁺ 채널 (VACC) 전류에 대한 저장액 팽윤의 효과를 나타낸 그림. A, VACC의 전류-전압(I-V) 관계는 전압 램프(ramp)에 의하여 유도되고, 그것의 형태는 도면 삽도(inset)로 나타내었다. 대조군 및 저장 조건 하에서 전류 흔적들(traces)은 비교를 위하여 겹쳐서 비교함. B, -10 mV에서 VACC 전류에 대한 저장액의 시간 경과 효과를 나타냄. 흔적 상부의 바(bar)는 기재된 bath 용액의 시간을 나타냄. C, 등장 대조군 및 저장 bathing 용액 하에서 전압 단계에 의하여 유도된 대표적인 전류 흔적을 나타내고 그 전압 단계의 형태는 도면의 삽도로 표시됨 (도 1D). D, 대조군 및 저장 조건 하에서 피크 I-V 관계의 비교를 나타낸 그림. 전체 I-V 관계는 등장 대조군 및 저장 조건 하에서 전압 단계에 의하여 유도된 전류로부터 얻었음. ***는 p <0.001 versus 대조군을 나타냄.

도 2는 nystatin-perforated patch-clamp 형태 하에서 전하 담체로 Ca²⁺에 의하여 기록된 VACC 전류에 대한 저장액 팽윤의 효과를 나타낸 그림. A, VACC의 전류-전압(I-V) 관계는 전압 램프(ramp)에 의하여 유도되고, 그것의 형태는 도면 삽도(inset)로 나타내었다. 대조군 및 저장 조건 하에서 전류 흔적들(traces)은 비교를 위하여 겹쳐서 비교함. B, 0 mV에서 VACC 전류에 대한 저장액의 시간 경과 효과를 나타냄. 흔적 상부의 바(bar)는 기재된 bath 용액의 시간을 나타냄. C, 등장 대조군 및 저장 bathing 용액 하에서 전압 단계에 의하여 유도된 대표적인 전류 흔적을 나타내고 그 전압 단계의 형태는 도면의 삽도로 표시됨 (도 2D). D, 대조군 및 저장 조건 하에서 피크 I-V 관계의 비교를 나타낸 그림. 전체 I-V 관계는 등장 대조군 및 저장 조건 하에서 전압 단계에 의하여 유도된 전류로부터 얻었음. ***는 p <0.01 versus 대조군을 나타냄.

도 3은 nystatin-perforated patch-clamp 형태 하에서 전하 담체로 Ba²⁺에 의하여 기록된 VACC 전류에 대한 저장액 팽윤의 효과를 나타낸 그림. A, VACC의 전류-전압(I-V) 관계는 전압 램프(ramp)에 의하여 유도되고, 그것의 형태는 도면 삽도(inset)로 나타내었다. 대조군 및 저장 조건 하에서 전류 흔적들(traces)은 비교를 위하여 겹쳐서 비교함. B, +10 mV에서 VACC 전류에 대한 저장액의 시간 경과 효과를 나타냄. 흔적 상부의 바(bar)는 기재된 bath 용액의 시간을 나타냄. C, 등장 대조군 및 저장 bathing 용액 하에서 전압 단계에 의하여 유도된 대표적인 전류 흔적을 나타내고 그 전압 단계의 형태는 도면의 삽도로 표시됨 (도 3D). D, 대조군 및 저장 조건 하에서 피크 I-V 관계의 비교를 나타낸 그림. 전체 I-V 관계는 등장 대조군 및 저장 조건 하에서 전압 단계에 의하여 유도된 전류로부터 얻었음. ***는 p <0.01 versus 대조군을 나타냄.

도 4는 표면소포(caveolae) 구조 및 Cav-1 분포에 대한 팽윤 및 콜레스테롤 결핍의 효과를 나타낸 그림으로, A, 대조군 및 저장 조건 하에서 싱글 RMASMC(rat mesenteric arterial smooth muscle cell) 막의 부분을 나타내는 전자 현미경 사진. 표면소포의 수가 저장 조건 하에서는 크게 감소한 것에 주목. B, 대조군 및 M β CD 처리 조건 하에서 싱글 RMASMC 막의 부분을 나타내는 전자 현미경 사진. 표면소포의 수가 M β CD 처리 후 유사하게 감소한

것에 주목. C, 대조군, 저장 팽윤 및 MβCD 처리 하에서 Cav-1에 대한 항체로 면역염색된 싱글 RSMSC 의 공초점 이미지. 하단 그래프는 각 공초점 이미지에서 나타난 라인(X 축)에 대한 Cav-1 항체 형광의 강도(Y축)을 나타낸다. 대조군 조건 하에서 원형질 부위보다 막 부위에서 Cav-1 항체의 더 높은 형광 강도에 주목. 저장 팽윤 및 MβCD 처리 후, 이 고르지 못한 형광 강도 분포는 사라지고 이것은 세포막(특히 표면소포)으로 부터 원형질로 Cav-1 의 이동을 나타냄.

도 5는 팽윤 유도된 VACC 활성화에 대한 MβCD 효과를 나타낸 그림으로, MβCD 처리는 종종 2가 양이온 없는 조건 하에서 전극과 세포막 사이의 다운 실(down seal)을 파괴하기 때문에 VACC 전류는 nystatin-perforated patch-clamp 형태 하에서 전하 담체로 Ca²⁺로 기록하였다. A, 대조군, MβCD 처리 및 MβCD 처리 조건 후 저장 팽윤 하에서 도면 삽도로 형태가 표시된 전압 램프에 의하여 유도된 대표적인 전류 흔적. B, 0 mV에서 기록된 VACC 전류 진폭(amplitude)에 대한 MβCD 처리 후 저장 팽윤 및 MβCD의 효과의 요약. *는 p <0.05 versus 대조군을 나타냄.

도 6은 팽윤-유도된 VACC 활성화에 대한 여러 카이네이즈 저해제의 효과를 나타낸 그림으로, VACC 전류는 나이스타틴-perforated 패치 클램프 형태 하에서 전하 담체로 Na⁺로 기록하였고 여러 조건 하에서 I-V 관계를 비교함. A-F, PKC의 저해제 또는 활성화제, 단백질 타이로신 카이네이즈의 저해제, EGFR 수용체 타이로신 카이네이즈 및 JNK MAP 카이네이즈의 저해제의 존재에서 저장 팽윤의 효과를 요약한 I-V 관계.

도 7은 팽윤-유도된 VACC 활성화에 대한 여러 카이네이즈 저해제의 효과를 나타낸 그림으로, VACC 전류는 nystatin-perforated patch-clamp 형태 하에서 전하 담체로 Ca²⁺로 기록하였고 여러 조건 하에서 I-V 관계를 비교함. A & D, 각각 PLC 감마 저해제 U73122 및 neomycin의 존재에서 저장 팽윤의 효과를 요약한 I-V관계. B, U73122의 네가티브 유도체인 U73343의 존재에서 저장 팽윤의 효과를 요약한 I-V관계. C, PTK 저해제 genistein의 존재에서 저장 팽윤의 효과를 요약한 I-V 관계.

도 8은 RSMSC에서 MAPKs, PLC감마-1, 및 Cav-1 인산화에 대한 신전(stretch)의 효과를 나타낸 그림으로, 1차 RSMSCs를 100Φ 디쉬에서 배양하였다. 그 후 그 세포들을 파쇄하고 이들 파쇄액으로부터 얻은 단백질을 특정 단백질에 대한 항체를 사용하여 SDS-PAGE로 분석하였다. A, 저장 용액 적용 후 ERK, JNK, PLCγ-1, 및 Cav-1의 인산화는 증가된 반면에 저장 팽윤에 의하여 p38의 인산화는 증가되지 않았음. B, 저장 용액 적용 전 10 분 동안에 1차 RSMSCs를 U73122 (5 mM)로 전처리한 후 Western blot 분석을 위하여 파쇄하였다. 그 pCav-1는 팽윤에 의하여 여전히 증가한 반면에 pJNK는 그러하지 않았고 이것은 PLCγ가 Cav-1 인산화의 다운 스트림이고 JNK의 업스트림이라는 것을 나타냄. H4, 저장 용액 4 min 적용. H8, 저장 용액 8 min 적용. 모든 실험은 적어도 3회 독립적으로 수행됨.

도 9는 EGFR, Src, JNK, 및 넓은 스펙트럼 PTK의 저해제 및 MβCD의 효과를 나타낸 그림으로, AG1478, PP2, MβCD, SP600125, 및 genistein의 존재 및 부존재에서 저장 팽윤(8분)의 효과를 나타내는 대표적인 블롯팅 결과를 나타냄. Cav-1에 대한 밴드는 로딩 대조군으로 나타냄. MβCD 자체는 Cav-1 및 JNK 인산화를 증가시키고 저장 팽윤은 Cav-1 및 JNK의 추가적인 인산화 증가를 억제한다는 것에 주목. N=4.

도 10은 비인산화된 Cav-1 및 pCav-1의 위치를 나타낸 그림으로, 비연속적인 sucrose 밀도 구배(5, 30, 45% sucrose)에 의하여 분리된 단백질들의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸 그림. 분획화가 효과적인지 아닌지를 조사하기 위하여 막에서만 특징적으로 발현되는 flotlin 및 원형질에서만 선택적으로 발현되는 actin의 분포를 각 항체를 사용하여 분석함. 비록 Cav-1이 분획 5에서 가장 풍부하게 위치하지만, 본 발명자들은 Cav-1 분포를 다른 질은(dense) 분획에서도 관찰할 수 있었다. 그러나, pCav-1은 질은 분획 (분획 8 이상)에서만 존재하고 이것은 비-표면소포 부위에 존재하는 Cav-1이 주로 그것의 인산화 형태로 존재한다는 것을 나타낸다. 이 결과는 적어도 3회의 독립적인 실험의 대표적인 예임.

도 11은 대조군 및 저장 조건 하에서 Cav-1 및 pPLCγ-1의 상호작용을 나타낸 그림으로, Cav-1는 대조군 조건 하에서 보다 저장 조건 하에서 더 pPLCγ-1와 동시에 면역침전된다. 동시면역침전(Coimmunoprecipitation)은 Cav-1에 대한 항체로 미리청정화된 RSMSC 균질액의 배양에 의하여 수행되고, protein-G 아가로스로 면역복합체의 침전을 수반함. 침전된 단백질을 pPLCγ-1에 대한 항체로 면역블롯을 함. 10%의 전체 세포 파쇄액을 런닝함.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위

한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0059] 실시예 1: 동물 및 세포 제조

[0060] 수컷 Sprague-Dawley (SD) rats (9±1주령)을 실험에 사용하였다. 모든 실험은 동물의 배려 및 사용에 대한 국립보건원 가이드라인에 따라서 수행하였고, 건국대학교 동물실험 관리 위원회가 본 연구를 승인하였다. 랫트는 이산화탄소의 증가된 농도에 노출시키거나 깊은 ketamine-xylazine 마취제 하에서 경동맥을 절단하여서 희생하였다. MASCs의 단일세포 현탁액을 Kim, A, Bae, YM, Kim, J, Kim, B, Ho, WK, Earm, YE, Cho, SI. *Eur. J. Pharmacol.* 2004. **483**:117-26에 기재된 것과 같이 제조하였다. 요약하면, 상부 장간막 동맥(superior mesenteric arteries)의 두 번째에서 네 번째 분지들(branches)을 조심스럽게 제거하고 Ca²⁺-free normal Tyrode (NT) 용액 (143 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.33 mM NaH₂PO₄, 0.5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 및 11 mM 포도당, NaOH로 pH 7.4로 조정)에 위치시켰다. 그 동맥을 작게 자르고 소화 용액에 옮겼다. 조직을 1 mg/ml papain (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA), 1 mg/ml 소 혈청 알부민, 및 1 mg/ml dithiothreitol을 포함하는 Ca²⁺-free normal Tyrode (NT) 용액에서 15분간 처리하였다. 그 Ca²⁺-free normal Tyrode (NT)는 NT로부터 1.8 mM CaCl₂를 제거하여 제조하였다. 두 번째 용액에 수반된 두번째 25-분 배양은 3 mg/ml 콜라게네이즈(Wako, Osaka, Japan)이 파파인을 대체하였다. 효소 처리 후, 그 세포를 Ca²⁺-free NT 용액에서 피펫으로 천천히 교반하여서 분리하였다.

[0061] 실시예 2: 용액 및 화학물질

[0062] 용액: 등장액은 (이하 mM 단위): NaCl, 115; 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulphonic acid (HEPES), 5; 포도당, 11; sucrose, 65를 포함하고; NaOH로 pH 7.4로 조정하였다. 신전(stretching)에서 VACC 전류를 기록하기 위하여, 60mM의 sucrose를 등장액으로부터 제거하여 저장액을 제조하였다. 여러 전_L 담체(charge carrier)에 대한 VACC 전류의 기록을 위하여, 4.2 mM EDTA(Na⁺ 기록용) 또는 1.8mM CaCl₂ (Ca²⁺ 기록용)을 첨가하거나 1.8 mM CaCl₂ (Ba²⁺ 기록용) 대신에 10 mM BaCl₂을 첨가한 등장액을 사용하였다. perforated patches의 기록을 위하여, nystatin (200 mg/ml)을 Methanesulfonic acid (CH₃SO₃H) 100; CsCl, 40; MgCl₂, 1; HEPES, 5; EGTA 0.05(in mM); ;CsOH로 pH를 7.2로 조정된 피펫 용액에 첨가하였다. 전 세포(Whole cell) patches의 기록을 위하여 perforated patch 피펫 용액에 MgATP 5mM; 1,2-bis(aminophenoxy)ethane-N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA) 10mM를 첨가하였다.

[0063] 모든 화학물질은 특별한 언급이 없으면 Sigma (Sigma Chemical Co., USA)로부터 구입하였다.

[0064] 실시예 3: 전기생리학적 기록

[0065] 분리된 장간막 동맥 평활근 세포(Mesenteric arterial smooth muscle cells)를 patch-clamp 실험을 수행하였다. 전 세포 VACC 전류를 EPC8 patch-clamp amplifier (Heka, Germany)를 가지는 nystatin-perforated patch clamp 형태의 patch-clamp 기술(Kim, A, Bae, YM, Kim, J, Kim, B, Ho, WK, Earm, YE, Cho, SI. *Eur. J. Pharmacol.* 2004. **483**:117-26)에 의하여 기록하였다. 데이터를 1 kHz에서 low-pass 필터된 후 1 -10 kHz의 샘플링 속도에서 프로그램에 의하여 디지털화되고 컴퓨터에 저장하였다. 전압 펄스 생성도 소프트웨어로 조절하였다. 패치 피펫을 puller (PP-83, Narishige, Japan)를 사용하여 borosilicate capillaries (Clark Electromedical Instruments, Pangbourne, UK)로부터 잡아당겼다. 피펫 용액으로 채운 경우 2 - 3 MΩ 저항을 가지는 패치 피펫을 사용하였다. 모든 실험은 상온에서 수행하였다. 상업적으로 이용가능한 bathing chamber (RC-11, WPI, USA) 및 silver/silver chloride (Ag/AgCl) 펠렛 전극(WPI, USA)을 사용하였다.

[0066] 실시예 4: 웨스턴 블롯팅

[0067] 6에서 10 계대 사이의 1차 배양된 RSMSCs를 본 실험에 사용하였다. RMRASCs 10 마리의 수컷 Sprague Dawley (SD) 랫트(10~11 주령, 370g ±20g)으로부터 collagenase 및 papain 처리에 의하여 분리하고 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM에서 배양하였다. 모든 실험을 위하여, 6~10 계대에서 세포를 80% 컨플루언스로 성장시키고 FBS가 없는 DMEM에서 12에서 24시간 동안 굶겼다. 실험 두 시간 전, 그 배양배지를 신선한 배지로 대체하였다. 그 후 그 세포를 1회 세척하고 RIPA buffer (TNT research.LTD KOREA)를 사용하여 파쇄하였다. sucrose gradient 연구를 위하여, 그 세포를 2ml MBS buffer (MES + 1%Triton X-100)를 사용하여 파쇄하였다. 파쇄된 세포를 2ml의 90% sucrose, 5%, 30% 및 45%(파쇄된 세포) sucrose로 혼합하여 12ml 튜브에

넣었다. 그 후 그 샘플을 SW-41Ti rotors(Beckman L-100XP)로 39,000rpm에서 19시간 동안 4°C에서 원심분리하였다. 원심분리 후, 12 분획의 1 ml를 각 튜브의 위에서 아래까지 수집하였다. 샘플을 8% 또는 12% SDS-polyacrylamide non-reducing 젤에서 런닝한 후 PVDF 막(Millipore)으로 옮겼다. JNK, caveolin (1:1000; cell signaling), pCaveolin (1:1000; cell signaling, Try14), pJNK (1:1000; cell signaling; Thr183/Tyr185), pPLC γ -1 (1:500; santacruz,)에 대한 토끼 1차 항체 및 HRP가 부착된 2차 항체를 웨스턴 블롯 (1:2,000; cell signaling)에 사용하였다. 신호들을 Las-4000 (Fusi film)에 의하여 육안화하였다.

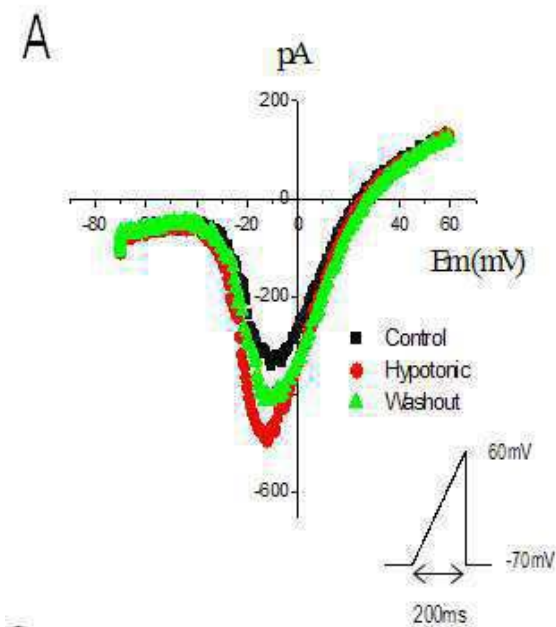
[0068] 실시예 5: 면역침전

[0069] RMASMC를 ice-cold RIPA 버퍼에서 파쇄하였다. 샘플로부터 단백질 면역침전을 위하여 1 mg protein/ml RIPA 버퍼에 희석하고, 200 μ l의 파쇄액을 4 μ g의 anti-caveolin-1(cell signaling anti-rabbit 1:50)으로 4°C에서 밤샘 배양하였다. 항원-항체 복합체를 protein-G agarose (Gendepot; 4 시간, 4°C)로 캡처하였다. 아가로스 비드를 SDS 샘플 버퍼에서 가열하여 결합한 단백질의 제거 전에 세척하였다. 샘플을 10% SDS-polyacrylamide non-reducing 젤에서 런닝한 후 PVDF 막(Millipore)으로 옮겼다. pPLC γ -1 (1:500; santacruz) 및 HRP가 부착된 2차 항체를 웨스턴 블롯 (1:2,000; cell signaling)에 사용하였다. 신호들을 Las-4000 (Fusi film)에 의하여 육안화하였다.

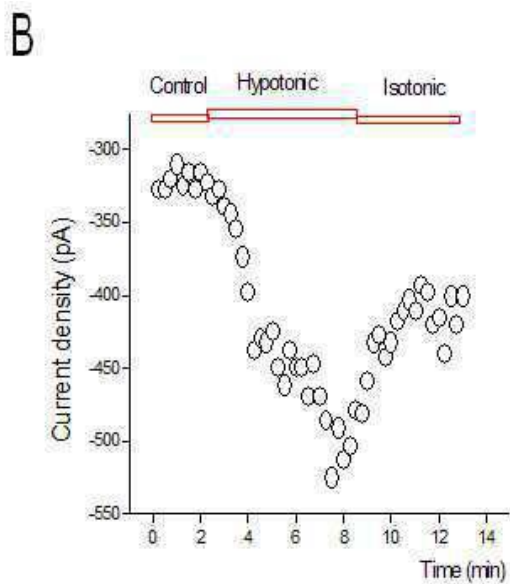
[0070] 그 결과들을 평균±표준편차로 나타내었다. Paired 또는 독립적인 Student *t*-tests를 적절성으로서 유의성에 대하여 테스트하였고, $P < 0.05$ 를 유의적으로 간주하였다.

도면

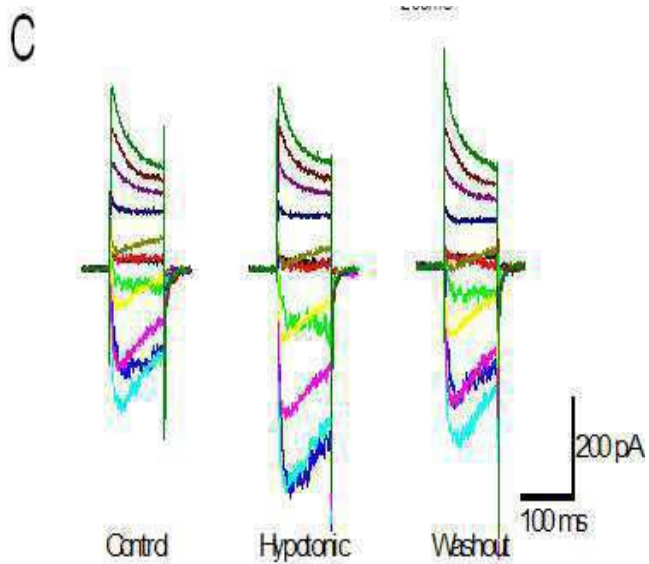
도면1a



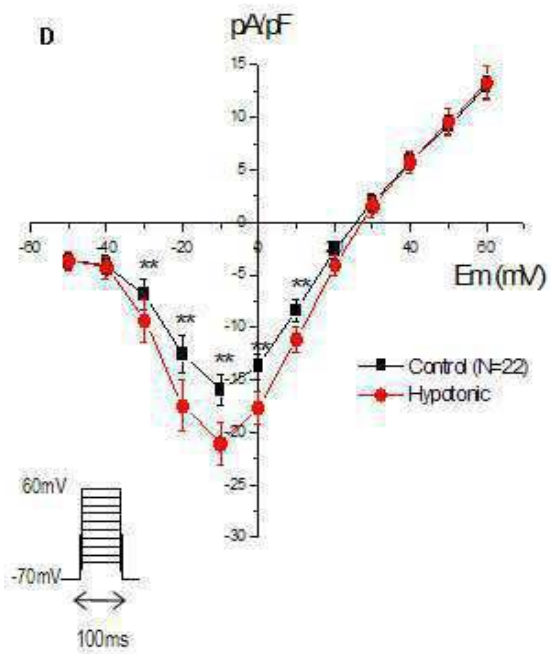
도면1b



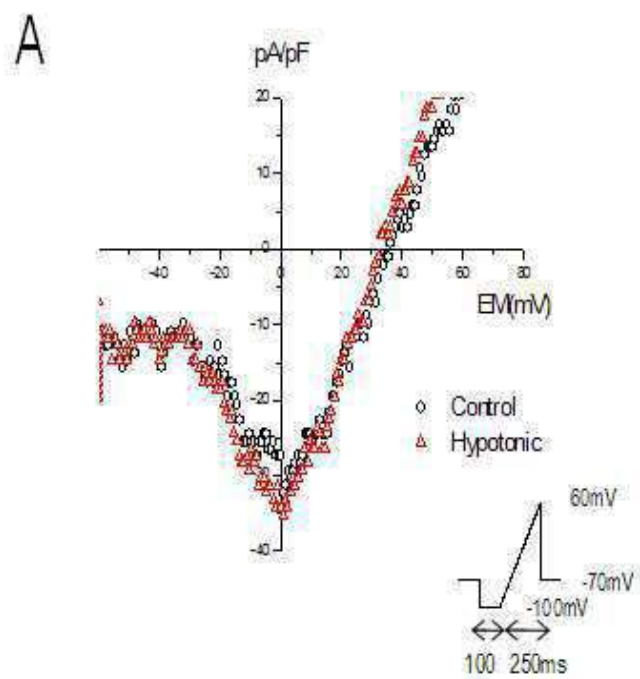
도면1c



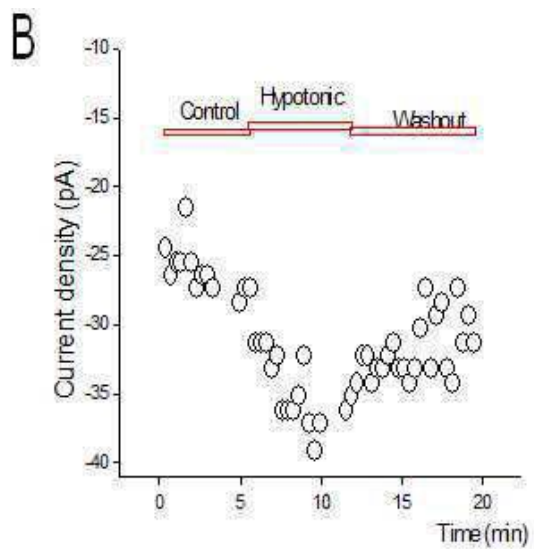
도면1d



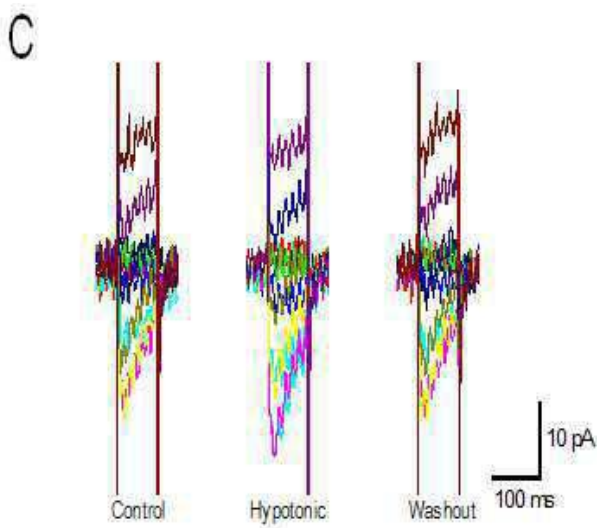
도면2a



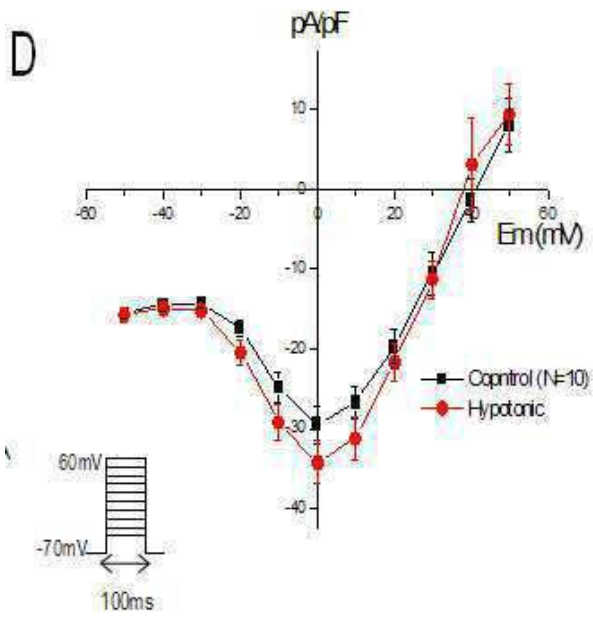
도면2b



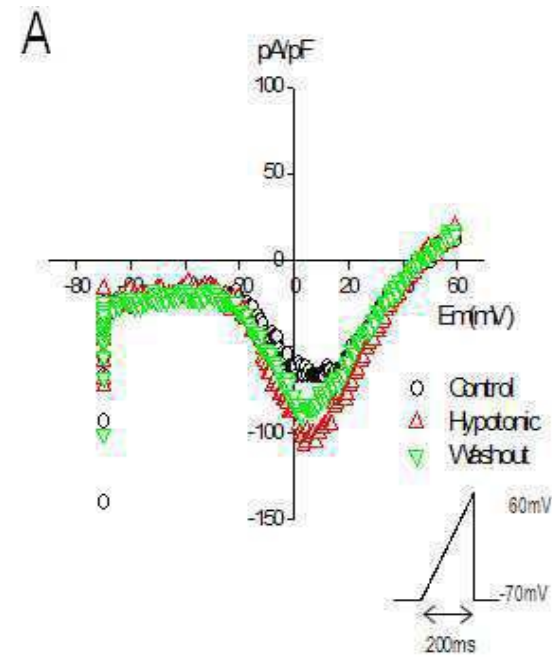
도면2c



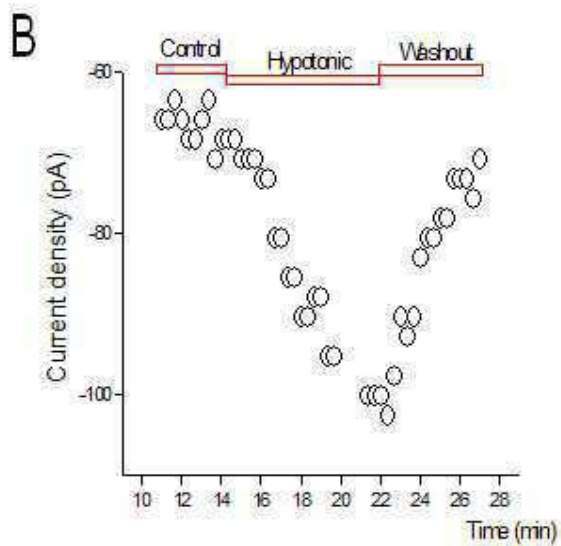
도면2d



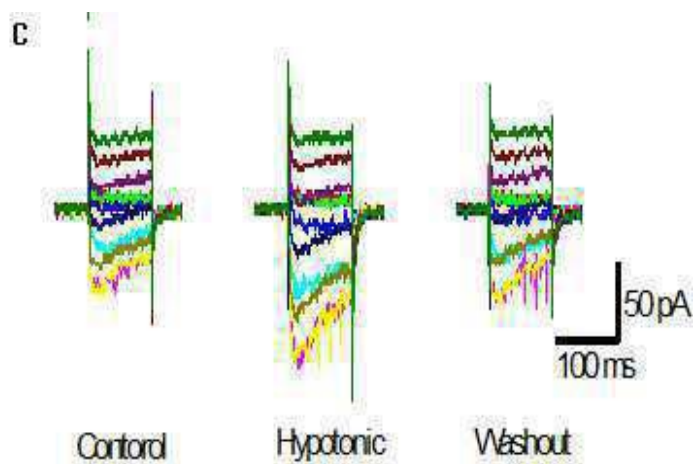
도면3a



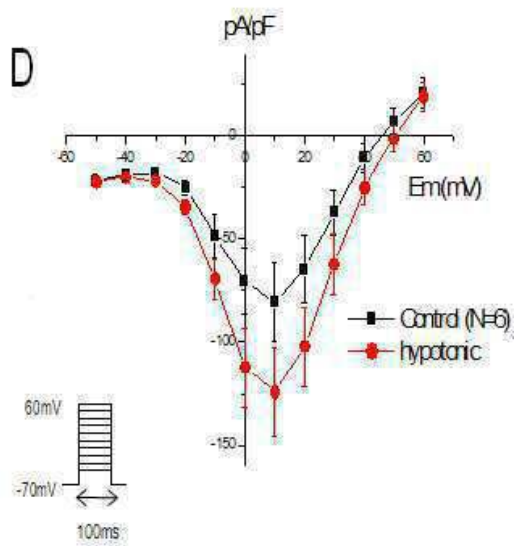
도면3b



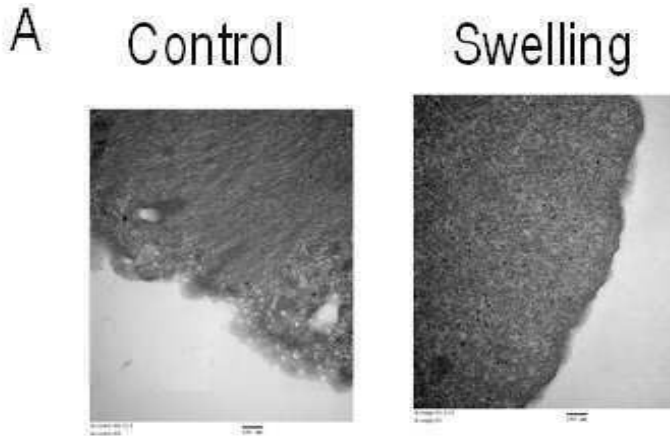
도면3c



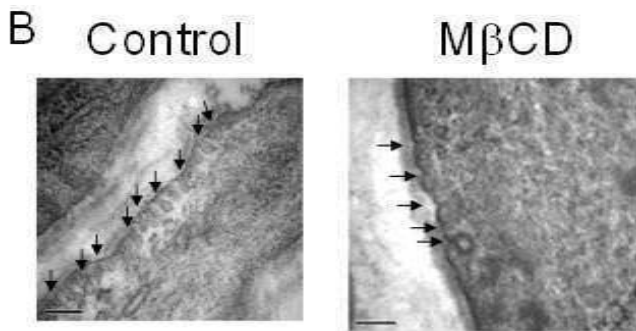
도면3d



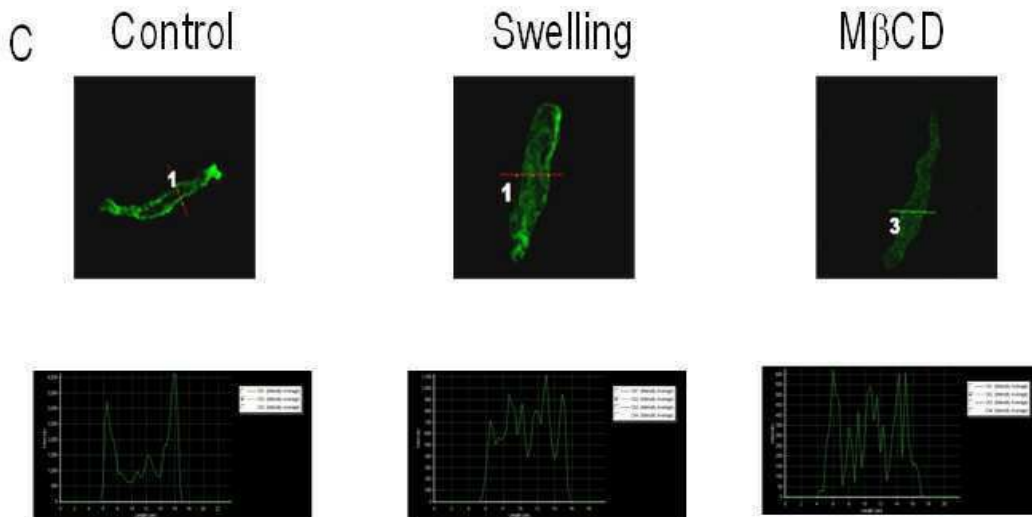
도면4a



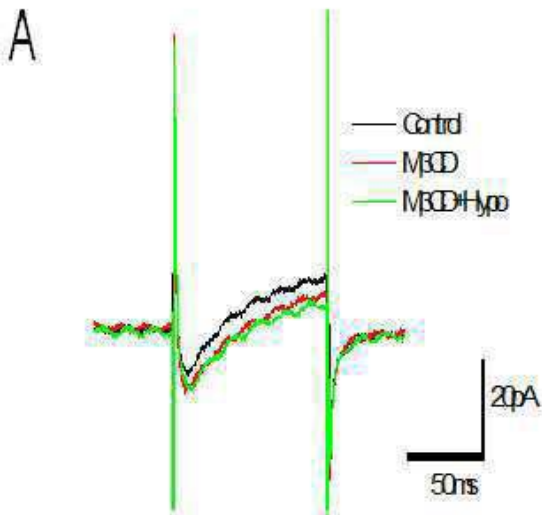
도면4b



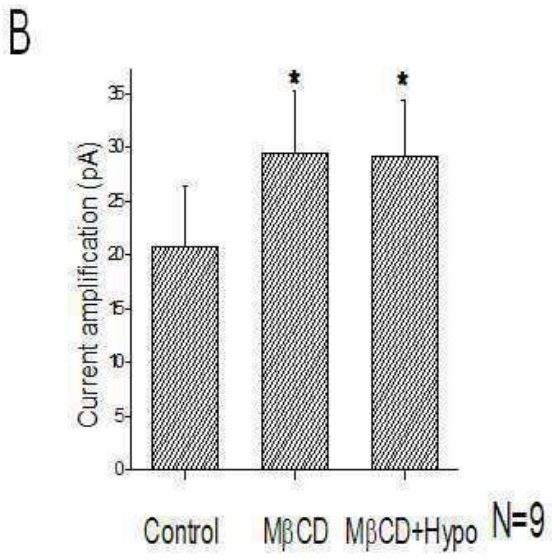
도면4c



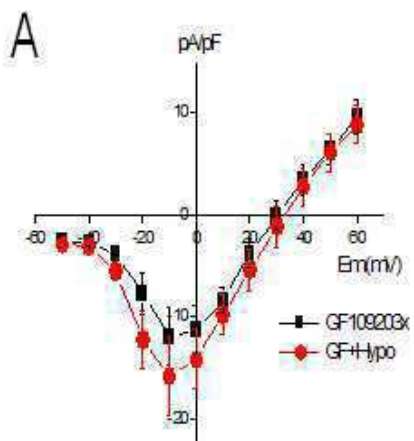
도면5a



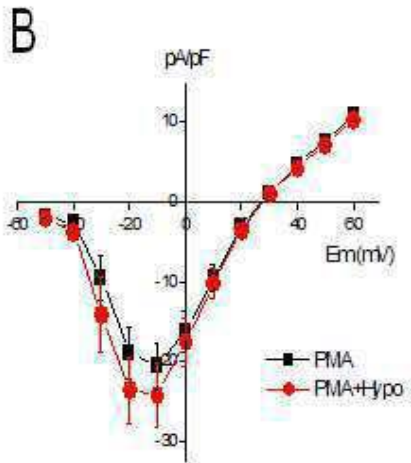
도면5b



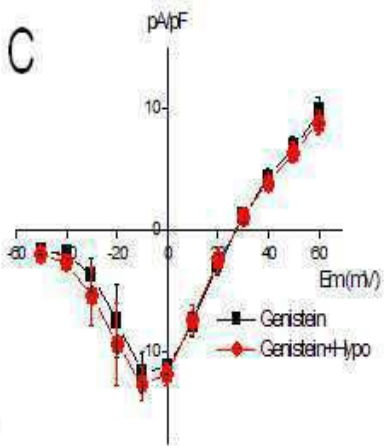
도면6a



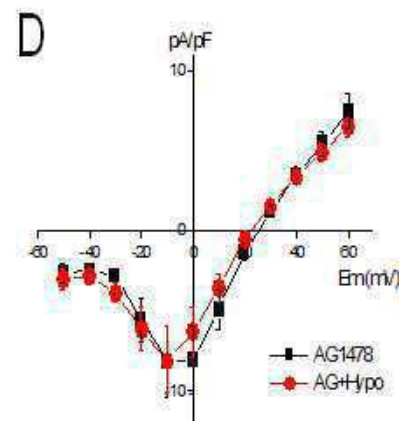
도면6b



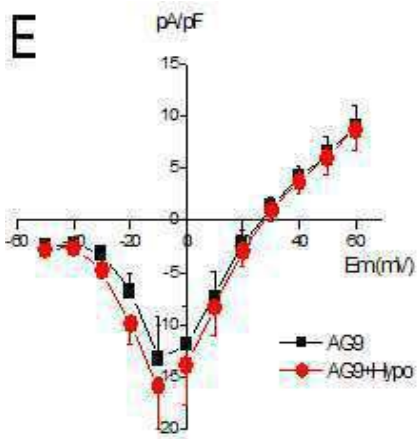
도면6c



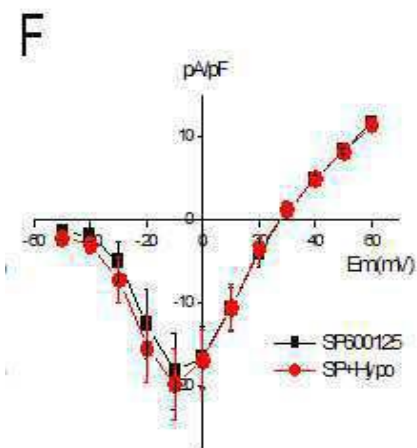
도면6d



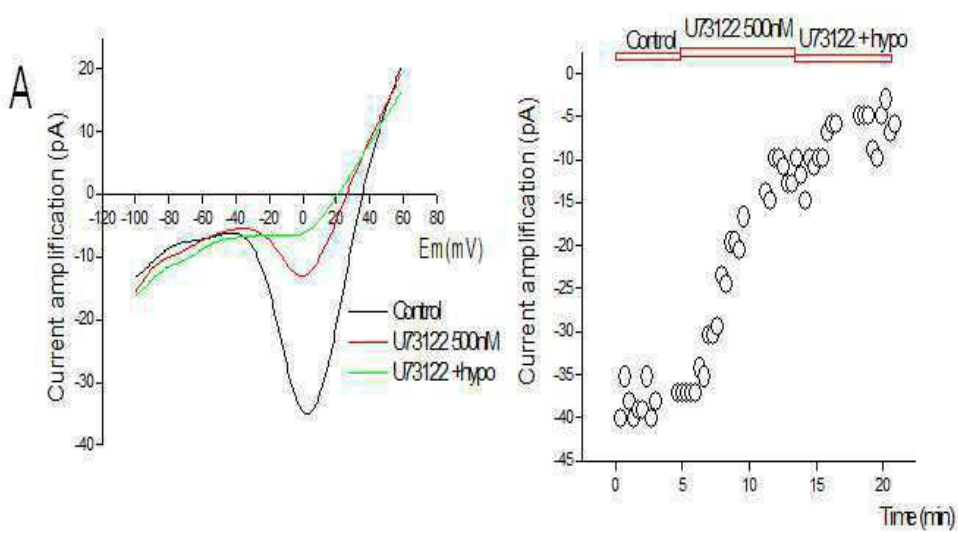
도면6e



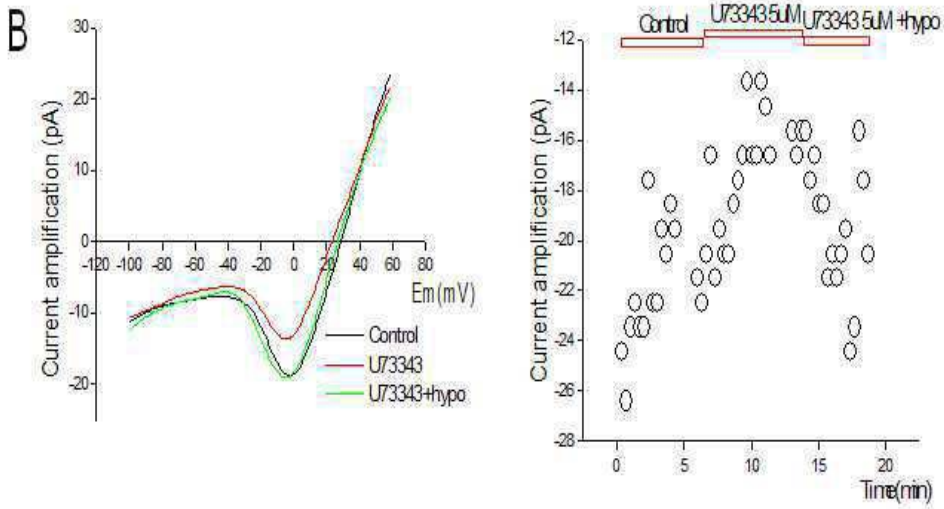
도면6f



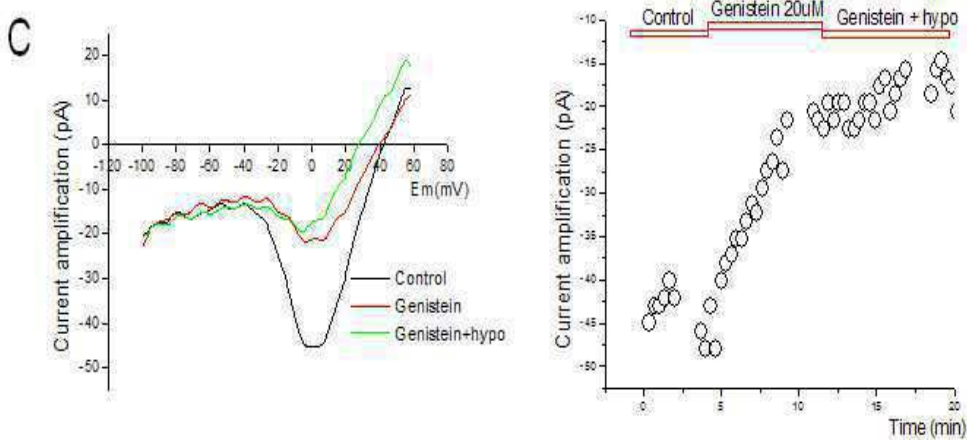
도면7a



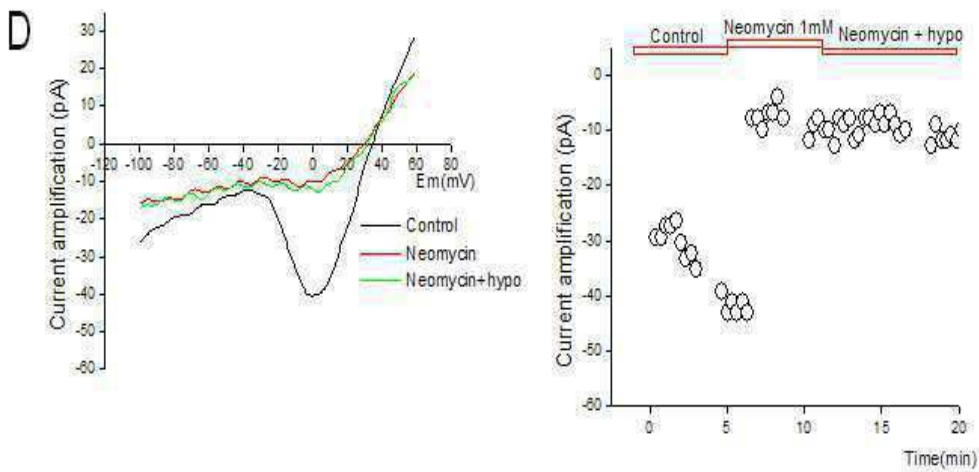
도면7b



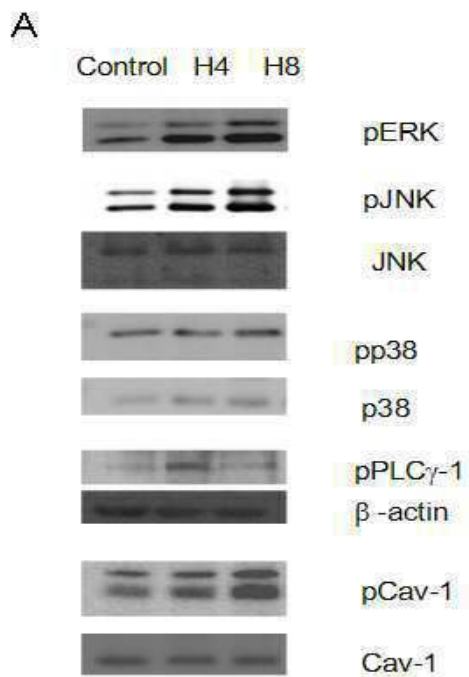
도면7c



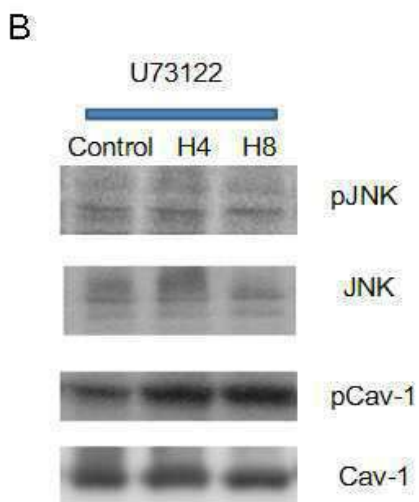
도면7d



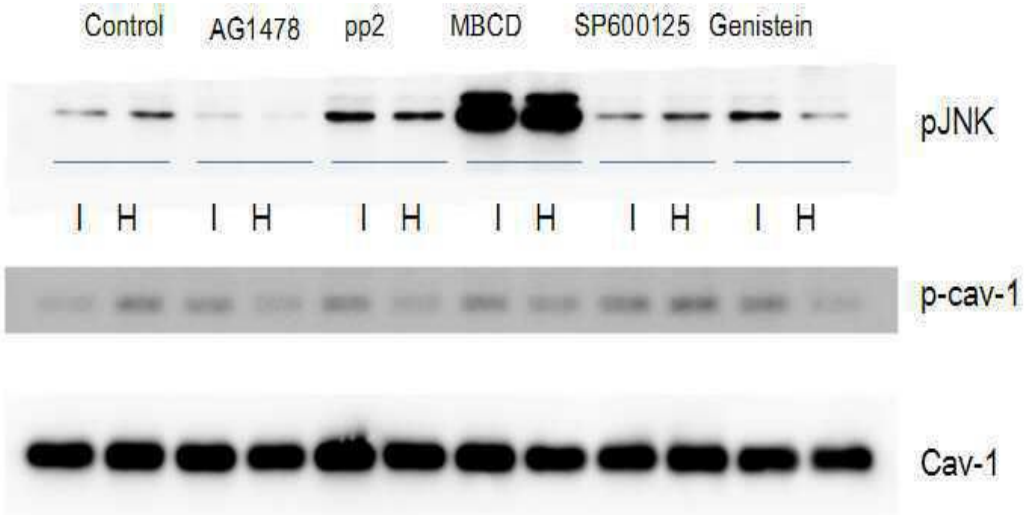
도면8a



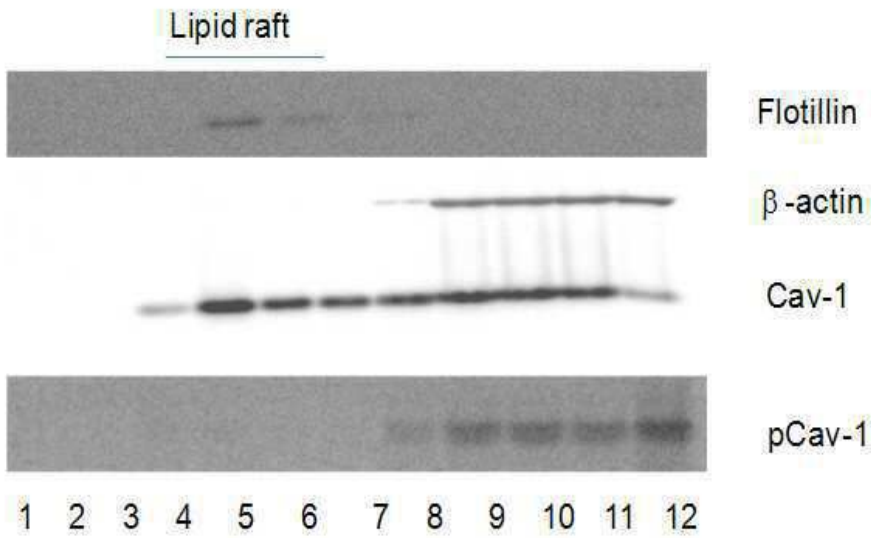
도면8b



도면9



도면10



도면11

