

극지 생물자원 유래 차세대 개념 기반 면역제어  
물질 개발

Development of next-generation concept-based  
immune-system control compound using polar  
organism resources



경상국립대학교

# 제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “ 국내 학 · 연 극지연구진흥프로그램(PAP사업)” 에 관한 연구 “극지 생물자원 유래 차세대 개념 기반 면역제어 물질 개발” 과제의 최종보고서(보고서명:극지 생물자원 유래 차세대 개념 기반 면역제어 물질 개발 )로 제출합니다.

2023. 01.

연구기관명 : 경상국립대학교

연구책임자 : 이 창 섭

참여연구원 : 신 성 아

“ : 김 문 수

극지연구소 : 김 민 지

“ : 최 세 연

“ : 권 수 근

“ : 배 민 지

“ : 한 민 주

“ : 류 경 아

“ : 안 장 은

“ : 김 희 지

# 요 약 문

## I. 제 목

극지 생물자원 유래 차세대 개념 기반 면역제어 물질 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 특이성을 가지는 극지 환경 생물 중에서 유래한 천연물을 이용하여 차세대 개념의 면역 세포의 활성을 제어 [사멸 세포 제거(apoptotic cell clearance : eat me signaling) 조절 및 면역 관문 (immune checkpoint : don' t eat me signaling) 제어] 할 수 있는 Hit 물질 발굴
- 발굴된 Hit 물질을 이용한 연구를 통해 기존 면역조절 기전과는 다른 통합적인 면역 시스템 제어 방법을 구축하고, 면역 관련 질병 제어 물질 및 원천기술 개발

## III. 연구개발의 내용 및 범위

- 극지환경 생존 생물 중에서 유래한 천연물 라이브러리를 이용한 차세대 개념의 면역제어 물질 스크리닝 및 기전연구
  - : 기존의 면역 세포의 활성을 조절 방법을 벗어나, 새로운 개념의 사멸세포제거 (apoptotic cell clearance)기전 조절을 통한 면역 제어 물질 탐색물질 발굴
  - : 차세대 항암치료제로 적용되고 있는 T-cell/macrophage 기반 면역 관문 억제제의 개념을 도입하여 새로운 면역관문 조절제 개발
- Hit 물질을 이용한 in vivo mouse model 연구를 통한 전체 면역시스템 조절/기능 검증
- Hit 물질연구를 통한 사멸세포 제거 활성 저하 및 면역 관문의 비정상적인 조절로 나타나는 면역관련 질병 [암, 자가면역질환(류마티스 관절염), 염증성 장질환(궤양성 대장염)] 들을 제어할 수 있는 원천기술 개발

(본 연구그룹만의 장점 및 노하우)

- : 면역제어 물질 발굴을 위한 다양한 세포 주 및 마우스 실험 모델 기구축
- : 경상국립대 약학대학의 합성 생물학/시스템 생물학 연구 그룹 및 독성학/약동학 연구그룹들과의 협업을 통해 향후 유효물질 대량 생산 및 안전성 실험 수행 가능
- 차세대 개념의 면역시스템 조절 물질 개발의 중요성 및 기존 타겟 단백질 기반 물질 탐색과의 차이점
  - : 기존 타겟 단백질 기반 물질 탐색(target based screening)은 한가지 단백질을 타겟으로 binding 기반 screening을 진행함으로써 스크리닝의 비효율성(사용한 라이브러리 대비, hit 비율 저조)과 스크리닝 후에도 hit 물질에 대한 기능 불

확실성이 강함

- : 본 연구그룹에서 제안하는 면역제어 물질 탐색은 Functional/systemic control based screening으로서, 한가지 단백질이 아니라, 면역제어 기능을 기반 (functional screening)으로 한 전체 면역 시스템 제어가 가능한 스크리닝 (systemic control based screening: 면역계 전체 면역 제어에 기여하는 eat me/don' t eat me signaling 조절을 통한 면역계 전체 면역제어 스크리닝) 방법임

#### IV. 연구개발결과

- 극지생물자원 유래 물질 라이브러리구축 및 면역제어 유효물질 분류
- 세포수준에서의 High-throughput microplate reader/FACS screening (HTMFS)를 통해 천연물 면역제어 유효물질 발굴
- 추가적 활성 평가를 통한 다양한 면역제어기능성 물질을 스크리닝을 통해 선별함 (면역항암, 항알러지 등)
- 면역제어 유효물질들의 세포수준에서의 다양한 검증시스템을 활용하여 면역제어 기능성을 확인함.(항염, 항암효능)
- 추가적인 면역제어 유효물질들의 항알러지 분자적 기전을 확인하였으며, 사멸세포제거의 효율이 증가함을 확인함.
- 면역조절 유효물질들의 개체수준의 영향을 검증하기 위한 다양한 동물 모델 시스템을 구축하였음(종양형성모델, PCA 모델, DNCB 유도 알러지모델, 패혈증모델 등)
- 구축된 동물모델을 활용하여 면역제어 유효물질의 유용성을 확인함.

#### V. 연구개발결과의 활용계획

- 신규 면역제어 선도물질의 제약회사나 바이오 업체로의 기술이전
  - : 신규 면역제어 선도물질의 합성생물학 기반 대량생산 기술 개발
  - : 국내외 특허출원 및 논문을 통한 지적 재산권 확보 및 노하우 구축
  - : 국내 및 외국 제약사와의 공동개발 또는 기술이전을 통한 실용화 추진으로 관련 산업 개발에 기여
  - : 다양한 면역질환 관련 극지생물 유래 치료제 공동개발 추진
  - : 국가적인 생명자원 확보를 통한 생명안보 확립 및 새로운 고부가 가치산업 창출을 통한 국가의 소득증대 기여
- 극지 생명자원 기반 유용물질개발 연구 플랫폼의 지속적인 활용가능
  - : 극지 생명자원 유용물질의 database를 이용한 유용물질의 다양한 활성 및 적용점 탐색 연구 수행
- 실용화 연구를 통한 극지연구의 저변확대와 극지생명 연구 분야 발전기여
  - : 극지생물 유래 면역조절 의약품 개발 방향 제시
  - : 국내외 전문가들과의 교류를 통한 관련지식 및 기술 교류
  - : 극지 생명자원 기반 면역조절 치료제 개발 관련 전문 인력 양성

# SUMMARY

## I. Title

Development of next-generation concept-based immune-system control compound using polar organism resources

## II. Purpose and Necessity of R&D

- Screening the lead compounds from polar environment specific organism to modulate apoptotic cell clearance (eat me signaling) or immune checkpoint (don' t eat me signaling)
- Developing platform technology and novel compounds that could modulate the integrated immune systems beyond current immune modulators

## III. Contents and Extent of R&D

- Screening and mechanical study of immune modulatory compounds using natural compounds-library derived from polar organism
  - : Discovery of new compounds that could control immune systems by modulating apoptotic cell clearance (novel concept)
  - : Developing new immune checkpoint modulator (related to don' t eat me signaling) based on the current concept, immune checkpoint inhibitors in anti-cancer therapy
- Verifying the immune modulatory effects of lead compounds in vivo model systems
- Developing new compounds that could have modulatory effects in various immune related diseases [cancer, rheumatoid arthritis, Systemic Lupus Erythematosus (SLE), and inflammatory bowel disease (IBD)]
- (Strong points and knowhow of my group)
  - : Already established various in vitro cell lines and in vivo animal model systems to discovery new immune modulators.
  - : Ability to mass-produce the new candidates and verify safety through collaboration with another groups of synthetic biology/systems biology or toxicology/ pharmacokinetics in College of Pharmacy, Gyeongsang National University
- Significance of the development of integrated immune regulatory systems based on novel concept & Differences from previous compound screening systems based on target proteins

- : Previous compound screening systems are inefficient because of poor hit ratio compared to used library and uncertainty of hit compounds
- : New compound screening that we suggest is functional/systemic screening methods based on integrated immune modulation beyond targeting one protein

#### IV. R&D Results

- Establishment of a library of materials derived from polar organisms and classification of candidate immunomodulatory compounds.
- Discovery of immunomodulatory compounds through High-throughput microplate reader/FACS screening (HTMFS) at the cellular level.
- Screening of various immunomodulatory functional compounds, including immune anticancer and anti-allergic effects, through additional activity evaluations.
- Confirmation of the immunomodulatory functionality at the cellular level using various in vitro systems for immunomodulatory compounds (anti-inflammatory, anti-cancer efficacy).
- Identification of the molecular mechanisms of additional immunomodulatory compounds and confirmation of increased efficiency in eliminating apoptotic cells by bone-marrow derived dendritic cells.
- Establishment of various in vivo systems to verify the effects of immunomodulatory compounds at the individual level (syngraft model, PCA model, DNCB-induced allergy model, sepsis model, etc.).
- Confirmation of the utility of immunomodulatory compounds using the established animal models..

#### V. Application plans of R&D Results

- Technology transfer of new lead compounds as immune modulators to pharmaceutical- or bio- company
  - : Developing the mass-production technology of lead compounds based on synthetic biology
  - : Ensuring intellectual properties through application of domestic or international patent and publishing the papers
  - : Contribution to technology development through joint development with domestic or international pharmaceutical company
  - : Driving joint development of remedy derived from polar organisms against immune-related diseases
  - : Ensuring the priority of biomedical engineering by contributing to the development of immune modulatory medicines
- Continuous utilization of the research platform to develop new compounds based on polar organisms resources

- : Researching various bioactivity and application of candidate compounds using big database of useful compound derived from polar organisms resources
- Contribution to the advancement of polar organism research through the research for practical application
- : Suggesting the direction to develop immune modulatory medicines based on natural compounds from polar organisms
- : Development of well-trained manpower involved in the development of immune modulators



# CONTENTS

|  |    |
|--|----|
| SUMMARY.....   | 4  |
| CONTENTS.....  | 7  |
| Chapter 1. Introduction.....   | 9  |
| Section 1. Necessity of this study.....  | 9  |
| Section 2. Importance of this study.....   | 10 |
| Chapter 2. Current R&D Status in Korea and Other Nations.....  | 12 |
| Section 1. Trends and issues of R&D status .....   | 12 |
| Section 2. Related Research Trends and Creativity.....   | 13 |
| Chapter 3. R&D Implementaion .....   | 15 |
| Section 1. Contents of R&D .....   | 15 |
| Section 2. Results of R&D .....  | 17 |
| Chapter 4. Degree of R&D Goal Achievement and Degree of Contribution to Outside<br>Research Institute..... | 29 |
| Section 1. Degree of R&D goal achievement.....   | 29 |
| Chapter 5. Application Plans of R&D Results.....   | 32 |
| Section 1. Utilization of R&D .....  | 32 |
| Section 2. Expected Effects .....  | 32 |
| Chapter 6. References.....   | 34 |
| Appendix 1. Proof of Quantitative Performance.....   | 35 |
| Appendix 2. Proof of human resources training.....   | 59 |



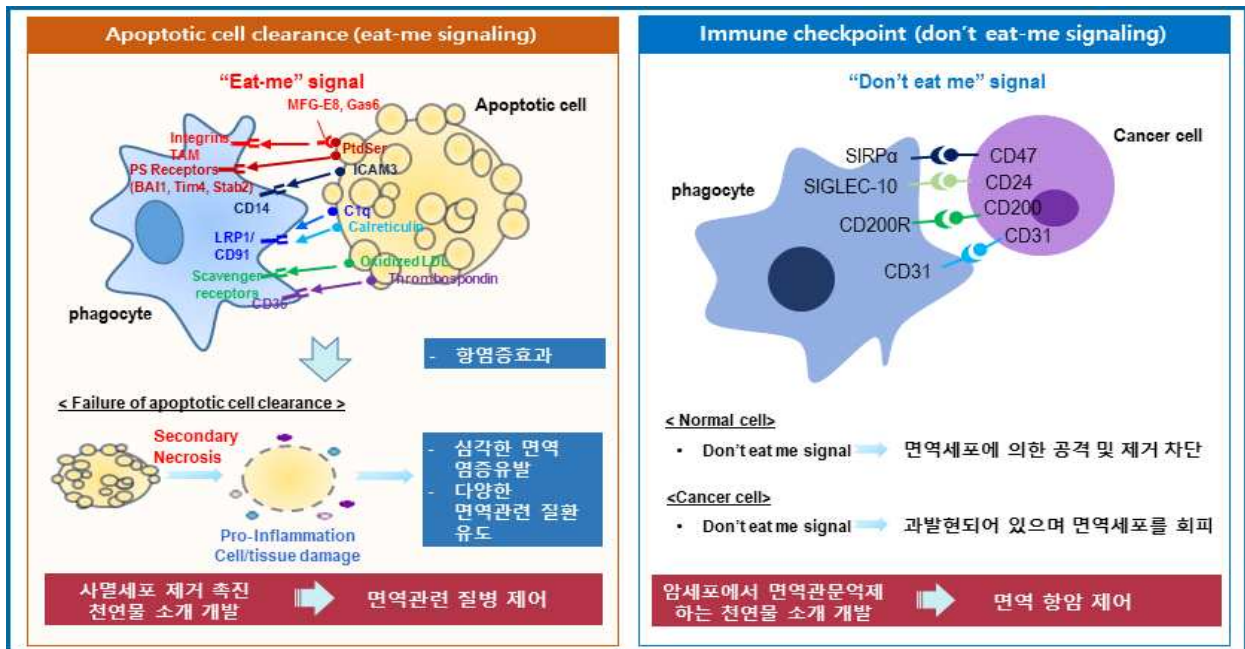
# 목 차

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| 요약문 .....                         | 2  |
| 목차 .....                          | 8  |
| 제 1 장 서론 .....                    | 9  |
| 제 1 절. 연구개발의 필요성 .....            | 9  |
| 제 2 절. 연구개발의 중요성 .....            | 10 |
| 제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....           | 12 |
| 제 1 절. 국내외 연구동향 및 기존연구의 문제점 ..... | 12 |
| 제 2 절. 관련 연구동향 및 독창성(창의성) .....   | 13 |
| 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....        | 15 |
| 제 1 절. 연구개발 내용 .....              | 15 |
| 제 2 절. 연구개발 결과 .....              | 17 |
| 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 .....    | 29 |
| 제 1 절 연구목표 달성도 .....              | 29 |
| 제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....          | 32 |
| 제 1 절. 활용방안 .....                 | 32 |
| 제 2 절. 기대효과 .....                 | 32 |
| ·                                 |    |
| 제 6 장 참고문헌 .....                  | 34 |
| 붙임 1. 정량적성과 증빙자료 .....            | 35 |
| 붙임 2. 인력양성 증빙자료 .....             | 59 |

# 제 1 장 서론

## 제 1 절. 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 개요: 극지 생물자원 유래물질을 활용한 차세대 개념 (apoptotic cell clearance (eat-me signaling) and immune checkpoint (don't eat me signaling))의 통합 면역시스템 조절을 통한 면역 제어 물질 개발



- **Apoptotic cell clearance (eat-me signaling)** : 정상적인 발생과정, 노화, 바이러스나 미생물에 의한 감염, 대사성 질병, 상처에 의해 유도된 사멸세포 (apoptotic cell : eat-me signal (phosphatidylserine) 노출)를 면역세포가 eat-me signal receptors (BAI1, TIM4, stabilin-2)를 통해 면역염증반응 없이 제거하기(항염증 반응 유도) 위한 과정임. 효과적이고 신속하게 apoptotic cell clearance가 이루어지지 않는 사멸세포들은 secondary necrosis로 진행되어 심각한 면역염증반응을 유발하게 되고 다양한 면역관련 질병(자가면역질환(전신성 홍반 루프스, 류마티스 관절염), 천식, 만성 폐쇄성 폐질환, 염증성 장 질환)을 유도하게 됨(Poon IK. 2014; Elliott MR. 2010) 따라서, 사멸세포 제거를 촉진할 수 있는 천연물 소재 개발은 면역계 전체 항염증 반응을 유도 (systemic immune regulation) 함으로써 다양한 면역관련 질병을 제어 할 수 있음.
- **Immune checkpoint (don't eat me signaling)** : 노화, 바이러스나 미생물에 의한 감염, 대사성 질병, 상처에 의해 유도된 사멸세포 (apoptotic cell : eat-me signal (phosphatidylserine) 노출)는 면역세포가 제거하지만, 정상세포는 don't eat me signal (CD47, CD24, CD200)을 노출하여 면역세포 (don't eat me receptor : SIRPα, SIGLEC-10,

CD200R)가 공격/제거 하지 못하게 하는 기전임. **면역계 전체 면역 제어에 기여하며 (systemic immune regulation)**, 특히, 암세포에서 don't eat me signal (CD47, CD24, CD200)이 과발현 되어 있어, 면역세포가 암세포를 제거하지 못하게 하는 것으로 알려져 있음(Coondoo A et al. 2023). 따라서, 암세포에서 don't eat me signaling을 억제할 수 있는 천연물 소재 개발을 통해 면역 항암제 개발에 이용할 수 있음

## 제 2 절. 연구개발의 중요성

### 1. 경제·산업적 측면

#### ○ 차세대 개념의 면역조절 기능성 물질 연구의 가치

- 면역 관련 질환은 개인적인 면역 관련 질환 환자의 치료 부담뿐 아니라 사회적인 비용과 노력까지 커지고 있는 실정임(Jacobs P et al. 2011). 따라서, 면역 관련 질환 환자의 삶의 질적 향상 뿐만 아니라 사회경제적인 측면에서도 질환의 발병 원인을 밝혀내고 새로운 치료법 개발연구가 절실히 요구됨
- 면역 조절 치료제로써, 타크로리무스(면역 억제제)는 연간 1조 4천억원, 사이클로스포린(면역 억제제)는 1조원, 메토틀렉세이트(항암제, 면역 억제제)는 연간 약 4천억원의 매출을 올리는 약물임.
- 해외의 극지 미답지 개척 연구를 통한 신약개발 연구를 범국가적인 차원에서 막대한 예산을 투자하고 있는 바, 우리나라도 국가적인 생명자원 확보를 통한 생명 안보 확립차원에서 세포독성이 낮고 저렴한 생물소재 기반 면역조절제 개발 및 대량 생산 시스템 확립이 필요함
- 극지 생물에서 유래한 천연물로부터 차세대 면역시스템 조절 선도 물질 발굴을 통해, 면역시스템 및 면역 관련 질병[암, 자가면역질환(류머티즘성 관절염, 스콜리오시스, 관절염), 염증성 장질환(궤양성 대장염, 크론병)] 등을 제어할 수 있는 원천기술 확보 및 그 유용성 검증을 통해 차세대 개념의 면역조절 천연물 의약품 개발을 위한 선도물질 발굴의 토대 마련
- 연평균 18.3%씩 성장하여 2025년 대략 273억 달러까지 성장할 것으로 예상되는 전세계 천연물 의약품 시장에서 본 과제 수행 결과 도출물 또한 상당한 경제 효과가 발생할 것으로 기대됨
- 미래 핵심기술 중 하나인 합성생물학을 적용하여 차세대 개념 의약품의 대량생산 및 기술이전까지 이어진다면 고부가가치 산업창출로 상당한 경제효과가 발생할 것으로 기대됨

### 2. 학문적/기술적 측면

○ 기존의 면역 치료제와 다른 차세대 면역조절 치료제의 새로운 방향성 제시

- 면역은 COVID-19 유발 바이러스 등으로부터 인체를 보호하는 방어시스템이지만, 여러 요인으로 인해 면역기능 이상을 유발하여 면역 관련 질환[암, 자가면역질환(류머티즘성 관절염), 염증성 장 질환(궤양성 대장염, 크론병)]을 초래하고 있음. 이런 질환들은 면역 조절제로 제어하고 있지만, 현재 면역조절제로 사용되고 있는 물질들은 높은 비용 부담과 장기 투여에 대한 부작용이 발생하고 있음(싸이토카인, 스테로이드 등). 미개발 극지방에서 유래한 생물체들에서 유래한 대사체의 면역조절제 기능성 연구는 본 연구팀이 최초로 입증하게 될 것임(Sarzi-Puttini P et al. 2020). 따라서 eat-me signal 및 don't eat-me signal을 타겟하여 전체 면역시스템을 조절함으로써 면역강화/면역억제 기능을 가지는 차세대 면역조절 치료제의 새로운 방향성을 제시할 것으로 기대됨

○ 마우스 모델(loss-of-function (knockout mice), gain-of-function (transgenic mice))들을 사용하여 in vivo에서의 차세대 면역조절 물질 기능성 증명

- 위에 언급된 차세대 면역제어 물질로서의 가능성을 증명하기 위해 본 연구단은 세포수준에서의 검증뿐만 아니라 형질전환 마우스를 이용하여, 극지방 생물 유래 대사체의 apoptotic cell clearance와 Immune checkpoint inhibitor로서 기능을 in vivo 수준에서 검증하여 차세대 면역조절물질로서 생체 내에서 실질적으로 적용될 수 있음을 증명할 수 있으며 의약품으로 개발 가능성을 기대함

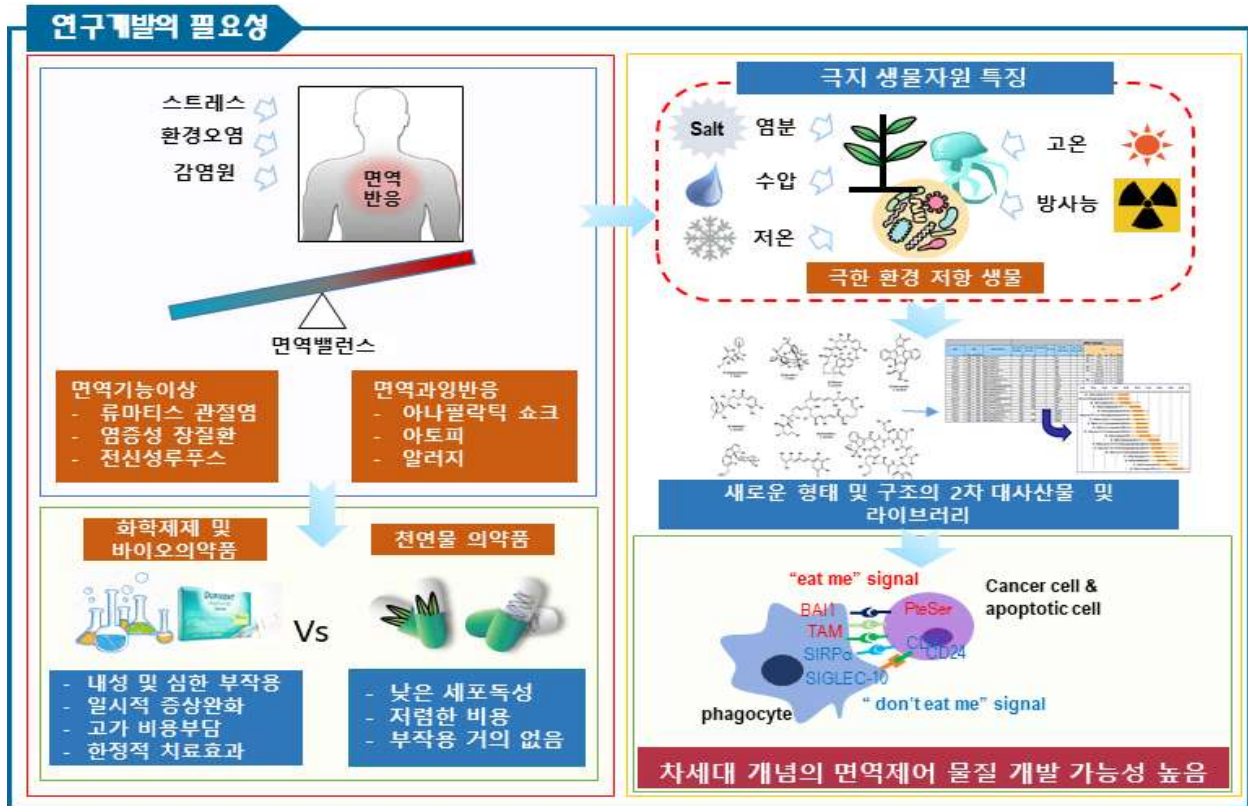
○ 극지방 생물 유래 대사체에서 사멸세포 제거 및 면역관문 억제 기반 면역조절제 개발 플랫폼 제시

- 극지환경 생물은 높은 염분, 저온, 고온, 오염물질 등의 특수한 환경에서 진화를 거듭해 오며 생존을 위해 타 지역 생물들과는 다른 형태와 구조의 유용물질들을 만드는 것으로 생각되며, 이는 지금까지 개발된 의약품과는 다른 구조와 성질을 가지고 있어 신규 의약품 개발 가능성이 높음. 따라서, 이를 이용한 apoptotic cell clearance 혹은 immune checkpoint inhibitor 매개 전체 면역 시스템을 조절할 수 있는 새로운 면역조절제 개발 기반 제공 및 개발 플랫폼을 제시할 것임

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절. 국내·외 연구동향 및 기존연구의 문제점

- 북극해 주변 유럽연합에서는 남극과 북극을 포함한 해양에서 새로운 항생제 및 신약 후보 물질을 발굴하는 대형 프로젝트인 “PharmaSea (2012.10.01.~2016.09.30.), <http://www.pharma-sea.eu/>” 연구 과제를 수행하여 13개국에서 24개의 기업 및 연구기관 참여, 4년간 950만 유로 이상의 투자를 하였음. 그 외에도 다양한 의약후보 물질 탐색 후속 과제 (SeaBiotech, BlueGenics, Micro B3 과제)를 지원하고 있음.
- 해양과학기술원에서는 기관고유 사업으로 “해양생물 기반 생리활성 화합물의 확보와 응용·평가 기술 개발” 연구사업 추진, 해양과학기술원 해수부 R&D 사업 “해양단백질 기반 바이오메디컬 소재 개발” 연구 추진 중에 있음.
- 전 세계적으로 감염병인 COVID-19의 확산으로 면역 활성 조절제에 대한 연구가 요구되고 있으며, 식물 대사체의 유용성 연구를 통한 면역조절 물질 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있음. 하지만, 현재 면역조절제로 사용되고 있는 물질들은 높은 비용부담과 장기 투여에 대한 부작용이 발생하고 있다(싸이토카인, 스테로이드). 따라서 세포독성이 낮고 저렴한 면역조절제 개발이 필요하며, 국제적으로도 합성제체에 따른 부작용을 줄이기 위해 식물 대사체를 이용한 천연물 소재 면역조절 약제 개발이 활발히 이루어지고 있으나, 기존의 임상적 유용성이 입증된 원료를 기반으로 한 천연물 의약품 개발이 주를 이루고 있음.
- 통합된 전체 면역시스템 조절을 위한 차세대 개념의 면역 조절기전으로서 사멸세포 제거 (apoptotic cell clearance-eat me signaling) 및 면역 관문 (immune checkpoint-don't eat me signaling) 제어에 대한 연구를 통해 면역 관련 질병 치료와 그 기전에 대한 국내 연구는 아직 초기단계에 불과한 실정이다 [사멸세포 제거 관련 국내 연구진은 3그룹 정도임].
- 따라서, 기존 천연물 library가 아닌 독특한 극지 생물자원의 천연물을 이용하여 차세대 개념의 면역 세포 활성을 조절 [사멸세포 제거 (apoptotic cell clearance)활성 조절, 면역 관문 (immune checkpoint) 제어] 할 수 있는 물질 탐색을 통해 선도적인 면역 제어 물질 발굴이 필요하다.



## 제 2 절. 관련 연구동향 및 독창성(창의성)

- 광주과학기술원 박대호 교수팀(세포제거 연구실)은 eat-me signal 수용체 중 하나인 Tim-4의 식세포내 자가사멸세포 인지 신호체계 및 사멸세포 제거 매개 면역제어 기전연구를 통해 atherosclerosis 치료제 개발 연구를 진행 중에 있다 (Park D et al. 2011; Park D et al. 2009).
- 미국 버지니아 대학 Kodi S. Ravichandran 교수 연구팀은 식세포의 eat-me signal 수용체인 BAI1이 apoptotic cell과 상호작용을 통해 콜레스테롤 수송체인 ABCA1을 증가시킴을 발견하였고, 이러한 eat-me signaling을 통한 염증제어가 심혈관 질환과 중요한 관련이 있다고 보고하였다 (Fond AM et al. 2015;
- 한국과학기술연구원(KIST)의 테라그노시스 연구단 김인산 박사와 경북대 화학공학과 이은정 교수팀은 don't eat me signal인 CD47의 수용체 SIRPα가 발현된 나노입자를 개발하였다(Koh E et al. 2017).
- 기존 면역조절제 연구는 타겟 단백질 기반 물질 탐색 (target based screening)을 통해, 한가지 단백질을 타겟으로 binding 기반 screening을 진행함으로써 스크리닝의 비효율성

(사용한 라이브러리 대비, hit 비율 저조)과 스크리닝 후에도 hit 물질에 대한 기능 불확실성이 강하며, 또한 기존 면역조절제는 고비용을 부담하는 약물이 대부분으로 알려져 있다.

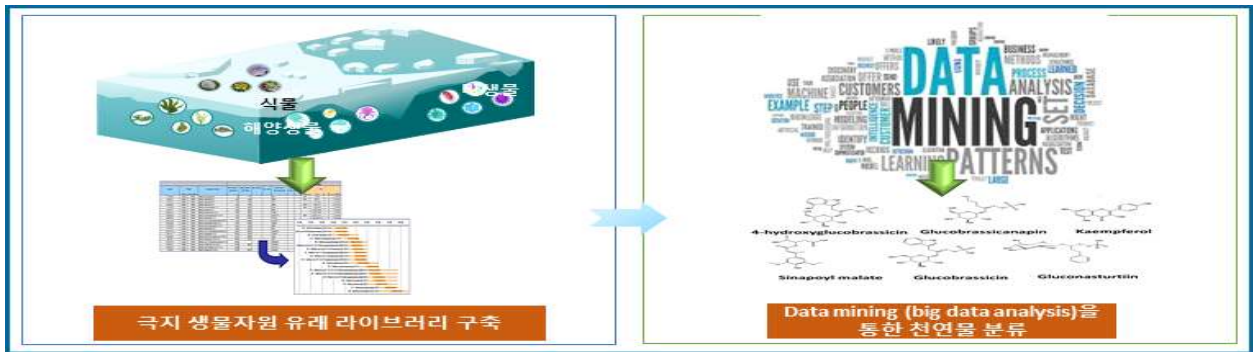
- 본 연구팀은 Functional/systemic control based screening을 통해 세계적으로 쉽게 확보할 수 없는 극지 환경에서 유래한 천연물 기반 물질을 활용하여, 기존과제들에서 일반적으로 제시하는 단일 표적이 아닌 면역제어 기능을 기반(functional screening)으로 한 전체 면역 시스템 제어가 가능한 스크리닝 (systemic control based screening : 면역계 전체 면역 제어에 기여하는 eat me/don't eat me signaling 조절을 통한 면역계 전체 면역 제어 스크리닝) 방법이다. 또한, 기존의 질병 특이적 치료제와 접목하여 면역 관련 질환의 치료를 획기적으로 향상시키는 선도적/통합적/융합형 기술이다.
- 현재 국내·외에서 통합된 전체 면역시스템 조절을 위해 사멸세포 제거 (apoptotic cell clearance-eat me signaling) 조절 및 면역관문 (immune checkpoint-don't eat me signaling) 제어를 통한 천연물 소재 이용 면역제어 기술개발에 대한 연구/개발 사례는 전무한 상황이다.



# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

## 제 1절. 연구개발 내용

### 1. 극지생물 유래 라이브러리 구축 및 물질 Data mining



- 극지연구소의 선행연구를 통해 분리/동정한 천연물 정보 및 물질을 획득하여 천연물 library 구축  
 : 극지연구소와 공동연구를 통한 극지생물자원 뿐만 아니라, “국립해양생물자원관”에서 분양 받은 해양생물자원을 이용한 다양한 생물유래 물질 library를 확보함.
- 천연물들의 data mining을 통해 기존 면역조절 관련성 검증 및 분류

### 2. High-throughput microplate reader/FACS screening (HTMFS) 방법을 이용한 극지생물 유래 대사물질 활용 면역제어 물질 스크리닝



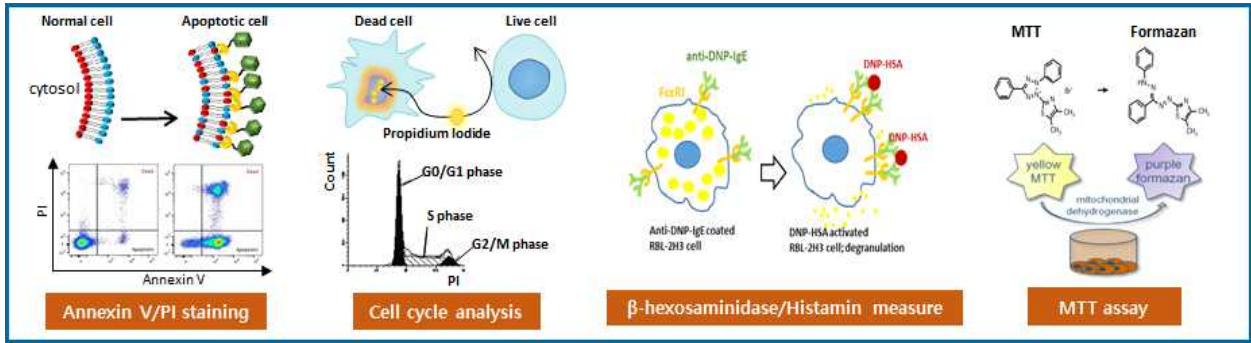
- Data mining을 통해 1차적으로 분류한 유효물질들을 사멸세포 제거 활성 조절/면역관문 제어 물질로써의 기능성 검증을 통해 면역조절 물질을 스크리닝함  
 : 기존의 면역세포 활성 조절 방법을 벗어나, 새로운 개념의 사멸세포제거 (apoptotic cell clearance)기전 조절을 통한 면역제어 물질 탐색 및 발굴  
 : 차세대 항암치료제로 적용되고 있는 macrophage 기반 면역관문 억제제의 개념을 도입하



여 새로운 면역항암 Hit 물질 탐색 및 발굴

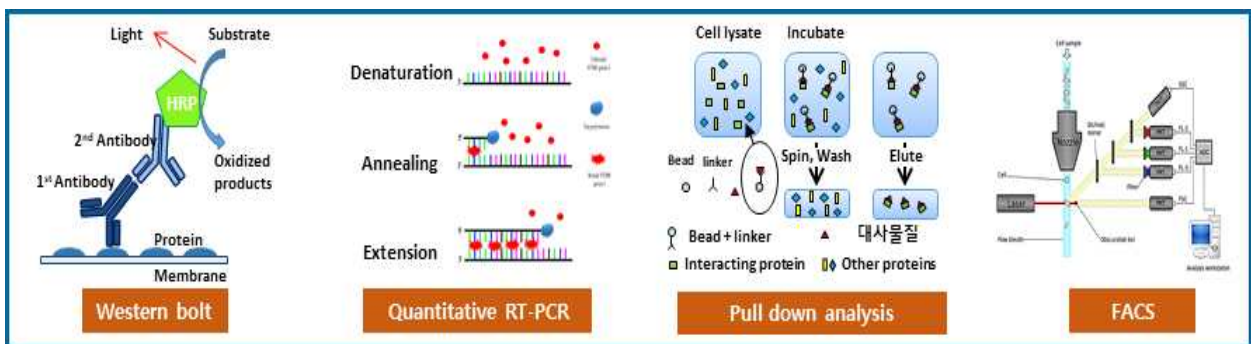
- 새로운 개념의 기전 조사뿐만 아니라 본 연구실에 확립되어 있는 면역 조절 관련 cell-based 분석법 (NO/ROS assay)을 이용하여 유효물질들의 면역 조절 가능성을 추가적으로 스크리닝 함.

3. 극지생물자원 유래 물질을 이용한 면역제어 기능 추가 스크리닝 및 독성 평가



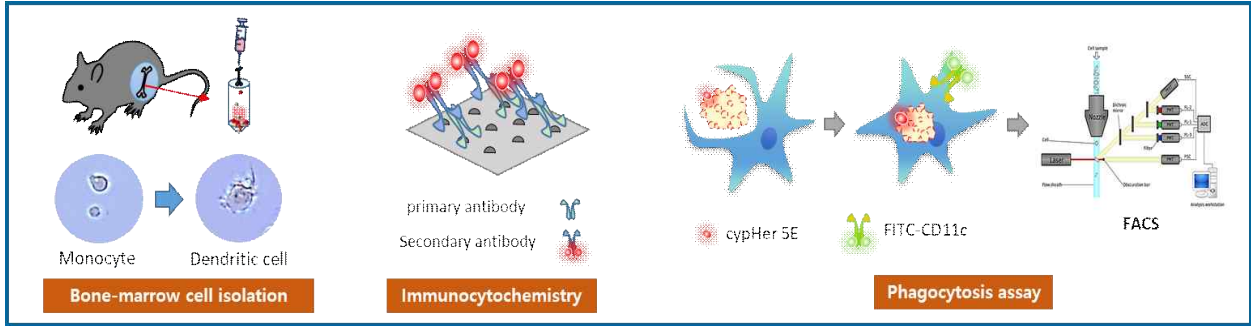
- “극지연구소 이\*\*박사님, 윤\*\* 박사님과의 공동연구를 통한 극지생물자원”을 이용하여 면역제어 관련된 포괄적인 스크리닝(항알러지 등)을 진행함
  - : 면역제어물질들의 다양한 암세포에서의 면역항암효과를 확인함 (Immunogenic cell death, apoptosis (Annexin V/PI staining) assay, cell cycle assay)
  - : 면역제어물질들의 mast cell에서 항알러지 효과를 확인함 ( $\beta$ -hexosaminidase/Histamin measure)
- 스크리닝을 통해 확보된 다수의 면역제어 유효물질의 독성평가를 위해 세포수준에서 MTT assay를 통해 세포독성을 확인함

4. 사멸세포 제거/면역관문 조절 기반 면역제어 유효물질의 세포수준에서의 기능성 검증



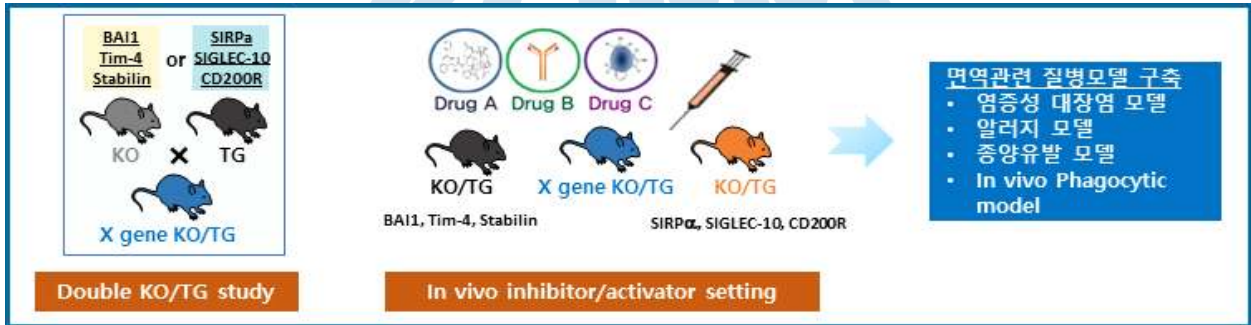
- 면역제어 유효물질로 확보된 대사물질의 세포수준에서 기능성을 확인하기 위해 다양한 검증시스템 (Western Blot, Pull down analysis, qRT-PCR, FACS)를 활용하여 면역제어 기능성을 확인

5. 극지생물자원 유래 면역제어 유효물질의 세포수준에서의 추가 기능성 검증



- 극지생물자원 유래 면역제어 유효물질의 세포수준에서 추가 기능성을 확인하기 위해 다양한 검증시스템을 활용하여 면역조절 기능성 (mechanism) 연구
  - : 스크리닝을 통해 확인된 면역제어 유효물질들의 세부적인 기능성(detail mechanism)을 검증하기 위해, mast 세포주를 이용하여 세포수준에서의 기능성을 확인
  - : 추가 스크리닝으로 선정한 면역제어 유효물질의 기능성 검증을 위해, mouse의 bone-marrow dendritic cell을 이용하여 세포수준에서의 기능성을 확인.

6. in vivo system 동물 모델 구축



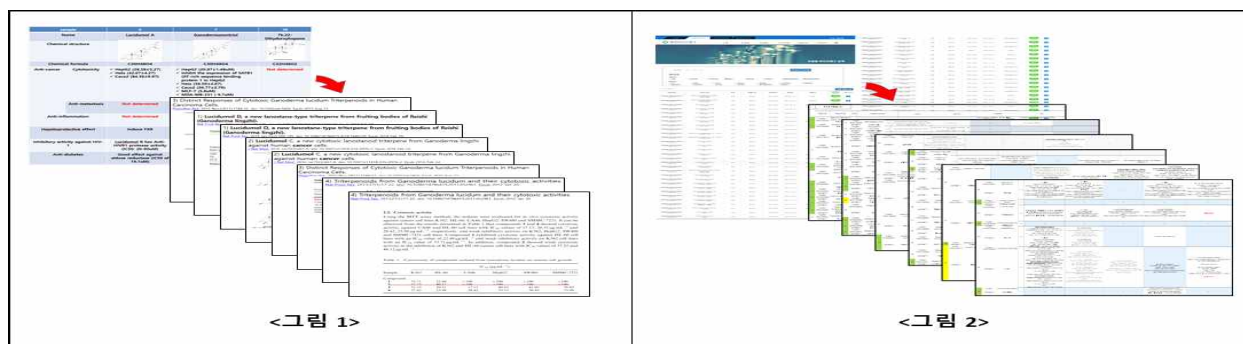
- in vivo assay 시스템 및 질병모델을 구축하여 세포수준 모델에서 검증된 면역조절 유효물질들을 기능성을 검증함.
  - : 염증성 대장염 모델 (DSS-induced colitis model), 알러지 유발 모델 (DNFB-induced allergy model), 종양유발 모델, ex vivo phagocytic model 구축

제 2 절. 연구개발 결과

1. 극지생물자원 유래 물질 라이브러리 스크리닝

- Library 확보 및 data mining
  - : data mining을 통하여 “극지연구소” 및 “국립해양생물자원관”에서 분양받은 천연물들의 구조분석/기능정리 및 library 확보

: 확보된 library를 이용하여 1차적으로 면역조절 유효 물질을 선별 및 분류함.

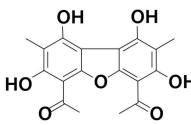
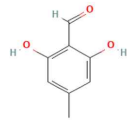
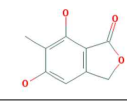
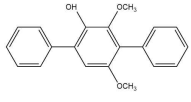
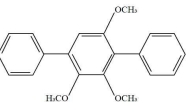
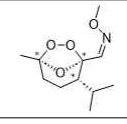
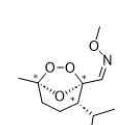


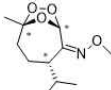
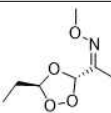
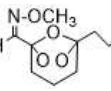
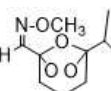
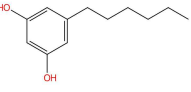
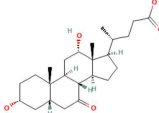
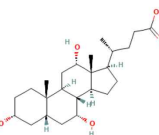
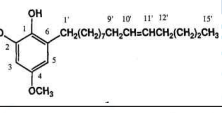
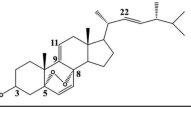
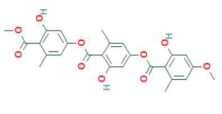
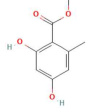
: library 대한 메타데이터 확보 및 Hit 물질 선별

| 추출물 |            |                             |               |     |
|-----|------------|-----------------------------|---------------|-----|
| No  | 물질명        | 종                           | 활성            | 생산자 |
| 1   | An-L4      | Pseudephebe pubescens       | 면역제어          | 윤의중 |
| 2   | An-L6      | Cladonia borealis           | ICD           |     |
| 3   | An-L7      | Cetraria aculeata           | ICD, 면역제어, 항암 |     |
| 4   | An-L9      | Collema sp.                 | 면역제어          |     |
| 5   | An-L10     | Lecania brialmontii         | 항암, 면역제어      |     |
| 6   | An-PL1     | Deschampsia antarctica      | 항암, 면역제어, 알리지 |     |
| 7   | An-PL2     | Colobanthus quitensis       | 항암, 면역제어, 알리지 |     |
| 8   | An-PL2-GH  | Colobanthus quitensis(온실)   | 항암, 면역제어      |     |
| 9   | An-PL2-GHS | Colobanthus quitensis(온실씨앗) | 항알리지, 면역제어    |     |
| 10  | An-Ag4     | Desmarestia antarctica      | 항알리지          |     |
| 11  | An-Ag5     | Palmaria decipiens          | 항알리지, 면역제어    |     |
| 12  | An-Ms1     | Warnstorfia fontinaliopsis  | 항염증, 면역제어     |     |
| 13  | An-Ms2     | Sanionia uncinata           | 항염증, 면역제어     |     |
| 14  | An-Ms3y    | Syntrichia filaris          | 항염증, 면역제어     |     |
| 15  | An-Ms4     | Chorisodontium aciphyllum   | 항염증           |     |
| 16  | An-Ms5     | Ceratodon purpureus         | 항염증, 면역제어     |     |
| 17  | An-Ms6     | Andreaea depressinervis     | 항염증, 항알리지     |     |
| 18  | An-Ms7     | Polytrichum strictum        | 항염증           |     |
| 19  | An-Ms9     | Ditrichum hyalinocuspdatum  | 항염증, 면역제어     |     |
| 20  | An-Ms10    | Syntrichia saxicola         | 항염증           |     |
| 21  | An-Ms11    | Andreaea regularis          | 항알리지          |     |
| 22  | An-Ms12    | Bartramia patens            | 항암            |     |
| 23  | An-Ms13    | Syntrichia magellanica      | 항알리지, 면역제어    |     |
| 24  | An-Ms16    | Bryum argenteum             | 항알리지, 면역제어    |     |
| 25  | An-Ms17    | Bryum pseudotriquetrum      | 항알리지, 면역제어    |     |

|    |         |                      |                    |
|----|---------|----------------------|--------------------|
| 26 | An-Ms18 | Pohlia cruda         | 항염증, 항알러지          |
| 27 | Unk1    | Cladonia fimbriata   | 항염증, 항알러지          |
| 28 | SAA     | Stereocaulon alpinum | 항암                 |
| 29 | SAAH    | Stereocaulon alpinum | 면역제어               |
| 30 | SAAE    | Stereocaulon alpinum | 항암                 |
| 31 | SAMH    | Stereocaulon alpinum | 항암                 |
| 32 | SAME    | Stereocaulon alpinum | 항암, ICD            |
| 33 | MushHH  | 국내버섯                 | 항암, ICD,           |
| 34 | MushHEA | 국내버섯                 | 항암, ICD            |
| 35 | LW2H    | 우산이끼(중동정 중)          | 항암, ICD, 면역제어      |
| 36 | LW2EA   | 우산이끼(중동정 중)          | 항암, ICD, 면역제어      |
| 37 | LW2B    | 우산이끼(중동정 중)          | 항염증, 항알러지,<br>면역제어 |
| 38 | LW3H    | 우산이끼(중동정 중)          | 항암, ICD            |
| 39 | LW3EA   | 우산이끼(중동정 중)          | 멜라닌합성 억제,<br>면역제어  |
| 40 | LW3B    | 우산이끼(중동정 중)          | 항암, ICD            |
| 41 | HE-Ace  | Haematomma erythroma | 항암, ICD            |

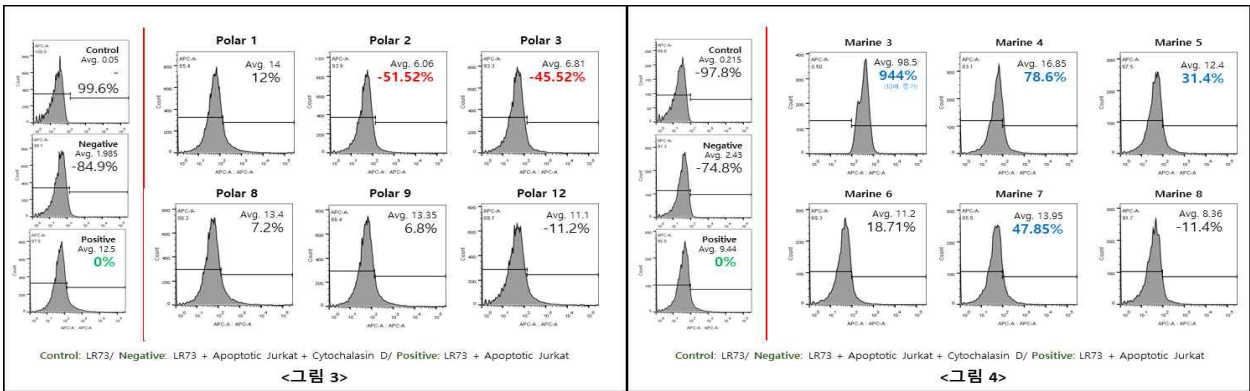
단일물질 (Hit 물질)

| No | 물질명   | 물질구조  | 분자량 | 활성                | 생산자 |
|----|---|---|-----|-------------------|-----|
| 1  | 1,3,7,9-tetrahydroxy-2,8-dimethyl-4,6-di(ethanoyl)dibenzofuran                      |  | 344 | 항암, 면역제어          | 윤의중 |
| 2  | Atranol   |  | 152 | 멜라닌합성 억제          |     |
| 3  | 5,7-dihydroxy-6-methyl-1(3H)-isobenzofuranone                                       |  | 180 | 멜라닌합성 억제          |     |
| 4  | 2,6-dimethoxy-5-hydroxy-p-terphenyl   |  | 306 | 멜라닌합성 억제          |     |
| 5  | 2,5,6-trimethoxy-p-terphenyl  |  | 320 | 항염증,<br>멜라닌합성 억제  |     |
| 6  | 2-isopropyl-5-methyl-6,7,8-trioxabicyclo[3,2,1]octane-1-carbaldehyde-o-methyl oxime |  | 229 | 멜라닌합성 억제,<br>면역제어 |     |
| 7  | 2-isopropyl-5-methyl-6,7,8-trioxabicyclo[3,2,1]octane-1-carbaldehyde-o-methyl oxime |  | 229 | 항염증,<br>면역제어      |     |

|    |   |   |     |               |  |
|----|---|---|-----|---------------|--|
| 8  | 2-isopropyl-5-methyl-6,7,8-trioxabicyclo[3,2,1]octane-1-carbaldehyde-o-methyl oxime |    | 229 | 항암            |  |
| 9  | (Z)-1-((3S,5S)-5-ethyl-1,2,4-trioxolan-3yl)ethan-1-one O-methyl oxime               |    | 175 | 항염증           |  |
| 10 | (E)-5-propyl-6,7,8-trioxabicyclo[3.2.1]octane-1-carbaldehyde O-methyl oxime         |    | 215 | 항염증           |  |
| 11 | (E)-5-isopropyl-6,7,8-trioxabicyclo[3.2.1]octane-1-carbaldehyde O-methyl oxime      |    | 215 | 면역제어          |  |
| 12 | 5-hexyl-1,3-benzenediol   |    | 194 | 항염증, 멜라닌합성 억제 |  |
| 16 | 7-ketodeoxycholic acid  |    | 406 | 멜라닌합성 유도      |  |
| 17 | cholic acid   |   | 408 | 멜라닌합성 유도      |  |
| 18 | belamcandol A   |  | 362 | 멜라닌합성 억제      |  |
| 19 | 9,11-dehydroergosterol peroxide   |  | 426 | 항염증, 멜라닌합성 억제 |  |
| 20 | tenuiorin   |  | 496 | 항염증           |  |
| 21 | methyl orsellinate  |  | 182 | 멜라닌합성 유도      |  |

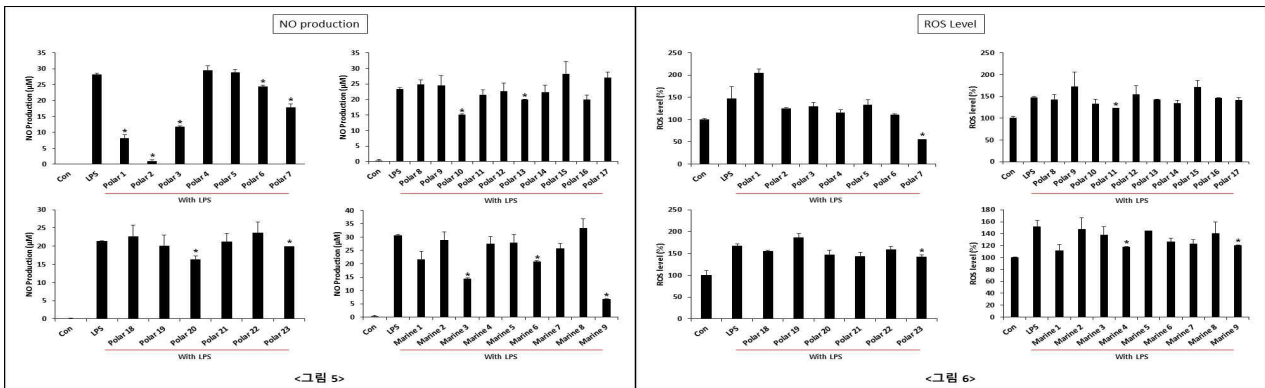
## 2. 면역제어 유효물질 선정

- High-throughput microplate reader/FACS screening (HTMFS) 방법을 이용한 극지생물 유래 대사물질 활용 면역제어 물질 스크리닝 (FACS analysis 활용)
  - : LR73 phagocyte에서 극지 sample 2,3의 사멸세포제거 활성이 약 50%이상 감소되는 경향을 보임 (그림 3) : 항암제 유효 물질
  - : LR73 phagocyte에서 해양추출물 3,4,5,7의 사멸세포 제거 활성이 상당량 증가하는 경향을 보임 (그림 4) : 항염증제 유효 물질



○ 본 연구실에 확립되어 있는 면역 제어 cell-based 스크리닝 방법을 이용하여 유효 물질들의 기능성을 검증함.

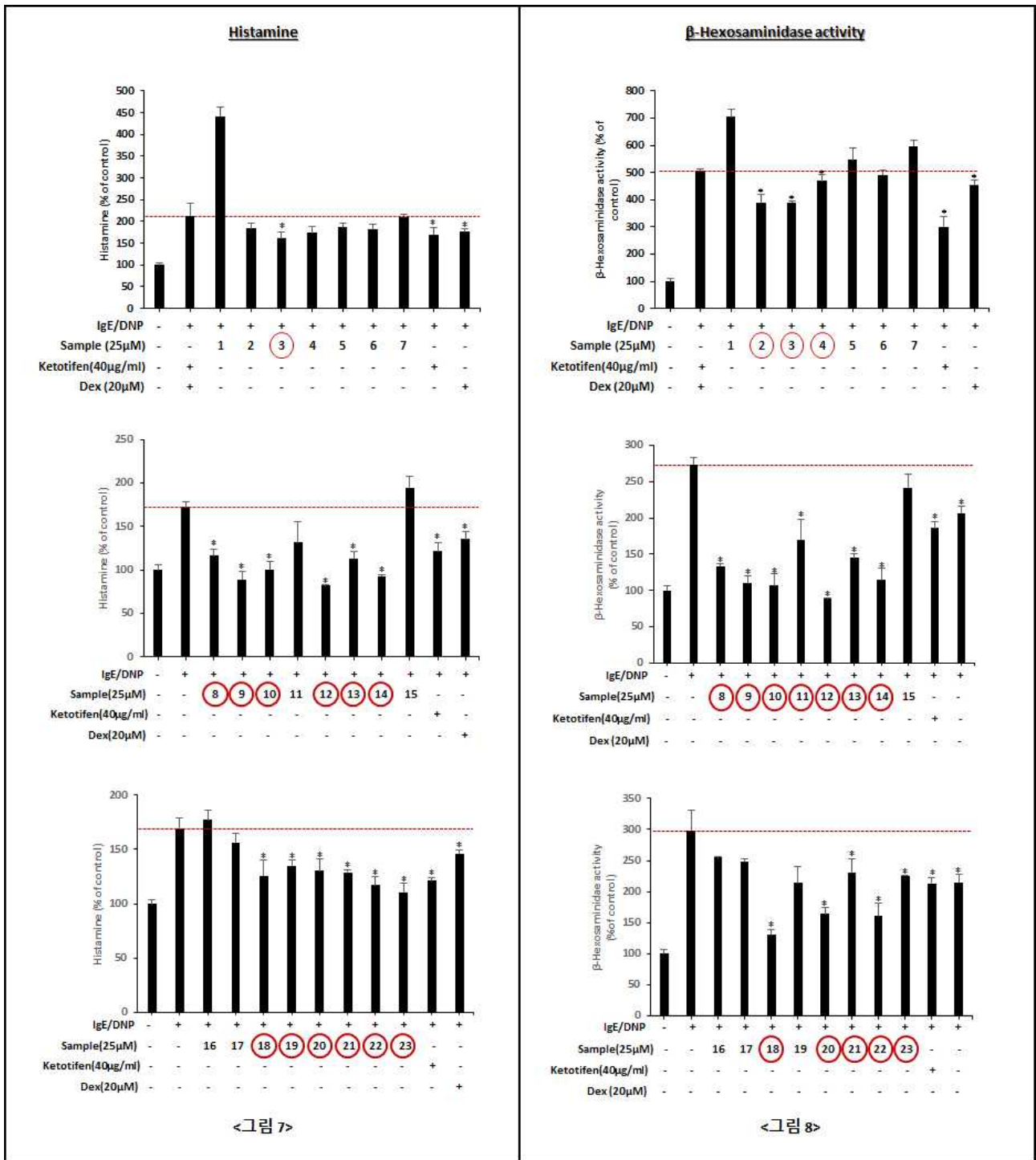
: 면역세포(RAW 264.7 macrophage)에서 유효물질들의 NO/ROS 생성조절을 Griess assay, DCF-DA로 검증함 (그림 5/6).



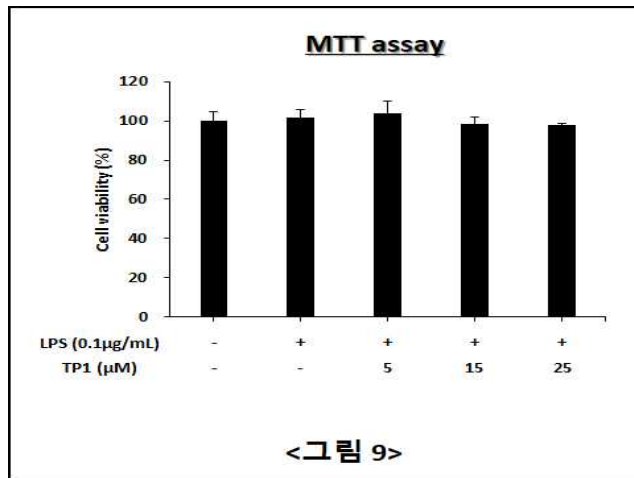
### 3. 극지생물자원 유래 물질 스크리닝 및 다양한 면역제어 기능성 물질 추가선정

○ 기존 1차년도에 분류한 “극지연구소 자원”을 이용하여 면역제어 관련 포괄적인 스크리닝을 진행함

: 1차년도에 분류된 유효물질들을 활용하여 Mast cell에서 Histamin 과  $\beta$ -hexosaminidase 측정을 통해 항알러지 효능을 확인함. <그림 7, 8>



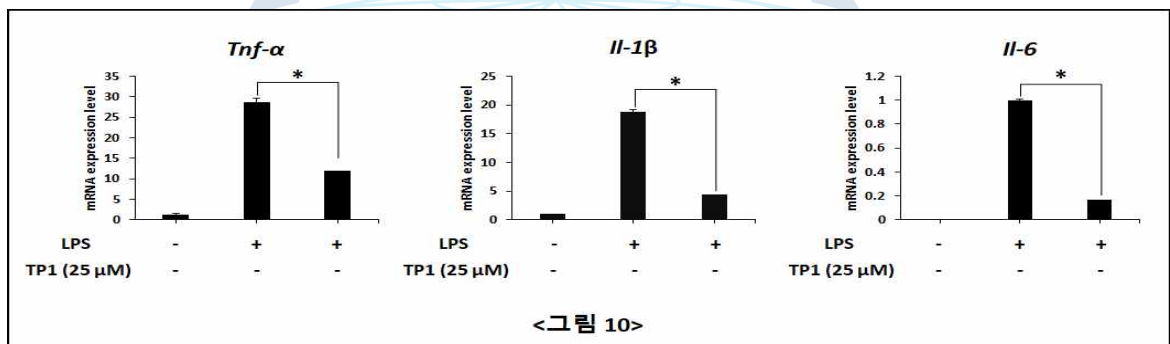
○ 1차년도에 스크리닝을 통해 확보된 면역제어 유효물질의 독성평가를 위해 면역세포(RAW 264.7 macrophage)에서 극지지의류(Antarctic lichen)인 *Stereocaulon alpinum*에서 유래된 2,5,6-trimethoxy-p-terphenyl (TP1)을 24h간 처리한 후 MTT assay를 통해 세포독성을 확인함. <그림 9>



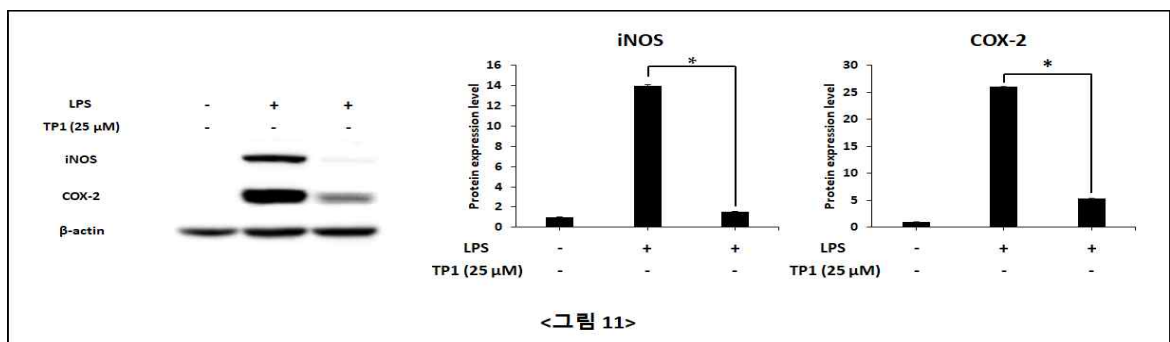
#### 4. 면역제어 유효물질의 세포수준에서의 기능성 검증

- 면역제어 유효물질의 세포수준에서 기능성을 확인하기 위해 다양한 검증시스템(Western Blot, qRT-PCR, FACS)를 활용하여 기능성을 검증함.

: 면역세포(RAW 264.7 macrophage)에서 극지지의류인 *Stereocaulon alpinum*에서 유래된 2,5,6-trimethoxy-p-terphenyl (TP1)의 pro-inflammatory cytokine (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6) mRNA level을 qRT-PCR로 검증함 <그림 10>

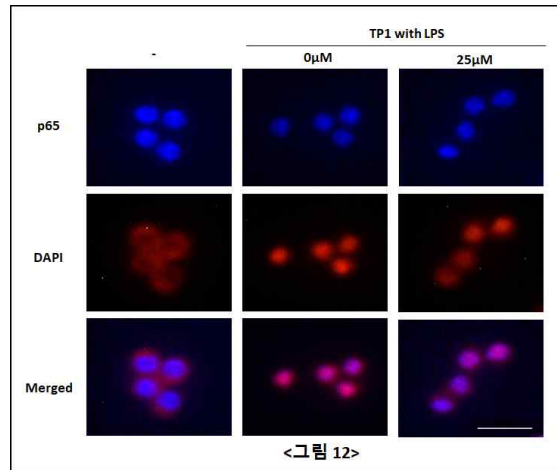


: 면역세포(RAW 264.7 macrophage)에서 극지지의류인 *Stereocaulon alpinum*에서 유래된 2,5,6-trimethoxy-p-terphenyl (TP1)의 pro-inflammatory enzymes (iNOS, COX-2)의 단백질 발현을 western blot을 통해 검증함 <그림 11>

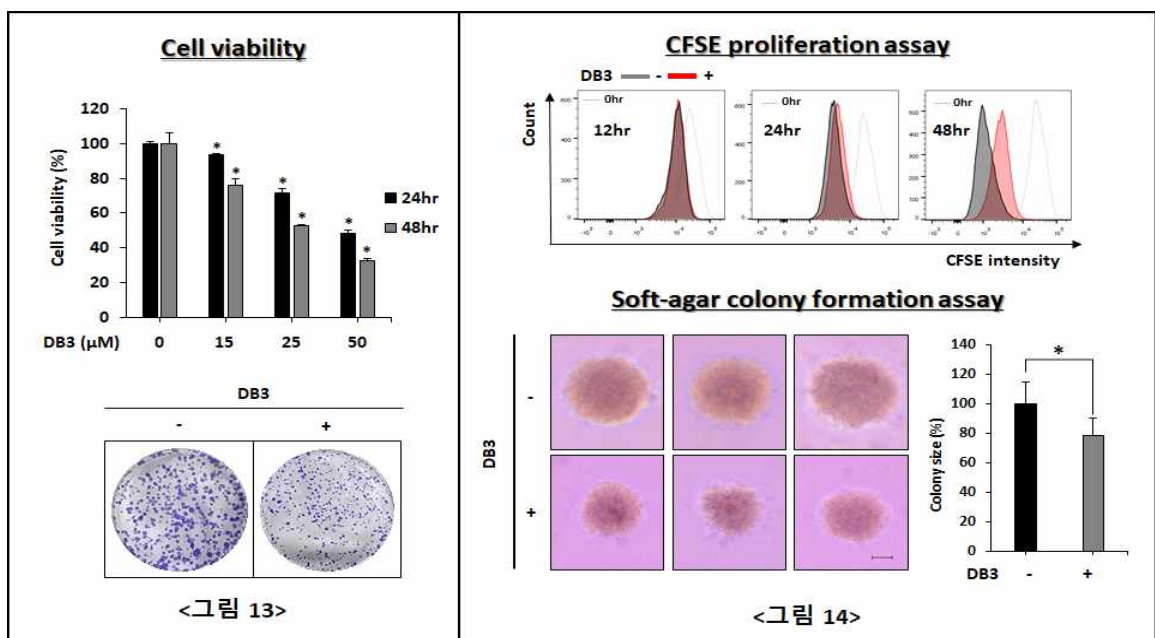




: 면역세포(RAW 264.7 macrophage)에서 극지지의류인 *Stereocaulon alpinum*에서 유래된 2,5,6-trimethoxy-p-terphenyl (TP1)의 pro-inflammatory enzymes(iNOS, COX-2) 및 pro-inflammatory cytokine (IL-1 $\beta$  및 IL-6)의 발현과 생산을 조절하는 것으로 알려진 NF- $\kappa$ B의 subunit인 p65의 핵으로의 translocation을 immunocytochemistry를 통해 검증함. <그림 12>

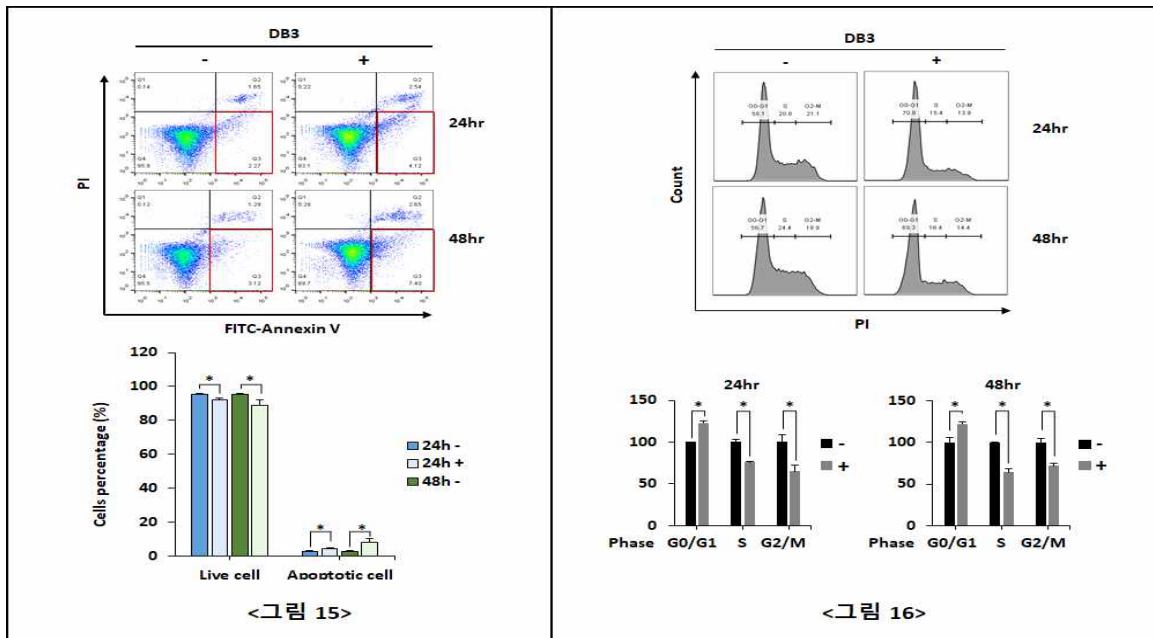


: 흑색종 암세포 (B16F10 cell)에서 극지지의류인 *Ramalina terebrata*에서 유래된 1,3,7,9-tetrahydroxy-2,8-dimethyl-4,6-di[ethanoyl]dibenzofuran (DB3)에 의한 Cell viability를 확인하기 위해 MTT assay 및 colony formation assay로 검증함.<그림13> 또한, DB3에 의한 암세포 증식 억제와 metastasis 변화를 CFSE proliferation assay와 soft-agar colony formation assay로 검증함 <그림 14>

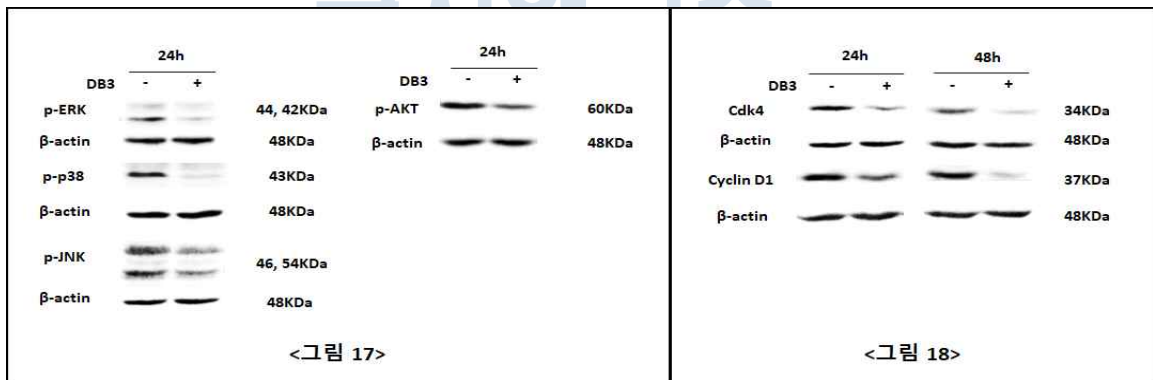


: 흑색종 암세포 (B16F10 cell)에서 극지지의류인 *Ramalina terebrata*에서 유래된 1,3,7,9-tetrahydroxy-2,8-dimethyl-4,6-di[ethanoyl]dibenzofuran (DB3)의 항암 효능을 평

가하기 위해 24, 48 시간 처리후 apoptosis (Annexin V/PI staining), cell cycle analysis assay로 검증함. <그림 15, 16>



: 흑색종 암세포 (B16F10 cell)에서 극지지의류인 *Ramalina terebrata*에서 유래된 1,3,7,9-tetrahydroxy-2,8-dimethyl-4,6-di[ethanoyl]dibenzofuran (DB3)에 의한 proliferation pathway와 관련된 protein 발현량의 변화 <그림 17> 및 cell cycle pathway 관련protein 발현량의 변화를 western blot analysis로 검증함. <그림 18>

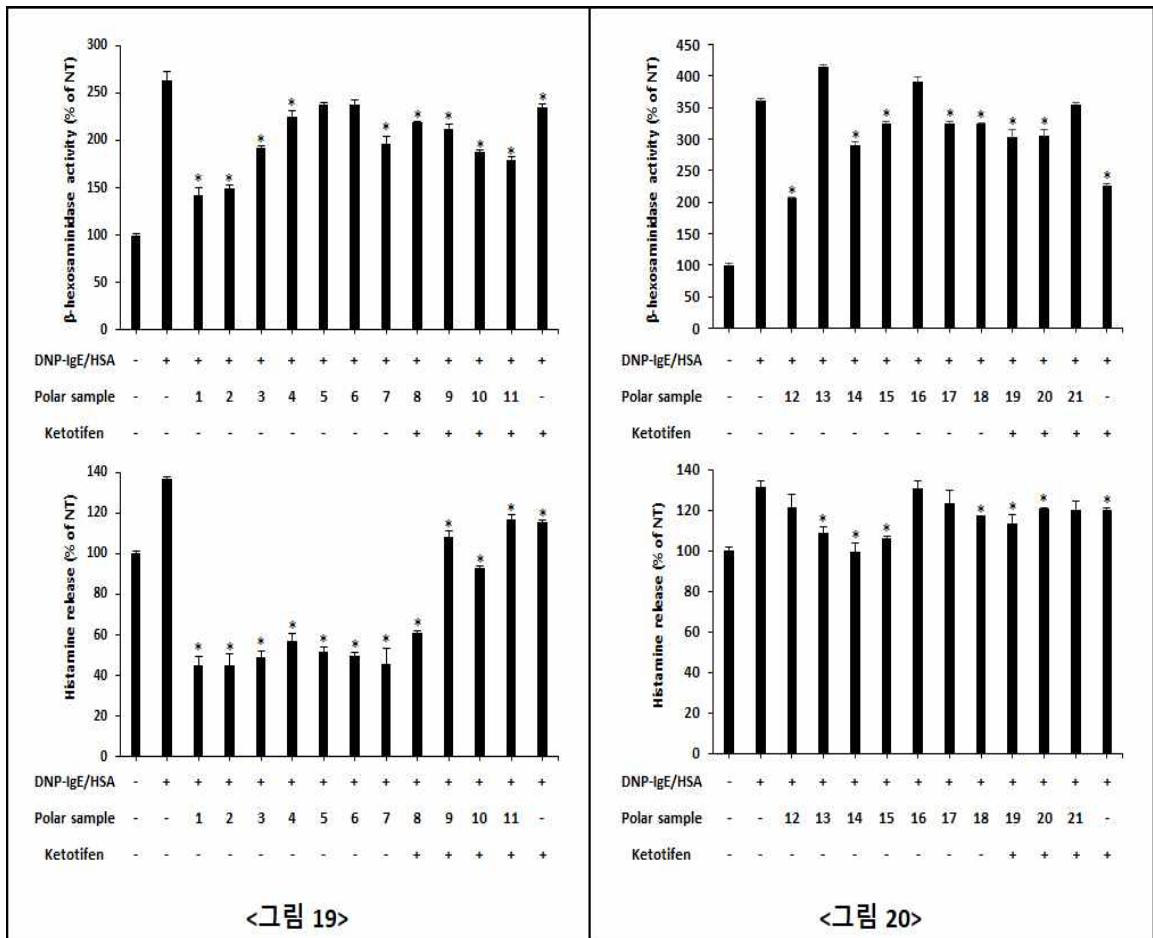


### 5. 극지생물자원 유래 면역제어 유효물질의 세포수준에서의 추가 기능성 검증

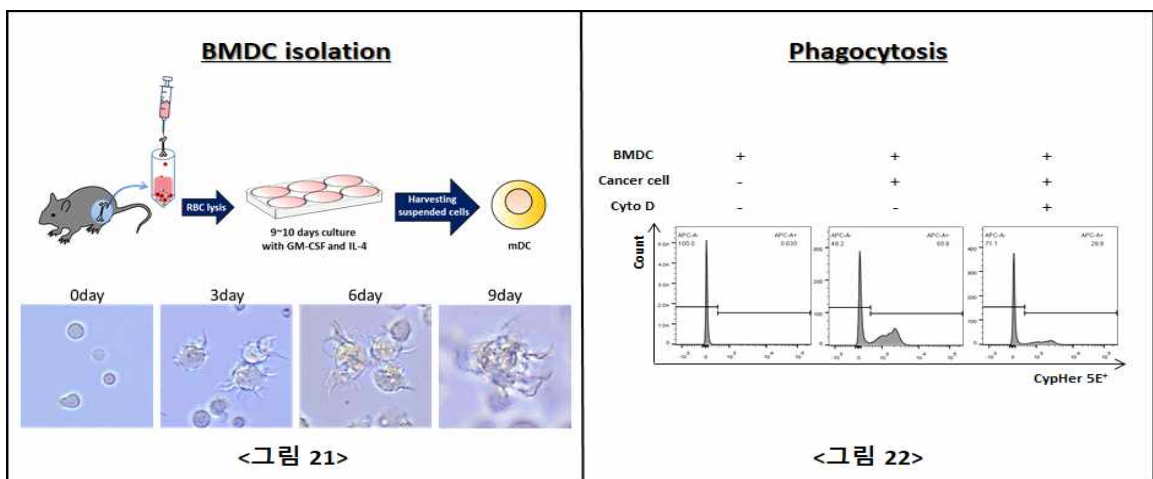
○ 극지생물자원 유래 면역제어 유효물질의 세포수준에서 추가 기능성을 확인하기 위해 다양한 검증시스템을 활용하여 면역조절 기능성 (mechanism) 연구

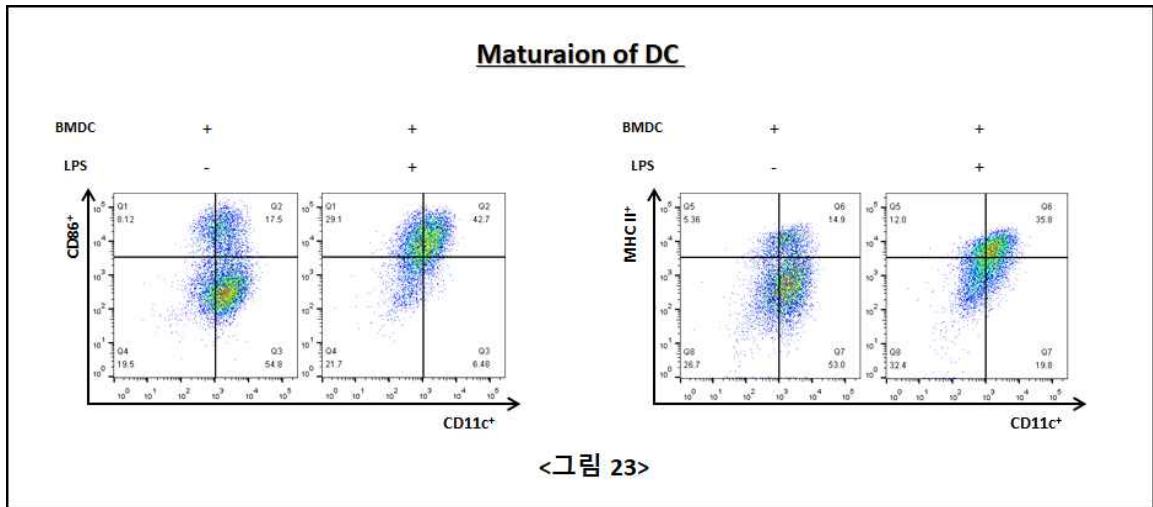
: 비만세포 (Mast cell)에서 극지조류 *Desmarestia antarctica*, *Palmaria decipiens* 및 극지지의류인 *Sanionia uncinata*, *Syntrichia filaris*, *Chorisodontium aciphyllum*, *Ceratodon purpureus*, *Andreaea depressinervis*, *Polytrichum strictum* 등의 추출물에서 β-hexosaminidase 및 Histamine 측정을 통해 항알러지 효능을 평가함 <그림 19>. 또한, 남

극 지의류 *Sphaerophorus globosus*, *Umbilicaria antarctica* 등에서 유래된 단일물질에서  $\beta$ -hexosaminidase 및 Histamine 측정을 통해 항알러지 효능을 평가함 <그림 20>



: 스크리닝을 통해 선별한 물질중 물질 F의 면역조절 기능성을 평가하기 위해, C57BL/6 마우스의 골수세포를 분리하여 분화시킨 bone-marrow dendritic cell (BMDC)를 활용하여 phagocytosis의 활성을 평가를 위한 조건을 확립하고 <그림 21, 22>, 미성숙DC의 maturation을 FACS를 통해 평가하기위한 조건을 확립함 <그림 23>.

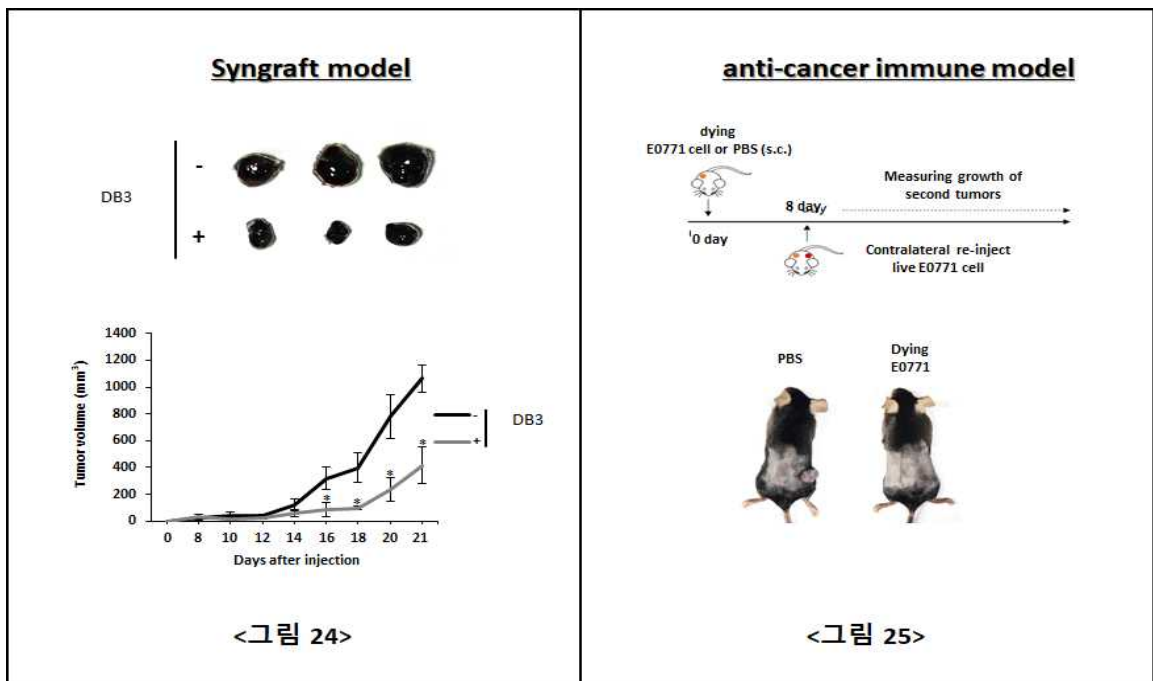




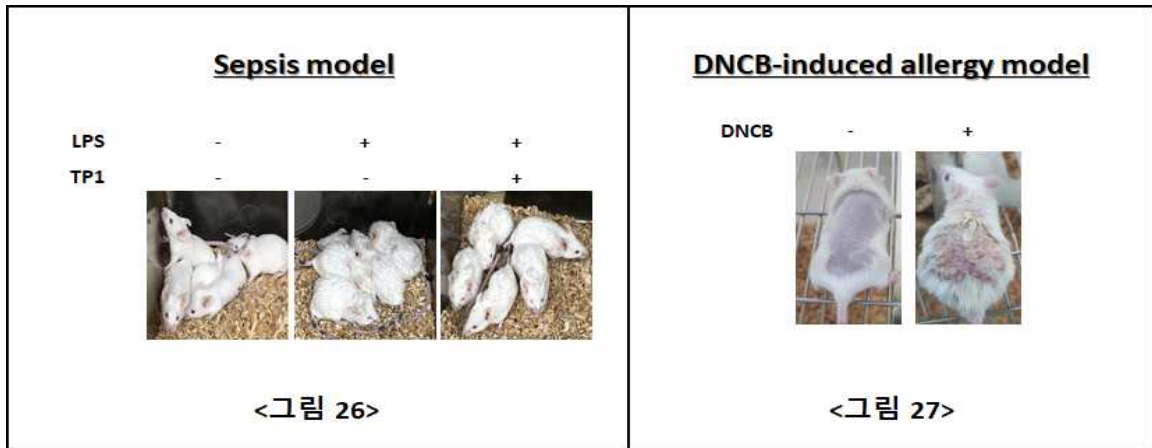
### 6. in vivo system 동물 모델 구축

- 세포수준에서 검증한 유효물질들의 유효성을 평가하기 위해, 다양한 in vivo assay 시스템 및 질병 마우스 모델을 구축한 후 이를 활용하여 개체수준에서 면역조절 유효물질들의 기능을 검증함.

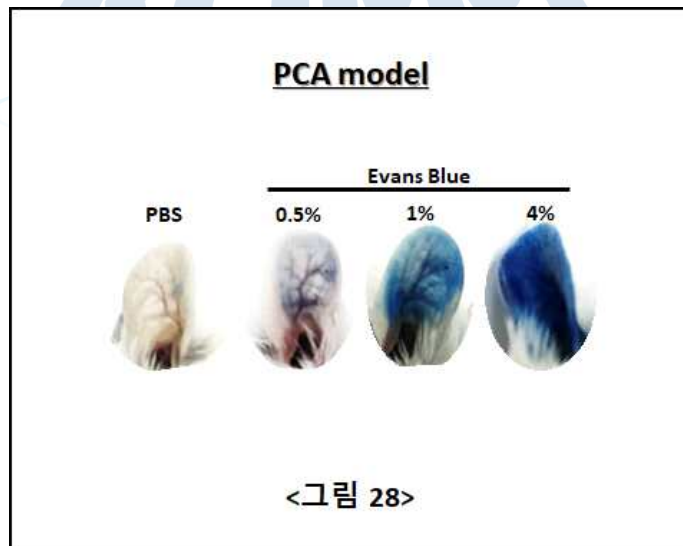
: 극지지의류 *Ramalina terebrata*에서 유래된 1,3,7,9-tetrahydroxy-2,8-dimethyl-4,6-di[ethanoyl]dibenzofuran (DB3)를 처리에 의한 B16F10 세포의 종양 성장억제를 평가하기 위해 8주령 C57BL/6 마우스 등부위에 종양을 implant 한 후 종양성장 정도를 평가하였고, control group 대비 현저한 항종양효능(종양 부피 50 % 이상 감소)을 확인하였음 <그림 24>. 또한, 항암면역 효과를 평가하기 위한 vaccination 동물모델을 구축함 <그림 25>



: 극지지의류인 *Stereocaulon alpinum*에서 유래된 2,5,6-trimethoxy-p-terphenyl (TP1)의 개체 수준의 항염증 효능을 평가하기 위해 8주령 BALB/c 마우스로 sepsis모형을 구축한 후, 염증억제(폐부종 30 ~ 50%억제) 효능을 확인함 <그림 26>. 또한, 개체수준에서 항알러지 효능 평가를 위해 DNCB에 의해 유발되는 알러지 모형을 구축하였음<그림 27>.



: 항알러지 효능을 평가를 위해 Passive cutaneous Anaphylaxis(PCA) 모형을 구축하기위해 8주령 BALB/c 마우스의 귀에 anti-DNP-IgE를 intraderma injection하여 감작한 후, Evans blue 농도 조건을 달리하여 efflux된 정도를 평가함 <그림 28>.



# 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

## 제 1절 연구목표 달성도

### 1. 연구목표

- 특이성을 가지는 극지 환경 생물 중에서 유래한 천연물을 이용하여 차세대 개념의 면역 세포의 활성을 제어 [사멸 세포 제거(apoptotic cell clearance : eat me signaling) 조절 및 면역 관문 (immune checkpoint : don't eat me signaling) 제어] 할 수 있는 Hit 물질 발굴 (> 3종)
- 발굴된 Hit 물질을 이용한 연구를 통해 기존 면역조절 기전과는 다른 통합적인 면역 시스템 제어 방법을 구축하고, 면역 관련 질병[암, 자가면역질환(류마티스 관절염), 염증성 장질환(궤양성 대장염, 크론병)]을 제어할 수 있는 Hit 물질 및 원천기술 개발 (SCI(E)급 논문 > 3편, 특허 출원 > 3건)
- 본 연구과제를 통해 향후 미개발 극지방 생물체 관련 학문적 지식과 새로운 개념의 면역 치료제 개발 경험을 두루 겸비한 인재 양성/세계적 수준의 글로벌 경쟁력을 갖춘 면역학 분야를 선도할 글로벌 연구인재 양성에 기여할 것임 (석사 > 4명, 박사 > 1명)



## 2. 목표달성도 (연구개발 성과)

### 가. 정성적 성과

| 구분       | 연도   | 연구개발목표                                 | 연구개발 달성내용  | 달성도   |
|----------|------|--|--|-------|
| 1차<br>년도 | 2021 | 극지생물자원 유래 물질 라이브러리 스크리닝                | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ “극지연구소”의 선행연구를 통해 분리/동정한 천연물 정보 및 물질을 획득하여 천연물 library 구축 및 “국립해양생물자원관”에서 분양받은 해양생물자원을 다양한 생물유래 물질 library를 확보</li> <li>○ 극지화합물 및 해양추출물의 data mining을 통해 1차적으로 유효물질 선별 및 분류함</li> </ul>             | 100 % |
|          |      | 면역제어 유효 물질 선정                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ High-throughput microplate reader/FACS screening (HTMFs) 방법을 이용한 면역제어 유효 물질 스크리닝</li> <li>○ 본 연구실에 확립되어 있는 cell-based 분석법 (NO/ROS assay)을 통해 유효물질들의 다양한 기능성을 추가적으로 스크리닝</li> </ul>                  | 100 % |
| 2차<br>년도 | 2022 | 극지생물자원 유래 물질 스크리닝 및 다양한 면역제어 기능성 물질 발굴 | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 본 연구실에 확립되어 있는 cell-based 분석법 (Histamin/<math>\beta</math>-hexosaminidase assay 및 melanognensis assay)을 통해 유효물질들의 기능성을 추가로 스크리닝 (항알러지)</li> <li>○ 스크리닝을 통해 확보한 다수의 면역제어 유효물질의 독성평가를 진행함.</li> </ul> | 100 % |
|          |      | 면역제어 유효 물질의 세포수준에서의 기능성 검증             | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 확보된 유효물질의 면역제어 기능성을 세포수준에서 다양한 검증시스템(Western Blot, Pull down analysis, qRT-PCR, FACS)을 활용하여 평가</li> <li>○ 대식세포 및 암세포를 활용하여 유효물질들의 항염/항암 기능성을 확인</li> </ul>  | 100 % |
| 3차<br>년도 | 2023 | 극지생물자원 유래 면역제어 유효물질의 세포수준에서의 추가 기능성 검증 | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유효물질의 면역조절 기능성의 추가적 연구를 위해 C57BL/6 마우스의 골수세포를 분리하여 분화시킨 BMDC를 활용하여 phagocytosis 효능을 평가하고, 미성숙DC의 maturation 평가를 진행함.</li> <li>○ 비만세포 (mast cell)을 활용하여 유효물질들의 항알러지 기능성을 평가함.</li> </ul>             | 100 % |
|          |      | in vivo system 동물 모델 구축                | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 면역조절 유효물질의 개체수준에서 효능 평가를 위한 in vivo assay 시스템을 구축하였음</li> <li>: 중앙형성동물모델, PCA모델, 패혈증 모델, DNCB 유도 알러지모델을 구축함.</li> </ul>   | 100 % |

### 나. 정량적 성과

| 구분  |       | 목표 (건) | 달성 (건) | 주저자 실적 | 달성도 | 증빙자료(제출) | 비고 |                             |
|-----|-------|--------|--------|--------|-----|----------|----|-----------------------------|
| '21 | 국외 논문 | SCI(E) | -      | -      | -   | %        | -  | -                           |
|     | 국내 논문 | SCI(E) | -      | 2      | 2   | 200      | %  | 붙임 1. 증빙 1-2<br>논문 2편 초과 달성 |
|     | 특허    |        | -      | -      | -   | -        | %  | -                           |

|     |       |        |   |   |        |         |     |              |              |
|-----|-------|--------|---|---|--------|---------|-----|--------------|--------------|
| '22 | 국외 논문 | SCI(E) | 1 | 2 | 주저자 2건 | 200     | %   | 붙임 1. 증빙 3-4 | 논문 1편 초과 달성  |
|     | 국내 논문 | SCI(E) | - | - | -      | -       | %   | -            | -            |
|     | 특허    |        |   | 1 | 1      | 주발명자 1건 | 100 | %            | 붙임 1. 증빙 7   |
| '23 | 국외 논문 | SCI(E) | 2 | 2 | 주저자 2건 |         | %   | 붙임 1. 증빙 5-6 | -            |
|     | 국내 논문 | SCI(E) | - | - | -      | -       | %   | -            | -            |
|     | 특허    |        |   | 2 | 2      | 주발명자 2건 | 100 | %            | 붙임 1. 증빙 8-9 |

다. 인력양성 달성내역- 붙임 2. 인력양성 증빙 1-3(학위증명서, 학위수여예정증명서)

(명)

| 구 분 | 학사(학사과정) |    | 석사(석사과정) |                            | 박사 |    | 계  |                            |
|-----|----------|----|----------|----------------------------|----|----|----|----------------------------|
|     | 목표       | 달성 | 목표       | 달성                         | 목표 | 달성 | 목표 | 달성                         |
| '21 | -        | -  | 2        | 2                          | -  | -  | 2  | 2                          |
| '22 | -        | -  | 2        | 2                          | 1  | 1  | 3  | 3                          |
| '23 | -        | -  | -        | 1<br>(2024년<br>2월<br>졸업예정) | -  | -  | -  | 1<br>(2024년<br>2월<br>졸업예정) |

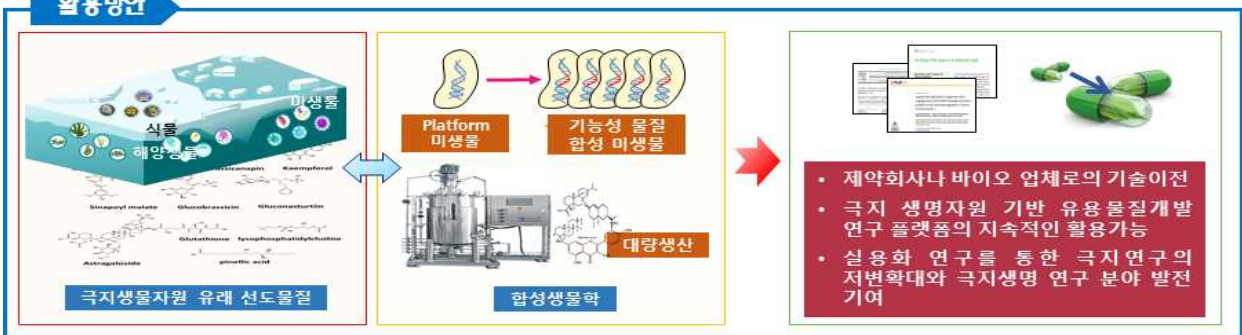
라. 양성인력 정보

| 소속부서    | 학위 | 성명  | 전공 및 학위          |      |         |
|---------|----|-----|------------------|------|---------|
|         |    |     | 졸업년도             | 전공   | 학교      |
| 경상국립대학교 | 박사 | 신성아 | 2023             | 생명약학 | 경상국립대학교 |
| 경상국립대학교 | 석사 | 류경아 | 2022             | 생명약학 | 경상국립대학교 |
| 경상국립대학교 | 석사 | 한민주 | 2022             | 생명약학 | 경상국립대학교 |
| 경상국립대학교 | 석사 | 김희지 | 2023             | 생명약학 | 경상국립대학교 |
| 경상국립대학교 | 석사 | 안장은 | 2023             | 생명약학 | 경상국립대학교 |
| 경상국립대학교 | 석사 | 권수근 | 2024년 2월<br>졸업예정 | 생명약학 | 경상국립대학교 |



# 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

## 제 1 절 활용방안



- 극지생물자원 유래 면역제어 물질들을 합성생물학을 활용한 합성생물 구축을 통해 국내·외 특허 출원 및 논문을 통한 지적 재산권 확보 및 노하우 구축
- 합성생물에 의한 극지생물 면역제어 물질의 대량생산 공정 기술이전 및 면역치료제 공동개발 추진
- 극지생명자원 기반 유용물질 개발 연구의 한 플랫폼으로 활용 및 관련 우수연구인력 양성
- 발굴된 hit (2,5,6-trimethoxy-p-terphenyl (TP1), 1,3,7,9-tetrahydroxy-2,8-dimethyl-4,6-di[e thanoyl]dibenzofuran (DB3)) 물질들의 후속 연구로써 hit 물질을 bead에 결합시킨 후 pu ll-down analysis를 통한 binding protein들을 동정하고, 연구된 signaling pathway상에 유력한 단백질들과 비교/분석 후 표적단백질을 확인할 예정.

## 제 2 절 기대효과

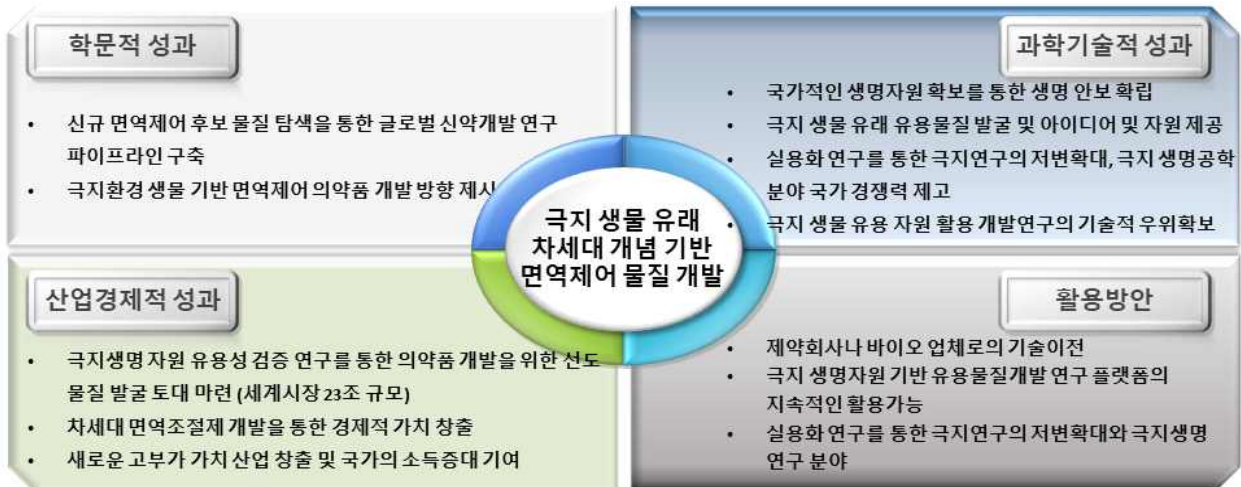
1. 학문적 측면
  - 극지연구소와 공동연구/대학원 교육을 통한 신개념 면역질환 치료제에 대한 비전 및 전략 수립가능
  - 미개발 극지방 유래 천연물과 새로운 개념을 도입한 면역치료제 개발 연구성과의 시너지 효과 극대화
  - 융복합 연구력 및 기술력의 축적된 know-how 기반 전문인력 양성 교육 인프라 확립
  - 지역 거점 대학교 대학원생들의 연구 역량을 제고하고, 증가하는 면역질환 대응 방안 및 니즈에 부응할 수 있는 새로운 방향성 제시
  - 다학제적 연구분야를 포괄적으로 습득한 글로벌 스탠다드 융합형 바이오 전문 인력 양성
  - 극지 연구 관련 분야의 선도적 리더로써 글로벌 네트워크 구축 및 상호연계 연구/교육

가능

- 미래를 이끌어 갈 학문 후속세대의 양성을 위한 멘토 활동 가능
- 독자적 연구수행능력을 갖춘 인재 육성 추구
- 연구의 국제화를 통해 연구 논문(학위논문)의 질적 수준 향상

나. 사회적/경제적 측면

- 면역관련 질환자(암, 자가면역질환(류마티스 관절염), 염증성 장질환(궤양성 대장염) 등)에 대한 국민 건강증진 관련 인력양성을 통한 사회적 기여
- 극지환경 생물 유래 천연물 기반 낮은 독성 및 표적물질의 발굴 및 개발연구의 의료산업화를 통한 차세대 성장동력 파이프라인 구축
- 새로운 개념의 면역치료제 개발 및 극지생물 활용 전문연구/산업인력 양성과 협력 연구의 산학 간 선순환구조 정착
- 미개발 극지방 천연물을 이용한 면역질환 치료제 개발의 학문적 지식 습득과 연구참여 경험을 가진 대학원생 및 신진 연구인력의 취업률 향상
- 극지생물 자원 활용 면역질환 치료제 개발 플랫폼을 활용한 사업팀 연구성과의 기술이전/산업화 역량 겸비 인력양성 강화
- 우수한 연구성과를 통한 기술이전/산업화 강화를 통해 우수연구인력의 경력 강화 및 일자리 창출, 창업 인프라 구축을 통한 국가적 인력 mismatch 문제를 해소할 수 있는 효과적인 방안 마련
- 극지 연구 관련 고급 연구 인력의 사회로의 지속적인 배출을 통해 전문인력 제공 및 일자리 창출 등의 사회/경제적 선순환 기여
- 새롭게 성장하는 극지환경 생물 유래 기반 천연물을 이용한 Hit 물질 발굴/개발 연구의 선도적인 기술력을 가진 인력양성을 통해 글로벌 바이오의약품 시장의 학문적/기술적 우위 확보
- 극지생명자원 기반 유용물질 개발 연구의 플랫폼으로 활용 및 관련 우수연구인력 양성



## 제 6 장 참고문헌

- Poon, I. K., Lucas, C. D., Rossi, A. G., and Ravichandran, K. S. (2014). Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), 166-180.
- Elliott, M. R., and Ravichandran, K. S. (2010). Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *Journal of Cell Biology*, 189(7), 1059-1070.
- Karizak, A. Z., Salmasi, Z., Gheibihayat, S. M., Asadi, M., Ghasemi, Y., Tajbakhsh, A., & Savardashtaki, A. (2023). Understanding the regulation of “Don’t Eat-Me” signals by inflammatory signaling pathways in the tumor microenvironment for more effective therapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 149(1), 511-529.
- Jacobs, P., Bissonnette, R., & Guenther, L. C. (2011). Socioeconomic burden of immune-mediated inflammatory diseases—focusing on work productivity and disability. *The Journal of Rheumatology Supplement*, 88, 55-61.
- Sarzi-Puttini, P., Marotto, D., Antivalle, M., Salaffi, F., Atzeni, F., Maconi, G., ... & Ardizzone, S. (2020). How to handle patients with autoimmune rheumatic and inflammatory bowel diseases in the COVID-19 era: An expert opinion. *Autoimmunity reviews*, 19(7), 102574.
- Park, D., Han, C. Z., Elliott, M. R., Kinchen, J. M., Trampont, P. C., Das, S., ... & Ravichandran, K. S. (2011). Continued clearance of apoptotic cells critically depends on the phagocyte Ucp2 protein. *Nature*, 477(7363), 220-224.
- Park, D., Hochreiter-Hufford, A., & Ravichandran, K. S. (2009). The phosphatidylserine receptor TIM-4 does not mediate direct signaling. *Current biology*, 19(4), 346-351.
- Fond, A. M., Lee, C. S., Schulman, I. G., Kiss, R. S., & Ravichandran, K. S. (2015). Apoptotic cells trigger a membrane-initiated pathway to increase ABCA1. *The Journal of clinical investigation*, 125(7), 2748-2758.
- Koh, E., Lee, E. J., Nam, G. H., Hong, Y., Cho, E., Yang, Y., & Kim, I. S. (2017). Exosome-SIRP $\alpha$ , a CD47 blockade increases cancer cell phagocytosis. *Biomaterials*, 121, 121-129.

ARTICLE

Open Access



# Anti-cancer effects of lucidadiol against malignant melanoma cells

Seong-Ah Shin<sup>1</sup>, Jun Seob Lee<sup>1</sup>, Byeong Jun Joo<sup>1</sup>, Gyoungah Ryu<sup>1</sup>, Minjoo Han<sup>1</sup>, Huiji Kim<sup>1</sup>, Jangeun An<sup>1</sup>, Man Hyung Koo<sup>2</sup>, Ui Joung Youn<sup>3,4</sup>, Jun Hyuck Lee<sup>2,4</sup>, Hyun Ho Park<sup>5</sup> and **Chang Sup Lee<sup>1\*</sup>**

**Abstract**

Melanoma is one of the most aggressive and lethal skin cancers. Lucidadiol is a triterpenoid isolated from *Ganoderma lucidum* and is known to have various biological functions, including antibacterial effects. However, the anti-cancer effects and mechanism of action of lucidadiol in malignant melanoma are unknown. In this study, lucidadiol significantly reduced B16 melanoma cell viability in a dose- and time-dependent manner. In addition, lucidadiol induced apoptosis and suppressed cell mobility in B16 melanoma cells. Moreover, our findings revealed that lucidadiol remarkably downregulated phospho-Akt/ERK/JNK, but not p38. Taken together, our results suggest that lucidadiol could exert its anti-cancer effects by inducing apoptosis via modulation of the Akt/MAPK pathway. Therefore, lucidadiol may be a potential cancer therapeutic agent for malignant melanoma.

**Keywords:** Melanoma, Lucidadiol, Anti-cancer, Akt, MAPK

**Introduction**

Melanoma is one of the most lethal types of skin cancer, developing from melanocytes located in the basal layer of epithelial surfaces [1]. Although it accounts for only 4% of all skin cancers, melanoma-associated mortality is estimated to be approximately 80% [2]. The main risk factors for developing melanoma are the number of melanocytic nevi, genetic susceptibility, mutagenesis, and exposure to ultraviolet radiation, which induces genotoxic effects [3]. Current therapies include surgery, radiotherapy, and chemotherapy; however, these are only effective for early-stage melanoma, which is less invasive [4]. Notably, melanoma has a poor prognosis at later stages of tumor progression, often progressing to an unresectable stage or advanced metastatic disease. Moreover, the current therapeutic agents used to treat melanoma have several side effects, often inducing resistance to conventional chemotherapy and radiation [5]. Thus, there is an urgent

need to develop an early diagnosis system and improve therapeutic agents for melanoma.

Natural products are a critical source for the development of novel anti-cancer drugs, as they are considered to be less toxic and have fewer side effects than synthetic drugs [6]. As such, interest in chemotherapy drugs originating from natural sources has been progressively increasing for various cancer types, including melanoma [7–9].

Lucidadiol (Fig. 1A) is a lanostane-type triterpenoid isolated from *Ganoderma lucidum*, commonly known as Lingzhi. This species has been previously used as a medicinal mushroom to treat various diseases, as well as for its life-prolonging effects [10]. Its anti-cancer properties are mainly attributed to triterpenoids, which are one of the main constituents [11]. Until now, lucidadiol has been reported to have antiviral activity against influenza virus A and herpes simplex virus (HSV) 1 [12]. However, the anticancer mechanism of lucidadiol in melanoma cells has yet to be investigated.

Recent studies have found that melanoma has the highest mutation frequency among cancers analyzed to determine genetic factors of malignancies [13]. In

\*Correspondence: changsup@gnu.ac.kr

<sup>1</sup> College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea  
 Full list of author information is available at the end of the article

of p53 is sufficient to trigger apoptosis by inducing the pro-apoptotic Bax protein family and inhibiting the anti-apoptotic Bcl-2 protein family, leading to the activation of caspase-3 (effector caspase) [42, 43]. Consequently, cleaved PARP levels are increased by cleaved caspase-3 (activated form), which plays a role in apoptotic processes, including DNA repair and cell cycle regulation [44]. As shown in Fig. 3, lucidadiol induces a potential increase in the apoptotic cell population through an apoptosis-related molecular mechanism. Overall, our findings indicate that the lucidadiol-induced decrease in melanoma cell viability is mediated by apoptosis and cell cycle arrest.

Given that distant metastasis is a leading cause of death in melanoma patients, it is important to elucidate the mechanisms underlying cancer cell metastasis [45]. Cancer metastasis is a complex process involving multiple steps such as migration, invasion, and adhesion [46]. MMPs are involved in cancer cell invasion and metastasis by cleaving extracellular matrix proteins [34]. In particular, MMP-9 has been found to be an indicator of melanoma invasiveness [47]. Our findings showed that lucidadiol treatment reduced the migration of melanoma cells by suppressing MMP9 expression levels. This suggests that lucidadiol may also have anti-metastasis effects in melanoma.

The Akt and ERK pathways have been shown to play crucial roles in the tumorigenesis of many cancers, including melanoma, by promoting the translation of target genes associated with cell proliferation, migration, and invasion [48]. Therefore, several studies have emphasized that inhibition of the PI3K/Akt and ERK signaling pathways may be a promising strategy for melanoma treatment [49–51]. In this study, lucidadiol treatment decreased the phosphorylation of Akt and ERK1/2 in B16 melanoma cells. As a result, we speculated that the alteration of biological activity induced by lucidadiol treatment in B16 melanoma could be, in part, attributed to its ability to inhibit the Akt/ERK pathway. In addition, the JNK signaling pathways, which are a subfamily of MAPK, have been shown to have paradoxical roles in carcinogenesis, with both tumor growth and tumor suppressor properties [52]. Alexaki et al. reported that JNK supports the viability of melanoma cells by modulating cell cycle arrest and apoptosis [53], while Qin et al. reported that a decrease in JNK activation is involved in suppressing melanoma cell growth [54]. Accordingly, our results indicate that lucidadiol induces apoptosis and cell cycle arrest through the inhibition of JNK activation. Another subfamily, p38 MAPK, is also activated by diverse pro-inflammatory and stressful stimuli. Although the role of p38 MAPK in tumors is complicated, many studies have suggested that p38 MAPK functions as a tumor suppressor associated

with apoptosis in some cell systems [21, 55]. In addition, She et al. reported that p38 MAPK activates p53 and p53-induced apoptosis [56]. Moreover, activation of the ERK and p38 pathways is inversely regulated and high p38 activity levels inhibit ERK activity and prevent tumorigenesis [18]. Overall, our findings suggest that lucidadiol induces apoptosis of melanoma cells via cell cycle arrest and blocking of migration by suppressing Akt, ERK, and JNK activation while activating p38 MAPK.

To the best of our knowledge, this is the first demonstration of the anti-cancer mechanism of lucidadiol in melanoma cells. Taken together, our findings not only reveal the important role of the Akt/MAPK pathway in lucidadiol-induced bioactivity in melanoma cells but also suggest that lucidadiol may be a promising novel therapeutic agent for melanoma treatment.

#### Acknowledgements

This research was supported by a grant from Next-Generation BioGreen21 Program (PJ01327302), Rural Development Administration of Korea, the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIT) (Grant Number: 2020R1F1A1070844), and the Korea Polar Research Institute (KOPRI, PE21900).

#### Authors' contributions

S-AS, JSL, BJJ, GR, MH, HK, JA and MHK performed experiments. S-AS and CSL wrote the manuscript with guidance from CSL. UJY, JHL, and HHP provided intellectual contributions in this study. All authors read and approved the final manuscript.

#### Availability of data and materials

The datasets that support the finding of this study are available from the corresponding author on reasonable request.

#### Declarations

##### Competing interests

The authors declare no conflicts of interest.

##### Author details

<sup>1</sup>College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea. <sup>2</sup>Research Unit of Cryogenic Novel Material, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Republic of Korea. <sup>3</sup>Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Republic of Korea. <sup>4</sup>Department of Polar Sciences, University of Science and Technology, Incheon 21990, Republic of Korea. <sup>5</sup>College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 06974, Republic of Korea.

Received: 5 October 2021 Accepted: 21 October 2021

Published online: 29 October 2021

#### References

1. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tyminska A (2013) Skin melanocytes: biology and development. *Postepy Dermatol Alergol* 30:30–41
2. Pal HC, Hunt KM, Diamond A, Elmets CA, Afaq F (2016) Phytochemicals for the management of melanoma. *Mini Rev Med Chem* 16:953–979
3. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M (2014) Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo* 28:1005–1011
4. Erdei E, Torres SM (2010) A new understanding in the epidemiology of melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 10:1811–1823



Review

# Physiological Roles of Apoptotic Cell Clearance: Beyond Immune Functions

Minjoo Han <sup>1,†</sup>, Gyoungah Ryu <sup>1,†</sup>, Seong-Ah Shin <sup>1</sup> , Jangeun An <sup>1</sup>, Huiji Kim <sup>1</sup>, Daeho Park <sup>2</sup> , Dae-Hee Lee <sup>3</sup> and Chang Sup Lee <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea; dlsel79@gnu.ac.kr (M.H.); rga\_97@gnu.ac.kr (G.R.); shinsaya@gnu.ac.kr (S.-A.S.); audttraus98@gnu.ac.kr (J.A.); 2019080041@gnu.ac.kr (H.K.)

<sup>2</sup> School of Life Sciences and Aging Research Institute, Gwangju Institute of Science and Technology, Gwangju 61005, Korea; daehopark@gist.ac.kr

<sup>3</sup> Department of Marine Food Science and Technology, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 25456, Korea; neogene@gwnu.ac.kr

\* Correspondence: changsup@gnu.ac.kr; Tel.: +82-55-772-2432

† These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** The clearance of apoptotic cells is known to be a critical step in maintaining tissue and organism homeostasis. This process is rapidly/promptly mediated by recruited or resident phagocytes. Phagocytes that engulf apoptotic cells have been closely linked to the release of anti-inflammatory cytokines to eliminate inflammatory responses. Defective clearance of apoptotic cells can cause severe inflammation and autoimmune responses due to secondary necrosis of apoptotic cells. Recently accumulated evidence indicates that apoptotic cells and their clearance have important physiological roles in addition to immune-related functions. Herein, we review the current understanding of the mechanisms and fundamental roles of apoptotic cell clearance and the beneficial roles of apoptotic cells in physiological processes such as differentiation and development.

**Keywords:** apoptosis; apoptotic cell clearance; differentiation; development; inflammation; phagocyte



**Citation:** Han, M.; Ryu, G.; Shin, S.-A.; An, J.; Kim, H.; Park, D.; Lee, D.-H.; Lee, C.S. Physiological Roles of Apoptotic Cell Clearance: Beyond Immune Functions. *Life* **2021**, *11*, 1141. <https://doi.org/10.3390/life11111141>

Academic Editor: Pietro Di Fazio

Received: 29 September 2021

Accepted: 25 October 2021

Published: 26 October 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Overview of Apoptotic Cell Clearance

There are various types of cell death such as apoptosis, pyroptosis, necroptosis, ferroptosis, and NETosis. In pyroptosis, pathologic stimuli and inflammatory caspases form pores in cell membranes [1]. Necroptosis is a programmed inflammatory cell death characterized by both apoptosis and necrosis [2]. Ferroptosis is an iron-dependent programmed cell death, in response to intracellular oxidative perturbations [3]. NETosis is a regulatory neutrophil cell death that occurs with the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) [4]. These cell death types are also referred to as “regulated cell death” because various pathways define them at the molecular level [5]. In this review, we focused on apoptotic cell death and apoptotic cell clearance. Apoptosis is referred to as “programmed cell death”, which mediates normal development and tissue homeostasis in multicellular organisms [6–8]. Dysregulated apoptosis is known to cause a variety of pathological diseases, including cancer and neurodegenerative disorders [9–11]. Furthermore, cellular senescence is a state of irreversible cell cycle arrest exhibiting apoptosis resistance, and recent studies have found that it increases with aging and aging-related disease [12]. One form of cellular senescence called SASP (senescence-associated secretory phenotype) results in pathological outcomes [13]. During the past several decades, many critical results and scientific research data in the field of apoptosis have been obtained at the level of dying cells [6,9,14]. Currently, the removal of cell corpses after apoptosis *in vivo* is a major focus issue in this field [6].

Apoptotic cells arise under a variety of pathophysiological conditions, such as tissue remodeling during normal development, aging of cells, infection by viruses and bacteria,

interrelationships and crosstalk among “eat me” signals, receptors, and/or phagocytes have not been determined. Additionally, downstream molecules and pathways of engulfment receptors need to be identified and characterized. Furthermore, investigating the function of apoptotic cells and their clearance in other pathophysiological processes, and identifying the “eat me” signals, engulfment receptors, and signaling pathways involved in differentiation and development processes will be the first step in understanding and verifying the new concept. Meta-data analysis and integration of new information and knowledge through systemic approaches such as the proteomic/genomic approach will be helpful in answering the above questions.

**Author Contributions:** M.H., G.R. and C.S.L. wrote the manuscript with guidance from C.S.L. S.-A.S., J.A., H.K., D.P. and D.-H.L. provided intellectual contributions in this study. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIT) (Grant Number: 2020R1F1A1070844) and the Korea Polar Research Institute (KOPRI, PE21900).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.




**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Jorgensen, I.; Miao, E.A. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunol. Rev.* **2015**, *265*, 130–142. [[CrossRef](#)]
- Nirmala, J.G.; Lopus, M. Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell Biol. Toxicol.* **2020**, *36*, 145–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Yang, W.S.; Stockwell, B.R. Ferroptosis: Death by lipid peroxidation. *Trends Cell Biol.* **2016**, *26*, 165–176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Brostjan, C.; Oehler, R. The role of neutrophil death in chronic inflammation and cancer. *Cell Death Discov.* **2020**, *6*, 26. [[CrossRef](#)]
- Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S.A.; Abrams, J.M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E.S.; Altucci, L.; Amelio, I.; Andrews, D.W.; et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 486–541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gregory, C.D.; Pound, J.D. Cell death in the neighbourhood: Direct microenvironmental effects of apoptosis in normal and neoplastic tissues. *J. Pathol.* **2011**, *223*, 177–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Elmore, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35*, 495–516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kumar, S.; Calianese, D.; Birge, R.B. Efferocytosis of dying cells differentially modulate immunological outcomes in tumor microenvironment. *Immunol. Rev.* **2017**, *280*, 149–164. [[CrossRef](#)]
- Singh, R.; Letai, A.; Sarosiek, K. Regulation of apoptosis in health and disease: The balancing act of bcl-2 family proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 175–193. [[CrossRef](#)]
- Wong, R.S. Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2011**, *30*, 87. [[CrossRef](#)]
- Radi, E.; Formichi, P.; Battisti, C.; Federico, A. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *J. Alzheimer's Dis.* **2014**, *42* (Suppl. S3), S125–S152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Payea, M.J.; Anerillas, C.; Tharakan, R.; Gorospe, M. Translational control during cellular senescence. *Mol. Cell. Biol.* **2021**, *41*, e00512–20. [[CrossRef](#)]
- Di Micco, R.; Krizhanovsky, V.; Baker, D.; d’Adda di Fagagna, F. Cellular senescence in ageing: From mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2021**, *22*, 75–95. [[CrossRef](#)]
- Poon, I.K.; Lucas, C.D.; Rossi, A.G.; Ravichandran, K.S. Apoptotic cell clearance: Basic biology and therapeutic potential. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14*, 166–180. [[CrossRef](#)]
- Arandjelovic, S.; Ravichandran, K.S. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat. Immunol.* **2015**, *16*, 907–917. [[CrossRef](#)]
- Gregory, C. Cell biology: Sent by the scent of death. *Nature* **2009**, *461*, 181–182. [[CrossRef](#)]
- Atkin-Smith, G.K. Phagocytic clearance of apoptotic, necrotic, necroptotic and pyroptotic cells. *Biochem. Soc. Trans.* **2021**, *49*, 793–804. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ravichandran, K.S.; Lorenz, U. Engulfment of apoptotic cells: Signals for a good meal. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 964–974. [[CrossRef](#)]
- Kourtzelis, I.; Hajishengallis, G.; Chavakis, T. Phagocytosis of apoptotic cells in resolution of inflammation. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 553. [[CrossRef](#)]
- Grabiec, A.M.; Hussell, T. The role of airway macrophages in apoptotic cell clearance following acute and chronic lung inflammation. *Semin. Immunopathol.* **2016**, *38*, 409–423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Van Vre, E.A.; Ait-Oufella, H.; Tedgui, A.; Mallat, Z. Apoptotic cell death and efferocytosis in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2012**, *32*, 887–893. [[CrossRef](#)]

## Article

# Wistin Exerts an Anti-Inflammatory Effect via Nuclear Factor- $\kappa$ B and p38 Signaling Pathways in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW264.7 Cells

Jangeun An<sup>1</sup>, Gyoungah Ryu<sup>1</sup>, Seong-Ah Shin<sup>1</sup>, Huiji Kim<sup>1</sup>, Mi-Jeong Ahn<sup>1</sup> , Jun Hyuck Lee<sup>2,3</sup>   
and Chang Sup Lee<sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea

<sup>2</sup> Research Unit of Cryogenic Novel Material, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Korea

<sup>3</sup> Department of Polar Sciences, University of Science and Technology, Incheon 21990, Korea

\* Correspondence: changsup@gnu.ac.kr; Tel.: +82-55-772-2432



**Citation:** An, J.; Ryu, G.; Shin, S.-A.; Kim, H.; Ahn, M.-J.; Lee, J.H.; Lee, C.S. Wistin Exerts an Anti-Inflammatory Effect via Nuclear Factor- $\kappa$ B and p38 Signaling Pathways in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW264.7 Cells. *Molecules* **2022**, *27*, 5719. <https://doi.org/10.3390/molecules27175719>

Academic Editor: Nour Eddine Es-Safi

Received: 10 August 2022

Accepted: 2 September 2022

Published: 5 September 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Inflammation is an immune response to cellular damage caused by various stimuli (internal or external) and is essential to human health. However, excessive inflammatory responses may be detrimental to the host. Considering that the existing drugs for the treatment of inflammatory diseases have various side effects, such as allergic reactions, stomach ulcers, and cardiovascular problems, there is a need for research on new anti-inflammatory agents with low toxicity and fewer side effects. As 4',6-dimethoxyisoflavone-7-O- $\beta$ -d-glucopyranoside (wistin) is a phytochemical that belongs to an isoflavonoid family, we investigated whether wistin could potentially serve as a novel anti-inflammatory agent. In this study, we found that wistin significantly reduced the production of nitric oxide and intracellular reactive oxygen species in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. Moreover, wistin reduced the mRNA levels of pro-inflammatory enzymes (inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase (COX-2)) and cytokines (interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-6) and significantly reduced the protein expression of pro-inflammatory enzymes (iNOS and COX-2). Furthermore, wistin reduced the activation of the nuclear factor- $\kappa$ B and p38 signaling pathways. Together, these results suggest that wistin is a prospective candidate for the development of anti-inflammatory drugs.

**Keywords:** inflammation; phytochemical; wistin

## 1. Introduction

Inflammation is the body's immune response and defense mechanism against tissue damage caused by exposure to harmful or toxic external agents, infections, and physical injuries [1]. Inflammation resulting from infection or injury is associated with inflammatory responses such as immune cell recruitment and accumulation, release of inflammatory mediators, and changes in blood vessel permeability [2]. Generally, there are two types of inflammation: acute and chronic. Acute inflammation is a rapid process that repairs quickly to minimize damage and restore tissue homeostasis [3]. However, in chronic conditions, the inflammatory response continues, resulting in severe organ damage [4]. Chronic inflammation promotes the progression of several diseases, including cardiovascular disease, inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis and diabetes [5]. Crohn's disease (CD) is the most prevalent IBD syndrome treated using 6-mercaptopurine (6-MP) and its prodrug azathioprine (AZA) [6]. As immunosuppressive drugs, 6-MP and AZA inhibit inflammation by blocking the body's immune response; however, they may cause disease recurrence and side effects, such as hepatotoxicity [6]. Sulfasalazine, a medication for patients with rheumatoid arthritis, has immunomodulatory properties and suppresses pro-inflammatory cytokines; however, it can cause gastrointestinal side effects, such as headache, dizziness,



**Author Contributions:** J.A., G.R., S.-A.S. and H.K. performed the experiments. J.A. and C.S.L. wrote the manuscript with guidance from C.S.L., M.-J.A. and J.H.L. provided intellectual contribution to this study. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIT) (Grant Number: 2020R1F1A1070844) and the Korea Polar Research Institute (KOPRI) grant funded by the Ministry of Oceans and Fisheries (KOPRI project No. \*PE21900).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Singh, N.; Baby, D.; Rajguru, J.P.; Patil, P.B.; Thakkannavar, S.S.; Pujari, V.B. Inflammation and cancer. *Ann. Afr. Med.* **2019**, *18*, 121–126. [CrossRef] [PubMed]
- Chen, L.; Deng, H.; Cui, H.; Fang, J.; Zuo, Z.; Deng, J.; Li, Y.; Wang, X.; Zhao, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* **2018**, *9*, 7204–7218. [CrossRef] [PubMed]
- Yao, C.; Narumiya, S. Prostaglandin-cytokine crosstalk in chronic inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **2019**, *176*, 337–354. [CrossRef] [PubMed]
- Zhong, J.; Shi, G. Editorial: Regulation of Inflammation in Chronic Disease. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 737. [CrossRef]
- Panigrahy, D.; Gilligan, M.M.; Serhan, C.N.; Kashfi, K. Resolution of inflammation: An organizing principle in biology and medicine. *Pharmacol. Ther.* **2021**, *227*, 107879. [CrossRef]
- Kozuch, P.L.; Hanauer, S.B. Treatment of inflammatory bowel disease: A review of medical therapy. *World J. Gastroenterol.* **2008**, *14*, 354–377. [CrossRef]
- PLoSker, G.L.; Croom, K.F. Sulfasalazine: A review of its use in the management of rheumatoid arthritis. *Drugs* **2005**, *65*, 1825–1849. [CrossRef]
- Bindu, S.; Mazumder, S.; Bandyopadhyay, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem. Pharmacol.* **2020**, *180*, 114147. [CrossRef]
- Gonzalez-Rey, M.; Bebianno, M.J. Non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) ibuprofen distresses antioxidant defense system in mussel *Mytilus galloprovincialis* gills. *Aquat. Toxicol.* **2011**, *105*, 264–269. [CrossRef]
- Parolini, M. Toxicity of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) acetylsalicylic acid, paracetamol, diclofenac, ibuprofen and naproxen towards freshwater invertebrates: A review. *Sci. Total Environ.* **2020**, *740*, 140043. [CrossRef]
- Rainsford, K.D. Ibuprofen: Pharmacology, efficacy and safety. *Inflammopharmacology* **2009**, *17*, 275–342. [CrossRef] [PubMed]
- Tang, D.; Kang, R.; Coyne, C.B.; Zeh, H.J.; Lotze, M.T. PAMPs and DAMPs: Signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol. Rev.* **2012**, *249*, 158–175. [CrossRef]
- Lu, Y.C.; Yeh, W.C.; Ohashi, P.S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **2008**, *42*, 145–151. [CrossRef] [PubMed]
- Kawai, T.; Akira, S. TLR signaling. *Semin. Immunol.* **2007**, *19*, 24–32. [CrossRef] [PubMed]
- Miao, F.; Shan, C.; Ning, D. Walnut oil alleviates LPS-induced intestinal epithelial cells injury by inhibiting TLR4/MyD88/NF-kappaB pathway activation. *J. Food Biochem.* **2021**, *45*, e13955. [CrossRef]
- Kaminska, B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1754*, 253–262. [CrossRef]
- Sharif, O.; Bolshakov, V.N.; Raines, S.; Newham, P.; Perkins, N.D. Transcriptional profiling of the LPS induced NF-kappaB response in macrophages. *BMC Immunol.* **2007**, *8*, 1. [CrossRef]
- Giridharan, S.; Srinivasan, M. Mechanisms of NF-kappaB p65 and strategies for therapeutic manipulation. *J. Inflamm. Res.* **2018**, *11*, 407–419. [CrossRef]
- Bai, D.; Ueno, L.; Vogt, P.K. Akt-mediated regulation of NFkappaB and the essentialness of NFkappaB for the oncogenicity of PI3K and Akt. *Int. J. Cancer* **2009**, *125*, 2863–2870. [CrossRef]
- Liu, T.; Zhang, L.; Joo, D.; Sun, S.C. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2017**, *2*. [CrossRef]
- Kang, K.S. Phytochemical Constituents of Medicinal Plants for the Treatment of Chronic Inflammation. *Biomolecules* **2021**, *11*, 672. [CrossRef] [PubMed]
- Mueller, A.L.; Brockmueller, A.; Kunnumakkara, A.B.; Shakibaei, M. Modulation of Inflammation by Plant-Derived Nutraceuticals in Tendinitis. *Nutrients* **2022**, *14*, 30. [CrossRef] [PubMed]
- Vonkeman, H.E.; van de Laar, M.A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Adverse effects and their prevention. *Semin. Arthritis Rheum.* **2010**, *39*, 294–312. [CrossRef]
- Nguyen, H.P.; Doan, H.Q.; Brunell, D.J.; Rady, P.; Tyring, S.K. Apoptotic gene expression in sin catechins-treated external genital and perianal warts. *Viral Immunol.* **2014**, *27*, 556–558. [CrossRef] [PubMed]

## ARTICLE

## Open Access



# Afformosin exerts an anticancer effect via MAPK and AKT signaling pathways in B16F10 cells

Huiji Kim<sup>1</sup>, Minjoo Han<sup>1</sup>, Seong-Ah Shin<sup>1</sup>, Jangeun An<sup>1</sup>, Mi-Jeong Ahn<sup>1</sup>, Jun Hyuck Lee<sup>2,3</sup>, Hyun Ho Park<sup>4</sup> and Chang Sup Lee<sup>1\*</sup> 

## Abstract

Melanoma is a deadly skin cancer with high mortality, and its incidence is increasing every year. Although numerous anticancer drugs have been developed, these treatments have various side effects, such as skin rash, fatigue, diarrhea, cough, and muscle pain. Therefore, there is a need for research on novel anticancer drugs with low cytotoxicity and few side effects. In this study, we investigated whether afformosin (7-hydroxy-4',6-dimethoxyisoflavone), a member of the isoflavonoid family, could have the potential as a novel anticancer drug. Afformosin decreased the viability of B16F10 melanoma cells in a time- and dose-dependent manner. We also found that the afformosin-induced decrease in cell viability was caused by the reduction of cell proliferation through G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest and the induction of apoptosis in B16F10 melanoma cells. Furthermore, afformosin decreased the metastatic activity (cell invasion and migration) of B16F10 melanoma cells. At the molecular level, afformosin reduced the levels of Bcl-2, an anti-apoptotic protein, and augmented the levels of Bax, a pro-apoptotic protein, and p53, a tumor suppressor. Additionally, procaspase-3 levels were reduced by afformosin treatment. When we examined the signaling pathways affected by afformosin, we found that the AKT/ERK pathways were inhibited and the p38/JNK pathway was activated by afformosin. Collectively, these results suggest the potential anticancer effect of afformosin, making it a prospective candidate for development as an anticancer drug.

**Keywords:** Afformosin, Phytochemical, Anticancer

## Introduction

The skin is an innate immune system that functions as the first defense barrier and protects the human body from various environmental attacks [1]. The skin is particularly vulnerable to exposure to various harmful substances, sun damage, and microbes [1]. A combination of genetic and environmental risk factors causes most skin cancers [2]. The three major types of skin cancer include melanoma, squamous cell carcinoma (SSC), and basal cell carcinoma (BBC). Melanoma is a lethal skin

cancer whose incidence rate is increasing rapidly every year [3]. Although melanoma constitutes approximately 2% of skin cancers, it has a highly metastatic property that leads to the majority of deaths [4, 5]. Early diagnosis and rapid treatment are required to decrease the mortality rate of malignant melanoma; however, it is difficult to distinguish melanoma from spots, and early diagnosis is difficult because of its rapid spread [6–8]. Several chemotherapeutic drugs are available for the treatment of inoperable or metastatic melanoma. Dacarbazine and temozolomide have mainly been used to treat metastatic melanoma. Both dacarbazine and temozolomide suppress cancer cell division and trigger cancer cell death by methylating nucleic acids, thereby causing DNA damage [9, 10]. However, they damage some healthy cells and

\*Correspondence: changsup@gnu.ac.kr

<sup>1</sup> College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea  
Full list of author information is available at the end of the article

Moreover, afrormosin decreased the invasion and migration of the B16F10 cells. In terms of apoptosis, afrormosin reduced the level of anti-apoptotic protein Bcl2, augmented the level of pro-apoptotic protein BAX, increased the level of tumor suppressor protein p53, and activated caspase3, an important mediator of apoptosis. The MAPK pathway regulates various biological functions such as differentiation, apoptosis, proliferation, invasion, migration, and stress responses. The JNK/p38 pathway primarily involves cellular stress and apoptosis, and the ERK signaling pathway regulates cell proliferation and growth [32]. The PI3K/AKT pathway also controls cell proliferation, growth, cell cycle, angiogenesis, and motility [33]. Afrormosin decreased the phosphorylation of ERK and AKT and augmented the phosphorylation of JNK and p38. These results suggest that afrormosin may exert anticancer effects by activating the JNK/p38 pathway to induce apoptosis and inhibit proliferation by downregulating the ERK and AKT pathways. In addition, isoflavones, as diphenolic compounds, have estrogen-like chemical structures. They can interact with estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) and beta (ER $\beta$ ) to regulate various biological functions [34]. Therefore, it needs to investigate next whether afrormosin, a member of the isoflavone family, can mediate anticancer effects through ER.

In conclusion, we found that afrormosin activated the JNK/p38 pathway in B16F10 cells to induce apoptosis and downregulate the ERK and AKT pathways to induce G0/G1 arrest and inhibit proliferation (Fig. 9). These results imply that the phytochemical afrormosin has the potential to become a new alternative drug with fewer side effects through the regulation of apoptosis and proliferation in the future for the treatment of malignant melanoma.

#### Acknowledgements

Not applicable.

#### Author contributions

HK, MH, S-AS, and JA performed the experiments. HK and CSL wrote the manuscript with guidance from CSL, M-JA, JHL, and HHP provided intellectual contribution to this study. All authors have read and approved the final manuscript.

#### Funding

This research was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIT) (Grant Number: 2020R1F1A1070844) and the Korea Polar Research Institute (KOPRI) Grant funded by the Ministry of Oceans and Fisheries (KOPRI Project No. \* PE21900).

#### Availability of data and materials

The datasets that support the finding of this study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Declarations

#### Competing interests

The authors declare no conflicts of interest.

#### Author details

<sup>1</sup>College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea. <sup>2</sup>Research Unit of Cryogenic Novel Material, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Republic of Korea. <sup>3</sup>Department of Polar Sciences, University of Science and Technology, Incheon 21990, Republic of Korea. <sup>4</sup>College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 06974, Republic of Korea.

Received: 1 October 2022 Accepted: 24 October 2022

Published online: 09 November 2022

## References

- Ng CY, Yen H, Hsiao HY, Su SC (2018) Phytochemicals in skin cancer prevention and treatment: an updated review. *Int J Mol Sci*. <https://doi.org/10.3390/ijms19040941>
- Watson M, Holman DM, Maguire-Eisen M (2016) Ultraviolet radiation exposure and its impact on skin cancer risk. *Semin Oncol Nurs* 32:241–254. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2016.05.005>
- Danciu C, Soica C, Antal D, Alexa E, Pavel IZ, Ghiulai R, Ardelean F, Babuta RM, Popescu A, Dehelean CA (2018) Natural compounds in the chemoprevention of malignant melanoma. *Anticancer Agents Med Chem* 18:631–644. <https://doi.org/10.2174/1871520617666171121142522>
- Linares MA, Zakaria A, Nizran P (2015) Skin cancer. *Prim Care* 42:645–659. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2015.07.006>
- Turner N, Ware Q, Bosenberg M (2018) Genetics of metastasis: melanoma and other cancers. *Clin Exp Metastasis* 35:379–391. <https://doi.org/10.1007/s10585-018-9893-y>
- Corneli P, Zalaudek I, Magaton Rizzi G, di Meo N (2018) Improving the early diagnosis of early nodular melanoma: can we do better? *Expert Rev Anticancer Ther* 18:1007–1012. <https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1507822>
- Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ (2019) Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biol Ther* 20:1366–1379. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1640032>
- Rigel DS, Russak J, Friedman R (2010) The evolution of melanoma diagnosis: 25 years beyond the ABCDs. *CA Cancer J Clin* 60:301–316. <https://doi.org/10.3322/caac.20074>
- Jiang G, Li RH, Sun C, Liu YQ, Zheng JN (2014) Dacarbazine combined targeted therapy versus dacarbazine alone in patients with malignant melanoma: a meta-analysis. *PLoS ONE* 9:e111920. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111920>
- Quirbt I, Verma S, Petrella T, Bak K, Charette M (2007) Members of the melanoma disease site group of cancer care ontario's program in evidence-based, C. Temozolomide for the treatment of metastatic melanoma. *Curr Oncol* 14:27–33. <https://doi.org/10.3747/co.2007.98>
- Alfarouk KO, Stock CM, Taylor S, Walsh M, Muddathir AK, Verduzco D, Bashir AH, Mohammed OY, Elhassan GO, Harguindey S et al (2015) Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell Int* 15:71. <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0221-1>
- Thomadaki H, Tsiapalis CM, Scorilas A (2005) Polyadenylate polymerase modulations in human epithelioid cervix and breast cancer cell lines, treated with etoposide or cordycepin, follow cell cycle rather than apoptosis induction. *Biol Chem* 386:471–480. <https://doi.org/10.1515/BC.2005.056>
- Debatin KM (2004) Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 53:153–159. <https://doi.org/10.1007/s00262-003-0474-8>



Review

# Emerging Immune Checkpoint Molecules on Cancer Cells: CD24 and CD200

Sun Young Moon <sup>1</sup>, Minjoo Han <sup>1</sup>, Gyoungah Ryu <sup>1</sup>, Seong-Ah Shin <sup>1</sup>, Jun Hyuck Lee <sup>2,3</sup>  and Chang Sup Lee <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea; symoon0414@gnu.ac.kr (S.Y.M.); dlsel79@gnu.ac.kr (M.H.); rga\_97@gnu.ac.kr (G.R.); shinsaya@gnu.ac.kr (S.-A.S.)

<sup>2</sup> Research Unit of Cryogenic Novel Material, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Republic of Korea; junhyucklee@kopri.re.kr

<sup>3</sup> Department of Polar Sciences, University of Science and Technology, Incheon 21990, Republic of Korea

\* Correspondence: changsup@gnu.ac.kr; Tel.: +82-55-772-2432

**Abstract:** Cancer immunotherapy strategies are based on the utilization of immune checkpoint inhibitors to instigate an antitumor immune response. The efficacy of immune checkpoint blockade, directed at adaptive immune checkpoints, has been demonstrated in select cancer types. However, only a limited subset of patients has exhibited definitive outcomes characterized by a sustained response after discontinuation of therapy. Recent investigations have highlighted the significance of immune checkpoint molecules that are overexpressed in cancer cells and inhibit myeloid lineage immune cells within a tumor microenvironment. These checkpoints are identified as potential targets for anticancer immune responses. Notably, the immune checkpoint molecules CD24 and CD200 have garnered attention owing to their involvement in tumor immune evasion. CD24 and CD200 are overexpressed across diverse cancer types and serve as signaling checkpoints by engaging their respective receptors, Siglec-10 and CD200 receptor, which are expressed on tumor-associated myeloid cells. In this review, we summarized and discussed the latest advancements and insights into CD24 and CD200 as emergent immune checkpoint moieties, further delving into their therapeutic potentials for cancer treatment.

**Keywords:** immune checkpoint molecules; CD24; CD200; Siglec-10; CD200 receptor



**Citation:** Moon, S.Y.; Han, M.; Ryu, G.; Shin, S.-A.; Lee, J.H.; Lee, C.S. Emerging Immune Checkpoint Molecules on Cancer Cells: CD24 and CD200. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 15072. <https://doi.org/10.3390/ijms242015072>

Academic Editors: Marco Erreni and Diletta Di Mitri

Received: 12 September 2023

Revised: 4 October 2023

Accepted: 10 October 2023

Published: 11 October 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Cancer is a perpetually advancing disease characterized by the development of abnormal cells that are uncontrollably divided [1]. Despite advancements in anticancer therapies, cancer remains one of the leading causes of mortality [2]. The immune system substantially affects the development of cancer cells and the pertinent treatment approaches. Cancer immunotherapy involves multiple immunomodulatory strategies to control the progression of malignant tumors. Recently, immunotherapy via immune checkpoint blockade has been successfully used to treat several cancer types [3].

Immune checkpoints include costimulatory molecules, such as CD28, and co-inhibitory signaling molecules, including cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) and programmed cell death protein 1 (PD-1), which are required for immune homeostasis [4]. These checkpoints influence the balance between costimulation and co-inhibition, facilitating self-tolerance under physiological conditions. However, tumor cells exploit immune checkpoint pathways to evade immune surveillance, thereby suppressing antitumor immune responses [5]. Immune checkpoint molecules, such as CTLA-4 and PD-1, disrupt antitumor immunity by attenuating T-cell activation in the event of malignancy, leading to a highly immunosuppressive tumor microenvironment [6]. Immune checkpoint inhibitors (ICIs) targeting PD-1, such as nivolumab, cemiplimab, and pembrolizumab, and those targeting CTLA-4, such as ipilimumab, have been clinically approved for the treatment of

activation [135]. In the present review, we propose that the CD24–Siglec-10 and CD200–CD200R axes are emerging immune checkpoints. Recently, increasing evidence has proven that CD24, highly expressed in multiple cancer cells, serves as a “Don’t eat me” signal and modulates macrophage activity in concert with Siglec-10. Therefore, blocking the interaction between CD24 and Siglec-10 may improve the host immune response against cancer cells by targeting phagocytic checkpoints in cancer immunotherapy. CD200 is an immune checkpoint molecule that suppresses innate immune cell activation by interacting with CD200R. CD200 is highly expressed in various malignant tumor cells and has a pro-tumor effect [98]. The receptor for CD200, CD200R, is predominantly expressed in myeloid cells, including macrophages [127]. The impact of the CD200–CD200R axis on tumor growth and progression has been confirmed in various tumor microenvironments.

Collectively, several preclinical and clinical studies have demonstrated the significance of the CD24–Siglec-10 and CD200–CD200R axes as targets for immune checkpoint blockade. Although no drugs have entered the clinical stages, the effectiveness of targeting these two immune checkpoint axes needs to be investigated in further clinical studies across multiple cancer types and combinatorial studies with other chemotherapy and diverse immunotherapy approaches in the near future. Blocking other immune checkpoint molecules, such as PD-1 and CTLA-4, along with CD24 or CD200, may synergistically enhance antitumor immunity. Based on the current knowledge of CD24 and CD200, further research suggests that CD24- and CD200-targeted treatments are potential immunotherapeutic drugs for patients with cancer.

**Author Contributions:** M.H. and G.R. conceptualized the study, while S.Y.M. wrote the manuscript under the guidance of C.S.L., S.-A.S. and J.H.L. contributed intellectually to the present study. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The present research was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF), funded by the Ministry of Education (RS-2023-00246627) and the Korea Polar Research Institute (KOPRI) grant funded by the Ministry of Oceans and Fisheries (KOPRI project No. \* PE21900).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Bray, F.; Laversanne, M.; Weiderpass, E.; Soerjomataram, I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer* **2021**, *127*, 3029–3030. [CrossRef]
2. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J. Clin.* **2020**, *70*, 7–30. [CrossRef]
3. Ribas, A.; Wolchok, J.D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* **2018**, *359*, 1350–1355. [CrossRef]
4. Gun, S.Y.; Lee, S.W.L.; Sieow, J.L.; Wong, S.C. Targeting immune cells for cancer therapy. *Redox Biol.* **2019**, *25*, 101174. [CrossRef]
5. Darvin, P.; Toor, S.M.; Sasidharan Nair, V.; Elkord, E. Immune checkpoint inhibitors: Recent progress and potential biomarkers. *Exp. Mol. Med.* **2018**, *50*, 1–11. [CrossRef]
6. Wei, S.C.; Duffy, C.R.; Allison, J.P. Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. *Cancer Discov.* **2018**, *8*, 1069–1086. [CrossRef]
7. Haanen, J.B.; Robert, C. Immune checkpoint inhibitors. *Prog. Tumor Res.* **2015**, *42*, 55–66.
8. Liu, X.; Hogg, G.D.; DeNardo, D.G. Rethinking immune checkpoint blockade: ‘Beyond the t cell’. *J. Immunother. Cancer* **2021**, *9*, e001460. [CrossRef]
9. Marin-Acevedo, J.A.; Kimbrough, E.O.; Lou, Y. Next generation of immune checkpoint inhibitors and beyond. *J. Hematol. Oncol.* **2021**, *14*, 45. [CrossRef]
10. Lentz, R.W.; Colton, M.D.; Mitra, S.S.; Messersmith, W.A. Innate immune checkpoint inhibitors: The next breakthrough in medical oncology? *Mol. Cancer Ther.* **2021**, *20*, 961–974. [CrossRef]
11. Chen, D.S.; Mellman, I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity* **2013**, *39*, 1–10. [CrossRef]
12. Feng, M.; Jiang, W.; Kim, B.Y.S.; Zhang, C.C.; Fu, Y.X.; Weissman, L.L. Phagocytosis checkpoints as new targets for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2019**, *19*, 568–586. [CrossRef]

## ARTICLE

## Open Access



# DB3 from Antarctic lichen inhibits the growth of B16F10 melanoma cells in vitro and in vivo

Seyeon Choi<sup>1</sup>, Huiji Kim<sup>1</sup>, Seong-Ah Shin<sup>1</sup>, Moonsu Kim<sup>1</sup>, Sun Young Moon<sup>1</sup>, Minji Kim<sup>1</sup>, Seulah Lee<sup>2</sup>, Jun Hyuck Lee<sup>3,4</sup>, Hyun Ho Park<sup>5</sup>, Ui Joung Youn<sup>3,6\*</sup> and **Chang Sup Lee<sup>1\*</sup>** 

**Abstract**

Malignant melanoma is a fatal disease with an increasing global incidence. Despite numerous studies focused on anti-cancer drugs, a variety of side effects of cancer treatment remain challenging. Thus, there is a pressing need to identify novel anti-cancer agents with minimal cytotoxicity and side effects. DB3 (1,3,7,9-tetrahydroxy-2,8-dimethyl-4,6-di[ethanoyl]dibenzofuran) is a member of the dibenzofuran family and is extracted from *Ramalina terebrata* (Antarctic lichen). We investigated if DB3 exerted an antitumor effect on B16F10 melanoma cells. The results revealed that DB3 exerted time- and dose-dependent reduction of cell viability by inducing apoptosis and significantly suppressing cell proliferation through cell cycle arrest in the G0/G1 phase in B16F10 melanoma cells. Additionally, DB3 impeded the migration and invasiveness of B16F10 cells. Subsequently, we observed that DB3 decreased the expression levels of Cdk4/Cyclin D1 and the phosphorylation of p38, JNK, ERK, and AKT. Furthermore, DB3 decreased melanoma tumor growth in a mouse tumor syngraft model. Based on these findings, we propose that DB3 possesses potential for use as an anti-cancer agent for melanoma treatment.

**Keywords** Anti-cancer, DB3, Proliferation, Migration, Invasion

**\*Correspondence:**

Ui Joung Youn

ujyoun@kopri.re.kr

Chang Sup Lee

changsup@gnu.ac.kr

<sup>1</sup> College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea

<sup>2</sup> Department of Oriental Medicine Biotechnology, College of Life Sciences, Kyung Hee University, Yongin 17104, Republic of Korea

<sup>3</sup> Department of Polar Sciences, University of Science and Technology, Incheon 21990, Republic of Korea

<sup>4</sup> Research Unit of Cryogenic Novel Material, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Republic of Korea

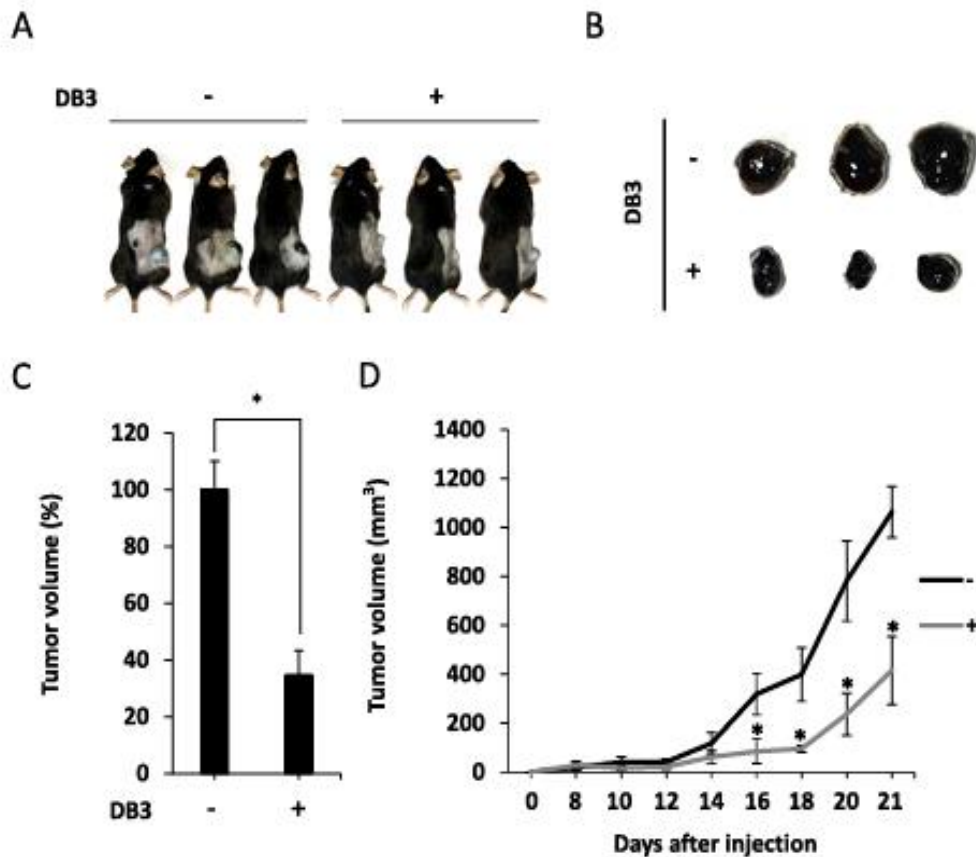
<sup>5</sup> College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 06974, Republic of Korea

<sup>6</sup> Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Republic of Korea

**Introduction**

Melanoma originates from genetic mutations in melanocytes and can manifest in the skin, eye, and inner ear, and it is one of the most aggressive and lethal types of cutaneous cancer [1]. Although melanoma constitutes a small proportion of total skin cancer cases, it is responsible for 80% of related mortalities [2]. The incidence of melanoma is rising more rapidly than that of other cancers, with projections indicating a potential doubling in the number of patients within the next 10–20 years [2]. Melanoma is indistinguishable from dysplastic nevi in terms of its morphological characteristics, thus making it difficult to diagnose in its early stages [3].

Cancer cells, including melanoma cells, are characterized by their ability to proliferate limitlessly and are marked by uncontrolled growth and reduced ability to undergo apoptosis [4, 5]. The diminished apoptosis capability enables cancer cells to survive for longer periods of



**Fig.7** DB3 reduces tumor size in vivo. **A** Images of tumor-bearing mice after injecting DB3-treated or non-treated B16F10 cells. **B** Images of reduced tumor size following DB3 treatment. **C** Quantitative analysis of panel B. **D** The graph represents the tumor size development after injecting the B16F10 melanoma cells. \* $p < 0.05$  when compared to the control group. The data are presented as the means  $\pm$  SD. Three independent experiments were performed. Among them, representative data are presented

new, low-side-effect anti-cancer drug for the treatment of melanoma by regulating cell proliferation and apoptosis.

**Acknowledgements**  
Not applicable

**Author contributions**  
SC, HK, S-AS, MK, MK, and SL performed the experiments. SC wrote the manuscript under the guidance of SYM, UJY, and CSL. SYM, JHL, HHR, UJY, provided intellectual contributions to this study. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding**  
This research was supported by the Korea Polar Research Institute (KOPRI) grant funded by the Ministry of Oceans and Fisheries (KOPRI project No. PE23900) and the Korea Institute of Marine and Technology Promotion (KIMST) grant funded by the Ministry of Oceans and Fisheries (KIMST 202006102(PM23030)).

**Availability of data and materials**  
The datasets that support the finding of this study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Declarations

**Competing interests**  
The authors declare no competing interest.

Received: 5 October 2023 Accepted: 24 October 2023  
Published online: 15 November 2023

## References

- Domingues B et al (2018) Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets Ther* 7:35–49. <https://doi.org/10.2147/ITT.S134842>
- Kuphal S, Bosserhoff A (2009) Recent progress in understanding the pathology of malignant melanoma. *J Pathol J Pathol Soc Great Britain Ireland* 219(4):400–409
- Zhang G, Li G (2012) Novel multiple markers to distinguish melanoma from dysplastic nevi. *PLoS ONE* 7(9):45037
- Feitelson MA et al (2015) Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Seminars Cancer Biol*. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.006>

관인생략

## 출원번호통지서

출원일자 2022.11.07  
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)  
출원번호 10-2022-0146801 (접수번호 1-1-2022-1178449-35)  
(DAS접근코드8822)  
출원인명칭 경상국립대학교산학협력단(2-2004-010719-4) 외 1명  
대리인성명 최규환(9-2005-001504-0)  
발명자성명 이장섭 안미정 신성아 류경아 안장은 김희지 이준혁  
발명의명칭 위스틴을 유효성분으로 함유하는 항염증용 조성물

## 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지([www.patent.go.kr](http://www.patent.go.kr))에서 확인하실 수 있습니다.  
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호  
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.  
※ 심사제도 안내 : <https://www.kipo.go.kr>-지식재산제도



## 【서지사항】

|            |  |
|------------|--|
| 【서류명】      | 특허출원서  |
| 【출원구분】     | 특허출원   |
| 【출원인】      |  |
| 【명칭】       | 경상국립대학교산학협력단   |
| 【특허고객번호】   | 2-2004-010719-4  |
| 【출원인】      |  |
| 【명칭】       | 한국해양과학기술원  |
| 【특허고객번호】   | 1-2012-034461-6  |
| 【대리인】      |  |
| 【성명】       | 최규환  |
| 【대리인번호】    | 9-2005-001504-0  |
| 【포괄위임등록번호】 | 2014-059102-4  |
| 【포괄위임등록번호】 | 2012-104963-7  |
| 【발명의 국문명칭】 | 위스틴을 유효성분으로 함유하는 항염증용 조성물  |
| 【발명의 영문명칭】 | Anti-inflammatory composition comprising wistin as effective component |
| 【발명자】      |  |
| 【성명】       | 이창섭  |
| 【성명의 영문표기】 | Lee, Chang Sup   |
| 【주민등록번호】   | 750225-1XXXXXX   |
| 【우편번호】     | 52650  |

**【주소】** 인천광역시 연수구 컨벤시아대로252번길 30, 1503동 2501호(송도동, 송도 더샵 퍼스트파크 F15BL)

**【출원언어】** 국어

**【공지예외적용대상증명서류의 내용】**

**【공개형태】** 논문발표

**【공개일자】** 2022.09.05

**【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】**

**【과제고유번호】** 1711166821

**【과제번호】** 2020R1F1A1070844

**【부처명】** 과학기술정보통신부

**【과제관리(전문)기관명】** 한국연구재단

**【연구사업명】** 개인기초연구(과기정통부)

**【연구과제명】** Efferocytosis 복합체 조절을 통한 자살세포 제거 기전 및 제어 연구

**【기여율】** 1/2

**【과제수행기관명】** 경상국립대학교

**【연구기간】** 2022.03.01 - 2023.02.28

**【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】**

**【과제고유번호】** 1525012064

**【과제번호】** PE21900

**【부처명】** 해양수산부

**【과제관리(전문)기관명】** 극지연구소

|           |                                  |
|-----------|----------------------------------|
| 【연구사업명】   | 극지연구소운영지원(R&D)(주요사업비)            |
| 【연구과제명】   | 2021년도 국내 학·연 극지연구 진흥프로그램(PAP사업) |
| 【기여율】     | 1/2                              |
| 【과제수행기관명】 | 한국해양과학기술원부설극지연구소                 |
| 【연구기간】    | 2021.01.01 ~ 2021.12.31          |
| 【취지】      | 위와 같이 특허청장에게 제출합니다.              |

대리인 최규환 (서명 또는 인)

#### 【수수료】

|           |  |          |
|-----------|--|----------|
| 【출원료】     | 0 면  | 46,000 원 |
| 【가산출원료】   | 26 면   | 0 원      |
| 【우선권주장료】  | 0 건  | 0 원      |
| 【심사청구료】   | 0 항  | 0 원      |
| 【합계】      |  | 46,000원  |
| 【감면사유】    | 공공연구기관(50%감면)[1], 전담조직(50%감면)[1]                 |          |
| 【감면후 수수료】 | 23,000 원   |          |
| 【첨부서류】    | 1. 공지에외적용대상(신규성상실의예외, 출원시의특례)규정을 적용받기 위한 증명서류_1통 |          |

1 : 공지에외적용대상(신규성상실의예외, 출원시의특례)규정을 적용받기 위한 증명서류

[PDF 파일 첨부](#)

관인생략

## 출원번호통지서

출원일자 2024.02.07  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
출원번호 10-2024-0018921 (접수번호 1-1-2024-0153148-13)  
(DAS접근코드EC1F)  
출원인명칭 경상국립대학교산학협력단(2-2004-010719-4) 외 2명  
대리인성명 최규환(9-2005-001504-0)  
발명자성명 **이창섭** 김민지 안장은 신성아 문선영 김문수 최세연 김희지 피킴호아 이준혁 윤의중 박현호  
발명의명칭 2,5,6-트리메톡시-p-테르페닐을 유효성분으로 함유하는 항염증용 조성물

## 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로  
홈페이지([www.patent.go.kr](http://www.patent.go.kr))에서 확인하실 수 있습니다.  
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가  
까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호  
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하  
여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에  
문의하여 주시기 바랍니다.  
※ 심사제도 안내 : <https://www.kipo.go.kr>-지식재산제도

## 【서지사항】

|            |  |
|------------|--|
| 【서류명】      | 특허출원서  |
| 【출원구분】     | 특허출원   |
| 【출원인】      |  |
| 【영칭】       | 경상국민대학교산학협력단   |
| 【특허고객번호】   | 2-2004-010719-4  |
| 【출원인】      |  |
| 【영칭】       | 한국해양과학기술원  |
| 【특허고객번호】   | 1-2012-034461-6  |
| 【출원인】      |  |
| 【영칭】       | 중앙대학교 산학협력단  |
| 【특허고객번호】   | 2-2004-038530-5  |
| 【대리인】      |  |
| 【성명】       | 최규환  |
| 【대리인번호】    | 9-2005-001504-0  |
| 【포괄위임등록번호】 | 2014-059102-4  |
| 【포괄위임등록번호】 | 2012-104963-7  |
| 【발명의 구분영칭】 | 2,5,6-트리메톡시-p-테르페닐을 유효성원으로 함유하는 항염증용 조성물   |
| 【발명의 영문영칭】 | Anti-inflammatory composition containing 2,5,6-trimethoxy-p-terphenyl as effective component |
| 【발명자】      |  |
| 【성명】       | 이창섭  |

**【성명】** 윤의중  
**【성명의 영문표기】** Youn, Ui Joung  
**【주민등록번호】** 731205-1XXXXXX  
**【우편번호】** 14999  
**【주소】** 경기도 시흥시 장현천로 170, 804동 802호 (군자동, 장현  
 동원로알듀크 메트로포레)

**【발명자】**

**【성명】** 박현호  
**【성명의 영문표기】** Park, Hyun Ho  
**【주민등록번호】** 740909-1XXXXXX  
**【우편번호】** 05555  
**【주소】** 서울특별시 송파구 잠실로 62, 321동 1403호 (잠실동, 트리  
 지움)

**【출원언어】** 국어

**【심사청구】** 청구

**【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】**

**【과제고유번호】** 1525014937

**【과제번호】** PE23900

**【부처명】** 해양수산부

**【과제관리(전문)기관명】** 극지연구소

**【연구사업명】** 2023년도 국내 학·연 극지연구 진흥프로그램(PAP사업)

**【연구과제명】** 극지 생물자원 유래 차세대 개념 기반 면역제어 물질 개발

관인생략

## 출원번호통지서

출원일자 2023.11.14  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(2)  
출원번호 10-2023-0157625 (접수번호 1-1-2023-1260543-11)  
(DAS접근코드2693)  
출원인명칭 경상국립대학교산학협력단(2-2004-010719-4) 외 3명  
대리인성명 최규환(9-2005-001504-0)  
발명자성명 이창섭 최세연 김희지 신성아 김문수 문선영 김민지 이슬아 이준혁 박현호 윤의중  
발명의명칭 1,3,7,9-테트라하이드록시-2,8-디메틸-4,6-디(에타노일)디벤조푸란을 유효성분으로 함유하는  
항암용 조성물

## 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지([www.patent.go.kr](http://www.patent.go.kr))에서 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정) 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.  
※ 심사제도 안내 : <https://www.kipo.go.kr>-지식재산제도

## 【서지사항】

|            |                 |
|------------|-----------------|
| 【서류명】      | 특허출원서           |
| 【참조번호】     | 2               |
| 【출원구분】     | 특허출원            |
| 【출원인】      |                 |
| 【명칭】       | 경상국립대학교산학협력단    |
| 【특허고객번호】   | 2-2004-010719-4 |
| 【출원인】      |                 |
| 【명칭】       | 한국해양과학기술원       |
| 【특허고객번호】   | 1-2012-034461-6 |
| 【출원인】      |                 |
| 【명칭】       | 경희대학교 산학협력단     |
| 【특허고객번호】   | 2-2004-007362-3 |
| 【출원인】      |                 |
| 【명칭】       | 중앙대학교 산학협력단     |
| 【특허고객번호】   | 2-2004-038530-5 |
| 【대리인】      |                 |
| 【성명】       | 최규환             |
| 【대리인번호】    | 9-2005-001504-0 |
| 【포괄위임등록번호】 | 2014-059102-4   |
| 【포괄위임등록번호】 | 2012-104963-7   |



|                   |  |
|-------------------|--|
| <b>【발명의 국문명칭】</b> | 1,3,7,9-테트라하이드록시-2,8-디메틸-4,6-디(에타노일)디벤조푸란을 유효성분으로 함유하는 항암용 조성물   |
| <b>【발명의 영문명칭】</b> | Anticancer composition containing<br>1,3,7,9-Tetrahydroxy-2,8-dimethyl-4,6-di(ethanoyl)dibenzofuran as effective component |
| <b>【발명자】</b>      |  |
| <b>【성명】</b>       | 이창섭  |
| <b>【성명의 영문표기】</b> | Lee, Chang Sup   |
| <b>【주민등록번호】</b>   | 750225-1XXXXXX   |
| <b>【우편번호】</b>     | 52650  |
| <b>【주소】</b>       | 경상남도 진주시 새평거리 30, 109동 1701호 (평거동, 엠코타운더프라하)   |
| <b>【발명자】</b>      |  |
| <b>【성명】</b>       | 최세연  |
| <b>【성명의 영문표기】</b> | Choi, Seyeon   |
| <b>【주민등록번호】</b>   | 980220-2XXXXXX   |
| <b>【우편번호】</b>     | 51462  |
| <b>【주소】</b>       | 경상남도 창원시 성산구 대암로 82, 305동 1406호 (대방동, 성원남산3차아파트)   |
| <b>【발명자】</b>      |  |
| <b>【성명】</b>       | 김희지  |
| <b>【성명의 영문표기】</b> | Kim, HuiJi   |

**【주소】** 인천광역시 연수구 컨벤시아대로252번길 30, 1503동 2501호  
(송도동, 송도 더샵 퍼스트파크 F15BL)

**【발명자】**

**【성명】** 박현호

**【성명의 영문표기】** Park, Hyun Ho

**【주민등록번호】** 740909-1XXXXXX

**【우편번호】** 05555

**【주소】** 서울특별시 송파구 잠실로 62, 321동 1403호 (잠실동, 트리  
지움)

**【발명자】**

**【성명】** 윤의중

**【성명의 영문표기】** Youn, Ui Joung

**【주민등록번호】** 731205-1XXXXXX

**【우편번호】** 14999

**【주소】** 경기도 시흥시 장현천로 170, 804동 802호 (군자동, 장현  
동원로알듀크 메트로포레)

**【출원언어】** 국어

**【심사청구】** 청구

**【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】**

**【과제고유번호】** 1525014937

**【과제번호】** PE23900

**【부처명】** 해양수산부

【과제관리(전문)기관명】 극지연구소  
 【연구사업명】 2023년도 국내 학·연 극지연구 진흥프로그램(PAP사업)  
 【연구과제명】 극지 생물자원 유래 차세대 개념 기반 면역제어 물질 개발  
 【기여율】 1/2  
 【과제수행기관명】 극지연구소  
 【연구기간】 2023.01.01 ~ 2023.12.31

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 1525013765  
 【과제번호】 202006102  
 【부처명】 해양수산부  
 【과제관리(전문)기관명】 해양수산과학기술진흥원  
 【연구사업명】 극지유전자원활용기술개발사업  
 【연구과제명】 극지 유래 생물자원을 활용한 항생제 후보물질 개발  
 【기여율】 1/2  
 【과제수행기관명】 한국해양과학기술원 부설 극지연구소  
 【연구기간】 2023.01.01 ~ 2023.12.31

【취지】 위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

대리인 최규환 (서명 또는 인)

【수수료】

【출원료】 0 면 46,000 원  
 【가산출원료】 32 면 0 원

붙임 2.

## <인력양성 증빙자료>

[인력양성증빙 1]

### 2021학년도 2학기 약학과 대학원 학위청구논문심사(발표)

▶ 일시 : 2021. 11. 12.(금) 16:00~18:00

▶ 장소 : 약학대학 28동 420호 강의실

▶ 1부 석사과정 (16:00 ~ 16:30) / 발표 10분, 질의응답 5분

- 대식세포에서 Pulmatin의 항염증 효과 연구 (생명약학전공 류경아)
- 약성 흡색중 세포에서 Wistin의 항암효과 연구 (생명약학전공 한민주)

▶ 2부 박사과정 (16:30 ~ 18:00) / 발표 30분, 질의응답 15분

- 적층 제조 기술을 이용한 경구 및 안과형 약물전달시스템 개발 (산업약학전공 이재민)
- 식물 천연성 면역에서 HOS1의 분자 및 기능적 특성 연구 (생명약학전공 Donah Mary Jitgano Macoy)

- 코로나19 바이러스로 인하여 참가자는 마스크 착용을 의무화합니다.  
(Wearing a mask)





제 출 용 도 : 신분 확인용  
제 출 처 : 경상국립대학교

발 급 일 : 2023/11/27  
유 효 기 간 : 2024/02/25

제 2023 - 0178424 호

경상국립대학교  
Gyeongsang National University

## 학 위 증 명 서

성 명 : 류경아  
 생 년 월 일 : 1997년 4월 13일  
 소 속 : 대학원 석사과정 약학과  
 전 공 : 생명약학  
 입 학 일 자 : 2020년 3월 2일  
 학 위 수 여 일 자 : 2022년 2월 25일  
 학 위 명 : 약학석사  
 학 위 등 록 번 호 : 경상국립대2021(석)079

GYEONGSANG  
 NATIONAL UNIVERSITY  
 위의 사실을 증명합니다.

2023년 11월 27일

경 상 국 립 대 학 교 총 장



본 증명서는 전자증명서(PDF)이므로 타인으로부터 도난당하거나 전자서명이 없는 증명서는 허위로 간주되며 과실 이외의 손해충족을 사본입니다.

(INTERNET NO) 3629705136163645

본 증명서는 전자증명서(PDF파일)로 발급되었습니다. 전자증명서는 출력시 출력물은 사본으로 인정됩니다.  
전자증명서 확인용 전용부여가 아닌 경우 진본 여부 및 전자서명을 확인 할 수 없으며 진본여부가 표시되지 않습니다.  
전자증명서 확인용 전용부여는 [www.certpia.com/eDown](http://www.certpia.com/eDown) 에서 다운 받을 수 있습니다.

제 출 용 도 : 신분 확인용  
제 출 처 : 경상국립대학교

발 급 일 : 2023/11/16  
유 효 기 간 : 2024/02/14

제 2023 - 0172893 호

경상국립대학교  
Gyeongsang National University

## 학 위 증 명 서

성 명 : **한민주**  
생 년 월 일 : 1997년 6월 3일  
소 속 : 대학원 석사과정 약학과  
전 공 : 생명약학  
입 학 일 자 : 2020년 3월 2일  
학 위 수여 일자 : 2022년 2월 25일  
학 위 명 : **약학석사**  
학 위 등록 번호 : 경상국립대2021(석)080

GYEONGSANG  
NATIONAL UNIVERSITY  
위의 사실을 증명합니다.

2023년 11월 16일

경 상 국 립 대 학 교 총 장



※ 증명서는 전자증명서(파일)이므로 타인소유 및 전자서명이 없는 증명서는 취조를 간주 되어 합법 이외의 출력을 할 수 없습니다.

(INTERNET) ※ **본 증명서는 열람용이며, 법적 효력이 없습니다.**

본 증명서는 전자증명서(PDF파일)로 발급되었습니다. 전자증명서는 출력시 출력물은 사본으로 인정됩니다.  
전자증명서 확인용 전용부여가 아닌 경우 진본 여부 및 전자서명을 확인 할 수 없으며 진본여부가 표시되지 않습니다.  
전자증명서 확인용 전용부여는 [www.certpia.com/eDown](http://www.certpia.com/eDown) 에서 다운 받을 수 있습니다.

## 2022학년도 2학기 약학과 대학원 학위청구논문심사(발표)

▶ 일시 : 2022. 11. 17.(목) 11:00~13:45

▶ 장소 : 약학대학 28동 420호 강의실

▶ 1부 석사과정 (11:00 ~ 11:45) / 발표 10분, 질의응답 5분

- 대식세포에서 항염증 효능에 대한 Wistin의 역할 (생명약학전공 안장은)
- 참느릅나무에서 추출된 catechin 유도체 화합물의 멜라닌 생성 억제 효능에 관한 연구 (생명약학전공 황태익)
- 고속중 세포에서 항암 효능에 대한 Afrormosin의 역할 (생명약학전공 김의지)

▶ 2부 박사과정 (13:00 ~ 13:45) / 발표 30분, 질의응답 15분

- 파이토케미칼에 의한 면역원성 및 비면역원성 세포죽음 연구 (생명약학전공 신성아)

- 참가자는 실내 마스크 착용을 의무화합니다.  
(Wearing a mask)



# 극지연구소



제 출 용 도 : 취업제출용  
제 출 처 : 과제

발 급 일 : 2023/11/17  
유 효 기 간 : 2024/02/15

제 2023 - 0173214 호



경상국립대학교  
Gyeongsang National University

## 학 위 증 명 서

성 명 : 안장은  
 생 년 월 일 : 1998년 12월 15일  
 소 속 : 대학원 석사과정 약학과  
 전 공 : 생명약학  
 입 학 일 자 : 2021년 3월 2일  
 학 위 수 여 일 자 : 2023년 2월 24일  
 학 위 명 : 약학석사  
 학 위 등록 번호 : 경상국립대2022(석)045

GYEONGSANG  
 NATIONAL UNIVERSITY  
 위의 사실을 증명합니다.

2023년 11월 17일

경 상 국 립 대 학 교 총



※ 증명서는 전자증명서(파일)이므로 단일스탬프 및 전자서명이 없는 증명서는 취조로 간주 되어 파일 이외의 출력물은 사본입니다.

(INTERNET NO) 3437653423073846

본 증명서는 전자증명서(PDF파일)로 발급되었습니다. 전자증명서는 출력시 출력물은 사본으로 인정됩니다.  
전자증명서 확인용 전용뷰어가 아닌 경우 진본 여부 및 전자서명을 확인 할 수 없으며 진본여부가 표시되지 않습니다.  
전자증명서 확인용 전용뷰어는 [www.certpia.com/eDown](http://www.certpia.com/eDown) 에서 다운 받을 수 있습니다.



# 학 위 증 명 서

성 명 : 김희자  
 생년월일 : 1998년 4월 28일  
 소 속 : 대학원 석사과정 약학과  
 과 공 : 생명화학  
 입학일자 : 2021년 3월 2일  
 학위수여일자 : 2023년 2월 24일  
 학 위 명 : 석사학위  
 학위등록번호 : 경상국립대2022(석)044

위의 사실을 증명합니다.

2023년 2월 9일

경 상 국 립 대 학 교 총 장



본 증명서 발급에 사용된 QR코드는 경상국립대학교 홈페이지에 등록된 증명서 발급정보를 포함하고 있으며, QR코드를 스캔하여 증명서 발급정보를 확인할 수 있습니다. QR코드 발급정보는 증명서 발급일로부터 1년 동안 유효하며, 이후에는 증명서 발급정보를 갱신해야 합니다.



2023년 2월 9일

www.gju.ac.kr | TEL: 053-850-4000

본 증명서 발급부  
 원본이 일치함  
 053-850-4000

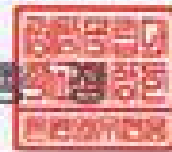
# 학 위 증 명 서

성 명 : **신성아**  
 생 년 월 일 : 1987년 6월 16일  
 소 속 : 대학원 박사과정 - 의학과  
 전 공 : 생명화학  
 입 학 일 자 : 2018년 3월 2일  
 학위 수여 일자 : 2023년 2월 24일  
 학 위 명 : **의학박사**  
 학위 등록 번호 : 경상국립대2022(박)035

위의 사실을 증명합니다.

2023년 5월 24일

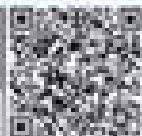
경 상 국 립 대 학 교



본 증명서 발급을 위하여 본 대학교에 대한 개인정보처리방침을 반드시 확인하십시오. 개인정보 처리방침은 본 대학교 홈페이지(www.gnu.ac.kr)에서 확인하실 수 있습니다. 본 증명서의 유효기간은 발급일로부터 5년입니다. 기타 자세한 내용은 개인정보처리방침을 반드시 확인하십시오.



Internet Mail 00104733224



본 증명서 발급  
 문의처 : 053-850-1111  
 팩스 : 053-850-1100

## 2023학년도 2학기 약학과 대학원 학위 청구논문심사(발표)

▶ 일시 : 2023. 11. 23.(목) 11:00~13:00

▶ 장소 : 약학대학 28동 420호 강의실

▶ 1부 박사과정 (11:00 ~ 12:30) / 발표 30분, 질의응답 15분

- 진단용력을 도입한 새로운 혈액 뇌 장벽 체외 모델의 개발 (약물과학전공 김준영)
- mRNA 약물 전달을 위한 생체 모방 마이크로니들 시스템의 개발과 응용 (산업약학전공 노인환)

▶ 2부 석사과정 (12:30 ~ 13:00) / 발표 10분, 질의응답 5분

- 세포/동물 모델에서 5,7-dihydroxy-4-methylcoumarin의 항알러지 효과 (생명약학전공 권수근)
- 벡터 내 안정성 및 단백질 발현을 개선하기 위해 설계된 폴리(A) 꼬리의 최적화 (산업약학전공 김진)

- 참가자는 실내에서 마스크를 착용해주시기 바랍니다.  
(Wearing a mask)



극지연구소



제 출 용 도 : 신분 확인용  
제 출 처 : 경상국립대학교

발 급 일 : 2024/01/08  
유 효 기 간 : 2024/04/07



제 2024 - 0004944 호

경상국립대학교  
Gyeongsang National University

## 학 위 수 여 예 정 증 명 서

성 명 : 권수근  
 생 년 월 일 : 1997년 11월 5일  
 소 속 : 대학원 석사과정 약학과  
 전 공 : 생명약학  
 입 학 일 자 : 2022년 3월 2일  
 수 여 예 정 일 자 : 2024년 2월 23일

GYEONGSANG  
NATIONAL UNIVERSITY

위의 사실을 증명합니다.

2024년 1월 8일

경 상 국 립 대 학 교 총



본 증명서는 전자증명서(파일)이므로 타협스탬프 및 전자서명이 없는 증명서는 효력으로 간주 되어 마일 이외의 출력물은 사본입니다.

(INTERNET NO) 3523405016603342

본 증명서는 전자증명서(PDF파일)로 발급되었습니다. 전자증명서는 출력시 출력물은 사본으로 인정됩니다.  
전자증명서 확인용 전용뷰어가 아닌 경우 진본 여부 및 전자서명을 확인 할 수 없으며 진본여부가 표시되지 않습니다.  
전자증명서 확인용 전용뷰어는 [www.certpia.com/eDown](http://www.certpia.com/eDown) 에서 다운 받을 수 있습니다.

KOPRI

주 의  
극지연구소

1. 이 보고서는 극지연구소 PAP사업 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 PAP 사업으로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.