

Hsp90 저해기전을 가진 천연물들의 최근 연구동향

오연일¹ · 김난아² · 김예현² · 이태훈² · 이용섭^{1*}

¹경희대학교 약학과, ²경희대학교 한약학과

Recent Advances on the Study of Hsp90 Inhibitory Natural Products

Yeon Il Oh¹, Nan A Kim², Ye Hyun Kim², Tae Hoon Lee², and Yong Sup Lee^{1*}

¹Department of Life and Nanopharmaceutical Science & Department of Pharmacy,
College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

²Department of Oriental Pharmaceutical Science & Kyung Hee East-West Pharmaceutical Research Institute,
Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Abstract – Heat shock protein 90 (Hsp90) is a molecular chaperone that assists protein folding and contributes to the stability of various proteins. It also stabilizes a number of proteins involved in tumor growth to consider it as a promising target for the treatment of cancer. Natural products have been a rich source of agents of value in medicine, therefore discovering lead compounds from them is one of important strategy in the drug development. In this regard, geldanamycin, radicicol, novobiocin and celastrol have been utilized as leads for the development of Hsp90 inhibitory anticancer agents. This review summerizes recent findings of natural products as Hsp90 inhibitors. The Hsp90 inhibitory activities, mode of actions on Hsp90 and cytotoxicities on human cancer cell lines of natural products including bulgariolactone B, curcumin, (-)-gambogic acid, quercetin, sansalvamide A, silybin, and withaferin A were discussed.

Key words – heat shock protein 90, natural products, inhibitors, anticancer agents, bulgariolactone B, curcumin, (-)-gambogic acid, sansalvamide A, withaferin A.

의약품의 작용기전을 분자 수준에서 이해하기 어려웠던 1990년대 이전에는 천연물에서 분리된 활성물질들을 리드 화합물로 하여 이들의 구조개선을 통하여 의약품을 개발하는 전략이 주류를 이루어 왔다. 근래에는 생명과학의 비약적인 발전에 힘입어 신체가 세포 또는 분자적 차원에서 어떻게 작용하는지에 대해서 많은 이해가 됨으로써 의약품 개발에 적합한 새로운 표적들이 속속 발굴되어 의약품 개발의 패러다임은 이제 표적 중심으로 전환되고 있다. 그러나 이러한 표적들은 최근에 와서야 새로이 발굴되었으므로 이에 작용하는 리드 화합물의 도출이 의약품 후보물질의 개발에 필요하다. 따라서, 최근에는 새로운 표적에 작용하는 리드 화합물의 도출을 위하여 화합물 라이브러리의 무작위 검색(random screening) 및 화합물 라이브러리의 구축을 위한 조합화학, 표적의 구조에 근거한 리드 화합물의 합리적인 디자인 등 다양한 방법들이 활용되고 있다. 리드 화합물로서의 천연물은 일반적으로 질소보다는 산소를 더 많이 함

유하고 있는 구조적 특성으로 인해 경구 투여 시 생체 이용률이 낮을 수 있으며, 입체중심을 많이 가지고 있어 합성이 어려운 단점이 있을 수 있다. 하지만, 천연물들은 합성 화합물 라이브러리보다 훨씬 구조적인 다양성과 복잡성을 제공할 수 있으며, 다양한 범위에서 생리활성을 나타낼 수 있는 장점을 지녀 새로운 표적에 작용하는 리드 화합물 발굴을 위한 유용한 자원으로 여전히 많이 활용되고 있다. 이에 본 총설에서는 최근 발굴된 표적인 heat shock protein(Hsp)에 작용하는 새로운 리드 화합물을 천연물로부터 도출한 연구들을 소개함으로써 Hsp 저해기전을 가진 새로운 항암제 개발에 기여하고자 한다.

열 충격 시 발현이 증가되어 heat shock protein으로 명명된 Hsp들은 생성된 초기의 폴리펩티드 또는 미성숙 단백질과 같은 client 단백질들과 결합하여 단백질 접힘 또는 성숙 과정을 유도하여 이들이 온전한 기능을 가지는 3차원적 구조가 되도록 도와주는 분자 샤프론(molecular chaperone)의 기능을 가지고 있다.^{1,2)} Hsp의 이러한 기능은 체내에서 단백질의 안정성에 기여하는 정상적인 역할을 하지만 암세포

*교신저자(E-mail): kyslee@khu.ac.kr
(Tel): +82-2-961-0370

의 성장과 생존에 있어서도 매우 중요한 기능을 하기 때문에 최근 항암제 개발을 위한 새로운 표적으로 많은 주목을 받고 있다.³⁾ Hsp90은 molecular chaperone 중 세포 내에 가장 많이 존재하며, 정상 세포에서는 전체 단백질의 1~2%를 차지하지만 세포가 스트레스를 받는 조건에서는 4~6%로 증가하는 것으로 알려져 있다. 암세포 역시 과도한 증식이나 열악한 주변 환경으로 인해 스트레스를 많이 받는 상황에 놓여 있기 때문에 Hsp90의 발현이 크게 증가되는 것으로 보고되었다. 따라서 Hsp90의 기능 억제제는 정상세포보다는 암세포에 더 큰 작용을 할 것으로 여겨지므로 Hsp90 저해제 발굴을 통한 항암제 개발이 최근에 와서 활발하게 진행되고 있다.

Geldanamycin(GDA)은 *Streptomyces hygroscopicus*로부터 분리된 화합물로 Hsp90 억제작용을 통하여 항암 효과를 나타낸다고 보고된 최초의 천연물이다.^{4,5)} 이후 GDA이 가진 독성 및 낮은 용해도 등의 단점을 보완하기 위해 17-allylaminogeldanamycin(17-AAG), 17-desmethoxy-17-N,N-dimethylaminoethylamino-geldanamycin(17-DMAG) 등과 같은 여러 유도체들이 합성되었으며, 17-AAG은 흑색종을 대상으로 한 임상시험 2단계에 진입하였다.^{6,7)} 이와 같이 GDA이 Hsp90을 억제하는 화합물로 알려짐에 따라 천연물로부터 새로운 Hsp90 저해제를 분리하기 위한 많은 연구들이 진행되어 herbimycin, radicicol, novobiocin, coumermycin A1, clorobiocin, epigallocatechin gallate(EGCG), taxol, pochonin, derrubone, gedunin, celastrol 등이 Hsp90을 억제하는 천연물로 보고되었다(Fig. 1).⁸⁾

본 총설에서는 Hsp90의 구조적 기능 및 Hsp90 저해제의 항암기전을 간략히 소개하고, 2009년 이후에 새롭게 보고된 Hsp90 저해작용을 가진 천연물의 구조와 작용기전을 살펴봄으로써 Hsp90의 저해작용을 가진 항암제의 개발 연구에

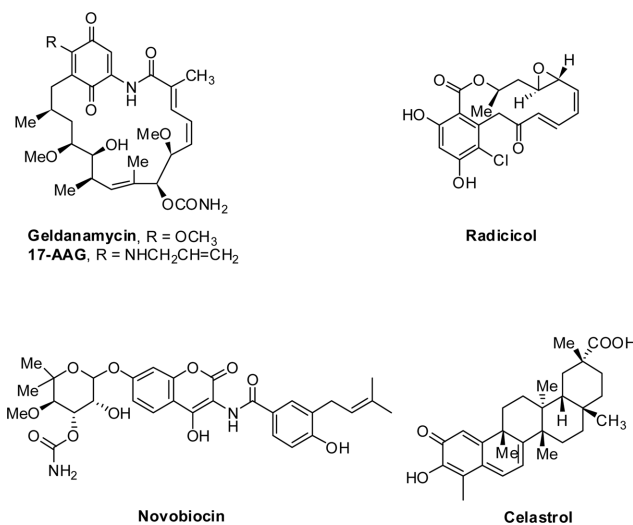


Fig. 1. The structure of Hsp90 inhibitors.

조금이나마 기여할 수 있기를 기대한다.

Hsp90의 기능적 특징 및 항암 작용기전

포유동물의 Hsp들은 분자 크기에 따라 분류되며, Hsp90, Hsp70, Hsp60과 Hsp40, 그리고 작은 분자량의 Hsp27 등이 현재까지 발견되었다.⁹⁾ Molecular chaperone 중 세포 내에 가장 많이 존재하는 Hsp90은 4 가지의 isoform으로 존재한다.^{10,11)} 세포질에는 Hsp90 α , Hsp90 β , endoplasmic reticulum에는 GRP94(94 kDa의 glucose-regulated protein), 미토콘드리아에는 TRAP-1(Hsp75/tumor necrosis factor receptor associated protein 1)이 각각 존재한다.¹²⁾ Hsp90의 각 하위 단위는 세 가지의 영역; 24-28 kDa의 N-말단 ATP-결합 영역(NBD); 38-44 kDa의 중간 영역(MD); 그리고 11-15 kDa의 C-말단 이합체화 영역(DD)으로 이루어져 있다.¹³⁾ 아래 Fig. 2에서 보듯이 Hsp90에 의한 단백질의 접힘과정은 ATP에 의해서 기동된다. Hsp90의 ATPase 활성은 약하지만, ATP의 결합과 가수분해가 Hsp90의 molecular chaperone으로서의 역할에 필수적이다. Hsp90의 활성 또는 기질 특이성은 co-chaperone에 의해서도 조절되며, p23, Aha1, Hop, Cdc37, immunophilin(FKBP51, FKBP52, Cyp-40), CHIP 등이 co-chaperone으로 알려져 있다.¹⁴⁾ 예를 들면, Hop은

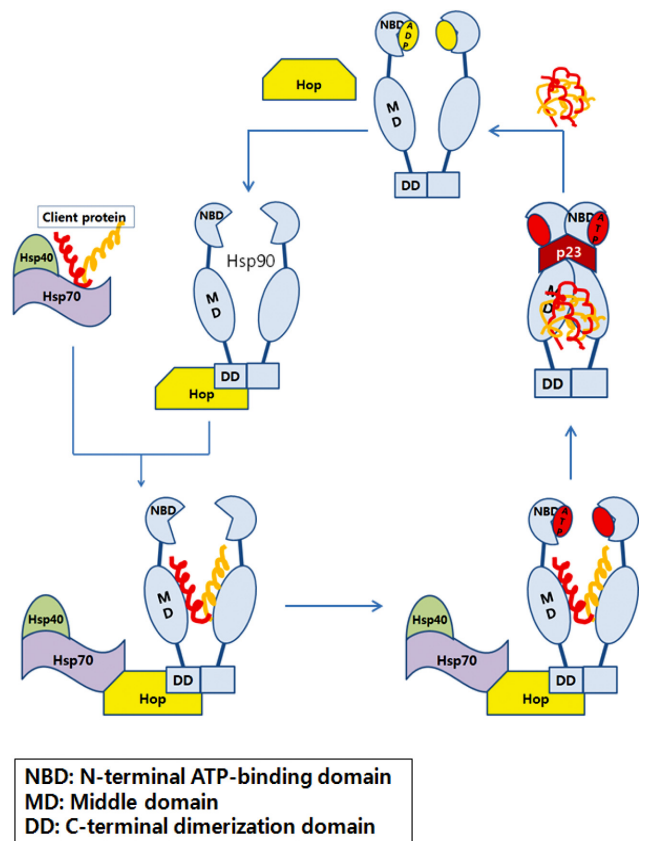


Fig. 2. Protein folding mechanism of Hsp90.

Hsp90과 Hsp70 사이의 연결고리가 됨으로써 기질이 Hsp90으로 이동하는 것을 용이하게 한다. Client 단백질들이 Hsp90으로 이동하여 MD에 결합하면 p23이 이어서 Hsp90에 결합하면서 Hsp70, Hsp40 및 Hop가 떨어져 나가게 된다. 이후 불완전한 client 단백질들은 단백질 접힘(folding) 또는 성숙과정을 거쳐 온전한 기능을 가지는 단백질로 전환된 후에 Hsp90을 떠난다.

현재까지 개발이 가장 활발한 Hsp90 저해제는 N-말단 영역에 결합하는 기전을 가지는 화합물들이다. 이 저해제들은 Hsp90의 N-말단 영역의 ATP 결합부위에 반응하여 Hsp90이 ATP와 결합하는 것을 차단한다. 이에 따라 chaperone cycle이 순환되지 않고 결국은 client protein의 분해를 유도한다.¹⁵⁾ Hsp90의 중간 영역은 client protein의 결합장소이자 ATPase 촉진의 기능적 위치이지만 정확한 기전은 아직 밝혀지지 않고 있다.¹⁶⁾ C-말단 영역은 이합체화를 하는 장소이며, co-chaperone과 상호작용을 하는 위치로써 이 부위와 반응하여 저해하는 저해제 또한 연구 중에 있다.¹⁶⁾ 이 외에도 N-말단 영역과 중간 영역의 co-chaperone 과의 반응을 억제시키는 저해제에 관한 연구도 진행 중이다.¹⁷⁾ 이와 같이 Hsp90의 다양한 위치에 여러 가지 방식으로 화합물들은 Hsp90과 암세포의 client 단백질과의 반응을 저해하여 단백질 접힘이 제대로 이루어지지 않게 함으로써 암 유발 단백질들이 ubiquitination을 거쳐 proteasome에 의해 분해가 되도록 하여 항암효과를 나타낸다.

항암제 표적으로서 Hsp90 저해제의 장점

암은 무한한 세포분열과 주변 세포로의 전이 등을 동반하는 질병으로 자가 성장촉진, 성장억제 신호에 대한 반응성 저하, 세포사멸 과정으로부터의 회피, 무한증식 능력의 획득, 지속적인 혈관증식, 암세포의 전이 등의 6가지 주요 특징이 발견된다(Table I).^{18,19)} 정상세포에서 Hsp90은 스트레스 환경으로 인하여 변성된 단백질 구조를 원래 상태의 활성구조로 안정화시킨다.²⁰⁾ 이러한 Hsp90의 기능이 암세포에서는 세포 사멸을 막고, 변형 단백질의 구조변화를 안정화시키게 된다.^{21,22)} 또한, 혈관 신생을 지속적으로 일으키고 암 전이와 변형을 강화시켜 무한한 복제를 가능하게 한다.¹⁶⁾ 따라서, Hsp90의 기능의 억제는 암세포의 6가지 특징 모두에 동시에 작용하므로 매우 효과적인 표적으로 여겨지고 있다.

Hsp90은 Hsp70에 의해 어느 정도 접힘이 이루어진 준안정한 상태의 단백질에 결합하여 접힘을 완성시키는 기능을 한다.¹⁴⁾ Hsp90과 결합하는 미성숙한 단백질들을 client protein이라고 하는데 지금까지 200 종류 이상의 세포내 신호전달에 관여하는 Hsp90 의존 client protein이 발견되었으며, 새로운 단백질들이 지금도 계속 발견되고 있다. 아래 Table I에는 암세포의 6가지 특징과 이에 관련된 client protein들을 나타내었다. 특히, Her2, Src family kinase, Raf,

Table I. The six hallmarks of cancer and related client proteins^{12,13)}

Hallmark	Hsp90 client proteins
자가 성장 촉진	Raf-1, AKT, Her-2, MEK, Bcr-Abl, FLT-3, EGFR, IGF-1R, FGFR, KDR
성장 억제 신호에 대한 반응성 저하	Wee 1, Myt 1, CDK4, CDK6, Plk
세포 사멸 과정으로부터의 회피	RIP, AKT, mutant p53, c-MET, Apaf-1, Survivin
무한 증식 능력의 획득	Telomerase(h-TERT)
지속적인 혈관 증식	FAK, AKT, HIF-1 α , VEGFR, FLT-3
암세포의 전이	c-MET, MMP

PLK, RIP, Akt, telomerase, Met 등은 암과 직접적인 연관이 있는 client protein들로 알려져 있다.^{18,23,24)} 따라서 Hsp90의 활성을 조절함으로써 client protein의 성숙을 억제하는 방법을 통해 암세포의 성장을 방해하는 것이 항암제 신약 개발의 새로운 전략이 되고 있다. 특히, 다른 계열의 항암제는 제한적인 기전을 가지는 데에 비해서 Hsp90 저해제는 암세포 성장에 관련된 다양한 downstream에 영향을 미치기 때문에 암세포로 하여금 내성을 갖기 힘들게 한다는 장점도 갖는다고 보고되었다.²⁵⁾

항암제 타깃으로서 Hsp90의 또다른 효용성은 정상세포 대비 암세포에 대한 선택적인 작용에서 찾을 수 있다. 최근 연구에 따르면 정상세포에서 Hsp90은 세포질 단백질의 약 1-2% 정도 발현하는데 비하여 세포가 스트레스를 받는 상황에서는 정상세포 보다 약 3배 정도가 발현된다고 보고되었다.²⁶⁾ 암세포에서도 마찬가지로 세포표면에 Hsp90의 수준이 높는데 이 역시 암세포가 일반 세포보다 스트레스를 많이 받기 때문으로 보인다.²⁷⁾ 또한, 암세포는 비정상적인 증식을 하므로 client protein이 과도하게 생성되고, 이에 따라 molecular chaperone의 필요성이 더욱 증가하기 때문에 더욱 Hsp90을 더욱 필요로 한다.^{28,29)} 따라서, Hsp90의 발현이 증가된 암세포에서는 Hsp90 저해제의 작용이 정상세포에 비해 상대적으로 강하게 나타날 수 있다. 실제로 어떤 Hsp90 저해제는 정상세포에 비해 암세포에 200 배 이상의 선택성을 보이는 것으로 보고되었다.

이와 같이 Hsp90 저해제는 정상세포에 비해 암세포에 선택적으로 작용할 뿐만 아니라 암세포의 생존에 필요한 6가지 특징들을 모두 방해할 수 있고, 암세포 성장에 관련된 다양한 downstream에 골고루 영향을 미치는 등 다양한 장점을 가질 수 있으므로 Hsp90 저해 기능을 가진 항암제 개발을 위하여 새로운 골격의 다양한 리드화합물의 발굴이 필요할 것으로 보인다.

Hsp90 억제작용을 나타내는 천연물

1. Bulgarialactone B

Bulgarialactone B는 *Bulgaria inquinans*에서 분리된 물질로 azaphilone계 화합물이다(Fig. 3). 이 계열의 화합물들은 monoamine oxidase 억제,³⁰⁾ 암 발생 중 2단계인 암 촉진 단계 저해,³¹⁻³³⁾ 세포 독성,^{34,35)} gp120-CD4 결합 억제에 의한 항-HIV 효과,³⁶⁾ sphingosine kinase 억제³⁷⁾ 등 다양한 활성들이 보고되었다.

Musso 등은 최근 천연물의 target-oriented screening 과정에서 bulgarialactone B가 세포주기 조절로 암을 억제하는 p53의 기능을 안정화하고 강화할 뿐만 아니라 Hsp90의 기능 또한 저해하는 작용을 나타낸다고 보고하였다. Bulgarialactone B의 Hsp90 ATPase 활성 저해력 IC₅₀ 값은 9.87±0.71 μM이었으며, fluorescence polarization (FP) protein binding assay 방법을 이용한 Hsp90과 client 단백질의 결합 친화력 억제효과를 측정할 경우 IC₅₀ 값이 61.7±0.85 μM로 나타났다(Table II). 또한, 다양한 암세포주를 대상으로 한

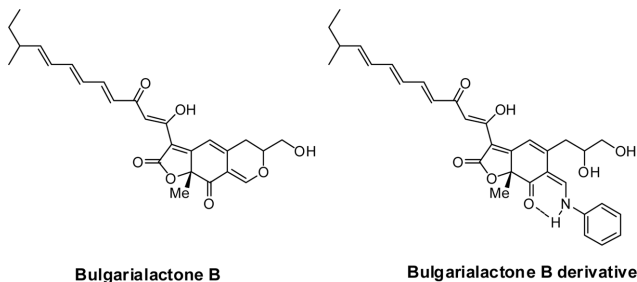


Fig. 3. The structure of bulgarialactone B and its derivative.

Table II. ATPase inhibitory activity and Hsp90 binding affinity of bulgarialactone B and its derivative

Compd.	ATPase inhibitory activity (IC ₅₀ , μM)	Hsp90 binding affinity (IC ₅₀ , μM)
Bulgarialactone B	9.87±0.71	61.7±0.85
Bulgarialactone B derivative	5.75±0.75	27.7±0.65

Table III. Antiproliferative activity of bulgarialactone B and its derivative

Compd.	Antiproliferative activity (IC ₅₀ , μM)		
	A431 ^a	JR8 ^b	IGROV-1 ^c
Bulgarialactone B	5.53±0.71	6.42±0.87	4.65±0.64
Bulgarialactone B derivative	0.30	4.80	0.20
Geldanamycin	0.2±0.04		
17-AAG	0.07±0.01		

^aHuman epithelial carcinoma cell line, ^bhuman melanoma cell line, ^chuman ovarian cancer cell line

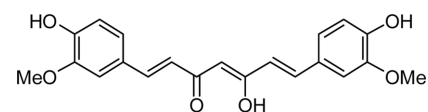
세포독성을 측정한 결과, A431(상피암 세포주), JR8(흑색종 세포주), IGROV-1(자궁암 세포주)에 대한 세포독성이 각각 5.53±0.71, 6.42±0.87, 4.65±0.64 μM로 나타났다(Table III). Bulgarialactone B의 세포독성은 기존의 Hsp90 저해제인 geldanamycin과 그 유도체인 17-AAG의 A431에 대한 세포 독성(IC₅₀ = 0.2±0.04, 0.07±0.01 μM)과 비교하였을 때는 그리 높지 않았지만, bulgarialactone B를 aniline과 반응하여 얻은 유도체는 A431에 대한 세포독성(IC₅₀ = 0.3 μM)이 geldanamycin과 유사하게 나타나 bulgarialactone B의 유도체 합성을 통한 새로운 Hsp90 저해제 발굴의 가능성을 보여 주었다.³⁸⁾

아울러 Patel 등은 bulgarialactone B의 Hsp90 저해기전을 연구한 결과, 이 화합물은 Hsp90의 NBD (N-말단 nucleotide binding domain)와 결합하여 ATP 결합 부위를 저해함으로써 Hsp90 chaperone의 활성을 조절한다는 결과를 얻었다.³⁹⁾

2. Curcumin

Curcumin은 생강과(Zingiberaceae)에 속하는 동인도산의 식물인 강황 또는 울금(*Curcuma longa* Linn)의 뿌리 또는 뿌리줄기에서 추출된 폴리페놀 성분 중 하나이다(Fig. 4).⁴⁰⁾

암세포에서는 telomerase가 활성화되기 때문에 telomerase 또한 암 치료의 표적으로 많은 관심을 받고 있다.⁴¹⁻⁴³⁾ 최근 Seimiya 등은 curcumin이 hTERT(human telomerase reverse transcriptase)의 핵전사를 저해함으로써 telomerase의 활성을 억제하는 것을 발견하고, 이와 같은 작용기전이 curcumin의 세포사멸 유도 효과와 연관되어 있다고 보고하였다.⁴⁴⁾ Curcumin의 이러한 작용기전은 geldanamycin에서도 유사하게 나타나는데, curcumin은 Hsp90과 p23의 ATP 의존성 결합을 막음으로써 hTERT의 작용을 억제하기 때문으로 보고 있다.⁴⁵⁾ Molecular chaperone의 복합체 Hsp90-p23은 hTERT와 함께 결합해 있는데, 이 결합은 hTERT의 접힘과 활성화된 telomerase의 조립에 필요하다.^{46,47)} Curcumin의 telomerase 억제 메커니즘은 확실하게 밝혀지지 않았지만 hTERT로부터 Hsp90-p23 co-chaperone을 분리하여 hTERT가 핵 안으로 운반되는 것을 막는다는 기전이 가장 유력한 것으로 예상하고 있다. 이와 같은 작용으로 인해 curcumin은 hTERT를 세포질에 축적시켜 ubiquitination을 통해 hTERT가 proteasome에 의해 빠르게 분해되게 한다.⁴⁸⁾ Telomeric repeat amplification protocol(TRAP) assay를 통해 측정된



Curcumin

Fig. 4. The structure of curcumin.

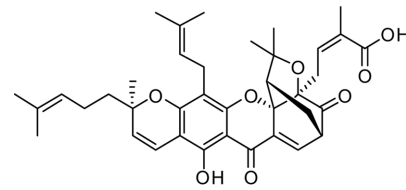
curcumin의 시간에 따른 telomerase 저해 활성을 살펴보면, 비소세포폐암 세포주인 H1299 세포에 50 μM 의 curcumin을 처리한 후 6시간이 경과 하자 telomerase의 활성이 80% 감소한 것을 볼 수 있었다.⁴⁸⁾ 또한 인간의 백혈병 세포주인 K562에 curcumin을 2시간 동안 처리한 경우에는 50%의 세포독성을 나타내는 IC_{50} 이 48 μM 로 나타났고, 8시간 처리 시에는 IC_{50} 이 35 μM 로 나타났다.⁴⁹⁾ 이러한 curcumin의 작용기전은 암세포의 telomerase 활성을 조절하는 데 있어 매우 중요한 방식이 될 수 있기 때문에 향후 암치료제의 후보로 발전할 가능성이 높다고 보인다.

3. (-)-Gambogic acid

등황(藤黃)은 등황나무(*Garcinia hanburyi* Hooker f.) 또는 기타 동속식물(등황나무과 Guttiferae)의 줄기에서 유출된 수지로 부종치료, 해독, 지혈, 살충 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

(-)-Gambogic acid는 등황(*Garcinia hanburyi*)에서 추출한 성분으로 최근에는 Hsp90을 저해하여 항암 및 항종양에 효과가 있다는 사실이 밝혀졌다(Fig. 5).⁵⁰⁾ (-)-Gambogic acid는 항암 치료제로써의 가능성을 보여주는 두 가지 특징을 갖고 있는데 우선, 정상세포보다 암세포에 대한 선택성을 갖는다는 것이다.^{51,52)} 특히 Hsp90, Hsp70, 그리고 Cdc37이 HRI (heme-regulated eIF2 α kinase)와 반응하는 것을 막으며, *in vitro*에서도 (-)-Gambogic acid가 HRI의 성숙을 방해한다는 것이 입증되었다.⁵⁰⁾ 두 번째로 (-)-gambogic acid는 Hsp90과 결합하는 위치가 특징적인 점이다. (-)-Gambogic acid는 Hsp90 N-말단 영역 안의 ATP 결합 부위와는 구별되는 또 다른 위치인 transferrin 수용체에 결합한다.⁵³⁾ Transferrin 수용체는 세포 내에 철이 끼어 들어가게 하기 위해 transferrin에 존재하는 특이적 수용체로 헤모글로빈을 합성하는 적아구세포나 활발하게 증식하는 세포에 존재한다. 과거에 연구된 transferrin 수용체 길항제들은 iron-dependent하게 철의 결합 자리에 대신 결합함으로써 transferrin 수용체의 활성을 저해하였다면, (-)-gambogic acid는 iron에 비의존적으로 수용체에 결합하여 활성에 필요한 수용체간의 상호 작용을 방해하는 기전으로 활성을 저해시킨다.⁵⁴⁾ N-말단의 ATP 결합 부위와 결합하는 geldanamycin과는 상이한 결합위치를 보이기 때문에 이 화합물과 서로 경쟁적이지 않은 새로운 기전의 치료제로써 geldanamycin에 내성이 생긴 암세포에 대해 효과를 나타낼 것이라 기대할 수 있다.

Davenport 등은 (-)-gambogic acid의 활성을 조사하기 위하여 망상적혈구 용해질에서 luciferase refolding 분석을 통한 Hsp90 억제효과, 암세포주의 증식 억제활성, client protein의 활성 변화 등을 살펴보았다.⁵⁰⁾ Luciferase는 Hsp90의 client protein 중 하나이며, 열에 의해 변형된 luciferase는 Hsp90에 의해 재생된다.⁵⁵⁾ 기존에 이미 알려진 Hsp90



(-)-Gambogic acid

Fig. 5. The structure of (-)-gambogic acid.

Table IV. Antiproliferative activity and luciferase refolding inhibitory activity of (-)-gambogic acid

Compd.	Luciferase refolding inhibitory activity (IC_{50} , μM)	Antiproliferative activity (IC_{50} , μM)		
		HeLa ^a	MCF-7 ^b	SK-Br3 ^c
(-)-Gambogic acid	2	1.5	2.0	0.8
Celastrol	20			

^aHuman cervical cancer cell line, ^bHuman breast adenocarcinoma cell line

저해제인 celastrol과 함께 (-)-gambogic acid의 luciferase refolding 저해 활성을 측정하였을 때, 각각 20 μM , 2 μM 에서 luciferase의 refolding을 50% 저해하는 것으로 보아 (-)-gambogic acid의 Hsp90에 대한 저해활성이 celastrol 보다 우수함을 알 수 있다(Table IV). 또한 (-)-gambogic acid의 자궁경부암 세포주인 HeLa, 유방암 세포주인 MCF-7과 SK-Br3에 대한 증식억제 효과를 측정한 결과, IC_{50} 값이 각각 1.5, 2.0, 그리고 0.8 μM 로 나타났다. (-)-Gambogic acid와 Hsp90 client protein의 분해의 연관성을 조사하기 위하여 1.0~5.0 μM 의 (-)-gambogic acid를 MCF-7, SK-Br3 세포에 처리하였을 때, client protein인 Her2, Raf, Akt가 확연히 감소하는 것으로 보아 (-)-gambogic acid는 Hsp90의 작용을 억제함으로써 암세포의 client 단백질들의 안정성을 저하시키는 것을 알 수 있었다.⁵⁰⁾

(-)-Gambogic acid는 최근 중국에서 항암제로써 임상 1 단계 시험 진행 중에 있으며,⁵⁶⁾ Hsp90을 저해할 수 있는 새로운 결합 부위의 발견으로 다른 천연물들과 구별되는 Hsp90 저해제로써의 개발의 가능성을 제시하고 있다.

4. Quercetin

백합과(Liliaceae)에 속하는 양파는 고대 그리스 때부터 식용 또는 다양한 용도로 사용되었을 것으로 추측되는 인류의 가장 오래된 농작물 중 하나이다. 양파는 총혈완화 작용, 이노작용 등 의학용 약제로서의 유용성 때문에 고대부터 수 세기에 걸쳐서 재배되어왔다.

근자에는 양파껍질에 주목하여 항균, 항산화 및 항노화에 관한 활발한 연구가 진행 중에 있는데,⁵⁷⁾ 최근 연구에서 양

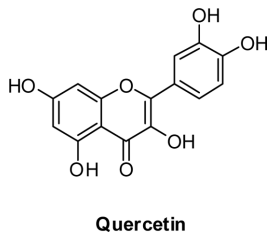


Fig. 6. The structure of quercetin.

Table V. Antiproliferative activity of quercetin

Compd.	Antiproliferative activity (IC ₅₀ , μM)	
	PC-3 ^a	DU-145 ^b
Quercetin	30.2	64.2

^{a,b}Human prostate cancer cell line

과껍질에 많이 함유되어 있는 quercetin이 전립선암 세포에서 Hsp90 발현을 억제한다는 결과가 발표되었다. Heat shock factor(HSF)는 열충격에 의한 전사촉진을 지배하는 전사조절인자로 정상시에는 진핵생물의 세포에서 비활성으로 세포질에 존재하다가 세포가 열충격을 받으면 활성화 되어 핵 내로 이행하여 열충격 유전자의 전사를 촉진하는 기능을 가지고 있다(Fig. 6).⁵⁸⁾ Quercetin은 HSF1의 과인산화를 막고, HSF1의 DNA결합 및 Hsp 발현 유전자의 전사를 막음으로써 Hsp의 생성을 방해하는 역할을 하는 것으로 보고되었다.⁵⁹⁾ 즉, 위에서 소개된 Hsp90 저해제들과는 달리 quercetin은 Hsp90의 생성 자체를 막아줄 수 있기 때문에 더욱 효과적으로 작용할 수 있는 것으로 보인다. Quercetin의 암세포주에 대한 세포독성을 측정 하였을 때, 전립선암 세포주인 PC-3 세포에 대해서는 IC₅₀ 값이 30.2 μM로 나타났고, DU-145 세포에 대해서는 64.2 μM로 나타났다(Table V).⁶⁰⁾ 하지만 quercetin의 활성이 HSF1에 특이적으로 일어나는 것이 아니라 다른 몇몇의 단백질효소의 활성 또한 동시에 억제하기 때문에 항암제로 개발하기 위해서는 선택성 문제의 해결이 필요할 것으로 보인다.^{61,62)}

5. Sansalvamide A

Sansalvamide A는 marine fungus(*Fusarium spp.*)에서 분리된 해양 천연물로 다양한 암세포주에 증식 억제효과를 나타내는 것으로 보고되었다(Fig. 7).⁶³⁻⁶⁵⁾ 하지만, sansalvamide A는 depsipeptide 형태로 ester 구조를 갖기 때문에 esterase에 의해 쉽게 고리가 열리는 경향이 있다. 따라서 약물이 세포 내에서 더 안정한 상태로 존재하도록 ester 결합을 amide 결합으로 변경하여 제조한 San A-amide 및 다양한 유도체들이 합성되었다.⁶⁶⁻⁶⁸⁾ 이들의 경우 ester 결합을 가질 때보다 분해에 안정하며, 항암활성 또한 10배 이상 뛰어난 것으로 밝혀졌다. 특히, San A-amide 유도체들은 췌장암, 결장암, 유방암, 전립선암, 악성 흑색종에 세포독성을 나타내어

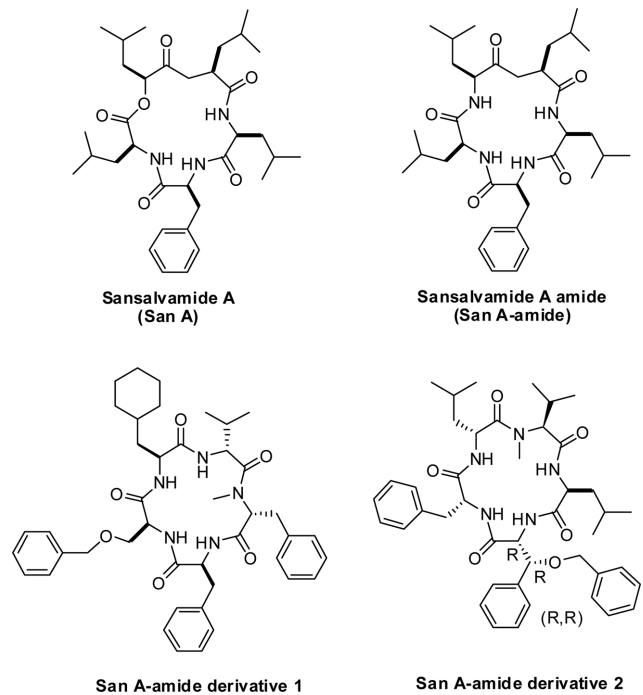


Fig. 7. The structures of sansalvamide A and its derivatives.

다양한 종류의 암의 치료제 개발에 선도물질로써의 활용 가능성을 보여주고 있다.⁶⁹⁾

San A-amide는 Hsp90의 중간 영역에 결합하고 allosteric regulation을 통해 입체변화를 일으켜 Hsp90이 C-말단 client protein인 IP6K2, FKBP52와 결합하는 것을 방해하는 것으로 나타났다. 이 두 client protein은 San A-amide에 의해 Hsp90와의 결합이 방해받음으로써 세포질 안에 남게 되고, 이어서 ubiquitination이 유도된다. 이와 같은 San A-amide의 기전은 현재 임상단계에 있는 N-말단 영역과 client protein의 결합을 방해하는 대부분의 저해제들의 기전과는 차이가 있음을 보여주며, 이러한 작용기전의 차별성으로 인해 San A-amide가 새로운 기전의 항암제로 개발될 수 있는 충분한 잠재력을 가지고 있다고 볼 수 있다.⁷⁰⁾

Robert 등은 San A-amide에 추가적인 구조적 변경을 통하여 다수의 새로운 유도체들을 합성하였다. 이 유도체들을 대장암 세포주인 HCT-116에 대한 저해 활성을 측정한 결과, 가장 높은 활성을 나타내는 San A-amide 유도체 **1**의 IC₅₀ 값이 1.9 μM로 나타났다(Table VI). Hsp90과 client protein의 결합을 방해하는 정도를 측정한 결과, 이 화합물은 두 개의 client protein인 IP6K2과 Her2의 결합을 5 μM에서 약 40% 저해하는 활성을 보였다. 추가적인 구조-활성 관계 연구를 통하여 San A-amide 유도체 **1**의 N-methyl기의 존재가 Hsp90의 기능을 억제하는데 중요하다는 것을 알 수 있었다. 하지만 ADME 실험(absorption, distribution, metabolism, 및 excretion)에서는 San A-amide 유도체 **1**의

Table VI. Antiproliferative activity and pharmacokinetic parameters of San A-amide derivatives 1 and 2

Compd.	Antiproliferative activity on HCT-166 ^a (IC ₅₀ , μM)	Kinetic solubility (μM)	Half-life (min)
San A-amide derivative 1	1.9	<5	38
San A-amide derivative 2	3.2	7	>172

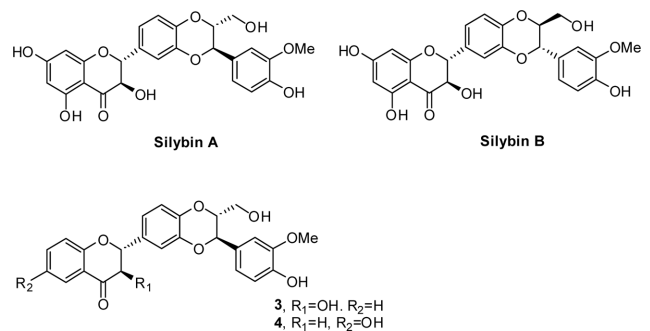
^aHuman colon carcinoma cell line

약동학적 성질이 좋지 않은 것으로 나타났다. 이를 보완하기 위하여 관련된 여러 화합물들의 약동학적 성질을 측정 한 결과, San A-amide 유도체 2가 가장 잠재력이 있는 화합물로 밝혀졌다. 화합물 San A-amide 유도체 2는 HCT-116에 대한 IC₅₀ 값이 3.2 μM로 화합물 San A-amide 유도체 1에 비해 활성이 비교적 낮지만 약동학적 성질 측면에서는 보다 유리하며, 수용성도 더 좋은 것으로 나타났다. 또한 San A-amide 유도체 1이 38분의 반감기를 보여주는데 반하여 San A-amide 유도체 2는 172분 이상의 비교적 긴 반감기를 갖는다.⁷⁰⁾ 위에서 살펴보았듯이 San A-amide 유도체들은 다른 Hsp90 저해제들과 비교되는 구조적 특성과 상이한 기전을 갖기 때문에 항암제 후보물질로서의 가능성을 보여주고 있다.

6. Silybin

Silymarin은 국화과(Compositae)에 속하는 마리아영경귀(*Silybum marianum*) 즉, milk thistle의 씨에서 추출한 성분으로서, silybin, silydianin, silychristin이 혼합되어 있는 플라보노리그난 집합체이다. Silybin은 서로 부분입체이성질체 관계인 silybin A와 silybin B가 거의 같은 양으로 존재하는 혼합물을 일컫는다(Fig. 8).

Qi 등은 silybin이 epidermal growth factor receptor (EGFR)가 관여하는 세포의 신호전달 체계에 작용하여 암세포의 성장을 억제하는 것으로 보고하였다.⁷¹⁾ 최근 연구에서는 silybin이 암세포에 대한 세포독성 활성을 보일뿐만 아니라 다른 화학요법제의 효과증대에도 기여하는 것으로 밝혀졌다.^{72,73)} 추가로 이 연구에서는 silybin의 항암작용이 Hsp90과 관련되어 있음이 밝혀졌다.⁷⁴⁾ Hsp90의 client 단백질인 CDK2, CDK4 및 CDK6은 cyclin-dependent kinase (CDK)에 속하며, cyclin과 결합하여 복합체를 형성하여 세포주기를 조절하는 역할을 한다. Cyclin-CDK 복합체는 세포주기가 진행되는 과정 중에 다음 단계가 일어날 수 있는지의 여부를 측정하도록 검사하는데, CDK가 과도하게 활성화되면 무분별한 세포분열이 일어날 수가 있고 결국 암이 발생할 수 있다.⁷⁵⁾ 따라서 silybin은 Hsp90의 작용을 억제하여 Hsp90 client 단백질인 CDK2, CDK4, CDK6의 과

**Fig. 8.** The structures of silybin and its derivatives 3 and 4.**Table VII.** Antiproliferative activity of silybin and its derivatives 3 and 4

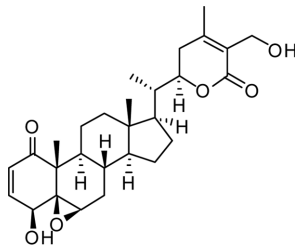
Compd.	Antiproliferative activity (IC ₅₀ , μM)	
	SK-Br3 ^a	MCF-7 ^b
Silybin	197.0±45.3	222.8±3.6
3	11.12±1.42	13.42±2.56
4	15.63±4.35	15.62±0.50

^{a,b}Human breast adenocarcinoma cell line

다 활성을 막음으로써 항암효과를 가질 수 있다는 것이다. 이러한 기전을 바탕으로 한 연구에서는 Hsp90에 의존하는 반딧불이의 luciferase refolding 분석을 통한 silybin의 Hsp90 억제효과 및 유방암 세포주에 대한 세포독성을 측정하였다.⁷⁴⁾ 이 때 망상적혈구용해질에서 luciferase refolding에 대한 IC₅₀는 250 μM로 나타났다(Table VII). 이 수치는 기존의 알려진 Hsp90 억제제인 geldanamycin의 IC₅₀ 값인 2 μM과 비교하였을 때는 훨씬 활성이 떨어지는 수치이지만, novobiocin의 IC₅₀ 값인 350 μM과 비교해 보았을 때는 유의한 수치로 볼 수 있다. 또한 silybin을 유방암 세포주인 SK-Br3와 MCF-7에 대한 세포독성을 측정하였을 때 IC₅₀ 값이 각각 197.0 μM, 222.8 μM로 나타났고, silybin 유도체 중 활성이 가장 뛰어난 화합물 3와 4 역시 10 μM 이상의 IC₅₀ 값을 보이기 때문에 세포독성 측면에서는 기존의 Hsp90 저해제보다 활성이 훨씬 떨어진다. 그럼에도 불구하고 silybin은 기존의 저해제들과 상이한 작용기전을 가지고 있다는 점에서 향후 항암제 개발 리드 화합물로의 발전 가능성을 볼 수 있다.

7. Withaferin A

Withaferin A는 인도, 중동 및 아프리카 일부에서 자라는 가지과(Solanaceae)의 작은 상록관목인 아슈와간다(Ashwaganda)의 주요 추출성분이다. 아슈와간다는 인도의 전통 의학인 आयुर्वेद에서 사용되는 가장 중요한 허브중의 하나로 인도에서 3000년 이상 사용되어져 왔으며 회춘 및 강장 효과로 인해 '인도의 인삼'이라고 불리기도 한다(Fig. 9).⁷⁶⁾



Withaferin A

Fig. 9. The structure of withaferin A.

Table VIII. Antiproliferative activity of withaferin A

Compd.	Antiproliferative activity (IC ₅₀ , μM)		
	PC-3 ^a	MiaPaCa2 ^b	BxPc3 ^c
Withaferin A	1.24	2.93	2.78

^ahuman prostate cancer cell line, ^{b,c}human pancreatic adenocarcinoma cell line

이슈와간다가 최근에는 withanolide라고 알려진 많은 alkaloid와 steroidal lactone 성분을 함유하고 있는 것으로 주목을 받고 있으며^{77,78)} withaferin A는 이슈와간다의 주요 withanolide 성분 중 하나이다.

Withaferin A는 항염,⁷⁹⁾ 항암,⁸⁰⁾ 항박테리아,⁸¹⁾ 항산화⁸²⁾ 기능이 있는 것으로 알려져 있으며, 가장 최근에는 췌장암 세포에서 Hsp90을 억제함으로써 암세포의 세포사멸을 가능하게 한다고 알려져 있다.⁸³⁾ Radicol이나 geldanamycin과 같은 현재 알려진 대부분의 Hsp90 저해제가 Hsp90과 ATP의 결합을 방해하는 것과는 달리^{84,85)} withaferin A는 Hsp90과 co-chaperone인 Cdc37의 복합체의 상호결합 및 활성을 방해하는 작용을 하는 것으로 보고되었다. 컴퓨터 시뮬레이션을 통해 Hsp90과 withaferin A가 결합한 복합체가 열역학적으로 안정하다는 사실 또한 확인되었다.⁸⁶⁾

Yu 등에 의한 연구에 따르면, MTS assay를 이용하여 withaferin A의 세포독성을 측정 하였을 때, 췌장암 세포주인 Panc-1에 대해서는 1.24 μM의 IC₅₀ 값을 나타냈고, MiaPaCa2와 BxPc3 세포주에 대해서는 IC₅₀ 값이 각각 2.93 μM와 2.78 μM로 나타났다.⁸⁷⁾ 이처럼 withaferin A가 기존의 Hsp90 저해기전과는 다른 방법으로 Hsp90을 억제한다는 점에서 기존 Hsp90의 억제제에 대한 암세포의 내성에 대비할 수 있는 새로운 항암제로서의 개발을 기대할 수 있다.

결 론

지난 수년 동안 Hsp90의 기능과 암 유발의 기전에 관한 연구가 지속적으로 이루어져 왔다. 그 결과, Hsp90의 기능 억제는 암 유발 단백질의 억제를 유도하는 중요한 역할을

하기 때문에 암 억제제의 표적으로써 Hsp90은 상당한 의미가 있는 것으로 나타났다. 특히, Hsp90이 암세포에서 과활성화 된다는 점과 암의 생장에 중요한 단백질을 안정화시킨다는 점으로 미루어 볼 때, 이에 대한 저해제는 암 억제제로써의 활용 가능성이 높다. Hsp90을 억제시키는 기전으로는 C-말단과 N-말단 영역에 대한 직접적인 작용 그리고 단백질을 안정화 시킬 때 함께 도와주는 co-chaperone 과의 상호작용을 막는 등의 여러 기전들이 있다. 최근 이런 기전을 통해 Hsp90을 억제하는 천연물에 관한 연구도 상당히 진행되고 있다. Geldanamycin이 Hsp90 천연물 억제제로 처음 발견된 초기에는 geldanamycin과 그의 유도체들에 대한 연구가 활발하여 많은 화합물들이 임상실험에도 도달하였다. 이후에도 celastrol, novobiocin 등 새로운 천연물들이 Hsp90 저해제로 밝혀져 항암제 개발을 위한 새로운 리드 화합물로 제시되고 있다. 본 총설에서 다루고 있는 Hsp90 저해작용을 나타내는 새로운 천연물들인 bulgariolactone B, (-)-gambogic acid, quercetin, silybin, Sansalvamide A 등에 대한 연구 또한 활발하게 진행되고 있으며, 특히, 이 화합물들은 서로 다른 기전으로 Hsp90의 기능을 저해함으로써 암을 억제시키므로 다양한 암세포에 대한 선택적 작용이 가능할 것이라 생각되며, 동시에 기존의 항암제뿐만 아니라 다른 Hsp90 억제제의 내성을 서로 보완할 수 있을 것으로 보인다. 앞으로도 Hsp90의 활성을 억제하는 천연물 탐색과 임상 연구가 지속적으로 필요하며 이러한 노력들이 항암제 및 Hsp 관련 다양한 질환을 치료할 수 있는 새로운 의약품의 개발에 필요한 기반을 넓혀 줄 것으로 기대한다.

사 사

이 논문은 2013년도 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 일반연구자사업의 지원(NRF-2012R1A1A2006431)을 받아 수행한 것이며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Pearl, L. H. and Prodromou, C. (2006) Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu. Rev. Biochem.* **75**: 271-294.
- Gimnez Ortiz, A. and Montalar Salcedo, J. (2010) Heat shock proteins as targets in oncology. *Clin. Transl. Oncol.* **12**: 166-173.
- Pearl, L. H., Prodromou, C. and Workman, P. (2008) The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. *Biochem. J.* **410**: 439-453.
- Fukuyo, Y., Hunt, C. R. and Horikoshi, N. (2010) Geldanamycin and its anti-cancer activities. *Cancer Lett.* **290**: 24-35.
- Uehara, Y., Hori, M., Takeuchi, T. and Umezawa, H. (1986) Phenotypic change from transformed to normal induced by

- benzoquinonoid ansamycins accompanies inactivation of p60src in rat kidney cells infected with rous sarcoma virus. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 2198-2206.
6. Jez, J. M., Chen, C., Rastelli, G., Stroud, R. M. and Santi, D. V. (2003) Crystal structure and molecular modeling of 17-DMAG in complex with human Hsp90. *Chem. Biol.* **10**: 361-368.
 7. Solit, D. B. (2008) Phase II trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.* **40**: 8302-8307.
 8. Amolins, M. W. and Blagg, B. S. J. (2009) Natural product inhibitors of Hsp90: Potential leads for drug discovery. *Mini-Rev. Med. Chem.* **9**: 140-152
 9. Hartl, F. U. and Hayer-Hartl, M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein. *Science* **295**: 1852-1858.
 10. Buchner, J. (1999) Hsp90 & Co. a holding for folding. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 136-142.
 11. Mayer, M. P. and Bukau, B. (2005) Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**: 670-684.
 12. Blagg, B. S. J. and Kerr, T. D. (2006) Hsp90 inhibitors: Small molecules that transform the Hsp90 protein folding machinery into a catalyst for protein degradation *Med. Res. Rev.* **26**: 310-338.
 13. Schlesinger, M. J. (1994) How the cell copes with stress and the function of heat shock proteins. *Pediatr. Res.* **36**: 1-6.
 14. 한지숙 (2007) 항암제 및 퇴행성 신경질환 치료제로써의 Hsp90 억제제 개발 동향, *Biochemistry and Molecular Biology News* **12월호**. 1-6.
 15. Donnelly, A. and Blagg, B. S. (2008) Novobiocin and additional inhibitors of the Hsp90 C-terminal nucleotide-binding pocket. *Curr. Med. Chem.* **15**: 2702-2717.
 16. Karapanagiotou, E. M., Syrigos, K. and Saif, M. W. (2009) Heat shock protein inhibitors and vaccines as new agents in cancer treatment. *Expert Opin. Investig. Drugs.* **18**: 161-174.
 17. Pratt, W. B., Galigniana, M. D., Harrell, J. M. and DeFranco, D. B. (2004) Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. *Cell Signal* **16**: 857-872.
 18. Zhang, H. and Burrows, F. (2004) Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90. *J. Mol. Med.* **82**: 488-499.
 19. Adams, J. and Elliot, P. J. (2000) New agents in cancer clinical trials. *Oncogene* **19**: 6687-6892.
 20. Neckers, L. and Ivy, S. P. (2003) Heat shock protein 90. *Curr. Opin. Oncol.* **15**: 419-424.
 21. Neckers, L. and Neckers, K. (2002) Heat-shock protein 90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Expert Opin. Emerg. Drugs.* **7**: 277-288.
 22. Nimmanapalli, R., O'Bryan, E. and Bhalla, K. (2001) Geldanamycin and its analogue 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin lowers Bcr-Abl levels and induces apoptosis and differentiation of Bcr-Abl-positive human leukemic blasts. *Cancer Res.* **61**: 1799-1804.
 23. Xu, W. and Neckers, L. (2007) Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 provides a multifaceted effect on diverse cell signaling pathways of cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **13**: 1625-1629.
 24. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer review. *Cell* **100**: 57-70.
 25. Workman, P., Burrows, F., Neckers, L. and Rosen, N. (2007) Drugging the cancer chaperone HSP90: combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1113**: 202-216.
 26. Sreedhar, A. S., Kalmar, E., and Csermely, P. (2004) Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett.* **562**: 11-15.
 27. Becker, B. (2004) Induction of Hsp90 protein expression in malignant melanomas and melanoma metastases. *Exp. Dermatol.* **13**: 27-32.
 28. Chiosis, G., Huez, H., Rosen, N., Mimnaugh, E., Whitesell, L. and Neckers, L. (2003) 17AAG: Low target binding affinity and potent cell activity finding an explanation. *Mol. Cancer Ther.* **2**: 123-129.
 29. Schnur, R. C., Corman, M. L., Gallaschun, R. J., Cooper, B. A., Dee, M. F., Doty, J. L., Muzzi, M. L., DiOrio, C. I., Barbacci, E. G., Miller, P. E., Pollack, V. A., Savage, D. M., Sloan, D. E., Pustilnik, L. R., Moyer, J. D. and Moyer, M. P. (1995) erbB-2 oncogene inhibition by geldanamycin derivatives: Synthesis, mechanism of action, and structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* **38**: 3813-3820.
 30. Hossain, C. F., Okuyama, E. and Yamazaki, M. (1996) A new series of coumarin derivatives having monoamine oxidase inhibitory activity from *Monascus anka*. *Chem. Pharm. Bull.* **44**: 1535-1539.
 31. Yasukawa, K., Takahashi, M., Natori, S., Kawai, K., Yamazaki, M., Takeuchi, M. and Takido, M. (1994) Azaphilones inhibit tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mice. *Oncology* **51**: 108-112.
 32. Akihisa, T., Tokuda, H., Ukiwa, M., Kivota, A., Yasukawa, K., Sakamoto, N., Kimura, Y., Suzuki, T., Takayasu, J. and Nishino, H. (2005) Anti-tumor-initiating effects of monascin, an azaphilonoid pigment from the extract of *Monascus pilosus* fermented rice (red-mold rice). *J. Chem. Biodivers.* **2**: 1305-1309.
 33. Akihisa, T., Tokuda, H., Yasukawa, K., Ukiwa, M., Kivota, A., Sakamoto, N., Suzuki, T., Tanabe, N., Nishino, H. and Kavas, J. (2005) Azaphilones, furanoisophthalides, and amino acids from the extracts of *Monascus pilosus*-fermented rice (red-mold rice) and their chemopreventive effects. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 562-565.
 34. Su, N. W., Lin, Y. L., Lee, M. H. and Ho, C. H. (2005) Ankaflavin from *Monascus*-fermented red rice exhibits selective cytotoxic effect and induces cell death on Hep G2 cells. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 1949-1954.
 35. Knecht, A. and Humpf, H. U. (2006) Cytotoxic and anti-mitotic effects of N-containing *Monascus* metabolites studied

- using immortalized human kidney epithelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **50**: 406-412.
36. Omura, S., Tanaka, H., Ikead, H. and Masuma, R. (1993) Isochromophilones I and II, novel inhibitors against gp120-CD4 binding from *Penicillium* sp. *J. Antibiot.* **46**: 1908-1911.
 37. Kono, K., Tanaka, M., Ono, Y., Hosoya, T., Ogita, T. and Kohama, T. (2001) S-15183a and b, new sphingosine kinase inhibitors, produced by a fungus. *J. Antibiot.* **54**: 415-420.
 38. Musso, L., Dallavalle, S. and Merlini, L. (2010) Natural and semisynthetic azaphilones as a new scaffold for Hsp90 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **18**: 6031-6043.
 39. Patel, H. J., Modi, S., Chiosis, G. and Taldone, T. (2011) Advances in the discovery and development of heat-shock protein 90 inhibitors for cancer treatment. *Expert Opin. Drug Discov.* **6**: 559-587.
 40. Ammon, H. P. and Wahl, M. A. (1991) Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med.* **57**: 1-7.
 41. Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L. C., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L. and Shay, J. W. (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**: 2011-2015.
 42. Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S. and Wright, W. E. (1998) Extension of lifespan by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**: 349-352.
 43. Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W. and Weinberg, R. A. (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* **400**: 464-468.
 44. Seimiya, H., Sawada, H., Muramatsu, Y., Shimizu, M., Ohko, K., Yamane, K. and Tsuruo, T. (2000) Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase. *EMBO J.* **19**: 2652-2661.
 45. Keppler, B. R., Grady, A. T. and Jarstfer, M. B. (2006) The biochemical role of the heat shock protein 90 chaperone complex in establishing human telomerase activity. *J. Biol. Chem.* **281**: 19840-19848.
 46. Holt, S. E., Aisner, D. L., Baur, J., Tesmer, V. M., Dy, M., Ouellette, M., Trager, J. B., Morin, G. B., Toft, D. O., Shay, J. W., Wright, W. E. and White, M. A. (1999) Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev.* **13**: 817-826.
 47. Forsythe, H. L., Jarvis, J. L., Turner, J. W., Elmore, L. W. and Holt, S. E. (2001) Stable association of hsp90 and p23, but not hsp70, with active human telomerase. *J. Biol. Chem.* **276**: 15571-15574.
 48. Lee, J. H. and Chung, I. K. (2010) Curcumin inhibits nuclear localization of telomerase by dissociating the Hsp90 co-chaperone p23 from hTERT. *Cancer Lett.* **290**: 76-86.
 49. Teiten, M. H., Reuter, S., Schmucker, S., Dicato, M. and Diederich, M. (2009) Induction of heat shock response by curcumin in human leukemia cells. *Cancer Lett.* **279**: 145-154.
 50. Davenport, J., Manjarrez, J. R., Peterson, L., Krumm, B., Blagg, B. S. and Matts, R. L. (2011) Gambogic acid, a natural product inhibitor of Hsp90. *J. Nat. Prod.* **74**: 1085-1092.
 51. Yang, Y., Yang, L., You, Q. D., Nie, F. F., Gu, H. Y., Zhao, L., Wang, X. T. and Guo, Q. L. (2007) Differential apoptotic induction of gambogic acid, a novel anticancer natural product, on hepatoma cells and normal hepatocytes. *Cancer Lett.* **256**: 259-266.
 52. Zhao, L., Guo, Q. L., You, Q. D., Wu, Z. Q. and Gu, H. Y. (2004) Gambogic acid induces apoptosis and regulates expressions of Bax and Bcl-2 protein in human gastric carcinoma MGC-803 cells. *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 998-1003.
 53. Pandey, M. K., Sung, B., Ahn, K. S., Kunnumakkara, A. B., Chaturvedi, M. M. and Aggarwal, B. B. (2007) Gambogic acid, a novel ligand for transferrin receptor, potentiates TNF-induced apoptosis through modulation of the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Blood* **110**: 3517-3525.
 54. Ortiz-Sanchez, E., Daniels, T. R., Helguera, G., Martinez-Maza, O., Bonavida, B. and Penichet, M. L. (2009) Enhanced cytotoxicity of an anti-transferrin receptor IgG3-avidin fusion protein in combination with gambogic acid against human malignant hematopoietic cells: Functional relevance of iron, the receptor, and reactive oxygen species. *Leukemia* **23**: 59-70.
 55. Galam, L., Hadden, M. K., Ma, Z., Ye, Q. Z., Yun, B. G., Blagg, B. S. and Matts, R. L. (2007) High-throughput assay for the identification of Hsp90 inhibitors based on Hsp90-dependent refolding of firefly luciferase. *Bioorg. Med. Chem.* **15**: 1939-1946.
 56. Ren, Y., Yuan, C., Chai, H. B., Ding, Y., Li, X. C., Ferreira, D. and Kinghorn, A. D. (2011) Absolute configuration of (-)-gambogic acid, an antitumor agent. *J. Nat. Prod.* **74**: 460-463.
 57. Kim, J. E., Kim, A. R., Kim, M. J. and Park, S. N. (2011) Antibacterial, antioxidative and antiaging effects of *Allium cepa* peel extracts. *Appl. Chem. Eng.* **22**: 178-184.
 58. Powers, M. V. and Workman, P. (2007) Inhibitors of the heat shock response: Biology and pharmacology. *FEBS Lett.* **581**: 3758-3769.
 59. Nagai, N., Nakai, A. and Nagata, K. (1995) Quercetin suppresses heat shock response by down regulation of HSF1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**: 1099-1105.
 60. Aalinkeel, R., Bindukumar, B., Reynolds, J. L., Sykes, D. E., Mahajan, S. D., Chadha, K. C. and Schwartz, S. A. (2008) The dietary bioflavonoid, quercetin, selectively induces apoptosis of prostate cancer cells by down-regulating the expression of heat shock protein 90. *The Prostate* **68**: 1773-1789.
 61. Matter, W. F., Brown, R. F. and Vlahos, C. J. (1992) The inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase by quercetin and analogs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**: 624-631.
 62. Levy, J., Teuerstein, I., Marbach, M., Radian, S. and Sharoni, Y. (1984) Tyrosine protein kinase activity in the DMBA-induced rat mammary tumor: Inhibition by quercetin. *Biochem. Biophys. Res. Chem.* **123**: 1227-1233.
 63. Cueto, M., Jensen, P. R. and Fenical, W. (2000) N-Meth-

- ylsalsalvamide, a cytotoxic cyclic depsipeptide from a marine fungus of the genus *fusarium*. *Phytochem.* **55**: 223-226.
64. Hwang, Y., Rowley, D., Rhodes, D., Gertsch, J., Fenical, W. and Bushman, F. (1999) Mechanism of inhibition of a pox-virus topoisomerase by the marine natural product sansalvamide A. *Mol. Pharmacol.* **55**: 1049-1053.
 65. Belofsky, G. N., Jensen, P. R. and Fenical, W. (1999) Sansalvamide: A new cytotoxic cyclic depsipeptide produced by a marine fungus of the genus *fusarium*. *Tetrahedron Lett.* **40**: 2913-2916.
 66. Styers, T. J., Kecec, A., Rodriguez, R. A., Brown, J. D., Cajica, J., Pan, P. S., Parry, E., Carroll, C. L., Medina, I., Corral, R., Lapera, S., Otrubova, K., Pan, C. M., Mcguire, K. L. and Mcalpine, S. R. (2006) Synthesis of sansalvamide A derivatives and their cytotoxicity in the MSS colon cancer cell line HT-29. *Bioorg. Med. Chem.* **14**: 5625-5631.
 67. Rodriguez, R. A., Pan, P. S., Pan, C. M., Ravula, S., Lapera, S. A., Singh, E. K., Styers, T. J., Brown, J. D., Cajica, J., Parry, E., Otrubova, K. and Mcalpine, S. R. (2007) Synthesis of second-generation sansalvamide A derivatives: Novel templates as potential antitumor agents. *J. Org. Chem.* **72**: 1980-2002.
 68. Pan, P. S., Vasko, R. C., Lapera, S. A., Johnson, V. A., Sellers, R. P., Lin, C. C., Pan, C. M., Davis, M. R., Ardi, V. C. and Mcalpine, S. R. (2009) A comprehensive study of sansalvamide A derivatives: The structure-activity relationships of 78 derivatives in two pancreatic cancer cell lines. *Bioorg. Med. Chem.* **17**: 5806-5825.
 69. Vasko, R. C., Rodriguez, R. A., Cunningham, C. N., Ardi, V. C., Agard, D. A. and Mcalpine, S. R. (2010) Mechanistic studies of sansalvamide A-amide: An allosteric modulator of Hsp90. *ACS Med. Chem. Lett.* **1**: 4-8.
 70. Sellers, R. P., Alexander, L. D. and Johnson, V. A. (2010) Design and synthesis of Hsp90 inhibitors: exploring the SAR of sansalvamide A derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **18**: 6822-6856.
 71. Hannay, J. A. and Yu, D. (2003) Silibinin: a thorny therapeutic for EGF-R expressing tumors? *Cancer. Biol. Ther.* **2**: 532-533.
 72. Gazak, R., Walterova, D. and Kren, V. (2007) Silybin and silymarin-new and emerging applications in medicine. *Curr. Med. Chem.* **14**: 315-338.
 73. Lu, P., Mamiya, T., Lu, L. L., Mouri, A., Niwa, M., Hiramatsu, M., Zou, L. B., Nagai, T., Ikejima, T. and Nabeshima, T. (2009) Silibinin attenuates amyloid beta(25-35) peptide-induced memory impairments: implication of inducible nitric-oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **331**: 319-326.
 74. Zhao, H., Brandt, G. E., Galam, L., Matts, R. L. and Blagg, B. S. (2011) Identification and initial SAR of silybin: An Hsp90 inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**: 2659-2664.
 75. Kastan, M. B. and Bartek, J. (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**: 316-323.
 76. Winters, M. (2006) Ancient medicine, modern use: *Withania somnifera* and its potential role in integrative oncology. *Altern. Med. Rev.* **11**: 269-277.
 77. Matsuda, H., Murakami, T., Kishi, A. and Yoshikawa, M. (2001) Structures of withanosides I, II, III, IV, V, VI, and VII, new withanolide glycosides, from the roots of Indian *Withania somnifera* Dunal. and inhibitory activity for tachyphylaxis to clonidine in isolated guinea-pig ileum. *Bioorg. Med. Chem.* **9**: 1499-1507.
 78. Ray, A. and Gupta, M. (1994) Withasteroids, a growing group of naturally occurring steroidal lactones. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **63**: 1-106.
 79. Alhindawi, M. K., Alkhafaji, S. H. and Abdunabi, M. H. (1992) Anti-granuloma activity of Iraqi *Withania-somnifera*. *J. Ethnopharmacol.* **37**: 113-116.
 80. Mishra, L., Singh, B. and Dagenias, S. (2000) Scientific basis for the therapeutic use of *Withania somnifera* (ashwagandha): a review. *Altern. Med. Rev.* **5**: 334-336.
 81. Owais, M., Sharad, K. S., Shehbaz, A. and Saleemuddin, M. (2005) Antibacterial efficacy of *Withania somnifera* (ashwagandha) an indigenous medicinal plant against experimental murine salmonellosis. *Phytomedicine* **12**: 229-235.
 82. Bhattacharya, A., Ghosal, S. and Bhattacharya, S. K. (2001) Anti-oxidant effect of *Withania somnifera* glycowithanolides in chronic footshock stress-induced perturbations of oxidative free radical scavenging enzymes and lipid peroxidation in rat frontal cortex and striatum. *J. Ethnopharmacol.* **74**: 1-6.
 83. Yu, Y. K., Hamza, A., Zhang, T., Gu, M. C., Zou, P., Newman, B., Li, Y. Y., Gunatilaka, A. A. L., Zhan, C. G. and Sun, D. X. (2010) Withaferin A targets heat shock protein 90 in pancreatic cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **79**: 542-551.
 84. Chiosis, G. (2006) Targeting chaperones in transformed systems - a focus on Hsp90 and cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* **10**: 37-50.
 85. Neckers, L. (2003) Development of small molecule Hsp90 inhibitors: utilizing both forward and reverse chemical genomics for drug identification. *Curr. Med. Chem.* **10**: 733-739.
 86. Grover, A., Shandilya, A., Agrawal, V., Pratik, P., Bhasme, D., Bisaria, V. S. and Sundar, D. (2011) Hsp90/Cdc37 Chaperone/co-chaperone complex, a novel junction anticancer target elucidated by the mode of action of herbal drug withaferin A. *BMC Bioinformatics* **12**: Suppl 1:S30.
 87. Yu, Y., Hamza, A., Zhang, T., Gu, M., Zou, P., Newman, B., Li, Y., Gunatilaka, A. A., Zhan, C. G. and Sun, D. (2010) Withaferin A targets heat shock protein 90 in pancreatic cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **79**: 542-551.
- (2013. 7. 1 접수; 2013. 8. 19 심사; 2013. 9. 16 게재확정)