

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2011년 9월 1일 (01.09.2011)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2011/105847 A2

- (51) 국제특허분류:
G01N 33/483 (2006.01) C12N 5/09 (2010.01)
G01B 5/28 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/001325
- (22) 국제출원일: 2011년 2월 25일 (25.02.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2010-0018010 2010년 2월 26일 (26.02.2010) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 조선대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC CO-OPERATION FOUNDATION, CHOSUN UNIVERSITY) [KR/KR]; 광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내, 501-759 Gwangju (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (71) 출원인 : 이건호 (LEE, Kun Ho) [KR/KR]; 광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 자연과학대학 5508호, 501-759 Gwangju (KR). 강치중 (KANG, Chi Jung) [KR/KR]; 경기도 용인시 처인구 남동 산 38-2 명지대학교 자연과학대학 물리학과, 449-030 Gyeonggi-do (KR). 신상모 (SHIN, Sang Mo) [KR/KR]; 광주광역시 북구 오룡동 261 광주과학기술원 기전공학과,

500-480 Gwangju (KR). 김 유 진 (KIM, Yu Jin) [KR/KR]; 경기도 용인시 처인구 남동 산 38-2 명지대학교 자연과학대학 물리학과, 449-030 Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 이문섭 (LEE, Moon-Sup); 서울특별시 관악구 인현동 1659-2 청동빌딩 301호, 151-832 Seoul (KR).

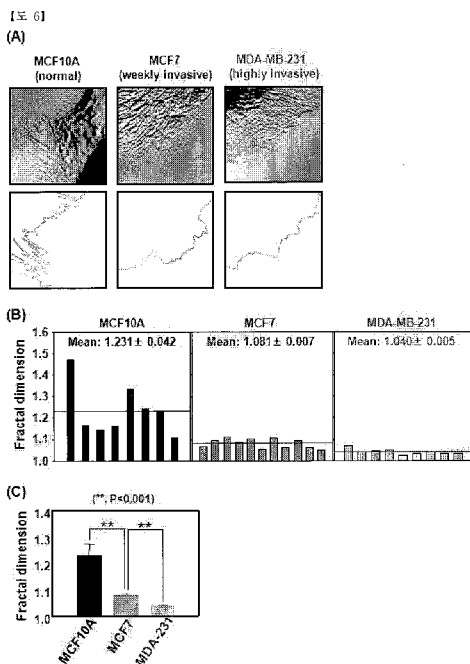
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: APPARATUS FOR ANALYZING CANCER CELLS USING CELL SURFACE MICROSTRUCTURE ANALYSIS

(54) 발명의 명칭 : 세포표면 미세구조분석을 이용한 암세포 분석 장치



(57) Abstract: The present invention relates to an apparatus for analyzing cancer cells using cell surface microstructure analysis, and more particularly, to an apparatus for analyzing cancer cells, comprising: an atomic force microscope (AFM) for observing the surface of a specimen cell; a first calculation unit for extracting a cell boundary from the image of the surface of the specimen cell observed by the AFM; and a second calculation unit for calculating a fractal dimension (FD) from the extracted cell boundary. The apparatus for analyzing cancer cells according to the present invention analyzes the fractal dimension for the microstructure of the cell boundary, and the microstructure of the surface of a disease cell, such as a tumor cell, has a unique FD value which is different from that of a normal cell. Particularly, a metastatic cancer cell tends to have a fractal dimension remarkably lower than that of a non-metastatic cancer cell. Thus, the apparatus of the present invention collects FD information on an ultra-low volume of tumor cells, and effectively uses the collected information in predicting and diagnosing various characteristics of tumor cells such as the progression of tumor cells, and whether tumor cells are malignant or benign. In addition, the apparatus of the present invention can measure, at a nanoscale level, the structure of surfaces of live cells, and therefore can be valuably used in the development of biological tools for the study of cells, that is, for the analysis of the ultra-microstructures of the surfaces of cells.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를
별도 공개함 (규칙 48.2(g))

본 발명은 세포표면 미세구조분석을 이용한 암세포 분석 장치에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 시료 세포 표면을 관찰하기 위한 원자력 주사 현미경 (AFM); 상기 AFM에서 관찰된 시료 세포 표면의 이미지로부터 세포 경계 (cell boundary)를 추출하기 위한 제 1 연산부; 및, 상기 추출된 세포 경계로부터 프랙탈 차원 (fractal dimension; FD)을 계산하기 위한 제 2 연산부를 포함하는 암세포 분석 장치에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 상기 암세포 분석 장치를 이용하여 세포 경계의 미세구조에 대한 프랙탈 차원 (Fractal dimension: FD)을 분석할 수 있으며, 종양세포를 비롯한 질환세포의 표면 미세구조는 정상세포와 다른 고유의 FD 값을 갖는다. 특히 전이성 암세포는 비전이성 암세포 보다 낮은 프랙탈 차원을 갖는 경향이 뚜렷하다. 따라서 극미량의 종양세포에 대한 FD 정보를 수집하여 종양세포의 진행정도 및 악성, 양성 여부 등 여러 가지 특성을 예측하고 진단하는데 효과적으로 사용될 수 있다. 또한 살아있는 세포의 표면구조에 대해 나노스케일 수준으로 측정할 수 있으므로, 세포 표면의 극미세구조 분석을 위한 세포 연구용 바이오칩 개발에 핵심적으로 활용될 수 있다.

【명세서】**【발명의 명칭】**

세포표면 미세구조분석을 이용한 암세포 분석 장치

【기술분야】

본 발명은 세포표면 미세구조분석을 이용한 암세포 분석 장치에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 시료 세포 표면을 관찰하기 위한 원자력 주사 현미경(AFM); 상기 AFM에서 관찰된 시료 세포 표면의 이미지로부터 세포 경계(cell boundary)를 추출하기 위한 제1연산부; 및, 상기 추출된 세포 경계로부터 프랙탈 차원(fractal dimension; FD)을 계산하기 위한 제2연산부를 포함하는 암세포 분석 장치에 관한 것이다.

【배경기술】

원자력 주사 현미경(Atomic Force Microscopy; AFM)은 고분자 앙상블과 세포의 플라즈마 막을 포함하는 생물학적 물질들의 미세구조 표면을 탐구하기 위한 가치있는 도구이다 [G. Binning, C.F. Quate, C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* 56 (1986) 930933].

AFM 분석 원리는 날카로운 탐침(tip)이 분석시료표면에 수Å 이내로 접근하여 스캐닝이 이루어지며, 이 때 시료표면과 탐침 사이의 원자력을 측정하고 그것을 일정하게 유지하는 피드백 조절 기능을 가지면 시료표면의 굴곡 정도에 따른 에러(error) 신호를 모니터링 하여 이미지를 얻는다. AFM의 측정 방식에는 척력을 이용한 contact mode와 인력을 이용한 non-contact mode가 있다. contact mode의 측정 원리는 탐침과 시료간의 간격유지 제어방식으로서, 시료의 표면을 스캐닝하는 캔틸레버(cantilever)의 탐침이 시료에 접근하게 되면 탐침과 시료 사이의 상호 작용력(interaction force)에 의해 캔틸레버가 굽힘이 일어나고, 이때 반사되는 빔(beam)의 변화량을 포토다이오드(photodiode)가 감지하여 이 신호가 z-motion 컨트롤러에 전달되며, 컨트롤러는 시료가 올려져 있는 PZT scanner의 z축의 위치를 변화시켜 탐침과 시료 표면간의 간격을 일정하게 유지시켜 PZT scanner의 z축 변위량을 표면 이미지로 형상화 한다. 반면, non-contact mode는 힘의 크기가 0.1 ~ 0.01 nN 정도로 시료에 인가하는 힘이 contact mode에 비해 훨씬 작아 손상되기 쉬운 시료를 측정하는데 적합하다. 또한 원자 간의 인력의 크기가 너무 작아 캔틸레버가 휘는 각도를 직접 측정할 수 없기 때문에 캔틸레버를 고유진동수 부근에서 기계적으로 진

동시켜 시료표면에 다가갔을 때, 고유진동수의 변화에 의해 진폭과 위상에 변화가 생기는 것을 측정한다. AFM이 측정하는 원자간 상호 작용하는 힘은 전기적 성질에 관계없이 항상 존재하므로 도체나 부도체 모두를 높은 분해능으로 측정 및 분석할 수 있다. 따라서 AFM은 시료의 전기적인 특성과 무관하므로 도체, 반도체 및 부도체 등 모든 시료의 분석에 범용적으로 이용되고 있다.

수성 환경(aqueous environment)에서 AFM의 친화성(compatibility)은 SEM(Scanning Electron Microscopy)를 이용하였을 때 관찰된 인공물(artifact) 보다 좋으며, 이는 SEM 측정시 시료의 코팅 또는 건조를 포함하기 때문이다. 또한 AFM은 생리학적으로 관련된 조건에서 유지되므로 생물학적 물질을 허용할 수 있다 [A.E. Pelling, S. Sehati, E.B. Gralla, J.S. Valentine, J.K. Gimzewski, *Science* 305 (2004) 11471150; S.E. Cross, Y.-S. Jin, J. Rao, J.K. Gimzewski, *Nat. Nanotechnol.* 2 (2007) 780783]. 게다가, AFM 지형도(topography, 물체 표면의 정밀 사진)는 SEM 이미지와 다르게 세포질 미세구조의 3D 조직에 관련된 정보를 정확히 제공한다 [M. Radmacher, *Methods Cell Biol.* 83 (2007) 347372; D.P. Allison, M.J. Doktycz, *J. Cell. Mol. Med.* 10 (2006) 847856]. 그러나 이러한 AFM의 이점에도 불구하고, AFM 이미지는 형광 현미경(fluorescence microscopy)과 같은 장비의 결합된 사용 없이 해석하기 어려우며, 이는 생물학적 구조물의 불규칙성 및 본질적인 복잡성(complexity) 때문이다.

한편, Benoit Mandelbrot에 의해 소개된 것과 같이 [B.B. Mandelbrot, *The fractal geometry of nature*, W.H. Freeman & Company, New York (1982)], 프랙탈 기하학(Fractal geometry)은 이전의 유클리드 기하학(Euclidian geometry)으로 설명할 수 없었던 불규칙적 형태와 복잡체를 설명하기 위한 강력한 수단이다. 유클리드 기하학은 선, 평면, 원주(cylinder) 및 구(sphere)와 같은 부드러운 형태를 기초로 한다. 반면, 프랙탈 개체는 몇몇 양상에서 전체와 유사한 부분으로 구성된 형태로써 정의되며, 이러한 자가-유사성(self-similarity)은 해안선, 눈송이, 구름 및 산을 포함하는 많은 자연 개체에서 발생한다 [B.B. Mandelbrot, *The fractal geometry of nature*, W.H. Freeman & Company, New York (1982); B.B. Mandelbrot, *Science* 156 (1967) 636638]. 프랙탈 분석의 장점 중 한 가지는 개체의 불규칙성 및 복잡성을 프랙탈 차원(fractal dimension; FD , D_f)과 같은 수학적 값으로 정량하는 것이다. 프랙탈 차원은 주어진 개체의 공간 채우기(space-filling) 행동을 측정하는 박스-카운팅(box-counting) 분석법을 이용하여 쉽게 결정할 수 있다 [T.G. Smith, Jr., G.D. Lange, W.B. Marks, *J. Neurosci. Meth.* 69 (1996) 123136]. 유

클리드 기하학 차원(선:1, 표면:2, 고체:3)과 다르게, 프랙탈 차원은 정수(integer)를 필요로 하지 않는다. 2-차원적 이미지에서 개체들의 아웃라인(outline)은 1과 2 사이의 D_f 값을 갖으며 [J.Z. Liu, L.D. Zhang, G.H. Yue, *Biophys. J.* 85 (2003) 40414046], 보다 복잡한 아웃라인은 1 보다 2에 가까운 D_f 값을 갖는 경향이 있다.

생물학적 시스템의 두드러진 특징은 복잡성과 불규칙적인 구조이다. 그러므로 프랙탈 분석은 생물학적 시스템의 형태학적 복잡성을 명확히 하기 위한 접근방법으로 사용되고 있다. 게다가, 다른 자연 개체들과 같은 많은 생물학적 구조(기관, 조직, 세포이하의 독립체)는 프랙탈 특성을 나타내고, D_f 값을 갖는다 [F. Bernard, J.-L. Bossu, S. Gaillard, *J. Neurosci. Res.* 65 (2001) 439445; S.S. Cross, *J. Pathol.* 182 (1997) 18; B.R. Masters, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 6 (2004) 427452; R. Sedivy, C. Windischberger, K. Svozil, E. Moser, G. Breiteneker, *Gynecol. Oncol.* 75 (1999) 7883; A.L. Goldberger, B.J. West, *The Yale J. Biol. And Med.* 60 (1987) 421435; J.W. Baish and R.K. Jain, *Cancer Res.* 60 (2000) 36833688]. 따라서 프랙탈 분석은 세포질의 미세구조의 형태학적 특성을 특성화하기 위한 도구로 사용 가능하다.

생체 내에서 자라는 여러 암 조직이 특징적인 프랙탈 차원을 갖는다는 보고가 있어왔으며, 프랙탈 구조 자체는 자기-유사성을 가지므로 이를 통해 암 조직에서 나타나는 프랙탈 구조가 세포에서도 재현될 수 있음을 유추 가능하게 한다. 그러나 암 조직의 프랙탈적인 특성이 단일 세포수준에서 도출된 바는 없다.

이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 원자력 주사 현미경(AFM)을 이용한 고해상도의 세포영상을 통해 세포 경계의 프랙탈 차원을 계산할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

따라서, 본 발명의 주된 목적은 세포 경계의 미세구조에 대한 프랙탈 차원을 비롯한 기하학적 분석을 할 수 있는 암세포 분석 장치를 제공하는 데 있다.

【기술적 해결방법】

본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 시료 세포 표면을 관찰하기 위한 원자력 주사 현미경(AFM); 상기 AFM에서 관찰된 시료 세포 표면의 이미지로부터 세포 경계(cell boundary)를 추출하기 위한 제1연산부; 및, 상기 추출된 세포 경계로부터 프랙탈 차원(fractal dimension; FD)을 계산하기 위한 제2연산부를 포함하는 암세포 분석 장치를 제공한다.

본 발명의 암세포 분석 장치에 있어서, 상기 제1연산부는 AFM 이미지로부터 노이즈(noise)를 스크리닝하고, 이원(binary) 변환시키고, 에지(edge) 추출을 함으로써 세포 경계를 추출하는 것을 특징으로 한다.

구체적으로 노이즈의 스크리닝은 임계값 처리(threshold filtering)로 수행하였으며, 에지 추출은 이산 웨이블릿 변환(discrete wavelet transformation)으로 수행하였다. 본 발명의 실시예 3에서 확인한 바와 같이, 상기의 단계들을 완료한 후, 흑/백의 매우 선명한 세포 경계 이미지가 관찰되었다.

본 발명의 암세포 분석 장치에 있어서, 상기 제2연산부는 하기 공식의 박스-카운팅(Box-counting) 분석법을 이용하여 세포 경계의 프랙탈 차원(FD)을 계산하는 것을 특징으로 한다.

< 수학적식 >

$$FD = \frac{\log N_2 - \log N_1}{\log (1/L_2) - \log (1/L_1)}$$

여기서 차원에 대한 식으로 나타내기 위해 식에 로그가 사용되며, N은 선이 걸쳐있는 box의 개수, L은 해당 box의 한변의 길이를 의미한다.

보다 자세히 설명하면 다음과 같다.

박스-카운팅(box-counting) 분석은 자가-유사성(self-similarity)을 가지는 이미지의 프랙탈 차원(D_f)을 평가하며, 길이 L의 박스(box)로 구조를 커버링(covering) 함으로써, 프랙탈 차원 D_f 는 하기와 같이 정의될 수 있다.

$$D_f = \lim_{L \rightarrow 0} \frac{\log(N)}{\log(L)}$$

(1)

여기서 N은 윤곽 영역을 포함하는 박스의 수를 나타내며, L은 박스의 길이를 나타낸다. 상기 D_f 는 다시 하기와 같이 일반화될 수 있다.

$$N(s) = \left(\frac{1}{s}\right)^D$$

(2)

여기서 s 는 감소한 비율을 나타낸다. 박스의 크기는 프랙탈 차원을 계산하기 위한 기본적인 파라미터이며, 동일한 지름(span)을 가지며 윤곽을 포함하는 전체 영역을 포함한다.

방법을 간단히 하기 위해, 2-차원적 박스에 대해 본 발명자들은 $1/2^n$ 의 측면 길이로 박스를 분할하였으며, 이후 $(2^n)^2$ 의 매우 작은 박스들로 구성되었다. 상기 n 을 위해, 윤곽을 포함하는 수많은 박스들을 계산하였다. 서로 다른 값의 n (격자 크기)으로 상기 과정을 반복함에 따라, 본 발명자들은 하기식으로부터 기울기(slope)를 얻어냄으로써 차원을 평가할 수 있다.

$$\log[N(s)] = D \log(1/s)$$

(3)

이는 상기 식(2)를 로그화하여 나타낸 것이다. 박스 L 의 측면 길이는 $1/s$ 와 동일하며, 여기서 s 는 박스의 상대적인 크기이다. 박스 크기를 작게 할수록, 결과는 더 상세하고 정확하게 된다. 한 가지 픽셀의 윤곽 라인 너비(width)를 갖는 수많은 박스들을 이용하여 계산한 D_f 는 $16(128 \times 128 \text{ 픽셀}) \sim 16,384(4 \times 4 \text{ 픽셀})$ 를 갖는다. 상기 해상도로 계산된 D_f 값은 대부분 AFM의 해상도에 독립적이다.

본 발명의 암세포 분석 장치에 있어서, 다양한 암세포에 특징적인 프랙탈 차원(FD)들을 저장하고 있는 데이터베이스(DB)와 상기 DB에 저장된 암세포에 특징적인 프랙탈 차원(FD)과 시료 세포의 프랙탈 차원(FD)을 비교하기 위한 제3연산부를 더 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 데이터베이스(DB)는 일반 DB뿐 아니라 목록 형태의 엑셀 또는 텍스트 파일도 가능하다.

상기 데이터베이스(DB) 저장된 암세포의 프랙탈 차원(FD)은 정상세포의 프랙탈 차원(FD)보다 낮고, 비전이성 암세포의 프랙탈 차원(FD)은 전이성 암세포의 프랙탈 차원(FD)보다 높은 것을 특징으로 한다.

본 발명의 실시예에서 살펴본 바와 같이, 암세포와 정상세포의 세포 경계의 프랙탈 차원을 측정한 결과, 유방상피에서 유래한 정상세포($FD=1.231$)의 프랙탈 차원이 암세포($FD=1.040$)에 비해 월등히 높은 수치를 나타내었다. 또한 암세포주간 비교에서도 비전이성 암세포주($FD=1.081$)가 전이성 암세포주($FD=1.040$)에 비해 유의미하게 높은 프랙탈 수치를 보였다.

본 발명의 암세포 분석 장치에 있어서, 상기 제3연산부는 시료 세포의 프랙탈 차원(FD)이 암세포의 프랙탈 차원(FD)과 일정범위의 편차로 유사하면 암세포로

진단하고, 암세포의 프랙탈 차원(FD)보다 상기 편차 이상 높게 나오면 정상세포로 진단하는 것을 특징으로 한다. 여기서 상기 암세포 진단의 기준이되는 프랙탈차원(FD)의 편차는 암세포의 종류에 따라 달라질 수 있으며, 바람직하게는 상기 편차는 10 %인 것을 특징으로 한다.

본 발명의 암세포 분석 장치에 있어서, 상기 암세포 분석은 암세포의 종류, 진행정도 및 악성 또는 양성 여부를 진단하는데 사용하는 것을 특징으로 한다. 즉 살아있는 극미량의 종양세포에 대한 세포 표면 미세구조에 대한 다양한 프랙탈 패턴정보를 수집함으로써 여러 가지 특성을 예측하고 진단하는데 효과적으로 사용할 수 있다.

본 발명은 AFM(원자력 주사 현미경)을 이용하여 세포 경계의 미세구조에 대한 기하학적 분석기술을 기반으로 한 것이다. 실제로 생체 내에서 자라는 여러 암 조직이 특징적인 프랙탈 차원을 갖는다는 보고가 있어왔다. 프랙탈 구조 자체는 재현적 자기-유사성을 갖는다는 것이 잘 알려져 있는바, 이를 통해 암조직에서 나타나는 프랙탈 구조가 세포에서도 재현될 수 있음을 유추 가능하게 한다. 그러나 암의 프랙탈적인 특성이 단일 세포수준에서 도출된 바는 없다. 본 발명에서는 AFM을 이용한 고해상도의 세포영상을 통해 세포 경계의 프랙탈 차원(FD)을 계산할 수 있었으며, 차원분석을 통해 유방상피에서 유래한 정상세포(MCF10A)와 암세포(MCF7, MDA-MB-231)의 기하학적 차이를 밝혀내었다. 박스-카운팅(box-counting) 분석법을 이용하여 세포 경계의 프랙탈 차원을 산출한 결과, 상기에 나타낸 바와 같이 정상 세포가 암세포의 프랙탈 차원보다 월등히 높은 수치를 나타내었다. 또한 암세포주 간 비교에서도 비전이성 암세포주(MCF7)가 전이성 암세포주(MDA-MB-231)에 비해 높은 프랙탈 수치를 보여주었다. 이는 세포 경계의 프랙탈 차원이 특정세포의 비정상적인 특성이나 전이성을 반영할 수 있음을 증명한다.

상기의 성과는 그 목적에 따라 의료현장에서 암 진단을 위한 툴(tool)로서 사용될 것이다. 즉 살아있는 극미량의 종양세포에 대한 세포표면 미세구조에 대한 다양한 프랙탈 패턴정보를 수집하여 종양세포의 정확한 진행정도, 종류 및 악성, 양성 여부 등 여러 가지 특성을 예측하고 진단하는데 효과적으로 사용될 수 있을 것이다. 더욱이 본 기술이 성공적으로 실현될 경우, 종양세포 검진이 자동화 및 고속화가 가능하게 되어 High-throughput 진단장비 개발이 가능해 질 수 있다. 또한 현미경과 광학의 발전은 생명과학 분야의 학문적 발전의 토대를 이루고 있다는 점은 주지의 사실이다. 살아있는 세포의 표면구조에 대한 나노 스케일 수준의 측정은

분자세포생물학 연구에 전기를 마련하게 될 것이다. 따라서 본 발명은 세포표면의 극미세구조 분석을 위한 세포 연구용 바이오툴 개발에 핵심적으로 활용될 수 있을 것이다.

【도면의 간단한 설명】

도 1의 (A), (B)는 MCF10A 세포 경계($30 \times 30 \mu\text{m}^2$)의 동일 영역의 DIC 이미지(A)와 AFM 에러 신호 이미지(B)를 비교하여 나타낸 것이며, (C)는 AFM으로부터 얻은 높이 지형도(height topography) 이미지를 나타내고, (D)는 (C)에 표시된 부분을 확대하여 나타낸 것이다. 또한 (E)는 (B)에 표시한 red 및 blue 라인에 속하는 필로포디아(filopodia) 및 라멜리포디아(lamellipodia)의 높이 개요를 나타낸 것이다.

도 2는 MCF10A 세포 경계로부터 세포 윤곽을 적출하는 각 단계에 따른 AFM 이미지를 나타낸 것이다.

도 3의 (A)는 윤곽을 포함하는 박스 수를 박스 크기에 대해 로그-로그 플롯으로 계산된 프랙탈 차원을 나타낸 것이며, (B)는 (A)의 red 박스를 확대한 AFM 이미지와 프랙탈 차원을 나타내고, (C)는 (A)의 blue 박스를 확대한 AFM 이미지와 프랙탈 차원을 나타낸 것이다.

도 4는 서로 다른 MCF10A 세포주의 세포 경계의 AFM 이미지 및 상기 세포들의 프랙탈 차원 값의 분포를 나타낸 것이다.

도 5는 시토칼라신 D(cytochalasin D)의 처리에 따른 MCF10A 세포 경계의 AFM 이미지 및 처리 시간에 따른 프랙탈 차원 값의 변화를 나타낸 것이다.

도 6의 (A)는 정상 세포(MCF10A) 및 암 세포(MCF7, 비전이성; MDA-MB-231, 전이성)의 AFM 이미지를 나타내며, (B)와 (C)는 상기 각 세포의 프랙탈 차원을 측정한 결과를 나타낸다.

도 7은 본 발명에 따른 암세포 분석 장치의 개략도를 나타낸 것이다.

도 8은 도 7의 암세포 분석 장치를 이용한 암세포 분석 방법의 흐름도를 나타낸 것이다.

【발명의 실시를 위한 형태】

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

실시예 1. 세포 배양, AFM 측정 위한 시료 준비 및 AFM 측정

유방상피세포주 MCF10A는 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 얻었으며, 상기 세포를 100 ng/ml 콜레라 독소(cholera toxin, sigma)가 함유된 MEGM(Mammary Epithelial Growth Media) 배지(Clonetics)에서 배양하였다. 상기 배양은 37 °C, 5 % CO₂를 포함하는 습도 분위기에서 수행하였으며, 모든 배양 절차는 ATCC의 권장에 따라 수행되었다. 수용액 환경에서 AFM 이미지를 얻기 위해, 세포를 35 mm 디쉬(dish)에 24 시간 동안 배양시키고, 새롭게 준비한 4 % 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 10 분 동안 고정시켰다. 이후, AFM 및 광학 현미경(optical microscopy)을 통한 세포의 동일 부분의 이중 이미지(dual image)를 얻기 위해, 세포를 55 µm 스퀘어 그리드(square grid, Eppendorf)가 포함된 커버슬립(cover slip) 위에 배양시키고, 타겟 세포의 위치를 확인하였다. AFM 측정 결과는 도 1에 나타내었다.

도 1의 (A)에 보이는 바와 같이, DIC(differential interference contrast) 이미지는 낮은 배율에서는 세포의 전체 형태를 그리지만, 높은 배율에서는 세포 경계의 윤곽에 대한 정확한 정보를 제공하지 못한다(화살표; optical edge). 반면, 도 1의 (B)에 보이는 바와 같이, 에러 신호 모드로 수집된 AFM 이미지는 세포 경계의 정확한 구조가 보임을 확인할 수 있다. 즉, 세포의 동일 영역에서 손가락 모양의 필로포디아(filopodia)와 나뭇잎 모양의 라멜리포디아(lamellipodia)의 광범위한 돌출부위를 볼 수 있다. 막 돌출부위에서 에러 신호의 변화는 기저(substratum)로부터 세포의 경계를 명확하게 설명하며, 또한 높이 모드(height mode)에서 수집된 데이터는 세포의 3-차원적 이미지를 생성하고 (도 1의 (C) 및 (D)), 상기 데이터는 표면 토폴로지(topology)에 대한 정확한 정보를 제공한다. 또한 도 1의 (B)에 표시한 라인(red line 및 blue line)에 대한 높이 프로파일(height profile)은 도 1의 (E)에 나타내었다. 그 결과, 필로포디아(red line) 및 라멜리포디아(blue line)는 각각 약 100 nm, 200 nm의 두께가 측정되었다.

상기의 결과는 정상 파동(standing-wave) 형광 현미경을 이용하여 섬유아세포를 이끄는 라멜럼(lamellum)의 두께를 측정한 연구와 일치한다 [V.C. Abraham, V. Krishnamurthi, D.L. Taylor, F. Lanni, *Biophys. J.* 77 (1999) 1721-1732].

실시예 2. AFM 이미징(imaging)

세포의 모든 AFM 분석은 인산염 완충 식염수에서 AFM 시스템(XE-100, Park

Systems)을 이용하여 수행하였다. 상기 AFM 시스템은 120 μm 의 뾰족한 스퀘어 피라미드 형태의 AFM 캔틸레버(cantilever)(HYDRA-G, Applied Nanostructures)가 장착되어 있다. 상기 캔틸레버의 스프링 상수(spring constant)와 공명 주파수(resonance frequency)는 각각 0.60 N/m, 54 kHz 였다. 모든 신호에 대한 AFM 포토검출기는 2 ~ 3 V로 설정하고, 스캔 속도(scan rate)는 이미지 품질(quality)을 최적화하기 위해 약 0.4 Hz로 설정하였다. 토포그래피(topography)와 에러 신호 이미지를 포함하는 모든 AFM 이미지들은 512×512 픽셀(pixel)의 해상도로 측정된 30×30 μm^2 영역을 접촉모드(contact mode)로 수집한 것이다.

실시예 3. 세포 경계 추출(boundary extraction)

AFM 이미지를 통해 세포의 윤곽을 추출하기 위해, 본 발명자들이 고안한 소프트웨어를 사용하였다. 첫째, AFM 이미지를 히스토그램 스무딩 알고리즘(histogram smoothing algorithm)을 이용하여 디지털화 하고, 이로부터 얻은 이미지를 256 그레이-레벨(gray-level)로 디지털화 하였다(도 2의 (A)). 이후, 불변 신호(invariant signal)에 임계값 처리(threshold filtering)하였다. 이는 노이즈(noise)가 없는 오리지널 신호로 나타낼 수 있다. 상기 단계로 세포 가장자리 주변의 밝거나 어두운 노이즈가 제거되었다(도 2의 (B)). 상기 필터링 단계를 통해 처리된 이미지는 명확한 세포의 특성을 보여준다. 필터링 단계 이후 이원(binary) 변환을 수행하였으며, 이로 인해 임계값 보다 높은 픽셀은 흰색, 낮은 픽셀은 검은색으로 변화하였다(도 2의 (C)). 이후, 세포 경계를 추출하기 위해, 이산 웨이블릿 변환(discrete wavelet transformation, DWT)을 수행하였다. 이미지에서 1 또는 0에 인접한 픽셀 값을 제외하면, 세포 가장자리에 위치한 픽셀만 1(black)로 지정되고, 반면 다른 픽셀들은 0(white)으로 지정된다. 상기의 과정으로 매우 선명한 경계가 나타난다. DWT의 과정 후 얻어진 세포 경계의 윤곽은 도 2의 (D)에 나타내었다.

실시예 4. 프랙탈 차원(fractal dimension)의 계산

상기 실시예 3에서 추출한 세포 경계의 프랙탈 차원을 측정하였다. 측정 결과는 도 3에 나타내었다.

도 3의 (A) ~ (C)에 나타낸 것과 같이, D 는 박스 크기의 로그(log) 값에 대한 윤곽 영역을 포함하는 박스 수의 로그 값의 선형 회귀(linear regression)의 기울기(slope)로부터 계산된다. 로그/로그 플롯(plot) 선형 회귀의 상관계수(correlation coefficient)의 높은 값($r \geq 0.995$)은 세포 경계의 불규칙성이 넓은

범위의 배율에 대해 일정하게 유지됨을 의미하며, 이러한 특성은 프랙탈 개체의 한정 특성(defining characteristic)이다. 또한 세포 경계의 자가-유사성(self-similarity)를 동일한 이미지에서 유사한 영역으로부터 계산된 프랙탈 차원과 전체 이미지로부터 계산된 프랙탈 차원을 비교함으로써 평가하였다. 도 3의 (A) ~ (C)의 각각 계산된 D_f 값은 거의 동일하므로, MCF10A 세포를 이끄는 에지(edge)의 프랙탈 특성을 확인하였다.

상기와 같이, 단일 세포의 경계 구조의 프랙탈 특성은 구조적으로 유사한 복잡성을 가지는 동일 개체군의 다른 세포들을 의미하는 것은 아니다. 이는 세포 경계의 세부적인 형태가 세포와 세포 사이에서 일반적으로 다르기 때문이다. 상기 문제를 해결하기 위해, 본 발명자들은 다중 세포($n=43$)의 AFM 이미지를 얻어낸 후 프랙탈 분석을 수행하여 복잡성을 평가하였다. 상기 AFM 이미지는 도 4에 나타내었다.

도 4에 나타낸 각각의 AFM 이미지들은 서로 다른 세포의 가장자리를 확대하여 나타낸 것이다. 각 세포의 프랙탈 분석을 수행한 결과, $1.302 \sim 1.439$ (mean $D_f = 1.352 \pm 0.044$) 범위 내의 값을 갖는 것으로 측정되었다. 이러한 결과는 프랙탈 차원의 다양성이 제한됨을 보여준다.

실제 측정된 값은 세포의 배양 조건에 의해 영향을 받을 수 있으며, 이러한 결과는 MCF10A 세포의 프랙탈 차원이 상기 세포주 또는 인간 상피세포의 본질적인 특성을 반영함을 강하게 제시한다.

실시에 5. 약물 처리에 따른 세포 경계의 프랙탈 특성

세포 경계의 D_f 의 크기는 플라즈마 막의 견고성(ruggedness)에 의해 증가되며, 이는 주로 막 돌출부위, 필로포디아 및 라멜리포디아 기반의 두 개로 구별되는 액틴에 의해 영향을 받는다. 이러한 매우 역동적인 구조는 액틴 필라멘트의 회전을 [N. Watanabe, T.J. Mitchison, *Science* 295 (2002) 10821086] 및 이동을 포함한 여러 가지 세포질 프로세스에서의 기능에 밀접하게 연결되어 있다 [P.K. Mattila, P. Lappalainen, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 446454]. 상기 기능은 상처 치료(healing) 및 신경돌기의 성장(neurite outgrowth)이며, 이는 세포 형태에 의존적이다. 이러한 기능의 관련성은 제공된 세포 형태의 액틴 역학에 따라 결정되며, 실제로 필로포디아는 서로 다른 세포 유형에서 역학, 길이 및 위치에 따라 변화한다 [O.C. Rodriguez, A.W. Schaefer, C.A. Mandato, P. Forscher, W.M. Bement and C.M. Waterman-Storer, *Nat. Cell Biol.* 5 (2003) 599609]. MCF10A 세포 개개

의 형태학적 불균일에도 불구하고, 액틴 역학의 기초적인 균일성은 프랙탈 차원의 상대적인 불변성(constancy)으로 설명 되어져야 한다. 상기를 확인하기 위해, 실시예 1에서 배양한 MCF10A 세포에 1 μ M 시토칼라신 D(cytochalasin D)를 시간 별(0, 30, 60, 120 min)로 처리한 후, AFM 이미지를 얻어낸 후, 프랙탈 분석을 수행하였다.

도 5의 (A)에 보이는 바와 같이, 시토칼라신 D 처리 30 분 후 필로포디아의 수축 및 퇴화되는 현상을 확인할 수 있다. 이는 처리 시간이 지속될수록 더 뚜렷이 나타났으며, 2 시간 후에는 거의 최대에 도달하였다. 그러나 AFM 이미징 결과는 시토칼라신 D의 처리에도 라멜리포디아와 같은 구조에서 약간의 변화만 나타났다. 또한 도 5의 (B)에 나타낸 것과 같이, 각 상기 각 세포 경계의 프랙탈 차원을 평가한 결과, 시토칼라신 D의 처리 시간이 증가할수록 mean D_f 값이 점차적으로 감소하나, 각각의 D_f level은 약간만 변동하였다. 이러한 세포 경계 미세구조의 D_f 값의 차이는 주로 플라즈마 막에 인접한 액틴 필라멘트의 무결성(integrity) 및 역학(dynamic)의 정도(degree) 때문인 것으로 사료된다. 상기의 발견은 프랙탈 차원이 세포 형태의 형태학적 복잡성뿐만 아니라, 액틴 기초의 막 돌출부위의 윤택함(exuberance)을 평가하기 위한 유용한 파라미터임을 의미한다.

실시예 6. 암세포 및 정상세포 경계의 프랙탈 특성

암세포와 정상세포의 프랙탈 특성을 비교하기 위해, 실시예 1에서와 같이 암세포(MCF7, 비전이성; MDA-MB-231, 전이성)를 배양한 후, 실시예 2 및 3의 방법을 거쳐 암세포의 경계를 추출하였다. 상기 추출한 세포 경계의 이미지는 도 6의 (A)에 나타내었다. 이후 상기 세포 경계의 프랙탈 차원을 산출하였다.

그 결과(도 6의 (B), (C)), 정상세포인 MCF10A는 1.231 이었으며, MCF7은 1.081, MDA-MB-231은 1.040으로 정상세포의 프랙탈 차원이 암세포에 비해 월등히 높은 수치를 나타내었다. 또한 암세포주 간의 비교시, 비전이성 암 세포주(MCF7)가 전이성 암세포주(MDA-MB-231)에 비해 유의미하게 높은 프랙탈 수치를 보였다. 이러한 결과는 세포 경계의 프랙탈 차원이 특정 세포의 비정상적인 특성이나 전이성을 반영할 수 있음을 증명한다.

【산업상 이용가능성】

이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 원자력 주사 현미경(AFM)을 이용하여 세포 경계의 미세구조에 대한 기하학적 분석을 할 수 있으며, 특히 종양세포

에 대한 세포 표면 미세구조에 대한 다양한 프랙탈 특성을 분석할 수 있다. 따라서 본 발명의 암세포 분석 장치는 극미량의 종양세포에 대한 프랙탈 패턴정보를 수집하여 종양세포의 정확한 진행정도, 종류 및 악성, 양성 여부 등 여러 가지 특성을 예측하고 진단하는데 효과적으로 사용될 수 있다. 또한 살아있는 세포의 표면구조에 대해 나노스케일 수준으로 측정할 수 있으므로, 세포 표면의 극미세구조 분석을 위한 세포 연구용 바이오툴 개발에 핵심적으로 활용될 수 있다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

시료 세포 표면을 관찰하기 위한 원자력 주사 현미경(AFM);

상기 AFM에서 관찰된 시료 세포 표면의 이미지로부터 세포 경계(cell boundary)를 추출하기 위한 제1연산부; 및,

상기 추출된 세포 경계로부터 프랙탈 차원(fractal dimension; FD)을 계산하기 위한 제2연산부를 포함하는 암세포 분석 장치.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 제1연산부는 AFM 이미지로부터 노이즈(noise)를 스크리닝하고, 이원(binary) 변환시키고, 에지(edge) 추출을 함으로써 세포 경계를 추출하는 것을 특징으로 하는 암세포 분석 장치.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 제2연산부는 하기 공식의 박스-카운팅(Box-counting) 분석법을 이용하여 세포 경계의 프랙탈 차원(FD)을 계산하는 것을 특징으로 하는 암세포 분석 장치.

< 수학식 >

$$FD = \frac{\log N_2 - \log N_1}{\log (1/L_2) - \log (1/L_1)}$$

【청구항 4】

제 1항에 있어서, 다양한 암세포에 특징적인 프랙탈 차원(FD)들을 저장하고 있는 데이터베이스(DB)와 상기 DB에 저장된 암세포에 특징적인 프랙탈 차원(FD)과 시료 세포의 프랙탈 차원(FD)을 비교하기 위한 제3연산부를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 암세포 분석 장치.

【청구항 5】

제 4항에 있어서, 상기 DB에 저장된 암세포의 프랙탈 차원(FD)은 정상세포의 프랙탈 차원(FD)보다 낮고, 비전이성 암세포의 프랙탈 차원(FD)은 전이성 암세포의 프랙탈 차원(FD)보다 높은 것을 특징으로 하는 암세포 분석 장치.

【청구항 6】

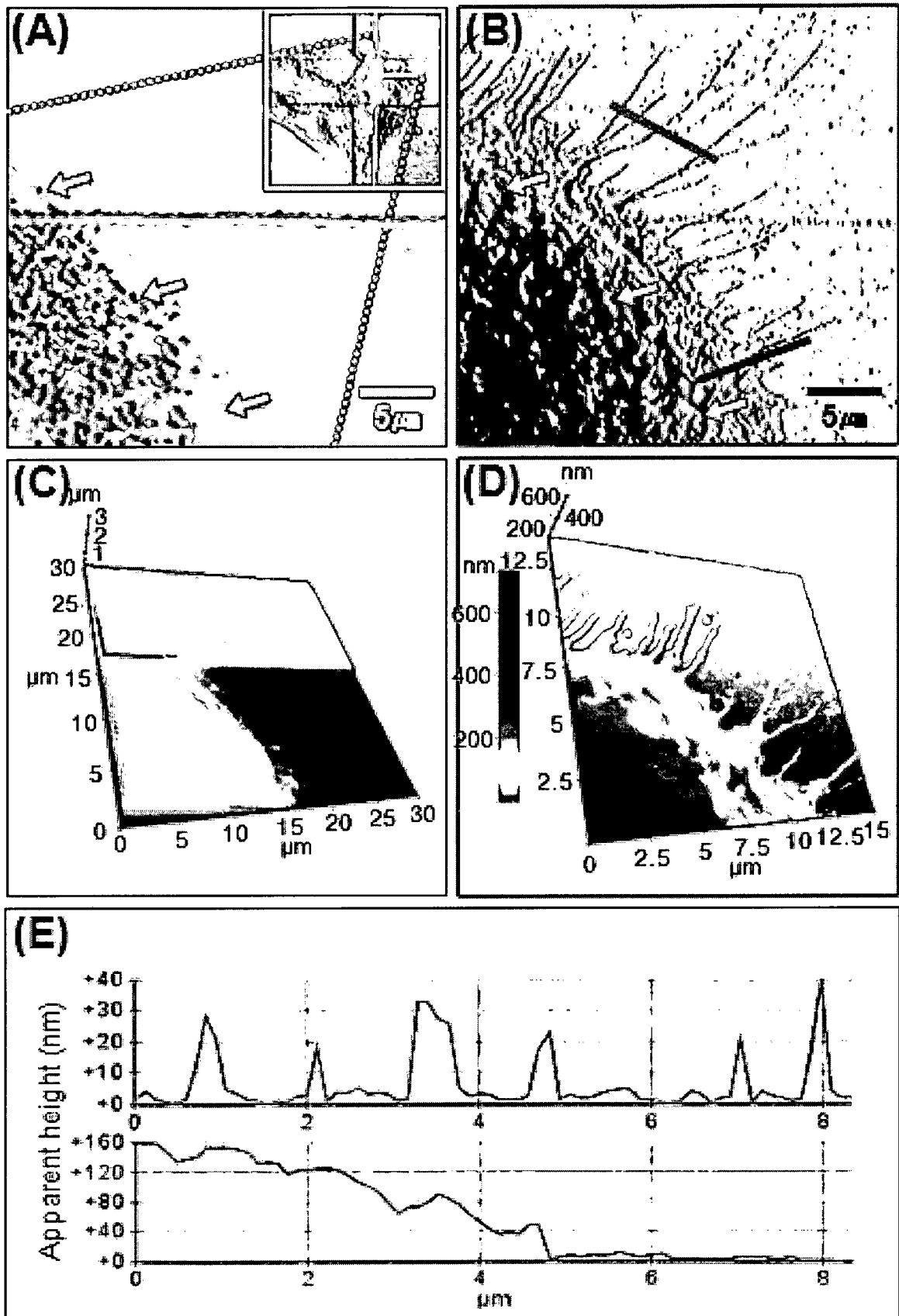
제 4항에 있어서, 상기 제3연산부는 상기 시료 세포의 프랙탈 차원(FD)이 암세포의 프랙탈 차원(FD)과 10 % 미만의 편차로 유사하면 암세포로 진단하고, 암세포의 프랙탈 차원(FD)보다 10 % 이상 높게 나오면 정상세포로 진단하는 것을 특징으로 하는 암세포 분석 장치.

【청구항 7】

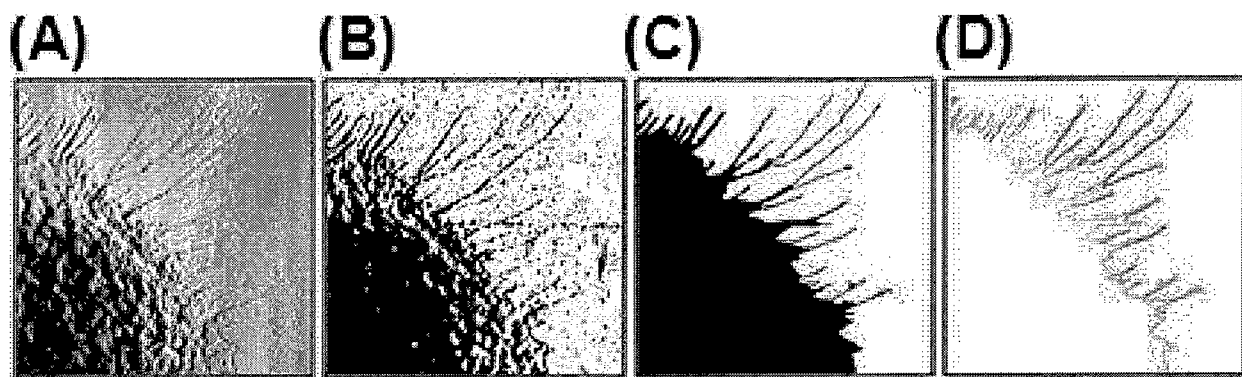
제 1항에 있어서, 상기 암세포 분석은 암세포의 진행정도, 종류 및 악성 또는 양성 여부를 진단하는데 사용하는 것을 특징으로 하는 암세포 분석 장치.

【도면】

【도 1】

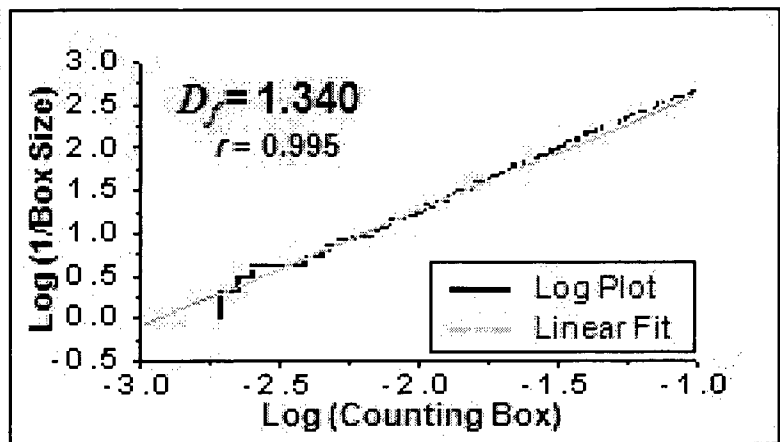
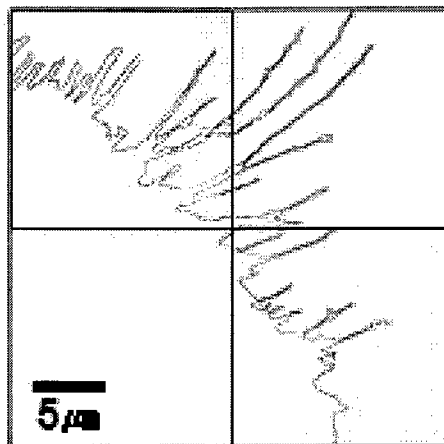


【도 2】

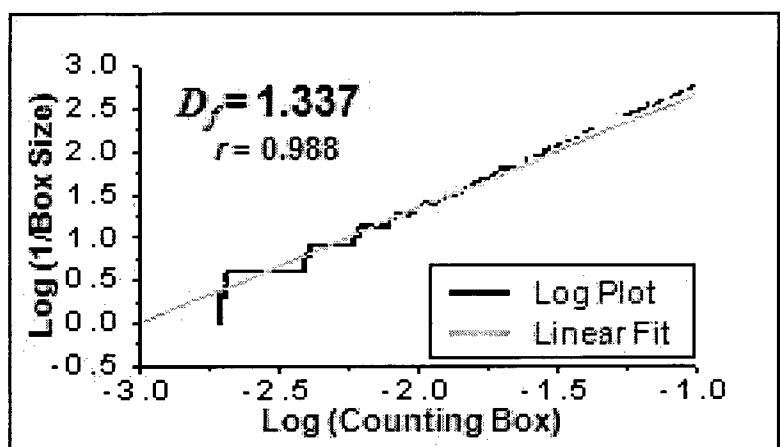
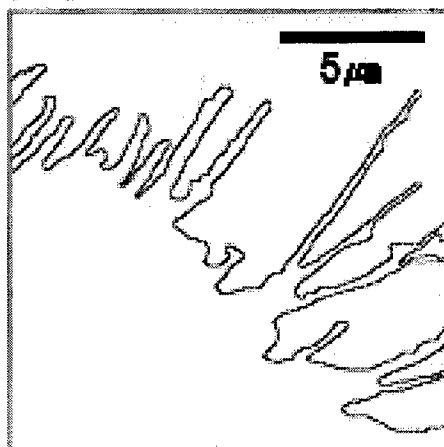


【도 3】

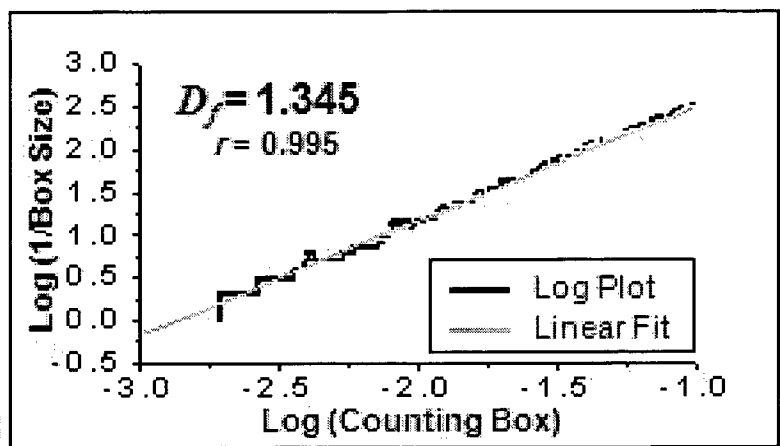
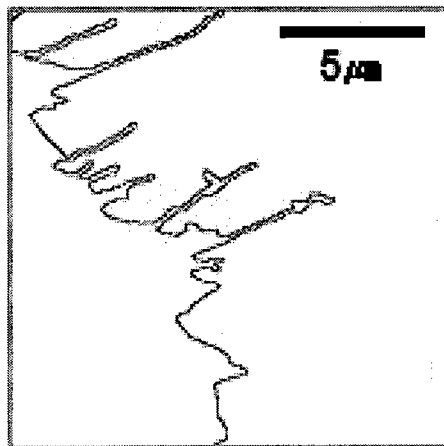
(A)



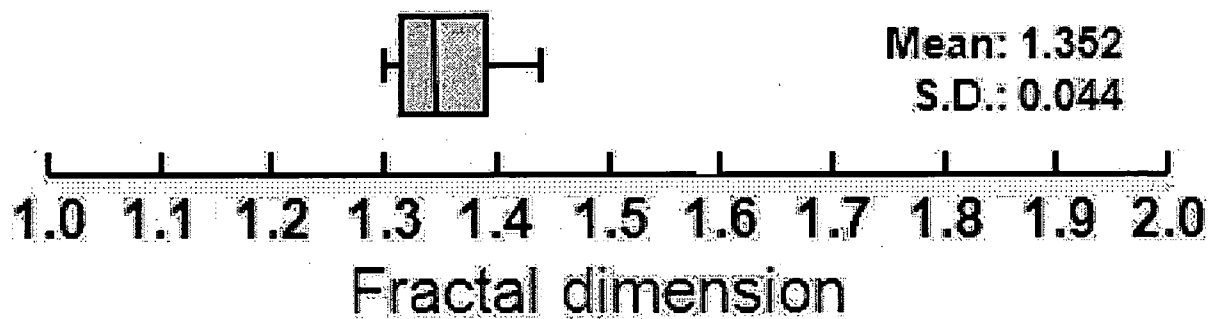
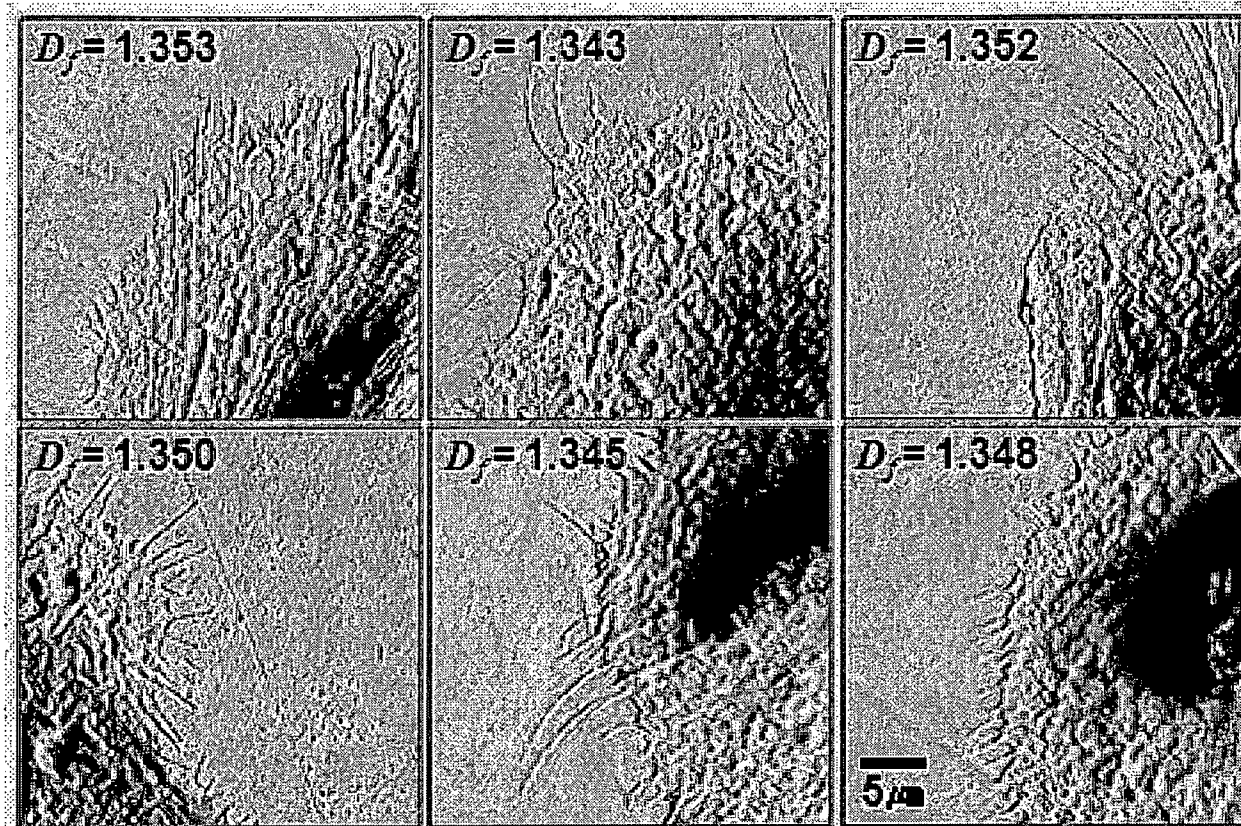
(B)



(C)

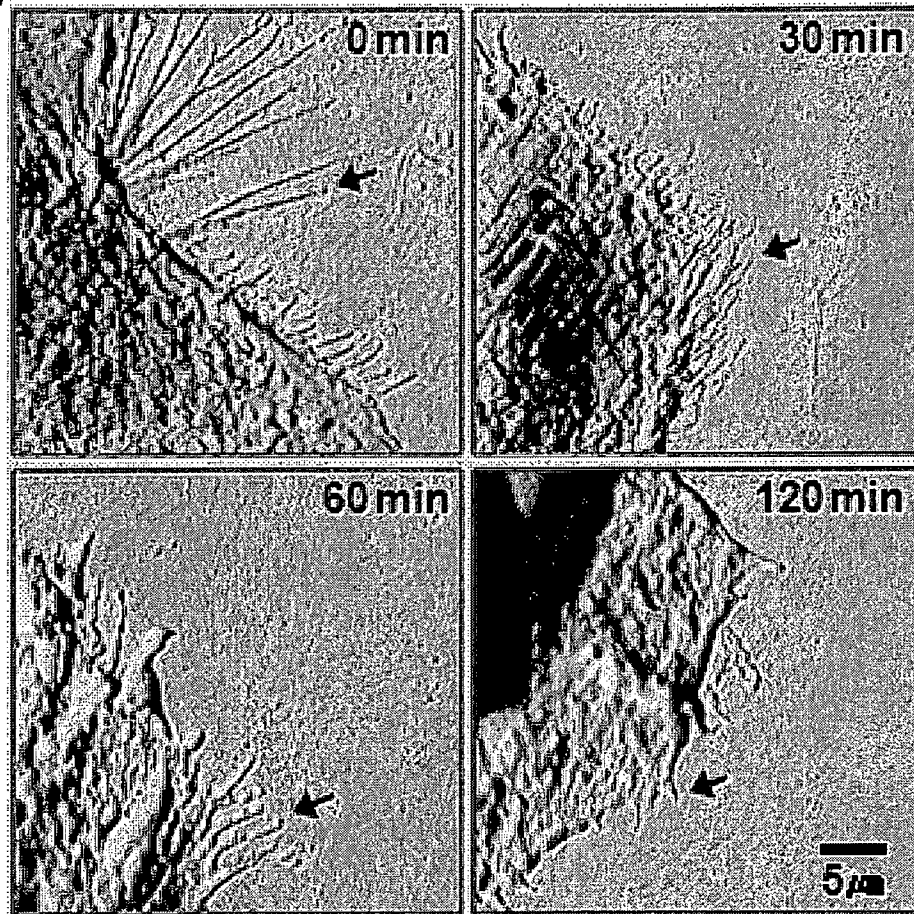


[도 4]

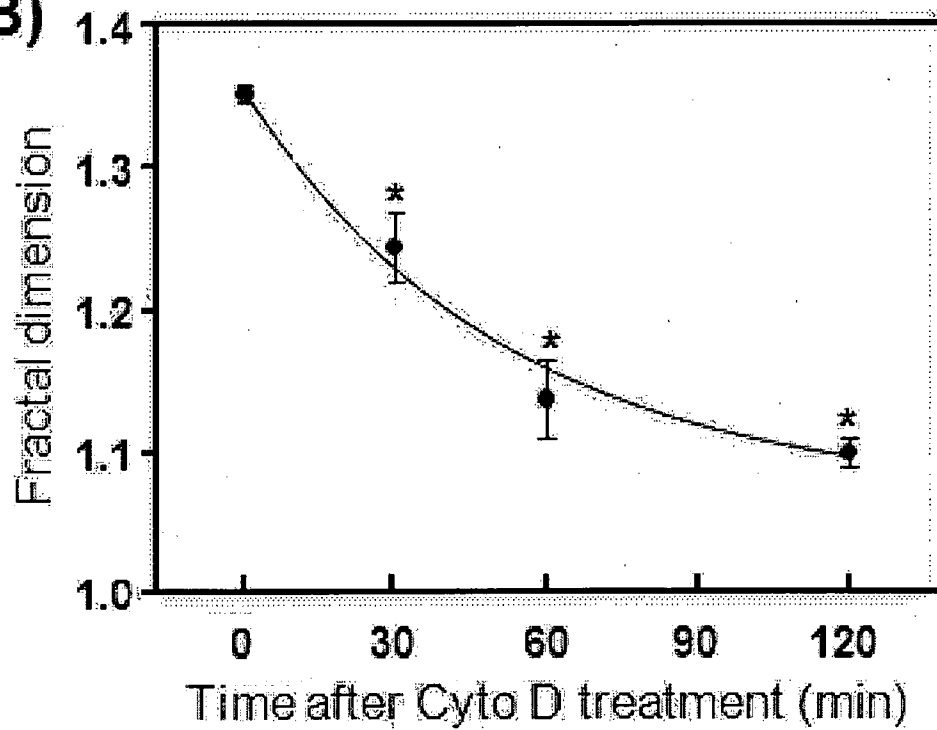


【도 5】

(A)

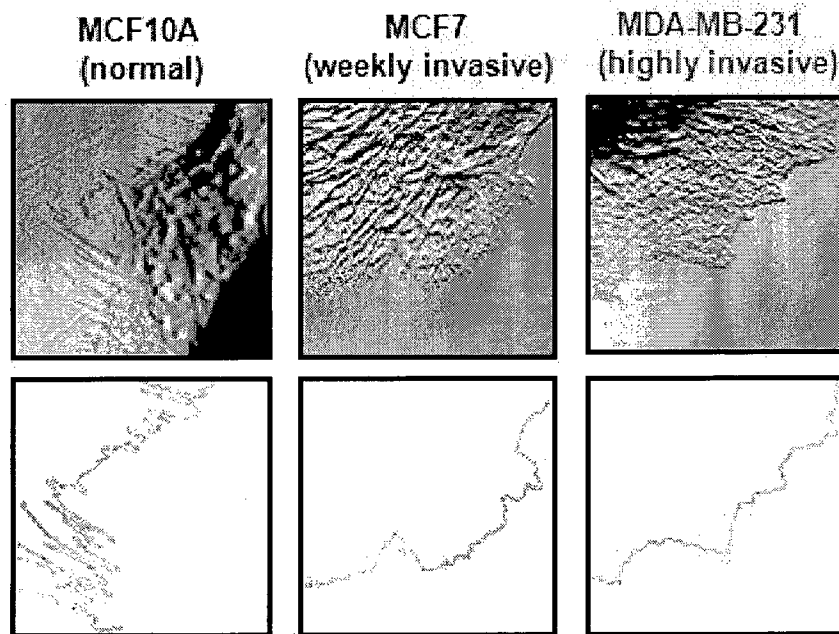


(B)

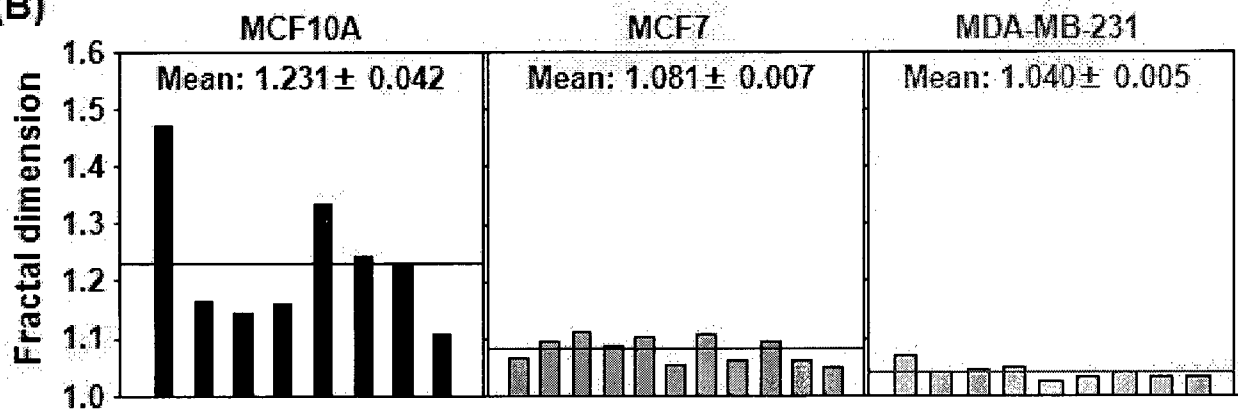


【도 6】

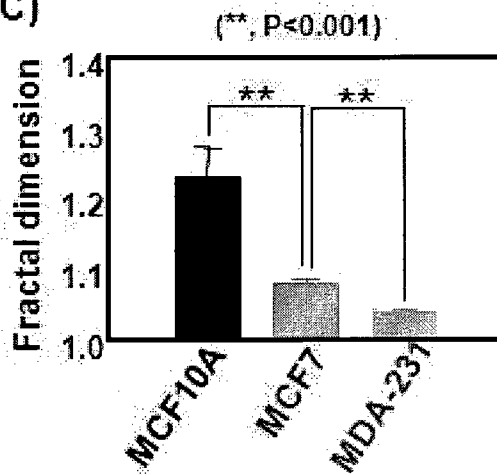
(A)



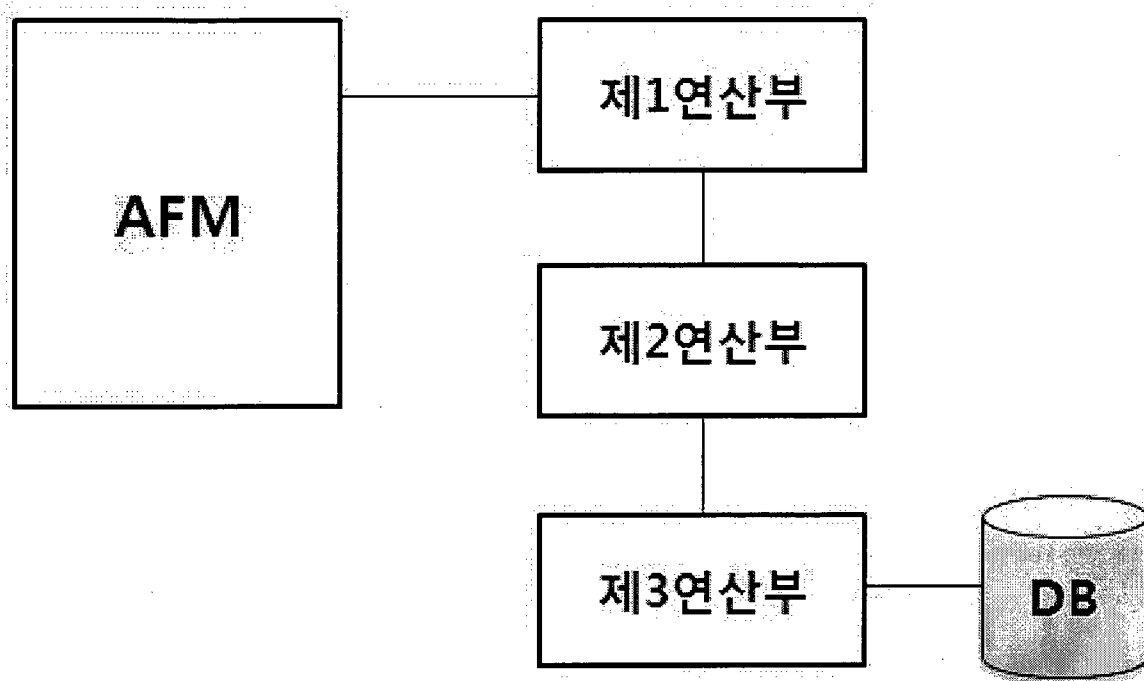
(B)



(C)



【도 7】



【도 8】

