



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0002745
(43) 공개일자 2020년01월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/06 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/06 (2013.01)
G01N 33/5011 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0174193(분할)
(22) 출원일자 2019년12월24일
심사청구일자 2019년12월24일
(62) 원출원 특허 10-2013-0044083
원출원일자 2013년04월22일
심사청구일자 2018년03월07일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
강덕희
서울특별시 서대문구 가재울로 45, 103동 1706호 (남가좌동, 남가좌동현대아파트)
최학선
부산광역시 동래구 금정마을로 105(온천동)
오억수
서울특별시 서초구 방배로 14, 5동 606호(방배동, 임광아파트)
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 4 항

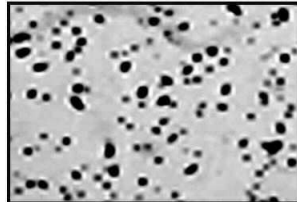
(54) 발명의 명칭 암 줄기세포의 고속 계수 방법

(57) 요약

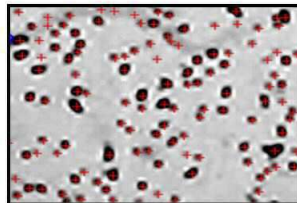
본 발명은 NICE(NIST's Integrated Colony Enumerator) 프로그램을 이용한 암 줄기세포의 고속계수 방법 및 상기 방법을 이용한 항암제의 고속 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 NICE 프로그램을 이용한 암 줄기세포의 고속계수 방법은, 세포의 이미지를 이용하여 암 줄기세포를 고속으로 정확하게 측정할 수 있는 우수한 효과가 있다. 또한 본 발명을 이용하면, 실험자의 판단에만 의존했던 기존의 계수 방식의 문제점을 해결하고 고속으로 암 줄기세포 항암제를 스크리닝할 수 있는 장점이 있다.

대표도 - 도3

얻어진 이미지



마모스페어 계수



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465011788

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술연구개발사업-병원특성화연구센터

연구과제명 세포표현형 변이 제어를 통한 여성암 치료법 개발(3세부)

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2012.05.01 ~ 2017.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 세포 이미지를 얻는 단계;
- 2) 상기 1) 단계의 세포 이미지의 관심영역(regions of interest; ROI)을 지정하고 임계값을 설정하는 단계; 및
- 3) 지정된 관심영역 이미지를 NICE 프로그램으로 분석하여 지름 60 μm 이상의 세포를 선별하는 단계를 포함하는 암 줄기세포 고속 계수 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 암 줄기세포는 골수성 백혈병, 결장암, 다발골수증, 전립선암, 두경부암, 췌장암, 전립선암 및 유방암으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 암 유래의 줄기세포인, 고속 계수 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 암 줄기세포는 마모스페어(mammosphere)인 고속 계수 방법.

청구항 4

- 1) 제1항의 방법으로 암 줄기 세포를 계수하는 단계;
- 2) 항암제 후보군을 암 줄기 세포에 처리하는 단계;
- 3) 항암제 후보군이 처리된 2) 단계의 암 세포를 제1항의 방법으로 계수하는 단계; 및
- 4) 1) 단계의 계수 값과 3) 단계의 계수 값을 비교하는 단계를 포함하는 항암제의 고속 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 NICE(NIST's Integrated Colony Enumerator) 프로그램을 이용한 암 줄기세포의 고속계수 방법 및 상기 방법을 이용한 항암제의 고속 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 악성종양이라고도 부르는 암은 정상세포가 유전적으로 혹은 후천적으로 한 번 이상의 돌연변이를 거쳐 비정상적인 성장능력을 획득하여 발생한다. 암의 치료에 사용되는 항암치료제 중에는 암세포에서 발현하는 항원이나 호르몬 수용체에 작용하여 암세포의 성장 및 증식을 특이적으로 막는 것도 있지만, 주로 암세포가 정상세포에 비하여 그 성장이 빠르다는 특성을 이용하여 개발된 것이 많다. 이런 항암제는 분열속도가 빠른 세포에 작용하여 이들의 DNA와 결합하거나, 다양한 성장주기에 작용하여 암세포의 성장을 억제하거나 암세포의 사멸을 유도하는 것이 일반적이거나, 암세포에 비특이적으로 작용할 수 있는 문제점이 있다. 즉, 성장이 빠른 정상세포, 예를 들어 모발세포, 위장관 내피세포, 백혈구와 림프구를 비롯한 조혈세포 등에 관련된 부작용이 나타나며, 이로 인하여 항암제를 이용한 치료가 중단되는 상황이 초래되기도 한다.

[0003] 또한, 항암제를 사용하는 경우에도 임상적으로 완전히 암이 제거되지 않고, 암이 전이 또는 재발되는 문제점이 아직까지 해결되지 않고 있다. 항암제 투여에도 불구하고 다시 암이 재발되는 원인에 대하여, 최근 암 줄기세포가 그 원인일 것이라는 가능성이 제기되고 있다. Cohnheim는 1867년에 모든 장기는 혈액 속의 줄기세포에서 유래하고 재생된다는 가설을 처음으로 제기하였고, 1889년에는 정상조직뿐만 아니라 암도 혈액 안의 줄기세포에서

기인한다고 하였다. 이어 Ribbert는 1904년에 이러한 줄기세포가 암을 만드는 이유는 이를 정상적으로 발달하도록 조절하는 환경에 문제가 생긴 탓이라고 하였다.

[0004] 1990년대 중반에 혈액암인 급성골수성 백혈병에서 이런 성격을 띠는 암세포가 있다는 것이 처음 알려진 이후, 고형암 중에서는 2003년에 유방암을 필두로 하여 속질모세포종을 비롯한 뇌종양에서 이런 소수의 암세포가 존재한다고 보고되었으며, 이후 결장암, 다발골수증, 전립선암, 두경부암, 췌장암, 전립선암 등에서도 암줄기세포가 있다는 보고가 있었다.

[0005] 암 줄기세포는 Oct4, Sox2, Nanog, c-kit, ABCG, ALDH-1, 및 CXCL12와 같은 일반 줄기세포에서 확인되는 마커 단백질을 갖는 것으로 알려져 있다. 특히, CXCL12(factor 1 유래 스트로마 세포)는 전이 부위인 골수, 폐 및 간에서 높게 발현되는 호밍 분자(homing molecule)이다. 따라서 암 줄기세포는 암의 전이에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 암 줄기세포는 또한 기존의 항암제에 대하여 저항성을 나타내는 점에서 기존의 암 세포와 구별된다. 이러한 암 줄기세포의 특징은 암 줄기세포에 대한 약물 표적 동정의 필요성을 나타낸다. 알려진 타깃은 아릴 탄화수소(aryl hydrocarbon) 수용체, 염증-연관 신호분자(inflammation-related signaling molecules), TGF- β 신호, 호밍 분자 연관 전이(homing molecules related metastasis; CXCR4 및 CXCL 12), 수용체 및 이의 신호 요소를 포함하는 성장 인자, CD44, EpCAM 및 인테그린(integrins)을 포함하는 세포 표면 인자, 및 기타 살리노마이신(salinomycin) 및 8-퀴놀리놀(8-quinolinol) 등을 포함한다.

[0006] 유방암 세포주, MCF-7은 in vitro에서 부착 없이도 세포 자멸사를 하지 않고 타원 형태로의 성장을 할 수 있는 줄기 세포와 유사한 능력을 가진 세포의 부분집락을 가진 것으로 알려져 있다. 부유배양으로 기층이 없는 조건을 인공적으로 만들면 줄기세포의 성질을 가지는 세포들은 서로 부착되어 구형의 세포 덩어리를 만들게 되며, 이러한 세포 덩어리는 뉴로스페어(neurosphere)라고 명명되었다. 인간의 유방 줄기세포에 이러한 개념을 적용한 것이 "마모스페어(mammosphere)"이다. 마모스페어에는 일반 인간 유방 세포보다 8배 많은 전구 세포들이 존재하며 지속적으로 계대 배양이 가능하고, 여러 번의 계대 배양 후에는 100%의 세포가 모두 bi-potent 전구체로 자라는 특징이 있다. 마모스페어는 성인 유방 세포인 유선 상피세포(mammary gland epithelial cell), 관 상피세포(ductal epithelial cell), 엘비올라 상피세포(alveolar epithelial cell) 들로 모두 분화가 가능하며, 마트리겔(Matrigel)내에서 삼차원 구조를 이루면서 복잡한 기능성 유방 구조물을 형성하는 것이 관찰된다. 마모스페어는 줄기세포의 가장 특징 중의 하나인 자가 증식을 할 수 있는 성질이 있어서 하나의 마모스페어에서 여러 개의 마모스페어 또는 유방줄기세포를 다량으로 얻을 수 있다. 또한 조혈모 세포, 신경 줄기세포, 배아 줄기세포 등과 비교하여 많은 발현 유전자가 중복되는 것이 확인되므로, 마모스페어가 실제적인 유방 줄기세포인 것으로 생각된다.

[0007] 암 줄기세포의 자가 재생 능력의 표준 분석 방법은 in vivo 에서의 이식(transplantation) 및 in vitro에서의 마모스페어 형성 분석방법이다. 마모스페어 형성 분석방법은 지름이 60 μm 이상인 구를 욱안으로 확인하고 직접 계수하는 방법으로 이루어지며, 이는 실험자가 오랜 시간을 들여 직접 마모스페어를 계수해야 하며, 실험자의 개인적인 판단에 의존하므로 부정확하다는 단점이 있다.

[0008] 따라서 암 줄기세포를 연구함에 있어서, 마모스페어와 같은 암 줄기세포를 실험자의 판단에 의하지 않고 빠르고 정확하게 계수할 수 있는 방법에 대한 필요성이 있다. 이에 본 발명자들은 고속화, 자동화된 암 줄기세포 계수 방법에 대하여 연구 하던 중, 암 줄기세포의 이미지를 얻고 이로부터 암 줄기세포를 계수하는 경우 빠르고 정확한 암 줄기세포의 계수가 가능함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 NICE 프로그램을 이용한 암 줄기세포의 고속계수 방법을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 고속계수 방법을 이용한 항암제의 고속 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 NICE 프로그램을 이용한, 암 줄기세포의 고속 계수 방법에 관한 것이다.

[0012] 본 발명의 고속 계수 방법을 이용하면, 특정 크기 이상의 암 줄기세포를 고속으로 선별해 낼 수 있으며, 실험자의 판단에 의존하지 않으므로 정확한 계수 결과를 얻을 수 있다.

- [0013] 보다 구체적으로 본 발명의 암 줄기세포 고속 계수 방법은 1) 세포 이미지를 얻는 단계; 2) 상기 1) 단계의 세포 이미지의 관심영역(regions of interest)을 지정하고 임계값을 설정하는 단계; 및 3) 지정된 ROI 이미지를 NICE 프로그램으로 분석하여 자동으로 60 μm 이상의 세포를 선별하는 단계를 포함하는 암 줄기세포 고속 계수 방법을 제공한다.
- [0014] 상기 세포 이미지는 배양된 부유 세포들의 이미지를 카메라로 촬영하거나 부유 세포를 직접 스캔하여 얻을 수 있으며, 이미지는 저해상도에서 고해상도로, 바람직하게는 300dpi에서 1200dpi로 스캔되는 것이 바람직하다. 사용할 수 있는 카메라나 스캐너는 고가의 전문 촬영 또는 스캔 광학 영상기기로 제한되지 않으며, 일반 상용화된 카메라 또는 스캐너, 예를 들어 HP ScanjetG4010 등을 제한 없이 사용할 수 있다.
- [0015] 상기 세포는 액체 상태에서 현탁되어 부유하는 상태의 세포이다. 정상적인 상피세포는 부착 의존적이므로 부유 상태에서 사멸하나, 암 줄기세포의 경우 부착이 없는 부유 환경에서도 사멸하지 않고 부유하는 세포 덩어리를 형성하므로, 액체 상태에서 현탁되어 부유하는 세포를 시료로 함으로써 암 줄기세포를 형성시키고 이를 일반 세포와 구별할 수 있다.
- [0016] 상기 "관심영역(regions of interest; ROI)"이란 임의의 관측영역으로 설정되는 영역을 말하며, 이후 각각의 설정된 ROI를 중심으로 얻어진 이미지를 분석할 수 있다. 세포가 배양되는 플레이트에서 분석을 원하는 임의의 열 및 칼럼을 선택하여 관심영역을 설정할 수 있으며, NICE 프로그램을 이용하여 관심영역을 재조정할 수 있다.
- [0017] 얻어진 세포 이미지들의 배경 신호를 조절하기 위해서 임계값 알고리즘을 적용할 수 있으며, 선택적인 임계값은 -1 내지 -10, 바람직하게는 -3 내지 -6의 표준편차가 되도록 설정할 수 있다.
- [0018] 상기 "NICE(NIST's Integrated Colony Enumerator) 프로그램"은 온라인상에 공개된 프리웨어로, NIST 홈페이지에서 무상으로 다운로드 받을 수 있다. NICE 프로그램의 구체적인 작동방법에 대해서는 <ftp://ftp.nist.gov/pub/physics/mlclarke/NICE>에 기술되어 있다.
- [0019] 상기 NICE 프로그램은 지름이 60 μm 인 세포들을 선별하도록 파라미터(parameter) 배경(수동) 값 110, 해상도 낮음으로 설정될 수 있으며, 이에 의하여 촬영 또는 스캔으로 얻어진 세포 이미지상에서 암 줄기세포를 선별하고 계수할 수 있다. 구체적으로 NICE 프로그램은 획득된 이미지 상의 세포의 지름을 자동적으로 인식하고, 지름이 60 μm 이상으로 확인된 세포들을 암 줄기세포로 선별하고 계수할 수 있다.
- [0020] 상기 암 줄기세포는 부착 비 의존적으로 부유 환경에서 생존하여 지름 60 μm 이상의 덩어리를 형성할 수 있는 세포를 말하며, 바람직하게는 골수성 백혈병, 결장암, 다발골수증, 전립선암, 두경부암, 췌장암, 전립선암 및 유방암으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 암 유래의 암 줄기세포일 수 있고, 보다 바람직하게는 유방암 줄기세포인 마모스페어일 수 있다.
- [0021] 또한 본 발명은 1) 상기 암 줄기세포 고속 계수 방법으로 암 줄기세포를 계수하는 단계; 2) 항암제 후보군을 암 줄기세포에 처리하는 단계; 3) 항암제 후보군이 처리된 2) 단계의 암 줄기세포를 상기 암줄기세포 고속 계수 방법으로 계수하는 단계; 및 4) 1) 단계의 계수 값과 3) 단계의 계수 값을 비교하는 단계를 포함하는 항암제의 고속 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0022] 1) 단계에서 계수된 암 줄기세포와 3) 단계에서 계수된 암 줄기세포의 계수값 비교는 암줄기세포의 형성 효율, 바람직하게는 마모스페어 형성 효율(mammosphere forming efficiency; MFC)을 비교하여 이루어질 수 있다. 1) 단계에서 확인된 암 줄기세포의 형성 효율과 비교하여, 3) 단계에서 확인된 암 줄기세포의 형성 효율이 효과적으로 낮아지도록 하는 항암제 후보를 암 줄기세포에 효과적인 항암제로 선별해 낼 수 있다.
- [0023] 본 발명에 따른 스크리닝 방법을 이용하면 빠르고 정확하게 암 줄기세포 형성의 변화를 비교해 볼 수 있으므로, 많은 수의 항암제 후보군을 고속으로 스크리닝할 수 있는 장점이 있다.

발명의 효과

- [0024] 본 발명에 따른 NICE 프로그램을 이용한 암 줄기세포의 고속계수 방법은, 세포의 이미지를 이용하여 암 줄기세포를 고속으로 정확하게 측정할 수 있는 우수한 효과가 있다. 또한 본 발명을 이용하면, 실험자의 판단에만 의존했던 기존의 계수 방식의 문제점을 해결하고 고속으로 암 줄기세포 항암제를 스크리닝할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 NICE 프로그램을 이용한 마모스페어의 고속 계수 방법을 간략하게 도식화한 도이다.
- 도 2는 스캔이미지를 통해 6-웰 초-저부착 플레이트 상에서 확인되는 마모스페어(A) 및 이를 100 배 확대한 모습(B)을 나타낸 도이다.
- 도 3은 NICE 프로그램을 이용하여 세포 이미지 상에서 마모스페어를 계수한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4는 실험자에 의한 마모스페어 계수 결과와 NICE 프로그램을 이용한 마모스페어 고속 계수 방법을 이용한 계수 결과를 비교한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 5는 NICE 프로그램을 이용한 마모스페어 고속 계수 방법을 이용하여 마모스페어 형성효율(MFC)을 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 6은 메트포르민 처리에 따른 마모스페어 형성 효율의 변화를 NICE 프로그램을 이용한 마모스페어 고속 계수 방법으로 측정한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0028] 실시예 1. 재료의 준비

- [0029] 메트포르민(Metformin) 및 초-저 부착성 클러스터(ultra-low attachment cluster) 6 웰 플레이트를 포함하는 조직 배양 플레이트를 시그마-알드리치 Co.(St. Louis, MO, USA) 및 Nunc labware(Waltham, MA, USA)로부터 구입하였다. 달리 언급되지 않는 모든 다른 화학물질들은 생화학용이다. 메트포르민은 DMSO 용해시켜 1M의 모액으로 제조하였다.

[0031] 실시예 2. 유방암 MCF-7 세포 및 마모스페어(mammosphere) 배양

- [0032] MCF-7 세포들은 10% 열-불활성화된 우태아혈청, 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신을 포함하는 DMEM(Dulbecco's Minimum Essential Medium)에서 성장되었고, 5 % CO₂ 를 갖는 배양기에서 37℃로 유지되었다. 세포들은 10cm 배양 접시 당 1x10⁶ 세포 밀도로 도말되었다. 인간 MCF-7 세포주들의 마모스페어가 마모스페어 배양을 위한 MammoCult™ 배지(StemCell Technologies, Vancouver, BC, 캐나다)를 이용하여 배양되었다. MCF-7 세포 유래의 단일 세포들이 트립신/EDTA를 사용하여 획득되었으며 3.5-4x10⁴ 단일 부유 세포들이 2ml의 완전 MammoCult™ 배지를 포함하는 초-저부착 6-웰 접시에 분주되었다. 그 후, 5% CO₂ 배양기에서 37℃로 7일 동안 배양하였다. 완전 MammoCult™ 배지에는 4 µg/ml 헤파린, 0.48 µg/ml 하이드로코르티손(hydrocortisone), 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신이 보충되었다.

[0034] 실시예 3. 마모스페어의 자동계수 방법

- [0035] 마모스페어의 자동계수를 위하여 마모스페어를 포함하는 초-저부착 6-웰을 준비하였다. 배양된 마모스페어 샘플들이 이미지 획득 조절 및 이미지 분석의 초기 시험을 위하여 사용되었다. 초-저부착 6-웰 플레이트 내의 마모스페어의 이미지를 얻기 위하여 스캐너(HP ScanjetG4010, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA)위에 마모스페어를 포함하는 상기 플레이트를 위치시키고 플레이트의 8-bit 그레이스케일(grayscale) 이미지를 300 dpi(dots/인치) 및 600 dpi (dots/인치)에서 얻었다.

- [0036] 무상 소프트웨어인 NICE(NIST's Integrated Colony Enumerator)를 다운받아 상기와 같이 얻어진 그레이스케일 이미지에서 마모스페어를 자동 계수하였다. NICE 프로그램의 구체적인 작동 방법에 대해서는 NICE 매뉴얼(<ftp://ftp.nist.gov/pub/physics/mlclarke/NICE>)에 기술되어 있으며 해당 홈페이지에서 NICE 프로그램을 무료로 다운받을 수 있다.

- [0037] 보다 구체적으로 NICE 프로그램을 데스크톱에 인스톨한 후 스캔된 마모스페어의 이미지를 로드하였다. 계수를 위하여 이미지의 히스토그램(histogram) 분포를 파악하여 임계값(threshold)을 결정하고 결정된 임계값을 이용하여 이미지 영상을 이진화(binarization) 하였다. 원하는 열과 칼럼을 선택하여 관심영역(regions of interest; ROI)들을 지정하였으며 NICE 프로그램의 Elliptical 선택에 의해서 관심영역을 이동하고 크기를 재조정하였다. 임계값 알고리즘을 이용하여 이미지의 배경 신호를 조절하였으며, 자동적으로 선택된 이미지를 계수하였다. 선택적인 임계값은 -3 내지 -6 표준편차가 되도록 하였다.
- [0038] 상기 자동계수 과정을 도 1에 간략하게 도식화하여 나타내었다.
- [0040] **통계적 분석 방법**
- [0041] 모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 나타내었다. 데이터는 Student's t-test를 이용하여 분석하였으며, $p < 0.05$ 를 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다(GraphPad Prism 5 Software, SanDiego, CA, USA).
- [0043] **시험예 1. 인간 유방암 MCF-7 세포 유래 마모스페어의 형성 확인**
- [0044] 실시예 2와 같이 배양하여 마모스페어를 형성하고 이를 확인하였다. 구체적으로 부착형 MCF-7 세포들을 효소 처리를 통해 단리 되도록 하였으며, 세포들을 초-저부착 6-웰 플레이트에 암 줄기세포(Cancer stem cell) 선택적 배양 배지와 함께 위치시켰다. 배양 시스템에서, 4×10^4 의 단리된 MCF-7 세포들이 2ml의 완전 마모스페어 배양 배지 MammoCult™와 함께 6-웰 초-저부착 플레이트의 각각에 위치되었다. 7일 동안 배양하고, 육안으로 식별 가능한 크기(60 내지 100 μm 이상)를 가진 원형의 마모스페어를 확인하였으며, 생성된 마모스페어를 도 2에 나타내었다.
- [0045] 도 2에 나타난 바와 같이, 6-웰 초-저부착 플레이트 상에서 육안으로 확인할 수 있는 마모스페어가 형성됨을 확인하였다.
- [0047] **시험예 2. NICE 프로그램을 이용한 마모스페어 자동 분류**
- [0048] NICE 프로그램을 이용하여, 시험예 1에서 얻어진 마모스페어를 자동으로 확인하고 분류하였다. 배양된 6웰 플레이트를 스캐너(HP ScanjetG4010, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA)에 위치시키고, 8 비트 이미지를 300dpi 또는 600dpi에서 얻었다. 6-웰 플레이트에서 얻어진 이미지 중 ROI 이미지가 선택되었다. ROI의 분석은 원하는 열 및 칼럼 및 부모 ROI로 정의한 위치에서 시작하였다. 이미지 분석 전에 ROI들은 얻어진 원래 이미지에서 이동되고 크기를 재조정 하였으며, 이미지의 배경 노이즈도 역치 알고리즘을 이용하여 제거하였다. -3 내지 -6 표준 편차를 역치 값으로 선택하였다. 유효한 수의 마모스페어가 선택된 역치에 의하여 확인되고 마모스페어로 분류되었으며, 분류 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0049] 도 3에 나타난 바와 같이, 스캔하여 얻어진 이미지 상에서 NICE 프로그램에 의해서 마모스페어로 분류되는 세포들이 계수되었다.
- [0051] **시험예 3. NICE 프로그램을 이용한 마모스페어 분류의 정확성 분석**
- [0052] 시험예 2에서 얻어진 마모스페어 분류 결과의 정확성을 확인하기 위하여, 기존의 방법인 실험자에 의한 분류 결과와 비교하였다. 마모스페어를 스캔하여 얻어진 원래 이미지내의 실험자에 의하여 확인된 마모스페어는 검은 점으로 표시하였고, NICE 프로그램에 의하여 마모스페어로 확인된 이미지는 붉은 십자로 표시하였으며, 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0053] 도 4에 나타난 바와 같이, 얻어진 원래의 이미지에서 실험자에 의해 마모스페어로 확인된 검은 점은 NICE 프로그램을 이용하여 확인된 마모스페어인 붉은 십자 표시와 완전하게 일치하였으며, 기존에 실험자에 의해 확인되는 모든 마모스페어가 NICE 프로그램을 통하여 마모스페어로 확인되어 분류될 수 있음을 알 수 있었다. 따라서, NICE 프로그램을 이용한 마모스페어 분류 방법은 기존의 실험자에 의한 분류를 대체할 수 있으며, 실험자에 의한 분류보다 고속으로 정확하게 마모스페어를 확인하고 분류할 수 있음을 알 수 있다.

[0055] **시험예 4. NICE 프로그램을 이용한 MCF-7 세포 유래 마모스페어의 자동 계수**

[0056] 촬영한 마모스페어의 이미지를 캡처하고, NICE 프로그램을 구동하여 마모스페어를 자동 계수하였다. 또한 마모스페어 형성 분석을 통해 심어진 총 세포수/웰 중에서 형성된 총 마모스페어 수/웰 마모스페어의 비율인 마모스페어 형성 효율(mammosphere forming efficiency; 이하 MFC) 확인하였다. MCF-7 세포주의 MFE를 NICE 프로그램 및 실험자에 의한 계수 방식으로 계산하였으며, 결과를 도 5에 나타내었다.

[0057] 도 5에 나타낸 바와 같이 MCF-7 세포주의 MFE는 NICE프로그램으로 계산한 결과 2.2%로 나타났다. 실험자에 의한 계수 방식에 의하면 동일한 MCF-7 세포주의 MFE가 2.0%로 나타났다. 이러한 결과를 통해, 실험자에 의한 계수 방식은 일부 형성된 마모스페어가 누락되고 계수되지 않을 수 있다는 문제점을 알 수 있으며, NICE 프로그램을 이용하는 경우 이러한 누락 마모스페어의 수를 줄이므로써 더 정확한 계수가 가능함을 확인할 수 있다. 따라서 마모스페어 계수 방식이 실험자의 육안에 의한 계수 방식보다 더 정확하고 합리적인 방법임을 알 수 있다.

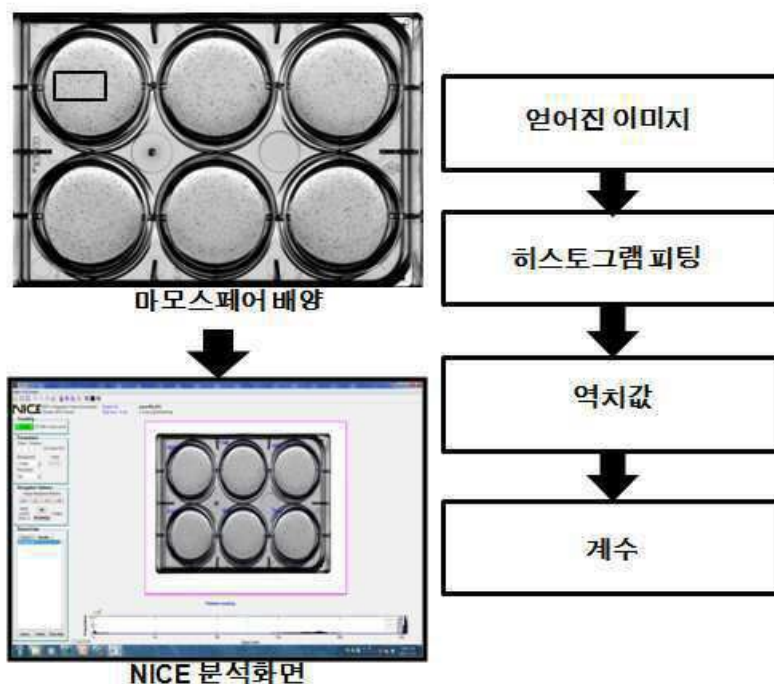
[0059] **시험예 5. NICE 프로그램을 이용한 마모스페어 계수 방법을 이용한 항암제 스크리닝**

[0060] 본 발명의 방법을 이용하여 함암제 처리 전과 처리 후의 마모스페어를 계수하는 경우, 빠르고 정확하게 형성된 마모스페어의 수를 비교할 수 있으므로 새로운 항암제 고속 스크리닝 방법으로 사용할 수 있다. 이를 확인하기 위하여, 항당뇨제이나 최근 항암 효과를 나타내는 것으로 알려진 메트포르민을 배양된 마모스페어에 처리하고 처리 전 후의 마모스페어의 수를 계수하였다. 메트포르민을 5mM, 10mM 농도로 시험예 1과 같이 준비된 마모스페어에 처리하였으며, NICE 프로그램을 이용하여 시험예 2와 동일한 방법으로 마모스페어를 계수하였으며, 결과를 도 6에 나타내었다.

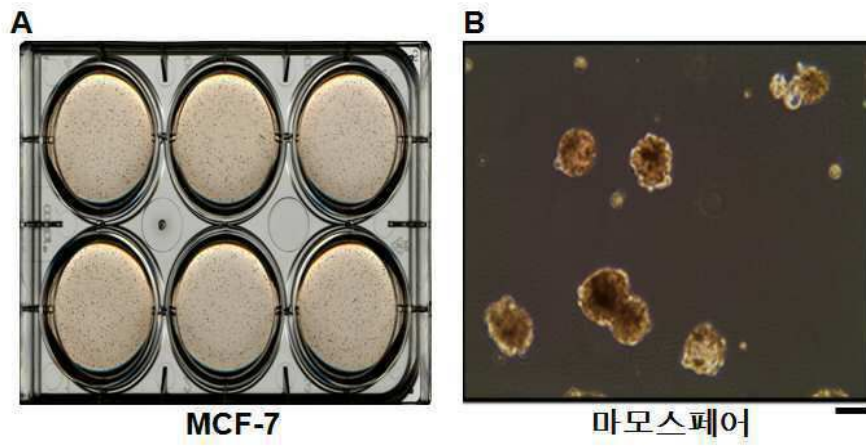
[0061] 도 6에 나타낸 바와 같이, 마모스페어의 MFE는 메트포르민 용량 의존적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 발명의 고속 계수 방법은 빠르고 정확하게 마모스페어가 억제되는 것을 확인할 수 있으므로 고속, 고효율로 항암제 후보군의 항암 효과를 확인할 수 있게 되어 빠른 항암제 스크리닝 방법에 적용될 수 있다.

도면

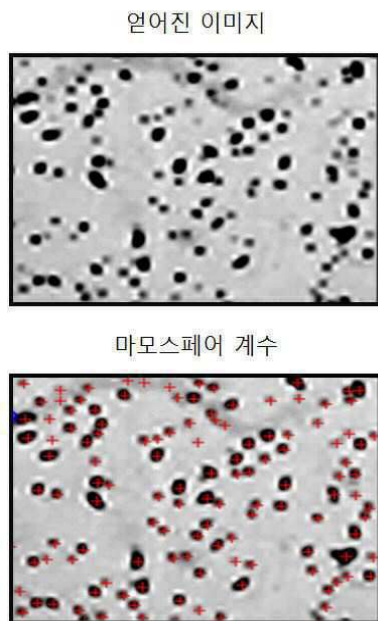
도면1



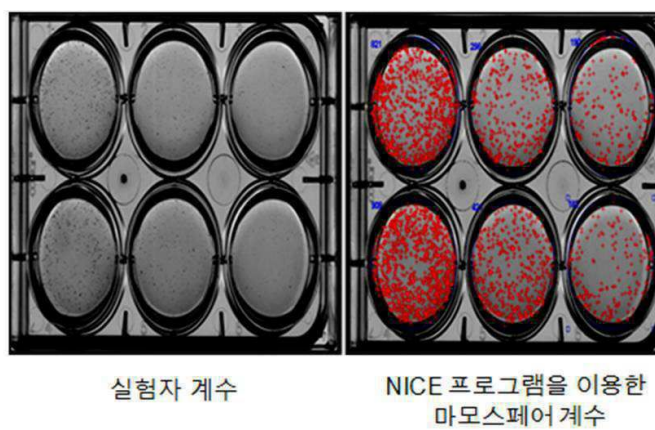
도면2



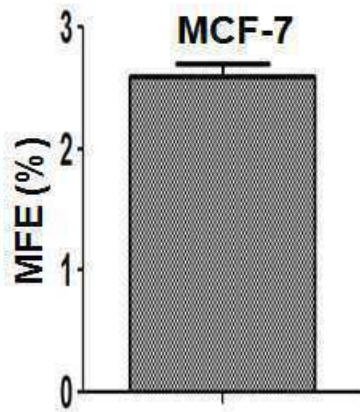
도면3



도면4



도면5



도면6

