



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0087971
(43) 공개일자 2015년07월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61N 5/067 (2006.01) A61B 18/20 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0008232
(22) 출원일자 2014년01월23일
심사청구일자 2014년01월23일

(71) 출원인
한국과학기술원
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
(72) 발명자
최철희
대전 유성구 대학로 291, 정문술빌딩 1101호 (구성동, 한국과학기술원)
윤중희
대전 유성구 대학로 291, 정문술빌딩 701호 (구성동, 한국과학기술원)
(74) 대리인
이원희

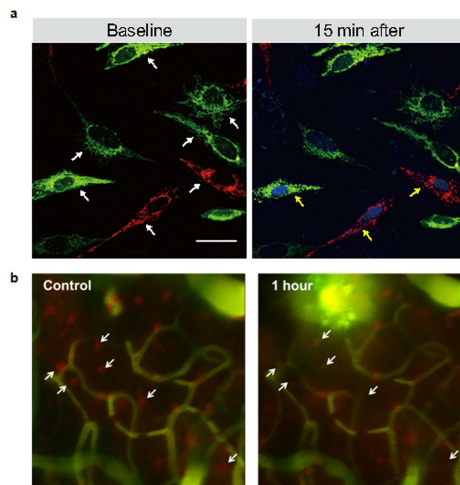
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 극초단파 펄스 레이저를 이용한 선별적 세포 죽음의 유도 방법

(57) 요약

본 발명은 극초단파 펄스 레이저를 이용한 선별적 세포 죽음의 유도 방법에 관한 것으로, 구체적으로 극초단파 펄스 레이저 자극에 의해 초점 부위의 세포에서만 국소적으로 활성산소종이 발생되고, 생성된 활성산소종은 세포 내부의 고유 기능에 의해 증폭되어 미토콘드리아 분열, 세포막 수축, 세포막 수포형성에 의해 세포 죽음을 유도하므로, 상기 극초단파 펄스 레이저를 선별적 세포죽음의 유도 방법으로 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A2A4A01007108

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자 지원사업

연구과제명 생체모방 종양모델을 이용한 종양 신생혈관 표적 유전자 분석 시스템 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한국과학기술원

연구기간 2013.05.01 ~ 2014.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

표적 세포에 극초단파 펄스 레이저를 조사하는 단계를 포함하는 선별적 세포 죽음의 유도 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 극초단파 펄스 레이저는 펄스의 지속시간이 100 내지 140 펨토초(femtosecond)인 것을 특징으로 하는 선별적 세포 죽음의 유도 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 극초단파 펄스 레이저는 파장(wavelength)이 680 내지 1080 nm인 것을 특징으로 하는 선별적 세포 죽음의 유도 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 극초단파 펄스 레이저는 반복률(repetition rate)이 80 내지 180 MHz인 것을 특징으로 하는 선별적 세포 죽음의 유도 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 극초단파 펄스 레이저의 조사 지속 시간은 1 내지 170 μ s인 것을 특징으로 하는 선별적 세포 죽음 유도 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 극초단파 펄스 레이저 자극 세기는 300 내지 3000 mW인 것을 특징으로 하는 선별적 세포 죽음 유도 방법.

청구항 7

극초단파 펄스 레이저를 발생시키는 극초단파 펄스 레이저 발생부;

상기 발생부로부터 발생된 극초단파 펄스 레이저를 제어하도록 상기 극초단파 펄스 레이저 발생부에 장착된 극초단파 펄스 레이저 특성 제어부;

상기 극초단파 펄스 레이저 발생부로부터 발생된 상기 극초단파 펄스 레이저가 전달되도록, 상기 제어부로부터 연장된 광 에너지 전달부; 및

상기 극초단파 펄스 레이저가 세포의 국소에 조사되도록 상기 광 에너지 전달부의 단부에 설치된 조사부를 포함하는 선별적 세포 죽음의 유도 장치.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 극초단파 펄스 레이저 발생부는 펌프(pump laser) 및 발진기(oscillator)를 포함하는 것을 특징으로 하는 선별적 세포 죽음의 유도 장치.

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 발생부로부터 발생된 극초단파 펄스 레이저를 측정하도록 상기 광 에너지 전달부에 장착된 광 진단부(beam diagnostics)를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 선별적 세포 죽음 유도 장치.

청구항 10

제 7항에 있어서, 상기 극초단파 펄스 레이저 특성 제어부는 레이저 세기, 조사 시간, 조사 모드, 조사 위치 또는 조사 순서로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 제어하는 것을 특징으로 하는 선별적 세포 죽음의 유도 장치.

청구항 11

제 7항에 있어서, 상기 세포로부터 반사된 극초단파 펄스 레이저를 검출하도록 상기 광 에너지 전달부에 장착된 검출부(detector)를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 선별적 세포 죽음의 유도 장치.

청구항 12

제 7항에 있어서, 상기 광 에너지 전달부는 발생부로부터 발생된 극초단파 펄스 레이저의 일부를 투과시켜 외부로 출력하고 나머지 일부를 광 진단부를 향해 반사하는 광 분리기(beam splitter), 상기 광 분리기에서 방출된 광을 제어부를 향해 반사하는 반사 거울, 또는 세포로부터 반사된 광을 검출부를 향해 반사하는 반사 거울을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 선별적 세포 죽음의 유도 장치.

청구항 13

제 7항에 있어서, 상기 선별적 세포 죽음을 확인 및 표시하는 표시부를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 선별적 세포 죽음의 유도 장치.

청구항 14

- 1) 표적 세포에 극초단파 펄스 레이저를 조사하여 표적세포 내 국소적으로 활성산소종을 형성시키는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 표적 세포에 피검물질을 처리하는 단계; 및
- 3) 상기 단계 2)의 피검물질이 처리된 표적 세포의 활성산소종을 측정하는 단계를 포함하는 항산화 물질의 스크리닝 방법.

청구항 15

종양세포 또는 정상교세포에 극초단파 펄스 레이저를 조사하는 단계를 포함하는 선별적 종양세포 또는 정상교세포 제거 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 극초단파 펄스 레이저(ultrashort-pulsed laser)를 이용하여 인접한 세포에는 영향을 주지 않고 선별적으로 레이저 자극을 받은 세포만 죽음을 일으키는 방법, 및 극초단파 펄스 레이저를 이용한 선별적 세포 죽음을 유도하는 장치에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 레이저(laser)는 광자를 결맞은 빛으로 방출하는 광원이다. 전형적인 레이저 광은 단색, 즉, 오직 하나의 파장이나 색으로 이루어진다. 대부분의 광원은 결이 맞지 않은 수많은 빛을 넓은 파장 범위에서 넓은 면적으로 방출하지만, 일반적으로 레이저 빔은 얇고 퍼지지 않는다. 빛 본래의 성질에 더하여 레이저의 강력한 에너지를 이용하여 공업, 의료, 핵융합, 계측, 정보 기억 및 광통신에 이르기까지 다양한 용도로 확대되어 왔다.

[0003] 레이저는 크게 연속파(continuous wave)와 펄스(pulse) 형태로 구분이 된다. 연속파 레이저는 시간에 따른 빛의 강도가 일정한 반면, 펄스 레이저는 전체 에너지는 연속파 레이저와 비슷하지만 하나의 펄스 지속시간이 짧기 때문에 높은 빛의 강도를 지닌다. 본 연구에서 사용한 레이저는 펄스 지속시간이 120 펨토초(10^{-15} 초)로 매우 짧은 펄스 지속시간을 지니기 때문에 순간적으로 매우 큰 빛 강도를 낼 수 있다. 이렇게 높은 빛 강도를 가질 때 비선형효과가 일어나게 되는데, 이 효과를 통해서 물질의 화학변화를 일으킬 수 있다. 본 연구에서 목표로 한 것은 세포 내 활성산소를 발생하고 이에 따른 선별적인 세포죽음 유도이다.

[0004] 활성산소는 생체 내에서 다양한 신호전달 체계에 관여하는 물질로 물질대사, 노화, 질병 등에 관여한다. 활성산소 농도에 따라서 세포의 활성이 조절되는데, 특히 세포 내 활성산소 농도가 특정 기준 이상으로 증가하면 세포의 죽음이 일어난다. 세포죽음은 세포괴사(necrosis)와 세포사멸(apoptosis)로 구분된다. 세포괴사는 세포가 피해에 의해 세포 내 물질이 외부로 유출되며 죽는 방식으로 염증반응을 유발하는데, 세포사멸은 예정된 죽음으로써 세포 내 물질이 외부로 유출되는 것 없이 죽음이 일어나 염증반응을 일으키지 않는다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 광학 기술을 이용하여 세포사멸을 유도할 수 있는 방법을 찾고자 노력한 결과, 극초단파를 가진 펄스 레이저로 자극된 세포에서만 활성산소종이 생성되고, 세포막이 유지된 채로 빠르게 선별적으로 세포 죽음을 유도하는 것을 확인함으로써, 상기 극초단파 펄스 레이저를 이용한 선별적 세포죽음 유도 방법을 생체 내, 생체 외 환경에서 선택적 세포 제거 및 활성산소종을 미세유체 기술과 결합하여 약물 효과를 검증하는 장치에 유용하게 이용할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 표적 세포에 극초단파 펄스 레이저(ultrashort-pulsed laser)를 조사하는 단계를 포함하는 선별적 세포 죽음의 유도 방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은

[0008] 극초단파 펄스 레이저를 발생시키는 극초단파 펄스 레이저 발생부;

[0009] 상기 발생부로부터 발생된 극초단파 펄스 레이저를 제어하도록 상기 극초단파 펄스 레이저 발생부에 장착된 극초단파 펄스 레이저 특성 제어부;

[0010] 상기 극초단파 펄스 레이저 발생부로부터 발생된 상기 극초단파 펄스 레이저가 전달되도록, 상기 제어부로부터 연장된 광 에너지 전달부; 및

[0011] 상기 극초단파 펄스 레이저가 세포의 국소에 조사되도록 상기 광 에너지 전달부의 단부에 설치된 조사부를 포함하는 선별적 세포 죽음의 유도 장치를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 표적 세포에 극초단파 펄스 레이저(ultrashort-pulsed laser)를 조사하는 단계를 포함하는 선별적 세포 죽음의 유도 방법을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은
- [0014] 극초단파 펄스 레이저를 발생시키는 극초단파 펄스 레이저 발생부;
- [0015] 상기 발생부로부터 발생된 극초단파 펄스 레이저를 제어하도록 상기 극초단파 펄스 레이저 발생부에 장착된 극초단파 펄스 레이저 특성 제어부;
- [0016] 상기 극초단파 펄스 레이저 발생부로부터 발생된 상기 극초단파 펄스 레이저가 전달되도록, 상기 제어부로부터 연장된 광 에너지 전달부; 및
- [0017] 상기 극초단파 펄스 레이저가 세포의 국소에 조사되도록 상기 광 에너지 전달부의 단부에 설치된 조사부를 포함하는 선별적 세포 죽음의 유도 장치를 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은
- [0019] 1) 표적 세포에 극초단파 펄스 레이저를 조사하여 표적세포 내 국소적으로 활성산소종을 형성시키는 단계;
- [0020] 2) 상기 단계 1)의 표적 세포에 피검물질을 처리하는 단계; 및
- [0021] 3) 상기 단계 2)의 피검물질이 처리된 표적 세포의 활성산소종을 측정하는 단계를 포함하는 항산화 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0022] 아울러, 본 발명은 종양세포 또는 정상교세포에 극초단파 펄스 레이저를 조사하는 단계를 포함하는 선별적 종양 세포 또는 정상교세포 제거 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명의 극초단파 펄스 레이저(ultrashort-pulsed laser)는 세포의 자극 부위에만 국소적으로 활성산소종을 생성하고, 생성된 활성산소종은 세포 내부의 고유 기능에 의해 증폭되어 미토콘드리아 분열, 세포막 수축, 세포막 수포형성에 의해 세포죽음을 유도하므로, 선별적 세포죽음 유도 방법으로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1a는 세포에서 극초단파 펄스 레이저(ultrashort-pulsed laser) 자극에 의한 미토콘드리아 절단을 나타낸 도이다.
- 도 1b는 세포에서 극초단파 펄스 레이저 자극에 의한 세포죽음을 나타낸 도이다.
- 도 1c는 세포에서 극초단파 펄스 레이저 자극에 의한 세포막 수축을 나타낸 도이다.
- 도 1d는 세포에서 극초단파 펄스 레이저 자극에 의한 세포막 수포형성을 나타낸 도이다.
- 도 2a는 세포에서 극초단파 펄스 레이저 자극에 의해 생성된 활성산소종을 나타낸 도이다.
- 도 2b는 항활성산소 약을 처리한 세포에서 극초단파 펄스 레이저 자극에 의한 세포죽음을 나타낸 도이다.
- 도 2c는 세포에서 극초단파 펄스 레이저 자극에 의한 미토콘드리아 분열 및 융합에 따른 세포죽음 변화를 나타낸 도이다.
- 도 3a는 생체 외에서(*in vitro*) 극초단파 펄스 레이저 자극에 의한 선별적인 세포죽음을 나타낸 도이다.
- 도 3b는 생체 내에서(*in vivo*) 극초단파 펄스 레이저 자극에 의한 선별적인 세포죽음을 나타낸 도이다.
- 도 4는

- 10은 극초단파 펄스 레이저 발생부;
- 20은 극초단파 펄스 레이저 특성 제어부;
- 30은 광 에너지 전달부;
- 40은 세포 대상부에 극초단파 펄스 레이저를 조사하는 조사부; 및
- 50은 특정 세포에만 자극을 주는 모식도를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0026] 본 발명은 표적 세포에 극초단파 펄스 레이저(ultrashort-pulsed laser)를 조사하는 단계를 포함하는 선별적 세포 죽음의 유도 방법을 제공한다.
- [0027] 상기 방법에 있어서, 극초단파 펄스 레이저는 펄스의 지속시간이 100 내지 140 펨토초(femtosecond, 10^{-15} 초)인 것이 바람직하고, 110 내지 130 펨토초인 것이 보다 바람직하고, 120 펨토초인 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0028] 상기 방법에 있어서, 극초단파 펄스 레이저는 파장(wavelength)이 680 내지 1080 nm인 것이 바람직하고, 800 nm인 것이 보다 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 극초단파 펄스 레이저의 파장 800 nm는 심부 조직까지 접근이 가능하다는 장점이 있다.
- [0029] 상기 방법에 있어서, 극초단파 펄스 레이저는 반복률(repetition rate)이 80 내지 180 MHz인 것이 바람직하고, 80 내지 100 MHz인 것이 보다 바람직하고, 80 MHz인 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0030] 상기 방법에 있어서, 극초단파 펄스 레이저의 조사 지속 시간은 1 내지 170 μ s인 것이 바람직하고, 1.68 내지 168.93 μ s인 것이 보다 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0031] 상기 방법에 있어서, 극초단파 펄스 레이저 자극 세기는 300 내지 3000 mW인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0032] 상기 방법에 있어서, 극초단파 펄스 레이저는 국소적인 부위에서 활성산소종을 일으켜 본래의 세포가 가지고 있는 기능을 이용하여 세포 죽음을 유도하는 것이 특징이다. 또한, 외부의 도움 물질 없이 극초단파 펄스 레이저 자극에 의해 원하는 부위에서 선별적으로 세포 죽음을 유도하는 것을 특징이다.
- [0033] 본 발명자들은 구체적인 실시예에서, 극초단파 펄스 레이저 자극에 의한 세포 죽음을 확인하기 위하여, 세포에 극초단파 펄스 레이저의 자극 세기 300-3000 mW, 펄스의 지속시간 120 펨토초, 반복률 80 MHz, 파장 680-1080 nm, 조사 지속 시간 1.68-168.93 μ s로 극초단파 펄스 레이저를 조사한 후 세포 염색을 수행한 결과, 1 μ m² 이하의 초점부위에서 미토콘드리아가 조각나고, 세포막이 급격히 수축하고 수포가 형성되면서 세포죽음이 일어나는 것을 확인함으로써, 상기 극초단파 펄스 레이저 자극에 의해 세포가 세포 사멸에 가까운 세포 죽음이 유도됨을 확인하였다(도 1a 내지 도 1d 참조).
- [0034] 또한, 본 발명자들은 극초단파 펄스 레이저 자극에 의해 유도되는 세포 죽음의 원인을 확인하기 위하여, 세포에 항활성산소 시약을 처리하고 극초단파 펄스 레이저를 조사한 후 세포 염색을 수행한 결과, 극초단파 펄스 레이저를 조사한 초점 부위에서만 활성산소종이 생성되어 세포 죽음이 유도되고, 항활성산소 시약을 처리한 세포에서 활성산소종의 발생 및 세포 죽음이 감소하는 것을 확인함으로써, 극초단파 펄스 레이저 자극에 의해 세포 내부에서 국소적으로 활성산소종이 발생하고 이로써 세포 죽음이 유도됨을 확인하였다(도 2a 내지 도 2c 참조).
- [0035] 또한, 본 발명자들은 극초단파 펄스 레이저 자극이 선별적 세포 죽음을 유도할 수 있는지 확인하기 위하여, 생체 외에서(*in vitro*) 및 생체 내에서(*in vivo*) 세포에 극초단파 펄스 레이저를 조사한 후 세포 염색을 수행한 결과, 생체 외 및 생체 내에서 극초단파 펄스 레이저를 조사한 부위에서 국소적으로 활성산소종이 발생하여 선별적 세포 죽음이 유도됨을 확인하였다(도 3a 및 도 3b 참조).
- [0036] 따라서, 본 발명의 극초단파 펄스 레이저는 초점부위의 세포 내부에서 국소적으로 활성산소종을 일으키고, 생성

된 활성산소종에 의해 선별적 세포 죽음을 유도하므로 극초단파 펄스 레이저를 이용한 선별적 세포 죽음의 유도 방법으로 유용하게 이용될 수 있다.

- [0037] 또한, 본 발명은 극초단파 펄스 레이저를 이용한 선별적 세포 죽음의 유도 장치를 제공한다.
- [0038] 구체적으로, 상기 장치는
- [0039] 극초단파 펄스 레이저를 발생시키는 극초단파 펄스 레이저 발생부;
- [0040] 상기 발생부로부터 발생된 극초단파 펄스 레이저를 제어하도록 상기 극초단파 펄스 레이저 발생부에 장착된 극초단파 펄스 레이저 특성 제어부;
- [0041] 상기 극초단파 펄스 레이저 발생부로부터 발생된 상기 극초단파 펄스 레이저가 전달되도록, 상기 제어부로부터 연장된 광 에너지 전달부; 및
- [0042] 상기 극초단파 펄스 레이저가 세포의 국소에 조사되도록 상기 광 에너지 전달부의 단부에 설치된 조사부로 구성되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0043] 상기 장치에 있어서, 극초단파 펄스 레이저 발생부는 펌프(pump laser) 및 발진기(oscillator)를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0044] 상기 장치에 있어서, 발생부로부터 발생된 극초단파 펄스 레이저를 측정하도록 상기 광 에너지 전달부에 장착된 광 진단부(beam diagnostics)를 추가적으로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0045] 상기 장치에 있어서, 극초단파 펄스 레이저 특성 제어부는 레이저 세기, 조사 시간, 조사 모드, 조사 위치 또는 조사 순서로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 제어하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0046] 상기 장치에 있어서, 세포로부터 반사된 극초단파 펄스 레이저를 검출하도록 상기 광 에너지 전달부에 장착된 검출부(detector)를 추가적으로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0047] 상기 장치에 있어서, 광 에너지 전달부는 발생부로부터 발생된 극초단파 펄스 레이저의 일부를 투과시켜 외부로 출력하고 나머지 일부를 광 진단부를 향해 반사하는 광 분리기(beam splitter), 상기 광 분리기에서 방출된 광을 제어부를 향해 반사하는 반사 거울, 또는 세포로부터 반사된 광을 검출부를 향해 반사하는 반사 거울을 추가적으로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0048] 상기 장치에 있어서, 선별적 세포 죽음을 확인 및 표시하는 표시부를 추가적으로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0049] 상기 장치에 있어서, 극초단파 펄스 레이저는 펄스의 지속시간이 100 내지 140 펨토초(femtosecond, 10^{-15} 초)인 것이 바람직하고, 110 내지 130 펨토초인 것이 보다 바람직하고, 120 펨토초인 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0050] 상기 장치에 있어서, 극초단파 펄스 레이저는 파장(wavelength)이 680 내지 1080 nm인 것이 바람직하고, 800 nm인 것이 보다 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0051] 상기 장치에 있어서, 극초단파 펄스 레이저는 반복률(repetition rate)이 80 내지 180 MHz인 것이 바람직하고, 80 내지 100 MHz인 것이 보다 바람직하고, 80 MHz인 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0052] 상기 장치에 있어서, 극초단파 펄스 레이저의 조사 지속 시간은 1 내지 170 μ s인 것이 바람직하고, 1.68 내지 168.93 μ s인 것이 보다 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0053] 상기 장치에 있어서, 극초단파 펄스 레이저 자극 세기는 300 내지 3000 mW인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0054] 본 발명의 극초단파 펄스 레이저는 초점부위의 세포 내부에서 국소적으로 활성산소종을 일으키고, 생성된 활성산소종에 의해 선별적 세포 죽음을 유도하므로 극초단파 펄스 레이저를 이용한 선별적 세포 죽음의 유도 장치에 유용하게 이용될 수 있다.

- [0055] 또한, 본 발명은
- [0056] 1) 표적 세포에 극초단파 펄스 레이저를 조사하여 표적세포 내 국소적으로 활성산소종을 형성시키는 단계;
- [0057] 2) 상기 단계 1)의 표적 세포에 피검물질을 처리하는 단계; 및
- [0058] 3) 상기 단계 2)의 피검물질이 처리된 표적 세포의 활성산소종을 측정하는 단계를 포함하는 항산화 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0059] 상기 방법에 있어서, 극초단파 펄스 레이저는 펄스의 지속시간이 100 내지 140 펨토초(femtosecond, 10^{-15} 초)인 것이 바람직하고, 110 내지 130 펨토초인 것이 보다 바람직하고, 120 펨토초인 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0060] 상기 방법에 있어서, 극초단파 펄스 레이저는 파장(wavelength)이 680 내지 1080 nm인 것이 바람직하고, 800 nm인 것이 보다 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0061] 상기 방법에 있어서, 극초단파 펄스 레이저는 반복률(repetition rate)이 80 내지 180 MHz인 것이 바람직하고, 80 내지 100 MHz인 것이 보다 바람직하고, 80 MHz인 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0062] 상기 방법에 있어서, 극초단파 펄스 레이저의 조사 지속 시간은 1 내지 170 μ s인 것이 바람직하고, 1.68 내지 168.93 μ s인 것이 보다 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0063] 상기 방법에 있어서, 극초단파 펄스 레이저 자극 세기는 300 내지 3000 mW인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0064] 본 발명의 극초단파 펄스 레이저는 초점부위의 세포 내부에서 국소적으로 활성산소종을 일으키고, 생성된 활성산소종에 의해 선별적 세포 죽음을 유도하므로 극초단파 펄스 레이저를 이용한 항산화 물질의 스크리닝 방법으로 유용하게 이용될 수 있다.
- [0065] 아울러, 본 발명은 종양세포(tumor cell) 또는 정상교세포(astrocyte)에 극초단파 펄스 레이저를 조사하는 단계를 포함하는 선별적 종양세포 또는 정상교세포 제거 방법을 제공한다.
- [0066] 상기 방법에 있어서, 종양세포 또는 정상교세포는 인체로부터 유래한 것일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0067] 상기 방법에 있어서, 극초단파 펄스 레이저는 펄스의 지속시간이 100 내지 140 펨토초(femtosecond, 10^{-15} 초)인 것이 바람직하고, 110 내지 130 펨토초인 것이 보다 바람직하고, 120 펨토초인 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0068] 상기 방법에 있어서, 극초단파 펄스 레이저는 파장(wavelength)이 680 내지 1080 nm인 것이 바람직하고, 800 nm인 것이 보다 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0069] 상기 방법에 있어서, 극초단파 펄스 레이저는 반복률(repetition rate)이 80 내지 180 MHz인 것이 바람직하고, 80 내지 100 MHz인 것이 보다 바람직하고, 80 MHz인 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0070] 상기 방법에 있어서, 극초단파 펄스 레이저의 조사 지속 시간은 1 내지 170 μ s인 것이 바람직하고, 1.68 내지 168.93 μ s인 것이 보다 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0071] 상기 방법에 있어서, 극초단파 펄스 레이저 자극 세기는 300 내지 3000 mW인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0072] 본 발명의 극초단파 펄스 레이저는 초점부위의 세포 내부에서 국소적으로 활성산소종을 일으키고, 생성된 활성산소종에 의해 선별적 세포 죽음을 유도하므로 극초단파 펄스 레이저를 이용한 선별적 종양세포 또는 정상교세포 제거 방법으로 유용하게 이용될 수 있다.
- [0073] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.
- [0074] 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0075] <실시예 1> 극초단파 펄스 레이저 자극에 의한 세포 죽음 유도 확인

[0076] 극초단파 펄스 레이저 자극에 의한 세포 죽음을 확인하기 위하여, 하기의 실험을 수행하였다.

[0077] 구체적으로, 극초단파 펄스 레이저(chameleon Ultra II laser Coherent Inc.)는 발생부로부터 120 펨토초(10^{-15} 초)의 펄스 지속시간을 지니는 레이저가 80 MHz 진동수로 발생하는 것을 이용하여 레이저 특성 제어부를 통해 광 에너지 전달부로 전달된 레이저를 개구수(Numerical Aperture)가 높은 대물렌즈(40x, NA 0.8 혹은 20x, NA 1.0)를 이용하여 512×512 크기의 화면 중 1×1 픽셀만 선택하여 자궁경부암 세포(HeLe cell, 한국세포주은행)에 1.68-168.93 마이크로 초(μs)로 조사하였다. 레이저 자극 세기는 300-3000 mW로 변화를 주었다. Abbe diffraction에 의해 1×1 픽셀 크기는 분해능 한계인 $1 \mu m^2$ 이하이다. 또한, LSM 510 공초점 현미경을 이용하여 680-1080 nm 파장의 레이저 자극을 통해 미토콘드리아 형광염색 지시약(Mitotracker Red, Invitrogen, USA) 200 nM 농도로 37°C 및 CO₂ 5%(세포배양기 환경)에서 10분간 염색하고, 세포막 형광염색 지시약(CellMask, Invitrogen, USA) 100 nM 농도로 37°C 및 CO₂ 5%(세포배양기 환경)에서 10분간 염색하고, 세포죽음확인 형광염색 지시약(Propidium iodide, Sigma, USA) 1 $\mu g/ml$ 농도로 37°C 및 CO₂ 5%(세포배양기 환경)에서 10분간 염색하여 염색된 세포의 형광 영상을 시각화하였다.

[0078] 그 결과, 도 1a 내지 도 1d에 나타낸 바와 같이, $1 \mu m^2$ 이하의 초점부위에 극초단파 펄스 레이저 자극 세기를 300-3000 mW로, 1.68-168.93 μs 의 시간으로 자극을 주었을 때 미토콘드리아가 조각나는 것을 확인하였다(도 1a). 또한, 세포막에서 급격한 수축 및 수포형성을 되어 세포 죽음이 일어나는 것을 확인하였다(도 1b 내지 도 1d). 또한, 수 분내로 일어나는 세포 죽음이지만 세포막의 투과도가 온전히 유지되며 주위 세포에는 영향을 주지 않는 것을 확인함으로써, 상기 극초단파 펄스레이저 자극은 세포괴사보다는 세포 사멸에 가까운 특징이지만 매우 이른 시간에 일어나는 세포 죽음을 유도함을 확인하였다(도 1a 내지 도 1d).

[0079] <실시예 2> 극초단파 펄스 레이저 자극에 의해 생성된 활성산소종 확인

[0080] 극초단파 펄스레이저 자극에 의해 유도되는 세포 죽음의 원인을 확인하기 위하여, 하기의 실험을 수행하였다.

[0081] 구체적으로, 자궁경부암 세포에 항활성산소 약(N-acetyl-cysteine, 10 mM) 을 처리하고 극초단파 펄스 레이저 자극 세기를 300-3000 mW로, 1.68-168.93 μs 의 시간으로 조사하였다. 그 다음, 10 μM 농도의 활성산소종 형광염색 지시약(Dihydroethidium, Invitrogen, USA)으로 염색하여 염색된 세포의 활성산소종을 형광 영상을 통해 시각화하였다(도 2a).

[0082] 또한, 상기 항활성산소 약을 처리하고 극초단파 펄스 레이저를 조사한 세포를 세포죽음확인 형광염색 지시약(Propidium iodide, Sigma, USA) 1 $\mu g/ml$ 농도로 37°C 및 CO₂ 5%(세포배양기 환경)에서 10분간 염색하여 염색된 세포의 형광영상을 얻고, 이 영상 결과를 ImageJ 프로그램을 이용하여 세포죽음을 그래프화하였다(도 2b).

[0083] 또한, 상기 항활성산소 약을 처리하고 극초단파 펄스 레이저를 조사한 세포를 미토콘드리아 형광염색 지시약(Mitotracker Red, Invitrogen, USA) 200 nM 농도로 37°C 및 CO₂ 5%(세포배양기 환경)에서 10분간 염색하여 염색된 세포의 형광영상을 얻고, 이 영상 결과를 ImageJ 프로그램을 이용하여 미토콘드리아 분열 또는 융합에 따른 세포죽음을 그래프화하였다. 미토콘드리아의 분열 및 융합은 siRNA 처리를 통하여 유도하였고 각 서열은 하기 [표 1]과 같다. siRNA를 처리하고 24 시간 후 극초단파 펨토초 레이저 자극을 통해 각 에너지별로 세포죽음의 확률을 계산하였다(도 2c).

표 1

siRNA	서열(5'→3')
인간 Mfn1	5'-GUGUAGAUUCUGGAAUGA-3'(서열번호 1)
인간 Drp1	5'-GAGGUUAUUGAACGACUCA-3'(서열번호 2)
음성 대조군	5'-CCUACGCCAAUUUCGU-3'(서열번호 3)

[0085] 그 결과, 도 2a 및 도 2b에 나타낸 바와 같이, 극초단파 펄스 레이저 자극을 준 초점부위로부터 활성산소종이

생겨 세포 전체로 퍼져나가고, 오직 자극을 받은 세포에서만 세포죽음 시약이 염색되는 것을 확인하였다(도 2a). 또한, 극초단파 펄스 레이저에 의한 세포죽음이 항활성산소 약 처리를 통하여 줄어드는 것을 확인함으로써, 상기 극초단파 펄스 레이저에 의한 죽음의 원인이 활성산소종임을 확인하였다(도 2b).

[0086] 또한, 도 2c에 나타난 바와 같이, 미토콘드리아 동역학(분열/융합)에 적용해 보았을 때 미토콘드리아 상태에 따라 레이저에 의해 생성된 활성산소에 반응성이 다른 것을 확인하였다(도 2c). 따라서, 상기 결과들을 통해 극초단파 펄스 레이저를 이용하면 세포 내부에 국소적인 부위에 활성산소종을 만들어 줄 수 있어, 이는 극초단파 레이저 자극이 생물학적으로 유의미한 활성산소를 생성함을 확인하였다(도 2).

[0087] **<실시예 3> 극초단파 펄스 레이저 자극에 의한 선별적 세포 죽음 유도 확인**

[0088] 극초단파 펄스 레이저 자극에 의해 선별적 세포 죽음을 유도할 수 있는지 확인하기 위하여, 하기의 실험을 수행하였다.

[0089] 구체적으로, 생체 외에서(*in vitro*) 극초단파 펄스 레이저 자극에 의한 선별적 세포 죽음을 확인하기 위하여, 상기 <실시예 1>과 같이 자궁경부암 세포에 극초단파 펄스 레이저를 조사한 후, 세포죽음 확인 형광염색 지시약으로 염색하고 염색된 세포의 형광영상을 얻어 시각화하였다(도 3a).

[0090] 또한, 생체 내에서(*in vivo*) 극초단파 펄스 레이저 자극에 의한 선별적 세포 죽음을 확인하기 위하여, 임신 18주 된 랫트(오리엔트바이오, 대한민국)로부터 준비된 해마체 뇌세포에 극초단파 펄스 레이저를 조사한 후, 세포죽음 확인 세포죽음확인 형광염색 지시약(Propidium iodide, Sigma, USA) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 37°C 및 CO₂ 5%(세포 배양기 환경)에서 10분간 염색하여 염색된 세포의 형광 영상을 시각화하였다.(도 3b).

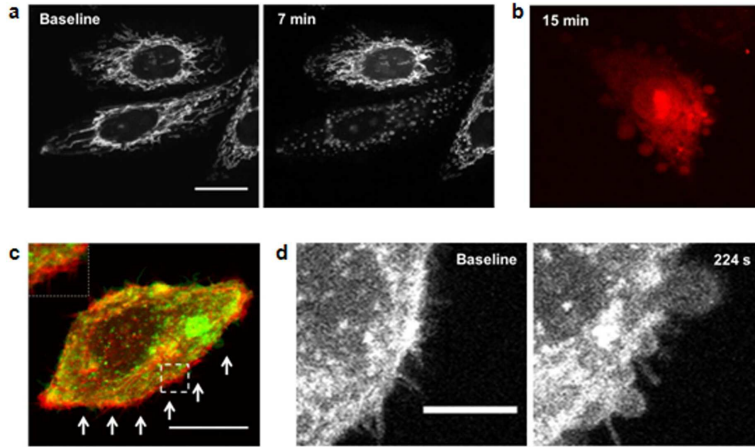
[0091] 그 결과, 도 3a 및 도 3b에 나타난 바와 같이, 극초단파 펄스 레이저를 조사한 세포 내부에서 활성산소종을 일으킬 수 있고, 활성산소종이 생성된 세포만 죽음을 일으키는 것을 확인함으로써, 극초단파 펄스 레이저를 이용하여 생체 외 및 생체 내에서 국소적으로 세포의 활성산소종을 유발하고 이를 통해 염증반응 없이 선별적 세포 죽음을 유도할 수 있음을 확인하였다(도 3a 및 도 3b).

산업상 이용가능성

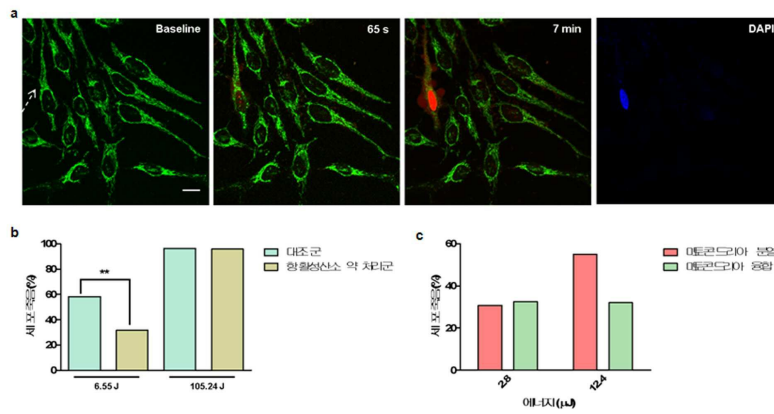
[0092] 본 발명은 극초단파 펄스 레이저 자극에 의해 세포 내 국소적인 부위에만 활성산소종을 형성하므로, 상기 극초단파 펄스 레이저 조사 및 미세유체 기술을 결합하여 약물 농도에 따른 활성산소종 억제 효과 및 레이저 자극 파워에 따른 활성산소종 생성량을 비교를 통한 약물의 효과를 검증하는 빠른 약물 효과 검증(Hightthroughput Drug Screening) 기술에 활용될 수 있다. 또한, 본 발명의 극초단파 펄스 레이저 자극은 염증 반응 없이 세포 죽음을 유도할 수 있으므로, 전이된 종양이나 수술로 제거하기 힘든 경계부분의 종양 세포 또는 신경세포를 제거하는 데 활용될 수 있다.

도면

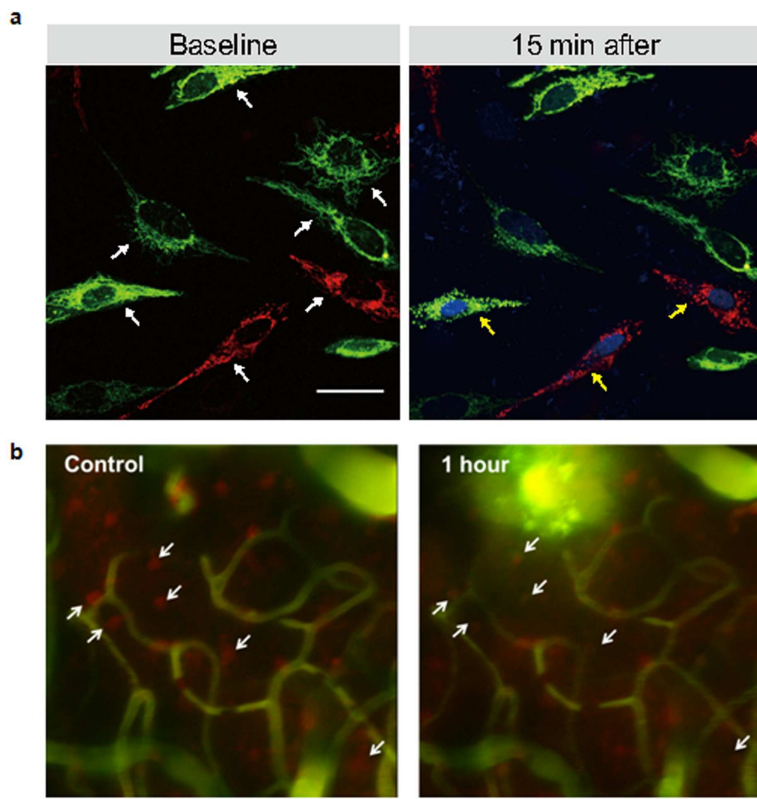
도면1



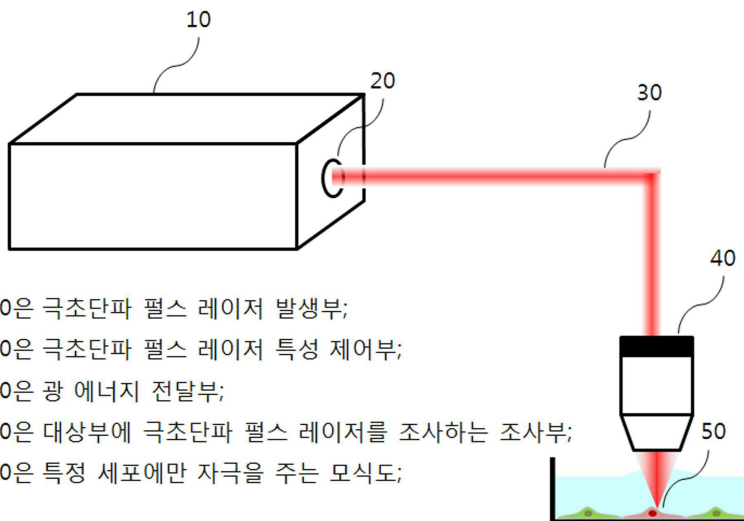
도면2



도면3



도면4



서열목록

- <110> Korea Advanced Institute of Science and Technology
- <120> A method for selective cell death using ultrashort-pulsed laser
- <130> 13p-09-41

<160> 3
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human Mfn1 siRNA
 <400> 1
 guguagauuc ugguaauga 19
 <210> 2
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human Drp1 siRNA
 <400> 2

 gagguuuuug aacgacuca 19
 <210> 3
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> control siRNA
 <400> 3
 ccuacgccaa uuucgu 16