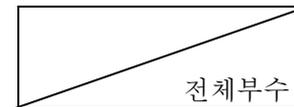


<별지 1 내표지>

2019 년 1 월

18ZS1410-01-1500P



# 전기장을 이용한 입는 암치료기 핵심 기술개발

The Development of Core Technologies for Wearable Cancer Treatment Device  
using Electric Field

<별지 2>

## 인 사 말 씀

안녕하십니까,

최근, 4차 산업혁명 시대에 이르러 이제 미래의 기술은 좀 더 개인적인 취향과 욕구에 부합하려는 경향과 함께 인간의 수명 연장과 고령화 사회, 미세 먼지와 같은 나로 오염이 심해지는 환경의 위협으로부터 자유로워지고 건강하고 평안한 삶의 질의 실현에 그 목표를 두어야 할 것입니다.

한편, 암은 매년 국내 발생환자의 수는 7%씩 증가하고 있고, 심혈관 질환과 더불어 전세계적으로 가장 높은 사망원 중의 하나이며, 그 사망률도 계속 증가하고 있습니다. 최근, 웨어러블 기술과 나노 기술의 발달로 새로운 개념의 암치료 방법에 대한 연구가 증가하고 있고, 고성능이면서, 저가, 비침습 웨어러블 암 치료 가능한 치료방법을 통해 환자가 고통없이 일상생활하는 것이 가능해 지고 있습니다.

본 연구 과제의 내용은 ICT 기술 기반의 전기장을 이용하여 비침습, 밧데리 구동, 웨어러블 암치료기의 핵심기술을 연구 개발하는 것이다. 좀 더 구체적으로, 전기장 치료기기는 암환자의 사람의 질을 개선할 수있어 FDA승인이 이루어졌으나, 현재 실용화를 위한 파괴적 혁신 (destructive innovation) 연구 기술 개발이 절실히 필요하다. 건강하고 행복한 삶을 제공하는데 큰 기여를 할 것으로 생각합니다. 그 동안 연구 수행에 참여하여 주신 연구원 여러분께 감사를 드리며 본 연구 결과가 암 치료 분야에서 유익하게 활용되어 국내뿐만 아니라 세계 무대에서 기술, 산업 및 시장 경쟁력에서도 큰 성과를 거둘 수 있기를 기원합니다.

2019 년 1 월

한국전자통신연구원 원장 이 상 훈



G-01

<별지 3>

## 제 출 문

본 연구보고서는 주요사업인 "전기장을 이용한 입는 암치료기 핵심 기술 개발에 관한 연구"의 결과로서, 본 과제에 참여한 아래의 연구팀이 작성한 것입니다.

2019 년 1 월

연구책임자 : 책임연구원 이대식 (바이오의료 IT 연구본부)  
연구참여자 : 책임연구원 표현봉 (바이오의료 IT 연구본부)  
                  책임연구원 박정원 (바이오의료 IT 연구본부)  
                  선임연구원 박형주 (바이오의료 IT 연구본부)

<별지 4>

## 요 약 문

### I. 서 론

### II. 연구목적 및 중요성

생체 조직에 콘덴서형 AC 전기장을 인가하여 암세포의 분열을 억제하고 괴사를 유도하는 전기장 치료기기의 원천 기술 확보하고, 이를 통해서 전기장 치료기 플랫폼 기술을 개발하고, 생체 유효성 평가를 통해서 개발된 치료기기의 최적화 조건을 확보한다.

### III. 연구내용 및 결과

- ✓ 전기장 제어 기술 개발
- ✓ 전기장 나노 신규작용점 발굴
- ✓ 전기장 치료기기 플랫폼 제작 기술
- ✓ 암세포 및 정상 세포 활용 항암효능 검증

### IV. 결론 및 건의 사항

---

G-01

<별지 5>

## ABSTRACT

This project is targeting development of an electric field treatment device, that dedicates to obtain basic technologies for refraining of cancer cell division and appotosis by applying AC electric field. Through these developed technoliges, we are going to obtainthe electric field treatment device technologies and its clinical effectiveness evaluation for optimization of the device. As results, we may suggest a new and bright way to non-invasive and alternative cancer treatments.

<별지 6>

## CONTENTS

### CHAPTER 1 INTRODUCTION

SECTION 1 Research on technology of the electric field treatment platform

SECTION 2 Effectiveness evaluation of the the electric field treatment platform

### CHAPTER 2 THE OBJECTIVES

SECTION 1 Development of electric field controlling technology

SECTION 2 Fabrication technology of the the electric field treatment platform prototype

SECTION 3 Search of nano-sized new functional points working in the electric field environments

### CHAPTER 3. THE CONTENTS AND SCOPE OF THE STUDY

SECTION 1 Effectiveness evaluation of the the electric field treatment platform on cancer cells

SECTION 2 Effectiveness evaluation on cancer cells when applying both the the electric field and BaTiO<sub>3</sub> nano probes

G-01

SECTION 3 Effectiveness evaluation on cancer cells when applying both the the electric field and griseofulvine as an inhibitor centrosome clustering inhibitor

CHAPTER 4. RESULTS & PROPOSITION

SECTION 1 Summary and conclusion

- 1, Rearach on the electric field treatment platform
2. Effectiveness test of the electric field treatment platform

SECTION 2 Propositons

## Table Index

<Table 1> DLS measurement results of 100 nm, 200 nm BaTiO<sub>3</sub> nanocube

## Figure Index

<Figure 2.1> Design model of dish-type ferroelectric electrodes

<Figure 2.2> Pictures of the dish-type ferroelectric electrodes using polycrystalline PMN-PT materials (left) and single crystalline (right)

<Figure 2.3> Schematic diagram of platform of the electric treatment device module

<Figure 2.4> Electronic field control part in the software of the developed electric field treatment device

<Figure 2.5> Analysis part in the software of the developed electric field treatment device

<Figure 2.6> Schematic diagram of the high frequency electric field generation module

<Figure 2.7> Expecting type of the designed high frequency electric field generation module

<Figure 2.8> Picture of the fabricated high frequency electric field generation module

<Figure 2.9> Picture of the fabricated base plate

<Figure 2.10> SEM and TEM pictures of 100nm- and 200nm-sized BaTiO<sub>3</sub> nanocubes

<Figure 2.11> EDX analysis results of 200nm-sized BaTiO<sub>3</sub> nanocubes

<Figure 2.12> In vitro cytotoxicity test of BaTiO<sub>3</sub> nanoprobe

<Figure 3.1> Pictures of the electric field treatment device set up in the cell laboratory

<Figure 3.2> Cell-treatment performance comparison between the lab-made and commercialized electric field treatment devices

<Figure 3.3> Test results showing cell apoptosis when using both electric treatment and ferroelectric nanoprobe together

<Figure 3.4> Test results showing the accumulation levels of nanoprobe

G-01

with different diameters in cells

<Figure 3.5> Bio-TEM pictures the cells after treating both electric field and nanoprobe

<Figure 3.6> Comparison of genetic change appearance using the nanostring

<Figure 3.7> Synergy effect of electric field treatment by treating of griseofulvine as an inhibitor centrosome clustering inhibitor

<별지 7>

# 목 차

## 제1장 서 론

제1절 전기장 치료 플랫폼 기술 연구

제2절 전기장 치료기기의 생체 유효성 평가

## 제2장 연구 목적 및 중요성

제1절 전기장 제어 기술 개발

제2절 전기장치료기기 플랫폼 시작품 제작 기술

제3절 전기장 나노 신규작용점 발굴

## 제3장 연구 내용 및 결과

제1절 제작된 전기장 치료기기의 세포 유효성 평가

제2절 전기장 치료와 BaTiO<sub>3</sub> 나노프루브 적용에 따른 세포 유효성 평가

제3절 전기장 치료와 중심체 응축 억제제 적용에 따른 세포 유효성 평가

## 제4장 결론 및 건의 사항

제1절 과제 요약 및 결론

1. 전기장 치료기 플랫폼 기술 연구

2. 전기장 치료기기의 유효성 테스트

제2절 건의사항

## 참고사항

표목차

<표2.1> 100nm, 200nm의 BaTiO<sub>3</sub> nanocube의 DLS 측정 결과

그림목차

<그림 2.1> 접시형 강유전 전극 설계 모형

<그림 2.2> 다결정 PMN-PT성분으로 이루어진 접시형 강유전 전극 사진(왼쪽) 단결정 PMN-PT성분으로 이루어진 접시형 강유전 전극 사진(오른쪽)

<그림 2.3> 전기장 치료기기의 플랫폼 구성도

<그림 2.4> 개발된 전기장 치료기기 소프트웨어의 전기장 조절 부분

<그림 2.5> 개발된 전기장 치료기기 소프트웨어의 분석 부분

<그림 2.6> 고주파 전기장 발생 모듈의 구성 모식도

<그림 2.7> 설계된 고주파 전기장 발생 모듈의 예상 모식도

<그림 2.8> 제작된 고주파 전기장 발생 모듈의 사진

<그림 2.9> 제작된 베이스 플레이트의 모습

<그림 2.10> 100nm, 200nm 크기의 BaTiO<sub>3</sub> nanocubes의 SEM와 TEM의 사진들

<그림 2.11> 200nm 크기의 BaTiO<sub>3</sub> nanocubes의 EDX 분석 결과

<그림 2.12> BaTiO<sub>3</sub> 나노프로브의 세포독성 in vitro 시험

<그림 3.1> 자체 제작된 전기장 치료기기를 세포 실험실에 설치한 모습

<그림 3.2> 자체 제작된 전기장 치료기기와 상용화 전기장 치료기기의 효과 비교

<그림 3.3> 전기장 치료와 나노프로브 병용 치료 시 세포사멸의 증가

<그림 3.4> 전기장 치료기기에 의한 나노프로브의 축적도 증가

<그림 3.5> 전기장 치료 및 나노프로브 처치 후 세포의 TEM 사진

<그림 3.6> 나노스트링을 통한 유전자 변화 양상 비교

<그림 3.7> 중심체 응축 억제제 처치에 의한 전기장 치료 시너지 효과

참고문헌

약어표

<부록>

# 제 1 장 서 론

## 제 1 장 서 론

매년 국내 암 발생환자의 수는 7%씩 증가하고 있고, 특히 암은 심혈관질환과 더불어 전 세계적으로 가장 높은 사망원인 중의 하나이며, 사망률이 계속 증가하고 있다. 하지만 현재 사용되는 3대 암치료 방법(수술, 화학요법, 방사선 요법)은 정상조직 손상으로 인한 환자의 고통증가, 입원 또는 통원 치료의 불편함으로 인하여 암환자의 삶의 질이 떨어지고 있고 이로 인하여 암환자의 삶의 질 향상에 대한 요구가 증가 되고 있다. 특히 최근에 웨어러블 기술과 나노 기술의 발달로 새로운 개념의 암치료 방법에 대한 연구가 증가하고 있고, 저가, 비침습, 휴대 가능한 치료방법을 통해서 환자가 고통 없이 일상 생활하는 것이 가능하다는 연구들이 새롭게 보고 되고 있다. 예를 들면, 노보큐어(Novocure)의 전기장 치료기기는 뇌종양 환자의 삶의 질을 개선할 수 있다는 연구 성과에 기반하여 비교적 빠른 시간 안에 FDA 승인이 이루어졌고, 현재에도 전 세계적으로 많은 연구 그룹에서 다양한 암종에 대한 전기장 치료 효과를 알아보기 위한 파괴적 혁신 연구 기술 개발이 이루어지고 있다. 기존 3대 암치료는 주로 고가의 시설이 잘 갖추어진 대형병원에서 이루어지고 있다. 이로 인하여 치료시 입원을 하거나 병원과 가까운 곳에서 통원치료를 해야 하는 일들이 발생한다. 전기장을 이용한 입는 암치료기는 간단한 기기를 착용하는 것으로 치료가 가능하기 때문에 소규모 작은 병원에서도 이용이 가능할 뿐만 아니라, 일상생활을 하면서도 암치료 행위가 가능하다. 그리고 정상조직 손상으로 인한 치료시 부작용으로 인한 환자 삶의 질이 떨어지는 일들을 방지할 수 있다.

전기장을 이용한 암 치료기기 개발 연구는 미국과 이스라엘을 중심으로 활발하게 진행

중에 있으며, 선두기업 노보큐어는 지난 2011년 해당 기술과 적용 사례를 공개해 화제를 불러일으키고, 최근에는 Novo-TTF라는 전기장 치료기기를 개발하고, 대규모 투자를 받아 뇌종양에 대해서는 1000명 이상의 환자를 500여 센터에서 상업적인 치료행위가 실시되고 있다. 그리고 뇌종양 뿐만 아니라 폐암, 췌장암 등 치료 회복이 어려운 고형암을 중심으로 대규모 임상실험이 진행되고 있으며, 몇 가지 암에 대해서는 FDA 승인을 눈앞에 두고 있다. 그 뿐만 아니라 전통적인 암치료법과 혼용하여 암치료 효과를 증진시키고자 하는 연구도 활발하게 연구되고 있고 국내에서도 고려대학교, 한국원자력의학원 연구팀에서 전기장 치료기기의 생물학적인 치료 메카니즘을 밝히고자 하는 기초연구가 진행되고 있다.

## 제 1 절 전기장 치료기 플랫폼 기술 연구

생체 조직에 콘덴서형 AC 전기장을 인가하여 암세포의 분열을 억제하고 괴사를 유도하는 전기장 치료기기의 원천 기술 확보하기 위해서 전기장 치료기 플랫폼 기술 연구 개발이 필요하다. 최근 전기장 치료 임상학적 효능이 발표되고 있지만, 아직 전기장 암치료에 관한 메커니즘, 학문적인 많은 의문점들이 완전히 해결되고 있지 않고 있다. 이런 의문점들을 해소하기 위해서 많은 연구 그룹에서 세포에 전기적인 자극을 주고 일어나는 변화를 관찰하기 위한 기초 실험용 전기장 치료기 플랫폼 개발에 대한 욕구가 증진되고 있다. 여기서는 전기장 암치료시 영향을 미치는 전기장 치료기기의 플랫폼 요소 기술을 알아보고 시작품 제작시 이를 반영하여 기기의 저전력, 사용자 편의성, 치료효과를 개선하고자 하였다.

## 제 2절 전기장 치료기기의 생체 유효성 평가

본 연구개발 과제에서 새롭게 제작된 기초 실험용 전기장 치료기 시스템의 성능을 알아보기 위하여 전기장 치료기기의 생체 유효성 평가 작업을 수행하였다. 전기장 치료기기의 생체 유효성 평가 작업을 통해서 전기장 치료기기를 이용한 새로운 치료 프로토콜을 이해하고 다양한 암종에 대한 최적화된 전기장 치료기기의 사용법 기술을 확보하였다.

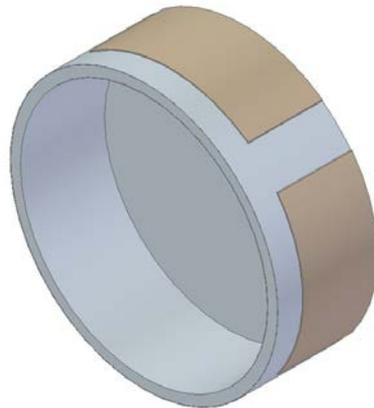
온도조절이 이루어지는 배양기 안에서 전기장을 조사한 후 세포를 배양하고 현미경과 유세포 분석장비(FACS 장비) 등을 활용하여 세포의 상태와 개수를 관찰하는 실험을 수행하였다.

## 제 2 장 전기장 치료기 플랫폼 기술 연구

## 제 2 장 전기장 치료기 플랫폼 기술 연구

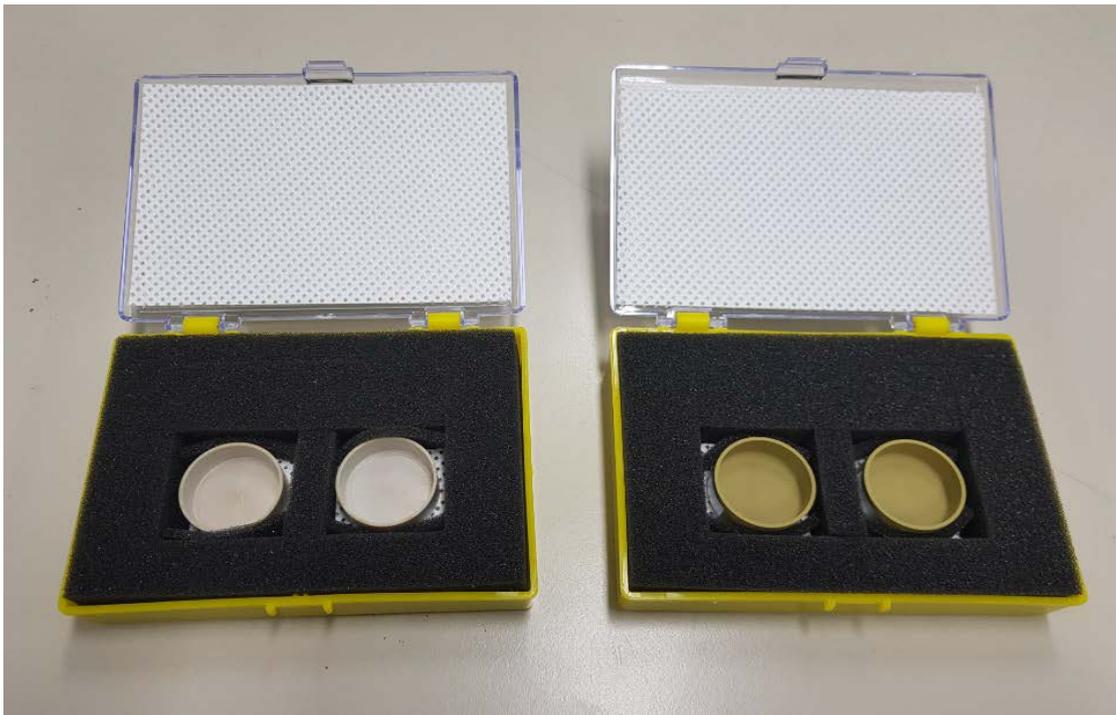
### 제 1 절 전기장 제어 기술 개발

전기장에 대한 In-Vitro 세포 유효성 실험을 수행하기 위해서 전극 표면에서 세포를 잘 성장 시킬 수 있는 접시 형태의 강유전체 전극 제작을 수행하였습니다. 아래 그림은 In-Vitro 형 전기장 치료기기의 전극 모양입니다. 세포를 담지 할 수 있도록 접시형태로 전극 모양을 설계하였고, 접시형 전극 표면 전체에 효과적으로 전기장을 인가하기 위해서 2 쌍의 서로 다른 위상차를 가지는 전압을 인가할 수 있도록 전극 모양을 설계하고 제작하였다.



<그림 2.1> 접시형 강유전 전극 설계 모형

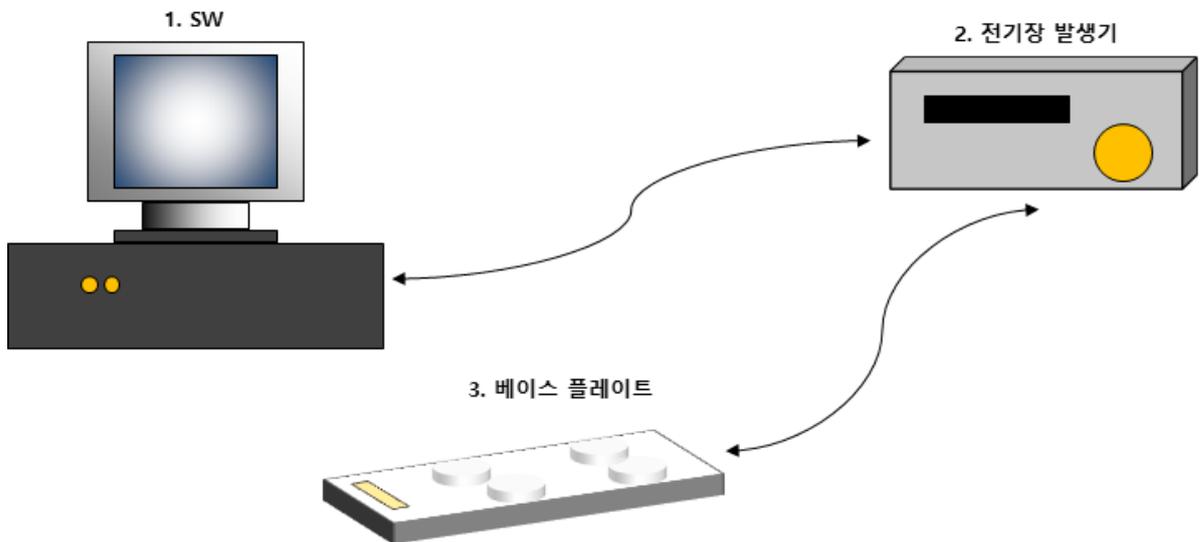
효과적으로 전기장을 세포에 인가하기 위해서 유전상수가 높은 PMN-PT [ $\text{Pb}(\text{M}_x\text{Nb}_y)\text{O}_3\text{-PbTiO}_3$ ]를 전극 재료로 활용하였다. 특히 고상 단결정 성장방법을 이용하여 비교적 크기가 PMN-PT 판을 만들고 가공하여 접시형 강유전 전극을 제작하였고, 이는 분말상태의 PMN-PT 가루를 가열하여 제작한 강유전 전극보다 효과적인 전기장이 발생함을 확인하였다. 아래 그림은 제작된 접시형 강유전 전극의 모양입니다. 왼쪽은 다결정 PMN-PT성분 접시형 강유전 전극이고 오른쪽은 단결정 PMN-PT성분 접시형 강유전 전극입니다.



<그림 2.2> 다결정 PMN-PT성분으로 이루어진 접시형 강유전 전극 사진(왼쪽) 단결정 PMN-PT성분으로 이루어진 접시형 강유전 전극 사진(오른쪽)

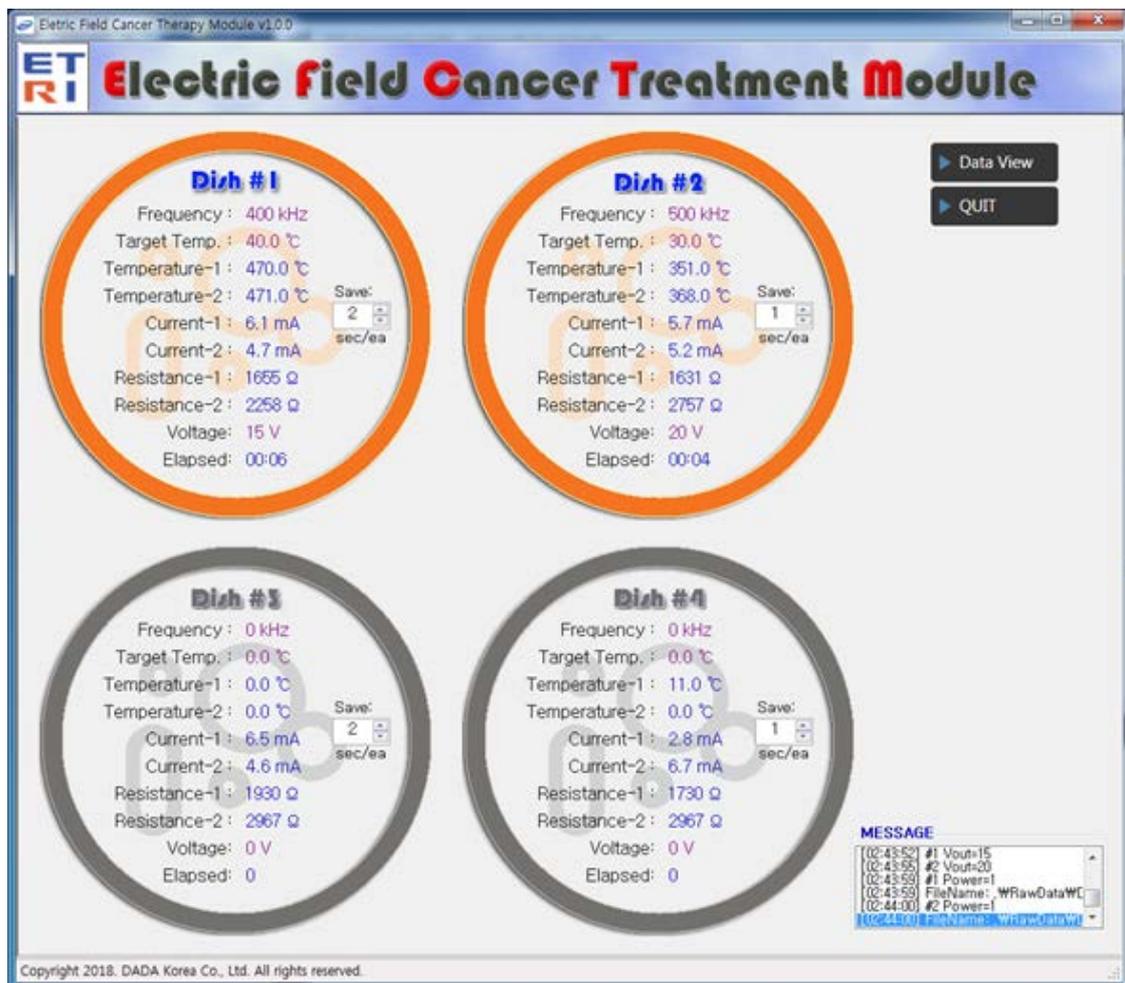
## 제 2 절 전기장 치료기기 플랫폼 시작품 제작 기술

연구 실험실 수준에서 다양한 종류의 암세포에 영향을 미치는 최적의 전기장 세기, 주파수를 알아보기 위한 전기장 치료기기 플랫폼을 설계하고 제작하는 과정을 수행하였다. 아래 그림은 제작하고자 하는 전기장 치료기기의 플랫폼 구성도입니다. 세포 배양 온도, 전기장의 주파수, 전압, 전류, 저항을 조절하고 분석하는 컴퓨터 시스템, 50-500 KHz 의 8 채널 전기장을 한번에 발생할 수 있는 전기장 발생 모듈 장치, 전기장 발생 모듈 장치에서 발생한 전기장을 세포 배양 접시에 전달하는 베이스 플레이트 3 가지 요소로 구성하였다.



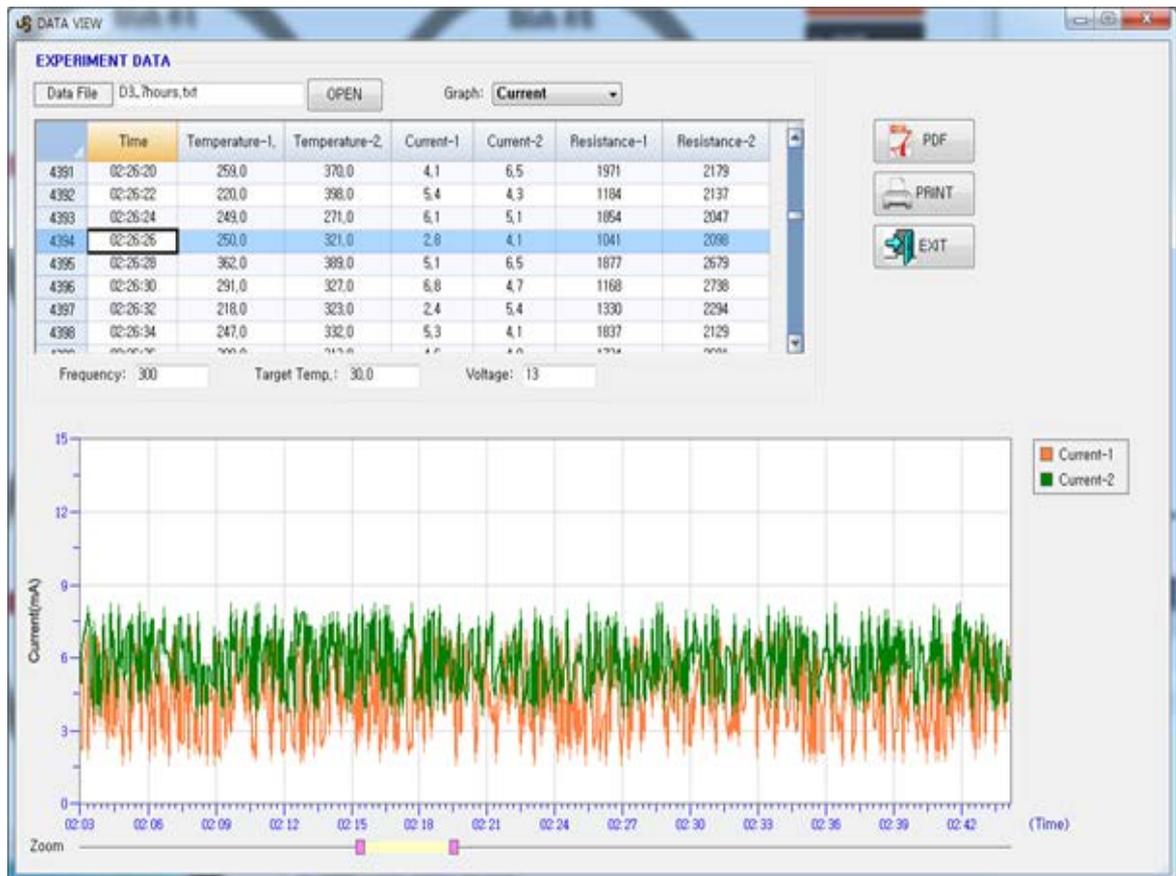
<그림 2.3> 전기장 치료기기의 플랫폼 구성도

4 개의 독립적인 세포 유효성 실험을 한번에 수행하기 위해서 하나의 화면에서 조절이 가능하도록 프로그램을 설계하였다. 전기장의 주파수, 전극 표면 온도 설정을 통해서 전기장 발생기에 나오는 전압, 전류, 저항값은 자동적으로 결정하여 일정 온도를 넘어가지 않도록 설계하였다. 이는 전기장이 아닌 다른 요소(온도)에 의해서 세포 성장에 영향을 받지 않기 위한 중요한 요소입니다. 제작된 전기장 발생 모듈 장치의 조절이 가능한 주파수의 변위는 50-500 KHz 이고, 온도값은 20-40 °C 입니다.



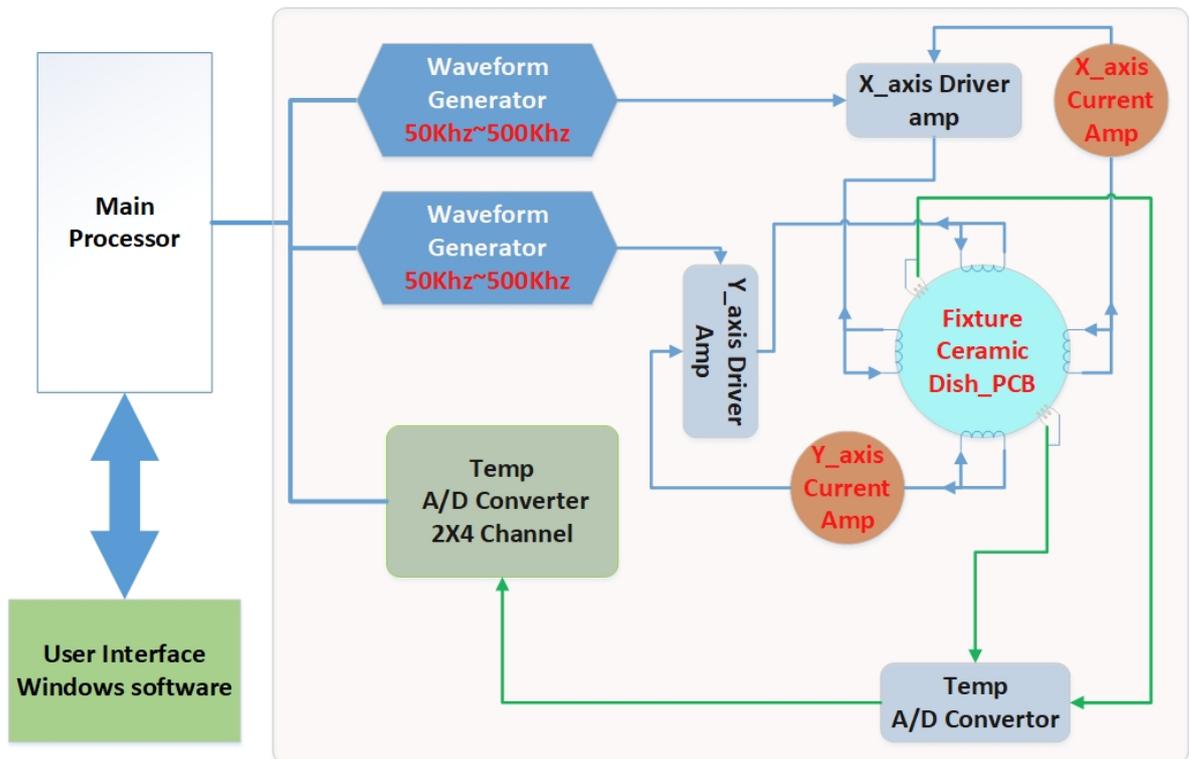
<그림 2.4> 개발된 전기장 치료기 소프트웨어의 전기장 조절 부분

설계된 소프트웨어(SW)는 전기장 발생 요소를 조절할 뿐만 아니라 전극 표면의 전기적 특성을 측정하고 저장하여 전기장 발생기의 작동유무를 확인할 수 있다. 특히 분석 메뉴를 통해서 보다 효과적으로 전극에서 일어나는 전기적 특성 변화를 잘 확인하고 분석할 수 있도록 설계하였다.



<그림 2.5> 개발된 전기장 치료기 소프트웨어의 분석 부분

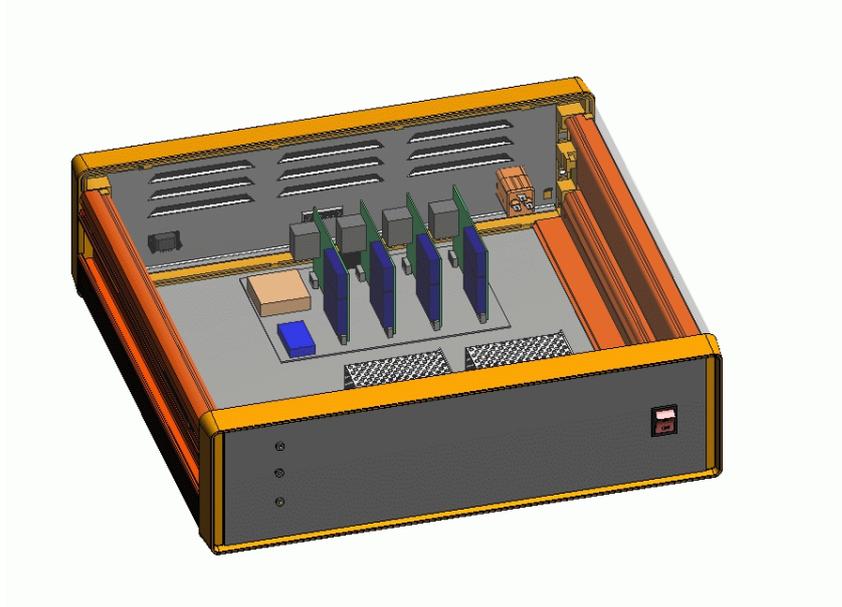
고주파 전기장 발생 모듈의 구성도는 아래 그림과 같다. 접시형 전극 아래에 온도 센서를 설치하여 측정된 온도를 통해서 고주파 전기장 발생 모듈의 전압, 전류세기가 자동적으로 조절되도록 설계하였다.



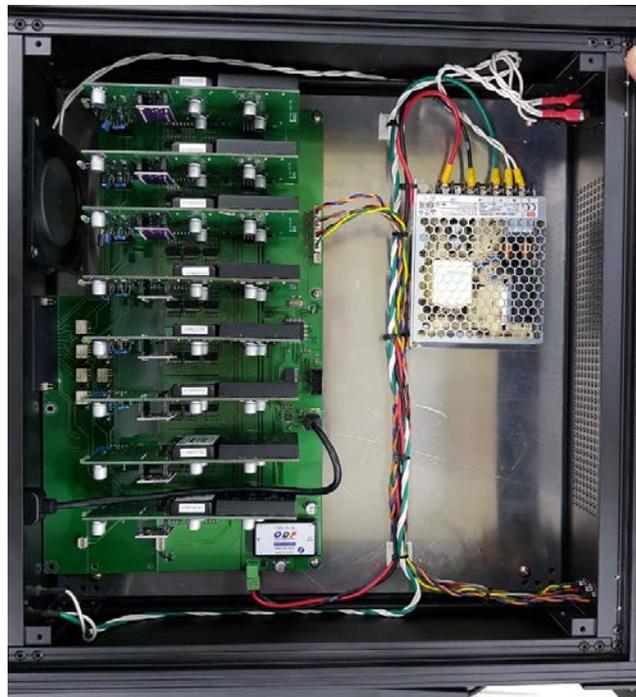
<그림 2.6> 고주파 전기장 발생 모듈의 구성 모식도

하나의 메인보드에 4개의 강유전 접시형 전극에 전기장을 인가하는 고주파 전기장 발생 보드를 병렬로 연결하여 구성된 하나의 고주파 전기장 발생 모듈을 제작하였다.

G-01



<그림 2.7> 설계된 고주파 전기장 발생 모듈의 예상 모식도



<그림 2.8> 제작된 고주파 전기장 발생 모듈의 사진

전기장을 인가할 수 있는 4개의 세포 배양용 전극이 독립적으로 작동이 가능한 베이스플레이트 모양을 설계하고 제작하였다. 아래 그림은 현재 가공 제작된 베이스 플레이트 모습입니다.

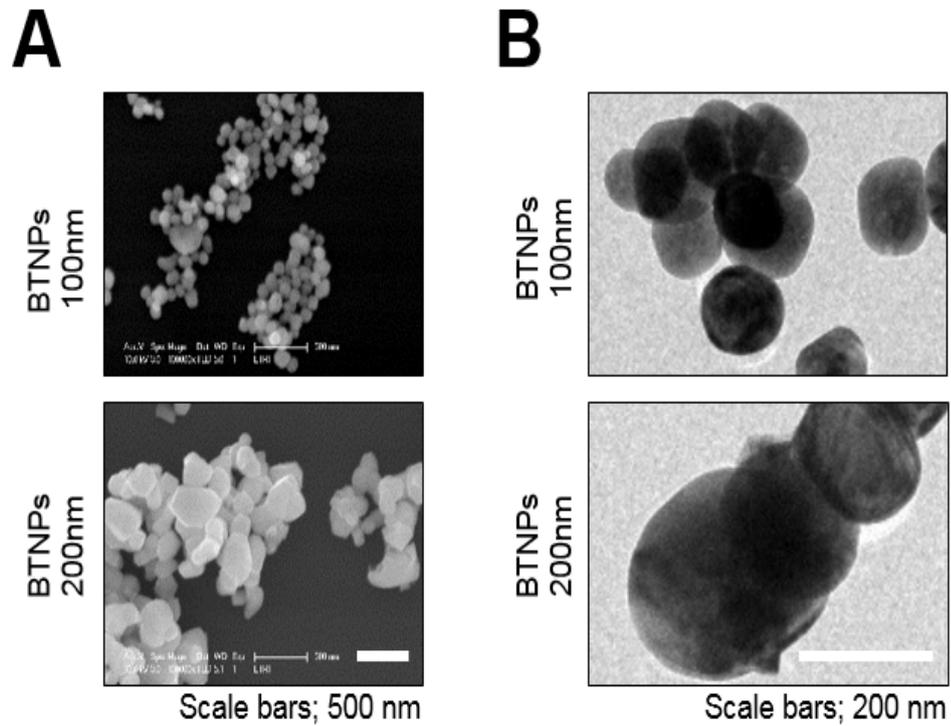


<그림 2.9> 제작된 베이스 플레이트의 모습

완성된 전기장 치료기기 플랫폼 시작품의 특성을 평가하는 작업을 수행하였다. 소프트웨어 컴퓨터 시스템에서 전기장의 주파수와 전극 온도를 설정한 후 실제 강유전 접시형 전극 표면에 인가한 전원이 전달 되어짐을 확인하였다. 아래 그림은 오실로스코프를 이용하여 최종 전극에서 측정된 고주파 전원의 파형 모습입니다. 소프트웨어 컴퓨터 시스템에서 전기장의 주파수 변화에 따라 전극에서 측정된 전원의 모형을 변화됨을 확인하였다.

### 제 3 절 전기장 나노 신규작용점 발굴

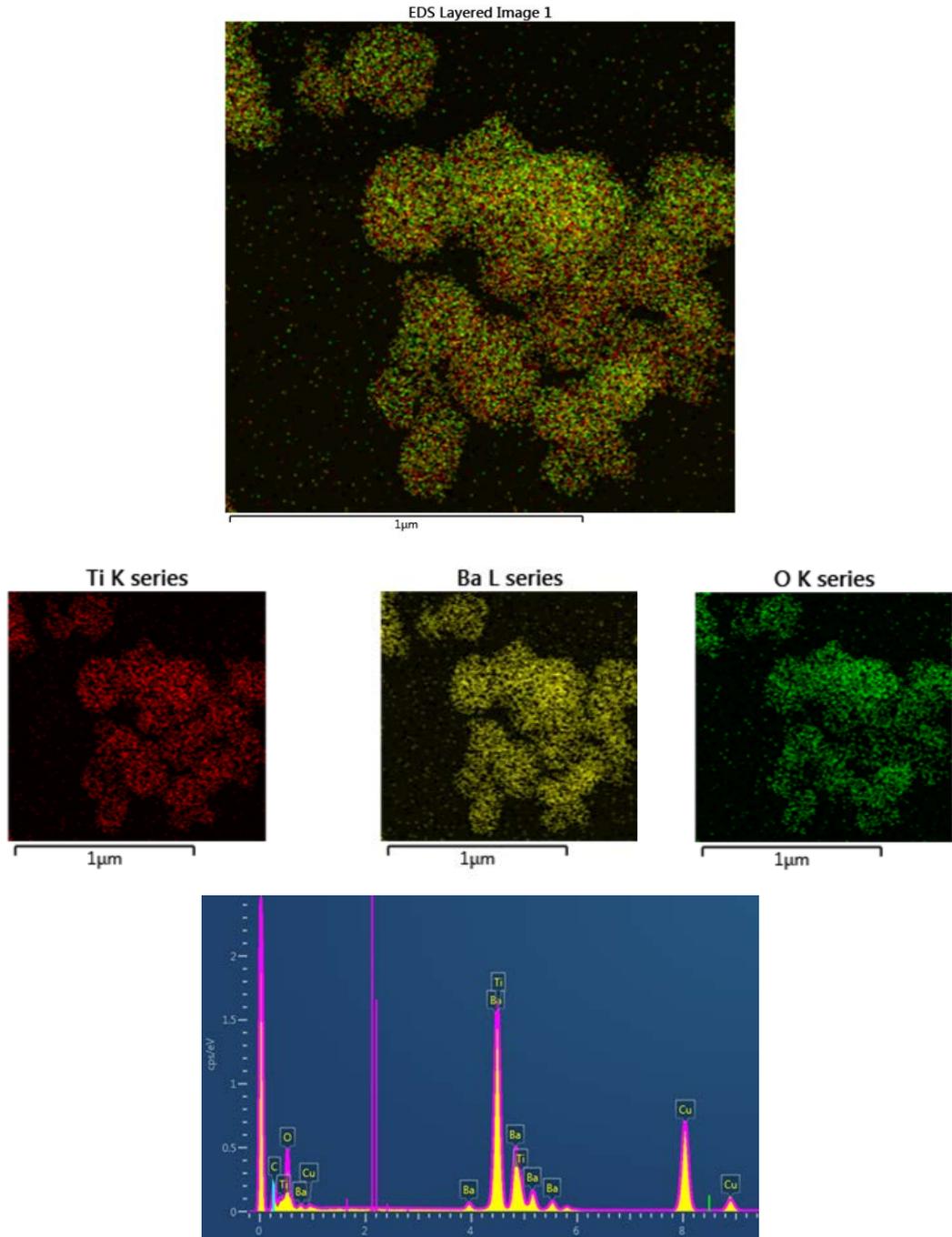
전기장 치료법은 치료시 발생하는 정상세포의 부작용이 최소화시키는 장점을 보유하고 있지만 장기간 전기장 치료를 하여야 효과를 발생하는 단점도 존재한다. 이를 극복하기 위해서 본 연구과제에서는 전기장 치료 효과를 증진시키기 위한 새로운 대조작용제를 개발하려는 연구를 병행하였다. 높은 유전 상수값을 가지면서도 세포 독성이 적은 물질 BaTiO<sub>3</sub> 나노입자를 전기장 치료효과를 증진시키는 대조작용제로 선택하였다. TiO<sub>2</sub> 나노입자를 만든 후 Ba<sup>2+</sup> 전구체가 포함된 용액을 넣고 용매열 반응을 가하면 비교적 쉽고 간단하게 대량의 BaTiO<sub>3</sub> nanocube 합성이 가능하였다. 그리고 BaTiO<sub>3</sub> nanocube 성장 시간과 전구체의 농도를 조절하면 BaTiO<sub>3</sub> nanocube 크기가 조절이 가능하다. 만들어진 나노입자의 크기와 모양을 SEM(Scanning Electron Microscopy)와 TEM(Transmission Electron Microscopy)를 통해서 확인하였습니다. 아래 그림은 합성된 100nm, 200nm 크기의 BaTiO<sub>3</sub> nanocubes의 SEM와 TEM의 각각 사진들입니다.



<그림 2.10> 100nm, 200nm 크기의 BaTiO<sub>3</sub> nanocubes의 SEM와 TEM의 사진들

합성된 나노입자가 BaTiO<sub>3</sub> 물질을 확인하기 위해서 입자의 성분을 EDX(Energy-Dispersive X-ray spectroscopy) 분석으로 하였다. 아래 그림의 200nm 크기의 BaTiO<sub>3</sub> nanocubes의 EDX 성분 결과값입니다. 3차원적인 EDX 분석을 통해서 Ba, Ti, O 성분이 입자 표면에 골고루 분포가 되어 있을 뿐만 아니라 Ba:Ti:O 비율이 거의 1:1:3으로 분포되어 있는 것을 통해서 간접적으로 BaTiO<sub>3</sub> nanocubes가 잘 합성됨을 확인하였다.

G-01



<그림 2.11> 200nm 크기의 BaTiO<sub>3</sub> nanocubes의 EDX 분석 결과

BaTiO<sub>3</sub> nanocube의 생체 적합성을 높이기 위해서 표면에 FBS(Fetal Bovine Serum)을 코팅을 작업을 하였고, 코팅 작업 전후의 BaTiO<sub>3</sub> nanocube의 Zeta-Potential 값을 통해서 FBS 코팅 유무를 간접적으로 확인하였다. 아래 그림은 DLS를 통해서 특정된 BaTiO<sub>3</sub> nanocube의 입자 크기와 표면 전위값을 표시한 표입니다. FBS 코팅 후 BaTiO<sub>3</sub> nanocube의 Zeta-Potential 값이 약한 플러스값에서 약한 마이너스값으로 변화되는 것을 통해서 표면에 FBS가 잘 코팅이 이루어졌음을 간접적으로 확인하였다. 즉 FBS를 코팅하므로써 생체 적합성이 높은 고유전상수값을 가지는 나노입자 프로브가 만들어졌다.

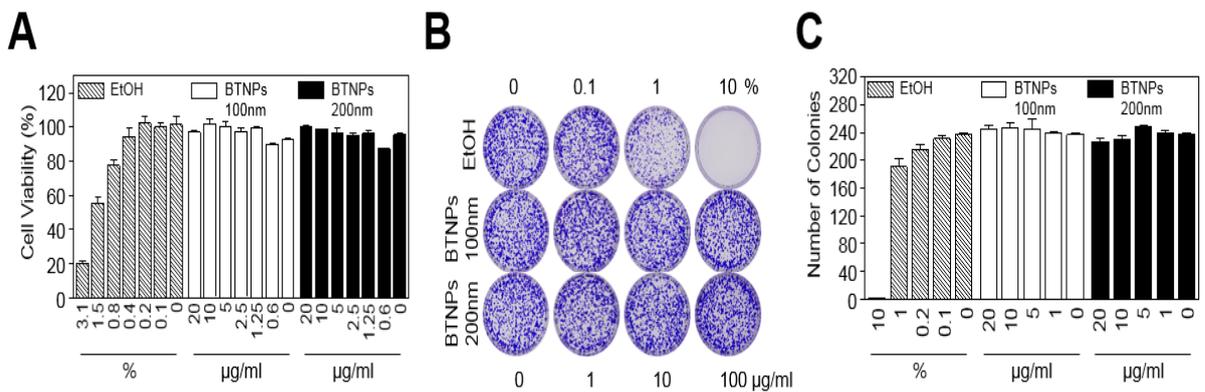
Name	Primary size (nm)	Zeta potential (mV)	Zeta potential in vehicle (mV)
<b>BTNPs 100nm</b>	110 ± 35	21.4 mV ± 12.0	-14.1 mV ± 10.4
<b>BTNPs 200nm</b>	224 ± 63	31.5 mV ± 9.03	-14.5 mV ± 12.8

<표 2.1> 100nm, 200nm의 BaTiO<sub>3</sub> nanocube의 DLS 측정 결과

합성된 BaTiO<sub>3</sub> 나노프로브의 생체적합성을 확인하기 위해서 합성한 나노프로브는 지방암

G-01

세포주 MCF7 에 농도별로 처리하여 WST-8 시험법을 통해 세포독성을 확인하였다. 그 결과, 양성 대조군의 에탄올 농도별 처리 결과와 달리 고농도의 나노프로브 처리에도 세포의 생존률에 변화가 없음을 확인하였고, 또 다른 세포독성 시험법으로 Clonogenic 시험법을 수행함으로써 나노프로브 단독 처리만으로는 세포독성이 나타나지 않았음을 재차 확인하였다. 아래 그림은 BaTiO<sub>3</sub> 나노프로브의 세포독성 in vitro 시험 결과값입니다.



<그림 2. 12> BaTiO<sub>3</sub> 나노프로브의 세포독성 in vitro 시험

## 제 3 장 연구 내용 및 결과

### 제 3 장 연구 내용 및 결과

#### 제 1 절 제작된 전기장 치료기기의 세포 유효성 평가

본 과제를 통해서 새롭게 제작한 In-Vitro 용 전기장 치료기기를 실사용하기 위해 한국원자력의학원에 아래 그림과 같이 전기장 치료기기를 설치하고, 상용 전기장 치료기기와 비교 실험을 통해서 자체 제작된 In-Vitro 용 전기장 치료기기의 성능을 확인하는 연구를 수행하였다.

**A**

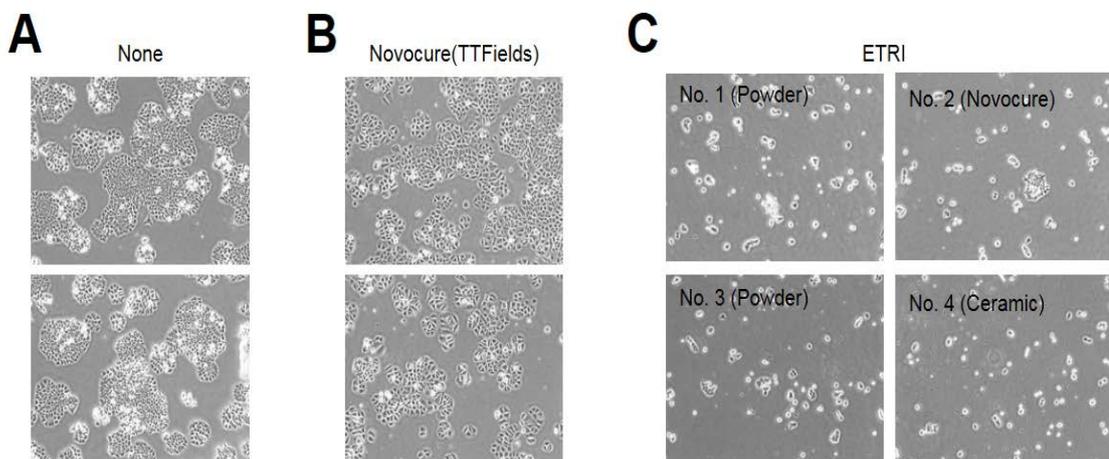


**B**



<그림 3.1> 자체 제작된 전기장 치료기기를 세포 실험실에 설치한 모습

자체 제작된 치료기기 처치 결과, 기존에 판매되는 상용화 전기장 치료기기보다 표면에 붙어 있는 세포의 양이 훨씬 줄어들고 있음을 확인하였다. 그러나 항암효과가 증대된 것이 아닌, 온도 조절에 문제가 있는 것으로 판단되며 이에 대한 수정 보완이 요구되고 있다. 즉 보다 정확한 항암 효과를 알아보기 위해서는 기존 장비와 동일한 온도에서 실험이 이루어질 수 있는 장비 보완이 요구된다.

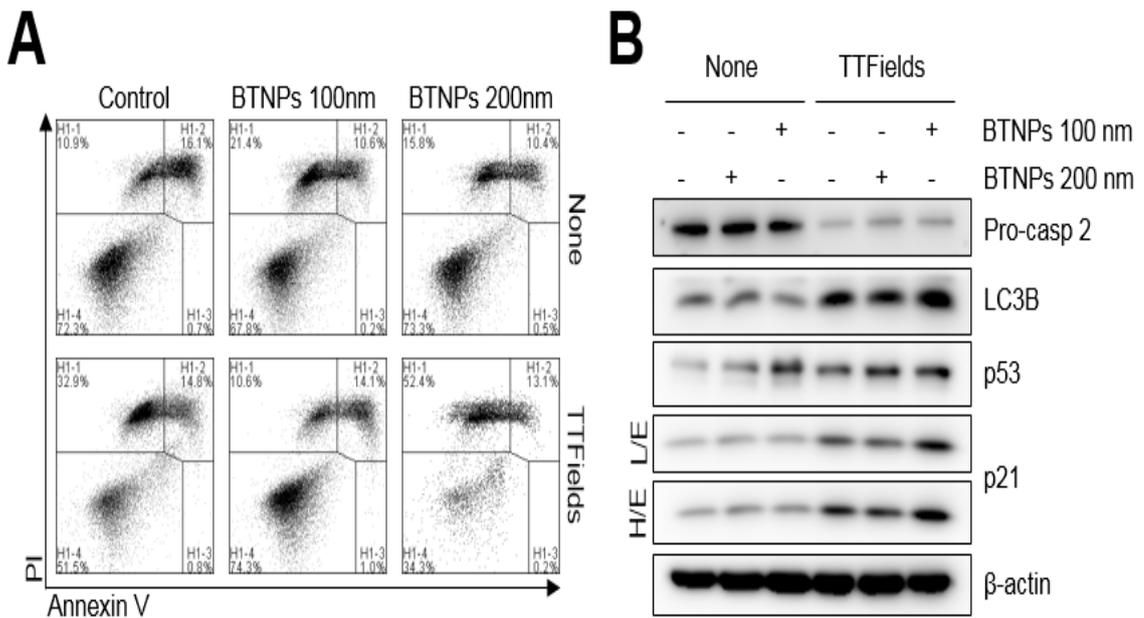


<그림 3.2> 자체 제작된 전기장 치료기기와 상용화 전기장 치료기기의 효과 비교

## 제 2 절 전기장 치료와 BaTiO<sub>3</sub> 나노프로브 적용에 따른 세포 유효성 평가

앞서 실험에서 만들어진 강유전 나노입자인 BaTiO<sub>3</sub> 나노프로브를 세포에 첨가하고 전기장 치료기기를 적용하면 암세포에서 세포사멸이 증가됨을 확인하였다. 아래 그림은 살아있는 세포 수의 감소 원인을 추적하기 위해 세포사멸 관련 인자들을 추적하였다. 세포 표면의

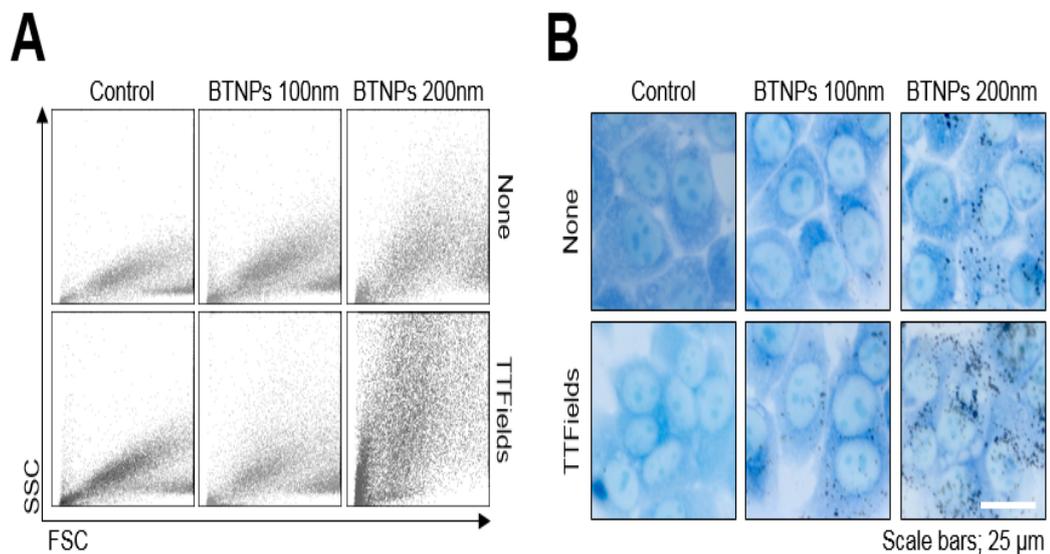
포스파티딜세린(phosphatidylserine)을 탐지하는 AnnexinV-FITC 을 첨가하여 세포사멸(apoptosis) 정도를 평가하고, PI(Propidium Iodide)의 첨가로 세포괴사(necrosis)를 평가하였다. 그 결과, 세포사멸에 해당하는 세포의 비율이 대조군과 비교하였을 때 나노프로브 단독처리 만으로는 5% 이내로 큰 차이 없는 세포사멸 정도를 보인다. 전기장 치료 단독처리 시 대조군과 비교하면 21.2%의 세포사멸의 증가가 확인되었으며, 흥미롭게도 200 nm 사이즈의 나노프로브 처리에 의해서는 39%의 세포사멸이 증가하였음을 확인하였다.



<그림 3.3> 전기장 치료와 나노프로브 병용 치료 시 세포사멸의 증가

그리고 한가지 더 흥미로운 사실은 나노프로브와 전기장 치료기기의 병용 처리 후 유세포분석기(flow cytometry)를 통해 Forward scatter(FSC)와 Side scatter(SSC) 분석할 때 급격한

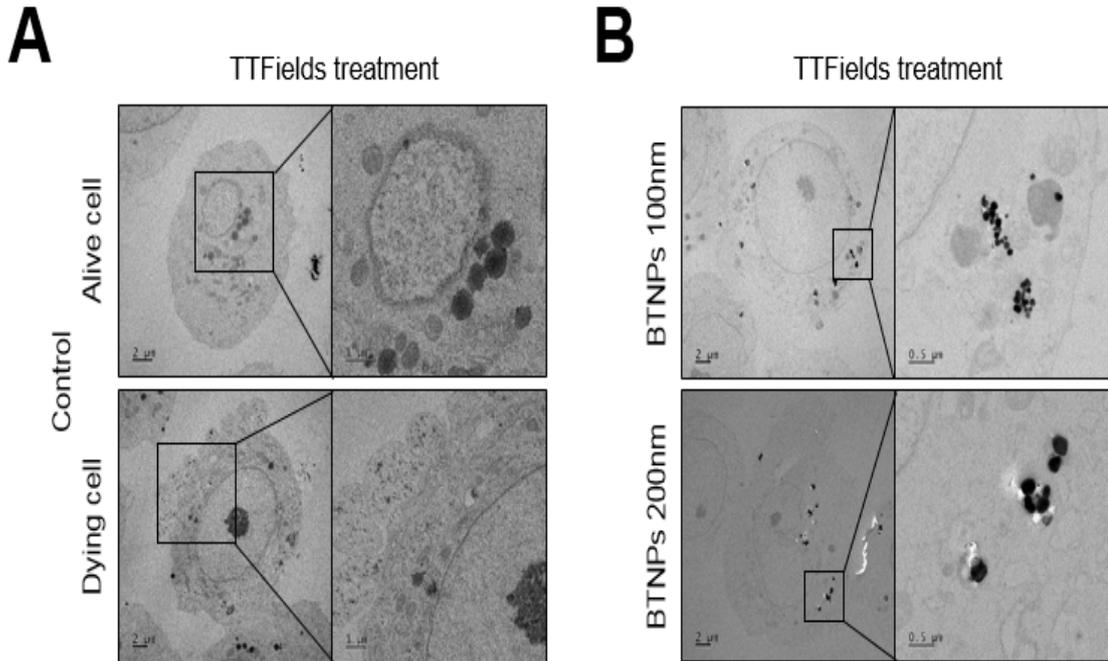
SSC의 증가를 확인하였다. 이를 통해 SSC 값은 세포의 복잡성(complexity)을 나타내는 지표로써, 나노프로브 처치에 의해 세포의 복잡성이 증가한 것으로 보아 세포내에 나노프로브의 축적이 증가하였음을 추측해 낼 수 있었다. 게다가 전기장 치료를 병행할 경우 나노프로브의 축적 정도를 상당히 증가시켰음을 확인하였다. 세포내의 나노프로브 축적 정도를 이미지로 확인하기 위하여 메틸렌블루 염색 후 광학현미경으로 관찰하였다. 아래 그림은 유세포분석기 결과와 유사한 경향성으로 나노프로브는 핵을 제외한 세포질내에 축적되어 있음이 확인되었고, 전기장 치료와 병용 시 나노프로브의 축적이 훨씬 증가하였음을 확인하였다.



<그림 3.4> 전기장 치료기기에 의한 나노프로브의 축적도 증가

그리고 메틸렌블루 염색을 통해 나노프로브의 세포질내 축적을 확인할 수 있었으나, 세포내 정확한 위치 확인을 하고자 Bio-TEM(Biological Transmission Electron Microscopy) 이미지를 확인하였다. 그 결과 전기장 치료에 의해 엔도솜(endosome)으로 추정되는 다수의

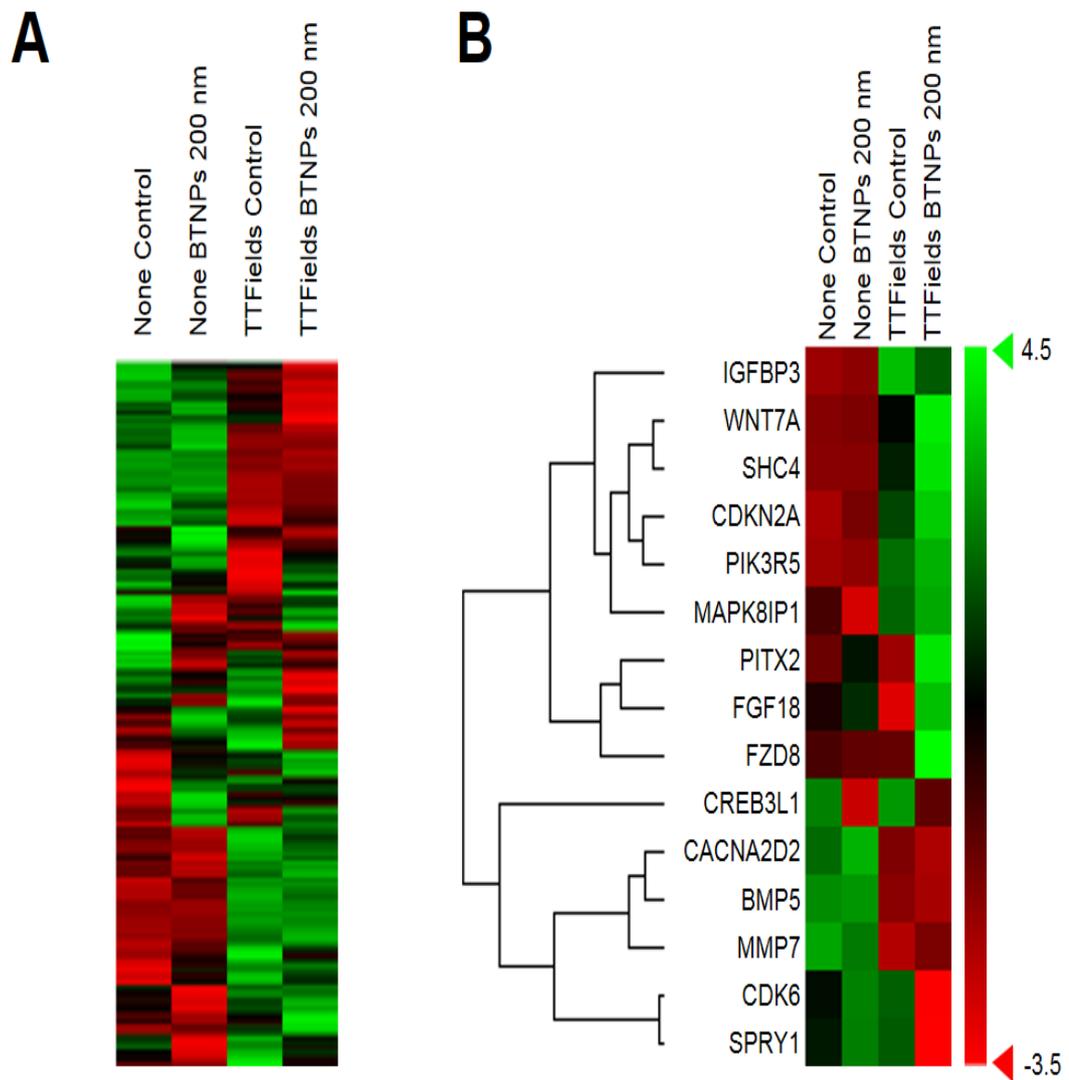
과립(granule)들이 확인되었으며, 나노프로브는 이러한 엔도솜내에 축적되어 있거나 세포질 내 자체에 있는 것으로 추정된다.



<그림 3.5> 전기장 치료 및 나노프로브 처치 후 세포의 TEM 사진

또 이런 현상의 정확한 메커니즘을 알아보기 위해서 유전적 수준에서 어떠한 변화가 일어나는지 확인하는 실험을 추가하였다. 즉 해당 치료법에 의한 유전적 변화를 측정하기 위해 나노스트링(Nanostring) 기기를 이용하여 700 여 가지의 유전자 레벨을 확인하였다. 그 결과 전기장 치료기기에 의해 변화하는 유전적 양상을 확인할 수 있었으며 나노프로브에 의한 변화도 있음을 추측할 수 있었다. 아래 그림은 나노스트링의 결과 중 유의미한 값의 유전자만을 선택하여 히트맵(Heat map)을 그려 보았을 때 전기장 치료기기의 효과가 증대되는

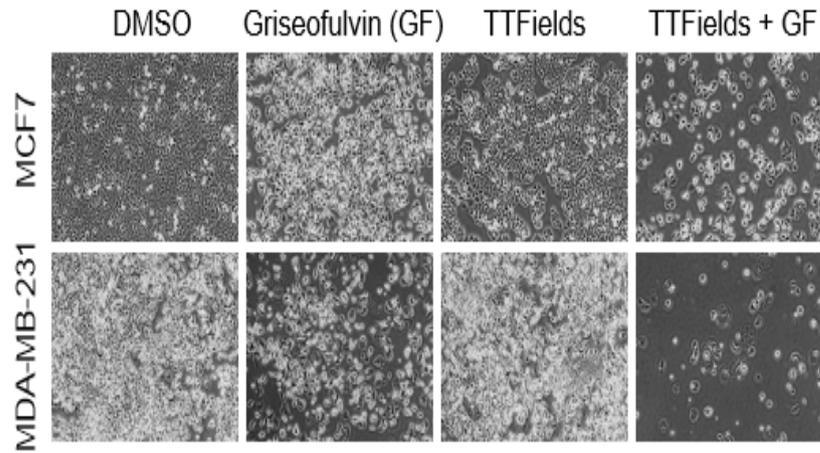
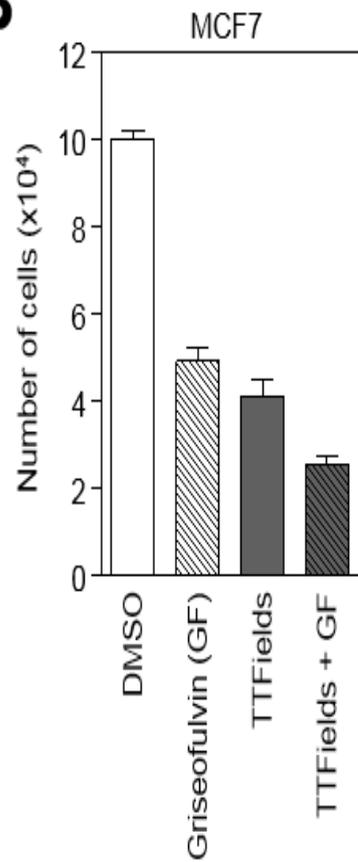
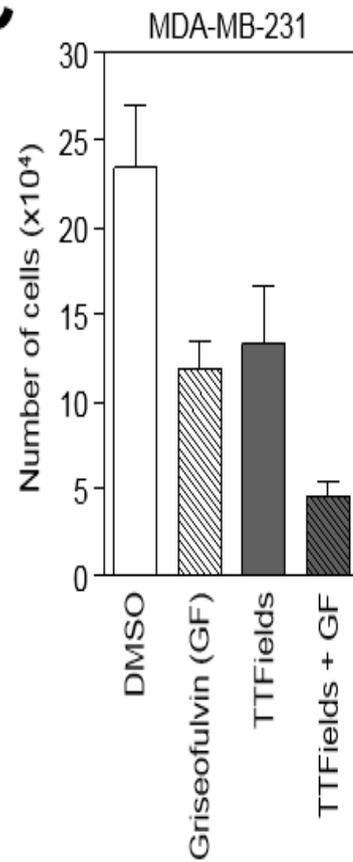
현상을 확인하였다. 나노스트링 결과 값을 토대로 다각도의 분석법을 통해 나노프로브 축적에 의한 효과를 정리하고 있고, 지금까지 소포체 내에 축적된 나노프로브에 의하여 세포의 스트레스가 증가된 유전적 변화로(CREB3L1, CACBA2D2, BMP5, MMP7,1 CDK6, SPRY1) 추정하고 있다.



<그림 3.6> 나노스트링을 통한 유전자 변화 양상 비교

### 제 3 절 전기장 치료와 중심체 응축 억제제 적용에 따른 세포 유효성 평가

전기장 조사가 암세포의 활발한 세포 분열 주기를 공격하므로써 암치료 효과가 이루어짐은 이미 많이 알려진 바 있고, 세포 분열 주기에 관여하는 세포 소기관으로 이미 전기장 치료에 영향을 받는 방추사 이외에 중심체도 영향을 받을 수도 있다. 그러므로 전기장에 의한 암세포 억제기능의 신규작용점으로 전기장과 중심체 응축(centrosome clustering) 정도에 따른 항암효과의 정도를 확인하는 실험을 추가하였다. 삼중음성 유방암 세포주 MDA-MB-231 는 상대적으로 세포주 MCF7 에 비하여 중심체의 수가 2 개를 초과하는 세포의 수가 많고, 그로 인해 중심체 응축 현상이 많이 나타나는 세포주로 알려지고 있다(Ganem et al., Nature, 2010). Griseofulvin(GF)는 항진균제로 알려져 있으나 중심체 응축 억제제의 역할이 알려진 바 있다(Rebacz et al., Cancer Research, 2007). GF 처치에 대한 민감도는 MDA-MD-231 세포에서 더 강하게 확인되었으며, 전기장 치료를 병행하면 두 세포주 모두에서 더 높은 시너지 효과를 보았다. 아래 그림은 GF 처치 및 전기장 치료의 병행으로 인해 두 세포 주 모두에서 살아있는 세포 수가 대조군 대비 1/5 이상의 감소됨을 보여 준다. 따라서, 전기장 치료기기는 중심체 응축 억제제의 효과를 증가시키는 것으로 판단된다.

**A****B****C**

G-01

<그림 3.7> 중심체 응축 억제제 처치에 의한 전기장 치료 시너지 효과

## 제 4 장 결론 및 건의 사항

## 제 4 장 결론 및 건의 사항

### 제 1 절 과제 요약 및 결론

#### 1. 전기장 치료기 플랫폼 기술 연구

전기장을 이용한 암 치료기는 간단한 기기를 착용하는 것으로 암 치료가 가능하기 때문에 소규모 작은 병원에서도 이용이 가능할 뿐만 아니라, 일상생활을 하면서도 암 치료 행위가 가능하다. 특히 정상세포에 비해서 암세포의 세포주기가 빠르고 세포손상시 회복이 어려움을 이용하여 암 치료에 활용하기 때문에 전기장 조사시 정상세포의 손상을 최소화하여 암환자의 삶의 질을 개선할 수 있는 장점을 가진다. 본 과제에서는 출력 전원이 50-500 KHz, 0-20 v/cm 의 8채널 전기장을 한번에 발생할 수 있는 전기장 발생 모듈 장치를 새롭게 설계하고 제작하였다. 그리고 학문 연구용 In-Vitro 전기장 치료기 플랫폼을 만들기 위해서 전극 표면에서 세포를 잘 성장 시킬 수 있는 접시형 강유전 전극을 개발하는 작업도 병행하였다. 강유전 유전상수값을 높이기 위해서 다결정과 단결정의 PMN-PT 강유전체 전극을 제작하고 사용자가 쉽고 편리하게 전극을 전기장 전원에 연결할 수 있는 베이스 플레이트를 설계하고 제작하는 일도 수행하였다. 그리고 전기장 치료기기의 치료 효과를 증진시키기 위해서 고유전상수값을 가지는 BaTiO<sub>3</sub> 나노프로브를 합성하고 특성을 평가하는 작업도 수행하였다. 당 나노프로브는 유방암 세포주 MCF7에 농도별로 처치하여 WST-8 시험법을 통해 세포독성을 확인하였다.

## 2. 전기장 치료기기의 유효성 테스트

본 과제를 통해서 새롭게 제작한 In-Vitro 용 전기장 치료기기의 성능을 알아 보기 위해 암세포와 정상세포의 유효성 평가를 통해서 항암 효과를 알아보는 연구를 수행하였다. 그리고 전기장 암치료 효과를 높이기 위한 고유한 치료법 개발에 관련한 연구를 수행하였다. 특히 강유전 나노 프로브를 도입하여 암이 존재하는 국소적인 부분에만 전기장을 증강시켜 실험환경에서 전기장 암치료 효과를 약 40% 정도 높이는 것을 확인하였다. 그리고 전기장에 의한 암세포 억제기능의 신규작용점으로 전기장과 중심체 응축(centrosome clustering) 정도에 따른 항암효과의 정도를 확인하는 실험도 추가하였다.

## 제 2 절 건의 사항

본 사업과제는 새로운 분야임에도 불과하고 연구용 In-Vitro 전기장치료기 플랫폼 기술과 전기장 치료기기의 유효성 테스트를 통한 노하우를 기반으로, 사용자의 기기 사용 편의성을 증진시킨 고유한 전기장 치료기기 시작품 기술을 개발하였다. 이는 향후 사회의 변화와 요구를 미리 읽고, 이를 대비하여 IT 기술을 이용한 암치료기기의 고도화를 이루려는 끊임없는 연구 개발 시도의 중요한 첫 걸음이라고 생각합니다. IT-BT 기술을 융합한 의료기기 분야는 사회의 노령화와 이에 따른 경제활동 인구의 고령화 및 국가 기술 경쟁력의 제고라는 복지와 경제 분야의 중요한 문제점을 해결할 수 있는 중요한 연구 분야이며, 이를 고려해 볼 때, 본 과제에서 제작된 전기장 치료기기는 향후 전임상 테스트를 통해 임상 유효성을 확인하는 작업이 필요하고, 궁극적으로는 전기장 치료기기의 원천 기술을 기반으로 한 암치료기기 실용화를 추구하는 방향으로 나아가는 것이 적절하다고 생각합니다

# 부 록

## 참고 문헌

1. “Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields” , E. D. Kirson, Z. Gurvich, R. Schneiderman, E. Dekel, A. Itzhaki, Y. Wasserman, R. Schatzberger, Y. Palti, Cancer Research, 64, 3288, (2004)
2. “Is current therapy of malignant gliomas beneficial for patients? Proteomics evidence of shifts in glioma cells expression patterns under clinically relevant treatment conditions” , D. Trog, M. Fountoulakis, A. Friedlein, O. Golubnitschaja, Proteomics, 6, 2924, (2006)
3. “ Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors” E. D. Kirson, V. Dbaly, F. Tovarys, J. Vymazal, J. F. Soustiel, A. Itzhaki, D. Mordechovich, S. Steinberg-Shapira, Z. Gurvich, R. Schneiderman, Y. Wasserman, M. Salzberg, B. Ryffel, D. Goldsher, E. Dekel, Y. Palti, PNAS, 104, 10152, (2007)
4. “Electrical dimensions in cell science” , C. D. McCaig, B. Song, A. M. Rajnicek, J. Cell Sci. 122, 4267, (2009)
5. “Alternating electric fields (TFIELDS) inhibit metastatic spread of solid tumors to the lungs” , E. D. Kirson, M. Giladi, Z. Gurvich, A. Itzhaki, D. Mordechovich, R. S. Schneiderman, Y. Wasserman, B. Ryffel, D. Goldsher, Y. Palti, Clin. Exp. Metastasis, 26, 633, (2009)

6. “A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability” , N. J. Ganem, S. A. Godinho, D. Pellman, *Nature*, 460, 278, (2009)
7. “Trimodal glioblastoma treatment consisting of concurrent radiotherapy, temozolomide, and the novel TGF- $\beta$  receptor I kinase inhibitor LY2109761, M. Zhang, T. W. Herion, C. Timke, N. Han, K. Hauser, K. J. Weber, P. Peschke, U. Wirkner, M. Lahn, P. E. Huber, *Neoplasia* 13, 537 (2011)
8. “Novo TTF-100A Versus Physician’ s choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: A randomized phase III trial of a novel treatment modality” , R. Stupp, E. T. Wong, A. A. Kanner, D. Steinberg, H. Engelhard, V. Heidecke, E. D. Kirson, S. Taillibert, F. Liebermann, V. Dbaly, Z. Ram, J. L. Villano, N. Rainov, U. Weinberg, D. Schiff, L. Kunschner, J. Raizer, J. Honnorat, A. Sloan, M. Malkin, J. C. Landolfi, F. Payer, M. Mehdorn, R. J. Weil, S. C. Pannullo, M. Westphal, M. Smrcka, L. Chin, H. Kostron, S. Hofer, J. Bruce, R. Cosgrove, N. Paleologous, Y. Palti, P. H. Gutin, *Eur. J. Cancer*. 48, 2192, (2012)

## 약어표

SW: Software  
SEM: Scanning Electron Microscopy  
TEM: Transmission Electron Microscopy  
Bio-TEM: Biological Transmission Electron Microscopy  
EDX: Energy-Dispersive X-ray spectroscopy  
FBS: Fetal Bovine Serum  
PI: Propidium Iodide  
FSC: Forward Scatter  
SSC: Side Scatter  
TTF : Tumor Treating Fields  
PMN-PT :  $\text{Pb}(\text{MxNby})\text{O}_3\text{-PbTiO}_3$   
FDA : Food Drug Administration  
GBM : Glioblastomas  
ICT : Information & Communication Technology  
GF : Griseofulvin

<부록>