

두경부 편평상피세포암 연구의 3차원적 in vitro 실험모델

서울대학교 이비인후과교실
성명훈·김춘동

Three Dimensional Culture Model for Head and Neck Cancer Research

Myung Whun Sung, M.D., Chun Dong Kim, M.D.

Department of Otolaryngology, College of Medicine, Seoul National University

1. 서 론

발암기전이나 치료법의 개발을 위한 악성종양의 연구에는 반드시 일정 실험조건을 검증하기 위한 model이 필요하다. 그러한 연구의 방법군으로 크게 in vivo model과 in vitro model이 있는데, in vivo model에서는 실험적 조작을 인체에 직접 가하여 행해지는 인체실험과 실험동물을 이용한 방법이 있으며 인체를 이용한 실험에는 여러 제약이 따르게 되는 것은 주지의 사실이므로 질환에 대한 연구의 많은 부분은 동물실험에 의지하여 이루어지고 있다. 그러나 동물실험의 경우에도 두경부편평상피암에 대한 syngeneic model이 드물고, xenograft model을 이용한 연구 model도 아직 동물실험의 결과에서 재현되지 못하는 경우가 대부분 이고 연구자료의 인체로의 extrapolation에 아직 미흡한 실정이다. In vitro 연구 model로서 가장 기본적인 cell culture는 flask의 표면을 따라 세포가 이차원적으로 성장해가는 monolayer culture system으로 배양이 다른 방법보다 쉬워 연구를 수월히 할 수 있으나 생체와는 여러면에서 조건이 다르다. 이런이유로 monolayer culture model에서 항암효과가 있

는 것으로 판명된 여러 cytokine들을 생체내에 투여했을 때에는 효과가 없는 결과를 나타내어 in vitro model의 결과와 in vivo model의 결과의 차이에 대한 해석을 요구하게 되어 생체의 조건과 비슷한 새로운 실험 model의 요구는 계속되고 있는데 본 종설에서는 최근 새로운 in vitro model로 이용되고 있는 방법으로써 세포를 3차원적으로 배양하여 성장하는 세포 덩어리를 형성하여 생체에서 암세포가 미세전이한 상태(avasascular metastasis)와 유사한 조건을 제공하는 multicellular tumor spheroid (MTS) model과 배양시 암세포를 직접 공기에 노출시켜 피부, 호흡기계, 구강등에서 발생하는 암종과 유사한 환경을 제공하는 방법인 raft culture model을 고찰하고자 한다.

2. Multicellular tumor spheroid (MTS) model

암세포가 in vivo에서 어떻게 발생되어 성장하고, 인체의 면역체계를 비롯한 방어 기전과 어떠한 상호작용을 하는가 연구하기 위해서는 이에 관계되는 여러 조건들을 잘 조절하는 좋

KEY WORDS : Head and Neck Cancer · Spheroid · Raft Culture

은 in vitro 실험모델이 필요하다. 암 연구를 위한 기본적인 in vitro model로서 사용되는 일반적인 세포배양법은 암세포가 배양용기의 표면에 부착하여 판상으로 분열하고 성장하기 때문에 생체내에서 3차원적으로 성장하는 암종과 그 성격이 같을 수 없어 암세포가 가지고 있는 고유의 생물학적 특성을 in vitro culture 중에 잃기도 하고, 때로는 생체내의 암세포는 가지고 있지 않은 새로운 형질을 갖게 되기도 한다. 이러한 단점을 극복하고자 세포가 입체적으로 자랄 수 있는 model을 개발하고자 하는 노력이 시도되어, 3차원적 organ culture, histoculture 등의 방법이 고안되었다(Vescio et al, 1991). 하지만 이들은 fresh tissue에서 출발하는 배양으로서 일단 조직이 생존하여도 수 대 이상 계대배양을 할 수 없어 대부분 일시적인 관찰에 국한되었다. 결국 계속적으로 분열하고 성장하는 세포의 배양이 요구되었고, 세포주의 수립을 통해 지속적인 암세포의 특성에 관해 연구할 수 있게 되었다.

삼차원적 multicellular tumor spheroid (MTS)는 in vitro에서 single-cell suspension으로 부터 형성되는 것으로 단순한 monolayer culture와 생체에서의 종양과 중간 단계의 성

질을 가진다고 생각되며 생체내에서 미세전이 (avascular metastasis)한 상태와 조건이 비슷하다(Yuhas et al 1979; Ochalek and von Kleist, 1994). MTS를 만들기 위해서는 우선 monolayer로 배양된 세포를 trypsinization하여 single-cell suspension을 만든 후 미리 0.5~1.0 % agarose로 coating 된 U-bottom culture plate에 주입한다. 주입하는 세포수는 형성될 MTS의 크기를 고려하여 대개 5,000~100,000/well의 범위에서 세포주에 따라 적절한 수를 정한다. Plate의 coating은 세포 분주 전일에 액체 상태의 agarose로 plate를 무균적으로 coating한 후 자외선 하에서 건조 시킨다. 세포 배양액은 기본적으로 원래 세포주가 배양되던 배양액을 동일하게 사용하고 37°C, CO₂ 5%로 유지되는 세포배양기에서 MTS의 형성을 유도 하며 세포배양액은 주 2회 교환하는 것을 원칙으로 하되 세포의 과밀에 따라 적절히 조절한다. 성숙과정을 관찰하는 중 적절한 시기에 MTS를 harvest하여 조직표본을 제작하거나 세포의 특성연구에 사용한다(Fig. 1).

MTS는 형태학적인 분화를 비롯한 생체내의 구형 종양이 가진 많은 면의 특성을 재현하는 것으로 알려져 있고(Kawata et al, 1991), 여러

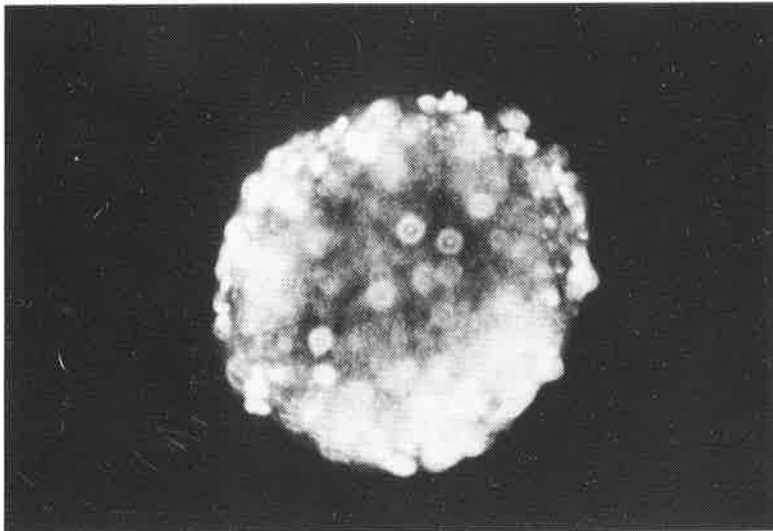


Fig. 1. Sample spheroids formed from squamous cell carcinoma cell line.

종류의 세포를 이용하여 MTS model들이 개발되고 있어, 암생물학의 기초연구(Sutherland, 1988; Neeman et al, 1991), 항암제의 전임상 연구(Chen et al, 1991)나 방사선치료(Wilson and Lord, 1986), 또는 면역요법(Jaaskenlainen et al, 1989; Chen et al, 1991) 등의 연구에 응용되고 있다.

MTS model은 그간의 연구에서 여러 이학적, 생물학적 조건에 대해 monolayer culture와는 상당히 다른 반응을 보여주었다. MTS에서 ionizing radiation에 감수성이 줄어 있는 것이 관찰되었고(Durand and Sutherland, 1981), 여러 약제에 대해서도 약제들의 항암효과가 저하되었으며, 이는 약제의 침투가 불량해지고, 세포자체의 생물학적 성상이 변화하기 때문으로 사료되었다(Knuckel and Sutherland, 1990). 또한, MTS는 초음파에 노출되었을 때 monolayer culture에 비해 저항성이 강해지며, 이러한 현상은 MTS의 삼차원적 구조와 연관이 있으며, MTS의 크기와 비례함이 관찰되었다(Sacks et al 1981; Sacks et al 1983). MTS model에서 분열하고 성장하는 세포는 주로 spheroid의 외층에 분포하여 특히 외층 3~5층에 국한되는 것으로(75 μ m) 관찰되고 있는데(Sutherland, 1988; Sacks et al, 1994), 산소의 소모 상태는 spheroid 전체에 균일하며, 이는 mitochondria의 volume density가 균일함과 관련이 있다고 보고되었다(Bredel et al, 1992). 최근, Sacks 등(1989, 1990, 1994)은 편평상피암의 MTS model을 이용하여 retinoic acid의 유도체가 편평상피암의 형태학적 분화(squames의 형성), involucrin 표현정도, keratin 표현정도 등에 영향을 주어 편평상피암의 분화를 저해한다고 보고하고, 이 MTS model이 anchorage-dependent한 배양법과, anchorage-independent한 배양법의 차이를 연구하고, 세포의 분화 기전을 연구하는데 매우 유용한 방법임을 제시하였다. Waleh 등(1994)은 MTS에서 integrin 등의 세포의 matrix receptor들의 분포가 in vivo에서의 분포와 같은 패턴을 보이는 것을 관찰하고, 세포-세포 접

촉과 MTS내 또는 세포주위의 microenvironment가 integrin의 발현을 조절한다고 보고하였다.

이 MTS model은 종양세포와 host의 면역체계와의 상호작용의 연구에도 이용되었다. Sacks 등(1990)은 MTS를 target으로 lymphokine-activated killer(LAK) cell들의 세포살해 및 MTS 파괴 능력을 관찰하여 주요한 effector cell이 Leu19+/CD3-인 림프구군임을 보이고, MTS가 LAK cell에 대해 초기에 저항성을 갖지만 single-cell suspension은 현저하게 lysis되는 것을 보고하여 MTS의 tissue-like structure가 LAK cell killing에서 중요한 요소가 됨을 제시하였다. Kleist(1994)도 in vitro에서 매우 강력한 암세포살해 능력을 보이는 LAK cell들이 in vivo에서 상대적으로 낮은 항암능력을 보이는 이유를 연구하기 위해 MTS model을 이용하여 림프구들의 활성화도 보다도 암세포의 감수성이 더 중요한 요소이며 이러한 차이는 종양세포의 microenvironment의 변화에 의해서 영향받았다고 보고하였다.

그러나 실제로 두경부 편평상피암세포를 이용하여 MTS model에서 집중적으로 어떤 생물학적 조건의 효과에 대해 비교 연구한 보고는 많지 않지만 Sacks 등(1989, 1990, 1994)이 임파선에 전이한 후두암의 세포주에서 retinoic acid가 MTS의 성장, 분화에 미치는 영향을 squame의 형성, involucrin, keratin expression의 표지자와 면역조직화학법, 생화학법같은 다양한 방법을 이용하여 두경부 편평상피암의 retinoic acid의 연구에 MTS model이 유용하다는 것을 보고하였고 IFN- β , IFN- γ 의 영향을 같은 세포주에서 보고한 것과, IFN- γ 가 melanoma cell line의 MTS에 미치는 효과에 대한 보고가 있으나(Gorlach et al, 1994), 이 보고는 형태학적 관찰에 그치고 있어, 이러한 처치에 따른 MTS의 구조의 변화, 세포 표면의 형질 변화, 특히 cell adhesion molecule들의 변화, 이러한 adhesion molecule을 변화시켰을 때 생기는 MTS 형성 및 성장 패턴의 변화 등, 그 기전에 대한 자세한 포괄적 연구는 아직 미진

한 상태이다.

3. Raft culture model

두경부의 악성종양 중 가장 흔한 편평상피세포암은 대개 구강, 인두, 후두 등과 같이 호흡기계의 일부에 많이 발생하고, 이 호흡기계는 공기에 노출되어 있는 조건을 형성하여 다른 영역의 종양과 생체환경이 다르다. 따라서 호흡기계에서 발생하는 편평상피세포암의 기초 및 임상응용연구를 수행하기 위하여는 배양시 공기에 노출시켜 실제 생체와 유사한 조건을 제공하는 방법으로 피부의 배양에 사용되는 raft culture를 시행하면 기존의 cell culture model과는 또 다른 생체조건을 재현하는 in vitro model이 될 것으로 사료된다. 이와같은 호흡기계의 조건과 비슷한 raft model은 현재까지 in vitro model로 이용되어온 이차원적인 암세포의 배양에서 볼 수 없는 암세포의 침윤기전이나 암세포의 분화유도 연구 및 cytokine의 효과연구 등에 활용될 수 있다.

Raft culture model은 그간 피부에 대한 약물의 효과를 측정하는데 많이 이용되어 왔는데 Asselineau 등(1986)에 의하면 배양된 상피세포는 정상 상피세포에 비해 기저층세포의 모양이 다르고 분화정도를 나타내는 67-kD keratin, involucrin 등의 표현이 약간 다르나 정상 상피세포와 비슷한 것으로 생각하고 실험하여도 문제가 없다고 보고하였다. 이에 따라 피부과 영역에서 새로운 신약의 평가에 있어서 인간에 직접 실험해 보는 여러 문제점들을 피하고 그 효과를 평가할 수 있게 되었다. 특히 약제의 효과 판정에 있어서 약제를 넣어주는 위치에 따라 지역적 혹은 전신적 영향을 각각 평가할 수 있다(Fig. 2).

Raft를 만드는 방법은 크게 두가지가 있는데 de-epidermized dermis위에서 세포를 키우는 방법과 collagen-fibroblast lattice위에서 세포를 배양하는 방법이다(Fig. 3). 이중 후자의 방법을 간단히 설명하면 polycarbonated millicell

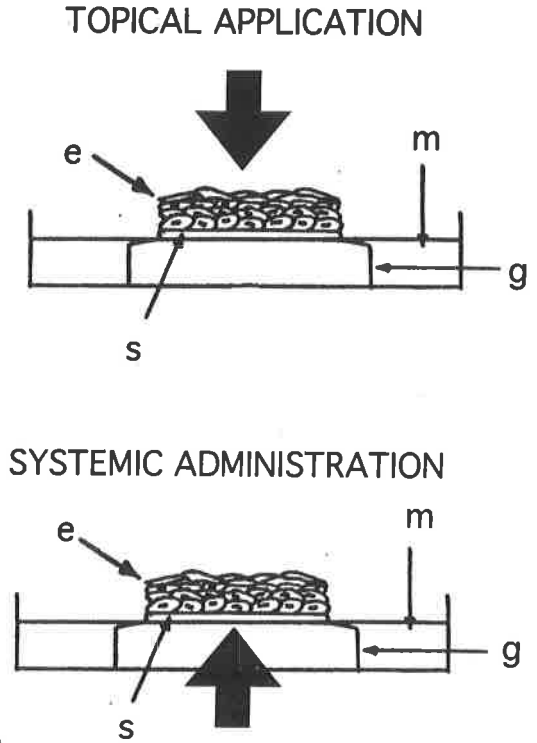


Fig. 2. Epidermis(e) reconstructed on de-epidermized dermis(s) exposed to the atmosphere to study the effects of pharmacological agents administered either 'systematically' or 'topically' (arrows).

m=Culture medium; g=grid.

용기에 type 1 collagen matrix의 gelation과정에 fibroblast를 embed 하여 collagen-fibroblast lattice(dermal equivalent)를 만들어 세포주에 대한 기질로 사용한다. 이렇게 만들어진 기질 위에 배양된 상피세포나 편평상피암의 세포주를 trypsinization하여 single-cell suspension을 만든 후 millicell당 2×10^6 의 세포를 submerged culture하여 1주일 배양하면 tight monolayer가 형성된다. Tight monolayer가 형성되면 semi air-liquid interface에 1주내지 2주간 배양하여 multilayer를 형성시키고 이 조직을 고정하고 표본을 만들어 hematoxylin and eosin 염색이나 여러가지 표식자를 이용한 면역조직화학법을 이용하여 암세포의 침윤정도나 배양

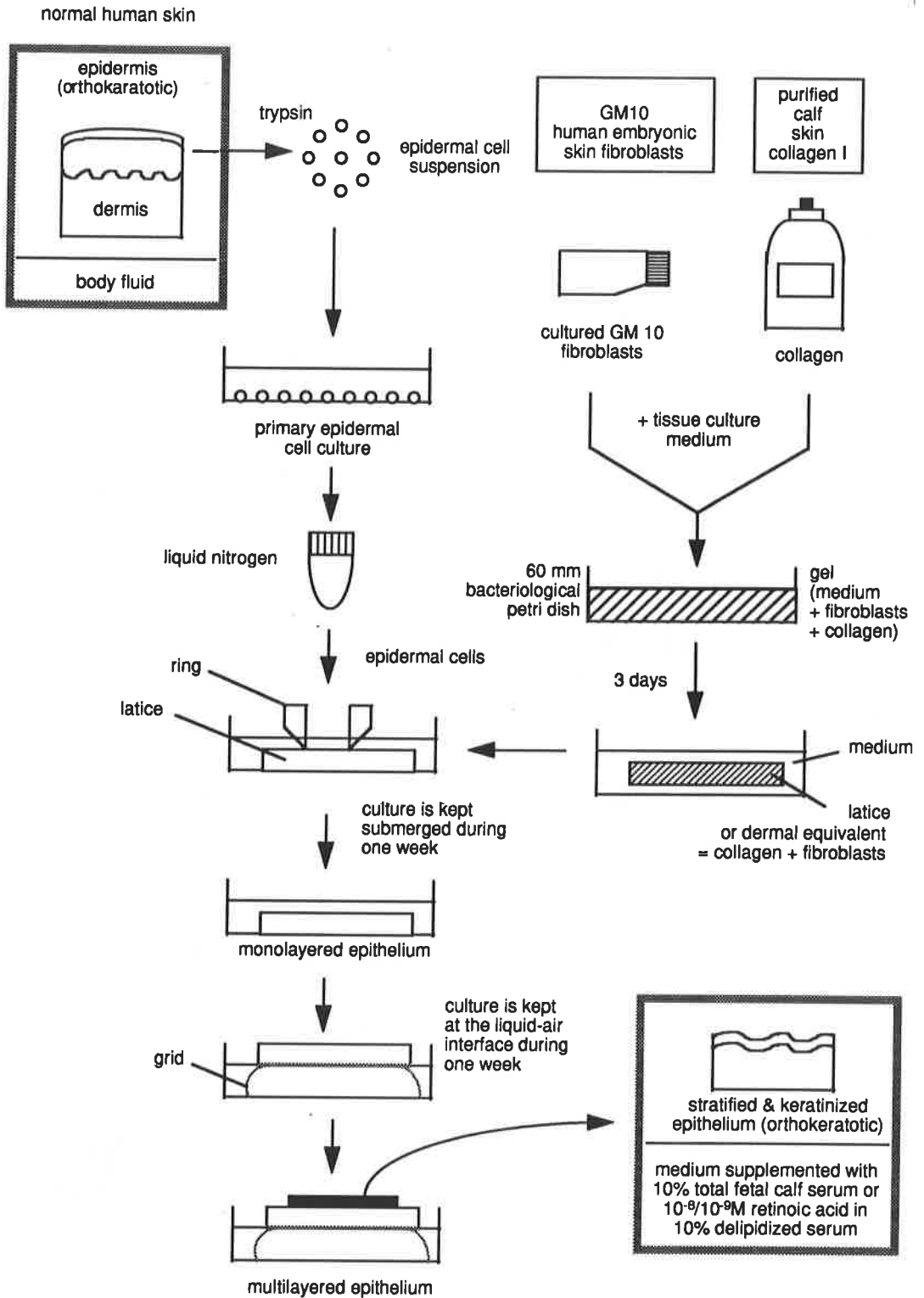


Fig. 3. Schematic presentation of the experimental procedure.

된 세포의 특징을 연구할 수 있다.

현재 이 모델을 사용하는 연구는 주로 피부의 상피세포를 이용하여 이루어지고 있는데 주로 retinoic acid, 1,25-dihydroxyvitamin D₃ 등을 이용하여 세포들의 분화에 미치는 영향을 관찰한 연구와 여러 가지 약제의 영향을 평가하는데 주로 사용되고 있다.

종양세포주로 연구한 실험은 아직 활성화가 되어있지 않고 주로 공기와 접하는 영역에서 발생하는 종양을 대상으로 이루어지고 있다. Doki등(1993)이 한 실험에 따르면 esophageal cancer cell line에서 E-cadherin과 invasiveness의 관계를 raft model에서 적용하여 E-cadherin의 표현이 되지 않을 때 세포의 접착력이 감소하여 invasion이 증가함을 보고하였다. Shiozaki등(1995)은 epidermal growth factor (EGF)나 transforming growth factor α (TGF- α)의 overexpression시 종양의 크기보다 전이나 invasion에 더 영향을 준다고 발표하였다. Zheng등(1994)은 human cervical epithelial cell(HCE)에 human papillomavirus(HPV) type 16과 18 DNAs를 transfection 시켜 raft 배양을 하였을 때 종양세포와 비슷하게 비정상적인 분화를 보인다고 발표하였으며 Shindoh등(1995), Pray와 Laimins(1995), Dollard등(1992)도 human papillomavirus를 이용한 실험에 raft culture를 이용하였다. Coleman과 Stanley(1994)는 자궁경부 종양세포에서 HLA-DR의 expression이 증가되어 있고 IFN- γ 을 넣었을 때 종양세포의 분화가 억제됨을 보고하였다. 이와같이 종양의 특성을 관찰하는 연구에서 raft culture의 이용은 우선 종양의 위치가 자궁경부암, 두경부암, 식도암과 같이 공기에 노출될 수 있는 위치이며 조직이 편평상피세포암으로써 monolayer culture에서는 실험하지 못하는 세포의 분화도를 이용하여 hormone, cytokine, 약제를 사용하여 세포의 분화에 미치는 영향이나 인공으로 만들어진 collagen-fibroblast lattice로의 침윤성에 미치는 영향을 보는데 주로 이용되고 있다.

이 방법의 앞으로의 전망은 raft culture에 의해 배양된 세포들은 피부의 세포들이나 암세포, 유전적변형이 있는 세포들의 약리효과나 호르몬, cytokine들의 in vitro 실험 model로 많이 사용될 것으로 판단된다. 특히 이 model은 세가지 관점에서 흥미를 주는데 hormone이나 성장인자(growth factor)를 배양초기에 넣어 세포의 분화도의 변화 연구에 사용하고, 분화가 완성된 배양세포에서 hormone이나 약제를 넣어 그 물질의 효과를 보거나, dermis like matrix의 이용은 dermal pathology를 연구하는데 유용할 것으로 생각된다.

4. 결 론

발암기전이나 치료법의 개발을 위한 악성종양의 연구의 in vitro model로 monolayer culture system은 배양이 다른 방법보다 쉽고 간편하여 연구를 수월히 할 수 있으나 생체조건과는 여러면에서 조건이 다르므로 생체의 조건과 비슷한 새로운 in vitro model인 MTS model과 raft model은 인체실험이나 동물실험에 따른 여러가지 제약을 극복하고 in vivo model의 대체방법이 될 것이다. 특히 in vitro model에서 두경부 편평상피세포암 세포에 대한 여러 증식과 분화에 관계되는 조건들, 예를 들면 cytokine이나 retinoic acid 등의 현재 주목 받는 molecule들의 생물학적 효능을 연구하는데 이 model을 이용하게 될 것이다. 적절한 in vitro model 개발의 중요성은 이 model이 암세포 자체에 대한 연구 model로서 암 침윤 및 전이 연구, 암세포 분화 유도 연구 등에 이용되고 단순히 molecule의 효과 관찰 판정뿐만 아니라, 이차원배양과 MTS 및 raft 배양이 서로 다른 반응을 보이면 암세포와 주위의 면역세포들과의 interaction을 연구하는 데에도 이용될 수 있다. 또한 새로운 항암제의 효능검정, 면역치료, 유전자요법 등의 새로운 치료법의 효과를 판정하는 데에도 응용될 수 있다.

참 고 자 료

- 1) Heo DS, Snyderman SM, Pan S et al : Biology, cytogenetics, and sensitivity to immunological effector cells of new head and neck squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res* 49 : 5167~5175, 1989
- 2) Carey TE : Establishment of epidermoid carcinoma cell lines In RE Witter(ed.), *Head and neck cancer* 1985
- 3) Easty DM, Easty GC, Carter RL et al : Ten human carcinoma cell lines derived from squamous carcinoma of head and neck. *Br J Cancer* 43 : 772~785, 1981
- 4) Sung MW, Johnson JT, Van Dongen G et al : Protective effects of interferon- γ on squamous cell carcinoma of the head and neck targets in antibody-dependant cellular cytotoxicity mediated by human NK cells. *Int J Cancer*(in press)
- 5) Sacks PG, Miller MW, Sutherland RM : Response of multicell spheroids to 1-MHz ultrasonic irradiation : Cavitation-related damage. *Radiat Res* 93 : 545~559, 1983
- 6) Sacks PG, Oke V, Amos B et al : Modulation of growth, differentiation and glycoprotein synthesis by β -All-trans retinoic acid in a multicellular tumor spheroid model for squamous carcinoma of the head and neck. *Int J Cancer* 44 : 926~933, 1989
- 7) Sacks PG, Oke V, Calkins DP et al : Effects of β -All-trans retinoic acid on growth, proliferation, and cell death in a multicellular tumor spheroid model for squamous carcinomas. *J Cell Physiol* 144 : 237~243, 1990
- 8) Sacks PG, Taylor DL, Racz T et al : A multicellular tumor spheroid model of cellular immunity against head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother* 32 : 195~200, 1990
- 9) Doki Y, Shirozaki H, Tahara H et al : Correlation between e-cadherin expression and invasiveness in vitro in a human esophageal cancer cell lines. *Cancer Res* 53 : 3421~3426, 1993
- 10) Shirozaki H, Kadowaki T, Doki Y et al : Effect of epidermoid growth factor on cadherin-mediated adhesion in a human esophageal cancer cell line. *Br J Cancer* 71 : 250~258, 1995
- 11) Asselineau D, Bernard BA, Bailey C et al : Human epidermoid reconstructed by culture : is it "normal" ? *J Invest Dermatol* 86 : 181~186, 1986
- 12) Grolach A, Herter P, Hentschel H et al : Effects of nIFN beta and rIFN gamma on growth and morphology of two human melanoma cell lines : Comparison between two- and three-dimensional culture. *Int J Cancer* 56 : 249~54, 1994
- 13) Acker H, Carlson J, Durand R et al : Spheroid in cancer research. *Rec Results Cancer Res* 95 : 1~183, 1984
- 14) Garbe C, Krasangakis K, Zoubolis CZ et al : Antitumor activity of interferon alpha, beta, and gamma, and their combination on human melanoma cells in vitro : changes of proliferation, melanin synthesis, and immunophenotype. *J Invest Dermatol* 95 : 231~237, 1990
- 15) Johns TG, Mackay IR, Callister KA et al : Antiproliferative potencies of interferon on melanoma cell line and xenograft : higher efficacy of interferon beta. *J nat Cancer Inst* 84 : 1185~1190, 1992
- 16) Sacks PG, Oke V, Calkins DP et al : Effects of beta trans retinoic acid on growth, proliferation, and cell death in a multicellular tumor spheroid model for

- squamous carcinoma. *J Cell Physiol* 144 : 237~243, 1990
- 17) Hong WK, Endicott J, Itri L et al : The effectiveness of retinoic acid in the treatment of premalignant lesions in oral cavity. *N Engl J Med* 315 : 1501~1505, 1986
- 18) Lippman SM, Kessler JF, Meysken FL : Retinoids as preventive and therapeutic anticancer agent. *Cancer Treat Rep* 71 : 391~405, 1987
- 19) Lippman SM, Kessler JF, Meysken FL : Retinoids as preventive and therapeutic anticancer agent. *Cancer Treat Rep* 71 : 493~514, 1987
- 20) Lotan R, Sacks PG, Lotan D : Differential effects of retinoic acid on in vitro growth and cell surface glycoconjugate of 2 human head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 40 : 224~229, 1987