

구강암 세포주를 이중 이식한
이소위 종양의 누드마우스 모델

연세대학교 대학원

치 의 학 과

김 종 현

구강암 세포주를 이종 이식한
이소위 종양의 누드마우스 모델

지도교수 차 인 호

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2008년 6월 일

연세대학교 대학원

치의학과

김 종 현

김중현의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2008년 6월 일

감사의 글

연세대학교 치과대학 구강악안면외과학 교실을 떠난 지 벌써 8년이 다 되어 갑니다. 수련 생활 동안의 열정과 미래에 대한 포부는 세월 앞에 점점 사라져 버렸고 벌써 두 아이의 아버지로서 아이들 앞에 부끄럽지 않은 아버지가 되고 싶은 현실적인 마음만 덩그러니 남았습니다. 8년 이라는 긴 시간 동안 석사과정을 하리라고 저도 미처 생각하지 못했습니다만 어느덧 석사과정을 마치게 되어 스스로는 너무 기쁘며 행복합니다. 그러나 아직도 부족한 저로서는 앞으로 더 많은 일을 해야 함을 절실히 깨닫게 되었습니다.

먼저, 이 논문이 완성되기 까지 용기를 주시고 시종 세심한 배려와 지도를 해주시며 저를 이끌어 주신 존경하는 차 인 호 교수님께 깊은 감사의 말씀을 올립니다. 또한 따뜻한 마음으로 많은 격려와 조언을 아끼지 않은 성실하고 자신감 넘치는 남 응 교수에게도 진심으로 감사를 드립니다.

이 지면을 빌어 저를 구강 악안면 외과의사의 길로 이끌어 주신 윤 중 호, 이 의 응, 이 충 국, 박 형 식, 김 형 준 교수님께도 진심으로 감사의 마음을 전합니다. 또한 논문을 성실히 지도해 주시고 바쁘신 와중에도 많은 도움과 가르침을 주신 김현실 교수와 황영선 박사님께도 감사의 마음을 전합니다.

끝으로 저를 낳아주시고 길러주신 아버지, 어머니, 멀리서 조용히 도움주신 장모님과 하늘에 계신 장인어른께도 감사드립니다. 또한 인생의 동반자며 조력자인 제가 가장 사랑하는 아내 박 인 숙과 바쁜 아빠 때문에 많은 시간을 함께 하지 못해 항상 미안하게 생각하는 정말 사랑하는 나의 두 아들 김 세 훈, 김 태 원 과 함께 이 작은 결실을 함께 하고자 합니다.

2008년 7월

김 중 현

목 차

국문요약	iv
I. 서 론	1
II. 연구 재료 및 방법	5
1. 연구 재료 및 방법	5
가. 세포주 확립과 배양.....	5
나. Transwell [®] invasion assay.....	6
다. Zymography	6
라. 실험 동물	7
마. 실험 동물군 설정	7
바. 실험 동물 희생	7
사. 조직학적 관찰	7
III. 연구 결과	8
1. YD-10B _{mod} 세포주 제작	8
가. Transwell [®] invasion assay	8
나. Zymography	9
2. 종양 형성	10
가. 생체 내 종양 형성	10
나. 세포 수에 따른 종양 형성	11
다. 주입 후 경과 시간에 따른 종양 형성	11

3. 조직학적 검사	12
가. 대조군	12
나. YD-10B _{mod} 세포주 실험 군에서의 종양 형성	13
1) 1x10 ⁶ µg/ml 처리군	13
2) 1x10 ⁷ µg/ml 처리군	14
3) 2x10 ⁷ µg/ml 처리군	16
IV. 총괄 및 고찰	17
V. 결 론	20
참고문헌	21
영문요약	28

그림 차례

그림 1. Transwell [®] invasion assay 결과	8
그림 2. Crystal violet으로 염색한 세포주 비교	8
그림 3. MMP-9의 gelatinase 활성도 비교 결과	9
그림 4. YD-10B _{mod} 세포주에 의해 flank부위에 형성된 종양	10
그림 5. 대조군의 조직병리학적 소견	12
그림 6. YD-10B _{mod} 세포주 (1×10^6 , 2주)에 의한 종양의 조직병리학적 소견	13
그림 7. YD-10B _{mod} 세포주 (1×10^7 , 2주)에 의한 종양의 조직병리학적 소견	14
그림 8. YD-10B _{mod} 세포주 (1×10^7 , 6주)에 의한 종양의 조직병리학적 소견	15
그림 9. YD-10B _{mod} 세포주 (2×10^7 , 2주)에 의한 종양의 조직병리학적 소견	16

표 차례

표 1. 누드마우스 생체 내 종양형성	10
표 2. YD-10B _{mod} 세포주의 주입된 세포 수에 따른 종양형성	11
표 3. 대조군과 YD-10B _{mod} 세포주의 주입경과시간에 따른 종양형성	11

국문요약

구강암 세포주를 이종 이식한 이소위 종양의 누드마우스 모델

성공적인 구강암 치료를 위해서는 종양 생물학에 대한 이해와 함께 효능이 알려져 있는 여러 안전한 항암제의 효능을 연구하는 것이 필요하다. 이런 연구를 위해서는 적당한 생체 종양 모델의 개발이 필요하지만 여러 가지 종양의 형성 및 전이 과정에 관여하는 많은 인자들에 의해 나타나는 현상을 모두 연구할 수 있는 최적의 생체 종양 모델은 아직 드문 실정이다.

이에 저자는 사람의 혀에 발생한 편평 세포 암에서 확립한 YD-10B 세포주를 이용하여 이를 변형시킨 YD-10B_{mod} 세포주를 제작, 배양 후 누드마우스의 옆구리 피하에 이식하여 암의 형성과 성장 및 주위조직으로의 침윤양상을 관찰하여 구강암 연구에 적합한 누드마우스 모델을 확립하고자 하였고, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 누드마우스의 피하 부위에 YD-10B_{mod} 세포주를 주입한 실험군은 15 예 중 13 예 에서 종양이 형성되었고, 배양액만 주입한 대조군에서는 모두 종양이 형성되지 않았다.

2. 1×10^6 cells/mouse을 주입한 누드마우스에서는 5 예 중 3 예 에서 종양이 형성되었고, 1×10^7 cells/mouse, 2×10^7 cells/mouse을 각각 주입한 누드마우스에서는 5 예 모두에서 종양이 형성되었다.

3. 세포 수에 따른 조직학적 검사에서는 1×10^6 cells/mouse을 주입한 누드마우스에서는 2, 4, 10 주재에 주변 조직과의 경계가 명확한 섬유성 피막을 형성하며

팽창성 성장을 하고 있는 종양이 관찰되었다.

4. 1×10^7 cells/mouse을 주입한 누드마우스에서는 대체로 팽창성 성장을 하다가 6 주째부터 중앙부위의 괴사 양상과 주변 조직으로 광범위한 침윤성 성장 양상을 보이는 종양이 관찰되었다.

5. 2×10^7 cells/mouse을 주입한 누드마우스에서는 팽창성 성장과 침윤성 성장을 보이다가 6 주째 주변 결합조직으로의 침윤성 양상을 보이는 종양이 관찰되었다.

이상의 결과로 변형시킨 YD-10B_{mod} 세포주를 누드마우스의 피하부위에 이종 이식 시킨 것은 높은 종양 형성능력을 가지며, 생성된 종양은 인체 내 종양 형성과 유사한 조직학적 특징과 주위조직으로의 침윤성 성장 양상을 보이기 때문에 구강암 연구에 적합한 동물 실험 모델로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

핵심 되는 말 : 구강암, 설암, 편평 세포 암, 이소위 종양 모델, 세포 주

구강암 세포주를 이종 이식한 이소위 종양의 누드마우스 모델

(지도 차 인호 교수)

연세대학교 대학원 치의학과

김 종 현

I. 서 론

구강암은 조기 진단기법과 다양한 치료방법의 발전에도 불구하고 5년 생존율이 전체적으로 50%이하로 예후가 불량한 암으로 알려져 있다 (Johnson, 2003). 구강암은 경부 임파절 전이가 잘 일어나며, 경부 임파절 전이 시 예후에 나쁜 영향을 주기 때문이다 (Carew, 2003).

성공적인 구강암 치료를 위해서는 종양 생물학에 대한 이해와 효능이 알려져 있는 여러 안전한 항암제의 효과를 연구하는 것이 필요하다. 이런 연구를 위해서는 적당한 생체 종양 모델의 개발이 필요하지만, 여러 가지 종양의 형성 및 전이 과정에 관여하는 많은 인자들에 의해 나타나는 현상을 모두 연구할 수 있는 최적의 생체 종양 모델은 아직 드문 실정이다.

구강암을 연구하기 위한 *in-vivo* 모델은 인체의 종양조직을 유전적으로 조작된 숙주에 이식하는 방법과 DMBA (9,10-dimethyl-1, 2-benzanthracene), 4NQO (4-nitroquinoline-1-oxide)와 같은 화학적 암 유발 인자를 이용해서 동물에게 암을 유도하는 방법이 있다 (Hawkins, 1994). 그러나 암 유발 인자를 이용한 동물모델은 유도된 종양 조직이 인체에서 유래한 조직이 아닌 동물의 조직이며, 종양 생물학에 대한 연구와 치료방법에 대한 연구보다는 발암과정의 연구에 적합한

모델이다. 따라서 새로운 치료 방법 개발이나 새로운 항암제의 선택에 관한 연구에는 인체의 종양조직을 숙주에 이식하는 모델이 유용할 것이다 (Giovanella, 1974). 이러한 인체 악성 종양의 이종이식은 햄스터, 기니아 피그 등 면역학적인 이점을 가진 여러 종의 동물에 시도되어왔지만 (Santis, 1964, Odukoya, 1984), 그중에 가장 안정적인 것은 누드마우스를 이용한 종양이식이다 (Fidler, 1986). 최초의 성공적인 누드마우스에의 인체 악성 종양의 이식은 1969년 Rygaard와 Povlsen에 의해 이루어졌고 (Raygaard, 1969), 그 후 여러 인체 암종이 다양한 유전적 배경을 가진 흥선이 없는 누드마우스에 이식되었다 (Giovanella, 1973, McDermott, 1987).

누드마우스에 인체 종양을 이식하는 방법은 종양조직을 이식하는 방법과 배양된 암 세포주를 이식하는 방법이 있다. 종양조직을 직접 이식하는 방법은 종양의 미세 환경요소들을 함께 이식해 줄 수 있다는 장점이 있지만, 기술적으로 어려운 측면이 많다. 그러나 배양된 암세포주를 이식하는 방법은 실험방법이 간단하며, 배양된 암세포주 이식에 의해 유도된 종양과 조직이식에 의해 유도된 종양과 조직학적으로 차이점이 거의 없으며 (Hendrickson, 1993), 종양 조직이식 보다 성공률이 높은 것으로 보고되고 있다 (Kubota, 1994). 따라서 배양된 인체 암 세포주는 종양연구의 필수적인 요소라고 할 수 있다.

배양 세포주를 유전적으로 조작된 숙주에 이식하는 방법과는 달리 실험실에서 행해지는 배양세포를 이용한 *in-vitro* 모델은 암세포의 특정 유전인자 조작으로 야기 되는 세포의 형태학적 및 분자생물학적 변화를 쉽게 관찰할 수 있으나, 주위 인접 결체조직과의 관계나 종양 내 암세포들의 다양한 변화 등 실제 생체 내에서 일어날 수 있는 여러 결과들을 관찰하기에는 부족하다. 즉 배양세포를 이용한 wound assay나 invasion assay 등으로 암세포 침윤능력을 간접적으로 확인할 수는 있으나 이를 근거로 실제 원격 전이 여부를 판단하기에는 어렵다. 그러나 생체 내 종양 형성 모델은 종양 중심부 괴사 부위, 인접 조직으로의 침윤부위, 림프절로의 전이, 원격전이, 신생 혈관 생성 부위 등을 관찰할 수 있다 (Fu, 1991, Umeda, 2002, Kim, 2005). 또한 생체 내 모델은 host-tumor간 상호 작용도 연구할 수 있다는 장점을 가지고 있다 (Fidler, 1986, Khanna, 2005). 따라서 새로

은 치료방법의 개발이나 새로운 항암제의 효과를 확인하기 위해서는 생체내 종양 형성 모델이 필수적이라 할 수 있다.

생체 내 종양 형성 모델제작에 관한 연구는 인간 암세포를 실험동물의, 종양이 기원된 동일한 조직, 즉 동소위에 이식 하였을 경우와 이소위인 피하에 이식한 경우로 나눌 수 있다. 대부분의 연구에서는 동소위 조직에 이식된 경우가 이소위 피하에 이식된 경우보다 종양 발생율이 높고, 임상적 상황을 재현하는 자발적 전이와 비슷한 주위조직으로의 침윤양상이 가능하다는 점과 이를 이용해서 전이의 분자 생물학적 기전을 연구할 수 있어 동소위 종양 모델의 가치가 높은 것으로 알려져 있다 (Fu, 1991, Killion, 1999, Umeda, 2002).

그러나 누드마우스의 구강 내에 이식된 동소위 종양 모델은 이식방법이 복잡하고, 실험동물의 구강이 작아 종양 형성 후 식이 섭취가 곤란하여 오랜 기간 연구가 이루어지기 쉽지 않다. 반면 누드마우스의 피하조직에 이식하는 이소위 종양이식은 이식방법이 간단하고, 치료에 반응하는 종양성장을 확인하기 쉽고 장기간의 관찰이 가능하다. 따라서 유용한 항암제 선택의 연구는 이소위 피하이식 종양 형성 모델에 의해 이루어지고 있다 (Scheper, 2007, Huang, 2007등). 또한 과거의 연구에서는 피하조직에 이식된 생체 내 종양은 기관전이도 잘 일어나지 않는다고 보고되었으나 (Hoffman, 1994, Myers, 2002), 최근에는 피하이식 모델에서도 임파절 전이 및 원격기관 전이 발생에 대해 보고되고 있으며, Takasi 등은 피하이식 모델은 동소위 이식 모델에 비해 이식방법이 쉽고, 실험 재현성이 뛰어나 암 전이에 대한 새로운 동물 모델로서의 가능성에 대해 제시하였다 (Takashi, 2008).

Human tongue 기원의 편평 세포 암에서 확립된 YD-10B 세포주는 이미 누드마우스의 피하에 접종, 이종이식 종양 유도 실험이 보고된 바 있다 (Lee, 2005). 이 등의 연구에 의하면 5/5의 확률로 종양이 형성되었고, 원래 인체 암 종과 유사한 조직학적 소견을 보였으나, 경계가 명확한 섬유성 피막에 둘러 싸여 침윤성 성장을 보이지는 않았다고 보고하였다 (Lee, 2005). 이에 저자는 종양의 형성과정 뿐만 아니라 전이 과정 및 주위조직으로의 침윤성을 보이는 세포주의 필요성을 느꼈으며, YD-10B 세포주를 변형시켜 종양의 주위조직으로의 침윤성이 높은

YD-10B_{mod} 세포주를 제작하여 본 실험에 이용하였다.

본 연구의 목적은 사람의 혀에 발생한 상피 세포 암에서 확립한 구강암 세포주를 이용하여, 전이 가능성이 높고 주위 조직으로의 침윤성이 높은 세포주를 제작, 누드마우스의 피하에 이식하여 암의 발생과 성장 및 주위조직으로의 침윤성을 관찰하여 향후 구강암 연구를 위한 향상된 누드마우스 종양 형성모델을 만들고자 하였다.

II 연구 재료 및 방법

1. 연구 재료 및 방법

가. 세포주 확립과 배양

동물실험을 위해 연세대학교 치과대학 구강병리학교실에서 확립한 Human tongue cancer origin의 YD-10B 세포주 (Lee, 2005)에 Transwell invasion apparatus를 Matrigel (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ)로 재구성 시킨 basement membrane을 투과시켜 침투력이 높은 세포주를 선택하였다. YD-10B 중에서 highly invasive cell들을 pEGFP [Clontech, encoding enhanced green fluorescence protein (EGFP) with C-terminal His6 tag, Palo Alto, CA] 로 Lipofectamine-mediated transfection 한 후, flow cytometer로 분석, 40 mm mesh를 거쳐 FACS vantage SE (Becton-Dickinson) 하에서 강한 형광을 발하는 세포들(< 1%)을 골라 YD-10B_{mod} 세포주를 제작하였다. 이후 Trypsin-EDTA로 분리, serum-containing medium으로 세척 후 누드마우스에 접종하기 전까지 배양하였다

나. Transwell® invasion assay

세포의 침윤 정도는 Matrigel® (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ)로 insert chamber를 코팅시킨 Transwell® chamber plates (Costar, Corning, NY)를 이용하여 측정하였다. Matrigel®을 일정 시간 녹이고 30 µg/ml를 insert chamber에 가하여 코팅하였다. [³H] thymidine으로 표지한 세포를 well당 50,000개씩 넣고 48 시간 동안 배양한 후, Matrigel®을 통과하여 lower chamber로 이동한 세포의 총 cpm(cycles per minute)을 Scintillation counter로 측정하였다. 세포의 침윤 정도는 처음 넣어준 세포의 총 cpm(cycles per minute)에 대한 백분율로 표시하였다. 또한 Matrigel®을 통과하여 lower chamber로 이동한 세포를 paraformaldehyde로 fixing 후 crystal violet으로 염색하여 현미경 하에서 관찰하였다.

다. Zymography

세포 (1×10^5 cells/ml)를 24 시간 동안 배양한 후, 배양액을 원심분리하였다. 20 µg의 단백질을 포함하는 상등액을 0.1% (w/v) gelatin이 함유된 10% polyacrylamide 겔에서 전기 영동하였다. 겔을 2.5% Triton X-100이 함유된 Tris-HCl 완충용액에 2시간 동안 방치하였다가 37°C, 10 mM CaCl₂, 0.15 M NaCl이 함유된 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충용액에서 16 시간 동안 반응시켰다. 겔을 0.25% Coomassie brilliant blue로 염색하여 세포 침윤에 주된 역할을 하는 단백질 분해 효소인 MMP-9에 의해 기질이 분해된 부분을 확인하였다.

라. 실험동물

20 마리의 생후 4 주된 자성의 athymic BALB/c nude (nu/nu) mice를 이용하였다. Clean bench에서의 일주일의 적응 기간 후 임의로 각 군으로 나누어 실험에 이용하였다.

마. 실험동물 군 설정

상기한 방법으로 확립한 구강 편평 상피 세포 암 종 세포주인 YD-10B_{mod} 세포주를 대조군과 실험군으로 나눈 누드마우스의 옆구리 피하부위에 실험군은 1×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 cells/mouse로 피하 층으로 0.1 ml씩 마취 후 주입하였고, 대조군은 media만을 마우스의 피하 부위에 주입하였다. 모든 동물들은 NIH guideline에 따라 사육되었다.

바. 실험동물 희생

YD-10B_{mod} 세포주 실험군의 경우 옆구리 피하 부위에 1×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 cells/mouse로 각각 5 마리씩에 0.1 ml 용량으로 주입 후 2 주째부터 2 주마다(2 주, 4 주, 6 주, 8 주, 10 주) 동물을 희생하고 종양을 포함한 주위 조직을 절제하여 포르말린 고정액에 보관하였다.

사. 조직학적 관찰

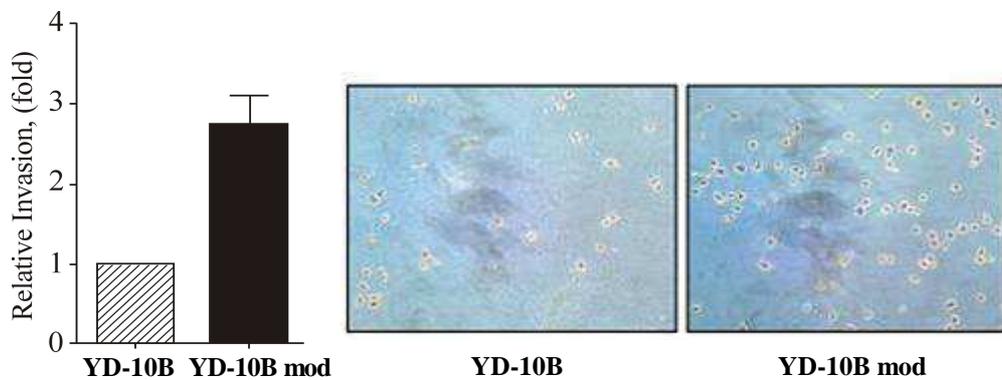
채취한 조직은 10% 중성 포르말린에 24 시간 이상 고정한 후 파라핀에 포매하여 4 μ m 두께의 조직 표본을 만들어 통상적인 방법으로 H&E 염색한 후 각 군에서 암 종의 조직학적 소견을 관찰하였다.

III. 연구 결과

1. YD-10B_{mod} 세포주 제작

가. Transwell[®] invasion assay

YD-10B를 Matrigel를 간 transwell chamber를 이용해 4 번 연속 highly invasive한 세포만을 선택하여 green fluorescence protein을 transfection하여 구축된 YD-10B_{mod} 세포주는 YD-10B와 비교하여 Transwell[®] invasion assay 상에서 2.3-3.2배 높은 invasion 활성을 나타내었고 (그림 1), crystal violet으로 세포를 직접 염색하여 확인한 결과에서도 비슷한 정도의 차이가 확인되었다 (그림 2).



(그림 1)

(그림 2)

그림 1. Transwell[®] invasion assay 결과

그림 2. crystal violet으로 염색한 세포주 비교

나. Zymography

Gelatin이 함유된 zymography를 이용하여 암세포 침윤에 주된 역할을 하는 단백질 분해 효소인 MMP-9 (matrix metalloproteinase 9)의 활성을 확인하였다. Secretion 된 MMP-9의 gelatinase 활성은 YD-10B_{mod}가 YD-10B보다 약 2배 정도 높았으며 (그림 3) 이는 단백질의 발현 양에 따른 차이임을 western blot으로 확인하였다

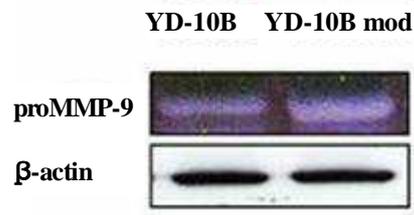


그림 3. MMP-9의 gelatinase 활성도 비교 결과

2. 종양 형성

가. 생체 내 종양 형성

누드마우스의 등 피하 부위에 주입한 media 대조군 및 변형된 YD-10B_{mod} 실험군에서 다음과 같이 종양 형성을 확인하였다.

표 1. 누드마우스 생체내 종양형성

	종양 형성율
Media (대조군)	0/5
YD-10B _{mod} (실험군)	13/15



그림 4. YD-10B_{mod} 세포주에 의해 옆구리 부위에 형성된 종양 (우로부터 1×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 cells/mouse)

나. 세포수에 따른 종양 형성

표 2. YD-10B_{mod} 세포주에 주입된 세포 수에 따른 종양 형성

주입 세포 수	종양 형성율
1×10^6 cells/mouse	3/5
1×10^7 cells/mouse	5/5
2×10^7 cells/mouse	5/5

다. 주입 후 경과 시간에 따른 종양 형성

표 3. 대조군과 YD-10B_{mod} 세포주의 주입 경과 시간에 따른 종양형성

		2주	4주	6주	8주	10주
대조군		-	-	-	-	-
	1×10^6 cells/mouse	+	+	-	-	+
실험군	1×10^7 cells/mouse	+	+	+	+	+
	2×10^7 cells/mouse	+	+	+	+	+

3. 조직학적 검사

가. 대조군

피하 조직 내에 종양의 형성이 관찰되지 않았으며, 약간의 염증세포 만이 밀집한 양상을 볼 수 있었다 (그림 5).

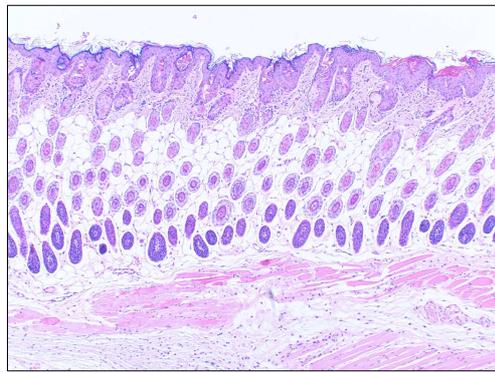


그림 5. 대조군 (2 주)의 조직병리학적 소견. 누드마우스의 피하에 세포주 없이 media만 주입한 대조군은 종양의 형성이 관찰되지 않았다. (H-E 염색, x40)

나. YD-10B_{mod} 실험군의 종양 형성

1) 1×10^6 cells/mouse 처리군

YD-10B_{mod} 세포주를 1×10^6 cells/mouse로 누드마우스의 피하에 0.1 ml 주입한 후, 2주, 4주, 10 주후에 생검한 조직에서는 피하 조직에 종양 세포가 mass를 형성하고 있었다. 종양 세포는 대체로 분화가 좋은 편평 세포 암종 양상 이었다 (그림 6).

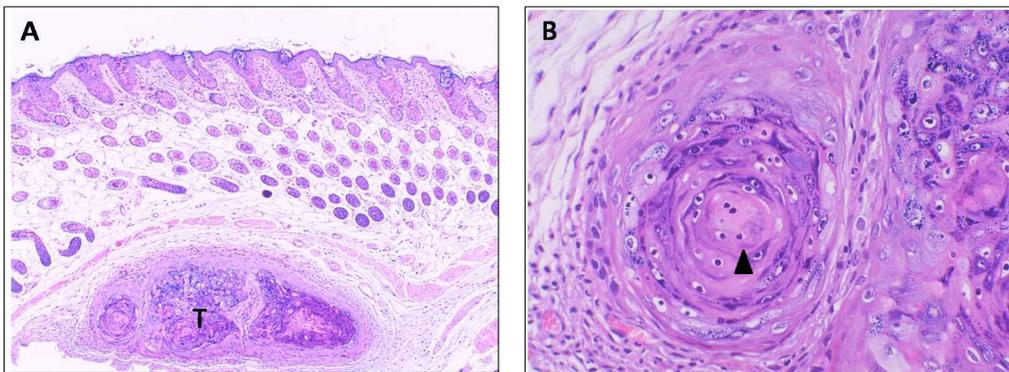


그림 6. YD-10B_{mod} 세포주 (1×10^6 cells/mouse, 2 주)에 의한 종양의 조직병리학적 소견. **A.** YD-10B_{mod} 세포를 1×10^6 cells/mouse의 농도로 누드마우스의 피하에 0.1 ml 주입하고 2 주 후 관찰하였을 때, 주변 조직과의 경계에 섬유성 피막을 형성하며 팽창성 성장을 하고 있는 종양 (T)의 형성이 관찰되었다. **B.** 종양은 keratin pearl (arrowhead)을 형성하고 있어 분화가 좋았다. (H-E 염색, A: x40, B: x200)

2) 1×10^7 cells/mouse 처리군

YD-10B_{mod} 세포주를 1×10^7 cells/mouse로 누드마우스의 피하에 0.1 ml 주입한 후, 2 주, 4 주, 6 주, 8 주, 10 주째에 생검한 조직 모두에서 피하 조직에 편평 세포 암 종이가 관찰되었다. 종양 세포는 대체로 팽창성 성장을 하고 있었으며, 일부에서는 주변 결합 조직으로 침윤성 성장 양상을 보였다(그림 7). 6 주, 8 주 후에 생검한 조직에서는 주변 지방 조직으로 광범위한 침윤성 성장 양상을 보였으며, 종양의 중앙부위에 괴사 양상을 보였다 (그림 8).

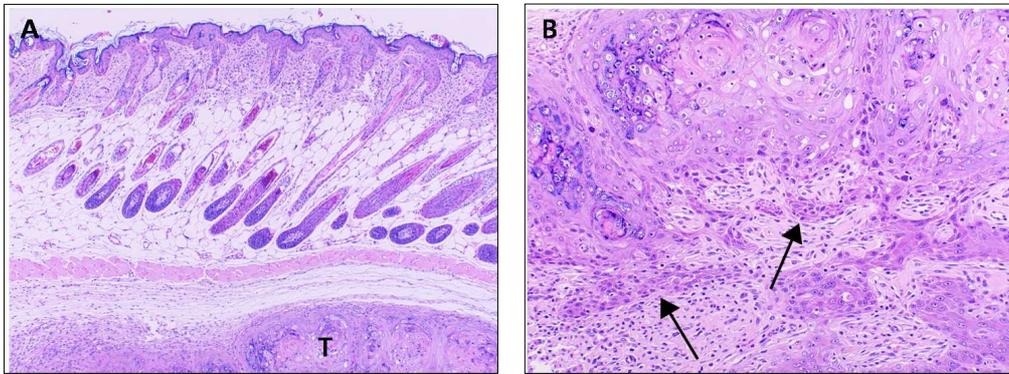


그림 7. YD-10B_{mod} 세포주 (1×10^7 , 2 주)에 의한 종양의 조직병리학적 소견. **A.** YD-10B_{mod} 세포를 1×10^7 cells/mouse로 누드마우스의 피하에 0.1 ml 주입하고 2 주 후 관찰 하였을 때, 피하에 팽창성 성장을 하고 있는 종양 (T)의 형성이 관찰되었다. **B.** 종양은 주변 결합조직으로 침윤성 성장 (arrow)을 하고 있었다. (H-E 염색, A: x40, B: x200)

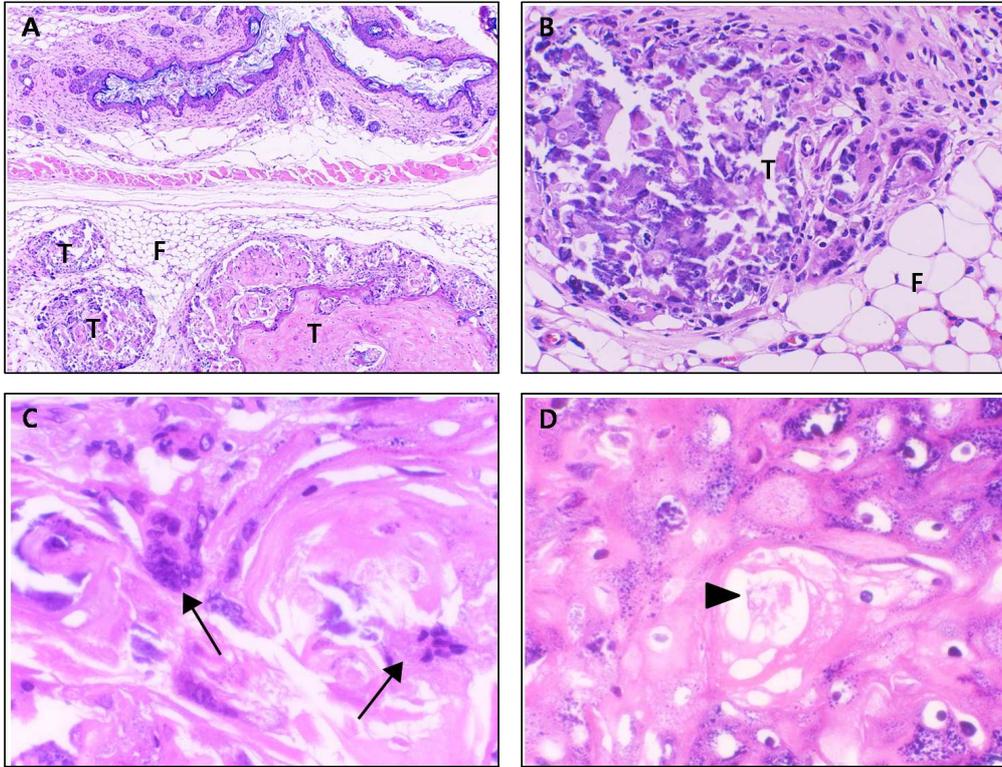


그림 8. YD-10B_{mod} 세포주 (1×10^7 cells/mouse, 6 주)에 의한 종양의 조직병리학적 소견. **A.** YD-10B_{mod} 세포를 1×10^7 cells/mouse의 농도로 누드마우스의 피하에 0.1 ml 주입하고 6 주 후 관찰하였을 때, 주변 지방 조직 내에 종양 (T)이 산재되어 있었다. **B.** 종양 (T)은 주변 지방조직 (F) 사이로 침윤성 성장을 보이고 있었다. **C.** 종양의 일부분에선 haphazard 형태의 거대 종양 세포 (arrow)가 관찰되었다. **D.** 종양의 중심 부위에선 괴사 (arrowhead)가 관찰되었다. (H-E 염색, A: x40, B: x200, C, D: x400)

3) 2×10^7 cells/mouse 처리군

YD-10B_{mod} 세포주를 2×10^7 cells/mouse로 누드마우스의 피하에 0.1 ml 주입한 후, 2 주, 4 주, 6 주, 8 주, 10 주째에 생검한 조직 모두에서 피하 조직에 편평 세포 암종이 관찰되었다. 종양 세포는 팽창성 성장 및 침윤성 성장을 보이고 있으며 (그림 9), 6 주 후에는 주변 결합조직으로의 침윤 양상이 관찰되었다.

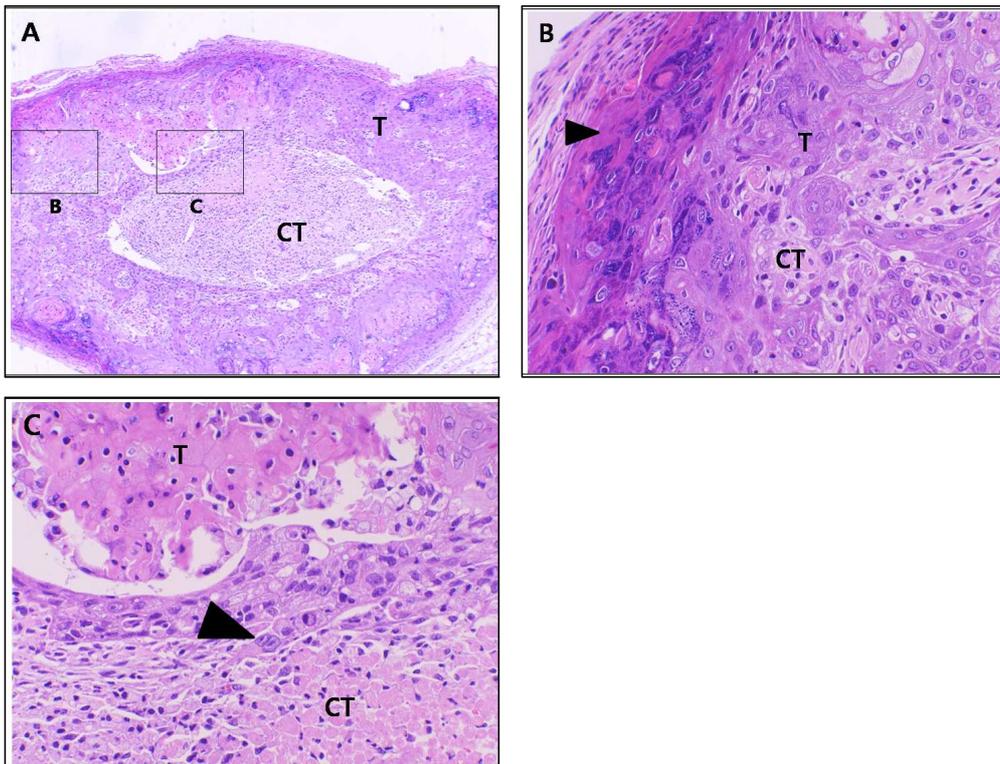


그림 9. YD-10B_{mod} 세포주 (2×10^7 cells/mouse, 2 주)에 의한 종양의 조직병리학적 소견. **A.** YD-10B_{mod} 세포주를 2×10^7 cells/mouse로 누드마우스의 피하에 0.1 ml 주입하고 2 주 후 관찰하였을 때, 피하 조직 내에 침윤 및 팽창성 성장을 보이는 종양 (T)이 관찰되었다. **B.** 종양의 일부에선 keratin으로의 분화를 보이는 부위가 관찰되었고 (arrowhead), 주변 결합조직 (CT)으로 침윤성 성장을 보이고 있었다. **C.** 결합조직으로 침윤하는 최전방의 종양세포들은 세포의 이형성이 심하였다 (arrowhead). (H-E 염색, A: x40, B, C: x200)

IV. 총괄 및 고찰

구강암 발현 빈도는 전체 암 발현 빈도에 비해서 낮은 편에 속하나 점점 그 빈도가 증가하는 추세에 있으며, 조기진단에 의한 외과적 수술, 방사선 치료, 항암화학요법을 포함한 다양한 치료법에도 불구하고 높은 악성도와 재발성향으로 만족스러운 결과를 얻기가 어려운 실정이다.

이러한 구강암 치료에 있어서 종양의 원인규명이나 치료의 효과를 알아내기 위한 여러 연구 중에 누드마우스에 배양된 구강암 세포주를 이식하는 것은 매우 효과적인 동물모델임에 분명하다 (Dinesman, 1990, Jeffrey, 2002). 즉 확립된 구강암 세포주를 가지고 그것을 이용하여 계속 반복적인 결과를 얻을 수 있다면 많은 구강암 연구에서 이용할 수 있는 적합한 동물 모델일 수 있다.

Human Tongue 기원의 편평 세포 암에서 확립된 YD-10B 세포주는 이미 누드마우스의 피하에 접종, 이종이식 종양 유도 실험이 보고된 바 있다. 김의 연구에 의하면 YD-10B 세포 주를 이용하여 누드마우스에 피하 이식하였을 경우 2/5의 확률로 종양 형성 실험의 결과가 부분적이었고 (김, 2005), 이 등의 연구에 의하면 많은 세포주 들 중 누드마우스의 피하이식에서 종양 형성을 보인 경우는 YD-10B 세포주 뿐 이었으며, 5/5의 확률로 종양이 형성되었고, 원래 인체 암종과 유사한 조직학적 소견을 보였으나, 경계가 명확한 섬유성 피막에 둘러 싸여 침윤성 성장을 보이지는 않았다고 보고하였다 (Lee, 2005). 이에 저자는 YD-10B 세포주를 이용, 이를 주위 조직으로의 침윤성이 높은 세포주의 필요성을 가지게 되었다. 따라서 변형시킨 YD-10B_{mod}를 제작하여 본 실험에 이용하였으며 변형시킨 YD-10B_{mod} 세포주는 기존의 세포주에 비해 Transwell[®] invasion assay 상에서 2.3-3.2배 높은 invasion 활성을 나타내었고, crystal violet으로 세포를 직접 염색하여 확인한 결과에서도 비슷한 정도의 차이가 확인되었다. 또한 암세포 침윤에 주된 역할을 하는 단백질 분해 효소인 MMP-9 (matrix metalloprotenase 9)의 활성이 약 2배 정도 높은 것으로 확인이 되었다. 그래서 본 연구에서 종양의 높은 형성 능력뿐만 아니라 주변 주위 조직으로의 침윤성을 보이는 생체 내 종양 형성모

델을 개발 할 수 있었으며, 향후에는 변형시킨 YD-10B_{mod} 세포주를 이용하여 누드마우스 종양 이식 시 임파절 전이 및 원격전이에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 피하 이식 시 눈에 띄게 종양이 자라나는 것을 볼 수 없었기 때문에 종양의 크기를 측정하는 것은 불가능 하였다. 이는 대부분의 피하이식 종양 형성 시 섬유성 피막에 둘러싸인 형태로 팽창성 성장을 하는 경우에는 눈에 띄게 크기가 성장하지만 본 연구에서 형성된 종양은 주위조직으로 침윤성 성장을 하기 때문에 명확하게 자라는 종양의 크기를 보여주지는 못한 것으로 생각되었다. 즉 인체 내에서의 구강 편평 세포 암의 특성을 이종 이식된 종양에서도 조직학적으로 유사하게 보여주었으며, 또한 주위조직으로 침윤성 성장하는 양상도 비슷하게 보여주어 명확하게 크기가 자라지는 않았지만 구강암 연구 생체모델로서의 가치는 더 우수할 것으로 사료된다.

구강암 연구에서 누드마우스의 피하보다는 기원이 동일한 부위, 동소위에 이식한 종양이 형성도 잘 일어나며, 주위조직으로의 침윤양상이나 경부 임파절 전이양상, 원격전이등도 비슷하게 일어난다고 알려져 있다 (Myers, 2002, Hosinger, 2003). 또한 이러한 동소위 종양 모델의 가치는 임상상황을 재현하는 자발적 전이가 가능하고, 전이의 분자생물학적 기전을 연구할 수 있으며, 부가적으로 전이 병소로부터 암 세포 주를 재확립함으로써 전이성이 확립된 세포주를 만들 수 있다는 것이다 (Dinney, 1995, Bruns 1999, Lensch, 2002). 그러한 이유로 구강암 연구에서 동소위에 이식하는 것이 필수적이라고 한다. 그러나 동일부위에 이식하는 것은 기술적으로 어려운 부분이 발생할 수 있으며, 특히 구강암 세포주 주입 후 실험동물의 음식물 섭취가 현저히 감소하여 조기에 죽는 경우도 발생하여 관찰기간이 한정적일 수 있다. 그래서 항암제나 방사선치료의 결과를 연구하는 경우에는 실험동물에서 접근하기 쉬운 부위의 피하에 이식하는 방법이 많이 사용된다 (Boeheim, 1986, Huang, 2000등).

항암제는 현재 악성 종양의 치료에 광범위하게 쓰여 지고 있다. 대부분의 항암제는 설치류를 매개로 실험하여 개발되었지만 많은 다른 종류의 인체 악성 종양에 대한 감수성을 알기에는 이 설치류를 이용한 모델은 역부족이었다. 박테리아에 대한 연구가 발달하면서 생체 외 실험은 급진전 되었지만 생체 내 실험은 적당한 모델이 없었는데 누드마우스는 이러한 분야에서 획기적인 발전을 제공하였으며 각각의 인체 종양의 치료에 쓰일 수 있는 항암제의 적절한 선택에 중요한 실험 모델이 되었다. 이는 누드마우스에 이식된 종양들이 일정하고 예측 가능한 성장속도를 보이며, 종양 성장을 쉽게 측정할 수 있으며, 이식된 종양에서 인체의 특성이 그대로 유지되기 때문이다. 그래서 대부분의 항암제 연구에서 종양 이식은 누드마우스의 피하조직에 이식하는데 이는 이식방법이 쉽고, 치료에 반응하여 종양 성장을 확인하기 쉽고 여러 연구에서 이러한 피하이식 방법에 의한 연구가 항암제 선택에 유용하다고 알려져 있다. 따라서 동일부위에 이종 이식하는 동물모델 뿐만 아니라 피하에 이종 이식하여 종양을 발생 시킬 수 있는 동물모델 또한 구강암의 연구에 꼭 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서 1×10^6 cells/mouse 세포수의 변형된 YD-10B_{mod} 편평 세포암 세포주 주입 시 2주, 4주, 10주째에서는 구강암 형성을 관찰할 수 있었고, 또한 관찰된 구강암은 분화가 좋은 편평 세포 암 종이었으며, 주위조직과의 경계에 섬유성 피막을 형성하여 팽창성 성장을 하고 있었다. 그러나 6주, 8주째에는 구강암 형성을 관찰할 수 없었다. 이는 실험과정에서의 오류일 가능성이라고 생각된다. 또한 본 연구에 따르면 적은 수의 세포주를 주입한 경우 초기에만 종양의 형성을 관찰할 수 있었으며 적정 수준의 세포 수 (1×10^7 cells/mouse) 이상에서는 모든 기간에서 종양 형성이 관찰 되었고 주위 조직으로의 침윤양상까지 보여 주는 것으로 보아 상당한 의미가 있는 것으로 보인다. 또한 적정 세포 수 이상에서는 꾸준히 10주까지 유지되며 성장하는 것으로 보아 항암제의 연구에 있어 적절한 동물 모델이 될 것으로 생각된다.

V. 결 론

변형시킨 YD-10B_{mod} 구강암 세포주를 누드마우스의 피하에 이식한 후 구강암의 안정적인 형성과 성장이 관찰되었다. 특히 적정 세포 수 (1×10^7 cells/mouse) 이상의 주입은 피하이식에서도 주위조직으로의 침윤을 보일 정도로 주목할 만한 종양발생이 가능하였다.

이상의 결과로 누드마우스에서 YD-10B_{mod} 세포주의 피하부위 이종이식은 높은 종양 형성능력을 가지며, 생성된 종양은 인체 내 종양 형성과 유사한 조직학적 특징과 주위조직으로의 침윤성 성장 양상을 보이기 때문에 구강암 연구에 적합한 동물 실험 모델로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

참고 문헌

Boeheim K., Teicher B., Ervin T. J., Shklar G. : The effect of chemotherapeutic agents on human oral squamous cell carcinoma transplanted to nude mice: a histologic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 62(1): 50-56, 1986.

Bruns C. J., Garbison M. T., Kuniyasu H., Eue I., Fidler I. J. : In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice. *Neoplasia* 1:50-62, 1999.

Carew J. F., Singh B., Shah J. P. : Factors affecting choice of treatment. In *Oral Cancer*. Shah J.P., Johnson N.W., Batsaki J.G.(eds)., 2003, pp.209-213, Martin Dunitz, London.

Dinesman A., Haughey B., Gates G. A., Aufdemorte T., Von Hoff D. D. : Development of a new in vivo model for head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 103: 766-774, 1990

Dinney C. P., Fishbeck R., Singh R. K., Eve B., Pathak S., Brown N. : Isolation and characterization of metastatic variants from human transitional cell carcinoma passaged by orthotopic implantation in athymic nude mice. *J Urol.* 154: 1532-1538, 1995.

Eun Ju Lee, Jin Kim, Seoung Ae Lee, Eun Jung Kim, Yong Chan Chun, Mi Heon Ryu, and Jong In Yook : Characterization of newly established oral cancer cell lines derived from six squamous cell carcinoma and two mucoepidermoid carcinoma cells. *Experimental and molecular Medicine*. 37(5): 379–390, 2005.

Fidler I. J. : Rationale and methods for the use of nude mice to study the biology and therapy of human cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 5: 29–49, 1986

Fitch K. A., Somers, K. D., Schechter, G. L. : The development of a Head and Neck tumor model in the nude mouse. *Head and Neck Oncology Research*. 1988, pp 187–190. Amsterdam; Kugler Publications.

Fu X. Y., Theodorescu D, Kerbel R. S., Hoffman R. M. : Extensive multi organ metastasis following orthotopic onplantation of histologically intact human bladder carcinoma tissue in nude mice. *Int J Cancer*. 49: 938, 1991

Giovanella B.C., Stehiin J. S. : Heterotransplantation of human malignant tumors in nude thymusless mice 1. Breathing and maintenance of nude mice. *J Natl Cancer Inst*. 51: 615–619, 1973

Giovanella B. C., Stehiin J. S., Williams L. J. : Heterotransplantation of human malignant tumors in nude thymusless mice. II. Malignant tumors induced by injection of cell cultures derived from human solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 52: 921–930, 1974

Hendrickson E. A. : The SCID mouse : relevance as an animal model system for studying human disease. *Am J Pathol* 143: 1511, 1993

Huang J, Liang Z. O., Wu T. T., Hoque A, Chen H, Jiang Y, Zhang H, Xu X. C. : Tumor suppressive effect of retinoid-induced gene-1(RRIG 1) in esophageal cancer. *Cancer Res.* 15; 67(4): 1589-93, 2007

Huang S. M., Harari P. M. : Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas : inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res.* 6(6): 2166-74, 2000

Huang S. M., Li J, Armstrong E. A., Harari P. M. : Modulation of radiation response and tumor-induced angiogenesis after epidermal growth factor receptor inhibition by ZD1839(Iressa). *Cancer Res* 1: 62(15): 4300-6, 2002

Hoffman, R. M. : Orthotopic is orthodox : why are orthotopic-transplant metastatic models different from all other models? *J. Cell. Biochem.*, 56: 1-3, 1994

Holsinger F. C., Doan D. .D, Jasser S. A., Swan E. A., Greenberg J. S., Schiff B. A. : Epidermal growth factor receptor blockade potentiates apoptosis mediated by paclitaxel and leads to prolonged survival in an murine model of oral cancer. *Clin Cancer Res.* 9: 3183-3189, 2003.

Hawkins B. L., Heniford B. W., Ackermann D. M., Leonberger M, Martinez S. A., Hendler F. J. : 4NQO carcinogenesis : A mouse model of oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck* 16: 424–432, 1994

Johnson N. W., : Global epidemiology in oral cancer. Shah J.P., Johnson N.W., Batsaki J.G.(eds), 2003, pp.10–20, Martin Dunitz, London.

Jeffrey N., Myers J. N., Holsinger F. C., Samar A, Jasser S. A., Bekele B. N., Fidler I. J. : An orthotopic nude mouse model of oral tongue squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 8(1): 293–8, 2002

Kubota T. : Metastatic models of human cancer xenografted in mice: the importance of orthotopic transplantation. *J Cell Biochem* 56: 4, 1994

Khazaie K., Schirmacher V., Lichtner R. B. : EGF receptor in neoplasia and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 12: 255, 1993

Khanna C., Hunter K. : Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis* 26(3): 513–523, 2005

Killion J. J., Radinsky R., and Fidler I. J., : Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer metastasis Rev.*, 17: 279–284, 1998

Kim S., Prak Y. W., Schiff B. A., Doan D. D., Yazici Y., Jasser S. A., et al : An Orthotopic model of anaplastic thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res.* 11: 1713–1721, 2005

Lensch R., Gotz C., Andres C., Bex A., Lehmann J., Zwergel T. : Comprehensive genotype analysis of human prostate cancer cell lines and sublines derived from metastases after orthotopic implantation in nude mice. *Int J Oncol.* 21: 695–706, 2002.

McDermott–Lancaster R. D., Ito T., Kohaka K., Colston M. J. : The nude mouse characteristics, breeding and husbandary. *Int J Leprosy* 55: 885–888, 1987

Myers J. N., Holsinger F. C., Jasser S. A., Bekele B. N., Fidler I. J. : An orthotopic nude mouse model of oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 8: 293–298, 2002.

Odukoya O., Shklar G. : Two–phase carcinogenesis in hamster buccal pouch. *Oral Surg* 54: 547–552, 1982

Odukoya O. : Initiation and promotion in experimental oral carcinogenesis. *Oral Surg* 58: 315–320, 1984

Park Y. W., Younes M. N., Jasser S. A., Yigitbasi O. G., Zhou G., Bucana C. D., Bekele B. N., Myers J. N. : AEE788, a dual tyrosine kinase receptor inhibitor, induces endothelial cell apoptosis in human cutaneous squamous cell carcinoma xenografted in nude mice. *Clin Cancer Res.* 1; 11(5): 1963–73, 2005

Rygaard J., Povlsen C. O., : Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 77(4): 758–760, 1969

Santis H., Shklar G., Chauncey H. H. : Histochemistry of experimental induced leukoplakia and carcinoma of the hamster buccal pouch. *Oral Surg.* 17: 207–218, 1964

Scheper M. A., Nikitakis N. G., Chaisuparat R., Montaner S., Sauk J. J. : Sulindac induces apoptosis and inhibits tumor growth in vivo in head and neck Squamous cell carcinoma. *Neoplasia* 9(3): 192–9, 2007

Shin K., Gimenez I. B., Lee J. S., Nishioka K., Wargovich M. J., Thacher S., Lotan R., Slaga T. J., Hong W. K. : Expression of epidermal growth factor receptor, polyamine levels, ornithine decarboxylase activity, micronuclei, and transglutaminase 1 in a 7, 12–dimethylbenzanthracene–induced hamster buccal pouch carcinogenesis model. *Cancer Res* 50: 2505–2510, 1990

Takashi S., Masahiro Umeda, Hideki Komatsubara, et al : Lymph node and pulmonary metastasis after transplantation of oral squamous cell carcinoma cell line (HSC–3) into the subcutaneous tissue of nude mouse : detection of metastases by genetic methods using β -globin and mutant p53 genes. *Oral Surg Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 105 : 486–90, 2008

Umeda M., Komatsubara H., Nishimatsu N., Oku N., Shibuya Y., Yokoo S., et al : Establishment and characterization of a human adenoid cystic carcinoma line of the salivary gland which is serially transplantable and spontaneously metastasizes to the lung in nude mice. *Oral Oncol.* 38: 30–34, 2002

Wong D. T. W., Biswas D. K. : Expression of c-erbB proto-oncogene during dimethylbenzanthracene induced tumorigenesis in hamster cheek pouch. *Oncogene* 1: 67-72, 1987

Zhang Z., Mitra R. S., Henson B. S., Datta N. S., McCanley L. K., Kumar P., Lee J. S., Carey T. E., D'silva N. J. : Rap1GAP inhibits tumor growth in oropharyngeal Squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 168(2): 585-96, 2006

김 문기 : 누드마우스에서 Snail 발현을 이용한 이종이식 종양의 침윤성 성장 유도. 박사학위 논문, 연세대학교 대학원, 서울, 2005.

ABSTRACT

An atopic nude mouse model of Tongue carcinoma

JONG HYUN KIM

Department of Dental Science, Graduate School, Yonsei University

(Directed by Prof. INHO CHA, D.D.S, Ph, D.)

In order to make successful oral cancer treatment, we need to understand about tumor biology and effective chemotherapeutic agents. To achieve these studies, it is necessary to develop a proper *in-vivo* model. Therefore the author will make try to develop more improved animal model of more applicable in various method of cancer study.

In this study, the author induced *in-vivo* tumorigenesis in nude mice by YD-10B_{mod} cell line used by YD-10B cell line originated from oral tongue squamous cell carcinoma and observed tumor formations and invasiveness of surrounding tissue, and found some results as follows :

1. The experimental group (YD-10B_{mod}, subcutaneous injection) produced tumors 13 out of 15 mice, while the control group produced none of 5 mice.

2. The inoculation of 1×10^6 cells/mouse produced tumors 3 out of 5 mice and inoculation of 1×10^7 cells/mouse, 2×10^7 cells/mouse produced tumors in every 5 mice.

3. In the histopathologic studies, the inoculation of 1×10^6 cells/mouse group showed the characteristic features of well-differentiated squamous cell carcinoma and demarcated expansile growth, while the inoculation of 1×10^7 cells/mouse, 2×10^7 cells/mouse group showed the expansile growth with partial central necrosis and invasive growth to surrounding fat & connective tissue.

These findings suggest that atopic xenograft of YD-10B_{mod} cell line in nude mice has a improved productivity of tumors, produced tumors showed the characteristics feature of human tumor and invasive growth to surrounding tissue in histopathologic appearance. These atopic nude mouse model of tongue carcinoma might assist in studying oral cancer biology and effective choice of chemotherapeutic agents.

Key words : Oral cancer, Tongue cancer, Squamous cell carcinoma, Atopic nude mouse model, Cell line