삼차원 배양법을 이용한 구강 암종 세포주의 특성 규명

연세대학교 대학원

치 의 학 과

허 정

삼차원 배양법을 이용한 구강암종 세포주의 특성 규명

지도 육 종 인 조교수

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2001년 6월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

허 정

허 정의 박사학위 논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2001년 6월 일

감사의 글

메마른 대지를 적시는 한줄기 비와도 같은 사람이 되고 싶었습니다. 거칠고 먼지날리는 들녘, 어스름이 내리는 저녁, 놀에 붉게 물들어 혹시 내일 비를 내려주지 않을까 기대케하는 서편에 걸린 구름이 되고 싶었습니다. 그러나 어느 날 시류에 흘러가는 내 모습을 보게 되었습니다. 그래서 대학원을 시작하였지만 세월과 함께 무디고 나태해져 가는 제 모습만 확인하게 되었습니다.

학부를 졸업한지 어느덧 17년이란 세월이 흐르고, 석사과정을 마친지도 7년이란 세월이 흘렀습니다. 시간의 흐름과 함께 모든 것이 참 많이도 변했습니다. 뒤늦게 시작한 공부에 어려움도 많았습니다. 박사과정 내내 항상 곁에서 이끌어 주시고 조언해주시고 논문 나오기까지 많은 수고 아끼지 않으셨던 지도교수 육종인 교수님께 깊이 감사드립니다. 또한 항상 옆에서 채찍질해주시며 흐트러진 마음을 다잡아 주셨던 김진 교수님께도 감사드립니다. 논문이 완성되기까지 무척 애를 써 주셨던 윤정훈 선생님, 바쁜 와중에도 조언을 마다 않으신 박광균 교수님, 양우익 교수님께도 깊이 감사드립니다.

아울러 실험실에서 애써 주시던 구강병리학 교실의 이승애 선생님과 의국원 여러분, 슬라이드 제작에 도움 주셨던 홍준철 선생님, 논문 번역을 도와주신 오유나 선생님께도 감사의 마음 전하고 싶습니다. 그리고 논문이 나오기 까지 갖은 고생을 다한 이은하 선생님, 논문 때문에 많이 자리를 비웠던 병원에서 저 없는 자리를 잘 지켜 주었던 우리 병원 식구들 모두에게도 감사드립니다.

늘 곁에서 격려해주고 따뜻한 사랑으로 지켜봐 주던 아내와 두 아이들에게 이 논문을 바치고 싶습니다.

2001년 6월

허 정

목 차

그림 및 표 차례

국문요약

삼차원 배양법을 이용한 구강 암종 세포주의 특성 규명

평면상에서 세포를 배양하는 일반적인 세포 배양법은 상피 하방의 결체 조직이 없으므로 결여에 의해 상피 세포-결체조직간의 상호작용이 없어 원래의 in vivo조직과는 다른 형태학적, 생화학적, 기능적 특성을 갖게된다. 또한 단층 배양시 배지 아래에서 성장함에 따라 생체와 같은 대기 접촉이 소실되어 상피세포나 암종 세포의 분화가 유도되지 않는다.

결체조직과 상피 세포간의 상호 작용은 세포의 성장 및 분화에 중요한 요소로 작용한다. 포유 동물의 발생 과정뿐만 아니라 성인 조직이 정상 기능을 수행하는데 있어서도 상피와 결체조직간의 상호작용의 중요성은 이미 널리 알려져 왔으며, 특히 암 발생과 전이 과정에서도 핵심적인 역할을 수행한다. 그러나 이러한 상피-결체조직 상호간의 조절과정을 실험실에서 재현할 수 있는 연구 모델은 많지 않다.

이에 본 연구에서는 제 1 형 교원질과 섬유모세포로 구성된 진피 유사체와 함께 air-liquid interface 환경을 제공하는 organotypic raft culture를 시행하여 생체와 보다 유사한 조건으로 구강 암종 세포주를 삼차원으로 배양하고 이와같이 배양된 종양을 일반 H-E염색과 면역조직화학염색을 통하여 구강 암 조직과 비교 분석함으로써 생물학적 특성을 평가하고자 하였다. 또한 구강 암종 세포의 삼차원 배양에 미치는 섬유모세포의 영향을 알아보기 위해 하부 결체조직에 섬유모세포를 포함시킨 것과 포함시키지 않은 조건에서 배양을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 진피 유사체 상에서 삼차원 배양된 구강 암종 세포는 중층화, 핵의 과염색상, 다형성, 비정상적인 세포 분열를 관찰할 수 있어 생검된 조직과 유사한 형태학적 특징을 가졌다.

2. 대부분의 구강 암종 세포는 결체 조직내로의 침윤성 성장이 관찰되었고, 백서 진피에서 유래하여 불멸화된 swiss3T3를 진피유사체로 사용한 경우와 일차 배양된 구강 점막 섬유모세포로 사용한 경우간의 뚜렷한 차이는 없었다. 그러나 진피 유사체에 섬유모세포가 포함되지 않았을 때에는 암종 세포의 침윤이 관찰되지 않았다.

3. YD-15, -15M, -17, -17M에서는 표층에 각화 세포로 분화가 일어났으며, involucrin 염색에서도 양성으로 반응하여 삼차원 배양조건이 종양 세포의 분화를 유도함을 알 수 있었다.

4. Cytokeratin(CK) 13과 AE1/AE3에는 생검조직과 삼차원 재건된 조직에서 모두 발현하여 종양세포가 상피 기원의 성격을 유지함을 확인할 수 있었다. CK8/18/19는 점액표피양암종으로 진단된 생검조직의 점액세포에서만 약하게 발현하였으나 그외의 생검예와 삼차원 배양된 조직에서는 모두 음성이었다.

이상의 결과로 제 1 형 교원질과 섬유모세포로 구성된 진피 유사체상에서 종양세포를 air-liquid 접촉면에서 삼차원 배양하였을 때 생검조직과 유사한 특성을 보여 삼차원적 배양 모델이 기존의 평면 단층 배양에 비해 보다 생체와 유사한 미세환경을 제공함을 보여주었다. 향후 이러한 연구 모델은 종양 세포의 침윤성 성장이나 상피-결체 상호작용, 암 치료제 개발 등에 응용될 수 있을 것으로 생각하며, 이를 위한 체계적이고 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

핵심되는말 : 구강암종세포주, 삼차원 배양.

삼차원 세포배양법을 통한 구강암종 세포주의 특성 규명

연세대학교 대학원 치의학과

(지도 육종인 조교수)

허 정

제 1 장 서 론

지금까지 병리학적 연구는 주로 파라핀에 포매된 생검 조직을 이용해 왔다. 그러나 이러한 방법은 조직의 양이 제한되고 전향적인 연구를 할 수 없다는 단점이 있다. 따라서 최근에는 세포 배양법이 많이 이용되고 있는바, 세포주를 이용한 연구는 세포를 충분히 얻을 수 있고, 같은 실험을 반복할 수 있으며, 살아있는 상태에서의 세포내 대사작용을 연구할 수 있을 뿐만 아니라, 체내에서 불가능한 여러가지 조작이 가능하다는 장점이 있다 (Freshney, 1994). 그러나 이와 같은 종래의 방법을 이용할 경우 많은 양의 상피 세포를 얻을 수는 있지만 미분화 상피 세포의 과성장과 적절한 상피-상피, 상피-결체 조직간의 조절 기능 부족으로 인해 (Levine and Stockdale 1985, Boyce and Hansbrough 1988, Shahabeddin et al. 1990) 원래의 in vivo 조직과는 다른 형태학적, 생화학적, 기능적 특성을 갖게된다. 또한 특정 생화학적 물질의 투여나 생리적인 조건의 변화를 통해 증식이나 분화를 유도할 수는 있지

만 생체 내에서와 같이 증식과 분화가 동시에 진행되는 입체적인 구성을 이룰 수는 없다 (Prunieras 1979). 특히 확립된 종양 세포주는 종래 배양 방법으로는 상피 세포 분화 표지자인 involucrin의 발현이 전혀 없어 단층배양법으로는 분화와 연관된 연구를 하는데 한계가 있다. 이러한 종래의 상피세포 배양 방법의 한계점은 크게 세가지 이유에 의해 기인된다. 첫째, 배양 세포 주변 결체 조직의 결여에 의해 배양 세포-결체 조직 간의 상호작용이 없고 (Limat et al. 1994), 둘째, 기저막의 소실로 인해 배양세포-결체 조직 상호 작용이 소실됨으로써 생체와 유사한 극성을 가질 수 없으며 (Sabatini et al. 1983), 마지막으로 단층 배양시 배지 아래에서 성장함에따라 생체와 같은 대기 접촉이 소실되어 배양 세포의 분화가 유도되지 않는다.

생체 내에서의 세포는 주변 기질 세포나 세포외 기질과의 반응과 상호 작용을 통하여 증식과 분화를 조절한다. 포유 동물의 발생 과정 뿐만 아니라 성인 조직이 정상 기능을 수행하는데 있어서도 상피와 결체 조직간의 상호 작용 (epithelial-mesenchymal interaction)의 중요성은 이미 널리 알려져 왔으나 이러한 개념이 세포 배양에 적극적으로 도입되지는 않았다 (Peault 1995, Limat et al. 1995). 최근 배양 접시 바닥에 laminin, type IV collagen등의 세포외 기질을 도포하는 방법이 소개되기도 했으나 상피 세포의 부착과 증식에는 도움이 되지만 분화의 유도나 중층 형성(stratification)은 이루어지지 않았다 (Sutherland 1988, Toillier et al. 1990).

일차 배양된 세포를 이용하여 실험실에서 생체와 유사한 조직을 형성하기 위한 지속적인 노력으로 생체와 유사한 실험적 조건 즉 air-liquid interface에서 삼차원적으로 재현된 실험실 모델이 연구되고 있다 (차 et al. 1997). 정상 상피의 경우 결체 조직 부위를 재생하기 위하여 기증된 사체에서 만들어진 de-epithelialized dead epidermis가 이용(Boyce and Hansbrough 1998)되기도 하였으나, 이는 재료가 제한되고 일관된 실험 결과를 얻기 어렵다는 점 때문에 최근에는 제1형 교원질을 이용한 연구 모델의 개발이 활발히 이루어지고 있다 (Hoffman 1991, Robbins et al.

1991, Robbins et al. 1994,).

따라서 본 연구는 제 1형 교원질, 섬유모세포를 이용한 결체 조직으로 구성된 진피 유사체와 air-liquid interface**를 유지할 수 있는 배양조건을 제공하는** organotypic raft culture**를 이용하여 구강 세포주의 삼차원 재생방법을 확립하고 이러한 조건에서 배양된 암종 세포주의 특성을 광학 현미경으로 관찰하고, 분화 및 증식 표지자에 대한 면역조직화학 염색 결과를 암종 세포주가 기원된 구강 암종 조직과 비교 분석함으로써 본 연구 모델이 생체와 유사한 성장 환경을 제공할 수 있는지 검증하고자 하였다.**

제 2 장 연구 재료 및 방법

2.1. 구강 암종 세포주 확립과 배양

사용된 세포주는 연세대학교 치과대학 구강병리학 교실에서 확립한 8종의 구강 암종 세포주를 이용하였으며, 이들 세포주가 유래한 환자의 임상 및 병리학적 특징은 Table 1과 같다. 배지는 DMEM과 F12가 3:1 비율로 혼합되고 100 IU/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin, 0.6 mg/ml L-glutamine과 함께 10% FBS가 포함된 배지를 이용하였고 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 각 세포주가 기원한 환자의 생검 조직은 10% 포르말린에 고정하여 파라핀에 포매하고 통법에 따라 제작된 Hematoxylin-Eosin(H-E) 슬라이드를 현미경으로 검색하여 세포의 분화도, 다형성(pleomorphism), 비정형적 세포분열, 괴사등을 관찰하였다.

Table 1. Clinico-pathologic characteristics of established cancer cell lines

Cell Line	Age/Sex	Primary Site	Pathologic Diagnosis
YD-8	46/F	tongue	SCC, MD
YD-9	56/M	buccal cheek	SCC, MD
YD-10B	67/M	tongue	SCC, MD
YD-15	39/M	tongue	MEC, HG
YD-15M		lymph node	Metastatic
YD-17	66/M	mandible	SCC, PD
YD-17M		lymph node	metastatic
YD-38	67/F	mandible	SCC, MD

SCC: Squamous cell carcinoma MEC: Mucoepidermoid carcinoma
MD: Moderately differentiated PD: Poorly differentiated
UD: Undifferentiated

2.2. 삼차원 배양을 위한 진피 유사체(dermal equivalent)의 제조

진피 유사체 (dermal equivalent) 제조를 위해 사용되는 섬유모세포는 불멸화된 Swiss 3T3, 또는 일차 배양된 구강 점막 섬유모세포를 사용하였다. Swiss 3T3는 DMEM과 F12가 3:1로 혼합되고 10% fetal bovine serum (FBS)이 포함된 배지를 이용하였다.

제 1형 교원질 (pH 3.0, Nitta Gelatin, Japan)을 이용하여 이를 중화 완충 용액 (2.2% $NaHCO_3$, 0.05N NaOH, and 200 mmol/L HEPES)과 10배의 DMEM/F12 농축 배지를 8:1:1의 비율로 혼합하고, 진피 세포로는 swiss 3T3 섬유모세포 혹은 구강 점막하 섬유모세포를 이용하였다. 구강 점막 섬유모세포는 제 3 대구치 발치시 얻어진 정상 치은 조직의 외식 배양(explant culture)에서 얻어진 것을 계대 배양하여 4-5 passage가 된 것을 사용하였다. 섬유모세포는 제 1 형 교원질에 1.2 x 10^5/ml의 농도가 되도록 혼합하여 gel matrix에 섬유모세포가 균일하게 분포하게 하여 반지름 12 mm의 0.2 um pore size membrane으로 제작된 millicell에 casting 한후 37°C 배양기에서 12시간 이상 중합과 수축이 일어나도록 하였다.

2.3. 구강 암종 세포주의 삼차원 배양

확립되어 계대 배양중인 두경부 암종 세포 YD-8, -9, 10B, -15, -15M, -17, -17M, -38을 PBS로 3회 세척 후 0.125% trypsin-EDTA를 처리하여 모은 후 원심분리하여 hemocytometer로 세포수를 측정하였다. 종양 세포는 6-well plate에 내부에 위치한 millicell의 각 well 당 3 x 10^5개의 세포가 되도록 분주하였고, 바깥쪽은 DMEM과 F12가 3:1 비율로 혼합되고 100 IU/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin, 0.6 mg/ml L-glutamine과 함께 10% FBS가 포함된 배지 3 ml를 넣어 주어 5% CO^2, 37°C 배양기에서 배양하였다. 배지는 2-3일 간격으로 교환하였고, 5일 후에는 종양 세포 상층부의 배지를 제거하여 종양 세포가 대기에 노출되도록

하여 2주간 추가 배양하였다.

2.4. 삼차원 배양된 구강 암종 조직의 현미경소견 분석

진피 유사체와 함께 배양된 암종 조직은 10% 중성 포르말린에 12시간 이상 고정하고 파라핀에 포매한 후 4 um의 연속 절편을 H-E, PAS 염색하여 광학 현미경에서 종양 세포의 분화도, 핵과 세포의 다형성 (pleomorphism), 비정형 세포분열, 각질 형성, 종양 세포의 진피 유사체로의 침윤성 성장등의 소견을 관찰하고 세포주가 기원한 병리 표본의 소견과 비교 검토함으로써 삼차원적 배양이 생체 조건과 유사한 배양 환경을 제공했는지를 판별하였다.

2.5. 삼차원 배양된 암종 조직의 면역조직화학 염색

파라핀에 포매된 조직으로부터 4 μm의 연속 절편을 얻어 xylene에서 3회 처리하여 파라핀을 제거하고 95%, 90%, 70% ethanol에서 단계적으로 함수하였다. 0.5% hydrogen peroxide에서 endogenous peroxidase를 제거한 후 정상 goat serum으로 30분간 처리하고 일차 항체를 3% BSA (bovine serum albumin)가 포함된 phosphate buffer saline (PBS)에 제조 회사의 지시대로 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. 상피골격단백에 대한 일차 항체로는 cytokeratin (CK) AE1/AE3 (Dako, Denmark), CK13(Dako), CK8/18/19(Dako), vimentin(Dako)을 이용하였고, 분화 표지자로서 involucrin(Santa Cruz, CA, USA)을, 증식 표지자로는 PCNA(Dako)를 이용하였다. 일차항체 반응후 Tris-buffer saline (TBS)에서 3번 세척하고 3% BSA에 희석한 5 μg/ml biotinylated anti-mouse/anti-rabbit IgG에 30분간 반응시키고 3회 TBS에서 세척하였다. 3 μg/ml horseradish peroxidase streptavidin에서 30분간 방치시키고 AEC와 hydrogen peroxide를 이용하여 발색 한 후 Mayer's hematoxylin

에서 대조 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다. 대조군으로 점막하층이 포함된 정상 점막 조직을 이용하였다.

제 3 장 연구결과

3.1. 삼차원 배양된 암종 조직의 형태학적 특징과 침윤성 성장

제 1 형 교원질과 섬유모세포로 구성된 진피 유사체상에서 배양된 두경부 암종 세포는 YD-9을 제외하고는 모두 4-10층의 중층화를 이루며 성장하였다. YD-9은 1-2층의 세포가 얇게 부착하여 중층화는 이루어지지 않았지만 결체 조직내로의 침윤이 관찰되었다 (Fig. 1).

삼차원으로 재구성된 종양 세포들은 핵의 과염색상과 다형성을 나타냈다. 중층화된 암종 세포는 기저층뿐만 아니라 상층부의 세포에서도 비정상적인 세포 분열이 관찰되어 이형성이 심한 백반증, 또는 초기의 침윤성 편평 세포 암종과 유사하였다. 생검된 환자의 조직은 대부분 중증도 이상의 분화를 보이는 편평세포암종이었고 각질의 형성이 분명하였으나, YD-8, -9, -10B는 삼차원 배양 암종 조직의 표면에서 각질의 형성을 관찰할 수 없었다. 그러나 점액 표피양 암종에서 유래한 YD-15, -15M, -38은 전체적으로, 또는 국소적으로 표층의 각화를 관찰할 수 있었다 (Table 2).

Table 2. Histological findings of three-dimensionally cultured oral cancer cell lines

Cell Lines	Layers	Keartinization	Invasion
YD-8	4-5	-	+/-
YD-9	1-2	-	+
YD-10B	4-5	-	+
YD-15	5-6	+	+
YD-15M	8-10	+	+
YD-17	4-5	+/-	+/-
YD-17M	6-7	+/-	+/-
YD-38	5-8	-	+/-

+ : positive - : negative +/- : focal

3.2 구강 암종 세포의 삼차원 배양시 섬유모세포의 영향

삼차원 배양시 진피 유사체의 구성 성분인 섬유모세포를 일차 배양된 치은 섬유모세포를 사용했을 때와 백서에서 유래하여 불멸화된 Swiss 3T3로 삼차원 배양했을 때 종양 세포의 삼차원 조직 형성에 차이점은 발견할 수 없었고, 중층화와 침윤성 성장은 유사하였다. 진피 유사체에 섬유모세포를 포함시키지 않았을 때에도 종양 세포의 중층화가 일어났으나 진피 유사체 내로 종양 세포의 침윤성 성장은 전혀 보이지 않아 종양 세포의 침윤성 성장에 섬유모세포가 필수적임을 알 수 있었다 (Fig. 2).

3.3 삼차원 배양된 구강 암종 조직의 증식과 분화 표지자 발현 양상

구강 암종 세포주 중 H-E 소견상 중층화와 침윤성 성장이 가장 뚜렷하게 관찰되는 편평 세포 암종 세포주 YD-10B와 점액표피양 암종 YD-15M에 대해 증식 및 분화 표지자에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하여 환자로부터 생검된 조직과 삼

차원 배양된 조직의 표지자 발현을 비교하였다. CK13, AE1/AE3을 이용한 증층 편평 상피세포의 중간 세사(intermediate filament)에 대한 면역조직화학염색에서 생검된 조직과 삼차원 배양된 암종 조직에서 모두 발현되고 있어, 삼차원 배양조건이 암종 세포의 분화를 잘 유도함을 알 수 있었다. 타액선 점액 세포에 양성으로 발현하는 CK8/18/19는 생검 조직의 일부 점액 세포로의 분화를 보이는 부위에서만 양성으로 반응하였고 삼차원 배양된 암종 조직에서는 전혀 발현하지 않았다. 간질 세포의 중간 세사인 vimentin에 대한 염색에서 생검 조직과 삼차원 배양된 조직의 종양세포에서 발현되지 않았고 종양 세포 주변, 또는 하방의 섬유모세포에서만 발현하였다.

상피 세포의 각질 분화 표지자인 involucrin은 생검 조직 모두에서 각질 분화가 관찰되는 부위에서 발현하고 있었지만, 삼차원 배양된 종양 조직에서는 H-E 소견상 각질 세포의 분화가 관찰된 YD-15M에서 뚜렷한 표층의 발현을 관찰할 수 있었고, YD-17, -17M에서도 표층에서 미약하게 발현하였다.

증식 표지자로 사용한 PCNA (proliferating cell nuclear antigen)은 생검 조직과 삼차원 배양된 종양에서 모두 발현하였다 (Fig 3). 구강 암종 세포주를 삼차원 배양한 조직과 이 암종 세포주가 유래한 환자의 조직표본에 분화 및 증식 표지자에 대한 면역조직화학 염색 결과는 Table 3에 기록하였다.

Table 3. The expression of various markers on YD 10B and YD 15M epithelial tumor cells

	YD 10B		YD 15M	
	Raft-culture	Biopsy specimen	Raft-culture	Biopsy specimen
CK AE1/AE3	+	+	+	+
CK 13	+	+	+	+
CK 8/18/19	-	-	-	-*
Vimentin	-	-	-	-
Involucrin	-	+	+	+
PCNA	+	+	+	+

* Mucus cell only positivity

CK: cytokeratin

PCNA: proliferating cell nuclear antigen

제 4 장 고찰

구강 암은 인체에 발생되는 암의 약 3-5 %를 차지하며, 그 중 90 % 이상이 편평세포암종이다. 구강암은 전암 병소인 백반증이나 홍반증이 동반되며, 다른 장기에서와는 달리 그 진행과정을 육안으로 관찰하기 용이한 전형적인 다단계의 발암모델이다 (Licciardello et al. 1989, Lippman and Hong 1989). 또한 임상증상 및 임상자료의 수집이 쉽고, field cancerization 으로 인해 이차 원발성 암종의 발생 가능성이 높으며, 화학 암예방이나 암치료의 결과를 쉽게 추적 관찰할 수 있어 구강암은 다른 암종과는 달리 암의 진행을 연구하는 데 좋은 발암연구모델이라 할 수 있다 (Sacks 1996; Hong et al. 1990, MacComb and Fletcher 1967). 지금까지의 구강 암종의 역학 자료, 분자 생물학적 자료를 바탕으로 볼 때 그 발생 과정은 유전적인 요인보다는 식이 습관과 환경에 의해 영향을 받는다 (Devesa et al 1990, Strong et al 1984., Banden 1968., Boring et al. 1992, Slaughter et al 1953). 그러므로 우리나라 사람들의 두경부 암종의 치료법을 개발하기 위해서는 우리 나라 사람들 고유의 세포주 확보와 이를 이용한 실험실 모델을 확립하는 것이 필수적이다.

세포 배양을 이용한 in vitro 실험은 생물학적 복잡성을 최소화 할 수 있는 장점 때문에 최근 가장 많이 사용되는 연구 방법이다. 그러나 지금까지의 상피 배양 연구가 증식 유도에 의한 상피 재생에 초점을 맞추어져 왔고 상피암종 세포와 주변 조직과의 유기적인 관계를 재생해 주지는 못하였다. 즉 세포 배양을 이용한 연구 방법이 계속 발전하여 세포가 성장하는데 필요한 영양소, 호르몬 등을 충분히 제공함으로써 세포의 증식을 유도하거나, 분화나 apoptosis를 유도하는 약제의 투여에 의해 세포의 변화를 연구하는 방식을 취해왔다 (Rheinwald and Green 1975[1,2]). 그러나 생체 내에서의 세포는 세포 배양처럼 단일 층만을 형성하지는 않으며 주변 기질 세포나 세포외 기질과의 반응과 상호 작용을 통하여 증식과 분화를 조절하게 되므로 단일층만을 형성하는 종래의 배양방식을 이용한 연구방식은 한계가 있다 (Prunieras 1979, Mendelsohn et al. 1991). 이를 극복하고자 생체와 유사한 배양 조

건을 제공함으로써 생체 조직과 유사한 특성을 갖는 모델을 만들려는 시도가 계속되어 왔으며, 배양 접시 바닥에 laminin, type IV collagen 등의 세포외 기질을 도포하는 방법이 소개되기도 했으나 상피 세포의 부착과 증식에는 도움이 되지만 분화의 유도나 중층 형성 (stratification)은 이루어지지 않았다 (Toillier et al. 1990). 포유 동물의 발생 과정 뿐만 아니라 성인 조직이 정상 기능을 수행하는데 있어 상피와 결체조직간의 상호작용 (epithelial-mesenchymal interaction)의 중요성은 이미 널리 알려져 왔으나 이러한 개념은 종양 세포 배양에 기술적인 문제로 인해 적극적으로 도입되지 못했다 (Peault 1995, Limat et al. 1994, Hoffman 1991).

1979년 Bell 등 (1979)이 collagen lattice를 이용한 배양상피 재조합 삼차원 배양법을 처음 소개한 후 이에 대한 본격적인 연구가 이루어지기 시작했다. 처음에는 dead de-epidermized dermis (DED)를 이용하여 상피 하방에 결체 조직을 제공하였으나 (Boyce and Hansbrough 1988), 최근에는 실험의 간편성과 재현성을 위해 제 1 형 교원질과 섬유모세포로 구성된 진피 유사체(dermal equivalent)를 이용한 방법이 선호되고 있다 (Shahabeddin et al. 1990). 최근까지 실험 방법의 많은 개량을 통해 거의 정상 상피와 유사한 형태학적, 생리-화학적 특성을 갖는 상피의 재생이 가능하게 되었고, 이를 이용하여 상피 역학, 생화학적 물질에 의한 상피 세포의 분화-증식 유도, 종양 형성 기전 연구 (Choi and Fuchs 1991, Oda et al. 1996), 상피 조직내의 바이러스 증식 및 역학 연구, 배양 상피의 외과적 수복과 약리학적 효과와 기전 연구 (Otto et al. 1995, Garlick and Taichman 1994)등의 수 많은 분야에 응용되고 있다. 본 연구에서도 organotypic culture를 통하여 단층배양과는 달리 좀더 생체 조직에 근접한 중층의 조직을 얻을 수 있었다.

특히 삼차원적으로 배양된 암종 세포에 TGF-α 투여시 암종 세포의 교원질 분해와 세포 이동이 증가한다고 보고되어 있어 (Turksen et al. 1991) 이 실험 모델이 암종 세포의 이동과 전이를 연구하는데 좋은 모델이 될 수 있음을 보여주고, 특히 종양 세포의 침윤성 성장을 평가하고 주변 기질을 분해하는데 필수적인 collagenase

분비를 연구하는데 이러한 실험 모델이 적극적으로 이용되고 있다. 본 연구에서도 진피 유사체상에서 종양 세포를 19일간 배양하였을 때 대부분의 구강 암종 세포주는 교원질 내로 침윤성 성장을 보여, 침윤과 전이를 연구하는 좋은 모델임을 알 수 있었다. 그러나 침윤성 성장 능력을 객관적으로 평가하는 것은 매우 어려운 일이며, 이를 수치화할 수 있는 연구가 필요하리라 생각하였다.

본 연구에서 YD-8을 제외한 대부분의 구강 암종 세포는 dermal equivalent 상에서 배양하였을 때 중층화가 관찰되어 본 실험에서 사용한 모델이 종양 세포를 이용하여 삼차원적 조직을 얻는데 효과적임을 알 수 있었다. 삼차원 배양된 종양 세포는 현미경 소견 뿐만 아니라 면역염색에서도 AE1/AE3, CK13에 양성으로 반응하여 상피세포의 표현형을 유지하고 있음을 보여주고 있다. 특히 암종 세포주에서는 플라스크에서 배양할 때 전혀 발현되지 않는다고 알려진 involucrin이 발현하여, 제 1형 교원질과 섬유모세포로 이루어진 dermal equivalent가 일반 배양법과 달리 종양 세포의 적절한 분화를 유도함을 보여주었다.

최근 두경부 종양세포를 이용하여 본 연구와 같은 organotypic 세포 배양법으로 삼차원 배양하였을 때, dermal equivalent에 사용한 섬유모세포의 종류에 따라 침윤 양상이 차이가 있다는 것이 보고되었다. 유방암을 포함한 종양에서 채취한 섬유모세포를 사용했을 경우가 정상 점막의 섬유모세포를 사용했을 경우보다 종양 세포의 중층화와 분화 그리고 침윤이 잘 일어난다는 보고가 있어, 삼차원 배양시 섬유모세포의 중요성이 부각되고 있다. 즉, 유방 암조직 주변의 섬유모세포는 정상 조직에서 유래한 섬유모세포와는 달리 종양 세포의 침윤성 성장을 촉진한다는 것이다(Cullen et al. 1991). 이러한 차이는 종양 세포와 섬유모세포간의 상호 정보 교환(cross-talking)의 차이에서 기인한다고 하였으나(Dotto et al. 1989, Vescio et al 1987) 정확한 기전은 아직 정확히 밝혀져 있지 않다. 또 MRC5 사람 폐 섬유모세포주를 교원성 기질에 포함시켰을 때 종양세포의 침윤성 성장이 잘 일어나고, 이에반해 사람 섬유모세포주인 WI-38, 쥐 섬유모세포주인 Swiss-albino 3T3, 혹은 사람

유래세포주인 SUSM-1을 사용하였을때나 또는 섬유모세포를 사용하지 않았을 경우 침윤이 아주 약하거나 거의 나타나지 않는다는 보고도 있다 (Doki et al. 1993). 본 연구에서는 백서 피부의 진피에서 유래하여 불멸화된 Swiss 3T3를 사용한 경우와 치은에서 생검하여 일차 배양한 섬유모세포를 사용하였을 때 삼차원 배양된 암종 조직은 형태학적으로 침윤성 성장을 하였으나 침윤성 양태에 있어 큰 차이를 보이지 않았고, 진피 유사체에 섬유모세포를 포함시키지 않은 경우는 모든 세포주가 침윤성 성장을 보이지 않았다.

종양 세포의 성장과 침윤 능력은 숙주 간질 세포와의 상호작용을 통해서 영향을 받으며 (Van den Hoff 1988, Matsumoto et al. 1989, Camps et al. 1990, Wernet 1997), 이는 in vitro 상에서 편평세포 암종의 교원성 기질로의 침윤은 간질 섬유모세포와의 합동 배양에 의해 더욱 증진된다는 점을 뒷받침 한다. 구강 편평세포암종의 침윤성은 간질에서 유래한 HGF (hepatocyte growth factor)에 의해 자극되고, 구강암종세포주는 간질의 섬유모 세포의 HGF 형성의 강력한 유발인자인 IL-1을 분비한다는 보고로 미루어 볼 때 여러종류의 종양세포에서 섬유모세포의 HGF 형성을 유도하는 IL-1과 같은 유도인자를 분비하고 섬유모세포 유래 HGF는 종양세포의 침윤을 유도한다고 볼 수 있다 (Hasina et al. 1999). 본 연구에서 섬유모세포를 포함시키지 않았을 때 암종 세포의 침윤성 성장이 관찰되지 않은 것은 암종세포의 침윤성 성장에 섬유모세포와의 상호작용이 필수적임을 보여준다. 후두암 조직을 이용하여 삼차원 배양하였을때에도 종양 세포와 섬유모세포와의 접촉이 없는 경우 종양 세포의 퇴행성 공포화(vacuolization)가 관찰된다는 보고가 있어 (Sari et al. 1997) 본 연구 결과를 뒷받침하고 있다. 그러나 본 연구에서는 종양 세포의 침윤성 성장에 관여하는 성장인자나 유도인자를 확인하는 구체적인 실험을 시도하지 않았으며, 이는 앞으로 이루어져야할 과제라고 생각하였다.

섬유모세포와 상피사이의 직접 접촉은 세포간 소통의 또 다른 결정인자이며(Sarri et al. 1997), Yaeger 등은 상피세포와 섬유모세포의 직접 접촉이 배양시 상피세포

증식에 필수적이라고 하였고, Waelti 등은 각화상피세포와 섬유모세포의 직접세포접촉은 IL-6의 과생산을 유발한다고 하였다. 이러한 현상은 섬유모세포의 형질막 외측에 존재하는 각화 상피세포의 성장 인자에 의존하며, 이러한 효과를 위해서는 상피세포와 섬유모세포간의 직접 접촉이 요구됨이 보고되었다 (Yaeger et al. 1991). 그러나 생체 조직에서는 암종이라 할지라도 비록 불규칙하게나마 기저막이 존재하여 암종 세포와 섬유모세포의 직접적인 접촉은 거의 없다. 따라서 생체외 배양시 상피성 종양의 증식에 섬유모세포와 종양 세포의 직접적이 접촉이 더 중요하다는 몇몇의 연구 결과는 임상적으로 중요성이 떨어지고, 본 연구에서와 같이 교원질 내에 섬유모세포를 포함시키는 것이 생체조건과 유사하여 더 유용한 연구 모델이 될 수 있을 것으로 생각된다.

생체상태와 아주 유사함에도 불구하고 organotypic raft system은 생체 피부와 비교하여 몇가지 중요한 차이점이 있는데, 이중 하나는 기저막의 재생이 어렵다는 점이다 (Asselineau et at. 1986). 비록 Bohnert 등은 기저막을 단지 상피 항상성을 유지하는데 필요한 보조인자로 간주하였지만, 최근 여러 실험에서 기저막의 역동적인 역할이 증명되었으며, 정상 구강 점막 세포에서 제4형 교원질과 laminin의 적절한 공급으로 보다 완벽한 기저막의 재생이 유도된다고 알려져 있지만, 아직 침윤성 성격이 강한 종양 세포를 대상으로 삼차원 배양하여 기저막이 형성되었다는 보고는 없어 organotypic culture는 일반적인 단층 배양보다는 생체에 근접했지만 최근 상피세포와 기저막으로 구성된 미세환경(microenvironment)의 중요성이 부각되고 있어 아직도 생체조건과는 차이점이 있으며 향후 좀더 생체와 유사한 조건을 만들기 위한 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

본 연구에서 사용한 PCNA는 증식 주기의 세포에서 발현된다. H-E 염색에서도 비정상적인 세포분열이 관찰되었고, PCNA에 대한 면역 염색에서도 종양 세포 핵에 과발현이 관찰되어 삼차원 배양하였을 때 종양 세포의 증식도 유지됨을 알 수 있다 (Vambutas et al. 1993). 또한 상피의 분화 표지자인 involucrin은 일차배양된 종양

세포에서는 거의 발현되지 않는데 비해 본 연구에서 사용한 삼차원 배양에서는 표층에서 분명한 발현을 보이고 있어, 진피 유사체를 이용한 삼차원적 배양이 증식과 분화의 평형을 유지하는 좋은 연구 모델임을 보여주었다.

상피세포와 상피 기원의 종양 세포는 세포 기원이나 분화정도에 따라 다양한 중간 섬유인 cytokeratin(CK)의 발현을 보인다. 그중 AE1/AE3는 상피세포의 가장 대표적인 표지자로 사용되고 있으며, 본 연구에서도 생검조직과 삼차원 배양 조직에서 모두 잘 발현하고 있었고, 구강 점막의 중층 상피 극세포층 상방에 발현하는 CK13은 생검된 조직과 삼차원 재건된 조직에서도 기저세포를 제외한 상층부에서 잘 발현하고 있었다(Regnier et al. 1988). 또한 점액 세포에 발현한다고 알려진 CK8/18/19는 본 연구에서 사용한 점액표피양 암종 기원의 종양세포에서 거의 발현되지 않았고, 삼차원 배양한 조직의 H-E 소견에서도 점액세포의 분화가 관찰되지 않아 점액세포로의 분화를 위해서는 좀더 섬세한 배양 조건이 필요함을 알 수 있었다(Reppucci et al. 1991). 간엽기원의 세포에 존재하는 중간 섬유인 vimentin의 발현은 생검조직과 삼차원 배양된 종양세포에서 모두 발현되지 않았다.

결론적으로 본 실험의 결과는 제 1 형 교원질과 섬유모세포로 구성된 진피 유사체상에서 종양세포를 air-liquid 접촉면에서 삼차원 배양하였을 때 조직학적 소견상 생검조직과 유사한 형태학적 특징을 보이며, 면역조직화학 염색에서 증식과 분화를 유지하고 있는 조직임을 알 수 있어, 이러한 결과는 삼차원적 배양 모델이 기존의 평면 단층 배양에 비해 보다 생체와 유사한 미세환경을 제공함을 보여주었다. 향후 이러한 연구 모델은 종양 세포의 침윤성 성장이나 상피-결체 상호작용, 암 치료제 개발등에 응용될 수 있을 것으로 생각하며, 이를 위한 체계적이고 지속적인 연구가 필요할 것이다.

제 5 장 결 론

본 연구에서는 확립된 구강 암종 세포주를 oragnotypic co-culture를 이용하여 삼차원 배양을 시도하고, 배양된 종양 조직의 형태학적, 생물학적 특성을 환자 생검 조직과 비교함으로써 삼차원적 배양법이 생체조직과 보다 유사한 조건을 제공할 수 있는 암 연구 모델인지를 평가하고자 이미 확립된 구강 암종 세포주인 YD-8, -9, -10B, -15, -15M, -17, -17M, -38을 제1형 교원질과 섬유모세포로 구성된 진피 유사체(dermal equivalent)상에 분주하고 air-liquid interface상에서 2주간 배양하여 이들의 형태학적, 면역조직화학적 특성을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

암종 세포주를 삼차원적으로 배양하였을 때 종양 세포의 중층화와 분화가 관찰되었고, 또한 비정상적인 세포분열, 이형성을 보였으며 대부분의 종양 세포에서 결합조직 내로의 침윤성 성장이 관찰되었다. 증식 표지자로 PCNA는 삼차원 배양조직에서 강하게 발현하였고, 분화 표지자인 involucrin은 상층부의 세포에서 발현하여 증식과 분화를 유지하고 있음을 알 수 있었다. 삼차원 배양된 암종 세포에서 CK13과 AE1/AE3은 모두 강양성으로 발현하여 암종 세포가 각질세포 기원임을 보여주었으며, CK 8/18/19는 점액표피양 암종으로 진단된 생검 조직의 점액세포에서만 약하게 발현하였고, 삼차원적 배양 조직에는 발현하지 않았다. 생검 조직과 삼차원 배양된 암종 조직에서 vimentin의 발현은 전혀 없었다.

이상의 결과로 제1형 교원질과 섬유모세포로 구성된 진피 유사체(dermal equivalent)상에서 배양된 구강 암종 세포주는 기존의 평면 단층배양에 비해 생체와 보다 유사한 환경을 제공함을 알 수 있었다.

참고 문헌

Asselineau D, Bernard BA, Bailly C, Darmon M, Prunieras M. 1986. “Human epidermis reconstructed by culture. Is it normal?” *J Invest Dermatol* 86: 181-186.

Banden E. 1968. "Tobacco and oropharyngeal and bronchial cancer". *Rev Med Toulouse* 14: 549-560.

Bell E, Ivarsson B, Merrill C. 1979. "Production of a tissue-like structure by contraction of collgen lattices by human fibroblast of different proliferative potential *in vitro*". *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 1274-1279.

Bohnert, A., Hormnung, J., Mackenzie, I.C., and FUseng, N.E.(1986) Cell Tissue Res. 244, 413-429.

Boring C, Squirls TS, Tong T. 1992. "Cancer Statistics, CA". *Cancer J Clin* 42:19-38.

Boyce ST, Hansbrough JF. 1988. "Biologic attachment, growth, and differentiation of cultured human epidermal keratinocytes on a graftable collagen and chondroitin-6-sulfate substrate". *Surgery* 103: 421-431.

Camps JL. Chang S, Hsu TC, Freeman MR, Hong S, Zhau HE, von Eschenbach AC and Chung LWK. 1990. "Fibroblast-mediated acceleration of human epitherial tumour growth in vivo". *Proc Natl Acad Sci USA* 87:75-79.

Choi YS, and Fuchs E. 1991. "TGF alpha induces collagen degradation and cell

migration in differentiating human epidermal raft cultures". *Cell Regul* 2: 613-662.

Cullen, K.J., Smith, H.S., Hill, S., Rosen, N., and Lippman, M. E. 1991 " Growth factor messenger RNA expression by human breast fibroblasts from benign and malignant lesions" *Cancer Res*. 51, 4978-4985.

Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF Jr. 1990. "Cohort trends in mortality from oral, esophageal and laryngeal cancers in the United Stated". *Epidermiology* 1: 116-121.

Doki Y, Shiozaki H, Tahara H, Inoue M, Oka H, Iihara K, Kadowaki T, Takeichi Mi, and Mori T 1993. " Correlation between E-cadherin expression and invasivenss in vitro in a humkan esophageal cancer cell line" Cancer Res 53, 3421-3426

Dotto GP, Weinberg RA, and Ariza A. 1988. " Malignant transformation of mouse primary keratinocytes by Harvey sarcoma virus and its modulation by surrounding normal cells" *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6389-6393.

Dotto GP. Moellmann G, Ghosh S, Edwards M, Halaban R. 1989. " Transformation of murine melanocytes by basic fibroblast growth factor cDNA and oncogenes and selective suppression of the transformed phenotype in a reconstituted cutaneous environment" *J Cell Biol* 109, 3115-3128.

Freshney RI. 1987. "Culture of animal cells. A manual of basic technique". *Wiley-Liss, New York*.

Garlick JA, Taichman LB. 1994. "Fate of human keratinocytes during reepithelialization in an organotypic culture model". *Lab Invest* 70: 916-924.

Hasina R, Matsumoto K, Matsumoto-Taniura N,Kato I, Sakuda M, Nakamura T. 1999. "Autocrine and paracrine motility factors and their involvement in invasiveness in a human oral carcinoma cell line". *Br J of Cancer* 80:1708-1717.

Hoffman RM. 1991. "Three-dimensional histoculture: origins and applications in cancer research". Cancer Cell 3: 86-92.

Hong WK, Lippman SM, Itri LM, Karp DD, Lee JS, Byers RM, Schantz SP, Kramer AM, Lotan R, Peters LJ, dimery IW, Brown BW, Goepfert H. 1990. "Prevention of second primary tumors with isotretinoin in squamous-cell carcinoma of the head and neck". *New Eng J Med* 323: 795-801.

Levine JF, Stockdale EF. 1985. "Cell-cell interactions promote mammary epithelial cell differentiation". *J Cell Biol* 100: 1415-1422.

Licciardello JT, Spitz MR, Hong WK. 1989. "Multiple primary cancer in patients with cancer of the head and neck: Second cancer of the head and nek, esophagus, and lung". *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 17: 467-476.

Limat A, Hunziker T, Breitkreutz D, Fusenig EN, Braather LR. 1994. "Organotypic cocultures as models to study cell-cell and cell-matrix interactions of human hair follicle cells". *Skin Pharmacol* 7: 47-54.

Lippman SM, Hong WK. 1989. "Second malignant tumors in head and neck

squamous cell carinoma: The overshadowing threat for patients with early-stage disease". *Int J Radiat Oncol Biol Phy* 17: 691-694.

MacComb W, Fletcher G. 1967. "Cancer of the Head and Neck". *Baltimore: Williams & Wilkins* :21.

Matsumoto K. Horikoshi M, Rikimaru K, Enomoto S. 1989. "A study of an in vitro model for invasion of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 18:498-501.

Mendelsohn MG, Dilorenzo TP, Abramson AL, Steinberg BM. 1991. "Retinoic and regulate in vitro. the two normal pathways of differentiation of human laryngeal keratinocytes". *In Vitro Cell Dev Biol* 27A: 137-141.

Oda D, Savard CE, Eng L, Lee SP. 1996. "The effect of N-methyl-N'-mitrosoguanidine (MNNG) on cultured dog pancreatic duct epitheial cells". *Pancreas* 12: 109-116.

Otto WR, Nanchahal J, Lu QL, Boddy N, Dover R. 1995. "Survival of allogenic cells in cultured organotypic skin grafts". *Plastic Reconst Surg* 96: 166-176.

Peault B. 1995. "In-vitro models of stroma-dependent lymphopoiesis". *Semi Immunol* 7: 169-157.

Prunieras M. 1979. "Recent advances in epidermal cell cultures". *Arch Dermatol Res* 264: 243-247.

Regnier M, Desbas C, Bailly C, Darmon M. 1988. "Differentiation of normal and tumoral human keratinocytes cultured on dermis: reconstruction of either normal or turmoral architecture". *In Vitro Cell Dev Biol* 24: 625-632.

Reppucci AD, LiLorenzo TP, Abramson AL, Steinberg BM. 1991. "In vitro modulation of human laryngeal papilloma cell differentiation by retinoid acid". *Otolaryngol Head Neck Surg* 105: 528-532.

Rheinwald JG, Green H. 1975. "Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes". *Nature* 265: 421-424.

Rheinwald JG, Green H. 1975. "Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells". *Cell* 6: 331-343.

Robbins KT, Connors KM, Storniolo AM, Hanchett C, Hoffman RM. 1994. " Sponge-gel supported histoculture drug response assay for head and neck cancer. Correlations with clinical response to cisplatin". *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 120: 288-292.

Robbins KT, Varki NM, Storniolo AM, Hoffman H, Hoffman RM. 1991. "Drug response of head and neck tumors in native-state histoculture". *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 117: 83-86.

Sabatini DD, Griepp EB, Rodriguez-Boulan EJ, Dolan WJ, Robbins ES, Papadopoulos S, Ivanov IE, Rindler MJ. 1983. "Biogenesis of epithelial cell polarity". *Mod Cell Biol* 2: 419-450.

Sacks PG. 1996. "Cell, tissue and organ culture as in vitro models to study the biology of squamous cell carcinomas of the head and neck". *Cancer Metasta Rev* 15: 27-51.

Sari Atula, Reidar Greman, Stina Syrjanen. 1997. "Fibroblast can modulate the phenotype of malignant epithelial cells in vitro". *Exp Cell Res* 235: 180-187.

Shahabeddin L, Berthod F, Damour O, Collombel C. 1990. "Characterization of skin reconstructed on a chitosan-cross-linked collagen-glycosaminoglycan matrix". *Skin Phamacol* 3: 107-114.

Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. 1953. "'Field cancerization' in oral stratified squamous epithelium: Clinical implications of multicentric origin". *Cancer* 6: 963-968.

Strong MS, Incze J, Vaughan CW. 1984. "Field cancerization in the aerodigestive tract: Its etiology, manifestation and significance". *J Otolaryngol* 13: 1-6.

Sutherland RM. 1988. "Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model". *Science* 240: 177-184.

Tiollier J, Dumas H, Tardy M, Tayot JL. 1990. "Fibroblast behavior on gels of type I, III, and IV human placental collagens". *Exp Cell Res* 191: 95-104.

Turksen K, Shoi YS, Fuchs E. 1991. "TGF-α induces collagen degradation and cell migration in differentiating human epidermal raft culture". *Cell Regulation* 2:

613-626.

Vambutas A, Di Lorenzo TP, Steinberg BM. 1993. "Laryngeal papilloma cells have high levels of epidermal growth factor receptor and respond to epidermal growth factor by a decrease in epithelial differentiation". *Cancer Res* 53: 910-914.

Vescio RA, Redfern CH, Nelson TJ, Ugoretz S, Stern PH, Hoffman RM. 1987. "In vivo-like drug responses of human tumors growing in three-dimensional, gel-supported, primary culture". *Proc Natl Acad Sci* 84: 5029-5033.

Waelti, E.R., Inasebnit, S.P., Rast, H.P., Hunxiker, T., Limat, A., Braathen, L.R., and Wiesmann, U.J. 1992 " Co-culture of human keratinocytes on post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells: production of large amounts of interleukin 6" *J. Invest. Dermatol.* 98, 805-808.

Yaerger, P.C., Stiles, C.D., and Rollins, B.J.J. 1991 " Human keratinocyte growth-promoting activity on the surface of fibroblasts" *J Cell. Physiol.* 149, 110-116.

차인호, 육종인, 손영숙, 이은하, 정소영, 김경주, 김진. 2000. "**구강점막 각화상피의 삼차원적 배양과 재건된 조직의 생물학적 특성**". ***대한병리학회지*** 34: 181-189

Abstract

In Vitro Model of Three Dimensional Organotypic Culture of Oral Cancer Cell Lines

Huh Jung

Department of Dental Science, The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Assistant Professor Jong In Yook. DDS, MSD, phD)

Epithelial-mesenchymal interaction plays an important role in cell growth and differentiation. This interaction is already well known to have much importance during embriogenesis as well as carcinogenesis and cancer metastasis. However, in vitro experimental model is not well developed to reproduce in vivo cellular microenvironment which provides an epiethelial-mesenchymal interaction.
Because conventional monolayer culture system lacks an epithelial-mensenchymal interaction, cultivated cells have morphologic, biochemical, and functional characteristics different from in vivo tissue. Moreover, it usually does not induce cellular differentiation due to submerged culture condition.

The aims of this study were to develop an in vitro experimental model that maintains an epithelial-mesenchymal interaction by organotypic raft culture, and to characterize biologic properties of three-dimensionally cultured oral cancer cells by histological and immunohistochemical analysis. Furthermore, the role of fibroblast in the dermal equivalent was evaluated. The results were as follows;

1. Oral cancer cells reconstituted by three-dimensional organotypic culture

revealed similar morphologic characteristics to equivalant biopsy specimens in the point that they show stratification, hyperchromatism, pleomorphism, and abnormal mitosis.

2. Both immortalized swiss 3T3 cells and primary cultured gingival fibroblasts in the dermal equivalent elicited the invasive property of the tumor cells. In the absence of fibroblast, the tumor cells did not infiltrated into the dermal equivalent

3. YD-15, -15M, -17, -17M showed surface keratinization and expression of involucrin, CK AW1/3 and CK13 suggesting that oragnotypic co-culture condition is able to induce cellular differentiation. However, this organotypic culture system fail to induce mucous or glandular differentiation.

These results suggest that three-dimensional oragnotypic co-culture of the established cancer cell lines with the dermal equivalent consisting type I collagen and fibroblasts reproduce the morphologic and immunohistochemical characteristics similar to those in vivo condition. So this culture system seems to provide adequate microenvironment for in vitro tissue reconstitution compared with a conventional monolayer culture system for the study of cancer invasion, metastasis, epithelial-mensenchymal interaction, and development of novel cancer therapeutics.

Key Words : Oral cancer cell line, Organotypic culture, In vitro model

Explanation for figures

Fig. 1-a Raft culture of YD-8 cell lines shows stratification more than 2 cell layers with invasion into the collagen matrix (H-E. ×200)

Fig. 1-b Raft culture of YD-9 cell lines shows one layer, but tumor cells invade into the collagen matrix (H-E. ×200)

Fig. 1-c Raft culture of YD-10 cell lines shows stratification and invasion without keratinization. The tumor cells reveal hyperchromatic nuclei and pleomorphism simulating early squamous cell carcinoma (H-E. ×200)

Fig. 1-d Raft culture of YD-15M cell lines shows focal keratinization devoid of mucus cell differentiation (H-E. ×200)

Fig. 1-e Raft culture of YD-17M cell lines shows severe dysplasia or intraepithelial carcinoma appearance (H-E. ×200)

Fig. 1-f Raft culture of YD-17 cell lines shows histologic features simulating the invasive squamous cell carcinoma (H-E. ×200)

Fig 2-a Raft culture without fibroblasts of YD-15M shows stratification and keratinization, but no invasive feature (H-E. ×200)

Fig 2-b Raft culture without fibroblasts of YD-1-B cell lines shows stratification devoid of keratinization and invasion (H-E. ×200)

Fig 3-a Diffuse PCNA expression is demonstrated in the cells of the biopsy specimen originated YD-15 cell lines (PCNA, ×200)

Fig. 3-b Raft culture of YD-15M cell lines shows PCNA expression mainly in the basal and parabasal cell layers (PCNA, ×200)

Fig 4-a The involucrin expression is demonstrated mainly in the keratinized

tumor cells of the biopsy specimen originated in YD-10B (Involucrin, ×200)

Fig. 4-b Raft culture of YD-10B cell lines shows no involucrin expression (Involucrin, ×200)

Fig. 4-c The involucrin is strongly expressed in the tumor cells of the YD-15M cell lines originated biopsy specimen (Involucrin, ×200)

Fig. 4-d Raft culture of YD-15M cell lines shows involucrin expression only in the keratinized layer (Involucrin, ×200)

Fig. 5-a The cytokeratin AE1/AE3 is strongly expressed in the tumor cells YD-10B cell lines originiated biopsy specimen (CK AE1/AE3, ×200)

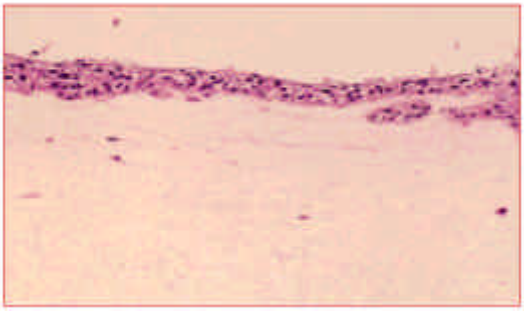
Fig 5-b Raft culture of YD-10B cell lines AE1/AE3 expression in the entire epithelium and invading tumor cells (CK AE1/AE3, ×200)

Fig. 5-c The cytokeratin AE1/AE3 is strongly expressed in the tumor cells YD-15M cell lines originated biopsy specimen (CK AE1/AE3, ×200)

Fig. 5-d Raft culture of YD-15M cell lines shows AE1/AE3 expression in the entire epithelium and invading tumor cells (CK AE1/AE3. ×200)

Fig. 6-a. CK13 expression is demonstrated mainly in the center of tumor islands of biopsy specimen (CK13, ×200)

Fig. 6-b. Raft culture of YD-15M cell lines shows CK 13 expression mainly in the superficial keratinized layers (CK13, ×200)

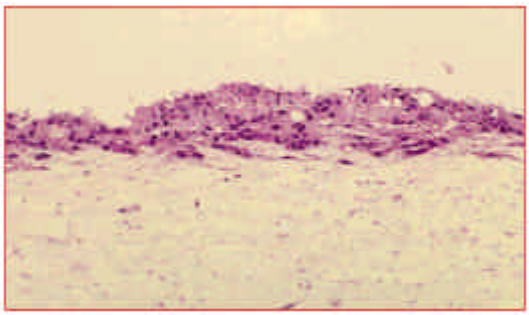


YD-8

Fig 1-a

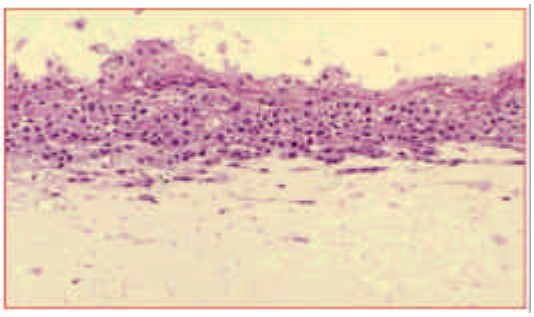
YD-9

Fig 1-b



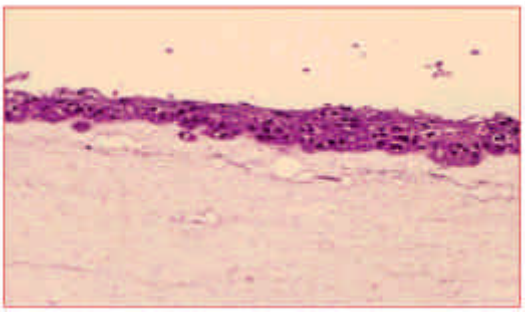
YD10

Fig-1c



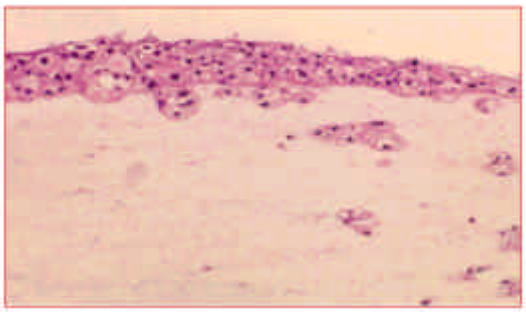
YD15M

Fig 1-d



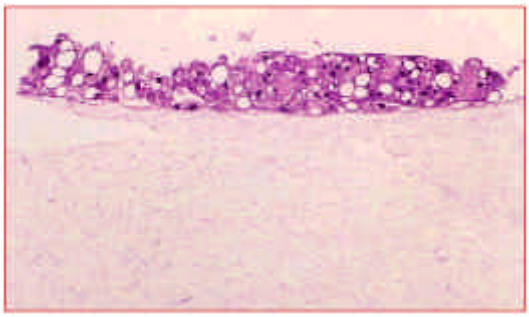
YD17M

Fig 1-e



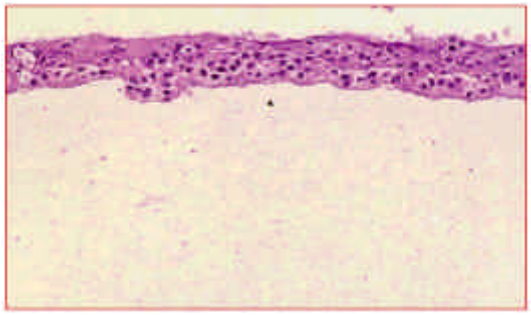
YD17

Fig1-f



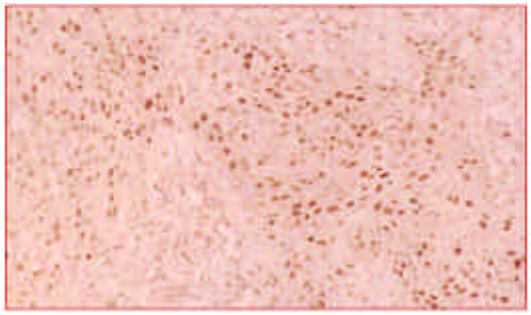
YD15M without fibroblst

Fig 2-a



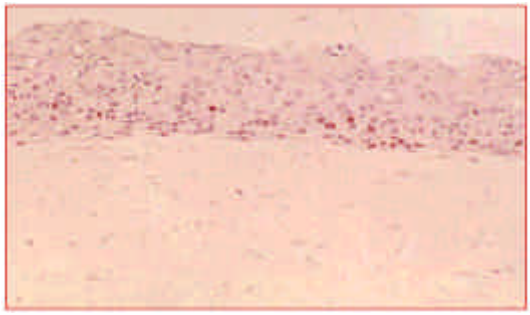
YD10B without fibroblast

Fig 2-b



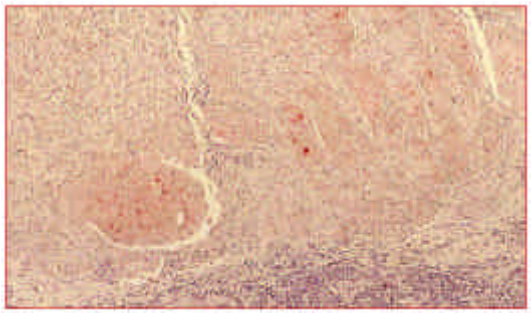
YD15 biopsy

Fig 3-a



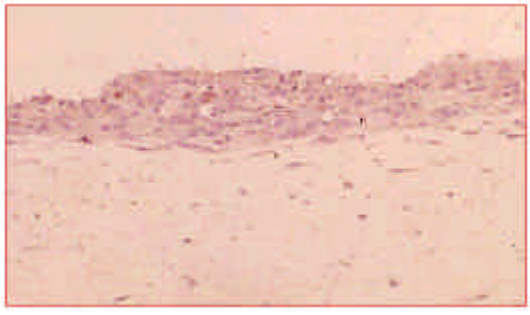
YD15M culture

Fig 3-b



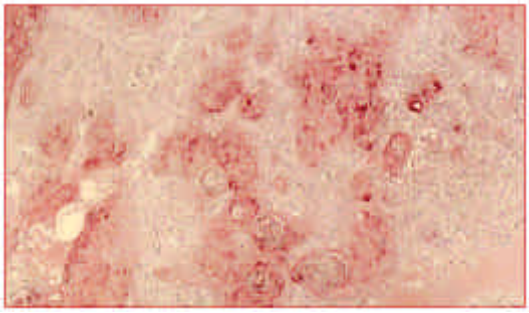
Involucrin YD10B

Fig 4-a



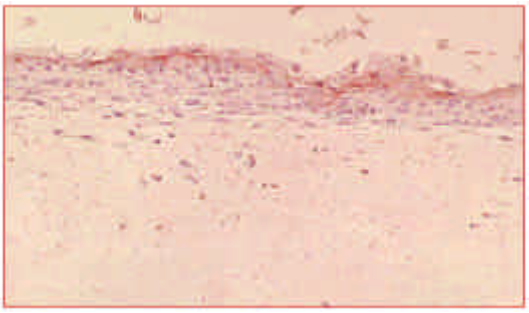
Involucrin YD15M

Fig 4-b



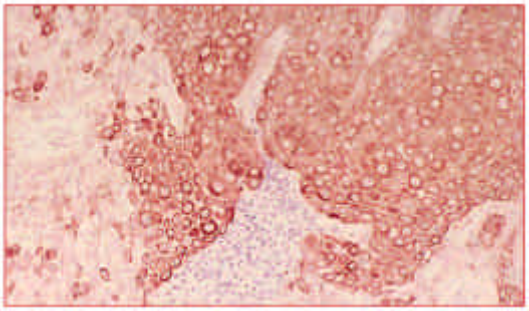
CK AE1/3 YD10B

Fig 4-c



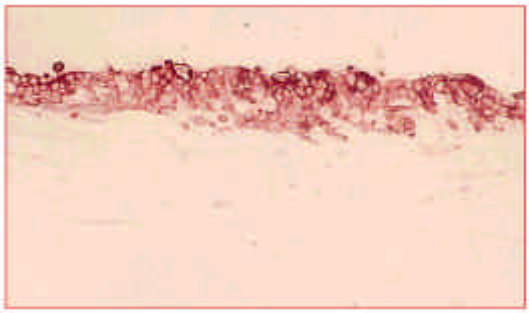
CD AE1/3 YD10B

Fig 4-d



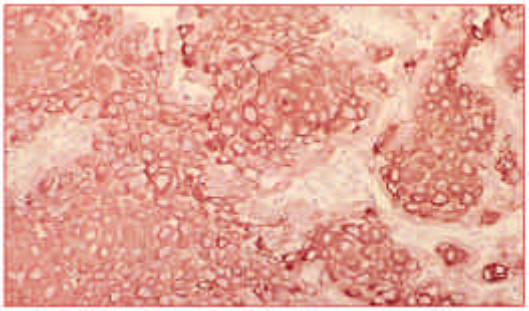
CD AE1/3 YD10B

Fig5-1



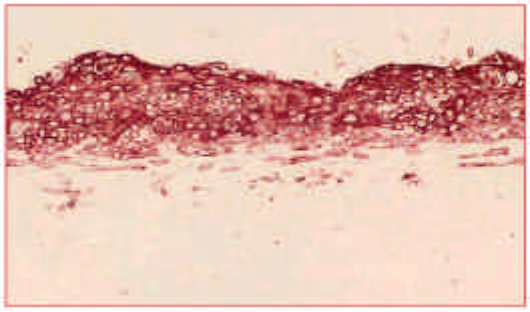
CD AE1/3 YD10B

Fig 5-b



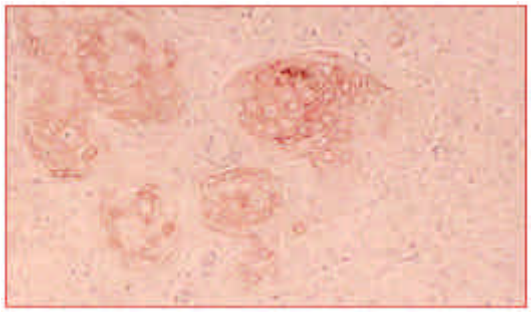
CD AE1/3 YD15M

Fig 5-c



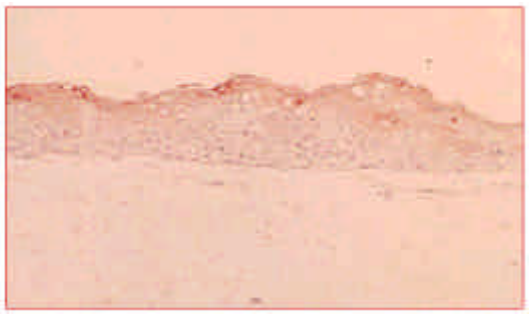
CD AE1/3 YD15M

Fig 5-d



CK13 YD15M

Fig 6-a



CK 13 YD15M

Fig 6-b