



등록특허 10-2253366



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년05월18일

(11) 등록번호 10-2253366

(24) 등록일자 2021년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/09 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0693 (2013.01)

C12N 2502/1305 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0007056

(22) 출원일자 2020년01월20일

심사청구일자 2020년01월20일

(56) 선행기술조사문헌

Frontiers in Pharmacology, vol.9(6), pp.1~14(2018)\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

구자승

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 연세대학 의과대학 구관 232호(신촌동)

김은솔

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 연세대학 의과대학 구관 214(신촌동)

(74) 대리인

특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 11 항

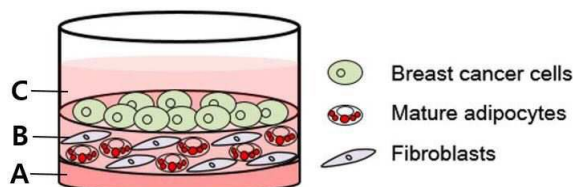
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 암세포, 지방세포 및 섬유아세포의 3차원 공배양 및 이를 이용한 종양 미세환경의 제조 방법

### (57) 요약

본 발명은 암세포를 지방세포 및 섬유아세포와 함께 3차원 공배양함으로써 종양 미세환경(tumor microenvironment)과 유사한 배양환경을 제공하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 암세포-지방세포 간 상호작용을 섬유아세포에 의해 더욱 증폭시킴으로써 암세포의 형태 변화, 침습 정도, 사이토카인의 발현 양상 등 생체 내에서 실제 암세포가 가지는 다양한 표현형을 보다 정확히 재현할 수 있으며, 이를 통해 암세포에 대한 다양한 인 비트로 어세이 시스템으로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2502/1323 (2013.01)

C12N 2533/54 (2013.01)

C12N 2533/90 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711092706

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업

영향 연구과제명 지방암에서 섬유아세포와 지방세포간 상호작용이 adipokine 분비 및 종양에 미치는

기 여 율 1/1

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

다음의 단계를 포함하는 유방암 세포의 배양 방법:

- (a) 배양 용기 표면에 세포의 기질(extracellular matrix) 또는 그 유사체를 개질하는 단계;
- (b) 상기 세포의 기질 또는 그 유사체의 개질층 위에 지방세포 및 섬유아세포의 혼합 배양액 층을 형성하는 단계; 및
- (c) 상기 혼합 배양액 층 표면에 유방암 세포 배양층을 형성하는 단계로서, 상기 개질층과 상기 혼합 배양액 층 간의 부피 비는 3:10 내지 5:10인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 세포의 기질(extracellular matrix) 또는 그 유사체는 젤라틴성 단백질 혼합물인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 젤라틴성 단백질 혼합물은 매트릭셀인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 배양 방법은 상기 단계 (b) 및 단계 (c) 사이에 상기 혼합 배양액 층을 건조하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 7

제 1 항 및 제 4 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법으로 배양된 암세포는 종양 미세환경(tumor microenvironment) 내에서의 유사한 표현형을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 8

세포의 기질(extracellular matrix) 또는 그 유사체를 포함하는 하층(lower layer) 및 지방세포 및 섬유아세포를 포함하는 상층(upper layer)을 포함하며, 상기 하층과 상기 상층 간의 부피 비는 3:10 내지 5:10인, 유방암의 종양 미세환경(tumor microenvironment) 제조용 조성물.

#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

삭제

#### 청구항 11

삭제

#### 청구항 12

제 8 항에 있어서, 상기 상층(upper layer)은 세포외 기질(extracellular matrix) 또는 그 유사체를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 세포외 기질(extracellular matrix) 또는 그 유사체는 상기 상층(upper layer) 내에 80 내지 95v/v%로 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 14

제 8 항 또는 제 12 항에 있어서, 상기 세포외 기질(extracellular matrix) 또는 그 유사체는 젤라틴성 단백질 혼합물인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 젤라틴성 단백질 혼합물은 매트릭셀인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 16

제 8 항, 제 12 항 및 제 13 항 중 어느 한 항의 조성물을 유효성분으로 포함하는 유방암 세포 배양용 조성물.

#### 청구항 17

삭제

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 암세포를 2가지 기질세포인 지방세포 및 섬유아세포와 3차원 공배양을 함으로써 생체 내 암 미세환경과 보다 유사한 환경을 제공하는 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 현재까지 고형암에 대한 인 비트로 약물 스크리닝에 사용되어온 세포 배양 시스템은 생체 내 구조에 비해 매우 단순화되어 약물 반응성 및 내성의 원인이 될 수 있는 생물학적, 생리학적 및 화학적 특성을 반영하지 못하며, 이에 생체 내 고형암이 갖는 복잡하고 동적인 미세환경을 재현하지 못하기 때문에 이러한 배양 시스템 하에서 수득한 데이터는 신뢰도에 문제가 있다. 특히, 환자 체내의 환경적, 생물학적, 유전적, 약동학적 및 약력학적 특성에 영향을 주는 종양 미세환경의 특성이 반영되지 못한 상황에서 인 비트로에서의 단순 암세포 사멸을 또는 증식 억제율만을 기준으로 선별된 항암제는 타 질환 치료제와 달리 평균 약물효과가 25% 이하이고, 부작용으로

초래되는 환자 사망률이 전체 암환자의 20% 수준에 육박한다. 따라서, 신뢰도 높은 약물 스크리닝을 위해 암세포 세포 주변을 둘러싸고 있는 세포 외 기질, 기질 세포 및 이들이 주고 받는 다양한 신호전달 물질이 포함되어 생체 내 종양 주변 환경을 더 잘 모방하는 인 비트로 배양 시스템에 대한 요구가 커지고 있다.

[0004] 한편, 인체 유방암 조직은 조직학적으로 상당수가 섬유성 기질(fibrous stroma)과 지방 기질(adipose stroma)이 동시에 존재할 뿐 아니라 서로 근접하게 위치해 있다. 유방암과 그 주변의 기질은 상호작용으로 서로를 활성화시켜 결국 암이 생존하기에 유리한 환경을 만들 것으로 예상되지만, 구체적으로 기질세포와 어떠한 입체적 관계 속에서 어떠한 상호작용을 주고받는지 명확하지 않다. 이에, 생체 내 종양 미세환경과 유사한 배양 시스템을 구축하기 위해서는 기질 세포들과 유방암 세포 간의 공간적, 생물학적 관계가 보다 합리적으로 재현될 필요가 있다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 공개공보 제10-2009-0133062호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 인 비트로 종양 미세환경에 보다 유사한 배양 환경을 제공함으로써 실제 생체 내에서 증식, 확산, 침윤 및 전이하는 암세포의 다양한 표현형을 보다 정확하게 재현할 수 있는 인 비트로 암세포 배양방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 두 가지 기질세포인 지방세포와 섬유아세포를 암세포, 보다 구체적으로는 유방암 세포와 3중 공배양(triple co-culture)할 경우 유방암 세포-지방세포 간 상호작용이 섬유아세포에 의해 더욱 증폭되어 생체 내 암 미세환경과 보다 유사한 환경이 조성됨을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 암세포를 지방세포 및 섬유아세포와 공배양하는 단계를 포함하는 암세포의 배양 방법을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 종양 미세환경(tumor microenvironment) 제조용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

### 과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 암세포를 지방세포 및 섬유아세포와 공배양하는 단계를 포함하는 암세포의 배양 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명자들은 인 비트로 종양 미세환경에 보다 유사한 배양 환경을 제공함으로써 실제 생체 내에서 증식, 확산, 침윤 및 전이하는 암세포의 다양한 표현형을 보다 정확하게 재현할 수 있는 인 비트로 암세포 배양방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 두 가지 기질세포인 지방세포와 섬유아세포를 암세포, 보다 구체적으로는 유방암 세포와 3중 공배양(triple co-culture)할 경우 유방암 세포-지방세포 간 상호작용이 섬유아세포에 의해 더욱 증폭되어 생체 내 암 미세환경과 보다 유사한 환경이 조성됨으로써 효율적인 인 비트로 어레이 시스템으로 유용하게 사용될 수 있음을 발견하였다.

[0017] 명세서에서 용어 “공배양(co-culture)”은 동일한 배양환경을 가지는 동일한 배양 공간에서 둘 이상의 상이한 종류의 대상세포를 배양하는 것을 의미한다. 공배양에는 동일한 배양 공간에서 상이한 복수의 세포 간 접촉이 허용되는 직접적 공배양(direct co-culture)과, 일정한 크기의 포어(pore)를 가지는 막으로 나뉘어져 각 세포가 물리적 접촉이 차단된 채 분비 단백질이나 대사 산물을 통해 상호작용을 하는 간접적 공배양(indirect co-culture)이 있다. 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 공배양은 직접적 공배양이다. 본 발명에

따르면, 본 발명자들은 고탄압 세포, 특히 유방암 세포가 유방 조직 내에서 두 기질 세포인 지방세포 및 섬유아 세포와 공간적으로 매우 근접해있다는 사실에 착안하여 세가지 세포를 직접적 공배양함으로써 종양 미세환경을 보다 유사하게 모방하고자 하였다. 후술하는 실시예에서 보는 바와 같이, 이러한 3중 직접 공배양에 의해 세포 간의 상호작용 증가에 기인한 아디포카인 발현량의 유의한 변화가 관찰되었다.

- [0018] 본 발명에서, 두 기질 세포인 지방세포 및 섬유아세포는 배양 목적세포인 암세포가 인 비배양 종양 미세환경에서와 유사한 표현형을 가지도록 하는 일종의 지지세포 역할을 한다. 본 명세서에서 용어 “지지세포(feeder cell)”는 배양 배지 내에서 대사 물질을 생산하여 목적 세포가 증식, 분화, 성장하거나 또는 생체 내에서와 유사한 형태변화, 침습, 사이토카인의 발현 등을 보이도록 돕는 배양 보조 세포를 의미한다.
- [0019] 본 명세서에서 용어 “종양 미세환경(tumor microenvironment)”은 종양 세포를 둘러싸고 이에 영양을 공급하는 기질 세포 등의 비-암세포(non-cancerous cell), 단백질을 포함하는 세포외 기질, 신호 분자 및 혈관을 포함하는 인 비배양 내 종양 세포의 주변 공간을 의미한다. 종양 세포는 미세환경의 구성 및 조성을 변화시킬 수도 있고 미세환경이 종양의 성장 및 확산에 영향을 줄 수 있어, 종양세포와 미세환경은 상호간에 영향을 미친다.
- [0020] 본 명세서에서 사용되는 용어 “배지”는 당업계에서 통상적으로 이용되는 동물세포용 배지를 의미한다. 본 발명에서 이용될 수 있는 배지는 동물세포의 배양에 통상적으로 이용되는 어떠한 배지도 가능하며, 예를 들어, Eagles's MEM (Eagle's minimum essential medium, Eagle, H. Science 130:432(1959)),  $\alpha$ -MEM (Stanner, C.P. et al., Nat. New Biol. 230:52(1971)), Iscove's MEM (Iscove, N. et al., J. Exp. Med. 147:923(1978)), 199 배지 (Morgan et al., Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 73:1(1950)), CMRL 1066, RPMI 1640 (Moore et al., J. Amer. Med. Assoc. 199:519(1967)), F12 (Ham, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53:288(1965)), F10 (Ham, R.G. Exp. Cell Res. 29:515(1963)), DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium, Dulbecco, R. et al., Virology 8:396(1959)), DMEM과 F12의 혼합물 (Barnes, D. et al., Anal. Biochem. 102:255(1980)), Waymouth's MB752/1 (Waymouth, C. J. Natl. Cancer Inst. 22:1003(1959)), McCoy's 5A (McCoy, T.A., et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100:115(1959)) 및 MCDB 시리즈 (Ham, R.G. et al., In Vitro 14:11(1978)) 등이 이용될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 방법으로 배양되는 암세포는 고탄압세포이며, 보다 구체적으로는 난소암 세포, 위암 세포 또는 유방암 세포이며, 가장 구체적으로는 유방암 세포이다.
- [0022] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 공배양은 다음의 단계를 포함하여 수행된다:
- [0023] (a) 배양 용기 표면에 세포외 기질(extracellular matrix) 또는 그 유사체를 개질하는 단계;
- [0024] (b) 상기 세포외 기질 또는 그 유사체의 개질층 위에 지방세포 및 섬유아세포의 혼합 배양액 층을 형성하는 단계;
- [0025] (c) 상기 혼합 배양액 층 표면에 암세포 배양층을 형성하는 단계.
- [0026] 본 명세서에서 용어 “세포외 기질(extracellular matrix)의 그 유사체”는 세포 외 거대분자들의 3차원적 네트워크로 구성된 세포외 기질과 유사한 구성을 가지는 혼합물로서, 천연의 세포외 기질과 동일하거나 유사한 생물학적 기능을 하는 인공 또는 천연의 단백질 혼합물을 의미한다.
- [0027] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 세포외 기질(extracellular matrix) 또는 그 유사체는 젤라틴성 단백질 혼합물이며, 보다 구체적으로는 매트릭셀이다.
- [0028] 본 발명에서 사용되는 매트릭셀은 매트릭셀 희석액일 수 있으며, 구체적으로는 단백질 농도가 3 내지 7mg/ml인 희석액일 수 있다. 3mg/ml 미만의 단백질 농도에서는 건조가 되지 않아 분리된 층(layer)을 형성하기에 부적합한 물성을 보이는 반면, 7mg/ml가 초과되는 단백질 농도에서는 점도가 지나치게 높아져 효율적으로 개질(coating)되지 못한다. 보다 구체적으로는 본 발명의 매트릭셀은 희석액은 단백질 농도가 4 내지 6mg/ml이고 가장 구체적으로는 약 5mg/ml이다.
- [0029] 본 명세서에서 용어 “개질(coating)”은 대상표면 상에 특정 물질로 피막을 형성함으로써 일정한 두께의 새로운 층을 형성하는 것을 의미한다. 대상표면과 개질 물질은 이온결합, 공유결합, 수소결합 등의 다양한 화학적 결합을 통해 코팅될 수 있다. 본 발명에서 세포외 기질 등이 배양 용기 표면을 개질하는 경우 세포외 기질은 배양 용기 표면을 완전히 둘러싸면서 밀폐된 층을 형성할 수도 있고 부분적으로 밀폐된 층을 형성할 수도 있다.
- [0030] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 공배양은 상기 단계 (b) 및 단계 (c) 사이에 상기 혼합 배양액 층을

건조하는 단계를 추가적으로 포함한다.

- [0034] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 방법으로 배양된 암세포는 종양 미세환경(tumor microenvironment) 내에서와 유사한 표현형을 가진다.
- [0035] 항암제 스크리닝을 위한 인 비트로 세포 배양 시스템은 실제 생체 내 환경에 비해 지나치게 단순화되어 약물 반응성이나 내성의 원인이 될 수 있는 생물학적, 생리학적 및 화학적 특성을 반영하지 못하는데, 본 발명은 종래 기술의 이러한 문제점을 해결하기 위해 암세포와 두 기질세포 간의 생체 내에서의 공간적 관계를 재현함으로써 아디포카인 분비를 비롯한 이들 간의 생물학적인 상호작용까지 복원하였다. 이에, 본 발명의 방법으로 배양된 암세포는 실제 종양 미세환경에서의 생물학적, 유전적, 약동학적 및 약력학적 특성과 매우 유사한 표현형을 가져 다양한 종양학 관련 어세이 수단으로 유용하게 이용될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 지방세포 및 섬유아세포를 유효성분으로 포함하는 종양 미세환경(tumor microenvironment) 제조용 조성물을 제공한다.
- [0037] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 상기 조성물은 세포외 기질(extracellular matrix) 또는 그 유사체를 추가적으로 포함한다.
- [0038] 본 발명에서 재현하고자 하는 종양 미세환경 및 이를 위해 이용되는 세포외 기질 또는 그 유사체에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.
- [0040] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 조성물은 상기 세포외 기질(extracellular matrix) 또는 그 유사체를 포함하는 하층(lower layer) 및 상기 지방세포 및 상기 섬유아세포를 포함하는 상층(upper layer)을 포함한다.
- [0041] 본 발명에 따르면, 본 발명의 종양 미세환경 제조용 조성물은 상이한 성분으로 구성되면서 그 경계가 구분되는 복수의 층으로 이루어진 적층형 다층 구조(laminated multilayer)를 가진다. 상기 구조는 하층 및 상층의 최소 2개의 층을 포함하지만, 추가적인 층을 더 포함할 수도 있다.
- [0042] 본 명세서에서 용어 “하층(lower layer)”은 배양 용기의 바닥(bottom)에 개질되거나 또는 상층보다 배양 용기의 바닥에 더 가까운 층을 의미하며, 용어 “상층(upper layer)”은 상기 하층 바로 위에 형성되어 하층과 경계면이 접촉하거나 또는 하층에 비해 배양 용기의 바닥에서 멀리 위치한 층을 의미한다. 따라서, 상층과 하층 사이에 추가적인 층이 존재할 수 있으며, 상층과 배양하고자 하는 암세포 배양층 사이에도 추가적인 층이 존재할 수 있다. 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 하층, 상층 및 암세포 배양층은 밀폐된 막 또는 다공성(porous) 막으로 분리되지 않고 서로 경계면이 접촉되어 있다.
- [0043] 보다 구체적으로는, 상기 하층(lower layer)과 상기 상층(upper layer) 간의 부피 비는 3:10 내지 5:10이다. 보다 더 구체적으로는 3.5:10 내지 4.5:10이며, 가장 구체적으로는 약 4:10이다.
- [0044] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 상층(upper layer)은 세포외 기질 또는 그 유사체를 추가적으로 포함하며, 보다 구체적으로는 상기 세포외 기질 또는 그 유사체는 상기 상층 내에 80 내지 95v/v%로 포함된다. 보다 더 구체적으로는 85 내지 95v/v%로 포함되며, 가장 구체적으로는 88 내지 92v/v%로 포함된다.
- [0046] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 종양 미세환경(tumor microenvironment) 제조용 조성물을 유효성분으로 포함하는 암세포 배양용 조성물을 제공한다.
- [0047] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 배양되는 암세포는 유방암 세포이다.

### 발명의 효과

- [0049] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0050] (a) 본 발명은 암세포를 지방세포 및 섬유아세포와 함께 3차원 공배양함으로써 종양 미세환경(tumor microenvironment)과 유사한 배양환경을 제공한다.
- [0051] (b) 본 발명의 3차원 공배양 방법을 통해 암세포-지방세포 간 상호작용이 섬유아세포에 의해 더욱 증폭됨으로써 암세포의 형태 변화, 침습 정도, 사이토카인의 발현 양상 등 생체 내에서 실제 암세포가 가지는 다양한 표현형을 보다 정확히 재현할 수 있으며, 이를 통해 암세포에 대한 다양한 인 비트로 어세이 시스템으로 유용하게 이용될 수 있다.



## 도면의 간단한 설명

- [0053] 도 1은 3D 배양의 3단계 및 그에 따라 생성되는 각 층을 보여주는 모식도이다. 층(A)는 ECM(Extracellular matrix)을 플레이트에 코팅함으로써 생성되며, 층 (B)는 기질세포를 ECM에 포매시킴으로써 생성되고, 층 (C)는 유방암 세포를 기질층 위에 깔아 놓음으로써 생성된다.
- 도 2는 MDA-MB-231, MCF-7의 각 군별 아디포카인 발현량을 나타내는 그림이다. MDA-MB-231과 MCF-7을 각각 4가지 군으로 배양하여[유방암 세포군(BC only), 섬유아세포와 공배양한 군(BC co BJ), 지방세포와 공배양한 군(BC co Adi), 두 가지 기질세포와 공배양한 군(BC co BJ+Adi)] 각 군에 대해 세포 배양액과 세포 용출액으로 아디포카인 어레이를 진행하여 발현량을 조사하였다.
- 도 3은 공배양군과 유방암 세포 단독군 간의 아디포카인 발현량 차이를 보여주는 그림이다.
- 도 4는 섬유아세포, 지방세포와 함께 배양한 유방암 세포의 실제 아디포카인 발현량과 예상값과의 차이를 나타낸 그림이다. 섬유아세포 및 지방세포와 공배양된 유방암 세포의 아디포카인 예상값을 계산한 뒤 예상값과 실제 측정값과의 차이가 큰 아디포카인을 선정하여 세가지 세포군 간 상호작용에 의해 촉진되는 아디포카인 후보를 조사하였다.
- 도 5는 기질세포에 의하여 촉진된 MDA-MB-231, MCF-7의 아디포카인 및 이들 간의 상호관계를 보여주는 모식도이다. 지방세포 공배양군, 섬유아세포 및 지방세포 공배양군에서 각각 촉진된 아디포카인 및 예상값과 실제값의 차이가 큰 것들을 나누고, 이들간의 관계를 정리하였다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0054] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0056] **실시예**
- [0057] **실험방법**
- [0058] *유방암 세포의 배양*
- [0059] 본 발명에서는 기저 세포(basal cell)인 MDA-MB-231(이하 ‘231’)과 내강 세포(luminal cell)인 MCF-7(이하 ‘MCF7’)의 두 가지 유방암 세포를 이용하였다. 231은 10% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 DMEM배지(이하 ‘10% FBS DMEM 배지’)에서 배양하였다. MCF7은 10% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신 및 0.1mg/ml의 인슐린이 보충된 DMEM배지에서 배양하였다. 두 세포주 모두 5%의 CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다.
- [0061] *섬유아세포의 배양*
- [0062] 섬유아세포로서 BJ-5ta(이하, ‘BJ’)를 10% FBS DMEM 배지에서 5%의 CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다.
- [0064] *지방세포의 분화*
- [0065] 지방 전구 세포(preadipocytes)인 3T3-L1을 10% 우아 혈청, 1% 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 DMEM 배지에서 배양하다가, 일정 시간별로 배지를 교체하여 성숙 지방세포가 되도록 유도하였다. 지방세포로의 분화과정은 다음과 같다: 60mm 배양접시에서 배양한 3T3-L1이 꼭 차면, 이를 후 1 $\mu$ M의 텍사메타손(Sigma), 0.5mM의 IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine, Sigma) 및 100  $\mu$ g/ml 인슐린(Sigma)이 보충된 10% FBS DMEM 배지로 교환하고, 이를 1일차(day 1)로 하였다. 이를 후인 day 3에는 100  $\mu$ g/ml 인슐린(Sigma)을 추가한 10% FBS DMEM 배지로 교환하였고, day 5에 10% FBS DMEM배지로 교환하였다. 이후 3일 뒤인 day 8에 유방암 세포와 공배양을 진행하였다. 보통 어세이는 day 7~14 사이에 하므로, 조정된 공배양 조건에 맞추어 분화유도를 계획하였다.
- [0067] *지방세포의 분리*
- [0068] 지방세포는 물리적 충격에 약하고 Trypsin-EDTA에도 잘 떨어지지 않기 때문에, 본 발명자들은 지방세포의 충격을 최소화하여 탈루시키는 방법을 모색하고자 하였다. PBS로 디쉬를 세척한 후, 2배 농축된 Trypsin-EDTA를 처리한 다음 그대로 실온에서 3분 간 둔 뒤, 10% FBS DMEM 배지를 넣어 조심스럽게 피펫팅하여 떼어내었다. 떨어진 지방세포를 튜브에 모아 150g로 5분간 원심분리하여 세포를 수득하였다. 이후에 재부유 시에도 조심스럽게



피펫팅을 하여 세포를 수집하였다.

[0070] 3D 3중(triple) 공배양 및 유지

[0071] 3D 배양은 크게 3단계로 나뉜다(도 1).

[0072] (1) 매트리지겔(Matrigel) 보관 방법 및 취급시 주의사항

[0073] ECM으로서 Matrigel®(Corning)을 사용하였다. 매트리지겔은 실온에서 겔화가 일어나고, 기포가 생기면 그 모양대로 굳어버리기 때문에 매트리지겔과 접촉하는 모든 실험 소모품과 기기 및 배지는 미리 냉장을 시키고, 실험 중에는 얼음에 박아서 실험을 진행하였다. 피펫팅 시 기포가 생기지 않도록 유의하고, 혹 실험 도중 기포가 발생하면 플레이팅 전에 가볍게 원심분리 하여 이를 제거하였다.

[0074] 본 발명에서 매트리지겔은 단백질 농도가 5mg/ml가 되도록 배지에 희석(이하 ‘매트리지겔 희석액’)하였으며, 각 튜브의 수용가능 최대 부피의 1/4 이하만 넣어 채운으로 인한 겔화를 방지하였다.

[0075] 각 단계마다 매트리지겔이 완전하게 건조되도록 하였다. 잘 굳지 않은 매트리지겔 위에 다른 층을 얹으면 겔이 훼손되어서 균일한 실험 조건을 형성하기 어렵고, 반면 겔이 과건조(over dry)되는 것도 바람직하지 않다.

[0077] (2) 매트리지겔 희석액의 코팅 (도1의 A층)

[0078] 공배양을 개시 전날에 24웰 플레이트를 -20℃에 보관하고, 멸균한 1000P 피펫팁을 2세트씩 냉장고에 넣어 미리 온도를 낮춰놓았다. 매트리지겔 희석액은 얼음에 박아서 밤새 냉장보관하였다.

[0079] 이후 리버스 피펫팅으로 웰당 200 μl씩의 매트리지겔을 코팅한 다음 플레이트 뚜껑을 덮고, 37℃ 인큐베이터에서 30분간 건조시켰다. 플레이팅 중 피펫팁의 온도가 올라가기 전 또다른 냉장 팁으로 바꾸어 매트리지겔이 굳지 않도록 하였다.

[0081] (3) 매트리지겔 포매된 기질세포 도말 (도1의 B층)

[0082] 건조된 매트리지겔 표면에 실험군에 따라 상이한 구성의 세포층을 형성하였다. 각 세포주들의 갯수와 배지 부피는 최적화 과정을 통해 도출되었다. BJ는 10<sup>5</sup>세포/웰, 60mm 배양접시 한판의 지방세포는 24웰 플레이트의 2 웰씩, 유방암 세포는 각각 4 X 10<sup>5</sup>세포/웰로 씨당하여 4일간 공배양하였다.

[0083] 이 단계에서 올려지는 층의 총 볼륨은 500 μl이고, 배지는(w/ or w/o 세포)는 매트리지겔의 1/10 부피로 혼합하였다. 따라서 450 μl의 매트리지겔 희석액과 혼합될 각 실험군 별 성분은 다음과 같다. [① 유방암 단독배양 군: 미리 냉각된 배지 50 μl, ② 유방암과 섬유아세포 공배양군: 10<sup>5</sup>개의 BJ가 있는 50 μl의 배지, ③ 유방암과 지방세포 공배양군: 1판의 지방세포 디쉬를 배지 100 μl에 재부유시킨 배양액 50 μl, ④ 유방암과 섬유아세포 및 지방세포 공배양군: 10<sup>5</sup>개의BJ가 있는 25 μl의 배지+1판의 지방세포 디쉬를 배지 50 μl에 재부유시킨 배양액 25 μl]. 각 내용물이 균일하게 섞이도록 피펫팅한 뒤, 매트리지겔 희석액이 코팅된 플레이트 위에 층을 올린 후 뚜껑을 덮고 37℃ 인큐베이터에서 1시간 동안 건조시켰다.

[0085] (4) 유방암 세포를 기질 층 위에 도포하는 단계 (도1 C)

[0086] 4 X 10<sup>5</sup>개의231과MCF7이 각각의 배양배지500 μl에 들어가도록 준비한 뒤 플레이팅하였다.

[0088] (5) 3D 배양의 유지

[0089] 본 연구에서는 4일째의 세포 상등액이 어세이에 사용되므로, 24시간과 72시간 뒤에 웰당 1ml씩 배지를 교체하였다. 배지는 맨 위의 유방암 세포주에 따라 상이한 종류를 사용하였다.

[0091] 세포 및 배양액의 회수

[0092] 어세이를 위해서 4일간 키운 세포 배양액과 세포를 수집하였다. 세포 배양액을 튜브에 옮기고 4℃, 14000g에서 5분간 원심분리하여 미립자를 제거한 뒤, 바로 분석에 이용하거나 소분하여 -20℃ 이하에 보관하였다. 매트리지겔에 둘러싸인 세포는 세포 Recovery Solution(BD사)을 이용하여 회수하였다. 튜브를 살짝 위 아래로 움직여 내용물이 잘 섞이도록 한 뒤, 얼음에 박아 rocking shaker에 1시간 동안 두고 4℃, 300g에서 5분간 원심분리 후 펠렛을 수집하였다. 차가운 PBS로 재부유시켜 원심분리하는 과정을 2회 반복하고, 마지막에는 PBS를 가능한 한 많이 제거하였다. 수득된 세포는 바로 용해시키거나 -20℃ 이하에 보관하였다.

- [0094] 어세이를 위한 세포 용해
- [0095] 용해 완충액의 조성은 다음과 같다. 1% Igepal CA-630(Sigma), 20mM Tris-HCl(pH8.0), 137mM NaCl, 10% 글리세롤, 2mM EDTA, 10 µg/ml 아프로티닌(Sigma), 10 µg/ml 류펩틴(Tocris), 10 µg/ml 펩스타틴(Tocris).
- [0096]  $1 \times 10^7$  세포/ml 만큼의 용해 완충액을 넣고 피펫팅하여 2-8℃에서 30분간 부드럽게 흔들어준 다음 4℃, 14000g에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 새 튜브에 이동시킨 뒤 단백질 정량을 하여 적정량을 취해 분석하고, 잔여 용해물은 분주하여 -70℃ 이하에 보관하였다.
- [0098] 각 군들의 아디포카인 발현 종류 및 상대적 양 어세이
- [0099] R&D Systems의 Proteome Profiler, Human 아디포카인 Array kit을 이용하여 각 군들의 아디포카인 발현량을 제조사의 지시에 따라 측정하였다. 각 실험군마다 세포 배양액 또는 세포 용해물의 두가지 샘플에 대하여 어세이하였다.
- [0101] 실험결과
- [0102] 유방암과 기질간 상호작용에 의해 아디포카인 발현양상은 변화하고, 같은 아형의 유방암도 기질세포의 종류에 따라 촉진되는 아디포카인이 달라진다.
- [0103] 4가지 그룹 (① 유방암 세포 단독 배양군, ② 유방암/ 섬유아세포 공배양군, ③ 유방암/ 지방세포의 공배양군, ④ 유방암/섬유아세포/지방세포 공배양군)의 세포 배양액과 세포 용출액으로 아디포카인 분석을 수행한 결과, 각 유방암 세포 아형별, 샘플 유형에 따른 아디포카인 발현량에 대한 데이터를 얻었다(도 2)
- [0104] 공배양군들 및 유방암 세포 단독 배양군 간의 아디포카인 발현량을 비교하여 기질 세포가 아디포카인 발현에 미치는 영향을 조사하였다(도 3). 231 세포 용출액 결과를 보면, 섬유아세포에 의해 DPP4, IGFBP-6, IL-6, IL-8의 발현이 증가되었고, 231 세포배양액 결과를 통해, 섬유아세포와의 상호작용으로 카텡신 L, IGFBP-3, IGFBP-6, MCP-1의 분비가 촉진됨을 알 수 있었다. 또한 231과 지방세포와의 상호작용으로 231의 카텡신 D, Pref-1 발현량 및 분비량이 증가하였고, IGFBP-3, TIMP-1, VEGF의 분비 또한 촉진되었다. 섬유아세포 및 지방세포와 함께 배양한 231군에서는 DPP4, IGFBP-6, Pref-1의 발현이 증가하였고, 카텡신 D, IGFBP-3, Pref-1, TIMP-1의 분비가 촉진되었다.
- [0105] MCF7의 경우 섬유아세포에 의해 DPP4의 발현이 증가하였고, IGFBP-3, IGFBP-6, IGFBP-7, IL-8, PAI-1의 분비가 증가하였다. 또한 지방세포의 상호작용으로 MCF7의 카텡신 D, Pref-1의 발현 및 분비가 촉진되었고, MIF와 TIMP-1의 분비가 촉진되었다. 세가지 세포주를 공배양하였을 때는 카텡신D, DPP4, Pref-1의 발현 및 카텡신 D, MIF, Pref-1, TIMP-1의 분비가 증가하였다. 이를 통해 기질세포와 유방암 세포간 상호작용으로 아디포카인 발현 및 분비가 달라짐을 알 수 있고, 같은 아형(subtype)의 유방암 세포주도 공배양하는 기질세포에 따라 상호작용이 달라지며, 이에 따른 아디포카인 양도 달라짐을 알 수 있다.
- [0107] 섬유아세포와 지방세포를 동시에 공배양시킨 군에서 일부 아디포카인은 기질세포 한가지와 공배양했을 때 보다 발현이 훨씬 촉진됨을 확인하였다.
- [0108] 유방암 세포주를 섬유아세포 또는 지방세포 중 하나와 공배양한 군의 아디포카인 발현량의 평균값으로 유방암과 두가지 기질 세포를 공배양(3중 배양)한 군의 아디포카인 예상 발현량을 계산하였다. 예상 값과 실제 측정값 간의 차이가 큰 아디포카인의 종류를 선별하여, 이들이 섬유아세포와 지방세포간 상호작용에 의해 촉진되는 아디포카인일 가능성이 클 것으로 간주하였다.
- [0109] 231 용해물에서는 DPP4와 Pref-1이 예상값보다 실제 측정값이 높게 관찰되었으며, 231 상등액에서는 IGFBP-3, Pref-1, 카텡신 D가 예상값보다 많이 분비되었다. 특히 카텡신 D는 231의 4가지 실험군 중 상중배양군에서 가장 많이 분비되었다. MCF7에서는 DPP4가 세포 안에서 예상값보다 월등히 높게 발현되었고, IGFBP-6, Pref-1, PAI-1의 실제 분비량이 예상값보다 높았다(도 4). 이들은 모두, 삼중배양시 유방암 단독 배양군보다 증가하였다(도 2 및 도 3).
- [0111] Pref-1은 지방세포와의 상호작용으로 유방암에서 발현 및 분비가 촉진되고, 섬유아세포도 이 상호작용에 도움을 줄 수 있다.
- [0112] 섬유아세포 세포주인 BJ-5ta는 인간 유래 세포이고, 성숙 지방세포는 마우스 유래 세포인 3T3-L1으로부터 분화를 유도하였다. 따라서 본 발명에서 이용된 인간 아디포카인 분석 키트는 마우스 유래 지방세포로부터 분비된 아

디포카인을 자연스럽게 배제시킬 수 있다. 반면에 섬유아세포가 포함된 실험군에 대한 분석에서는 아디포카인의 유래가 섬유아세포인지 지방세포인지를 구별할 필요가 있기 때문에 후속실험을 위해 섬유아세포가 포함된 군에서 분리된 아디포카인을 배제하였다.

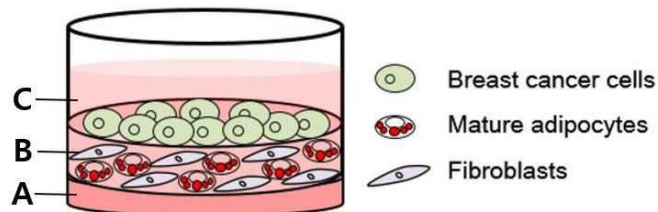
[0113] 지방세포와의 공배양군, 섬유아세포 및 지방세포와의 3중 공배양군에서 각각 촉진된 아디포카인 및 예상값과 실제값의 차이가 큰 것들을 선정하여 이들 간의 관계를 정리하였다. 기질세포와 지방세포 간 상호작용에 의해 촉진된 아디포카인 및 이러한 작용에 시너지 효과를 주는 또 다른 기질의 효과를 알아보기 위해서 이전 결과에서 선정된 아디포카인을 그룹화하여 상호관계를 조사하였다(도 5).

[0114] 먼저 231에서 지방세포에 의하여 촉진된 아디포카인은 총 5가지로, 이들 중 VEGF를 제외한 나머지는 모두 3중 공배양군에서도 촉진되었다. 특히 카텝신 D, Pref-1, IGFBP-3는 예상값과 실제값의 차이가 커 섬유아세포의 관여에 더욱 촉진되었을 가능성이 크다. MCF7에서는 지방세포와의 공배양군과 삼중 공배양군에서 촉진된 아디포카인이 일치한다. 그 중, Pref-1은 예상값과의 차이가 커서 섬유아세포가 관여했을 가능성이 있다. 231과 MCF7 공통적으로 Pref-1이 지방세포와 접촉하면 증가하고, 섬유아세포가 이를 더욱 촉진함을 알 수 있다.

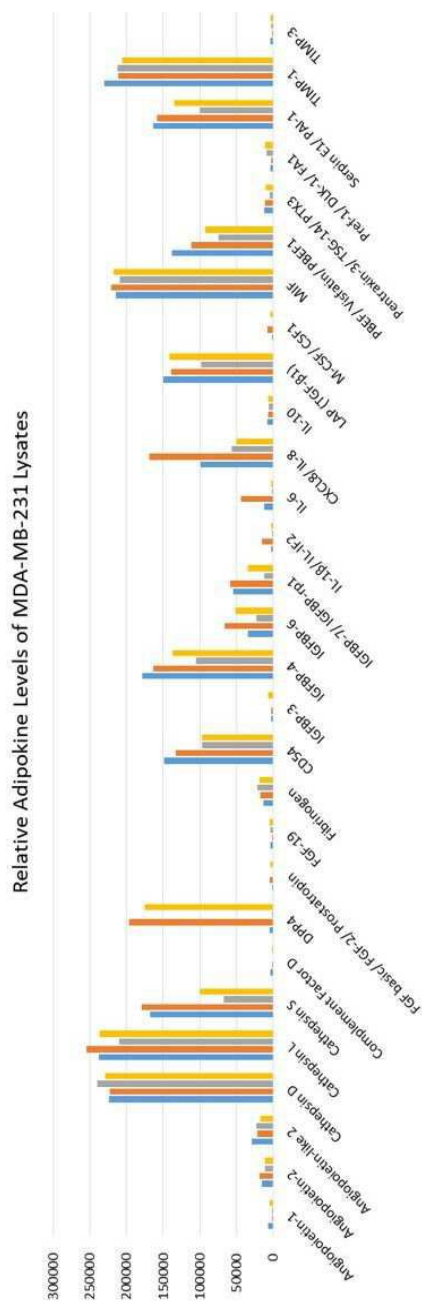
[0116] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

## 도면

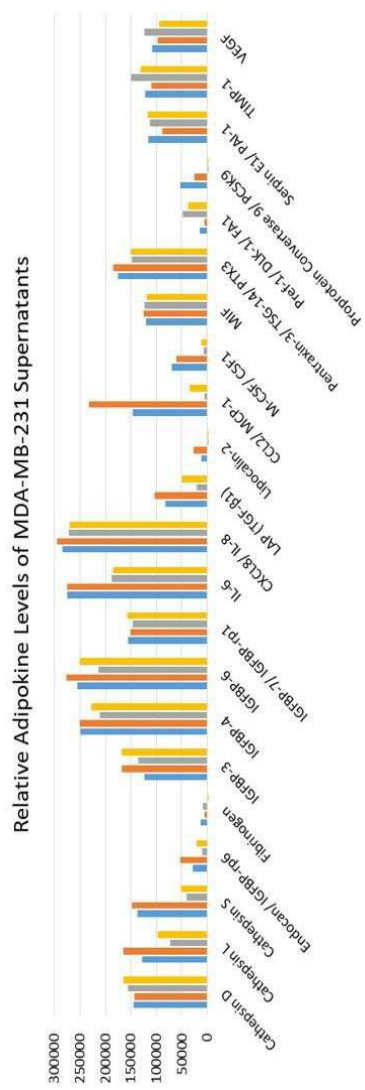
### 도면1



도면2a

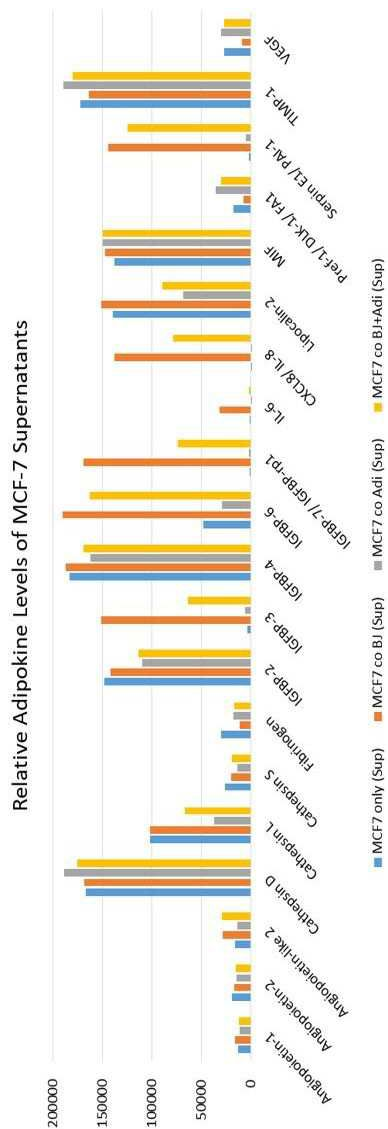


도면 2b

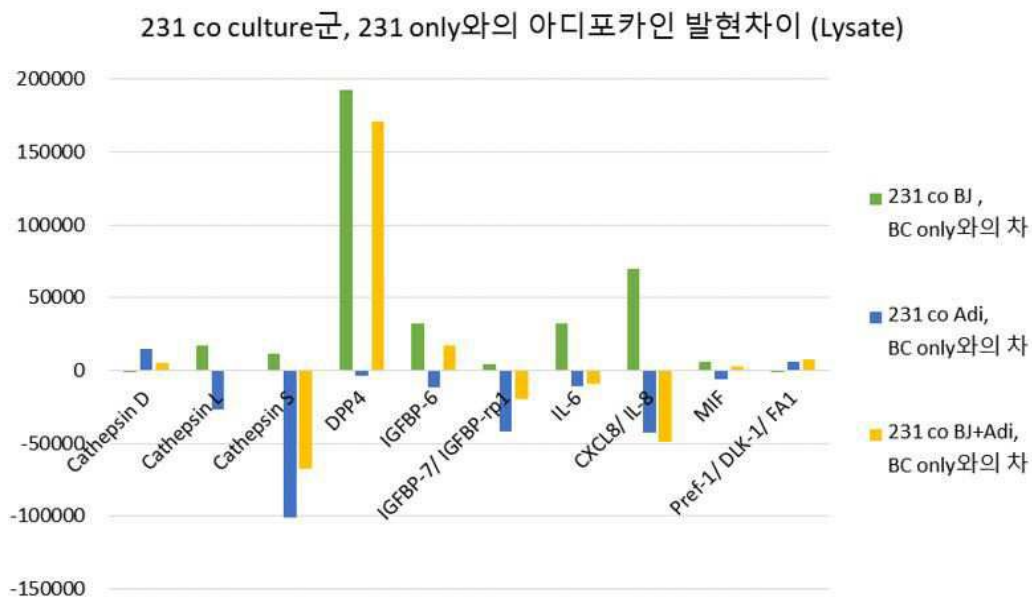




도면2d

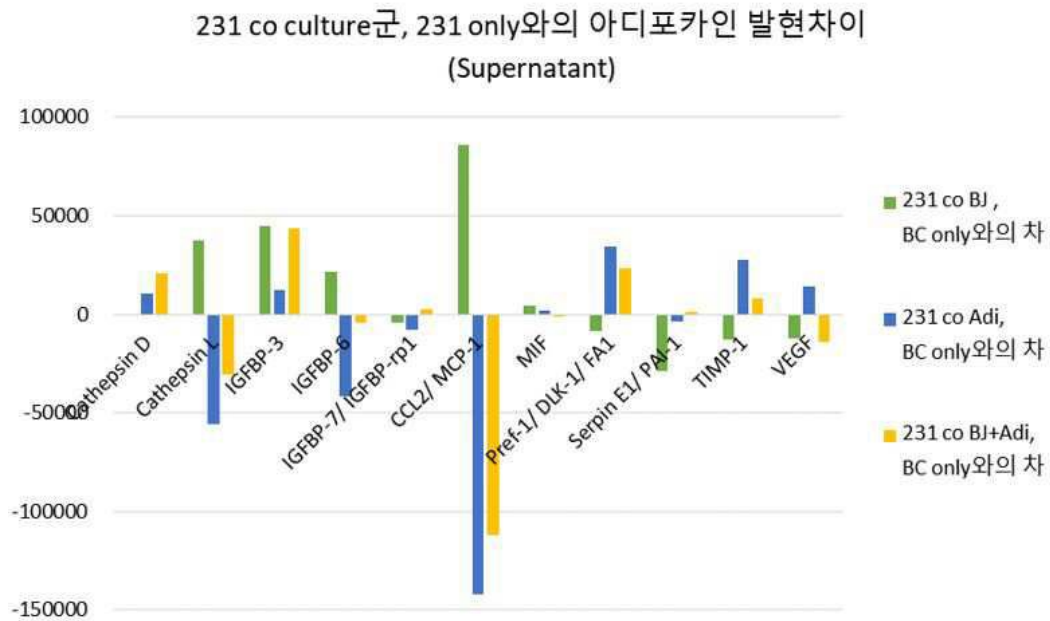


도면3a

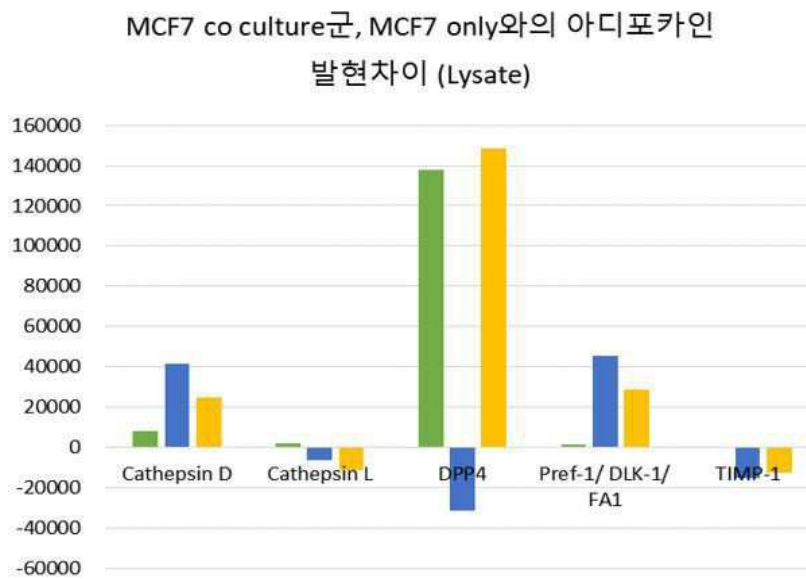




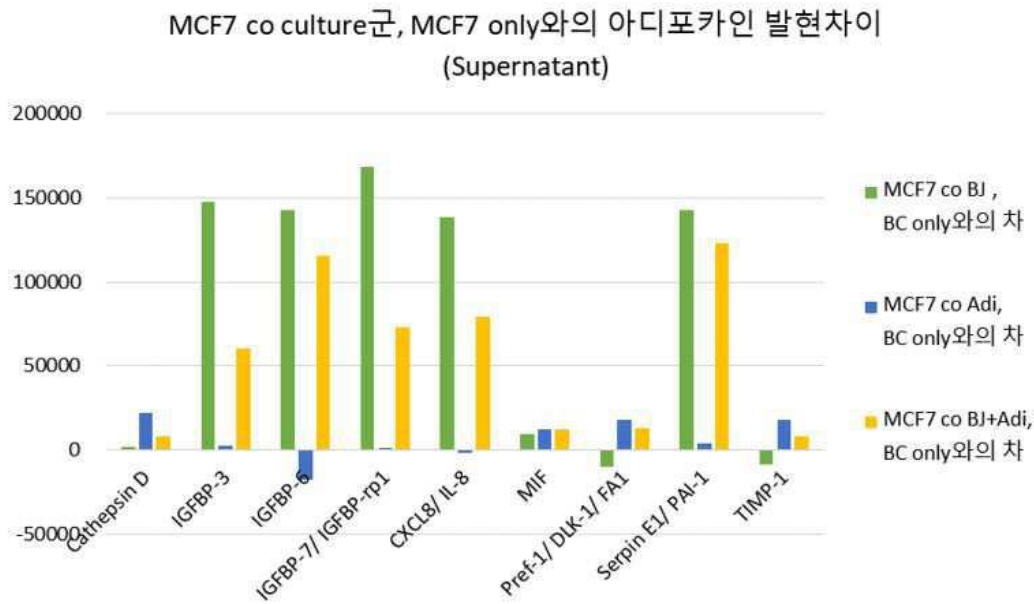
도면3b



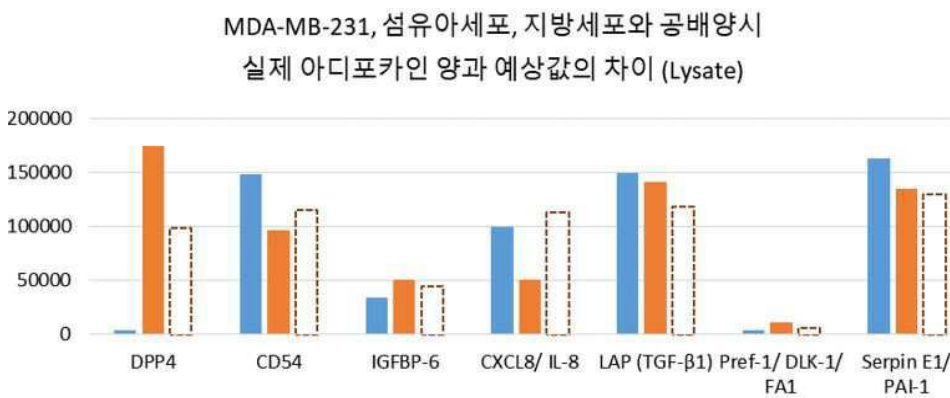
도면3c



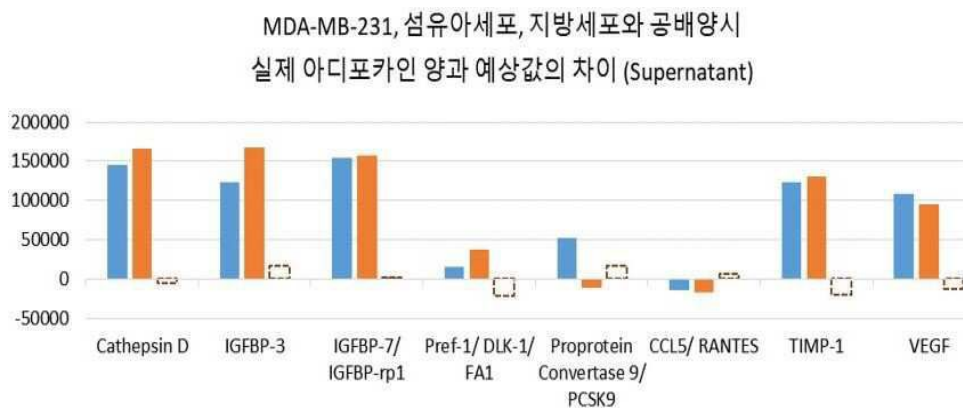
도면3d



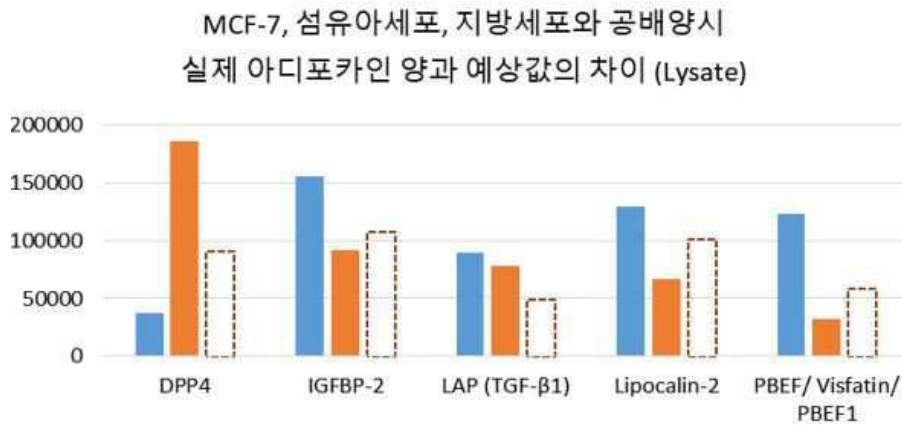
도면4a



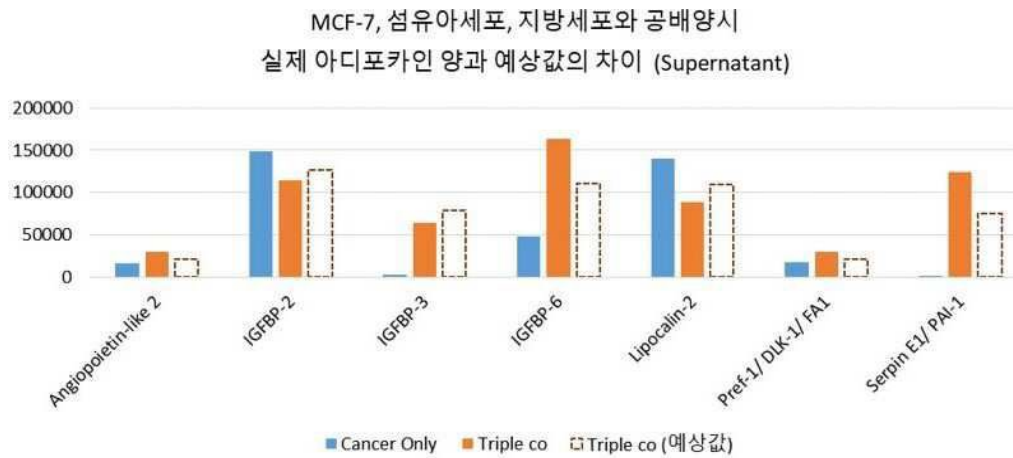
도면4b



도면4c



도면4d



도면5

