



암 미세환경 생체 인쇄의 현재와 미래

중앙대학교병원 비뇨기과학교실

조민지* · 지병훈* · 김명주 · 황영미 · 장인호

The Present and Future of the Cancer Microenvironment Bioprinting

Min Ji Cho*, Byung Hoon Chi*, Myeong Joo Kim, Young Mi Whang, In Ho Chang

Department of Urology, Chung-Ang University Hospital, Seoul, Korea

Cancer is the tissue complex consisted with heterogeneous cellular compositions, and microenvironmental cues. During the various stages of cancer initiation, development, and metastasis, cell-cell interactions as well as cell-extracellular matrix play major roles. Conventional cancer models both 2-dimensional and 3-dimensional (3D) present numerous limitations, which restrict their use as biomimetic models for drug screening and fundamental cancer biology studies. Recently, bioprinting biofabrication platform enables the creation of high-resolution 3D structures. Moreover this platform has been extensively used to model multiple organs and diseases, and this versatile technique has further found its creation of accurate models that figure out the complexity of the cancer microenvironment. In this review we will focus on cancer biology and limitations with current cancer models and we discuss vascular structures bioprinting that are critical to the construction of complex 3D cancer organoids. We finally conclude with current literature on bioprinting cancer models and propose future perspectives. (**Korean J Urol Oncol 2017;15:103-110**)

Key Words: Cancer · Microenvironment · Bioprinting

서 론

암의 미세환경은 엄청난 복잡체로 이루어져있으며, 암의

대다수는 돌연변이화된 상피세포로부터 기원한 암세포, 내피세포, 섬유아세포, 세포 외 기질(extracellular matrix, ECM)로 구성된 주위 간질에 이르는 다양한 미세환경과 상호 작용하면서 증식한다.¹⁻³ 암세포는 혈관 신생 인자의 전구체(vascular endothelial growth factor)를 생성시키고 간질 세포 및 주위 염증 세포(대식세포, 호중구 및 비만세포)와의 상호 작용을 촉진시킴으로써 그들의 증식 및 이동을 조절한다.⁴ 화학적 신호(성장 인자 및 사이토카인) 및 생물물리학적 신호(간질 내압 및 매트릭스 역학)를 비롯한 종양 미세환경은 매우 복잡하며 시간에 따라 진행되며 종양의 성장 및 전이에 중요한 역할을 한다.^{4,5} 이 미세환경은 질병의 상이한 단계마다 나타나는 특유의 주요 특징(세포 및 ECM 조성물, 매트릭스 강성 및 혈관신생정도)을 가지고 있으며 그 작용이 매우 역동적이다.^{6,7} 따라서 암세포와 상호 작용하는 모든 주요 요소를 분해하여 종양의 성장과 이동에 어떻게,

Received November 17, 2017, Revised November 21, 2017,
Accepted November 24, 2017

Corresponding Author: In Ho Chang

Department of Urology, Chung-Ang University Hospital, 102 Heukseok-ro, Dongjak-gu, Seoul 06973, Korea

E-mail: caucih@cau.ac.kr

Tel: +82-2-6299-1785, Fax: +82-2-6294-1406

ORCID code: <https://orcid.org/0000-0003-0240-1310>

*These authors contributed equally to this study and should be considered co-first authors.

· This research was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology, Republic of Korea (2017R1D1A1B03031514), and the Korea Health Technology R&D Project (HI17C0710).



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

2017 © Copyright The Korean Urological Oncology Society and The Korean Prostate Society. All Rights Reserved.

왜, 언제 관련되는지 이해할 수 있어야 하며, 또한 암 종양의 이형성 및 이종성이 있다는 것을 이해해야 한다.⁸⁻¹¹ 이러한 이질성(heterogeneity)때문에 환자 맞춤형 치료는 높은 복잡성과 가변성을 띠게 된다.¹²

전통적인 동물에 기초한 생체 모방 암 모델이 반드시 인간의 생리학과 약물 반응을 재구성하는 것은 아니기 때문에 이러한 문제점을 해결하기 위해, 3D 암 모델은 인체 내 종양 세포/기질 구성과 질병의 유형과 일치하는 적절한 종양 세포/기질을 재구성하여 환자의 생체 내 종양 미세 환경을 정확하게 모방하고, 정밀한 기계학적인 연구를 제공할 수 있을 뿐만 아니라, 개인화된 항암제 치료 스크리닝을 위한 도구를 제공할 것으로 기대한다.¹³⁻¹⁵ 이 논문에서는 조직 공학적 접근을 통해 시험관 내 3-dimensional (3D) 암 모델을 생성하는 기존의 방법 및 한계에 대하여 논하고, 정확한 공간 정밀도와 성분 정밀도를 가져 복잡한 조직 구조물을 생산할 수 있게 하는 3D 생체인쇄기술을 소개한다. 마지막으로 생체모방 암 모델 제작에 대한 3D 생체인쇄기술의 적용과 향후 전망에 대해 논할 예정이다.

시험관 3D 암 모델 구축을 위한 통상적인 접근법

현재의 시험관 암 모델의 범위는 2-dimensional (2D) 단층 모델뿐만 아니라 기존의 조직 공학적 접근법을 이용한 3D 공동 배양(cocultures) 모델까지 다양하다. 평면적인 암 모델(planar cancer model)은 1950년대 초반부터 오랜 역사를 가지고 있으나 생체 내 반응과 비교할 때 특히 약물반응에 강한 차이를 나타낸다.^{16,17} 이러한 차이점은 2D 모델에는 종양 미세환경이 결여되어 있기 때문이며 결과적으로 2D 암 모델의 응용과 효능은 매우 제한적이다.¹⁸⁻²¹ 이러한 2D 단층배양의 결점을 완화하기 위해, 회전 타원체 공동 배양기법과 3D 매트릭스를 사용해서 3D 암 모델을 만드는 방법이 후속적으로 개발되었다.²²

일반적으로 다세포 종양 회전 타원체라고 불리는 종양 세포의 집합체는 세포를 아가로오스(agarose) 및 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane)과 같은 비 부착성 표면에 파종하여 생성할 수 있다.^{22,23} 회전 타원체 생성을 위한 다른 방법에는 “hanging drop”^{24,25}을 이용해 바닥에서 종양 세포의 응집을 유도한다.²⁶ 회전 타원체에서 응집하는 세포는 생체 내 세포와 유사한 특징을 나타내는데, 중심부의 피사가 원형에서 형성된다.²⁷ 개선된 기능을 가진 다세포 종양 회전 타원체는 근본적인 암 생물학²⁷ 및 약물 스크리닝 및 검증에 사용되었다.²⁸⁻³⁰ 2차원 배양과 비교하여 더 발전되었지만, 다세포 종양 회전 타원체를 기반으로 한 3D 모델은 종양 미세 환경의 주요한 ECM 요소가 부족하다.^{4,31}

이러한 문제점의 극복을 위해, 하이드로겔 또는 다공성 스캐폴드를 기반으로 암 ECM을 모방한 3D 매트릭스를 종양세포와 결합시킨 생체모방 암 모델을 개발했다.³²⁻³⁶ 매트릭스 재구성을 위한 생체적합물질인 다양한 하이드로겔은 콜라겐,³⁷ 피브린,³⁸ 및 매트리지(Matrigel)^{39,40}와 같은 천연 고분자에서 추출하며, 종양 ECM의 중요한 특성을 재현할 수 있기 때문에 암 모델링의 맥락에서 일반적인 매트릭스로 사용된다.⁴⁰ 다른 방법으로, 3D 스캐폴드는 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol, PEG), 폴리락트산(poly-lactic acid), 폴리글리콜산(poly-glycolic acid), 폴리에틸렌글리콜 등의 화학적 및 물리적 특성을 보다 잘 제어할 수 있는 합성 폴리머로 제조될 수 있으며, 이들의 공중 합체 폴리(락틱-코-글리콜산, poly-lactic-co-glycolic acid)가 포함된다.^{41,42} 다공성 스캐폴드를 사용하여 생성된 3D 암 모델은 시험관 내와 생체 내 이식 후 매트리지(matrigel)에 내장된 2D 단층배양 및 3D 조직보다 향상된 성장 인자의 분비와 혈관 형성을 보인다.³²

생체모방 암 모델 구축을 위한 생체 인쇄 기술

현재의 3D 시험관 모델과 관련된 주요 문제점은 단순화된 구조를 지니고 있으며, 혈관 형성의 가능성이 매우 제한적이라는 점이다. 예를 들어, 다세포 종양 회전 타원체(multicellular tumor spheroids) 또는 3D 스캐폴드 기반 종양(3D scaffold-based tumors)은 혈관 형성이 부족하기 때문에 크기가 제한되며, 종양 세포와 ECM 조성물의 조직화된 공간 분포가 결여되어 있다. 따라서 최근에는 생체를 모방한 시험관 내 3D 암 모델(biomimetic 3D *in vitro* cancer models)을 구축하기 위한 목적으로 3D 생체 인쇄 기술 활용에 대한 연구가 진행되고 있다.⁴³

1. 생체 인쇄 기술

생체 인쇄 기술은 일반적으로 생체 잉크를 사용하는데, 이는 세포와 같은 생물학적 성분을 가지고 공간적으로 생체를 모방한 방법으로 만드는 기술이다.^{44,45} 3D 인쇄는 수십 년 전에 개발되었지만, 최근에 들어서야 생체적합물질을 사용해서 정교한 생물학적 구조를 제작하는 기술로 발전하였다.⁴⁶ 생체 인쇄 기술의 일반적인 방법에는 잉크젯 인쇄,^{47,48} 압출기반 인쇄,^{49,50} 레이저지원 인쇄^{51,52}와 광조형기술이 있다.⁵³⁻⁵⁵

잉크젯 생체 인쇄는 열적 또는 전압 구동에 의해 활성화되어 확립된 드롭-드롭(drop-by-drop) 부착 메커니즘을 기반으로 하며, 일반적인 카트리지의 설정은(셀이 가득 찬) 생체 잉크로 채워져 있고, 이 잉크는 컴퓨터 프로그램에 의해

구동되는 전동 스테이지와 동기화된 프린트 헤드를 통해 방울로 분사되어 특정 위치에 부착되고 3D 구조물을 구축한다.^{44,45} 잉크젯을 사용한 생체 인쇄는 다른 방법에 비해 상대적으로 저렴한 비용, 빠른 속도, 부착된 구조물상에서 세포의 높은 생존력을 보장한다는 특징이 있다.^{56,57}

압출 기반 생체 인쇄는 노즐을 통해 공기의 압력 또는 기계식 압력을 사용하여 생체 잉크를 분사하는 방법으로,^{44,45} 비교적 비용이 저렴하고 중간 빠르기의 속도를 제공한다.

레이저지원 인쇄(laser-assisted bioprinting) 또는 레이저유도 인쇄(laser-induced forward transfer)의 경우, 중간층을 필요로 하는데 이 중간층은 집중된 에너지를 흡수하고 고압 버블의 국지적 생성을 이용해 레이저 자극에 반응하는 것으로 이 방법은 선택된 기판(substrate) 위에 중간의 생체 잉크를 정밀한 방울의 형태로 분사하는 것이다.^{44,45} 그러나 이 방법은 비용이 비싸고 계층이 부피가 클 뿐만 아니라 생체 잉크보다 선택이 제한된다는 어려움이 있다.

광조영기술은 광을 함유한 하이드로겔을 패터닝할 수 있게 프로그래밍된 미러 어레이(mirrors array)에 의해 생성된 디지털 마스크로 선택적으로 포토 크로스 링크 패턴을 촬영하기 위해 계층-레이어 방식(layer-by-layer manner)으로 바이오 연료 탱크에 투영된다. 이것은 3D 객체 구조물을 수직으로 이동시킬 수 있어서 매우 정확하게 제작할 수 있다.^{53-55,58,59}

이러한 모든 생체 인쇄 방법은 기존 접근법에 비해 3D 공간 내에서 세포 배분을 매우 효과적으로 제어할 수 있으며, 대규모 구조물의 생성을 가능하게 하여 생체 내 조직을 모방한 복잡한 암 미세환경을 재현할 수 있다.

2. 생체 잉크의 종류

종양의 ECM은 종양 및 간질 세포와 함께 종양 미세환경을 구성하는 세포 외 단백질과 분자로 구성되어 있다.^{4,7,18,21} 종양기질의 구성은 종양 유형 및 단계에 독특한 특징이 있으며 환자 간에 강한 이질성을 나타내는데, 이것은 시험 관 내에서 종양의 표현형을 유지하는데 결정적인 역할을 한다.⁶⁰ 또한 매트릭스의 단단함은 지지대 같은 역할을 하여 종양의 개시, 진행 및 전이를 조절하는데 중요한 역할을 한다.⁶¹⁻⁶⁵ 따라서 종양 모델 제작에 사용되는 생체 잉크는 암의 생체 인쇄에 필요한 조건들에 충족되도록 신중하게 선택하거나 설계해야 한다.

생체 인쇄를 위해 사용되는 생체 잉크는 일반적으로 하이드로겔(hydrogel) 형태이며, 이는 인쇄성, 가교 결합 메커니즘(cross-linking mechanisms)과 생체 적합성을 지녀야 한다.^{44,46,66-69} 생체 인쇄된 조직 구조체의 인쇄성은 생체 잉크

자체의 물리적 성질에 의해서도 좌우될 수 있지만, 구조물의 후속 안정화는 추가적인 가교 결합 단계(cross linking step)에 의해서도 좌우된다.^{46,70} 일반적으로, 가교 결합 방법은 두 가지 방법을 적용할 수 있는데, 이것은 알긴산의 경우와 같은 이온적 상호작용 기본으로 한 물리적인 가교 결합과,^{71,72} 하이드로겔 전구체를 포함하여 중합체의 메타크릴화 형태와 같은 공유 결합을 형성할 수 있는 광학적인 가교 결합 방법이 있다.^{44,73-75}

기존의 생체 잉크는 합성물(예: PEG 및 그 유도체, 플루로닉스)과 천연물(예: 콜라겐, 히알루론산, 피브린, 알긴산, 젤라틴)에서 기원한 수많은 종류의 생체 적합 물질(biomaterial)에서 유래되었다.^{44,46,76,77} 천연 생체 적합 물질의 주요 이점은 생체 적합성 및 고유의 세포 부착 리간드의 존재와 같은 우수한 생체 활동에 있으나 일반적으로 이것은 기계적인 성질이 약하고 조절이 어렵다는 단점이 있었다.^{46,78} 그와는 반대로, 합성 생체적합물질로 된 생체 잉크는 광범위한 범위 안에서 기계적 성질, 분해 및 생체 활성을 쉽게 조절할 수 있다는 장점이 있다.^{41,79,80} 각각의 암 유형에 최적화된 생체 잉크를 사용하기 위해서는 천연 및 합성 생체적합물질들의 조합이 필요한데, 이러한 조합은 암 조직에 대한 생존력, 생물학적 활동과 기능적인 측면의 재현성을 최대한으로 기대할 수 있다.

최근에는 decellularized ECM (dECMs)에서 유래한 생체 잉크가 보고되었는데, 이는 조직에 특이적인 dECM을 표준적인 탈세포 절차에 따라 공정한 후 다시 이를 수화함으로써 얻을 수 있다.^{45,81-83} dECM 기반 생체 잉크의 장점은 생체 인쇄 과정에서 표적 조직에 유사한 생체 물질과 생화학적 신호를 유발할 수 있으므로 생체 인쇄한 구조물과 실제 조직과 유사성을 향상시킬 수 있다.

3. 혈관 구조의 생체 인쇄

광범위한 혈관 형성은 암의 중요한 특징으로 시험관상의 암 모델을 구축하는 데 중요한 요소인데 생체 인쇄는 혈관 같은 구조물을 3D 조직상에 만들어 낼 수 있다.^{6,7,84} 이를 위하여 sacrificial bioprinting이라고 하는 기술을 사용하는데, 하이드로겔 매트릭스가 주형 주위에 주조되고, 마지막으로 주형이 선택적으로 제거되어 관류 가능한 채널이 하이드로겔 내에 매립된다. 이러한 빈 채널은 더욱 혈관 내피 세포 내재화를 이용하여 혈관으로 인쇄할 수 있다. 희생적 생체 인쇄를 통한 혈관 생성을 달성하기 위해 다양한 종류의 재료가 선택될 수 있다.

암의 생체 인쇄

현재 사용되고 있는 3D 암 모델은 실험실마다의 차이, 조직 패턴화에 대한 제한된 통제, 낮은 처리량 등의 여러 가지 한계점을 가지고 있으므로 3D 생체 인쇄는 이러한 한계점을 해결하기 위한 새로운 방법으로 제시되고 있다. 그러나, 이는 최근의 방법으로 생체 모방 암 모델에 대한 생체 인쇄 시도는 아직 많지 않다.

앞서 언급한 혈관의 새로운 생성은 대부분의 암 종류에서 필수적인 영양소와 산소를 공급함으로써 암세포가 자라는 데에 매우 중요한 역할을 한다.^{6,7,84} 이 부분에 대해서, 연구자들은 sacrificial bioprinting과 다세포 회전체를 결합한 아교모세포종(glioblastoma) 혈관 신생 모델을 개발한 바 있다.⁸⁵ 혈관 내피세포에 심어진 마이크로 채널이 콜라겐 지지체에 생체 인쇄되고, 이후에 환자로부터 얻어진 신경교종(glioma) 줄기세포를 포함하는 회전체가 혈관 채널에 주사되는 방법으로 제작되었다. 신경교종 회전타원체는 7일 동안 점차적으로 리모델링되어 증식하고 혈관 형성을 보여 암세포-혈관 간의 간극(niche)의 연구에 활용되고 있다.

또한 종양의 미세환경을 중심으로 하는 연구 또한 진행되고 있는데, 3D 자궁경부암 모델을 직접 생체 인쇄할 수 있도록 HeLa 세포들을 젤라틴/알지네이트/피브리노겐으로 구성된 생체 잉크에 캡슐 형태로 제작한다.^{86,87} 전통적인 2D 모델에 비해 생체 인쇄된 3D 모델이 암세포의 확산, 생존 능력 그리고 화학적 요법에 대한 반응이 생체와 유사하며, 우리가 원하는 방향으로 마이크로 섬유 매트릭스(microfibrous matrix)의 네트워크를 디자인 할 수 있다. Droplet 생체 인쇄를 사용하여 난소 암 세포인 OVCAR-5와 매트릭셀에 정상적인 섬유아세포를 사용하는 공동 배양 모델도 제작되었으며, 세포 간의 간격 배분뿐만 아니라 세포의 밀도를 보다 잘 통제할 수 있다는 장점이 있어 생체와 유사한 종양의 미세환경을 만들 수 있다.⁸⁸

면역세포는 암세포의 변형에 적극적으로 관여하는 세포로써 종양 미세환경의 또 다른 중요한 구성요소로 알려져 있다.⁵ MDA-MB 231 유방암 세포와 대식세포 간의 작용을 밝혀내기 위한 공동 압출(coextrusion) 생체 인쇄 모델이 보고되어 있다.⁸⁹ 두 세포 타입은 생체 인쇄의 카트리지 내에 따로따로 주입되며, 공간적으로 분리(통제)된 상태에서 공동 압출이 진행된다. 여기에서 이 유방암 세포들은 대식세포와 함께 CaCl₂ 용액에 섞인 후 코어를 통해 내보내진 후 아르긴산의 바깥층을 가교 결합하는 동안, 아르긴산 생체 잉크에 각인되어 파인 홈을 통해 전달된다. 처음부터 코어 마이크로 채널(core microchannel)에 있던 대식세포의 경우

주위의 유방암 세포와 작용하기 위해 서서히 이동해 나가는데, 이는 종양세포와 주위의 간질세포상 간의 상호작용을 밝혀내기 위한 방법으로 사용된다. 또한 정밀하게 디자인된 niche에 종양세포를 생체 인쇄하는 것 역시 암세포의 전이와 이동에 대한 미래 연구를 가능하게 할 것이다.⁹⁰

비뇨기계 암에서 시험관 3D 암 모델 구축을 위한 현재까지의 연구 현황

신장, 요관, 방광, 전립선 및 요도로 구성된 비뇨기계에서 다양한 암이 발생하지만, 신장암, 방광암 및 전립선암이 주로 발병하며, 많은 연구들이 이들 암을 중심으로 연구되고 있다. Liu 등⁹¹은 microfluidic system을 이용하여 방광암 미세환경을 제작하였는데, 방광암 세포주 T24, 기질세포, 혈관내피세포, 대식세포를 3D 환경에서 공동 배양하였다. 관류시스템을 이용하고, 서로 다른 크기의 채널을 이용하여 4가지 세포를 공동 배양할 수 있는 최적의 조건을 구축하고, 이를 이용하여 저자들은 방광암에 대한 다양한 신보조항암치료법의 효과를 비교하는데 활용하였다. Zhao 등⁹²은 동일한 microfluidic system을 이용한 방광암 미세환경에서 대식세포 및 암세포의 이동에 lactate shuttling이 영향을 준다고 보고하여 암세포의 이동에 대하여 적용이 가능함을 보고하였다. 상기의 연구들은 방광암 3D 암 모델의 개발이라는 데 의의가 있으나, 디자인이 복잡하고 제작이 어려운 점은 상용화의 걸림돌이다.

전립선암은 현재 활발히 연구가 진행되고 있으며, 주로 진단 및 치료에 대하여 3D 암 모델이 개발되고 있다. Salmanzadeh 등⁹³은 전자기장에 대한 전립선암세포의 반응을 microchip 및 전립선암세포주 PC3 스페로이드 배양을 이용한 3D 암 모델을 이용하여 연구하였다. 전립선암세포주 스페로이드는 280 Vrms 전자기장을 쬐었을 때 작아지는 경향을 보였으며, 이를 이용하여 암 치료에 응용하거나 전이 기전에 대한 연구를 수행 중에 있다. 아직까지는 비뇨기계 암의 3D 암 모델 구축에 대한 연구는 초기 단계이고, 대부분의 연구들이 암의 발견에 집중되어 있으므로 향후에 다양한 방향으로 연구가 될 것으로 생각한다.

결론 및 전망

3D 생체 인쇄 기술의 발전은 정밀한 조직의 구성과 혈관 신생을 통해 시험관 내 3D 조직 모델의 제작을 가능하게 하였다. 하지만 3D 암 모델에 생체 인쇄 기술이 적용된 것은 최근의 일이며, 향후 기초 생물학분야뿐만 아니라 항암제 스크리닝과 개인화/맞춤화된 암 치료법을 발견하기 위

해 다양하게 사용될 것으로 예상된다. 그러나 아직까지는 낮은 생존 능력과 암 및 기질세포들의 자연적 표현형을 유지하는 것이 3D 생체 인쇄 기술을 이용한 3D 암 모델을 개발하는데 극복해야 할 과제이다. 개인화된 암세포 모델링을 달성하기 위해서는, 세포의 생체 활동과 표현형을 그들이 native niches에서 가진 그대로 보존하는 것이 매우 중요하다. 이러한 맥락에서, 생체 인쇄 과정 자체에서 세포에 가해지는 스트레스는 세포의 생존력을 떨어뜨린다. 또한 생존력 자체에는 큰 문제가 없으나, 생체 인쇄되는 과정에서 가해지는 스트레스로 인해 표현형이나 기능적인 부분에서 변형이 생길 수 있다.⁹⁴⁻⁹⁷ 따라서 생체 인쇄 과정의 매개 변수들(생체 잉크의 점도, 압출 비율, 노즐의 움직이는 속도)을 제대로 설정하는 것이 생존력과 표현형이 보존된 세포를 만들어내는 데에 아주 중요한 요소가 된다.

우리는 적합한 생체 인쇄 조건을 통한 생체 잉크의 개발 및 생체 잉크 결합 기술을 통한 암세포 생체 인쇄 분야의 발전이 이전의 암 모델의 문제점을 개선할 것으로 기대하며, 결국 환자 유래 체세포, 기질세포, 암세포와의 결합을 통해 개인화/개별화된 암 치료 방법으로 응용될 것으로 생각한다.

이해관계(Conflict of Interest)

저자(들)은 이 논문과 관련하여 이해관계의 충돌이 없음을 명시합니다.

REFERENCES

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.
2. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 2004;432:332-7.
3. De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* 2013;13:97-110.
4. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009;9:239-52.
5. Turley SJ, Cremasco V, Astarita JL. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 2015;15:669-82.
6. Cao Y. Tumor angiogenesis and therapy. *Biomed Pharmacother* 2005;59 Suppl 2:S340-3.
7. Fukumura D, Jain RK. Tumor microenvironment abnormalities: causes, consequences, and strategies to normalize. *J Cell Biochem* 2007;101:937-49.
8. Swanton C. Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. *Cancer Res* 2012;72:4875-82.

9. Marusyk A, Almendro V, Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer* 2012;12:323-34.
10. Cancer Genome Atlas Research Network, Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, Shaw KR, Ozenberger BA, et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat Genet* 2013;45:1113-20.
11. Walter T, Shattuck DW, Baldock R, Bastin ME, Carpenter AE, Duce S, et al. Visualization of image data from cells to organisms. *Nat Methods* 2010;7(3 Suppl):S26-41.
12. Longo DL. Tumor heterogeneity and personalized medicine. *N Engl J Med* 2012;366:956-7.
13. Thibaudeau L, Taubenberger AV, Holzapfel BM, Quent VM, Fuehrmann T, Hesami P, et al. A tissue-engineered humanized xenograft model of human breast cancer metastasis to bone. *Dis Model Mech* 2014;7:299-309.
14. Choi SY, Lin D, Gout PW, Collins CC, Xu Y, Wang Y. Lessons from patient-derived xenografts for better in vitro modeling of human cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;79-80:222-37.
15. Aparicio S, Hidalgo M, Kung AL. Examining the utility of patient-derived xenograft mouse models. *Nat Rev Cancer* 2015;15:311-6.
16. Eagle H, Foley GE. Cytotoxicity in human cell cultures as a primary screen for the detection of anti-tumor agents. *Cancer Res* 1958;18:1017-25.
17. Hirschberg E. Tissue culture in cancer chemotherapy screening. *Cancer Res* 1958;18(8 Part 1):869-78.
18. Alemany-Ribes M, Semino CE. Bioengineering 3D environments for cancer models. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;79-80:40-9.
19. Unger C, Kramer N, Walzl A, Scherzer M, Hengstschläger M, Dolznig H. Modeling human carcinomas: physiologically relevant 3D models to improve anti-cancer drug development. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;79-80:50-67.
20. Pickl M, Ries CH. Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab. *Oncogene* 2009;28:461-8.
21. Weigelt B, Lo AT, Park CC, Gray JW, Bissell MJ. HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment. *Breast Cancer Res Treat* 2010;122:35-43.
22. Hickman JA, Graeser R, de Hoogt R, Vidic S, Brito C, Gutekunst M, et al. Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: capturing tumor complexity in vitro/ex vivo. *Biotechnol J* 2014;9:1115-28.
23. Yeon SE, No da Y, Lee SH, Nam SW, Oh IH, Lee J, et al. Application of concave microwells to pancreatic tumor spheroids enabling anticancer drug evaluation in a clinically relevant drug resistance model. *PLoS One* 2013;8:e73345.
24. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng* 2003;83:173-80.
25. Carver K, Ming X, Juliano RL. Multicellular tumor spheroids

- as a model for assessing delivery of oligonucleotides in three dimensions. *Mol Ther Nucleic Acids* 2014;3:e153.
26. Song KD, Liu TQ, Li XQ, Cui ZF, Sun XY, Ma XH. Three-dimensional expansion: in suspension culture of SD rat's osteoblasts in a rotating wall vessel bioreactor. *Biomed Environ Sci* 2007;20:91-8.
 27. Lee JM, Mhawech-Fauceglia P, Lee N, Parsanian LC, Lin YG, Gayther SA, et al. A three-dimensional microenvironment alters protein expression and chemosensitivity of epithelial ovarian cancer cells in vitro. *Lab Invest* 2013;93:528-42.
 28. Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc* 2009;4:309-24.
 29. Vinci M, Gowan S, Boxall F, Patterson L, Zimmermann M, Court W, et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol* 2012;10:29.
 30. Kim B, Han G, Toley BJ, Kim CK, Rotello VM, Forbes NS. Tuning payload delivery in tumour cylindroids using gold nanoparticles. *Nat Nanotechnol* 2010;5:465-72.
 31. Gilkes DM, Semenza GL, Wirtz D. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* 2014;14:430-9.
 32. Fischbach C, Chen R, Matsumoto T, Schmelzle T, Brugge JS, Polverini PJ, et al. Engineering tumors with 3D scaffolds. *Nat Methods* 2007;4:855-60.
 33. Song HH, Park KM, Gerecht S. Hydrogels to model 3D in vitro microenvironment of tumor vascularization. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;79-80:19-29.
 34. Loessner D, Meinert C, Kaemmerer E, Martine LC, Yue K, Levett PA, et al. Functionalization, preparation and use of cell-laden gelatin methacryloyl-based hydrogels as modular tissue culture platforms. *Nat Protoc* 2016;11:727-46.
 35. Chwalek K, Tsurkan MV, Freudenberg U, Werner C. Glycosaminoglycan-based hydrogels to modulate heterocellular communication in in vitro angiogenesis models. *Sci Rep* 2014;4:4414.
 36. Nietzer S, Baur F, Sieber S, Hansmann J, Schwarz T, Stoffer C, et al. Mimicking metastases including tumor stroma: a new technique to generate a three-dimensional colorectal cancer model based on a biological decellularized intestinal scaffold. *Tissue Eng Part C Methods* 2016;22:621-35.
 37. Szot CS, Buchanan CF, Freeman JW, Rylander MN. 3D in vitro bioengineered tumors based on collagen I hydrogels. *Biomaterials* 2011;32:7905-12.
 38. Jeon JS, Bersini S, Gilardi M, Dubini G, Charest JL, Moretti M, et al. Human 3D vascularized organotypic microfluidic assays to study breast cancer cell extravasation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:214-9.
 39. Kenny PA, Lee GY, Myers CA, Neve RM, Semeiks JR, Spellman PT, et al. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol Oncol* 2007;1:84-96.
 40. Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* 2005;15:378-86.
 41. Zhang YS, Xia Y. Multiple facets for extracellular matrix mimicking in regenerative medicine. *Nanomedicine (Lond)* 2015;10:689-92.
 42. Ma PX. Biomimetic materials for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:184-98.
 43. Knowlton S, Onal S, Yu CH, Zhao JJ, Tasoglu S. Bioprinting for cancer research. *Trends Biotechnol* 2015;33:504-13.
 44. Malda J, Visser J, Melchels FP, Jüngst T, Hennink WE, Dhert WJ, et al. 25th anniversary article: engineering hydrogels for biofabrication. *Adv Mater* 2013;25:5011-28.
 45. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol* 2014;32:773-85.
 46. Zhang YS, Yue K, Aleman J, Moghaddam KM, Bakht SM, Yang J, et al. 3D bioprinting for tissue and organ fabrication. *Ann Biomed Eng* 2017;45:148-63.
 47. Nakamura M, Kobayashi A, Takagi F, Watanabe A, Hiruma Y, Ohuchi K, et al. Biocompatible inkjet printing technique for designed seeding of individual living cells. *Tissue Eng* 2005;11:1658-66.
 48. Boland T, Xu T, Damon B, Cui X. Application of inkjet printing to tissue engineering. *Biotechnol J* 2006;1:910-7.
 49. Khalil S, Sun W. Biopolymer deposition for freeform fabrication of hydrogel tissue constructs. *Mater Sci Eng: C* 2007;27:469-78.
 50. Chang CC, Boland ED, Williams SK, Hoying JB. Direct-write bioprinting three-dimensional biohybrid systems for future regenerative therapies. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2011;98:160-70.
 51. Guillotin B, Souquet A, Catros S, Duocastella M, Pippenger B, Bellance S, et al. Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. *Biomaterials* 2010;31:7250-6.
 52. Gaebel R, Ma N, Liu J, Guan J, Koch L, Klopsch C, et al. Patterning human stem cells and endothelial cells with laser printing for cardiac regeneration. *Biomaterials* 2011;32:9218-30.
 53. Gauvin R, Chen YC, Lee JW, Soman P, Zorlutuna P, Nichol JW, et al. Microfabrication of complex porous tissue engineering scaffolds using 3D projection stereolithography. *Biomaterials* 2012;33:3824-34.
 54. Soman P, Chung PH, Zhang AP, Chen S. Digital microfabrication of user-defined 3D microstructures in cell-laden hydrogels. *Biotechnol Bioeng* 2013;110:3038-47.
 55. Ma X, Qu X, Zhu W, Li YS, Yuan S, Zhang H, et al. Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via rapid 3D bioprinting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:2206-11.
 56. Cui X, Breitenkamp K, Finn MG, Lotz M, D'Lima DD. Direct human cartilage repair using three-dimensional bioprinting technology. *Tissue Eng Part A* 2012;18:1304-12.

57. Cui X, Gao G, Qiu Y. Accelerated myotube formation using bioprinting technology for biosensor applications. *Biotechnol Lett* 2013;35:315-21.
58. Gou M, Qu X, Zhu W, Xiang M, Yang J, Zhang K, et al. Bio-inspired detoxification using 3D-printed hydrogel nanocomposites. *Nat Commun* 2014;5:3774.
59. Lee MP, Cooper GJ, Hinkley T, Gibson GM, Padgett MJ, Cronin L. Development of a 3D printer using scanning projection stereolithography. *Sci Rep* 2015;5:9875.
60. Majumder B, Baraneedharan U, Thiyagarajan S, Radhakrishnan P, Narasimhan H, Dhandapani M, et al. Predicting clinical response to anticancer drugs using an ex vivo platform that captures tumour heterogeneity. *Nat Commun* 2015;6:6169.
61. Zaman MH, Trapani LM, Sieminski AL, Mackellar D, Gong H, Kamm RD, et al. Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:10889-94.
62. Pathak A, Kumar S. Independent regulation of tumor cell migration by matrix stiffness and confinement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:10334-9.
63. Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Ertler JT, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 2009;139:891-906.
64. Huang S, Ingber DE. Cell tension, matrix mechanics, and cancer development. *Cancer Cell* 2005;8:175-6.
65. Butcher DT, Alliston T, Weaver VM. A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2009;9:108-22.
66. Skardal A, Atala A. Biomaterials for integration with 3-D bioprinting. *Ann Biomed Eng* 2015;43:730-46.
67. Chimene D, Lennox KK, Kaunas RR, Gaharwar AK. Advanced bioinks for 3D printing: a materials science perspective. *Ann Biomed Eng* 2016;44:2090-102.
68. Jungst T, Smolan W, Schacht K, Scheibel T, Groll J. Strategies and molecular design criteria for 3D printable hydrogels. *Chem Rev* 2016;116:1496-539.
69. Murphy SV, Skardal A, Atala A. Evaluation of hydrogels for bio-printing applications. *J Biomed Mater Res A* 2013;101:272-84.
70. Colosi C, Shin SR, Manoharan V, Massa S, Costantini M, Barbetta A, et al. Microfluidic bioprinting of heterogeneous 3D tissue constructs using low-viscosity bioink. *Adv Mater* 2016;28:677-84.
71. Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol Biosci* 2006;6:623-33.
72. Christensen K, Xu C, Chai W, Zhang Z, Fu J, Huang Y. Freeform inkjet printing of cellular structures with bifurcations. *Biotechnol Bioeng* 2015;112:1047-55.
73. Nichol JW, Koshy ST, Bae H, Hwang CM, Yamanlar S, Khademhosseini A. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials* 2010;31:5536-44.
74. Yue K, Trujillo-de Santiago G, Alvarez MM, Tamayol A, Annabi N, Khademhosseini A. Synthesis, properties, and bio-medical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials* 2015;73:254-71.
75. Highley CB, Rodell CB, Burdick JA. Direct 3D printing of shear-thinning hydrogels into self-healing hydrogels. *Adv Mater* 2015;27:5075-9.
76. Kolesky DB, Truby RL, Gladman AS, Busbee TA, Homan KA, Lewis JA. 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs. *Adv Mater* 2014;26:3124-30.
77. Kolesky DB, Homan KA, Skylar-Scott MA, Lewis JA. Three-dimensional bioprinting of thick vascularized tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:3179-84.
78. Zhang YS, Aleman J, Arneri A, Bersini S, Piraino F, Shin SR, et al. From cardiac tissue engineering to heart-on-a-chip: beating challenges. *Biomed Mater* 2015;10:034006.
79. Peppas NA, Hilt JZ, Khademhosseini A, Langer R. Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology. *Adv Mat* 2006;18:1345-60.
80. Khademhosseini A, Langer R. Microengineered hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* 2007;28:5087-92.
81. Pati F, Jang J, Ha DH, Won Kim S, Rhie JW, Shim JH, et al. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nat Commun* 2014;5:3935.
82. Skardal A, Devarasetty M, Kang HW, Mead I, Bishop C, Shupe T, et al. A hydrogel bioink toolkit for mimicking native tissue biochemical and mechanical properties in bioprinted tissue constructs. *Acta Biomater* 2015;25:24-34.
83. Skardal A, Devarasetty M, Kang HW, Seol YJ, Forsythe SD, Bishop C, et al. Bioprinting cellularized constructs using a tissue-specific hydrogel bioink. *J Vis Exp* 2016;(110):e53606.
84. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-57.
85. Lee VK, Dai G, Zou H, Yoo SS. Generation of 3-D glioblastoma-vascular niche using 3-D bioprinting. In: *Biomedical Engineering Conference (NEBEC), 2015 41st Annual Northeast*; 2015 Apr 17-19; Troy (NY), USA. Piscataway (NJ): Institute of Electrical and Electronics Engineers; 2015.
86. Zhao Y, Yao R, Ouyang L, Ding H, Zhang T, Zhang K, et al. Three-dimensional printing of Hela cells for cervical tumor model in vitro. *Biofabrication* 2014;6:035001.
87. Ling K, Huang G, Liu J, Zhang X, Ma Y, Lu T, et al. Bioprinting-based high-throughput fabrication of three-dimensional MCF-7 human breast cancer cellular spheroids. *Engineering* 2015;1:269-74.
88. Xu F, Celli J, Rizvi I, Moon S, Hasan T, Demirci U. A three-dimensional in vitro ovarian cancer coculture model using a high-throughput cell patterning platform. *Biotechnol J* 2011;6:204-12.
89. Grolman JM, Zhang D, Smith AM, Moore JS, Kilian KA. Rapid 3D extrusion of synthetic tumor microenvironments. *Adv Mater* 2015;27:5512-7.
90. Huang TQ, Qu X, Liu J, Chen S. 3D printing of biomimetic microstructures for cancer cell migration. *Biomed Microdevices*

- 2014;16:127-32.
91. Liu PF, Cao YW, Zhang SD, Zhao Y, Liu XG, Shi HQ, et al. A bladder cancer microenvironment simulation system based on a microfluidic co-culture model. *Oncotarget* 2015;6:37695-705.
 92. Zhao Y, Wang D, Xu T, Liu P, Cao Y, Wang Y, et al. Bladder cancer cells re-educate TAMs through lactate shuttling in the microfluidic cancer microenvironment. *Oncotarget* 2015;6:39196-210.
 93. Salmanzadeh A, Romero L, Shafiee H, Gallo-Villanueva RC, Stremmler MA, Cramer SD, et al. Isolation of prostate tumor initiating cells (TICs) through their dielectrophoretic signature. *Lab Chip* 2012;12:182-9.
 94. Blaeser A, Duarte Campos DF, Puster U, Richtering W, Stevens MM, Fischer H. Controlling shear stress in 3D Bioprinting is a key factor to balance printing resolution and stem cell integrity. *Adv Healthc Mater* 2016;5:326-33.
 95. Blaeser A, Duarte Campos DF, Fischer H. 3D-bioprinting induced shear stress strongly impacts human msc survival and proliferation potential. *Tissue Eng 2015 Part A* 21(Suppl 1):S322-3.
 96. Ning L, Guillemot A, Zhao J, Kipouros G, Chen X. Influence of flow behavior of alginate-cell suspensions on cell viability and proliferation. *Tissue Eng Part C Methods* 2016;22:652-62.
 97. Li M, Tian X, Kozinski JA, Chen X, Hwang DK. Modeling mechanical cell damage in the bioprinting process employing a conical needle. *J Mech Med Biol* 2015;15:1550073.