REVIEW ARTICLE

환자 맞춤형 종양 미세환경 모사 모델들

이정우¹, 김지아¹, 신영재¹, 지병훈², 김정훈³, 최세영²

¹중앙대학교 의과대학 의학부, ²중앙대학교 의과대학 중앙대학교병원 비뇨의학과, ³한일병원 비뇨의학과

Patient-Specific Tumor Microenvironment Models

Jung Woo Lee¹, Jia Kim¹, Youngjae Shin¹, Byung Hoon Chi², Jung Hoon Kim³, Se Young Choi²

¹Department of Medicine, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea

²Department of Urology, Chung-Ang University Hospital, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

³Department of Urology, Hanil General Hospital, Seoul, Korea

The heterogeneity of cancer makes it difficult to predict the prognosis of treatment. There is still a lack of preclinical model systems that reflect the clinical characteristics of patients who have heterogenous tumors. Advances in 3-dimensional (3D) cell culture are leading to discoveries that occur in the development and progression of cancer that has not been known. There are many models including patient-derived xenograft, patient-derived organoid and spheroid, patient-derived explant, scaffold-based model, and system-based model. Each 3D model has its strengths and limitations. One model cannot answer every question, so it seems most reasonable to approach multiple models when studying cancer heterogeneity. Hopefully, 3D tumor modeling will make tremendous progress on this path by fusion of innovative biomaterials and advanced modeling techniques that can partially mimic the heterogeneous environment of real tumors.

Key Words: 3D tumor model, Patient-derived explant, Tissue engineering, Microfluidics

Received March 25, 2021

Revised April 9, 2021

Accepted May 6, 2021

Corresponding author:

Se Young Choi

Email: alse3025@gmail.com

https://orcid.org/0000-0002-4615-0966

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science, ICT & Future Planning (NRF-2019R1C1C1005170).

서론

암의 예후는 종양의 종류, 병기, 치료 방법에 따라 다를 수 있는데, 암의 이질성은 치료에 대한 평가를 예측하기 어렵게 한다. 최적의 환자 계층화(stratification)는 효과적인 치료법을 선택하고 확인하는 데에 매우 중요하다. 하지만 아직 환자의 임상 특징을 반영하는 전임상 모델 시스템은 부족한 실정이다. 암세포생물학, 3차원(3-dimensional, 3D) 프린터를 이용한 생체조직 제조, 그리고 마이크로 공학 기술의 발전이 약물검사 플랫폼과 새로운 암 메커니즘을 밝히는 데에 쓰이는 보다 정교한 모델의 개발을 이끌고 있다. 이런 종양미세환경을 흉내내

는 모델들은 치료 저항성에 영향을 주는 이질성에 대한 연구를 가능하게 해주었다. 물리, 화학적 인자를 이용한 최신 생물재료와 조직공학 기술은 대용량 플랫폼을 통하여 언제든지 다시 재현 가능하게 해주었다. 하지만 불멸성화된(immortalized) 세포주에만 초점을 맞춘다면 이는 환자에서 유래된 세포의 성질과 맞지 않을 수 있고 결국 치료 약물 효과 해석에 어려움이 있을 수 있다. 물론 이는 새로운 모델 구축과 검증에 필요한 단계이지만, 앞으로의 모델 설계에는 환자 유래 물질의 성질이 반영될 수 있게 패러다임의 변화가 필요할 것이다. 이 종설에서는 먼저 서로 다른 종양미세환경의 이질성을 일으키는 요소를 살펴보고, 기존 전통적인 scaffold-free 방법에 환자

유래 물질을 적용하는 방법에 대해 소개하려고 한다. 또 새로운 생물공학 scaffold-based 접근법, 그리고 생물반응장치(bioreactor), 미세 유체공학(microfluidics), 종양칩(tumor-on-a-chip) 장치 같은 동적 시스템까지 합친 현재 최신 *in vitro* 3D 암 모델을 소개하려고 한다.

암의 이질성(heterogeneity)

역동적 질병으로서 암의 다면적 특성은 특정 시점에 서 종양 각각의 특징을 알아내는 것을 어렵게 한다. 나이, 환경, 생활방식, 유전, 후생유전(epigenetics) 때문에 암은 수많은 종류(type)와 아형(subtype)과 함께 이질성이 나타난다. 종양의 이질성은 암의 단계, 치료력 등 질병의 과정에 따라 더 증가하며, 이는 궁극적으로 환자의 치료상 내성과 실패로 이어진다. 심층 서열분석을 가능하게 한 지속적인 생명공학의 발달로, 특정한 종양의 아클론(subclone)이 분리되고 종양의 이질성 모델을 통하여, 효과적인 개인 맞춤형 약의 개발을 위해 노력하고 있다.

암의 단계에서 이질성은 두가지 핵심 요인으로 나타나는데, 이 두가지 요인은 유전적/후생유전적 내부 요인과 외부 기질적(stromal) 요인이다. 내재적으로 클론 성장, 기능적 특성, 대사 상태, 발현 마커의 차이가 같은 종양 클론에서 일반적으로 발견된다.¹ 클론 진화 모델은 종양 내 이질성의 가장 많이 받아들여진 원인으로, 유전적/후생유전적 변화가 이전의 클론보다 유리한 점이 많은 새로운 클론으로 만든다.¹ 논란이 있지만 암 줄기세포가 후생유전적 변화를 통해 이질성을 증가시켜 종양에 작은 아집단을 만드는 것으로 알려져 있다. 외재적으로는 종양 미세환경이 다양한 분화 단계의 기질 성분, pro/antitumor 면역 생성물, 장기 특이적 세포바깥바탕질(extracellular matrix, ECM)으로 구성된다. 초기에는 종양세포가 국소 종양 미세환경을 조절하지만, 결국에는 활성화된 기질세포가 종양세포의 종양발생(oncogenic) 표현형에 기여하고 시너지적으로 가속시킨다. 항-신생물(antineoplastic) 약물 치료는 암환자의 전반적인 생존율을 높이는 가장 일반적인 방법이지만, 질병 이질성 때문에 부적절하거나 비효율적인 치료가 이루어지거나 불필요한 독성 부작용으로 이어질 수 있다. 미래에는 향상된 서열분석 기술이 개인의 분자생물학적 특징 규정을 가능하게 해, 더 나은 치료 선택과 맞춤형 치료의 토대를 마련해줄 것이다. 그러나 이러한 프로젝트는 공간적, 시간적

맥락에서, 내재적, 외재적 이질성 인자를 설명하는 환자 특이적 모델을 임상에서 이용하며 실행하기 전에 생물표지자의 검증이 필요하다.

이 종설에서 다양한 미세환경의 핵심적인 이질성 요소를 개괄적으로 살펴본 후, 현재 종양과 기질세포에서 나오는 환자유래 세포를 이용해 종양 이질성을 다루는 환자 특이적 배양 시스템에 대해 논할 것이다. 마지막으로 미래를 전망하면서 기초 연구와 임상 연구를 발전시키기 위해 어떤 기술 플랫폼이 환자 특이성과 정확한 질병 모델링을 다룰 수 있을지 예측해 볼 것이다.

종양 미세환경에서의 핵심 이질성 요소에 대한 개요

종양 미세환경은 암 발달의 중요한 요소로 종양은 미세환경 유래 인자의 도움 없이는 생존할 수 없다.² 지금까지 임상 표본의 수집을 통해 암세포 내에서만 아니라 그 주변 기질에서도 유전자 조절 장애가 일어난다는 것이 확인되었다. 종양의 정체성은 암/기질 상호작용으로 나타나는 물리적, 화학적 변수들에 의해 역동적으로 만들어지고 클론 재프로그래밍을 강력히 좌우해 이는 종양과 기질세포 양쪽에서 이질적인 적응 세포 반응으로 이어진다. 바로 아래에 이질성의 핵심 요소들을 소개할 것이며, 환자 특이적 미세환경의 효율적인 종양 모델링에 대한 배경지식을 제공할 것이다.

1. 핵심 세포적 요소

종양은 보통 유전적으로 돌연변이가 일어난 세포 집단과 돌연변이가 일어나지 않은 집단을 모두 포함한 이질적인 세포 집단으로 구성된다.¹ 광범위하게 세포 기질은 상피세포, 정상이거나 암-관련된 섬유모세포(cancer-associated fibroblasts, CAFs), 내피세포, 지방세포, 침윤 면역세포, 혈관주위세포를 포함하며, 이들은 다양한 방법으로 암 발달을 보조한다.³ 유도 혈관형성(angiogenesis)은 종양의 성장과 전파에 매우 중요하므로 모든 암을 아우르는 핵심 요소다. 종양세포의 대사 스트레스는 내피세포와 섬유모세포를 모으고 종양 기질 주위에 새로운 미세혈관이 생성되도록 신호를 내보내는데 이를 혈관형성 스위치(angiogenic switch)라 한다. 종양 혈관형성이 이런 메커니즘으로 일어나면, 혈관은 대개

불규칙하고 잘 새며 조직적인 모세혈관을 만들지 못한다. 기관(organ) 간에서도 변동성이 발생하는데, 기관 특이적인 내피세포가 종양 진행에 영향을 준다.

섬유모세포(CAF)는 종양 이질성과 깊게 관련된 또 다른 핵심 기질적 요소다. 암-종양 혼선(crosstalk) 이후 CAF는 성장인자, cytokine, 대사산물 같은 profibrotic 신호의 분비로 나타나며, 거기서 근섬유모세포가 기질 섬유모세포로부터 발달해 궁극적으로 CAF 표현형으로 이어진다. CAF는 혈관 민무늬근세포, 혈관주위세포, 혈중 섬유세포, 골수 유래 세포에서도 생길 수 있다.⁴ 증식이 매우 빠른 CAF는 ECM 리모델링에 가장 많이 기여를 하고 collagen 생산의 원천이 되며, 암세포가 진행하는 데에 필요한 메커니즘적 지지를 제공한다.⁴ CAF의 생물학적 특징은 이질적이고 서로 다른 종류의 CAF는 별개의 기능적 기여를 한다.³ CAF는 전이(metastasis) 성공 여부에도 중요하며 일부가 암세포와 함께 전파될 수 있어, 암세포가 자리잡고 생존하기 위한 이차 미세환경을 마련하는 것을 도와주고 전체적으로 높은 수준의 이질성에 기여한다.

원발 종양이 진행되는 동안, 암세포는 혈관과 림프관을 타고 온몸으로 퍼지거나 주위 미세환경에 직접 침습해 발전할 수 있다. 세포-세포와 세포-바탕질(matrix) 상호작용, 주변분비(paracrine) 신호전달은 이러한 활동에 중요한 요소다. 암세포 이동 자체는 집락자극인자 1 (colony stimulating factor 1), 상피성장인자(epidermal growth factor), 그리고 각 인자의 수용체를 통해 조절된다. 주변분비로 C-X-C chemokine receptor 4를 발현하는 암세포와 섬유모세포나 혈관주위세포같이 C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12)로 알려진 기질세포 유래 인자 1 (stromal cell-derived factor 1)을 생산하는 기질세포는 직접 암세포 이동에 기여한다.⁵ 암세포가 혈액 순환계로 들어가는 것은 혈관주위 대식세포와 종양 관련 대식세포의 존재와 직접적인 관련이 있다. 암세포와 함께 있는 대식세포는 혈관 기저막의 파괴를 매개한다. 이웃하는 혈관주위세포에서 분비된 인자를 통한 기저막의 소실이나 파괴로 암세포가 림프계로 진입하게 된다. 종양세포에 내재된 상피에서 중간엽으로의 이행(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)과 역 EMT는 E-cadherin의 조절에 의한 이차 미세환경에서의 종양 발달과 생존에 핵심적인 과정이다.

전이 전 틈새(premetastatic niche)의 형성은 암세포가 들러붙는 데에 중요하며 이 틈새는 종양 자체에서 인

자들이 분비되면서 형성된다.⁶ 전이 전 틈새는 각 암종마다 고유하며 혈관 밖으로 유출되는 지점을 결정하는 요인으로 생각된다. 조혈 전구세포, 기질 세포, 내피 세포, 대식세포는 국소 인자에 이끌려 전이 전 틈새로 모여든다. 혈관 밖으로 나간 종양세포 중 오직 약 0.01%만이 순환계 미세환경에서 살아남은 후 전이 전 틈새에 자리잡는다. 일부 세포는 자리잡고 얼마 안 가 잠복상태로 남거나 죽지만, 살아남은 세포는 ECM을 심하게 변형시켜 미세전이(micrometastasis)를 형성하는데, 이는 매우 작아 현재 관찰기술로는 탐지되지 않는다. 전이 종양은 새로운 환경에 대한 종양세포 클론의 적응과 국소 세포 집단, ECM 생산물, 동적인 주변분비 신호의 도움으로 성장하고 유지된다.⁶ 일부 암에서는 원발암과 전이암 사이에 어느 정도 계층 일치치가 있겠지만, 이질성은 전반적으로 전이암에서 가장 높다. 이는 전이암이 환자에 가장 오래 머물면서, 아클론의 진화가 여러 번 일어나고 여러 미세환경에 노출되면서, 각 위치마다 특이적으로 가장 잘 적응하도록 세포 프로그램이 바뀌기 때문이다. 중요한 점은 종양이 진행함에 따라 세포 이질성이 꾸준히 증가하면서, 세포/비세포 상호작용과 그들의 가변적인 생리화학적 기술기가 이질성, 진행, 치료 반응에 추가로 영향을 줄 수 있다는 점이다.¹

2. 핵심 비세포적 요소

세포바깥바탕질(ECM)은 암세포 증식, 침습, 이동, 분화, 전이, 치료 반응, 자멸사(apoptosis)에 영향을 주는 생물물리학적, 생화학적 신호를 줌으로써 암세포 행동을 조절하는 핵심 역할을 수행한다. ECM은 구조적, 생화학적으로 매우 역동적이고 이질적으로, 따라서 암 미세환경의 이질성에 크게 기여한다. ECM은 collagens, proteoglycans, elastin, fibronectin, laminin, hyaluronan (HA) 등과 같은 수백가지의 거대분자로 구성되어 있으며, matrix metalloproteinase (MMP)와 같은 효소로 재형성된다.⁷ 염증은 거대한 ECM 단백질의 침전과 함께 상당한 ECM 재형성을 수반하며, 이 단백질 침전물은 lysyl oxidase (LOX)의 증가로 인해 가교결합(crosslink)하여, 고형 스트레스(solid stress), 종양 ECM 경직, 약물 내성을 야기한다. 증가한 ECM 단백질의 침전은 세포-세포 간 부착, 세포 극성, 성장인자 신호를 바꾸어 암 진행을 촉진한다. 경직성, 국소 해부학적 형태(topography), 생화학적 분포의 광범위한 차이를 포함

해 각 종양의 미세환경에 따라 ECM 조직화가 달라진다. 고도로 정렬된 섬유 네트워크는 뼈 같은 결합조직에서 찾을 수 있는 반면, 무정형의 기질(substrate)은 뇌 같은 조직화되지 않은 구조에서 찾을 수 있고, 그 결과 미세환경의 경직성이 각각 높고 낮다. 예를 들어 뇌는 100–200 Pa 정도이고, 아교모세포종(glioblastoma)과 관련된 ECM은 대부분 collagen IV, procollagen III, laminin, fibronectin, HA-fibrillar collagen으로 구성되어 있다.⁸ 반대로 정상 유방 샘조직은 1–45 kPa 정도로, 종양 ECM은 collagen I, V, IV, fibronectin, entactin, proteoglycan, glycosaminoglycan으로 구성되어 있다.⁸ 종양 ECM은 특이한 단백질 구성을 갖고 있어, 일반 ECM과 달리 분리되면 시험관내에서 암의 성장을 향상시킨다.⁹ 암에서 경직성은 극적으로 증가하며, 그 예로 유방의 fibroglandular 조직이 고침습성 ductal carcinoma 이 되면서 경직성이 13배 증가한 것이 관찰되었다.¹⁰ 결국에는 증가한 경직성이 상호적으로 종양의 진행을 촉진한다. 특히 유방암 조직의 증가하는 ECM 경직성은 암의 공격성, 전이 잠재성, 약물 반응, 전반적인 예후에 대한 중요한 지표다.¹¹ 이는 ECM의 조직 구조의 변화 그리고 재형성 효소뿐만 아니라 강하게 가교 결합한 원섬유 collagen, fibronectin, laminin, proteoglycan 등 바탕질(matrix) 단백질 구성의 변화 모두로 이어진다.

암 침윤은 특히 종양 ECM에 의해 촉발되는데, 종양 ECM은 정상 기질보다 침전이 증가해, 바탕질 경직성이 높아지고 durotaxis에 의해 암세포가 이동하는 결과를 낳는다.¹² 세포 간 부착의 방해 결과 원발성 덩어리로부터 일부 종양 세포가 떨어지게 된다. 이러한 세포들은 ECM을 따라 이동해 주변 조직으로 침습하고 정상 ECM을 손상시킨다. 암세포는 이러한 목적을 위해 microtrack을 형성을 통해 collagen 섬유를 자주 이용한다. 그리고 이런 섬유들은 종종 근처 혈관에 달라붙어, 그 자리에 암세포가 쌓일 수 있다. 초기에 원발암에서 발견되는 콜라겐 섬유는 점차 종양 경계와 수직 방향으로 배열되어, 원발 부위에서 전파가 쉽게 일어나게 한다. 결국 암세포가 원발암에서 떨어져 움직일 수 있게 되면, 암세포는 이른바 mesenchymal나 amoeboid인 이질적 상태로 이동한다. 최근 연구는 종양세포가 쌓이면서 이동이 일어나지만, 결국 세포 이동은 그 세포들이 collagen 섬유를 따라 배열되어 있는 것보다 actin 세포골격에 의해 촉진되는 개별적인 과정이 된다고 주장한다.¹³ 다른 경우에는, 해부학

적 구조에 마이크로미터 규모로 구멍이 어느 정도 존재해도, 구멍 크기가 $7 \mu\text{m}^2$ 보다 작으면 암세포는 주변 ECM을 파괴해야 한다.¹⁴ 종양 세포는 능동적 혹은 수동적으로 혈관이나 림프관으로 들어가(intravasation) 순환계로 진입할 수 있다. Intravasation은 주로 chemokine 농도 기울기에 의해 화학적으로 잘 일어나 암세포가 순환계 관으로 들어가게 하고, 또한 국소적인 스트레스나 궁극적으로 부서지기 쉬운 취약한 관 네트워크를 통해서도 일어날 수 있다. 섬유모세포와 내피세포에 의해 침전되는 fibronectin, collagen IV, tenascin, periostin 등을 포함한 기질 부위 단백질 집합체에는 종양 세포 군락 형성에 영향을 주는 분명한 역할이 있다.¹⁵ 이런 단백질들은 전이 부위에서의 세포 부착과 성장을 촉진한다. 또한 integrin 발현이 종양 세포가 표적 장기를 정하는 데에 관여하는 중요한 인자라는 가설이 세워졌다. Integrin $\beta 1$, $\alpha 2$, $\alpha 6$ 는 뇌, 간, 폐 ECM에서 발현되며, 모두 그 부위에서 세포 부착을 통제하고 있다. 게다가 신호전달 물질을 운반하는 세포 밖 과립으로 알려진 exosome의 역할이 혈관 밖으로 나온 종양 세포 증식을 위해 조직을 준비함으로써 전이 전 틈새를 형성하는 것으로 판명되었다.¹⁶ 종양 세포에서 유래한 exosome은 기관 특이적 세포로의 부착을 촉진하는 integrin 발현을 보여준다. 일단 종양세포가 도착하면, 종양세포는 fibronectin에 의해 유지되고 성장인자가 전이 전 틈새에 도달한다. 종양세포 도착 후 국소 조직 재형성은 침윤과 전이 증식을 하는 데에 필수적이다. 따라서 MMP의 발현 역시 전이 전 틈새에서 상향 조절된다. 전이 종양 주변에서는 ECM 구성과 기계적 경직성이 동일하게 많이 재형성된다. 전이 종양은 원발 종양보다 훨씬 공격적이고 이차 부위에서 더 빨리 성장하기 위한 주변분비 신호전달이 더 활발하다. 다양한 암 종류와 아형은 서로 다른 장기에 우선적으로 전이되며, 이는 각 암이 서로 다른 미세환경에 정착하고 성장하는 경향이 있음을 시사한다. 결과적으로 주요 각 종양 미세환경의 주요 ECM 요소, 생화학적 구성, 공간적 구조, 그에 따른 경직성을 확인하는 것은 생리학적으로 연관된 바탕질을 제작하기 위한 적절한 기반을 제공해, 결국 종양 ECM 이질성을 더 잘 다룰 수 있게 할 것이다.

환자 특이적 종양 미세환경 모델 공학

전통적인 3차원(3D) 종양 배양 시스템은 불멸의 세포

주(cell line)에 의존해왔다. 세포주는 새로운 배양 시스템의 효율성을 검증하고 종양을 3D에서 키웠을 때 어떻게 행동하는지에 대해 중요한 통찰력을 제공하는 데에 필수적이지만, 개별화된 치료를 위한 종양 모델을 만드는 데에는 그 힘을 제대로 발휘하지 못한다. 그 예로 암 세포주가 driver mutation을 보유하고 있는데도, 암 세포주가 조직 기원에 상관없이 모델링하려는 임상 샘플보다 세포주끼리 서로 닮게 되어버리는 것이 다수 연구 결과 밝혀졌다.¹⁷ 즉 세포주를 사용하는 것은 생체내(*in vivo*) 전임상 3D 설정에서도 환자를 위한 효율적인 치료 플랫폼이 되지 못한다는 것이다. 이는 2상, 3상 시험에서 약물 실패율이 높은 것과 관련이 있고, 환자유래 세포를 사용하는 방향으로 패러다임을 바꿔야 한다는 목소리가 나오기 시작했다. 그러나 환자유래 세포는 분리하기 어렵고, 분리된 수가 적고, 주변 기질의 보조에 의존적이어서 증식에 한계가 있기 때문에, *in vitro*에서 배양하기가 까다롭다. 그리고 환자유래 세포의 연속적인 2차원(2-dimensional, 2D) 배양이 적은 절차로 빠른 진단을 가능하게 하였지만, 암 세포주보다 적절성이 높다 해도, 효과적인 예측 모델에 요구되는 범용성에 적합하지 않다. 다만 약물 효능 예측이 항상 목표는 아니며 모델의 목적도 중요하게 고려하기 때문에 모델의 복잡성은 목적에 따라 달라진다. 몇몇 더 간단한 시스템들이 약물 선별에 가장 적합하더라도, 더 복잡하고 생리학적으로 적절한 모델이 검증이라는 목적을 위해 필요하다. 2D에서의 일차 배양 시스템은 대용량을 빠른 속도로 처리할 수가 있어 현재까지 최적의 약물 선별 방법으로 남아있었다. 그러나 약물의 실제 종양에서의 국소적인 침투는 2D 설정에서는 빠져 있는 간질액의 흐름, 저산소증, pH, ECM 구성 성분의 영향을 받고,¹⁸ 이는 치료 효능에서의 연관성이 떨어지고 *in vivo*에서 약물 효능의 예측자로서 능력이 떨어지는 결과를 가져온다. 향상된 3D 시스템의 발달이 이 문제를 일부 다루기 시작했지만, 아직까지 암세포가 질병의 진행에 따라 순차적으로 노출될 미세환경 이질성의 환자 특이적 기질적, 면역학적, 구조적, 화학적, 분자적 양상을 완벽히 재현할 수 있는 전임상 모델은 없다. 지금까지의 발전이 뒤에서 논할 최신식의 향상된 바이오 소재와 기술에 더해지며 복잡한 암 진행 단계를 재현하기 시작했다. 우리는 어떻게 환자유래 미세환경이 scaffold-free 접근법으로 더 전통적으로 모델링 되는지 볼 것이고, 이어서 더 복잡성을 가능하게 한 새로운 바이오 소재와 조직공학 기술도 볼 것

이다. 마지막으로 동적 배양 접근법을 활용한 시스템 기반 기술에 대해 논할 것이다(Fig. 1).

1. Scaffold-free 접근법

현재까지 환자유래 배양의 대다수는 암 진행의 재현과 연구보다는 약물 실험의 목적으로 사용되었고, 암 진행의 재현과 연구는 주로 cell line을 이용했다. 사용 가능한 재료에 제한이 큰 것 외에도, 환자유래 재료를 다룰 때 약물 실험과 생물학적 평가를 할 수 있을 정도로 충분한 시간 동안 조직을 유지해야 한다는 것도 중요한 난점이다. 이와 같이 단순하고 단기적인 전략을 전통적으로 사용하였고 이는 바로 뒤에 소개한다.

1) 환자유래 이종이식

환자유래 이종이식(patient-derived xenograft, PDX)은 표적 검증을 위한 표준적인 방법으로, 지금까지 *in vitro* 설정에서의 논란을 극복할 수 있는 가장 발전된 전임상 모델을 제시해왔다. PDX는 환자에게서 막 떼어낸 종양 생검체를 면역이 약화된 쥐(Nonobese diabetic/severe combined immunodeficient [NOD/SCID], Nude, NOD SCID gamma [NSG] mouse)의 손상되지 않은 기질과 ECM 구조물을 포함한 전위(ectopic) 또는 정위(orthotopic)에서 증식하는 것을 포함한다. 몇몇 경우에는 해리된 종양 세포를 이식 전에 Matrigel이나 다른 gel (fibrin, gelatin)을 이용한 organoid에서 재성장 시키기도 한다. Mouse 순환계의 존재가 화학 요법을 시험할 수 있게 해주고, 또한 다양한 기관으로의 후속 효과를 모니터링할 수 있게 해준다. PDX는 많은 암에서의 종양을 사용했고 일부 전이 종양(이자관 샘종, 포도막 흑색종, 직장암, 유방암, 전립선암)도 사용하지만, 대다수는 원발암에 초점이 맞춰져 있다. 몇몇 최근의 연구는 원발성 유방암, 아교모세포종, 두경부암, 전립선암, 이자관 샘종, 직장암의 이종이식을 포함하기도 한다. 현재까지 이종이식은 생물표지자 선별과 검사, 전임상 약물 평가, 개별화된 치료법에 쓰이고 있다.¹⁹

기본적인 기질과 구조 내에서 PDX는 기본적인 종양 전이의 생물학적, 유전적 형질이 유지되고 여러 단계를 거쳐도 상대적으로 안정적이다. 다만 PDX는 mouse에서 이식 속도의 한계와 ECM 구성을 바꾸는 이종 이식으로 인한 오염이 나타나고 있으며, 이는 궁극적으로 장기간

Fig. 1. Patient-specific tumor models.

배양하는 설정에서 종양이 변질되는 중요한 요인이다. 일부 잘라낸 종양은 생존 가능한 인간 기질이 부족해 빠르게 쥐 기질에 압도당하고 이종이식한 부위의 영향을 받을 수 있다. 이는 증식 속도가 느린 종양 조직에 치명적으로, 숙주세포의 군집 형성이 가능하게 한다.² 이식 부위와 종양의 종류(원발, 전이)에 따라 어떤 PDX는 상대적으로 빠르게 이루어질 수 있고(아교모세포종에서 1-3주²⁰), 반대로 어떤 PDX는 배양에 수 개월이 걸린다(전립선암에서 최대 22개월²). 이런 상당한 배양 시간은 유전자 변형을 증가시키고, 그에 따라 약물 선별 시간이 늘어나, 반응이 달라지고 예측력을 떨어뜨리기 때문에 문제가 된다. 예를 들어 Daniel 등²¹의 연구는 small cell lung cancer (SCLC)의 PDX 모델이 원발 종양 조직과 유사한 유전자 발현 특징을 유지했지만, 다시 배양으로 돌아가 두번째로 이종이식을 했을 때는 비가역적인 변화가 일어났음을 보여주었다. PDX가 종양 미세환경의 비세포적 자발적 이질성을 제대로 설명하지 못하면서, 다양한 방법들이 쓰이고

있다. 특정 기질, CAF, 중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cell, MSC) 등은 큰 종양에 이질성을 유지하게 도와줘, 이를 PDX 옆에 이식할 수 있다.²² 맞춤형 환자 기질 구성성분을 이용하는 것은 더 적절한 인간화 미세환경을 제공하지만, 그것을 분리하고 원래 종양처럼 성공적으로 생존하고 정착하는 것을 보장할 정도로 세포를 불리는 것은 한계가 있다. 그리고 면역 침윤은 또다른 중요한 면이지만, PDX로서는 림프구와 대식세포가 없는 NSG 품종 같은 면적이 상실된 쥐를 써야 한다. 이는 T세포와 B세포로 분화할 수 있는 인간 CD34+ 조혈 줄기세포를 이식해 해결할 수 있다. 마지막으로 고려할 점은 조직 특이적인 ECM인데, PDX 모델에서 이식 효율성을 높일 수 있는 가장 대중적인 방법으로 내재적으로 성장인자 성분이 풍부한 쥐-기저막 Matrigel이 있다. 게다가 사용되는 이 모델은 상당수가 전위성으로, 변형된 ECM 성분으로 구성된다. 이러한 한계는 합성 hydrogel 대체제와 표적 미세환경과 유사한 ECM 성분을 사용하고, 정위부위를 사용함으

로써 해결할 수 있다.

재료로 인한 이질성을 제한하는 또다른 방법은(전형적으로 몇 개월 정도 걸리는) PDX 배양 시간을 제한하는 것이다. 이는 환자가 임상적으로 적절한 기한 내에 개별화된 화학치료를 받을 수 있게 하는 빠른 약물 민감도 검사로서 “mini-PDX”라 불리는 새로운 PDX가 최근 도입되었다. 이 모델에서 종양은 추출되고, 단일 세포로 해리시켜 속이 빈 섬유 캡슐(OncoVee, Biotech, Shanghai, China)에 삽입된다. 그리고 nu/nu mouse에 이식되고 7일 동안 생착시켜 반응성을 비교하게 된다. 이 연구에는 구멍 크기가 500 kDa보다 작은 분자만 통과하도록 하는 것 말고는, 캡슐에 대해 알려진 바가 적다. Mini-PDX는 위암, 폐암, 췌장암 조직, 전이된 십이지장 암종, 담낭 암종의 환자유래 종양세포를 사용한다. 약물 반응에 대한 상당한 차이점이 관찰되었지만, PDX 지시대로 화학치료를 받은 환자들이 기존의 화학 치료를 받은 담낭 암종에 걸린 환자 12명의 집단보다 전체 생존 기간이 길었고 (18.6개월 vs. 13.9개월), 무병 생존 기간도 마찬가지였다 (17.6개월 vs. 12개월).²³ 이는 고무적이지만, 세포 해리와 짧은 기한은 어떤 기본적인 기질 구조도 막았고 기존의 PDX처럼 적절한 3D구조의 재현도 없다는 것을 알아야 한다. 또 *in vitro* 체외 이식 모델이 같은 결과를 낼 수 있는 상황에서 동물을 단기간 실험에 쓰는 것에 대한 윤리적 문제도 있다. 추후 체외이식이나 organoid를 mini-PDX와 비교해 이 방법이 더 잘 예측한다는 것을 밝힐 연구가 이루어져야 하겠다.

궁극적으로 PDX는 이질성과 원발성 종양의 복잡성을 다루는 가장 광범위하게 받아들여진 전임상 플랫폼이다. 그러나 이식과 증식이 가장 공격적인 표현형을 가진 암세포를 선택적으로 유지할 수 있기 때문에, PDX 역시 결과적으로 원래 종양의 특징을 잘못 재현할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 면역계의 상실, 높은 유지비용, 윤리적 문제 때문에, PDX는 약물 시험에 사용할 가장 합리적인 방법은 아닐 것이다.

2) 환자유래-오가노이드와 스페로이드

환자유래-오가노이드(patient-derived organoid, PDO)와 스페로이드(patient-derived spheroid, PDS)는 *in vitro*에서 해리된 단일세포로부터 자발적인 유기적 구조체를 구현할 수 있고 이 유기체는 2D 단일배양이나 PDX보다 원래 환자 종양의 특징을 더 잘 유지할 수 있다.

여기서 PDS는 무바탕질 3D 세포 집합체로, PDO는 자연적 유래 바탕질이 지지하는 3D 배양체로 정의된다. 단연코 PDO를 배양하는 가장 유용한 방법은 Matrigel이나 collagen I과 같은 자연유래 hydrogel 바탕질을 이용하는 것이고, PDS는 adhesive/agarose-coated plate를 이용하는 것으로²⁴ 모두 공학적으로 복잡하진 않다. 천연 hydrogel을 이용한 PDO 배양은 장기적으로 배양할 수 있는 잠재력이 있고 유래된 조직의 이질적 특징 때문에 특별하다. 그러나 organoid 형성의 성공률에 문제가 있는데, PDO가 종양 미세환경과 관련된 섬유모세포, 면역세포, 그리고 다른 지지 세포 종류같이 종양 내 이질성에 직접 영향을 주는 핵심 세포 성분이 자주 부족하다는 것이다. 그렇지만 PDO는 세포주 유래 organoid에 비해 *in vivo* 종양의 유전적 다양성을 더 정확히 유지할 수 있고, 자연 조직병리에 더 가깝게 반복 재현할 수 있다고 알려져 있으며, *in vivo*에서 약물 민감도 예측이 가능해, 결과적으로 강력한 전임상 모델을 제공할 수 있다.

(1) 무바탕질(matrix-free) PDS 형성

바탕질의 지지가 없는 PDS 형성 실험에는 Hanging Drop 기법²⁵과 ultra-low-adherent plate/coating²⁶이 가장 많이 쓰이고, Aggrewell plate²⁷가 드물게 쓰인다. Hanging drop 기법은 종양의 중력 매개 자가조립에 의존하고, 부유(suspension) 배양을 사용하며, ultra-low attachment (ULA) 배양접시는 세포가 잘 부착되지 않는 표면을 갖고 있어, 그 결과 세포 응집을 유도한다. Aggrewell 접시는 특히 매우 균일한 3D spheroid 배양체를 얻는데 좋다. Hagemann 등²⁵은 이 두 기술을 비교했고 hanging drop 기법보다 ULA 접시에서 두 경부 편평세포암종(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)의 더 일관성 있는 spheroid가 형성된다는 것을 발견했다. 전립선암 PDS 성장을 위한 ULA 접시를 이용한 유사한 프로토콜이 환자 109명의 샘플을 이용해 개발되었다.²⁴ Gleason score가 높은 전립선암은 점수가 낮은 것보다 spheroid 형성이 잘 되지 않았다. 게다가 100 μ m보다 큰 종양은 중심에서 저산소증과 비슷하게 괴사가 일어났고, 종양 초기 발달 단계에서 영양 부족 현상이 나타났다. 또한 PDS가 전립선 상피와 기질세포를 포함하고 지지하고 있는 것을 발견하였다. 이 모델은 다양한 약물 치료를 시험하는 데에 쓰였고 결과는 각 환자 샘플마다 달랐다. 이와 비슷하게 Plummer 등²⁸은 아교모세포종 조직으로부터 PDS를 얻기 위해 공동배

양(coculture) 접근법을 이용해, 먼저 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell)를 신경 전구세포로 분화하게 했고, 그 다음 환자유래 아교모세포종 세포와 공동배양하였다. 24시간 후 두 세포를 모두 긁어내 다시 심었고, 화학치료제에 노출시키거나 정밀분석을 위한 조직 microarray를 만들기 위해 고정되었다.

Halfter 등²⁹은 환자 78명의 생검을 이용한 더 광범위한 유방암 연구를 발표했다. 세포 부착을 막고 세포 응집을 유도하기 위해, PDS는 아무 처리도 안 한 한천으로 코팅된 접시를 이용해 형성되었다. PDS 간 이질성은 기록되었다. 흥미롭게도 높은 등급의 종양에서 유래된 조직은 낮은 등급의 종양보다 덜 뾰족하게 PDS가 형성되었다. 이 모델은 임상에서 개별 환자가 받은 다양한 치료의 결과를 예측할 수 있었다. 또 한천 코팅된 접시를 이용해 Bansal 등²⁶은 전립선암 조직으로부터 spheroid를 만들었다. 이 저자는 세포 생존, 클론형성(clonogenicity), 이동성에 영향을 주는 B 세포 특이적 삼입 부위의 억제를 연구했다. 여기서도 환자 간 이질성이 관찰되었다. 종합적으로 PDS 배양은 수행하기에 상대적으로 쉽고 저렴하다. 그러나 주위 조직 미세환경이 제공하는 생물공학적, 생화학적인 신호가 종양의 발달뿐만 아니라 침윤과 다양한 화학요법의 효과에도 영향을 미치는데, 이러한 인자는 무바탕질 spheroid 모델에는 빠져 있다.

(2) 천연 바탕질에 기반한 PDO 형성

기저막 추출물인 Matrigel은 제조과정에서 묽음마다 차이가 생기고 구성이 복잡해 바탕질 신호를 세포 기능으로 연결하는 것이 어려워도, PDO 배양에 이용된 바탕질 중 지금까지 가장 많이 연구되었다. 지금부터 최근이거나 핵심이 되는 Matrigel을 이용한 PDO 연구를 소개할 것이다. Sato 등³⁰의 핵심 논문은 대장암 환자 20명의 창자암(intestinal crypt)을 Matrigel에서 배양한 결과를 발표했다. 인간 organoid는 적어도 한 달 동안 배양할 수 있고, 그 이후로는 형태가 바뀌고 증식이 감소한다. PDO의 배양 기간은 passaging (주로 1-2주마다)을 통해 연장될 수 있으며, 필수 성장인자와 억제자를 추가해 최대 6개월까지 늘릴 수 있다. 이후 이자, 결장직장, 전립선, 위장관, 유방, HNSCC PDO 배양을 위한 비슷한 프로토콜이 개발되었다. PDO는 암생물학 지식의 확장을 위한 일반적인 도구가 되었다. 그 예로 Sato 연구진은 CRISPER-Cas9 게놈 편집 기술을 이용해 평범한 창자 PDO에 종양 억제유전자와 종양유전자 돌연변이를 만든 논문을 발

표했다.³¹ 이렇게 조작한 organoid는 이러한 돌연변이들만으로 암 발생을 유도하기에 충분하지 않음을 강조한다. PDO 배양을 약물 시험과 예측 임상의학이나 미래의 연구에 대비한 PDO biobank에 적용하기 위한 추가적인 연구가 진행되고 있다.

Matrigel에서 자란 PDO에는 다양한 성공률이 나올 수 있다. 이자에서는(성공률 80%) 건강한 이자 organoid가 배양 6개월 후 증식이 멈췄는데, 종양 샘플은 무한정 증식할 수 있었고 냉동보관해도 생존했다.³² Mouse에 정위 PDO 이식 후, mouse 이자에서 정상 관 구조가 관찰되었고 종양 발달의 전체적인 과정이 모방되었다. 종양 이질성은 시간이 지남에 따라 그리고 종양 발달에 따라 달라졌다. 이 변화가 쥐의 미세환경인 organoid가 스스로 촉발한 것인지, 아니면 Matrigel 바탕질 때문인지는 아직 판명된 바가 없다. 한 인상적인 연구가 환자 20명의 건강한 결장직장 organoid와 악성 결장직장 organoid가 짝지어진 biobank 수집물의 특징을 분석했다.³³ 전체적으로 성공률과 냉동-해동 생존율이 모두 80% 이상이었다.

PDO가 대부분 원발 종양으로부터 만들어지는 반면에, 전이 PDO는 한정된 채로 남아있다. 전이 결장직장암에서³⁴ 환자 14명으로부터 Matrigel 배양된 PDO (성공률 71%)가 원래 종양에 비교해 체세포 돌연변이의 90%를 유지했다. Kijima 등³⁵은 이질성이 매우 높고 치료상 내성이 큰 암인 입인두와 식도 편평세포암종으로부터 PDO를 성공적으로 개발했다(성공률 71.4%). 3주가 지나 PDO가 p53와 CD44의 발현, 증식, 자가포식 현상 등 원래 종양과 유사성을 띠었다. 저자는 PDO를 통해 환자에서 높은 CD44의 발현과 자가포식과 관련된 5-fluorouracil 치료 내성을 모방할 수 있었다. 또다른 연구는 유방암에서 90%보다 높은 유지 성공률을 가졌으나 이 비율은 30일 동안 확장한 결과 72%까지 떨어졌다.³⁶ 이 저자는 PI3KA 돌연변이가 있는 환자와 이들 억제 인자에 대한 민감도 사이의 중요한 상관관계를 발견해 환자 간 이질성을 깔끔하게 다룰 수 있었다. 아마 임상 예측의 가능성을 보여준 가장 획기적인 PDO 연구 중 하나는 전이 위장관 암 환자 110명의 PDO에 대한 연구일 것이다(성공률 70%).³⁷ PDO와 원래 조직의 조직학적 평가는 비슷했고, 추가로 원래 종양과 PDO 모델의 돌연변이 스펙트럼 유사성이 96%이었다. 시공간적 이질성과 치료에 대한 종양의 진화/내성은 임상에서 88% 양성 예측도가 나오며 모델을 통해서도 확인되었다.³⁷

흥미롭게도 전립선암은 유독 낮은 PDO 증식 성공률을 보여주었다. 장기간 전립선 PDO 배양 연구에서 저자는 같은 환자에서 유래한 전이 종양, PDX 종양, PDO 모델을 비교했다. PDO 7개가 70% 이만의 부드러운 전이 종양 생검에 대해, 30% 이만의 뼈 생검에 대해 최대 2개월까지 유지되었다. 그러나 지속적으로 증식하는 organoid 배양체를 형성할 효율은 18% 미만이었다. 이 3D organoid 배양은 환자 간 이질성을 유지하며 일차 환자 생검 표본에서 조직학적 구조와 표지자 발현을 모방했다.³⁸ HNSCC에 대한 다른 연구³⁹에서도 Matrigel 사용에서 낮은 성공률(30%)을 보였으나, 성공한 PDO는 *in vivo*에서 나타난 것과 유사한 약물 반응을 보여주었다.

PDO는 개별화 치료의 영역에서 귀중한 자원을 제공하고 다양한 암 종류를 모델링할 수 있는 가능성을 갖고 있다. 환자유래 조직의 이용에서 가장 중요한 점이 양이 적은 조직으로도 많은 시험 가능한 organoid를 생산할 수 있다는 점이다. Organoid가 냉동보관이나 biobank로서 제공하는 재생가능한 자원과 임상과 organoid 모델에서의 치료 반응 사이에서 얻을 수 있는 높은 상관관계는 약물 선별을 위해 강력하게 이용할 수 있는 도구를 제공한다. 약학적 약물 검사에의 PDO 적용을 위한 핵심 생명공학기술의 발전으로는 organoid 배양체를 생성하고 약물 패널에 적용할 수 있는 pipetting 도구의 개발이 있으며,⁴⁰ 이는 spheroid를 통해 수천개의 약물을 선별할 수 있다. Matrigel 묶음 사이에 일어날 수 있는 변동성이 organoid 배양체의 재생을 방해할 수 있지만,⁴¹ 다양한 반(semi)합성, 합성 바탕질의 조작⁴²이 Matrigel같이 복잡한 미세환경부터가 아니라 세부적인 데에서부터 새로운 플랫폼 설계를 도와줄 것이다. 게다가 Matrigel과 collagen hydrogel 간 PDO 행동의 형태적, 표현형적 차이는 미세환경의 신호가 세포 반응에 직결된다는 것을 거듭 보여주어, 사용하려는 바탕질에 신경을 써야 한다고 알려주고 있다. 혈액 공급 부족이 PDO 성장 잠재력을 제한하고 있지만, 이는 새로운 multi-PDO chip-based 플랫폼⁴³이나 organoid 미세환경의 공동배양⁴⁴을 통해 해결할 수 있다.

3) 환자유래 체외이식(patient-derived explant)

PDO가 3D에서 재성장한 세포를 이용하면, 또다른 환자 특이적 접근법으로 수술을 통해 수집한 종양 조직을 기관형 체외이식(organotypic explant)으로써 또

는 조직 슬라이스 배양으로써 배양할 수 있다. 딱 맞게도 종양의 3D 구조는 육안으로 해리했을 때만 온전히 남는다. 환자유래 미세절개 체외이식(patient-derived microdissected explant, PDME)는 주로 조직 조각으로 조심스럽게 해리되기 전에 조각조각 갈리는 반면에, 환자유래 기관형 조직 슬라이스(organotypic tissue slice, OTS)는 메스(scalpel)를 이용해 손으로 자르거나 vibratome같이 특화된 절단기를 이용할 수 있다. 상대적으로 짧은 기간이긴 하지만, 형태, 세포 증식, 조직의 생존력을 이러한 기술을 이용해 유지할 수 있다.⁴⁵

(1) 환자유래 미세 절단 체외이식

PDME는 약물 시험용으로 폭넓게 쓰인다. 수술 표본에서 분리된 일차 조직이 기계적으로 분해되고 효소와 collagenase 소화를 이용해 부드럽게 가공된다. 그리고 밀도 원심분리나 체 거르기(sieving)를 통해 마이크로미터에서 밀리미터 크기의 조각을 분리할 수 있다(40–100 μm 조각, 300 μm , 1 mm³, 3 mm³). 주요 장점은 PDME는 조직을 조작하는 데에 수일이나 수주가 걸리지 않는다는 것이고, 이는 신속한 약물 선별에 적합하기 때문에 중요하다. 약물 검사와 기계론적 조사에 동일하게 사용되는 PDO와 다르게, PDME는 증식 지표(index)가 적고 수일 이상 배양할 수가 없어서, 기계론적 조사에는 쓰이지 않는다. 하지만 다루기가 쉽기 때문에, PDME의 생존력은 미세 유체공학이나 생물반응기 같은 시스템을 이용해 배양 기간을 7–10일까지 연장할 수 있다.⁴⁶

종합적으로 PDME는 종양 미세환경을 고려하면 임상 치료에 대한 반응을 예측하는 데에 사용되는 매우 대표적인 플랫폼을 제공한다. 몇몇 예시에는 치료하지 않았거나 진행되었거나 전이된 non-small cell lung cancer (NSCLC)에 쓸 화학요법을 선택하는 데에 쓰일 때가 있다.⁴⁷ 이 전략으로 과거 대조군 30%에서 두 배 개선되었다. PDME는 전립선암²과 유방암⁴⁸에도 96시간 동안 100% 생존하면서 성공적으로 쓰인다. 일부 연구에서는 PDME를 단순히 배지에 스며들게 하지 않고 때때로 티타늄이나 스테인리스 격자나 젤라틴 스폰지 같은 기질에 놓기도 한다.⁴⁹ 이는 예를 들어 전립선암 PDME 같은 곳에서 볼 수 있는 자주 발생하는 현상인 종양 조직 밖으로 세포가 자라는 현상을 막아, 배양체의 생존력을 최대 일주일까지 유지한다.⁵⁰ 중요한 점은 PDX나 PDO와는 다르게 PDME는 기질세포와 면역세포를 유지한다는 점인데, 이것이 immune checkpoint blockade (ICB)와 같은 면

역-종양학에서 약물 선별을 가능하게 하고, 이는 면역 담당 부분이 결여된 다른 그 어떤 3D 접근법에서도 불가능하다. 이는 미세 유체 기구를 이용해 철저히 조사된 것이다.⁴⁶

PDME의 가장 큰 단점은 실험에 쓸 크기를 조절하기가 어렵다는 것이다. 크기 조절이 빈약해 조각이 좋지 못하게 잘리는 일이 자주 일어난다. 조각들이 체로 걸러진다 해도 조각들은 여전히 서로 차이가 커(두 배 이상 차이가 남) 이질성이 높아지고, 이는 약물 반응의 변동성이 최소화된 상태로 유지되어야 하는 상황에서도 불필요한 변동성을 증가시킨다. 이런 면에서 기관형 슬라이스가 약물 시험을 위한 체외이식물을 배양하는 재생 가능한 방법을 더 많이 제시한다.

(2) 기관형 조직 슬라이스

OTS는 전체 종양 조직에서 꽤 얇은 부분으로, 조각을 부유하거나 지지 구조 위에 배양된다. 최근에는 OTS가 종양 내 이질성과 *in vivo* 종양에서의 종양-기질 상호작용을 고려하는 데에 최적이다.⁵¹ OTS는 organoid 배양에 필요한 조직을 해리하는 것과는 달리 조직 환경의 복잡성을 유지할 수 있으나, 짧은 시간 동안만 가능하다. OTS는 이질적인 표현형을 지지하는 기본 세포를 포함한다. OTS가 많은 장점을 갖고 있지만, 현대 연구에는 그다지 잘 쓰이고 있지 않다. 이 이유는 대부분 생검 조직으로부터 만들 수 있는 샘플 수가 적고, passage가 불가능하며, 배양하는 동안 샘플을 연구할 시간이 충분하지 않기 때문이다.

OTS는 주로 다양한 암 조직에서의 화학요법에 대한 반응을 연구하는 데에 쓰여 왔다. 조직 절단기와 vibratome을 이용한 자동화 절단은 조직을 온전히 유지하고 조직 조각에 손이 최소한으로 가게 해주어 생존 가능성을 높여주었다. 슬라이스의 두께는 적절한 배지 관류(perfusion)가 가능하도록 해야 하는 동시에 조직의 구조를 유지할 수 있을 정도여야 하는데, 대부분 300 μm 안팎이다.² 일부 보고는 더 작은 종양은 자르기 전에 agarose gel에 고정하는 것을 추천한다.⁵² 종양의 질감은 절단의 용이성과도 연관되어 있는데, 부드럽거나 점액질이거나 섬유질인 종양 부위는 500 μm 보다 작게 자르는 것이 불가능하다. 자동화 절단은 NSCLC, 뇌 종양, 결장 종양, 전립선 종양, HNSCC, 그리고 이자 종양 조직의 OTS를 준비하는 데에 광범위하게 쓰인다.

OTS는 다양한 방법으로 배양할 수 있는데, 주로 배지

에 떠있거나 막의 지지를 받는다. 지지 구조물을 사용하는 것은 때때로 OTS 배양의 주 특징이 된다. 초기 발표에는 티타늄이나 스테인리스 금속 격자를 썼고⁵³ 최근 발표에는 Millipore 세포 배양 삽입물을 쓴다.⁵⁴ 일부 연구진은 각 슬라이스 표면에서 의미 없는 염증성 반응을 피하기 위해, 젤라틴 스폰지로 OTS 배양을 지지하기도 한다.⁵⁵ 비교를 위해 Davies 등⁵²은 고정과 조직학적 절개 전에 배양치를 배지에 띄우거나 Millipore 세포 배양 삽입물 위에서 72시간 동안 유지했다. 부유하는 OTS는 스트레스 전달경로가 변하고 조직 온전성도 잃은 반면에, 막에서 배양된 슬라이스에는 이러한 변화가 보이지 않았다. 국소적인 미세환경이 공기와 필터가 만나는 지점에서 형성되었고, 종양이 원래 있던 자리(*in situ*)처럼 산소 농도 기울기를 모방했다. 정적 부유 배양에서는 산소와 영양소 관류의 부족이 조직의 생존력이 약한 이유로 여겨진다. 관류를 보장하기 위한 회전 장치를 이용해 부유 배양을 더 긴 시간동안 지지할 수 있다. 잘 다듬어진 배지 보충제나 자가 혈청의 사용은 배양 시간을 늘리거나 임상적 관련성을 개선할 수 있다. 자가 혈청은 환자 간 이질성과 긴밀히 관련된 한편, 또한 환자의 임상적 과거력에서 발생하는 변동성도 어느 정도 포함하고 있다. 발표된 것 중 찾을 수 있는 가장 긴 OTS 배양 기간은 Millipore 세포 배양 삽입물에서 일차 아교교세포종 조직 슬라이스를 350 μm 두께로 잘라 준비한 Merz 등⁵⁶의 것이다. 환자 12명의 샘플이 적어도 16일 동안 원래 종양 구조와 표현형을 유지할 수 있었다.

전임상 연구에 통합되었을 때, OTS는 임상적으로 관련된 endpoint를 양적 평가할 수 있다. 조직에의 치료의 효과를 기본 종양 이질성을 포함한 전체 구조로써 시각화할 수 있다면 짧은 기간이라도 통찰력을 제공할 수 있다. 또한 정상 조직에 인접하게 종양 조직을 배양할 수 있는 기회는 건강한 주변 세포를 건드리지 않고 악성 세포만 표적으로 한 치료를 시험할 수 있다. 미래에 OTS의 가치를 제대로 활용하기 위해서는, 사용자는 대용량 live spinning disc와 광 시트 공초점 현미경을 고려해야 할 것인데, 이들은 전체 OTS에 쓰일 때 정적 분석보다 괄목할 만한 이점을 제공할 것이다. 이러한 기술로 다양한 공간적 위치에 따라 약물 처치에 대한 시간상 반응을 관찰할 수 있을 것이다. 이러한 접근법은 약물 반응에 따른 살아있는 세포의 메커니즘을 동물의 생체 내를 현미경으로 관찰하는 것보다 희망적으로 높은 수준으로 보여줄 것이다.

2. Scaffold 기반 접근법

Scaffold 기반 시스템은 종양과 기질 유래 재료가 함께 배양될 수 있는 도구를 제공한다. 적용할 수 있는 화학적, 물리적 단서와 함께 천연이나 합성 바탕질을 사용함으로써, 다양한 미세환경 인자들의 영향을 연구할 수 있다. 혁신적이고 더 적절한 전략이 계속 보고되고 있고, Matrigel이 쥐 종양 ECM에서 유래되었지만 현재에도 환자유래 물질의 3D 세포 배양의 절대적인 표준이다. 여기서부터 우리는 합성/반합성 hydrogel과 조직 공학 scaffold와 위 조합물에 초점을 맞추어 다른 모든 scaffold 기반 대체물에 집중해볼 것이다.

1) Hydrogel과 조직 공학 scaffold

(1) Hydrogel

PDO는 일차 종양 세포의 생체모방 배양에서 획기적인 개선을 보여주었다. 그러나 주변 바탕질의 전성(malleability)이 약해 공간적 조절과 세포를 통제할 수 있게 다층으로 쌓는 것이 힘든 문제가 남아있다. 반합성이나 합성 재료는 둔함(inertness)을 쥐 세포가 특이적 표현형이나 형태를 만들기 위해 신호를 받기보다 스스로 세포만의 ECM을 축적할 수 있는 능력을 제공한다. 이는 Matrigel이 자기 scaffold 간, 묶음 간 이질성으로 환자 이질성을 훼손하는 한편, 합성 재료를 사용하면 생체 재료의 이질성 감소를 얻을 수 있음을 의미한다.⁴¹ 주로 glycoprotein과 함께 polyethylene glycol (PEG)에서 유래한 최신 3D 생물공학 모델은 천연 바탕질의 발달을 도와주면서 추가한 ECM 단백질을 통제할 수 있게 해준다. 이러한 접근법은 지속적으로 개선되었고 그 결과 신소재들이 탄생했으나, 일차 환자유래 종양세포로의 적용은 미미한 상황이다.

Hribar 등²⁷은 integrin 결합 부위와 MMP 분해능력이 있는 무-성장인자 플랫폼인 VersaGel이라 불리는 photocrosslink 가능한 hydrogel에서 아교모세포종과 신장세포 암종의 배양을 설명했다. VersaGel은 PDX 샘플이나 환자 조직에서 온 해리된 세포나 종양 조각의 성장을 도와준다. 앞선 ULA 플라스크에서의 배양이 VersaGel에 놓이기 전에 spheroid 형성을 촉진한다. 일반 배지에서 배양된 gel이 뽕뽕이 배치된 spheroid가 된 반면에 원래 ULA spheroid 배양에서 온 조건 배치(conditioned media)에서 배양된 gel은 신장암 PDX

조직의 침습적 표현형을 보여주었다. 환자 다섯 명의 아교모세포종 샘플도 VersaGel에서 배양되었고 일선 아교모세포종 화학치료제인 temozolomide에 노출되었다. 여기서의 반응을 Matrigel에서의 반응과 비교했는데, VersaGel의 치료 반응이 환자 다섯 명 모두의 임상 반응과 연관된 반면, Matrigel 배양은 환자 다섯 명 중 오직 세 명과만 연관되었다. Combinatorial hydrogel 접근법은 다른 연구진들⁵⁷이 가슴막과 폐 사이에서 발견된 유출액에서 분리된 두 폐암 샘플을 배양하는 데에 사용했다. 이 hydrogel은 자외선 중합을 이용해 methacrylate화된 collagen I과 thiolate화된 HA로 구성되었다. 배양은 6주간 유지되었고 세포집단의 이질성을 유지했으며 2D 배양에 비해 화학치료가 gel에 덜 먹혔다. 또다른 combined hydrogel 접근법에서는 환자 12명의 충수암으로 HA-collagen hydrogel 모델을 제작하였다.⁵⁸ 일부 배양체에서 연구자들은 환자의 종양 샘플에 더해서 같은 환자의 림프절에서 뽑아낸 세포를 추가해 배양체의 “면역을 향상”시키려 했다. 환자 12명으로부터 75%의 배양체를 완성할 수 있었다. 높은 등급의 암은 hydrogel에서 조직 비슷한 구조를 보여주었고, 낮은 등급의 암은 더 확산된 세포/organoid를 보여주었다. 흥미롭게도 낮은 등급의 암은 화학치료에 반응하지 않았으나, 높은 등급의 암에는 다양한 반응이 있었다. 림프절 세포와 공동배양한 종양에서는 면역치료에 노출된 organoid가 첫 노출 24시간 후에 증가한 미토콘드리아의 대사 활동을 보여주었다. 그러나 노출 96시간 후 치료를 받은 그룹에서 미토콘드리아 대사가 줄었다. 이러한 면역세포와의 상호작용은 특히 면역치료 연구에서 종양 미세환경 재현의 핵심적인 부분이다. Tam 등⁵⁹에서는 HA도 포함한 생체모방 hydrogel 플랫폼을 이용해 전이 폐암 모델을 개발했다. 폐조직의 점성과 탄성을 모방하기 위해 methylcellulose를 3D 모델에 첨가하였다. MMP 매개 세포 이동과 침습은 세포 분비 MMP에 의해 촉매 분해 가능한 collagen I 유래 펩타이드 가교를 포함함으로써 설명했다. 연구자들은 대용량 약물 선별을 가능하게 할 384-well 포맷을 개발하기 위해 그들의 배양 플랫폼을 개조했는데, 이는 미래의 환자 특이적 *ex vivo* 모델의 핵심 우선사항이다.

Fong 등⁶⁰은 PDX 샘플과 조직 공학을 섞었다. PDX 전립선 종양 해리 직후에 세포 알갱이들은 HA-PEG hydrogel에 다시 띄워졌는데, 이 PEG 구성성분은 Arg-Gly-Asp (RGD) tripeptide와 MMP로 분해할 수 있

는 서열로 수정된 것이다. 몇몇 경우에는 PDX 샘플은 MC3T3-E1 뼈모세포와 함께 압축되기도 한다. 이 모델에서 뼈모세포는 시간이 흐르면서 확산하고, 반면에 PDX 전립선암 샘플은 뭉친 채로 있다. 공동배양은 개별 단일배양보다 높은 증식성을 보여주며, 모델에서 효과적인 세포 간 신호전달을 보여준다. 게다가 이 연구는 원래 환자 종양, 쥐 PDX 모델, *in vitro* hydrogel 모델 사이의 강한 구조적, 표현형적 유사성을 보여준다. Fong 등⁶⁰은 나중에 16개의 간암 PDX 샘플을 배양하기 위한 hydroxypropyl cellulose methacrylate에서 유래한 새로운 미세구멍 hydrogel 스폰지를 발표했다. 샘플 16개 중에서 두개는 시스템에 맞지 않았으며, 이는 샘플 간 종양 다양성을 암시했다. Taubenberger 등의 연구에서 이미 환자유래 샘플의 배양을 위해 반합성 PEG-hairpin hydrogel을 사용했다.⁶¹

가장 최근에 Bray 등⁴²은 사람의 급성골수성백혈병 (acute myeloid leukemia, AML) 세포의 성장을 이 hydrogel에서 관찰하고 그것을 일선의 화학치료로 처치한 연구를 발표했다. 환자 세명의 말초 혈액에서 온 세포주와 일차 AML 세포는 사람 배꼽 정맥 내피 세포(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)와 MSC에서 유래된 혈관계를 따라 성장하는 경향을 보여주었다. 그러나 세포주는 배양 전체로 증식하는 반면, 일차 AML 세포는 퍼지지 않고 그 자리를 유지했다. 배양은 화학치료제 처치 전 7일간 유지되었고 기증자 사이에서 다양한 결과를 보여주었다. De la Puente 등⁶²의 연구에서 fibrinogen hydrogel을 이용해 다발골수종(다발골수종 환자에게서 유래한) 기질세포, HUVEC의 다세포 배양을 개발했다. 그리고 이 fibrinogen을 poly(lactic-co-glycolic acid) (PGLA) microsphere, AlgiMatrix, MatriGel과 비교하였다. 이 fibrinogen 모델을 이용해 저자는 환자유래 다발성 골수종(multiple myeloma, MM) 세포와 기질세포의 공동배양이 MM 세포의 증식을 증가시키고 내피세포가 추가되면 증식이 더 증가하는 것을 발견했고, 이는 종양 미세환경 모델에 지지 세포를 추가하는 것의 중요성을 보여준다. MM 세포가 2D 환경에서 배양하기가 악명 높게 어렵고 대부분은 *ex vivo*에서도 자라지 않는다는 점에서, 이는 흥미로운 발견이다. 다른 바탕질 종류를 볼 때, PGLA microsphere는 환자유래 MM 증식을 도와주지 못하고, AlgiMatrix와 MatriGel은 MM 증식을 조금 도와주는 한편, fibrinogen

scaffold는 혈액과 골수 원형질의 천연 구성물질이 되기 때문에 환자 세 명의 MM 샘플의 증식이 250%까지 증가하게 도와준다. 이러한 scaffold는 산소 농도 기울기를 형성하고, hypoxia-inducible factor 1- α (HIF1 α)와 pimonidazole가 scaffold의 농도가 하층에서 높게 발견되는 한편, 약물 침투성은 scaffold 깊이에 반비례한다.

아교모세포종 연구 영역에서는 alginate microfiber와 결합한 합성 PEG hydrogel을 이용해 3D 종양 모델링이 진척되고 있다. 연구자들은 쥐 뇌 미세혈관 내피세포주와 결합해 환자유래 성인 아교모세포종 이종이식 세포주(D-270MG)를 활용했다. 종양세포는 RGD 펩타이드와 분해 가능한 MMP와 함께 PEG-HA hydrogel 전구체 용액에 다시 띄워졌다. 이 종양세포는(photocrosslinking을 통해 형성된) 무세포성 alginate microfiber나 alginate 용액에 미리 띄운 내피세포주와 공동 배양되었다. 이 단층 내피세포들은 단일배양에서는 잘 형성되지만, 종양세포와의 공동배양에서 조직화되지 못하고 둥글게 된다. 14일 후 내피세포 통로 근처의 아교모세포종 종양은 더 둥그렇게 된 반면, 단일배양에서는 이 종양이 더 퍼진다. 그러나 쥐 내피세포와 인간 아교모세포종 세포를 이용하는 것은 현실적인 반응을 제공하지 않는다. 또한 생성된 미세섬유 통로가 관류나 흐름을 일으키지 않았다는 점도 기억해야 한다. 그럼에도 hydrogel 재료와 융합한 모세관 구조의 공간적인 조직화는 유용한 *in vitro* 모델을 재구조화 할 수 있게 한다. 관류 가능한 모세관에 대한 미래의 연구가 종양으로의 영양과 산소 공급의 관점을 업그레이드할 것이다.

종양 미세환경의 재현은 종양세포의 배양을 넘어선다. 최근 연구에서는 젤라틴 다공성 microbead를 이용해 미세조직 구조를 만들거나 spheroid를 생산한다. CAF나 정상 섬유모세포는 microbead와 함께 spinning flask에 실리거나 methylcellulose 용액이 든 둥근 바닥 무처리 96-well 접시에 심어지고 12일간 유지된다. Methylcellulose 모델의 생물물리학적 특성은 CAF와 정상 섬유모세포의 중간과 비슷하지만, microbead에서 배양되면 중요한 차이점이 드러나기 때문에, 모델 개발에서 구조를 고려하는 것이 중요하다. CAF의 바탕질 퇴적이 증가했고, 정상 섬유모세포에서 생겨난 것에 비해 높은 증식 속도, 높은 경직도가 나타났다. 추가로 용매의 녹는점 아래에서 hydrogel을 형성함으로써 cryogel이 생성될 수 있다. PEG-hairpin에서 형성된 cryogel이 보고

되었고⁶³ 그것은 유방암 세포주와의 공동배양을 위해 결정화된 일차 인간 뼈모세포를 이용해 뼈 미세환경을 만드는 데에 사용되었다. 또다른 연구에서는 methacrylate 그룹(GelMA)으로 개조된 젤라틴 기반 cryogel을 활용했다.⁶⁴ 저자들은 cryogel을 이용해 유방암 환자에서 유래한 CAF를 이용한 종양 기질 미세환경을 만들었고, 단일 배양에 비해 암세포 전이가 증가한 것을 보여주었다. 다른 연구자들⁶⁵은 CAF를 활용해 유방암 일차세포와 뇌 전이세포 이동에 CAF가 미치는 영향을 연구하였다. 그들은 PEG-HA-Collagen hydrogel을 이용해 수많은 환자 유래 종양세포가 뇌 전이 샘플에서 유래한 CAF로 전이된 것을 발견하였는데, 이 발견은 전이 전 틈새 가설을 지지하고 암세포를 끌어오는 데에 cytokine 농도 기울기가 효율적임을 강조했다.

악성 변이가 일어나는 동안 국소 조직이 겪는 미세환경 변화가 생기는 것은 중요하면서도 자주 간과되는 암 모델링에 통합될 필요가 있는 종양 공학의 양상이기도 하다. 그럼에도 연구자가 반합성이나 합성 hydrogel 바탕질 이용을 통해 재료 간섭의 감소 등 재생산성에서 무엇을 얻든, Matrigel에서 ECM 구성물질이 많이 손실된다는 것을 알아야 한다. 그러므로 이러한 합성 모델이 환자 간, 종양 간 이질성이 Matrigel 기반 모델과 비슷하게 유지되었는지 결정할 조건을 제대로 갖추었는지 확인해야 한다. 가장 적합한 *in vitro* ECM 재현은 고르는 조직에 달려 있다. Collagen은 유방, 전립선, 직장결장 부위를 포함한 많은 종양 조직에서 가장 중요한 성분이다. Collagen 말고도 ECM을 구성하는 proteoglycan, laminin, fibronectin도 모두 종양 진행의 맥락에서 중요하다. Hairpin과 HA 유래 hydrogel의 적용은 위에 서술하였으나, 반합성 hydrogel 재료의 조작에서 chondroitin sulfate 같은 다른 glycosaminoglycan을 포함하기 위한 추가적인 연구를 수행할 수 있다. 조직 공학의 영역에서는 ECM 모방을 위해 collagen I (GFOGER), laminin-111 (IKVAV), fibronectin (GRD)을 모방하려 펩타이드 모티프를 합성 재료로 통합해볼 수 있으나,⁶¹ 이를 환자유래 조직을 이용해 검증해보지는 않았다. 몇몇 경우에서 포함된 지지 세포들이 그들의 바탕질을 스스로 쉽게 축적할 수 있으면 ECM 성분을 합성 hydrogel로 통합할 필요가 없을 수 있다.

(2) Tissue-engineered scaffold

종양 미세환경 공학에 적용된 Scaffold는 표적 미세환

경에 맞춰 제작이 쉬운 천연이나 합성 폴리머에 기반을 두었다. 천연 폴리머(alginate, chitosan)로부터 만들어진 구조물은 독성이 낮고 천연 ECM과 성분이 비슷하지만, 기계적으로 약하고 분해성이나 화학적 성질을 조절하는 데에 제한이 크다. 합성 구조물은 재생산성이 높고 화학적, 기계적 측면에서 재단이 쉬운 의료등급(medical-grade) 폴리머[polycaprolactone (PCL)과 PLGA 기반]로 만들 수 있다.

Hydrogel은 부드러운 종양을 모방하는 데에 적합한 반면, 단단한 scaffold는 경도가 2에서 10 GPa 정도 되는⁶⁶ 단단한 뼈 같은 경직도가 높은 종양 부위에 더 적합하다. 의료등급 PCL (mPCL)은 점성과 탄성이 적합하고 녹는점이 낮아 다양한 scaffold 모양을 제작하기 쉽기 때문에 뼈 조직 공학 적용에 폭넓게 쓰인다. 이는 대부분 *in vivo* 적용에 조사되었지만, mPCL은 이제 *in vitro* 암 모델에도 쓰이고 있고, 주로 뼈세포의 이식과 배양을 가능하게 하는 미세섬유 3D 구조물로서 생산되고 있다. Bock 등⁶⁷은 mPCL 미세섬유를 일차 인간 뼈조직에서 분리한 뼈 전구세포가 담긴 선형이나 관형 다공성 scaffold에 print하기 위해 추가 공정("용융 전기각인")을 거친 용융 전기방사법을 이용했다. 섬유를 인산 칼슘으로 코팅하고 뼈 형성 분화 배지를 이용함으로써, 그에 따른 뼈모세포 유래 미세조직이 핵심 ECM 축적이 풍부한 뼈모세포와 뼈세포를 포함하게 되었다. 암세포주⁶⁷와 PDX⁶⁸를 공동 배양해 환자 유래 미세조직이 뼈에서 전립선암의 성장을 연구하기 위한 *in vitro* 결정화 모델 플랫폼으로 쓰인다. 이 PDX 연구에서는 림프절 전이(LuCaP35)와 뼈 전이(BM18)에서 온 전립선암 PDX 모델이 사용되었다. PDX는 관형 뼈모세포 유래 미세조직의 중심에서 Matrigel의 지지를 받고 3주간 배양된다. 공동배양은 유전자, 단백질, 결정화 정도에서 양쪽 PDX가 뼈를 모방하게 했다. 흥미롭게도 PDX 공동배양을 기증자 한 명의 뼈 전구세포로부터 만들어진 미세조직으로 완성했지만, 연구는 처음에는 미세조직을 서로 다른 기증자 세명의 세포로 만들었다고 보고했다. 한 환자에서 온 세포는 재생 가능했지만, 뼈 미세조직은 기증자 이질성을 보였고, 한 환자는 구조의 결정화가 잘 안 되었는데, 이는 심각하게 비만인 body mass index로 설명 가능했다. 이러한 결과는 적절한 환자 특이적 맥락의 조직 공학을 보장하기 위해 3D 배양 시스템 모델에서 일차 세포를 이용하는 것이 중요함을 말해준다. 미래에는 완전한 인간 모델에서 쥐 성분을 피하기 위해 Matrigel

이 GelMA같은 매력적인 합성물질로 대체될지도 모른다. Bock 등⁶⁷에서처럼 유사한 scaffold 디자인을 이용해, 용융 mPCL 전기각인 scaffold가, 분화된 불멸 인간 MSC를 이용하더라도, 뼈모세포와 비슷한 미세환경을 만들기 위해 쓰인다. 두 환자유래 PDX 샘플들이 해리되고 결정화된 미세조직 위에서 한 환자 PDX는 50일 동안 다른 환자 PDX는 30일 동안 배양되었다. 구조물에 기질이 없으면 이곳에서 온 PDX 세포도 생존했다. 이는 환자유래 성분의 장기간 배양을 위해서는 기질 환경이 필요함을 의미한다.

용융 전기각인 mPCL scaffold는 또한 전립선 CAF와 정상 섬유모세포를 배양하고 기질 환경이 갖춰진 미세조직 구조를 만들기 위한 ECM 축적을 용이하게 하는 데에 쓰인다. 보통 전립선 섬유모세포와 비교했을 때 CAF 미세조직에서 배양하면 BPH-1 양성 전립선 과다형성 내피 세포의 구형, 방향, 세포 길이가 변한다는 것이 보고되어 있다. 비슷하게 Nayak 등⁶⁹은 salt leaching 기술로 제작한 PCL 다공성 scaffold를 활용해 ECM 바탕질에 불멸 CAF가 축적된 두 환자유래 유방암 표본을 배양했다. 이 사례에서 CAF가 있는 PCL scaffold는 ECM 축적 이후 탈세포화 했다. CAF ECM의 존재가 맨 PCL scaffold과 비교했을 때 유방암 내피세포의 생존력과 세포-바탕질 상호작용을 증가시켰다. 유방암 세포의 약물 반응성은 환자마다 천차만별이었으며, 이는 환자 간 이질성이 유지되었음을 의미한다.⁷⁰

2) 부가 바이오 제조/3D 바이오 프린팅

3D *in vitro* 종양 모델을 디자인하기 위한 scaffold 기반이나 무-scaffold 접근법의 대부분은 세포나 바탕질 정형화의 한계, 다수 세포 집단과 ECM의 동시 축적의 한계, 적은 처리량, 수동 제작, 묶음 간 변동성 등 많은 한계를 보여주고 있다. 부가 바이오 제조나 바이오 프린팅은 복잡하고 공간적으로 깔끔한 3D 생물구조물의 재생 가능한 제조를 가능하게 하는 다용도 대체제이다. 전통적으로 3D 바이오 프린팅은 압출이나 잉크젯이나 레이저 등의 보조로 이루어진다. 다수의 세포나 조직으로 구성되면서, 바이오 프린팅된 다세포 모델은 보통 조직이나 병든 조직을 모델링할 수 있는 특이적 미세환경을 더 사실적으로 재현할 수 있다. 더 최근에는 이러한 다용도 기술이 다세포성 암과 기질부분을 같이 프린팅 함으로써, 재생성이 더 높고 더 복잡한 *in vitro* 암 모델의 혁신을 가능하게 하

고 있다. 처음으로 그리고 여전히 지금도 바이오 프린팅된 시스템은 대부분 세포주로 구성되어 있다. 그러나 (드물게) 암⁷¹이나 기질⁷²부위에서 발견되는 환자 특이적 성분을 담으려는 연구가 일부에서 시작되었으며 환자 특이성과 미세환경 이질성을 이전의 단순화된 3D 시스템보다 더 잘 평가할 수 있게 되었다.

2019년 그 영역의 핵심 연구에서 Langer 등⁷¹이 환자 유래 기질세포로 둘러싸인 암 코어로 구성된 밀리미터 크기의 무-scaffold 구조물을 프린팅 하기 위해 Organovo의 Novogen MMX 바이오 프린터 플랫폼을 사용했다. 췌장암 PDX cell line (OPTR3099C)과 두 일차 환자 종양(Oregon Pancreas Tissue Registry, OPTR) 조직이 안쪽 코어로 쓰였다. 바깥 코어를 구성하는 기질 성분은 HUVEC의 성분과 일차 췌장 성상세포(pancreatic stellate cell, PSC)가 섞인 반 일차성이다. Hydrogel은 alginate가 들어있는 젤라틴 hydrogel로 만들어졌으며, 섭씨 37°C 배양에서 48시간 후 용해되게 설계되었다. OPTR/기질 바이오 프린트는 대응하는 PDX 유사체와 일차 조직의 형태학적 구조물을 재현했다. 신호 이질성도 mammalian target of rapamycin 신호를 판독하는 pS6 염색을 거치며 재현된다. 그러나 종양 조직과 원래 PDX는 암세포와 주변 기질 모두에서 선명하게 pS6가 염색되지만, 바이오 프린트는 주변 기질이 염색되지 않는다. 암세포 영역에서의 이질적인 염색은 바이오 프린트와 PDX와 일차 조직 사이에서도 비슷하다. 종합적으로 모든 바이오 프린팅된 종양 모델은 기본 세포와 유사하게(Ki67+로 측정되는) 증식하는 세포 수준이 낮다(10% 미만). 생존력이 측정되지는 않지만, 다양한 세포나 다른 약물 처치의 추가가 임상 상황과 더 비슷한 정량화할 수 있는 효과를 보여준다. 예를 들어 기질 혼합물에서의 PSC의 사용은 반응성이 높은 ECM이 풍부한 종양 미세환경을 보여주고, dactolisib (PI3K 억제 약물)같은 약물은 섬유모세포가 있는 배지를 추가하면 효능이 떨어진다. 이는 과거에 섬유모세포의 결분비(paracrine) 인자가 dactolisib 치료 내성에 영향을 줄 수 있다고 알려져 예상된 결과였고, 바이오 프린트에서 재현된 것이다. 요약하자면 이 연구는 환자유래 재료와 지지 세포주의 조합으로 치료에 대한 반응, 이동, 신호의 이질성을 포착할 가능성을 보여준 것이다.⁷¹

다른 바이오 프린트 된 시스템도 암 세포주를 사용해왔지만 일차 세포와 함께 바이오 프린트 된 기질 부분을 사

용해왔다. 이 전략은 연구의 초점이 암/기질에 맞춰져 있다면 적절하다. 이는 다양한 photocurable GelMA 바이오 잉크에 프린트된 골수 bone marrow (BM)-MSC와 함께 유방암 뼈 전이 모델에 채택되었다.⁷² 공동배양에서 BM-MSC가 암세포의 증식과 혈관 내피 성장인자 발현을 증가시켰고, 상호적인 효과로 BM-MSC에서 알칼리 인산염 반응성의 감소가 있었다. MSC와 뼈모세포 세포주(hFOB 1.19)에서도 비슷한 결과가 관찰되었다. 그러나 뼈모세포 세포주 바이오 프린트와 일차 BM-MSC의 생존력을 비교해보면, 후자가 모든 GelMA 바이오 잉크 variant에서 바이오 프린팅으로 죽은 세포가 75%를 넘었고, 뼈모세포 세포주에서는 그만큼 죽지는 않아, 후자에서 과정으로 인해 손상이 크게 일어났다.⁷² 이 결과는 일차 세포가 세포주보다 바이오 프린팅에 더 민감함을 의미해, 바이오 프린팅 모델에서 생존력 평가를 철저히 해야 하는 이유이다.

또다른 유방암 연구에서 암 세포주 코어와 일차 지방세포 유래 MSC (adipose-derived MSC, ADMSC)로 만들어진 다양한 층수의 기질 껍질을 얻기 위해 이중 hydrogel 기반 바이오 잉크가 압출되었다.⁷³ 양측 부분 모두 서로 다른 바이오 재료 성질을 가진 채 성공적으로 프린트 되었다. 전체적으로 바이오 잉크는 HA와 젤라틴을 포함하고, 이는 methacrylate화되거나 안 되었다. 세포 확산을 위해 연한 혼합물(~400 Pa)은 암세포에 사용되었고 밀도가 높은 성분(~1,000 Pa)은 ADMSC에 쓰였다. 종합적으로 HA와 젤라틴은 변형 없이 점성을 높이고 프린트를 잘 되게 하며 바이오 프린팅 된 구조물의 부드러움을 유지해 세포 이동이 잘 되게 하기 위해 쓰였다. 여기서 이질성은 비만도처럼 기질층의 두께를 구분해(얇음: 0.4, 중간: 0.8 두꺼움: 1.2 mm) 구조적 시각에서 다뤄졌다. 21일 동안 배양한 후, doxorubicin (DOX)과 LOX 억제제에 대한 반응을 3일간 측정했다. Apoptosis는 중간과 두꺼운 ADMSC 층에서는 느렸다. 흥미롭게도 collagen과 elastin의 가교결합을 유도하고 유방암 진행과 음의 상관관계를 갖는 LOX는 ADMSC 두께나 DOX 투여의 변화와는 상관없이 발현되었다. 그러나 quantitative polymerase chain reaction 결과에 따르면 두꺼운 ADMSC 층이 ABCC1, ABCB1, ABCG1 같은 다중 약물 내성과 연관된 유전자를 상향 조절하는데, 따라서 이들 유전자는 LOX 억제자에 의해 ADMSC 중간두께 층에 한해 확연히 줄어들었다. 최종적으로 연구자들은

ADMSC가(HIF1 α 으로 측정되는) 저산소증보다 약물 내성에 더 많은 영향을 준다는 것을 밝혀냈다.⁷³

최근의 아교모세포종 연구에서 2% HA와 섞인 해리된 암줄기세포(tumor-initiating cell, TIC)가 육안으로 보이는 alginate 튜브(400 μ m)에 압출되었다.⁷⁴ 세포는 7일만에 튜브를 채우며 30배 팽창하였고 높은 생존력을 보였다. 이 단순한 시스템의 정교함은 생존력의 문제(95% 초과 생존)이나 형태적 이상 없이 TIC를 팽창시키고 10번 passage 할 수 있을 정도로 배양할 수 있게 했다. 성장인자가 제거된 상태에서, TIC는 TuJ1+과 GFAP+을 보이며 각각 성공적으로 뉴런과 교질세포로 분화되었다. 이 연구는 샘플 압출 시스템과 바이오 재료의 적절한 선택의 조합이 어떻게 일차 유래 종양 줄기세포의 증식, 표현형, 분화를 지지하는지 강조한다.⁷⁴

아직은 걸음마 단계이지만 3D 바이오 프린팅은 이질성과 복잡성을 둘 다 잡으면서 현장에서 도약을 예고하고 있다. 다중규모의 ECM 유사 바이오 재료를 프린트할 수 있는 능력으로 이질성과 농도 기울기를 포함한 더 포괄적인 종양 미세환경이 반복적으로 재현될 수 있다. 이상적으로, 높은 수준의 물리화학적 기능화를 보여주는 바이오 잉크는 경직도와 추가적인 종양 ECM이 천연 미세환경에 더 가깝게 모방하도록 만들어질 수 있게 해, 환자유래 조직을 프린트하는 데에 선호될 것이다.

3. 시스템 기반 접근법

3D 배양 모델의 배양의 난관 중 하나가 전달 시스템에 있다. 사실 3D 종양은 초기에는 *in vivo* 샘플과 닮지만, 물질 전달 한계로 인해 동적 미세환경의 부재가 세포 증식에 충격을 주게 된다. 회전 세포 배양 시스템(rotary cell culture system, RCCS) 생물 반응기 같은 동적 시스템은 조직 공학 영역에서 널리 쓰여왔고 개선된 물질 전달과 전단 응력(shear stress)을 제공한다. 종양 공학에서 이런 척도는 국소적인 기계적 스트레스를 받는 자연 상태의 미세환경을 재현하는 데에 중요하다. 이는 미세 유체공학 시스템으로도 비슷하게 얻을 수 있다.⁷⁵ 이 시스템은 관류와 함께 지속적으로 영양소를 공급하고 노폐물 제거를 제거하며, 그 결과 더 안정된 배양 환경을 유지하고, 더 쉽게 수송 지표를 정량화 할 수 있게 되었다. Organ-on-a-chip같은 향상된 미세 유체공학 시스템으로, 이러한 속성은 추가로 기질 성분과 합쳐져 시공간적, 생화학

적 이질성을 통합한 동적 상황에서의 약물 반응을 연구할 수 있게 한다.

1) 생물반응기(Bioreactor)

RCCS 생물반응기는 주로 scaffold-free spheroid의 자가조립과 배양을 용이하게 하는 데에 널리 쓰여왔다. 다만 생물반응기는 약물 선별 과정에서 3D 종양 모델의 수명과 예측력을 연장하기 위해 환자유래 종양 모델로 영양분을 전달하는 데에도 가장 많이 쓰였다. 물리적 생물반응기는 대류를 통해 유체 수송량을 늘리는 일반적인 목적을 위해 roller tuber, spinner flask, microgravity bioreactor를 이용하거나 관류 시스템으로 전단(shear)을 얻어 궁극적으로 물질 수송을 개선할 수 있다.⁷⁶ 환자 유래 3D 모델 환경에서 RCCS와 관류 시스템 모두 다발성 골수종, 유방암, 직장결장암, 아교모세포종의 영역에서 쓰여 배양 시스템의 생존력을 높인다.

특히 Ferrarini 등⁷⁷의 연구에서는 RCCS 생물반응기가 다양한 전이 위치에서의 다양한 다발성 골수종 (크기가 2-3 mm³) 배양에 쓰였다. 조직학적 평가가 뼈의(관련된) lamellae와 혈관을 포함한 구조가 잘 보존된 조직학적 구조와 함께 원래 미세환경에 있는 생존 가능한 골수종 세포의 보존을 보여주었다. 7일간의 동적 배양 사용은 혈관 유지에 특히 중요하며, 혈관이 제대로 유지되지 못하면 정적 배양에서 전체 구조가 망가지고 사라진다. 이후 3일간의 표준 항-골수종 약인 bortezomib 투여에서, 약물 처리된 샘플은 *ex vivo*와 *in vivo*에서 약물 반응에 대해 전반적으로 일치했다. 특기할 점은 치료받은 한 환자에서 관찰된 *in vivo* 약물 내성은 대응하는 생물반응기 시스템에서의 체외이식에서도 관찰되었다는 것이다.⁷⁷ 같은 그룹에서의 후속 연구⁷⁸에서 저자는 분리된 MM 세포에 초점을 맞췄다. 하지만 여기서 저자는 scaffold 기반으로 접근했고, 이 scaffold는 Spongostan sheet로 환자에 맞춰진 BM-MSD와 HUVEC가 preload된 porcine gelatin 유래 스폰지다. 공동배양은 분리된 MM 세포가 생물반응기에서 최대 7일까지 살아있게 했다. 배양 마지막에 scaffold에서 회수된 동종이형 BM-MSD, HUVEC, MM 세포의 풀은 투입 숫자와 일치했고, 이는 세포가 증식하지 않고 살아만 있었다는 것을 의미한다. Immunohistochemistry에서는 MM 세포와 CD73+ 기질의 분포가 균일했다. 생물반응기에서 배양에 쓴 환자 6명에 대해서 MM 세포와 기질 모두가 특화된 기능과 유의

미한 화학치료 반응을 유지했다. 종합적으로 생물반응기에서의 *ex vivo* 3D 공동배양 모델은 연장된 시간 동안의 MM-BM 영속성, 일차 MM 세포의 생존의 재현이라는 요구를 충족시킬 수 있었고, 따라서 MM의 2D나 정적 시스템에서 거의 볼 수 없는 시간적 차원도 통합할 수 있었다. 이러한 성과는 MM이 진행되고 치료에 반응하는 동안의 클론 역학의 정밀 분석을 가능하게 했다. 환자의 다발성 골수종 세포를 맞추는 동종이형 BM-MSD의 조합은 이 연구의 또다른 강점으로, 이는 환자 골수 틈새(niche) 특이성을 복제할 수 있게 했다.⁷⁸

유방암에서는 Muraro 등⁷⁹은 유방암 체외이식물을 최대 14일까지 유지하기 위해 관습적으로 쓰였던 생물반응기를 이용했다. 종양 표본을 2 mm×2 mm×2 mm 조각으로 수작업으로 조각 낸 상태에서, 배지로 동질의 조직 관류를 유도하기 위해 collagen type I으로 제작한 두 8-mm-scaffold 디스크가 샌드위치 배양 시스템에 쓰였다. 저자는 차세대 서열분석을 이용해 임상 샘플과 생물반응기로 배양된 체외이식물이 가깝게 일치한다는 것을 입증했다. 이와 비교해 정적 배양에서의 종양 조각은 생존 상태의 세포가 비율이 매우 낮았다. 체외이식물의 최대 2주간의 유지는 항-에스트로겐 치료와 다른 항체 치료를 평가하는 것을 가능하게 했다. 이후 같은 관류 생물반응기 개념이 *in vitro*에서 배양하기 어렵기로 알려진 결장직장암 표본의 종양 조각의 배양에도 쓰였다.⁸⁰ 유방암 연구와는 다르게 결장직장 샘플은 생물반응기에서 3일 동안만 배양되었다. 정적 배양과는 다르게 생물반응기 배양 표본은 조직 물질, 높은 조직 세포충실성, 전반적인 초기 구조가 유지되었고, 이는 관류가 안 된 배양에서는 상실되는 성질이다. 그 예로 관류 배양에서의 내피 성분과 면역 세포 일부는 신선한 조직과 비슷했지만, 정적 배양에서는 유사성이 줄었다. 그리고 크게 이질적인 반응이 환자 사이에서 관찰되었다. 종합적으로 이 연구는 scaffold 시스템과 결합한 생물반응기 시스템이 일차 조직 샘플의 유지, 길어진 배양 기간 그리고 이질성을 다룰 능력 등 어떤 선명한 이득을 갖는지 보여준다. 그러나 중요하게 생각할 점은 hydrogel 같은 부드러운 물질의 일부가 회전하는 well-culture 시스템에서 찢어질 수 있는 생물반응기 미세환경에서 다른 생체물질이 살아남을 가능성이다. 이런 맥락에서는 정적 시스템에서의 관류가 추천된다.

아교모세포종에서 alginate hydrogel 튜브로 압출한 후 양적 측정 가능한 환자유래 아교모세포종 세포의 제

작을 위한 프로토타입 생물반응기가 개발되었다.⁷⁴ 기계적 단계가 배지가 들어있는 부분을 압축해, 튜브를 포함한 부분에서 임상적 흐름이 일어날 수 있게 했다. 정적 2D/3D 그리고 3D에서의 무-동적 부유와 달리, alginate 튜브에 있는 세포는 14일간 최대 710배 팽창할 수 있었고 생물반응기로 옮겨졌을 때 높은 부피 팽창을 이루었다. 이 연구는 환자유래 세포를 빠르고, 경제적이고, 양적 측정이 가능하도록 확장하는 중요한 발전을 보여주었고, 세포가 대량으로 필요한 개별화된 대용량 약물 검사에 상당한 영향을 주었다.⁷⁴

2) 미세 유체공학

미세 유체공학적 3D 세포 배양은 더 복잡한 암 미세환경을 전달하고 암 역학을 조사하는 데에 최적인 전략이다. 미세 유체공학의 개념 덕분에 축소화 되었지만 명확하고 생물학적으로 적절한 배양 환경에서 연구자가 세포를 배양해 발달 과정과 약물 반응성을 연구할 수 있다. 암 증식, 혈관 신생, 전이, 침윤 등 암의 일련의 특징을 연구하는 데에 적합한 미세 유체공학 장치는 여러 복잡한 시공간적 층을 가능하게 한다. 미세 유체공학은 정량화 할 수 있는 chemokine 농도 기울기에 대한 종양 세포의 반응을 측정하는 수많은 곳에서 적용되고 있다.⁸¹ 종양세포와 기질세포 모두 성장과 확산을 하는 동안 chemokine의 근원을 향해 이동하며, 이는 미세 유체공학 플랫폼을 통해 볼 수 있다. 암 세포주를 쓰는 매우 복잡한 모델과 달리, 환자 특이적 미세 유체공학 모델은 상대적으로 준수한 편이며, scaffold-free PDME/PDS/PDO 접근법이나 간단한 공동배양 모델을 사용하고, cytokine 정보수집이나 치료 평가에 주로 쓰여, 최대 28일까지 배양할 수 있다. 이들을 지금부터 소개할 것이다.

(1) 면역요법

미세 유체공학 장치를 이용한 특이적 환자유래 적용 중 하나는 면역종양학에서 ICB에 대한 동적 반응의 모델링이다. 암이 면역 검문 경로(checkpoint pathway)를 끌어들여 면역 반응과 약물을 회피할 수 있고, 이 면역 검문지점을 차단하는 것이 항암 면역을 가속하고 암 퇴행을 일으킬 수 있다. 미세 유체공학 장치는 자연상태 면역 세포의 존재 덕분에 다양한 ICB 연관 억제제에 대한 PDME의 반응을 평가하는 좋은 선택이다. 예로 Aref 등⁴⁶의 연구에서 효소에 의한 소화를 이용해 다양한 종양에서 온 종양 표본이 단일 세포, PDS, 육안으로 보이

는 PDME (>100 μ m)로 해리되었다. 이 spheroid 조각이 collagen-I과 혼합되어 cyclic olefin co-polymer (COC) 기반 3D 미세 유체공학 장치(DAX-1, AIM BIOTECH)에서의 배양에 쓰였다. 이 연구에서 소장 신경내분비 종양이 RNA 서열분석과 cytokine 정보 분석을 위해 9일간 배양되었다. 같은 연구팀에서 이 연구에 대한 후속 연구가 진행되었는데, 더 많은 환자(20명 이상)로부터 흑색종 PDME를 배양하기 위해 비슷한 미세 유체공학적 접근을 이용했다.⁸² 다양한 암 종류에서 림프구성과 골수성 세포 집단이 organoid 형태로 보존되었고 PDS가 ICB에 적당히 반응했다. 이 시스템의 한가지 한계점은 T 세포 활성화(priming)나 비활성(naive) 면역 세포를 종양 미세환경으로 모으는 것을 재현하는 것이 불가능하다는 것이다. 이는 미래에 PDME와 상호작용할 면역세포 자원을 제공할 더 복잡한 tumor-on-a-chip 플랫폼을 설계함으로써 해결할 수 있다. 덧붙여 전통적인 미세 유체공학 장치는 작은 소수성 분자를 흡수하는 polydimethylsiloxane (PDMS)를 주로 이용했는데, 이것이 약물 시험에 어느정도 영향을 준 것 같다. 이러한 상황에서는 COC 유래 미세 유체공학 장치를 쓰는 것이 더 적합한 것이다. 또한 최근에 COC 유래 미세 유체공학 장치는 Jenkins 등⁸²과 Aref 등⁴⁶의 ICB 연구에도 비슷하게 준비한 이자관 샘암(pancreatic ductal adenoma, PDA) PDME에 쓰였다. 체외 이식물을 mincing하고 collagen에서 PDME를 재부유한 후, 혼합물은 새로운 억제 분자(RIP1i)를 평가하기 전에 DAX-1 미세 유체공학 장치에 삽입되었다. PDA 유래 PDME를 위한 미세 유체공학 장치의 사용은 복제가능한 RIP1i 치료의 평가와 환자 10명에서의 면역성 cytokine의 스펙트럼을 분석하는 것을 가능하게 하였고, 이는 동물실험의 결과와 들어맞았다.

(2) 화학요법

미세 유체공학 chamber는 관류를 통해 체외 이식물의 생존력을 늘릴 수 있어, 같은 종양 조각에서 온 몇몇 표본 조각에서 시험되는 대량의 복제를 가능하게 한다. Astolfi 등⁸³의 연구에서 난소암(2명)과 전립선암(1명)에서 추출한 대형 PDME를 PDMS 미세 유체공학 장치안에서 생존력이 내내 떨어지지 않고 최대 8일간 성공적으로 배양했다. PDME 4종에서 이질적인 염색 패턴이 있었고 이 4종 모두에서 암이 없는 조직이 생존력이 가장 낮았는데, 이는 아마 감소한 대사 때문일 것이다. 이후에 난소 PDME 중

하나를 장치 안에서 24시간 후와 48시간 후에 일반 환자
에게 이론적으로 최대한 투여할 수 있는 혈중 농도와 동
일한 carboplatin으로 처리하였다. 조직 가용성과 높은
수의 미세 유체공학 chamber 덕분에 PDME 복제 25개
모두 장치에 실려 종양 내 이질성이 다뤄질 수 있다. 특별
히 PDME 간 높은 변동성이 관찰되었고, 난소 종양은 높
은 종양 내 이질성을 나타낸다고 알려져 있기 때문에, 저
자들은 이 PDME 간 변동성이 종양조직에 있는 서로 다
른 세포 하위집단의 변동성이 큰 화학적 반응에 기인한다
고 여겼다. 궁극적으로 높은 변동성에도 치료에 대한 환
자의 반응이 *in vitro* 실험 결과와 유사함을 입증했다. 다
만 일부 암의 경우 종양이 충분히 뺏겨지지 않거나 생존
이 미세환경의 영향을 너무 심하게 받아 PDME의 사용이
실용적이지 않을 수 있다. 이런 경우에는 적출, 파편화, 미
세 유체공학 장치에서의 배양 전에 이중이식을 통해 종양
질량을 늘릴 수 있다. Holton 등⁸⁴은 이 전략을 폐, 방광,
흑색종 체외이식에서 사용하였다. PDX는 쥐에서 적출된
후 미세 바늘 흡인(fine needle aspiration)으로 해리되
고 지속적으로 관류하는 미세 유체공학 장치에서 10일간
배양되었다. 이 연구에서는 폐 유래 환자 PDX를 PDME
샘플 18개로 쪼개 5일간(광범위한 단백질 인산화 효소 억
제제인) staurosporine 처리에 쓰였다. 이 PDME는 처리
하지 않은 대조군에 비해 확연히 생존력이 줄었고, 약간
의 종양 내 이질성만 나타나, 임상에서 쓰게 되었을 때 더
높은 치료 성공 가능성을 보여주었다.⁸⁴

암 세포주는 일차 종양 세포와는 다르게 화학치료제
에 반응한다고 알려져 있다. 이는 폐암을 이용한 미세 유
체 칩 기반 3D 공동배양 장치를 통해 증명되었다. 아무
처리도 하지 않은 폐 종양 표본에서 일차 종양 세포를 분
리한 후, 세포를 세포 기반 막 추출물(cell-basement
membrane extract)과 함께 24시간 동안 공동배양하
고 약물검사를 시행했다. 암 세포주를 일차 세포 대신 공
동배양에 사용할 때, gefitinib약제에 대한 IC50가 일
차 세포의 경우보다 더 커지는 것을 확인했다. 전체적
으로 apoptosis 속도는 환자 8명에서 비슷했다. 그러
나 이 연구에서는 일부 세포를 종합적으로 보면서도 개
별 세포에 자체의 반응도 확인하였다는 특징점이 있었
다.⁸¹ Mazzocchi 등⁸⁵의 연구에서 종양 세포는 중피종(환
자 2명)에서 가져왔고, 이를 HA-gelatin hydrogel에서
*in situ*로 높은 세포 생존력을 갖는 organoid로 성장시
켰다. Organoid는 각 환자에서 1일과 7일 후 관찰되었

고, 각각에 서로 다른 양의 carboplatin/pemetrexed이
나 cisplatin/pemetrexed 화학치료제 혼합물이 주입되
었다. 어떤 약물을 어떤 양으로 선택해 각테일 요법으로
섞었는지에 따라 7일과 14일 후 각 환자에서 다른 반응
이 나타났고, 이는 비슷한 치료에 대한 환자의 선천적인
반응의 차이를 강조한다. 전통에서 벗어난 미세 유체공학
장치가 최근 2018년 Akay 등⁸⁶에 의해 소개되었는데, 아
교모세포종 PDS에서 다양한 약물 농도가 동시에 시험될
수 있었고(channel 7개가 microwell을 11개까지 포함)
효능이 spheroid 크기와 생존력으로 측정되었다. 세 환
자의 실험으로부터, 시험된 channel 7개 중 4개에서 동
일한 하향 경향이 관찰되었는데도, 큰 환자 간 이질성이
관찰되었다. 이런 방법은 연구자들이 다양한 약물 농도로
동시에 처리할 수 있게 해 대용량의 실험을 가능하게 해
준다.

Ruppen 등⁸⁷의 실험에서 세포 중력 microwell-포착
시스템을 이용해, 환자 두명의 원발성 폐 샘암종에서 PDS
를 생성했다. 처음 24시간 동안 spheroid를 생성한 후
그들의 크기는 밀집되면서 수축했다. 변형에서는 알려
진 혈관주위세포의 약물 차단 효과를 측정하기 위해 내
피 세포가 일차 혈관주위세포와 5:1비율로 주입되었다.
Spheroid가 다시 동일하게 생성되었고 다양한 cisplatin
농도로 처리되었을 때 그 종양/혈관주위세포 spheroid의
화학 민감성이 확연히 떨어져, 이 미세 유체공학 장치를
이용해 혈관주위세포의 알려진 효과를 입증했다.

(3) 방사요법

HNSCC 같은 일부 암에서는 표준 치료법에 감마선 조
사(irradiation)가 있다. 그 결과 미세 유체공학 장치가
단지 종양 표본의 생존력을 유지하는 것만이 아닌 조사를
지속하는 쪽으로도 개발되어 왔다. HNSCC PDME 샘플
에의 조사에 쓰이는 미세 유체공학 장치는 대부분 PDMS
로 구성되지만, 여기에 유리, 최근에는 polyether ether
ketone (PEEK)도 포함한다. 가장 큰 규모의 환자 수로
진행된 실험에서⁸⁸ 환자 35명의 표본이 3 mm² PDME 샘
플로 분할되어 미세 유체공학 장치에 실려 72시간 배양
되었다. 이 연구는 Gy를 높이면 apoptosis의 지표가 늘
어나지만, 임상에서의 양을 쓰면 apoptosis는 22시간
후에 줄어든다. 후속 연구에서⁸⁹ HNSCC 환자 5명(3명
은 원발 2명은 전이)의 PDME를 0에서 20 Gy까지 실험
했지만 조사 후 24시간 동안만 배양했다. 흥미롭게도 전
이 샘플이 조사에 내성이 클 것이라 예상한 것에 반해, 전

이 PDME의 3분의 2가 비전이 샘플에 비해 15 Gy에서 더 높은 반응을 보였다. 종합적으로 환자 5명의 PDME는 조사에 대해 무반응부터 가벼운 반응까지 굉장히 다양한 반응을 보여주었고, 이를 통해 종양 내, 종양 간 이질성을 확인했다. 이러한 결과에서 환자의 특이적 반응을 결정하기 위해 기술적으로 환자 당 많은 복제물을 만들어 종양을 개별 분석하는 것의 가치가 두드러졌다.⁸⁹ Kennedy 등⁹⁰의 연구는 PEEK 유래 미세 유체공학 장치를 환자 18명으로부터 생으로 적출된 샘플을 로드하기 위해 썼다. 표본을 vibratome slicing으로 자르고 중간에 2시간 관류를 끼고 68시간 동안 배양했다. 표본은 2 Gy 조사와 $\pm$ cisplatin에 노출되었고, 이는 대조군보다 증가한 apoptosis 염색을 보여주었다. 종양 내 이질성은 조사 치료 전후의 모든 면역조직화학적 마커에서 확실했다. 이러한 PEEK 시스템의 장점에는 사용하기 쉬운 설정과 조사에 따르는 결과를 측정할 수 있다는 점이 있지만, 이 미세 유체공학 장치는 chamber가 4개밖에 없어, 동시에 연구할 수 있는 복제의 수에 한계가 있다.⁹⁰

3) Tumor-on-a-chip

지난 10년간 organ-on-a-chip 시스템에서 파생된 수많은 tumor-on-a-chip 시스템이 대용량 기술을 받아들이며 암의 다양한 동적 양상의 복잡성을 제공할 강력한 가능성을 보여주었다. 이들 시스템은 미세 유체공학에 의존하고 다세포 구조, 조직-조직 인터페이스, 혈관 관류를 지속할 수 있는 생체 모방의 물리적 미세환경을 제공함으로써 개별 종양 모델의 이점도 가진다. 다만 침윤, 이동, 혈관 진입, 혈관 이출, 전이 같은 동적 암 진행 모델은 주로 세포주를 이용해 개발되어왔다. 최근에 와서야 환자유래 종양 물질과 기질을 결합해 더 복잡한 “개별화 tumor-on-a-chip”에 다가가고 있으나, 이 역시 제작 과정에 세포주가 들어간다. 주로 cytokine 세부 정보와 단일 세포 유래 spheroid나 체외이식물체의 치료 효과를 평가하기 위해 쓰인 단순한 미세 유체공학 시스템을 소개한 이전 절과는 달리, 이번 절에는 생물학 연구에 약물 반응 검사를 위한 다양한 세포 종류와 결합한(면역 시스템과 전이 발생을 모방한) 더 복잡한 시스템에 대해 소개할 것이다.

(1) Immune-system-on-a-chip

암 모델링의 영역에서 면역 반응은 *in vitro*에서 재현하기가 복잡해 면역 반응을 상대적으로 무시하는 것이 일반적으로 받아들여진 상식이었다. 그러나 tumor-on-

a-chip은 환자유래 물질을 세포주에 결합함으로써 염증 반응과 면역 세포-종양 상호작용을 자세히 연구할 수단을 주어 이 방향의 길을 개척할 수 있는 기술을 제공한다. 예를 들어 Moore 등⁹¹은 *ex-vivo* immune-oncology dynamic environment for tumor biopsy (EVIDENT)라 불리는 COC 유래 미세 유체공학적 모델을 개발해 환자에 맞춰진 유동 tumor-infiltrating lymphocyte (TIL)과의 상호작용을 위한 12개의 분리된 생검 단편을 수용할 수 있게 했다. 이 EVIDENT 미세 유체공학 시스템은 정량화할 수 있는 수준의 TIL 침윤과 종양 괴사를 나타내 유동 TIL의 ICB 처치에 대한 *in vivo* 종양 반응을 모방한다. 혁신적으로 이 시스템은 시각적으로 투명도가 높은 재료를 쓰고 실시간으로 이미지를 습득하고 분석할 수 있는 고해상도 공초점 현미경에 로드할 수 있다.⁹¹ 물론 이 방법도 세포주가 들어가 있지만, 이 연구는 한 NSCLC 환자의 샘플도 추가로 연구했다. TIL 투여 24시간 후에, 투여한 NSCLC 종양 조각에서 세포 apoptosis와 거의 비슷한 현상과 함께 상당한 TIL 침윤이 나타났고 이는 시간의 흐름수록 더 나타났다. 다른 연구는 세포주 종양 organoid를 재생하는 것에 초점을 두었고 분화된 환자유래 면역 세포의 추가로 인한 반응을 시험하기 위해 미세 유체공학 장치를 사용했다. 그 예로 Lee 등⁹²은 B형 간염 바이러스 특이적 T 세포에 대한 단핵구의 면역억제 능력과 ICB 신호전달의 역할을 조사하기 위해 정적 3D 미세 유체공학 모델을 이용해 간내 종양 미세환경 모델을 개발했다. 이 미세 유체공학 장치를 이용하는 것의 3D microchamber를 앞선 장점은 처음 HepG2 cell line 무리와 환자 단핵구, 그 다음으로 환자유래 T 세포 순으로 순차적으로 주입할 수 있다는 것이다. 단핵구가 레트로 바이러스로 형질 도입된 T 세포의 암에 대한 세포독성만 억제하고 세포독성이 단핵구의 존재에 영향을 받지 않아, 다르게 생성된 T 세포들 사이에 기능적 차이점이 존재한다는 것이 밝혀졌다. 이 결과는 미세 유체공학 장치(동적 3D)에서만 관찰되고 정적 2D 환경에서는 관찰되지 않는다.

(2) Metastasis-on-a-chip

전이의 동적 진행은 미세 유체공학 플랫폼을 이용한 연구에 매우 적합하고, 뼈 전이에 대해 깊게 조사되었다. 이는 MM에 대해 조사가 많이 이루어지는데, 일차 MM 세포가 쉽게 접근 가능하고 뼈와 유사한 조직으로 구성된 미세 유체공학 장치에 쉽게 주입될 수 있기 때문이다.

Zhang 등⁹³은 “3D 골화 조직”이라 부르는 것을 발명하였다. 이 연구는 많은 review가 있을 정도로 미세 유체공학 학계에서 자주 인용되는데, 이 연구의 한계점이 대부분의 review에서 빠져 있다. 이 “3D 골화 조직”이라는 호칭은 맞지 않을 수 있다. 단순히 인간 뼈모세포(hFOB 1.19 cell line) 한 층으로 되어있는 이 “조직”은 MM 환자에게서 골수 단핵 세포를 4시간 동안 뽑기 전에 미세 유체공학 chamber의 평평한 표면에서 4일간 배양된 후, 관류한 배양에 21일간 배양한다. 논문에 쓰이는 부적절한 “scaffold”라는 용어 때문에, 물리적인 3D scaffold가 조직을 키우는 데 쓰인다고 착각한다. 구조적으로 뼈모세포 유래 조직은 60 μm 보다 작다. 또한 CD138+와 CD38+ CD56+ 집단은 7-21일 사이에 증식이 멈추고 집락을 형성하기 전 뼈모세포 층의 꼭대기에서 7일간 증식하는 데에 충분한데도, 뼈 전이에 중요한 뼈 ECM 표지자의 특성화가 일어나지 않는다. 저자는 MM cell의 존재 하에서 결정화가 잘 일어나지 않는다고 밝혔으나, 이는 양적 측정이 아니라 눈으로 관찰한 결과다.⁹³ 같은 연구진이 한 후속 연구는 뼈모세포/MM 세포 상호작용과 어떻게 뼈모세포의 N-cadherin MM 세포를 뼈모세포 층으로 옮겨 유지하는지에 대한 기계론적인 논의를 제공하고자 했다. 이 연구에서 공동배양한 일차 MM을 어떻게 장기간 유지할 수 있는지 설명했다. 후속 연구는 오직 일차 세포만을 이용해 유체공학 장치에서 뼈 기질/MM 세포 상호작용과 약물 반응을 심층 조사했으나⁹⁴ 골수 미세환경은 tumor-on-a-chip 시스템이 아닌 미세 유체공학 기술의 보조를 받는 단순 2D 공동 배양 모델을 반영했다. 흥미롭게도 환자 17명을 대상으로 한 연구에서 단백질 분해효소 복합체 억제제 bortezomib에 대한 반응은 *in vitro* 모델의 반응과 일치했으나, 이는 오직 MM 세포가 CD138- 골수 기질세포와 공동 배양되었을 때 뿐이었다. 이 결과는 복잡한 구조의 3D 미세환경을 가질 필요성에 의문을 던진다.

최근에 내피조직, 폐, 간을 포함한 각 개별 chamber에서 다양한 종류의 organoid를 재생하기 위해 독창적인 multi-organ-on-a-chip 기술에서 파생된 multi-site metastasis-on-a-chip에서 HA-gelatin hydrogel의 광-패터닝과 미세 유체역학과 결합했다.⁹⁵ 결장직장암의 upstream organoid를 재순환하는 액체 흐름 하에 최대 15일까지 배양함으로써, 형광 표지된 종양 세포가 결장직장암 organoid에서 떨어져 다른 chamber의 장기에 전이되는 것을 추적했는데, 간과 폐에 잘 정착했고, 이는 임

상적으로도 그렇다. 이 연구는 전부 세포주(HCT116)로 수행되었지만, 환자유래 원발 종양 세포와 비슷한 시스템의 이용은 개별 전이 전파 정도와 개별화 치료 선택을 평가하기 위한 더 전체론적인 접근을 가능하게 할 것이다.

고 찰

3D 세포 배양의 발전은 그동안 알지 못했던 암의 발달과 진행에서 발생하는 특이적 세부사항 등 새로운 발견을 이끌었다. 각 3D 모델은 고유의 장점과 한계를 가지고 있고, 전형적이지만 어떤 모델도 모든 질문에 답을 할 수 없으므로, 암 이질성을 연구할 때 여러 모델로 접근하는 것이 가장 합리적으로 보인다. 오늘날 환자 특이적인 대표 전임상 플랫폼을 공급할 수 없는 것이 개별화되고 효율적인 암 치료를 해치는 주요 원인이다. 희망적으로 3D 종양 모델링이 이 길에서 부분적으로 실제 종양의 이질적 환경을 모방할 수 있는 진보된 모델링 기술과 혁신적인 바이오 재료를 융합해 엄청난 진척을 이루었다. 그러나 불행히도 이러한 시스템은 *ex vivo*에서 조직 접근성, 조직의 질, 조직의 생존력 등에 한계가 있어 시스템상으로 환자유래 물질을 활용하는 데에 실패해 응용력이 떨어졌다. 환자유래 종양의 *ex vivo* 배양의 영역에서는 여전히 압도적으로 PDO와 PDS를 활용해 scaffold-free/Matrigel 접근법을 이용하는 것에 집중하고 있으며⁹⁶ 이는 최소화된 공정을 거치고 빠르게 약물을 검사할 수 있게 했다. 이러한 전략은 단순화, 생산량, 적은 노동력, 상대적으로 높은 처리량이라는 면에서는 이득을 제공해 제약 회사에게는 매력적이겠지만, 이러한 모델은 묶음마다 존재하는 이질성과 이질성을 고려하는 데에 매우 중요한 3D 기질 네트워크의 부재라는 치명적인 단점이 있다.

기관이나 조직을 모방하기 위해서, 화학자, 생물학자, 의공학자들이 기술과 지식의 협력을 통해 spheroid에 환경을 제공하고 원래 organoid에서 온 다수의 지지 세포류의 배양을 도와주는 좀더 *in vivo*를 닮은 종양 미세환경을 제작해야 할 것이다. 이러한 맥락에서 CAF의 사용은 모델과 상대적으로 쉽게 결합할 수 있는 하나의 중요한 요소이지만, 종양 모델의 이질성을 높일 수 있기도 하다.²² 그리고 조직 특이적 내피세포와 혈관지지세포는 환자와 기관 특이적 혈관 형성에 매우 중요한데, 이는 종양 세포 생존과 전이에 상당한 하류 효과를 일으켜 영양과 치료법에 접촉한다는 것을 암시한다. 그러나 이러한 일차

세포는 수집, 확장, 3D 환경에서의 유지가 어렵기에 이러한 이질성 양상을 위해 HUVEC을 사용해볼 수 있다.

생물반응기, 미세 유체공학, tumor-on-a-chip 같은 생물공학 접근법은 통제된 동적 공동 배양을 위한 통합적 플랫폼을 제공함으로써 이질성을 높이는 흥미로운 옵션을 제시하며, 여기에는 적절한 개별 미세환경에 특이적인 물리적, 화학적 경사를 포함한다. 종양이든 기질 유래물이든 동적 플랫폼으로 통합된 지지 scaffold 바이오 재료와 조합한 환자유래 물질의 이용은 가장 높은 수준의 이질성을 제공해 따라서 종양 모델에 적절할 것이다. 전이의 특이적 환경에서 multi-site organs-on-a-chips는 이 방법으로 완벽하게 환자 특이적인 미세 기관을 재현하는 것이 불가능해도 증가한 복잡성을 위한 적절한 후보다. 이러한 경우에는 기관 특이적 세포주 유래 organoid와 일차 환자유래 종양의 혼합물이 전이 평가와 개별화된 화학 치료 지침에 굉장한 잠재력을 가지고 있다. 추가로 다세포나 다장기 모델 개발에서 모델을 어떻게 크게 하는지 의문이 남는다. 연구자가 실제 크기의 종양과 그 바탕질을 *in vitro*에서 개발하면서 영양과 산소 결핍으로 인해 세포/조직 죽음과 괴사가 불가피하게 일어난다. 혈관과 다른 구조의 이식이 종양 모델에 필요하며 관류, 기능성, 내피세포 기원과 표현형, 그리고 종양세포와의 공동배양이라는 추가적인 논의로 이어질 수 있다. 이 목표가 멀어 보이지만, 사실 이들은 우리가 아는 것보다 가까이 와있다. 독립된 3D 배양과 신경이나 뉴런과의 조합이 이전에는 불가능했던 세포류와 조직 구조의 연결을 가능하게 하고 있다. 여기에 더해 자동화된 피펫팅, 이미징, 다른 기계화 전략을 통해 대용량으로, 재생가능한 결과를 낼 수 있게 할 것이다.⁴⁰ 최종적으로 환자 특이적 미세환경에 대해 고려할 사항은 적절한 특징화 기술과 함께 새로 나오는 공학 기술을 적용하는 것이다. 궁극적으로 우리가 이질성을 고려하고 포괄적으로 통합된 기술을 향해 나아갈 때에 복잡한 종양 미세환경을 복원할 할 수 있을 것이며, 이것을 통해 개별 암 진행과정을 이해하고 개별 치료를 현실적으로 가능하게 할 것이다.

이해관계(CONFLICT OF INTEREST)

저자들은 이 논문과 관련하여 이해관계의 충돌이 없음을 명시합니다.

ORCID

Jung Woo Lee, <https://orcid.org/0000-0001-9488-3235>

Jia Kim, <https://orcid.org/0000-0002-7383-2217>

Youngjae Shin, <https://orcid.org/0000-0003-2511-703X>

Byung Hoon Chi, <https://orcid.org/0000-0002-4184-7780>

Jung Hoon Kim, <https://orcid.org/0000-0002-0947-876X>

Se Young Choi, <https://orcid.org/0000-0002-4615-0966>

REFERENCES

- Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* 2013;501:338-45.
- Risbridger GP, Toivanen R, Taylor RA. Preclinical models of prostate cancer: patient-derived xenografts, organoids, and other explant models. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018;8:a030536.
- Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* 2013;501:346-54.
- Ishii G, Ochiai A, Neri S. Phenotypic and functional heterogeneity of cancer-associated fibroblast within the tumor microenvironment. *Adv Drug Deliv Rev* 2016;99(Pt B):186-96.
- Kucia M, Reza R, Miekus K, Wazneck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, et al. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells* 2005;23:879-94.
- Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nature Rev Cancer* 2009;9:285-93.
- Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* 2012;196:395-406.
- Gkretsi V, Stylianou A, Papageorgis P, Polydorou C, Stylianopoulos T. Remodeling components of the tumor microenvironment to enhance cancer therapy. *Front Oncol* 2015;5:214.
- Romero-Lopez M, Trinh AL, Sobrino A, Hatch MM, Keating MT, Fimbres C, et al. Recapitulating the

- human tumor microenvironment: colon tumor-derived extracellular matrix promotes angiogenesis and tumor cell growth. *Biomaterials* 2017;116:118-29.
10. Samani A, Zubovits J, Plewes D. Elastic moduli of normal and pathological human breast tissues: an inversion-technique-based investigation of 169 samples. *Phys Med Biol* 2007;52:1565-76.
11. Acerbi I, Cassereau L, Dean I, Shi Q, Au A, Park C, et al. Human breast cancer invasion and aggression correlates with ECM stiffening and immune cell infiltration. *Integr Biol (Camb)* 2015;7:1120-34.
12. Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* 2011;147:992-1009.
13. Ilina O, Campanello L, Gritsenko PG, Vullings M, Wang C, Bult P, et al. Intravital microscopy of collective invasion plasticity in breast cancer. *Dis Model Mech* 2018;11:dmm034330.
14. Wolf K, Te Lindert M, Krause M, Alexander S, Te Riet J, Willis AL, et al. Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. *J Cell Biol* 2013;201:1069-84.
15. Oskarsson T. Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis. *Breast* 2013;22 Suppl 2:S66-72.
16. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 2015;527:329-35.
17. Gillet JP, Varma S, Gottesman MM. The clinical relevance of cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst* 2013;105:452-8.
18. Vilanova G, Bures M, Colominas I, Gomez H. Computational modelling suggests complex interactions between interstitial flow and tumour angiogenesis. *J R Soc Interface* 2018;15:20180415.
19. Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, Budinska E, Byrne AT, Caldas C, et al. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov* 2014;4:998-1013.
20. Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, Jimeno A, Leong S, Pitts TM, et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat Rev Clin Oncol* 2012;9:338-50.
21. Daniel VC, Marchionni L, Hierman JS, Rhodes JT, Devereux WL, Rudin CM, et al. A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture in vitro. *Cancer Res* 2009;69:3364-73.
22. Augsten M. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Front Oncol* 2014;4:62.
23. Zhan M, Yang RM, Wang H, He M, Chen W, Xu SW, et al. Guided chemotherapy based on patient-derived mini-xenograft models improves survival of gallbladder carcinoma patients. *Cancer Commun (Lond)* 2018;38:48.
24. Linxweiler J, Hammer M, Muhs S, Kohn M, Pryalukhin A, Veith C, et al. Patient-derived, three-dimensional spheroid cultures provide a versatile translational model for the study of organ-confined prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2019;145:551-9.
25. Hagemann J, Jacobi C, Hahn M, Schmid V, Welz C, Schwenk-Zieger S, et al. Spheroid-based 3D cell cultures enable personalized therapy testing and drug discovery in head and neck cancer. *Anticancer Res* 2017;37:2201-10.
26. Bansal N, Bartucci M, Yusuff S, Davis S, Flaherty K, Huselid E, et al. BMI-1 targeting interferes with patient-derived tumor-initiating cell survival and tumor growth in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2016;22:6176-91.
27. Hribar KC, Wheeler CJ, Bazarov A, Varshneya K, Yamada R, Buckley P, et al. A simple three-dimensional hydrogel platform enables ex vivo cell culture of patient and PDX tumors for assaying their response to clinically relevant therapies. *Mol Cancer Ther* 2019;18:718-25.
28. Plummer S, Wallace S, Ball G, Lloyd R, Schiapparo

- elli P, Quinones-Hinojosa A, et al. A Human iPSC-derived 3D platform using primary brain cancer cells to study drug development and personalized medicine. *Sci Rep* 2019;9:1407.
29. Halfter K, Ditsch N, Kolberg HC, Fischer H, Hauzenberger T, von Koch FE, et al. Prospective cohort study using the breast cancer spheroid model as a predictor for response to neoadjuvant therapy--the SpheroNEO study. *BMC Cancer* 2015; 15:519.
 30. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brink S, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 2011;141:1762-72.
 31. Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat Med* 2015;21:256-62.
 32. Boj SF, Hwang CI, Baker LA, Chio II, Engle DD, Corbo V, et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell* 2015;160:324-38.
 33. van de Wetering M, Francies HE, Francis JM, Bou-nova G, Iorio F, Pronk A, et al. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell* 2015;161:933-45.
 34. Weeber F, van de Wetering M, Hoogstraat M, Dijkstra KK, Krijgsman O, Kuilman T, et al. Preserved genetic diversity in organoids cultured from biopsies of human colorectal cancer metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:13308-11.
 35. Kijima T, Nakagawa H, Shimonosono M, Chandramouleeswaran PM, Hara T, Sahu V, et al. Three-dimensional organoids reveal therapy resistance of esophageal and oropharyngeal squamous cell carcinoma cells. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2019;7:73-91.
 36. Orditura M, Della Corte CM, Diana A, Ciaramella V, Franzese E, Famiglietti V, et al. Three dimensional primary cultures for selecting human breast cancers that are sensitive to the anti-tumor activity of ipatasertib or taselisib in combination with anti-microtubule cytotoxic drugs. *Breast* 2018;41:165-71.
 37. Vlachogiannis G, Hedayat S, Vatsiou A, Jamin Y, Fernandez-Mateos J, Khan K, et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science* 2018;359:920-6.
 38. Gao D, Vela I, Sboner A, Iaquinta PJ, Karthaus WR, Gopalan A, et al. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell* 2014; 159:176-87.
 39. Tanaka N, Osman AA, Takahashi Y, Lindemann A, Patel AA, Zhao M, et al. Head and neck cancer organoids established by modification of the CTOS method can be used to predict in vivo drug sensitivity. *Oral Oncol* 2018;87:49-57.
 40. Kondo J, Ekawa T, Endo H, Yamazaki K, Tanaka N, Kukita Y, et al. High-throughput screening in colorectal cancer tissue-originated spheroids. *Cancer Sci* 2019;110:345-55.
 41. Hughes CS, Postovit LM, Lajoie GA. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* 2010;10:1886-90.
 42. Bray LJ, Binner M, Korner Y, von Bonin M, Bornhauser M, Werner C. A three-dimensional ex vivo tri-culture model mimics cell-cell interactions between acute myeloid leukemia and the vascular niche. *Haematologica* 2017;102:1215-26.
 43. Maschmeyer I, Hasenberg T, Jaenicke A, Lindner M, Lorenz AK, Zech J, et al. Chip-based human liver-intestine and liver-skin co-cultures--A first step toward systemic repeated dose substance testing in vitro. *Eur J Pharm Biopharm* 2015;95(Pt A):77-87.
 44. Birey F, Andersen J, Makinson CD, Islam S, Wei W, Huber N, et al. Assembly of functionally integrated human forebrain spheroids. *Nature* 2017;545:54-9.
 45. Naipal KA, Verkaik NS, Sanchez H, van Deurzen CH, den Bakker MA, Hoeijmakers JH, et al. Tumor slice culture system to assess drug response of primary breast cancer. *BMC Cancer* 2016;16:78.

46. Aref AR, Campisi M, Ivanova E, Portell A, Larios D, Piel BP, et al. 3D microfluidic ex vivo culture of organotypic tumor spheroids to model immune checkpoint blockade. *Lab Chip* 2018;18:3129-43.
47. Nagourney RA, Blitzer JB, Shuman RL, Asciuto TJ, Deo EA, Paulsen M, et al. Functional profiling to select chemotherapy in untreated, advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2012;32:4453-60.
48. Carranza-Torres IE, Guzman-Delgado NE, Coronado-Martinez C, Banuelos-Garcia JI, Viveros-Valdez E, Moran-Martinez J, et al. Organotypic culture of breast tumor explants as a multicellular system for the screening of natural compounds with antineoplastic potential. *Biomed Res Int* 2015;2015: 618021.
49. Geller J, Partido C, Sionit L, Youngkin T, Nachtsheim D, Espanol M, et al. Comparison of androgen-independent growth and androgen-dependent growth in BPH and cancer tissue from the same radical prostatectomies in sponge-gel matrix histoculture. *Prostate* 1997;31:250-4.
50. Centenera MM, Gillis JL, Hanson AR, Jindal S, Taylor RA, Risbridger GP, et al. Evidence for efficacy of new Hsp90 inhibitors revealed by ex vivo culture of human prostate tumors. *Clin Cancer Res* 2012;18: 3562-70.
51. Meijer TG, Naipal KA, Jager A, van Gent DC. Ex vivo tumor culture systems for functional drug testing and therapy response prediction. *Future Sci OA* 2017;3:FSO190.
52. Davies EJ, Dong M, Gutekunst M, Narhi K, van Zoggel HJ, Blom S, et al. Capturing complex tumour biology in vitro: histological and molecular characterisation of precision cut slices. *Sci Rep* 2015;5: 17187.
53. Parrish AR, Sallam K, Nyman DW, Orozco J, Cress AE, Dalkin BL, et al. Culturing precision-cut human prostate slices as an in vitro model of prostate pathobiology. *Cell Biol Toxicol* 2002;18:205-19.
54. Vaira V, Fedele G, Pyne S, Fasoli E, Zadra G, Bailey D, et al. Preclinical model of organotypic culture for pharmacodynamic profiling of human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:8352-6.
55. Papini S, Rosellini A, De Matteis A, Campani D, Selli C, Caporali A, et al. Establishment of an organotypic in vitro culture system and its relevance to the characterization of human prostate epithelial cancer cells and their stromal interactions. *Pathol Res Pract* 2007;203:209-16.
56. Merz F, Gaunitz F, Dehghani F, Renner C, Meixensberger J, Gutenberg A, et al. Organotypic slice cultures of human glioblastoma reveal different susceptibilities to treatments. *Neuro Oncol* 2013;15: 670-81.
57. Mazzocchi A, Devarasetty M, Herberg S, Petty WJ, Marini F, Miller L, et al. Pleural effusion aspirate for use in 3D lung cancer modeling and chemotherapy screening. *ACS Biomater Sci Eng* 2019;5:1937-43.
58. Votanopoulos KI, Mazzocchi A, Sivakumar H, Forsythe S, Aleman J, Levine EA, et al. Appendiceal cancer patient-specific tumor organoid model for predicting chemotherapy efficacy prior to initiation of treatment: a feasibility study. *Ann Surg Oncol* 2019;26:139-47.
59. Tam RY, Yockell-Lelievre J, Smith LJ, Julian LM, Baker AEG, Choey C, et al. Rationally designed 3D hydrogels model invasive lung diseases enabling high-content drug screening. *Adv Mater* 2019;31: e1806214.
60. Fong EL, Martinez M, Yang J, Mikos AG, Navone NM, Harrington DA, et al. Hydrogel-based 3D model of patient-derived prostate xenograft tumors suitable for drug screening. *Mol Pharm* 2014;11: 2040-50.
61. Taubenberger AV, Bray LJ, Haller B, Shaposhnykov A, Binner M, Freudenberg U, et al. 3D extracellular matrix interactions modulate tumour cell growth, invasion and angiogenesis in engineered tumour microenvironments. *Acta Biomater* 2016;36:73-85.
62. de la Puente P, Muz B, Gilson RC, Azab F, Luderer M, King J, et al. 3D tissue-engineered bone marrow as

- a novel model to study pathophysiology and drug resistance in multiple myeloma. *Biomaterials* 2015; 73:70-84.
63. Bray LJ, Secker C, Murekatete B, Sievers J, Binner M, Welzel PB, et al. Three-dimensional in vitro hydro- and cryogel-based cell-culture models for the study of breast-cancer metastasis to bone. *Cancers (Basel)* 2018;10:292.
 64. Zhang G, Song X, Mei J, Ye G, Wang L, Yu L, et al. A simple 3D cryogel co-culture system used to study the role of CAFs in EMT of MDA-MB-231 cells. *RSC Adv* 2017;7:17208-16.
 65. Chung B, Esmaeili AA, Gopalakrishna-Pillai S, Murad JP, Andersen ES, Kumar Reddy N, et al. Human brain metastatic stroma attracts breast cancer cells via chemokines CXCL16 and CXCL12. *NPJ Breast Cancer* 2017;3:6.
 66. Qiao H, Tang T. Engineering 3D approaches to model the dynamic microenvironments of cancer bone metastasis. *Bone Res* 2018;6:3.
 67. Bock N, Shokoohmand A, Kryza T, Rohl J, Meijer J, Tran PA, et al. Engineering osteoblastic metastases to delineate the adaptive response of androgen-deprived prostate cancer in the bone metastatic microenvironment. *Bone Res* 2019;7:13.
 68. Shokoohmand A, Ren J, Baldwin J, Attack A, Shafiee A, Theodoropoulos C, et al. Microenvironment engineering of osteoblastic bone metastases reveals osteomimicry of patient-derived prostate cancer xenografts. *Biomaterials* 2019;220:119402.
 69. Nayak B, Balachander GM, Manjunath S, Rangarajan A, Chatterjee K. Tissue mimetic 3D scaffold for breast tumor-derived organoid culture toward personalized chemotherapy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2019;180:334-43.
 70. Pereira BA, Lister NL, Hashimoto K, Teng L, Flandes-Iparraguirre M, Eder A, et al. Tissue engineered human prostate microtissues reveal key role of mast cell-derived tryptase in potentiating cancer-associated fibroblast (CAF)-induced morphometric transition in vitro. *Biomaterials* 2019;197:72-85.
 71. Langer EM, Allen-Petersen BL, King SM, Kendersky ND, Turnidge MA, Kuziel GM, et al. Modeling tumor phenotypes in vitro with three-dimensional bioprinting. *Cell Rep* 2019;26:608-23.e6.
 72. Zhou X, Zhu W, Nowicki M, Miao S, Cui H, Holmes B, et al. 3D bioprinting a cell-laden bone matrix for breast cancer metastasis study. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016;8:30017-26.
 73. Wang Y, Shi W, Kuss M, Mirza S, Qi D, Krasnoslobodtsev A, et al. 3D bioprinting of breast cancer models for drug resistance study. *ACS Biomater Sci Eng* 2018;4:4401-11.
 74. Li Q, Lin H, Rauch J, Deleyrolle LP, Reynolds BA, Viljoen HJ, et al. Scalable culturing of primary human glioblastoma tumor-initiating cells with a cell-friendly culture system. *Sci Rep* 2018;8:3531.
 75. Sung KE, Beebe DJ. Microfluidic 3D models of cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;79-80:68-78.
 76. Selden C, Fuller B. Role of bioreactor technology in tissue engineering for clinical use and therapeutic target design. *Bioengineering (Basel)* 2018;5:32.
 77. Ferrarini M, Steimberg N, Ponzoni M, Belloni D, Berenzi A, Girlanda S, et al. Ex-vivo dynamic 3-D culture of human tissues in the RCCS bioreactor allows the study of multiple myeloma biology and response to therapy. *PLoS One* 2013;8:e71613.
 78. Belloni D, Heltai S, Ponzoni M, Villa A, Vergani B, Pecciarini L, et al. Modeling multiple myeloma-bone marrow interactions and response to drugs in a 3D surrogate microenvironment. *Haematologica* 2018;103:707-16.
 79. Muraro MG, Muenst S, Mele V, Quagliata L, Iezzi G, Tzankov A, et al. Ex-vivo assessment of drug response on breast cancer primary tissue with preserved microenvironments. *Oncoimmunology* 2017;6:e1331798.
 80. Manfredonia C, Muraro MG, Hirt C, Mele V, Governà V, Papadimitropoulos A, et al. Maintenance of primary human colorectal cancer microenvironment using a perfusion bioreactor-based 3D culture system. *Adv Biosyst* 2019;3:e1800300.

81. Xu X, Farach-Carson MC, Jia X. Three-dimensional in vitro tumor models for cancer research and drug evaluation. *Biotechnol Adv* 2014;32:1256-68.
82. Jenkins RW, Aref AR, Lizotte PH, Ivanova E, Stinson S, Zhou CW, et al. Ex vivo profiling of PD-1 blockade using organotypic tumor spheroids. *Cancer Discov* 2018;8:196-215.
83. Astolfi M, Peant B, Lateef MA, Rousset N, Kendall-Dupont J, Carmona E, et al. Micro-dissected tumor tissues on chip: an ex vivo method for drug testing and personalized therapy. *Lab Chip* 2016;16:312-25.
84. Holton AB, Sinatra FL, Kreaehling J, Conway AJ, Landis DA, Altiok S. Microfluidic biopsy trapping device for the real-time monitoring of tumor microenvironment. *PLoS One* 2017;12:e0169797.
85. Mazzocchi AR, Rajan SAP, Votanopoulos KI, Hall AR, Skardal A. In vitro patient-derived 3D mesothelioma tumor organoids facilitate patient-centric therapeutic screening. *Sci Rep* 2018;8:2886.
86. Akay M, Hite J, Avci NG, Fan Y, Akay Y, Lu G, et al. Drug screening of human GBM spheroids in brain cancer chip. *Sci Rep* 2018;8:15423.
87. Ruppen J, Wildhaber FD, Strub C, Hall SR, Schmid RA, Geiser T, et al. Towards personalized medicine: chemosensitivity assays of patient lung cancer cell spheroids in a perfused microfluidic platform. *Lab Chip* 2015;15:3076-85.
88. Carr SD, Green VL, Stafford ND, Greenman J. Analysis of radiation-induced cell death in head and neck squamous cell carcinoma and rat liver maintained in microfluidic devices. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2014;150:73-80.
89. Cheah R, Srivastava R, Stafford ND, Beavis AW, Green V, Greenman J. Measuring the response of human head and neck squamous cell carcinoma to irradiation in a microfluidic model allowing customized therapy. *Int J Oncol* 2017;51:1227-38.
90. Kennedy R, Kuvshinov D, Sdrolia A, Kuvshinova E, Hilton K, Crank S, et al. A patient tumour-on-a-chip system for personalised investigation of radiotherapy based treatment regimens. *Sci Rep* 2019;9:6327.
91. Moore N, Doty D, Zielstorff M, Kariv I, Moy LY, Gimbel A, et al. A multiplexed microfluidic system for evaluation of dynamics of immune-tumor interactions. *Lab Chip* 2018;18:1844-58.
92. Lee SWL, Adriani G, Ceccarello E, Pavesi A, Tan AT, Bertoletti A, et al. Characterizing the role of monocytes in T cell cancer immunotherapy using a 3D microfluidic model. *Front Immunol* 2018;9:416.
93. Zhang W, Lee WY, Siegel DS, Tolias P, Zilberberg J. Patient-specific 3D microfluidic tissue model for multiple myeloma. *Tissue Eng Part C Methods* 2014;20:663-70.
94. Khin ZP, Ribeiro ML, Jacobson T, Hazlehurst L, Perez L, Baz R, et al. A preclinical assay for chemosensitivity in multiple myeloma. *Cancer Res* 2014;74:56-67.
95. Aleman J, Skardal A. A multi-site metastasis-on-a-chip microphysiological system for assessing metastatic preference of cancer cells. *Biotechnol Bioeng* 2019;116:936-44.
96. Nagle PW, Plukker JTM, Mu ijs CT, van Luijk P, Coppes RP. Patient-derived tumor organoids for prediction of cancer treatment response. *Semin Cancer Biol* 2018;53:258-64.