



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

CD34+ HSCs기반 인간화 마우스에서
구축한 췌장암 동소이식모델의 종양학적 특성
및 anti-PD-1 antibody 처치에 따른
종양면역학적 변화 분석

Analysis of oncological features in pancreatic cancer
orthotopic model using CD34+HSCs based
humanized mice and change of
immune-oncological feature
after anti-PD-1 antibody treatment

울산대학교 대학원

의과학과

박수진

CD34+ HSCs기반 인간화 마우스에서
구축한 췌장암 동소이식모델의 종양학적 특성
및 anti-PD-1 antibody 처치에 따른
종양면역학적 변화 분석

지도교수 전은성

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2024년 8월

울산대학교 대학원

의과학과

박수진

박수진의 이학석사학위 논문을 인준함

심사위원 정 성 윤 (인)

심사위원 전 은 성 (인)

심사위원 황 정 진 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2024년 8월

국 문 요 약

PART I

췌장암에서 면역항암제의 효능을 평가하기 위해서는 인간 면역시스템을 잘 반영할 수 있는 전임상 동물 모델이 필요하다. 췌장암 환자 대부분이 유전자 돌연변이를 가지고 있기 때문에 다양한 종양학적 특징을 가지는 것 또한 면역항암제의 효능을 확인하는데 중요한 요소로 작용될 수 있다. 본 연구에서는 췌장암 인간화 마우스를 제작하여 췌장암 환자들이 가지는 다양한 종양학적 특징을 반영할 수 있는지 확인하였다.

췌장암 동소이식 모델을 제작하기 위해서 KRAS wild type 세포주인 BxPC3_luc와 KRAS G12D type인 AsPC1_luc 세포주를 CD34+ hematopoietic stem cell (HSCs) 기반 인간화 마우스의 췌장에 이식하였다. 이식 후 종양 크기 및 위치를 확인하기 위해서 이식한 췌장암 세포주 모두 luciferase가 transfection된 세포주를 실험에 사용하였다.

In Vivo Imaging System (IVIS)과 Positron emission tomography-Magnetic resonance (PET-MR)를 이용하여 종양의 생성과 위치를 확인할 수 있었다. 그리고 flow cytometry를 사용하여 혈액과 종양 내 침윤된 인간면역세포들의 분포를 확인하였을 때, hCD45(+) cells이 AsPC1_luc group의 혈액에 많이 존재할 뿐 아니라 종양조직 내에 침윤된 비율도 더 높은 것을 확인하였다. AsPC1_luc group의 종양조직 내에 침윤된 인간면역세포 중에서도 hCD3(+) 세포와 hCD11b(+) 세포가 BxPC3_luc group과 비교했을 때 유의미하게 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

종양조직 내에 침윤된 면역세포가 AsPC1_luc group에 많은 것과 Extracellular matrix (ECM) composition의 연관성을 확인하기 위해서 MT(Masson's Trichrome) staining을 진행하여 ECM intensity 분석을 진행하였다. 그 결과 전체 ECM 부분이 AsPC1_luc group에서 유의미하게 낮은 것을 확인할 수 있었고, 그 중에서도 ECM_dense 부분이

BxPC3_luc group에 비해 유의미하게 낮은 것을 확인할 수 있었다. 이를 근거로, 면역 세포가 종양조직 내에 침윤될 때 ECM intensity의 영향을 받는 것을 확인할 수 있었다.

인간화 마우스에서 유래한 종양조직으로 세포주와 오가노이드를 구축하여 각각이 가지는 특징을 flow cytometry를 통해 확인해봤을 때, 종양 특이적 마커들에서 parental cell line과 유사한 발현을 가지는 것을 확인하였고, 계대가 진행됨에 따라 그 특성이 계속 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 특히나 인간화 마우스의 종양조직에서 구축한 세포주와 오가노이드의 경우 Programmed death-ligand 1 (PD-L1)의 발현 값이 parental cell line에 비해 줄어든 것을 확인하였다.

Keywords: Pancreatic cancer, Humanized mouse, Orthotopic model, KRAS mutation, Organoid

PART II

앞서 동소이식 인간화 마우스가 췌장암 환자들이 가지는 종양미세환경의 특징을 반영할 수 있다는 것을 확인하였고, 이 모델이 면역항암제 후보약물들의 효과를 평가하기 위한 전임상 모델로서 활용이 가능하다는 것을 검증하기 위해서 추가 실험을 진행하였다.

CD34+HSCs 기반 인간화 마우스에서 구축한 BxPC3_luc 모델의 종양 조직과 인간 췌장암조직의 유사성을 확인하기 위해서 단일 세포 RNA 시퀀싱을 진행하였다. 각 조직에 침윤된 세포에서 mRNA 발현 수준에 대한 분석을 진행하였고, 동일한 마커들을 발현하는 세포들의 클러스터들을 확인했을 때, 인간 종양조직과 인간화 마우스 종양조직의 단일세포 분포의 특징이 유사함을 확인할 수 있었다.

인간의 종양미세환경을 잘 반영하는 인간화마우스에서 면역항암제의 효능을 평가하기 위해 anti-PD-1 항체를 주 5회 복강으로 주입하였다. IVIS 촬영을 통해 주 1회 종양의 성장을 비교하였고, 이후 종양 무게를 측정했을 때 anti-PD-1 항체 투여 그룹에서 종양의 성장과 무게가 control 그룹보다 다소 낮은 것을 확인할 순 있었지만 유의미한 차이는 확인할 수 없었다.

추가적으로 인간화마우스의 혈액과 종양조직에서 인간 면역세포의 분포를 확인하기 위해서 유세포분석을 진행하였다. 그 결과 anti-PD-1 항체 투여군에서 hCD45(+) CD11b(+) Myeloid 세포가 증가하였고, hCD45(+) CD3(+) T 세포는 감소하였다.

그리고 혈액과 종양조직에서 hCD3(+)CD8(+) T 세포의 PD-1 발현이 감소한 것을 확인하였고, anti-PD-1 antibody 투여군에서 hCD3(+)FoxP3(+) T 세포의 비율과 활성화가 control 그룹에 비해 감소된 것을 확인할 수 있었다.

이러한 분석을 통해, 인간화마우스 기반의 췌장암 종양 모델이 면역 항암제 후보물질들의 유효성 평가와 세밀한 면역 분석을 진행하기에 적절한 모델임을 확인하였다.

Keywords: Pancreatic cancer, Humanized mouse, Orthotopic model, Immunotherapy

Table of contents

국문요약: PART I	i
국문요약: PART II	iii
Table of contents	iv
List of figures: PART I	v
List of figures: PART II	vi
Introduction	1
Methods and materials	3
Results: PART I	9
Results: PART II	22
Discussion	33
Reference	37
영문 요약	41

List of figures

Part I

Figure 1. CD34+ HSCs 기반 인간화 마우스를 이용하여 췌장암 동소이식 모델 제작

Figure 2. 췌장암 동소이식모델의 peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)에서
인간 면역세포 아형별 분포 확인

Figure 3. 췌장암 동소이식모델의 종양조직에서 종양 세포와 인간 면역세포 아형별 분포
확인

Figure 4. 종양 조직의 Extracellular matrix (ECM) 분포와 조직내 침윤된 면역세포
사이의 상관 관계 확인

Figure 5. 췌장암 동소이식 모델 종양 조직 유래의 세포주 및 오가노이드 구축

Figure 6. 췌장암 종양 조직 유래 세포주 및 오가노이드에서 종양 관련 마커 변화 확인

List of figures

Part II

Figure 1. 단일세포 RNA 시퀀싱 분석을 이용한 췌장암 종양 조직과 췌장암 인간화
마우스 기반의 췌장 종양 조직의 유사성 비교

Figure 2. 인간화 마우스를 이용한 췌장암 모델에서 anti-PD-1 항체 처리 후 항 종양
치료 효과 확인

Figure 3. anti-PD-1 투여 차수에 따른 혈액 내 인간 면역세포 분포의 연속적 변화
확인

Figure 4. 췌장암 인간화 마우스 모델의 혈액과 종양조직에서 anti-PD-1 항체 투여 후
면역세포 아형별 분포의 변화 확인

Figure 5. CD3(+) T 세포 아형에서, anti-PD-1 투여에 따른 PD-1 발현 변화 확인

Figure 6. anti-PD-1 항체 투여 후 T세포 하위 집단의 활성화 확인

Introduction

췌장암은 국소적으로 많이 진행되거나 전이가 일어나기 전까지는 특별한 증상이 없기 때문에 [1], 증상이 나타나게 되면 수술로는 완전한 치료가 불가능하다. 이렇듯, 췌장암은 늦은 진단으로 인한 예후가 좋지 않은 암으로 알려져 있는데, 췌장암이 발생하는 원인 중 KRAS mutation가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [2].

2021년 국가 암 등록 통계 데이터에서 췌장암은 10대 암중 8번째로 다른 암 중에 비해 발생률이 낮을 뿐 아니라 사망률도 낮은 것을 확인할 수 있다. 하지만 주요 암 5년 생존율 추이 데이터에서 췌장암 환자의 생존율이 꾸준히 증가했는데 [3], 이는 조기 발견으로 인한 치료의 결과이며 췌장암 치료제 개발에 대한 연구가 늘어나고 있음 또한 시사한다 [4].

췌장암을 치료하는데 사용되는 치료 전략은 수술, 방사선 치료, 항암화학요법, 그리고 표적 항암제 등이 있다. 그 중에서도 항암화학요법이 주로 사용되고 있는데, 췌장암 세포가 다양한 매커니즘을 통해서 약물에 대한 저항성을 가질 수 있기 때문에 항암화학요법 시 병용 투여를 진행하는 경우가 많다 [5].

일반적으로 췌장암 치료에 사용되는 항암제는 부작용을 유발할 수 있는데 이를 개선하고자 면역세포 활성화에 초점을 맞춘 면역 항암제 관련 치료제들의 개발이 증가하고 있고 [6], 이러한 후보 물질의 치료효과를 스크리닝하기 위해서는 적절한 전임상 모델이 필요하다.

암 연구에 사용되는 전임상 모델은 인간 유래 췌장암 세포 이식 시, 이식편 거부반응을 피하기 위해서 주로 면역이 결핍된 마우스인 누드 마우스나 SCID 마우스 등을 사용한다. 이 마우스들은 암 형성이 잘 된다는 장점을 가지고 있지만 [7], 인간의 면역반응을 반영할 수 없다는 단점을 가지고 있기 때문에 면역세포의 활성화에 초점을 맞춘 면역

항암제의 효능을 평가하기 위한 [8] 모델로는 사용이 불가능하다는 한계점을 가지고 있다. 이러한 한계점을 극복하고자 인간의 면역시스템을 잘 반영할 수 있는 인간 면역세포를 가지는 마우스 모델이 개발이 되었는데, 이 모델이 바로 인간화 마우스 모델이다.

인간화 마우스 모델은 이식하는 인간 면역세포의 종류나 이식 방법에 따라서 여러가지 카테고리로 나뉘게 되는데, 인간의 peripheral blood mononuclear cell (PBMCs)을 이식하여 제작된 Hu-PBL 모델, 방사선 조사로 마우스의 골수 기능을 떨어뜨린 후 인간의 hematopoietic stem cells (HSCs)를 이식하여 제작된 Hu-SRC 모델, 마찬가지로 방사선 조사 후 HSCs를 이식하고, 인간 태아의 골수와 흉선, 간 조직을 마우스의 신장 피막에 이식하여 제작된 Hu-BLT 모델 등이 있다 [9-12].

본 연구에 사용한 마우스 모델은 human hematopoietic stem cells (HSCs)을 이식하여 제작된 CD34+ HSCs NSG 마우스 모델이다. 이 마우스 모델은 HSCs를 이식하여 제작되었기 때문에 세포 분화까지 시간이 오래 걸리고, 성공률의 차이가 크다는 단점이 있지만, 다양한 면역세포로 분화가 가능하고 다른 방법들보다도 제작이 쉽다는 장점과 장기간동안 면역반응 관찰이 가능하다는 장점이 있다 [13].

이러한 장점을 가진 CD34+ HSCs 인간화 마우스 모델을 사용하여, 인간의 종양미세환경을 잘 반영하는지, 그리고 췌장암에서 면역항암제의 효능을 평가하기에 적합한 모델로 사용이 가능한지를 확인하는 연구를 진행하였다.

Methods and Materials

1. Luminescence 발현 췌장암 세포주 구축

AsPC1 와 BxPC3 췌장암 세포주는 각각 KCLB (Seoul, Korea)와 ATCC (Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, 두 세포주 모두 RPMI-1640에 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% antibiotic/antimycotic solution을 첨가한 배지를 사용하여 세포주 계대를 진행하였다.

동소이식 모델에서 luminescence 발현을 통해 종양성장을 확인하기 위해서 AsPC1와 BxPC3 세포주에 luciferase와 puromycin의 저항성을 가지는 유전자를 포함하는 plasmid DNA를 도입하였고, 이후 계대를 진행할 때 배지에 $1\mu\text{g/mL}$ puromycin를 첨가하여 유전자가 도입된 세포만 선택하는 과정을 거쳤다. 유전자가 도입된 세포들만 선택하는 과정이 끝나고, luciferase가 도입된 세포들이 특성을 잃지 않고 안정적으로 계대가 진행되고 있었는지 확인하기 위해서, 동소이식 모델을 제작하기 전에 luminescence 발현을 확인하였다. Luciferase가 도입된 두 세포주를 96 well plate에 seeding하여 그 다음날에 D-luciferin을 처리한 후, VICTOR3™(PerkinElmer)를 사용하여 luminescence 발현을 확인하였다.

2. 인간화 마우스를 이용한 췌장암 동소이식모델 제작

인간화 마우스는 Jackson Laboratory (Farmington, CT, USA)와 Jabio (Suwon, Korea)에서 구입하였는데, 각각 NSG™ (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wj})와 NOD-Prkdc^{em1Baek} Il2rg^{em1Baek} mice 종을 기반으로 제작되었다. 회사에서 공개된 프로토콜에 따르면 인간화 마우스는 3-4주령 암컷 마우스에 방사선 조사를 하여 골수의 기능을 저하시켰고, 그 이후 intravenous (I.V) 방법으로 human CD34+ hematopoietic stem

cells (HSCs)를 1×10^5 cells/mouse씩 마우스에 주입하였다. HSCs 이식 10주차에 Flow Cytometry (유세포 분석)을 진행하여 마우스 혈액 내 hCD45(+) 세포의 비율이 25% 이상인 마우스들을 선별하여 공급하였다. 췌장암 동소이식모델 제작 시, 동물 케어와 실험 프로토콜은 Asan Medical Center (Permit no. 2021-12-292) 승인을 받고 진행하였고, 실험은 국가와 기관 규정의 가이드라인에 따라서 수행하였다.

췌장암 인간화 마우스 모델을 제작하기 위해서 21주령 인간화 마우스의 췌장에 췌장암 세포주 AsPC1_luc와 BxPC3_luc를 한 마리당 2×10^6 cells/ $50 \mu\text{l}$ 씩 이식하였다. Luciferase가 도입된 췌장암 세포주는 Matrigel® (Corning, NY, USA)과 1:1로 혼합해서 인간화 마우스의 췌장에 이식되었고, isoflurane을 사용하여 전신 마취 후 진행되었다.

3. In vivo imaging system (IVIS)와 positron emission tomography(PET) /magnetic resonance(MR)을 이용하여 종양성장 확인

췌장암 세포주 이식 3주후, 동소 이식한 종양세포의 성장을 확인하기 위해서 IVIS와 PET/MR 촬영을 진행하였다. IVIS 촬영은 주 1회 진행하였고, 촬영 전 D-luciferin (Abcam, Cambridge, MA, USA)을 150mg/kg의 용량으로 마우스의 Intraperitonea l(I.P)로 주입하여 IVIS spectrum imaging system (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)으로 bioluminescence 발현을 측정하였다.

종양 성장확인용 nanoScan PET/MRI system (1T, Mediso, Buda pest Hungary)을 사용하여 촬영된 PET/MR 이미징을 통해서도 측정되었다. 마우스는 100% O₂에 용해된 1.5% isoflurane으로 마취하였고, flurodioxyglucose (FDG, 9.6 ± 1.1 MBq in 0.2 mL)를 tail vein을 통해 주입하였다.

FDG uptake 동안 T1-weighted gradient-echo (GRE) 3D sequence (TR = 25 ms, TE_{eff} = 3.4, FOV = 64 mm, matrix = 220 × 220)를 사용하여 전신 MR영상을 확보하

였다. 그 이후 MRI field 내에서 단일 시퀀스로 10분동안 1-5개 일치하는 정적인 PET 이미지를 확보하였다. 촬영을 진행하는 동안 animal bed (Multicell, Mediso)에서 공기를 가열하여 체온을 유지할 수 있도록 하였고, 호흡유도를 위해서 압력감지 패드를 사용하였다. PET 이미지는 Tera-Tomo 3D (Mediso)를 사용하여 보정하였고, InterView Fusion (Mediso)을 사용하여 보정한 이미지를 종양과 근접한 조직 내에서 중점을 둔 부분의 3D 부피(VOIs, 2-mm diameter spheres)를 측정하였다.

각 VOI 부분의 표준 uptake 값의 평균(SUVmean)은 다음 공식을 사용하여 계산되었다. $SUV_{mean} = (\text{tumor radioactivity in the tumor volume of interest with the unit of Bq/cc} \times \text{body weight (g)}) \text{ divided by injected radioactivity.}$

4. 유세포분석(Flow cytometry)

췌장암 동소이식 모델의 peripheral blood mononuclear cells(PBMCs)와 종양 조직에서 인간 면역세포의 아형을 정량화하기 위해 유세포분석을 진행하였다.

PBMCs를 샘플링하기 위해서 RBC lysis buffer를 혈액 샘플에 넣어 5분동안 실온에서 반응시킨 후 staining을 진행하였고, 종양조직은 단일세포를 분리하기 위해서 조직을 1-2mm로 작게 자른 후 collagenase /dispase를 넣고 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 그 후 collagenase/dispase의 분해작용을 멈추기 위해서 FBS가 들어간 배지를 넣은 후 원심분리 (450xg)를 5분동안 진행했다. 그 이후 DNase+TrypLE를 넣고 37°C에서 10분 동안 반응시킨 후 앞과 동일하게 FBS가 들어간 배지를 넣어 중화를 시킨 후 원심분리 (450xg)를 5분동안 진행하였다. Cell pellet은 70 μm cell strainer에서 걸러주고 Phosphate-buffered saline (PBS)를 사용하여 debris를 제거하였다.

이후 유세포분석을 위한 항체 염색을 진행하였다. Dead cell 염색을 위해서 Fixable Viability Dye eFluor® 506 (eBioscience, San Diego, CA, USA)를 사용하여 4°C에서 30분동안 반응시켰다. 그리고 FcR blocking reagents (Miltenyi Biotec, Auburn, CA,

USA) 와 surface marker를 검출하기 위해 primary 항체를 염색하였다.

유세포분석에 사용된 항체: anti-human CD45-PerCP /Cy5.5 (clone: 2D1, Biologend), anti-human CD3-Alexa647 (HIT3a, Biologend), anti-human CD19-FITC (4G7, Biologend), anti-human CD56-PE (5.1H11, Biologend), anti-human/mouse CD11b-PE/Cy7 (M1/70, Biologend), anti-mouse CD45 (30-F11, Biologend), anti-human EpCAM-APC/Cy7 (9C4, Biologend), anti-human CD44-BV421 (clone:BJ18, Biologend), and anti-human PD-L1-PE (29E2A3, Biologend), anti-human α -SMA-APC (IC1420, R&D), anti-human vimentin-APC (IC2105, R&D), anti-human pan-CK-FITC (CAM5.2, BD), 그리고 anti-Ki-67-eFluor® 450 (SolA15, invitrogen).

Intracellular staining을 하기 위해서 surface marker를 염색한 후 FoxP3 /Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience™)를 사용하여 fixation과 permeabilized를 진행하였다. 데이터는 BD FACSCanto™ II flow cytometer (BD Biosciences)를 사용하여 확보하였고, 확보한 데이터는 FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA)로 분석을 진행하였다.

5. 종양조직 hematoxylin and eosin (H&E) 그리고 immunohistochemistry (IHC)

조직학 분석을 위해서, 종양 조직은 4% paraformaldehyde (PFA)에 고정시켰고, 파라핀 블록을 제작하여 10 μ m 절편으로 잘라낸 다음 섹션을 탈파라핀화하고 일반적인 절차에 따라 H&E와 Masson's trichrome (MT) 염색을 진행하였다. 또한 제조사의 설명에 따라 BenchMark XT automated immunostaining device (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA)에서 OptiView DAB IHC Detection Kit를 사용하여 포르말린 고정, 파라핀이 내장된 섹션을 면역 염색하였다.

IHC에 사용한 항체: anti-CD45 (1:1600, mouse monoclonal, clone 2B11 +PD7/26, Catalog No. M0701, Dako), anti-CD3 (1:100, rabbit polyclonal, clone POLY, Catalog No. A0452, Dako), anti-CD19 (1:100, mouse monoclonal, clone MRQ-36, Catalog No. 119M-16, Cell Marque), 그리고 anti-CD56 (1:250, rabbit monoclonal, clone MRQ-42, Catalog No. 156R-96, Cell Marque).

6. 종양 조직 유래 세포주 및 오가노이드 구축

췌장암 종양조직 유래 세포주를 구축하기 위해서, 췌장암 인간화 마우스 모델의 종양 조직을 앞서 유세포분석시에 진행했던 방법대로 단일세포로 분리하였고, 10% FBS와 1% 항생제/항진균제 혼합물 (Gibco, Grand Island, NY, USA)이 첨가된 RPMI1640 배지 (Welgene, Daegu, Korea)를 사용하여 배양하였고, 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 계대를 진행하였다.

오가노이드는 인간화마우스의 췌장 종양조직에서 분리해 낸 단일세포 2.5×10^4 세포들을 Cultrex® Reduced Growth Factor BME (R&D Systems)에 섞어서 low attached Cellstar® 48-well plates (Greiner Bio-one, Monroe, NC, USA)에 well당 $20 \mu\text{l}$ 씩 seeding 하였다. 그 다음 오가노이드를 seeding한 플레이트를 거꾸로 뒤집어서 37°C 인큐베이터에서 30분동안 BME를 굳힌 후, 오가노이드 배양 배지를 각 well에 첨가하였다. 오가노이드 계대를 위해서 각 well의 배지를 제거한 후, BME를 1% bovine serum albumin (BSA)으로 코팅된 tube에 옮겼다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 오가노이드 pellet을 clod PBS로 wash하고, 4°C에서 30분동안 원심분리를 진행한 후, 상층액을 다시 제거하고 Cultrex® Organoid Harvesting Solution (R&D Systems)를 넣고 ice에 30분동안 반응시킨다. 그 후 남아있는 BME를 제거하기 위해서 PBS로 wash를 해준다.

분리된 세포는 구축 진행시 사용한 방법과 동일하게 seeding 하여 계대를 완료하였고,

구축한 오가노이드에서 luminescence 발현을 확인하기 위해서 오가노이드에 D-luciferin을 처리한 후 VICTOR3™ instrument (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)를 사용하여 측정하였다.

7. 췌장암 환자 종양조직과 인간화마우스의 췌장암 종양 조직에서 단일세포 RNA 시퀀싱 분석 진행

췌장암 환자 종양조직(N=2)과 인간화 마우스의 췌장암 종양조직(N=2)에서 단일세포를 분리하여 단일세포 RNA 시퀀싱 분석을 진행하였다. Cellranger(7.0.1 버전)을 사용하여 alignment, filtering, barcode counting, 그리고 UMI counting 등과 같은 데이터를 확보하였고, 확보한 데이터는 seurat 패키지(5.0.3 버전)를 이용하여 분석을 진행하였다.

먼저 각 그룹별로 확보한 데이터들을 합친 후 quality control 테스트를 진행하여 단일세포가 아니거나, 손상이 있는 세포들을 nCount 값과 nFeature 값 그리고 percent.mt 값을 조정하여 분석에서 제외시켰다. 그 후 principal component analysis (PCA)를 사용하여 정규화시킨 데이터의 차원을 축소시켰고, harmony를 진행하여 integration된 데이터들은 UMAP에 나타내어 각 cluster별로 cell annotation을 진행하였다.

8. 췌장암 인간화 마우스 모델에 anti-PD-1 항체 투여

앞서 제작한 췌장암 인간화 마우스 모델에서 anti-PD-1 항체를 투여했을 때, 항종양 효과를 확인하기 위해서 anti-PD-1 항체(Bio x cell, Cat#BE0188)를 주 5회, 총 14회 intraperitoneal(I.P)로 투여하였다. 1회차는 5mg/kg의 용량으로 투여하였고 나머지 13회는 10mg/kg로 투여 진행하였다.

Results

PART I

1. 인간화 마우스를 사용하여 췌장암 동소이식 모델 제작

본 연구에서는 인간화마우스를 이용하여 동소이식 모델 제작을 통해, 유전자 돌연변이에 따른 종양미세환경을 인간화마우스가 반영할 수 있는지 확인하기 위해서 KRAS wild type인 BxPC3 세포주와 KRAS G12D 변이를 가지는 AsPC1 세포주를 인간화 마우스의 췌장에 이식하여 모델을 제작하였다(Fig 1A). 동소이식 모델의 특성상, 종양의 위치나 크기를 외관상으로 확인하기 어렵기 때문에 종양 세포주에 luciferase를 도입한 세포주를 사용하여 비침습적인 영상 방법 (IVIS, PET-MR)을 사용하여, 종양의 발생과 성장을 확인하였다.

인간화 마우스에 췌장암 암세포를 이식한 후, In Vivo Imaging System (IVIS)와 Positron Emission Tomography- Magnetic Resonance (PET-MR) 촬영을 진행하였고, 종양세포를 심지 않은 일반 인간화 마우스와 비교하였을 때, 췌장암 동소이식 모델에서 region of interest (ROI) 값이 높게 나타났으며(Fig 1B, C), PET-MR 결과 또한 standardized uptake values(SUV) mean 값이 췌장암 동소이식 모델의 췌장에서 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다(Fig 1D).

그리고 구축된 종양조직이 췌장암의 종양학적 특징을 반영하는지 확인하기 위해서, 종양 조직에서 Hematoxylin and Eosin(H&E) 염색과 Masson's Trichrome(MT) 염색을 통해 췌장암의 종양학적특징을 확인하였다(Fig. 1E).

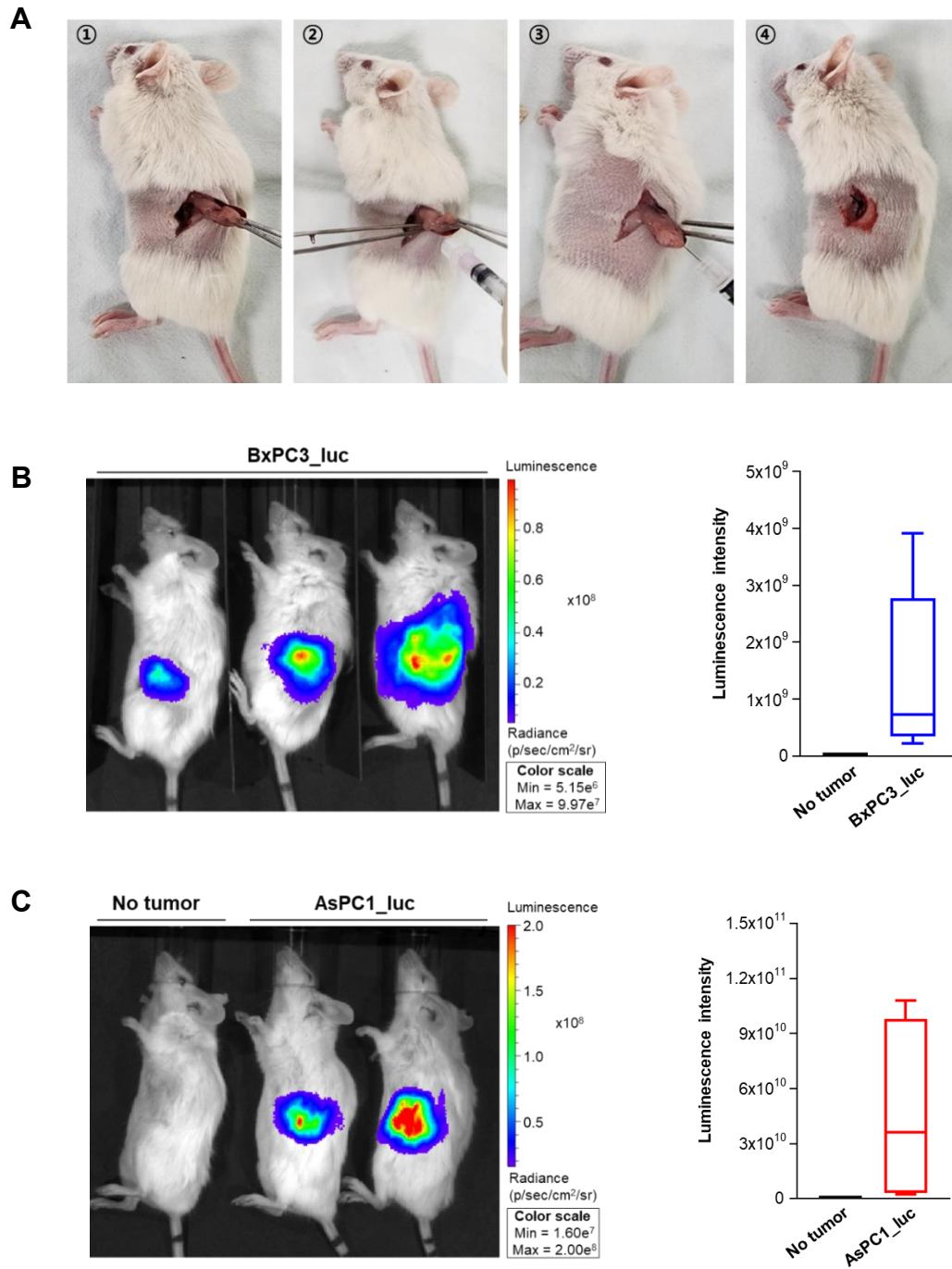


Figure 1. CD34+ HSCs 기반 인간화 마우스를 이용하여 췌장암 동소이식 모델 제작

(A) 인간화 마우스를 이용하여 췌장암 동소이식 모델을 제작하는 과정; (B, C) 암세포 이식 후 28일차에 D-luciferin (150mg/kg)를 복강 내 주입하여 IVIS 촬영 진행

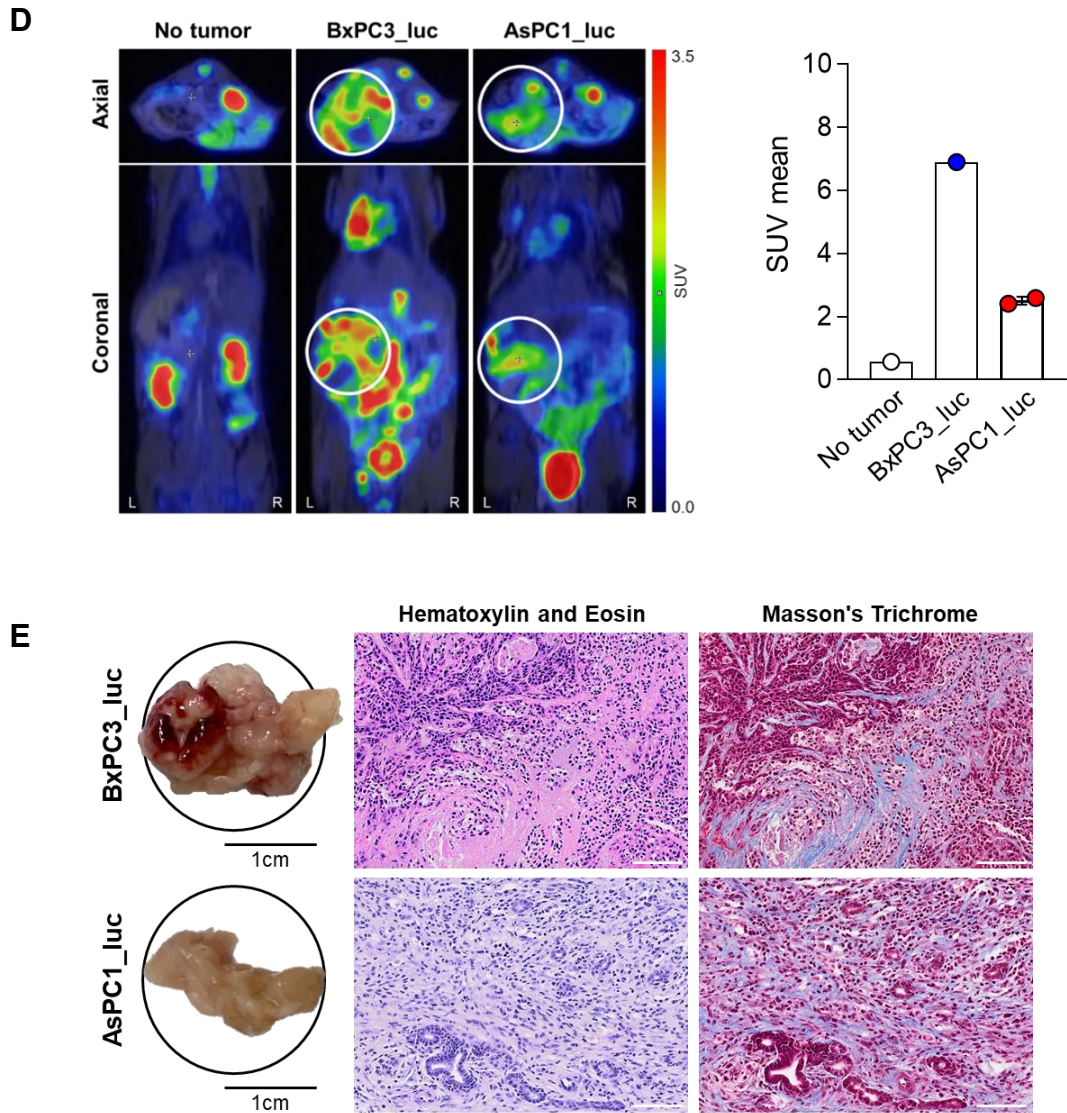


Figure 1. CD34+ HSCs 기반 인간화 마우스를 이용하여 췌장암 동소이식 모델 제작

(C) PET_MR 촬영을 진행하여 인간화 마우스를 이용하여 제작한 췌장암 동소이식 모델

의 췌장부위의 metabolic activity를 확인; (D) 종양 조직(왼쪽), H&E 염색 결과 이미지

(중간), 그리고 MT염색 결과 이미지(오른쪽);

(H&E와 MT염색 이미지 scale bar = 100 μm)

2. 췌장암 동소이식 모델인 인간화 마우스에서 인간 면역세포의 분포 확인

우리가 구축한 인간화 마우스 기반의 췌장암 동소이식 모델이 인간 면역세포를 가지고 있는지 확인하기 위해서 마우스의 혈액을 채취하여 인간 면역세포 프로파일링을 진행하였다.

NSG 마우스와 인간화 마우스를 사용하여 제작한 췌장암 동소이식 모델의 혈액에서 유세포분석을 통해 비교한 결과, 인간화 마우스의 혈액에서만 human CD45(hCD45)(+) 세포가 존재하는 것을 확인할 수 있었다(Fig 2A, B).

또한, 이식한 두가지 췌장암 세포주 그룹 간의 인간 면역세포 비율의 차이를 비교하기 위해서 BxPC3_luc 그룹과 AsPC1_luc 그룹의 hCD45(+) 세포의 비율을 비교했을 때, 상대적으로 AsPC1_luc 그룹에서 hCD45(+) 세포가 인간화 마우스의 혈액에 많이 존재하고 있음을 확인하였다(Fig 2A, B).

그리고, hCD45(+) 세포들의 하위 면역세포의 분포를 확인하기 위해서 여러 면역세포의 마커(CD3, CD19, CD56, CD11b)들을 확인했을 때, BxPC3_luc 그룹과 AsPC1_luc 그룹 모두 인간화 마우스 혈액 내에 인간 면역세포가 다양하게 분포하고 있음을 확인할 수 있었고, 특히 AsPC1_luc 그룹의 혈액에서 CD3(+) T세포의 분포가 BxPC3_luc 그룹에 비해 높았다(Fig 2C).

인간화 마우스의 혈액 내에 존재하는 인간 면역세포가 종양조직 내에도 존재하는지 확인하기 위해서, 인간화 마우스의 종양조직을 확보하여 유세포분석을 진행하였다. 그 결과 혈액과 유사하게 AsPC1_luc 그룹에서 침윤된 hCD45(+) 세포의 비율이 BxPC3_luc 그룹에 비해 높은 것을 확인할 수 있었고(Fig 3A, B) 침투한 hCD45(+) 세포 중에서도 CD3(+) T세포와 CD11b(+) Myeloid 세포가 AsPC1_luc 그룹의 종양조직에 유의미하게 많이 존재하였다(Fig 3C).

또한, 인간 면역세포가 종양조직 내에 상대적으로 적게 침윤 되어있는 BxPC3_luc 그룹의 종양 조직에서, Ep-CAM(+) 종양 세포의 비율이 유의미하게 증가 되어있는 것을

확인할 수 있었다(Fig 3B).

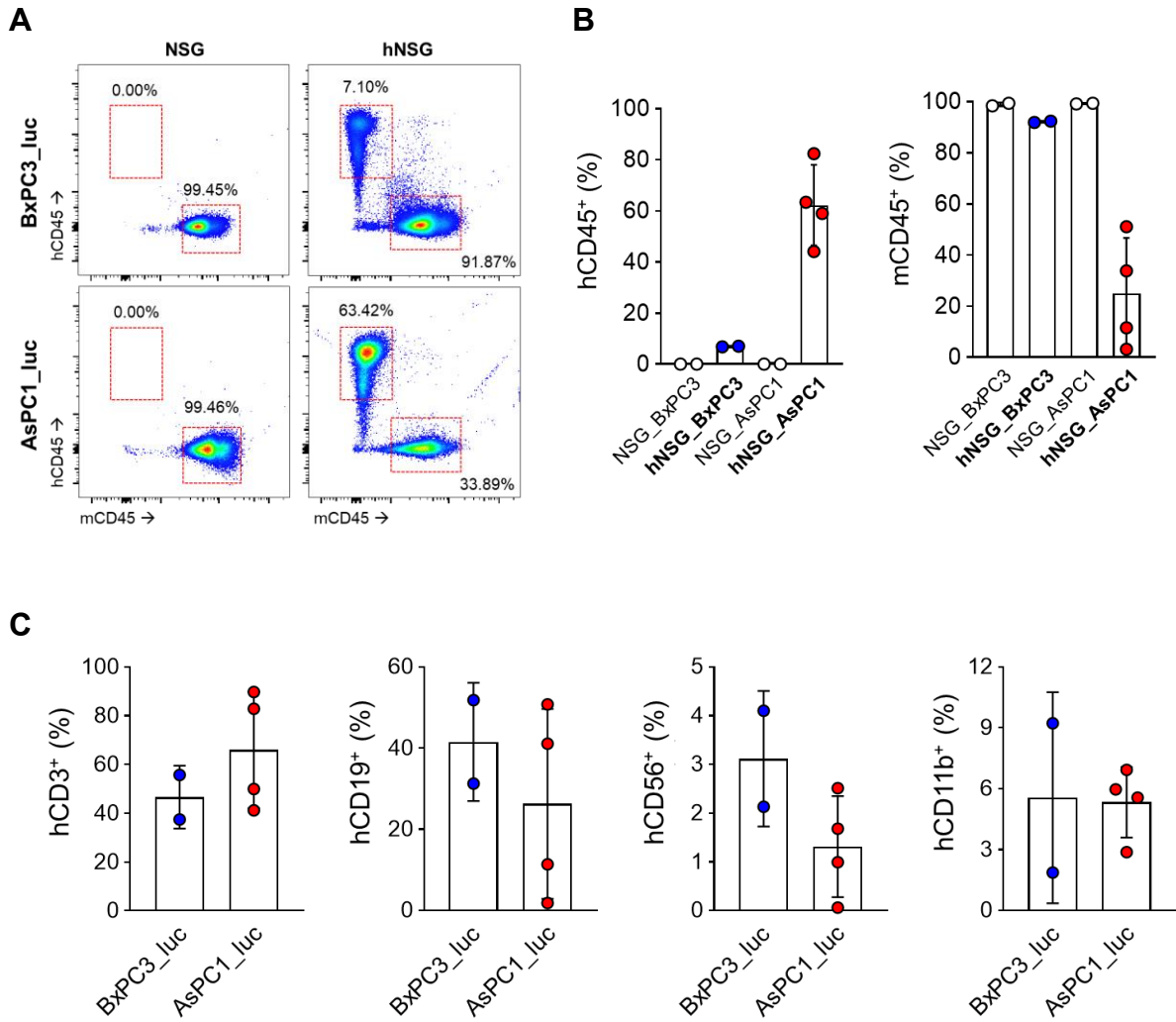


Figure 2. 췌장암 동소이식모델의 peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)에서 인간 면역세포 아형별 분포 확인

(A, B) NSG 와 humanized NSG mice를 이용하여 구축한 췌장암 동소이식 모델의 PBMCs에서 hCD45(+) 세포와 mCD45(+) 세포 분포 확인; (C) hCD45(+) 세포의 하위 집단 면역세포(hCD45(+)CD3(+), hCD45(+)CD19(+), hCD45(+)CD56(+), 그리고 hCD45(+) CD11b(+))의 비율을 확인

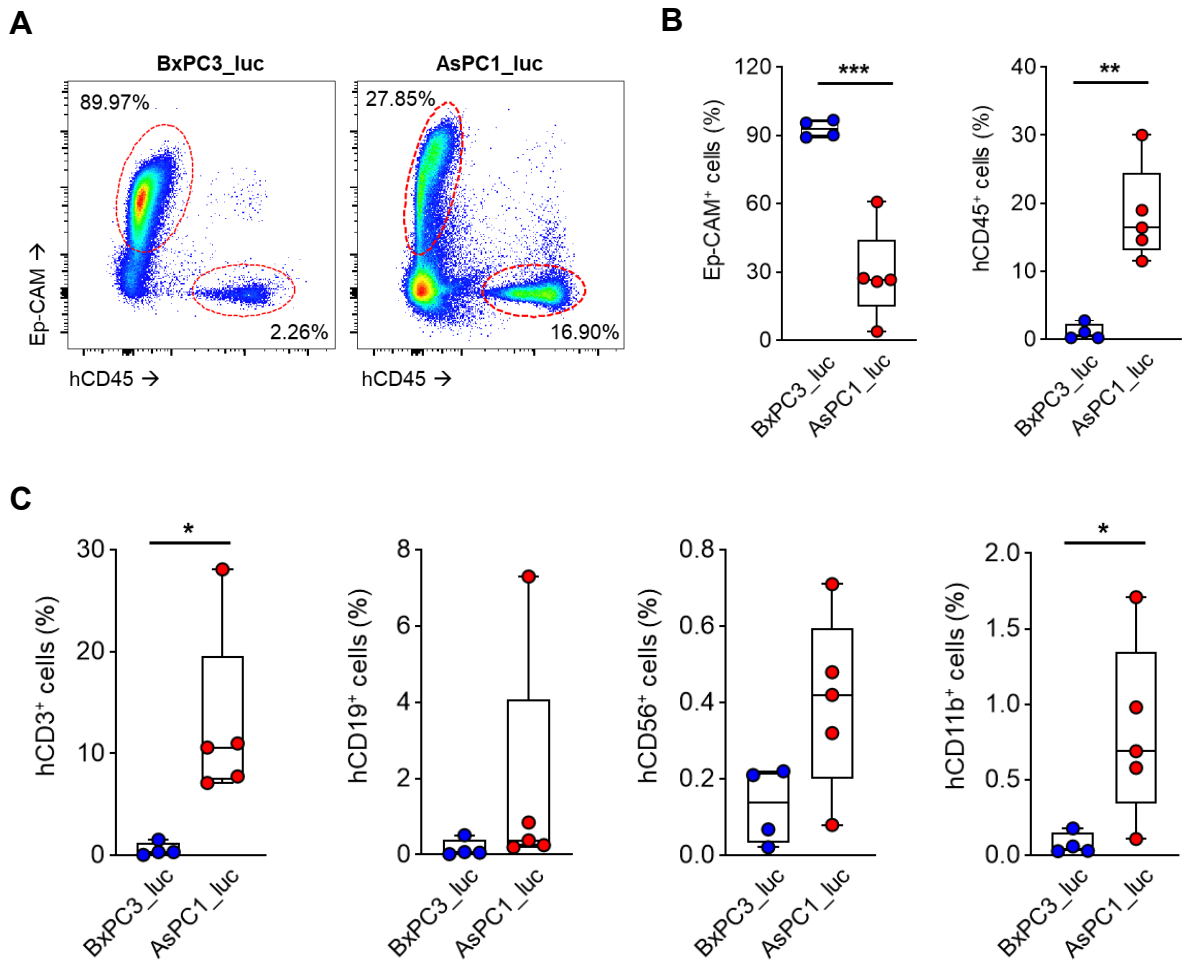


Figure 3. 췌장암 동소이식모델의 종양조직에서 종양 세포와 인간 면역세포 아형별 분포 확인

(A, B) 인간화 마우스를 이용하여 제작한 췌장암 동소이식 모델의 종양조직 내에 존재하는 Ep-CAM(+) 세포와 조직 내로 침윤된 hCD45(+) 세포의 그룹별 분포 확인; (C) 종양 조직 내 침투한 hCD45(+) 세포의 하위집단 분포 확인;

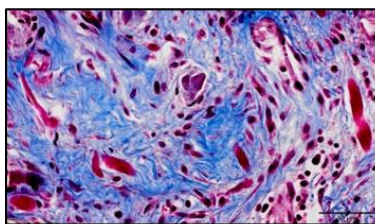
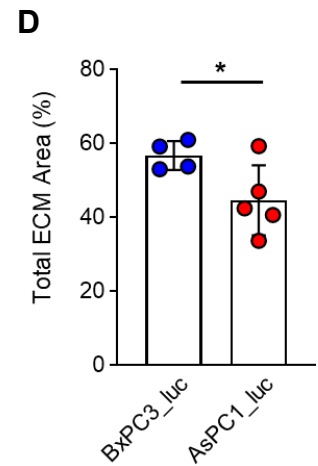
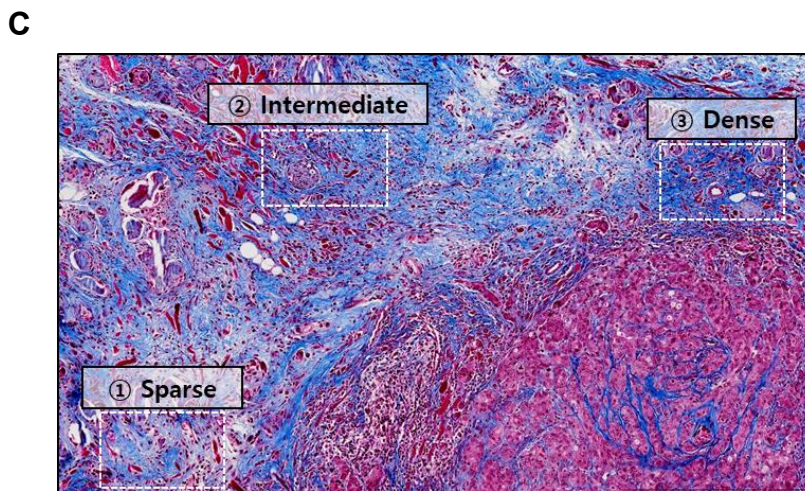
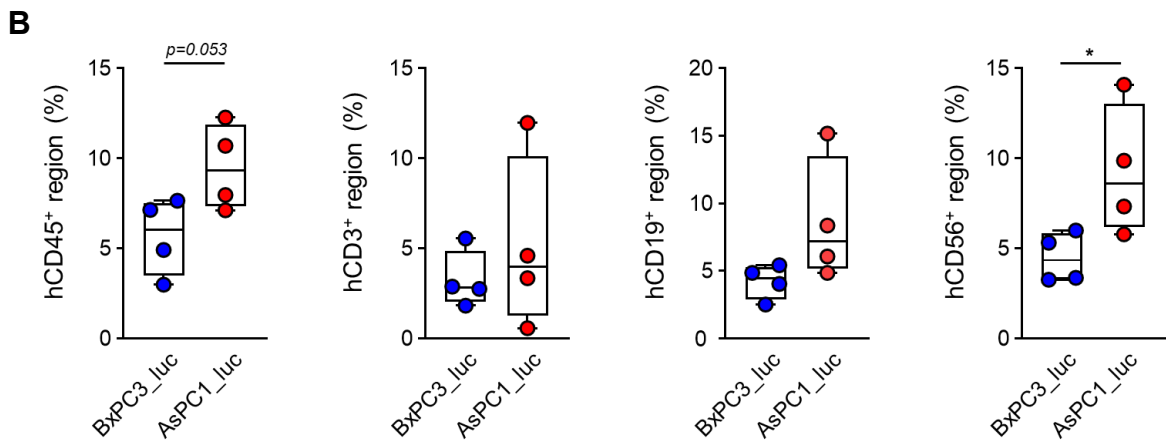
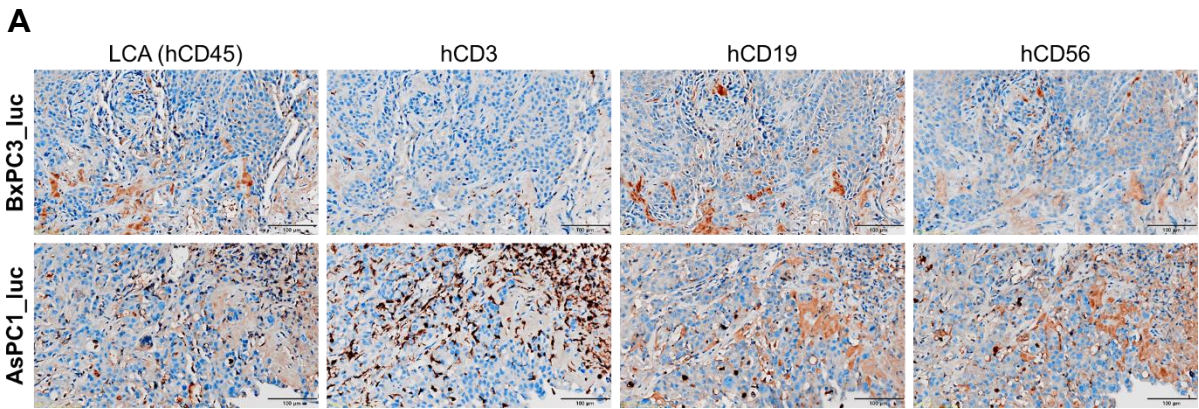
(* : p -value < 0.05; ** : p -value < 0.005; *** : p -value < 0.001)

3. Extracellular matrix (ECM)과 종양조직 내 침윤한 면역세포와의 관계

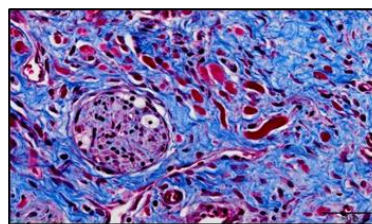
앞선 유세포분석 결과에서 혈액과 종양조직 내에 존재하는 인간 면역세포의 비율이 AsPC1_luc 그룹에서 높은 것을 확인할 수 있었다. 추가적으로 면역조직화학 (Immunohistochemistry) 염색을 통해 유세포분석 결과와 비슷한 경향을 보이는지 확인하였다. 면역조직화학 염색을 진행했던 면역세포 마커들은 LCA(hCD45), CD3, CD19, 그리고 CD56이고, 그 중 LCA(hCD45)(+) 부분과 CD56(+) 부분이 AsPC1_luc 그룹에서 유의미하게 많은 부분을 차지하고 있다는 것을 확인할 수 있었다 (Fig 4A, B).

유세포분석 결과와 면역조직화학 염색을 통해, AsPC1_luc 그룹에서 인간 면역세포의 비율이 높은 것을 확인하였는데, 이러한 경향이 췌장암 종양 미세환경 내에 존재하는 extracellular matrix (ECM)와 연관성이 있는지 확인하기 위해서 Masson's trichrome (MT) 염색을 진행하였다.

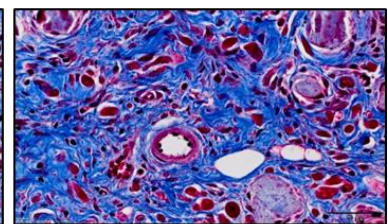
MT 염색 분석 이후, ECM intensity에 따라 sparse와 intermediate 그리고 dense 부분으로 나누어 부분별로 분포를 분석하였고(Fig 4C), AsPC1_luc group에서 전체 ECM 부분과, ECM-dense 부분이 BxPC3_luc 그룹에 비해 유의미하게 낮은 비율로 존재한다는 것을 알 수 있었다(Fig 4D, E). 종양조직 내로 침윤되는 인간 면역세포의 비율이 높았던 AsPC1_luc 그룹에서 ECM의 구성 부분이 낮은 결과로 미루어보아 AsPC1_luc 그룹에서 인간 면역세포의 비율과 ECM 구성이 서로 음의 상관관계를 가지는 것을 확인할 수 있었다.



Sparse intensity < 0.174



intermediate intensity < 0.395



Dense intensity < 0.748

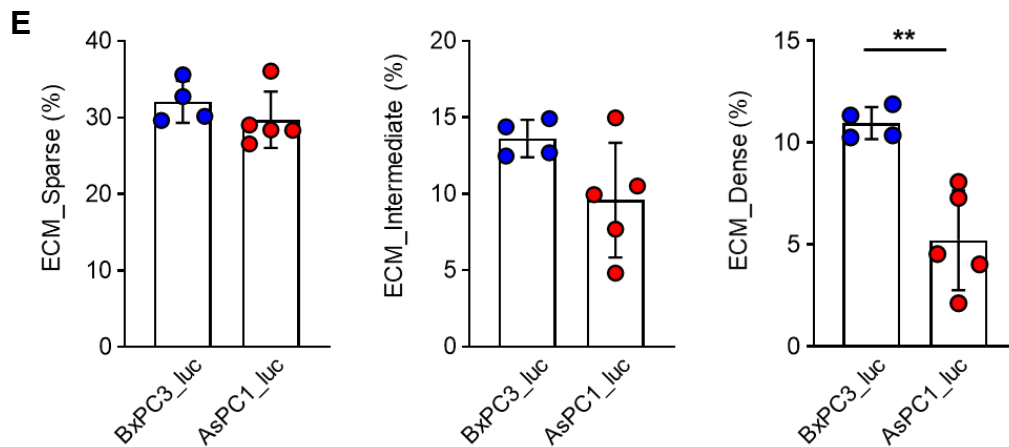


Figure 4. 종양 조직의 Extracellular matrix (ECM) 분포와 조직내 침윤된 면역세포 사이의 상관 관계 확인

(A) hCD45, hCD3, hCD19, hCD56에 대한 면역조직화학(IHC) 염색 결과 대표 이미지 (scale bar=100 μ m); (B) HALO platform을 이용하여 염색된 부분을 정량한 결과; (C) ECM intensity에 따른 대표 이미지; sparse (①, mean density ~ 0.173), intermediate (②, ~ 0.395), 그리고 dense-ECM (③, ~ 0.748); (E) ECM intensity별 영역 비교 그래프; (* : p -value < 0.05; ** : p -value < 0.005)

4. 인간화 마우스모델의 췌장암 종양조직 유래 세포주 및 오가노이드 특성 분석

인간화 마우스 기반 췌장암 동소이식 모델의 췌장암 조직을 통해, 세포주(Fig 5A)와 오가노이드를 구축하여 종양학적 특성을 분석하였다. AsPC1_luc 그룹의 종양조직에서 구축한 오가노이드는 spheroid 형태의 구조를 가지고 있었고(Fig 5B), H&E 염색을 통해서 종양세포로 이루어진 췌장암 오가노이드임을 확인하였다(Fig 5C). 또한 인간화 마우스에 이식했던 세포주의 luciferase가 구축된 오가노이드에서도 동일하게 luminescence 발현됨을 확인할 수 있었다(Fig 5D).

구축한 세포주(Xenograft derived Cell, XC)와 오가노이드(Xenograft derived Organoid, XO)의 특성을 분석하기 위해서 유세포분석을 진행하여 종양세포와 관련된 여러 단백질 마커들(Pan-CK, Ep-CAM, CD44, Vimentin, α -SMA, Ki-67, 그리고 PD-L1)을 확인하였다. 결과적으로 XC와 XO에서 관련 마커들이 parental cell과 유사하게 발현하는 것을 확인할 수 있었고, 그 중에서 PD-L1 발현은 parental cell에 비해 낮은 발현을 보이는 것을 확인하였다(Fig 6A, B, C).

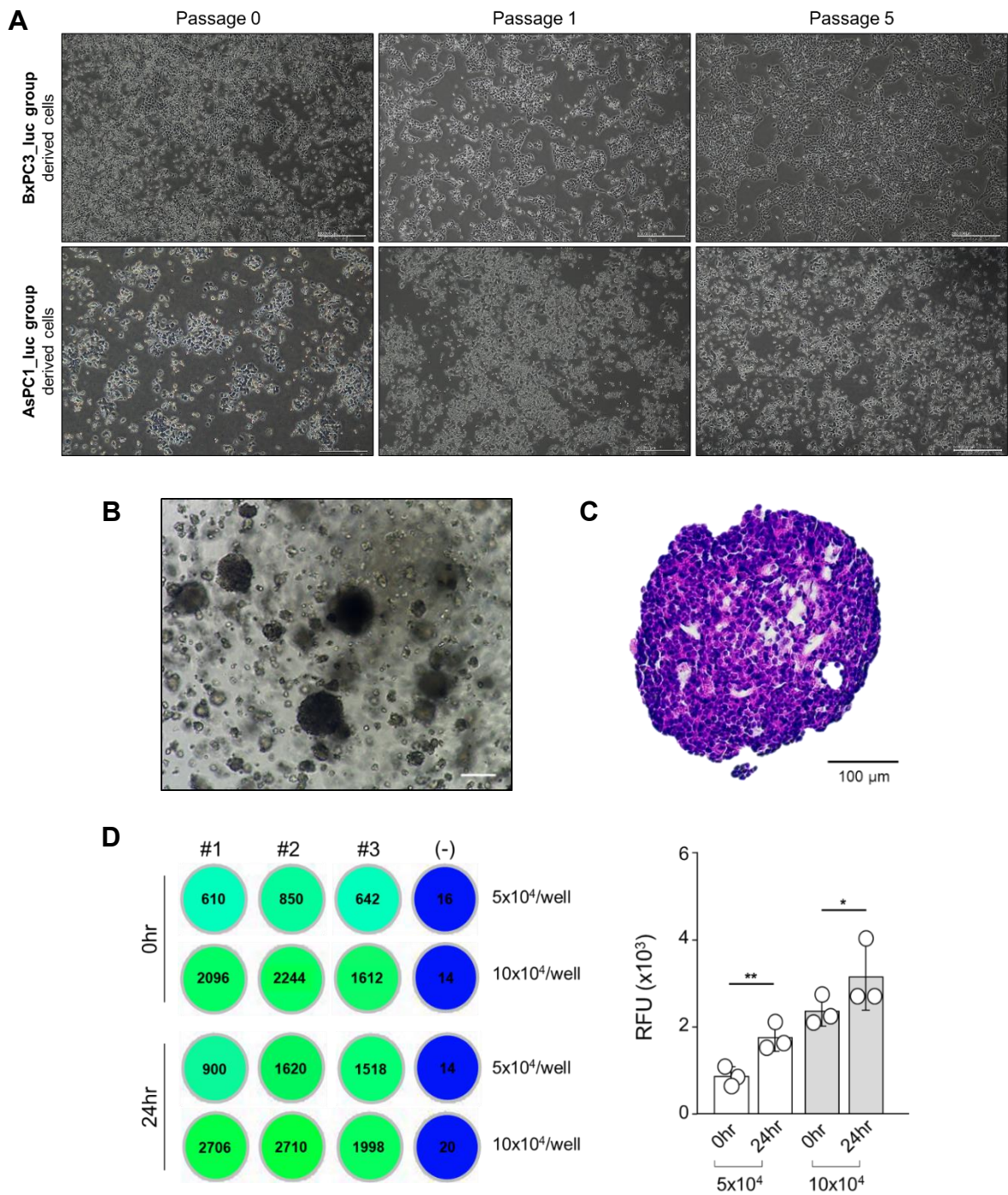


Figure 5. 췌장암 동소이식 모델 종양 조직 유래의 세포주 및 오가노이드 구축

(A) 췌장암 동소이식모델에서 확보한 종양 조직을 이용하여 구축한 세포주 이미지 (scale bar=50 μ m)와 오가노이드 이미지(scale bar=10 μ m); (C) 오가노이드 H&E 염색 사진; (D) 구축한 오가노이드의 luminescence 발현을 확인 결과

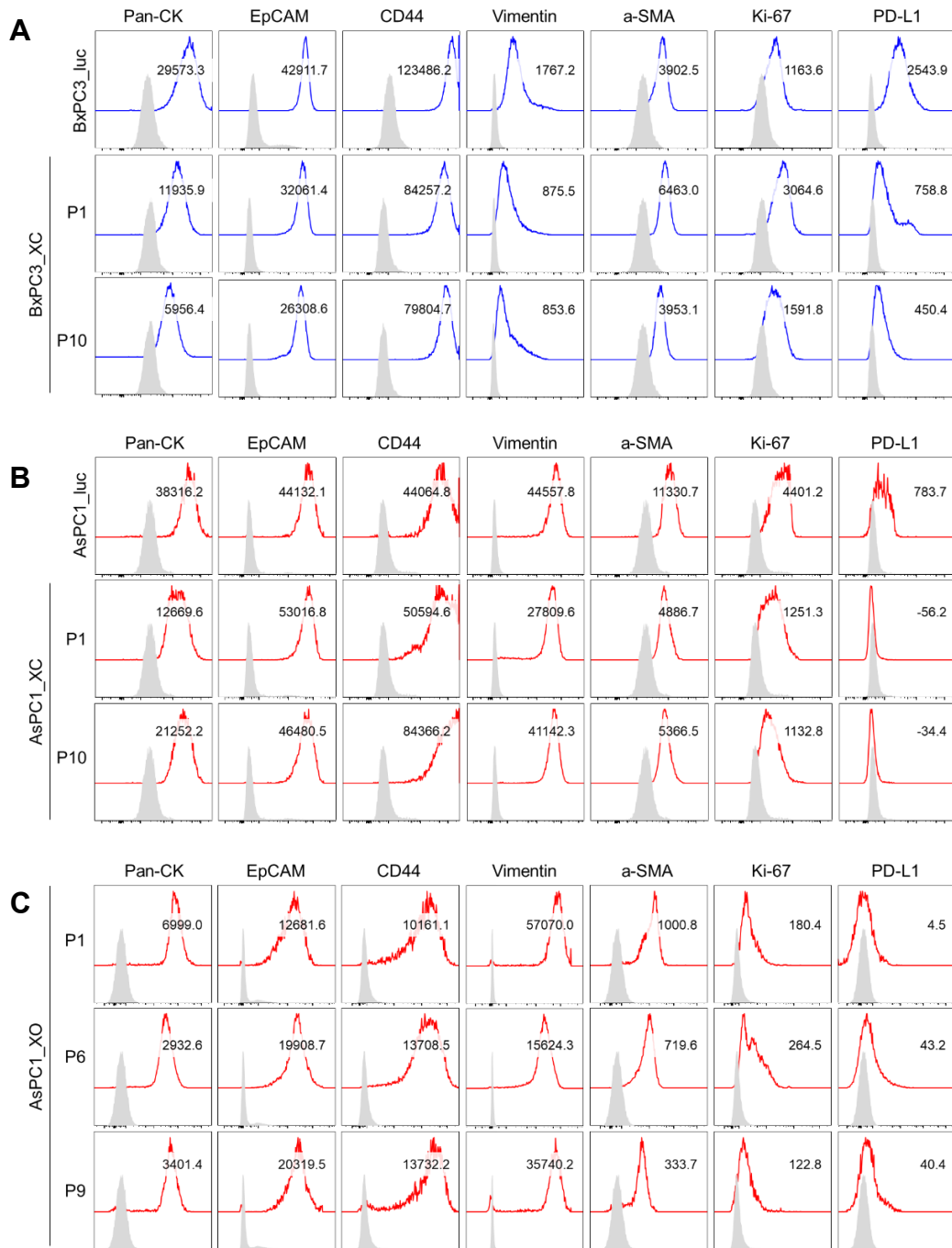


Figure 6. 췌장암 종양 조직 유래 세포주 및 오가노이드에서 종양 관련 마커 변화 확인

(A, B) Parental cell과 인간화 마우스 종양조직 기반 세포주에서 종양세포 관련 마커 발현 확인 (gray line: isotype, blue line: BxPC3_luc 그룹 종양조직 내 target marker, red line: AsPC1_luc 종양조직 내 target marker);

(C) AsPC1_luc 그룹의 종양조직으로 구축한 오가노이드에서 마커의 발현 확인

PART II

1. 췌장암 동소이식 인간화마우스 모델과 인간의 종양미세환경 비교

앞서 구축한 인간화마우스 기반의 췌장암 모델이, 췌장 종양 조직의 종양미세환경을 유사하게 반영할 수 있는지를 확인하기 위하여, 종양 조직을 통한 single cell RNA seq 분석을 진행하였다. 먼저, CD34+ hematopoietic stem cells (HSCs) 인간화 마우스 모델의 췌장에 luciferase가 도입된 췌장암 세포주 BxPC3_luc 세포를 이식하여 췌장암 동소이식 모델을 구축하였다. 그리고, 췌장암 환자의 종양 조직도 확보하여, 각 조직들을 단일세포로 분리 한 후, 세포의 생존률을 위해 dead cell removal(DCR)를 진행하였고, DCR을 진행한 세포들을 대상으로 단일세포 RNA 시퀀싱 분석을 진행하였다.

췌장암 환자와 췌장암 동소이식모델의 종양미세환경을 분석했을 때, 인간화 마우스의 종양조직 내에 다양한 인간 면역세포들이 분포하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 췌장암 환자의 종양조직에는 T세포의 여러 하위집단이 존재하고 있을 뿐 아니라 선천면역에 관여하는 Neutrophil이나 Macrophage 그리고 Dendritic cell과 같은 면역세포들, 그리고 섬유아세포가 존재하는 것을 확인하였고(Fig 1A), 인간화 마우스에서도 췌장암 환자와 유사하게 인간 면역세포 및 종양 관련 세포들이 다양하게 존재하고 있음을 확인할 수 있었다(Fig 1B).

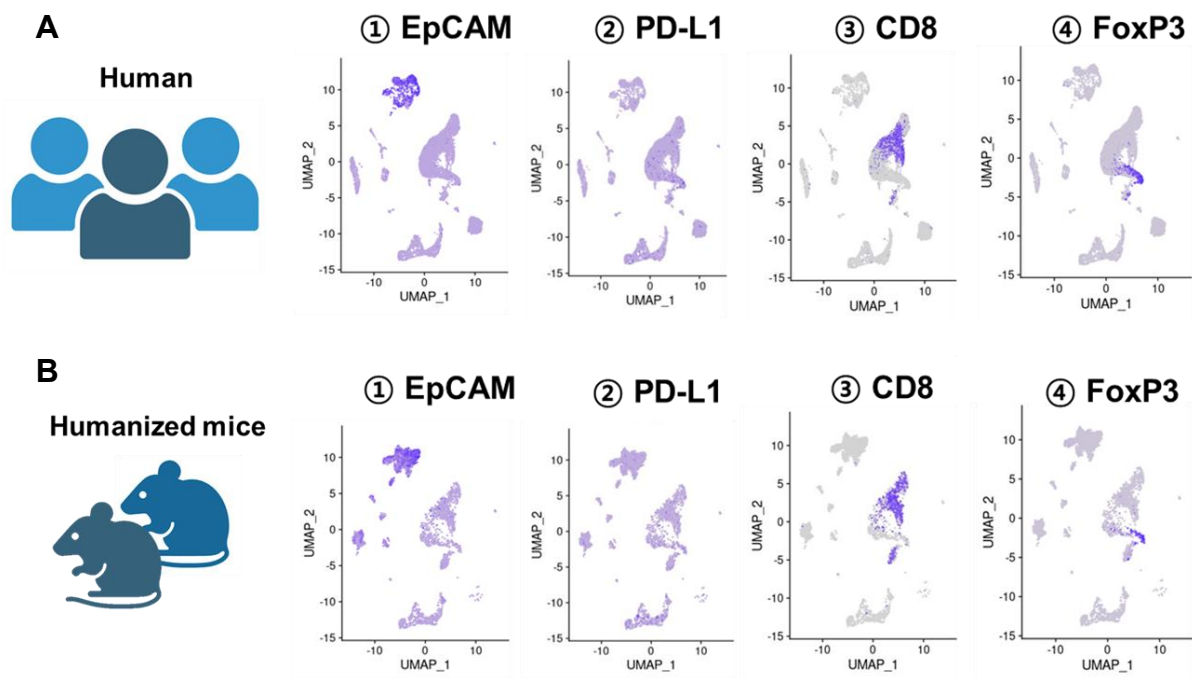


Figure 1. 단일세포 RNA 시퀀싱 분석을 이용한 췌장암 종양 조직과 췌장암 인간화 마우스 기반의 췌장 종양 조직의 유사성

(A) 췌장암 환자의 종양 조직과 (B) 인간화 마우스를 이용한 췌장암 모델의 종양조직 단일세포 RNA 분석을 진행하여 각 cluster별 세포 마커 발현 확인

2. anti-PD-1 항체 처리 후 췌장암 동소이식 인간화마우스 모델의 종양 치료효과 확인

앞서 우리가 제작한 췌장암 동소이식 모델이 인간의 종양 조직과 유사한 종양미세환경을 가진다는 것을 확인할 수 있었기에, anti-PD-1 항체의 종양치료 효과를 확인하는 실험을 추가적으로 진행하였다. 특히 BxPC3 세포주는 다른 췌장암 세포주들보다 Programmed Death Ligand 1(PD-L1)의 발현이 높은 것으로 알려져 있기에 [14], anti-Programmed cell Death protein 1(PD-1)의 효과를 검증하는데 적합한 모델로 판단하였다.

BxPC3_luc 종양세포를 이식한 후 5일차에 IVIS를 촬영하여 종양의 형성 유무와 위치를 확인하였고, 실험군에 anti-PD-1 항체를 주 5회 복강으로 주입하였다. anti-PD-1 항체 14차 주입 이후 종양조직을 확보하여 무게를 측정하였는데, anti-PD-1 항체 투여군에서 IVIS total flux 값과 종양 조직 무게가 조금 낮긴 했지만 통계적으로 유의미하진 않았다(Fig 2B, C).

3. anti-PD-1 항체 처리 후 췌장암 동소이식 인간화마우스 모델의 면역세포 하위집단의 분포 변화 확인

anti-PD-1 항체 투여 유무에 따라 인간 면역세포 분포의 변화를 확인하기 위해 주 1회 안와 채혈을 진행하여 인간화 마우스의 PBMCs에서 유세포분석을 진행하였다(Fig 3A). 분석결과 anti-PD-1 항체 투여군과 control 그룹에서 전체 Hu_CD45(+) 세포는 감소, Ms_CD45(+) 세포는 증가하는 경향을 보였다. 두 그룹 모두Hu_CD45(+) 세포 중에서도 CD19(+) B 세포는 감소하는 경향을 보였고(Fig 3E), CD3(+) T 세포와 CD56(+) NK 세포, 그리고 CD11b(+) Myeloid 세포는 증가하는 경향을 보였다(Fig 3D, F, G). 특히 anti-PD-1 항체 투여군에서는 투여 차수가 진행됨에 따라서 CD11b(+) Myeloid 세포의 비율이 control 그룹과 비교하여 유의미하게 증가한 것을

확인할 수 있었다(Fig 3G).

anti-PD-1 항체 14차 투여 이후 마우스 희생을 진행하여 투여 마지막 시점의 혈액과 종양조직을 확보하였고, 췌장암 동소이식 모델에 존재하는 인간 면역세포의 하위집단 비율을 추가적으로 확인하였다. anti-PD-1 항체 투여군의 혈액과 종양조직에서 CD11b(+) 세포가 control 그룹에 비해 유의미하게 많이 분포하고 있는 것을 확인하였고, CD3(+) T 세포는 항체 투여군에서 적게 분포되어 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig 4A, B).

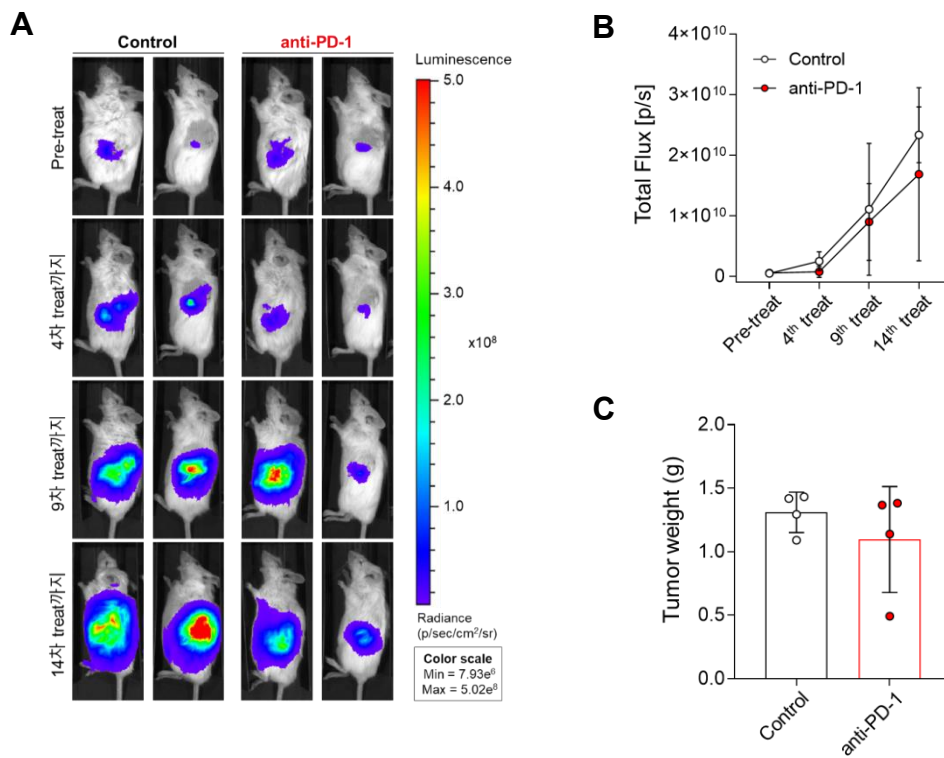


Figure 2. 인간화 마우스를 이용한 췌장암 모델에서 anti-PD-1 항체 처리 후 항 종양 치료 효과 확인

(A) anti-PD-1 항체 처리 차수별 IVIS 이미지 결과; (B) IVIS ROI 정량값 비교; (C) 그룹별 종양 무게 비교

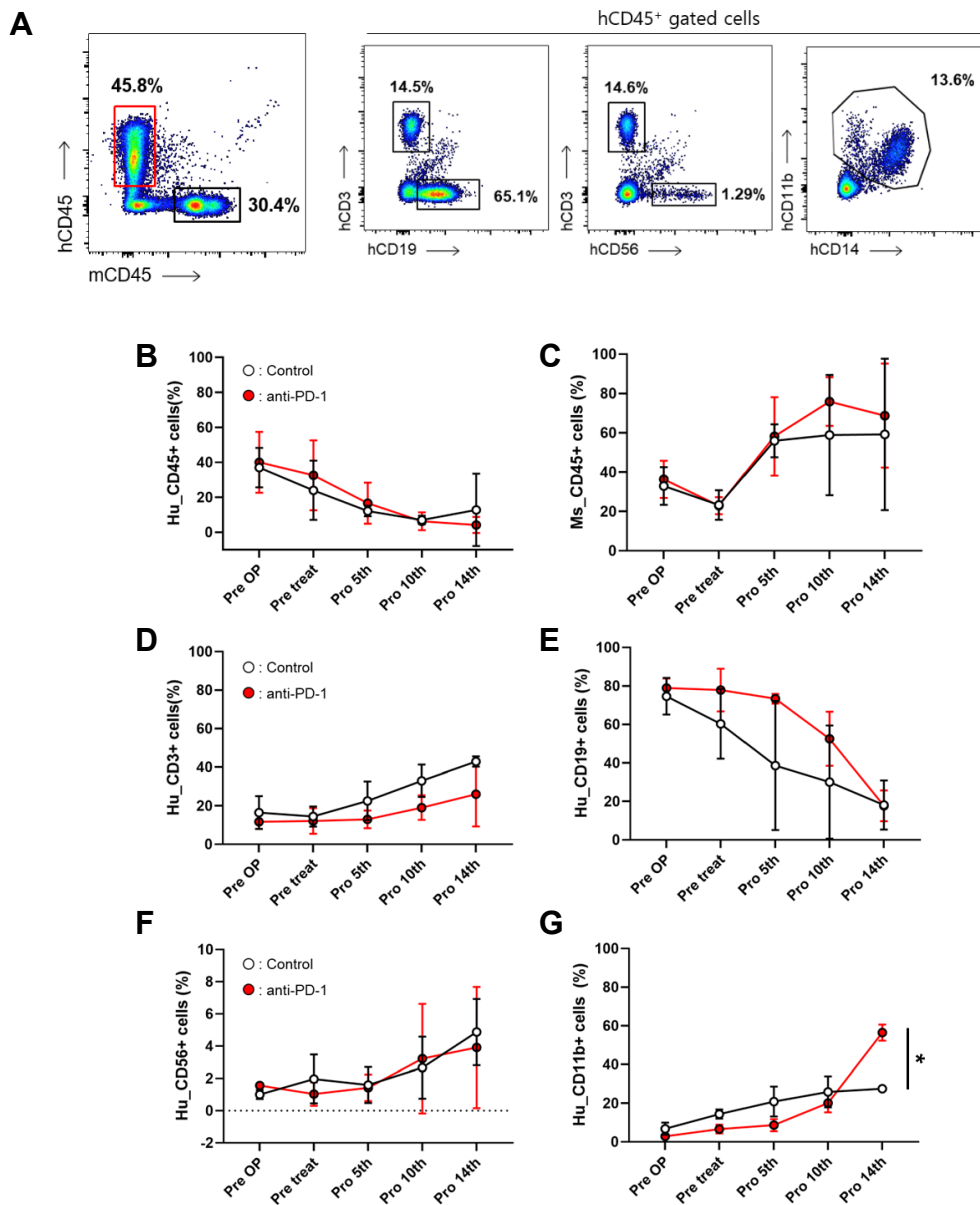


Figure 3. anti-PD-1 투여 차수에 따른 혈액 내 인간 면역세포 분포의 연속적 변화 확인

(A) 면역세포 분석 gating strategy; (B-G) 췌장암 동소이식 모델의 혈액에서 anti-PD-1 항체 처리 차수에 따른 면역세포 분포의 변화 그래프; (B) hCD45(+), (C) Ms_CD45(+) 세포의 분포를 확인; Hu_CD45(+) 세포에서 인간 면역세포 하위 집단 분포 확인; (D) CD3(+) T 세포; (E) CD19(+) B 세포; (F) CD56(+) NK 세포; (G) CD11b(+) Myeloid 세포; (* : p -value < 0.05)

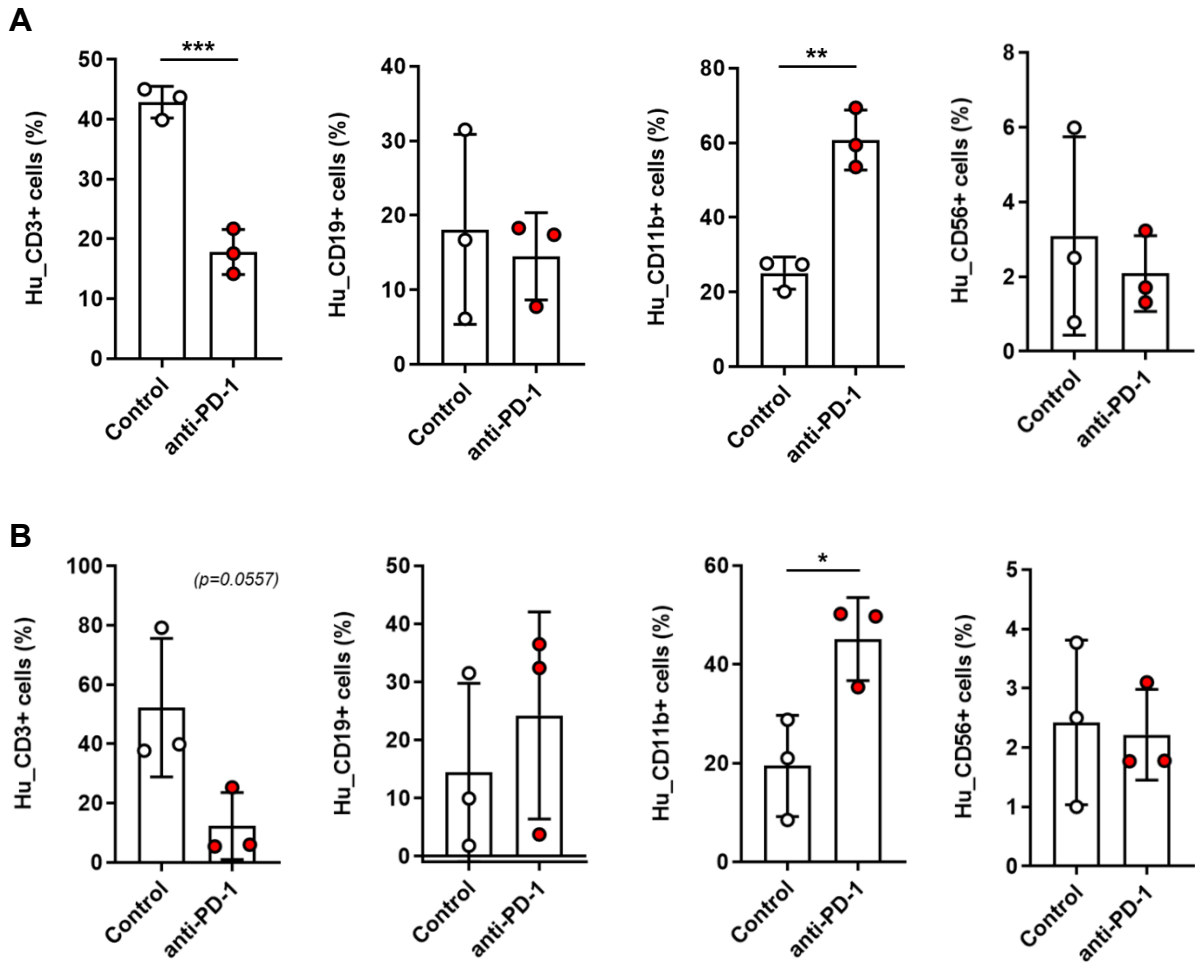


Figure 4. 체장암 인간화 마우스 모델의 혈액과 종양조직에서 anti-PD-1 항체 투여 후 면역세포 아형별 분포의 변화 확인

(A) 인간화 마우스의 혈액과 (B) 종양조직에서 hCD45(+) 세포의 하위 집단의 분포 확인; CD3(+) T 세포, CD19(+) B 세포, CD56(+) NK 세포, CD11b(+) Myeloid 세포; (***) : p -value < 0.001, (**) : p -value < 0.005, (*) : p -value < 0.05)

4. anti-PD-1 antibody를 처리한 췌장암 동소이식 인간화마우스 모델에서 T cell subsets 변화 및 활성화 확인

anti-PD-1 항체 투여 후 T 세포의 하위 집단 (세포독성 T 세포, 도움 T 세포)에서 PD-1의 발현을 확인하기 위해서 관련 T 세포 마커(CD3, CD8, FoxP3)들을 사용하여 유세포분석을 진행하였다.

췌장암 동소이식 모델의 혈액과 종양조직 내 침윤된 T 세포는 세포독성 T 세포(hCD3(+)CD8(+))와 도움 T 세포(hCD3(+)CD8(-))로 구분하여 PD-1의 발현 정도를 확인하였다(Fig 5A, B). 결과적으로 anti-PD-1 항체 투여군의 혈액과 종양조직 내 침윤된 hCD3(+)CD8(+) T 세포에서 PD-1 발현이 유의미하게 감소 되어있는 것을 확인 할 수 있었다(Fig 5A).

anti-PD-1 항체를 투여함에 따른 T 세포 하위집단의 분포의 변화와 활성화 정도를 확인하기 위해서, 주 1회 안와 채혈을 통해 확보한 PBMCs를 사용하여 유세포분석을 진행하였다. T 세포 하위집단의 분포는 세포독성 T 세포와 도움 T 세포 그리고 조절 T 세포(hCD3(+)FoxP3(+))에서 확인하였고, T 세포의 활성화를 확인하기 위한 마커로 CD44의 발현을 확인하였다.

그 결과 anti-PD-1 항체 투여군에서 hCD3(+)FoxP3(+) 세포의 분포가 약물투여 후 control 그룹에 비해 증가 폭이 감소하는 경향을 확인할 수 있었고, 활성화 마커의 발현 또한 낮은 것을 확인 할 수 있었다(Fig 6C).

앞선 결과에서 control 그룹의 혈액과 종양조직 내에 존재하는 hCD3(+) T 세포의 분포가 anti-PD-1 항체 투여군에 비해 높았었는데(Fig 4A, B), 이는 면역관용 및 억제 작용을 하는 T 세포 중에서도 hCD3(+)FoxP3(+) 조절 T세포의 분포가 증가한 것으로 추정된다.

그 외 anti-PD-1 항체 투여군에서 세포독성 T 세포나 도움 T 세포가 control 그룹과 비교했을 때, 분포가 증가하거나 활성화 마커의 발현이 증가하는 등의 T 세포 면역

활성의 결과는 확인할 수 없었다(Fig 6A, B).

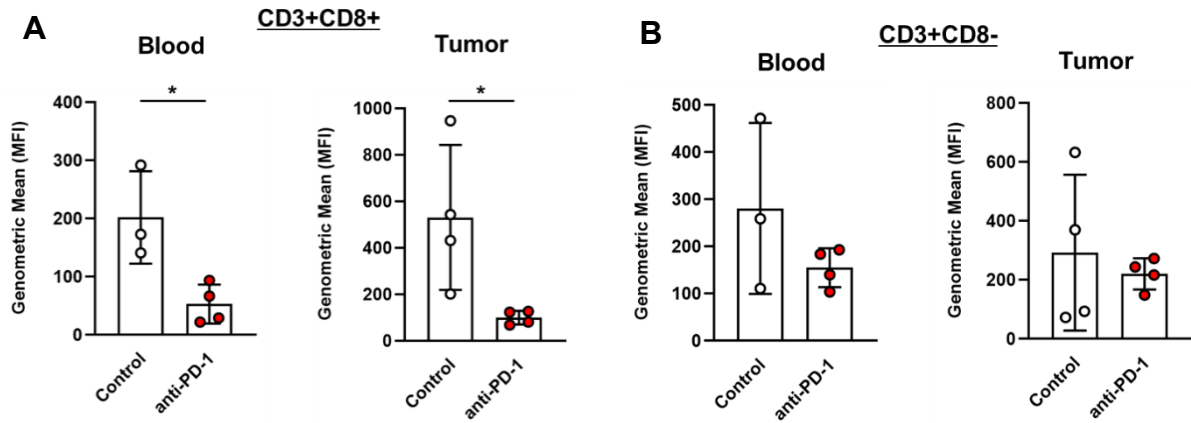


Figure 5. CD3(+) T 세포 아형에서, anti-PD-1 투여에 따른 PD-1 발현 변화 확인

인간화 마우스의 혈액과 종양조직 내에 존재하는 (A) hCD3(+)CD8(+) T 세포의 PD-1 발현 확인; (B) hCD3(+)CD8(-) T 세포에서 PD-1 발현 확인;

(* : p -value < 0.05)

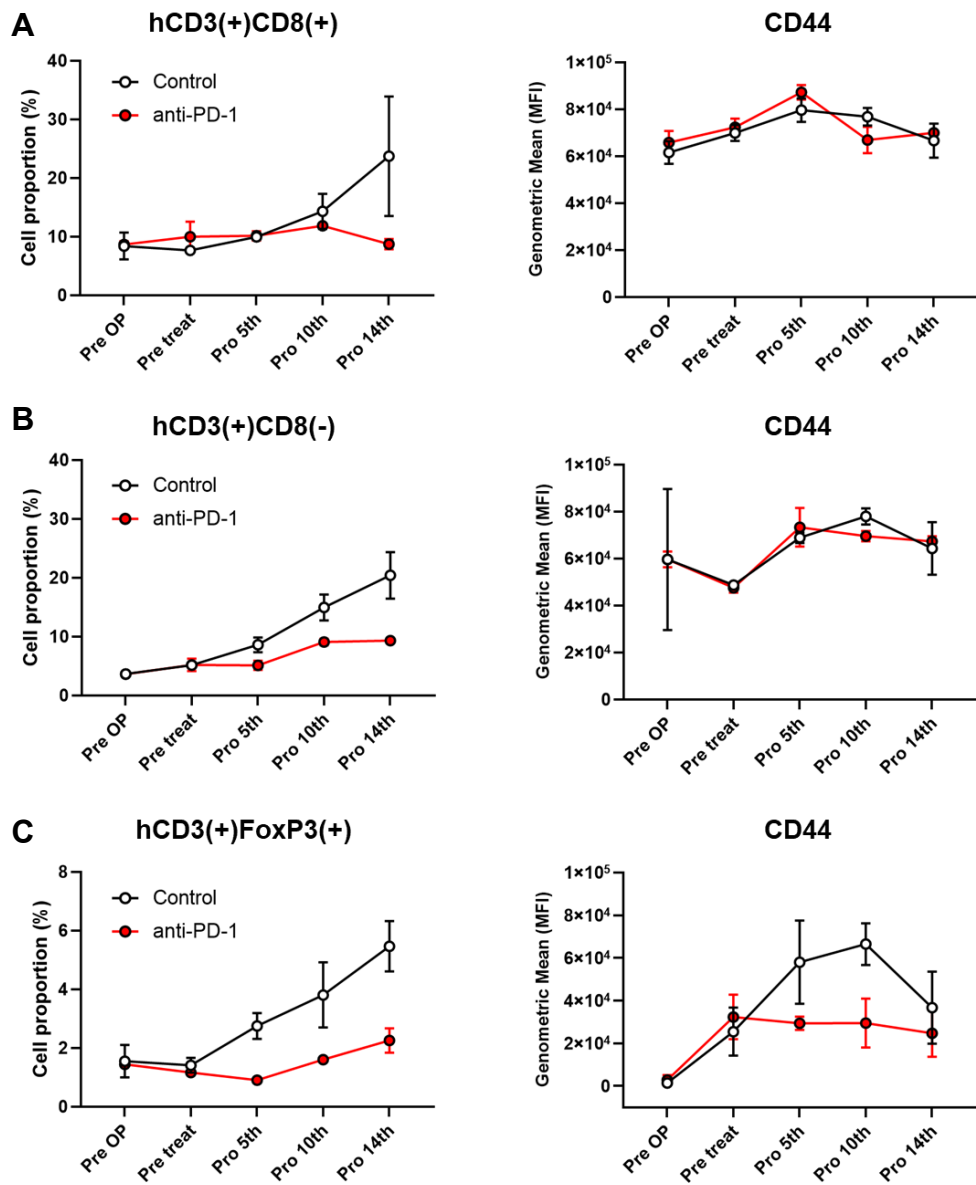


Figure 6. anti-PD-1 항체 투여 후 T세포 하위 집단의 활성화 확인

anti-PD-1 항체 처리 군과 control 그룹의 혈액에서 다양한 T 세포 하위 군에서 (A) hCD3(+)CD8(+) 세포 독성 T 세포 (B) hCD3(+)CD8(-) 도움 T 세포, (C) hCD3(+)FoxP3(+) 조절 T 세포의 분포 및 활성화 마커(CD44)의 발현 확인

Discussion

췌장암(Pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)은 KRAS, CDKN2A, p53, DPC4 등의 유전자 변이를 기반으로 [2], 다양한 종양학적 특징들이 나타나게 되고, 이는 다양한 항암치료제 개발을 위한 중요한 요소가 된다. 특히나 최근에는, 췌장암과 같은 난치성 고형암을 대상으로, anti PD-1, CTLA-4 항체와 같은 면역항암제에 대한 개발을 진행하고 있기에 [15], 인간의 면역시스템을 반영할 수 있는 비임상 모델을 구축하는 것이 매우 중요하다. 이 연구를 통해, 췌장암 고유의 종양학적 특징을 가질 뿐 아니라, 인간의 면역시스템이 활성화되어 있는 췌장암 특이적인 비임상 모델을 구축하여, 면역항암제 후보들에 대한 유효성 평가를 진행할 수 있을지, 그 유용성을 검증하는 것을 목표로 하였다.

PART I 에서 CD34+ hematopoietic stem cells (HSCs)를 이식하여 만들어진 인간화 마우스를 이용하여 췌장암 동소이식 모델 구축을 시도하였고, 구축된 췌장암 동소이식 종양이 췌장 종양의 고유한 특징들을 나타내는지, 그리고 혈액 뿐 아니라, 종양 조직안 에까지 인간 면역세포들이 존재하는지에 대한 평가를 진행하였다. 일반적으로, 췌장 종양은 암세포가 관구조를 이루며, 림프혈관 및 췌장 주위 연조직 또는 큰 혈관이나 인접한 조직으로의 침범을 하는 등의 병리학적 특징을 가지고 있다 [16, 17]. 더 나아가, 다량의 섬유아세포등의 활성을 통해 콜라겐과, 라미닌, 그리고 파이브로넥틴등의 단백질이 침착되는 섬유조직형성 반응 (desmoplastic reaction)이 광범위하게 나타나는데, 이러한 현상에 의해 면역세포의 비활성화와 침입이 저해되고, 다양한 항암 약물에 대한 반응성을 저해하는 결과를 초래한다 [18]. 우리가 구축한 췌장암 동소이식 모델의 종양조직에서, H&E 염색을 통해 변형된 관의 구조나 혈관과 인접한 조직으로 암세포가 침투해 있

고, MT염색을 통해서 종양조직 내에서 섬유조직형성 반응이 많이 발생함을 관찰하여, 췌장암 고유의 특징을 반영하는 모델임을 확인할 수 있었다.

또한, 유세포분석을 통해서 혈액과 종양 조직에 CD3+, CD19+, CD56+, CD19 등, 인간 면역세포들의 아형이 다양하게 분포하고 있음을 확인하였다. 그리고 이러한 면역세포들의 분포는 세포외기질의 침착에 따라 저해되는, 음의 상관관계가 나타남을 확인하였다. 앞서 진행한 혈액과 조직에서의 다양한 분석들을 통해, 췌장암 고유의 병리학적 특징이 있으며, 인간의 면역시스템도 반영된 고유의 모델을 성공적으로 구축하였다.

이렇게 구축된 종양 조직을 *in vitro* 실험에서도 활용하기 위하여, 종양 조직을 이용하여 세포주와 오가노이드를 구축하였고, 그 특성을 분석하였다. 2D 세포주와 오가노이드를 구축하여, 각 모델의 종양학적 특성을 분석하였고, 여러 번의 계대를 거치며, 세포실험을 진행할 수 있는 모델을 확보할 수 있었다. 추가로, 각 모델에서 다양한 표현형 마커에 대한 분석을 진행한 결과, PD-L1의 발현이 유의미하게 감소되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 인간화마우스 모델에서 구축한 세포주와 오가노이드가 면역 원성 (immunogenic)이 더욱 증가되는 특성을 가진다는 것을 알 수 있고, 이는 인간화 마우스의 체내에서 종양이 형성되는 과정 또는 *ex vivo*에서 세포주를 구축하는 과정 중에 변화가 발생했음을 추측할 수 있다. 이렇게 구축한 세포주와 오가노이드에서 PD-L1의 발현이 낮아졌기 때문에 anti-PD-1를 투여했을 때, 항종양효과가 나타나는지 혹은 PD-1/PD-L1 면역억제 신호전달에 관여하는 다른 리간드나 수용체가 존재하는지 확인할 수 있는 특징적인 모델로 사용 가능할 것으로 여겨진다.

인간화 마우스 기반으로 구축한 췌장암 동소이식모델과, 형성된 종양 조직 기반의 세포주 및 오가노이드 모델은, 추후 면역항암제의 효능을 평가하는데 사용될 수 있는 전임상 후보 모델로서 사용이 가능할 것으로 기대된다.

PART II 에서는, 앞서 구축한 췌장암 모델이, 실제로 면역항암치료제에 대한 유효성

평가를 진행할 수 있을지에 대한 검증을 진행하였다. 우선, 환자 조직과 종양 조직을 대상으로 단일세포전사체 분석을 진행하여, 각 그룹의 대표적인 세포 구성과 각 마커에서 매우 높은 유사성을 확인하였다. 이를 통해, 모델이 췌장암 고유의 특징을 가질 뿐 아니라, 인간 종양의 세포 구성과도 매우 흡사함을 확인하여, 실제로 인간을 대상으로 하는 면역항암치료제의 평가를 대신할 수 있는 모델로서의 가능성을 확인하였다.

이러한 결과를 바탕으로, 종양환자에게 많이 사용되는 anti PD-1 면역항암제의 항종양효과를 확인하고자 하였다. 그 결과, 종양의 크기가 줄어드는 효과를 확인할 수는 없었지만, 동소이식모델의 혈액과 종양조직 내에 존재하는 인간 면역세포의 변화를 관찰할 수 있었다. 특히 anti-PD-1 항체 투여군의 혈액과 종양조직에서 CD11b(+) myeloid 세포가 유의미하게 많이 분포하고 있는 것을 확인할 수 있었고, 반대로 CD3(+) T 세포는 control 그룹에 비해 분포가 낮은 것을 확인할 수 있었다. 특히 증가된 CD11b 마커는 T 세포에 암 항원을 제시하는 항원제시세포(Antigen presenting cell, APC)에 많이 존재하기 때문에 [19-21], 이러한 사실은 면역 반응이 더욱 촉진될 수 있음을 나타낸다. 다만, CD11b 마커는 여러 면역 세포에 공통적으로 존재하기 때문에 [22-25] 실제적으로 어떤 면역세포가 증가했는지는 대해서는 추가 분석을 통해 규명한다면, anti PD-1 항체와 더불어 병합요법을 진행할 치료 전략 수립에 도움이 될 것이다.

anti-PD-1 항체의 투여를 통해, 면역반응을 억제하는데 중요한 역할을 하는 PD-1 수용체의 신호전달을 억제하면, T 세포의 분포가 증가하고 활성화가 많이 일어날 것이라 예상했는데 [26-29] 오히려 T 세포의 분포가 감소했기 때문에 T 세포 중에서도 하위 집단의 분포를 확인하였다. 결과적으로 anti-PD-1 항체 투여군에서 hCD3(+)FoxP3(+) 조절 T세포가 항체 투여 차수에 따라 control 그룹에 비해 분포나 활성화의 증가폭이 감소하는 경향을 보였다. 조절 T 세포는 면역관용 및 억제 작용의 기능을 가지고 있기 때문에, anti-PD-1 항체 투여군에서 조절 T 세포의 비율이 감소했다는 점은 control 그룹에 비해 면역반응이 더 일어났다는 것을 의미한다.

항체 투여에 따른 결과들을 종합하면, 우리가 구축한 췌장암 동소이식 마우스 모델에서 anti-PD-1 항체의 투여를 통해, 종양 크기가 감소하는 등의 치료효과를 확인할 수 없었지만, 항원제시세포나 조절 T 세포의 증가를 통해, 종양 조직내 면역시스템이 활성화되었음을 통해, 이러한 변화들이 종양효과에 미치는 영향들에 대한 연구를 추가로 진행할 예정이다.

모든 결과들을 종합해 봤을 때 CD34+ hematopoietic stem cells (HSCs)를 이식하여 만들어진 인간화 마우스를 이용하여 구축한 췌장암 동소이식 모델은 췌장암 고유의 특징을 가지고 있으며, 인간의 종양 조직과 세포 구성이 유사한 특징을 가지고 있으며, 또한 면역항암제 투여를 통해, 면역시스템의 활성화등 다양한 변화를 확인할 수 있으므로, 유효성 평가 뿐 아니라 면역세포의 아형 및 새로운 마커 등을 발견할 수 있는 유용한 모델이 될 수 있을 것으로 판단한다. 다만, 이 모델이 가지는 한계도 확인할 수 있었다. 췌장암 세포주를 이식한 후 인간 면역세포(hCD45(+))의 비율을 확인했을 때 hCD45(+) 세포가 점차 감소하는 경향이 보이는 것인데, 이는 인간화 마우스 제작을 위해 주입한 CD34+ hematopoietic stem cell이 계속 분화하면서 결국은 stemness가 소실되는 것이 추측할 수 있는 원인중의 하나로 추정된다 [30].

난치성 고형암의 대표적인 종양에 해당하는 췌장암의 경우, 새로운 면역항암제의 개발이 시급하며, 이를 위해 췌장암 고유의 종양학적 특징과 인간 면역시스템이 활성화되어 있는 모델이 반드시 필요하다. 본 연구를 통해, 인간화 마우스 기반의 췌장암 동소이식 모델을 구축하고, 면역항암치료제의 효능을 평가할 수 있는 유용한 모델임을 검증하였다. 본 연구를 통해 확보한 다양한 데이터와 추가 연구를 기반으로, 췌장암 환자에게 적용할 다양한 면역항암제의 후보물질들을 평가할 수 있는 대안 모델이 정립될 수 있기를 기대하고, 췌장암 환자의 생존율을 증진시킬 수 있는 획기적인 치료제 개발로 이어질 수 있기를 희망한다.

Reference

- [1] Park, Wungki et al. “Pancreatic Cancer: A Review.” JAMA vol. 326,9 (2021): 851–862.
- [2] Hu, Hf., Ye, Z., Qin, Y. et al. Mutations in key driver genes of pancreatic cancer: molecularly targeted therapies and other clinical implications. Acta Pharmacol Sin 42, 1725–1741 (2021).
- [3] “국가암등록사업 연례보고서(2021년 암등록통계)”, 국립 암센터, 2024년 4월 8 일, <https://www.ncc.re.kr/cancerStatsView.ncc?bbsnum=678searchKey=total&searchValue=&pageNum=1>.
- [4] Kumar, L.; Kumar, S. Sandeep, K. Patel, S.K.S. Therapeutic Approaches in Pancreatic Cancer: Recent Updates. Biomedicines 2023, 11.
- [5] Liu, Z., Parveen, N., Rehman, U. et al. Unravelling the enigma of siRNA and aptamer mediated therapies against pancreatic cancer. Mol Cancer 22, 8 (2023).
- [6] Yoon JH, Jung YJ, Moon SH. Immunotherapy for pancreatic cancer. World J Clin Cases 2021; 9(13): 2969–2982.
- [7] Qiu, W., Su, G.H. Challenges and advances in mouse modeling for human pancreatic tumorigenesis and metastasis. Cancer Metastasis Rev 32, 83–107 (2013).
- [8] Laface, C.; Memeo, R.; Maselli, F.M.; Santoro, A.N.; Iaia, M.L.; Ambrogio, F.; Laterza, M.; Cazzato, G.; Guarini, C.; De Santis, P.; et al.

Immunotherapy and Pancreatic Cancer: A Lost Challenge? *Life* 2023, 13, 1482.

[9] Cogels MM, Rouas R, Ghanem GE, Martinive P, Awada A, Van Gestel D and Krayem M (2021) Humanized Mice as a Valuable Pre-Clinical Model for Cancer Immunotherapy Research. *Front. Oncol.* 11:784947.

[10] Yin, Ling et al. “Humanized mouse model: a review on preclinical applications for cancer immunotherapy.” *American journal of cancer research* vol. 10,12 4568–4584. 1 Dec. 2020.

[11] Chuprin, J., Buettner, H., Seedhom, M.O. et al. Humanized mouse models for immuno-oncology research. *Nat Rev Clin Oncol* 20, 192–206 (2023).

[12] Allen TM, Brehm MA, Bridges S, Ferguson S, Kumar P, Mirochnitchenko O, Palucka K, Pelanda R, Sanders-Beer B, Shultz LD, Su L, PrabhuDas M. Humanized immune system mouse models: progress, challenges and opportunities. *Nat Immunol.* 2019 Jul;20(7):770–774.

[13] Park N, Pandey K, Chang SK, et al. Preclinical platform for long-term evaluation of immuno-oncology drugs using hCD34+ humanized mouse model. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2020;8:e001513.

[14] Zhang, Z., Yang, A., Chaurasiya, S. et al. CF33-hNIS-antiPDL1 virus primes pancreatic ductal adenocarcinoma for enhanced anti-PD-L1 therapy. *Cancer Gene Ther* 29, 722–733 (2022).

[15] Liu, Q., Li, J., Zheng, H. et al. Adoptive cellular immunotherapy for solid neoplasms beyond CAR-T. *Mol Cancer* 22, 28 (2023).

[16] Taherian, M.; Wang, H.; Wang, H. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Molecular Pathology and Predictive Biomarkers. *Cells* 2022, 11, 3068.

[17] Haeberle L, Esposito I. Pathology of pancreatic cancer. *Transl Gastroenterol*

Hepatology 2019;4:50.

[18] Truong, L.-H.; Pauklin, S. Pancreatic Cancer Microenvironment and Cellular Composition: Current Understandings and Therapeutic Approaches. *Cancers* 2021, 13, 5028.

[19] Miranda L. Broz, Mikhail Binnewies, Bijan Boldajipour, Amanda E. Nelson, Joshua L. Pollack, David J. Erle, Andrea Barczak, Michael D. Rosenblum, Adil Daud, Diane L. Barber, Sebastian Amigorena, Laura J. van' t Veer, Anne I. Sperling, Denise M. Wolf, Matthew F. Krummel, Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity, *Cancer Cell*, Volume 26, Issue 5, 2014, Pages 638-652, ISSN 1535-6108.

[20] Ellen Duong, Tim B. Fessenden, Emi Lutz, Teresa Dinter, Leon Yim, Sarah Blatt, Arjun Bhutkar, Karl Dane Wittrup, Stefani Spranger, Type I interferon activates MHC class I-dressed CD11b+ conventional dendritic cells to promote protective anti-tumor CD8+ T cell immunity, *Immunity*, Volume 55, Issue 2, 2022, Pages 308-323.e9, ISSN 1074-7613.

[21] Yoshihiro Okita, Hiroaki Tanaka, Masaichi Ohira, Kazuya Muguruma, Naoshi Kubo, Mao Watanabe, Wakaba Fukushima, Kosei Hirakawa, Role of tumor-infiltrating CD11b+ antigen-presenting cells in the progression of gastric cancer, *Journal of Surgical Research*, Volume 186, Issue 1, 2014, Pages 192-200, ISSN 0022-4804.

[22] Elliott LA, Doherty GA, Sheahan K and Ryan EJ (2017) Human Tumor-Infiltrating Myeloid Cells: Phenotypic and Functional Diversity. *Front. Immunol.* 8:86.

[23] Mingjie Lin, Di Chen, Zheyu Shao, Qinyuan Liu, Zhixing Hao, Zhongwei Xin,

- Yongyuan Chen, Wenxuan Wu, Xiaoke Chen, Teng He, Dang Wu, Pin Wu, Inflammatory dendritic cells restrain CD11b+CD4+ CTLs via CD200R in human NSCLC, *Cell Reports*, Volume 43, Issue 2, 2024, 113767, ISSN 211–1247.
- [24] Bachran, C., Schröder, M., Conrad, L. et al. The activity of myeloid cell-specific VHH immunotoxins is target-, epitope-, subset- and organ dependent. *Sci Rep* 7, 17916 (2017).
- [25] Duan, M., Steinfort, D., Smallwood, D. et al. CD11b immunophenotyping identifies inflammatory profiles in the mouse and human lungs. *Mucosal Immunol* 9, 550–563 (2016).
- [26] Tang Q, Chen Y, Li X, Long S, Shi Y, Yu Y, Wu W, Han L and Wang S (2022) The role of PD-1/PD-L1 and application of immune-checkpoint inhibitors in human cancers. *Front. Immunol.* 13:964442.
- [27] Qin, S., Xu, L., Yi, M. et al. Novel immune checkpoint targets: moving beyond PD-1 and CTLA-4. *Mol Cancer* 18, 155 (2019).
- [28] Simon, S., & Labarriere, N. (2017). PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy? *OncoImmunology*, 7(1).
- [29] Rui Liu, Hui-Fang Li, Shu Li, PD-1-mediated inhibition of T cell activation: Mechanisms and strategies for cancer combination immunotherapy, *Cell Insight*, Volume 3, Issue 2, 2024, 100146, ISSN 2772–8927.
- [30] Huang, Dan; Chen, Chiqi; Xie, Li; Yu, Zhuo; Zheng, Junke. Hematopoietic stem cell metabolism and stemness. *Blood Science* 1(1):p 12–18, August 2019.

영문 요약

PART I

Pancreatic cancer almost has genetic mutations, so various oncological characteristics appear, which is important in developing immunotherapy drugs. To evaluate the efficacy of candidate immunotherapy drugs, they must be able to reflect not only the human immune response but also the diverse tumor microenvironment of patients. I constructed an orthotopic model of pancreatic cancer using humanized mice and confirmed they can reflect the various oncological characteristics of patients.

I transplanted luciferase-transfected BxPC3_luc, a KRAS wild-type cell line, and luciferase-transfected AsPC1_luc, a KRAS G12D type cell line, into the pancreas of a humanized mouse-based on CD34+ hematopoietic stem cells (HSCs). The formation and location of the tumor were confirmed using the In Vivo Imaging System (IVIS) and Positron emission tomography magnetic resonance (PET_MR).

When the distribution of human immune cells infiltrated the blood and tumor was confirmed using Flow cytometry, not only hCD45(+) cells in the blood of the AsPC1_luc group, but the proportion of infiltrating the tumor tissue was also higher. Among the human immune cells infiltrated tumor tissue in the AsPC1_luc group, hCD45(+)CD3(+) T cells and hCD45(+)CD11b(+) Myeloid cells significantly increased compared with the BxPC3_luc group.

As a result, I observed that the AsPC1 luc group has a low overall ECM area, especially the ECM_dense part was also significantly lower than the BxPC3_luc group.

These results show the impact of ECM intensity when immune cells infiltrate to tumor tissue.

I constructed the cell lines and organoids from the tumor tissue of humanized mice and analyzed the characteristics of established cell lines and organoids through flow cytometry. Tumor-specific markers expressed similarly to parental cell lines in the established cell line and organoid, and the characteristics were maintained as the passage progressed.

However, in cell lines and organoids constructed from tumor tissues of humanized mice, the expression value of Programmed death-ligand 1 (PD-L1) was confirmed to be reduced compared to parental cell lines.

PART II

Previously, I confirmed that orthotopic humanized mice can reflect the characteristics of the tumor microenvironment (TME) of pancreatic cancer patients, and conducted additional experiments to verify that this model can be used as a preclinical model to evaluate the effects of candidate immunotherapy drugs.

I analyzed single-cell RNA sequencing to confirm the TME similarities between pancreatic cancer patients and orthotopic models in humanized mice. When analyzing the mRNA expression level in the infiltrating cells, the cluster of cells expressed the same cell markers. It was confirmed that the single-cell distribution characteristics of human TME and humanized mouse TME were similar.

To evaluate the efficacy of immunotherapy in humanized mice that can reflect the human TME, anti-PD-1 antibody was injected intraperitoneally five times a week. We measured the tumor growth once a week through IVIS imaging, and it was confirmed that the tumor growth and tumor weight in the anti-PD-1 antibody treatment group were slightly lower than in the control group, but there was no significant difference.

Using Flow cytometry, I analyzed the proportion of human immune cells in humanized mice blood and tumor tissue. In the anti-PD-1 treatment group, hCD45(+)CD11b(+) cells are significantly higher and hCD45(+)CD3(+) cells are significantly lower than control group.

I also observed the PD-1 expression of hCD3(+)CD8(+) T cells decreased in the blood and tumor tissue of the anti-PD-1 group. In the anti-PD-1 group, the proportion and activation marker expression of hCD3(+)FoxP3(+) T cells activation decreased.

These results show that the pancreatic cancer orthotopic model using humanized mice is an appropriate model for evaluating the effectiveness of immunotherapy drug candidates and conducting immune response analysis.