



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

외과적 절제된 대장암 조직에서
미세혈관침범의 3 차원 조직병리학적 재구성
Three-dimensional histopathologic reconstruction of
microscopic venous invasion in surgically resected
colorectal cancer tissues

울 산 대 학 교 대 학 원
의 과 학 과
정 동 준

외과적 절제된 대장암 조직에서
미세혈관침범의 3차원 조직병리학적 재구성

지도교수 홍승모

이 논문을 이학석사학위 논문으로 제출함

2021 년 8 월

울산대학교대학원

의과학과

정동준

정동준의 이학석사학위 논문을 인준함

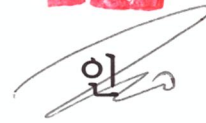
심사위원

박 인 자



심사위원

장 성 욱



심사위원

홍 승 모



울 산 대 학 교 대 학 원

2021 년 8 월

국문요약(Abstract)

연구 배경 및 목적: 대장암은 한국에서 2 번째로 흔한 호발암이며, 간 등의 장기로 원격전이가 발생할 경우 급격히 낮은 생존율을 보인다. 대장암의 혈관침범은 원격전이와 연관이 있으며 상피간엽이행이 기전으로 제시되고 있지만, 정확한 기전은 잘 알려져 있지 않다. 이번 연구는 조직투명화와 다중면역형광염색을 이용하여 대장암의 혈관침범과정을 3 차원 조직병리학적으로 분석하고자 한다.

연구재료와 연구 방법: 서울아산병원에서 2019 년부터 2020 년까지 외과적 대장암 절제술을 받은 T2 카테고리 이상의 대장암 환자 조직 91 건 (49 건의 신선동결조직과 병리검사에서 혈관침범을 확인한 42 건의 포르말린고정 파라핀 포매 조직)을 대상으로 조직투명화와 cytokeratin19, desmin, CD31, e-cadherin 을 이용한 다중면역형광염색을 시행한 조직을 이용하여 공초점 레이저 스캔 현미경으로 얻은 이미지를 3 차원 조직병리학적으로 재구성하여 대장암의 혈관침범 양상을 파악하였다.

연구결과: 대장암의 암세포는 종양의 분화도에 따라 다양한 정도의 관선을 형성하였다. 3 차원 분석에서, 총 91 건의 대장암 조직 중 41 건 (45%)에서 혈관침범을 확인하였다. 평균 $334.0 \pm 212.4 \mu\text{m}$ 의 길이의 혈관침범이 3 차원 재구성으로 관찰되었다. 암세포는 혈관을 향해 접근할 때 돌기를 뺀고, 여러 암세포가 줄지어 혈관으로 접근하였으며, 혈관의 평활근층을 파괴하고 내부로 들어가서 혈관 내벽을 따라 성장하고 정맥 내강을 채우는 것을 관찰하였다. 혈관밖에 있는 기질을 침범한 암세포에서 다양한 정도의 e-cadherin 의 발현이 관찰되었다. 반면 혈관에 접근하고 있는 암세포에서는 e-cadherin 의 발현이 유지되고, 말단부분에선 e-cadherin 발현이 소실되었고, 혈관침범 후 내벽에서 성장한 암세포에서는 다시 e-cadherin 이 나타났다. 이후 혈관벽 바깥으로 나온 암세포는 관선을 형성하지 못하고 작은 덩어리 또는 단일세포로 존재하며 e-cadherin 발현이 나타나지 않았다. 이는 대장암의 혈관침범에서 상피간엽이행이 지속되지 않았음을 보여준다.

결론: 3 차원 조직병리학적 재구성으로 분석한 대장암 증례의 45%에서 혈관침범을 관찰하였고, 대장암의 혈관침범 과정에서 상피간엽이행이 지속적으로 유지되지 않는 것을 확인하였다. 조직투명화와 3차원적 대장암 조직병리학적 분석은 상피간엽이행 뿐 아니라 대장암의 발생, 진행, 및 전이과정에서 새로운 기전을 밝히고 임상적으로 대장암환자의 진단과 치료에서의 여러가지 다양한 미충족 요구를 해소하는데 도움이 될 수 있을 것이다.

목차

국문요약(Abstract)	i
표 목차	iii
그림 목차	iv
총론(Introduction)	1
재료와 방법(Materials & Methods)	4
환자 및 검체의 수집(Patients sample collection)	4
검체 처리(Sample preparation)	4
일차항체 결합(Primary antibody binding)	5
형광 표지(Fluorescent labeling)	5
조직 투명화(Tissue clearing)	6
시각화와 3차원 재구성(Visualization & 3D reconstruction)	6
결과(Results)	7
환자 및 증례의 선정(selection of patients and cases)	7
정상 대장 조직(Normal colon tissue)의 3차원 다중면역형광염색 소견	9
대장암 조직의 3차원 다중면역형광염색 소견	10
대장암의 혈관침범	12
정상점막과 대장암 분화도에 따른 E-cadherin의 발현	15
혈관침범 부위에서 E-cadherin의 발현	20
H&E 슬라이드와 비교	21
토의(Discussion)	25
참고문헌(References)	32
영문요약(Abstract)	36

표 목차

표 1. 91건의 대장암 증례의 임상병리학적 특성	8
표 2. 동물 대장 조직에서의 조직 투명화를 이용한 기존의 3차원 시각화 연구	28
표 3. 사람 대장 조직에서의 조직 투명화를 이용한 기존의 3차원 시각화 연구	31

그림 목차

그림 1. 대장 조직의 투명화	9
그림 2. 다중면역형광염색을 적용한 정상 대장 조직의 3 차원 형태	10
그림 3. 다중면역형광염색을 적용한 대장암 조직의 3 차원 형태	11
그림 4. 대장암에서 혈관(정맥)침범 양상에 대한 대표적 사진	13
그림 5. 침범한 정맥 내강을 채우고 있는 암세포 클러스터	14
그림 6. 정맥 내벽에서의 암세포 성장	15
그림 7. 다중면역형광 염색을 통한 정상 대장 점막에서의 cytokeratin19, e-cadherin, desmin 발현	16
그림 8. 다중면역형광 염색을 통한 고분화 선암에서의 cytokeratin19, e-cadherin, desmin 발현	17
그림 9. 다중면역형광 염색을 통한 저분화 선암에서의 cytokeratin19, e-cadherin, desmin 발현	18
그림 10. 다중면역형광 염색을 통한 정맥벽 내부의 저분화 선암에서 cytokeratin19, e-cadherin, desmin 의 발현	19
그림 11. 정맥 내강을 향하는 암세포 최첨단에서의 e-cadherin 발현 소실	20
그림 12. 정맥 내부에서 성장하는 암세포의 e-cadherin 발현	21
그림 13. 혈관벽을 따라 연결된 암세포에서는 e-cadherin 발현의 유지	22
그림 14. 대장암 혈관침범의 H&E 슬라이드와 저배율 3 차원 재구성 사진 비교	23
그림 15. 대장암 혈관침범의 H&E 슬라이드와 3 차원 재구성 사진 비교	23
그림 16. 대장암 혈관침범의 H&E 슬라이드와 3 차원 재구성 사진 비교	24

총론(Introduction)

대장암은 2017년 기준으로 한국에서 2번째의 높은 발병률과 (12.1%), 3번째의 높은 사망률을 (11%) 보이는 악성종양이다 [1]. 원발 국소성(localized) 대장암 환자의 5년 생존율은 약 94%이며, 주변부로 전이가 일어난(regional disease) 경우의 생존율은 약 81%이고, 간 또는 폐 등의 장기로 원격 전이가 발생할 경우 5년 생존율은 약 19%로 급격하게 감소된다 [1]. 진단 당시 약 16%의 대장암환자에서 원격전이가 관찰되며 [1], 간으로의 전이는 약 70%에서 가장 빈번하게 관찰된다 [2, 3]. 대장암의 원격전이는 국소적인 정맥 침범(venous invasion)으로 시작되며 [4], 하장막간정맥(inferior mesenteric veins)과 간문맥(portal vein)을 거쳐 간으로 전이하게 된다 [5, 6]. 혈관침범이 있는 대장 직장암 환자의 생존율은 약 40개월로 상당히 낮아진다 [7]. 또한, 대장암의 벽외 혈관 침범(extramural vascular invasion)은 근육층 바깥에 위치한 정맥에서의 혈관침범이 관찰되는 경우로 수술 후 재발의 위험성을 증가시키며, 환자의 생존율을 감소시키며 대장암환자의 나쁜 예후와 연관이 있다 [8-11]. 그러므로, 대장암의 혈관침범 기전에 대한 연구는 환자의 생존율을 높이기 위해서 필수적이다.

대장암은 병리조직검사로 확진을 하며, 통상적으로 얇게 박절된 조직을 hematoxylin과 eosin(H&E)으로 염색한 슬라이드에서 조직학적 유형, 암세포의 분화도, 종양의 침범 깊이, 림프혈관침범, 정맥침범, 절제연 침범, 림프절 전이, 신경 주위 침범, 종양발아(tumor budding) 등을 관찰한다 [12]. 이러한 병리학적 인자 중 종양의 침범깊이, 림프혈관침범 또는 림프절 전이 여부는 수술 후 추가적인 항암치료 결정에 필요한 정보이고, 신경주변부 침범과 종양발아는 암의 공격적인 여부를 평가하여 환자의 예후를 예측하기 위한 지표로 사용된다 [13].

림프관, 모세혈관, 모세혈관후세정맥(post capillary venule)에 종양세포가 침범한 경우 림프관 침윤으로 간주하며, 종양세포가 근육층이 있는 혈관 안에서 관찰될 경우 정맥 침범으로 간주한다 [14]. 그러나 이러한 2차원 H&E 조직검사서 혈관침범을 관찰하는 것은 부분적인 제한이 생긴다. 정상 조직과 그로부터 발생하는 병변은 3차원으로 구성된다. 그러므로 H&E 염색 후 현미경 검경에 의지하는 통상적인 조직의 2차원적 관찰 방법으로는 암의 진행 양상, 특히 암세포가 혈관벽을 뚫고 혈관 내부로 침범하는 과정 등을 이해하는데 제한이 발생할 수 있다 [15]. 최근 발달된 특수현미경의 이용, 다중면역형광항체의 이용, 조직투명화 기법 등을 이용하여 얇게 박절하

지 않은 두꺼운 조직의 내부구조를 3차원으로 관찰할 수 있는 길이 열렸고, 이 방법을 이용하여 앞서 기술한 2차원적 관찰의 한계점을 극복할 수 있다 [15]. 조직투명화는 투명화에 사용하는 용매의 종류 따라 크게 용매기반(solvent-based) 과 수용성 기반(aqueous-based)의 투명화로 구분되며, CUBIC, CLARITY, SeeDB, DISCO법 등 다양한 방법이 알려져 있다 [15-21]. 이와 같은 조직투명화 기법은 인체 장기를 구성하는 세포의 특성에 따라 선택되고 개발된 형태로 적용된다.

혈관침범(vascular invasion)은 원격전이의 시작이다. [22]. 상피세포(epithelial cell)가 악성 종양으로 진행됨에 따라 기존의 부착 형태에서 변화하며 주변 조직으로 침범하기 시작하며, 산소와 영양 인자를 제공 받기위해 새로운 혈관 네트워크를 형성한다. 또한 형성된 암세포는 작은 혈관 또는 림프관으로 침투하여 관내 이동으로 원발 부위로 이동하여 새로운 환경에서 성장하게 된다. 이러한 단계를 이루는 과정을 침범-원격전이 흐름(invastion-metastasis cascade)이라고 한다 [5, 23, 24]. 이를 설명할 수 있는 세포이동의 대표적인 기전으로 상피세포가 세포와 세포 사이(cell-to-cell) 부착 성질을 잃고 이동 가능한 간엽세포(mesenchymal cell)의 특성을 얻는 과정인 상피간엽이행(epithelial to mesenchymal transition, EMT)이 있다[25, 26]. 전이 기전에서 상피간엽이행은 암세포가 발생부위에서 주변으로 침범한 다음 가까운 혈관으로 이동하고 혈관내부로 침범(intravasation)하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [27-32]. 상피간엽이행의 특징은 세포접합부위(adherence junctions)의 불안정화를 유발하는 e-cadherin 단백질 발현의 소실이다 [33]. E-cadherin은 종양의 침범, 원격전이, 환자의 나쁜 예후와 연관된 상피세포 부착 단백질로 세포를 정지상태로 유지하며 [34], 이것이 소실될 경우에 암세포의 해리를 일으켜 전이를 촉진한다 [35].

본 연구에서는 대장암의 혈관침범 과정을 3차원으로 관찰하기 위해 이전에 췌장암 조직의 혈관침범 과정 관찰에 사용된 변형 iDISCO(immunolabeling-enabled three-dimensional imaging of solvent-cleared organs) 방법을 섬유조직형성반응(desmoplasia reaction)이 자주 발생하는 크고 두꺼운 대장암 조직의 조직투명화에 적용하였다[36, 37]. 최근 연구에서 대장을 포함하는 소화기관의 조직 투명화에 대해 CLARITY, FocusClear 등 다양한 방법이 시도되고 있다 [38-43]. 췌장암에서 조직투명화 방법을 이용하여 혈관침범 기전은 연구되었지만 [44], 대장에서의 조직투명화를 이용한 3차원 구조 연구는 대부분 생쥐를 이용한 연구, 점막 상피 환경(mucosal epithelial environment), 혈관의 3차원 배열에 대한 연구 만이 이루어져 있으며, 3차원적 혈관침범과정에 대한

연구는 없었다[39-41, 43, 45-50]. 단지 Lui 등이 연구한 논문만이 대장 관선암종에서 대한 조직투
명화를 한 다음 암세포와 미세혈관에 대한 분포위치에 대한 기술을 보고하였다 [50]. 이에 본 연
구는 대장암에서 혈관침범 과정을 3차원으로 도출하고 이 결과를 바탕으로 대장암의 초기 혈관침
범 및 원격전이를 제어할 수 있는 기전을 밝혀내고자 한다.

재료와 방법(Materials & Methods)

환자 및 검체의 수집(Patients sample collection)

본 연구는 서울아산병원 기관 심의위원회 (승인번호 : 2021-0717)의 승인을 받았으며, 2019년부터 2020년까지 서울아산병원에서 외과적 대장암 절제술을 받은 환자 중 조직세포자원센터에 수집된 수술 후 대장암 신선동결조직(fresh frozen tissue)을 49건을 분양 받아 사용하였다. 또한 통상의 병리검사에서 혈관침범을 확인한 42건의 포르말린고정 파라핀포매(formalin fixed paraffin embedded) 대장암 조직을 수집하였다. 조직을 평균 0.7 x 0.5 x 0.2 cm의 크기로 잘라서 사용하였다.

검체 처리(Sample preparation)

신선조직은 포르말린으로 고정된 후 0.02% sodium azide/PBS에서 냉장보관 하였다. 수분을 제거하기 위해 50%메탄올(methanol), 80% 메탄올, 100% 메탄올로 1시간씩 상온에서 200 rpm의 속도로 흔들었다. 1시간 동안 100% 메탄올로 세척한 다음, 지방성분을 제거하기 위해 66% 디클로로메탄(dichloromethane)/33% 메탄올로 상온에서 밤새 배양하였다. 적혈구와 조직내 색소(endogenous pigment) 등 자가 형광을 방출하는 단백질을 산화시키기 위하여 100% 메탄올로 2회 세척 후 4°C에서 5% 과산화수소(H₂O₂)로 배양하였다. 80% 메탄올, 50% 메탄올로 재수화(rehydration)하고, PBS/0.2% Triton X-100으로 1시간씩 2회 세척하였다. 조직의 투과성을 높이기 위하여 PBS/20% DMSO/0.2% Triton X100/0.3 mol/L 글라이신(glycine) 용액으로 37°C에서 2일 동안 진탕 배양(shaking incubation)하였다. 과도한 염색을 방지하기 위하여 글라이신을 사용하였다.

포르말린고정 파라핀포매 된 대장 조직은 실온(RT)에서 Xylene을 이용하여 파라핀을 녹이고, 이 조직을 100% 메탄올, 80% 메탄올, 50% 메탄올의 단계를 거쳐 삼투압으로 인한 조직 내에 남아있는 xylene을 제거하였다. 이 후 각 1시간씩 80% 메탄올, 두 번의 100% 메탄올로 수분을 제거하고 66% 디클로로메탄/33% 메탄올에 상온에서 밤새 진탕 배양하였다. 이후 100% 메탄올을 2회 세척 후 4°C에서 5% 과산화수소에 담가 적셔 두었다. 80% 메탄올, 50% 메탄올로 재수화하고, PBS/0.2% Triton X-100으로 1시간씩 2회 세척하였다. 조직의 투과성을 높이기 위하여 PBS/20% DMSO/0.2% Triton X100/0.3 mol/L 글라이신 용액으로 37°C에서 2일 동안 진탕 배양하였다.

일차항체 결합(Primary antibody binding)

투과성을 높인 조직은 비 특이적 항원-항체반응을 막기 위하여 PBS/0.2% Triton X-100/10% DMSO/6% 당나귀 혈청 용액(Donkey serum solution)으로 37°C에서 2일 동안 진탕 배양하였다. PBS/0.2% Tween-20 with 10mg/mL 헤파린으로 1시간 동안 세척하였다. 배경의 면역반응을 방지하기 위하여 헤파린을 첨가하였다. 면역형광염색을 위한 전처리 과정이 끝난 조직은 세포 표지자로 선택한 3가지 일차항체(primary antibody)를 PBS/5% DMSO/3% 당나귀 혈청/0.2% Tween-20 과 10mg/mL 헤파린 용액에 37°C에서 반응시켰다. 병변 세포 표지를 위한 cytokeratin 19 (EP1580Y, 토끼 단클론항체; 1:200; Abcam, Cambridge, UK), 혈관의 근육벽 표지를 위한 desmin (염소 다클론 항체; 1:100, LifeSpan Biosciences, Seattle WA), e-cadherin (M168, 생쥐 단클론항체; 최종농도, 1:150; Abcam)은 상피세포의 발현 확인을 위해, CD31 (JC/70A, 생쥐단클론항체; 1:100, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)는 혈관의 내피세포의 표지자로 사용되었다. 두꺼운 조직의 경우 조직 내부로 항체의 전달이 용이하지 못하기 때문에 효과적인 표지를 위하여 37°C에서 4일의 진탕 배양 동안 전체 항체농도에서 나뉜 용량을 매일 마다 추가하였다. 또한 매일 12시간은 400 xg의 원심분리(centrifugation)를 하고 물리적으로 뭉쳐진 조직과 항체에 1시간의 초음파처리(ultrasound sonication) 과정을 추가하여 물리적인 항체 투과 효과를 주었다. 일차항체 표지 후 조직을 PBS/0.2% Tween-20 과 10 mg/mL 헤파린 용액으로 각 1시간씩 5회 세척하였다.

형광 표지(Fluorescent labeling)

이차항체(secondary antibody)는 Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure F(ab')₂ 당나귀 항 토끼 절편(fragment donkey anti-rabbit) IgG (1:300, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), DyLight 405-conjugated AffiniPure F(ab')₂ 당나귀 항 염소 절편(fragment donkey anti-goat) IgG (1:300, Jackson ImmunoResearch), and Cyanine 3-conjugated AffiniPure F(ab')₂ 당나귀 항 생쥐 절편(fragment donkey anti-mouse) IgG (1:300, Jackson ImmunoResearch)을 혼합하여 사용하였다. 조직으로의 항체 침투를 증가시키기 위해 온전한 IgG 항체보다 분자량이 작은 펩신-소화 이차항체 절편을 사용하였다. 이차항체는 PBS/3% 당나귀 혈청/0.2% Tween-20과 10 mg/mL 헤파린 용액에 4일 동안 37°C에서 진탕 배양하고, 매일 12시간의 400 xg 원심분리, 1시간의 초음파 처리 과정으로 이루어졌다. 이후 상온에서 PBS/0.2% Tween-20과 10 mg/mL 헤파린 용액에 각 1시간씩 5회 세척하고, 이 모

든 단계는 형광의 소실을 막기 위해 빛 노출로 부터 보호하였다.

조직 투명화(Tissue clearing)

50%, 80%, 100%의 메탄올에 순차적으로 조직을 탈수화 하였고, 상온에서 3시간 동안 66% 디클로로메탄/33% 메탄올로 혼합하였다. 이후 100% 디클로로메탄으로 15분씩 2회 세척하여 디벤질 에테르(dibenzyl ether)에 침지 시키면 염색된 조직은 24시간 이내 투명화 되었다.

시각화와 3 차원 재구성(Visualization & 3D reconstruction)

면역표지가 된 투명화 조직은 레이저와 조직 사이의 굴절률을 일치시키기 위해 유리배양접시에서 디벤질에테르에 담가 두었고, 내부구조의 시각화는 역위 공초점 레이저 스캔 현미경(inverted confocal laser scanning microscopy; LSM780; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 사용하였다. 정상과 암 상피세포에서 발현하는 cytokeratin 19의 Alexa Fluor 488 신호는 450/50 nm의 여기 범위 (excitation range)와 510/50 nm의 방출 범위(emission range)를 가지고 있는 bandpass filter set 38 에서 시각화하였다. Desmin을 발현하는 근섬유세포(smooth muscle cells)의 DyLight 405 신호는 G 365 nm의 여기 범위 와 445/50 nm의 방출 범위를 가지고 있는 bandpass filter set으로 시각화 하였다. Cyanine 3 signals of CD31 expressing endothelial cells, of e-cadherin labeled cells 545/25 nm의 여기 범위 와 605/70 nm의 방출 범위를 가지고 있는 bandpass filter set 43에서 시각화 되었다. 조직 샘플에서의 자가형광 신호를 줄이기 위한 처리를 하였지만, 혈관의 탄력판(elastic lamina)과 콜라겐에서 여전히 자가형광이 남아있었다. 하지만 desmin 신호가 부족한 부분에서 자가형광은 혈관을 식별하는데 유용하게 작용되었다.

2.5 μ m의 간격으로 objective C-apochromat 10x/0.45 W M27 lens, 1.5 μ m의 간격으로 objective C epiplan-apochromat 20x/0.7 DIC M27 lens를 사용하여 z-stack 이미지를 획득하였다. 획득 된 연속적인 z-stack image는 Zen 2012 SP5 software(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany of the LSM780 confocal microscopy system)을 사용하여 단층 영상화로 구현되었다. 또한 IMARIS 8.1.2. software(Bitplane, Belfast, Ulaster, USA)를 이용하여 이미지를 3차원 영상으로 재구성하였으며, 각 형광 신호를 렌더링(rendering)하여 흐릿한 부분을 선명하게 시각화 하였다.

결과(Results)

환자 및 증례의 선정(selection of patients and cases)

91건의 대장암 증례의 임상병리학적 특성은 표1에 요약하였다. 환자의 평균 연령은 62 ± 12 세였고, 종양의 평균 크기는 5 ± 2 (range 1.7-11.3 cm)이다. 발생위치 별 대장암의 분포는 좌측대장 (descending colon, splenic flexure, sigmoid colon)발생이 24건 (26%), 우측대장 (ascending colon, hepatic flexure, cecum, transverse colon)발생이 34건 (37%), 직장에스결장접합부 4건 (5%), 직장 발생이 29건 (32%)이었다. 조직학적 분류에서 대부분의 대장암이 (90건, 99%) 관선암종(tubular adenocarcinoma)이었고, 1증례 (1%)는 점액암종 (mucinous carcinoma)이다. 86증례 (95%)에서 중등도의 분화 (moderately differentiation)를 보였고, 74증례 (81%)는 장막하 연부조직 침범이 관찰되었다. 림프혈관침범은 48증례 (52%)에서 관찰되었다. 실험에 사용된 42증례의 포르말린고정 파라핀 포매 조직은 6증례 (19%)의 H&E슬라이드에서 혈관침범이 확인되었다. 직장암 환자 1명이 수술 전 항암치료 (neoadjuvant chemotherapy-FOLFOX)를 받았고 나머지 환자들은 수술 전 치료를 받지 않았다. 추적 검사에서 재발은 5명의 환자에서 발생하였으며, 폐전이는 3명의 환자에서, 간과 난소의 전이는 각 한 명의 환자에서 발생하였다.

표 1. 91건의 대장암 증례의 임상병리학적 특성

Characteristics	Variables	No of patients	% of patients
Sex	Male	54	59.3
	Female	37	40.7
Age, years	<60	38	41.8
	≥60	53	58.2
Age (mean ± SD)	62.2 ± 11.8		
Size (cm)	<3	7	7.7
	≥3	84	92.3
Location	Left colon	24	26.4
	Splenic flexure		1 1.1
	Descending colon.		0 0
	Sigmoid colon		23 25.3
	Right colon	34	37.4
	Cecum		9 9.9
	Hepatic flexure		6 6.6
	Transverse colon		4 4.4
	Ascending colon		15 16.5
	Rectosigmoid junction	4	4.4
Rectum	29	31.9	
Histologic subtype	Tubular adenocarcinoma	90	98.9
	Mucinous carcinoma	1	1.1
Differentiation	Well	3	3.3
	Moderate	86	94.5
	Poor	1	1.1
	Not applicable	1	1.1
T category	T2 (Proper muscle)	8	8.8
	T3 (Pericorectal adipose tissue)	74	81.3
	T4 (Serosa exposure)	9	9.9
N category	N0	55	60.4
	N1	22	24.2
	N2	14	15.4
Lymphovascular invasion	Absent	43	47.3
	Present	48	52.7
Perineural invasion	Absent	60	65.9
	Present	31	34.1
Large vessel invasion	Absent	67	73.6
	Present	24	26.4
Recurrence	Absent	86	94.5
	Present	5	5.5

정상 대장 조직(Normal colon tissue)의 3차원 다중면역형광염색 소견

대장암의 3차원 형태학적 특징을 비교 분석하기 위하여 대장 조직의 암 부위와 정상 부위를 대상으로 조직투명화와 다중면역형광염색을 시행하였다. PBS에서 불투명한 대장 조직은 변형 iDISCO 기법을 통하여 굴절률을 맞춘 벤질 에테르 (benzyl ether)로 성공적으로 투명화가 되었다 (그림 1).

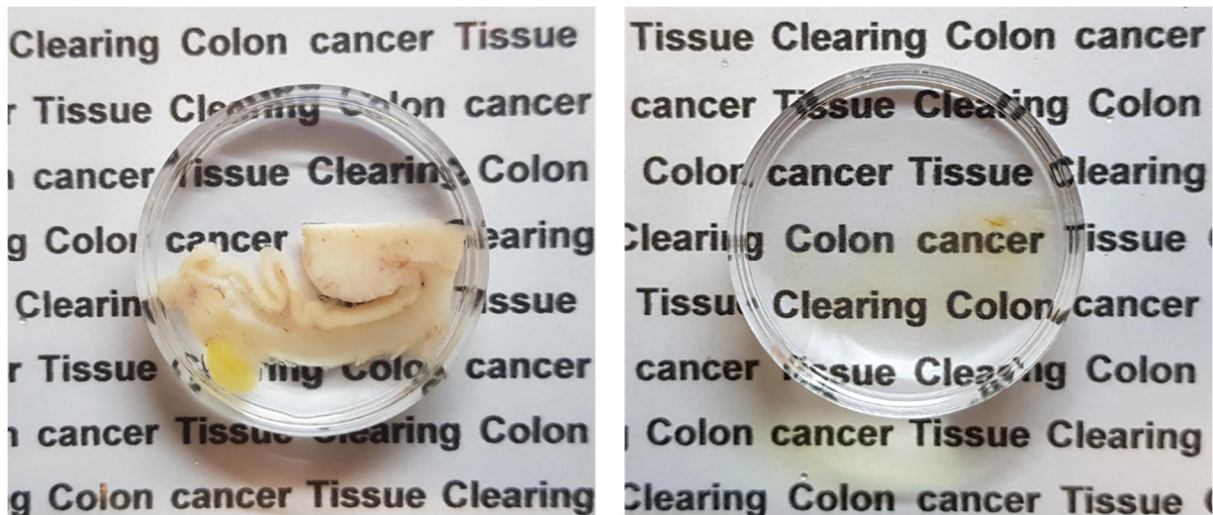


그림 1. 대장 조직의 투명화. 변형 iDISCO 기법으로 대장의 정상과 종양이 이행하는 부분을 성공적으로 투명화 하였음. 왼쪽은 투명화 전, 오른쪽은 투명화 후의 사진.

상피세포 마커인 cytokeratin19, 혈관 내피세포 마커인 CD31, 평활근 마커인 desmin 항체를 사용하여 다중면역형광염색을 시행하였다. 공초점 레이저 스캔 현미경 (10x, 20x 대물 렌즈)을 사용하여 투명 된 정상 대장 조직은 점막층에서 시험관 튜브 모양의 관선의 움 (crypt)의 뺨뺨하고 균일한 간격으로 배치되어 대장 조직의 가장 안쪽을 차지하였다. 움과 움사이의 고유판 (lamina propria)에는 작은 관강을 가지는 모세혈관(capillary)과 혈관이 일정한 간격을 두고 고르게 주행하였다 (그림 2).

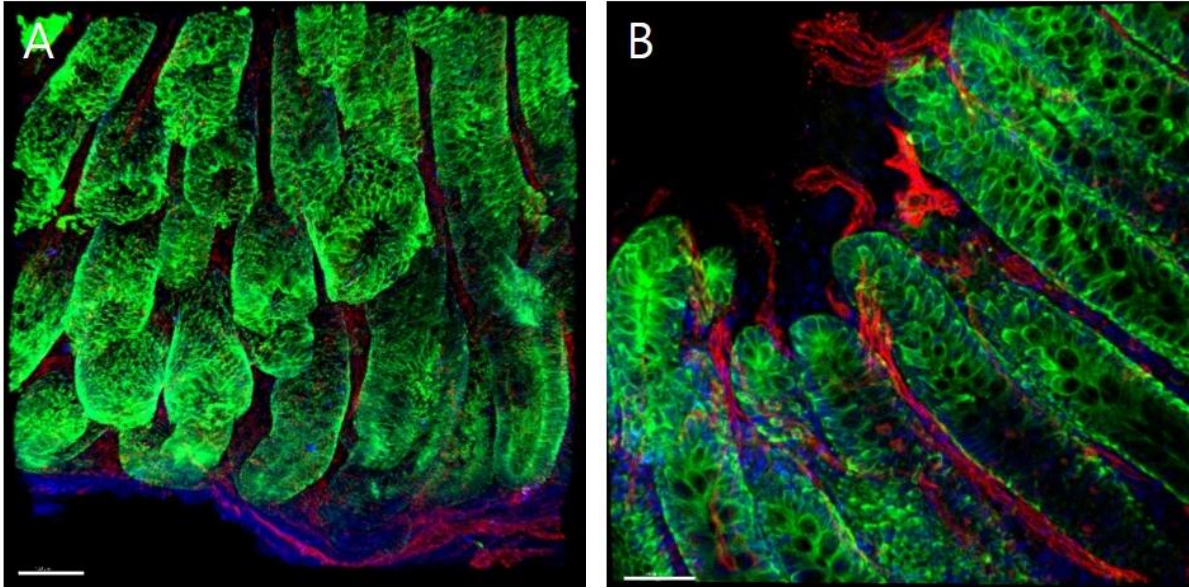
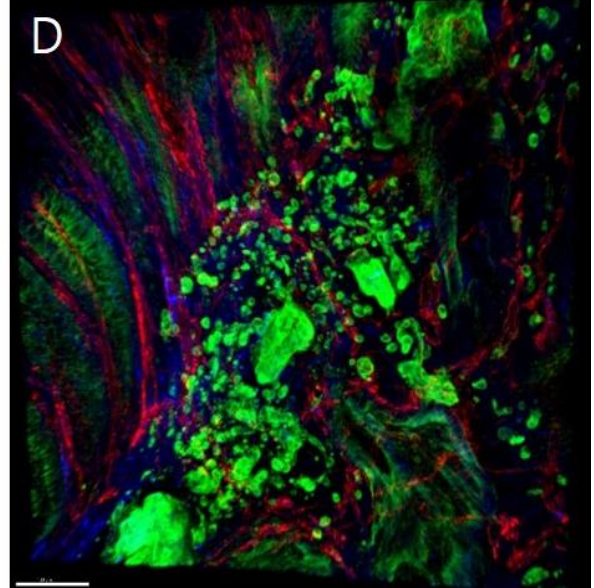
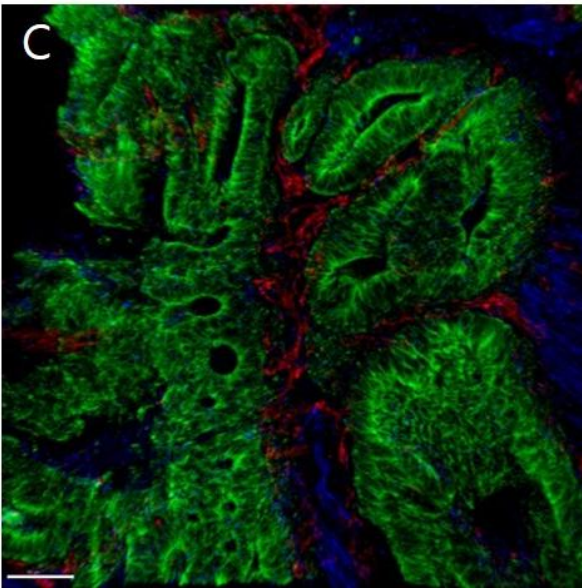
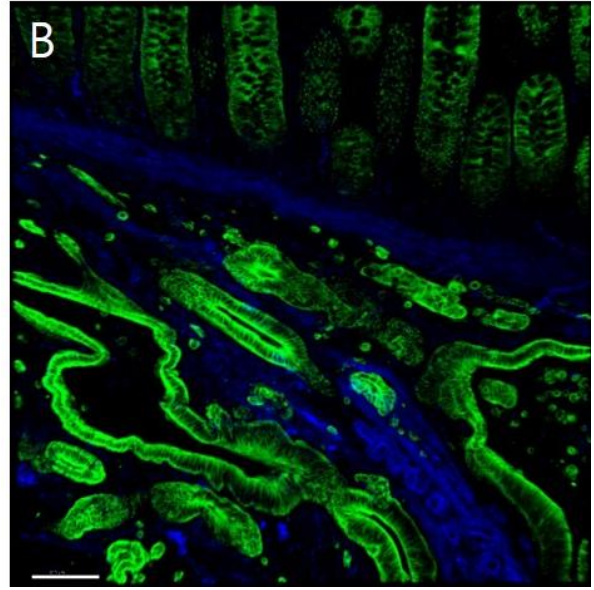
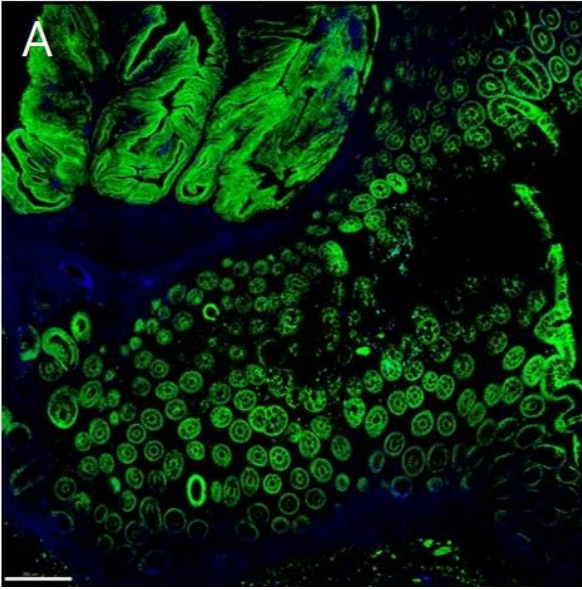


그림 2. 다중면역형광염색을 적용한 정상 대장 조직의 3차원 형태. **A**, 정상 대장 조직의 움 (crypt, 초록색)과 점막 근육층 (파란색). **B**, 점막의 움과 움 사이에 분포되는 모세혈관이 관찰됨. [대장상피 (CK19, 초록색), 혈관내피세포 (CD31, 붉은색), 혈관근층 (desmin, 파란색); 눈금막대, A, 100 μ m, B, 40 μ m]

대장암 조직의 3차원 다중면역형광소견

대장암과 정상대장점막이 이행하는 부위를 3차원으로 관찰하였다. 정상 점막의 관선의 움이 뾰족하고 일정하게 분포하는 반면, 분화가 좋은 고분화 (well-differentiated)암종의 관선은 비정형의 불규칙한 관선을 만들고 있었고, 관선의 내강이 불균일한 크기를 가지고 있었다 (그림 3A). 정상 점막의 관선의 균일한 시험관 모양으로 내강은 좁고 닫혀 있는 반면, 중등도 분화도 (moderately differentiated)의 대장암이 만든 암관선은 여러 다양한 크기의 관강을 만들고 있거나 (그림 3B-C), 저분화 (poorly differentiated)암종인 경우 관선을 거의 못 만들거나 전혀 만들지 못하고 있었다 (그림 3D-E). 다수의 암세포들이 혈관주변에 분포되어 있는 것을 관찰하였다 (그림 3F).



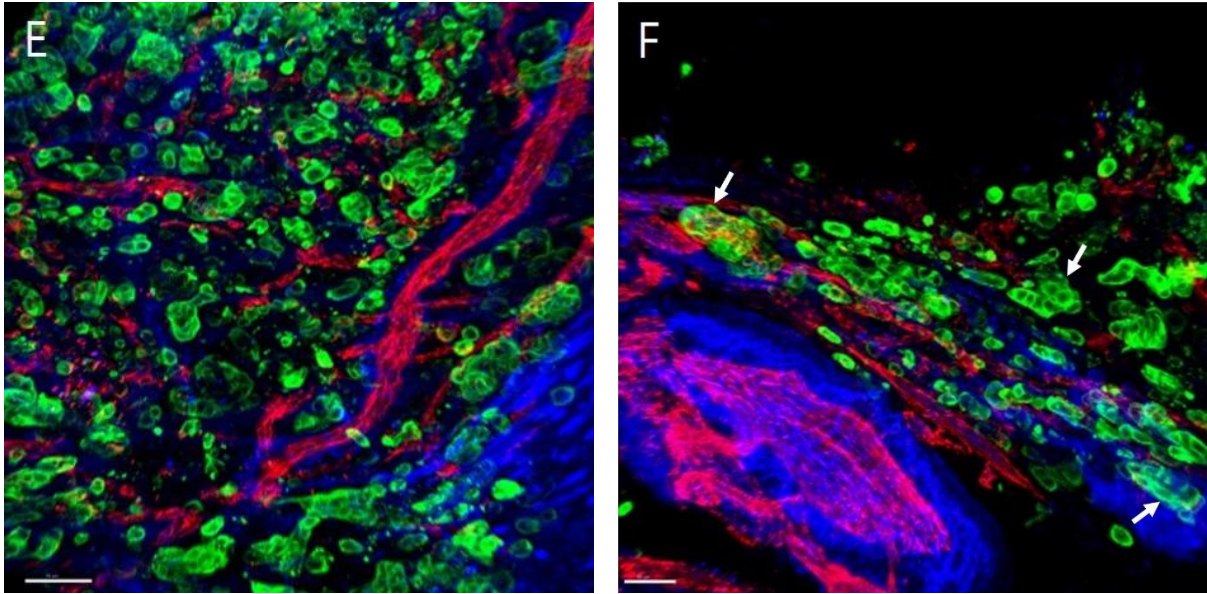


그림 3. 다중면역형광염색을 적용한 대장암 조직의 3차원 형태. **A-B**, 정상 대장점막과 대장암의 이행부위. **C**, 고분화 암세포는 정상 대장에서 관찰되는 움과 유사한 관선 구조를 형성함. **D-E**, 저분화 암세포는 관 형태를 형성하지 않음. **F**, 작은 암세포 덩어리가 혈관주변부로 접근함. [대장상피 및 대장암 (CK19, 초록색), 혈관내피세포 (CD31, 붉은색), 혈관근층 (desmin, 파란색); 눈금막대, A, 300 μ m, B, 80 μ m, C, 80 μ m, D, 100 μ m, E, 70 μ m, F, 50 μ m]

대장암의 혈관침범

IMARIS 영상 소프트웨어를 이용하여 2차원 연속 절편 이미지를 3차원으로 재구성하여 종양조직에서 혈관침범여부를 관찰한 결과, 총 91건의 대장암 조직 중 41건(45%)에서 혈관침범을 확인하였다. 이 중 실험 전에 혈관침범 여부를 알 수 없었던 49증례의 신선 조직 (fresh tissue) 중 17증례 (35%)에서 혈관침범이 관찰되었고, 42 증례의 포르말린고정 파라핀 포매 검체 중 24증례 (57%)에서 혈관침범을 확인하였다.

혈관의 주변부에서 관찰되는 암세포는 둥근 모양이지만, 일부 암세포는 혈관과 가까운 쪽으로 돌기를 뺀고, 여러 암세포가 줄을 지어서 혈관벽 가까이 접근한다 (그림 4 A). 줄을 지어 연결된 암세포가 혈관벽을 이루는 평활근을 파괴하는 모습이 관찰되며, 이 부분에서 desmin의 염색의 소실이 관찰된다 (그림 4B-C). 이러한 과정을 거쳐 혈관에 들어간 암세포들이 혈관 내벽을

따라 성장하고 (그림 4B-C), 일부에서는 정맥의 내강을 암세포가 채우는 것을 관찰하였다 (그림 5). 암세포가 정맥을 침범하여 성장함에 따라 혈관의 내피세포는 파괴되어 사라지고, 정상 정맥의 혈관벽 형태를 구분하기 어려운 정도로 형태가 변화한다 (그림 4 A).

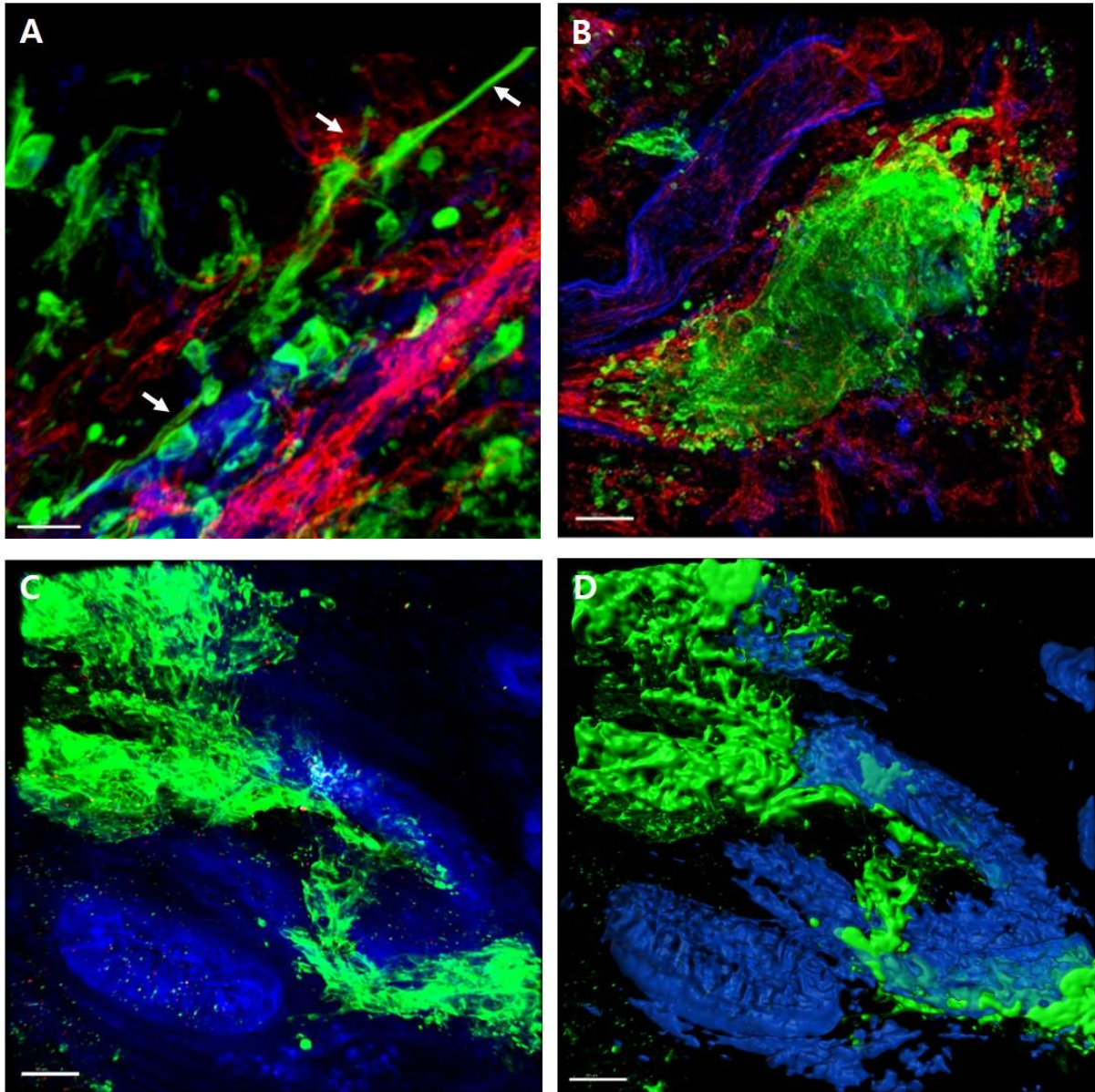


그림 4. 대장암에서 혈관(정맥)침범 양상에 대한 대표적 사진. **A**, 긴모양의 암세포가 혈관으로 접근. **B**, 암세포 덩어리가 정맥벽을 통과하여 정맥 내벽에 부착함. **C**, 암세포가 줄지어서 혈관내부로 들어감. **D**, **C**의 회반죽(surface rendering)영상 [대장암 (CK19, 초록색), 혈관내피세포 (CD31, 붉은색), 혈관근층 (desmin, 파란색); 눈금막대, A, 30 μ m, B and C, 50 μ m, D, 100 μ m]

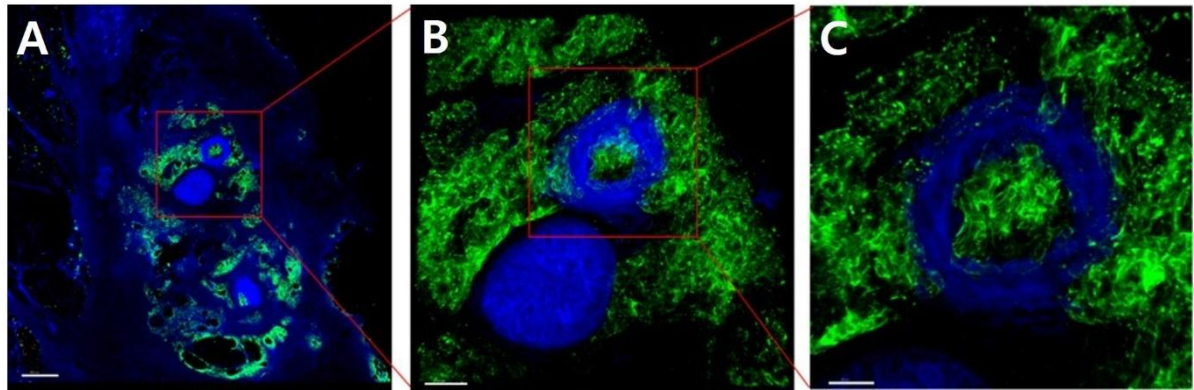


그림 5 침범한 정맥 내강을 채우고 있는 암세포 덩어리 [대장암 (CK19, 초록색), 혈관내피세포 (CD31, 붉은색), 혈관근층 (desmin, 파란색); 눈금막대, A, 300µm; B, 100µm; C, 40µm]

혈관내부로 암세포는 덩어리의 형태를 유지하면서 자라거나 일부에서는 각각의 작은 수의 암세포가 덩어리에서 떨어진 형태로 (화살표) 관찰되었다 (그림 6).

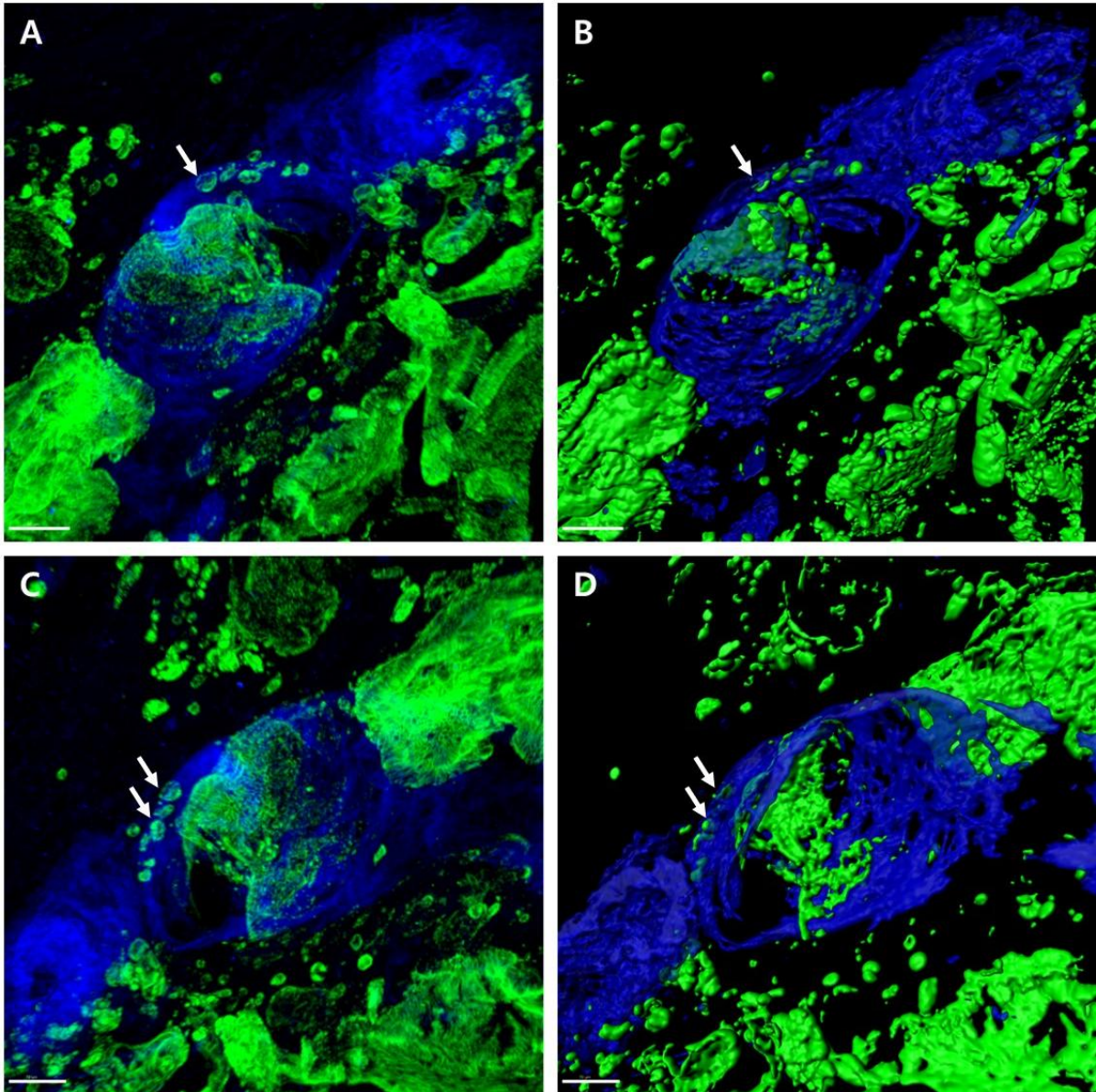


그림6. 정맥 내벽에서의 암세포의 성장. 암세포 덩어리는 정맥 내벽을 따라 성장하고 내강을 채움. 여러 개의 흩뿌려진 단일 암세포가 정맥 내벽에 붙어있음을 표시 (화살표). [대장암 (CK19, 초록색), 혈관내피세포 (CD31, 붉은색), 혈관근층 (desmin, 파란색); 눈금막대, A 와 B, 80 μ m; C 와 D, 70 μ m]

정상점막과 대장암 분화도에 따른 E-cadherin 의 발현

대장암세포의 침범과 진행에 따른 세포의 변화를 확인하기 위해 상피세포 표지자인 e-cadherin

(red) 면역 염색으로 정상 대장 상피, 분화가 좋은 고분화 암종에서 발현을 확인하였다. 정상 상피 세포에서 e-cadherin은 상피세포의 세포막에서 발현이 되었고, 모든 상피세포의 발현이 고르게 관찰되었다 (그림 7).

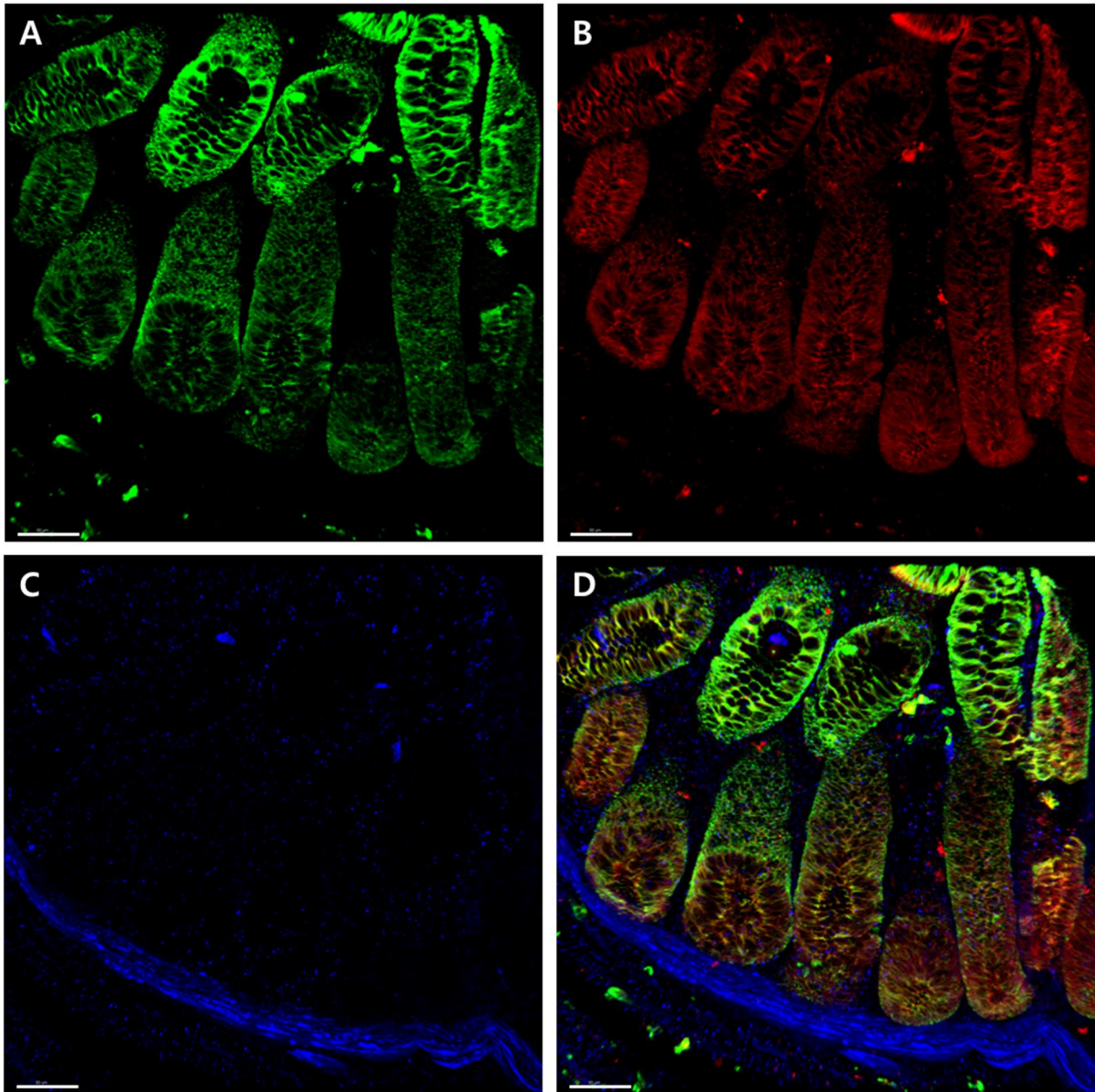


그림 7. 다중면역형광 염색을 통한 정상 대장점막에서의 cyokeratin19, e-cadherin, desmin 발현. A, cyokeratin19 (초록색); B, E-cadherin (붉은색); C, muscularis mucosae, desmin (파란색); D, merge; 눈금막대, 80 μ m

분화가 좋은 고분화 암종의 암세포에서도 암세포의 세포막에서 e-cadherin의 발현이 고르게 관찰되었다 (그림 8).

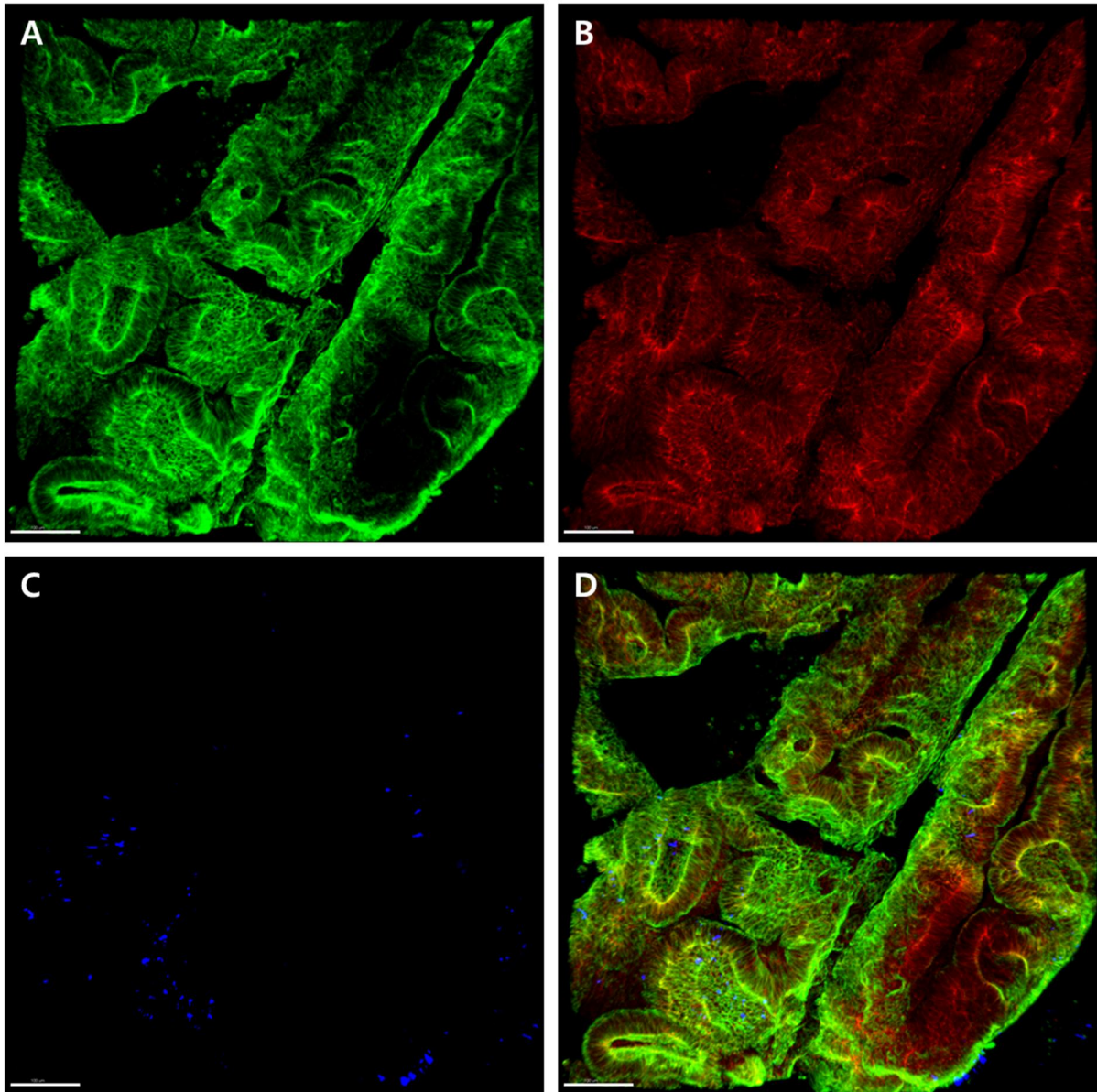


그림 8. 다중면역형광 염색을 통한 고분화 선암에서의 cytokeratin19, e-cadherin, desmin 발현. A, cytokeratin19 (초록색); B, E-cadherin (붉은색); C, muscularis mucosae, desmin (파란색); D, merge; 눈금막대, 100 μ m

반면 저분화도의 암종인 경우 다양한 정도의 E-cadherin의 발현을 보였다 (Fig 9). 암세포

는 관선을 만드는 중심부에서 e-cadherin의 발현이 잘 유지되었지만, 주변부로 이행하면서 관선을 못 만드는 부분에서 e-cadherin 발현의 소실이 관찰되었다 (Fig 9).

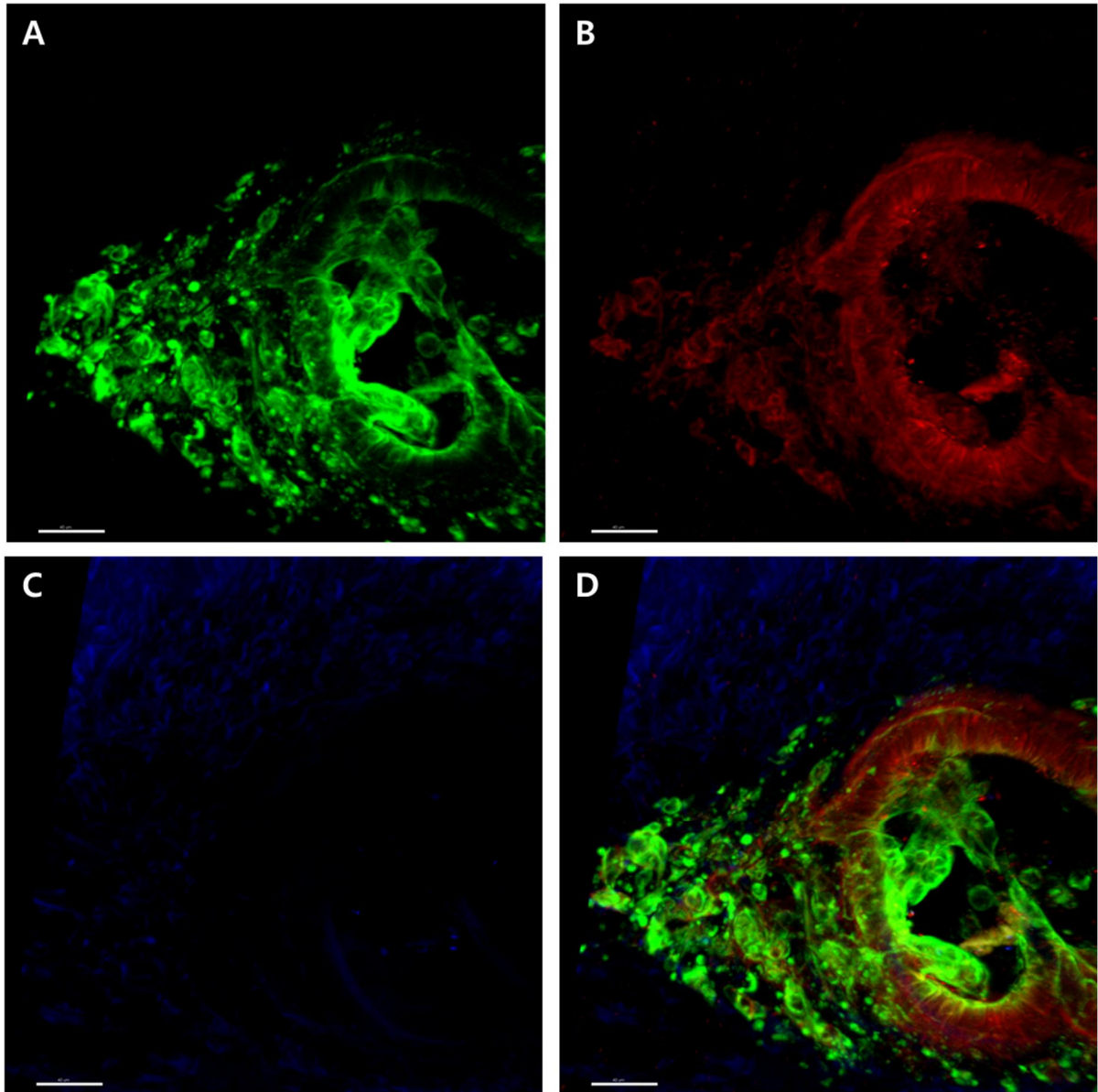


그림 9. 다중면역형광 염색을 통한 저분화 관선암에서의 cytokeratin19, e-cadherin, desmin 발현.

A, cytokeratin19 (초록색); B, E-cadherin (붉은색), muscularis mucosae, desmin (파란색) D, merge;

눈금막대, 40 μm

정맥벽 내부에서 관찰된 혈관침범이 이루어진 암세포는 혈관벽 내부에서 고분화도의 암

관선 (cancer gland)과 마찬가지로 암세포의 세포막에서 e-cadherin의 발현이 잘 유지되며, 관강 내부를 채우고 있었다 (Fig 10).

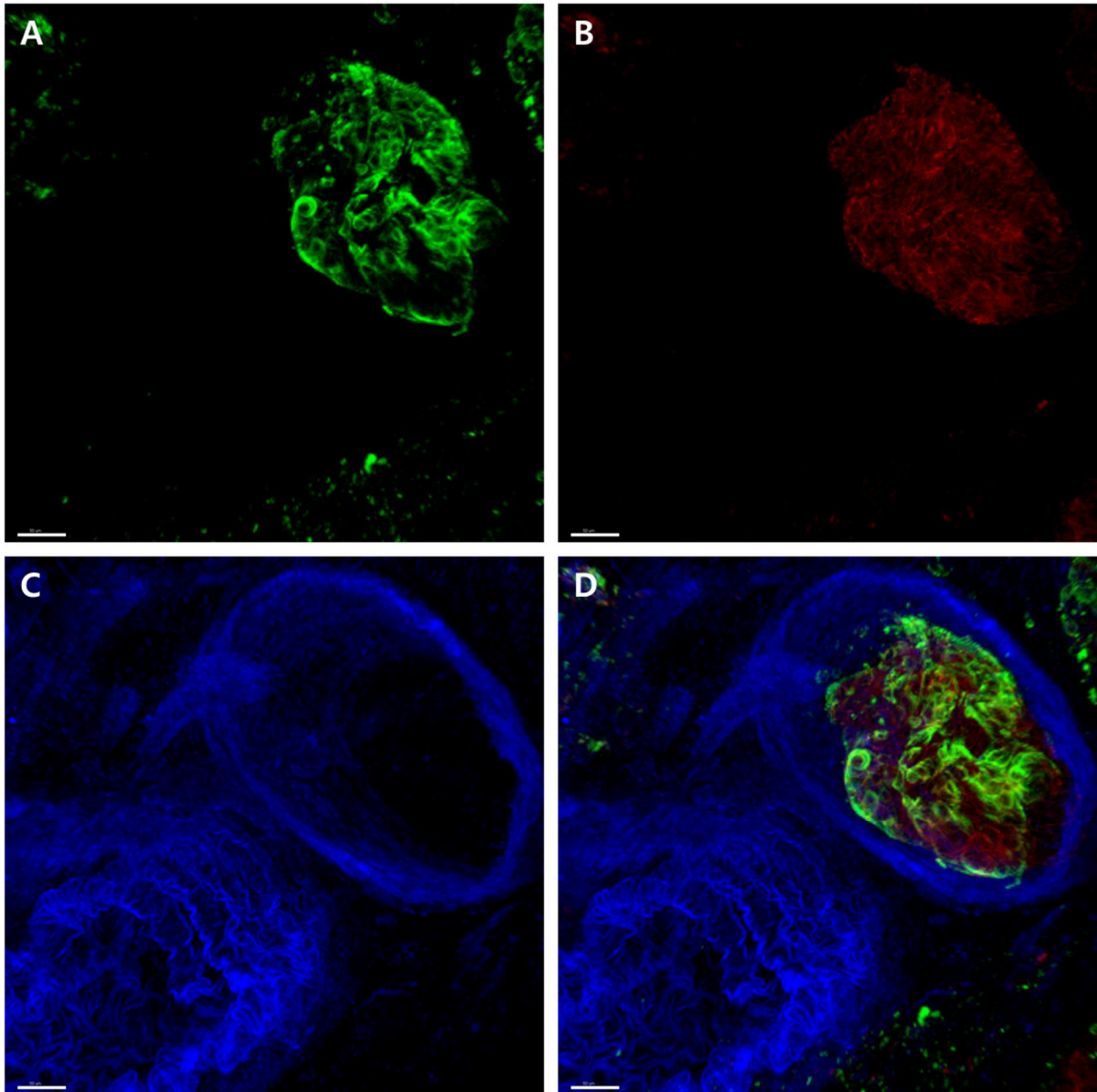


그림 10. 다중면역형광 염색을 통한 정맥벽 내부의 저분화 선암에서 cytokeratin19, e-cadherin, desmin의 발현. [A, cytokeratin19 (초록색); B, E-cadherin (붉은색); C, desmin (파란색); D, 합체영상; 눈금막대, 50 μ m]

혈관침범 부위에서 E-cadherin 의 발현

앞서 기술한 것처럼, 암세포들이 혈관침범 전에 암세포가 혈관으로 접근할 때 일부 암세포는 혈관과 가까운 쪽으로 돌기를 뺀고, 여러 암세포가 줄을 지어서 혈관벽 가까이 접근한다. 이 때 e-cadherin으로 염색을 하면, 줄지어 있는 암세포들에서 e-cadherin의 발현이 유지가 되는 반면 줄의 끝부분에 위치한 암세포에서는 e-cadherin의 발현이 소실된다 (Fig 11). 반면, 혈관 내부로 침범하여 혈관벽을 둘러싸는 암세포들에서 E-cadherin의 발현이 암세포의 세포막에 다시 나타나기 때문에 혈관침범과정에서 상피간엽이행이 유지되지 않음을 관찰하였다 (Fig. 12).

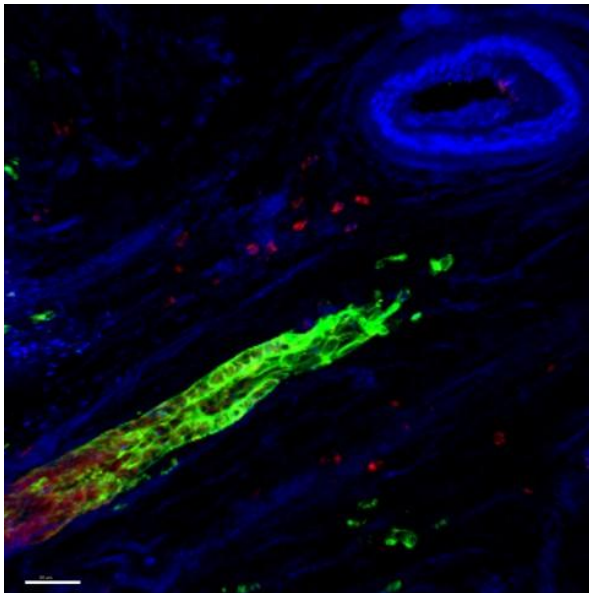


그림 11 정맥 내강을 향하는 암세포 최첨단에서의 e-cadherin 발현 소실 [cytokeratin19 (초록색), e-cadherin (붉은색), desmin (파란색); 눈금막대, 50 μ m]

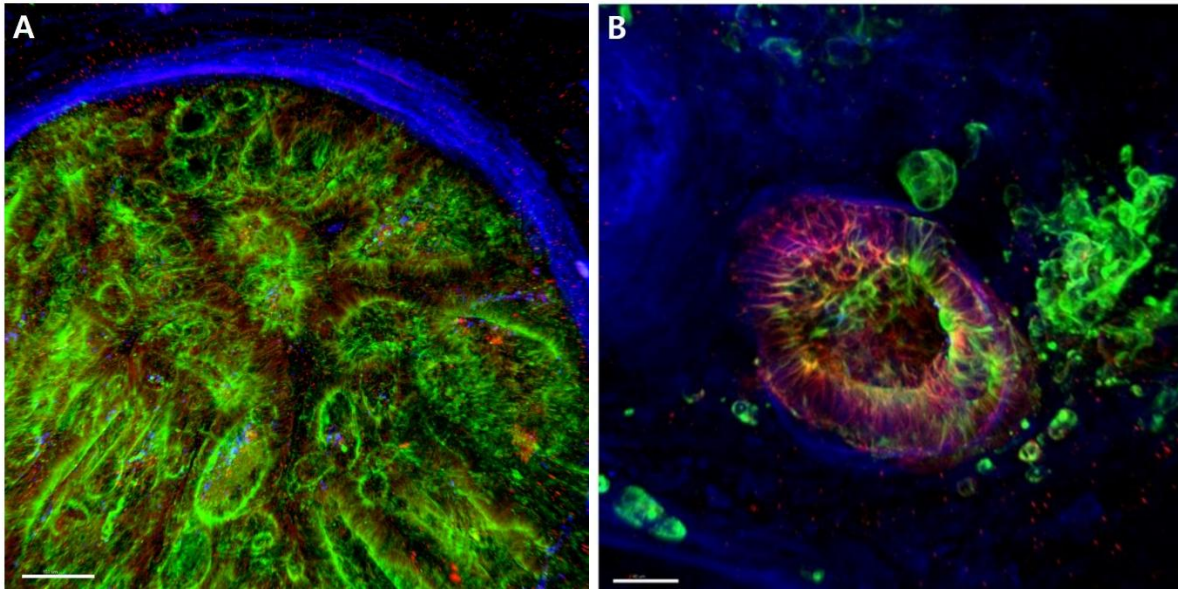


그림 12. A, B 정맥 내부에서 성장하는 암세포의 e-cadherin 발현 [cytokeratin19 (초록색), e-cadherin (붉은색), desmin (파란색); 눈금막대, A, 100 μ m; B, 40 μ m]

혈관 내부를 채우며 성장하는 암세포는 혈관 밖으로 이동 (extravasation)하며 혈관 내벽에 붙은 암세포와 마찬가지로 혈관벽을 따라 띠처럼 연결된 암세포에서 e-cadherin이 발현한다. 이들 암세포가 혈관벽 바깥으로 나간 다음, 다시 암관선을 만들지 못하는 분화도가 나쁜 암세포로 모양이 바뀌게 되고, 작은 덩어리 또는 각개의 단일세포로 변하며, 이러한 형태가 변하는 부위에서 암세포에서의 e-cadherin의 발현이 소실한다 (Fig. 13).

H&E 슬라이드와 비교

투명화 된 대장암 조직의 3차원 영상에서 혈관침범을 확인하고 기존의 고정 파라핀 포매 조직의 H&E슬라이드 사진과 비교하였다 (Fig. 14-16). 4 μ m 두께의 절단면에서 혈관침범이 의심되는 부위를 확인하여 3차원 재구성을 통해 이에 대한 연장선상의 영상을 얻을 수 있고, 암세포의 혈관침범 형태를 확인하였다. 3차원으로 평가한 혈관침범 길이는 평균 $334.0 \pm 212.4 \mu$ m (median, 284 μ m; range, 81-789 μ m) 이었다.

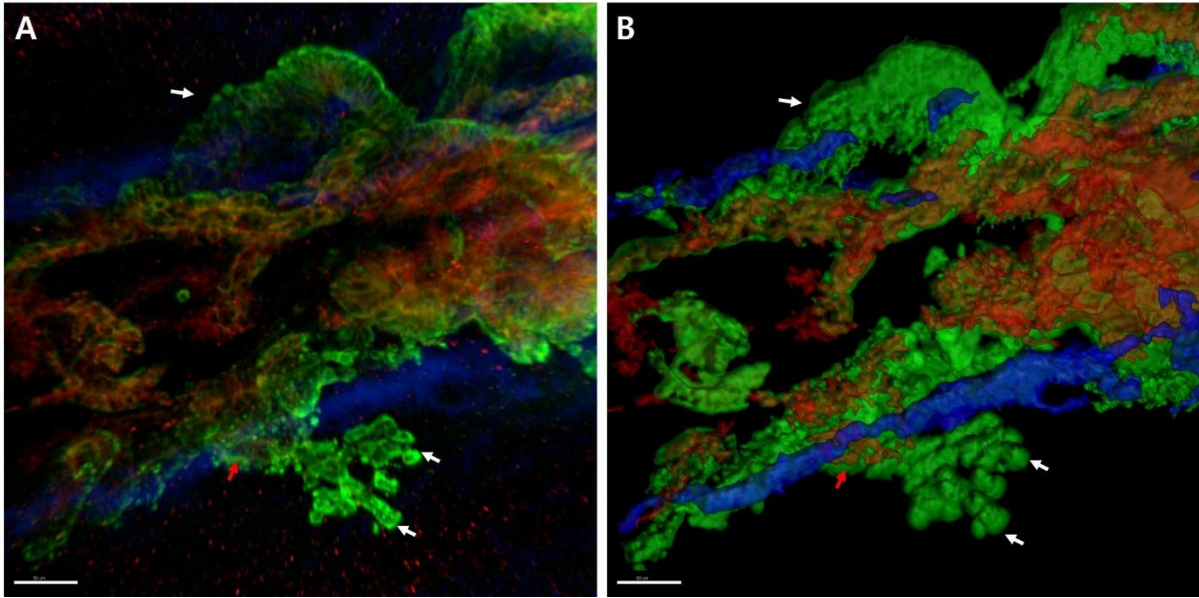


그림 13. **A** 혈관벽을 따라 연결된 암세포에서는 e-cadherin 발현의 유지(빨간색 화살표). 반면, 암세포의 덩어리가 단일 세포로 분리될 때 e-cadherin이 소실 (흰색 화살표). **B**, **A**의 회반죽(surface rearing)영상 [cytokeratin19 (초록색), E-cadherin (붉은색), desmin (파란색); 눈금막대, 50 μ m]

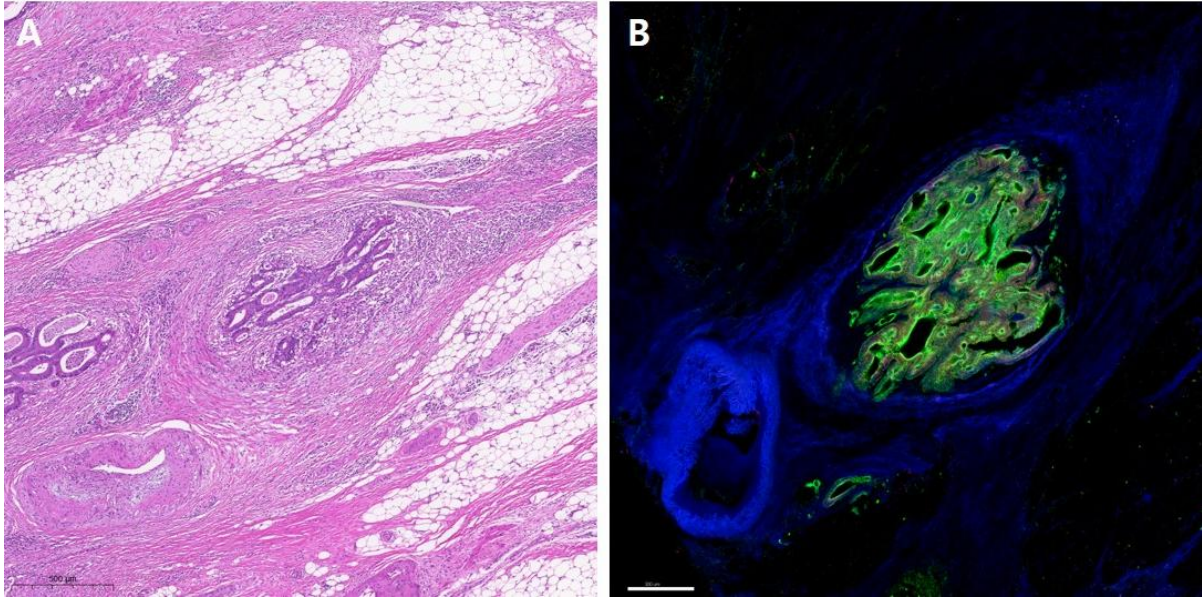


그림 14. 대장암 혈관침범의 H&E 슬라이드와 저배율의 3차원 재구성 사진 비교. 정맥 침범이 일어난 암세포 덩어리에서 e-cadherin 발현이 나타남. [A, H&E 슬라이드 눈금막대, 500 μm, B, cytokeratin19 (초록색), E-cadherin (붉은색), desmin (파란색); 눈금막대, 300 μm]

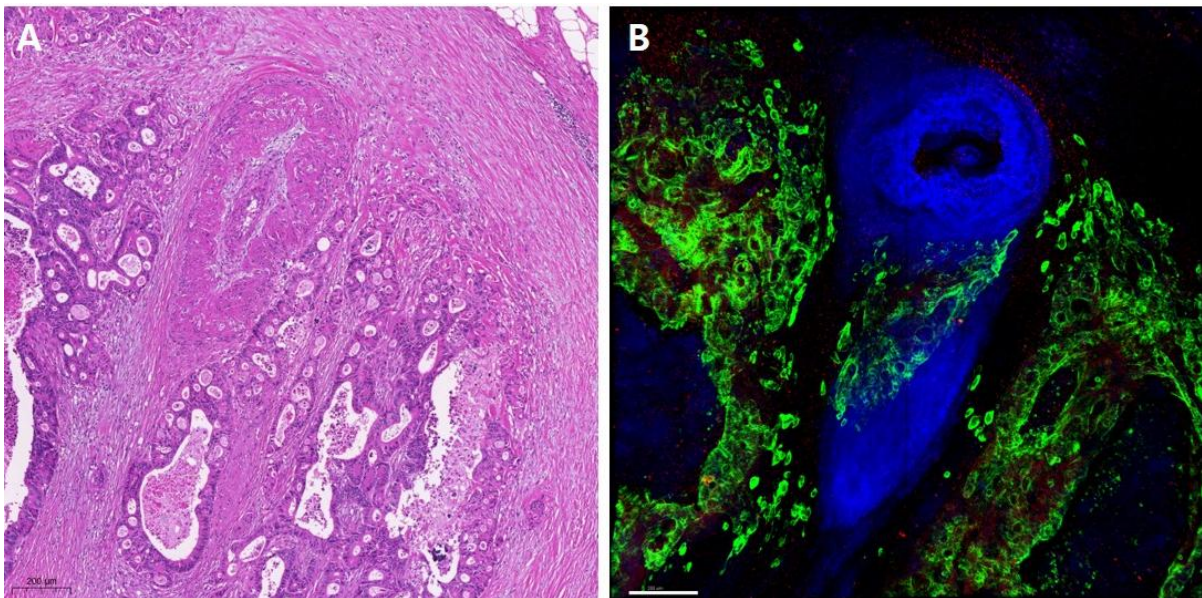


그림 15. 대장암 혈관침범의 H&E 슬라이드와 3차원 재구성 사진 비교. 혈관 벽 주위를 암세포가 둘러 쌓고 있음. [A, H&E 슬라이드 눈금막대, 200 μm, B, cytokeratin19 (초록색), E-cadherin (붉은색), desmin (파란색); 눈금막대, 200 μm]

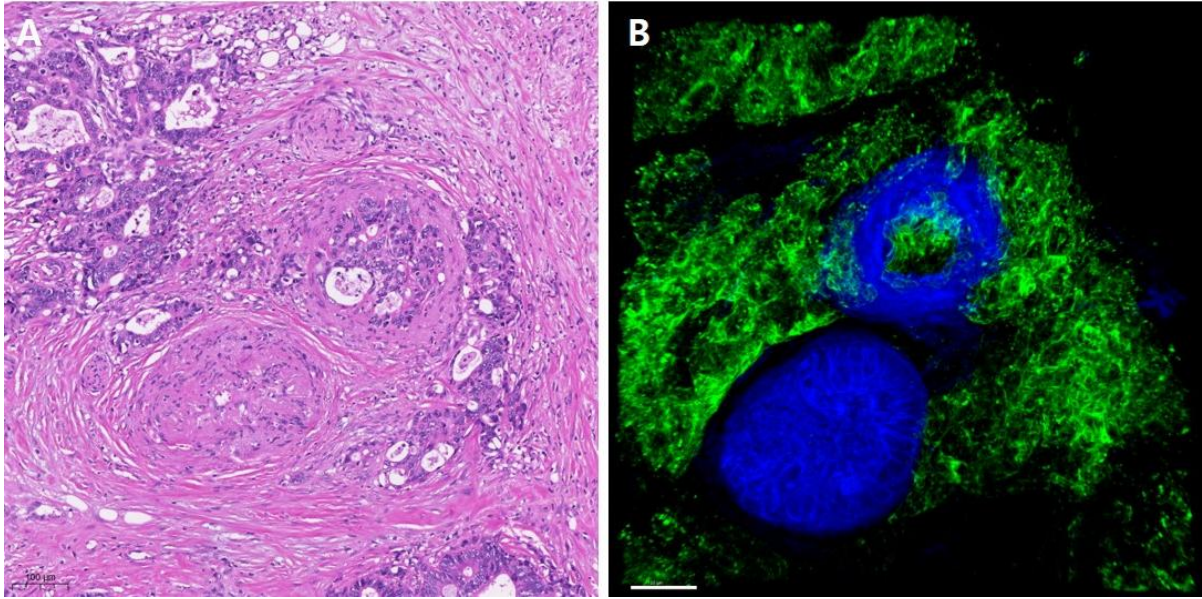


그림 16. 대장암 혈관침범의 H&E 슬라이드와 3 차원 재구성 사진 비교. 혈관침범을 한 암세포가 혈관 내부에서 관찰됨. [A, H&E 슬라이드 눈금막대, 100 μm , B, cytokeratin19 (초록색), desmin (파란색); 눈금막대, 100 μm]

토의(Discussion)

이번 3차원 분석에 의해 1) 대장암의 40%에서 혈관침범이 관찰되었고, 2) 암세포가 혈관으로 침범할 때에는 줄지어서 혈관벽으로 접근하였고, 3) 줄지어 있는 암세포의 끝부분에서는 e-cadherin의 발현이 소실되었다. 4) 암세포가 혈관벽을 뚫고 내부로 들어가서 혈관벽을 덮으며 자란 상태에서는 혈관 내피세포가 파괴되어 CD31의 발현이 관찰되지 않았다. 이때 암세포들은 정맥벽을 따라 붙어 있으며, 이때에 e-cadherin의 발현이 유지되는 것을 관찰하였다. 5) 평균 334.0 μm 의 길이에서 혈관침범이 관찰되었다. 그 외에도 3차원 시각화분석으로 정상 대장 관선은 일정하게 배치된 비슷한 크기의 암관선으로 분포하는 것을 관찰하였고 관선의 끝부분에 움이 관찰되었다. 관선과 관선 사이의 고유판에서 일정하게 분포하는 혈관이 관찰되었다. 대장암인 경우 분화도에 따라 다양한 모양의 암관선을 만드는 것이 관찰되었다.

여러 소화기계 장기에서 발생한 종양에서 암세포의 혈관침범은 궁극적으로 원격전이를 일으키며 환자의 예후와 연관이 있다 [51-53]. 소화기계 악성종양에 대한 H&E 슬라이드를 이용한 병리검사 결과, 췌장암에서의 혈관침범 빈도가 65%로 가장 높았고, 위암은 24%, 대장암은 21%로 비교적 낮은 빈도의 혈관침범이 관찰된다는 보고가 있다 [54-56]. 대장암은 췌장암에 비해 혈관침범의 빈도는 낮지만 평활근벽이 관찰되는 큰 혈관침범을 보일 경우 간 전이와 연관이 있고 불량한 예후를 보인다 [57-60]. 본원의 병리검사에서 2차원 H&E슬라이드 검경에 의한 혈관침범은 91건 중 24건 (26%)인데 비해, 3차원 재구성을 이용한 분석에서 전체 91건 중 41건 (45%)의 대장암 조직에서 혈관침범이 관찰되어, H&E슬라이드 검경 검사보다 3차원 재구성영상에서 더 높은 빈도로 혈관침범이 관찰하였다. 2차원 H&E슬라이드 검경에서 혈관침범을 낮은 빈도로 관찰되는 이유로 평균 두께가 3 mm인 포르말린고정 파라핀포매 암조직 블록에서 극히 일부의 절단면인 4 μm 에서 혈관침범을 찾는 통상의 병리검사법에서 발생할 수 있는 표본오차 (sampling error)의 영향을 받지 않았을까 추정한다. 또한, 평균 334.0 μm 의 길이의 혈관침범을 3차원 재구성영상으로 관찰하여 2차원 H&E슬라이드에서 놓쳤던 암세포의 혈관침범을 연속적인 영상정보로 확인할 수 있었다.

통상적으로 상피간엽이행은 암세포가 원발병소에서 벗어나 혈관안으로 침범하는데 아

주 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [27, 29, 30, 61]. E-cadherin은 정상 대장 상피의 세포막에서 발현하여, 상피세포와 상피세포를 접착하는 역할을 한다 [62]. E-cadherin의 소실은 상피간엽이행에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [27]. 예로 e-cadherin의 발현 소실은 Twist 등의 다수의 전사인자 (transcription factor)를 유도하여 궁극적으로는 원격전이 (distant metastasis)를 일으킨다 [63]. 대장암에서도 e-cadherin의 발현 소실이 대장암의 진행, 원격전이와 환자의 나쁜 예후에 연관이 있다는 여러 보고가 있다 [64-69]. 이번 연구에서 우리는 기질 (stroma)과 정맥의 관강 안에 있는 응집력이 좋은 (cohesive) 암세포에서 e-cadherin의 발현의 유지가 잘 이루어지는 것을 관찰하였다. 형태학적으로 응집력이 좋은 종양세포가 관선을 잘 만드는 것 (분화가 좋은 대장관선암에서 e-cadherin 발현의 유지)과 종합하여 볼 때, 대장암의 혈관침범에 있어서 암세포의 상피간엽이행은 일시적으로 발생하며 지속적으로 유지되지 않는 것으로 여겨진다. 대장암 세포가 주변으로 침범할 때, 종양의 중심부에서는 상피형 발현을 유지하지만, 종양의 선행하는 침범부위에서의 간엽형 발현을 보이는 등의 비균질적인 상피간엽이행이 나타난다는 보고도 이번 연구에서 우리의 관찰 결과와 맥을 같이한다 [70]. 또한, 커다란 응집력이 있는 암세포의 최첨단에 위치한 암세포의 돌기부분에서 e-cadherin의 발현이 불균일하게 나타나는 현상은 조직투명화를 적용한 3차원 웨장암 조직의 분석에서도 관찰되었던 소견과 동일 하다 [44]. 3차원 재구성 분석을 통해 발견된 대장암과 웨장암 조직의 혈관침범 부위에서 e-cadherin 발현이 유지되는 현상은, 소화기암의 혈관침범 과정의 일부에서 기존에 알려진 바와 다르게 상피간엽이행이 일어나지 않을 수 있다는 것을 시사한다.

최근 다양한 광학 조직 투명화 방법의 개발로 불투명한 조직 내부의 미세환경을 관찰할 수 있으며, 이를 3차원 시각화로 구현하는 연구가 활발히 이루어지고 있다 [16, 18, 19]. 우리는 변형 iDISCO법을 이용하여 사람의 대장 조직에 적용하였다. 현재까지 조직 투명화를 장관 조직에 적용하여 시행한 3차원 시각화에 대한 동물 연구는 주로 생쥐를 대상으로 이루어진 5건의 연구가 있다 (표 2). Fu 등은 생쥐 결장 조직에서 조직투명화와 3차원 시각화로 점막과 점막하 조직의 움과 용모, 결합조직의 공간적 관계를 시각화 하였다 [45]. Arranz 등은 염증성 대장염모델인 DSS 치료한 대장 점막 주름(mucosal fold)의 소실을 관찰하였다 [46]. Jing 등은 PEGASOS 방법을 제시하여 위장관계, 뼈, 치아 등을 포함한 동물 전체의 투명화를 보고하였다 [47]. Kaufman 등은 생쥐

공장(jejunum)의 움에서 EdU 양성인 상피세포를 시각화 하여, 소장에서 세포 증식을 3차원으로 시각화 관찰할 수 있다는 방법을 제시하였다 [39]. Liu 등은 대장 상피 및 장 신경계 이미징을 보여주었으며, 소화 기관 연구에 적용할 수 있는 최신 조직 투명화 방법을 제시하였다 [41].

표 2. 동물 대장 조직에서의 조직 투명화를 이용한 기존의 3차원 시각화 연구

Reference	Target	Method	Fluorescent probe	Evaluation	Microscope	Analysis software	Year
Fu et al.[45]	Mouse colon	FocusClear	nestin-GFP	Spatial relationships in crypts, villi, and connective tissue	LSM 510 (Zeiss, confocal), 2-photon/multiphoton microscopy	Amira 4.1.2	2009
Arranz et al.[46]	Mouse colon	BABB	Phalloidin	DSS-treated colitis model	Selective Plane Illumination Microscopy	Developed Reconstruction software	2013
Jing et al.[47]	Mouse colon	PEGASOS	GFP, tdTomato, GS-IB4	Endogenous fluorescence intensity, vasculature	Zeiss LSM 780, 880, two-photon microscopy	Imaris 9.0, ImageJ	2018
Kaufman et al.[39]	Mouse intestine	Iohexol-based RIMS	EdU	Cell proliferation within intestinal crypts	Leica TCS SPE confocal microscope	Leica LAS-X software	2018
Liu et al.[41]	Mouse colon	CUBIC-1, iDISCO	tdTomato, red-emitting TO-PRO-3 and photostable methyl green dyes, E-Cadherin, TUBB3	Whole mount tissue clearing for gastrointestinal tract research	Light sheet microscopy, conventional laser-scanning confocal microscopy	Imaris, ImageJ	2020

동물연구에 비해 사람의 대장조직을 이용한 3차원 영상연구는 상대적으로 적었다 (표 3). Liu 등 은 신경 및 근육과의 방향성에 따른 Cajal 간질 세포 네트워크가 여러가지 아형으로 나뉘는 것을 보고하였다 [48]. Liu 등 은 다른 보고에서 점막 움의 위치에 따른 신경교 네트워크(glia network) 분포 양상에 차이가 있음을 보고 하였다 [49]. Cambrian Y. Liu. 등은 종양 형성, 염증성 환경, 줄기세포 기능과 관련된 무린 결장 점막에서의 상피 구조를 밝혀냈다 [40]. Neckel 등은 동물과 인간의 장관에 조직 투명화와 다양한 항체 (cytokeratin, aquaporin4, ZO-1, TH, CD31, TUJ)을 이용하여 장관의 신경과학 연구에 적용할 수 있음을 제시하였다 [43]. 이러한 이전의 조직 투명화를 이용한 대장조직의 3차원 구조 연구 대부분이 점막의 환경 변화에 따른 시각화를 주로 다루었다. Liu 등은 정상 대장 CD34 를 이용한 점막과 대장선암종의 미세혈관의 분포를 비교하였고, 정상 대장 점막의 움 사이의 고유판 (lamina propria)에 미세혈관이 고르게 분포하는 것을 보고하였고 [50], 이는 우리가 CD31 을 이용하여 움 사이의 고유판에서 모세혈관(capillary)이 움과 일정한 간격을 두고 고르게 주행한다는 결과와 일치하였다. Lui 등은 또한 같은 논문에서 대장 관선암종에서 미세혈관이 암세포가 있는 부위에서 겹쳐서 (folded) 나타나며, 암세포-미세혈관-암세포-미세혈관 순서의 샌드위치 양상으로 관찰되는 것을 보고하였다 [50]. 우리도 이번 연구에서 종양세포 사이의 CD31 발현하는 혈관 내피 세포의 분포가 매우 복잡하게 나타남을 관찰하였고, 기존 인체조직을 사용한 3차원 조직연구에서 밝혀내지 못한 소견들을 관찰하였다.

저자가 알고 있는 범위에서 대장암 조직에서 혈관침범기전을 3차원으로 관찰한 것은 이번 연구가 처음이다. H&E 염색 슬라이드 검경에 의한 2차원 분석보다 3차원 병리조직학적 분석은 병변의 크기와 형태를 보다 정확하게 파악할 수 있다. 이번 연구에서 대장암 조직에서 평균길이 334.0 μm 의 혈관침범을 관찰하였고, 암세포가 정맥혈관벽에 붙어 관내강을 따라 뺨어나가는 현상을 관찰하였다. 우리가 관찰한 대부분의 혈관침범 부위의 대부분이 암조직 블록의 전체가 아닌 일부 또는 블록의 끝부분에 위치하기 때문에 관찰한 혈관침범의 길이는 최소한의 혈관침범 길이일 것으로 추정된다. 또한 3차원 영상을 비교적 중배율, 고배율에서 관찰할 수 있는 역위 공초점 레이저 스캔 현미경을 사용하여 관찰한 결과이기 때문에, 후속 연구에서 저배율로 3차원 조직을 관찰할 수 있는 빛 시트 현미경(light sheet microscope)을 이용하면 보다 긴 거리의

혈관침범과 더 높은 빈도의 혈관 안에서 밖으로의(extravasation) 암세포 이동에 대한 분석을 할 수 있으리라 생각한다.

조직투명화를 이용한 3 차원 영상분석은 대장암 연구에서 다양하게 이용할 수 있을 것이다. 예를 들면 직장암의 주변절제연(circumferential resection margin)에서의 암세포의 3 차원 분포 양상이 재발에 미치는 영향을 파악하거나, 수술 전 항암방사선 치료 후 직장암 수술조직에서 잔존암의 3 차원적 부피를 측정하고 부피가 재발율에 미치는 영향을 파악하거나, 점막절제술을 받은 조기 대장암에서 암세포가 점막하층을 침범한 부위를 3 차원적으로 측정하여 침범 깊이에 따른 수술적 치료방침 결정에 미치는 영향 파악하는 등 다양한 임상적인 미충족 수요를 해소하는데 있어서 조직투명화를 이용한 대장조직의 3 차원 영상분석이 사용될 수 있다.

이번 연구에서 혈관침범기전에 대한 정확한 지식은 대장암을 포함하여 다른 장기에서의 암의 진행과 전이를 이해하는데 있어 기초가 되는 시야를 제공할 것이다. 또한 3 차원적 관찰은 상피간엽이행 뿐만 아니라 암전이에 대한 새로운 기전을 밝히는데 유용한 방법이 될 것이다. 임상적인 측면에서 3 차원 조직투명화 및 다중형광면역염색을 통한 병변 부위의 연속적인 영상획득은 2 차원적 현미경 검사에서 놓칠 수 있는 부위를 정확하게 구현함으로써 진단의 도구로써 활용할 수 있을 것이다.

요약하면, 인간의 대장조직에서 혈관침범을 3 차원 조직형태학적으로 관찰하였고, 약 45%의 대장암에서 혈관침범을 관찰하였다. 암세포가 혈관으로 접근할 때 일부 암세포는 혈관과 가까운 쪽으로 돌기를 뺀고, 여러 암세포가 줄을 지어서 혈관벽 가까이 접근하였고, 혈관벽을 뚫고 들어갈 때 e-cadherin 의 발현이 유지되어 상피간엽이행이 혈관침범에 지속적으로 유지되지 않는 것을 관찰하였다. 조직투명화와 3 차원적 대장암 조직병리학적 분석은 상피간엽이행뿐 아니라 대장암의 발생, 진행, 및 전이과정에서 새로운 기전을 밝히고 임상적으로 대장암환자의 진단과 치료에서의 여러가지 다양한 미충족 요구를 해소하는데 도움이 될 수 있을 것이다.

표 3. 사람 대장 조직에서의 조직 투명화를 이용한 기존의 3차원 시각화 연구

Reference	Target	Method	Fluorescent probe	Evaluation	Microscope	Analysis software	Year
Liu et al.[48]	Human colon	FocusClear	CD117, α -smooth muscle actin	Location-dependent network orientation of interstitial cells of Cajal (ICC)	LSM 510 (Zeiss, confocal)	Avizo 6.2, Zen	2012
Liu et al.[49]	Human colon	FocusClear	S100B, D2-40, CD34	Enteric glial network interaction in mucosa	LSM 510 (Zeiss, confocal)	Avizo 6.2, Zen	2013
Liu et al.[50]	Human colon	FocusClear	CD34	Spatial information of microvasculature in normal and cancer tissue	LSM 510 (Zeiss, confocal)	Avizo 6.2, Zen	2013
Liu et al.[40]	Mouse colon, Human colon	ScaleA2 and SeeDB	MPO, CDH1, MUC2	Epithelial structures for research	LSM 700 (Zeiss, confocal)	ImageJ	2015
Neckel et al.[43]	Mouse and human intestine	CLARITY, PACT	CD31, TUJ-1, TH, Cytokeratin, ZO-1, aquaporin4, serotonin	Enteric nervous system	LSM 5 (Zeiss, confocal), light sheet microscope (Light-sheet Z.1, Zeiss), LEO 912AB transmission electron microscope (Zeiss)	Zen	2016

참고문헌(References)

1. Hong, S., et al., *Cancer Statistics in Korea: Incidence, Mortality, Survival, and Prevalence in 2017*. *Cancer Res Treat*, 2020. **52**(2): p. 335-350.
2. Wang, J., et al., *Metastatic patterns and survival outcomes in patients with stage IV colon cancer: A population-based analysis*. *Cancer Med*, 2020. **9**(1): p. 361-373.
3. Kallini, J.R., et al., *New Developments in Interventional Oncology: Liver Metastases From Colorectal Cancer*. *Cancer J*, 2016. **22**(6): p. 373-380.
4. Talbot, I.C., et al., *Invasion of veins by carcinoma of rectum: method of detection, histological features and significance*. *Histopathology*, 1981. **5**(2): p. 141-63.
5. Paschos, K.A., A.W. Majeed, and N.C. Bird, *Natural history of hepatic metastases from colorectal cancer--pathobiological pathways with clinical significance*. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(14): p. 3719-37.
6. Braet, F., et al., *The hepatic sinusoidal endothelial lining and colorectal liver metastases*. *World J Gastroenterol*, 2007. **13**(6): p. 821-5.
7. T, F., et al., *Vascular invasion, but not lymphatic invasion, of the primary tumor is a strong prognostic factor in patients with colorectal cancer*. *Anticancer research*, 2014. **34**(6).
8. Betge, J., et al., *Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer: prognostic significance and quality of pathology reporting*. *Cancer*, 2012. **118**(3): p. 628-38.
9. van Eeghen, E.E., et al., *Extramural Venous Invasion as Prognostic Factor of Recurrence in Stage 1 and 2 Colon Cancer*. *Gastroenterol Res Pract*, 2017. **2017**: p. 1598670.
10. Dawson, H., et al., *Optimizing the detection of venous invasion in colorectal cancer: the ontario, Canada, experience and beyond*. *Front Oncol*, 2014. **4**: p. 354.
11. Sato, T., et al., *Objective criteria for the grading of venous invasion in colorectal cancer*. *Am J Surg Pathol*, 2010. **34**(4): p. 454-62.
12. Kim, B.H., et al., *Standardized Pathology Report for Colorectal Cancer, 2nd Edition*. *J Pathol Transl Med*, 2020. **54**(1): p. 1-19.
13. Benson, A.B., et al., *Colon Cancer, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*. *J Natl Compr Canc Netw*, 2021. **19**(3): p. 329-359.
14. Kakar, S., et al. *Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Primary Carcinoma of the Colon and Rectum*. 2017 [cited 2017; Colon Rectum 4.0.1.0:]
15. Hong, S.M., Noë, M., Hruban, C. A., Thompson, E. D., Wood, L. D., & Hruban, R. H., *A "Clearer" view of pancreatic pathology: a review of tissue clearing and advanced microscopy techniques*. *Advances in Anatomic Pathology*, 2019: p. 26(1), 31-39.
16. Tian, T., Z. Yang, and X. Li, *Tissue clearing technique: Recent progress and biomedical applications*. *J Anat*, 2021. **238**(2): p. 489-507.
17. Chung, K., et al., *Structural and molecular interrogation of intact biological systems*. *Nature*, 2013. **497**(7449): p. 332-7.
18. Ariel, P., *A beginner's guide to tissue clearing*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017. **84**: p. 35-39.
19. Gómez-Gaviro, M.V., et al., *Biomedical Applications of Tissue Clearing and Three-Dimensional Imaging in Health and Disease*. *iScience*, 2020. **23**(8): p. 101432.
20. Sabdyusheva Litschauer, I., et al., *3D histopathology of human tumours by fast clearing and ultramicroscopy*. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 17619.
21. Lee, H., et al., *Improved application of the electrophoretic tissue clearing technology, CLARITY, to intact solid organs including brain, pancreas, liver, kidney, lung, and intestine*. *BMC Dev Biol*, 2014. **14**: p. 48.
22. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
23. Talmadge, J.E. and I.J. Fidler, *AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective*. *Cancer Res*, 2010. **70**(14): p. 5649-69.

24. Rejniak, K.A., *Investigating dynamical deformations of tumor cells in circulation: predictions from a theoretical model*. Front Oncol, 2012. **2**: p. 111.
25. Pearson, G.W., *Control of Invasion by Epithelial-to-Mesenchymal Transition Programs during Metastasis*. J Clin Med, 2019. **8**(5).
26. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
27. Chen, T., et al., *Epithelial-mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis*. J Cell Physiol, 2017. **232**(12): p. 3261-3272.
28. Guarino, M., *Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(12): p. 2153-60.
29. Micalizzi, D.S., D.A. Haber, and S. Maheswaran, *Cancer metastasis through the prism of epithelial-to-mesenchymal transition in circulating tumor cells*. Mol Oncol, 2017. **11**(7): p. 770-780.
30. Nieto, M.A., et al., *EMT: 2016*. Cell, 2016. **166**(1): p. 21-45.
31. Gurzu, S., et al., *Systematic review of the old and new concepts in the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(30): p. 6764-75.
32. Hugo, H., et al., *Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression*. J Cell Physiol, 2007. **213**(2): p. 374-83.
33. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(3): p. 178-96.
34. Schipper, J.H., et al., *E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis*. Cancer Res, 1991. **51**(23 Pt 1): p. 6328-37.
35. Kumaraswamy, S., et al., *Radiation-induced gene translation profiles reveal tumor type and cancer-specific components*. Cancer Res, 2008. **68**(10): p. 3819-26.
36. Renier, N., et al., *iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging*. Cell, 2014. **159**(4): p. 896-910.
37. Noë, M., et al., *Immunolabeling of Cleared Human Pancreata Provides Insights into Three-Dimensional Pancreatic Anatomy and Pathology*. Am J Pathol, 2018. **188**(7): p. 1530-1535.
38. Bossolani, G.D.P., et al., *Comparative analysis reveals Ce3D as optimal clearing method for in toto imaging of the mouse intestine*. Neurogastroenterol Motil, 2019. **31**(5): p. e13560.
39. Kaufman, J.A., et al., *Optical clearing of small intestine for three-dimensional visualization of cellular proliferation within crypts*. J Anat, 2018. **232**(1): p. 152-157.
40. Liu, C.Y., et al., *Optical reconstruction of murine colorectal mucosa at cellular resolution*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2015. **308**(9): p. G721-35.
41. Liu, C.Y. and D.B. Polk, *Cellular maps of gastrointestinal organs: getting the most from tissue clearing*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2020. **319**(1): p. G1-G10.
42. Fu, Y.Y. and S.C. Tang, *At the movies: 3-dimensional technology and gastrointestinal histology*. Gastroenterology, 2010. **139**(4): p. 1100-5, 1105.e1.
43. Neckel, P.H., et al., *Large-scale tissue clearing (PACT): Technical evaluation and new perspectives in immunofluorescence, histology, and ultrastructure*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 34331.
44. Hong, S.M., et al., *Three-dimensional visualization of cleared human pancreas cancer reveals that sustained epithelial-to-mesenchymal transition is not required for venous invasion*. Mod Pathol, 2020. **33**(4): p. 639-647.
45. Fu, Y.Y., et al., *Microtome-free 3-dimensional confocal imaging method for visualization of mouse intestine with subcellular-level resolution*. Gastroenterology, 2009. **137**(2): p. 453-65.
46. Arranz, A., et al., *Helical optical projection tomography*. Opt Express, 2013. **21**(22): p.

- 25912-25.
47. Jing, D., et al., *Tissue clearing of both hard and soft tissue organs with the PEGASO S method*. Cell Res, 2018. **28**(8): p. 803-818.
 48. Liu, Y.A., et al., *3-D illustration of network orientations of interstitial cells of Cajal subgroups in human colon as revealed by deep-tissue imaging with optical clearing*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012. **302**(10): p. G1099-110.
 49. Liu, Y.A., et al., *3-D imaging, illustration, and quantitation of enteric glial network in transparent human colon mucosa*. Neurogastroenterol Motil, 2013. **25**(5): p. e324-38.
 50. Liu, Y.A., et al., *3-D visualization and quantitation of microvessels in transparent human colorectal carcinoma [corrected]*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e81857.
 51. Keleg, S., et al., *Invasion and metastasis in pancreatic cancer*. Molecular Cancer, 2003. **2**(1): p. 1-7.
 52. Inada, K., et al., *The clinical significance of venous invasion in cancer of the stomach*. Jpn J Surg, 1990. **20**(5): p. 545-52.
 53. Sternberg, A., et al., *Conclusions from a study of venous invasion in stage IV colorectal adenocarcinoma*. J Clin Pathol, 2002. **55**(1): p. 17-21.
 54. Gresta, L.T., et al., *Assessment of vascular invasion in gastric cancer: a comparative study*. World J Gastroenterol, 2013. **19**(24): p. 3761-9.
 55. Hong, S.M., et al., *Vascular invasion in infiltrating ductal adenocarcinoma of the pancreas can mimic pancreatic intraepithelial neoplasia: a histopathologic study of 209 cases*. Am J Surg Pathol, 2012. **36**(2): p. 235-41.
 56. Hwang, C., et al., *Venous Invasion in Colorectal Cancer: Impact of Morphologic Findings on Detection Rate*. Cancer Res Treat, 2016. **48**(4): p. 1222-1228.
 57. Chapuis, P.H., et al., *A multivariate analysis of clinical and pathological variables in prognosis after resection of large bowel cancer*. Br J Surg, 1985. **72**(9): p. 698-702.
 58. Harrison, J.C., et al., *From Dukes through Jass: pathological prognostic indicators in rectal cancer*. Hum Pathol, 1994. **25**(5): p. 498-505.
 59. Knudsen, J.B., et al., *Venous and nerve invasion as prognostic factors in postoperative survival of patients with resectable cancer of the rectum*. Dis Colon Rectum, 1983. **26**(9): p. 613-7.
 60. Ouchi, K., et al., *Histologic features and clinical significance of venous invasion in colorectal carcinoma with hepatic metastasis*. Cancer, 1996. **78**(11): p. 2313-7.
 61. Serrano-Gomez, S.J., M. Maziveyi, and S.K. Alahari, *Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications*. Mol Cancer, 2016. **15**: p. 18.
 62. Schnoor, M., *E-cadherin Is Important for the Maintenance of Intestinal Epithelial Homeostasis Under Basal and Inflammatory Conditions*. Dig Dis Sci, 2015. **60**(4): p. 816-8.
 63. Onder, T.T., et al., *Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways*. Cancer Res, 2008. **68**(10): p. 3645-54.
 64. Canel, M., et al., *E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 2): p. 393-401.
 65. Christou, N., et al., *E-cadherin: A potential biomarker of colorectal cancer prognosis*. Oncol Lett, 2017. **13**(6): p. 4571-4576.
 66. Okugawa, Y., et al., *Clinical significance of serum soluble E-cadherin in colorectal carcinoma*. J Surg Res, 2012. **175**(2): p. e67-73.
 67. Cao, H., et al., *Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A systematic review*. Pathol Res Pract, 2015. **211**(8): p. 557-69.
 68. Gao, M., et al., *Expression analysis and clinical significance of eIF4E, VEGF-C, E-cadherin and MMP-2 in colorectal adenocarcinoma*. Oncotarget, 2016. **7**(51): p. 85502-85514.
 69. Dorudi, S., et al., *E-cadherin expression in colorectal cancer. An immunocytochemical and in situ hybridization study*. Am J Pathol, 1993. **142**(4): p. 981-6.

70. Brabletz, T., et al., *Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10356-61.

영문요약 (English Abstract)

Background: Colorectal cancers are the second common malignant neoplasms in Korea, and has a low survival rate when distant metastasis occurred. Venous invasion of colorectal cancer is associated with distant metastasis and epithelial mesenchymal transition is one of the suggested mechanisms. However, the exact mechanism of venous invasion is not well elucidated. The purpose of this study is to analyze venous invasion process three-dimensionally using tissue clearing and multicolor immunofluorescent labeling of colon cancer tissues.

Materials & methods: 91 cases (49 fresh frozen tissues with unknown information of vascular invasion and 42 formalin-fixed paraffin-embedded tissues which were confirmed with vascular invasion) of colorectal cancer tissues from patients with surgically resected colorectal cancers with more than T2 categories from 2019 to 2020 at Asan Medical Center were used for tissue clearing and multicolor immunofluorescence staining with cytokeratin19, desmin, CD31, and e-cadherin. The three-dimensional histopathologic reconstruction images were obtained with the confocal laser scanning microscope to determine the vascular invasion pattern of colorectal cancer.

Results: Cancer cells of colorectal cancer formed various degree of tubular structure based on the degree of differentiation of the tumor. In the three-dimensional analysis, vascular invasion was confirmed in 41 cases (45%) of a total of 91 colorectal cancer tissues. Mean length of venous invasion was $334.0 \pm 212.4 \mu\text{m}$ after 3 dimensional reconstructions. When the cancer cells approached to the blood vessel, the cancer cells stretched out processes, were lined up for approaching the blood vessel, destroyed the smooth muscle layer of the blood vessels, entered the vessel, grew along the inner wall of the vessel, and filled the

venous lumen. Various degree of e-cadherin expression was observed in cancer cells invading the surrounding stroma outside the blood vessels. In contrast, intact e-cadherin expression was noted when cancer cells approaching to blood vessels, but lost expression in the terminal portion, and expression of e-cadherin was observed in cancer cells grown in the inner wall after vascular invasion. Afterwards, when the cancer cells came out of the venous wall, the cancer cells did not form tubules and were as small clusters or single scattered cells, and lost e-cadherin expression. This shows that epithelial mesenchymal transition did not sustained in venous invasion of colorectal cancer.

Conclusions: Venous invasion was noted in 45% of colorectal cancers analyzed by 3D histopathologic image reconstruction Epithelial mesenchymal transition was not consistently sustained during the venous invasion process of colorectal cancers. Tissue clearing and 3 dimensional reconstructions of colorectal cancer tissues will provide a basis for understanding the tumorigenesis, progression and metastasis of colorectal cancers and will be helpful for resolving clinically unmet need in diagnosis and treatment of patients with colorectal cancers.