



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](#)

의학박사 학위논문

맞춤형 정밀 의료를 위한 환자 유래 전임상
오가노이드를 이용한 간세포암 연구 플랫폼

Hepatocellular carcinoma research platform using patient-
derived preclinical organoid toward personalized precision
medicine

울산대학교 대학원

의 학 과

강 상 현

맞춤형 정밀 의료를 위한 환자 유래 전임상
오가노이드를 이용한 간세포암 연구 플랫폼

지도교수 황신

이 논문을 의학박사 학위 논문으로 제출함

2020년 08월

울산대학교 대학원

의 학 과

강 상 현

강상현의 의학박사학위 논문을 인준함

심사위원 안철수 (인)

심사위원 황 신 (인)

심사위원 하태용 (인)

심사위원 정동환 (인)

심사위원 주선형 (인)

울산대학교 대학원

2020년 08월

국문요약

배경 및 목적 : 간세포암 연구를 위해 연구 플랫폼에는 2차원 세포주 배양법, 3차원 배양법, spheroid, patient-derived xenograft (PDX) 그리고 오가노이드가 있다. 각각의 연구 방법에는 특성 및 장단점이 있다. 연구자는 50 개체수의 간세포암 PDX 모델을 형성하여 연구를 진행하고 있으나, 개체 수를 유지하고 생존 시키기 위해선 막대한 비용이 든다. 이러한 PDX 모델을 대체하기 위해 오가노이드를 개발하고자 하였다.

방법 : 간세포암 오가노이드 모델을 형성하기 위해 Hanging drop 방식과, low-binding plate 2가지 방법을 이용하였다. 1차 간조직과 세포 외 기질을 배합하여 오가노이드를 형성하였고, 오가노이드 형성 과정을 관찰하고 비교하였다. 오가노이드의 각종 biomarker 발현을 확인하였다. 개발한 오가노이드를 동결 보존하여 생존을 확인하였다. 간세포암 PDX에서부터 채취한 조직으로 오가노이드를 형성하였다. 또한 형성된 오가노이드를 이용하여 이종 이식을 통해 마우스에서 PDX를 만들었다.

결과 : 정상 간 조직 오가노이드 및 간세포암 오가노이드를 성공적으로 개발할 수 있었다. 상호 호환성 확인을 위해, 5세트의 간세포암 PDX로부터 조직을 채취하여 Hanging drop 방식 및 low-binding plate 방법을 이용하여 오가노이드를 형성할 수 있었으며, 두 방법 모두 효율적이었다. 형성된 오가노이드를 이용하여 cisplatin을 이용하여 약물 스크리닝 시험을 시행하여 연구 플랫폼으로서의 적합성을 확인하였다. 또한 형성된 오가노이드를 이용하여 alpha-fetoprotein, keratin 등의 간세포암 biomarker 발현을 확인하였다. 간세포암 오가노이드로부터 세포를 추출하여 이종이식을 통해 다시 성공적으로 간세포암 PDX를 형성할 수 있었다. 간세포암 오가노이드를 영하 150℃ 액체 질소에 보존한 뒤 1개월 후 녹인 후 세포 활성도가 잘 유지됨을 확인하였다.

결론 : 이번 연구를 통해 1차 조직에서 유래된 인간 간세포암 오가노이드 및 정상 간 조직 오가노이드를 개발할 수 있었다. 또한 기존 플랫폼들과 상호호환성 및 보존성을 확인할 수 있었다. 간세포암의 오가노이드는 향후 개인 맞춤형 의학 치료 및 연구에 새로운 플랫폼으로 적합할 것이다.

목 차

국문요약	i
그림 목차	iv
서론	1
연구 방법	3
1. 정상 간세포 및 간세포암 조직을 이용한 오가노이드 모델 형성	3
(1) 인체 유래 간세포암을 이용하여, PDX 모델의 구축 및 일차배양의 확립	3
(2) 간세포암의 PDX 모델 유래의 Primary culture cell 확보	5
(3) 인간의 간세포암 1 차 조직을 활용하여 오가노이드 모델 관련 설계를 완성	7
(4) 구축한 오가노이드를 배양하면서 관찰	11
2. 구축된 정상 간 및 간세포암 조직의 오가노이드 모델에서 상동성 조사	11
3. 구축된 정상 간 및 간세포암 오가노이드에서 biomarker 발현을 조사	12
4. 구축된 간세포암 오가노이드와 항암제인 cisplatin 을 이용하여 drug screening test 를 시행	12
5. 구축된 정상 간 및 간세포암 조직의 오가노이드의 바이오뱅크에 보존 가능한지 확인	13
6. 간세포암 PDX 와 간세포암 오가노이드의 상호 호환성을 평가	13
결과	14
1. 간세포암 PDX 와 정상 간 조직 및 간세포암 오가노이드 형성 확인	14
2. Hanging-drop method 및 low-binding plate 방식의 오가노이드 모델 구축 비교	15
3. 정상 간 조직 및 간세포암 조직의 오가노이드 형태학적 비교	17
4. 1 차 조직 및 간세포암 PDX, 간세포암 오가노이드의 biomarker 발현 여부	19
5. 간세포암 오가노이드와 cisplatin 을 이용한 drug screening test	19
6. 오가노이드의 동결보존능력 평가	20
7. 간세포암 PDX 와 간세포암 오가노이드의 상호 호환성 평가	20
고찰	21
결론	29

참고문헌.....	30
영문요약.....	36

그림 목차

Figure 1. 환자 유래 간세포암의 NOD-SCID 마우스에 이종이식 및 종양 분리.	4
Figure 2. 인체로부터 1차 조직을 채취하여 1차 배아 세포주 확보.....	6
Figure 3. 1차 조직으로부터 다세포 오가노이드 모델 확립.	8
Figure 4. 1차조직을 이용하여 Hanging-drop 방식 및 Low-binding plate 를 사용하여 오가노이드 구축.	10
Figure 5. 간세포암 조직으로부터 비롯된 간세포암 PDX 및 간세포암 오가노이드 현미경 시야.	14
Figure 6. Hanging-drop method 및 low-binding plate 방식의 오가노이드 모델 형성과정.	16
Figure 7. 정상 간 조직 및 간세포암 오가노이드 형태학적 비교.	18

서론

2차원 세포주 배양법은 세포가 유래한 위치 본연의 성질과 조직 단위의 특성을 재현하기 힘들다는 애로 사항이 있으며, 또한 동물실험 모델은 인체와 유전적, 생물학적 특성면에서 다르기 때문에 약물 시험 반응의 신뢰성에 한계가 있다. 그 대안으로 최근 많은 임상연구에서는 환자 유래 이종이식 모델(patient-derived xenograft; PDX)이 활용 되고 있다. 그러나 PDX는 유지 관리 비용이 많이 들고 모델 자체를 동결 보존하기 어렵다는 점, 그리고 조작이 용이하지 않다는 단점 등이 있어, 대규모 약물 스크리닝에는 부적합하다. 2차원 세포 배양, 3차원 배양, 실험 동물 모델 등 기존 방법에서 발생하는 다양한 문제점을 해결하는 방안으로, 최근에는 이와 같은 문제점을 보완한 새로운 약물 스크리닝 플랫폼으로서 오가노이드가 주목받고 있다.

'오가노이드(organoid)'라는 용어는 역사적으로, 1차 조직(조직 하위 단위 또는 단일 세포), 배아 줄기세포(embryonic stem cell, ESC) 및 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC), 세포주(cell line), 그리고 여러 조직 유형들로 구성된 장기 외식편(explant)과 같은 전체 또는 분절된 기관에서 비롯된 모든 3차원 기관형 배양체(organotypic culture)를 포함하여 일컫는 용어이다.¹⁻² 한스 클레버스 박사 연구팀에서 최초로 장 오가노이드를 확립한 이후 뇌, 위, 췌장, 폐, 간, 허 등 여러 장기와 장기 연관 연부조직에 이르는 다양한 오가노이드가 구축

되었다.³⁻⁴ 다양한 암 환자의 조직 및 순환종양세포로부터 환자 별 특성이 보존된 암 오가노이드가 배양되었다.⁵⁻⁷ 오가노이드는 1차 조직, ESC 또는 iPSC에서 파생되어 나온 것으로, 자가 재생과 자가 조직화(self-organization)가 가능하며 본래 조직과 같은 기능을 하는 생체 외 3차원 세포 클러스터(3D cellular cluster)로 정의한다. 대부분의 오가노이드 조직은 생체 내 조직에 있는 간 층직세포, 기질세포, 면역세포, 신경세포들을 포함하고 있지 않기 때문에, 인체 조직의 구조와 유사하게 만들기 위해 인공적인 세포외 기질(extracellular matrix)를 사용한다.⁸⁻¹⁰

오가노이드는 무제한으로 증식할 수 있고 그 자체로 바이오 뱅크(biobank)로 동결 보존할 수 있으며, 전통적인 2D 단층 배양법과 유사한 기술을 사용하여 쉽게 조작할 수 있는 장점을 가진다. 1차 조직 유래 오가노이드에는 간 층직세포/기질세포가 없기 때문에 국소 미세환경으로부터 받는 영향을 제거할 수 있는 장점도 가진다. 또한 오가노이드는 2D 단층 배양 모델보다 생리학적으로 비슷하고, 생체 내 모델보다 주변 미세환경 구성요소(niche component), 신호 전달 경로 및 유전체 조작에 훨씬 더 간편하기 때문에 전통적인 2D 배양과 생체 내 마우스/인간 모델 사이의 중요한 다리 역할을 할 수 있다.

이에 이 연구에서는 인간의 정상 간조직과 간세포암 조직을 이용하여 새로운 항암제 스크리닝과 개인 맞춤형 의학 치료의 새로운 장을 여는 전임상 오가노이드 모델을 개발하고자 하였다.

연구 방법

1. 정상 간세포 및 간세포암 조직을 이용한 오가노이드 모델 형성

(1) 인체 유래 간세포암을 이용한 PDX 모델의 구축 및 일차 배양의 확립

환자 유래의 간세포암 조직을 면역력이 감소된 SCID 마우스에 이식하여 자라게 하는 PDX 모델을 완성하고 각 PDX의 분자적 / 조직학적 특성을 파악하였다.

① 환자의 간세포암 조직 0.2~0.3g 을 면역기능이 저하되어 있는 NOD-SCID 마우스 피하조직에 이식한다. 종양생성 유무를 확인 후 마우스로부터 간세포암 조직을 떼어 종양의 크기 및 무게 등을 측정하고 일부는 NOD-SCID 마우스에 재 이식하였다.

(Figure 1)



13S-11506
Implantation : 2013. 12. 18
Harvest : 2014. 02. 07

Figure 1. 환자 유래 간세포암의 NOD-SCID 마우스에 이종이식 및 종양 분리.

② PDX를 SCID mouse에 재 이식하여 다시 자라는 것을 확인하고 다수의 조직을 DMSO-FBS freezing media에 보관하여 환자 유래 암조직을 안정적으로 보존한다.

(2) 간세포암 PDX 모델 유래의 primary culture cell 확보

간세포암의 신약 개발을 위하여 PDX 세포를 이용하여 primary culture를 수행하였고, Figure 2 와 같은 간암 1차 배양 세포주를 확보하였다.

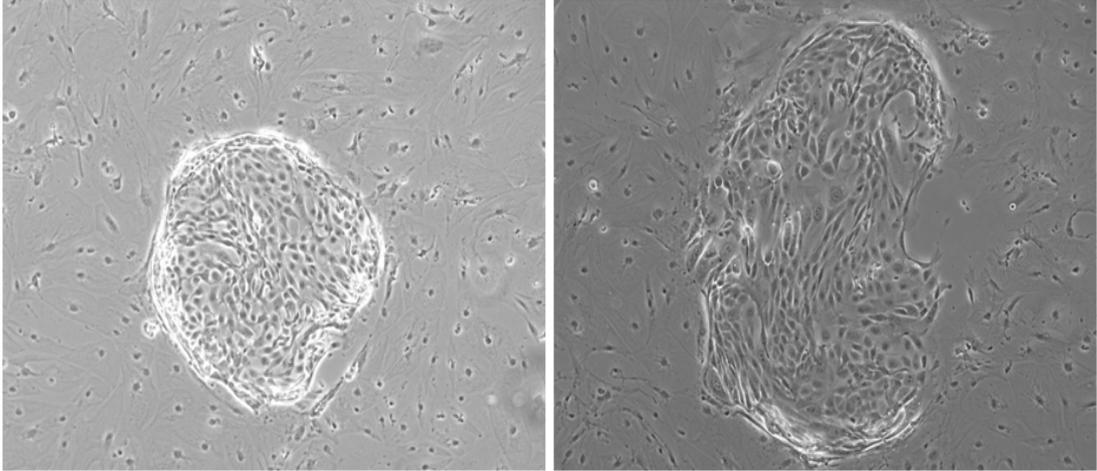


Figure 2. 인체로부터 1차 조직을 채취하여 1차 배아 세포주 확보.

(3) 인간의 간세포암 1차 조직을 활용하여 오가노이드 모델 관련 설계를 완성

① 정상 간 및 간세포암 오가노이드 모델은 1차 간세포조직과 혈관 내피세포, 섬유소세포 및 정상세포를 모두 혹은 일부를 각각 일정한 비율로 섞어서 다세포 종양 오가노이드 모델을 확립하였다. (Figure 3)

Human HCC and Liver Organoids

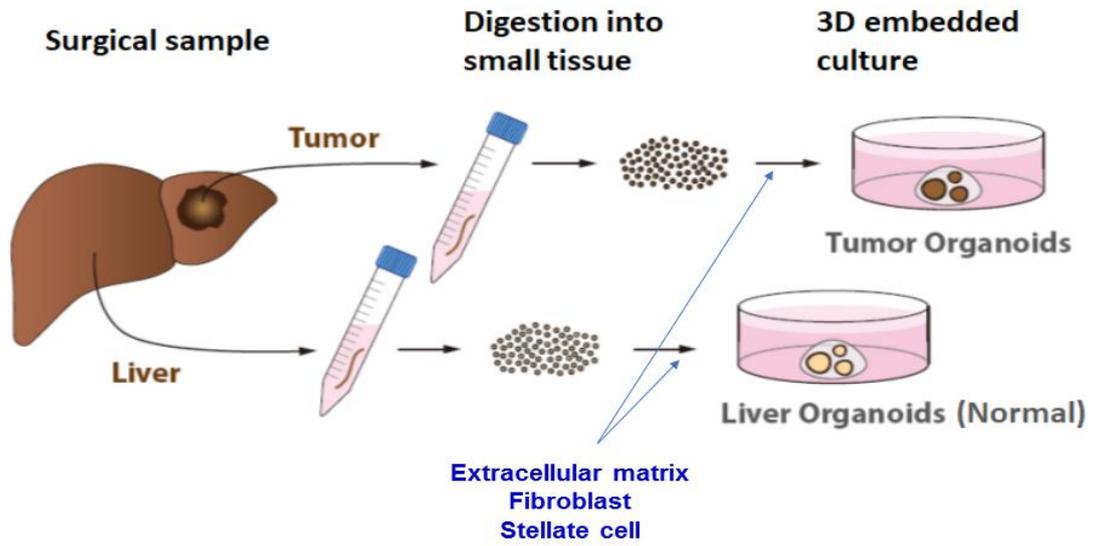


Figure 3. 1차 조직으로부터 다세포 오가노이드 모델 확립.

② HCC 1차 조직을 가지고 각 1개씩 Hanging drop 방식과 Low-binding plate를 사용하여 오가노이드를 구축하였다 (Figure 4).

A. *Hanging drop* 방식

1차 조직과 기질세포를 섞어서 HAM 배지에 suspension한 뒤 3D hanging-drop plate system (In Sphero, 3D Biomatrix)을 사용하여 30 ul씩 점을 찍듯이 petridish에 seeding한 후 7일 간 petridish를 뒤집은 채로 incubator에서 배양하였다.

B. Low-binding plate를 사용

1차 조직과 기질세포를 섞어서 HAM 배지에 suspension한 후 low binding 96 well plate (Corning)에 한 well 당 5,000개의 세포가 들어가도록 분주한 후 잠시 원심 분리하여 중앙에 오가노이드가 형성될 수 있도록 배양기에서 키웠다.

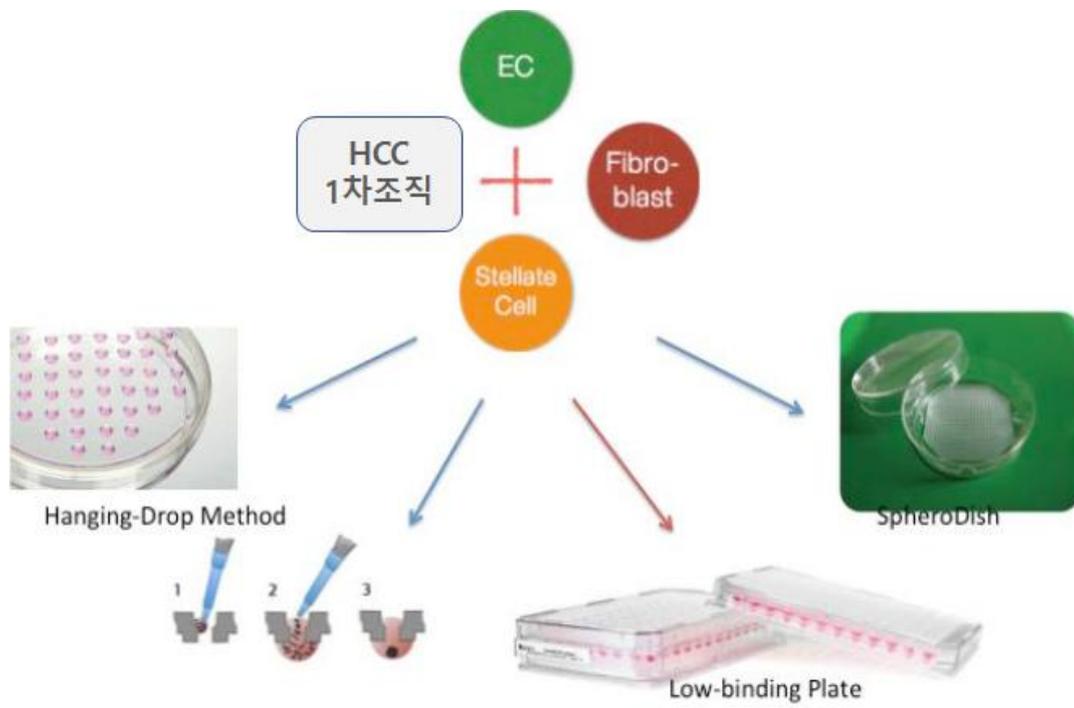


Figure 4. 1차조직을 이용하여 *Hanging-drop* 방식, Low-binding plate를 사용하여 오가노이드 구축.

(4) 구축한 오가노이드를 배양하면서 관찰

배양 배지는 FBS를 포함한 RPMI 배지와 FBS가 없는 stem cell 배지인 HAM 배지를 사용하여 spheroid 성장속도와 분화에 미치는 영향들을 파악하였고 10일 정도 오가노이드 형성을 관찰 및 기록하며 현미경으로 각각 사진을 찍어 크기를 측정하였다.

2. 구축된 정상 간 및 간세포암 조직의 오가노이드 모델에서 상동성 조사

1) 간세포암 오가노이드 모델에서 원조직과 상동성을 분석하기 위하여 Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)을 시행하였다. 단층배양 1차 세포조직과 오가노이드 모델에서 Total RNA를 Hybrid-R Total RNA purification kit (Gene All, Korea) 통해 분리 정제하였다.

2) 1 μ g의 RNA를 Prime Script RT Master Mix (Takara, Japan)을 이용하여 역 전사 시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 1:10으로 희석하여 Primer와 SYBR premix와 섞어준 후 CFX96 real-time PCR system (Bio-Rad)를 이용하여 qRT-PCR을 수행하였다. Nanog, Oct4, Sox2, CD44, CD133 gene expression 값은 CFX manager software (Bio-Rad)를 이용하여 $\Delta \Delta Ct$ 값으로 계산하고 reference gene으로는 CypA, RPL13A를 사용하였다. PCR program은 아래와 같은 설정에 따랐다 (initial pre-incubation step, 95 $^{\circ}$ C 1 min; 95 $^{\circ}$ C 5 sec, 60 $^{\circ}$ C 30sec, 45 cycle 반복). 마지막 증폭 cycle에서는 melt curve를 분석하여 PCR 증폭과정에서 각 gene들의 특이성을 제시하였다.

3. 구축된 정상 간 및 간세포암 오가노이드에서 **biomarker** 발현을 조사

- 1) 간세포 유래의 종양여부를 확인하기 위해 Hep-Par1(Hepatocyte specific antigen) 1차 조직에서 확인하였다.
- 2) 좋지 않은 예후를 시사하는 Migration/differentiation marker인 EpCAM(Epithelial cell adhesion molecule) 발현을 1차 조직에서 확인하였다.
- 3) 간세포암 특이 biomarker인 alpha-fetoprotein (AFP)의 발현을 1차 조직 및 간세포암 PDX, 간세포암 오가노이드에서 확인하였다.
- 4) Hepatic progenitor cell marker인 KRT-7과 KRT-19의 발현을 간세포암 오가노이드에서 확인하였다.

4. 구축된 간세포암 오가노이드와 항암제인 **cisplatin**을 이용하여 **drug screening test** 를 시행

총 3 개의 간세포암 오가노이드에 cisplatin 용량을 다르게 하여 cell viability를 확인하였으며, 이를 통해 간세포암 오가노이드를 실제로 drug screening test에 사용할 수 있는지 확인하였다.

5. 구축된 정상 간 및 간세포암 오가노이드의 바이오뱅크에 보존가능한지 확인

구축된 오가노이드를 영하 150℃ 액체 질소 탱크에 보관하였으며, 1개월뒤 이를 melting 하여 viability를 확인하였다.

6. 간세포암 PDX와 간세포암 오가노이드의 상호 호환성을 평가

간세포암 조직으로부터 비롯된 간세포암 오가노이드에서 1차 배아 세포주를 다시 분리하였고 이를 NOD-SCID mouse에 이종이식으로 하여 간세포암 오가노이드에서 비롯된 간세포암 PDX를 만들어 보았다.

그와 반대로 인체의 간세포암 조직에서 비롯된 간세포암 PDX에서 1차 배아 세포주를 채취하여 이를 가지고 간세포암 오가노이드도 만들어 보았다.

결과

1. 간세포암 PDX 를 만들었으며, 정상 간 조직 및 간세포암 조직으로부터 비롯된 organoid를 만들었다. (Figure 5)

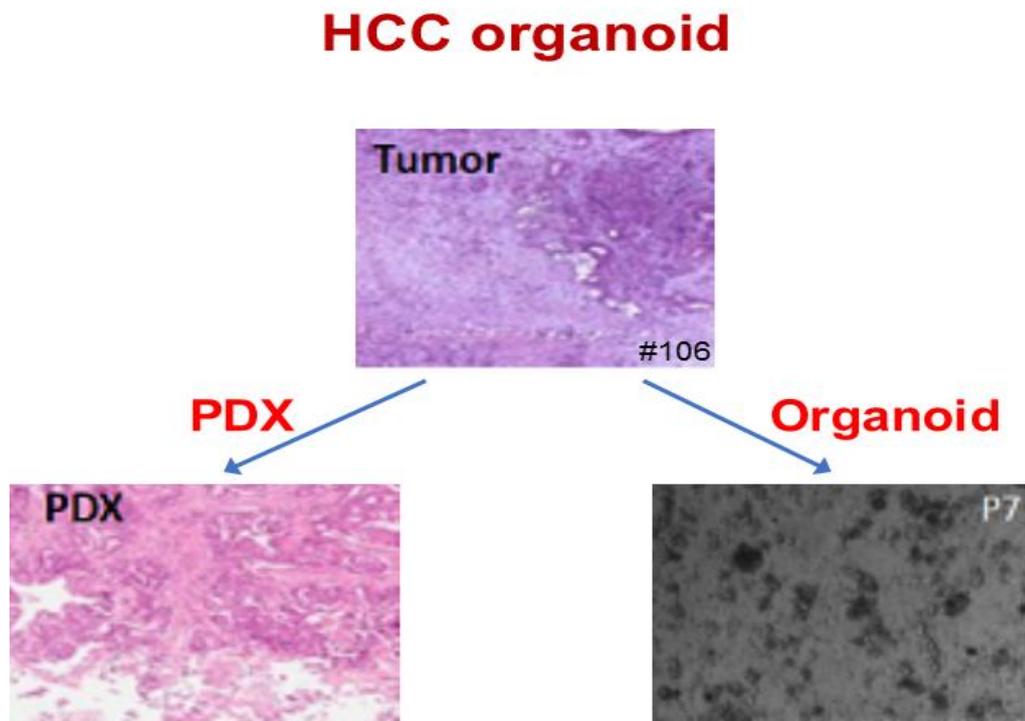


Figure 5. 간세포암 조직으로부터 비롯된 간세포암 PDX 및 간세포암 오가노이드 현미

경 시야 사진

2. Hanging-drop method 및 low-binding plate 방식의 오가노이드 모델

구축 비교

오가노이드 구축 방식에 따른 차이를 비교하기 위해 현미경으로 비교해 보았으나, 방식에 따른 차이는 보이지 않았다 (Figure 6).

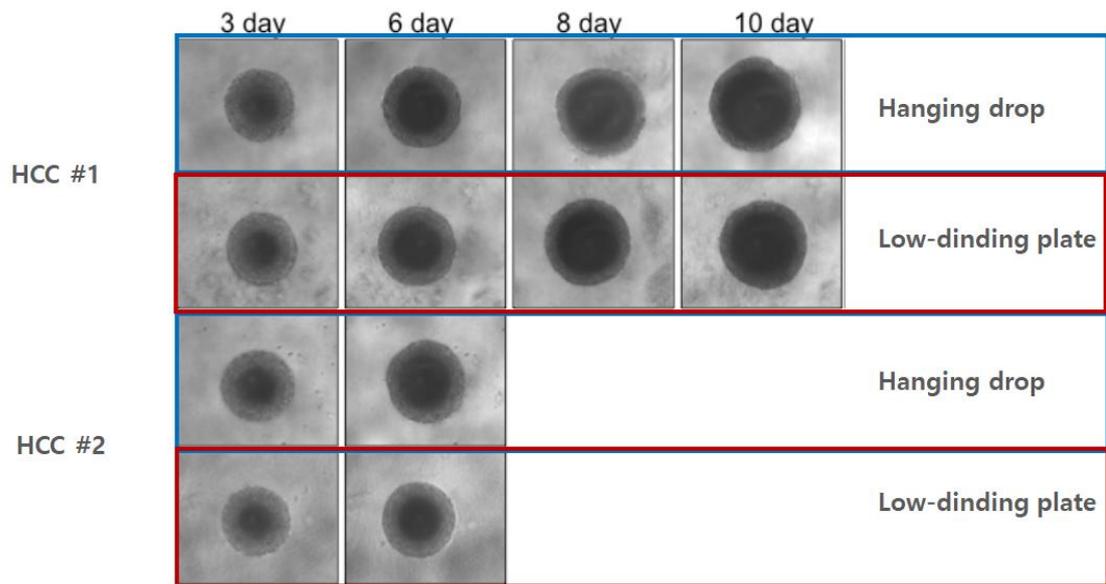


Figure 6. Hanging-drop method 및 low-binding plate 방식의 오가노이드 모델 형성과정

3. 정상 간 조직 및 간세포암 조직의 오가노이드 형태학적 비교

구축한 오가노이드를 형태학적으로 비교해 보면 정상 간 조직에서와 달리 간세포암 오가노이드의 H&E 염색 사진에서 cell 들이 밀집되어 있는 것을 관찰하였다 (Figure 7).

이는 tumor cell 들이 고밀도도 밀집되어 있음을 의미한다. 이를 저 배율 시야로 확인해보면, 이러한 특징이 더 잘 관찰되었다. 고 배율 시야로 확대하여 살펴보면, 정상 간 조직 오가노이드는 크게 원 형태의 선으로 cell 들이 관찰되며, 이와 달리 간세포암 오가노이드는 tumor cell 들의 밀집으로 인해 cell 들이 뭉쳐져 있는 형태로 관찰되었다. 간세포암 오가노이드의 경우 stem cell 과 같이 분화도가 높고 증식능이 높은 cell 로 구성된다는 것을 알 수 있다.

Morphological comparison

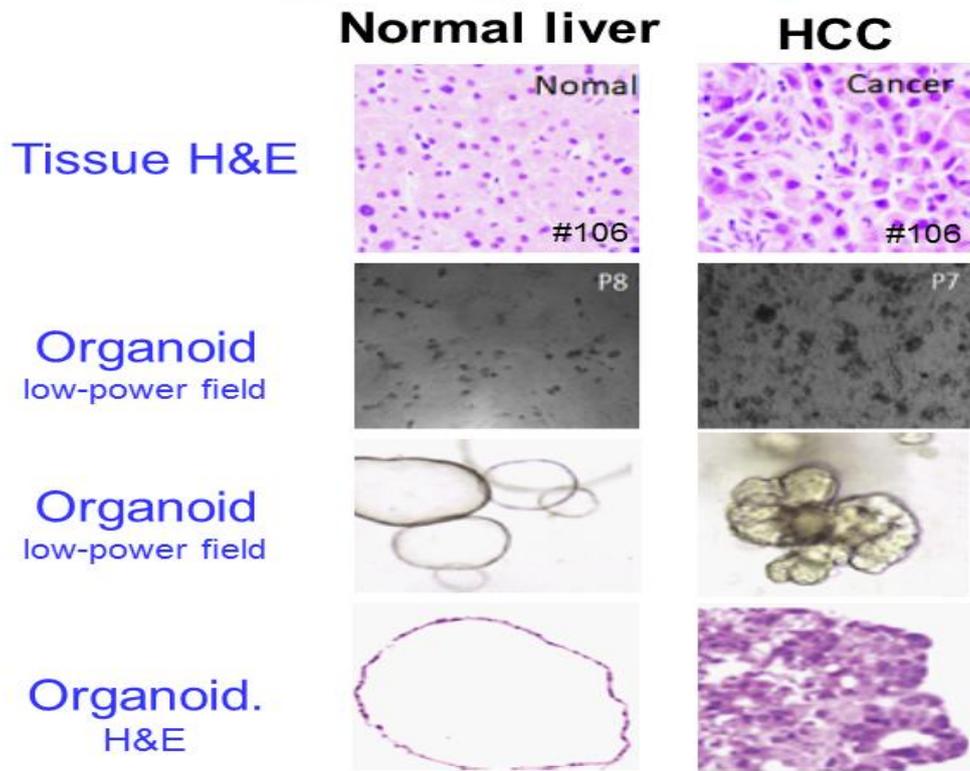


Figure 7. 정상 간 조직 및 간세포암 오가노이드 형태학적 비교

4. 1차 조직 및 간세포암 PDX, 간세포암 오가노이드의 biomarker 발현 여부

정상 간 조직과 간세포암 조직 그리고 간세포암 PDX, 간세포암 오가노이드들에서 각종 biomarker가 잘 발현되는지 확인하였다.

Hep Par1은 hepatocyte 기원의 tumor임을 나타내는 biomarker로 정상 간 조직에서도 발현을 보이지만 간세포암 조직에서 더 잘 발현되는 것을 관찰할 수 있다. 이는 간세포암 조직에서 hepatocyte들이 더 많이 증식되어 있기 때문이며, 이를 통해 연구에 사용된 인체 조직이 간세포 암임을 확인할 수 있다.

EpCAM은 migration 및 differentiation marker로 발현도가 높을수록 예후가 좋지 않은 분화도가 낮음을 의미한다. 정상 조직보다 간세포암 조직에서 더 잘 발현되는 것을 관찰할 수 있었다.

AFP는 간세포암의 특징적인 marker로 잘 발현될 수록 예후가 좋지 않음을 나타낸다. 간세포암 오가노이드에서 간세포암 조직과 간세포암 PDX에 비해 좀더 잘 발현되어 나타나는 것을 관찰할 수 있다.

KRT-7과 KRT-19 주로 hepatic progenitor cell에서 잘 발현되는 biomarker로, 간세포암 오가노이드에서 더 잘 발현되어 나타나는 것을 관찰할 수 있었다.

5. 간세포암 오가노이드와 cisplatin 을 이용한 drug screening test

간세포암 오가노이드에 cisplatin 을 용량을 달리 주입하여 cell viability 를

확인하였으며, cisplatin 용량이 1 μ M 에서는 control 과 큰 차이를 보이지 않았으나, cisplatin 용량이 10 μ M, 20 μ M 으로 올라갈수록 cell viability 가 확연하게 떨어지는 것을 확인 할 수 있었다.

6. 오가노이드의 동결보존능력 평가

구축된 오가노이드를 영하 150°C 액체 질소 탱크에 보관하였으며, 1 개월뒤 이를 해동 처리하여 viability 를 확인하여 동결 보존이전과 cell viability 가 차이 나지 않음을 확인할 수 있었다.

7. 간세포암 PDX와 간세포암 오가노이드의 상호 호환성 평가

간세포암 조직으로부터 비롯된 간세포암 오가노이드에서 1차 배아 세포주를 다시 분리하였고 이를 NOD-SCID mouse에 이종이식으로 하여 간세포암 오가노이드에서 비롯된 간세포암 PDX를 만들 수 있었다.

역으로 인체의 간세포암 조직에서 비롯된 간세포암 PDX에서 1차 배아 세포주를 채취하여 이를 가지고 간세포암 오가노이드도 성공적으로 만들 수 있었다.

본 연구에서는 총 3개의 증례에서 이와 같이 간세포암 PDX와 간세포암 오가노이드의 상호 호환성을 확인할 수 있었다.

고찰

현재까지 암을 위한 임상 연구는 다양한 방법으로 이루어져 왔다. 초창기의 2차원적 세포주 배양을 이용하여 많은 연구를 진행하기도 하였고, 여러가지 방법의 동물실험도 있고 최근에는 동물에 이종 이식을 이용한 PDX를 통한 연구가 많이 이루어지고 있다. 2차원 세포주 배양은 조직 단위의 특성을 재현하기 힘들며, 동물실험은 인체와 유전적, 생물학적 특성이 다르기 때문에 그 신뢰성을 확보하는데 어렵다는 단점들이 있다. 이종 이식을 이용한 PDX가 그나마 많은 단점들을 보완한 방법으로 많이 시행되고 있다. 실제로 연구자는 PDX를 이용한 *in vitro* 연구로 간세포암 PDX로부터 cell culture를 시행하여 이를 이용하여 metformin과 sorafenib의 약물 효능 연구를 시행하기도 하였고, *in vivo* 연구로 간세포암 PDX를 이용하여 sorafenib과 everolimus의 약물 효능 연구를 시행하기도 하였다.¹¹ 그러나 이러한 PDX를 이용한 연구는 암 종별 차이가 있으나 이종이식 형성의 성공율이 대체로 높지 않은 편이며, 구축될 때까지 수 개월의 시간이 소요됨에 따라 그 유지 관리 비용이 많이 들고, 조작과 동결보존 등이 용이하지 않다는 단점이 있다. 그리고 환자에서의 암 미세환경을 정확히 재현할 수 없고, 이종이식 동물의 미세환경으로 오염되어 제한된 재현성을 보여 대규모 약물 스크리닝 시험에는 이용하기가 어렵다.¹²⁻¹⁴ 최근엔 이러한 단점을 보완할 수 있는 새로운 연구 방법인 오가노이드를 이용한 방법이 각광받고 있다. 오가노이드는 생체 기관과 유사한 기관형 배양체를 일컫는 말로 인체의 각 기관에 대한 각각의 오가노이드를 형성할 수 있다.

오가노이드가 임상 연구의 새로운 플랫폼으로 조명 받기 시작한 것은 낭포성 섬유증 (cystic fibrosis) 환자의 오가노이드 모델링을 통해서였다. 낭포성 섬유증은 CFTR 유전자 변이로 인해 발생하는 질환으로 정상 직장 오가노이드의 경우 forskolin 약물에 반응해서 부종이 나타났지만, 낭포성 섬유증 환자에서 비롯된 직장 오가노이드의 경우에는

반응이 나타나지 않았다. 이러한 부종 반응은 CFTR 유전자 회복 약물에 의해 다시 나타났다. 이렇게 낭포성 섬유증 환자의 오가노이드는 CFTR 유전자 기능을 회복할 수 있는 약물개발에 활용되고 있다.¹⁵⁻¹⁸ 이러한 시험 이후 최근에 단일 유전자 변이에 의한 질환 및 암 등의 다양한 질병 모델 오가노이드를 통한 약물 반응 시험, 신약 스크리닝 시험, 새로운 연구 모델 확립 등에 오가노이드가 활용되고 있는 추세이다.

조직 특이적 오가노이드 모델의 개발은 적합한 실험 모델, 질병 모델의 부재를 해결할 획기적인 방법이다. 췌장암은 예후가 매우 좋지 않고 치료제 개발이 미흡한 암이다. 이는 연구와 약물 시험에 적합한 모델 형성이 매우 어렵기 때문이었다. 그러나 최근 환자의 췌장암 조직으로부터 배양한 췌장암 오가노이드는 환자의 특이적인 조직학적, 특징, 생리활성을 재현할 수 있었고, 이 오가노이드를 이용한 이종이식으로 형성된 췌장암은 원발 암과 매우 유사한 특성을 갖고 있었다. 이를 통해 시행한 H3K27me3의 히스톤 메틸전달효소(EZH2) 저해 약물 시험을 통해 치료제 개발의 가능성을 보여주었다.¹⁹ ²⁰ 암세포와 미세 환경의 비균질성으로 인해 예후가 좋지 않은 뇌종양인 악성 교모세포종(glioblastom) 환자의 암 오가노이드 역시 저 산소 농도 차, 암줄기세포의 비균질성을 재현하여 진단과 치료 시스템으로 활용될 수 있는 잠재성을 보여주었다.²¹

최근 염기서열 분석 기술의 발전과 분석 비용의 절감으로 인해 환자의 유전체 정보에 대한 접근과 활용이 쉬워지고 있으며, ICGC(international Cancer Genome Consortium), TCGA(The Cancer Genome Atlas)와 같은 컨소시엄이 구성되어 유형별 암 환자의 대규모 유전체 정보가 축적되고 있다. 다양한 암 환자의 유전체 정보는 암의 유전적 영향에 대해 새로운 시각을 제시해 줄 뿐 아니라 새로운 치료 표적을 발굴하는 데에도 중요하다.²²⁻²³ 그러나 이 유전체 정보를 기반으로 유전 변이 기능을 이해하고 치료 반응에 대한 영향을 검증할 수 있는 전임상 시험 모델은 여전히 제한적이다. 오가노이드 배양 기

술의 발전으로 암 환자로부터 암 오가노이드를 *in vitro* 환경에서 배양하게 되면서 암 오가노이드 기반 약물 스크리닝이 가능 해졌다. 유전체 정보를 환자의 치료 선택에 활용하기 위해서는 환자 별 약물 감수성을 검증할 수 있는 전임상 약물 시험 플랫폼이 필요하다. 따라서 환자 오가노이드 기반 약물 스크리닝 플랫폼과 PDX 모델이 유용하게 활용될 수 있다. 기존 PDX 모델과 환자 오가노이드 기반의 약물 스크리닝 시험 결과를 비교 검증하여 실제 환자의 치료 전략 수립 및 효과적인 치료제 적용 결정의 근거로 사용할 수 있다.

오가노이드 기반 약물 스크리닝 플랫폼의 핵심 가치는 바이오 बैं크 기반 대규모 신약 스크리닝 수행에 있다. 오가노이드를 활용하게 되면 다수 환자의 암 조직으로부터 암 오가노이드를 배양하고 이를 통해 바이오 बैं크를 구축하고 신약 검증 시험으로 선별된 약물에 대해 임상 연구 수행이 가능해진다. 또한 새로운 적응증 확대를 위한 약물 검증 시험도 가능하다. 암 오가노이드 기반 플랫폼은 암 유전체 정보 기반 치료와 임상 적용간 간극을 메워준다. 환자 별 오가노이드 바이오 बैं크는 휘브레흐트 오가노이드 기술 연구소에서 대장암 환자의 정상 장 조직 및 대장암 오가노이드 바이오 बैं크를 구축하고 환자 오가노이드 유전체를 분석하면서 시도되었다.^{24,25} 환자 유래 암 오가노이드는 특정 표적 치료가 가능한 환자를 선별하는데 활용될 수 있다. 암 오가노이드가 임상 결정의 플랫폼으로 검증되면 전임상 단계에서 부작용감소, 치료 비용 절감, 높은 치료 효과를 기대할 수 있는 신약 개발에 활용될 수 있을 것이다.

현재 1차조직으로부터 만든 오가노이드로 허에서 결장에 이르기까지 마우스 위장관 많은 부위에서 오가노이드를 성공적으로 형성하였다. 미국에서는 존스 홉킨스 병원에서는 알츠하이머 치매나 뇌졸중 등 뇌신경질환 연구의 효율성을 높일 수 있는 ‘미니 뇌’를 제작하기도 하였으며,²⁶ 유도만능줄기세포(iPSC)를 이용하여 만든 오가노이드 뇌를

이용하여 지카 바이러스 발병 연구하기도 하였다. 2016년 중남미 지역에서 창궐한 지카 바이러스는 태아의 소두증의 원인으로 지목되었으나 바이러스와 뇌 발달의 상관 관계를 연구하기 위한 실험모델이 없었다. 그러나 오가노이드 뇌를 이용하여 지카 바이러스 감염이 신경줄기세포의 사멸과 자식작용을 유도하는 신경발달 손상 기전을 규명할 수 있었고 치료제 개발에 새로운 길을 개척하였다.²⁷⁻²⁸ 또한 하버드 연구팀은 실험 쥐의 위장과 십이지장 사이의 상피세포로 iPSC를 만든 뒤 이를 이용하여 인슐린을 분비하는 베타세포로 분화 시켜 인공 위장을 제작하여 이것을 쥐에 이식 성공하기도 하였다. 미국 스크 생물학연구소 연구팀은 인간 피부세포를 역분화시켜 만든 유도만능 줄기세포를 신장 전구세포로 분화한 뒤 쥐 배아 신장세포와 재조합 하여 3차원 미니 신장 배양에 성공하였고,²⁹ 2014년 미국 신시내티 아동병원 의학센터 연구팀은 인간 유도만능 줄기세포를 posterior foregut 단계에서 3차원 분화하여 위 오가노이드를 제작하였다.³⁰ 2015년에는 미국 캘리포니아 버클리대 교수팀과 미국 글래드스톤 연구소 교수팀이 인간 배아 줄기세포와 유도만능 줄기세포에 생물리학적 환경을 조성해주는 방법으로 공간적 3차원 분화를 유도하여 0.5mm 크기의 실제로 박동하는 미니 심장을 제작하였다.³¹ 일본에서는 도쿄대-교토대 공동연구로 환자의 iPSC를 배양하여 연골세포를 만든 뒤 사람의 귀 형상을 만들어 이를 실험 쥐에 이식 성공하여 인공 귀를 개발 하였으며, 오사카 대에서는 사람 눈의 외배엽 세포에서 얻은 iPSC로 눈을 구성하는 여러 세포로 분화 시켜 인공 눈 조직을 배양해 눈 먼 토끼에 이식시켜 시력을 회복시킨 연구도 시행하였다.³² 2013년 일본 요코하마 시립의대 연구팀은 유도만능줄기세포를 간 전구세포로 분화한 뒤 태줄에서 얻은 혈관세포와 골수에서 얻은 중간엽 줄기세포를 섞어 배양해 3차원 ‘간 씨앗(liver bud)’ 제작에 성공하였다.³³ 영국에서는 자궁내막조직에서 세포를 채취하여 배양한 자궁내막 오가노이드 개발에 성공하기도 하였다.³⁴ 2017년에는 영국 캠브리지 대학 연구팀에서 사람의 간암에서 유래된 간암 오가노이드 모델을 제작하여 맞춤형 치료

에 활용가능성과 새로운 항암제 타겟 유전자를 발굴하는데 성공하였다.³⁵

국내에서도 안전성평가연구소에서 독성 평가 모델, 대량 세포 제작, 3차원 배양 등 오가노이드 개발에 필요한 공통 기반 기술을 개발하였고, 온도 감응성 고분자를 이용해 개발한 ‘3D spheroid 형성, 배양법’을 통해 생명과학 연구 기자재 개발 기업에 기술 이전도 시행하였다. 한국생명공학연구원은 실험 동물 대체용 인공실험체(NOCS) 구현 사업을 통해 실험 동물 대체를 위한 오가노이드 기반 시험법을 개발 중으로 배양접시를 층층히 쌓아 3차원으로 만든 새로운 순환 배양기 개발을 통해 각각의 오가노이드를 담은 배양 접시들이 관으로 연결되어 체내 장기들이 혈관으로 연결되어 있는 형태를 구현하기도 하였다. 서울아산병원 연구팀에서는 개인별 특성을 재현한 폐암 오가노이드 배양에 성공하였다. 정상세포를 억제하고 폐암세포만을 선택적으로 키워 암 조직구조를 이루게 하는 방법을 이용하여 폐암 오가노이드를 구축하였다. 그러나 현재 국내 연구진 대부분은 성체줄기세포(ASC)나 iPSC를 이용하는 방법으로 오가노이드를 제작하고 있으며 1차 인체 조직을 이용한 간의 오가노이드 제작은 거의 보고된 바가 없다.

우리나라에서 원발성 간세포암은 전체 암 발생의 6위를 차지 하고 있으며 이중 대부분은 간세포암으로 76%에 달한다. 간세포암은 사망률이 3위로 예후가 매우 불량한 암종으로,³⁶⁻³⁷ 이는 근치적 치료 후에도 재발이 흔하고 진단 당시 진행된 경우도 많아 근치적 치료가 불가능한 경우도 많기 때문이다.³⁸ 그러므로 간세포암을 이용한 다세포 종양 오가노이드 모델의 개발은 실제 종양이 자라는 환경을 모방할 수 있고 실제 환자의 종양과 비슷한 특성을 가지므로 간세포암에 대한 치료법 개발에 큰 역할을 할 수 있다. 그리고 다른 종양에 비해 환자마다 다양한 치료 반응과 예후를 보이는 간세포암에 대한 연구를 위해 환자 유래 간암세포를 이용한 다세포 종양 오가노이드를 구축하는 것이 향후 간세포암 연구에 필수적일

것이다.

이 연구에서는 1차 인체 조직인 인간의 정상 간조직과 간세포암 조직을 이용하여 새로운 항암제 스크리닝과 개인 맞춤형 의학 치료의 새로운 장을 여는 전임상 오가노이드 모델을 성공적으로 개발해 보았다.

50건 이상의 간세포암 조직 구득하였으며 이를 이용하여 오가노이드 형성 및 오가노이드와 비교, 상호호환성 평가를 위해 간세포암 PDX를 제작하였다. 줄기세포가 아닌 1차 조직인 정상 간조직과 간세포암 조직을 이용하여 성공적으로 오가노이드를 형성하였으며 이를 현미경 하에 비교해 보았을 때, 세포 증식 및 밀집 등 간세포암의 특징적인 소견이 오가노이드에서 더 잘 관찰되는 것을 확인하였다.

오가노이드 모델 구축 방법으로 Hanging-drop method 및 low-binding plate 방식을 사용하였는데, 오가노이드 형성 성공 및 배양, 성장에서 두 방식 간의 유의미한 차이는 확인하기 힘들었다. 현미경 시야 및 H&E염색에서 관찰된 모습을 볼 때 오가노이드는 간세포암의 증식능, 분화능이 더 잘 반영되어 나타났다. 이는 간세포암 오가노이드가 stem cell 특징을 더 잘 나타내는 것으로 볼 수 있다.

Biomarker의 발현에서도 간세포암 오가노이드에서 AFP, KRT-7, KRT-19이 특징적으로 더 잘 발현되는 것을 관찰할 수 있었는데, 이들은 간세포암에서 좋지 않은 예후를 나타내는 biomarker이다. 이는 이러한 biomarker들이 세포의 증식능력과 분화능력을 나타내기 때문으로 간세포암 오가노이드에 더 잘 발현된다는 것은 간세포암 오가노이드가 간세포암의 분화능 및 증식능의 특징을 더 잘 나타내는 것이라고 볼 수 있다. 간세포암 오가노이드는 줄기세포의 특징을 더 잘 반영하기 때문에 이러한 분식능과 증식능이 잘

나타나는 것이다.

이 연구에서 구축한 간세포암 오가노이드 중 3개정도의 오가노이드를 이용하여 cisplatin을 통해 약물 성능 시험을 시행하였을 때 기존 PDX 등을 이용한 시험과 차이가 나지 않음을 확인하여 구축한 오가노이드가 실제로 약물 성능 시험에 적용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

간세포암 오가노이드는 3차원 기관형 배양체로 그 자체를 동결보존하기 쉬웠으며, 실제로 동결 보존 후 해동 처리하여 평가하였을 때 해동 전과 비교하여 cell viability 등에서 차이가 나지 않아서 동결 보존 능력을 확인할 수 있었다.

이 연구에서는 간세포암 오가노이드와 기존의 PDX와의 상호 호환성 여부를 확인하기 위하여 간세포암 오가노이드에서 PDX를 형성해보았고, 역으로 간세포암 PDX로부터 간세포암 오가노이드를 성공적으로 구축할 수 있었다. 이와 같은 상호 호환가능한 부분은 향후 임상 연구에 활용성 부분에서 매우 큰 장점이라고 볼 수 있다.

오가노이드는 질병 모델링, 신약개발 플랫폼, 중개 의학의 도구로써 높은 잠재적 가치에도 불구하고 극복해야 할 문제점들이 있다. 현재까지 개발된 모델 중 가장 인체 생리활성에 근접한 모델이지만, 줄기세포 주위 미세 환경 및 면역세포는 여전히 존재하지 않는다. 이로 인해 약물 반응, 감염 및 염증 반응 모델링에는 한계가 있다. 물론 이러한 문제점은 배양 조건의 최적화 과정을 통해 면역세포를 비롯한 다양한 기질세포를 함께 배양하여 극복해 나갈 수 있을 것으로 생각된다. 현재 다양한 오가노이드가 개발되었지만 아직까지 모든 인간의 장기에 대해 오가노이드를 형성하지 못하고 있는 상태이다. 오가노이드는 실제 장기와 일치하는 세포로 구성되어 있지만 장기의 실제 거대 구조의 재현 자체는 부족한 상태이다.

현재 대부분의 오가노이드는 혈관을 통한 영양 공급 대신 전적으로 배양 배지에 의존한 배양법이기에 때문에 그 크기가 제한적일 수밖에 없다. 형태와 기능적 측면에서 이식 가능한 수준으로 향상된 오가노이드를 만들기 위해서는 배양법의 최적화 및 규모 확장이 반드시 필요하다. 이는 바이오 프린팅 기술을 통한 배양환경 개선이 새로운 대안을 제시해 줄 수 있다.

조직과 유사한 오가노이드는 3차원 형상을 가지고 있고 이를 3차원적 구조적 고찰이 필요한데, 크기가 수백 μm 에서 수 mm에 이르고 일반적인 생체 조직과 마찬가지로 불투명하기 때문에 내부를 관찰할 수 없다는 한계점도 있다. 이를 극복하기 위해서는 투명화 된 오가노이드 구축이 필요하다. 투명화 된 오가노이드를 형성했다 하더라도 현재 가장 널리 사용되고 있는 공초점 현미경을 사용하는 경우 오가노이드 1개의 3차원 이미지를 획득하는 데 수 시간이 걸리기 때문에 많은 오가노이드를 동시 분석해야 하는 약물 평가 연구에 활용에 어려움이 있다. 그러므로 향후 오가노이드 배양 기술의 발전과 함께 공초점 현미경보다 훨씬 빠른 이미징 기술의 발전도 병행되어야 한다.

오가노이드 바이오 बैं킹의 윤리적 문제도 제기되고 있다. 기존의 인체 조직은 비상업적인 목적의 기증으로 확보되었으나, 오가노이드 기술의 발전, 임상적 가치의 상승으로 상업적 목적으로의 개발이 관심이 높아지면서, 인체 조직 기반이 오가노이드 바이오 बैं킹에 대한 윤리적, 법적 논의가 필요한 상황이다. 오가노이드 바이오 बैं킹의 성공적인 정착과 활용을 위해서는 바이오 बैं킹 참여자의 권리가 침해되지 않으면서 임상적, 과학적, 사회적 가치에 대한 제고가 필요할 것이다.

이 연구에서는 간세포암 오가노이드 구축을 성공적으로 할 수 있었으며, 기존

연구에 활용성 등을 입증할 수 있었다. 더불어 기존의 단점으로 여겨졌던 동결 보존성, 조작 용이성, 비용 등에서도 큰 장점을 가지는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 오가노이드의 여러 한계점도 있고 아직 기술 개발의 부족한 점도 있으므로 향후 이러한 간세포암 오가노이드를 더욱더 발전시켜 개인 맞춤형 의학 치료 및 전임상 암 연구 등에 적극적으로 활용할 수 있게 되길 기대한다.

결 론

간세포암 오가노이드는 인체의 1차조직을 이용하여 형성할 수 있으며, 기존의 PDX 등과 같은 플랫폼들과 상호 호환 가능하며 비용 및 보존성, 조작용이성 등 기존 플랫폼들의 단점들을 보완할 수 있었다. 간세포암 오가노이드는 향후 개인 맞춤형 의학 치료 및 연구에 새로운 플랫폼으로 적합할 것으로 생각된다.

참고 문헌

- [1] Fatehullah A., SH. Tan, and N. Barker., Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nat Cell Biol*, 2016. 18(3): p. 246-54.
- [2] McCracken KW, Cata EM, Crawford CM, Sinagoga KL, Schumacher M., Rochkitch BE, Tsai YH, Mayhew CN, Spence JR., Modelling Human Development and Disease in Pluripotent Stem-Cell-Derived Gastric Organoids. *Nature*. 2014 Dec 18;516(7531):400-4.
- [3] Sato T., Vries RG, Snippert HJ, Wetering M. Barker N., Stange DE, Johan H., Abo A., Kujala P., Peters PJ, Vlevers H., Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 2009. 459(7244): p. 262-5.
- [4] Dutta D., I. Heo, and H. Clevers, Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems. *Trends Mol Med*, 2017. 23(5): p. 393-410.
- [5] Sato T., Stange DE, Ferrante M., Vries RG., Es JH, Brink SV, Houdt WJ, Pronk A., Gorp J., Siersema PD, Clevers H., Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*, 2011. 141(5): p. 1762-72.
- [6] Gao, D., Vela I., Sboner A., Iaquinta PJ, Karthaus WR, Gopalan A., Dowling C., Wanjala JN, et al., Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell*, 2014. 159(1): p. 176-187.
- [7] Weeber F., Ooft SN, Dijkstra KK, Voest EE., Tumor Organoids as a Pre-clinical Cancer Model for Drug Discovery. *Cell Chem Biol*, 2017. 24(9): p. 1092-1100.
- [8] Lancaster MA, Knoblich JA., Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. 2014Jul 18;345, *Science*

- [9] Hans Clevers, Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell*, 2016 Jun 16;165(7): p1586-1597
- [10] Yin X., Mead BE, Safaee H., Langer R., Karp JN., Levy O., Engineering Stem Cell Organoids. *Cell Stem Cell*, 2016. 18(1): p. 25-38.
- [11] Jung DH, Tak E, Hwang S., Song GW, Ahn CS, Kim KH, Moon DB, Ha TY, Park GC, Ryoo BY, Lee KJ, Kim N., Kwon JH, Jwa EK, Lee SG., Antitumor Effect of Sorafenib and Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor in Liver Transplantation Recipients With Hepatocellular Carcinoma Recurrence. *Liver Transpl.* 2018 Jul;24(7):932-945.
- [12] DeRose YS, Wang G, Lin YC, Bernard PS, Buys SS, Ebbert MT, Facor R., Matsen C., Milash BA, Nelson E., Neymayer L., Randall RL, Stijleman IJ, Welm BE, Welm AL., Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. *Nat Med.* 2011;17:1514-20.
- [13] James R Whittle, Michael T Lewis, Geoffrey J Lindeman and Jane E Visvader., Patient-derived xenograft models of breast cancer and their predictive power. *Breast Cancer Research.* 2015;17:17-29.
- [14] Ryoji Ito, Takeshi Takahashi, Ikumi Katano and Mamoru Ito, et al., Current advanced in humanized mouse models. *Cellular & Molecular Immunology.* 2012;9:208-214.
- [15] Boj SF, Vonk AM, Statia M., Su J., Vries RR, Beekman JM, Clevers H., Forskolin-induced Swelling in Intestinal Organoids: An In Vitro Assay for Assessing Drug Response in Cystic Fibrosis Patients. *J Vis Exp*, 2017(120).
- [16] Dekkers JF, Wiegerinck CL, Jonge HR, Vronsveld I., Janssens HM, Groot KM, Brandsma AM, Jong NW, Vijvelde MJ, Scholte BJ, Nieuwenhuis EE, Brink S., Clevers H., Ent CK, Middendorp S., Beekman JM., A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis

intestinal organoids. *Nat Med*, 2013. 19(7): p. 939-45.

[17] Schwank G., Koo BK, Sasselli V., Dekkers JF, Heo I., Demircan T., Sasaki N., Boymans S., Cupen E., Ent CK, Nieuwenhuis EE., Beekman JM, Clevers H., Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell*, 2013. 13(6): p. 653-8.

[18] Firth AL, Menon T., Parker GS., Qualls SJ, Lewis BM, Ke E., Dargitz CT, Wright R., Khanna A., Gage FH, Verma IM., Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell Rep*, 2015. 12(9): p. 1385-90

[19] Huang L., Holtzinger A., Jagan I., Begora M., Lohse I., Ngai N., Nostro C., Wang Rennian., Muthuswamy L., Crawford HC, Schaeffer DF, Roehrl M., Tsao MS, Gallinger S., Keller G., Muthuswamy SK., Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids. *Nat Med*, 2015. 21(11): p. 1364-71.

[20] Wills ES, Drenth JP, Building pancreatic organoids to aid drug development. *Gut*, 2017. 66(3): p. 393-394.

[21] Hubert CG, Rivera M., Spangler LC, Wu Q., Mack SC, Prager BC, Couce M., Mclendon RE, Sloan AE, Rich JN., A Three-Dimensional Organoid Culture System Derived from Human Glioblastomas Recapitulates the Hypoxic Gradients and Cancer Stem Cell Heterogeneity of Tumors Found In Vivo. *Cancer Res*, 2016. 76(8): p. 2465-77.

[22] Pauli C., Hopkins BD, Prandi D., Shaw R., Fedrizzi T., Sboner A., Sailer V., Augello M., Puca L., Rosati R., McNary TJ, Churakova Y., Personalized In Vitro and In Vivo Cancer Models to Guide Precision Medicine. *Cancer Discov*, 2017. 7(5): p. 462-477.

[23] Broutier L., Mastrogiovanni G., Verstegen MM, Francies HE, Gavarro LM, Bradshaw

CR, Koo BK, Dietmann S., Davies SE, Prasadom RK, et al., Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nat Med*, 2017.

[24] van de Wetering, M., Frances HE, Francis JM, Bounova G., Iorio F., Pronk A., Houdt W., Gorp J., Taylor-Weiner A., Kester L., MacLare-Douglas A., Blokker J., et al., Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell*, 2015. 161(4): p. 933-45.

[25] Boers SN, Delden JJ, Clevers H., Bredenoord AL., Organoid biobanking: identifying the ethics: Organoids revive old and raise new ethical challenges for basic research and therapeutic use. *EMBO Rep*, 2016. 17(7): p. 938-41.

[26] Lancaster MA, Renner M., Martin CA, Wenzel D., Bichnell LS, Hurles ME, Homfray T., Penninger JM, Jackson AP, Knoblich JA., Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 2013. 501(7467): p. 373-9. \

[27] Nowakowski TJ, Pollen AA, Lullo ED, Sandoval-Espinosa C., Bershteyn M., Kriegstein A., Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 2016. 18(5): p. 591-6.

[28] Qian X, Nguyen HN, Song MM, Hadiono C., Ogden SC, Hammack C., Yao B., Hamersky GR, Jacob F., Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell*, 2016 May 19;165(5):1238-1254.

[29] Xia Y, Nivet E, Sancho-Martinez I, Gallegos T., Suzuki K., Okamura D., Wu MZ, Dubova I., Esteban CR, Montserrat N., Campistol JM, et al., Directed differentiation of human pluripotent cells to ureteric bud kidney progenitor-like cells. *Nat Cell Biol*. 2013 Dec;15(12):1507-15.

[30] McCracken KW, Catá EM, Crawford CM, Sinagoga KL, Schumacher M., Rockich BE,

Tsai YH, Mayhew CN, Spence JR, Zavros Y., Wells JM., Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. *Nature*. 2014 Dec 18;516(7531):400-4.

[31] Ma Z, Wang J, Loskill P, Huebsch N, Koo S., Svedlund FL, Marks NC, Hua EQ, Grigoropoulos CP, Conklin BR, Healy KE., Self-organizing human cardiac microchambers mediated by geometric confinement. *Nat Commun*. 2015 Jul14;6:7413.

[32] Hayashi R, Ishikawa Y, Sasamoto Y, Katori R, Nomura N., Ichikawa T., Araki S., Soma T., Kawasaki S., Sekiguchi K., Quantock AJ, Tsujikawa M., Nishida., Co-ordinated Ocular Development From Human iPS Cells and Recovery of Corneal Function. *Nature*. 2016 Mar 17;531(7594):376-80.

[33] Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H., Kimura M., Ogaeri T., Zhang RR, Ueno Y., Zheng YW, Koike N., Aoyama S., Adachi Y., Taniguchi H., Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*. 2013 Jul 25;499(7459):481-4.

[34] Margherita Y. Turco, Lucy Gardner, Jasmine Hughes, et al., Long-term, Hormone-Responsive Organoid Cultures of Human Endometrium in a Chemically Defined Medium. *Nat Cell Biol*. 2017 May;19(5):568-577.

[35] Laura B., Mastrogiovanni G., Verstegen MM, Francies HE, Gravarro LM, Bradshaw CR, Allen GE, Arnes-Benito R., Sidorova O., Gaspersz MP, Geogakopoulos N., et al., Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening." *Nature medicine* 23.12 (2017): 1424.

[36] 보건복지부 중앙암등록본부. 국가암등록사업 연례보고서 (2013년 암등록통계). 2015.

[37] 보건복지부 중앙암등록본부. 국가암등록사업 연례보고서 (2010년 암등록통계).

2012.

[38] 대한간암학회-국립암센터 2014 간세포암종 진료 가이드라인. 2014.

Abstract

Hepatocellular carcinoma research platform using patient-derived preclinical organoid toward personalized precision medicine

Background: The basic/translational research platforms for hepatocellular carcinoma (HCC) include 2-dimensional culture, 3-dimensional spheroid, patient-derived xenograft (PDX) and organoid. Every platform has its own merit, but precision medicine should be based on the most appropriate study platform. We have established 50 mouse models of HCC PDX so far, but its maintenance was hurdled by high cost because each animal should be alive. To maintain the tumors cost-effective, we adopted organoid platform replacing PDX models.

Method: We established HCC organoid using two methods as Hanging drop and low-binding plate. We use primary tissues and add extracellular matrix to make organoid. We observe biomarker expression such as alpha-fetoprotein and keratin. We tested the feasibility of drug screening test using cisplatin. We compared the interchangeability and preservability between the organoid and PDX.

Results: We made normal liver organoid and HCC organoid successfully. For interchangeability test, 5 sets of HCC PDX were harvested and treated to make organoid through the hanging drop and low-binding plate methods. All PDXs were successfully converted to organoid and the efficacy of two processing methods was high enough. HCC organoid were cultured and inoculated into the nude mice, by which HCC PDX was formed again. We verified the feasibility of drug screening test using cisplatin, in which there was dose-dependent cytotoxicity. For preservability test, HCC organoid were stored at -150 C in liquid nitrogen tank. After preservation for 1 month and subsequent melting, all organoid sets were proven to be viable.

Conclusions: We established human HCC organoid and normal liver organoid using human primary tissues. This study confirmed that the interchangeability and preservability of HCC organoid are high enough to be used as a reliable research platform. Biobanking of HCC organoid will help to establish individualized patient-tailored treatment as an essential component of precision medicine.