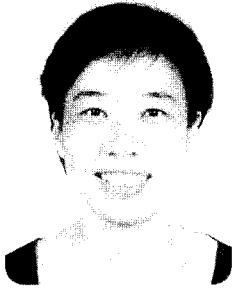


Laser Captured Microdissection



이 경 아

1983 연세대학교 이과대 생물학과 학사
 1985 서울대학교 자연대 동물학과 석사
 1992 미국 University of Illinois, Urbana-Champaign 생리학과 박사
 1992-현재 차병원 여성의학연구소 분자생식생리학연구실 실장
 1997-현재 포천중문 의과대학교 생리학교실 조교수

■ 요약 ■

대부분의 조직은 여러 가지 세포가 모여서 이루어지기 때문에 그 중의 어떤 특정세포에서 발현하는 물질을 분석하려면 조직을 이루고 있는 각각의 세포를 분리해내야 한다. 이렇게 순수하게 세포를 분리해 내는 기술 중의 하나가 Laser Captured Microdissection (LCM)이다. LCM의 개발로 기존에 사용되던 방법에 비하여 빠르고 간편하면서, 매우 정확하게 원하는 세포를 순수 분리해서 그 세포의 분자생물학적 또는 생화학적인 분석을 할 수 있게 되었다. LCM은 현미경으로 조직절편을 관찰하면서 원하는 세포를 낮은 에너지의 laser를 사용하여 도려내는 방법으로 조직절편 이외에도 도말된 혈액이나 자궁경부 조직, 그리고 배양된 세포를 cytocentrifugation한 후에 원하는 세포를 포획할 수도 있다. LCM을 이용한 연구는 여러 분야에서 다양하게 진행되고 있으며, 특히 같은 조직 내에 존재하는 정상세포와 전이종인 세포, 그리고 암세포를 구분해냄으로써 암의 전이기전 및 병인 연구에 매우 큰 공헌을 하고 있다. 이렇게 분리된 세포는 RT-PCR, LOH (loss of heterozygosity), microsatellite instability, differential gene profiling, cDNA microarray, Western blot, 2D PAGE protein analysis 등의 기법을 접목하여 연구하게 된다. 본 논단을 통하여 1996년 개발된 LCM의 원리와 이

제까지 LCM을 이용한 연구 성과를 살펴보고자 한다.

■ 서론 ■

최근에 이르기까지 분자생물학적 분석은 조직 검체를 모두 사용하여 이루어지고 있다. 그러나, 조직은 여러 가지 세포가 모여서 이루어져 있고, extracellular 물질도 섞여 있기 때문에 결과의 분석이 잘못 해석되거나, 결론내리기 어려운 경우가 많다. 따라서 이런 조직으로부터 각각의 세포를 분리하여 정확한 분석을 할 수 있는 방법이 모색되었다. 이러한 방법 중 하나가 여기 소개하고자 하는 LCM 방법이다. LCM은 1996년 NIH의 Lance Liotta, Robert Bonner, Michael Emmert-Buck 등에 의해 개발되고 (Emmert-Buck et al., 1996), 이어 1997년 미국의 Arcturus Engineering (www.arctur.com)에서 제작 시판하게 되었다. 현재 전 세계적으로 약 500여대가 분포되어 있으며, 우리나라는 현재 4-5대를 보유하고 있는 것으로 알고 있다. LCM의 개발로 기존에 사용되던 microdissection방법에 비하여 빠르고 간편하며, 매우 정확하고 순수하게 원하는 세포를 분리할 수 있게 되었다. 기존에 사용되던 수작업 방법은 정교하고 숙련된 기술을 요구할 뿐만 아니라 매우 긴 시간을 필요로 했고, 또한 이렇게 얻어진 세

포가 100% 순수하게 분리되었다고 장담할 수 없는 단점을 갖고 있었다.

■ 본 론 ■

1. LCM의 원리

LCM의 원리는 다음과 같다. 조직절편 혹은 혈액을 도말하여 준비된 슬라이드를 현미경에서 관찰하면서 그 위에 CapSure™ 혹은 CapSure HSTM라고 하는 LCM cap을 올려놓는다. 이 cap의 아래에는 termoplastic transfer film이 얇게 도말되어 있어서, cap 위에서 laser를 쏘이게 되면 실제로 이 transfer film이 녹아내려 원하는 세포와 붙게된다. 이렇게 원하는 세포만을 laser로 쏘이게되면 cap에는 원하는 세포만이 순수하게 붙게되고 cap을 들어올리면 주위의 나머지 조직은 그대로 슬라이드 위에 남고, 원하는 세포만 cap에 붙어 떨어져 나오게 된다. 이 cap은 microcentrifuge tube에 꼭 맞게 되어있어서 tube에 DNA, RNA 또는 단백질을 용해하는데 필요한 buffer를 넣고 cap을 덮어서 원하는 세포로부터 원하는 물질을 추출할 수 있게 되는 것이다 (Chu et al., 2000; 그림 1 참조).

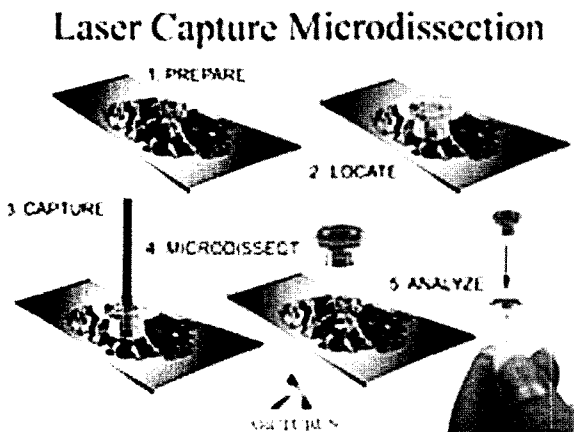


그림 1. LCM의 과정

LCM에 사용되는 laser는 낮은 에너지의 infrared laser로 세포 내 물질의 변형을 유발하지 않으며, beam의 크기는 7.5, 15, 30 μm 로써 이론상 5 μm 크기까지 구분해 낼 수 있다. 현재 beam의 크기를 줄이는 기술이 개발중으로 멀지 않은 장래에 더 줄일 수

있을 것으로 기대된다.

LCM을 위해 시료를 제조하는 과정은 신선한 조직을 신속하고 간편하며, 분석을 원하는 물질이 변질되지 않도록 안전하게 진행되어야 한다. 특정세포의 유전자 발현을 관찰하기 위해서는 우선 세포의 구조가 선명하게 구별 가능할 수 있도록 조직의 형태학적인 구조가 잘 유지되어야 한다. 특히 유전자 발현을 연구할 경우 RNA의 상태가 잘 보존되어야 할 것이다. 이와 같은 이유 때문에 시료에서 RNA를 추출하기 위한 적합한 상태와 적절한 고정제의 선택이 중요하다. 동결 절편(frozen section) 방법에 비해 상대적으로 전체적인 과정이 길고 복잡한 파라핀 절편(paraffin section) 방법을 이용할 때 핵산의 회수 효율성이 낮다 (Goldsworthy et al., 1999). 그러나 핵산의 회수 효율성이 낮을 뿐 전혀 회수되지 않는 것은 아니므로 복잡한 구조를 갖고 있어서 원하는 세포를 구분해 내기 어려운 조직의 경우에는 파라핀 절편을 이용하여도 무방하다. 이때 대부분의 과정은 일반 조직학적 방법과 비슷하나, alcohol-based fixative를 사용하여야 한다.

조직은 그 구조를 관찰하기 위하여 일반적인 방법으로 염색하거나 (그림 2, 3), 혹은 immunohistochemistry 방법으로 세포를 구분하여 인지 가능하게 한 후에도 LCM이 가능하다. 현재까지 보고된 염색방법으로는 가장 고전적인 Hematoxylin-Eosin, Toluidin Blue, Nuclear Fast Red, Methyl Green 등으로 염색된 조직으로부터 LCM후 PCR이 가능했고, ToPro-3와 같은 형광염색도 가능하다. Immunohistochemistry를 이용할 경우에는 가능한 한 incubation 단계 및 시간을 줄이고 항체의 농도를 높이는 방법을 사용하여 회수율을 높일 수 있다.



그림 2. 생쥐의 자궁조직으로부터 luminal epithelium만을 포획한 결과.

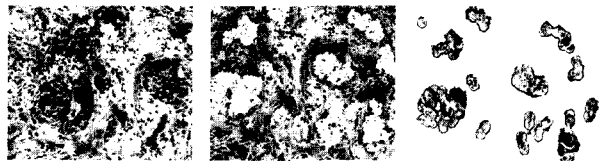


그림 3. Invasive breast carcinoma cells를 포획한 결과

이제까지의 보고에 의하면 DNA분석을 위해서는 100-500개의 세포를 (Simone et al., 1998; Sirivatanauksorn et al., 1999; Tam et al., 1999), RNA 분석을 위해서는 500-1000개의 세포를 (Jin et al., 1999; Kohda et al., 2000; Glasow et al., 1998; Goldsworthy et al., 1999) 필요로 한다. 그러나 본 연구실에서는 난자 10개, 근육세포 20개를 포획해서도 PCR과 Southern blot을 이용한 DNA분석이 가능하였으며, RNA분석의 경우에는 조직절편의 준비 방법에 따라 난자는 50-100개, 근육세포는 200-400개를 가지고도 유전자 발현을 관찰할 수 있었다. 단백질의 분석을 위해서는 이보다 훨씬 많은 세포 즉, 대략 10,000개 이상의 세포가 필요하다 (Wittliff et al., 2000).

2. LCM의 응용

LCM으로 구분하여 낸 세포를 가지고 DNA, RNA, 단백질의 분석이 모두 가능하다. LCM 기법은 어떤 연구분야에서나 사용될 수 있지만, 특히 분화 (differentiation)나 암의 전이 (metastasis) 및 병인연구에 아주 유용하게 사용될 수 있다. 특히 암조직과 같이 조직 중에 원하는 세포의 분포가 불규칙하거나 혹은 여러 가지 세포가 매우 복잡한 형태를 갖고 섞여 있는 경우에 특히 LCM의 진가를 발휘할 수 있다.

LCM 과 Genomic Analysis

종양의 microsatellite instability 및 loss of heterozygosity (LOH)를 측정하는 것이 암의 예후 및 진단에 매우 중요한데 (Thibodeau et al., 1993), 이때 종양 조직 시료 내에 정상적인 세포와 종양세포가 섞여있게 되면 그 결과가 매우 모호하여 정확한 진단을 내리기 어렵다. LCM을 사용하여 한 환자에서 나온 시료 중에서 정상세포와 병에 걸린 세포를 따로 분리함으로써 LOH의 정도를 정확하게 측정할 수 있다 (Shen et al., 2000).

이외에도 정상세포와 비교하고자 원하는 세포의 DNA를 추출한 후에 PCR, mutational analysis, fingerprinting (Sirivatanauksorn et al., 1999), comparative genome hybridization (Jones et al., 2000) 등의 기법을 접목하여 genomic analysis를 연구한 보고가 있다.

본 연구실에서 진행하고 있는 preliminary study 중 한가지를 소개하면, 근육병에 걸린 환자의 근육조직을 5 μ m 두께의 절편으로 잘라 Type I과 Type II 근육세포를 각각 20개씩 LCM으로 분리하여 PCR후 Southern analysis를 할 수 있었다 (data not shown). 이와 같은 방법으로 병의 진행과 mutation관계, 그리고 mutation이 일어나는 정확한 장소를 확인함으로써 그 이전까지도 밝혀낼 수 있을 것으로 기대한다.

LCM과 Gene Expression

LCM으로 분리해 낸 각 세포로부터 RNA를 얻은 후 RT-PCR, cDNA microarray 등 기존의 여러 가지 gene expression 연구방법을 접목할 수 있다. 1999년 Luo 등은 dorsal root ganglia의 small-size, large-size neuron을 LCM으로 분리한 후, T7-based RNA amplification, cDNA microarray 방법을 통하여 differential gene expression을 연구하였다 (Luo et al., 1999). 이들은 10 μ m 두께로 자른 절편을 이용, 1000개의 neuron을 이용하였다. 그러나 size만으로 neuron을 분리하는 방법보다는 immunocytochemistry를 이용하여 neuron을 기능에 따라 더 세분화한 후에 LCM을 이용하는 방법을 제안하기도 하였다. 이외에도 adrenal glands (Glasow et al., 1998), anterior pituitary (Jin et al., 1999), Purkinje cell (Benoeohr et al., 2000), breast cancer (Sgroi et al., 1999, Shen et al., 2000) 등에서 LCM을 이용하여 유전자 발현을 연구한 보고가 있다.

물론 충분한 양의 시료를 갖고 있는 경우에는, 필요한 충분한 양의 RNA를 얻기 위해 충분한 수의 세포를 포획하여 연구할 수 있을 것이다. 그러나, 매우 적은 양의 생검 조직을 이용해야 하는 등, 시료의 양에 제한을 받을 경우에는 본인의 연구에 어느 정도의 세포를 필요로 하는지 규명이 필요할 것이다. 본 연구실에서는 세포의 크기가 크고, mRNA의 양이 풍부한 생쥐의 난자를 이용하여 RT-PCR 방법을 이용할 경우 필요한 세포의 수 및 cDNA양, PCR cycle 수 등에 대한 최소한도를 찾아보았다. 앞서서도 언급한 바, 냉동절편을 이용할 경우 파라핀절편에 비하여 mRNA는 많이 얻을 수 있으나, 조직의 형태를 알아보기 어려운 점을 고려하여, 두 가지 방법을 함께 비교하였는데, 파라핀절편을 이용할 경우에는 냉동절편에 비하여 약 2배의 세포를 필요로 하였으며, 같은 수의 세포라고 하여도 RT-PCR후 gel상에서 band를 관찰하기 위해서는 3 cycles 정도 더 PCR을 해야 하였다. 참고로 생쥐의 난자를 이용할 경우, 냉동절편의 경우에는 50개의 난자만으로도 20 μ l 중 0.25 μ l cDNA를 이용하여 PCR 21 cycle을 돌렸을 때 housekeeping 유전자인 GAPDH를 관찰할 수 있었다. 따라서 자신이 원하는 세포의 크기, RNA 발현양, 연구하기를 원하는 유전자의 발현이 GAPDH의 발현보다 많은지 적은지 등을 알 수 있다면 아주 적은 양의 시료를 갖고 있는 경우 실험을 위한 조건을 찾기 위해 여러 번의 실패 없이 위의 연구결과를 유용하게 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

LCM과 Proteomic Analysis

실제로 세포의 특성을 조절하는 것은 발현되는 단백질의 기능에 따라서 좌우되기 때문에 최근 들어서는 유전자의 발현을 넘어 단백질의 발현을 연구하려는 움직임이 활발하게 일어나고 있다. LCM을 이용해서 세포를 분리한 후 2D PAGE (Banks et al., 1999; Ornstein et al., 2000) 및 SELDI(Protein surface enhanced laser desorption/ionization) mass spectrometry를 이용하여 cancer biomarker를 찾아내는 등 LCM을 이용하여 단백질의 발현을 연구한 보고가 속속 발표되고 있다 (Paweletz et al., 2000; Palmer-Toy et al., 2000).

LCM으로 단백질 발현을 연구하기 위해서는 DNA나 RNA연구에 필요했던 세포보다 더 많은 수의 세포를 필요로 하는데 대개 몇 만개의 세포를 사용하였다. 2D PAGE를 위해서는 약 2만개의 세포를 사용하였고 한가지 방법만을 사용할 경우에는 5천개에서 일만개 정도가 사용되었다.

■ 장래전망 ■

여러 가지 cell lines을 갖고 있거나 충분한 양의 시료를 확보할 수 있는 동물실험과는 달리 환자로부터 조직을 얻고, 그것을 이용하여 임상적인 문제점을 파헤치기 위한 genomic, proteomic 테스트를 모두 다 해내는 일은 많은 어려움을 갖고 있다. 우선 생화학적인 실험을 한다고 할 때, 조직의 여러 가지 세포가, 특히 정상세포와 병에 걸린 세포가 섞여 있는 한 그 결과는 모호할 수밖에 없다. 대안으로 이용되는 immunohistochemistry 방법 또한 사용되는 항체의 종류, 실험하는 사람의 기술 등에 의해 그 결과가 많은 영향을 받으며 무엇보다 semi-quantitative 하다는 단점을 갖고 있다. 따라서 환자로부터 얻어진 조직으로부터 정확한 분석을 하기 위해서는 조직을 이루고 있는 여러 가지 세포를 빠르게, 정확하게, 순수하게 분리해 내는 일이 무엇보다도 중요한 관건이었다.

LCM을 사용함으로써 빠르고 정확하게 정상세포와 병에 걸린 세포, 또는 발달과 분화과정에 있는 여러 가지 단계별 세포, 즉 연구자가 원하는 특이세포를 순수하게 분리하여 낼 수 있게 되었다. LCM을 이용하여 한 환자에서 정상세포와 병에 걸린 세포를 동시에 얻어 직접적으로 비교 분석할 수 있게 됨으로써 분자생물학적인 진단의 발전을 기대하게 되었다. 이제 LCM은 세포수준에서 병인을 연구하고 새로운 약을 개발하거나, 임상적 진단에 매우 유

용하게 사용되는 강력한 도구로써 인정받고 있다. 이렇게 LCM을 이용하여 순수하게 분리된 세포를 가지고 최근 급속하게 발전하고 있는 여러 가지 분자생물학적인 기법을 적절하게 접목하여 연구 분석할 때, 생물학 및 의과학 발전에 기여함으로써 과학의 발전뿐만 아니라 병의 발견, 그리고 나아가 환자의 치료에 크게 공헌할 것으로 기대된다.

■ 참고문헌 ■

Banks RE, Dunn MJ, Forbes MA, Stanley A, Pappin D, Naven T, Gough M, Harnden P, Selby PJ. The potential use of laser capture microdissection to selectively obtain distinct populations of cells for proteomic analysis. *Electrophoresis* 1999; 20:689-700.

Benoeohr P, Fleisch C. Single-cell RT-PCR of laser capture-microdissected purkinje cells. *Bioresearch Online*, www.bioresearchonline.com 2000.

Chu SS, Kunitake S, Travis JC. Laser Capture Microdissection: Applications in Cancer Research. URL <http://www.biomedicalproducts.com> 2000.

Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang A, Godlstein SR, Weiss RA, Liotta LA. Laser capture microdissection. *Science* 1996; 274:998-1001.

Glasow A, Haidan A, Hilbers U, Breidert M, Gillespie J, Scherbaum WA et al. Expression of ob receptor in normal human adrenals: Differential regulation of adrenocortical and adrenomedullary function by leptin. *J Clin Endocrin Metab* 1998; 83: 4459-66.

Goldsworthy SM, Stockton PS, Trempus CS, Foley JF, Maronpot RR. Effects of fixation on RNA extraction and amplification from Laser Capture Microdissected Tissue. *Mol Carcinogen* 1999; 25: 86-91.

Jun L, Thompson CA, Qian X, Kuecker SJ, Kulig E, Lloyd RV. Analysis of anterior pituitary hormone mRNA expression in immunophenotypically characterized single cells after laser capture microdissection. *Lab Invest* 1999; 79: 511-4.

Jones C, Foschini MP, Chaggar R, Lu YJ, Wells D, Shipley JM, Eusebi V, Lakhani SR. Comparative genomic hybridization analysis of myoepithelial carcinoma of the breast. *Laboratory Investigation* 2000; 80:831-836.

- Kohda Y, Murakami H, Moe OW, Star RA. Analysis of segmental renal gene expression by laser capture microdissection. *Kidney Int* 2000; 57: 321-31.
- Luo L, Salunga RC, Guo H, Bittner A, Joy KC, Galindo JE et al. Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes. *Nature Med* 1999; 5: 117-22.
- Ornstein DK, Gillespie JW, Paweletz CP, Duray PH, Herring J, Vocke CD, Topalian SL, Bostwick DG, Marston Linehan W, Petricoin EF, Emmert-Buck MR. Proteomic analysis of laser capture microdissected human prostate cancer and in vitro prostate cell lines. *Electrophoresis* 2000; 21:2235-2242.
- Palmer-Toy DE, Sarracino DA, Sgroi D, LeVangie R, Leopold PE. Direct acquisition of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectra from laser capture microdissected tissues. *Clinical Chemistry* 2000; 46:1513-1516.
- Paweletz CP, Ornstein DK, Roth MJ, Bichsel VE, Gillespie JW, Calvert VS, Vocke CD, Hewitt SM, Duray PH, Herring J, Wang QH, Hu N, Linehan WM, Taylor PR, Liotta LA, Emmert-Buck MR, Petricoin EF 3rd. Loss of annexin 1 correlates with early onset of tumorigenesis in esophageal and prostate carcinoma. *Cancer Research* 2000; 60:6293-6297.
- Sgroi DC, Teng S, Robinson G, LeVangie R, Hudson JR, Jr., Elkahoul AG. In vivo gene expression profile analysis of human breast cancer progression. *Cancer Research* 1999; 59:5656-5661.
- Shen CY, Yu JC, Lo YL, Kuo CH, Yue CT, Jou YS, Huang CS, Lung JC, Wu CW. Genome-wide search for loss of heterozygosity using laser capture microdissected tissue of breast carcinoma: An implication for mutator phenotype and breast cancer pathogenesis. *Cancer Research* 2000; 60:3884-3892.
- Simone NL, Bonner RF, Gillespie JW, Emmert-Buck MR, Liotta LA. Laser-capture microdissection: Opening the microscopic frontier to molecular analysis. *Trends in Genetics* 1998; 14: 272-6.
- Srivatanauksorn Y, Srivatanauksorn V, Bhattacharya S, Davidson BR, Dhillon AP, Kakkar AK et al. Evolution of genetic abnormalities in hepatocellular carcinomas demonstrated by DNA fingerprinting. *J Pathol* 1999; 189: 344-50.
- Tam AS, Foley JF, Devereux TR, Maronpot RR, Massey TE. High frequency and heterogeneous distribution of p53 mutations in aflatoxin B1-induced mouse lung tumors. *Cancer Res* 1999; 59: 3634-40.
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260:816-819.
- Wittliff JL, Kunitake ST, Chu SS, Travis JC. Applications of laser capture microdissection in genomics and proteomics. *J Clin Ligand Assay* 2000; 23: 66-73.