

세포군집의 확장에 관여하는 물리적 힘의 가시화

조영빈* · 권보미** · 고웅현* · 신현정†

Visualization of mechanical stresses in expanding cell cluster

Youngbin Cho, Bomi Gweon, Ung Hyun Ko, and Jennifer H. Shin

Abstract. Collective cell migration is a fundamental phenomenon observed in various biological processes such as development, wound healing, and cancer metastasis. During the collective migration, cells undergo changes in their phenotypes from those of stable to the migratory state via the process called epithelial-mesenchymal transition (EMT). Recent findings in biology and biochemistry have shown that EMT is closely related to the cancer invasion or metastasis, but not much of the correlations in kinematics and physical forces between the neighboring cells are known yet. In this study, we aim to understand the cell migration and stress distribution within the expanding cell cluster. We constructed the in vitro cell cluster on the hydrogel, employed traction force microscopy (TFM) and monolayer stress microscopy (MSM) to visualize the physical forces within the expanding cell monolayer. During the expansion, cells at the cluster edge exhibited enhanced motility and developed focal adhesions that are the essential features of EMT while cells at the core of the cluster maintained the epithelial characteristics. In the aspect of mechanical stress, the cluster edge had the highest traction force of ~90 Pa directed toward the cluster core, which means that cells at the edge actively pull the substrate to make the cluster expansion. The cluster core of the tightly confined cells by neighboring cells had a lower traction force value (~60 Pa) but the highest intercellular normal stress of ~800 Pa because of the accumulation of traction from the edge of the monolayer.

Key Words : Mammary epithelial cell(유선상피세포), Micro-patterning(마이크로패터닝), Collective migration(세포 군집 운동), Traction force(세포 정지마찰력), Intercellular stress(세포간 물리적 힘)

1. 서 론

체내의 여러 생리·병리적 상황에서 세포군집의 유기적인 움직임은 중요한 역할을 한다. 대표적으로 피부, 폐, 기관지, 간 등을 감싸고 있는 대부분의 상피조직, 그리고 인슐린 분비를 조절하는 랭게르한스섬과 같은 조직의 세포군집 등이 있으며, 병리적인 예로는 암에서의 중앙조직이 있다^(1,2).

군집 속 세포들은 일반적으로 세포간의 연결과 협동력이 강하여 움직임이 한정되어 있다. 반면, Epithelial to Mesenchymal Transition(EMT)과 같은 특정 상황에서는

세포간의 유기적 연결이 끊어지고 각 세포들의 이동성이 증가하는 특성을 띄게 된다⁽³⁾. 체내에는 이러한 EMT 현상과 반대로 Mesenchymal to epithelial transition(MET) 현상도 활발하게 일어나며 주요 생리적 현상들을 주관하고 체내의 항상성을 유지한다. 기존의 많은 생물학적 관점에서 연구에서는 이러한 EMT현상 조절 및 세포 간의 신호 기작을 유전적 관점에서 이해하고, 이를 이용하여 암전이 등의 병리학적 현상을 치료하고자 하는 노력들이 활발히 진행되어 왔다⁽⁴⁾. 하지만 기존의 생물학적인 접근에 따른 유전적 지식에도 불구하고 여전히 세포군집의 이동이나 EMT를 이해하기에는 한계가 존재한다. 이는 세포

† 한국과학기술원 기계공학과, 한국과학기술원 의과대학원

E-mail : j_shin@kaist.ac.kr

* 한국과학기술원 기계공학과

** Harvard T.H. Chan School of Public Health

간 힘 등의 역학적 요소에 대한 이해의 부재로 인한 것이며, 따라서 본 연구에서 군집 속 세포들의 이동성과 물리적 힘의 상관관계에 대한 이해를 다양한 방법으로 시도하였다. *In vitro* 상에서 확장되는 세포 군집을 패턴의 형태로 구현하였으며, 전통적인 particle image velocimetry (PIV) 기술 및 이를 응용한 traction force microscopy (TFM), monolayer stress microscopy (MSM) 기술 등을 이용하여 세포군집의 확장에 따른 세포의 운동성과 군집 속 물리적 힘의 변화를 가시화 할 수 있는 기법을 도입하였다.

2. 실험 및 분석 방법

2.1 세포 군집 구현 및 이미징

본 실험에서는 유선상피세포(MCF-10A)를 사용하였으며, 초기 지름이 700 μm 인 원형 세포 군집으로 패턴링하였다. 패턴링은 PDMS 재질의 마스크를 사용하였으며, 마스크를 부착한 상태에서 세포들을 약 24시간을 배양하였다. 이렇게 만들어진 원형 군집의 자유 확장의 패턴을 보기 위해 이후 PDMS 마스크를 제거한 후 이미징을 진행하였다. 연속 이미지는 실체 및 형광 이미지를 얻기 위해 현미경 (AxioCam MRm, Carl Zeiss, Germany) 을 이용하여 6 frame/hour 의 속도로 약 12시간 촬영하였다. 12-16 시간 동안 유지되는 장시간 이미징을 위하여 군집 샘플들은 일반적인 세포 배양 조건인 36°C, 5% CO₂ 조건에서 유지하였으며 배양액의 증발을 막기 위해 충분한 습도를 공급하였다. 획득한 이미지는 ImageJ 프로그램을 통해 밝기 및 대조, 흔들림을 보정하였으며, 동일 프로그램의 Manual Tracking 기술을 이용하여 세포의 핵을 기준으로 이동속도를 계산하였다.

2.2 TFM, MSM 분석 기법

바닥은 세포가 잡아당기는 정지 마찰력을 측정하기 위해 3 kPa 의 Poly-Acrylamide 하이드로 젤을 사용하였다. 구축된 하이드로 젤 속에는 TFM 측정을 위해 0.5 μm 크기의 형광 비드를 섞어 사용하였으며, 하이드로 젤의 강도를 알기 때문에, 이와 함께 세포의 유무에 따른 형광 비드들의 움직임 정도를 분석하여 실시간 세포의 정지마찰력을 정량화 하였다.

위의 방법을 통해 얻은 국지적인 세포의 정지마찰력 값들을 이용해 세포와 세포 사이의 응력 값을 계산하였다 (MSM). MSM 계산 과정에서 세포 군집 전체는 하나의 2차원적 평면으로 가정하였고, 군집 외부에서 가해지는 힘

은 없다고 가정한다. 이러한 2차원 세포 군집 모델에는 외부 힘이 작용하지 않기 때문에, 앞에서 구한 군집 내부의 세포 정지 마찰력 값들과 세포-세포 간 힘의 값들이 같다는 힘 평형(force balance) 방정식을 이용해 결과적으로 세포와 세포 사이의 힘들을 정량적으로 얻게 된다⁶⁾. 이러한 TFM과 MSM 기술을 통해 전체 세포 군집 속 응력 값을 컬러맵으로 가시화하였다. 전체적인 계산 과정은 MATLAB 프로그램을 이용하여 계산하였다^(7,8).

3. 실험 결과

3.1 세포군집 확장에 따른 세포들의 이동성 변화

세포 군집 속에는 (1)세포와 세포 사이의 상호작용, (2) 세포와 바닥 사이의 상호작용, (3)세포 자체의 구조 및 힘에 의한 여러 물리적 힘들이 존재하며 군집의 확장과 내부 세포들의 이동에 중요한 영향을 끼친다. EMT 현상은 안정적으로 조직화된 군집으로부터 세포들이 분산되는 현상이며, 따라서 이는 물리적 힘과 밀접한 연관이 있다. 세포의 군집은 시간이 지나면서 빈 공간으로 이동해나간다. Fig 1(a)는 원형으로 패턴링 된 군집이 12시간에 걸쳐 퍼져나가는 모습을 보여준다. 본 실험에서, 원형 군집은 원형 중심으로부터 방사상으로 원형을 유지하며 이동해 나간다. 세포 군집이 자유로워진 직후에는 군집 속 모든 세포들이 움직임이 적은 상피 세포 형태를 가지고 있지만, 시간이 지나면서 군집 외부의 빈 공간을 접하는 가장자리 세포들은 자유 공간으로 이동하고자 하는 성질에 의해 EMT 과정을 겪게 된다. 따라서 군집 확장 속에는 두 가지 상태의 세포들이 공존하게 된다. 첫째, 외부의 빈 공간에 의해 자극된 군집 외부의 세포들은 간엽성 형태로 변화과정을 겪으며 Fig 1(b)의 이동궤적에서 볼 수 있듯이 방사상으로 빠르게 이동하는 성질을 가진다. 둘째, 반면 군집의 내부에 위치한 세포들은 주변 모든 공간이 이웃 세포와 맞닿아 있기 때문에 외부의 빈 공간에 노출되지 않고 오랜 시간 동안 상피성 세포(epithelial cell)의 특징을 띤다. 또한 이러한 세포들은 주변 세포들에 의해 이동이 자유롭지 않아 외부 세포들에 비해 상대적으로 방향성이 없는 이동 궤적을 지니고 또한 낮은 이동성을 보인다 (Fig 1(c)). 이동성의 차이는 Fig 1(d)의 평균이동속도 값을 통해 정량적으로 확인할 수 있다. 이와 같이 세포군집이 이동할 때 외부의 빈 공간은 상피성 세포에서 간엽성 세포로 (mesenchymal cell)의 형질 전환을 유도하며 이러한 원동력을 바탕으로 군집 이동이 효과적으로 일어나고 있음을 알 수 있다.

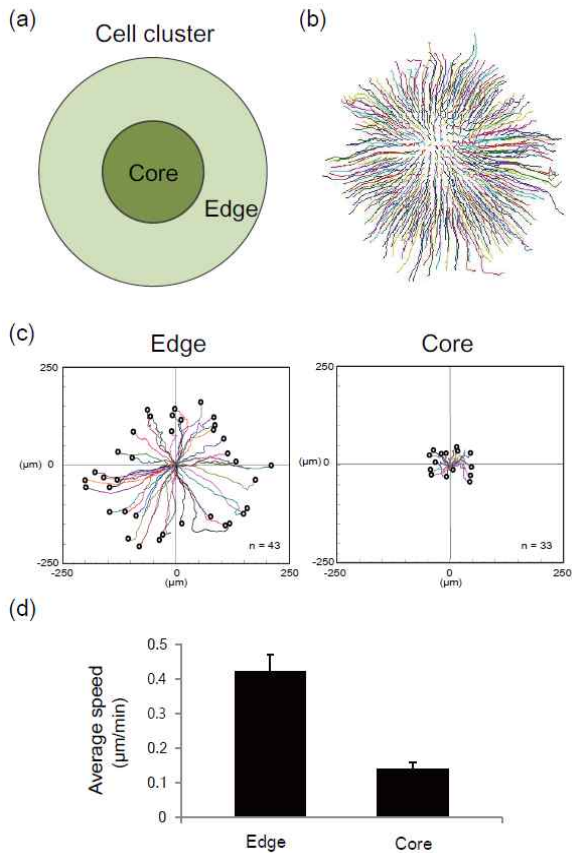


Fig. 1. A typical expanding behavior of the cell cluster. (a) Schematics of two states within the cell cluster. (b) Trajectory for entire cell cluster during 12 hours expansion analyzed by PIV method. (c) Trajectory for edge and core cells in 12 hours expansion experiment. (d) Average speed of the edge and core cells within the cluster.

3.2 TFM, MSM 측정 분석 : 확장에 따른 군집속 물리적 힘들의 변화

세포군집의 확장에 따른 EMT 과정에서 주목할 점은 세포간의 결합이 끊어지고 세포 개개의 운동성이 증가한다는 것이다. 이러한 세포간 결합의 변화는 지속촬영 기법을 통해 그 과정을 이미징 할 수 있고, 세포의 물리적 힘을 측정하는 TFM, MSM 기법을 이용해 기계적 힘의 변화과정 또한 가시화 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 3 kPa의 탄성계수를 가진 폴리(아크릴라미드)(PA) 젤을 이용하여 군집에 의한 정지마찰력 및 세포 간의 부착력 형성 패턴을 가시화하고자 하였다. 본 실험에서 사용한 TFM은 Fig 2(a)와 같이 세포 군집의 유무에 따른 하이드로 젤 표면에 심어져 있는 형광 비드의 변화량을 측정하여 이를 정지마찰력으로 계산하는 분석 방법이다. Fig 2(b)는 원형

으로 패턴링 한 유선 상피세포군집의 위상차 이미지를 나타내며, Fig 2(c)는 하이드로 젤 표면에 심어진 형광 비드 이미지다(주황색 실선은 세포 군집의 가장자리를 나타냄). 이러한 형광 비드의 움직임은 MATLAB 프로그램을 통한 PIV 방법으로 분석하며 결과적으로 Fig 2(d)와 같이 정지마찰력의 방향과 크기를 지도로 가시화할 수 있다. 데이터 속 파란색은 원형의 중심을 향한 인쪽 방향의 힘을 나타내며, 빨간색은 원형의 바깥 방향의 힘을 나타낸다. 오른쪽 막대는 힘의 크기를 의미하며 단위는 Pa이다.

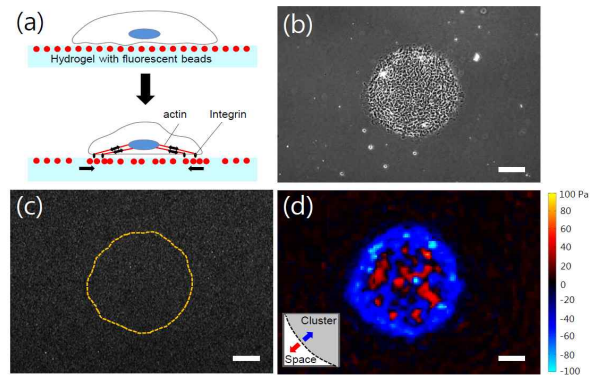


Fig. 2. Measurement of traction force exerted by the cell. (a) Schematics of the principle of TFM. (b) Reference phase image of patterned cell cluster. (c) Reference image of embedded fluorescent beads. (d) Map of traction stresses, depicted as color (blue describes the inward direction to the center, and red describes the outward direction). All scale bars represent 200 μm .

Fig 3(a)는 TFM 방법으로 세포 군집의 확장에 따른 세포와 바닥 사이의 정지마찰력을 가시화한 지도이다. 초기 세포 군집이 퍼져나감에 따라 원형 패턴의 가장자리에 있는, 빈 공간과 접하고 있는 부분의 세포들은 가장자리를 따라 파란색 밴드를 형성하고 있는 것을 확인할 수 있다. 즉, 세포 군집의 확장에 있어서, 빈 공간과 맞닿아 있는 부분들은 적극적으로 이동해 나가기 위해 바닥을 군집 안쪽을 향해 강하게 끌어당기고 있으며 이에 대한 반작용으로 하이드로 젤 표면이 세포가 앞으로 나아갈 수 있도록 밀어주는 형태를 보인다는 것을 알 수 있다. 본 연구에서는 이러한 가장자리 세포들의 강한 정지마찰력은 세포와 바닥 사이의 생물학적 접촉부와 밀접한 연관이 있을 것이라 판단하였고, 이를 확인하기 위해 세포-바닥 연결부인 초점접착결합구조(focal adhesion complex)에 존재하는 paxillin이라는 단백질을 형광 염색을 통해 확인하였다. Paxillin은 비활성화 되어 있을 때에는 세포 전역에 흐릿하게 퍼져있

지만 활성화될 때에는 선명한 반점 형태로 형상화되며 힘이 결집 된다. Fig 3(b)의 녹색 이미지는 세포군집이 확장되기 시작한 시점과 후기의 paxillin 형광 염색 결과를 나타내며 확장 초기 모두 비활성화 되어 있던 paxillin이 확장 후기로 갈수록 군집 가장자리 세포들에서 활성화 되는 현상을 보여주었다. 즉, 빈 공간과 만난 세포-바닥면 사이의 결합부위 단백질은 점차 활성화되어 세포 바닥면(하이드로젤 표면)을 더욱 큰 힘으로 끌어당긴다는 것을 알 수 있으며 이는 EMT 현상의 특징 중 하나이다 (Fig 3(c)). 흥미롭게도 이보다 몇 줄 뒤에 있는 세포들은 바닥면을 반대로 밖으로 밀어내는 힘의 경향을 보이고 있다. 이러한 반대방향으로 나타나는 마찰력의 반복적인 패턴은 시간이 지남에도 계속 유지되며 군집 확장을 이끌어 나가고 있다.

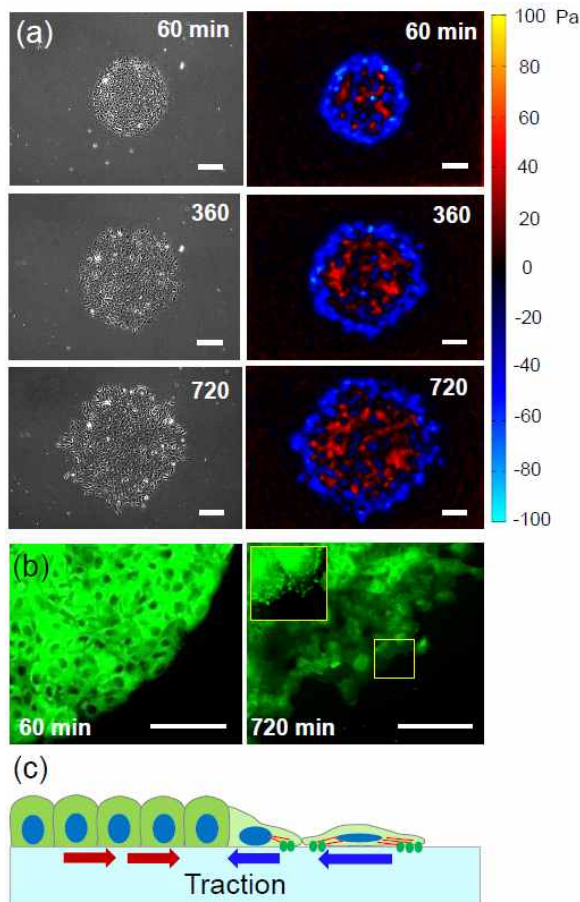


Fig. 3. Physical dynamics within the expanding cell cluster. (a) Visualization of time-lapse phase images and traction stresses. (b) Paxillin (green) for the initial cluster (60 min) and the expanded cluster (720 min) (Inset: enlargement of paxillin at the edge cells). (c) Schematics of the EMT within the expanding cell cluster. All scale bars represent 200 μm .

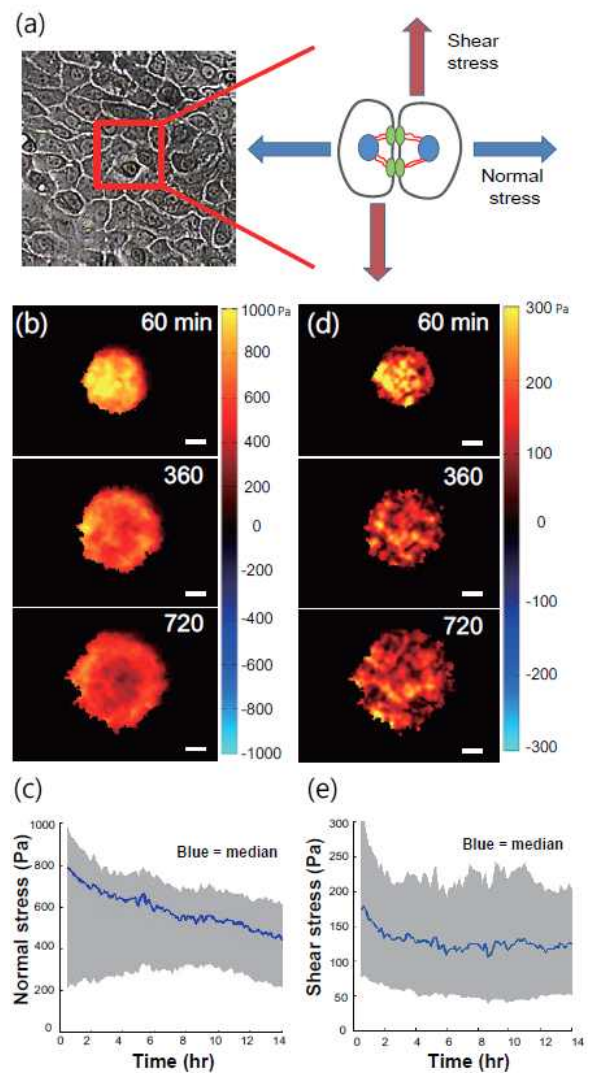


Fig. 4. Visualization of intercellular stress using the MSM. (a) Schematics of intercellular stresses (normal stress and shear stress). (b) Representative time-lapse images of normal stress. (c) Average normal stress of the entire cluster during expansion. (Blue line : median value, Gray region : 10~90 percentile of data). (d) Representative time-lapse images of shear stress. (e) Average shear stress of the entire cluster during expansion. (Blue line : median value, Gray region : 10~90 percentile of data). All scale bars represent 200 μm .

이러한 세포와 바닥면 사이의 힘 이외에도 군집 내부에는 이웃하는 세포들 사이에 미치는 힘 역시 중요한 고려대상이 되어 왔다^{7, 8)}. 이에, 본 연구에서 또한 군집 확장에 따른 세포 간의 수직응력 및 전단응력 변화를 측정하고 이를 가시화하기 위해 앞에서 구한 세포 정지마찰력 측정 결

과를 토대로 MSM 방법을 도입하여 분석을 진행하였다. 이웃 세포간의 힘은 크게 수직응력, 그리고 전단응력 이렇게 두 가지로 나뉜다. 수직응력은 이웃 세포들 간의 경계면에 수직하게 작용하는 힘이며 이 값이 양수인 경우는 맞닿은 세포들이 서로 잡아당기는 인장력이 작용한다고 간주할 수 있다. 반대로 음수 값의 경우에는 세포들이 서로 부딪히는 수축력이 작용한다고 볼 수 있다. 전단응력은 세포 사이의 경계면과 평행하게 작용하는 힘이며 세포 간의 부착 정도에 따라 다양한 값을 갖는다(Fig 4(a)). 군집의 확장 초기, 세포와 세포 사이의 수직응력은 세포들이 이웃 세포들과 가장 밀집되어 있는 군집의 중심 부분에서 최대 값을 보였다. 이처럼 중심부에서의 최대 응력값을 보이는 이유는, 군집의 가장자리 세포로부터 중심부 방향으로 세포 각각의 정지마찰력이 축적되기 때문으로 이해할 수 있다. 또한 수직응력은 군집 전반에 걸쳐 양의 값을 갖게 되는데, 이는 군집 가장자리의 세포들이 방사상으로 퍼져나 가려고 하며 내부의 세포들을 바깥방향으로 계속하여 잡아당기기 때문에 각각의 세포들은 인장력을 느끼게 되는 것으로 이해할 수 있다. 시간이 지나 군집이 확장되어 중심부의 세포들이 비교적 자유로워짐에 따라, 초기 집중되어 있던 중심부의 수직응력은 급격하게 감소하게 되며, 마치 중심부에서 가장자리 쪽으로 응력이 전파되는 듯한 현상을 관찰할 수 있다(Fig 4(b)). 또한 초기 밀집되어 있던 수직응력은 군집이 확장되면서 전체적으로 감소하는 패턴을 보였다(Fig 4(c)). 세포 경계면에 평행 방향으로 작용하는 전단응력 또한 확장 초기에 높은 값들이 전체적으로 나타났으며 군집 확장이 이루어질수록 점차 낮아지는 경향성을 보였다(Fig 4(d, e)). 즉, 확장 초기 단단히 밀집되어 세포 간 부착력이 높고 움직임이 자유롭지 못하던 군집 내부 세포들이 군집이 확장됨에 따라 움직임이 자유로워져 세포 간 부착력 및 영향력이 낮아지고 결국 수직 및 전단 응력의 감소로 이어지고 있음을 보여준다.

4. 결 론

본 연구에서는 하이드로 젤 위에 미세패턴으로 구현한 세포 군집의 이동성질 파악하고자 하였으며, 물리적 특성을 이해하기 위한 방편으로 PIV 기법을 적용한 TFM, MSM을 이용해 군집 내부의 정지마찰력, 수직응력, 그리고 전단응력의 변화 패턴을 분석하고자 하였다. 세포 군집은 확장될 수 있는 환경 속에서는 세포 자신의 특성을 바꿈으로써 보다 높은 이동특성을 나타낼 수 있음을 확인하

였다. 또한, TFM 측정 결과는 세포 군집이 바닥과 힘을 교환하는 방식을 정량적으로 보여주었다. 빈 공간과 직접 맞닿아있는 세포일수록 이동할 수 있는 여건이 잘 조성되며 이에 따라 높은 정지마찰력을 형성하고 있었으며 세포 간 수직 및 전단응력은 확장 초기, 중심에서 높은 값을 보이다가 군집이 확장될수록 점차 감소하는 추세를 보였다. 이는 군집 확장에 있어 경계면에 있는 세포와 바닥 사이의 힘이 중요한 역할을 함과 동시에 확장 초기 세포 간에 밀집되어 큰 힘을 내던 중심부 세포들 간의 응력이 점차 군집 전체로 분산된다는 것을 보여준다.

물리적 힘의 변화가 있는 일레로는 일반조직에 비해 단단해지는 종양 조직을 생각할 수 있다. 조직이 단단해지는 경우, 세포와 바닥 사이의 정지마찰력이 강해진다. 이렇게 강해진 마찰력은 세포의 이동특성과 연관이 있으며 결과적으로 군집 내 세포들 간의 물리적 연결에 영향을 미칠 것이다. 즉, 암 전이가 일어나기 위해 종양조직으로부터의 세포가 분리되어 나오는 분산 현상은 물리적인 힘과 밀접한 연관이 있을 것이라 예상된다. 따라서 향후 세포 군집에 다양한 약물 처리를 통해 세포 간의 연결 혹은 세포 내부의 탄성력 등을 변화시켰을 때 나타나는 힘의 패턴 차이에 대한 가시화를 시도하고자 한다. 이러한 연구들은 체내의 주요 기작인 세포 군집의 이동 및 분산 기작을 이해함에 있어 중요한 연결점을 제공해 줄 것으로 기대되는 바이다.

5. 후 기

본 연구는 한국연구재단의 글로벌연구네트워크 지원사업인 NRF-2013S1A2A2035518의 지원으로 수행됨.

Reference

- 1) C. L. Chaffer and R. a Weinberg, 2011, "A perspective on cancer cell metastasis," *Science*, vol. 331, no. 6024, pp.1559-64
- 2) P. Friedl and Darren Gilmour, 2009, "Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer", *Nature review molecular cell biology*, vol. 10, pp.445-457
- 3) I. Y. Wong, S. Javaid, E. A. Wong, S. Perk, D. A. Haber, M. Toner, D. Irimia, 2014, "Collective and individual migration following the epithelial-mesenchymal transition," *Nature materials*, vol. 13, pp.1063-1071

- 4) J. D. Rooij, A. Kerstens, G. Danuser, M. A. Schwartz, and C. M. Waterman-Storer, 2005, "Integrin dependent actomyosin contraction regulates epithelial cell scattering", *The Journal of cell biology*, vol. 171, no. 1, pp.154~164
- 5) E. M. Howard, S. K. Lau, R. H. Lyles, G. G. Birdsong, J. N. Umbreit, and R. Kochhar, 2005, "Expression of E-cadherin in high-risk breast cancer", *Journal of cancer research and clinical oncology*, vol. 131, no. 1, pp.14~18
- 6) D. T. Tambe, U. Crutelle, X. Trepate, C. Y. Park, J. H. Kim, E. Millet, J. P. Butler, J. J. Fredberg, 2013, "Monolayer stress microscopy: Limitations, artifacts, and accuracy of recovered intercellular stresses", *Plos one*, 9(1)
- 7) X. Trepate, M. R. Wasserman, T. E. Angelini, E. Millet, D. a. Weitz, J. P. Butler, and J. J. Fredberg, 2009, "Physical forces during collective cell migration," *Nature Physics*, vol. 5, no. 6, pp. 426~430
- 8) D. T. Tambe, C. C. Hardin, T. E. Angelini, K. Rajendran, C. Y. Park, X. S. Picamal, E. H. Zhou, M. H. Zaman, J. P. Butler, D. A. Weitz, J. J. Fredberg, X. Trepate, 2011, "Collective cell guidance by cooperative intercellular forces", *Nature Materials*, vol. 10, no. 6, pp.469~475