ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science **2021** Vol. 31. No. 2. 248~255 DOI : https://doi.org/10.5352/JLS.2021.31.2.248

- Review -

The Significance of Cancer Stem Cells in Canine Mammary Gland Tumors

Seo-Young Park[1†], Yeong-Bin Baek[2†], Sang-Ik Park[2], Chang-Min Lee[2*] and Sung-Hak Kim[1*]

[1]*Department of Animal Science, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea*
[2]*Department of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine and BK21 FOUR Program, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea*

Received February 8, 2021 /Revised February 17, 2021 /Accepted February 17, 2021

Mammary gland tumors are one of the most common cancers in female dogs, and there are various types of cells depending on the tumor type. Complex carcinoma consists of a combination of luminal epithelial and myoepithelial cells with intra-tumoral heterogeneity. However, the origins of these tumor cells and their effects on the malignancies of tumors have not been identified. Recently, it has been reported that cancer stem cells, identified in several types of human tumors, are involved in tumor heterogeneity and may also contribute to malignancies such as tumor recurrence and metastasis. Interestingly, cancer stem cells share several abilities of self-renewal and cell differentiation into multiple types of cancer cells, but they have abnormal genetic mutation and signal transduction pathways to regulate the maintenance of stem cell characters. Moreover, it is known that these cell populations contribute to cell metastasis as well as cell resistance against chemo- and radio-therapeutics that promote tumor recurrence. The existence of cancer stem cells might explain the intra-tumoral heterogeneity and cancer aggressiveness during tumorigenesis in canine mammary gland tumors. This review summarizes the characteristics and types of canine mammary gland tumors, the definition of tumor stem cells, methods of isolation, and clinical significance.

Key words : Cancer stem cells, canine mammary tumors, drug resistance, self-renewal

서 론

개 종양 중 유선종양이 가장 빈번하게 발생한다. 흥미롭게도 사람의 유방암보다도 개 유선종양이 더 높은 빈도로 발생하는데 매년 사람의 유방암은 100,000명 당 85명, 개의 경우 100,000마리 중 198 마리가 진단된다[4, 27]. 또한, 나이에 따른 발병율은 개의 경우 8~11세, 사람의 경우 50~58세로 나이에 따라 발병율이 급격히 증가한다[30]. 발생 원인으로서 호르몬에 대한 영향이 가장 큰 것으로 여겨지는데 그 이유는 개의 첫 생리 이전에 중성화를 실시할 경우 0.5% 미만으로 유선종양 발생이 거의 일어나지 않기 때문이다[11]. 그 외 비만 역시 유선종양 발생율과 높은 상관 관계를 높이는 것으로 알려져 있다[16].

개 유선종양의 치료는 외과적 수술, 화학 항암제, 그리고 방사선 치료로 나뉘어지는데, 종양 조직을 절제하는 외과적 수술이 가장 보편적이다. 하지만, 수술이 어렵거나 수술 후 화학 항암제 및 방사선 치료는 사람의 유방암 임상 연구 결과를 바탕으로 사용하고 있기 때문에 개의 유선종양 치료엔 한계가 있다. 무엇보다 개 특이적 종양 발생 기전을 이해하고 악성화 관련 비정상적 신호 기전을 밝히는 연구가 급선무라 할 수 있다. 따라서, 본 리뷰 논문에서는 개 유선종양에 대한 항암 약물 개발과 조기 진단을 위해 개 유선종양의 조직학적 특성과 종양 악성화와 종양 내 세포 이형성에 관여하는 종양 줄기세포의 개념, 분리 방법 및 발생 기전을 통한 임상적 중요성을 논하고자 한다.

본 론

개 유선종양의 특성

개의 유방 내에는 나뭇가지처럼 뻗은 유관으로부터 형성된 유선소엽폐포(lobuloalveolar)가 존재한다. 임신기간 동안 급격히 발달하는 유선소엽폐포의 안쪽을 살펴보면 비어 있는 공간인 내강을 둘러싸고 있는 세포층에 내강상피세포(luminal epithelium)가 있고 아래 근상피세포(myoepithelium)와 그 바깥쪽을 둘러 싸고 있는 기저막(basal membrane)으로 구성되어 있다. 내강상피세포는 유즙의 생산 및 수송을 담당한다. 근상피세포는 소엽폐포 내 내강상피세포 바깥 둘레에는 비연속적으로 띄엄 띄엄 존재하지만, 유선엽 사이의 내강상피세포에는 연속적으로 내강상피세포를 둘러싸고 있는 외배엽유래의 세포이다. 이들은 유분출, 기저막 합성, 주변 세포의 성장,

†**Authors contributed equally.**
***Corresponding authors**
Tel : +82-62-530-2115 Fax : +82-62-530-2129
E-mail : sunghakkim@jnu.ac.kr (Sung Hak Kim)
Tel : +82-62-530-2871, Fax : +82-62-530-2809
E-mail : cmlee1122@jnu.ac.kr (Chang Min Lee)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

분화 및 형태 발달에 관여한다[29]. 근상피세포의 수축성 특징은 민무늬근(smooth muscle)과 유사 한데 그 이유는 세포질에 수많은 액틴과 미오신 섬유관을 가지고 있기 때문이다. 근상피세포가 존재하고 있는 기저 부분은 유선 내에서 대사를 조절하고 내강과의 내분비신호전달을 통해 상호 소통을 통해 유선내 상피세포 형성 및 항상성을 유지하는 기능을 한다. 하지만, 이런 기저와 내강과의 상호 소통에 문제가 생기면 수유결핍 및 발암 등 갖가지 질병 및 발달에 이상이 발생한다[25, 35]. 흥미롭게도 이러한 기저 부분에 유선줄기세포집단이 존재하는 것으로 알려져 있는데 이들로부터 내강상피세포와 근상피세포로 분화될 수 있다. 이러한 측면에서 개 유선종양 내 다양한 세포종류는 기저내 유선줄기세포의 변형된 종양줄기세포가 관여할 것으로 보여진다[31]. 기저 바깥 주변은 라미닌 성분이 풍부하며 세포외기질(extra cellular matrix) 및 섬유아세포(fibroblast), 지방세포(adipocyte), 면역세포(immune cell) 등을 포함하고 있다.

유선종양은 사람, 개, 그리고 고양이에서 발생하는데 이들 중 특이하게 개 유선종양은 근상피세포의 기능이 중요하다. 예를 들어, 사람과 고양이의 유선종양은 내강상피기원의 한가지 타입의 세포로 구성되어 있어 선종(adenoma)과 상피암(carcinoma)으로 분류되지만, 개 유선종양은 형태학적으로 매우 다양하며 내강상피세포, 근상피세포 및 중간엽세포가 개별적으로 혹은 서로 섞여 다양한 종류의 종양이 발생한다[29].

개 유선종양의 조직학적 특성

종양의 조직 및 형태학적인 특성과 예후 정보를 종합적으로 고려한 WHO 국제 분류 기준으로 개 유선종양을 분류할 수 있다[11, 23](Table 1). 개 유선종양은 순수하게 상피세포만 구

Table 1. The different types of malignant and benign canine mammary [adapted from Gray et al ; Misdorp et al. [11, 23]

Histological classification	Description
Carcinomas	
In situ carcinoma	No invasion of the basement membrane
Complex carcinoma	Presence of luminal epithelial and myoepithelial components
Simple carcinoma	Composed of one cell type, resembling either luminal epithelial, or myoepithelial cells. Often invasive with lymphatic and/or haematogenous spread. Increasing malignancy from tubulopapillary to solid to anaplastic tumors
Tubulopapillary carcinoma	Characterized by tubules and/or papillary projections
Solid carcinoma	Characterized by the arrangement of tumor cells in solid sheets, cords or nests
Anaplastic carcinoma	Characterized by highly infiltrative pleomorphic epithelial cells
Spindle cell carcinoma	Spindle cells arranged in epithelial patterns
Squamous cell carcinoma	Characterized by solid sheets and cords of cells with squamous differentiation
Mucinous carcinoma	Characterized by mucin production
Lipid-rich carcinoma	Characterized by cells with vacuolated cytoplasm containing large amounts of lipids
Sarcomas	
fibrosarcoma	Fibroblasts with collagen production
Osteosarcoma	Characterized by neoplastic cellular osteoid and/or bone formation
Chondrosarcoma	Very rare
Liposarcoma	Very rare
Mixed	
Carcinosarcoma	Carcinomatous and sarcomatous components
Carcinoma/sarcoma in benign tumors	Foci of malignant cells within a complex adenoma or benign mixed tumor
Benign mammary tumors	
Adenoma	
Simple	Well differentiated luminal epithelial or myoepithelial cellular tumor
Complex	Characterized by luminal epithelial and myoepithelial cells
Basaloid	Uniform cords and clusters of basaloid epithelial cells
Fibroadenomas	
Low/high cellularity	Mixed luminal epithelial cells, stromal cells and myoepithelial cells
Mixed	
benign	Benign cells resembling epithelial components (luminal and/or myoepithelial) and mesenchymal cells that have produced cartilage, bone or fat in combination with fibrous tissue

성된 단순 선종(simple adenoma)이나 단순 상피암종(simple carcinoma), 중간엽세포로만 구성된 섬유 선종(fibroadenoma), 섬유 육종(fibrosarcoma), 골육종(osteosarcoma), 혹은 다른 종류의 육종, 반면에 상피세포와 근상피세포가 섞여 있는 복합 선종(complex adenoma) 혹은 복합 상피암종(complex carcinoma), 상피세포와 중간엽세포가 섞여 있는 양성혼합 종양(benign mixed tumors) 혹은 상피 육종(carcinosarcoma)으로 나눌 수 있다. 인간 유방암과는 다르게 대부분 개 유선종양은 양성의 경우가 전체 유선종양 중 절반 정도로 빈번하게 관찰되며 중간엽세포 기원 종양(섬유 선종, 섬유 육종, 그리고 골육종)과 근상피세포의 분열을 보이는 종양(복합 선종과 복합 상피암종)이 종종 확인된다[14]. 이러한 결과로부터 개 유선종양은 인간 유방암과는 다른 독특한 종양발생 기작을 가지고 있고 이에 맞는 더 구체적인 치료 전략이 필요하다. 개 유선종양의 악성 정도는 세포의 종류, 핵과 세포의 다형성, 유사분열지수, 괴사조직 존재, 림프절로의 전이 정도에 따라 결정된다[13].

상피내암종(in situ-carcinoma)는 기저막내에서 유선포 안에 세포막 층을 형성하며 발달한 종양 타입으로 이는 인간 유방암의 DCIS (Ductal Carcinoma In Situ)와 유사하다. 단순 상피암종(simple type carcinoma)는 내강상피세포 혹은 근상피세포로만 구성 되어있다. 관상 상피암종(tubular carcinoma)는 관 모양을 형성하는 것이 특징이며 이는 개에서 흔한 유선종양 타입이다. 관상유두 상피암종(tubulopapillary carcinoma)는 관상 상피암종 보다 더 악성인 종양으로서 관 내강쪽으로 유두가 확장되어 있는 조직학적 특성을 가지고 있다.

고형 상피암종(solid type carcinoma)의 경우 전형적인 내강의 구조가 보이지 않는 단단한 덩어리 형태로 형성되는 종양 타입으로 주변 림프절로의 전이가 발생할 수 있으며 종양 근처에서 발견된다. 미분화 상피암종(anaplastic type carcinoma)는 상피암종에서 가장 악성이며 이는 소엽간 연결조직 및 림프관으로의 전이를 보이며 소규모 그룹을 형성하거나 단일 세포 형태로 종양을 형성하며 국소 림프절로의 전이 후 폐로 전이된다. 복합 상피암종(complex carcinoma)는 악성상피세포와 근상피세포가 함께 존재하는 것이 특징이며, 이 종양의 주변에는 림프구와 형질(plasma) 세포로 구성된 염증반응을 보인다. 악성 상피세포 종양 중 특별한 타입으로는 편평세포암종(squamous cell carcinoma), 점액성 상피암종(mucinous carcinoma), 지질 풍부 상피암종(lipid-rich carcinoma), 악성 근상피종(malignant myoepithelioma), 염증성 상피암종(inflammatory carcinoma)가 있다. 편평세포 암종의 경우 편평세포나 관상피세포의 변화로 일어나며 형태학적으로 일반 상피세포 종양과 유사하며 종양 주변에 급성 및 만성 염증이 일어난다.

지질 풍부 상피암종의 경우 중성화하지 않은 어린 암컷에서 발생하며 이는 괴사를 동반할 수 있다. 세포는 둥글고 경계가 뚜렷하고 그 안에 액포를 형성할 수 있는 것이 특징이다. 일부 사례에서는 림프침습과 림프절 전이를 보여준다.

유선을 구성하고 있는 중간엽세포에서도 유선종양이 시작될 수 있는데 이를 육종(sarcoma)이라고 부르며 상대적으로 상피암종에 비해 낮은 확률로 발생한다. 육종 중 가장 흔하게 발생하는 것은 골육종(osteosarcoma)이며 종양조직내에서 뼈 및 연골을 형성하며 이것은 혈관을 타고 림프로 전이될 수 있다. 연골육종(chondrosarcoma)는 흔하지 않는 종양타입으로 세포의 다핵성이 발견되며 핵윤곽이 불규칙하거나 두드러진 형태의 세포를 포함하고 있는 것이 특징이다. 섬유육종암(fibrosarcoma)은 기존 종양조직 내 혹은 기질(stromal)에서 발생할 수 있으며 이는 잘 짜여진 패턴의 방추형세포로 구성되는 것이 특징이다. 최근 보고에 따르면, 157 마리의 개 유선종양을 유전자 발현 패턴을 기반으로 그룹핑 한 결과 한 종양 그룹이 가장 낮은 생존율을 가지면서 특이하게도 높은 EMT (상피세포에서 중간엽세포로의 전이) 관련 유전자 발현과 근상피 그리고 내강상피 전구세포로 분화할 수 있는 종양줄기세포에서 보이는 낮은 claudin 발현을 가지고 있음을 보고 하였다. 또한, 이러한 그룹에 속하는 종양 타입은 상피세포와 중간엽세포가 뒤섞여 있는 조직학적 특성을 가지고 있었다[14].

유선종양과 종양줄기세포

개 유선종양은 인간 유방암과 달리 복합 상피암종(complex carcinoma)과 같이 여러 종류의 세포가 동시에 존재하는 종양이 발생된다. 최근 보고에 따르면 이러한 종양 내의 세포 이형성(intra-tumoral heterogeneity)은 종양조직 내 존재하는 종양줄기세포가 분화하여 다양한 세포를 만들며 종양 발달 과정에서도 중요한 역할을 한다[8, 18]. 이러한 종양줄기세포(cancer stem cell)는 자가재생(self-renewal) 및 여러 세포로 분화될 수 있는 특성을 정상줄기세포와 공유하지만, 특이적으로 종양 개시 단계부터 재발에 관여하는 악성 세포로 알려져 있다[5, 8]. 무엇보다 정상줄기세포와 다른 점은 비정상적인 유전자 돌연변이와 줄기세포특성 유지 관련 신호 경로에 이상을 가지고 있다라는 점이다.

기존의 종양 생성 이론인 확률론적 모델(stochastic model)은 종양 조직내 존재하는 모든 세포가 자가재생 및 종양생성 능력을 가지고 세포 이형성에 영향을 미친다는 것이다(Fig. 1). 하지만 종양 조직의 일부 소수의 암세포를 면역결핍 마우스에 이식했음에도 불구하고 종양이 발생할 수 있다라는 결과는 모든 세포가 종양발생능을 갖는다는 확률론적 모델 보다는 상위계층에 있는 소수의 세포가 종양 발생에 적극적으로 관여한다는 체계적 모델(hierarchical model)이 더 가능성이 높은 것으로 보여 진다. 이 모델은 종양 조직내에 적은 수의 종양줄기세포만이 그들의 자가재생능을 통해 종양을 새롭게 생성하고 이로부터 여러 세포가 분화되어 전체 종양 조직을 구성한다라는 이론이다. 따라서, 이러한 체계적 모델을 통해 개 유선

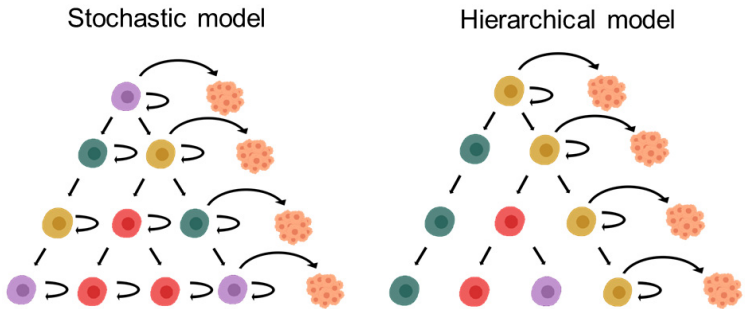

Fig. 1. Stochastic vs. hierarchical model of tumor formation. The stochastic model indicates that each tumor cell is able to initiate and maintain a tumor. In the hierarchical model, just a few cells, known as the CSC (Cancer Stem Cell), initiate tumor growth through an asymmetric cell division.

종양조직내의 세포 이형성(intra-tumoral heterogeneity)를 설명할 수 있을 것으로 보인다.

종양줄기세포는 종양개시세포(tumor initiating cell) 혹은 종양줄기유사세포(cancer stem- like cell)라고도 불린다. 왜냐하면, 보통 면역결핍마우스에 사람 유래 암세포를 이식하여 종양을 형성시킬 때 약 100~200만개가 사용되는데 종양줄기세포의 경우 약 100~1,000개의 세포만 이식하여도 종양을 형성시킬 수 있기 때문에 종양개시세포라고 불린다. 또한, 이러한 세포들은 정상줄기세포와 많은 특성들을 공유하고 있다. 정상줄기세포처럼 자가재생능을 통해 비대칭적으로 하나는 줄기세포성격을 유지하고 다른 나머지 세포는 여러 세포로 분화되며 무한한 증식 능력, 혈관과의 관련, 분화되지 않는 세포들의 유전자 발현을 보인다. 하지만, 가장 큰 차이점은 종양형성능이다. 종양줄기세포는 정상줄기세포와 다르게 면역결핍마우스에 이식시켰을 때 종양이 발생한다. 이러한 종양줄기세포는 종양유전자 및 종양억제유전자들의 비정상적인 돌연변이로 인한 세포의 증식이 조절되지 않고 WNT 및 NOTCH와 같은 줄기세포 조절 신호전달체계가 제대로 조절되지 않아 종양발생, 종양전이 및 항암제 저항성 특성을 가지고 있다. 뿐만 아니라, 줄기세포의 특성을 유지시키는 니치(niche)내의 미세환경과 주변 성장인자가 정상줄기세포와 다르다. 그렇다면 종양줄기세포의 기원은 어떤 세포일까? 정상줄기세포와 유사점 때문에 정상줄기세포로부터 유전자 돌연변이와 추가적인 염증과 같은 주변 환경의 변화로 인해 종양줄기세포가 발생되었을 것이라는 가설과 이미 유전자 돌연변이를 가지고 있는 분화된 세포로부터 역분화(dedifferentiation) 라는 과정을 통해 새로운 종양줄기세포가 생성될 수도 있다는 가설들이 존재한다.

종양줄기세포의 특성

방사선치료 혹은 항암제를 투여했을 때 종양 조직내의 많은 종양 세포들은 죽지만 일정 시간이 지나면 다시 재발한다(Fig. 2). 그럼 이러한 항암제 저항성을 갖는 세포들은 어디서 온 것일까? 원래부터 종양 조직내에 저항성을 가지고 있는 세포들이 재발에 관여했거나 항암제에 계속적인 자극에 적응하면서 저항성이 새롭게 생긴 세포들이 영향을 미칠 수 있다. 최근 보고에 의하면 종양줄기세포들은 종양 내 혈관주변 및 저산소

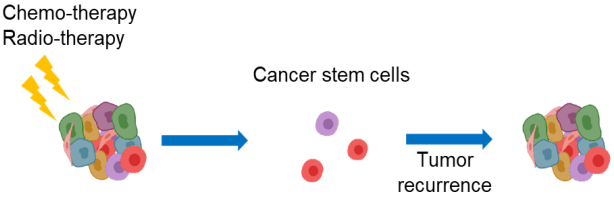

Fig. 2. Cancer stem cells resistance to chemo- and radio-therapy causing tumor to recurrence. Anticancer therapies can reduce bulk tumor burden, but CSCs could survive and lead to tumor regrowth.

주변 니치(niche)에 원래부터 존재하며 종양 수술 후 단세포 수준으로 분리한 후 항암제에 대한 반응을 조사한 결과 상대적으로 항암제에 저항성을 보이는 세포가 있는 것으로 보아 원래부터 저항성을 갖는 세포가 존재할 수 있음을 의미한다[16]. 즉, 항암제 투여했음에도 불구하고 결과적으로 이미 저항성을 갖는 종양줄기세포들이 재발에 관여할 수 있을 것이라는 것이다. 이러한 종양줄기세포들은 세포 분열이 오랜 기간동안 정지된 상태(quiescent state)를 유지할 수 있기 때문에 더 오래 DNA를 유지 및 보존할 수 있어 방사선 치료에 영향을 덜 받거나[7], ABC 약물펌프의 발현으로 외부에서 내부로 들어오는 약물을 외부로 배출시키거나, 항아폽토시스관련 단백질들의 높은 발현과 더불어 DNA 손상에 대한 수선 기능이 발달되어 있기 때문이다[36](Fig. 3). 환자 생존률에 큰 영향을 미치는 원인 중 하나가 다른 조직으로의 전이 인데 사람 선암종(adenocarcinoma)의 전이과정에서 EMT (Epithelial to mesenchymal transition) 라는 과정을 통해 이는 이미 분화된 상피세포로부터 이동성이 강한 중간엽 성격의 세포로 바뀌는 것을

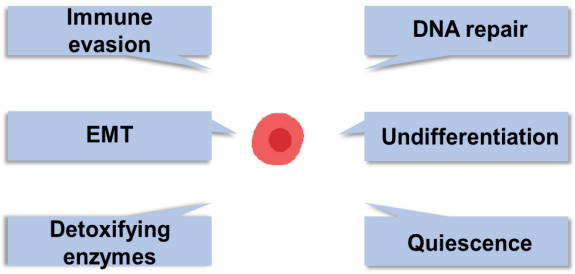

Fig. 3. Schematic representation of CSCs properties.

의미한다. 이러한 EMT를 유도하는 신호 중 하나가 줄기세포 관련 WNT 신호전달이다. 또한 유방암으로부터 골수로 전이된 세포의 표현형을 관찰했을 때 종양줄기세포의 성격을 가지고 있는 것으로 보아 전이에도 종양줄기세포가 관여할 수 있다[1, 3]. 따라서, 이러한 종양줄기세포의 성격을 이해하고 조절 기전을 이해한다면 종양의 전이와 재발을 억제할 수 있는 효과적인 약물을 개발할 수 있을 것이다.

종양줄기세포 분리 및 표지 인자

개 종양에서 종양줄기세포는 처음으로 골육종(osteosarcoma)에서 확인되었으며 이 후 뇌종양(glioma), 폐종양(pulmonary carcinoma), 전립선 종양(prostate carcinoma), 혈액종양(hepatocellular carcinoma), 흑색종(melanoma), 횡문근육종(rhabdomyosarcoma), 혈관육종(haemangiosarcoma), 선암종(mammary adenocarcinoma)에서 보고되었다[2, 6, 15, 19-21, 24, 26, 28]. 종양줄기세포를 분리하기 위해서는 그들의 기능적인 그리고 분자적인 특성의 이해가 무엇보다 필요하다[28]. 현재까지 알려진 개 유선종양에서의 종양줄기세포 분리 방법은 종양줄기세포성격유지를 영양 조성, 특이 표면단백질의 발현 유무, 효소 활성화 정도, 세포 형태학적인 특성을 이용한다. 일반적으로 종양줄기세포는 혈청에 의해 쉽게 세포 분화가 일어나는데 종양조직으로부터 세포 분리 후 종양줄기세포가 분화되지 않도록 혈청이 없는 상태의 배지에 B27, EGF (Epidermal Growth Factor), bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), 그리고 헤파린이 추가된 배양액을 특수 low attachment 세포배양 용기를 사용하여 배양을 하면 분화되지 않는 떠 있는 구형의 종양줄기세포들을 관찰할 수 있고 이들은 여러 세포들로 분화가 가능하다[10]. 이러한 방법을 이용하여 Cocola et al 그룹이 처음으로 2009년에 개 유선종양줄기세포를 분리하였다[6]. 뿐만 아니라, 이러한 세포들이 콜라겐 젤 위 *in vitro* 3D 배양에서 유선의 관 모양을 비슷한 가지 모양으로 분화되는 것을 보여주었고 면역결핍마우스의 유선 fat pad에 이식 시 종양이 형성되었다. 이러한 배양 방법을 통한 종양줄기세포 분리방법은 다음과 같은 한계가 있는데 *in vivo* 환경을 완전하게 반영하지 못해 종양줄기세포마다 성격이 다를 수 있고 종양줄기세포의 구형 형태가 단순한 세포 뭉침 현상인지 자가재생능을 보여주는 지 명확하게 구분 짓기 어렵다. 현재까지 가장 많이 사용되는 방법은 유세포분석기를 사용하여 세포표면 표지자와 기능적인 특성을 기초로 해서 종양줄기세포를 분리할 수 있다. 줄기세포 표면 마커인 CD44와 CD24는 인간 유방암에서 정상줄기세포 및 종양줄기세포에서 발견되며, 이 중 $CD44^{+}/CD24^{-}$ 표현형이 종양줄기세포의 특성을 가진다고 알려져 있으며, 이는 개 유선종양에서도 같은 표현형이 발견되었다[22]. 그 외 줄기세포 항원과(Sca-1) 과 CD10, CD34, CD44, CD24, 그리고 CD49f에 대한 추가적인 항체를 이용하여 개 유선종양줄기세포를 분리하기도 하였다[9].

종양줄기세포는 비정상적인 세포 분열 및 저산소 환경에서 생존하기 위해 특이적인 대사활동을 필요로 한다. 알데하이드 탈수소 효소(ALDH; aldehyde dehydrogenase)는 세포 내에 존재하는 알데하이드를 산화시켜 종양줄기세포에서 다양한 생물학적 특성 및 산화스트레스에 대한 반응, 그리고 약물 저항성 및 항상성에 관여한다. 분석 방법은 효소의 기질을 첨가하여, 효소의 활성화 정도에 따라 기질이 반응하여 형광을 발현하기 시작하고 이를 유세포분석기를 이용하여 형광을 보이는 종양줄기세포만을 분리할 수 있으며, 이 실험 방법은 인간 유방암과 개 유선종양에서 확인되었다[10]. 다음 방법으로 색소 배제법(dye exclusion)으로서 종양 줄기세포에는 ATP를 이용하여 세포 외부로 물질을 내보내는 ABC transporter의 특성을 이용하는 것이다. 이러한 특징으로 항암제에 대한 내성과도 직접적인 관련이 있다. 염료를 세포에 처리한 후 염색이 되지 않는 side 집단을 유세포분석기를 통해 분리할 수 있다. 현재까지 단 완전한 단 하나의 종양줄기세포 분리 방법은 없으며 일정한 결과를 얻기 위한 방법들이 향후 보완되어야 할 것이다.

개 유선종양 연구를 위한 세포 모델

In vivo 실험모델로 가장 많이 이용되는 마우스의 경우 인간과 개와 다른 유선 구조를 가지고 있다. 마우스는 비교적 덜 복잡한 유선구조를 가지고 있는데 마우스는 한 개의 유선포가 존재하는 반면 인간과 개는 가지 형태의 여러 유선포를 가지고 있으며 더 복잡한 세포 및 조직간의 상호작용이 일어난다[17]. *In vitro* 세포 배양을 통해 실제 *in vivo* 조직내의 세포와 세포, 세포와 세포외기질, 세포와 조직간의 상호작용을 이해하는 것은 불가능하다. 정상유선세포 뿐만 아니라 확립된 종양세포주 및 종양줄기세포들도 그 고유한 특성을 장기간 유지하기 어려우며, 원래 조직의 표현형 일부만 나타낸다고 알려져 있다[12]. 또한, *in vivo* 조직은 *in vitro*와 같은 2차원 구조가 아닌, 여러 세포 및 ECM이 잘 엮여진 형태의 3차원 미세환경을 형성한다. 이러한 미세환경은 세포간 상호작용을 통해 조직의 성장과 발달, 항상성, 기능 및 질병 발생에 관여한다. 종양조직내 미세환경에서 세포들은 생존을 위한 진화가 발생하며 이는 종양의 크기 및 진행속도에 영향을 미친다. 종양미세환경은 세포외기질과 정상 세포, 종양 활성화를 유도하는 주변기질세포(stromal cell)로서 섬유아세포, 대식세포와 같은 면역세포 및 지방세포로 구성된다. 따라서, *in vitro*에서 실제 조직과 유사한 세포들을 구성하고 구성된 세포들의 유전자형(genotype)과 표현형(phenotype) 성격을 유지하며 배양할 수 있는 시스템이 절대적으로 필요하다. 이러한 측면에서 최근 개발된 3차원 배양시스템이 오가노이드(organoid)이며, 이는 3차원 구조로 조직과 유사한 다양한 세포 집단이 인공장기로써 그 기능을 할 수 있다[33].

개 유선종양은 매우 이질적인 질병으로 종양 특성이 개체,

종양 내 세포 게놈, 생물학적 차이에 따라 달라지기 때문에 진다. 뿐만 아니라, 위와 같은 유방암의 이질성 및 종양미세환경은 복잡한 유방암 연구를 위한 실험모델로서 필요할 것으로 보인다.

결 론

지금까지 개 유선종양의 조직학적 특성과 종양줄기세포의 중요성에 대해서 논의하였다. 사람 종양에 비해 개 종양에서의 종양줄기세포 연구가 아직 활발하지 않지만 현재까지 밝혀진 그들의 종양 발달에서의 역할은 개 유선종양 치료의 타겟으로 관심을 끌기 충분하다. 특히, 종양줄기세포는 종양개시능과 항암제에 대한 저항성을 가지고 있기 때문에 종양줄기세포를 타겟으로 하는 전략이 무엇보다 임상적으로 필요하다. 한가지 전략은 종양줄기세포 특이 표지자를 타겟으로 하는 약물을 이용하여 선택적으로 종양줄기세포를 제거하는 것이다. 다른 전략으로 분화 유도제를 사용하는 것인데 정상세포에는 큰 영향을 미치지 않으면서 종양줄기세포만을 분화시켜 종양 성장 및 재발을 현저하게 줄일 수 있을 것이다. 향후 임상에 적용하기 위해서는 정확한 종양줄기세포 표지자의 발굴과 줄기세포 자가재생능 유지 및 분화 기작의 이해가 무엇보다 중요할 것이다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. and Clarke, M. F. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 3983-3988.
2. Aoshima, K., Fukui, Y., Gulay, K. C. M., Erdemsurakh, O., Morita, A., Kobayashi, A. and Kimura, T. 2018. Notch2 signal is required for the maintenance of canine hemangiosarcoma cancer stem cell-like cells. *BMC Vet. Res*. **14**, 1-16.
3. Balic, M., Lin, H., Young, L., Hawes, D., Giuliano, A., McNamara, G., Datar, R. H. and Cote, R. J. 2006. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin. Cancer Res*. **12**, 5615-5621.
4. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. and Jemal, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin*. **68**, 394-424.
5. Clevers, H. 2011. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat. Med*. **17**, 313-319.
6. Cocola, C., Anastasi, P., Astigiano, S., Piscitelli, E., Pelucchi, P., Vilardo, L., Bertoli, G., Beccaglia, M., Veronesi, M. C., Sanzone, S., Barbieri, O., Reinbold, R. A., Luvoni, G. C. and Zucchi, I. 2009. Isolation of canine mammary cells with stem cell properties and tumour-initiating potential. *Reprod. Domest. Anim*. **44**, 214-217.
7. Essers, M. A. G. and Trumpp, A. 2010. Targeting leukemic stem cells by breaking their dormancy. *Mol. Oncol*. **4,** 443-450.
8. Eun, K., Ham, S. W. and Kim, H. 2017. Cancer stem cell heterogeneity: Origin and new perspectives on CSC targeting. *BMB Rep*. **50**, 117-125.
9. Ferletta, M., Grawé, J. and Hellmén, E. 2011. Canine mammary tumors contain cancer stem-like cells and form spheroids with an embryonic stem cell signature. *Int. J. Dev. Biol*. **55,** 791-799.
10. Ginestier, C., Hur, M. H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C. G., Liu, S., Schott, A., Hayes, D., Birnbaum, D., Wicha, M. S. and Dontu, G. 2007. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* **1**, 555-567.
11. Gray, M., Meehan, J., Martínez-Pérez, C., Kay, C., Turnbull, A. K., Morrison, L. R., Pang, L. Y. and Argyle, D. 2020. Naturally-occurring canine mammary tumors as a translational model for human breast cancer. *Front. Oncol*. **10**, 617.
12. Keller, P. J., Lin, A. F., Arendt, L. M., Klebba, I., Jones, A. D., Rudnick, J. A., DiMeo, T. A., Gilmore, H., Jefferson, D. M., Graham, R. A., Naber, S. P., Schnitt, S. and Kuperwasser, C. 2010. Mapping the cellular and molecular heterogeneity of normal and malignant breast tissues and cultured cell lines. *Breast Cancer Res*. **12**, R87.
13. Kim, Y. H., Ahn, N. K., Roh, I. S., Yoon, B. I. and Han, J. H. 2009. Retrospective investigation of canine skin and mammary tumors in Korea. *J. Vet. Clin*. **8**, 229-236.
14. Kim, T. M., Yang, I. S., Seung, B. J., Lee, S., Kim, D., Ha, Y. J., Seo, M. K., Kim, K. K., Kim, H. S., Cheong, J. H., Sur, J. H., Nam, H. and Kim, S. 2020. Cross-species oncogenic signatures of breast cancer in canine mammary tumors. *Nat. Commun*. **11**, 3616.
15. Kishimoto, T. E., Yashima, S., Nakahira, R., Onozawa, E., Azakami, D., Ujike, M., Ochiai, K., Ishiwata, T., Takahashi, K. and Michishita, M. 2017. Identification of tumor-initiating cells derived from two canine rhabdomyosarcoma cell lines. *J. Vet. Med. Sci*. **79**, 1155-1162.
16. Lim, H. Y., Im, K. S., Kim, N. H., Kim, H. W., Shin, J. I., Yhee, J. Y. and Sur, J. H. 2015. Effects of obesity and obesity-related molecules on canine mammary gland tumors. *Vet. Pathol*. **52**, 1045-1051.
17. McNally, S. and Stein, T. 2017. Overview of mammary gland development: A comparison of mouse and human. *Methods Mol. Biol*. **1501**, 1-17.
18. Meacham, C. E. and Morrison, S. J. 2013. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* **501**, 328-337.
19. Michishita, M., Akiyoshi, R., Suemizu, H., Nakagawa, T., Sasaki, N., Takemitsu, H., Arai, T. and Takahashi, K. 2012.

Aldehyde dehydrogenase activity in cancer stem cells from canine mammary carcinoma cell lines. *Vet. J*. **193**, 508-513.
20. Michishita, M., Akiyoshi, R., Yoshimura, H., Katsumoto, T., Ichikawa, H., Ohkusu-Tsukada, K., Nakagawa, T., Sasaki, N. and Takahashi, K. 2011. Characterization of spheres derived from canine mammary gland adenocarcinoma cell lines. *Res. Vet. Sci*. **91**, 254-260.
21. Michishita, M., Ezaki, S., Ogihara, K., Naya, Y., Azakami, D., Nakagawa, T., Sasaki, N., Arai, T., Shida, T. and Takahashi, K. 2014. Identification of tumor-initiating cells in a canine hepatocellular carcinoma cell line. *Res. Vet. Sci*. **96**, 315-322.
22. Michishita, M., Otsuka, A., Nakahira, R., Nakagawa, T., Sasaki, N., Arai, T. and Takahashi, K. 2013. Flow cytometric analysis for detection of tumor-initiating cells in feline mammary carcinoma cell lines. *Vet. Immunol. Immunopathol*. **156**, 73-81.
23. Misdorp, W., Else, R. W., Hellmén, E. and Lipscomb, T. P. 1999. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat 2nd series, vol VII, Washington.in World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals.
24. Moulay, M., Liu, W., Willenbrock, S., Sterenczak, K. A., Carlson, R., Ngezahayo, A., Escobar, H. M. and Nolte, I. 2013. Evaluation of stem cell marker gene expression in canine prostate carcinoma- and prostate cyst-derived cell lines. *Anticancer Res*. **33,** 5421-5431.
25. Nelson, C. M., Bissell, M. J., Division, L. S. and Berkeley, L. 2006. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 287-309.
26. Nemoto, Y., Maruo, T., Sato, T., Deguchi, T., Ito, T., Sugiyama, H., Ishikawa, T., Madarame, H., Watanabe, T., Shida, T. and Sahara, H. 2011. Identification of cancer stem cells derived from a canine lung adenocarcinoma cell line. *Vet. Pathol.* **48**, 1029-1034.
27. Rasotto, R., Goldschmidt, M. H., Castagnaro, M., Carnier, P., Caliari, D. and Zappulli, V. 2014. The dog as a natural animal model for study of the mammary myoepithelial basal cell lineage and its role in mammary carcinogenesis. *J. Comp. Pathol.* **151,** 166-180.
28. Rybicka, A. and Król, M. 2016. Identification and characterization of cancer stem cells in canine mammary tumors. *Acta Vet. Scand*. **58**, 86.
29. Sánchez-Céspedes, R., Millán, Y., Guil-Luna, S., Reymundo, C., Espinosa de los Monteros, A. and Martín de las Mulas, J. 2016. Myoepithelial cells in canine mammary tumours. *Vet. J.* **207**, 45-52.
30. Schneider, R. 1970. Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer* **26**, 419-426.
31. Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K. J., Stingl, J., Smyth, G. K., Asselin-Labat, M. L., Wu, L., Lindeman, G. J. and Visvader, J. E. 2006. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* **439**, 84-88.
32. Stoica, G., Lungu, G., Martini-Stoica, H., Waghela, S., Levine, J. and Smith, R. 2009. Identification of cancer stem cells in dog glioblastoma. *Vet. Pathol.* **46**, 391-406.
33. Sumbal, J., Budkova, Z., Traustadóttir, G. Á. and Koledova, Z. 2020. Mammary organoids and 3D cell cultures: old dogs with new tricks. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* doi: 10.1007/s10911-020-09468-x.
34. Wilson-Robles, H. M., Daly, M., Pfent, C. and Sheppard, S. 2015. Identification and evaluation of putative tumour-initiating cells in canine malignant melanoma cell lines. *Vet. Comp. Oncol*. **13**, 60-69.
35. Wiseman, B. S. and Werb, Z. 2002. Development: stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science* **296**, 1046-1049.
36. Zhou, B. B. S., Zhang, H., Damelin, M., Geles, K. G., Grindley, J. C. and Dirks, P. B. 2009. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov*. **8**, 806-823.

초록 : 개 유선종양 내 종양줄기세포의 중요성

박서영[1†] · 백영빈[2†] · 박상익[2] · 이창민[2*] · 김성학[1*]
([1]전남대학교 동물자원학부, [2]전남대학교 수의과대학)

유선종양은 암컷 개에서 가장 흔한 암 중의 하나이며 종양 타입에 따라 조직학적으로 다양한 종류의 세포들이 존재한다. 특히, 복합 상피암종(complex carcinoma)의 경우 내강상피세포(luminal epithelium)와 근상피세포(myoepithelium)가 혼재되어 종양 내 세포 이형성(intra-tumoral heterogeneity)을 보인다. 하지만, 이러한 다양한 종양세포의 기원과 종양의 악성화에 미치는 영향에 대해서는 아직 밝혀진 바 없다. 최근, 여러 종류의 사람 종양에서 알려진 종양줄기세포는 종양 내 세포의 다양성(diversity)에 관여하고 악성화에도 기여할 수 있다고 보고되었다. 흥미롭게도 종양줄기세포는 자가재생능과 다분화능을 갖는 정상줄기세포와 동일한 능력을 가지고 있지만 종양 특이 유전자의 돌연변이와 줄기세포성격유지를 조절하는 신호전달체계에 문제가 있어 종양의 발생 시작부터 다른 조직으로의 전이에 관여하여 개체의 생존률에 직접적인 영향을 준다. 뿐만 아니라, 방사선 및 화학항암제에 대한 저항성을 보이기 때문에 종양 재발에 밀접하게 연관되어 있다. 본 리뷰 논문은 개 유선종양의 특성 및 종류, 종양줄기세포의 정의, 분리 방법, 임상학적 중요성에 대해서 정리하였다.