



(19) 대한민국특허청(KR)  
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0079302  
 (43) 공개일자 2008년08월29일

(51) Int. Cl.

*A61K 45/06* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)  
*C12N 5/06* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7016673

(22) 출원일자 2008년07월09일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2008년07월09일

(86) 국제출원번호 PCT/US2006/047136

국제출원일자 2006년12월08일

(87) 국제공개번호 WO 2007/067795

국제공개일자 2007년06월14일

(30) 우선권주장

60/748,951 2005년12월09일 미국(US)

(71) 출원인

메사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지

미국 02139 메사추세츠 캠브리지 메사추세츠 애브뉴 77

(72) 별명자

릴리, 윌리암, 지.

미국 01890 메사추세츠 원체스터 사우쓰 보더 로드 438

고스트제바, 엘레나, 브이.

미국 01890 메사추세츠 원체스터 사우쓰 보더 로드 438

(74) 대리인

남상선

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 핵 형태에 기초하여 종양 줄기 세포를 식별 및 타겟팅하는방법

**(57) 요약**

본원은 종양 줄기 세포-특이적 분자를 화학적으로 변형시키는 제제 또는 치료제를 환자내의 종양 줄기 세포에 표적화하는 단계를 포함하며, 그에 따라 종양 줄기 세포의 증식을 막는, 종양 줄기 세포 억제 방법을 개시한다.

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

종양 줄기 세포-특이적 분자를 화학적으로 변형(modification)시키는 제제(agent) 또는 치료제(treatment)를 종양 줄기 세포에 표적화(targeting)하는 단계를 포함하며, 그에 따라 종양 줄기 세포의 증식을 막는, 종양 줄기 세포 억제 방법.

### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 종양 줄기 세포-특이적 분자는 합성되고 종형 딸 핵(daughter bell-shaped nuclei)으로 분리됨을 특징으로 하는 종양 줄기 세포 억제 방법.

### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 종양 줄기 세포-특이적 분자는 단일-가닥(ssDNA)임을 특징으로 하는 종양 줄기 세포 억제 방법.

### 청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 제제가 화학적 제제임을 특징으로 하는 종양 줄기 세포 억제 방법.

### 청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 제제가 효소임을 특징으로 하는 종양 줄기 세포 억제 방법.

### 청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 치료제가 방사선(radiation)임을 특징으로 하는 종양 세포 억제 방법.

### 청구항 7

종양 줄기 세포-특이적 분자를 화학적으로 변형시키는 제제 또는 치료제를 환자내 종양 줄기 세포에 표적화시키는 단계를 포함하며, 그에 따라 종양 줄기 세포의 증식을 막는, 환자 내의 종양 성장 억제 방법.

### 청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 종양 줄기 세포-특이적 분자는 합성되고 종형 딸 핵으로 분리됨을 특징으로 하는 종양 성장 억제 방법.

### 청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 종양 줄기 세포-특이적 분자가 단일 가닥 DNA(ssDNA)임을 특징으로 하는 종양 성장 억제 방법.

### 청구항 10

제 7항에 있어서, 상기 제제가 화학적 제제임을 특징으로 하는 종양 성장 억제 방법.

### 청구항 11

제 7항에 있어서, 상기 제제가 효소임을 특징으로 하는 종양 성장 억제 방법.

### 청구항 12

제 7항에 있어서, 상기 치료제가 방사선임을 특징으로 하는 종양 성장 억제 방법.

## 명세서

&lt;1&gt;

관련 출원

&lt;2&gt;

본원은 2005년 12월 9일에 출원된, 미국 가출원 제 60/748,951호에 대한 우선권을 주장한다. 상기 출원의 전체

교시내용은 본원의 참고문헌으로써 인용된다.

### <3> 발명의 배경

- <4> 과학자들은 종양 세포와 초기 태아(embryos)의 세포 및 조직에 관한 병리학적 조직 구조물(예컨대, 기형암(teratocarcinomas))의 유사점에 대해 인지하고 있다. 정상적이지만 미분화된 태아 줄기 세포는 논리적으로 세포 갯수의 급속한 증가 및 기관 원기(anlage)와 연속적인 기관발생에서의 분화를 포함하여야 하는 밝혀지지 않은 과정에 의해 기관을 생성시킬 수 있다. 악성 종양은 초기 태아(fetuses)와 비슷한 속도로 성장하며, 조직학적으로 미분화되거나 정상 조직의 조직학적 생김새를 떠면서 조직화되는 영역(niches)을 포함한다.
- <5> 세포 표면에서 복잡한 항원성 글리코사미노글리칸(glycosoaminoglycans)이외에, "암태아성 항원(carcinoembryonic antigens)", 세포 부착 및 조직 재구성에 관여하는 분자들, 예를 들어, 카데린(cadherins), 카테닌, 메탈로프로테아제(metalloproteases)는, 태아 조직 및 종양 둘 모두에서 발현된다.
- <6> 종양은 초기 태아 조직의 저산소성(hypoxic) 조건 하에서 산소를 감소시키기 위해 미토콘드리아성(mitochondrial) 아미노산의 용도를 모방한다.
- <7> 개체발생처럼 종양형성은 확장되는 줄기 세포 세트를 거쳐 직계 후손으로 가공되는 것으로 생각된다. 인간 종양으로부터의 적은 분량의 세포들만이 면역저하된 설치류로의 이종이식(xenograft)에 따라 새로운 종양을 형성할 수 있는 능력을 지닌다. 추정되는 종양형성 세포들 중 하나 이상의 세포들이 추가의 줄기 세포를 포함하는 새로운 종양을 생성시킬 뿐만 아니라, 본래 종양에 존재하는 표현형적으로 혼재된 세포들의 개체군을 재생시킬 수 있다는 점에서 줄기 세포와 유사한 특징을 나타낸다는 것을 제한 희석(limiting dilution) 이종이식 실험은 보여주었다.
- <8> 종양의 단일클론성(monoclonality)에 대한 개념이 1900년대 초에 확립되었고, 20세기에 거의 모든 형태의 후기-발병(late-onset) 암이 연장된 전종양(proneoplasia) 기간을 거치며, 이러한 전종양성 콜로니들은 그 자체가 단일클론이며 발달초기(germinal) DNA에서의 하나 이상의 드문 세포유전성 돌연변이로부터 기인한다는 것이 확인되었다. 21세기 초기까지, 장기이식/희석 실험을 위한 "줄기" 세포와 함께 종양 세포를 수확하려는 직접적인 시도는 조직 줄기 세포가 전종양의 기원이 되는 유망한(likely) 세포라는 것뿐만 아니라, 종양 그 자체가 "줄기" 세포를 포함한다는 것도 밝혀내었다. 종양은 사실상 잘-조직화된 이종성 태아 구조물이라는 가정의 현대적 재진술이 제안되었다. '암태아성' 줄기 세포는 숫자가 늘어나고 종양 덩어리 내부에서 매우 이질적인(heterogeneous) 영역을 차지하는(populating) 분화된 세포 유형을 발생시킬 것으로 예상된다. 그러나, 발달 중인 기관과 종양 내의 줄기 세포로서 세포에 대한 인지는 여전히 미흡하다.
- <9> 줄기 세포 분야 전반에 걸쳐 사용된 다양한 항원성 마커들이 종종 높은 비율(degree)로 조직 또는 종양을 재생시킬 수 있는 세포를 수확하기 위해 사용되어 왔다. 그러나, 이러한 증식된 개체군 내의 어떤 세포도 이들을 줄기 세포로 특징지우는 현미경하의 형태학적 세포 특성을 나타내지 아니하였다. 종양이 단일의 줄기 세포로부터 생겨난다는 것이 사실이라면, 분자적이고 생화학적인 분석대상물에 대한 분석에 적당한 동질의(homogeneous) 줄기 세포 개체군으로서 상기 종양을 식별하고 수집하기 위한 수단이 요구된다. 그런 다음에야 거대분자 어레이 기술(제노믹스, 프로테오믹스, 글라코믹스 등) 및 강력한 형태의 생화학적 분석(예컨대, 매직 앵글 핵자기 공명 분광기)의 힘에 촛점을 맞출 수 있다.
- <10> **발명의 요약**
- <11> 본 발명은 종양 줄기 세포를 식별하고 인접한 환경내의 정상 또는 유지(maintenance) 줄기 세포에 최소의 손상을 미치거나 미치지 아니하면서 종양 줄기 세포를 선택적으로 및 특이적으로 파괴하는 방법에 관한 것이다. 종양 줄기 세포들은 다수의 핵을 포함하는데, 상기 핵에서, 핵 분열이 일어나는 동안, 계놈은, 상당하며 활용 가능한 시간 동안, 실질적으로 단일-가닥 DNA(ssDNA)로 존재한다는 예상치 못한 발견이 본원에서 소개된다. 제제(Agents), 예를 들어, ssDNA를 표적으로 삼고 변형시키는, 화학적 또는 효소적 제제(예를 들어, 알킬화 시약, 단일-가닥-특이적 뉴클레아제, 복제 기구를 표적으로 삼는 제제, 분리를 표적으로 삼는 제제 및 하나 이상의 줄기 세포-특이적 분자를 표적으로 삼는 제제)를 사용함으로써, 종양 줄기 세포의 핵 물질이 파괴를 위한 표적이 되며, 이에 따라 변형된 ssDNA는 이중-가닥 DNA(dsDNA)로 복귀되는 추가적인 복제를 겪을 수 없게 된다. 종양 줄기 세포-특이적 분자는 종양 줄기 세포(바람직하게는, 핵)에 존재하나, 주변 세포(surrounding cells)의 세포에는 존재하지 않는 분자이다. 특정 종양-세포-특이적 분자가 표적이 될 수 있으며, 그에 따라 종양 줄기 세포-특이적 분자의 기능 또는 활성에 대한 표적화 및 파괴가 종양 세포 성장을 방해(prevention)거나 억제(inhibition)하게 된다. 예를 들어, ssDNA의 복제를 방해하는 임의의 제제, 예를 들어, DNA에 혼성화되지만,

신장시킬 수 없는 분자, 예를 들어, 변형된 올리고뉴클레오티드 또는 핵산 유도체, 예를 들어, 신장에 필요한 γ-포스페이트가 결여된 핵산 또는 웹티드 핵산. 환자 내의 세포 또는 종양 조직에 제제를 전달하기 위한 방법은 당업계에 공지되어 있는데, 상기 전달된 제제는 ssDNA 계놈의 복제를 방해할 것이고, 그에 따라 종양 줄기 세포의 증식이 방해받게 된다.

<12> 한 구체예에서, 본 발명의 방법은 주위 세포(예를 들어, 유지 줄기 세포)의 성장을 실질적으로 방해하거나 억제하지 아니하면서, 종양 줄기 세포의 성장(예를 들어, 핵 또는 세포의 분열)에 대한 선택적 방해 또는 억제와 관련되어 있다. 특히, 표적이 된 줄기 세포가 핵 분열을 겪고 있는 동안, 본 발명의 방법은 세포 핵으로 진입하여 핵의 ssDNA를 변형 또는 변화시킬 수 있는 제제를 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는데, 그에 따라 표적이 된 세포의 추가적인 핵 분열과 세포 분열이 방해 또는 억제되게 된다.

<13> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 종양 줄기 세포-특이적 분자(예를 들어, ssDNA)를 변화시키거나 변형시키는 제제 또는 치료제를 환자 내의 종양 줄기 세포에 표적화시키는 단계를 포함하는 환자 내의 종양 성장을 억제하는 방법과 관련이 있는데, 본 발명의 방법에 따라 ssDNA의 복제가 방해 또는 억제되며 궁극적으로 종양 줄기 세포의 증식이 방해 또는 억제되게 된다. 특별한 구체예에서, 상기 제제는 세포 내부에서 합성되며 종형(bell-shaped) 딸 핵으로 분리(segregation)되는 종양 줄기 세포-특이적 분자를 표적으로 삼는다. 한 구체예에서, 상기 종양 줄기 세포-특이적 분자는 단일-가닥 DNA(ssDNA)이다. 또 다른 구체예에서, 상기 제제는 화학적 제제, 방사선제제(radioagent), 효소, 또는 방사선 치료제인데, 그에 따라 종양 세포-특이적 분자가 표적이 된다.

### 발명의 상세한 설명

<29> 본 발명은 종양 줄기 세포, 예를 들어, 분열하여 종양에 이르는 세포가 비대칭적 핵 분열을 겪는다는 예상치 못한 발견과 관련이 있다. 종양 조직을 제외하고 성인 조직에서 발견되지 않는, 종형 핵은 계놈이 단일-가닥 DNA(ssDNA)로 나타나는 시기를 거친다. 비대칭적으로 분열하는 종형 핵의 이러한 특징은 그러한 핵을 포함하는 세포, 예를 들어, 종양 줄기 세포의 특이적인 표적화, 식별 및 파괴를 가능하게 한다. 종형 핵을 지니는 구조들은 안간 종양에서 줄기 세포와 유사한 특성(qualities)을 갖는다.

<30> 본원에서는 종형 핵이 대장성 및 췌장성 인간 종양에서 비-유사분열적 분열 과정에 의해 대칭적으로 및 비대칭적으로 분열한다는 예상치 못한 발견에 기초한 방법을 소개한다(Gostjeva et al., 2005, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, in press). 이러한 종형 핵은 5-7주 배아 후장(hindgut) 내에서 대단히 많은 숫자로 나타나는데, 여기서 상기 핵은 관형 핵포체 안에 담겨지고(encased) 전체 핵과 종양 조직(이들은 "미분화된" 영역에 풍부함)의 30%를 포함한다. 이들은 몇몇 줄기 세포와 유사한 특성을 보유하는데, 특히, 비대칭적 분열의 "쉽볼렛(shibboleth)" 및 인간 대장 전종양성 및 신생물성 조직의 성장 속도와 일치하는 핵분열 빈도를 갖는다(Herrero-Jimenez et al., 1998, 2000). 이러한 이전에 확인되지 아니한 핵 형태는 종양 발생 및 분화의 근원이 되며 따라서 암 치료 전략의 목표가 된다.

<31> 종형 핵을 포함하는 구조물(예를 들어, 세포, 세포-유사 구조 또는 핵포체)은 종양 줄기 세포를 나타낸다. 이들의 무사분열(amitotic) 형식의 핵분열은 유사분열에 의해 분열하는 것으로 생각되는 배아(활구성(blastomeric)) 및 성인 유지 줄기 세포에서 비발현되는 분자 표적으로 정의될 수 있는 분자 기구를 필요로 한다. 예를 들어, 이를 종형 핵에서 계놈이 ssDNA로 나타나는 단계를 거친다는 관찰은 이들에 대한 표적화 및 파괴를 가능하게 할 것이다. 종형 핵이 공간적으로 어떻게 조직화되는지, 염색질이 어떻게 핵에 분포되는지, 특정 염색체가 핵 라미나 내부 전역의 특정 영역을 점유하는지 여부에 대한 탐험은 더 특이적인 치료학적 표적을 제시하며 핵 형태(shape) 및 유전자 발현 사이의 관계에 대한 추가적인 이해를 제공할 것이다.

<32> 종형 핵으로부터의 비대칭적 핵분열로 최초부터(ab initio) 발생되나 뒤이어 유사분열에 의해 분열하며 아폽토시스에 의해 사멸되는 것으로 생각되는 태아 후장(hindgut), 대장 선종 및 선암 내의 정렬(array)된 독특한 폐쇄된(closed) 핵형에 대한 발견이 본원에서 소개된다. 성체 조직에는 결여되어 있는 배아 및 종양 내의 공통된(shared) 핵형의 세트는 종양은 성체 기관에서 배아 성장(embryonic growths)이라는 19세기의 가정을 뒷받침한다(Cohnheim, J., Virchows Arch., 65:p.64, 1875; Seill, S., Crit. Rev. One. HematoL, 51:1-28, 2004).

<33> 본원에 소개된 방법은, 당업계의 통상의 기술자로 하여금, 대장, 췌장, 신장, 난소 및 기타 종양의 종형 핵을 특별히 강조하면서, 최첨단 고분해능 현미경 및 정량적 이미지 분석기술에 기초하여, 상이한 형태의 핵의 세포 유전학적 종결점(end-points)에 대한 생체내 분석을 실행할 수 있게 한다.

<34> 세포의 종형 핵 및 핵포체 내의 핵의 구조, DNA 함량(content) 및 염색체의 공간적 분포는 당업계의 통상의 기

술자에게 공지되어 있는 방법, 예를 들어, 정량적 이미지 세포분석기 및 공초점 현미경에 의해 특성결정될 수 있다. 예를 들어, 이와 같은 기술은 당업계의 통상의 기술자로 하여금 총 DNA 함량 측정을 가능하게 하며, ssDNA와 이중-가닥 DNA(dsDNA)를 구별하기 위해, 예를 들어, 아크리딘 오렌지 또는 가닥-특이적(strand-specific) DNA 혼성화 프로브와 같은, 특정 시약을 사용할 수 있게 한다. 이러한 정보는 상이한 형태의 종형 핵, 종양 유형(대장성 종양 대 췌장성 종양) 및 종양 내부의 영역을 구별하는데 상용될 수 있다. 이와 같은 기술은 또한 DNA 합성 진행과정을 특징지우는데 사용될 수 있고, 예를 들어, 대칭적 핵분열 및 몇몇 형태의 비대칭적 핵분열이 일어나는 동안의 종형 핵에서의 DNA 합성과 분리와 관련된 단백질의 존재를 검출하는데 사용될 수도 있다.

<35> 균질 샘플로서 종형 핵을 지니는 세포 및 합포체의 분리.

<36> 종양 조직 표본에 관한 본원에 소개된 방법과 그 밖의 문헌에 소개된 방법[PCT/US2005/021504호(2005년 6월 17일 출원); 및 미국 특허출원 제 11/156,251호(출원일자: 2005년 6월 17일); 상기 문헌의 전체내용은 참고문헌으로써 본원에서 인용됨]은 대사산물과 거대분자의 분석에 적용될 수 있는 핵 형태에 관한 균질한 세포 샘플을 생성하기 위하여 "캐터펄트(catapult)" 압력 활성화 레이저 미세 절제에 관한 구비조건(requirements)에 적합하게 변형될 수 있다. 이와 같은 방법은 당업계의 통상의 기술자로 하여금 분열을 자연시키기 위해, 또는 인간 종양 내의 종형 핵을 포함하는 구조물의 사멸을 위해 논리적인 표적을 식별하는 것을 가능하게 한다.

<37> 본 발명의 방법은 부분적으로 비고정된 종양 표본내의 핵 형태를 인지할 수 있는 수단에 기초하고 있어서 종형 핵을 지니는 살아있는 세포 및 합포체의 균질 표본이 생체외에서(*ex vivo*) 연구될 수 있다. 살아 있는 종형 핵은 이들의 특이한 DNA 합성기작 및 분리 기작을 더 잘 이해하기 위해 그리고 암 치료에 있어서 이들의 진행과정을 방해하기 위한 수단을 제시하기 위해 연구될 수 있다.

<38> 암 치료학에서의 '줄기 세포 표적'.

<39> 암 치료학에 있어서 기존 방법의 주요한 표적은 세포 주기를 통과중인(transiting) 세포이다(Gomez-Vidal, J. et al., A., Curr. Top. Med. Chem., 4:175-202, 2004; Fischer, P. and Gianella-Borradori, A., Expert Opin. Investig. Drugs, 14:457-477, 2005). 프로그램된 세포 사멸에 의해 소실된 말기 세포의 손실을 대체할 수 있는 이행 세포(transition cells)를 제공하기 위해 분열하는 성체 유지 줄기 세포와 종양 줄기 세포 사이에서 이행(transit) 중인 세포들 간의 구별되는 차이점은 존재하지 않는다. 치료법은 환자를 사망에 이르게 하지 아니하면서 모든 종양 줄기 세포를 사멸시키는 협소한 범위의 섭생을 목표로 한다. 그러나 성체 유지 줄기 세포는 논리적으로 0의 순(net) 세포 성장 특성을 지니는 것으로 기대될 것이고, 한편, 정의에 의해, 태아 줄기 세포처럼, 종양 줄기 세포는 급속한 순 세포 성장에 관여한다. 성체 유지 줄기 세포 분열은 필연적으로 새로운 유지 줄기 세포와 첫번째 분화 이행 세포를 생성시키는 특성면에서 비대칭적인 것으로 생각된다. 종양 줄기 세포는 순 종양 성장을 지탱하기 위해 연속적인 대칭적 핵 분열을 필요로 할 것이다. 종양에서 대칭적인 '컵에서 컵으로(cup-from-cup)' 핵 분열을 겪는 종형 핵에 대한 발견으로 세포분열억제적(cytostatic) 또는 세포사멸적(cytocidal) 치료를 위한 특정 표적이 발견되었다.

<40> 화학요법의 이러한 세포사멸 전략은 종양이 혈관신생을 방해함으로써 기세가 꺽일(asphyxiated) 수 있다는 가정과는 독립적이다[예를 들어, 폴크만과 잉그버의 문헌 참조(Folkman and Ingber, Sem. Cancer Biol., 3:88-96, 1992)]. 다른 연구자들은 세포의 분화를 차단함으로써 암을 치료하는 접근법을 제시하여 왔다. 그러나, 줄기 세포에 관한 한, 저산소증(hypoxia)을 조성하는 것은 초기 배발생 조건을 재조성(recreation)할 수 있고 일시적으로 억제하지만 치료 효과가 없는 항-혈관신생 전술인 것으로 설명될 수 있다(Warburg, O., Biochem. Zeitschrift, 152:479, 1924). 종양의 분화를 차단하는 것은 바람직하지 아니한 결과와 함께 정상 조직의 분화를 차단할 수 있다. 줄기 세포가 짧은 기간 내에 종양을 재군집(repopulation)시킬 수 있기 때문에 현재의 암 치료법은 효과가 극히 미미하다는 이해는, 성체 유지 줄기 세포와 상반되는 종양 줄기 세포에 특별한 분자적 및 생화학적 특성에 대한 연구에 강력한 자극이 되었다(Otto, W., J. Pathol., 197:527-535, 2002; Sperr, W. et al., Eur. J. Clin. Invest., 34 (Suppl 2):31-40, 2004; Venezia, T. et al., PLoS Biol., 2:e301, 2004). 이와 같은 종양 줄기 세포의 분자적 및/또는 생화학적 특징들은 암 치료학에서 표적으로서 역할할 수 있다. 종형 핵이 대장 종양에서 대칭적- 및 비대칭적 분열 둘 모두를 겪지만 성체 대장 상피에서는 그렇지 않다는 발견은 당업계의 통상의 기술자로 하여금 성체 유지 줄기 세포로부터 종양 줄기 세포를 구별하는 것을 가능케 한다(Gostjeva, E. et al., Cancer Genet. Cytogenet., 164:16-24, 2006).

<41> 배아, 줄기 세포주 및 종양에서 줄기 세포의 세포유전학.

<42> 종양 줄기 세포 특성은 순 줄기 세포 성장을 이루는 대칭적 분열 및 자가 재생(renewal) 및 분화를 이루는 비대칭적 분열을 포함한다. 그러나, 핵분열시의 DNA 합성 및 분리를 포함하는, 세포 주기 진행에 관한 기작은 배아 및 종양의 줄기 세포에 있어서 본질적으로 탐구되지 못한채 남아 있다. 이러한 노력의 부족은 인간 또는 조직에서 줄기 세포를 식별하기 위한 직접적인 세포학적 마커가 없었다는 점에 있어서는 이해될 수 있다. 젖과동물(Murine) 대장 및 세포 종의 성체 줄기 세포에 있어서 비대칭적 분열은 추정되는 줄기 세포에서 모 DNA 가닥의 선택적인 판게노믹(pangenomic) 분리에 대한 과도하게 중요한 설명과 함께 조사되었다(Potten, C. et al., J. Cell, Sci., 115:2381-2388, 2002; Merok, J. et al., Cancer Res., 62:6791-6795, 2002). 비무작위적(Non-random) 방식으로 염색체의 유전적 전달(transmission)의 줄기 세포-특이적 양상에 대한 상기 인식은 줄기 세포-특이적 핵 형태 및 분열 양상이 어떤지에 대한 현재의 인식을 수십년 정도 앞선다(Cairns, J., Nature, 255:197-200, 1975).

## 실시 예

<43> 실시예 1. 조직 및 종양 공급원의 구축.

<44> 성체 조직 및 종양 표본을 메사추세스 종합 병원, 병리학과의 협력자들에 의해서 그리고 상기 협력자들로부터 외과수술 폐기물(surgical discards)로 수집하였다(Gostjeva, E. et al., Cancer Genet. Cytogenet., 164:16-24, 2006). 익명의 폐기 종양 및 조직 절편의 사용은 더블유. 지. 씰리(Prof. W. G. Thilly) 교수의 실험실을 통해 '실험 대상으로서 인간의 사용(Use of Humans as Experimental subjects)'에 관한 MIT 위원회에 의해 승인되었다.

<45> 조직 절개, 고정, 스프레딩 및 DNA 염색을 위한 방법의 개발.

<46> 하기 프로토콜은 염색체와 핵에 대한 구조적 및 정량적 관찰을 위한 요망되는 명료도(clarity)를 갖는 조직 및 종양 표본의 핵에 대한 시각화를 가능케 한다. 핵심 요소는 수술후 30분 이내에 고정된 신선한 종양 샘플의 사용과 박편 제작(thin sectioning)에 관한 표준 절차의 회피이다. 종형 핵이 조직 및 종양 샘플에서 초기 자가 분해(autolysis)의 제물(victims)이 된다는 것은 명확하며 절제하고 나서 약 45분 후에는 더 이상 구별할 수 없게 된다. 표준 5미크론 절편은 단순히 발견된 몇몇 핵 형태를 통과하여 절단하며, 거의 모두가 최소 5미크론을 초과하는 직경을 갖는다. 중요한 진척의 증거로서 특별한 기술이 고안된다:

<47> 벗겨진 대장 점막 또는 ~1mm 두께로 절제된 선종, 선암 또는 전이암과 같은, 절제 후 30분 이내의 시트(~1cm<sup>2</sup>)를 적어도 3부피의 즉석에서 제조한 4°C 카노이(Carnoy) 고정액(3:1, 메탄올: 빙초산)에 넣었다. 신선한 고정액을 3회 교체하고 나서(45분마다), 4°C 70% 메탄올로 대체하고 -20°C에서 샘플을 저장하였다. 고정된 절제물을 중류수에 행구고 거대분자의 부분적 가수분해 및 DNA 탈퓨린화(depurination)를 위하여 60°C에서 8분 동안 2mL의 1N HCl 중에 두었다. 차가운 중류수에서 행궁으로써 가수분해를 종결시켰다. 현미경 커버 슬립에 적당한 압력을 가함으로써 식물 및 동물 조직 절제물의 스프레딩과 관찰을 가능케 하는 "조직 침연(tissue maceration)"을 위하여 행궈진 샘플을 15 내지 30분 간 45% 아세트산(실온) 중에 담갔다. 각각의 침연된 절제물을 ~0.5 x 1mm 조각으로 이등분하고 5μm의 아세트산과 함께 커버 슬립 하의 현미경 슬라이드에 옮겼다. 조직 스프레딩을 위해 5겹의 여과지를 상기 커버 슬립 위에 놓았다. 균일하게 약간의 압력을 가하면서 여과지를 따라서 한 방향으로 일정한 속도로 편셋 손잡이(tweezers handle)를 움직였다. 잘 퍼진 대장 조직에서, 손상된 핵은 없었으며, 한편 크립트는 본질적으로 단일층(monolayer)이 되게 가압되었다. 커버 슬립을 드아이 아이스 상에서 동결시킨 후 제거하고 슬라이드를 1시간 동안 건조시켰다. 슬라이드를 실온에서 1시간 동안 부분적으로 탈퓨린화된 DNA(포엘겐 염색)을 염색하기 위해 스키프(Schiff) 시약으로 채원진 코플린 자(Coplin jars)에 두고, 동일한 코플린 자에서 2xSSC(트리소디움 시트레이트 8.8 g/L, 염화나트륨 17.5 g/L)로 2회 행구었다(1회 30초 및 1회 급속히). 그후 슬라이드를 중류수로 행구고 핵에 대한 이미지 분석에 적합하게 만들었다(Gostjeva, E., Cytol. Genet., 32:13-16, 1998). 우수한 분해능을 얻기 위해, 슬라이드를 추가로 김사(Giemsa) 시약으로 염색하였다. 즉시 2xSSC로 행군 후, 슬라이드를 5분간 1% 김사 용액(Giemsa, Art. 9204, Merck)에 넣었다가 재빨리 행구었는데, 먼저 쇼렌센(Sorensen) 완충액(디소디움 하이드로젠 포스페이트 디하이드레이트 11.87 g/L, 포타슘 디하이드로젠 포스페이트 9.07 g/L)에 행구고 나서, 중류수로 행구었다. 슬라이드를 1시간 동안 실온에서 건조시키고 크실렌이 채워진 코플린 자에 3시간 이상 두어 지방을 제거하였다. 커버 슬립을 DePex 마운팅 매체(mounting media)로 슬라이드에 접착시키고 고해상도 스캐닝을 실시하기 전에 3시간 동안 건조하였다.

<48> 대안적으로, 규정된 핵 형태를 지닌 살아 있는 세포의 분리를 달성하기 위해, 예를 들어, 콜라제나제 II와 같은, 단백질분해 효소에 노출시킴으로써 침연을 달성할 수 있다.

<49> 현미경 및 이미지 프로세싱 시스템.

<50> 본원에서 사용된 정량적 이미지 분석용 소프트웨어는 초기 위성 감시 시스템에서 알맞게 변형된 백그라운드 억제에 관한 접근법을 이용한다. 상기 기술은 짜이스(Zeiss, Inc.) 사(社)에 의해 자체적으로 획득된 이래로 보유하고 있던 독일의 콘트론 법인(Kontron corporation)으로부터 획득되었다. 모든 이미지는 맞춤제작된 자동구동 광 현미경, Axioscope™, 컬러 CCD 카메라, 개인용 컴퓨터에 연결된 AxioCam™(Zeiss, Germany)으로 구성된 KS-400 Image Analysis System™(버전 3.0)(Zeiss, Germany)을 사용하여 획득하였다. 이미지는, 포엘겐 염색이 단독으로 사용되었을 때, 가시 광선 및 560nm(녹색) 필터를 사용하여 평면 아포크로마틱(planar apochromatic) 대물렌즈에서 현미경의 1.4/100 배율로 현미경으로부터 전송되었다. 포엘겐-김자 염색이 이용될 때에는 필터는 사용되지 아니한다. 프레임 그레버 및 최적 광 노출이 각각의 스캐닝 세션 이전에 조정되었다. 핵의 이미지는 0.0223 x 0.0223미크론의 픽셀 크기로 기록되었다.

<51> 배아 장.

<52> 7가지 독특한 핵 형태[거대한 회전타원체(spheroid), 응축된 회전타원체, 난(ovoid), 콩(bean)-, 시가(cigar)-, 소시지(sausage)- 및 종(bell)-형]가 태아 장 샘플을 통틀어 발견되었다(도 1A). 응축된 염색질에 의해 개방되어 있는 것처럼 보이는 종형 핵은 응축된 염색체와 생김새가 비슷하다(도 1B). 종형 핵은 ~20-50미크론의 튜브. 또는 합포체 내부에서 선형의 '헤드-투-토우' 방향으로 정렬되었다(도 2). 상기 종형 핵들의 '헤드-투-토우(head to toe)' 패턴은 관찰된 모든 배아 튜브들에서 유지되었으나, 튜브들은 앞뒤로 뒤틀려 평행한 튜브들은 국소적으로 역-평행한 종형 핵 방향을 지닐 수 있었다.

<53> 종형 핵은 단지 합포체 내부에서만 대칭적 및 비대칭적 무사분열을 겪는 것이 관찰되었다(도 3). 종형 핵의 대칭적 무사분열은 2개의 적층된 종이컵의 단순 분리와 유사한 모습이었다. 가장 높은 해상도에서, 쌍을 이룬 염색체와 생김새가 비슷한 응축된 염색질은 애늘러스를 형성하는 것처럼 보이는데, 상기 애늘러스는 종 "입(mouth)"이 개방된 상태로 유지되게 한다. 관형 합포체 외부에서 몇몇 "폐쇄된(closed)" 핵 형태의 각각의 경우 유사분열이 흔하게 관찰되었으며 작은 콜로니들은 동일한 핵 형태의 세포들로 이루어진 것이 명확하였다. 특이적인 "폐쇄된" 핵 형태는 도 1에 도시된 바와 같이 전기 초기에 유지되었다.

<54> 정상 대장 상피.

<55> 크립트 내의 거의 모든 핵들을 크립트 기부(base)에서 루미날 표면까지 관찰할 수 있다(도 4A). 개개의 핵 형태가 식별 가능한 정도로 많은 크립트들이 펴져있다. 난형 또는 회전타원체 핵을 지니는 세포들은 상기 기부에서 상피 신장부(epithelial extension)까지 이르는 크립트에서 루멘으로 늘어서 있다(도 4C). 크립트 기부의 최초 ~2<sup>5</sup>개 세포에서, 독특한, 유력한 9번째 핵 형태가 우세하게 존재하는데, 상기 핵 형태는 원반형, ~2-3미크론 두께 및 ~10미크론 직경에 의해 특징지워질 수 있다(도 4B). 세포들이 잘 분리되어 있는 1% 미만의 모든 크립트 기저분에서, 단독의 종형 핵이 분명히 원반형 핵들 중에서 식별되었다(도 4A 및 4B). 비슷하게 낮은 빈도의 종형 핵들이 성체 간 표본에서 관찰되었다. 신생물 또는 전종양의 임의의 병리학적 징후 없이 성체 대장에서, 그 밖의 다른 핵 형태적 변이체는 수천개의 잘 펴진 크립트에 대한 수천번 이상의 세포-대-세포(cell-by-cell) 스캔에서 관찰되지 아니하였다.

<56> 선종.

<57> 선종은 ~ 2000개의 세포를 지지는 각각의 정상 대장 크립트로부터 구별불가능한, 다수의 크립트를 포함하였다. 이러한 선종은 도 5A에 도시된 바와 같이 가지를 뻗고 있는 형태로 흔히 발견되었다. 정상 대장 크립트 내에서 와 마찬가지이나 정상 대장에서 보다 더 흔하게 상기 크립트 내의 동일한 회전타원체 및 난형 핵들은 크립트 기부에 1개 또는 2개의 종형 핵들로 존재하였다. 최대 ~8000개 까지의 세포를 포함하는 불규칙적인 소엽(lobular) 구조물들이 또한 관찰되었는데, 상기 세포들은 조직 침연에 의해 더 용이하게 펴졌다. 거의 모든 불규칙적인 구조물 내에, 상기 구조물의 몸통(body) 방향으로 종 개구부(openings)가 정렬된 2개 이상의 종형 핵들이 존재하였다(도 5B). 또한 다수의 다양한 세포들과 그룹들(groups)이 크립트 및 불규칙적인 구조물 사이에 산재되어 있었다(도 5C). 일부 규칙적인 구조물들은 ~250개, ~500개 또는 ~1000개의 세포를 포함하는 전장-크기의(full-sized) 정상 크립트로 성장하는 것처럼 보였다. 다수의 세포 그룹들은 각각 한 개의 종형 핵을 지니는 정확하게 8개, 16개, 32개, 64개 및 128개 세포의 "고리(ring)"으로 관찰되었다(도 5D).

<58> 고 배율 시험은 크립트-유사 구조물의 벽에 존재하는 대부분의 세포들이 정상 성인 대장 크립트에서와 마찬가지로 구형 또는 난형 핵을 지녔음을 밝혀내었다. 난형, 시가형- 또는 총알형-핵 중 어느 하나를 갖는 세포의 콜로니들은 불규칙적인 소엽 구조물로 나타났는데, 이는 몇몇 상이한 콜로니들이 융합된 것임을 제시한다. 난형

및 시가형 핵을 갖는 콜로니들은 배아 후장에서 관찰되었으나, 총알형 핵 형태는 선종과 선암에서만 관찰되었다(도 5E). 총알형 핵 형태는 또한 비대칭적 무사분열에 의해서 종형 핵으로부터 생겨나는데, 제일먼저 나타나는 불규칙적인 말단부(end)를 지닌다. 총알형 핵을 지니는 세포들의 작은 콜로니들이 관찰되었으며 보통의 유사분열을 겪는 세포를 포함하는 이러한 콜로니들은 특이한 핵 형태들은 전기에서 아나텔로페이즈 내내 어느 정도 유지된다는 흥미로운 사실을 제시하였다.

<59> 정상 성체 대장에서는 드물지만, 종형 핵은 흔하게 나타났으며 선종 부분(adenoma contexts)에서 많은 수로 나타났다. 일부는 크립트-유사 구조물 사이의 공간에서 1개 내지 10개 또는 그 이상의 "종"으로 발견되었다(도 5D). 다른 것들은 다세포 고리 구조물에서 단일의 "종"으로서 발견되었는데, 상기 구조물에서 한 개의 종형 핵은 항상 회전타원체 또는 다른 형태인 ( $2^n - 1$ )개의 세포를 지니는 고리에서 관찰되었다(도 5C 및 5D).

<60> 종형 핵은 크립트-유사 구조를 기부의 컵 내부에서 단일의 종으로, 더 흔히 한 쌍의 종으로 또는 때때로 4개 또는 8개의 종으로 나타났다. 훨씬 더 거대한 불규칙적인 소엽 구조물에서, 종형 핵은 다른 핵 형태의 세포와 혼재된 비정상 구조물의 벽에 해부학적으로 통합되었다. 이러한 더 거대한 불규칙적인 크립트-유사 구조물들은 마치 각각 자신의 핵 형태를 지니는 다수의 상이한 종류의 클러스터들의 모자이크인 것처럼 보였다. 거대한 선종(~1cm)은 약 1000개의 종형 핵을 포함하는 것으로 평가되었다. 수백개의 종형 핵들은 다수의 선종 각각에서 관찰되었으나, 임의의 선종에서 단일의 종형 핵은 배아 절제물에서 흔히 발견되는 대칭적 형태의 핵 분열로 관찰되었다; 그러나, 비대칭적 핵분열의 몇몇 예들이 선종에서 관찰되었다.

#### 선암

<62> 선종과 마찬가지로 선암은 트립트, 더 거대한 불규칙적인 구조물 및 16개, 32개, 64개 및 128개 세포로 이루어진 크립트간(inter-cryptal) 클러스터의 혼합체를 포함하였다. 종형 핵은 크립트의 기부 컵에서 단일체(singlets), 쌍 또는 더 많은 수로 발견되었으며 복잡한 소용돌이체(complex whorls)로 더 거대한 불규칙적인 소엽 구조물의 벽에 엠베딩되었다(도 6). 선암에서 핵 형태의 세트는 총알형 형태를 포함하는 선종에서 확인된 세트와 동일한 것으로 보인다.

<63> 선종과 선암 사이에 구분가능한 차이점은 크립트-유사 구조물이 무작위적으로 종양 표면에 대해 향해 있다는 것이다. 또한 크립트와 불규칙적인 구조물들은 종양 내부에서 흔하게 발견되지 아니하였는데, 이는 절충적(eclectic)이나 무질서하지 않은 더 작고, 국소적으로 조직화된 구조물의 집합물로서 더 잘 특징지워질 수 있다.

<64> 선종과 다른 선암의 가장 주목할만한 차이점은 명확하게 조직화된 수백개 이상의 종형 핵들의 그룹핑의 흔한 등장이었는데, 상기 다수의 종형 핵들은 빈번하게(~1%) 대칭적 핵분열에 관여하였다. 이러한 대칭적 분열은 추후 응축된 핵 물질을 포함하는 것으로 확인되었다. 종형 핵은 정상 반수체 세포의 DNA 양과 동일한 DNA 양을 가질 것이다. 종형 핵이 "컵에서 컵으로(cup-from-cup)" 대칭적 분열을 겪기 시작함에 따라, DNA 함량은 반수체 계놈에 포함된 DNA 양의 1.05까지 증가된다(대략적으로 상기 증가 량은 동원체가 복제되는 경우 예상된다). 상기 DNA 함량은 "컵에서 컵으로" 과정으로부터 훨씬 더 나중에 2개의 핵이 상기 DNA 물질의 양의 2배를 포함하는 그 시점에 도달할 때까지 상기 수준으로 유지된다. 상기 단계가 진행되는 동안 아마도 동원체들이 복제될 때만이고, 계놈의 가닥들은 분리되는데, 상기 계놈은 주로 ssDNA의 형태를 갖추게 된다. 상기 과정으로부터 훨씬 더 나중에 복제되고 나서야 상기 계놈은 다시 dsDNA가 된다.

<65> 저배율에서, 이러한 구조물들은 크립트-유사 구조물 사이의 공간에서 나타나며, 거미집(spider web) 또는 엽맥(leaf vein) 골격처럼 보였다. 고배율에서, 얇은 맥(thin veins)은 종형 핵을 지니는 부분적으로 정돈된 가닥들인 것으로 확인되었는데, 상기 종형 핵은, 동일한 방향(상기 맥 축으로부터 90°)을 지향하고 있는 이들의 입을 갖는 흥미로운 특성을 지니고 있다(도 6C). 종형 핵은 또한 배아 장에서 관찰되나 선종에서 관찰되지 않는 '머리에서 발끝' 방향(도 6C)으로 국소적으로 경계가 정해진(delimited) 합포체에서 발견되었다. 수백만개의 종형 핵들은 빈번한 대칭적 및 비대칭적 무사분열로 선암성 덩어리가 되는 것으로 평가된다(도 6D 및 6E). 결장직장 종양의 간으로의 전이는 선암에서 관찰되는 것들과 겉으로는 구분할 수 없는 핵 형태의 패턴, 크립트 및 불규칙적인 구조물의 패턴을 재생시켰다.

<66> 3D 보존된 단일의 종형 핵 및 여러 쌍의 대칭적으로 분열하는 종형 핵에 대한 공초점 현미경 검사.

<67> 3D 보존된 단일의 종형 핵 및 여러쌍의 대칭적으로 분열하는 종형 핵에 대한 공초점 현미경 검사를 수행하기 위해, 화이트헤드 연구소(Whitehead Institute), 이미징 센터에서, 멜타비전 알티 레스토레이션 이미징 시스템

(DeltaVision® RT Restoration Imaging System)을 사용하였다. 상기 시스템은 실시간 2D 디콘볼류션(deconvolution) 및 핵 이미지 복원을 위한 3D Z 프로젝션을 제공한다.

<68> 핵 세포질(FITC-팔로이딘(phalloidin) 및 핵(DAPI)의 대비염색(counterstaining)을 종형 핵의 내부 구조를 탐구하기 위해 적용하였다. 세포를 슬라이드 상에 퍼고 포엘겐 염색에 관한 하기 절차를 동일하게 수행하였다: '가수분해' 침연으로. 결과의 비교를 위해 2개의 서로 다른 고정액에서의 고정이 적용되었다는 것이 차이점이다: 카노이 고정액(4C) 및 3.7% 포름알데히드에서 15분 및 블록킹 용액인, 100mℓ의 PBS 중의 2% BSA(2g), 0.2% 무지방 우유(0.2g), 0.4% 트리톤 X-10(400μl)에서 2시간(실온)(후자는 살아 있는 조직 세포의 고정에 권장된다). PBS에서 2회 세척한 후, 조직 스프레드(spreads)를 지니는 현미경 슬라이드를 항습 챔버(humidity chamber)에 옮기고, 상기 스프레드의 전 지역을 뒤덮을 수 있게 블록킹 용액으로 적절히 희석된 1차 항체를 담은 100 mℓ 액적(droplets)을 떨어뜨리고, 커버슬립의 상부를 고무 시멘트로 밀봉하고, 상기 커버슬립을 포일로 감싼 용기에 넣고 밤새도록 추운 실내에 위치한 항습 챔버에 두었다. 그후 밀봉하지 않는 슬라이드를 PBS로 3회 세척하였다. 상기 슬라이드를 꺼내고 블록킹 용액으로 적절히 희석된 2차 항체 및/또는 세포 염색액(예를 들어, FITC-팔로이딘, DAPI)을 담은 100μl 액적을 다시 떨어뜨려 상기 세포를 포함하는 구역을 뒤덮을 수 있게 하고 용기 내에 설치된 항습 챔버로 옮겼다. 상기 용기/항습 챔버를 밀봉하고, 포일로 감싸고, 2시간 동안 실온에 두었다. 슬라이드를 PBS로 5회 세척하고 각각의 슬라이드가 마운팅 매체(안티-페이드(anti-fades) SlowFade, VectaShield 또는 ProLong) 2-5μl 액적을 지니도록 제조되었다. 과량의 PBS가 제거되어야 한다는 것에(페이퍼 타월에서 상기 커버슬립의 모서리를 가볍게 두드림) 주의하면서 커버슬립을 마운팅하였다. 마운팅 과정에서 형성된 방울의 갯수는 완전하게 낮추기 전에 상기 커버슬립의 가장자리를 상기 마운팅 매체에 도입함으로써 제한된다. 커버슬립을 매니큐어 액(nail polish)을 사용하여 슬라이드에 밀봉시키고 상기 슬라이드를 4°C (또는 -20°C에서 더 장시간 동안) 암실에서 저장하였다. 슬라이드를 DeltaVision® RT 복원 이미징 시스템을 사용하여 영상화하였다.

<69> DNA의 세포화학적 로컬라이제이션 및 화학량론에 있어서 정확도가 입증된, 포엘겐-스키프 절차의 프로토콜을 사용하여 핵 DNA 함량을 측정하였다. DNA 함량을 포엘겐-DNA(안료-리간드) 복합체 분자들의 흡광도를 측정함으로써 단일의 핵에서 측정하였다(Kjellstrand, P., J. Microscopy, 119:391-396, 1980; Andersson, G. and Kjellstrand, P., Histochemie, 27:165-200, 1971). 비분열중인(간기) 핵과 분열중인 종형 핵을 KS 400 이미지 분석 시스템(Zeiss Inc, Germany)에서 적합하게 조정된 소프트웨어를 사용하여 각각의 개별 핵의 전 구역(IOD)에 걸쳐 통합된 광학 밀도를 측정함으로써 측정하였다.

<70> 칼 짜이스 사의 기술자들에 의해 조립된, 컴퓨터에 연결된 AxioCam 컬러 CCD 카메라(Zeiss)와 커플링된 현미경 Axioscop 2 MOT (Zeiss)로 구성된, 이 특별한 이미지 분석 워크스테이션은(도 9D 참조) 핵 및 세포 구조에 대한 고해상도 이미지 현미경 검사가 가능하게 하는데, 전기 초기 염색체 측정시 픽셀 당 약 1000bp의 DNA가 존재한다. 따라서, 간기 핵에서 ~ 1Mb 쌍의 응축된 염색질 도메인의 정확한 측정이 가능하다. 상기 이미지는 560 nm 녹색 필터를 사용하여 핵에 대한 배율, 광 노출 및 임계값(컨투어링)의 일정한 파라미터하에서 스캐닝되었다. DNA 함량 측정에 관한 이러한 방식은 가장 정확한 결과를 약속하기 때문에 선택되었다(Biesterfeld, S. et al., Anal. Quant. Cytol. HistoL, 23:123-128, 2001; Hardie, D. et al., J. Histochem. Cytochem., 50:735-749, 2002; Gregory and Hebert, 2002; Gregory, 2005).

<71> 간기 및 핵분열 진행 중의 종형 핵에서 24개 인간 염색체 모두의 공간적 분포를 규명하기 위한 형광동소혼성화 기법(Fluorescent *in situ* Hybridization).

<72> 종형 핵의 상부에서 '고리'로 나타나는 응축(condensation)에 관여하는 염색체들 전체를 결정하기 위해 FISH를 사용하였다. 기본적으로, 상기 '고리' 내의 염색체들에 대한 라벨링은 종형 핵이 상이한 형태의 핵을 생성시킬 때 이들의 변형(transformation)을 분석하기 위한 순단으로써 뿐만 아니라 다른 수단 보다는 핵 형태에 의해 이러한 핵을 인지하기 위한 형광 마커의 개발을 위한 수단으로써 예견된다.

<73> 슬라이드 당  $1-5 \times 10^7$  개 세포 미만의 종양 세포들이 상기 슬라이드에 스프레딩된다. 상기 슬라이드를 세포 스프레딩에 관한 2개의 상이한 방법으로 고정시켰다: 한 방법은 포엘겐 DNA 이미지 세포분석기용 프로토콜에서 사용되었고 또 다른 방법은 대장내시경(colonoscopic) 생검 표본에서 상피 세포 분리를 위해 집순에 의해 제안되었다(Gibson, P. et al., Gastroenterology, 96:283-291, 1989). 후자는 기본적으로 수술 30분 이내에 종양 조직을 채취하고 상기 조직을 즉시 50mℓ의 차가운 핸크(Hank) 평형염 용액(balanced salt solution)에 넣고 나서, 세척한다. 상기 표본을 이후 스칼펠(scalpel) 칼날로 잘게 썰고 4 mℓ의 콜라제나제-디스파제 매질(1.2 U/

$\text{ml}$ 의 디스파제 I(Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, Ind.) 및 50 U/ $\text{ml}$ 의 콜라게나제 타입 IV(Worthington, Biochemical Corp., Freehold, N.J.)을 포함하는 배지) 중에서 1.5시간 동안 분해(digestion)시켰다. 상기 커버슬립 위에 적당한 슬라이딩 압력을 가함으로써 펠렛이 현미경 슬라이드의 표면 위에 스프레딩되게 하였다. '가수분해' 침연에 의한 스프레딩은 종형 핵 형태의 임의의 왜곡이 세포 스프레딩을 위한 콜라게나제-디스파제 처리 후 발생되었는지 여부를 확인하기 위한 양성 대조군으로써 역할 한다. 준비된 슬라이드를 꺼내서 건조시키고 밤새 37°C에 놓아 두었다. 슬라이드를 그후 순차적으로 얼음으로 냉각된 70% 에탄올, 80% 에탄올, 100% 에탄올(실온)에서 각각 2분간 탈수시키고 완전히 건조시키고, 72°C에서 2분간 70% 포름아미드/2xSSC 중에서 변성(denaturation)을 겪게 하고, 즉시 상기와 동일한 순서로 다시 탈수시키고 완전히 건조하였다. 7 $\mu\text{l}$  혼성화 완충액, 2 $\mu\text{l}$  멸균수, 및 1 $\mu\text{l}$  프로브를 포함하는 혼성화 혼합물을 제조하였다. 혼합물을 72°C에서 8 내지 12분간 변성시키고 이를 즉시 슬라이드에 첨가하고 나서 상기 슬라이드에 커버슬립을 씌우고, 고무 시멘트로 밀봉하고, 37°C의 어두운, 항습 박스에 밤새 놓아 두었다.

<74> 슬라이드를 그후 차가운 70% 에탄올, 차가운 80% 에탄올, 및 실온의 100% 에탄올에서 각각 2분간 탈수시키고; 아세트산 변성 정도에 따라, 72°C에서 70% 포름아미드, 2xSSC 중에서 50-60초간 변성시켰다. 슬라이드를 차가운 70% 에탄올, 차가운 80% 에탄올, 및 실온의 100% 에탄올에서 각각 2분간 다시 탈수시켰다. 혼성화 혼합물(Hybridization mix)은 7 $\mu\text{l}$  혼성화 완충액, 1.5 $\mu\text{l}$  멸균된 H<sub>2</sub>O, 및 1.5 $\mu\text{l}$  프로브를 포함하였다. 주황색(Orange) 스펙트럼 또는 녹색 스펙트럼 형광 안료 중 어느 하나와 함께 홀 크로모좀 페이트 프로브(Whole Chromosome Paint probes)(Vysis)를 적용하였다. 혼성화 혼합물을 72°C에서 5-10분간 변성시키고 슬라이드를 연이어 완전히 건조시켰다. 혼성화 혼합물을 상기 슬라이드에 적용하고, 커버슬립을 씌우고, 고무 시멘트로 밀봉하였다. 슬라이드를 이후 항습된 박스 안에서 밤새, 37°C에서 인큐베이션하였다. 그 다음 날, 슬라이드를 각각 42°C에서 8분간 50% 포름아미드, 2xSSC로 2회 세척하였다. 슬라이드를 이후 37°C에서 8분간 2xSSC로 세척하고 나서 실온에서 1분간 1xPBD(0.05% Tween, 4xSSC)로 각각 3회 세척하였다. 그후 10 $\mu\text{l}$  DAPI II 안티페이트, 125ng/ $\text{ml}$ (Vysis) 및 커버슬립을 부가하였다. 과량의 DAPI II Antifade를 제거하고 상기 슬라이드를 고무 세멘트로 밀봉하였다. 이미지 스캐닝 절차를 실행하기 전에 -20°C의 암실에서 유지하였다.

<75> 종형 핵의 핵분열 전, 중, 후에 DNA 합성을 추적하기 위한 정량적 DNA 세포분석기의 사용.

<76> 본원에 기재된 기술은 임의의 2개의 핵들 또는 인간 세포 배양물에서 유사분열이 진행되는 동안 아나텔로페이즈s의 딸 핵들 사이의 차이점을 2% 미만의 오차로 검출이 가능하게 한다. 상기 기술은 종형 핵을 포함하는 세포 또는 합포체에 의해 DNA가 언제 합성되는지를 결정하기 위해 사용되었다. 상기 기술은 핵분열 과정에 진입한 것으로 보이는 핵에 대한 스캐닝을 포함한다. 일반적으로 태아 종형 핵은 동일하게 염색된 슬라이드 상의 인간 림프구 DNA 함량과 대비하여 2배체 인간 세포에서 예상되는 DNA 함량을 포함한다는 것이 주목된다. 또한, 인간 전종양성(proneoplastic) 병변 및 종양의 종형 핵에서 DNA의 양은 2배체 DNA 양을 평균적으로 초과하는 평균 근처에서 상당한 변이를 나타낸다는 것이 주목된다. 측정 결과 전혀 예상치 못한 하기의 또 다른 발견을 하였다: DNA 합성은 종형 핵을 포함하는 대칭적 핵분열 및 비대칭적 핵분열 둘 모두의 경우 핵분열 과정에 앞서서 일어난다기보다 상기 과정과 일치하여 일어난다. 핵은 단일의 핵 양으로부터 총 DNA 함량의 증가가 명백히 검출되기 전에 '컵에서 컵으로' 분리 과정을 잘 따르는 것처럼 보인다. DNA의 총량은 분명하게 분열이 시작된 핵에서 단일의 종양 핵의 평균에 가까운 낮은 값에서 증가하고 막 분열이 완료된 것처럼 보이는 핵의 평균 핵 함량의 거의 2배에 다다른다.

<77> **실시예 2. 태아 기관발생에 있어서 합포체 종형 핵.**

<78> 이전까지 인식되지 않았던 일련의 핵 형태들이 종형 핵을 발생시키는 인간 태아 표본에서 확인되었다. 이러한 형태들은 5주째에 검출되었는데, 종형 핵을 포함하는 최초의 관형 합포체였다. 이들에 대한 예는 도 13A-D에 제시되어 있다. 이것은 유사분열적, 초기 배발생의 구형 핵으로부터 후기 유사분열적, 종형 핵으로의 형태적 전이를 드러내는 중요한 발견인데, 상기 종형 핵은 생식력있는(generative) "줄기" 세포 계통(lineage)의 순 성장 및 분화를 의미한다.

<79> 이러한 발견은 모든 조직 형태에 걸쳐서 일치하는데, 예를 들어, 근육, 발달중인 사지, 신경 조직 및 내장 기관(위, 췌장, 방광, 폐 및 간을 포함함)을 포함하는 일련의 조직 표본에서 관찰되었기 때문이다. 합포체는 발달 중인 기관 덩어리(organ mass) 내부에 규칙적으로 공간을 차지하고 있는 ~16-24개 합포체의 클러스터로 발견되는데, 각각의 합포체는 ~16개의 종형 핵을 지닌다. 합포체는 가장 최소로 발달된 인간에서 사용한 물질인 것이 명백하며(~5주) 13주째에 사라진다. 12주 후, 종형 핵은 각각의 기관에 특유한 방식으로 3차원적으로 규칙적으로 분배된다.

- <80> 도 13A는 구형 또는 약간 난형인 핵의 장축 주위를 둘러싼 "벨트"로서 총 DNA 함량의 ~10%의 응축을 지니는 핵을 보여준다. 도 13B는 핵을 보여주는데, 상기 핵에서 2개의 응축된 핵 "벨트"는 분리되고 있으나 여전히 단일 핵의 일부분인 것을 보여준다. 도 13C는 도 13B의 2개의 벨트를 찬 핵의 분열로 발생되는 것으로 보이는 한쌍의 핵을 보여준다. 도 13D는 각각의 합포체가 도 13C에서와 같이 마주보고 있는 입과 함께 이의 직선 중간지점에 단일한 한 쌍의 종을 지니는 한 세트의 종을 포함한다는 것을 보여준다. 이러한 이미지들은 본 발명자들에게 일련의 대칭적 분열이 중심 쌍으로부터 떨어져 나오는 핵을 생성시킨다는 것을 제시한다. 합포체 구조는 종형 핵 4개 정도의 작은 그룹에서 검출된다.
- <81> 암발생에 관한 핵 형태의 연구에서, 핵은 대장 선종(도 14A) 및 선암(도 14B)에서 적은 숫자로 유사한 벨트-난형 핵의 장축 주위를 둘러싼 1개 또는 2개의 벨트-를 나타내었다. 이러한 발견은 아무리, 역전된 출현(appearance)의 순서로 나타난다고 할지라도, 종양발생과정이 개체발생의 다수의 중요한 표현형 전이 단계를 공통적으로 거친다는 일반적인 가정을 확신시켜주며 상기 가정을 뒷받침하기 위한 근거를 확장시킨다.
- <82> 인간 동원체에 특이적인 FISH 염색.
- <83> 잉여 합포체(Extra-synctial) 종형 핵은 실제적으로 인간 DNA를 포함한다. 대부분의 동원체는 태아 샘플 내의 종형 핵의 입에 응축된 DNA의 지역과 연관되어 있다. 흥미롭게도, 표준 FISH 프로토콜은 합포체내 종형 또는 다른 형태의 핵을 염색시키지 못하는데, 이는 합포체의 수축성 인자를 함유하는 쉬스(contractile element-containing sheath)가 FISH 시약의 진입을 억제할 것임을 시사한다. 도 15는 12주째 인간 태아 대장의 조직으로부터의 구형(도 15A), "시가형"(도 15B) 및 종형(도 15C) 형 핵에서의 동원체(녹색)을 보여준다.
- <84> 딸 핵의 DNA 함량은 태아에서 종형 핵의 무사분열에서와 동일하나, 이들은 여러 기원의 조직으로부터의 인간 종양에서 종형 핵의 무사분열로 현저히 불균등한 DNA 분리를 나타낸다. 대장 전종양성 폴리피(polyps)의 종형 핵들 간의 유사분열성 분열의 예가 발견되지 않았지만, 폴리피(polyp)마다 발견되는 수십개의 종형 핵들 간의 DNA 함량의 현저한 분산(dispersion)은, 불균등한 DNA 분할(partitioning)이 전종양뿐만 아니라 종양형성(neoplasia)에 있어서 영향을 미치지만, 종형 핵의 태아 분열시에는 영향을 미치지 아니하는 현상이라는 것을 시사한다는 점에서 주목된다. 이러한 관찰은 종양 조직과 배아 조직이 유사한 조직학적 특성들을 지닌다는 비르쵸프(Virchow)와 콘하임(Cohnheim)의 관찰을 확장시키면서, 또한 유사분열시의 종양 세포들은 종양의 모든 세포에 공통적인 비정상적인 염색체의 거대한 단편(fraction)을 나타낸다는 보베리(Boveri)의 관찰-이는 불안정한 염색체 형성 또는 분리시에 보다 초기의 공통적인 기원을 시사함-을 확장시킨다.
- <85> 생쥐에서의 핵 형태.
- <86> 도 13A-D와 거의 동일한 형태로, 특히 종형 핵, 전-합포체 형태 및 합포체 형태를 포함하는, 핵의 다양한 모든 형태가 생쥐 태아의 조직에서 발견되었는데, 전합포체 형태는 12.5일에 제일 먼저 검출되고 나서, 14.5-16.5일 째의 태아에서 태아 생쥐에 있어서 정의된 기관의 기간과 거의 비슷한 시기에 검출되었다. 생쥐에서의 이러한 발견이 인간에서의 관찰을 고려할 때 놀랍지는 않지만, 이러한 발견은 인간에 있어서는 비윤리적이거나 불가능한 비인간 종에서의 기관발생의 연구의 폭넓은 가능성을 제시한다.
- <87> 임태기간 15주 내지 16주째의 특성이 고정된 태아 폐기물 샘플에서, 합포체는 더 이상 분명하게 나타나지 않지만 종형 핵은 성장중인 기관 도처에 걸쳐 규칙적인 패턴으로 분포되어 있다.
- <88> 실시예 3.
- <89> 미발달된 장의 풍부한 합포체 및 종형 핵은 염색체 및 염색체 엘리먼트, 다양한 신축성 분자(예를 들어, 액틴) 및 다른 식별 가능한 마커(흔히 "줄기 세포 마커"로 일컬어지는 그러한 마커들을 포함)의 위치를 정의하기 위한 FISH를 포함하는 일련의 조직화학 절차를 이용하는데 사용된다. 본원에 기재된 기술은 ZEISS-P.A.L.M. 미세절제 장치를 사용하여 합포체와 개개의 핵을 수집하는 작업에 사용된다. 성공의 관건은 합포체 형태 또는 핵 형태에 관한 균질한 일련의 샘플을, 세포의 mRNAs, 가장 흔한 단백질 및 글리코사민오글리칸을 스캐닝하는데 충분한 갯수인, 10,000개의 핵 등가물(equivalents)과 동일 또는 더 많은 수로, 수집하는데 있다.
- <90> 본 발명은 특별하게 이의 바람직한 구체예를 제시하고 이를 참고로 하여 기재되었으나, 당업계의 통상의 기술자는 본 발명에 있어서 형태 및 세부내용에서의 다양한 변형이 첨부된 청구항으로 가능되는 본 발명의 영역으로부터 벗어남이 없이 이루어질 수 있다는 것을 이해할 것이다.

### 도면의 간단한 설명

- <14> 도 1은 핵심 이미지의 요약도이다. A) 인간 태아 장(gut), 정상 대장 점막, 선종(adenoma) 및 선암(adenocarcinoma)의 간기(interphase)와 전기 초기(early prophase; E.P.) 세포에서 관찰된 핵 형태(nuclear morphotypes)의 예. B) 태아 장의 종형 핵의 고해상도 이미지(x 1400). 응축된(Condensed) DNA는 개방부(opening)를 속빈 종 구조(hollow bell structure)로 유지하는 애늘러스(anulus)를 생성하는 것으로 보인다. 스케일 바, 5  $\mu\text{m}$ .
- <15> 도 2A 및 B는 5-7주째, 배아 장의 이미지이다. 도 2A: 위상차(Phase-contrast) 이미지(왼쪽 프레임) 및 염색된 핵 이미지(가운데) 및 합병된 이미지(오른쪽)는 직경 ~50미크론의 관형 합포체(tubular syncytium) 내부에 존재하는 일직선으로 배열된 핵을 보여준다. 도 2B: 고해상도 핵 이미지는 속빈 종형 구조를 보여준다. 상기 종형 핵의 '헤드-투-토우(head to toe)' 방향은 관찰된 모든 배아 튜브들(tubes)에서 유지되나, 튜브들은 앞뒤로 뒤틀려(snake) 평행한(parallel) 튜브들은 국소적으로 역-평행한 종형 핵 방향을 지닐 수 있게 된다. 스케일 바, 50 $\mu\text{m}$ (저배율) 및 5 $\mu\text{m}$ (고배율).
- <16> 도 3A-D는 태아 장에서 종형 핵들의 핵 분열 이미지를 보여준다. 도 3A 및 3B: 대칭적 핵분열. 종형 핵은 유사한 형태의 종형 핵에서 생겨난다. 도 3C 및 3D: 비대칭적 핵분열. 구형(Spherical) 핵, 및 종형 핵에서 생겨난 '시가형(cigar-shaped)' 핵. 스케일 바, 5 $\mu\text{m}$ .
- <17> 도 4A-C는 정상 성인 대장 크립트(crypts)에서 획득한 이미지를 보여준다. 도 4A: 약 2000개 회전타원체(spheroid), 구형 또는 원반형(discoid) 핵의 크립트는 때때로 (<1/100) 크립트 하단부에 자리잡고 있는 인지 가능한 종형 핵(화살표)을 포함하고 있었다. 도 4B: 또 다른 종형 핵을 보여주는 크립트 기부(base). 도 4C: 잘-퍼진(well-spread) 크립트 내의 벽(walls) 및 루미날 표면(luminal surface)의 간기 핵과 유사분열 핵의 형태. 확대된 이미지는 다음을 보여준다: (i) 구형 및 난형(ovoid) 간기 핵, (ii, iii) 전기 초기의 구형- 및 난형-핵, 및 (iv) 아나텔로페이즈(anatelophase) 핵. 스케일 바, 100 $\mu\text{m}$ (저배율 이미지) 및 5 $\mu\text{m}$ (고배율 이미지).
- <18> 도 5A-E는 선종에서 획득한 이미지를 보여준다. 도 5A: 거대 가지를 뻗고 있는(large branching) 특색있는 선종의 크립트. 도 5B: 선종 도처에서 발견된 불규칙적인 크립트-유사 구조. 전형적으로 2개, 그러나 때로는 1개, 4개 또는 심지어 8개의, 종형 핵(삽입부분)이 이러한 거대한(>4000 세포) 불규칙적인 크립트-유사 구조의 기부에서 나타난다. 도 5C: 1개의 종형 핵을 포함하는 유사한 핵 형태의 세포 클러스터. 이러한 형태의 클러스터는 정확하게 총 16개, 32개, 64개, 및 128개의 세포를 포함한다. 왼쪽 판넬, 포엘겐-김자(Feulgen-Giemsa) 염색. 오른쪽 판넬, 위상차 자동형광 이미지. 도 5D: 선종에서 나타나는 종형 핵 내의 내용물(contents): (i) 31개의 난형 핵과 1개의 종형 핵을 지니는 클러스터, (ii) 밀집된(shoulder to shoulder) 배열을 취하고 있는 다수의 종형 핵, (iii) 나란한(side-by-side) 패턴으로 배열되어 있는 종형 핵(화살표), (iii) 근처의 크립트 기부를 연상시키는 몇몇 종형 핵과 함께 ~250개 핵의 불규칙적인 혼합체(mixture). 도 5E: 기부에 1개의 종형 핵(화살표)과 함께 명백하게 클론성 패치(clonal patches)인 5개의 상이한 핵 형태의 세포를 포함하고 있는 불규칙적인 크립트-유사 구조. 스케일 바, 100 $\mu\text{m}$ ('a, b') 및 5 $\mu\text{m}$ ('e').
- <19> 도 6A-E는 선암으로부터 얻은 이미지를 보여준다. 도 6A: 빈도높은 과열 지점(break points)과 함께 가지(branches)를 지니는, 매우 거대한 크립트-유사 구조(> 8000개 세포). 화살표는 주로 종양 표면 근처에서 발견되는 ~250개 세포 크립트-유사 구조의 예를 제시한다. 도 6B: 다수의 종형 핵(전체 핵 형태 중 ~ 3%)을 지니는 종양 덩어리의 내부. 도 6C: 도 6B의 종형 핵은 헤드-투-토우 합포체성 배열 및 비합포체성 나란한 배열로 정렬된다. 도 6D: 선암에서의 대칭적 핵분열. 도 6E: 선암에서 종을 형성하는 시가형 핵의 비대칭적 핵분열. 간으로의 대장 전이 시 유사한 구조가 관찰되었다. 스케일 바, 5  $\mu\text{m}$ .
- <20> 도 7A-D는 인간 조직 및 세포 연구 시의 정량화 이미지 세포분석의 각 단계를 도시한 것이다. 도 7A: 고정을 위하여 외과적 적출로 준비된 신선한 대장. 도 7B: 폴리피(polyp)(폴리피의 포지셔닝, '위에서 아래로(top-to-bottom)' 표기되어 있음)를 통한 1mm 절편(sections)의 스프레딩(spreading) 결과를 보여주는 현미경 슬라이드 표본(preparation). 도 7C: 세포 핵은 전체 크립트를 관찰가능하게 스프레딩되어 있다(붉은 자줏빛(magenta)으로 도시됨). 모든 크립트 핵은, 위에 제시한, 5  $\mu\text{m}$  절편과 대비하였을 때(BrdU 염색 및 H&M 염색), 보존되어 있다. 도 7D: Motorized Axioscop 현미경-AxioCam 컬러 CCD 카메라-KS 400 소프트웨어 이미지 분석 워크스테이션.
- <21> 도 8A 및 B는 종양 내에서 비분열중인 종형 핵과 분열중인 종형 핵을 찾아 내기 위한 FISH 적용시의 '관심있는 표적'에 대해 도시한 도면이다. 도 8A: 염색질( $\mu\text{m}^2$  당 더 높은 DNA 밀도로 인해 더 어둡게 염색됨)은 2개의 평

행한 원으로 배열된 전기 염색체와 유사한 독특한 구조를 형성한다. 도시된 상기 원은 특정 염색체가 종형 핵의 이 특정 부위에서 발견될 수 있다는 예상을 보여준다. 도 8B: 염색질 분포 및 특정 염색체 포지셔닝은 종형 핵의 비대칭적 분열을 통해 일어나는 가상의 변형(본원에서 '종형 핵에서 난형 핵으로(bell-to-oval)')에 따라서 변화한다.

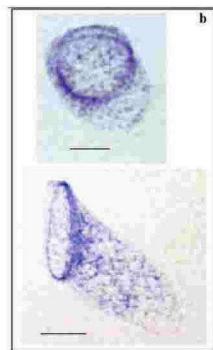
- <22> 도 9A-D는 TK-6 인간 세포의 구형 핵내의 염색체 11에 대한 인 시츄(*in situ*) 혼성화에 따른 형광의 결과를 나타내는 이미지이다. 도 9A: 전기 염색체인 2쌍의 염색체들이 퍼져있다. 도 9B: 구형 핵 DAPI 핵 염색. 도 9C: FITC 형광 프로브로 혼성화시킨 동일한 염색체 쌍. 도 9D: DAPI 및 FITC 간기 염색체 염색의 합병된 이미지. 스케일 바, 5미크론.
- <23> 도 10은 합포체로 정렬된 종형 핵의 대칭적 핵 분열 이미지를 보여준다.
- <24> 도 11은 핵 분열이 진행중인 종형 핵내의 DNA 로컬라이제이션을 도시한 이미지를 보여준다.
- <25> 도 12는 종형 핵의 핵 분열이 진행되는 동안의 핵 물질의 배열 및 구성(ssDNA 또는 dsDNA)을 보여준다.
- <26> 도 13A-D는 인간 태아 표본에서 얻은 이미지를 보여주는데, 지금까지 확인되지 않은 일련의 핵형을 도시하고 있다. 상기 핵형들은 본래 종형 핵에서 생겨난다. 도 13A는 구형 또는 약간 난형인 핵의 장축을 둘러싼 "벨트(belts)"로서 총 DNA 함량의 ~10%의 응축률을 지니는 핵을 보여준다. 도 13B는 핵을 도시하고 있는데, 상기 핵내의 응축된 2개의 핵 "벨트"는 분리되어 있으나 여전히 단일한 핵의 일부분인 것으로 생각된다. 도 13C는 한 쌍의 핵을 도시하고 있는데, 상기 핵은 도 13B의 2개의 벨트 핵의 분열로 생성되는 것으로 생각된다. 도 13D는 각각의 합포체가 도 13C에서와 같이 마주보고 있는 입(mouths)과 함께 이의 직선 중간지점에 단일한 한 쌍의 종을 지니는 한 세트의 종을 포함한다는 것을 보여준다. 이러한 이미지들은 일련의 대칭적 분열이 중심 쌍으로부터 떨어져 나오는 핵을 생성시킨다는 것을 제시한다.
- <27> 도 14A 및 B는 대장 선종(도 14A) 및 선암(도 14B)의 핵 형태를 보여준다. 암발생의 형태는 유사한 벨트-난형 핵의 장축 주위의 1개 또는 2개-를 보여준다.
- <28> 도 15A-C는 인간 동원체에 특이적인 FISH 염색을 보여준다. 도 15는 12주의 인간 태아 대장의 조직으로부터의 구형(도 15A), "시가형"(도 15B) 및 벨형(도 15C) 핵 동원체(centromeres)(밝은 부분)를 보여준다.

## 도면

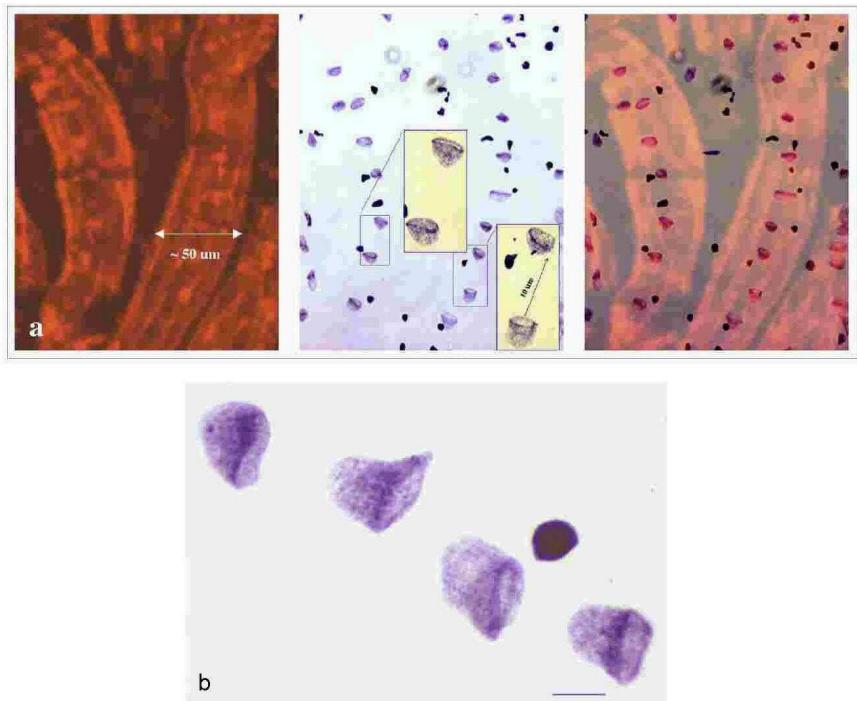
## 도면1A

혈 액 체 액	태아 장	성인 정상 대장	선종, 선암
화 장 액	 전기 초기 관찰되지 아니함	 *	 
화 장 액	 E.P.		
화 장 액 단 단	 E.P.  E.P.		 
화 장 액 단 단 시 기	 E.P.  E.P.	관찰되지 아니함	 
화 장 액 단 단 시 기 증 증	관찰되지 아니함	관찰되지 아니함	 
화 장 액 단 단 시 기 증 증 증 증	 E.P.  E.P.	관찰되지 아니함	관찰되지 아니함
화 장 액 단 단 시 기 증 증 증 증 증	 E.P.  E.P.	관찰되지 아니함	관찰되지 아니함
화 장 액 단 단 시 기 증 증 증 증 증 증 증	 E.P.  E.P.	관찰되지 아니함	<b>a</b>

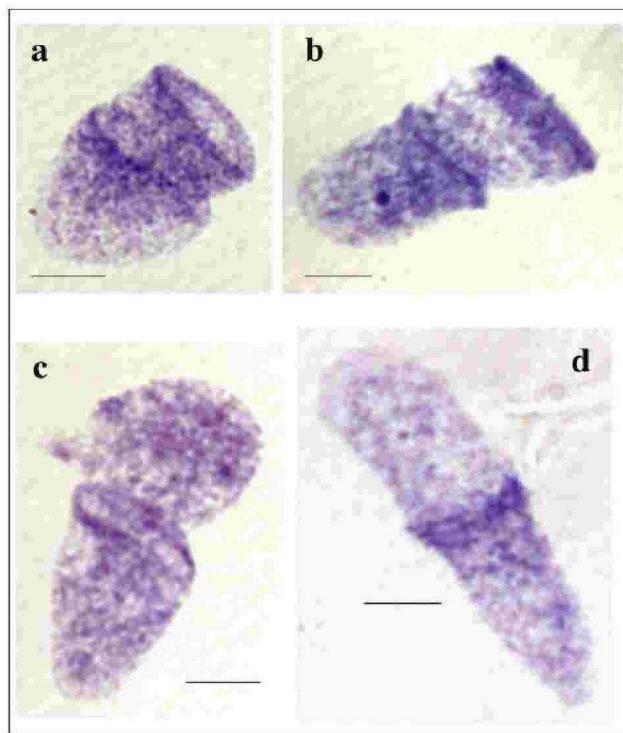
## 도면1B



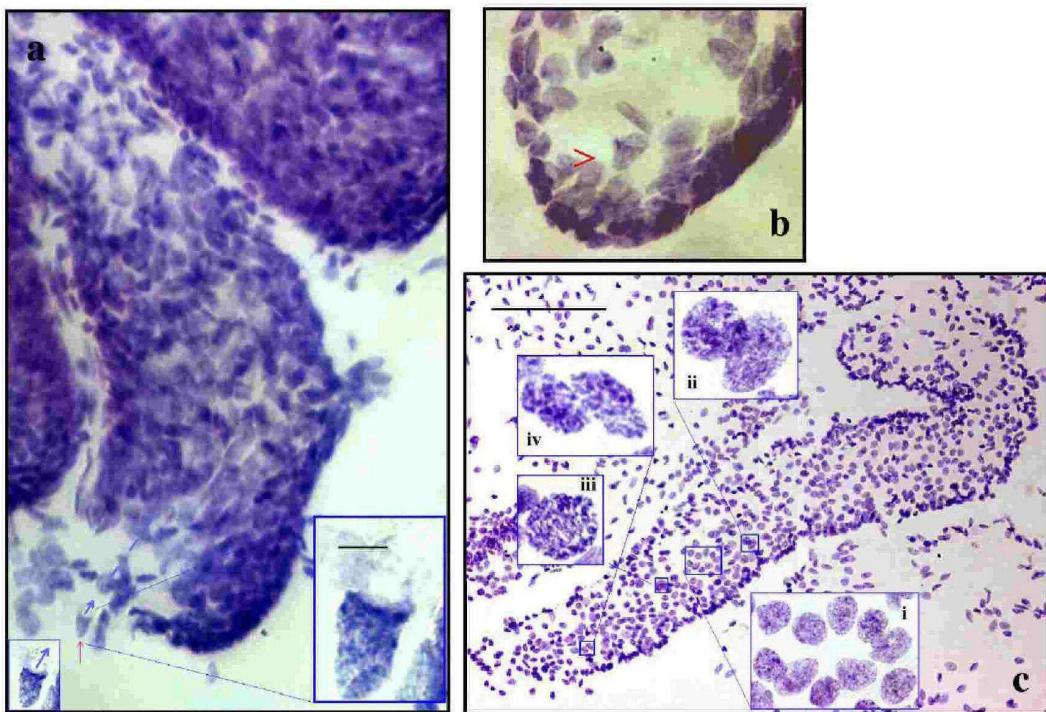
도면2



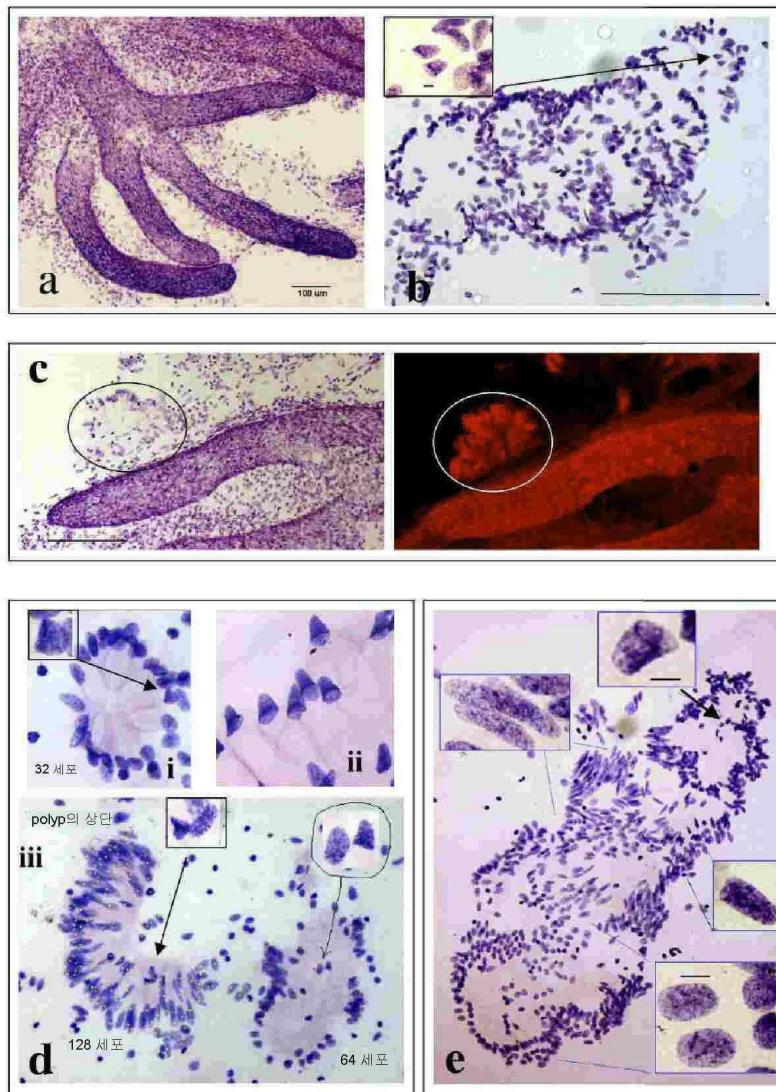
도면3



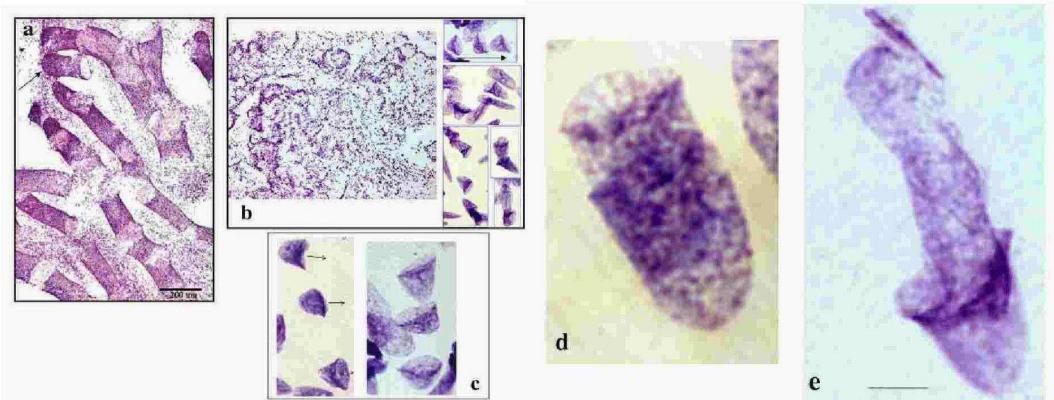
도면4



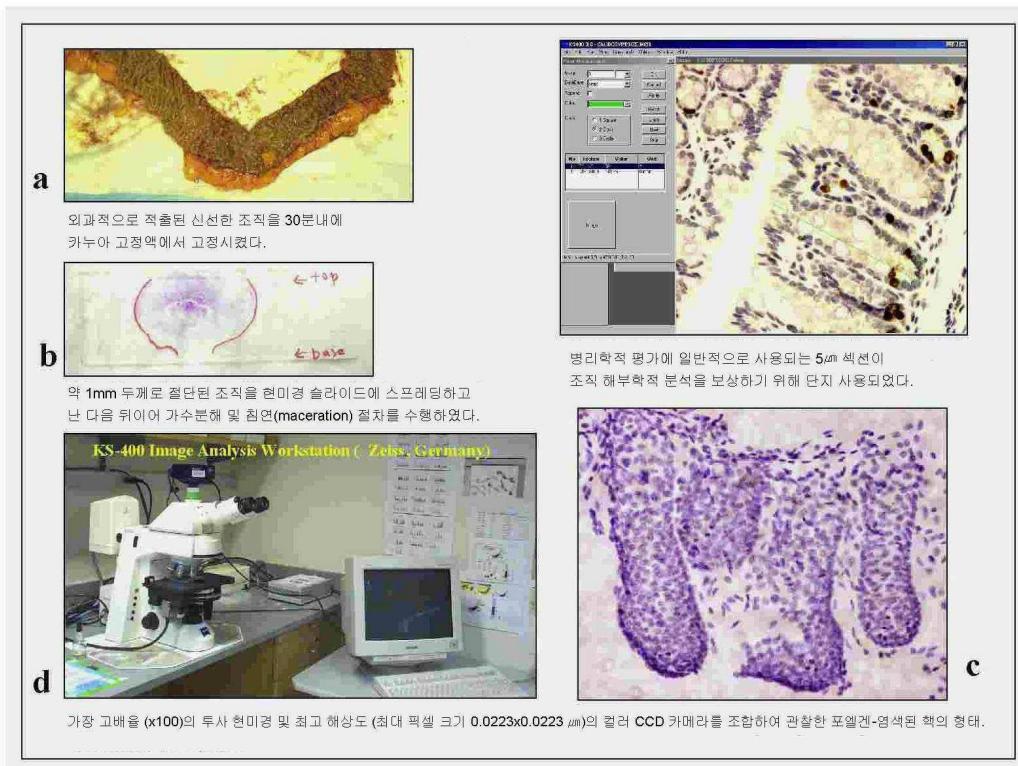
도면5



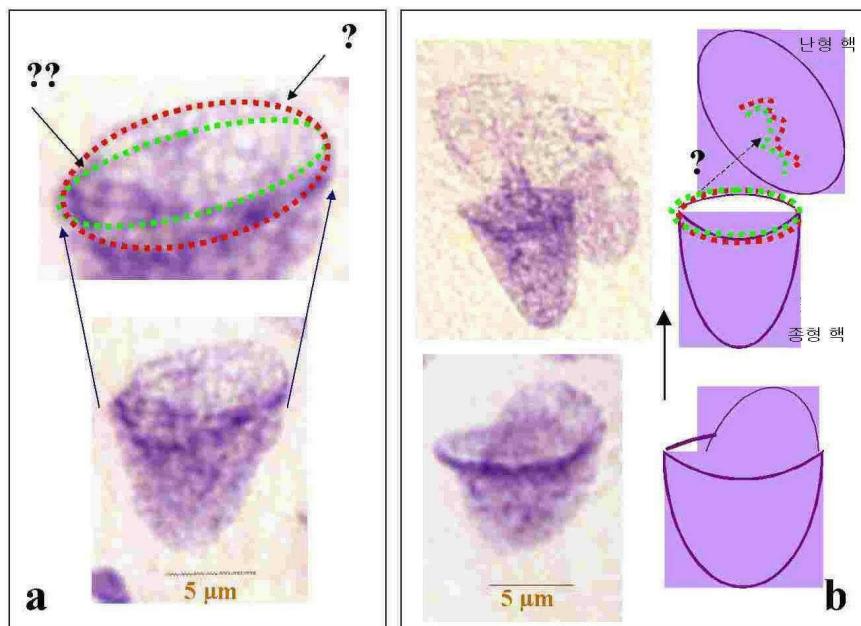
도면6



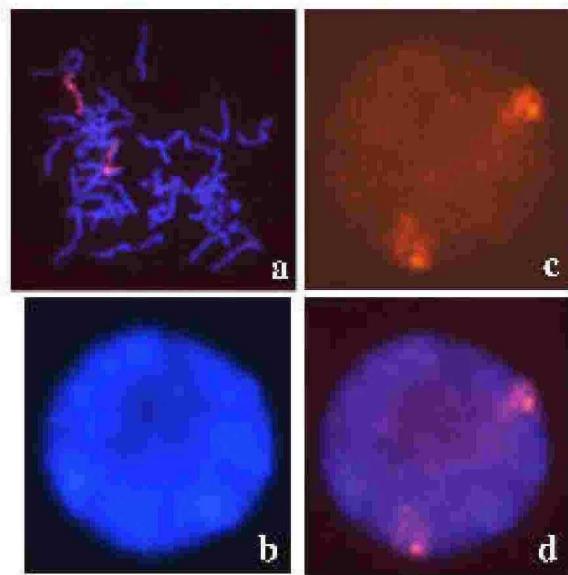
## 도면7



## 도면8

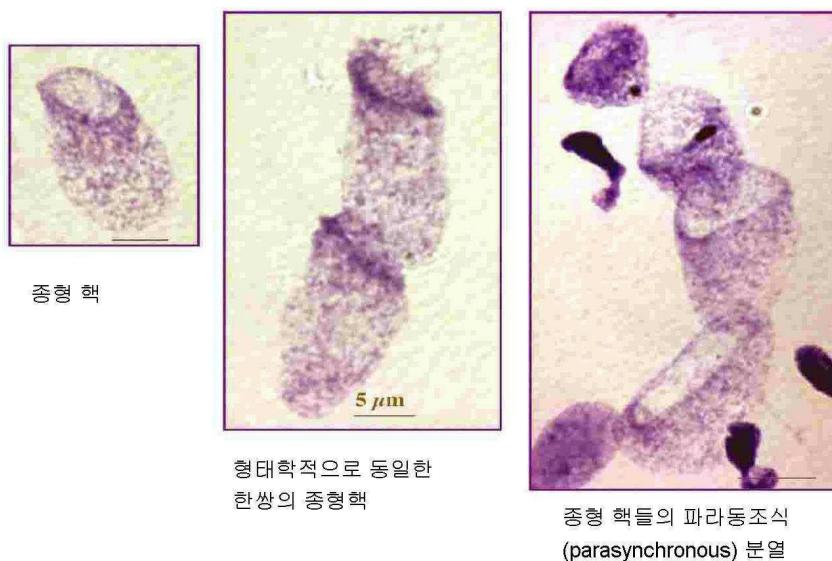


도면9

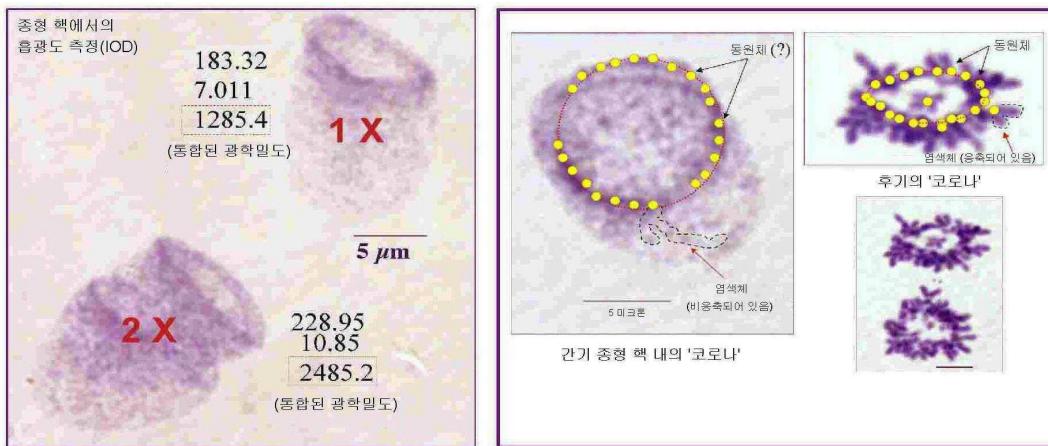


도면10

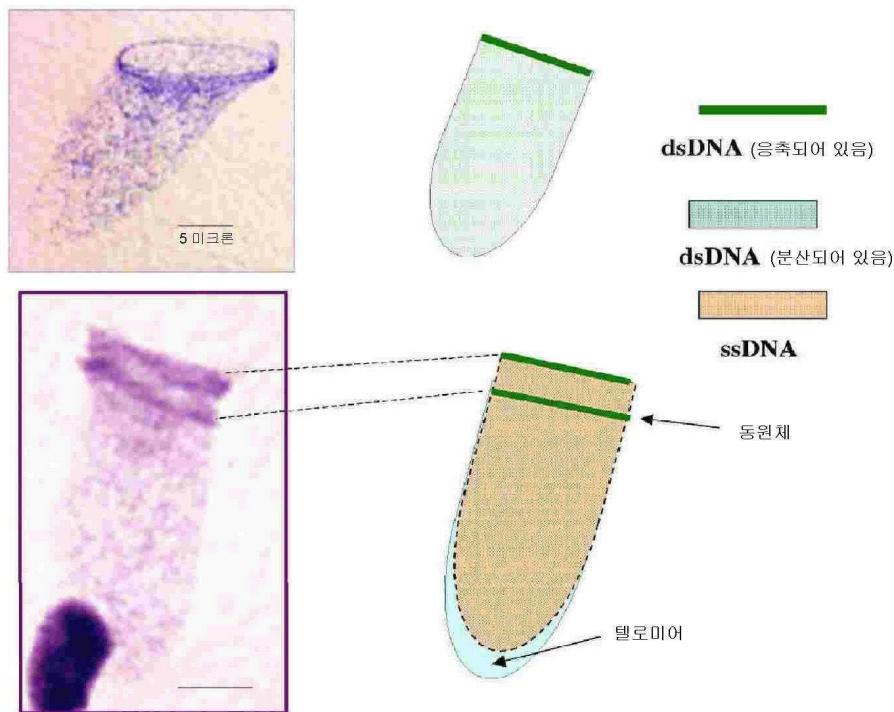
종형 핵 분열은 합포체(syncytia)를 생성시킨다:



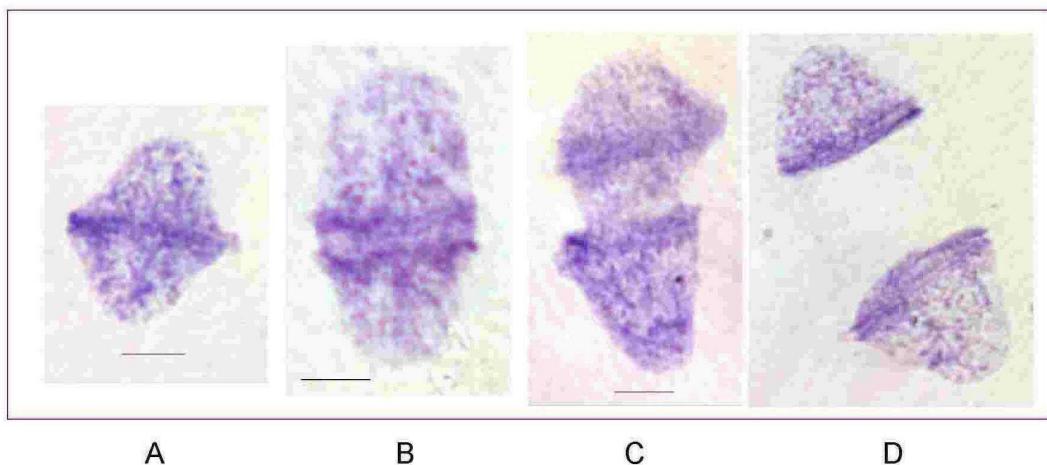
도면11



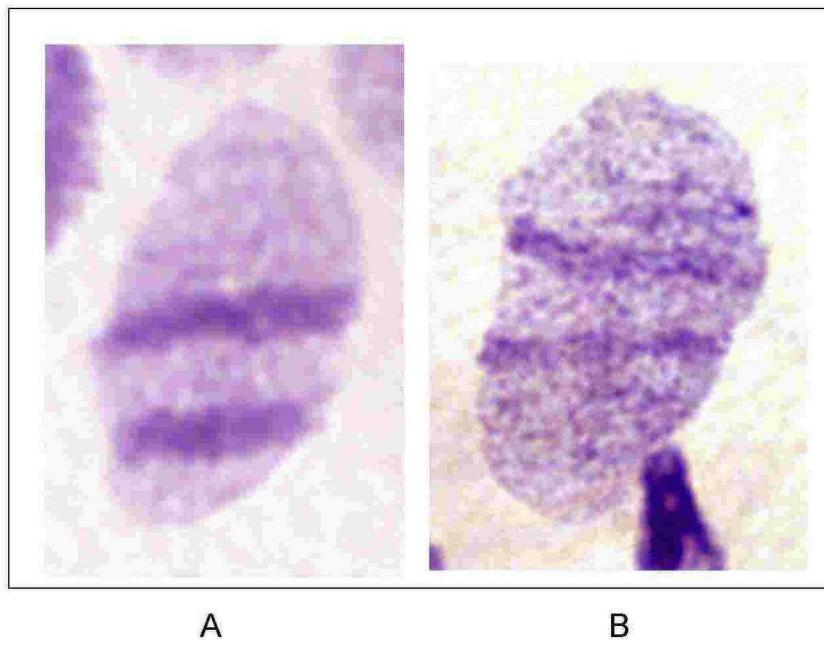
도면12



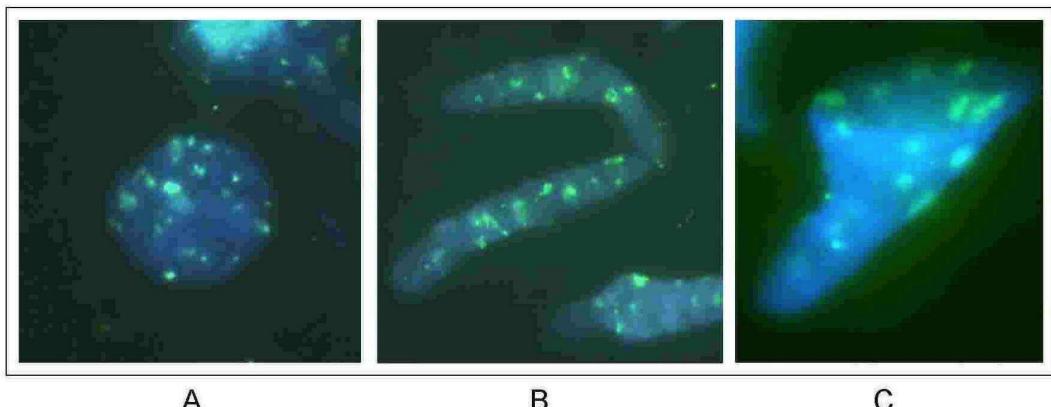
도면13



도면14



도면15



A

B

C