

## 수지상세포를 이용한 마우스 악성흑색종의 면역치료

연세대학교 의과대학 피부과학교실<sup>1</sup>, 피부생물학연구소<sup>2</sup>, 두뇌한국21 의과학사업단<sup>3</sup>

이태형<sup>2,3</sup> · 조영훈<sup>1</sup> · 이민걸<sup>1,2,3</sup>

### Immunotherapy for Malignant Melanoma using Dendritic Cells

Tae Hyung Lee<sup>2,3</sup>, Young-Hun Cho<sup>1</sup>, Min-Geol Lee<sup>1,2,3</sup>

Department of Dermatology<sup>1</sup>, Cutaneous Biology Research Institute<sup>2</sup>,  
and Brain Korea 21 Project for Medical Science<sup>3</sup>, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

**Background:** Malignant melanoma is a potentially lethal cancer that arises from melanocytes present in skin, mucosa, or the epithelial surfaces of eyes and ears, and its incidence has increased substantially. Although primary tumor excision can sometimes achieve complete remission, most melanomas are beyond surgical margins when diagnosed, and are usually resistant to chemotherapy and radiotherapy. Therefore, many other therapeutic modalities are being investigated, and one of them is dendritic cells (DC)-based immunotherapy.

**Objective:** The purpose of this study was to investigate the therapeutic effect of DC-based immunotherapy on malignant melanoma.

**Methods:** Malignant melanoma was induced in mice by subcutaneously inoculating B16F10 cell line, and fifteen mice were divided into 3 groups: 1) PBS-treated (n=5), 2) treated with DC (n=5), and 3) treated with tumor lysate (Ag)-pulsed DC (n=5). We identified that DC were able to present Ag to T cells with mixed lymphocyte reaction and induce Ag-specific immune response with delayed hypersensitivity. To evaluate the therapeutic effect, we examined changes of tumor size and survival rates.

**Results:** The following results were obtained: 1. Ag-pulsed DC generated much T cell proliferation (mixed lymphocyte reaction). 2. Ag-pulsed DC treatment induced only delayed hypersensitivity. 3. Ag-pulsed DC treatment decreased tumor size (PBS:703±49 mm<sup>3</sup>, DC:619±26 mm<sup>3</sup>, and Ag-pulsed DC: 463±25 mm<sup>3</sup>) and increased survival rates.

**Conclusion:** Our results suggest that intratumoral injection of Ag-pulsed DC could be used to treat malignant melanoma. (Korean J Dermatol 2006;44(2):141~148)

**Key Words:** Dendritic cells, Immunotherapy, Malignant melanoma

### 서 론

악성흑색종은 예후가 매우 나쁜 종양으로 멜라닌세포에서 유래하며, 피부, 눈, 상부 호흡기, 위장관 그리고 비뇨생

식기 등에서 발생한다<sup>1</sup>. 악성흑색종의 발병률은 전 세계적으로 증가하고 있으며<sup>2</sup>, 최근 우리나라도 증가하는 추세이다<sup>3</sup>. 악성흑색종은 앞으로도 오존층의 파괴와 함께 계속 발병률이 증가할 것으로 예상된다. 악성흑색종의 초기 병변은 외과적 절제로 완치될 수 있으나, 대부분의 악성흑색종은 이미 진단 시 외과적 절제 범위를 벗어나 있으며, 기존의 치료 방법인 항암치료나 방사선치료에는 잘 반응하지 않는다. 따라서 다양한 보조치료법 또는 대체치료법에 대한 많은 연구가 진행 중이며, 최근 면역반응을 시작하는 항원전달세포인 수지상세포를 이용한 면역치료가 다양하게 시도되고 있다<sup>4-6</sup>. 특히 악성흑색종의 경우, 종양의 자연 소실과 종양 내 면역세포들의 침윤 그리고 여러 가지 싸이

<접수: 2005년 9월 2일>

\*본 논문은 2000년도 스티펠상 연구비에 의하여 연구되었음.

교신저자: 이민걸

주소: 120-752 서울특별시 서대문구 신촌동 134  
연세대학교 의과대학 피부과학교실

전화: 02)2228-2085, Fax: 02)393-9157

E-mail: mglee@yumc.yonsei.ac.kr

토카인에 대하여 부분적인 반응을 보인다는 점 때문에 면역치료의 좋은 대상으로 이용되고 있다<sup>7,8</sup>.

수지상세포는 수지(dendrite)를 가지고 있는 형태 때문에 붙여진 이름으로, 생체 내 가장 강력한 항원전달세포로 알려져 있다<sup>9</sup>. 골수의 전구세포로부터 기원하는 수지상세포는 뇌를 제외한 거의 모든 조직에 산재해 있으며, 말초 단핵구(PBMC)에는 1% 미만으로 존재한다<sup>10</sup>. 수지상세포는 다른 세포에 비하여 항원전달분자(CD1a, MHC-I, MHC-II), 부속/동시자극분자(CD40, CD58, CD80, CD86 등), 세포 내 부착 분자(CD50, CD54) 그리고 항원 흡수에 필요한 다양한 수용체(CD11b, CD32, CD64, macrophage mannose receptor, DEC-205)를 많이 발현한다<sup>11-13</sup>. 따라서 이와 같은 많은 표면 항원분자와 수용체를 때문에 수지상세포는 다양한 감염원과 항원 그리고 주위 환경의 변화에 민감하게 반응한다.

수지상세포를 이용한 면역치료는 B세포 림프종 환자를 대상으로 처음 시도되었으며, 치료 후 종양특이적 T세포 반응이 유발되어 임상적 효과가 있음이 보고되었다<sup>14</sup>. 그 이후 악성흑색종<sup>15,16</sup>, 다발골수종<sup>17</sup>, 신장암<sup>18</sup>, 전립선암<sup>19</sup>, 대장암<sup>20</sup> 그리고 자궁암<sup>21</sup>의 치료에 사용되어, 부분적으로 치료 효과가 있음이 보고되었다. 그러나 면역치료 시 사용되는 수지상세포의 성숙 정도(미성숙 수지상세포와 성숙 수지상세포), 수지상세포의 주사 부위, 주사하는 수지상세포의 수 및 횟수, 그리고 수지상세포 자극에 필요한 항원의 종류 등 아직 확립되지 않은 부분들이 많다.

이 연구에서 연구자들은 C57BL/6 마우스에 B16F10 세포주로 악성흑색종을 유발하고 악성흑색종 세포 용해질(종양 항원)로 감작된 수지상세포를 종양 내에 주사하는 면역치료를 시도하여 그 치료 효과를 관찰하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 마우스

수지상세포 배양 및 악성흑색종 모델에 6~8주령의 암컷 C57BL/6 마우스를 사용하였다.

### 2. 배지와 싸이토카인

수지상세포 배양 및 C57BL/6 마우스 악성흑색종 유래 세포주(B16F10)를 배양하기 위하여 RPMI 1640 (Gibco, BRL, Grand Island, NY, USA) 배지에 56°C에서 30분간 비동화시킨 우태아 혈청 10%, 100 IU/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES (Sigma, Saint Louis, MO, USA) 그리고 50µM 2-mercaptoethanol (Sigma)을 첨가하여 사용하였다. 재조합 마우스 GM-CSF와 IL-4는 Endogen (Woburn, MA, USA)에서 구입하였으며 10 ng/ml로 배양배지에 첨가하여 사용하였다. 단클론항체를 분비하는 hybridoma cell lines을 배양하기 위하여 DMEM (Gibco)과 RPMI 1640을 사용하였다.

### 3. 수지상세포의 배양

약 6~8주령의 암컷 C57BL/6 마우스의 대퇴골과 경골로부터 골수세포를 수집하였다. 골수세포에 적혈구 용해 완충액을 처리하여 적혈구를 용해시켰다. 단클론항체 anti-CD4 (GK1.5, ATCC TIB207), anti-CD8 (53-6.72, ATCC TIB105), anti-B220 (RA3-3A1/6.1, ATCC TIB146), 그리고 anti-I-A<sup>b,d,q</sup> & I-E<sup>d,k</sup> (M5/114.15.12, ATCC TIB120) 혼합액을 준비된 골수세포에 섞어 4°C에서 30분간 처리한 후 배양배지로 2회 세척하였다. 세척 후 보체(Cedarlane, Ontario, CANADA)를 첨가하고 37°C 항온수조에서 1시간 방치하였다. 보체 처리 후 골수세포를 24 well 배양판에 1 ml (7×10<sup>5</sup>/ml)씩 나누어 분주하고 GM-CSF와 IL-4를 10 ng/ml 농도로 첨가한 후 배양하였다. 배양 2일째에 배지 내에 떠 있는 과립구만 선택적으로 제거하기 위하여 배양판을 부드럽게 흔든 후 배지를 완전히 제거하고 같은 농도의 싸이토카인이 포함된 새로운 배지로 채워주었다. 배양 4일째 배양판을 부드럽게 흔든 후 배지를 완전히 제거하고 같은 농도의 싸이토카인이 포함된 새로운 배지로 채워주었다. 제거된 배양액의 세포는 원심분리하여 새로운 24 well 배양판에 1 ml (5×10<sup>5</sup>/ml)씩 분주하고 GM-CSF와 IL-4를 10 ng/ml 농도로 첨가한 후 배양하였다. 배양 6일째 배지에 떠 있는 세포를 수집하여 이 실험에 사용하였다.

### 4. 유세포 계측

배양 6일째의 세포가 수지상세포인지를 확인하기 위하여 1~2×10<sup>5</sup>개의 세포를 0.4% BSA/PBS (BSA/PBS)로 2회 세척한 후 Pharmingen (San Diego, CA, USA)으로부터 구입한 CD11c, CD80, CD86에 대한 항체와 단클론항체 배양액(anti-I-A<sup>b,d,q</sup> & I-E<sup>d,k</sup>)을 1차 항체로 첨가하고 30분 동안 4°C에 방치하였다. 동종형(isotype)은 Pharmingen의 hamster IgG와 rat IgG2a를 사용하였다. 30분 후 BSA/PBS로 2회 세척한 후 적정농도의 FITC-conjugated goat anti-rat Ig's (Biosource, Camarillo, CA, USA)과 FITC-conjugated anti-hamster IgG (Pharmingen)를 2차 항체로 첨가하고, 30분 동안 4°C에 방치하였다. 30분 후 BSA/PBS로 2회 세척하고 BSA/PBS 400µl로 세포를 현탁시킨 후 FACS Calibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)를 이용하여 유세포 계측을 시행하였다.

### 5. 악성흑색종 세포주의 용해질 준비 및 감작

배양된 악성흑색종 세포주(B16F10)를 수집하여 인산염 완충식염수로 세척한 후 적정량의 인산염완충식염수로 다시 현탁하였다. 냉동/해동(3회)으로 현탁된 세포를 파쇄하고 12,000 rpm으로 4°C에서 30분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액을 항원으로 사용하였다. 항원의 감작은 배양 6일째의 수지상세포 배양액에 150µg/ml 항원을 첨가하고 18시간 정도 배양하였다.

## 6. 혼합림프구반응(Mixed Lymphocytic Reaction)

BALB/c 마우스의 비장세포를 적혈구 용해 완충액으로 처리하여 적혈구를 제거한 후 대식세포를 제거하기 위하여 T75 플라스크에 배양하였다. 배양 90분 후 플라스크 바닥에 부착되지 않은 비장세포를 수집하였다. B세포를 제거하기 위하여 nylon wool 칼럼을 통과시켰다. 칼럼 통과 후 얻어진 T세포(R)와 수지상세포 또는 항원에 감작된 수지상세포(S)를 96 well 배양판에 각각 넣어준 후 37°C 세포배양기에서 96시간 동안 함께 배양하였다(R : S=10 : 1, 100 : 1, 1,000 : 1). 배양 96시간 후 각각의 well에 [<sup>3</sup>H] thymidine 1 µCi를 첨가하고 16시간 추가 배양하였다. 배양된 세포는 Harvester 96 (Tomtec, Hamden, CT, USA)을 이용하여 유리 섬유펴터에 수집한 후 섬광계측기(Wallac, Truku, Finland)로 측정하였다.

## 7. 마우스 악성흑색종의 면역치료

마우스 악성흑색종을 유발하기 위하여 B16F10 ( $1 \times 10^5$ /100µl 인산염완충식염수) 세포주를 C57BL/6 마우스 오른쪽 옆구리에 피하 주사하였다. 면역치료는 악성세포주 주사 일주일 후 수지상세포( $1 \times 10^6$ /100µl 인산염완충식염수, n=5) 또는 항원으로 감작된 수지상세포 (n=5)를 종양 내에 주사하였다. 일주일 후 수지상세포를 한 번 더 주사하였다. 대조군(n=5)에는 인산염완충식염수를 주사하였다.

## 8. 지연성 과민반응 확인

인산염완충식염수와 항원으로 감작된 수지상세포를( $1 \times 10^6$ /100µl 인산염완충식염수) 6~8주령의 C57BL/6 마우스 등에 피하 주사하였다. 일주일 후 인산염완충식염수와 동일한 수지상세포를 한 번 더 주사하였다. 마지막 주사 일주일 후 종양 항원(100µg/50µl 인산염완충식염수)을 마우스의 오른쪽 발바닥에 주사하였다. 지연성 과민반응 결과는 48시간 후 마우스 발바닥의 부기(swelling)로 확인하였다. 발바닥의 부기를 비교하기 위하여 마우스 왼쪽 발바닥에는 인산염완충식염수를 주사하였다.

## 9. 종양 크기의 변화 및 생존율 관찰

수지상세포를 마지막으로 주사한 후 2~3일 간격으로 죽을 때까지 종양의 장축(A)과 단축(B)의 길이를 측정하였다. 대조군과 종양의 부피 변화를 비교하기 위하여 다음과 같이 종양의 부피를 환산하였다(Tumor Vol.= $1/2 \times A \times B^2$ ). 또한 종양의 부피 변화를 이용하여 각 군 간의 종양 성장 지연 차이를 비교 분석하였다. 생존율은 대조군의 마우스가 모두 죽은 후 실험군의 생존한 마우스를 백분율로 환산하였다.

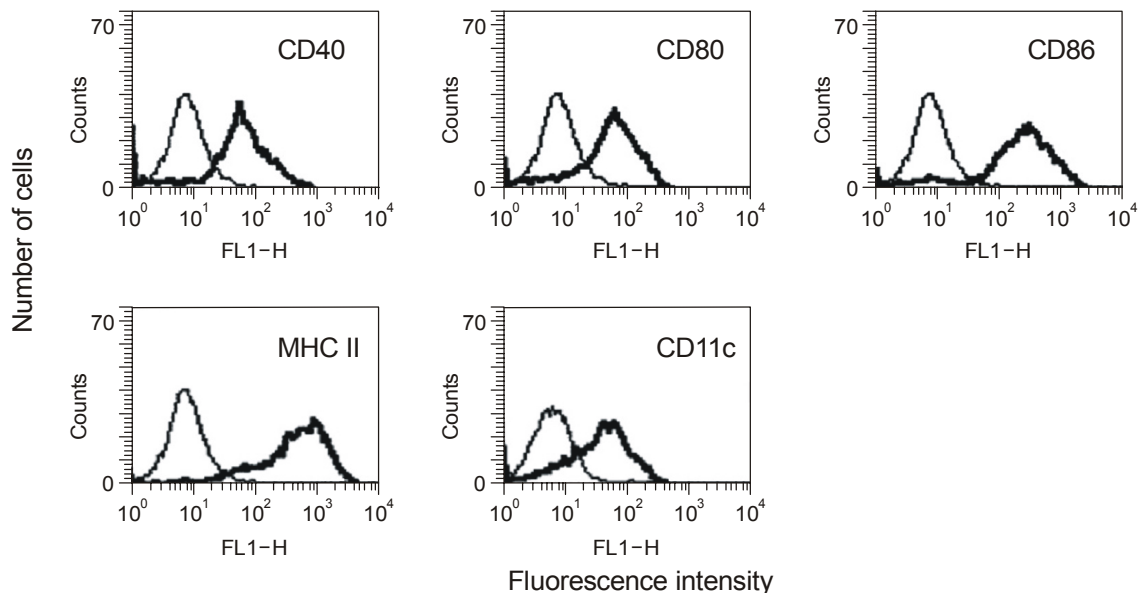


Fig. 1. Flow cytometric analysis of mouse bone marrow-derived dendritic cells (DC). Bone marrow cells were cultured with rmGM-CSF and rmIL-4. On days 6 the surface phenotypes of bone marrow-derived DC were examined by flow cytometry using CD40, CD80, CD86, MHC class II and CD11c mAb. Similar results were obtained from three experiments. The data shown are from one representative experiment. In this study, Ag (tumor lysate)-pulsed DC on day 7 were used.

결 과

1. 수지상세포의 표면 항원 변화

적혈구, 림프구 그리고 호중구가 제거된 C57BL/6 마우스의 골수세포를 재조합 마우스 GM-CSF와 IL-4로 배양하였다. 배양 6일째 때 있는 세포를 수집하여 CD11c, CD40, CD80, CD86, 그리고 MHC class II의 표면 항원을 유세포계측기로 분석하였다. 분석 결과 배양된 마우스 골수세포가 재조합 마우스 GM-CSF와 IL-4에 의해 수지상세포로 분화되었음을 확인하였다(Fig. 1). 그러나 배양 6일째 종양 항원을 첨가하여, 18시간 교육된 수지상세포의 표면 항원은 종양 항원을 처리하지 않은 군에 비하여 별다른 변화가 없었다.

2. 수지상세포의 항원 제시 능력

수지상세포의 항원 흡수 및 항원 제시 능력을 확인하기 위하여, BALB/c 마우스의 nylon-wool 비부착 비장세포를 이용하여 동종(allogeneic) 혼합림프구반응을 수행하였다. Fig. 2에서처럼, T 세포를 10,000개의 수지상세포로 배양(R : S=10 : 1)하였을 때, 항원에 감작시키지 않은 수지상세포에 비해 종양 항원으로 감작된 수지상세포에서 T세포의 증식 반응이 약 3배 증가하였다.

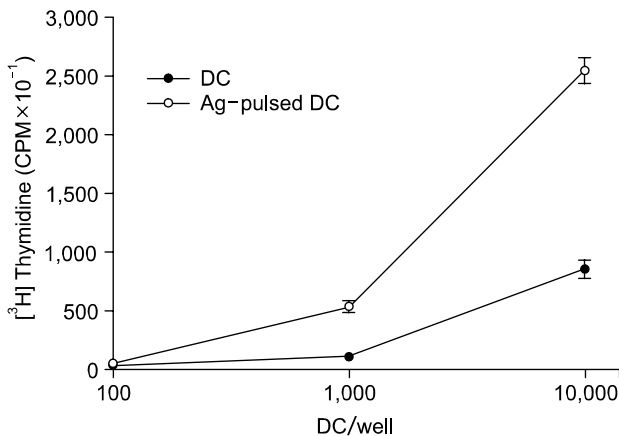


Fig. 2. Allo-mixed lymphocyte reaction. Splenocytes were obtained from BALB/c mice and then RBC, macrophage and B lymphocytes were removed. Triplicate samples of  $1 \times 10^5$  cells were seeded in 96 well round-bottom plates. The splenocytes were stimulated with DC or Ag-pulsed DC treated with irradiation (30,000 rad). The cells were incubated at 37°C for 96 h, then 1μCi/well [<sup>3</sup>H] thymidine was added for another 16 h. [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation (CPM) was counted on a scintillation counter. The data shown are the mean values and their standard errors.

3. 수지상세포 주사에 의한 지연성 과민반응 결과

수지상세포 주사에 의한 항종양 면역반응을 확인하기 위하여, 종양 항원에 대한 지연성 과민반응을 관찰하였다. 인산염완충식염수를 등에 주사한 대조군에서는 오른쪽과 왼쪽 발바닥의 부기에 차이가 없었다. 그러나 종양 항원으로 감작시킨 수지상세포를 주사한 군에서는 종양 항원을 주사한 발바닥의 평균 두께는 3.67 mm로 인산염완충식염수를 주사한 발바닥(2.05 mm)에 비하여 약 1.8배 정도 더 많이 부었다(Fig. 3). 이 결과는 항원으로 감작된 수지상세포가 생체 내에서 효과적으로 특이적 항종양 면역반응을 유도할 수 있음을 나타낸다.

4. 수지상세포 주사에 의한 종양 크기 및 생존율의 변화

B16F10 세포주를 C57BL/6 마우스 오른쪽 옆구리에 주사하였다. 주사 일주일 후, 수지상세포 또는 항원으로 감작된 수지상세포( $1 \times 10^6/100\mu\text{l}$  인산염완충식염수)를 악성흑색종 내에 주사하였다. 대조군은 인산염완충식염수를 악성흑색종 내로 주사하였다. 주사 후 2~3일 간격으로 종양의 크기 변화를 관찰하였다(Fig. 4). 악성흑색종에 수지상세포를 주사한 군은 인산염완충식염수를 주사한 대조군과 같이 종양의 성장 억제 효과가 없었다. 반면 항원으로 감작된 수지상세포를 주사한 군은 치료 15일 후부터 종양 생장의 억제 효과가 나타났다. B16F10 접종 23일 후, 대조군, 수지상세포 주사군, 그리고 항원으로 감작된 수지상세포 주사군의 종양 크기는 각각  $703 \pm 49 \text{ mm}^3$ ,  $619 \pm 26 \text{ mm}^3$  그리고  $463 \pm 25 \text{ mm}^3$ 로 통계학적 유의성( $p=0.122$ )은 없지

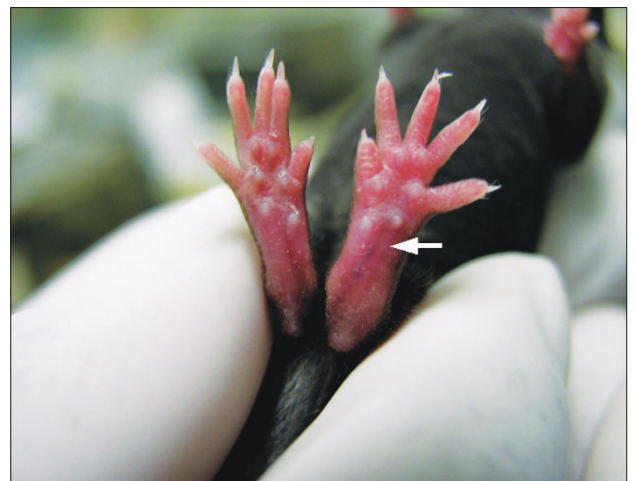


Fig. 3. Delayed hypersensitivity. Two cycles of Ag-pulsed DC in total were injected into C57BL/6 mice at 7 days intervals subcutaneously. Seven days after the last DC injection, Ag (100μg/50μl PBS) and PBS were injected into right (arrow) and left footpad, respectively.

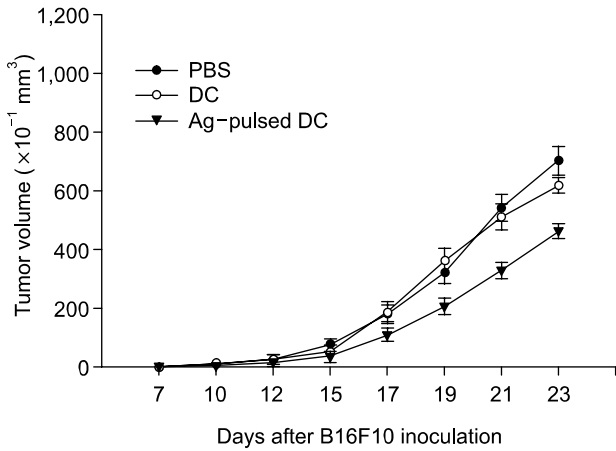


Fig. 4. Tumor volume changes after various treatments. Melanomas were generated by subcutaneously injecting B16F10 melanoma cells ( $1 \times 10^5$  cells) suspended in 100 $\mu$ l of PBS into the flanks of C57BL/6 mice. After seven days, DC were injected two times at 7 days intervals intratumorally. Mean tumor volumes were reduced in the Ag-pulsed DC-treated group on day 23 (PBS;  $703 \pm 49$  mm<sup>3</sup>, DC;  $619 \pm 26$  mm<sup>3</sup> and Ag-pulsed DC;  $463 \pm 25$  mm<sup>3</sup>). The data shown are the mean values and their standard errors.

만, 항원으로 감작된 수지상세포군에서 종양 성장 억제효과를 관찰할 수 있었다.

생존율은 대조군과 수지상세포를 주사한 군에 비해 항원으로 감작된 수지상세포를 주사한 군에서 현저히 증가하였다. 대조군과 수지상세포 주사군은 각각 36, 39일째 모두 사망하였다. 그러나 항원으로 감작된 수지상세포 주사군은 39일째에도 60%의 생존율을 나타내었다(Fig. 5).

### 고찰

수지상세포는 특정 항원에 대하여 강력한 면역반응을 유발할 수 있는 항원전달세포이다. 생체 외에서 수지상세포의 전구세포를 취하여 수지상세포로 배양한 후 원하는 항원으로 감작시켜 생체 내로 다시 투여할 경우 특정 항원에 대한 강력한 면역반응을 유도할 수 있다<sup>22</sup>. 최근 특정 종양 항원으로 감작시킨 수지상세포 치료제를 투여하여 종양을 치료하고자 하는 면역치료법에 대한 많은 연구가 진행되고 있다<sup>23</sup>. 면역치료 시 수지상세포의 감작에 이용되는 종양 항원으로는 펩타이드, 유전자, 그리고 종양세포 용해질 등이 있다.

종양 펩타이드를 이용한 면역치료는 종양 항원결정기(epitope)에 대한 세포용해성 T 림프구 활성의 특이성이 높다는 장점이 있다. 그러나 확인된 종양 펩타이드들의 대부분이 HLA형-제한적이기 때문에 특이 HLA haplotype을 가진 환자에게만 사용할 수 있고, 모든 종양세포에서 종양

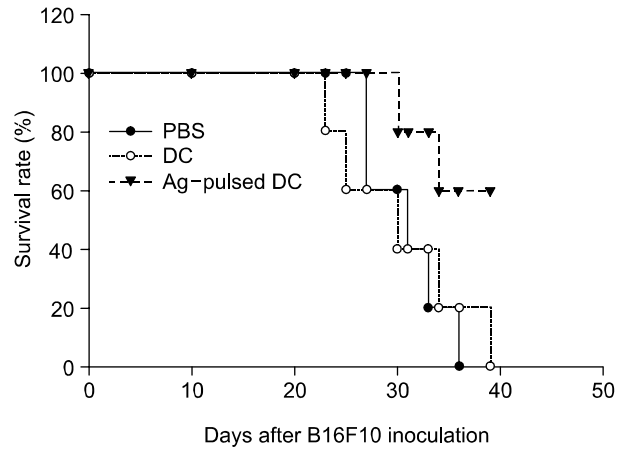


Fig. 5. Survival rates of mice with melanoma in each treatment group. Survival rates are presented as number of animals surviving (%). PBS or DC-treated mice lived for up to 36 and 39 days, respectively. However, 3 of 5 (60%) mice in the Ag-pulsed DC-treated group remained alive on day 39.

항원 결정기가 발현되지 않기 때문에 종양 펩타이드 사용에 한계가 있다. 이러한 한계를 극복하기 위하여 종양유래 RNA<sup>24</sup>, 종양유래고사체<sup>25</sup>, 그리고 종양세포 용해질 등이<sup>15</sup> 종양 항원으로 고려되고 있다.

이 중 종양세포 용해질을 수지상세포 면역치료제의 항원으로 사용할 때 다음과 같은 장점이 있다. 첫째, 종양세포 용해질의 항원이 MHC class II에 의해 제시되고 MHC class I에 의해서도 교차 제시된다. 따라서 MHC class I과 MHC class II에 의한 항원의 동시제시는 항원특이적 CD4<sup>+</sup> T 세포에 의한 기억(memory) CD8<sup>+</sup> T 세포의 생성 촉진<sup>26</sup>과 항종양 면역반응에 필수적인 CD4<sup>+</sup> T 세포 생성에 중요하다<sup>27</sup>. 둘째, 수지상세포로 면역치료를 하기 전에 환자의 HLA-type을 결정할 필요가 없다. 셋째, 종양세포 용해질에 포함된 저농도의 종양항원이 높은 친화도의 T 세포를 유도할 수 있다. 종양 세포에서 발현되는 약 30,000개의 유전자 중 단지 30개만이 종양항원으로 종양세포 용해질에 포함될 수 있는 종양 항원의 농도가 매우 낮다. 실험동물 모델에서, 고농도의 펩타이드로 감작된 항원전달세포는 낮은 친화도를 가진 T세포를 유도하지만, 저농도의 펩타이드로 감작된 항원전달세포는 높은 친화도를 가진 T세포를 유도하는 것이 확인되었다<sup>28,29</sup>. 따라서 연구자들은 마우스 악성흑색종 세포주의 용해질을 종양 항원으로 사용하였으며, 항원으로 감작된 수지상세포를 직접 종양 내에 주사하는 방법으로 면역치료를 시행하였다.

배양 6일째의 수지상세포를 종양세포 용해질로 18시간 감작시킨 후 세포의 표면 항원 변화를 유세포계측기로 확인하였으나 표면 항원의 변화는 없었다. 생체 내에서, 미성숙 수지상세포는 항원을 흡수하여 성숙한 형태로 변하며,

이때 표면항원의 발현도 함께 증가한다<sup>30</sup>. 그러나 생체 외에서 종양세포 용해질에 의한 수지상세포의 표면 항원 변화에 관하여는 아직까지 연구자들의 상반된 견해가 많다. Somersan 등<sup>31</sup>은 세포고사와 세포괴사 용해질은 미성숙 수지상세포의 성숙을 유도한다고 보고하였다. 그러나 종양세포 용해질에 의해 미성숙 수지상세포의 표면항원 발현이 증가하지 않는다는 보고도 있다<sup>32</sup>. 이 실험에서는 종양세포 용해질을 수지상세포에 감작시킨 후 혼합림프구반응이 증가하였고, 수지상세포 주사 후 종양 항원에 대한 지연성 과민반응 실험에서 효과적인 항종양 면역반응을 관찰하였다. 그러므로 이 연구에서 사용된 수지상세포는 종양 항원에 의한 표면항원의 변화는 관찰되지 않았지만, 종양 항원을 T세포에 제시하여 세포증식을 유도하였고, 지연성 과민반응을 일으키는 것으로 보아 악성흑색종의 면역치료에 사용될 수 있는 세포로 생각된다.

이 실험에서 종양 항원으로 감작된 수지상세포로 치료한 군에서, 인산염완충식염수를 주사한 대조군이나 수지상세포만을 주사한 군에 비하여 종양의 성장이 억제되었고 생존율도 증가되었다. 그러나, 항원으로 감작시킨 수지상세포 치료만으로는 만족스런 치료 효과를 관찰할 수 없었다. 이에 대한 몇 가지 원인을 생각해 보면, 첫째, B16F10에 의한 악성흑색종은 다른 종양에 비하여 성장 속도가 매우 빠르기 때문에, 종양 항원에 감작된 수지상세포로 유도된 면역반응만으로는 종양 성장의 억제 효과가 크지 않았을 수도 있다. 둘째, 수지상세포 면역치료 후 T세포 증식과 지연성 과민반응을 관찰하였지만, 유세포 계측에서 항원으로 감작된 수지상세포의 표면항원 발현에 대한 변화가 적은 것으로 보아 이 실험에 사용된 수지상세포의 성숙 정도가 약할 가능성이 있다. 따라서 수지상세포에 의해 유도된 면역반응이 약하였거나 오히려 부분적으로 면역관용이 동반되었을 가능성을 생각할 수 있다. Dhodapkar 등<sup>33</sup>은 항원으로 감작된 미성숙 수지상세포는 특이적 면역관용을 유도함을 보고하였다. 또한 미성숙 수지상세포보다는 성숙 수지상세포를 이용하여 면역치료를 시행하였을 때 치료 효과가 좋다는 보고들이 있다<sup>34-37</sup>.

따라서 수지상세포를 이용한 면역치료의 효과를 증대시키기 위하여, 종양 항원으로 감작된 수지상세포 단독 치료보다 싸이토카인을 이용하여 수지상세포를 성숙시킨 후 면역치료에 이용하거나, 케모카인 또는 세포고사/세포괴사를 유발하는 물질과의 병용치료를 시도하면 더욱 만족스런 치료 효과를 관찰할 수 있을 것으로 생각한다.

## 결 론

연구자들은 C57BL/6 마우스에 B16F10 세포주로 악성흑색종을 유발하고 악성흑색종 세포 용해질로 감작된 수지상세포를 종양 내에 주사하는 면역치료를 시도하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 배양된 수지상세포를 종양 항원으로 처리하였을 때,

수지상세포의 표면항원에는 변화가 없었다.

2. 혼합림프구반응에서 항원에 감작시키지 않은 수지상세포에 비해 종양 항원으로 감작된 수지상세포에서 T 세포의 증식 반응이 약 3배 증가하였다.

3. 종양 항원으로 감작시킨 수지상세포를 주사한 군에서 종양 항원에 대한 지연성 과민반응이 나타났다.

4. B16F10 세포주 접종 23일 후, 대조군, 수지상세포 주사군, 그리고 항원으로 감작된 수지상세포 주사군의 종양 크기는 각각  $703 \pm 49 \text{ mm}^3$ ,  $619 \pm 26 \text{ mm}^3$  그리고  $463 \pm 25 \text{ mm}^3$ 로 항원으로 감작된 수지상세포군에서 종양 성장 억제 효과가 나타났다.

5. 생존율 결과에서, 대조군과 수지상세포를 주사한 군에 비해 항원으로 감작된 수지상세포를 주사한 군은 39일째에도 60%의 생존율을 나타내었다.

결론적으로, 연구자들은 악성흑색종 세포 용해질로 감작된 수지상세포를 종양 내에 주사하는 면역치료가 항종양 면역반응을 유발함으로써, 종양의 성장을 억제하고 생존율을 증가시키는 등 악성흑색종의 치료에 효과적임을 관찰하였다. 그러나 앞으로 더 효과적인 치료 방법을 찾기 위한 노력이 필요할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Alan NH, Jason SG, Nathalie EB. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. *Curr Opin Immunol* 2001; 13:134-140
2. Kim CJ, Dessureault S, Gabrilovich D, Reintgen DS, Slingluff CL Jr. Immunotherapy for melanoma. *Cancer Control* 2002;9:22-30
3. Chung HG, Moon TK, Bang D, Lee MG. Clinical observation of cutaneous malignant tumors and premalignant lesions over 15 years (1982~1996). *Korean J Dermatol* 1999;37:1413-1422.
4. Nestle FO, Brug G, Dummer R. New perspectives on immunology and immunotherapy of melanoma. *Immunol Today* 1999;20:5-7
5. Colaco C. DC-based cancer immunotherapy: the sequel. *Immunol Today* 1999;20:197-198
6. Nouri-Shirazi M, Banachereau J, Bell D, Burkeholder S, Kraus ET, Davoust J, et al. Dendritic cells capture killed tumor cells and present their antigens to elicit tumor-specific immune responses. *J Immunol* 2000;165:3797-3803
7. Rosenberg SA, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, Parkinson DR, et al. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high dose bolus interleukin-2. *JAMA* 1994; 271:907-913
8. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated

- killer cells and interleukin-2 or high dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 1987;316:889-897
9. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-252
  10. Fearnley DB, Whyte LF, Carnoutsos SA, Cook AH, Hart DN. Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation. *Blood* 1999;93:728-736.
  11. Stockwin LH, McGonagle D, Martin IG, Blair GE. Dendritic cells: immunological sentinels with a central role in health and disease. *Immunol Cell Biol* 2000;78:91-102
  12. Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, et al. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 1995;375:151-155
  13. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995;182:389-400
  14. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996;2:52-58
  15. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998;4:328-332
  16. Lau R, Wang F, Jeffery G, Marty V, Kuniyoshi J, Bade E, et al. Phase I trial of intravenous peptide-pulsed dendritic cells in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 2001;24:66-78
  17. Wen YJ, Ling M, Bailey-Wood R, Lim SH. Idiotypic protein-pulsed adherent peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells prime immune system in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 1998;4:957-962
  18. Holtl L, Rieser C, Papesh C, Ramoner R, Herold M, Klocker H, et al. Cellular and humoral immune response in patients with metastatic renal cell carcinoma after vaccination with antigen pulsed dendritic cells. *J Urology* 1999;161:777-782
  19. Salgaller ML, Tjoa BA, Lodge PA, Ragde H, Kenny G, Boynton A, et al. Dendritic cell-based immunotherapy of prostate cancer. *Crit Rev Immunol* 1998;18:109-119
  20. Morse MA, Nair S, Fernandez-Casal M, Deng Y, St Peter M, Williams R, et al. Preoperative mobilization of circulating dendritic cells by Flt3 ligand administration to patients with metastatic colon cancer. *J Clin Oncol* 2000;18:3883-3893
  21. Thornburg C, Boczkowski D, Gilboa E, Nair SK. Induction of cytotoxic T lymphocytes with dendritic cells transfected with human papillomavirus E6 and E7 RNA: implications for cervical cancer immunotherapy. *J Immunother* 2000;23:412-418
  22. Fields RC, Shimizu K, Mule JJ. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9482-9487
  23. Lesterhuis WJ, de Vries IJ, Adema GJ, Punt CJ. Dendritic cell-based vaccines in cancer immunotherapy: an update on clinical and immunological results. *Ann Oncol* 2004;15:145-151
  24. Gilboa E, Nair SK, Lyerly HK. Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 1998;46:82-87
  25. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998;392:86-89
  26. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* 1998;188:2205-2213
  27. Toes RE, Ossendorp F, Offringa R, Melief CJ. CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J Exp Med* 1999;189:753-756
  28. Zeh HJ 3rd, Perry-Lalley D, Dudley ME, Rosenberg SA, Yang JC. High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy. *J Immunol* 1999;162:989-994
  29. Alexander-Miller MA, Leggatt GR, Berzofsky JA. Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic T lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4102-4107
  30. Weinlich G, Heine M, Stossel H, Zanella M, Stoitzner P, Ortner U, et al. Entry into afferent lymphatics and maturation in situ of migrating murine cutaneous dendritic cells. *J Invest Dermatol* 1998;110:441-448
  31. Somersan S, Larsson M, Fonteneau JF, Basu S, Srivastava P, Bhardwaj N. Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. *J Immunol* 2001;167:4844-4852
  32. Vegh Z, Mazumder A. Generation of tumor cell lysate-loaded dendritic cells preprogrammed for IL-12 production and augmented T cell response. *Cancer Immunol Immunother* 2003;52:67-79
  33. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001;193:233-238
  34. Jonuleit H, Giesecke-Tuettnerberg A, Tuting T, Thurner-

- Schuler B, Stuge TB, Pagnik L, et al. A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer* 2001;93:243-251
35. Dhodapkar MV, Steinman RM, Sapp M, Desai H, Fossella C, Krasovsky J, et al. Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J Clin Invest* 1999;104:173-180
36. Dhodapkar MV, Krasovsky J, Steinman RM, Bhardwaj N. Mature dendritic cells boost functionally superior CD8 (+) T-cell in humans without foreign helper epitopes. *J Clin Invest* 2000;105:R9-R14
37. McIlroy D, Gregoire M. Optimizing dendritic cell-based anticancer immunotherapy: maturation state does have clinical impact. *Cancer Immunol Immunother* 2003;24:1-18
-