

세포고사된 마우스 악성 흑색종주와 반응시킨 수지상세포의 T 세포 자극 효과

정우길¹ · 이태형^{2,3} · 김혜련¹ · 한희돈¹ · 박상건¹ · 이민걸^{1,2,3}

연세대학교 의과대학 피부과학교실¹, 피부생물학연구소², 두뇌한국 21 의과학사업단³

T Cell Proliferation Effect of Dendritic Cells Cultured with Apoptotic Mouse Melanoma Cells

Woo Gil Chung¹, Tae Hyung Lee^{2,3}, Hye-Ryun Kim¹, Hee-Don Han¹, Sang Kun Park¹
and Min-Geol Lee^{1,2,3}

Department of Dermatology¹, Cutaneous Biology Research Institute² and Brain Korea 21 Project for Medical
Science³, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Dendritic cells (DCs) are antigen-presenting cells that induce T cell responses. DCs efficiently present antigens derived from apoptotic cells, stimulating class I-restricted CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. However, DCs that have ingested apoptotic cells may not become activated, therefore inducing T cell tolerance unless further DC maturation is promoted by additional maturation factors. In this study, the aim was to improve the methods for antigen preparation in DC immunotherapy. We postulated that apoptotic mouse melanoma cell would be a more efficient antigen with additional full DC maturation factors. To remove the supernatant which included late apoptotic and necrotic cells, floating cells were centrifuged and the pellet was obtained. When the pellet was stained with annexin-V/propidium iodide, more than 80% of the cells, which were previously treated with mitomycin-C for 48 hours, were early apoptotic cells. We also observed an increased expression of MHC class II, CD80 and CD 86 molecule after antigen pulsing with maturation factors (CD40 ligand and lipopolysaccharide (LPS)). However, there were no definite differences in the expression of DC surface molecules, according to the method of preparation of tumor antigens. DCs pulsed with apoptotic cells, followed by activation with CD40 ligand and LPS, had enhanced T cell stimulatory activity compared to other experiment groups. When cultured DCs, which were pulsed with apoptotic cells, received simultaneous stimulation with CD40 ligand and LPS, interleukin(IL)-12 secretion was increased compared to the group stimulated with necrotic cells. These results reflect that DCs pulsed with apoptotic cells, with the supplement of additional maturation factors, induced enhanced T cell proliferation and secreted high levels of IL-12. It also suggests the utility of mitomycin-C induced apoptosis, supplemented with additional maturation factors, as a mean to generate efficient immunity for tumor *in vivo*.

Key words : Apoptosis, Dendritic cells, Melanoma, Maturation factor, T cell proliferation

저자연락처 : 이 민 걸, (120-752) 서울특별시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 피부과학교실,

전화: 02) 361-5720 / Fax: 02) 393-9157 / E-mail: mglee@yumc.yonsei.ac.kr

* 본 연구는 2002년도 연세대학교 의과대학 일반 교수 연구비로 수행되었음.

서 론

수지상세포(dendritic cell, DC)는 형태학적으로 수상돌기를 갖고 있다¹. 그리고 가장 강력한 항원전달능력이 있어 일차 면역반응 및 T 세포매개 면역반응에 가장 중요한 기능을 수행한다^{2,3}. 항원가공능력이 발달되어 있으나, T 세포 자극 능력은 약한 초기상태를 미성숙 수지상세포(immature DC)라 한다. 그리고 외부항원 등에 노출된 후 항원가공능력은 감소하고, T 세포 자극능력이 발달하며 동시자극분자(costimulatory molecules)의 발현이 높아지면 성숙 수지상세포(mature DC)라 한다^{4,7}.

수지상세포가 가장 강력한 항원전달세포로서 일차 면역 반응을 일으키는 중요한 세포라는 것이 알려졌지만, 각 장기에 존재하는 수지상세포의 수가 너무 적어 연구에 제약이 많았다. 그러다가 1992년 CD34⁺세포를 granulocyte/macrophage colony stimulating factor(GM-CSF)와 tumor necrosis factor(TNF)-α로 자극하여 수지상세포의 대량배양이 가능하다는 것이 보고되었고⁸⁻¹⁰, 그 후 말초혈액에서 약 5-10% 정도인 CD14⁺세포도 GM-CSF와 interleukin(IL)-4를 이용하여 수지상세포로 배양이 가능하다는 것이 보고되어, 수지상세포 연구가 크게 활성화될 수 있었다^{11,12}.

암 환자에서는 여러가지 이유로 항원전달세포의 기능이 억제되어, 암세포의 항원이 정상적으로 T 세포에 전달되지 않아 암세포에 대한 세포독성 T 세포의 생성이 잘되지 않는 것으로 알려져 있다¹³. 따라서 최근에는 가장 강력한 항원전달세포인 환자의 수지상세포를 실험실에서 배양하고 여기에 환자의 암세포나 알려진 암세포 항원을 같이 배양하여 암세포 항원을 인지한 수지상세포를 만든다¹⁴. 이 수지상세포를 환자에게 투여하여, 수지상세포가 효과적으로 종양특이 세포독성 T 세포를 유도함으로써 생체의 항암 면역작용을 증가시키게 할 수 있다^{15,16}.

특히 말기 악성 흑색종의 치료에 시험판에서 배양한 수지상세포를 이용하여 제한적이지만 희망적인 결과를 보고한 연구가 있으며^{17,18}, 이를 계기로 다른 여러 종류의 암에서도 비슷한 연구가 시도되고 있다¹⁹⁻²¹. 그러나 아직까지 수지상세포를 이용한 암 치료법은 초기 단계로 미성숙 수지상세포와 성숙 수지상세포의 사용, 수지상세포의 투입방법, 투입하는 수지상세포의 수, 그리고 수지상세포에 어떤 항원을 사용하는 것이 좋은지 등 여러 가지 확립되어야 할 점들이 많다²².

세포고사(apoptosis)는 손상 받았거나 원하지 않는 세포를 생체 내에서 제거하여 생물의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다^{23,24}. 외부 항원을 major histocompatibility complex(MHC) class II 분자뿐만 아니라 MHC class I 분자를

통하여 항원전달하는 것을 교차장전(cross-priming)이라고 하는데, 세포고사된 종양세포가 세포괴사(necrosis)된 종양세포에 비하여 더 효과적으로 MHC class I 분자를 통한 항원전달을 할 수 있다²⁵⁻²⁸. 따라서 수지상세포를 이용한 면역치료를 하는 경우에 세포고사된 종양세포가 종양특이 세포독성 CD8⁺ T 세포를 더 잘 유도하여 종양살해 효과가 큰 것으로 보고되고 있다²⁹⁻³². 또한 종양세포가 세포고사되면 면역원성(immunogenecity)이 높아진다는 보고도 있다^{33,34}.

하지만, 상반되는 보고도 많다. 세포고사된 종양세포와 세포괴사된 종양세포가 함께 있는 혼합물이 더 좋은 항원으로 사용될 수 있다는 보고가 있으며³⁵, 각각 세포고사와 세포괴사된 항원을 사용한 수지상세포의 치료결과가 동등하였다는 보고도 있다³⁶. 이렇게 현재까지 세포고사와 세포괴사된 항원 중 어느 것이 더 효과적으로 수지상세포 면역치료에 사용될 수 있는지에 대해서는 이견이 많다.

세포고사된 종양세포가 수지상세포에 탐식되어 항원으로 사용될 때, 종양면역을 나타내지 않고 면역관용을 일으키는 것은 수지상세포의 성숙상태와 연관이 있을 가능성성이 있다. 그러나 수지상세포의 성숙상태를 변화시킬 수 있는 CD40 ligand와 lipopolysaccharide(LPS) 같은 성숙인자(maturation factor)를 추가했을 때, 세포고사 항원을 인지한 수지상세포에서 면역관용이 일어나지 않고 효과적인 T 세포 활성이 일어나는지에 대한 연구는 미진하다.

따라서 본 연구에서는 마우스 악성 흑색종주를 세포고사시키고 수지상세포와 배양한 후, CD40 ligand와 LPS로 자극하여 완전히 성숙시키고자 하였다. 그리하여 세포고사된 항원과 부가적인 성숙인자 자극이 수지상세포의 표면항원과 T 세포의 자극능력에 어떠한 영향을 주는지 시험판 실험(*in vitro*)을 통하여 확인하여 보다 효율적인 항암 면역치료 방법을 찾고자 하였다.

재료 및 방법

1. 마우스에서 수지상세포의 분리배양

6내지 8주령의 암컷 C57BL/6 마우스의 대퇴골과 경골에서 골수세포를 분리하였다. 보체매개 세포용해(complement-mediated cytotoxicity)와 표면항원 염색을 수행하기 위한 단클론항체를 얻기 위해서 다음과 같은 하이브리도마 세포주를 사용하였다(53-6.72 (anti-mouse CD8, rat IgG_{2a}, ATCC TIB 105), GK1.5 (anti-mouse CD4, rat IgG_{2b}, ATCC TIB207), RA3-3A1/6.1 (anti-mouse B220, rat IgM, ATCC TIB146), M1/70 (anti-mouse Mac-1, rat IgG_{2b}, ATCC TIB128), M5/114.15.12 (anti-mouse I-A^{b,d,q} & I-E^{d,k}, rat IgG_{2b}, ATCC TIB120)). 하이브

리도마 세포주에서 얻은 단클론항체를 이용하여 보체매개 세포용해를 일으켜서 T 세포, B 세포, 단구 등을 제거하였다. 세포제거 후 골수세포 ($1 \times 10^6/\text{ml}$)를 24 well culture plate (Costar, Cambridge, MA, USA)에 1 ml 씩 넣어주고 배양배지에서 배양하였다. 배양배지는 RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배지에 56°C에서 30분간 비동화시킨 우테아 혈청 10%, penicillin, streptomycin, L-glutamine (Gibco BRL), HEPES (Sigma, St. Louis, MO, USA) 그리고 2-mercaptoethanol (Sigma)을 첨가하여 사용하였으며, 여기에 싸이토카인으로 재조합 마우스 GM-CSF (PharMingen, San Diego, CA, USA)와 IL-4 (PharMingen)를 각 10 ng/ml씩 추가하였다. 2일 간격으로 배지를 교환하면서 배양 6일째 채취하였다.

배양한 세포가 기대한 대로의 수지상세포인지 유세포 분석기 (FACS calibur; Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)로 수지상세포의 표면항원인 CD11c (PharMingen), MHC class II (하이브리도마 세포주 M5/114.15.12), CD40 (PharMingen), CD80 (PharMingen), CD86 (PharMingen) 분자의 항체로 확인하였다.

2. 세포고사 및 세포괴사

세포고사는 C57BL/6 마우스 악성 흑색종 유래 세포주인 1×10^6 B16/F10 세포를 2.7 ml 배양배지에 부유시킨 후, mitomycin-C (50 µg/ml; Sigma) 0.3 ml로 24시간, 36시간, 48시간, 그리고 72시간 동안 처리하여 뜯 세포 (floating cell)만 채취하였다. 채취한 뜯 세포에서 처리한 mitomycin-C와 후기 세포고사 (late apoptosis)나 세포괴사된 세포조각 (cell fragment)을 제거하기 위해 10 ml phosphate buffered saline (PBS)으로 부유시킨 후, 2500 rpm에서 5분간 원심분리하고 상청액 (supernatant)을 제거하였으며 이것을 3차례 반복 시행하였다. 이렇게 상청액을 제거하고 남은 침전물 (pellet)을 세포고사 항원으로 사용하였다. 배양한 세포가 기대한 대로의 세포고사된 것인지 유세포 분석기를 통하여 propidium iodide (PI)와 annexin-V (PharMingen) 염색으로 확인하였다.

세포괴사는 3×10^5 B16/F10 세포를 각 3분 동안 냉동과 해동을 3번 반복한 후 원심분리를 2500 rpm에서 5분간 시행하고 상청액만을 채취하여 세포괴사 항원으로 사용하였다.

3. 항원전달과 성숙인자 자극

Mitomycin-C를 처리한 3×10^5 B16/F10 세포를 원심분리하고 상청액을 제거한 세포고사 항원에 배양된 1×10^5 수지상세포를 배양배지에 넣고 24시간 동안 함께 배양하였다. 그리고 냉동과 해동을 3차례 반복한 3×10^5 B16/F10 세포를

원심분리한 후, 채취한 상청액을 세포괴사 항원으로 사용하여 배양된 1×10^5 수지상세포와 배양배지에 넣고 24시간 동안 함께 배양하였다. 성숙인자 자극 군에는 배양 마지막 12시간동안 성숙인자로 anti-CD40 (0.1 µg/ml; HM40-3; PharMingen)와 LPS (10 µg/ml; *E. coli* 026:B6; Sigma)를 첨가하였다.

4. 수지상세포 표면항원의 변화 관찰

배양된 수지상세포가 성숙되었는지 유세포 분석기로 수지상세포의 표면항원인 MHC class II, CD80, CD86 분자의 항체로 확인하였다.

5. 싸이토카인 분비 검사

수지상세포를 세포고사와 세포괴사된 B16/F10 세포로 자극하였을 때, 배양 24시간 후의 상청액을 모아 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Endogen, Woburn, MA, USA)로 반응시킨 후, 발색정도는 microplate spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 IL-12p70을 정량 분석하였다.

6. T 세포 증식검사

비장 유래 T 세포는 6 내지 10주령의 암컷 C57BL/6 마우스에 5×10^5 B16/F10 세포를 등의 양쪽 피하에 주사한 후, 7일 동안 사육하여 악성 흑색종을 유발시키고 비장을 분리한 후, 비장세포 부유물을 RPMI 1640 배양배지에 넣고 36°C에서 1시간 30분 동안 배양하여 뜯 세포만을 채취하고 nylon wool column에 통과시켜 얻었다.

세포고사와 세포괴사된 B16/F10 세포와 배양한 후, 일부 실험군에서는 성숙인자로 재자극한 1×10^3 수지상세포를 96 well culture plate (Costar)에 놓고 1×10^5 마우스 비장 유래 T 세포를 첨가하여 배양하고, 배양 4일 후 [³H] thymidine (Costar)을 1 µCi/well의 농도로 첨가하여 liquid scintillation counter (Wallac, Turku, Finland)로 16시간 후 방사능을 측정하였다.

7. 실험군

제 1군: 항원을 처리하지 않은 수지상세포를 CD40 ligand 와 LPS 자극 없이, sensitized T 세포와 배양

제 2군: 항원을 처리하지 않은 수지상세포를 CD40 ligand 와 LPS 자극 후, sensitized T 세포와 배양

제 3군: 세포괴사된 항원과 반응시킨 수지상세포를 CD40 ligand 와 LPS 자극 없이, sensitized T 세포와 배

양

- 제 4군: 세포고사된 항원과 반응시킨 수지상세포를 CD40 ligand와 LPS 자극 후, sensitized T 세포와 배양
 제 5군: 세포고사된 항원과 반응시킨 수지상세포를 CD40 ligand와 LPS 자극 없이, sensitized T 세포와 배양
 제 6군: 세포고사된 항원과 반응시킨 수지상세포를 CD40 ligand와 LPS 자극 후, sensitized T 세포와 배양

결 과

1. 마우스에서 수지상세포의 분리배양

6내지 8주령의 암컷 C57BL/6 마우스의 대퇴골과 경골에서 분리한 골수세포를 하이브리도마 세포주에서 얻은 단클론항체를 이용하여 보체매개 세포용해를 일으켜서 T 세포, B 세포, 단구 등을 제거하였다. 그 후 재조합 마우스 GM-CSF와 IL-4가 첨가된 배양매지에 6일간 배양하여 미성숙 수지상세포를 얻었으며, 이 세포들을 유세포 분석기로 수지상세포의 표면항원인 CD11c, MHC class II, CD40, CD80, CD86 분자의 발현을 확인하였다(Fig. 1).

2. Mitomycin-C로 유도한 마우스 악성 흑색종 세포고사 항원

B16/F10 세포를 mitomycin-C (5 µg/ml)로 처리 24시간 후에는 조기 세포고사가 57.2%, 후기 세포고사가 19.7% 관찰되었다. 그리고 조기 세포고사가 mitomycin-C 처리 36시간 후에는 83.5%, 48시간에는 84.6% 그리고 72시간에는 90.8%로 관찰되었다(Fig. 2). 따라서 이 실험에서는 mitomycin-C로 48시간동안 처리하고 뜯 세포만을 채취한 후, PBS로 부

유시켜 2500 rpm에서 원심분리로 상청액을 제거하고 남은 침전물을 얻는 방법을 사용하였으며 이러한 방법이 후기 세포고사나 세포고사된 세포조각을 제거하여 80% 이상의 조기 세포고사 된 세포만 비교적 쉽게 얻을 수 있음을 유세포 분석기를 통하여 annexin-V/PI 염색으로 확인하였다(Fig. 2C).

3. 항원의 종류와 성숙인자 자극 유무에 따른 수지상세포의 표면항원 변화

세포고사와 세포고사된 항원이 수지상세포의 성숙상태에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 수지상세포를 세 배양하였다. 그 결과 수지상세포에서 MHC class II, CD80, CD86 분자의 발현이 조금 증가됨을 확인할 수 있었으나, 포고사와 세포고사시킨 B16/F10 세포와 24시간 동안 함께 isotype control과 비교하였을 때는 실험군간의 통계학적으로 의미 있는 차이는 관찰할 수 없었다(Fig. 3A). 이러한 표면 항원의 증가는 CD40 ligand와 LPS를 성숙인자로 추가하였을 때 모두 뚜렷이 관찰되었다. 그러나 성숙인자로 자극하였을 때 관찰되는 표면항원의 증가는 항원의 종류에 따라서는 의미있는 차이를 보이지 않았다(Fig. 3B).

4. 항원의 종류와 성숙인자 자극 유무에 따른 수지상세포의 IL-12p70 생성

수지상세포에 항원과 성숙인자를 처리하였을 때 수지상세포의 성숙상태를 간접적으로 측정하기 위해서 수지상세포를 세포고사와 세포고사된 B16/F10 세포와 배양하고 배양 24시간 후의 상청액을 모아 ELISA kit로 IL-12p70 생성을 측정하였다.

그 결과, 항원의 종류와는 상관없이 성숙인자를 추가하지

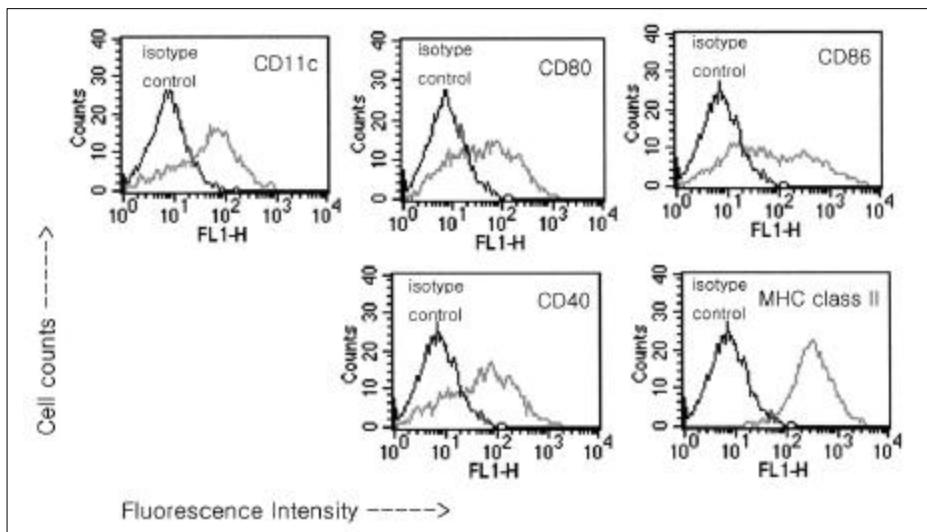


Fig. 1. Changes of surface molecules expressed on DCs with maturation. DCs were cultured from mouse bone marrow cells using GM-CSF and IL-4, as described in Materials and Methods. On culture day 6, cells were assessed for CD11c, MHC class II, CD40, CD80, and CD86 expressions by flow cytometry. A representative experiment of the five performed is shown.

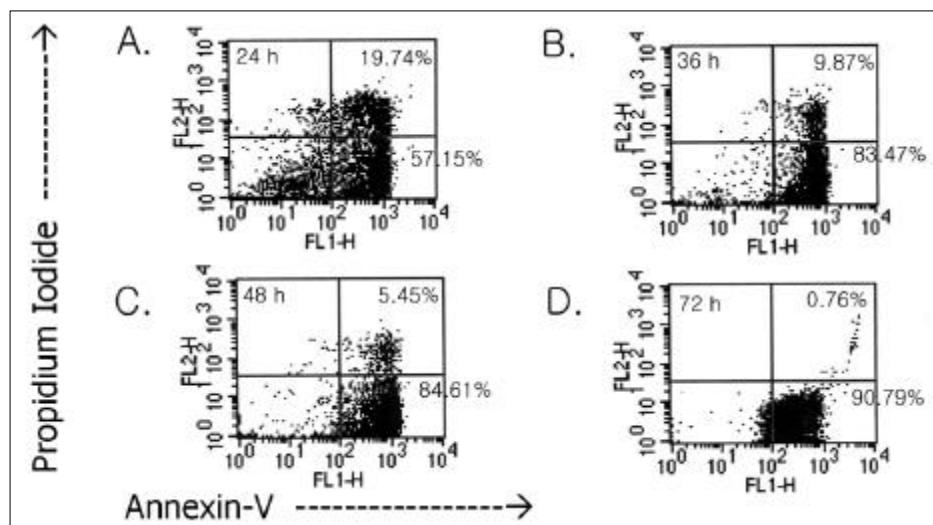


Fig. 2. Stains with annexin-V/propidium iodide of antigen pellet, treated with mitomycin-C for 24(A), 36(B), 48 (C), and 72(D) hours. To remove the supernatant which contained late apoptotic and necrotic cells, floating cells were centrifuged and the pellet was obtained. When the pellet was stained with annexin-V/propidium iodide, more than 80% of the cells, which were previously treated with mitomycin-C for 36 hours or longer, were early apoptotic cells. A representative experiment of the five performed is shown.

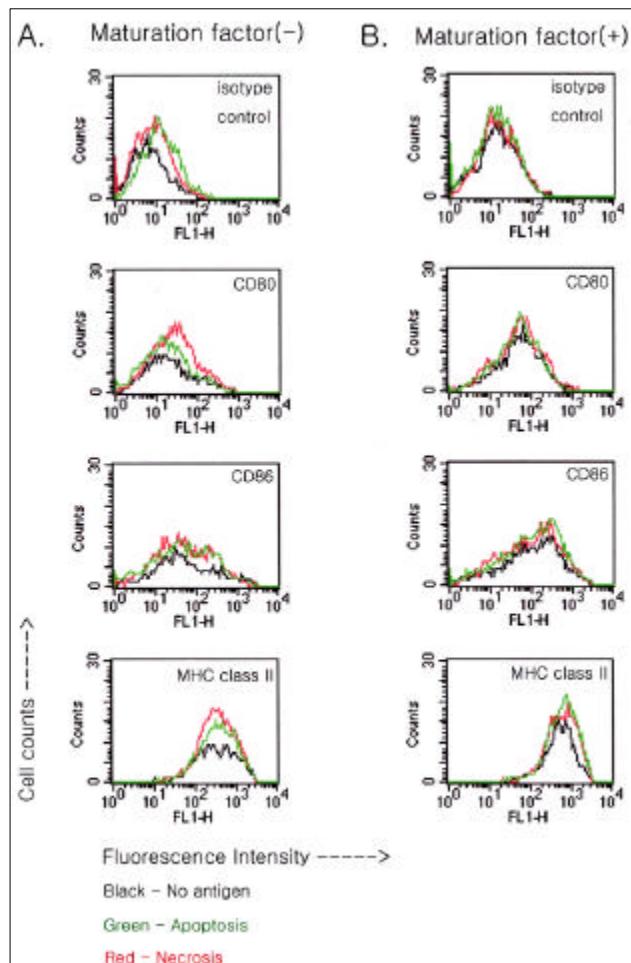


Fig. 3. Changes of surface molecules expressed on DCs after antigen pulsing with maturation factors(CD40 ligand and LPS), according to the method of preparation of tumor antigens. Cells were assessed for MHC class II, CD80, and CD86 expressions by flow cytometry. A representative experiment of the five performed is shown.

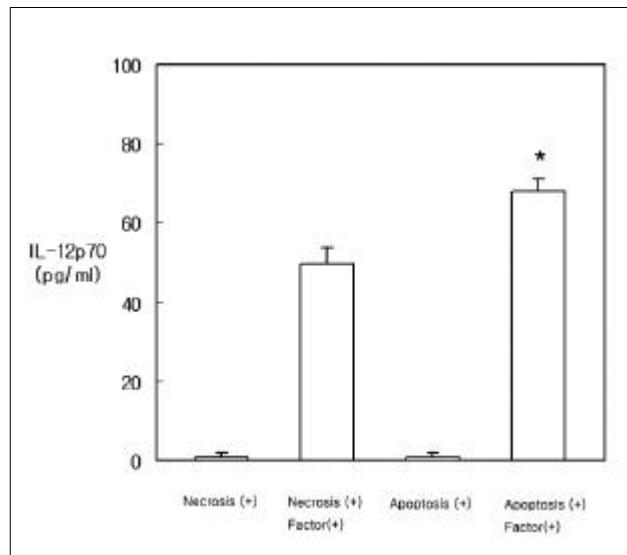


Fig. 4. Interleukin(IL)-12p70 production by DCs in the presence or absence of antigen and maturation factors for 24 hours by enzyme-linked immunosorbent assay kit. When cultured DCs, which were pulsed with apoptotic cells, received simultaneous stimulation with CD40 ligand and LPS, IL-12p70 production was increased compared to the group stimulated with necrotic cells(*: p<0.05). A representative experiment of the five performed is shown. Factor; CD40 ligand and LPS

않았을 때의 수지상세포의 IL-12p70 생성은 ELISA로 검출되지 않았으며, 성숙인자를 추가한 경우에는 세포고사된 항원과 배양한 군에 비해 세포고사된 항원과 배양한 군에서 통계학적으로 유의하게 높은 IL-12p70 생성을 보였다($p < 0.05$) (Fig. 4).

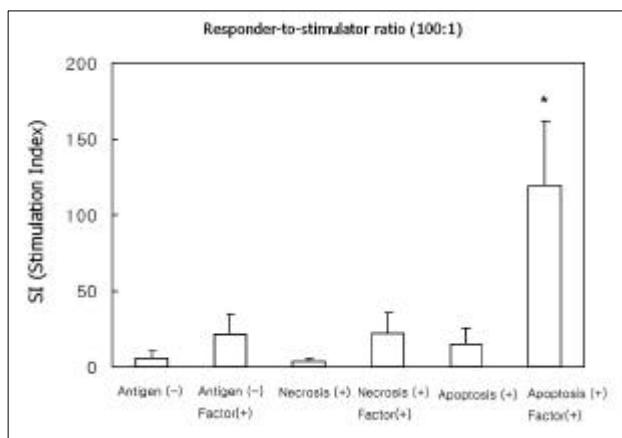


Fig. 5. T cell stimulatory activity of DCs in the presence or absence of antigen and maturation factors. DCs pulsed with apoptotic cells, followed by activation with CD40 ligand and LPS, had enhanced T cell stimulatory activity compared to other experiment groups (*: p<0.05). The values are reported as mean SI (stimulation index) of triplicate wells with an error bar representing the standard deviation. Factor; CD40 ligand and LPS.

5. 항원의 종류와 성숙인자 자극 유무에 따른 수지상세포의 T 세포 증식능

세포고사와 세포괴사된 항원 중, 어떤 항원이 수지상세포와 배양하였을 때 높은 T 세포 증식을 가져와 강력한 종양 억제 효과를 가져올 수 있는지를 확인하기 위하여 T 세포 증식능을 조사하였다. 수지상세포의 T 세포 증식능은 세포고사와 세포괴사된 B16/F10 세포와 배양한 수지상세포에 C57BL/6 마우스의 등에 B16/F10 세포를 피하에 주사하고 7 일 후 얻은 비장 유래 T 세포를 첨가하여 배양하고, 배양 4 일 후 [³H] thymidine을 첨가한 후 방사능을 측정하였다. 그리고 부가적인 CD40 ligand와 LPS와 같은 성숙인자를 추가하였을 때 수지상세포의 T 세포 증식능이 어떻게 변하는지 확인하였다.

성숙인자를 추가하지 않았을 때는 세포괴사된 항원과 배양한 군에 비해 세포고사된 항원과 배양한 군에서 수지상세포의 T 세포 증식을 나타내는 자극지표(stimulation index, SI; 대조 배양군에 대한 자극 배양군의 thymidine 흡수비)가 다소 높았으나 통계학적으로 유의하지 않았다($p>0.05$).

반면 항원의 종류와 관계없이 성숙인자를 추가한 모든 경우에 성숙인자를 추가하지 않은 군에 비해 수지상세포의 T 세포 증식을 보여주는 자극지표가 높게 나타났다. 특히 항원을 사용하지 않거나 세포괴사된 항원을 사용하고 성숙인자를 추가한 경우보다 세포고사된 항원을 사용하고 성숙인자를 추가한 수지상세포의 T 세포 증식능이 통계학적으로 유

의하게 높게 나타났다($p<0.05$)(Fig. 5).

고 찰

여러 종류의 암에 대하여 수술, 항암 화학요법, 방사선 치료 등이 시행되고 있지만 특히 말기 암에서는 아주 제한적인 효과만이 보고되고 있다. 따라서 보조적인 여러 면역치료법이 개발되고 있으며 강력한 항원전달세포인 수지상세포를 이용한 항암 면역치료가 새로운 가능성을 제시하고 있다¹⁴⁻²².

수지상세포를 이용한 면역치료에서 세포고사된 항원이 좋은 항원으로 사용될 수 있는 가능성이 있음에도 불구하고 현재까지 효과가 떨어진다는 상반된 결과는 수지상세포의 성숙상태와 연관이 있을 가능성이 있다³⁷. 수지상세포를 이용한 면역치료에는 주로 성숙 수지상세포가 사용되는데, 미성숙 수지상세포가 항원가공능력이 발달되어 있지만, 실제 동물실험에서는 면역관용(immune tolerance)을 유발하는 경우가 많고 T 세포 자극능력은 성숙 수지상세포가 더 강하기 때문이다. 그러나 세포고사된 항원은 교차장전을 더 효과적으로 일으키고 면역원성이 높아지는 장점에도 불구하고 수지상세포를 성숙시키는 능력은 부족하기 때문에 종종 면역 반응보다는 면역관용을 일으킨다^{38,39}.

이러한 단점을 극복하기 위하여 이 실험에서는 면역관용 상태를 일으킬 것으로 생각되는 미성숙 수지상세포를 성숙한 상태로 돌리기 위해 성숙인자를 사용하였다. 마우스 골수 세포에서 유래한 수지상세포를 CD40 ligand와 같은 성숙인자와 같이 배양하였을 때, 마우스 상피 세포암을 포함한 여러 암종에서 더 성숙된 수지상세포의 생성과 T 세포 독성반응을 관찰하였다는 보고가 있으나⁴⁰⁻⁴², 마우스 악성 흑색종에서는 T 세포 독성반응이 감소하였다는 상반된 보고도 있다⁴³. 또한 인체 말초혈액 단구세포에서 유래한 수지상세포에 CD40 ligand와 LPS를 동시에 추가하여 배양하였을 때, 성숙된 수지상세포의 생성과 인체 악성 흑색종에서 T 세포 독성반응을 보였다는 보고도 있다⁴⁴.

세포고사는 자외선, 방사선, 항암제 등 여러 가지 방법으로 유도할 수 있다³⁴⁻³⁶. 암세포가 자외선에 노출되면 초기 세포고사(annexin-V⁺, PI⁻)가 일어나지만, 곧 후기 세포고사(annexin-V⁺, PI⁺)가 일어난다³⁷. 세포고사를 유도함에 있어 mitomycin-C 처리 후 배양접시에 붙어있는 세포와 뜯 세포 모두를 사용하거나, 원심분리 후 상청액을 제거하지 않았을 때는 후기 세포고사(annexin-V⁺, PI⁺)나 살아있는 세포(annexin-V⁻, PI⁻)가 높은 비율로 관찰된다. 반면 본 실험에서 사용한 48시간 동안 mitomycin-C로 처리하여 뜯 세포만을 채취한 후, 원심분리하여 상청액을 제거하고 침전물만을 세

포고사 항원으로 사용하는 방법은 80%이상의 조기 세포고사된 세포만을 쉽게 얻을 수 있는 좋은 방법으로 사료된다. 따라서 후기 세포고사되거나 살아있는 세포의 영향은 최소화하고 80%이상 조기 세포고사된 항원만으로 실험할 수 있었다. 조기 세포고사 세포가 수지상세포의 성숙을 억제시키고, 후기 세포고사 세포는 수지상세포의 성숙을 촉진하는 것으로 보고되고 있으나, 조기 세포고사 세포만 사용한 이유는 종양연관항원을 가장 많이 발현할 것으로 생각되기 때문이다³⁷. 본 실험에서는 80%이상의 조기 세포고사된 세포를 사용하여 종양연관항원이 많이 발현되는 이점을 취하면서 수지상세포의 성숙의 억제는 성숙인자를 통한 제자극으로 극복하려 하였다.

미성숙 수지상세포가 항원 자극을 받으면 여러 가지 표면 항원과 유착분자의 발현이 증가하게 된다⁴⁷. 본 실험에서 세포고사와 세포괴사된 B16/F10 세포를 24시간 동안 함께 배양한 결과 MHC class II, CD80, CD86 분자의 발현이 조금 증가됨을 관찰할 수 있었으나 통계학적으로는 크게 의미가 없었으며 이러한 변화는 성숙인자 자극없이 항원 자체만으로는 수지상세포를 성숙시키는 능력이 약함을 반영한다. 하지만 이러한 표면항원의 증가는 CD40 ligand와 LPS를 성숙인자로 추가하였을 때 확실하게 나타났다. 이는 세포고사나 세포 괴사된 항원 자체만으로는 수지상세포를 완전히 성숙시킬 수 없으며, 부가적인 성숙인자의 추가가 수지상세포의 완전한 성숙에 꼭 필요함을 의미한다. 하지만 표면항원 자체가 마우스의 성숙정도를 정확히 반영할 수는 없으므로 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

IL-12는 p35와 p40단백이 이종 이량체(heterodimer)를 이루고 있으며 특히 Th1 반응의 시작을 유도하고 반응을 지속시키는 효과를 나타낸다⁴⁵. 항원전달 과정에서 수지상세포는 여러 가지 표면항원과 유착분자의 발현이 증가되고 IL-12의 생산능도 높아지게 되는 등 기능적으로 성숙하게 된다^{45,46}. 본 실험에서 수지상세포의 IL-12 생성능은 성숙인자를 추가한 경우에 세포괴사된 항원과 배양한 군에 비해서 세포고사된 항원과 배양한 군에서 통계학적으로 유의하게 높았다($p < 0.05$). 이것은 세포고사된 항원을 수지상세포에 처리하였을 때, 성숙인자 존재하에서 더욱 강력한 Th1 반응을 보임을 반영한다.

본 연구에서 성숙인자를 추가한 모든 실험군에서 수지상세포의 T 세포 증식을 나타내는 자극지표가 높아졌으나, 세포고사를 항원으로 사용하고 성숙인자를 추가한 군에서만 통계학적으로 유의하게 높았다($p < 0.05$). 이러한 결과는 시험관 실험에서 세포고사된 항원이 성숙인자 존재하에서는 좋은 수지상세포 면역치료의 항원으로 사용될 수 있으며, 또

한 생체실험(*in vivo*) 상에서도 세포고사 항원을 수지상세포와 배양한 후 성숙인자로 재자극하는 방법이 효과적으로 이용될 수 있음을 추정할 수 있다.

참 고 문 헌

- Steinman R, Nussenzweig M. *Dendritic cells: features and functions*. Immunol Rev 1980;53:127-47
- Steinman R. *The dendritic cell system and its role in immunogenicity*. Annu Rev Immunol 1991;9:271-93
- Stingl G, Bergstresser P. *Dendritic cells: a major story unfolds*. Immunol Today 1995;16:330-3
- Banchereau J, Steinman RM. *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature 1998;392: 245-52
- Kampgen E, Koch N, Koch F, et al. *Class II major histocompatibility complex molecules of murine dendritic cells: synthesis, sialylation of invariant chain, and antigen processing capacity are down-regulated upon culture*. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:3014-8
- Romani N, Reider D, Heuer M, et al. *Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability*. J Immunol Methods 1996;196:137-51
- Gluckman JC, Canque B, Rosenzwajg M. *Dendritic cells: a complex simplicity*. Transplantation 2002;74:S3-6
- Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. *GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells*. Nature 1992;360:258-61
- Inaba K, Steinman RM, Pack MW, et al. *Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood*. J Exp Med 1992;175:1157-67
- Inaba K, Inaba M, Romani N, et al. *Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*. J Exp Med 1992;176:1693-702
- Sallusto F, Lanzavecchia A. *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. J Exp Med 1994;179:1109-18
- Strunk D, Rappersberger K, Egger C, et al. *Generation of human dendritic cells/Langerhans cells from circulating CD34 $^+$ hematopoietic progenitor cells*. Blood 1996;87:1292-302
- Gabrilovich DI, Corak J, Ciernik IF, Kavanaugh D, Carbone DP. *Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer*. Clin Cancer Res 1997;3:483-90
- Fields RC, Shimizu K, Mule JJ. *Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysate mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:9482-7
- Porgador A, Snyder D, Gilboa E. *Induction of antitumor immunity using bone marrow-generated dendritic cells*. J Immunol 1996;156:2918-26

16. Gong J, Chen D, Kashiwaba M, Kufe D. *Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells.* Nat Med 1997;3:558-61
17. Nestle F. O, Alijagic S, Gilliet M, et al. *Vaccination of melanoma patients with peptide or tumor lysate-pulsed dendritic cells.* Nat Med 1998;4:328-32
18. Turner B, Haendel I, Roder C, et al. *Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma.* J Exp Med 1999;190: 1669-78
19. Gilboa E, Nair S, Lyerly H. *Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines.* Cancer Immunol Immunother 1998;46:82-7
20. Timmerman JM, Levy R. *Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy.* Annu Rev Med 1999;50:507-29
21. Schnurr M, Galambos P, Scholz C, et al. *Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: an in vitro model for the assessment of tumor vaccines.* Cancer Res 2001;61:6445-50
22. Nestle FO, Banchereau J, Hart D. *Dendritic cells: On the move from bench to bedside.* Nat Med 2001;7:761-5
23. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.* Br J Cancer 1972;26:239-57
24. Stuart L, Hughes J. *Apoptosis and autoimmunity.* Nephrol Dial Transplant 2002;17:697-700
25. Albert M, Sauter B, Bhardwaj N. *Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs.* Nature 1998;392:86-9
26. Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, et al. *Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha beta 5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes.* J Exp Med 1998;188:1359-68
27. Hoffmann TK, Meidenbauer N, Dworacki G, Kanaya H, Whiteside TL. *Generation of tumor-specific T-lymphocytes by cross-priming with human dendritic cells ingesting apoptotic tumor cells.* Cancer Res 2000;60:3542-9
28. Russo V, Tanzarella S, Dalerba P, et al. *Dendritic cells acquire the MAGE-3 human tumor antigen from apoptotic cells and induce a class I-restricted T cell response.* Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:2185-90
29. Henry F, Boistea O, Bretaudeau L, Lieubeau B, Meflah K, Gregoire M. *Antigen-presenting cells that phagocytose apoptotic tumor-derived cells are potent tumor vaccines.* Cancer Res 1999;59:3329-32
30. Ferlazzo G, Semino C, Spaggiari GM, Meta M, Mingari MC, Melioli G. *Dendritic cells efficiently cross-prime HLA class I-restricted cytolytic T lymphocytes when pulsed with both apoptotic and necrotic cells but not with soluble cell-derived lysates.* Int Immunol 2000;12:1741-7
31. Strome SE, Voss S, Wilcox R, et al. *Strategies for antigen loading of dendritic cells to enhance the antitumor immune response.* Cancer Res 2002;15:62:1884-9
32. Schnurr M, Scholz C, Rothenfusser S, et al. *Apoptotic pancreatic tumor cells are superior to cell lysates in promoting cross-priming of cytotoxic T cells and activate NK and gammadelta T cells.* Cancer Res 2002;62:2347-52
33. Ronchetti A, Rovere P, Iezzi G, et al. *Immunogenicity of apoptotic cells in vivo: role of antigen load, antigen-presenting cells, and cytokines.* J Immunol 1999;163:130-6
34. Shaif-Muthana M, McIntyre C, Sisley K, Rennie I, Murray A. *Dead or alive: immunogenicity of human melanoma cells when presented by dendritic cells.* Cancer Res 2000;60:6441-7
35. Chen Z, Moyana T, Saxena A, Warrington R, Jia Z, Xiang J. *Efficient antitumor immunity derived from maturation of dendritic cells that had phagocytosed apoptotic/necrotic tumor cells.* Int J Cancer 2001;93:539-48
36. Kotera Y, Shimizu K, Mule JJ. *Comparative analysis of necrotic and apoptotic tumor cells as a source of antigen(s) in dendritic cell-based immunization.* Cancer Res 2001;61:8105-9
37. Pietra G, Mortarini R, Parmiani G, Anichini A. *Phases of apoptosis of melanoma cells, but not of normal melanocytes differently affect maturation of myeloid dendritic cells.* Cancer Res 2001;61:8218-26
38. Rovere P, Vallinoto C, Bondanza A, et al. *Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function.* J Immunol 1998;161:4467-71
39. Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. *Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells.* J Exp Med 2000;191:423-34
40. Labey MS, Roters B, Pers B, et al. *Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage.* J Immunol 1999;162:168-75
41. Kelleher M, Beverley PC. *Lipopolysaccharide modulation of dendritic cells is insufficient to mature dendritic cells to generate CTLs from naive polyclonal CD8⁺ T cells in vitro, whereas CD40 ligation is essential.* J Immunol 2001;167:6247-55
42. Manna PP, Mohanakumar T. *Human dendritic cell mediated cytotoxicity against breast carcinoma cells in vitro.* J Leukoc Biol 2002;72:312-20
43. Kedl RM, Jordan M, Potter T, Kappler J, Marrack P, Dow S. *CD40 stimulation accelerates deletion of tumor-specific CD8(+) T cells in the absence of tumor-antigen vaccination.* Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:10811-6
44. Lapointe R, Toso JF, Butts C, Young HA, Hwu P. *Human dendritic cells require multiple activation signals for the efficient generation of tumor antigen-specific T lymphocytes.* Eur J Immunol 2000;30:3291-8
45. Gately MK, Renzetti LM, Magram J, et al. *The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses.* Annu Rev Immunol 1998;16:495-521
46. Portielje JE, Gratama JW, van Ojik HH, Stoter G, Kruit WH. *IL-12: a promising adjuvant for cancer vaccination.* Cancer Immunol Immunother 2003;52:133-44