

대장암 마우스모델에서
신규 CpG 올리고핵산
(CpG Oligodeoxynucleotide)
을 이용한 면역치료효과

연세대학교 대학원

의 학 과

김 익 용

대장암 마우스모델에서
신규 CpG 올리고핵산
(CpG Oligodeoxynucleotide)
을 이용한 면역치료 효과

지도교수 김 수 기

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2006년 6월 30 일

연세대학교 대학원

의 학 과

김 익 용

김 익용의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2006년 6월 일

감사의 글

지난 수년간 본 논문을 완성하는데는 참으로 많은 분들의 도움과 격려가 있었습니다. 먼저 능력이 많지 않은 제게 힘든 외과업무를 열과 성으로 무사히 이루어낼 수 있도록 건강을 허락하신 하나님께 먼저 감사와 영광을 돌립니다. 그리고 연구자로서의 올바른 자세를 가르쳐 주시고 불철주야 기초가 부족한 제게 개인의 시간을 기꺼이 투자하여 논문의 시작부터 마무리까지 지도와 편달을 해주신 김수기 교수님의 은혜는 평생 잊지 못할 것입니다. 또한 논문의 완성도를 위하여 지도와 조언을 아끼지 않으신 예병일 교수님, 박광화 교수님께도 감사드립니다. 임상 의사로서 뒤늦게나마 학위를 준비함에 있어서 많은 격려와 배려를 해주신 외과학교실의 김대성 주임교수님과 외과에 입문하여 한 분야의 전문의사가 되고 또한, 지금까지 늘 후원자가 되어 주신 노병선, 강성준 교수님께도 감사를 드립니다. 바쁜 시간에도 고생하며 실험준비와 진행에 열심으로 도와주신 조미연 교수님, 조현철, 김보환 선생님과 미생물학교실 연구원들께 심심한 감사를 드립니다. 무엇보다 본 연구에 전념할 수 있도록 도와주신 원주의대 외과학교실과 오늘도 열악한 환경에서 묵묵히 최선을 다하고 있는 후배 외과의국원에 경의를 표하며 결코 감사를 잊을 수 없습니다. 대학을 졸업한 후 무수한 시간이 지났습니다, 뒤늦게 학위논문을 마치게 되면서 지금까지 저를 키워주셨고 자식이 원하는 일을 함에 묵묵히 지켜보면서 항상 사랑을 베풀어 주시는 부모님께 다시 한번 깊이 감사드립니다. 마지막으로 어려웠던 지난날들을 말없이 따라주고 신뢰하여 준 소중한 아내와 함께 이 작은 완성의 기쁨을 나누고 싶습니다.

2006년 6월 30 일

저자 씀

차 례

그림 차례	ii
표 차례	iii
국문요약	1
I. 서론	2
II. 재료 및 방법	6
1. 세포배양	6
2. 실험동물	6
3. 비장세포 및 복강 내 대식세포 분리 및 배양	6
4. CpG Oligodeoxynucleotide(ODN) 제제	7
5. 종양의 용적 측정과 생존율	9
6. 전이장기의 조직학적 소견	9
7. RNA 분리, cDNA 합성 및 반정량 RT-PCR	91
8. 면역학적 기능 측정	11
9. CpG ODN 독성실험(MTT assay) 및 DNA 분절분석	12
10. 통계분석	13
III. 결과	14
1. CT-26 대장암세포의 종양형성 적정농도	14
2. CpG ODN 치료 후 종양 용적의 변화	14
3. CpG ODN 치료 후 생존율 비교	15
4. 조직학적 소견	18
5. Cytokine 유전자의 발현 및 분비 능 측정결과	20
6. 세포증식결과	24
7. 자연살해세포의 살상능 측정	24
8. MTT assay 및 DNA 분절분석	25
IV. 고찰	27
V. 결론	35
참고문헌	36
영문요약	40

그림 차례

그림 1. BALB/c 마우스 내 피하 접종한 CT-26 대장암세포의 종양형성 적정농도	14
그림 2. CT-26 종양을 피하에 접종한 BALB/c 마우스에서 CpG ODN 치료 후 종양용적.....	15
그림 3. CpG ODN 치료 후 마우스 피하내 CT-26 종양의 현미경적 소견.....	16
그림 4. CpG ODN 치료 후 BALB/c 마우스의 생존 곡선	17
그림 5. HK-13 CpG ODN의 농도 별 치료 후 BALB/c 마우스 생존 곡선	17
그림 6. HK-13 CpG ODN 치료 후 장기 생존한 마우스의 생존 곡선	18
그림 7. CT-26 종양이식 BALB/c 마우스에서 HK-13 CpG ODN 정맥투여 후 조직학적 소견	19
그림 8. BALB/c 마우스 복강의 대식세포의 CpG ODN에 의한 Th1 형 cytokine mRNA발현.....	20
그림 9. BALB/c 마우스 비장세포의 CpG ODN에 의한 Th1 cytokine mRNA발현.....	21
그림 10. C57BL/6와 BALB/c 마우스 비장세포에서 HK-13 CpG ODN 에 의한 cytokine분비	22
그림 11. C57BL/6 마우스 비장세포에서 HK-13 CpG ODN에 의한 IL-6, IL-12의 cytokine mRNA발현	23
그림 12. HK-13 CpG ODN정맥 치료 후 BALB/c 마우스의 비장세포에서 cytokine mRNA 발현	23
그림 13. HK-13 CpG ODN을 정맥 내 치료 후 비장세포의 세포증식.....	24
그림 14. 비장 세포에서 Chromium 방출법 (⁵¹ Cr-release assay)에 의한 자연살해세포의 살상 능력 측정	25
그림 15. CT-26 세포주의 CpG ODN에 의한 직접 세포독성 측정결과	26
그림 16. CT-26 세포주의 CpG ODN에 의한 DNA 분절 분석	26

표 차례

표 1. 실험에 사용한 CpG ODN 종류 및 구조	8
표 2. 중합효소연쇄반응에 사용한 primer서열과 증폭산물의 크기.....	10
표 3. 중합효소연쇄반응의 수행 조건	10

국문 요약

대장암 마우스모델에서 신규 CpG 올리고핵산 (CpG Oligodeoxynucleotide)을 이용한 면역치료 효과

대장암의 근본치료는 수술적 절제이나 전체 환자의 25%가 이미 진단 당시 원격 전이되어 있고 전체 환자의 40%가 결국 재발된다. 현재까지 대장암의 치료약제로는 항암화학요법, 생물학적 표적치료가 알려져 있으나 최적의 치료 방법은 아직 정립되지 않았고 또한, 화학요법은 심각한 독성 때문에 환자의 골수 기능과 면역 기능을 저해 시키는 부작용을 가지고 있다. 면역치료는 최근 비교적 적은 독성과 증양에 대항할 수 있도록 면역세포의 활성화 작용을 통하여 치료하는 매우 유망한 첨단 치료방법으로 각광을 받고 있다. 이러한 면역치료의 핵심기술 중 하나는 면역학적 어쥬반트(Adjuvant)의 개발이 필수적이다. 이 중 유망한 면역 어쥬반트의 하나로 Toll like receptor (TLR) 9을 조절하는 리간드인(ligand)인 CpG ODN (CpG ODN; Oligodeoxynucleotide)가 최근 주목을 받고 있다. CpG ODN은 선천면역의 감지수용체인 TLR9과 특이 결합하여 세포내부로 면역신호전달을 촉발하며 이차적으로 다양한 선천면역세포 및 적응면역세포를 자극한다. 그러므로 항종양효과 및 T 세포 및 B 세포의 활성화로 인한 보호항체생성 및 세포독성 특이 림프구의 활성을 유도하는 강력한 항종양효과를 나타낸다. CpG ODN의 대장암에서의 효과는 아직 전임상수준으로 그 기전과 다양한 합성CpG ODN의 비교연구가 매우 미흡하다. 본 연구의 목적은 대장암의 치료제 후보물질로서 CpG ODN을 이용하여 대장암의 증양억제 효과와 생존율을 관찰하고 신규 개발된 CpG ODN (HK-13)을 활용하여 증양억제 능력과 그 치료 기전을 밝히고자 하였다. 재료 및 방법으로 CT-26 마우스 대장종양 세포주를 이식한 BALB/c 마우스에서 CpG ODN에 의한 증양성장억제와 마우스의 생존율을 분석하였다. 또한, 증양억제 기전을 알아보려고 CpG ODN에 의한 자

극 후 세포 증식과 자연살해세포의 살상능력 등 면역세포 활성을 관찰하였다. 마지막으로 이러한 활성화에 선천면역의 관련성을 알아보기 위해 종양이 이식된 마우스에서 자극된 복강 내 대식세포와 비장세포를 분리하여 Th 1 (T helper 1) 형태의 cytokine 발현을 역전사 중합효소연쇄반응으로 확인하여 다음의 결과를 얻었다.

1. CT-26 세포주 대장암 이식 마우스에서 신규 합성 인간형 CpG ODN은 BALB/c 마우스에서 기존의 마우스형 CpG ODN과 유사하거나 보다 우수한 종양 성장억제효과와 생존율을 보였다.
2. 신규 인간형 CpG ODN으로 치료한 마우스 중 장기 생존한 마우스에서 CT-26세포를 재이식 후에도 생존하여 기억면역을 유발한 것으로 사료되었다.
3. 신규형 CpG ODN으로 치료한 마우스대식세포에서 TNF- α , IL-6, IL-12 mRNA가 발현되었고 비장에서는 IFN- γ mRNA 등이 발현되어 Th1 형의 cytokine의 발현을 관찰하였다.
4. 신규형 CpG ODN처리시 우수한 비장세포의 증식능과 자연살해세포의 살상능력이 있었다.
5. 대장종양을 이식한 마우스에서 신규 인간형 CpG ODN은 마우스형 CpG ODN과 대등하거나 우수한 면역반응이 증명되었다.

결론적으로 대장암 마우스이식 모델에서 신규 인간형 CpG ODN 치료는 매우 효과적이며 이는 선천면역세포의 직접적인 활성화와 Th1 형태의 cytokine을 매개로 하는 면역 활성화 효과로 사료된다.

핵심 되는 말: 대장암, 마우스모델, CpG ODN(Oligodeoxynucleotide), 항종양효과, 생존율, 면역기전, T helper type 1 Cytokine T(H)1

대장암 마우스모델에서 신규 CpG 올리고핵산 (CpG Oligodeoxynucleotide)을 이용한 면역치료 효과

<지도교수 김 수 기>

연세대학교 대학원 의학과

김 익 용

I. 서론

대장암은 미국에서 발생률과 사망률 모두 폐암 다음으로 두 번째를 차지하는 암이며, 국내에서도 최근 발생률이 증가 되고 있다^{1,2}. 대장암은 동물성 지방질과 육류를 많이 섭취하는 서구에서 많이 발생하며, 특히 한국이나 일본을 비롯한 아시아 각국에서는 서구에 비하여 발생률이 낮으나 근래에는 식생활이 점차 서구화 되어감에 따라 예전에 비하여 대장암의 발생률이 증가되고 있다. 국내에서도 2002년 보고에서 대장암은 여자는 3번째, 남자는 4번째로 호발하고 사망률은 남녀 공히 4번째로 높은 암으로서 2003년 한해 국내 사망원인 중 인구 십만 명 당 대장암의 연령표준화사망률은 남자는 13.2명, 여자 10.2명으로, 최근 10년 사이 대장암에 의한 사망률은 증가하여 그 상승 속도가 발생률과 함께 가파르게 높아지고 있다².

대장암의 근본 치료는 수술적 절제이나 전체 환자의 25%가 이미 진단 당시 원격 전이되어 있고 수술 후 초기 병기의 환자들을 포함하여 결국 40%가 진행 또는 전이된다. 이러한 전이 현상을 효율적으로 제어한다면 생존율의 향상을 기대할 수 있다.

전이성 대장암의 치료제로 항암제, 단클론 항체를 이용한 생물학적 표적 치료가 도입되었으나 최적의 치료 방법은 아직 정립되지 않았다³. 또한, 이들 화학요법은 악성 세포를 치료하는 한편 심각한 독성 때문에 환자의 골수기능과 면역 기능을 저

해 시키는 부작용을 가지고 있다⁴. 이와 같은 독성을 극복하기 위해서 치료하는 방법 중 하나가 면역치료이다. 종양 면역치료란 종양세포에 대항할 수 있는 특이적 면역작용을 활성화 시키는 것이다. 즉, 기존의 BCG, IL-2, IFN- α 등의 면역자극제와 T 세포나 관련된 T 세포의 이종이식이나 자가이식, 종양침습림프구(tumor infiltrating lymphocyte) 등이 있다⁵. 특히 최근 BCG를 이용한 자가 암 백신이 대장암 환자의 임상시험에서 성공하여 향후 유망한 면역요법으로 부상 중이다⁶. 암 백신을 포함한 대장암 면역치료에 면역 어쥬반트는 필수적이다. 그러나 현재 BCG를 대체할만한 면역 어쥬반트는 대장암에서 전무한 실정이다.

사람의 면역계는 일반적으로 선천면역과 적응면역의 방법을 사용하는데 선천면역은 병원체의 미생물의 종류에 따라 공통되는 구조형태를 인식하고 이를 제거한다. 병독인자 특정구조인 pathogen-associated molecular pattern (PAMP)을 인지하며 이들은 병원체에 매우 특이적이며 병원체의 반복적 침입에도 그 반응방식과 정도가 달라지지 않는다. 각종 대식세포, 호중구, 자연살해세포, 수지상세포등이 이를 담당하며 T 세포와 B 세포도 이에 관계된 수용체를 가지고 있다. 이들 면역을 유발하는 분자들로는 증식하는 바이러스에 존재하는 dsRNA, LPS (lipopolysaccharide), 비메틸화 (Unmethylated) CpG 핵산, 세균의 핵산 그리고 펩타이드 등의 수용체가 알려져 있다^{7,8}.

면역반응은 여러 종류의 세포가 모여 협력하여 하나의 통일된 방향성의 반응이 만들어지게 된다. CD4의 Helper T세포 반응의 방향성은 여러 가지 복잡한 요인에 의하여 결정되는데 크게는 항체를 형성하는 Th 2 (T helper 1) 반응과 세포매개성 반응이 위주로 되는 Th 1 (T helper 2) 반응으로 대별된다. Th1 세포와 Th2 세포는 cytokine의 분비양상으로 구별되며 Th1 세포는 주로 IFN- γ 와 IL-2를 주로 분비하고 Th2 세포는 IL-4, IL-5 와 IL-10을 주로 분비한다^{9,10}. Th1 면역반응의 특징은 대식세포에 의한 방어기전을 활성화하여 탐식작용과 세포내 살해를 이용하고 지연형 과민반응(DTH)을 보인다. Th2 면역반응의 특징은 항체와 비만세포 및 호산구에 의한 방어기전을 활성화 한다^{9,10}.

최근 세포막 수용체인 Toll-like receptor(이하 TLR)가 미생물 병독인자의 특정 구조인 PAMP 를 인지하여 cytokine 생성신호체계를 촉발함으로써 선천면역(innate

immunity)에 중요한 역할을 담당하는 것으로 밝혀졌다¹¹. Toll 단백질은 크게 세포 밖, 세포막, 세포질의 세 부분으로 구성되어 있으며, 세포 밖에는 leucine이 풍부한 반복 서열을 포함하는 부분 (leucine-rich repeat motif)이 있고, 세포질 영역은 포유동물의 Interleukin-1 수용체 (IL-1R)계와 유사하여 Toll/IL-1R (TIR) 상동 영역이라고 불린다. 선천면역계의 가장 큰 특징은 TLR과 같은 일정한 수용체의 목록을 사용하여 광범위한 병원체를 인식하는 것이며, 이들 수용체들은 미생물체의 광범위한 부류에 존재하는 고도로 보존된 구조를 인식하게 된다. Medzhitov 등¹²은 TLR4의 활성 부분을 사람 단핵구 유사세포주에 핵산 전달 감염하여 TLR4의 활성이 cytokine 생산을 유도하고 공동보조자극 분자들의 발현을 증가시키는 것을 확인하였으며, 이에 따른 전구 염증 cytokine인 TNF- α , IL-1과 면역 조절성 cytokine인 IL-6, IL-8, IL-10, IL-12가 미생물 리간드에 의해 TLR 활성 후 유도되는 것이 관찰되었다. 단핵구 유래 수지상세포를 지질단백(lipoprotein)으로 자극하여 IL-12가 생성되고 항-염증성 cytokine인 IL-10은 생성되지 않았다. 결국 PAMP에 의해 촉발된 cytokine 환경은 T helper 1 세포 반응으로 진행된다는 것을 의미한다.

CpG (Cytosine-phosphorothiolate-Guanine) ODN 을 인지하는 것으로 알려진 TLR7과 TLR9은 혈장유사 수지상세포와 B 림프구에서 높게 발현되며, CpG ODN 으로 B 림프구를 자극하였을 때 TLR9의 발현이 급격히 감소하였고, TLR7은 혈장유사 수지상세포에서는 증가하고 B 림프구에서는 감소함을 보고하였다^{11,13}. TLR계는 면역반응을 강력하게 조절함으로써 최근 치료제 개발의 목표 물질로 관심을 받고 있다. 미생물의 구성성분과 마찬가지로 내인성 리간드들과 작은 분자량의 합성 화합물이 TLR에 의해 인지됨이 발견되어 다양한 질환에서 새로운 치료법의 개발에 강력한 표적으로서 이 수용체에 대한 관심이 증가되고 있다. 또한, 기존 백신은 한번 침입한 병원체를 면역세포가 기억해 공격하는 적응 면역계의 기전을 이용하나, TLR을 이용한 치료제는 병원체의 침입을 신속하게 감지하는 선천면역계를 활용하고 또한, 후천 면역계의 활성화에도 필수적이다.

최근 연구는 TLR을 표적으로 화합물을 개발하여 실제 Leichman 등은¹⁴ 최근 개발한 TLR9 항진제로 합성 DNA를 단편으로 진행된 비소세포폐암으로 이전에 치료받지 않은(naive treatment) 환자 112명을 대상으로 화학요법과 병용 투여한 2상 임

상 연구에서 생존기간을 6개월 연장시켰다.

CpG ODN은 세균, 바이러스 DNA 또는 BCG에 존재하는 메틸화되지 않은 이중 염기(dinucleotide)를 포함한 ODN이다. 본 연구에서 실험한 합성 CpG ODN은 TLR-9의 리간드로 강력한 Th1 어쥬반트이며 현재 흑색종, 림프종 등의 임상연구에 시도되고 있으며 면역 조절 치료법에 있어 강력한 면역 조절 치료제로 알려져 있다^{15,16}.

CpG ODN의 세포면역자극의 기전은 B세포와 T세포, 자연살해(NK)세포 및 전문적인 항원표현세포에 관여하는 면역조절의 연쇄반응을 자극하고 촉진하는 Th 1 반응으로 귀결된다. 이러한 Th 1의 면역학적 편향성은 숙주의 면역 환경을 왜곡시키며 면역학적 보호제로 백신치료 및 Th 2 편향성 질환인 알러지 질환의 면역 어쥬반트로서 효과가 있다. 전임상연구는 CpG ODN이 이러한 용도로 각각 사용하는 데 효과가 있음을 보여준다. 현재 진행 중인 임상연구는 CpG ODN의 치료가 인간에서 안전하다는 것을 보여주고 그것들이 CpG ODN 단독이나 알러지 유발 물질인 항원과 함께 투여하여 면역반응을 조절함을 입증하고 있다.^{9,10}.

생쥐에서 인간형 CpG ODN을 투여하기 전에 인간형의 CpG motif가 생쥐에서 선천 면역 세포인 대식 세포를 자극하는 능력이 있음을 확인된 바 있으나 결국 CpG ODN을 인체에 투여하기 위하여는 인체형의 사용이 원칙이다.

CpG ODN을 이용한 임상에서 항암면역치료는 현재 폐암 및 일부 림프종 등에 제한적으로 사용되고 있다. 아직까지 대장암의 경우에는 상대적으로 실험적 결과가 충분치 못하여 주로 마우스형 CpG ODN을 이용한 기초 자료만 제시되어있고 인간형 CpG motif의 효과는 알려져 있지 않아 이에 임상적인 적용을 위한 충분한 의학적인 근거가 부족한 형편이다.

본 연구의 목적은 신규 합성 인간형 CpG ODN을 마우스 대장암모델에서 기존의 마우스형과 비교하여 유사 또는 우수한 항종양효과가 있는지와 CpG ODN을 대장종양이 있는 생체에 투여 시 종양의 성장억제, 생존율을 분석하고 내재 면역 기능의 항진 효과를 관찰하여 대장암에서 CpG ODN의 치료의 기전을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포

실험에 사용한 세포주로는 마우스 대장암세포주인 CT-26, 림프종 세포주인 YAC1 (moloney virus induced lymphoma)로 세포주는 American Type Culture and Collection (ATCC) 또는 Korean Cell Line Bank (KCLB) 에서 분양 받아 사용하였다. 세포배양은 각각 DMEM 과 RPMI 1640배지에 10% 우태아 혈청(FBS)과 페니실린 100 IU/ml, 스트렙토마이신 100 μ g/ml 과 Amphotericin B 0.25 μ g/ml을 첨가하여 사용하였다. 37 $^{\circ}$ C의 5% CO₂ 항온 항습 조건의 배양기에서 증식 시켰다. CT-26세포주는 trypsin 처치와 phosphate buffered saline (PBS)에 부유하여 1 \times 10⁴/ml부터 1 \times 10⁷/ml 까지 10/ml씩 점차 지수로 증가시켜 각각 마우스의 피하 접종하여 종양형성을 관찰하였다.

2. 실험동물

무균상태의 6-8주령 암컷 BALB/c 마우스(코아텍, 평택, 대한민국)와 7-8주령의 C57Bl/6 마우스를 중앙실험동물센터 (Japan SLC; Shizuoka, Institute for Laboratory Animals Center, Japan)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 이들 동물들은 멸균된 환경에서 수돗물과 펠렛사료(삼양유지사료주식회사, 원주, 대한민국)를 공급 받았으며 사육 환경은 항온 항습기에서 사육하였고 물과 사료는 제한 없이 공급하였다. 실험은 연세대학교 원주의과대학 동물 실험실에서 시행하였으며 본 대학 기관의 동물실험실 규칙에 의거하여 실험을 시행하였다.

3. 세포배양 및 분리

가. 마우스 비장세포의 분리 및 배양

마우스의 경추를 탈골하여 희생한 후 비장을 분리 한 다음 얼음 위에 놓인 페트리접시에 PBS을 넣어 분리된 비장을 담근 후, 10ml 정도의 새로운 PBS가 있는 페트리접시로 옮긴다. 그리고 비장에 붙은 조직 덩어리들을 깨끗이 제거한 후, homogenizer를 이용하여 세포가 빠져나오도록 분쇄 한 다음, 파이펫을 사용하여 접

시 바닥에 붙은 세포가 떨어지도록 부유하여 50ml 코니컬 시험관으로 옮긴 뒤 1분간 그대로 두어 조직세포를 가라앉히고 파이펫으로 상등액을 다른 시험관으로 옮기고 2000rpm에서 5분간 원심분리 한 다음 상등액을 제거한다. 모아진 세포에 적혈구 용해 완충액 0.83% NH₄Cl 5ml을 넣고 부유 후 상온에서 5분간 둔다, 즉시 PBS 5ml 넣어 부유한 뒤 곧바로 5분간 원심분리 후 배지를 제거하여 한 두번 세척한 후 자연살해세포의 세포독성도의 작동세포(effector cell)로 사용하였다.

나. 마우스 복강내 대식세포 분리 및 배양

마우스에 무균 처리한 3% thioglycolate broth (Difco laboratories, Detroit, ML, USA) 3ml을 마우스 복강 내로 주사하고 3일째 마우스를 희생하여 8~10ml의 PBS를 복강내로 주입한 후 주사기로 다시 뽑아내는 과정을 3~5회 실시 한 후 완전히 뽑아낸다. 이후에 2000rpm에서 20분간 원심분리 한 후 0.83% NH₄Cl을 3ml을 3분 동안 처리하여 적혈구를 제거한다. 분리된 대식세포는 PBS로 세척 한 후 다시 원심분리 한 후 세포를 세어 사용하였다.

4. CpG 올리고핵산(ODN) 제제

가. CpG ODN 종류

모든 CpG ODN은 phosphorothiolate ODN으로 본 대학의 미생물학교실에서 개발한 것으로 내독소가 없이 처리한 것을 사용하였다. 먼저 CpG motif가 없는 CpG ODN 1982 (이하 MK-1로 명명)은 구조가 phosphorothioate로 서열은 5'-TCC AGG ACT TCT CTC AGG TT-3'이고 마우스 motif는 CpG ODN 1826 이하 MK-2 (5'-TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT-3') 그리고 신규 CpG ODN은 HK-12 CpG ODN, HK-13 CpG ODN의 구조는 표 1과 같다.

나. CpG ODN 투여 후 Th1 형의 cytokine 생성 검색

CpG ODN 치료 후 Th1 형의 cytokine 생성과 활성을 검증하고 이중에서 생체 활성이 우수하다고 판단되는 신규 HK-13를 MK-1, MK-2과 비교하여 복강의 대식세포 및 비장세포의 증식과 cytokine 유도 생성을 조사하였다.

표 1. 실험에 사용한 CpG ODN 종류 및 구조

Code name	ODN	Sequence 5'-3'
MK-1	(Non-CpG ODN 1982)	5'-TCC AGG ACT TCT CTC AGG TT-3'
MK-2	(mouseCpG ODN 1826)	5'-TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT-3'
HK-7	(human CpG ODN-1)	5'-TCG TCG TTT TCG TCG TCG GGGGGG-3'
HK-12	(human CpG ODN-2)	5'-TCG TCG TTT TCG TCG TTT TGT CG TT-3'
HK-13	(human CpG ODN-3)	5'-TCG TCG TTT TCG TCG TCG TTT T-3'

다. BALB/c 마우스의 꼬리 정맥 내에 1×10^6 /ml CT-26 세포주를 주입 후 HK-13 CpG ODN을 2일, 6일, 13일째 마리당 20 μ g를 꼬리 정맥 내로 주입하여 주사하였다. 이들 마우스에서 Th1 cytokine mRNA 발현을 역전사 중합효소연쇄반응을 통하여 조사하였다.

5. 종양의 용적 측정과 생존율

가. CT-26 세포 1×10^6 /ml를 BALB/c 마우스의 우측 옆구리 피하조직에 주사한 후 CpG ODN의 치료는 종양세포를 접종 한 후 다음날부터 9일째까지 이틀간격으로 모두 다섯 차례 투여하였다. 각각의 CpG ODN은 모두 마리당 20 μ g를 마우스 종양의 주위와 서혜부의 피하에 각각 10 μ g씩 피내 접종하였다. 대조군은 멸균된 PBS를 0.2 ml으로 주사하였다. 각 군마다 모두 8마리씩 실험하였으며 종양의 용적은 실험 시작 후 60일까지 측정하였다. 종양의 용적 측정은 1주간 세 차례 Vernier caliper로 종양의 직경을 측정하였다. 측정시 매 3회 이상 시행하였다. 종양의 용적은 $\text{Volume}(\text{mm}^3) = 4/3 \times \pi r^3$ 이때 $r = (\text{길이; length} + \text{너비; width}) / 4$ 공식으로 계산하였다.

나. 마우스 생존율:

CT-26 세포 1×10^6 /ml를 BALB/c 마우스 복강 내로 접종 후 대조군에는 PBS를 치료군에는 MK-1, MK-2, HK-12, HK-13 CpG ODN을 마리당 10 μ g의 농도로 1일, 5일, 9일, 13일에 각각 마우스 복강 내로 주입하여 치료 하였다. 모든 마우스는 매일 상태를 측정하고 생존기간을 측정하였다. 60일 이후에도 생존해 있는 경우에도

정기적으로 측정하였다.

6. 주요 전이장기의 조직학적 소견

BALB/c 마우스의 꼬리 정맥 내에 1×10^6 CT-26 세포주를 주입 후 대조군에는 PBS를, 실험군은 HK-13 CpG ODN을 2일, 6일, 13일째 마리당 $20 \mu\text{g}$ 를 꼬리 정맥 내로 주입하여 치료 하였다. 각각 치료 후 모두 다음날 마우스를 희생하여 주 전이 장기인 간과 폐의 전이집락을 확인하였다. 간과 폐를 절제하여 채취한 후 10% 중성 포르말린에 고정하고 파라핀 블록에 포매 시켜 연속 절편을 만든 후 Hematoxylin-Eosin (H&E)으로 염색하여 조직학적 소견을 관찰하였다.

7. RNA 분리 및 cDNA 합성

가. Trizol 용액 (Life technologies, Grand, Island, NY, USA)을 이용하여 RNA를 분리하였다. 그 과정으로는 배양접시를 PBS로 세척하고 Trizol 용액을 넣어 세포를 깬 후 상온에서 5분간 두었다가 시료 당 $100 \mu\text{l}$ 씩의 chloroform ($200 \mu\text{l}/\text{ml}$)을 첨가 한 후 15초간 진탕하였다. 상온에서 5분간 반응시킨 후 4°C 에서 15,000 rpm으로 15분간 원심분리 후에 RNA가 포함된 상층액을 tube로 옮겨 담은 후 isopropanol $200 \mu\text{l}$ 넣어주고 첨가하고 시험관을 한 두번 뒤집어 섞은 후 상온에 10분간 두었다가 4°C 에서 15,000 rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 RNA 침전물을 제외한 나머지 용액을 제거하고 나서 75% 에탄올을 1ml 첨가하여 흔들어 준 후 4°C 에서 15,000 rpm으로 10분간 원심 분리하였다. 이후에 상층액은 제거하고 RNA 침전물은 공기 중에서 건조시킨 후 diethylpyrocarbonate로 처리한 증류수 $30 \mu\text{l}$ 를 첨가하여 RNA를 녹였다. RNA정량은 증류수에 녹아있는 RNA용액 $4 \mu\text{l}$ 에 nuclear free 증류수 $396 \mu\text{l}$ 를 첨가하여 잘 섞은 다음 분광광도계 (Du 530, Beckman, USA)를 이용하여 260nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

나. cDNA를 합성하기 위해 $1 \mu\text{g}$ 의 RNA와 완충용액, 500ng의 oligo-dT primer, 15U의 avian myeloblastosis virus 역전사효소, 20U의 RNase inhibitor (RNasin), 1mM의 dNTP, 5mM의 MgCl_2 를 얼음 위에서 혼합하여 $20 \mu\text{g}$ 의 반응액을 만든다 이 반응액을 PCR thermal cycler (Hybaid, Franklin, MA. USA)를 이용하여 42°C 에

서 30분간 반응 시킨 후 95℃에서 5분간 두어 효소를 불활성화 시키고 4℃에서 10분간 두었다가 실험에 사용 할 때까지 -70℃에 보관하였다.

다. 반정량-중합효소연쇄반응

역전사 반응의 결과로 만들어진 cDNA는 각각의 실험 목적에 맞게 β -Actin, IL-6, IL-12, TGF- β 의 primer를 사용하여 증폭하였다. 표 2 중합효소 연쇄반응을 수행하기 위하여 cDNA 합성액 2 μ l, 완충용액, 0.2mM dNTP, 0.125U Taq DNA polymerase (Takara, Otsu, Shiga, Japan), primer 1 μ l, 2mM MgCl₂를 넣어서 25 μ l의 반응액을 만든 후 thermal cycler에 넣고 적절한 조건으로 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 표 3 중합효소연쇄반응의 산물은 ethidium bromide가 함유된 1.2% agarose gel에 전기영동 하여 증폭산물을 관찰하고 각 시료에서 β -Actin 발현정도를 densitometer로 읽은 후에 이 값을 가지고 cytokine 발현 정도를 보정하여 상대적으로 발현 정도를 나타내었다.

표 2. 중합효소연쇄반응에 사용한 primer서열과 증폭산물의 크기

cDNA	Sequence	Primer Sequence	증폭산물
IL-6	Forward	5'-AAT GAT GGA TGC TAC CAA AC-3'	281 bp
	Reward	5'-TAG CCA CTC CTT CTG TGA CT-3'	
IL-12 p40	Forward	5'-GAG GTG GAC TGG ACT CCC GA-3	618 bp
	Reward	5'-CAA GTT CTT GGG CGG GTC TG-3'	
TGF-β	Forward	5'-CTG CTG CTT TCT CCC TCA AC-3'	340 bp
	Reward	5'-GAC TGG CGA GCC TTA GTT TG-3'	
β-actin	Forward	5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3'	348 bp
	Reward	5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3	

표 3. 중합효소연쇄반응의 수행 조건

Mouse cDNA	cDNA(μ l)	Annealing temperature	Cycle number
IL-6	2	55 °C	35 cycle
IL-12p40	2	65 °C	37 cycle
TGF-β	2	58 °C	35 cycle
β-actin	2	60 °C	30 cycle

8. 면역학적 기능 측정

가. 비장세포의 자연살해세포, 대식세포의 cytokine mRNA 유전자의 발현조사

BALB/c마우스와 C57BL/6 마우스 복강의 대식세포와 비장내 단핵세포를 분리하여 표적 cytokine mRNA의 발현을 확립된 조건의 역전사 중합효소연쇄반응을 이용하여 측정하였다. 마우스의 복강내세포를 분리한 후 100mm 배양 접시에 5×10^5 개의 세포를 넣었다. 4시간이 지난 후 배지를 제거하고 새 배지와 함께 시료를 처리한 후 9시간 후에 Trizol-reagent를 이용하여 RNA를 분리하고 RT-PCR 기법으로 cytokine IL-6, IL-12, TGF- β 의 mRNA의 상대적인 양을 측정하였다.

나. 면역 세포증식 분석

먼저 CpG ODN을 선투여한 마우스의 복강내 대식세포와 비장 세포를 추출하여 각각 5×10^4 세포를 배양하였다. 이들 세포를 37°C CO₂에서 3일간 배양하였다. Thymidine 흡착시험을 위해 배양기에서 충분히 자란 세포를 trypsin/EDTA (0.25%/1 mM)로 처리한 후 96well plate의 각 well 당 1×10^4 의 세포를 분주 한 후 [³H]-thymidine (PerkinElmer life science Inc, Boston, MA, USA)을 각 well 에 1 μ Ci의 농도로 첨가하고, 6시간 동안 반응 시킨 후 배양세포를 cell harvester (Skatron instruments Inc, Sterling, VA, USA)를 이용하여 glass filter에 흡착시켜 실온에서 약 6시간 동안 건조시킨 다음, 3ml 꺼내어 Scintillation beta counter (Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA, USA)로 흡착된 [³H]-thymidine 양을 측정하여 림프구 증식반응을 조사하였다. 모든 실험은 3회 반복 시행하였다.

다. Chromium 방출법 (⁵¹Cr-release assay)에 의한 자연살해세포의 살상능 측정

CpG ODN에 의하여 자연살해세포가 충분히 활성화되었는지 확인하기 위하여 Chromium 방출 법을 이용하여 살상능을 관찰하였다. 먼저 CpG ODN 10 μ g를 마우스에 정맥 투여 후 18시간 후 희생하여 역시 CpG ODN (1 μ g/ml)을 2시간 반응시켜 유착되지 않은 작동세포인 마우스 비장세포를 분리하여 활성화시켰다. 이 때 YAC1 표적세포 수를 1×10^6 에 맞추어 RPMI 1640 (FBS3%)로 섞은 후 1000 rpm에서 3분 동안 원심분리한 후 상층액을 제거 한 다음 ⁵¹Cr을 100uCi 넣고 배양기에 2시간 동안 반응시켰다.

비장세포를 96 well plate의 100:1 line에 1×10^6 /well (total volume 200 μ l/well)

에 세포를 분주 한 후 100:1, 50:1, 25:1 line에 차례대로 2배 희석 한 다음 1×10^6 표적세포를 RPMI 로 3번 세척 한 후 배지를 제거 하고 RPMI을 1ml 넣고 부유 후 500ul의 배지를 버린 후 그곳에 total의 RPMI을 희석하여 96 well plate에 100ul (5×10^3 세포)씩 세포를 과중 시켰다. 자연방출(spontaneous release) test well에 100ul RPMI (FBS3%)을 넣어주고, 총방출(total release) test well에 5% triton X-100을 넣어주고 작동세포와 표적세포를 4시간 함께 배양 하였다. 2000rpm로 5분 원심분리 하여 100ul의 상층액을 따서 γ -counter 용기에 넣고 방사성동위원소 측정기로 $^{51}\text{Chromium}$ 방출을 측정 한 다음 Percentage of specific lysis = [(experimental release - spontaneous release) / (maximum release - spontaneous release)] \times 100의 공식을 사용하여 환산하였다.

9. CpG ODN의 직접 세포독성평가

가. 약물독성 실험 (MTT assay)에 의한 세포독성 평가

세포 독성능 실험은 microculture tetrazolium방법으로 실시하였다. RPMI 1640 배지에 세포수가 1×10^4 cells/ml이 되도록 희석한 후에 세포 희석액 100 μl 씩 96well microculture plate (Nunc, Denmark)의 각 well에 분주 후 약제를 농도별로 첨가하여 상기와 같은 조건으로 배양하였다. 이 후 20 μl 의 MTT(1 mg/ml)를 well에 첨가하고 37°C에서 4시간 추가 배양 후 흡입하여 배지를 완전히 제거하였다. 배양된 세포를 PBS buffer로 세척 후 150 μl 의 Dimethyl sulfoxide (DMSO)를 각 well에 분주하여 formazan이 잘 용해 되도록 배양접시를 잘 흔든 후, ELISA를 이용하여 595 nm파장에서 흡광도를 측정하였다. 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 % 생존율로 환산하여 세포의 증식을 50% 억제 할 수 있는 농도 (IC₅₀ value)를 기준으로 하였다.

나. DNA 분절 분석

24시간 약제 처리한 세포 부유액(1×10^6 cells/ml)을 세척용액 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl)으로 2회 세척한 후에 500 μl 의 lysis buffer (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 20 mM EDTA)를 넣고 잘 섞은 후에 1시간 동안 얼음에 정치한 후 냉장온도의 1000 g에서 10분간 원심 하였다. 상층액을 새로운 미

세원침 시험관에 옮기고 1% SDS 100 μ l, TE/RNase (RNase 10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 15 mM NaCl) 10 μ l, 1 mg/ml의 농도로 희석된 proteinase K (Sigma, St.Louis, MO, USA)를 50 μ l 첨가하여 37°C에서 4시간 반응 시킨 후, phenol/chloroform/isoamylalchol (25:24:1의 비율)을 동량 첨가 후 잘 섞고 10,000 rpm에서 5분간 원심 하여 상층액을 옮기고 1 ml의 100% 에탄올을 첨가 후 -70°C에서 DNA를 침전한 후 70% 에탄올로 세척 후 건조하여 에탄올을 제거한 후에 TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) 20 μ l을 넣어 DNA를 재부유 시켰다. 추출한 DNA 20 μ l를 2% agarose gel에 loading하여 50 V 전류에서 2시간 전기영동 후에 ethidium bromide로 염색하고 UV DNA image visualizer (Seolin Scientific 주, 서울, 대한민국) 위에 놓고 DNA 사다리를 확인하였다.

10. 통계처리

통계학적 분석을 위하여 Prism 3.0 (San Diego, USA)와 SPSS10 (SPSS Inc., Chicago, USA) 프로그램을 사용하였다. 실험군과 대조군의 차이를 비교하기 위하여 Kaplan-Meier test, chi-square test, 단일 ANOVA 및 재검정 ANOVA를 시행하였다. P value는 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

III. 결과

1. CT-26 대장암 세포주의 마우스 내 접종 후 종양형성 적정 농도

종양세포 수를 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 부터 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 까지 각각 $10/\text{ml}$ 씩 지수로 점차 증가시켜 각각 마우스의 우측 옆구리에 피하 접종하여 1주일 후 종양형성을 관찰한 결과는 $1 \times 10^6 / 100\mu\text{l}$ 세포를 접종한 경우 75mg의 종양이 관찰되었다. (그림 1)

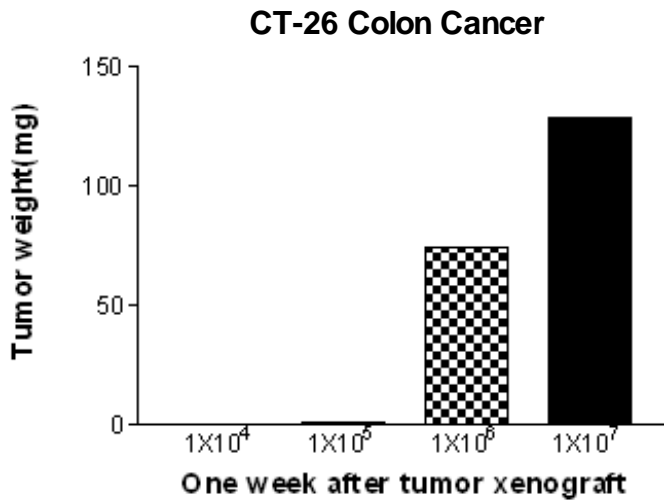


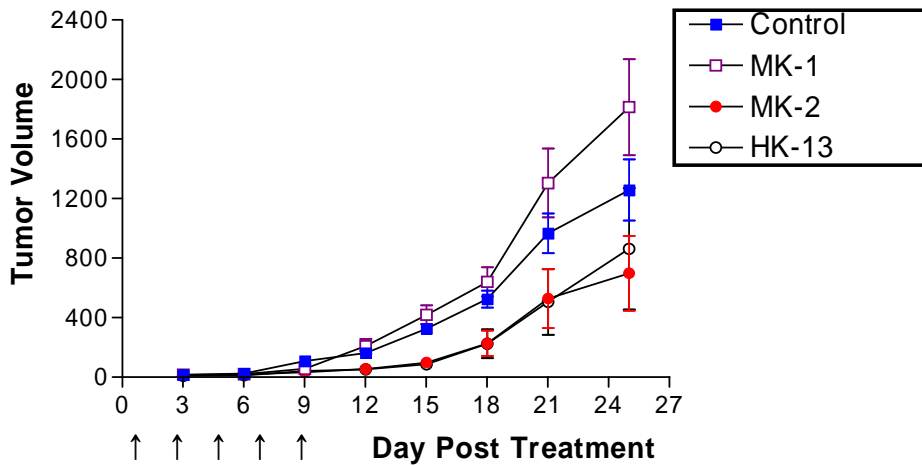
그림 1. BALB/c 마우스 내 피하 접종한 CT-26 종양세포수에 따른 종양형성

2. CT-26 대장암모델에서 CpG ODN 치료에 따른 종양용적의 감소효과

가. CT-26 세포 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 개를 BALB/c 마우스에 피하 내에 접종 후 여러 종류의 CpG ODN을 각각 1일, 3일, 5일, 7일, 9일째에 마우스 종양의 주위에 $10\mu\text{g}$, 그리고 동측 서혜부에 $10\mu\text{g}$ 씩, 모두 $20\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 을 주사 하였으며 대조군에는 PBS를 $200\mu\text{l}$ 주사하였다.(↑) 종양세포의 피하 주입 후 각 종류별 CpG ODN으로 치료 후 25일째 각 군의 종양의 평균 용적은 대조군이 $1,257 \text{ mm}^3$, MK-1 군이 $1,814 \text{ mm}^3$, MK-12 군이 699 mm^3 , 그리고 HK-13 군이 863 mm^3 로 대조군과 HK-13 군 간의 차이가 있었다. ($p=0.013$) 또한, MK-1 군과 HK-13 군 간에도 용적에 유의한 차

이가 있었다.(p=0.004) (그림 2) 그러나 MK-2 군과 HK-13 치료군 간의 차이는 없었다. 그러므로 새로운 CpG ODN은 기존 마우스 형과 유사한 종양억제효과가 있음을 알 수 있다.

CT 26 Colon cancer



· $Volume(mm^3) = \frac{4}{3} \pi r^3$ $r = (length + width) / 4$

그림 2. CT-26을 피하에 접종한 BALB/c 마우스에서 CpG ODN 치료 후 종양용적 각각 1일, 3일, 5일, 7일, 9일에 투여 후(↑)종양 용적의 변화 (p=0.013)

나. CpG ODN 투여 후 감소된 종양의 조직학적 소견

CT-26 대장암 세포주를 접종한 실험군 모두 종양용적의 대부분은 종양세포로 구성되어있고 대조군인 PBS 투여군의 종양은 지속적으로 성장하여 주위 지방조직과 연부조직 그리고 복벽의 근육층에 종양침윤이 관찰되었다. HK-13 CpG ODN으로 치료 후 용적이 감소한 종양조직의 현미경소견상 종양내에 종양세포가 부분적으로 소실되었고 종양세포가 실제 차지하는 비율이 낮았다. 고배율소견상 간질조직에서 염증성 세포의 침윤과 종양의 괴사가 관찰되었다. HK-13으로 다섯 차례 모두 치료 한 경우 종양용적 중 종양세포가 차지하는 비율은 더욱 감소하였고 염증 반응이 증가된 부위에서 대식세포, 림프구, 다핵세포 (polymorphonuclear cells)인 호중구의 침윤이 많이 관찰되었다. (H&E 염색, x400) 그림 3.

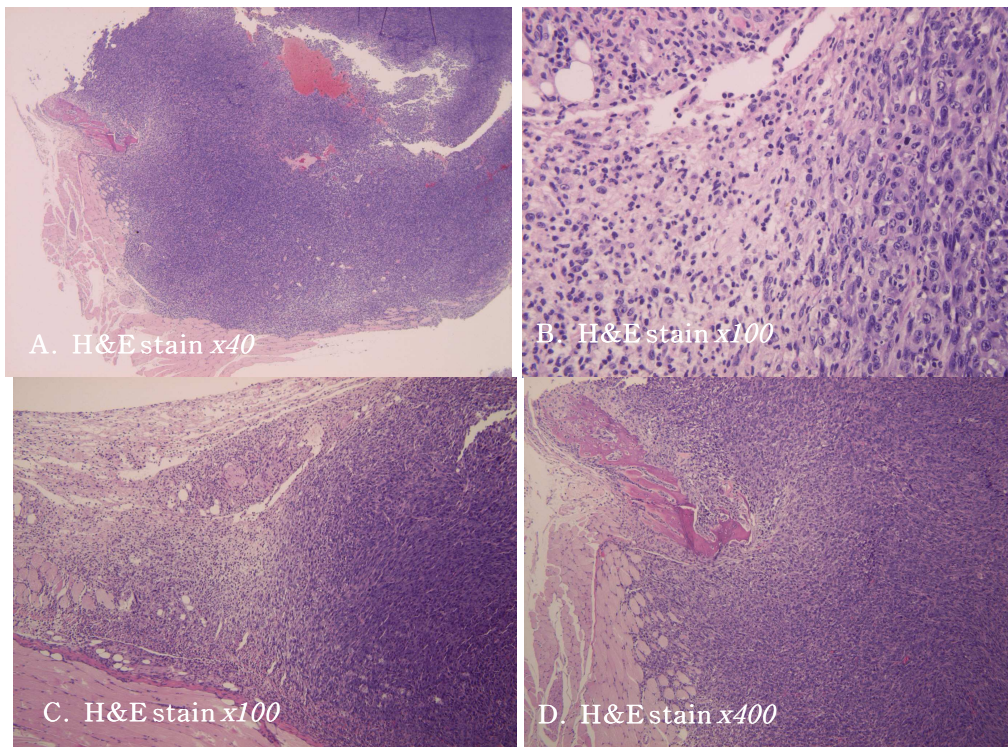


그림 3. CpG ODN 치료 후 BALB/c마우스 피하내 CT-26 종양의 현미경적 소견

A, B 실험 14일째 대조군 마우스는 종양이 계속 성장하여 주위 지방조직과 연부 조직 그리고 복벽의 근육층에 종양침윤이 관찰되었다. **C, D** HK-13 Cp-ODN 투여 후 종양의 용적은 감소되었고 조직 중 종양세포가 부분적으로 소실되었고 (H&E 염색, $\times 100$) 고배율에서 종양주위에 증가된 대식세포, 림프구, 다핵세포인 호중구의 침윤이 많이 관찰되었다(H&E 염색, $\times 400$).

3. CpG ODN 치료 후 생존율 비교

BALB/c 마우스 복강 내에 CT-26 세포주 $1 \times 10^6/ml$ 를 투여 후 역시 복강 내에 각 종류별 CpG ODN을 1일, 5일, 9일, 13일째에 각각 투여한 후 생존 기간을 측정하였다. (n=6) 각 CpG ODN 치료 후 마우스의 평균 생존기간은 대조군은 21.2일, MK-1 21.5일, MK-2 군이 36일 그리고 HK-13 군은 43.2일 이었다. 생존율은 대조군과 HK-13 CpG ODN군 간의 차이가 있었다. (p=0.013) MK-2 군 과 HK-13 CpG 군 간의 생존 기간도 차이가 있었다. (p<0.011) 특히, HK-13 CpG ODN을 처치한

군에서 70일 이후에도 생존한 마우스도 관찰되었다. (그림 4)

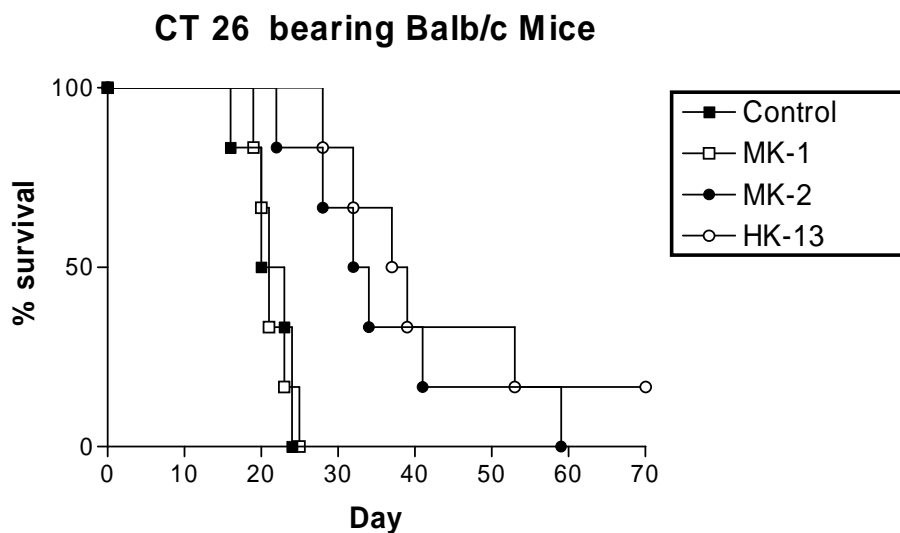


그림 4. CT-26 세포를 $1 \times 10^6/ml$ BALB/c 마우스 복강 내 접종 후 각 종류별 CpG ODN 치료 후 생존 곡선. $p < 0.018$

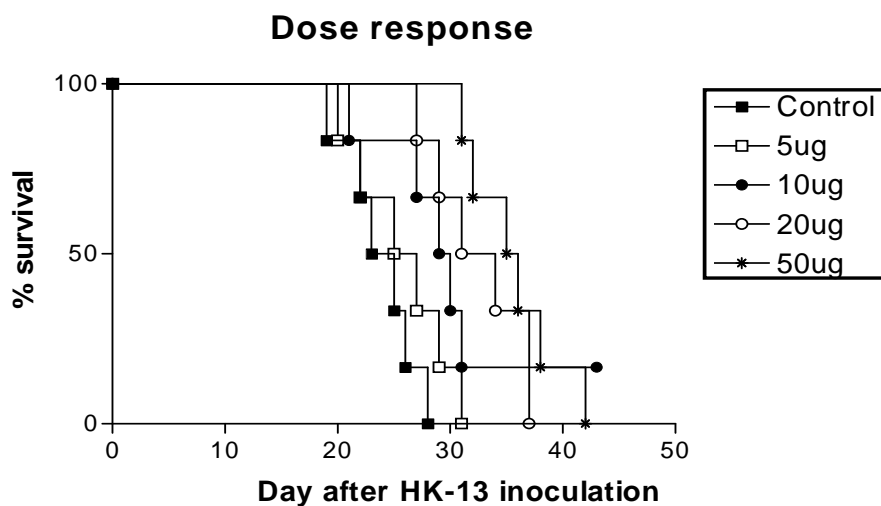


그림 5. HK-13 CpG ODN의 농도 별 치료 후 BALB/c 마우스의 생존 곡선.

이중 신규형 HK-13 CpG ODN의 치료 용량에 따라 증량하여 생존율을 관찰하였으며 각 농도별 처치 후 10 μ g으로 치료한 마우스에서 대부분 생존 기간이 연장되었으며 한 마리의 경우는 43일 이상 생존하였다. p<0.04 (그림 5)

HK-13 CpG ODN으로 치료한 경우는 70일 이후 에도 생존하였으며, 면역 반응의 기억 면역능을 조사하기 위하여 이 실험동물에 다시 1 \times 10⁶개의 CT-26 세포를 복강 내에 재투여 시 장기 생존하여 기억면역의 존재를 확인하였다. (그림 6)

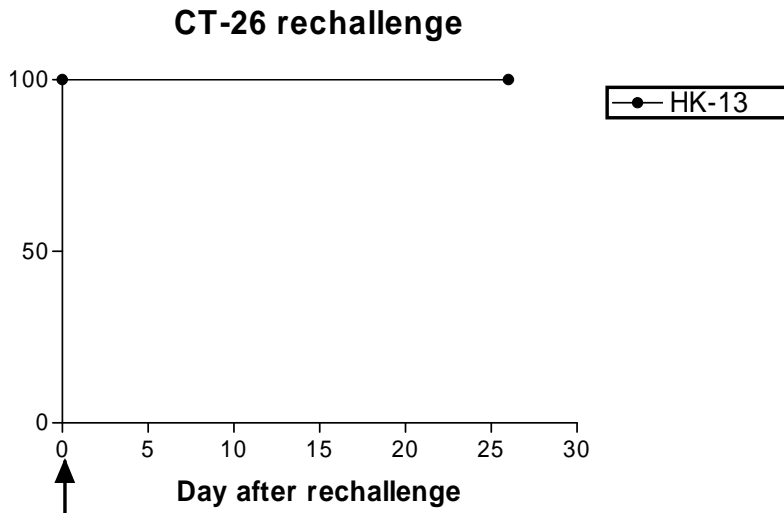


그림 6. HK-13 CpG ODN치료 후 장기 생존한 마우스에서 생존곡선.

장기생존 한 BALB/c 마우스에 CT-26 세포를 1 \times 10⁶/ml 복강 내 재접종 후 생존 곡선을 나타내고 있다.

4. 전이장기의 조직학적 소견

BALB/c 마우스에 CT-26 세포주 1 \times 10⁶개를 꼬리 정맥에 접종 후 역시 HK-13 CpG ODN으로 정맥치료 후 부검하여 동물의 간과 폐로의 전이 집락을 확인하여 각각 2일, 6일, 13일 치료 후 시기별로 처치한 여러 군의 육안 소견상 대조군에 비하여 간 및 폐 모두 육안 적으로 전이된 병변 수의 차이는 없었다.

현미경 소견상 폐전이 병소의 경우 CpG ODN으로 6일째 치료한 폐는 실질 조직 중 종양세포나 세포의 작은 덩어리(tumor cell nest)의 침윤이 차지하는 비율이 낮았다. (tumor cell infiltration/ total parenchymal ratio)

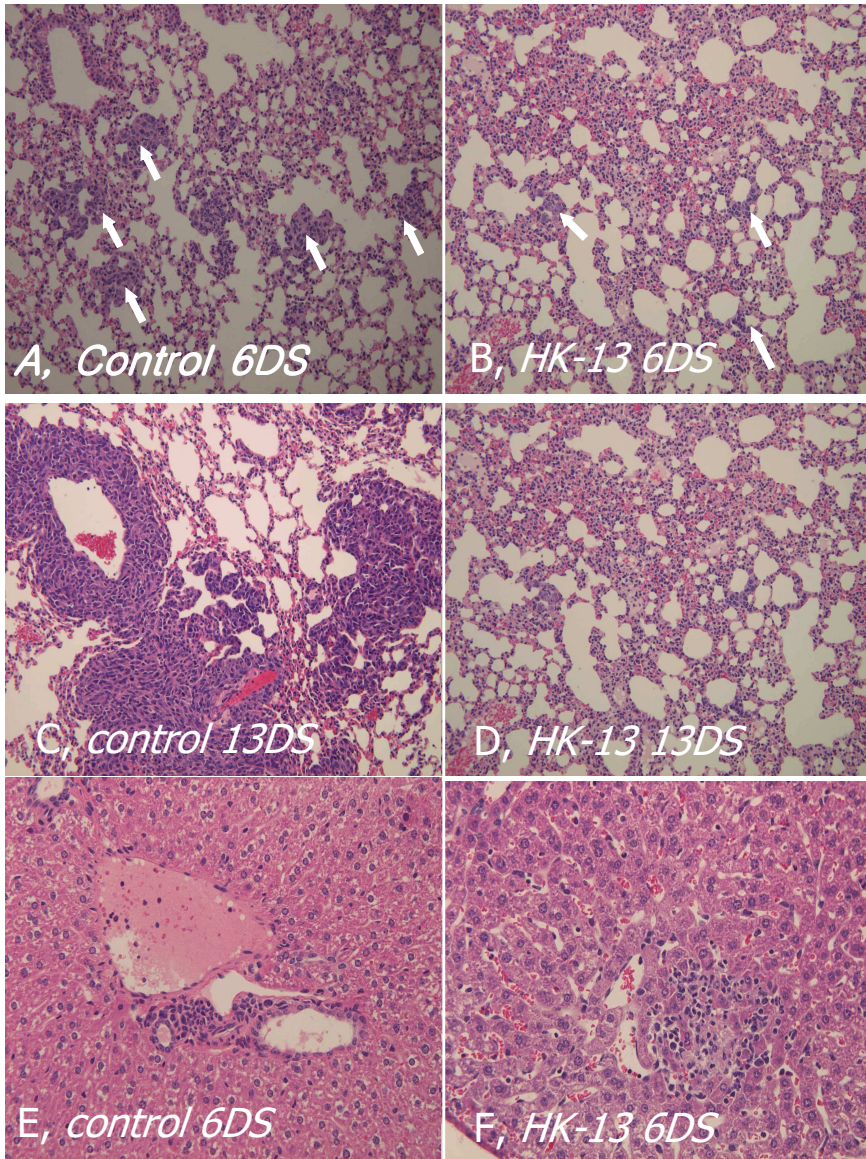


그림 7. BALB/c 마우스에 CT-26 세포를 정맥내 접종 후 HK-13투여 후 조직소견
 A, C: 6일, 13일 대조군, B, D: HK-13의 6일, 13일 투여 후 폐 조직 소견
 (H&E 염색, ×200). E, F: 간문맥조직 사진, 대조군에 비하여 치료군에서 문맥주
 위의 중앙주위에 림프구의 침윤과 대조군에 비하여 중앙세포 주위로 림프구와
 다핵세포가 많이 관찰된다(H&E 염색, ×400).

그러나 치료 2일, 13일 때 치료 한 경우의 종양세포 침윤정도는 치료하지 않은 대조군과 비교하여 차이가 없었다. 간의 경우 각 치료시기 별 종양침윤의 정도의 차이는 없었다. 그러나 고배율에서 간문맥 주위의 종양 주위에 림프구의 침윤 (lymphocyte infiltration)이 관찰되었다. 또한 6일 때 치료 한 마우스의 간에서도 치료 군이 종양 세포 주위로 림프구와 다핵세포(polymorphonuclear cells)가 많이 관찰되었다. (H&E 염색, ×400, 6일) (그림 7.)

5. Cytokine 유전자의 발현 및 분비 능 측정결과

BALB/c 마우스 복강 내에서 대식세포를 분리하여 0.6 g/ml의 각 CpG ODN을 12시간동안 Th1 cytokine 유전자의 발현을 RT-PCR을 이용하여 측정하였다. CpG ODN 처리 하여 배양 후 IL-6, TNF- α 와 IL-12 cytokine mRNA 발현유도 결과 MK 형태의 CpG ODN군과 HK형의 CpG ODN군과 IL-6, TNF- α 와 IL-12의 mRNA 발현양상이 유사하였다.(그림 8) 또한, BALB/c 마우스 비장세포를 분리하여 배양 후 Th1 cytokine의 INF- γ , IL-6, TNF- α , IL-12mRNA 발현은 MK, HK형의 대부분의 CpG ODN군에서 IL-6, 와 IL-12 cytokine mRNA 발현의 차이가 없었다. HK-12, HK-13 CpG ODN은 모두 우수한 Th1 cytokine 분비가 유도되었다. (그림 9)

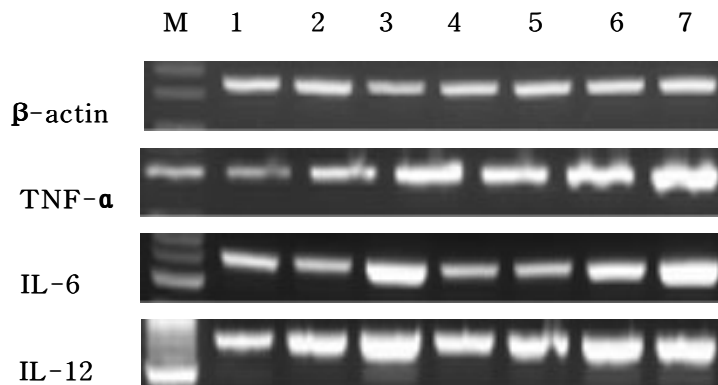


그림 8. BALB/c마우스 복강의 대식세포의 CpG ODN에 의한 Th1 형cytokine mRNA 발현

M. Size marker, lane 1. Meida only, lane 2. MK-1, lane 3. MK-2, lane 4 HK-7, lane 5. HK-12, lane 6. HK-13, lane 7. LPS

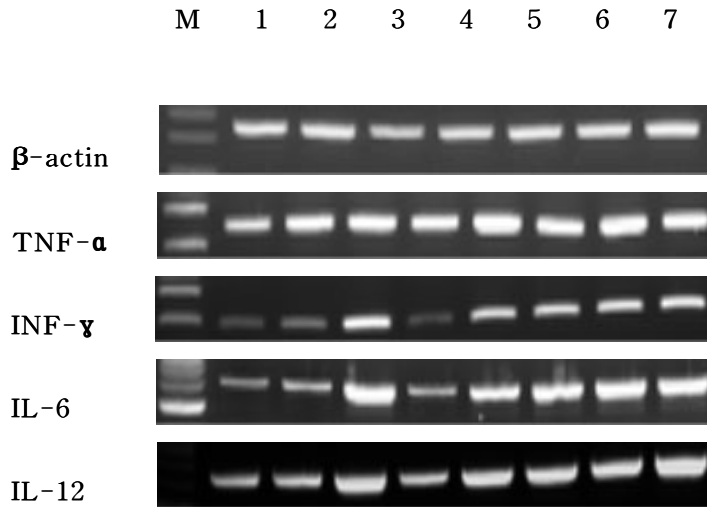


그림 9. BALB/c마우스 비장세포의 CpG ODN에 의한 Th1 cytokine mRNA 발현
 M. Size marker, lane 1. Meida only, lane 2. MK-1, lane 3. MK-2, lane 4
 HK-7, lane 5. HK-12, lane 6. HK-13, lane 7. LPS

또한, BALB/c 마우스와 비교하여 HK-13 CpG ODN을 이용한 C57BL/6마우스의 비장세포의 cytokine 발현을 비교한 결과 IL-6, IL-12 모두 두 종류의 실험동물에서 유사하게 증가하였다. (그림 10)

C57BLI/6 비장세포를 분리 배양하여 HK-13 CpG ODN 1 μg/ml 을 처리하여 활성화 한 후 IL-6, 와 IL-12의 cytokine mRNA 발현 결과 IL-6은 12시간, 24시간 발현 되었고 IL-12는 배양 후 1시간 후 부터 발현되었다. (그림 11)

BALB/c 마우스에 CT-26 세포를 1×10^6 /ml 정맥 내 접종 후 HK-13 CpG ODN을 각각 2일, 6일째 정맥 치료 후 대조군에 비교하여 IL-12의 유전자 mRNA 가 발현되었으나, IL-6 유전자 mRNA의 발현은 나타나지 않았다. 13일째 치료결과는 IL-12의 유전자 mRNA가 발현되지 않았으나, IL-6 유전자 mRNA의 발현이 나타났다. (그림 12)

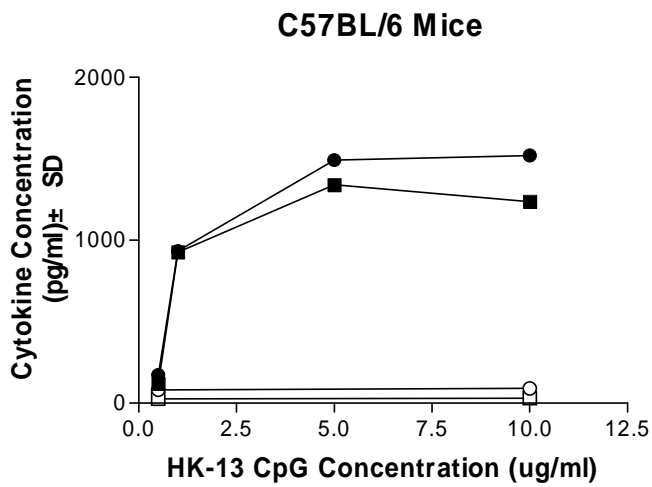
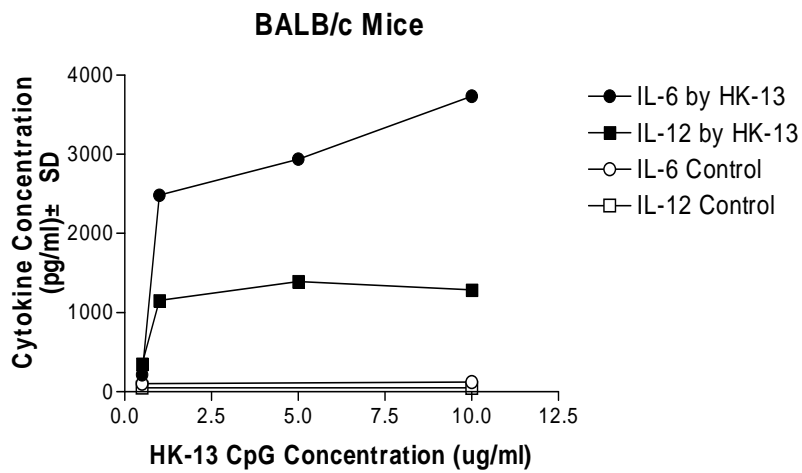


그림 10. C57BL/6와 BALB/c마우스 비장세포에서 HK-13 CpG ODN에 의한 IL-6, IL-12 cytokine 분비

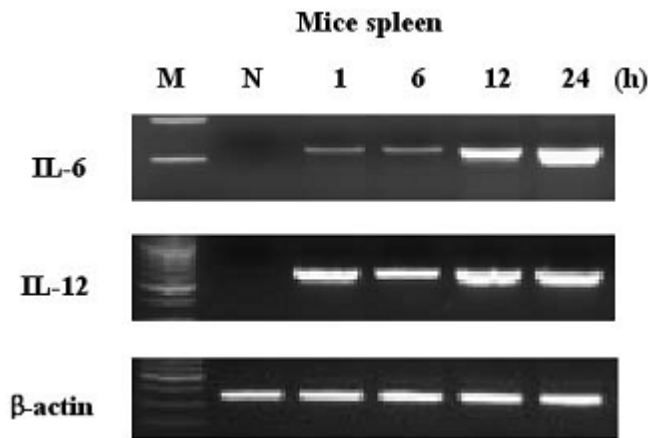


그림 11. C57BL/6 마우스 비장세포에서 HK-13 CpG ODN에 의한 IL-6, IL-12의 cytokine mRNA 발현 N: medium-treated control.

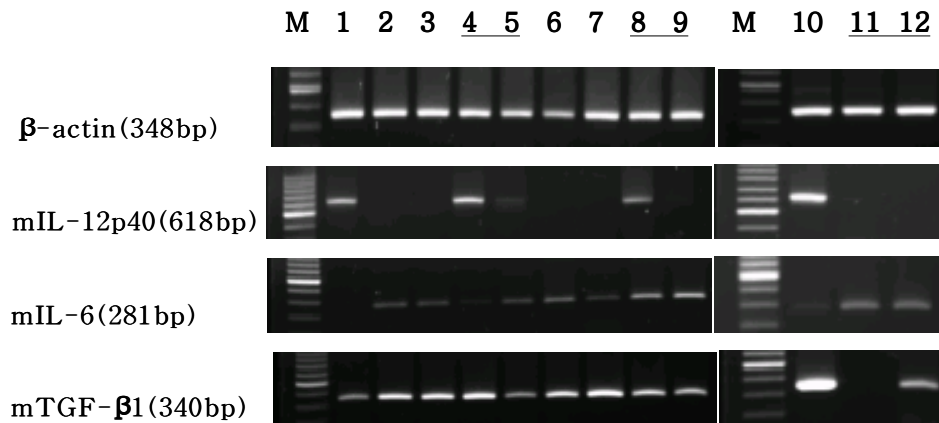


그림 12. CT-26 정맥 접종 후 HK-13 CpG ODN으로 정맥 치료 후 BALB/c 마우스의 비장세포에서 cytokine 유전자 mRNA의 발현
 Lane 1: Control mouse PBS on Day 2 , Lane 2,3: CT-26 only on Day 2, Lane 4,5: CT-26 + HK-13 on Day 2, Lane 6,7: CT-26 only on Day 6, Lane 8,9: CT-26 +HK-13 on Day 6, Lane 10 : CT-26 only on Day 13, Lane 11,12: CT-26 + HK-13 on Day 13

6. 세포증식 검사 결과

MK-1 MK-2, HK-12, HK-13 CpG ODN 치료 군과 대조군의 비장세포를 5×10^4 개 추출, 분리하여 배양 후 세포증식 능의 결과는 마우스형인 MK-2에서 배양 후 48시간에서 가장 증식능이 높았으며 HK-13형은 HK-12에 비하여 높은 세포증식능을 보였다. (그림 13)

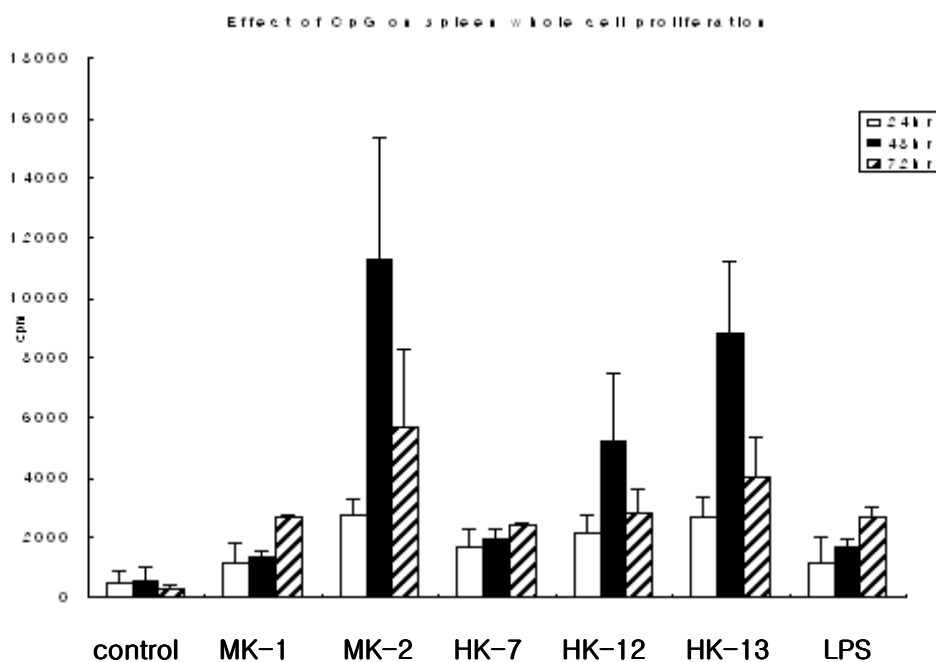


그림 13. HK-13 CpG ODN 치료 후 비장세포의 세포증식

7. 자연살해세포의 살상능 측정

여러 CpG ODN을 정맥투여 후 작동세포가 있는 비장세포를 분리하여 5×10^3 개의 ^{51}Cr -labeled YAC1 표적세포에 희석하여 반응시켜 자연살해세포의 살상능을 측정한 결과 MK-2가 가장 높은 살상능을 보였고 HK-13에서도 유사한 자연살해세포의 살상능이 있었다. (그림 14)

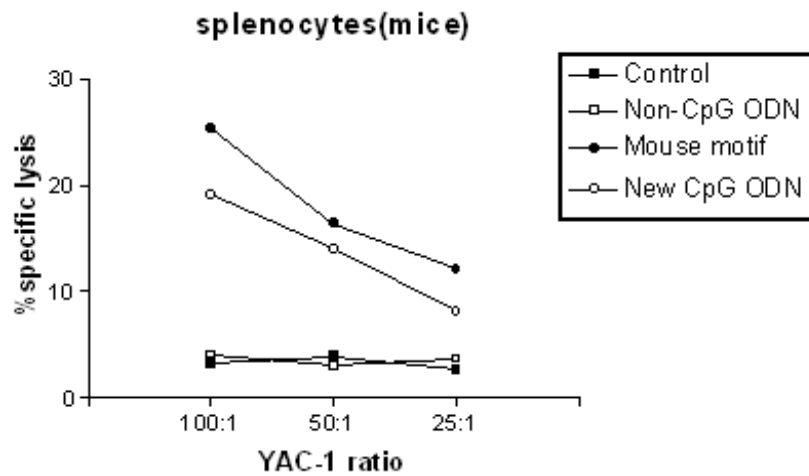


그림 14. 마우스비장 세포에서 Chromium방출법에 의한 자연살해세포의 살상능 측정

8. CpG ODN의 직접 독성 측정

가. CT-26세포주에 대한 CpG ODN의 직접적인 세포독성측정인 MTT assay 결과 HK-13 CpG ODN은 10 μ g의 농도에서 독성이 관찰되지 않았다. (그림 15)

나. DNA 분절 분석결과

CT-26 세포주의 HK-13 CpG ODN에 의한 핵산 분절분석으로 인하여 세포에 대한 세포자멸사 (apoptosis)유도 되는지 여부를 확인하고자 세포에 HK-13CpG ODN을 0.1 μ M 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M의 농도로 각각 처리하고 겔전기영동 결과 핵산 분절에 의한 사다리가 관찰되지 않았다. (그림 16)

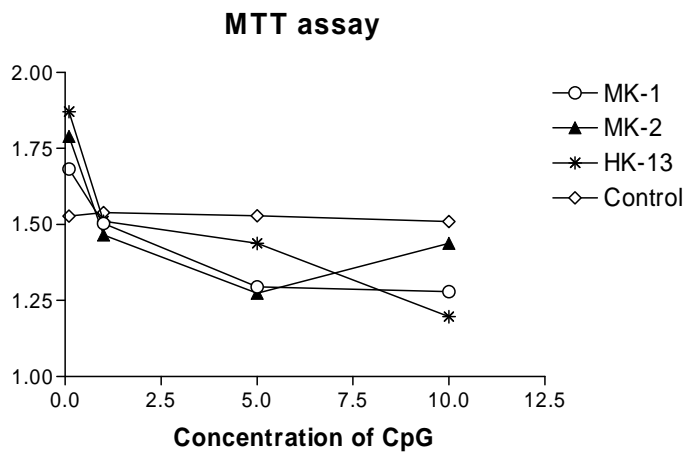


그림 15. CT-26 세포주의 CpG ODN에 의한 직접세포독성 측정결과 (MTT assay)

M C 1 2 3 4 5

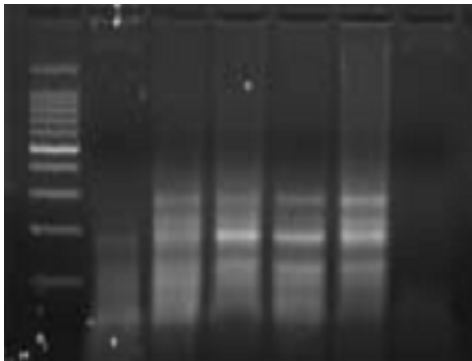


그림 16. CT-26 세포주의 CpG ODN에 의한 DNA 분절 분석

Lane M, DNA marker Lane C. Control lane 1. MK-1 CpG, lane 2. HK-13; 0.1 μ g, lane 3. HK-13 1 μ g, lane 4. HK-13 (5 μ g), lane 5. HK-13(10 μ g)

IV. 고찰

최근 대장암의 항암치료는 새로운 항암화학제와 생물학적 표적치료제가 임상에서 사용되고 있으나 최적의 치료 방법은 아직 정립되지 않았다³.

면역치료는 기존의 화학요법 및 방사선치료에 비하여 독성이 적고 종양에 대항할 수 있도록 선천 및 적응면역세포를 활성화 시켜 종양에 특이적으로 작용하는 것으로 알려져 매우 유망한 첨단 치료방법으로 각광받고 있다. 종양세포를 면역학적으로 치료하려는 시도는 숙주나 사람의 항암면역을 직접 증가시키는 방법과 외부로부터 항암면역반응 물질을 주입하는 수동적 방법으로 나눌 수 있다. 항암면역을 증가시키는 방법으로 면역기능의 자극을 유도시키는 방법은 BCG, CpG ODN이나 CD3 항체 등을 사용하여 T 세포를 비특이적으로 활성화 시키는 것이 그 예이며 종양세포에서 추출되는 heat shock protein (gp96, hsp 70) 등은 항암면역반응의 자연적인 어쥬반트(adjvant)로서 관심의 대상이 되고 있다⁵.

그 중 유망한 면역 어쥬반트의 하나로 Toll like receptor (TLR) 9을 조절하는 리간드인 CpG ODN가 최근 주목을 받고 있다. CpG ODN은 선천면역의 감지수용체인 TLR9과 특이 결합하여 세포내부로 면역신호전달을 촉발하며 이차적으로 다양한 선천 면역세포 및 적응 면역세포를 자극하여 항종양효과 및 T 세포 및 B 세포의 활성화로 인한 보호항체생성 및 세포독성 특이 림프구의 활성을 유도하여 강력한 항종양효과를 나타낸다고 한다^{7,8,11}.

최근까지 사람과 마우스에서 11개의 TLR의 유전자가 밝혀져 있다. 현재 TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR9 등의 여러 TLR들의 리간드들이 밝혀져 있으며 이들은 대부분 병원체로부터 기인되며, 숙주에는 없는 것으로 이중 TLR 9은 미생물 등의 침입을 인지하는 중요한 감지수용체로 알려져 있다^{11,13}.

CpG ODN을 이용한 임상연구로 비소세포성 폐암 및 흑색종 등에서 좋은 치료효과가 보고되고 있다. Leichman 등은¹⁴ 자체 합성한 CpG ODN 7909를 이용하여 이전에 치료받지 않았던 진행성 소세포폐암 환자에서 일차약제로서 효과를 무작위 대조연구를 보고하였고, Wagner 등은¹⁵ 전이성 흑색종에서, Jahrsdorfer 등은¹⁶ B세포

림프종에서의 연구를 보고하였다. 이들 모두 2상 및 3상의 임상시험에서 유의한 치료성적을 보고하여 CpG ODN가 암치료의 선호하는 면역 어쥬반트로 부각되고 있다.

그러나 대장암에서의 CpG ODN의 효과는 아직 전 임상수준으로 현재까지 임상적인 적용을 위한 충분한 의학적인 근거가 부족하고 그 기전과 다양한 CpG ODN의 비교연구는 매우 미흡하다. 본 연구의 목적은 대장암의 치료제 후보물질로서 CpG ODN을 이용하여 대장암의 종양억제 효과와 생존율을 관찰하고 인간형으로 생각되는 신규 개발된 CpG ODN (HK-13)을 활용하여 종양억제 능력과 그 치료 기전을 밝히고자 하였다.

본 연구에서 CT-26 대장암세포를 BALB/c 마우스에 피하 접종 후 여러 종류의 CpG ODN을 각각 5차례 마우스 $20\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 을 주사 하였으며 치료 후 각 군의 종양의 평균 용적은 대조군과 HK-13 CpG ODN 군 간의 차이가 있었다. 또한, MK-1 CpG ODN과 HK-13 CpG ODN 군에도 유의한 차이가 있었다. (그림 2) 그러므로 새로운 CpG ODN은 기존의 마우스 형 motif와 유사한 종양억제효과가 있었다. 또한, 생존율 비교는 여러 CpG ODN을 대장암이 있는 BALB/c 마우스 복강 내에 투여한 후 대조군에 비하여 HK-13 CpG군, MK-2 군에서 차이가 있었고 MK-1군과 HK-13 군간의 생존 기간도 차이가 있었다. ($p<0.011$) (그림 3) 특히, HK-13 CpG ODN을 치료 한 동물은 70일 이후에도 생존하였다. 이러한 결과를 얻은 후 면역 반응의 기억능을 검사하기 위하여 이 실험 동물에 다시 CT-26 대장암세포를 복강 내에 재투여 한 후에도 장기간 생존하였다. 본 연구 결과에서처럼 신규형 CpG ODN를 처치 기억면역반응(memory immune response)를 나타낸 것으로 사료되어 소위 비특이적 치료제인 CpG ODN가 기억 면역치료로서 새로운 가능성을 시사한다고 사료된다.

CpG ODN의 구조는 염기 서열상 palindrome 존재 여부에 따라 K(B)형과 D형(A형)으로 나뉘고, 중심 염기 구조에 따라 마우스형과 인간형으로 나뉘게 된다. 먼저 A형은 염기서열 5' 또는 3'에 poly G (guanine)를 기저로 항원전달세포 (antigen presenting cell)을 자극하며 이는 많은 INF- γ 에 의한 매개로 이루어지며 수지상세포를 자극하여 항체생성을 유도하여 암세포에 Th1 및 항체면역반응을 거쳐 암세포를 살상한다. B형은 주로 수지상세포의 성장과 TNF를 생산하며 또한, B 림프구 세

포성장을 자극하여 Ig M과 Th1 형의 cytokine인 IL-6을 생성한다. 또한, 단핵구 활성 및 자연살해세포 활성이 강하여 직접적인 면역세포의 활성화를 유발하여 TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand)로 같은 암세포에 간접적인 세포독성을 유발한다. 마지막으로 C형은 최근 신규 합성물질들이 개발 되고 있는 이들 두 가지 장점을 갖는 것으로 INF- γ , Ig M과 IL-6, IL-10의 분비를 자극한다.

본 연구에 사용한 CpG ODN은 본 대학 미생물학교실에서 자체 개발하여 이미 타 종양모델(마우스 흑색종 및 T 세포 림프종)에서의 전이억제능력이 밝혀진 전임상연구의 후보물질로 인체에 적용 가능한 형으로 추정되고 있다^{11,14}. 본 실험에 사용한 것으로 먼저 MK-1형은 CpG motif 가없는 CpG ODN이고, 기존의 마우스 motif인 CpG ODN 1826 (MK-2)과 HK-12 CpG ODN을 신규 합성한 HK-13 CpG ODN과 비교하였다.

일반적으로 CpG ODN의 효과는 CpG dinucleotide motif의 수와는 무관하고 유사한 ODN의 구조, 용량 등에 의존한다고 알려져 있다. 본 연구에서는 BALB/c 마우스에 다양한 투여 경로태에 따라 다양하게 치료하였으며 독성을 고려하여 20 μ g 이상에서 더 이상 증량하지 않았다. 생존율을 관찰한 분석에서도 신규형인 HK-13 CpG ODN의 농도가 10 μ g이상으로 치료한 마우스에서 대부분 생존 기간이 연장되었다. CpG ODNs의 효과적인 투여용량에 대한 보고는 다양하여 한 연구에서는 신규 합성 CpG ODN에서 50 μ g 보다 100 μ g에서 두 배의 완전관해를 보여주었다. 더욱 증량하여 200 μ g에서까지도 100% 완전관해를 보여주었고 마우스도 비교적 양호하고 독성도 관찰되지 않았다. 그러나 Ballas 등은 종양주위에 최대 300 μ g을 주사하였으나 오히려 30 μ g 보다 효과가 적었다고 한다¹⁷. 이론적으로 마우스에 효과적인 용량을 사람에게 적용할 경우 10-50 μ g의 최적화된 농도로 사용할 수 있으며 현재도 종양에서 효과적인 최적의 농도와 용량은 독성과 함께 연구 중이다.

지금까지 알려진 CT-26 대장암이 있는 BALB/c 마우스에서 가장 효과적인 CpG ODN의 치료기전은 B 림프구와 마우스 수지상세포를 활성화시키고 자연살해세포를 활성화 시킨다는 것이다. 그러나 누드마우스에서도 종양의 성장을 지연시키고 이것은 자연살해세포에 의하여 조기에 종양을 제거하는 역할을 한다.

본 연구의 결과에서도 종류별 CpG ODN처리 후 비장 세포증식 검사 결과 배양

후 48 시간에서 신규형 HK-13 CpG ODN은 기존의 마우스 형과 유사한 세포증식 능력을 보였으며 아울러 CpG ODN을 처치 후 ⁵¹Cr-release assay에 의한 자연살해 세포의 살상능 측정에서도 HK-13 CpG ODN는 활성도가 증가하였다.

본 연구에서 HK-13 CpG ODN으로 치료 한 마우스는 장기 생존하여 방어면역 반응으로 기억면역능이 있음을 보여주었다.

Ninalga 등은¹⁸ 어쥬반트로서 BCG 와 CpG ODN를 비교한 연구로 MB49 마우스 방광암세포주의 동소이식모델에서, CpG ODN 1668을 네 차례 치료 한 경우 8마리 중 5마리가 100일 이상 생존하였으며 역시, BCG로 치료한 경우에서도 장기생존은 하였으나 완치는 없어 결국 BCG의 면역반응은 면역기억 능력이 없다고 하였다.

방광암 모델의 CpG ODN 치료로 마우스모델로 방광암세포주인 MB49를 재접종 한 경우 61%가 면역이 되었으며 MB49 재접종 후 생존한 마우스를 순계 마우스종양 LLC-1로 접종 후에 24 일내 대부분 LLC-1 종양의 성장을 억제하였다고 하며 이것은 CpG ODN의 면역기억반응으로 사료된다²². 유도된 LLC-1은 매우 면역성이 높아 C57BL/6 마우스에서 조차 100% 종양이 형성되지 않아 실제로 CpG ODN로 치료된 마우스가 MB49에 특이적으로 장기간 방어면역을 갖고 있음을 보여 주었다.

한편, 암백신 치료의 비교연구로 아데노바이러스(adenovirus)를 매개로 하는 백신치료와 CpG ODN를 단독, 혹은 병용 투여하는 비교연구에서 아데노바이러스가 상승효과가 없다는 보고가 있다. 즉, 수지상세포와 재조합 아데노바이러스 백신인 AD40L, AdIL-15, 그리고 AdMock 는 모두 오히려 CpG ODN를 단독으로 투여하는 경우와 비교하여 종양 억제효과면에서 차이가 없었다고 한다¹⁹. 실제 결과는 재조합 아데노바이러스 치료시 생체에서 혈청내 IL-12의 농도가 CpG ODN 경우보다 높지 않았으며 대조군인 PBS나 아데노바이러스를 매개로한 단독치료군과 유사하였다¹⁹. Krieg 등은²⁰ 이러한 이유가 아데노바이러스의 DNA 사슬 구조의 일부가 중화적인 motifs를 갖고 있어 CpG ODNs의 면역효과를 억제한다고 한다. 그러므로 이 결과는 CpG ODN의 단독치료가 효과적이라는 고무적인 결과이기도 하다. 실제 Heckelsmiller 등은²¹ CT-26 대장종양 마우스에 CpG ODN 단독으로 치료시 종양을 재 접종시 방어면역효과로 항종양효과를 이끌어내었다.

이러한 기전은 CT-26 대장종양을 재접종 시에 비장세포에서 CD8 T 세포 의존

성 종양용해능력을 보여주는 방어효과로 Kawarada 등도²⁹ 다른 CT-26 대장암을 이용한 CpG ODN 단독치료시, NK세포와 또는 CD8 T 세포가 관여하는 CpG ODN에 의한 항종양효과를 보여주었다. 이것은 아직 논란이 있지만 비장의 T 세포군이 방어 면역에서 관찰되는데, 비록, CD4 T 세포가 기억 작동세포로서 밝혀진 역할을 하지만 부분적으로는 CD8 세포독성 T 세포가 관여 할 수도 있다고 한다²².

실험적인 암에 대한 가장 효과적인 면역치료는 대개 Th 1 반응을 야기하는 것으로 알려져 있고 이는 T 독성세포 효과세포 뿐 아니라 IL-12 나 IFN- γ 와 같은 Th 1형 cytokine에 의한 반응의 증가로 특이적으로 인지되거나 악성세포를 살상하는 능력이 있다고 한다. 본 연구결과에서 BALB/c 마우스 복강 내에서 분리한 대식세포를 분리하여 CpG ODN을 12시간 배양하여 표적 Th1 cytokine mRNA 발현을 RT-PCR 을 이용하여 측정한 결과 MK-2 CpG ODN군과 HK형의 CpG ODN군 모두 IL-6, TNF- α 와 IL-12의 mRNA 발현이 유사하였다. 또한, 비장세포를 배양한 결과에서도 MK, HK형 대부분의 CpG ODN군에서 IL-6, 와 IL-12 cytokine mRNA 발현이 유사하였다. 즉 신규형인 HK-13 CpG ODN에 모두 우수한 Th1 cytokine 분비가 유도 되었다.

대장암을 포함한 종양에서 cytokines의 분비는 면역계의 활성을 나타낸다. 대장암의 비특이적 염증세포, Th 1, Th 2 cytokine 활성도를 측정한 연구에서 25개의 종양/정상점막 조직에서 cytokines를 real-time PCR로 측정한 결과는 IL-1 α , IL-4, IL-5와 TNF- α 는 종양조직에서 정상에 비하여 의미 있게 발현이 증가하였고 IL-2는 감소하였다²³. 대장암에서 cytokine의 유형은 종양조직에서 IL-1 과 TNF- α 가 높게 발현되어 강력한 비특이적 염증반응을 보여주고 낮은 IL-2의 발현은 소위 Th1형이라는 특이적인 면역반응을 시사하여 이것으로 종양의 국소면역의 탈출 기전의 원인 또는 결과가 될 수 있을 것이다.

CpG ODN를 사용하는 이론적 근거도 수지상세포의 성숙과 Th1 반응을 유도 활성화 하는 효과가 입증된 것이 있다²⁴. 또한, CpG ODN의 작용 중 수지상세포에 주는 영향은 아마도 NF- κ B를 활성화하고, Th1 환경을 만들어서 종양에 대한 강력한 세포독성림프구 반응을 활성화시키는 것이다²⁵. 합성 CpG ODN은 수지상세포에서 더욱 많은 IL-12 p40 와 IL-18 mRNAs를 발현한다. cytokine분석은 IL-12

(IL-12 p70 + IL-12 p40 혼합형태) 이었고 실제, CpG ODN 1826 수지상세포를 이용하여 백신 치료한 경우에 생체 종양내 T 세포가 증가하였다. 이러한 결과는 수지상세포가 종양에 자연살해세포와 CD8+T 세포의 활성화를 통하여 세포독성반응을 증가시키는 능력을 나타낸다^{22,26}. 또한, 특정 Cytokine, GM-CSF 유전자를 세포에 삽입하는 암백신 후 재주입 할 경우에 항원전달세포인 수지상세포의 분화촉진을 유도하여 T 림프구를 활성화하고 이 활성화 된 림프구로부터 IL-2, IL-4, IL-12, IFN- γ , TNF- α 의 생산, 분비되어 면역작용을 나타낸다⁵.

본 결과에서 HK-13 CpG ODN을 이용한 C57BL/6마우스의 cytokine 분비 유도를 비교한 결과 IL-6, IL-12 모두 두 종류의 실험동물에서 유사하게 증가하였다. 특히, HK-13 CpG ODN 치료 후 C57BL/6 비장세포를 배양하여 IL-6, 와 IL-12의 분비의 결과 IL-6은 12시간, 24시간 발현 되었고 IL-12는 배양 1시간 후 부터 발현되었다.

BCG를 제외하고는 CpG ODN이 GM-CSF보다 수지상세포를 더 활성화하고, 성장시키며 그 기능은 Th1 같은 T 세포반응을 증진시킨다고 한다 즉, 흑색종 마우스에서 종양단백질을 CpG 치료와 병용하여 T 세포의 독성능을 10-100배 증가시키고 종양의 성장을 지연하고 생존기간을 연장시켜 CpG의 종양내 주사 후 종양의 미세환경하에서 면역자극과 종양림프구의 침윤은 암의 면역치료에 새로운 접근방법임을 나타낸다²⁷.

신규형 HK-13CpG ODN을 이용한 대장암 마우스모델의 생체에서 면역학적 기능 측정평가는 비장세포의 자연살해세포, 대식세포의 cytokine mRNA 유전자의 발현조사를 통하여 BALB/c마우스와 C57BL/6 마우스 복강의 대식세포와 비장내 단핵세포를 분리하여 cytokine 유전자의 발현을 확립된 조건의 중합효소연쇄반응을 이용하여 측정하였다.

본 연구에서는 BALB/c 마우스에 CT-26 대장암세포를 정맥내 접종한 전이모델에서 HK-13 CpG ODN으로 정맥 치료 후 cytokine IL-12의 mRNA가 발현되었으나, IL-6 mRNA의 발현은 없었다. 치료 13일에는 IL-12의 mRNA가 발현되지 않았으나, IL-6 유전자 mRNA의 발현되었다.

이상에서 본 연구에서 CT-26 대장암 모델에서 신규형 HK-13 합성 CpG ODN

은 강력한 Th 1 반응을 증진시키고 전신면역을 유도하고 종양의 피하 성장을 억제 하였다. 이는 MB49 방광암 마우스모델에서도 CpGODN은 강력한 Th1 반응을 증진 시키고 전신의 면역과 피하 뿐 아니라, 동소 이식된 모델에서도 종양을 억제한 보고 와 유사하다²⁸.

또한, 앞서 언급한대로 CpG ODN를 치료하는 경우에 수지상세포를 이용하거나 보조하여 활성화시키는 것이 필요할 수 있다. 또한, 수지상세포를 이용한 cytokine 연구에서 CpG ODN에 비교하여 BCG가 있다 Atkins 등은²⁹ CpG ODNs 와 BCG 모두 수지상세포 을 자극하여 IL-12를 생성하나 CpG ODN와는 달리 BCG 는 IL-10을 생성하였다고 하였다^{29,30}. Furumoto 등은³¹ 이런 경우 결국 수지상세포의 수가 증가해야 한다고 하며 cytokine 이외에 실제 CCL20/대식세포염증성 단백질 (macrophage inflammatory protein)인-3a 케모카인을 종양의 수지상세포에 부착하여 CT-26 종양의 항종양반응을 효과적으로 얻었다.

CpG ODN는 인간과 마우스에서 효과가 뚜렷하고 종 특이적이라 한다²⁷. 만일 임상적으로 치료를 적용 한다면 몇 가지를 고려해야 하며 첫째, 마우스의 면역계를 자극시키는 CpG motif가 인간의 면역세포를 활성화하는데 적절한 CpG ODN인지를 선택해야한다. 이러한 종간의 차이는 CpG motifs의 수용체인 TLR9가 종 특이적인 성질에 의한다. 인간에서는 면역계에서 다른 효과가 있는 몇몇 활성도가 높은 CpG ODN가 있다¹¹. CpG ODN가 종특이적인 면이 있지만 본 연구결과는 인간형이 마우스에서도 면역작용을 하는 것으로 나타나 신규형 합성 CpG ODN이 종 특이성을 넘 는 강력한 효과를 기대 할 수도 있겠다.

투여 방법의 경우 앞서 대부분의 보고에서 CpG ODN를 종양주위에 단독으로 치료를 고려할 수 있으며 이러한 경우 CpG ODN의 투여기간과 시기가 다소 늦어지는 경우에는 효과가 감소하므로 실제 환자에서 큰 종양을 치료하기 위해서는 충분치 않은 것 같다. 그러나 CpG ODN를 종양주위에 투여하는 치료는 수술, 항암화학치료 등과 같은 다른 암의 표준치료 뿐만 아니라 면역치료라는 보조적인 치료의 접근이 될 수 있다. 특히 수술 전에 종양주위에 단독으로 CpG ODN를 투여하는 새로운 보조요법(neoadjuvant) 개념으로 전신 면역반응으로 잔존종양이나 미세전이를 치료하고 또한, 재발을 예방할 수 있을 것이다.

항암화학치료와 병용하는 면역치료의 효과를 판정하기란 간단하지는 않으나 항암치료 중에도 면역기능이 정상이고 장기 생존한다면 면역기능의 방어현상을 보여 줄 것이다 그러므로 면역치료 단독 치료한 경우 보다 항암치료를 병용한 경우에 더 효율적이다. 본 연구의 제한점은 대장암마우스 모델에서 주로 신규 인간형 CpG ODN의 단독처치군만 이루어 졌으나 항 후 항암화학치료와 방사선치료와의 병용투여시 상승효과와 또한, 수지상세포를 이용한 치료를 적용하여 비교 한 연구가 필요 할 것이다. 둘째, CT-26 대장암세포 세포의 대장암 전이모델은 BALB/c 마우스에 CT-26 대장암 세포를 정맥에 접종 후 신규형 CpG ODN 정맥치료 후 간과 폐로의 전이 집락을 확인하였으나 맹장, 직장 등 동소부위에 종양을 이식 후 전이한 모델로서 적용하기에는 한계가 있다. 아울러 대장암 전이모델에서 실험동물의 혈청과 조직을 통한 발현 등의 연구가 없어 전이 억제기전의 연구로는 다소 제한적이다. 항 후 이에 대한 실험을 고려 할 수 있다. 또한 연구자는 주로 Th1 cytokine형태의 면역세포 등의 실험을 시행하였으나 면역계가 Th1과 Th2 간의 항상성 균형이 매우 중요함을 고려할 때 더욱 다양한 Th2 면역 반응의 감소가 증명되어야 하겠다. 항 후 대장암에서 임상적인 적용의 연구를 필요로 하며 대장암의 마우스 다양한 전이모델이 필요할 것으로 사료된다.

본 연구의 면역학적 결과를 요약하면 CpG ODN의 항종양효과 기전은 몇 가지에 의해 추정 할 수 있다. 첫째, CpG에 의하여 자연살해세포가 cytokine에 의하여 활성화되고 CD8+ T 세포반응과 종양특이 기억을 자극하였다. 둘째, CpG ODN은 능동면역에 관여하는 TNF- α , IL-12, IL-6 등의 Th1형의 cytokine 생성을 증가시켰다.

V.결 론

CpG ODN는 TLR 9를 조절하는 리간드로서 선천면역을 자극하여 암세포에 Th1 및 항체면역반응을 거쳐 항종양효과와 TLR외에 다른 신호전달 수용체와도 반응하여 직접적인 암세포독성을 유발한다. 본 실험에 사용한 신규형 CpG ODN은 신규물질로서 인체에 적용 가능한 형으로 추정되고 대장암 마우스모델에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CT-26 대장암 이식 마우스모델에서 신규 합성 인간형 CpG ODN(HK-13)은 BALB/c 마우스에서 기존의 마우스형 CpG ODN과 유사하거나 보다 우수한 종양 성장 억제효과와 생존율을 보였다.
2. 신규 인간형 CpG ODN으로 치료한 마우스 중 일부에서는 장기 생존하였으며 CT-26세포를 재이식 한 후에도 생존하여 면역반응의 기억 면역능력이 있는 것으로 사료되었다.
3. 신규형 CpG ODN은 마우스대식세포에서 TNF- α , IL-6, IL-12 mRNA가 발현되었고 비장에서는 IFN- γ , TGF β mRNA가 발현되어 Th1 형의 cytokine이 발현 되었다.
4. 신규형 CpG ODN은 면역세포증식을 보였으며 자연살해세포의 살상 능력이 있었다.
5. 대장종양을 이식한 마우스에서 인간형 CpG ODN은 마우스형 CpG ODN과 유사 혹은 강력한 면역반응이 증명되었다.

신규형 CpG ODN의 치료는 선천면역세포의 직접적인 활성화와 Th1 형태의 cytokine을 매개로 하는 것을 확인하였다. 본 연구의 결과 신규형 합성 CpG ODN가 면역치료로서 새로운 가능성을 시사한다고 사료된다. 향후 단독 또는 항암제와의 병용요법과 치료가능성이 있으며 향후 면역 기전에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. 한국인 암등록사업 조사자료분석 보고서, 2003 보건복지부, 2003
2. 통계청 2003년 사망원인 통계 자료, 통계청, 2005년
3. 대한대장항문학회 편저. 대한대장항문학회 총서 1. 대장암의 항암요법. 의학문
회사. 2004,17-36.
4. Mokyr MB, Dray S. Interplay between the toxic effects of anticancer drugs
and host antitumor immunity in cancer therapy. *Cancer Invest* 1987;5:31-8
5. Blattman JN, Greenberg PD. Cancer immunotherapy: a treatment for the
masses. *Science* 2004;305:200-5.
6. Uyl-de Groota CA, Vermorkenb JB, Hanna G, Verbooma JP, Groota MT,
Bonseld GJ, et al Immunotherapy with autologous tumor cell-BCG vaccine
in patients with colon cancer: a prospective study of medical and economic
benefits *Vaccine* 2005; 23:2379-87.
7. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R,
Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct
B-cell activation. *Nature* 1995; 374: 546-9.
8. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu
Rev Immunol* 2002; 20: 709-60.
9. Maeda, H, Shiraishi A. TGF- β contributes to the shift toward
Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in
tumor-bearing mice. *J. Immunol* 1996;156: 73-8.
10. Pellegrini P, Berghella AM, Del Beato T, Cicia S, Adorno D,
Casciani, CU. Disregulation in TH1 and TH2 subsets of CD4-T cells in
peripheral blood of colorectal cancer patients and involvement in cancer
establishment and progression. *Cancer Immunol. Immunother* 1996;42: 1-8.

11. Klinman DM. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol* 2004;4:249-59.
12. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway Jr. CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-7.
13. Kawai T, Akira SC. Pathogen recognition with Toll-like receptors, *Current Opinion in Immunology* 2005, 17:338-44
14. Leichman G, Gravenor D, Woytowicz D, Mezger J, Albert G, Schmalbach T, Al-Adhami M, Manegold C. CpG 7909, a TLR9 agonist, added to first Line taxane/platinumfor advanced non-small cell lung cancer, a randomized, controlled phase II study. *J Clin Oncol Pro ASCO.* 22, 2004: 7126.
15. Wagner SN, Pashenkov G, Goess C, Wagner A, Schneeberger A, Krieg AM, Stingl G. TLR9-targeted CpG immunostimulatory treatment of metastatic melanoma: a phase II trial with CpG 7909 (ProMune). *J Clin Oncol* 2004;22:7513.
16. Jahrsdorfer B, Muhlenhoff L, Blackwell SE, Wagner M, Poeck H, Hartmann E, Jox R, Giese T, Emmerich B, Endres S, Weiner GJ, Hartmann G. B-cell lymphomas differ In their responsiveness to CpG oligodeoxynucleotides. *Clin Cancer Res* 2005;11: 1490-9.
17. Ballas ZK, Krieg AM, Warren T, Rasmussen W, Davis HL, Waldschmidt M, Weiner GJ. Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxynucleotides with distinct CpG motifs. *J Immunol* 2001;167: 4878-86.
18. Ninalga C, Loskog A, Klevenfeldt M, Essand M, and Thomas H. CpG Oligonucleotide Therapy Cures Subcutaneous and Orthotopic Tumors and Evokes Protective Immunity in Murine Bladder Cancer *J Immunother* 2005;28:20-7.

19. Wagner M, Poeck H, Jahrsdoerfer B, et al. IL-12p70-dependent Th1 induction by human B cells requires combined activation with CD40 ligand and CpG DNA. *J Immunol.* 2004;172:954-63.
20. Krieg AM, Wu T, Weeratna R, et al. Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc Natl Acad Sci USA.*1998;95:12631-36.
21. Heckelsmiller K, Roll K, Beck S, Schlamp A, Seiderer J, Jahrsdorfer B, Krug A, Rothenfusser S, Endres S, Hartmann G. Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model. *J Immunol* 2002;169:3892-9.
22. Lanzavecchia A, Sallusto F. From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. *Curr Opin Immunol* 2000;12:92-8.
23. Baier PK, Wolff-Vorbeck G, Eggstein S, Baumgartner U, Hopt UT Cytokine expression in colon carcinoma *Anticancer Research* 2005;25 : 2135-9
24. Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, et al. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG ODN trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 1998;28:20:45-54.
25. Arnold J, de Boer EC, O'Donnell MA, et al. Immunotherapy of experimental bladder cancer with recombinant BCG expressing interferon-gamma. *J Immunother.* 2004;27:116-23.
26. Kawarada Y, Ganss R, Garbi N, Sacher T, Arnold B, Hammerling GJ. NK- and CD8(+) T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2001;167; 5247-53
27. Hartmann G, Krieg AM. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 2000; 164:944-53.

28. Nishimura T, Iwakabe K, Sekimoto M, et al. Distinct role of antigenspecific T helper type 1 (Th 1 and Th 2 cells in tumor eradication in vivo. *J Exp Med.* 1999;190:617-27.
29. Atkins H, Davies BR, Kirby JA, et al. Polarisation of a T-helper cell immune response by activation of dendritic cells with CpG-containing ODN: a potential therapeutic regime for bladder cancer immunotherapy. *Br J Cancer.* 2003;89:2312-9.
30. Riemensberger J, Bohle A, Brandau S. IFN-gamma and IL-12 but not IL-10 are required for local tumour surveillance in a syngeneic model of orthotopic bladder cancer. *Clin Exp Immunol.* 2002;127:20-6.
31. Furumoto K, Soares L, Engleman EG, Merad M. Induction of potent antitumor immunity by in situ targeting of intratumoral DCs. *J Clin Invest* 2004;113:774-83.

ABSTRACT

Immunotherapeutic Efficacy of Novel CpG Oligodeoxynucleotide in Murine Colon Cancer Model

Ik Yong Kim

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Soo-Ki Kim)

TLR 9 (Toll like receptor 9) agonist is potent innate immune booster. As a prototype of TLR9 ligand, synthetic oligodeoxynucleotides (ODN) holding unmethylated deoxycytosine–deoxyguanosine (CpG) motifs has been entered immunotherapeutic clinical trial against infection (i.e, hepatitis B, C), tumor or asthma. In particular, the clinical application of CpG ODN as anti-cancer immunotherapeutics has been limited in several types of cancer such as lymphoma, lung cancer. Colorectal carcinoma is one of the most common malignancies in the Western world. Despite intensive research and the introduction of new therapies, the prognosis of colorectal cancer is still static. Moreover, CpG ODN based immunotherapy in patients with advanced colorectal cancer has not been conducted. As a preclinical test toward clinical trial, we attempted the immunotherapeutic impact of novel CpG ODN in the CT26 murine colon cancer model. To dissect the therapeutic potential novel CpG ODN, *in vitro* and *in vivo* immune parameters are employed.

The results were as briefly synopsis:

1. Novel CpG (HK-13) ODN peritumoral injection on flank-formed CT-26 tumor clearly reduces tumor volume. Histologically, there were seen infiltration of macrophage, polymorphonuclear cells into the tumor tissue receiving CpG injection.
2. Novel CpG ODN therapy in CT-26 intraperitoneal tumor model significantly

prolonged the life span of tumor bearing BALB/c mice and, the rechallenge of CT-26 on the cured mouse verified complete protection against CT-26, suggesting that novel CpG ODN elicits a potent memory response.

3. *In vitro* treatment of novel CpG ODN on mouse peritoneal macrophages upregulated the mRNA expression of Th1 cytokine.
4. Consistently, novel CpG ODN treatment on BALB/c or C57BL/6 splenocytes induced IL-12, IL-6 release.
5. As effector cell response, novel CpG ODN provoked a definite *in vitro* proliferation of naive splenocytes at 48hr incubation and potently augmented natural killer cell cytotoxicity against YAC1 cell.

In summary, novel CpG ODN as mono-immunotherapeutics is effective in CT-26 murine colon cancer model. This therapeutic effect might be mediated by strong Th1 type immune augmentation.

Key words: CpG oligodeoxynucleotides (ODN), Toll like receptor, murine colon cancer, Antitumor activity, Survival, Immunotherapy, T helper type 1 Cytokine T(H)1