

세포고사된 마우스 악성 흑색종주와  
반응시킨 수지상세포의  
T 세포 자극 효과

연세대학교 대학원

의 학 과

정 우 길

세포고사된 마우스 악성 흑색종주와  
반응시킨 수지상세포의  
T 세포 자극 효과

지도 이 민 결 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2003년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

정 우 길

# 정우길의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2003년 6월 일

## 감사의 글

본 논문을 완성하기까지 모든 방면에 끊임없는 격려와 세심한 배려로 지도해 주신 은사 이민걸 교수님께 깊은 감사를 드리며, 또한 많은 관심과 교정의 노고로 격려해 주신 박전한 교수님, 정기양 교수님께 진심으로 감사드립니다. 연구 진행에 많은 도움을 주신 임상의학 연구센터의 이태형 선생님께도 깊은 감사를 드립니다.

끝으로 무한한 사랑으로 용기를 주신 부모님께 이 기쁨을 드립니다.

저 자 씀

그림 및 표 차례 .....	ii
국문요약 .....	1
<b>I. 서론</b> .....	3
<b>II. 재료 및 방법</b> .....	6
1. 마우스에서 수지상세포의 분리배양 .....	6
2. 세포고사 및 세포괴사 .....	7
3. 항원전달과 성숙인자 자극 .....	7
4. 실험군 .....	8
5. 수지상세포 표면항원의 변화 관찰 .....	9
6. 싸이토카인 분비 검사 .....	9
7. T 세포 증식 검사 .....	9
<b>III. 결과</b> .....	10
1. 마우스에서 수지상세포의 분리배양 .....	10
2. Mitomycin-C로 유도한 마우스 악성 흑색종 세포고사 항원 .....	10
3. 항원의 종류와 성숙인자 자극 유무에 따른 수지상세포의 표면항원 변화 .....	11
4. 항원의 종류와 성숙인자 자극 유무에 따른 수지상세포의 IL-12p70 생성 .....	11
5. 항원의 종류와 성숙인자 자극 유무에 따른 수지상세포의 T 세포 증식능 .....	12
<b>IV. 고찰</b> .....	18
<b>V. 결론</b> .....	21
참고문헌 .....	23
영문요약 .....	28

## 그림 차례

그림 1. 배양 6일째의 수지상세포의 표면항원의 발현 양상 .....	13
그림 2. Mitomycin-C 처리 후, 뜯 세포만을 채취하여 원심분리로 상청액을 제거한 마우스 악성 흑색종 세포의 조기 세포고사 .....	14
그림 3. 항원의 종류와 성숙인자 자극 유무에 따른 수지상세포 표면항원 변화	15
그림 4. 항원의 종류와 성숙인자 자극 유무에 따른 수지상세포 IL-12p70 생성	16
그림 5. 항원의 종류와 성숙인자 자극 유무에 따른 수지상세포 T 세포 증식능	17

국문요약

## 세포고사된 마우스 악성 흑색종주와 반응시킨 수지상세포의 T 세포 자극 효과

수지상세포(dendritic cell)는 형태학적으로 수상돌기를 갖고 있으며 가장 강력한 항원전달능력이 있어 일차 면역반응 및 T 세포매개 면역반응에 가장 중요한 기능을 수행한다. 최근 이러한 수지상세포를 사용하여 효과적으로 종양특이 세포독성 T 세포를 유도함으로써 생체의 항암 면역작용을 증가시키는 방법이 연구되고 있다.

세포고사(apoptosis)는 손상 받았거나 원하지 않는 세포를 생체 내에서 제거하여 생물의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다. 이때 수지상세포가 강력한 항원전달세포로 작용하여 세포고사된 항원을 T 세포에 전달하여 면역반응을 일으키는 것으로 알려져 있다. 세포고사된 종양세포가 수지상세포를 이용한 면역치료에 좋은 항원으로 사용될 수 있는 이유는 세포고사된 종양세포가 세포괴사(necrosis)된 종양세포에 비해 교차장전을 잘 일으켜서 CD8<sup>+</sup> T 세포를 더 잘 유도하여 결과적으로 종양억제 효과가 크기 때문이다. 하지만, 세포고사된 항원이 면역치료에 좋은 항원으로 사용되지 못한다는 상반된 연구도 많은데 이는 세포고사된 종양세포를 수지상세포가 T 세포로 항원전달할 때 필요한 성숙인자(maturation factor)의 부족이 그 이유로 생각된다.

이 실험에서는 마우스 악성 흑색종주(B-16/F10)를 mitomycin-C (50 µg/ml)로 48시간 동안 처리하고 뜬 세포(floating cell)만 채취한 후, 2500 rpm에서 5분간 원심분리하고 상청액(supernatant)을 제거한 후 남은 침전물(pellet)을 세포고사 항원으로 사용하였다. 세포괴사된 항원은 마우스 악성 흑색종주를 각 3분간 냉동과 해동을 3번 반복한 후 2500 rpm에서 5분간 원심분리하고 상청액만을 채취하

여 사용하였다. 이러한 세포고사와 세포괴사의 방법으로 처리한 마우스 악성 흑색종주를 배양 6일째의 미성숙 수지상세포와 함께 배양하여 항원을 전달하였다. 그 후 수지상세포를 성숙인자(CD40 ligand와 lipopolysaccharide)로 재자극한 후 표면항원(CD80, CD86, major histocompatibility complex(MHC) class II 분자)의 발현과 interleukin(IL)-12의 생성을 관찰하였고 T 세포 증식 정도를 조사하였다.

그 결과 각 실험군에서 단순히 항원만 처리하였을 때보다는 성숙인자를 추가한 경우, 더욱 증가된 표면항원의 발현과 IL-12 생성을 관찰할 수 있었다. 그리고 T 세포 증식 검사에서는 세포고사시킨 항원을 수지상세포와 배양한 후, 성숙인자로 재자극한 군이 세포고사시킨 항원과 배양하였으나 성숙인자로 재자극하지 않은 군이나 세포괴사시킨 항원을 사용한 군보다 더욱 강력한 T 세포 증식을 보였다.

이상의 결과로 수지상세포와 세포고사된 종양세포를 항원으로 반응시킨 후, 성숙인자를 추가하였을 때 표면항원의 발현과 IL-12 생성의 증가와 함께 강력한 T 세포 증식효과가 보임을 관찰하였다. 따라서 수지상세포에 세포고사된 항원을 처리한 후 성숙인자로 재자극하는 방법이 향후 더욱 강력한 종양면역 효과를 얻기 위한 방법으로 이용될 수 있으리라 생각된다.

---

핵심되는 말 : 세포고사, 수지상세포, 악성 흑색종, 성숙인자, T 세포 증식, IL-12

# 세포고사된 마우스 악성 흑색종주와 반응시킨 수지상세포의 T 세포 자극 효과

<지도교수 이민결>

연세대학교 대학원 의학과

정우길

## I. 서 론

수지상세포(dendritic cell, DC)는 형태학적으로 수상돌기를 갖고 있다<sup>1</sup>. 그리고 가장 강력한 항원전달능력이 있어 일차 면역반응 및 T 세포매개 면역반응에 가장 중요한 기능을 수행한다<sup>2,3</sup>. 항원가공능력이 발달되어 있으나, T 세포 자극능력은 약한 초기상태를 미성숙 수지상세포(immature DC)라 한다. 그리고 외부항원 등에 노출된 후 항원가공능력은 감소하고, T 세포 자극능력이 발달하며 동시자극 분자(costimulatory molecules)의 발현이 높아지면 성숙 수지상세포(mature DC)라 한다<sup>4-7</sup>.

수지상세포가 가장 강력한 항원전달세포로서 일차 면역반응을 일으키는 중요한 세포라는 것이 알려졌지만, 각 장기에 존재하는 수지상세포의 수가 너무 적어 연구에 제약이 많았다. 그러다가 1992년 CD34<sup>+</sup>세포를 granulocyte/macrophage colony stimulating factor(GM-CSF)와 tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$ 로 자극하여 수지상세포의 대량배양이 가능하다는 것이 보고되었고<sup>8-10</sup>, 그 후 말초혈액에서

약 5-10% 정도인 CD14<sup>+</sup>세포도 GM-CSF와 interleukin(IL)-4를 이용하여 수지상 세포로 배양이 가능하다는 것이 보고되어, 수지상세포 연구가 크게 활성화될 수 있었다<sup>11,12</sup>.

암환자에서는 여러가지 이유로 항원전달세포의 기능이 억제되어, 암세포의 항원이 정상적으로 T 세포에 전달되지 않아 암세포에 대한 세포독성 T 세포의 생성이 잘 되지 않는 것으로 알려져 있다<sup>13</sup>. 따라서 최근에는 가장 강력한 항원전달 세포인 환자의 수지상세포를 실험실에서 배양하고 여기에 환자의 암세포나 알려진 암세포 항원을 같이 배양하여 암세포 항원을 인지한 수지상세포를 만든다<sup>14</sup>. 이 수지상세포를 환자에게 투여하여, 수지상세포가 효과적으로 종양특이 세포독성 T 세포를 유도함으로써 생체의 항암 면역작용을 증가시키게 할 수 있다<sup>15,16</sup>.

특히 말기 악성 흑색종의 치료에 시험관에서 배양한 수지상세포를 이용하여 제한적이지만 희망적인 결과를 보고한 연구가 있으며<sup>17,18</sup>, 이를 계기로 다른 여러 종류의 암에서도 비슷한 연구가 시도되고 있다<sup>19-21</sup>. 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 많다<sup>22</sup>.

세포고사(apoptosis)는 손상 받았거나 원하지 않는 세포를 생체 내에서 제거하여 생물의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다<sup>23,24</sup>. 외부 항원을 major histocompatibility complex(MHC) class II 분자 뿐만 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 있다<sup>25-28</sup>. 따라서 수지상세포를 이용한 면역치료를 하는 경우에 세포고사된 종양세포가 종양특이 세포독성 CD8<sup>+</sup> T 세포를 더 잘 유도하여 종양살해 효과가 큰 것으로 보고되고 있다<sup>29-32</sup>. 또한 종양세포가 세포고사되면 면역원성(immunogenicity)이 높아진다는 보고도 있다<sup>33,34</sup>.

하지만, 상반되는 보고도 많다. 세포고사된 종양세포와 세포괴사된 종양세포가 함께 있는 혼합물이 더 좋은 항원으로 사용될 수 있다는 보고가 있으며<sup>35</sup>, 각각 세포고사와 세포괴사된 항원을 사용한 수지상세포의 치료결과가 동등하였다는 보고도 있다<sup>36</sup>. 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 가능성이 있다<sup>37</sup>. 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 시험관 실험(*in vitro*)을 통하여 확인하여 보다 효율적인 항암 면역치료 방법을 찾고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 마우스에서 수지상세포의 분리배양

6 내지 8 주령의 암컷 C57BL/6 마우스의 대퇴골과 경골에서 골수세포를 분리하였다. 보체매개 세포용해(complement-mediated cytolysis)와 표면항원 염색을 수행하기 위한 단클론항체를 얻기 위해서 다음과 같은 하이브리도마 세포주를 사용하였다(53-6.72 (anti-mouse CD8, rat IgG<sub>2a</sub>, ATCC TIB105), GK1.5 (anti-mouse CD4, rat IgG<sub>2b</sub>, ATCC TIB207), RA3-3A1/6.1 (anti-mouse B220, rat IgM, ATCC TIB146), M1/70 (anti-mouse Mac-1, rat IgG<sub>2b</sub>, ATCC TIB128), M5/114.15.12 (anti-mouse I-A<sup>b,d,q</sup> & I-E<sup>d,k</sup>, rat IgG<sub>2b</sub>, ATCC TIB120)). 하이브리도마 세포주에서 얻은 단클론항체를 이용하여 보체매개 세포용해를 일으켜서 T 세포, B 세포, 단구 등을 제거하였다.

세포제거 후 골수세포( $1 \times 10^6$ /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 우태아 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/ml 씩 추가하였다. 2일 간격으로 배지를 교환하면서 배양 6일째 채취하였다.

배양한 세포가 기대한 대로 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  $1 \times 10^6$  B16/F10 세포를 2.7 ml 배양배지에 부유시킨 후, mitomycin-C ( $50 \mu\text{g/ml}$ ; Sigma) 0.3 ml로 24시간, 36시간, 48시간, 그리고 72시간 동안 처리하여 뜬 세포(floating cell)만 채취하였다. 채취한 뜬 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 3 차례 반복 시행하였다. 이렇게 상청액을 제거하고 남은 침전물(pellet)을 세포고사 항원으로 사용하였다. 배양한 세포가 기대한 대로 세포고사된 것인지 유세포 분석기를 통하여 propidium iodide(PI)와 annexin-V (PharMingen) 염색으로 확인하였다.

세포괴사는 C57BL/6 마우스 악성 흑색종 유래 세포주인  $3 \times 10^5$  B16/F10 세포를 각 3분동안 냉동과 해동을 3번 반복한 후 원심분리를 2500 rpm에서 5분간 시행하고 상청액만을 채취하여 세포괴사 항원으로 사용하였다.

## 3. 항원전달과 성숙인자 자극

Mitomycin-C를 처리한  $3 \times 10^5$  B16/F10 세포를 원심분리하고 상청액을 제거한 세포고사 항원에 배양된  $1 \times 10^5$  수지상세포를 배양배지에 넣고 24시간 동안 함께 배양하였다. 그리고 냉동과 해동을 3 차례 반복한  $3 \times 10^5$  B16/F10 세포를 원심분리한 후, 채취한 상청액을 세포괴사 항원으로 사용하여 배양된  $1 \times 10^5$  수지상세포와 배양배지에 넣고 24시간 동안 함께 배양하였다. 성숙인자 자극 군에는 배양 마지막 12시간동안 성숙인자로 anti-CD40 ( $0.1 \mu\text{g/ml}$ ; HM40-3; PharMingen)와 LPS ( $10 \mu\text{g/ml}$ ; *E. coli* 026:B6; Sigma)를 첨가하였다.

#### 4. 실험군

제 1군:

항원을 처리하지 않은 수지상세포를 CD40 ligand와 LPS 자극 없이, sensitized T 세포와 배양

제 2군:

항원을 처리하지 않은 수지상세포를 CD40 ligand와 LPS 자극 후, sensitized T 세포와 배양

제 3군:

세포괴사된 항원과 반응시킨 수지상세포를 CD40 ligand와 LPS 자극 없이, sensitized T 세포와 배양

제 4군:

세포괴사된 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

## 5. 수지상세포 표면항원의 변화 관찰

배양된 수지상세포가 성숙되었는지 유세포 분석기로 수지상세포의 표면항원인 CD11c, MHC class II, CD40, CD80, CD86 분자의 항체로 확인하였다.

## 6. 싸이토카인 분비 검사

수지상세포를 세포고사와 세포괴사된 B16/F10 세포로 자극하였을 때, 배양 24 시간 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.

## 7. T 세포 증식 검사

비장 유래 T 세포는 6 내지 10주령의 암컷 C57BL/6 마우스에  $5 \times 10^5$  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 1 시간 30분 동안 배양하여 뜬 세포만을 채취하고 nylon wool column에 통과시켜 얻었다.

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

### III. 결 과

#### 1. 마우스에서 수지상세포의 분리배양

6 내지 8 주령의 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 배양배지에 6일간 배양하여 미성숙 수지상세포를 얻었으며, 이 세포들을 유세포 분석기로 수지상세포의 표면항원인 CD11c, MHC class II, CD40, CD80, CD86 분자의 발현을 확인하였다(그림 1).

#### 2. Mitomycin-C로 유도한 마우스 악성 흑색종 세포고사 항원

B16/F10 세포를 mitomycin-C (50  $\mu$ g/ml)로 24시간, 36시간, 48시간 그리고 72시간 동안 처리하여 뜯 세포만 채취하였다. 채취한 뜯 세포에 처리한 mitomycin-C와 후기 세포고사나 세포괴사된 세포조각을 제거하기 위해 10 ml PBS를 첨가하여 부유시킨 후 2500 rpm에서 5분간 원심분리하고 상청액을 제거하는 것을 3 차례 반복 시행하였다. 그 후 상청액을 제거하고 남은 침전물을 PBS로 부유시킨 후, 유세포 분석기를 통하여 annexin-V/PI 염색으로 시간의 변화에 따른 조기 세포고사(early apoptosis)와 후기 세포고사를 확인하였다.

원심분리 후 상청액을 제거하고 남은 침전물의 세포는 mitomycin-C 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(그림 2). 따라서 이 실험에서는 mitomycin-C로 48시간동안 처리하고 뜯 세포만을 채취한 후, PBS로 부유시켜 2500 rpm에서 원심분리로 상청액을 제거하고 남은 침전물을 얻는 방법을 사용하였으며 이러한 방법이 후기 세포고사나 세포괴사된 세포조각을 제거하여 80%이

상의 조기 세포고사된 세포만 비교적 쉽게 얻을 수 있음을 유세포 분석기를 통하여 annexin-V/PI 염색으로 확인하였다(그림 2C).

### **3. 항원의 종류와 성숙인자 자극 유무에 따른 수지상세포의 표면항원 변화**

세포고사와 세포괴사된 항원이 수지상세포의 성숙상태에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 수지상세포를 세포고사와 세포괴사시킨 B16/F10 세포와 24시간 동안 함께 배양하였다. 그 결과 수지상세포에서 MHC class II, CD80, CD86 분자의 발현이 조금 증가됨을 확인할 수 있었고(그림 3A), 이러한 표면항원의 증가는 CD40 ligand와 LPS를 성숙인자로 추가하였을 때 더욱 뚜렷하였다(그림 3B).

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

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

그 결과, 항원의 종류와는 상관없이 성숙인자를 추가하지 않았을 때의 수지상세포의 IL-12p70 생성은 ELISA로 검출되지 않았으며, 성숙인자를 추가한 경우에는 세포괴사된 항원과 배양한 군에 비해 세포고사된 항원과 배양한 군에서 통계학적으로 유의하게 높은 IL-12p70 생성을 보였다( $p < 0.05$ )(그림4).

## 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 종양억제 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 7일 후 얻은 비장 유래 T 세포를 첨가하여 배양하고, 배양 4일 후 [<sup>3</sup>H] 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 유의하게 높게 나타났다( $p<0.05$ )(그림5).

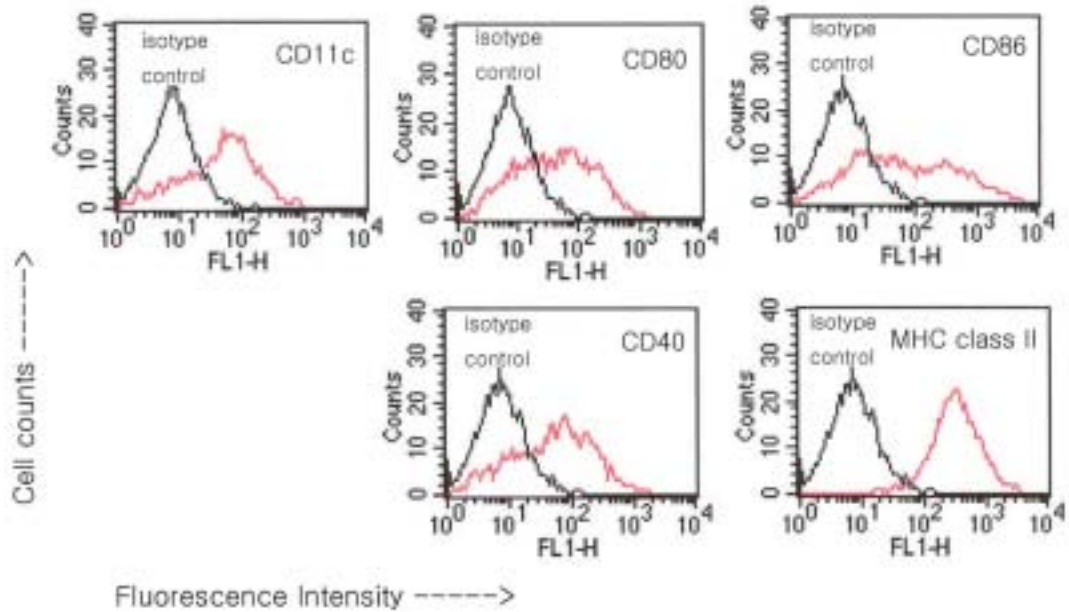


그림 1. 배양 6일째의 수지상세포의 표면항원의 발현 양상. 6 내지 8 주령의 암컷 C57BL/6 마우스의 대퇴골과 경골에서 분리한 골수세포를 하이브리도마 세포주에서 얻은 단클론항체를 이용하여 보체매개 세포용해를 일으켜서 T 세포, B 세포, 단구 등을 제거하고, 재조합 마우스 GM-CSF와 IL-4가 첨가된 배양배지에 6일간 배양한 후, 유세포 분석기로 수지상세포의 표면항원인 CD11c, MHC class II, CD40, CD80, CD86 분자의 발현을 확인하였다.

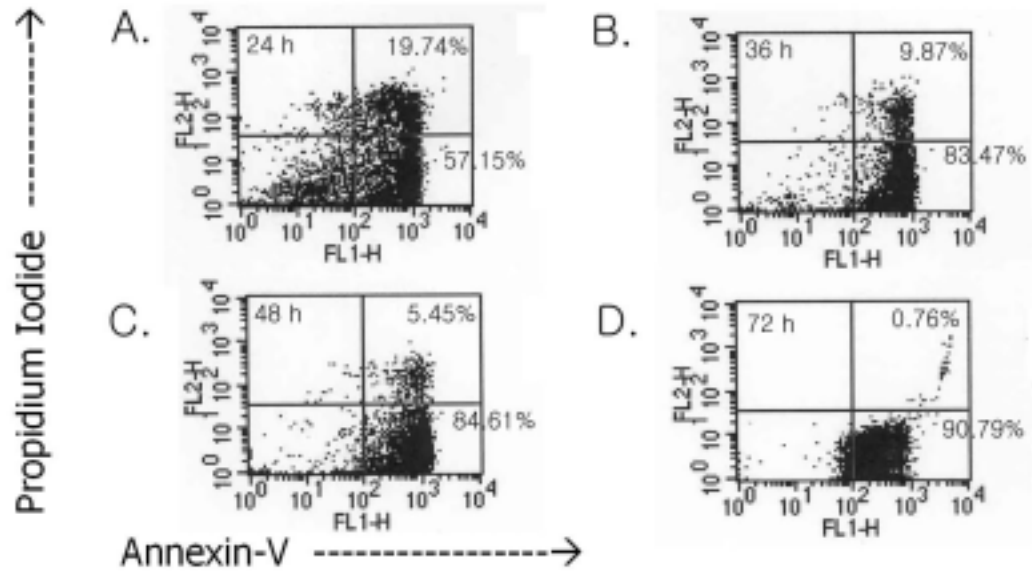


그림 2. Mitomycin-C 처리 후, 뜯 세포만을 채취하여 원심분리로 상청액을 제거한 마우스 악성 흑색종 세포의 조기 세포고사. B16/F10 세포를 mitomycin-C (50  $\mu$ g/ml)로 각 24시간, 36시간, 48시간, 그리고 72시간 동안 처리하여 뜯 세포만 채취하였다. 그 후 처리한 mitomycin-C와 후기 세포고사나 세포괴사된 세포 조각을 제거하기 위해 10 ml PBS로 부유시킨 후, 2500 rpm에서 5분간 원심분리하여 상청액을 제거한 후, 남은 침전물을 유세포 분석기를 통하여 annexin-V/PI 염색으로 시간의 변화에 따른 조기 세포고사와 후기 세포고사를 확인하였다.

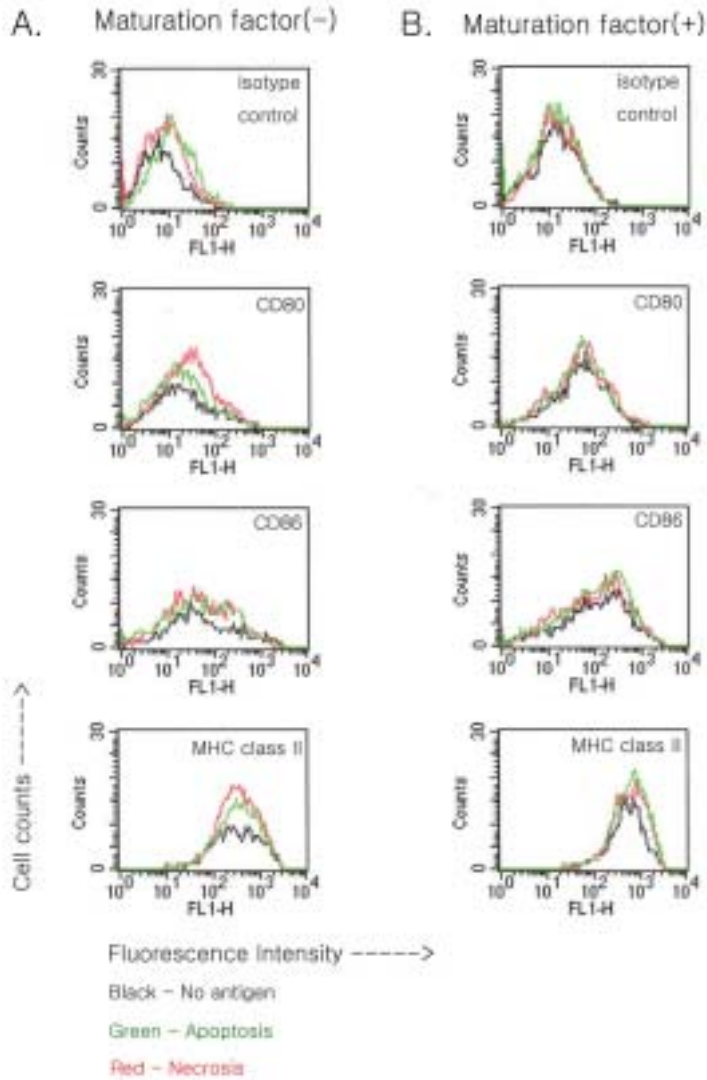


그림 3. 항원의 종류와 성숙인자 자극 유무에 따른 수지상세포 표면항원 변화. 수지상세포를 세포고사와 세포괴사시킨 B16/F10 세포와 24시간 동안 함께 배양하고 성숙인자(maturation factor; CD40 ligand와 LPS)를 추가한 후, 유세포 분석기를 통하여 MHC class II, CD80, CD86 분자의 발현을 관찰하였다.

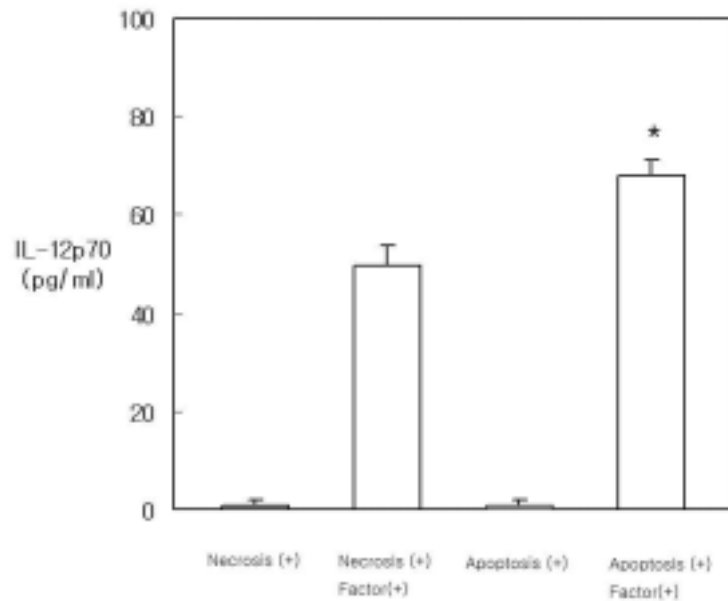


그림 4. 항원의 종류와 성숙인자 자극 유무에 따른 수지상세포 IL-12p70 생성. 수지상세포를 세포고사와 세포괴사된 B16/F10 세포와 배양하고 24시간 후의 상청액을 모아 ELISA kit로 IL-12p70을 정량 분석하였다. 항원의 종류와는 상관없이 성숙인자를 추가하지 않았을 때의 IL-12p70의 생성은 ELISA로 검출되지 않았으며, 성숙인자를 추가한 경우에는 세포괴사된 항원과 배양한 군에 비해 세포고사된 항원과 배양한 군에서 통계학적으로 유의하게 높은 IL-12p70 생성을 보였다(\*:  $p < 0.05$ ).

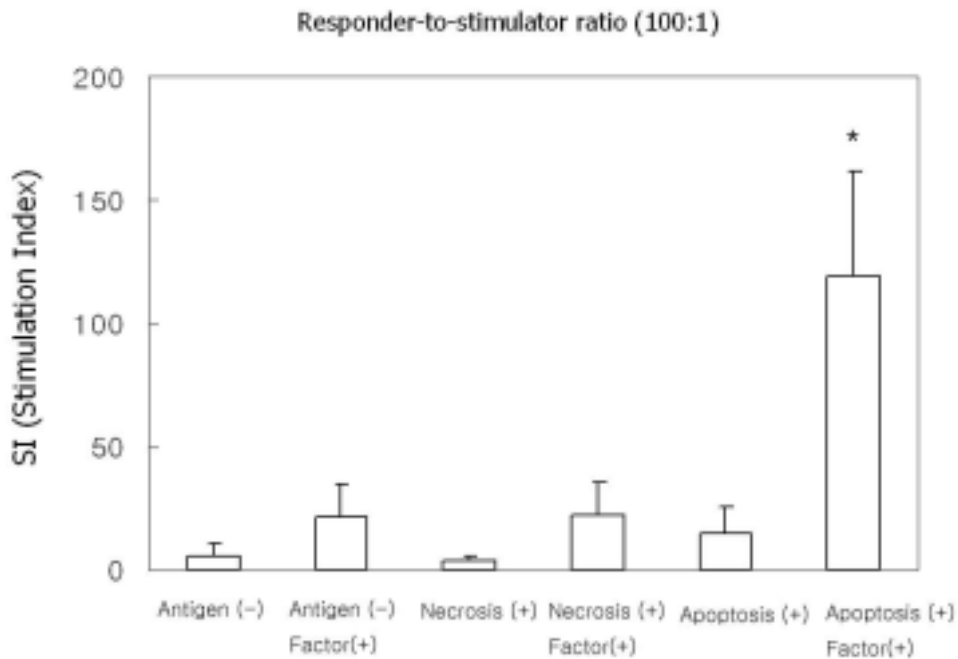


그림 5. 항원의 종류와 성숙인자 자극 유무에 따른 수지상세포 T 세포의 증식능. 세포고사와 세포괴사된 B16/F10 세포와 배양하고 성숙인자로 재자극한  $1 \times 10^3$  수지상세포를 96 well culture plate에 놓고  $1 \times 10^5$  마우스 비장 유래 T 세포를 첨가하여 배양하고, 배양 4일 후 [ $^3\text{H}$ ] thymidine을  $1 \mu\text{Ci/well}$ 의 농도로 첨가하여 liquid scintillation counter로 16시간 후 방사능을 측정하고 SI를 계산하였다. 항원을 사용하지 않거나 세포괴사된 항원을 사용하고 성숙인자를 추가한 군보다 세포고사된 항원을 사용하고 성숙인자를 추가한 군에서 SI가 통계학적으로 유의하게 높게 나타났다(\*:  $p < 0.05$ ).

Factor; CD40 ligand와 LPS.

## IV. 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 있다<sup>14-22</sup>.

수지상세포를 이용한 면역치료에서 세포고사된 항원이 좋은 항원으로 사용될 수 있는 가능성이 있음에도 불구하고 현재까지 효과가 떨어진다는 상반된 결과는 수지상세포의 성숙상태와 연관이 있을 가능성이 있다<sup>37</sup>. 수지상세포를 이용한 면역치료에는 주로 성숙 수지상세포가 사용되는데, 미성숙 수지상세포가 항원가공 능력이 발달되어 있지만, 실제 동물 실험에서는 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 면역반응보다는 면역관용을 일으킨다<sup>38,39</sup>.

이러한 단점을 극복하기 위하여 이 실험에서는 면역관용 상태를 일으킬 것으로 생각되는 미성숙 수지상세포를 성숙한 상태로 돌리기 위해 성숙인자를 사용하였다. 마우스 골수세포에서 유래한 수지상세포를 CD40 ligand와 같은 성숙인자와 같이 배양하였을 때, 마우스 상피 세포암을 포함한 여러 암종에서 더 성숙된 수지상세포의 생성과 T세포 독성반응을 관찰하였다는 보고가 있으나<sup>40-42</sup>, 마우스 악성 흑색종에서는 T 세포 독성반응이 감소하였다는 상반된 보고도 있다<sup>43</sup>. 또한 인체 말초혈액 단구세포에서 유래한 수지상세포에 CD40 ligand와 LPS를 동시에 추가하여 배양하였을 때, 성숙된 수지상세포의 생성과 인체 악성 흑색종에서 T 세포 독성반응을 보였다는 보고도 있다<sup>44</sup>.

세포고사는 자외선, 방사선, 항암제 등 여러 가지 방법으로 유도할 수 있다<sup>34-36</sup>. 암세포가 자외선에 노출되면 초기 세포고사(annexin-V<sup>+</sup>, PI<sup>-</sup>)가 일어나지만, 곧

후기 세포고사(annexin-V<sup>+</sup>, PI<sup>+</sup>)가 일어난다<sup>37</sup>. 세포고사를 유도함에 있어 mitomycin-C 처리 후 배양접시에 붙어있는 세포와 뜬 세포 모두를 사용하거나, 원심분리 후 상청액을 제거하지 않았을 때는 후기 세포고사(annexin-V<sup>+</sup>, PI<sup>+</sup>)나 살아있는 세포(annexin-V<sup>-</sup>, PI<sup>-</sup>)가 높은 비율로 관찰된다. 반면 본 실험에서 사용한 48시간 동안 mitomycin-C로 처리하여 뜬 세포만을 채취한 후, 원심분리하여 상청액을 제거하고 침전물만을 세포고사 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 때문이다<sup>37</sup>. 본 실험에서는 80%이상의 조기 세포고사된 세포를 사용하여 종양연관항원이 많이 발현되는 이점을 취하면서 수지상세포의 성숙의 억제는 성숙인자를 통한 재자극으로 극복하여 하였다.

미성숙 수지상세포가 항원 자극을 받으면 여러 가지 표면항원과 유착분자의 발현이 증가하게 된다<sup>4-7</sup>. 본 실험에서 세포고사와 세포괴사된 B16/F10 세포를 24시간 동안 함께 배양한 결과 MHC class II, CD80, CD86 분자의 발현이 조금 증가됨을 관찰할 수 있었고, 이러한 결과는 성숙인자 자극없이 항원 자체만으로도 수지상세포의 성숙상태를 변화시킬 수 있다는 것을 반영한다. 하지만 이러한 표면항원의 증가는 CD40 ligand와 LPS를 성숙인자로 추가하였을 때 더욱 강력하게 나타났다. 이는 세포고사나 세포괴사된 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 이중 이량체(heterodimer)를 이루고 있으며 특히 T<sub>H</sub>1

반응의 시작을 유도하고 반응을 지속시키는 효과를 나타낸다<sup>45</sup>. 항원전달 과정에서 수지상세포는 여러 가지 표면항원과 유착분자의 발현이 증가되고 IL-12의 생산능도 높아지게 되는 등 기능적으로 성숙하게 된다<sup>45,46</sup>. 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  $T_H1$  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, 또한 생체 실험(*in vivo*)상에서도 세포고사 항원을 수지상세포와 배양한 후 성숙인자로 재자극하는 방법이 효과적으로 이용될 수 있음을 추정할 수 있다.

## V. 결 론

본 연구에서는 마우스 악성 흑색종주(B16/F10)를 세포고사와 세포괴사시키고 수지상세포와 반응시킨 후, CD40 ligand와 LPS로 자극한 후, 항원 준비방법과 부가적인 성숙인자 자극 유무에 따른 수지상세포의 표면항원의 증가와 IL-12의 생산능, 그리고 T 세포의 자극능력이 어떻게 변화하는지를 시험관 실험을 통하여 관찰하고, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Mitomycin-C를 48시간동안 처리하여 뜯 세포만을 채취한 후, 원심분리하여 상청액을 제거하고 침전물만을 세포고사 항원으로 사용하였다. 이러한 세포고사 항원 준비방법은 후기 세포고사나 세포괴사된 세포조각을 제거하여 80%이상의 조기 세포고사된 세포만 비교적 쉽게 얻을 수 있었다.
2. 세포고사와 세포괴사된 항원과 배양한 수지상세포의 MHC class II, CD80, CD86 분자의 발현은 CD40 ligand와 LPS를 성숙인자로 추가하였을 때 뚜렷하였다.
3. 성숙인자를 추가한 경우에는 세포괴사된 항원과 배양하였을 때에 비해 세포고사된 항원과 배양하였을 때 수지상세포가 높은 IL-12p70 생성을 보였다( $p < 0.05$ ).
4. 항원의 종류와 관계없이 성숙인자를 추가한 경우에 성숙인자를 추가하지 않은 군에 비해 수지상세포의 T 세포 증식을 보여주는 자극지표가 높게 나타났다. 특히 수지상세포의 자극지표는 항원을 사용하지 않거나 세포괴사된 항원을 사용하고 성숙인자를 추가한 경우보다 세포고사된 항원을 사용하고 성숙인자를 추가했을 때에 통계학적으로 높게 나타났다( $p < 0.05$ ).

이러한 결과로 마우스 흑색종 생체 실험 모델에서 수지상세포를 세포고사된 항원과 배양하고 부가적인 성숙인자를 추가하였을 때, 수지상세포의 T 세포 증식능력이 높을 것임을 예상할 수 있다. 따라서 흑색종의 수지상세포에 세포고사된 항원 처리 후, 부가적인 성숙인자로 재자극하는 방법이 향후 더욱 강력한 종양면

역 효과를 나타낼 수 있는 치료로 이용될 수 있으리라 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Steinman R, Nussenzweig M. Dendritic cells: features and functions. *Immunol Rev* 1980;53:127-147.
2. Steinman R. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991;9:271-293.
3. Stingl G, Bergstresser P. Dendritic cells. a major story unfolds. *Immunol Today* 1995;16:330-333.
4. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392: 245-252.
5. Kaempgen E, Koch N, Koch F, Stoeger P, Heufler C, Schuler G, 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;88:3014-3018.
6. Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, et al. Generation of mature dendritic cells from human blood- an improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 1996;196:137-151.
7. Gluckman JC, Canque B, Rosenzwajg M. Dendritic cells: a complex simplicity. *Transplantation* 2002;74:S3-S6.
8. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF- $\alpha$  cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 1992;360:258-261.
9. Inaba K, Steinman RM, Pack MW, Aya H, Inaba M, Sudo T, et al. Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. *J Exp Med* 1992;175:1157-1167.
10. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, 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;176:1693-1702.

11. 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;179:1109-1118.
12. Strunk D, Rappersberger K, Egger C, Strobl H, Kromer E, Elbe A, et al. Generation of human dendritic cells/Langerhans cells from circulating CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996;87:1292-1302.
13. 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;3:483-490.
14. 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;95:9482-9487.
15. Porgador A, Snyder D, Gilboa E. Induction of antitumor immunity using bone marrow-generated dendritic cells. *J Immunol* 1996;156:2918-2926
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;3:558-561.
17. Nestle F. O, 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.
18. Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, 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;190:1669-1678.
19. Gilboa E, Nair S, Lyerly H. Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 1998;46:82-87.
20. Timmerman JM, Levy R. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu Rev Med* 1999;50:507-529.

21. Schnurr M, Galambos P, Scholz C, Then F, Dauer M, Endres S, 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;61:6445-6450.
22. Nestle FO, Banchereau J, Hart D. Dendritic cells: On the move from bench to bedside. *Nat Med* 2001;7:761-765.
23. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.
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;392:86-89.
26. Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, et al. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1998;188:1359-1368.
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;60:3542-3549.
28. Russo V, Tanzarella S, Dalerba P, Rigatti D, Rovere P, Villa A, 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;97:2185-2190.
29. Henry F, Boisteau 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;59:3329-3332.
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;12:1741-1747.
31. Strome SE, Voss S, Wilcox R, Wakefield TL, Tamada K, Flies D, et al. Strategies for antigen loading of dendritic cells to enhance the antitumor immune response. *Cancer Res* 2002;15:62:1884-1889.

32. Schnurr M, Scholz C, Rothenfusser S, Galambos P, Dauer M, Robe J, 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;62:2347-2352.
33. Ronchetti A, Rovere P, Iezzi G, Galati G, Heltai S, Protti MP, et al. Immunogenicity of apoptotic cells in vivo: role of antigen load, antigen-presenting cells, and cytokines. *J Immunol* 1999;163:130-136.
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;60:6441-6447.
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;93:539-548.
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;61:8105-8109.
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;61:8218-8226.
38. Rovere P, Vallinoto C, Bondanza A, Crosti MC, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P, et al. Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. *J Immunol* 1998;161:4467-4471.
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;191:423-434.
40. Labeur MS, Roters B, Pers B, Mehling A, Luger TA, Schwarz T, et al. Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. *J Immunol* 1999;162:168-175.

41. Kelleher M, Beverley PC. Lipopolysaccharide modulation of dendritic cells is insufficient to mature dendritic cells to generate CTLs from naive polyclonal CD8<sup>+</sup> T cells *in vitro*, whereas CD40 ligation is essential. *J Immunol* 2001;167:6247-6255.
42. Manna PP, Mohanakumar T. Human dendritic cell mediated cytotoxicity against breast carcinoma cells *in vitro*. *J Leukoc Biol* 2002;72:312-320.
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;98:10811-10816.
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;30:3291-3298.
45. Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, 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;52:133-144.

## **Abstract**

### **T cell proliferation effect of dendritic cells cultured with apoptotic mouse melanoma cells**

Woo Gil Chung

*Department of Medicine  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Min-Geol Lee)

Dendritic cells(DCs) are antigen-presenting cells that induce T cell responses, which play roles in autoimmune and allergic diseases, transplantation, and cancer. DCs can present exogenous antigens to T cells not only in the context of major histocompatibility complex(MHC) class II, but also of MHC class I molecules, a phenomenon termed cross-priming. DCs efficiently present antigens derived from apoptotic cells, stimulating class I-restricted CD8<sup>+</sup> 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 apoptosis antigen 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, which were previously treated with mitomycin-C for 48 hours, were centrifuged and the pellet was obtained. When the pellet was stained with annexin-V/propidium iodide, more than 80% of the cells 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, IL-12