

## 말초혈액을 이용한 수상세포 제작에 있어 외음암 세포주 공배양의 효과

연세대학교 의과대학 산부인과학 교실  
김영태 · 신종승 · 김재욱 · 김성훈

### Effect of vulvar cancer cell coculture on the development of dendritic cell using peripheral blood

Young Tae Kim, M.D., Jong Seung Shin, M.D., Jae Wook Kim, M.D.,  
Sung Hoon Kim, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

**Objective:** The effect of melanoma cell coculture on generating human dendritic cells(DC) from CD14+ monocytes has not been extensively studied yet. We investigated how melanoma cells and membrane-bound granulocyte/macrophage colony stimulating factor (mbGM-CSF) melanoma cell lines affect the differentiation of DC obtained by in vitro coculture of plastic-adherent blood monocytes with the presence or absence of GM-CSF and interleukin(IL)-4.

**Method:** The malignant melanoma cell lines(Conley and Jorp) were used in this study. Conley B-F8 and Jorp C-E6 are mbGM-CSF-positive cells derived from Conley and Jorp respectively. Each cell-free supernatants were collected and used to assess the level of GM-CSF using ELISA. Peripheral blood was collected from healthy donors. Adherent monocytes were cocultured for 6-7 days with irradiated mbGM-CSF and wild type melanoma cells(50 Gy) at each 1:1 and 0.1:1 ratio in 6-well culture plates in X-vivo culture medium containing IL-4. In control experiments, GM-CSF was added at the time of culture initiation. Immunophenotyping was performed by triple color immunofluorescence staining with flow cytometry analysis.

**Results:** In this study, GM-CSF was detected at low levels in the culture supernatants of Conley B-F8 (0.48 ng/106 cells/24h), whereas there was no detectable GM-CSF in that of Conley melanoma cell line. ELISA demonstrated that Jorp C-E6 cells produced 18 ng/106 cells/24h, whereas Jorp wild type produced 3.6 pg/106 cells/24h. Monocytes cultured with GM-CSF/IL-4 generated the expression of high levels of HLA DR, CD1a and CD86, while the expression of CD14 and CD83 were in low amounts. After culture in medium containing IL-4 alone, monocytes cocultured with Conley B-F8 showed low levels of CD1a and CD86 and relatively low value of HLA DR. However, the addition of GM-CSF to these cultures resulted in an increased expression of these markers and decreased that of CD14. Monocytes cocultured with Jorp C-E6 illustrated similar expression pattern of CD1a, HLA DR and CD14 in the presence or absence of GM-CSF as Conley B-F8 melanoma cell line. Monocytes cocultured with Conley B-F8 melanoma cells at 1:1 and 0.1:1 ratio showed no significant difference in expression of CD1a, CD14 and CD83 between two ratio.

**Conclusion:** Our results illustrate the feasibility to generate monocyte-derived DC from coculture with melanoma tumor cells in the presence of GM-CSF and IL-4. However, mbGM-CSF tumor cells did not significantly enhance the DC differentiation through juxtacrine stimulation unless soluble GM-CSF was added in the culture media.

**Key words:** Human Dendritic cells, Coculture, GM-CSF, mbGM-CSF

## 서 론

지난 여러 세기동안 종양을 치료하기 위한 많은 시도가 항암치료 전략분야에서 이루어져 왔다. 수술 요법, 항암 화학요법, 방사선 요법의 발전을 통해 국소 부위 병변을 지닌 초기암 환자의 치료는 매우 성공적인 결과를 보이게 되었다. 그러나 진행된 전이성 병변은 전통적인 방법으로 치료하는 경우 아직 불량한 치유효과를 나타내고 있기 때문에 암정복의 새로운 시도가 꾸준히 요구되어 지고 있다. 지난 10여년 동안 종양 면역생물학의 눈부신 발전을 통해 최근 각광받는 치료방법으로서 항암 면역치료에 대한 새로운 관심이 집중되게 되었다. 항암 면역치료의 중대한 성공중의 하나는 종양항원 특이 면역반응을 유도하면서 인체세포에는 독성을 거의 나타내지 않으며 단지 종양세포만을 선택적으로 제거할 수 있는 종양백신의 개발을 들 수 있다.<sup>1-3</sup> 현재 종양백신 연구분야 중에서 가장 각광받는 분야는 수상세포(dendritic cell, DC)를 이용한 시도가 되고 있다.<sup>4</sup> 수상세포는 잘 알려진 전문적인 항원 전달 세포로서 naive T 림프구를 활성화시켜 일차 T 세포 매개 면역 반응을 유발하는데 중추적 역할을 담당하고 있다. 수상세포는 또다른 항원전달세포인 단핵구 및 대식세포 비하여 형태학상으로 다르고 기능적으로도 구별이 된다. 수상세포는 쥐의 비장에서 최초로 규명된 강력한 항원전달세포로 독일인인 Steinman에 의해서 처음 발견되었고 이 세포는 높은 운동성을 보이며 여러 개의 세포 돌기를 갖고 있어 수상세포라고 명명되었다.<sup>5</sup> 수상 세포는 항원 펩타이드를 조직적합항원 (Major histocompatibility complex, MHC)분자에 실어 세포 표면에 이르게 하며 MHC 및 costimulatory분자의 발현을 증가시켜 naive T 세포를 활성화 할 수 있다. 이러한 수상세포의 항원 전달 특성이 수상세포를 종양 면역 치료의 중요한 모델로 자리잡게 한 것이다.<sup>6,8</sup> 수상세포는 말초혈액에서 거의 발견되지 않고 모든 순환 혈액 임파구 중에서 0.05% 미만으로 존재한다.<sup>9</sup> 그러나 수상세포는 in vitro에서 CD34 양성 조혈전구세포를 Granulocyte-Macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), Tumor necrotizing factor(TNF- $\alpha$ )와 함께 배양하여 얻을 수 있다.<sup>10,11</sup> 수상세포는 또한 CD14 양성 말초 혈액 단핵구 세포를 GM-CSF, Interleukin 4(IL-4)<sup>12-16</sup> 또는 IL-1317과 함께 배양하여 얻을 수 있다. 이러한 사이

토카인 유도 수상세포의 생성 방법은 in vitro에서 TNF- $\alpha$ 와의 추가적인 성숙 배양을 필요로 하지만 CD14 양성 말초 혈액 단핵구는 쉽게 얻을 수 있으며 수상세포의 대량제작이 가능한 장점을 가지고 있다. 더불어 이들 in vitro 에서 순환 전구세포를 수상세포로 분화시키는 분화 과정은 사이토카인의 역할을 연구하는 데 한 전형으로 제시되고 있다.

최근 들어 GM-CSF를 분비하는 항암 백신이 쥐에서 암종을 파괴하는 것이 증명되었고 악성흑색종, 전립선, 신장암 환자에서도 임상적으로 매우 긍정적인 결과를 보여주었다.<sup>18-20</sup> 더욱이 membrane bound GM-CSF(mbGM-CSF) 종양 세포주(cell line)인 P815 mastocytoma 모델에서 항 종양 면역가 강력하게 나타나는 것이 보고되었다.<sup>21</sup> 그러나 암세포가 수상세포 분화, recruitment 그리고 기능을 방해하는 사이토카인을 분비한다는 것이 보고되어 있으며 IL-10, transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ), vascular endothelial growth factor(VEGF)가 포함되는 몇몇의 사이토카인이 악성흑색종, 뇌종양, B 세포 임파종 및 몇몇의 편평세포 암<sup>22-26</sup>에 의해 분비되어 수상세포의 분화와 기능을 감소시키는 것이 알려져 있다. in vitro 연구에서도 IL-10은 GM-CSF, IL-4와 함께 배양하여 얻는 단핵구 유도 수상 세포 생성을 방해함이 보고되었다.<sup>27,28</sup> 그러나 최근까지도 혈중 단핵구로부터 분화된 인간 수상세포와 외음부 흑색종세포의 공동배양의 효과는 아직까지 광범위하게 연구되지 않고 있다. 이번 연구에서는 사이토카인의 첨가 여부로 외음암 흑색종세포와 혈중 단핵구를 공배양하였을 때 단핵구가 형태학적, 표현형적 특징을 보이는 수상세포로 분화될 수 있는지를 평가하였으며 또한 in vitro 상에서 mbGM-CSF 흑색종 세포주가 CD14 양성 단핵구와 함께 공배양하였을 때 수상세포의 분화에 어떻게 영향을 미치는 지 조사하였고 GM-CSF, IL-4의 존재유무에 따른 변화를 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 배양 세포주

본 연구에서는 외음부 악성 흑색종 세포주(Conley & Jorp)가 사용되었다. Conley B-F8 과Jorp C-E6은 각각 Conley 와 Jorp 에 의해 유도된 mbGM-CSF 양성세

포들이다. 이들 두 개의 mbGM-CSF 양성세포는 이전에 보고한 프로토크올<sup>21</sup> 이용하여 만들어 졌다. Jorp 와 Jorp C-E6 는 CD54 와 Human leukocyte antigen A2(HLA-A2)분자를 표현하지만 Conley B-F8 는 CD54는 표현하나 Conley 는 HLA-A2와 CD54 모두를 표현하지 않는다. 이들 모든 세포주는 기본 배지로서 RPMI 1640(life technologies, Rockville, MD)에 열처리된 비활성화된 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum) 과 항생제(zeocine 800ug/ml)(Invitrogen, Carlsbad, Ca)를 첨가한 배양 배지에서 배양되었다.

### ELISA에 의한 GM-CSF의 양적 측정

세포표면에 부착되어 있는 mbGM-CSF는 단백분해작용을 통하여 배양액내에 용해성GM-CSF(soluble GM-CSF)로 전환될 수 있다. 배양 배지로 mbGM-CSF의 분비는 4개 흑색종 세포주에서 두 번에 걸쳐 측정하였다. 각각의 세포주에서 2 X 10<sup>6</sup> 세포를 이용하여 24시간 동안 배양하여 결과를 얻었다. 세포가 없는 상층액이 수집되었고 ELISA kit (BioSource International, Camarillo, CA)을 사용하여 GM-CSF의 양을 측정하였다. GM-CSF 검출의 감수성은 1.25pg/ml 였다.

### 말초혈액 단핵구(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)의 추출과 공동배양

말초혈액은 항응고액(heparinized)으로 처리된 주사기로 건강한 공여자로부터 얻었고 말초혈액 단핵구(PBMC)는 Ficoll-Hypaque(Pharmacia biotech, Uppsala, Sweden) gradient 원심분리법을 이용하여 추출하였다. PBMC는 6-well tissue culture plate(Falcon, Becton Dickinson, NJ)의 각 well 당 1.8 - 2.0 X 10<sup>7</sup> 세포 정도로 AIM-V 배양액(GIBCO/BRL)에넣어 CO<sub>2</sub> 조식 배양기에서 37℃로 2시간 동안 배양시켰다. 비부착세포들은 plates를 hood top에서 앞, 뒤로 6회정도로 부드럽게 두드려 배지에서 제거하였다. 비부착세포들은 무균의 50ml 원뿔형 튜브에 넣었다. 배양 plate 표면은 PBS(phosphate buffered saline) 용액으로 세척후 50ml tube에 비부착세포를 넣었다. 비부착세포는 부착세포의 수를 측정하기 위해 계산하였고 면역평가분석에서 T 세포 반응의 대조군으로 사용하기 위해 동결하였다. 부착 단핵구는 1000IU/ml농도의 IL-4를

포함한 X-VIVO 배양액에서 6- well culture plates에 방사선 처리된 mbGM-CSF 흑색종 세포와 wild type 흑색종세포와 1:1, 0.1:1 의 비율로 7일 동안 공배양되었다. 대조군 실험에서는 배양 초기부터 1000IU/ml의 GM-CSF가 첨가되었다. 배양은 매 3일 마다 신선한 배양액과 사이토카인을 공급하고 세포 분화는 위상차 현미경으로 관찰하였다.

### 유세포 분석(flow cytometry)을 통한 세포의 형태학적인 분석

유세포 분석으로 삼색 면역형광 염색법을 이용하여 표면항체의 발현(immunophenotyping)을 살펴보았다. 삼색 직접 또는 간접 면역형광분석을 위하여 세포는 특이 항체와 함께 4℃에서 30분간 반응시키고 그 후 2번 세척하였다. 사용된 항체는 fluorescein isothiocyanate (FITC)가 붙은 anti-CD1a(BL6) IgG1(Becton Dickinson, Mountain View, CA), cychrome이 붙은 anti-CD86(HA5.2 B7) IgG1(Pharmingen, La Jolla, CA), phycoerythrin(PE)이 붙은 anti-CD83(HB15A) IgG1(Pharmingen), FITC가 붙은 anti-HLA-DR IgG2a(Becton Dickinson), PE가 붙은 anti-GM-CSF IgG2a(Darko, Carpinteria, CA), tricolor가 붙은 anti-CD14(63D3) IgG2(pharmingen)을 사용하였다. 간접 면역 형광분석은 세포 특이 결합부위에 human r-globulin을 결합시킨 후 적절한 단클론 항체를 이용하여 4℃에서 30분간 반응시킨 후 광범위하게 세척하고 이차 항체로 FITC 가 붙은 goat antiimmune 항체 (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL)를 이용하여 4℃에서 30분간 반응시켰다. 대조군으로 배경염색의 정도를 결정하기 위하여 isotype-matched control Ab을 사용하였다. 만개의 세포를 대상으로 Becton-Dickinson FACScan으로 특징적인 FSC/SSC profile에 따라서 분석하였다. 결과는 양성세포의 percentage 또는 형광정도(fluorescence intensity, FI)로서 표현하였고 형광정도는 다음 공식에 따라 계산되었다.

$$FI = \text{mean fluorescence}(\text{sample}) - \text{mean fluorescence}(\text{control})$$

## 결 과

### mbGM-CSF 외음부 흑색종 세포주의 상층액에서 GM-CSF 양 측정

GM-CSF는 항원전달세포 전구세포를 recruit하고 강력한 항원전달세포로 활성화시키는 능력 때문에 항종양 면역에서 중요한 사이토카인으로 알려져 있다. 세포표면에 부착되어 있는 mbGM-CSF는 단백분해작용을 통하여 배양액내에 용해성 GM-CSF(soluble GM-CSF)로 전환될 수 있다. 본 실험에서 GM-CSF는 Conley B-F8의 배양 상층액에서 낮은 level ( $0.48\text{ng}/106\text{cell}/24\text{hr}$ ,  $48\text{IU}/\text{ml}$ )로 발견되었으나 반면 Conley cell line에서는 GM-CSF를 발견할 수 없었다. Jorp C-E6에서는  $18\text{ng}/106\text{cell}/24\text{hr}$ ( $180\text{IU}/\text{ml}$ )을 반면 Jorp wild type은  $3.6\text{pg}/106\text{cell}/24\text{hr}$ 을 분비하였다(Fig.1). 그러나 이

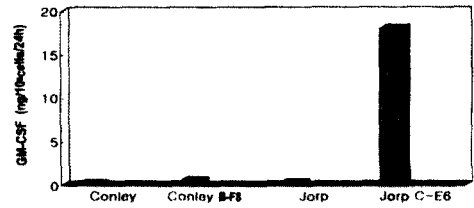


Fig. 1 Soluble GM-CSF detected in the supernatant of melanoma cell lines by ELISA

러한 농도는 쥐 모델에서 항종양 면역반응을 유도하기 위한 골수자극에 필요한 양 이하였다. GM-CSF의 'reshold level'(대략  $35\text{ng}/106\text{cell}/24\text{hr}$ )은 백신에서 일어나는 항종양 면역에서 매우 중요하다<sup>30</sup>. GM-CSF 유전인자의 transfection은 in vitro에서 Conley B-F8과 Jorp C-E6 세포주의 성장에 별다른 영향을 나타내지는 않았다(Fig.2).

Fig. 2 Phase contrast micrographs of melanoma cell lines. A, Jorp; Cells tend to be polygonal, most of them in contact with other cells via dendritic projections. ( $\times 200$ ) B, Jorp C-E6; Cells show a closely packed morphology. ( $\times 200$ ) C, Conley; The culture is not confluent and the cells are well spread and randomly oriented. ( $\times 100$ ) D, Conley B-F8; Cells have assumed a parallel orientation with each other. ( $\times 200$ )

### 흑색종 세포주와 공배양하여 분화된 수상세포의 형태학적인 특징

수상세포의 분화과정은 세포 표면 항원의 분석을 통해 평가하였다. 수상세포는 CD1a, MHC I, II, CD80, CD86을 높은 level로 표현하고 CD14, CD16은 낮은 level로 표현하거나 발현되지 않는 것으로 알려져 있다<sup>9</sup>. 성숙 수상세포에 존재하는 특이 표식자는 CD83이었다<sup>15</sup>. 흑색종 세포와의 공동배양에서 수상세포 분화의 가능성을 조사하기 위해서 우리는 4명의 건강한 공여자로부터 얻은 buffy coats에서 PBMC를 분리하였다. 풍부한

단핵구의 준비는 Ficoll-Hypaque gradient 원심분리법을 이용하여 얻었다. 세포 획득은 전혈  $150\text{ml}$ 에서 단핵구를  $136 \pm 20 \times 106\text{cell}$ 을 얻었고 viability는 97% 이상이었다. 단핵구는 전에 기술한 것처럼 배양용기 표면에 부착하는가에 따라 분리하였다<sup>12</sup>. Table 1. 2는 GM-CSF의 존재 유무에 따라 배양후에 각각의 세포표면 항원 물질에 대해 양성인 세포의 percentage를 보여준다. GM-CSF, IL-4와 함께 배양된 단핵구들은 높은 level의 HLA DR, CD1a, CD86을 보여 주었고 반면 CD14와 CD83은 낮은 level로 표현되었다. 낮은 level의 mbGM-

CSF의 표현은 면역 형광 분석동안 암종세포를 mbGM-CSF 종양 세포의 오염을 배제할 수 있었다(Fig.3). IL-4 만 포함된 배양액에서 Conley B-F8과 공배양된 단핵구는 CD1a와 CD86를 낮은 level로 표현하였고 상대적으로 낮은 HLA DR을 표현하였으나 이들 배양에 GM-CSF의 첨가는 이들 표식자의 증가된 표현과 CD14의 표현의 감소를 보였다. Jorp C-E6와 공배양된 단핵구는 Conley B-F8 흑색종 세포주에서처럼 GM-CSF의 존재

유무에 따라 CD1a, CD14의 표현형태가 비슷한 양상을 보였다. 수상세포 분화에서 mbGM-CSF 종양세포의 juxtacrine 효과를 평가하기 위해 부착 단핵구는 Conley B-F8 흑색종 세포와 1:1, 0.1:1의 비율로 공배양되었다. Fig.4는 각각의 암세포:단핵구 비율로 Conley B-F8 과 공동배양된 단핵구의 형태학적 표현을 보여준다. 두 비율사이에 CD1a, CD14, CD83의 표현에 의미있는 차이는 없었다.

Table 1. Percentage of cells positive for marker molecules in the presence(pre) or absence(abs) of GM-CSF

Cells cocultured with	HLA DR		CD1a		CD86	
	pre	abs	pre	abs	pre	abs
Conley B-F8	83	76	60	31	82	3
Conley	91	72	81	2	61	2
Jorp C-E6*	66±13	60±13	62±2	21±9	26±9	22±19
Jorp*	67±11	51±11	50±1	44±21	37±15	35±1
Monocytes*	80±6		64±4		44±17	

\*Result are expressed as mean ± SE of four experiments.

Table 2. Percentage of cells positive for marker molecules in the presence(pre) or absence(abs) of GM-CSF

Cells cocultured with	CD14		mbGM-CSF		CD83	
	pre	abs	pre	abs	pre	abs
Conley B-F8	2	48	3	2	14	3
Conley	3	63	<1	<1	13	2
Jorp C-E6*	2±1	63±14	6±1	4±2	15±6	1±0.3
Jorp*	2±1	21±3	8±7	7±3	3±0.9	18±1
Monocytes*	3±3		4±3		25±20	

\*Result are expressed as mean ± SE of four experiments.

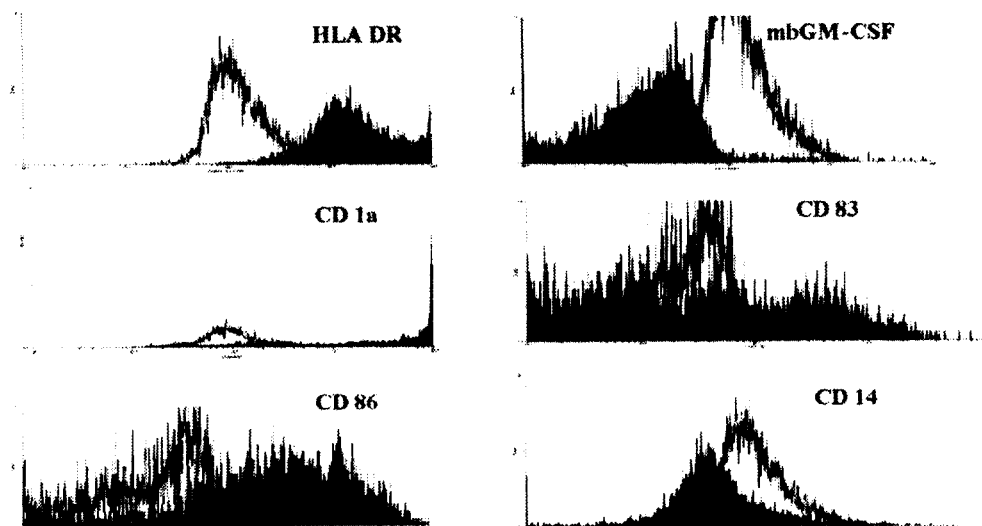


Fig. 3 Flow cytometric phenotyping of DC grown in the presence of GM-CSF/IL-4 and cocultured with Conley B-F8 melanoma cell line. Cells were stained with control isotype (open histogram) or with the indicated monoclonal antibody(mAb) cell surface markers (solid histogram).

Fig. 4. Phenotypic expression of cells cocultured with Conley B-F8 cell line

## 고 찰

지난 수세기 동안 암을 정복하기 위한 많은 연구가 여러 의학자에 의해 시도되어 왔다. 수술 요법, 항암화학 요법, 방사선 요법의 발전을 통해 국소 부위 병변을 가진 암 환자의 치료는 매우 성공적인 결과를 보이게 되었다. 그러나 진행된 전이성병변은 전통적인 방법으로 치료하는 경우 아직 불량한 치유효과를 나타내고 있기 때문에 암정복의 새로운 시도가 꾸준히 요구되어 지고 있다. 수상세포는 잘 알려진 전문적인 항원전달 세포로서 naive T 림프구를 활성화시켜 일차 T 세포 매개 면역 반응을 유발하는데 중추적 역할을 담당한다. 수상세포는 또 다른 항원전달세포인 B 림프구 및 대식세포(macrophage)에 비하여 형태학상으로 다르고 기능적으로도 구별이 된다. 수상세포는 쥐의 비장에서 최초로 규명된 강력한 항원전달세포로 1973년 Steinman과 Cohn에 의해서 처음 발견되었고 이 세포는 높은 운동성을 보이며 여러개의 세포돌기를 갖고 있어 수상세포라고 명명되었다.<sup>5</sup> 이후 수상세포는 다른 여러 장기에서도 규명이 이루어져서 중추신경계에서는 microglial cell이, 간에서는 Kupffer cell, 그리고 피부에서는 랑게르한스 세포(Langerhans cell)가 이러한 수상세포의 역할을 담당하는 것이 밝혀졌으나 당시 면역학자들 사이에서는 수상세포의 항원전달기능이 쉽게 수긍되지 못하였다. 왜냐하면 첫째 림프기관에서 1%미만을 차지하고 있는 이 세포를 연구하는 사람들이 많지

않았고, 둘째로는 대부분의 면역학자들이 전문적인 식세포 기능을 가지고 있는 대식세포가 가장 중요한 항원전달 세포라는 과거의 개념을 고수하였기 때문이다. 또한 비장, 림프절등에 존재하는 매우 적은 수의 수상세포가 신체말단에 소량 접근하는 항원을 인지하여 신체의 면역반응을 유발한다는 것을 초기에는 이해할 수 없었기 때문이다.

수상세포의 발견과 그들의 naive T 림프구 활성화 능력은 종양에 대한 면역치료의 새로운 장을 열어놓았다. 수상세포는 면역반응을 유도하는데 핵심적인 역할을 담당한다. 수상세포는 B 림프구 보다 naive T 림프구를 30배 내지 100배정도 유의하게 활성화시킬 수 있다.<sup>31</sup> 본 연구에서는 GM-CSF와 IL-4 존재 하에 수상세포 분화에 부정적인 영향을 미치는 종양 세포와 공배양하더라도 PBMC가 형태학적 및 표현형적(morphological and phenotypical) 특징을 보이는 수상세포로 분화됨을 알 수 있었다. 이번 실험에서 흑색종세포와 공배양한 단핵구로부터 많은 양의 수상세포를 얻을 수 있었다.

수상세포 제작에는 여러 가지 실험실 연구방법이 보고되어 있다. 초기 연구는 저밀도 수상세포를 우혈청 Albumin 경사(bovine serum albumin gradient)를 이용하여 밀도구배 원심분리를 이용하여 분리하는 방법이 보고되었으나<sup>32,33</sup> 이러한 방법은 엄격한 실험실 작업이 필요함에도 불구하고 얻어지는 수상세포의 수는 매우 적었다. 최근 들어 수상세포의 획득은 in vitro에서 사이토

카인의 존재하에 전구세포의 배양을 이용한 방법이 알려져 있다. Inaba 등이 보고한 실험에서 GM-CSF와 IL-4가 포함된 배양배지에서 쥐골수세포로부터 다량의 수상세포가 생성됨을 보여주었다<sup>34</sup>. 수상세포는 또한 밀도를 이용한 순화기술로 혈액으로부터 순환 전구세포로부터 얻어질 수 있다.<sup>35</sup> 본 연구에서는 다른 연구자처럼 in vitro에서 GM-CSF와 IL-4 존재하에 순환 CD14양성 단핵구가 풍부한 PBMC로부터 수상세포를 분화시켰다.<sup>13-15,36</sup> 사이토카인 유도 수상세포는 in vitro에서 TNF- $\alpha$ 와의 부가적인 성숙이 필요하지만 이 방법을 사용하게 되면 CD14양성 단핵구를 손쉽게 얻을 수 있으며 수상세포의 대량생성이 가능한 장점이 있다. 이번 연구를 통하여 mbGM-CSF 종양 세포 또는 순수한 종양 세포와 공배양하여 얻은 수상세포가 공배양없이 얻은 수상세포와 형태학적, 표현형적으로 다르지 않다는 것을 발견한 성과는 매우 중요하다고 하겠다.

GM-CSF와 IL-4 존재하에 흑색종세포와 공배양하여 얻은 수상세포는 항원 제공물질 HLA DR과 CD1a, costimulatory 분자 CD86의 높은 표현을 보여주는 전형적인 수상세포의 형태학적 특징을 나타내었다. 그러나 이들 세포는 수상세포 성숙표지자인 CD83의 낮은 표현을 보여주었다. 이번 결과는 수상세포를 이용한 면역치료를 위하여 in vitro에서 종양 세포와 공배양하여도 많은 수의 수상세포를 생성할 수 있는 가능성을 열어놓았기 때문에 특히 생물학적으로 중요하다고 평가할 수 있다. 이전 연구에서 종양 세포가 수상세포 분화, recruitment 그리고 수상세포의 기능을 방해하는 IL-10<sup>22-24</sup>, transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )<sup>25</sup>, vascular endothelial growth factor(VEGF)<sup>26</sup> 사이토카인을 분비한다는 것이 보고되었다. 하지만 Beissert 등은 랑게르한스 세포 등의 항원 전달 세포는 GM-CSF를 투여하기 이전에 IL-10에 노출될 경우에는 완벽하게 랑게르한스 세포의 항원 전달 능력을 잃었으나 GM-CSF와 IL-10과 동시에 배양하거나 또는 랑게르한스 세포의 IL-10 투여 전에 GM-CSF에 노출시킨 때에는 랑게르한스 세포의 성숙 또는 항원전달능력을 억제하지 못한다고 보고하였다.<sup>37</sup> 그러므로 수상세포 제작에 있어 GM-CSF와 동시에 공배양하게 되면 배양된 종양 세포로부터 유리되는 방해 사이토카인의 기능을 억제할 수 있다는 것이 기대되어진다. 여기서 나타난 data도 말초 단핵구와 공배양된 종양

세포는 GM-CSF와 IL-4를 투여하여 배양하였을 때 수상세포의 분화에 거의 역효과가 없다는 것을 보여주었다. 이번 실험에서는 또한 mbGM-CSF 종양 세포가 단핵구로부터 수상세포로의 분화에 미치는 효과에 대해 실험을 진행하였다. Conley B-F8과 Jorp C-E6 흑색종 cell line에서 배양 배지로의 mbGM-CSF분비의 잠재적인 효과를 배제하기 위하여 이번 실험에서는 세포가 없는 상층액(supernatant)에서 GM-CSF의 농도를 측정하였다. 세포표면에 부착되어 있는 mbGM-CSF는 단백분해작용을 통하여 배양액내에 용해성GM-CSF(soluble GM-CSF)로 전환될 수 있다. 이러한 단백분해작용은 세포표면에서 작용되며 확실한 물리적 혹은 약리적 인자에 의해 조절된다. 이는 세포막 단백질의 분해를 명령하는 신호에 의존한다. mbGM-CSF는 trypsin에 매우 민감하며 mbGM-CSF의 c-terminal의 많은 trypsin 분해 site가 있기 때문에 우리는 배양용기에서 종양 세포를 분리할 때 trypsin을 사용하지 않았다. 이들 mbGM-CSF 흑색종 세포주는 GM-CSF를 낮은 level로 분비하는데 특히 Conley B-F8 흑색종 세포주에서는 거의 측정이 되지 않았다. 이번 실험을 진행하면서 초반기에는 수상세포 분화에서의 mbGM-CSF 종양 세포의 양성 juxtacrine 효과를 기대했었다. Soo Hoo가 지적했듯이 수상세포의 GM-CSF receptor에 mbGM-CSF의 접촉은 직접적인 세포대 세포의 접촉이 필요로 한다.<sup>29</sup> Juxtacrine 자극은 확산성 요인이 없이 receptor와 함께 세포막에 고정되어 있는 성장인자(growth factor)에 물리적 작용에 의해 매개되므로 autocrine, paracrine, endocrine 자극과 구별된다.<sup>38,39</sup> 그러나 Conley B-F8도 Jorp C-E6 세포주도 수상세포 생성에 있어 기대했던 juxtacrine효과의 상승 조절 작용을 보이지 않았고 이들 mbGM-CSF 흑색종 세포주와 공배양된 단핵구는 배양 배지에 용해성GM-CSF를 첨가해야만 정상적인 분화과정을 보였다. 이번 연구에서 얻어진 결과는 두 가지의 가능한 설명으로 해석될 수 있다. 첫 번째로는 mbGM-CSF 종양 세포와 단핵구의 비율이 너무 적어서 종양 세포와 부착 단핵구 사이의 중요한 세포간 접촉이 적절하게 이루어지지 않았을 가능성이 있다. 배양액에서는 GM-CSF가 거의 측정되지 않았기 때문에 직접적인 물리적 접촉이 수상세포분화에 영향을 미치기 위해 반드시 필요하다고 할 수 있다. 두 번째는 mbGM-CSF 흑색종세포가 수상세포 분화를 방해하는

IL-10 같은 방해인자를 생성할 가능성이다. Baleen 등은 in vitro 연구에서 IL-10은 GM-CSF와 IL-4 존재하에 단핵구 유도 수상세포의 발생을 방해한다고 보고하였기 때문이다.<sup>38</sup> 결론적으로 본 연구의 결과는 GM-CSF와 IL-4 존재하에 외음부 흑색종 종양 세포와 공동배양으로 단핵구 유도 수상세포 제작의 가능성을 보여주었다. 그러나 mbGM-CSF 종양 세포는 juxtacrine 자극을 통한 수상세포의 분화에 긍정적으로 작용하지 않았고 오직 배양 배지에 GM-CSF를 첨가할 경우에만 수상세포가 분화됨을 확인할 수 있었다.

## 참고문헌

1. Anichini A, Mortarini R, Maccalli C, Squarcina P, Fleischhauer K, Mascheroni L, Parmiani G. Cytotoxic T cells directed to tumor antigens not expressed on normal melanocytes dominate HLA-A2.1-restricted immune repertoire to melanoma. *J Immunol* 1996; 156: 208-17
2. Aichele P, Brduscha-Riem K, Zinkernagel RM, Hengartner H, Pircher H. T cell priming versus T cell tolerance induced by synthetic peptides. *J Exp Med* 1995; 182: 261-6
3. Kast WM, Roux L, Curren J, Blom HJ, Voordouw AC, Meloan RH, Kolakofsky D, Melief CJ. Protection against lethal Sendai virus infection by in vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with a free synthetic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 2283-7
4. 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
5. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 271-96
6. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2: 52-8
7. Reid CD. The biology and clinical applications of dendritic cells. *Transfus Med* 1998; 8: 77-86
8. Laupeze B, Fardel O, Onno M, Bertho N, Drenou B, Fauchet R, Amiot L. Differential expression of major histocompatibility complex class Ia, Ib, and II molecules on monocytes-derived dendritic and macrophagic cells. *Hum Immunol* 1999; 60: 591-7
9. Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997; 90: 3245-87
10. 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: 258-61
11. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, Jacquet C, Yoneda K, Imamura S, Schmitt D, Banchereau J. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* 1996; 184: 695-706
12. 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
13. Peters JH, Gieseler R, Thiele B, Steinbach F. Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. *Immunol Today* 1996; 17: 273-8
14. Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; 180: 83-93
15. Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 2588-92
16. Kierstcher SM, Roth MD. Human CD14+ leukocytes acquire the phenotype and function of antigen-presenting dendritic cells when cultured in GM-CSF and IL-4. *J Leukoc Biol* 1996; 59: 208-18
17. Piemonti L, Bernasconi S, Luini W, Trobonjaca Z, Minty A, Allavena P, Mantovani A. IL-13 supports differentiation of dendritic cells from circulating precursors in concert with GM-CSF. *Eur Cytokine Netw* 1995; 6: 245-52
18. Sanda MG, Ayyagari SR, Jaffee EM, Epstein JI, Clift SL, Cohen LK, Dranoff G, Pardoll DM, Mulligan RC, Simons JW. Demonstration of a rational strategy for human prostate cancer gene therapy. *J Urol* 1994; 151: 622-8
19. Nelson WG, Simons JW, Mikhak B, Chang JF, DeMarzo AM, Carducci MA, Kim M, Weber CE, Baccala AA, Goeman MA, Clift SM, Ando DG,



- Levitsky HI, Cohen LK, Sanda MG, Mulligan RC, Partin AW, Carter HB, Piantadosi S, Marshall FF. Cancer cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer as vaccines for the treatment of genitourinary malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; 46 Suppl: S67-72
20. Salgaller ML, Thurnher M, Bartsch G, Boynton AL, Murphy GP. Report from the International Union Against Cancer (UICC) Tumor Biology Committee: UICC workshop on the use of dendritic cells in cancer clinical trials. *Cancer* 1999; 86: 2674-83
  21. Soo Hoo W, Lundeen KA, Kohrumel JR, Pham NL, Brostoff SW, Bartholomew RM, Carlo DJ. Tumor cell surface expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor elicits antitumor immunity and protects from tumor challenge in the P815 mouse mastocytoma tumor model. *J Immunol* 1999; 162: 7343-9
  22. Fortis C, Foppoli M, Gianotti L, Galli L, Citterio G, Consogno G, Gentilini O, Braga M. Increased interleukin-10 serum levels in patients with solid tumours. *Cancer Lett* 1996; 104: 1-5
  23. Smith DR, Kunkel SL, Burdick MD, Wilke CA, Orringer MB, Whyte RI, Strieter RM. Production of interleukin-10 by human bronchogenic carcinoma. *Am J Pathol* 1994; 145: 18-25
  24. Khatri VP, Caligiuri MA. A review of the association between interleukin-10 and human B-cell malignancies. *Cancer Immunol Immunother* 1998; 46: 239-44
  25. Hsieh CL, Chen DS, Hwang LH. Tumor-induced immunosuppression: a barrier to immunotherapy of large tumors by cytokine-secreting tumor vaccine. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 681-92
  26. Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2: 1096-103
  27. Allavena P, Piemonti L, Longoni D, Bernasconi S, Stoppacciaro A, Ruco L, Mantovani A. IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur J Immunol* 1998; 28: 359-69
  28. Buelens C, Verhasselt V, De Groote D, Thielemans K, Goldman M, Willems F. Interleukin-10 prevents the generation of dendritic cells from human peripheral blood mononuclear cells cultured with interleukin-4 and granulocyte/macrophage-colony stimulating factor. *Eur J Immunol* 1997; 27: 756-62
  29. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, Jackson V, Hamada H, Pardoll D, Mulligan RC. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 3539-43
  30. Horak H, Turner AR, Shaw AR, Yau OW. Stimulation of [<sup>3</sup>H]thymidine uptake in mouse marrow by granulocyte-macrophage colony stimulating factor from mouse lung conditioned medium. *J Immunol Methods* 1983; 56: 253-60
  31. Guery JC, Adorini L. Dendritic cells are the most efficient in presenting endogenous naturally processed self-epitopes to class II-restricted T cells. *J Immunol* 1995; 154: 536-44
  32. Steinman RM, Adams JC, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J Exp Med* 1975; 141: 804-20
  33. Van Voorhis WC, Hair LS, Steinman RM, Kaplan G. Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood. *J Exp Med* 1982; 155: 1172-87
  34. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM. 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
  35. Markowicz S, Engleman EG. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes differentiation and survival of human peripheral blood dendritic cells in vitro. *J Clin Invest* 1990; 85: 955-61
  36. Palucka KA, Taquet N, Sanchez-Chapuis F, Gluckman JC. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol* 1998; 160: 4587-95
  37. Beissert S, Hosoi J, Grabbe S, Asahina A, Granstein RD. IL-10 inhibits tumor antigen presentation by epidermal antigen-presenting cells. *J Immunol* 1995; 154: 1280-6
  38. Massague J. Transforming growth factor- $\alpha$ . *J Biol Chem* 1990; 265: 21393-6
  39. Bosenberg MW, Massague J. Juxtacrine cell signaling molecules. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 832-8

## ■ 국문요약 ■

**연구목적:** 인간 수상세포의 분화과정에서 흑색종세포 공동배양시의 효과는 아직까지 광범위하게 연구되지 않고 있다. 외음암 흑색종세포와 mbGM-CSF 흑색종 세포주를 혈중 단핵구와 공배양하였을 때 in vitro에서 GM-CSF, IL-4의 존재유무에 따라 수상세포의 분화에 어떻게 영향을 미치는 지를 조사하였다.

**연구방법:** 본 연구에서는 외음부 악성 흑색종 세포주(Conley & Jorp)가 사용되었다. Conley B-F8 과 Jorp C-E6는 각각 Conley 와 Jorp 에 의해 유도된 mbGM-CSF 양성세포들이다. 각각 세포가 없는 상층액이 수집되었고 ELISA를 사용하여 GM-CSF의 양을 측정하였다. 말초혈액은 항응고액(heparinized)으로 처리된 주사기로 건강한 공여자로부터 얻었고 부착 단핵구는 IL-4를 포함한 X-vivo 배양액에서 6- well culture plates에 방사선 처리된(50Gy) mbGM-CSF 흑색종세포와 wild type 흑색종세포와 1:1, 0.1:1 의 비율로 6-7일 동안 공배양되었다. 대조군 실험에서는 배양 초기부터 GM-CSF가 첨가되었다. 유세포 분석으로 삼색 면역형광 염색법을 이용하여 표면항체의 발현(immunophenotyping)을 살펴 보았다.

**결과:** 본 실험에서 GM-CSF는 Conley B-F8의 배양 상층액에서 낮은 level (0.48ng/106cell /24hr, 48IU/ml)로 발견되었으나 반면 Conley cell line에서는 GM-CSF를 발견할 수 없었다. Jorp C-E6에서는 18ng/106cell/24hr(180IU/ml)을 반면 Jorp wild type은 3.6pg/106cell/24hr을 분비하였다. GM-CSF, IL-4와 함께 배양된 단핵구들은 높은 level의 HLA DR, CD1a, CD86을 보여 주었고 반면 CD14와 CD83은 낮은 level로 표현되었다. IL-4만 포함된 배양액에서 Conley B-F8과 공배양된 단핵구는 CD1a와 CD86를 낮은 level로 표현하였고 상대적으로 낮은 HLA DR을 표현하였으나 이들 배양에 GM-CSF의 첨가는 이들 표식자의 증가된 표현과 CD14의 표현의 감소를 보였다. Jorp C-E6와 공배양된 단핵구는 Conley B-F8 흑색종 세포주에서처럼 GM-CSF의 존재유무에 따라 CD1a, HLA DR, CD14의 표현형태가 비슷한 양상을 보였다. Conley B-F8 흑색종세포와 1:1, 0.1:1의 비율로 공배양된 단핵구는 두 비율사이에 CD1a, CD14, CD83의 표현에 의미 있는 차이는 없었다.

**결론:** 본 연구결과는 GM-CSF 와 IL-4의 존재에서 흑색종 종양세포와의 공동배양으로부터단핵구 유도 수상세포 생성의 가능성을 보여주었다. 하지만 mbGM-CSF 종양세포는 용해성 GM-CSF를 배양 배지에 첨가하지 않으면 juxtacrine 자극으로 수상세포 분화를 유의하게 향상시키지 않았다.

**중심단어:** 수상세포, 공배양, GM-CSF, mbGM-CSF