

## K562 세포주와 IL-2를 이용하여 말초혈액 단핵구로부터 자연살세포의 선택적 증폭

전남대학교 의과대학 화순전남대학교병원 암백신팀<sup>1</sup>, 진단검사의학교실<sup>2</sup>

조 덕<sup>1,2</sup> · 신시원<sup>1</sup> · 박정선<sup>1</sup> · 강현규<sup>1</sup> · 김상기<sup>1</sup> · Nguyen Pham TN<sup>1</sup> · Zhu XW<sup>1</sup>  
신명근<sup>2</sup> · 서순팔<sup>2</sup> · 양동욱<sup>2</sup> · 남종희<sup>1</sup> · 김영진<sup>1</sup> · 이제중<sup>1</sup>

### Selective Expansion of Natural Killer Cells from Peripheral Blood Mononuclear Cells by K562 Cell Line and IL-2

Duck Cho, M.D.<sup>1,2</sup>, Shi-Won Shin, M.T.<sup>1</sup>, Jung-Sun Park, Ph.D.<sup>1</sup>, Hyun-Kyu Kang, Ph.D.<sup>1</sup>,  
Sang-Ki Kim, Ph.D.<sup>1</sup>, Than-Nhan Nguyen Pham<sup>1</sup>, Xiao-Wei Zhu<sup>1</sup>,  
Myung-Geun Shin, M.D.<sup>2</sup>, Soon-Pal Suh, M.D.<sup>2</sup>, Dong-Wook Ryang, M.D.<sup>2</sup>,  
Jong-Hee Nam, M.D.<sup>1</sup>, Young-Jin Kim, M.D.<sup>1</sup> and Je-Jung Lee, M.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cancer Vaccine Team, Chonnam National University Hwasun Hospital, Jeonnam, <sup>2</sup>Department of Laboratory  
Medicine, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

**Background:** Several attempts have been made to expand human NK cells from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). This study examined the selective expansion of NK cells using interleukin 2 (IL-2) plus the K562 cell line, the expression of the NK cell receptors, and the cytotoxic activity.

**Methods:** The PBMCs from seven healthy volunteers were cultured in a medium containing the IL-2 plus the K562 cell line for 14 days. The expression of the activating and inhibitory receptors on the resting NK cells and the 72 hr-expanded NK cells were analyzed. A flow cytometric cytotoxic assay was used to determine the killing activity of the non-expanded NK cells and the 7 day-expanded NK cells against the K562 target cells.

**Results:** The NK cells from PBMCs expanded 4.5-fold after 7 days, and contained 56.5% CD3-CD56+ cells. The IL-2 or IL-2 plus K562 increased the expression levels of CD158b (MFI, mean fluorescence intensity), CD158e1/e2 (MFI), and NKp44 (MFI), while it decreased the expression levels of NKp30 (%), CD16 (MFI), and 2B4 (MFI). The non-expanded NK cells lysed 9.0% and 27.6% of the K562 target cells in the 1 : 1 and 5 : 1 effector and target ratio, respectively, and the 7-day expanded NK cells lysed 36.9% and 57.2% of the K562 target cells, respectively.

**Conclusion:** The selective expansion of CD3-CD56+ NK cells occurred only during 7 days of culture. IL-2 or IL-2 plus the K562 cells altered the expression of various activating and inhibitory receptors of NK cells, and the cytotoxicity of the expanded NK cells was higher than in the non-expanded cells. (*Korean J Hematol* 2006;41:8-15.)

**Key Words:** Natural killer cells, K562, IL-2, Expansion

접수 : 2006년 1월 14일, 수정 : 2006년 2월 20일

승인 : 2006년 2월 25일

교신저자 : 이제중, 전남 화순군 화순읍 일십리 160

☎ 519-809, 화순전남대학교병원 혈액종양내과

Tel: 061-379-7638, Fax: 061-379-7628

E-mail: drjejung@chonnam.ac.kr

본 연구는 과학기술부 21세기 프론티어연구개발사업인 세포  
응용연구사업단(과제관리번호: SC3290) 및 산업자원부 지방  
기술혁신사업(과제관리번호: RTI05-01-01)의 연구비 지원에  
의해 수행되었음.

Correspondence to : Je-Jung Lee, M.D., Ph.D.

Department of Hematology-Oncology, Chonnam National Uni-  
versity Hwasun Hospital

160 Ilshim-ri, Hwasun 519-809, Korea

Tel: +82-61-379-7638, Fax: +82-61-379-7628

E-mail: drjejung@chonnam.ac.kr

## 서 론

자연살세포(natural killer cell, NK 세포)는 형태학적으로 세포질 내 과립을 갖는 림프구로, 정상 성인 말초혈액 림프구의 10~20%를 차지한다.<sup>1)</sup> NK 세포는 면역표현형상 CD56+CD3-의 특징을 보이며, T 세포와 달리 특이 항원에 감작되지 않고도 바이러스 감염세포나 암세포를 직접 살생하거나 각종 사이토카인을 분비하여 자연면역(innate immunity)의 중요한 세포로 알려져 있다. 비록 NK 세포가 표적세포(target cell)를 인지하는 MHC-class I 분자가 필요하지는 않지만, 표적세포에 존재하는 HLA-class I 혹은 class I 유사 항원이 NK 세포의 활성화 및 억제성 수용체의 리간드(ligand)로 작용하여 표적세포의 공격을 조절한다. 표적세포에 존재하는 여러 항원들 중 HLA-C 항원은 NK 세포의 수용체인 killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs)의 리간드로 작용하여 강력한 억제성 신호를 보내서 NK 세포가 표적세포를 공격하지 못하게 한다. 따라서 NK 세포는 HLA-class I 분자가 존재하는 정상 자가세포는 물론이고, 동종세포도 NK 세포의 수용체 및 해당 리간드에 따라 공격하지 않을 수도 있다.<sup>2)</sup> 그러나, 바이러스 감염이나 암 발생으로 MHC-class I 분자의 발현이 감소되면 NK 세포의 이러한 억제성 신호가 상실되어 이들 세포들을 공격할 수 있다. 이러한 NK 세포의 특성 때문에 NK 세포는 암 발생의 면역감시기구(immuno-surveillance)의 역할을 담당하는 것으로 알려져 있고, 실험실에서는 MHC-class I의 발현이 되지 않는 K562와 같은 세포주를 NK 세포의 세포독성능력을 평가하는 데 활용할 수 있다.

NK 세포는 비활성화 상태에서는 그 기능이 약하지만, IL-2와 같은 사이토카인으로 활성화되면 활성화 및 억제성 수용체의 발현에 변화가 오고 세포수도 증가하며 또한 강력한 항암 능력을 갖는다.<sup>3,4)</sup> 그러나 IL-2 단독으로는 다량의 NK 세포를 선택적으로 증폭시킬 수 없어서 부가자극(co-stimulant)을 제공할 수 있는 feeder cell 등이 있어야 한다.<sup>5)</sup> 그런데, 대부분 feeder cell로 사용되고 있는 세포주의 공통된 특징은 MHC-class I이 감소되어 NK 세포가 쉽게 공격할 수 있는 세포주인데 대부분 고형암에서 유래한 것이며, 혈액암에서 유리한 세포주로는 K562 세포주가 대표적인데, 이는 고형암 세포주에 비해 증식이 빠르며, 실험실에서 유지하기가 쉬운 장점이 있어 그간 feeder cell로도 널리 사용되었다.

그 동안 자가 혹은 동종 NK 세포를 이용한 면역치료를 위해서 사람의 말초혈액 단핵구로부터 살생능력이 뛰어난 NK 세포를 대량으로 증폭 배양하려는 연구가 많이 있었으나,<sup>5-8)</sup> 국내에서는 이에 관한 연구가 아직 미흡하여 저자들은 NK 세포의 선택적 증폭에 널리 사용되어온 K562 세포주를 feeder cell로 활용하고 IL-2와 함께 배양하여서 말초혈액 NK 세포를 선택적으로 증폭하고, 또한 NK 세포의 활성화 및 억제성 수용체의 발현 양상과 세포독성능을 평가하고자 본 연구를 수행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. K562 세포주 준비

K562 세포주를 배양 하루 전에 RPMI-1 640 배지에 50U penicillin-streptomycin, 10% fetal bovine serum (FBS)를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 후, 다음 날 감마선조사기(Gammacell 3000 Elan, Nordion MDS, Ottawa, Canada)로 50Gy를 조사한 후 feeder cell로 이용하였다.

### 2. 말초혈액 NK 세포의 증폭

1) **K562세포주와 IL-2를 이용한 배양법:** 정상 성인 7명으로부터 헤파린 처리된 시험관에 말초혈액을 40~50mL 채혈한 후, Ficoll-Hypaque (Lymphoprep™, Nycomed, Oslo, Norway)을 이용한 비중 원침법으로 단핵구를 분리하였다. 이 단핵구는 Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)으로 한번 세척 후, 50U penicillin-streptomycin, 10% FBS가 첨가된 Cellgro SCGM 배지(CellGenix, Freiburg, Germany)를 이용하여 24 well plate에  $1 \times 10^6$ /mL/well을 넣은 후, 여기에 감마선이 조사된 K562 세포주를  $1 \times 10^5$ /mL/well로 추가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 또한, 배양 배지에 IL-2 (500IU/mL)를 첨가하였다. 배양액은 매 2일 혹은 3일에 한 번씩 교체하였다.

2) **IL-2 단독 배양법:** 대조군으로 이용하기 위해서 상기에 기술된 동일한 방법에 feeder cell로 이용한 K562 세포주는 사용하지 않고, IL-2만 동일하게 500IU/mL를 추가하여 단핵구를 배양하였다.

### 3. 유세포 분석을 이용한 NK 세포 수용체의 분석

건강인 7명으로부터 얻은 말초혈액 단핵구로부터 분리한 배양 전 NK 세포와 'IL-2법' 및 'K562를 활용한 IL-2법'으로 배양한 3일째에 분리한 NK 세포의 활성화

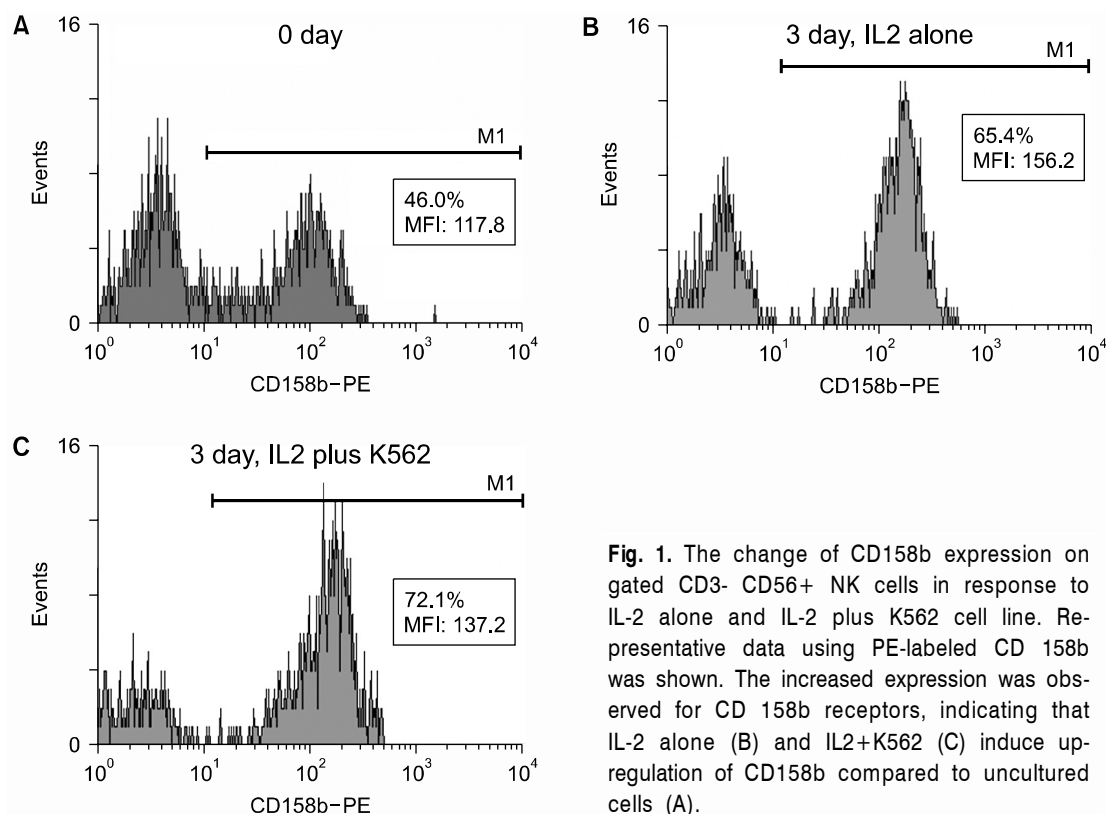
화 및 억제성 수용체의 발현 정도를 유세포분석기를 이용하여 분석하였다. 모든 검체 시험관에 CD3-fluorescein isothiocyanate (FITC)와 CD56-PC5 (Beckman-Coulter-Immunotech, Brea, CA, USA)이 동시에 부착된 항체를 모든 시험관에 넣고, phycoerythrin (PE)이 표지된 CD158a, CD158b (Becton Dickinson, San Jose, USA), CD158e1/e2, CD85j, CD94, NKG2A, NKG2D, NKp30, NKp46, NKp44, CD16, 2B4 (Beckman-Coulter-Immunotech) 단클론성 항체를 각 시험관에 넣었으며, 매 검사마다 isotype control을 사용하였다. 3색 형광으로 염색된 세포는 Coulter EPICS XL-MCL (Beckman Coulter, Miami, FL)로 수집하였고, 데이터 분석은 WinMDI 2.8 software를 이용하였다. 림프구 구획은 forward-scatter (FS) gating과 side-scatter (SS) gating으로 정하였다. 그리고 CD3-FITC와 CD56-PC5를 사용하여, CD3-/CD56+인 세포만을 gating한 후, PE가 부착된 단클론성 항체를 이용하여 11종의 수용체 발현에 대한 양상을 분석하였다. 이들의 발현을 % expression과 MFI 값으로 표기하였고, 또한 각 군 간에 통계학적인 유의성을 분석하였다.

#### 4. NK 세포의 분리

말초혈액 단핵구에서 NK 세포의 분리는 CD3, CD4, CD14, CD15, CD19, CD36, CD123와 glycophorin A가 포함된 단클론성 항체를 이용하여 magnetic activated cellsorter (MACS) (Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany)로 negative selection하였으며, 분리된 NK 세포의 순도는 유세포분석기(Coulter EPICS XL-MCL)를 이용하였을 때 CD3-CD56+ 세포가 80% 이상이었다.

#### 5. 유세포분석을 이용한 세포독성(cytotoxicity) 시험

유세포분석을 이용한 세포독성 검사는 방사선 동위원소를 사용하지 않고 K562 세포와 같은 부유세포를 활용한 세포독성검사에 유용한 Godoy-Ramirez 등<sup>9)</sup>의 방법을 변형하여 시행하였다. K562 세포주는 검사 하루 전날부터 배양하여 표적세포로 활용하였고, 효과기 세포(effector cell)는 검사 당일 MACS를 이용하여 NK 세포를 분리한 후 사용하였다. 효과기세포(E)와 표적세포(T)의 비율(E : T ratio)을 1 : 1과 5 : 1로 혼합한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. 대조군으로는 표적세포만 넣은 것과 효과기세포만 넣은 것을 이용하여 spontaneous cell death를 평가하였고,



**Fig. 1.** The change of CD158b expression on gated CD3- CD56+ NK cells in response to IL-2 alone and IL-2 plus K562 cell line. Representative data using PE-labeled CD 158b was shown. The increased expression was observed for CD 158b receptors, indicating that IL-2 alone (B) and IL2+K562 (C) induce up-regulation of CD158b compared to uncultured cells (A).

이를 세포독성 분석 시 isotype control처럼 기준점으로 삼았다. 이후 CD45-FITC 단클론성항체(Beckman-Coulter-Immunotech) 10L를 각각의 시험관에 넣은 후 얼음에서 20분간 반응하였다. 유세포분석기로 수집하기 10~15분 전에 propidium iodide (PI) 1  $\mu$ g/mL를 넣은 후, Coulter EPICS XL-MCL를 이용하여 수집하였고, WinMDI 2.8 software로 분석하였다. 데이터의 분석은 CD45-FITC FS에서 SS로 효과기 세포 구역(NK 세포) 그리고 표적세포 구역(K562 세포주)을 정하고, 각 구역을 gating하여, PI의 형광강도를 분석하여 PI에 염색된 세포는 세포가 사멸된 것으로 판단하여 이를 세포독성 정도를 수치화하였다(Fig. 1). 효과기 세포와 K562 세포는 95% 이상의 세포가 생존해 있어야 세포독성시험에 유효한 것으로 판정하였다.

## 6. 통계 분석

통계 분석은 SPSS 12.0 (SPSS for windows, Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 시행하였다. 말초혈액 단핵구(배양전 검체)와 'IL-2 단독배양법' 및 'K562 세포주를 활용한 IL-2법'으로 배양한 NK 세포의 수용체 발현 정도(% expression; MFI)의 비교 분석은 비모수적 방법 중 하나인 Wilcoxon signed ranks test법으로 검증하였고,  $P$ 값이 0.05 이하인 경우에 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

## 결 과

### 1. 말초혈액 단핵구로부터 NK 세포의 선택적 증폭

정상인 7명으로부터 각각 채혈한 말초혈액 40~50 mL에서 분리된 단핵구의 중앙값은  $2.0 \times 10^7 / \mu\text{L}$  (범위,  $1.3 \sim 2.6 \times 10^7 / \mu\text{L}$ )였고, 유세포분석기를 이용하여 림프구 영역에서 측정된 CD3-CD56+ 세포의 비율의 중앙값은 16.9% (범위, 13.1~30.6%)였다. 이들을 K562 세포주와 IL-2를 이용해 배양하였으며, 배양 후 3일, 7일, 10일, 13일에 수확한 세포 수와 CD3-CD56+ 세포

의 비율은 Table 1과 같았다. NK 세포는 배양 3일째와 7일째에는 각각 1.2배와 4.5배 증폭되었지만, 배양 10일째와 13일째에는 0.6배와 0.4배로 오히려 세포 수가 감소하였고, 또한 CD3-CD56+ 세포의 비율도 3일째와 7일째에는 각각 21.2%, 56.5%로 높아졌다가, 이후 배양 10일째와 13일째에는 각각 17.1%, 8.8%로 낮아지면서 더 이상 증폭되지 않았다.

### 2. NK 세포에서 활성화 및 억제성 수용체의 분석

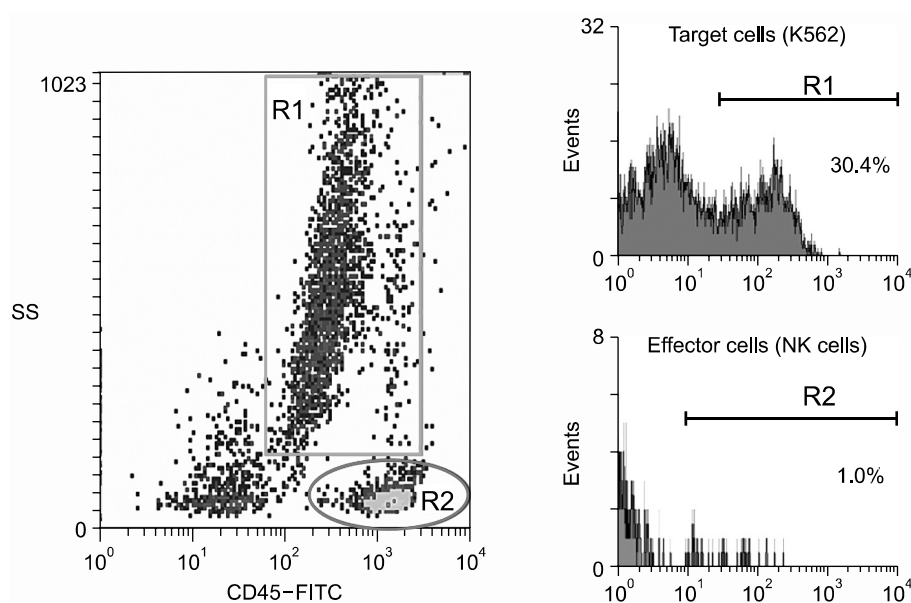
배양 전 NK 세포와 'IL-2법'으로 배양된 NK 세포를 비교 분석하였을 때 CD158b (MFI), CD158e1/e2 (MFI), NKp30 (% expression), NKp46 (% expression), NKp44 (MFI), CD16 (MFI), 2B4 (MFI) 등의 발현 정도가 통계적으로 유의한 차이를 보였으며( $P < 0.05$ ), 배양 전 NK 세포와 'K562를 활용한 IL-2법'으로 배양된 NK 세포 사이에는 CD158b (MFI), CD158e1/e2 (MFI), NKp30 (% expression), CD16 (MFI), 2B4 (MFI) 등의 발현 정도가 유의한 차이를 보였다( $P < 0.05$ ).

### 3. 증폭된 NK 세포의 세포독 성능

세포독성 검사는 정상인 2명의 말초혈액 단핵구에서 분리된 NK 세포를 배양 배지에서 24시간 배양하여 준비한 NK 세포(증폭 전 NK 세포)와 'K562를 활용한 IL-2법'으로 7일간 배양하여 증폭이 이루어진 NK 세포(증폭된 NK 세포)를 효과기세포로 이용하였고, K562 세포주를 표적세포로 사용하여 유세포분석기를 이용하여 분석하였다. 분석 시 효과기 세포는 PI 양성률이 모두 매 검사 시 5% 이내로 대부분 NK 세포가 살아 있었다. 증폭 전 NK 세포에서 K562 세포주에 대한 세포독 성능은 유효기세포와 표적세포의 비율이 1 : 1인 경우 표적세포 구역(K562 세포주)의 PI 양성률은 평균 9.0% (7.3% & 10.7%)를 보였으며, 5 : 1의 비율에서는 평균 27.6% (24.7% & 30.4%)를 보였다(Fig. 2). 7일간 증폭된 NK 세포의 세포독 성능은 유효기세포와 표적세포의 비율이 1 : 1인 경우 표적세포 구역의 PI 양성

**Table 1.** Median cell count, percentage of CD3-CD56+ cells, and fold expansion rate from peripheral blood mononuclear cells of seven donors. The cells were cultured in IL-2 (500U/mL) and irradiated K562 cell line as a feeder cell

Day	0	3 <sup>rd</sup>	7 <sup>th</sup>	10 <sup>th</sup>	13 <sup>th</sup>
Cell count ( $\times 10^7 / \mu\text{L}$ )(range)	2.0 (1.3~2.6)	2.3 (0.5~3.9)	3.0 (1.8~6.0)	1.9 (0.5~4.8)	1.9 (0.6~3.6)
CD3-CD56+ cell% (range)	16.9 (13.1~30.6)	21.2 (15.3~29.1)	56.5 (38.7~66.4)	17.1 (1.2~22.0)	8.8 (3.0~20.0)
Expansion rate (range)	0.0	1.2 (0.6~3.0)	4.5 (2.5~10.0)	0.6 (0.1~1.7)	0.4 (0.2~1.5)



**Fig. 2.** Flow cytometric measurement of NK cytotoxicity using staining with FITC-conjugated anti-CD45 and side scatter profiles to identify different cell populations and uptake of propidium iodide (PI) to detect cell death. Target cells and effectors (1 : 5) incubated for 4 hrs, are identified by region 1 (R1) and region 2 (R2) respectively. Percentages of dead cells in different regions are calculated from histograms showing PI uptake as measured by the intensity of fluorescence.

**Table 2.** The change of activating and inhibitory natural killer cell receptors when lymphocytes are treated with IL-2 alone or IL-2 with irradiated K562 cell line as feeder cell

	Day 0		Day 3 <sup>rd</sup> IL-2 alone		Day 3 <sup>rd</sup> IL-2+k562		P value ( $<0.05$ )
	% <sup>a)</sup>	MFI <sup>b)</sup>	% <sup>c)</sup>	MFI <sup>d)</sup>	% <sup>e)</sup>	MFI <sup>f)</sup>	
CD158a	26.1±17.5	53.5±26.2	27.7±17.0	77.4±33.9	28.5±18.1	80.4±31.0	—
CD158b	51.1±23.1	91.3±17.5	49.6±15.3	153.7±48.5	47.1±17.4	133.5±47.7	b/d, b/f
CD158e1/e2	16.1±9.3	65.2±41.9	16.3±9.6	127.0±73.4	17.3±9.5	128.2±66.0	b/d, b/f
CD85j	38.7±15.5	21.2±11.2	45.8±21.5	21.3±7.2	44.3±17.6	22.1±9.4	—
CD94	69.6±5.9	24.0±4.6	68.0±12.8	21.6±5.52	67.5±14.3	23.4±5.7	—
NKG2A	35.0±18.5	60.5±8.4	33.1±20.1	57.3±27.3	35.2±21.2	62.4±30.6	—
NKG2D	89.7±8.9	21.4±9.3	88.7±14.0	21.8±4.8	75.9±19.9	24.8±16.3	—
NKp30	25.7±15.5	12.7±2.1	9.2±7.8	12.6±2.5	10.1±7.4	12.9±4.8	a/c, a/e
NKp46	49.0±21.7	26.5±13.1	73.9±20.0	34.9±21.7	70.3±22.2	34.8±23.7	a/c
NKp44	2.5±2.2	8.2±2.4	1.9±1.4	13.4±4.5	3.1±3.3	9.5±4.6	b/d
CD16	96.4±2.7	443.3±185.0	96.7±4.1	256.4±168.2	92.3±9.5	233.1±146.6	b/d, b/f
2B4	98.6±1.5	48.1±8.2	96.6±4.8	35.3±5.1	91.3±18.3	38.9±8.2	b/d, b/f

Abbreviation: MFI, mean fluorescence intensity.

률은 평균 36.9% (33.8% & 39.9%)를 보였고, 5 : 1인 경우는 평균 57.2% (57.4% & 57.0%)를 보여서, 증폭전 NK 세포에 비해서 7일간 배양되어 증폭된 NK 세포에서 세포독성능이 증진되었다(Fig. 2).

## 고 찰

NK 세포 표면에 발현되어 있는 활성화 및 억제성 수용체는 표적세포의 HLA class I 또는 class I 유사 항

원을 리간드로 인지하여 활성화 또는 억제성 신호를 보내서 표적세포의 공격을 조절한다.<sup>10)</sup> 만성골수구성 백혈병에서 유래한 K562 세포주는 표면에 HLA-class I 분자를 거의 발현하지 않아서 NK 세포로 억제성 신호를 보낼 수 없어 NK 세포에 의해 쉽게 공격을 받기 때문에, NK 세포의 세포독 성능을 증명할 때에 양성 대조군으로 K562 세포주를 흔히 사용한다.<sup>5)</sup> 본 연구에서도 증폭된 NK 세포의 세포독 성능을 증명하기 위해 K562 세포주를 사용하였으며, 증폭된 NK 세포가 효과적인 세포독 성능을 나타냄을 증명할 수 있었다.

한편, 체외 실험에서 NK 세포가 K562 세포주를 살생한 후에 증식되는 현상이 발견되었고, 이후 NK 세포를 증폭 배양하는 feeder cell로도 활용되어 왔다.<sup>11)</sup> 일반적으로 feeder cell은 각종 성장인자(growth factor)나 사이토카인 등을 분비하여 어떤 세포를 배양할 때 최적의 배양조건을 마련하기 위해 보조적으로 사용한다. NK 세포의 증폭에 사용되었던 feeder cell로는 K562 세포주 이외에도 EBV-transformed lymphoblastoid 세포주,<sup>6)</sup> 악성흑색종 세포주,<sup>12)</sup> 자가 단구,<sup>7)</sup> 자궁내막암 세포주,<sup>5)</sup> 율름 종양 세포주<sup>5)</sup> 등이 있으며, 이들은 K562 세포주와 유사하게 MHC-class I 분자의 발현이 낮은 각종 암 세포주들이다. Feeder cell로 활용하기 위해서는 통상 전처리를 실시하며, 이는 feeder cell이 배양 중에 증식되지 않기 위해서 시행하는 대표적인 방법으로는 방사선조사, 메탄올에 의한 고정, 가열(heating), 그리고 냉동-해빙 등이 있다.<sup>5)</sup> 본 연구에서는 좋은 성적을 보인다고 보고된<sup>5)</sup> 방사선조사(50Gy)의 방법을 이용하여 feeder cell로 활용하였고, 증식되지 않음을 확인하기 위해 동일한 조건에서 feeder cell만을 2차례 배양했으나 모두 증식되지 않았다.

그간 여러 방법으로 말초혈액 NK 세포를 선택적으로 증폭한 기법들이 보고되었다.<sup>5,8)</sup> 본 연구에서 정상인의 말초혈액 단핵구를 K562 세포주와 IL-2 (500 IU/mL)로 배양하였다. K562 세포주를 feeder cell로 사용하지 않고, IL-2만으로 증폭할 경우 NK 세포보다 T 세포가 더욱 잘 반응하여 T 세포의 우세하게 증폭하지만, K562 세포주를 함께 사용하면 기본적으로 적은 비율을 차지한 NK 세포가 우세하게 선택적으로 증폭된다. 본 연구에서 배양 7일째에 CD3-CD56+ 세포의 비율이  $54.8 \pm 9.6\%$ 를 보여 Carlens 등<sup>8)</sup>의 방법보다는 높고, Harada 등<sup>5)</sup>의 결과보다는 다소 낮은 비율을 보였다. 그러나, 최종적인 증폭배율은 현저하게 낮았는데, 이는 배양 7일째까지는 적절한 배양조건에서 NK 세포의 선택적 증폭이 잘 진행되었지만, 그 이후에는

Harada 등<sup>5)</sup>의 K562 세포주를 사용한 실험과 유사하게 세포가 사멸에 빠져 증폭이 잘 되지 않았는데, 그들과 달리 9일 정도 일찍 이러한 현상이 관찰된 것인데, 그 이유에 대해서는 명확하지 않다.

한편, 본 연구에서는 'K562를 활용한 IL-2법'으로 7일간 배양하여 증폭이 이루어진 NK 세포와 배양 전 NK 세포에 IL-2만을 처리한 후의 세포독 성능을 비교하였는데, 증폭된 NK 세포가 더 강력한 세포독 성능을 보였다. 이러한 비교 분석은 자가 NK 세포를 이용한 치료 모델에서 환자의 말초혈액 단핵구로부터 7일 이상 NK 세포를 선택적으로 증폭한 후 환자에게 주입한 보고에 근거하여 시행하였다.<sup>13)</sup> 따라서, 이러한 실험 결과는 NK 세포를 이용한 면역치료법에서 보다 강력한 치료 효과를 얻기 위해서는 사이토카인이나 feeder cell 등을 이용하여서 NK 세포를 활성화시키거나 증폭시켜야 함을 시사해주고 있다.

NK 세포의 여러 활성화 및 억제성 수용체가 규명된 이래로 표적세포를 보다 효과적으로 공격하기 위한 전략이 많이 연구되어 왔다.<sup>14-16)</sup> 각종 사이토카인을 이용하여서 활성화 수용체를 강화시키거나 NK 세포의 공격이 효과적으로 이루어질 수 있는 조건을 만드는 것이다. 대표적으로 Ruggeri 등<sup>14)</sup>의 보고에 의하면 T 세포 제거 haploidentical 조혈모세포이식에서 공여자 NK 세포의 억제성 KIR 수용체와 환자의 해당 리간드인 HLA-C group이 불일치한 경우(KIR mismatch) 억제성 신호는 발생하지 않고, 활성화 신호를 통하여 NK 세포가 급성골수성백혈병의 잔존 세포를 효과적으로 공격하여서 생존율이 향상된다는 보고를 하였으며, Giebel 등<sup>15)</sup>도 비혈연 T 세포 제거 조혈모세포이식술에서 유사한 결과를 보고하였다. 한편, Miller 등<sup>16)</sup>은 조혈모세포이식을 시행하지 않고 고식적인 치료를 받는 환자를 대상으로 haploidentical sibling의 동종 NK 세포를 투여해서 효과적으로 잔존하는 급성골수성백혈병 세포를 살상하였음을 보고하였는데, 이들은 백혈구분반술로 채집한 세포로부터 NK 세포를 분리한 후 세포독성을 높이기 위해서 ex vivo에서 IL-2 (1,000 IU/mL)로 활성화시킨 후에 환자에게 투여하였다.

NK 세포를 활성화시켜 세포독 성능을 증진시키기 위하여 IL-2가 흔히 이용되지만, IL-2가 NK 세포의 활성화 및 억제성 수용체의 발현에 미치는 영향에 대해서는 아직 많이 규명되지 않았다. Kogure 등<sup>17)</sup>에 의하면 IL-2를 투여하였을 때 NK 세포의 KIR 수용체인 CD158a와 CD158b의 발현이 증가되어서 표적세포를 감별하는 능력이 증가하여서 세포독성능이 강화될 것

이라고 보고하였으며, Shin 등<sup>18)</sup>은 NK 세포를 IL-2로 배양하였을 때, 배양 24시간 후에는 NK 세포의 억제성 수용체 뿐만 아니라 활성화 수용체의 기능을 가진 CD158a와 CD158b KIR 수용체의 발현에 변화가 없었지만, 배양 72시간 이후에 CD158b KIR 수용체의 발현이 증가함을 보고하였다. 본 연구에서도 증폭 배양을 하였을 때 CD158b의 MFI는 유의하게 증가하였지만, CD158a의 경우 발현율에 유의한 변화가 없었다. 또한, 본 연구에서 증폭 배양 후에 발현율에 유의한 차이를 보인 수용체로는 CD158b 이외에도 CD158e1/e2, NKp30, NKp46, NKp44, CD16, 2B4 등이 있었다. NK 세포를 IL-2로 활성화시키는 경우 활성화 수용체인 natural cytotoxicity receptor (NCR)인 NKp30, NKp44, NKp46의 발현이 증가되어서 NK 세포의 세포독 성능을 증진시킨다고 보고되었다.<sup>19,20)</sup> 본 연구에서도 NKp44, NKp46의 발현이 증가되어서 동일한 결과를 보였지만, NKp30의 경우 오히려 발현이 감소되는 결과를 보였는데, 이러한 상반된 결과에 대해서는 추후 연구를 통해서 규명되어야 할 것이다.

결론적으로 저자들은 말초혈액 단핵구에 K562 세포주를 feeder cell로 활용하고 IL-2와 함께 배양하여 7일까지는 효과적으로 NK 세포를 선택적으로 증폭할 수 있었으며, 증폭된 NK 세포는 효과적인 세포독 성능을 갖고 있음을 규명하였고, 또한 이들 배양법이 NK 세포의 활성화 및 억제성 수용체의 발현에 미치는 영향을 규명하는 기초자료를 마련하였다. 하지만, 본 연구에서 활용한 방법으로 7일 이상 배양했을 때 NK 세포가 사멸에 빠지며 더 이상 증폭되지 않은 점은 극복되어야 할 것이다.

## 요 약

**배경:** NK 세포를 이용한 면역치료를 위해서 사람의 말초혈액 단핵구로부터 NK 세포를 증폭시키려는 많은 연구가 있었다. 저자들은 말초혈액 NK 세포를 IL-2와 K562 세포주를 활용하여 선택적 증폭, 증폭된 NK 세포의 활성화 및 억제성 수용체의 발현 양상, 그리고 이들 NK 세포의 세포독 성능을 평가해 보았다.

**방법:** 정상 성인 7명의 말초혈액 단핵구를 Cellgro SCGM 배지에 IL-2 (500IU/mL)와 feeder cell로 K562 세포주를 사용하여 14일간 배양을 하였고, NK 세포의 활성화 및 억제성 수용체를 분석하기 위해 배양을 하기 전의 NK 세포와 IL-2 단독배양법과 K562와 IL-2를 함께 사용한 배양법으로 72시간 배양한 NK 세포의 활

성화 및 억제성 수용체를 분석하였다. 세포 독성능 평가는 증폭 전과 7일간 증폭된 NK 세포를 이용하여 K562 세포주를 표적세포로 하여 유세포를 활용한 독성 검사로 실시하였다.

**결과:** NK 세포는 7일간 배양 후 4.5배(범위 2.5~10) 증폭되었으며, CD3-CD56+ 세포는 56.5%를 보였다. IL-2 단독 혹은 IL-2와 K562를 함께 사용한 배양법에 의한 NK 세포의 수용체 중 CD158b (mean florescence intensity, MFI), CD158e1/e2 (MFI), NKp44 (MFI) 및 NKp46 (%)는 그 발현이 증가하였고, NKp30 (%), CD16 (MFI) 및 2B4 (MFI)는 그 발현이 감소하였다. 세포독성능 평가에서 비 증폭된 NK 세포는 표적세포인 K562 세포주와 1:1 및 5:1에서 각각 9.0%와 27.6%를 살생했으며, 7일간 증폭된 NK 세포는 표적세포를 각각 36.9%와 57.2%를 살생했다.

**결론:** NK 세포의 의미 있는 선택적 증폭은 배양 7일 동안만 이루어졌으며, 증폭된 NK 세포의 다양한 활성화 및 억제성 수용체의 발현이 변화되었으며, 세포독성능은 증폭된 NK 세포가 비 증폭된 것에 비해 높았다.

## 참 고 문 헌

- 1) Kim JS, Lee WK, Suh JS, et al. T and B cell changes with aging. Korean J Lab Medicine 2001;21:135-40.
- 2) Lanier LL, Corliss B, Phillips JH. Arousal and inhibition of human NK cells. Immunol Rev 1997; 155:145-54.
- 3) Domzig W, Stadler BM, Herberman RB. Interleukin 2 dependence of human natural killer (NK) cell activity. J Immunol 1983;130:1970-3.
- 4) Burns LJ, Weisdorf DJ, DeFor TE, et al. IL-2-based immunotherapy after autologous transplantation for lymphoma and breast cancer induces immune activation and cytokine release: a phase I/II trial. Bone Marrow Transplant 2003;32:177-86.
- 5) Harada H, Saijo K, Watanabe S, et al. Selective expansion of human natural killer cells from peripheral blood mononuclear cells by the cell line, HFWT. Jpn J Cancer Res 2002;93:313-9.
- 6) Perussia B, Ramoni C, Anegón I, Cuturi MC, Faust J, Trinchieri G. Preferential proliferation of natural killer cells among peripheral blood mononuclear cells cocultured with B lymphoblastoid cell lines. Nat Immun Cell Growth Regul 1987;6:171-88.
- 7) Miller JS, Oelkers S, Verfaillie C, McGlave P. Role of monocytes in the expansion of human activated natural killer cells. Blood 1992;80:2221-9.

- 8) Carlens S, Gilljam M, Chambers BJ, et al. A new method for in vitro expansion of cytotoxic human CD3-CD56+ natural killer cells. *Hum Immunol* 2001; 62:1092-8.
- 9) Godoy-Ramirez K, Franck K, Gaines H. A novel method for the simultaneous assessment of natural killer cell conjugate and formation and cytotoxicity at the single-cell level by multi-parameter flow cytometry. *J Immunol Methods* 2000;239:35-44.
- 10) Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002;100:1935-47.
- 11) Phillips JH, Lanier LL. A model for the differentiation of human natural killer cells. Studies on the in vitro activation of Leu-11+ granular lymphocytes with a natural killer-sensitive tumor cell, K562. *J Exp Med* 1985;161:1464-82.
- 12) Warren HS, Skipsey LJ. Phenotypic analysis of a resting subpopulation of human peripheral blood NK cells: the FcR gamma III (CD16) molecule and NK cell differentiation. *Immunology* 1991;72:150-7.
- 13) Ishikawa E, Tsuboi K, Saijo K, et al. Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma. *Anticancer Res* 2004;24:1861-71.
- 14) Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295:2097-100.
- 15) Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, et al. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood* 2003;102:814-9.
- 16) Miller JS, Soignier Y, Panoskaltis-Mortari A, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 2005;105:3051-7.
- 17) Kogure T, Mantani N, Sakai S, Shimada Y, Tamura J, Terasawa K. Natural killer cytolytic activity is associated with the expression of killer cell immunoglobulin-like receptors on peripheral lymphocytes in human. *Mediators Inflamm* 2003;12:117-21.
- 18) Shin EC, Choi KS, Kim SJ, Shin JS. Modulation of the surface expression of CD158 killer cell Ig-like receptor by interleukin-2 and transforming growth factor-beta. *Yonsei Med J* 2004;45:510-4.
- 19) Vitale M, Bottino C, Sivori S, et al. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 1998;187:2065-72.
- 20) Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, et al. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:4120-5.