B형 간염 바이러스 X 항원을 면역한 A2K^b Transgenic Mice에서 CD8+ T Cell의 활성화에 의한 X 항원 표현 재조합 Vaccinia Virus에 대한 방어 효과; *in vitro* 배양을 통한 XEP-3 특이적인 CTL의 반응

[1]주식회사 쎄라피아진 펩타이드치료제 개발팀, [2]아주대학교 의과대학 미생물학교실

황유경[1,2] · 김형일[2] · 김남경[1] · 박정민[1] · 정홍석[1]

Protective Effects on A2K^b Transgenic Mice That Were Immunized with Hepatitis B Virus X Antigen Peptides by the Activation of CD8+ T Cells; XEP-3 Specific CTL Responses in the *in vitro* Culture

Yu Kyeong Hwang[1,2], Hyung-Il Kim[2], Nam Kyung Kim[1], Jung Min Park[1] and Hong Seok Cheong[1]

[1]Division for Development of Peptide Therapeutics, TherapiaGene Corp., Yongin, Korea, [2]Department of Microbiology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

ABSTRACT

Background: Viral antigens presented on the cell surface in association with MHC class I molecules are recognized by CD8+ T cells. MHC restricted peptides are important in eliciting cellular immune responses. As peptide antigens have a weak immunigenicity, pH-sensitive liposomes were used for peptide delivery to induce effective cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses. In the previous study, as the HBx peptides could induce specific CTLs *in vitro*, we tested whether the HLA-A2/K^b transgenic mice that were immunized by HBx-derived peptides could be protected from a viral challenge. **Methods:** HBx-peptides encapsulated by pH-sensitive liposomes were prepared. A2K^b transgenic mice were immunized i.m. on days one and seven with the indicated concentrations of liposome-encapsulated peptides. Three weeks later, mice were infected with 1×10^7pfu/head of recombinant vaccinia virus (rVV)-HBx via i.p. administration. The ovaries were extracted from the mice, and the presence of rVV-HBx in the ovaries was analyzed using human TK$^-$ 143B cells. IFN-γsecretion by these cells was directly assessed using a peptide-pulsed target cell stimulation assay with either peptide-pulsed antigen presenting cells (APCs), concanavalin A (2μg/ml), or a vehicle. To generate peptide-specific CTLs, splenocytes obtained from the immunized mice were stimulated with 20μg/ml of each peptide and restimulated with peptide-pulsed APC four times. The cytotoxic activity of the CTLs was assessed by standard ^{51}Cr-release assay and intracellular IFN-γassay. **Results:** Immunization of these peptides as a mixture in pH-sensitive liposomes to transgenic mice induced a good protective effect from a viral challenge by inducing the peptide-specific CD8+ T cells. Mice immunized with 50μg /head were much better protected against viral challenge compared to those immunized with 5μg/head, whereas the mice immunized with empty liposomes were not protected at all. After *in vitro* CTL culture by peptide stimulation, however, specific cytotoxicity was much higher in the CTLs from mice immunized with 5μg/head than 50μg/head

책임저자 : 정홍석, (주) 쎄라피아진 펩타이드치료제 개발팀
㉾ 449-910, 경기도 용인시 구성면 보정리 341번지
Tel: 031-260-9850, Fax: 031-266-3516, E-mail: hcheong@greencross.com
본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(HMP-98-D-7-0019).

group. Increase of the number of cells that intracellular IFN-γsecreting cell among CD8+ T cells showed similar result. **Conclusion:** Mice immunized with XEPs within pH-sensitive liposome were protected against viral challenge. The protective effect depended on the amount of antigen used during immunization. XEP-3-specific CTLs could be induced by peptide stimulation *in vitro* from splenocytes obtained from immunized mice. The cytotoxic effect of CTLs was measured by ^{51}Cr-release assay and the percentage of accumulated intracellular IFN-γ secreting cells after *in vitro* restimulation was measured by flow cytometric analysis. The result of ^{51}Cr-release cytotoxicity test was well correlated with that of the flow cytometric analysis. Viral protection was effective in immunized group of 50μg/head, while in the in vitro restimulation, it showed more spectific response in 5μg/head group. **(Immune Network 2002;2(1): 41-48)**

Key Words: Hepatitis B virus X antigen, A2K^b transgenic mice, cytotoxic T lymphocyte

서 론

바이러스성 질환에 대한 면역반응은 체액성 면역반응과 세포성 면역반응으로 나누어 설명할 수 있다. 항체에 의해 조절되는 체액성 면역반응은 혈액 또는 체액에 존재하는 바이러스 입자와 직접 결합하여 바이러스의 부착을 억제하거나 제거하게 되지만, 일단 세포 내로 들어간 바이러스는 감염된 세포 내에서 증식하면서 질병을 일으킨다. 세포 내에 있는 바이러스를 선택적으로 제거하는 면역반응은 없으며, 세포독성 T 임파구의 활성화에 의해 감염된 세포를 선택적으로 파괴함으로써 바이러스의 증식을 저해하게 된다. 그러나 이러한 면역반응이 적절히 일어나지 못하면 바이러스가 완전히 제거되지 않고 만성화하게 된다(1-2). 따라서 바이러스 감염을 완전히 제거하기 위해서는 체내의 면역반응을 통하여 바이러스에 특이적으로 작용할 수 있는 세포독성 T 임파구(CTL)를 유도하여 감염세포를 직접 파괴할 수 있어야 한다.

B형 간염 바이러스(HBV)에 감염되면, 간세포는 HBV 유전자에 의해 네 가지 항원단백질(HBs, HBc, HBx, 및 pol)을 생성하고 계속해서 새로운 바이러스 입자를 만들어 내게 된다. 감염초기에는 이들 항원단백질에 대한 세포성 면역반응이 활발히 일어나서 대부분의 감염자는 자연치유가 되지만, 바이러스가 감염된 숙주세포는 바이러스의 다양한 면역회피 기전으로 인하여 정상적인 숙주의 면역체계의 공격을 피해갈 수 있기 때문에 이들 중 일부가 만성간염, 간경화 혹은 간암으로 진행하게 된다(3-6). 이렇게 정상적인 면역체계의 감시를 벗어난 감염세포를 다시 면역세포로 하여금 인식하게 하여 질병을 치유하고자 하는 노력이 다양하게 시도되어왔다. 대표적으로 HBV의 여러 항원에 대한 에피톱 펩타이드로 CTL을 유도하고자 하는 연구가 활발히 진행되었다. 특히 core 항원과 surface 항원에 대한 CTL 에피톱은 펩타이드 형태나 혹은 DNA 형태로 면역되어 특이적인 CTL을 유도할 수 있음이 잘 알려져 있다(7-10).

펩타이드 항원의 낮은 면역원성 때문에 adjuvant가 필요하다(11). 펩타이드 항원 그 자체로는 체내에서 쉽게 분해되므로 펩타이드에 lipid를 결합시키거나, 다양한 adjuvant에 함입시켜서 항원성을 갖게 할 수 있다. 알려진 대표적인 adjuvant로는 liposome, ISCOMs, lipo-peptide, Quil-A, squalene/tween based oil emulsion, IFA, 혹은 CFA 등이 있다(12-20). 본 연구에서는 pH에 민감한 리포좀을 사용하여 리포좀 내부에 함입된 peptide가 세포질로 전달될 수 있도록 하였다. pH에 민감한 리포좀이 함입된 물질을 세포질에 전달할 수 있음은 이미 여러 실험에서 확인되었다(21-24).

사람의 주조직적합항원복합체인 HLA에 제한적인 항원에 대한 동물실험모델로서 HLA transgenic 마우스를 사용하고 있다. 이 때 항원이 결합하는 α1과 α2 부위는 HLA에서 유래하여야 하며, 마우스 CD8+ T cell이 인식하는 α3 부위는 마우스 H-2에서 유래하였을 때 마우스 CTL에 의한 항원의 인식이 더 효율적으로 일어난다. 이와 같은 HLA 제한적인 항원 특이 면역반응의 유도를 확인하는데 A2K^b transgenic 마우스가 유용하다고 보고되어 있다(25-28).

기존의 연구에서 HBx 유래의 펩타이드(XEP-3, -4, 및 -6)를 함입한 pH에 민감한 리포좀(pH-some-XEP)을 A2K^b transgenic 마우스에 면역하였을 때, rVV-HBx의 공격을 방어하였고 그 효과는 XEP 특이적인 CD8+ T 세포 수가 증가한 때문임을 ex vivo에서 확인한 바 있다(in press). 그러나 XEP 특이 CD8+ T 세포가 표적세포에 특이적인 살해능을 가지는지 여부는 확인하지 못하였으며 펩타이드 특이적인 CTL의 반응이 in vitro 배양 후에도 나타나는지에 대해서도 확인하지 못하였다. 따라서 본 연구에서는 A2K^b transgenic 마우스에 pH-some-XEP를 다양한 농도로 면역하고 rVV-HBx의 challenge에 대한 방어효과가 있는지를 확인한 다음, 이러한 방어효과가 펩타이드에 특이적인 CTL에 의한 것인지 알기 위하여 주효세포를 in vitro culture하여 세포 살해능 검사와 감마 인터페론을 분비하는 CD8+ T 세포 수를 측정하였다.

재료 및 방법

펩타이드. 본 연구에서는 선행 연구의 결과에 근거하여 HBx에서 유래한 세 가지 펩타이드를 사용하였다. 펩타이드는 MPS (Multiple Peptide System, San Diego, CA)에서 합성, 정제한 것을 사용하였고, 각 펩타이드의 서열은 다음과 같다. XEP-3; HLSLRGLFV, XEP-4; VLHKRTLGL, XEP-6; CLFKDWEEL. CTL의 배양을 위하여 phosphate buffered saline (PBS)에 잘 녹지 않는 XEP-3와 XEP-6 펩타이드는 우선 적절한 버퍼에 녹인 후 최종적으로 1X PBS가 되도록 하였으며 XEP-4는 PBS에 곧바로 용해하였다. XEP-3 펩타이드는 5% acetic acid 최소량으로 먼저 용해하였고, XEP-6는 0.1% ammonium acetate 버퍼에 녹인 다음, 농도를 1 mg/ml로 맞추고 pH를 7.0～7.4로 맞춘 후 4°C 냉장조건에서 한 달 이내에 사용하거나 -70°C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

HBx 펩타이드를 함유하는 pH에 민감한 리포좀의 제조. 펩타이드를 pH에 민감한 리포좀에 함입하는 선행 연구를 다소 수정하여 HBx 펩타이드를 함입하였다. 요약하면, phosphatidyl-β-oleoyl-ɣ-palmitoyl ethanolamine (POPE, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)과 cholesterol hemisuccinate (CHOH, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)를 chloroform에 7 : 3의 mole 비로 녹이고, 유리관에서 질소가스로 말렸다. 10 mg의 리피드에 펩타이드 총량이 1 mg 되도록 사용하였다. 적절한 버퍼에 녹인 각 펩타이드를 지질피막을 이룬 유리관에 넣고 강하게 섞었다. 유화액은 extruder (Lipex Biomembranes, Vancouver, BC, Canada)에 장착한 두 겹의 0.4㎛ polycarbonate 막을 통과시켜서 균질한 크기의 리포좀을 만들었다. 펩타이드가 함입된 리포좀은 4°C 에 보관하거나 장기보존을 위하여 동결건조하였다.

HBx를 coding하는 재조합 vaccinia virus (rVV-HBx)의 제조. HBx 유전자는 pMJ601 벡터의 합성된 late promoter 다음에 있는 *Sal*I/*Hind*III site로 클로닝되었다. 이 plasmid는 야생 vaccinia 바이러스(Western Reverse 주)를 143B 세포에 감염시킬 때 함께 형질도입하여 HBx 유전자를 가지는 재조합 vaccinia 바이러스가 만들어 지도록 하였다. 재조합된 vaccinia 바이러스의 검색은 바이러스가 감염된 143B 세포를 5% FBS와 25μg/ml 농도의 BrdU가 함유된 α-MEM 배양액에서 배양하여 재조합된 vaccinia 바이러스만 증식하도록 하였고, 대조군으로 BrdU가 없는 배양액에도 동일한 바이러스가 감염된 143B 세포를 배양하였다. 배양 2일 후에 viral plaque를 X-gal 염색하여 파란색을 띠는 viral plaque만을 선별하였다. 선별된 viral plaque를 다시 143B 세포에 감염시키는 과정을 5회 이상 반복하여 BrdU가 없는 배양액에서도 더 이상 X-gal에 염색되지 않는 야생 vaccinia 바이러스가 나타나지 않을 때까지 선별하였다. 재조합된 바이러스 plaque로 바이러스 stock을 만들었고 바이러스 역가를 측정한 후 -70°C에 보관하였다.

A2K^b transgenic 마우스의 생산. 사람의 HLA-A2.1 유전자에서 펩타이드와 결합하는 부위인 α1과 α2 부위와 마우스의 H-2K^b 유전자에서 α3 이하의 부위를 PCR로 증폭시켜 각각 클로닝한 다음 제한효소와 T4 ligase를 사용하여 두 유전자를 결합하여 chimeric MHC 유전자를 만들었다. 이 유전자를 EL-4 세포에 형질도입하여 HLA-A2.1분자가 가지는 α1과 α2 부위를 정상적으로 발현하는 것을 확인한 다음(data not shown), Balb/C와 C57BL/6 마우스의 잡종암컷으로부터 얻은 단세포 배아(single cell embryo)에 이 유전자 절편을 미세주사하여 transgenic 마우스를 생산하였다. 꼬리조직의 genomic 유전자와 혈구세포에서 얻은 RNA를 PCR하여 유전자의 발현을 확인하였으며, 최종적으로 말초혈액세포에서 HLA-A2.1의 α1과 α2 분자를 인식하는 항체를 이용하여 A2K^{b}분자의 발현을 유세포 분석기(FACScalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA)로 확인하였다. Chimeric MHC의 발현이 확인된 마우스는 8～9 주령일 때 면역실험에 사용하였다.

면역 및 방어실험. XEP 펩타이드가 함입된 pH에 민감한 리포좀을 펩타이드 농도별로 마우스에 근육주사하고 1주일 후 추가 접종하였다. 대조 군으로 아무런 처리를 하지 않은 마우스와 펩타이드 없이 지질만으로 구성된 빈 리포좀 면역을 설정하였고 각 마우스는 펩타이드 농도를 기준으로 0.5μg/head, 5μg/head, 50μg/head가 되도록 면역하였다. 암컷 마우스를 XEP-리포좀으로 면역한 지 3주 후에 rVV-HBx를 1×10^7 pfu/head로 복강주사하고 5일 후에 난소를 적출하였다. 난소는 pellet pestle motor (Kontes, Vineland, NJ)로 균질화시킨 다음 143B 세포에서 바이러스 역가를 측정하였다. 바이러스로 challenge하지 않은 마우스에서는 면역 3주 후에 비장을 적출하고 삼등분한 다음 in vitro에서 XEP 각 펩타이드로 자극을 주면서 CTL을 배양하였다.

마우스 CTL의 *in vitro* 유도. 면역 3주 후에 적출한 마우스의 비장세포는 삼등분한 후 각각의 펩타이드를 주면서 배양하였다. 1×10^6의 세포를 48-well plate의 한 well에 넣고 20μg/ml의 각 펩타이드와 10 unit/ml의 재조합 mIL-2 (Calbiochem, Darmstadt, Germany)를 주어, RPMI 1640 배양액에서 배양하였다. 배양액은 10%의 FBS (Gibco-BRL, Grand Island, NY), 0.05 mM β-mercaptoethanol, L-glutamine, antibiotic-antimycotic (Gibco-BRL, Grand Island, NY), 25 mM HEPES를 섞어 사용하였다. 1주일 간격으로 3회에 걸쳐서 세포를 재자극하면서 펩타이드에 특이적인 CTL을 유도하였다. 배양 중인 세포에 면역하지 않은 동종의 마우스 비장세포를 추출하여 20μg/ml 농도의 각 펩타이드에 2시간 동안 노출시킨 후 첨가하여

재자극하였다. 이렇게 배양된 세포는 마지막 재자극 4일 후에 ^{51}Cr-release assay 방법으로 세포 살해능을 확인하였다.

세포 살해능 검사. 면역하지 않은 동종 마우스의 비장세포를 Con. A로 이틀동안 활성화시켜 세포 크기를 증가시킨 다음 ficoll에 얹어 원심분리하여 살아있는 세포만을 취하였다. XEP-3 펩타이드에 2시간 동안 노출시킨 다음 ^{51}sodium chromate로 표지하고 이를 표적세포로 사용하였다. 표적세포를 1×10^4/100 ul씩 96-well plate의 각 well에 넣었다. 각 펩타이드로 유도된 CTL을 주효세포로 하여 다양한 농도로 섞어 준 후 4시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 대조군으로 HBc18 펩타이드에 노출시킨 비장세포를 표적 세포로 사용하였다. 반응이 끝난 상청액은 well마다 100μL씩 걷어내어 γ-counter (Cobra II, Packard Instrument, Meriden, CT)로 방사능량을 측정하였다. 세포 살해능은 다음의 식으로 계산되었다. Percentage specific lysis=100×(experimental release-spontaneous release)/(maximum release-spontaneous release).

감마 인터페론을 분비하는 CD8+ 세포 수의 측정. 배양된 세포는 5군으로 나누어 시험 군으로 세 가지 XEP 펩타이드를 처리하고 양성 대조 군으로는 Con. A (2μg/ml) 처리를, 음성 대조 군으로는 아무 처리도 하지 않았다. 펩타이드 자극은 동종 마우스의 비장세포에 각 펩타이드를 노출시킨 APC를 배양된 주효세포와 1 : 1로 섞어 주었고, 이 때 배양액에 GolgiStop (PharMingen, San Diego, CA)을 함께 넣어 6시간 동안 배양하였다. 자극된 세포는 FITC (fluorescen isothiocyanate)가 표지된 CD8 항체로 세포표면의 CD8분자를 염색한 다음 CytoFix/Cytoperm (PgarMingen)과 Perm/Wash (PharMingen) 버퍼로 고정하고 세포막 투과를 하였다. PE가 표지된 감마 인터페론 항체로 염색하여 유세포 분석기로 분석하였다. 결과는 CD8+ 세포 중에서 감마 인터페론을 분비하는 세포 수를 측정하여 백분율로 나타내었다.

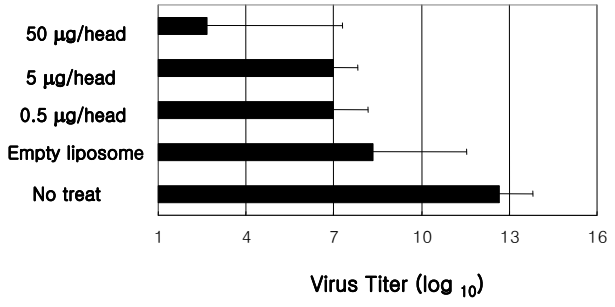

Figure 1. Three weeks after immunization with XEPs-liposome or empty liposome as control, mice were challenged with 1×10^7 pfu/head of rVV-HBx i.p.. The ovaries were harvested and the viral titer was measured using TK$^-$ 143B cells. The mean viral titre±S.E. value of three or four mice in each group is shown.

결 과

면역된 transgenic 마우스에서 rVV-HBx 바이러스의 방어. XEP 펩타이드로 면역된 A2K^b transgenic 마우스에 HLA-A2.1에 제한적인 HBx 유래의 펩타이드를 함입한 pH에 민감한 리포좀으로 면역하고 rVV-HBx로 challenge 하였을 때, 난소에서 검출되는 바이러스의 역가는 면역한 항원 펩타이드의 농도에 의존적인 것으로 나타났다 (Fig. 1). 아무런 처치를 하지 않은 A2K^b transgenic mouse는 바이러스 역가가 10^{12}~10^{13} pfu/ml에 이르는 것으로 나타난 반면, 50μg/head로 면역된 마우스에서는 바이러스가 전혀 검출되지 않거나 10^2~10^3 pfu/ml인 것으로 확인되었다. 5μg/head와 0.5μg/head로 면역한 마우스에서는 큰 차이를 보이지 않았으며, 펩타이드 없이 리포좀만 면역한 군보다는 다소 낮은 역가를 보였다. 리포좀만 면역한 군에서도 아무런 면역을 하지 않은 군에 비해 바이러스 역가는 낮게 나타났다. 이와 같은 바이러스 방어효과는 선행연구의 결과와 유사하였다.

세포 살해능 비교. 각 면역군의 마우스로부터 얻은 비장세포를 XEP-3, -4, 및 6으로 재자극을 주면서 4주간 배양하고 세포 살해능을 보았다. XEP-3로 자극된 주효세포의 세포 살해능을 면역한 펩타이드의 농도별로 비교해 보았을 때(Fig. 2), 5μg/head로 면역한 마우스 비장세포가 펩타이드 특이적인 세포 살해능이 큰 것을 확인할 수 있었다. 특기할 사실은 50μg/head로 면역한 마우스에

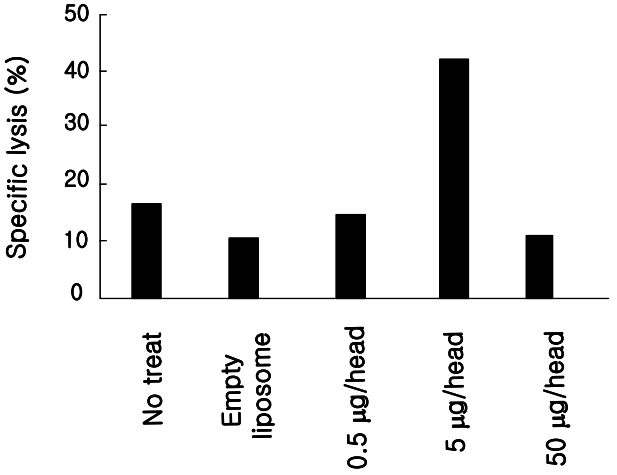

Figure 2. The cytotoxic activity of the CTLs was assessed by standard ^{51}Cr-release methods on the fifth day after restimulation. Syngeneic splenocytes were stimulated with Con.A (2μg/ml) for 2 days and harvested by centrifugation over ficoll cushion. Splenocytes were labeled with ^{51}Cr, and incubated with six fold of effector cells. Supernatants were collected and the radioactivity counted using a γ-counter (Cobra II, Packard Instrument, Meriden, CT). Specific lysis was calculated as follows: percentage specific lysis=100×(experimental release-spontaneous release)/(maximum release-spontaneous release).

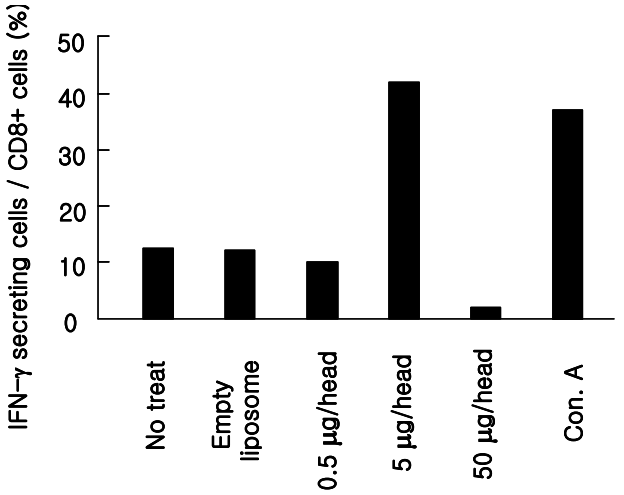

Figure 3. Three weeks after immunization with XEPs-liposome, or empty liposome as control, mice were challenged with 1×10^7 pfu/head of rVV-HBx i.p.. Five days after challenge, the spleens were harvested and restimulated with either the appropriate peptide (20μg/ml) on APCs, Con. A (2μg/ml, positive control), or vehicle (negative control) for 5hrs in media supplemented with GolgiStop. Cells were stained with FITC-conjugated anti-CD8 (PharMingen), washed, fixed, and permeabilized with Perm Wash/Fix (PharMingen) and further stained with PE-conjugated anti IFN-ɣ.

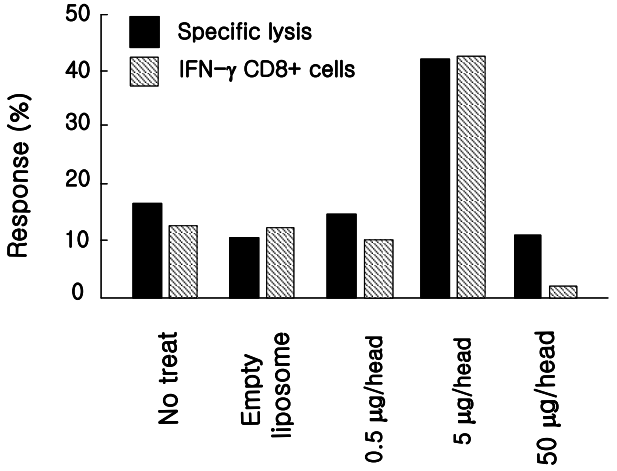

Figure 4. Stimulated with syngeneic APC cells were stained with FITC-conjugated anti-CD8 and PE-conjugated anti-IFN-ɣ. Results are presented as the percentage of positive cells among $CD8^+$ cells. The cytotoxic activity of the CTLs was assessed on XEP-3 pulsed-syngeneic target cells by standard ^{51}Cr-release methods.

서 오히려 낮은 세포 살해능을 보인 점이다. XEP-4와 XEP-6로 자극하였던 경우에는 동일한 양으로 자극했음에도 불구하고 배양 도중 세포들의 과도한 활성화가 관찰되었으며, 활성화 후의 급격한 사멸 현상 때문에 주효세포를 확보하지 못하여 세포살해시험을 시행하지 못하였다.

면역한 마우스 비장세포 중 감마 인터페론을 분비하는 CD8+ 세포 수의 증가. XEP-3로 감작시켜 배양한 세포를 펩타이드로 처리한 동종 비장세포로 재자극한 후 CD8+ 세포 중에서 감마 인터페론은 분비하는 세포수를 유세포 분석기로 측정하였다(Fig. 3). 각 농도별로 면역된 마우스의 비장세포는 XEP-3 펩타이드로 *in vitro*에서 자극받을 때 감마 인터페론을 분비하는 CD8+세포 수가 차이가 났다. 5μg/head로 면역된 마우스에서 양성 대조군으로 사용한 Con. A자극과 비교하여 상당한 정도의 감마 인터페론 분비세포가 증가하였다. 5μg/head로 면역한 마우스를 제외한 어느 면역 군에서도 유의할 만한 감마 인터페론 분비 CD8+ 세포의 증가를 보이지 않았다.

세포 살해능 검사와 인터페론 감마 분비세포 검사의 비교. 세포 살해능 검사와 감마 인터페론을 분비하는 CD8+ 세포 수의 측정방법은 상관관계가 큰 것으로 나타났다(Fig. 4). XEP-3 펩타이드로 면역된 마우스에서 각 면역 군별로 주효세포에 대한 세포 살해능과 CD8+ 세포 중 감마 인터페론 분비세포의 백분율을 비교해 보았을 때 XEP-3 펩타이드에 대하여 5μg/head로 면역된 마우스 군은 펩타이드 자극에 대하여 감마 인터페론을 분비하는 CD8+ T 세포수를 증가시켰고 또한 펩타이드가 감작된 표적세포를 잘 살해할 수 있었으며 다른 농도로 면역된 마우스에서는 어느 것도 충분한 반응을 보이지 못하였다.

고찰 및 결론

우리는 선행연구에서 HBx의 CTL 에피톱으로 XEP-3, -4, 및 6를 선택한 바 있다. 이들 펩타이드가 간염환자의 말초혈액에서부터 특이적인 CTL을 잘 유도하였을 뿐만 아니라 XEP 펩타이드가 함입된 pH에 민감한 리포좀으로 A2K^b transgenic 마우스에 면역했을 때 rVV-HBx의 공격을 잘 방어하였으며 이 때 감마 인터페론을 분비하는 CD8+ 세포 수가 늘어난다는 것을 확인한 바 있다(in press). 그러나 이러한 세포수의 증가는 *ex vivo* 상태에서 확인한 결과이고, in vitro 배양 후 특이적인 세포 살해능을 보지 못하였다. 그러나 이들 세포들이 세포 살해능도 가질 것이라고 추측하였다.

먼저, 선행연구 결과와 마찬가지로 세 가지 펩타이드(XEP-3, -4, 그리고 6)를 섞어서 리포좀에 함입한 XEP-liposome을 면역하였을 때, 3주가 경과하면 rVV-HBx의 공격을 면역농도에 의존적으로 방어할 수 있음을 알 수 있다. 선행 연구에서와 마찬가지로 이러한 방어효과가 주로 XEP-4와 XEP-6에 대한 감마 인터페론을 분비하는 CD8+ 세포 수의 증가에 기인한다는 것을 *ex vivo*에서 확인하였다. 그러나 본 실험에서는 4주 이상 *in vitro* 배양을 통하여 펩타이드에 특이적인 CTL을 배양한 결과,

XEP-4와 XEP-6에 대한 세포 살해능 및 감마 인터페론 분비 세포 수는 측정하지 못하였고 대신 XEP-3에 대한 효과만을 비교하였다. 그 이유는 아마도 펩타이드 자극으로 CTL을 유도하는 방법에 있다고 생각한다. 본 실험에서는 1주 간격으로 총 4회에 걸쳐 20μg/ml의 펩타이드에 노출시킨 APC로 자극하였고 배양액 교환 시에도 수차례 펩타이드를 추가로 가하였다. 이와 같은 강도의 펩타이드 자극은 XEP-4와 XEP-6과 같은 펩타이드를 사용할 경우 너무 강한 자극이었다고 판단된다. 펩타이드로 자극된 후 주효세포들은 그 크기가 몹시 비대해 지고 활성화된 T 세포의 모양을 잃었으며, 수일 내에 모두 사멸하고 일부 남아있는 T 세포가 다시 증식하는 것을 관찰하였다. 대신, 상대적으로 HLA-A2.1에 대한 결합력이 약한 XEP-3 펩타이드는 이 정도의 자극에 대해 적절한 정도로 T 세포가 증식하는 것을 관찰하였고, 그 결과 펩타이드 특이적인 CTL을 유도한 것이라고 생각된다.

HLA-A2.1 분자와 펩타이드 간의 상대적인 결합능력의 차이는 선행연구에서 확인한 바가 있다. XEP-3 펩타이드는 XEP-4와 XEP-6에 비해 HLA-A2.1에 대하여 짧은 결합 반감기를 가지며(http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/index.html) 이는 HLA-A2.1분자와의 결합력과 CTL 유도능력을 반영하였다(in press). 따라서 펩타이드에 대한 특이적인 CTL을 유도하고자 할 때, 펩타이드의 물리 화학적 성질을 고려하여 적정농도의 자극이 주어져야 한다. 즉, XEP-3보다 상대적으로 결합력이 강한 XEP-4와 XEP-6에 대한 CTL을 *in vitro*에서 배양하고자 할 때, 훨씬 낮은 강도로 자극되어야 할 것이다.

XEP-3의 자극에 있어서 50μg/head로 면역된 마우스는 5μg/head로 면역된 마우스보다 훨씬 낮은 세포 살해능과 감마 인터페론 분비 세포 비율을 보였다. 이것 또한 같은 이유로 설명될 수 있다고 보여진다. 즉, XEP-3도 50μg/head로 면역되면 충분히 자극된 펩타이드 특이적인 CTL이 유도될 수 있고 이러한 CTL은 강한 *in vitro* 자극에서 대부분 과다하게 활성화되어 세포사멸을 초래하는 것으로 보여진다. 선행연구에서 XEP-4와 XEP-6에 대한 감마 인터페론 분비 세포 수는 5μg/head로 면역된 마우스와 50μg/head로 면역된 마우스에서 비슷하게 측정되지만 XEP-3로 면역된 마우스에서는 농도 의존적으로 세포 수가 증가하였다. 이것은 적어도 XEP-3의 면역에 있어서 XEP-4와 XEP-6의 5μg/head로 면역한 것과 비슷한 면역효과를 내려면 50μg/head의 면역이 필요함을 설명한 바 있다(in press).

본 연구에서는 펩타이드에 대한 주효세포의 특이적인 반응을 세포살해능 검사와 감마 인터페론을 분비하는 CD8+ 세포수의 증가로 측정하였다. 두 가지 방법은 적어도 서로 연관이 있음을 볼 수 있었다. 이미 CD8+ T 세포 혹은 NK 세포에서 인터페론 감마의 분비가 세포살해능과 깊은 연관이 있음은 여러 연구에서 보고되었다(29). DNA minigene을 면역한 마우스에서 CD8+ T 세포 중 인터페론 감마를 분비하는 세포 수를 ELISA 방법으로 분석한 연구, 펩타이드가 감작된 dendritic cell을 면역한 후에 유도되는 CTL의 반응, CD56+ 세포의 세포 살해능과 감마 인터페론 분비량과의 상관관계에 관한 연구 등에서 ^{51}Cr-release에 의한 세포살해능 검사와 감마 인터페론 분비를 측정하는 방법은 밀접하게 연관되어 있음을 보여주었다. 본 연구에서도 두 가지 방법으로 CTL의 반응을 확인한 결과, 5μg/head로 면역된 마우스에서 XEP-3 펩타이드 특이적인 CD8+ T 세포가 잘 유도됨을 보았다.

이상의 결과들을 요약하면 다음과 같다. 첫째, XEP 펩타이드를 pH에 민감한 리포좀에 싸서 A2K^b transgenic 마우스에 면역하면, 면역 3주 후에 rVV-HBx의 공격을 방어할 수 있고 이는 면역한 항원의 양에 의존적으로 증가하였으며, 둘째, XEP-3, -4, 및 6 펩타이드를 이용하여 *in vitro*에서 주효세포를 자극할 때, 20μg/head의 펩타이드가 감작된 APC로 4회 정도 자극하는 것은 XEP-4와 XEP-6에 반응하는 CTL을 성공적으로 배양할 수 없으며, 상대적으로 HLA-A2.1분자에 대한 결합력이 약한 XEP-3 펩타이드에 반응하는 CTL을 유도하기에는 적절하다고 판단된다. 셋째, XEP-3 펩타이드에 반응하는 CTL의 효능을 세포 살해능 검사와 감마 인터페론 분비세포수의 측정으로 보았을 때 5μg/head로 면역한 마우스에서 가장 강한 반응을 보였다. 넷째, 펩타이드에 반응하는 CTL의 효과를 비교하는 두 가지 시험법은 서로 연관이 있는 것으로 보여진다. 즉 펩타이드 자극에 대하여 감마 인터페론을 분비하는 CD8+ 세포수가 증가한다는 것은 펩타이드 특이적인 세포 살해능이 크다는 의미이다.

앞으로 좀더 다양한 농도로 면역을 하였을 때, *in vitro* 펩타이드 자극을 통하여 특이적인 CTL이 유도되는지, 그리고 감마 인터페론 분비세포수가 증가하는지 확인해 볼 필요가 있다. 그리고, 각 펩타이드의 물리화학적 특성을 고려하여 적절한 in vivo, in vitro CTL유도 조건을 확립하여야 할 것이다. 또한 50μg/head로 면역한 마우스에서 특이적인 CTL 반응과 감마 인터페론 분비가 낮은 이유가 CTL 유도가 약한 때문인지, 혹은, 강한 자극으로 유도된 세포사멸(activated induced cell death) 때문인지를 실험적으로 증명하여야 할 것이다. 그리고 본 실험에서 사용한 두 가지 시험법이 상관관계를 보이는 것이 반복된 실험에서도 계속 확인될 것인지 더 연구가 필요할 것이다.

참 고 문 헌

1. Hackett CJ, Eisenlohr LC: Virus entry and antigen biosynthesis in the processing and presenta-

tion of class-II MHC-restricted T-cell determinants of influenza virus. Immunol Res 9;103-114, 1990
2. Antonio A, Ulrich HK: Viral mechanism of immune evasion. Molecular Medicine Today 6;365-372, 2000
3. Chisari FV, Ferrari C: Hepatitis B virus immunopathogenesis. Annu Rev Immunol 13;29-60, 1995
4. Yasunari N, Guiditti LG, Kohien CV, Fowler P, Chisari FV: Immune pathogenesis of hepatocellular carcinoma. J Exp Med. 188;341-350, 1998
5. Protzer U, Schaller H: Immune escape by Hepatitis B virus. Virus Genes 21;27-37, 2000
6. Hohne M, Schaefer S, Seifer M, Feitelson MA, Paul D, Gerlich WH: Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus DNA. Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus DNA. EMBO J 9;1137-1145, 1990
7. Arichi T, Saito T, Major ME, Belyakov IM, Shirai M, Engelhard VH, Feinstone SM, Berzofsky JA: Prophylactic DNA vaccine for hepatitis C virus (HCV) infection: HCV-specific cytotoxic T lymphocyte induction and protection from HCV-recombinant vaccinia infection in an HLA-A2.1 transgenic mouse model. Proc Natl Acad Sci USA 97;297-302, 2000
8. Schirmbeck R, Zheng X, Roggendorf M, Geissler M, Chisari FV, Reimann J, Lu M: Targeting murine immune responses to selected T cell- or antibody-defined determinants of the hepatitis B surface antigen by plasmid DNA vaccines encoding chimeric antigen. J Immunol 166;1405-1413, 2001
9. Loirat D, Lemonnier FA, Michel ML: Multiepitopic HLA-A* 0201-restricted immune response against hepatitis B surface antigen after DNA-based immunization. J Immunol 165; 4748-4755, 2000
10. Nayersina R, Fowler P, Guilhot S, Missale G, Cerny A, Schlicht HJ, Vitiello A, Chesnut R, Person JL, Redeker AG, et al: HLA A2 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection. J Immunol 150;4659-4671, 1993
11. Wiesmuller KH, Fleckenstein B, Jung G: Peptide vaccines and peptide libraries. Biol Chem 382; 571-579, 2001
12. Sjolander A, Drane D, Maraskovsky E, Scheerlinck JP, Suhrbier A, Tennent J, Pearse M: Immune responses to ISCOM formulations in animal and primate models. Vaccine 19;2661-2665, 2001
13. Agger EM, Andersen P: Tuberculosis subunit vaccine development: on the role of interferon-gamma. Vaccine 19;2298-2302, 2001
14. Polakos NK, Drane D, Cox J, Ng P, Selby MJ, Chien D, O'Hagan DT, Houghton M, Paliard X: Characterization of hepatitis C virus core-specific immune responses primed in rhesus macaques by a nonclassical ISCOM vaccine. J Immunol 166; 3589-3598, 2001
15. Plum SM, Holaday JW, Ruiz A, Madsen JW, Fogler WE, Fortier AH: Administration of a liposomal FGF-2 peptide vaccine leads to abrogation of FGF-2-mediated angiogenesis and tumor development. Vaccine 19;1294-1303, 2000
16. Chin J, San Gil F: Skin delivery of a hybrid liposome/ISCOM vaccine implicates a role for adjuvants in rapid modulation of inflammatory cells involved in innate immunity before the enhancement of adaptive immune responses. Immunol Cell Biol 76;245-255, 1998
17. Tsunoda I, Sette A, Fujinami RS, Oseroff C, Ruppert J, Dahlberg C, Southwood S, Arrhenius T, Kuang LQ, Kubo RT, Chesnul RW, Ishioka GY: Lipopeptide particles as the immunologically active component of CTL inducing vaccines. Vaccine 17;675-685, 1999
18. Chikh G, Bally M, Schutze-Redelmeier MP: Characterization of hybrid CTL epitope delivery systems consisting of the Antennapedia homeodomain peptide vector formulated in liposomes. J Immunol Methods 254;119-135, 2001
19. Lopes LM, Chain BM: Liposome-mediated delivery stimulates a class I-restricted cytotoxic T cell response to soluble antigen. Eur J Immunol 22;287-290, 1992
20. Luo L, Li Y, Chang JS, Cho SY, Kim TY, Choi MJ, Cheong HS, Kim HJ, Ahn HJ, Min MK, Chun BH, Jung SM, Woo SG, Park SY, Kang CY: Induction of V3-specific cytotoxic T lymphocyte responses by HIV gag particles carrying multiple immunodominant V3 epitopes of gp120. Virology 240; 316-325, 1998
21. Chang JS, Choi MJ, Kim TY, Woo GJ, Chung S, Cheong HS: Effect of dehydration and rehydration of the pH-sensitive liposomes containing chimeric gag-V3 virus like particle on their long-term stability. Biotechnol Bioprocess Eng 4;66-71, 1999
22. Chang JS, Choi MJ, Kim TY, Cho SY, Cheong HS: Immunogenicity of synthetic HIV-1 V3 loop peptides by MPL adjuvanted pH-sensitive liposomes. Vaccine 17;1540-1548, 1999
23. Park JM, Cho SY, Hwang YK, Um SH, Kim WJ, Cheong HS, Byun SM: Identification of H-2K(b)-restricted T-cell epitopes within the nucleocapsid

protein of Hantaan virus and establishment of cytotoxic T-cell clones. J Med Virol 60;189-99, 2000
24. Chang J, Choi M, Cheong H, Kim K: Development of Th1-mediated CD8+ effector T cells by vaccination with epitope peptides encapsulated in pH-sensitive liposomes. Vaccine 19; 3608-3614, 2001
25. Newberg MH, Smith DH, Haertel SB, Vining DR, Lacy E, Engelhard VH: Importance of MHC class 1 alpha2 and alpha3 domains in the recognition of self and non-self MHC molecules. J Immunol 156;2473-2480, 1996
26. Epstein H, Hardy R, May JS, Johnson MH, Holmes N: Expression and function of HLA-A2.1 in transgenic mice. Eur J Immunol 19;1575-1583, 1989
27. Yu Z, Liu X, McCarty TM, Diamond DJ, Ellenhorn JD: The use of transgenic mice to generate high affinity p53 specific cytolytic T cells. J Surg Res 69;337-343, 1997
28. Ishioka GY, Fikes J, Hermanson G, Livingston B, Crimi C, Qin M, Marie France del Guercio, Oseroff C, Dahlberg C, Alexander J, Chesnut RW, Sette A: Utilization of MHC class I transgenic mice for development of minigene DNA vaccines encoding multiple HLA-restricted CTL epitopes. J Immunol 162;3915-3925, 1999
29. McKinney DM, Skvoretz R, Qin M, Ishioka G, Sette A: Characterization of an in situ IFN-gamma ELISA assay which is able to detect specific peptide responses from freshly isolated splenocytes induced by DNA minigene immunization. J Immunol Methods 237;105-117, 2000