

CEA 발현 수지상 세포를 이용한 CEA 특이 살해 T 세포의 유도

가톨릭대학교 의과대학 ¹미생물학교실, ²외과학교실, ³신경외과학교실

원은하¹ · 김창현¹ · 박미영¹ · 조현일¹ · 오승택² · 홍용길³ · 김태규¹

Induction of CEA-specific Cytotoxic T Lymphocytes by Murine Dendritic Cells Expressing CEA

Eun-Ha Won¹, Chang-Hyun Kim¹, Mi-Young Park¹, Hyun-Il Cho¹, Seong-Taek Oh², Yong-Kil Hong³ and Tai-Gyu Kim¹

Departments of ¹Microbiology and Immunology, ²Surgery and ³Neurosurgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: Carcinoembryonic antigen (CEA) is well-known soluble tumor marker frequently detectable in peripheral blood of carcinoma patients and considered as good target for antigen-specific immunotherapy. In this study, we used a replication-deficient adenovirus containing CEA to study CTL induction in vitro after adenovirus-mediated gene transfer into DC. **Methods:** DC were obtained from mouse bone marrow and cultured with IL-4 and GM-CSF. For measuring CTL activity, splenocytes were harvested from the mice, which were immunized with DC that had been infected AdV-CEA or pulsed with CEA peptide. Untreated DC was used as a control. Splenocytes were re-stimulated in vitro with DC pulsed with CEA peptide for 7 days and CTL activity with CEA peptide-pulsed EL-4 cells were assessed in a standard ⁵¹Cr-release assay. The frequencies of antigen-specific cytokine-secreting T cell were determined with mIFN- γ ELISPOT. **Results:** DC infected with recombinant adenovirus expressing CEA induced CEA-specific CTL responses in vivo. Splenocyte induced from mice immunized with AdV-CEA-infected DC increase in the number of IFN- γ secreting T cells compared with those from mice immunized with CEA peptide-pulsed DC. **Conclusion:** These results suggested that DC infected with recombinant adenovirus has advantages over other forms of vaccination and could provide an alternative approach vaccination therapies. (Immune Network 2003;3(4):295-301)

Key Words: Carcinoembryonic antigen (CEA), adenovirus, dendritic cell (DC), cytotoxic T lymphocytes (CTL)

서 론

항종양 면역반응에는 일반적으로 세포성 면역반응이 관여하고, 이러한 반응은 CD8⁺ 세포독성 T세포(CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte, CTL)의 역할이 중요한 것으로 알

려졌다(1). 이들 항종양 T세포를 유도하기 위해 종양-연관 항원(tumor-associated antigen; TAA)에 대한 연구가 지속되어 왔으며, 재조합 DNA 기술의 발달로 종양에 대한 T세포 면역치료법의 개발을 위한 연구가 최근 계속되고 있다(2). 종양-연관 항원에는 prostate-specific antigen (3), HER-2/neu (4), MUC-1 (5), point mutated or wild-type overexpressed p53 (6), MAGE antigen (7), 그리고 carcinoembryonic antigen (CEA) 등이 알려져 있으며, 종양 항원 유래의 펩타이드 항원결정기(peptide epitope)를 규명하고 이들 종양 항원에 특이적으로 작용하는 세포독성 T

책임저자 : 김태규, 가톨릭대학교 의과대학 미생물학교실
☎ 137-701, 서울시 서초구 반포동 505
Tel: 02-590-1216, Fax: 02-594-7355
E-mail: kimtg@cmc.cuk.ac.kr

본 연구는 Korea Research Foundation Grant (KRF-2002-005-E00013)의 지원으로 수행되었음.

세포를 이용하여 종양을 치료하기 위한 면역 치료법이 개발되고 있다(8). CEA는 180 kDa의 당 단백질로서 대장 직장암, 위암, 췌장암에서 95% 이상 발현되고, 유방암의 약 50%, 비소세포성 폐암의 70%에서 발현되는 것으로 보고되었다(9). Kass는 실험 마우스를 이용하여 CEA 유전자에 대한 재조합 vaccinia를 면역 주입함으로써 CEA에 특이적인 체액성 면역반응과 세포성 면역반응을 유도함으로써 CEA를 발현하는 종양세포에 대해 방어적인 항-종양 면역반응이 유도됨을 확인하였다(10). 최근에는 전이암 환자에서 재조합 vaccinia를 이용하여 항종양 효과를 유도하기 위한 임상 연구가 시도되었으며(11), CEA를 암호화하고 있는 DNA를 결장암 환자에 주입하여 CEA에 특이적인 세포 독성 T 세포를 유도함으로써 효과적인 항종양 면역반응을 유도한 보고가 있다(12). 종양세포에 특이적으로 작용하는 항원-특이 세포독성 T 세포가 유도되기 위해서는 MHC class I 분자에 항원이 제시되는 과정이 필수적이다. 이러한 과정은 세포 내의 단백질이 large multifunctional proteasome에 의해 처리되어 transporter associated with antigen processing 단백질에 의해 소포체(endoplasmic reticulum)로 이동하여 MHC class I 분자와 결합되고, 골지체(golgi apparatus)를 경유하여 세포 표면에 제시되는 과정으로 이루어진다(13). CEA를 이용한 항종양 효과 연구에서 MHC class I 항원 제시 과정에 의한 세포독성 T 세포를 유도하기 위하여 초기에는 CEA를 발현하는 재조합 vaccinia 바이러스를 이용하였다. 마우스 모델에서 재조합 vaccinia를 면역 주입하여 CEA에 특이적인 체액성 면역반응과 세포성 면역반응을 유도하여 CEA를 발현하는 종양세포에 대하여 방어적인 면역반응이 일어나는 것을 확인하였다. 최근에는 전이성 선암 환자에서 재조합 vaccinia를 이용하여 항종양 효과를 유도하기 위한 연구가 시도되고 있다. 또한 몇몇 MHC class I 분자에 제한적인 CEA 항원 결정기(CEA epitope)가 규명됨으로써 수지상 세포와 CEA peptide를 이용하여 종양에 대한 세포독성 T 세포를 유도하고자 하는 연구가 있으며(14), CEA를 암호화하고 있는 DNA를 결장직장암 환자에 주입하여 CEA에 특이적인 세포독성 T세포 생성을 유도함으로써 효과적인 항종양 면역반응을 유도한 보고가 있다. 그러나, 이러한 MHC class I 분자에 의한 항원제시 과정은 세포 내부에서 발현되는 단백질에 국한되어 나타나는 특징이 있으므로 최근에는 외래 단백질을 직접 MHC class I 분자에 제시되도록 하는 연구가 시도되고 있다. 일반적으로 백신으로 사용되는 외래 단백질은 endocytosis된 후 대부분 MHC class II 분자에 의해 제시되어 Th (CD4⁺) 세포를

자극하게 되므로 항종양 면역반응을 증가시키는 데 부적합한 것으로 알려져 있다.

따라서 강력한 항원제시세포로서 알려졌다며 항원-특이 CTL유도에 사용되는 항원제시세포 중 수지상 세포는 골수에서 기원하여 말초 부위(peripheral site)에서 미성숙 상태로 존재한 후 항원을 인지하여 증식이 억제된 T 세포를 자극하여 항원에 대해 활성을 갖는 T 세포의 면역 반응을 개시하거나 조절하는 것으로 알려져 있다. 수지상 세포는 면역 반응에 관여하는 MHC, CD80, CD86, lymphocyte function-associated antigen (LFA) 1과 3, intracellular adhesion molecule (ICAM) 1과 3 등의 분자를 높은 수준으로 발현하므로 최근 항종양 면역 반응을 유도하기 위하여 많이 이용되고 있다. 수지상 세포를 이용하여 종양-특이 T 세포를 유도하기 위해 특정 HLA (Human leukocyte antigen)형에 특이적인 종양 항원 유래의 펩타이드가 이용되고 있으나, 특정 HLA 아형에 제한적으로 작용하는 단점이 있다(15). 이러한 한계점을 극복하기 위해 수지상 세포에 종양 유전자를 전이함으로써 종양 항원을 발현시키기 위한 여러 방법이 연구되고 있다(16). 특히 재조합 아데노바이러스는 큰 크기의 외래 항원 유전자의 삽입이 가능하고, 세포 분열을 하지 않는 표적세포에 감염되어 항원 단백질을 발현하는 장점이 있어 다양한 유전자 치료법 개발에 널리 사용되고 있다(17).

본 연구에서는 CEA 종양 항원 단백질을 발현하는 고역가 재조합 아데노바이러스를 생산하여 수지상 세포에 효율적으로 종양 항원을 전이하고 마우스에 면역 주입하여 CEA 종양 항원을 발현하는 수지상 세포를 이용하여 종양 항원에 특이적인 T 세포를 마우스 모델에서 유도함으로써 종양-특이 세포성 면역 치료법 개발의 기초적 연구 자료로 이용되며 세포독성 T 세포에 의한 세포성 면역반응을 증가시킬 수 있는 종양 백신을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

세포주 및 배양. 사람 대장암 종양 세포주인 LoVo 세포주(ATCC# CCL-229), YAC-1 세포주는 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin/streptomycin과 10% 우태아 혈청(Fetal bovine serum; FBS: Gibco BRL, Grand Island, USA)이 포함된 RPMI 1640 (Gibco BRL) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 사람태아 신장 세포주인 HEK 293 세포주(Clontech, Palo Alto, CA, USA)와 마우스 T 세포 림프종 EL-4 (ATCC# TIB-39) 세포는 위와 같이 제조된 DMEM (Gibco BRL)배지에서 배양하였다.

재조합 Ad-CEA 생산 및 바이러스 역가 측정. CEA 단백질을 발현하는 LoVo 세포주로 부터 RNA를 추출한 다음 Reverse Transcriptase AMV kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 sense primer 5'-GGACTTTTAAACACAGAA-TTGGG-3', antisense primer 5'-CCTTGTGCCCATGGAA-CACAGAC-3'를 사용하여 중합 효소 연쇄 반응법으로 증폭시켜 약 2.1 kb의 CEA 유전자를 클로닝하여 염기서열을 확인하였다. 재조합 아데노바이러스는 pAdeno-XTM kit (Clontech)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 생산하였다. 약술하면, 증폭된 CEA 유전자를 pShuttle 벡터에 삽입한 후 제한 효소 *I-CeuI*과 *PI-SceI*을 사용하여 절단하고 동일하게 처리된 pAdeno-XTM 벡터에 삽입하여 재조합 Ad-CEA와 대조군으로 EGFP (Enhanced Green fluorescent Protein) 유전자가 삽입된 Ad-EGFP 유전자를 제조하였다. 재조합 Ad-CEA를 제한효소 *PacI*으로 처리하여 정제한 후 SuperfectTM Transfection (Qiagen, Hilden, Germany) 제제를 이용하여 HEK 293 세포주에 전이하였고, 7~10일 배양한 후 플라크를 관찰하여 재조합 아데노바이러스를 확인하였다. 생산된 재조합 아데노바이러스를 CsCl₂ 고속 원심 분리법을 이용하여 수득한 후 TCID₅₀ (50% tissue culture infection dose) 방법으로 바이러스 역가를 측정하였다.

수지상 세포의 배양과 재조합 아데노바이러스 발현 확인. 실험쥐 유래된 수지상 세포를 배양하기 위하여 6~8주령 암컷 C57BL/6 마우스의 골수로부터 분리한 골수 세포에서 T세포, B세포 및 대식세포를 제거한 후 100 U/ml GM-CSF (Genzyme, Cambridge, MA, USA)와 50 U/ml IL-4 (Genzyme)가 포함된 RPMI 1640 배지(Gibco BRL)에서 7일간 배양하였다. 배양된 수지상 세포에 CEA의 발현을 확인하기 위하여 MOI 100으로 CEA를 발현하는 재조합 아데노바이러스를 첨가하고 37°C에서 90분간 감염시킨 후 항CEA 항체(Ascites; ATCC# HB-8747)를 이용하여 형광염색 및 Western 방법으로 CEA의 발현을 확인하였다.

Ad-CEA와 CEA 펩타이드로 감작시킨 수지상 세포를 이용한 면역. 마우스 H-2K^b에 특이적인 항원 결정기로 알려진 CEA 펩타이드(EAQNTTYL)는 AnyGen (광주기술원, 광주, 한국)사에 의뢰하여 제조하였다. 10 μ g/ml 농도의 CEA 펩타이드와 Ad-CEA 바이러스 MOI 100으로 처리한 수지상 세포(5 \times 10⁵/마리)를 각 실험군당 4마리씩 마우스에 정맥주사하였다. 대조군으로 마우스에서 유래된 수지상 세포만을 주입하였다. 제1차 수지상 세포의 정맥주사 후, 2 주일 후 재주사하고, 재주사 2주 후에

세포성 면역 반응을 측정하였다.

ELISPOT에 의한 INF- γ 발현 림프구 측정. CEA 펩타이드에 대한 세포성 면역반응 유도 효과로서 INF- γ 를 측정하기 위해 마우스에서 분리하여 1주간 배양한 수지상 세포에 10 μ g/ml로 CEA 펩타이드를 감작시켜 항원제시세포로서 사용하였다. 마우스 capture mAb INF- γ 가 코팅된 96-well 배양조에 면역 주입한 마우스의 비장세포를 분리하여 적혈구를 제거한 다음 CEA 펩타이드가 감작된 수지상 세포와 같은 비율(1 : 1)로 혼합하여 1 \times 10⁴/well 농도로 배양조에 접종한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 반응시켰다. PBS (phosphate-buffer saline)/Tween (0.05%)로 3회 세척 후 2 μ g/ml Biotinylate가 부착된 항INF- γ 항체를 첨가하여 실온에서 2시간 반응시켰다. 4번 수세한 다음 avidin/alkaline phosphatase를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 발색하여 각 well의 spot 개수를 ELISPOT Reader (AID, Strassberg, Germany)를 이용하여 측정하였다.

CEA-특이 T세포주의 세포 살해능 측정. 면역되지 않은 수지상 세포 1 \times 10⁶/ml에 H-2K^b에 제한된 CEA 펩타이드를 (EAQNTTYL) 10 μ g/ml 농도로 4시간 반응시킨 세포를 2번 수세한 다음 표적 항원이 첨가된 수지상 세포를 3,000 cGy로 방사선 조사하였다. 면역 주입한 마우스의 비장세포를 분리하여 20 : 1 비율로 혼합하고 24-well 배양조에 접종한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 2~3일마다 세포를 관찰하면서 20 U/ml의 IL-2 (Genzyme)를 첨가하였다. 배양 7일 후 자극된 림프구를 수득하여 CEA에 대한 특이 CTL 살해능을 측정하기 위해 EL-4 세포에 CEA 펩타이드를 10 μ g/ml 농도로 4시간 반응시킨 후 2회 수세한 다음 표적세포로 사용하여 종양에 대한 특이적인 세포 살해능을 측정하였다. 표적세포를 100 Ci ⁵¹Cr/5 \times 10⁵ 세포로 90분 동안 표지한 다음 4회 수세 후 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640 배지에 부유하여 V-형의 96-well 배양조에 1 \times 10⁴/well 농도로 접종하고 시험관 내에서 배양된 T 세포주를 100 : 1 비율로 첨가하였다. 배양조를 1,500 rpm에서 10분 원심 침전시킨 다음 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 배양한 후 100 μ l의 상층액을 수거하여 γ -counter (Packard, Meriden, CT, USA)를 이용하여 방사량을 측정하고 다음의 계산식을 이용하여 세포살해 정도를 측정하였다.

통계학적 분석. 모든 측정 결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하였고, 자료의 유의성을 검정하기 위하여 Student's *t*-test로 통계처리하여 유의성을 검정하였으며 통계학적 유의수준은 $p < 0.05$ 이하로 하였다.

$$\% \text{ specific release (SR)} = \frac{\text{experimental release} - \text{spontaneous release}}{\text{maximal release} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

experimental release: 표적세포와 세포독성 T 세포를 함께 배양하여 얻은 값

spontaneous release: 배지만으로 배양된 표적세포에서 얻은 값

maximal release: 1% Triton X-100을 첨가하여 배양한 표적세포에서 얻은 값

결 과

유도된 수지상 세포에 재조합 아데노바이러스 발현 확인. CEA를 발현하는 재조합 아데노바이러스를 제조하여 HEK 293 세포주에 전이하여 7~10일 배양 후에 플라크를 관찰하여 재조합 아데노바이러스를 생산하였다.

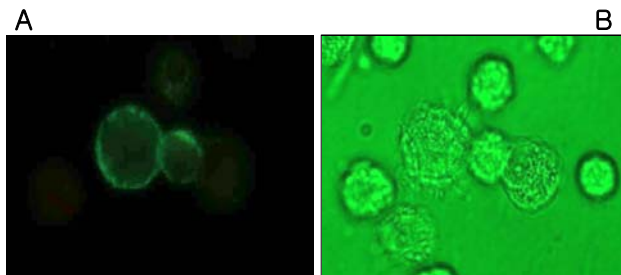


Figure 1. Expression of CEA in cultured dendritic cells. Transmitted light micrograph of dendritic cells were cultured for 48 hrs after infection with AdV-CEA at an MOI of 100 at 37°C (A). Same field as in left panel under fluorescence detection using a fluorescein filter set (B). CEA was expressed on the surface of DCs.

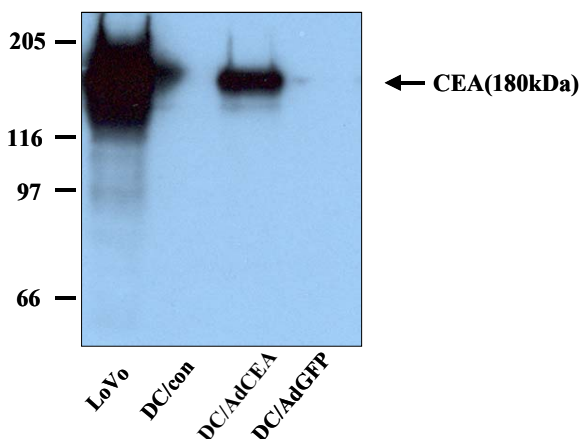


Figure 2. Expression of AdV-CEA in dendritic cells. Protein extracts of dendritic cells were analyzed by 8% SDS-PAGE gel and subjected to Western blot analysis with an anti-CEA antibody. CEA was expressed at 180 kDa.

생산된 재조합 아데노바이러스를 수득한 후 TCID₅₀ (50% tissue culture infection dose) 방법으로 바이러스 역가를 측정된 결과 1×10^9 /ml의 역가를 확인하였다. 재조합 아데노바이러스를 수득한 후 C57BL/6 마우스의 골수로부터 분리한 골수 세포에서 유래된 수지상 세포에 CEA를 발현하는 재조합 아데노바이러스를 MOI 100으로 37°C에서 90분간 감염시켜 배양시킨 후 CEA의 발현을 면역 형광 염색법으로 확인한 결과 CEA는 세포표면에 분포하고 있음을 관찰하였고(Fig. 1), Western blot 분석법으로 CEA 발현을 LoVo 세포주를 대조군으로 사용하였으며 항-CEA 항체를 이용하여 180 kDa의 발현을 확인하였다(Fig. 2).

IFN- γ 발현 림프구 빈도 측정에 의한 CEA 특이 세포성 면역능 평가. Ad-CEA와 CEA 펩타이드로 감염시킨 수지상 세포에 의한 세포성 면역반응 유도 효과를 측정하기 위해 면역시킨 마우스에서 분리한 비장세포를 CEA 펩타이드(EAQNTTYL)로 감염시킨 수지상 세포로 시험관 내에서 자극하여 IFN- γ 발현 림프구의 빈도를 측정하였다. IFN- γ 발현 림프구 빈도는 대조군으로 사용한 CEA로 감염되지 않은 수지상세포군에서는 $17.8 \pm 4.5 / 10^4$ 림프구, CEA 펩타이드로 감염시킨 수지상세포군에서 $201.6 \pm 26.8 / 10^4$ 림프구 ($p < 0.0002$), 또한 Ad-CEA로 감염시킨 수지상세포군에서는 $375.8 \pm 27.1 / 10^4$ 림프구 ($p < 0.0001$)로 유의하게 관찰되었다(Fig. 3, 4).

CEA 특이 세포 독성 T 세포 면역능 측정. 면역시킨 마우스에서 분리한 비장세포를 CEA 펩타이드(EAQNTTYL)로 감염시킨 수지상 세포로 시험관 내에서 자극하여 1주일간 배양 후 EL-4와 CEA 펩타이드 감염 EL-4를 표적세포로 이용하여 CEA 특이 세포독성 T세포 면역능을 측정하였다. EL-4에 CEA 펩타이드를 감염시킨 표적세포에 대해 DC만을 면역시킨 실험군에서는 CEA 특이 CTL이 유도되지 않았으나, Ad-CEA로 감염시킨 수

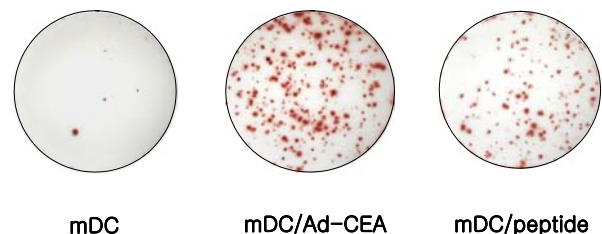


Figure 3. Detection of antigen-specific CD8⁺ T cells by ELISPOT in the spleen cells of mice immunized with DCs that had been infected AdV-CEA or pulsed with CEA peptide. Representative ELISPOT wells are shown after plate development. Cells are incubated with DCs pulsing with 10 μ g/ml CEA peptide. These spots were visualized and counted as described in the method.

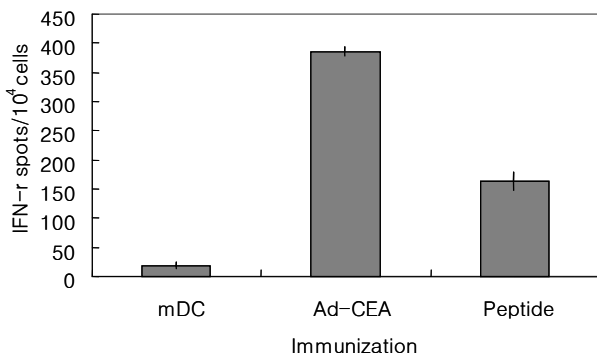


Figure 4. DCs infected with AdV-CEA induces CEA-specific CD8⁺ T cell responses in IFN- γ ELISPOT assay. Splenocytes from mice immunized with DC infected AdV-CEA or pulsed with CEA peptide were incubated with 10^4 DC pulsed with CEA peptide for 24 hrs. Each bar represents the mean of the results from four mice \pm S.D.

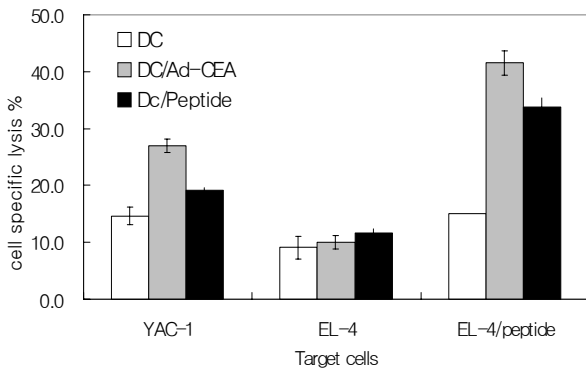


Figure 5. Induction of the CTL response using dendritic cells pulsed with CEA peptide. DCs pulsed with CEA peptide at 37°C and then used as stimulators. Splenocytes of immunized mouse were used as responders. Targets consisted of EL-4 unpulsed or pulsed with 10 μ g/ml of CEA peptide.

지상세포로 면역시킨 실험군에서 $41.5 \pm 4.3\%$ ($p < 0.002$) ($E : T = 1 : 100$), DC/peptide로 면역 주입시킨 실험군에서는 $33.8 \pm 3.18\%$ ($p < 0.0001$) ($E : T = 1 : 100$)로 두 군 모두에서 T 세포에 의한 세포독성을 관찰하였다. 음성대조로 CEA 펩타이드가 감작되지 않은 EL-4를 표적세포로 이용한 경우 모든 군에서 T세포에 의한 세포독성이 나타나지 않았다. 자연살해세포 활성을 확인한 결과 재조합 Ad-CEA군에서는 $27.0 \pm 2.32\%$, 펩타이드군에 의해 유도된 경우 $19.2 \pm 0.79\%$ 의 활성이 관찰되었다(Fig. 5).

고 찰

CEA는 다양한 종양에서 발현되는 자가 항원의 일원이며 면역치료에서 강력한 표지 인자로 정의되고 있다(7). 지금까지 CEA는 태아 세포에서 자가 항원으로 발현

되고 정상 결장 표피세포에서 아주 적게 발현되어 CEA에 대한 내성을 나타내므로 CEA에 대한 항원의 유도가 어려웠다. 그러나 최근에 몇몇 CEA를 기본으로 항원 백신을 이용하여 종양 환자에서 CEA 특이 CD4⁺와 CD8⁺ T 세포 반응을 유도한 연구가 보고되었다(18). 항원-특이 CTL 유도에서 체내에서 가장 강력한 항원제시세포로 수지상 세포의 이용은 세포성 면역 치료에 많이 이용되고 있으며 시험관 내에서 항원 존재 시 수지상 세포의 발달은 악성종양의 면역치료를 중요한 방법으로 연구되고 있다. 수지상 세포를 이용하여 종양-특이 T 세포를 유도하기 위한 방법으로 항원으로서 펩타이드, RNA 등이 이용되었으나 그 효율은 매우 낮은 것으로 보고되었다. 따라서 수지상 세포에 효과적으로 종양 항원을 전달하기 위한 연구가 진행되었다. 여러 연구를 통하여 지금까지는 B7-1 유전자와 융합된 CEA 유전자를 삽입시킨 avipox virus를 수지상 세포에 전이시켜 시험관 내에서 CEA-특이 세포 독성 T 세포를 유도를 증명하였으며(19), CAP-1 펩타이드와 IL-2로 자극된 말초 혈액세포와 함께 vaccinia virus에 CEA 유전자를 삽입시켜 투여한 환자로부터 세포독성 T 세포를 유도할 수 있음이 보고되었다(18,20).

본 실험에서는 수지상 세포에 재조합 Adeno-CEA의 전이 조건을 확립하여 수지상 세포에 재조합 Ad-CEA 바이러스와 CEA 펩타이드를 감작시킨 후 각각 면역 주입하여 *in vivo* 상에서 CEA 특이 세포 독성 T 세포의 유도를 확인하였다. 수지상 세포에 외부 유전자 전이에 효율적이며 안정적이라고 알려진 adenovirus의 전이는 마우스의 골수로부터 분리한 골수 세포로부터 GM-CSF, IL-4가 포함된 배지에서 7일 이상 배양 시 유도된 수지상 세포에 37°C 정도에서 아데노바이러스의 전이가 효율적인 것으로 확인하였다. 이는 성숙한 수지상 세포로의 분화가 되었을 때에 전이 효율이 높으며, 대부분의 세포 발생 조건과 마찬가지로 수지상 세포가 발생되고 분화되는 환경에서 외부유전자의 전이 또한 발생하는 것으로 생각된다.

Th1의 대표적인 사이토카인으로 알려진 IFN- γ 는 항원 또는 마이토젠 자극으로 활성화된 T 세포에서 생성되며 MHC class I에 의해 제시되는 펩타이드에 대한 항원 특이 T 세포 반응 시 분비되어 세포성 면역반응 유도 효과를 측정하는 인자이다. 항원에 특이하게 반응하는 T 세포의 빈도를 직접 측정할 수 있는 IFN- γ ELISPOT 검사에서 AdV-CEA로 감작시킨 수지상세포군에서도 CEA 펩타이드로 감작시킨 군과 마찬가지로 세포성 면역 반응을 유도할 수 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과

는 CEA 종양 항원 단백질을 발현하는 고역가 재조합 아테노바이러스가 수지상 세포에 효율적으로 종양 항원을 전이되었음을 시사한다. Rice 등은 마우스의 CEA peptide (EAQNTTYL)를 발견하여 이용함으로써 CEA 특이 세포 독성 T 세포반응을 유도하였다는 보고가 있다(21). 동일한 펩타이드로 감염된 수지상 세포로 비장세포를 자극하여 1주일간 배양시킨 결과 CEA 펩타이드와 Ad-CEA로 면역한 마우스에서는 CEA 특이 세포 독성 T 세포 면역능을 유도할 수 있었으며 두 실험군 간의 차이를 나타내지 않았다. 이는 CEA의 특이 세포 독성 T 세포 면역능을 정량적으로 반영하지 못한 것으로 생각된다. 그러므로 두 군 간의 차이를 확인하기 위해 백신의 횡수, 항원의 양, 표적세포 등의 특성을 고려하여야 할 것으로 생각된다. 또한, YAC-1 target cell에 대한 NK cell 활성화가 나타나는데 이는 Adenovirus에 의해 DC가 활성화함으로써 IL-12나 IFN- γ 를 분비하여 NK 세포의 활성이 유도되는 것으로 생각된다(22). 이상의 결과로서 Ad-CEA는 종양백신이나 시험관 내 세포 독성 T 세포를 유도하여 세포성 면역치료를 개발하는 데 유용하게 사용될 수 있음을 시사하였다. 정상인 말초 혈액 단핵구로부터 수지상세포로 유도하여 재조합 adenovirus CEA를 감염시켜 효율적으로 CEA 특이적인 세포 독성 T 세포를 유도한 보고가 있다(23).

앞으로 Ad-CEA와 수지상 세포를 이용한 면역치료의 최종적인 효과를 검증하고 전임상 연구를 위해 동물 모델에서 종양의 발생을 억제하거나 종양의 치료 효과를 증명하는 것이 필요할 것으로 생각된다. 또한, 재조합 아테노바이러스는 대상 세포의 핵 내로 삽입되지 않고 episomal 상태로 유지된다. 따라서 바이러스에 감염된 세포가 증식하면서 외부 유전자의 발현수준이 점차 떨어질 것이므로 일시적으로 많은 양의 발현이 필요하게 될 것이다. 따라서 많은 양의 바이러스를 종양 세포에 감염이 가능하겠지만 높은 역가의 감염 시 염증의 유발을 초래한다고 알려져 있으므로(24) 이를 극복하기 위해 수지상 세포의 이용이 제시되고 있다. 따라서 재조합 Ad-CEA가 전이된 수지상 세포에 의해 유도된 낮은 자연 살해 세포 활성화는 아테노바이러스가 세포에 미치는 영향이 적음을 의미하므로 재조합 아테노바이러스 벡터는 새로운 백신의 개발이나 유전자 치료에 아주 유용한 유전자 전달 매개체로 사용될 수 있을 것으로 생각되며, 종양 항원인 CEA에 대한 특이 세포 독성 T 세포의 유도는 CEA를 발현하는 종양세포를 제거할 수 있으므로 면역 치료에 좋은 인자로 이용될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Alters SE, Gadea JR, Sorich M, O'Donoghue G, Talib S, Philip R: Dendritic cells pulsed with CEA peptide induce CEA-specific CTL with restricted TCR repertoire. *J Immunother* 21;17-26, 1998
2. Schultze JL, Maecker B, Von Bergwelt-Baildon MS, Anderson KS, Vonderheide RH: Tumor immunotherapy: new tool, new treatment modalities and new T-cell antigens. *Vox Sang* 80; 81-89, 2001
3. Oesterling JE: Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. *J Urol* 145;907-923, 1991
4. Fisk B, Chesak B, Pollack MS, Wharton JT, Ioannides CG: Oligopeptide induction of a cytotoxic T lymphocyte response to HER-2/neu proto-oncogene in vitro. *Cell Immunol* 157;415-427, 1994
5. Ioannides CG, Fisk B, Jerome KR, Irimura T, Wharton JT, Finn OJ: Cytotoxic T cells from ovarian malignant tumors can recognize polymorphic epithelial mucin core peptides. *J Immunol* 151;3693-3703, 1993
6. Houbiers JG, Nijman HW, van der Burg SH, Drijfhout JW, Kenemans P, van de Velde CJ, Brand A, Momburg F, Kast WM, Melief CJ: In vitro induction of human cytotoxic T lymphocyte responses against peptides of mutant and wild-type p53. *Eur J Immunol* 23;2072-2077, 1993
7. Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Pel A: Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 12;337-365, 1994
8. Ockert D, Schmitz M, Hampl M, Rieber EP: Advance in cancer immunotherapy. *Immunol Today* 22;516-523, 1999
9. Thompson JA, Grunert F, Zimmermann W: Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal* 5;344-366, 1991
10. Kass E, Schlom J, Thompson J, Guadagni F, Graziano P, Greiner JW: Induction of protective host immunity to carcinoembryonic antigen (CEA), a self-antigen in CEA transgenic mice, by immunizing with a recombinant vaccinia-CEA virus. *Cancer Res* 59; 676-683, 1999
11. Conry RM, Khazaeli MB, Saleh MN, Allen KO, Barlow DL, Moore SE, Craig D, Arani RB, Schlom J, LoBuglio AF: Phase I trial of a recombinant vaccinia virus encoding carcinoembryonic antigen in metastatic adenocarcinoma: comparison of intradermal versus subcutaneous administration. *Clin Cancer Res* 5; 2330-2337, 1999
12. Zhu MZ, Marshall J, Cole D, Schlom J, Tsang KY: Specific cytolytic T-cell responses to human CEA from patients immunized with recombinant avipox-CEA vaccine. *Clin Cancer Res* 6;24-33, 2000
13. Germain RN: The biochemistry and cell biology of antigen presenting by MHC class I and class II molecules: implications for development of combination vaccines. *Ann NY Acad Sci* 754;114-125, 1995
14. Nair SK, Hull S, Coleman D, Gilboa E, Lyster HK, Morse MA: Induction of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vitro using autologous dendritic cells loaded with CEA peptide or CEA RNA in patients with metastatic malignancies expressing CEA. *Int J Cancer* 82;121-124, 1999
15. Massimo DN, Salvatore S, Marco B, Palo L, Michele M, Marco M, Paola M, Roberta M, Andrea A, Giorgio P, Ingo D, Volker E, Gerd S, A. massimo G: Gene transfer into human dendritic antigen-presenting cells by vaccinia virus and adenovirus vectors. *Cancer Gene Therapy* 5;350-356, 1998
16. Bruce CB, Akkrig A, Sharpe SA, Hanke T, Wilkinson GW,

- Cranage MP: Replication-deficient recombinant adenoviruses expressing the human immunodeficiency virus Env antigen can induce both humoral and CTL immune responses in mice. *J Gen Virol* 80;2621-2628, 1999
17. Wickham TJ, Mathias P, Cheres DA, Nemerow GR: Integrins alpha V beta 3 and alpha V beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73;309-319, 1993
 18. Tsang KY, Zaremba S, Nieroda CA, Zhu MZ, Hamilton JM, Schlom J: Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine. *J Natl Cancer Inst* 87;982-990, 1995
 19. Tsang KY, Zhu M, Even J, Gulley J, Arlen P, Schlom J: The infection of human dendritic cells with recombinant avipox vectors expressing a costimulatory molecule transgene (CD80) to enhance the activation of antigen-specific cytolytic T cells. *Cancer Res* 61;7568-7576, 2001
 20. Marshall JL, Hoyer RJ, Toomey MA, Faraguna K, Chang P, Richmond E, Pedicano JE, Gehan E, Peck RA, Arlen P, Tsang KY, Schlom J: Phase I study in advanced cancer patients of a diversified prime-and-boost vaccination protocol using recombinant vaccinia virus and recombinant nonreplicating avipox virus to elicit anti-carcinoembryonic antigen immune responses. *J Clin Oncol* 18; 3964-3973, 2000
 21. Rice J, Elliott T, Buchan S, Stevenson FK: DNA fusion vaccine designed to induce cytotoxic T cell responses against defined peptide motifs: implications for cancer vaccines. *J Immunol* 167;1558-1568, 2001
 22. Miller G, Lahrs S, Pillarisetty VG, Shah AB, DeMatteo RP: Adenovirus infection enhances dendritic cell immunostimulatory properties and induces nature killer and T-cell-mediated tumor protection. *Cancer Res* 62;5260-5266, 2002
 23. Cho HI, Kim HJ, Oh ST, Kim TG: In vitro induction of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells transduced with recombinant adenovirus. *Vaccine* 22;224-236, 2003
 24. Engelhardt JF, Simon RH, Yang Y, Zepeda M, Weber-Pendleton S, Doranz B, Grossman M, Wilson JM: Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of nonhuman primates: biological efficacy study. *Hum Gene Ther* 4;759-769, 1993
-