

GD2 유사 항이디오타입 항체의 세포면역 유발 잠재성

관동대학교 의과대학 미생물학교실

박윤선 · 신운섭

Potentiality of Anti-idiotypic Antibodies Mimicking GD2 to Induce Cellular Immunity

Yoon-Sun Park and Woon-Seob Shin

Department of Microbiology, Kwandong University College of Medicine, Gangneung, Korea

ABSTRACT

Background: Disialoganglioside GD2 is a tumor-associated antigen that is overexpressed on tumor cells of neuroectodermal origin, such as melanoma, small cell lung carcinoma and neuroblastoma. Immunity against GD2 has anti-tumor activities, but GD2 is poorly immunogenic. Anti-idiotypic antibodies that mimic GD2 may induce more effective immune responses than GD2 antigen itself, because they are protein antigens and are known to be able to break immune tolerance. In our previous study, we produced anti-idiotypic antibodies mimicking GD2 (3A4 and 3H9), which induced humoral immunity. However, cellular immunity is essential to eradicate tumor cells in vivo as well as humoral immunity. In the present study, we investigated whether these anti-idiotypic antibodies 3A4 and 3H9 could induce cellular immune responses. **Methods:** BALB/C mice were immunized with anti-idiotypic antibody 3A4 or 3H9, or normal mouse IgG as a negative control. Lymphoproliferative responses, cytokine production responses, and delayed-type hypersensitivity reactions were measured in mice immunized with the anti-idiotypic antibodies. **Results:** Both the anti-idiotypic antibody 3A4 and 3H9 induced GD2-specific lymphoproliferative responses and IFN- γ production of lymph node lymphocytes in BALB/C mice. Only anti-idiotypic antibody 3H9 induced significant GD2-specific delayed-type hypersensitivity in the mice. **Conclusion:** These results show that anti-idiotypic antibodies 3A4 and 3H9 have the potentiality of inducing GD2-specific cellular immune responses that cannot be induced by the native antigen GD2 itself. (*Immune Network* 2004;4(4):229-236)

Key Words: Cellular immunity, anti-idiotypic antibody, GD2

서 론

악성종양 치료에 이용되는 면역요법은 면역반응의 가장 중요한 특징인 특이성 (specificity)을 이용하는 방법으로서 면역계의 주효세포들(effector cells)이 정상세포에는 영향을 주지 않으면서 종양세포만 선택적으로 공격함으로써 효과적인 항암작용을 보일 것으로 기대되고 있다. 특히 능동면역요법은 수동면역요법에 비해 면역반응의 효과와 지속성면에서 더 우수하다고 알려져 있

라 종양세포 자체를 항원으로 사용하는 종양세포 백신(tumor cell vaccines), 종양관련항원(tumor-associated antigen: TAA) 또는 종양특이항원(tumor-specific antigen: TSA)을 사용하는 종양항원 백신(antigen vaccine), 그리고 TAA나 TSA의 항원결정부위만을 면역원으로 사용하는 항원결정부위 백신(epitope vaccine)으로 나눌 수 있다. 이중 항원결정부위 백신은 항원결정부위만을 표적으로 하므로 위의 두 방법들과 비교하여 면역반응의 특이성이 가장 높아 정상조직에 대한 면역반응을 유발하지 않는 장점을 가지고 있다(3).

항원결정부위 백신은 다시 peptide나 ganglioside와 같이 항원결정부위를 갖는 분자를 직접 면역원으로 사용하거나, 이 부위에 대한 항이디오타입 항체(anti-idiotypic

책임저자 : 신운섭, 관동대학교 의과대학 미생물학교실

☎ 210-701, 강원도 강릉시 내곡동 522

Tel: 033-649-7470, Fax: 033-641-1074

E-mail: shinws@kwandong.ac.kr

으며(1,2), 능동면역요법은 사용되는 면역원의 성질에 따

antibody)를 면역원으로 사용하는 방법으로 나눌 수 있다. 이 중 항이디오타입 항체는 종양항원의 항원결정부위에 대한 항체 (Ab1)의 이디오타입(idiotype)에 대한 항체(항이디오타입 항체: Ab2)로서, 한 종류의 Ab1에는 여러 개의 이디오톱(idiotope)들이 존재하므로 한 종류의 Ab1에 대해서 여러 종류의 항이디오타입 항체가 생성될 수 있다(4). 이들 항이디오타입 항체 중에는 종양항원의 항원결정부위와 항원성이 유사한 internal image를 가지고 있는 항체가 포함되어 있으며, 이러한 항이디오타입 항체는 종양항원과 항원성이 유사하므로 종양항원을 대신하여 종양백신으로 사용될 수 있다(5). 항원결정부위 자체를 사용하는 백신과 비교한 항이디오타입 백신의 장점은 항이디오타입 항체가 단일클론 항체이므로 백신의 대량 생산이 용이하다는 점이며(6), 특히 종양항원의 성분이 disialoganglioside GD2와 같이 당질(carbohydrate) 성분인 경우에는 단백 성분의 항이디오타입 항체가 당질항원을 대신함으로써 더욱 효과적인 면역반응의 유발이 가능하다는 점이다. 그러나 무엇보다도 항이디오타입 항체의 가장 큰 매력은 종양항원에 대한 면역관용을 항이디오타입 항체가 극복할 수 있다는 것이다. 대부분의 종양항원은 정상조직에서도 발현되는 경우가 많아 종양항원과 반응하는 림프구가 소실되거나 불응상태를 보이는 면역관용이 유발된다(7,8). 이것이 종양이 면역계를 빠져나가는 주요 기전이라 생각되고 있으며, 이것을 극복하는 것이 종양에 대한 능동면역요법의 가장 중요한 과제라 할 수 있다. 항이디오타입 백신과 항원 백신을 비교 연구한 실험에서, 항원 자체로 면역시켰을 경우에는 면역관용으로 인해 면역반응이 유발되지 않았으나, 항이디오타입 항체를 면역원으로 사용하였을 경우에는 항원에 대한 면역반응이 유발되어, 항이디오타입 항체에 의해 면역관용이 극복될 수 있음을 보여주었다(9). 이러한 결과는, 동일한 항원성을 지니고 있으나 분자 형태가 다른 면역원(예, 항이디오타입 항체)을 항원대신 사용함으로써 특정 항원에 대한 면역관용을 극복할 있다는 가능성과 함께 종양에 대한 면역요법에 있어서 항이디오타입 백신의 전망과 중요성을 의미한다.

본 연구실에서는 당질 성분의 종양항원인 disialoganglioside GD2에 대한 항이디오타입 항체들을 제조하였으며, 이들 중 GD2의 internal image를 가지고 있을 것으로 판단되는 항체들(3A4와 3H9)을 선별하고, 이들 항이디오타입 항체 3A4와 3H9를 토끼에게 주사하여 항이디오타입 항체에 대한 항체, 즉 항항이디오타입 항체(anti-anti-idiotypic antibody: Ab3)의 생성을 유도하였다(10). 토끼의 혈청 내에 있는 항항이디오타입 항체는 항이디오타입 항체에 결합할 뿐만 아니라 본래의 항원인 GD2와 GD2를 발현하는 종양세포에도 특이적으로 결합함으로써 항이디오타입 항체 3A4와 3H9가 종양항원인 GD2에

직접 작용하는 항체매개면역반응을 유도함을 확인하였다. 그러나 종양백신이 종양에 대해서 효과적인 면역반응을 유발하기 위해서는 항체매개면역반응뿐만 아니라 세포매개면역반응도 유발할 수 있어야 한다. 따라서 이번 연구에서는 본 연구실에서 제조한 항이디오타입 항체 3A4와 3H9가 본래의 종양항원인 GD2에 대한 세포면역반응을 유발할 가능성이 있는지를 알아보기 위해, 항이디오타입 항체 3A4와 3H9로 면역시킨 마우스 림프구의 항원 자극에 대한 림프구 증식과 싸이토카인 생성을 측정하고, 항이디오타입 항체 면역 마우스에서 항원 자극에 대한 지연형 과민면역반응(delayed-type hypersensitivity: DTH)을 조사하였다.

재료 및 방법

면역원으로 사용된 항체. 항이디오타입 항체에 의해서 대표적 세포면역반응인 림프구 증식, 림프구에 의한 싸이토카인 생성, 및 지연형 과민면역반응이 유발되는 지를 알아보기 위한 실험에서 3A4, 3H9, 그리고 normal mouse IgG를 마우스 면역원으로 사용하였다. 이들 항체 중 3A4와 3H9는 disialoganglioside GD2에 대한 항이디오타입 항체로서 본 실험실에서 제조되었으며, 각 항체를 각 마우스 군에 접종하였다. Normal mouse IgG (Cappel JCN Pharmaceuticals, Aurora, OH, USA)는 항이디오타입 항체 3A4와 3H9에 대한 음성대조 면역원으로서 대조군 마우스에 접종하였다.

면역반응 자극제. 항이디오타입 항체로 면역된 마우스에서 림프구 증식, 싸이토카인 생성, 및 지연형 과민면역반응의 유발을 위한 자극제로는 GD2 분자(Sigma, St Louis, MO) 및 GD2 발현 세포인 WM115(melanoma cell line)를 사용하였다. 이들 자극제들에 대한 음성대조로는 GD1a 분자(Sigma, St Louis, MO) 및 GD2를 발현하지 않는 세포인 SW1116(colon carcinoma cell line)을 GD2와 WM115에 대한 각각의 음성대조 자극제로 사용하였다. WM115와 SW1116 세포는 10% fetal calf serum (FCS)이 첨가된 L-15 배지에서 배양하며 사용하였다.

실험동물. 항이디오타입 항체의 면역을 위해 사용된 실험동물은 모두 BALB/c 마우스로서 6주령의 female 마우스를 사용하였다.

마우스면역. 림프구 증식 반응과 싸이토카인 측정을 위해서는 항이디오타입 항체 3A4 또는 3H9를 BALB/C 마우스의 발바닥에 두 차례 피하접종하였으며, 지연형 과민면역반응을 유발하기 위해서는 각각의 항이디오타입 항체를 피하로 단 회 접종하였다. 두 차례 접종한 경우, 첫 회는 complete Freund's adjuvant와 섞어 50 μ g의 Ab2를 접종하였으며, 2주일 후에 incomplete Freund's adjuvant와 섞어 50 μ g의 Ab2를 재차 접종하였다. 한 차례 접종한 경우에는 complete Freund's adjuvant와 섞어 100 μ g

의 Ab2를 피하접종하였다. 각각의 경우에 대조군 마우스에게는 normal mouse IgG를 항이디오타입 항체와 동일한 adjuvant와 섞어 동량 주사하였다.

림프구 증식 반응 측정. 각 면역원의 두 번째 접종 2주 후, 마우스로부터 비장과 림프절을 적출하여 림프구들을 single-cell suspension으로 만들었다. 림프구들을 5% FCS이 포함된 RPMI 1640배지에 풀어 U-bottom plate에 well당 2×10^5 개씩 넣고 각각의 증식 자극제들(stimulants)을 첨가한 다음, 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 3일간 배양하였다. 림프구의 증식을 유발하기 위해 사용된 자극제로서는 GD2 분자와 이에 대한 음성대조인 GD1a 분자, 그리고 방사선처리한 WM115세포와 이에 대한 음성대조로서 방사선처리한 SW1116 세포를 사용하였으며, GD2 분자와 GD1a 분자는 well당 30µg을, WM115 세포와 SW1116 세포는 well당 10^4 개를 첨가하였다. 각각의 자극제를 첨가하고 3일간 배양한 다음, well당 1.0µCi의 ³H-thymidine을 넣고 18시간 동안 더 배양하였다. 배양된 림프구들을 glass-fiber filter에 모은 다음 liquid scintillation counter를 이용하여 림프구로 흡수된 ³H-thymidine의 양을 측정하였다. 이 때 한 종류의 실험에 대해 각각 세 세트(triplicate)를 구성하고, 세 세트 측정값(cpm)의 평균값을 구하였다. 림프구의 증식 정도는 각각의 자극제를 첨가했을 때의 값을 자극제 없이 buffer만을 첨가했을 때의 값으로 나눈 값인 stimulation index (SI)로서 나타내었다.

사이토카인 측정. 림프구들에 의해 분비되는 cytokine은 capture enzyme-linked immunosorbent assay (capture ELISA)를 사용하여 측정하였다. IFN-γ와 IL-4에 대한 monoclonal rat antibody로 ELISA plate의 well을 coating한 다음, 72시간 동안 각각의 자극제들과 함께 배양한 림프구 배양액의 상층액을 첨가하고 4°C에서 12시간 동안 반응시켰다. 이 때 각각의 mouse recombinant cytokine을 2배 계단 희석하여 cytokine standard를 만들고 monoclonal rat antibody가 coating된 well에 첨가한 다음, 림프구 배양액과 동일한 조건에서 배양함으로써 cytokine standard curve를 얻었다. Well에 coating된 monoclonal rat antibody와 결합한 cytokine의 양을 측정하기 위해 coating된 항체와 다른 항원결정부위(epitope)를 인지하는 biotinylated rat antibody를 첨가하고 상온에서 2시간 반응시켰다. 다시 alkaline phosphatase가 결합된 streptavidin을 첨가하고 45분간 더 반응시킴으로써 streptavidin이 biotin에 결합하도록 하였다. 마지막으로 10% diethanolamine과 phosphatase에 대한 기질을 첨가하고 10분간 반응시킨 다음, ELISA reader의 415 nm에서 흡광도를 측정하고 cytokine standard curve를 이용하여 각 흡광도에 해당하는 cytokine의 농도를 구하였다.

지연형 과민면역반응 측정. 각 면역원의 접종 7일 후,

BALB/C 마우스의 오른쪽 귀에는 방사선처리한 WM115 세포 또는 GD2 분자를 주사하고, 마우스의 왼쪽 귀에는 방사선처리한 SW1116 세포 또는 GD1a를 주사하였다. WM115 세포와 SW1116 세포는 5×10^5 개씩 주사하였으며, GD2와 GD1a는 1µg씩 사용하였다. 주사 후 24시간, 48시간, 72시간에 각각 귀의 두께를 caliper로 측정하고, 주사 전 두께와의 차이를 과민면역반응에 의한 증가치로 계산하였다.

통계 분석. 실험군과 대조군의 통계학적 차이는 t-test에 의해서 분석하였으며, *P* value가 0.05 이하인 경우에 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결과

항이디오타입 면역 마우스의 림프구 증식 반응. 항이디오타입 항체 3A4와 3H9에 의한 면역이 종양항원 GD2에 특이한 림프구를 증식시키는지 알아보기 위해, 각각의 Ab2로 면역시킨 마우스의 림프구를 GD2와 GD1a, 그리고 GD2 발현 세포인 WM115와 GD2 비발현 세포인 SW1116으로 자극하여 림프구의 증식 정도를 측정하였다. 이때 림프절 림프구와 비장 림프구를 분리하여 별도로 실험하였다. 항이디오타입 항체 3A4 면역 마우스의 림프절 림프구는 GD2 분자로 자극했을 경우 이것에 대한 음성대조 자극제인 GD1a 분자로 자극했을 경우보다 약 1.5배 더 높은 림프구 증식 반응을 보였으며, normal mouse IgG로 면역시킨 마우스와의 비교에서도 약 1.4배 증가된 증식 반응을 보였다. 그러나 통계적으로는 의미 있는 차이로 나타나지 않았다(Table I). WM115 세포 자극에 대한 림프절 림프구 증식 반응은 이것에 대한 음성대조 자극제인 SW1116으로 자극했을 때의 증식반응과 비교하여 약 6배 정도 증가하였으며(*P* < 0.05), 항이디오타입 항체 3A4에 대한 음성대조 면역원인 normal mouse IgG로 면역시키고 WM115 세포로 자극한 경우와 비교

Table I. Proliferative responses of lymph node lymphocytes from mice immunized with anti-idiotypic antibodies to stimulants

Stimulants	Stimulation index (means±SD)		
	Immunogen		
	3A4	3H9	NL mouse IgG
GD2	3.14±3.15	3.16±2.05	2.32±1.52
GD1a	2.16±1.05	2.12±0.98	1.16±2.38
WM115	22.56±4.25*	19.05±3.16*	4.12±2.45
SW1116	3.65±0.58	2.78±1.32	2.45±0.56

*Values are significantly (*P* < 0.05) higher than each of the control values.

했을 경우에도 약 5배 정도의 림프구 증식 반응을 나타

났다($P<0.05$). 항이디오타입 항체 3H9으로 면역시킨 마우스의 림프절 림프구도 GD2 분자의 자극에 대해서는 GD1a 자극 대조 및 normal mouse IgG 면역 대조와 비교하여 림프구 증식이 각각 약 1.5배와 1.4배 증가되었으며, WM115 세포로 자극했을 경우에는 각각의 음성대조에 비해서 약 7배($P<0.05$)와 5배($P<0.05$) 증가된 림프구 증식 반응을 보였다(Table I).

비장 림프구의 자극 실험에서는 항이디오타입 항체 3H9 면역 마우스의 비장 림프구만이 WM115 세포로 자극했을 때 통계적으로 의미있는 림프구 증식 반응을 보였으며($P<0.05$), 항이디오타입 항체 3A4 면역 마우스로부터의 비장 세포는 WM115 세포로 자극했을 경우에는 음성대조들과 비교하여 의미있는 림프구 증식 반응의 차이를 보이지 않았다(Table II). 항이디오타입 항체 3A4와 3H9 면역 마우스의 비장 림프구는 모두 GD2 분자의

Table II. Proliferative responses of spleen lymphocytes (splenocytes) from mice immunized with anti-idiotypic antibodies to stimulants

Stimulants	Stimulation index (means \pm SD)		
	Immunogen		
	3A4	3H9	NL mouse IgG
GD2	2.57 \pm 1.54	2.36 \pm 1.99	1.63 \pm 0.76
GD1a	1.13 \pm 2.12	1.72 \pm 2.51	0.97 \pm 1.34
WM115	3.61 \pm 2.98	16.25 \pm 1.73*	3.54 \pm 1.78
SW1116	2.75 \pm 1.75	3.11 \pm 2.45	1.87 \pm 1.11

*Values are significantly ($P<0.05$) higher than each of the control values.

보였으나, 통계적으로 의미있는 차이는 아니었다(Table II).

항이디오타입 면역 마우스의 싸이토카인 생산. 항이디오타입 항체 3A4와 3H9에 의해 면역된 마우스의 림프구들이 종양항원인 GD2에 반응하여 싸이토카인의 생성을 증가시키는 지 조사하기 위해 싸이토카인 IFN- γ 와 IL-4의 생성량을 측정하였다. 이 경우에도 림프절 림프구와 비장 림프구를 분리하여 실험하였으며, 림프절 림프구와 비장 림프구를 GD2, GD1a, WM115, 또는 SW1116으로 자극한 다음 생성된 각각의 싸이토카인 양을 비교하였다. 림프절 림프구를 대상으로 한 실험에서 (Fig. 1), 항이디오타입 항체 3A4와 3H9에 의해 면역된 마우스의 림프구들은 모두 WM115의 자극에 대해서는 IFN- γ 의 생성이 각각의 음성대조에 비해서 현저하게 증가되었으며($P<0.05$), GD2의 자극에 대해서는 음성대조보다 IFN- γ 의 생성이 약간 증가되었다(Fig. 1A). IL-4 생성 시험에서는 3A4와 3H9 면역 마우스 모두에서 림프절 림프구들의 항원자극 배양액으로부터 의미있는 양의 IL-4를 검출할 수 없었다(Fig. 1B). 비장 림프구를 대상으로 한 실험에서는(Fig. 2), 항이디오타입 항체 3A4 면역 마우스의 비장세포를 WM115로 자극했을 경우에 음성대조들에 비해서 IFN- γ 의 현저한 생성 증가를 보였으며, 항이디오타입 항체 3H9로 면역시킨 마우스의 비장 세포 배양액에서는 통계적으로 의미는 없으나 대조군들에 비해서 약간 증가된 IFN- γ 의 생성 증가를 나타냈다(Fig. 2A). 비장 림프구도 림프절 림프구와 마찬가지로 항원으로 자극한 배양액 내에서 증가된 IL-4의 생성을 확인할 수 없었다.

항이디오타입 면역 마우스의 지연형 과민면역반응. 항이디오타입 항체 3A4와 3H9에 의한 면역이 마우스에

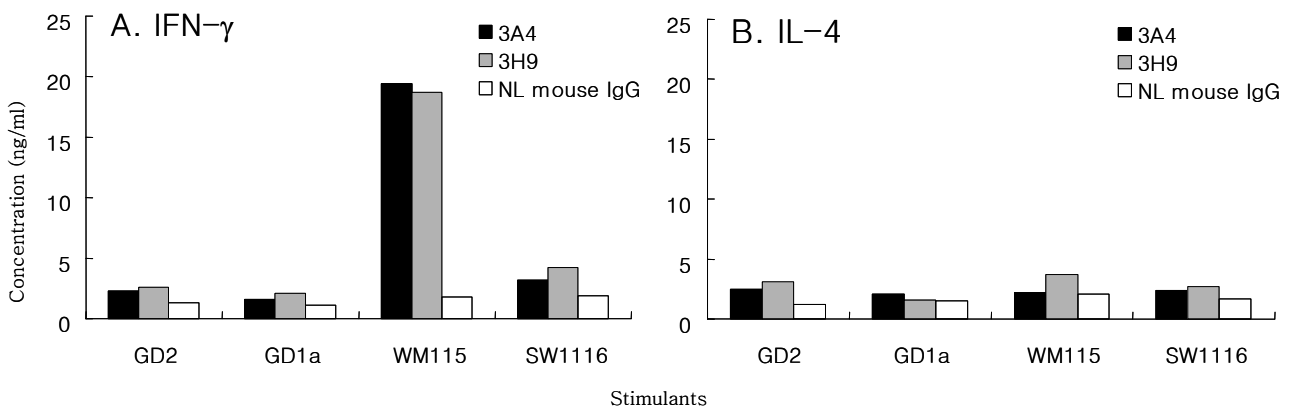


Figure 1. Production of IFN- γ (A) and IL-4 (B) by lymph node lymphocytes from mice immunized with anti-idiotypic antibodies (3A4 or 3H9) or normal mouse IgG (NL mouse IgG) in presence of stimulants. GD2 and WM115 (a GD2-positive cell line) were used as the stimulants, and GD1a and SW1116 (a GD2-negative cell line) were used as negative controls of GD2 and WM115 respectively.

자극에 대해서 음성대조들과 비교하여 증가된 반응을

서 GD2에 특이한 지연형 과민면역반응을 유발하는지

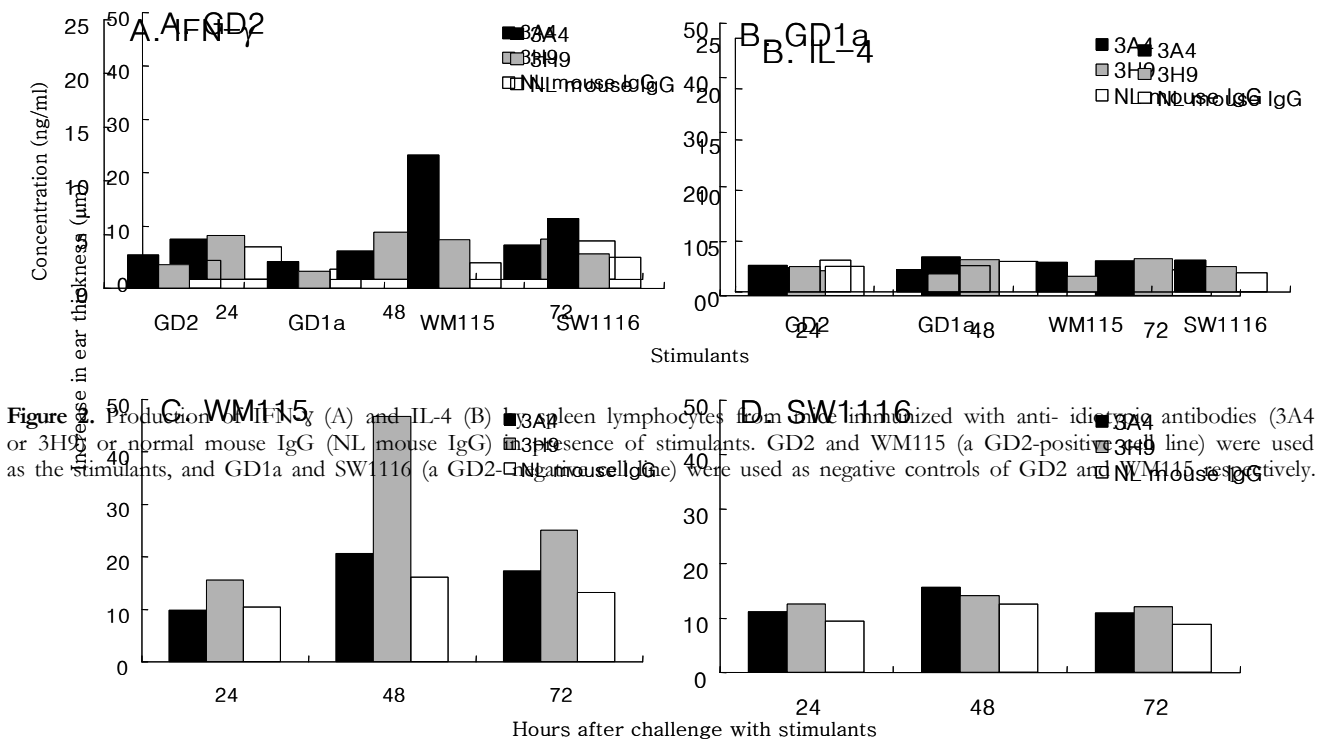


Figure 3. Production of IFN- γ (A) and IL-4 (B) by spleen lymphocytes from mice immunized with anti-idiotypic antibodies (3A4 or 3H9) or normal mouse IgG (NL mouse IgG) in the presence of stimulants. GD2 and WM115 (a GD2-positive cell line) were used as the stimulants, and GD1a and SW1116 (a GD2-negative cell line) were used as negative controls of GD2 and WM115, respectively.

Figure 3. Delayed-type hypersensitivity reactions in mice immunized with anti-idiotypic antibodies (3A4 or 3H9) or normal mouse IgG (NL mouse IgG) to GD2 (A), GD1a (B), WM115 (C) or SW1116 (D) challenge. GD1a and SW1116 (a GD2-negative cell line) were used as negative controls of GD2 and WM115, respectively.

알아보기 위해, 마우스를 세 group으로 나누어 각 group의 마우스를 3A4, 3H9, 또는 normal mouse IgG로 면역시킨 다음, 다시 각 group을 2개의 subgroup으로 나누었다. 한 subgroup의 마우스는 오른쪽 귀에 GD2 분자를 주사하고 왼쪽 귀에 GD1a를 주사하였으며, 다른 subgroup의 마우스는 오른쪽 귀에 WM115, 왼쪽 귀에 SW1116을 주사하고 24, 48, 72시간 후에 귀의 두께를 측정하였다(Fig. 3). 실험 결과, 항이디오타입 항체 3H9으로 면역시킨 마우스를 WM115로 자극했을 경우에 각각의 음성대조들에 비하여 현저하게 증가된 지연형 과민면역반응이 유발되었다(Fig. 3C). 이 경우에는 자극 후 48시간뿐만 아니라 72시간 후에도 음성대조 자극제(SW1116) 및 음성대조 면역원(NL mouse IgG)과 비교했을 때 의미있는 지연형 과민면역반응의 차이를 보였다. 항이디오타입 항체 3A4로 면역시킨 마우스에서도 WM115의 자극에 대해서 지연형 과민면역반응이 관찰되었으나, 음성 대조들에 비해서 통계적으로 의미있는 차이는 아니었다.

고 찰

Disialoganglioside GD2는 melanoma, neuroblastoma, small cell lung carcinoma 등과 같은 신경외배엽(neuroectoderm)에서 기원한 종양세포들에서 발현이 증가되어 있는 종양연관항원(Tumor associated antigen)이다(11,12).

이들 종양연관항원이 알려진 이래 GD2에 대한 단일클론 항체를 이용한 수동면역요법이 melanoma와 neuroblastoma 환자를 대상으로 시도되어 항종양 효과를 나타냈으며(13,14), 마우스에서는 GD2에 대한 단일클론 항체가 종양전이를 억제하기도 하였다(15,16). 그러나 수동면역은 종양항원에 대한 지속적인 면역반응을 유발하기 어려우므로 더 효과적이고 지속적인 면역반응을 유발하기 위한 능동면역요법들이 시도되고 있다. GD2 항원 자체를 백신으로 사용하는 연구들에서는 GD2 항원의 낮은 면역원성(immunogenicity)을 보완하기 위해 GD2 항원에 KLH(Keyhole limpet hemocyanin)와 같은 고분자의 운반체(carrier)를 결합시키거나, GD2 면역시 아쥘반트(adjuvant)를 함께 투여하는 방법들이 사용되고 있다. GD2-KLH conjugate와 아쥘반트를 동시에 면역시킨 실험들에서 GD2 항원과 반응하는 IgM 항체의 생산이 유도되었으며, 항원에 대한 친화도가 높지는 않지만 IgG항체의 생성도 유도되었다(17-19). 그러나 이러한 연구 결과들은 GD2-KLH conjugate 백신에 의해 항체매개면역반응이 유발될 수 있다는 사실을 의미하며, GD2-KLH conjugate 백신이 세포매개면역반응을 유발했다는 연구결과는 아직까지 보고되어 있지 않다.

본 연구자들은 당질 성분인 GD2 항원을 대신하여 GD2의 internal image를 갖고 있으나 단백 성분인 항이디

오타입 항체를 백신으로 사용함으로써 GD2 항원 자체의 면역에 의해 유발되지 않는 세포면역반응이 일어날 수 있을 것을 기대하고 GD2 항원에 대한 항이디오타입 항체 3A4와 3H9를 제조하였다. 몇몇 당단백(glycoprotein) 성분의 종양항원들(gp175, gp52)에 대한 항이디오타입 항체들이 각각의 당단백에 특이한 세포면역반응을 유발한 실험 결과들도 이러한 가능성을 고무하고 있다(20-22). 본 연구자들은 이미 항이디오타입 항체 3A4와 3H9이 본래의 종양항원인 GD2에 대해서 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 생성을 유도할 수 있음을 확인하였으며, 이번 연구에서는 항이디오타입 항체 3A4와 3H9이 GD2 항원에 특이한 세포면역반응을 유발할 수 있는 잠재성 여부를 조사하였다.

본 연구에 사용된 GD2 발현 양성 및 음성 세포는 WM115와 SW1116 세포로서 각각 사람의 melanoma cell line과 colon cancer cell line이다. 이들 세포가 BALB/c 마우스의 세포면역반응의 자극제로 사용됨으로써 실험 결과에서 관찰된 세포면역반응들의 일부가 자극세포 표면의 이종 항원(xenogeneic antigen)들에 대한 면역반응의 결과일 가능성을 완전히 배제할 수는 없다. 그러나 본 실험에서는 면역원으로 GD2와 유사한 구조를 갖는 항이디오타입 항체들(3A4와 3H9)을 사용하였으므로 면역반응 자극제로 사용한 세포 표면의 여러 항원들 중 면역원으로 사용되었던 항원과 동일한 항원 즉 GD2에 대해서 훨씬 더 활발하게 세포매개면역반응이 유발된다는 전제 하에 다음과 같은 설명이 가능하다. 우선 normal mouse IgG를 면역원으로 사용한 경우와 항이디오타입 항체를 면역원으로 사용한 경우를 비교했을 때, WM115의 자극에 대해서 항이디오타입 항체 3A4 및 3H9으로 면역시킨 마우스에서의 림프절 림프구 증식이 normal mouse IgG로 면역시킨 마우스에서의 그것보다 약 4배 내지 5배 정도 증가함으로써, 림프구 증식 반응의 현격한 차이를 보였다(Table I). 또한 3A4 및 3H9으로 면역시킨 마우스들에서 GD2 양성 세포인 WM115의 자극과 GD2 음성 세포인 SW1116의 자극에 대한 반응을 비교했을 때, 양성 반응을 나타낸 경우들 모두에서 WM115에 의한 자극이 SW1116에 의한 자극보다 의미있게 증가된 세포면역반응을 유발하였다. 마지막으로 림프구 증식 시험에서 통계적으로 의미있는 차이는 아니었으나, GD2 분자를 자극제로 사용했을 경우에 림프절 림프구와 비장 림프구 모두에서 GD1a 자극 대조군과 normal mouse IgG 면역 대조군에 비해서 약 1.4배 내지 1.5배 정도의 증가된 증식 반응을 보였다(Table I, II). 이상의 결과들은 이종 항원에 대한 면역반응으로만은 설명할 수 없으며, 본 실험에서 유발된 세포면역반응 중 최소한 대조군들과의 차이 부분은 GD2 유사 항이디오타입 항체와 자극세포 위의 GD2항원에 대한 특이 면역반응의 결

과임을 시사한다. 그러나 이종 항원에 대한 면역반응의 가능성을 완전히 배제할 수 있는 방법, 즉 마우스에서의 세포면역반응을 유전형이 동일한(syngeneic) 세포를 사용하여 측정하는 방법을 사용한다면 항이디오타입 항체 3A4와 3H9에 의한 항원특이 세포면역반응을 보다 명확하게 증명할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구의 의의는 GD2 항원만으로는 유발되지 않는 세포면역반응이 항이디오타입 항체 3A4와 3H9의 면역을 통해서 유발될 가능성이 있음을 보여주는 것이며, 이러한 가능성을 뒷받침하는 실험 결과들로는 림프구 증식 반응에서 3A4와 3H9이 모두 WM115 세포 자극에 대한 림프절 림프구의 증식을 유발한 점(Table I), 싸이토카인 생성 시험에서 두 항체 모두가 WM115의 자극에 대해 림프절 림프구의 IFN- γ 생성을 유도한 점(Fig. 1A), 그리고 3H9으로 면역시킨 마우스에서 WM115의 자극에 대해 DTH 반응이 유발된 점 등을 들 수 있다(Fig. 3C). 항이디오타입 항체 백신이 면역계의 세포들을 활성화시키는 기전은 아직까지 잘 알려져 있지 않으나, 항이디오타입 항체가 외인성 단백질처럼 작용하여 항원전달세포에 의해 섭취되고(endocytosis), 14개 내지 25개 정도의 아미노산 펩타이드로 처리된 다음 MHC class II 분자에 의해 보조 T세포에게 전달된다는 가설이 있다(23). 이 가설에서는 보조 T세포 중 Th2세포는 IL-4와 IL-10을 생성하여 B세포의 항체 생산을 활성화시키고, Th1세포는 IFN- γ 와 IL-2를 생성하여 T세포, 대식세포, 및 NK세포를 활성화시킴으로써 항체매개면역반응 및 세포매개면역반응을 포함한 전반적인 면역반응의 유발 가능성을 제시한다. 또한 종양항원이 단백질 성분의 항원인 경우에도 항이디오타입 항체 백신이 단백질항원 백신보다 더 우수한 면역반응을 유발한다는 연구 결과들이 보고되었으며(24-26), 이러한 효과들에 대한 기전을 설명하는 연구결과도 보고되었다(27). 이 연구 결과에 의하면 항이디오타입 항체가 자신의 Fc 부분을 통하여 항원전달세포의 Fc 수용체에 결합함으로써 Fc receptor-mediated endocytosis가 가능하다는 것이다. 따라서 Fc 부분이 없는 일반적인 단백질항원에 비해서 항원전달세포에 의한 항원전달이 매우 효과적으로 이루어지며, 결과적으로 T세포 활성화에 따른 세포매개면역반응이 유발된다고 설명하고 있다.

반면 GD2 항원 자체는 disialoganglioside 성분으로서 일반적으로 단백질 성분의 항원에 비해서 효과적인 세포면역반응을 유발하지 못하는 것으로 알려져 있다. 최근 glycolipid 성분의 항원도 CD1d 라는 분자에 의해 natural killer T (NKT) 세포에게 전달이 되는 것으로 밝혀지고 있으며 NKT 세포가 면역반응 조절에 중요한 기능을 하는 세포로 알려짐에 따라, GD2 항원도 NKT 세포에게 전달되어 이를 활성화시킬 가능성이 있으나, 종양연관항원인 GD2가 NKT 세포를 활성화시킨다는 직접적인

보고는 아직까지 없는 상태이다. 또한 본 연구에서 GD2 항원을 자극제로 사용한 시험들 가운데 림프구 증식 시험 및 싸이토카인 생성 시험과 같은 *in vitro* 시험에서는 GD2에 의한 자극이 약한 정도일지라도 세포면역반응을 유발하는 것이 관찰되었으나, *in vivo* 시험인 지연형 과민반응 시험에서는 GD2 자극에 대한 효과가 전혀 나타나지 않았다. 이는 GD2 항원이 *in vivo*에서 세포면역반응 유발을 위해 효과적으로 전달되지 못했을 가능성을 의미하며, 정확한 설명을 위해서는 앞서 기술한 GD2의 항원전달과정에 대한 기전이 먼저 이해되어야 할 것으로 사료된다.

항이디오타입 항체 백신의 가장 큰 단점은, 항이디오타입 항체가 종양항원 중 한 개의 epitope 부분만을 갖는 항원백신(single-epitope vaccine)으로 작용하므로, 여러 개의 epitope을 갖는 항원백신(multiple-epitope vaccine)과 비교하여 면역반응의 양적인 면에서 면역원성이 낮다는 것이다(28). 본 연구에서 항이디오타입 항체 3A4는 비장 림프구의 IFN- γ 생산을 증가시켰으나 비장 림프구의 증식은 유발하지 못하였으며, 항체 3H9은 비장 림프구의 증식은 유발하였으나, IFN- γ 의 생산은 증가시키지 못하였다. 림프구 증식 시험과 IFN- γ 측정 시험은 서로 다른 마우스들을 대상으로 시행하였으므로, 시험 결과가 음성으로 나타난 경우에는 각 마우스 group에서 항이디오타입 항체가 림프절 림프구와 비장 림프구를 모두 활성화시키기 위해 충분한 면역원으로 작용하지 못한 것으로 추측된다. 또한 동일한 마우스에서 림프절 림프구만이 증식 반응 또는 IFN- γ 의 생산이 증가되고 비장 림프구는 각각의 반응이 음성으로 나타난 것은 GD2 항원에 특이한 림프구 클론의 수가 제한적이므로 활성화된 GD2-특이 림프구가 림프절에만 존재하고 비장에는 거의 존재하지 않거나 매우 적은 수가 존재했을 가능성을 생각할 수 있다.

이와 같이 낮은 면역원성에도 불구하고 항이디오타입 항체 백신은 기존의 종양항원 백신과 비교했을 때, 종양항원으로는 극복할 수 없는 면역관용을 극복할 수 있다는 장점을 갖는다. 특히 종양항원이 당질 성분의 항원인 경우에는 면역반응의 유발 면에서 뿐만 아니라 백신의 제조 방법에 있어서도 종양항원 보다 훨씬 우월한 것이 사실이다. 따라서 항이디오타입 항체 백신의 단점을 보완하기 위한 방법들, 즉 항원의 여러 epitope들에 대한 다양한 항이디오타입 항체를 사용하는 방법, 항이디오타입 항체에 KLH를 결합시키는 방법, 및 항이디오타입 항체 백신을 아쥘반트와 함께 사용하는 방법 등을 이용한다면 항이디오타입 항체 백신의 효과를 극대화할 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Zhang H, Zhang S, Cheung NK, Ragupathi G, Livingston PO: Antibodies against GD2 ganglioside can eradicate syngeneic cancer micrometastases. *Cancer Res* 58;2844-2849, 1998
2. Jinnohara T, Tsujisaki M, Sasaki S, Hinoda Y, Taniguchi M, Imai K: Anti-tumor effect of internal image bearing anti-idiotypic monoclonal antibody in relation to GM3 ganglioside. *Int J Cancer* 76;345-353, 1998
3. Herlyn D, Birebent B: Advances in cancer vaccine development. *Ann Med* 31;66-78, 1999
4. Jerne NK: Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol* 125;373-389, 1974
5. Herlyn D, Ross AH, Koprowski H: Anti-idiotypic antibodies bear the internal image of a human tumor antigen. *Science* 232;100-103, 1986
6. Kasai Y, Herlyn D, Sperlagh M, Maruyama H, Matsushita S, Linnenbach AJ: Molecular cloning of murine monoclonal anti-idiotypic Fab. *J Immunol Methods* 155;77-89, 1992
7. Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, Borrello I, Hwang L, Fein S: Induction of antigen-specific T cell anergy: an early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 95;1178-1183, 1998
8. Antonia SJ, Externann M, Flavell RA: Immunologic non-responsiveness to tumors. *Crit Rev Oncog* 9;35-41, 1998
9. Stein K, Soderstrom T: Neonatal administration of idiotypic or anti-idiotypic primes for protection against Escherichia coli K13 infection in mice. *J Exp Med* 160;1001-1011, 1984
10. Park YS: Characterization of anti-anti-idiotypic antibodies induced by immunization of anti-idiotypic antibodies mimicking disialoganglioside GD2: *Immune Network* 3; 118-125, 2003
11. Hamilton WB, Helling F, Lloyd KO, Livingston PO: Ganglioside expression on human malignant melanoma assessed by quantitative immune thin-layer chromatography. *Int J Cancer* 53;566-573, 1993
12. Sariola H, Terava H, Rapola J, Saarinen UM: Cell-surface ganglioside GD2 in the immunohistochemical detection and differential diagnosis of neuroblastoma. *Am J Clin Pathol* 96;248-252, 1991
13. Irie RF, Morton DL: Regression of cutaneous metastatic melanoma by intralesional injection with human monoclonal antibody to ganglioside GD2. *Proc Natl Acad Sci USA* 83;8694-8698, 1986
14. Saleh MN, Khazaeli MB, Wheeler RH, Dropcho E, Liu T, Urist M, Miller DM, Lawson S, Dixon P, Russell CH, LoBuglio AF: Phase I trial of the murine monoclonal antibody anti-GD2 antibody 14G9a in metastatic melanoma. *Cancer Res* 52;4342-4347, 1992
15. Iliopoulos D, Ernst C, Steplewski Z, Jambrosic J, Rodeck U, Herlyn M, Clark WH, Koprowski H, Herlyn D: Inhibition of metastases of a human melanoma xenograft by monoclonal antibody to the GD2/GD3 gangliosides. *J Natl Cancer Inst* 81;440-444, 1989
16. Zhang H, Zhang S, Cheung NK, Ragupathi G, Livingston PO: Antibodies against GD2 ganglioside can eradicate syngeneic cancer micrometastases. *Cancer Res* 58;2844-2849, 1998
17. Tai T, Cahan LD, Tsuchida T, Saxton RE, Irie RF, Morton DL: Immunogenicity of melanoma-associated gangliosides in cancer patients. *Int J Cancer* 35;607-612, 1985
18. Portoukalian J, Carrel S, Dore JF, Rumke P: Humoral immune response in disease-free advanced melanoma patients after vaccination with melanoma-associated gangliosides. *Int J Cancer* 49;893-899, 1991

19. Livingston PO: Approaches to augmenting the immunogenicity of melanoma gangliosides: from whole melanoma cells to ganglioside-KLH conjugate vaccines. *Immunol Rev* 145;147-166, 1995
20. Lee VK, Harriot TM, Kuchroo VK, Halliday WJ, Hellstrom I, Hellstrom KE: Monoclonal anti-idiotypic antibodies related to a murine oncofetal bladder tumor antigen induce specific cell-mediated tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 82;6286-6290, 1985
21. Raychaudhury S, Sacki Y, Chen J-J, Kohler H: Tumor-specific idiootype vaccines. III. Induction of T helper cells by anti-idiootype and tumor cells. *J Immunol* 139;2096-2102, 1987
22. Sacki Y, Chen J-J, Shi L, Kohler H: Idiotypic intramolecular help. Induction of tumor-specific antibodies by monoclonal anti-idiotypic antibody with the help of Fc-specific T helper clones. *J Immunol* 142;2629-2634, 1989
23. Bhattacharya-Chatterjee M, Chatterjee SK, Foon KA: The anti-idiootype vaccines for immunotherapy. *Curr Opin Mole Ther* 3;63-69, 2001
24. Barak R, Sherrat A, Das R, Foon KA, Bhattacharya-Chatterjee M: Murine monoclonal anti-idiotypic antibody as a surrogate antigen for human Her-2/neu. *Int J Cancer* 92; 88-95, 2001
25. Herlyn D, Ross AH, Iliopoulos D, Koprowski H: Induction of specific immunity to human colon carcinoma by anti-idiotypic antibodies to monoclonal antibody CO17-1A. *Eur J Immunol* 17;1649-1652, 1987
26. Bhattacharya-Chatterjee M, Mukerjee S, Biddle W, Foon KA, Kohler H: Murine monoclonal anti-idiootype antibody as a potential network antigen for human carcinoembryonic antigen. *J Immunol* 145;2758-2765, 1990
27. Durrant LG, Parsons T, Moss R, Spendlove I, Carter G, Carr F: Human anti-idiotypic antibodies can be good immunogens as they target Fc receptors on antigen-presenting cells allowing efficient stimulation of both helper and cytotoxic T-cell responses. *Int J Cancer* 92;414-420, 2001
28. Maruyama H, Zaloudik J, Li W, Sperlagh M, Koido T, Somasundaram R, Scheck S, Prewett M, Herlyn H: Cancer vaccines: single-epitope anti-idiootype vaccine versus multiple-epitope antigen vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 49; 123-132, 2000