

Epitope발현 DNA Vaccine과 Recombinant Vaccinia Virus를 이용한 Heterologous Prime-boost Vaccination에 의하여 유도되는 CD8+ T 세포 매개성 면역

전북대학교 수의과대학 미생물학교실, 생체안전성연구소

박성옥 · 윤현아 · Abi George Aleyas · 이준화 · 채준석 · 어성국

CD8+ T Cell-mediated Immunity Induced by Heterologous Prime-boost Vaccination Based on DNA Vaccine and Recombinant Vaccinia Virus Expressing Epitope

Seong-Ok Park, Hyun-A Yoon, Abi George Aleyas, John-Hwa Lee, Joon-Seok Chae and Seong-Kug Eo

Laboratory of Microbiology, College of Veterinary Medicine and Bio-Safety Research Institute, Chonbuk National University, Jeonju, Republic of Korea

ABSTRACT

Background: DNA vaccination represents an anticipated approach for the control of numerous infectious diseases. Used alone, however, DNA vaccine is weak immunogen inferior to viral vectors. In recent, heterologous prime-boost vaccination leads DNA vaccines to practical reality. **Methods:** We assessed prime-boost immunization strategies with a DNA vaccine (minigene, gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA) and recombinant vaccinia virus (vvgB₄₉₈₋₅₀₅) expressing epitope gB₄₉₈₋₅₀₅ (SSIEFARL) of CD8+ T cells specific for glycoprotein B (gB) of herpes simplex virus (HSV). Animals were immunized primarily with gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope-expressing DNA vaccine/recombinant vaccinia virus and boosted with alternative vaccine type expressing entire Ag. **Results:** In prime-boost protocols using vvgBw (recombinant vaccinia virus expressing entire Ag) and vvgB₄₉₈₋₅₀₅, CD8+ T cell-mediated immunity was induced maximally at both acute and memory stages if primed with vvgBw and boosted with vvgB₄₉₈₋₅₀₅ as evaluated by CTL activity, intracellular IFN-staining, and MHC class I tetramer staining. Similarly gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA prime-gBw DNA (DNA vaccine expressing entire Ag) boost immunization elicited the strongest CD8+ T cell responses in protocols based on DNA vaccine. However, the level of CD8+ T cell-mediated immunity induced with prime-boost vaccination using DNA vaccine expressing epitope or entire Ag was inferior to those based on vvgBw and vvgB₄₉₈₋₅₀₅. Of particular interest CD8+ T cell-mediated immunity was optimally induced when vvgB₄₉₈₋₅₀₅ was used to prime and gB DNA was used as alternative boost. Especially CD8+ T cell responses induced by such protocol was longer lasted than other protocols. **Conclusion:** These facts direct to search for the effective strategy to induce optimal CD8+ T cell-mediated immunity against cancer and viral infection. (**Immune Network 2005;5(2):89-98**)

Key Words: Heterologous prime-boost vaccination, DNA vaccine, recombinant vaccinia virus, CD8+ T cell-specific epitope

책임저자 : 어성국, 전북대학교 수의과대학 미생물학교실
☎ 561-756, 전북 전주시 덕진구 덕진동 1가 664-14
Tel: 063-270-3882, Fax: 063-270-3780
E-mail: vetvirus@chonbuk.ac.kr

본 연구는 한국학술진흥재단 지역대학우수과학자 지원연구(R05-2003-000-10270-0)의 지원에 의하여 수행된 것임.

서 론

DNA vaccine의 출현은 각종 병원체 및 암에 대한 백신 개발의 연구에 많은 변화를 유발하였다(1,2). 그러나 예방 접종에의 안전성에 비하여 DNA vaccine은 recombinant

viral vaccine이나 다른 attenuated live vaccine과 달리 유도되는 면역반응이 약하고 일부의 경우에는 완벽한 방어기구를 형성하지 못한다는 단점을 가지고 있다. 이와 같은 한계성을 극복하기 위하여 다양한 방법의 연구가 수행되어 왔다(3-8). 그와 같은 연구에는 encoded Ag 발현의 증가, DNA vaccine의 전달(delivery) 및 MHC class I pathway로 표적화(targeting)함으로써 CD8⁺ T 세포 반응 증가, cytokine adjuvant의 도입 등을 포함한다(3-8). 더욱이 최근 DNA vaccine과는 다른 형태의 vaccine (recombinant viral vaccine, protein vaccine 등)을 이용한 prime-boost vaccination은 DNA vaccine을 보다 쉽게 임상에 적용할 수 있는 길을 열었다(9-13). 이와 같은 heterologous prime-boost vaccination에서 DNA vaccine을 priming 시 이용하고 boosting에서 recombinant viral vector를 이용한 것이 DNA vaccine 또는 recombinant viral vector만을 이용한 경우 보다 우수한 CD8⁺ T 세포 매개성 면역반응이 유도되었다(14).

CD4⁺ T 세포와 더불어 CD8⁺ T 세포는 적응 면역(adaptive immunity)의 중요한 방어 면역의 축으로 바이러스 및 세균뿐만 아니라 각종 암에 대하여 작용한다. CD8⁺ T effector cell은 항원을 인식하면 IFN- γ 와 TNF- α 를 생산하거나 접촉에 의한 cytolytic effect에 의하여 표적세포를 살해하거나 항바이러스 효과를 나타낸다(15). CD8⁺ T 세포의 priming response는 MHC class II 분자와 peptide epitope을 인식하는 CD4⁺ helper T 세포의 “help”를 필요로 한다(16-20). 더욱이 immunostimulatory ODN 또는 선천성 면역(innate immunity)을 자극하는 각종 activation signal (proinflammatory cytokine 등)은 CD4⁺ T helper 없이 CD8⁺ T 세포 priming response를 유도할 수 있다(21, 22). CD8⁺ T 세포 특이 epitope만을 이용한 vaccination은 T cell epitope에 대한 경쟁과 epitope에 의하여 자극되는 “suppressive” regulatory T cell이 유도되지 않는다는 점에서 이점을 갖고 있다(23-25). 그러나 CD8⁺ T 세포 특이 epitope peptide를 이용한 vaccination은 매우 약한 CD8⁺ T 세포 반응을 유도한다. 그와 같은 inert epitope peptide는 immunostimulatory CpG ODN과 함께 투여하게 되면 epitope-specific CD8⁺ T 세포 반응이 유도되고 바이러스 감염에 대하여 저항성이 나타났다(26). 결국, CD8⁺ T 세포의 priming은 CD4⁺ help를 비롯한 innate stimulatory signal이 요구된다.

CD8⁺ T 세포 반응을 유도하기 위한 vaccinia virus를 비롯한 viral vector는 많은 곳에서 이용되어 왔다(27, 28). 그와 같은 viral vector의 이점은 강력한 세포성 면역 반응을 유도할 수 있는 viral vector 자체 감염에 의한 innate immunity의 활성화 및 viral vector에 대한 CD4⁺ help T 세포 반응이 유도된다는 것이다(28). 본 연구 논문에서는 epitope 발현 DNA vaccine/recombinant vaccinia virus과 전

체 항원 단백을 발현하는 DNA vaccine 또는 recombinant vaccinia virus를 이용한 heterologous prime-boost vaccination후 나타나는 항원 특이 CD8⁺ T cell-mediated immunity를 분석하였다. 그 결과 epitope 발현 recombinant vaccinia virus를 priming시 이용하고 boosting시 전체 항원 발현 DNA vaccine을 이용한 경우에 강력한 epitope-specific CD8⁺ T 세포 반응이 유도되었으며 그러한 면역 반응은 오랫동안 유지되었다(long-lasting immunity).

재료 및 방법

실험동물 및 바이러스. 실험에 사용한 실험동물은 5~6 주령의 C57BL/6(H-2^b) 암컷 생쥐를 (주)다물 사이언스에서 공급받아 사용하였다. 구입된 실험동물들은 전북대학교 수의과대학 실험동물실에서 유지되어 관리 규정에 맞추어 실험에 사용하였다. 면역에 이용된 herpes simplex virus (HSV)의 전체 glycoprotein B (gB) 또는 CD8⁺ T 세포 특이 epitope gB₄₉₈₋₅₀₅ (SSIEFARL) 발현 recombinant vaccinia virus는 CV-1 세포 (ATCC, Manassas, VA)에서 증식시켰다. 배양된 recombinant vaccinia virus, vvgBw (전체 gB 단백질 발현) 및 vvgB₄₉₈₋₅₀₅ (gB 단백질의 CD8⁺ epitope SSIEFARL만 발현)는 농축하여 plaque assay에 의하여 바이러스 양을 측정한 후 -80°C에 보관하여 사용하였다.

DNA vaccine의 준비. HSV gB의 CD8⁺ T 세포 epitope 발현 DNA vaccine (minigene, gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA)과 전체 gB 단백질 발현 DNA vaccine (gBw DNA)는 이전에 기술한 polyethylene glycol (PEG) precipitation 방법에 준하여 준비하였다(29,30). 간략히 기술하면, 배양된 박테리아를 분쇄한 후 세포 단백질은 7.5 M ammonium acetate로 처리한 후 isopropanol precipitation에 의하여 plasmid DNA를 얻었다. 얻어진 plasmid DNA는 다시 phenol-chloroform extraction과정을 거친 후 absolute ethanol precipitation에 의하여 plasmid DNA를 얻었다. 최종적으로 얻어진 plasmid DNA는 1% agarose gel에서 확인하였다. 준비된 plasmid DNA의 내독소(endotoxin) 양은 *Limulus* amoebocyte lysate test에 의하여 결정하고 내독소에 의한 영향은 대조 plasmid DNA를 이용함으로써 결과를 보정하였다.

면역 방법 및 비장 세포 준비. 각 실험군당 6~7 마리의 실험동물 C57BL/6 생쥐를 준비하고, gB epitope gB₄₉₈₋₅₀₅ (SSIEFARL) 발현 DNA vaccine (gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA) 또는 recombinant vaccinia virus (vvgB₄₉₈₋₅₀₅)를 이용하여 근육 내 주입하였다. 또 다른 실험군은 전체 gB 단백질 발현 gBw DNA 또는 vvgBw로 면역하였다. DNA vaccine은 생쥐 당 100 μ g를 주입하였고 recombinant vaccinia virus는 10⁶ plaque-forming unit (pfu)를 주입하였다. 또한 peptide의 경우는 100 μ g씩 근육 내 주사하였다. 이와 같이 면역된 생쥐들은 10일 후 다시 다른 형태의 vaccine을 같은

방법에 의하여 boosting하였다. 마지막 boosting 후 2주째 (acute phase)와 5주째(memory phase)에 각 실험군의 생쥐를 희생한 후 비장을 꺼내어 적혈구는 hypotonic 0.83% ammonium chloride용액을 이용하여 제거하고, 준비된 비장세포는 complete RPMI 배지에 재현탁한 후 실험에 이용하였다.

Cytotoxic T lymphocyte (CTL) 활성 측정. CTL 활성 측정은 이전에 기술된 것과 같이 표적세포(target cell)로부터 유리되는 ^{51}Cr 의 양을 측정함으로써 결정하였다(31). 준비된 비장 세포를 $10\mu\text{g/ml}$ gB₄₉₈₋₅₀₅ (SSIEFARL) peptide로 처리한 후 5일간 배양하여 항원 특이 CD8+ T 세포를 자극하여 살해 세포 (effector cell)를 준비하였다. Effector cell은 ^{51}Cr 로 labeling된 5시간 동안 혼합하여 배양함으로써 세포 밖으로 유출되는 ^{51}Cr 양을 γ -counter를 이용하여 결정하였다. Target cell은 SSIEFARL peptide ($1\mu\text{g/ml}$)로 처리된 MHC-matched EL-4 (H-2^b), peptide 처리된 MHC-mismatched EMT-6 (H-2^d) 및 peptide 무처리 EL-4를 포함하였다. Spontaneous lysis는 target cell을 배지에 effector cell과 혼합하지 않은 상태에서 유리되는 ^{51}Cr 양을 측정함으로써 결정하였고, ^{51}Cr -maximum release는 target cell을 5% Triton X-100으로 처리하여 유리되는 양을 측정함으로써 결정하였다. Effector cell의 target cell에 대한 specific lysis는 다음의 식에 의거하여 계산되었다.

$$\text{Specific lysis (\%)} = \frac{([\text{experiment release} - \text{spontaneous release}])}{([\text{maximum release} - \text{spontaneous release}])} \times 100$$

MHC class I -tetramer staining. gB₄₉₈₋₅₀₅ (SSIEFARL) peptide-specific CD8+ T 세포의 수는 이전에 기술된 MHC class I (H-2^b) tetramer staining에 의하여 분석하였다(32). 간략히 기술하면, 준비된 비장 세포를 $10\mu\text{g/ml}$ gB₄₉₈₋₅₀₅ (SSIEFARL) peptide로 처리한 후 5일간 배양하여 FACS buffer $100\mu\text{l}$ 에 현탁시킨 후 MHC class I (H-2^b)/SSIEFARL-PE tetramer와 FITC-anti CD8 Ab를 넣고 4°C 에서 45분간 결합시켰다. 항체와 tetramer로 염색된 비장 세포는 FACS buffer를 이용하여 두 번 세척하고 formaldehyde 용액을 이용하여 고정하였다. 고정된 세포는 다시 PBS 용액에 재현탁 한 후 flow cytometry (BD FACSCalibur, Mountain View, CA)를 이용하여 SSIEFARL-specific CD8+ T세포를 분석하였다.

Intracellular INF- γ staining. 면역화된 실험동물의 비장 세포 내 gB₄₉₈₋₅₀₅ (SSIEFARL) peptide에 반응하여 IFN- γ 를 생산하는 항원 특이 CD8+ T 세포의 수는 intracellular IFN- γ staining에 의하여 이전에 기술된 방법에 준하여 측정하였다(32,33). 준비된 비장 세포를 U-bottom 96-well microplate에 5×10^5 cells/well을 분주하고 SSIEFARL peptide ($1\mu\text{g/ml}$)로 처리하여 자극하였다. Brefeldin A (10

$\mu\text{g/ml}$) 존재 하에서 6시간 동안 배양한 후, 자극된 비장 세포를 FACS buffer $100\mu\text{l}$ 에 현탁하고 FITC-anti CD8 Ab를 처리하고 4°C 에서 40분간 방치하여 표면 항원을 염색하였다. 표면 CD8 분자가 염색된 비장 세포는 formaldehyde용액을 이용해 고정시킨 후 permeabilization buffer (0.5% saponin in FACS buffer)을 이용해 세포의 투과성을 증가시킨 후 PE-IFN- γ antibody (clone XMG1.2)로 처리하고 상온에서 30분간 방치한 후 세포 내 IFN- γ 를 염색하였다. 염색된 세포는 FACS buffer로 두 번 세척하고 다시 고정액을 이용해 고정시킨 후 IFN- γ 를 생산하는 SSIEFARL-specific CD8+ T 세포는 FACSCalibur flow cytometer를 이용해 분석하였다.

결 과

CD8+ T 세포 특이 epitope발현 recombinant vaccinia virus를 이용한 prime-boost vaccination. 전체 항원 단백질을 발현하는 recombinant vaccinia virus와 전체 항원 중 CD8+ T 세포의 특이 epitope 만을 발현하는 recombinant vaccinia virus를 이용하여 prime-boost vaccination 후 나타나는 CD8+ T 세포 반응을 분석하기 위하여, herpes simplex virus (HSV)의 전체 glycoprotein B (gB)를 발현하는 recombinant vaccinia virus (vvgBw)와 CD8+ T 세포의 epitope gB₄₉₈₋₅₀₅ (SSIEFARL) peptide (H-2^b)만을 발현하는 recombinant vaccinia virus (vvgB₄₉₈₋₅₀₅)를 이용하여 prime-boost vaccination을 실시하였다. 면역 방법은 vvgBw, vvgB₄₉₈₋₅₀₅ 또는 SSIEFARL peptide (pepgB₄₉₈₋₅₀₅)로 실험동물의 근육 내에 주사하고 10일 후 다른 형태의 immunogen으로 boosting하였다. CD8+ T 세포 반응은 boosting 후 2주째(acute phase)와 5주째 (memory phase)에 CTL activity, MHC class I (H-2^b)/SSIEFARL tetramer staining 및 intracellular IFN- γ staining 방법에 의하여 분석하였다. 그 결과 vvgBw priming 후 vvgB₄₉₈₋₅₀₅로 boosting하였을 때 acute phase와 memory phase에서 다른 protocol보다 강력한 CD8+ T세포의 CTL activity를 보여 주었다(Fig. 1). 그 다음은 위의 순서를 바꾼 vvgB₄₉₈₋₅₀₅ priming-vvgBw boosting 실험군에서 강한 활성을 나타내었다. 그러나, pepgB₄₉₈₋₅₀₅를 이용하여 priming된 면역 반응은 vvgBw에 의하여 boosting 되지 않았고, vvgBw에 의하여 유도된 primed immunity도 pepgB₄₉₈₋₅₀₅에 의하여 증가되지 않았다(Fig. 1). 또한, 면역된 실험 동물 내의 항원 특이 CD8+ T 세포의 수를 분석하기 위하여 MHC class I(H-2^b)/SSIEFARL tetramer staining과 intracellular IFN- γ staining을 이용하여 분석한 결과 같은 경향의 결과 나타내었다. vvgBw priming-vvgB₄₉₈₋₅₀₅ boosting 실험군에서 가장 많은 수의 tetramer-positive cell와 IFN- γ 생산 CD8+ T 세포가 관찰되었다(Fig. 2A and B). 또한 pepgB₄₉₈₋₅₀₅는 priming 시 유도된 면역반응을 증가시키지 못하는 것으

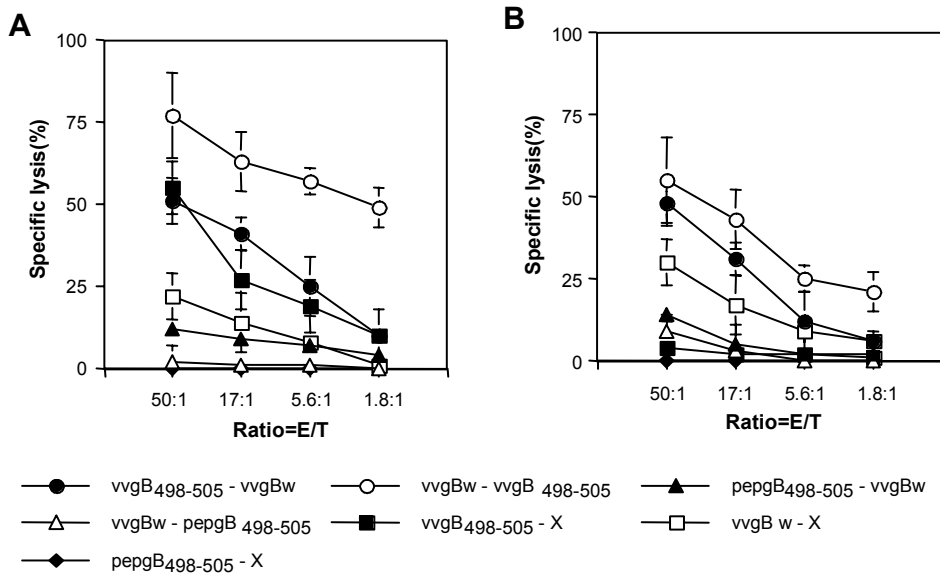


Figure 1. CD8⁺ T cell-mediated CTL activity induced by prime-boost vaccination based on recombinant vaccinia virus expressing entire Ag (vvgBw) or gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope (vvgB₄₉₈₋₅₀₅) of HSV gB protein. C57BL/6 (H-2^b) mice were immunized i.m. with vvgBw, vvgB₄₉₈₋₅₀₅, or epitope peptide (pepgB₄₉₈₋₅₀₅) and boosted via the same route used for priming with alternative vaccine type. Two (A: acute phase) and five (B: memory phase) weeks later, splenocytes were collected to measure CD8⁺ T cell-mediated CTL activity. The results are plotted as the mean net percentage of specific lysis of EL-4 target cells (H-2^b) pulsed with gB₄₉₈₋₅₀₅ (SSIEFARL) peptide in four mice per group.

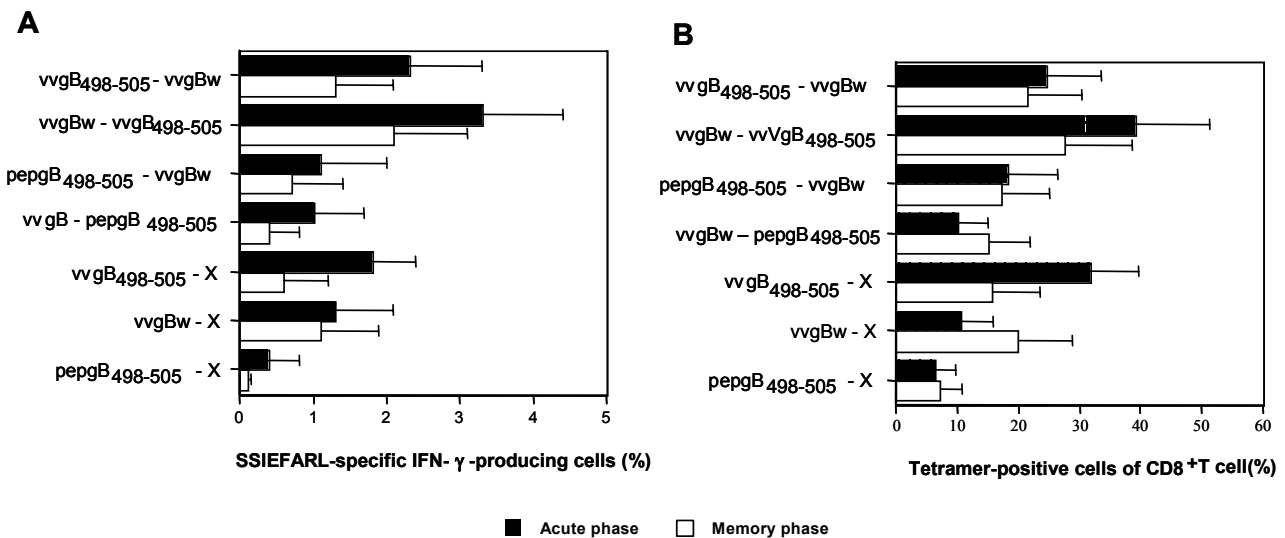


Figure 2. Analysis of gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope-specific CD8⁺ T cells induced by prime-boost vaccination based on recombinant vaccinia virus expressing entire Ag (vvgBw) or gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope (vvgB₄₉₈₋₅₀₅) of HSV gB protein. C57BL/6 (H-2^b) mice were immunized i.m. with vvgBw, vvgB₄₉₈₋₅₀₅, or epitope peptide (pepgB₄₉₈₋₅₀₅) and boosted via the same route used for priming with alternative vaccine type. Two (acute phase) and five (memory phase) weeks later, splenocytes were collected to analyze epitope-specific CD8⁺ T cells. Epitope-specific CD8⁺ T cells were determined by intracellular IFN- γ staining (A) and MHC class I (H-2^b)/SSIEFARL tetramer staining (B). The graphs are showing the mean from four mice.

로 나타났으며 pepgB₄₉₈₋₅₀₅ 자체가 매우 약한 immunogen임을 보여 주었다. 결국 이와 같은 결과는 recombinant vaccinia virus를 이용한 prime-boost vaccination의 경우에는 전체 항원 단백 발현 vvgBw로 priming하고 epitope 발현 vvgB₄₉₈₋₅₀₅로 boosting하여야 훌륭한 CD8⁺ T 세포 반응을 얻을 수 있음을 의미한다.

CD8⁺ T 세포 특이 epitope 발현 DNA vaccine을 이용한 prime-boost vaccination. 전체 항원 단백 발현 DNA

vaccine (gBw DNA)와 CD8⁺ T 세포 특이 epitope 발현 DNA vaccine (gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA)를 이용한 prime-boost vaccination에서 나타나는 CD8⁺ T 세포 반응을 분석하기 위하여 기술된 방법에 의하여 실험동물을 면역하고 acute phase와 memory phase에서 반응을 분석하였다. 그 결과 recombinant vaccinia virus를 이용한 결과와 다른 경향을 보여 주었다. CD8⁺ T 세포 특이 epitope 발현 gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA로 priming한 후 gBw DNA를 이용하여 boosting하였

을 때 acute phase에서 가장 강력한 CD8⁺ T 세포의 활성을 보여 주었다. 그러나 그와 같은 CD8⁺ T 세포 활성은 memory phase에서 오래 지속되지 못하고 낮게 나타났다 (Fig. 3). 반면, gBw DNA priming-후 gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA로 boosting한 경우 acute phase에서 gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA priming- gBw

DNA boosting protocol보다 활성이 낮게 나타났으나 memory phase에서는 보다 높게 나타났다(Fig. 3). 또한, pepgB₄₉₈₋₅₀₅는 recombinant vaccinia virus를 이용한 경우와 같이 약한 immunogen으로 DNA vaccine에 의하여 유도되는 면역반응을 boosting시키지 못했다. 이와 같은 경향

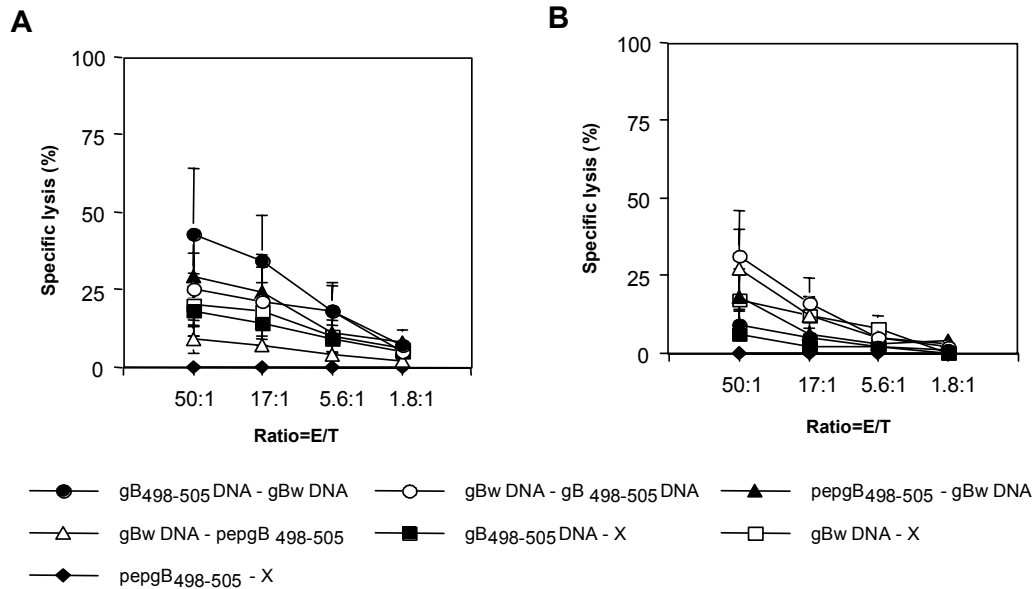


Figure 3. CD8⁺ T cell-mediated CTL activity induced by prime-boost vaccination based on DNA vaccine expressing entire Ag (gBw DNA) or gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope (gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA) of HSV gB protein. C57BL/6 (H-2^b) mice were immunized i.m. with gBw DNA, gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA, or epitope peptide (pepgB₄₉₈₋₅₀₅) and boosted via the same route used for priming with alternative vaccine type. Two (A: acute phase) and five (B: memory phase) weeks later, splenocytes were collected to measure CD8⁺ T cell-mediated CTL activity. The results are plotted as the mean net percentage of specific lysis of EL-4 target cells (H-2^b) pulsed with gB₄₉₈₋₅₀₅ (SSIEFARL) peptide in four mice per group.

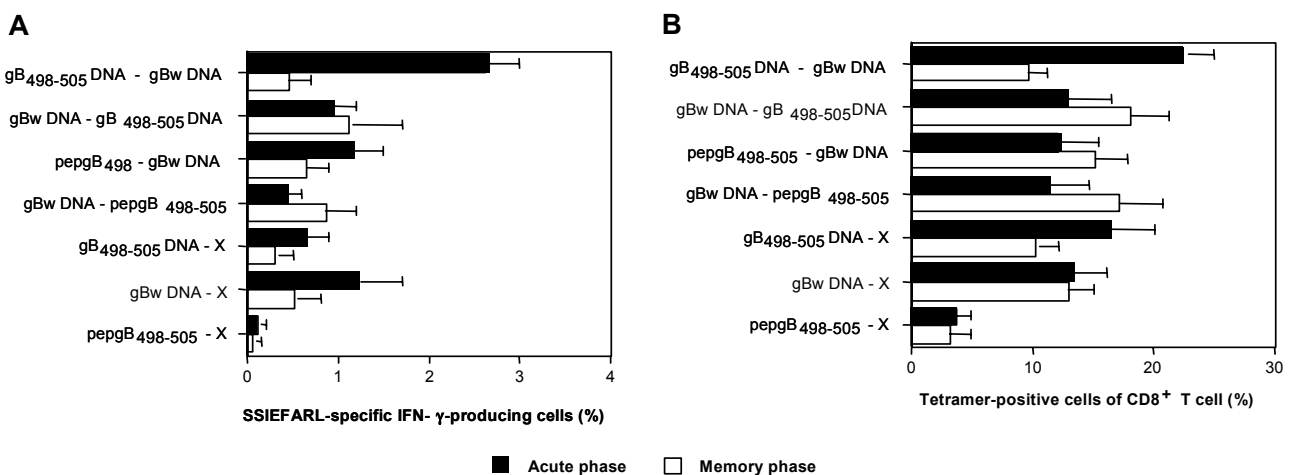


Figure 4. Analysis of gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope-specific CD8⁺ T cells induced by prime-boost vaccination based on DNA vaccine expressing entire Ag (gBw DNA) or gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope (gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA) of HSV gB protein. C57BL/6 (H-2^b) mice were immunized i.m. with gBw DNA, gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA, or epitope peptide (pepgB₄₉₈₋₅₀₅) and boosted via the same route used for priming with alternative vaccine type. Two (acute phase) and five (memory phase) weeks later, splenocytes were collected to analyze epitope-specific CD8⁺ T cells. Epitope-specific CD8⁺ T cells were determined by intracellular IFN- γ staining (A) and MHC class I (H-2^b)/SSIEFARL tetramer staining (B). The graphs are showing the mean from four mice.

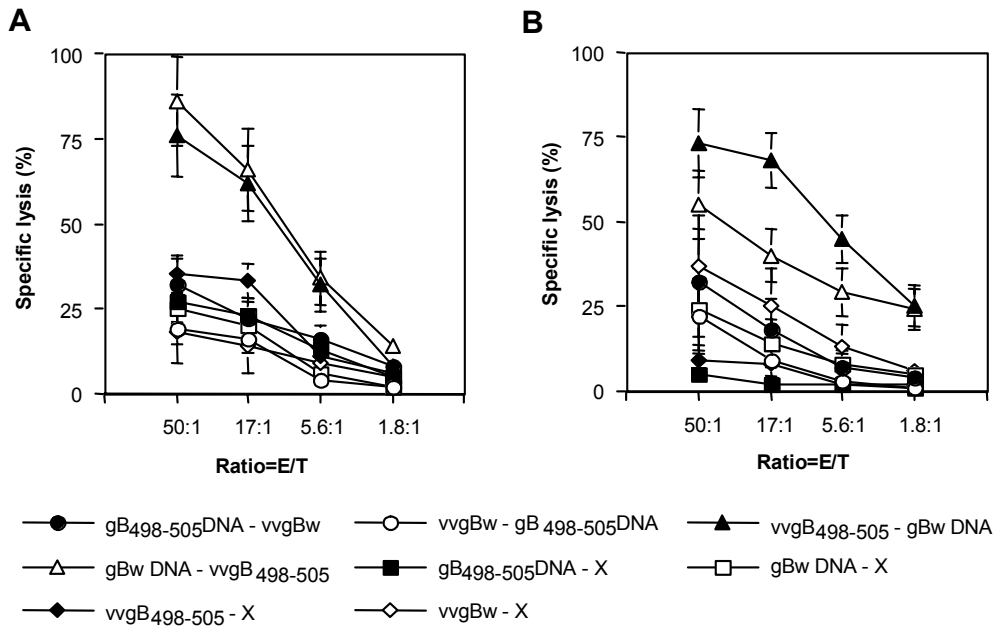


Figure 5. CD8⁺ T cell-mediated CTL activity induced by prime-boost vaccination based on DNA vaccine/recombinant vaccinia virus expressing entire Ag (gBw DNA/vvgBw) or gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope (gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA/vvgB₄₉₈₋₅₀₅) of HSV gB protein. C57BL/6 (H-2^b) mice were immunized i.m. with gBw DNA, gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA, vvgBw or vvgB₄₉₈₋₅₀₅ and boosted via the same route used for priming with alternative vaccine type. Two (A: acute phase) and five (B: memory phase) weeks later, splenocytes were collected to measure CD8⁺ T cell-mediated CTL activity. The results are plotted as the mean net percentage of specific lysis of EL-4 target cells (H-2^b) pulsed with gB₄₉₈₋₅₀₅ (SSIEFARL) peptide in four mice per group.

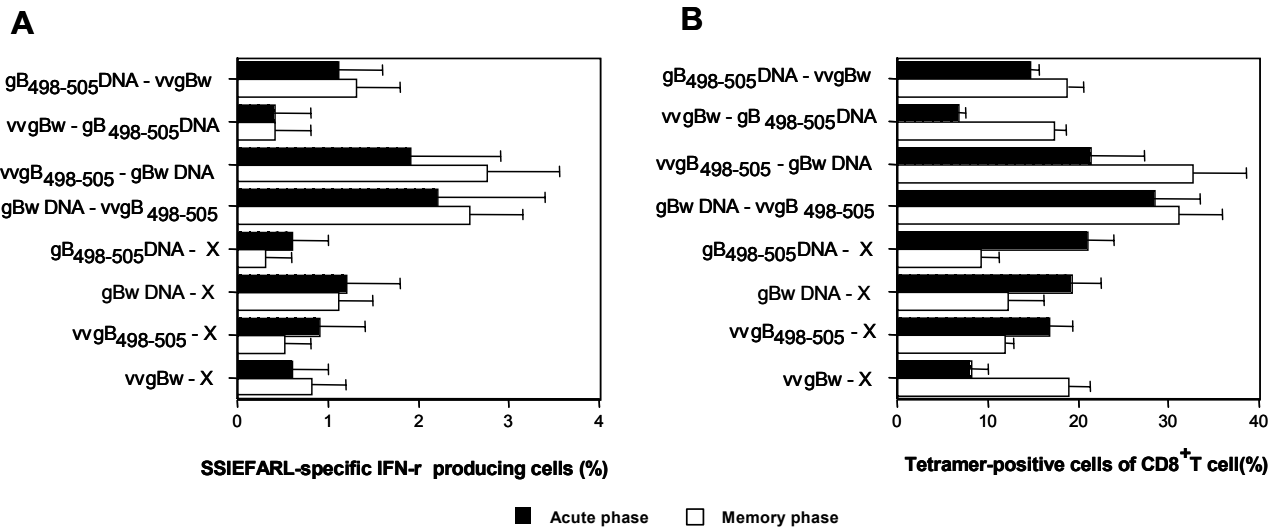


Figure 6. Analysis of gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope-specific CD8⁺ T cells induced by prime-boost vaccination based on DNA vaccine/recombinant vaccinia virus expressing entire Ag (gBw DNA/vvgBw) or gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope (gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA/vvgB₄₉₈₋₅₀₅) of HSV gB protein. C57BL/6 (H-2^b) mice were immunized i.m. with gBw DNA, gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA, vvgBw or vvgB₄₉₈₋₅₀₅ and boosted via the same route used for priming with alternative vaccine type. Two (acute phase) and five (memory phase) weeks later, splenocytes were collected to analyze epitope-specific CD8⁺ T cells. Epitope-specific CD8⁺ T cells were determined by intracellular IFN- γ staining (A) and MHC class I (H-2^b)/SSIEFARL tetramer staining (B). The graphs are showing the mean from four mice.

의 결과는 tetramer staining과 intracellular IFN- γ staining에서도 보여 주었다. 즉 acute phase에서는 gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA priming-gBw DNA boosting protocol이 가장 좋은 결과를 보여 주는 반면에 memory phase에서는 반대의 protocol (gBw DNA priming-gB₄₉₈₋₅₀₅ boosting)이 다른 실험군과 비교하여 우수한 결과를 보여 주었다(Fig. 4A and B). 결국 전체 항원 단백 발현 DNA vaccine gBw DNA와

epitope 발현 gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA를 이용한 prime-boost vaccination의 경우에는 비록 recombinant vaccinia virus를 이용한 경우보다 낮은 활성을 나타내지만, priming과 boosting시 이용되는 immunogen형태에 따라 acute phase와 memory phase에서의 면역 수준이 다양하게 나타날 수 있음을 의미한다.

CD8⁺ T 세포 epitope 발현 DNA vaccine과 recombi-

nant vaccinia virus를 이용한 heterologous prime-boost vaccination. 전체 항원 발현 DNA vaccine 및 recombinant vaccinia virus (gBw DNA 그리고 vvgBw)와 함께 epitope 발현 DNA vaccine 및 recombinant vaccinia virus (gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA 그리고 vvgB₄₉₈₋₅₀₅)를 이용하여 heterologous prime-boost vaccination 후 나타나는 CD8+ T 세포의 항원 특이 반응을 분석하였다. 그 결과 vvgB₄₉₈₋₅₀₅를 이용하여 priming한 후 gBw DNA로 boosting하였을 때 acute phase에서 gBw DNA priming-vvgB₄₉₈₋₅₀₅ boosting protocol과 함께 가장 우수한 CD8+ T 세포 활성을 나타내었다(Fig. 5). 그와 같은 활성은 recombinant vaccinia virus 만을 이용한 prime-boost vaccination의 경우보다 강력한 결과를 보여 주었다(Fig. 1). 가장 흥미로운 것은 vvgB₄₉₈₋₅₀₅ priming-gBw DNA boosting protocol의 acute phase에서의 활성은 memory phase에서도 유지되어 다른 어느 실험군보다 강력한 활성을 보여 주었다(Fig. 5B). 마찬가지로, MHC class I tetramer staining과 intracellular IFN- γ staining을 수행하여 항원 특이 CD8+ T 세포의 수를 분석한 결과 같은 경향의 결과를 보여 주었다(Fig. 6A and B). vvgB₄₉₈₋₅₀₅ priming-gBw DNA boosting 실험군과 반대의 protocol (gBw DNA priming-vvgB₄₉₈₋₅₀₅ boosting) 실험군에서 acute phase에서 우수한 결과를 보여 주었으나, memory phase에서는 vvgB₄₉₈₋₅₀₅ priming-gBw DNA boosting 실험군에서 항원 특이 CD8+ T 세포 반응이 유지되어 나타남을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 epitope 발현 DNA vaccine과 recombinant vaccinia virus를 이용한 heterologous prime-boost vaccination의 경우 memory phase에서 보다 강력한 항원 특이 CD8+ T 세포 반응을 유지하기 위해서는 epitope 발현 vvgB₄₉₈₋₅₀₅를 이용하여 priming 후 전체 항원 단백 발현 DNA vaccine gBw DNA으로 boosting하여야 함을 의미한다.

고 찰

외래 항원에 대한 특이 면역 반응의 시작은 선천성 면역(innate immunity)이 유도됨으로써 시작된다. 이와 같이 시작된 innate immunity는 costimulatory molecule, cytokine 및 그 외 각종 조절 물질의 발현을 통해 후천성 면역(adaptive immunity)을 유도할 수 있는 항원제시 세포(antigen-presenting cell; APC)에 영향을 주어 활성화를 유도한다(34). 결국 활성화된 APC는 cognate T 세포를 자극함으로써 고유의 항원 특이 면역반응이 유도된다. 여기서 본 저자들은 이와 같은 innate immunity 또는 CD4+ T 세포반응을 CD8+ T 세포와 함께 priming 시 유도하면 boosting 시 도입되는 CD8+ T 세포의 항원 특이 반응이 보다 증강된 형태로 나타날 것이고, 그와 같은 항원 특이 CD8+ T 세포 반응은 오랜 기간 동안 유지될 것으로 가정하였다.

그래서 prime-boost vaccination을 이용하여 priming 시 CD8+ T 세포의 epitope만을 발현하는 vaccine type으로 priming하는 것보다 다른 immune response, 즉 innate immunity 관련 세포로부터 생성되는 각종 면역 조절 물질 및 항원의 다른 부분에 의하여 유도되는 CD4+ T 세포 반응을 유도함으로써 일차 항원 특이 CD8+ T 세포 반응을 유도하고, 후에 boosting 시 도입되는 epitope에 의하여 CD8+ T 세포의 반응이 다른 prime-boost vaccination protocol보다 증가된 형태로 나타날 것으로 예견하였다. 본 연구 논문에서 기술된 바와 같이 CD8+ T 세포 특이 epitope을 발현하는 recombinant vaccinia virus vvgB₄₉₈₋₅₀₅를 priming 시 이용하고 유도된 항원 특이 면역 반응을 DNA vaccine gBw DNA로 boosting하면 acute phase에서 우수한 CD8+ T 세포 반응을 보여 주었으며 그와 같은 acute CD8+T 세포 반응은 memory phase까지 다른 실험군과 비교하여 오랫동안 유지됨을 확인할 수 있었다. 보다 흥미로운 사실은 vvgB₄₉₈₋₅₀₅ priming-gBw DNA boosting protocol이 recombinant vaccinia virus만을 이용한 vvgB₄₉₈₋₅₀₅ priming-vvgBw boosting protocol보다 유도된 항원 특이 CD8+ T 세포 반응이 우수하고 오랫동안 유지되었다는 것이다. 그리고 gBw DNA를 priming 시 이용하고 boosting시 vvgB₄₉₈₋₅₀₅를 도입하면 acute phase의 항원 특이 CD8+ T 세포 반응은 강력하게 유도되었으나, memory phase에서 그와 같은 CD8+ T 세포 반응은 vvgB₄₉₈₋₅₀₅ priming-gBw DNA boosting protocol보다 낮게 나타났다. 결국 이와 같은 결과들은 앞서 서술한 가정을 뒷받침하고 바이러스 감염이나 항암에 유효한 항원 특이 CD8+ T 세포 반응을 유도하기 위한 최적의 prime-boost vaccination strategy를 찾는 데 중요한 단서를 제공한다.

CD8+ effector 세포에 의하여 발휘되는 cytotoxic T lymphocyte (CTL) 활성은 antiviral cytokine IFN- γ , TNF- α 를 생산함으로써 각종 바이러스 및 intracellular bacteria 등에 의한 감염을 비롯하여 악성 종양에 대하여 작용하는 중요한 adaptive immunity의 축을 차지한다(15). 또한 항원 특이 CD8+ T 세포는 MHC class I+epitope peptide complex를 인식하여 cytolytic effect에 의한 표적 세포를 살해함으로써 방어 면역을 발휘한다. DNA vaccine의 출현은 각종 질병에 대한 백신 개발의 경향에 많은 변화를 유발하였다. DNA vaccine의 장점중의 하나는 항원 단백질을 이용한 vaccine과 달리 DNA vaccine에 도입된 항원에 대하여 세포성 면역이 자연 바이러스 감염과 같이 endogenous Ag의 MHC class I pathway를 거쳐 cognate CD8+ T 세포를 자극함으로써 세포성 면역을 유도할 수 있다는 것이다(1,2). 그러나 DNA vaccine에 의하여 유도되는 세포성 면역은 바이러스나 각종 암에 대하여 충분한 방어 면역을 구축할 수 없다는 것이다(35).

최근 DNA vaccine과 다른 형태의 vaccine type, recombinant poxvirus 또는 adenovirus를 이용한 prime-boost vaccination은 DNA vaccine에 의하여 유도되는 열악한 면역 반응을 증강시킴으로써 보다 실용적인 접근이 가능해졌다(13). 이와 같은 DNA vaccine을 포함한 prime-boost vaccination에서 굳어져 왔던 정설(dogma)은 DNA vaccine을 priming 시 이용하고 boosting 시 다른 형태의 vaccine, 즉 recombinant vaccinia virus를 이용하여야 강력한 세포성 면역이 유도될 수 있었다(14,36). 이러한 정설은 systemic immunization (근육주사 등)의 경우 굳어진 protocol이 되었다. 그러나 그와 같은 DNA vaccine을 포함한 prime-boost vaccination protocol을 mucosal route (비강 투여 등)을 통해 면역하면 systemic immunity와 mucosal immunity가 동시에 유도될 수 있으나 강력한 면역 반응을 유도하기 위해서는 기존의 protocol과 반대로 recombinant vaccinia virus를 priming 시 이용하고 boosting 시 DNA vaccine을 이용하면 가장 우수한 면역 반응을 유도할 수 있었다(31). 본 연구에서도 이와 같은 기존의 굳어진 protocol과 다른 결과를 얻을 수 있었다. CD8+ T 세포 epitope 발현 vector를 이용해 강력한 CD8+ T 세포를 유도하기 위해서 priming 시 epitope 발현 recombinant vaccinia virus를 이용하고 boosting 시 전체 항원 발현 DNA vaccine을 이용하여야만 했다. 그리고 그와 같이 유도된 CD8+ T 세포 반응은 오랫동안 유지될 수 있었다. 결국 이러한 protocol은 기존의 DNA vaccine priming-viral vector boosting protocol과 반대되는 것으로 흥미로운 결과이다. 생각컨대, priming 시 사용된 recombinant vaccinia virus감염에 의하여 유도되는 innate immunity관련 세포로부터 생성되는 각종 “innate cytokine storm”이 encoded epitope에 대한 CD8+ T 세포의 primary response에 영향을 주어 boosting시 도입되는 DNA vaccine에 대한 primary CD8+ T 세포가 반응함으로써 유효한 memory CD8+ T 세포 반응이 나타난 것으로 예견된다(16,17,19,20). 그러나 본 연구 논문에서 vaccinia virus의 주입에 의하여 유도되는 vaccinia virus에 대한 innate immunity와 adaptive immunity의 HSV gB₄₉₈₋₅₀₅-specific CD8+ T 세포 반응에 대한 공헌을 분석하지 못했다. 이러한 epitope 발현 viral vector를 이용한 vaccination에서의 encoded epitope에 대한 반응과 viral vector자체에 대한 CD4+/CD8+ T 세포 반응을 분석하는 것은 viral vector를 이용한 prime-boost vaccination을 최적화하는 데 유용하게 이용될 수 있을 것이다(37).

Long-lasting memory CD8+ T 세포는 바이러스 재감염에 대하여 중요한 protective immunity로 작용한다. 그와 같은 memory CD8+ T 세포의 발생은 많은 인자에 의하여 좌우되는 것으로 보인다(38-42). 특히, naive CD8+ T 세포가 항원에 노출될 때 자극의 수준에 의하여 세포의

생존기간이 결정되는 것으로 보인다(43-46). 즉 최초 자극 시 APC 표면의 Ag density, APC와의 접촉 기간, costimulatory molecule 및 inflammatory cytokine (IFNs, IL-12 등), 그 외 IL-2, IL-7, IL-15 등의 cytokine에 의한 자극에 의하여 결정될 것이다. 결국, recombinant vaccinia virus 감염에 의하여 나타나는 각종 inflammatory cytokine 등에 의하여 priming 시 나타나는 primary CD8+ T 세포에 대한 survival signal이 유지됨으로써 gBw DNA로 boosting 후의 항원 특이 CD8+ T 세포가 유지되는 것으로 보인다. 그러나 vvgBw priming-vvgB₄₉₈₋₅₀₅ boosting protocol 이 반대 protocol (vvgB₄₉₈₋₅₀₅ priming- vvgBw boostin)보다 우수한 결과를 보여준 것과 vvgB₄₉₈₋₅₀₅에 의하여 유도된 primary CD8+ T 세포가 gB DNA에 의하여 크게 boosting된 것은 더욱 고찰되어야 할 것으로 보인다. 결국, 본 연구 논문에서는 priming 후 유도되는 항원 특이 CD8+ T 세포에 전해지는 survival signal (anti-apoptosis), IL-7 receptor 발현 등의 분석이 이루어지지 않았다. 이와 같은 분석은 보다 정교한 prime-boost vaccination strategy를 이룩하는데 흥미로운 결과를 얻을 수 있을 것으로 보인다. 결론적으로 본 저자들에 의하여 도출된 결과들은 각종 암이나 바이러스 감염에 대한 CD8+ T 세포 반응을 유도하기 위한 최적의 prime-boost vaccination strategy를 확립하는데 도움을 줄 것이다. 특히, CD8+ T 세포 특이 epitope을 이용한 prime-boost vaccination을 확립하는데 중요한 단서를 제공할 것이다.

참 고 문 헌

1. Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA: DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu Rev Immunol* 18;927-974, 2000
2. Kirman JR, Seder RA: DNA vaccination: the answer to stable, protective T cell memory? *Curr Opin Immunol* 15;471-476, 2003
3. Xiang Z, Ertl HC: Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. *Immunity* 2;129-135, 1995
4. Ahlers JD, Dunlop N, Alling DW, Nara PL, Berzofsky JA: Cytokine-in-adjuvant steering of the immune response phenotype to HIV-1 vaccine constructs: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and TNF-alpha synergize with IL-12 to enhance induction of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 158;3947-3958, 1997
5. Kim JJ, Nottingham LK, Sin JI, Tsai A, Morrison L, Oh J, Dang K, Hu Y, Kazahaya K, Bennett M, Dentshev T, Wilson DM, Chalian AA, Boyer JD, Agadjanyan MG, Weiner D: CD8 positive T cells influence antigen-specific immune responses through the expression of chemokines. *J Clin Invest* 102;1112-1124, 1998
6. Lu Y, Xin KQ, Hamajima K, Tsuji T, Aoki I, Yang J, Sasaki S, Fukushima J, Yoshimura T, Toda S, Okada E, Okuda K: Macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1) expression plasmid enhances DNA vaccine-induced immune response against HIV-1. *Clin Exp Immunol* 115;335-341, 1999
7. Wu T, Kipps TJ: Deoxyribonucleic acid vaccines encoding antigens with rapid proteasome-dependent degradation are

- highly efficient inducers of cytolytic T lymphocytes. *J Immunol* 159;6037-6043, 1997
8. Fu TM, Guan L, Friedman A, Ulmer JB, Liu MA, Donnelly JJ: Induction of MHC class I-CTL response by DNA immunization with ubiquitin-influenza virus nucleoprotein fusion antigens. *Vaccine* 16;1711-1717, 1998
9. Schneider J, Langermans JA, Gilbert SC, Blanchard TJ, Twigg S, Naitza S, Hannan CM, Aidoo M, Crisanti A, Robson KJ, Smith GL, Hill AV, Thomas AW: A prime-boost immunisation regimen using DNA followed by recombinant modified vaccinia virus Ankara induces strong cellular immune responses against the *Plasmodium falciparum* TRAP antigen in chimpanzees. *Vaccine* 19;4595-4602, 2001
10. Rogers WO, Baird JK, Kumar A, Tine JA, Weiss W, Aguiar JC, Gowda K, Gwadz R, Kumar S, Gold M, Hoffman SL: Multistage multiantigen heterologous prime boost vaccine for *Plasmodium knowlesi* malaria provides partial protection in rhesus macaques. *Infect Immun* 69;5565-5572, 2001
11. Kent SJ, Zhao A, Best SJ, Chandler JD, Boyle DB, Ramshaw IA: Enhanced T-cell immunogenicity and protective efficacy of a human immunodeficiency virus type 1 vaccine regimen consisting of consecutive priming with DNA and boosting with recombinant fowlpox virus. *J Virol* 72;10180-10188, 1998
12. Amara RR, Villinger F, Altman JD, Lydy SL, O'Neil SP, Staprans SI, Montefiori DC, Xu Y, Herndon JG, Wyatt LS, Candido MA, Kozyr NL, Earl PL, Smith JM, Ma HL, Grimm BD, Hulse ML, McClure HM, McNicholl JM, Moss B, Robinson HL: Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Vaccine* 20; 1949-1955, 2002
13. Vuola JM, Keating S, Webster DP, Berthoud T, Dunachie S, Gilbert SC, Hill AV: Differential immunogenicity of various heterologous prime-boost vaccine regimens using DNA and viral vectors in healthy volunteers. *J Immunol* 174;449-455, 2005
14. Leong KH, Ramsay AJ, Morin MJ, Robinson HL, Boyle DB, Ramshaw IA: Generation of enhanced immune responses by consecutive immunization with DNA and recombinant fowlpox viruses. In: Brown F, Chanock H, Norrby E, eds: *Vaccine* 95. p.327, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1995
15. Zinkernagel RM: Immunology taught by viruses. *Science* 271; 173-178, 1996
16. Fernando GJ, Khammanivong V, Leggett GR, Liu WJ, Frazer IH: The number of long-lasting functional memory CD8+ T cells generated depends on the nature of the initial non-specific stimulation. *Eur J Immunol* 32;1541-1549, 2001
17. Shedlock DJ, Shen H: Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300;337-339, 2003
18. Sun JC, Bevan MJ: Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300;339-342, 2003
19. Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP: CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 421;852-856, 2003
20. Bourgeois C, Rocha B, Tanchot C: A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science* 297;2060-2063, 2002
21. Wild J, Grusby MJ, Schirmbeck R, Reimann J: Priming MHC-I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to exogenous hepatitis B surface antigen is CD4+ T cell dependent. *J Immunol* 163;1880-1887, 1999
22. Stober D, Jomantaite I, Schirmbeck R, Reimann J: NKT cells provide help for dendritic cell-dependent priming of MHC class I-restricted CD8+ T cells in vivo. *J Immunol* 170; 2540-2548, 2003
23. Schirmbeck R, Stober D, El-Kholy S, Riedl P, Reimann J: The immunodominant, I_d-restricted T cell response to hepatitis B surface antigen (HBsAg) efficiently suppresses T cell priming to multiple D_d-, K_d-, and K_b-restricted HBsAg epitopes. *J Immunol* 168;6253-6262, 2002
24. Kursar M, Bonhagen K, Fensterle J, Kohler A, Hurwitz R, Kamradt T, Kaufmann SH, Mittrucker HW: Regulatory CD4+ CD25+ T cells restrict memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med* 196;1585-1592, 2002
25. Murakami M, Sakamoto A, Bender J, Kappler J, Marrack P: CD25+CD4+ T cells contribute to the control of memory CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99;8832-8837, 2002
26. Gierynska M, Kumaraguru U, Eo SK, Lee S, Krieg A, Rouse BT: Induction of CD8 T-cell-specific systemic and mucosal immunity against herpes simplex virus with CpG-peptide complexes. *J Virol* 76;6568-6576, 2002
27. Carroll MW, Moss B: Poxviruses as expression vectors. *Curr Opin Biotechnol* 8;573-577, 1997
28. Zavala F, Rodrigues M, Rodriguez D, Rodriguez JR, Nussenzweig RS, Esteban M: A striking property of recombinant poxviruses: efficient inducers of in vivo expansion of primed CD8(+) T cells. *Virology* 280;155-159, 2001
29. Kuklin N, Daheshia M, Kareem K, Manickan E, Rouse BT: Induction of mucosal immunity against herpes simplex virus by plasmid DNA immunization. *J Virol* 71;3138-3145, 1997
30. Toka FN, Gierynska M, Rouse BT: Codelivery of CCR7 ligands as molecular adjuvants enhances the protective immune response against herpes simplex virus type 1. *J Virol* 77;12742-12752, 2003
31. Eo SK, Gierynska M, Kamar AA, Rouse BT: Prime-boost immunization with DNA vaccine: mucosal route of administration changes the rules. *J Immunol* 166;5473-5479, 2001
32. Eo SK, Kumaraguru U, Rouse BT: Plasmid DNA encoding CCR7 ligands compensate for dysfunctional CD8+ T cell responses by effects on dendritic cells. *J Immunol* 167;3592-3599, 2001
33. Kumaraguru U, Rouse BT: Application of the intracellular gamma interferon assay to recalculate the potency of CD8 (+) T-cell responses to herpes simplex virus. *J Virol* 74; 5709-5711, 2000
34. Stein-Streilein J, Sonoda KH, Faunce D, Zhang-Hoover J: Regulation of adaptive immune responses by innate cells expressing NK markers and antigen-transporting macrophages. *J Leukoc Biol* 67;488-494, 2000
35. Robinson HL: DNA vaccines for immunodeficiency viruses. *AIDS* 11;S109-119, 1997
36. Ramshaw IA, Ramsay AJ: The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol Today* 21; 163-165, 2000
37. Harrington LE, Most Rv R, Whitton JL, Ahmed R: Recombinant vaccinia virus-induced T-cell immunity: quantitation of the response to the virus vector and the foreign epitope. *J Virol* 76;3329-3337, 2002
38. Badovinac VP, Porter BB, Harty JT: Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol* 3;619-626, 2002
39. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD, Ahmed R: Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* 188;2205-2213, 1998
40. D'Souza WN, Lefrancois L: IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. *J Immunol* 171;5727-5735, 2003
41. Lanzavecchia A, Sallusto F: Progressive differentiation and

- selection of the fittest in the immune response. *Nat Rev Immunol* 2;982-987, 2002
42. Gett AV, Sallusto F, Lanzavecchia A, Geginat J: T cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol* 4;355-360, 2003
43. Wong P, Pamer EG: Cutting edge: antigen-independent CD8 T cell proliferation. *J Immunol* 166;5864-5868, 2001
44. Kaech SM, Ahmed R: Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol* 2;415-422, 2001
45. van Stipdonk MJ, Lemmens EE, Schoenberger SP: Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat Immunol* 2;423-429, 2001
46. Williams MA, Bevan MJ: Shortening the infectious period does not alter expansion of CD8 T cells but diminishes their capacity to differentiate into memory cells. *J Immunol* 173; 6694-6702, 2004
-