

# 수지상세포의 항원제시 능력 및 항암활성에 미치는 Lipofectin의 영향

숙명여자대학교 생명과학과

노 영 욱 · 임 중 석

## Effect of Lipofectin on Antigen-presenting Function and Anti-tumor Activity of Dendritic Cells

Young-Woock Noh and Jong-Seok Lim

*Department of Biological Sciences, Sookmyung Women's University, Seoul, Korea*

### ABSTRACT

**Background:** Dendritic cells (DC) are professional antigen-presenting cells in the immune system and can induce T cell response against virus infections, microbial pathogens, and tumors. Therefore, immunization using DC loaded with tumor-associated antigens (TAAs) is a powerful method of inducing anti-tumor immunity. For induction of effective antitumor immunity, antigens should be efficiently introduced into DC and presented on MHC class I molecules at high levels to activate antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells. We have been exploring methods for loading exogenous antigens into APC with high efficiency of Ag presentation. In this study, we tested the effect of the cationic liposome (Lipofectin) for transferring and loading exogenous model antigen (OVA protein) into BM-DC. **Methods:** Bone marrow-derived DC (BM-DC) were incubated with OVA-Lipofectin complexes and then co-cultured with B3Z cells. B3Z activation, which is expressed as the amount of  $\beta$ -galactosidase induced by TCR stimulation, was determined by an enzymatic assay using  $\beta$ -gal assay system. C57BL/6 mice were immunized with OVA-pulsed DC to monitor the in vivo vaccination effect. After vaccination, mice were inoculated with EG7-OVA tumor cells. **Results:** BM-DC pulsed with OVA-Lipofectin complexes showed more efficient presentation of OVA-peptide on MHC class I molecules than soluble OVA-pulsed DC. OVA-Lipofectin complexes-pulsed DC pretreated with an inhibitor of MHC class I-mediated antigen presentation, brefeldin A, showed reduced ability in presenting OVA peptide on their surface MHC class I molecules. Finally, immunization of OVA-Lipofectin complexes-pulsed DC protected mice against subsequent tumor challenge. **Conclusion:** Our data provide evidence that antigen-loading into DC using Lipofectin can promote MHC class I-restricted antigen presentation. Therefore, antigen-loading into DC using Lipofectin can be one of several useful tools for achieving efficient induction of antigen-specific immunity in DC-based immunotherapy. (*Immune Network* 2006;6(2):102-110)

**Key Words:** Dendritic cell, DC-based immunotherapy, lipofectin, antigen presentation, anti-tumor immunity

### 서 론

수지상세포(DC)는 면역계에 존재하는 세포 중에서 항원을 전달하는 능력이 가장 강력한 항원전달세포로서 항원을 접한 적이 없는 naive T cell을 자극시킬 수 있는 일차면역반응(primary immune response)을 유도하는 능력을 지니며, 또한 면역기억을 유도할 수 있는 특성을

책임저자 : 임중석, 숙명여자대학교 생명과학과  
☎ 140-742, 서울시 용산구 청파동 2가 53-12  
Tel: 02-710-9560, Fax: 02-2077-7322  
E-mail: jslim@sookmyung.ac.kr

본 연구는 숙명여자대학교 2005년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었음.

갖는 유일한 면역세포이다(1,2). 수지상세포는 세포 표면에 항원제시분자들(MHC 분자와 보조자극분자들)을 많이 발현하고 있고, IFN- $\alpha$ , IL-12 등 여러 가지 사이토카인을 분비하기 때문에 항원 특이 세포살해 T 세포의 생성, Th1 세포의 증식 및 활성화를 유도할 수 있다고 알려져 있다(3).

항암 면역반응을 유도하기 위해서는 세포독성 T 세포의 유도가 중요하게 여겨지는데, 세포독성 T 세포 유도 반응은 바이러스의 침입에 의해 주로 이루어진다. 일반적으로 바이러스 항원과 달리 종양 항원은 대개 면역 유도능력이 약하여 그 자체만으로는 지속적이고 효과적인 항암면역 반응을 유도할 수 없기 때문에, 효과적인 항암 면역반응을 유도하기 위해서 인체 내에서 새로운 항원에 대한 면역유도를 담당하는 가장 강력한 항원전달세포인 수지상세포를 암치료 백신제작에 사용하고 있다(4,5). 근래에는 동물실험 및 임상실험을 통한 항암 효과가 자주 보고되고 있어 수지상세포를 이용한 항암 치료에 대한 기초연구 분야 및 임상분야에서 관심이 급격히 증가하고 있다. 이들 실험의 대부분은 수지상세포를 시험관내에서 분리한 후 종양 항원을 수지상세포에 처리하여 항원을 함유한 수지상세포를 종양백신으로서 동물에 투여하는 방법을 이용하고 있다.

종양 항원을 수지상세포에 전달하기 위한 방법으로 항원 단백질을 발현하는 RNA 또는 DNA를 수지상세포에 주입하는 연구가 많이 진행되었다(6). 하지만 많은 시간과 비용이 필요하므로 그리 효율적이지 못한 방법이다. 또한 수지상세포의 MHC class I 분자에 적합한 항원 유래 펩타이드를 이용하는 방법이 연구되고 있는데 이는 특이적인 항원 펩타이드가 동정이 된 몇몇 종양에만 국한될 뿐 항원이 밝혀지지 않은 여러 종양에서는 면역 반응을 유도하는데 많은 어려움이 따른다(7). 따라서, 최근에는 종양세포와 수지상세포를 융합시켜 항암 면역반응을 유도하는 방법도 이용하고 있으며, 종양세포의 lysate를 이용하여 항암 치료에 이용하려는 연구도 다양하게 진행되고 있다. 이러한 방법들은 종양 특이적인 항원의 펩타이드 구조가 밝혀지지 않은 종양에 대해 좋은 효과를 거두고 있다(8).

효과적인 항암 면역작용 유도를 위해서는 수지상세포에 항원 단백질을 효과적으로 전달하여 MHC class I 분자에 의한 종양 특이적인 항원 유래 peptide 제시율을 높여 수지상세포의 기능을 활성화시키고 또한 세포독성 T 세포를 효과적으로 자극하도록 하는 것이 중요하다. 본 연구에서는 OVA 단백질을 모델 단백질로 채택하고 이 항원 단백질을 수지상세포에 효과적으로 전달하여 항원 제시세포의 기능을 활성화시키며, 궁극적으로 세포 살해 T 세포를 효과적으로 자극하여 모델 단백질에 특이적인 면역반응을 유도하여 항암치료에 이용하고자 하는

실험을 수행하였다. 따라서 실험에 사용된 OVA 단백질을 양이온성 지질과 함께 리포좀 복합체를 형성하여 수지상세포 내로 전달하는 방법을 이용하여 수지상세포의 항원제시 능력이 증강될 수 있는지를 확인하는 실험을 수행하였다. 이를 위해서 시험관 내에서 OVA 특이적 T 세포 hybridoma의 활성화 유도를 시험하고, 이러한 항원 특이적 활성화로 인하여 체내에서 OVA 단백질에 특이적인 항암 면역반응이 유도되는지 확인하는 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

**세포주.** 본 연구에 사용된 EL-4 (Murine thymoma cell line; American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD), EG7-OVA (H-2<sup>b</sup>-OVA-transfectant of EL-4; ATCC) (9) 세포주는 L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 $\mu$ g/ml), HEPES (10 mM)와 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, Grand Island, NY)이 첨가된 RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO) 배양액으로 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 37°C 배양기에서 배양하였다. B3Z (T cell hybridoma) 세포주(10)는 충북대학교 약학대학에서 제공 받았으며, 암세포주와 동일한 조건에서 배양을 하였다. DC2.4 세포주는 Harvard Medical School의 K. Rock 박사에게서 분양을 받았다(11).

**실험동물.** 동물실험은 병원균 감염이 없는(Specific pathogen-free, SPF) 조건에서 사육된 6~8주령 암컷 C57BL/6 (Daehan Bio-Link, Umsong, Korea)를 이용하였으며, 실험 동물 사육실에서 멸균된 사료와 물을 자유롭게 섭취시켰고, 12시간 명암조건을 유지하여 사육하였다.

**골수 유래의 수지상세포의 배양.** 마우스 골수세포로부터 분화하는 골수 유래 수지상세포의 배양은 Inaba 등의 방법을 이용하였다(12). 마우스 대퇴골과 경골을 분리하고, 주사기에 담긴 RPMI 1640 배지로 씻어 골수를 분리한 후 red blood cell lysing buffer (Sigma)를 이용하여 적혈구를 제거하고 골수세포를 확보하였다. 분리된 골수세포에 hybridoma 세포 배양액으로 이루어진 항체 혼합 용액 5 ml를 첨가하고 4°C에서 30분간 배양하여 골수세포를 제외한 B 세포, T 세포, 자연 살해 세포(Natural killer cell), 대식세포(Macrophage) 등에 항체를 결합시켰다(Table 1). RPMI 1640 배지로 2번 세척한 후 10 ml rabbit complement (Low-Tox-M, Cedarlane, Ontario, Canada)를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 배양하여 항체가 결합되어 있는 세포들을 파괴하였다. 살아있는 세포를 분리하기 위하여 보체를 처리한 세포 3 ml를 5 ml의 Histopaque 1077 (Sigma)에 첨가하여 1,700 rpm으로 30분 동안 원심분리 하였다. 림프구가 제거된 골수유래 단핵세포를 두 번 세척해준 후 5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml를 24 well plate에 분주하여 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 37°C 배양기에서 배양하

**Table I.** Clone names and characteristics of hybridoma cell lines used for BM-DC preparation.

Name	Target antigen	Source	Isotype	ATCC code
J1j.10	Anti-Thy 1.2	Rat	IgM	TIB-184
GK1.5	Anti-CD4 (L3T4)	Rat	IgM	TIB-207
3.168	Anti-CD8	Rat	IgM	Unknown
RA3-3A1	Mouse B cell surface glycoprotein B220 (CD45)	Rat	IgM	TIB-146
J11d	Anti-mouse B and T cell	Rat	IgG	TIB-183
M5/114	Anti-I-A <sup>b,d,q</sup> and I-E <sup>d,k</sup>	Rat	IgG <sub>2b</sub>	TIB-120
F4/80	Anti-mouse macrophage	Rat	IgG	HB-198

였다. 배양에 사용된 배지는 10% RPMI 1640에 수지상세포 분화유도 인자인 recombinant mouse granulocyte-macrophage colony-stimulation factor (rmGM-CSF; Endogen, Woburn, MN)와 interleukin-4 (rmIL-4; Endogen)를 각각 10 ng/ml 첨가하여 사용하였다. 배양 2일째, 바닥에 흡착되어 있지 않은 세포는 배양액과 함께 제거하고 새로운 배지를 넣어주고, 4일째, 흡착되어 있지 않은 세포를 회수하여  $5 \times 10^5$  cells/ml 농도로 분주하여 배양하였다. 배양 6~7일째 흡착되어 있지 않은 세포를 회수하여 표현형을 관찰하였다. 또한, 수지상세포의 성숙을 유도하기 위하여 6~7일째, 수지상세포를 1 $\mu$ g/ml의 LPS (Sigma)가 들어있는 배지에서 24시간 동안 배양하였다.

**수지상세포에 OVA 항원의 전달.** K<sup>b</sup> 분자에 결합하는 OVA 단백질 유래의 peptide (SIINFEKL; Peptron, Daejeon, Korea)(13)와 chicken ovalbumin (OVA; Sigma) 단백질을 각각 0~10 $\mu$ g/ml와 1 ml/ml의 농도로 6일째 수확한 수지상세포에 처리한 후 37°C 배양기에서 6시간 동안 배양하였다. EG7-OVA 세포주의 괴사는 freeze-thawing 방법을 이용하였다. EG7-OVA ( $2 \sim 4 \times 10^6$ )를 RPMI 1640 또는 무혈청 배지(serum-free media)에 넣고 액체질소를 이용하여 냉동한 후 37°C 수조를 이용하여 급속히 해동하였다. 2~3회 반복 후 trypan blue 염색법으로 괴사를 확인하였다.  $2 \sim 4 \times 10^6$ 개의 괴사물과  $1 \times 10^6$ 개의 수지상세포를 37°C 배양기에서 24시간 동안 배양하였다.

**OVA-Lipofectin 복합체를 이용한 OVA 항원전달.** N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N, N, N-trimethylamminium chloride (DOTMA)와 dioleoyl phosphatidylethanol amine (DOPE)로 구성된 Lipofectin<sup>TM</sup> (Life Technologies, Gaithersburg, MD) 10 $\mu$ g/ml와 1 mg/ml OVA 단백질을 1 ml의 opti-MEM (Life Technologies)을 이용하여 섞어준 후 20분간 상온에서 방치하였다. 수지상세포( $1 \times 10^6$ )에 1 ml의 OVA-Lipofectin 복합체를 첨가하여 37°C 배양기에서 6시간 동안 배양하였다. 또한, 수지상세포에서의 MHC class I pathway와의 관련성을 시험하기 위해서 brefeldin A (Sigma) 1~10 $\mu$ g/ml를 30분간 미리 처리해준 후 OVA-Lipofectin 복합체와 함께 37°C 배양기에서 6시간 동안

배양하였다.

**B3Z 세포의 활성도 측정.** B3Z 세포는 OVA 펩타이드에 특이적인 T 세포 (CD8<sup>+</sup> T cell) hybridoma로써 TCR에 의한 신호전달에 특이적으로 발현되도록 NF-AT-lacZ reporter vector로 형질전환된 종양세포주를 OVA/K<sup>b</sup> 리간드에 특이적인 세포독성 T 세포와 융합하여 확립한 세포주이다(10).

B3Z cell 활성도는 TCR을 통한 신호전달로 활성화된 B3Z 세포가 생성하는  $\beta$ -galactosidase의 생성을 측정하고자 하였다. 이를 위해  $\beta$ -galactosidase Enzyme Assay System (Promega, Mannheim, Germany)을 이용한 효소의 활성 능력 측정이 이루어졌다. 수지상세포를 RPMI 1640으로 2회 세척한 후,  $1 \times 10^5$  cells/100 $\mu$ l의 수지상세포를 96 well round-bottomed microtiter plate에 분주하고,  $2 \times 10^5$  cells/100 $\mu$ l의 B3Z 세포를 분주하여 37°C 배양기에 16시간 동안 함께 배양하였다. B3Z 세포를 1.5 ml tube에 회수하여 PBS로 2번 세척한 후 1 $\times$ reporter lysis buffer (Promega) 25 $\mu$ l씩 첨가하여 교반한 후 4°C에 20분간 방치하였다. 4°C에서 12,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상층액을 96-well Nunc-Immuno<sup>TM</sup> Modules (Nunc, Roskilde, Denmark)에 분주하였다. 2 $\times$ Assay buffer (Promega)를 25 ml씩 첨가해준 후 37°C에 방치하였다. 30분~3시간 내에 Emax precision microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 O.D. 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**마우스 IL-12 cytokine 측정.** 마우스 골수 유래의 수지상세포 배양액 내에 있는 IL-12 cytokine 양을 측정하기 위하여 mouse IL-12 Custom ELISA Development Systems (Endogen)을 사용하였다. PBS에 용해되어 있는 anti-mouse IL-12 coating monoclonal antibody (3 $\mu$ g/ml)를 96-well Nunc-Immuno<sup>TM</sup> Modules에 100 $\mu$ l씩 분주한 후 25°C에서 하룻밤 동안 방치하였다. Coating 용액을 제거하고 assay solution (PBS with 4% bovine serum albumin (Sigma), pH 7.2~7.4)을 200 $\mu$ l씩 첨가하여 2시간 동안 상온에서 blocking하였다. PBS-T로 3번 세척한 후 시료와 standard를 assay solution에 녹인 후 50 $\mu$ l씩 well에 첨가하여 1시

간 동안 상온에서 방치하였다. 0.5 $\mu$ g/ml 농도의 biotin-labeled anti-IL-12 detecting monoclonal antibody (50 $\mu$ l)를 well에 첨가하여 1시간 동안 상온에 방치하였다. 3회 세척 후 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated strept-avidin을 assay solution으로 1 : 8,000 배율로 희석한 용액을 100 $\mu$ l씩 well에 첨가하였다. 30분 후 3회 세척하고, TMB substrate solution (Endogen)을 100 $\mu$ l씩 well에 첨가하였다. 약 15~20분이 지난 후 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2.5 N) 100 $\mu$ l 씩 첨가하고 O.D. 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**실험용 마우스를 이용한 tumor challenge.** 수지상세포를 OVA, Lipofectin, 그리고 OVA-lipofectin 복합체가 들어있는 배지에서 6시간 동안 배양한 후 회수하여 6~8주령 C57BL/6 마우스의 복부에 피하주사(s.c; 1 $\times$ 10<sup>6</sup>/mice) 하였다. 5일 후 배양된 EL-4 세포 또는 EG7-OVA 세포 (1 $\times$ 10<sup>6</sup>/mice)를 마우스의 같은 위치에 피하주사하여 암이 발생하도록 하였으며, 5일 후부터 약 2~5일 간격으로 2주 또는 3주간 동안 종양의 크기를 측정하였다. 종양의 크기는 버니어 캘리퍼스를 이용하여 가로와 세로를 측정한 후 그 측정값을 곱하여 값을 정하는 방법을 이용하였다.

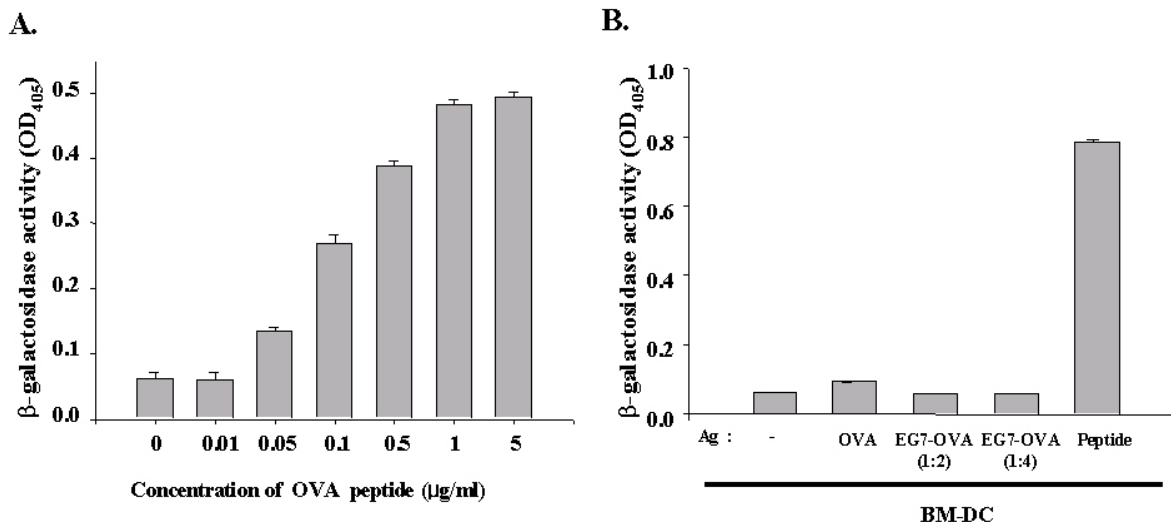
**통계분석.** 모든 결과는 mean $\pm$ SE로 표현하였으며, 처리구간의 통계적 유의성은 Student's *t*-test를 이용하여 검정하였다. 처리된 결과는  $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

**골수 유래 수지상세포의 배양.** 본 실험에서는 마우스

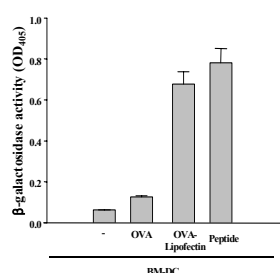
골수에서 유래한 골수세포에 사이토카인을 처리하여 분화를 유도하여 만들어지는 골수 유래 수지상세포를 이용하였다. 마우스 골수 유래 수지상세포는 항원 전달 분자인 MHC class I과 II 분자를 세포표면에 높게 발현하고 있으며, 보조자극 분자(CD80과 CD86), 수지상세포의 신호전달에 관여하는 분자(CD40), 그리고 adhesion 분자(CD54)가 높게 발현되는 것으로 알려져 있다(1). 또한 CD11c 분자를 특이적으로 발현하는데, 이 표면 분자는 골수성 수지상세포의 표지자로 주로 이용된다. 실험에 사용한 수지상세포를 분석한 결과 CD11c, MHC class II, CD40, CD80 (B7.1)과 CD86 (B7.2)을 높게 발현하고 있어, 배양된 세포가 항원제시 및 소개 기능을 담당할 가능성을 지니고 있음을 확인하였다(data not shown)(14).

**수지상세포의 항원제시(antigen-presentation) 능력 측정.** EG7-OVA 세포주는 EL-4 thymoma 세포주에 chicken의 OVA 단백질을 발현하도록 만들어진 세포주이다(20). 따라서, OVA 항원 단백질의 면역성을 조사하는데 널리 이용되고 있다. 특히, K<sup>b</sup> type에 해당하는 MHC class I 분자에 의해 제시되는 OVA의 항원성 peptide (SIINFEKL)가 널리 사용되고 있다 (13). 먼저, 6~7일간 배양한 수지상세포를 0~5 $\mu$ g/ml의 OVA peptide가 포함된 배지에서 6시간 동안 배양한 후 B3Z 세포와 함께 16시간 동안 배양하여  $\beta$ -galactosidase의 발현량을 흡광도(OD 405)를 이용하여 측정한 결과 펩타이드 항원 농도 의존적으로  $\beta$ -galactosidase의 발현이 증가됨을 확인할 수 있었다(Fig. 1A). 처리한 펩타이드 양이 5 $\mu$ g/ml 이후에서는 용량의존적 T 세포의 활성화가 관찰되지 않았다. 그러나, OVA 단백



**Figure 1.** Presentation of OVA peptide on MHC class I molecules in BM-DC. (A) BM-DC (1 $\times$ 10<sup>5</sup>) were incubated with the indicated amount of OVA peptide for 6 h, washed, and then cocultured for 16 h with a T-cell hybridoma, B3Z cells (2 $\times$ 10<sup>5</sup>/well), which express  $\beta$ -galactosidase upon recognition of the OVA peptide, SIINFEKL, complexed with the H-2K<sup>b</sup> molecule. The amount of  $\beta$ -galactosidase expressed in B3Z cells was determined by an enzymatic assay using  $\beta$ -galactosidase Enzyme Assay System. (B) BM-DC were incubated with EG7-OVA cell necrotic bodies for 24 h at the ratio of 1 : 2 or 1 : 4, OVA protein (1 mg/ml) or OVA peptide (5 $\mu$ g/ml) for 6 h.

질(1 mg/ml) 또는 OVA peptide (5 $\mu$ g/ml)가 포함된 배지에서 6시간 동안 배양한 후 B3Z 세포와 함께 배양하여  $\beta$ -galactosidase의 발현량을 측정한 경우, 펩타이드에 의한 활성화는 관찰된 반면에, OVA-pulsed DC에 의한 흡광도의 변화는 대단히 약한 정도로만 나타났다(Fig. 1B). 또한, EG7-OVA를 freeze-thawing을 1회 수행하여 만든 괴사물을 2 : 1, 4 : 1의 비율로 24시간 동안 함께 배양하

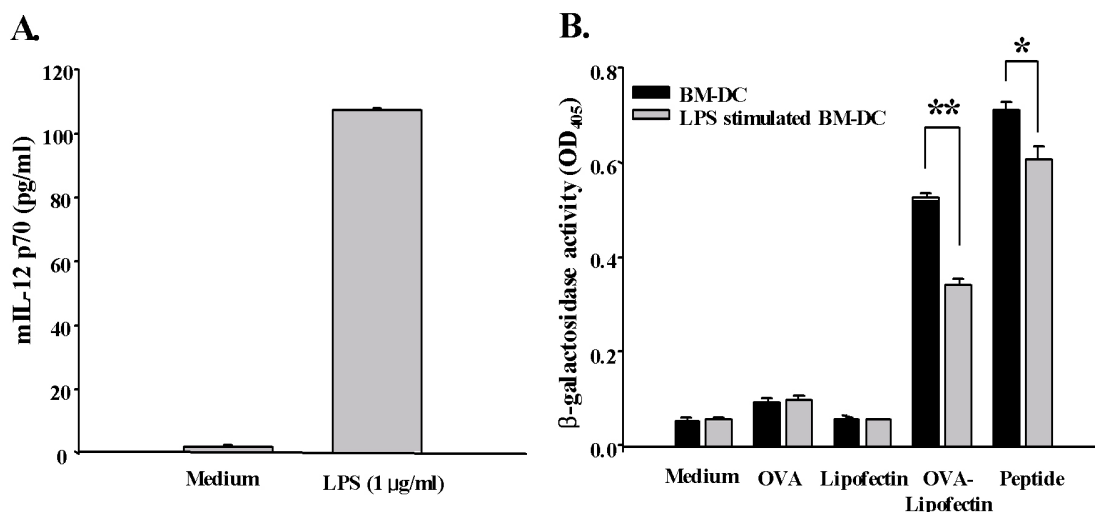


**Figure 2.** Presentation of OVA peptides on MHC class I molecules in BM-DC pulsed with OVA or OVA-Lipofectin complexes. BM-DC ( $1 \times 10^5$ ) were incubated with 1 mg/ml of OVA mixed with 10 $\mu$ g/ml of Lipofectin. After 6 h, they were washed and co-cultured for 16 h with B3Z cells. Response of B3Z cells was determined as in legend to Fig. 1. Lipofectin was mixed with OVA in Opti-MEM, and incubated for 20 min at RT.

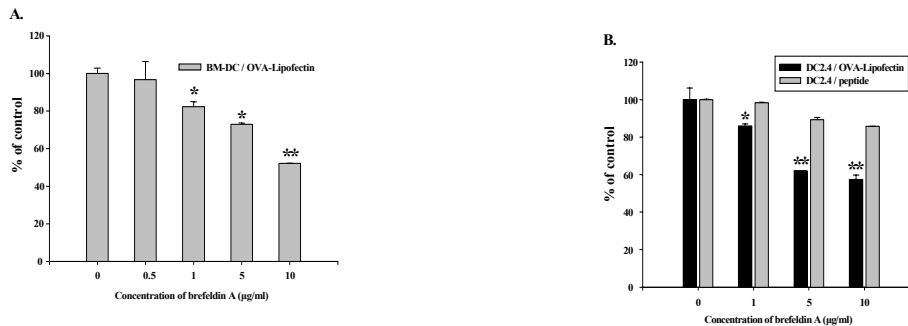
여 pulse시킨 수지상세포 역시 흡광도 변화를 거의 유도하지 못하였다. 이러한 결과는 수지상세포에 가해진 단백질 항원의 cross-presentation 효율이 예상외로 높지 않음을 시사하는 것으로 해석되었다.

**OVA-Lipofectin에 의한 수지상세포의 항원제시 능력 측정.** 외부 단백질 항원의 cross-presentation 효율을 향상시키기 위한 방법으로 OVA-lipofectin 복합체를 이용하여 OVA 단백질을 수지상세포 내로 전달하고자 하는 실험을 수행하였다. Lipofectin은 양이온성 지질로써 주로 plasmid DNA를 세포 내로 전달하는데 사용된다. OVA 단백질, OVA-lipofectin 복합체, 그리고 OVA peptide를 pulse시킨 수지상세포를 B3Z 세포와 함께 배양하여 항원제시 능력을 측정한 결과, OVA 단백질을 pulse한 수지상세포에 비해 OVA-lipofectin 복합체를 pulse한 수지상세포가 MHC class I 분자에 OVA 항원을 제시하는 능력이 현저히 더 높다는 것을 알 수 있었다(Fig. 2).

**OVA-Lipofectin 항원복합체에 의한 성숙한 수지상세포의 항원 제시 능력 측정.** OVA-lipofectin 복합체를 이용하여 성숙한 수지상세포 내로 OVA를 전달하는 실험을 수행하였다. 수지상세포는 LPS 혹은 CD40L 같은 자극에 의해 성숙(mature) 상태의 세포로 분화될 수 있다. 성숙한 수지상세포는 표면에 MHC 분자와 co-stimulation 분자의 발현이 증가하여 T 세포를 효과적으로 활성화시킬 수 있다. 그러나, 미성숙(immature) 수지상세포에 비해 phagocytic 능력이 감소되는 특징이 있다. OVA-lipofectin 복합체에 의한 항원전달이 수지상세포의 phagocytic 능력에 의해서 영향을 받는지 알아보기 위해 먼저, 6~7일 된 수지상세포를 LPS (1 $\mu$ g/ml)가 첨가된 배



**Figure 3.** Presentation of OVA peptide on MHC class I molecules in LPS-stimulated BM-DC. (A) BM-DC were stimulated with LPS (1 $\mu$ g/ml) for 24 h. After incubation, culture supernatants were collected, and then subjected to mIL-12 p70 ELISA. (B) Stimulated or non-stimulated BM-DC were incubated with OVA protein (1 mg/ml), OVA peptide (5 $\mu$ g/ml), Lipofectin (10 $\mu$ g/ml) or OVA-Lipofectin complex. After 6 h, they were washed and co-cultured for 16 h with B3Z cells. Response of B3Z cells was determined as in legend to Fig. 1. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (compared with medium w/o LPS).



**Figure 4.** Effect of brefeldin A on antigen presentation by MHC class I molecules in BM-DC. BM-DC (A) or DC2.4 cells (B) were pretreated with 0.5~10µg/ml brefeldin A or medium alone (control) followed by the addition of OVA (1 mg/ml) mixed with lipofectin (10µg/ml)(A and B) or OVA peptide (5µg/ml)(B), and incubated for 6 h. After 6 h, they were co-cultured with B3Z cells. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (compared with medium w/o brefeldin A).

지에서 24시간 동안 배양하여 성숙한 수지상세포로의 분화를 유도하였다. 일반적으로 성숙한 수지상세포는 IL-12 사이토카인을 분비하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 수지상세포 배양액 내의 IL-12 사이토카인의 양을 사이토카인 ELISA를 이용하여 측정한 결과 LPS에 의해 성숙한 수지상세포가 유도됨을 확인하였다(Fig. 3A).

성숙 또는 미성숙 상태의 수지상세포에 OVA-lipofectin 복합체를 pulse 시킨 결과 미성숙한 수지상세포에 비해 성숙한 수지상세포에 의한 B3Z 세포의 활성도가 떨어짐을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 이 결과는 성숙한 수지상세포의 phagocytic 능력이 미성숙 세포에 비해 상대적으로 감소되어 생긴 현상으로 생각되며, 이 현상은 대조군으로 사용한 펩타이드 항원에 의한 T 세포 활성화의 경우에서도 상대적으로 약하게 관찰되었다. 결과적으로 OVA-lipofectin 복합체에 의한 OVA의 세포 내 전달이 세포의 phagocytosis 능력에 따라서 영향을 받을 수 있다는 것을 보여주었다.

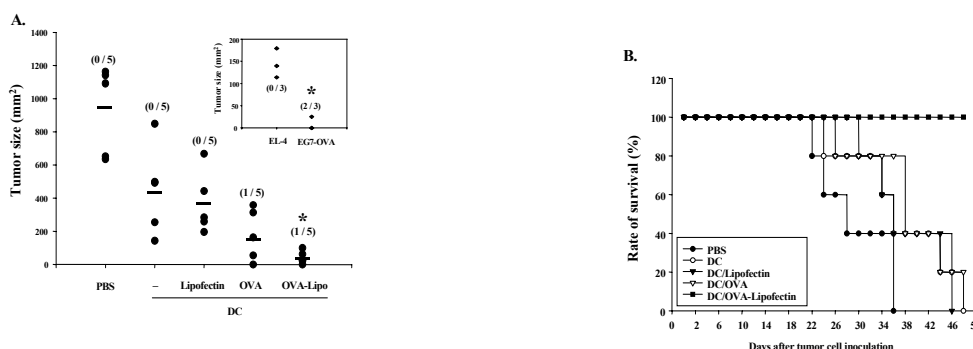
**Brefeldin A에 의한 수지상세포의 항원제시 능력 억제.** MHC class I 분자에 제시되는 항원은 수지상세포 또는 APC의 세포 내에서 생성된 세포 내재성 항원으로부터 만들어지며 이는 MHC class I 항원의 대사과정을 거쳐서 일어나는 현상이다. Brefeldin A는 세포질 내에서 합성된 단백질이 소포체(ER; endoplasmic reticulum)와 골지체(Golgi complex)를 거쳐서 세포 밖으로 분출되는 과정을 억제하는 물질로써, MHC class I 대사과정을 억제할 수 있는 물질로 알려져 있다. 따라서 brefeldin A를 이용하여 OVA-lipofectin complex-pulsed 수지상세포의 항원제시 능력이 변화될 수 있는지 보는 실험을 수행하였다.

Brefeldin A (0~10µg/ml)가 첨가되어 있는 배지에서

30분간 배양한 수지상세포에 OVA-lipofectin 복합체를 pulse한 후 B3Z 세포의 활성도를 측정하였다. 실험결과 첨가된 brefeldin A의 농도에 비례하여 B3Z cell의 활성도가 감소하였으며, brefeldin A가 첨가되지 않았을 때를 기준으로 10µg/ml가 첨가된 경우 약 50% 정도 감소되었음을 관찰하였다(Fig. 4A). 수지상세포의 특성을 지니는 DC2.4 세포주를 사용한 실험에서도 유사한 결과를 얻을 수 있었는데, 펩타이드 항원의 경우에는 이러한 경향이 거의 관찰되지 않았으며, OVA 단백질을 처리한 경우에만 brefeldin A에 의한 현저한 억제효과를 관찰할 수 있었다(Fig. 4B). 따라서, OVA-lipofectin 복합체에 의해 OVA 단백질이 수지상세포 내로 전달되며, 이때에 전형적인 MHC class I 항원전달 경로를 통하여 OVA 항원이 제시된다는 것을 알 수 있었다.

**수지상세포에 의한 종양억제효과 측정.** OVA-lipofectin complex pulsed DC에 의한 OVA항원 특이적인 종양억제효과를 확인하기 위하여 tumor challenge 실험을 수행하였다.

6~8주령 C57BL/6 마우스에 각각 PBS, 수지상세포( $1 \times 10^6$  cells/mice), OVA 단백질 pulsed DC, lipofectin pulsed DC, 그리고 OVA-lipofectin pulsed DC를 피하주사하였다. 백신 투여 5일 후 같은 위치에 EG7-OVA 종양세포( $1 \times 10^6$  cells/mice)를 피하주사하였으며, 투여 5일 후부터 약 5일 간격으로 3주간 종양의 크기를 측정하였다. 측정 결과, 5일 후부터 종양이 성장한 대조군 그룹에 비해 OVA-lipofectin pulsed DC 그룹은 투여 2주 후부터 종양이 성장하기 시작하였으며, 3주 후 대조군 그룹에 비해 현저하게 작은 크기의 종양이 관찰되었다(Fig. 5A). 반면에 OVA-lipofectin pulsed DC ( $1 \times 10^6$ )를 백신으로 투



**Figure 5.** Inhibition of tumor growth by immunization with OVA-lipofectin pulsed BM-DC. C57BL/6 mice were subcutaneously immunized with  $1 \times 10^6$  DC pulsed with OVA-lipofectin, OVA, or lipofectin. 5 days later,  $1 \times 10^6$  EG7-OVA tumor cells were subcutaneously inoculated into left flank. (A) Tumor size was evaluated in two perpendicular dimensions with vernier calipers on day 21 after tumor inoculation. The numbers indicate the ratio of tumor-free mice to treated mice. Each group consisted of five mice. The horizontal line indicates median level of tumor size. EL-4 tumor cells were also inoculated into mice immunized with OVA-lipofectin pulsed DC ( $1 \times 10^6$ ). Tumor size was evaluated on day 14 (insert). \* $p < 0.01$  (compared with PBS control, DC alone or EL-4 inoculation). (B) Survival curve of EG7-OVA-bearing mice vaccinated with either DC or different forms of antigen-pulsed DC.

여한 후, EG7-OVA와 기원세포인 EL-4를 피하주사한 후 2주가 경과하여 종양의 성장 정도를 측정한 결과 EG7-OVA로 유도한 암의 경우와 달리, EL-4로 유도된 암의 경우에는 종양 예방효과가 전혀 나타나지 않았다(Fig. 5A, insert). 여러 형태의 항원을 처리한 수지상세포를 면역화한 그룹들에서 생존율을 비교하여 보면 OVA-lipofectin pulsed DC 그룹에서 다른 그룹들과 달리 완벽한 종양 예방효과를 관찰할 수 있었다(Fig. 5B). 따라서, OVA-lipofectin complex pulsed DC는 OVA 항원 특이적인 항암 면역반응을 강력하게 유도할 수 있음을 알 수 있었다.

## 고 찰

수지상세포는 면역반응 유도에 있어서 지금까지 알려진 가장 강력한 항원제시세포(APC)이다(1,2). 따라서 많은 연구자들이 수지상세포를 이용하여 항원 특이적인 세포독성 T 세포의 활성화와 항암 면역반응을 유도하기 위하여 노력해왔다. 수지상세포를 이용한 성공적인 항암 면역반응 유도는 종양 항원이 수지상세포에 효과적으로 전달되고, MHC class I 분자를 통해 많은 양의 항원이 표면에 제시되어 이로 인해 세포독성 T 세포가 활성화가 일어나는가에 의해서 좌우된다. 이를 위해 수지상세포의 MHC class I 분자에 특이적인 항원 peptide를 이용하여 수지상세포의 면역반응을 유도하는 연구가 진행되었으며(1,2,15), 수지상세포에 종양 항원 발현 유전자(DNA & RNA 등)를 도입하여 항암 면역을 유도하기도 하였다(6,16). 그러나 이는 세포독성 T 세포가 인식할 수

있는 특이적인 항원 peptide가 동정이 된 몇몇 종양에만 국한될 뿐 모든 종양에 대한 면역반응을 유도하기에는 많은 어려움이 따른다(7,17). 따라서, 최근 종양의 괴사물을 이용하여 항암 면역을 유도하는 연구가 이루어지고 있다(7).

본 연구자는 지금까지의 연구를 바탕으로 외부 항원 단백질을 이용하여 외부 항원이 항원전달세포의 MHC class I 분자에 의해 제시되는 효율을 높이기 위한 방법을 조사하였다. 수지상세포의 항원 제시 활성화를 위해 외부 항원 단백질을 직접 이용하는 것은 효율적이지 않았다. 하지만, 수지상세포의 내포작용 또는 대식작용을 이용하면 효과적으로 수지상세포를 활성화시킬 수 있다고 알려져 있다(18). 본 연구에서는 양이온성 지질(Lipofectin)을 이용하여 외부 항원 단백질인 OVA 단백질을 수지상세포에 전달하여 OVA 항원을 MHC class I 분자에 전달하기 위한 실험을 수행하였으며, 이러한 결과를 활용하여 항원 단백질을 이용한 수지상세포의 종양 특이적인 활성화와 이를 이용한 항암 면역 유도가 효과적으로 이루어질 수 있음을 증명하고자 하였다.

실험에 사용된 Lipofectin은 N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N, N, N-trimethylanmonium chloride (DOTMA)와 보조 지질 기능을 하는 융해성 지질인 dioleyl phosphatidylethanolamine (DOPE)으로 구성되어 있어 양이온성 리포솜을 형성하는 물질이다. 본 연구에서는 수지상세포에 OVA-Lipofectin 복합체를 처리하였을 때 같은 양의 OVA 단백질을 처리해준 것에 비해 더 많은 양의 OVA 펩타이드가 MHC class I 분자에 의해 제시된다는 것을



확인하였다(Fig. 2). 일반적으로 MHC class I 분자에 의한 항원 펩타이드의 제시는 바이러스 감염 등에서 보이는 것처럼 항원 전달 세포 내에서 생성된 항원 단백질에 의해 이루어진다. 그러나, 전문적 항원전달 및 제시 기능을 가지는 수지상세포는 세포질 내로 전달된 외부 항원 단백질을 가공하여 MHC class I 대사과정을 통하여 제시할 수 있다고 보고되어 있다(19). 이를 증명하기 위해 우리는 MHC class I pathway를 억제하는 물질로 알려진 brefeldin A를 먼저 처리해준 후 OVA-Lipofectin을 처리해준 결과, 수지상세포의 OVA 항원 peptide 제시 효과가 감소되는 것을 확인하였다. 따라서, 외부 항원인 OVA 단백질이 MHC class I 대사과정을 거쳐서 OVA peptide를 세포 표면에 제시되었다고 할 수 있다. 이 과정은 주로 대식작용(19), macropinocytosis (18,20), 또는 수용체에 의한 내포작용(21)에 의해 이루어진다. 비록 정확히 밝히지는 못했지만, Lipofectin에 결합되어 있는 OVA 단백질이 대식작용에 의해 수지상세포 내로 전달되어 가공과정과 MHC class I 대사과정에 의해서 항원 펩타이드의 제시가 이루어진 것으로 생각된다(22).

항원 peptide는 항원전달세포에 효과적으로 제시되어 항원 특이적인 세포독성 T 세포를 자극하는 것으로 보고되었으며(15), B3Z 모델 세포를 활용한 본 실험을 통하여도 확인될 수 있었다(Fig. 1). 뿐만 아니라 이렇게 제시된 항원을 함유하는 수지상세포를 백신으로 투여한 경우, 동일 항원을 가지는 종양세포의 성장을 억제할 수 있음을 보였으므로, 효과적인 항원 특이적 항종양 면역반응이 유도될 수 있다는 것을 알 수 있었다. 비록 본 연구에서는 종양모델에서의 항원 특이적 세포살해성 T 임파구의 활성화도 실험을 진행하지는 않았으나, 이미 OVA 항원을 이용한 여러 연구결과들은 본 연구에서 얻은 종양 예방효과가 펩타이드 항원 특이적 세포살해성 T 임파구의 활성화유도에 의한 것임을 강력하게 시사하고 있다(23). 대부분의 종양 세포의 경우 항원 특이적인 peptide가 잘 알려져 있지 못하다. 따라서, 항원 단백질을 항원전달세포에 전달하여 MHC class I에 항원 peptide가 제시되도록 하는 것이 훨씬 효율적이라고 할 수 있다. 외부 항원 단백질을 항원전달세포에 효과적으로 전달하고자 하는 시도는 많은 연구자들에 의해 이루어져 많은 효과가 입증되고 있다. 그 방법으로는 항원전달물질로 알려진 cholera toxin (CT)에 항원 단백질을 결합하여 수용체에 의한 내포작용을 이용한 항원 전달 방법과 리포솜, 특히 바이러스 리포솜인 비로솜(virosome)을 이용하여 대식작용에 의한 항원 단백질의 전달 방법 그리고 전기충격법 (electroporation)을 이용하는 방법 등이 연구되었다(24-27). 본 연구에서 사용한 Lipofectin 역시 기대한 대로 외부 항원을 항원전달세포에 효과적으로 전달할 수 있음을 확인하였다.

이와 같은 효과적인 항원 전달과 항원전달세포의 활성화 유도를 위한 연구를 통해서 종양 특이적인 항원이 밝혀지지 않은 여러 종양의 경우에서 항종양 면역반응 유도과 종양의 면역치료에 효과적인 수단들이 개발될 수 있을 것으로 기대한다.

## 감사의 글

저자들은 연구에 사용된 B3Z 세포주를 제공하여 주신 충북대학교 약학대학 이종길 교수님께 감사의 말씀을 드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392;245-252, 1998
2. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K: Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18;767-811, 2000
3. Hilkens CM, Kalinski P, de Boer M, Kapsenberg ML: Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype. *Blood* 90;1920-1926, 1997
4. Nouri-Shirazi M, Banchereau J, Fay J, Palucka K: Dendritic cell based tumor vaccines. *Immunol Letter* 74;5-10, 2000
5. Whiteside TL, Odoux C: Dendritic cell biology and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 53;240-248, 2004
6. Milazzo C, Reichardt VL, Muller MR, Grunebach F, Brossart P: Induction of myeloma-specific cytotoxic T cells using dendritic cells transfected with tumor-derived RNA. *Blood* 101; 977-982, 2003
7. Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM: The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 15; 138-147, 2003
8. Kim A, Kim KD, Choi SC, Jeong MJ, Lee HG, Choe YK, Paik SG, Lim JS: IL-12 production and subsequent natural killer cell activation by necrotic tumor cell-loaded dendritic cells in therapeutic vaccinations. *Immune Network* 3;188-200, 2003
9. Moore MW, Carbone FR, Bevan MJ: Introduction of soluble-protein into the class-I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* 54;777-785, 1988
10. Karttunen J, Sanderson S, Shastri N: Detection of rare antigen-presenting cells by the LacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 89;6020-6024, 1992
11. Shen Z, Renznikoff G, Dranoff G, Rock KL: Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol* 158;2723-2730, 1997
12. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM: Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176; 1693-1702, 1992
13. Shastri N, Gonzalez F: Endogenous generation and presentation of the ovalbumin peptide/k(b) complex to T-cells. *J Immunol* 150;2724-2736, 1993
14. Kim A, Noh YW, Kim KD, Jang YS, Choe YK, Lim JS: Activated natural killer cell-mediated immunity is required for the inhibition of tumor metastasis by dendritic cell vaccination. *Exp Mol Med* 36;428-443, 2004
15. Porgador A, Snyder D, Gilboa E: Induction of antitumor immunity using bone marrow-generated dendritic cells. *J Immunol*



- 156;2918-2926, 1996
  16. De Veerman M, Heirman C, Van Meirvenne S, Devos S, Corthals J, Moser M, Thielemans K: Retrovirally transduced bone marrow-derived dendritic cells require CD4<sup>+</sup> T cell help to elicit protective and therapeutic antitumor immunity. *J Immunol* 162; 144-151, 1999
  17. Rosenberg SA: A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 10;281-287, 1999
  18. Norbury CC, Chambers BJ, Prescott AR, Ljunggren HG, Watts C: Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 27;280-288, 1997
  19. Shen Z, Reznikoff G, Dranoff G, Rock KL: Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol* 158;2723-2730, 1997
  20. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A: Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182;389-400, 1995
  21. Rodriguez A, Regnault A, Kleijmeer M, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S: Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol* 1;362-368, 1999
  22. Okada N, Tsujino M, Hagiwara Y, Tada A, Tamura Y, Mori K, Saito T, Nakagawa S, Mayumi T, Fujita T, Yamamoto A: Administration route-dependent vaccine efficiency of murine dendritic cells pulsed with antigens. *Br J Cancer* 84;1564-1570, 2001
  23. Galea-Lauri J, Wells J, Darling D, Harrison P, Farzaneh F: Strategies for antigen choice and priming of dendritic cells influence the polarization and efficacy of antitumor T-cell responses in dendritic cell-based cancer vaccination. *Cancer Immunol Immunother* 53;963-977, 2004
  24. Eriksson K, Sun JB, Nordstrom I, Fredriksson M, Lindblad M, Li BL, Holmgren J: Coupling of antigen to cholera toxin for dendritic cell vaccination promotes the induction of MHC class I-restricted cytotoxic T cells and the rejection of a cognate antigen-expressing model tumor. *Eur J Immunol* 34;1272-1281, 2004
  25. Kim KW, Kim SH, Jang JH, Lee EY, Park SW, Um JH, Lee YJ, Lee CH, Yoon S, Seo SY, Jeong MH, Lee ST, Chung BS, Kang CD: Dendritic cells loaded with exogenous antigen by electroporation can enhance MHC class I-mediated antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* 53;315-322, 2004
  26. Bungener L, Serre K, Bijl L, Leserman L, Wilschut J, Daemen T, Machy P: Virosome-mediated delivery of protein antigens to dendritic cells. *Vaccine* 20;2287-2295, 2002
  27. Nakanishi T, Hayashi A, Kunisawa J, Tsutsumi Y, Tanaka K, Yashiro-Ohtani Y, Nakanishi M, Fujiwara H, Hamaoka T, Mayumi T: Fusogenic liposomes efficiently deliver exogenous antigen through the cytoplasm into the MHC class I processing pathway. *Eur J Immunol* 30;1740-1747, 2000
-