

마우스 동종 줄기세포 유래 수지상 세포를 이용한 백신의 흑색종 폐암 전이 모델에서의 항암 효과 및 기전 연구

¹성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 암센터, ²주메디포스트 중앙연구소

김명주¹ · 손혜진¹ · 백소영¹ · 이강은¹ · 이영준² · 이현아¹

Anti-cancer Effect of Hematopoietic Stem Cell-derived Allogeneic-DC Vaccine in Melanoma Metastasis Model

Myoung Joo Kim¹, Hye Jin Shon¹, Soyoung Back¹, Kang Eun Lee¹, Young-Joon Lee² and Hyunah Lee¹

¹The Cancer Center, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, ²Medipost biomedical Research Institute, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: Dendritic cell (DC)-based cancer immunotherapy is studied for several years. However, it is mainly derived from autologous PBMC or leukapheresis from patient, which has limitations about yield and ability of DC production according to individual status. In order to solve these problems, inquiries about allogeneic DCs are performed but there are no preclinical trial answers for effect or toxicity of allogeneic DC to use for clinical trial. In this study, we compared the anti-tumor effect of allogeneic and autologous DCs from mouse bone marrow stem cells in mouse metastatic melanoma model. **Methods:** B16F10 melanoma cells (5×10^4 /mouse) were injected intravenously into the C57BL/6 mouse. Therapeutic DCs were differentiated from autologous (C57BL/6: CDC) or allogeneic (B6C3F1: BDC) bone marrow stem cells with GM-CSF, SCF and IL-4 for 13days and pulsed with B16F10 tumor cell lysate (Blys) for 18hrs. DC intra-peritoneal injections began on the 8th day after the tumor cell injection by twice with one week interval. **Results:** Anti-tumor response was observed by DC treatment without any toxicity especially in allogeneic DC treated mice (tumor burden score: 2.667 ± 0.184 , 2.500 ± 0.463 , 2.000 ± 0.286 , 1.500 ± 0.286 , 1.667 ± 0.297 for saline, CDC/unpulsed-DC: U-DC, CDC/Blys-DC, BDC/U-DC and BDC/Blys-DC, respectively). IFN- γ secretion was significantly increased in allogeneic DC group stimulated with B16F10 cell lysate ($2,643.3 \pm 5,89.7$, $8,561.5 \pm 2,204.9$, $6,901.2 \pm 141.1$ pg/ 1×10^6 cells for saline, BDC/U-DC and BDC/Blys-DC, respectively) with increased NK cell activity. **Conclusion:** Conclusively, promising data was obtained that allogeneic DC can be used for DC-based cancer immunotherapy. (*Immune Network* 2006;6(3):154-162)

Key Words: Stem cell-derived DC, allogeneic DC, anti-cancer immunotherapy

서 론

현대의 생활습관과 환경오염으로 인하여 암환자의 수가 증가하였고, 이를 위하여 외과적 수술이나 약물 치료,

방사선 치료 등 다양한 치료 방법들이 개발되어 왔다. 그러나 정상 세포에 대한 부작용이라는 한계점을 넘어서지 못하였으므로 이를 극복하기 위한 새로운 치료제 개발을 위해 종양 세포 특이적인 치료 방법이 연구되어 왔으며, 이 중 수지상 세포를 이용한 항암 면역 세포 치료 방법이 1990년대 후반부터 개발되어 현재까지 많은 연구가 거듭되어 왔다. 1996년 Hsu 등(1)에 의해 처음으로 수지상 세포를 기반으로 하는 항암 면역 치료 결과가 발표된 이후 100사례 이상의 연구 결과들이 발표되어 왔

책임저자 : 이현아, 성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 암센터
☎135-710, 서울시 강남구 일원동 50번지
Tel: 02-3410-3455, Fax: 02-3410-6808
E-mail: hlee@smc.samsung.co.kr

본 연구는 산업자원부 신기술실용화기술개발사업(2005~2006) 연구비 지원으로 수행되었음.

으며 이러한 연구를 통하여 수지상 세포의 치료가 안전하고 부작용이 없었다는 사실이 알려졌다(2-6).

지금까지 발표된 수지상 세포를 이용한 항암 면역 치료법은 배양된 세포에 종양의 항원을 인지시킨 후 종양 항원 특이 T cell의 활성화를 유도하여 암세포를 공격하도록 하는 것이었다. 이를 위하여 Th1 type response를 유도하는 myeloid 수지상 세포를 환자 본인의 human peripheral blood나 umbilical cord blood 등에서 단핵구를 분리한 후 배양하여 사용해 왔다. 신장암 환자를 대상으로 한 연구에서 종양 세포 용해액을 첨가한 자가 수지상 세포로 치료했을 때 일부의 환자에서 임상적 반응을 보였다고 나타난 바 있으며 O'Rourke 등에 의해 자가 유래 수지상 세포가 melanoma 환자 일부에서 임상적 효과를 보였다고 보고되었다(7-11). 그러나 이러한 자가 단핵구 유래 수지상 세포의 배양은 1) 수득율이 낮고, 2) 환자의 상태에 따라서 각기 다른 양상을 보인다는 단점이 있다(8,9,12). 그러므로 수득율의 문제점을 해결하기 위하여 hematopoietic stem cell (CD34⁺ cell)을 이용하여 수지상 세포를 배양하는 방법이 연구되고 있다. CD34⁺ cell을 이용하면 in vitro에서 효과적으로 대량의 성숙한 수지상 세포를 만들어 낼 수 있으며 다양한 stage로의 분화가 가능하므로 여러 분야의 임상연구에 적용될 수 있다. 또한 수지상 세포에 genetic engineering방법을 도입할 때 CD34⁺ precursor를 사용하는 것이 더 많이 분화된 수지상 세포 precursor를 이용하는 것보다 효율적일 수 있다. Ward 등에 의해 PBSC에서 분리한 CD34⁺ cell을 GM-CSF, IL-4, SCF, Flt-3L, TNF- α 와 함께 배양하였을 때, 수지상 세포의 수득율이 60배에 달한다고 보고된 바 있으며(12), cord blood에서 CD34⁺ cell로부터 배양된 수지상 세포가 배양한 지 12일 후에 30배 이상 증가했다는 결과도 발표된 바 있다(13-16).

환자의 자가 세포를 이용한 맞춤형 세포 치료제는 환자 입장에서는 장점으로 인식되고 있으나 반면에 환자의 질환 또는 생리적 상태 등의 개인차로 인해 치료세포 배양이 불가능한 경우가 발생한다. 그러므로 allogeneic donor로부터 치료용 세포를 공급할 수 있다면 이 같은 문제점을 해결할 수 있을 것이다. 이와 관련된 연구로써 건강한 human PBMC로부터 배양된 수지상 세포 백신이 종양 특이 면역 반응에 관여하는 cytotoxic T cell을 생성하며 결과적으로 충분한 양의 항암효과를 가진 수지상 세포를 얻을 수 있다는 연구 결과가 보고된 바 있다(17). 또한 Hsu 등에 의해 초기 단계의 B-cell chronic lymphocytic leukemia 환자를 건강한 공여자의 leukapheresis로부터 생성된 동종 수지상 세포로 치료하였을 때 in vitro상에서 종양 항원 특이 면역반응의 지표가 되는 IFN- γ 가 생성되었다고 발표된 바 있으며(18), allogeneic PBMC로부터 생성된 수지상 세포 백신이 Phase I/II metastatic

renal cell carcinoma 환자 일부에게서 임상적 효과를 보였다고 보고되었다(19). 이 같은 몇몇의 임상결과가 보고되었음에도 불구하고, 동종 수지상 세포를 세포 치료에 사용하기 위한 효능, 효과, 독성에 관한 전임상 결과는 보고된 바 없다. 본 실험에서는 수지상 세포 항암백신의 수득율과 효능, 효과를 개선하기 위한 노력으로 조혈줄기세포유래 수지상 세포의 배양 및 동종 수지상 세포의 전임상 동물 실험을 수행하였다. 특히 allogeneic bone marrow transplantation 등에서 HLA typing을 수행하여 가장 적합한 수혜자와 공여자를 찾는 원칙에 따라(20) 본 연구에서도 MHC class의 한 부분이 다른 B6C3F1 mouse (H-2Kb/k)를 [C57BL/6 mouse (H-2Kb)와 C3H (H-2Kk)의 잡종] 사용하여 임상에서 가능한 상황을 묘사한 동종 수지상 세포 백신의 효능을 생쥐 in vivo 발암 모델에서 관찰하였다. 생쥐 흑색종 폐암 전이 모델에서 동종 수지상 세포(allogeneic DC)의 효과가 자가 수지상 세포(autologous DC)의 효능보다 우세함을 관찰하였고 immune monitoring을 통해 가능한 기전을 확인하였다.

재료 및 방법

실험동물. 암컷 순계인 C57BL/6 mice (5~6주령)를 Orient (경기도 성남)로부터 구입하였고 C57BL/6와 C3H mouse의 hybrid인 B6C3F1 mice (5~6주령)를 Charles River Japan, Inc. (Yokohama, Kanagawa)으로부터 구입하였다. Mice는 특정 병원균이 없는(specific pathogen-free, SPF) 동물로 삼성서울병원 실험동물연구실에서 ILAR (Institute of Laboratory Animal Resources) guideline에 따라 사육되었다. 실험 기간 중 사료와 물은 자유롭게 섭취시켰고, 12시간 명, 암 조건을 유지하였다. 모든 동물은 실험을 시작하기 전 일주일 동안 적응기간을 거쳤다.

시약. 세포 배양에 필요한 배지의 성분인 RPMI-1640 medium, fetal bovine serum과 penicillin-streptomycin은 GIBCO laboratories (Grand Island, NY)의 시약을 사용하였다. 수지상 세포의 표현형 검색을 위한 fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin conjugated MHC class I (H-2Kb, H-2Kk), MHC class II (IAb, IAk), CD11c, CD80과 CD86은 BD Pharmingen (San Diego, CA)로부터 구입하였다. 또한 CFSE assay를 위한 carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)는 SIGMA Chemical Co. (St. Louise, MO)로부터 구입하였다.

세포주. C57BL/6의 syngenic 흑색종 세포주인 B16F10 cell line (H-2Kb)을 미국 세포주 은행(ATCC, Rockville, MD)으로부터 구입한 후 RPMI-1640 medium (10% heat inactivated FBS, 2mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 g/ml streptomycin을 첨가한 complete media)에서 계대 배양하였다.

생쥐 골수 세포 분리. 경추 탈골 후 얻은 대퇴골을 주사기에 담긴 RPMI-1640으로 씻어 골수를 채취한 후 nylon

Table I. Semiquantitative rating system of pulmonary metastatic melanoma in C57BL/6 mice

Grade	Score	Description of tumor burden
I	0	No tumor mass or colonies are observed grossly or microscopically.
II	1	Tumor mass or colonies account for less than 30% of the pulmonary mass.
III	2	Tumor mass of colonies account for approximately 30~50% of the pulmonary mass.
IV	3	Tumor mass of colonies account for approximately 50~70% of the pulmonary mass.
V	4	Tumor mass of colonies covered over 70% of the pulmonary mass.

Table II. Semiquantitative rating system of whole body metastatic melanoma in C57BL/6 mice

Grade	Score	Description of tumor metastasis
I	0	No metastasis to other organ
II	1	Metastasis to other organ

mash를 통해 단일세포로 만들었다. 골수 내의 적혈구는 Tris-buffered 0.15M ammonium chloride solution (pH 7.2)으로 씻어 용해시킨 후 남아있는 유핵세포를 hemacytometer를 통해 계수하였다.

Lineage negative cell 분리. C57BL/6 mouse와 B6C3F1 mouse의 골수 세포에서 줄기세포를 분리하였다. 단일세포로 만들어진 골수 유핵세포에 lineage cell depletion kit (Miltenyi Biotech Inc, CA)를 이용하여 분화된 세포들(T cells, B cells, monocyte/macrophages, granulocytes와 erythrocytes)을 magnetic cell sorting system (MACS)을 통해 제거하였다. 남은 세포는 hemacytometer를 이용하여 계수하였으며 세포 생존율은 trypan blue exclusion (routinely >90%)으로 확인하였다.

줄기세포 유래 수지상 세포의 ex-vivo 배양. MACS를 통해 얻어진 줄기세포는 5×10^4 /ml의 농도로 GM-CSF (1,000 U/ml)와 SCF (40 ng/ml)을 첨가하여 7일간 배양한 후, D-8에 IL-4 1,000 U/ml을 첨가하여 수지상 세포로의 분화를 유도하였으며 D-13에 종양세포 용해액 50 ug/ml을 첨가하여 18시간 동안 배양하였다. 종양세포 용해액은 자가 종양 세포주 B16F10을 liquid nitrogen (-180°C)과 incubator (37°C)에서 6회의 freezing-thawing 과정을 거친 후 1,800 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻어진 상등액의 단백질 함유량을 Bradford assay (Bio-Rad, CA)로 확인하여 정량하였다. 배양 14일째, 수지상 세포를 거두어 세포 표현형 및 C57BL/6 mouse의 비장 림프구를 responder로 하는 mixed lymphocyte response (MLR)를 통하여 기능을 검증하였다. 치료용으로 투여하기 위한 수지상 세포는 saline에 부유하여 1×10^6 /200 ul/mouse의 농도로 생쥐의 복강에 투여했다.

종양세포 이식 및 치료용 수지상 세포 투여. 배양된 흑

색종 세포들을 거두어 saline에 부유한 후, 5×10^4 /100 ul/mouse로 C57BL/6 mouse의 정맥 내로 주사하였다. 치료용 수지상 세포(1×10^6 DCs/mouse)는 종양세포 이식 8일 후부터 일주일 간격으로 2회 복강에 투여하였다. 실험의 대조군은 saline 200 ul/mouse를 투여한 군으로 설정하였고, 실험군으로는 C57BL/6 (자가 줄기세포)에서 생성된 수지상 세포(CDC)와 B6C3F1 (동종 줄기세포)에서 생성된 수지상 세포(BDC)를 비교하였으며 각각의 종 내에서 흑색종 종양세포 용해액으로 pulsing한 수지상 세포군(Blys-DC)과 pulsing하지 않은 수지상 세포군(U-DC)을 설정하였다. 종양 형성은 마지막 치료 2주 후, 종양세포를 이식한 지 3주 후에 생쥐를 희생시켜 확인하였다 (Fig. 3). 폐에 형성된 전이 흑색종은 종양생성능력이 매우 뛰어나고 종양의 결절들이 각개 결절의 수를 측정할 수 없을 만큼 뭉쳐있어서 종양의 형성 정도를 평가하기 위하여 등급을 나누어 반정량적으로 평가하는 방법을 사용하였다(Table I,II).

수지상 세포와 비장 세포의 표현형 측정. 배양된 수지상 세포의 표현형을 flow cytometric assay를 통하여 검사하였다. 수지상 세포의 표현형은 형광 물질로 표식된 항체들과 수지상 세포를 HBSS (hanks balanced salt solution)를 이용하여 1×10^5 /100 ul의 농도로 4°C 에서 40분간 반응시켰다. 사용된 항체는 CD11c (dendritic cell), CD80 (B7.1 co-stimulatory molecule), CD86 (B7.2 co-stimulatory molecule), H-2Kb (MHC class I molecule)와 IAb (MHC class II molecule) 및 CD8a를 사용하였다. 비장 림프구의 경우 동일한 실험과정으로 CD4, CD8과 CD25/CD4를 모두 발현하는 세포를 측정하였다. Negative control은 rat IgG2b와 rat IgG2a를 사용하였다. 배양이 끝난 후 세포를 세척한 후 500 ul의 HBSS-CS (1% FBS, 0.1% sodium azide)에 풀어 flow cytometer (FACSVantage, Becton-Dickenson, Mountain View, CA)로 분석하였다.

비장 림프구 증식 반응. 배양된 수지상 세포의 기능을 확인(auto-MLR)하기 위하여 또는 치료 후 종양특이 면역 기능 증가를 확인(immune monitoring)하기 위하여 비장 림프구의 증식을 확인하였다. 수지상 세포의 경우, 형광물질인 carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)를 비장 림프구에 처리한 후 수지상 세포와 함께

반응시켰으며 종양 특이 면역 기능 증가를 확인하기 위해서는 치료 후 희생된 동물의 비장 림프구를 CFSE로 염색하고 수지상 세포 pulsing에 사용한 종양 세포 용해액 첨가로 세포 증식을 유도하였다. 증식 분열한 세포내의 형광 발현도가 증식 유도 이전에 비해 감소하는 정도를 flow cytometer로 측정하여 분열한 세포의 비율을 측정하였다. 분석할 비장 세포들은 5×10^6 cells/ml의 농도로 맞추어 0.5 μ M CFSE를 첨가하여 37°C incubator 안에서 빛을 차단하며 15분간 반응시킨 후, FBS가 첨가된 HBSS를 이용하여 세척한 후 계수하여 사용하였다. 수지상 세포와 함께 배양시키는 경우 Stimulator (수지상 세포): Responder (비장 림프구)를 1 : 1, 1 : 2, 1 : 5의 비율로 반응시켰고, 면역 기능 증가의 확인(immune monitoring)을 위해서는 2×10^6 cells/well의 농도로 24 well plate에 넣고 20 ug/ml의 종양세포 용해액을 첨가하여 37°C incubator에서 96시간 배양했다. 배양 후 수확한 비장 세포의 형광발생 정도를 flow cytometer로 측정했다.

종양 항원 특이 IFN- γ 분비. 종양을 발생시키고 수지상 세포로 치료한 마우스의 비장 림프구를 종양세포 용해액으로 자극한 후 상등액 중에서 IFN- γ 분비를 측정하였다. 비장 림프구 1×10^7 을 종양세포 용해액 20 ug/ml과 함께 24 well plate에서 18시간 동안 37°C incubator에서 배양한 후, 상등액을 추출하여 분비된 IFN- γ 를 ELISA assay kit (BD Pharmingen, CA)로 측정하였다.

NK cell activity 측정. 수지상 세포 치료 후 유도된 NK cell의 활성은 Yoon 등에 의해 발표된 방법을 사용하였다(21). NK세포의 활성은 target cell인 YAC-1 mouse lymphoma cell을 이용하여 effector cell인 비장 림프구가 target cell을 얼마나 효과적으로 죽이는지를 측정하였다. $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 로 label된 target cell (1×10^4 /100 μ l)과 effector cell을 여러 농도(T : E=1 : 25, 1 : 50)로 함께 처리하여 4 시간 동안 37°C incubator 안에서 반응시켰다. 그 후 원심 분리하여 상등액을 취하고 그 중의 방사능을 Wallac 1470 Wizard gamma counter로 측정하였다. 방사능 표시된 target cell로부터의 자연적인 ^{51}Cr 의 방사(spontaneous release, SR)와 total release (TR)은 각각 배양액과 1N HCl을 처리하여 측정하였다. NK cell activity는 다음 식을 통해 나타내었다.

$$\% \text{ NK cell activity} = \frac{\text{Experimental cpm} - \text{SR cpm}}{\text{TR cpm} - \text{SR cpm}} \times 100$$

통계처리. In vivo 실험은 그룹당 5마리씩으로 2번 반복하였다. 통계처리는 mean \pm standard error로 처리하였으며 통계적 유의성의 검증은 t-test를 이용하여 p value가 0.05 이하일 때 통계적인 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

결 과

배양된 치료용 수지상 세포의 검증.

치료용 수지상 세포의 표현형: 마우스의 골수에서 추출한 lineage negative cell로부터 배양된 골수 줄기세포 유래 수지상 세포의 표현형 발현은 flow cytometry로 측정하였다. 항원을 제시하는 역할을 하는 MHC class I (H-2Kb), MHC class II (IAb)의 발현이 90% 이상으로 매우 높고 co-stimulatory molecule인 CD80 (B7.1), CD86 (B7.2)이 80% 이상 발현되며 대표적인 수지상 세포의 marker라고 알려져 있는 CD11c도 80% 이상 발현된 것으로 보아 T cell을 효과적으로 활성화시킬 수 있는 수지상 세포임을 확인하였다. CD11c와 CD8a를 동시에 발현하는 세포 또한 40% 이상 존재했으며 이는 mouse 수지상 세포 subset 중 Th1 type immunity를 유도하는 lymphoid 수지상 세포일 것으로 생각된다(22). 종양 세포 용해액 pulsing이나 마우스의 계통의 차이에 따른 유의한 영향은 관찰되지 않았다(Fig. 1).

수지상 세포 자극에 의한 비장 림프구 증식(mixed lymphocyte response, MLR): C57BL/6 마우스의 비장에서 림프구를 채취하여 치료용 수지상 세포의 자극에 의한 증식정도를 CFSE assay를 통하여 확인하였다(Fig. 2). 수지상 세포의 농도와 림프구의 증식정도가 비례했으며, 림프구만을 배양시킨 실험군과 수지상 세포에 의해 자극된 배양군 사이에서 유의한 차이가 관찰되었다. 그러나 동종 수지상 세포와 자가 수지상 세포, 그리고 B16F10

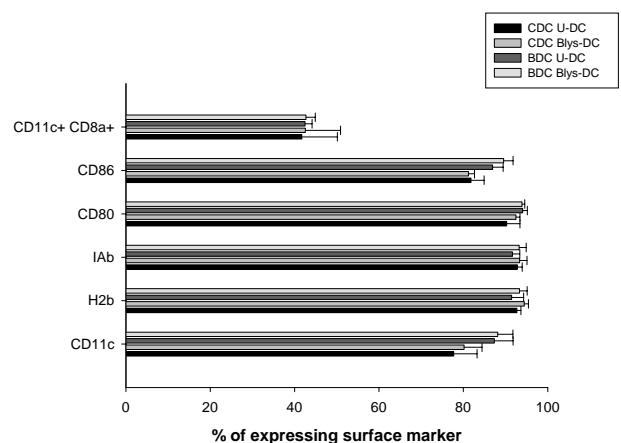


Figure 1. The phenotype of mouse bone marrow stem cell derived dendritic cell (DC). DCs were derived from bone marrow lineage negative cells of C57BL/6 (CDC) or B6C3F1 (BDC) mice. Lineage negative cells were cultured with GM-CSF, SCF and IL-4 (U-DC) for 13days and were pulsed with B16F10 tumor cell lysate (Blys-DC) for 18 hrs. After 14 days, DCs were harvested and stained with FITC or PE conjugated antibodies. Co-stimulatory molecule (CD80, CD86), DC marker CD11c, MHC class I and II (IAb and H-2Kb) were expressed high level on the surface of cultured DCs.

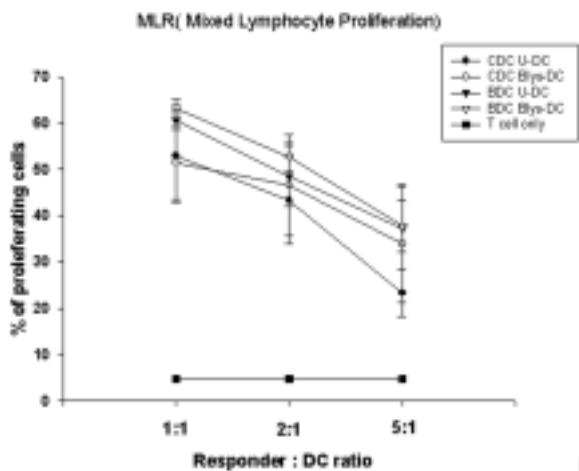


Figure 2. In vitro autologous and allogeneic MLR (mixed lymphocyte proliferation) assay. DCs (stimulator) from C57BL/6 mice (CDC/U-DC, CDC/Blys-DC) and B6C3F1 mice (BDC/U-DC and BDC/Blys-DC) were treated with mitomycin C. Responders were splenocytes from C57BL/6 mice labeled with CFSE (5×10^6 /ml). DCs and responders were co-cultured in ratio of 1 : 1, 2 : 1 and 5 : 1 (responder: stimulator) for 96 hrs. Decreased fluorescence intensity by proliferating cells was detected by flow cytometer. The fluorescence intensity was related with the concentration of stimulator.

종양세포 용해액으로 pulsing한 유무에 따라서는 통계적으로 유의적인 차이를 발견할 수 없었다.

흑색종 폐암 전이 모델에서 수지상 세포의 효과 검증: C57BL/6 마우스에 흑색종 세포를 혈관으로 주입한 뒤 8일 후부터 일주일 간격으로 2회 치료용 수지상 세포를 복강에 주사하였다. 수지상 세포는 자가 수지상 세포 (CDC group)와 동종 수지상 세포(BDC group)를 1×10^6 /mouse로 치료하였으며 마지막 수지상 세포를 주입한 지 14일 후에 모든 개체를 안락사시켜 종양의 크기와 전이 양상을 육안으로 확인하였다(Fig. 3). 종양의 생성 및 전이 정도는 반정량적인 지표를 사용하여 나타내었다(Table I, II). Saline을 주입한 대조군의 tumor burden이 2.7 ± 0.2 인 것이 비해 BDC group에서 1.5 ± 0.3 ($p=0.01$)(U-DC), 1.7 ± 0.3 ($p=0.03$)(Blys-DC)로 통계적으로 유의하게 종양생성이 억제되었다. 또한 종양세포 용해액으로 pulsing하지 않은 실험군 사이에 자가 수지상 세포보다 동종 수지상 세포 투여군에서 유의하게 종양 생성이 억제되었다($p=0.05$). 그러나 같은 종에서 배양된 수지상 세포에서 종양 세포 용해액으로 인한 항암효과는 통계적으로 유의한 차이가 발견되지 않았다(Table III).

종양 항원 특이 림프구 증식 반응 검색.

수지상 세포 치료군에서 림프구 표현형 검증: 수지상 세포로 치료한 마우스의 비장 세포에서 분리한 림프구의 표현형을 flow cytometry로 검색하였다. $CD4^+$ helper T cell의 비율은 40% 이하였으며 $CD8^+$ cytotoxic T cell은

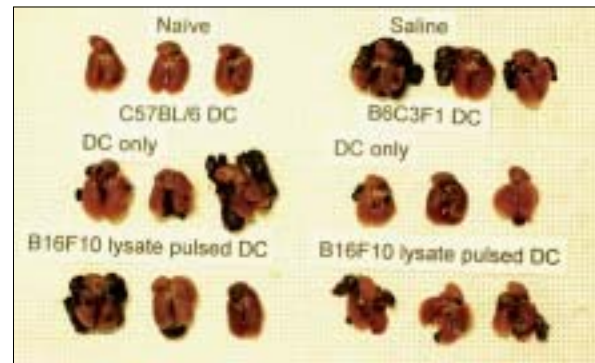


Figure 3. Tumors in the lung. Tumor bearing mice were sacrificed after two weeks from the last DC injection. The score of tumor burden and metastasis were calculated based on Table I and II. Table III represented the collective score of tumor burden in the body including pulmonary mass and metastatic nodule.

Table III. Quantitation of anti-tumor effect of DCs in melanoma

Types of vaccination	Tumor score (by semiquantative system)	p value
Saline	2.667 ± 0.184	—
CDC U-DC	2.500 ± 0.463	0.68
CDC Blys-DC	2.000 ± 0.286	0.12
BDC U-DC	1.500 ± 0.286	0.01*
BDC Blys-DC	1.667 ± 0.297	0.03*
CDC U-DC	2.500 ± 0.463	—
BDC U-DC	1.500 ± 0.286	0.05*

Metastatic melanoma was classified by Table I and II. p value ≤ 0.05 is considered significant variation against control.

20~30%로 수지상 세포 치료에 의한 유의적인 차이는 보이지 않았다. Regulatory T cell의 확인을 위하여 $CD25/CD4$ 를 함께 발현하는 세포를 같은 방법으로 검색하였다. 수지상 세포의 치료로 인한 regulatory T cell의 발현은 동종 수지상 세포 투여군 중 종양세포 용해액으로 pulsing하지 않은 군을 제외하고 증가하였으나 통계적으로 유의성은 없었다(data not shown).

종양 항원 특이 림프구 증식 반응: 종양을 발생시키고 수지상 세포로 치료한 마우스의 비장세포에서 종양세포 용해액에 반응하는 종양 항원 특이 림프구의 증식반응을 CFSE assay로 관찰하였다(Fig. 4). Media와 함께 배양한 군(control)에 비해 종양세포 용해액으로 자극시킨 군의 비장 림프구들의 증식이 유의적으로 증가하였다. 그러나 각 실험군 사이에 치료용 수지상 세포의 유래에 따른 차이(CDC vs. BDC) 또는 종양세포 용해액으로의 pulsing 유무에 의한 차이에서 통계적 유의성은 발견하지 못했다.

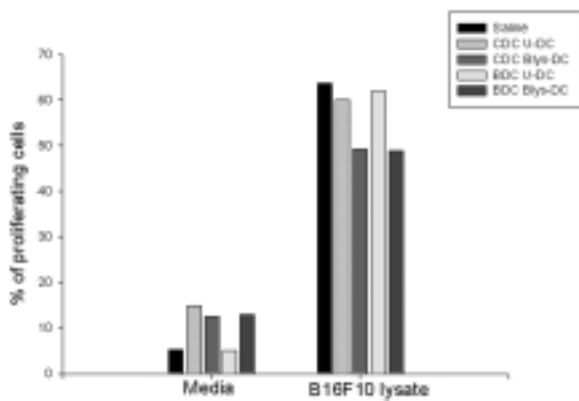


Figure 4. Splenocyte proliferation induced by B16F10 tumor cell lysate. CFSE-labeled splenic lymphocytes were cultured with media (control) or B16F10 tumor cell lysate 20 ug/ml for 96 hrs and then the fluorescence intensity was measured with flow cytometer. Splenic lymphocytes were derived from control mice (saline treated), autologous DC treated mice (CDC/U-DC and CDC/Blys-DC) and allogeneic DC treated mice (BDC/U-DC and BDC/Blys-DC).

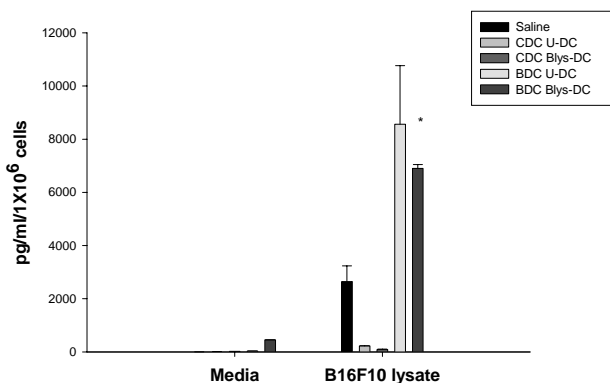


Figure 5. IFN- γ secretion from the splenocytes of DC treated mice was measured. Splenic lymphocytes were stimulated with media (control) or B16F10 tumor cell lysate 20 ug/ml for 18hrs at 37°C incubator. IFN- γ concentration in the supernatant was measured by ELISA. The statistical significance between saline and BDC/U-DC in tumor cell lysate stimulated group ($p \leq 0.05$) was represented by asterisk.

마우스 비장 림프구의 종양 항원 특이 IFN- γ 분비: 종양을 발생시키고 치료한 마우스의 비장에서 분리한 림프구를 종양세포 용해액으로 자극하여 분비된 IFN- γ 의 양을 ELISA로 측정하였다(Fig. 5). BDC 투여군으로부터 얻어진 비장 림프구를 종양세포 용해액으로 자극한 경우 IFN- γ 의 분비가 Blys-DC 치료군에서 대조군(saline)에 비해 통계적으로 유의하게 증가하였다($p=0.01$). 특히 유의적으로 우수한 종양 생성 억제 효과를 보여주었던 BDC 투여군에서 IFN- γ 의 분비 또한 유의적으로 증가되는 것으로 보아 IFN- γ 의 분비가 수지상 세포를 통한 항암효과와 관련이 있음을 확인하였다.

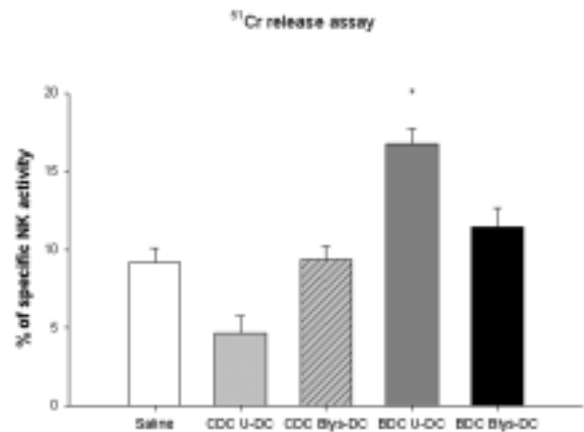


Figure 6. Splenic NK cell activity in DC treated tumor bearing mice was measured as was described in "Materials and Methods". The asterisk represented the statistical significance between saline and BDC/U-DC ($p \leq 0.05$).

수지상 세포 치료군에서 NK activity 측정: 수지상 세포 치료군의 비장 림프구에서 natural killer cell (NK cell)의 활성을 ^{51}Cr release assay를 통하여 검증하였다(Fig. 6). Saline을 처리한 대조군에 비해 BDC 투여군에서 NK cell의 활성이 증가하였으며, 특히 Blys-DC 투여군보다 U-DC 투여군에서 NK cell의 활성이 통계적으로 유의하게 증가하였다($p=0.004$). 또한 CDC 투여군보다 BDC 투여군에서 유의적으로 NK cell의 활성이 증가하였다($p=0.001$). CDC 투여군에서 보이는 NK cell 활성은 대조군과 유의적인 차이가 없었다. 특히 유의적으로 우수한 종양 생성 억제 효과를 보여주었던 BDC 투여군에서 IFN- γ 의 분비 증가와 더불어 NK cell의 활성이 증가하는 경향이 나타났다. 이것으로 동종 수지상 세포 치료에 따른 항암 효과의 기전으로 NK cell activity의 변화와 IFN- γ 의 분비 증가를 유추할 수 있을 것으로 생각된다.

고 찰

항암 효능을 가진 수지상 세포를 이용한 종양 특이 면역반응에 대해서 현재까지 전임상 및 임상 연구가 활발하게 진행되고 있다(23,24). 특히 임상연구에서는 환자 본인에게서 추출한 PBMC나 leukapheresis에서 생성된 단핵구 유래 수지상 세포를 이용한 항암 치료법 연구가 주로 보고되고 있다. 그러나 환자에게 이미 시행된 화학적 치료나 방사선 요법 등 환자 각 개인의 상태에 따라 단핵구 유래 수지상 세포의 생성 자체가 불가능한 경우가 있으며, 배양하는 방법에 따라 환자에게 충분히 치료할 수 있는 양의 수지상 세포를 생성하기 어려우므로 임상적으로 적용하는 데 한계가 있어왔다. 이러한 한계점을 극복하기 위하여 건강한 공여자의 혈액을 이용하여 단핵구 유래 수지상 세포를 만드는 방법이 연구되어 왔

고 이를 통해 수지상 세포의 생성에 관련된 문제는 해결할 수 있었으나 이 역시 충분한 양의 치료용 수지상 세포를 공급 받기 어렵다는 단점이 있으며 동종 면역 반응이 항암 면역 반응에 이롭게 작용할지 부작용을 유발할지에 관한 충분한 연구 data가 부족한 상황이다. 또 다른 해결방법으로 최근 혈액에서 분리한 줄기세포를 이용한 수지상 세포의 배양방법이 연구되고 있다. 줄기세포는 배양 기간과 방법에 따라 세포의 수가 30~60배 이상 증가할 수 있으며 첨가하는 cytokine의 종류에 따라 원하는 종류의 세포로 분화시킬 수 있는 가능성이 있다는 장점이 있다. 그러나 동종 수지상 세포의 효능과 독성, 그리고 줄기세포 유래 수지상 세포의 분화와 효능에 대해서는 연구된 바가 많지 않다. 그러므로 이 연구에서는 마우스 자가(H-2Kb)와 동종(H-2Kb/k) 골수 유래 줄기세포를 이용하여 수지상 세포를 분화 시킨 후 마우스의 흑색종 세포주를 사용한 혈행성 전신전이 모델에서의 치료효과를 관찰하였다.

본 연구에서 배양한 골수 줄기세포 유래 수지상 세포는 co-stimulatory molecule과 항원을 제시하는 MHC class molecule이 세포 표면에 많이 존재하고 효과적으로 T cell의 증식을 유도하는 것이 관찰되었다. 그러나 CD11c⁺, CD8a⁺의 표현형을 가지는 세포가 40% 이상 존재하였으며 이것은 myeloid 수지상 세포가 아닌 lymphoid 수지상 세포가 생성되었을 수 있다는 것을 의미한다. 마우스는 사람에서와 다르게 lymphoid 수지상 세포가 CD11c⁺, MHC class II⁺, CD86 (B7.2)⁺의 특징을 가짐과 동시에 CD8a⁺를 높게 발현하며 IL-12를 다량 분비하여 Th1 response를 유도하는 것으로 알려져 있다(22,25,26). Th1 type에 따른 세포 매개 반응은 종양 면역치료 방법의 중요한 요소라고 알려져 있으므로(27,28) 이러한 점은 사람의 myeloid 수지상 세포에서 기대되는 작용에 해당한다.

종양 생성 후 수지상 세포로 치료한 마우스에서 종양 특이 면역반응이 발생했는지 확인하기 위하여 종양의 크기와 전이성 정도를 표에 의한 점수로 나타내었을 때, BDC 치료군에서 종양의 유의적인 감소를 보였지만 CDC 치료군에서는 수지상 세포로 치료하지 않은 saline 군과 종양의 크기나 전이성에 유의적인 차이가 없었다. 또한 수지상 세포 치료군에서 복강으로의 전이가 관찰되었으며, 본 연구를 통해 배양된 수지상 세포가 암세포의 전이를 억제하지 못했다고 할 수 있다. 또한 비장 림프구에서 CD25와 CD4를 모두 발현하는 regulatory T cell의 비율이 같은 종 수지상 세포 치료군 중 U-DC를 제외하고 나머지 실험군에서 모두 saline을 처리한 대조군에 비하여 통계적으로 유의하지는 않으나 증가하는 경향을 보였다(data not shown). CD25/CD4 double positive cell은 자연적으로 발생하는 regulatory T cell (T_{reg})로 알려져 있으며 CD4⁺ T cell 중 5~10%의 비율로 존재한다. Regu-

latory T cell은 IL-10과 TGF- β 를 분비함으로써 면역 반응을 조절하고 in vitro와 in vivo에서 naive T cell의 성장과 증식을 억제한다(29). 그러나 본 실험에서 관찰된 T_{reg}의 미미한 변화율로는 in vivo 또는 in vitro 효과를 설명하기 힘들고, 다만 수지상 세포 항암 vaccine의 효과를 추정하는 immune monitoring parameter로서의 사용 가능성을 확인하였다.

종양세포 항원 자극에 대한 비장 림프구의 IFN- γ 분비는 치료 받지 않은 대조군에 비해 BDC 치료군에서 확실히 증가되는 것을 확인하였다. 특히 BDC 치료군 중 종양 세포 용해액으로 pulsing하지 않은 군에서 IFN- γ 가 유의하게 증가하였으며 종양 생성 정도 또한 유의하게 감소했음을 볼 수 있다. 이것은 수지상 세포에 의한 항암 효과와 IFN- γ 의 분비가 연관성이 있다는 기존의 연구 결과들을 뒷받침한다.

실제 수지상 세포의 항암기전은 종양 항원 특이 CTL (cytotoxic T lymphocyte) 뿐 아니라 NK cell 등 innate와 adoptive immunity 전반에 연관되어 있다고 알려져 있다. 많은 종양이 MHC class I의 표현을 억제함으로써 CTL에 의한 종양세포 인식을 막는 기전이 있는 반면 이러한 MHC molecule의 감소가 NK cell을 활성화시켜 NK-mediated cytotoxicity가 가능하게 한다(30). 또한 myeloid 수지상 세포에 의해 NK cell이 활성화되고 IFN- γ 가 분비된다고 알려져 있으며 수지상 세포 백신에 의한 NK cell의 활성화와 관련된 clinical trial에서 NK cell의 활성이 감소한 환자들에게서 예후가 좋지 않다는 사실이 보고된 바 있다(31-34). 본 실험의 결과, CDC 치료군에 비하여 BDC 치료군에서의 NK cell의 활성이 높게 나타났으며, 항암 효과가 가장 좋은 BDC 치료군 중 종양 세포 용해액을 pulsing하지 않은 군(U-DC)에서 유의하게 증가했다. 따라서 NK cell의 활성이 동종 수지상 세포에 의한 항암 효과와 밀접한 관련이 있다는 점을 추측할 수 있다.

본 실험을 통해 자가 수지상 세포에 비하여 동종 수지상 세포의 항암효과가 in vivo상에서 우수하다는 사실을 확인하였으며, 동종 수지상 세포의 주입에 따른 부작용은 관찰되지 않았다. 또한 동종과 자가 수지상 세포로 인한 항암효과의 차이가 NK cell 활성화와 IFN- γ 의 분비와 관련이 있음을 확인하였다. 결론적으로, 동종 골수 줄기세포 유래 수지상 세포 백신을 부작용 없이 사용할 수 있는 가능성을 확인하였다. 이러한 결과는 동종 줄기 세포 유래 수지상 세포 백신이 환자 개인의 상태에 무관하게 난치성 암 환자들을 치료할 수 있는 유용한 세포 치료제로 적용될 수 있을 것이라는 기대를 확인시켜 주었다.

참 고 문 헌

1. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Jiles TM, Czerwinski D, Taidi B: Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autol-

- ogous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 2;52-58, 1996
2. Lee YJ, Kim MJ, IN SH, Choi OM, Baek S, Kwon YD, Lee H: Effect of dendritic cell based cancer vaccine using allogeneic tumor cell lysate in melanoma pulmonary metastasis model. *Immune Network* 5;163-171, 2005
3. Nencioni A, Brossart P: Cellular immunotherapy with dendritic cells in cancer: current status. *Stem Cells* 22;501-513, 2004
4. Curti A, Isioiri A, Ferri E, Terragna C, Neyroz P, Cellini C, Ratta M, Baccarani M, Jemoli RM: Generation of dendritic cells from positively selected CD14⁺ monocytes for anti-tumor immunotherapy. *Leukemia & Lymphoma* 45;1419-1428, 2004
5. Figdor CG, De Vries IJM, Lesterhuis WJ, Melief CJM: Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Leuk Lymphoma* 10;475-480, 2004
6. Lee H, Choi KM, Baek S, Lee HG, Jung CW: Dendritic cell based cancer immunotherapy: in vivo study with mouse renal cell carcinoma model. *Immune Network* 4;44-52, 2004
7. Dietz AB, Padley DJ, Butler GW, Maas ML, Greiner CW, Gastineau DA, Pavolovic SV: Clinical-grade manufacturing of DC from CD14⁺ precursors: experience from phase I clinical trials in CML and malignant melanoma. *Cytotherapy* 6;563-570, 2004
8. Schuler-Thurner B, Schultz FS, Berger TG, Weinlich G, Ebner S, Woerl P, Bender A, Feuerstein B, Fritsch PO, Romani N, Schuler G: Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J Exp Med* 195;1279-1288, 2002
9. Hold L, Zeller-Rieser C, Gander H, Papesh C, Ramoner R, Bartsch G, Rogatsch H, Barsoum AL, Coggin JH Jr, Thurnher M: Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin Cancer Res* 8;3369-3376, 2002
10. O'Rourke MGE, Johnson M, Lanagan C, See J, Yang J, Bell JR, Slater GJ, Kerr BM, Crowe B, Purdie DM, Elliott SL, Ellem KAO, Schmidt CW: Durable complete clinical responses in a phase I/II trial using an autologous melanoma cell/dendritic cell vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 52;387-395, 2003
11. Iwashita Y, Tahara K, Goto S, Sasaki A, Kai S, Seike M, Cehn CL, Kawano K, Kitano S: A phase I study of autologous dendritic cell-based immunotherapy for patients with unresectable primary liver cancer. *Cancer Immunol Immunother* 52;155-161, 2003
12. Ward KA, Stewart LA, Schwarzer AP: CD34⁺-derived CD11c⁺⁺⁺ BDCA-1⁺⁺ CD123⁺⁺DC: expansion of a phenotypically undescribed myeloid DC1 population for use in adoptive immunotherapy. *Cytotherapy* 8;130-140, 2006
13. Li-Cheng Xu RL, Tang Y, Ogburn PL, Malinowski K, Madajewicz S, Santiago-Schwarz F, Fan Q: Implication of delayed TNF- α exposure on dendritic cell maturation and expansion from cryopreserved cord blood CD34⁺ hematopoietic progenitors. *J Immunol Methods* 293;169-182, 2004
14. Encabo A, Solves P, Mateu F, Sepulveda P, Carbonell-Uberos F, Minana MD: Selective generation of different dendritic cell precursors from CD34⁺ cells by interleukin-6 and interleukin-3. *Stem Cells* 22;725-740, 2004
15. Dilioglou S, Cruse JM, Lewis RF: Function of CD80 and CD86 on monocyte- and stem cell-derived dendritic cells. *Exp Mol Pathol* 75;217-227, 2003
16. Guanghua G, Suzuan C, Juan Z, Lili L, Jing Y, Hongmei D, Hong X, Zhongjing S, Libiao W: Antitumor activity of a fusion of esophageal carcinoma cells with dendritic cells derived from cord blood. *Vaccine* 23;5225-5230, 2005
17. Guardino AE, Rajapaksa R, Ong KH, Sheehan K, Levy R: Production of myeloid dendritic cells (DC) pulsed with tumor-specific idiotype protein for vaccination of patients with multiple myeloma. *Cytotherapy* 8;277-289, 2006
18. Hus I, Rolinski J, Tabarkiewicz J, Wojas K, Bojarska-Junak A, Greiner J, Giannopoulos K, Dmoszynska A, Schmitt M: Allogeneic dendritic cells pulsed with tumor lysates or apoptotic bodies as immunotherapy for patients with early-stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 19;1621-1627, 2005
19. Marten A, Renoth S, Heinicke T, Alebers P, Pauli A, Mey U, Caspari R, Flieger D, Hanfland P, Ruecker AV, Eishubinger AM, Muller S, Schwaner I, Lohmann U, Heymann G, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IGH: Allogeneic dendritic cells fused with tumor cells: preclinical results and outcome of a clinical phase I/II trial in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Hum Gene Ther* 14;483-494, 2003
20. Wagner JE, Barker JN, Defor TE, Baker KC, Blazer BR, Eide C, Goldman A, Kersey J, Krivit W, MacMillan ML, Orchard PJ, Peters C, Weisdorf DJ, Ramsay NKC, Davies SM: Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 100;1611-1618, 2002
21. Yoon HL, Singh K, Ratner S, Reiners JJ: Phorbol ester effects on splenic lymphocyte composition and cytotoxic T cell activities of SSIN mice: a strain deficient in CD8⁺ T cells. *Carcinogenesis* 17;2617-2624, 1996
22. Pulendran B, Maraskovsky E, Banchereau J, Maliszewski C: Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol* 22;41-47, 2001
23. Parmiani G, Castelli C, Rivoltini L, Casati C, Tully GA, Novellino L, Patuzzo A, Tosi D, Santinami M: Immunotherapy of melanoma. *Semin Cancer Biol* 13;391-400, 2003
24. Lee SJ, Kim MJ, In SH, Baek S, Lee H: Immunocell therapy for lung cancer: dendritic cell based adjuvant therapy in mouse lung cancer model. *Immune Network* 5;36-44, 2005
25. Moser M, Murphy KM: Dendritic cell regulation of T_H1-T_H2 development. *Nature Immunol* 1;199-204, 2000
26. Martin P, Martinez del Hoyo G, Anjuere F, Ruiz SR, Arias CF, Marin AR, Ardavin C: Concept of lymphoid versus myeloid dendritic cell lineages revisited: both CD8 α ⁻ and CD8 α ⁺ dendritic cells are generated from CD4^{low} lymphoid-committed precursors. *Blood* 96;2511-2519, 2000
27. Mohty M, Olive D, Gaugler B: Leukemic dendritic cells: Potential for therapy and insights towards immune escape by leukemic blasts. *Leukemia* 16;2197-2204, 2002
28. Ratzinger G, Baggers J, de Cos MA, Yuan J, Dao T, Reagan JL, Munz C, Heller G, Young JW: Mature human langerhans cells derived from CD34⁺ hematopoietic progenitors stimulate greater cytolytic T lymphocyte activity in the absence of bioactive IL-12p70, by either single peptide presentation or cross-priming, than do dermal-interstitial or monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 173;2780-2791, 2004
29. O'Garra A, Vieira P: Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 10;801-805, 2004
30. Van den Broeke JT, Daschbach E, Thomas EK, Andringa G, Berzofsky JA: Dendritic cell-induced activation of adaptive and innate antitumor immunity. *J Immunol* 171;5842-5852, 2003
31. Osada T, Clay T, Hobeika A, Lysterly HK, Morse MA: NK cell activation by dendritic cell vaccine: a mechanism of action for clinical activity. *Cancer Immunol Immunother* 55; 1122-1131, 2006
32. Mailliard RB, Son YI, Redlinger R, Coates PT, Giermasz A, Penelope AM, Storkus WJ, Kalinski P: Dendritic cells med-

- iate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. *J Immunol* 171;2366-2373, 2003
33. Kalinski P, Giermasz A, Nakamura Y, Basse P, Storkus WJ, Kirkwood JM, Mailliard RB: Helper role of NK cells during the induction of anticancer responses by dendritic cells. *Mol Immunol* 42;535-539, 2005
34. Gerosa F, Gobbi A, Zorzi P, Burg S, Briere F, Catra G, Trinchieri G: The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol* 174;727-734, 2005
-